



CRISPR 电化学生物传感器在肿瘤检测中的应用

李双^{1,2)*} 陈攀^{3)*} 黄韵霞¹⁾ 赵国军^{1)**} 江婷^{1)**}

(¹⁾ 广州医科大学附属清远医院/清远市人民医院, 清远 511518; (²⁾ 大理大学药学院, 大理 671000;

(³⁾ 深圳大学物理与光电工程学院, 深圳 518060)

摘要 肿瘤的早期诊断对提高生存率和减轻患者痛苦具有重要意义。对体液中的肿瘤标志物（如 ctDNA、miRNA、蛋白质、外泌体等）进行敏感检测是早期肿瘤诊断的重要途径。然而，传统的肿瘤检测方法由于其成本高、时间长以及灵敏度低，已成为肿瘤诊疗领域亟需突破的技术瓶颈。源于细菌的适应性免疫系统的规则成簇间隔短回文重复序列（clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR）及其相关蛋白质（CRISPR-associated protein, Cas）系统，已开发成为一种高效的分子诊断工具。近年来，通过结合便捷、高灵敏、响应速度快的电化学技术，CRISPR/Cas 生物传感器在快速检测领域显示出巨大潜力。本文简要介绍了第 II 类 CRISPR/Cas 系统单效应蛋白的原理及特点，重点综述了基于 CRISPR/Cas 电化学生物传感器的各种检测技术（包括阻抗法、伏安法、光电化学法和电化学发光法）在肿瘤诊断领域的应用，并讨论了 CRISPR/Cas 集成电化学生物传感器的优势与局限性、当前的挑战及未来的发展前景。

关键词 CRISPR/Cas 系统, 电化学生物传感器, 肿瘤检测

中图分类号 Q78

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0376

肿瘤是威胁人类生命的主要疾病之一，恶性肿瘤的扩散更是造成大多数癌症病人死亡的有关原因^[1]。近年来，肿瘤发病率不断升高，数百万人死于癌症，其中很多病人诊断时已是肿瘤晚期，从而错过了最佳的治疗期。因此，早期的准确诊断和及时的治疗对有效延长生存期至关重要。目前，传统的肿瘤检测方法主要有组织活检和影像学检查两种^[2]，组织活检是肿瘤诊断的“金标准”，但其作为一种侵入性有创手术，成本高且耗时，同时，恶性肿瘤可向多部位转移，而从不同部位进行多次组织活检是不现实的^[3]。影像学检查虽然是一种非侵入性诊断工具，但其灵敏度低、准确性差，难以明确病变性质^[4]。目前的研究工作集中在发现新的、无创的方法来诊断肿瘤和评估术后治疗效果。液体活检技术因其无创、简单、可重复操作等优点已成为肿瘤学和肿瘤精准医学发展中的重要技术，

主要是基于对循环肿瘤细胞（circulating tumor cell, CTC）、循环肿瘤 DNA（circulating tumor DNA, ctDNA）和微 RNA（microRNA, miRNA）、蛋白质和外泌体等肿瘤标志物的检测^[5]。目前已开发了多种检测肿瘤标志物的方法，包括聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR）、RNA 印迹法（Northern blotting）、下一代测序技术、流式细胞仪以及酶联免疫吸附试验等^[6]，然而，这些方法通常存在耗时长、成本高、灵敏度低以及需要专业人员操作等不足。因此，亟需一种新的便捷、快速且高效的肿瘤检测方法。

* 并列第一作者。

** 通讯联系人。

赵国军 Tel: 18820540486, E-mail: zhaoguojun@gzhmu.edu.cn

江婷 Tel: 13922557407, E-mail: 1416764737@qq.com

收稿日期: 2023-09-22, 接受日期: 2024-02-01

源于细菌适应性免疫系统的规则成簇间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) /相关蛋白质 (CRISPR-associated protein, Cas) 系统, 起初作为基因编辑工具被广泛使用^[7]。目前, CRISPR/Cas9 已经成为生物学研究中最常用的基因编辑手段, 这一简单、高效、成本低的技术, 可以精确地删除、添加、替换或修改动植物甚至人类身上的基因, 相关技术已广泛应用于农业领域和生物医药领域^[8-11]。CRISPR 技术不仅在基因组编辑领域得到了应用, 在核酸检测方面也展现出巨大的潜力, 尤其是 CRISPR/Cas 集成电化学传感器 (CRISPR/Cas integrated electrochemical sensors, E-CRISPR) 具有高灵敏度、高特异性、响应速度快等优点^[12-13], 可以快速、准确地对多种生物样本进行定量测定, 已在医疗健康、环境监测、食品安全等多个领域中应用, 并且在提升肿瘤标志物检测水平上具有巨大潜力。本文综述了 E-CRISPR 平台的构建及其在肿瘤检测中的应用, 并讨论 CRISPR 技术在分子检测领域的优势和局限性, 为相关领域人员提供参考和帮助。

1 CRISPR/Cas系统

CRISPR/Cas 系统是细菌和古细菌为对抗病毒和质粒不断进攻而演化来的获得免疫防御机制^[14]。CRISPR/Cas 系统主要由两部分组成, 即 CRISPR 阵列与相关 Cas 蛋白基因。完整的 CRISPR 阵列包括上游的前导序列和下游由独特序列分隔的重复序列^[15]。前导序列富含 A-T 碱基对, 可作为启动子来启动下游的间隔序列与重复序列的转录, 其转录产物为 CRISPR RNA (crRNA)^[16]。CRISPR/Cas 系统作用机制分为适应、表达和干扰三个阶段的免疫反应^[17]。当细菌或古细菌细胞首次接触病毒或外源基因时, 即进入适应阶段。CRISPR 位点将 Cas 基因表达为 Cas 蛋白, 这些 Cas 蛋白识别病毒以及外源核酸, 并切割病毒核酸的一部分形成间隔子, 将其储存在 CRISPR 阵列的前导链中^[18]。第二阶段称为表达阶段, 细菌或古细菌细胞的 CRISPR 阵列将其存储的间隔转录成小的非编码 RNA, 称为前体 crRNA (pre-CRISPR RNA, pre-crRNA), 并通过碱基配对与转录激活 crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA) 连接, 形成成熟的 crRNA。第

三阶段即干扰阶段, crRNA 与效应 Cas 酶形成复合物, 该复合物通过独特的原型间隔区相邻基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 定位病毒核酸, 并破坏病毒基因, 从而实现完全免疫^[19-21]。

根据 Cas 的结构和功能, CRISPR/Cas 系统可分为 I 类和 II 类两大类, 其中 II 类是目前研究最多、应用最广泛的系统^[22]。I 类 CRISPR/Cas 系统由多个 Cas 蛋白复合物组成, 包括 I 型、III 型和 IV 型; II 类 CRISPR/Cas 系统是由 RNA 介导的单一多域 Cas 蛋白系统, 分别是 Cas9 (II 型)、Cas13 (VI 型)、Cas12 (V 型) 和 Cas14 (V 型)^[23]。尽管它们的种类和结构组成本质上不同, 但它们都形成了作为生物识别元件的二元复合物 (Cas-crRNA), 且在分析领域的应用中发挥着关键作用。

Cas9 主要由 Cas9 蛋白、可编程的单指导 RNA (single-guide RNA, sgRNA) 和目标序列三元组成。其中 Cas9 蛋白酶切割活性是由 pre-crRNA 与 tracrRNA 形成的复合体 sgRNA 调控的, 该复合体在 PAM 附近的特定位点切割目标双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA) (图 1a)^[24]。Cas12 在 crRNA 的引导下靶向 PAM 附近的 DNA 序列进行识别, 并在特定位置切割目标链。同时, 其反式切割能力被激活, 主要切割周围的单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 荧光报告分子, 这种对周围 ssDNA 进行反式切割的 DNase 活性称为反式切割, 从而产生荧光信号 (图 1b)^[25]。相比之下, Cas13 是一种由 crRNA 引导的 RNA 靶向系统, 在切割目标 RNA 链的同时切割周围的单链 RNA (single-stranded RNA, ssRNA) 荧光报告基团。具体来说, crRNA 引导 Cas13a 检测目标 RNA, 与 Cas9 和 Cas12 家族不同, 大多数报道的 Cas13 家族的变体依赖原间隔子侧翼序列 (protospacer flanking sequence, PFS) 的识别 (图 1c)^[26-27]。

Cas14 在结构上被划分为和 Cas12 一样的 V 类效应器, 作为一个全新的 Cas 成员。Cas14 蛋白需在 sgRNA 的帮助下识别 ssDNA, 并同时触发反式切割 ssDNA 荧光报告基团的能力。值得注意的是, Cas14 对靶标分子的识别并不依赖于 PAM 序列, 其切割效率比 Cas9、Cas12、Cas13 蛋白更具特异性 (图 1d)^[28]。上述几种 CRISPR/Cas 系统的主要特征见表 1。

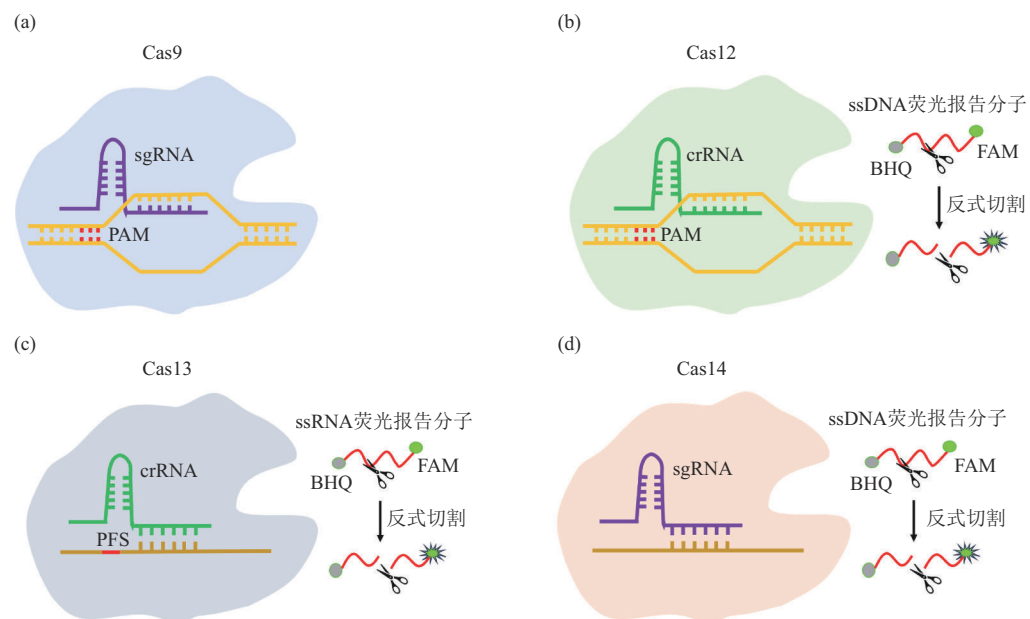


Fig. 1 Principles of detection of class II CRISPR/Cas systems

图1 II类CRISPR/Cas系统的检测原理

BHQ: 黑洞猝灭剂 (black hole quencher); FAM: 羧基荧光素 (carboxyfluorescein)。

Table 1 Main features of class II CRISPR/Cas systems

表1 II类CRISPR/Cas系统的主要特征

	Cas9	Cas12	Cas13	Cas14
靶标类型	dsDNA	dsDNA/ssDNA	ssRNA	ssDNA
向导RNA	sgRNA	crRNA/sgRNA	crRNA	sgRNA
PAM	5'-NGG-3'	5'-TTTN-3'	PFS序列A/U/C-3'	—
顺式切割	有	有	有	有
反式切割	—	ssDNA	ssRNA	ssDNA
检测方法	CAS-EXPAR ^[29]	DETECTR ^[30] HOLMES ^[31]	SHERLOCK ^[32] SHERLOCKv2 ^[33]	Cas14-DETECTR ^[34]

