



基于 CRISPR/Cas 的分子诊断传感器 在非核酸分子诊断中的应用*

李卓 周建** 王馨 徐璞

(西安医学院第一附属医院检验科, 西安 710077)

摘要 CRISPR/Cas 不仅是一种重要的基因编辑工具, 而且还是一种有效的分子诊断工具。目前基于 CRISPR/Cas 建立了一系列的分子诊断传感器系统, 广泛应用于核酸、非核酸等检测过程中。与应用较广泛的核酸分子诊断传感器系统相比, 基于 CRISPR/Cas 的非核酸检测系统目前尚未见系统性综述, 因此本文围绕基于 CRISPR/Cas12 和 CRISPR/Cas13 建立的两大类非核酸分子传感器诊断系统的基本特征、工作流程及其检测原理等进行了全面综述, 期望能为 CRISPR/Cas 分子诊断系统在体外诊断中的应用提供依据。

关键词 CRISPR/Cas, 分子诊断传感器, 非核酸分子诊断
中图分类号 R446, Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0389

分子诊断技术已广泛应用到了生命科学、食品安全、环境监测以及临床诊断等各个方面^[1]。尤其是在新型冠状病毒感染疫情全球蔓延的大背景下, 以 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associate) 系统为代表的新兴技术在分子诊断领域迎来了快速发展, 凸显出独特的优势。传统的 PCR 方法建立的核酸分子诊断技术, 需要配备专业的实验室、特定的检测设备, 以及经过严格培训的专业技术人员等, 往往受到诸多限制^[2], 相比之下, 基于 CRISPR/Cas 的分子诊断传感器系统具有检测时间短、无需特殊设备等优势, 因此更适合床旁快速检测 (point-of-care testing, POCT)^[1]。CRISPR/Cas 技术最初主要应用于核酸检测, 随着研究的深入, 人们逐渐发现它也可以应用于非核酸分子诊断, 目前基于 CRISPR/Cas 系统已陆续建立了一系列非核酸分子检测技术^[2], 然而尚未见系统性分析其原理、特点等相关报道。本文系统综述并全面分析了基于 CRISPR/Cas 分子诊断传感器系统在非核酸分子诊断中的应用和最新进展, 期望能为其在体外诊断中的应用提供参考。

1 CRISPR/Cas 系统

1.1 CRISPR/Cas 系统的主要分类及特点

CRISPR/Cas 系统是细菌和古生菌抵御病毒等外源核酸入侵的“获得性免疫系统”, 研究表明其具有强大的基因编辑功能, CRISPR/Cas 作为基因编辑系统获得了 2020 年的诺贝尔化学奖。随着对 CRISPR/Cas 研究的深入, 已经发现了一系列的 CRISPR/Cas 系统。CRISPR/Cas 系统依据效应蛋白的种类可分为 Class-I 型和 Class-II 型, 包含 6 个亚型, 分别为: I、II、III、IV、V、VI 亚型^[3]。Class-I 型的 Cas 效应蛋白为多亚基蛋白组成的复合体, 包含 I、III、IV 亚型; Class-II 型的 Cas 效应蛋白是由单个亚基组成, 包括 II 类的 Cas9 蛋白、V 类的 Cas12 蛋白、VI 类的 Cas13 等^[4]。Class-II 型的

* 陕西省卫生健康委联合攻关项目 (B 类) (2022B009), 西安市科技局 (西安市创新能力强基计划-医学研究项目) (22YXYJ0126) 和西安医学院校级科技创新团队项目 (2021TD14) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 13919413656, E-mail: zhoujian715412@126.com

