

基于 CRISPR/Cas12a 的核酸便捷化检测方法和现场快速便携式检测装置

胡飞^{1,2,4,5}, 刘艳飞^{1,2,4,5}, 李希晨^{1,2,4,5}, 曹铭航^{1,2,4,5}, 彭年才^{1,2,4,5*}, 张镇西^{3,4,5}

¹西安交通大学机械制造系统工程国家重点实验室, 陕西 西安 710049;

²西安交通大学机械工程学院, 陕西 西安 710049;

³西安交通大学生命科学学院, 陕西 西安 710049;

⁴西安市生物医学检测和高端装备重点实验室, 陕西 西安 710049;

⁵陕西省生命科学检测仪器工程技术研究中心, 陕西 西安 710049

摘要 核酸检测是病原体检测的必备流程,也是提升重大疾病和传染病应对能力、实施精准医疗的关键,在疾病防控、临床诊断、生物安全、环境监测等领域被广泛应用。目前临床上常用实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)方法进行核酸检测,但该方法的检测周期较长,且对实验室环境、硬件设备等要求较高。本文提出了一种基于 CRISPR/Cas12a(Cpf1)的核酸便捷化检测方法,并设计了一种现场快速便携式检测装置。基于前期开发的新型管中管耗材,本团队建立了基于肉眼或智能手机识别检测结果的单样本便捷核酸检测方法,并开发设计了多样本同时自动化检测的便携式小型化装置以及基于同轴光纤的荧光检测光路。基于上述方法和装置对新型冠状病毒核酸进行检测,检测灵敏度低于 10 copy/ μL ,检测时间可缩短至 32 min,检测过程中无需开盖,适用于家庭自检或现场快速检测。

关键词 生物光学; CRISPR/Cas12a; 便携式检测装置; 现场快速核酸检测; 荧光检测光路

中图分类号 O65

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL202249.1507402

1 引言

快速、准确、灵敏、定量检测特定的核酸序列在人类传染病诊断^[1]、粮食安全^[2]、病原体测定^[3]、全球生物安全^[4]、跟踪生物污染以及环境质量监测^[5]等方面发挥着越来越重要的作用。2019 年底暴发的新型冠状病毒(SARS-CoV-2 病毒)使世界各国人民的生命健康受到威胁。核酸检测作为疫情防控的关键核心环节和对抗疫情的重要武器,已经广为人知。

实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)核酸检测以其灵敏度高、窗口期短、特异性强、便于临床使用等优势成为临床传染病防控中首选的核酸检测平台^[6]。为了满足检测灵敏度和通量要求,现有的实时荧光 RT-PCR 病毒核酸检测设备大多存在检测周期较长(3~5 h 出结果)以及对环境、技术、硬件设备要求高等问题,比较适合在省/市级疾控中心和较大规模的三甲医院应用^[7]。本次新型冠状病毒来势凶猛,且具有较强的潜伏性特征,需要在社区、口岸等场所对疑似患者和密切接触人群开展快速诊断和现场筛查。光学检测技术在

疾病诊断中具有重要作用。基于荧光蛋白(FPs)的 FRET 测量已成为监测细胞内微弱的、实时的动态生化过程的一种不可或缺的技术^[8]。定量 mExEm-spFRET 检测技术能够高灵敏度、高精度、无损地实现 FRET 的定量检测^[9],张琪等^[10]利用亚扩散光谱技术搭建了亚扩散空间分辨漫反射测量系统,该系统能够有效检测黏膜组织病变。

美国 Cepheid 公司的 GeneXpert 系统是最早的全自动核酸现场检测系统。用户将样本简单预处理后直接加入试剂盒, GeneXpert 系统就能自动完成样品裂解、核酸纯化浓缩、定量 PCR 扩增检测,并输出分析结果,整个过程可在 1 h 内完成^[11]。与该仪器类似的还有 BioMérieux 公司的 Filmarray 系统、Roche 公司的 LiaT 系统和 iCubate 公司的 iCubate4000 系统,但这些系统除了仪器本身价格昂贵之外,其使用成本也较为昂贵(单次检验成本为 500~2000 元),不适宜大规模现场核酸检测筛查使用。

CRISPR 全称为规律成簇的间隔短回文重复序列,它是一种广泛存在于古细菌和细菌中的适应性免

收稿日期: 2021-12-01; 修回日期: 2022-02-25; 录用日期: 2022-03-03

基金项目: 国家自然科学基金(62005209)

通信作者: *ncpeng@mail.xjtu.edu.cn

疫系统^[12]。2013 年,研究人员发现 CRISPR/Cas9 系统只需设计一个向导 RNA(gRNA)就可以对相关基因进行定点编辑,自此,CRISPR 技术成为最受欢迎的基因编辑工具^[13]。近几年,科学家发现 CRISPR 及相关的 Cas 蛋白系统在 gRNA 的引导下不仅会导致靶标裂解,还会不加区分地切割非靶标序列,产生一种附带的切割活性。利用这种附带的切割活性,CRISPR 技术开始应用到核酸检测这一领域。2016 年 6 月,East-Seletsky A 等^[14]报道了一种 II 类 VI 型 CRISPR 效应蛋白 Cas13a,Cas13a 是一种在 gRNA 引导下可与靶标 RNA 特定位点结合并可以切割靶标 RNA 的核酸内切酶;2017 年,Zuo 等^[15]发现 *Leptotrichia buccalis* Cas13a(LbuCas13a)不仅具有切割靶标 RNA 的活性,还具有切割非靶标 RNA 的活性,这种非特异性切割后来被称为“附属切割”。利用这种附属切割活性,该研究小组将 Cas13a 用于 RNA 靶标检测,检出限约为 10 pmol/L。2017 年,Gootenberg 等^[16]将 *Leptotrichia wadei* Cas13a(LwaCas13a)与重组酶聚合酶等温扩增技术(RPA)结合,开发了一个基于高特异性和灵敏性的酶解锁报告探针(SHERLOCK)核酸检测系统。该检测系统中的靶标核酸分子经 RPA 扩增以及 T7 转录酶转录后,可以激活 LwaCas13a 的附属切割活性,从而任意切割底物 RNA 并产生荧光信号。2018 年,Doudna 团队^[17]利用 Cas12a 附属切割活性开发了一个基于 DNA 内切酶靶向 CRISPR 非特异性的报告探针,并形成了 DETECTR 核酸检测平台,该检测平台成功鉴定了 HPV16(人乳头瘤病毒)和 HPV18 两种基因。2019 年,Doudna 团队^[18]再次利用 Cas14 酶开发了 DETECTR-Cas14 平台,并将其成功用于 SNP 基因的分型和分子诊断。2018 年,基于 CRISPR 开发的病原体或肿瘤体外诊断技术入选由中国科学院和中国工程院组织两院院士评选出的世界十大科技进展^[19]。

