

· 综 述 ·

# 无细胞系统在 CRISPR 技术和生物传感器中的应用研究进展

姚夏, 胡潇予, 王晓祺, 葛璟燕\*

浙江工业大学生物工程学院, 浙江 杭州 310014

姚夏, 胡潇予, 王晓祺, 葛璟燕. 无细胞系统在 CRISPR 技术和生物传感器中的应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 86-102.

YAO Xia, HU Xiaoyu, WANG Xiaoqi, GE Jingyan. Application of cell-free transcription and translation system in CRISPR technologies and the associated biosensors[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 86-102.

**摘 要:** 无细胞转录翻译系统(cell-free transcription and translation, TXTL), 简称无细胞系统, 即基于细胞提取物在体外快速表达蛋白质的系统。该系统绕过了细菌转化、克隆筛选和细胞裂解等过程, 更精准便捷地控制反应底物, 减少细菌对蛋白质产生的影响, 具有多功能性和灵活性等优点。近年来, TXTL 作为一个新兴平台在 clusterd regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) 技术研究中应用广泛, 实现了对 CRISPR/Cas 系统快速、便捷地表征, 比如高特异性的向导 RNA (guide RNA, gRNA) 以及抗 CRISPR 蛋白的筛选。同时, 基于 TXTL 的 CRISPR 生物传感器与生物材料、基因回路等结合, 开发并用于病原体中核酸标志物等的检测, 相关试剂冻干后也提高了便携性, 实现高灵敏度的即时检测(point-of-care testing, POCT)。传感器与可编程的电路元件等技术的结合为全细胞生物传感器(whole cell biosensor, WCB)提供了一种非生物替代品, 提高了生物安全性, 加速了其通过监管机构的批准应用。本文重点介绍并讨论了近年来利用 TXTL 对 CRISPR 系统的表征及在生物传感器中的应用, 希望能更好地推动 CRISPR 技术和 TXTL 在生物传感器方面的发展。

**关键词:** 无细胞系统(TXTL); CRISPR/Cas 系统; 即时检测; 生物传感器

资助项目: 国家自然科学基金(21877100, 22177104); 浙江省属高校基本科研业务费(RF-B2019003)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (21877100, 22177104) and the Fundamental Research Funds for the Provincial Universities of Zhejiang Province (RF-B2019003).

\*Corresponding author. E-mail: gejy@zjut.edu.cn

Received: 2022-04-30; Accepted: 2022-10-18

# Application of cell-free transcription and translation system in CRISPR technologies and the associated biosensors

YAO Xia, HU Xiaoyu, WANG Xiaoqi, GE Jingyan\*

College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

**Abstract:** Cell-free transcription and translation (TXTL) system is a cell extract-based system for rapid *in vitro* protein expression. The system bypasses routine laboratory processes such as bacterial transformation, clonal screening and cell lysis, which allows more precise and convenient control of reaction substrates, reduces the impact of bacteria on protein production, and provides a high degree of versatility and flexibility. In recent years, TXTL has been widely used as an emerging platform in clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) technologies, enabling more rapid and convenient characterization of CRISPR/Cas systems, including screening highly specific gRNAs as well as anti-CRISPR proteins. Furthermore, TXTL-based CRISPR biosensors combined with biological materials and gene circuits are able to detect pathogens through validation of related antibiotics and nucleic acid-based markers, respectively. The reagents can be freeze-dried to improve portability and achieve point-of-care testing with high sensitivity. In addition, combinations of the sensor with programmable circuit elements and other technologies provide a non-biological alternative to whole-cell biosensors, which can improve biosafety and accelerate its application for approval. Here, this review discusses the TXTL-based characterization of CRISPR and their applications in biosensors, to facilitate the development of TXTL-based CRISPR/Cas systems in biosensors.

**Keywords:** cell-free transcription and translation (TXTL); CRISPR/Cas system; point-of-care testing (POCT); biosensor

无细胞转录翻译系统(cell-free transcription and translation, TXTL)主要利用活细胞提取物成分,通过加入转录翻译机制所需要的原料及 DNA 模板,使蛋白质在体外快速合成<sup>[1-3]</sup>。该系统主要由 3 个部分组成:细胞提取物(核糖体、RNA 聚合酶及其他转录和翻译辅助蛋白)、用于蛋白质合成的补充辅因子反应混合物(氨基酸、多肽、能源、代谢辅因子等)和从质粒 DNA 或聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)获得的线性模板(图 1)。目前,已经开发出多种基于真核生物和原核生物细胞提取物的 TXTL,如实验室中最常用的微生物模式菌株大

肠杆菌<sup>[4]</sup>、酿酒酵母<sup>[5]</sup>等系统,植物中的小麦胚芽系统,动物中的兔网织红细胞,中国仓鼠卵巢巢细胞以及昆虫系统<sup>[6-7]</sup>。其中,基于大肠杆菌提取物的 TXTL 因其易于生产、蛋白表达量高的特点而得到最为广泛的应用,但是在翻译后修饰和其他复杂蛋白质合成方面存在局限性;基于动物细胞的 TXTL 具有翻译后修饰功能,可以表达膜蛋白等其他复杂蛋白,但是蛋白产量较低且生产成本更高,因此应用较少。尽管各种无细胞系统各有利弊,近年许多公司如 Arbor Science、Creative Biolabs、Promega 已经在不断改进技术实现蛋白质的高表达和 TXTL 的商业化。随着

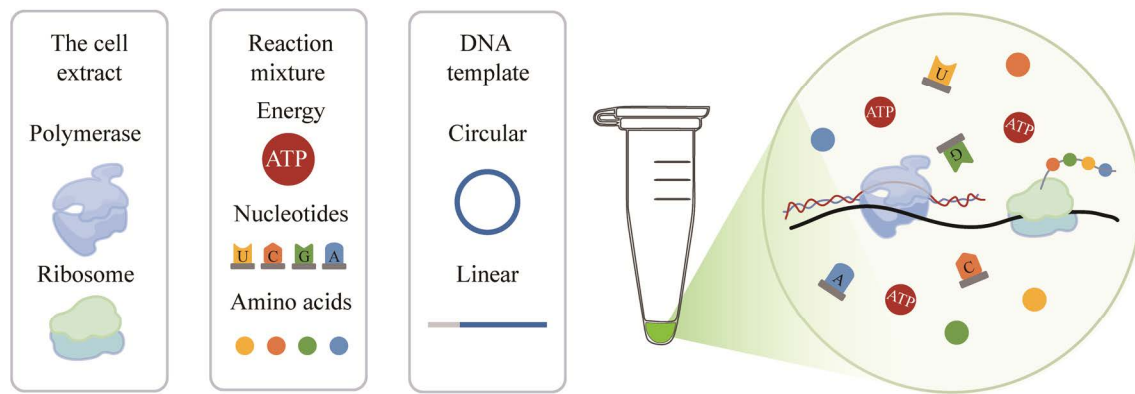


图 1 无细胞系统的组成

Figure 1 The components of cell-free transcription and translation system.

技术的发展, TXTL 已逐渐成为一种多功能工具, 特别是利用大肠杆菌细胞提取物构建的无细胞蛋白合成系统(cell-free protein synthesis, CFPS)<sup>[8]</sup>, 已被广泛用于 clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) 系统的表征、基因回路设计<sup>[9]</sup>、生物传感器的开发<sup>[10-11]</sup>等合成生物学领域中。

CRISPR/Cas 系统, 一种来自细菌的适应性免疫防御系统<sup>[12]</sup>, 可以识别并抵御携带遗传信息的入侵核酸序列, 如噬菌体和质粒<sup>[13-14]</sup>。近年来该技术发展迅速, 几乎可以用于靶向所有的基因组<sup>[15-16]</sup>, 成为了一种革命性的基因编辑工具<sup>[17-19]</sup>。目前已经报道了许多基于 CRISPR 技术的检测方法, 相关的生物传感器在病原体等核酸检测方面呈现了高灵敏度、快速反应等优良的性能<sup>[20-22]</sup>。然而, CRISPR 检测技术的灵敏度和准确度受 CRISPR 系统自身元件的影响, 如 gRNA 和原始间隔邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 位点的特异性。在实验室中, 对这些元件的表征需要烦琐的实验步骤(细菌培养转化以及蛋白纯化), 耗时较长。TXTL 作为一个快速、精确的体外蛋白表达平台, 可以实现 1-16 h 内从 DNA 转录翻译为蛋白质, 无需活细胞参与和冗长的实验过程, 极大提高了

