

CRISPR-Cas13a 系统用于肿瘤诊断与治疗的进展

张婧^{1#}, 罗佳豪^{1#}, 赵奕君¹, 黄颖而², 陈佳灵², 郝文波^{1,2}

1 南方医科大学 检验与生物技术学院, 广东 广州 510515

2 南方医科大学 检验与生物技术学院抗体工程研究所, 广东 广州 510515

张婧, 罗佳豪, 赵奕君, 黄颖而, 陈佳灵, 郝文波. CRISPR-Cas13a 系统用于肿瘤诊断与治疗的进展. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2079-2086.

ZHANG J, LUO JH, ZHAO YJ, HUANG YE, CHEN JL, HAO WB. Advances of using CRISPR-Cas13a system for tumor diagnosis and treatment. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2079-2086.

摘要: CRISPR-Cas 系统是一种目前已知的基因编辑工具, 其中以靶向 DNA 基因组编辑的 CRISPR-Cas9 系统的研究较为成熟。相较于靶向 DNA 的基因组编辑技术 CRISPR-Cas9 系统, 近年来靶向 RNA 的 VI 型-CRISPR 家族 CRISPR-C2c2/Cas13a 系统研究日渐增多。CRISPR-Cas13a 系统具有特异性识别并结合单链 RNA 序列从而非特异性切割 RNA 的特点, 可应用于检测肿瘤外周血游离核酸, 对早期肿瘤患者进行筛查。同时, Cas13a 在进行体内 RNA 切割的过程中, 不涉及编码基因 DNA 的改变, 可直接对基因转录产物 mRNA 进行编辑, 达到基因修饰的目的, 并能够同时靶向多基因转录产物从而调控基因的表达。Cas13a 系统可应用于分子诊断及 RNA 编辑中, 该系统在肿瘤的诊断与治疗中也被证实具有广阔的发展前景。基于已有的文献资料, 文中综述了靶向 RNA 的 CRISPR-Cas13a 技术应用于肿瘤诊断与治疗的研究进展, 探讨了 CRISPR-Cas13a 系统对癌症治疗的新思路及存在的局限, 并展望了未来可能的研究方向。

关键词: CRISPR-Cas13a; 肿瘤诊断; 肿瘤治疗; RNA 编辑; 基因表达调控

Received: October 31, 2021; **Accepted:** January 7, 2022; **Published online:** January 12, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31672536); Innovation and Entrepreneurship Training Project for College Students (S202012121080)

[#]These authors contributed equally to this work

Corresponding author: HAO Wenbo. E-mail: haowa@126.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31672536); 南方医科大学 2020 年度大学生创新创业训练计划项目 (S202012121080)

Advances of using CRISPR-Cas13a system for tumor diagnosis and treatment

ZHANG Jing^{1#}, LUO Jiahao^{1#}, ZHAO Yijun¹, HUANG Ying'er², CHEN Jialing², HAO Wenbo^{1,2}

1 School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

2 Institute of Antibody Engineering, School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

Abstract: CRISPR-Cas systems are well known gene editing tools, among which CRISPR-Cas9 system targeting DNA is the most well developed. Compared with CRISPR-Cas9 system, CRISPR-C2c2/Cas13a system derived from TYPE VI of CRISPR family that can target RNA has attracted increasingly intense investigations in recent years. The CRISPR-Cas13a system is featured by specific recognition and binding of single stranded RNA sequences, thus playing a role in non-specific cleavage of RNA. This feature could be potentially applied to detect free nucleic acid in tumors or peripheral blood as a diagnostic approach. Since Cas13a specifically targets RNA, it can directly edit mRNA transcripts of genomic DNA to achieve the downregulation of target proteins without involving DNA editing. Therefore, Cas13a system could be used in tumor treatment. This review summarized the advances of using CRISPR-Cas13a for RNA targeting in tumor diagnosis and treatment, and prospected future applications.