CRISPR 技术作为一种新兴的核酸检测技术,在核酸检测领域展现出了巨大的发展潜力,但其本身还存在着一些技术限制,比如:单独使用 CRISPR 技术进行核酸检测,其灵敏度不能满足检测要求;采用 CRISPR 技术联合基因扩增技术进行核酸检测,可以满足灵敏度要求,但检测的自动化和防污染又成为一个亟待解决的问题;CRISPR 技术缺乏一套简单便携式的专业设备,以满足现场快速检测的需求。为防止 CRISPR 检测体系对扩增过程的干扰,研究人员提出了在反应管内将扩增反应与检测反应分开的一管式核酸检测方法^[20-25],即:在反应管底加入扩增试剂,在管帽或管壁加入 CRISPR 试剂,扩增完成后,CRISPR 试剂经离心或者手动摇晃转移至管底与扩增试剂混合,

实现相应的核酸检测。然而,在该方法中,CRISPR 试剂通过液滴之间的表面张力吸附在管帽和管壁上,这需要良好的操作技巧,实验系统不够稳定。Parinaz 研究团队^[26]利用 CRISPR-Cas13a 技术,开发了一款检测新型冠状病毒的便携式检测装置,实验结果可以用手机直接读取。基于该检测装置,CRISPR-Cas13a 技术在不扩增条件下的灵敏度能够达到 100 copy/ μ L,并且检测时间可缩短至 30 min;但是,在不扩增的前提下,该方法的灵敏度无法满足临床检测需求。如果直接增加前置扩增技术,则面临着分步加样操作,极易造成气溶胶污染,而且整个检测过程操作繁琐,难以实现检测的自动化。上述方法虽然为防污染的 CRISPR 现场快速核酸检测提供了新思路,但它们在稳定性、易用性、成本或灵敏度等方面还有待进一步优化。

针对上述方法的不足,本研究团队在前期开发的新型管中管耗材^[27]的基础上,建立了针对新型冠状病毒检测的 CRISPR/Cas12a 检测反应系统;同时,借助 CRISPR/Cas12a 检测反应系统以及新型管中管耗材,开发设计了多样本同时自动化检测的便携式小型化装置,以及基于同轴光纤的荧光检测光路。此外,针对手动检测模式,本团队开发了基于智能手机识别检测结果的单样本便捷核酸检测 APP。基于上述方法和装置对 SARS-CoV-2 核酸进行检测,检测灵敏度低于 10 copy/ μ L,检测时间可缩短至 32 min,而且检测过程中无需开盖,适用家庭自检或现场快速检测。

2 材料与方法

2.1 试剂

LbaCas12a 酶、LbaCas12a 酶缓冲液和 RT-RPA(反转录重组酶聚合酶扩增)等温扩增试剂盒购于广州博徕斯生物科技股份有限公司,鼠核糖核酸酶抑制剂购于基因生物技术国际贸易(上海)有限公司,核酸提取试剂盒(包括磁珠、裂解液、洗涤液和洗脱液)购于西安天隆科技有限公司,TaKaRa TaqTM 热启动聚合酶购于宝日医生物技术(北京)有限公司,SuperScriptTM IV 一步法 RT-PCR(反转录聚合酶链反应)系统购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司,无核酸酶水购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

2.2 SARS-CoV-2 检测相关引物等生物材料

引物设计后由生工生物工程(上海)股份有限公司合成纯化,其他序列,包括 crRNA、单链 DNA-FQ 荧光探针和 DNA 探针定购于广州博徕斯生物科技股份有限公司。所有序列详见表 1。所用 PCR 扩增仪为全自动医用 PCR 分析系统(Gentier 32R)。

表 1 DNA 寡核苷酸和 crRNA 的序列信息
Table 1 Sequence information of DNA oligonucleotides and crRNA

Name	Sequence (5'-3')
Universal RPA forward primer (SARS-CoV-2)	AGGCAGCAGTAGGGGAAGTCTCTCTGCTAGAAT
Universal RPA reverse primer (SARS-CoV-2)	TTGGCCTTTACCAGACATTTTGCTCTCAAGCTG
Universal PCR forward primer (SARS-CoV-2)	TTACAAACATTGGCCGCAAA
Universal PCR reverse primer (SARS-CoV-2)	GCGCGACATTCCGAAGAA
Universal PCR Probe (SARS-CoV-2)	FAM-ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG-BHQ
(SARS-CoV-2) crRNA	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUCUGCUGCUUGACAGAUUGAAC

2.3 RT-PCR 检测反应

利用 RT-PCR 核酸检测反应检验本文所提方法的可行性和准确性。实验采用的 50 μL RT-PCR 检测反应体系包括 10 μL RNA 样本、25 μL 2 倍 PlatinumTM SuperFiTM RT-PCR 预混液、2.5 μL 正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)、2.5 μL 反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)、0.5 μL SuperScriptTM IV RT 混合液和 2.5 μL PCR 探针,最后添加无核酸酶水至 50 μL 。将样本放到 Gentier 32R 实时荧光定量 PCR 仪中,进行如下操作:

1) 运行 cDNA 合成程序,温度设置为 50 $^{\circ}\text{C}$,孵育时间设置为 10 min;

2) 运行 PCR 检测程序(在 98 $^{\circ}\text{C}$ 下运行 2 min 为一个循环),实现逆转酶的灭活及初始变性;

3) 在 98 $^{\circ}\text{C}$ 下运行 10 s,接着在 55 $^{\circ}\text{C}$ 下运行 10 s,然后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下运行 30 s,共运行 45 个循环;

4) 在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 5 min,完成 RT-PCR 核酸检测。

2.4 RT-RPA 扩增反应

RT-RPA 反应体系主要包括缓冲液和反应微球。反应体系主要包括 29.5 μL 无引物再水化缓冲液、2.4 μL RPA 前向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)、2.4 μL RPA 反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)、3.2 μL 无核酸酶水、10 μL DNA 模板和 2.5 μL 醋酸镁溶液(280 mmol/L)。RT-RPA 扩增反应的具体操作流程如下:

1) 配制 47.5 μL 反应溶液,其中包含 29.5 μL 无引物再水化缓冲液、2.4 μL RPA 前向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)、2.4 μL RPA 反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)、3.2 μL 无核酸酶水和 10 μL DNA 模板;

2) 将 47.5 μL 反应溶液转移到反应微球中,然后将反应溶液先离心后振荡,接着再离心;

3) 在反应溶液中加入 2.5 μL 醋酸镁溶液(280 mmol/L),接着将反应溶液先快速离心,然后振荡,接着再离心;

4) 将反应溶液放入实时荧光 PCR 仪中,在 39 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 20 min,完成核酸扩增。

2.5 CRISPR 检测反应

CRISPR/LbaCas12a 检测系统主要包括

LbaCas12a 酶、LbaCas12a 酶缓冲液、crRNA、单链 DNA-FQ 荧光探针、鼠核糖核酸酶抑制剂、靶标和无核酸酶水。在自动化检测模式下,检测系统主要包括 100 nmol/L LbaCas12a 酶、50 nmol/L crRNA、1xLbaCas12a 缓冲液、2000 nmol/L 单链 DNA-FQ 荧光探针、20 U 鼠核糖核酸酶抑制剂和 2 μL DNA 模板,然后添加无核酸酶水到 20 μL 。最后,将整个反应系统在 39 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 12 min。

