

前锋·新锐

基因魔剪 CRISPR/Cas:核酸精准检测的新宠和利器^{*}

冯春凤¹,王云霞²,蒲晓允¹,熊瑜²,刘飞¹综述,张立群^{1△}审校

(1. 陆军军医大学第二附属医院检验科,重庆 400037;2. 陆军军医大学第一附属医院检验科,重庆 400038)

摘要:规则成簇间隔短回文重复序列及其相关蛋白(CRISPR/Cas)系统是存在于大多数细菌及古细菌中的一种获得性免疫系统。作为一种高效的基因定点编辑工具,CRISPR/Cas 系统不仅在基因敲出、基因治疗及基因修饰等领域炙手可热,而且正在发展成为核酸精准检测领域的新利器。随着众多研究者的不断探索,便携、快速、低成本、灵敏度高、特异性强的 CRISPR/Cas 核酸精准检测技术不断涌现。本文就 CRISPR/Cas 技术在核酸快速精准检测领域的最新成果作一概述,并总结展望其面临的困难和挑战。

关键词:CRISPR/Cas; 核酸; 精准检测**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2020.03.001**文章编号:**1673-4130(2020)03-0257-05**中图法分类号:**R440**文献标识码:**A

CRISPR/CAS:a new darlings and powerful tool in the nucleic acid precise detection^{*}

FENG Chunfeng¹,WANG Yunxia²,PU Xiaoyun¹,XIONG Yu²,LIU Fei¹,ZHANG Liqun^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Army Military Medical University, Chongqing 400037, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Army Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR associated proteins (CRISPR/Cas) are an acquired immune system found in most bacteria and archaea. It has been a mature gene editing tool, mainly used in the fields of gene cutting, gene therapy and modification. Recently, researchers have continuously shifted the CRISPR/Cas technology from gene editing to nucleic acid testing, trying to develop a portable, fast, low-cost, high sensitivity and strong specificity nucleic acid detection technology for point-of-care testing. This paper reviews the latest applications of CRISPR/Cas technology in nucleic acid detection and summarizes the potential challenges in the nucleic acids rapidly detecting field.

Key words:CRISPR/Cas; nucleic acid; accurate detection


规则成簇间隔短回文重复序列及其相关蛋白(CRISPR/Cas)系统是细菌和古细菌在进化过程中形成的一种适应性免疫应答系统,其机理是保护自身免受入侵病毒和质粒的影响^[1]。CRISPR由多个高度保守的重复序列与噬菌体或质粒 DNA 存在同源性的

间隔序列串联而成^[2]。CRISPR 区域中,位于第一个重复序列上游的是前导序列,负责 CRISPR 序列转录生成 CRISPR RNA(crRNA)。CRISPR 位点附近为 CRISPR 相关蛋白基因 Cas,Cas 基因编码的蛋白具有核酸内切酶活性,可切割外源性 DNA,是 CRISPR/Cas 系统执行防御功能的重要组成部分。当病毒首次入侵时,细菌将病毒小片段 DNA 整合到自身 CRISPR 基因的间隔序列中。病毒再次入侵时,

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81873981);重庆市技术创新与应用示范项目(cstc2018jscx-msybx0060);陆军军医大学第一附属医院医务人员军事医学创新能力提升计划(SWH2018BJLC-05))。

专家简介:张立群,陆军军医大学第二附属医院检验科主任,副研究员,博士,硕士研究生导师,重庆市学术带头人后备人选。目前担任中华医学学会检验分会青年委员;中华医学学会检验分会实验室管理学组委员;中国医疗器械行业协会 POCT 专委会常委;中国医学装备协会检验分会委员;全国产学研专委会委员;中国医检联盟理事等学术任职。近年来在传感器领域最高杂志 biosensors and bioelectronics(IF=9.518)等 SCI 期刊发表论文 10 余篇。课题研究方向为基因编辑与快速诊断,目前主持国家自然科学基金面上项目、重庆市应用开发重点项目、军队后勤科研重大项目分题、863 计划子课题、国家及重庆市研究生教改等课题 10 余项,累计科研经费 500 余万元。以第一发明人获美国、加拿大、PCT 国际专利、中国发明专利 10 余项。

