

· 基础研究 ·

基于CRISPR/Cas13a技术检测肿瘤驱动基因TP53 R248W的研究

邝振展¹, 肖斌², 孙朝晖¹, 罗镓³, 何洁雯⁴, 李林海^{2*}

¹中国人民解放军南部战区总医院检验科, 广东 广州 510010; ²广州医科大学附属第六医院(清远市人民医院)检验医学部, 广东 清远 511518; ³广州医科大学金域检验学院, 广东 广州 510180; ⁴广州南方学院云康医学与健康学院, 广东 广州 510970

[摘要] 目的: 建立一种基于CRISPR/Cas13a的TP53 R248W变异体的快速检测技术。方法: 根据Over-lap PCR技术, 以TP53野生型质粒为模板构建TP53 R248W变异体质粒; 对TP53R248W变异体扩增产物大小, 扩增反应条件及crRNA长度和浓度进行优化, 初步建立基于CRISPR/Cas13a的R248W变异体快速检测方法; 利用不同突变率TP53 R248W变异体及模拟血浆ctDNA, 评价CRISPR/Cas13a方法的检测灵敏度。结果: 建立的CRISPR/Cas13a方法成功检测出产物大小为368 bp的TP53 R248W片段; 在0.05~0.25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, crRNA浓度越高, 检测结果相对荧光值越高; 该方法检测TP53 R248W变异体的灵敏度为 1×10^4 拷贝/ μL , 最低可以检测出突变率为0.01%的变异体。结论: 建立的CRISPR/Cas13a方法具有快速、简便、灵敏、特异等优点, 为组织和血浆中的TP53 R248W变异体的检测提供了新的技术手段。

[关键词] CRISPR/Cas13a; TP53 R248W; crRNA; 快速检测

[中图分类号] R446.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2022)08-1119-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20220811

Detection of tumor driver gene TP53 R248W by CRISPR/Cas13a

KUANG Zhenzhan¹, XIAO Bin², SUN Zhaohui¹, LUO Rong³, HE Jiewen⁴, LI Linhai^{2*}

¹Department of Clinical Laboratory, General Hospital of the Southern Theater Command of the People's Liberation Army, Guangzhou 510010; ²Department of Laboratory Medicine, the Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University (Qingyuan People's Hospital), Qingyuan 511518; ³Jinyu College of Laboratory Science, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510180; ⁴Yunkang School of Medicine and Health, Guangzhou Nanfang University, Guangzhou 510970, China

[Abstract] **Objective:** To establish a CRISPR/Cas13a based method for detecting TP53 R248W mutant molecules. **Methods:** TP53 R248W mutant plasmid was constructed by Over-lap PCR using TP53 wild-type plasmid as template. The CRISPR/Cas13a method for the detection of TP53 R248W variant was initially established by optimizing the amplification product size, amplification technology, the length and concentration of crRNA. The sensitivity of CRISPR/Cas13a method was evaluated by TP53 R248W variants with different mutation rates and simulated plasma ctDNA. **Results:** The size of the amplified product detected by CRISPR/Cas13a was about 368 bp. The concentration of crRNA had influence upon the detection intensity of CRISPR/Cas13a. In the range of 0.05~0.25 $\mu\text{mol/L}$, the higher the concentration of crRNA, the higher the detection intensity of CRISPR/Cas13a was detected. The sensitivity of CRISPR/Cas13a in detecting TP53 R248W variants was 10^4 copies/ μL , and the minimum mutation rate was 0.01%. **Conclusion:** The established CRISPR/Cas13a method has the advantages of rapid, simple, sensitive and specific, and provides a new technology for the detection of TP53 R248W variant in tissues and plasma.

