

CRISPR-Cas13a 系统在病原体检测应用中的最新研究进展

李青松¹, 赵聪平¹, 刘 静¹, 杨 均², 燕思羽¹, 张银河³ (1. 西南医科大学公共卫生学院, 四川泸州 646000; 2. 泸州市人民医院, 四川泸州 646000; 3. 太极集团重庆涪陵制药厂有限责任公司, 重庆 408000)

摘要: 规律成簇的间隔短回文重复序列及相关蛋白 (CRISPR-Cas) 系统已作为近年来兴起的新一代分子诊断工具, 被广泛应用于基因编辑、核酸检测等领域, 其中 Cas13a 亚型因其在核酸检测中高特异度、高灵敏度、无需昂贵设备、操作简单、费用低廉等特点, 在病原体检测领域展现出巨大的潜力。该文综述了 CRISPR-Cas13a 的作用机制、在病原体检测中的应用以及相关检测方法, 并对 Cas13a 应用前景进行了展望。以期为 CRISPR-Cas13a 系统的进一步研究及其在病原体检测中的应用提供借鉴和参考。

关键词: 规律成簇的间隔短回文重复序列及相关蛋白 13a 系统; 病原体; 核酸检测

中图分类号: R446; **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2024) 03-199-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2024.03.034

Recent Advances in the Application of CRISPR-Cas13a Systems in Pathogen Detection

LI Qingsong¹, ZHAO Congping¹, LIU Jing¹, YANG Jun², YAN Siyu¹, ZHANG Yinhe³ (1. School of Public Health, Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China; 2. Luzhou People's Hospital, Sichuan Luzhou 646000, China; 3. Taiji Group Chongqing Fuling Pharmaceutical Co. Ltd., Chongqing 408000, China)

Abstract: As a new generation of molecular diagnostic tools emerged in recent years, the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated (CRISPR-Cas) systems have been widely used in gene editing, nucleic acid detection, and other fields. Due to its high specificity, high sensitivity, without expensive equipment, simple operation, and inexpensive characteristics in nucleic acid detection, the Cas13a subtype has shown great potential in the field of pathogen detection. This article reviews the mechanism of action of CRISPR-Cas13a, its application in pathogen detection, and related detection methods, and looks forward to the application prospects of Cas13a. To facilitate future investigations on the CRISPR-Cas13a systems and their potential in pathogen detection, this study aims to offer inspiration and serve as a valuable reference.

Keywords: clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 13a systems; pathogen; nucleic acid detection

病原体引发的疾病对现有公共卫生系统造成巨大冲击, 有效遏制病原体传播需要快速、灵敏、特异的检测方法。因此不受设备和技术制约的现场快速核酸检测技术将成为核酸检测的发展新方向。规律成簇的间隔短回文重复序列及相关蛋白 [clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) - CRISPR associated proteins, CRISPR-Cas] 系统是广泛存在于细菌及古细菌中的抵御外源核酸入侵的获得性免疫系统^[1]。2012年, JINEK 等^[2]通过实验得出 Cas9 可以靶向切割任意双股脱氧核糖核酸 (double-stranded deoxyribonucleic acid, dsDNA) 序列, 以达到基因编辑的目的。2019年, 张锋团队将 CRISPR-Cas 系统与重组酶聚合酶扩增 (Recombinase Polymerase Amplification, RPA) 技术联用, 创建了名为 SHERLOCK 的核酸

检测平台^[3]。将 CRISPR-Cas 系统运用于核酸检测领域, 具有快速、操作简单、成本低廉、灵敏度高、特异度好等特点。本文将主要介绍 CRISPR-Cas13a 在病原体检测方面的应用, 以期为研发更高效的病原体检测工具提供理论支持。

1 CRISPR-Cas13a 系统概述

1.1 CRISPR-Cas 系统分类 CRISPR-Cas 系统是源自细菌的一种适应性免疫系统, 在外源 DNA 或病毒入侵时, 可以通过 CRISPR RNA (crRNA) 引导 Cas 核酸酶特异切割外源核酸序列来保护细菌^[4]。CRISPR-Cas 系统可分为两大类、6 个类型和 33 个亚型。其中, 第二大类自 2015 年发现后, 被广泛应用于基因编辑、核酸检测等领域。第二大类包括 II, V, VI 型及 17 个亚型, 通过单个、大的多结构域的 Cas 核酸酶发挥作用^[5-6]。其中, II 类的

