

- [31] SPENCER B L, DENG L, PATRAS K A, et al. Cas9 contributes to group B Streptococcal colonization and disease [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1930.
- [32] SULLIVAN M J, GOH K G K, ULETT G C. Cellular management of Zinc in group B Streptococcus supports bacterial resistance against metal intoxication and promotes disseminated infection [J]. *mSphere*, 2021, 6 (3): e00105-21.
- [33] HOOVEN T A, CATOMERIS A J, AKABAS L H, et al. The essential genome of *Streptococcus agalactiae* [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 406.
- [34] HOOVEN T A, CATOMERIS A J, BONAKDAR M, et al. The *Streptococcus agalactiae* stringent response enhances virulence and persistence in human blood [J]. *Infect Immun*, 2018, 86(1): e00612-17.
- [35] DAMMANN A N, CHAMBY A B, CATOMERIS A J, et al. Genome-wide fitness analysis of group B Streptococcus in human amniotic fluid reveals a transcription factor that controls multiple virulence traits [J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(3): e1009116.
- [36] ZHU L, YERRAMILLI P, PRUITT L, et al. Genome-wide assessment of *Streptococcus agalactiae* genes required for survival in human whole blood and plasma [J]. *Infect Immun*, 2020, 88(10): e00357-20.
- [37] ZHU L, YERRAMILLI P, PRUITT L, et al. Functional insights into the high-molecular-mass penicillin-binding proteins of *Streptococcus agalactiae* revealed by gene deletion and transposon mutagenesis analysis [J]. *J Bacteriol*, 2021, 203(17): e00234-21.
- [38] LIU X, KIMMEY J M, MATARAZZO L, et al. Exploration of bacterial bottlenecks and *Streptococcus pneumoniae* pathogenesis by CRISPRi-Seq [J]. *Cell Host Microbe*, 2021, 29(1): 107-120. e6.

(收稿日期: 2022-09-10 修回日期: 2023-01-07)

• 综 述 •

CRISPR-Cas 技术在病原体核酸检测中的研究进展*

张咪咪¹综述, 刘家云^{1,2△}审校

1. 陕西中医药大学医学技术学院, 陕西咸阳 712000; 2. 第四军医大学西京医院检验科, 陕西西安 710032

摘 要: 规律成簇的间隔短回文重复序列 (CRISPR) 及其相关蛋白 (Cas) 简称 CRISPR-Cas, 是原核生物的一种适应性免疫系统, 因其强大的基因编辑功能及核酸切割活性成为近年来的研究热点。感染性疾病的传统检测方法虽然特异度高, 但存在灵敏度不够高、操作复杂、检测周期长等不足。随着 CRISPR-Cas 系统的发现及深入研究, 目前依赖特异性识别靶标后所激发的 Cas 蛋白“附带切割”活性, 已经开发出多项基于 CRISPR-Cas 的核酸检测方法, 它们高效、简便、快速的优点弥补了传统诊断方法的不足。该文对 CRISPR-Cas 技术及其在感染性疾病核酸检测中的现状进行综述, 旨在为开发更多基于 CRISPR-Cas 技术的检测新方法提供新思路。

关键词: CRISPR-Cas 系统; Cas 蛋白; 附带切割; 感染性疾病; 核酸检测

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.10.022

中图法分类号: R542.2; R446.5

文章编号: 1673-4130(2023)10-1259-07

文献标志码: A

Research progress of CRISPR-Cas systems in nucleic acid detection of pathogens*

ZHANG Mimi¹, LIU Jiayun^{1,2△}

1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China

Abstract: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated proteins (Cas), abbreviated as CRISPR-Cas, is an adaptive immune system of prokaryotes. It has become a research hotspot in recent years due to its powerful gene editing function and nucleic acid cleavage activity. Although the traditional detection methods of infectious diseases have high specificity, they are insufficient in lower sensitivity, complicated operation and long turn around time (TAT). With the discovery and in-depth study of CRISPR-Cas system, a number of nucleic acid detection methods based on CRISPR-Cas have been developed, which rely on the activation of Cas protein collateral cleavage activity after specific recognition of the target. They are efficient, simple and rapid, and make up for the shortcomings of traditional diagnostic meth-

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81972026)。

△ 通信作者, E-mail: jiayun@fmmu.edu.cn。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230426.1526.002.html\(2023-04-27\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230426.1526.002.html(2023-04-27))

ods. Here we review CRISPR-Cas technology and its current status in nucleic acid detection of infectious diseases, in order to provide a strategy for future development of more novel detection methods based on CRISPR-Cas technology.

