

• 综述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.05.023

CRISPR-Cas 系统在病原微生物分子诊断中的研究进展*

龙文巧¹, 许永杰²综述, 张 华^{1,2△}审校

1. 遵义医科大学, 贵州遵义 563000; 2. 贵州省人民医院检验科, 贵州贵阳 550000

摘要:快速、灵敏、准确的病原微生物检测方法对感染性疾病的诊治及防控至关重要。基于成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)-CRISPR 相关蛋白(Cas)系统的检测技术在病原微生物核酸检测中具有高灵敏度和高特异度的特点, 该文概述了 CRISPR-Cas 系统的作用机制及不同 Cas 的核酸酶活性, 总结了基于 CRISPR-Cas 系统的检测技术在病原微生物核酸检测中的研究现状, 对该系统在核酸检测应用中的挑战进行了综合分析, 并提出了目前存在的一些解决方案。目前基于 CRISPR-Cas 系统的非核酸分析物检测仍处于前期研究阶段, 但其在扩大检测范围、缩短检测时间、提高检测灵敏度等方面具有较大潜力, 为开发基于 CRISPR-Cas 系统的病原微生物检测平台提供新思路。

关键词:成簇规律间隔短回文重复序列-成簇规律间隔短回文重复序列相关蛋白系统; 病原微生物; 核酸检测; 非核酸分析物检测; 应用

中图法分类号: R446

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2024)05-0687-06

Advances in CRISPR-Cas systems-based molecular diagnosis of pathogenic microorganisms*

LONG Wenqiao¹, XU Yongjie², ZHANG Hua^{1,2△}

1. Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550000, China

Abstract: Rapid, sensitive and accurate detection of pathogenic microorganisms is critical for the diagnosis, treatment, prevention and control of infectious diseases. Based on the high sensitivity and specificity characteristics of detection techniques of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-CRISPR-associated protein (Cas) systems. This review summarizes the mechanism of CRISPR-Cas system, the nuclease activities of different Cas and the research status of CRISPR-Cas detection technology in the detection of pathogenic microorganisms. Moreover, the challenges of the CRISPR-Cas system in the application of nucleic acid detection are comprehensively analyzed, and some existing solutions are proposed. At present, the detection of non-nucleic acid targets based on the CRISPR-Cas system is still in the preliminary research stage, but it has great potential to expand the detection field, shorten the detection time and improve the detection sensitivity, which provides a new way for the development of pathogenic microbial detection platforms based on the CRISPR-Cas system.

Key words: CRISPR-Cas system; pathogenic microorganisms; nucleic acid detection; non-nucleic acid analytes detection; application

常见的病原微生物如病毒、细菌、真菌等引起的感染性疾病仍是危害人类健康的主要原因之一^[1]。因此, 快速、灵敏、准确、简便的检测方法对感染性疾病的诊断、疗效评估及预防控制具有重要意义。基于成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)-CRISPR 相关蛋白(Cas)系统的检测技术因具有高灵敏度、高特异度、快速、便携等优点而广泛应用于病原微生物的检测中^[2]。

1987 年 ISHINO 等^[3]在大肠杆菌中首次发现了 CRISPR 基因组, 2005 年 HAFT 等^[4]鉴定了 Cas 的

功能, 随后 POURCEL 等^[5]证明了 CRISPR-Cas 系统是细菌抵抗噬菌体入侵的适应性免疫系统。目前 CRISPR-Cas 系统除了应用于基因编辑技术外, 还广泛应用于病原微生物核酸检测技术^[6]。基于 CRISPR-Cas 系统的核酸检测技术表现出高灵敏度、高特异度、快速等优点, 可实现现场检测, 在感染性疾病诊断方面具有巨大应用前景。同时, 基于 CRISPR-Cas 系统的核酸检测技术的进一步应用也存在许多挑战, 这些挑战包括开发快速高效的核酸提取方式、简便的检测程序及高通量检测技术等^[7]。随着基于