CRISPR 系统的表征和元件验证的速度, 如 PAM 位点的快速筛选<sup>[23-25]</sup>、向导 RNA (guide RNA, gRNA) 的设计表达<sup>[26-28]</sup>和抗 CRISPR 蛋白的表征筛选<sup>[9,29-30]</sup>。在此基础上, 研究人员还开发出 TXTL 与 CRISPR 相结合的生物传感器, 将 CRISPR 系统与核酸开关、基因回路、试纸材料等结合, 使 CRISPR 传感器的应用能力极大提高, 不再局限于实验室和专业仪器人员, 检测对象除了核酸外, 也可以检测小分子物质<sup>[31]</sup>, 极大地扩展了 CRISPR 检测系统的应用范围和传感器的灵活度。

无细胞生物传感器通常由检测对象、检测手段和信号输出组成, 需优化系统稳定性和鲁棒性<sup>[32-33]</sup>。其中, 检测手段的选择影响了检测对象的类别和信号输出的范围。目前, 基于 CRISPR/Cas13 的 specific high-sensitivity enzymatic reporter unLOCKing (SHERLOCK)<sup>[21]</sup>、SHERLOCKv2<sup>[34]</sup> 和 heating unextracted diagnostic samples to obliterate nucleases (HUDSON)<sup>[35]</sup> 技术已经显示出 CRISPR/Cas 系统在核酸检测方面的巨大潜力。以 TXTL 作为反应平台, 将 CRISPR 传感器与生物材料结合, 开发出基于纸张<sup>[22]</sup>和可穿戴式材料<sup>[36]</sup>的 CRISPR 生物传感器, 便于实际应用; 也可以与可编程的 gRNA<sup>[26-28]</sup>和 toeholdswitch<sup>[37]</sup> 等工程化基因回路结合, 使得传感器呈现布尔

逻辑,易于调控。

因此,本综述聚焦 TXTL 与 CRISPR 技术的结合,首先整理了近年 TXTL 对 CRISPR 系统各部分的表征,然后对在生物传感器方面的应用进行归纳总结。最后,我们将讨论如何突破实验室仪器和专业人员的限制,拓展传感器应用场景,实现便携快速的即时检测(point-of-care testing, POCT)。

## 1 利用无细胞系统表征 CRISPR/Cas 系统

CRISPR/Cas 系统作为细菌和古生菌的适应性防御系统,依赖一种特定 RNA 引导的核酸酶,靶向并切割特定的 DNA 或 RNA,从而识别来自同一入侵者的再次攻击<sup>[38]</sup>。该系统根据其结构和功能的差异性分为 2 大类,包括 6 种类型和 33 个亚型<sup>[12]</sup>。本节将重点总结基于大肠杆菌提取物 TXTL 对 CRISPR 系统中各部分的检测表征,包括 PAM 序列的表征、gRNA 的设计和快速筛选、不同 Cas 蛋白的表达和抗 CRISPR 蛋白的筛选等。

### 1.1 PAM 序列

整个 CRISPR 系统有超过 30 种不同的 Cas 蛋白,除 III 型外,其余的 CRISPR/Cas 系统都需要一个 PAM 或 PAM 相关序列才能有效地切割目标 DNA<sup>[24,39]</sup>。PAM 序列是一段短的 DNA 序列,通常为 2–6 个碱基对,一般在 Cas 蛋白切割位点下游,参与切割前的定位识别过程。因此,解析 Cas 蛋白特异性识别的 PAM 序列是揭示其特征的关键步骤之一,且对预测系统的脱靶效应也至关重要<sup>[40]</sup>。

目前,体外检测方式一般需要克隆和纯化系统中的 Cas 蛋白和对 gRNA 进行体外转录(*in vitro* transcription, IVT),纯化过程可能引起 Cas 蛋白的失活、IVT 的多步骤等问题,亟需

开放高通量、大规模并精准性的快速筛查方法<sup>[23,25]</sup>。2018 年,美国明尼苏达大学的 Noireaux 课题组构建了 PAM 文库,利用 TXTL 原位表达 Cas 蛋白、gRNA 和文库,对带有特异的 PAM 序列的核酸进行切割后,采用 PCR 扩增和下一代测序技术进行测序,从而确定 Cas 蛋白对 PAM 序列的识别程度(图 2A)<sup>[9]</sup>。同时期,德国亥姆霍兹研究学院的 Beisel 课题组通过在 PAM 序列下游引入启动子和报告基因 *deGFP* 序列,利用荧光强度分析 Cas 蛋白的切割效率和速度,极大地加快筛选新型 CRISPR-Cas 工具的作用模式<sup>[23]</sup>。近日,该课题组又开发了基于 TXTL 的多亚基效应物 I 型 CRISPR 系统的 PAM 表征工具“PAM-DETECT”<sup>[41]</sup>(图 2B),对 I 型 CRISPR 系统中不同亚类和 CRISPR 转座子(CRISPR-associated transposons, CASTs)的 PAM 位点进行表征,发现了 I-B 型 CRISPR 转座子的一个新的分支 RoCAST,进一步完善了体外的高通量表达 PAM 序列方式。

### 1.2 gRNA 的表征和设计改造

在 CRISPR/Cas 系统中,gRNA 可以引导 Cas 蛋白对目标核酸序列进行识别和切割,其序列可分为 2 个部分:可变的间隔(spacer)序列和保守的 scaffold 序列<sup>[42]</sup>。spacer 序列与靶向的目标序列互补,且识别序列与 Cas 蛋白活性相关,因此,设计并筛选出一条高特异性的 gRNA 是决定 CRISPR 系统灵敏度和脱靶率的关键<sup>[43]</sup>。目前,TXTL 在筛选 gRNA 方面已逐渐成为一亮眼的工具。2018 年, Noireaux 课题组根据不同的 PAM 序列(NGG、NAG)分别设计了靶向 *deGFP* 序列上游的启动子、核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)和 *deGFP* 基因序列不同位置的 gRNA,以在 TXTL 系统中反应 16 h 后 *deGFP* 的荧光强度作为指示,进行高通量筛选,快速得到高特异性的 gRNA<sup>[9]</sup>(图 3)。

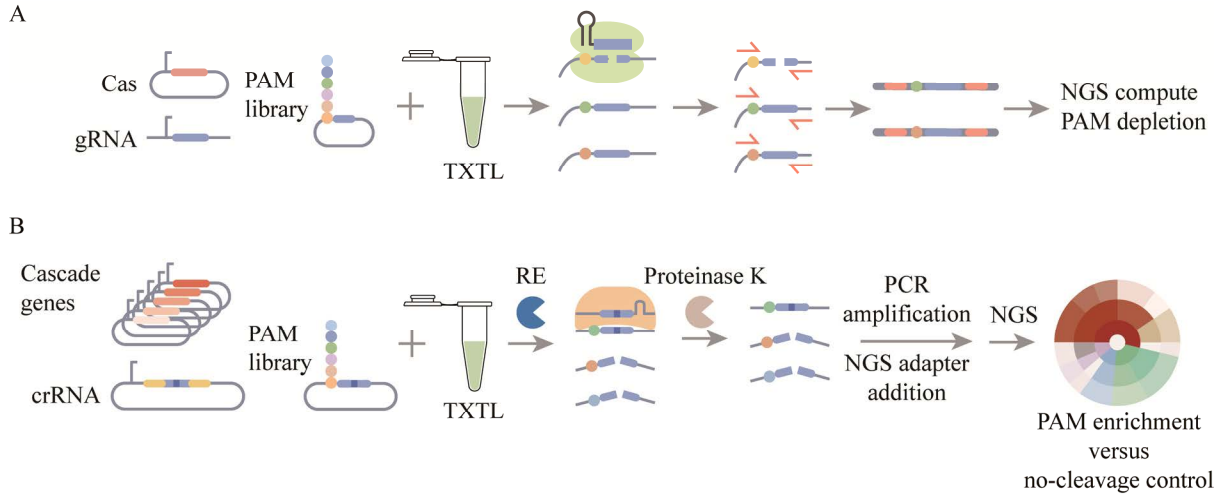


图 2 利用 TXTL 对 PAM 位点进行表征与筛选<sup>[9,41]</sup>

Figure 2 Schematic representation of characterization and screening of PAM sites using a cell-free system<sup>[9,41]</sup>. A: Schematic of a TXTL-based cleavage assay to determine the PAM sequences recognized by Cas nucleases. B: DNA components added to a TXTL reaction to perform PAM-DETECT. The cascade genes can be encoded on separate plasmids, as shown here, or as an operon.

