

基于 CRISPR-Cas 系统的分子诊断技术：原理、进展与展望

作者：_____ 学号：_____ 专业：_____

摘要：

CRISPR-Cas 系统作为一种革命性的基因编辑工具，近年来在分子诊断领域展现出巨大的应用潜力。基于 Cas12 和 Cas13 蛋白的附带切割活性（collateral cleavage activity），研究者们开发了以 SHERLOCK、DETECTR 和 HOLMES 为代表的多种核酸检测平台，实现了对病原体核酸、肿瘤标志物及遗传变异的高灵敏度、高特异性快速检测。本文系统综述了 CRISPR-Cas 核酸检测技术的分子机制，梳理了主要诊断平台的技术迭代历程，总结了该技术在传染病诊断、肿瘤液体活检等临床场景中的应用进展，并对其在即时检测（point-of-care testing）集成化、多重检测及监管审批等方面的未来发展方向与挑战进行了展望。

关键词：CRISPR-Cas; 分子诊断; 核酸检测; SHERLOCK; DETECTR; 即时检测

1 引言

分子诊断技术是指利用分子生物学方法对生物体内的遗传物质进行检测与分析，从而实现疾病诊断、病原体鉴定和个体化医疗的技术体系。传统的分子诊断手段主要包括聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）、实时荧光定量 PCR（quantitative real-time PCR, qPCR）以及基因测序等方法。这些技术虽然在灵敏度和准确性方面表现优异，但普遍存在对昂贵仪器设备的依赖、操作流程复杂、检测周期长等局限性，难以满足基层医疗和现场即时检测的需求[1]。

2012 年，CRISPR-Cas（clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins）系统被发现可作为高效的基因编辑工具，标志着生命科学进入了精准基因组工程时代。随后的研究揭示，部分 Cas 蛋白（如 Cas12a 和 Cas13a）在识别并切割靶标核酸后，会被激活产生非特异性的附带切割活性（collateral cleavage），这一发现为开发新型核酸检测技术提供了全新思路[2]。2017 年，张锋团队首次报道了基于 Cas13a 的 SHERLOCK（Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing）核酸检测系统[3]，随后 Doudna 团队于 2018 年发表了基于 Cas12a 的 DETECTR（DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter）平台[4]。这些开创性工作标志着 CRISPR-Cas 系统正式进入分子诊断应用领域，开启了核酸检测技术发展的新篇章。

本文旨在系统综述基于 CRISPR-Cas 系统的分子诊断技术，从技术原理、平台发展、临床应用及未来展望四个维度进行全面阐述，以期为该领域的研究者和从业者提供系统性参考。

2 CRISPR-Cas 核酸检测的技术原理

CRISPR-Cas 系统用于核酸检测的核心机制在于特定 Cas 蛋白被靶标核酸激活后所产生的附带切割活性。目前应用于分子诊断的 Cas 蛋白主要分为两大类：靶向 DNA 的 Cas12 家族和靶向 RNA 的 Cas13 家族，二者的检测原理既有共通之处，也存在显著差异[1,5]。

Cas12a（又称 Cpf1）属于 Class 2、Type V CRISPR 系统的效应蛋白，其在 crRNA（CRISPR RNA）引导下识别并结合含有 PAM（protospacer adjacent motif）序列的双链 DNA 靶标。当 Cas12a-crRNA 复合物成功识别并切割靶标 dsDNA 后，Cas12a 蛋白构象发生变化，暴露出非特异性的单链 DNA（ssDNA）切割活性位点，能够以“反式”（trans）方式大量降解周围环境中的任意单链 DNA 分子[4]。利用这一特性，研究者设计了携带荧光基团和淬灭基团的 ssDNA 报告探针；在无靶标存在时，报告探针保持完整，荧光信号被淬灭；当靶标核酸存在并激活 Cas12a 时，报告探针被快速切割，释放荧光信号，从而实现靶标核酸的高灵敏度检测。由于一个被激活的 Cas12a 分子可以切割数千条报告探针，这种酶促信号放大机制赋予了该检测体系极高的灵敏度[4,6]。