Keywords: CRISPR-Cas13a; tumor diagnosis; tumor treatment; RNA editing; regulation of gene expression

1 CRISPR-Cas 系统简介

成簇的规律间隔的短回文重复序列相关蛋白系统 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated proteins system, CRISPR-Cas) 是原核生物用来抵抗外来遗传物质 (如噬菌体、质粒) 入侵的后天免疫防御体系^[1-2]。依据 Cas 编码的效应子模块, 目前将 CRISPR-Cas 系统分为两大类^[3]。1 类系统含有多个 Cas 蛋白组成的效应复合物, 包括 I 型、III 型和 IV 型; 2 类系统仅有单个 Cas 蛋白作为效应器, 比如 II 型的 Cas9 蛋白、V 型的 Cas12 蛋白以及 VI 型的 Cas13 蛋白。

目前, 较为人熟知的基因编辑系统是 II 型

CRISPR-Cas 系统, 也就是 CRISPR-Cas9 系统。自发现以来, 因其操作便捷、成本低及特异性高等优点而被广泛应用, 但它的不足之处——脱靶效应 (off-target effects) 限制了其应用^[4]。CRISPR/Cas9 系统中的向导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 是一段通过与靶 DNA 片段匹配, 从而介导 Cas9 蛋白对基因组进行识别的 RNA 序列。Gupta 等发现^[5], sgRNA 会与非靶点 DNA 序列错配, 引入非预期的基因突变, 即脱靶效应。

CRISPR-Cas13a 系统则具有更强的特异性, 可以靶向识别并切割 RNA, 其仅靶向 RNA 的能力为靶向 DNA 的 CRISPR-Cas9 系统

提供了重要补充。CRISPR-Cas13a 属于 2 类 VI 型蛋白,除了能够靶向和降解 RNA 之外,该系统还能实现对 DNA 或 RNA 的高效特异性检测,灵敏度达到阿摩尔级别 (10^{-18} mol/L),可用于病原体的精准检测、癌症的早期诊断以及遗传性疾病的治疗等,是 RNA 研究领域的又一项卓越成果,具有重要的研究意义及巨大的应用潜力。

2 CRISPR-Cas13a 系统基本原理

CRISPR-Cas13a (旧称 C2c2) 系统是一种由 RNA 介导的 RNA 核酸内切酶。Cas13a 系统较为简单,只需要一个 Cas13a 蛋白、crRNA 分子以及目标序列即可产生效应^[6]。

CRISPR-Cas13a 系统主要由 Cas13a 蛋白发挥作用,Cas13a 与 crRNA 的重复序列结合并组成复合物。迄今为止研究的 Cas13a 蛋白均具有两种不同的核糖核酸酶活性^[7],一种是负责处理前体 crRNA 的核糖核酸酶活性,辅助 crRNA 与 Cas13a 蛋白组装为成熟的干扰复合物;另一种是由高等真核生物和原核生物核苷酸结合域 (higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domain, HEPN) 提供的核糖核酸酶活性。Cas13a 含有两个 HEPN,对 Cas13a 发挥切割 RNA 序列的功能是必需的。在 Cas13a 不结合靶向单链 RNA 时,不存在切割 RNA 序列的活性;但当 Cas13a 与 crRNA 的复合物结合靶向单链 RNA 时,crRNA 的间隔序列与靶向 RNA 互补配对,触发核糖核酸蛋白 (ribonucleoprotein, RNP) 复合物的构象变化,两个 HEPN 结构域靠近,从而形成一个催化位点^[8]。由于此位点与 crRNA 靶向的 RNA 双链体有一定距离,因此会引起 crRNA 与 Cas13a 蛋白的构象变化,激活 Cas13a 切割靶 RNA 的活性,使其不仅切割靶 RNA,而且切割其他任意的单链 RNA,

包括宿主自身的非靶标 RNA,这一特征称为 Cas13a 的附带切割活性 (collateral cleavage)^[9]。因此,基于 Cas13a 高效的 RNA 酶切活性及其附带的切割活性,CRISPR-Cas13a 系统可作为一个强大的基因表达调控工具与 mRNA 检测工具,在各类重大疾病的快速检测、诊断治疗以及基础研究领域都具有广阔的应用前景。

