

基于 RPA - CRISPR/Cas12a 的 5 种呼吸道病毒检测方法的建立

王清华¹, 张雅路², 谭琪², 石耀强², 王攀¹, 白明明¹, 杨春晖²

1. 成都市温江区中医医院, 四川 成都 611130; 2. 中国医学科学院输血研究所

摘要: **目的** 为了在基层、诊所、边防和野外等资源匮乏环境中及早明确常见导致呼吸道感染的病毒, 从而采取有效的治疗方法和应对措施, 本研究建立了一种基于重组酶聚合酶扩增技术 (recombinase polymerase amplification, RPA) 和 CRISPR/Cas12a (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR - associated 12a) 系统的可视化检测方法。**方法** 针对每种病毒靶标的保守序列设计和筛选 RPA 引物及单链向导 RNA (single - strand guide RNA, sgRNA), 然后将 RPA 技术与 CRISPR/Cas12a 检测方法相结合, 建立呼吸道病毒即时可视化检测方法, 并通过检测甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒、新型冠状病毒和鼻病毒临床样品对该方法进行验证。**结果** 所建立的方法可在 1.5 h 内获得结果, 灵敏度达 3.5 copies/ μ l, 各病毒靶标之间无交叉反应。该方法在检测正确率方面与对照的定量逆转录 - 聚合酶链式反应 (Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, qRT - PCR) 法比具有较高的一致性。**结论** 本研究建立的可视化检测方法对常见 5 种呼吸道感染病毒的 8 种型别具有较好的特异性和高灵敏度, 适用于常见呼吸道病毒感染的现场检测, 尤其是资源有限的地区, 具有良好的临床应用前景。

关键词: 呼吸道病毒感染; RPA; CRISPR/Cas12a; 可视化检测; 现场检测

中图分类号: R56 文献标志码: A 文章编号: 1003 - 8507 (2025) 16 - 3013 - 09

DOI: 10. 20043/j. cnki. MPM. 202410457

Establishment of a detection method for five respiratory viruses based on RPA - CRISPR/Cas12a

WANG Qing - hua*, ZHANG Ya - lu, TAN Qi, SHI Yao - qiang, WANG Pan, BAI Ming - ming, YANG Chun - hui

* Chengdu Wenjiang District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 611130, China

Abstract: **Objective** To promptly identify common respiratory viruses causing infections and facilitate effective therapeutic interventions in resource - limited settings such as grassroots, clinics, border areas, and border defense, this study established a visual detection method based on recombinase polymerase amplification (RPA) technology and CRISPR/Cas12a (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR - associated 12a) system. **Methods** Initially, conservative sequences of each virus target were designed, and RPA primers along with single - strand guide RNAs (sgRNAs) were selected. Subsequently, the RPA technology was integrated with the CRISPR/Cas12a detection method for visual detection of influenza A virus, influenza B virus, respiratory syncytial virus, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, and human rhinovirus. **Results** The detection method yielded results within 1.5 hours, with a sensitivity of 3.5 copies/ μ l plasmid, and exhibited no cross - reactivity between each virus target. In terms of detection accuracy, this method demonstrated higher consistency compared to the control Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, (qRT - PCR) method. **Conclusion** The visual detection method established in this study possesses good specificity and high sensitivity for the common five respiratory virus infections. It is suitable for on - site detection of common respiratory virus infections, especially in resource - limited environments, and holds promising clinical application prospects.

Keywords: Respiratory virus infection; RPA; CRISPR/Cas12a; Visual detection; On - site detection

呼吸道感染是全球范围内导致呼吸道疾病的主要原因之一, 对公共卫生构成了严重威胁^[1]。这

些病毒包括流感病毒 (Influenza Virus)、呼吸道合胞病毒 (Respiratory Syncytial Virus, RSV)、冠状病毒 (如 SARS - CoV - 2) 和鼻病毒 (Rhinovirus)^[2] 等。这些病毒的传播迅速且难以控制, 尤其是在人口密集的地区。尽早检测和确诊呼吸道感染对于控制疾病传播、指导临床治疗和保护公众健康至关重要^[3]。

基金项目: 成都市卫健委医学科研课题 (2021331)

作者简介: 王清华 (1976—), 女, 硕士, 副主任中医师, 研究方向: 输血医学

通信作者: 杨春晖, E - mail: yangchunhui@ibt.pumc.edu.cn

传统的呼吸道病毒检测方法主要包括病毒培养、免疫荧光检测 (immunofluorescence assays, IFA)、酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA) 和聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)^[4] 等。这些方法虽能够提供较为准确的检测结果,但也存在一些不足。病毒培养方法耗时较长,操作复杂,且对实验室条件要求较高^[5];免疫荧光和 ELISA 方法的特异性和灵敏度受限,可能出现假阳性或假阴性结果^[6];PCR 方法虽然灵敏度和特异性较高,但需要昂贵的仪器和耗材,且实验过程繁琐^[7]。因此,迫切需要开发一种快速、准确、简便且成本效益高的呼吸道病毒检测方法,以满足基层临床和公共卫生需求。

近年来,CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein) 技术的发展为分子诊断领域带来了革命性的变化。CRISPR/Cas 系统不仅在基因编辑方面取得了重要进展,还展示了在分子诊断中的巨大潜力^[8]。特别是 CRISPR/Cas12a (也称 Cpf1) 系统,通过其独特的核酸切割特性,可以实现高灵敏度和高特异性的核酸检测^[9]。此外,重组酶聚合酶扩增 (Recombinase Polymerase Amplification, RPA) 技术因其操作简便、反应速度快且无需热循环仪的优势,成为一种理想的等温扩增方法^[10]。将 RPA 与 CRISPR/Cas12a 结合,能够在短时间内实现目标核酸的高效扩增和检测,具有极大的应用潜力。Jennifer Doudna 团队开发的 DETECTR 方法是两步法即先进行 RPA 扩增,然后将部分 RPA 产物转移到含有 Cas12a、crRNA 和报告分子的另一管中进行检测^[11]。

本研究的目的在于开发一种基于 RPA-CRISPR/Cas12a 的检测平台,用于快速、灵敏地检测五种常见呼吸道病毒:甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒、新型冠状病毒、人鼻病毒。本研究设计了一系列针对这些病毒的特异性引物和 sgRNA (single-strand guide RNA, sgRNA),通过对温度、反

