

CRISPR/Cas 系统在新型冠状病毒肺炎快速诊断中的应用

吴永彬¹, 李 凌²

(1. 广西壮族自治区南溪山医院检验科, 广西桂林 541002; 2. 南方医科大学基础医学院, 广州 510515)

摘要: 近年来, 基于规律成簇间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及其相关蛋白 (CRISPR-associated protein, Cas) 系统的新型分子诊断工具, 为病原体的诊断开辟了新的机遇。该文将关注现有和正在研究的 CRISPR/Cas 系统用于新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 快速诊断的潜在能力, 并重点探讨其在临床中的应用和面临的挑战。

关键词: 间隔的短回文重复序列及其相关蛋白系统; 新型冠状病毒; 新型冠状病毒肺炎; 快速诊断

中图分类号: R373.1; R446 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2022) 03-001-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2022.03.001

Application of CRISPR/Cas Systems in the Rapid Diagnosis of Coronavirus Disease 2019

WU Yong-bin¹, LI Ling² (1. Department of Laboratory Medicine, Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guangxi Guilin 541002, China; 2. School of Basic Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: In recent years, emerging molecular diagnostic tools based on clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated (CRISPR/Cas) systems have opened up new opportunities for pathogen diagnosis. This article will focus on the potential capabilities of the existing and under-research CRISPR/Cas systems for rapid diagnosis of the coronavirus disease 2019 (COVID-19), and discuss their clinical applications and challenges.

Keywords: CRISPR/Cas systems; SARS-CoV-2; COVID-19; rapid diagnosis

规律成簇间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及其相关蛋白 (CRISPR-associated protein, Cas) 相互协同, 构成原核生物中 CRISPR/Cas 自适应免疫系统的基础。近年来, 该系统被开发成为一种高效的分子诊断工具^[1-2], 并在感染性疾病的诊断领域取得重大突破^[3-6], 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, SARS-CoV-2) 及其变异株^[7-8] 引起的新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 作为一种新的传染病, 其导致的疫情仍在全球肆虐, 快速、便携、准确的诊断方法是及时发现病原体, 防止疫情扩散的重要手段。为此, 本文将关注现有和正在研究的 CRISPR/Cas 系统用于 COVID-19 快速诊断的潜在能力, 并重点探讨其在临床中的应用和面临的挑战, 以期为新代分子诊断技术的研究和 SARS-CoV-2 等病原体的检测提供借鉴和参考。

1 CRISPR/Cas 系统工作机制

1.1 CRISPR/Cas 系统简介 CRISPR/Cas 系统由四部分组成, 分别为 CRISPR 簇、前导序列、重复序列、以及一系列保守的 CRISPR 相关基因。最初发

现于原核生物的基因组中, 包括细菌和古细菌^[9], 随着 Cas 的发现和重组 DNA 技术的应用, 科学家又发现 CRISPR/Cas 系统还是原核生物防御系统对病毒的自适应免疫基础, 其通过俘获一段外源 DNA 序列, 找出其原间隔序列邻近基序 (proto-spacer adjacent motif, PAM), 表达并加工 CRISPR RNAs (crRNA), 当噬菌体二次感染时, crRNA 与 Cas 蛋白复合物相互作用, 形成一个具有特殊功能的复合物 crRNP (crRNA-Cas ribonucleoprotein), 靶向干扰入侵核酸的合成, 特异性地阻止噬菌体感染, 见图 1。近年来, 经过重新设计的 Cas 扩展了 CRISPR/Cas 系统的功能和应用, 也丰富了 CRISPR/Cas 系统的进化分类^[10], 即类别一 (包含 I, III 和 IV 型) 和类别二 (包含 II, V 和 VI 型)。CRISPR/Cas 系统常用的 Cas 蛋白为 II 型 (Cas9 等)、V 型 (Cas14, Cas12a, Cas12b 等) 和 VI 型 (Cas13a, Cas13b 等) 效应蛋白^[11-12]。其中 Cas12 和 Cas13 在 COVID-19 快速诊断中的应用越来越受到重视^[13-15], 包括近期 SARS-CoV-2 新变异株的诊断^[16-17]。

