

CRISPR/Cas 系统在分子检测中的应用

王雪亮, 肖艳群, 王华梁

(上海市临床检验中心分子生物学室, 上海 200126)

摘要: 近年来, 成簇规律间隔短回文重复序列/成簇规律短回文重复序列相关蛋白 (CRISPR/Cas) 系统凭借其简单、高效的基因编辑能力, 已被广泛应用于生物、医学等多个研究领域。随着 CRISPR 技术的快速发展, CRISPR/Cas 系统已被开发为一种快速、便携、低成本、高灵敏度的分子检测工具, 在病原体检测、耐药性分析、单核苷酸多态性 (SNP) 分型、肿瘤基因突变检测等方面取得重大突破。文章就不同 Cas 蛋白在分子检测中的最新研究进展进行综述, 并对其应用前景进行展望, 以期为从事相关领域的科研工作者提供参考与帮助。

关键词: 成簇规律间隔短回文重复序列; 相关蛋白; 附带切割; 分子检测; 诊断

Application of CRISPR/Cas system in molecular detection WANG Xueliang, XIAO Yanqun, WANG Hualiang.
(Department of Molecular Biology, Shanghai Center for Clinical Laboratory, Shanghai 200126, China)

Abstract: In recent years, clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated protein (Cas) system has been widely applied in biology, medicine and other research fields, because of its simple and efficient gene editing ability. With the rapid development of CRISPR technology, the CRISPR/Cas system has been developed as a rapid, portable, low-cost and high-sensitive molecular detection tool, and it has made great breakthroughs and progress in pathogen detection, drug resistance analysis, single nucleotide polymorphism (SNP) typing and tumor gene mutation detection. In order to provide a reference and help for researchers engaged in related fields, this review described the latest research progress of different Cas and their further application in molecular detection.

Key words: Clustered regularly interspaced short palindromic repeat; Clustered regularly interspaced short palindromic repeat-associated protein; Collateral cleavage; Molecular detection; Diagnostics

随着分子生物学技术的飞速发展, 分子检测的应用范畴不断扩大, 目前已被广泛应用于感染性疾病、遗传性疾病和肿瘤等多个领域, 是疾病预防、诊断、治疗、监测和预后评估的重要方法。目前, 临床常用的分子检测技术主要分为 3 类: 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)、分子杂交技术和基因测序技术。这 3 类技术存在操作复杂、设备昂贵、人员需专业培训等局限, 因此开发更为快速、价廉、操作简单、灵敏度高、特异性强的新一代检测技术, 是分子检测领域不断追求的目标^[1-3]。

成簇规律间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats,

CRISPR)/成簇规律间隔短回文重复序列相关蛋白 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat-associated protein, Cas) 系统是细菌和古细菌在生物进化过程中形成的一种适应性免疫防御系统^[4]。目前, CRISPR 技术作为基因组编辑利器, 已被广泛应用于生物、医学、农业等多个领域^[5-6]。此外, 在科学家发现部分 Cas (如 Cas13 和 Cas12) 具有“附带切割”活性, 并将其用于快速分子检测后, 此领域的发展立即驶入快车道, 并取得系列重要成果^[2,7]。我们就 CRISPR 技术在分子检测中的相关应用展开综述, 以期为相关人员在此领域中进一步应用该技术提供参考与帮助。

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC0910000)

作者简介: 王雪亮, 1981 年生, 男, 硕士, 主管技师, 主要从事临床分子检测质量管理与技术研究。

通信作者: 肖艳群, E-mail: xiaoyanqun@sccl.org.cn; 王华梁, E-mail: wanghualiang@sccl.org.cn。