应时间、试剂浓度等试验条件的摸索,建立了适用于多种呼吸道病毒的即时检验方法,并评估了该方法的灵敏度、特异性和实际样本中的应用效果。

1 材料与方法

1.1 阳性质粒与病毒样本来源 本实验所用的 5 种病毒对应的 8 种靶标的阳性标准质粒 (甲型流感病毒 H1N1 型 HA 靶标 (influenza A virus - H1N1 - HA)、甲型流感病毒 H3N2 型 HA 靶标 (influenza A virus - H3N2 - HA)、乙型流感病毒 HA 靶标 (influenza B virus - HA)、乙型流感病毒 NS1 靶标 (influenza B virus - NS1)、呼吸道合胞病毒 A 型 (Respiratory syncytial virus - A)、呼吸道合胞病毒 B 型 (Respiratory syncytial virus - B)、新型冠状病毒 ORF1ab 靶标 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 - ORF1ab, SARS-CoV-2 - ORF1ab)、人鼻病毒 Poly 靶标 (rhinovirus - Poly)) 均购自上海生工有限公司;呼吸道咽拭子病毒样本由成都市温江区中医医院提供。样品获取经过医院的伦理委员会审批,病人知情同意由医院完成。

1.2 主要试剂与仪器 RPA 引物、qPCR 引物、ssDNA 探针、琼脂糖粉均在上海生工有限公司合成和购买;PCR 反应试剂、一步法 qRT-PCR 反应试剂、T7 高效体外转录试剂盒、极简 RNA 纯化回收试剂盒均购自北京全式金有限公司;RT-RPA 基础型扩增试剂盒购自杭州众测生物有限公司;缓冲液 r2.1、缓冲液 3、Cas12a 蛋白均购自北京纽英伦生物技术有限公司;qPCR 试剂购自近岸蛋白有限公司。荧光定量 PCR 仪 (型号为 CFX96) 购买自上海伯乐生命医学产品有限公司;凝胶成像仪 (型号为 Jena) 北京耶拿分析仪器有限公司;分光光度计 (型号为 NanoDrop) 和 PCR 仪 (型号为 VeritiPro) 均购买自上海赛默飞世尔科技有限公司;蓝光仪 (型号为 TGreen Transilluminator) 购买自北京全式金有限公司。PRA 引物序列和 sgRNA 序列见表 1 和表 2。

表 1 RPA 引物序列

Table 1 Primer sequences of RPA

引物名称	序列 (5'—3')
H1N1 - HA - 1F	TAGACACAGTACTAGAAAAGAATGTAACAGTA
H1N1 - HA - 1R	GAATATCTCAAACCTTTCAAATGATGACACTG
H1N1 - HA - 2F	CAAATCCTACATTAATGATAAAGGGAAAGAAGT
H1N1 - HA - 2R	ACTAGATTTCCAGTTGCTTCCAATGTTATTTT
H1N1 - HA - 3F	AAAAGCTTCTACAAAAATTTAATATGGCTAGTT
H1N1 - HA - 3R	CTCTACTAGTGTCCAGTAATAGTTCAATCTC
H3N2 - HA - 1F	AATAACAGTTTCTTTAGTAGATTGAATTGGTTG
H3N2 - HA - 1R	TTAATCAAAAGTATGTCTCCCGGTTTTACTATT
H3N2 - HA - 2F	TAACAGTTTCTTTAGTAGATTGAATTGGTTGA

(续表)

引物名称	序列(5'—3')
H3N2 - HA - 2R	TGTTAATCAAAAAGTATGCTCCTCCGGTTTTACTA
H3N2 - HA - 3F	GATATGTTAAGCAAAACACTCTGAAATTGG
H3N2 - HA - 3R	TTCTACTTCTGAGAATTCTTTTCAATCTGATG
FluB - HA - 1F	CAATAAATCCAGTAACAGTAGAAGTACCATAC
FluB - HA - 1R	CAGGTTTTGTACCATGTAATCAACAACAATTC
FluB - HA - 2F	TAAATCCAGTAAACAGTAGAAGTACCATACATT
FluB - HA - 2R	GGTTTTGTACCATGTAATCAACAACAATTC
FluB - HA - 3F	TCTAATATCCACAAAATGAAGGCAATAATTGTA
FluB - HA - 3R	GTTTGACTTCATGGAGTATTGAGACTTTTG
FluB - NS1 - 1F	AAACGAAAATTAGAATCAAGAATAAAGACTCAC
FluB - NS1 - 1R	TTTATTGTTTCATGTCCCTTAATACTACCTCAAT
FluB - NS1 - 2F	CACAGACTAAAACGAAAATTAGAATCAAGAATA
FluB - NS1 - 2R	ATCTTTATTTGTTTCATGTCCCTTAATACTACCTC
FluB - NS1 - 3F	TACACAGACTAAAACGAAAATTAGAATCAAGAA
FluB - NS1 - 3R	CATCTTTATTTGTTTCATGTCCCTTAATACTACC
RSV - A - 1F	TTAACAAACAGTTAAAGATCTCACTATGAAAACA
RSV - A - 1R	TAATATATACTTTCTTTTTCTAGGTAGGCTCCA
RSV - A - 2F	CTCATAAAAGAACTAGCCAATGTCAATATACTA
RSV - A - 2R	TGTTACTATATTTTCAAATTCACATAAAGCAATG
RSV - A - 3F	TACTCATAAAAGAACTAGCCAATGTCAATATACT
RSV - A - 3R	TTACTATATTTTCAAATTCACATAAAGCAATGA
RSV - B - 1F	ATAGATTTAACTTTGTATTTAGTTCCACAGGAT
RSV - B - 1R	AAAGATACTAATAGGTTCTGCAAATTTTATGTG
RSV - B - 2F	GAAC TTCATCCTGCATAAGATATATTTACAGA
RSV - B - 2R	TTACATGCTTACTCCATTCAATTATGATTTTAC
RSV - B - 3F	CTTGTACAATTTATTTCCAATTTGTTGTATAGA
RSV - B - 3R	CTTCTGTAAATATATCTTATGTCAGGATGAAGT
COV2 - ORF1ab - 1F	CTCAGAGTAGAAAATTTACAAGAATTTAAACCCA
COV2 - ORF1ab - 1R	ATCATCAAGTAATAAATCAATAACAGAACACAC
COV2 - ORF1ab - 2F	AAATGGAAATTTGATTTCTTAGAATTAGCTATGG
COV2 - ORF1ab - 2R	ATAAATCAATAACAGAACACACACACTTAGATG
COV2 - ORF1ab - 3F	AGTTTCTATCATTAAATAACACTGTTTACACAAA
COV2 - ORF1ab - 3R	TTTCTAAATAAGTCTACTTTGACCATCAACTCTA
RV - Poly - 1F	TTATTAATTTATTACAAGGATGCAGCAAGTTCAT
RV - Poly - 1R	TTTGATAAATTTGTCATGTTTACTCTCTAGG
RV - Poly - 2F	ACACTTACTGTTATTAATTATTACAAGGATGC
RV - Poly - 2R	TTTTGTTTACATCACTTGCATCAGTATCTGTTA
RV - Poly - 3F	TTACTGTTATTAATTATTACAAGGATGCACGAA
RV - Poly - 3R	GTTTACATCACTTGCATCAGTATCTGTTAAGTA

表 2 sgRNA 序列

Table 2 sgRNA Sequences

引物名称	序列(5'—3')
influenza A virus - H1N1 - HA - sgRNA1	GGGGUAAUUUCUACUAAAGUGUAGAUUGGGGUCAUCAAGAUACAGCAAGA
influenza A virus - H1N1 - HA - sgRNA2	GGGGUAAUUUCUACUAAAGUGUAGAUCCUUUAUCAUUAAUGUAGGAAUUG
influenza A virus - H3N2 - HA - sgRNA1	GGGGUAAUUUCUACUAAAGUGUAGAUUGCCUGAAACCCGUACCAACCGUC
influenza A virus - H3N2 - HA - sgRNA2	GGGGUAAUUUCUACUAAAGUGUAGAUCCGAUCAACCUAUUCAGCUUCCCA
influenza B virus - HA - sgRNA1	GGGGUAAUUUCUACUAAAGUGUAGAUUCUUCUCCCUUCUGAACAAAUGUA
influenza B virus - HA - sgRNA2	GGGGUAAUUUCUACUAAAGUGUAGAUUGGGUUCACUCUGAUGACAAAAC
influenza B virus - NS1 - sgRNA1	GGGGUAAUUUCUACUAAAGUGUAGAUACACAGUAUGGCUCAAAACCCUUGA
influenza B virus - NS1 - sgRNA2	GGGGUAAUUUCUACUAAAGUGUAGAUUGGAUCCUCUGCUGGAAUUGAAG
RSV - A - sgRNA1	GGGGUAAUUUCUACUAAAGUGUAGAUACAGGGUGUGGUUACAUCAUUAUC
RSV - A - sgRNA2	GGGGUAAUUUCUACUAAAGUGUAGAUCCAUAUGUGCCAAUUGUGUCCUUGG
RSV - B - sgRNA1	GGGGUAAUUUCUACUAAAGUGUAGAUACCAUUCUGCUACAGAUUGCAACU
RSV - B - sgRNA2	GGGGUAAUUUCUACUAAAGUGUAGAUUAUGCCCGUUGUAUAACCUUAGAA
SARS - CoV - 2 - ORF1ab - sgRNA1	GGGGUAAUUUCUACUAAAGUGUAGAUCAUCUACUGAUUGGACUAGCUAAA
SARS - CoV - 2 - ORF1ab - sgRNA2	GGGGUAAUUUCUACUAAAGUGUAGAUAGUCAUAGUCAGUUAGGUGGUUAC
RhV - Poly - sgRNA1	GGGGUAAUUUCUACUAAAGUGUAGAUUCUGAGCCUGUAAAGGAUUAUCUGU
RhV - Poly - sgRNA2	GGGGUAAUUUCUACUAAAGUGUAGAUCAUCACUUGCAUCAGUAUCUGUUA

1.3 方法

1.3.1 RPA 引物设计和筛选 在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中下载不同病原的基因序列,并分段比对查找保守基因片段。将筛选出来的 5 种病毒 8 个靶标的保守序列合成阳性标准质粒。同时通过 NCBI 对这 8 条保守序列分别设计 RPA 引物,选取评分较高的前 3 对引物合成。

以 8 种阳性标准质粒为模板,按照 RPA 核酸扩增试剂盒说明书,分别对每种靶标的三对 RPA 引物进行 RPA 反应。将 A buffer 25 μl ,上下游引物(10 μM)各 2 μl ,B buffer 2.5 μl ,阳性标准质粒 5 μl ,无酶水补齐到 50 μl ,混合均匀后加入装有干粉的检测单元管中,上下颠倒充分混匀 5~6 次,低速离心 10s 后,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min,同时设置阴性对照组。扩增结束后取 5 μl 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果。

1.3.2 sgRNA 的设计与制备 在 CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/>) 上设计 sgRNA 的序列,然后转换为一对互补的带有骨架序列的 DNA 链,交于上海生工有限公司合成。对 DNA 链在 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min,梯度降温到室温以合成 DNA 双链。对退火后的 DNA 双链进行体外转录得到 RNA 产物,最后将 RNA 产物通过 RNA 纯化回收试剂盒纯化以得到 sgRNA,对每种靶标设计合成了 2 种 sgRNA。

1.3.3 sgRNA 筛选和 CRISPR/Cas12a 反应的建立 CRISPR/Cas12a 反应体系包括 200 nM Cas12a,36 ng sgRNA,1 000 nM ssDNA 探针,10 \times NEBuffer r2.1 3 μl ,10 μl RPA 扩增产物,无酶水补齐至 30 μl 。将该体系充分混匀后放到 PCR 仪或金属浴中 37 $^{\circ}\text{C}$ 加热 60 min,然后在蓝光下通过肉眼观察或拍照记录终点荧光强度。也可通过荧光采集仪器如实时荧光定量 PCR 仪,按照 37 $^{\circ}\text{C}$ 加热,每 1 min 记录一次荧光,记录 60 次的方法,来记录实时荧光强度的变化。以阳性标准质粒为模板,按照上述方法建立 CRISPR/Cas12a 反应体系,对每种靶标的 sgRNA 进行筛选,同时设置空白对照组,根据终点荧光强度高选择最佳的 sgRNA。

1.3.4 RPA - CRISPR/Cas12a 检测方法的灵敏度检测 将每种靶标的阳性标准质粒进行 10 倍梯度稀释,取 5 个浓度($3.5 \times 10^0 \sim 3.5 \times 10^4$ copies/ μl) 作为模板,空白对照组以无酶水作为模板,按照上述方法建立 10 μl RPA 反应体系加在反应管管底。同时按照上述方法建立 30 μl CRISPR/Cas12a 反应体系加于反应管管盖上,先在 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min 使得靶序列充分扩增,然后将反应管离心 20 s,使管盖上的 CRISPR/Cas12a 反应体系与 RPA 产物混合,于 37 $^{\circ}\text{C}$