1.2 CRISPR/Cas12 系统工作机制 Cas12 具有 RNA 核糖核苷酸酶 (RNA ribonuclease, RNase) 和

基金项目: 广西临床重点专科建设项目 (202015)。

作者简介: 吴永彬 (1984-), 男, 硕士研究生, 副主任技师, 主要从事病原微生物的致病分子机制及其诊断方法的研究, E-mail: yongbinwu@163.com。

DNA 核糖核苷酸酶 (DNA ribonuclease, DNase) 活性,可激活独立的 crRNA 生物反应^[18],无需反式激活 crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA) 的协助。在 CRISPR/Cas12a 系统中, Cas12a (或称 Cpf1) 特异性地识别 DNA 靶标内的 5'-TTTV-3' PAM,使 crRNA 间隔区片段特异性地与靶标 DNA 碱基配对^[19],实现 DNA 双链切割,形成黏性末端,见图 1。基于该特性,CHEN 等^[20]人开发了一种新型的分子诊断工具,即 DNA 内切酶靶向的

CRISPR 反式报告系统 (DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter, DETECTR)。在该系统中, Cas12a 利用自身的核酶功能域对 crRNA 的表达阵列进行剪切,并与荧光淬灭法结合起来实现基因编辑。同时,通过重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA) 技术来提高检测系统的灵敏度,进一步提升了其整体检测优势和临床应用价值。

