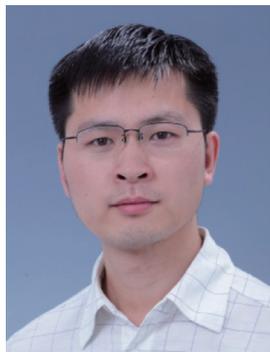


DOI: 10.13376/j.cbls/2022136

文章编号: 1004-0374(2022)10-1217-10



李伟, 中国科学院动物研究所研究员, 博士生导师, 现任干细胞与生殖生物学国家重点实验室副主任, 北京市干细胞与再生医学研究院副院长。致力于基因工程和干细胞等创新生物技术的研发, 并利用这些新技术和模型揭示哺乳动物生殖与再生的基础调控规律, 开发重大疾病的基因治疗。已发表 SCI 论文百余篇, 其中作为通讯作者(含共同通讯)在 *Nature*、*Cell*、*Science*、*Cell Stem Cell* 等刊物发表论文多篇。

## 基因编辑技术在疾病诊断中的应用

王鑫阁<sup>1,2,3</sup>, 毛邦炜<sup>1,2,3</sup>, 李伟<sup>1,2,3\*</sup>

(1 中国科学院动物研究所, 干细胞与生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101;  
2 中国科学院干细胞与再生医学创新研究院, 北京 100101; 3 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 对疾病进行准确的检测和诊断是疾病治疗的先决条件。分子诊断由于其灵敏、便捷、能够在较早窗口期开展筛查的特点, 已经在疾病诊断中广泛应用。本文基于基因编辑技术在疾病诊断中的应用, 一方面阐述了基因编辑技术在诊断中较为常见的工作原理, 另一方面针对不同应用场景讨论了基因编辑在疾病诊断中的应用情况, 包括大规模实验室检测与家用检测两种模式。通过理性设计和多学科工程化, 基于基因编辑的分子检测平台会在疾病诊断领域产生更多突破性的应用和变革。

**关键词:** 基因编辑技术; 疾病检测; 分子诊断; 大规模筛查; 即时检测

中图分类号: Q78; R44 文献标志码: A

## The application of gene editing in disease diagnosis

WANG Xin-Ge<sup>1,2,3</sup>, MAO Bang-Wei<sup>1,2,3</sup>, LI Wei<sup>1,2,3\*</sup>

(1 State Key Laboratory of Stem Cell and Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2 Institute for Stem Cell and Regeneration, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Prompt and correct treatment of disease depends on detection and diagnosis. Molecular diagnosis has been playing an increasingly important role in disease diagnosis because of its sensitivity, convenience and early screening window. Based on the application of gene editing technology in disease diagnosis, in this paper, on the one hand, we explain the common working principle of gene editing technology in diagnosis, and on the other hand, discuss the application of gene editing in disease diagnosis for different application scenarios, including two modes of large-scale laboratory testing and home testing. Through rational design and multidisciplinary engineering, molecular detection platform based on gene editing will produce more breakthrough applications and changes in the

收稿日期: 2022-06-30

基金项目: 国家重点研发计划(2020YFA0707900)

\*通信作者: E-mail: liwei@ioz.ac.cn

field of disease diagnosis.

**Key words:** gene editing; disease detection; molecular diagnosis; screening detection; POCT

疾病检测是指通过某种方式或手段分析核酸、蛋白质标志物、小分子化合物的变化,从而实现诊断目的。疾病检测对于疾病的治疗和研究具有重要的意义,目前主要可分为预防性检测和治疗过程中的治疗性检测。根据 WHO 统计,全球主要死因与三大主题相关:心血管(缺血性心脏病、中风)、呼吸系统(慢性阻塞性肺病、下呼吸道感染)和新生儿疾病<sup>[1]</sup>。尤其是自新型冠状病毒肺炎疫情爆发以来,截至 2022 年 6 月 17 日,全球已向世卫组织报告了 535 863 950 例 COVID-19 确诊病例,其中包括 6 314 972 例死亡病例<sup>[2]</sup>,说明在疾病的诊断和治疗上仍有许多需要解决的问题。我国人民的健康同样面临这些疾病的威胁,一方面是要加强对这些疾病的治疗能力,推动基础科研向临床转化,另一方面也要求我们坚持预防为主,减少疾病发生,强化早诊断、早预防的能力。因此,要求我们具有较高水平的疾病检测和诊断能力,建立更完备更健全的检测系统,从而可以更精准快速地进行有效的对症治疗。

目前的疾病诊断主要依赖于多种多样的检测技术,这些技术根据待检的靶标物质可以分成三类:一种是基于核酸物质的核酸检测,一种是基于蛋白质的抗原抗体特异性结合,还有一种是基于病原体或者病灶的病理学镜检。其中,基于核酸物质的核酸检测由于具有能够在早期检出、灵敏性强、特异性高的特点,已经在多种疾病的检测中发挥了重要作用,主流的核酸检测方法主要分为 PCR、QPCR、测序技术。PCR 技术中的等温 PCR 技术虽然能够进行恒温检测,但是由于其经常出现非特异扩增,对于引物和扩增体系的要求往往更为严格;QPCR 虽然是现在最灵敏的检测方式并且已经成为了一些疾病检测的金标准,但是其依赖价格相对昂贵的荧光定量 PCR 仪,并且需要专用的 PCR 级别实验室和专业的操作人员,导致检测成本更高;而测序技术除了依赖测序仪器,耗时较长。恰在此时,CRISPR 技术被发现并产生了多种应用,尤其是基于 CRISPR/Cas 系统的特性建立的检测新技术的出现,使得疾病诊断领域产生了许多创新、变革性的突破。

作为基因工程技术的一种,CRISPR/Cas 系统在锌指核酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶之后