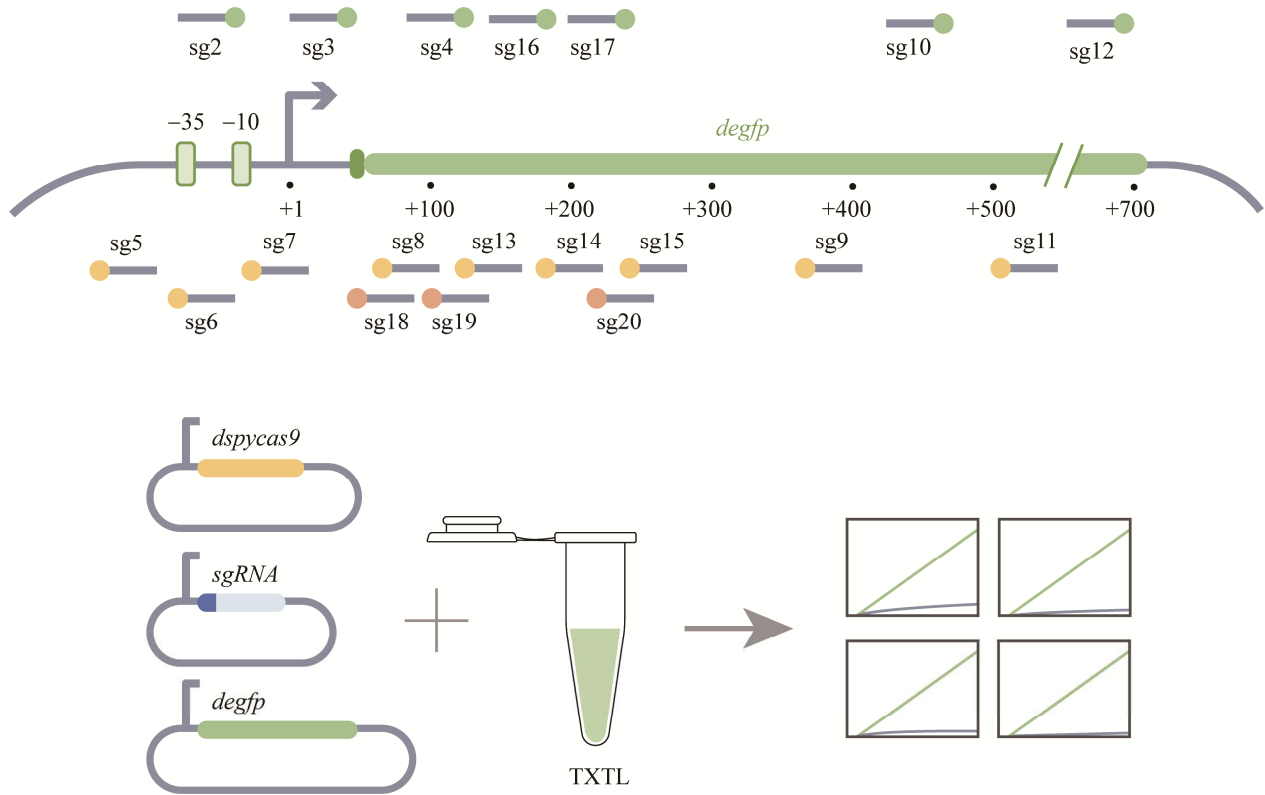


图 3 利用 TXTL 快速表征和筛选 gRNA<sup>[9]</sup>

Figure 3 Schematic representation of characterization and screening gRNAs in a cell-free system<sup>[9]</sup>.

另外, 为了实现对 CRISPR 系统的时序性调控, 研究人员相继报道有关 gRNA 的设计方案。目前较为常见的是在 gRNA/crRNA 前的 5' 端或 3' 端添加序列后, 将其改造成 RNA/DNA 响应的核酸开关。2018 年, 我国清华大学的 Li 课题组通过在单向导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 的 scaffold 序列的第一个颈环和 3' 末端分别添加额外的序列, 设计了一种与目标 RNA 杂交后才能与 Cas9 结合的 sgRNA (mRNA-sensing gRNA, msgRNA)<sup>[28]</sup> (图 4A), 可用作 RNA 传感器, 实现了利用 CRISPR/Cas9 响应输出正交检测多个 mRNA 输入。2020 年, 英国华威大学的 Jaramillo 课题组提出了一种简单且长度更短的 sgRNA 设计(RNA-interacting guide RNA, igRNA)<sup>[26]</sup>。他们通过在 sgRNA 的

5' 末端添加额外序列, 使 spacer 序列在无目标 RNA 的情况下呈双链状态, 无法与靶标 DNA 结合, 从而使需要特异性 RNA 序列激活的基因的靶向成为可能, 并可应用于体外传感器和诊断工具的开发(图 4B)。2021 年, Beisel 课题组改造了 crRNA, 使其成为可以响应不同核酸序列的 gRNA 开关(图 4C), 并用来检测在阿拉伯糖或铁离子存在的生长条件表达的内源性 RNA, 使 Cas12 的靶向活性依赖于细胞代谢和应激, 从而使传感器与细胞状态绑定<sup>[27]</sup>。该设计具有普适性, 也可以应用于分子检测、抗耐药基因等领域。得益于碱基互补配对原则, 这些设计对目标序列具有高度特异性, 但它们的灵敏度和最低检测限度仍有待探索。

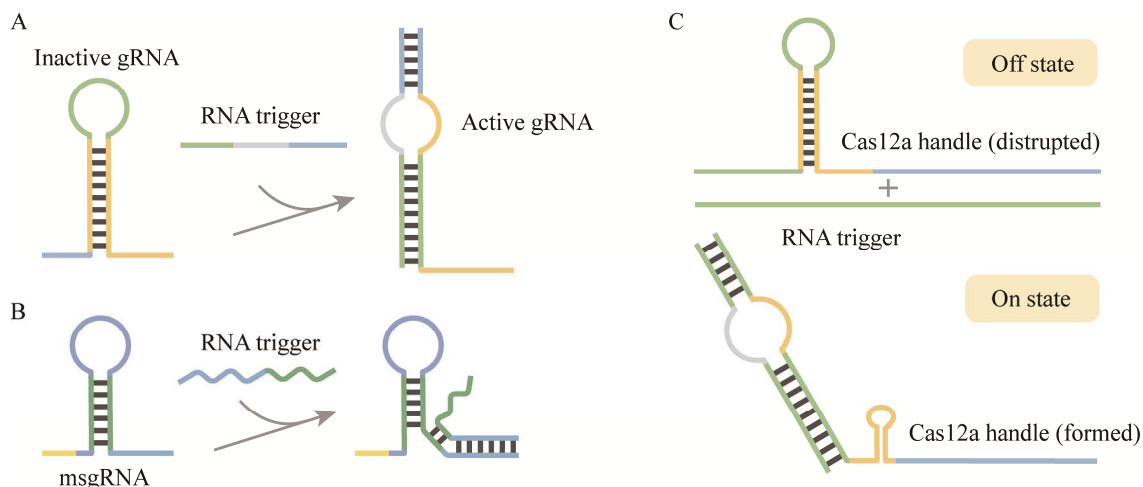


图 4 gRNA 被设计为核酸开关的不同方法<sup>[26-28]</sup>

Figure 4 The different approaches of gRNA designed as riboswitches<sup>[26-28]</sup>. A: Schematic representation of gRNA in its inactive state, RNA trigger and activated gRNA after hybridization with the RNA trigger. B: Schematic representation of the structure of msgRNA with RNA trigger sensing region embedded and expected structural change of msgRNA in the presence of trigger. Trigger RNA interacted with the region of msgRNA and anti-mRNA sensing region was displaced by mRNA. msgRNA structure refolds with mRNA tagging along at the 3' end. C: Architecture and intended conformational states of the gRNA switch. In the absence of an RNA trigger (Off state), the clamp base pairs with the Cas12a handle, disrupting its formation and subsequent recognition by Cas12a. In the presence of an RNA trigger (On state), the base pair with the RNA trigger, leading to an energetically favorable conformation wherein the Cas12a handle re-folds and can be recognized by Cas12a.

