

· 综述 ·

病原核酸 CRISPR-Cas 可视化检测方法研究进展

胡祐^{1,2#}, 陈中甫^{1,2#}, 张师音^{1,2*}, 葛胜祥^{1,2}

1 厦门大学 公共卫生学院, 福建 厦门 361102

2 厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 福建 厦门 361102

胡祐, 陈中甫, 张师音, 葛胜祥. 病原核酸 CRISPR-Cas 可视化检测方法研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 3872-3887.

HU You, CHEN Zhongfu, ZHANG Shiyin, GE Shengxiang. Advances in visual detection of pathogen nucleic acids by CRISPR-Cas[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 3872-3887.

摘要: 可视化检测是通过肉眼判读检测结果, 不依赖复杂的光学检测系统的一种检测方法, 大多基于可见光、气压变化和迁移距离等肉眼可直接观察的信号快速获取结果, 被广泛应用于体外诊断行业。成簇规律间隔短回文重复序列及相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein, CRISPR-Cas)系统以其反应条件温和, 无需热循环等控制, 且具备较强的信号放大能力, 在发展即时检测(point of care testing, POCT)技术中具有非常大的潜力。可视化检测与 CRISPR-Cas 系统的联用, 极大地降低了核酸检测对实验室基础设施、精密仪器及专业人员的依赖程度, 推动了核酸 POCT 技术和方法的发展。本文综述了 CRISPR-Cas 系统核酸可视化检测技术的信号输出方式及特点, 并对该可视化检测技术应用中存在的问题进行了讨论, 最后对其未来的临床转化进行了展望, 为研发 CRISPR-Cas 可视化检测方法提供了参考。**关键词:** 成簇规律间隔短回文重复序列及相关蛋白(CRISPR-Cas); 可视化检测; 核酸检测; 即时检测

Advances in visual detection of pathogen nucleic acids by CRISPR-Cas

HU You^{1,2#}, CHEN Zhongfu^{1,2#}, ZHANG Shiyin^{1,2*}, GE Shengxiang^{1,2}

1 School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China

2 National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China

Abstract: Visual detection is a technique for evaluating the results through visual judgment

资助项目: 厦门市自然科学基金(3502Z202373019)

This work was supported by the Xiamen Natural Science Foundation (3502Z202373019).

[#]These authors contributed equally to this study.

*Corresponding author. E-mail: zhangshiyin@xmu.edu.cn

Received: 2024-02-07; Accepted: 2024-05-31; Published online: 2024-06-07

without relying on complex optical detection systems. It obtains results quickly based on signals, such as visible light, changes in air pressure, and migration distance, that can be directly observed by naked eyes, being widely used in the *in vitro* diagnostics industry. The CRISPR-Cas system has the potential to be used in the development of point of care testing (POCT) technologies due to the advantages of mild reaction conditions, no need for thermal cycling or other control measures, and a robust signal amplification capability. In recent years, the combination of visual detection and CRISPR-Cas has significantly reduced the need for laboratory infrastructures, precision instruments, and specialized personnel for nucleic acid detection. This has promoted the development of POCT technology and methods for nucleic acids. This article summarizes the signal output modes and characteristics of the visual detection of nucleic acid by CRISPR-Cas and discusses the issues in the application. Finally, its future clinical translation is envisioned with a view to informing the development of CRISPR-Cas visualization assays.

Keywords: CRISPR-Cas; visual detection; nucleic acid detection; point of care testing (POCT)

病毒、细菌、真菌、寄生虫等病原体造成的传染性疾病在全球范围内迅速传播,给公共卫生系统带来巨大挑战,严重影响人类的生命健康^[1-2]。其中部分传染性疾病具有感染人群庞大、死亡率高、传播速度快、传播范围广、传播方式复杂多样等特点。传染性疾病本身的上述特点及当前世界人口流动频繁造成传染病传播迅速、有效防控难度极大。病原体检测作为“检测-治疗-预防”疫情防控体系的第一道科技防线,近年来得到了长足的发展,其中核酸检测凭借其灵敏度高、特异性强等特点在医疗服务中扮演着重要角色,推动了临床诊疗的发展进程^[3]。尤其在新冠病毒大流行期间,核酸检测结果更是成为了病毒病原体检测的金标准^[4]。传统核酸检测对人员、检测环境和配套设施等提出较高要求,其较多地应用在医疗资源丰富的中心医院等大型医疗机构,然而传染病防控过程中现场检测早期预警、社区等基层单位检测能力的建设极为重要。如何实现快速、便捷、无需仪器设备的即时检测(point of care testing, POCT)式核酸检测是病原体检测重要发展方向。

随着微加工技术、冷冻干燥常温保存技术和新型传感器技术的发展,涌现出大量 POCT

式的检测系统,但为了保证高反应效率实现信号放大以及准确的信号采集、结果分析,导致目前的实现方案难以摆脱对仪器的需求,无法真正做到无设备化检测^[5-6]。成簇规律间隔短回文重复序列及相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein, CRISPR-Cas)具备较强的信号放大能力,且反应条件温和,无需热循环等控制设备,为 POCT 式核酸检测提供了必要的前提条件^[7]。Cas 蛋白报告系统表现出较强的信号放大效果,与重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)等快速扩增技术整合,具有较强的核酸快速检测能力,较为切合当前核酸检测发展方向^[8-9]。近年来,研究人员相继基于 CRISPR-Cas 蛋白开发核酸检测技术。Gootenberg 等^[10]基于 Cas13a 蛋白开发出 SHERLOCK 检测系统实现寨卡病毒、登革热病毒的检测。SHERLOCK 系统首先采用 RPA 扩增靶核酸分子,并引入 T7 promoter 序列。随后该系统将扩增产物进行体外转录,进而激活 Cas13a 蛋白反式切割活性。最终, Cas13a 蛋白切割单链 RNA (single stranded RNA, ssRNA)报告探针实现寨卡病毒、登革热

病毒检测。Chen 等^[11]基于 RPA 和 Cas12a 蛋白开发出 DETECTR 检测系统实现人乳头瘤病毒检测。当靶标核酸存在时, RPA 能够特异性地扩增出特定产物从而激活 Cas12a 的反式切割活性。活性激活后, 单链 DNA (single stranded DNA, ssDNA) 报告探针被切割, 并释放荧光, 从而实现人乳头瘤病毒检测。

与此同时, 可视化信号检测具备无需仪器、结果分析时间短等特点, 更加符合世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 提出的 POCT 指导原则——ASSURED (affordable, sensitive, specific, user-friendly, robust and rapid, equipment-free and deliverable) 的要求。将 Cas 蛋白的信号放大能力与可视化检测的快速、简便高效的优势相结合, 有望进一步推动核酸 POCT 的技术发展。本文综述了 CRISPR-Cas 系统在病原体(病毒、细菌、真菌)核酸可视化检测的研究进展。文中先对 CRISPR-Cas 系统进行基本介绍, 然后对 CRISPR-Cas 系统在病原体检测方面的应用进行总结, 并对不同信号读取方式进行分类。最后就目前 CRISPR-Cas 系统在病原体核酸可视化检测在临床转化中面临的挑战进行探讨, 并对其未来的发展趋势及应

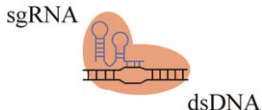
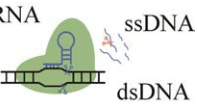
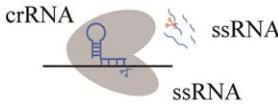
用前景作了展望。

