CRISPR技术在临床上诊断的应用

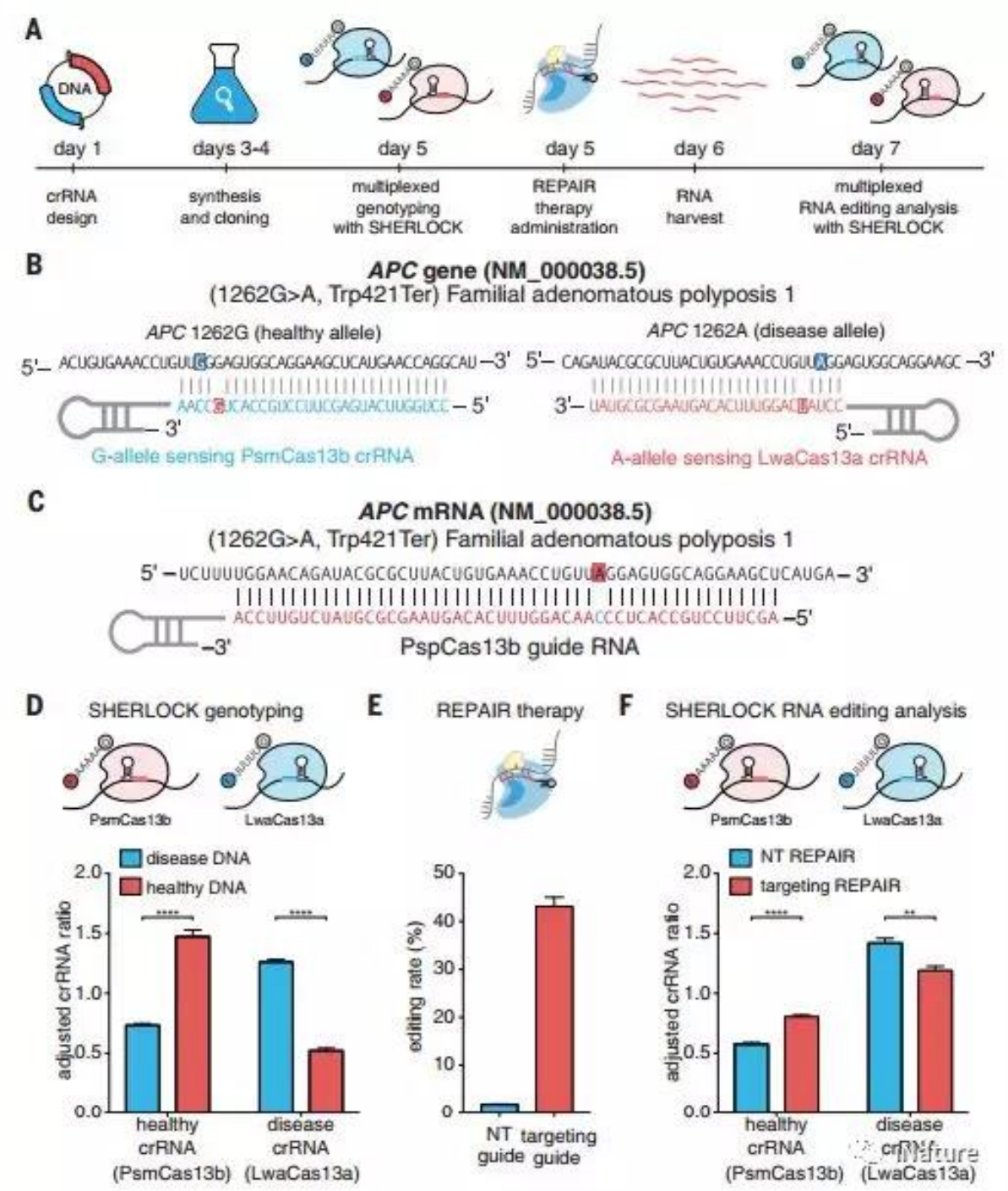
作者：writer 来源：本站

本文原地址：https://www.iikx.com/news/progress/324.html

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

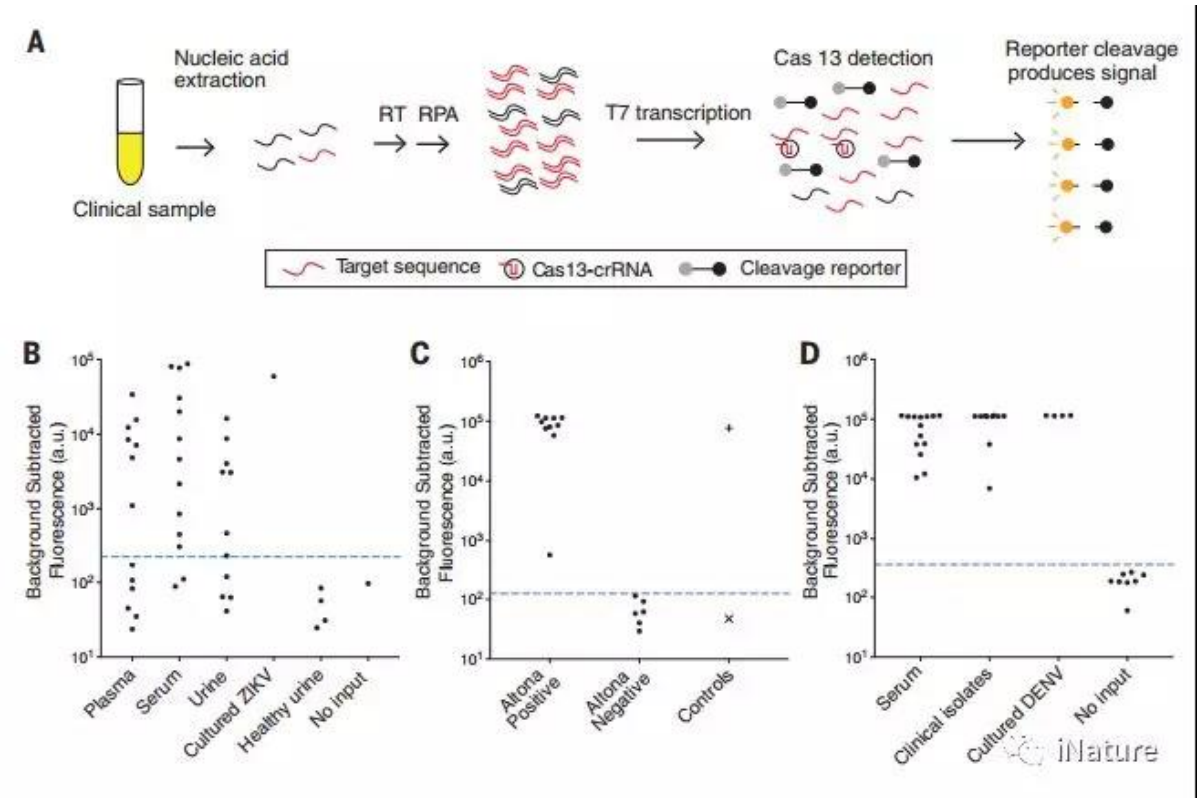
2018年4月27日，4篇CRISPR技术在临床诊断相关应用的文章同时在Science杂志上发表，这也是CRISPR技术在临床上应用的前奏，具有里程碑式的意义。这4篇Science文章分别是：Doudna等研究组发表了题为“ CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity ”的研究论文，该文章首次创建了一种名为DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter(DETECTR)的方法，该方法实现了DNA检测的超高的灵敏度。 DETECTR能够快速，专一地检测患者样本中的人乳头瘤病毒，从而为分子诊断提供了一个简单的平台;张锋等研究组发表了题为“ Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6 ”的研究论文，该文章揭示SHERLOCKv2可通过侧流检测登革病毒或寨卡病毒ssRNA以及患者液体活检样本中的突变，突出其作为核酸的多路复用，便携式，快速和定量检测平台的潜力;张锋等研究组发表了题为“ Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13 ”的研究论文，该论文开发了HUDSON(加热未提取的诊断样品以消除核酸酶)，该方案与SHERLOCK配对直接从体液中进行病毒检测，可在<2小时内直接从患者样品中进行DENV检测;Chertow发表了题为“ 新兴的诊断工具必须与标准诊断进行比较以确保灵敏度和特异性，并且需要进行现场测试以确保患者护理环境的性能，因为环境条件和最终用户应用可能会影响性能。如果负担得起的话，经证实的检测方法有望在资源有限的环境中改善护理，其中未分化的发热性疾病是常态，诊断，靶向护理和感染控制方面的差距或延迟会导致传染病死亡率和传播。