收稿日期: 2022-08-18, 接受日期: 2022-11-27

Cas效应蛋白结构单一,更适合基因工程的应用。随着对CRISPR/Cas系统应用研究的不断深入,其应用领域也在逐渐丰富。CRISPR/Cas系统已经开始应用于分子诊断系统,目前用于分子诊断的CRISPR/Cas系统主要包括Class-II型的II类CRISPR/Cas9、Class-II型的V类CRISPR/Cas12、Class-II型的VI类CRISPR/Cas13、Class-II型的V类CRISPR/Cas14,以及Class-I型的I类CRISPR/Cas3等^[5],各自的特点分别如下:a. CRISPR/Cas9系统的Cas蛋白含有HNH和RuvC酶活性区域,CRISPR/Cas9在指导RNA(guide RNA, gRNA)的引导下识别靶向序列,同时识别靶向序列上游含有5'-NGG-3'的前间区序列邻近基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)序列,gRNA引导Cas9蛋白识别靶向序列后激活HNH和RuvC酶对靶向核酸序列的切割,产生DNA双链断裂(double strand break, DSB),CRISPR/Cas9切割DNA主要产物双链的平末端^[6]; b. Class-II型V类的主要代表为CRISPR/Cas12系统,Cas12蛋白含有RuvC酶活性区域,CRISPR/Cas12在gRNA的引导下识别靶向核酸序列,CRISPR/Cas12识别DNA靶标序列和PAM序列,激活CRISPR/Cas12对靶向双链DNA切割,同时激活了CRISPR/Cas12的非靶向切割^[7]; c. Class-II型VI类的CRISPR/Cas13为针对RNA的一种核酸识别系统,在gRNA的引导下CRISPR/Cas13与crRNA序列形成复合物,识别间隔区侧翼(proto-spacer flanking, PFS)序列和靶向RNA序列后,激活了Cas13针对靶向RNA序列特异性的剪切,同时也激活了非特异性切割活性^[8]; d. CRISPR/Cas14是基于Class-II型的V类CRISPR/Cas系统,在gRNA的引导下识别靶向核酸ssDNA序列,激活其靶向切割活性,随后激活了CRISPR/Cas14对ssDNA的靶向切割^[9]; e. CRISPR/Cas3属于Class-I的I-E型CRISPR/Cas系统,Cas3靶向识别过程中需要一个crRNA,在gRNA引导Cas3下识别dsDNA靶向序列后激活Cas3蛋白对靶向dsDNA的解旋并进行切割,gRNA非互补链的切割产生缺口,也激活了Cas3蛋白的非靶向切割ssDNA^[10]。正是基于CRISPR/Cas蛋白对靶向核酸序列识别的优良特性,以及对靶向DNA或者RNA的切割特点,其在基因功能研究、重组疫苗研发、基因治疗、分子检测等方面得到越来越广泛的应用。

1.2 CRISPR/Cas系统的主要应用

CRISPR/Cas系统最早被发现具有基因编辑功能并进行了较为深入的研究,目前已有一系列的相关研究报告和文献综述^[11]。随着对Cas蛋白结构的研究,人们发现CRISPR/Cas除了应用于基因编辑外,还可以用于转录调控、基因突变以及单碱基突变疾病的治疗等方面^[8]。CRISPR/Cas系统另外一个重要的应用便是分子检测功能,具有简单快捷等优势。现已应用CRISPR/Cas9、CRISPR/Cas12、CRISPR/Cas13和CRISPR/Cas14系统构建了一系列分子诊断平台,其中核酸分子诊断系统的典型代表有SHERLOCK(specific high sensitivity enzymatic reporter unlocking)、DETECTR(DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter)等^[12]。除此之外,近年来研究者陆续发现利用CRISPR/Cas系统构建生物传感器系统,可以用于非核酸(DNA或RNA)分子的检测,并建立了一系列分子诊断平台,但目前尚缺乏全面深入的报道。本文重点针对基于CRISPR/Cas生物传感器系统在外泌体(exosome, Exo)、小分子化合物等非核酸分子诊断中的应用和最新进展做以下介绍。

2 基于CRISPR/Cas12a的分子诊断传感器在非核酸分子诊断中的应用

2.1 基于CRISPR/Cas12a的分子诊断传感器系统在Exo检测中的应用

Exo是由多种活细胞分泌的囊泡小体,研究认为Exo参与细胞间重要的信息交换,在多种病理和生理过程中发挥重要作用。Exo在不同体液中丰度不一,不同组织来源的Exo在组成和功能方面存在差异,并受到细胞外基质和微环境的动态调控,因此外泌体检测可能成为疾病病理变化的重要诊断手段^[11]。目前有研究人员应用CRISPR/Cas12a技术建立了一种快速检测外泌体的方法(CRISPR/Cas12a/exosome)^[11]。CRISPR/Cas12a/exosome系统基于Cas12a构建生物传感器,首先采用生物素标记一段含有外泌体标志物CD63适配体的DNA序列(CD63 aptamer),其中CD63 aptamer互补序列为Cas12a的靶向序列即阻断子序列(blocker)。CRISPR/Cas12a/exosome生物传感器系统检测的基本过程如下:首先将生物素(biotin)标记的CD63 aptamer与链霉亲和素标记的磁珠结合,当检测体系中有Exo存在时,CD63适配体序列与Exo上的CD63结合并且吸附于磁珠表面,导致blocker

释放至反应体系, 通过磁铁将磁珠、CD63 aptamer/Exo/磁珠的复合体与 blocker 分离, Cas12a 在 gRNA 的引导下识别靶向 Blocker 序列后激活其靶向切割, 同时也激活 Cas12a 非特异性切割荧光素标记的非靶向核苷酸序列产生荧光信号。当检测系统不存在 Exo 时, CD63 适配体序列与磁珠结合, 不能释放 Blocker 序列, 在磁珠分离过程中 blocker

序列一起被磁珠吸附分离, 因此 Cas12a 未识别到 blocker 序列的存在, 不能激活 Cas12a 切割活性, 因而未有荧光信号产生。此技术目前已经成功应用于临床样本的外泌体检测过程中, 其检测范围为 $3\times10^9\sim6\times10^{13}$ particles/L, 并在肝癌患者和健康患者的临床样本中进行了系统验证 (图 1, 表 1)。

