



基于 CRISPR/Cas 系统的核酸生物传感器*

陈思^{1)**} 林昱坤^{1)**} 宋春燕¹⁾ 只帅¹⁾ 李毅^{2)***} 杨丹婷^{1)***}

¹⁾ 宁波大学医学部公共卫生学院, 浙江省病理生理学技术研究重点实验室, 宁波 315211;

²⁾ ARC Centre of Excellence in Nanoscale Biophotonics, University of New South Wales, Sydney 2052, Australia)

摘要 近年来, CRISPR/Cas 系统已经成为转录调控和基因组编辑的重要工具。除了在基因编辑领域的贡献, CRISPR/Cas 系统独特的靶核酸顺式切割和非特异性单链核酸反式切割能力, 在开发核酸检测的新型生物传感器方面展现出巨大潜力。构建基于 CRISPR/Cas 系统高灵敏度生物传感器的关键通常依赖其与不同信号扩增策略, 诸如核酸扩增技术或特定信号转导方法的结合。基于此, 本文旨在通过介绍不同类型的 CRISPR/Cas 系统, 全面概述基于该系统的核酸检测生物传感器的研究进展, 并重点对结合核酸扩增技术 (PCR、LAMP、RCA、RPA 和 EXPAR)、灵敏的信号转导方法 (电化学和表面增强拉曼光谱) 和特殊结构设计生物传感器的三大类型信号放大策略的 CRISPR/Cas 生物传感器进行总结和评论。最后, 本文对目前的挑战以及未来的前景进行展望。

关键词 CRISPR/Cas 系统, 核酸检测, 生物传感器, 核酸扩增技术, 电化学, 表面增强拉曼光谱

中图分类号 Q81, R115

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0348

CRISPR/Cas 系统 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins) 是由成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 和 CRISPR 关联蛋白 (Cas) 组成的原核适应性免疫系统, 存在于大多数古菌和许多细菌中, 于 1987 年由 Ishino 等^[1] 在大肠杆菌中发现, 2002 年被 Jansen 等^[2] 正式命名。CRISPR/Cas 系统作为基因编辑工具被广泛应用于生物、医学、农业等多个领域^[3-4]。随着研究者对 CRISPR/Cas 系统特异性识别靶标功能的深入研究, CRISPR/Cas 系统在核酸检测领域开启了新的应用大门。目前已发表的基于 CRISPR/Cas 系统核酸检测的综述^[5-10], 主要围绕其与基于荧光、电化学和比色法结合的传感器进行介绍, 少有结合表面增强拉曼光谱技术的进展综述, 同时缺乏针对核酸检测系统中提高检测灵敏度策略的分类、归纳和对比。基于此, 本文从提高 CRISPR/Cas 系统核酸检测灵敏度的 3 种策略 (利用增加检测靶标量的核酸扩增技术; 利用高灵敏信号转导的电化学和表面增强拉曼光谱方法; 利用传感器的特殊结构设计) 入手, 对基于这 3 种方式的 CRISPR/Cas 系统核酸检测生物传感器的最新

研究进展进行了综述、总结和评论, 以期针对核酸检测的新一代 CRISPR/Cas 生物传感器检测新方法的开发提供参考。

1 CRISPR/Cas 系统的分类

CRISPR/Cas 系统可分为 1 类系统和 2 类系统两大类群 (表 1)。1 类系统包括 I (Cas3)、III (Cas10) 和 IV (Csf1) 型, 由多个效应蛋白发挥作用; 2 类系统包括 II (Cas9)、V (Cas12) 和 VI (Cas13) 型, 仅需依靠单个蛋白质发挥作用, 操作简单高效, 可被广泛用于核酸检测的生物传感器研究^[11-12]。这里对广泛使用的 3 种用于核酸检测的蛋白质 Cas9、Cas12 和 Cas13 进行介绍。

* 浙江省自然科学基金 (LY23H260002), 国家自然科学基金 (82073514), 浙江省省属高校基本科研业务费专项资金 (SJLY2021009), 宁波大学研究生科研创新基金 (IF2022189) 和宁波大学王宽诚基金资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

杨丹婷 Tel: 0574-87609894, E-mail: yangdanting@nbu.edu.cn

李毅 Tel: 61-452-660-629, E-mail: yi.li6@unsw.edu.au

收稿日期: 2022-07-27, 接受日期: 2022-10-19

Table 1 Types of CRISPR/Cas systems [11, 13-18]

表1 CRISPR/Cas系统的分类 [11, 13-18]

名称	特征基因	亚型	特征蛋白	体外特性	识别核酸类型	反式切割活性
I型	<i>cas3</i>	I-A~I-F、I-U	Cas3	切割靶DNA	dsDNA	无
II型	<i>cas9</i>	II-A~II-C	Cas9	切割靶DNA	dsDNA	无
III型	<i>cas10</i>	III-A~II-F	Cas10	识别靶DNA转录出的mRNA, 非特异性切割ssDNA	mRNA	有
IV型	<i>csf1</i>	IV-A、IV-B	Csf1	尚未明确	尚未明确	尚未明确
V型	<i>cpf1</i>	V-A~V-I、V-U	Cas12a	切割靶DNA, 非特异性切割ssDNA	dsDNA/ssDNA	有
	<i>c2c1</i>		Cas12b	切割靶DNA, 非特异性切割ssDNA	dsDNA/ssDNA	有
VI型	<i>c2c2</i>		Cas13	切割靶RNA, 非特异性切割ssRNA	ssRNA	有

Cas9蛋白是目前被研究最为广泛的效应蛋白(图1a),能够对双链DNA(double-strand DNA, dsDNA)进行定点编辑。其crRNA(CRISPR RNA)和反式作用crRNA(trans-activating CRISPR RNA, tracrRNA)中的重复序列杂交构成单向导RNA(single guide RNA, sgRNA),与Cas9蛋白形成sgRNA-Cas9复合物。在靶标核酸出现后,sgRNA-Cas9复合物可定位到靶序列的前间隔序列邻近基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)位点,使靶标序列dsDNA被部分打开,crRNA与互补链杂交,Cas9蛋白中的HNH(His-Asn-His)结构域切割杂交DNA链,RuvC结构域切割游离链,造成目标DNA的断裂。此外,Cas9蛋白的另一种形式,核酸酶缺陷型Cas9(deactivated Cas9, dCas9)在酶切活性失活后也具

备特异性的序列结合能力^[19]。两种类型Cas9蛋白均可用于核酸检测的生物传感器开发。

Cas12蛋白包括Cas12a、Cas12b和Cas12f等10个亚型^[13]。Cas12由crRNA和Cas12核酸酶组成,与Cas9不同,它只包含一个RuvC结构域。在crRNA的引导下,Cas12a蛋白可以利用RuvC结构域识别PAM序列,特异性切割dsDNA或单链DNA(single-stranded DNA, ssDNA),同时激活非特异性的ssDNA反式切割功能^[5](图1b)。Cas12f(Cas14)蛋白的大小仅为目前已知的2类Cas蛋白的一半^[20],和Cas12a类似,Cas12f识别靶标也可触发非特异性ssDNA反式切割活性,但其不需要PAM激活就能够实现靶向ssDNA的切割^[12](图1c)。Cas12f与ssDNA靶标结合的特异性比Cas12a更高,因而更适用于开发需达到单碱基分

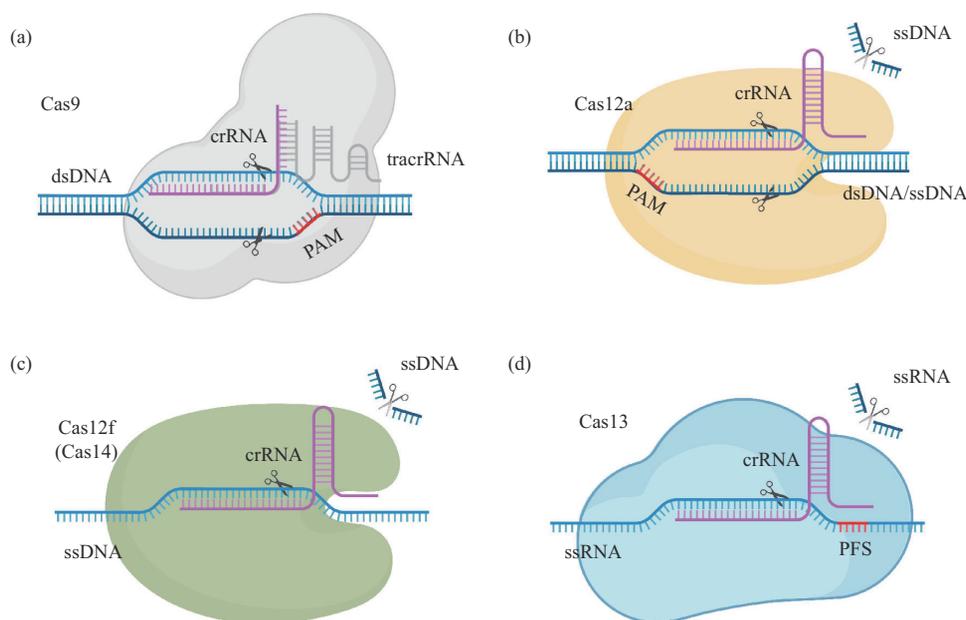


Fig. 1 Fundamental components of CRISPR/Cas9, CRISPR/Cas12a, CRISPR/Cas12f and CRISPR/Cas13

图1 CRISPR/Cas9、CRISPR/Cas12a、CRISPR/Cas12f和CRISPR/Cas13结构示意图

辨率的检测方法。例如，基于Cas12f开发的一种单核苷酸多态性基因分型系统（Cas14-DETECTR），可实现蓝眼和褐眼两种基因的鉴别^[21]。

Cas13蛋白是一种独特的蛋白质，与Cas9和Cas12靶向DNA不同，Cas13仅靶向切割单链RNA（single strand RNA, ssRNA）^[22]（图1d）。另外，Cas13识别目标RNA依赖的不是PAM序列，而是前间隔序列侧翼位点（protospacer flanking site, PFS）。Cas13有两个通过构象变化结合在一起的HEPN（higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding）结构域^[23]，当与Cas13 crRNA间隔区互补的ssRNA序列存在时^[24]，Cas13的HEPN结构域则会启动Cas13的顺式和反式切割活性，实现靶标序列ssRNA以及附近任意非特异性ssRNA的切割^[25]。Cas13a蛋白的应用最广，其混杂切割RNA的能力^[26]，已被开发为体外高度灵敏的核酸检测工具。