基金项目: 西南医科大学应用基础项目 (NO. 2021ZKQN002)。

作者简介: 李青松 (2001-), 男, 本科在读, 主要研究方向: 病原体检测, E-mail: 17380784728@163.com。

通讯作者: 刘静, 博士, 讲师, 主要从事荧光传感检测的研究, E-mail: liujing.1583@163.com。

Cas9 因其高特异度、高效性、易操作和低成本等优点,成为国内外研究者青睐的新型基因定点编辑技术^[7]。V型主要由 Cas12a, Cas12b 和 Cas14 组成,它们都具有 DNA 酶活性^[8]。Cas12a 可以有效地识别特定核酸靶标的存在和序列的微小变化,对于核酸识别和病原体检测尤为重要^[9]。Cas13a, Cas13b 属于 VI 型,只能特异切割靶标 RNA 序列。Cas13a 在特异性切割靶标单链 RNA (ssRNA) 时,会激活它的附属切割活性,切割非特异性 ssRNA^[10]。基于这个特点,研究人员将 Cas13a 和发光 RNA 适配体结合,实现了无逆转录、无核酸扩增、无标记的 RNA 分析,从而快速检测病原菌,实验表明,该方法能够检测低至 10 CFU 的蜡样芽胞杆菌^[11],具有操作简单、检测速度快、特异度好、灵敏度高特点并逐渐成为新一代病原体检测的有力工具,通过与其他方法相结合,优势互补,从而优化检测体系,提高检测性能,使之适于临床使用^[10-12]。

1.2 CRISPR-Cas13a 系统的作用机制 CRISPR-Cas13a 发挥其切割能力主要依赖于 Cas13a 蛋白上的 Helical-1 结构域、HEPN 结构域以及相关转录产物 CRISPR RNA (crRNA)。其中, Helical-1 结构域主要在切割 crRNA 前体时发挥作用, HEPN 结构域则主要负责切割靶 RNA, crRNA 负责整个系统的靶向特异性^[13-14]。Cas13a 在细菌体内的防御机制主要分为四个阶段: ①获取外源核酸序列; ②表达加工 crRNA; ③激活 HEPN-RNase 活性; ④酶特异切割。见图 1。外源核酸序列获取后,被整合到 CRISPR 阵列形成新的间隔^[15],再由 CRISPR 基因座转录生成前体 crRNA,并通过 Cas13 蛋白催化生产 crRNA^[16]。而 crRNA 通过与靶标 ssRNA 结合,激活 Cas13 蛋白 HEPN-RNase 活性,进而特异性切割靶标 ssRNA,并对其他 ssRNA 进行附属切割^[13]。研究人员利用该机制将 Cas13a 应用于基因编辑、核酸检测等方面。

1.3 CRISPR-Cas13a 系统检测优势 Cas13a 及其同源蛋白在靶标被 CRISPR-Cas13a 识别之后,可以启动其对外源 ssRNA 的反式切割,将信号探针集成在外源 ssRNA 上,可有效简化生物传感系统的设计^[14,17]。研究表明,与传统的 PCR 方法相比,基于 CRISPR 的 SHERLOCK, DETECTR 和 FELUDA 技术能在 1h 内检测 SARS-CoV-2 RNA 基因组,具有 100% 的准确度、特异度和灵敏度^[18]。ZHANG 等^[19]基于此设计了一种新的核酸检测方法,通过切割 FQ 探针,使免疫层析条上无法检测到被破坏的探针,无需复杂的操作和昂贵的设备即可在 1h 得出结果,具有良好的敏感度和特异度。相比于传统聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction,

PCR) 技术, Cas13a 具有简单、无污染的优点,是偏远地区核酸检测工作的有力工具。WANG 等^[20]设计的 Cas13a 级联放大测定方法,利用 Cas13a 直接识别靶标 RNA 并且启动转录扩增以产生用于输出荧光信号的发光 RNA 适配体,应用于病毒检测,检测限为 0.216 fmol/L。Cas13a 在成为 PCR 技术的有效补充的同时,也为病原体检测提供新思路。