Key words: CRISPR-Cas system; Cas proteins; collateral cleavage; infectious diseases; nucleic acid detection

感染性疾病的病原体种类繁多,临床最常见的有病毒和细菌等,它们具有易变异,致病性强,传播速度快等特点,严重威胁人类健康^[1]。目前全球感染性疾病的现状不容乐观,尤其是新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染暴发流行,凸显了病原体的早期快速检测对临床诊断、预后判断,以及指导用药、控制传播的重要性^[2]。传统的病原体检测方法包括直接镜检、病原体分离与培养、抗原-抗体检测、聚合酶链式反应(PCR)等。目前实验室最常用的核酸检测技术是 PCR,尽管其灵敏度高、特异性好,但存在实验耗时长、检测成本高,对实验室环境、人员和设备要求高等不足^[3]。因此,迫切需要开发出更简便、快速的新型核酸诊断方法。近年来,基于规律成簇的间隔短回文重复序列及其相关蛋白(CRISPR-Cas)的发现和深入研究给研究者带来了希望^[4-5]。2016 年 ABU-DAYYEH 等发现^[6],Cas12 具有“附带切割”活性,即识别并结合到靶序列之后,Cas 蛋白除可以特异性切除靶序列外,还会非特异性地切割荧光报告探针,释放荧光信号,可以此达到检测目的。此后,基于 CRISPR-Cas 的核酸检测技术成为重要的研究方向之一。本文旨在对 II 类 CRISPR-Cas 系统及其在感染性疾病核酸检测方面的应用现状进行综述。

1 CRISPR-Cas 系统概述

1.1 CRISPR-Cas 系统及分类 CRISPR-Cas 系统是原核生物的一种 RNA 引导的适应性免疫系统,包括重复序列与间隔序列交替出现的 CRISPR 序列及 Cas 蛋白,其通过在细菌宿主染色体中以病毒 DNA 的形式储存记忆来阻止噬菌体感染^[7-8]。该系统通过适应、成熟、干扰 3 个阶段发挥免疫功能。第一阶段,当噬菌体或者病毒入侵时,细菌免疫防御机制激活,Cas 蛋白剪切入侵基因的特定序列并将其整合到 CRISPR 序列中,以便再次入侵时能快速识别;第二阶段,间隔序列翻译成包含入侵序列的 CRISPR 核糖核酸(crRNA)和反式激活 RNA (tracrRNA),二者通过碱基配对形成向导 RNA (sgRNA),用于募集 Cas 蛋白;第三阶段,当外源物再次入侵时,sgRNA 与 Cas 蛋白结合成复合物,sgRNA 通过序列互补捕捉靶标,Cas 蛋白则发挥内切酶活性进行切割,并在前间隔序列邻近基序(PAM)的协助下,清除外来遗传物质,发挥其免疫作用^[9]。

Cas 蛋白是具有目标依赖性的核酸酶,可由单个蛋白或者蛋白复合物组成。根据不同的 Cas 蛋白,将 CRISPR-Cas 系统分为两大类、6 种类型、33 种亚型和

若干变种^[10]。I 类系统由 I 型、III 型和 IV 型组成,主要依赖由多个 Cas 蛋白和 crRNA 组成的复合物;II 类系统包括 II 型、V 型和 VI 型,与 I 类系统相比,II 类系统的效应复合物是一个与 crRNA 结合的单一 Cas 蛋白^[11]。由于 II 类的 CRISPR-Cas 系统具有简单且高效的特点,因此被广泛应用于基因编辑和分子诊断领域。CRISPR 介导的适应性免疫和一系列的 Cas 蛋白的发现和深入研究,不仅引领了基因编辑的变革,还推动了核酸检测方法不断推陈出新^[12]。

