

分子诊断中基于 CRISPR/Cas 生物传感平台的应用

张 华

南通大学 江苏南通

【摘要】基因组编辑中 CRISPR/Cas 系统应用比较广泛, CRISPR/Cas 系统能准确切割、识别 DNA、RNA 序列, 在对目标序列识别过程中, CRISPR/Cas 系统在 Cas12、13 蛋白经 RNA 引导, 不仅能对目标序列进行识别, 让靶向切割活性得到启动, 且在 DNA、RNA 分子及其他单链中也表现出非特异性切割活性, 将荧光基团报告核酸分子加入反应体系, 通过荧光信号还能观察到目标核酸分子所在, 且借助 Cas 蛋白的不同切割偏好, 还能同时检测多种靶标分子。

【关键词】分子诊断; CRISPR/Cas; 生物传感平台; 应用价值

Application of CRISPR/Cas-based biosensing platforms in molecular diagnostics

Hua Zhang

Nantong University, Nantong, Jiangsu

【Abstract】The CRISPR/Cas system is widely used in genome editing. The CRISPR/Cas system can precisely cleave and recognize DNA and RNA sequences. In the process of recognizing a target sequence, the CRISPR/Cas system not only recognizes the target sequence and initiates target-cleaving activity, but also shows non-specific cleavage activity on single strands such as DNA and RNA molecules, and emits fluorescence. is appended. Group of reporter nucleic acid molecules to be added In the reaction system, the positions of target nucleic acid molecules can be observed by fluorescence signals, and multiple target molecules can be detected simultaneously due to the different cleavage priorities of Cas proteins.

【Keywords】molecular diagnostics, CRISPR/Cas, biosensing platform, application value

早在 2012 年 CRISPR 技术就已经应用于生物 DNA 序列突变、敲除、添加、替换, 借助 CRISPR 技术进行基因编辑不仅构建更加简单方便、快速、准备, 且能降低成本, 对设备依赖性比较低, 扩大适应范围, 因此, CRISPR 技术拥有“基因魔剪”的称号, 并在获 2020 荣获了诺贝尔化学奖, 为生物技术发展开拓了更良好的前景。目前, CRISPR/Cas 系统在核酸分子诊断方面方法比较多, 本研究基于 CRISPR 诊断中不同 Cas 蛋白核酸分子进行讨论分析, 综述如下:

1 CRISPR/Cas 系统概论

1.1 CRISPR/Cas 系统的结构分析

古细菌、细菌中都存在 CRISPR/Cas 系统, 属于获得性免疫系统, 对质粒、噬菌体等外源遗传物质具有良好的抵抗作用。CRISPR/Cas 也就是成簇规律

间隔短回文重复序列 (CRISPR) 与 CRISPR 关联蛋白, CRISPR/Cas 系统含有许多保守、短、重复序列区和间隔区, CRISPR 序列启动子为上游前导区^[1]。上游多态性家族基因中编码蛋白和 CRISPR 序列之间的共同作用就是 Cas 基因, Cas 基因和前导序列-重复-间隔序列相反的方向就是反式激活 crRNA, 当介导非编码前体 crRNA 成熟后形成 crRNA, 也就是向导 RNA。

1.2 CRISPR/Cas 系统机理分析

细菌、古细菌不同, CRISPR/Cas 系统也存在一定差异, 以化脓链球菌中 CRISPR/Cas9 系统来看, 病毒入侵后, 细菌会整合病毒入侵片段 DNA 序列, 并将其自身 CRISPR 间隔区进行融合, 如果病毒出现再次入侵, 经过前导区调控, 会将 CRISPR 序列转录成长 pre-crRNA, 通过和 tracrRNA 进行配对,

和 RNaseIII 酶加工, 形成 gRNA 结构, gRNA 结构再和 Cas9 蛋白融合形成 Cas9-gRNA, gRNA 受 Cas9 蛋白影响产生核酸内切酶活性, 可以降解、识别靶标序列^[2]。基于原间隔序列周围基序 PAMCas9 蛋白可以识别靶标序列^[3]。

1.3 CRISPR/Cas 系统分类

CRISPR/Cas 系统按照效应蛋白数量可以分为两类, 一是需要借助多个效应蛋白才能发挥作用的复合物系统, 二是单个效应蛋白就会发挥作用。但是参考新的分类标准, CRISPR/Cas 系统被划分成 6 种型、33 种亚型、2 类, 1 类系统涵盖 I、III、IV 型, 亚型合计 16 种, 2 类系统涵盖 II、V、VI 型, 亚型共计 17 种^[4]。