反应 60 min,使 Cas12a 酶识别和切割靶序列,并切割体系中的 ssDNA 以产生荧光。在蓝光下通过肉眼观察或拍照记录终点荧光强度,或在实时荧光定量 PCR 仪中实时记录荧光强度的变化。

1.3.5 RPA - CRISPR/Cas12a 检测方法的特异度检测 以每种靶标的阳性标准质粒为模板,将其对应的 RPA - CRISPR/Cas12a 检测方法作为阳性对照组,其他 7 种 RPA - CRISPR/Cas12a 检测方法作为阴性对照组,同时设置水为扩增模板作为空白依照组,以进行 8 种 RPA - CRISPR/Cas12a 检测方法的特异度评价。

1.3.6 临床样本的 RPA - CRISPR/Cas12a 检测与 qRT - PCR 方法对比 将 8 份呼吸道咽拭子病毒样本经核酸提取后作为模板,按照上述建立的 8 种 RPA - CRISPR/Cas12a 检测方法进行临床样本的检测,通过实时荧光定量 PCR 仪实时记录荧光强度变化,并通过蓝光记录终点荧光强度。同时通过 qRT - PCR 的方法对临床样本进行检测,比较两种方法应用于临床样本的一致性。

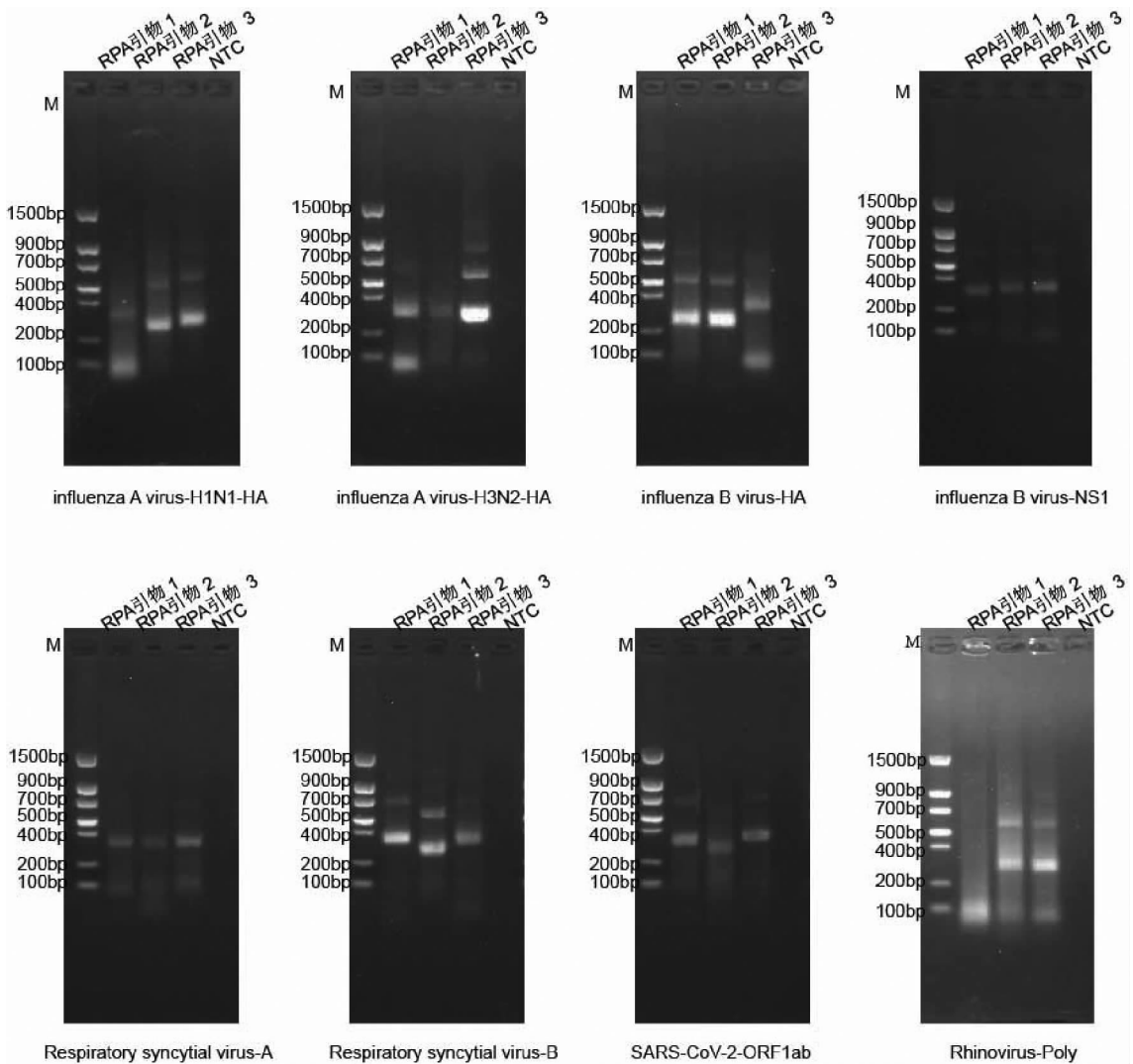
2 结果

2.1 RPA 引物的筛选 以 8 种靶标的阳性标准质粒作为模板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min,反应结束后,取 5 μl RPA 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,根据能否扩增出与目的条带大小相符的 DNA 片段以及条带的亮度与单一性,对每种病毒靶标选择合适的 RPA 产物,以用于后续的反应。结果如图 1,对每个病毒靶标分别进行了 3 对 RPA 引物筛选,最终对甲型流感病毒 H1N1 型 HA 靶标、甲型流感病毒 H3N2 型 HA 靶标、乙型流感病毒 HA 靶标、乙型流感病毒 NS1 靶标、呼吸道合胞病毒 A 型、呼吸道合胞病毒 B 型、新型冠状病毒 ORF1ab 靶标、人鼻病毒 Poly 靶标分别选择引物 3,引物 3,引物 2,引物 3,引物 3,引物 1,引物 1,引物 3 为后续 RPA 反应的引物。