1 CRISPR/Cas系统简介

CRISPR/Cas系统本质上是一系列由RNA引导的核酸内切酶,存在于约40%的细菌和90%的古细菌中,是细菌抵御外源物质(如噬菌体和质粒)入侵的获得性免疫系统^[8]。1987年,ISHINO等^[9]即在大肠埃希菌中发现了串联的间隔重复序列,但其功能未知。2002年,JANSEN等^[10]将此重复序列正式命名为CRISPR序列。CRISPR序列主要由前导区、重复序列和间隔序列组成,其上富含AT碱基对,长度为100~500 bp,即CRISPR序列前导区,被认为是CRISPR序列转录的启动子;重复序列长度为21~48 bp,含回文序列,可形成发卡结构;间隔序列位于重复序列之间,长度为25~72 bp,其序列来源于病毒或噬菌体等外源DNA^[11]。2007年,BARRANGOU等^[8]首次发现并证实了嗜热链球菌可利用CRISPR系统抵抗噬菌体感染。CRISPR系统行使功能主要包括3个阶段:(1)适应阶段。当外源核酸入侵细菌时,细菌启动自身防御机制,将外源核酸整合到CRISPR回文重复序列中;(2)表达阶段。CRISPR序列在RNA聚合酶帮助下进行转录,然后被剪切为成熟CRISPR RNA(crRNA)。成熟crRNA与反式作用crRNA相结合,形成向导RNA(single-guide RNA, sgRNA),发挥导向功能;(3)干扰阶段。通过识别外源核酸序列中的前间区序列邻近基序(proto-spacer adjacent motif, PAM),sgRNA引导Cas(如Cas9、Cas12、Cas13等)与靶标序列相互作用,引发对外源核酸的定向切割^[12-13]。

根据Cas的组成及发挥功能的方式,CRISPR/Cas可分为两大类群:第1类以多个Cas组成的效应复合体行使功能为特征,包括I、III和IV型;第2类则只需单个多结构域的Cas,包括II(Cas9)、V(Cas12)和VI(Cas13)型^[14-15]。第2类系统简单、高效、操作方便,是目前主要的基因编辑系统,其中最具有代表性的是Cas9。相比Cas9,Cas12a和Cas13a仅需crRNA即可实现特异性靶位点切割,这表明其系统更为简洁,具有成为精度更高、安全性更好的新一代基因编辑工具的潜力^[16-17]。

2 基于Cas9的分子检测系统

CRISPR/Cas9系统具有精准识别和切割特

定DNA序列的能力,这意味着其可用于新型分子检测方法的开发。2016年,PARDEE等^[18]首次将CRISPR/Cas9技术引入分子检测中,他们将等温toehold生物传感检测到的寨卡病毒和冻干CRISPR/Cas9相混合,肉眼观察即可对寨卡病毒美洲株和非洲株进行准确分型(图1)。ZHOU等^[19]和HUANG等^[20]利用CRISPR/Cas9的特异识别切割能力和等温扩增技术相结合策略分别开发了CRISDA和CAS-EXPAR方法,可实现阿摩尔级的高灵敏度(amol/L, 10^{-18} mol/L)单碱基分辨率,并成功用于单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分型和单增李斯特菌检测。有学者将CRISPR/Cas9和PCR技术相结合,建立了具有较高灵敏度和特异性的不同版本的ctPCR技术,有效用于人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)16型和18型的检测和基因分型^[21-23]。此外,LEE等^[24]还利用Cas9/sgRNA的特异性切割结直肠癌患者血液中的野生型DNA,进而增加样本中循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)的丰度,可显著提高ctDNA检测的灵敏度和准确性,更好地用于肿瘤的早期诊断和用药监测。然而,上述研究报道的基于Cas9的检测方法主要还是作为辅助工具切割特定靶标序列,并未被直接应用于各种靶标序列检测,这使得其在实际临床工作中的推广受到一定程度的限制。

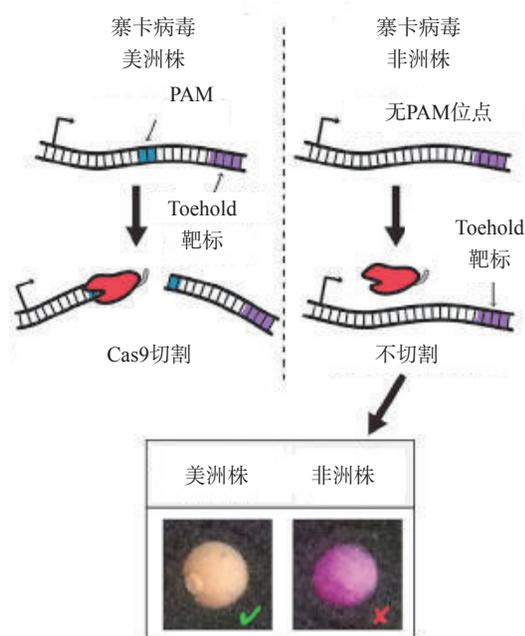


图1 CRISPR/Cas9用于寨卡病毒毒株分型^[18]