2.6 检测流程

在极简模式和自动化检测模式下,SARS-CoV-2 的检测流程主要包括以下步骤:1) 根据 2.5 节所述实验方法配制 10 μL CRISPR 反应溶液,在这里需要把靶标替换成无核酸酶水,然后将反应溶液加入反应外管中;2) 根据 2.4 节所述实验方法配制 10 μL RT-RPA 反应溶液,将其加入反应内管中;3) 按照内外管的安装顺序,将内管以及外管组装成反应管。

在极简模式下,组装完成反应管后执行以下检测步骤:1) 将整个反应管握在手心,孵育 20 min,完成 RT-RPA 反应;2) 用力甩动反应管,使内管中完成扩增的靶标序列经疏水性小孔转移到反应外管;3) 再次将整个反应管握在手心,孵育 12 min,完成 CRISPR 反应;4) 将反应管放在蓝光 LED 下,通过手机 APP 识别检测结果。

在自动化检测模式下,组装完成反应管后,将反应管放入仪器中,打开仪器,按下自动检测开关,仪器自动运行以下程序:1) 仪器自动加热检测腔室环境,并将温度保持在 39 $^{\circ}\text{C}$;2) 反应管在 39 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 20 min 后,仪器自动启动步进电机,步进电机将已完成扩增的 SARS-CoV-2 病毒从内管转移到外管;3) 步进电机正转反转各三次,完成试剂的混匀,然后,步进电机停止运行;4) 反应管继续在 39 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下孵育 12 min,完成相应的 CRISPR 反应;5) 仪器自动启动荧光识别电路,对相应的试管显示出的荧光进行成像,接着仪器内部的微处理器对图像数据进行处理,显示样本的检测结果(阴性或阳性)。极简模式及自动化检测模式下的检测流程如图 1 所示。

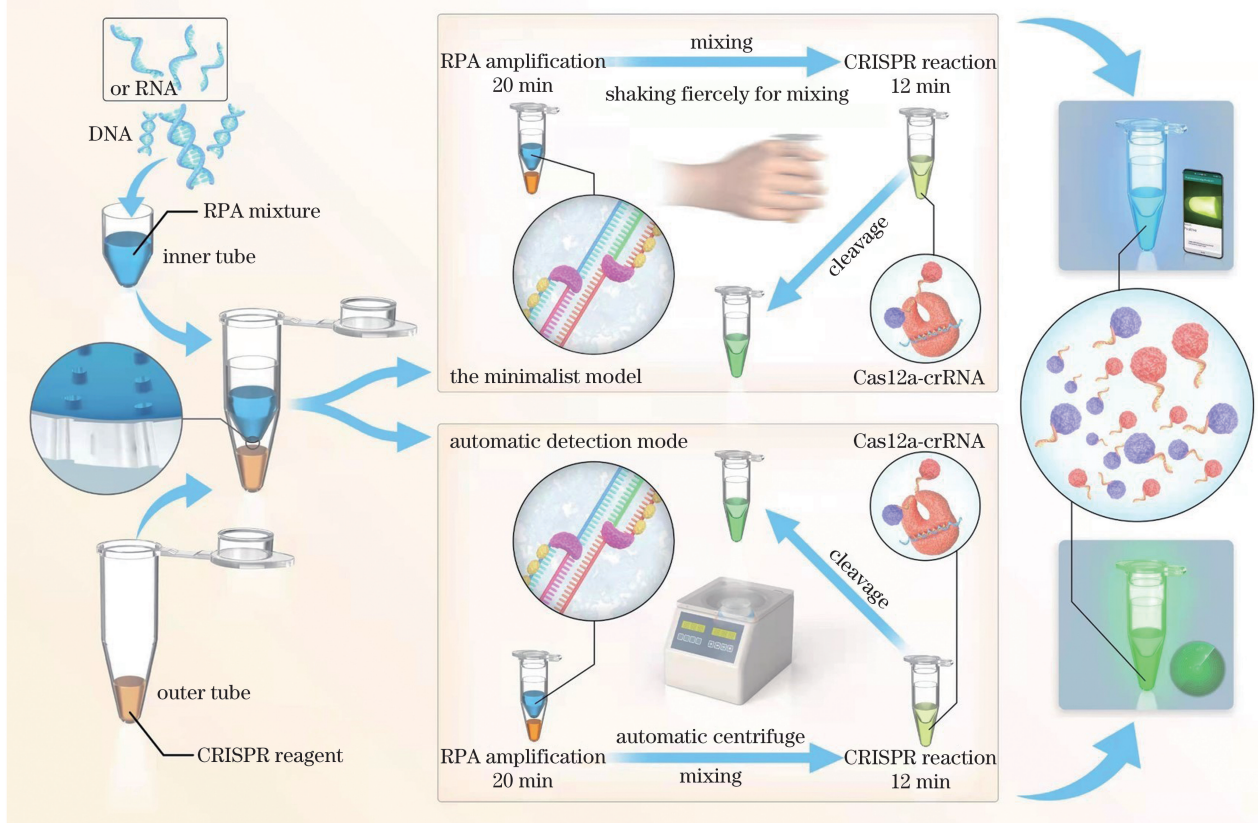


图 1 基于 CRISPR/Cas12a 的核酸便捷化检测方法流程图

Fig. 1 Flow chart of a convenient nucleic acid detection method based on CRISPR/Cas12a

3 结果与讨论

3.1 结构设计

本团队前期开发的管中管耗材由反应外管以及与反应外管相配合的反应内管组成,内管底部相对面开有两个疏水性小孔,在离心力或者振荡作用下,内管中的液体会经疏水性小孔转移到外管,实现反应内管反应体系与反应外管反应体系的混合。

检测仪器的实物图如图 2(a)所示,检测仪器主要

分为上下两部分。如图 2(b)所示,上半部分是一个光学暗盒,也是整个反应的检测腔室。暗盒内部集成有温度传感器、硅橡胶加热板、试管支架、步进电机、光电开关、光电开关安装板、LED 灯源、CMOS(互补金属氧化物半导体)相机、两个光纤安装板、同轴光纤等结构,暗盒的内外结构如图 2(c)所示。下半部分是仪器底座,作为暗盒的支撑结构,其内部集成有 PCB 电路板和人机交互显示屏,其主要结构如图 2(d)所示。