核酸的快速检测对于临床诊断和生物技术应用是不可或缺的。张锋等研究组最近开发了一个名为SHERLOCK(特定高灵敏度酶解报告系统)的平台，将等温预扩增与Cas13组合起来检测单个RNA或DNA分子。



通过对CRISPR酶学和应用开发的描述，张锋等研究组在此报告将SHERLOCKv2整合到四个方面：1)使用正交CRISPR酶的4通道单反应复合; 2)定量测量输入降至2 aM; 3)通过将Cas13与辅助性CRISPR相关酶Csm6组合，使信号灵敏度提高3.5倍; 和4)横向流动读出。 SHERLOCKv2可通过侧流检测登革病毒或寨卡病毒ssRNA以及患者液体活检样本中的突变，突出其作为核酸的多路复用，便携式，快速和定量检测平台的潜力。

缓解全球传染病需要诊断工具，这些工具是敏感的，特定的，并且可快速部署。 在这项研究中，张锋等研究组证明了基于Cas13的SHERLOCK(特异性高灵敏度酶解报告基因解锁)平台可以检测患者样本中的寨卡病毒(ZIKV)和登革病毒(DENV)，浓度低至每微升1拷贝。



张锋等研究组开发了HUDSON(加热未提取的诊断样品以消除核酸酶)，该方案与SHERLOCK配对直接从体液中进行病毒检测，可在<2小时内直接从患者样品中进行DENV检测。 张锋等研究组进一步证明SHERLOCK可以区分四种DENV血清型以及2015-2016流感大流行的ZIKV地区特定菌株。 最后，张锋等研究组报告了快速(<1周)的无仪器检测方法的设计和测试，以检测临床相关的病毒单核苷酸多态性。

Science

CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity

Janice S. Chen, Enbo Ma, Lucas B. Harrington, Maria Da Costa, Xinran Tian, Joel M. Palefsky and Jennifer A. Doudna

Science **360** (6387), 436-439.
DOI: 10.1126/science.aar6245originally published online February 15, 2018

Taking CRISPR technology further

CRISPR techniques are allowing the development of technologies for nucleic acid detection (see the Perspective by Chertow). Taking advantages of the distinctive enzymatic properties of CRISPR enzymes, Gootenberg *et al.* developed an improved nucleic acid detection technology for multiplexed quantitative and highly sensitive detection, combined with lateral flow for visual readout. Myhrvold *et al.* added a sample preparation protocol to create a field-deployable viral diagnostic platform for rapid detection of specific strains of pathogens in clinical samples. Cas12a (also known as Cpf1), a type V CRISPR protein, cleaves double-stranded DNA and has been adapted for genome editing. Chen *et al.* discovered that Cas12a also processes single-stranded DNA threading activity. A technology platform based on this activity detected human papillomavirus in patient samples with high sensitivity.