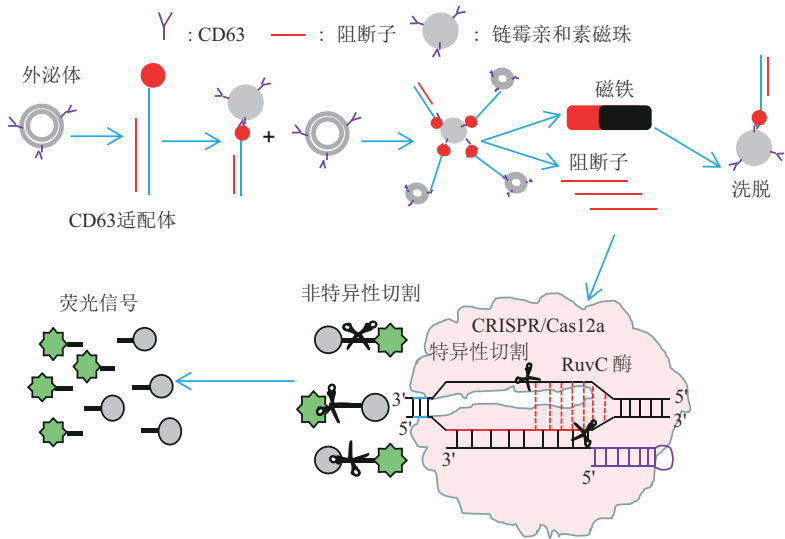


Fig. 1 Principle diagram of exosome detection by CRISPR/Cas12a biosensor^[11]
图1 CRISPR/Cas12a生物传感器外泌体检测原理示意图^[11]
CD63, 外泌体表面特有的标志物。

2.2 基于CRISPR/Cas12a建立的CaT-SMelor小分子化合物检测系统

CaT-SMelor (CRISPR-Cas12a and aTF-mediated small molecule detector) 小分子检测平台 (图 2a)^[12] 是基于 LbCas12a 联合变构转录因子 (allosteric transcription factor, α TF) 构建的小分子检测系统: α TF 通过纤维素结合域 (cellulose-binding domain, CBD) 固定在微晶纤维素上, 含有能被纤维素结合域变构转录因子 (CBD- α TF) 复合体识别的 dsDNA 序列, 作为 Cas12a 识别的靶向序列。CaT-Smelor 系统检测基本流程如下: dsDNA 与 CBD- α TF 形成复合体, 当被检测目标小分子与 CBD- α TF 结合时, 引起复合体构象改变, 复合体解聚释放 dsDNA, gRNA 引导 Cas12a 识别靶向 dsDNA 序列, Cas12a、gRNA 和靶向序列形成三元复合体后激活 Cas12a 特异性切割和非特异性切割荧光标记的非靶向 ssDNA 序列产生荧光信号, 其强弱与反应体系中小分子化合物成正比, 通过荧

光信号强弱定性和定量分析小分子化合物含量。目前构建的 CaT-SMelor 小分子检测系统, 已经可以检测人类血清样本中的尿酸, 检测时间大约 1 h, 检测限 (LOT) 为 1 nmol/L, 一次检测可应用 96 孔板进行高通量检测 (图 2a, 表 1)。

2.3 基于CRISPR/Cas12a建立的无细胞物传感器小分子化合物检测系统

基于 Cas12a 构建的 Cas12a-依赖的无细胞小分子检测传感器 (cell-free biosensors) 检测平台 (图 2b), 其基本检测流程为: 构建一段含有 T7 启动子、操纵子、T7 启动子的终止密码子序列和 gRNA 和 Cas12a 识别的 dsDNA 靶向序列。 α TF 可以与 T7 启动子下游的操纵子序列结合抑制 T7 启动子的转录下游的 dsDNA 转录为前 crRNA (pre-crRNA)。当反应体系中有小分子存在时, 其可以与 α TF 结合引起 α TF 构象改变后与操纵子区域分离, 激活 T7 启动子的转录活性, 转录为 pre-crRNA 后经过酶切产生成熟的 crRNA, 与 Cas12a 形成复合体识别靶