3 CRISPR-Cas13a 系统的基因调控功能

3.1 CRISPR-Cas9 系统 DNA 编辑的局限性

虽然目前已有不少关于 CRISPR-Cas9 系统应用于基因编辑的研究,但遗憾的是,Cas9 系统仍具有一定的局限性。如空肠弯曲菌^[10]在感染人体细胞后,会向细胞质分泌无向导 Cas9 (*Campylobacter jejuni* Cas9, CjeCas9) 核酸酶,天然核定位信号使 CjeCas9 定位至细胞核,并在此催化非靶向 DNA 裂解导致细胞死亡。尽管可以通过修饰 Cas9 系统,增加其可控性和靶向能力,但它依然具有脱靶效应及单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 裂解的风险。由于针对 DNA 进行编辑,CRISPR-Cas9 系统可能会对细胞内部某些关键基因造成不可逆的损伤。因此,相较于 CRISPR-Cas9 系统,CRISPR-Cas13a 仅靶向 RNA 的特性更为安全。

3.2 CRISPR-Cas13a 系统的 RNA 调控功能

CRISPR-Cas13a 只靶向 RNA 的特异性,保证了其对 RNA 的定点调控,并且不改变编码基因本身。由于 DNA 碱基序列没有发生改变,因此,基因表达的调控在时间、空间和效率上都更加可控。同时,CRISPR-Cas13a 系统靶向 RNA 时,可以同时靶向修饰多个基因及多拷贝基因的转录产物,这可能比 DNA 编辑更为高效。

Cas13a 系统的 RNA 靶向特性可在基因表

达调控方面发挥 RNA 编辑作用。Jing 等^[11]尝试将 Cas13a 改造成精确定点的 RNA 调控工具，他们在模式生物裂殖酵母中实现了 CRISPR-Cas13a 靶向内源 RNA 并降解靶标 RNA 的功能，将无 RNA 切割活性的 Cas13a 蛋白 (deactivated Cas13a, dCas13a) 与人源的 RNA 腺嘌呤脱氨酶催化结构域 (hADAR2d) 融合成一种 RNA 调控系统。此系统可靶向 mRNA 并精确编辑特定的核苷酸残基。研究表明，该系统在编辑随机选择的内源基因转录本中具有实用性，其对内源 RNA 的精确定点调控，体现了 CRISPR-Cas13a 具有通过类似 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 的途径发挥基因治疗的潜力。同时，该系统仅靶向 RNA 的特点还可以应用于对某些逆转录病毒的干扰。通常，在转录水平抑制基因表达的技术还有 RNA 干扰技术，但是该技术会产生大量非特异性的脱靶效应。相较于此，CRISPR-Cas13a 系统对靶 RNA 可表现出更好的降解效应及更显著的特异性^[12]。

4 CRISPR-Cas13a 系统在疾病检测中的应用

Gootenberg 等^[13]建立了一个基于 CRISPR-Cas13a 系统的分子检测平台，命名为特异性高灵敏度酶报告系统 (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking, SHERLOCK)，该系统是重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA) 技术与 CRISPR 技术的完美结合。RPA 技术是一种利用重组酶、单链结合蛋白和 DNA 聚合酶，在等温条件下 (37–42 °C) 进行核酸扩增的技术，可克服传统 PCR 扩增方法在灵敏度和特异度等诸多方面的不足，简化了对仪器的要求、缩短了反应时间，特别是在

临床、基层和即时检测 (point-of-care testing, POCT) 时显示出突出的优越性。

该系统首先将目的核酸 (DNA 或 RNA) 经过 RPA 进行扩增，再经过 T7 体外转录，转录后的 RNA 可被 Cas13a 与 crRNA 识别并结合，诱发 Cas13a 的附带切割效应，剪切 RNA 荧光报告探针并发出荧光。通过荧光信号可检测目的序列，因此该技术可用于体外检测目的核酸。

Wang 等^[14]建立了结合 PCR 扩增的 CRISPR-Cas13a 检测系统 (简称 PCR-CRISPR)，对 312 份血清标本的乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) DNA 序列进行检测，发现其中 302 份标本与实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 结果一致，其余 10 份 HBV-DNA 低水平阳性的样本，仅可被 PCR-CRISPR 检测到。

2018 年，第二代 SHERLOCK 检测系统开发完成^[15]。相较于第一代，二代 SHERLOCK 在以下 4 个方面更为突出：(1) 检测水平低至 10^{-21} mol。(2) 将 Cas13a 与 CsmVI (辅助 CRISPR 相关酶) 结合，从而提高灵敏度。(3) 添加横向流动条带，可以直接观察检测结果。(4) 4 类不同的 CRISPR 酶可在同一体系下完成相互独立的反应，以此完成针对 4 个靶点的多通路检测。改良的二代 SHERLOCK 检测系统能同时检测出经稀释的寨卡病毒及登革热病毒的单链 RNA (single-stranded ribonucleic acid, ssRNA)。