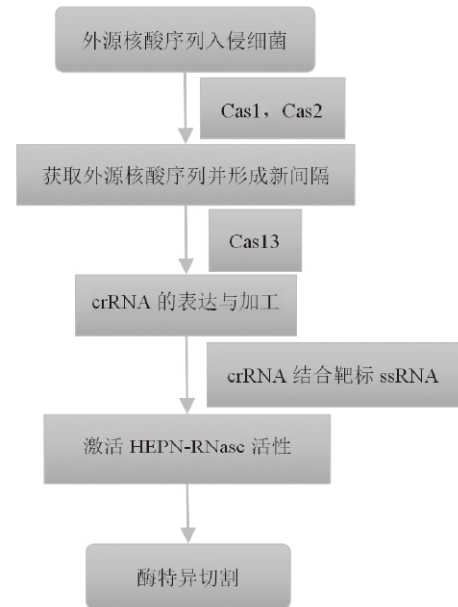


图1 CRISPR-Cas13a 系统的分子防御机制

2 CRISPR-Cas13a 系统与多种技术联合应用

虽然 Cas13a 技术具有简单、迅速、特异度好、灵敏度高特点,但在实际检测中,被检测样品浓度过低会导致结果不准确。因此,研究人员将 Cas13a 与其他技术联用,来提高其检测效能。

2.1 与 PCR 技术联用 PCR 技术自发明以来,广泛应用于体外无限制核酸扩增^[21-22]。GAO 等^[23]建立了一种基于 PCR 和 Cas13a 的沙门氏菌检测方法 (PCF 检测),检测限达 100 CFU/ml,为检测沙门氏菌提供了一种新策略,可推广应用在其他微生物检测中。于佳佳等^[24]人建立了一种 PCR 联合 Cas13a 检测结核分枝杆菌的方法,最低检测限为 10^1 copies/ μ l,具有敏感度及特异度高、稳定性好、成本低等特点。WANG 等^[25]人将 PCR 与 Cas13a 结合,应用于幽门螺杆菌检测,在 PCR 扩增后 2min 内即可筛选最低限为 2.30 copies/ μ l 的幽门螺杆菌,相比传统检测方法有更低的检测限^[26]。任锋团队发明了基于 RCA-PCR-CRISPR-Cas13a 检测乙型肝炎病毒 (Hepatitis B, HBV) cccDNA 的试剂盒,实现了可视化检测 HBV cccDNA,有较高的临床应用价值^[27]。WANG 等^[28]人将 PCR-Cas13a 应用于 HBV 检测中,在 HBV 感染的早期检测、耐药性检测、临床用药指导方面前景广阔。

2.2 与 RPA 技术联用 RPA 技术是近年来开发的核酸扩增技术,具有操作简单、对设备和资源要求低、出结果迅速且保证灵敏和特异的特点,是一种有前景的核酸检测等温扩增方法。2017 年,研究人员基于 Cas13a 附属切割特点建立了 SHERLOCK 平台,对病毒核酸实现了低至 amol (10~18mol/L) 浓度的目标分子识别,且 SHERLOCK 试剂可以冻干储存,可用于现场快速检测^[29]。2018 年,GOOTENBER 等^[30]在 SHERLOCK 方法基础上进行改进,开发了 SHERLOCKv2 平台,通过将 Cas13 与辅助 CRISPR 相关酶 Csm6 结合,信号敏感度增加 3.5 倍,兼顾经济效益和检测效率,为基础设施欠发达地区的病原体检测提供了新的技术手段。同年,MYHRVOLD 等^[31]开发了与 SHERLOCK 配对的 HUDSON 方案,通过加热未提取的诊断样本以消除核酸酶,使患者在 2h 内无需仪器即可直接检测登革病毒。2022 年,TIAN 团队构建了基于 Cas12a/Cas13a 和 RPA 技术的便携式双基因检测平台,用于在资源有限的环境中提供精确的传染病筛查^[32]。CUI 等^[33]人提出将 RPA 技术与 Cas13a 联用,构建了名为 PADLOCK-CRISPR 的分析模型,为超灵敏和精确的核酸定量奠定基础。HU 等^[34]人开发了一种基于一歩法 CRISPR-Cas13a 的视觉生物传感器,相比传统检测技术,具有耗时短、成本低的优点,被期以在疫情暴发时用于资源有限地区的新冠筛查。因此,Cas13a 具有成为新一代经济且高效能生物传感器的潜力。