CRISPR/Cas系统所具备的特异性序列识别能力，以及非特异性切割的信号扩增特性，使其可根据不同核酸检测需求进行设计和选择，在开发下一代新型生物传感器方面具有显著的潜力。

2 基于CRISPR/Cas系统的核酸检测生物传感器

第一个基于CRISPR/Cas系统的生物传感方法

是Gootenberg课题组2017年基于Cas13a蛋白设计的SHERLOCK（specific high sensitivity enzymatic reporter UnLOCKing）方法^[27]，该方法利用了Cas13a蛋白的靶向和非靶向的ssRNA切割活性，非靶向的ssRNA反式切割产生信号放大效应^[28]，可用于检测特定的寨卡病毒和登革病毒株，区分病原菌，对人类DNA进行基因分型以及鉴定肿瘤DNA突变^[27]。随着DNA靶向效应蛋白Cas12a反式切割活性的发现，CRISPR/Cas系统对DNA的检测得到了发展^[29]。这一节将根据基于CRISPR/Cas系统的核酸检测生物传感器提高检测灵敏度的3种不同策略（与增加检测靶标量的核酸扩增技术联用；与电化学、表面增强拉曼光谱等高灵敏信号转导方式联用；与特殊结构设计的传感器联用），对CRISPR/Cas核酸检测生物传感器的应用进行分类讨论。

2.1 与核酸扩增策略联用实现高灵敏度核酸检测

常用的核酸扩增策略诸如聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR）、滚动循环扩增（rolling circular amplification, RCA）、环介导等温扩增（loop-mediated isothermal amplification, LAMP）、指数扩增反应（exponential amplification reaction, EXPAR）和重组酶聚合酶扩增（recombinase polymerase amplification, RPA）等（表2）常与CRISPR/Cas系统结合^[30]，以实现信号增强，提高检测灵敏度。

Table 2 Nucleic acid amplification techniques—CRISPR methods

表2 核酸扩增—CRISPR方法

名称	扩增效率	温度	优点	缺点	参考文献
PCR	1~2 h: 10^7	95°C、60°C、72°C	引物设计简单；价格低廉；灵敏度和特异性高	反应需进行温度调节；反应时间长；需要精密的仪器和熟练的操作人员；受PCR抑制剂的影响，需要对模板DNA进行纯化；需通过琼脂糖凝胶电泳对产物进行结果判读	[31-36]
RCA	1.5 h: 10^9	37°C	反应温度低且不需要温度调节；特异性高，灵敏度高	可能产生线性多聚副产物；产物长期存储会导致组分分子内部和成分分子之间的非特异性交联，导致大规模生产和存储困难；仅用于环状核酸	[37-40]
LAMP	15~60 min: 10^9 ~ 10^{10}	60~65°C	不需要温度调节；扩增不受非靶DNA含量的显著影响；产物形成茎环结构，易于检测和选择；特异性高，灵敏度高	引物设计复杂；产物回收测序困难，不能用来克隆；假阳性率高	[33, 41-42]
RPA	10~20 min: 10^{12}	37~42°C	反应温度低；操作容易不需要热循环；扩增时间短；背景噪声低；核心试剂易于保存；特异性高，灵敏度高	会产生非特异性扩增；需要使用ATP为重组酶供能；需三种酶，操作复杂；需要纯化和蛋白设计；引物较长不适用于短序列核酸检测；产物需要专门荧光检测仪器来检测	[32-33, 38, 41, 43]

续表2

名称	扩增效率	温度	优点	缺点	参考文献
EXPAR	30 min: 10 ⁶ ~10 ⁸	~60°C	扩增速度快; 扩增效率高	会产生非特异性的扩增; 反应机制复杂, 产物产量易受扩增模板限制, 后期从指数扩增转变为线性扩增	[39, 44-45]

PCR是以母链DNA为模板,在DNA聚合酶的催化下,以特定引物为延伸点,通过变性、退火、延伸等步骤复制出与母链DNA互补的子链DNA的过程^[31]。作为最常用的核酸扩增方法,PCR已被用于多种病毒和细菌的检测。Tsou等^[46]证明,将CRISPR/Cas12a系统与PCR结合,可在不到3 h的时间内实现H1975癌细胞基因组DNA中两个EGFR杂合突变(L858R和T790M)的检测,用时是液滴数字PCR(droplet digital PCR)的一半,可检出的突变等位基因频率最小值为0.005%,ddPCR检测限的1/10(图2a)。Liang等^[47]通过设计PCR引物,在靶标突变位点附近引入CRISPR/Cas12a的PAM序列,可以在没有PAM序列的情况下检测到严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus2, SARS-CoV-2)的标志性尖峰蛋白突变。Wu等^[48]开发了一种结合PCR和Cas12a的横向流动试纸条生物传感器(lateral flow biosensor, LFB),可实现肉眼观测的7种类型非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)的同步检测。他们首先用PCR对含有ASFV的样品进行预扩增,然后通过crRNA的靶标识别触发Cas12a对ssDNA报告基因的反式切割,导致报告基因不能与LFB检测线上的互补DNA杂交,这种效应可通过LFB用肉眼观察到,方法简单。Peng等^[49]利用CRISPR/Cas12a系统的可编程性、序列特异性识别和高碱基分辨优势构造了3个双输入的基本AND、OR、INHIBIT逻辑门,利用CRISPR/Cas12a的序列可寻址能力使该AND逻辑门能够准确地追溯和区分输入基因,在利用PCR进行靶扩增后可实现对金黄色葡萄球菌的检测,动态范围为10³~10⁷ CFU/ml。Zhang等^[50]利用微型热循环仪,结合PCR与CRISPR/Cas12a系统,开发出一种用于副溶血弧菌检测的方法,该方法可达到102拷贝/μl的检测灵敏度。为了减少PCR扩增和CRISPR/Cas检测两步反应过程中可能造成的试剂污染,Wang等^[19]提出了一种使用毛细管一锅法快速实现PCR和Cas12a酶切结合的方法,检测可在10 min内对最低1.28拷贝的目标序列产生明亮的荧

光,并可通过比色反应实现肉眼检测。尽管PCR法能够大大提高CRISPR/Cas系统的灵敏度,但利用PCR法进行扩增需要专门的设备,昂贵的试剂、训练有素的人员以及较长的周转时间^[31-32, 51],不利于CRISPR/Cas12a系统在现场检测的应用。为了克服以上困难,无需特殊温度调节的等温扩增方法诸如RCA、LAMP、RPA等,更适用于即时检测(point-of-care-testing, POCT)技术的开发。

RCA是以环状ssDNA为模板通过一个短的DNA引物(与部分环状模板互补),在DNA聚合酶催化下将脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphates, dNTPs)转变成包含成百上千个重复模板互补片段ssDNA的过程^[44]。Wang等^[52]构建的RCA辅助CRISPR/Cas9平台能够特异性识别RCA扩增长链ssDNA,激活CRISPR/Cas9对探针信号分子的切割活性,通过记录荧光变化实现恒温下细胞外小泡(extracellular vesicle, EV)来源的微小RNA(microRNA, miRNA)高特异性检测(图2b)。Xu等^[37]研究出一种将双适配体与RCA辅助CRISPR/Cas12a技术相结合检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的方法,两种适配体分别用于捕获细菌和进行RCA扩增。研究表明,此方法不仅可以特异性识别细菌表面上的蛋白质靶标,还可以将蛋白质识别转化为核酸信号,获得双倍的核酸信号扩增。Zhang等^[53]利用RCA和PCR扩增目的基因,并通过CRISPR/Cas13a辅助荧光读出系统进行检测,可检测到1拷贝/μl的乙肝病毒共价闭合环状DNA(hepatitis B virus covalently closed circular DNA, HBVcccDNA)。然而,与定量PCR和液滴数字PCR方法相比,该方法对于cccDNA的定量是非线性的,需要进一步优化。

LAMP使用4~6个引物互补于6~8个不同的目标序列,可实现高度的靶向特异性^[42]。LAMP与CRISPR/Cas的联合应用涉及多种Cas蛋白。比如Song等^[54]开发了一种结合LAMP、CRISPR/Cas9和比色反应的方法,Cas9的应用可以消除LAMP产物的假阳性信号,以实现SARS-CoV-2及其变

异基因的1 h内检测,并且在136个临床样本检测的盲法实验中,检测敏感度和特异性都能达到100%,该实验使用比色法,使结果可直接用肉眼观察到,方便直观。Wu等^[55]以含有CaMV35S启动子的转基因大豆粉为检测对象,将CRISPR/Cas体系直接与LAMP扩增产物在37°C下混合5 min,在紫外光下肉眼可清楚地识别检测结果。同年该课题组^[56]还提出了一种基于CRISPR/Cas12a的便携式生物传感器(Cas12a-PB),该装置具有3个通道和3个检测室,将其与LAMP结合可实现对转基因大豆粉中CaMV35S启动子和凝集素基因的荧光检测与裸眼的双重检测,方便携带(图2c)。为了实现对RNA的检测,Wang等^[57]提出了一种结合反转录(reverse transcription, RT)-LAMP和Cas12a的SARS-CoV-2一锅法可视化检测方法,可在45 min内完成对SARS-CoV-2的检测,并达到接近单分子水平的检测灵敏度。Ali等^[44]开发的一种名为iSCAN的高灵敏SARS-CoV-2核酸检测平台,同样可以在45 min获取可靠的SARS-CoV-2阳性信号。Mahas等^[58]识别出一种新的Cas13变体,并将其命名为微型Cas13(miniature Cas13, mCas13),通过mCas13与RT-LAMP的结合,使用STOPCovid策略中的引物设计方法,可在1 h内检测到低至4拷贝/ μl 的SARS-CoV-2。