△ 通信作者,E-mail:1434103777@qq.com。

本文引用格式:冯春凤,王云霞,蒲晓允,等.基因魔剪 CRISPR/Cas:核酸精准检测的新宠和利器[J].国际检验医学杂志,2020,41(3):

CRISPR 转录生成 crRNA。在 crRNA 的引导下,具有核酸内切酶活性的 Cas 蛋白对含原型间隔序列毗邻基(PAM)的靶标序列进行特异性识别和切割^[3]。研究表明,Cas 蛋白不仅可用于基因编辑,在核酸检测方面也具有非常重要的应用价值^[1]。

现有的核酸检测方法大多数操作步骤复杂且依赖于昂贵的仪器设备。理想的核酸检测技术应具备便携、快速、低成本、灵敏度高及特异性强的特点。近期,科学家们将被誉为“基因魔剪”的 CRISPR/Cas 系统与其他技术尤其是核酸扩增技术相联合,开发了一系列基于 CRISPR/Cas 系统的核酸检测技术。这些技术可直接检测经过简单处理的临床样本,样本用量极少且无需贵重仪器设备,显示出极高的灵敏度和特异度,操作极其简便,已具有发展成为理想的核酸快速精准检测技术的潜力。

1 CRISPR/Cas9 在核酸检测中的应用

1.1 CRISPR/Cas9 Cas9 是Ⅱ型 CRISPR/Cas 系统的标志性蛋白,在反式激活 crRNA(tracrRNA)与成熟 crRNA 碱基互补配对形成的双链 RNA(tracrRNA/crRNA)的引导下,特异切割靶双链 DNA(dsDNA)。由于 tracrRNA/crRNA 的设计较复杂,KONERMANN 等^[4]随后将 tracrRNA 和 crRNA 整合到一条 RNA 链中,并称之为单向导 RNA(sgRNA),极大地简化了 CRISPR/Cas9 系统的操作步骤。Cas9 介导的位点特异性 DNA 切割依赖于 sgRNA 对靶序列 dsDNA 上的 PAM 序列的特异识别,不同来源的 Cas9 识别的 PAM 序列存在差异。其中,应用最广泛的化脓性链球菌 Cas9 核酸内切酶切割靶标时依赖于含 5'-NGG-3' 的 PAM 序列。当存在与靶标单链 DNA(ssDNA)或单链 RNA(ssRNA)杂交并起到 PAM 作用的寡核苷酸时,sgRNA/Cas9 也可以裂解 ssDNA 和 ssRNA。

1.2 基于 Cas9 核酸内切酶活性的核酸检测技术 针对不同的检测靶标可设计与之互补配对的 sgRNA,从而使 Cas9/sgRNA 复合物可特异性切割各种不同靶序列。2016 年,PARDEE 等^[5]最先将 CRISPR/Cas 技术用于核酸检测。他们将 CRISPR/Cas 技术与合成技术相结合,开发了一种快速、低成本检测寨卡病毒及区分其亚型的纸质传感器。寨卡病毒 RNA 经核酸依赖性扩增及逆转录产生的 dsDNA 作为 sgRNA/Cas9 复合物的底物,另外设计一个分子开关作为检测 RNA 的传感器,并将这种传感器转移到试纸条上冷冻干燥。随后将核酸依赖性扩增检测技术的反应产物滴加到试纸条上,通过观察试纸条的颜色是否发生改变,判断检测结果。应用该技术可检测不同的寨卡病毒亚种,并区分出感染后临床症状相