2.3 与其他技术联用 Cas13a 还可以与电化学检测等技术联用。WANG 等^[35]人设计了一种用于登革病毒敏感电化学检测的信号放大方法,通过 Cas13a 切割并释放阻断剂产生电信号,该方法的线性检测范围为 5 fmol~50 nmol,检测限为 0.78 fmol,表明 Cas13a 在疾病早期检测中有应用潜力。符汪洋团队发明了一种基于 Cas13a 反式切割和石墨烯场效应晶体管 (graphene field effect transistor, GFET) 放大的核酸检测方法,用于快速检测修饰在 GFET 上的 ssRNA,可实现对多种病毒核酸的快速响应^[36]。ORTIZ-CARTAGENA 等^[37]开发了一种逆转录环介导等温扩增 (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP) - CRISPR-Cas13a 方法,在鼻咽拭子样本中检测 SARS-CoV-2 病毒,显示出 100% 的特异度和 83% 的敏感度。2020 年,研究人员开发出了用于多重核酸检测的组合阵列反应 (CARMEN) 平台与 Cas13 的检测组合 (CARMEN-Cas13),能在单个阵列上对 4 500 多个 crRNA 靶标进行稳定检测,目前该平台可以同时区分 169 种人类相关病毒,还可以检测

SARS-CoV-2。同时,CARMEN-Cas13 进一步对甲型流感毒株进行区分,并且鉴定了数十种 HIV 的耐药性突变^[38]。随着研究的深入,CRISPR 展示出强大的核酸检测能力,有望成为阻断传染病流行的重要检测工具。

3 CRISPR-Cas13a 系统在病原体检测中的应用

3.1 病毒检测 病毒引发的疾病对人类健康和经济产生了巨大影响。核酸检测是确诊病毒引发疾病的金标准,荧光定量 PCR 是目前最常用的病毒核酸检测方法^[39]。核酸检测对于样品保存、核酸提取的实验条件、操作人员的熟练程度以及操作环境等都有较高要求,给大面积早期筛查和诊断带来一定困难^[40]。分子诊断和检测患者感染病毒后体内产生的抗原或抗体的免疫诊断技术是常用的诊断方法。以胶体金法为主的抗原检测方法,出结果迅速,操作简单,但是此方法敏感度较低,易出现假阴性。因此,更高效、便捷的基于 CRISPR 的平台是检测病毒的一种合理新方法。HE 等^[41]将 Cas13a 与 RPA 和 T7 转录结合,开发了针对鸭坦布苏病毒的检测系统,在临床实验验证中,性能与 RT-qPCR 相当,具有可靠、简单、特异、敏感等优点,对于养殖业有可观的经济效益。Cas13a 还被用于检测猪流行腹泻病毒、猪繁殖和呼吸障碍综合症病毒,成为了养殖业的有力检测工具^[42-43]。面对传统的传染病,Cas13a 也有独特的优势,在非洲国家,简陋的基础设施是导致埃博拉流行的重要因素。QIN 等^[44]研发了一种用于检测埃博拉 RNA 的自动化 POC 系统,其纯化埃博拉病毒 RNA 检测限达到 20 pfu/ml,能实现快速现场检测,未来埃博拉监测将变得更加迅速。在中国,乙肝病毒感染是导致肝硬化甚至肝癌的主要因素,如果患者未检测到低水平的乙型肝炎病毒 (HBV) DNA,可能会导致乙肝复发及耐药性突变等问题。ZHANG 等^[45]开发了基于 Cas13a 的检测 HBV cccDNA 的方法,灵敏、高效,可检出 1 copy/ μ l 的 HBV cccDNA,为 HBV 感染的检测、治疗及疗效评价提供了更多样的选择。