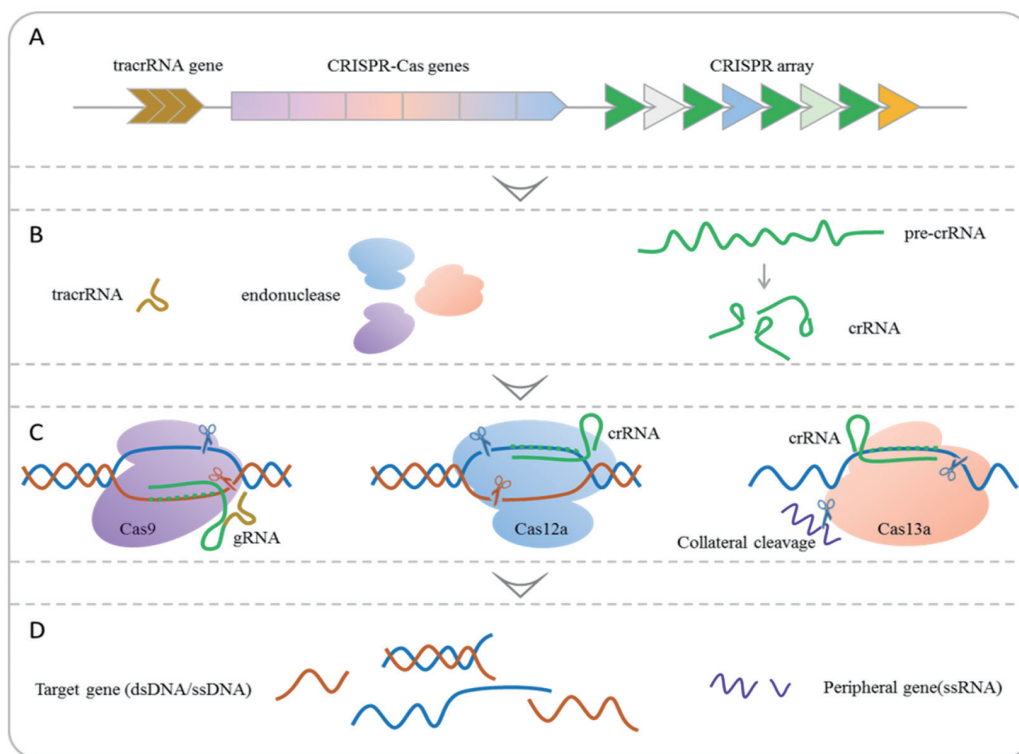


图1 CRISPR/Cas 系统工作机制

1.3 CRISPR/Cas13 系统工作机制 与其他 Cas 不同的是, Cas13a (或称 C2c2) 具有双重核酸酶特性^[21],一方面专一靶向 RNA 进行剪切靶序列,另一方面又非特异性地对附近的 RNA 片段进行无差别的“附带剪切”^[22]。其工作机制是:先募集由重复茎环结构和间隔序列构成的向导 RNA (guide RNA, gRNA) 片段,再由 gRNA-Cas13 复合物通过 RNA-RNA 配对识别靶 RNA 并切割靶向区域,此过程中 Cas13 需要前间隔序列侧翼位点 (protospacer-flanking site, PFS) 来协助锁定目标 RNA,见图 1。基于该特性,另一种新型的分子诊断工具,即特异性高灵敏度酶促解锁系统 (specific high-sensitivity enzymatic reporter unLOCKing, SHERLOCK) 由 MYHRVOLD 等^[4]人建立起来,其借助 RPA 恒温扩增技术对样本中核酸进行扩增,产物经 T7 核糖核酸聚合酶介导转录后再通过 Cas13a 工具进行检测。目前,该系统通过不断优化,引入辅助性

CRISPR 相关酶 Csm6, 已实现更高灵敏度的定量检测^[23]。

2 CRISPR/Cas 系统在 COVID-19 快速诊断中的应用

目前, COVID-19 的常见诊断分子技术主要有逆转录 PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)、恒温扩增 [如:重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA)、环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、重组酶介导扩增 (recombinase-aided amplification, RAA) 等]、微滴数字 PCR、微流控芯片等,基于 CRISPR/Cas 系统开发的快速诊断平台见表 1。与传统分子诊断技术比较,其具有以下几点优势:①快速,现有的技术平台均可在 1h 左右完成,快速综合核酸酶串联检测 (fast integrated nuclease detection in tandem, FIND-IT) 甚至可缩短至 20min 内完成。②便携,无需大型和专用的设备,如 FIND-IT,使用 CRISPR 酶 Cas13 和 Csm6 放