被开发出来。CRISPR/Cas 系统在细菌和古菌中被发现,是微生物适应性免疫系统的一部分,由 CRISPR 阵列和附近的 CRISPR 相关蛋白(Cas)组成<sup>[3]</sup>。CRISPR/Cas 系统不仅能够进行哺乳动物细胞内进行基因编辑<sup>[4]</sup>,而且能够结合脱氨酶或与逆转录酶融合或耦联实现碱基编辑或者先导编辑,从而精准地在基因组上进行编辑和操纵<sup>[5-6]</sup>。同时,基于 CRISPR/Cas 系统的基因治疗策略能够通过腺病毒相关病毒(adeno-associated virus, AAV)、脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNP)等载体递送进入体内进行基因编辑,从而实现肌营养不良、先天性黑朦等疾病的治疗<sup>[7-10]</sup>。除此以外,还可以通过基因编辑技术对细胞进行改造,建立 CAR-T 等改造型细胞,实现细胞治疗<sup>[11]</sup>。近年来基因编辑技术已经在多领域如表观遗传研究、精准基因治疗、动植物模型建立、大规模筛选中发挥了重要的作用<sup>[12]</sup>。

CRISPR 基因编辑技术在疾病检测中也有非常重要的延展应用。该类技术通常会结合等温扩增技术或者理性设计的级联反应进行信号放大实现检测,能够不依赖复杂仪器设备展开即时场景化的高效便捷的核酸检测。因此,基于 CRISPR 的核酸检测新技术往往具有高特异性、灵敏、快捷、便携等特点,对于将疾病诊断的关口前移至更早期或更基层具有重要意义。

## 1 基于基因编辑进行疾病诊断的原理

根据检测原理不同,基于基因编辑的诊断技术主要可以分为基于 CRISPR/Cas 系统的反式切割活性检测技术、基于 CRISPR/Cas 系统传感器理性设计的检测技术和基于 Argonaute 蛋白理性设计的检测技术。

### 1.1 基于 CRISPR 的反式切割原理的核酸检测技术

2016 年,研究人员发现转染表达 CRISPR/Cas13a 质粒的大肠杆菌生长速度减缓,从而首次证明 CRISPR 的反式切割活性<sup>[13]</sup>。其原理是 Cas13a 在特异性结合靶 RNA 后能激活反式切割活性,通过其 HEPN 结构域非特异切割 ssRNA。随后, Cas12a 和 Cas12b 同样也被证实具有反式切割活性<sup>[14-15]</sup>,它们与靶向 DNA 的特异结合会激活其依赖 RuvC 结构域的非特异切割 ssDNA 的能力。依赖 Cas 蛋白的特异性识别靶标序列和非特异性反式切割的特

征, 多种多样的检测技术平台被建立。

### 1.1.1 Cas13

CRISPR/Cas13 是 RNA 介导的靶向 RNA 的核酸酶, 属于 2 类 VI 型 CRISPR/Cas 系统, 包含两个 HEPN 结构域<sup>[16]</sup>。当存在靶 ssRNA 时, crRNA 与 Cas13 形成的 RNP 复合物特异识别并结合靶 RNA, 在切割 ssRNA 的同时会激活反式切割活性, 将荧光-淬灭基团修饰的 ssRNA 探针切割释放荧光基团, 一旦荧光基团被释放则会发出荧光, 从而证明靶 RNA 存在。2017 年, 张锋团队利用 Cas13 建立了首个基于 CRISPR 系统的诊断平台——SHERLOCK (specific high-sensitivity enzymatic reporter unLOCKing)<sup>[17]</sup>。之后为了拓展 CRISPR 诊断的应用场景, 研究人员建立了优化的 SHERLOCK v2 检测平台, 通过优化探针的序列实现了互不影响的正交 CRISPR 酶的四通道多重检测, 并与辅助相关酶 Csm6 结合可使信号灵敏度提高 3.5 倍, 检测结果可以通过侧向流层析读取<sup>[18]</sup>。除了体系本身, 为了简化核酸的提取, 后续在 SHERLOCK 的基础上结合了 HUDSON (heating unextracted diagnostic samples to obliterate nucleases) 的样本处理办法, 直接使用样本进行病毒检测, 其检测过程仅耗时 2 h<sup>[19]</sup>。

由于在检测中重复开盖的操作容易产生气溶胶, 进一步导致实验室污染, 所以为了进一步提升便携度与可操作性, 有研究团队开发了 SHINE (streamlined highlighting of infections to navigate epidemics) 一步检测技术<sup>[20]</sup>, 它不仅改进了 HUDSON, 使其能在 10 min 内迅速灭活鼻咽拭子和唾液中的病毒, 实现在未提取的样本中检测 SARS-CoV-2 RNA; 还通过一步法实现了基于 RPA (recombinase polymerase amplification) 的扩增和基于 Cas13 的检测, 简化了分析制备流程, 减少了运行时间, 并且检测结果可以通过管内荧光读数可视化。与 RT-qPCR 相比, 其灵敏度为 RT-qPCR 的 90%, 特异性为 100%, 检测过程耗时 50 min。除此以外, 为了进一步提高检测通量和多重性, 研究者建立了 CARMEN (combinatorial arrayed reactions for multiplexed evaluation of nucleic acids) 平台<sup>[21]</sup>, 在该平台中, 将 CRISPR 检测体系置于微阵列中, 在每个微孔中进行不同 crRNA 的检测。CARMEN 和 Cas13 检测的结合 (CARMEN-Cas13) 能够在单个阵列上对超过 4 500 对 crRNA 进行检测, 具有能够迅速转化到实际应用的前景, 以满足未来突发大流行的病原体筛查。为了进一步简化组分, 减少试剂成分的相互影

响并提高操作便携度, 研究者开发了一种无扩增的 CRISPR-Cas13a 分析方法, 该方法可以直接从鼻拭子 RNA 中检测 SARS-CoV-2, 然后用手机显微镜读取结果, 该方法耗时 30 min 内, 灵敏度达到 100 copies/ $\mu$ L, 可在 5 min 内准确检测一组阳性临床样本中预提取的 RNA。该检测方法与基于手机的读取设备集成在一起, 有可能实现快速、低成本的即时筛查<sup>[22]</sup>; 之后对其进行了进一步升级优化, 在体系中引入了 TtCsm6, 并通过修饰的探针激活进一步提高检测灵敏度<sup>[23]</sup>。

