



SHERLOCK-HBA 检测方法的建立 及其在血液鉴别中的应用*

姚乾威^{1,2)} 何红霞³⁾ 胡 胜²⁾ 赵一霞²⁾ 罗 雨²⁾ 季安全²⁾** 孙启凡²⁾**

(¹⁾ 山西医科大学法医学院, 太原 030001; (²⁾ 公安部鉴定中心, 法医遗传学公安部重点实验室, 北京 100038;

(³⁾ 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

摘要 **目的** 基于规律成簇的间隔短回文重复 (CRISPR) /CRISPR 关联蛋白质系统 (Cas) 技术建立检测血液特异性血红蛋白 α (HBA) mRNA 的方法, 以准确、快速地鉴定血液样本。**方法** 本研究通过设计和筛选血液特异性 HBA mRNA 上的 CRISPR RNA (crRNA) 短片段, 基于 CRISPR/Cas 技术原理建立了 SHERLOCK-HBA 检测方法, 对 5 种体液 (包括外周血、月经血、唾液、阴道分泌液、精液) 共 79 份样本进行检测以评价所建方法鉴别血液的能力, 并通过种属特异性实验、灵敏度实验、模拟混合斑检测、模拟降解样本检测、实际案件样本检测等进一步验证实验体系的法医学应用能力。**结果** 该方法检测人源血液的相对荧光单位 (RFU) 值显著高于非血液 ($P < 0.0001$) 以及非人源血液样本 ($P < 0.0001$), 对血液 RNA 的检出灵敏度可达 1×10^{-3} ng, 且可成功检测出混合斑迹以及陈旧降解斑迹中的微量血液成分。**结论** 本研究成功建立了一种基于 CRISPR/Cas 技术的 SHERLOCK-HBA 检测体系, 能准确、灵敏地鉴定血液, 操作简单、快速, 为快速识别血液类样本提供了新的思路 and 参考。

关键词 法医遗传学, 血液鉴定, 血红蛋白 α , CRISPR/Cas, SHERLOCK

中图分类号 DF795.2

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0494

体液鉴定是指能够准确鉴定遗留在犯罪现场的体液类斑迹 (如血斑、精斑、唾液斑等) 的类型或来源, 该技术在以审判为中心的司法体制改革背景下愈发重要, 可为案件重建和审判提供重要的价值。传统的体液鉴定方法包括免疫法、光谱法、显微镜镜检法等, 但这些方法已逐渐无法满足实际办案和法庭审判的需求。目前, 针对 DNA 鉴定的短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 分型检测技术日益完善, 使得常见的生物检材如唾液、血液和精液等可以成功判定其个体来源。然而, DNA 在不同组织中具有同一性的特点, 因此常规 STR 分析并不能对同一个体不同组织分泌的体液斑迹进行区分。随着分子生物学的发展, 基于 RNA 或 DNA 甲基化等分子标记的鉴定方法逐渐形成, 其中 mRNA 因其良好的组织特异性成为法医学领域进行体液鉴定研究的主要分子标记之一^[1-5]。血红蛋白 α (hemoglobin alpha, HBA) 是表达血红蛋

白 A 的 α 亚基基因, 具有显著的血液特异性, 是血液鉴定的重要标记分子^[6-11]。

目前, 法医学上对 mRNA 的检测主要通过反转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 后, 使用毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 分析仪进行。然而, 这种方法对仪器依赖性较强, 难以满足现场快速检测的实际需求。近年来, 以规律成簇的间隔短回文重复 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) /CRISPR 关联蛋白质系统 (CRISPR-associated proteins system, Cas) 为代表的基因编辑技术带来

* 国家重点研发计划 (2022YFC3341002) 和公安部科技强警基础工作计划 (2022JC11) 资助项目。

** 通讯联系人。

孙启凡 Tel: 15801616421, E-mail: sunqifan@cifs.gov.cn

季安全 Tel: 13601078664, E-mail: aqjdna@163.com

收稿日期: 2023-12-18, 接受日期: 2024-04-09

了生物技术革命性进步。基于CRISPR的核酸检测技术因其快速、准确、灵敏、经济等特点，正在引发分子诊断领域的革新，并已被成功应用于传染病、遗传病、肿瘤基因突变诊断，以及食品安全等领域，是理想的下一代核酸即时检测（POCT）技术^[12-13]。2017年张峰团队基于CRISPR/Cas13a系统开发出名为SHERLOCK（Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing）的检测工具，可快速检测样品中amol浓度的靶标物，证明了CRISPR具有强大地检测RNA的能力^[14-15]。本文旨在基于CRISPR/Cas原理建立血液特异性mRNA-HBA快速检测方法，并验证其在人类血液鉴定中的应用能力，为法医现场快速体液鉴定奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 样本收集与制备

遵照知情者同意原则，采集外周血、唾液、精液、月经血和阴道分泌物样本。样本采集已通过公安部鉴定中心科研伦理委员会审查（批件号：2023-002）。采集方法为：外周血通过肘静脉穿刺抽取；精液通过无菌塑料杯收集；唾液使用5 ml离心管收集自然流出的口腔液体；月经血通过卫生棉采集，放置于室温阴干；阴道分泌物是通过医用

无菌棉签在月经周期的第8天至第28天的阴道内擦拭取得，放置于室温阴干。血卡样本的制备方法为取200 μl血液滴在FTA（flinders technology associates）滤膜上，放置于室温阴干。

1.2 重组酶聚合酶等温扩增引物和CRISPR RNA的设计及筛选

根据NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 公布的HBA代表性mRNA序列，在ensembl数据库 (<https://asia.ensembl.org/index.html>) 中查找HBA的所有转录本，选取转录本上不存在单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism, SNP）或者存在SNP但最小等位基因频率（minor allele frequency, MAF）小于0.05的共同片段，以此作为目标序列进行重组酶聚合酶等温扩增（recombinase polymerase amplification, RPA）引物和CRISPR RNA（crRNA）设计。

使用CRISPR-RT网站进行crRNA序列预测并通过BLAST分析确保特异性，在crRNA识别靶标序列的上下游进行RPA引物设计，引物均骑跨外显子以避免基因组上的非特异性扩增。HBA基因上共挑选并合成2条crRNA，经RPA及Cas蛋白激活实验验证后，最终确定的引物与crRNA序列信息如表1所示，均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

Table 1 Primer sequence and crRNA sequence of HBA gene

Primer name	Sequence (5'-3')
HBA-F	taatacgaactactataggTGGTGCGGAGGCCCTGGAGAGGATG
HBA-crRNA	gauuuagacuacccccaaaacgaaggggacuaaaacUAGGUCUUGGUGGUGGGAAGGACAGGA
HBA-R	TCGGCCACCTTCTTGCCGTGGCCCT

Lower case section is T7 in primer sequence. In crRNA sequence, lower case is the guide region, and the underlined part is the space sequence.

