

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.21.006

## 基于双重 CRISPR-Cas12a 的新型冠状病毒核酸 胶体金检测试纸条的研制\*

黄涛<sup>1</sup>, 魏道舜<sup>1</sup>, 钱纯亘<sup>2</sup>, 李永聪<sup>1</sup>, 刘仲明<sup>3</sup>, 李辉军<sup>4</sup>, 汪大明<sup>5</sup>, 张赛<sup>1△</sup>

1. 深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司, 广东深圳 518116;
2. 华中科技大学生命科学与  
技术学院, 湖北武汉 430074;
3. 中国人民解放军南部战区总医院医学实验科, 广东广州 510010;
4. 华中科技大学同济医学院附属同济医院检验科, 湖北武汉 430030;
5. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏苏州 215163

**摘要:**目的 为实现快速检测新型冠状病毒(SARS-CoV-2), 干预和防止病毒的传播, 研制一种基于双重 CRISPR-Cas12a 的 SARS-CoV-2 核酸胶体金快速检测试纸条。方法 通过设计基于 ORF1ab 和 N 基因靶序列内的正反两个依赖原间隔邻近基序(PAM)位点 crRNAs, 将恒温扩增技术与 CRISPR-Cas12a 检测相结合, 并结合侧向层析试纸条技术, 实现对 SARS-CoV-2 ORF1ab 和 N 基因同时扩增与双重 CRISPR 的可视化检测。结果 检测试纸条可在 37 °C 条件下 20 min 内取得结果, 具有较好的灵敏度、特异度及热稳定性。对 SARS-CoV-2 假病毒的检测灵敏度为 250 copy/mL, 检测 16 种其他呼吸道病原体均无交叉反应, 在 37 °C 条件下存放 8 d 仍然具有较好检测效果。临床研究显示, 检测 SARS-CoV-2 总符合率为 95.00% (57/60)。结论 基于双重 CRISPR-Cas12a 的 SARS-CoV-2 核酸胶体金快速检测试纸条提高检测效率和准确度的同时降低了成本, 可用于 SARS-CoV-2 的现场快速检测。

**关键词:** 新型冠状病毒; 重组酶聚合酶等温扩增; 成簇规律间隔短回文重复序列相关核酸内切酶 12a; 胶体金; 免疫层析; 快速检测

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)21-3126-06

### Development of a SARS-CoV-2 nucleic acid colloidal gold test strip based on dual-CRISPR-Cas12a\*

HUANG Tao<sup>1</sup>, WEI Daoshun<sup>1</sup>, QIAN Chungeng<sup>2</sup>, LI Yongcong<sup>1</sup>, LIU Zhongming<sup>3</sup>,  
LI Huijun<sup>4</sup>, WANG Daming<sup>5</sup>, ZHANG Sai<sup>1△</sup>

1. Shenzhen YHLO Biotech Co., Ltd., Shenzhen, Guangdong 518116, China;
2. College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China;
3. Department of Medical Laboratory, General Hospital of Southern Theater Command of PLA, Guangzhou, Guangdong 510010, China;
4. Department of Laboratory Medicine, Tongji Hospital Affiliated to Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China;
5. Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China

**Abstract: Objective** To develop a novel colloidal gold rapid diagnosis strips for SARS-CoV-2 based on dual CRISPR-Cas12a in order to achieve rapid detection of SARS-CoV-2 and to intervene and prevent the spread of the virus. **Methods** The crRNAs were designed based on the positive and negative protospacer-adjacent motif (PAM) sites in the target sequences of the ORF1ab and N genes of SARS-CoV-2, combining the thermostatic amplification technology with the CRISPR-Cas12a assay and combining it with the lateral chromatography test strip technology, and the visual detection of the simultaneous amplification of the ORF1ab and N genes of SARS-CoV-2 with dual CRISPR was achieved. **Results** The rapid diagnosis strips could be obtained in 20 min at 37 °C, with good sensitivity, specificity and thermal stability. The sensitivity of the test for SARS-CoV-2 pseudovirus was 250 copy/mL. There was no cross-reactivity among 16 other respiratory pathogens, and the test was still effective when stored at 37 °C for 8 d. The clinical study showed an overall compliance rate of 95.00% (57/60) for the detection of SARS-CoV-2. **Conclusion** A dual-CRISPR-Cas12a-based novel colloidal gold rapid diagnosis strip for SARS-CoV-2 is developed to improve the detection efficiency and ac-

