

• 综 述 •

基于 CRISPR/Cas 系统的病原体核酸检测技术研究进展*

艾力非热·艾尼瓦尔^{1,2}, 宁雅婷¹, 徐英春¹综述, 张 丽^{1△}审校

1. 中国医学科学院北京协和医学院/北京协和医院疑难重症及罕见病国家重点实验室检验科, 北京 100730; 2. 中国医学科学院北京协和医学院研究生院, 北京 100005

摘 要:由细菌及病毒等病原体引发的感染性疾病是重大全球公共卫生挑战。精准且高效的检测手段对于感染性疾病的诊疗及防控至关重要。基于成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)/相关蛋白(Cas)系统的核酸检测技术凭借高灵敏度、高特异度以及操作简便快捷等优势在病原微生物检测领域中广泛应用。近年来基于 CRISPR/Cas 系统衍生出诸多便捷高效的病原微生物核酸检测技术及平台,进一步拓宽了病原体核酸检测领域。该文梳理了基于 CRISPR/Cas 系统的病原体核酸检测技术的研究动态,探讨了这些技术在病原体体外诊断中的价值,并为 CRISPR/Cas 核酸检测技术的后续发展提供参考。

关键词:成簇规律间隔短回文重复序列/相关蛋白系统; Cas 蛋白; 核酸检测; 病原微生物; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2025.19.017 **中图法分类号:**R440

文章编号:1673-4130(2025)19-2408-08 **文献标志码:**A

Research progress in pathogen nucleic acid detection technology
based on the CRISPR/Cas system*

AILIFEIRE Ainiwaer^{1,2}, NING Yating¹, XU Yingchun¹, ZHANG Li^{1△}

1. Department of Laboratory Medicine, State Key Laboratory of Complex Severe and Rare Diseases, Peking Union Medical College Hospital/Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100730, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Abstract: Infectious diseases caused by bacteria, viruses, and other pathogens are a significant global public health challenge. Accurate and efficient detection methods are crucial for the diagnosis and prevention of infectious diseases. Nucleic acid detection technologies based on the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated protein (Cas) systems have begun to be applied in the detection of pathogenic microorganisms due to their high sensitivity, high specificity, and rapid simplicity. In recent years, various convenient and efficient nucleic acid detection technologies and platforms for pathogenic microorganisms have been derived from the CRISPR/Cas system, further expanding the field of pathogen nucleic acid detection. This article summarizes the research progress of pathogen nucleic acid detection technologies based on the CRISPR/Cas system, discusses the value of these detection technologies in the in vitro diagnosis of pathogens, and provides references for the further development of CRISPR/Cas nucleic acid detection technologies.

Key words: clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein system; Cas protein; nucleic acid testing; pathogenic microorganisms; diagnosis

成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)/相关蛋白(Cas)系统是细菌和古菌在进化过程中形成的一种适应性免疫系统,通过特异性识别并切割外源 DNA 或 RNA 序列,保护宿主免受病毒等病原体的入侵^[1]。传统病原体检测依赖定量聚合酶链式反应(qPCR),但其操作复杂、依赖精密仪器且易受干扰。

相比之下,基于 CRISPR/Cas 系统的检测技术无需核酸扩增,可在室温下完成,兼具高灵敏度、高特异度和操作便捷的优势,尤其适用于即时检测(POCT),为病原微生物的快速诊断提供了新方向^[2-3]。目前,该技术已在病原体核酸检测领域展现出显著潜力,成为突破传统方法局限的重要工具,相关研究正推动其在体

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82472341);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2021-I2M-1-044)。

△ 通信作者, E-mail: zhanglipumchlab@163.com。

外诊断中的广泛应用与优化升级。CRISPR 被分为两个部分: CRISPR 序列和编码 Cas 蛋白的基因。CRISPR 引导的适应性免疫过程包含 3 个环节: 适应、表达与干扰。在适应环节, 系统会将入侵病毒和质粒中的外源 DNA 片段, 即“原型间隔区”, 作为新的间隔区整合进 CRISPR 基因座, 间隔区储存了序列信息, 以便后续对相应病毒或质粒的再次入侵进行靶向防御。在表达环节, CRISPR RNA (crRNA) 逐渐成熟, 间隔序列转录成 crRNA, 同时反式激活 CRISPR RNA (tracrRNA) 与之通过碱基配对结合, 形成向导 RNA (sgRNA), 进而募集 Cas 蛋白。到了干扰环节, crRNA 在 Cas 蛋白的协助下, 与 sgRNA 结合形成效应复合体, 借助原间隔相邻基序 (PAM) 精准识别并切割目标序列, 实现对入侵核苷酸序列的特异性清除^[4-5]。CRISPR/Cas 系统的分类主要基于 Cas 蛋白组成差异和效应模块之间的序列差异, 根据其编码的不同蛋白将 CRISPR 系统分为两类, 第一类包括 I、III 和 IV 型 Cas 蛋白, 需要多种 Cas 组成效应复合体; 第二类有 II、V 和 VI 型, 由单一、多结构域的 crRNA 结合蛋白即可发挥与 I 类系统中复合体类似的功能^[6]。因此, 相比于 I 类系统, II 类系统应用更为广泛。