[Key words] CRISPR/Cas13a; TP53 R248W; crRNA; rapid detection

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(08): 1119-1124]

[基金项目] 全军保健专项科研课题(18BJZ4); 广东省医学科学技术研究基金项目(B2019139); 全军卫勤保障能力创新与生成项目(20WQ029); 后勤科研开放项目(BLB19J009)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: mature303@126.com

肿瘤蛋白53(tumor protein 53, TP53)是最重要的抑癌基因之一,其编码蛋白P53是胞内关键的转录因子,能够调控P21、Bcl-2相关X蛋白(BCL2 associated X, BAX)等多种靶基因的表达水平,广泛参与DNA损伤修复、细胞凋亡、细胞周期调控等多种重要进程^[1]。TP53功能获得性突变常导致其抑癌功能的丧失,如R273H、R175H、R248W等,其中R248W突变不仅导致其抑癌功能丧失,还能够促进肿瘤恶性表型和侵袭,导致患者预后较差,而有研究发现阿霉素对携带TP53 R248W突变的患者治疗更为敏感^[2-3]。因此,对TP53 R248W变异体的检测不仅有助于预警肿瘤的发生发展,还能指导肿瘤的治疗和用药。目前,组织和血浆中TP53 R248W的检测手段主要有数字PCR、高通量测序、突变扩增系统等。数字PCR准确度高,但成本高,对仪器和操作人员要求高;高通量测序灵敏度高但实验流程复杂;突变扩增系统操作简单但稳定性欠佳,所以亟需寻找一个新的灵敏度高、稳定性好及成本低的肿瘤驱动基因检测方法^[4]。

成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及其相关蛋白是近年来火爆的研究热点,在RNA干扰和基因编辑等领域有着巨大的潜力^[5]。其中,CRISPR相关蛋白13a(CRISPR-associated protein 13a, Cas13a)是一种新发现的II类、VI型Cas效应蛋白,其活性由高等真核生物和原核生物核苷酸结合(higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding, HEPN)结构域决定^[6]。与II型Cas9不同,Cas13a属于RNA酶分子,在CRISPR RNA(crRNA)的引导下,Cas13a结合靶RNA,激活HEPN结构域,从而特异性水解靶RNA及‘连带剪切’周围RNA分子^[7-8],但当Cas13a/crRNA复合物与非靶RNA结合

时,Cas13a的RNA酶特性被抑制^[9]。

本研究利用Over-lap PCR技术,构建TP53 R248W变异体质粒作为检测对象,设计特异性的靶标crRNA,并根据Cas13a蛋白的‘连带剪切’特性,实现对TP53基因R248W突变的快速检测,以期建立新的、快速、简便以及灵敏的肿瘤驱动基因检测方法,为肿瘤的治疗及监控提供帮助。

1 材料和方法

1.1 材料

Cas13a蛋白(M20201)、FAM荧光探针(H2001-2023)和本研究设计的crRNA购自于广州博徕斯生物公司,所设计扩增引物由威海四合生物公司合成,具体序列见表1。T7转录酶试剂盒(JT101-01)、高保真DNA聚合酶(AP231-13)、RNA酶抑制剂(AI101-01)(北京全式金生物)。Top10感受态细胞(B528412)(上海生工生物工程公司)。RAA试剂盒(TABAS03KIT)(TwistDx生物公司,英国)。T4连接酶(6022Q)、Xho I限制酶(1094S)及Kpn I限制酶(1068S)(TaKaRa公司,日本)。血浆DNA提取试剂盒(D3182-03C)(Magen生物公司,美国)。ABI 9700 PCR仪(赛默飞公司,美国)。荧光检测仪(Bio-Rad公司,美国)。TP53野生型质粒、pENTER空载体由本课题组实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 TP53 R248W标准品的构建

以野生型TP53质粒为模板,使用TP53-F&Rm和Fm&TP53-R两对引物分别扩增TP53 R248W突变位点前后段序列,使扩增前后段序列均携带有R248W点突变,然后进行重叠(Over-lap)PCR将上述两个片段融合。融合产物经限制酶Xho I和Kpn I双酶切后,使用T4连接酶将它与pENTER载体进行连接。