除了经典的核酸检测, 还可以通过设计实现其他带有表观遗传修饰的核酸的检测。有研究报道 DNA 甲基化与癌症的发生有着密切的关系<sup>[24]</sup>。为了应对这样的应用场景, 研究者建立了一种基于双甲基化敏感的限制性内切酶与重组酶聚合酶扩增辅助的 CRISPR/Cas13a 系统 DESCs (dual methylation-sensitive restriction endonucleases coupling with an RPA-assisted CRISPR/Cas13a system), 该系统可用于准确和敏感地检测位点特异性 DNA 甲基化, 其原理是利用双甲基化敏感的限制性内切酶系统选择性地消化未甲基化的靶点但不会切割甲基化的 DNA 的特性来处理样本, 之后利用完整的甲基化 DNA 靶点触发 RPA 反应, 实现快速信号扩增。由于引物带有 T7 启动子, 产物可以在 T7 RNA 聚合酶的存在下进行 T7 转录, 产生大量可被 CRISPR/Cas13a 识别的靶 ssRNA, 诱导 Cas13a 的反式切割活性, 这种检测形式具有高灵敏度, 可实现 0.01% 的甲基化水平与未甲基化 DNA 的有效区分, 还消除了未甲基化靶点消化不完全造成的假阳性影响。此外, DESCs 检测还能与侧向流层析相结合实现试纸化, 用于 DNA 甲基化的即时测定<sup>[25]</sup>。

### 1.1.2 Cas12

Cas12 家族作为 CRISPR 系统中另一个重要的分支, 同样具有反式切割活性, 其中 Cas12a、Cas12b 和 Cas12f (Cas14) 被报道也能够应用于核酸检测平台。它们有着相对独特的性质: (1) Cas12 只含有 RuvC 结构域, 没有 HNH 结构域; (2) Cas12a 实现基因组编辑只需要 crRNA, 不需要 tracrRNA; (3) Cas12a 识别的 PAM 序列与 Cas9 不同, 即识别 5' 富含 AT 碱基的 PAM 序列<sup>[26]</sup>。相较于 Cas13, Cas12 家族识别的靶核酸为 DNA, 因此在检测平台的设计上与 Cas13 类似但又有独特性。

Doudna 团队基于 LbCas12a 建立了核酸检测平台 DETECTR (DNA endonuclease targeted CRISPR

trans reporter)<sup>[13]</sup>；随后又基于 Cas12f (Cas14) 结合 DETETCR 建立了新的检测平台<sup>[27]</sup>，它们都具有很好的特异性和高灵敏度。随着新的基因编辑工具 Cas12b 的发现并且其能够在哺乳动物细胞内实现编辑<sup>[28]</sup>，研究人员在这一新工具的基础上开发了一种 Cas12b 介导的 DNA 检测策略 CDetection (Cas12b-mediated DNA detection)，与之前报道的基于 Cas12 的检测平台相比，CDetection 可以结合优化的 tgRNA (optimization tuned guide RNA) 在单碱基水平上区分差异，通过检测肿瘤细胞的 SNP 实现分型<sup>[15]</sup>。之后基于新冠病毒的基因组序列，研究者将整个 CDetection 的流程重新进行优化，并且整合柱提取核酸和裂解液提取核酸两种方式，以及荧光和可视化观察的结果判读形式，实现了在一管中检测 RNA 的综合性病毒检测平台 CASdetec (CRISPR-assisted detection)<sup>[29]</sup>。

为了更好地满足临床便捷度和环境要求，张锋团队在线发布了检测 SARS-CoV-2 的 STOPCovid.v1 技术 (SHERLOCK testing in one pot)，其通过将等温扩增与 CRISPR/Cas12b 检测两个步骤在一个体系进行反应，经过优化实现一步等温扩增。为了提高灵敏度，他们优化并建立了 STOPCovid.v2，引入磁珠富集核酸，将核酸提取、释放、富集的时间压缩至 15 min 内，同时通过结合侧向层析实现灵敏特异的检测<sup>[30]</sup>。

基于 CRISPR/Cas12 系统的核酸检测技术不仅可以依赖于由 sgRNA 介导的 DNA 核酸酶活性，还能够与其他学科的技术相结合，实现学科交叉建立新式检测平台。通过对探针的改造，科学家将磁珠与连接多巴胺的脂质体建立在 ssDNA 的两端，构建了哑铃状多巴胺脂质体-磁珠复合的新型探针，利用 Cas12a 反式切割活性检测光电流的有无实现与电化学的有机结合，建立了光电生物传感器<sup>[31]</sup>。除此以外，也可以通过理性设计扩增步骤和 Cas12a 实现高效的级联反应进行核酸检测，引入 cgRNA、scgRNA、iDNA，通过靶核酸的引发实现大量预存 sgRNA 的释放，从而启动第二重体系预置的高浓度检测体系实现荧光的快速释放，进而实现免扩增、高灵敏的检测<sup>[32]</sup>。

有些疾病的表征不止有核酸，一些小分子物质也可以被用于表征疾病。因此，结合 CRISPR-Cas12a 的单链 DNA 切割能力和 aTFs (allosteric transcription factors) 对小分子和双链 DNA 的竞争性结合活性，有研究组开发了一种简单、超灵敏、快速、高通量

的小分子检测平台，能够对各种小分子尤其是尿酸实现纳摩尔 (nM,  $10^{-9}$  mol/L) 水平浓度的成功检出。该平台还可以直接测量临床人类血液样本中尿酸的浓度，表明基因编辑技术在小分子检测方面也有很大的潜力<sup>[33]</sup>。