反应所需恒温加热条件由硅橡胶加热板和温度传

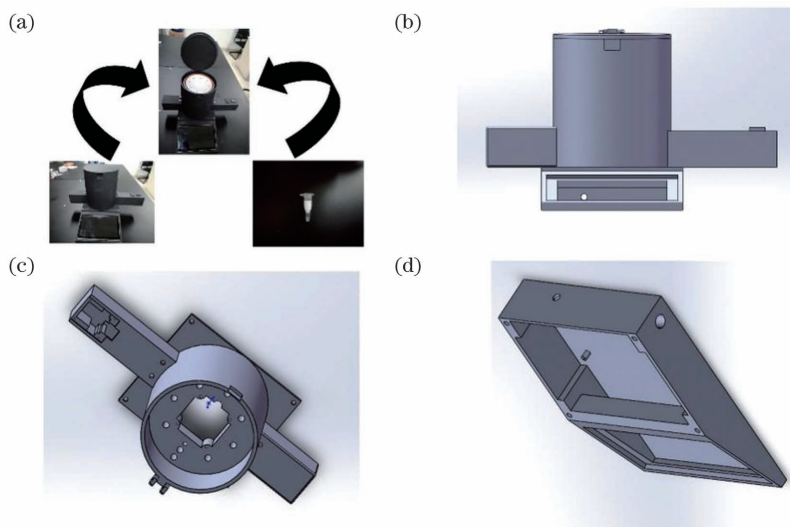


图 2 仪器结构示意图。(a)仪器实物图;(b)检测仪器整体结构示意图;(c)光学暗盒结构示意图;(d)仪器底座结构示意图

Fig. 2 Schematics of instrument structure. (a) Physical map of experimental instrument; (b) schematic of overall structure of testing instrument; (c) schematic of optical cassette structure; (d) schematic of instrument base structure

传感器提供,通过 PID(比例-积分-微分)算法实现加热和恒温保持功能。集成光电开关和步进电机的离心运动装置为反应管提供合适的离心速度,使内管液体在离心力作用下能够自动转移到外管,同时使反应内管中扩增后的样本在加减速正反转作用下与反应外管中的 CRISPR 核酸检测体系混合均匀。LED 灯源、准直镜头、CMOS 相机、同轴光纤、低电压差分信号(Lvds)显示屏、滤光片共同组成荧光检测光路。

3.2 光学检测结果呈现及相关图像处理

本团队基于 RT-RPA 扩增以及 CRISPR/Cas12a 反应开发了两种核酸检测模式,一种是基于人体手握

加热,靠肉眼或者智能手机识别检测结果的极简模式,另一种是基于小型便携化装置的自动化检测模式。根据试剂盒说明书中的建议,本文选择 RT-RPA 扩增时间为 20 min。本文选用的 CRISPR 反应时间由实验确定,具体做法是:低浓度样本经 RT-RPA 孵育 20 min 后,取 $10\ \mu\text{L}$ 扩增的靶标加入到 $10\ \mu\text{L}$ CRISPR 反应试剂中,然后将整个反应管放到实时荧光 PCR 仪中孵育。实验结果如图 3(b)所示。由实验结果可知,当反应时间为 8 min 时,已经产生了明显的荧光信号。为了缩短检测时间,同时保证检测的准确性,本文选择 12 min 作为最终 CRISPR 反应的孵育时间。

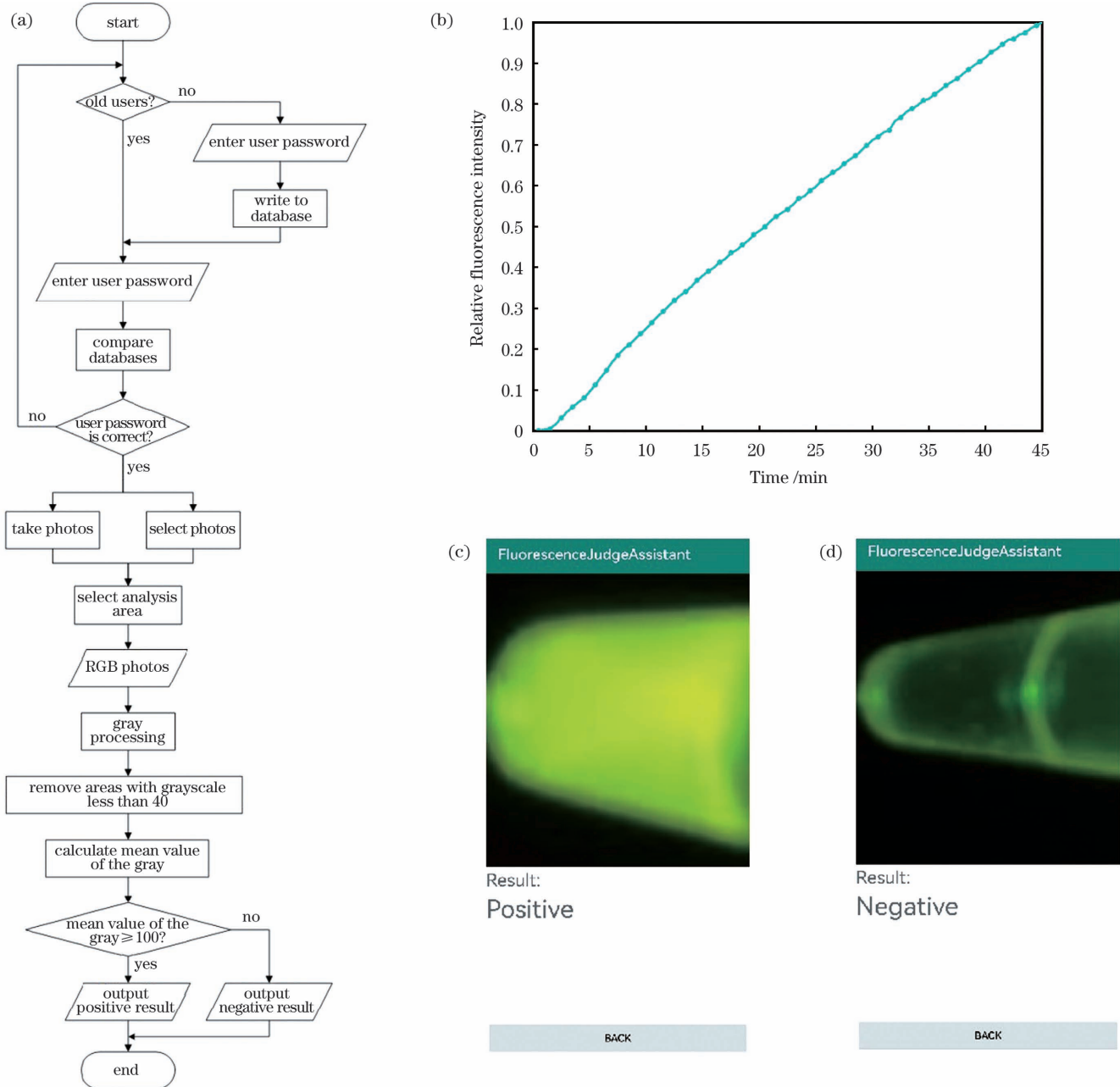


图 3 极简模式下的光学检测。(a)核酸检测 APP 的工作流程图;(b)实时荧光 CRISPR 反应时间;(c)核酸检测 APP 阳性结果呈现;(d)核酸检测 APP 阴性结果呈现

Fig. 3 Optical inspection in minimalist mode. (a) Workflow chart of nucleic acid detection APP; (b) real-time fluorescent CRISPR reaction time; (c) positive result showed by nucleic acid detection APP; (d) negative result showed by nucleic acid detection APP

在极简模式下,由于选择 FAM 荧光基团作为最后的检测标志物,而 FAM 荧光基团一般选用的激发波长为 450~490 nm,所以在该模式下选择 470 nm LED 光源搭配滤光片靠肉眼观察进行最终的荧光识别。除了通过肉眼识别外,本团队还开发了手机核酸检测 APP。该 APP 将荧光图像处理算法进行集成,设置检测阈值,协助检测人员识别最终的检测结果。检测流程如图 3(a)所示,核酸检测 APP 界面及检测结果如图 3(c)和图 3(d)所示。