CRISPR-Cas 系统的核酸检测技术的发展,非核酸分析物的检测也成为当前研究热点^[8]。本文概述了 CRISPR-Cas 系统的作用机制和不同效应蛋白的核酸酶活性,综述了 CRISPR-Cas 系统在病原微生物核酸检测中的应用研究进展和挑战,并进一步介绍了 CRISPR-Cas 系统在抗原、血清学抗体、病原体等非核酸分析物检测方面的最新研究热点。

1 CRISPR-Cas 系统概述

CRISPR-Cas 系统由存储记忆的 CRISPR 和 Cas 基因组成,这两部分共同作用形成 CRISPR-Cas 效应复合体,参与核酸识别、切割过程^[4]。CRISPR-Cas 系统通过将外来噬菌体 DNA 储存到细菌宿主染色体中形成记忆,进而阻止噬菌体再次感染。CRISPR-Cas 系统遵循免疫的 3 个主要阶段^[9]:(1)适应。对外来核苷酸序列识别、处理后将间隔序列整合到 CRISPR 基因座中,由此存储首次感染的记忆。(2)CRISPR RNA(crRNA)成熟。间隔序列翻译成 crRNA 和反式激活 RNA 通过碱基配对形成向导 RNA(sgRNA),用于募集 Cas。(3)干扰。Cas 通过结合 sgRNA 形成效应复合体,在原间隔相邻基序(PAM)的协助下对靶标识别并切割,完成对外来核苷酸序列的特异性清除。

不同的 Cas 具有不同的核酸内切酶活性,当前研究主要集中于 Cas9、Cas12、Cas13、Cas14,Cas9 结合 sgRNA 后特异性识别和切割靶标,通过对切割产物的分析实现靶标的检测^[10]。而 Cas12、Cas13、Cas14 识别并结合 crRNA 及靶标后形成效应复合体,该复合体可非特异性切割任意单链 DNA 或单链 RNA,该过程被称为反式切割。此类蛋白反式切割大量带有标记的单链 DNA 或单链 RNA 报告探针,进而输出检测信号。基于 CRISPR-Cas 系统的病原微生物检测技术可分为两类^[11]:第 1 类是通过提取基因组,联合 CRISPR-Cas 系统建立核酸检测方法;第 2 类是通过适配体或抗体识别非核酸分析物,直接或间接与 CRISPR-Cas 系统联合,实现非核酸分析物的检测。

2 基于 CRISPR-Cas 系统的病原微生物核酸检测

基于 CRISPR-Cas 系统的核酸检测技术常通过对样品中的微量核酸进行特异性识别和信号放大完成相关检测。目前,基于 CRISPR-Cas9/Cas13/Cas12/Cas14 系统的检测技术具有高特异性、高灵敏度、快速等特点,已被广泛应用于核酸检测中。基于 CRISPR-Cas9 系统的检测技术依赖于该系统识别及切割双链 DNA(dsDNA)的能力,用于病原微生物的核酸检测。PARDEE 等^[12]将基于 CRISPR-Cas9 及含有激发序列的 toehold 传感器联合依赖核酸序列的扩增(NASBA)方法开发一种显色纸片检测技术,建立了可视化检测寨卡病毒检测技术,该技术通过比色法输出检测信号,检测灵敏度可达 3 fmol/L,能鉴别

美洲和非洲寨卡病毒株,且不需要昂贵的设备。但 NASBA 需要 3 种酶使得反应成本较高,反应成分较复杂,检测时间较长。选择合适的核酸扩增方法对提高检测平台的综合检测性能至关重要。此外,去核酸酶活性的 Cas9(dCas9)保留了 dsDNA 的结合能力,对目标核酸序列无切割活性,也可用于核酸检测。HAIJIAN 等^[13]开发了 CRISPR 芯片(CRISPR-Chip)技术,该技术将 dCas 固定于石墨烯电子晶体管,在 sgRNA 辅助下,加入目标 dsDNA 后在晶体管上形成 dCas-sgRNA-dsDNA 复合物,该复合物会改变晶体管电导率,可根据电导率变化得出检测结果。CRISPR-Chip 技术无须对靶标进行检测前扩增,可直接检测到 1.7 fmol/L 的目标 dsDNA,耗时 15 min。Cas9 和 dCas9 常用于核酸检测,但此类技术的信号放大及输出过程较复杂。Cas12a、Cas13a、Cas14 等具有反式切割活性的发现为开发更简便、快速、精准的基于 CRISPR-Cas 系统的检测平台提供更多可能。

