



CRISPR/Cas12a 系统：核酸检测的多功能工具*

党生^{1,2)**} 张帅^{1)**} 翟景波^{1,3,4)***}⁽¹⁾ 内蒙古民族大学医学院, 通辽 028000; ⁽²⁾ 通辽市科尔沁区第一人民医院, 通辽 028000;⁽³⁾ 人兽共患病防控自治区高等学校重点实验室, 通辽 028000; ⁽⁴⁾ 内蒙古自治区布鲁氏菌病防治工程技术研究中心, 通辽 028000)

摘要 规律成簇的间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 是原核生物的适应性免疫系统, 对抗外来遗传物质 (如质粒和噬菌体) 的攻击。近年来, 科学家们发现了一种新型基因编辑工具, 一种强大的分子剪刀 CRISPR/Cas12a 系统, 该系统在对靶标 DNA 进行切割的同时还具有对体系内单链 DNA 进行任意切割的活性, 并将其转移到体外检测系统。本文对 CRISPR/Cas12a 系统组成、结构、Cas12a 与 Cas9 的对比和 CRISPR/Cas12a 系统在核酸检测中的应用进行了综述。

关键词 规律成簇的间隔短回文重复序列, Cas12a, CRISPR RNA, 原间隔子相邻基序, Cas9, 核酸检测

中图分类号 Q71

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0163

规律成簇的间隔短回文重复序列 (CRISPR) 和 CRISPR 相关基因 (CRISPR-associated, Cas) 组成的 CRISPR/Cas 系统, 构成细菌和古细菌的适应性免疫系统, 用以保护自身免受外来遗传物质的影响^[1]。CRISPR/Cas 的发现揭示了细菌和古细菌获得遗传物质并将其整合到自身基因组中的能力, 证明了周围环境和原核基因组之间的信息交换^[1]。其发挥功能包括 3 个阶段 (图 1), 每一阶段都需要由 CRISPR 序列附近的 Cas 基因编码的特定 Cas 蛋白, 以及其他辅助蛋白^[2-3]。第一阶段为适应: 细菌通过特定的 Cas 蛋白, 如 Cas1 和 Cas2 从入侵的 DNA/RNA 中识别和提取原间隔子, 并将其整合到自身的 CRISPR 序列中, 原间隔子的识别始于适应复合体对原间隔子相邻基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 的识别^[3], 随后, 将间隔区 (邻近 PAM 的序列) 整合到 CRISPR 阵列中, 并重复该保守的重复序列。PAM 序列被排除在 CRISPR 序列之外, 是第一个用于识别目标核酸进行降解的识别基序^[3-5]。第二阶段为表达: CRISPR 序列转录并加工成与外来基因序列匹配的引导 RNA (guide RNA, gRNA), 每个 gRNA 分子包含间隔区和重复序列, 与相对应的 Cas 蛋白结合。第三阶段为干扰: gRNA 和 Cas 蛋白形成的复合物定位到与其同

源的入侵核酸靶点上, 并激活 Cas 蛋白内切酶活性, 该内切酶由 gRNA 引导, 经过 PAM 识别后, gRNA 通过其间隔序列与目标 DNA 杂交, 最终切割目标 DNA 序列, 从而发挥免疫功能。

CRISPR/Cas 系统被分为 2 类 6 型。1 类包括 I、III 和 IV 型, 通过多个 Cas 蛋白发挥功能, 最常见于细菌和古菌中, 约占所有已鉴定 CRISPR/Cas 位点的 90%。2 类系统包括 II (Cas9)、V (Cas12) 和 VI (Cas13) 型, 通过单一的 Cas 蛋白发挥功能^[6-7], 大部分存在于细菌中, 小部分存在于古菌和噬菌体中 (如 V 型中的 V-F 亚类、V-J 亚类), 约占所有已鉴定的 CRISPR/Cas 位点的 10%。由 1 个 CRISPR RNA (crRNA) 和 1 个 Cas 蛋白组装成 1 个核酸蛋白复合物^[8], 是理想的基因编辑和体外检测工具。crRNA 包含针对特定 DNA 序列的信息, 多结构域效应 Cas 蛋白在识别 PAM 序列后, 通过

* 国家自然科学基金 (82160312), 内蒙古自治区科技重大专项 (2019ZD006), 2023 年度青年科技人才发展项目 (创新团队) 人兽共患病防控关键技术研究项目 (NMGIRT2315) 和内蒙古自治区自然科学基金 (2023MS08057) 资助。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 0475-8314234, E-mail: jbzhai@imn.edu.cn

收稿日期: 2023-04-21, 接受日期: 2023-08-21

crRNA 与目标序列之间的互补性来实现干扰目标 DNA^[9]。最广泛的 CRISPR/Cas 系统是在化脓性链球菌 (Sp) 中发现的 II-A 亚型, 如第一个被用于基因编辑的 SpCas9 蛋白^[10]。2 类 V 型进一步分为 V-A~V-M、V-U 亚型^[11]。其中 V-A 编码蛋白 Cas12a (也称为 Cpf1), 通过对 Cas12a 蛋白的高分辨率结构研究, 有助于对其工作机制进行深入的

探索^[12-13]。

2015 年张锋团队^[14]报道了 CRISPR/Cpf1 (Cas12a) 具有核酸内切酶活性, 并提出 CRISPR/Cas12a 将在以后的基因编辑和生物技术领域发挥重要作用。本文对 CRISPR/Cas12a 系统中各组分的序列、结构要求, 与 Cas9 的对比及其在体外核酸检测中的应用进行了综述。