RPA是一种依赖于重组酶、单链结合蛋白和DNA聚合酶实现的等温核酸扩增技术^[33]。RPA和Cas12a也可用来开发一锅法检测,与上述基于RT-LAMP的一锅法检测相比,该方法用时更短,仅需5~30 min^[59-60]。例如Feng等^[59]将RT、RPA和Cas12a介导的检测集成在一个试管中,实现了单一温度(40°C)下的快速灵敏RNA检测,检测结果可在紫外光下直接可视化,或通过便携式荧光读取器进行半定量读数检测。Tsou等^[31]开发了一种结合RPA、CRISPR/Cas12a与LFB的检测方法,直接靶向血浆进行循环人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV) DNA检测,并可以通过肉眼立即读取结果,检测限与PCR相同,达到0.24 fmol/L,但所需时间更短,在3 h内就可完成。这种方法还可用于监测和追踪其他核酸的感染性和非感染性体液疾病(图2d)。RPA除去可辅助Cas12蛋白实现DNA检测,还可辅助基于CRISPR/Cas13系统的检测,Khan等^[61]先利用RPA法对犬细小病毒2型(Canine parvovirus type 2, CPV-2) DNA进行转录与扩增,再利用Cas13a进行检测,可在

30 min内达到100 amol/L的检测灵敏度。Cao等^[62]开发了一种结合RPA、CRISPR/Cas13a与LFB的SARS-CoV-2检测方法,此外,还设计了一种带有微流控芯片的荧光分析仪,一块芯片可同时检测两个样品,以实现高通量和快速检测。

EXPAR以含两段重复序列的对称DNA为模板,目标序列与模板的3'端互补杂交后,在聚合酶的作用下沿模板延伸;延伸出的dsDNA被切口酶识别并切割后,在DNA聚合酶的链置换作用下被释放出来,进一步与另一条模板的3'端进行杂交和扩增,形成指数形式的扩增^[63]。与其他等温扩增方法相比,EXPAR具有明显的扩增效率高、速度快的优点。Huang等^[64]建立了一种CRISPR/Cas9触发等温指数扩增反应(CAS-EXPAR)新方法。该方法以CRISPR/Cas9剪切产生的目的DNA片段为引物进行循环扩增反应,产生大量DNA复制产物,并采用实时荧光法进行监测,适用于DNA、RNA和甲基化DNA等多种核酸检测。Wang等^[65]建立了一种PAMmer辅助CRISPR/Cas9系统介导的G4-EXPAR(Cas-G4EX)策略,用于ssRNA和ssDNA的位点特异性检测。CRISPR/Cas9切割目标ssRNA或ssDNA产生的产物片段作为引物激活EXPAR反应,富含G的EXPAR产物与氯化血红素组装形成G-四链(G4/氯化血红素),G4/氯化血红素催化2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS)-H₂O₂体系产生鲜艳绿色,可实现肉眼分析(图2e)。Hang等^[66]将无逆转录(reverse transcription-free, RTF)-EXPAR与CRISPR/Cas12a联用,实现了对SARS-CoV-2 RNA的超灵敏检测,终点荧光读出方式的检测下限为3.77 amol/L(~2 拷贝/ μl),智能手机辅助分析系统的检测下限为4.81 amol/L(~3 拷贝/ μl)。与上述结合RT-RPA和RT-LAMP的SARS-CoV-2检测方法相比,该方法拥有更高的检测灵敏度^[44, 59]。

2.2 结合高灵敏信号转导技术的核酸检测生物传感器

2.2.1 结合电化学技术的核酸检测生物传感器

CRISPR/Cas体系增强的电化学方法被认为是一类新型的分析生物传感器,由于对各种生物靶标具有基于高选择性亲和力的相互作用,因而得到广泛应用。CRISPR/Cas体系与电化学的结合通常是将具有电化学活性的底物通过ssDNA连接到电极上,CRISPR/Cas工具切割单链DNA,在电化学信

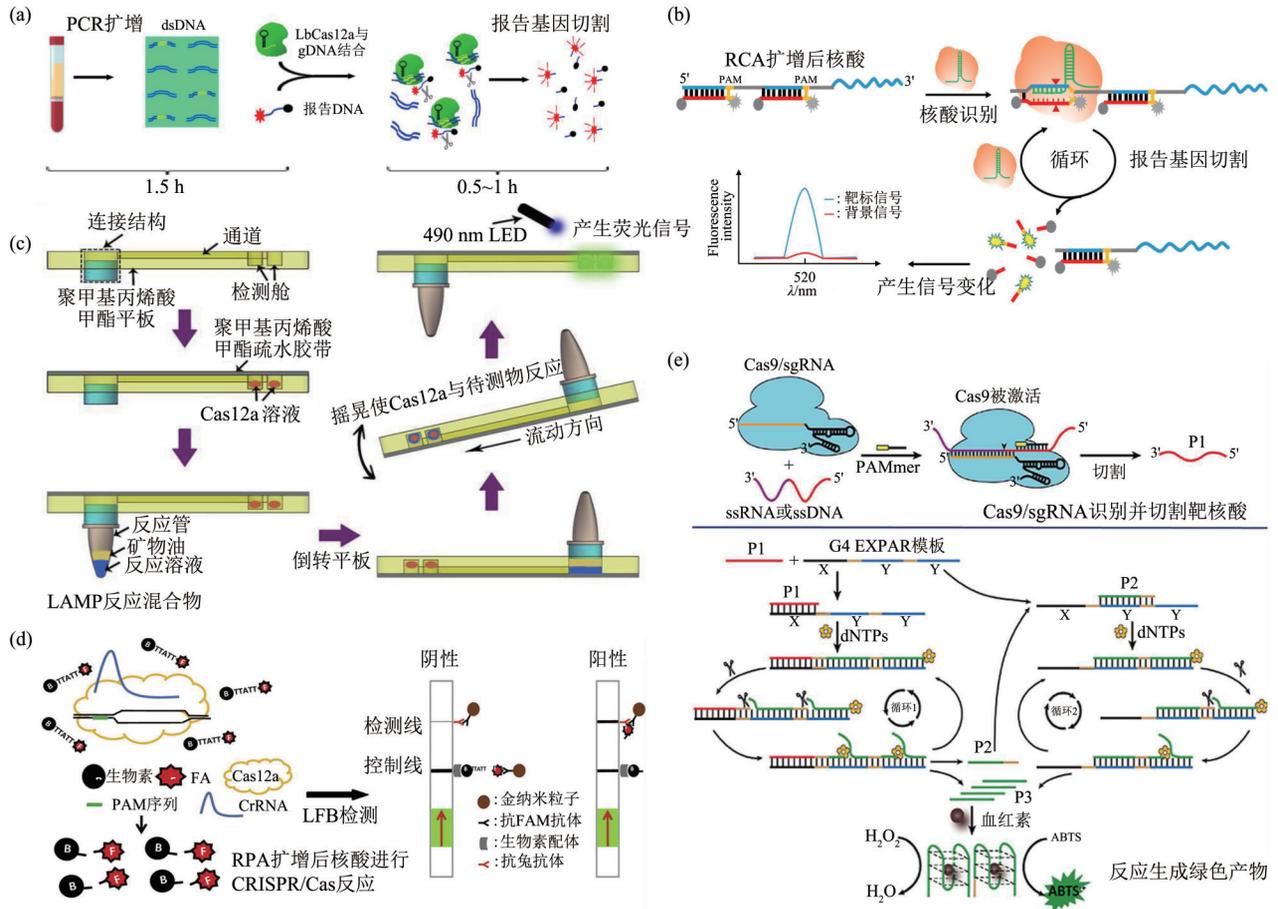


Fig. 2 CRISPR/Cas combined with nucleic acid amplification technology for super sensitive nucleic acid detection

图2 CRISPR/Cas系统与核酸扩增技术联用于核酸的超灵敏检测

(a) CRISPR/Cas12a结合PCR检测EGFR杂合突变^[46]; (b) RACE检测示意图^[52]; (c) Cas12a-PB检测原理图^[56]; (d) 结合RPA、CRISPR/Cas12a与LFB检测HPV示意图^[31]; (e) Cas-G4EX策略检测示意图^[65]。

号中产生可测量的变化^[67]。Xu等^[68]开发了一种CRISPR增强型电化学DNA (electrochemical DNA, E-DNA) 传感器, 在不需核酸扩增的情况下, 可实现对细小病毒fmol/L的检测限, 创新性地推动了CRISPR生物传感器的发展(图3a)。Hajian等^[69]发明了一种CRISPR增强型石墨烯基场效应晶体管(graphene-based field-effect transistor, gFET), 称为CRISPR-Chip。这种CRISPR-Chip结合了CRISPR/Cas9的基因靶向能力和gFET的灵敏检测能力, 可在无需核酸扩增的情况下, 达到1.7 fmol/L的检测灵敏度, 输出信号可以用手持阅读器测量。Uygun等^[70]利用dCas9-sgRNA修饰的氧化石墨烯丝网印刷电极(GPHOXE)作为生物识别受体, 实现了循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)的免标记检测。在40 s内, dCas9-sgRNA修饰的生物传感器

对120 bp的ctDNA呈现出良好的线性关系, 检出范围为2~20 nmol/L, 定量限为1.92 nmol/L。对实际血样进行选择性和重复性研究, 回收率大于96%(图3c)。Zamani等^[71]利用CRISPR/Cas12a与电化学传感器的结合, 并通过LAMP技术扩增病毒基因, 实现了对人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、HPV-16、HPV-18的检测, 对于HPV-16和HPV-18可达到 1.2×10^4 拷贝/ μ l的检测灵敏度。Liu等^[72]针对无扩增的HPV-16 DNA设计了一种基于Cas12a的电化学发光生物传感器, 利用Cas12a的特异性识别和反式切割能力实现特异性增强和信号放大, 利用1-甲硫氨酸稳定金纳米团簇(Met-AuNCs)作为高效电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)元件实现ECL信号转换。这种基于Cas12a的ECL生物传感器具有较高的选择性, 实现了对未稀释人体血液样品