1.4 CRISPR/Cas 系统分子诊断原理

相较于 Cas9, Cas12、Cas13 亚型经过向导 RNA 引导, 不仅能目标序列启动靶向切割活性进行识别, 还具有间接非特异性切割活性, 可降解、剪切 ssRNA、ssDNA。将荧光基团报告核酸分子加入反应体系, 通过荧光信号还能观察到目标核酸分子所在为 CRISPR/Cas 系统分子诊断奠定了良好基础^[5]。目前使用的比较多的报告核酸分子为寡核苷酸, 两端分别负有淬灭剂、荧光素, 受猝灭作用限制, 报告核酸分子无荧光, 当目标序列、Cas 蛋白相结合时, 激活了非特异性切割活性, 报告核酸分子经剪切, 不受猝灭作用限制, 就会产生荧光^[6]。

2 CRISPR/Cas 系统分子诊断平台

2.1 CRISPR/Cas9 分子诊断平台

Cas9 蛋白酶无非特异性切割活性, 主要是结合 PCR、Cas9 进行特异性诊断。早在 2016 年 CRISPR/Cas9 系统就已经在核酸分子诊断中开始应用, 并衍生出寨卡病毒谱系鉴别技术。2019 年使用 Cas9sgRNA 的 FLASH 技术应用于病原体抗菌素耐药性序列, 通过 FLASH 技术可以切割感兴趣序列形成 Illumina 测序片段。磷酸酶会阻断 DNA、cDNA 输入基因, Cas9 酶切割消化 sgRNA, 因此, 切割产物可以对通用测序衔接子进行连接^[7]。靶向序列得到扩增后再将其用在流式池测序中, 这种诊断方式已经远远胜过其他 CRISPR 诊断方法, 可以在数千个目标诊断中应用^[8]。

2.1 CRISPR/Cas13a 分子诊断平台

早在 2016 年 CRISPR/Cas13a 机理、功能就已经被验证, Cas13a 可以对靶 RNA 进行特异性剪切,

还能对 RNA 功能进行非特异性降解。2017 年 SHERLOCK 技术的问世, 证实形成了含重组酶聚合酶等温扩增技术的新检测系统, 在核酸分子检验过程中, 针对 DNA 需先进行 RPA 扩增, 而 RNA 则先进行 RT-RPA 扩增, 再将 DNA 产物转变成 RNA 分子。由 Cas13a-crRNA、报告 RNA 完成靶 RNA 检测^[9]。SHERLOCK 技术单碱基特异性、aM 灵敏度均比较高, 但是在检验过程中一次只能完成一种核酸序列检验, 且荧光数据需要其他设备才能进行收集^[10]。2018 年经过对 SHERLOCK 技术进行更新形成了 SHERLOCKv2, 该检测结束灵敏度大幅度提升, 且可以根据切割偏好, 选择特异性荧光报告基团, 一次性可以完成多种类型病毒核酸检测^[11]。目前, 该技术已经应用于肺癌血液样本检测, 在检测过程中能准确观察到游离肿瘤 DNA, 浓度 > 2amol/LZIKA、DENV 单链 RNA 仅需 90 分钟就可以检测到, 且操作更加方便、快捷^[12]。

2.3 CRISPR/Cas12a 分子诊断平台

2015 年有团队发现当 Cas12a-crRNA 单链、双链 DNA 识别能力被激活以后, 单链 DNA 就会受到 Cas12a 借助非特异性地剪切、降解。该团队参考 SHERLOCK 技术, 将 RPA 步骤引入, 形成 RPA+Cas12a 核酸分子检验技术, 也就是 DETECTR, 这种检验技术直接省略了扩增后 DNA 产物向 RNA 转录的过程, 能快速、准确的对宫颈癌 16、18 型 HPV 进行检测, 且能准确对 HPV 病毒亚型进行区分^[13-15]。后期又基于 DETECTR 形成了环介导等温扩增技术、以及各种信号输出形式的检测方法。

3 结论

在疾病治疗中有效的诊断工具对患者病情恢复具有重要意义, 临床检验经过不断 CRISPR/Cas 系统相关诊断方法进行改造、优化, 进一步提升了各种病原体检测准确性及速度, 为临床实验室疾病检验提供了更多方便。但是 CRISPR/Cas 系统中各种检测方法还有很大的进步空间, 未来应不断进行改善, 从而促进 CRISPR/Cas 系统核酸分子诊断技术进一步发展^[16-18]。

参考文献

- [1] Koo B, Kim D, Kweon J, et al. CRISPR/dCas9-mediated biosensor for detection of tick-borne diseases[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 273: 316-321.