表1 突变株的构建引物、RAA引物、crRNA序列和探针序列

Table 1 Mutant strain primer, RAA primer, crRNA sequence and probe sequence

名称	序列(5'→3')
TP53-F	ACACCCGGGGTACCGATTCCCTCACTGATTGCTCTTA(KpnI位点)
TP53-R	ACCCACCGCTCGAGAGTAACACCATCGTAAGTCAAG(XhoI位点)
Fm	CCTGCATGGGCGGCATGAAC <u>T</u> GAGGGCCCATCTCACCATCATCACA(R248W突变)
Rm	TGTGATGATGGTGGAGATGGGCCTCC <u>A</u> GTTTCATGCCGCCCATGCAGG(R248W突变)
R248W-RAA-F	ATATTTAATACGACTCACTATAGGGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTAC
R248W-RAA-R1	CTGGAGTCTTCCAGTGTGATGATGGTGAGG
R248W-RAA-R2	ATCTACTCCCAACCACCCTTGTCTCTTC
R248W-crRNA	GATTTAGACTACCCCAAAAACGAAGGGGACTAAAACCC <u>A</u> CTTCATGCCGCCCATGCAGGAAGCTG (碱基A为R248W突变,碱基C为引入突变)
Probe	5'-FAM-UUUUUU-3'-BHQ1

连接产物转化入Top10细胞,取菌液进行测序鉴定。

1.2.2 PCR或RAA扩增TP53 R248W变异体

本研究使用两对扩增引物Primer1(R248W-RAA-F&R248W-RAA-R1)和Primer2(R248W-RAA-F&R248W-RAA-R2),利用PCR或重组酶介导链置换核酸扩增技术(recombinase aided amplification, RAA)扩增技术,按说明书指导扩增出含TP53 R248W突变序列片段。PCR的扩增体系如下:TP53 R248W质粒(1 μmol/L)1 μL,前、后引物混合物(10 μmol/L)2 μL,高保真聚合酶混合物25 μL,纯水22 μL。将上述试剂充分混匀后,进行PCR扩增,PCR的扩增程序如下:98℃预热5 min,然后98℃10 s,58℃15 s,72℃30 s,循环40次,最后72℃孵育10 min。RAA的扩增体系如下:TP53 R248W质粒(1 μmol/L)1 μL,前、后引物混合物2 μL,RAA反应液29.5 μL, MgCl₂ 2.5 μL,纯水15 μL。将上述试剂充分混匀后,加入RAA干粉管中,然后39℃孵育20 min。

1.2.3 CRISPR/Cas13a方法对TP53 R248W变异体检测

对步骤1.2.2的扩增产物进行检测,体系如下:扩增产物2 μL, crRNA(1 μmol/L)1 μL, Cas13a蛋白(10 μmol/L)1 μL, 荧光探针(10 μmol/L)1 μL, T7转录酶1 μL, RNA酶抑制剂1 μL, T7 buffer(5×)4 μL, NTP 2 μL, 无RNA酶纯水补足反应体系至20 μL, 混匀后置于Bio-Rad CFX 荧光检测仪, 37℃检测1 h, 记录各时间段的相对荧光值(relative fluorescence unit, RFU)。

1.2.4 CRISPR/Cas13a检测体系中crRNA浓度的优化

将crRNA梯度稀释成5个浓度,使检测反应体系中的crRNA终浓度分别为0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 μmol/L。除crRNA外,CRISPR/Cas13a检测反应体系如步骤1.2.3。

1.2.5 CRISPR/Cas13a方法对不同突变率TP53 R248W的检测

将浓度为 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 拷贝数(copies)/μL的TP53 R248W质粒分别与 1×10^7 copies/μL的TP53野生株混合1:1混合,形成突变频率为0.01%、0.1%、1%、10%,取2 μL混合物进行PCR扩增,然后用上述优化的CRISPR/Cas13a方法进行检测。

1.2.6 CRISPR/Cas13a方法对模拟血浆ctDNA的检测

将浓度为 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 copies/μL的TP53 R248W质粒取1 μL分别与1 mL经基因检测无TP53突变的人血浆混合,构建TP53 R248W突变基因浓度分别为 1×10^0 、 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 copies/μL的模拟血浆。使用