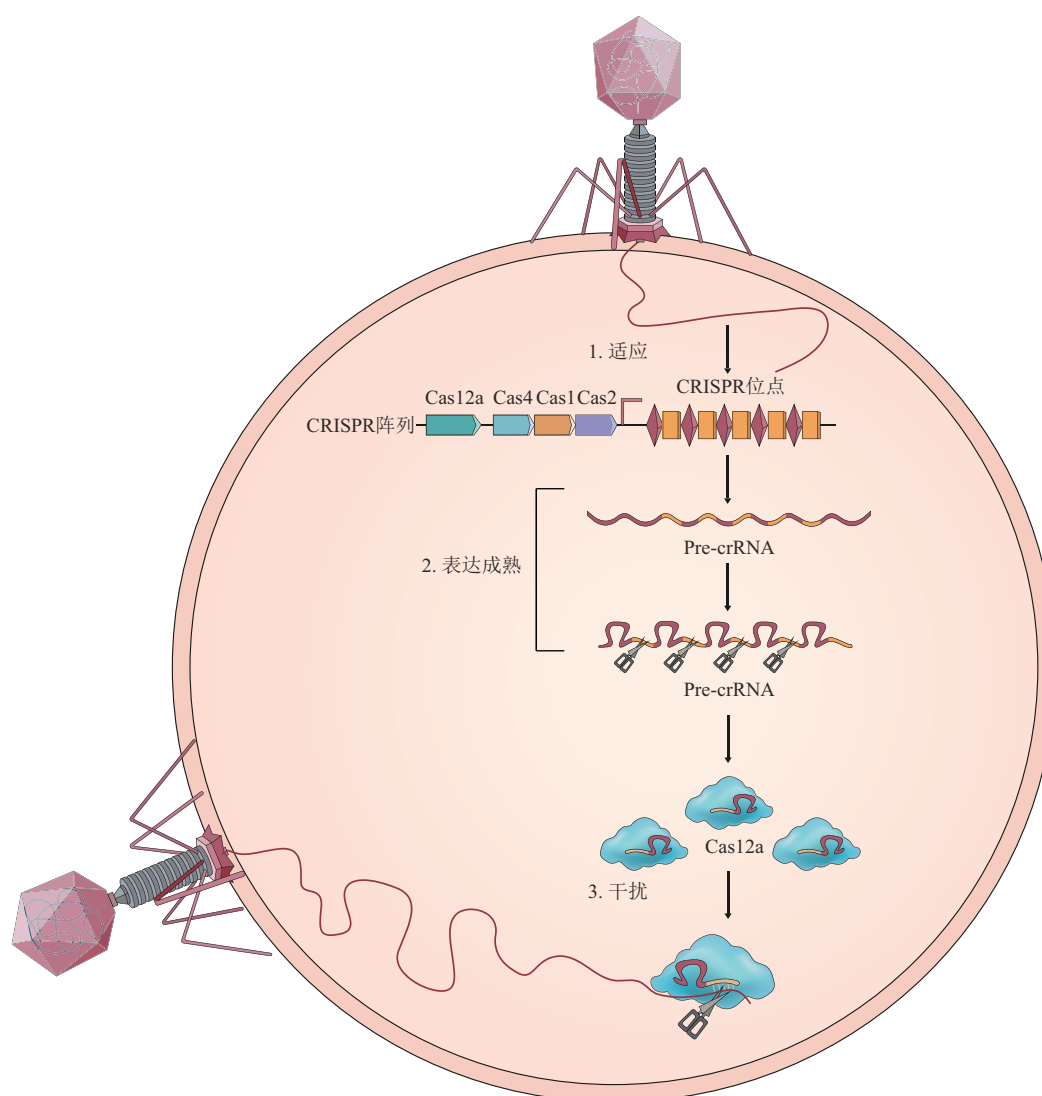


Fig. 1 Stages of CRISPR/Cas12a immunity: adaptation, expression/maturation, interference

图1 CRISPR/Cas12a系统免疫的3个阶段: 适应、表达/成熟、干扰

1 CRISPR/Cas12a 系统中各组分的序列、结构要求

1.1 CRISPR RNA (crRNA)

从含有 CRISPR/Cas12a 基因位点的新凶手弗朗

西斯菌 (*Francisella novicida*) U112 培养物中提取的小 RNA 分子测序结果显示, Cas12a 对应的成熟 crRNA 长度为 42~44 nt, 前 19/20 nt 对应重复序列, 其余 23~25 nt 对应间隔序列^[14]。研究表明, 在 II 型 CRISPR 系统中, 在 Cas9 存在下 crRNA 的成熟

是由宿主管家蛋白 RNase III 和反式激活 crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA) 一起完成, 该 RNA 与 pre-crRNA 碱基互补配对^[15-16]。相比之下, Cas12a 具有核糖核酸内切酶活性, 将自己的 pre-crRNA 加工成成熟的 crRNA, 而不需要 tracrRNA, 使其成为一种独特的效应蛋白, 同时还具有 RNA 引导的 DNase 活性对靶 DNA 进行裂解^[17-18]。pre-crRNA 在表达阶段被转录后, Cas12a 将其切割到 CRISPR 重复序列形成的发夹结构上游 4 nt, 形成的中间 crRNA 分子在体内被进一步加工成成熟的 crRNA。2015 年张锋团队^[14]将 crRNA 序列对 FnCpf1 活性的影响进行了研究, 分别从 crRNA 长度、间隔序列的突变、重复序列的突变几个方面进行了研究测试: 若要达到体外完全切割活性, crRNA 间隔序列长度至少要有 18 nt; 间隔序列中 5' 端前 5 个碱基的点突变会影响切割活性, 后面的点突变不影响切割活性; FnCpf1 活性取决于直接重复 RNA 结构茎环中的二级结构, 即保留 RNA 双链结构茎环中的突变并不影响切割活性, 破坏茎环双链结构的突变则完全消除切割活性, 环区的碱基取代并不影响核酸酶的活性, 而立即进入间隔序列的尿嘧啶不能被取代。

1.2 Cas12a 结构域和核糖核蛋白复合物组装

Cas12a 具有典型的 RuvC 结构域 (图 2a), 该结构域已被证明与编码 IS605 家族转座子蛋白有关^[7]。晶体学和低温电子显微镜数据显示, Cas12a 是由 REC 和 Nuc 形成的双叶结构 (图 2b)^[5, 14, 18-19]。REC 叶由 REC1 和 REC2 结构域组成, Nuc 叶由 RuvC、PI (PAM-interacting) 和 WED 结构域, 以及桥螺旋 (bridge helix, BH) 组成。该效应蛋白的 RuvC 内切酶结构域由 3 个不连续的部分 (RuvC I~III) 组成, 用于处理自身 crRNA 的 RNase 位点位于 WED-III 亚结构域, 而 DNase 位点位于 RuvC 和 Nuc 结构域之间的界面上, RuvC 结构域的 DED 位点通过与 Mg²⁺ 的配位作用, 调整其电荷分布, 从而增强了其催化活性, 在 Cas12a 复合物与目标 DNA 结合后, 该催化中心能够准确识别目标序列, 并在 Mg²⁺ 的催化下进行精确的 DNA 切割^[13, 18]。结构研究还表明, crRNA 的 5' 重复区参与了二元复合物的组装, 19/20 nt 重复区通过分子内碱基配对形成假结结构, crRNA 通过与内切酶的 WED、RuvC 和 REC2 结构域以及两个水合的 Mg²⁺ 离子的相互作用来稳定^[5, 12-13, 18]。这种二元干扰复合物负责识别和降解外源 DNA。

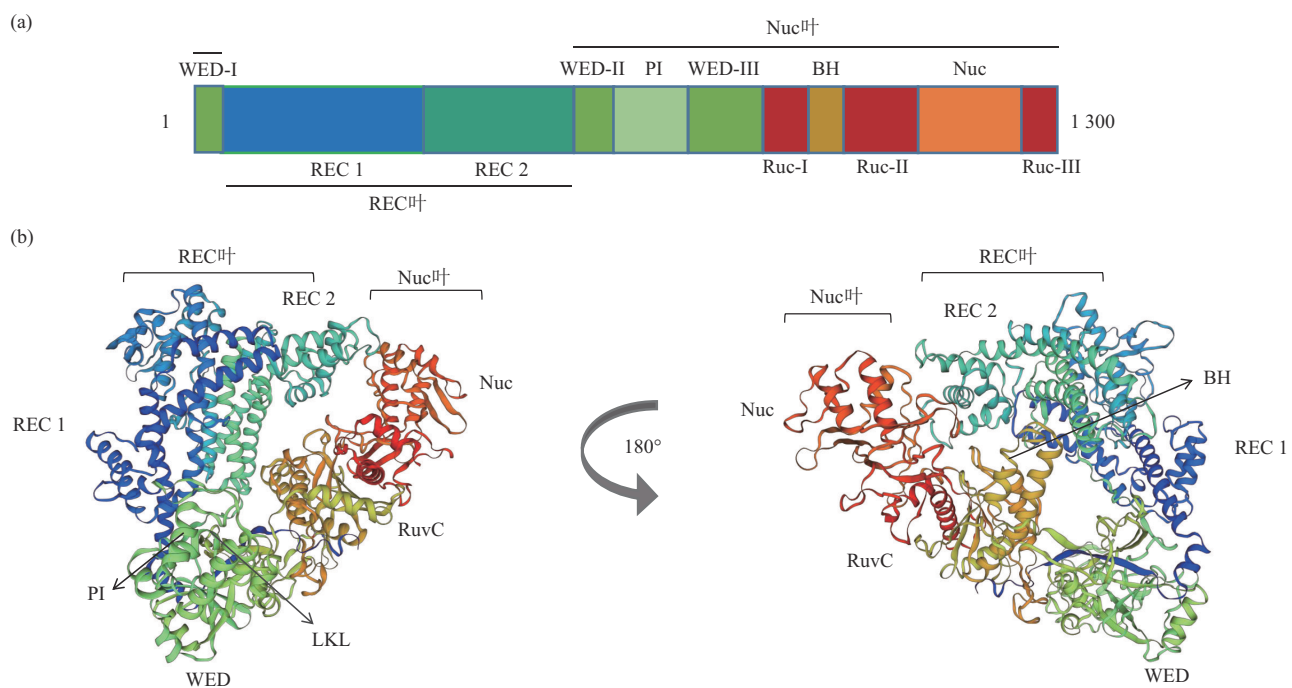


Fig. 2 Domain organization and crystal structure of FnCpf1
图2 FnCpf1结构域和晶体结构
(a) FnCpf1结构域; (b) FnCpf1晶体结构 (PBD 6GTC)。