\* 基金项目: 广东省深圳市科技创新委员会资助项目(2020254008); 广东省深圳市龙岗区科技发展资金资助专项(LGKCXGXZ2020012)。

作者简介: 黄涛, 男, 工程师, 主要从事免疫检测技术方向的研究。△ 通信作者, E-mail: zhangsai0623@126.com。

curacy while reducing cost for rapid on-site detection of SARS-CoV-2.

**Key words:** SARS-CoV-2; isothermal amplification of recombinant polymerase; CRISPR-Cas12a; colloidal gold; immunochromatography; rapid detection

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)属于 $\beta$ 属的冠状病毒,有包膜,是一种单股正链 RNA 病毒,基因组全长约 30 kb,两端为非编码区,中间为非结构蛋白编码区和结构蛋白编码区。非结构蛋白编码区主要包括开放读码框架(ORF)1a 和 1b 基因,编码 16 个相对保守的非结构蛋白(NSP),即 NSP1-16。结构蛋白编码区主要编码刺突(S)蛋白、包膜(E)蛋白、膜(M)蛋白和核衣壳(N)蛋白<sup>[1-2]</sup>。

对于 SARS-CoV-2 的核酸检测,目前有基因测序<sup>[3-4]</sup>、数字 PCR<sup>[5]</sup>和实时逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)<sup>[6-7]</sup>。RT-qPCR 作为 SARS-CoV-2 检测的“金标准”,对病毒核酸的检测具有很好的灵敏度、准确度和特异度。但由于 RT-qPCR 需要昂贵的仪器,较高要求的实验室环境及专业的操作人员,从而限制了它的临床应用。近些年来,已有多种恒温扩增方法,如重组酶聚合酶等温扩增(RPA)<sup>[8]</sup>、酶促反应恒温扩增(ERA)<sup>[9]</sup>及环介导等温扩增(LAMP)<sup>[10]</sup>等,由于这些操作简单、速度快、成本低从而得到快速的发展。

成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)和相关核酸内切酶(包括 Cas12a、Cas12b、Cas13a、Cas13b 和 Cas14)可在序列特异性 RNA 分子(gRNA)的指导下,与其特定靶点结合后表现出侧向切割活性,激活的 Cas 核酸酶额外地切割单链 DNA(ssDNA)<sup>[11-14]</sup>。基于恒温扩增及 CRISPR/Cas 的核酸检测技术,有研究者开发了 SHERLOCK 系统<sup>[15]</sup>、AIOD-CRISPR<sup>[16]</sup>和 DETECTR<sup>[17]</sup>系统,用于 SARS-CoV-2 的即时检测。尽管 SHERLOCK 和 DETECTR 可通过侧向层析试纸条进行 SARS-CoV-2 检测,但从扩增到取得结果大约需要 1 h。

为克服上述检测系统的缺点,达到快速检测 SARS-CoV-2 目的。本研究将 RPA 与 CRISPR-Cas12a 检测相结合,通过设计依赖原间隔区邻近基序位点(PAM)序列的正反双重 crRNAs 来启动高效核酸剪切。标本裂解后,既可实现双靶点基因的恒温扩增与双重 CRISPR 检测单管反应,又可将双靶点基因的恒温扩增与双重 CRISPR 检测同管同时反应,最后使用胶体金试纸条进行侧向层析检测,实现对 SARS-CoV-2 的现场快速检测。现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器与试剂** 含 SARS-CoV-2 的 ORF1ab 部分序列和 N 基因全部序列的阳性质粒(深圳市亚辉生物科技股份有限公司),引物、crRNA、单链 DNA 探针[生工生物工程(上海)股份有限公司],RT-基础型核

酸扩增试剂(RAA 法,杭州众测生物科技有限公司,货号:S003ZC),SARS-CoV-2 假病毒全基因组质控品[菁良基因(深圳)科技有限公司,货号:GW-CRBM001],超快速核酸释放剂[RNA 型,安普未来(常州)生物科技有限公司,货号:WLD8202]。