血浆DNA提取试剂盒,按说明书操作提取模拟血浆ctDNA,取2 μL模拟血浆ctDNA进行PCR扩增,随后使用上述优化的CRISPR/Cas13a方法进行检测。

1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析。计量资料经K-S正态性检验,若呈正态分布,采用方差分析或者t检验,若呈偏态分布,采用非参数Mann-Whitney U检验。计数资料用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TP53 R248W变异体质粒的构建

根据PCR点突变技术,利用两对携带TP53 R248W(C>T)点突变的引物,将TP53野生型序列扩增成前后2个片段,这两片段均含有突变位点序列,以及前段的3'端及后段5'端存在互补序列(图1A),然后使用Over-lap PCR将2个基因片段融合成完整的TP53 R248W变异体(图1B),经与pENTER质粒连接后转化入Top10感受态,测序结果显示TP53 R248W变异体质粒构建成功。

2.2 CRISPR/Cas13a联合PCR或RAA技术检测TP53 R248W突变株

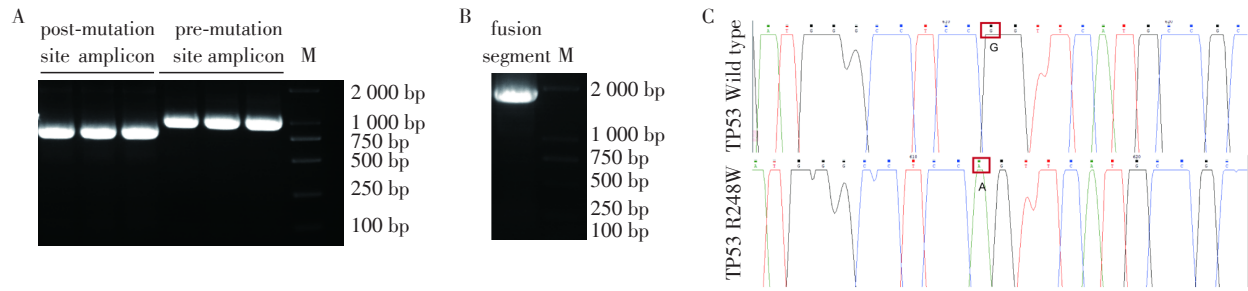
根据TP53 R248W变异体序列设计两对扩增引物(Primer 1和Primer 2)。对于Primer 1和Primer 2,PCR和RAA技术均成功扩增出约110 bp和368 bp的片段(图2A)。使用CRISPR/Cas13a方法检测扩增产物,结果表明,在10 min内,各组RFU值均达到平台期,但基于Primer 1扩增的片段,TP53 R248W变异体的RFU值与野生型相比无显著性差异($P > 0.05$);而基于Primer 2扩增的片段,变异体的RFU值显著高于野生型($P < 0.001$,图2B、C)。

2.3 不同浓度crRNA对TP53 R248W变异体检测结果的影响

为了探究不同浓度的crRNA对TP53 R248W变异体检测结果的影响,对crRNA进行了梯度浓度稀释,并分别进行CRISPR/Cas13a检测。结果表明,在0.05~0.25 μmol/L范围内,随着crRNA浓度的增加,RFU值也随之增大,其中crRNA浓度达到0.20 μmol/L及以上时,差异具有统计学意义($P < 0.001$),表明crRNA浓度的上升会提高TP53 R248W变异体的检测强度(图3)。