1.3 PAM识别

PAM 识别是识别和降解 DNA 分子的关键一步, 因为 PAM 允许 CRISPR/Cas 系统区分自身的基因组 DNA 和入侵的核酸^[20]。Cas12a 采用了一种多步骤的质量控制机制, 以确保对目标间隔序列的准确识别。WED II-III、REC1 结构域和 PAM 相互作用负责 PAM 识别, 并启动 DNA 靶点与 crRNA 杂交。通过 WED 和 REC1 结构域对 dsDNA 进行识别后, 插入 PI 结构域的保守环-赖氨酸螺旋环 (loop-lysine helix-loop, LKL) 区域, LKL 位于 L662 至 I679, 包含 3 个保守的赖氨酸残基 (K667、K671、K677), 在 LKL 区域的两个保守脯氨酸的帮助下, 螺旋进入 PAM 双链^[5]。结构研究表明, 该螺旋相对于 dsDNA 的纵轴以 45° 角插入, 促进螺旋状的 dsDNA 展开。3 个保守赖氨酸在 PAM 后 dsDNA 的关键位置启动了 dsDNA 的解偶联。目标 dsDNA 解旋允许 crRNA 与包含 PAM 的目标链 DNA (TS) 杂交, 而解旋的非目标 DNA 链 (NTS) 通过 PAM 相互作用结构域向 DNase 位点移动^[13, 18]。已证明 Cas12a 可以有效地靶向 5' 富含 T 的 PAM 序列后的间隔序列。LbCas12a 和 AsCas12a 的 PAM 序列为 5'-TTTN-3', FnCas12a 的 PAM 序列为 5'-TTN-3', 位于 NTS 5' 端上游^[13-14, 17]。研究还表明, 除了典型的 5'-TTTN-3' PAM 外, Cas12a 通过与目标 DNA 双链形成可变的相互作用, 对次优含 C 的 PAM 序列也表现出松弛的 PAM 识别^[21]。

1.4 ssDNA 裂解

除了高特异性的 dsDNA 裂解, Cas12a 在 crRNA 引导下与互补的 ssDNA 结合时激活出对任意 ssDNA 的降解活性。这种活性由所有的 Cas12a 同源物显示出来, 可将所有可用的 ssDNA 分子降解为单/双核苷酸^[22]。比较 Cas12a 在裂解前、中和后的结构, 揭示了导致这种任意降解活性的结构变化 (图 3a)^[23]。REC Linker 又称 Rec 连接子, 是连接 REC1 和 REC2 结构域的环状连接肽 (图 3b), Lid 包含可催化 E1006 和 K1013 以及环上的其他残基, 在关闭载脂蛋白的催化位点方面发挥作用 (图 3b), REC1 中存在指状的螺旋结构称为 Finger (图 3b), 这 3 个保守区域沿着主蛋白腔以交替的方式定位, 一旦发现 crRNA 的存在并与 TS 杂交, 就会激活 DNase 位点的催化作用^[23]。Lid 参与目标检查点的准确识别, 在 crRNA-DNA 杂交形成之前, Lid 封闭了催化残基所在的裂缝。在杂化形成时, Lid 改变构象形成 α 螺旋, 从而与杂化组装的 crRNA 相互作用, 解离极性相互作用, 使催化口袋可用, 在切割后的 R 环结构中该区域表现无序, 表明在 dsDNA 底物的远端部分与复合物分离后, 催化位点可到达^[5]。因此, 催化裂解是开放的, 能够不加区别地降解 ssDNA。这一分子机制可以解释在 RNA-DNA 杂交体激活 Cas12a 后 ssDNA 分子是如何被降解的^[5, 18]。此外, 最近的研究报道了在目标 DNA 的远端区域存在不匹配目标序列的非特异

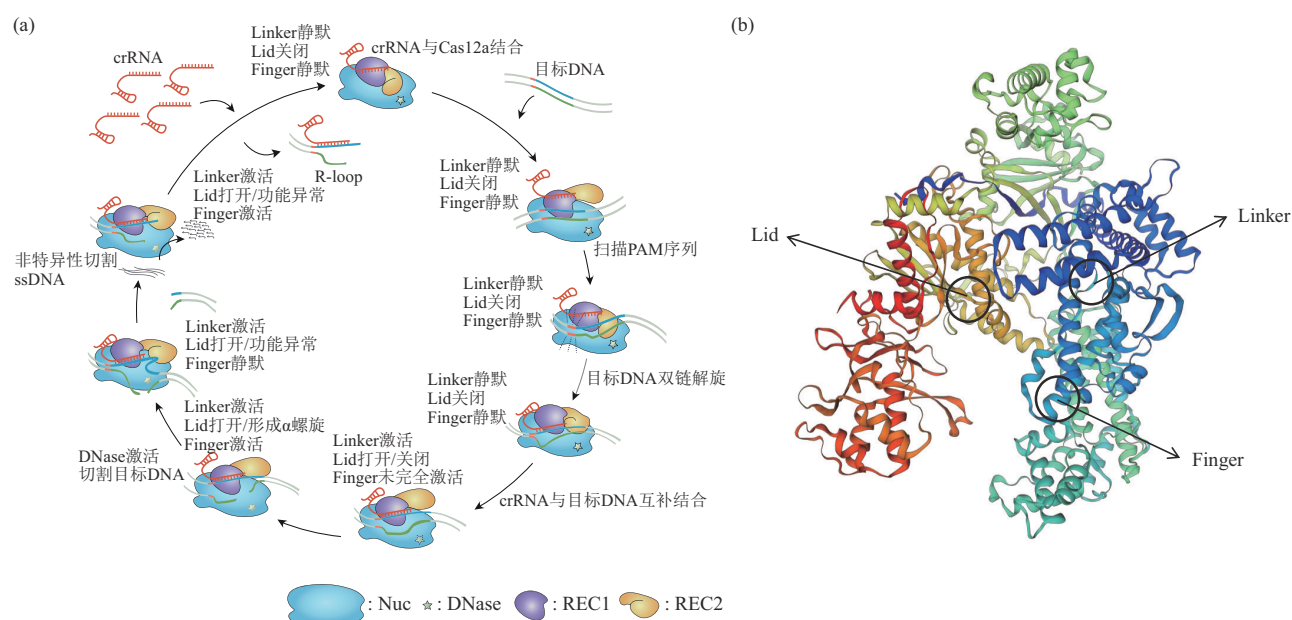


Fig. 3 Fncpf1 cleavage process of dsDNA and ssDNA

图3 Fncpf1裂解dsDNA和ssDNA过程

(a) dsDNA和ssDNA裂解过程及结构变化; (b) Fncpf1晶体结构 (PDB 6GTC) 中Linker、Lid、Finger所在位置。

性缺口, 这表明这可能有潜在的应用^[24]。

2 Cas12a与Cas9

Cas12a 和 Cas9 虽然通过独立的途径进化, 但功能相似 (表1), 大小相似 (SpCas9 为 1 368 个氨基酸; FnCas12a 为 1 307 个氨基酸), 都是多结构域效应蛋白, 采用二叶结构与各自的 RNA 形成复合物。Cas9 需要两个 RNA 分子, tracrRNA 和 crRNA, 而 Cas12a 只需要 1 个 RNA 分子, 即 crRNA。Cas9 具有两个核酸酶位点 HNH 和 RuvC 结构域, 而 Cas12a 只有 RuvC 结构域这一个核酸酶位点。此外, Cas12a 还具有一个 RNA 加工位点^[25-26]。这两种蛋白质在 RNA 加工、PAM 识别、目标 DNA 结合和最终催化方面所采用的机制有明显的差异。