重组酶 T4 UvsX(南京巨匠生物科技有限公司,货号:M105),重组酶辅助蛋白 T4 UvsY(南京巨匠生物科技有限公司,货号:M106),T4 gene protein 32(南京巨匠生物科技有限公司,货号:M104),链置换 DNA 聚合酶 Bsu(南京巨匠生物科技有限公司,货号:M103),Lb-Cas12a 核酸内切酶(NEB,货号:M0653T)。

硝酸纤维素膜(NC 膜)、玻璃纤维素膜(默克密理博公司),兔抗 6-FAM 单克隆抗体(金斯瑞生物科技股份有限公司,货号:V90101),SA 链霉亲和素(菲鹏生物股份有限公司,货号:SA8),羊抗兔二抗(南京京达生物技术有限公司,货号:W4011)。

## 1.2 方法

**1.2.1 引物、crRNA 以及 ssDNA 的设计、合成与筛选** 根据 SARS-CoV-2 ORF1ab 基因和 N 基因的序列,设计了用于恒温扩增的引物和启动 CRISPR-Cas12a 的 crRNA,单链 DNA 探针的 5'端标记 FAM 荧光基团,3'端进行生物素 biotin 修饰。引物、crRNA、单链 DNA 探针(表 1)均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。采用阳性质粒和杭州众测生物科技有限公司的 RT-基础型核酸扩增试剂(RAA 法)进行引物筛选,具体策略:采用 SYBR Green 染料法将正向引物与反向引物相互搭配组合的方式进行,筛选最佳正向和反向引物对。

**1.2.2 双重 CRISPR 检测试剂反应体系建立** 在引物和病毒裂解液筛选基础上,进行配方及反应体系优化。恒温扩增体系:50  $\mu$ L 反应体积中加入 20  $\mu$ L 2.5 $\times$  A buffer (50 mmol/L pH 8.0 Tris-Ac, 80 mmol/L KAc, 14 mmol/L MgOAc)、6  $\mu$ L B buffer (2 mmol/L DTT, 5% PEG 20000, 200  $\mu$ mol/L dNTPs, 3 mmol/L ATP, 50 mmol/L 磷酸肌酸)、9  $\mu$ L Enzyme Mix-core (100 ng/ $\mu$ L CPK, 1 U/ $\mu$ L M-MLV, 0.1 U/ $\mu$ L RNase H, 50 ng/ $\mu$ L Bsu DNA 聚合酶 I 大片段, 300 ng/ $\mu$ L T4 UvsX, 60 ng/ $\mu$ L T4 UvsY, 500 ng/ $\mu$ L T4 GP32, 1 U/ $\mu$ L Rnasin), 2  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L 正向引物、2  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L 反向引物、11  $\mu$ L 模板和 RNase-free water (RNA 模板加 5  $\mu$ L, RNase-free water 加 6  $\mu$ L; DNA 模板加 1  $\mu$ L, RNase-free water 加 10  $\mu$ L), 23~37  $^{\circ}$ C 条件下反应 5~20 min。CRISPR

检测体系为 50  $\mu$ L 反应体积中加入 2.5  $\mu$ L 20  $\times$  CRISPR 检测试剂(10 mmol/L pH 7.40 的 Tris-HCl 缓冲液, 10  $\mu$ mol/L LbCas12a 核酸内切酶, 2 mg/mL BSA), 0.5  $\mu$ L 1  $\mu$ mol/L crRNA1/2, 2.5  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L 单链 DNA 探针, 5  $\mu$ L 恒温扩增产物, 39.5  $\mu$ L RNase-free water, 23~37  $^{\circ}$ C 条件下反应 5~20 min。

恒温扩增与 CRISPR 检测同时进行的反应体系: 50  $\mu$ L 反应体积中加入 20  $\mu$ L 2.5 $\times$ A buffer, 6  $\mu$ L B buffer, 9  $\mu$ L Enzyme Mix-core, 2  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L 正向引物, 2  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L 反向引物, 2.5  $\mu$ L 20  $\times$  CRISPR 检测试剂、0.5  $\mu$ L crRNA1/2, 2.5  $\mu$ L 单链 DNA 探针, 5.5  $\mu$ L 模板和 RNase-free water(RNA 模板加 5  $\mu$ L, RNase-free water 加 0.3  $\mu$ L; DNA 模板

加 1  $\mu$ L, RNase-free water 加 4.3  $\mu$ L), 23~37  $^{\circ}$ C 条件下反应 5~20 min。

**1.2.3 胶体金检测试纸条制备** 用标本垫处理液将标本垫涂布处理均匀, 每张玻纤涂布量为 30 mL, 50  $^{\circ}$ C 烘干 24 h。用偶合物稀释液稀释胶体金标记兔抗 6-FAM 单克隆抗体偶合物, 体积占比为 20%, 用稀释好的偶合物处理液将偶合物垫涂布处理均匀, 每张玻纤涂布量为 30 mL, 45  $^{\circ}$ C 干燥 24 h。用含 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS、5% 海藻糖的包被液稀释羊抗兔二抗和 SA 链霉亲和素浓度为 1.0 mg/mL, 分别作为检测线(T 线)和质控线(C 线)捕获抗体包被在 NC 膜上, 45  $^{\circ}$ C 烘干 48 h。将制备好的标本垫、偶合物垫及 NC 膜依次黏贴在 PVC 底板上, 用切条机裁切 3 mm 宽度。

表 1 引物、crRNAs 及探针的名称和序列

名称	序列
ORF1ab-F1	5'-GCGGTATGTGGAAAGGTTATGGCTGTAGTTGTG-3'
ORF1ab-F2	5'-GTAGTTGTGATCAACTCCGCGAACCCATGCTTC-3'
ORF1ab-F3	5'-AACTCCGCGAACCCATGCTTCAGTCAGCTGATG-3'
ORF1ab-R1	5'-CAGTACTAGTGCCTGTGCCGCACGGTGTAAGAC-3'
ORF1ab-R2	5'-CGACATCAGTACTAGTGCCTGTGCCGCACGGTG-3'
ORF1ab-R3	5'-CTGTATACGACATCAGTACTAGTGCCTGTGCCG-3'
N-F1	5'-GAACTTCTCTGCTAGAAATGGCTGGCAATGGCG-3'
N-F2	5'-GCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCT-3'
N-F3	5'-GAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTGC-3'
N-R1	5'-CTTAGTGACAGTTTGGCCTTGTTGTTGTTGGC-3'
N-R2	5'-ATTTCTTAGTGACAGTTTGGCCTTGTTGTTGTT-3'
N-R3	5'-GCAGATTTCTTAGTGACAGTTTGGCCTTGTTGT-3'
ORF1ab-crRNA1	5'-UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUaaacggguuugcgguguaagug-3'
ORF1ab-crRNA2	5'-UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUaaaacgattgtgcatcagct-3'
N-crRNA1	5'-UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUctgtgcttgacagattgaac-3'
N-crRNA2	5'-UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUccagacatttctctcaag-3'
ssDNA FB	5'-6-FAM-TTATT-3'-biotin

**1.2.4 双重 CRISPR 检测系统评估** 使用 ssDNA-FB(5'-6-FAM-TTATT-3' biotin) 探针在反应管中添加不同的成分进行了 12 个反应, 1~9 号管为先进进行恒温扩增后进行双重 CRISPR 检测, 10~12 号管为恒温扩增与双重 CRISPR 检测同管同时进行。在 37  $^{\circ}$ C 条件下反应 15 min, 反应结束后采用凝胶电泳进行终点检测, 同时用胶体金试纸条进行侧向层析检测。

**1.2.5 灵敏度分析** 将 SARS-CoV-2 假病毒加入一定体积的 RNase-free water 进行复溶, 并用 RNase-free water 分别稀释成 2 000、1 500、1 000、500 copy/mL 的假病毒稀释液。分别取上述稀释液 5  $\mu$ L 加入等体积的病毒裂解液混匀后, 室温裂解 5 min, 得到 1

000、750、500、250 copy/mL 的病毒裂解液, 分别取 1  $\mu$ L 进行恒温扩增。扩增产物一部分用氯仿按 1 : 1 粗提后进行凝胶电泳检测, 一部分搭配 ssDNA-FB (5'-6-FAM-TTATT-3' biotin) 探针经 CRISPR 酶切反应后用胶体金试纸条进行侧向层析检测。

**1.2.6 特异度分析** 分别选用筛选获得的基于 SARS-CoV-2 ORF1ab 和 N 基因的特异性引物对 16 种呼吸道病原体进行交叉反应性评价。将病原体原液按 1 : 1 体积比加入病毒裂解液, 室温处理 5 min。按照上述恒温扩增条件进行反应, 37  $^{\circ}$ C 反应 15 min 后, 用胶体金试纸条进行侧向层析检测, 并记录检测结果。

**1.2.7 不同温度扩增效率分析** 以 SARS-CoV-2 的 N 基因质粒为模板,在 23 ℃ 和 37 ℃ 条件下进行反应,分别设置反应时间为 5、10、15、20 min,反应结束后进行凝胶电泳检测,同时用胶体金试纸条进行侧向层析检测(添加 ssDNA-FB 探针)。

**1.2.8 稳定性分析** 配制基于胶体金试纸条显色的试剂,按照试剂所包含的组分分成两组,每组 8 份。一组于 -20 ℃ 及以下条件存放,一组于 37 ℃ 条件存放。处理至第 0、1、3、6、7、8 天,分别取出试剂以 N 基因质粒为模板在 37 ℃ 条件下反应 15 min,根据检测原理用胶体金试纸条进行侧向层析检测评估稳定性。

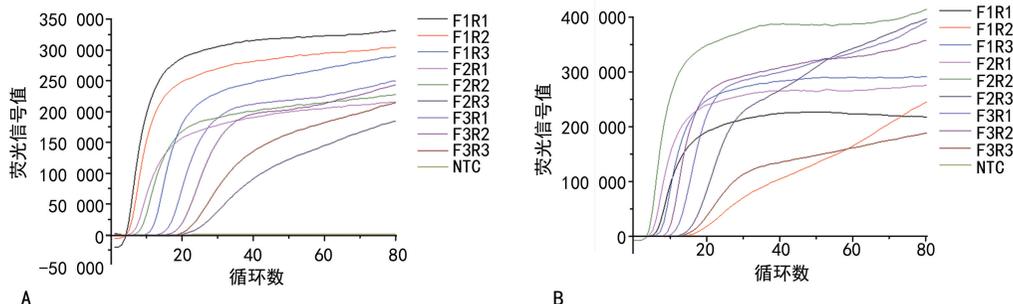
**1.2.9 临床性能评价** 用广州万孚生物技术股份有限公司生产的 SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)筛选阳性及阴性标本各 30 例,每个标本用本研究制备的核酸胶体金检测试纸条测试,使用 SPSS 20.0 统计软件及 Kappa 检验进行数据分析,评价所研制的核酸胶体金检测试纸条的临床性能。

## 2 结果

**2.1 引物筛选** 以 100 ng/μL 含 SARS-CoV-2 开放阅读框 ORF1ab 部分序列和 N 基因全部序列的质

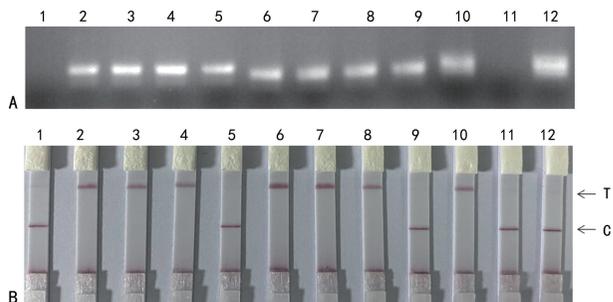
粒为标本进行测试。为能筛选到性能最优的基于 ORF1ab 基因的恒温扩增引物,笔者将 F1、F2、F3 引物分别与 R1、R2、R3 配对组合,采用 SYBR Green 染料法进行引物对扩增性能的评估。结果显示,F1R1 引物对起峰时间最短,荧光信号最强,表现为扩增效率最高,见图 1A。同样的策略,筛选得到基于 N 基因的最优引物组合 F2R2,见图 1B。