3.2 细菌检测 细菌感染在人类疾病史上占很大比重,如目前仍流行的肺结核依旧对人类健康产生了巨大威胁^[46]。近年来细菌污染导致的食品卫生以及细菌的耐药性突变问题,对检测方法提出了新的要求。ZHOU 等^[47]开发了一种名为 CCB 检测 (CRISPR-Cas13a based bacterial detection) 的细菌传感模型,并用金黄色葡萄球菌进行实验验证,证明该模型性能与传统的基于培养的计数方法相当,但测定时间短、灵敏度高,可推广用于其他细菌检测。在 Cas13a 优异的附属切割能力基础上,SHEN 等^[48]提出了一种名为 APC-Cas 的检测系统,用于

在不分离的情况下检测低浓度沙门氏菌,检出率达到 $1\sim 10^5$ CFU,为控制沙门氏菌传播提供了新方法。而ZHANG Ting团队构建的一种发光RNA适配体信号CRISPR-Cas13a测定法,可以准确区分活细菌,用于检测蜡样芽孢杆菌检测限可达10 CFU,可以更准确地估计其对食物产生的破坏程度^[41]。在检测致病性李斯特菌方面,XIANG等^[49]在高通量微流体芯片上开发的基于重组酶介导等温核酸扩增技术(Recombinase Aided Amplification, RAA)和CRISPR的一步检测方法,一次检测八个样本的同时,每个指标的检测限可达到aM水平。安柏霖团队提出的RAA-Cas13a检验方法,利用RAA技术扩增样本核酸,同时进行CRISPR-Cas13a恒温荧光检测,对志贺氏菌、霍乱弧菌、肠出血性大肠埃希菌O157:H7的最低检测限为10 copies/ μ l,灵敏度高、特异度强^[50]。Cas13a在细菌检测方面展示了巨大潜力的同时,其高特异度也为控制细菌耐药问题提供了新方向。

3.3 其他病原微生物检测 Cas13a也可以检测衣原体和原虫等微生物。通过利用Cas13a的附属切割功能切割RNA荧光探针释放荧光信号,HUANG等^[51]建立了一种筛查沙眼衣原体的检测方法,其灵敏度为10 fmol,为社区医院和其他机构筛查眼衣原体提供了技术支持。CHEN等^[52]发明了一种基于PCR-CRISPR-Cas13a的梅毒螺旋体检测方法,在临床实验中有93.3%的敏感度和100%的特异度,在梅毒的诊断以及流行病学监测中具有应用潜力。ZHAO等^[53]开发了一种使用RAA和横向流动试纸条(LFD)结合Cas13a的检测技术来检测弓形虫,最低检测限为 1×10^{-6} ng/ml,优于qPCR检测,可实现对弓形虫快速、灵敏、特异、可视化的现场检测。近年,ZHAN等^[54]建立了基于Cas13a检测耶氏肺孢子虫的方法,在临床实验中,对耶氏肺孢子虫的最低检测限为2 copies/ μ l,有78.9%的敏感度和97.7%的特异度。在发展中国家,寄生虫感染仍是不容小觑的公共卫生问题,Cas13a在寄生虫、螺旋体等微生物检测中拥有很大发展空间。

4 展望

本文对CRISPR-Cas13a的应用进行综述,Cas13a的灵敏度高、特异度好、操作简单、成本低廉并且可以实现快速检测,有望成为具有较高应用开发价值的核酸检测工具。新冠病毒肺炎暴发让全世界对传染病有了更深的认识,产生了对更快速、精确的检测病原体方法的需求。CRISPR-Cas13a具有可编程性,更改crRNA的间隔序列,可以针对多种靶标核酸序列设计对应的CRISPR-Cas13a识别探针。笔者认为,今后可通过CRISPR-Cas13a的可编程

性并结合其它技术联用,如在RPA体系中加入逆转录酶,通过CRISPR-Cas13a结合RT-RPA多级放大方法实现对靶标的高灵敏高选择性识别,利于RNA病毒核酸检验,有望打造成适合多种病原体快速检测筛查的通用型平台。Cas13a的实验室研究证明其具有成为新型核酸检测工具的能力,但该方法缺乏大量临床标本的验证,如何将该方法应用于更多的病原体检测中,仍需研究人员进一步努力。相信随着研究的不断深入以及与其他学科的深度融合,CRISPR-Cas13a必将成为新一代的核酸检测工具,弥补PCR技术的不足,在医疗、食品卫生、水环境卫生等领域发挥重要作用。