HPV-16的检测。电化学传感器结合靶向RNA的Cas酶, 可实现对RNA的高灵敏度检测。Bruch等^[73]介绍了一种用于现场检测的CRISPR/Cas13a驱动微流控集成电化学生物传感器, 实现了对潜在的肿瘤标志物miRNA-19b和miRNA-20a的量化。Cui等^[74]将CRISPR/Cas13a系统与催化发夹组装(catalytic hairpin assembly, CHA)相结合, 开发了一种适用于miRNA-21检测的超灵敏电化学分析方法。在miRNA-21存在的情况下, 它会与Cas13a/crRNA双链的间隔区杂交, 激活CRISPR/Cas13a系统的切割活性, 导致CHA引发剂的释放, 两个发夹相互杂交形成双链结构, 从而使触发器循环, 使电化学信号放大百倍。此外, 与适配体的联用扩大了基于CRISPR/Cas12a电化学传感器的应用范围, 可实现对非核酸的检测^[75-77]。

2.2.2 结合表面增强拉曼光谱技术的核酸检测生物传感器

表面增强拉曼光谱(surface-enhanced Raman scattering, SERS)是指当一些分子被吸附到某些粗糙的金属(如金、银、铜等)表面上时, 它们的拉曼散射强度会增加 $10^4\sim 10^6$ 倍^[78]。基于SERS的生物传感器可以对极少的样品(低至几微升)进行检测并展现出极高的灵敏度(可至单分子), 目前文献报道的SERS与CRISPR/Cas系统的结合主要是针对病毒及细菌的检测。Kim等^[79]将CRISPR/dCas9系统与具有SERS活性的金包磁性纳米粒子(Au coated magnetic nanoparticles, AuMNPs)结合, 开发了一种CRISPR/dCas9介导的超级细菌检测方法。利用这种方法, 可以在不需要扩增和纯化核酸的条件下检测多药耐药金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌和肺炎克雷伯菌的基因, 并可达到fmol/L级别的检测限。该方法也提示可以通过选择不同的CRISPR/Cas蛋白和gRNA实现其他细菌、病毒、癌症和遗传疾病的检测(图3b)。Liang等^[80]开发了一种CRISPR/Cas12a结合拉曼换能器的免扩增诊断平台, 称为SERS-CRISPR(S-CRISPR)。使用该平台检测从鼻咽拭子标本($n=112$)中提取的RNA提取液中的SARS-CoV-2衍生核酸, 可在30~40 min内完成。S-CRISPR的灵敏度和特异性分别达到RT-qPCR的87.50%和100%。Pang等^[81]结合侧向流动分析(lateral flow assay, LFA)、SERS与CRISPR/Cas12a可直接无扩增定量检测HIV-1 dsDNA, 检测限为0.3 fmol/L, 比传统的比色LFA方法低近4个数量级。而且, 基于Cas12a的靶点特

异性, HIV-1单基因耐药突变(M184V)的识别率最低可达0.01%。Yin等^[82]设计了一种DNA/RNA嵌合发夹探针, 并将其引入CRISPR/Cas12a/SERS集成系统中, 该系统的SERS探针用AuNPs作为核心, 包裹着4-巯基苯甲酸的AuNPs通过部分互补的DNA对(DNA1/DNA2)连接在其周围。在靶DNA存在的情况下, CRISPR/Cas12a被激活, 立即切割发夹探针释放大量RNA, 释放的RNA与DNA1完全互补, 导致连接DNA2的周围AuNPs从核心AuNPs表面分离出来, 以产生SERS信号的变化, 用于超灵敏、高选择性和无扩增的核酸检测。

此外, 将SERS的高灵敏度检测能力与核酸扩增技术相结合, 可达到更低检测限。比如Liu等^[83]提出了一种将CRISPR/Cas12a、LAMP与SERS相结合的核酸检测策略, 该策略利用CRISPR/Cas12a系统的反式切割活性来捕获负载4-硝基硫苯酚(4-nitrothiophenol, 4-NTP)和半胱氨酸两种信号分子的脂质体, 可以实现SERS和肉眼对靶DNA的双重检测, 并分别检测到低至100 amol/L和10 pmol/L的SERS和可视化信号(图3d)。Pan等^[84]将普鲁士蓝纳米颗粒(prussian blue nanoparticles, PB NPs)修饰的ssDNA探针固定在微孔板上, LAMP扩增后靶标识别激活的CRISPR/Cas12a反式切割能够移除部分PB NPs, 对剩余的PB NPs进行碱处理可生成能产生特征拉曼峰的铁氰化物阴离子($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$)。通过这种方法, 能够达到对牛奶DNA的224 amol/L检测限。Zhuang等^[85]结合CRISPR/Cas12a、SERS与RPA扩增技术, 设计了一种微流控纸质分析仪(μPAD), 简称RPA-Cas12a- μPAD 。这种分析仪可实现对鼠伤寒沙门氏菌的高灵敏度检测, 能够在45 min内达到3~4 CFU/ml的检测限。

2.3 利用传感器特殊结构设计提高核酸检测灵敏度

除了上述两种方法, 还有一部分研究是通过结合特殊设计的传感器(包括利用信号转化中的特殊结构设计和结合一些非常规的辅助检测设备)以达到很高的检测灵敏度。信号转化中的特殊设计包括利用毛细管、微流控、微阵列等结构放大反应产生的效应, 从而增大检测的灵敏度。比如Hass等^[86]设计的全集成微柱聚二甲基硅氧烷CRISPR检测(IMPACT)系统用于ASFV DNA的检测。将CRISPR/Cas12a-crRNA复合物注入经过表面修饰和探针固定化的全封闭高纵横比微柱通道, 这种微

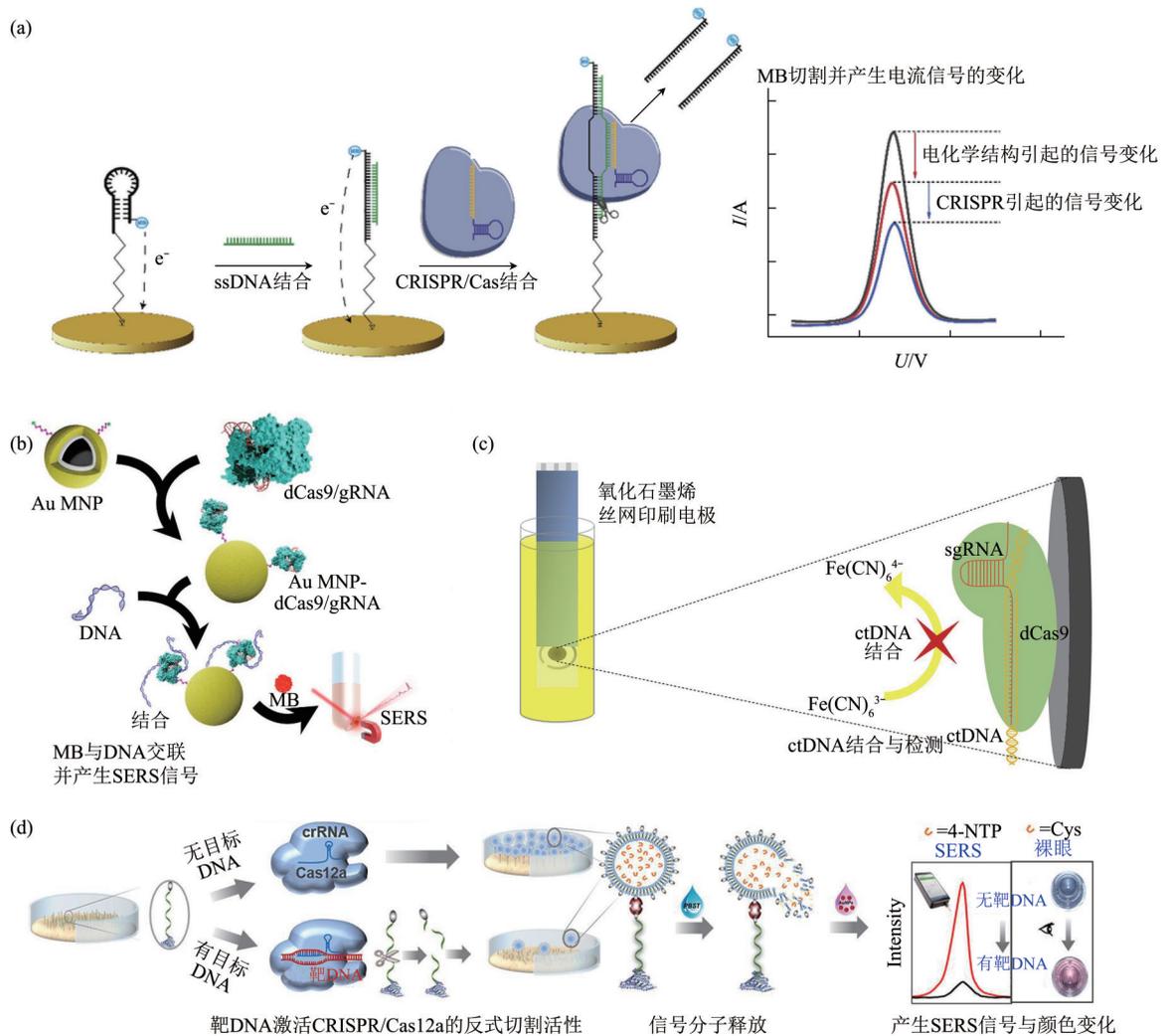


Fig. 3 CRISPR/Cas combined with signal transduction technology biosensors for nucleic acid detection

图3 CRISPR/Cas系统与信号转导技术联用的核酸检测生物传感器

(a) CRISPR增强型E-DNA传感器的原理^[68]; (b) CRISPR介导的SERS检测方法^[79]; (c) dCas9-sgRNA修饰的GPHOXE检测ctDNA原理图^[70]; (d) CRISPR/Cas12a介导的脂质体扩增策略用于SERS和肉眼检测靶核酸检测示意图^[7]。