3 基于Cas13的分子检测系统

与常用Cas9不同, Cas13a (旧称C2c2) 是一种RNA引导的RNA核酸内切酶, 属于第2类CRISPR/Cas系统中的VI型^[25]。Cas13a能在crRNA的引导下特异性切割单链靶标RNA, 并在切割完成后仍保持活性, 继续切割其他非靶标RNA, 即具有“附带切割”能力^[26]。基于此特性, EAST-SELETSKY等^[27]开发出基于CRISPR/Cas13a检测不同靶标RNA的新方法, 但其灵敏度较低, 不具有实际临床应用价值。2017年, 张峰开发了特异性高灵敏度酶解报告基因解锁 (specific high-sensitivity enzymatic reporter unLOCKing, SHERLOCK) 检测系统^[28]。在该系统中, 目标模板首先经重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA) (用于检测DNA靶标) 或逆转录-RPA (用于检测RNA靶标) 为含有T7启动子的DNA模板, 后经T7 RNA聚合酶逆转录, 产物可作为Cas13a切割的靶标, 在Cas13a对上述靶标特异性切割后激活附带切割功能, 切割体系中单链RNA荧光报告探针能产生可被检测的荧光信号 (图2)^[28]。相比先前的研究, PRA方法的

引入显著提高了该方法的检测灵敏度, 已被成功用于寨卡病毒、登革热病毒、致病细菌株及其耐药基因、SNP分型和ctDNA等多种靶标检测。此外, 该方法所用检测试剂可冻干制备成滤纸片, 用于即时检测 (point-of-care testing, POCT), 成本极为低廉 (0.61美元/次)^[28]。在此基础上, 该团队很快开发出第2代SHERLOCK (SHERLOCKv2) 系统, 在性能方面有了较大提升: (1) 单管中可同时进行4通道检测; (2) 定量检测限可低至2 amol/L; (3) 结合Csm6蛋白可进一步将灵敏度提高3.5倍; (4) 侧向层析试纸条检测, 有效解决了上一代系统检测通量低、不能定量、需特定荧光设备等问题^[29]。此外, MYHRVOLD等^[30]开发了改良版的SHERLOCKv2系统, 命名为 (heating unextracted diagnostic samples to obliterate nucleases, HUDSON)。此方法可不经核酸提取纯化, 仅需对临床样本进行核酸酶灭活和加热等快速处理, 即可用于后续SHERLOCK2反应, 2 h不到便可肉眼观测寨卡病毒和登革热病毒的检测及分型结果, 其快速、价廉、准确的特点非常适用于POCT等应用场景^[30]。