**2.2 双重 CRISPR 检测系统评估** 凝胶电泳检测结果除了未加模板的 1 和未加恒温扩增酶试剂的 11 两个反应没有扩增条带以外,其余均有扩增条带,见图 2A。其中,仅加了基于 ORF1ab 基因引物的 2、3、4、5 和仅加了 N 基因引物的 6、7、8、9 为单带,10 和 12 两个反应为模糊的两条带。胶体金试纸条检测结果显示,试纸条 2、3、4、6、7、8 及 10 仅 T 线显色,结果为阳性,试纸条 1、5、9、11 及 12 仅 C 线显色,结果为阴性,见图 2B。以上研究结果充分说明,双重 CRISPR 检测试剂既能高效地实现先恒温扩增再进行双重 CRISPR 检测,又可实现恒温扩增与双重 CRISPR 检测同管同时进行。



注:A 为 ORF1ab 基因引物扩增曲线图;B 为 N 基因引物扩增曲线图。

图 1 不同引物恒温扩增曲线



注:A 为凝胶电泳条带结果;B 为胶体金侧向层析试纸条显色结果;1 表示未加模板,2 表示加 ORF1ab-crRNA1 引物,3 表示加 ORF1ab-crRNA2 引物,4 表示同时加 ORF1ab-crRNA1 和 ORF1ab-crRNA2 引物,5 表示未加 ORF1ab-crRNA1 和 ORF1ab-crRNA2 引物,6 表示加 N-crRNA1 引物,7 表示加 N-crRNA2 引物,8 表示同时加 N-crRNA1 和 N-crRNA2 引物,9 表示未加 N-crRNA1 和 N-crRNA2 引物,10 表示所有试剂组分均加,11 表示未加 RPA 恒温扩增酶,12 表示未加 Cas12a 核酸内切酶。

图 2 不同反应条件下凝胶电泳及胶体金试纸条结果

**2.3 灵敏度分析** 凝胶电泳及胶体金试纸条结果显示,除了无模板的对照(CK)没有扩增条带外,1 000、750、500、250 copy/mL 的病毒裂解液均有目标大小的凝胶电泳条带出现(图 3A)。同时,胶体金侧向层析试纸条的 T 线均显色(图 3B),为阳性;而在无模板对照中 C 线显色,为阴性。以上结果表明,双重 CRISPR-Cas12a 检测试剂对 SARS-CoV-2 假病毒的检测灵敏度为 250 copy/mL。

**2.4 特异度分析** 16 种呼吸道病原体检测结果均为阴性,这说明双重 CRISPR 检测试剂与本研究中提到的病原菌不会发生交叉反应,表现出很强的特异性。见表 2。

**2.5 不同温度扩增效率分析** 23 ℃ 条件下扩增反应 10 min 及以上时,胶体金试纸条 T 线显色,当反应 15 min 时可以观察到目的大小的凝胶电泳条带。同样,在 37 ℃ 条件下扩增反应 5 min,胶体金试纸条 T 线显

色,当扩增反应 10 min 及以上时可以观察到目的大小的凝胶电泳条带。扩增 5 min 的反应,虽凝胶电泳检测不到条带,但胶体金试纸条均为强阳性,这说明扩增得到的靶基因量足够激活酶切体系中的 Cas12a,实现对探针的完全切割。加上胶体金试纸条本身反应时间一般在 10 min 内,以上结果表明,双重 CRISPR 检测试剂在 37 °C 条件下 20 min 内即可达到

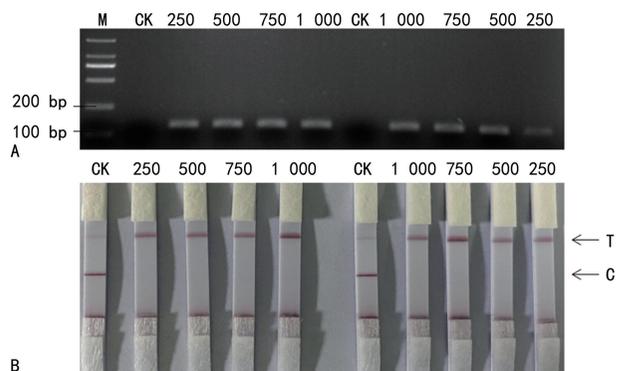
检测 SARS-CoV-2 的目的。

**2.6 稳定性分析** 试纸条于分别在 -20 °C 和 37 °C 条件下存放 8 d,取出试剂以 N 基因质粒为模板在 37 °C 条件下反应 15 min 反应后,胶体金试纸条仍呈现 T 线显色 C 线不显色,保持其良好的检测效果,说明双重 CRISPR 检测试剂稳定性良好。