基于 CRISPR-Cas12/Cas13/Cas14 系统的检测技术通常利用 Cas 的反式切割活性直接切割带标记的检测探针,从而产生各种信号(如荧光、比色、电化学等),直接、快速地获得较高的检测灵敏度。KELLNER 等^[2]将重组酶聚合扩增技术(RPA)联合 CRISPR-Cas13a 系统,建立了 SHERLOCK 技术。该技术通过切割淬灭的荧光报告探针放大和输出检测信号,在寨卡病毒检测中可达到单碱基分辨率,并极大地提高了检测的灵敏度。此外,Cas12a 同样具有强大的反式切割活性,CHEN 等^[14]将 CRISPR-Cas12a 系统联合 RPA 开发了 DETECTR 技术。SHERLOCK 及 DETECTR 技术具有高灵敏度、高特异度和快速等优点,并为开发更多新的基于 CRISPR-Cas 系统的检测技术提供基础。但此类技术有两步反应,增加了检测过程中被污染的风险,进一步的研究可通过将核酸扩增过程与 CRISPR 检测过程整合于单一反应体系中进而降低检测过程被污染的风险。基于 CRISPR-Cas 系统的检测技术在实际应用中面临着复杂的核酸提取方式和检测程序,以及难以实现对单一 crRNA 及 Cas 进行多重靶标检测等挑战,这些挑战限制了新技术在实际样本检测中的应用。

3 病原微生物核酸检测的挑战

基于 CRISPR-Cas 系统的病原微生物核酸检测在临床应用上面临需开发简易的核酸提取方法,简化检测程序,建立多重检测平台等诸多挑战^[7],笔者进一步讨论了目前的一些解决方案。

3.1 核酸提取的简化 简化核酸提取过程仍然是快速核酸检测技术发展的主要瓶颈,因此需要开发快速高效的核酸提取方法促进基于 CRISPR-Cas 系统的检测技术的应用。MYHRVOLD 等^[15]建立了样本加

热消除核酸酶非提取(HUDSON)技术,将 HUDSON 与 SHERLOCK 技术联合,在提取和纯化 DNA 或 RNA 的情况下裂解病毒,可以直接从临床样本中检测病毒核酸,极大地简化了操作步骤,降低了气溶胶污染的风险。然而,HUDSON 技术缺乏纯化和浓缩核酸的步骤,可能会降低检测复杂样本中目标核酸的能力。纳米材料和技术可以通过简便的工艺从复杂样品中提取目标核酸。纳米级的隔离膜具有较大的比表面积,RODRIGUEZ 等^[16]开发了基于纸张核酸扩增的流控芯片技术,该技术使用的隔离膜通过静电作用和氢键结合力将高盐溶液中的目标核酸快速、高效地分离,使吸附在膜上的核酸保持稳定的结合,通过环介导等温扩增(LAMP)技术原位扩增,实现目标序列的富集、纯化和扩增,完成从样品到结果的集成检测。目前,芯片上的等温放大步骤需要外部热源,该技术使用加热模块来辅助等温扩增,因此,若在基于纸张的微流控检测平台中整合一个集成的加热系统将大大加强其便携性。

3.2 检测过程的简化 大多数基于 CRISPR-Cas 系统的检测技术仍然使用标准的两步检测法,此类方法增加了检测的时间和检测过程中交叉污染的风险,这促使研究者开发单管检测策略。常规两步检测法首先利用核酸扩增技术提高靶标的浓度,再联合 CRISPR-Cas 系统产生放大的检测信号^[2]。但核酸扩增技术扩增靶标的同时,还增加了非特异性扩增的风险,故研究者们开发了无须靶标扩增的超灵敏的检测方法。