1 CRISPR-Cas 蛋白及分类

CRISPR-Cas 系统由成簇规律间隔短回文序列重复序列及其相关蛋白组成, 是细菌和古细菌中用于切割侵入核酸的原核适应性免疫机制, 可以抵御病毒、噬菌体、质粒等外源基因的入侵^[12-13]。根据 Cas 蛋白组成和效应模块序列可将 CRISPR-Cas 系统分为 Class1 和 Class2 两类。Class1 效应模块是由多个 Cas 蛋白质构成的复合物, 可进一步分为 I、III 和 IV 型。与 Class1 不同, Class2 是由单个多结构域蛋白组成效应子模块。根据效应蛋白不同, Class2 类 CRISPR-Cas 系统又可分为 3 型及若干亚型, 包括 Cas9 等 II 型 CRISPR 系统、Cas12 (Cpf1) 等 V 型系统和 Cas13 等 VI 型系统^[14-15] (表 1)。II 型的 Cas9、V 型的 Cas12a 和 VI 型的 Cas13a 效应蛋白具有特异性好、操作简单等优势, 已广泛应用于病原体核酸检测。Cas12a、Cas13a 等效应蛋白、引导 RNA (guide RNA, gRNA) 和目标序列形成复合物时, Cas 蛋白被激活, 其不仅能对靶核酸进行剪切, 还可凭借反式切割活性切割 ssDNA 或 ssRNA。Cas12a、Cas13a 旁切

表 1 Cas9、Cas12a 和 Cas13a 的比较

Table 1 Comparison of Cas9, Cas12a, and Cas13a

Cas effector	Cas9	Cas12a	Cas13a
			
Type	II	V	VI
Spacer length	About 30 nt	18–24 nt	22–30 nt
tracrRNA	Yes	No	No
PAM/PFS	3' G-rich PAM	5' T-rich PAM	3' non-G-PFS
Substrate	dsDNA	dsDNA, ssDNA	ssRNA
Collateral cleavage	None	ssDNA	ssRNA

sgRNA: Single guide RNA; dsDNA: Double stranded DNA; crRNA: Crispr RNA; ssRNA: Single stranded RNA; ssDNA: Single stranded DNA; PAM: Protospacer adjacent motif; PFS: Protospacer flanking sites.

割活性无特异性,难以实现单独 Cas12 或 Cas13 酶多重检测。Cas9、Cas12a 在核酸检测应用中会受限于原间隔序列邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)位点。Cas13a 只能特异性识别 RNA,不能直接对 DNA 进行检测,必须先将 DNA 转录为 RNA 后才能检测。因此,Cas13a 在 DNA 检测方面的流程更为复杂,且系统中的 RNA 相对 DNA 更容易降解^[8,16-18]。

2 CRISPR/Cas 技术在病原体可视化核酸检测中的应用

近年来,随着病原体检测技术不断向简单、便捷和无需复杂配套设备的方向发展,基于肉眼判读可视化信号的检测反应越来越受到人们的关注。用于 POCT 的可视化检测方法主要有光吸收信号变化(可见光分光光度法)、散射光信号变化(颗粒散射光谱法)以及气压变化等非传统光信号的报告方式(表 2)。

3 基于可见光分光光度法的 CRISPR-Cas 检测

可见光分光光度法是采用可见光区域的电磁波作为光源照射样品,并分析样品特征光吸收的方法,基于此原理可实现定性分析或依据朗伯-比尔定律进行定量分析,同时样品光吸收特性的差异可具体表现为颜色的变化,可进一步实现可视化检测^[30-31]。

分光光度法可视化检测包括指示剂显色法以及酶促底物特征吸收峰迁移这 2 种。在生化反应过程中往往产生可与金属离子指示剂或 pH 敏感指示剂相互作用的副产物,并呈现出特定的颜色变化^[32-33]。pH 等理化条件的大幅变化会降低反应效率,基于指示剂法的可视化检测的应用较为受限,因此本文主要针对酶促底物特征吸收峰变化的可视化检测展开综述。

酶促底物显色是一种常用的特征吸收峰变

表 2 CRISPR/Cas 技术在病原体可视化核酸检测中的应用

Table 2 Application of CRISPR/Cas technology in visualized nucleic acid detection of pathogens

Visual analysis method	Pathogen	Cas effector	Target	Amplification	Sensitivity	Time	Reference
Visible spectrophotometry	HPV	Cas12a	DNA	RPA	17 pmol/L	2.5 h	[19]
	HBV	Cas12a	DNA	SDA	41.8 pmol/L	1.75 h	[20]
	<i>Bacillus anthracis</i>	Cas12a	DNA	RPA	1 copy/reaction	1.5 h	[21]
Particle scattering spectrometry	Zika virus	Cas9	RNA	NASBA	fmol level	2-6 h	[22]
	SARS-CoV-2	Cas12a	RNA	RT-RPA	1 copy/reaction	1 h	[23]
	African swine fever	Cas12a/Cas13a	DNA/RNA	RPA	fmol level	1 h	[24]
	SARS-CoV-2	Cas12a	RNA	RT-RPA	50 copies/reaction	1.5 h	[25]
	<i>Listeria</i> , African swine fever	Cas9	DNA	PCR	150 copies/reaction	1 h	[26]
	SARS-CoV-2	Cas9	RNA	PCR	2.5 copies/ μ L	1.2 h	[27]
	SARS-CoV-2	Cas9	RNA	RT-RPA	4 copies/ μ L	1 h	[28]
Other methods	Invasive fungi	Cas12a	RNA	RAA	10 CFU/mL	2 h	[29]

RPA: Recombinase polymerase amplification; SDA: Strand displacement amplification; NASBA: Nucleic acid sequence-based amplification; RAA: Recombinase aided amplification.

化的可视化检测方法,利用酶与底物间的特异性反应产生颜色变化,实现可视化检测。CRISPR-Cas 系统酶促底物显色法检测中常用的酶有辣根过氧化物酶、脱氧核酶等为代表的过氧化物酶和半乳糖苷酶^[19-22]。

3.1 辣根过氧化物酶催化的可视化检测反应

辣根过氧化物酶可催化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)、2,2'-联氮-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)铵盐[2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), ABTS]、酪胺等物质发生氧化还原反应,反应前后溶液的颜色会发生改变^[34]。

辣根过氧化物酶催化显色反应与 CRISPR-Cas 系统整合大体上包括直接法和竞争法两大类。Wu 等^[34]通过直接法实现了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌核酸可视化检测(图 1A),该法通过目标核酸激活 Cas12a 切割一端耦连在磁珠表面另一端偶联辣根过氧化物酶的 ssDNA,使辣根过氧化物酶从磁珠表面脱落,释放到溶液中与葡萄糖、4-氨基安替比林和 N-乙基-N-(2-羟基-3-磺基丙基)-3-甲基苯胺反应,从而实现可视化检测。

Hu 等^[19]利用竞争法,实现了 HPV 临床样本的可视化检测(图 1B),与商用 PCR-反向点杂交(PCR-reverse dot blot, PCR-RDB)诊断试剂盒相比,特异性和灵敏度分别为 100.00%和 87.50%。该方法通过 Cas12a 切割置换 DNA 链以实现竞争性的酶置换反应。在无靶核酸的情况下,未激活的 Cas12a 不会切割起始 DNA (initiator DNA),完整的起始 DNA 可通过 Toehold 介导的 DNA 链置换反应(toehold-mediated strand displacement reaction, TSD)与标有辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)的捕获 DNA 形成双链 DNA。磁珠表面的 DNA 探针不能与标有 HRP 的捕获 DNA 杂交,进而无法催化显