## 1.2 基于CRISPR特点理性设计的核酸检测技术

### 1.2.1 Cas9

Cas9 由于不具有反式切割活性，因此不具有类似 Cas12、Cas13 的机制，但是仍然可以通过理性设计建立基于 Cas9 的多种有效的核酸检测方法。其中，Collins 团队基于已经开发的 toehold switch 算法系统设计了靶向病原体的 toehold switch，结合等温扩增技术 NASBA (nuclear acid sequence-based amplification) 扩增靶向 RNA。当靶核酸存在时，核糖开关打开，报告基因进行翻译表达，从而实现检测。在此基础上，还结合 Cas9 实现了对 NGG PAM 的识别特异性，从而对不同地区寨卡病毒的基因进行分型，其检测灵敏度达到飞摩尔 (fM,  $10^{-15}$  mol/L) 级别<sup>[34]</sup>。Cas9 不止能同分子开关结合，还可以经过设计与侧向流装置集成实现试纸化，Xiong 等<sup>[35]</sup>使用带有生物素的引物扩增靶核酸，利用 Cas9 与作为靶核酸的扩增产物和 sgRNA 形成复合物的特性，以与胶体金偶联的核酸分子杂交的方式实现在侧向流层析上的应用检测。

Cas9 由于能够结合两条 sgRNA，通过其核酸酶活性切开靶 DNA，从而在 DNA 链上发生切割引入一对可以用来设计级联反应的缺口，也可以同链置换反应 SDA (链置换扩增术, strand displacement amplification) 相结合建立 CRISDA (CRISPR-Cas9-triggered nicking endonuclease mediated strand displacement amplification method)，该平台借助内切酶的共同作用进行链置换反应引发指数扩增，整个过程在 25~40 °C 恒温下进行，能够以亚纳摩尔 ( $10^{-19}$  mol/L) 级别的灵敏度完成核酸检测<sup>[36]</sup>。类似地，CAS-EXPAR (CRISPR/Cas9 triggered isothermal exponential amplification reaction)<sup>[37]</sup> 也通过理性设计，利用 Cas9 在靶标序列的特异位点切割产生能够用作后续扩增引物的目标片段结合链置换反应，形成循环扩增过程，产物可用荧光染料进行检测，能够实现亚纳摩尔级灵敏度和单碱基分辨率。除此以外，Cas9 会产生能够引导 Cas9 靶向 DNA 的非典型 crRNA，也具有介导多重靶标检测的前景。基于此，研究者建立了 LEOPARD (leveraging engineered tracrRNAs and on-target DNAs for parallel RNA

detection) 多路诊断平台, 该平台可以实现在患者样本中以单碱基分辨率区分 SARS-CoV-2 及其 D614G 变体 [38]。

### 1.2.2 其他CRISPR/Cas系统

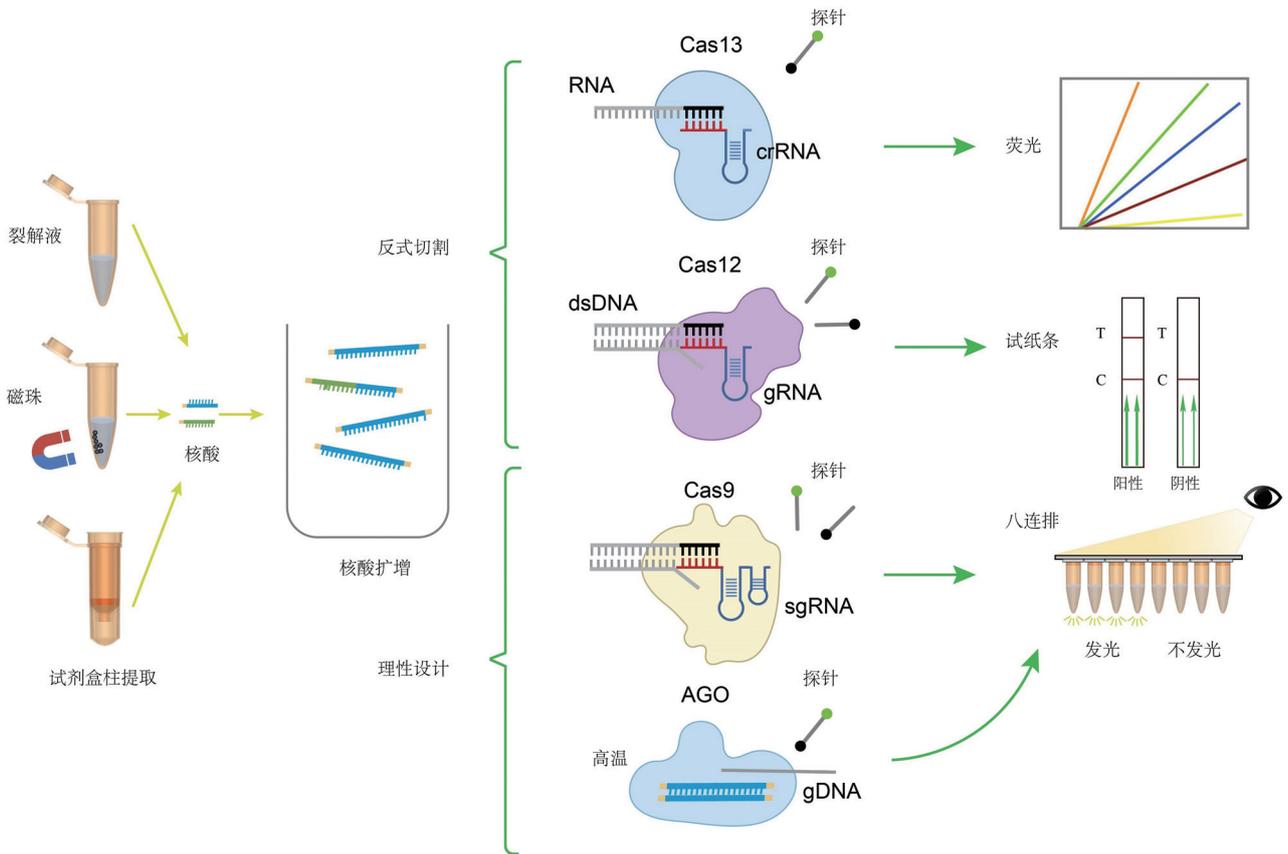
I 型 CRISPR-Cas 系统包含多种 Cas 蛋白, 需要彼此募集形成复合物来形成具有活性的核酸酶 [39]。有研究报道证明 I 型 CRISPR/Cas 系统可以在人细胞中实现大片的基因敲除 [40], 说明 I 型 CRISPR/Cas 系统同样能够在真核系统中实现基因编辑, 具有巨大的应用价值。在疾病诊断的应用中, 有研究发现 EcoCas3/EcoCascade-crRNA 形成复合体后能够识别非经典 PAM (CCA), 特异切割双链 DNA, 同样可以触发其类似反式切割活性的特性, 实现流感病毒和新冠病毒的检测 [41]。