Cas13a（原名 C2c2）属于 Class 2、Type VI CRISPR 系统，是目前已知唯一靶向单链 RNA 的 Cas 效应蛋白。Cas13a 在 crRNA 引导下识别靶标 ssRNA 序列后，同样会被激活产生非特异性的“附带”RNA 酶活性（collateral RNase activity），能够切割周围的任何单链 RNA 分子[3]。SHERLOCK 系统正是利用了这一原理：首先通过等温扩增（recombinase polymerase amplification, RPA）将 DNA 靶标扩增并经 T7 转录转化为 RNA，再利用 Cas13a 的附带切割活性切割 RNA 荧光报告探针，产生可检测的荧光信号。Cas13a 的附带切割效率极高，单个被激活的 Cas13a-crRNA 复合物每秒可切割约 10,000 个报告分子，使得 SHERLOCK 系统在理论上可实现单分子级别（attomolar, 10^{-18} M）的检测灵敏度[3,5]。

除上述核心机制外，CRISPR 诊断系统通常还集成前端核酸扩增步骤以进一步提升灵敏度。常用的等温扩增方法包括 RPA、环介导等温扩增（loop-mediated isothermal amplification, LAMP）以及滚环扩增（rolling circle amplification, RCA）等，这些方法无需热循环仪，可在恒温条件下完成核酸扩增，有利于即时检测设备的开发[2,7]。信号输出方面，除荧光法外，还发展了侧流层析试纸条（lateral flow assay, LFA）可视化读出、电化学信号输出、比色法等多种检测模式，进一步拓展了 CRISPR 诊断的应用场景[1,2]。

3 主要 CRISPR 诊断平台的研究进展

自 2017 年以来，基于不同 Cas 蛋白的诊断平台相继问世并经历了快速的技术迭代。本节重点介绍 SHERLOCK、DETECTR 和 HOLMES 三大代表性平台及其演进历程。

SHERLOCK 系统由张锋实验室于 2017 年首次报道，初代 SHERLOCK 结合 RPA 扩增和 Cas13a 检测，对寨卡病毒和登革病毒 RNA 实现了 attomolar 级灵敏度检测[3]。2018 年，该团队发布了升级版 SHERLOCKv2，通过整合多种 Cas 蛋白（Cas13a、Cas13b 和 Cas12a）和辅助核酸酶 Csm6，实现了在单一反应中同时检测多个靶标（multiplexing），并引入侧流层析试纸条读出方式，使结果判读无需专业仪器[8]。同年，Myhrvold 等人将 SHERLOCK 与 HUDSON（Heating Unextracted Diagnostic Samples to Obliterate Nucleases）样品处理方法结合，开发了可直接从临床样本（血液、尿液、唾液）中检测病毒的现场部署方案[9]。2021 年，Collins 团队进一步开发了 miSHERLOCK（minimally instrumented SHERLOCK），将整个检测流程集成在一个手持式装置中，实现了真正意义上的即时检测[10]。

DETECTR 系统由 Doudna 实验室于 2018 年提出，其核心创新在于发现了 Cas12a 蛋白结合靶标 DNA 后产生的非特异性 ssDNA 切割活性[4]。初代 DETECTR 结合 RPA 扩增和 Cas12a 检测，成功实现了对人乳头瘤病毒（HPV）16 型和 18 型的快速区分鉴定。与 SHERLOCK 相比，DETECTR 的优势在于直接检测 DNA 靶标无需 RNA 转录步骤，操作流程更为简便。2020 年新冠疫情期间，Broughton 等人基于 DETECTR 开发了 SARS-CoV-2 快速检测方法，在 40 分钟内即可完成从 RNA 提取到结果判读的全流程，灵敏度与 RT-qPCR 相当[11]。