表 2 不同呼吸道病原体交叉反应分析

序号	病原体种类	毒株号	浓度	结果
1	肺炎支原体	ATCC 15531	/	-
2	肺炎衣原体	ATCC VR-2282, TW-183	$4.2 \times 10^2$ TCID <sub>50</sub> /mL	-
3	肺炎链球菌	/	$1.0 \times 10^8$ CFU/mL	-
4	金黄色葡萄球菌	CMCC(B) 26003	$3.0 \times 10^9$ CFU/mL	-
5	流感嗜血杆菌	GIM 1.961	/	-
6	冠状病毒 OC43	ATCC VR-1558, OC43	$1.8 \times 10^5$ TCID <sub>50</sub> /mL	-
7	冠状病毒 229E	ATCC VR-740, 229E	$5.6 \times 10^4$ TCID <sub>50</sub> /mL	-
8	冠状病毒 NL63	BELRESOURCES NR-470	/	-
9	甲型 H1N1 流感病毒	A/PR/8/34(H1N1)	$1.8 \times 10^8$ TCID <sub>50</sub> /mL	-
10	甲型 H3N2 流感病毒	L8-A3/Brisbane/10/2007	$4.2 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub> /mL	-
11	新型甲型 H1N1 流感病毒(2009)	A/GZ/GIRD02/2009(2009H1N1)	1 062.5 TCID <sub>50</sub> /mL	-
12	乙型流感 Victoria	L2-BV/Heilongjiang/116/2010	$1.0 \times 10^5$ TCID <sub>50</sub> /mL	-
13	乙型流感 Yamagata	B/Guangzhou/GIRD06/09(Yamagata)	$1.0 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub> /mL	-
14	呼吸道合胞病毒 A 型	RSVA/Long	106.25 TCID <sub>50</sub> /mL	-
15	呼吸道合胞病毒 B 型	RSVB/GZ/Hecin1704-8	$2.4 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub> /mL	-
16	腺病毒 3 型	ADV3/GZ/0101/2011	$3.2 \times 10^8$ TCID <sub>50</sub> /mL	-

注: / 表示无数据; - 表示阴性。



注: A 为凝胶电泳条带结果; B 为胶体金侧向层析试纸条显色结果; M 为 DNA Marker, CK 表示未加模板, 250、500、750、1 000 分别为病毒拷贝数。

图 3 不同病毒浓度下凝胶电泳及胶体金试纸条结果

**2.7 临床性能评价** 用广州万孚生物技术股份有限公司生产的 SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)筛选阳性及阴性标本各 30 例,每个标本用本研究制备的核酸胶体金检测试纸条测试,结果见表 3,与万孚 SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒检测结果比较,本研

究制备的核酸胶体金检测试纸条灵敏度为 90.00% (27/30), 95% CI: 73.47% ~ 97.89%; 特异度为 100% (30/30), 95% CI: 88.43% ~ 100.00%, 总符合率为 95.00% (57/60), 95% CI: 86.08% ~ 98.96%; Kappa 检验一致性较好, Kappa 值为 0.900 0,  $P < 0.05$ 。

表 3 临床性能比对测试结果(n)

本研究试剂盒	万孚 2019-nCoV 核酸检测试剂盒		合计
	阳性(+)	阴性(-)	
阳性(+)	27	0	27
阴性(-)	3	30	33
合计	30	30	60

### 3 讨论

PCR 核酸检测是早期发现病原体灵敏度和特异度均高的方法,但由于常规的 PCR 检测需要昂贵的核酸扩增设备和训练有素的专业人员,而且检测时间几乎都在 1.5 h 以上,使目前的 PCR 技术不适合快速