参考文献:

- [1] ISHINO Y, KRUPOVIC M, FORTERRE P. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology[J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(7): e00580-17.
- [2] 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.
- [3] KELLNER M J, KOOB J G, GOOTENBERG J S, et al. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases[J]. *Nature Protocols*, 2019, 14(10): 2986-3012.
- [4] WIEDENHEFT B, STERNBERG S H, DOUDNA J A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 331-338.
- [5] 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.
- [6] MAKAROVA K S, ZHANG Feng, KOONIN E V. SnapShot: class 2 CRISPR-Cas systems[J]. *Cell*, 2017, 168(1/2): 328.e1.
- [7] 冯江浩,魏思昂,闫丽欢,等. CRISPR/Cas9 基因编辑技术及应用研究概述[J]. *动物医学进展*, 2021, 42(3): 123-126.
FENG Jianghao, WEI Siang, YAN Lihuan, et al. Progress on gene editing technology and application of CRISPR/Cas9[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2021, 42(3): 123-126.
- [8] YAN W X, HUNNEWELL P, ALFONSE L E, et al. Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems[J]. *Science*, 2019, 363(6422): 88-91.
- [9] MAO Zefeng, CHEN Ruipeng, WANG Xiaojuan, et al. CRISPR/Cas12a-based technology: a powerful tool for biosensing in food safety[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 122: 211-222.
- [10] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONER-MANN S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573.

- [11] ZHANG Ting, ZHOU Wenhui, LIN Xiaoya, et al. Light-up RNA aptamer signaling-CRISPR-Cas13a-based mix-and-read assays for profiling viable pathogenic bacteria[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021, 176: 112906.
- [12] 王雅轩, 朱晓雁, 苏建荣. CRISPR/Cas 系统在病原体检测方面的研究进展 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2021, 37(9): 839-844.
WANG Yaxuan, ZHU Xiaoyan, SU Jianrong. Research progress on the CRISPR/Cas system in pathogen detection[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2021, 37(9): 839-844.
- [13] LIU Liang, LI Xueyan, MA Jun, et al. The molecular architecture for RNA-Guided RNA cleavage by Cas13a[J]. *Cell*, 2017, 170(4): 714-726, e10.
- [14] O'CONNELL M R. Molecular mechanisms of RNA targeting by Cas13-containing type VI CRISPR-Cas systems[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(1): 66-87.
- [15] WAN Hua, LI Jianming, CHANG Shan, et al. Probing the behaviour of Cas1-Cas2 upon protospacer binding in CRISPR-Cas systems using molecular dynamics simulations[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 3188.
- [16] 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.
- [17] YAN C, CUI J, HUANG L, et al. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2020, 26(6): 773-779.
- [18] GUPTA R, KAZI T A, DEY D, et al. CRISPR detectives against SARS-CoV-2: a major setback against COVID-19 blowout[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(20): 7593-7605.
- [19] ZHANG Qin, LI Jiahao, LI Yue, et al. SARS-CoV-2 detection using quantum dot fluorescence immunochromatography combined with isothermal amplification and CRISPR/Cas13a[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2022, 202: 113978.