1.2 CRISPR-Cas 系统核酸检测原理 CRISPR-Cas 系统起初作为微生物、动植物系统中基因组编辑的有效工具,已逐渐成为传统方法锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)等基因编辑方式的潜在替代品^[13-14]。2012 年 MARTIN 等^[15]首次报告了 CRISPR-Cas9 系统的基因组编辑潜力及其切割双链 DNA(dsDNA)的能力,并于 2013 年首次作为编辑基因组的工具应用于哺乳动物细胞。目前关于基因组编辑的研究主要集中在病毒感染、心血管疾病(CVDs)、代谢紊乱、免疫系统缺陷、血友病等方面^[16]。近年来,Cas13a(以前称为 C2c2)和 Cas12a(以前称为 Cpf1)的 RNA 引导的核酸酶活性推动了新的核酸检测工具的开发。基于 CRISPR-Cas 的核酸检测技术主要是利用不同 Cas 蛋白的核酸酶活性。II 类 Cas 蛋白在核酸检测中广泛应用,其原理也有所不同。其中,Cas9 以基因编辑闻名,也可用于核酸检测,它有 2 个结构域 HNH 和 RuvC,且依赖 3' 端富含 GC 的 PAM 序列,通过 sgRNA 结合 Cas9 后识别并裂解 dsDNA 发挥其核酸酶活性^[17]。Cas12a 的结构域为单个 RuvC,依赖的 PAM 序列 5' 端富含 AT,可以在 crRNA 的介导下识别并切割 dsDNA,然后通过激活的“附带切割”活性非特异性切割单链 DNA(ssDNA)^[18]。Cas13a 靶向 RNA 且具有 2 个 HEPN 结构域,其依赖的原间隔子侧翼位点(PFS)3' 端可以是 A、U 或 C,Cas13a 一旦识别并切割由 crRNA 序列识别的 RNA 靶标,就转入了一种酶促“激活”状态,将结合并切割其他的 RNA,而不管是否与 crRNA 同源,或是否存在 PFS^[19]。最近发现的 Cas14 是一种靶向 ssDNA 的核酸酶,且体积比 Cas9 小 1/2,可以在 sgRNA 引导下不依赖 PAM 发挥酶切作用^[20]。上述几种 CRISPR-Cas 系统的主要特征见表 1。

2 CRISPR-Cas 技术在感染性疾病核酸检测中的应用

2.1 CRISPR-Cas9 Cas9 自被发现以来,除了作为

基因编辑中普遍使用的酶之外,也越来越广泛地应用于感染性疾病的诊断^[21]。将其裂解功能与核酸扩增相结合,可检测特异性核酸序列,用于病原菌基因分型和单核苷酸多态性(SNP)鉴别。2016 年,PARDEE 等^[22]将 Cas9 和核酸依赖扩增技术(NASBA)结合,借助 Toehold 生物传感器建立了肉眼判读寨卡病毒检测结果的平台(NASBACC)。该平台利用 NASBA 对目标 RNA 的高效扩增和 CRISPR-Cas9 可特异性识别靶标的优势,可在 3 h 内鉴别寨卡病毒并对其进行基因分型。指数扩增反应(EXPAR)是一种快速的等温扩增技术,但是和其他核酸扩增方法一样存在非特异性扩增。2018 年 HUANG 等^[23]将 CRISPR-Cas9 与 EXPAR 联合起来开发了 Cas-EXPAR 检测系统,用于李斯特菌的快速超敏检测,该系统首先由 CRISPR-Cas9 切割产生目标 DNA 片段,然后通过 EXPAR 产生大量 DNA,并通过实时荧光监测方法检测,它结合了 CRISPR-Cas9 和指数扩增的优点,可以精准识别并切割目标,解决了 EXPAR 非特异性扩增的问题,提高了检测的特异性和效率。

上述 2 个平台都利用了 Cas9 特异性切割靶蛋白的特性,除 Cas9 之外,核酸酶失活的 Cas9(dCas9)也被应用于感染性疾病的诊断,不同的是研究者通过对 Cas9 的 2 个核酸酶结构域进行突变,使其失去剪切能力但可以特异性结合靶蛋白^[24-25]。基于此,GUK 等^[26]开发了一种基于 DNA 荧光原位杂交(FISH)的 CRISPR 传感技术,FISH 已广泛应用于研究和诊断,

可达到可视化结果的目的。该技术使用 dCas9-sgRNA 复合物作为靶标,通过特异性识别与耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)中与甲氧西林抗性有关的 *mecA* 来捕获 MRSA 的基因组,因为大多数对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(MSSA)的 DNA 菌株不含 *mecA* 基因,因此可用于检测 MRSA,通过荧光染料显色来达到可视化的效果,且荧光强度可以反映 MRSA 的浓度。重要的是,通过简单地改变 sgRNA 序列,本方法可以应用于 MRSA 以外的任何目标序列。ZHANG 等^[27]开发一种 RNA 引导的成对 dCas9(PC)报告系统,用于结核分枝杆菌的检测。该系统中的 2 个 dCas 蛋白分别与一分为二的荧光素酶相连,当 2 个 dCas9 同时识别并结合到靶标时,分开的两部分荧光素酶会被拉近产生增强的荧光信号,以此来达到检测目的。