2019 年底至今，SARS-CoV-2 新型冠状病毒引起的 COVID-19 肆虐全球。Joung 等^[16]开发了针对新型冠状病毒检测的 SHERLOCK 系统。另外，Patchsung 等^[17]利用 SHERLOCK 检测了 154 个鼻咽和咽拭子样本中是否存在新型冠状病毒，灵敏度为 96%，特异性为 100%。STOP (SHERLOCK testing in one pot)^[18]作为改良版的 SHERLOCK，最低检测下限为 100 个新型冠状病毒拷贝，与 RT-qPCR 检测方法相比具

有同等的敏感性。令人振奋的是, Fozouni 等^[19]进一步发明了联合智能手机的 CRISPR-Cas13a 免扩增方法, 用于检测新型冠状病毒, 整体检测流程更加便捷。但 SHERLOCK 诊断系统在 COVID-19 的病毒核酸检测中的应用正处于发展阶段, 仍需进一步优化。

5 CRISPR-Cas13a 系统在肿瘤诊断与治疗中的作用

5.1 CRISPR-Cas13a 用于肿瘤的早期诊断

在肿瘤的诊断中, 相较于传统的肿瘤检测方法, 检测外周血的游离 DNA (cell free DNA, cfDNA) 和微小 RNA (microRNAs, miRNA) 可进行癌症的早期诊断。

5.1.1 cfDNA 的检测

肿瘤相关标志物可反映肿瘤的发生发展, 如 cfDNA 是人体组织排放到血液里的 DNA 片段, 其中循环肿瘤游离 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 具有肿瘤突变成分的特征, 能够作为癌症早期筛查的分子标记物^[20-21]。

cfDNA 的传统检测方法是基因测序技术, 包括 Sanger 测序法、二代测序和数字 PCR。Gootenberg 等^[13]利用 SHERLOCK 系统检测微摩尔水平的单链 ctDNA, 可检测出两种不同的突变等位基因包括表皮生长因子受体 L858R 和鼠类肉瘤病毒癌基因同源物 B1 V600E。第二代 SHERLOCK 的灵敏度则更高, 能成功检测出非小细胞肺癌患者 cfDNA 标本中 EGFR L858R 突变和 EGFR 19 号外显子缺失突变。另外, 目前已有研究发现, 胃癌患者的血浆 cfDNA 浓度显著升高, 虽与传统肿瘤生物标志物无显著相关性, 但与化疗疗效呈负相关。因此, 血浆 cfDNA 浓度可作为胃癌诊断与疗效判断的潜在指标^[22]。

5.1.2 miRNA 的检测

在肿瘤细胞中, miRNA 是参与调控肿瘤细胞增殖等的重要因素。已知 miRNA 与靶 mRNA 互补配对可调控靶 mRNA 的降解, 进而影响基因表达, 调控正常细胞的增殖、分化及凋亡^[23]。例如抑癌性 miRNA 的缺失会增加其靶向癌基因的表达效率, 而其他类型的 miRNA, 如 miR-155 对 Burkitt 淋巴瘤有正向调控作用。因此, 某些参与调控肿瘤细胞活动的 miRNA 同样有可能成为癌症早期诊断的有效工具^[24]。

检测 miRNA 水平的传统方法包括 DNA 微阵列技术、RNA 测序方法以及 RT-qPCR。利用 Cas13a/crRNA 检测系统, 同样可实现对 miRNA 的检测。Shan 等^[25]利用 *LbuCas13a*, 即毛螺科细菌的 *NK44179* 表达的 Cas13a 蛋白, 直接检测到肿瘤的 miRNAs。对于 Cas13a 检测体系的特异性, 可通过设计不同的 crRNA 以鉴别出单核苷酸变异, 包括位于 miRNA 序列末端的变异。

在 Cas13a 检测肿瘤 miRNA 的实际应用中, Huang 等^[26]联合 Cas13a 和电化学技术, 利用电化学发光技术 (electrochemiluminescence, ECL), 构建了一种 CRISPR-Cas13a 驱动 ECL 芯片 (PECL-CRISPR), 其原理是目标肿瘤 miRNA 激活 Cas13a 后, 触发指数级放大程序和 ECL 检测信号。在最适条件下, 选用的 miR-17 的检测限达到 10^{-15} mol/L, 通过合理设计 crRNA, 该平台可以提供单核苷酸分辨性, 从而显著区分 miRNA 靶点与其高度同源的家族成员。