似的登革热病毒。由于病原体存在进化漂移,因此分子诊断技术必须具备检测基因突变的能力。该研究证实,具有高达 4-nt(11%)错配的变异菌株也能够完全激活分子传感器,表明该技术具有耐受自然界中预期遗传变异的能力。HUANG 等^[6]将 CRISPR/Cas9 技术引入等温指数扩增反应,开发了基于 CRISPR/Cas9 技术的指数扩增反应。他们将 CRISPR/Cas9 切割 ssDNA 产生的短片段作为等温指数扩增反应的引物,使该技术适用于长链 DNA 或 RNA 的检测,扩展了等温指数扩增反应的检测范围,避免了外来引物的非特异性扩增。该方法具有较强特异性和检测速度,检测限可达 0.82 阿摩尔,适用于 DNA、RNA 和甲基化 DNA 等多种核酸的检测,在生物分析和疾病诊断中具有巨大的应用潜力。

1.3 基于 dCas9 特异结合靶序列的核酸检测技术 dCas9 是经化学修饰的 Cas9,虽然其失去核酸内切酶活性,但仍然具有特异结合靶 DNA 的能力。ZHANG 等^[7]利用成对 CRISPR/dCas9 开发了一种 PC 核酸报告系统,并与聚合酶链式反应(PCR)联合,用于检测结核分枝杆菌。他们将荧光素酶的 N 端和 C 端(NFLuc 和 CFLuc)分别标记一对 dCas9,当 sgRNA/NFLuc-dCas9、sgRNA/CFLuc-dCas9 与同一靶标结合且两结合位点间距在(21±2)bp 之间时,荧光素被氧化,发出荧光信号,从而检测出病原体。随后,QUIU 等^[8]也开发了另一与之类似的核酸检测技术,即 RCA-CRISPR-split-HRP(RCH)系统。microRNA 以哑铃型探针为模板,经滚环扩增以后,形成大量茎环状靶标。两个 dCas9 分别被辣根过氧化物酶(HRP)片段(sHRP-C 和 sHRP-N)标记(sHRP-C-dCas9 和 sHRP-N-dCas9),然后与茎环状靶标特异性结合,导致裂解 HRP 重建,底物四甲基联苯胺从浅黄色变为蓝色,从而实现 microRNA 的检测。YANG 等^[9],利用 dCas9 与靶标 dsDNA 特异性结合而不切割的特点,将其引入固态纳米孔传感技术。当 sgRNA/dCas9 复合物与靶标结合并穿过固态纳米孔时,大大减少了离子的通过,从而产生明显的电流阻断信号。HAJIAN 等^[10]将 sgRNA/dCas9 与场效应晶体管相结合,开发了一种无需标记的 CRISPR 芯片技术。他们将 dCas9 固定在场效应晶体管表面,并与 sgRNA 形成复合物,从而特异地结合靶标并产生相应的电化学信号,该芯片在不扩增靶标的情况下即可达 1.7 fM 的灵敏度,并且在 15 min 内就可读取检测结果。

2 CRISPR/Cas12a 在核酸检测中的应用

Cas12a(又名 Cpf1)属于 V 型 CRISPR/Cas 系统,在 crRNA 的引导下特异识别裂解富含 T 核苷酸 PAM

序列的 dsDNA 或 ssDNA^[11-12]。2018 年, CHEN 等^[13]发现毛螺旋菌科细菌 (Lb) ND2006 Cas12a (LbCas12a) 在 crRNA 的引导下, 特异切割靶 ssDNA 或 dsDNA 后, 也可非特异性诱导其附近非靶 ssDNA 的断裂, 具有与 Cas13a 相同的“附属切割”活性。随后他们将重组酶聚合酶扩增反应 (RPA) 与 LbCas12a 偶联, 开发了 DNA 内切核酸酶靶向 CRISPR 反式报告基因 (DETECTR) 核酸检测技术。应用该技术成功检测出了人乳头瘤病毒 16 型和 18 型。DETECTR 可在 1 h 内检测出靶标并且灵敏度可达阿摩尔级, 其检测结果与 PCR 检测结果具有良好的一致性。LI 等^[14] 将 crRNA/Cas12a 与 PCR 相结合, 开发出灵敏度、高特异性强的 HOLMES 核酸检测系统, 但该检测系统需经过两步反应。为了避免交叉污染, 简化操作步骤, 后来他们开发出一步式反应。LI 等^[15] 选取一种耐热的 Cas12b 蛋白与环介导等温扩增 (LAMP) 技术相结合, 从而实现一步式反应, 他们将该技术命名为第 2 版 HOLMES (HOLMES V2)。WANG 等^[16] 将 RPA 扩增试剂和 Cas12a 酶放在物理上相互分开的同一试管中, 在 RPA 反应 15 min 后, Cas12a 才添加到反应系统中, 从而实现一步法检测。