2 结合CRISPR/Cas的生物传感器检测技术

生物传感器是一种能将生物指标转化为可测量信号的设备，广泛应用于疾病的监测与诊断、新药开发、食品安全检测等领域^[35-37]。例如，临床环境中糖尿病患者的血糖监测仪^[36]和严重急性呼吸综合征冠状病毒2（severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2）抗原检测中使用的胶体金试纸条^[37]。生物传感器由两个核心部分构成：生物识别元件和信号转导元件。生物识别元件（如酶、抗体、核酸、细胞等）能够与样本中的目标分析物特异性结合，引起化学或物理性

质的变化，产生可解析的参数。然后，信号转导元件将这些参数转换为可测量的信号，常见的转导系统包括电化学、光学、热量或质量感应等方法^[38-39]。在众多的信号转导方法中，电化学生物传感器是一种经典的生物传感器，能高效地把生物学信息转化为可测量的电信号。根据电信号的输入输出方式，电化学生物传感器可分为伏安法、阻抗法、光电化学和电化学发光法等^[40]。电化学生物传感器不仅响应读数快、便携、成本低，还可以通过使用特定的增强元件来提高特异性及灵敏度，为生物传感技术的发展和應用打开了新的视角。

CRISPR 检测技术作为一种新的分子诊断工

具,能特异性识别和切割靶基因,用于单核苷酸多态性分型、体外核酸检测和胞内特定基因成像^[41]。CRISPR/Cas系统在核酸检测,尤其是在SARS-CoV-2的检测中发挥了重要的作用。在新型冠状病毒感染(COVID-19)疫情期间,为实现便捷、快速、高灵敏的SARS-CoV-2核酸分子检测,基于CRISPR方法检测了临床COVID-19患者样本,检测技术“opvCRISPR”(one-pot visual rt-lamp-CRISPR)、“DETECTR”(DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter)的检测时间、检测限分别约为45 min、5 copies/ μ l^[26]和30 min、10 copies/ μ l^[42],这些技术极大缩短了核酸检测的时间。

目前,功能性核酸适配体、结构转录因子和其他生物特征元件的添加使得非核酸分子信号能够转化为核酸信号,扩大了CRISPR/Cas系统的应用范围,使得基于CRISPR/Cas的生物传感技术可广泛用于检测多种靶标,包括核酸、生物标志物、小分子和金属离子等^[43],CRISPR/Cas检测技术输出模式主要有荧光、比色、电化学、拉曼等^[44-45]。CRISPR/Cas检测技术研究的当前重点之一是克服现有报告系统的某些局限性,如在荧光检测器中,信号分子的稳定性较差、灵敏度低,在基于光学转导的生物传感系统中,成本较高以及便携性较差。在当今数字化时代,简单、快速、准确、灵敏、高选择性和低成本是新时代生物传感器的代名词,为促进CRISPR/Cas多重生物传感,需要考虑将CRISPR/Cas与一些信号转导技术相结合。与现有的检测策略相比,电化学传感器具有结构简单、易于小型化、成本低、响应速度快、灵敏度高等优点,因此广泛应用于生物传感应用^[46]。

3 各类肿瘤标志物及其现有检测方法

肿瘤标志物是一种在肿瘤发展过程中产生的特殊物质,它可以由肿瘤细胞自身分泌,也可以通过机体对肿瘤细胞的反应而产生^[47]。肿瘤标志物可以存在于血液、尿液、组织等样本中。目前,肿瘤标志物主要分为五大类:循环肿瘤细胞、外泌体、蛋白质、ctDNA和miRNA。通过检测肿瘤标志物,可以进行肿瘤的早期筛查、诊断、疾病进展监测和疗效评估等,具有重要的临床意义。以下简要介绍ctDNA、miRNA和蛋白质三类典型的肿瘤标志物以及现有的检测方法。

ctDNA是血液及其他体液中的游离DNA片段,

主要源自恶性肿瘤细胞^[48]。ctDNA含有与其来源肿瘤DNA同样的基因缺陷,包括突变、缺少、插入、重排、拷贝数异常以及甲基化等^[47]。ctDNA作为一种高敏感性和特异性的生物标志物,可以在许多晚期实体肿瘤患者的外周血液中检测到,其水平变化与肿瘤的发展密切相关。例如,结直肠癌术后患者若血液中ctDNA含量较高,则表明复发风险增加^[49]。肺癌患者中的表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)基因突变检测对于指导用药和监测疗效具有重要作用^[50]。因此,ctDNA检测对于肿瘤的早期发现以及预后评估具有重要意义。目前临床ctDNA定量检测主要基于PCR^[6],尽管PCR技术在精准度和特异性方面表现优异,但由于其对复杂设备的依赖、对操作人员的高技能要求,以及较长的处理周期,其应用范围往往限于设备齐全的实验室。

miRNA是一类长度为18~24个核苷酸的小型非编码RNA分子,主要通过与其靶标RNA的互补配对,调控基因表达^[51]。在细胞内,miRNA参与多种生物学过程,如细胞增殖、分化、凋亡和细胞周期调控等^[52]。miRNA的表达水平与多种癌症密切相关,发挥类似癌基因或抑癌基因的作用。miRNA-6807-5p和miRNA-6856-5p被发现是诊断胃癌和评估胃癌切除手术治疗效果生物标志物^[53]。有研究指出,miRNA-155在多种恶性肿瘤中过表达,如淋巴瘤和肺癌^[54]。miRNA-155上调抑制了转化生长因子 β 受体2的表达,从而促进了胃癌细胞的增殖和迁移。使用miRNA-155抑制剂可以抑制肿瘤细胞的生长^[55]。因此,miRNA表达和定量可作为早期癌症诊断和评估治疗效果的有价值的生物标志物。然而,由于miRNA长度短、同源性高、含量较低等特点,精确检测miRNA仍然是一个挑战。目前,miRNA的分析主要采用逆转录PCR、RNA印迹法(Northern blotting)、高通量测序等技术^[56],但这些技术往往存在耗时长、设备昂贵或灵敏度低的问题。因此,迫切需要开发一种简单、高效且灵敏的miRNA生物传感器。

蛋白质是生物体中重要的生物大分子,独特蛋白质的表达通常与疾病相关。肿瘤蛋白标志物是一类在肿瘤细胞中过度表达或突变的特定蛋白质,主要由肿瘤细胞分泌释放到体液中,包括抗原、酶和激素等物质^[57]。肿瘤蛋白标志物与癌症的进展之间的关系非常明确,蛋白质肿瘤标志物的表达水平越高,表明疾病的晚期程度越高。因此,检测其含

量对于肿瘤的早期诊断和病情监测等具有重要意义。例如, 癌抗原 72-4 是目前诊断胃癌的最佳肿瘤标志物之一, 具有较高的特异性, 常被作为胃癌的首选肿瘤标志物, 并且可作为胃癌分期和疗效检测的良好指标, 并与癌胚抗原联合检测可以监测超过 70% 的胃癌^[58]。甲胎蛋白是最常用的临床肿瘤标志物之一, 在正常人的血清中含量较少, 但在原发性肝癌患者体内显著上升^[59]。因此, 临床上主要使用甲胎蛋白作为原发性肝癌的血清标志物, 用于原发性肝癌的诊断和疗效监测。肿瘤蛋白标志物的检测技术可能是最成熟的。然而, 目前常用的临床检测方法, 如酶联免疫吸附试验、流式细胞术、和蛋白质印迹法^[60], 存在受人工操作影响大、重复性差、灵敏度有限以及需要大量样本等缺点, 阻碍了其在早期疾病诊断中的应用。

4 CRISPR/Cas结合电化学生物传感器在肿瘤检测方面的应用

CRISPR/Cas技术与电化学传感器的结合, 可将生化信号转化为电信号, 因其高度选择性、稳定性、灵敏性, 有望用于检测各种肿瘤标志物, 如核酸、蛋白质等, 相比于荧光生物传感器法, E-CRISPR更具有分析优势^[61]。同时, E-CRISPR集成床旁检测 (point-of-care testing, POCT) 具有多功能检测

的优点, 并且易于转换为智能设备, 使临床医生能够在短时间内分析数据, 并为患者提供更好的 POCT, 为临床诊断带来便利。Zhou 等^[62]构建了一种基于CRISPR/Cas13a技术的便携式电化学发光芯片 (CRISPR/Cas13a powered portable ECL chip, PECL-CRISPR), 用于高灵敏度和特异性 miRNA 检测。该芯片在 70 min 内实现了对 miRNA-17 的 1 pmol/L 检测限, 并且具有单核苷酸分辨能力, 可以显著区分高度同源的 miRNA 家族成员。凭借其高灵敏度、高特异性和便携性, PECL-CRISPR 在临床诊断领域展现出广泛应用前景, 对于 POCT 系统尤为适用。图 2 显示了一个简单的 E-CRISPR 集成 POCT 设备的示意图。处理后的样品被添加到样品区, 通过通道移动到 CRISPR/Cas 系统反应区, CRISPR/Cas 系统在存在目标的情况下被激活, 并切割目标产生关闭信号。另一方面, 在没有靶标的情况下, CRISPR/Cas 系统失活导致信号开启, 最终通过电化学或电化学发光读出器监测产生的信号^[43]。与其他方法相比, E-CRISPR 表现出了出色的传感性能, 具有较高的灵敏度、特异性和重复性, 可以从高设备需求实验室转移到低设备现场部署, 从而推动疾病的早期筛查及个性化精准治疗, 对提高疾病防控领域科技进步具有重大的意义^[63]。

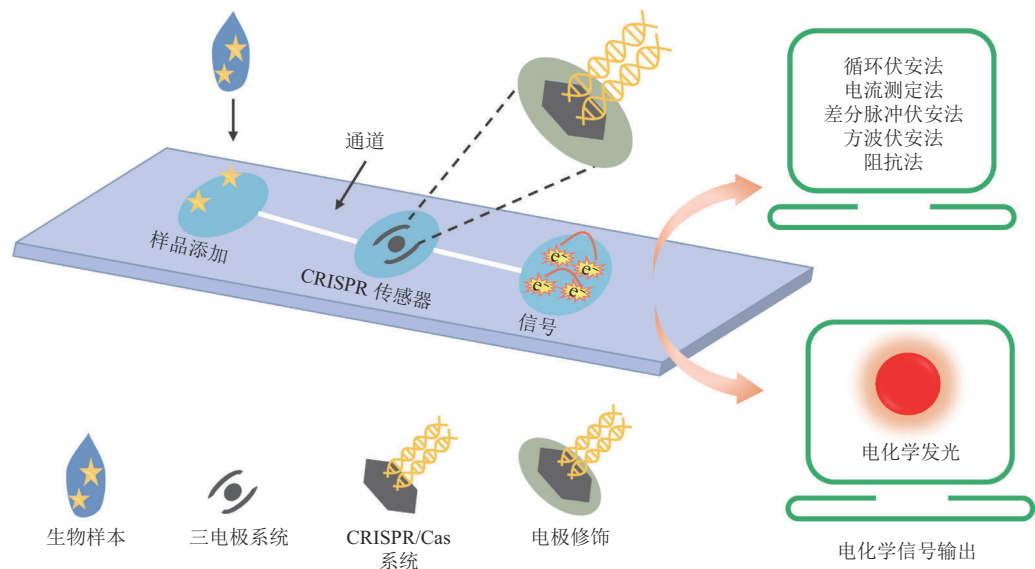


Fig. 2 Schematic representation of working mechanism for E-CRISPR based POCT platforms^[43]
图2 基于E-CRISPR的POCT平台工作机制示意图^[43]