3.2.1 单管检测策略 基于 CRISPR-Cas 系统的单管检测技术将核酸扩增和 CRISPR-Cas 系统反应整合于一个缓冲体系,用于快速现场检测。单管检测是在反应管底部添加核酸扩增试剂,在反应管盖上也添加 Cas12a 和 crRNA 试剂,反应管底部的核酸扩增完成后,将预先加在管盖上的 Cas12a 和 crRNA 试剂通过离心移至管底,使 Cas12a 和 crRNA 试剂与扩增子混合,实现在 1 管内完成扩增和检测,避免了气溶胶污染^[17]。但此技术先进行靶标扩增再将扩增产物与 CRISPR-Cas 系统反应,检测时间较长。因此,研究者们将靶标的扩增与 CRISPR-Cas 系统整合于一个缓冲系统中同时进行反应,缩短了检测时间。根据核酸扩增步骤和 CRISPR-Cas 系统反应的温度偏好,JOUNG 等^[18]将 LAMP 介导的核酸扩增反应(55~65℃)与耐高温的 Cas12b(31~59℃)集中于一管中同时完成核酸扩增与信号检测,建立了单管检测技术。该技术不但降低了交叉污染的风险,还明显缩短了检测时间。同样,该技术的核酸扩增过程也需要加热,未来的研究可通过开发集成加热系统,进一步简化工作流程,进而不同环境下均可进行相关核酸

检测。

3.2.2 无扩增检测策略 无核酸扩增步骤的检测策略具有快速、避免非特异性扩增、不易产生交叉污染等优势,但可能会造成检测灵敏度下降。为解决灵敏度下降这一问题,研究者们通常使用超灵敏信号报告系统、信号级联放大技术,以及微小体积等方式提高灵敏度^[13]。首先,电化学传感器、金属纳米材料、高性能的表面增强拉曼散射技术等可放大来自 CRISPR-Cas 系统的微弱信号,超灵敏地检测低浓度靶标。其次,因实验中 CRISPR-Cas 系统反应速率与 Cas-crRNA 复合物的数量呈正比,基于 CRISPR-Cas 系统的检测用多个 Cas-crRNA 复合物直接靶向目标序列的不同位点,通过加快信号积累速率,在更短的时间内达到检测信号阈值^[19]。此外,根据 Cas 的反式切割活性与底物浓度呈正比的原理,空间限制检测体系可浓缩底物进而提高检测灵敏度^[20]。不同无扩增策略的组合可提高检测的灵敏度。基于 CRISPR-Cas 系统的无扩增数字 RNA 检测技术通过采用多个 Cas13a-crRNA 复合物靶向多个位点在空间限制体系(反应体积减小到 nL 水平)中检测新型冠状病毒(SARS-CoV-2),检测限为 5 fmol/L,耗时 5 min^[21]。因此,合理整合上述策略可以实现无扩增、快速、灵敏的靶标检测。但由于缺乏靶标扩增步骤,用来增加灵敏度的策略可能会增加检测方法的复杂性和费用,在选择或设计检测方法时,必须综合考虑这些策略的优缺点。

3.3 多重检测 多重检测可以提高诊断效能,实现大规模样本的高通量检测。GOOTENBERG 等^[22]利用 PsmCas13b、LwaCas13a、CcaCas13b 和 Cas12a 分别切割富含特定核苷酸序列的报告探针,实现了四重检测。但在该检测方法中,Cas 的反式切割可能会产生信号重叠以降低检测的特异度,且该技术涉及较多的蛋白质种类,导致检测成本较高。因此,一种通过 DNA 阻断剂调控 Cas 反式切割活性的检测方法以单一蛋白实现了多重靶标的检测一定程度上降低了检测成本。HAN 等^[23]开发了一种基于 Cas12a-DNA 阻断剂的多重检测(CASTI)技术。CASTI 可以通过联合 RPA 扩增靶标,以一种 Cas 实现人乳头瘤病毒(HPV)16 和 HPV18 基因的检测,检测限为 1 amol/L。该多重检测平台有助于在设备有限的条件下进行病原微生物的检测。然而,与检测人工合成的 DNA 靶标相比,该技术在细胞系和临床样本中检测目标 DNA 的效率较低,因此,需要进一步优化实验条件以避免样本中其他 DNA 或 RNA 的干扰。此外,ACKERMAN 等^[24]将核酸多重评估的组合排列反应(CARMEN)联合 CRISPR-Cas13a 系统,开发一种多通道检测方法(CARMEN-Cas13)。CARMEN-Cas13 已可同时检测 169 种人类病毒,还能区分多种

亚型的流感病毒,检测时间为 5 min。CARMEN-Cas13 的灵敏度和特异度可与 SHERLOCK 技术匹配,这对病原微生物高通量检测及流行病学研究至关重要。该技术可检测来自不同人群的数千份样本,需要专业人员对检测结果进行仔细分析解释。该技术若能与移动电话应用程序连接将直接读出检测结果,会有更大的应用潜力。

4 基于 CRISPR-Cas 系统相关的病原微生物非核酸分析物检测

病原微生物及其抗原和血清学抗体等非核酸分析物往往在发病早期和治疗开始后以低浓度出现。灵敏和可定量的基于 CRISPR-Cas 系统的检测技术有助于发现早期病变和准确评估疾病疗效^[25]。近年来,基于 CRISPR-Cas 系统的检测技术已用于检测多种类型靶标,包括病原体、抗原、血清学抗体等。

4.1 基于 CRISPR-Cas 系统相关的病原微生物直接检测 基于 CRISPR-Cas 系统的病原微生物直接检测常通过抗体或适配体识别致病菌,再与 CRISPR-Cas 系统联合放大检测信号,实现免培养、免提取的病原微生物直接检测。基于抗体的检测方法利用抗体对靶细菌识别,通过免疫夹心法联合 CRISPR-Cas12a 系统输出检测结果。DUAN 等^[26]开发了一种基于 CRISPR-Cas12a 系统引导、无 DNA 提取和扩增、可快速直接检测病原体的生物传感器(CATCHER)。CATCHER 通过免疫夹心结构(标记鼠伤寒抗体的磁珠、靶细菌、标记鼠伤寒抗体和 DNA 核酸内切酶 I 的胶体金),经磁分离后巧妙地利用 DNA 核酸内切酶 I 将溶液中单链 DNA 激活探针降解为短寡核苷酸,改变 CRISPR-Cas12a 系统生物活性,进而输出检测结果,检测限为 7.9×10^1 CFU/mL。该方法为非核酸分析物的检测提供了一个通用平台。相比价格较贵的抗体识别方法,适配体识别方法成本较低且步骤更简便。基于适配体的方法,研究者通常识别适配体靶标后释放一个 DNA 或 RNA 激活探针用于激活 CRISPR-Cas 系统,进而完成信号的放大及输出。SHEN 等^[27]开发了将核酸变构探针(AP)与 CRISPR-Cas13a 系统联合的 APC-Cas 检测方法。该方法通过 AP 识别靶细菌后暴露引物结合位点,引物在 DNA 聚合酶和 T7 启动子作用下进行 DNA 序列的延伸和转录,产生大量单链 RNA 激活探针及 CRISPR-Cas13 系统,通过荧光信号输出结果。该技术可快速、直接、定量检测各种样本中肠炎单胞菌数($1 \sim 10^5$ CFU/mL)。以上病原微生物直接检测技术省去了检测前核酸提取和扩增步骤,明显缩短了检测时间。