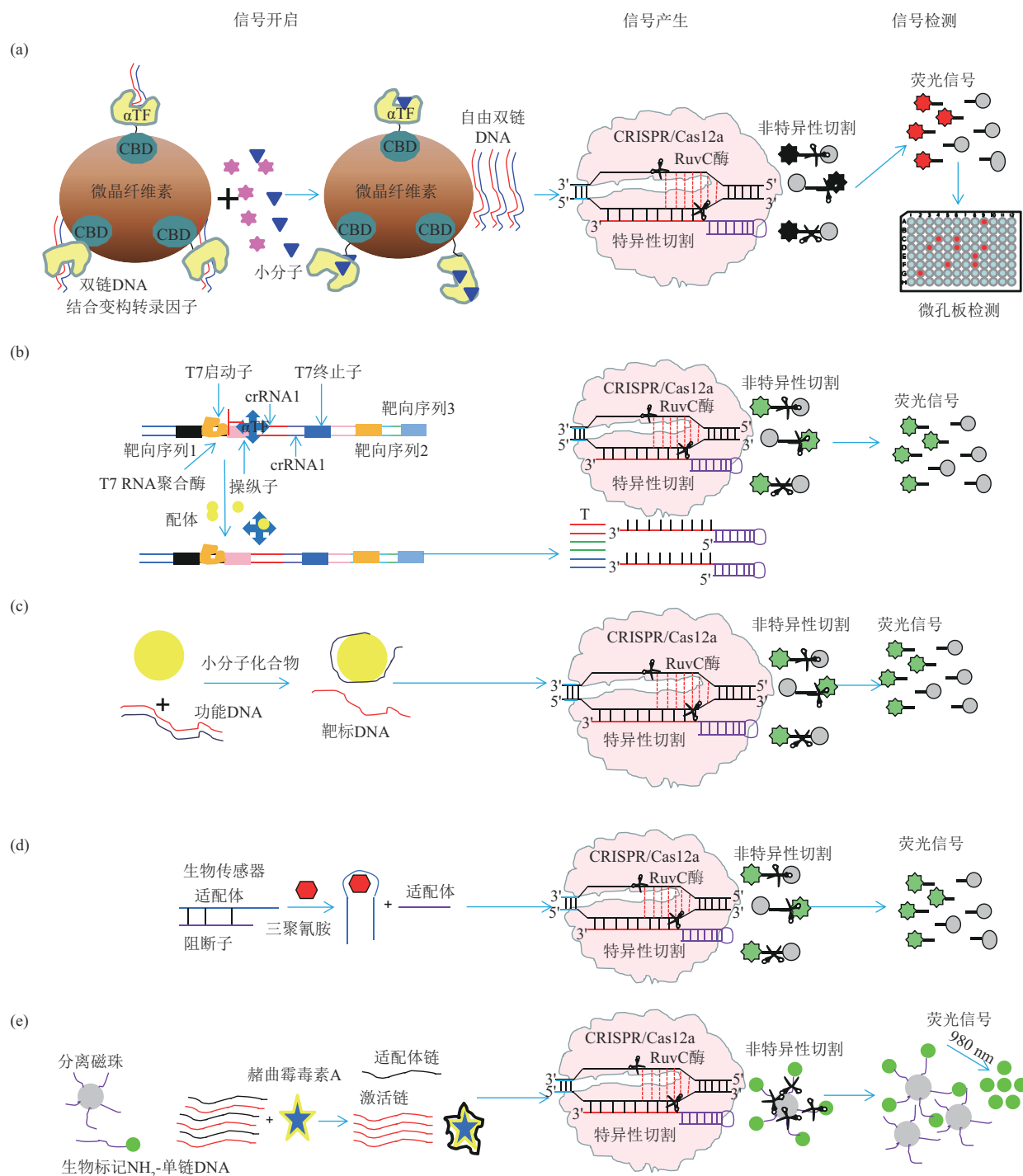


Fig. 2 Schematic diagram of small molecule detection based on CRISPR/Cas12a molecular diagnostic sensor

图2 基于CRISPR/Cas12a分子诊断传感器的小分子检测原理示意图

(a) 基于CRISPR/Cas12a构建的CaT-SMELOR小分子化合物检测系统^[12]; (b) 基于CRISPR/Cas12a建立的无细胞小分子检测传感器 (cell-free biosensors)^[13]; (c) 基于CRISPR/Cas12a联合功能DNA建立的小分子化合物检测系统^[14]; (d) 基于CRISPR/Cas12a建立的三聚氰胺检测系统^[15]; (e) 基于CRISPR/Cas12a建立的赭曲霉毒素A检测系统^[16]。 α TF, 变构转录因子; CBD, 纤维素结合域。

向序列, 激活双荧光标记的非特异切割产生荧光信号, 以检测小分子化合物的含量。无细胞生物传感器检测系统具有高灵敏度和高特异性等特点, 目前

已经用于快速检测环境中的四环素等抗生素, 检测时间约2 h^[13] (图2b, 表1)。

2.4 基于CRISPR/Cas12a联合功能DNA建立的小分子化合物检测系统

基于 Cas12a 和功能 DNA (functional DNA, fDNA) 构建的小分子化合物生物传感器检测平台 (图 2c), 是 fDNA 调节的 CRISPR/as12a 小分子检测系统 (fDNA-Cas12a)。fDNA-Cas12a 检测系统基本流程如下: 当系统不存在检测的靶标小分子化合物时, fDNA 与 CRISPR/as12a 识别的靶向序列结合, 抑制 CRISPR/as12a 系统与靶向识别 DNA 序列的结合, 系统不产生荧光信号; 当反应体系中有检测的靶向检测小分子化合物时, fDNA 释放 CRISPR/as12a 系统可识别 DNA 序列结合, 激活 CRISPR/as12a 切割荧光标记的非靶向 ssDNA 序列产生荧光信号。fDNA-Cas12a 系统目前已经应用于三磷酸腺苷 (ATP) 和钠离子 (Na^+) 的检测, 该系统的检测时间短, 且室温条件下即可完成反应^[14] (图 2c, 表 1)。