### 1.3 Cas 蛋白的表达

在 TXTL 中最先得到表达的是研究较为广泛和完善的 Cas9/dCas9 蛋白<sup>[9]</sup>, 随后 V-A 型的 Cas12a 蛋白也在 TXTL 中得到表达和检测<sup>[27]</sup>。Cas12a 与 Cas9 不同, Cas12a 识别目标序列 5' 端的 PAM 序列 TTN, 而 Cas9 识别 3' 端的 NGG<sup>[43]</sup>。先前的研究表明 Cas12a 的催化失活变体 dCas12a 能够在细胞中进行可编程的基因抑制<sup>[44]</sup>, 但抑制效果比 Cas9 更弱。

除了对 CRISPR 系统中单核酸酶进行表达之外, TXTL 还实现了对多核酸酶的表达。比如, 来自大肠杆菌 K12 品系的 I-E 型 CRISPR/Cas 系统 (EcCascade) 主要由 8 个 *cas* 基因 (*cas3*、*casA*、*casB*、*casC*、*casD*、*casE*、*cas1* 和 *cas2*) 和 CRISPR 阵列构成<sup>[45]</sup> (图 5)。CasA-E 蛋白会组合成一个复合体 cascade, 结合 crRNA 沉默目标序列, 并引导 Cas3 行使切割功能。相较于 II 型系统, I-E 型系统需要表达的蛋白更多, 在胞内会更难表征<sup>[46]</sup>。但在 TXTL 中, Noireaux 课题组将 cascade 序列基因克隆在 T7 启动子后即可实现表达。为了验证其功能, 他们在体系中加入 crRNA 序列和靶向基因序列 (P70a-deGFP) 的质粒, 实现了对目标基因的有效抑制, 且抑制效果比 Cas9 更强<sup>[9]</sup>。

### 1.4 抗 CRISPR 蛋白的表达

抗 CRISPR 蛋白是噬菌体用以对抗细菌和古生菌 CRISPR 系统的蛋白。越来越多的 CRISPR 系统被发现意味着有更多的抗 CRISPR

蛋白, 而不同的抗 CRISPR 蛋白抑制 CRISPR 系统的不同部分<sup>[30]</sup>。例如, 一些抗 CRISPR 蛋白与 Cas 蛋白结合, 阻断其靶向和结合 DNA 的能力, 一些抑制 Cas 蛋白聚集潜在的新的间隔序列, 还有一些与 Cas 蛋白结合, 抑制其切割结合的目标 DNA<sup>[29]</sup>, 进一步影响 CRISPR 系统调控基因和水平转移的能力<sup>[47-49]</sup>。但是目前发现的抗 CRISPR 蛋白缺乏明显的共性特征, 这使得研究抗 CRISPR 蛋白变得更加困难。

胞内验证一抗 CRISPR 蛋白需要将其基因克隆到一个表达载体上, 并转化到细胞中再进行检测。因此, 当面对一个蛋白库的验证时, 这个过程无疑是费力和复杂的。而在 TXTL 中, 只需要放入含抗 CRISPR 蛋白基因的质粒或线性 DNA 片段, 同时 CRISPR 系统靶向荧光报告基因, 通过检测荧光强度便可对抗 CRISPR 蛋白进行功能表征和验证, 因此, TXTL 为潜在的抗 CRISPR 新蛋白的快速的表征和挖掘提供了平台。2018 年, Noireaux 课题组率先实现了在 TXTL 中 CRISPR 蛋白的表达和功能性验证, 将当时胞内验证的活性最高的抗 CRISPR 蛋白 AcrIIA2 和 AcrIIA4<sup>[50]</sup> 在 TXTL 中成功进行表征, 发现这 2 种蛋白可以阻遏 Cas 蛋白靶向 *deGFP* 基因序列, 使得绿色荧光蛋白正常表达<sup>[9]</sup>。整个表达过程仅需 18 h, 极大地减少了抗 CRISPR 蛋白表达的时间, 且证实了 TXTL 是快速表征抗 CRISPR 蛋白的平台。在此基础上, 该课题组又对抗 CRISPR 蛋

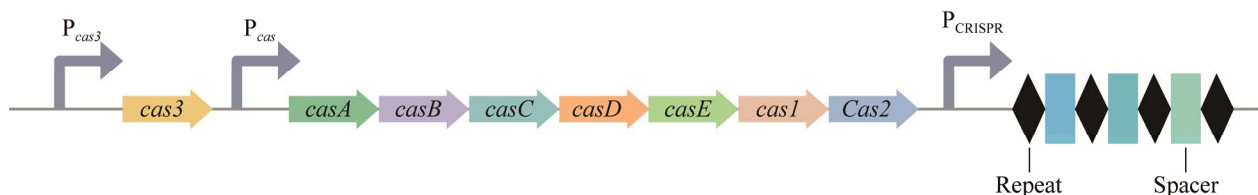


图 5 I-E 型 CRISPR/Cas 系统的组成<sup>[45]</sup>

Figure 5 The components of the type I-E CRISPR/Cas system<sup>[45]</sup>.

白库进行测试,将不同的 Cas 蛋白与抗 CRISPR 蛋白库组合,根据荧光强度的变化识别出抗 CRISPR 蛋白的不同活性和特异性。根据这个方法,2019 年加拿大多伦多大学的 Maxwell 课题组使用 TXTL 测试了预测的基因片段中是否有抗 CRISPR 蛋白基因的存在,最后在 67 个基因片段中得到了 3 个针对 Cas12a 的抗 CRISPR 蛋白基因(*AcrVA1*、*AcrVA4* 和 *AcrVA5*)<sup>[29]</sup>。

## 2 以无细胞系统为基础的 CRISPR 生物传感器

生物传感器是以生物成分为主要功能元件,用于快速检测各种痕量分析物的分析工具<sup>[32]</sup>。CRISPR/Cas 系统基于其特异性识别核酸序列的特性,与生物传感器的理念相结合已被广泛用于核酸检测中。但是,检测过程一般需要依靠实验室器材和专业人员操作,在实际诊断和

检测环境中缺少将样品处理、核酸扩增、Cas 反应、信号检测等功能模块集成的仪器,且难以保持 Cas 蛋白和 gRNA 的稳定活性<sup>[51]</sup>。TXTL 作为体外表达蛋白的反应环境,为 CRISPR 生物传感器实现实地体外诊断(*in vitro diagnosis*, IVD)提供了一个良好的平台,且通过冻干等技术使传感器附于生物材料上,便于运输和携带,常温下从质粒或 DNA 片段转录翻译为蛋白质使得检测系统可以最大限度保持活性,突破实验室专业设备和场地的限制。虽然在检测灵敏度方面仍不及传统的实验室 CRISPR 检测技术,但是这些方法实现了对原始样本如唾液<sup>[22]</sup>和血液<sup>[52]</sup>直接进行检测并呈现可视化结果,说明 TXTL 的引入为 CRISPR 生物传感器的实地应用提供了极大的可行性(表 1)。本节将重点讨论传统的 CRISPR 生物传感器及引入 TXTL 后拓展 CRISPR 检测工具箱的进展。

表 1 传统的 CRISPR 生物传感器与基于 TXTL 的 CRISPR 生物传感器性能比较

Table 1 Comparison of the classical CRISPR biosensors and the TXTL-based CRISPR biosensors

Classification	System	Key components	Sensitivity	Reaction time (h)	Sample	Amplification strategy	Signal output	References
Classic CRISPR biosensors	SHERLOCK	Cas13, DNA/RNA	aM	2.0–5.0	Pretreated	RPA/RT-RPA	Fluorescence lateral-flow device	[53]
	SHERLOCK v2	Cas13, mutli DNA/RNA	zM	0.5–43.0	Pretreated	RPA/RT-RPA	Fluorescence lateral-flow device	[34]
	SHERLOCK v2 +HUDSON	Cas13, mutli DNA/RNA	aM	<2.0	Raw with heating	RPA/RT-RPA	Fluorescence	[35]
TXTL-based CRISPR biosensors	Gene circuits: Toehold switch	Cas9, toehold switch	pM	3.0	Pretreated	None	Naked-eyed	[22]
	Paper-based biosensors	Toehold switch-based RNA sensor and cell-free system embedded into the paper	pM	3.0	Pretreated	NASBA	Naked-eyed	[22]
	Wearable devices	Wearable material with freeze-dried, cell-free synthetic circuits	fM	1.5	Raw	RT-RPA	Colorimetric, fluorescence or luminescence	[36]
	Gene circuits: gRNA design	Cas12a-gRNA switch	–	–	–	–	–	[27]

–: Not available.