柱通道对 ssDNA 报告基团具有强结合力, 当靶标存在时, Cas12a 酶被激活并切割微柱上的 ssDNA 报告基团, 产生荧光信号的变化, 其强度与靶标浓度成线性比例。该系统能够在 120 min 内灵敏、准确地检测 DNA。对于辅助检测设备的应用, Hu 等^[87] 开发了一种基于 DNA 模板化铜纳米粒子 (copper nanoparticles, Cu NPs) 和 CRISPR/Cas9 的免标记检测方法, 该方法使用电感耦合等离子体质谱 (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICPMS) 识别靶标 poly (AT-TA) 处合成的 Cu NPs 并进行分析。ICPMS 具有万亿分之一级的灵敏度、9 个数量级的动态范围以及可追溯到初级 SI 单位的

准确定量能力, 可实现单碱基突变的快速灵敏检测 (图 4a)。Katzmeier 等^[26] 设计了一种基于 Cas13a 的体外转录和核酸检测低成本微型荧光阅读器, 该传感器使用扁平墨盒来最大限度地收集发射光, 使用经济高效的硫化镉光敏电阻作为光传感器, 并建立了一套校准程序, 可实现目标 RNA 的序列特异性检测, 检测限为 3.7 nmol/L (图 4b)。利用 DNA 探针与纳米粒子的特殊交联, 并将其与 CRISPR/Cas 系统的反式切割活性结合, 也可以得到令人惊喜的效果, 比如 Yu 等^[88] 和 Choi 等^[89] 用这种模式设计的传感器可分别达到 0.34 fmol/L 和 3.1×10⁻⁵ U/ml 的检测灵敏度。

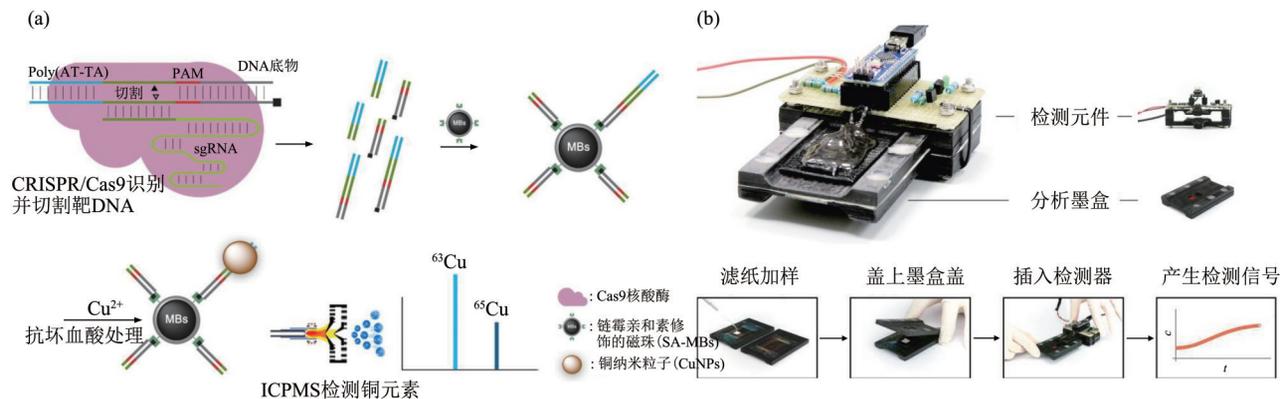


Fig. 4 CRISPR/Cas combined with specially designed sensors for super sensitive nucleic acid detection

图4 CRISPR/Cas系统与特殊设计传感器联用以实现超灵敏核酸检测

(a) 免标记CRISPR/Cas9与ICPMS结合检测原理^[87]; (b) 扁平墨盒助力的荧光阅读器部件构成及其工作流程图^[26]。

表3列出了本文中提到的核酸检测生物传感器的具体信息(包括提高灵敏度最主要方式、效应蛋白、检测限、核酸扩增时间、信号输出时间、传感器类型与信号读出系统、靶标类型以及检测样品等)。

3 总结与展望

作为当下最常用的基因编辑工具, CRISPR/Cas系统因其可编程性和高度的特异性被广泛用于新品种培育、基因通路研究、基因药物研制以及核酸检测等领域, 并取得了巨大的成功^[90]。基于CRISPR/Cas系统的核酸检测生物传感器具有高灵敏度、高选择性、低成本、快速及操作简单等显著优势, 在感染性病原体的核酸检测^[44, 47, 57, 80]和蛋白质小分子等非核酸检测^[91-93]显示出其巨大潜力。除了本文重点介绍的Cas9、Cas12和Cas13蛋白, 基于Cas10的研究也取得了一定的进展。与前3种系统不同的是, CRISPR/Cas10的结构是由多个蛋白质亚基结合在crRNA上形成的核酸蛋白复合物, 既能降解RNA又能降解DNA^[94]。Santiago-Frangos等^[95]结合RT-LAMP、T7转录与CRISPR/Cas10, 建立了一种靶向SARS-CoV-2的高灵敏度检测方法, 可通过荧光法、比色反应和肉眼检测3种方法观察到实验结果。目前基于CRISPR/Cas系统的综述多集中在对CRISPR-Cas9、-Cas12、-Cas13的介绍与应用, 但相信随着CRISPR/Cas10

优势的不断发掘, 会有更多基于其的应用得到发展。

所有的CRISPR/Cas系统都可以在温和的条件下, 在短时间内被编程并用于核酸的高特异性CRISPR/Cas检测, 这是基于CRISPR/Cas的核酸检测工具最突出的优势^[90]。核酸扩增是核酸检测的首要步骤, 在核酸扩增后引入CRISPR/Cas系统, 可以提高检测的特异性^[23]。然而在大部分核酸扩增的温度下, CRISPR/Cas系统的活性会大大降低, 因而需要分步反应, 从而增加了检测的时间和工作量。而CRISPR/Cas系统与电化学和表面增强拉曼光谱等信号转导策略或与灵敏的检测仪器结合可以省去繁琐的扩增步骤, 对核酸进行直接检测, 具有快速、高灵敏度、高特异性和低成本等优点。除此之外, 基于CRISPR/Cas的诊断工具还存在一系列挑战: Cas蛋白切割的脱靶效应会导致非靶标序列切割从而产生错误的信号; 依赖于PAM序列的识别导致潜在靶标序列有限, 虽通过使用特定设计的引物来引入PAM, 可以消除序列限制, 但不能用于无扩增检测^[29, 96]; 基于CRISPR/Cas的核酸定量检测依赖于复杂的仪器设备从而限制了其广泛应用; Cas蛋白的反式切割导致多路复用困难^[97], 等等。因此, 着重解决以上问题, 并与可视化的信号读取方法相结合实现定量及多重检测, CRISPR/Cas系统必将作为核酸检测的有力工具, 为人类疾病的诊断事业做出贡献。

Table 3 CRISPR/Cas biosensors based on different technologies

表3 结合不同策略的CRISPR/Cas核酸检测生物传感器

灵敏度提高 最主要方式	效应 蛋白	检测限	核酸 扩增 时间/ min	信号 输出 时间/ min	传感器类型 (信号读出系统)	靶标 类型	检测样品	参考 文献
PCR	Cas12a	0.005%	90	30~60	荧光阅读器 (荧光法)	DNA	H1975癌细胞	[46]
PCR	Cas12a	2.5 fmol/L	45	10	横向流动试纸条生物传感器 (比色法)	DNA	非洲猪瘟病毒	[48]
PCR	Cas12a	10 ³ CFU/ml	<30	90	双输入基本AND, OR, INHIBIT 逻辑门 (荧光法)	DNA	金黄色葡萄球菌	[49]
PCR	Cas12a	102拷贝/μl	80	40	紫外光照仪 (裸眼检测)	DNA	副溶血弧菌	[50]
RT-PCR	Cas12a	1拷贝/μl	<40	5~10	荧光阅读器 (荧光法)	RNA	SARS-CoV-2变种	[47]
快速PCR	Cas12a	1.28拷贝/μl	<3	5	一锅反应 (荧光法)	DNA	大肠杆菌	[19]
RCA	Cas9	100 fmol/L	90	30	有适配体的荧光阅读器 (荧光法)	miRNA	细胞外囊泡	[52]
RCA	Cas12a	100 CFU/ml	60	20	有适配体的荧光阅读器 (荧光法)	DNA	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	[37]
RCA+PCR	Cas13a	1拷贝/μl	23.5+ 50.5	8	荧光阅读器 (荧光法)	DNA	HBVcccDNA	[53]
LAMP	Cas12a	0.05%	40	5	紫外光照仪 (裸眼检测)	DNA	转基因大豆粉	[55]
LAMP	Cas12a	0.1%	30	5	便携式3D打印机 (荧光法)	DNA	转基因大豆粉	[56]
RT-LAMP	Cas9	1.08 amol/L	30	20	比色反应 (裸眼检测)	RNA	SARS-CoV-2 Orf1 基因	[54]
		0.92 amol/L					SARS-CoV-2 N 基因	
		1.37 amol/L					SARS-CoV-2 S 基因	
RT-LAMP	Cas10	200拷贝/μl	29	1~5 30 10	荧光阅读器 (荧光法) 比色反应 (裸眼检测) 可视化荧光法 (裸眼检测)	RNA	SARS-CoV-2	[95]
RT-LAMP	Cas12a	10拷贝/μl	20	20	比色反应 (荧光法)	RNA	SARS-CoV-2	[44]
RT-LAMP	Cas12a	单分子水平	40	5	一锅反应 (荧光法)	RNA	SARS-CoV-2	[57]
RT-LAMP	mCas13a	4拷贝/μl	35	20~30	荧光阅读器 (荧光法)	RNA	SARS-CoV-2	[58]
RPA	Cas12a	0.24 fmol/L	20	150	横向流动试纸条生物传感器 (荧光法)	DNA	HPV	[31]
RPA	Cas12a	10 amol/L	15	15	一锅反应 (荧光法)	DNA	支原体	[60]
RPA	Cas13	100 amol/L	文章未 说明	30	荧光阅读器 (荧光法)	ssDNA	CPV-2	[61]
RT-RPA	Cas12a	200 拷贝/μl		5~30	一锅反应 (荧光法)	RNA	SARS-CoV-2	[59]
RT-RPA	Cas13a	2 fmol/L/20 fmol/L 0.68 fmol/L/4.16 fmol/L	30	2	横向流动试纸条生物传感器 (荧光法) 微流控芯片荧光分析仪 (荧光法)	RNA	SARS-CoV-2 S 基因/SARS-CoV-2 Orf1ab基因	[62]
EXPAR	Cas9	0.82 amol/L	20	35	生物阅读器 (荧光法)	DNA	单核细胞增多性 乳杆菌溶血素	[64]
EXPAR	Cas9	250 amol/L 100 amol/L	120	70	比色反应 (比色法)	RNA DNA	ssRNA ssDNA	[19]
RTF-EXPAR	Cas12a	3.77 amol/L 4.81 amol/L	<20	20	荧光阅读器 (荧光法) 智能手机信号读出系统 (荧光法)	RNA	SARS-CoV-2	[66]
电化学	Cas9	1.7 fmol/L	-	<15	场效应晶体管 (电位法)	DNA	杜氏肌肉营养不 良患者基因	[69]