为了增加 CRISPR-Cas13a 实际的应用价值, 已经开发了多种基于 Cas13a 系统的快速诊断平台。Bruch 等^[27]报道了一种基于 CRISPR-Cas13a 系统的电化学微流控生物传感器系统, 可用于检测脑肿瘤患者血清样本中的 miR-19b, 9 min 内可准确测量体积小于 0.6 μ L

的样品,灵敏度可达 10 pmol/L。

由此可见,CRISPR-Cas13a 系统作为一种快速检测核酸的诊断工具,能用于肿瘤相关疾病的早期诊断,具有低成本和易于开展使用的优点,并且耗时短、灵敏度高,在多重靶分子的检测中亦有巨大的潜力。

5.2 CRISPR-Cas13a 用于肿瘤的治疗

除了检测肿瘤标志物,CRISPR-Cas13a 系统还可在肿瘤治疗中发挥作用。癌基因 (oncogene) 是指与细胞的肿瘤性转化有关的基因,其异常表达往往引起肿瘤的发生。总体上,CRISPR-Cas13a 系统主要通过特异性识别并降低癌细胞中癌基因的 mRNA 的表达,产生可控的附带切割作用,从而诱导癌细胞程序性死亡等,达到抑制肿瘤生长的目的。

5.2.1 胰腺癌

突变的 *KRAS* 是胰腺癌中已知的驱动癌基因,Zhao 等^[28]证明了 CRISPR-Cas13a 系统经改造后可以用于 *KRAS* 突变胰腺癌的靶向治疗。研究者先在 crRNA 靶双链中引入一个单错配,使 CRISPR-Cas13a 系统能够特异性识别 *KRAS*-G12D mRNA,而对于野生型 *KRAS* mRNA 的检测没有产生影响。之后对于 *KRAS* 基因突变的胰腺癌细胞,CRISPR-Cas13a 系统同样可以特异性地降低突变 *KRAS* 基因 mRNA 的表达,并引起细胞凋亡,在动物模型内引起了肿瘤的显著缩小。

5.2.2 宫颈癌

高危型人乳头瘤病毒 (high-risk human papillomavirus, HR-HPV) 如 HPV16 和 HPV18 亚型的持续感染,是宫颈癌的主要病因^[29]。CRISPR-Cas13a 能下调针对肿瘤细胞中 HPV 的核酸序列表达。Chen 等^[30]通过设计特异的 crRNA,使 Cas13a 系统可以靶向 HPV16/18 的 E6/E7 mRNAs。实验结果表明,特异性的

CRISPR/Cas13a 系统能有效并且特异地下调 HPV16/18 的 E6/E7 mRNAs 的转录,诱导 HPV16 阳性 SiHa 细胞和 HPV18 阳性的 HeLa 细胞生长抑制和凋亡。因此,通过 CRISPR/Cas13a 系统靶向 HPV E6/E7 mRNAs 可提供 HPV 相关宫颈癌的一种治疗策略。

5.2.3 胶质瘤

CRISPR-Cas13a 系统能针对性地影响肿瘤细胞癌基因的表达。Wang 等^[31]首次在真核生物中发现了 CRISPR-Cas13a 对肿瘤细胞的附带切割作用。在胶质瘤细胞 EGFRvIII 亚型中,CRISPR-Cas13a 系统靶向突变的表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 基因,特异性降低 EGFR 的 mRNA 的表达并产生附带切割效应。同时,研究者还观察到,在小鼠动物模型中小鼠脑胶质瘤的形成减弱,肿瘤的血管生成也有减缓。该研究表明,合理利用 CRISPR-Cas13a 系统靶向调节癌基因的转录是治疗肿瘤的一种潜在方法。