2.5 基于CRISPR/Cas12a建立的三聚氰胺检测系统

基于 CRISPR/Cas12a 建立的三聚氰胺检测系统 (aptamer-blocker) (图 2d): 首先通过构建适配体 (aptamer) 和阻断子 (blocker), 在有 三聚氰胺 存在的情况下 Aptamer 形成发卡结构, 解离释放 blocker 序列, 其中 blocker 为 Cas12a 识别的靶向序列, 二者识别后形成复合体后激活靶向切割和非靶向切割荧光标记的非特异性 ssDNA 序列产生荧光信号, 通过检测荧光信号即可反映三聚氰胺的含量^[15]。目前该技术已应用于牛奶中三聚氰胺的检测, 其检测过程大约需要 20 min, 检测下限为 38 nmol/L, (图 2d, 表 1)。

2.6 基于CRISPR/Cas12a建立的赭曲毒素A检测系统

基于链霉亲和素磁珠荧光信号 (magnetic separation fluorescent signal) 和 CRISPR/Cas12a 构建的赭曲毒素 A (ochratoxin A, OTA) 生物传感器检测系统 (图 2e): 首先构建 OTA 的适配体序列, 其互补序列为 CRISPR/Cas12a 的靶向识别的序列。当反应体系中有 OTA 存在, 适配体序列与 OTA 结合释放其互补序列 (CRISPR/Cas12a 的靶向识别的序列), gRNA 引导 CRISPR/Cas12a 识别靶向序列 (为适配体序列的互补序列), 激活 Cas12a 的复合

体激活靶向切割和非靶向切割磁珠链霉亲和素和荧光素标记的 ssDNA 序列后产生荧光信号, 应用磁铁分离未切割磁珠链霉亲和素和荧光素标记分子, 检测切割后荧光信号^[16]。该技术现已应用于检测食品中的 OTA, 其检测时间约为 1 h (图 2e, 表 1)。

3 基于CRISPR/Cas13a的分子诊断传感器在非核酸分子诊断中的应用

3.1 基于CRISPR/Cas13a建立的碱性磷酸酶(ALP)活性检测系统

基于 Cas13a 构建的碱性磷酸酶 (ALP) 活性测定生物传感器检测系统 (TITAC-Cas) (图 3a): 首先设计一个含有 T7 启动子的 DNA 双链 (double strand DNA, dsDNA), 其中 5' 端被磷酸化, 监测反应体系中无靶向分子 ALP 存在时, T7 启动子会被 λ 外切酶降解导致 T7 无法启动。然而当 ALP 存在时, 5' 端发生去磷酸化, T7 启动子开启转录活性, 转录出能被 CRISPR/Cas13a 识别的靶向序列, 启动 CRISPR/Cas13a/gRNA 复合体的靶向切割和非靶向切割产生荧光信号^[17]。目前该技术已经应用于 HepG2 细胞的 ALP 活性测定, 其检出限为 6 mU/L, 检测原理和基本特点如图 3a 和表 1。

3.2 基于CRISPR/Cas13a建立的病原微生物检测系统

基于 Cas13a 建立的沙门菌生物传感器检测系统, 即 Cas13a 联合变构探针的沙门菌检测平台 APC-Cas (allosteric probe-initiated catalysis and CRISPR/Cas13a) (图 3b): 设计能够识别病原体的特异性变构探针 (allosteric probe, AP), 在病原体存在的情况下, AP 能特异性与目标病原体结合, 改变构象, 并在引物和 DNA 聚合酶的作用下合成 dsDNA, 随后利用 T7 启动子, 启动适配体序列的转录, 转录产物单链 RNA (signal strand RNA, ssRNA) 为 Cas13a 识别的靶向序列, 激活 CRISPR/Cas13a 靶向切割和非靶向切割产生荧光信号, 通过检测荧光信号反映病原微生物是否存在。目前已采用 APC-Cas 技术实现了沙门氏菌的定量检测^[18], 可应用于牛奶等样本的沙门菌检测, 其检测范围 1~105 CFU, 与传统的实时聚合酶链反应 (real-time PCR) 法和培养法相比, 具有检测时间短等优势 (图 3b, 表 1)。

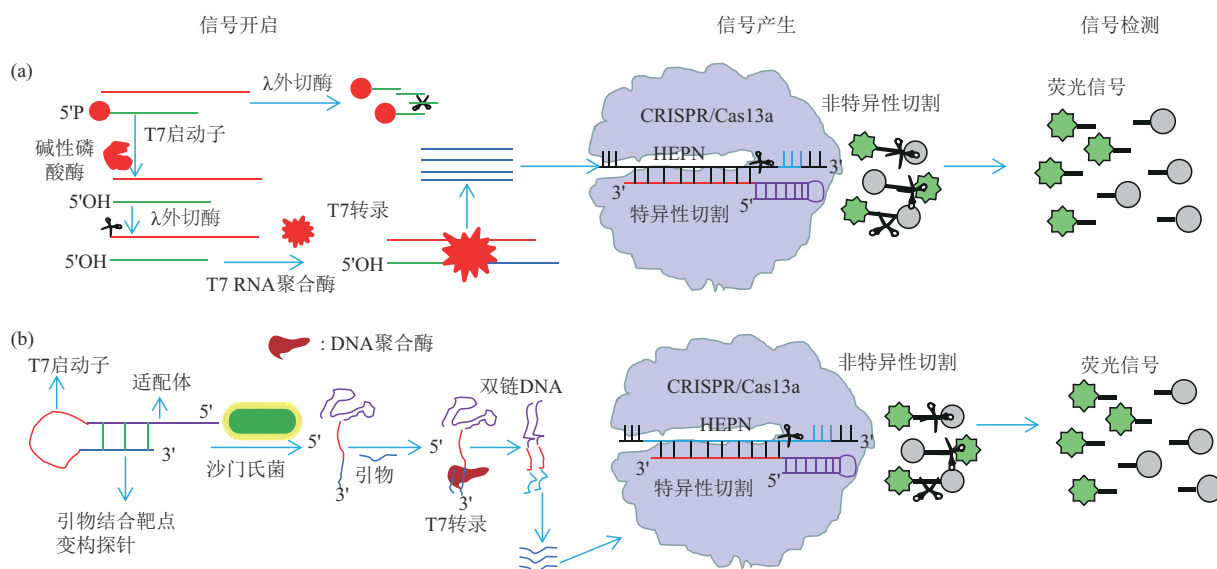


Fig. 3 Non-nucleic acid molecular diagnosis sensor detection system based on CRISPR/Cas13a

图3 基于CRISPR/Cas13a建立的非核酸分子诊断传感器检测系统

(a) 基于CRISPR/Cas13a建立的ALP活性检测系统^[17]; (b) 基于CRISPR/Cas13a建立的病原微生物检测系统^[18]。

Table 1 Application characteristics of CRISPR/Cas biosensor system in non-nucleic acid molecular detection

表1 CRISPR/Cas生物传感器系统在非核酸分子检测中的应用特点

检测系统	Cas 效应蛋白	PAM	靶标序列类型	检测时间	检测限	信号	定量	检测靶标分子	样本类型	参考文献
CRISPR/Cas12a/exosome	LbCas12a	5'-TTTV	DNA	~40 min	3×10^9 /L	荧光	是	外泌体	血浆	[11]
CaT-SMElor	LbCas12a	5'-TTTV	DNA	< 1 h	1 nmol/L	荧光	是	尿酸	血	[12]
Cell-free biosensors	Cas12a	5'-TTTV	DNA	~2 h	2 μ mol/L	荧光	是	小分子化合物	环境样本	[13]
fDNA-Cas12a	LbCas12a	5'-TTTV	DNA	< 1 h	4.75 μ mol/L	荧光	是	三磷酸腺苷和钠离子	血液	[14]
Aptamer-blocker	LbCas12a	5'-TTTV	DNA	~20 min	38 nmol/L	荧光	是	三聚氰胺	婴儿奶粉	[15]
Ochratoxin A cas12a	Cas12a	5'-TTTV	DNA	~1 h	5 μ g/L	荧光	是	赭曲霉毒素A	食品	[16]
TITAC-Cas	Cas13a	3'-PFS: H	RNA	100 min	6 mU/L	荧光	是	碱性磷酸酶	HepG2 细胞	[17]
APC-Cas	LbuCas13a	3'-PFS: H	DNA/RNA	30 min	1×10^3 cfu/L	荧光	是	沙门氏菌	牛奶	[18]

V代表4种碱基中的A/C/G (V=A/C/G)。

4 CRISPR/Cas分子诊断传感器在非核酸分子诊断应用中的优缺点和应用前景

随着新型冠状病毒疫情的蔓延,分子诊断技术得到了极大发展。CRISPR/Cas系统作为一种新兴的分子诊断技术,对病原菌的快速分子诊断具有很大潜力,现已应用于严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)的快速检测。CRISPR/Cas分子诊断技术的检测靶标分子主要为核酸和非核酸两种类型,其在核酸检测方面已得到深入研究和广泛应用,前期已有较多的总结和回顾性文献报道,但在

非核酸检测方面的应用尚未见系统性的研究报道。本文重点阐述了CRISPR/Cas分子诊断传感器系统在非核酸诊断中的应用。

4.1 CRISPR/Cas分子诊断传感器在非核酸分子诊断中的优点

目前应用于非核酸分子诊断的CRISPR/Cas系统主要有Cas12a和Cas13a两种类型,其检测样本类型复杂多样,涵盖了人的血液、体液、牛奶、食品、甚至环境样本等,检测过程所需时间从20~120 min不等,因此部分检测系统可实现即时检测。CRISPR/Cas分子诊断传感器系统具有适应复杂多