### 1.3 基于Argonaute蛋白的检测

Argonaute 蛋白 (Ago) 可以分为原核和真核两类, 其中 PfAgo 作为一种由单链 DNA 介导的 DNA 核酸酶 [42], 可以通过设计建立多样的诊断平台。基于 Ago 蛋白建立的 A-Star (a single-tube, multiplex

PCR-based system)[43] 系统, 是一种通过高温嗜热 PfAgo 而建立的检测方法, 由于这种蛋白可以在 95 °C 发挥其 DNA 核酸酶的活性, 所以能够与 PCR 的 DNA 聚合酶具有较好的相容性, 其检测原理主要是利用 PfAgo 在 94 °C 下以单核苷酸分辨率选择性切割消除野生型 DNA, 在 PCR 过程中可以有效地扩增含量很少的突变型 DNA, 从而检测样本中的单碱基突变。

除此以外, PfAgo 被发现具有“chopping 活性”, 即 Ago 蛋白会将不稳定的双链 DNA 的解链区域切开, 从而产生功能性的单干扰 DNA (siDNA)[44]。依赖这一特性, PAND (PfAgo-mediated nucleic acid detection) 检测平台被建立 [45], Ago 通过两条 gDNA 切开经由扩增得到的双链靶 DNA, 使扩增的靶 DNA 形成不稳定的双链 DNA 的解链区域, 进而引发“chopping 活性”, 随后在输入 gDNA 的作用下形成的 PfAgo 进一步通过“chopping 活性”切开作为底物的分子信标探针, 从而产生荧光实现检测, 灵敏度可达渺摩尔 (aM, 10<sup>-18</sup> mol/L) 级别。基于 Ago 蛋白的检测



基于基因编辑的诊断技术主要可以分为依赖CRISPR/Cas系统的反式切割活性、基于CRISPR/Cas系统传感器的理性设计和基于Argonaute蛋白的理性设计。

图1 基于基因编辑的诊断技术

的一种优势就是可以通过多个 gDNA 介导同一种 Ago 蛋白实现一管多重检测。因此, 结合设计“chopping 活性”逐步裂解初级和次级产物的级联反应, 科学家还建立了能够一管检测 4 种 HPV 分型的检测平台 RADAR (Renewed-gDNA Assisted DNA cleavage by Argonaute)<sup>[46]</sup>。

## 2 基因编辑技术在疾病检测中的应用

基于基因编辑技术所建立的核酸检测技术能够在多种应用场景下发挥不同的作用。面向不同的疾病, 根据需求端通过设计实现多样化临床转化。尤其是在重大传染疾病、重大健康疾病以及个人健康检测几个场景中, 基因编辑技术都有着重要的应用意义。

### 2.1 重大传染疾病

基因编辑技术作为一种新兴技术, 在应对重大的传染疾病, 如大规模筛查、海关入境、家庭诊断、

传染病自检时, 有着很广阔的应用场景。对于登革热、COVID-19、中东呼吸综合征这一类烈性的呼吸道传染疾病, 一旦爆发, 最有效的办法就是通过早期筛查将患者及时隔离, 以遏制传染病的进一步蔓延。而利用基因编辑的手段, 已经建立多种检测平台来应对这一类重大公共卫生安全事件(表 1)<sup>[27,30,41,47-51]</sup>, 它们都具有相对灵敏、特异的检测能力, 并且有多样化的应用场景。

### 2.2 常规健康疾病

除此以外, 影响人类健康的疾病主要还有癌症和寄生虫疾病, 为了及早检测机体的异常, 因此需要在疾病发生早期, 甚至未发生时, 通过基因诊断进行预防和治疗。作为指示癌症发生的标志物, miRNA、SNP、基因甲基化的检测就显得更为重要。传统的方法需要对样本进行测序, 耗时长且需要测序仪器辅助。基因编辑技术所带来的诊断方式具有较高的灵敏度和较为低廉的价格(表 2)<sup>[15,52-59]</sup>, 这

表1 基因编辑系统在重大传染疾病检测中的应用

技术名称	检测靶标	CRISPR/Cas系统	扩增方式	灵敏度	结果判读形式	参考文献
SARS-CoV-2 DETECTR	N、E	Cas12a	LAMP	10 copies/μL	荧光、试纸	[47]
CASdetec	Orf1ab	Cas12b	RT-RAA	5 copies/μL	荧光	[27]
STOPCovid	N、Orf1ab、S	Cas12b	LAMP	200 copies	荧光、试纸	[30]
STOPCovidv2	N、Orf1ab、S	Cas12b	LAMP	100 copies	荧光、试纸	[30]
MCCD	orf1ab、N	Cas12a	MCDA	7 copies	荧光、试纸	[48]
CONAN	N	Cas3	RT-LAMP	1.7 aM	荧光、试纸	[41]
AIOD-CRISPR	N	Cas12a	RPA	4.6 copies	荧光	[49]
ENHANCE	N	Cas12a	RPA、LAMP	3~300 copies	荧光、试纸	[50]
sPAMC	Orf1ab	Cas12a	RPA	荧光2.4 copies	荧光	[51]