续表3

灵敏度提高 最主要方式	效应 蛋白	检测限	核酸 扩增 时间/ min	信号 输出 时间/ min	传感器类型 (信号读出系统)	靶标 类型	检测样品	参考 文献
电化学	dCas9	0.65 nmol/L	-	2/3	氧化石墨烯丝网印刷电极 (电化学法)	DNA	循环肿瘤	[70]
电化学	Cas9 Cas12a	100 fmol/L 10 fmol/L	-	<60	电化学芯片 (电化学法)	DNA	细小病毒	[68]
电化学	Cas12a	0.48 pmol/L	-	70	电化学发光系统 (电化学发光法)	DNA	HPV-16	[72]
电化学	Cas13a	10 pmol/L	-	9	电化学芯片 (电化学法)	miRNA	miRNA-19b	[73]
电化学	Cas13a	2.6 fmol/L	-	<180	催化发夹组装 (电化学法)	miRNA	miRNA-21	[74]
SERS	dCas9	14.1 fmol/L 9.7 fmol/L 8.1 fmol/L	-	60	表面增强拉曼光谱仪 (表面增强拉曼光谱)	DNA	金黄色葡萄球菌 鲍曼不动杆菌 肺炎克雷伯菌	[79]
SERS	Cas12a	0.3 fmol/L	-	<60	侧向流动分析条带 (表面增强拉曼光谱)	DNA	HIV-1	[81]
SERS	Cas12a	10 fmol/L	-	120	表面增强拉曼光谱仪 (表面增强拉曼光谱)	DNA	SARS-CoV-2 Orf 基因	[82]
SERS+LAMP	Cas12a	100 amol/L 10 pmol/L	60	-	表面增强拉曼光谱仪 (表面增强拉曼光谱) 裸眼检测	DNA	鸭肉基因	[83]
SERS+LAMP	Cas12a	224 amol/L	10	70	表面增强拉曼光谱仪 (表面增强拉曼光谱)	DNA	牛奶基因	[84]
SERS+RPA	Cas12a	3~4 CFU/ml	10	16	表面增强拉曼光谱仪 (表面增强拉曼光谱)	DNA	鼠伤寒沙门氏菌	[85]
电感耦合等离子 体质谱	Cas9	0.13 nmol/L	-	35	电感耦合等离子体质谱 (电感耦合等离子体质谱)	DNA	单碱基突变基因 序列	[87]
聚二甲基硅氧烷微柱 光传感器	Cas12a Cas13a	0.1~10 fmol/L 3.7 nmol/L	-	2 20	微孔芯片 (荧光法) 纸质流体荧光阅读器 (荧光法)	DNA RNA	ASFV RNA	[86] [26]

表格中文献 [46] 中百分比数据表示突变等位基因频率, [55-56] 中百分比数据表示转基因频率。

参 考 文 献

- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, *et al.* Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 1987, **169**(12): 5429-5433
- Jansen R, van Embden J D A, Gaastra W, *et al.* Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 2002, **43**(6): 1565-1575
- 陈润仪. 基于 CRISPR-Cas9 基因编辑技术的茶叶育种研究. 福建茶叶, 2020, **42**(12): 9-10
Chen R Y. Tea in Fujian, 2020, **42**(12): 9-10
- 何秀娟, 胡凤枝, 刘秋雨等. 乳腺癌细胞 QSOX1 的 CRISPR/Cas 9 基因编辑及其对增殖侵袭的影响研究. 中国生物工程杂志, 2020, **40**(11): 1-9
He X J, Hu F Z, Liu Q L, *et al.* *China Biotechnology*, 2020, **40**(11): 1-9
- Van Dongen J E, Berendsen J T W, Steenbergen R D M, *et al.* Point-of-care CRISPR/Cas nucleic acid detection: recent advances, challenges and opportunities. *Biosens Bioelectron*, 2020, **166**: 112445
- Aman R, Mahas A, Mahfouz M. Nucleic acid detection using CRISPR/Cas biosensing technologies. *ACS Synth Biol*, 2020, **9**(6): 1226-1233
- 刘涛, 田亚晨, 刘程, 等. 基于 CRISPR/Cas 体系的生物传感器在病原体核酸检测方面的应用. 生物工程学报, 2021, **37**(11): 3890-3904
Liu T, Tian Y C, Liu C, *et al.* *Chin J Biotechnol*, 2021, **37**(11): 3890-3904
- 蒋静, 赵文亮, 李文越等. 基于 CRISPR/Cas 系统的现场核酸检测技术. 中国动物检疫, 2022, **39**(3): 55-60
Jiang J, Zhao W L, Li W Y, *et al.* *China Animal Health Inspection*, 2022, **39**(3): 55-60
- Selvam K, Ahmad Najib M, Khalid M F, *et al.* CRISPR-Cas systems-based bacterial detection: a scoping review. *Diagnostics (Basel)*, 2022, **12**(6): 1335
- Phan Q A, Truong L B, Medina-Cruz D, *et al.* CRISPR/Cas-

- powered nanobiosensors for diagnostics. *Biosens Bioelectron*, 2022, **197**: 113732
- [11] Makarova K S, Koonin E V. Annotation and classification of CRISPR-Cas systems. *Methods Mol Biol*, 2015, **1311**: 47-75
- [12] Wang X J, Shang X Y, Huang X X. Next-generation pathogen diagnosis with CRISPR/Cas-based detection methods. *Emerg Microbes Infect*, 2020, **9**(1): 1682-1691
- [13] Yan W X H P, Alfonse L E, Carte J M, *et al*. Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems. *Science*, 2019, **363**(6422): 88-91
- [14] Kolesnik M V, Fedorova I, Karneyeva K A, *et al*. Type III CRISPR-Cas systems: deciphering the most complex prokaryotic immune system. *Biochemistry (Mosc)*, 2021, **86**(10): 1301-1314
- [15] 李凯, 罗云波, 许文涛. CRISPR-Cas 生物传感器研究进展. *生物技术进展*, 2019, **9**(6): 579-591
Li K, Luo Y B, Xu W T. *Curr Biotechnol*, 2019, **9**(6): 579-591
- [16] 胡丽, 陈实. 细菌 CRISPR-Cas 系统的研究进展. *微生物学报*, 2017, **57**(11): 1643-1652
Hu L, Chen S. *Acta Microbiol Sin*, 2017, **57**(11): 1643-1652
- [17] Taylor H N, Laderman E, Armbrust M, *et al*. Positioning diverse type IV structures and functions within Class 1 CRISPR-Cas systems. *Front Microbiol*, 2021, **12**: 671522
- [18] 田东芳, 崔香玲, 周睿, 等. CRISPR 系统相关蛋白的纯化与活性分析. *中国医药生物技术*, 2020, **15**(2): 152-156
Tian D F, Cui X L, Zhou R, *et al*. *Chin Med Biotechnol*, 2020, **15**(2): 152-156
- [19] Wang R, Chen R, Qian C, *et al*. Ultrafast visual nucleic acid detection with CRISPR/Cas12a and rapid PCR in single capillary. *Sensors Actuators B Chem*, 2021, **326**: 128618
- [20] 胡孝琳, 王良婷, 顾玮, 等. 基于 CRISPR/Cas 系统的生物传感策略研究进展. *生物技术进展*, 2020, **36**(3): 69-77
Hu X L, Wang L T, Gu W, *et al*. *Biotechnol Bull*, 2020, **36**(3): 69-77
- [21] Harrington L B, Burstein D, Chen J S, *et al*. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science*, 2018, **362**(6416): 839-842
- [22] 张爱霞, 朱庆峰, 陈沛, 等. 基于 CRISPR/Cas13 的 RNA 编辑系统及其在核酸检测中的应用. *广东农业科学*, 2020, **47**(11): 243-251
Zhang A X, Zhu Q F, Chen P, *et al*. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2020, **47**(11): 243-251
- [23] Feng W, Newbigging A M, Tao J, *et al*. CRISPR technology incorporating amplification strategies: molecular assays for nucleic acids, proteins, and small molecules. *Chem Sci*, 2021, **12**(3): 4683-4698
- [24] Srivastava S, Upadhyay D J, Srivastava A. Next-generation molecular diagnostics development by CRISPR/Cas tool: rapid detection and surveillance of viral disease outbreaks. *Front Mol Biosci*, 2020, **7**: 582499
- [25] Khambhati K, Bhattacharjee G, Singh V. Current progress in CRISPR-based diagnostic platforms. *J Cell Biochem*, 2019, **120**(3): 2721-2725
- [26] Katzmeier F, Aufinger L, Dupin A, *et al*. A low-cost fluorescence reader for *in vitro* transcription and nucleic acid detection with Cas13a. *PLoS One*, 2019, **14**(12): e0220091
- [27] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Lee J W, *et al*. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 2017, **356**(6336): 438-442
- [28] 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. *Nature*, 2016, **538**(7624): 270-273
- [29] Li S Y, Cheng Q X, Wang J M, *et al*. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell Discov*, 2018, **4**: 20
- [30] Van Dongen J E, Berendsen J T W, Steenberg R D M, *et al*. Point-of-care CRISPR/Cas nucleic acid detection: recent advances, challenges and opportunities. *Biosens Bioelectron*, 2020, **166**: 112445
- [31] Tsou J H, Leng Q, Jiang F. A CRISPR test for detection of circulating nuclei acids. *Transl Oncol*, 2019, **12**(12): 1566-1573
- [32] Kang T, Lu J, Yu T, *et al*. Advances in nucleic acid amplification techniques (NAATs): COVID-19 point-of-care diagnostics as an example. *Biosens Bioelectron*, 2022, **206**: 114109
- [33] 钟宜科, 邹大阳, 赵彤, 等. 食源性致病菌核酸检测技术研究进展. *食品研究与开发*, 2020, **41**(12): 218-224
Zhong Y K, Zou D Y, Zhao T, *et al*. *Food Res Dev*, 2020, **41**(12): 218-224
- [34] Gupta S, Kakkar V. Recent technological advancements in tuberculosis diagnostics - a review. *Biosens Bioelectron*, 2018, **115**: 14-29
- [35] 欧阳伟伟, 李卓玲, 苏胜发, 等. PCR 技术在肺癌微转移中的应用现状. *医学研究杂志*, 2015, **44**(7): 187-190
Ouyang W W, Li Z L, Su S F, *et al*. *J Med Res*, 2015, **44**(7): 187-190
- [36] Reid M S, Le X C, Zhang H Q. Exponential isothermal amplification of nucleic acids and assays for proteins, cells, small molecules, and enzyme activities: an EXPAR example. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, **57**(37): 11856-11866
- [37] Xu L Q, Dai Q Q, Shi Z Y, *et al*. Accurate MRSA identification through dual-functional aptamer and CRISPR-Cas12a assisted rolling circle amplification. *J Microbiol Methods*, 2020, **173**: 105917
- [38] Obande G A, Banga Singh K K. Current and future perspectives on isothermal nucleic acid amplification technologies for diagnosing infections. *Infect Drug Resist*, 2020, **13**: 455-483
- [39] Zhao Y X, Chen F, Li Q, *et al*. Isothermal amplification of nucleic acids. *Chem Rev*, 2015, **115**(22): 12491-12545
- [40] Amy. CRISPR tools help to detect illnesses. *Nature*, 2019, **566**: 437
- [41] Liu W, Dong D R, Yang Z, *et al*. Polymerase spiral reaction (PSR): a novel isothermal nucleic acid amplification method. *Sci Rep*, 2015, **5**: 12723
- [42] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al*. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(12): e63
- [43] 樊晓旭, 赵永刚, 李林, 等. 重组酶聚合酶扩增技术在疾病快速检测中的研究进展. *中国动物检疫*, 2016, **33**(8): 72-77
Fan X X, Zhao Y G, Li L, *et al*. *China Animal Healthy Inspection*. 2016, **33**(8): 72-77