上述这些技术所用的生物传感器构建过程相对复杂、需要一对 Cas9/sgrNA、昂贵的荧光探针等成本较高,这阻碍了其广泛应用,特别是在即时检测(POCT)中。基于此 WANG 等^[28]开发一种快速、准确、便携的核酸检测平台,最大限度地减少对设备和专业技术人员的依赖,该技术的核心是将 CRISPR-Cas9 识别集成到侧向流动检测(LFA)平台中,称为 CRISPR-Cas9 介导的侧向流动核酸测定法(CASLFA),可在 1 h 内检测鉴定产单核细胞李斯特菌、转基因生物和非洲猪瘟病毒等。

表 1 II 类 CRISPR-Cas 系统的主要特征

名称	亚型	结构域	引导 RNA	PAM/PFS	靶标类型	“附带切割”活性	参考文献
Cas9	II	HNH RuvC	crRNA, tracrRNA	3'GC-rich PAM	dsDNA	无	[17]
Cas12a	VA	RuvC	crRNA	5'AT-rich PAM	dsDNA	有	[18]
Cas13a	VIA	HEPN	crRNA	3'PFS; non-G	ssRNA	有	[19]
Cas14	VF	RuvC	crRNA, tracrRNA	无	ssDNA	有	[20]

2.2 CRISPR-Cas13 在 CRISPR-Cas 家族中, Cas13a 是一种 RNA 引导的核酸酶,属于 VI 型 CRISPR-Cas 系统,可以在 crRNA 引导下特异性结合 ssRNA,2016 年被发现具有强大的“附带切割”活性。张锋团队开发了第一个基于 CRISPR-Cas13a 的核酸检测系统 SHERLOCK,该系统使用重组酶聚合酶扩增(RPA)对靶标进行扩增,极大地提高了检测的灵敏度,并在体系中加入荧光报告基团,通过产生可定量检测的信号,实现标本 DNA 和 RNA 的单碱基分辨率检测,该系统已经成功应用于检测寨卡病毒和登革病毒等^[29]。2018 年,GOOTENBERG 等^[30]开发了一种使用 Cas13、Cas12a 和 CRISPR 辅助相关酶 Csm6 的多路复用便携式核酸检测平台,称为 SHERLOCK version 2(SHERLOCK v2),与一代平台相比有以下

优点:(1)将 Cas13a 与 Csm6 联合使用增强信号,使检测灵敏度提高了 3.5 倍;(2)将等温扩增时需要的引物稀释后加入体系,避免了荧光报告基团饱和;(3)建立了基于 LFA 的便携试纸条;(4)可实现了四通道多重检测,这些优势使得 SHERLOCK v2 的应用更加便捷和广泛。之后,MYHRVOLD 等^[31]开发出 HUDSON 法,通过将病毒颗粒裂解和核糖核酸酶失活的热处理及化学处理与 SHERLOCK 相结合,可以在不经 DNA/RNA 提取和纯化步骤的情况下裂解病毒,使 SHERLOCK 可以直接从临床标本中检测病毒核酸,极大地简化了操作步骤。ARIZTI-SANZ 等^[32]将 HUDSON 进行优化开发出 SHINE 法,其可以加速标本中的病毒失活,极大提高了诊断能力。

2020 年 SARS-CoV-2 迅速传播并导致全球大流

行,虽然可以使用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)来诊断 SARS-CoV-2 感染,但由于试剂和设备的不足,在一定程度上减慢了疾病检测的速度^[33]。为了帮助推进 SARS-CoV-2 感染的诊断,JOUNG 等^[34]开发了一种基于 SHERLOCK 技术检测 SARS-CoV-2 的方案,通过使用合成的 SARS-CoV-2 RNA 片段,能够在 1 h 内完成 10^{-18} mol/L 的 SARS-CoV-2 靶序列检测。

2.3 CRISPR-Cas12 除了 Cas13,基于 II 类 V-A 型 Cas12a 也被发现具有“附带切割”活性,然而与 Cas13 不同的是,Cas12a 靶向 DNA 并“附带切割”侧支的 ssDNA^[35]。基于这一特性,CHEN 等^[36]将 Cas12a 与等温扩增结合起来建立了 DETECTR 平台,可以准确快速检测 HPV16 和 HPV18 2 种高危类型的人乳头瘤病毒(HPV),这对于识别有相关癌症风险的人群至关重要。与此同时,LI 等^[37]开发了 HOLMES 快速核酸检测系统,该平台在 Cas12a、crRNA 和靶核酸形成复合物后,Cas12a 的反式切割活性被激活,ssDNA 报告基因被切割成小片段,报告基因可以用荧光物质或生物素标记并通过生物传感器达到可视化。目前的方法中,核酸扩增和基于 CRISPR-Cas 的靶标检测是两个独立的步骤,需要将扩增产物与 Cas 检测系统混合后进行,这会造成实际应用的不便且标本间存在潜在交叉污染的可能。因此后续研究者在 DETECTR 的基础上开发出了一种称为 Cas12aVDet 的检测方法,该方法通过将等温扩增和 Cas12a 切割反应整合在一个系统中,减小了污染的可能,缩短了检测时间^[38]。BROUGHTON 等^[39]开发了一种快速检测 SARS-CoV-2 的 DETECTR 方法,该方法具有等温信号放大系统,不需要热循环,检测时间短,单核苷酸靶标特异性,可视化侧向流动条集成,不需要复杂的实验室基础设施等优点,经验证,DETECTR 检测 SARS-CoV-2 的准确性与 RT-qPCR 相当,提示该技术可以为传统检测提供一种更加便捷、可视化的新方法。AI 等^[40]利用 Cas12a 建立了一种快速检测临床标本中结核分枝杆菌的方法,称为 CRISPR-MTB,与 Xpert 方法相比,CRISPR-MTB 具有接近单拷贝的高灵敏度,需要的样品更少,并且检测周期更短。