表2 基因编辑系统在常规健康疾病检测中的应用

技术名称	检测靶标	CRISPR/Cas系统	扩增方式	灵敏度	结果判读形式	应用疾病场景	参考文献
CAM	甲基化序列	Cas12a	RCA	342 aM	荧光	甲基化诊断	[52]
CDetection	Tp53、BRCA	Cas12b	RPA	1 aM	荧光	癌症SNP诊断	[15]
HOLMESv2	COL1A2	Cas12b	LAMP	甲基化检测较准确	荧光	癌症甲基化诊断	[53]
vCas	miR-10b	Cas13a	RCA	1 fM	荧光、化学发光	肿瘤标志物检测	[54]
CAL-LAMP	Let-7a	Cas12a	LAMP	0.1 fM	荧光	肿瘤标志物检测	[55]
RACE	miR-21、 miR-221、 miR-222	Cas12a	RCA	fM级	荧光	肿瘤标志物检测	[56]
RCA-CRISPR/ Cas12a	miR-21、 B19 DNA	Cas12a	RCA	aM级	荧光	肿瘤标志物检测	[57]
CTSDR-Cas12a	miR-21	Cas12a	toehold开关 级联反应	70.28 fM	荧光	肿瘤标志物检测	[58]
MDANs-Cas12a	CCRF-CEM 细胞	Cas12a	适配体结合 RCA	26 cells/mL	荧光	肿瘤细胞检测	[59]

些技术为癌症的诊断和预防提供了新的思路。

### 2.3 个人健康筛查

还有一些应用场景涉及患者隐私, 或者个人处于健康考虑想要进行健康自我筛查, 如 HPV 检测、HIV 检测等。针对这些个人健康筛查的场景, 可能更倾向于家庭自检, 所以操作便携、结果易于确认可能是这种应用场景要着重体现的。基因编辑技术相较于 QPCR, 能够搭载侧向流层析, 或者通过化学发光荧光观察等方式直接对结果进行读取分析。而基因编辑技术由于其独特的原理和特性, 在 POCT (point of care testing) 的应用中也建立了很多新的检测思路 and 平台 (表 3)<sup>[12,60-64]</sup>。

## 3 基因编辑技术在疾病诊断中的展望

当突发重大公共卫生事件如传染病爆发时, 迫切需要快速诊断和大规模、高通量的灵敏筛查。除此以外, 家用检测、个人健康筛查也对检测的 POCT 和便携操作提出了要求。由于 CRISPR 技术具有高特异性、简单性和对其他模块的适应性、包容性, 因此在满足上述两个应用场景上都具有很大的潜力。

基于 CRISPR 的高灵敏度和特异性的核酸检测系统一直是人们追求的目标。在该系统中, 未来要关注以下两个方向: (1) 快速、简单、高效的核酸提取方法; (2) CRISPR 酶反应是核酸检测的核心步骤。当靶核酸浓度低于相对较高的值 [最低皮摩尔

级别 (pM,  $10^{-12}$  mol/L)] 时, Cas12 或 Cas13 核酸酶的反式切割活性迅速衰减, 说明 Cas 核酸酶对低浓度靶核酸的识别和结合能力或者反式切割的酶活性不足。因此, 对于酶切效率本身的改造和提高是十分重要的, 目前也已经发表了提高 Cas 蛋白效率的相关工作<sup>[65-66]</sup>。

检测的便携度和特异性也是需要持续优化和迭代的。(1) 考虑到核酸气溶胶污染的风险和缩短操作时间, 实际建议采用不开盖的一管反应。然而, 预扩增和反式切割的兼容性往往会由于组分的复杂而出现问题, 产生抑制检测反应的现象进而导致灵敏度不足。因此, 对缓冲体系优化的工作也能提高检测系统的灵敏度。(2) 等温扩增的应用, 同时也引入新的酶和蛋白质组分, 这样在便携化场景的使用中, 保存和稳定性的要求会增高, 因此对系统各组分改造提高稳定性也至关重要。(3) 进行免扩增的相关研究, 替代或者减少 PCR 信号放大所带来的气溶胶污染, 并且使用更简单的体系则更有助于进行冻干、运输、保存, 从而具有更广阔的应用场景和转化价值。

除此以外, 待检测的样本通常可能会存在多种分型或者需要同时检测多种靶标, 因此实现多重检测在临床上也具有重要意义。除了改进酶促反应体系之外, 还可以通过改进反应方式或利用多学科交叉来进一步将核酸检测工程化, 借助数字 PCR 或者微流控策略, 实现高通量、大规模、多重靶标的

表3 基因编辑系统在个人健康筛查中的应用

技术名称	检测靶标	CRISPR/Cas系统	扩增/放大方式	灵敏度	结果判读形式	应用疾病场景	参考文献
DETECTR	HPV16、HPV18	Cas12a	LAMP/RPA	1 aM	荧光	HPV自检、分型	[12]
CRISPR-PGM	HIV	Cas12a	MB-转化酶报告探针形成的 ssDNA 探针; 游离转化酶催化蔗糖水解为葡萄糖, 检测葡萄糖	11 fM	仪器读数、化学发光	HPV自检、分型	[60]
DAMR	HPV	Cas12a	RPA	10~100 copies	荧光	HPV荧光观察	[61]
CRICED	HPV	Cas12a	RPA	17 pM	化学发光	HPV自检	[62]
CLIPON	HPV16、HPV18	Cas12a	单链DNA-人绒毛膜促性腺激素复合探针和类花椰菜结构核酸联用	1 copy/ $\mu$ L	试纸	HPV自检	[63]
G-CRISPR	HIV	Cas12a	PCR	0.1 aM	荧光	HPV分型	[64]