上述基于 CRISPR/Cas12a 的核酸检测技术均结合了各种核酸扩增技术。最近, 研究者不断尝试将该技术与各种传感器相结合, 试图开发灵敏度高、特异性强的生物传感技术。SHAO 等^[17] 将传统的两端分别标记荧光基团和猝灭基团的 ssDNA 荧光报道分子用磁珠-ssDNA-铂纳米 (PtNP) 复合物取代。当 crRNA/Cas12a 结合并切割靶标时, ssDNA 也被非特异性地裂解, 从而释放出 PtNP。随后将该反应产物滴加到芯片上, 通过 PtNP 催化过氧化氢产生的氧气量来计算靶标的水平。DAI 等^[18] 将 crRNA/Cas12a 引入电化学传感器, 该技术对 HPV-16 及细小病毒 B19 的检测灵敏度达皮摩尔级。此外, 他们通过设计针对转化生长因子 β 1 的适配体, 从而实现了基于电化学和 CRISPR/Cas 技术的转化生长因子 β 1 的检测。该技术的成功开发表明 CRISPR/Cas 技术不仅在检测核酸方面具有重要的应用价值, 而且在蛋白检测方面也具有应用潜力。

3 CRISPR/Cas13a 在核酸检测中的应用

Cas13a(以前称为 C2c2) 属于 VI 型 CRISPR 系统, 对靶标的识别依赖于由 A、U 或 C 碱基组成的 PFS 序列(相当于 PAM 序列)^[19]。在 crRNA 的引导下, Cas13a 特异性切割靶标 ssRNA 后, 表现出核糖核酸酶活性, 可将靶标附近的非特异性 ssRNA 进行切割^[20]。GOOTENBERG 等^[21-22] 将高度特异性的 crRNA/Cas13a 与 RPA 等温扩增技术相结合, 开发

了一种特异性强、灵敏度高的酶报告解锁 (SHERLOCK) 核酸检测系统。该技术具有阿摩尔级的灵敏度和识别单个核苷酸错配的特异性, 当与 T7 RNA 聚合酶转录偶联时, 扩增的 DNA 可转录为 RNA。因此, SHERLOCK 在 DNA 和 RNA 的快速检测方面均具有重要的应用价值。为了简化操作、降低成本, 随后他们又开发了基于试纸条的 SHERLOCK 核酸检测技术。通过 16 个患者样品的 SHERLOCK 和寨卡病毒逆转录 PCR 的检测结果比较发现, 两种检测方法的灵敏度、特异度、一致性均达 100%^[23]。此外, 该技术已成功用于鉴定细菌病原体、耐药基因筛查以及无细胞肿瘤 DNA 突变等的检测。