大荧光信号,而不用借助扩增仪来完成。③准确,以 SHERLOCKv2 技术为例,其灵敏度高达 10^{-21} 摩尔水平。④廉价,如 SHERLOCKv2 试纸只需几美元、DETECTR 单次检测成本不到一美元。⑤多通路,基于不同的 Cas 和酶的组合,CRISPR/Cas 系

统可实现多通路检测,如 Cas12a, Cas13 与 Csm6 的组合。上述特点充分展现了 CRISPR/Cas 系统在 COVID-19 快速诊断中的优势。其中,DETECTR 和 SHERLOCK,尽管他们仍处于初期研发阶段,但可能是临床应用最有潜力的两种技术平台^[24-26]。

表 1 基于 CRISPR/Cas 系统快速诊断 COVID-19 的主要技术平台

检测平台	Cas 酶	扩增方法	靶基因	检测时间 (min)	检测限 (拷贝 / μ l)	灵敏度 (%)	特异度 (%)	参考文献
CRISPR-COVID	Cas13a	RT-RPA	N/ORF1ab	40	不适用	100	100	[27]
CREST	Cas13a	RT-PCR	N	30 ~ 50	10	100	110	[28]
SHERLOCK	Cas13a	RT-RPA	S/ORF1ab	70	2.1	96	100	[29]
CONAN	Cas3	RT-LAMP	N	40	<100	90	95	[30]
SHINE	Cas13a	RT-RPA	ORF1ab	50	10	90	100	[31]
DETECTR	Cas12a	RT-LAMP	N/E	45	10	95	100	[32]
ITP-CRISPR	Cas12a	RT-LAMP	N/E	25	10	75	100	[33]
STOPCovid	Cas12b	RT-LAMP	N	< 60	2	91.7	100	[34]
CRISPR/Cas12a-NER	Cas12a	RT-RAA	E	45	10	100	100	[35]
CRISPR-FDS	Cas12a	RT-PCR/RT-RPA	N/ORF1ab	50	2	100	71.4	[36]
FIND-IT	Cas13, Csm6	无需扩增	N	20	30	95	100	[37]