## 2.1 传统的 CRISPR 生物传感器

在核酸诊断中, CRISPR/Cas12 和 Cas13 系统目前发展与应用较为成熟。Cas12a 属于二类 CRISPR/Cas V 型<sup>[54]</sup>, 其最大的特点是靶向目标双链 DNA 时, 激活单链 DNase 活性, 能够非特异、无差别地反式切割附近的单链 DNA 分子<sup>[55]</sup>。基于这种特性, 在运用 Cas12 的生物传感器中大多引入了荧光报告基团和淬灭基团的报告单链 DNA, 当靶标激活 Cas12a 后, 切割报告单链 DNA, 释放荧光信号, 从而达到快速灵敏的核酸分子检测。Cas13 与 Cas12 在切割原理上类似, 但 Cas13 的靶标为 RNA, 因此, 在检测 RNA 病毒方面有更多的应用。

SHERLOCK 技术是一种基于 CRISPR/Cas13

的核酸检测技术<sup>[35,53]</sup>, 具有灵敏度高、反应快速的特点, 能够检测寨卡<sup>[20]</sup>、登革热<sup>[35]</sup>、COVID-19<sup>[18]</sup>等病毒(图 6A)。来自美国麻省理工学院的张锋课题组对该技术进行了优化并引入了 4 种不同的 Cas 酶(PsmCas13b、LwaCas13a、CcaCas13b、AsCas12a), 根据其不同切割活性选择适配的荧光报告分子, 从而实现了同时对多种类型病毒的同时检测, 推出 SHERLOCKv2 技术<sup>[34]</sup>(图 6B)。麻省理工学院 Sabeti 课题组在开发 SHERLOCK 检测时引入 HUDSON 技术<sup>[35]</sup>(图 6C), 仅通过简单的化学或预处理, 在裂解病毒的同时灭活被释放的核酸酶, 减少了 RNA 提取的需要, 不仅使样品处理更简洁, 同时也提高了检测的便携度。

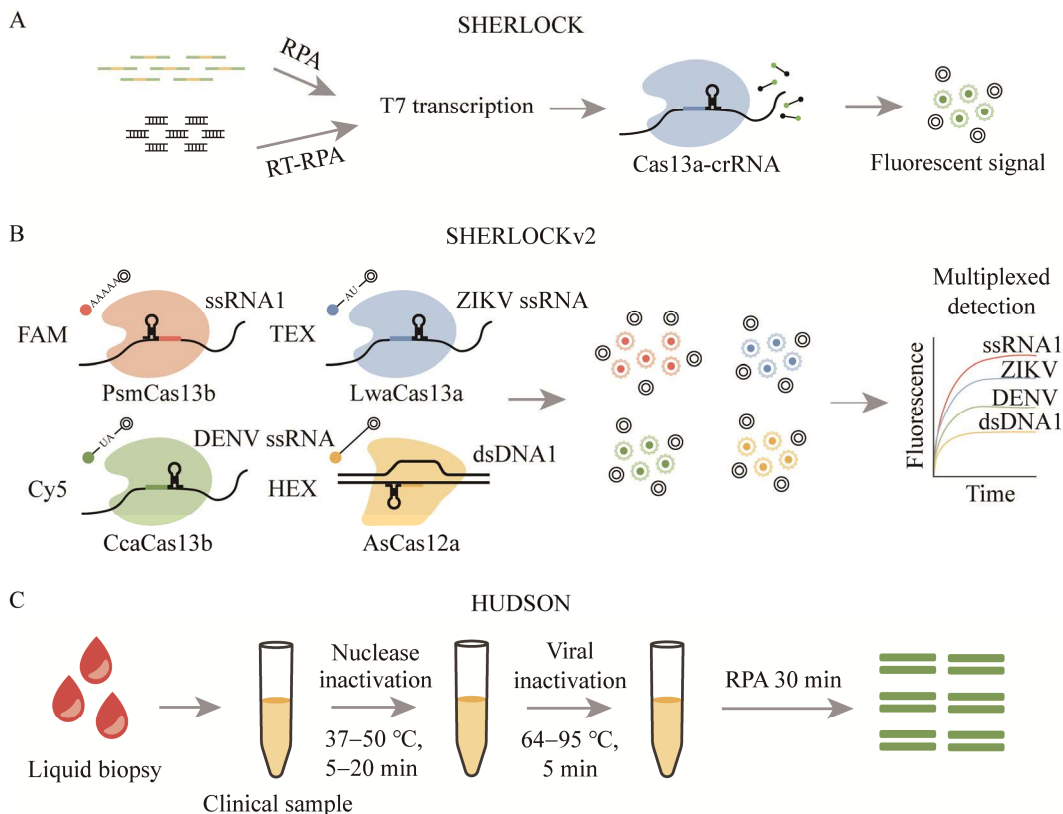


图 6 基于 CRISPR/Cas13 的传统生物传感器<sup>[22,34-35,51]</sup>

Figure 6 Schematic representation of CRISPR/Cas13-based biosensors<sup>[22,34-35,51]</sup>. A: The first SHERLOCK system. B: Four-channel multiplex detection of SHERLOCK system. C: HUDSON eliminates the nucleic acid extraction and purification procedures.

但是,目前基于 SHERLOCK 开发出的相关技术反应组分中需要蛋白质纯化和 RNA 的合成,这些实验操作增加了制备传感器的成本。此外,将传感器的反应混合物冻干,并在运输过程中维持其活性较难,目前尚未取得广泛的商业化<sup>[56]</sup>。因此,尽管 CRISPR 传感器核酸检测灵敏度高,在实际应用中仍缺乏合适的平台进行集成化的表达,TXTL 作为体外合成蛋白质的平台,能够为 CRISPR 传感器的便携实地应用提供极大的便利。

## 2.2 与材料相结合的 CRISPR 无细胞传感器

随着 CRISPR 系统的生物传感器逐步发展,科学家们尝试将其运用到实际检测中,将 TXTL 试剂与表达 CRISPR 元件的核酸混合,冻干附于各种生物医学工程材料上,如纸质、可穿戴柔性材料,通过加入水激活传感器,更好地实现运输过程中的稳定和实地快捷方便的检测。早在 2016 年,美国麻省理工学院的 Collins 课题组将无细胞试剂附于纸面并冻干,提出了一种基于纸质传感器的核酸检测法<sup>[22]</sup>(图 7A)。利用响应寨卡病毒 RNA 的 toehold switch<sup>[37]</sup>核糖开关,一旦目标 RNA 出现, toehold switch 与其结合,释放 RBS 区域序列,触发 *lacZ* 基因的表达,水解试纸上的氯酚红-β-D-吡喃半乳糖苷(chlorophenol red mono-β-D-galactopyranoside, CPRG)底物,使试纸颜色由黄色变成紫色。由于 toehold switch 可以特异性检测 RNA 序列,因此试纸上的颜色变化能够辨别出寨卡病毒,甚至 2 种不同的寨卡病毒毒株,且灵敏度可达皮摩尔(picomolar, pM)级别。2021 年,美国杨百翰大学的 Bundy 课题组开发出基于纸质的人类唾液 SARS-CoV-2 RNA 的核酸诊断平台,在无细胞反应体系中加入小鼠 RNA 酶抑制剂(murine RNase inhibitor, mRI),使得在唾液状态下稳定反应,进一步提

高了试纸即时检测的能力。并且他们利用 NanoLuc 生物发光报告基因使结果可视化,可用于快速和低成本的核酸检测<sup>[20]</sup>。

除此之外,将传感器整合到可穿戴设备中,可以扩大无创监测生理疾病状态、接触病原体 and 毒素的机会。2021 年, Collins 课题组开发了 3 种使用冷冻干燥后可穿戴的、基于无细胞系统的设备(wearable freeze-dried cell-free, wFDCF)<sup>[36]</sup>。第一种是将比色基因回路嵌入到由柔性弹性体制成的流体排芯和密封组件包围的纤维素基质中,通过毛细作用迅速吸进液体。使用 *lacZ* 作为基因回路的输出,其表达促进水解 CPRG,使材料由黄色变成紫色(图 7B)。第二种是将第一种传感器固定在可穿戴织物中,将电路的输出改为绿色荧光蛋白的荧光信号,通过嵌入的光纤对荧光蛋白进行激发和发射检测(图 7C)。第三种是基于 CRISPR/Cas12a SHERLOCK 的可穿戴口罩传感器,由于咳嗽、说话或呼吸时病毒会在口罩内部聚集,因此该口罩携带有 4 个模块化组件:一个储存水的容器、一个大面积样品收集垫、一个用于微流控的分析装置(内含冻干的无细胞试剂)和一个横向检测试纸条。毛细作用可将液体和病毒颗粒洗到样品收集垫上,然后经过等温扩增, Cas12a SHERLOCK 传感器检测和切割探针,最后在试纸条上显色(图 7D)。使用时只需按下按钮,便可在穿戴条件下检测 SARS-CoV-2,该口罩的检测灵敏度达到了飞摩尔(femtomolar, fM)数量级。这些设计展现出无细胞生物传感器在可穿戴材料和实际应用中的巨大潜力。

## 2.3 基因电路在 CRISPR 无细胞传感器中的应用

为了更好地扩展传感器的功能,许多研究引入了基因电路来更好地实现对信号的调控和不同条件下的响应,如非相干 1 型前馈回路



(incoherent type-1 feedforward loop, IFFL)、核酸开关(toehold switch)以及 CRISPR 系统中经编程改造后的 gRNA。