色反应。存在靶核酸时, Cas12a 会被激活切割置换链进而保证磁珠-HRP 复合物催化显色反应,以此实现靶核酸的可视化检测。

整体而言,可视化检测的主要思路是将目标核酸的有无转换为显色反应酶的有无以控制显色反应的信号。

3.2 脱氧核酶催化的可视化检测反应

Cas 蛋白的底物 ssDNA 也可折叠成复杂的三级结构作为脱氧核酶催化反应,如催化 RNA 切割、卟啉金属化和 DNA 腺苷酸化等^[35]。其中 G-quadruplex-hemin 是最常用的脱氧核酶,可在血红素辅助下催化底物显色,从而无需额外的显色酶,使系统得到了简化^[36]。

目前已经建立基于 G4-DNAzyme 和 Cas12a 炭疽芽孢杆菌可视化检测方案^[21]。该方案采用 CatG4 反向互补的核酸链 CatG4R 作为 Cas12a 反式切割效应的检测探针。当目标基因扩增后, Cas12a 对 CatG4R 进行切割,促使 CatG4 和血红素形成 G-四链体-血红素复合物。ABST²⁻发生氧化还原反应变为绿色的 ABST⁻。反之,当 Cas12a 未激活时, CatG4 与 CatG4R 反义分子互补配对,形成双链 DNA,阻碍 G-四链体-血红素复合物的形成,溶液保持无色(图 1C)。该方案采用免洗涤的液相竞争法检测,即溶液中原本含有大量 Cas 作用的底物,反应效率较高。

3.3 β -半乳糖苷酶催化的可视化检测反应

CRISPR-Cas 分析系统也可与合成生物学原理相结合,比如控制 β -半乳糖苷酶(LacZ)表达,再基于 LacZ 催化显色反应实现病原体核酸可视化检测^[37-38]。Pardee 等^[22]基于核酸依赖性扩增检测技术(nuclear acid sequence-based amplification, NASBA)、Cas9 切割活性及调控 β -半乳糖苷酶(LacZ)表达的 toehold 开关传感器建立了寨卡病毒不同谱系的区分方法。该方案将 toehold 触发装置连接至 NASBA 扩增的 RNA

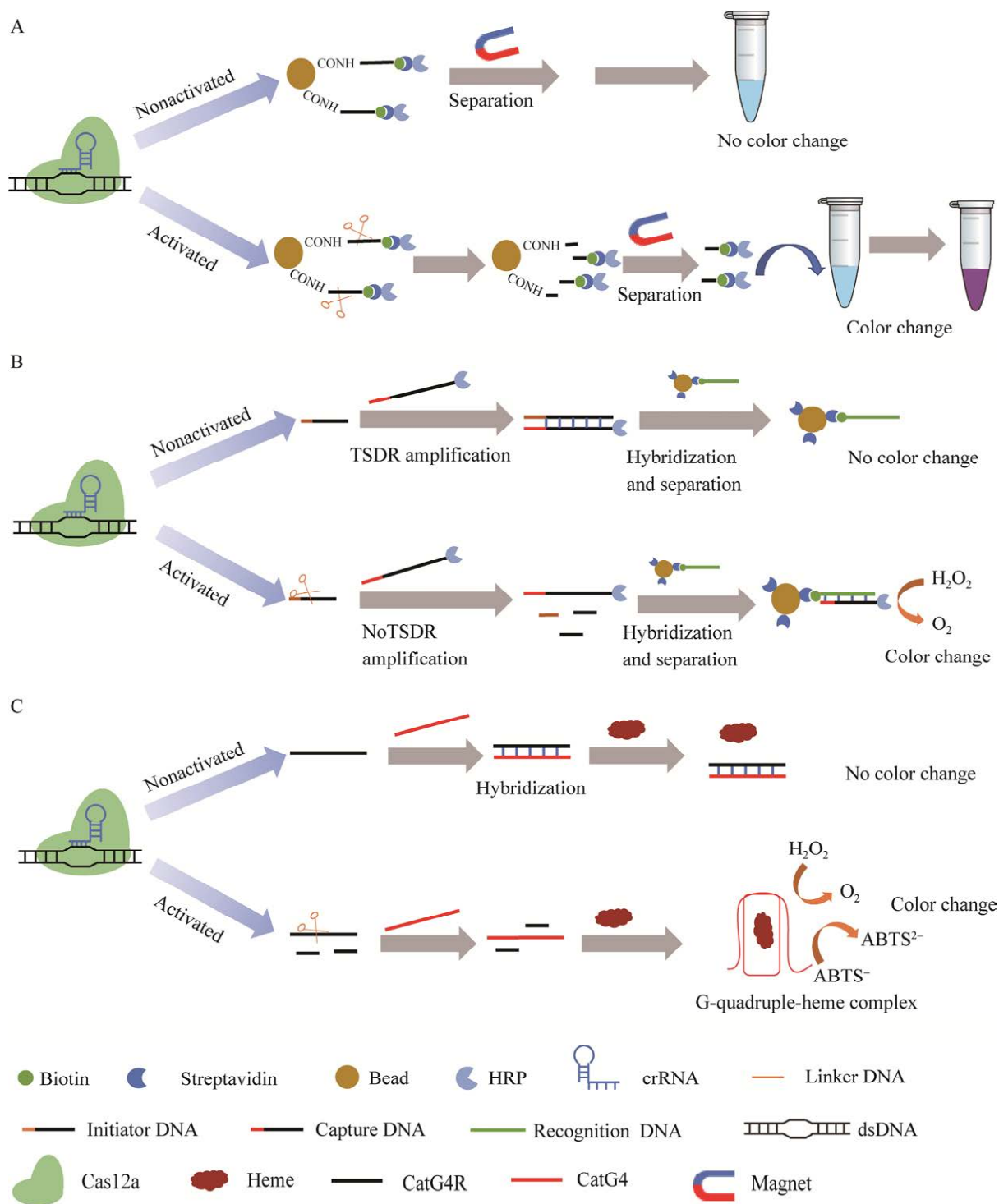


图 1 基于可见光分光光度法可视化检测原理 A: 辣根过氧化物酶直接法检测方案. B: 辣根过氧化物酶间接法检测方案. C: 脱氧核酶检测方案. D: β -半乳糖苷酶检测方案

Figure 1 Detection principle based on visible spectrophotometry visualization. A: Horseradish peroxidase direct assay scheme. B: Horseradish peroxidase indirect detection scheme. C: Deoxyribozyme test protocol. D: β -galactosidase test protocol.