- [20] WANG Yuxi, XUE Ting, WANG Minjin, et al. CRISPR-Cas13a cascade-based viral RNA assay for detecting SARS-CoV-2 and its mutations in clinical samples[J]. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, 2022, 362: 131765.
- [21] CHUNG H W. Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) and quantitative-competitive PCR (QC-PCR) [J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2001, 33(1 Suppl): 85-97.
- [22] 唐月明, 伊洁. 数字聚合酶链反应 (dPCR) 技术在病原体基因检测应用中的研究进展 [J]. *现代检验医学杂志*, 2021, 36(5): 174-179.
TANG Yueming, YI Jie. Recent advances in research on digital polymerase chain reaction (dPCR) in pathogen gene detection[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2021, 36(5): 174-179.
- [23] GAO Song, LIU Jingwen, LI Zhiyong, et al. Sensitive detection of foodborne pathogens based on CRISPR-Cas13a[J]. *Journal of Food Science*, 2021, 86(6): 2615-2625.
- [24] 于佳佳, 张旭霞, 张雨晴, 等. PCR 扩增技术联合 CRISPR-Cas13a 系统对 MTB DNA 检测方法的初步研究 [J]. *中国防痨杂志*, 2020, 42(12): 1280-1288.
YU Jiajia, ZHANG Xuxia, ZHANG Yuqing, et al. Preliminary study on detection method of MTB DNA by PCR amplification combined with CRISPR-Cas13a system[J]. *Chinese Journal of Antituberculosis*, 2020, 42(12): 1280-1288.
- [25] WANG Yaxuan, LIU Liyang, LIU Xiaochuan, et al. An ultrasensitive PCR-based CRISPR-Cas13a method for the detection of *Helicobacter pylori*[J]. *Journal of Personalized Medicine*, 2022, 12(12): 2082.
- [26] 李秋馨, 付玉梅, 梁志舜, 等. 5 种幽门螺杆菌检测方法的比较 [J]. *现代检验医学杂志*, 2015, 30(5): 127-128, 131.
LI Qiuxin, FU Yumei, LIANG Zhishun, et al. Comparison of 5 kinds of detection methods for *Helicobacter pylori*[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2015, 30(5): 127-128, 131.
- [27] 任锋, 张向颖, 田原, 等. 基于 RCA-PCR-CRISPR-cas13a 检测 HBV cccDNA 的试剂盒: CN202110200329.2 [P]. 2022-08-30.
REN Feng, ZHANG Xiangying, TIAN Yuan, et al. A test kit for detecting HBV cccDNA based on RCA-PCR-CRISPR-cas13a: CN202110200329.2 [P]. 2022-08-30.
- [28] WANG S, LI H, KOU Z, et al. Highly sensitive and specific detection of hepatitis B virus DNA and drug resistance mutations utilizing the PCR-based CRISPR-Cas13a system[J]. *Clinical Microbiology and Infection Diseases*, 2021, 27(3): 443-450.
- [29] AMAN R, MAHAS A, MAHFOUZ M. Nucleic acid detection using CRISPR/Cas biosensing technologies[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(6): 1226-1233.
- [30] 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.
- [31] MYHRVOLD C, FREIJE C A, GOOTENBERG J S, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 444-448.
- [32] TIAN Tian, QIU Zhiqiang, JIANG Yongzhong, et al. Exploiting the orthogonal CRISPR-Cas12a/Cas13a trans-cleavage for dual-gene virus detection using a handheld device[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2022, 196: 113701.
- [33] CUI J Q, LIU F X, PARK H, et al. Droplet digital recombinase polymerase amplification (ddRPA)