CRISPR 阵列首先转录成一个长的 pre-crRNA 分子, 然后被加工成成熟的 crRNA 才能与内切酶形成预组装核糖核蛋白 (pre-assembled ribonucleoprotein, RNP)。对于 Cas9, tracrRNA (编码在 CRISPR 位点附近) 首先需要与 pre-crRNA 杂交, 然后杂交的 RNA-RNA 双工结构被 Cas9 识别, 宿主 RNase III 切割双链, 留下一个长约 75 nt 的 tracrRNA 和一个长 39~42 nt 的 crRNA, 然后形成 RNP 复合物, 负责识别和降解目标 DNA^[16, 27-28]。相比之下, Cas12a 不需要 tracrRNA 或 RNase III, 因为该蛋白质在其核糖核酸酶催化位点中处理自己的 crRNA^[29]。在 *F. novicida* 菌 V 型 CRISPR 位点上, 间隔区序列长度为 27~32 bp, 间隔区之前有 36 bp 的重复序列, CRISPR 阵列转录产物 pre-crRNA 中的重复序列形成伪结, 可被 Cas12a 识别, 在识别之后 pre-crRNA 被裂解为约 43 nt 的成熟 crRNA, 实际的裂解长度可能会因具

体的 CRISPR/Cas 系统和酶的类型而有所不同^[12-14, 17-18, 30]。从逻辑上讲, Cas12a 比 Cas9 具有更极简的系统。

Cas9 靶向 DNA 序列的 PAM 为 5'-NGG-3', 位于非目标链间隔序列的下游, 被 PI 域识别, 相比之下, Cas12a 识别 5'富含 T 的 PAM 序列, 位于间隔区的上游^[28, 31]。识别 PAM 序列后目标 DNA 解开双链, RNA-DNA 杂交。两种酶在 PAM 序列旁都存在一个关键的种子序列, 以确保目标 DNA 结合的特异性, Cas9 的种子序列约为 10 nt, Cas12a 的种子序列约为 5~6 nt^[14, 17-18, 26]。当 DNA 与 RNA 杂交完成时, Cas9 在 HNH 和 RuvC 结构域的催化位点上分别切割模板链和非模板链, 产生平末端的双链断裂 (double strand break, DSB), 裂解位点为 PAM 序列上游 3 个碱基对^[26]。然而, Cas12a 仅存在一个核酸酶位点, DNA 两条链遵循不同的途径到达催化位点, 在同一核酸酶位点被切割产生粘性末端的 DSB^[5, 14]。核酸酶的裂解保真度是基因编辑中的一个重要问题^[32]。一个好的基因编辑工具必须保证只在目标位点上定点修饰, 而基因组的其余部分不被修饰, 来避免在基因组的其他位点上发生不可预测的变化和后果。因此, 特异性和由此产生的切割产物是基因编辑应用的关键, 同时高特异性也是好的检测技术的前提, 在 CRISPR/Cas 系统中, gRNA 需与靶序列互补结合后 Cas 蛋白才能发挥切割功能, 这种互补结合保证了检测的特异性。2015 年张锋团队^[14]报道了 CRISPR/Cas12a 具有核酸内切酶活性, 并提出 CRISPR/Cas12a 将在以后的基因编辑和生物技术领域中发挥重要作用。2017 年 Doudna 团队^[33]将 CRISPR/Cas12a 系统与重组酶聚合酶扩增技术 (RPA) 相结合用于人乳头瘤病毒 (HPV) 的检测, 从此基于 CRISPR/Cas12a 的检测系统登上了核酸检测舞台。

Table 1 Cas12a vs Cas9

表1 Cas12a与Cas9比对

类别	Cas12a	Cas9
蛋白质大小	~1 300个核苷酸	1 000~1 600个核苷酸
gRNA	crRNA (42~44 nt)	crRNA (39~42 nt) 和tracrRNA (~75 nt)
核酸酶位点	RuvC-Nuc	HNH和RuvC
切割方式	黏性末端 (PAM序列下游)	平端 (PAM序列上游)
PAM序列	3~4 nt, 识别5'富含T的PAM序列	3~5 nt, 识别3'富含G的PAM序列
Pre-crRNA加工	内在的RNase活性来加工pre-crRNA	需要宿主RNase III和tracrRNA来加工pre-crRNA

3 基于CRISPR/Cas12a开发的诊断技术

3.1 DETECTR (DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter)

2017年Doudna团队^[33]发现CRISPR系统在剪切靶向双链DNA的同时，Cas12a的非特异性核酸内切酶活性会被激活，对体系内的单链DNA产生任意切割的活性。这个发现为体外核酸检测提供了新思路，同时向反应体系内递送靶向目的DNA的CRISPR/Cas12a系统和非特异性ssDNA荧光报告基团(FQ-labeled reporter)，一旦检测到目的DNA，CRISPR/Cas12a系统切割活性将启动，荧光报告基团被降解，从而释放出荧光信号，通过捕获荧光信号即可实现对目的DNA的检测。2018年Doudna团队^[34]将恒温扩增技术与CRISPR/Cas12a相结合开发了一种检测系统，即DETECTR，该系统可用于对样本中的微量DNA进行快速、简便的即时检测(图4a)。该检测系统首先通过RPA技术对样本进行扩增，然后通过CRISPR/Cas12a、crRNA、荧光报告基团相结合进行核酸检测，利用该系统成功实现了HPV 16和HPV 18的诊断及鉴别诊断，与基于PCR的检测方法相比较结果基本相同。该检测系统灵敏度高、特异性强，可用于SNP^[35]、肿瘤^[36]、

细菌病毒感染^[37-39]、抗菌耐药方面的检测^[40]，为分子诊断提供了一个新的简便的检测平台。

3.2 HOLMES (one-hour low-cost multipurpose highly efficient system)

2018年Cell Discovery杂志发布了HOLMES检测系统(图4b)，该系统将PCR技术与CRISPR/Cas12a相结合，不需要昂贵的试剂和特殊的仪器，效率高、成本低，易于进行核酸检测^[41]。研究者们通过对10种具有附属切割活性的Cas12a进行纯化，最终得到4种最适合用于HOLMES检测系统的Cas12a，分别为毛螺旋菌(*Lachnospiraceae bacterium*) ND2006 Cas12a (LbCas12a)、口腔菌属(*Oribacterium* sp.) NK2B42 Cas12a (OsCas12a)、毛螺旋菌 NC2008 Cas12a (Lb5Cas12a)和土拉热弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*) Cas12a (FnCas12a)。用该方法进行了狂犬病毒(DNA病毒)和日本脑炎病毒(RNA病毒)检测，灵敏度可到达1~10 amol/L，与SHERLOCK系统相当，优于普通PCR和使用SYBR Green染料方法的定量PCR。并测试了该方法是否适用于SNP的检测，发现当突变位点临近PAM序列时CRISPR/Cas12a的特异性更强，考虑到有些突变位点附近没有PAM序列，因此可以在设计PCR引物时人为地加入PAM序列，因此可以在设计PCR引物时人为地加入PAM序列以达到检测目的。