4.2 基于 CRISPR-Cas 系统相关的病原微生物抗原检测 病原微生物抗原与致病力密切相关,抗原检测也是传染性疾病的诊断的主要方式之一。基于

CRISPR-Cas 系统的检测技术检测抗原时大多需利用适配体识别抗原后将抗原转化为核酸信号,联合 CRISPR-Cas 系统放大检测信号,实现抗原快速检测。生物毒素是细菌产生的一类重要抗原,会引起人类急性中毒、致癌或致畸等,生物毒素的检测有助于评估细菌感染严重程度和预防毒素引发的休克。AB-NOUS 等^[28]利用核酸适配体联合 CRISPR-Cas12a 系统识别黄曲霉毒素 M1(AFM1),开发了简便、高效的抗原检测技术。在添加了 AFM1 的牛奶样品中,该技术在 $0.5 \sim 50.0$ ng/L 呈现出较宽的线性关系。该技术利用比色法,通过颜色的变化输出检测结果,不需要昂贵设备,信号输出方式简便,便于现场检测,但比色这一信号输出方式灵敏度相对较低。研究者可探索使用包括金属有机框架在内的新型纳米材料来提高传感器的灵敏度。此外,病毒抗原往往决定了病毒的宿主、组织嗜性及其致病的能力,也成为检测的重要靶标。通过适配体联合 CRISPR-Cas12a 系统,研究者建立了 SARS-CoV-2 抗原的电化学检测平台^[29],实现核衣壳蛋白的检测。与常规抗原检测法相比,基于 CRISPR-Cas 系统的抗原检测技术提高了抗原检测的特异度和灵敏度,并可对抗原进行定量检测。

4.3 基于 CRISPR-Cas 系统相关的病原微生物抗体检测 抗体检测在疾病诊断、疗效评估和流行病学调查中具有重要意义。BARBER 等^[30]建立了 CRISPR-Cas9 系统介导的自组装固定肽(PICASSO)技术。PICASSO 技术通过将能与靶分子特异性结合的重组肽段与 dCas9 融合形成复合物,利用 sgRNA 引导该复合物与微阵列表面上特定位置的 DNA 进行自组装,构建 DNA-蛋白质微阵列,用于检测不同抗体。PICASSO 技术能快速识别样本中的上千种抗体,实现了病原微生物血清学抗体快速高通量检测。PICASSO 技术已被用于检测新型冠状病毒感染(COVID-19)恢复期患者血清 SARS-CoV-2 的抗体。但该技术难以避免非特异性背景信号,未来的研究可通过改变微阵列表面寡核苷酸的间距密度及 dCas9 与其融合蛋白之间的连接长度等进一步优化实验条件,提高检测特异度。

5 总结与展望

基于 CRISPR-Cas 系统的检测技术在病原微生物核酸和非核酸靶标的检测中迅速发展,实现对超低浓度样品的精确、灵敏检测。本文归纳了基于 CRISPR-Cas 系统的检测技术的构建和应用,讨论了该技术目前存在的挑战及可能的解决办法,进一步阐述了基于 CRISPR-Cas 系统的检测技术在病原微生物非核酸分析物检测方面的最新研究热点。核酸靶标的检测通过开发简易的核酸提取方法,简化检测程

序,建立多重检测平台等方式提高了检测性能。非核酸靶标的检测则需通过适配体、抗体及其他方式将靶标转换成核酸信号进一步完成检测,在病原微生物检测领域展现出了更广阔的应用前景。

尽管 CRISPR-Cas 系统在病原微生物检测中具有各种优势,但仍有一些挑战需要克服。(1)靶基因片段选择的局限性。CRISPR-Cas 系统在 Cas 锚定目标序列时依赖于 PAM,在选择检测的靶基因片段时存在一定的局限性。(2)crRNA 和单链 DNA、单链 RNA 报告探针在添加 RNA 酶抑制剂的临床复杂样本中仍存在降解风险。(3)Cas 存在一定的背景活性,不同批次的背景活性不同,导致样品检测结果不同。

基于 CRISPR-Cas 系统的检测技术在临床应用上具有巨大的潜力。基于 CRISPR-Cas 系统的检测技术与人工智能相结合,可以促进感染性疾病的早期诊断,直接向卫生专家甚至普通人群发出警报。此外,基于 CRISPR-Cas 系统技术的检测结果可以通过移动电话应用程序连接到云数据进行分析 and 储存,可用于构建医疗大数据分析平台,为临床诊疗及科学研究提供有力证据。CRISPR-Cas 系统现在能够检测的不仅是基因组材料,还有望扩展到更多领域。除病原微生物及其抗原和血清学抗体等非基因组目标外,CRISPR-Cas 系统在癌症生物标志物、人体样本罕见突变、食品水样污染检测、植物病原微生物检测等领域的新应用仍有待进一步探究。

参考文献

[1] DILNAWAZ F, ACHARYA S, KANUNGO A. A clinical perspective of chitosan nanoparticles for infectious disease management[J]. Polym Bull (Berl), 2023;1-25.