目前, 在所有 Cas 酶类型中, 应用最多的三种是 Cas9、Cas12、Cas13 及其各自的亚型。因 crRNA 的可编程性, E-CRISPR 检测系统经过简单调整即可用于任意肿瘤相关生物标志物(核酸、细胞外囊泡、蛋白质等)的检测。E-CRISPR 技术具有结构简单、易于小型化、成本低、响应速度快、

灵敏度高等优点, 使定量和定性信号的读出更灵敏、快速。可为应对未来的恶性肿瘤流行提供快速诊断手段, 充分展示了 CRISPR/Cas 联合电化学生物传感器在肿瘤检测领域的多功能性和巨大潜力^[64]。部分基于 E-CRISPR 建立的肿瘤标志物检测平台及其特点见表 2。

Table 2 Summary of tumor markers detection methods based on E-CRISPR

表2 基于E-CRISPR的肿瘤标志物检测方法总结

CRISPR/Cas 系统	扩增方法	检测技术	检测因子	时间/min	样本	检测限	参考文献
Cas9	聚合酶链式反应	电化学阻抗谱	ctDNA	0.67	血清	0.65 nmol/L	[65]
	熵驱动的链置换反应	方波伏安法	ctDNA	55	血清	0.13 pmol/L	[66]
	—	电化学阻抗谱	异柠檬酸脱氢酶基因	83	胶质母细胞瘤	33.96 fmol/L	[67]
Cas12a	重组酶聚合酶扩增	差分脉冲伏安法	HPV-16 DNA	60	阴道拭子样本	1 pmol/L	[61]
	—	方波伏安法	HPV-18 DNA	60	加标样品	1.95 pmol/L	[68]
	滚环扩增技术	光电化学	miRNA-21	120	加标样品	0.3 fmol/L	[69]
	滚环扩增技术	方波伏安法	miRNA-21	90	加标样品	0.83 amol/L	[70]
Cas13a	催化发夹DNA电路	方波伏安法	非小细胞肺癌RNA	36	血清	50 amol/L	[71]
	—	方波伏安法	环状RNA	10	尿液	0.089 fmol/L	[72]
	—	安培法	miRNA-19b	210	血清	2 pmol/L	[73]
	—	—	miRNA-20a	—	—	—	—
	催化发卡自组装	差分脉冲伏安法	miRNA-21	90	加标样品	2.6 fmol/L	[74]

4.1 CRISPR/Cas9

近年来, E-CRISPR 技术由于其高灵敏度、特异性和可编程性, 逐渐成为核酸检测的有力工具。CRISPR/Cas9 作为最先被发现的系统, 最初广泛应用于基因编辑, 随着研究的深入, 也逐渐应用于核酸检测。Uygun 等^[65]首次开发了一种基于催化失活 Cas9 (deactivated Cas9, dCas9) 的阻抗法生物传感器, 用于无标记检测 ctDNA。研究中使用了氧化石墨烯丝网印刷电极 (graphene oxide screen printed electrodes, GPHOXE) 作为固定化材料, 通过提高电极的表面积和导电性来提高传感器的灵敏度, 其原理如图 3a 所示。该平台首先将氧化还原探针和 dCas9-sgRNA 复合物固定修饰在 GPHOXE 电极上, 随后进行 ctDNA 检测, 当 sgRNA 和 ctDNA 成功识别结合时, 检测到电子转移阻抗值明显增加, 而其他野生型 ctDNA 序列以及单核苷酸突变序列没有明显的阻抗变化信号。该生物传感器采用阻抗测量技术, 实现了无标记的 ctDNA 检测, 避免了传统 CRISPR 检测方法中的标记物引入和处理步骤, 方便快捷, 40 s 即可输出结

果, 检测限为 0.65 nmol/L, 可作为一种新型液体活检方法, 有望在早期癌症诊断中应用。尽管该传感器具有以上优点, 但此研究样本数量较小, 需要进一步扩大样本规模以验证结果的可靠性和稳定性。

基于类似的原理, Uygun 等^[67]还构建了用于检测胶质母细胞瘤中最常见异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase, IDH) 突变的 CRISPR-dCas9 阻抗法传感器。该传感器通过电化学阻抗谱和电容同时测量 DNA 的浓度和长度, 降低了基于浓度的假阳性信号, 且操作简单, 能够在数分钟内得出结果, 检测限为 33.96 fmol/L。相比以往 IDH 突变检测的 DNA 测序方法, E-CRISPR 方法不需要昂贵的仪器和专业的人员, 具有更高的实用性。同时, 传统的 DNA 生物传感器只能检测 DNA 的突变状态或浓度, 而这种新型的生物传感器系统能够同时测量 DNA 的突变状态和长度, 从而提高了检测的准确性和可靠性, 这对于深入理解 DNA 突变与疾病进程的关系具有重要意义。然而, 该研究仅针对胶质母细胞瘤亚型的一种突变状态进行了检测,

对其他突变状态的检测还有待进一步研究。

由于ctDNA在血液中的含量极低,在其检测中通常需要借助酶扩增技术,如PCR、滚环扩增技术(rolling circle amplification, RCA)^[75],但这些技术往往伴随着非特异性和假阳性信号等不足。为了解决这一问题,熵驱动的链置换反应(entropy-driven strand displacement reaction, ESDR)作为一种创新的无酶扩增技术,提供了一个有效的替代方案。Chen等^[66]首次开发了一种新型的3D GR/AuPtPd纳米花伏安法生物传感器,用于检测表皮生长因子受体ctDNA,该传感器结合了CRISPR/Cas9的精准靶向能力和ESDR的信号放大效应,极大地提高了检测的准确性和灵敏度,其工作原理如图3b所示。首先将3D GR/AuPtPd与捕获探针组合,固定于玻碳电极表面,建立电化学传

感平台。然后,通过Cas9/sgRNA复合体特异性识别并切割靶标DNA,触发ESDR。在ESDR过程中,形成的三元DNA底物探针(由T1、R1和S1链组成)在T1释放后,与电极表面的捕获探针杂交,导致方波伏安法(square wave voltammetry, SWV)的电流显著降低;当靶标不存在时,电流峰值保持不变。Cas9-ESDR系统利用3D GR/AuPtPd纳米花作为传感器平台,不仅提高了检测的灵敏度和稳定性,还能够特异区分单碱基错配序列。在0.01 pmol/L~3 nmol/L线性范围内,其检测限低至0.13 pmol/L。这种创新策略为CRISPR/Cas9系统在生物传感器领域的应用提供了新的思路和方法,可以作为一种通用的DNA检测方法,有助于早期肿瘤的诊断和治疗监测。

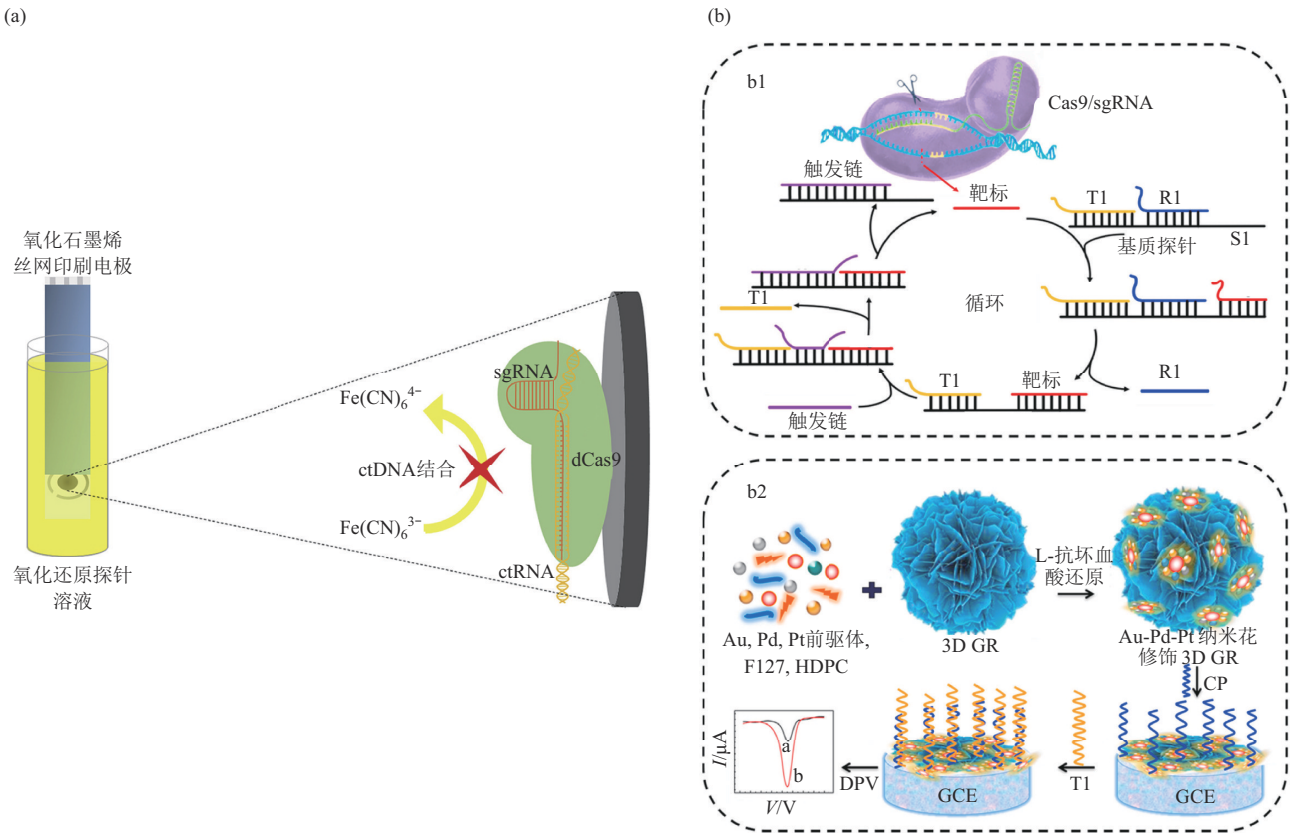


Fig. 3 CRISPR/Cas9-based electrochemical sensors for detection of tumor markers

图3 基于CRISPR/Cas9检测肿瘤标志物的电化学传感器

(a) 基于ctDNA检测的CRISPR/dCas9阻抗生物传感器^[65]。(b) 基于3D GR/AuPtPd纳米花的ctDNA检测电化学传感平台^[66]。(b1) 熵驱动的链置换反应;(b2) 基于3D GR/AuPtPd纳米花的电化学传感过程。HDPC: 氯化十六烷基吡啶-水合物; CP: 捕获探针; GCE: 玻碳电极。