- [2] Geraldi A, Giri-Rachman E A. Synthetic biology-based portable in vitro diagnostic platforms[J]. Alexandria journal of medicine, 2018, 54(4): 423-428.
- [3] 李甜,李娜.基于 CRISPR/Cas 的生物传感平台在分子诊断中的应用[J].分析测试学报,2022,41(4):520-528.
- [4] 徐文娟,宋丹,陈丹,等.基于 CRISPR/Cas 生物传感原理的病原菌检测技术研究进展 [J]. 中国生物工程杂志,2021,41(8):67-74.
- [5] GADWAL, A., ROY, D., KHOKHAR, M., et al. CRISPR/Cas-New Molecular Scissors in Diagnostics and Therapeutics of COVID-19[J]. Indian journal of clinical biochemistry: IJCB,2021,36(4):459-467.
- [6] Koo B, Kim D, Kweon J, et al. CRISPR/dCas9-mediated biosensor for detection of tick-borne diseases[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 273: 316-321.
- [7] Aquino-Jarquín G. CRISPR-Cas14 is now part of the artillery for gene editing and molecular diagnostic[J]. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2019, 18: 428-431.
- [8] 孙秀兰,付旭冉,鲍琦,等.新一代诊断技术:CRISPR 系统及其在分子诊断中的应用 [J]. 食品与生物技术学报,2022,41(7):57-70.
- [9] 曹亚玲,任锋.基于 CRISPR/Cas 技术的核酸即时检测研究进展[J].中华检验医学杂志,2021,44(9):864-867.
- [10] SINGH, DESH DEEPAK, VERMA, RAVI, TRIPATHI, SUBHASH K., et al. Breast Cancer Transcriptional Regulatory Network Reprogramming by using the CRISPR/ Cas9 System: An Oncogenetics Perspective[J]. 2021,21(31):2800-2813.
- [11] Batista A C, Pacheco L G C. Detecting pathogens with Zinc-Finger, TALE and CRISPR-based programmable nucleic acid binding proteins[J]. Journal of microbiological methods, 2018, 152: 98-104.
- [12] Liu L, Yang D, Liu G. Signal amplification strategies for paper-based analytical devices[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2019, 136: 60-75.
- [13] Otlu B. CRISPR-Cas System: A Brief History and Future in the Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases[J]. Infectious Diseases and Clinical Microbiology, 2019, 1(1): 2-6.
- [14] Jones K A, Zinkus-Boltz J, Dickinson B C. Recent advances in developing and applying biosensors for synthetic biology[J]. Nano Futures, 2019, 3(4): 042002.
- [15] Kim C M, Smolke C D. Biomedical applications of RNA-based devices[J]. Current Opinion in Biomedical Engineering, 2017, 4: 106-115.
- [16] Choi K R, Jang W D, Yang D, et al. Systems metabolic engineering strategies: integrating systems and synthetic biology with metabolic engineering[J]. Trends in biotechnology, 2019, 37(8): 817-837.
- [17] 史铠,雷春阳,聂舟.CRISPR/Cas 技术在核酸检测中的应用进展[J].分析测试学报,2018,37(10):1217-1220.
- [18] GONG, SHAOHUA, ZHANG, SHIQI, LU, FEI, et al. CRISPR/Cas-Based In Vitro Diagnostic Platforms for Cancer Biomarker Detection[J]. Analytical chemistry, 2021, 93(35): 11899-11909.

收稿日期: 2022 年 11 月 3 日

出刊日期: 2022 年 12 月 8 日

引用本文: 张华, 分子诊断中基于 CRISPR/Cas 生物传感平台的应用[J]. 细胞与分子生物学研究, 2022, 2(1): 23-25.

DOI: 10.12208/j.ijcmbr.20220006

检索信息: RCCSE 权威核心学术期刊数据库、中国知网 (CNKI Scholar)、万方数据 (WANFANG DATA)、Google Scholar 等数据库收录期刊

版权声明: ©2022 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS