

网络出版时间:2023-11-30 11:27:16 网络出版地址:<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20231129.1029.023>

CRISPR/Cas 应用于核酸特异性检测及其在检测 SARS-CoV-2 病毒中的应用

汪 琼¹ 综述 刘 飞²,柳传祺³,王效静²,陈付凉³ 审校

摘要 CRISPR/Cas 系统是细菌体内的获得性免疫系统,用来对抗侵略细菌的外源 DNA、质粒、病毒和噬菌体等,以此维持内环境的稳定。现该系统被广泛应用于基因编辑领域,主要用以完成真核、原核细胞型生物基因组的切割、修复和编辑。随着 Cas 蛋白家族新成员衍生物被陆续发现,赋予 CRISPR/Cas 系统新的功能,例如其在分子诊断领域中的应用。本文就 CRISPR/Cas 系统在分子诊断领域内的研究进展进行综述,并详细分析其在新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染检测中的应用价值,为进一步完善我国核酸检测体系,提升新型冠状病毒肺炎疫情防控能力提供参考和依据。

关键词 CRISPR/Cas 系统;基因编辑;分子诊断;SARS-CoV-2;应用研究

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)12-2139-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.024

SARS-CoV-2 病毒感染导致的新型冠状病毒肺炎(Corona virus disease 2019, COVID-19),引起世界范围内严重的卫生健康问题^[1]。截止 2023 年 3 月 26 日,全球 COVID-19 已造成超过 7 亿人感染,累计 680 万以上患者死亡^[2]。在目前的 COVID-19 疫情防控中,主要通过 SARS-CoV-2 病毒核酸检测确诊感染人群,采取的技术手段主要包括实时荧光 PCR (real-time PCR, RT-PCR)、下一代测序(next generation sequencing, NGS) 和血清学抗体检测。RT-PCR 技术是现阶段使用最广泛的 SARS-CoV-2 检测技术,在 2~4 h 内即可提供检测结果,被视作检测 SARS-CoV-2 病毒的金标准。但由于受采样不当、病毒载量低、引物设计局限以及病程变化等因素影响,导致临床样本检测中出现假阴性现象^[3]。RT-PCR 检测主要缺点为:① 需要 PCR 扩增仪;②

2023-09-26 接收

基金项目:安徽省重大科技专项(编号:202003a07020024)

作者单位:蚌埠医学院第一附属医院¹ 感染科实验室、² 分子诊断中心,蚌埠 233004

³ 蚌埠医学院基础医学院,蚌埠 233000

作者简介:汪 琼,女,硕士;

陈付凉,男,硕士,中级检验师,责任作者, E-mail: cfl3948636@163.com

需要专门的技术人员;③ 对实验室环境要求高;④ 检测周期相对较长等。NGS 技术在检测的灵敏度、特异度等方面相对于 PCR 技术有一定的优势,但因其操作程序复杂,检测周期更长,检测成本高等不利因素,大大限制了其在疫情防控中的推广和应用。血清特异性抗体检测,可在 15 min 内快速检出结果,而在症状出现前的 5~14 d 潜伏期,由于血液样本中 IgM 或 IgG 抗体滴度低,血清学检测的假阴性结果可能较高^[4-5]。因此,新型核酸分子检测方法亟待研究开发。近年来,随着对规律间隔成簇短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated systems, CRISPR/Cas) 系统研究的深入,发现该系统在分子检测领域有巨大潜力。该文主要介绍 CRISPR/Cas 系统及其在分子诊断中的演进,并重点介绍 CRISPR/Cas 诊断技术在 SARS-CoV-2 病毒核酸检测中的研究现状。

1 CRISPR/Cas 系统来源和基因编辑技术的应用

作为病毒最广泛的宿主,细菌在进化过程中具备了针对病毒的先天性和适应性免疫系统,先天性免疫系统主要通过限制性内切酶、修饰酶识别并切割外源 DNA 来清除入侵的病毒^[6],适应性免疫系统主要包含 CRISPR/Cas 系统,其主要功能是识别外源性核酸(如入侵的病毒核酸等)并进一步对其剪切、清除,以维持机体内环境的稳定^[7]。

CRISPR 序列与 Cas 蛋白酶为适应性免疫系统两大重要组成部分。CRISPR 存在于 90% 古生菌以及近 40% 细菌基因组中,由末端重复元件(repeat)和间隔序列(spacer)组成^[8]。Spacer 储存着外源性核酸信息,能够翻译成小引导 RNA (small guide RNA, sgRNA)。Cas 蛋白酶决定了 CRISPR/Cas 系统的工作方式及功能特征,其种类繁多。在自然界中,根据介人模块构架,广义上将 Cas 蛋白分为两大类,第一类通常依赖多蛋白复合体发挥生物功能;而第二类通常使用单个效应蛋白发挥生物功能^[9]。Cas9 为第二类家族Ⅱ型蛋白,拥有 RuvC 以及 HNH 核酸酶结构域,能切割双链 DNA。当外源核酸入侵

细菌,sgRNA 能够识别外源核酸并完成碱基配对,引导 Cas9 蛋白将识别的外源核酸切割、降解,以此来清除入侵的核酸^[10]。

CRISPR/Cas9 系统被广泛应用于真核、原核细胞生物核酸切割、修复。对 Cas9 蛋白进行结构改造,可以赋予 CRISPR/Cas 系统新的功能。如将 RuvC/HNH 元件替换成转录激活因子或抑制因子,则可构建 CRISPR/dead Cas9 (dCas9) 系统,用以实现对靶基因的内源激活或沉默^[11]。大鼠胞嘧啶核苷脱氨酶 rAPOBEC1 通过 linker 序列 XTEN 连接到 dCas9 的 N 端,可以构建单碱基编辑 (base editor, BE),可将胞嘧啶 (C) 转变为尿嘧啶 (U),实现单碱基水平碱基转换功能^[12]。由此看出,Cas 蛋白及其衍生体可以赋予 CRISPR/Cas 系统多样化功能。

2 CRISPR/Cas 应用于核酸检测技术的研究进展

2.1 Cas13a 蛋白的发现及初应用 2015 年,Shmakov et al^[13] 用 Cas1 作为诱饵成功筛选出了 LbaCas13a 蛋白。Cas13a 为 2 类家族 VI 型蛋白,拥有原核、真核生物核苷酸结合结构域,具有 RNase 活性,在 sgRNA 引导下在基因组靶向区域发挥生物学功能。Cas13a 蛋白除了具有核酸剪切功能外,还具有多种独有的特征,包括:① CRISPR/Cas13a 识别的靶分子是单链 RNA,而非 DNA;② CRISPR/Cas13a 识别、结合靶 RNA 分子后,Cas13a 蛋白被激活,不仅能特异性切割靶 RNA 分子,还获得了附带切割活性 (collateral cleavage activity, CCA)-非特异性剪切其他 RNA 分子的功能^[13]。2016 年,Doudna 教授^[14]首次利用 Cas13a 蛋白 CCA 功能,创造性将 CRISPR/Cas13a 技术引入 RNA 核酸分子检测的应用研究。该研究在 CRISPR/Cas13a 反应体系中加入报告 RNA 分子系统(荧光素 - 报告 RNA 分子 - 荧光淬灭基团),当“导向 RNA 分子”与环境中的“检测 RNA 分子”完成碱基互补配对后,Cas13a 蛋白就会被“导向 RNA 分子”招募到“检测 RNA 分子”识别位点并活化,随即“检测 RNA 分子”特异性降解以及通过 CCA 活性将“报告 RNA 分子”非特异性降解,从而将荧光素从淬灭基团中释放出来。荧光信号的检测间接指示环境中存在“检测 RNA 核酸分子”。通过 CRISPR/Cas13a 方法成功检测出了溶液中含有的噬菌体 RNA (灵敏度: 0.01 nmol/L)^[14]。该研究发现奠定了 CRISPR/Cas 技术应用于核酸分子诊断领域的基础。

同年,张锋团队^[15] 将重组酶聚合酶扩增

(recombinase polymerase amplification, RPA, 工作原理见图 1) 技术引入 CRISPR-Cas13a (LwaCas13a) 检测系统,开发出了灵敏性更高的夏洛克 (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking, SHERLOCK) 检测技术,其检测灵敏性达到了渺摩尔 (attomolar, amol/L 或 10 ~ 18 mol) 级别 (图 2A),且反应体系在常温下即可完成。利用 SHERLOCK 技术已成功在病毒感染患者血清或尿液里检测到浓度低至每微升含单一拷贝的寨卡病毒基因,在肺癌患者血液中检测到丰度低至 0.1% EGFR 突变基因^[15]。RPA 技术主要包含三种酶,常温下能结合核酸的重组酶、单链 DNA 结合蛋白 (single-stranded DNA binding protein, SSB) 和链置换 DNA 聚合酶。在常温下,聚合酶与引物复合体对基因组进行扫描,当引物与基因组序列相同时,引物与其中一条 DNA 链进行匹配,另一条游离链随即被 SSB 进行结合。引物与 DNA 结合后,DNA 聚合酶随即对模板进行扩增。该步骤进行多个循环,即可实现常温下靶向 DNA 核酸片段扩增。图 1 引自文献^[16],在此基础上进行修改。

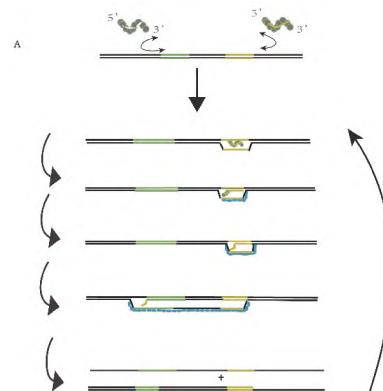


图 1 RPA 常温 DNA 扩增技术原理图

2.2 Cas13a 蛋白亚族的发现及应用 后续研究^[17]表明,Cas13a 可以被分为两个亚族,不同亚族 Cas13a 配套的导向 RNA 具有不同的辅助序列 (direct repeat, DR),且非特异性剪切“报告 RNA”时对序列具有不同的偏好性。此外,Cas13b 蛋白作为 Cas13 蛋白家族另一个亚型,同样具有靶向 RNA 的效应功能和干扰功能,其“导向 RNA”同样具有独特的结构以及独特的位点识别特征。这些发现为以后设计多重诊断提供了选择工具^[17]。2018 年,Doudna 与张锋^[18-19] 实验室均发现,Cas12a 蛋白介导的 CRISPR/Cas 系统能够识别单链及双链 DNA,一旦

被激活, Cas12a 能够非特异性剪切、降解单链 DNA。Doudna 团队^[18]因此开发了 Cas12a-DETECTR 检测系统, 该系统省去了重组酶聚合酶扩增技术 (recombinase polymerase amplification, RPA) 扩增后产物 (DNA 形式) 需要用 T7 酶转录成 RNA 的环节, 使得反应体系进一步简化 (图 2B)。张锋^[19]则在 CRISPR-Cas12a 的基础上, 对早期 SHERLOCK 技术进行迭代升级, 从多重化、定量化和去荧光化角度对 SHERLOCK 技术进行完善。完善后的 SHERLOCK 技术能够同时检测多种 RNA 病毒, 以及 RNA 病毒和 DNA 病毒混合样本的多个位点 (图 2C), 并通过颜色对样本核酸进行判读, 减少检测仪器的使用 (图 3); 该团队还将加热灭活技术 (heating unextracted diagnostic samples to obliterate nucleases, HUDSON) 引入 SHERLOCK 检测体系, HUDSON 技术能够对样本 RNA 核酸酶和病毒进行热灭活, 从而省略核酸提取环节, 可以在患者血清、唾液等样本中

直接完成核酸检测^[20]。Doudna^[21]后续研究表明, Cas14 蛋白能够靶向识别单链 DNA, 并基于此开发了 Cas14-DETECTR 检测体系, 其识别靶序列不受前间隔序列邻近基序限制, 但需要靶向序列严格匹配, 因此, 该体系可检测出单个碱基变异, 并且扩大了 sgRNA 的设计范围。检测流程包括: DNA 或 cDNA (RNA 反转录) 样本在常温下采用 RPA 进行扩增, 扩增产物 (DNA 形式) 在 T7 转录酶的作用下转录成 mRNA, 转录产物作为 CRISPR-Cas13a 的反应底物进行核酸检测 (图 2A), DNA 分子或者 cDNA (RNA 反转录) 在 RPA 技术扩增后, 直接作为 CRISPR/Cas12a 底物, 在常温下进行检测, 如图 2B, 图引自文献^[18], 在此基础上进行修改; 升级版 SHERLOCK 技术对 RNA 核酸样本 (ssRNA, ZIKA 病毒核酸, DENV 病毒核酸)、DNA 核酸样本进行多重检测, 信号分别通过 FAM、TEX、Cy5 以及 HEX 显示出, 如图 2C 图, 引自文献^[19]在此基础上进行修改。

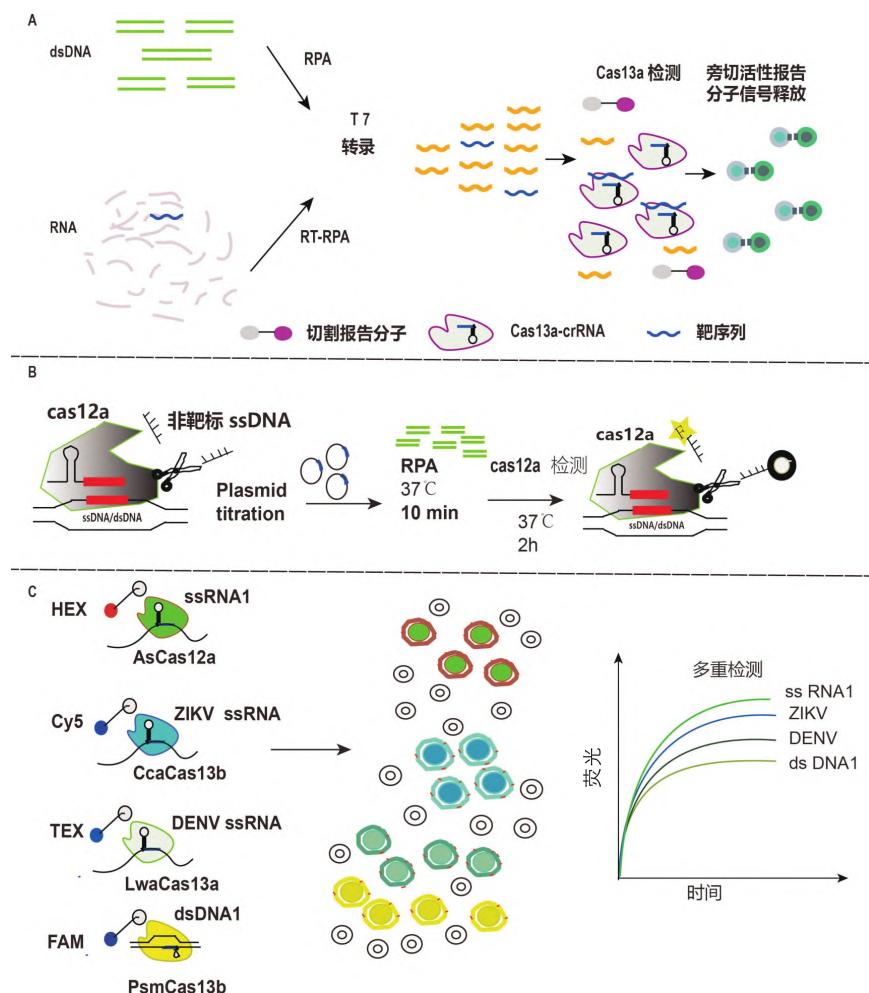


图 2 CRISPR/Cas 检测技术原理图

A: CRISPR/Cas13a 检测 DNA 或者 RNA 靶标的流程示意图; B: CRISPR/Cas12a 结合 RPA 检测 DNA 靶标的流程示意图; C: 不同 Cas 蛋白可以单个反应体系多重检测的示意图

2.3 更多的 Cas 蛋白家族被开发利用 Cas12, Cas13 以及 Cas14 等蛋白首先特异性结合靶向核酸分子, 并完成剪切功能(如破坏病毒核酸), 随后非特异性切割报告基因, 这样检测人员就可以通过颜色变化进行结果判断。Sabeti et al^[22] 基于这些蛋白的双重功能属性, 开发了“雕刻者”(Cas13-assisted restriction of viral expression and readout, CARVER) 技术。CARVER 技术不仅能诊断出细胞感染的淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、甲型流感病毒和单纯疱疹病毒, 而且还能实现有效清除细胞内病毒并指示残余病毒含量等三重功能。

3 CRISPR/Cas 技术在 SARS-CoV-2 病毒核酸检测中的应用

随着等温扩增技术的引入, CRISPR/Cas 与等温扩增相结合具有多种优势(表1)。等温扩增技术不需要热循环系统就能够进行核酸扩增。相比于常规 PCR 需要经过严格的高温变性、退火、延伸的等步骤才能模拟体外的 DNA 分子扩增, 等温扩增技术使用的温度为恒温, 且具有快速、高效、特异性高等优点。此外, 它不需要专门的设备。基于等温扩增原理研发出来的新型核酸扩增技术分别为环介导等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[23]、RPA^[16]、链置换扩增技术 (strand displacement amplification, SDA)^[24] 和指数扩增反应 (exponential amplification reaction, EXPAR)^[25]。

在疫情爆发后不久, 国内学者利用 Sherlock 技术针对 COVID-19 患者的样本进行测试, 并与 RT-PCR 方法、抗原抗体检测法进行比较, 发现 Sherlock 技术灵敏度高于其他两种方法^[26]。夏洛克技术最先是采用 RPA 技术对核酸进行 42 ℃ 等温扩增(扩增前在同一体系进行 RNA 核酸逆转录), 接着对扩增产物行 CRISPR/Cas13a 技术检测(检测前在同一体系对扩增产物进行转录), 最后采用可视化的方法对信号进行判读(图 3A、B)。胶体金试纸条信号

指示分子设计: Biotin-报告 RNA 分子-FAM。报告 RNA 未被切割, 金纳米颗粒-FAM 抗体-FAM-报告 RNA-Biotin 耦合物被 Streptavidin 滞留在一线, 二线不显色; 如 RNA 被剪切, 金纳米颗粒-FAM 抗体-FAM-被释放, 能在二线被 Protein A 滞留并显色(绿色箭头所示)。二线颜色的有、无间接指示环境中待检测核酸分子有、无, 图 3A、3B 引自文献^[27], 在此基础上进行修改。引导 RNA 与靶向核酸的精确互补配对, 决定了 CRISPR/Cas 系统的检测特异性。在 RPA 阶段, 核酸分子得到充分扩增。单个激活的 Cas13a 蛋白能够非特异性剪切多个报告 RNA 分子, 释放更多的信号基团使得检测信号被二次放大。相比基于 RT-PCR 核酸检测法, CRISPR/Cas13a 系统在检测 SARS-CoV-2 核酸中具有更高的灵敏度。在对 SARS-CoV-2 病毒核酸复制模拟物行 CRISPR/Cas13a 技术检测时, 其检测下限能达到 20 ~ 200 amol/L 浓度。病毒核酸的提取时间不计在内, 整个检测流程可以在 1 h 内完成。同时, 该系统具有仪器设备要求低、检测成本低(约 0.6 美元/反应)等优点。因此, CRISPR/Cas 系统在未来 COVID-19 患者检测中展现出了强大的潜在应用价值。

此外, Broughton et al^[28] 将 RT-LAMP 和 CRISPR-Cas 检测结合, 在单一温度下 60 min 内即可得到核酸检测结果。最近, Hu et al^[29] 为简化检测流程, 利用一条光敏感基团连接的短 RNA (inhibitory RNA) 与 crRNA 形成二聚体, 可抑制 crRNA 正常折叠并干扰其活性, 该二聚体在 365 nm 波长紫外线照射下可实现 crRNA 去抑制。通过引入一个含有 PC 连接子的保护性寡核苷酸链, 实现了 CRISPR/Cas12a 活性的暂时沉默, 使其能够在同一个反应体系中进行等温扩增与 CRISPR/Cas 识别、检测, 避免了 CRISPR 系统的裂解活性造成的扩增抑制。在对 60 份临床 SARS-CoV-2 RNA 样本的 O-gene 和 N-gene 的分析中取得较高的检测灵敏度和特异度。

对于 SARS-CoV-2 等 RNA 病毒核酸的检测, 与

表 1 几种 CRISPR 结合等温扩增检测方法的比较

检测方法	等温扩增技术	Cas 蛋白	灵敏度	特异性	临床检测应用
SHERLOCK	RPA/LAMP	Cas13a	10 amol/L 级别的 RNA	可同时检测多个目标序列和变异株	新冠病毒、登革热病毒、寨卡病毒等 ^[20]
DETECTR	LAMP/RPA	Cas12a	10 拷贝/μl 的 DNA 或 RNA	可同时区分不同类型和亚型的冠状病毒	新冠病毒、人乳头瘤病毒、淋球菌等 ^[18]
HOLMES	NASBA/LAMP	Cas12b	0.1 amol/L 级别的 RNA	可同时区分不同类型和亚型的流感病毒	流感病毒、埃博拉病毒、非洲马尔堡病毒等 ^[34]
OPERATOR	DNA 连接滚环扩增(RCA)	Cas12a	0.1 拷贝/μl 的 RNA	不需要逆转录步骤, 简化操作流程	新冠病毒 ^[35]

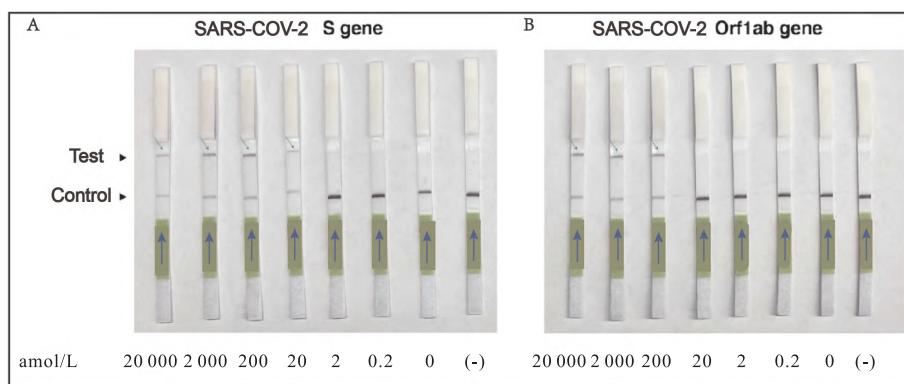


图3 CRISPR/Cas13技术检测SARS-CoV-2基因组模拟物结果

A: S基因模拟物检测结果图; B: Orf1ab序列模拟物检测结果图

表2 Cas蛋白家族介导的分子诊断平台各自属性

Cas蛋白	微生物来源	靶向性	DR方向	修饰偏	序列长度(nt)	灵敏度
LwaCas13a	L. wadei	ssRNA	5'	PolyU/AU	28	5e ⁵ mol/L ^[19]
LbaCas13a	L. bucterium	ssRNA	5'	PolyA/AC	28	1e ⁹ amol/L ^[19]
CcaCas13b	C. canimorsus	ssRNA	3'	PolyU/UA/UC	30	5e ⁶ amol/L ^[19]
PsmCas13b	P. sp. MA2016	ssRNA	3'	PolyA/GA	30	5e ⁸ amol/L ^[19]
AsCas12a	A. sp. BV3L6	ssDNA/dsDNA	5'	-	20	5e ¹⁰ amol/L ^[19]
Cas14/Cas12f	DPANN	ssDNA	5'	-	-	- ^[36-37]

诸多传统检测法类似,光控CRISPR法仍需要引入逆转录,实现RNA到DNA的转化,从而增加了整个反应体系的复杂度及检测成本。2021年,一种无逆转录指数扩增反应RTF-EXPAR完美规避了反应前的逆转录过程,极大缩短了反应时间(10 min内检测出结果),实现了SARS-CoV-2病毒检测。该体系利用BstNI核酸内切酶选择性剪切DNA:RNA杂交双链中的DNA链,实现从病毒RNA中酶解产生触发DNA(trigger DNA)的无逆转录过程,trigger可启动EXPAR反应并将病毒RNA信号快速转化为大量短的双链DNA片段(short double-strand DNA,sdsDNA),实现病毒的快速检测^[30]。近日,Wu et al^[31]提出了一种基于电化学CRISPR传感技术的新型冠状病毒变异株检测方法,该方法在金电极上均匀地修饰电沉积的金纳米颗粒,采用与SARS-CoV-2 Delta spike基因序列相同的DNA模板作为模型,可在1 h内完成检测,具有较高的稳定性和特异性。Li et al^[32]将石墨烯和电化学及纳米技术应用到CRISPR/Cas检测体系优化和改造生物传感器以提高检测效率、降低成本。为了方便结果读出, Ma et al^[33]开发了一种具有智能手机读数的CRISPR-Cas12a视觉生物传感器,用于检测SARS-CoV-2。简单地说,SARS-CoV-2衍生的核酸触发了基于CRISPR-Cas12a的单链DNA的任意降解,而单链

DNA原本连接两个金纳米颗粒,这导致了金纳米颗粒的解聚,从而产生了可观察到的颜色变化。这一变化可以通过带有Color Picker App的智能手机轻松识别。当然,CRISPR/Cas系统在核酸检测领域也面临着挑战:①临床测试数据采集周期较长;②CRISPR/Cas系统类别较多,且各系统拥有独特的属性(表2),在诊断应用领域尚未形成统一标准;③CRISPR/Cas系统所需配套试剂尚未统一商品化;④核酸片段被大量扩增,高浓度核酸易造成污染;⑤多人混检,难以评估样本中患者病毒载量;⑥RNA引物序列、crRNA序列需要反复优化以降低核酸病毒检测中的脱靶效应。这些因素减缓了CRISPR/Cas系统的临床应用进程。

4 展望

综上所述,CRISPR/Cas系统在分子诊断领域应用研究开发时间虽不足十年,但发展迅速,已经有多款检测试剂盒被开发应用,可见其在COVID-19患者临床检测中具有很高的应用价值。目前,美国食品药品监督管理局已经为一些基于CRISPR的诊断技术授予了紧急使用授权,未来有望成为普适性的分子诊断工具。在对所有试剂和反应条件进行系统的优化后,将会达到与PCR相同甚至更优越的检测性能。相信未来通过大规模临床样本测试以及进一

步条件优化,CRISPR/Cas系统能够在SARS-CoV-2和其他病原体临床检测中得到广泛应用。该技术的成功实施能进一步完善COVID-19疾病的诊断、筛查和防控体系并完善我国各领域分子诊断体系。

参考文献

- [1] Sachs J D, Karim S S A, Aknin L, et al. The Lancet commission on lessons for the future from the COVID-19 pandemic [J]. *Lancet*, 2022, 400 (10359):1224–80.
- [2] WHO TEAM. Weekly epidemiological update on COVID-19 - 30 March 2023 [EB/OL]. [2023-03-30]. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19--30-march-2023>.
- [3] Huang P, Liu T, Huang L, et al. Use of chest CT in combination with negative RT-PCR assay for the 2019 novel coronavirus but high clinical suspicion [J]. *Radiology*, 2020, 295:22–3.
- [4] Hardick J, Gallagher N, Sachithanandham J, et al. Evaluation of four point of care (POC) antigen assays for the detection of the SARS-CoV-2 variant omicron [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10 (3):e0102522.
- [5] Dong L, Li W F, Jiang Y. Performance evaluation of antigen detection rapid diagnostic test (Ag-RDT) for COVID-19 diagnosis in a primary healthcare center during the Shanghai COVID-19 quarantine period [J]. *Virol J*, 2022, 19(1):140.
- [6] Koonin E V, Makarova K S, Wolf Y I. Evolutionary genomics of defense systems in archaea and bacteria [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2017, 71:233–61.
- [7] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea [J]. *Science*, 2010, 327(5962):167–70.
- [8] Jansen R, Embden J D, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6):1565–75.
- [9] Makarova K S, Wolf Y I, Alkhnbashi O S, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(11):722–36.
- [10] Garneau J E, Dupuis M, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA [J]. *Nature*, 2010, 468(7320):67–71.
- [11] Qi L S, Larson M H, Gilbert L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression [J]. *Cell*, 2013, 152(5):1173–83.
- [12] Komor A C, Kim Y B, Packer M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J]. *Nature*, 2016, 533(7603):420–4.
- [13] Shmakov S, Abudayyeh O O, Makarova K S, et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems [J]. *Mol Cell*, 2015, 60(3):385–97.
- [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):270–3.
- [15] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Lee J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. *Science*, 2017, 356 (6336):438–42.
- [16] Piepenburg O, Williams C H, Stemple D L, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. *PLoS biology*, 2006, 4(7):e204.
- [17] East-Seletsky A, O'Connell M R, Burstein D, et al. RNA targeting by functionally orthogonal type VI-A CRISPR-Cas enzymes [J]. *Mol Cell*, 2017, 66(3):373–83.e3.
- [18] 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):436–9.
- [19] 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):439–44.
- [20] Myhrvold C, Freije C A, Gootenberg J S, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13 [J]. *Science*, 2018, 360 (6387):444–8.
- [21] Harrington L B, Burstein D, Chen J S, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes [J]. *Science*, 2018, 362(6416):839–42.
- [22] Freije C A, Myhrvold C, Boehm C K, et al. Programmable inhibition and detection of RNA viruses using Cas13 [J]. *Mol Cell*, 2019, 76(5):826–37.e811.
- [23] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28 (12):E63.
- [24] Walker G T, Nadeau J G, Spears P A, et al. Multiplex strand displacement amplification (SDA) and detection of DNA sequences from *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(13):2670–7.
- [25] Van Ness J, Van Ness L K, Galas D J. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(8):4504–9.
- [26] An J, Liao X, Xiao T, et al. Clinical characteristics of recovered COVID-19 patients with re-detectable positive RNA test [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(17):1084.
- [27] 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.
- [28] Broughton J P, Deng X, Yu G, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2 [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7):870–4.
- [29] Hu M, Qiu Z, Bi Z, et al. Photocontrolled crRNA activation enables robust CRISPR-Cas12a diagnostics [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(26):e2202034119.
- [30] Carter J G, Orueta Iturbe L, Duprey J H A, et al. Ultrarapid detection of SARS-CoV-2 RNA using a reverse transcription-free exponential amplification reaction, RTF-EXPAR [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(35):e2100347118.
- [31] Wu C, Chen Z, Li C, et al. CRISPR – Cas12a – empowered elec-

网络出版时间:2023-11-30 09:51:00 网络出版地址:<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20231129.1029.025>

lncRNA 在帕金森病发病机制中的研究进展

刘成 综述 李岩 审校

摘要 帕金森病(PD)是一种神经退行性疾病,其病理特征为黑质致密部的多巴胺(DA)能神经元丢失和路易氏包涵体的形成。PD 的发病机制十分复杂,就目前所知,细胞自噬、细胞凋亡、氧化应激以及神经炎症等参与了 PD 的发生发展。长链非编码 RNA(lncRNA)是一类生物大分子,属于非编码 RNA 中的一种。大量研究表明 lncRNA 对神经元细胞增殖、分化、凋亡和衰老具有重要调控作用,且与 PD 密切相关。该文就 lncRNA 在 PD 发病机制中的作用研究进行综述。

关键词 lncRNA; 帕金森病; 细胞凋亡; 线粒体功能障碍; 神经炎症; 发病机制

中图分类号 R 742.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)12-2145-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.025

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是仅次于阿尔兹海默症的第二大神经退行性疾病,其临床表现主要有静止性震颤、肌强直、姿势不稳以及运动迟缓等。据报道^[1],全球每年都有新增的 PD 患者,且随

2023-10-14 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81960585);遵义市科技计划项目(编号:市科合支撑 GY(2021)66 号);贵州省教育厅创新群体项目(编号:黔教合 KY 字[2021]020)

作者单位:遵义医科大学公共卫生学院,贵州 遵义 563000

作者简介:刘成,男,硕士研究生;

李岩,男,教授,研究生导师,责任作者, E-mail: liyan067321@sina.com

着人口老龄化,病例呈逐年上升的趋势。PD 分为偶发性和遗传性两类^[2]。约 10% 的 PD 遗传病例由 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)、parkin RBR E3 泛素连接酶(parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase, Parkin)、PTEN 诱导的推定激酶 1(PTEN-induced kinase 1, PINK1)、蛋白质去糖蛋白酶 DJ-1 和富亮氨酸的重复激酶 2 (leucine-rich repeat kinase 2, LRRK2) 等基因突变引起;而某些环境因素破坏线粒体功能可能会导致偶发性 PD,如杀虫剂和重金属。目前针对 PD 患者的治疗只能改善其症状,而不能阻止疾病的进展。因此,进一步了解 PD 的发病机制,探寻潜在的早期诊断标志物和有效治疗靶点十分重要。

长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA)是长度超过 200 个核苷酸的 RNA 转录本,不具备编码蛋白质的能力,但可通过与 DNA、RNAs 和蛋白质的相互作用调控转录、表观遗传修饰、蛋白质/RNA 稳定性以及翻译和翻译后修饰。如, lncRNA 可通过调控微小 RNA(miRNA)的表达来影响其靶基因的表达量,还可直接参与到 mRNA 转录后调控过程中。研究^[3]表明 lncRNA 大量存在于神经细胞中,参与了对神经退行性疾病,如 PD 的调控,且从多个方面影响了 PD 的发生和发展。

1 细胞自噬

自噬是一种细胞降解与再循环的过程,主要包

- trochemical biosensor for rapid and ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 delta variant [J]. *Nanomicro Lett*, 2022, 14 (1): 159.
- [32] Li H, Yang J, Wu G, et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 and respiratory syncytial virus using CRISPR Cas13a and graphene field-effect transistors [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61 (32): e202203826.
- [33] Ma L, Yin L, Li X, et al. A smartphone-based visual biosensor for CRISPR-Cas powered SARS-CoV-2 diagnostics [J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 195: 113646.
- [34] Li L, Li S, Wu N, et al. HOLMESv2: a CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quan-

titation [J]. *ACS Synth Biol*, 2019, 8 (10): 2228-37.

- [35] Zhu Z, Guo Y, Wang C, et al. An ultra-sensitive one-pot RNA-templated DNA ligation rolling circle amplification-assisted CRISPR/Cas12a detector assay for rapid detection of SARS-CoV-2 [J]. *Biosens Bioelectron*, 2023, 228: 115179.
- [36] Kim D Y, Lee J M, Moon S B, et al. Efficient CRISPR editing with a hypercompact Cas12f1 and engineered guide RNAs delivered by adeno-associated virus [J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40 (1): 94-102.
- [37] Okano K, Sato Y, Hizume T, et al. Genome editing by miniature CRISPR/Cas12f1 enzyme in *Escherichia coli* [J]. *J Biosci Bioeng*, 2021, 132 (2): 120-4.