在自动化检测模式下,本团队借助 470 nm LED 灯、滤光片、CMOS 相机、准直镜头和同轴光纤设计了荧光识别电路,如图 4 所示。整个荧光识别电路的左侧为

荧光激发电路,主要包括 470 nm LED 灯、准直镜头、滤光片以及同轴光纤的激发端。其中,LED 灯作为激发光源,其产生的激发光经过准直镜头后转变成准直光(平行光),先传输到同轴光纤的激发端,然后传输到同轴光纤的同轴端,完成反应管内检测物质的激发。如果反应管内含有待检测靶标,那么反应管内的液体经 LED 光源激发后,会产生可见荧光。右侧电路为荧光接收电路,主要包括 CMOS 相机和滤光片。反应管处的荧光会经同轴光纤的同轴端传导到同轴光纤的另外一端(发射端),这样荧光信号就会被同轴光纤右侧的 CMOS 相机采集。随后,荧光图像识别算法对 CMOS 相机采集到的信号进行处理,得到阴性或阳性检测结果。

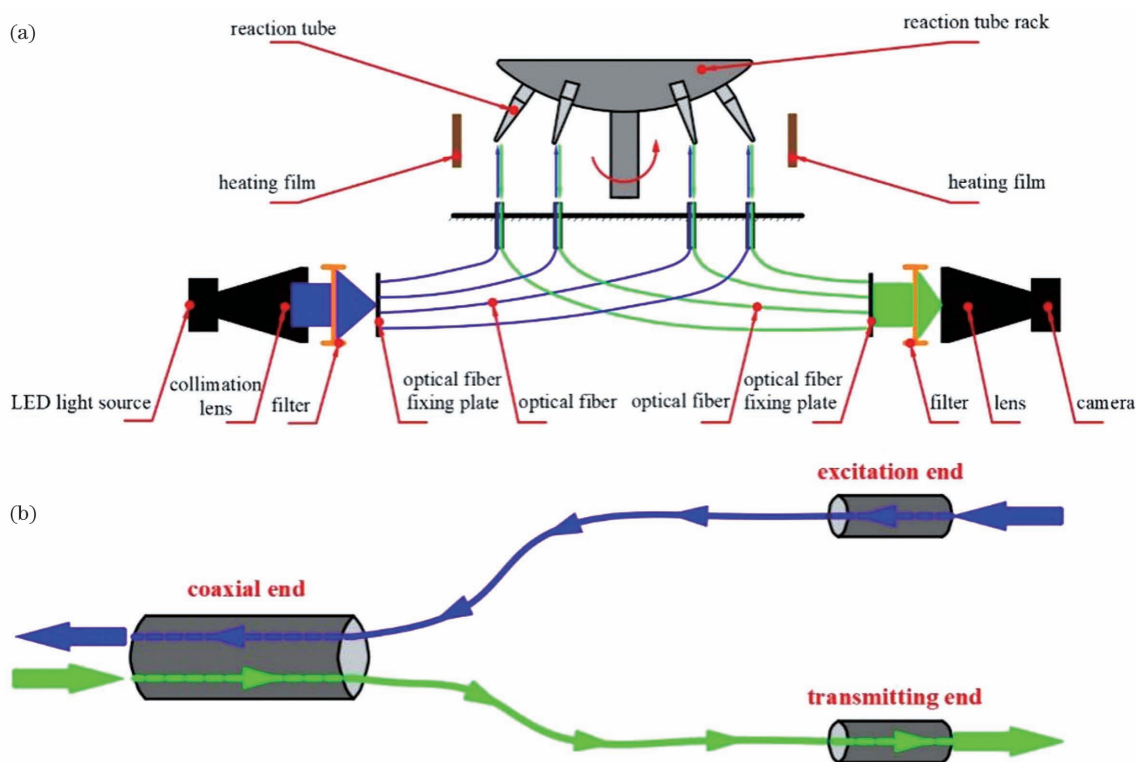


图 4 光学电路原理图。(a)小型便携式装置荧光识别电路示意图;(b)同轴光纤检测原理示意图

Fig. 4 Schematics of optical circuit. (a) Schematic of fluorescence recognition circuit for small portable device; (b) schematic of coaxial optical fiber detection principle

3.3 SARS-CoV-2 检测限探究

检测限是衡量核酸检测方法优劣的一个重要指标,也是衡量核酸检测方法是否能够实际应用的一个重要因素。为了探究本文所提两种方案的检测限,并验证这两种方案是否具有实际应用价值,本文将这两种方案与国际标准 PCR 技术进行对比,探究它们在检测限方面是否具有明显差异。

为了检验所提方案的检测极限,本团队分别对 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 、 2×10^3 、 2×10^2 copy/mL 的 SARS-CoV-2 核酸标准品进行了测试,然后设置一个 NTC 无核酸酶水作为阴性对照实验。首先在极简模式下进行实验,通过手握加热的方式完成 RT-RPA 扩增以及 CRISPR 反应,并手动剧烈甩动试管,使 RT-RPA 扩增的产物与 CRISPR 反应试剂混合,最终的结

果通过核酸检测 APP 进行识别。在极简模式下,RT-RPA 反应以及 CRISPR 反应可以在 32 min 内完成,结果如图 5 所示。由实验结果可知:在 SARS-CoV-2 核酸标准品的浓度为 2×10^2 copy/mL 以及样本为水的情况下,观察不到明显的荧光现象,核酸检测 APP 显示结果为阴性;当 SARS-CoV-2 核酸标准品的浓度为 2×10^3 copy/mL 时,可以观察到较弱的荧光信号,核酸检测 APP 显示结果为阳性;当浓度高于 2×10^3 copy/mL 时,可以在反应管中观察到明显的荧光现象,核酸检测 APP 显示结果为阳性。由此可以证明极简模式下的检测限可以达到 2×10^3 copy/mL。

将配制好的试剂放入小型便携化装置中,启动检测程序,反应 32 min 后,得到最后的检测结果。结果表明:当 SARS-CoV-2 核酸标准品的浓度为 $2 \times$