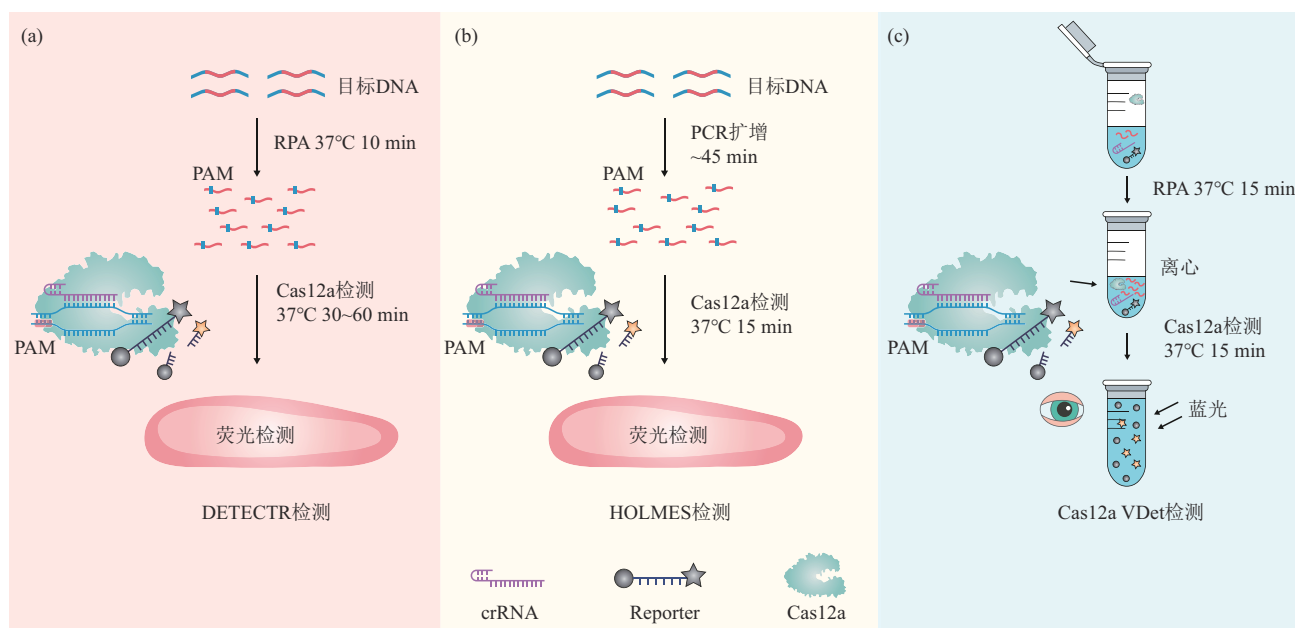


Fig. 4 Schematic diagram of DETECTR, HOLMES, and Cas12aVDet detection

图4 DETECTR、HOLMES、Cas12aVDet检测示意图

3.3 Cas12aVDet (Cas12a-based visual detection)

先前建立的基于CRISPR/Cas12a检测方法都需要两步操作, 第一步为通过恒温扩增技术或PCR技术对目的片段的扩增, 第二步为基于CRISPR/Cas12a的酶切反应, 操作过程中需要对扩增产物进行开盖处理, 这种操作不仅增加了检测所需的时间, 而且操作不慎会造成扩增产物泄漏污染实验室。为解决这一问题, 2019年Wang等^[42]开发了一步检测法, 即Cas12aVDet, 并将该技术应用到了支原体的检测中(图4c)。该技术将Cas12a蛋白固定在反应管壁的上部, 当第一步反应结束后通过离心机离心, 将固定在管壁上的Cas12a蛋白离心到反应溶液中, 反应结束后通过蓝光成像仪肉眼观察结果。不仅避免开盖造成污染, 还缩短了检测反应时间, 减轻人力。

3.4 dWS-CRISPR (digital warm-start CRISPR)

上述的检测方法只能对检测结果进行定性而不能进行定量。2021年Ding等^[43]开发了一种基于CRISPR/Cas12a的数字热启动检测方法dWS-CRISPR, 将RT-DAMP和CRISPR/Cas12a相结合的一锅式检测方法, 用于临床样本中严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2型(SARS-CoV-2)的敏感定量检测。dWS-CRISPR检测反应在50°C以上时启动, 克服了RPA等恒温检测方法室温下的过早扩增, 能够对SARS-CoV-2进行准确可靠的数字定量。通过靶向SARS-CoV-2的核蛋白基因, dWS-CRISPR检测方法能够在芯片中检测到低至5拷贝/ μl 的SARS-CoV-2 RNA。同时dWS-CRISPR对抑制剂具有较高的耐受性, 可以在不提取RNA的粗唾液样本中直接检测SARS-CoV-2。此外, dWS-CRISPR检测方法可以与基于智能手机的便携式检测平台集成, 以实现现场或即时定量检测^[44]。

3.5 CRISPR/Cas12a结合高灵敏信号转导技术的核酸检测传感器

CRISPR/Cas12a在核酸检测中的优势是反应在恒温条件下进行, 具有快速和高特异性, 然而上述方法检测中核酸扩增是检测的首要步骤, 接下来再进行CRISPR/Cas12a检测, 这样会增加检测的时间和工作量。近年来科学家们将CRISPR/Cas12a系统

与高灵敏信号转导技术相结合, 对核酸进行直接检测, 具有灵敏度高、特异性强、成本低、用时短等特点。2020年Xu等^[45]开发了一种基于CRISPR/Cas系统的增强型电化学DNA (electrochemical DNA, E-DNA) 传感器, 并比较了Cas9和Cas12a增强型E-DNA传感器的性能, 在无核酸扩增的情况下达到了飞摩尔每升的检测限, 创新性地推动了CRISPR/Cas生物传感器的发展(图5a)。2021年Liu等^[46]开发了一种基于CRISPR/Cas12a的电化学发光生物传感器, 利用L-甲硫氨酸稳定金纳米团簇 (Met-AuNCs) 作为高效电化学发光 (electrochemiluminescence, ECL) 元件实现电化学发光信号转换。这种生物传感器具有较高的选择性, 在不需要核酸扩增的前提下实现了对人体血液样品中HPV-16的检测, 整个检测可在70 min内完成, 检测下限为0.48 pmol/L (图5b)。

有文献报道将CRISPR/Cas系统与表面增强拉曼光谱 (surface-enhanced Raman scattering, SERS) 相结合用于核酸检测, 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^[47]。基于SERS的生物传感器可以对微量样品进行检测, 检测下限可至单分子^[48]。2021年Liang等^[49]将CRISPR/Cas12系统 with SERS相结合建立了SERS-CRISPR (S-CRISPR) 检测平台, 无需核酸扩增在30~40 min完成SARS-CoV-2鼻咽拭子标本核酸检测, 与定量逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR)相比, S-CRISPR的敏感性和特异性分别达到87.50%和100%, 是一种潜在的床旁即时检测(POCT)方法(图5c)。2022年Yin等^[50]设计了一种DNA/RNA嵌合杂交探针, 并将其引入到CRISPR-Cas12a/SERS系统, 该技术利用DNA/RNA嵌合发夹释放的ssRNA来分解纳米团簇, 而不是直接使用CRISPR/Cas12a来分解, 以避免纳米团簇造成的强空间位阻, 它由DNA1-Au₄₀NPs或DNA1-Fe@Au₄₀NPs为核心, MBA/DNA2-Au₁₃NPs作为周围的卫星, 由部分互补的DNA对(DNA1/DNA2)连接, 在没有目的片段的情况下, 偶联的AuNPs施加的空间位阻限制了激活的CRISPR/Cas12a在狭窄间隙处对ssDNA的切割(图5d)。不需要核酸扩增, 具有高选择性和高特异性, 检测下限可达10 amol/L, 向检测系统中引入磁响应功能使检测下限达到1 amol/L。

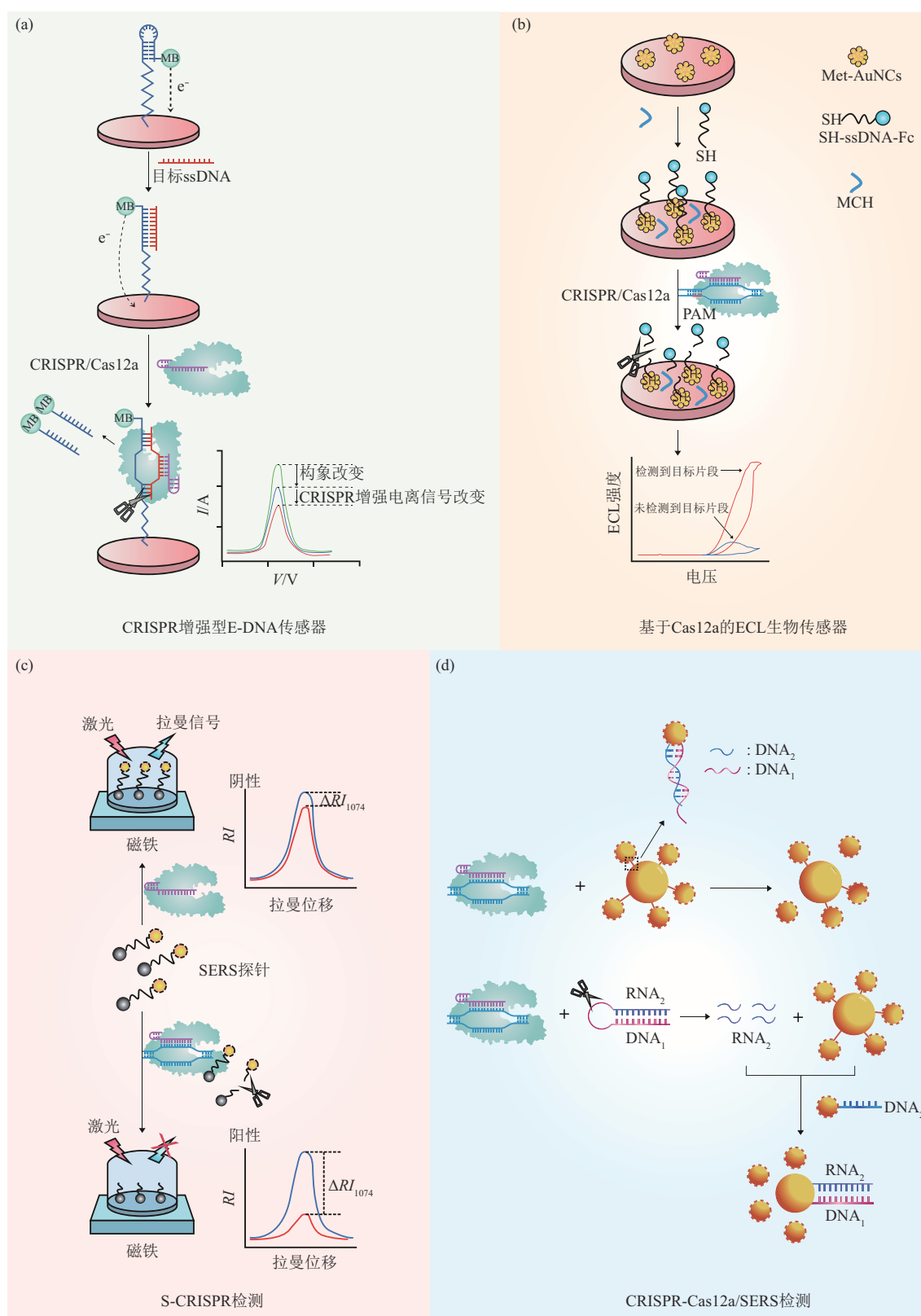


Fig. 5 The nucleic acid detection sensor based on CRISPR/Cas12a combined with highly sensitive signal transduction technology

图5 CRISPR/Cas12a结合高灵敏信号转导技术的核酸检测传感器

4 总结与展望

近两年来本课题组参照DETECTR系统检测原理, 将恒温扩增技术RPA与CRISPR/Cas12a系统相结合, 通过蓝光仪、核酸检测试纸条显色途径进行布鲁氏菌和猪细小病毒PPV7核酸检测, 灵敏度分别可达到10拷贝/ μl 和100拷贝/ μl ^[51-52]。与PCR技术相比, 反应在恒温下进行, 不需要昂贵的热循环仪, 通常30 min即可完成核酸检测, 这种检测方法不仅适用于基层卫生单位使用, 还可用于养殖场的大量样本筛查。但目前研究的检测方法需要分步进行, 中途需要开盖处理, 操作不慎可能会造成实验室污染。

本文对CRISPR/Cas12a在体外检测中的应用原理做了简要概述, 讨论了导致目标DNA催化反应途径的不同阶段的结构和功能特征, 并简单地讨论了Cas12a在核酸检测中的具体应用。这些发现揭示了一种靶标干扰机制, 该机制始于Cas12a引导的RNA复合物与PAM依赖(dsDNA)中的互补DNA序列结合方式, RNA与DNA的结合激活了Cas12a, 可用于位点特异性的dsDNA切割和非特异性的ssDNA反式切割。最后, 释放Cas12a蛋白的ssDNase活性, 为提高分子诊断应用的速度、敏感性和特异性提供了一种新的策略。Cas12a采用多个检查点来确保DNA的精确定位与Cas12a不加选择的单链核酸降解作用相结合, 使其在体外核酸检测中得到了有效的应用, 多点检查保证了检测方法的特异性, 对体系内ssDNA不加选择的降解提高了反应的灵敏度。CRISPR/Cas12a结合高灵敏信号转导技术的核酸检测传感器的出现摆脱了对核酸进行扩增的步骤, 使核酸检测变得更加简便, 如果核酸提取技术可以进一步简化, 这种检测技术有望用于POCT。CRISPR/Cas12a检测系统已展现出在诊断中的强大力量, 但由于CRISPR/Cas12a的反式切割活性, 目前还不能实现多重检测; 视觉检测只能做到定性无法定量; CRISPR/Cas12a的定量检测需要昂贵仪器, 不适用于基层单位和现场使用。基于CRISPR/Cas12a的核酸检测在进入临床使用前, 研究者们仍需要做大量的工作来确保诊断的准确性。相信这些基于CRISPR/Cas的新型检测工具必将改写未来的诊断技术, 尤其是为那些卫生条件相对较差、传染病高发的发展中国家在病原体感染诊断上会带来巨大的帮助。