1 基于 CRISPR/Cas 系统的病原体核酸检测技术

不同的 Cas 蛋白具有不同的核酸内切酶活性, Cas9 结合 sgRNA 后特异性识别和切割靶标, 通过对切割产物的分析实现靶标的检测^[7]。Cas12、Cas13 和 Cas14 在与 crRNA 及靶标结合后, 会形成一种效应复合体, 能够对大量带有标记的单链 DNA 或单链 RNA 报告探针进行非特异性切割, 从而产生检测信号^[8]。

1.1 基于 CRISPR/Cas9 系统的病原体核酸检测技术

Cas9 是最早发现的 Cas 酶之一, 是 CRISPR/Cas 系统中用于 DNA 编辑的主要核酸酶, 它通过 sgRNA 引导识别特定的 DNA 序列, 并在 PAM 序列附近切割双链 DNA (dsDNA)^[7]。

1.1.1 基于 CRISPR/Cas9 系统的病毒核酸检测技术

基于 CRISPR/Cas9 系统开发了能够检测人乳头状瘤病毒 (HPV)、新型冠状病毒 (SARS-CoV2) 以及寨卡病毒等常见病毒的技术和平台 (表 1)。PARDEE 等^[9]通过结合 Cas9 的切割活性、依赖核酸序列的扩增技术 (NASBA) 扩增和 toehold 传感器开发了 NAS-BACC 技术, 实现了快速且低成本检测寨卡病毒。技术原理是利用 NASBA 技术对目标 RNA 进行等温扩增, 通过 Cas9 酶识别并切割特定的 DNA 序列, 通过 Cas9 对特定 PAM 序列的识别, 实现对病毒株系的单碱基水平区分, 并在 NASBA 扩增的 RNA 中加入特定的 toehold 开关序列, Cas9 切割后影响 toehold 开

关的激活状态, 根据 toehold 开关的激活与否判断样本中是否存在特定的病毒株系。WANG 等^[10]将 CRISPR/Cas9 系统的 DNA 识别能力整合到侧流层析试纸条中, 创建了一种可高效检测非洲猪瘟病毒的新型的比色生物传感系统, 称为 CRISPR/Cas9 介导的侧向层析核酸测定 (CASLFA)。有学者开发了用于 HPV 快速基因分型的基于 Cas9 核酸酶的新型 DNA 检测方法 (ctPCR) 技术, 成功检测到了 3 种宫颈癌细胞 (HeLa、SiHa 和 C-33a) 中两种高危 HPV (HPV16 和 HPV18) 的 L1 和 E6/E7 基因以及临床样本中 HPV 的 L1 和 E6-E7 基因^[11]。ctPCR 不仅灵敏度高, 且整个检测过程可以在短短的 3~4 h 内完成。经优化推出来的 ctPCR3.0 版本, 通过 qPCR 扩增 Cas9/sgRNA 切割的 DNA 样本, 使检测过程更加快速简便^[12]。有研究团队开发了用于直接横向流动读数的 SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒, 原理是将 FELUDA 检测法与纸带化学结合^[13]。结果表明 FELUDA 准确性不亚于目前公认的金标准实时荧光定量 PCR (qRT-PCR), 并且可以在资源有限环境中替代 qRT-PCR 用于大规模社区筛查。JIAO 等^[14]发现 tracrRNA 能与细胞 RNA 结合形成“非典型”crRNA 且能够引导 Cas9 对 DNA 的靶向, 并且利用这个特性开发了利用工程化 tracrRNA 和目标 DNA 进行平行 RNA 检测平台 (LEOPARD), 它通过使用工程化的 tracrRNAs, 可以将 Cas9 的 DNA 靶向能力与特定 RNA 的存在联系起来, 实现了以单碱基分辨率区分 SARS-CoV-2 及其 D614G (Asp614→Gly) 变体。基于 Cas9 切口酶的扩增反应 (Cas9nAR), 可用于 SARS-CoV-2 和人类免疫缺陷病毒 (HIV) 检测^[15-16]。

1.1.2 基于 CRISPR/Cas9 系统的非病毒病原核酸检测技术

CRISPR/Cas9 系统进一步拓展了细菌以及真菌等病原微生物的核酸检测方法。HUANG 等^[17]开发了一种 CRISPR/Cas9 介导的等温指数扩增反应 (CAS-EXPAR), 它不需要外源引物且检测效率高, 结合了 Cas9/sgRNA 的位点特异性切割和 EXPAR 的快速扩增动力学的优势, 可以检测单核细胞增生李斯特菌 DNA 和 DNA 甲基化。在上文提到的 CASLFA 技术, 除了检测非洲猪瘟病毒之外, 还可用于检测单核细胞增生李斯特菌^[10]。QUAN 及其研究团队开发了一种结合了 CRISPR/Cas9 技术和下一代测序的诊断方法 (FLASH-NGS), 其广泛应用于耐药病原微生物检测中, 主要检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和耐万古霉素肠球菌感染以及恶性疟原虫耐药基因, 并且在其他依赖多重 PCR 的领域同样具有应用价值^[18]。ZHANG 等^[19]建立的名为配对 dCas9 报告系统 (PC reporter) 的体外报告系统, 用于特异性检