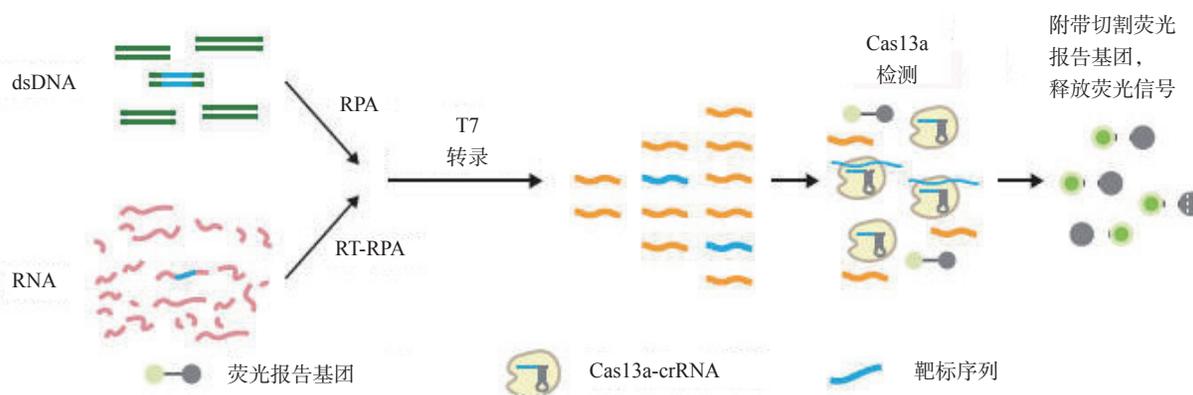


图2 CRISPR/Cas13a分子检测示意图^[28]

在上述重磅研究成果被报道后, 多个课题组进一步拓展了Cas13a在不同分子检测领域的实际应用。WU等^[31]、LIU等^[32]和QIN等^[33]分别报道了CRISPR/Cas13可用于EB病毒、H7N9禽流感病毒和埃博拉病毒等感染性病原体的准确、快速检测。此外, CRISPR/Cas13结合微流控芯片技术可实现样本检测的全自动化, 具有重要的临床应用价值^[33]。SHAN等^[34]的研究结果证实采用基于CRISPR/Cas13a的方法可在30 min

内准确定量样本中的miRNA。

4 基于Cas12的分子检测系统

Cas12a (旧称Cpf1) 属于第2类CRISPR/Cas系统中的V型, 由ZETSCHE等^[35]在2015年进行特性鉴定, 并成功用于人细胞基因组编辑。与Cas9类似, Cas12a是RNA引导的特异性DNA核酸内切酶。已有研究表明, Cas12a具有类似Cas13a的附带切割特性, 但其非特异性切割的靶标是单链DNA, 并利用此特性开发了基

于Cas12a的分子检测平台——DETECTR^[36]。与SHERLOCK工作原理相似，为提高方法的检测灵敏度，DETECTR利用RPA等温扩增靶标DNA，扩增产物与Cas12a/cRNA混合后启动特定靶标切割，并激活Cas12a的附带切割活性，反应体系中DNA荧光报告探针即可释放荧光信号（图3）^[36]。DETECTR可在短短1 h内准确检测临床患者样本中的HPV16和HPV18准确检测并分型。同一时期，LI等^[37]也报道了与DETECTR类似的基于Cas12a的分子检测方法，称为HOLMES。HOLMES与DETECTR的主要不同之处是前者使用RPA对目的片段进行扩增，而未使用RPA方法。HOLMES可灵敏、特异、快速地实现SNP分型、DNA病毒和RNA病毒的检测^[37]。

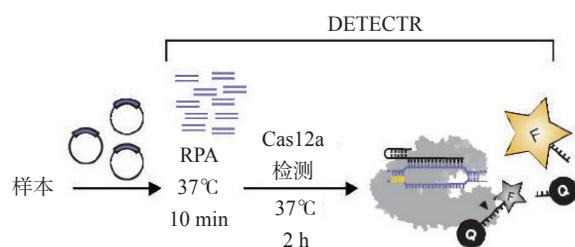


图3 CRISPR/Cas12a分子检测示意图^[36]

此外，同样属于第2类CRISPR/Cas系统V型的Cas12b（C2c1）也被证明具有附带切割活性，LI等^[38]利用其特性开发了基于Cas12b的分子检测平台HOLMESv2。与上一代HOLMES不同，HOLMESv2将环介导等温扩增技术和Cas12b检测相结合，二者相同的反应温度使检测系统可有效整合，从而实现快速、准确的一体化检测，并被成功用于1 h内快速检测乙型脑炎病毒^[38]。

5 基于Cas14的检测系统

与Cas12a相同，新近鉴定的Cas14同属第2类CRISPR/Cas系统中的V型，是RNA引导的特异性DNA核酸内切酶，同时具有针对单链DNA的附带切割活性^[39]。不同的是，Cas14a与靶标结合的特异性比Cas12a更高，因而更适用于开发需达到单碱基分辨率的检测方法。HARRINGTON等^[39]建立了基于Cas14a的DETECTR检测方法，并成功用于人类眼色HERC2基因SNP分型（图4）。然而，sgRNA引