SHERLOCK 系统虽可快速、灵敏地检测核酸分子, 但仍然存在一些局限, 例如缺乏定量, 依赖荧光设备读取检测结果, 一次只能检测一种核酸等。为了突破这些局限性, 他们随后将 SHERLOCK 系统进行了改装, 开发了更具有实用性的第 2 版 SHERLOCK (SHERLOCK V2) 核酸检测技术。GOOTENBERG 等^[22] 发现, 来自不同细菌的 Cas13 在附属切割时, 对报告 ssRNA 中碱基的切割位点不同。他们在原版 SHERLOCK 中同时引入 LwaCas13a, PsmCas13b, CcaCas13b 和 AsCas12a 4 种核酸内切酶, 设计针对 4 种不同靶标的 crRNA 并与相应的 Cas 蛋白组装, 用发出不同颜色的荧光分子分别标记 4 种特异合成的报告 ssDNA 或 ssRNA。当检测到靶标时, 相应报告分子裂解, 释放对应颜色的荧光信号, 从而实现在同一反应中检测出 4 种不同的靶标。随后他们又发现, 在较低的引物水平下, 反应不会达到饱和。因此, 可通过控制引物的水平而实现核酸定量检测, 且检测物水平可低至阿摩尔级。为了扩大 SHERLOCK 系统的输出信号, 他们又引入 CRISPR III 型效应核酸酶 Csm6, 该核酸酶能被环状腺苷酸分子或末端含 2'、3'-环腺苷酸的线性腺嘌呤同聚物激活^[24-25]。研究发现, Cas13 蛋白的附属切割恰好可以产生末端含 2'、3'-环腺苷酸的裂解产物, 通过 Cas13 与 Csm6 偶联, 从而使输出信号进一步放大。另一方面, 为了解决结果读取依赖于仪器设备的问题, 他们用 FAM-生物素标记报告基因开发了简便的检测试纸条。试纸条进样端包被捕获 FAM 的抗 FAM 抗体和金纳米颗粒缀合物, 在试纸条第一反应区固定与生物素具有高亲和力的链霉素, 第二反应区固定能捕获 FAM-抗 FAM 抗体复合物的物质。如果报告基因被 Cas13 裂解, 试纸条上可出现两条肉眼可见的条带, 反之只在第一反应区出现条带。这种读取结果的方法类似于胶体金的检测原理, 扩展了 SHERLOCK V2 在缺乏医疗设备的野外或现场病原检测中的应用。在此基础上, 他们又

开发了利用加热和化学还原法来溶解病毒颗粒及灭活核糖核酸酶的方法—HUDSON^[23],使 SHERLOCK 系统可直接检测临床样本,而无需 DNA 或 RNA 的提取和纯化。QIN 等^[26]将 crRNA/Cas13a 引入微流控技术,开发了自动化多路复用 CRISPR 微流控芯片,该检测体系所需样本量低至 10 μL,检测时间短至 5 min,不经过核酸扩增,检测灵敏度即可达 20 pfu/mL,并可同步检测 24 个样本。

4 CRISPR/Cas14a 在核酸检测中的应用

Cas14a 是迄今为止发现的最小的 RNA 引导核酸内切酶,由 400~700 个氨基酸组成,比 Cas9 小两倍。与 Cas12a 和 Cas13a 相同,Cas14 切割靶标 ssDNA 后,也具有非特异性附属切割活性,可用于单核苷酸突变分型(Cas14-DETECTR)^[27]。与其他 2 类 CRISPR 效应子不同的是,Cas14a-tracrRNA-crRNA 可识别切割任何与之具有 20 nt 核苷酸互补的靶 ssDNA 而不受 PAM 序列的限制。由于该蛋白对种子区中间部位的碱基突变非常敏感且不需要 PAM 序列的激活,因此该蛋白在基因组单碱基突变检测方面具有重要的应用价值。