2.1 DETECTR 快速诊断 COVID-19 DETECTR 平台已用于实验室和临床环境中的大量病毒的诊断。基于等温扩增与 CRISPR/Cas12 系统相结合的 DETECTR 技术可特异性地检测 SARS-CoV-2 的 N 基因和 E 基因,且在 30min 左右获得结果^[38-39],这节省了基于 Cas13a 检测所需的体外转录步骤花费的时间^[40]。而且 DETECTR 可以同时使用不同的 gRNA 来避免由于 N 基因突变引起的假阴性结果^[40]。此外,相较于其他人源性冠状病毒,DETECTR 检测 SARS-CoV-2 的特异度可达 100%^[39]。因此,无需特殊设备的 DETECTR 技术可作为 RT-PCR 技术的有效补充^[41]。

2.2 SHERLOCK 快速诊断 COVID-19 SHERLOCK 是最早基于 CRISPR/Cas 系统应用于 COVID-19 快速诊断的技术平台^[42-43],并得到不断的优化和升级^[44]。在 crRNA 的引导下,Cas13 识别并结合 SARS-CoV-2 两个靶基因 S 和 ORF1ab,同时激发了 Cas13 对周围 ssRNA 分子的“附带剪切”,系统将淬灭荧光的 ssRNA 报告基团添加到反应中,当激活的 Cas13 切割 RNA 后,收集检测信号以示目标核酸的存在。同时,通过 RPA 或 RT-RPA 扩增目标 DNA 或 RNA,再与 T7 转录相结合,将扩增后的 DNA 转化为 RNA,以利于后续的 Cas13 检测,最终使其检测灵敏度可及 10^{-18} 摩尔水平,特异度更是达到单碱基错配,且在不到 1h 内无需特殊设备条件下完成检测。

2.3 FIND-IT 快速诊断 COVID-19 基于 CRISPR/Cas 系统快速诊断 COVID-19 的主要技术平台几乎都是建立在基因扩增的基础上设计,见表 1 归纳的

前 10 种技术平台。根据最新研究,LIU 等^[37]人开发了一种不依赖于恒温扩增技术的 FIND-IT 技术,即通过 RNA 引导的 Cas13 和 Csm6 与化学稳定激活剂相结合,可以使用紧凑型探测器检测从呼吸道拭子样本中提取的 SARS-CoV-2,并在 20min 内实现对每微升 RNA 标本约 30 个拷贝进行稳定检测的能力^[37]。该方法特别适合于标准实验室之外的场地开展,如临床床旁和资源有限的偏远地区。

3 CRISPR/Cas 系统在 COVID-19 快速诊断中的局限

新兴的基于 CRISPR/Cas 系统的诊断工具在 SARS-CoV-2 等病原体的检测中也存在一些局限:

- ① CRISPR/Cas 系统自身在病原体检测优势还未充分体现:(a)需借助其他分子诊断技术辅助进行,(b)需利用多个不同的 Cas 实现多重病原体检测,(c)需结合预扩增环节提高检测灵敏度;
- ② CRISPR/Cas 系统在对 RNA 靶标进行编辑时存在易脱靶情况;
- ③ CRISPR/Cas 系统在真核细胞中进行有效的 ssRNA 切割时可能存在毒性;
- ④ CRISPR/Cas12 系统存在较低的基因组覆盖率和较低的靶向效率等缺点^[45-47];
- ⑤ CRISPR/Cas13 系统在多步核酸扩增环节中存在可能影响精确定量的缺陷。其中,针对常见的脱靶效应带来的问题,目前解决策略主要是从预测脱靶位点,优化 sgRNA 设计及修饰 Cas 蛋白结构等途径入手^[48]。