片段。如果 RNA 片段中存在 PAM 序列, Cas9 介导的切割可以形成截短 RNA, toehold 开关传感器处于失活状态。当 RNA 片段中不存在 PAM 序列时, Cas9 未被激活, 能够转录出含有全长 RNA 的触发器激活 toehold 开关, 实现 LacZ 基因翻译与后续表达。最终, LacZ 将黄色底物(氯酚红- β -D-吡喃半乳糖苷)转化为紫色产物(氯酚红), 实现可视化检测。

4 基于颗粒散射光谱的 CRISPR-Cas 检测

光在非均匀介质中传播时, 光子与介质发生弹性/非弹性碰撞, 其传播方向和频率会发生变化。可视化散射光谱分析法是基于此原理建立的测定可见光与介质相互作用后测定光吸收或者光散射程度的一类分析方法^[39]。

金纳米颗粒(gold nanoparticles, AuNPs)具有表面等离子共振决定的特殊光化学性质, 与其颗粒的大小、形状、颗粒间的距离相关。控制颗粒大小变化以及颗粒聚集与否均可实现可视化信号检测。目前常用的 AuNPs 粒径为 15–20 nm, 其聚集会导致等离子共振吸收峰发生红移, 从而发生颜色变化; 因此可以通过调节 AuNPs 之间的吸引力和排斥力相对大小, 从而控制 AuNPs 的聚集和分散促使颜色变化实现可视化检测, 且由于 AuNPs 直径较小, 能顺利通过层析纸条的微孔, 因此可与层析纸条法搭配使用^[40]。

4.1 溶液内颗粒散射光谱特征

在 AuNPs 表面标记 ssRNA 或 ssDNA 可以增大颗粒之间的排斥力, 有利于 AuNPs 稳定存在于溶液中。Zhang 等^[23]用硫醇化的 ssDNA 标记在 AuNPs 表面, 作为 Cas12a 裂解的底物。无靶核酸激活 Cas12a 时, AuNPs 凭借表面修饰的硫醇化 ssDNA 保持分散良好的状态, 使溶液

呈现红色。靶核酸激活的 Cas12a 水解 AuNPs 表面 ssDNA, AuNPs 颗粒间排斥力下降进而聚集, 溶液由红变紫。该法实现了基于 AuNPs 的可视化检测, 但其背景值较高且 ssDNA 切割效率会影响 AuNPs 聚集, 阴阳性结果差异较小, 限制了该方法的分析灵敏度(图 2A)。

Yuan 等^[24]在此基础上提出了更优的检测方案; 该方案首先采用靶序列激活 Cas 蛋白切割两端可分别杂交 AuNPs 表面探针的 ssDNA 或 ssRNA 连接子; 在无靶序列激活 Cas 蛋白时, 连接子双杂交 AuNPs-DNA 探针使形成 AuNPs 聚集状态, 反之, AuNPs 则分散到溶液中; 其次, 该方案采用低速离心将配对的 AuNPs 沉降至管底, 降低背景颜色的干扰。该方案不仅实现 AuNPs 颗粒的有序聚集, 同时提升阴阳性结果信号比, 可以显著提升检测的灵敏度(图 2B)。

由于以上方案对离心力、时间等要求较为严格, 难以真正地 POCT 化, 因此有研究提出基于磁珠法的信号放大方式来进行 POCT 化。Hu 等^[40]根据该方法建立了基于 CRISPR-Cas12a 金黄色葡萄球菌的可视化检测方法(图 2C)。该方案将两端杂交 AuNPs-DNA 的双杂交探针替换为一端通过生物素亲和素偶联至磁珠表面, 另一端杂交 AuNPs-DNA, 仍采用靶核酸 Cas 蛋白反式切割杂交捕获探针, 并通过磁场控制实现 AuNPs-磁珠/磁珠的分离, 观察溶液中 AuNPs 的含量以判断样品中是否有靶核酸。

4.2 层析法颗粒散射光谱特征

侧向层析技术基于毛细力驱使样品向试纸条一侧定向移动, 流经包被有检测原料的检测线和质控线, 实现免洗涤快速检测, 其往往与纳米颗粒结合使用, 是重要的 POCT 技术之一^[41]。根据检测原理 CRISPR-Cas+侧向层析可以分为两类。

一类依赖 Cas 蛋白的反式切割活性, 将两

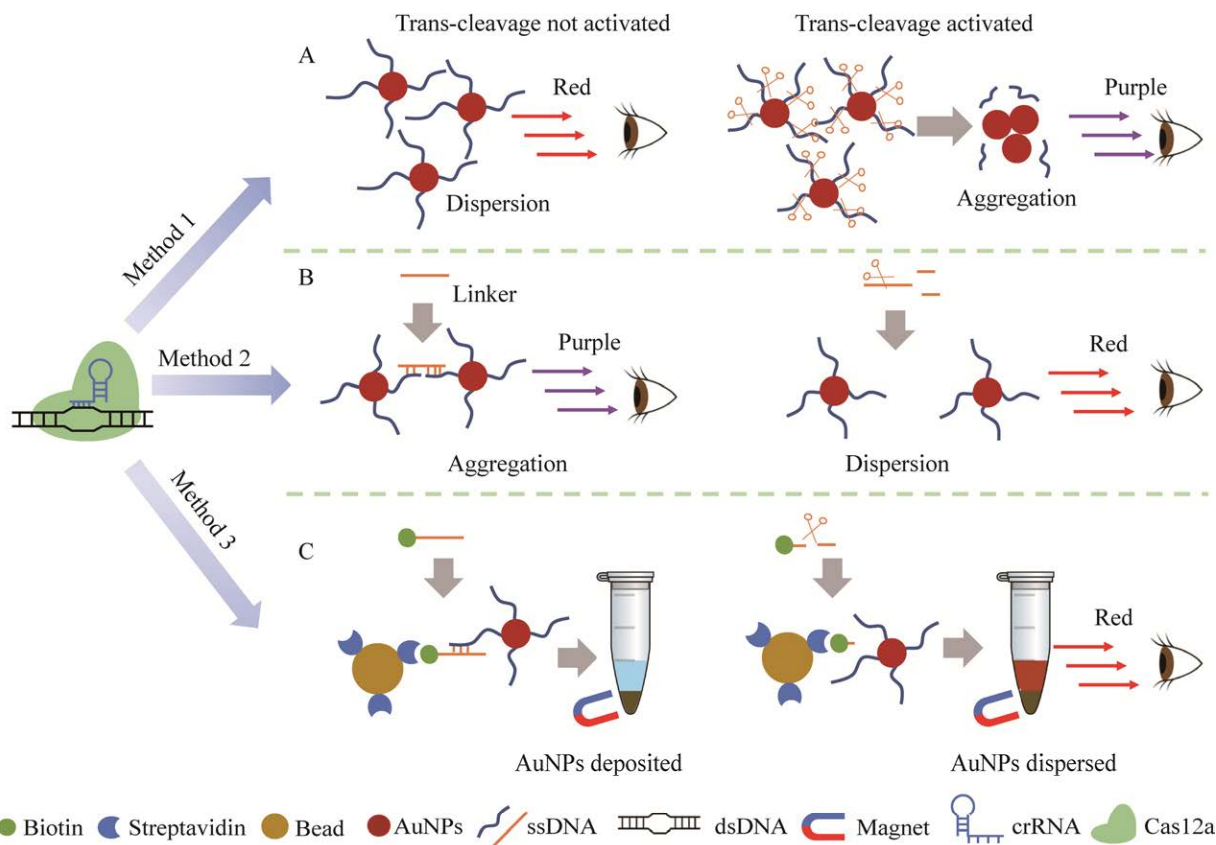


图 2 基于溶液内金纳米颗粒可视化检测原理 A: 依赖 AuNPs 表面修饰 DNA 的检测方案. B: 连接器介导的优化方案. C: 生物素磁珠介导的优化方案

Figure 2 Based on the principle of visual detection of gold nanoparticles in solution. A: AuNPs dependent surface-modified DNA assay protocol. B: Optimization scheme mediated by linker. C: Biotin magnetic bead-mediated optimisation scheme.