1.3 RNA的提取和定量

本研究选用商品试剂盒miRNeasy mini kit（德国QIAGEN公司），按照试剂盒操作说明提取体液样本RNA。使用Qubit™ 4.0荧光定量仪（美国Life Invitrogen公司）和Qubit™ RNA HS Assay试剂盒（美国Life Invitrogen公司）对提取的样本RNA进行定量。

1.4 引物特异性和crRNA效率验证

对筛选出的引物参考RNA恒温快速扩增试剂盒（基础型）-II（广州艾迪基因科技有限责任公司）说明书进行RPA反应。50 μl反应体系包括：29.4 μl A buffer，2.5 μl B buffer（包含反转录酶），干粉管（包含重组酶、单链DNA结合蛋白和DNA

聚合酶），正、反向引物各1 μl（浓度为10 μmol/L），1 ng总RNA，剩余由无核酸酶的水补齐。反应条件为：42℃、30 min，在DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌仪（邦西仪器科技有限公司，上海）上进行。对RPA产物使用3%琼脂糖凝胶电泳进行检测以验证引物特异性。

使用验证好的引物进行RPA反应，对RPA产物按照LwaCas13a Reaction说明书（广州艾迪基因科技有限责任公司）进行Cas蛋白反应。Cas蛋白反应总体积20 μl：1 μl RT-RPA反应产物，0.2 μl LwaCas13a Nuclease（5 μmol/L），4 μl LwaCas13a Reaction buffer（5×），0.2 μl T7 Transcription Enzyme Mix（1 000 U/50 μl），0.24 μl RNase Inhibitor

(2 000 U/40 μ l), 2 μ l NTP (25 nmol/L), 2.5 μ l crRNA (100 nmol/L), 0.2 μ l ssRNA Reporter (20 μ mol/L), 9.66 μ l 无核酸酶水。反应条件为: 37°C、40 min, 在 Quantstudio™7 Flex System 上进行检测, 荧光检测 1 次/min。通过相对荧光单位 (relative fluorescence units, *RFU*) 值验证 crRNA 的效率。两部分实验均设置阴性对照 (用无核酸酶水代替模板)。

1.5 SHERLOCK-HBA的建立和优化

SHERLOCK 反应体系由 RPA 和 CRISPR/Cas13a 两部分组成, 主要从 RPA 实验阶段的反应时间 (5、10、15、20、25、30 min) 和引物浓度 (2.5、5、10、20 μ mol/L)、CRISPR/Cas13a 实验阶段的 RPA 产物用量 (1、2.5、5 μ l) 和 Cas 蛋白用量 (0.2、0.5、1 μ l)、Cas 蛋白反应时间 (20、25、30、35、40 min) 等方面进行优化。

1.6 检测方法的验证

1.6.1 体液特异性试验

使用建立的检测体系对 5 种体液共 79 份样本 (51 份外周血、7 份月经血、7 份唾液、7 份阴道分泌物、7 份精液) 提取 RNA 并进行检测。对 *RFU* 值 (检测荧光 - 背景荧光) 进行 *t* 检验以验证本检测体系体液特异性。

1.6.2 种属试验

其他物种血液样本 (鸡、鸭、牛、马、驴、羊、猪、兔均购自于农贸市场) 共 8 个, 用棉签蘸取晾干后提取 RNA 进行检测。

1.6.3 灵敏度试验

取 3 份外周血 RNA 从 1 mg/L 开始 10 倍梯度稀释, 共设置 5 个梯度, 稀释后取 1 μ l 进行提取和检测, 样本浓度分别为 1、0.1、0.01、0.001、0.000 1 mg/L。然后用各取 1 μ l 稀释 RNA 作为模板进行检测以评估 SHERLOCK 体系的灵敏度并与 CE 法、金标抗人血红蛋白检测试纸条 (FOB) 法相对比, 同时以无核酸酶水为阴性对照。

1.7 实际应用能力验证

1.7.1 模拟混合斑样本的制备和检测

取 3 份外周血样本分别与 3 份精液、唾液、阴道分泌物样本进行 1:10、1:50、1:100 混合斑的制作, 制作方法如下: 取 200 μ l 精液滴于棉签上, 待完全吸收后, 分别将 20、4、2 μ l 血液滴于其上进行混合; 取 200 μ l 唾液滴于棉签上, 待完全吸收后, 分别将 20、4、2 μ l 血液滴于其上进行混合; 剪取 1 份采集了阴道分泌液的棉签, 分别取

20、4、2 μ l 血液滴于其上与之混合, 以上样本均室温晾干后进行检测。

1.7.2 模拟陈旧降解样本的制备和检测

模拟降解样本包括 3 份时间梯度样本及 3 份经紫外照射的样本。时间梯度样本制备方法为: 取 50 μ l 外周血滴于棉签上并晾干, 室温放置 1 天、1 个月、6 个月、1 年、2 年、3 年后进行检测; 紫外照射样本制备方法为: 取 50 μ l 外周血滴于棉签上并晾干, 放置于紫外灯下照射 0、4、8、16、32 h 后进行检测。

1.7.3 案件样本检测

收集日常办案中的体液类检材样本共 11 份 (包括 1 份血卡、1 份血迹擦拭物、3 份烟头、1 份带血阴道口拭子、1 份阴道拭子、2 份刀刃上血迹、1 份阴茎擦拭物、1 份受害者内裤), 刀刃上血迹用棉棒擦拭后提取检测, 其他案件样本均剪取部分进行提取和检测。