4.2 CRISPR/Cas12

目前, Cas12a是开发基于CRISPR的电化学生

物传感器最广泛使用的Cas酶之一,因为其反式切割活性的底物是相对稳定的DNA。基于CRISPR/

Cas12a的电化学生物传感器可检测 fmol/L 水平的核酸甚至蛋白质。为了提高电化学传感器核酸检测的敏感性和特异性,将CRISPR-Cas12a依赖的超分支滚环扩增(hyper-branched rolling circle amplification, HRCA)引入电化学传感器平台,能够增强其对极低浓度核酸的敏感性和对单点突变的特异性,弥补了现有RCA和HRCA的缺点,确保了10 amol/L的高灵敏度,并克服了假阳性问题^[76]。将CRISPR/Cas12a扩展到电化学生物传感系统,可以准确检测肿瘤细胞中不同性质的DNA、RNA和蛋白质,为促进体外分子诊断的深入研究提供了有力的技术支持。

近年来,基于CRISPR/Cas12a系统的电化学生物传感器在核酸检测领域引起了广泛关注。然而,大多数这类生物传感器需要复杂和耗时的过程将电化学探针固定在电极表面。为了解决这个问题,Li等^[61]在2021年开发出了一种简单、多功能的电场增强型(electric field-enhanced, EFE)电化学CRISPR生物传感器,用于检测均相溶液中的人乳头瘤病毒16型(human papillomavirus, HPV-16)DNA(图4a)。为了提高灵敏度,该检测系统利用脉冲电场在工作电极表面富集靶标核酸以及亚甲基蓝(methylene blue, MB)-ssDNA探针,消除了复杂的电化学探针固定过程。当靶标存在时,已被激活的CRISPR/Cas12a切割MB-ssDNA探针,释放带较少负电荷的MB探针,导致在检测过程中电化学电流增加。该传感器可以直接检测未扩增的HPV-16 DNA,灵敏度达到1 pmol/L,比常规电化学CRISPR检测高100倍。同时,结合重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)技术,成功检测了临床样本中的HPV-16 DNA,实现了简单、灵敏的POCT。为了进一步简化E-CRISPR技术的操作,作者提出将在未来开发“一步法RPA/CRISPR电化学检测系统”。总之,EFE电化学CRISPR生物传感器为基于核酸的分子诊断提供了一种简单、灵敏的检测方法。

E-CRISPR检测平台因其便捷、简单和高灵敏性而备受关注,尽管如此,E-CRISPR的广泛应用受到了其组成材料——贵金属电极(如金、铂)的电化学性能局限^[77],如蛋白质诱导的生物污染和信号转导效率较低^[78]。为解决这些问题,研究者们通过在工作电极中引入复合纳米材料来改善CRISPR/Cas系统的灵敏度和信号探针的固定表面

积比,同时限制脱靶效应以确保检测的选择性和准确性。例如,Duan等^[68]开发了一种基于金纳米颗粒和MXene Ti_3C_2 复合材料的E-CRISPR平台,用于定量检测HPV-18 DNA,检测限为1.95 pmol/L。该传感器利用基于金纳米颗粒/MXene Ti_3C_2 的碳电极,通过硫醇-金键共价修饰MB-ssDNA探针,产生明显的初始峰值电流。当存在靶标DNA序列时,Cas12a-crRNA引导的反式切割被激活,导致MB-ssDNA探针从金纳米颗粒/ Ti_3C_2 电极表面被切割掉,SWV电流显著降低。当靶标不存在时,探针分子保持完整,SWV电流保持不变。此外,研究团队还评估了传感器在长期储存期间的选择性、降解抗性和检测能力,发现该传感器在2个月后仍保留超过70%的初始电流,并提供可靠的分析结果。由于其优异的抗污染性、分析性能和耐久性,此E-CRISPR方法为现场快速肿瘤筛查提供了一种普适且成本效益高的解决方案。然而,尽管具有多项优点,该传感器在检测尿液中HPV-18 DNA时的信号强度却低于磷酸缓冲盐溶液样本,这可能是由于尿液中增加的镁离子影响了CRISPR/Cas12a酶活性,因此需要进一步研究以优化传感器性能。此外,利用复合纳米材料提高电化学传感器的敏感性和稳定性的特点,Liu等^[79]利用CRISPR/Cas12a系统和MB/ Fe_3O_4 @COF/PdAu纳米复合材料构建了一种E-CRISPR检测平台,用于检测非小细胞肺癌中ctDNA的突变。该方法具有高灵敏度和高选择性,能够在未经扩增的样本中进行单分子水平的DNA定量,避免了扩增过程中的误差和污染。其检测限低至3.3 amol/L,为非小细胞肺癌的早期发现、诊断和治疗提供了有力的辅助工具,从而有望显著提升患者的生存率和生活质量。

光电化学(photoelectrochemistry, PEC)生物传感器因其装置简单、稳定性好、灵敏度高、背景信号低等优点在分析领域引起了广泛的关注^[80]。Shen等^[69]开发了一种基于CRISPR/Cas12a多扩增策略的可编程miRNA(CRISPR/Cas12a-assisted multi-amplification strategy-mediated programmable miRNA, Cas-Master)生物传感器。Cas-Master融合了PEC和比色法(colorimetry, CM)技术,通过RCA-Cas12a多重放大电路实现了高效检测(图4b)。这一传感器首先将miRNA通过RCA转化为含有重复序列的长单链DNA,该链特异性地激活Cas12a的切割功能。随后,被激活的Cas12a会切

割杂交链式反应 (hybridization chain reaction, HCR) 中的触发链, 从而启动放大反应。接着, 葡萄糖氧化酶分别与 β -CD@AuNP 和 NH_2 -MIL-88B (Fe) 结合, 形成了同时响应 PEC 和 CM 信号的双重检测系统, 提高了检测结果的可靠性和准确性。在 1 fmol/L~100 nmol/L 范围内, PEC 和 CM 信号与 miRNA 浓度的对数呈线性关系, 检测下限分别为 0.3 fmol/L (PEC) 和 0.5 fmol/L (CM), 这种高灵敏度检测为早期肿瘤诊断提供了可能。此外, 研究团队还设计了一款便携式 Cas-Master 装置, 通过将信号调节和传输系统集成进微型电路板中, 实现了 miRNA 检测设备的微型化。这一创新不仅让检测结果能够即时发送到智能手机或电脑, 而且由于其便携性, 即便在资源匮乏的地区也能够顺利运行, 显著扩展了肿瘤检测的可及性。此技术的开创也为基于 Cas12 的检测平台应用于 POCT 和肿瘤早期筛查提供了新的策略。另外, Wang 等^[81] 也通过 Cas12 蛋白设计了检测 miRNA-122 的 PEC 生物传感器, 最低可检测到 2.04 fmol/L 的 miRNA-122, 并且该传感器具有出色的长期稳定性, 在 4~25°C 的环境下, 其 PCE 响应值至少可以稳定保持 1 个月, 确保了在实际应用过程中的可靠性。

电化学发光 (electrochemiluminescence, ECL) 技术融合了化学发光和电化学的特性, 其在显著降低背景的情况下实现高信噪比, 超越了传统荧光检测的灵敏度^[82]。同时, ECL 检测无需繁琐的光学装置, 利用电化学激发和检测过程, 具备操作简便、可控性强和灵敏度高等特点, 在生物医学检测领域中显示出巨大潜力。为了进一步提高 ECL 技术的灵敏度, 研究人员通常使用纳米材料、金属有机框架和介孔纳米微球等作为共反应加速剂^[83-84], 以提高 ECL 效率。Shen 等^[85] 成功构建了一种基于 CRISPR/Cas12a 和 TCPP-Fe@HMUiO@Au-ABEI 纳米发射器的 ECL 生物传感器, 用于超灵敏检测外泌体 miRNA-155, 其原理如图 4c 所示。首先, 利用 CRISPR/Cas12a 结合三维行走纳米马达策略放大靶标信号, 从而提高传感器的灵敏度和特异性。然后, 利用具有优异催化性能的 TCPP-Fe@HMUiO@Au-ABEI 纳米发射器来放大 ECL 信号, 通过增强的传质和催化活性位点, 进一步提高了检测的灵敏度。同时, 作者采用四面体 DNA 纳米结构作为支架制备“自下而上”地锚定生物探针, 显著提高了 Cas12a 的反式切割效率。由于这

些创新, 该生物传感器实现了极低的检测限, 达到 273.20 amol/L。此外, 该传感器还能通过分析外泌体 miRNA-155 有效区分乳腺癌患者, 显示出其在早期临床诊断中的巨大潜力。

除了 ctDNA 和 miRNA 外, 常见的肿瘤标志物还包括在恶性肿瘤发生和增殖过程中产生的蛋白质、酶和激素等大分子, 这些标志物对于肿瘤的辅助诊断和预后评估同样具有临床意义。利用具有优越特异性和亲和力的适配体, 结合多种分析方法, 如质谱^[86]、CRISPR/Cas 系统^[87] 和表面等离子共振^[88] 等技术, 可以提高蛋白质和酶分析的灵敏度。Qing 等^[89] 开发了一种还原氧化石墨烯修饰的 E-CRISPR 适配体传感器。该研究首先采用了一种称为“结合诱导的 DNA 链位移”的策略, 将凝血酶和适配体相互作用转化为核酸输出, 进而触发 RCA 反应来调控 CRISPR/Cas12a 对 MB 标记探针的切割活性, 从而导致电化学信号的明显变化。这一方法实现了对肿瘤相关生物标志物 (包括凝血酶、miRNA) 的高特异性和敏感性检测, 检测限达到了 1.26 fmol/L^[89] 和 0.83 amol/L^[70]。这不仅为蛋白质检测提供了新的高效、灵敏的途径, 也为未来的肿瘤诊断技术发展提供了新的思路和策略。此外, Wang 等^[90] 也基于以上原理, 建立了一种基于超薄二维共价有机框架纳米片的电化学生物传感器, 实现了程序性死亡配体 1 蛋白阳性外泌体的高灵敏检测, 检测限为 38 粒子/ μL 。该传感器在临床样本分析中表现出了令人满意的电化学稳定性和抗干扰能力, 并且成功地识别了非小细胞肺癌患者。

DNA 腺嘌呤甲基化甲基转移酶 (DNA adenine methylation methyltransferase, Dam MTase) 是一种与肿瘤发生直接相关的异常蛋白^[91]。Lin 等^[92] 首次开发了一种基于 Cas12a 双信号增强的 ECL 生物传感器, 用于 Dam MTase 检测, 其检测原理如图 4d 所示。在 Dam MTase 存在的情况下, 限制性内切酶特异性切割发夹 DNA 以释放茎端, 从而激活 CRISPR/Cas12a 的切割活性。在反式切割的辅助下, 信号猝灭因子二茂铁 (Fc) 与 ECL 信号单元之间的距离增加, 信号单元与氧化铟锡电极之间的排斥力减小, 从而增强了 ECL 传感器信号。该传感器的信号强度与 Dam MTase 浓度的对数值在 5~70 U/ml 的范围内呈良好的线性关系, 检测限为 23.4 U/L。这种新型方法为 Dam MTase 的检测提供了一种新的方法, 丰富了相关领域的研究手段。