端分别标有生物素和荧光素的报告分子切割成 2 段序列,随着液体流动游离的荧光素与 AuNPs 表面的荧光素抗体结合,最终被 T 线上抗荧光素抗体捕获。当 Cas12a、Cas13a 反式切割活性没有被激活时,报告分子一端的荧光素与 AuNPs 表面的荧光素抗体结合,另一端与 C 线上的亲和素结合(图 3A)。例如, Qian 等^[41]基于 Cas12a 和侧向层析技术开发了一种金黄色葡萄球菌的可视化检测。

另外一类通过 Cas9 与侧向层析结合,该方法不依赖于反式切割活性,可以进一步扩展 CRISPR-Cas 系统与侧向层析的联用。同时,

Cas9 识别目标 DNA 所依赖的 PAM 序列 NGG 比 Cas12a 所依赖的 PAM 序列 TTTN 出现的频率更高,降低了扩增引物的设计难度^[42]。

Wang 等^[26]使用带生物素标记的引物进行扩增,得到一端标有生物素的 DNA 片段,随后与无切割活性的 Cas9 (nuclease-dead mutants of Cas9, dCas9)和单链 gRNA 孵育形成复合物。该复合物中 sgRNA 与 AuNPs 表面的 DNA 探针杂交,然后被检测线上的链霉亲和素捕获。过量的 DNA-AuNPs 探针与在质控线的固相探针杂交显色(图 3B)。Xiong 等^[42]在此基础上增加了地高辛标记,实现了 SARS-CoV-2 双基因检测。

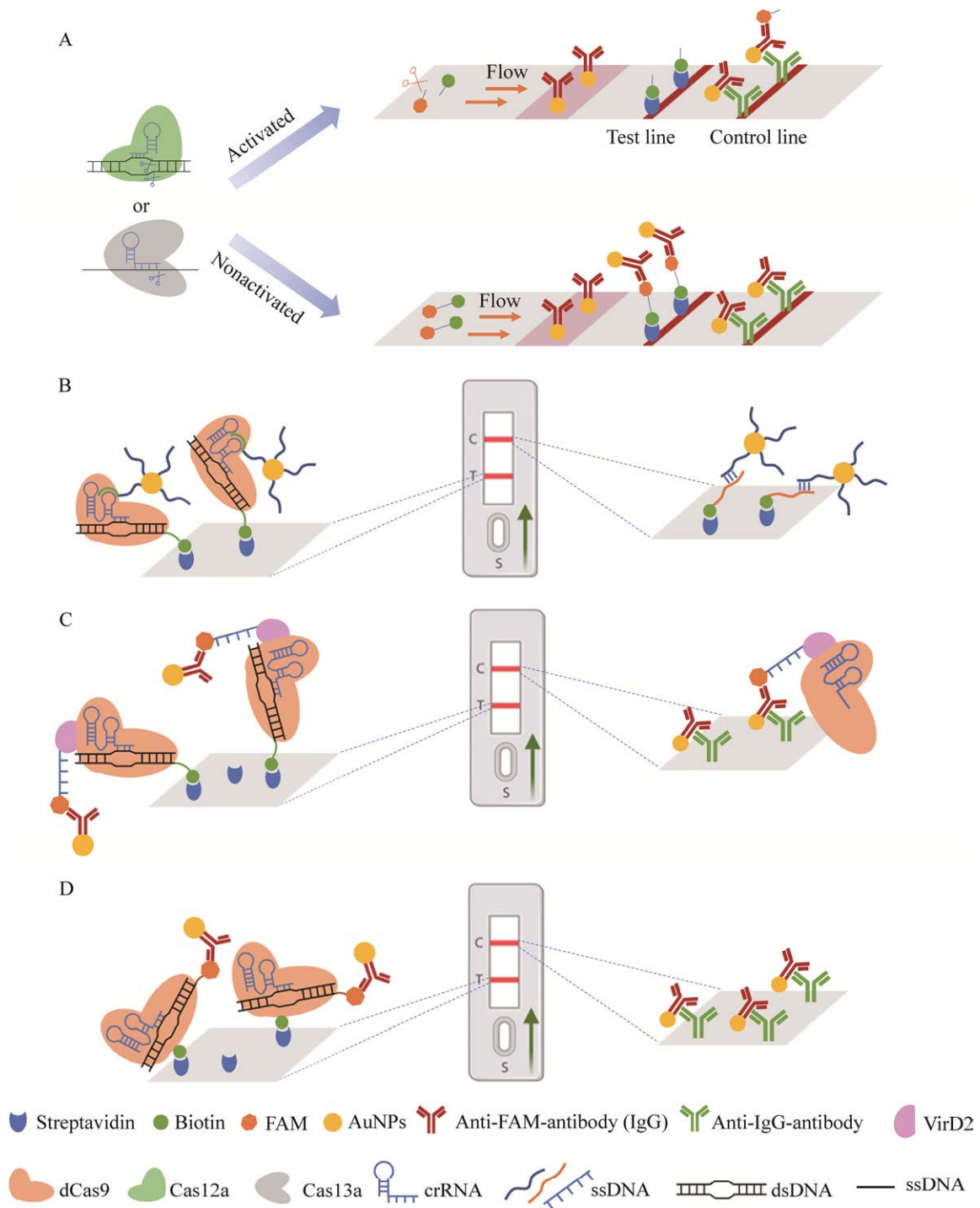


图3 基于层析法可视化检测原理 A: 依赖 cas 蛋白反式切割活性检测方案. B: 依赖固相探针杂交检测方案. C: 融合表达 dCas9 与松弛酶 VirD2 的检测方案. D: 生物素修饰的 dCas9 检测方案

Figure 3 Based on the principle of visual detection by chromatography. A: Cas protein trans-cutting activity-dependent detection scheme. B: Solid-phase probe hybridisation-dependent detection scheme. C: Assay scheme for fusion expression of dCas9 with relaxase VirD2. D: Biotin-modified dCas9 detection scheme.

Marsic 等^[27]融合表达 dCas9 与松弛酶 VirD2, 以共价连接的方式将 FAM 荧光基团标记的 ssDNA 偶联至 VirD2 表面, 随后与标有 AuNPs 的抗体结合, 最终建立了 SARS-CoV-2 的可视化检测方案。但 dCas9 存在大量的酪氨酸, 标记过程中 ssDNA 可能会被 dCas9 标记, 影响 dCas9 结合靶核酸的活性(图 3C)。

Ali 等^[28]将生物素标记至 dCas9 (bio-dCas9), 并使用 FAM 标记的引物扩增。在孵育过程中, bio-dCas9 特异性识别并结合扩增产物, 形成 bio-dCas9-sgRNA-DNA 复合物。然后复合物与侧向层析纸条上的 AuNPs 的抗体结合, 最终与 T 线上的亲和素结合(图 3D)。

5 基于其他可视化信号的 CRISPR-Cas 检测

5.1 基于气压信号的可视化检测

Shao 等^[43]基于铂纳米颗粒 (platinum nanoparticles, PtNPs)和气动芯片, 结合 Cas12a 实现了病原体核酸的可视化检测。Cas12a 激活后, 切割磁珠-ssDNA-金属铂纳米颗粒(magnetic bead-single-stranded DNA-PtNPs, BDNP)报告分子的 ssDNA, 释放 PtNPs。这些 PtNPs 与 H_2O_2 反应, 产生氧气。在氧气的推动下, 通道内的红

色墨水向前移动, 从而实现可视化检测(图 4)。相较于其他几种可视化检测方法, 该方法仅凭借肉眼就可实现定量检测, 极大地降低了检测成本, 提高检测效率。但是高温等因素会造成 H_2O_2 发生分解, 也能造成红色墨水的移动, 从而影响检测结果。因此, 在芯片使用过程中, 需要避免保存温度过高等因素造成 H_2O_2 的分解。