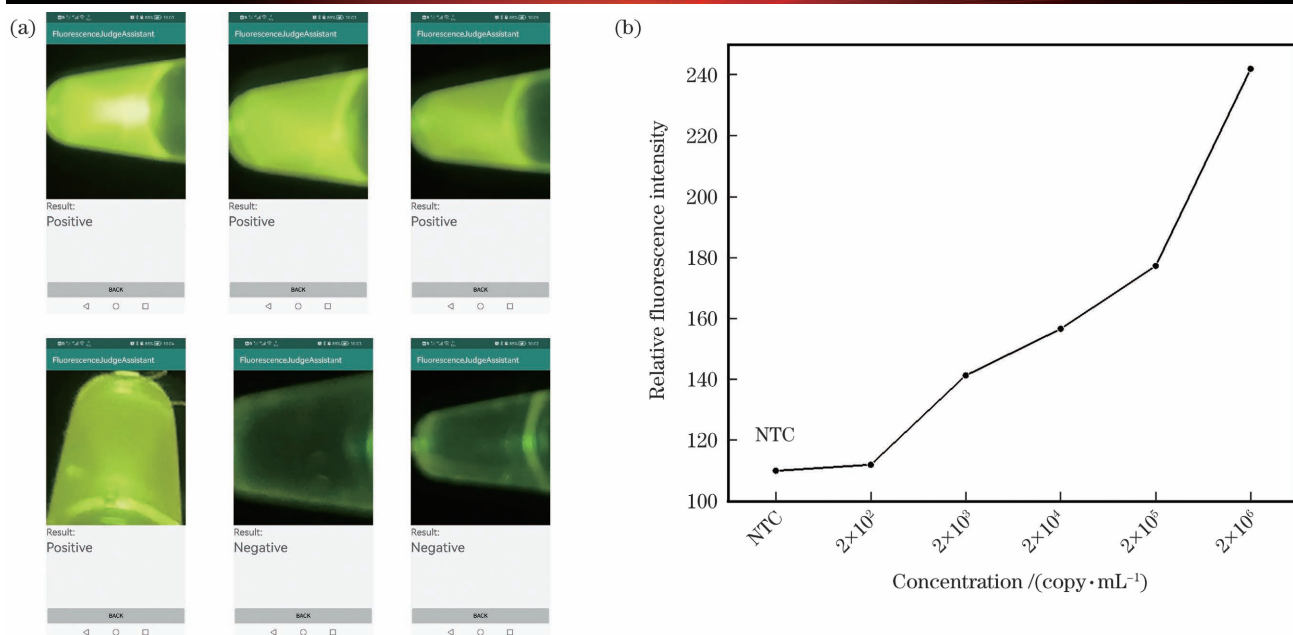


图 5 极简模式下检测限的实验结果。(a)核酸检测 APP 显示的结果;(b)荧光数据分析图

Fig. 5 Experimental detection limit in minimalist mode. (a) Results showed by nucleic acid detection APP; (b) fluorescence data analysis diagram

10^2 copy/mL 时,小型便携化装置的检测结果显示为阴性;当 SARS-CoV-2 核酸标准品的浓度为 2×10^3 copy/mL 或者浓度高于 2×10^3 copy/mL 时,小型便携化装置的检测结果显示为阳性。

由以上实验结果可以得出,在本实验反应体系下,基于 RT-RPA 等温扩增结合 CRISPR 检测的检测下限可以达到 2×10^3 copy/mL,可以满足实际现场快速检测场合的应用需求。

3.4 特异性分析

特异性是衡量核酸检测方法优劣的另外一个重要指标,也是判断其能否实际应用的一个关键指标。良好的特异性有助于避免假阳性结果的产生,减少错误判断,提高检测精度。为了进一步探究本文提出的基于 RT-RPA 以及 CRISPR 的检测方法的特异性,采用该方法分别对与 SARS-CoV-2 病毒相似的 SARA-CoV 病毒、MERS-CoV 病毒、HCoV-OC43 病毒、HCoV-HKU1 病毒、Hs_RPP30 病毒进行检测;同时,为了检验本文方法对单碱基是否具有特异性,分别对具有 1~3 个不同碱基差异的靶标序列进行检测。

将 SARA-CoV 病毒、MERS-CoV 病毒、HCoV-OC43 病毒、HCoV-HKU1 病毒、Hs_RPP30 病毒、SARS-CoV-2 病毒以及双蒸水 (NTC 阴性对照) 分别编号,接着将它们分别加入装有 RT-RPA 试剂以及 CRISPR 试剂的反应管中,标记好顺序;然后再将它们放到小型便携化仪器中,反应 32 min,得到实验结果。为了更好地量化和表征实验结果,将各反应管取出放置在蓝光切胶仪中进行观察,并使用手机拍照,得到实验图像,然后使用 ImageJ 软件对得到的图像进行处理,计算各反应管具体的荧光强度值,结果如图 6(a)

所示。结果表明,除 SARS-CoV-2 病毒显示阳性结果外,其余结果都显示阴性。这说明本文提出的基于 RT-RPA 以及 CRISPR 的检测方法具有较好的特异性。

此外,为了验证所提方法是否具有单碱基特异性,人工合成了 6 段与 SARS-CoV-2 病毒核酸序列相似的序列,这些序列与 SARS-CoV-2 病毒核酸序列只有 1~3 个碱基数目不同,且不同的碱基都与 crRNA 序列对应。上述 6 段碱基序列如表 2 所示。本文将合成的 6 段序列、SARS-CoV-2 病毒核酸序列以及双蒸水 (NTC 阴性对照) 采用上述验证病毒特异性的方法进行核酸检测,并采用相同的方法对实验结果进行处理。实验结果如图 6(b) 所示。可以看出,除 SARS-CoV-2 病毒核酸序列显示阳性之外,其余序列都显示阴性。这一结果证明了本文所提方法可以识别单碱基错配。

综上,本文所提方法不仅具有较好的特异性,还能够识别单碱基错配,具有较高的实际应用价值。

3.5 PCR 对比实验结果

为了进一步验证所设计的便携式小型化装置的临床应用价值以及用其检测实际样本的准确性,本团队对正常人群样本以及感染 SARS-CoV-2 病毒人群样本进行了检测。

本次实验验证共获得 20 个实际样本,其中:正常人群样本 14 个,男女各 7 名,所获得的正常人群样本均无传染性疾,身体健康;感染 SARS-CoV-2 病毒人群样本 6 个,男女各 3 个,所获得的感染 SARS-CoV-2 病毒人群样本来自西安天博医学检验所,并已经过了灭活样本前处理。将这 20 个样本打乱顺序,然后使用传统的提取纯化方法对样本进行提取纯化处理,得到各样本的核酸。为了验证本文方法(便携式小

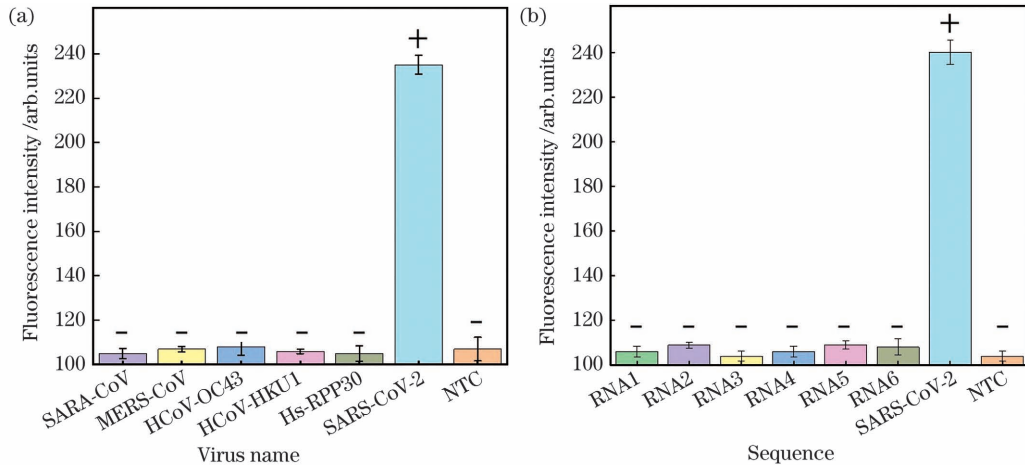


图 6 特异性分析(数据为三次重复实验的平均值±标准偏差)。(a) 不同病毒的特异性分析;(b) 碱基错配特异性分析
Fig. 6 Specific analysis (data represented as the mean ± standard deviation of three experimental replicates). (a) Specific analysis of different virus; (b) base mismatch specificity analysis