HOLMES（one-Hour Low-cost Multipurpose highly Efficient System）系统由中国科学家团队于 2018 年独立开发，同样基于 Cas12a 的附带切割活性，在 1 小时内实现高灵敏度核酸检测[6]。2019 年，该团队发布了 HOLMESv2 版本，引入 Cas12b 蛋白替代 Cas12a，不仅保持了高灵敏度，还新增了 DNA 甲基化定量检测功能，拓展了 CRISPR 诊断的应用维度。HOLMES 系统的开发标志着中国研究者在 CRISPR 诊断领域的重要贡献。

此外，2020 年 Ackerman 等人报道的 CARMEN（Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nucleic acids）系统将 Cas13 检测与微流控芯片技术结合，实现了对 169 种人类病毒的大规模并行检测，展示了 CRISPR 诊断在高通量筛查中的巨大潜力[12]。这些平台的快速迭代发展体现了 CRISPR 诊断技术从概念验证到临床转化的加速进程。

4 CRISPR 诊断在临床检测中的应用

CRISPR 诊断技术已在传染病检测、肿瘤分子标志物检测和遗传病筛查等多个临床领域展现出广阔的应用前景。

在传染病诊断方面，新型冠状病毒（SARS-CoV-2）的全球大流行极大地推动了 CRISPR 诊断的临床转化进程。2020 年，多个研究团队几乎同时报道了基于 CRISPR 的 COVID-19 检测方案：Broughton 等人开发的 DETECTR-based 方案在 40 分钟内完成检测[11]；张锋团队的 STOPCovid（SHERLOCK Testing in One Pot）实现了一管式操作[13]；Patchsung 等人完成了 Cas13 检测方法的大规模临床验证，证实其特异性达 100%，灵敏度与 RT-qPCR 相当[14]。特别值得关注的是，Fozouni 等人于 2021 年发表的无扩增 CRISPR-Cas13a 检测方法，无需前端核酸扩增即可直接检测临床样本中的 SARS-CoV-2 RNA，并结合手机显微镜实现了便携式定量读出，将检测设备成本降至最低[15]。这些工作证明了 CRISPR 诊断技术在应对突发传染病方面具有快速响应和灵活部署的独特优势。

在肿瘤分子诊断方面，CRISPR 技术正在为液体活检（liquid biopsy）领域带来新的技术突破。液体活检通过检测血液中的循环肿瘤 DNA（ctDNA）、循环肿瘤细胞（CTC）和外泌体等生物标志物实现肿瘤的早期发现和动态监测。CRISPR 诊断的高灵敏度特性使其在检测低丰度 ctDNA 突变方面具有天然优势。近年来，多项研究将 CRISPR-Cas 系统应用于 EGFR、KRAS 等肿瘤驱动基因突变的检测，灵敏度可达 0.01% 等位基因频率，显著优于传统 Sanger 测序。此外，研究者还开发了基于 CRISPR-Cas9 的可穿戴微针贴片，可实现循环游离 DNA 的长期原位捕获与实时监测，为肿瘤的无创动态监控提供了创新方案[2,5]。

在遗传病筛查方面，CRISPR 诊断技术的高特异性使其特别适合于单核苷酸多态性（SNP）的精确鉴定。通过精心设计 crRNA 序列，CRISPR 系统能够区分仅差一个碱基的等位基因变异，在镰刀细胞贫血症、囊性纤维化等单基因遗传病的基因型鉴定中表现出色。相比传统的基因分型方法，CRISPR 检测无需复杂的探针设计和多步杂交反应，可在等温条件下一步完成基因型判读[1,7]。