除了 Cas12a 之外,Cas12b 也被发现具有相同的“附带切割”活性^[41]。LI 等^[42]将 CRISPR-Cas12b 和环介导等温扩增(LAMP)联合起来创建了改进版的 HOLMESv2,结合了 Cas12b 的 48 °C 高温耐受性和 LAMP 可在 42~65 °C 达到 60 min 快速扩增的优点,该系统可区分 SNP,并将核酸扩增和目标检测步骤整合到一个体系中,简化了操作程序并避免交叉污染。2019 年 TENG 等^[43]通过优化 sgRNA,开发了基于 Cas12b 的 DNA 检测方法(CDetection),这之前报道的基于 Cas12a 的检测平台相比具有更高的灵敏度和特异性,为 DNA 检测提供了一个高效且实用的平

台。之后,GUO 等^[44]通过将标本处理和核酸扩增方法与 CDetection 相结合,建立了一个集成的病毒核酸检测平台 CASdetec(即 CRISPR 辅助检测),该平台将病毒处理、核酸扩增和基于 CRISPR 的检测等程序在一个试管中运行,不需要打开盖子即可在可见光下肉眼判读结果,具有防止气溶胶污染及降低假阳性率的优点。CHEN 等^[45]基于 CRISPR-Cas12b 设计了一个乙型肝炎病毒(HBV)检测平台,称为 CRISPR-HBV,可对临床上 2 种主要的 HBV 基因型(HBV-B 和 HBV-C)进行超灵敏、高特异性和快速检测。

2.4 CRISPR-Cas14 最近,发现了一种新的 CRISPR-Cas14 系统,其中 Cas14a 可不依赖 PAM 特异性靶向 ssDNA 且体积更小,这使得 Cas14a 成为 DNA 检测的另一个优秀候选者。SAVAGE^[46]在 DETECTR 的基础上,将 Cas12a 替换成 Cas14a,开发了 Cas14-DETECTR 系统,该系统结合等温扩增通过 RPA 和 Cas14a 高效检测 DNA,可诱导切割与荧光报道分子偶联的 ssDNA 序列产生荧光信号。这种新的诊断技术已经被证明可以准确检测人类 E3 泛素蛋白连接酶(HERC2)基因,具有更强的特异性和“附带切割”活性^[47]。

3 CRISPR-Cas 技术在病原体核酸检测中的优势与局限

与传统的诊断方法相比,CRISPR-Cas 系统为病原体核酸检测提供了新的思路。许多基于 CRISPR 的核酸检测方法简单便携,不需要经过严格培训的人员及专门仪器和设备,检测时间短,读取结果简单,灵敏度高,并且能够满足 POCT 的需要,还可以检测未经处理的和浓度极低的标本,这表明基于 CRISPR-Cas 技术的核酸检测有广阔的应用前景^[48]。部分基于 CRISPR-Cas 建立的核酸检测平台及其特点见表 2。目前,传统方法依然在临床病原微生物的检测方面发挥着重要作用,作为新兴技术的 CRISPR-Cas 在核酸检测中的优势在于核酸扩增后的进一步信号放大和信号转化及输出,尤其是 Cas 蛋白特异性识别扩增产物后所激活的“附带切割”活性^[49]。