表 2 核酸错配的序列信息

Table 2 Sequence information of nucleic acid mismatch

Name	Sequence (5'-3')
SARS-CoV-2 sequence	CAGGCAGCAGTAGGGAACTTCTCCTGCTAGAATG GCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTTGACAGAT TGAACCAGCTTGAGAGCAAATGTCTGGTAAAGGCCAACA
RNA1 mismatch	CAGGCAGCAGTAGG...CTTTGCTGCTGCAAGACAGAT TGAACCAG... GTAAAGGCCAACA
RNA2 mismatch	CAGGCAGCAGTAGG...CTTTGCTGCTGCTTACAGAT TGAACCAG... GTAAAGGCCAACA
RNA2 mismatch	CAGGCAGCAGTAGG...CTTTGCTGCTGCTTGACCGAT TGAACCAG... GTAAAGGCCAACA
RNA3 mismatch	CAGGCAGCAGTAGG...CTTTGCTGCTGCTTGACTGT CTGAACCAG... GTAAAGGCCAACA
RNA4 mismatch	CAGGCAGCAGTAGG...CTTTGCTGCTGCTTGACAGATAC TGAACCAG... GTAAAGGCCAACA
RNA5 mismatch	CAGGCAGCAGTAGG...CTTTGCTGCTGCTTAACAGAT TGAACCAG
RNA6 mismatch	CAGGCAGCAGTAGG...CTTTGCTGCTGCTTGACTTGAT TGAACCAG... GTAAAGGCCAACA

型化装置搭配 RT-RPA 联合 CRISPR)对实际样本检测的准确性,对于每一份实际样本,分别采用 PCR 法以及本文提出的便携式小型化装置搭配 RT-RPA 联合 CRISPR 的方法进行检测,检测结果如图 7 所示。由图 7 可以看出本文所提方法的检测结果与 PCR 方法的检测结果具有较好的一致性,这也在一定程度上证明了本文所提方法在 SARS-CoV-2 病毒核酸样本检测中具有一定的临床应用价值。

4 结 论

本文提出了一种基于 CRISPR/Cas12a 的防污染便携式核酸检测方法,并分别建立了基于肉眼或智能手机识别检测结果的极简模式以及基于荧光检测可实现多样本同时检测的小型化便携式装置。在无仪器条件下,通过手握反应管加热完成反应,检测结果可通过肉眼或智能手机 APP 识别;小型化便携式装置一次可

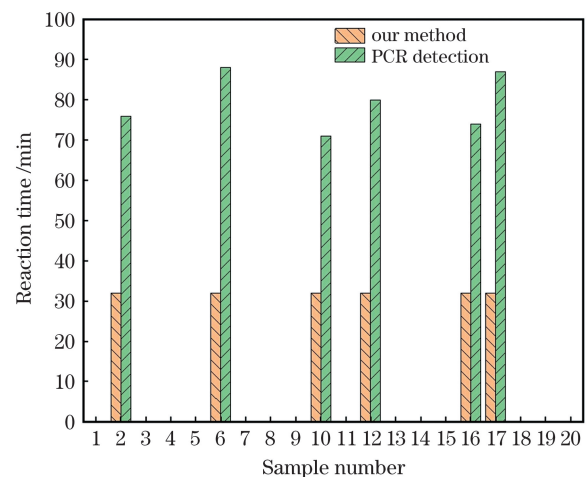


图 7 本文方法与 PCR 法的检测结果对比(阴性的反应时间用 0 min 代替)

Fig. 7 Detection results comparison between our method and PCR method (negative reaction time is replaced by 0 min)

检测多个样本,而且该装置集成了恒温加热设备及荧光激发检测光路,能够保障系统检测的准确性和稳定性。

基于本文建立的方法和装置对 SARS-CoV-2 病毒核酸进行检测,最低检测限低于 10 copy/ μL ;采用本文方法和装置对 SARS-CoV-2 病毒核酸标准品进行检测,检测结果与实时荧光定量 PCR 检测结果具有较好的一致性,而且所需时间不到实时荧光定量 PCR 方法的一半,32 min 内可完成全流程检测。本文建立的方法和装置为居家核酸检测和现场快速核酸检测提供了一种新思路。

在后续的研究中,本团队将探索如何实现核酸提取的简易化和自动化,并将其集成到该装置中,同时研究提高该装置检测灵敏度的方法,使目前建立的方法能够实现“样本进-结果出”的现场快速核酸检测,降低现有核酸检测的人力成本和时间成本,为传染病等疾病的核酸检测提供新的方法和模式。