测结核分枝杆菌,其原理为 dCas 与荧光素酶的 N 端和 C 端相连,并引入互补于靶 DNA 序列上下游片段的一对 sgRNA,当检测到包含两个邻近片段的底物 DNA 并被一对 dCas9 结合时,荧光素酶会催化荧光素发光。WANG 等^[16]在 Cas9nAR 的基础上开发了第二代 Cas9nAR(Cas9nAR-v2),这个方法不仅保留了 Cas9nAR 在原理和性能方面的优势而且提高了扩增效率,可用于检测鼠伤寒沙门菌 16SrRNA、大肠杆

菌 O157:H716SrRNA 以及耻垢分枝杆菌。此外,Cas9nAR-v2 还被应用于侧向层析试纸条上,该试纸条广泛应用于 POCT。
1.2 基于 CRISPR/Cas12 系统的病原体核酸检测技术 CRISPR/Cas12 系统包括 Cas12a 和 Cas12b,区别在于 Cas12a 只需要 crRNA,不需要 tracrRNA,而 Cas12b 需要 crRNA 和 tracrRNA,因此基于其不同的特性产生了不同的核酸检测平台见表 1。

表 1 基于 CRISPR/Cas 系统的核酸检测平台及其特点

检测平台	效应蛋白	扩增	PAM	gRNA	目标类型	检测时长	检测限	病原体
NASBACC	SpCas9	LAMP	NGG	crRNA、tracrRNA	RNA	3 h	2.8 fM	寨卡病毒
CASLFA	SpCas9	RPA/PCR	NGG	crRNA、tracrRNA	DNA	<1 h	100 copy/ μ L	单核细胞增多李斯特菌、非洲猪瘟病毒
ctPCR	SpCas9	PCR	NGG	crRNA、tracrRNA	DNA	4 h	400 copy/ μ L	HPV16/18
ctPCR3.0	SpCas9	qPCR	NGG	crRNA、tracrRNA	DNA	2 h	180 copy/ μ L	HPV16/18
FELUDA	FnCas9	RT-RPA	NGG	crRNA、tracrRNA	DNA	<1 h	10 copy/ μ L	SARS-CoV-2
LEOPARD	Cas9	RT-qPCR	NGG	crRNA、tracrRNA	DNA	N/A	N/A	SARS-CoV-2
Cas9nAR-v2	Cas9	qPCR	NGG	crRNA、tracrRNA	RNA	1 h	N/A	SARS-CoV-2、HIV、鼠伤寒沙门菌、大肠杆菌
CAS-EXPAR	SpCas9	EXPAR	NGG	crRNA、tracrRNA	DNA/ RNA	<1 h	0.82 aM	李斯特菌
FLASH-NGS	SpCas9	PCR	NGG	crRNA、tracrRNA	DNA	2 h	0.19 aM	抗菌药物耐药性
PC reporter	SpdCas9	PCR	NGG	crRNA、tracrRNA	DNA	4 h	0.5 aM	结核分枝杆菌
DETECTR	LbCas12a	RPA	TTTV	crRNA	DNA	2 h	116 copy/ μ L	HPV16/18、SARS-CoV-2
OR-DETECTR	Cas12a	RT-RPA	TTTV	crRNA	RNA	1 h	2.5 copy/ μ L	H1N1、SARS-CoV-2
HOLMES	LbCas12a	PCR,RT-PCR	TTTV	crRNA	DNA/ RNA	1 h	10 aM	伪狂犬病病毒、日本脑炎病毒
PLACID	Cas12a	LAMP	TTTV	crRNA	DNA	N/A	50 copy/ μ L	SARS-CoV-2
CRISPR-SPR-FT	Cas12a	SPR	TTTV	crRNA	DNA	1.5 h	59.5 copy/ μ L	猴痘病毒
CRISPR 凝胶生物传感平台	Cas12a	RT-RPA	TTTV	crRNA	RNA	0.5 h	30 copy/ μ L	HIV
COVID-19CRISPR-FDS	Cas12a	RT-PCR/RPA	TTTV	crRNA	DNA	N/A	2 copy/ μ L	SARS-CoV-2
dWS-CRISPR	Cas12a	RT-DAMP	TTTV	crRNA	RNA	N/A	50 copy/ μ L	SARS-CoV-2
CreDiT	Cas12a	RPA	N/A	crRNA	DNA	<35 min	40 copy/mL	HPV
Cas12aVDet	EnGenLba Cas12a	RPA	TTTV	crRNA	DNA	0.5 h	10 aM	支原体
CRISPR-MTB	Cas12a	RPA	TTTV	crRNA	DNA	1.5 h	1 copy/mL	结核分枝杆菌