5.2.4 膀胱癌

在靶向癌基因的基础上,如果使细胞内 Cas13a 蛋白的表达具有可控性,则反应更易控制。Qi 等^[32]将光开关系统作为基本构建体,并将 Cas13a 蛋白的 DNA 序列作为插入的表达基因,构建了一个结合 CRISPR-Cas13a 表达的光开关系统。在蓝光的诱导刺激下,膀胱癌 5637 和 T24 细胞株被诱导表达大量的 Cas13a 蛋白,并将转移相关肺腺癌转录物 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 作为靶点进行切割。研究者利用荧光报告法和 qRT-PCR 来检测基因 MALAT1 的表达情况。结果显示,结合了 CRISPR-Cas13a 表达的光开关系统可以有效抑制基因 *MALAT1* 的表达。因此,通过可控 CRISPR-Cas13a 在一定时间或空间上调节癌基因 mRNA 的转录,可

作为肿瘤精确治疗的新策略。

6 总结与展望

基于 CRISPR-Cas13a 系统开发的核酸检测技术的高灵敏度和高特异性, 在肿瘤相关标志物的快速检测和致癌突变的靶向治疗中, 该系统具有可观的应用潜力。但脱靶效应的存在说明这些新开发的技术仍需不断地研究和完善, 为了提高治疗的有效性及安全性, CRISPR-Cas13a 系统仍需要进一步优化。

CRISPR-Cas13a 系统的附带切割效应是否广泛地表现于肿瘤细胞中以及如何进一步优化该系统等都是我们需要关注的问题。例如 crRNA 往往是仅靶向癌基因的核酸序列, 因此未来的研究可能需要通过生物信息学选取癌细胞特有的核酸序列以满足 crRNA 的特异性。此外, miRNA 用于肿瘤的早期诊断, 依赖于完善的 miRNA 信息库, 以保证诊断结果的准确性, 因此, 在将来研究者可能着重于癌症患者的 miRNA 特征核酸序列以及表达量异常的 miRNA 种类。另外, CRISPR-Cas13 系统为 RNA 编辑领域提供了新的思路, 例如在某些基因病的临床治疗中调控有害基因的表达而改善患者病情。

尽管存在一定的挑战性, 但基于 crRNA 的特异性及 CRISPR-Cas13a 系统的灵敏性, CRISPR-Cas13a 系统仍有望在肿瘤治疗方面有所发展。目前, CRISPR-Cas13a 用于肿瘤治疗的基础研究已经有了不少进展, 但距离其发展为成熟的技术体系仍需进一步探索。

REFERENCES

- [1] Van Der Oost J, Westra ER, Jackson RN, et al. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12(7): 479-492.
- [2] Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, et al. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*, 2006, 1: 7.
- [3] Jung TY, An Y, Park KH, et al. Crystal structure of the Csm1 subunit of the Csm complex and its single-stranded DNA-specific nuclease activity. *Structure*, 2015, 23(4): 782-790.
- [4] Zheng W, Gu F. Progress of application and off-target effects of CRISPR/Cas9. *Yi Chuan*, 2015, 37(10): 1003-1010.
- [5] Gupta RM, Musunuru K. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *J Clin Invest*, 2014, 124(10): 4154-4161.
- [6] Spilman M, Cocozaki A, Hale C, et al. Structure of an RNA silencing complex of the CRISPR-Cas immune system. *Mol Cell*, 2013, 52(1): 146-152.
- [7] O'Connell MR. Molecular mechanisms of RNA targeting by Cas13-containing type VI CRISPR-cas systems. *J Mol Biol*, 2019, 431(1): 66-87.
- [8] Liu L, Li X, Ma J, et al. The molecular architecture for RNA-guided RNA cleavage by Cas13a. *Cell*, 2017, 170(4): 714-726.e10.
- [9] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573.
- [10] Saha C, Mohanraju P, Stubbs A, et al. Guide-free Cas9 from pathogenic *Campylobacter jejuni* bacteria causes severe damage to DNA. *Sci Adv*, 2020, 6(25): eaaz4849.
- [11] Jing X, Xie B, Chen L, et al. Implementation of the CRISPR-Cas13a system in fission yeast and its repurposing for precise RNA editing. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(15): e90.
- [12] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 2017, 550(7675): 280-284.
- [13] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 2017, 356(6336): 438-442.
- [14] Wang S, Li H, Kou Z, et al. Highly sensitive and specific detection of hepatitis B virus DNA and drug resistance mutations utilizing the PCR-based CRISPR-Cas13a system. *Clin Microbiol Infect*, 2021, 27(3): 443-450.