导的Cas14a仅能靶向切割单链DNA，故在检测时需先将扩增后的双链DNA的1条链降解，以生成靶标单链DNA，才能用于后续检测，这在一定程度上增加了操作的复杂性。

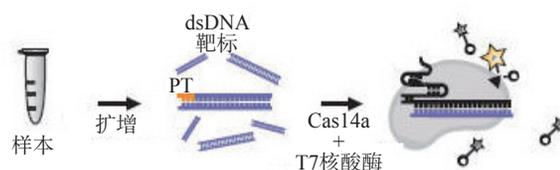


图4 CRISPR/Cas14a分子检测示意图^[39]

6 小结与展望

CRISPR技术在短短几年时间内飞速发展，已逐渐演变为一种功能强大的多用途生物学工具。目前，CRISPR/Cas系统在分子检测领域中的应用才刚刚开始，但SHERLOCK和DETECTR等方法已展现出良好的临床应用价值与前景。作为新型“下一代分子诊断”技术，其具有快速、便携、成本低廉、灵敏度高、特异性强等优点，已被证明可用于病原体检测、耐药性分析、SNP分型、肿瘤基因突变检测等多个方面令，特别适用于野外环境或基层医院。但是，基于Cas13a的检测需使用RNA荧光报告基团，其易受环境中RNA酶降解，可能出现假阳性结果。相对而言，使用DNA荧光报告基团的基于Cas12的检测方法则不易受此问题影响。此外，单独使用Cas检测的灵敏度偏低，现有CRISPR检测方法均需扩增相应目标核酸以提高检测灵敏度。为解决此问题，未来需挖掘更多新型Cas并建立更为简单、有效的CRISPR/Cas检测方法。目前报道的CRISPR检测方法尚处于实验室开发阶段，在临床工作中的实际作用如何尚需进一步评估，以确保其具有良好的临床适用性。总之，随着新的Cas的不断发现及相关研究的持续深入，CRISPR/Cas系统势必会对分子检测技术的发展和产生深远影响。

参考文献

- [1] CALIENDO A M, HODINKA R L. A CRISPR way to diagnose infectious diseases[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(17): 1685-1687.
- [2] CHERTOW D S. Next-generation diagnostics with CRISPR[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 381-382.
- [3] LI Y, LI S, WANG J, et al. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing[J]. *Trends Biotechnol*, 2019,