- [44] Ali Z, Aman R, Mahas A, *et al.* iSCAN: an RT-LAMP-coupled CRISPR-Cas12 module for rapid, sensitive detection of SARS-CoV-2. *Virus Res*, 2020, **288**: 198129
- [45] Tan E, Erwin B, Dames S, *et al.* Specific versus nonspecific isothermal DNA amplification through thermophilic polymerase and nicking enzyme activities. *Biochemistry*, 2008, **47**(38): 9987-9999
- [46] Tsou J H, Leng Q X, Jiang F. A CRISPR test for rapidly and sensitively detecting circulating EGFR mutations. *Diagnostics (Basel)*, 2020, **10**(2): 114
- [47] Liang Y H, Lin H Q, Zou L R, *et al.* CRISPR-Cas12a-based detection for the major SARS-CoV-2 variants of concern. *Microbiol Spectr*, 2021, **9**(3): e0101721
- [48] Wu J H, Mukama O, Wu W, *et al.* A CRISPR/Cas12a based universal lateral flow biosensor for the sensitive and specific detection of African swine-fever viruses in whole blood. *Biosensors*, 2020, **10**(12): 203
- [49] Peng L, Zhou J, Yin L J, *et al.* Integration of logic gates to CRISPR/Cas12a system for rapid and sensitive detection of pathogenic bacterial genes. *Anal Chim Acta*, 2020, **1125**: 162-168
- [50] Zhang M, Liu C, Shi Y, *et al.* Selective endpoint visualized detection of *Vibrio parahaemolyticus* with CRISPR/Cas12a assisted PCR using thermal cycler for on-site application. *Talanta*, 2020, **214**: 120818
- [51] Broughton J P, Deng X, Yu G, *et al.* CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol*, 2020, **38**(7): 870-874
- [52] Wang R X, Zhao X X, Chen X H, *et al.* Rolling circular amplification (RCA)-assisted CRISPR/Cas9 cleavage (RACE) for highly specific detection of multiple extracellular vesicle microRNAs. *Anal Chem*, 2020, **92**(2): 2176-2185
- [53] Zhang X, Tian Y, Xu L, *et al.* CRISPR/Cas13-assisted hepatitis B virus covalently closed circular DNA detection. *Hepato Int*, 2022, **16**(2): 306-315
- [54] Song J, Cha B, Moon J, *et al.* Smartphone-based SARS-CoV-2 and variants detection system using colorimetric DNAzyme reaction triggered by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR). *ACS Nano*, 2022, **16**: 11300
- [55] Wu H, He J S, Zhang F, *et al.* Contamination-free visual detection of CaMV35S promoter amplicon using CRISPR/Cas12a coupled with a designed reaction vessel: rapid, specific and sensitive. *Anal Chim Acta*, 2020, **1096**: 130-137
- [56] Wu H, Qian C, Wu C, *et al.* End-point dual specific detection of nucleic acids using CRISPR/Cas12a based portable biosensor. *Biosens Bioelectron*, 2020, **157**: 112153
- [57] Wang R, Qian C Y, Pang Y N, *et al.* opvCRISPR: one-pot visual RT-LAMP-CRISPR platform for SARS-COV-2 detection. *Biosens Bioelectron*, 2021, **172**: 112766
- [58] Mahas A, Wang Q, Marsic T, *et al.* A novel miniature CRISPR-Cas13 system for SARS-CoV-2 diagnostics. *ACS Synth Biol*, 2021, **10**(10): 2541-2551
- [59] Feng W, Peng H Y, Xu J Y, *et al.* Integrating reverse transcription recombinase polymerase amplification with CRISPR technology for the one-tube assay of RNA. *Anal Chem*, 2021, **93**(37): 12808-12816
- [60] Wang B, Wang R, Wang D Q, *et al.* Cas12aVDeT: a CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection. *Anal Chem*, 2019, **91**(19): 12156-12161
- [61] Khan H, Khan A, Liu Y, *et al.* CRISPR-Cas13a mediated nanosystem for attomolar detection of canine parvovirus type 2. *Chin Chem Lett*, 2019, **30**(12): 2201-2204
- [62] Cao G, Huo D, Chen X, *et al.* Automated, portable, and high-throughput fluorescence analyzer (APHF-analyzer) and lateral flow strip based on CRISPR/Cas13a for sensitive and visual detection of SARS-CoV-2. *Talanta*, 2022, **248**: 123594
- [63] Ness J V, Ness L V, Galas D J. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(8): 4504-4509
- [64] Huang M Q, Zhou X M, Wang H Y, *et al.* Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 triggered isothermal amplification for site-specific nucleic acid detection. *Anal Chem*, 2018, **90**(3): 2193-2200
- [65] Wang X F, Chen X L, Chu C X, *et al.* Naked-eye detection of site-specific ssRNA and ssDNA using PAMmer-assisted CRISPR/Cas9 coupling with exponential amplification reaction. *Talanta*, 2021, **233**: 122554
- [66] Hang X M, Wang H Y, Liu P F, *et al.* Cas12a-assisted RTF-EXPAR for accurate, rapid and simple detection of SARS-CoV-2 RNA. *Biosens Bioelectron*, 2022, **216**: 114683
- [67] Sohail M, Xie S, Zhang X, *et al.* Methodologies in visualizing the activation of CRISPR/Cas: the last mile in developing CRISPR-based diagnostics and biosensing - a review. *Anal Chim Acta*, 2022, **1205**: 339541
- [68] Xu W, Jin T, Dai Y F, *et al.* Surpassing the detection limit and accuracy of the electrochemical DNA sensor through the application of CRISPR Cas systems. *Biosens Bioelectron*, 2020, **155**: 112100
- [69] Hajian R, Balderston S, Tran T, *et al.* Detection of unamplified target genes *via* CRISPR-Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor. *Nat Biomed Eng*, 2019, **3**(6): 427-437
- [70] Uygun Z O, Yeniay L, G S F. CRISPR-dCas9 powered impedimetric biosensor for label-free detection of circulating tumor DNAs. *Anal Chim Acta*, 2020, **1121**: 35-41
- [71] Zamani M, Robson J M, Fan A, *et al.* Electrochemical strategy for low-cost viral detection. *ACS Central Science*, 2021, **7**(6): 963-972
- [72] Liu P F, Zhao K R, Liu Z J, *et al.* Cas12a-based electrochemiluminescence biosensor for target amplification-free DNA detection. *Biosens Bioelectron*, 2021, **176**: 112954
- [73] Bruch R, Baaske J, Chatelle C, *et al.* CRISPR/Cas13a-powered electrochemical microfluidic biosensor for nucleic acid amplification-free miRNA diagnostics. *Adv Mater*, 2019, **31**(51): e1905311
- [74] Cui Y, Fan S J, Yuan Z, *et al.* Ultrasensitive electrochemical assay