参 考 文 献

- [1] Mojica F J, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, *et al.* Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, 2005, **60**(2): 174-182
- [2] Wright A V, Nuñez J K, Doudna J A. Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell*, 2016, **164**(1-2): 29-44
- [3] Wang J Y, Pausch P, Doudna J A. Structural biology of CRISPR-Cas immunity and genome editing enzymes. *Nat Rev Microbiol*, 2022, **20**(11): 641-656
- [4] Mojica F J M, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, *et al.* Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology (Reading)*, 2009, **155**(Pt 3): 733-740
- [5] Stella S, Alcón P, Montoya G. Structure of the Cpf1 endonuclease R-loop complex after target DNA cleavage. *Nature*, 2017, **546**(7659): 559-563
- [6] 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
- [7] Shmakov S, Smargon A, Scott D, *et al.* Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2017, **15**(3): 169-182
- [8] Zhang F, Huang Z. Mechanistic insights into the versatile class II CRISPR toolbox. *Trends Biochem Sci*, 2022, **47**(5): 433-450
- [9] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, **327**(5962): 167-170
- [10] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, **337**(6096): 816-821
- [11] Wu W Y, Mohanraju P, Liao C, *et al.* The miniature CRISPR-Cas12m effector binds DNA to block transcription. *Mol Cell*, 2022, **82**(23): 4487-4502.e7
- [12] Dong D, Ren K, Qiu X, *et al.* The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA. *Nature*, 2016, **532**(7600): 522-526
- [13] Yamano T, Nishimasu H, Zetsche B, *et al.* Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2016, **165**(4): 949-962
- [14] Zetsche B, Gootenberg J S, Abudayyeh O O, *et al.* Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, **163**(3): 759-771
- [15] Charpentier E, Richter H, van der Oost J, *et al.* Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. *FEMS Microbiol Rev*, 2015, **39**(3): 428-441
- [16] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, **471**(7340): 602-607
- [17] Fonfara I, Richter H, Bratovič M, *et al.* The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*, 2016, **532**(7600): 517-521
- [18] Swarts D C, van der Oost J, Jinek M. Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR-Cas12a. *Mol Cell*, 2017, **66**(2): 221-233.e4

- [19] Li Z, Zhang H, Xiao R, *et al.* Cryo-EM structure of the RNA-guided ribonuclease Cas12g. *Nat Chem Biol*, 2021, **17**(4): 387-393
- [20] Sternberg S H, Redding S, Jinek M, *et al.* DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 2014, **507**(7490): 62-67
- [21] Yamano T, Zetsche B, Ishitani R, *et al.* Structural basis for the canonical and non-canonical PAM recognition by CRISPR-Cpf1. *Mol Cell*, 2017, **67**(4): 633-645.e3
- [22] Yuan X, Yuan H, Liu B, *et al.* Self-supplying guide RNA-mediated CRISPR/Cas12a fluorescence system for sensitive detection of T4 PNKP. *Molecules*, 2022, **27**(24): 9019
- [23] Stella S, Mesa P, Thomsen J, *et al.* Conformational activation promotes CRISPR-Cas12a catalysis and resetting of the endonuclease activity. *Cell*, 2018, **175**(7): 1856-1871.e21
- [24] Murugan K, Seetharam A S, Severin A J, *et al.* CRISPR-Cas12a has widespread off-target and dsDNA-nicking effects. *J Biol Chem*, 2020, **295**(17): 5538-5553
- [25] Doudna J A, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, **346**(6213): 1258096
- [26] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, **337**(6096): 816-821
- [27] Jiang F, Taylor D W, Chen J S, *et al.* Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science*, 2016, **351**(6275): 867-871
- [28] Jiang F, Zhou K, Ma L, *et al.* A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science*, 2015, **348**(6242): 1477-1481
- [29] Fonfara I, Richter H, Bratovič M, *et al.* The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*, 2016, **532**(7600): 517-521
- [30] Gao P, Yang H, Rajashankar K R, *et al.* Type V CRISPR-Cas Cpf1 endonuclease employs a unique mechanism for crRNA-mediated target DNA recognition. *Cell Res*, 2016, **26**(8): 901-913
- [31] Jia H, Wang Y, Su H, *et al.* LbCas12a-D156R efficiently edits LOB1 effector binding elements to generate canker-resistant citrus plants. *Cells*, 2022, **11**(3): 315
- [32] Stella S, Montoya G. The genome editing revolution: a CRISPR-Cas TALE off-target story. *Bioessays*, 2016, **38**(S1): S4-S13
- [33] Moreno-Mateos M A, Fernandez J P, Rouet R, *et al.* CRISPR-Cpf1 mediates efficient homology-directed repair and temperature-controlled genome editing. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 2024
- [34] Chen J S, Ma E, Harrington L B, *et al.* CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 2018, **360**(6387): 436-439
- [35] Wang D, Chen G, Lyu Y, *et al.* A CRISPR/Cas12a-based DNzyme visualization system for rapid, non-electrically dependent detection of *Bacillus anthracis*. *Emerg Microbes Infect*, 2022, **11**(1): 428-437
- [36] Zhong M, Chen K, Sun W, *et al.* PCDetection: polyA-CRISPR/Cas12a-based miRNA detection without PAM restriction. *Biosens Bioelectron*, 2022, **214**: 114497
- [37] Sun Y, Yu L, Liu C, *et al.* One-tube SARS-CoV-2 detection platform based on RT-RPA and CRISPR/Cas12a. *J Transl Med*, 2021, **19**(1): 74
- [38] Mayuramart O, Nimsamer P, Rattanaburi S, *et al.* Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and influenza viruses based on CRISPR-Cas12a. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021, **246**(4): 400-405
- [39] Jirawannaporn S, Limothai U, Tachaboon S, *et al.* Rapid and sensitive point-of-care detection of leptospira by RPA-CRISPR/Cas12a targeting lipL32. *PLoS Negl Trop Dis*, 2022, **16**(1): e0010112
- [40] Li Y, Shi Z, Hu A, *et al.* Rapid one-tube RPA-CRISPR/Cas12 detection platform for methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Diagnostics (Basel)*, 2022, **12**(4): 829
- [41] Li S Y, Cheng Q X, Wang J M, *et al.* CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell Discov*, 2018, **4**: 20
- [42] Wang B, Wang R, Wang D, *et al.* Cas12aVDET: A CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection. *Anal Chem*, 2019, **91**(19): 12156-12161
- [43] Ding X, Yin K, Li Z, *et al.* Sensitive quantitative detection of SARS-CoV-2 in clinical samples using digital warm-start CRISPR assay. *Biosens Bioelectron*, 2021, **184**: 113218
- [44] Gou T, Hu J, Wu W, *et al.* Smartphone-based mobile digital PCR device for DNA quantitative analysis with high accuracy. *Biosens Bioelectron*, 2018, **120**: 144-152
- [45] Xu W, Jin T, Dai Y, *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
- [46] 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
- [47] 陈思,林昱坤,宋春燕,等. 基于 CRISPR/Cas 系统的核酸生物传感器研究进展. *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
- [48] Du Y, Ji S, Dong Q, *et al.* Amplification-free detection of HBV DNA mediated by CRISPR-Cas12a using surface-enhanced raman spectroscopy. *Anal Chim Acta*, 2023, **1245**: 340864
- [49] Liang J, Teng P, 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
- [50] Yin B, Zhang Q, Xia X, *et al.* A CRISPR-Cas12a integrated SERS nanoplatfrom with chimeric DNA/RNA hairpin guide for ultrasensitive nucleic acid detection. *Theranostics*, 2022, **12**(13): 5914-5930
- [51] Zhai J B, Dang S, Sui H M J L, *et al.* CRISPR-Cas12a test strip (CRISPR/CAST) package: poverty family pasture health patron saint for livestock free from *Brucella* infection. *Authorea*, 2022. doi: 10.22541/au.165710884.40133572/v1
- [52] Wen S B, She L M G, Dang S, *et al.* Development of a RPA-CRISPR/Cas12a based rapid visual detection assay for porcine parvovirus 7. *Research Square*, 2023. doi: 10.21203/rs.3.rs-2903810/v1