核酸检测。此外，核酸的获取和最终信号的读取也是不可忽视的两个关键问题，这对整个核酸检测的可操作性和有效性至关重要。

基于基因编辑的诊断技术作为一种新兴技术，除了与生物学相关学科结合实现自身的优化升级，还应该有机地与全自动、一体化、智能化仪器相结合。有研究将 CRISPR 体系与小型便携化仪器相结合，实现加热、反应、观察结果于一体的装置，并实现了临床样本检测<sup>[67-68]</sup>。除此以外，还可以将检测体系微缩化，与可穿戴装置包括衣服、口罩这样的材料相结合<sup>[69]</sup>，这样就有可能仅通过佩戴口罩或穿戴设备实现检测。因此，将复杂的流程借助智能化仪器来完成，利用仪器自动化流程来替代检测实验室，推进综合性的核酸检测平台的建立，从而有效提高检测通量和便携性，使疾病诊断工程化，建立实现“样本进、结果出”的检测模式。基于基因编辑的疾病诊断技术并不是单纯的传统生物学研究，而是需要与合成生物学、化学生物学、生物信息学、结构生物学相结合；除此以外，要面向检测需求，更好地与临床医学和检测企业合作沟通，实现产、学、研之间的相互推动转化，实现由科研到临床疾病诊断的有效转化。

#### 4 结语

基于基因编辑而建立的疾病诊断技术还在飞速发展，越来越多的新技术随着基础研究的发现与深入和学科的进一步交叉而产生，同时也进一步促进应用研究和基础研究之间的相互转化。在疾病诊断领域，期待基因编辑技术在面向场景多元化和应用工程化上有着突破性的应用与变革。

#### [参 考 文 献]

- [1] World Health Organization. The top 10 causes of death. [EB/OL]. [2020.12.9]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- [2] World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. [EB/OL]. [2022-06-17]. <https://covid19.who.int/>
- [3] Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 273-97
- [4] Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*, 2013, 10: 957-63
- [5] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A\*T to G\*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551: 464-71
- [6] Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 2019, 576: 149-57
- [7] Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18: 358-78
- [8] Hou X, Zaks T, Langer R, et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat Rev Mater*, 2021, 6: 1078-94
- [9] Long C, Amoasii L, Mireault AA, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science*, 2016, 351: 400-3
- [10] Suh S, Choi EH, Leinonen H, et al. Restoration of visual function in adult mice with an inherited retinal disease via adenine base editing. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5: 169-78
- [11] Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*, 2020, 367: eaba7365
- [12] Lau CH. Applications of CRISPR-Cas in bioengineering, biotechnology, and translational research. *CRISPR J*, 2018, 1: 379-404
- [13] East-Seletsky A, O'Connell MR, Knight SC, et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature*, 2016, 538: 270-3
- [14] Chen JS, Ma E, Harrington LB, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 2018, 360: 436-9
- [15] Teng F, Guo L, Cui T, et al. CDetection: CRISPR-Cas12b-based DNA detection with sub-attomolar sensitivity and single-base specificity. *Genome Biol*, 2019, 20: 132
- [16] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 2017, 550: 280-4
- [17] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 2017, 356: 438-42
- [18] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, 2018, 360: 439-44
- [19] Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science*, 2018, 360: 444-8
- [20] Arizti-Sanz J, Freije CA, Stanton AC, et al. Streamlined inactivation, amplification, and Cas13-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Commun*, 2020, 11: 5921
- [21] Ackerman CM, Myhrvold C, Thakku SG, et al. Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13. *Nature*, 2020, 582: 277-82
- [22] Fozouni P, Son S, Díaz de León Derby M, et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy. *Cell*, 2021, 184: 323-33.e9
- [23] Liu TY, Knott GJ, Smock DCJ, et al. Accelerated RNA detection using tandem CRISPR nucleases. *Nat Chem Biol*, 2021, 17: 982-8
- [24] Hassler MR, Pulverer W, Lakshminarasimhan R, et al. Insights into the pathogenesis of anaplastic large-cell