2.2 sgRNA 的筛选 本研究对每种病毒靶标分别设计和合成了 2 种 sgRNA,以 8 种亚型或靶标的阳性标准质粒作为模板,通过 CRISPR/Cas12a 标准反应体系,根据荧光强度高选择适合的 sgRNA 以用于后续反应。图 2 为 8 种病毒靶标的 sgRNA 筛选结果,根据肉眼观察蓝光下反应管的荧光强度和荧光定量 PCR 仪记录到的荧光强度,选择荧光强度高的一组 sgRNA。最终对甲型流感病毒 H1N1 型 HA 靶标、甲型流感病毒 H3N2 型 HA 靶标、乙型流感病毒 HA 靶标、乙型流感病毒 NS1 靶标、呼吸道合胞病毒 A 型、呼吸道合胞病毒 B 型、新型冠状病毒 ORF1ab 靶标、人鼻病毒 Poly 靶标分别选择 sgRNA1, sgRNA1,

sgRNA1, sgRNA1, sgRNA2, sgRNA1, sgRNA1, sgRNA1

用于后续反应。



注:NTC: negative test control,下同。

图 1 8 种病毒靶标的 RPA 引物筛选结果

Fig.1 Screening results of RPA primers for eight viral targets

2.3 RPA - CRISPR/Cas12a 检测方法的灵敏度评价

将 8 种靶标的阳性标准质粒分别进行 10 倍梯度稀释,取 5 个浓度梯度 ($3.5 \times 10^0 \sim 3.5 \times 10^4$ copies/ μ l) 作为模板,空白对照组以无酶水作为模板,按照上述方法建立一管化 RPA - CRISPR/Cas12a 反应体系对 RPA - CRISPR/Cas12a 检测方法进行灵敏度评价,如图 3 所示,每种病毒靶标的 RPA - CRISPR/Cas12a 检测方法灵敏度都能达到 3.5×10^0 copies/ μ l 质粒。

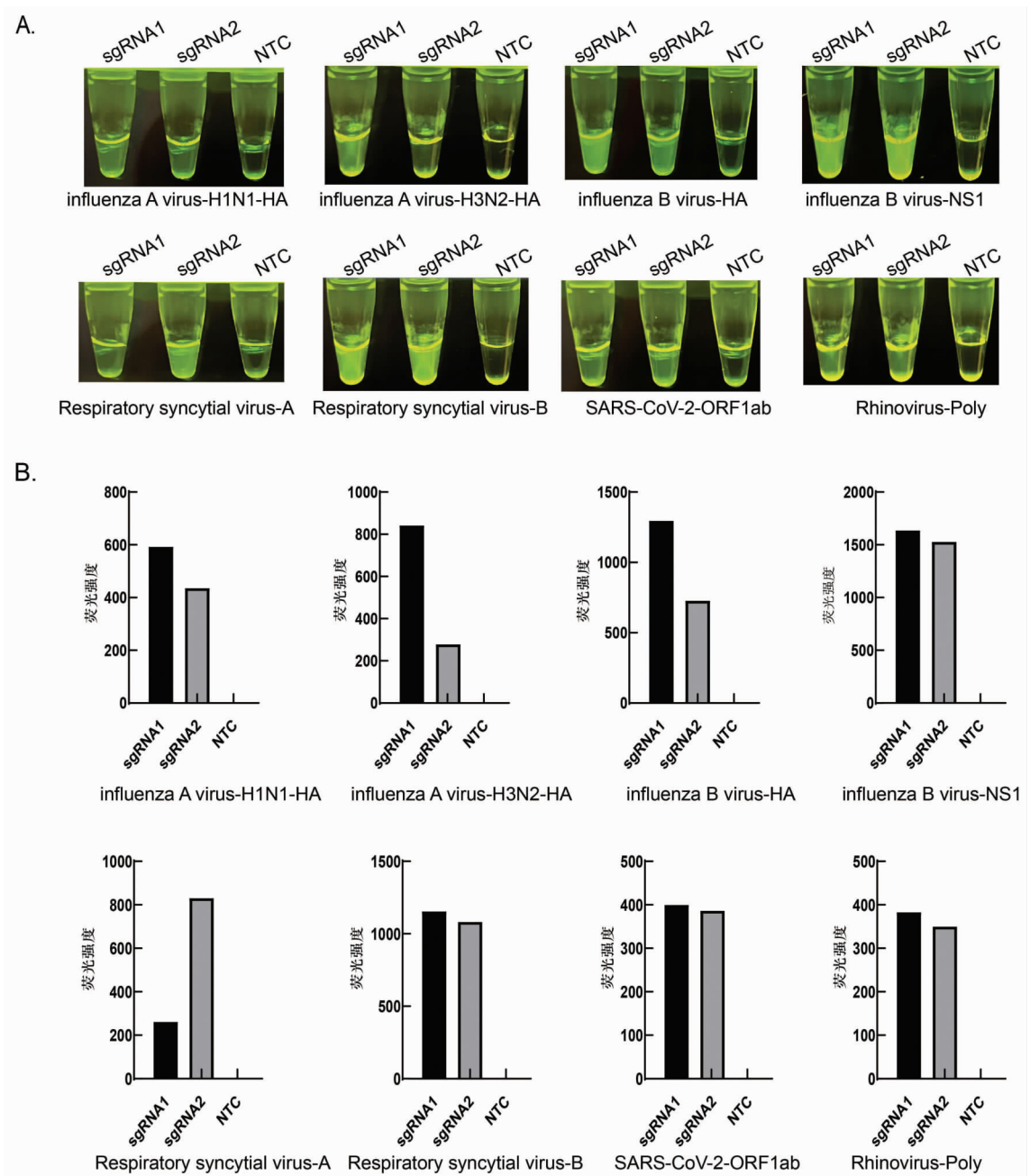
2.4 RPA - CRISPR/Cas12a 检测方法的特异度评价

以 8 种亚型或靶标的阳性标准质粒作为模板,按照上述建立的方法,分别对 8 种 RPA - CRISPR/Cas12a 检测方法进行特异度评价,结果如图 4 所示,每种病毒靶标的 RPA - CRISPR/Cas12a 检测方法特异性良好,与其他 7 种病毒型别 RPA - CRISPR/Cas12a 检测

方法无交叉反应。

2.5 临床样本的 RPA - CRISPR/Cas12a 检测与 qRT - PCR 方法对比

采用本研究建立的 5 种呼吸道病毒的 8 种亚型或靶标的 RPA - CRISPR/Cas12a 检测方法对 8 份临床样本进行检测,同时与 qRT - PCR 的方法进行比较。8 份样本的 RPA - CRISPR/Cas12a 方法检测结果如图 5。表 3 为 RPA - CRISPR/Cas12a 检测方法与 qRT - PCR 法的检测结果对比,可以看出本研究针对 5 种呼吸道病毒的 8 种亚型或靶标建立的 RPA - CRISPR/Cas12a 检测方法的检测结果与 qRT - PCR 法相比,除人鼻病毒 Poly 靶标一致率为 33% 外,其余亚型或靶标的一致率较高,能用于实际临床样本的检测。