2 结 果

2.1 SHERLOCK-HBA实验体系的建立及优化

使用筛选的引物进行 RPA 反应, 反应产物的琼脂糖凝胶电泳结果如图 1a 所示, 扩增片段大小与目标产物大小一致。经 1.5 所述反应条件的优化后, 最终将 RPA 反应时间设置为 10 min, RPA 引物浓度设置为 10 μ mol/L, Cas 蛋白反应时间设置为 20 min, 分别对 3 份外周血及阴性对照进行检测, 结果显示, 外周血样本 *RFU* 值最高接近 3×10^6 , 而与之相比, 阴性对照的 *RFU* 值处于非常低的范围区间, 与检测样本形成明显对比 (图 1b)。

2.2 检测方法的验证

2.2.1 体液特异性试验

使用建立的方法检测 5 种体液共 79 份样本, 经 *t* 检验, 血液类样本 (包括外周血和月经血样本) 的 *RFU* 值 ($2\,186\,660 \pm 516\,711$) 与阴性对照 ($15\,198 \pm 18\,248$) 的差异具有统计学意义 ($P < 0.000\,1$), 血液类样本 (包括外周血和月经血样本) 的 *RFU* 值 ($2\,186\,660 \pm 516\,711$) 与非血液类样本的 *RFU* 值 ($8\,124 \pm 4\,851$) 的差异具有统计学意义 ($P < 0.000\,1$), 而非血液类样本的 *RFU* 值 ($8\,124 \pm 4\,851$) 与阴性对照 ($15\,198 \pm 18\,248$) 的差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$) (图 2)。上述实验结果表明, SHERLOCK-HBA 检测体系能够将血液与非血液类其他样本进行有效区分。

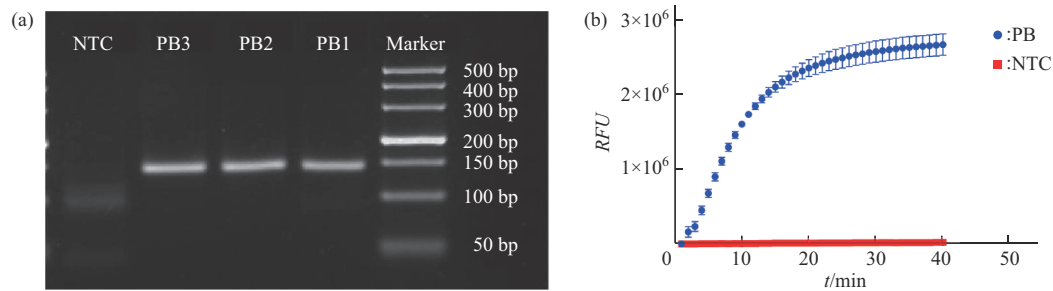


Fig. 1 Establishment and optimization of SHERLOCK-HBA system

(a) Results of HBA primers specific validation (PB1-3 represents 3 peripheral blood samples); (b) results of SHERLOCK-HBA experimental system.

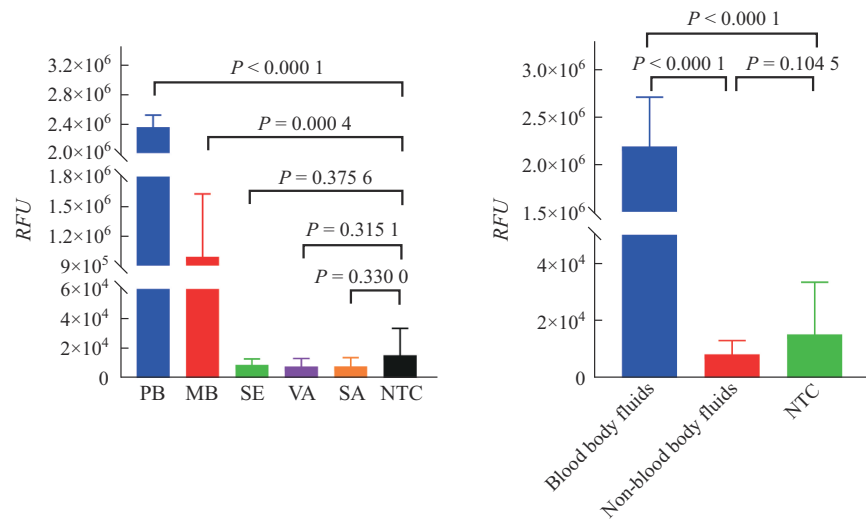


Fig. 2 Results of specific verification of body fluids

(a) Comparison of RFU values for 5 body fluid samples ($n=79$; 51 PB samples and 7 samples each of MB, SA, SE and VA); (b) comparison of RFU results between for blood samples ($n=58$, 51 PB samples and 7 MB samples) and non-blood samples ($n=21$, 7 samples each of SA, SE and VA). PB: peripheral blood; MB: menstrual blood; SE: semen; VA: vaginal secretion; SA: saliva; NTC: negative control.

2.2.2 种属特异性试验

本研究进行了常见动物血液样本的制备和检测, 收集鸡、鸭、牛、马、驴、羊、猪、兔血液样本共8个, 使用本体系进行检测, 结果显示, 人类血液样本的RFU值 ($2\,050\,932 \pm 35\,403$) 与阴性对照 ($4\,835 \pm 6\,745$) 的差异具有统计学意义 ($P < 0.0001$), 而人类血液样本的RFU值 ($2\,050\,932 \pm 35\,403$) 与动物血液样本的RFU值 ($1\,478 \pm 824$) 的差异具有统计学意义 ($P < 0.0001$), 动物血液样本的RFU值 ($1\,478 \pm 824$) 与阴性对照 ($4\,835 \pm 6\,745$) 的差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$), 证明

本检测体系具有较好的人血特异性 (图3)。

2.2.3 灵敏度试验

本研究对3份外周血样本进行了样本量从1~0.0001 ng RNA的梯度稀释检测同时并与FOB试纸条 (根据RNA浓度换算出未提取样本的体积)、CE法进行对比, 使用本方法当样本量低至0.001 ng时, 所有样本都可被检出。 t 检验分析结果显示: 在样本量为0.001 ng时, 本检测体系检测到的RFU值 ($298\,364 \pm 110\,606$) 与阴性对照 ($4\,059 \pm 3\,122$) 的差异有统计学意义 ($P = 0.0030$), 而当样本量降至0.0001 ng时, RFU值 ($18\,220 \pm 12\,685$) 与阴性