然而,CRISPR-Cas 技术也存在局限性:(1)序列限制。sgRNA 正确识别靶标位点需要 PAM 序列,虽然这在某种程度增加了系统的特异性,但也降低了靶标区域选择和 sgRNA 设计的灵活性;此外,不同种类的 CRISPR 类型和物种具有不同的 PAM 序列,这也使 sgRNA 的设计更复杂化。(2)定量分析。对于 CRISPR-Cas13a 检测系统,SHERLOCK 平台以其极高的灵敏度而备受青睐,然而,SHERLOCK 在反应开始后会迅速饱和,这使得实时准确定量非常困难,对于分子诊断,定量分析非常重要,且对于多种疾病来讲定量可能是诊断所必需的,这就需要做更多的探索来寻找量化的方法^[50]。(3)多重检测。由于信号采集策略的限制且多个检测步骤之间可能会存在干扰

和交叉反应,从而影响了灵敏度和特异性,所以多重检测仍具有相当的挑战性。(4)标准化。离子水平、环境温度、pH 值等许多因素可能会干扰效应蛋白的

裂解活性,从而使产生的信号发生变化,造成结果不准确,因此检测系统的标准化就显得更加重要^[51]。

表 2 基于 CRISPR-Cas 的核酸检测平台

效应蛋白	名称	结合方法	灵敏度	检测时间	读出方式	靶标类型	检测病原菌	参考文献
Cas9	NASBACC	NASBA	10^{-15} mol/L	≤ 3 h	肉眼比色	RNA	寨卡病毒	[22]
	Cas-EXPAR	EXPAR	10^{-18} mol/L	< 1 h	荧光信号	DNA	李斯特菌	[28]
	CASLFA	PCR/RPA	10^{-18} mol/L	1 h	荧光信号	DNA/RNA	非洲猪瘟病毒	[23]
dCas9	dCas9 based MRSA detection	FISH	10 CFU/mL	≤ 0.5 h	荧光信号	DNA	MRSA	[26]
	PC reporter	PCR	单拷贝	PCR 后 10 min	荧光信号	DNA	结核分枝杆菌	[27]
Cas13a	SHERLOCK	RPA	10^{-18} mol/L	2 h	荧光信号	DNA/RNA	寨卡病毒	[29]
	SHERLOCK v2	RPA	10^{-21} mol/L	0.5~3.0 h	荧光信号	DNA/RNA	寨卡病毒	[30]
	HUDSON + SHER-LOCK	RPA	10^{-18} mol/L	< 2 h	荧光信号	RNA	SARS-CoV-2	[31]
Cas12a	DETECTR	RPA	10^{-18} mol/L	30~40 min	荧光信号	RNA	SARS-CoV-2	[36]
	HOLMES	PCR	10^{-18} mol/L	≤ 1 h	荧光信号	DNA	乙型肝炎病毒	[37]
	Cas12aVDet	RPA	10^{-3} mol/L	≤ 30 min	肉眼比色	DNA	支原体	[38]
Cas12b	HOLMESv2	LAMP	10^{-18} mol/L	1 h	荧光信号	DNA	SARS-CoV-2	[41]
	CDetection	RPA	10^{-18} mol/L	≤ 1 h	荧光信号	DNA/RNA	HPV	[42]
	CASdetec	RT-RAA	10^4 copies/mL	25 min	荧光信号	RNA	SARS-CoV-2	[43]
Cas14a	Cas14-DETECTR	RPA	10^{-18} mol/L	1~2 h	荧光信号	DNA/RNA	HPV	[47]

注:NASBA 为核酸序列依赖性扩增技术;EXPAR 为指数扩增反应;RPA 为重组酶聚合酶扩增;CFU 为菌落形成单位。

4 总结与展望

近年来,CRISPR-Cas 系统因为其高效性、便携性和低成本的优点,在基因组编辑方面有巨大贡献,使得临床疾病的诊断和治疗发生了革命性的变化。自其“附带切割”活性被发现之后,基于 CRISPR-Cas 系统检测病原体核酸也进入高速发展期,开发的病原体检测平台逐步成为临床中的有用工具。作为一个迅速兴起的新技术,CRISPR-Cas9 技术已经被用于操作培养细胞、编辑动物和植物的基因组,极大地加快了基础研究的步伐,也使得农业和合成生物技术取得突破性进展,目前也逐步进入一个新的时代,可尝试将基因编辑技术用于患者体内的致病基因的失活或修正,这将为遗传性疾病患者提供一种全新的治疗方案^[52]。对于在 2016—2019 年基于 II 型 CRISPR-Cas 系统开发出的众多平台,通过不断衍生发展,目前可以实现对包括寨卡病毒、疟原虫、HPV、伪狂犬病毒、乙型肝炎病毒、非洲猪瘟病毒、SARS-CoV-2、HBV、人类免疫缺陷病毒(HIV)、登革热病毒、结核分枝杆菌等病原体的高效和特异性检测。同时,CRISPR-Cas 技术也可用于发现新的疾病治疗靶点和检测生物标志物,这为肿瘤的早期诊断以及临床治疗提供了更加准确的科学依据和方法。目前临床各种类型的耐