注:A: 8 种靶标的终点蓝光拍照图; B: 8 种靶标的终点荧光强度图。

图 2 8 种病毒靶标的 sgRNA 筛选结果

Fig. 2 Screening results of sgRNA for eight viral targets

表 3 临床样本的 qRT-PCR 与 RPA-CRISPR/Cas12a 检测结果

Table 3 Comparison of qRT-PCR and RPA-CRISPR/Cas12a detection results in clinical samples

病原体	qRT-PCR 检测 阳性数 (CT ≤ 35)	RPA-CRISPR/Cas12a 检测阳性数	一致率 ^a
influenza A virus - H1N1 - HA	8	8	100
influenza A virus - H3N2 - HA	8	8	100
influenza B virus - HA	8	8	100
influenza B virus - NS1	8	8	100
Respiratory syncytial virus - A	8	8	100
Respiratory syncytial virus - B	8	8	100
SARS - CoV - 2 - ORF1ab	8	8	100
Rhinovirus - Poly	6	2	33

注:一致率 (%) ^a = (RPA-CRISPR/Cas12a 阳性数 / qRT-PCR 阳性数) × 100%, 列表示百分比。

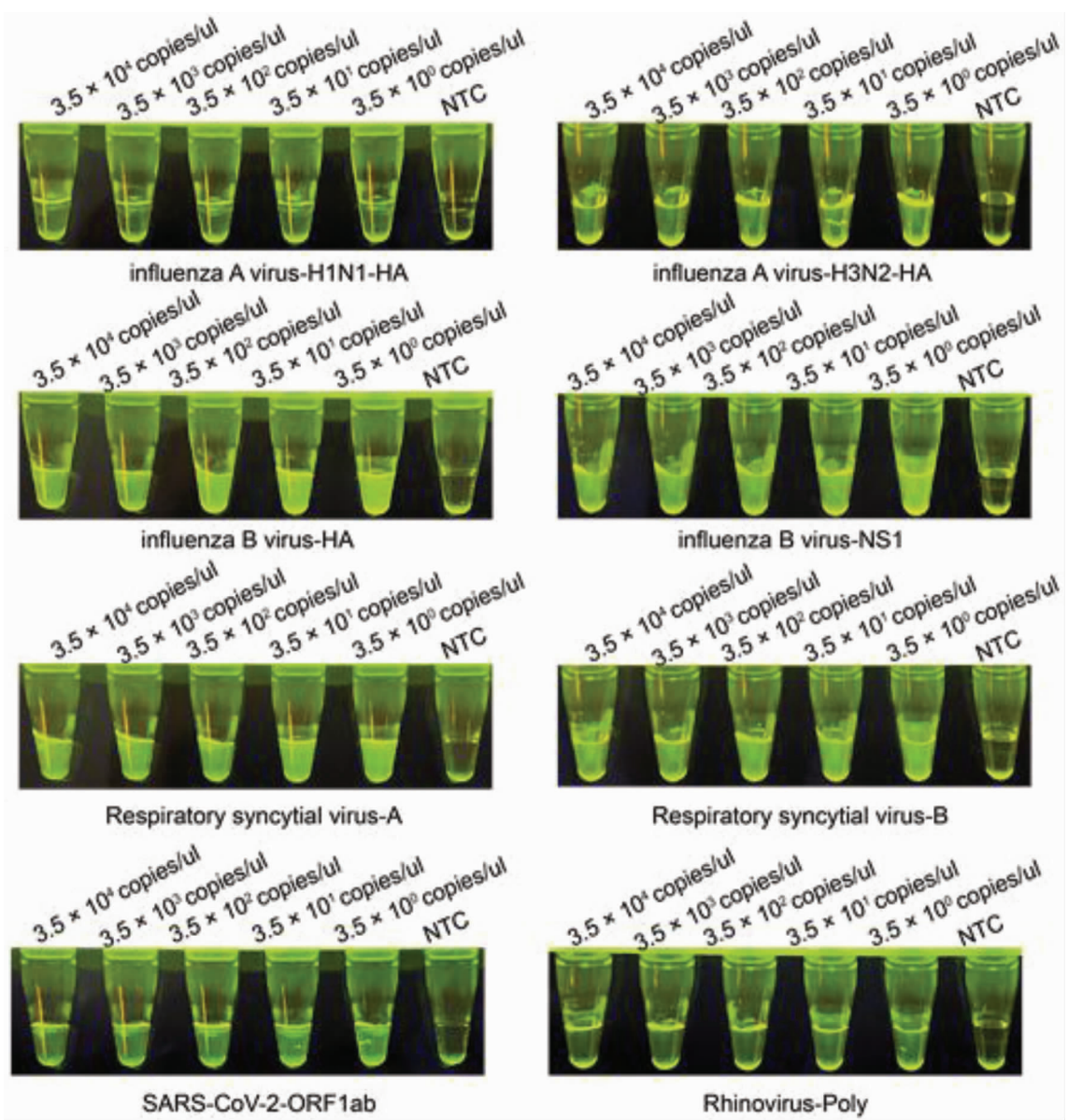


图 3 8 种病毒靶标 RPA - CRISPR/Cas12a 检测方法的灵敏度评价

Fig. 3 Sensitivity evaluation of the RPA - CRISPR/Cas12a detection method for eight viral targets

3 讨论

随着全球公共卫生事件的频发,快速、准确的病毒检测技术成为防控疫情、保障公共健康的关键。传统检测方法如病毒培养、免疫学检测及 PCR 技术等,在灵敏度、特异性、检测速度及成本效益等方面各有优劣^[12]。近年来,CRISPR/Cas 系统与等温扩增技术(如 RPA)的联合应用为病毒检测领域带来了革命性的变化。本研究建立的基于 RPA - CRISPR/Cas12a 可视化方法对 5 种常见呼吸道感染病毒甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒、新型冠状病毒和人鼻病毒有高灵敏度和特异性,该检测方法 1.5 h 内可得结果,灵敏度达 3.5 copies/ μ l,病毒靶标间无交