续表 1 基于 CRISPR/Cas 系统的核酸检测平台及其特点

检测平台	效应蛋白	扩增	PAM	gRNA	目标类型	检测时长	检测限	病原体
LAMP-CRISPR/ Cas12a	Cas12a	LAMP	TTTV	crRNA	DNA	1 h	1. 22 CFU/mL	大肠杆菌
CEXTRAR	LbCas12a	LAMP	TTTV	crRNA	DNA	N/A	N/A	幽门螺杆菌
HOLMESv2	AacCas12b	RT-LAMP/ PCR	TTV	crRNA、 tracrRNA	DNA/ RNA	1 h	0. 1 aM	SNP/DNA 甲基化
STOP	AapCas12b	LAMP	TTV	crRNA、 tracrRNA	RNA	<1 h	33 copy/mL	SARS-CoV-2
CDetection	AacCas12b	RPA	TTV	crRNA、 tracrRNA	DNA	3 h	0. 1 aM	HPV
SHERLOCK	LwCas13a	RPA	PFS; H	crRNA	DNA/ RNA	2. 5~5 h	2. 1 aM	寨卡和登革热病毒
SHERLOCKv2	LwaCas13a、 CcaCas13、 PsmCas13、 AsCas12a	RPA	PFS; H	crRNA、 tracrRNA	DNA/ RNA	1~3 h	2 aM	铜绿假单胞菌
FIND-IT	LbuCas13- TtCsm6	qRT-PCR	PFS; H	crRNA	RNA	<1 h	30 copy/ μ L	SARS-CoV-2
CARMEN	LwCas13a	PCR/RPA	PFS; H	crRNA	DNA/ RNA	0. 5~3 h	0. 9 aM	169 种人类感染相关 病毒
CCB-Detection	Cas13a	PCR	PFS; H	crRNA	DNA	4 h	1 CFU/mL	金黄色葡萄球菌
Cas14-DETECTR	Cas14a	PCR	N/A	crRNA、 tracrRNA	DNA	<2 h	aM 级别	SNP
ACasB	Cas14a1	无需扩增	N/A	N/A	N/A	N/A	400 CFU/mL	金黄色葡萄球菌
CONAN	Cas3	RT-LAMP	AAG	crRNA	ssDNA	30 ~ 40 min	1. 7 aM	SARS-CoV-2、IAV

注:CFU 为菌落形成单位;N/A 为未获取。

1. 2. 1 基于 CRISPR/Cas12a 系统的病原体核酸检测技术 病毒核酸检测技术;CHEN 等^[20]通过结合 LbCas12 和重组酶聚合酶扩增(RPA),开发了一种用于检测 HPV16 和 HPV18 的 DNA 内切酶靶向 CRISPR 转录报告系统(DETECTR)。BROUGHT-ON 等^[21]利用 DETECTR 技术从呼吸道拭子 RNA 提取物中检测 SARS-CoV-2。通过进一步将 DETECTR 和逆转录-重组酶聚合酶扩增(RT-RPA)相结合,开发了 OR-DETECTR 平台,可用于 H1N1 流感病毒以及 SARS-CoV-2 的检测^[22]。LI 等^[23]开发了一种基于 CRISPR/Cas12a 系统的快速核酸检测方法,称为 1 h 低成本多用途高效系统(HOLMES),可用于检测伪狂犬病病毒和日本脑炎病毒。SEN 等^[24]开发了基于纸张的结合环介导等温扩增(LAMP)和 CRISPR 技术集成诊断平台(PLACID),该平台利用了 LAMP 的简单性和 CRISPR/Cas12a 的特异性,集成到基于纸张的检测中,成功检测到了唾液中加标 SARS-CoV-2 RNA 片段。CHEN 等^[25]开发了一种将 CRISPR/Cas12a 和表面等离子体共振相结合的光纤探针生物传感器技术(CRISPR-SPR-FT),能特异

性诊断猴痘病毒以及精确鉴定 F8L 基因中致命突变位点(L108F)的样本。UNO 等^[26]设计了一个 CRISPR 凝胶生物传感平台,将 RT-RPA 反应与琼脂糖凝胶中的 CRISPR/Cas12a 检测相结合来检测 HIV 病毒 RNA,整个检测过程只需 30 min。基于 CRISPR 的荧光检测系统(CRISPR-FDS)使用一步法 RT-PCR 或 RT-RPA 方法从鼻拭子中提取的病毒 RNA 中扩增目标区域,并将得到的扩增子全部转移到基于 gRNA/Cas12a 的 CRISPR 系统中进行荧光检测 SARS-CoV-2^[27]。DING 等^[28]开发的数字温启动 CRISPR 检测(dWS-CRISPR)是一种结合了逆转录-多重引物 DNA 扩增(RT-DAMP)和 CRISPR/Cas12a 系统的分子诊断技术,用于灵敏定量检测临床样本中的 SARS-CoV-2。王珊珊等^[29]开发了一种基于 CRISPR/Cas12a 技术和逆转录 LAMP(RT-LAMP)的检测平台,用于检测 SARS-CoV-2 及其突变株,包括 Alpha、Beta、Gamma、Delta 和 Omicron。LEE 等^[30]开发的基于 CRISPR 的管内 DNA 检测(CreD-iT)会同时扩增和检测目标核酸的 Cas 反应且受数字无线电通信启发的高效信号处理,在临床宫颈癌筛查