- [15] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, 2018, 360(6387): 439-444.
- [16] Joung J, Ladha A, Saito M, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing. *N Engl J Med*, 2020, 383(15): 1492-1494.
- [17] Patchesung M, Jantarug K, Pattama A, et al. Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4(12): 1140-1149.
- [18] Li S, Huang J, Ren L, et al. A one-step, one-pot CRISPR nucleic acid detection platform (CRISPR-top): application for the diagnosis of COVID-19. *Talanta*, 2021, 233: 122591.
- [19] 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. *Cell*, 2021, 184(2): 323-333.e9.
- [20] Gold B, Cankovic M, Furtado LV, et al. Do circulating tumor cells, exosomes, and circulating tumor nucleic acids have clinical utility? A report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn*, 2015, 17(3): 209-224.
- [21] Ryder CB, Schmotzer CL. Circulating tumor DNA: the future of personalized medicine in oncology? *Clin Chem*, 2015, 61(2): 443-444.
- [22] 樊庆宇, 王雅静, 仲悦娇, 等. 胃癌血浆游离 DNA 检测的临床意义. *临床肿瘤学杂志*, 2020, 25(3): 241-245.
Fan QY, Wang YJ, Zhong YJ, et al. Clinical significance of detection of plasma cfDNA in gastric cancer. *Chin Clin Oncol*, 2020, 25(3): 241-245 (in Chinese).
- [23] 梁高峰, 何向峰, 陈宝安. miRNA 在肿瘤分子诊断和治疗中的研究进展. *中国生物工程杂志*, 2015, 35(9): 57-65.
Liang Gaofeng, He Xiangfeng, Chen Baoan. Progress in the research of miRNA on tumor molecular diagnosis and therapy. *China Biotechnol*, 2015, 35(9): 57-65 (in Chinese).
- [24] 许文剑, 苏秀兰, 刘明. miRNA 与肿瘤关系的研究进展. *医学综述*, 2013, 19(17): 3120-3123.
Xu WJ, Su XL, Liu M. Research progress of correlation between miRNA and cancer. *Med Recapitul*, 2013, 19(17): 3120-3123 (in Chinese).
- [25] Shan Y, Zhou X, Huang R, et al. High-fidelity and rapid quantification of miRNA combining crRNA programmability and CRISPR/Cas13a trans-cleavage activity. *Anal Chem*, 2019, 91(8): 5278-5285.
- [26] Huang MQ, Huang R, Yue HH, et al. Ultrasensitive and high-specific microRNA detection using hyper-branching rolling circle amplified CRISPR/Cas13a biosensor. *Sensor Actuat B: Chem*, 2020, 325: 128799.
- [27] Bruch R, Baaske J, Chatelle C, et al. CRISPR/Cas13a powered electrochemical microfluidic biosensor for nucleic acid amplification-free miRNA diagnostics. *bioRxiv*, 2019, DOI: 10.1101/738617.
- [28] Zhao X, Liu L, Lang J, et al. A CRISPR-Cas13a system for efficient and specific therapeutic targeting of mutant *KRAS* for pancreatic cancer treatment. *Cancer Lett*, 2018, 431: 171-181.
- [29] 李剑, 曲芃芃. HPV E6/E7 mRNA 与 HPV DNA 检测在宫颈癌早期筛查中的临床价值. *天津医药*, 2016, 44(4): 466-469.
Li J, Qu PP. The clinical value of HPV E6/E7 mRNA and HPV DNA in early screening of cervical cancer. *Tianjin Med J*, 2016, 44(4): 466-469 (in Chinese).
- [30] Chen Y, Jiang H, Wang T, et al. *In vitro* and *in vivo* growth inhibition of human cervical cancer cells via human papillomavirus E6/E7 mRNAs' cleavage by CRISPR/Cas13a system. *Antiviral Res*, 2020, 178: 104794.
- [31] Wang Q, Liu X, Zhou J, et al. The CRISPR-Cas13a gene-editing system induces collateral cleavage of RNA in glioma cells. *Adv Sci (Weinh)*, 2019, 6(20): 1901299.
- [32] Qi FM, Tan B, Ma FJ, et al. A synthetic light-switchable system based on CRISPR Cas13a regulates the expression of lncRNA *MALAT1* and affects the malignant phenotype of bladder cancer cells. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(8): 1630-1636.

(本文责编 郝丽芳)