5.2 基于迁移距离信号的可视化检测

Huang 等^[29]开发了基于水凝胶集成纸基微流控芯片的 CRISPR-Cas12a 可视化检测方案, 实现念珠菌等真菌的检测。该方案通过 Y 型支架 DNA 和连接 DNA 组装成水凝胶。当 Cas12a 激活后, 会切割连接 DNA 两端的 ssDNA, DNA 水凝胶发生崩解, 释放出的葡萄糖氧化酶水解直链淀粉, 并在水凝胶上清液中产生大量葡萄糖。最后, 在预修饰的纸基芯片上, 通过葡萄糖诱导级联酶促反应, 产生棕色条带作为检出信号。葡萄糖浓度与棕色条带迁移长度正相关, 可以通过肉眼读取棕色条的距离实现核酸半定量分析(图 5)。

6 总结与展望

CRISPR-Cas 系统核酸检测大致包括 Cas 蛋白反式切割报告探针和无切割活性 Cas 蛋白-报

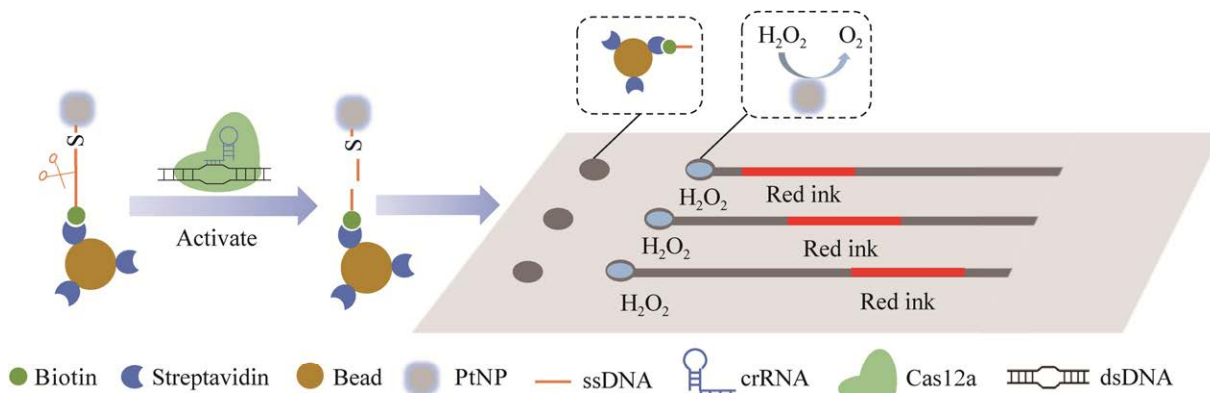


图 4 基于气压信号的可视化检测原理

Figure 4 Principle of visual detection based on pressure signals.

仅可以提升可视化检测的特异性,同时可大幅降低核酸检测对实验室基础设施、精密仪器及专业人员的依赖程度,实现真正意义上的不依赖于设备的 POCT 核酸检测。CRISPR-Cas 可视化检测技术在病原体核酸检测方面有广泛的应用潜力。为推动该技术的临床应用,还应克服以下挑战:

目前,CRISPR-Cas 可视化检测均需要扩增样本中的靶序列以激活 Cas 蛋白活性,但 CRISPR-Cas 检测体系与核酸片段扩增体系难以兼容、CRISPR-Cas 发挥反式切割活性时会水解扩增的靶片段干扰扩增反应,因此难以实现单管内“扩增+Cas 切割”反应,若扩增转移扩增产物至 Cas 体系,则易造成引起假阳性的核酸气溶胶污染。针对上述问题,目前有研究提出分隔法、非经典 PAM 序列法和酰化法这 3 种方案。分隔法通过温控石蜡的固液转换实现扩增体系与 CRISPR-Cas 反应体系分隔与混合,或通过离心法、微流控芯片实现类似功能^[45-46]。非经典 PAM 序列法是基于非经典 PAM 降低 CRISPR-Cas 蛋白的靶序列切割活性以使其与扩增反应兼容^[47]。反应初期 Cas12a 和底物的结合能力弱,等温扩增占据主导地位,快速富集足够的底物,为反应后期 Cas12a 切割奠定基础。该方法提升了 CRISPR-Cas 系统对 PAM 序列的兼容程度,降低了对检测序列的要求。酰化法是利用光敏试剂(photolabile agents PLGs)酰化成簇规律间隔短回文重复序列 RNA (crispr RNA, crRNA),抑制 crRNA 功能,阻碍 Cas12a 激活。当核酸扩增结束后,使用紫外灯照射 1 min, crRNA 去酰化,激活 Cas12a 反式切割活性,切割两端标记有荧光基团和猝灭基团的 ssDNA 底物,具有很好的通用性^[48]。权衡 Cas 蛋白激活与靶序列扩增之间的矛盾已经取得了一定的研究进展,但仍然是影响 CRISPR-Cas 可视化检

测走向临床应用的关键问题。

可视化信号分析的灵敏度需要进一步提升,可以从开发新型信号放大方式、降低检测体系背景值等方面开展优化。可视化检测主要依据人眼判断反应前后颜色变化以判读结果。为降低检测结果的偏差,需要尽量选用人眼敏感的颜色。此外,可视化检测还能与高效、简洁的生物传感系统进行联合使用,提升可视化检测性能。Li 等^[49]采用石墨烯场效应晶体管(graphene field-effect transistors, gFET)和 Cas13a 实现新型冠状病毒和呼吸道合胞病毒的免扩增检测。同时,还能使用一些可视化信号进一步拓展定量检测功能,满足病毒载量监测方面的需求。

CRISPR-Cas 可视化检测系统的检测性能需进一步提升,可采用将不同长度的 ssDNA 或 ssRNA 延长 crRNA 的 3'或 5'端、RNA 结合结构域插入 Cas 蛋白活性位点等方式提高系统灵敏度^[50-51]。同时,为了满足 WHO 对 POCT 产品的 ASSURED 指导原则,该系统还需简化检测步骤、提升集成度,从而开发出具备高性能、低成本、良好的便携性和易操作性等特点的核酸 POCT 产品。目前大多数 CRISPR-Cas 可视化检测系统仅满足其中部分要求,参考目前临床转化较为成功的 qPCR 技术的开发历程,CRISPR-Cas 可视化检测系统的提升需要从优化反应方案、提升试剂鲁棒性、开发配套的检测耗材等方面着手。

CRISPR-Cas 可视化检测还需要与 POCT 化样本处理方式结合,以实现快速、高效的现场检测。POCT 现场核酸检测需兼顾便捷、易操作、效率高、灵敏、特异性强等特点。完整步骤核酸提取包括裂解吸附-多次洗涤-洗脱,涉及复杂的液体转移过程,但完整步骤核酸提取可以最大程度去除样本中的抑制物,提升核酸模

板的纯度,是确保后续高灵敏度扩增检测的前提。简易裂解(免提取技术)可提升检测方案的简便性、缩短耗时,但其难以有效去除抑制物,影响后续反应,造成不同程度的漏检。综上,高性能核酸提取方法的 POCT 化是现场核酸检测的难点问题之一。目前,基于完整核酸提取的现场核酸检测产品已经得到广泛的认可。因此如何基于微流控技术、新型固液界面技术等新兴技术在确保不影响核酸提取纯度、得率的前提下提升核酸提取的自动化、简便度是推动 CRISPR-Cas 可视化检测 POCT 化的关键步骤^[52-53]。

CRISPR-Cas 可视化检测试剂中的生物活性物质需低温保存,依赖于专门的冷链运输,极大地限制了 POCT 的广泛使用。可采用冻干技术将液态试剂进行干燥处理,降低热敏性生物活性物质的损害,实现检测试剂的常温保存和运输^[54-55]。