IFFL 存在于自然系统中,具有产生基因表达脉冲的能力,是一种被广泛研究的电路设计<sup>[57]</sup>。简单而言,IFFL 电路通过第一条途径激活一个基因(*tetR*)和另一个基因(*deGFP*)的表达,而 *tetR* 的表达会抑制 *deGFP* 的表达。如果 *deGFP* 在被激活和被抑制的时间上有一个延迟,那么就可以看到该基因的表达脉冲<sup>[58]</sup>(图 8A)。2015 年,康奈尔大学的 Lucks 课题组率先实现了 IFFL 电路在 TXTL 中的表达调控<sup>[59]</sup>,通过测试得到了 IFFL 电路中 3 个原件的最佳浓度,避免了过量的 DNA 使 TXTL 表达量饱和。在 *deGFP* 蛋白的 C 端加入 *ssrA* 降解标签,能够被 ClpXP 蛋白降解,产生小脉冲。2021 年,课题组联合浙江工业大学国际基因工程机器大赛(international genetically engineered machine competition, IGEN)竞赛团队 ZJUT\_China,构建了基于 RNA 响应的 CRISPR/Cas9 系统,目标 RNA 与 gRNA 碱基互补配对形成 RNA-gRNA 复合物,结合并引导 Cas9 蛋白切割 IFFL 线路中的 *tetR* 基因,导致下游 *deGFP* 基因的表达,通过荧光强度反证目标 RNA 的含量,获得了 CRISPR/Cas 系统的 RNA 生物传感器<sup>[60]</sup>。

Toehold switch 是一种可编程的核酸开关,由 2 条 RNA 组成,其中一条 RNA 能通过形成茎环结构结合基因序列从而阻止其翻译过程,而另一条可以与形成茎环结构的 RNA 互补,从而解除对基因表达的阻遏效果<sup>[37]</sup>。2016 年,Collins 团队运用 toehold switch 来识别经 CRISPR/Cas9 系统切割后的序列,对不同的寨卡菌株进行区分,最后通过 *lacZ* 基因表达水解 CPRG 在附有 TXTL 的试纸中将黄色变为紫色<sup>[22]</sup>

(图 8B)。2021 年, Bundy 团队设计出能特异性结合 SARS-CoV-2 RNA 的 toehold switch,利用添加 mRI 的 TXTL 冻干试纸能快速检测到唾液样本中的核酸并产生生物发光信号<sup>[20]</sup>。

如前文提到的, gRNA 的编程化设计极大地拓展了对 CRISPR/Cas 系统的时序性调控,在 gRNA/crRNA 前的 3'或 5'端添加序列后,可将其变成 RNA/DNA 响应的核酸开关,如对 CRISPR/Cas9 系统中 gRNA 的设计改造而提出的 msgRNA<sup>[28]</sup>, igRNA<sup>[26]</sup>序列可用于构建更为复杂的基因电路;对 CRISPR/Cas12a 系统中的 crRNA 设计改造而用以检测细胞内源性 RNA 的传感器<sup>[27]</sup>。

### 3 存在的问题与展望

TXTL 是推动基于 CRISPR/Cas 系统传感器开发的有利平台。传统的 CRISPR 生物传感器在构建过程中需要进行大量实验,来获得合适的 PAM 位点和高特异性的 gRNA,而利用 TXTL 作为反应平台,能在短时间内实现蛋白表达,这一特性使对 CRISPR 系统中不同元件的表征与优化时间大大缩短,提高了实验效率。TXTL 在 CRISPR 传感器方面的应用相比于传统的核酸扩增与诊断技术有较大优势,可将样品处理到信号检测等过程模块集成,冻干附于生物材料中,仅加入水即可激活,便于运输和携带,无需离心机、酶标仪等仪器,无需专业操作;灵敏度较高,可以实现微量病毒检测;结果读取方便,荧光信号可视化;能与更多的学科结合,发展潜力较大。

尤其, TXTL 最大的优势在于能够在资源有限的国家和农村地区提供快速便捷的检测。传统的核酸检测技术需要解决的一个重要问题是温度——许多诊断试剂需要全程冷链运输及冷藏以维持蛋白或其余成分的活性,这对实际

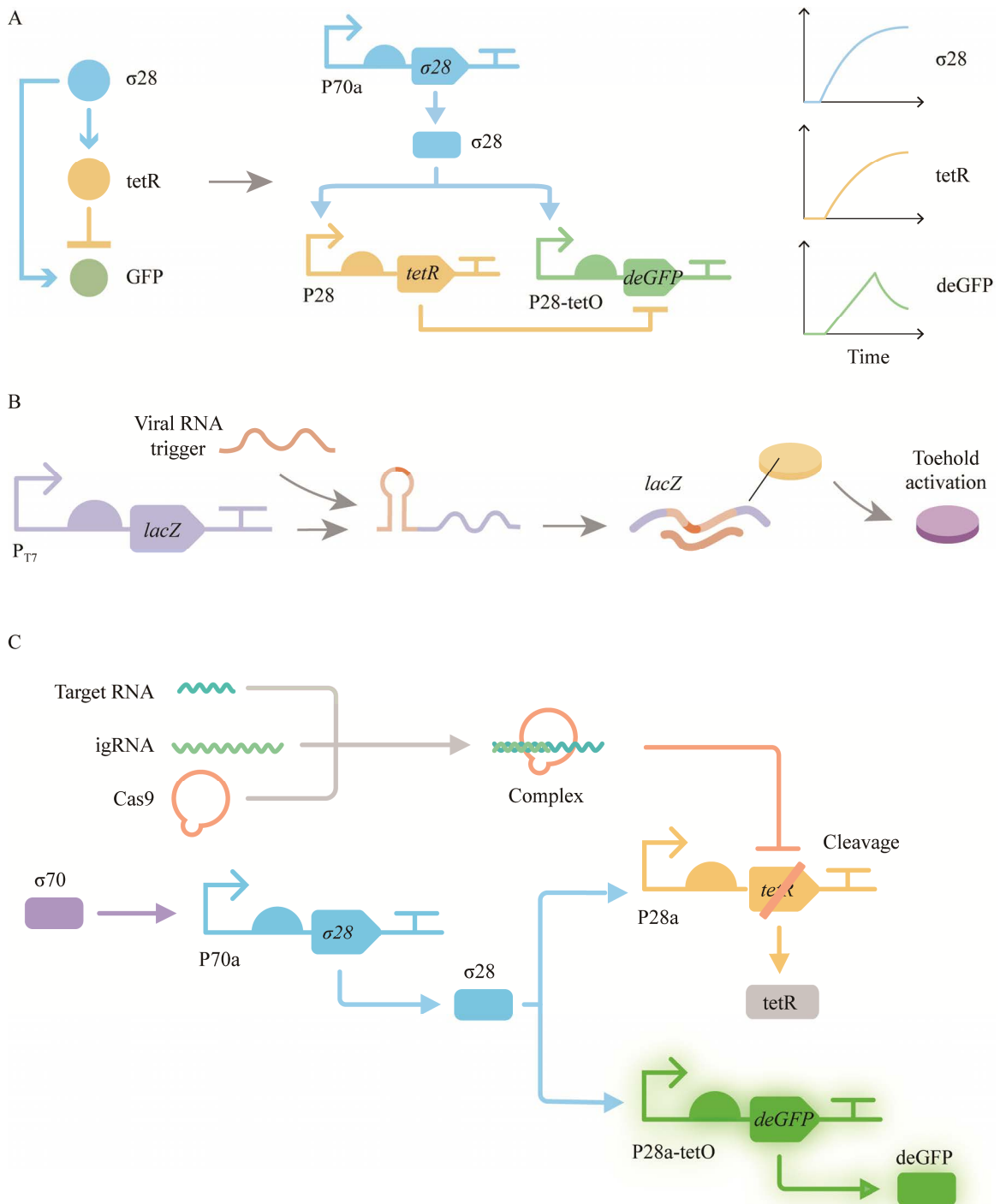


图 8 工程化基因电路在 TXTL 中的应用<sup>[22,58,60]</sup>

Figure 8 Application of engineered genetic circuits in cell-free system<sup>[22,58,60]</sup>. A: Incoherent feed forward loop circuit. The transcriptional factor sigma 28 activates the expression of *tet* repressor that represses deGFP, and activates the expression of *deGFP* through another. B: The detection of zika virus using toe-hold switch. C: Schematic design of gene circuits from team ZJUT-China in 2021 iGEM competition.