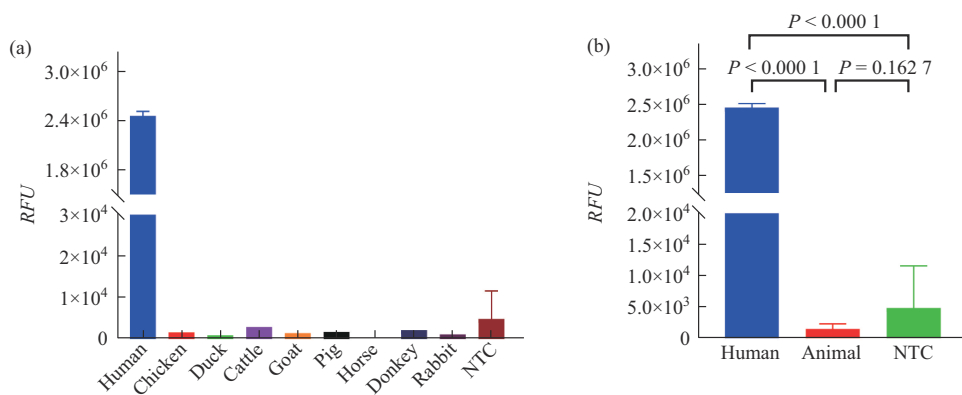


Fig. 3 Detection of species specificity

(a) Comparison of *RFU* values between human blood samples ($n=3$) and animal blood samples ($n=8$; 1 sample each of chicken, duck, cattle, goat, pig, horse, donkey, rabbit); (b) summary of *RFU* results between human blood samples ($n=3$) and animal blood samples ($n=8$; 1 samples each of chicken, duck, cattle, goat, pig, horse, donkey, rabbit). There is a significant difference between human and negative control, while the *RFUs* of animals are close to negative control, indicating that the system is less likely to be affected by forensic-related animal RNA.

对照 ($4\ 059 \pm 3\ 122$) 的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 可见本反应体系对血液样本RNA的检出下限 $0.001\ \text{ng}$ (图4a); 而金标抗人血红蛋白检测试纸条FOB则在 $0.001\ \text{ng}$ 时开始出现阴性 (图4b); CE法 (仅展示3个梯度的结果, 总体峰高呈随浓度降低而降低的趋势) 在 $0.000\ 1\ \text{ng}$ 时, HBA位点的 *RFU* 值可以检出但峰值较低 ($RFU < 500$) (图4c)。对比结果说明, SHERLOCK-HBA检测体系的灵敏度高于FOB试纸条, 与CE法近似, 具有良好的灵敏度。

2.3 实际应用能力验证

2.3.1 模拟混合斑样本试验

本研究对外周血与精液、唾液、阴道分泌液按 $1:10$ 、 $1:50$ 、 $1:100$ 混合而成的斑迹进行检测, 检测结果进行 *t* 检验, 发现所有混合样本的 *RFU* 值与阴性对照的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且可看到随着混合比例中血液成分的降低, *RFU* 值从 ($1\ 159\ 912 \pm 219\ 696$) 到 ($576\ 746 \pm 262\ 847$) 呈现明显的逐渐下降趋势 (图5)。

2.3.2 模拟降解样本试验

本研究分别进行了紫外灯照射样本、时间梯度样本的制备和检测, 每个条件各使用3份来自不同个体的外周血样本。随紫外照射时间的延长, 检测

样本中的荧光强度也逐渐降低, 在 $32\ \text{h}$ 时的 *RFU* 值 ($250\ 230 \pm 100\ 966$) 与阴性对照 (negative control, NTC) ($-1\ 431 \pm 8\ 034$) 的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图6a); 随着放置时间的延长, 检测样本的荧光强度逐渐下降, 但在放置3年的血卡样本中检测到的 *RFU* 值 ($34\ 012 \pm 9\ 643$) 与阴性对照 ($4\ 449 \pm 9\ 142$) 的差异依然具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图6b)。

2.3.3 案件样本试验

本研究进行了案件样本检测, 收集案件样本共11份 (包括1份血卡、1份血迹擦拭物、3份烟头、1份带血阴道口拭子、1份阴道拭子, 2份刀刃上血迹, 1份阴茎擦拭物、1份受害者内裤), 使用本体系进行检测, 结果如图7所示, 带有血迹样本 (1份血卡、1份血迹擦拭物、2份刀刃上血迹、1份带血阴道口拭子) 的 *RFU* 值 ($151\ 250 \pm 70\ 897$) 与阴性对照 ($3\ 367 \pm 3\ 498$) 的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 而无血迹案件样本 (3份烟头、1份阴道拭子、1份阴茎擦拭物、1份受害者内裤) 的 *RFU* 值 ($5\ 137 \pm 9\ 197$) 与阴性对照 ($3\ 367 \pm 3\ 498$) 的差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$), 本次检测结果与CE法结果 (图S1) 一致, 证明本检测体系具有较好的案件应用价值。