参 考 文 献

- [1] Jiang X, Loeb J C, Manzanos C, et al. Valve-enabled sample preparation and RNA amplification in a coffee mug for Zika virus detection[J]. *Angewandte Chemie*, 2018, 130(52): 17457-17460.
- [2] Adams I P, Miano D W, Kinyua Z M, et al. Use of next-generation sequencing for the identification and characterization of *Maize chlorotic mottle virus* and *Sugarcane mosaic virus* causing maize lethal necrosis in Kenya[J]. *Plant Pathology*, 2013, 62(4): 741-749.
- [3] Nawattanapaiboon K, Kiatpathomchai W, Santanirand P, et al. SPR-DNA array for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in combination with loop-mediated isothermal amplification [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 74: 335-340.
- [4] Fasanella A, Losito S, Adone R, et al. PCR assay to detect *Bacillus anthracis* spores in heat-treated specimens[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(2): 896-899.
- [5] Gardeniers J G E, van den Berg A. Lab-on-a-chip systems for biomedical and environmental monitoring [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378(7): 1700-1703.
- [6] Bustin S A, Benes V, Garson J A, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments[J]. *Clinical Chemistry*, 2009, 55(4): 611-622.
- [7] Nitsche A, Steuer N, Schmidt C A, et al. Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA[J]. *Clinical Chemistry*, 1999, 45(11): 1932-1937.
- [8] 尹傲, 翟士贤, 孙哈, 等. 活细胞定量 FRET 成像方法鲁棒性评估[J]. *中国激光*, 2021, 48(21): 2107001.
Yin A, Zhai S X, Sun H, et al. Robustness evaluation of quantitative fluorescence resonance energy transfer imaging methods in live cells[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2021, 48(21): 2107001.
- [9] 尹傲, 陈同生. 基于光谱分离的定量荧光共振能量转移检测[J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207009.
Yin A, Chen T S. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurement based on spectral unmixing[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207009.
- [10] 张琪, 张丽敏, 王佳玉, 等. 面向黏膜组织病变识别的亚扩散域空间分辨漫反射测量系统[J]. *中国激光*, 2021, 48(20): 2007001.
Zhang Q, Zhang L M, Wang J Y, et al. Spatially resolved reflectance in sub-diffusive regime measurement system for mucosal lesion recognition[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2021, 48(20): 2007001.
- [11] Nhu N T Q, Heemskerk D, Thu D D A, et al. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for diagnosis of tuberculous meningitis [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(1): 226-233.
- [12] van der Oost J, Jore M M, Westra E R, et al. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2009, 34(8): 401-407.
- [13] Mao Y F, Zhang H, Xu N F, et al. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants [J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(6): 2008-2011.
- [14] 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.
- [15] Zuo X L, Fan C H, Chen H Y. Biosensing: CRISPR-powered diagnostics [J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2017, 1: 91.
- [16] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Lee J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438-442.
- [17] Chen J S, Ma E B, Harrington L B, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity [J]. *Science*, 2018, 360(6387): 436-439.
- [18] Harrington L B, Burstein D, Chen J S, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes [J]. *Science*, 2018, 362(6416): 839-842.
- [19] 侯茜. 2018 年世界十大科技进展新闻 [N]. *中国科学报*, 2019-01-03.
Hou Q. World top ten science and technology progress news in 2018 [N]. *China Science Daily*, 2019-01-03.
- [20] Zhang M Y, Liu C Z, Shi Y, et al. Selective endpoint visualized detection of *Vibrio parahaemolyticus* with CRISPR/Cas12a assisted PCR using thermal cycler for on-site application [J]. *Talanta*, 2020, 214: 120818.
- [21] Wang B, Wang R, Wang D Q, et al. Cas12aVDet: a CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(19): 12156-12161.
- [22] Chen Y J, Shi Y, Chen Y, et al. Contamination-free visual detection of SARS-CoV-2 with CRISPR/Cas12a: a promising method in the point-of-care detection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 169: 112642.
- [23] Wang Y Q, Ke Y Q, Liu W J, et al. A one-pot toolbox based on Cas12a/crRNA enables rapid foodborne pathogen detection at attomolar level [J]. *ACS Sensors*, 2020, 5(5): 1427-1435.
- [24] Wang R, Qian C Y, Pang Y N, et al. opvCRISPR: one-pot visual RT-LAMP-CRISPR platform for SARS-cov-2 detection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 172: 112766.
- [25] Ali Z, Aman R, Mahas A, et al. iSCAN: an RT-LAMP-coupled CRISPR-Cas12 module for rapid, sensitive detection of SARS-CoV-2 [J]. *Virus Research*, 2020, 288: 198129.
- [26] Parinaz F, Sungmin S, Melanie O, et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy [J]. *Cell*, 2021, 184: 1-11.
- [27] Hu F, Liu Y F, Zhao S H, et al. A one-pot CRISPR/Cas13a-based contamination-free biosensor for low-cost and rapid nucleic acid diagnostics [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 202: 113994.

Convenient Nucleic Acid Detection Method and Point-of-Care Detection Device Based on CRISPR/Cas12a Molecular Diagnosis

Hu Fei^{1,2,4,5}, Liu Yanfei^{1,2,4,5}, Li Xichen^{1,2,4,5}, Cao Minghang^{1,2,4,5}, Peng Niancai^{1,2,4,5},
Zhang Zhenxi^{3,4,5}

¹ State Key Laboratory of Mechanical Manufacturing System Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi, China;

² School of Mechanical Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi, China;

³ School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi, China;

⁴ Xi'an Key Laboratory of Biomedical Testing and High-End Equipment, Xi'an 710049, Shaanxi, China;

⁵ Shaanxi Province Life Science Testing Instrument Engineering Technology Research Center, Xi'an 710049, Shaanxi, China

Abstract

Objective Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) has shown significant promise as an emerging nucleic acid detection technology. However, it still requires improvement in terms of sensitivity, detection automation, and anti-pollution. Furthermore, CRISPR technology lacks simple and portable professional equipment to meet the high demand of rapid point-of-care testing. Therefore, this study proposes a CRISPR/Cas12a detection reaction system for SARS-CoV-2. This detection response system and innovative tube-in-tube consumables aid in developing a portable compact device for simultaneous automatic detection of several samples and a coaxial fiber-based fluorescence detection system. Finally, we developed a single-sample user-friendly nucleic acid detection APP based on smartphone recognition and detection results for the manual detection mode.

Methods The target in this study was severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2), which was detected using the CRISPR method and enhanced via the reverse transcription-recombinase polymerase amplification (RT-RPA) technique; the feasibility was assessed using the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification method in the early stages. Various companies customized the required reagents and the designed sequences. In the detection process, first, with the tube-in-tube consumables developed by our team in the early stage, which comprised the reaction outer and inner tubes, the amplification reagents and detection reagents were loaded into the inner and outer tubes, respectively. The temperature was regulated to 37–42 °C to complete the amplification. The reagents in the inner and outer tubes were then mixed by shaking or centrifugation, and the temperature was adjusted to complete the CRISPR reaction. Finally, it was possible to observe if there was any fluorescence occurrence under the illumination of a blue light. The detection instrument was composed of an optical cassette and a base, and automatic detection was realized through a printed circuit board (PCB), a human-computer interaction display screen, *etc.* In addition, this study also used the fluorescence image recognition algorithm to process the detection images, compared with the international standard polymerase chain reaction (PCR) technology to explore the detection limit, and increased the target types to test the specificity strength.

Results and Discussions The lower part of the detection instrument designed by our team integrates the printed circuit board and the human-computer interaction display screen. In the automatic detection mode, the fluorescence recognition circuit was designed with the help of a 470 nm light-emitting diode (LED), an optical filter, a complementary metal oxide semiconductor (CMOS) camera, a collimating lens, and a coaxial fiber. At the same time, the specificity of the theoretical experiment was verified through comparative experiments on several different targets. In addition, to verify the accuracy of this method for detecting actual samples, we compared each actual sample through PCR detection and the method based on the combination of RT-RPA and CRISPR proposed in this study. The detection results showed that the two were perfectly consistent.

Conclusions The current study proposed a CRISPR/Cas12a-based anti-pollution portable nucleic acid detection technique. Furthermore, a simple model was proposed based on the naked eye or smartphone to recognize results; additionally, a downsized portable device based on fluorescence detection that can simultaneously detect numerous samples was constructed. The portable device can detect numerous samples simultaneously, and it has a constant heating mechanism and fluorescence stimulation detection optical channel to enhance the detection system's accuracy and stability. The nucleic acid of SARS-CoV-2 was verified using the proposed method and detection system. The minimum detection limit was <10 copy/ μ L. The test findings of our method had a good consistency with that of real-time fluorescence quantitative PCR method, but our method took less than half the time consuming of the PCR method, and the whole detection process could be finished in 32 min. The method and technology developed in this study propose a novel approach for nucleic acid detection at health-care center and home.

Key words biotechnology; CRISPR/Cas12a; point-of-care detection device; on-site nucleic acid rapid detection; fluorescence detection optical path