的现场应用造成了很大的障碍。而 Collins 课题组报道的冻干无细胞生物传感器实现了常温的运输和保存,并且可以稳定 3 个月及以上<sup>[22]</sup>。

但是,基于 TXTL 的 CRISPR 传感器也有一些问题需要解决。在试剂制备成本方面,目前尚未建立无细胞表达系统的制备标准<sup>[4]</sup>,就商业化最完善的大肠杆菌无细胞试剂而言,不同批次及菌株的试剂在表达蛋白活性方面有较大差异,且成本较高。以 Arbor Science 公司的 myTXTL Sigma 70 Master Mix Kit 产品为例,一次反应的成本在 60 元以上<sup>[61]</sup>,因此实验成本投入也相应较大。在传感器储存方面,冻干试剂虽能提高便携度,但是在一年之后活性会大大降低,若要长时间保存还需要其他的保护措施;在检测对象方面,尽管有一些策略如添加 aTF (allosteric transcription factor) 元件拓展实现 CRISPR 传感器对小分子的检测<sup>[31]</sup>,但是仍缺少有效的方案在抗生素、金属离子等领域进行检测;在分子诊断方面,尽管最近发现的 Cas14a 蛋白不受 PAM 位点序列的限制,在单核苷酸多样性(single nucleotide polymorphisms, SNP)检测方面有更灵活的应用<sup>[51]</sup>,但目前应用较多的 CRISPR 系统由于 gRNA 需要识别 PAM 位点或原间隔物侧翼位点(proto-spacer flanking sequence, PFS),因此对待检测物的核酸序列有所限制;在样品处理方面,该系统只适用于简单样品的检测,如血液和尿液可以通过加热(HUDSON)的办法去除样品中的蛋白等物质,而复杂的样品中某些成分可能会影响整个系统的表达。虽然目前已经有一些方案去解决这个问题,如 Bundy 课题组的工作表明 RNase 抑制剂的加入可以大大减少样本的干扰,尤其是血液样本<sup>[52]</sup>,但更加复杂的样本在 POCT 中依然有较大难度。另外,尽管基因线路和逻辑门的引入能对检测过程中复杂的信号转换、放大和输出实现

整合,但是其中相关信号的正交性和系统的鲁棒性仍然有待探索和提高。相信随着 TXTL 的不断发展,未来这些问题都能够得到改善和解决,生物传感器也将变得更加便捷和商业化。

## REFERENCES

- [1] GREGORIO NE, LEVINE MZ, OZA JP. A user's guide to cell-free protein synthesis[J]. *Methods and Protocols*, 2019, 2(1): 24.
- [2] PANDI A, GRIGORAS I, BORKOWSKI O, FAULON JL. Optimizing cell-free biosensors to monitor enzymatic production[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(8): 1952-1957.
- [3] SILVERMAN AD, KARIM AS, JEWETT MC. Cell-free gene expression: an expanded repertoire of applications[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2020, 21(3): 151-170.
- [4] ZHANG J, FU L, TANG T, ZHANG S, ZHU J, LI L, WANG Z, SI T. Scalable mining of proteins for biocatalysis via synthetic biology[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2020, 1(3): 319-336.
- [5] LI Y, LIN ZQ, LIU ZH. Advances in yeast based adaptive laboratory evolution[J]. 2021, 2(2): 287-301.
- [6] GEORGI V, GEORGI L, BLECHERT M, BERGMEISTER M, ZWANZIG M, WÜSTENHAGEN DA, BIER FF, JUNG E, KUBICK S. On-chip automation of cell-free protein synthesis: new opportunities due to a novel reaction mode[J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(2): 269-281.
- [7] ZHU JW. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production[J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(5): 1158-1170.
- [8] GARENNE D, NOIREAUX V. Cell-free transcription-translation: engineering biology from the nanometer to the millimeter scale[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 58: 19-27.
- [9] MARSHALL R, MAXWELL CS, COLLINS SP, JACOBSEN T, LUO ML, BEGEMANN MB, GRAY BN, JANUARY E, SINGER A, HE YH, BEISEL CL, NOIREAUX V. Rapid and scalable characterization of CRISPR technologies using an *E. coli* cell-free transcription-translation system[J]. *Molecular Cell*, 2018, 69(1): 146-157.e3.
- [10] SILVERMAN AD, AKOVA U, ALAM KK, JEWETT MC, LUCKS JB. Design and optimization of a cell-free atrazine biosensor[J]. *ACS Synthetic Biology*,

- 2020, 9(3): 671-677.
- [11] JUNG JK, ALAM KK, VEROSLOFF MS, CAPDEVILA DA, DESMAU M, CLAUER PR, LEE JW, NGUYEN PQ, PASTÉN PA, MATIASEK SJ, GAILLARD JF, GIEDROC DP, COLLINS JJ, LUCKS JB. Cell-free biosensors for rapid detection of water contaminants[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(12): 1451-1459.
- [12] MAKAROVA KS, HAFT DH, BARRANGOU R, BROUNS SJJ, CHARPENTIER E, HORVATH P, MOINEAU S, MOJICA FJM, WOLF YI, YAKUNIN AF, van der OOST J, KOONIN EV. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(6): 467-477.
- [13] JORE MM, LUNDGREN M, van DUIJN E, BULTEMA JB, WESTRA ER, WAGHMARE SP, WIEDENHEFT B, PUL Ü, WURM R, WAGNER R, BEIJER MR, BARENDREGT A, ZHOU KH, SNIJDERS APL, DICKMAN MJ, DOUDNA JA, BOEKEMA EJ, HECK AJR, van der OOST J, BROUNS SJJ. Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2011, 18(5): 529-536.
- [14] KOONIN EV. Evolution of RNA- and DNA-guided antiviral defense systems in prokaryotes and eukaryotes: common ancestry vs convergence[J]. *Biology Direct*, 2017, 12(1): 5.
- [15] ZAIDI SSEA, MUKHTAR MS, MANSOOR S. Genome editing: targeting susceptibility genes for plant disease resistance[J]. *Trends in Biotechnology*, 2018, 36(9): 898-906.
- [16] WRIGHT AV, NUÑEZ JK, DOUDNA JA. Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering[J]. *Cell*, 2016, 164(1/2): 29-44.
- [17] SAKUMA T, YAMAMOTO T. Magic wands of CRISPR—lots of choices for gene knock-in[J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2017, 33(6): 501-505.
- [18] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA JA, CHARPENTIER E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [19] CONG L, RAN FA, COX D, LIN SL, BARRETTO R, HABIB N, HSU PD, WU XB, JIANG WY, MARRAFFINI LA, ZHANG F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [20] HUNT JP, ZHAO EL, FREE TJ, SOLTANI M, WARR CA, BENEDICT AB, TAKAHASHI MK, GRIFFITTS JS, PITT WG, BUNDY BC. Towards detection of SARS-CoV-2 RNA in human saliva: a paper-based cell-free toehold switch biosensor with a visual bioluminescent output[J]. *New Biotechnology*, 2022, 66: 53-60.
- [21] JOUNG J, LADHA A, SAITO M, KIM NG, WOOLLEY AE, SEGEL M, BARRETTO RPJ, RANU A, MACRAE RK, FAURE G, IOANNIDI EI, KRAJESKI RN, BRUNEAU R, HUANG MW, YU XG, LI JZ, WALKER BD, HUNG DT, GRENINGER AL, JEROME KR, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 383(15): 1492-1494.
- [22] PARDEE K, GREEN AA, TAKAHASHI MK, BRAFF D, LAMBERT G, LEE JW, FERRANTE T, MA D, DONGHIA N, FAN M, DARINGER NM, BOSCH I, DUDLEY DM, O'CONNOR DH, GEHRKE L, COLLINS JJ. Rapid, low-cost detection of zika virus using programmable biomolecular components[J]. *Cell*, 2016, 165(5): 1255-1266.
- [23] MAXWELL CS, JACOBSEN T, MARSHALL R, NOIREAUX V, BEISEL CL. A detailed cell-free transcription-translation-based assay to decipher CRISPR protospacer-adjacent motifs[J]. *Methods*, 2018, 143: 48-57.
- [24] SHMAKOV S, ABUDAYYEH OO, MAKAROVA KS, WOLF YI, GOOTENBERG JS, SEMENOVA E, MINAKHIN L, JOUNG J, KONERMANN S, SEVERINOV K, ZHANG F, KOONIN EV. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems[J]. *Molecular Cell*, 2015, 60(3): 385-397.
- [25] KARVELIS T, GASIUNAS G, YOUNG J, BIGELYTE G, SILANSKAS A, CIGAN M, SIKSNYS V. Rapid characterization of CRISPR-Cas9 protospacer adjacent motif sequence elements[J]. *Genome Biology*, 2015, 16: 253.
- [26] GALIZI R, DUNCAN JN, ROSTAIN W, QUINN CM, STORCH M, KUSHWAHA M, JARAMILLO A. Engineered RNA-interacting CRISPR guide RNAs for genetic sensing and diagnostics[J]. *The CRISPR Journal*, 2020, 3(5): 398-408.
- [27] COLLINS SP, ROSTAIN W, LIAO CY, BEISEL CL. Sequence-independent RNA sensing and DNA targeting by a split domain CRISPR-Cas12a gRNA switch[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(5):