目前本课题组已经基于 Cas12a 和 RPA 建立了一种可兼容、超灵敏、超快速的“一管式”检测系统,实现猴痘病毒的 30 min 快速检测。该方案使用冻干技术将 RPA 扩增体系和 Cas12a 反应体系制备成可常温保存及运输的微球,通过冻干微球复溶的方式,克服了液态试剂冷链运输和体系配制的限制。并采用不同熔点石蜡包裹微球,解决了两种反应体系间不兼容的问题,提升了该系统的检测性能。

CRISPR-Cas 可视化核酸检测方案的建立对提升基层医疗单位、医疗资源匮乏地区的病原体快速检测能力有重要意义,同时是实现快速、便捷、无需仪器设备的 POCT 式核酸检测的重要途径。虽然目前 CRISPR-Cas 可视化核酸检测存在一些短板,但其 POCT 潜力是显而易见的,相信不久的将来会有更多的基于 CRISPR-Cas 可视化核酸检测的 POCT 产品应用于临床检测^[56]。

REFERENCES

- [1] BAKER RE, MAHMUD AS, MILLER IF, RAJEEV M, RASAMBAINARIVO F, RICE BL, TAKAHASHI S, TATEM AJ, WAGNER CE, WANG LF, WESOLOWSKI A, METCALF CJE. Infectious disease in an era of global change[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20: 193-205.
- [2] SIKANDAR S, SABIR A, AFZAL I, KHAN A, SARFRAZ S, QAMAR F. Emergence and re-emergence of infectious diseases: perpetual threat to public health world wide[J]. *Lahore Garrison University Journal of Life Sciences*, 2020, 2(3): 210-217.
- [3] SHEN J, DUAN HY, ZHANG BY, WANG JQ, JI JS, WANG J, PAN LJ, WANG XL, ZHAO KF, YING B, TANG S, ZHANG J, LIANG C, SUN HH, LV YB, LI Y, LI T, LI L, LIU H, ZHANG LB, WANG L, SHI XM. Prevention and control of COVID-19 in public transportation: experience from China[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 266(Pt 2): 115291.
- [4] ADHIKARI SP, MENG S, WU YJ, MAO YP, YE RX, WANG QZ, SUN C, SYLVIA S, ROZELLE S, RAAT H, ZHOU H. Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review[J]. *Infectious Diseases of Poverty*, 2020, 9(1): 29.
- [5] ZHANG L, DING BZ, CHEN QH, FENG Q, LIN L, SUN JS. Point-of-care-testing of nucleic acids by microfluidics[J]. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 2017, 94: 106-116.
- [6] NIEMZ A, FERGUSON TM, BOYLE DS. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases[J]. *Trends in Biotechnology*, 2011, 29(5): 240-250.
- [7] van DONGEN JE, BERENDSEN JTW, STEENBERGEN RDM, WOLTHUIS RMF, EIJKEL JCT, SEGERINK LI. Point-of-care CRISPR/Cas nucleic acid detection: recent advances, challenges and opportunities[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2020, 166: 112445.
- [8] YIN LJ, MAN SL, YE SY, LIU GZ, MA L. CRISPR-Cas based virus detection: recent advances and perspectives[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021, 193: 113541.
- [9] WANG SY, DU YC, WANG DX, MA JY, TANG AN,

- KONG DM. Signal amplification and output of CRISPR/Cas-based biosensing systems: a review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1185: 338882.
- [10] 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.
- [11] CHEN JS, MA EB, HARRINGTON LB, Da COSTA M, TIAN XR, PALEFSKY JM, DOUDNA JA. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 436-439.
- [12] PICKAR-OLIVER A, GERSBACH CA. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019, 20: 490-507.
- [13] GARNEAU JE, DUPUIS MÈ, VILLION M, ROMERO DA, BARRANGOU R, BOYAVAL P, FREMAUX C, HORVATH P, MAGADÁN AH, MOINEAU S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA[J]. *Nature*, 2010, 468: 67-71.
- [14] MAKAROVA KS, ZHANG F, KOONIN EV. SnapShot: class 1 CRISPR-Cas systems[J]. *Cell*, 2017, 168(5): 946-946.e1.
- [15] MAKAROVA KS, ZHANG F, KOONIN EV. SnapShot: class 2 CRISPR-Cas systems[J]. *Cell*, 2017, 168(1/2): 328-328.e1.
- [16] CHENG XK, LI YR, KOU J, LIAO D, ZHANG WL, YIN LJ, MAN SL, MA L. Novel non-nucleic acid targets detection strategies based on CRISPR/Cas toolboxes: a review[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2022, 215: 114559.
- [17] WU H, CHEN XY, ZHANG MY, WANG XF, CHEN YJ, QIAN C, WU J, XU JF. Versatile detection with CRISPR/Cas system from applications to challenges[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2021, 135: 116150.
- [18] WANG XJ, SHANG XY, HUANG XX. Next-generation pathogen diagnosis with CRISPR/Cas-based detection methods[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 1682-1691.
- [19] HU T, KE XX, OU YJ, LIN Y. CRISPR/Cas12a-triggered chemiluminescence enhancement biosensor for sensitive detection of nucleic acids by introducing a tyramide signal amplification strategy[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(23): 8506-8513.
- [20] GONG SH, ZHANG SQ, WANG X, LI JJ, PAN W, LI N, TANG B. Strand displacement amplification assisted CRISPR-Cas12a strategy for colorimetric analysis of viral nucleic acid[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(45): 15216-15223.
- [21] WANG DS, CHEN G, LYU YF, FENG EL, ZHU L, PAN C, ZHANG WC, LIU XK, WANG HL. A CRISPR/Cas12a-based DNase visualization system for rapid, non-electrically dependent detection of *Bacillus anthracis*[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2022, 11(1): 428-437.
- [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] ZHANG WS, PAN JB, LI F, ZHU M, XU MT, ZHU HY, YU YY, SU GX. Reverse transcription recombinase polymerase amplification coupled with CRISPR-Cas12a for facile and highly sensitive colorimetric SARS-CoV-2 detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(8): 4126-4133.
- [24] YUAN CQ, TIAN T, SUN J, HU ML, WANG XS, XIONG EH, CHENG M, BAO YJ, LIN W, JIANG JM, YANG CW, CHEN Q, ZHANG H, WANG H, WANG XR, DENG XB, LIAO XP, LIU YH, WANG Z, ZHANG GH, ZHOU XM. Universal and naked-eye gene detection platform based on the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas12a/13a system[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(5): 4029-4037.
- [25] JIANG YZ, HU ML, LIU AN, LIN Y, LIU LL, YU B, ZHOU XM, PANG DW. Detection of SARS-CoV-2 by CRISPR/Cas12a-enhanced colorimetry[J]. *ACS Sensors*, 2021, 6(3): 1086-1093.
- [26] WANG XS, XIONG EH, TIAN T, CHENG M, LIN W, WANG H, ZHANG GH, SUN J, ZHOU XM. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(2): 2497-2508.
- [27] MARSIC T, ALI Z, TEHSEEN M, MAHAS A,