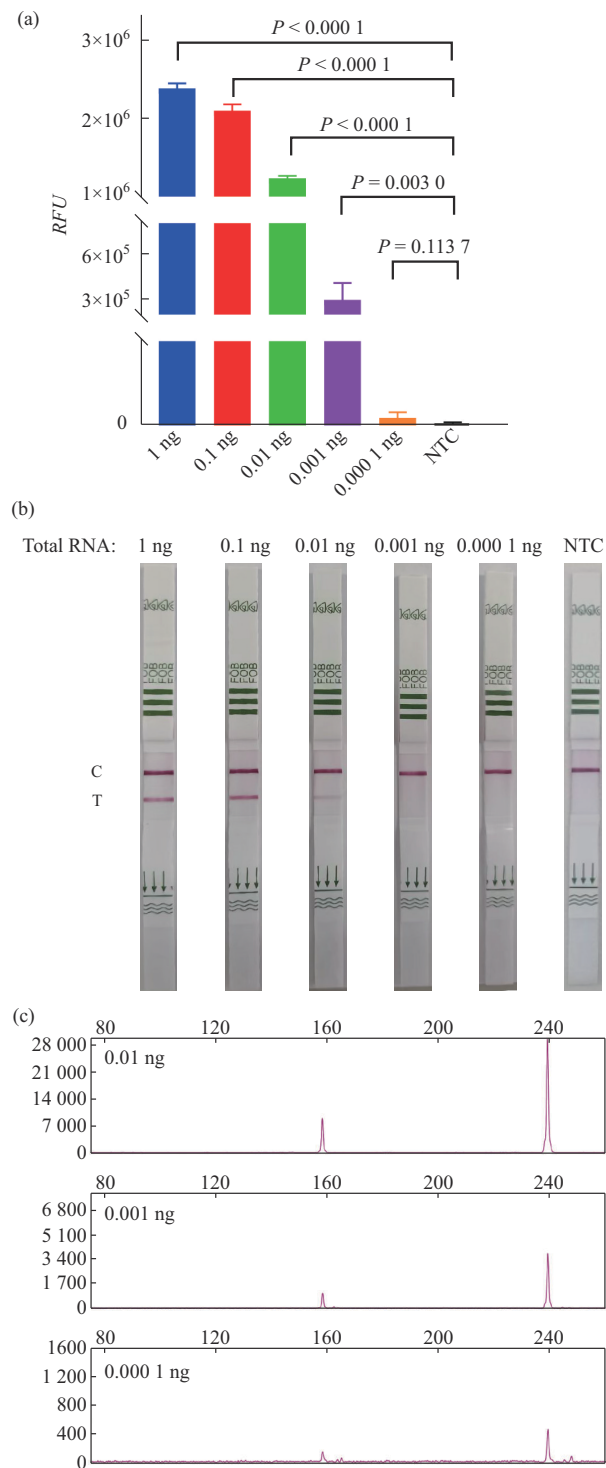


Fig. 4 The sensitivity assays of different detection methods

(a) Results of sensitivity assay in PB ($n=3$) detected by SHERLOCK-HBA; (b) results of sensitivity assay in PB ($n=3$, only one sample was shown) detected by FOB test strip; (c) results of sensitivity assay in PB ($n=3$, only three concentration gradients were shown in one sample) detected by capillary electrophoresis.

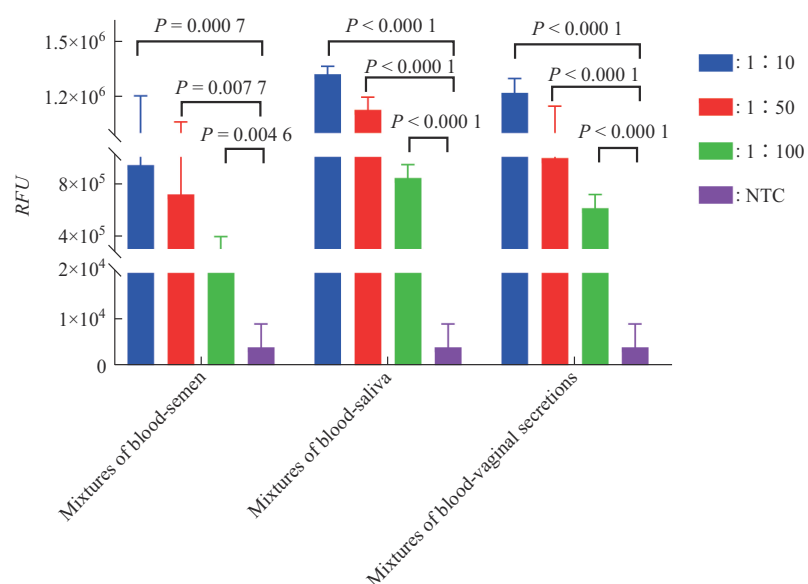


Fig. 5 Detection results of mock mixture samples

Comparison of *RFU* values between mixtures of blood-saliva ($n=9$, 3 samples each of 1 : 10, 1 : 50, 1 : 100), blood-semen ($n=9$, 3 samples each of 1 : 10, 1 : 50, 1 : 100) and blood-vaginal secretions ($n=9$, 3 samples each of 1 : 10, 1 : 50, 1 : 100).

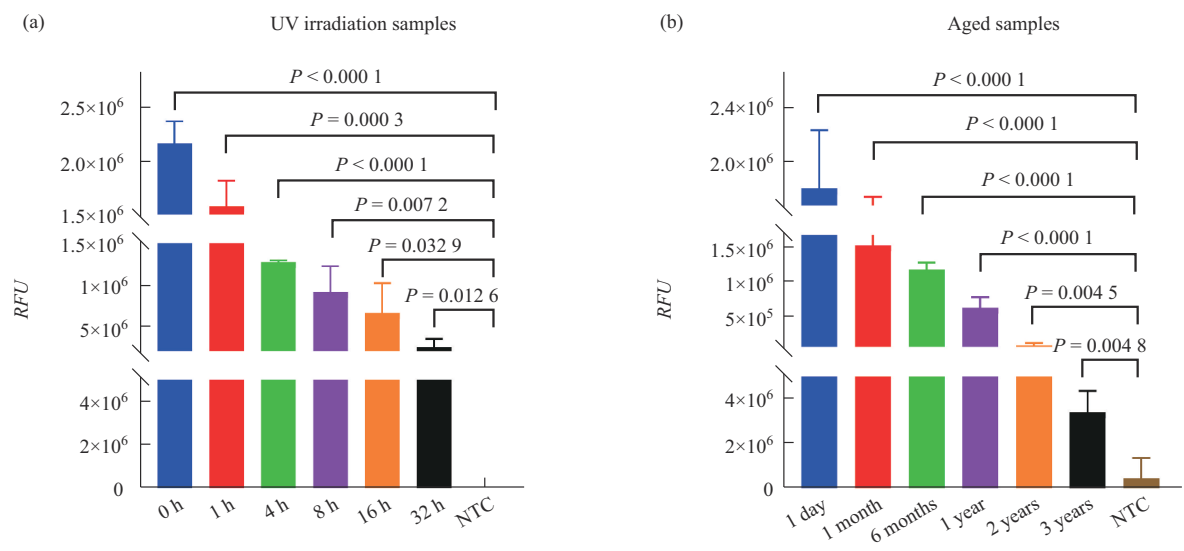


Fig. 6 Detection results of mock degraded samples

(a) Comparison of *RFU* values for UV irradiation samples ($n=18$, 3 samples each of 0, 1, 4, 8, 16, 32 h), showing that all UV irradiation samples could be detected with this system; (b) comparison of *RFU* values between aged samples ($n=18$, 3 samples each of 1 day, 1 month, 6 months, 1 year, 2 years, 3 years), showing that all aged samples could be detected with this system.