- 2985-2999.
- [28] LI Y, TENG XC, ZHANG KX, DENG RJ, LI JH. RNA strand displacement responsive CRISPR/Cas9 system for mRNA sensing[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(6): 3989-3996.
- [29] HWANG S, MAXWELL KL. Meet the anti-CRISPRs: widespread protein inhibitors of CRISPR-Cas systems[J]. *The CRISPR Journal*, 2019, 2(1): 23-30.
- [30] LI YP, BONDY-DENOMY J. Anti-CRISPRs go viral: the infection biology of CRISPR-Cas inhibitors[J]. *Cell Host & Microbe*, 2021, 29(5): 704-714.
- [31] MAHAS A, WANG QC, MARSIC T, MAHFOUZ MM. Development of Cas12a-based cell-free small-molecule biosensors via allosteric regulation of CRISPR array expression[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(11): 4617-4626.
- [32] ZHANG LY, GUO W, LU Y. Advances in cell-free biosensors: principle, mechanism, and applications[J]. *Biotechnology Journal*, 2020, 15(9): e2000187.
- [33] VOYVODIC PL, BONNET J. Cell-free biosensors for biomedical applications[J]. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 2020, 13: 9-15.
- [34] GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, KELLNER MJ, JOUNG J, COLLINS JJ, ZHANG F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 439-444.
- [35] MYHRVOLD C, FREIJE CA, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, METSKY HC, DURBIN AF, KELLNER MJ, TAN AL, PAUL LM, PARHAM LA, GARCIA KF, BARNES KG, CHAK B, MONDINI A, NOGUEIRA ML, ISERN S, MICHAEL SF, LORENZANA I, YOZWIAK NL, MACINNIS BL, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 444-448.
- [36] NGUYEN PQ, SOENKSEN LR, DONGHIA NM, ANGENENT-MARI NM, de PUIG H, HUANG A, LEE R, SLOMOVIC S, GALBERSANINI T, LANSBERRY G, SALLUM HM, ZHAO EM, NIEMI JB, COLLINS JJ. Wearable materials with embedded synthetic biology sensors for biomolecule detection[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(11): 1366-1374.
- [37] GREEN AA, SILVER PA, COLLINS JJ, YIN P. Toehold switches: *de-novo*-designed regulators of gene expression[J]. *Cell*, 2014, 159(4): 925-939.
- [38] JANSEN R, EMBDEN JD, GAASTRA W, SCHOOLS LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [39] KLEINSTIVER BP, TSAI SQ, PREW MS, NGUYEN NT, WELCH MM, LOPEZ JM, MCCAWE ZR, ARYEE MJ, JOUNG JK. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(8): 869-874.
- [40] ZHANG XH, TEE LY, WANG XG, HUANG QS, YANG SH. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2015, 4(11): e264.
- [41] WIMMER F, MOUGIAKOS I, ENGLERT F, BEISEL CL. Rapid cell-free characterization of multi-subunit CRISPR effectors and transposons[J]. *Molecular Cell*, 2022, 82(6): 1210-1224.e6.
- [42] JIANG WY, BIKARD D, COX D, ZHANG F, MARRAFFINI LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 233-239.
- [43] LIN YN, CRADICK TJ, BROWN MT, DESHMUKH H, RANJAN P, SARODE N, WILE BM, VERTINO PM, STEWART FJ, BAO G. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(11): 7473-7485.
- [44] LEENAY RT, MAKSIMCHUK KR, SLOTKOWSKI RA, AGRAWAL RN, GOMAA AA, BRINER AE, BARRANGOU R, BEISEL CL. Identifying and visualizing functional PAM diversity across CRISPR-cas systems[J]. *Molecular Cell*, 2016, 62(1): 137-147.
- [45] BHAYA D, DAVISON M, BARRANGOU R. CRISPR-Cas systems in bacteria and Archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation[J]. *Annual Review of Genetics*, 2011, 45: 273-297.
- [46] MAKAROVA KS, WOLF YI, ALKHNABASHI OS, COSTA F, SHAH SA, SAUNDERS SJ, BARRANGOU R, BROUNS SJJ, CHARPENTIER E, HAFT DH, HORVATH P, MOINEAU S, MOJICA FJM, TERNS RM, TERNS MP, WHITE MF, YAKUNIN AF, GARRETT RA, van der OOST J, BACKOFEN R, KOONIN EV. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(11): 722-736.
- [47] BONDY-DENOMY J, GARCIA B, STRUM S, DU MJ, ROLLINS MF, HIDALGO-REYES Y, WIEDENHEFT B, MAXWELL KL, DAVIDSON AR. Multiple mechanisms for CRISPR-Cas inhibition by



- anti-CRISPR proteins[J]. *Nature*, 2015, 526(7571): 136-139.
- [48] MAHENDRA C, CHRISTIE KA, OSUNA BA, PINILLA-REDONDO R, KLEINSTIVER BP, BONDY-DENOMY J. Broad-spectrum anti-CRISPR proteins facilitate horizontal gene transfer[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5(4): 620-629.
- [49] WANG XS, LI X, MA YJ, HE JQ, LIU X, YU GM, YIN H, ZHANG H. Inhibition mechanisms of CRISPR-Cas9 by AcrIIA17 and AcrIIA18[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(1): 512-521.
- [50] RAUCH BJ, SILVIS MR, HULTQUIST JF, WATERS CS, MCGREGOR MJ, KROGAN NJ, BONDY-DENOMY J. Inhibition of CRISPR-Cas9 with bacteriophage proteins[J]. *Cell*, 2017, 168(1/2): 150-158.e10.
- [51] LI Y, LI SY, WANG J, LIU GZ. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(7): 730-743.
- [52] SALEHI ASM, YANG SO, EARL CC, SHAKALLI TANG MJ, PORTER HUNT J, SMITH MT, WOOD DW, BUNDY BC. Biosensing estrogenic endocrine disruptors in human blood and urine: a RAPID cell-free protein synthesis approach[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2018, 345: 19-25.
- [53] GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, LEE JW, ESSLETZBICHLER P, DY AJ, JOUNG J, VERDINE V, DONGHIA N, DARINGER NM, FREIJE CA, MYHRVOLD C, BHATTACHARYYA RP, LIVNY J, REGEV A, KOONIN EV, HUNG DT, SABETI PC, COLLINS JJ, ZHANG F. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438-442.
- [54] ZETSCHKE B, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, SLAYMAKER IM, MAKAROVA KS, ESSLETZBICHLER P, VOLZ SE, JOUNG J, van der OOST J, REGEV A, KOONIN EV, ZHANG F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771.
- [55] LI SY, CHENG QX, LIU JK, NIE XQ, ZHAO GP, WANG J. CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA[J]. *Cell Research*, 2018, 28(4): 491-493.
- [56] MUSTAFA MI, MAKHAWI AM. SHERLOCK and DETECTR: CRISPR-cas systems as potential rapid diagnostic tools for emerging infectious diseases[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2021, 59(3): e00745-e00720.
- [57] SHEN-ORR SS, MILO R, MANGAN S, ALON U. Network motifs in the transcriptional regulation network of *Escherichia coli*[J]. *Nature Genetics*, 2002, 31(1): 64-68.
- [58] TAKAHASHI MK, CHAPPELL J, HAYES CA, SUN ZZ, KIM J, SINGHAL V, SPRING KJ, AL-KHABOURI S, FALL CP, NOIREAUX V, MURRAY RM, LUCKS JB. Rapidly characterizing the fast dynamics of RNA genetic circuitry with cell-free transcription-translation (TX-TL) systems[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(5): 503-515.
- [59] TAKAHASHI MK, HAYES CA, CHAPPELL J, SUN ZZ, MURRAY RM, NOIREAUX V, LUCKS JB. Characterizing and prototyping genetic networks with cell-free transcription-translation reactions[J]. *Methods*, 2015, 86: 60-72.
- [60] CRISPR/Cas9-based cell-free biosensors for RNA biomarkers[EB/OL]. [2022-10-15]. <https://2021.igem.org/Team:ZJUT-China>.
- [61] myTXTL-Cell-Free expression[EB/OL]. [2022-10-15]. <https://arborbiosci.com/synthetic-biology/cell-free-protein-expression/mytxtl/>.

(本文责编 陈宏宇)