样化的样本、检测时间短、操作流程简单、灵敏度高、特异性高,不需要昂贵的仪器设备和专业的实验环境等众多优势。检测的靶向分子从病原微生物到小分子三聚氰胺化合物均可实现,凸显出了CRISPR/Cas检测系统的靶标分子的广泛性、样本类型的普遍性以及检测操作的便捷性,且不需要复杂的检测设备,更适用于POCT。因此CRISPR/Cas检测更适于在医疗水平欠发达地区,以及需要即时检测的场景,如:海关、车站、学校甚至灾区等场所,进行推广应用。

4.2 CRISPR/Cas分子诊断传感器在非核酸分子诊断中的局限性

作为一种新型检测技术,CRISPR/Cas分子诊断传感器也存在一定的缺陷。a. CRISPR/Cas系统Cas蛋白的识别靶向序列过程中具有脱靶(off target)效应^[9, 19-20],在gRNA的引导下Cas蛋白识别靶向核酸序列过程中,与非靶点核酸序列部分错配形成CRISPR/Cas、gRNA、ssDNA/ssRNA三元复合物,产生脱靶切割,引起检测结果的假阳性。其解决方法为:通过寻找高保真CRISPR/Cas系统家族成员,或基因工程的方法设计优化CRISPR/Cas蛋白碱基序列获得高保真CRISPR/Cas突变体,通过优化gRNA的设计提高靶向效应(on target)并降低脱靶效应,提高阳性检出率。基于CRISPR/Cas的脱靶问题,本课题组前期建立了哺乳动物细胞优化的CRISPR/Cas系统,并对其特异性进行了不断优化,目前正在尝试基于该系统构建疾病临床诊断模型(数据尚未发表)。b. 序列限制,CRISPR/Cas系统设计时,gRNA靶点序列必须依赖于PAM序列,限制了检测的灵活性,因此需要寻找更多非严格依赖PAM的Cas蛋白,以增加检测灵活性。c. 大多数CRISPR/Cas检测系统需要进行体外核酸扩增,因此需要联合传统的PCR技术和LAMP技术等,尚无法实现临床POCT中的应用。基于这一问题,目前已采用CRISPR/Cas系统建立了一系列无需依赖于体外核酸扩增的核酸检测技术,但是仍存在检测限低等问题。目前研究者正在尝试通过优化体系来改善检测极限,以提高临床应用。d. CRISPR/Cas12和CRISPR/Cas13系统靶向切割后,CRISPR/Cas、gRNA和ssDNA/ssRNA形成的三元复合物解散失去靶向切割的同时也失去了非靶向切割(附带切割)能力,可通过优化降低CRISPR/Cas靶向切割活性,提高非靶向切割活性,

以提高检测灵敏度。e. 目前大多数基于CRISPR/Cas系统建立的分子诊断平台还无法实现高通量检测,欲提高检测通量就需要开发高通量的CRISPR/Cas分子诊断系统。伴随着科技的发展,未来可将CRISPR/Cas检测系统平台与信息技术和生物标记技术联合以提升检测效率,提高检测灵敏度和特异性,实现可视化检测,高通量、POCT等检测能力。f. 目前基于CRISPR/Cas建立的非核酸分子诊断系统的种类和数量还是很有限,很难适应复杂多样化的样本类型和分子种类,因此需要进一步完善基于CRISPR/Cas建立的非核酸分子诊断系统。

综上所述,CRISPR/Cas分子诊断传感器作为一种新型检测技术,无论在核酸分子诊断中还是在非核酸分子诊断中都具有广阔的应用前景。提高CRISPR/Cas系统的分子诊断能力,将有助于更好地服务于疫情防控、生物安全监测、食品安全检测、环境监测以及临床疾病诊断等领域,具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Priya Swetha P D, Sonia J, Sapna K, *et al.* Towards CRISPR powered electrochemical sensing for smart diagnostics. *Curr Opin Electrochem*, 2021, **30**(8): 100829
- [2] Entesari M, Zamani M, Heidarizadeh M, *et al.* An insight into detection pathways/biosensors of highly infectious coronaviruses. *Mol Biotechnol*, 2022, **64**(4): 339-354
- [3] Makarova K S, Wolf Y I, Iranzo J, *et al.* Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol*, 2020, **18**(2): 67-83
- [4] Wang J, Zhang C, Feng B. The rapidly advancing Class 2 CRISPR-Cas technologies: a customizable toolbox for molecular manipulations. *J Cell Mol Med*, 2020, **24**(6): 3256-3270
- [5] Pickar-Oliver A, Gersbach C A. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, **20**(8): 490-507
- [6] Wang T, Wei J J, Sabatini D M, *et al.* Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, **343**(6166): 80-84
- [7] Marraffini L A. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*, 2015, **526**(7571): 55-61
- [8] Wu W Y, Lebbink J H G, Kanaar R, *et al.* Genome editing by natural and engineered CRISPR-associated nucleases. *Nat Chem Biol*, 2018, **14**(7): 642-651
- [9] Fonfara I, Richter H, Bratovic M, *et al.* The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*, 2016, **532**(7600): 517-521
- [10] Creutzburg S C A, Wu W Y, Mohanraju P, *et al.* Good guide, bad guide: spacer sequence-dependent cleavage efficiency of Cas12a.