2.4 CRISPR/Cas13a检测不同突变频率的TP53 R248W

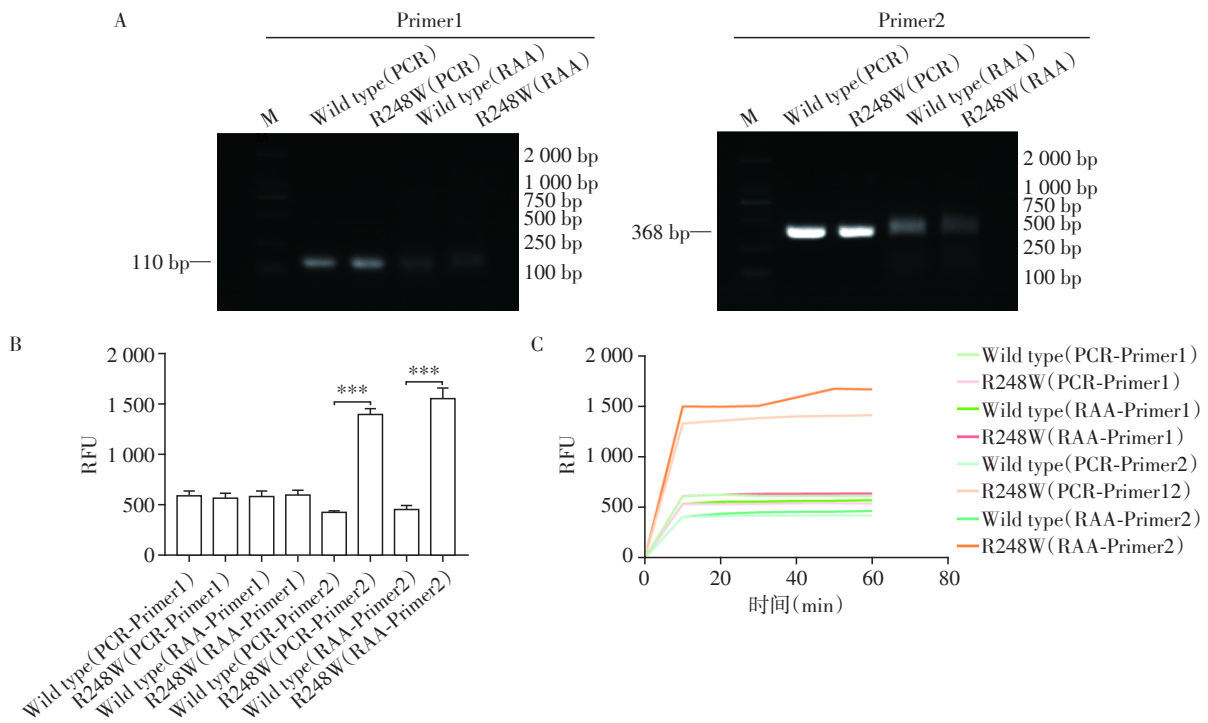
为探究CRISPR/Cas13a方法对不同突变频率的



A: TP53 基因前、后段电泳结果; B: 前、后段融合而成的 TP53 R248W 变异体电泳结果; C: 野生型与变异体的测序结果对比。

图1 TP53 R248W 突变株构建电泳结果与测序结果

Figure 1 The result of electrophoresis and sequencing of TP53 R248W mutant strain



A: Primer1 和 Primer2 扩增产物 (RAA 和 PCR) 琼脂糖凝胶电泳图; B: Primer1 和 Primer2 扩增产物的 CRISPR/Cas13a 检测结果; C: CRISPR/Cas13a 检测结果曲线。两组比较, *** $P < 0.001$ 。

图2 Primer1 和 Primer2 扩增产物的电泳结果及 CRISPR/Cas13a 检测结果

Figure 2 The result of electrophoresis and CRISPR/Cas13a for Primer1 and Primer2 amplification product

TP53 R248W 的检测效果,通过按比例混合 TP53 野生型和 R248W 变异体质粒,获得了不同突变频率的变异体。以混合质粒为模板,扩增含突变位点的序列片段(图 4A)。使用 CRISPR/Cas13a 技术检测扩增产物,结果显示,不同突变频率的变异体检测结果 RFU 值显著高于野生型,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),其中,本研究方法最低可以检测出突变频率为 0.01% 的混合质粒(含有 1×10^3 copies 的变异体),表明 TP53 基因野生型的存在基本不影响 TR248W 变异体的检出(图 4B)。