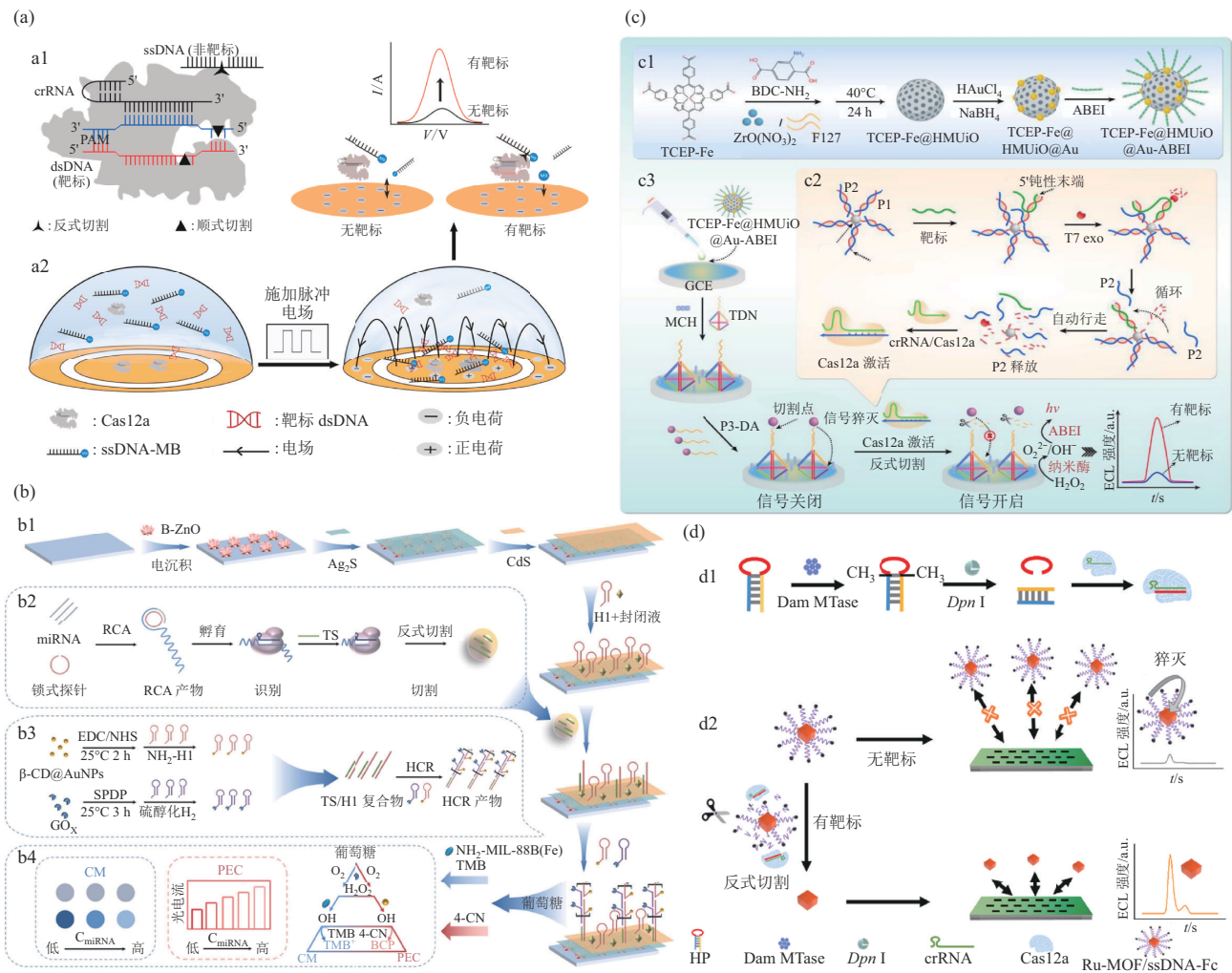


Fig. 4 CRISPR/Cas12-based electrochemical sensors for detection of tumor markers

图4 基于CRISPR/Cas12检测肿瘤标志物的电化学传感器

(a) 用于DNA检测的电场增强E-CRISPR平台^[61]。(a1) CRISPR/Cas12a蛋白在靶标DNA存在时的反式裂解和顺式裂解活性；(a2) 电场增强E-CRISPR检测平台的反应程序。(b) Cas-Master检测miRNA的机制示意图^[69]，(b1) PEC-CM双模式生物传感器的构建过程；(b2) CRISPR/Cas12a特异性识别miRNA触发的RCA产物，TS：触发链；(b3) TS触发的HCR反应，SPDP：琥珀酰亚胺3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯；(b4) 基于葡萄糖氧化酶诱导的双联级系统PEC和CM信号生成，TMB：3,3',5,5'-四甲基联苯胺，BCP：生物催化沉淀，PEC：光电化学，CM：比色法。(c) 用于miRNA检测的CRISPR/Cas12a ECL生物传感器^[85]。(c1) 纳米发射器的合成过程，ABEI：N-(4-氨基基)-N-乙基异鲁米诺；(c2) 3D行走纳米马达介导的CRISPR/Cas12a策略，T7 exo：T7核酸外切酶；(c3) ECL生物传感器的构建过程，GCE：玻碳电极，TDN：四面体DNA纳米结构，P3-DA：多巴胺修饰的P3链。(d) 用于Dam MTase检测的CRISPR/Cas12a ECL生物传感器^[92]。(d1) DNA甲基化诱导的Cas12a反式切割过程，Dam MTase：DNA腺嘌呤甲基化甲基转移酶；(d2) ECL传感的示意图，HP：发卡DNA，Ru-MOF/ssDNA-Fc：联吡啶衍-沸石咪唑酯骨架/ssDNA-二茂铁。

4.3 CRISPR/Cas13

Cas13a具有crRNA指导的RNase活性，从而保护细菌免受遗传因素的伤害，它能够特异性地识别靶RNA序列，同时激活其特异性的顺式切割活性，以及非特异性的反式切割活性，而且具有遗传修饰功能，可作为干扰RNA的强有力工具，有助于特异性和超灵敏的现场检测^[27]。

CRISPR/Cas13a是近年来发现并应用于RNA检测领域的新体系，基于CRISPR/Cas13a的电化学方法已被广泛用于肿瘤标志物检测。例如，Cui等^[74]通过结合CRISPR/Cas13a系统和催化发夹组装扩增技术，开发了测定miRNA-21的伏安法E-CRISPR技术平台，该平台表现出超高灵敏度，检测限可以低至2.6 fmol/L。为了实现快速、便捷、

高特异性和高灵敏性的 miRNA 检测, Sheng 等^[71]构建了 Cas-催化发卡 DNA 电路 (catalytic hairpin DNA circuit, CHDC) 供电的电化学 RNA 传感技术 (Cas-CHDC-powered electrochemical RNA-sensing technology, COMET), 其工作原理如图 5a 所示。目标 RNA 的存在激活 Cas13a 的反式切割活性, 导致触发链被切割, 从而生成催化 CHDC 扩增电路的中介物。CHDC 产物与芯片表面的硫代 DNA 结合形成复合体, 显著增强了电极与氧化还原标签 (亚甲基蓝和 Fc) 之间的电化学电流, 最终通过 SWV 读取检测结果。使用 10 μL 的测量体积, 在 36 min 内即可实现 50 amol/L 的超低检测限。该技术具有灵敏度高、成本低、测试时间短等优点, 对肿瘤患者的早期诊断和治疗监测至关重要, 有望显著改善患者的临床预后。然而, COMET 技术仍有改进空间, 目前它需要分别在芯片外和芯片内进行操作, 并且需要根据不同的靶序列重新设计和合成 crRNA 引导序列。未来, 可以通过将 COMET 技术与微流控平台结合, 实现多个 RNA 的同时检测, 从而创建高效的“一对多”生物传感器。

E-CRISPR 方法的高灵敏和特异性, 以及微流控技术的高通量特性, 催生了一种新型分子诊断技术。该技术以其低样本消耗、快速检测、最小污染、高灵敏度和多重检测集成等显著优势, 尤其适用 POCT。Bruch 等^[73]开发了一种基于 CRISPR/Cas13a 的电化学微流控生物传感器, 实现了无需扩增的 miRNA 定量分析。该平台具有在单个微流控通道中对多种核酸进行空间分离检测的能力, 它可以根据需要灵活地从单一临床样本中检测各种 RNA, 最多可以分析 8 种分析物。相比于当前 miRNA 分析的黄金标准——逆转录定量聚合酶链反应, 具有更快、成本更低、更易于处理的优势, 并能直接获得患者样本中 miRNA 的精确计量。通过微流控技术可以同时检测多个基因或突变, 为肿瘤特征提供更全面信息, 在分析肿瘤复杂遗传背景时具有重要意义, 有望显著改善诊断和治疗策略。

以上基于 Cas13a 的 E-CRISPR 技术都依赖于繁琐的扩增过程, 这需要复杂的设计和反应过程。同时电极表面固定探针的性能, 对 CRISPR 系统的切割效率起着关键作用。目前常用的探针形式, 包括线性单链^[12]和发夹结构^[93], 均存在纠缠和倒伏问题, 导致空间位阻, 影响 CRISPR 系统的切割能力。然而, 四面体 DNA 框架是一种自组装的 DNA

纳米结构, 为基于界面检测的空间位阻提供了一种方便的解决方案。与传统探针相比, 此结构更易于稳定地固定于电极, 避免了探针间的纠缠和非特异性的自组装。为简化实验流程, 提升电化学传感器性能, Xu 等^[94]开发了一种基于三维四面体 DNA 探针的 E-CRISPR 平台, 用于无扩增的 miRNA 检测, 实现了 Cas13a 的激活、切割和信号读取的全程芯片化, 其原理如图 5b 所示。研究中首先将四面体 DNA 与生物素标记的 RNA 报告分子偶联, 然后通过辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的亲合素与生物素结合, 构建成稳定的探针并固定在电极上, 以产生初始电流信号。在 Cas/crRNA 复合物的作用下, 仅在靶标 miRNA-19b 存在时, 触发 Cas13a 切割探针并释放 HRP, 由 HRP 催化的四甲基联苯胺 (tetramethylbenzidine, TMB) 与 H_2O_2 反应产生的电流信号即为检测信号。该传感器在 $10\sim 10^4$ pmol/L 范围内呈现良好的线性关系, 检测限为 10 pmol/L。此外, 该传感器在模拟血清中显示出良好的特异性, 可区分 miRNA-19b 和 miRNA-197。尽管已对模拟样本进行了验证, 但其在实际临床样本中的应用需要进一步验证。同时, 该方法的反应时间较长 (约 3 h), 需要进一步优化芯片设计和实验条件。总的来说, 该传感器提供了一种简单、无扩增且灵敏的 miRNA 检测方法, 有助于解决传统方法中设备昂贵、操作复杂的问题。该全芯片策略适用于 POCT, 有望在临床肿瘤早期筛查中发挥重要作用。