5 未来展望与挑战

尽管 CRISPR 诊断技术已取得了令人瞩目的进展，但其从实验室研究走向大规模临床应用仍面临多方面的挑战与机遇。

在技术层面，即时检测（POCT）集成化是当前最重要的发展方向之一。理想的 POCT 设备应实现“样本进-结果出”（sample-in-answer-out）的全封闭自动化操作，减少人为干预和污染风险。目前，将核酸提取、等温扩增和 CRISPR 检测三个步骤整合在单一反应管或微流控芯片中的“一管式”（one-pot）策略正受到广泛关注[7]。然而，不同反应步骤对缓冲液组成、温度和离子浓度等条件的差异性需求仍是实现真正一管式操作的主要技术障碍。

在应用拓展方面，多重检测能力的提升是另一关键方向。SHERLOCKv2 和 CARMEN 已初步展示了 CRISPR 系统的多重检测潜力[8,12]，但如何在保持高灵敏度的同时进一步增加检测通量，以及如何实现全自动化的高通量筛查平台，仍需持续的技术创新。此外，将 CRISPR 诊断与智能手机、可穿戴设备等消费电子产品结合，有望构建分布式的疾病监控网络，实现传染病的早期预警[15]。

在转化应用方面，监管审批和质量标准体系的建立是 CRISPR 诊断走向临床不可回避的问题。目前仅有极少数 CRISPR 诊断产品获得了紧急使用授权（EUA），尚无产品通过常规的体外诊断试剂审批流程。建立统一的性能评价标准、制定参考物质和质控品规范、以及开展大规模多中心临床试验，是推动 CRISPR 诊断临床转化的必要步骤。同时，CRISPR 诊断技术的知识产权格局复杂，Broad 研究所和 UC Berkeley 之间的专利纠纷也可能影响商业化进程[1,5]。

6 结语

基于 CRISPR-Cas 系统的分子诊断技术代表了核酸检测领域的一次范式性变革。从 2017 年 SHERLOCK 系统的首次报道至今，短短数年间该技术已发展出多个成熟的检测平台，并在 COVID-19 疫情中经受了临床应用的考验。随着一管式检测方案的优化、多重检测能力的提升、以及与智能设备的深度融合，CRISPR 诊断有望成为下一代即时分子检测的核心技术，为精准医疗和公共卫生安全提供有力的技术支撑。

参考文献

- [1] Kaminski MM, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, et al. CRISPR-based diagnostics[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2021, 5: 643-656.
- [2] Tang Y, Gao L, Feng W, et al. The CRISPR-Cas toolbox for analytical and diagnostic assay development[J]. *Chemical Society Reviews*, 2021, 50: 11844-11869.
- [3] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438-442.
- [4] Chen JS, Ma E, Harrington LB, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 436-439.
- [5] Tian T, Zhou X. CRISPR-Based Biosensing Strategies: Technical Development and Application Prospects[J]. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2023, 16: 311-334.
- [6] Li SY, Cheng QX, Wang JM, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection[J]. *Cell Discovery*, 2018, 4: 20.
- [7] Chen L, Hu M, Zhou X. Trends in developing one-pot CRISPR diagnostics strategies[J]. *Trends in Biotechnology*, 2025, 43(1): 98-110.

- [8] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 439-444.
- [9] Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 444-448.
- [10] de Puig H, Lee RA, Najber D, et al. Minimally instrumented SHERLOCK (miSHERLOCK) for CRISPR-based point-of-care diagnosis of SARS-CoV-2 and emerging variants[J]. *Science Advances*, 2021, 7(32): eabh2944.
- [11] Broughton JP, Deng X, Yu G, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 870-874.
- [12] Ackerman CM, Myhrvold C, Thakku SG, et al. Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13[J]. *Nature*, 2020, 582(7811): 277-282.
- [13] Joung J, Ladha A, Saber M, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK One-Pot Testing[J]. *New England Journal of Medicine*, 2020, 383(15): 1492-1494.
- [14] Patchesung 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.
- [15] Fozouni P, Son S, Diaz de Leon Derby M, et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy[J]. *Cell*, 2021, 184(2): 323-333.