Science, this issue p. 439, p. 444, p. 436; see also p. 381

iNature

CRISPR-Cas12a(Cpf1)蛋白是RNA引导的酶，其结合并切割DNA作为细菌适应性免疫系统的组分。 像CRIS

PR-Cas9一样，Cas12a基于其产生靶向双链DNA(dsDNA)断裂的能力而被用于基因组编辑。

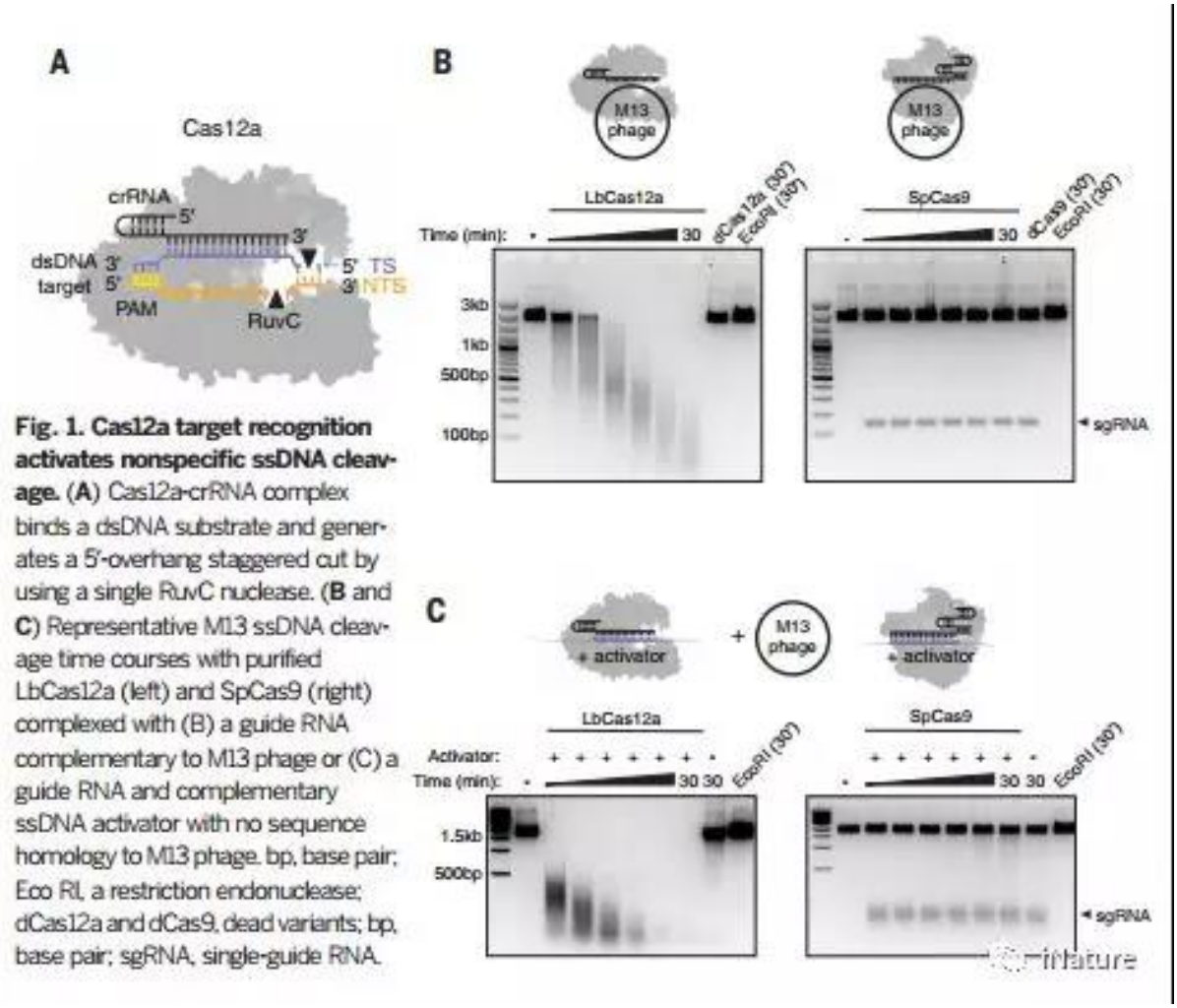


Fig. 1. Cas12a target recognition activates nonspecific ssDNA cleavage. (**A**) Cas12a-crRNA complex binds a dsDNA substrate and generates a 5′-overhang staggered cut by using a single RuvC nuclease. (**B** and **C**) Representative M13 ssDNA cleavage time courses with purified LbCas12a (left) and SpCas9 (right) complexed with (B) a guide RNA complementary to M13 phage or (C) a guide RNA and complementary ssDNA activator with no sequence homology to M13 phage. bp, base pair; Eco RI, a restriction endonuclease; dCas12a and dCas9, dead variants; bp, base pair; sgRNA, single-guide RNA.

Doudna等研究组发现目标激活的非特异性ssDNase切割也是其他V型CRISPR-Cas12酶的特性。通过将Cas12a ssDNase激活与等温扩增相结合，Doudna等研究组创建了一种名为DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter(DETECTR)的方法，该方法实现了DNA检测的超高的灵敏度。 DETECTR能够快速，专一地检测患者样本中的人乳头瘤病毒，从而为分子诊断提供了一个简单的平台。

爱科学
iikx.com

Science