药越来越严重,包括对我国乃至全世界造成重要疫情的结核病,因此可以将 CRISPR-Cas 技术应用于临床细菌耐药性检测中,这对于缓解结核菌耐药现状,以及临床常见的耐药细菌感染至关重要。

综上所述,CRISPR-Cas 技术目前仍处于起步发展阶段,在基于 CRISPR 的核酸检测能够完全取代 PCR 等已建立的核酸检测技术之前,仍然面临诸多挑战。但是,基于 CRISPR-Cas 的平台展示了其优越的性能,给核酸检测带来了革命性变化,相信通过不断探索与改进,CRISPR-Cas 技术将拥有更大的应用潜力。

参考文献

[1] ZHU X, YAN S, YUAN F, et al. The applications of nanopore sequencing technology in pathogenic microorganism detection[J]. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2020, 2020: 6675206.

[2] BAUD D, QI X, NIELSEN-SAINTE K, et al. Real estimates of mortality following COVID-19 infection[J]. Lancet Infect Dis, 2020, 20(7): 773.

[3] RAJAPAKSHA P, ELBOURNE A, GANGADOO S, et al. A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms[J]. Analyst, 2019, 44(2): 396-411.

- [4] BHATTACHARYYA R P, THAKKU S G, HUNG D T. Harnessing CRISPR effectors for infectious disease diagnostics[J]. *ACS Infect Dis*, 2018, 4(9): 1278-1282.
- [5] KAMINSKI M M, ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, et al. CRISPR-based diagnostics[J]. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5(7): 643-656.
- [6] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONER-MANN S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. *Science*, 2016, 353(6299): eaf5573.
- [7] BOLOTIN A, QUINQUIS B, SOROKIN A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin[J]. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 8): 2551-2561.
- [8] KOONIN E V, MAKAROVA K S. CRISPR-Cas: an adaptive immunity system in prokaryotes[J]. *F1000 Biol Rep*, 2009, 1: 95.
- [9] HILLE F, RICHTER H, WONG S P, et al. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward[J]. *Cell*, 2018, 172(6): 1239-1259.
- [10] MAKAROVA K S, HAFT D H, BARRANGOU R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(6): 467-477.
- [11] MAKAROVA K S, WOLF Y I, RANZO J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18(2): 67-83.
- [12] KNOTT G J, DOUDNA J A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering[J]. *Science*, 2018, 361(6405): 866-869.
- [13] LI H, YANG Y, HONG W, et al. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 1.
- [14] PARSAEIMEHR A, EBIRIM R I, OZBAY G. CRISPR-Cas technology a new era in genomic engineering[J]. *Bio-technol Rep*, 2022, 34: e00731.
- [15] MARTIN J, KRZYSZTOF C, INES F, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 6096(337): 816-821.
- [16] NIDHI S, ANAND U, OLEKSAK P, et al. Novel CRISPR-Cas systems: an updated review of the current achievements, applications, and future research perspectives[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7): 3327.
- [17] HU J H, DAVIS K M, LIU D R. Chemical biology approaches to genome editing: understanding, controlling, and delivering programmable nucleases[J]. *Cell Chem Biol*, 2016, 23(1): 57-73.
- [18] SHMAKOV S, ABUDAYYEH OMAR O, MAKAROVA KIRA S, et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems[J]. *Mol Cell*, 2015, 60(3): 385-397.
- [19] LUCAS B H, DAVID B, JANICE S C, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes[J]. *Science*, 2018, 362(6416): 839-842.
- [20] AMAN R, MAHAS A, MAHFOUZ M. Nucleic acid detection using CRISPR/Cas biosensing technologies[J]. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(6): 1226-1233.
- [21] MARTIN J, KRZYSZTOF C, INES F, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [22] KEITH P, ALEXANDER A G, MELIISSA K, et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components[J]. *Cell*, 2016, 165(5): 1255-1266.
- [23] HUANG M, ZHOU X, WANG H, et al. CRISPR/Cas9 triggered isothermal amplification for site-specific nucleic acid detection[J]. *Anal Chem*, 2017, 7b04542.
- [24] GILBERT L A, LARSON M H, MOSUT L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes[J]. *Cell*, 2013, 154(2): 442-451.
- [25] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-1183.
- [26] GUK K, KEEM J O, HWANG S G, et al. A facile, rapid and sensitive detection of MRSA using a CRISPR-mediated DNA FISH method, antibody-like dCas9/sgRNA complex[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 95: 67-71.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] MYHRYOLD C, FREIJE C A, GOOTENBERG J S, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 444-448.
- [32] ARIZTI-SANZ J, FREIJE C A, STANTON A C, et al. Integrated sample inactivation, amplification, and Cas13-based detection of SARS-CoV-2[J]. *BioRxiv*, 2020, 28: 119131.
- [33] 杨策. 新型冠状病毒肺炎诊治——殊死搏斗中的困境与挑战[J/CD]. *中华诊断学电子杂志*, 2020, 8(1): 7-14.
- [34] 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.