The Versatile Tool: CRISPR/Cas12a System for Nucleic Acid Detection*

DANG Sheng^{1,2)**}, ZHANG Shuai^{1)**}, ZHAI Jing-Bo^{1,3,4)***}

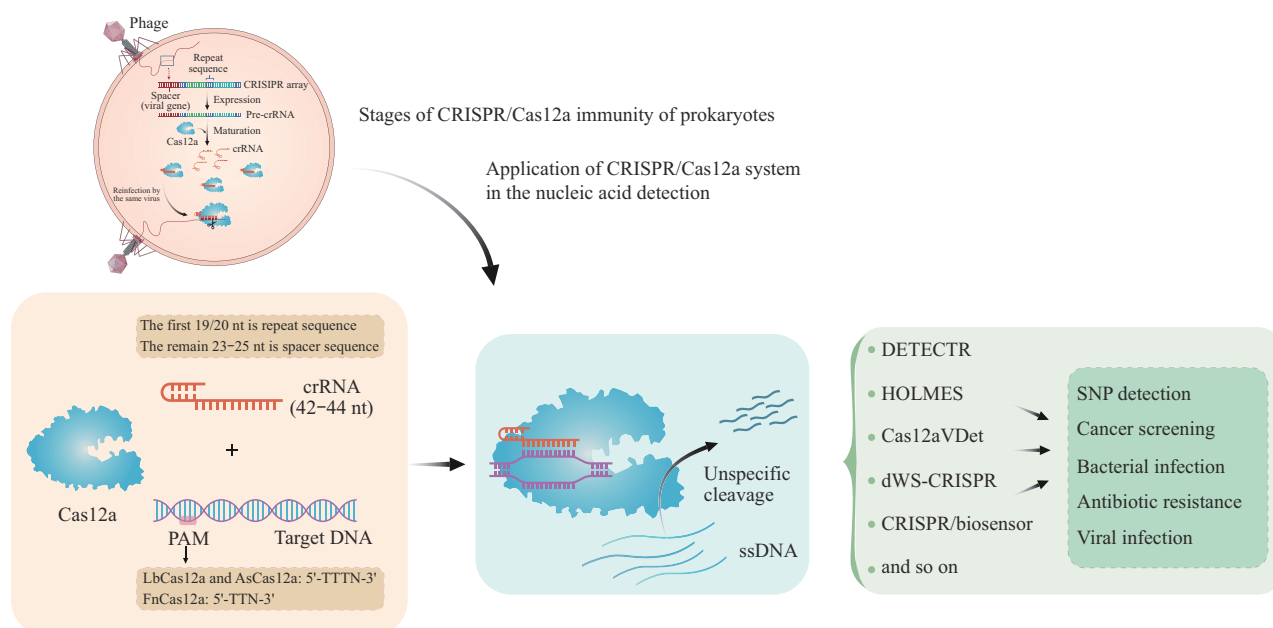
⁽¹⁾Medical College, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, China;

⁽²⁾Keerqin District First People's Hospital, Tongliao 028000, China;

⁽³⁾Key Laboratory of Zoonose Prevention and Control at Universities of Inner Mongolia Autonomous Region, Tongliao 028000, China;

⁽⁴⁾Brucellosis Prevention and Treatment Engineering Research Center of Inner Mongolia Autonomous Region, Tongliao 028000, China)

Graphical abstract



Abstract The CRISPR/Cas system consists of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated genes (Cas). The system forms an adaptive immune system in archaea and bacteria. The inherent defense mechanism enables these microorganisms to protect themselves against the invasion of foreign genetic material. The system functions of immune response including three main stages: adaptation, expression/maturation, and interference, each stage needs specific Cas proteins encoded by Cas gene located near the CRISPR sequences, along with other auxiliary proteins. In 2015, Zhang *et al.* reported

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (82160312), Major Science and Technology Projects of Inner Mongolia of China (2019ZD006), 2023 Young Science and Technology Talent Development Project (Innovation Team) for Key Technology Research Project of Zoonose Prevention and Control (NMGIRT2315), and Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2023MS08057).

** The authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-475-8314234, E-mail: jbzhai@imun.edu.cn

Received: April 21, 2021 Accepted: August 21, 2023

Cas12a (Cpf1) as a member of the Class II type V CRISPR/Cas12a system, which possesses endonuclease activity. This finding holds great promise for its application in the field of biotechnology. In 2018, Doudna's team first applied the CRISPR/Cas12a system for detecting HPV nucleic acid. The system comprises the following essential components *in vitro* detection: Cas12a, the crRNA sequence complementary to the target DNA, the PAM sequence, and the ssDNA reporter. Cas12a possesses a typical RuvC domain, displaying a canonical bilobed architecture that consists of a recognition (REC) lobe and a nuclease (NUC) lobe. The REC lobe contains the REC1 and REC2 domains, and the NUC lobe includes RuvC, PAM-interacting (PI), Wedge (WED), and bridge helix (BH) domains. The mature crRNA for Cas12a has a length of 42–44 nt, consists of repeat sequence (19/20 nt) and spacer sequence (23–25 nt). The crRNA spacer sequence has been found to require a length of 18 nt to achieve complete cleavage activity *in vitro*. Additionally, mutation in the bases of crRNA can indeed affect the activity of Cas12a. The PAM sequence plays a critical role in the recognition and degradation of DNA by the CRISPR/Cas system, enabling the system to distinguish between self and non-self genomic materials. Cas12a can effectively target the spacer sequence downstream of a T-rich PAM sequence at the 5' end. LbCas12a and AsCas12a both recognize the PAM sequences of 5'-TTTN-3', while FnCas12a recognizes the PAM sequences of 5'-TTN-3'. All of these PAM sequences are located upstream on the non-template strand (NTS) at the 5' end. Cas12a (Cpf1), guided by the crRNA, binds to the target DNA by recognizing the PAM sequence. It exhibits the ability to induce arbitrary cleavage of ssDNA within the system while cleaving the target ssDNA or dsDNA. According to this feature, an array of nucleic acid detection methods has been developed for tumor detection and infection diagnostics, such as the DETECTR (RPA-CRISPR/Cas12a method) and HOLMES (PCR-CRISPR/Cas12a method) in 2018. Then, in 2019, Cas12aVDet (one-step detection method), where Cas12a protein was immobilized on the upper wall of the reaction tube. This not only prevented contamination from opening the tube but also reduced the detection reaction time. In 2021, the dWS-CRISPR (digital warm-start CRISPR) was developed as a one-pot detection method. It serves as an accurate approach for quantitatively detecting SARS-CoV-2 in clinical specimens. With the innovation of scientific technology, the high-sensitivity signal transduction technology has also been integrated with the CRISPR/Cas12a system, enabling direct detection of nucleic acids, and eliminating the need for nucleic acid amplification steps. Here, we elaborated the detection principles of CRISPR/Cas12a in *in vitro* detection. We discussed the different stages leading to the catalytic pathway of target DNA, and the practical applications of Cas12a in nucleic acid detection. These findings revealed a target interference mechanism that originates from the binding of Cas12a-guided RNA complex to complementary DNA sequences within PAM-dependent (dsDNA) regions. The crRNA-DNA binding activates Cas12a, enabling site-specific dsDNA cleavage and non-specific ssDNA trans-cleavage. The release of Cas12a ssDNase activity provides a novel approach to enhance the sensitivity and specificity of molecular diagnostic applications. Before these CRISPR/Cas12a-based nucleic acid detection methods can be introduced into clinical use, substantial work is still required to ensure the accuracy of diagnosis. Nevertheless, we believe that these innovative detection tools based on CRISPR/Cas will revolutionize future diagnostic technologies, particularly offering significant assistance in pathogen infection diagnosis for developing countries with relatively poor healthcare conditions and high prevalence of infectious diseases.

Key words CRISPR, Cas12a, crRNA, PAM, Cas9, nucleic acid detection

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0163