环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一类具有闭环结构的 RNA 分子, 已证明在尿液中可作为膀胱癌标志物^[95]。Cheng 等^[72]开发了一种基于 Cas13a 系统和 DNA 四面体结构的电化学生物传感器, 用于检测膀胱癌相关的 circRNA。该传感的界面由具有高 MB 载荷能力的稳定 DNA 四面体构成, Cas13a 对 circRNA 的特异性识别触发其剪切活性, 导致 DNA 四面体结构解体并释放 MB, 从而引起峰值电流的急剧减小 (图 5c)。该装置具有较高的特异性, 能够很好地识别单碱基突变。与传统的检测方法相比, 该技术无需复杂的 circRNA 提取步骤, 可以在 10 min 内直接检测 25 μL 尿液样品中的 circRNA, 最低检测限为 0.089 fmol/L。这种方便、快速的 POCT 方法使膀胱癌的大规模筛查和分析成为可能。此方法可作为通用型的 CRISPR/Cas 信号输出装置用于检测不同的靶标分子, 以满足更多的检测场景需求。

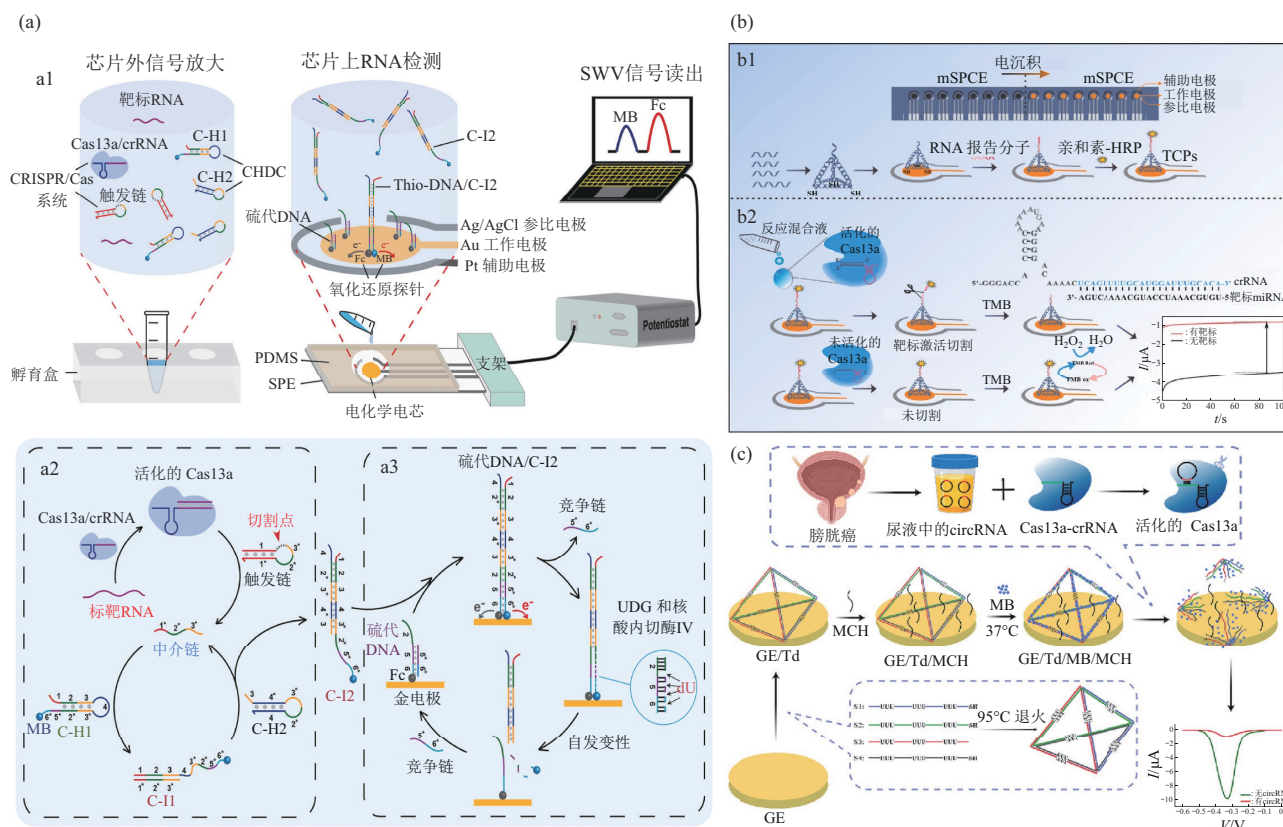


Fig. 5 CRISPR/Cas13-based electrochemical sensors for detection of tumor markers

图5 基于CRISPR/Cas13检测肿瘤标志物的电化学传感器

(a) Cas-CHDC电化学RNA传感技术 (COMET) 芯片的工作原理^[71]。(a1) COMET芯片的检测步骤, CHDC: 催化发夹DNA电路, PDMS: 聚二甲基硅氧烷, SPE: 丝网印刷电极, MB: 亚甲基蓝, Fc: 二茂铁; (a2) 基于Cas13a的Cas-CHDC系统示意图。(a3) 金电极表面信号生成示意图, UDG: 尿嘧啶DNA糖苷酶, dU: 脱氧尿苷。(b) E-CRISPR技术结合三维四面体DNA框架检测miRNA^[94]。(b1) E-CRISPR平台的组装过程, mSPCE: 多阵列丝网印刷碳电极, mSPGE: 多阵列丝网印刷金电极, avidin-HRP: 辣根过氧化物酶标记亲和素, TCPs: 四面体复合探针; (b2) E-CRISPR平台检测miRNA的原理。TMB: 3,3',5,5'-四甲基联苯胺。(c) 基于circRNA检测的E-CRISPR平台^[72], GE: 金电极, Td: 四面体, MCH: 6-巯基-1-醇, MB: 亚甲基蓝。

5 展 望

肿瘤的预防、诊断和治疗仍然是当今生物医学领域的研究热点, CRISPR作为一种可编程的技术, 只要经过简单的调整, 就有望应用于检测来自各种病原体的DNA或是RNA分子, 且对目标基因点突变位点具有高度特异性。CRISPR/Cas系统偶联的电化学传感器具有灵敏度高、特异性强和可重复性等性能, 克服了传统肿瘤检测技术的缺点, 在肿瘤检测领域显示出巨大的应用潜力, 成为当今检测技术的研究热点之一。E-CRISPR技术因快速、便捷和高灵敏性等优点, 已被广泛应用于肿瘤标志物如核酸和蛋白质等大分子检测。目前, 开发以E-CRISPR为核心的生物传感器已成为焦点, 它能

在多样化的资源环境下提供实时、准确的诊断, 实现低浓度下不同分子的快速检测, 从而有助于早期发现和诊断肿瘤, 提高治疗效果和患者的生存率。为适应临床多环境及时检测的需求, 未来的工作将集中在便携式微流控芯片的研发, 并将互联网和人工智能分析纳入传感平台, 以改善检测数据的管理模式, 从而支持E-CRISPR技术在POCT的开发。随着多学科知识的融合, POCT设备将在未来几年达到新的高度, 这将极大推动健康监测和疾病管理的进步。

然而, E-CRISPR平台的应用仍然面临着诸多挑战, 包括: a. 临床现场检测时, 低浓度的靶标和复杂基质可能影响检测准确性, 需开发简易有效的样本提取技术; b. 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; c. 依赖

PAM序列的识别限制了可检测的病原体范围。虽然通过使用特定设计的引物可以引入PAM来消除这种限制, 但该策略无法直接用于无扩增检测; d. 虽然复合纳米材料提高了E-CRISPR技术的灵敏度和总体信号强度, 但高表面积也增加了非特异性吸附, 从而降低了信噪比, 因此, 如何在生物传感器中功能化纳米材料, 同时提高信号和信噪比, 也是实际样本检测中的一个关键问题; e. 肿瘤诊断常需联合检测多种生物标志物, 但目前的E-CRISPR检测平台多为单通道, 难以实现高通量多生物分子检测。总体而言, 尽管E-CRISPR技术在肿瘤检测方面取得了重要进展, 但仍需要克服一些挑战才能实现其在临床中的广泛应用。通过不断优化E-CRISPR检测平台, 有望在临床中实现更为准确的肿瘤分型诊断, 对患者的早期诊断和预后评估将具有重大意义。