2.5 CRISPR/Cas13a 对模拟血浆 ctDNA 的检测

为探究 CRISPR/Cas13a 技术对模拟血浆 ctDNA

的检测效果,以模拟血浆 ctDNA 为模板,扩增含突变位点的序列片段(图 5A)。使用 CRISPR/Cas13a 技术检测扩增产物,结果显示,当血浆中的 TP53 R248W 变异体浓度达到 1×10^4 copies/ μ L,其 RFU 值明显高于野生型血浆,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),表明本研究方法最低能检测出模拟血浆中浓度为 1×10^4 copies/ μ L 的 TP53 R248W 变异体(图 5B)。

3 讨论

Cas13a 蛋白在体外具有 RNA 酶活性,因此,研究者探索了其在病原微生物核酸检测及基因分型中具有潜在的应用价值^[10-12]。Gootenberg 等^[13]通过

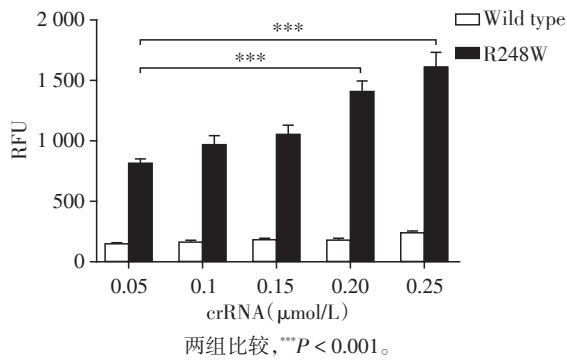
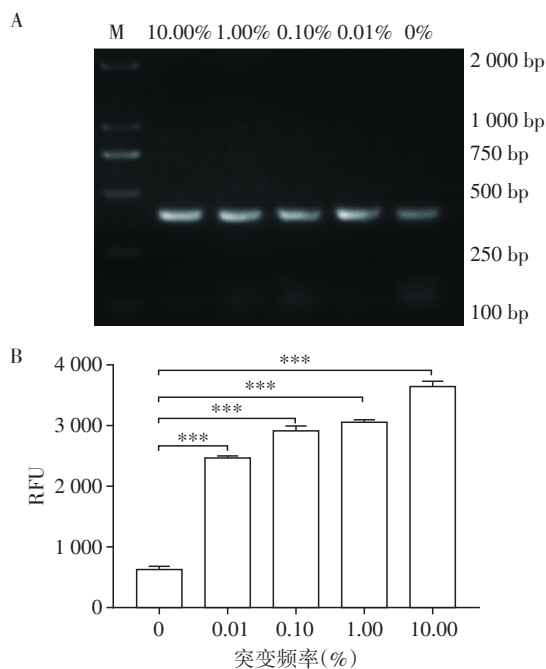


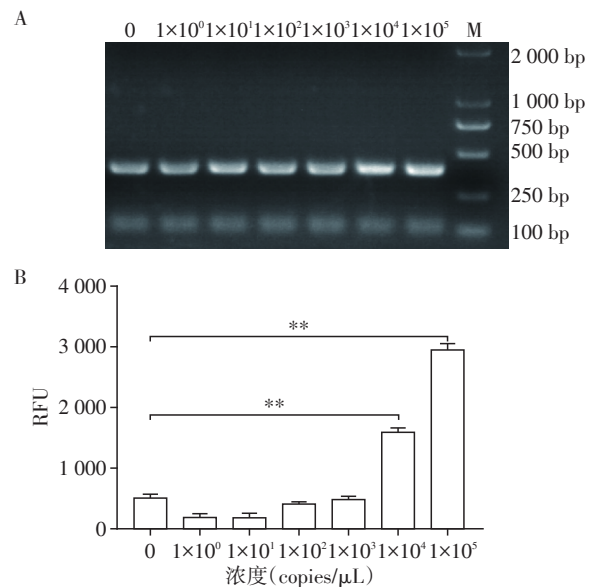
图3 不同浓度crRNA对CRISPR/Cas13a检测强度的影响
Figure 3 The effect of different crRNA concentrations for CRISPR/Cas13a detection