4 总结与展望

CRISPR/Cas 技术革新了分子诊断领域的研究模式,尤其是在感染性疾病的诊断上具有广阔的应用前景。本文重点论述了其在 COVID-19 快速诊断中的潜在应用,尽管诸如 DETECTR 和 SHERLOCK

等技术尚未完全实现商业化,但CRISPR/Cas系统的精确度和易操作程度目前在其他分子诊断工具中是无法实现的。现有的COVID-19诊断技术仍由数十年前的RT-PCR技术所主导,其昂贵的专用设备和严苛的实验环境限制了其在体外诊断的施展空间,尤其是近期出现的SARS-CoV-2新型突变体,给全球持续紧张的疫情防控带来了新的挑战。目前,相同的突变体已在不同国家独立出现^[49],新的突变位点可能会增加SARS-CoV-2的传染性,甚至对现有的治疗和疫苗接种人群构成重大威胁^[50-51]。从长远而言,开发高效的且同时覆盖病原体多个靶基因位点的新型分子诊断工具更具临床价值。另外,鉴于CRISPR/Cas系统本身的局限性,可以预见的是,未来的CRISPR/Cas技术平台仍离不开其他技术的支持,除前述的各类PCR,恒温扩增外,后期还会有更多的新兴材料与技术加入到CRISPR/Cas系统中,开发出更为实用和智能的诊断工具,这将为COVID-19等感染性疾病的快速诊断带来新的希望和契机。

参考文献:

- [1] CHARPENTIER E, ELSHOLZ A, MARCHFELDER A. CRISPR-Cas: more than ten years and still full of mysteries[J]. RNA Biology, 2019, 16(4): 377-379.
- [2] SAHEL D K, MITTAL A, CHITKARA D. CRISPR/Cas system for genome editing: progress and prospects as a therapeutic tool[J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019, 370(3): 725-735.
- [3] KOSTYUSHEVA A, BREZGIN S, BABIN Y, et al. CRISPR-Cas systems for diagnosing infectious diseases[J]. Methods, 2021, 9: S1046-2023(21)00099-2.
- [4] MYHRVOLD C, FREIJE C A, GOOTENBERG J S, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. Science, 2018, 360(6387): 444-448.
- [5] LEUNG D W. Mechanisms of non-segmented negative sense RNA viral antagonism of host RIG-I-like receptors[J]. Journal of Molecular Biology, 2019, 431(21): 4281-4289.
- [6] HAN J, PEREZ J T, CHEN C, et al. Genome-wide CRISPR/Cas9 screen identifies host factors essential for influenza virus replication[J]. Cell Reports, 2018, 23(2): 596-607.
- [7] SANCHE S, LIN YT, XU Chonggang, et al. High contagiousness and rapid spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2[J]. Emerging Infectious Diseases, 2020, 26(7): 1470-1477.
- [8] HE Changsheng, LIN Cailing, MO Guosheng, et al. Rapid and accurate detection of SARS-CoV-2 mutations using a Cas12a-based sensing platform [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2022, 198: 113857.
- [9] SAFARI F, ZARE K, NEGAHDARIPOUR M, et al. CRISPR Cpf1 proteins: structure, function and implications for genome editing[J]. Cell & Bioscience, 2019, 9: 36.
- [10] MAKAROVA K S, WOLF Y I, IRANZO J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18(2): 67-83.
- [11] CAI Yupeng, CHEN Li, SUN Shi, et al. CRISPR/Cas9-mediated deletion of large genomic fragments in soybean[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(12): 3835.
- [12] ZAYNAB M, CHEN Huirong, CHEN Yufei, et al. Signs of biofilm formation in the genome of *Labrenzia* sp. PO1[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021, 28(3): 1900-1912.
- [13] BHARATHKUMAR N, SUNIL A, MEERA P, et al. CRISPR/Cas-Based modifications for therapeutic applications: a review[J]. Molecular Biotechnology, 2022, 64(4): 355-372.
- [14] SHARMA A, BALDA S, APREJA M, et al. COVID-19 diagnosis: current and future techniques[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 193(Pt B): 1835-1844.
- [15] NEJAD Z, FATEMI F, RANAEI SIADAT S E. An outlook on coronavirus disease 2019 detection methods[J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2021. doi: 10.1016/j.jpha.2021.11.003. Epub ahead of print. PMID: 34777894; PMCID: PMC8578030.
- [16] LIANG Yuanbao, LIN Hongqing, ZOU Lirong, et al. CRISPR-Cas12a-Based detection for the major SARS-CoV-2 variants of concern[J]. Microbiology Spectrum, 2021, 9(3): e0101721.
- [17] ARIZTI-SANZ J, BRADLEY A D, ZHANG Yibin, et al. Equipment-free detection of SARS-CoV-2 and variants of concern using Cas13[J]. medRxiv, 2021. doi: 10.1101/2021.11.01.21265764. PMID: 34751276; PMCID: PMC8575147.
- [18] LI Tianwen, ZHU Linwen, XIAO Bingxiu, et al. CRISPR-Cpf1-mediated genome editing and gene regulation in human cells[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(1): 21-27.
- [19] WANG Jingyi, ZHANG Chenzi, FENG Bo. The rapidly advancing Class 2 CRISPR-Cas technologies: A customizable toolbox for molecular manipulations[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020, 24(6): 3256-3270.
- [20] 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.
- [21] COX D B T, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13[J]. Science (New York, N.Y.), 2017, 358(6366): 1019-1027.
- [22] AMAN R, MAHAS A, MAHFOUZ M. Nucleic acid detection using CRISPR/Cas biosensing technologies[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(6): 1226-1233.
- [23] KAZLAUSKIENE M, KOSTIUK G, VENCLOVAS Č, et al. A cyclic oligonucleotide signaling pathway in type III CRISPR-Cas systems[J]. Science, 2017, 357(6351): 605-609.