参 考 文 献

- [1] Zhang Z, Wei X. Artificial intelligence-assisted selection and efficacy prediction of antineoplastic strategies for precision cancer therapy. *Semin Cancer Biol*, 2023, **90**: 57-72
- [2] Rivera-Colon G, Chen H, Niu S, *et al.* Cervical adenocarcinoma: histopathologic features from biopsies to predict tumor behavior. *Am J Surg Pathol*, 2020, **44**(2): 247-254
- [3] Mino-Kenudson M. Cons: Can liquid biopsy replace tissue biopsy?-the US experience. *Transl Lung Cancer Res*, 2016, **5**(4): 424-427
- [4] Cheung A H, Chow C, To K F. Latest development of liquid biopsy. *J Thorac Dis*, 2018, **10**(Suppl 14): S1645-S1651
- [5] Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol*, 2022, **15**(1): 131
- [6] Ignatiadis M, Sledge G W, Jeffrey S S. Liquid biopsy enters the clinic - implementation issues and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, **18**(5): 297-312
- [7] Wang Y, Huang C, Zhao W. Recent advances of the biological and biomedical applications of CRISPR/Cas systems. *Mol Biol Rep*, 2022, **49**(7): 7087-7100
- [8] Chen K, Wang Y, Zhang R, *et al.* CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annu Rev Plant Biol*, 2019, **70**: 667-697
- [9] Jiang C, Lin X, Zhao Z. Applications of CRISPR/Cas9 technology in the treatment of lung cancer. *Trends Mol Med*, 2019, **25**(11): 1039-1049
- [10] Maximiano M R, Távora F, Prado G S, *et al.* CRISPR genome editing technology: a powerful tool applied to developing agribusiness. *J Agric Food Chem*, 2021, **69**(23): 6379-6395
- [11] Yi P, Morrow N. Applying CRISPR screen in diabetes research. *Diabetes*, 2021, **70**(9): 1962-1969
- [12] Dai Y, Somoza R A, Wang L, *et al.* Exploring the trans-cleavage activity of CRISPR-Cas12a (cpf1) for the development of a universal electrochemical biosensor. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, **58**(48): 17399-17405
- [13] Heigwer F, Kerr G, Boutros M. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *NatMethods*, 2014, **11**(2): 122-123
- [14] De Puig H, Lee R A, Najjar D, *et al.* Minimally instrumented SHERLOCK (miSHERLOCK) for CRISPR-based point-of-care diagnosis of SARS-CoV-2 and emerging variants. *Sci Adv*, 2021, **7**(32): eabh2944
- [15] Paul B, Montoya G. CRISPR-Cas12a: functional overview and applications. *Biomed J*, 2020, **43**(1): 8-17
- [16] Li H, Xie Y, Chen F, *et al.* Amplification-free CRISPR/Cas detection technology: challenges, strategies, and perspectives. *Chem Soc Rev*, 2023, **52**(1): 361-382
- [17] Alkhnbashi O S, Meier T, Mitrofanov A, *et al.* CRISPR-Cas bioinformatics. *Methods*, 2020, **172**: 3-11
- [18] 党生, 张师, 翟景波. CRISPR/Cas12a 系统: 核酸检测的多功能工具. *生物化学与生物物理进展*, 2024, **51**(4): 785-796
- [18] Dang S, Zhang S, Zhai J B. *Prog Biochem Biophys*, 2024, **51**(4): 785-796
- [19] Devi V, Harjai K, Chhibber S. CRISPR-Cas systems: role in cellular processes beyond adaptive immunity. *Folia Microbiol (Praha)*, 2022, **67**(6): 837-850
- [20] Liu G, Lin Q, Jin S, *et al.* The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies. *Mol Cell*, 2022, **82**(2): 333-347
- [21] Wang J Y, Doudna J A. CRISPR technology: a decade of genome editing is only the beginning. *Science*, 2023, **379**(6629): eadd8643
- [22] Habimana J D, Huang R, Muhoza B, *et al.* Mechanistic insights of CRISPR/Cas nucleases for programmable targeting and early-stage diagnosis: a review. *Biosens Bioelectron*, 2022, **203**: 114033
- [23] 史铠, 雷春阳, 裴舟. CRISPR/Cas 技术在核酸检测中的应用进展. *分析测试学报*, 2018, **37**(10): 1217-1220
- [23] Shi K, Lei C Y, Nie Z. *J Instrum Anal*, 2018, **37**(10): 1217-1220
- [24] Cromwell C R, Jovel J, Hubbard B P. Methods for measuring CRISPR/Cas9 DNA cleavage in cells. *Methods Mol Biol*, 2021, **2162**: 197-213
- [25] 冯薇, 肖航, 袁爱姣, 等. CRISPR 单管等温扩增技术高灵敏检测核酸: 以检测新型冠状病毒(SARS-CoV-2)RNA 为例. *中国科学化学*, 2022, **52**(9): 1685-1698
- [25] Feng W, Xiao H, Yuan A J, *et al.* *Sci Sin Chim*, 2022, **52**(9): 1685-1698
- [26] Wang R, Qian C, Pang Y, *et al.* opvCRISPR: one-pot visual rt-lamp-CRISPR platform for SARS-cov-2 detection. *Biosens Bioelectron*, 2021, **172**: 112766
- [27] Tong H, Huang J, Xiao Q, *et al.* High-fidelity Cas13 variants for targeted RNA degradation with minimal collateral effects. *Nat Biotechnol*, 2023, **41**(1): 108-119
- [28] Zhou B, Yang R, Sohail M, *et al.* CRISPR/Cas14 provides a promising platform in facile and versatile aptasensing with improved sensitivity. *Talanta*, 2023, **254**: 124120
- [29] Huang M, Zhou X, Wang H, *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
- [30] 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
- [31] Li S Y, Cheng Q X, Wang J M, *et al.* CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell Discov*, 2018, **4**: 20
- [32] Kellner M J, Koob J G, Gootenberg J S, *et al.* SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc*, 2019, **14**(10): 2986-3012
- [33] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Kellner M J, *et al.* Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, 2018, **360**(6387): 439-444
- [34] Aquino-Jarquin G. CRISPR-Cas14 is now part of the artillery for gene editing and molecular diagnostic. *Nanomedicine*, 2019, **18**: 428-431
- [35] Vigneshvar S, Sudhakumari C C, Senthilkumaran B, *et al.* Recent advances in biosensor technology for potential applications - an overview. *Front Bioeng Biotechnol*, 2016, **4**: 11
- [36] Dai J, Zhang H, Huang C, *et al.* A gel-based separation-free point-of-care device for whole blood glucose detection. *Anal Chem*, 2020, **92**(24): 16122-16129
- [37] Safiabadi Tali S H, Leblanc J J, Sadiq Z, *et al.* Tools and techniques for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 detection. *Clin Microbiol Rev*, 2021, **34**(3): e00228-20
- [38] Kim Y, Gonzales J, Zheng Y. Sensitivity-enhancing strategies in optical biosensing. *Small*, 2021, **17**(4): e2004988
- [39] Herrmann A, Haag R, Schedler U. Hydrogels and their role in biosensing applications. *Adv Healthc Mater*, 2021, **10**(11): e2100062
- [40] Yudin Kharismasari C, Irkham, Zein M, *et al.* CRISPR/Cas12-based electrochemical biosensors for clinical diagnostic and food monitoring. *Bioelectrochemistry*, 2024, **155**: 108600
- [41] 郭子璇, 杨治庆, 万逸等. 基于 CRISPR-Cas 系统的生物传感和生物成像研究进展. *分析化学*, 2023, **51**(5): 706-720
- Guo Z X, Yang Z Q, Wan Y, *et al.* *Chin J Anal Chem*, 2023, **51**(5): 706-720
- [42] Broughton J P, Deng X, Yu G, *et al.* CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol*, 2020, **38**(7): 870-874
- [43] Priya Swetha P D, Sonia J, Sapna K, *et al.* Towards CRISPR powered electrochemical sensing for smart diagnostics. *Curr Opin Electrochem*, 2021, **30**: 100829
- [44] 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
- [45] Xie S, Ji Z, Suo T, *et al.* Advancing sensing technology with CRISPR: from the detection of nucleic acids to a broad range of analytes - a review. *Anal Chim Acta*, 2021, **1185**: 338848
- [46] Dai Y, Liu C C. Recent advances on electrochemical biosensing strategies toward universal point-of-care systems. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, **58**(36): 12355-12368
- [47] Dang D K, Park B H. Circulating tumor DNA: current challenges for clinical utility. *J Clin Invest*, 2022, **132**(12): e154941
- [48] Cohen S A, Liu M C, Aleshin A. Practical recommendations for using ctDNA in clinical decision making. *Nature*, 2023, **619**(7969): 259-268
- [49] Parikh A R, Van Seventer E E, Boland G M, *et al.* A plasma-only integrated genomic and epigenomic circulating tumor DNA (ctDNA) assay to inform recurrence risk in colorectal cancer (CRC). *J Clin Oncol*, 2017, **37**(Suppl 15): 3602-3602
- [50] Castellanos E, Feld E, Horn L. Driven by mutations: the predictive value of mutation subtype in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2017, **12**(4): 612-623
- [51] Hill M, Tran N. Global miRNA to miRNA Interactions: impacts for miR-21. *Trends Cell Biol*, 2021, **31**(1): 3-5
- [52] Iorio M V, Ferracin M, Liu C G, *et al.* MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 2005, **65**(16): 7065-7070
- [53] Iwasaki H, Shimura T, Yamada T, *et al.* A novel urinary microRNA biomarker panel for detecting gastric cancer. *J Gastroenterol*, 2019, **54**(12): 1061-1069
- [54] Xue X, Liu Y, Wang Y, *et al.* MiR-21 and MiR-155 promote non-small cell lung cancer progression by downregulating SOCS1, SOCS6, and PTEN. *Oncotarget*, 2016, **7**(51): 84508-84519
- [55] Qu Y, Zhang H, Sun W, *et al.* MicroRNA-155 promotes gastric cancer growth and invasion by negatively regulating transforming growth factor- β receptor 2. *Cancer Sci*, 2018, **109**(3): 618-628
- [56] Wu H, Liu Y, Wang H, *et al.* Label-free and enzyme-free colorimetric detection of microRNA by catalyzed hairpin assembly coupled with hybridization chain reaction. *Biosens Bioelectron*, 2016, **81**: 303-308
- [57] Li W, Li C, Zhou T, *et al.* Role of exosomal proteins in cancer diagnosis. *Mol Cancer*, 2017, **16**(1): 145
- [58] Xu Y, Zhang P, Zhang K, *et al.* The application of CA72-4 in the diagnosis, prognosis, and treatment of gastric cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, **1876**(2): 188634
- [59] Kim D Y, Toan B N, Tan C K, *et al.* Utility of combining PIVKA-II and AFP in the surveillance and monitoring of hepatocellular carcinoma in the Asia-Pacific region. *Clin Mol Hepatol*, 2023, **29**(2): 277-292
- [60] Selickaja S, Galindo-Feria A S, Dani L, *et al.* ELISA, protein immunoprecipitation and line blot assays for anti-TIF1-gamma autoantibody detection in cancer-associated dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)*, 2022, **61**(12): 4991-4996
- [61] Li Z, Ding X, Yin K, *et al.* Electric field-enhanced electrochemical CRISPR biosensor for DNA detection. *Biosens Bioelectron*, 2021, **192**: 113498
- [62] Zhou T, Huang R, Huang M, *et al.* CRISPR/Cas13a powered portable electrochemiluminescence chip for ultrasensitive and specific miRNA detection. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, **7**(13): 1903661
- [63] Wu C, Chen Z, Li C, *et al.* CRISPR-Cas12a-empowered electrochemical biosensor for rapid and ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 delta variant. *Nanomicro Lett*, 2022, **14**(1): 159
- [64] Qiu X, Liu C, Zhu C, *et al.* MicroRNA detection with CRISPR/Cas. *Methods Mol Biol*, 2023, **2630**: 25-45
- [65] Uygun Z O, Yeniay L, Gi Rgi N S F. CRISPR-dCas9 powered impedimetric biosensor for label-free detection of circulating tumor DNAs. *Anal Chim Acta*, 2020, **1121**: 35-41
- [66] Chen M, Wu D, Tu S, *et al.* CRISPR/Cas9 cleavage triggered ESDR for circulating tumor DNA detection based on a 3D graphene/AuPtPd nanoflower biosensor. *Biosens Bioelectron*, 2020, **173**: 112821