- for microRNA-21 based on CRISPR/Cas13a-assisted catalytic hairpin assembly. *Talanta*, 2021, **224**: 121878
- [75] Liu M L, Li Y, Zhao M L, *et al.* Y-shaped DNA nanostructures assembled-spherical nucleic acids as target converters to activate CRISPR-Cas12a enabling sensitive ECL biosensing. *Biosens Bioelectron*, 2022, **214**: 114512
- [76] Li Y, Yang F, Yuan R, *et al.* Electrochemiluminescence covalent organic framework coupling with CRISPR/Cas12a-mediated biosensor for pesticide residue detection. *Food Chem*, 2022, **389**: 133049
- [77] Chen H, Li Z Y, Chen J, *et al.* CRISPR/Cas12a-based electrochemical biosensor for highly sensitive detection of cTnI. *Bioelectrochemistry*, 2022, **146**: 108167
- [78] 兰燕娜,周玲. 表面增强拉曼光谱. 南通工学院学报(自然科学版), 2004, **3**(2): 21-23
Lan Y N, Zhou L. *Journal of Nantong Institute of Technology (Natural Science)*, 2004, **3**(2): 21-23
- [79] Kim H, Lee S, Seo H W, *et al.* Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-mediated surface-enhanced raman scattering assay for multidrug-resistant bacteria. *ACS Nano*, 2020, **14**: 17241-17253
- [80] Liang J J, Teng P J, Xiao W, *et al.* Application of the amplification-free SERS-based CRISPR/Cas12a platform in the identification of SARS-CoV-2 from clinical samples. *J Nanobiotechnology*, 2021, **19**(1): 273
- [81] Pang Y, Li Q, Wang C, *et al.* CRISPR-cas12a mediated SERS lateral flow assay for amplification-free detection of double-stranded DNA and single-base mutation. *Chem Eng J*, 2022, **429**: 132109
- [82] Yin B, Zhang Q, Xia X, *et al.* A CRISPR-Cas12a integrated SERS nanoplatform with chimeric DNA/RNA hairpin guide for ultrasensitive nucleic acid detection. *Theranostics*, 2022, **12**(13): 5914-5930
- [83] Liu J H, Chen J H, Wu D, *et al.* CRISPR-/Cas12a-mediated liposome-amplified strategy for the surface-enhanced Raman scattering and naked-eye detection of nucleic acid and application to food authenticity screening. *Anal Chem*, 2021, **93**(29): 10167-10174
- [84] Pan R, Liu J, Wang P, *et al.* Ultrasensitive CRISPR/Cas12a-driven SERS biosensor for on-site nucleic acid detection and its application to milk authenticity testing. *J Agric Food Chem*, 2022, **70**(14): 4484-4491
- [85] Zhuang J, Zhao Z, Lian K, *et al.* SERS-based CRISPR/Cas assay on microfluidic paper analytical devices for supersensitive detection of pathogenic bacteria in foods. *Biosens Bioelectron*, 2022, **207**: 114167
- [86] Hass K N, Bao M D, He Q, *et al.* Integrated micropillar polydimethylsiloxane accurate CRISPR detection system for viral DNA sensing. *ACS Omega*, 2020, **5**(42): 27433-27441
- [87] Hu J Y, Jiang M, Liu R, *et al.* Label-Free CRISPR/Cas9 assay for site-specific nucleic acid detection. *Anal Chem*, 2019, **91**(16): 10870-10878
- [88] Yu Y, Zeng H, Wu Q, *et al.* A sensing strategy combining T7 promoter-contained DNA probe with CRISPR/Cas13a for detection of bacteria and human methyltransferase. *Anal Chim Acta*, 2022, **1227**: 340266
- [89] Choi J H, Lim J, Shin M, *et al.* CRISPR-Cas12a-based nucleic acid amplification-free DNA biosensor *via* Au nanoparticle-assisted metal-enhanced fluorescence and colorimetric analysis. *Nano Lett*, 2021, **21**(1): 693-699
- [90] Wang M, Zhang R, Li J M. CRISPR/cas systems redefine nucleic acid detection: principles and methods. *Biosens Bioelectron*, 2020, **165**: 112430
- [91] Li Y, Deng F, Goldys E M. A versatile CRISPR/Cas12a-based sensitivity amplifier suitable for commercial HRP-based ELISA kits. *Sensors Actuators B: Chem*, 2021, **347**: 130533
- [92] Li Y, Deng F, Hall T, *et al.* CRISPR/Cas12a-powered immunosensor suitable for ultra-sensitive whole *Cryptosporidium* oocyst detection from water samples using a plate reader. *Water Res*, 2021, **203**: 117553
- [93] Deng F, Li Y, Qiao L, *et al.* A CRISPR/Cas12a-assisted on-fibre immunosensor for ultrasensitive small protein detection in complex biological samples. *Anal Chim Acta*, 2022, **1192**: 339351
- [94] Kazlauskienė M, Tamulaitis G, Kostiuk G, *et al.* Spatiotemporal control of type III-A CRISPR-Cas immunity: coupling DNA degradation with the target RNA recognition. *Mol Cell*, 2016, **62**(2): 295-306
- [95] Santiago-Frangos A, Hall L N, Nemudraia A, *et al.* Intrinsic signal amplification by type III CRISPR-Cas systems provides a sequence-specific SARS-CoV-2 diagnostic. *Cell Rep Med*, 2021, **2**(6): 100319
- [96] Qian S, Chen Y, Xu X, *et al.* Advances in amplification-free detection of nucleic acid: CRISPR/Cas system as a powerful tool. *Anal Biochem*, 2022, **643**: 114593
- [97] Bruch R, Urban G A, Dincer C. CRISPR/Cas powered multiplexed biosensing. *Trends Biotechnol*, 2019, **37**(8): 791-792

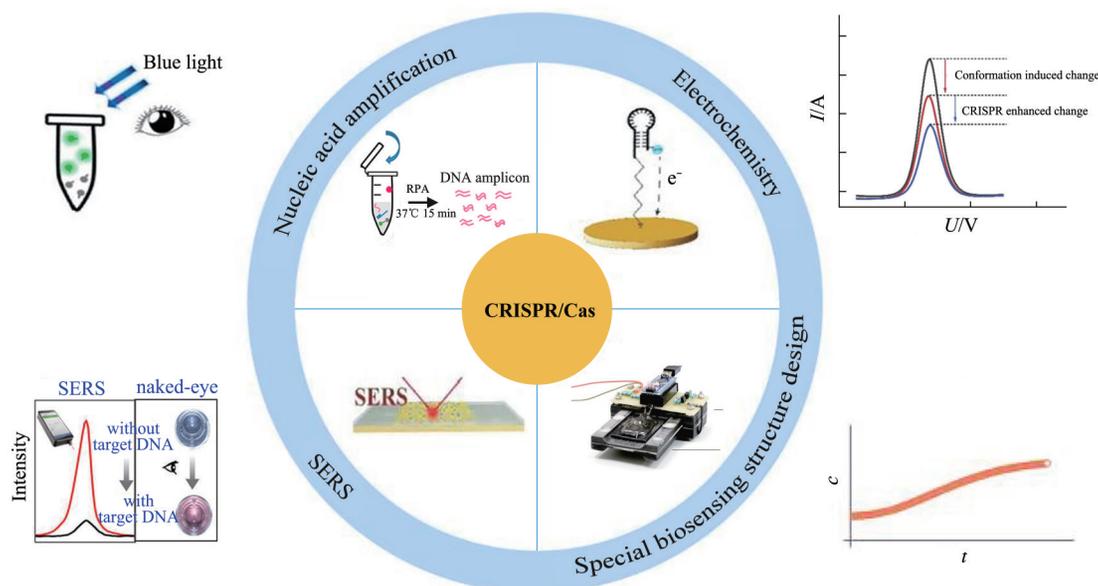
CRISPR/Cas-based Biosensors for Nucleic Acid Detection*

CHEN Si^{1)**}, LIN Yu-Kun^{1)**}, SONG Chun-Yan¹⁾, ZHI Shuai¹⁾, LI Yi^{2)***}, YANG Dan-Ting^{1)***}

¹⁾School of Public Health, Zhejiang Key Laboratory of Pathophysiology, Health Science Center, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

²⁾ARC Centre of Excellence in Nanoscale Biophotonics, University of New South Wales, Sydney 2052, Australia)

Graphical abstract



Abstract Over the last few years, CRISPR/Cas system has become a prominent tool in transcription regulation and genome editing. In addition, CRISPR/Cas system has shown remarkable potentials in developing novel biosensors for nucleic acid detection due to its unique capability for collateral cleavage of target nucleic acids and non-specific single stranded nucleic acids. The key to constructing highly sensitive CRISPR/Cas system-based biosensor usually relies on its combination with signal amplification strategies including nucleic acid amplification technologies or specific signal read-out methods. Thus, this paper aims to provide a comprehensive overview of CRISPR/Cas-based biosensors for nucleic acid detection by introducing different types of CRISPR/Cas system, highlighting the progress of signal amplification strategies used in CRISPR/Cas system-based biosensor along with nucleic acid amplification technologies (PCR, LAMP, RCA, RPA and EXPAR), sensitive signal transduction methods (electrochemical, and surface enhanced Raman spectroscopy), and special biosensing structure design. Current challenges and future prospective are discussed as well.

Key words CRISPR/Cas system, nucleic acid detection, biosensor, nucleic acid amplification technology, electrochemistry, surface-enhanced Raman spectroscopy

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0348

* This work was supported by grants from Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY23H260002), The National Natural Science Foundation of China (82073514), Fundamental Research Funds for the Provincial Universities of Zhejiang (SJLY2021009), Graduate Research Innovation Fund of Ningbo University (IF2022189), and K.C.Wong Magna Fund in Ningbo University.

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

YANG Dan-Ting. Tel: 86-574-87609894, E-mail: yangdanting@nbu.edu.cn

LI Yi. Tel: 61-452-660-629, E-mail: yi.li6@unsw.edu.au

Received: July 27, 2022 Accepted: October 19, 2022