叉反应,与 qRT - PCR 法检测正确率一致。适用于现场检测,尤其在资源有限环境下,临床应用前景良好。

CRISPR/Cas 系统与等温扩增技术的联合应用能够实现对病毒核酸的高灵敏度和特异性检测。具体而言,CRISPR/Cas 系统负责精准定位和切割目标核酸序列,而等温扩增技术则负责在体外快速扩增这些序列。这种组合不仅提高了检测的灵敏度和特异性,还大大缩短了检测时间,降低了对复杂设备的依赖,使得检测更加便捷和经济。近年来,基于 RPA 结合 CRISPR - Cas12a 的检测方法在呼吸道病毒检测中取得了显著成果。例如,亚辉龙研发团队开发的检测方法能够在 1h 内成功检测出 SARS - CoV - 2、甲型流感和乙型流感 3 种呼吸道病毒,检测限低至 10^2 copies/

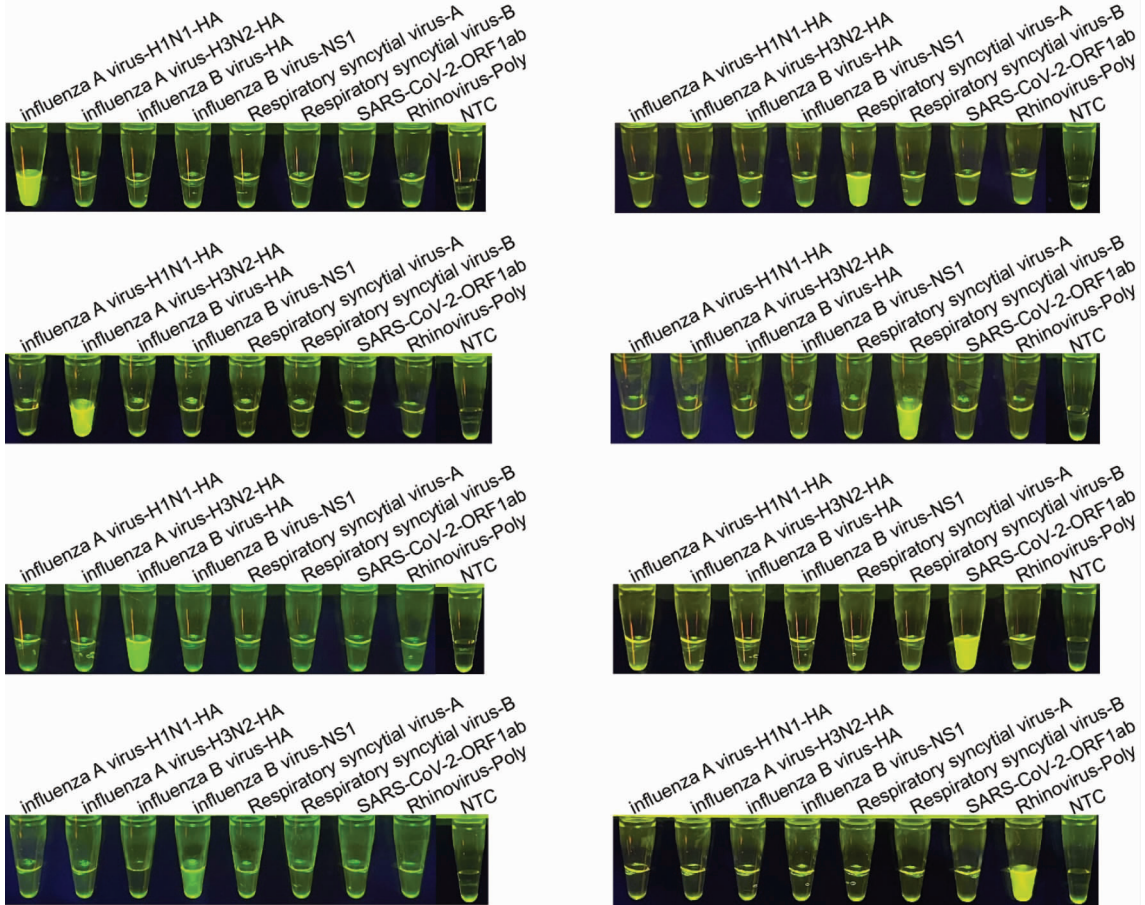


图 4 8 种病毒靶标 RPA - CRISPR/Cas12a 检测方法的特异度评价

Fig. 4 Specificity evaluation of the RPA - CRISPR/Cas12a detection method for eight viral targets