- [67] Uygun Z O, Atay S. Label-free highly sensitive detection of DNA approximate length and concentration by impedimetric CRISPR-dCas9 based biosensor technology. *Bioelectrochemistry*, 2021, **140**: 107812
- [68] Duan H, Wang Y, Tang S Y, *et al.* A CRISPR-Cas12a powered electrochemical sensor based on gold nanoparticles and MXene composite for enhanced nucleic acid detection. *Sens Actuators B Chem*, 2023, **380**(6): 133342
- [69] Shen H, Yang H, Qileng A, *et al.* Programmable readout sensor for microRNA: CRISPR/Cas12a-assisted multi-amplification strategy activated photoelectrochemistry-colorimetry detection. *Sens Actuators B Chem*, 2022, **371**: 132585
- [70] Qing M, Chen S L, Sun Z, *et al.* Universal and programmable rolling circle amplification-CRISPR/Cas12a-mediated immobilization-free electrochemical biosensor. *Anal Chem*, 2021, **93**(20): 7499-7507
- [71] Sheng Y, Zhang T, Zhang S, *et al.* A CRISPR/Cas13a-powered catalytic electrochemical biosensor for successive and highly sensitive RNA diagnostics. *Biosens Bioelectron*, 2021, **178**: 113027
- [72] Cheng L, Yang F, Zhao Y, *et al.* Tetrahedron supported CRISPR/Cas13a cleavage for electrochemical detection of circular RNA in bladder cancer. *Biosens Bioelectron*, 2023, **222**: 114982
- [73] Bruch R, Johnston M, Kling A, *et al.* CRISPR-powered electrochemical microfluidic multiplexed biosensor for target amplification-free miRNA diagnostics. *Biosens Bioelectron*, 2021, **177**: 112887
- [74] Cui Y, Fan S, Yuan Z, *et al.* Ultrasensitive electrochemical assay for microRNA-21 based on CRISPR/Cas13a-assisted catalytic hairpin assembly. *Talanta*, 2021, **224**: 121878
- [75] Lee S, You J, Baek I, *et al.* Synergistic enhanced rolling circle amplification based on muts and radical polymerization for single-point mutation DNA detection. *Biosens Bioelectron*, 2022, **210**: 114295
- [76] You J, Park H, Lee H, *et al.* Sensitive and selective DNA detecting electrochemical sensor *via* double cleaving CRISPR Cas12a and dual polymerization on hyperbranched rolling circle amplification. *Biosens Bioelectron*, 2023, **224**: 115078
- [77] Seker E, Berdichevsky Y, Begley M R, *et al.* The fabrication of low-impedance nanoporous gold multiple-electrode arrays for neural electrophysiology studies. *Nanotechnology*, 2010, **21**(12): 125504
- [78] Matharu Z, Daggumati P, Wang L, *et al.* Nanoporous-gold-based electrode morphology libraries for investigating structure-property relationships in nucleic acid based electrochemical biosensors. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, **9**(15): 12959-12966
- [79] Liu F, Peng J, Lei Y M, *et al.* Electrochemical detection of ctDNA mutation in non-small cell lung cancer based on CRISPR/Cas12a system. *Sens Actuators B Chem*, 2022, **362**: 131807
- [80] Laskowski F a L, Oener S Z, Nellist M R, *et al.* Nanoscale semiconductor/catalyst interfaces in photoelectrochemistry. *Nat Mater*, 2020, **19**(1): 69-76
- [81] Wang X, Wang F, Wang J, *et al.* Catalytic hairpin assembly-assisted CRISPR/Cas12a mediated photoelectrochemical biosensor for sensitive detection of miRNA-122. *Sens Actuators B Chem*, 2022, **370**: 132480
- [82] Li S K, Liu Z T, Li J Y, *et al.* Enzyme-free target recycling and double-output amplification system for electrochemiluminescent assay of mucin 1 with MoS₂ nanoflowers as co-reaction accelerator. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, **10**(17): 14483-14490
- [83] Huang Y, Ren J, Qu X. Nanozymes: classification, catalytic mechanisms, activity regulation, and applications. *Chem Rev*, 2019, **119**(6): 4357-4412
- [84] Lv H, Chen A, Cheng W, *et al.* Efficient DNA walker guided with well-regulated interfacial tracks for ultrasensitive electrochemiluminescence biosensing. *Anal Chem*, 2020, **92**(23): 15624-15631
- [85] Shen B, Li L, Liu C, *et al.* Mesoporous nanozyme-enhanced DNA tetrahedron electrochemiluminescent biosensor with three-dimensional walking nanomotor-mediated CRISPR/Cas12a for ultrasensitive detection of exosomal microRNA. *Anal Chem*, 2023, **95**(9): 4486-4495
- [86] Ahmad R, Jang H, Batule B S, *et al.* Barcode DNA-mediated signal amplifying strategy for ultrasensitive biomolecular detection on matrix-assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Anal Chem*, 2017, **89**(17): 8966-8973
- [87] Zhao X, Zhang W, Qiu X, *et al.* Rapid and sensitive exosome detection with CRISPR/Cas12a. *Anal Bioanal Chem*, 2020, **412**(3): 601-609
- [88] Narayan T, Kumar S, Kumar S, *et al.* Protein functionalised self assembled monolayer based biosensor for colon cancer detection. *Talanta*, 2019, **201**: 465-473
- [89] Qing M, Sun Z, Wang L, *et al.* CRISPR/Cas12a-regulated homogeneous electrochemical aptasensor for amplified detection of protein. *Sens Actuators B Chem*, 2021, **348**: 130713
- [90] Wang M, Lin Y, Wu S, *et al.* An electrochemical biosensor for PD-L1 positive exosomes based on ultra-thin two-dimensional covalent organic framework nanosheets coupled with CRISPR-Cas12a mediated signal amplification. *Sens Actuators B Chem*, 2022, **362**: 131813
- [91] Hu C, Liu X, Zeng Y, *et al.* DNA methyltransferase inhibitors combination therapy for the treatment of solid tumor: mechanism and clinical application. *Clin Epigenetics*, 2021, **13**(1): 166
- [92] Lin C, Huang Q, Tian M, *et al.* Electrochemiluminescence biosensor for DNA adenine methylation methyltransferase based on CRISPR/Cas12a trans-cleavage-induced dual signal enhancement. *Talanta*, 2023, **251**: 123748
- [93] Zhang D, Yan Y, Que H, *et al.* CRISPR/Cas12a-mediated interfacial cleaving of hairpin DNA reporter for electrochemical nucleic acid sensing. *ACS Sens*, 2020, **5**(2): 557-562
- [94] Xu Y, Wang C, Liu G, *et al.* Tetrahedral DNA framework based CRISPR electrochemical biosensor for amplification-free miRNA detection. *Biosens Bioelectron*, 2022, **217**: 114671
- [95] Yang X, Ye T, Liu H, *et al.* Expression profiles, biological functions and clinical significance of circRNAs in bladder cancer. *Mol Cancer*, 2021, **20**(1): 4

Application of CRISPR/Cas-based Electrochemical Biosensors for Tumor Detection

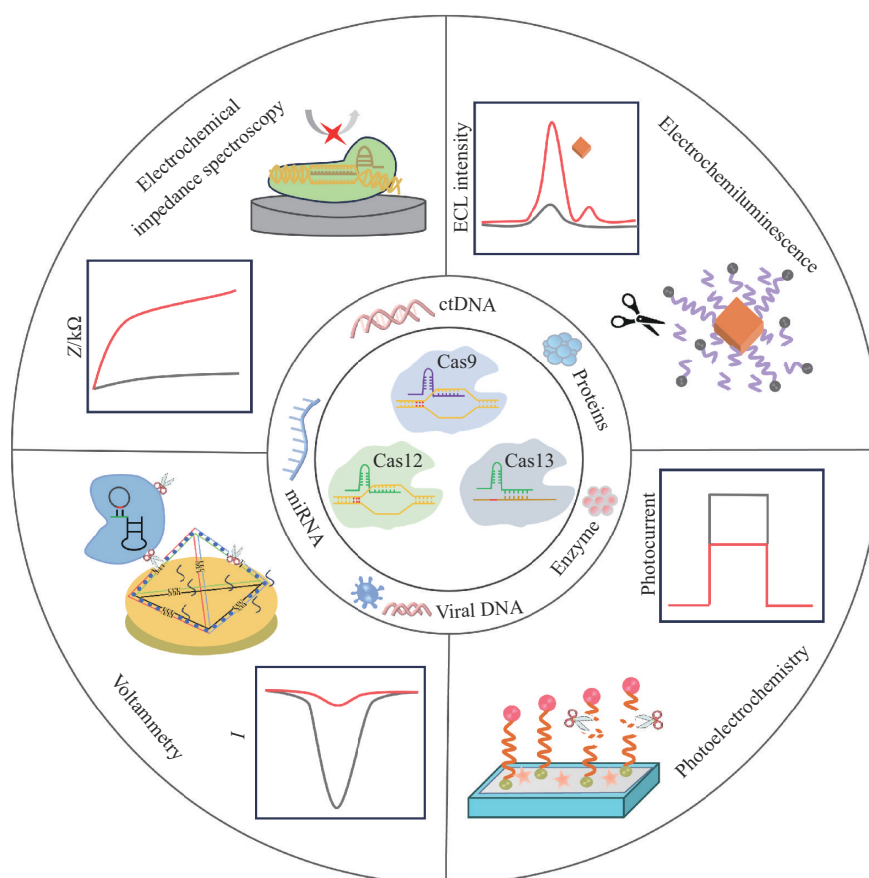
LI Shuang^{1,2)*}, CHEN Zhi^{3)*}, HUANG Yun-Xia¹⁾, ZHAO Guo-Jun^{1)**}, JIANG Ting^{1)**}

⁽¹⁾Affiliated Qingyuan Hospital, Guangzhou Medical University/Qingyuan People's Hospital, Qingyuan 511518, China;

⁽²⁾College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China;

⁽³⁾College of Physics and Optoelectronics Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Graphical abstract



Abstract Tumors represent one of the primary threats to human life, with the dissemination of malignant tumors being a leading cause of mortality among cancer patients. Early diagnosis of tumors can reliably predict their progression, significantly reducing mortality rates. Tumor markers, including circulating tumor cells, exosomes, proteins, circulating tumor DNA, miRNAs and so on, generated during the tumor development process, have emerged as effective approach for early tumor diagnosis. Several methods are currently employed to detect tumor

* The authors contributed equally to this work.

** Corresponding author.

ZHAO Guo-Jun. Tel: 86-18820540486, E-mail: zhaoguojun@gzhmu.edu.cn

JIANG Ting. Tel: 86-13922557407, E-mail: 1416764737@qq.com

Received: September 22, 2023 Accepted: February 1, 2024

markers, such as polymerase chain reaction, Northern blotting, next-generation sequencing, flow cytometry, and enzyme-linked immunosorbent assay. However, these methods often suffer from time-consuming process, high costs, low sensitivity, and the requirement for specialized personnel. Therefore, a new rapid, sensitive, and specific tumor detection method is urgently needed. The clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein (Cas) system, originating from the adaptive immune system of bacteria, has found extensive applications in gene editing and nucleic acid detection. Based on the structure and function of Cas proteins, the CRISPR/Cas system can be classified into two classes and six types. Class I systems consist of multiple Cas protein complexes, including types I, III, and IV, while Class II systems comprise single, multi-domain Cas proteins mediated by RNA, including types II (Cas9), V (Cas12), and VI (Cas13). Class II systems have been widely employed in the fields of biotechnology and nucleic acid diagnostics due to their efficient target binding and programmable RNA specificity. Currently, fluorescence method is the most common signal output technique in CRISPR/Cas-based biosensors. However, this method often requires the integration of signal amplification technologies to enhance sensitivity and involves expensive and complex fluorescence detectors. To enhance the detection performance of CRISPR/Cas-based biosensors, the integration of CRISPR/Cas with some alternative techniques can be considered. The CRISPR/Cas integrated electrochemical sensor (E-CRISPR) possesses advantages such as miniaturization, high sensitivity, high specificity, and fast response speed. E-CRISPR can convert the reactions between biomolecules and detecting components into electrical signals, rendering the detection signals more easily readable and reducing the impact of background values. Therefore, E-CRISPR enhances the accuracy of detection results. E-CRISPR has been applied in various fields, including medical and health, environmental monitoring, and food safety. Furthermore, E-CRISPR holds tremendous potential for advancing the detection levels of tumor markers. Among all types of Cas enzymes, the three most widely applied are Cas9, Cas12, and Cas13, along with their respective subtypes. In this work, we provided a brief overview of the principles and characteristics of Class II CRISPR/Cas single-effector proteins. This paper focused on the various detection technologies based on E-CRISPR technique, including electrochemical impedance spectroscopy, voltammetry, photoelectrochemistry, and electrochemiluminescence. We also emphasized the applications of E-CRISPR in the field of tumor diagnosis, which mainly encompasses the detection of three typical tumor markers (ctDNA, miRNA, and proteins). Finally, we discussed the advantages and limitations of E-CRISPR, current challenges, and future development prospects. In summary, although E-CRISPR platform has made significant strides in tumor detection, certain challenges still need to be overcome for their widespread clinical application. Continuous optimization of the E-CRISPR platform holds the promise of achieving more accurate tumor subtyping diagnoses in clinical settings, which would be of significant importance for early patient diagnosis and prognosis assessment.

Key words CRISPR/Cas system, electrochemical biosensor, tumor detection

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0376