Next-generation diagnostics with CRISPR

Daniel S. Chertow

Science **360** (6387), 381-382.
DOI: 10.1126/science.aat4982

nature

快速准确地识别传染病对于优化临床护理和指导感染控制和公共卫生干预以限制高度专业化的医疗中心和远程医疗保健机构中的疾病传播至关重要。理想的诊断测试价格低廉，准确，并能迅速提供结果，可在多种样本类型上进行即时使用，无需专业技术人员，辅助设备或电源。对偏远地区出现但可能在全球范围内传播的高致病性病毒(例如埃博拉病毒和中东呼吸综合征冠状病毒)的这种测试将有助于早期发现病例并进行隔离，从而限制疾病传播并促进及时护理。

原核生物(细菌和古细菌)具有通过CRISPR和CRISPR相关(Cas)蛋白介导的遗传适应性免疫的前哨基因，发现导致了分子生物学领域的变革性进展，其中最显著的是基因编辑。在本期的第436,444和439页，Chen等人，Myhrvold等人和Gootenberg等人分别强调了CRISPR-Cas生物学的发展如何通过在人类中检测塞卡病毒(ZIKV)，登革病毒(DENV)和人乳头瘤病毒(HPV)，将彻底改变传染病分子诊断领域样本和非传染性疾病，例如检测肺癌患者的循环无细胞DNA中的基因突变。

这些新兴的诊断工具必须与标准诊断进行比较以确保灵敏度和特异性，并且需要进行现场测试以确保患者护理环境的性能，因为环境条件和最终用户应用可能会影响性能。如果负担得起的话，经证实的检测方法有望在资源有限的环境中改善护理，其中未分化的发热性疾病是常态，诊断，靶向护理和感染控制方面的差距或延迟会导致传染病死亡率和传播。例如，结核病每年导致约130万人死亡，这是导致单一感染因素的主要原因，大多数死亡可以通过早期诊断和治疗来预防。

可以扩大检测范围，以提供对病原体抗性模式的指导，以指导抗菌治疗，指导感染控制的病原体活力的分子相关性，以及与其他标本类型(如粪便，呼吸道分泌物和脑脊液)的兼容性，与临床判断结合例如区分肠炎，肺炎和脑膜炎的病因。未来的工作将扩展到诊所，实验室和现场的传染性和非传染性疾病的诊断应用范围，其中测定的准确性，可靠性，简便性，速度，灵活性和成本将决定影响的范围。

更多 科学进展 请访问 https://www.iikx.com/news/progress/

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，爱科学iikx.com转发