5 CRISPR/Cas 系统在核酸检测中面临的挑战

CRISPR/Cas 技术在核酸检测方面已经取得了巨大成就,在核酸快速精准检测方面具有诸多优势:(1)通过加热等简单地处理包括血液、尿液、分泌物等临床样本,而不需要复杂的核酸提取;(2)反应所需的试剂耐受冷冻干燥,便于存储使用;(3)检测时间短,一般 2 h 内即可报告检测结果;(4)简单便携,不依赖于电力和昂贵的仪器;(5)结果读取方便,通过荧光检测或肉眼观察即可读取检测结果;(6)检测灵敏度高,特异性强,可用于单碱基突变检测;(7)检测范围广,可用于 DNA、RNA、甲基化以及蛋白质等检测。但是,CRISPR/Cas 技术在核酸检测方面仍存在许多障碍和局限,主要表现在以下几个方面:(1)sgRNA 对靶位点的正确识别依赖于 PAM 序列且不同物种的 CRISPR/Cas 系统识别不同的 PAM 序列,虽然这种特性在某种程度上增加了该系统的特异性,但同时降低了靶标的选择范围,增加了相应 sgRNA 的设计难度。LI 等^[15]通过在 HOLMES 和 HOLMES V2 中使用含有 PAM 的引物将 PAM 序列引入 PCR 或 LAMP 的扩增产物中,使 HOLMES 和 HOLMES V2 能够以不依赖于 PAM 序列的方式检测核酸。(2)由于 CRISPR/Cas 技术的“脱靶”效应,可能导致假阴性。笔者推测,在基因库中筛选最优的靶标、寻找其他来源的 Cas 蛋白或 CRISPR 系统的突变体可能有助于解决“脱靶”问题。随着未来“脱靶”效应的解决,CRISPR/Cas 技术在核酸检测中的准确性必将得到

更大程度地提高。(3)由于自然界中存在大量核糖核酸酶且十分稳定,sgRNA、报告基因 RNA 等容易被污染而遭到破坏,导致错误的检测结果。(4)CRISPR/Cas 技术使用针对已知碱基序列靶标的特异性探针来检测 DNA 或 RNA,因此检测新出现的病原体或快速突变的 RNA 病毒时可能面临巨大的挑战。尽管存在这些问题,但 CRISPR/Cas 技术依然为核酸检测提供了强大的新工具和新技术。因此,进一步研究以解决 CRISPR/Cas 技术的局限性将为重大疾病的病原核酸快速精准检测铺平道路。

6 总结及展望

目前,核酸检测一般包括病原体的分离、核酸提取与扩增、检测结果分析等,耗时长且对医疗设备和操作人员的专业水平要求很高。便携、快速、低成本、灵敏度高及特异性强的核酸检测技术对生物学研究和临床诊断具有非常重要的意义。本文概述的几种基于 CRISPR/Cas 技术的核酸检测证明了该系统不仅具有强大的基因定点编辑能力,而且在分子精准诊断领域具有重要的应用价值。SHERLOCK V2、CRISPR 微流控芯片等技术的开发表明 CRISPR/Cas 系统具有同时检测多个靶标的潜力。虽然单独的 CRISPR/Cas 系统对核酸检测灵敏度的提升有限,大多数需要跟核酸扩增技术相结合,但研究者发现将 CRISPR/Cas 系统与生物传感器相结合,同样具有极高的灵敏度,并可实现核酸的定量检测。该系统与其他核酸检测技术的结合,预示该检测技术有望不依赖于昂贵设备和专业技术,在现场快速检测领域具有巨大的应用前景。随着不断发现新的 Cas 蛋白,CRISPR/Cas 技术有望实现在分子水平上精确可靠的诊断病原体或鉴别突变癌基因。现阶段,实验室 CRISPR/Cas 核酸检测研究与复杂临床检测应用环境中的有效性仍有待观察。为了确保检测结果可靠准确,基于 CRISPR/Cas 的核酸检测技术在进入临床应用前还需经过更深入的科学的研究。随着众多科学家的不断探索和技术上的不断创新,被誉为“基因魔剪”的 CRISPR/Cas 技术必将成为核酸精准检测领域的新生和利器。

参考文献

- [1] WIEDENHEFT B, STERNBERG S H, DOUDNA J A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. Nature, 2012, 482(7385):331-338.
- [2] BARRANGOU R, MARRAFFINI L A. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity[J]. Mol Cell, 2014, 54(2):234-244.
- [3] MAKAROVA K S, ARAVIND L, WOLF Y I, et al. Unification of Cas protein families and a simple scenario for