- [35] LI S Y, CHENG Q X, WANG J M, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection[J]. Cell Discov, 2018, 4: 20.
- [36] 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.
- [37] LIS Y, CHENG Q X, LIU J K, et al. CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA[J]. Cell Res, 2018, 28(4): 491-493.
- [38] WANG B, WANG R, WANG D, et al. Cas12aVDe: a CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection[J]. Anal Chem, 2019, 91(19): 12156-12161.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] STRECHER J, JONES S, KOOPAL B, et al. Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 212.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] GUO L, SUN X, WANG X, et al. SARS-CoV-2 detection with CRISPR diagnostics[J]. Cell Discov, 2020, 6(1): 34.
- [45] CHEN X, TAN Y, WANG S, et al. A CRISPR-Cas12b-based platform for ultrasensitive, rapid, and highly specific detection of hepatitis B virus genotypes B and C in clinical application[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 743322.
- [46] SAVAGE D F. Cas14: big advances from small CRISPR proteins[J]. Biochemistry, 2019, 58(8): 1024-1025.
- [47] AQUINO-JARQUIN G. CRISPR-Cas14 is now part of the artillery for gene editing and molecular diagnostic[J]. Nanomedicine, 2019, 18: 428-431.
- [48] SASHITAL D G. Pathogen detection in the CRISPR-Cas era[J]. Genome Med, 2018, 10(1): 32.
- [49] 周恒, 邵艳娜, 王涓, 等. 基于 CRISPR/Cas 技术的核酸检测研究进展[J]. 微生物学报, 2021, 61(12): 3856-3869.
- [50] ZHOU L, PENG R, ZHANG R, et al. The applications of CRISPR/Cas system in molecular detection[J]. Cell Mol Med, 2018, 22(12): 5807-5815.
- [51] 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.
- [52] DOUDNA J A. The promise and challenge of therapeutic genome editing[J]. Nature, 2020, 578(7794): 229-236.

(收稿日期: 2022-11-18 修回日期: 2023-02-07)

• 综 述 •

脂肪动员过程中 3 种关键酶与肿瘤的相关性研究进展*

许 帅^{1,2}, 张 明², 高 鑫³, 任聪聪^{1,2} 综述, 赵 静^{2△} 审校

1. 河北北方学院研究生学院, 河北张家口 075000; 2. 河北省人民医院肿瘤科, 河北石家庄 050051;

3. 宁夏医科大学研究生学院, 宁夏银川 750004

摘 要: 代谢重编程是恶性肿瘤细胞的标志性特征之一。活跃的脂代谢产生大量脂质, 为肿瘤细胞提供了生物膜结构的基本原料分子、营养支持和能量供给, 并合成多种促癌信号分子, 从而促进肿瘤细胞的生长增殖、迁移及侵袭。脂肪动员是脂肪分解的第一步, 该过程中关键酶的表达异常, 是脂代谢重编程的重要组成部分。研究发现, 脂肪动员通路中的关键酶脂肪甘油三酯脂肪酶(ATGL)、激素敏感脂肪酶(HSL)和单酰甘油脂肪酶(MAGL)在多种恶性实体瘤表达异常, 并且通过干预这些酶的表达能够显著改善肿瘤细胞的恶性生物学行为。因此, 通过靶向脂肪动员通路中的关键酶, 改善肿瘤细胞的脂代谢重编程从而产生抗肿瘤作用, 有望为肿瘤治疗提供新的靶点和方向。作者综述了脂肪动员过程中的 3 种关键酶与肿瘤的相关性, 探索抗肿瘤治疗的新理论, 为开展相关性研究提供依据。

关键词: 脂肪动员; 脂肪甘油三酯脂肪酶; 激素敏感脂肪酶; 单酰甘油脂肪酶**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.10.023**中图法分类号:** R542.2**文章编号:** 1673-4130(2023)10-1265-05**文献标志码:** A

* 基金项目: 河北省人才工程培养项目(A201903002); 河北省医学科学研究重点课题(20180013)。

△ 通信作者, E-mail: zzzjmail@163.com。