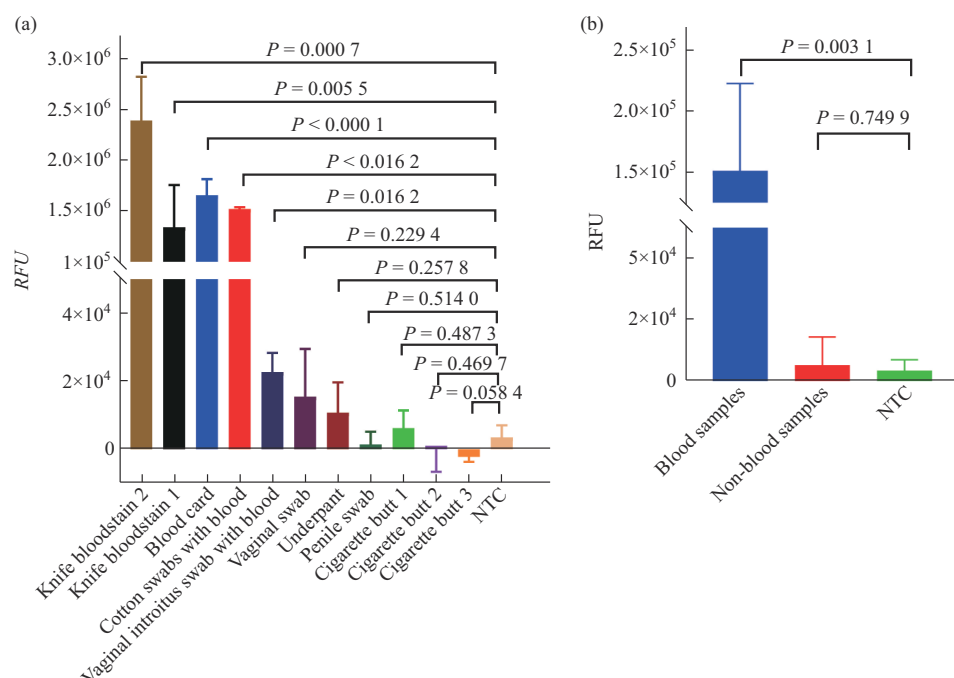


Fig. 7 Detection results of casework samples

(a) Comparison of RFU values between casework samples ($n=11$; a blood card, a cotton swabs with blood, three cigarette butts, a vaginal introitus swab with blood, a vaginal swab, two knife bloodstains, a penile swab and an underpant); (b) comparison of RFU values between blood samples ($n=5$, a blood card, a cotton swabs with blood, two knife bloodstains and a vaginal introitus swab with blood) and non-blood samples ($n=6$, three cigarette butts, a vaginal swab, a penile swab and an underpant).

3 讨 论

近年来,随着司法体制改革的深入推进,法庭对证据的要求越来越高,犯罪现场体液斑来源鉴定的重要性也日益增加,法医学工作者希望对犯罪现场的体液斑痕能够及时做出检测,因此建立简便、快速的体液斑来源检测方法具有重要意义^[16]。

CRISPR/Cas 系统是目前发现存在于大多数细菌与所有古菌中的一种免疫系统,研究发现,CRISPR/Cas 系统具有能够识别特定核苷酸序列的能力并具有附属核酸切割活性,可以与许多不同的信号读出方法相结合以进行核酸检测^[17-18]。2016年6月,布罗德研究所张峰团队首次描述了一种靶向 RNA 的 CRISPR 相关酶 Cas13a,能够经编程后切割细菌细胞中的特定 RNA 序列。不同于靶向 DNA 的 CRISPR 相关酶(如 Cas9 和 Cpf1),Cas13a 能够在切割它的靶 RNA 之后保持活性,并表现出不加区别的切割活性,而且能够在一种被称作“附带切割(collateral cleavage)”的过程当中继续切割其他的非靶 RNA,在 RNA 检测技术中显示出广

泛的潜在应用^[19-23]。2017年,张峰团队将 CRISPR/Cas 应用于生物传感并开发出 SHERLOCK 检测平台,将靶核酸通过 RPA,并引入 T7 启动子序列,通过 T7 聚合酶转录成单链 RNA(ssRNA),扩增的 ssRNA 与 Cas13a-crRNA 结合,激活 Cas13a 核酸酶活性,切割 ssRNA 荧光探针释放荧光信号,可将原始目标序列的浓度放大至 10 000 倍,且整个过程在 37°C 条件下的 1~3 h 内实现了 amol 浓度的 RNA 分子检测^[14-15]。

利用 mRNA 分析技术鉴定生物检材中各种体液斑迹的组织属性来源是近年来法医物证学的一个重要进展,法医使用的 mRNA 检测技术主要包括实时荧光定量 PCR、PCR 结合 CE 检测或二代测序(next-generation sequencing, NGS)等,但这些技术方法依赖专业的仪器设备,对技术人员的专业水平要求较高,检测时间也相对较长,仅限于实验室检测,很难应用于现场快检^[24-26]。本研究鉴于 CRISPR/Cas13a 检测 RNA 的强大能力,尝试基于 SHERLOCK 技术建立了快速检测血液特异性表达 HBA 的方法,可检测低至 0.001 ng 总 RNA 的样本,达到与 CE 法近似的灵敏度,高于传统的 FOB 试纸