- 37 (7) : 730-743.
- [4] MARRAFFINI LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes[J]. Nature, 2015, 526 (7571) : 55-61.
- [5] MOLLA K A, YANG Y. CRISPR/Cas-mediated base editing: technical considerations and practical applications[J]. Trends Biotechnol, 2019, 37 (10) : 1121-1142.
- [6] WANG H, LA RUSSA M, QI L S. CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond[J]. Annu Rev Biochem, 2016, 85: 227-264.
- [7] HATOUM-ASLAN A. CRISPR methods for nucleic acid detection herald the future of molecular diagnostics[J]. Clin Chem, 2018, 64 (12) : 1681-1683.
- [8] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315 (5819) : 1709-1712.
- [9] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. J Bacteriol, 1987, 169 (12) : 5429-5433.
- [10] JANSEN R, EMBDEN J D, GAASTRA W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. Mol Microbiol, 2002, 43 (6) : 1565-1575.
- [11] YOSEF I, GOREN M G, QIMRON U. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40 (12) : 5569-5576.
- [12] GASIUNAS G, BARRANGOU R, HORVATH P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109 (39) : E2579-E2586.
- [13] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337 (6096) : 816-821.
- [14] MAKAROVA K S, ZHANG F, KOONIN E V. SnapShot: Class 1 CRISPR-Cas systems[J]. Cell, 2017, 168 (5) : 946-946e1.
- [15] MAKAROVA K S, ZHANG F, KOONIN E V. SnapShot: Class 2 CRISPR-Cas systems[J]. Cell, 2017, 168 (1-2) : 328-328e1.
- [16] PICKAR-OLIVER A, GERSBACH C A. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20 (8) : 490-507.
- [17] WU W Y, LEBBINK J H G, KANAAR R, et al. Genome editing by natural and engineered CRISPR-associated nucleases[J]. Nat Chem Biol, 2018, 14 (7) : 642-651.
- [18] PARDEE K, GREEN A A, TAKAHASHI M K, et al. Rapid, low-cost detection of zika virus using programmable biomolecular components[J]. Cell, 2016, 165 (5) : 1255-1266.
- [19] ZHOU W, HU L, YING L, et al. A CRISPR-Cas9-triggered strand displacement amplification method for ultrasensitive DNA detection[J]. Nat Commun, 2018, 9 (1) : 5012.
- [20] HUANG M, ZHOU X, WANG H, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 triggered isothermal amplification for site-specific nucleic acid detection[J]. Anal Chem, 2018, 90 (3) : 2193-2200.
- [21] WANG Q, ZHANG B, XU X, et al. CRISPR-typing PCR (ctPCR), a new Cas9-based DNA detection method[J]. Sci Rep, 2018, 8 (1) : 14126.
- [22] ZHANG B, WANG Q, XU X, et al. Detection of target DNA with a novel Cas9/sgRNAs-associated reverse PCR (CARP) technique[J]. Anal Bioanal Chem, 2018, 410 (12) : 2889-2900.
- [23] ZHANG B, XIA Q, WANG Q, et al. Detecting and typing target DNA with a novel CRISPR-typing PCR (ctPCR) technique[J]. Anal Biochem, 2018, 561-562: 37-46.
- [24] LEE S H, YU J, HWANG G H, et al. CUT-PCR: CRISPR-mediated, ultrasensitive detection of target DNA using PCR[J]. Oncogene, 2017, 36 (49) : 6823-6829.
- [25] SHMAKOV S, ABUDAYYEH O O, MAKAROVA K S, et al. Discovery and functional characterization of diverse Class 2 CRISPR-Cas systems[J]. Mol Cell, 2015, 60 (3) : 385-397.
- [26] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMANN S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. Science, 2016, 353 (6299) : aaf5573.
- [27] 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[J]. Nature, 2016, 538 (7624) : 270-273.
- [28] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. Science, 2017, 356 (6336) : 438-442.
- [29] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, KELLNER M J, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6[J]. Science, 2018, 360 (6387) : 439-444.
- [30] MYHRVOLD C, FREIJE C A, GOOTENBERG J S, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. Science, 2018, 360 (6387) : 444-448.
- [31] WU Y, LIU S X, WANG F, et al. Room temperature detection of plasma Epstein-Barr virus DNA with CRISPR-Cas13[J]. Clin Chem, 2019, 65 (4) : 591-592.
- [32] LIU Y, XU H, LIU C, et al. CRISPR-Cas13a nanomachine based simple technology for avian influenza A (H7N9) virus on-site detection[J]. J Biomed Nanotechnol, 2019, 15 (4) : 790-798.
- [33] QIN P, PARK M, ALFSON K J, et al. Rapid and fully microfluidic Ebola virus detection with CRISPR-Cas13a[J]. ACS Sens, 2019, 4 (4) : 1048-1054.
- [34] SHAN Y, ZHOU X, HUANG R, et al. High-fidelity and rapid quantification of miRNA combining crRNA programmability and CRISPR/Cas13a trans-cleavage activity[J]. Anal Chem, 2019, 91 (8) : 5278-5285.
- [35] ZETSCHKE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. Cell, 2015, 163 (3) : 759-771.
- [36] CHEN J S, MA E, HARRINGTON L B, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. Science, 2018, 360 (6387) : 436-439.
- [37] LI S, CHENG Q, WANG J, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection[J]. Cell Discovery, 2018, 4: 20.
- [38] LI L, LI S, WU N, et al. HOLMESv 2: a CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation [J]. ACS Synth Biol, 2019, 8: 2228-2237.
- [39] HARRINGTON L B, BURSTEIN D, CHEN J S, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes[J]. Science, 2018, 362 (6416) : 839-842.

(收稿日期: 2019-09-11)

(本文编辑: 范基农)