- [24] MUSTAFA M I, MAKHAWI A M. SHERLOCK and DETECTR: CRISPR-Cas systems as potential rapid diagnostic tools for emerging infectious diseases[J]. J Clin Microbiol, 2021, 59(3): e00745-20.
- [25] KIM S, JI S, KOH H R. CRISPR as a diagnostic tool[J]. Biomolecules, 2021, 11(8): 1162.
- [26] DARA M, TALEBZADEH M. CRISPR/Cas as a potential diagnosis technique for COVID-19[J]. Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 2020, 12(3): 201-202.
- [27] HOU Tiejing, ZENG Weiqi, YANG Minling, et al. Development and evaluation of a rapid CRISPR-based diagnostic for COVID-19[J]. PLoS Pathogens, 2020, 16(8): e1008705.
- [28] RAUCH J N, VALOIS E, SOLLEY S C, et al. A scalable, easy-to-Deploy protocol for Cas13-based detection of SARS-CoV-2 genetic material[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2021, 59(4): e02402-20.
- [29] PATCHSUNG M, JANTARUG K, PATTAMA A, et al. Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA[J]. Nature Biomedical Engineering, 2020, 4(12): 1140-1149.
- [30] YOSHIMI K, TAKESHITA K, YAMAYOSHI S, et al. Rapid and accurate detection of novel coronavirus SARS-CoV-2 using CRISPR-Cas3[J]. SSRN Electronic Journal, 2020. doi:10.2139/ssrn.3640844.
- [31] ARIZTI-SANZ J, FREIJE C A, STANTON A C, et al. Streamlined inactivation, amplification, and Cas13-based detection of SARS-CoV-2[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 5921.
- [32] BROUGHTON J P, DENG Xianding, YU Guixia, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(7): 870-874.
- [33] RAMACHANDRAN A, HUYKE D A, SHARMA E, et al. Electric field-driven microfluidics for rapid CRISPR-based diagnostics and its application to detection of SARS-CoV-2[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(47): 29518-29525.
- [34] JOUNG J, LADHA A, SAITO M, et al. Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics[J]. medRxiv [Preprint], 2020. doi: 10.1101/2020.05.04.20091231. PMID: 32511521; PMCID: PMC7273289.
- [35] WANG Xinjie, ZHONG Mingtian, LIU Yong, et al. Rapid and sensitive detection of COVID-19 using CRISPR/Cas12a-based detection with naked eye readout, CRISPR/Cas12a-NER[J]. Science Bulletin (Beijing), 2020, 65(17): 1436-1439.
- [36] HUANG Zhen, TIAN Di, LIU Yang, et al. Ultra-sensitive and high-throughput CRISPR-powered COVID-19 diagnosis[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2020, 164: 112316.
- [37] LIU T Y, KNOTT G J, SMOCK D C J, et al. Accelerated RNA detection using tandem CRISPR nucleases[J]. medRxiv, 2021, 17(9): 982-988.
- [38] BROUGHTON J P, DENG Xianding, YU Guixia, et al. Rapid detection of 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2 using a CRISPR-based DETECTR lateral flow assay[J]. medRxiv [Preprint], 2020. doi: 10.1101/2020.03.06.20032334.
- [39] BRANDSMA E, VERHAGEN H J M P, VAN DE LAAR T J W, et al. Rapid, sensitive, and specific severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 detection: a multicenter comparison between standard quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction and CRISPR-Based DETECTR[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2021, 223(2): 206-213.
- [40] METSKY H C, FREIJE C A, KOSKOTHORODSEN T S F, et al. CRISPR-based COVID-19 surveillance using a genomically-comprehensive machine learning approach[J]. bioRxiv, 2020. DOI:10.1101/2020.02.26.967026.
- [41] UPPADA V, GOKARA M, RASINENI G K. Diagnosis and therapy with CRISPR advanced CRISPR based tools for point of care diagnostics and early therapies[J]. Gene, 2018, 656: 22-29.
- [42] ZHANG Feng, ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S. A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics[EB/OL]. submitted, 2020. [https://www.broadinstitute.org/files/publications/special/COVID-19%20detection%20\(updated\).pdf](https://www.broadinstitute.org/files/publications/special/COVID-19%20detection%20(updated).pdf).
- [43] U S Food & Drug Administration (FDA). EUA200466: Sherlock CRISPR SARS-CoV-2 Kit[EB/OL]. Sherlock BioSciences, Inc, 2020. <https://www.fda.gov/media/137747/download>.
- [44] JOUNG Julia, LADHA A, SAITO M, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing[J]. The New England Journal of Medicine, 2020, 383(15): 1492-1494.
- [45] COFSKY J C, KARANDUR D, HUANG C J, et al. CRISPR-Cas12a exploits R-loop asymmetry to form double-strand breaks[J]. eLife, 2020, 9: e55143.
- [46] MURUGAN K, SEETHARAM A S, SEVERIN A J, et al. CRISPR-Cas12a has widespread off-target and dsDNA-nicking effects[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(17): 5538-5553.
- [47] SHI Yuyan, FU Xiaoyi, YIN Yao, et al. CRISPR-Cas12a system for biosensing and gene regulation[J]. Chemistry Asian Journal, 2021, 16(8): 857-867.
- [48] XIE Haihua, GE Xianglian, YANG Fayu, et al. High-fidelity SaCas9 identified by directional screening in human cells[J]. PLoS Biology, 2020, 18(7): e3000747.
- [49] KUPFERSCHMIDT K. Fast-spreading U.K. virus variant raises alarms[J]. Science (New York, N.Y.), 2021, 371(6524): 9-10.
- [50] LI Qianqian, WU Jiajing, NIE Jianhui, et al. The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity[J]. Cell, 2020, 182(5): 1284-1294, e9.
- [51] YURKOVETSKIY L, WANG Xue, PASCAL K E, et al. Structural and functional analysis of the D614G SARS-CoV-2 spike protein variant[J]. Cell, 2020, 183(3): 739-751, e8.

收稿日期: 2021-12-02

修回日期: 2022-02-18