及诊断中有良好的应用前景。

WANG 等^[31]开发的基于 CRISPR/Cas12a 的快速和可视化核酸检测平台(Cas12aVDet)将 RPA 与 Cas12a 切割整合在单一反应体系中,避免了开盖操作,减少了气溶胶污染的风险,此方法应用于支原体检测。与 DETECTER 原理相似,有学者开发的结核分枝杆菌检测技术(CRISPR-MTB)检测利用了 CRISPR/Cas12a 和 RPA,检测过程快速简便且灵敏度显著高于结核分枝杆菌培养,在临床诊断肺结核有极好的价值^[32]。SHENG 等^[33]构建了一个基于脲化学介导的 CRISPR/Cas12a 系统的检测平台,该平台在适体或基于探针的识别级联反应地帮助下直接检测核酸靶标且已应用于金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的检测。LEE 等^[34]结合了 LAMP 和 CRISPR/Cas12a 系统,开发了全新的 LAMP-CRISPR/Cas12a 技术,克服了 LAMP 检测中常见的假阳性,用于检测大肠杆菌 O157:H7。利用增强的 CRISPR/Cas12a 反式切割活性与扩展的报告基因和还原剂检测(CEXTRAR)是一种用于检测幽门螺杆菌的方法,特别是针对其毒力因子 CagA 和 VacA 基因的检测,通过增强 LbCas12a 的反式切割活性,结合扩展的单链 DNA(ssDNA)报告基因及新型缓冲体系和 LAMP 技术,显著提高了检测灵敏度^[35]。有研究团队开发了基于电化学银金属化的 CRISPR/Cas12a 生物传感器(E-Si-CRISPR),检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的 mecA 基因且无需扩增^[36]。谢晓倩等^[37]研究团队建立了一种基于 RPA-CRISPR/Cas12a 系统的检测方法,以李斯特菌的 hlyA 基因与副溶血性弧菌的 tlh 基因为靶标检测,不与其他常见致病菌发生交叉反应,在临床上有良好的应用前景。

1.2.2 基于 CRISPR/Cas12b 系统的病原体核酸检测技术 与 CRISPR/Cas12a 相比,基于 CRISPR/Cas12b 的病原体核酸检测平台仍需进一步研究。LI 等^[38]利用 Cas12b 反式切割活性创建了 HOLMES 的改进版本(HOLMES version2, HOLMESv2)。HOLMESv2 因在恒温下采用一步法结合 LAMP 扩增而避免了交叉污染,已广泛应用于分子诊断领域。JOUNG 等^[39]改进了特异度高灵敏度酶报告系统(SHERLOCK)流程,将来自嗜酸耐热菌的 Aap-Cas12b 与 LAMP 联合,开发了 SHERLOCK 的一管化系统 STOP)。TENG 等^[40]开发的 CDetection 结合了 Cas12b 蛋白、向导 RNA、ssDNA 荧光报告分子和 RPA 等温扩增,已被用于检测人血浆中的 HPV DNA。基于 CRISPR/Cas12b 系统的检测平台还有结核分枝杆菌检测平台(TB-QUICK),该平台结合了 LAMP 和 CRISPR/Cas12b 检测,在检测结核分枝杆菌复合体中具有较大的优势和潜力^[41]。

1.3 基于 CRISPR/Cas13 系统的病原体核酸检测 基于 CRISPR/Cas13 的核酸检测近年来有了巨大发展,GOOTENBERG 等^[42]建立了一个基于 CRISPR/Cas13a 系统的分子检测平台 SHERLOCK,该系统结合了 RPA 技术与 CRISPR 技术,能够检测 RNA 病毒暴发,例如拉沙热、埃博拉病毒、寨卡病毒和登革热。为了提高 SHERLOCK 的检测特异度,根据 CRISPR/LwaCas13a、CRISPR/CcaCas13b、CRISPR/PsmCas13b 和 CRISPR/AsCas12a 的原理和应用产生了一个升级版本,称为第二代 SHERLOCK(SHERLOCKv2)^[43]。SHERLOCKv2 能够通过向导 RNA 引导检测 Cas12/Cas13 不同亚型的靶序列,识别核酸序列和激活靶 ssRNA 序列切割,最终导致荧光素标记的 ssRNA 的侧支切割。LIU 等^[44]使用 CRISPR/Cas13a 和嗜热栖热菌 Csm6 的增强型荧光信号的快速串联集成核酸酶检测(FIND-IT)是一种快速的 RNA 检测技术,适用于 SARS-CoV-2 即时感染诊断。用于核酸多重评估的组合阵列反应(CARMEN)是一个高通量核酸检测平台,CARMEN/Cas13a 以阿摩尔敏感性检测寨卡序列,能够同时区分 169 种与人类健康相关的病毒,并对数十种耐药的 HIV 突变进行多重区分,还可鉴定甲型流感毒株的亚型分型和多种 HIV 耐药突变^[45]。在后续的研究中团队使用 Fluidigm 微流体技术和仪器,结合 CRISPR/Cas12 和 Cas13 开发了呼吸道病毒面板(mCARMEN)可以检测多达 21 种病毒包括 SARS-CoV-2、其他冠状病毒和两种流感菌株,并且识别出包括 Delta 和 Omicron 在内的 6 个 SARS-CoV-2 变体谱系^[46]。SHERLOCK 的研发者还开发了一种无需核酸提取和纯化的预处理措施的核酸检测方法(HUDSON)。通过进一步设计引物和 crRNA 来区分不同血清型和品种的病毒,整个检测过程快速简便^[47]。有研究团队将 CRISPR/Cas13a 与自主无酶杂交链式反应相结合,实现了高灵敏度和低检测成本检测 SARS-CoV-2^[48]。WANG 等^[49]将 PCR 和 CRISPR/Cas13a 系统结合开发了检测乙型肝炎病毒 DNA 和 YMDD(酪氨酸-蛋氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸)耐药突变的 PCR-CRISPR 检测技术,有良好的应用价值。

除病毒检测之外,CRISPR/Cas13a 系统在细菌检测方面也得到了广泛研究与应用。GAO 等^[50]将 CRISPR/Cas13a 系统与 PCR 技术相结合,成功实现了对沙门菌的检测,检测过程只需 2 h。ZHOU 等^[51]开发了 CRISPR/Cas13a 的细菌检测(CCB-Detection)平台,不仅能够检测金黄色葡萄球菌,而且通过改变核酸序列可以实现对不同微生物的检测,极大拓宽了 CRISPR/Cas13a 在分子检测领域的应用。

1.4 基于 CRISPR/Cas14 系统的病原体核酸检测

CRISPR/Cas14 也是近几年研究的热点,基于 CRISPR/Cas14 的核酸检测 Cas14-DETECTR 可用于检测医学和生态领域中重要的 ssDNA 病原体,在无 PAM 序列限制的情况下高保真检测 SNP 位点^[52]。WEI 等^[53]开发了基于寡核苷酸适配体的 Cas14a1 生物传感器(ACasB),用于高度特异性检测活体金黄色葡萄球菌,无需核酸提取或扩增,在临床上有良好的应用前景。

1.5 基于 CRISPR/Cas3 系统的病原体核酸检测 基于 CRISPR/Cas3 的核酸检测平台(CONAN)已被用于医院对疑似 SARS-CoV-2 或甲型流感病毒感染的患者的即时检测^[54]。

2 小结与展望

基于 CRISPR/Cas 系统的病原体体外核酸检测技术近年来取得了显著的进展。CRISPR/Cas 系统通过与等温扩增技术、其他核酸检测技术以及各种生物传感器相结合,可检测出各种基质中的病原体核酸,具有极高灵敏度和特异度且简便高效,为病原体核酸检测提供了新的途径。

CRISPR/Cas 系统作为新型核酸检测工具,其临床应用仍面临分子机制与生物系统的双重挑战。技术局限性根植于 Cas 蛋白对 PAM 序列的依赖性(如 SpCas9 需 NGG 序列),导致靶点选择受限,而 Rec3 结构域对 DNA 错配的容忍性(尤其是 sgRNA 5'端种子区的非精准匹配)是脱靶效应的核心诱因,叠加染色质可及性、表观修饰等细胞异质性因素,进一步放大了脱靶风险。针对这些问题,当前通过工程化改造 Cas 蛋白(如高保真变体 eSpCas9、HypaCas9)、AI 优化 sgRNA 设计(整合基因组与表观遗传数据的 DeepCRISPR 模型)及递送策略创新(瞬时 RNP 递送缩短活性窗口),已显著提升了编辑精度与安全性,但靶向范围狭窄、体内递送效率不足及免疫原性等问题仍制约其广泛应用。未来突破需聚焦三大方向:(1)开发普适性 Cas 蛋白,通过定向进化或结构设计拓展 PAM 识别谱并降低免疫排斥;(2)构建智能化编辑系统,结合单分子成像与纳米孔测序实现编辑过程实时监测,并整合单细胞多组学数据建立脱靶预测模型;(3)推动精准临床转化,利用不断裂编辑技术避免染色体异常风险,同时开发诊疗一体化设备,实现感染性疾病快速检测与干预。尽管存在上述局限和挑战,但 CRISPR/Cas 系统在病原体体外核酸检测诊断领域展现出巨大的潜力和发展前景,期待在未来能够克服这些局限,为临床病原微生物核酸检测带来新的突破。

参考文献

[1] BARRANGOU R, MARRAFFINI LA. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity[J]. Mol

Cell, 2014, 54(2): 234-244.

[2] WENG Z, YOU Z, YANG J, et al. CRISPR-Cas biochemistry and CRISPR-based molecular diagnostics[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2023, 62(17): e202214987.

[3] KELLNER M J, KOOB J G, GOOTENBERG J S, et al. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases[J]. Nat Protoc, 2019, 14(10): 2986-3012.

[4] GARNEAU J E, DUPUIS M È, VILLION M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA[J]. Nature, 2010, 468(7320): 67-71.

[5] MOHANRAJU P, MAKAROVA K S, ZETSCHKE B, et al. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems[J]. Science, 2016, 353(6299): 5147.

[6] ADLER B A, TRINIDAD M I, BELLINENY-RABELO D, et al. CasPEDIA database: a functional classification system for class 2 CRISPR-Cas enzymes[J]. Nucleic Acids Res, 2024, 52(D1): D590-D596.

[7] WANG S W, GAO C, ZHENG Y M, et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 57.

[8] KOONIN E V, MAKAROVA K S, ZHANG F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems [J]. Curr Opin Microbiol, 2017, 37: 67-78.

[9] 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.

[10] WANG X, XIONG E, TIAN T, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay[J]. ACS Nano, 2020, 14(2): 2497-2508.

[11] WANG Q, ZHANG B, XU X, et al. CRISPR-typing PCR (ctPCR), a new Cas9-based DNA detection method[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 14126.

[12] ZHANG B, XIA Q, WANG Q, et al. Detecting and typing target DNA with a novel CRISPR-typing PCR (ctPCR) technique[J]. Anal Biochem, 2018, 561-562: 37-46.

[13] AZHAR M, PHUTELA R, KUMAR M, et al. Rapid and accurate nucleobase detection using FnCas9 and its application in COVID-19 diagnosis[J]. Biosens Bioelectron, 2021, 183: 113207.

[14] JIAO C, SHARMA S, DUGAR G, et al. Noncanonical crRNAs derived from host transcripts enable multiplexable RNA detection by Cas9[J]. Science, 2021, 372(6545): 941-948.

[15] WANG T, LIU Y, SUN H H, et al. An RNA-guided Cas9 nickase-based method for universal isothermal DNA amplification[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2019, 58(16): 5382-5386.

[16] WANG T, WANG Y, CHEN P, et al. An ultrasensitive, One-pot RNA detection method based on rationally engineered Cas9 nickase-assisted isothermal amplification re-

- action[J]. *Anal Chem*, 2022, 94(36):12461-12471.
- [17] 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.
- [18] QUAN J, LANGELIER C, KUCHTA A, et al. FLASH: a next-generation CRISPR diagnostic for multiplexed detection of antimicrobial resistance sequences[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(14):e83.
- [19] 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.
- [20] CHEN J S, MA E, HARRINGTON L B, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. *Science*, 2018, 360(6387):436-439.
- [21] BROUGHTON J P, DENG X, YU G, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2[J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7):870-874.
- [22] SUN Y, YU L, LIU C, et al. One-tube SARS-CoV-2 detection platform based on RT-RPA and CRISPR/Cas12a[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1):74.
- [23] LI S Y, CHENG Q X, WANG J M, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection[J]. *Cell Discov*, 2018, 4:20.
- [24] SEN A, MASETTY M, WEERAKOON S, et al. Paper-based loop-mediated isothermal amplification and CRISPR integrated platform for on-site nucleic acid testing of pathogens[J]. *Biosens Bioelectron*, 2024, 257:116292.
- [25] CHEN Y, CHEN Z, LI T, et al. Ultrasensitive and specific clustered regularly interspaced short palindromic repeats empowered a plasmonic fiber tip system for amplification-free monkeypox virus detection and genotyping[J]. *ACS Nano*, 2023, 17(13):12903-12914.
- [26] UNO N, LI Z, AVERY L, et al. CRISPR gel: a one-pot bio-sensing platform for rapid and sensitive detection of HIV viral RNA[J]. *Anal Chim Acta*, 2023, 1262:341258.
- [27] HUANG Z, TIAN D, LIU Y, et al. Ultra-sensitive and high-throughput CRISPR-powered COVID-19 diagnosis[J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 164:112316.
- [28] DING X, YIN K, LI Z, et al. Sensitive quantitative detection of SARS-CoV-2 in clinical samples using digital warm-start CRISPR assay[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 184:113218.
- [29] 王姗姗, 闫君, 杜彤彤, 等. 基于 CRISPR-Cas12a 的环介导等温核酸扩增技术在 SARS-CoV-2 病毒检测中的应用(英文)[J]. *武汉大学学报(自然科学英文版)*, 2024, 29(5):453-460.
- [30] LEE C Y, KIM H, DEGANI I, et al. Empowering the on-site detection of nucleic acids by integrating CRISPR and digital signal processing[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1):6271.
- [31] WANG B, WANG R, WANG D, et al. Cas12aVDet: a CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection[J]. *Anal Chem*, 2019, 91(19):12156-12161.
- [32] AI J W, ZHOU X, XU T, et al. CRISPR-based rapid and ultra-sensitive diagnostic test for *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8(1):1361-1369.
- [33] SHENG A, YANG J, TANG L, et al. Hydrazone chemistry-mediated CRISPR/Cas12a system for bacterial analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(18):10562-10570.
- [34] LEE S Y, OH S W. Filtration-based LAMP-CRISPR/Cas12a system for the rapid, sensitive and visualized detection of *Escherichia coli* O157: H7[J]. *Talanta*, 2022, 241:123186.
- [35] HABIMANA J D, MUKAMA O, CHEN G, et al. Harnessing enhanced CRISPR/Cas12a trans-cleavage activity with extended reporters and reductants for early diagnosis of *Helicobacter pylori*, the causative agent of peptic ulcers and stomach cancer[J]. *Biosens Bioelectron*, 2023, 222:114939.
- [36] SUEA-NGAM A, HOWES P D, DEMELLO A J. An amplification-free ultra-sensitive electrochemical CRISPR/Cas biosensor for drug-resistant bacteria detection[J]. *Chem Sci*, 2021, 12(38):12733-12743.
- [37] 谢晓倩, 史梅梅, 杨俊, 等. 单核细胞增生李斯特氏菌与副溶血性弧菌 RPA-CRISPR/Cas12a 检测方法的建立[J]. *中国口岸科学技术*, 2024, 6(11):88-96.
- [38] 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.
- [39] JOUNG J, LADHA A, SAITO M, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing[J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(15):1492-1494.
- [40] TENG F, GUO L, CUI T, et al. CDetection: CRISPR-Cas12b-based DNA detection with sub-attomolar sensitivity and single-base specificity[J]. *Genome Biol*, 2019, 20(1):132.
- [41] SAM I K, CHEN Y Y, MA J, et al. TB-QUICK: CRISPR-Cas12b-assisted rapid and sensitive detection of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *J Infect*, 2021, 83(1):54-60.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] LIU T Y, KNOTT G J, SMOCK D C J, et al. Accelerated RNA detection using tandem CRISPR nucleases[J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(9):982-988. (下转第 2420 页)

• 综 述 •

EB 病毒相关淋巴瘤检测技术的研究进展^{*}欧倬君 综述, 向 瑜[△] 审校

重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016

摘 要: EB 病毒(EBV)在全球范围内感染率极高, 早期为无症状潜伏感染, 与多种淋巴瘤及淋巴组织增殖性疾病的发生发展密切相关。此类疾病兼具了病毒感染和血液淋巴系统受累的特点, 临床表现复杂, 预后不良, 为疾病的诊断与治疗方案的选择带来了困难。早检出、早干预对 EBV 相关疾病的预防与治疗至关重要。传统的检测方法面临病毒漏检以及 EBV 相关淋巴瘤复杂的遗传学诊断的难题, 急需新的检测技术对疾病进行辅助诊断。该文主要围绕常见的 EBV 相关淋巴瘤的临床特征和相应检测技术的研究进展进行综述。

关键词: EB 病毒; 淋巴瘤; 检测技术; 辅助诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2025.19.018

中图法分类号: R733.4

文章编号: 1673-4130(2025)19-2415-06

文献标志码: A

Advances in Epstein-Barr virus-associated lymphomas detection techniques^{*}OU Zhuojun, XIANG Yu[△]

Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing

Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Epstein-Barr virus(EBV) has a high prevalence of infection worldwide, with early onset of a-symptomatic latent infection, and has been shown to be closely associated with the development of many lymphomas and lymphoproliferative disorders. These diseases are characterized by both viral infection and involvement of the blood and lymphatic system, with complex clinical manifestations and poor prognosis, which pose problems in the diagnosis and selection of treatment options. Early detection and intervention are essential for the prevention and treatment of EBV-related diseases. However, traditional detection methods face the difficulties of viral leakage and the complex genetic features of EBV-associated lymphomas, and there is an urgent need for new detection techniques to assist in the diagnosis of the disease. This article mainly focuses on the clinical features of common EBV-associated lymphomas and the research progress of the corresponding detection technologies.

Key words: Epstein-Barr virus; lymphoma; detection techniques; companion diagnosis

EB 病毒(EBV)属于疱疹病毒科嗜淋巴细胞病毒属 γ 亚科, 是一种具有包膜结构的双链线状 DNA 病毒, 于 1964 年首次从 Burkitt 淋巴瘤中分离出, 其直径为 150~200 nm, 约有 18 万个碱基对, 编码 80~100 种蛋白, 是最早被发现与人类肿瘤相关的病毒^[1]。EBV 主要传播途径为唾液传播, 通过病毒糖蛋白与细胞受体间的相互作用感染口腔上皮细胞, 侵犯记忆 B 淋巴细胞后在人体内建立起终身潜伏感染。潜伏期的 EBV 阳性 B 淋巴细胞可重新激活进入生命周期, 称为病毒再激活^[2]。多数病毒携带者不会表现出临床症状。这种看似无症状的感染掩盖了 EBV 真实的致病潜能, 一旦病毒-宿主间的平衡受到干扰, 可导致多种疾病的发生。EBV 已被证实与多种淋巴瘤的发

生密切相关^[3-5]。

1 概 述

1.1 EBV 相关淋巴瘤的特征 淋巴瘤是一种以淋巴细胞或淋巴前体细胞恶性增生为特征的淋巴系统疾病。EBV 感染可导致霍奇金淋巴瘤(HL)、弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)、NK/T 细胞淋巴瘤(NKTCL)、伯基特淋巴瘤(BL)、浆母细胞瘤(PBL)等淋巴瘤的发生^[6]。根据潜伏基因的表达定义了不同的 EBV 潜伏感染模式(0、I、II、III 型)。EBV 相关淋巴瘤各自的细胞起源、与 EBV 的相关性以及相应的遗传特征, 见表 1。

1.2 EBV 相关淋巴瘤发病机制 目前, EBV 相关淋巴瘤的发病机制还未完全明确。有研究指出, EBV 可能是通过“hit and run”的机制诱导淋巴瘤的发生^[7]。

* 基金项目: 2025 年重庆市科卫联合医学科研面上项目(2025MSXM097)。

[△] 通信作者, E-mail: 202931@hospital.cqmu.edu.cn。