[2] KELLNER M J, KOOB J G, GOOTENBERG J S, et al. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases[J]. Nat Protoc, 2019, 14(10): 2986-3012.

[3] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product[J]. J Bacteriol, 1987, 169(12): 5429-5433.

[4] HAFT D H, SELENGUT J, MONGODIN E F, et al. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes[J]. PLoS Comput Biol, 2005, 1(6): e60.

[5] POURCEL C, SALVIGNOL G, VERGNAUD G. CRISPR elements in Yersinia pestis acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies[J]. Microbiology (Reading), 2005, 151(Pt 3): 653-663.

[6] VAN BELJOUW S P B, SANDERS J, RODRÍGUEZ-MOLINA A, et al. RNA-targeting CRISPR-Cas systems [J]. Nat Rev Microbiol, 2023, 21(1): 21-34.

[7] QIU M, ZHOU X M, LIU L. Improved strategies for CRISPR-Cas12-based nucleic acids detection[J]. J Anal Test, 2022, 6(1): 44-52.

[8] LI Y, DENG F, GOLDDYS E M. A simple and versatile CRISPR/Cas12a-based immunosensing platform: towards attomolar level sensitivity for small protein diagnostics [J]. Talanta, 2022, 246: 123469.

[9] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. Science, 2012, 337 (6096): 816-821.

[10] KOONIN E V, MAKAROVA K S, ZHANG F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems [J]. Curr Opin Microbiol, 2017, 37: 67-78.

[11] LI J J, YANG S S, ZUO C, et al. Applying CRISPR-Cas12a as a signal amplifier to construct biosensors for Non-DNA targets in ultralow concentrations [J]. ACS Sens, 2020, 5(4): 970-977.

[12] PARDEE K, GREEN A A, TAKAHASHI M K, et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components [J]. Cell, 2016, 165 (5): 1255-1266.

[13] HAJIAN R Z, BALDERSTON S, TRAN T, et al. Detection of unamplified target genes via CRISPR-Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor [J]. Nat Biomed Eng, 2019, 3(6): 427-437.

[14] 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.

[15] MYHRVOLD C, FREIJE C A, GOOTENBERG J S, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13 [J]. Science, 2018, 360(6387): 444-448.

[16] RODRIGUEZ N M, WONG W S, LIU L N, et al. A fully integrated paperfluidic molecular diagnostic chip for the extraction, amplification, and detection of nucleic acids from clinical samples [J]. Lab Chip, 2016, 16(4): 753-763.

[17] WANG B, WANG R, WANG D Q, et al. Cas12aVDet: a CRISPR/Cas12a-Based platform for rapid and visual nucleic acid detection [J]. Anal Chem, 2019, 91(19): 12156-12161.

[18] 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.

[19] 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(1): 4711.

[20] TIAN T, SHU B W, JIANG Y Z, et al. An ultralocalized Cas13a assay enables universal and nucleic acid amplification-free single-molecule RNA diagnostics [J]. ACS Nano, 2021, 15(1): 1167-1178.

[21] FOZOUNI P, SON S, DÍAZ DE LEÓN DERBY M, et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy [J]. Cell, 2021, 184(2): 323-333.

et al. The predictive value of thromboelastogram in the evaluation of patients with suspected acute venous thromboembolism[J]. *Acta Haematol*, 2020, 143(3): 272-278.

[8] BROWN W, LUNATI M, MACEROLI M, et al. Ability of Thromboelastography to detect hypercoagulability: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Orthop Trauma*, 2020, 34(6): 278-286.

[9] VAN HAREN R M, THORSON C M, VALLE E J, et al. Hypercoagulability after burn injury[J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2013, 75(1): 37-43.

[10] LLOYD-DONALD P, VASUDEVAN A, ANGUS P, et al. Coagulation in acutely ill patients with severe chronic liver disease: insights from thromboelastography[J]. *J Crit Care*, 2017, 38: 215-224.