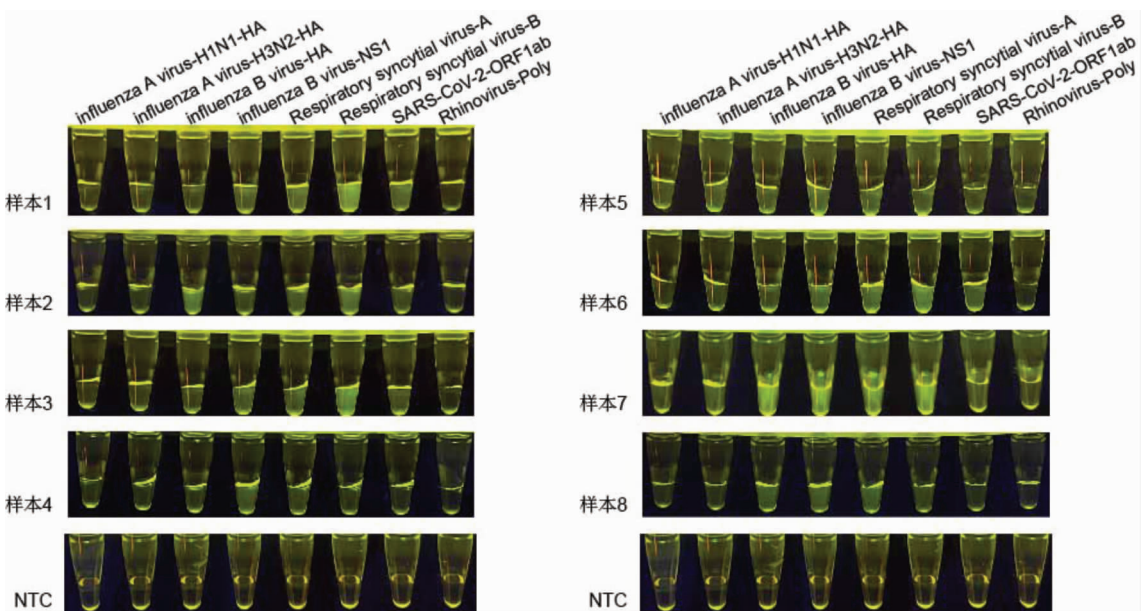


图 5 RPA - CRISPR/Cas12a 检测方法的临床应用

Fig. 5 Clinical application of the RPA - CRISPR/Cas12a detection method

$\mu\text{l}^{[13]}$ 。本研究相比既往的基于 RPA 结合 CRISPR - Cas12a 的检测方法新颖性在于,将扩增和检测放在同

一管中,开发了单管反应,灵敏度达 $3.5 \text{ copies}/\mu\text{l}$,从而提升便捷性,提高灵敏度,减少污染风险。

尽管 CRISPR/Cas 系统与等温扩增技术具有诸多优势,但仍也存在一些不足,如本方法目前暂时仅能实现定性检测,下一步打算进一步优化反应体系和结果判读方式,以实现半定量或定量解读,达到更全面的诊断结果。另外,本实验还需设置质控品,以排除某些假阳性和假阴性结果。未来希望本研究建立的 One - Pot - RPA - CRISPR/Cas12a 方法能在其他更多的细菌菌株和病毒突变体上检测和进一步验证。随着技术的不断发展,需要建立相应的标准化体系和监管机制来确保检测结果的准确性和可靠性。这包括制定统一的技术标准、建立质量控制体系以及加强监管力度等方面。未来,随着 CRISPR/Cas 系统和等温扩增技术的不断发展和完善,本研究可以期待更创新性的应用出现。例如,可以探索将其他类型的 CRISPR/Cas 系统(如 Cas13a、CasX 等)与等温扩增技术相结合,以实现对不同病毒或病原体的检测;还可以开发更加高效、稳定的扩增酶和 sgRNA 设计工具,以提高检测的灵敏度和特异性。为了满足现场检测和基层医疗机构的需求,未来应继续推动检测平台的便携化和自动化发展。通过集成更多的功能模块和优化操作流程,可以实现检测设备的小型化、轻量化以及一键式操作等功能;同时,还可以利用物联网、大数据等先进技术实现检测结果的远程传输和智能分析等功能。

通过本研究,我们期望提供一种便捷、高效的检测工具,能够显著提升呼吸道病毒感染的早期诊断能力,为疾病防控和临床管理提供有力支持。未来,我们还将进一步扩展该平台的检测范围,开发针对更多病原体的快速检测方法,以应对可能出现的新型呼吸道病毒威胁。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

[1] Tang LZ, Rhoads WJ, Eichelberg A, et al. Applications of quantitative microbial risk assessment to respiratory pathogens and implications for uptake in policy: a State - of - the - Science review [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2024, 132(5): 56001.

[2] Wang JZ, Yuan D, Yang XH, et al. Epidemiological and etiological characteristics of 1266 patients with severe acute respiratory infection in central China, 2018 - 2020: a retrospective survey[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2024, 24(1): 426.

[3] Song X, Jiang H, Zong L, et al. The clinical value of mNGS of bronchoalveolar lavage fluid versus traditional microbiological tests for pathogen identification and prognosis of severe pneumonia (NT - BALF): Study protocol for a prospective multi - center randomized clinical trial[J]. *Trials*, 2024, 25(1): 276.

[4] Tarim EA, Karakuzu B, Oksuz C, et al. Microfluidic - based virus detection methods for respiratory diseases [J]. *Emergent Mater*, 2021, 4(1): 143 - 168.

[5] Hu LX, Zhang SY, Song WQ, et al. A sensitive mass spectrometry - based method to identify common respiratory pathogens in children[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(5): e0185823.

[6] Tieri S, Morsella C, Méndez L, et al. Comparison of two serological diagnosis tests for bovine paratuberculosis [J]. *Veterinary Research Communications*, 2024, 48(4): 2645 - 2650.

[7] Balaga KB, Pavon RDN, Calayag AMB, et al. Development of a closed - tube, calcein - based loop - mediated isothermal amplification assay to detect *Salmonella* spp. in raw meat samples [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2024, 220: 106922.

[8] Liu P, Lin Y, Zhuo X, et al. Universal crRNA acylation strategy for robust Photo - Initiated One - Pot CRISPR - Cas12a nucleic acid diagnostics [J]. *Angewandte Chemie: International ed. in English*, 2024, 63(23): e202401486.

[9] Chen JH, Liu JH, Wu D, et al. CRISPR/Cas precisely regulated DNA - Templated Silver nanocluster fluorescence sensor for meat adulteration detection [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(44): 14296 - 14303.

[10] Ishidoya M, Fujita T, Tasaka S, et al. Real - time MBDi - RPA using methyl - CpG binding protein 2: A real - time detection method for simple and rapid estimation of CpG methylation status [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2024, 1302: 342486.

[11] Chen JS, Ma EB, Harrington LB, et al. CRISPR - Cas12a target binding unleashes indiscriminate single - stranded DNase activity [J]. *Science*, 2018, 360(6387): 436 - 439.

[12] Onwuchekwa C, Moreo LM, Menon S, et al. Underascertainment of respiratory syncytial virus infection in adults due to diagnostic testing limitations: a systematic literature review and meta - analysis [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2023, 228(2): 173 - 184.

[13] Wang YN, Wu LQ, Yu XM, et al. Development of a rapid, sensitive detection method for SARS - CoV - 2 and influenza virus based on recombinase polymerase amplification combined with CRISPR - Cas12a assay [J]. *Journal of Medical Virology*, 2023, 95(11): e29215.

收稿日期:2024-10-29

(上接第 2951 页)

[34] Gersh F, O'Keefe JH, Elagizi A, et al. Estrogen and cardiovascular disease [J]. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 2024, 84: 60 - 67.

[35] 宋楚翘,朱依萍,韩邦旻,等. 压力性尿失禁的危险因素与防治策略[J]. *中华医学杂志*, 2022, 102(48): 3811 - 3814.

Song CQ, Zhu YP, Han BM, et al. Overview of risk factors for stress urinary incontinence and strategies in its prevention and treatment [J]. *National Medical Journal of China*, 2022, 102(48): 3811 - 3814. (In Chinese)

[36] Bianchettin RG, Lavie CJ, Lopez - Jimenez F. Challenges in cardiovascular evaluation and management of obese patients: JACC

State - of - the - Art review [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2023, 81(5): 490 - 504.

[37] Pan JC, Liang EL, Cai QL, et al. Progress in studies on pathological changes and future treatment strategies of obesity - associated female stress urinary incontinence: a narrative review [J]. *Translational Andrology and Urology*, 2021, 10(1): 494 - 503.

[38] Andersson KE. Oxidative stress and its possible relation to lower urinary tract functional pathology [J]. *BJU International*, 2017, 121(4): 527 - 533.

收稿日期:2025-03-03