- Nucleic Acids Res, 2020, **48**(6): 3228-3243
- [11] Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. J Clin Invest, 2016, **126**(4): 1208-1215
- [12] Liang M, Li Z, Wang W, *et al.* A CRISPR-Cas12a-derived biosensing platform for the highly sensitive detection of diverse small molecules. Nat Commun, 2019, **10**(1): 3672
- [13] Mahas A, Wang Q, Marsic T, *et al.* Development of Cas12a-based cell-free small-molecule biosensors *via* allosteric regulation of CRISPR array expression. Anal Chem, 2022, **94**(11): 4617-4626
- [14] Xiong Y, Zhang J, Yang Z, *et al.* Functional DNA regulated CRISPR-Cas12a sensors for point-of-care diagnostics of non-nucleic-acid targets. J Am Chem Soc, 2020, **142**(1): 207-213
- [15] Qiao B, Xu J, Yin W, *et al.* "Aptamer-locker" DNA coupling with CRISPR/Cas12a-guided biosensing for high-efficiency melamine analysis. Biosens Bioelectron, 2021, **183**(7): 113233
- [16] Mao Z, Wang X, Chen R, *et al.* Upconversion-mediated CRISPR-Cas12a biosensing for sensitive detection of ochratoxin A. Talanta, 2022, **242**(5): 123232
- [17] Wang X, Zhou S, Chu C, *et al.* Target-induced transcription amplification to trigger the trans-cleavage activity of CRISPR/Cas13a (TITAC-Cas) for detection of alkaline phosphatase. Biosens Bioelectron, 2021, **185**(8): 113281
- [18] Shen J, Zhou X, Shan Y, *et al.* Sensitive detection of a bacterial pathogen using allosteric probe-initiated catalysis and CRISPR-Cas13a amplification reaction. Nat Commun, 2020, **11**(1): 267
- [19] Abudayyeh O O, Gootenberg J S, Essletzbichler P, *et al.* RNA targeting with CRISPR-Cas13. Nature, 2017, **550**(7675): 280-284
- [20] Wiedenheft B, Sternberg S H, Doudna J A. RNA-guided human genome engineering *via* Cas9. Nature, 2012, **482**(7385): 331-338

Application of CRISPR/CAS Molecular Diagnostics Biosensor in Non-nucleic Acid Molecular Diagnosis*

LI Zhuo, ZHOU Jian**, WANG Xin, XU Pu

(Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, China)

Abstract CRISPR/Cas is not only an important gene editing tool, but also an effective molecular diagnostic tool. Presently, based on the CRISPR/Cas, a series of molecular diagnostic sensor systems have been established, which are widely used in nucleic acid and non-nucleic acid detection. There have been series reviews of nucleic acid molecular diagnostic sensor system based on CRISPR/Cas. However, there is no systematic review of CRISPR/Cas-based non-nucleic acid detection system. This paper is to review CRISPR/Cas-based non-nucleic acid molecular sensor diagnosis system of characteristics and principles. CRISPR/Cas system of non-nucleic acid molecular sensor diagnosis system is divided into two type, CRISPR/Cas12 and CRISPR/Cas13. Based on CRISPR/Cas12a, detection system of exosomes, CaT-SMelor small-molecule compounds, cell-free biosensors, fDNA-based small-molecule compounds, melamine and ochratoxin was established. Another large class of non-nucleic acid molecular diagnostic sensor systems that based on CRISPR/Cas13 is alkaline phosphatase (ALP) activity and pathogen detection system. The advantages of CRISPR/Cas of molecular diagnosis *in vitro* have been demonstrated. Therefore, the basic work flow, detection principle and characteristics of non-nucleic acid molecular diagnosis based on CRISPR/Cas molecular diagnosis sensor system are reviewed in this paper. It is expected to provide a basis for the application of CRISPR/Cas-based molecular diagnostic system in *in vitro* diagnosis.

Key words CRISPR/Cas, molecular diagnostics biosensor, non-nucleic acid molecular diagnosis

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0389

* This work was supported by grants from Health Committee of Shaanxi Province, Joint Project (Class B) (2022B009), Xi'an Science and Technology Bureau Project (Medical Research Project of Xi'an Innovation Capability Foundation project) (22YXYJ0126), and Project of Scientific and Technological Innovation Team of Xi'an Medical College (2021TD14).

** Corresponding author.

Tel: 86-13919413656, E-mail: zhoujian715412@126.com

Received: August 18, 2022 Accepted: November 27, 2022