条法。为进一步明确该鉴别方法在实际法医案件中的应用价值,本研究从陈旧样本、紫外照射的模拟样本、混合样本以及实际办案过程中收集到的真实案例样本的多方面进行了验证评估,均得到了理想的检测结果。其中在放置了3年的样本,以及紫外照射32 h的样本中均可以获得阳性结果,这可能是因为检测的目标片段更短,因此与常用CE方法比,更适用于降解检材^[27]。SHERLOCK技术方法全部检测过程仅需一台提供RPA实验温度的水浴锅以及一台用于荧光信号收集的PCR仪(可替换为酶标仪等具有荧光检测功能的设备),无需毛细管分析仪等大型专业设备,操作更为简单,在检测时间上更短(仅需30 min),节省了实验时间,非常适合法医现场快检的应用要求。

考虑到HBA由 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 两种珠蛋白基因组成,并在人类基因组中有4个拷贝(两种珠蛋白基因各有2个拷贝)^[28],在前期试验设计时,针对 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 在编码区的共同序列设计了可以同时扩增 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 的引物,因此该体系可以应对缺失型 α 地贫4种类型中的3种($\alpha 1$ 地贫、 $\alpha 2$ 地贫、中间型 α 地贫),可以应对非缺失型 α 地贫3种类型中的2种(α ConstantSpring(αcs)、 α QuongSze)。

实际上,在使用RT-PCR结合毛细管电泳分析仪进行体液方法鉴定时,对于未知样本的判别并非仅靠一种mRNA的表达与否进行判断,而是结合管家基因以及其他特异性基因的表达情况进行综合判断^[27],而目前本方法仅检测HBA的表达情况,因此在法医实践中如何正确使用检测结果将需要更多的研究数据进行支撑,同时仍需进一步研究月经血、唾液、精液、阴道分泌液等其他常见体液类型样本的方法适用性,并探索优化荧光信号收集与检测方法,以进一步契合法医现场快速检测的需求。

4 结 论

本检测方法的建立首次将CRISPR/Cas技术原理引入法医体液鉴定领域,是分子生物学前沿技术应用于法医检测的又一成功尝试。该方法在方法特异性、灵敏度、混合斑迹中微量血液的检出、陈旧降解类样本中血液的检出以及实际案件样本的应用上均体现了较高的适用性。SHERLOCK-HBA检测体系操作更为简单、快速,且降低了对PCR仪、毛细管分析仪等大型设备的需求,为快速识别血液类样本提供了新的思路和方法,在法医实际案件中具有很好的应用前景。

附件 见本文网络版(<http://www.pibb.ac.cn>或<http://www.cnki.net>):

PIBB_20230494_Figure_S1.pdf

参 考 文 献

- [1] An J H, Shin K J, Yang W I, *et al.* Body fluid identification in forensics. *BMB Rep*, 2012, **45**(10): 545-553
- [2] Willott G M. An improved test for the detection of salivary amylase in stains. *J Forensic Sci Soc*, 1974, **14**(4): 341-344
- [3] Leary K R O, Glynn C L. Investigating the isolation and amplification of microRNAs for forensic body fluid identification. *Microna*, 2018, **7**(3): 187-194
- [4] Sakurada K, Watanabe K, Akutsu T. Current methods for body fluid identification related to sexual crime: focusing on saliva, semen, and vaginal fluid. *Diagnostics*, 2020, **10**(9): 693
- [5] Richard M L L, Harper K A, Craig R L, *et al.* Evaluation of mRNA marker specificity for the identification of five human body fluids by capillary electrophoresis. *Forensic Sci Int Genet*, 2012, **6**(4): 452-460
- [6] Nussbaumer C, Gharehbaghi-Schnell E, Korschineck I. Messenger RNA profiling: a novel method for body fluid identification by real-time PCR. *Forensic Sci Int*, 2006, **157**(2/3): 181-186
- [7] Haas C, Hanson E, Anjos M J, *et al.* RNA/DNA co-analysis from blood stains—results of a second collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet*, 2012, **6**(1): 70-80
- [8] Salzman A P, Bamberg M, Courts C, *et al.* mRNA profiling of mock casework samples: results of a FoRNAP collaborative exercise. *Forensic Sci Int Genet*, 2021, **50**: 102409
- [9] Zhao H, Wang C, Yao L, *et al.* Identification of aged bloodstains through mRNA profiling: experiments results on selected markers of 30- and 50-year-old samples. *Forensic Sci Int*, 2017, **272**: e1-e6
- [10] Alshehhi S, Haddrill P R. Evaluating the effect of body fluid mixture on the relative expression ratio of blood-specific RNA markers. *Forensic Sci Int*, 2020, **307**: 110116
- [11] Liu B, Song F, Yang Q, *et al.* Characterization of tissue-specific biomarkers with the expression of circRNAs in forensically relevant body fluids. *Int J Legal Med*, 2019, **133**(5): 1321-1331
- [12] 冯柳, 唱凯, 陈鸣. 基于CRISPR/Cas系统的核酸即时检测技术现状及研究进展. *重庆医科大学学报*, 2022, **47**(8): 910-916
Feng L, Chang K, Chen M. *J Chongqing Med Univ*, 2022, **47**(8): 910-916
- [13] 孙雯君, 黄行许, 王鑫杰. 基于CRISPR的快速灵敏便捷分子检测. *生物工程学报*, 2023, **39**(1): 60-73
Sun W J, Huang X X, Wang X J. *Chin J Biotechnol*, 2023, **39**(1): 60-73
- [14] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Lee J W, *et al.* Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 2017, **356**(6336): 438-442
- [15] Abudayyeh O O, Gootenberg J S, Konermann S, *et al.* C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting

- CRISPR effector. *Science*, 2016, **353**(6299): aaf5573
- [16] 马丽莉, 马红杜, 黄代新. 人体组织/体液来源的法医学鉴定. *中国法医学杂志*, 2013, **28**(4): 291-294
- Ma L L, Ma H D, Huang D X. *Chin J Forensic Med*, 2013, **28**(4): 291-294
- [17] Barrangou R, Marraffini L A. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell*, 2014, **54**(2): 234-244
- [18] 陈思, 林昱坤, 宋春燕, 等. 基于 CRISPR/Cas 系统的核酸生物传感器. *生物化学与生物物理进展*, 2023, **50**(8): 1782-1796
- Chen S, Lin Y K, Song C Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2023, **50**(8): 1782-1796
- [19] 赵子璇, 李春辉, 周莉莉, 等. CRISPR/Cas 系统递送技术及其应用研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2020, **47**(4): 286-299
- Zhao Z X, Li C H, Zhou L L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2020, **47**(4): 286-299
- [20] Koonin E V, Makarova K S, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*, 2017, **37**: 67-78
- [21] Wang M, Zhang R, Li J. CRISPR/cas systems redefine nucleic acid detection: principles and methods. *Biosens Bioelectron*, 2020, **165**: 112430
- [22] van der Oost J, Westra E R, Jackson R N, *et al.* Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2014, **12**(7): 479-492
- [23] 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
- [24] Arya M, Shergill I S, Williamson M, *et al.* Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*, 2005, **5**(2): 209-219
- [25] van Dijk E L, Auger H, Jaszczyszyn Y, *et al.* Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet*, 2014, **30**(9): 418-426
- [26] Lynch C, Fleming R. One-step endpoint RT-PCR assays for confirmatory body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet*, 2023, **64**: 102856
- [27] 赵一霞, 王哲, 胡胜, 等. 一步法 mRNA 体液鉴定体系的建立及应用 [J/OL]. *刑事技术*: 1-8[2024-03-10]. <http://doi.org/10.16467/j.1008-3650.2023.0082>
- Zhao Y X, Wang Z, Hu S, *et al.* *Forensic Science and Technology*: 1-8[2024-03-10]. <http://doi.org/10.16467/j.1008-3650.2023.0082>
- [28] Luo S Q, Chen X Y, Tang N, *et al.* Pedigree analysis of nonhomologous sequence recombination of *HBA1* and *HBA2* genes. *Hemoglobin*, 2020, **44**(5): 329-333

Establishment of SHERLOCK-HBA Detection Method and Its Application in Blood Identification *

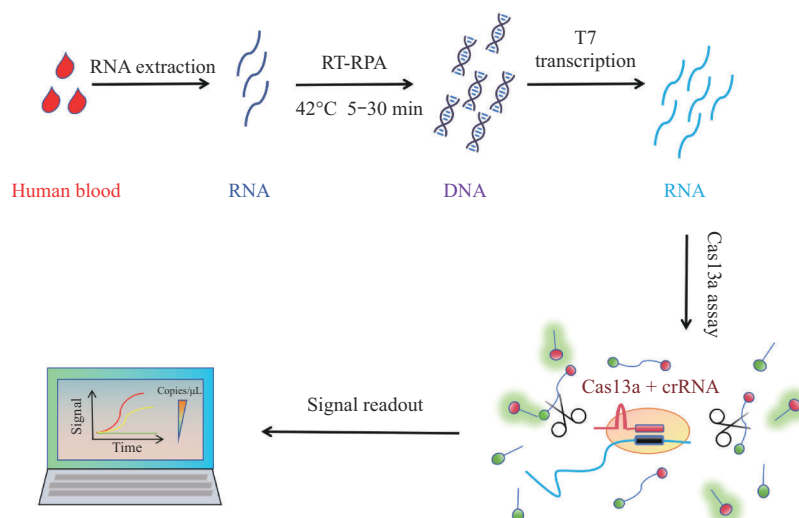
YAO Qian-Wei^{1,2)}, HE Hong-Xia³⁾, HU Sheng²⁾, ZHAO Yi-Xia²⁾, LUO Yu²⁾,
JI An-Quan^{2)**}, SUN Qi-Fan^{2)**}

⁽¹⁾Faculty of Forensic Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

⁽²⁾MPS's Key Laboratory of Forensic Genetics, National Engineering Laboratory for Crime Scene Evidence Investigation and Examination, Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security (MPS), Beijing 100038, China;

⁽³⁾Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medicine, PLA Academy of Military Sciences, Beijing 100071, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Rapid and accurate identification of body fluid traces at crime scenes is crucial for case investigation. Leveraging the speed and sensitivity of nucleic acid detection technology based on SHERLOCK, our research focuses on developing a peripheral blood SHERLOCK-HBA detection system to detect mRNA in forensic practice. **Methods** Short crRNA fragments targeting the blood-specific mRNA gene *HBA* were designed and screened, alongside RPA primers. Optimal RPA primers were selected based on specificity and amplification efficiency, leading to the establishment of the RPA system. The most efficient crRNA was chosen based on relative fluorescence units (RFU) generated by the Cas protein reaction, and the Cas protein reaction system was constructed to establish the SHERLOCK-HBA detection method. The RPA and Cas protein reaction

* This work was supported by grants from National Key R&D Programme (2022YFC3341002) and the MPS Key Laboratory of Forensic Genetics (2022JC11).

** Corresponding author.

Sun Qi-Fan. Tel: 86-15801616421, E-mail: sunqifan@cifs.gov.cn

JI An-Quan. Tel: 86-13601078664, E-mail: aqjdna@163.com

Received: December 18, 2023 Accepted: April 9, 2024

systems in the SHERLOCK detection system were then individually optimized. A total of 79 samples of five body fluids were tested to evaluate the method's ability to identify blood, with further verification through species-specific tests, sensitivity tests, mixed spots detection, aged samples, UV-irradiated samples, and actual casework samples. **Results** The SHERLOCK reaction system for the peripheral blood-specific marker HBA was successfully established and optimized, enabling detection within 30 min. The method demonstrated a detection limit of 0.001 ng total RNA, better than FOB strip method and comparable to RT-PCR capillary electrophoresis. The system could detect target body fluids in mixed samples and identify blood in samples stored at room temperature for three years and exposed to UV radiation for 32 h. Detection of 11 casework samples showed performance comparable to RT-PCR capillary electrophoresis. **Conclusion** This study presents a CRISPR/Cas-based SHERLOCK-HBA detection system capable of accurately, sensitively, and rapidly identifying blood samples. Introducing CRISPR/Cas technology to forensic body fluid identification represents a significant advancement in applying cutting-edge molecular biology techniques to forensic science. The method's simplicity, shorter detection time, and independence from specialized equipment make it promising for rapid blood sample identification in forensic cases.

Key words forensic genetics, blood identification, HBA, CRISPR/Cas, SHERLOCK

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0494