[11] FAN D, OUYANG Z, YING Y, et al. Thromboelastography for the prevention of perioperative venous thromboembolism in orthopedics[J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2022, 28: 10760296221077975.

[12] RYAN M L, VAN HAREN R M, THORSON C M, et al. Trauma induced hypercoagulability in pediatric patients [J]. *J Pediatr Surg*, 2014, 49(8): 1295-1299.

[13] SCHERER A G, WHITE I K, SHAIKH K A, et al. Risk of deep venous thrombosis in elective neurosurgical procedures: a prospective, doppler ultrasound-based study in children 12 years of age or younger[J]. *J Neurosurg Pediatr*, 2017, 20(1): 71-76.

[14] HARAHSHEH Y, DUFF O C, HO K M. Thromboelastography predicts thromboembolism in critically ill coagulopathic patients[J]. *Crit Care Med*, 2019, 47(6): 826-832.

[15] MEIZOSO J P, KARCUTSKIE C A, RAY J J, et al. A simplified stratification system for venous thromboembolism risk in severely injured trauma patients[J]. *J Surg Res*, 2017: 138-144.

[16] RIZZA A, RICCI Z, PEZZELLA C, et al. Kaolin-activated thromboelastography and standard coagulation assays in cyanotic and acyanotic infants undergoing complex cardiac surgery: a prospective cohort study[J]. *Paediatr Anaesth*, 2017, 27(2): 170-180.

[17] HAWKINS R B, RAYMOND S L, HARTJES T, et al. Review: the perioperative use of thromboelastography for liver transplant patients [J]. *Transplant Proc*, 2018, 50(10): 3552-3558.

[18] 杨涛. 儿童骨折流行病学调查[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2018.

[19] MIRABELLA L, COTOIA A, COLACICCO G, et al. Reference values for coagulation assessment in full-term newborns[J]. *Minerva Anestesiol*, 2017, 83(4): 369-374.

[20] SCHOTT N J, EMERY S P, GARBEE C, et al. Thromboelastography in term neonates[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2018, 31(19): 2599-2604.

(收稿日期: 2023-09-11 修回日期: 2023-12-22)

(上接第 691 页)

[22] 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.

[23] HAN J, SHIN J, LEE E S, et al. Cas12a/blocker DNA-based multiplex nucleic acid detection system for diagnosis of high-risk human papillomavirus infection[J]. *Biosens Bioelectron*, 2023, 232: 115323.

[24] ACKERMAN C M, MYHRVOLD C, THAKKU S G, et al. Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13[J]. *Nature*, 2020, 582(7811): 277-282.

[25] ZHOU B, XU K, ZHENG X, et al. Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 3; 5(1): 144.

[26] DUAN M L, LI B Y, ZHAO Y J, et al. A CRISPR/Cas12a-mediated, DNA extraction and amplification-free, highly direct and rapid biosensor for *Salmonella Typhimurium* [J]. *Biosens Bioelectron*, 2023, 219: 114823.

[27] SHEN J J, ZHOU X M, SHAN A A, et al. Sensitive detection of a bacterial pathogen using allosteric probe-initiated catalysis and CRISPR-Cas13a amplification reaction [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 267.

[28] ABNOUS K, DANESH N M, RAMEZANI M, et al. A novel colorimetric aptasensor for ultrasensitive detection of aflatoxin M1 based on the combination of CRISPR-Cas12a, rolling circle amplification and catalytic activity of Gold nanoparticles [J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 1165: 338549.

[29] LIU N, LIU R, ZHANG J J. CRISPR-Cas12a-mediated label-free electrochemical aptamer-based sensor for SARS-CoV-2 antigen detection [J]. *Bioelectrochemistry*, 2022, 146: 108105.

[30] BARBER K W, SHROCK E, ELLEDGE S J. CRISPR-based peptide library display and programmable microarray self-assembly for rapid quantitative protein binding assays [J]. *Mol Cell*, 2021, 81(17): 3650-3658.

(收稿日期: 2023-08-16 修回日期: 2023-11-08)