- lymphoma through genome-wide DNA methylation profiling. *Cell Rep*, 2016, 17: 596-608
- [25] Wang X, Zhou S, Chu C, et al. Dual methylation-sensitive restriction endonucleases coupling with an RPA-assisted CRISPR/Cas13a system (DESCS) for highly sensitive analysis of DNA methylation and its application for point-of-care detection. *ACS Sens*, 2021, 6: 2419-28
- [26] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, 163: 759-71
- [27] Harrington LB, Burstein D, Chen JS, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science*, 2018, 362: 839-42
- [28] Teng F, Cui T, Feng G, et al. Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering. *Cell Discov*, 2018, 4: 63
- [29] Guo L, Sun X, Wang X, et al. SARS-CoV-2 detection with CRISPR diagnostics. *Cell Discov*, 2020, 6: 34
- [30] Joung J, Ladha A, Saito M, et al. Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics. medRxiv, 2020, doi: 10.1101/2020.05.04.20091231
- [31] Gong H, Wu Y, Zeng R, et al. CRISPR/Cas12a-mediated liposome-amplified strategy for the photoelectrochemical detection of nucleic acid. *Chem Commun (Camb)*, 2021, 57: 8977-80
- [32] Shi K, Xie S, Tian R, et al. A CRISPR-Cas autocatalysis-driven feedback amplification network for supersensitive DNA diagnostics. *Sci Adv*, 2021, 7: eabc7802
- [33] 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: 3672
- [34] Pardee K, Green AA, Takahashi MK, et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components. *Cell*, 2016, 165: 1255-66
- [35] Xiong E, Jiang L, Tian T, et al. Simultaneous dual-gene diagnosis of SARS-CoV-2 based on CRISPR/Cas9-mediated lateral flow assay. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60: 5307-15
- [36] Zhou W, Hu L, Ying L, et al. A CRISPR-Cas9-triggered strand displacement amplification method for ultrasensitive DNA detection. *Nat Commun*, 2018, 9: 5012
- [37] 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: 2193-200
- [38] Jiao C, Sharma S, Dugar G, et al. Noncanonical crRNAs derived from host transcripts enable multiplexable RNA detection by Cas9. *Science*, 2021, 372: 941-8
- [39] Hidalgo-Cantabrana C, Barrangou R. Characterization and applications of Type I CRISPR-Cas systems. *Biochem Soc Trans*, 2020, 48: 15-23
- [40] Tan R, Krueger RK, Gramelspacher MJ, et al. Cas11 enables genome engineering in human cells with compact CRISPR-Cas3 systems. *Mol Cell*, 2022, 82: 852-67.e5
- [41] Yoshimi K, Takeshita K, Yamayoshi S, et al. CRISPR-Cas3-based diagnostics for SARS-CoV-2 and influenza virus. *iScience*, 2022, 25: 103830
- [42] Qin Y, Li Y, Hu Y. Emerging Argonaute-based nucleic acid biosensors. *Trends Biotechnol*, 2022, 40: 910-4
- [43] Liu Q, Guo X, Xun G, et al. Argonaute integrated single-tube PCR system enables supersensitive detection of rare mutations. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: e75
- [44] Hegge JW, Swarts DC, van der Oost J. Prokaryotic Argonaute proteins: novel genome-editing tools? *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16: 5-11
- [45] He R, Wang L, Wang F, et al. *Pyrococcus furiosus* Argonaute-mediated nucleic acid detection. *Chem Commun (Camb)*, 2019, 55: 13219-22
- [46] Xun G, Liu Q, Chong Y, et al. Argonaute with stepwise endonuclease activity promotes specific and multiplex nucleic acid detection. *Bioresour Bioprocess*, 2021, 8: 46
- [47] Broughton JP, Deng X, Yu G, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 870-4
- [48] Zhu X, Wang X, Li S, et al. Rapid, ultrasensitive, and highly specific diagnosis of COVID-19 by CRISPR-based detection. *ACS Sens*, 2021, 6: 881-8
- [49] Ding X, Yin K, Li Z, et al. All-in-One dual CRISPR-Cas12a (AIOD-CRISPR) assay: a case for rapid, ultrasensitive and visual detection of novel coronavirus SARS-CoV-2 and HIV virus. bioRxiv, 2020, 2020.03.19.998724
- [50] Nguyen LT, Smith BM, Jain PK. Enhancement of trans-cleavage activity of Cas12a with engineered crRNA enables amplified nucleic acid detection. *Nat Commun*, 2020, 11: 4906
- [51] Lu S, Tong X, Han Y, et al. Fast and sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA using suboptimal protospacer adjacent motifs for Cas12a. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6: 286-97
- [52] Zhang L, Zhao X, Hu X, et al. Probing low abundant DNA methylation by CRISPR-Cas12a-assisted cascade exponential amplification. *Analyst*, 2022, 147: 2655-61
- [53] Li L, Li S, Wu N, et al. HOLMESv2: a CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation. *ACS Synth Biol*, 2019, 8: 2228-37
- [54] Zhou T, Huang M, Lin J, et al. High-fidelity CRISPR/Cas13a trans-cleavage-triggered rolling circle amplified DNzyme for visual profiling of microRNA. *Anal Chem*, 2021, 93: 2038-44
- [55] Zhang M, Wang H, Wang H, et al. CRISPR/Cas12a-assisted ligation-initiated loop-mediated isothermal amplification (CAL-LAMP) for highly specific detection of microRNAs. *Anal Chem*, 2021, 93: 7942-8
- [56] Wang R, Zhao X, Chen X, et al. Rolling circular amplification (RCA)-assisted CRISPR/Cas9 cleavage (RACE) for highly specific detection of multiple extracellular vesicle microRNAs. *Anal Chem*, 2020, 92: 2176-85
- [57] Qing M, Chen SL, Sun Z, et al. Universal and programmable rolling circle amplification-CRISPR/Cas12a-mediated immobilization-free electrochemical biosensor. *Anal Chem*, 2021, 93: 7499-507
- [58] Li X, Zhang D, Gan X, et al. A cascade signal amplification based on dynamic DNA nanodevices and

- CRISPR/Cas12a trans-cleavage for highly sensitive microRNA sensing. *ACS Synth Biol*, 2021, 10: 1481-9
- [59] Lv Z, Wang Q, Yang M. Multivalent duplexed-aptamer networks regulated a CRISPR-Cas12a system for circulating tumor cell detection. *Anal Chem*, 2021, 93: 12921-9
- [60] Fang B, Jia Z, Liu C, et al. A versatile CRISPR Cas12a-based point-of-care biosensor enabling convenient glucometer readout for ultrasensitive detection of pathogen nucleic acids. *Talanta*, 2022, 249: 123657
- [61] Yin K, Ding X, Li Z, et al. Dynamic aqueous multiphase reaction system for one-pot CRISPR-Cas12a-based ultrasensitive and quantitative molecular diagnosis. *Anal Chem*, 2020, 92: 8561-8
- [62] Hu T, Ke X, Ou Y, et al. CRISPR/Cas12a-triggered chemiluminescence enhancement biosensor for sensitive detection of nucleic acids by introducing a tyramide signal amplification strategy. *Anal Chem*, 2022, 94: 8506-13
- [63] Tang Y, Qi L, Liu Y, et al. CLIPON: a CRISPR-enabled strategy that turns commercial pregnancy test strips into general point-of-need test devices. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61: e202115907
- [64] Li T, Hu R, Xia J, et al. G-triplex: a new type of CRISPR-Cas12a reporter enabling highly sensitive nucleic acid detection. *Biosens Bioelectron*, 2021, 187: 113292
- [65] Chen Y, Hu Y, Wang X, et al. Synergistic engineering of CRISPR-Cas nucleases enables robust mammalian genome editing. *Innovation*, 2022, 3: 100264
- [66] Yang J, Song Y, Deng X, et al. Engineered LwaCas13a with enhanced collateral activity for nucleic acid detection. *Nat Chem Biol*, 2022, doi: 10.1038/s41589-022-01135-y
- [67] Puig H, Lee RA, 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: eabh2944
- [68] Karlikow M, da Silva SJR, Guo Y, et al. Field validation of the performance of paper-based tests for the detection of the Zika and chikungunya viruses in serum samples. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6: 246-56
- [69] Nguyen PQ, Soenksen LR, Donghia NM, et al. Wearable materials with embedded synthetic biology sensors for biomolecule detection. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 1366-74