A: CRISPR/Cas13a方法对不同TP53 R248W突变频率的检测结果; B: 扩增产物的电泳结果。两组比较,*** $P < 0.001$ 。

图4 CRISPR/Cas13a对不同突变频率TP53 R248W的检测
Figure 4 CRISPR/Cas13a detection to different mutation frequency of TP53 R248W

对Cas13a蛋白、RNA荧光探针及侧向层析试纸的联合使用,成功对登革热和寨卡病毒单链RNA进行了检测。Fozouni等^[14]为提高Cas13a蛋白对SARS-CoV-2病毒核酸检测的灵敏度,在同一反应中使用多个crRNA,并且通过一个手持小型设备,实现快速便携地获取结果。Ke等^[15]为降低Cas13a蛋白的脱靶效应,在crRNA的3'末端添加发夹结构,并将改进的技术成功应用在乙肝病毒DNA的分型。本文探究了CRISPR/Cas13a技术可否对多态性核酸(如TP53 R248W)进行鉴别,从而为肿瘤驱动基因的检测提供新的帮助。



A: 血浆ctDNA的扩增结果电泳图; B: CRISPR/Cas13a方法对模拟血浆ctDNA的检测结果。两组比较,** $P < 0.01$ 。

图5 CRISPR/Cas13a对模拟血浆ctDNA的检测
Figure 5 CRISPR/Cas13a detection to mimic plasma ctDNA

本研究设计了两对扩增引物Primer1和Primer2,其扩增产物长度分别为110 bp和368 bp。结果显示CRISPR/Cas13a技术不能检测Primer1的扩增产物,而可以有效检测Primer2的扩增产物,说明靶RNA长度可能影响CRISPR/Cas13a的检测效能,推测是较短的靶标RNA与Cas13a/crRNA形成的复合物所获得的自由能不能激活Cas13a的RNA酶活性^[15]。

为了探究不同扩增方法对CRISPR/Cas13a技术的影响,本研究使用了PCR和RAA两种扩增技术。结果表明CRISPR/Cas13a检测结果没有因扩增方法不同而显示出差异。一般而言,RAA方法不需要专用的仪器,实验时间短,大多30 min内可完成扩增,但目前测试价格比较昂贵;PCR需要专用的PCR仪,实验所需时间长,但价格相比RAA便宜^[16]。目前,肿瘤驱动基因检查对结果报告时间没有太高的要求,因此扩增技术可以选用更为便宜的PCR方法。

据报道,crRNA的间隔序列在重复序列的3'端,且长度为28 nt时,功能发挥最佳^[17],因此,本研究的crRNA间隔序列也设计在重复序列的3'端且长度为28 nt,并通过CRISPR/Cas13a检测结果证实了这一结论。同时报道称,当crRNA与靶RNA结合出现碱基配对错误时,Cas13a依旧具有RNA酶活性,这对多态性单核苷酸(single nucleotide polymorphism, SNP)的鉴定造成了干扰^[18]。因此,本研究将R248W突变碱基设计在crRNA的间隔序列的5'末

端,并引入新的错配碱基C,结果发现,当crRNA的间隔序列的5'末端与野生型RNA之间有两个错配碱基,而与变异体RNA之间只有一个错配碱基时,可以有效地区分野生型和变异体。另外,本研究发现crRNA浓度与CRISPR/Cas13a检测强度呈正相关,在0.05~0.25 $\mu\text{mol/L}$ 范围内,crRNA浓度越高,CRISPR/Cas13a检测强度越大。

通过混合TP53野生型和R248W变异体,构建了不同突变频率的TP53 R248W变异体,结果显示CRISPR/Cas13a方法最低可检出突变频率为0.01%的TP53 R248W变异体(1×10^3 copies),与同类型报道检测的灵敏度相当^[13]。最后,通过对模拟血浆cDNA的检测,发现CRISPR/Cas13a检测方法可以在血浆中检测出浓度为 1×10^4 copies/ μL 的TP53 R248W变异体,为下一步临床样本的检测提供重要依据。