- reaction unlocking via picoinjection[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2022, 202: 114019.
- [34] HU Fei, LIU Yanfei, ZHAO Shuhao, et al. A one-pot CRISPR/Cas13a-based contamination-free biosensor for low-cost and rapid nucleic acid diagnostics[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2022, 202: 113994.
- [35] WANG Jiaojiao, XIA Qianfeng, WU Jie, et al. A sensitive electrochemical method for rapid detection of dengue virus by CRISPR/Cas13a-assisted catalytic hairpin assembly[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1187: 339131.
- [36] 符汪洋, 秦怡, 经求是, 等. 基于 CRISPR-Cas 反式切割和 gFET 核酸检测: CN202111543506.3 [P] 2022-03-08.
- FU Wangyang, QIN Yi, JING Qiushi, et al. Based on CRISPR-Cas transcleavage and gFET nucleic acid detection: CN202111543506.3 [P] 2022-03-08.
- [37] ORTIZ-CARTAGENA C, FERNÁNDEZ-GARCÍA L, BLASCO L, et al. Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification-CRISPR-Cas13a technology as a promising diagnostic tool for SARS-CoV-2[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(5): e0239822.
- [38] ACKERMAN C M, MYHRVOLD C, THAKKU S G, et al. Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13[J]. *Nature*, 2020, 582(7811): 277-282.
- [39] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒感染诊疗方案(试行第十版)[J]. *中华临床感染病杂志*, 2023, 16(1): 1-9.
- National Health Commission of the People's Republic of China. Diagnosis and treatment plan for COVID-19 (trial version 10) [J]. *Chinese Journal of Clinical Infectious Diseases*, 2023, 16(1): 1-9.
- [40] SCHURR F, TISON A, MILITANO L, et al. Validation of quantitative real-time RT-PCR assays for the detection of six honeybee viruses[J]. *Journal of Virological Methods*, 2019, 270: 70-78.
- [41] HE Dalin, LIU Gang, YANG Jing, et al. Specific high-sensitivity enzymatic molecular detection system termed RPA-Based CRISPR-Cas13a for duck tembusu virus diagnostics[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2022, 33(6): 1232-1240.
- [42] CHANG Yafei, DENG Yue, LI Tianyu, et al. Visual detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using CRISPR-Cas13a[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67(2): 564-571.
- [43] YIN Dongdong, YIN Lei, GUO Hao, et al. Visual detection and differentiation of porcine epidemic diarrhea virus wild-type strains and attenuated vaccine strains using CRISPR/Cas13a-based lateral flow strip[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 976137.
- [44] QIN Peiwu, PARK M, ALFSON K J, et al. Rapid and fully microfluidic Ebola virus detection with CRISPR-Cas13a[J]. *ACS Sensors*, 2019, 4(4): 1048-1054.
- [45] ZHANG Xiangying, TIAN Yuan, XU Ling, et al. CRISPR/Cas13-assisted hepatitis B virus covalently closed circular DNA detection[J]. *Hepatology International*, 2022, 16(2): 306-315.
- [46] 蒋远东, 腾子豪, 王玥, 等. 1990-2019 年中国结核病发病趋势的年龄-时期-队列模型分析[J]. *中华疾病控制杂志*, 2022, 26(11): 1275-1282.
- JIANG Yuandong, TENG Zihao, WANG Yue, et al. Trend of tuberculosis incidence in China from 1990 to 2019 based on the age-period-cohort model [J]. *Chinese Journal of Disease Control & Prevention*, 2022, 26(11): 1275-1282.
- [47] ZHOU Jin, YIN Lijuan, DONG Yanan, et al. CRISPR-Cas13a based bacterial detection platform: sensing pathogen *Staphylococcus aureus* in food samples[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1127: 225-233.
- [48] SHEN Jinjin, ZHOU Xiaoming, SHAN Yuanyue, et al. Sensitive detection of a bacterial pathogen using allosteric probe-initiated catalysis and CRISPR-Cas13a amplification reaction[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 267.
- [49] XIANG Xinran, LI Fan, YE Qingping, et al. High-throughput microfluidic strategy based on RAA-CRISPR/Cas13a dual signal amplification for accurate identification of pathogenic *Listeria*[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, 358: 131517.
- [50] 安柏霖, 苏璇, 郭悦, 等. 重组酶介导的等温扩增技术联合 CRISPR-Cas13a 快速检测 4 种腹泻病原菌[J]. *中国食品卫生杂志*, 2023, 35(3): 381-389.
- AN Bailin, SU Xuan, GUO Yue, et al. Rapid detection of four diarrheal bacteria by CRISPR-Cas13a combined with recombinase aided amplification [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2023, 35(3): 381-389.
- [51] HUANG Kaichen, YU Hailing, CHEN Zhenhua, et al. CRISPR-Cas13a-based diagnostic method for *Chlamydia trachomatis* from nongonococcal urethritis[J]. *Bioanalysis*, 2021, 13(11): 901-912.
- [52] CHEN Wentao, LUO Hao, ZENG Lihong, et al. A suite of PCR-LwCas13a assays for detection and genotyping of *Treponema pallidum* in clinical samples[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 4671.
- [53] ZHAO Jinhong, LI Yuanyuan, XUE Qiqi, et al. A novel rapid visual detection assay for *Toxoplasma gondii* combining recombinase-aided amplification and lateral flow dipstick coupled with CRISPR-Cas13a fluorescence (RAA-Cas13a-LFD)[J]. *Parasite*, 2022, 29: 21.
- [54] ZHAN Yangqing, GAO Xiaoqing, LI Shaoqiang, et al. Development and evaluation of rapid and accurate CRISPR/Cas13-based RNA diagnostics for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 904485.

收稿日期: 2023-11-04

修回日期: 2023-12-04