诊断 POC 应用。因此,迫切需要一种简易的、快速且价格低廉的诊断方法。

在本研究中,笔者介绍了一种简单、快速、高灵敏、高特异度、一体化检测 SARS-CoV-2 的双重 CRISPR 检测试剂。这种检测试剂基于 SARS-CoV-2 的 ORF1ab 和 N 基因目标序列设计正反双重 crRNAs,可以免病毒 RNA 提取和纯化,直接将病毒标本裂解后加入恒温扩增试剂和 CRISPR 检测试剂,将所有成分放在同一反应管中进行恒温扩增和 CRISPR 检测,实现了快捷、一体化的 SARS-CoV-2 病毒分子诊断,无需专业的操作人员和昂贵的核酸扩增仪器,真正意义上脱离 PCR 实验室开展分子诊断。更重要的是,检测结果可以直接通过侧向层析试纸条进行肉眼观察,整个检测过程在 20 min 内就可完成,在 23~37 °C 均可进行检测。同时,该检测试剂具有良好的热稳定性,即使于 37 °C 条件存放 8 d 仍具有良好的检测效果。与已经报道的基于 CRISPR 的核酸检测方法相比<sup>[17-18]</sup>,这种检测试剂无需单独提取病毒 RNA 和逆转录获得 cDNA 的步骤,等温扩增和基于 CRISPR 检测的成分都是在一个反应管中进行,完全避免了需要单独提取病毒 RNA,再逆转录,以及靶核酸的单独预扩增所带来的耗时长缺点。

综上所述,双重 CRISPR 分析是一种快速、一体化、可恒温扩增的核酸检测方法,具有高特异度、高灵敏度的特点。这种简单而稳健的方法在未来开发下一代 POC 分子诊断技术,并用在家或诊所快速检测传染病方面具有巨大潜力。

## 参考文献

- [1] WU F, ZHAO S, YU B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 265-269.
- [2] CHEN Y, LIU Q Y, GUO D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis [J]. *J Med Virol*, 2020, 92(4): 418-423.
- [3] MOORE S C, PENRICE-RANDAL R, ALRUWAILI M, et al. Amplicon based MinION sequencing of SARS-CoV-2 and metagenomic characterisation of nasopharyngeal swabs from patients with COVID-19[J]. *medRxiv*, 2020, 12: 1-26.
- [4] COLSON P, LAGIER J, BAUDOIN J P, et al. Ultrarapid diagnosis, microscope imaging, genome sequencing, and culture isolation of SARS-CoV-2[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2020, 39: 1601-1603.
- [5] YU F T, YAN L T, WANG N, et al. Quantitative detection and viral load analysis of SARS-CoV-2 in infected patients[J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(15): 793-798.
- [6] NIU P H, LU R J, ZHAO L, et al. Three novel real-time RT-PCR assays for detection of COVID-19 virus[J]. *China CDC Wkly*, 2020, 2(25): 453-457.
- [7] CORMAN V, BLEICKER T, BRÜNINK S, et al. Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT-PCR[J]. *World Health Organization*, 2020, 8: 1-38.
- [8] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins[J]. *PLoS Biol*, 2006, 4(7): 1115-1121.
- [9] LIU S H, HUANG M Q, XU Y N, et al. CRISPR/Cas12a technology combined with RT-ERA for rapid and portable SARS-CoV-2 detection[J]. *Virology*, 2021, 516(5): 1-5.
- [10] TSUGUNORI N, HIROTO O, HARUMI M, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63.
- [11] CHEN J S, MA E, HARRINGTON L B, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity [J]. *Science*, 2018, 360(6387): 436-439.
- [12] 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.
- [13] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, KELLNER M J, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6 [J]. *Science*, 2018, 360(6387): 439-444.
- [14] 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.
- [15] JOUNG J, LADHA A, SAITO M, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(15): 1492-1494.
- [16] DING X, YIN K, LI Z Y, et al. Ultrasensitive and visual detection of SARS-CoV-2 using all-in-one dual CRISPR-Cas12a assay [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(4711): 1-10.
- [17] BROUGHTON J P, DENG X D, YU G X, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2 [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 870-874.
- [18] SUN Y Y, YU L, LIU C X, et al. One-tube SARS-CoV-2 detection platform based on RT-RPA and CRISPR/Cas12a [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(74): 1-10.

(收稿日期: 2023-03-10 修回日期: 2023-09-08)