综上所述,本研究建立的CRISPR/Cas13a检测方法能够快速、灵敏且高效地检出TP53 R248W变异体,有效区分TP53 R248W变异体与TP53野生型,从而为TP53 R248W突变肿瘤的诊断及治疗提供极大帮助。另外,本研究建立的方法学也可应用于其他肿瘤驱动基因变异体的检测,从而为肿瘤基因检测提供了新的、多样性的技术手段。

[参考文献]

- [1] XU A, ZHOU R, TU J, et al. Establishment of a human embryonic stem cell line with homozygous TP53 R248W mutant by TALEN mediated gene editing [J]. *Stem Cell Res*, 2018, 29(5): 215-219
- [2] CROESSMANN S, WONG H Y, ZABRANSKY D J, et al. PIK3CA mutations and TP53 alterations cooperate to increase cancerous phenotypes and tumor heterogeneity [J]. *Breast Cancer Res Tr*, 2017, 162(3): 451-464
- [3] DE SOUZA C, MADDEN J A, MINN D, et al. The P72R polymorphism in R248Q/W p53 mutants modifies the mutant effect on epithelial to mesenchymal transition phenotype and cell invasion via CXCL1 expression [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8025-8042
- [4] YE P, CAI P, XIE J, et al. The diagnostic accuracy of digital PCR, ARMS and NGS for detecting KRAS mutation in cell-free DNA of patients with colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2021, 16(3): e248775-e248778
- [5] VAN DONGEN J E, BERENDSEN J T W, STEENBERGEN R D M, et al. Point-of-care CRISPR/Cas nucleic acid detection: recent advances, challenges and opportunities [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 166(15): 112445-112461
- [6] TAMBE A, EAST-SELETSKY A, KNOTT G J, et al. RNA binding and HEPN-nuclease activation are decoupled in CRISPR-cas13a [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(4): 1025-1036
- [7] YIN L, ZHAO F, SUN H, et al. CRISPR-Cas13a inhibits HIV-1 infection [J]. *Mol Ther-Nucl Acids*, 2020, 2(4): 147-155
- [8] WANG M, ZHANG R, LI J. CRISPR/cas systems redefine nucleic acid detection: principles and methods [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 165(1): 112430-112487
- [9] HABIBZADEH P, MOFATTEH M, SILAWI M, et al. Molecular diagnostic assays for COVID-19: an overview [J]. *Crit Rev Cl Lab Sci*, 2021, 58(6): 1-20
- [10] WANG X, SHANG X, HUANG X. Next-generation pathogen diagnosis with CRISPR/Cas-based detection methods [J]. *Emerg Microbes Infec*, 2020, 9(1): 1682-1691
- [11] MUSTAFA M I, MAKHAWI A M. SHERLOCK and DETECTR: CRISPR-cas systems as potential rapid diagnostic tools for emerging infectious diseases [J]. *J Clin Microbiol*, 2021, 59(3): e720-e745
- [12] ZHOU L, PENG R, ZHANG R, et al. The applications of CRISPR/Cas system in molecular detection [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(12): 5807-5815
- [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] FOZOUNI P, SON S, DÍAZ D L D M, et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy [J]. *Cell*, 2021, 184(2): 323-333
- [15] KE Y, HUANG S, GHALANDARI B, et al. Hairpin-spacer crRNA - enhanced CRISPR/Cas13a system promotes the specificity of single nucleotide polymorphism (SNP) identification [J]. *Adv Sci*, 2021, 8(6): 2003611-2003621
- [16] 吴晓东, 杜秋明, 郑秀红, 等. 猪附红细胞体重组酶介导等温扩增技术(RAA)荧光检测方法的建立 [J]. *中国兽医学报*, 2020, 287(11): 99-103
- [17] SAIFULLAH, SAKARI M, SUZUKI T, et al. Effective RNA knockdown using CRISPR - Cas13a and molecular targeting of the EML4-ALK transcript in H3122 lung cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 8904-8921
- [18] 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

[收稿日期] 2021-06-30

(本文编辑:唐震)