- HAMDAN S, MAHFOUZ M. Vigilant: an engineered VirD2-Cas9 complex for lateral flow assay-based detection of SARS-CoV2[J]. Nano Letters, 2021, 21(8): 3596-3603.
- [28] ALI Z, SÁNCHEZ E, TEHSEEN M, MAHAS A, MARSIC T, AMAN R, RAO GS, ALHAMLAN FS, ALSANEA MS, AL-QAHTANI AA, HAMDAN S, MAHFOUZ M. Bio-SCAN: a CRISPR/dCas9-based lateral flow assay for rapid, specific, and sensitive detection of SARS-CoV-2[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(1): 406-419.
- [29] HUANG D, NI DS, FANG MJ, SHI ZW, XU ZN. Microfluidic ruler-readout and CRISPR Cas12a-responded hydrogel-integrated paper-based analytical devices (μ ReaCH-PAD) for visible quantitative point-of-care testing of invasive fungi[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(50): 16965-16973.
- [30] MÖRSCHBÄCHER AP, DULLIUS A, DULLIUS CH, BANDT CR, KUHN D, BRIETZKE DT, MALMANN KUFFEL FJ, ETGETON HP, ALTMAYER T, GONÇALVES TE, ORESTE EQ, RIBEIRO AS, de SOUZA CFV, HOEHNE L. Validation of an analytical method for the quantitative determination of selenium in bacterial biomass by ultraviolet-visible spectrophotometry[J]. Food Chemistry, 2018, 255: 182-186.
- [31] LIANG LJ, ZHEN SJ, HUANG CZ. Visual and light scattering spectrometric method for the detection of melamine using uracil 5'-triphosphate sodium modified gold nanoparticles[J]. Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2017, 173: 99-104.
- [32] GARRIDO-MAESTU A, PRADO M. Naked-eye detection strategies coupled with isothermal nucleic acid amplification techniques for the detection of human pathogens[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2022, 21(2): 1913-1939.
- [33] QIU XY, ZHU LY, ZHU CS, MA JX, HOU T, WU XM, XIE SS, MIN L, TAN DA, ZHANG DY, ZHU LY. Highly effective and low-cost microRNA detection with CRISPR-Cas9[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(3): 807-813.
- [34] WU XZ, JIN D, NI W, WANG F, ZHANG YL, ZHANG GJ. CRISPR/Cas12a coupling with RPA and MNPs for rapid and visualized identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2023, 382: 133546.
- [35] SEN D, GILBERT W. Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis[J]. Nature, 1988, 334: 364-366.
- [36] PARDEE K, GREEN AA, FERRANTE T, CAMERON DE, DALEYKEYSER A, YIN P, COLLINS JJ. Paper-based synthetic gene networks[J]. Cell, 2014, 159(4): 940-954.
- [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] JANS H, HUO Q. Gold nanoparticle-enabled biological and chemical detection and analysis[J]. Chemical Society Reviews, 2012, 41(7): 2849-2866.
- [39] TANNER NA, ZHANG YH, JR EVANS TC. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes[J]. BioTechniques, 2015, 58(2): 59-68.
- [40] HU ML, YUAN CQ, TIAN T, WANG XS, SUN J, XIONG EH, ZHOU XM. Single-step, salt-aging-free, and thiol-free freezing construction of AuNP-based bioprobes for advancing CRISPR-based diagnostics[J]. Journal of the American Chemical Society, 2020, 142(16): 7506-7513.
- [41] QIAN JJ, HUANG D, NI DS, ZHAO JR, SHI ZW, FANG MJ, XU ZN. A portable CRISPR Cas12a based lateral flow platform for sensitive detection of *Staphylococcus aureus* with double insurance[J]. Food Control, 2022, 132: 108485.
- [42] XIONG EH, JIANG L, TIAN T, HU ML, YUE HH, HUANG MQ, LIN W, JIANG YZ, ZHU DB, ZHOU XM. Simultaneous dual-gene diagnosis of SARS-CoV-2 based on CRISPR/Cas9-mediated lateral flow assay[J]. Angewandte Chemie (International Ed in English), 2021, 60(10): 5307-5315.
- [43] SHAO N, HAN X, SONG YN, ZHANG PC, QIN LD. CRISPR-Cas12a coupled with platinum nanoreporter for visual quantification of SNVs on a volumetric bar-chart chip[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(19): 12384-12391.
- [44] LI YN, SHI ZL, HU AZ, CUI JS, YANG K, LIU Y, DENG GQ, ZHU CC, ZHU L. Rapid one-tube RPA-CRISPR/Cas12 detection platform for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Diagnostics, 2022, 12(4): 829.
- [45] HUANG D, ZHAO YK, FANG MJ, SHEN PJ, XU H, HE YC, CHEN SF, SI ZJ, XU ZN.

- Magnetofluid-integrated biosensors based on DNase-dead Cas12a for visual point-of-care testing of HIV-1 by an up and down chip[J]. *Lab on a Chip*, 2023, 23(19): 4265-4275.
- [46] WANG YQ, KE YQ, LIU WJ, SUN YQ, DING XT. A one-pot toolbox based on Cas12a/crRNA enables rapid foodborne pathogen detection at attomolar level[J]. *ACS Sensors*, 2020, 5(5): 1427-1435.
- [47] LU SH, TONG XH, HAN Y, ZHANG K, ZHANG YZ, CHEN QB, DUAN JY, LEI XL, HUANG MH, QIU Y, ZHANG DY, ZHOU X, ZHANG Y, YIN H. Fast and sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA using suboptimal protospacer adjacent motifs for Cas12a[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2022, 6: 286-297.
- [48] LIU PF, LIN YT, ZHUO XH, ZENG JY, CHEN BL, ZOU Z, LIU GH, XIONG EH, YANG RH. Universal crRNA acylation strategy for robust photo-initiated one-pot CRISPR-Cas12a nucleic acid diagnostics[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2024: e202401486.
- [49] LI HJ, YANG J, WU GF, WENG ZY, SONG Y, ZHANG YX, VANEGAS JA, AVERY L, GAO Z, SUN H, CHEN YP, DIECKHAUS KD, GAO X, ZHANG Y. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 and respiratory syncytial virus using CRISPR Cas13a and graphene field-effect transistors[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2022, 61(32): e202203826.
- [50] NGUYEN LT, SMITH BM, JAIN PK. Enhancement of trans-cleavage activity of Cas12a with engineered crRNA enables amplified nucleic acid detection[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 4906.
- [51] YANG J, SONG Y, DENG XY, VANEGAS JA, YOU Z, ZHANG YX, WENG ZY, AVERY L, DIECKHAUS KD, PEDDI A, GAO Y, ZHANG Y, GAO X. Engineered LwaCas13a with enhanced collateral activity for nucleic acid detection[J]. *Nature Chemical Biology*, 2023, 19: 45-54.
- [52] ALI N, RAMPAZZO RCP, COSTA ADT, KRIEGER MA. Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics[J]. *BioMed Research International*, 2017, 2017: 9306564.
- [53] PRICE CW, LESLIE DC, LANDERS JP. Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip[J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(17): 2484-2494.
- [54] HOLM TP, MENG-LUND H, RANTANEN J, JORGENSEN L, GROHGANZ H. Screening of novel excipients for freeze-dried protein formulations[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 2021, 160: 55-64.
- [55] ARIZTI-SANZ J, BRADLEY A, ZHANG YB, BOEHM CK, FREIJE CA, GRUNBERG ME, KOSOKO-THORODDSEN TS F, WELCH NL, PILLAI PP, MANTENA S, KIM G, UWANIBE JN, JOHN OG, EROMON PE, KOCHER G, GROSS R, LEE JS, HENSLEY LE, MacINNIS BL, JOHNSON J, SPRINGER M, HAPPI CT, SABETI PC, MYHRVOLD C. Simplified Cas13-based assays for the fast identification of SARS-CoV-2 and its variants[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2022, 6: 932-943.
- [56] CELLO J, PAUL AV, WIMMER E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template[J]. *Science*, 2002, 297(5583): 1016-1018.

(本文责编 陈宏宇)