- the origin and evolution of CRISPR-Cas systems [J]. *Biol Direct*, 2011, 6:38.
- [4] KONERMANN S, BRIGHAM M D, TREVINO A E, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex [J]. *Nature*, 2015, 517 (7536):583-588.
- [5] PARDEE K, GREEN A A, TAKAHASHI M K, et al. Rapid, low-cost detection of zika virus using programmable biomolecular components [J]. *Cell*, 2016, 165 (5): 1255-1266.
- [6] HUANG M, ZHOU X, WANG H, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 triggered isothermal amplification for Site-Specific nucleic acid detection [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(3):2193-2200.
- [7] ZHANG Y, QIAN L, WEI W, et al. Paired design of dCas9 as a systematic platform for the detection of featured nucleic acid sequences in pathogenic strains [J]. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(2):211-216.
- [8] QIU X Y, ZHU L Y, ZHU C S, et al. Highly effective and low-cost microRNA detection with CRISPR-Cas9 [J]. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(3):807-813.
- [9] YANG W, RESTREPO-PÉREZ L, BENGTSON M, et al. Detection of CRISPR-dCas9 on DNA with solid-state nanopores [J]. *Nano Lett*, 2018, 18(10):6469-6474.
- [10] HAJIAN R, BALDERSTON S, TRAN T, et al. Detection of unamplified target genes via CRISPR-Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor [J]. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3(6):427-437.
- [11] SWARTS D C, VAN D O J, JINEK M. Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR-Cas12a [J]. *Mol Cell*, 2017, 66 (2): 221-233.
- [12] STELLA S, ALCÓN P, MONTOYA G. Structure of the Cpf1 endonuclease R-loop complex after target DNA cleavage [J]. *Nature*, 2017, 546(7659):559-563.
- [13] CHEN J S, MA E B, HARRINGTON L B, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity [J]. *Science*, 2018, 360 (6387):436.
- [14] LI S Y, CHENG Q X, WANG J M, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection [J]. *Cell Discov*, 2018, 4:20.
- [15] LI L, LI S, WU N, et al. HOLMESv2: a CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation [J]. *ACS Synth Biol*, 2019, 8 (10):2228-2237.
- [16] WANG B, WANG R, WANG D Q, et al. Cas12aVDet: A CRISPR/Cas12a-Based platform for rapid and visual nucleic acid detection [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(19):12156-12161.
- [17] SHAO N, HAN X, SONG Y, et al. CRISPR-Cas12a coupled with platinum nanoreporter for visual quantification of SNVs on a volumetric bar-chart chip [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(19):12384-12391.
- [18] DAI Y, SOMOZA R A, WANG L, et al. Exploring the trans-cleavage activity of CRISPR-Cas12a (cpf1) for the development of a universal electrochemical biosensor [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58 (48):17399-17405.
- [19] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMANN S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector [J]. *Science*, 2016, 353(6299):5573.
- [20] EAST-SELETSKY A, O'CONNELL M R, KNIGHT S C, et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection [J]. *Nature*, 2016, 538(7624):270-273.
- [21] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. *Science*, 2017, 356(6336):438-442.
- [22] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, KELLNER M J, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6 [J]. *Science*, 2018, 360(6387):439-444.
- [23] MYHRVOLD C, FREIJE C A, GOOTENBERG J S, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13 [J]. *Science*, 2018, 360(6387):444-448.
- [24] KAZLAUSKIENE M, KOSTIUK G, VENCLOVAS Ģ, et al. A cyclic oligonucleotide signaling pathway in type III CRISPR-Cas systems [J]. *Science*, 2017, 357(6351): 605-609.
- [25] NIEWOEHNER O, GARCIA-DOVAL C, ROSTØL J T, et al. Type III CRISPR-Cas systems produce cyclic oligoadenylate second messengers [J]. *Nature*, 2017, 548 (7669):543-548.
- [26] QIN P, PARK M, ALFSON K J, et al. Rapid and fully microfluidic ebola virus detection with CRISPR-Cas13a [J]. *ACS sensors*, 2019, 4(4):1048-1054.
- [27] HARRINGTON L B, BURSTEIN D, CHEN J S, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes [J]. *Science*, 2018, 362(6416):839-842.

(收稿日期:2019-07-22 修回日期:2019-10-28)