

专家论坛

基于CRISPR Cas12a的等温核酸检测技术 用于新型隐球菌高敏诊断的临床研究

叶 辛¹, 刘伊诺², 张 蕾³, 罗明明⁴, 李俊玉⁴, 张黎明⁴, 方文捷², 刘馨遥⁵, 冉玉平⁵, 潘炜华², 许 斌⁴, 廖万清²

(1. 西安交通大学第一附属医院检验科, 西安 710061; 2. 海军军医大学附属长征医院皮肤科, 上海 200003; 3. 陕西省人民医院皮肤科, 西安 710068; 4. 江西省肿瘤医院, 南昌 330029; 5. 四川大学华西医院, 成都 610044)



廖万清, 中国工程院院士, 中国医学科学院学部委员, 皮肤病、真菌病学专家, 一级教授、文职特级、博士生导师、总后一代名师。长期致力于军内、外皮肤病与真菌病防治研究, 在国内、外发现9种新的病原真菌及其引起的疾病类型, 其中格特隐球菌ITSC型(S8012)引起脑膜炎及胶囊青霉(Li-aoWQ-2011)引起肺青霉菌病的菌种已被美国、荷兰、比利时等国的菌种保藏中心永久保藏, 并向全世界有偿供应。承担国家传染病重大专项、国家973课题、军队课题、国家自然科学基金(重点、重大)等重要课题项目20余项。发表论文545篇, 主编《真菌病学》等专著10部, 荣获国家科技进步奖一等奖1项、二等奖2项、三等奖1项, 军队及上海市科技进步奖一等奖3项及其他各类成果奖共24项, 荣立二等功1次、三等功4次。2014年获首届叶剑英奖, 2016年获国家优秀科技工作者称号, 2017年获中华医学会皮肤科分会卓越贡献奖、上海医学发展终身成就奖等, 2018年获得戴芳澜终身成就奖, 2019年获得第三届“国之大医·特别致敬”奖, 2019年获得大国匠心·年度致敬人物奖励, 2021年获第八届树兰医学奖, 2023年获得吴阶平医学奖。

摘要 目的:构建基于CRISPR Cas12a的高敏等温核酸检测方法, 并评估其在支气管肺泡灌洗液及脑脊液中对于新型隐球菌的诊断能力。**方法:**利用NCBI Blast确定新型隐球菌保守序列, 针对保守序列, 设计等温重组酶聚合酶扩增引物及crRNA序列。利用新型隐球菌标准菌株及其他菌株(白念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、金黄色葡萄球菌、脑膜炎奈瑟菌、肺炎链球菌), 提取其核酸, 以评估方法的特异性及最低检测限。进一步收集临床确诊的10例肺部及10例中枢神经系统新型隐球菌感染患者的支气管肺泡灌洗液及脑脊液, 以评估本研究构建的核酸诊断方法的临床检测性能。**结果:**共设计6组引物及crRNA组合, 经筛选得到1组最佳组合。本研究构建的检测方法特异性高(与7种其他类型菌株无交叉反应), 最低检测限达到5 copies/ μ L, 整个检测流程速度快(在1 h内完成)。针对10例支气管肺泡灌洗液及10例脑脊液临床标本的阳性检出率均为100%。**结论:**本研究构建的新型核酸检测方法, 具有高度的特异性和良好的检测限, 在临床标本检测中同样具有优良检测性能, 具备了较强的临床新型隐球菌核酸检测的应用潜力。

关键词 新型隐球菌; 等温重组酶聚合酶扩增; CRISPR Cas12a; 临床诊断

中图分类号: R519.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-930X(2024)04-0483-06

DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.04.001

[基金项目] 西安交通大学第一附属医院院级基金资助项目(No.2021ZYTS-18); 科技部重点研发项目(No.2022YFC2504803); 国家自然科学基金资助项目(No.82202543; No.82072257; No.82102416); 上海市科委基金资助项目(No.20DZ2272000; No.21410750500)

[共同第一作者] 叶辛、刘伊诺

[通信作者] 许斌, E-mail: 469996535@qq.com; 廖万清, E-mail: liaowanqing@sohu.com

[收稿日期] 2024-03-11

Clinical study of isothermal nucleic acid detection technology based on CRISPR Cas12a for highly sensitive diagnosis of *Cryptococcus neoformans*

YE Xin¹, LIU Yinuo², ZHANG Lei³, LUO Mingming⁴, LI Junyu⁴, ZHANG Liming⁴, FANG Wenjie², LIU Xinyao⁵, RAN Yuping⁵, PAN Weihua², XU Bin⁴, LIAO Wanqing². (1. Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 2. Dermatology Department, Changzheng Hospital Affiliated to Naval Medical University, Shanghai 200003, China; 3. Dermatology Department, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China; 4. Jiangxi Cancer Hospital, Nanchang 330029, China; 5. West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610044, China)

Abstract Objective: To construct a highly sensitive isothermal nucleic acid detection method based on CRISPR Cas12a and evaluate its diagnostic ability for *Cryptococcus neoformans* in bronchoalveolar lavage fluid and cerebrospinal fluid. **Methods:** Conserved sequences of *Cryptococcus neoformans* were determined using NCBI Blast, and isothermal recombinase polymerase amplification primers and crRNA sequences were designed targeting these conserved sequences. Nucleic acids were extracted from standard strains of *Cryptococcus neoformans* and other strains (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*) to evaluate the specificity and the lowest detection limit of the method. Furthermore, bronchoalveolar lavage fluid and cerebrospinal fluid samples from 10 clinically diagnosed cases of *Cryptococcus neoformans* infection in the lungs and central nervous system were collected to evaluate the clinical detection performance of the nucleic acid diagnostic method constructed in this study. **Results:** A total of 6 primer and crRNA combinations were designed, and 1 optimal combination was selected after screening. The detection method constructed in this study exhibited high specificity (no cross-reaction with 7 other types of strains), a lowest detection limit of 5 copies/ μ L, and rapid detection process (completed within 1 hour). The positive detection rates for bronchoalveolar lavage fluid and cerebrospinal fluid clinical specimens from 10 cases each were 100%. **Conclusion:** The novel nucleic acid detection method constructed in this study has high specificity and a good detection limit, demonstrating excellent detection performance in clinical specimen testing, and showing strong potential for clinical application in the detection of *Cryptococcus neoformans* nucleic acids.

Keywords *Cryptococcus neoformans*; isothermal recombinase polymerase amplification; CRISPR Cas12a; clinical diagnosis

新型隐球菌是一种环境中普遍存在的有荚膜酵母菌,作为一种重要的机会感染性真菌,其在免疫功能低下的个体,特别是艾滋病(AIDS)患者中的感染率维持在较高水平。近年来,较多研究揭示了其在免疫功能正常群体中同样也会造成感染^[1-2]。这种病原体常见的感染部位包括肺部及中枢神经系统,经常导致危及生命的脑膜炎,给患者和社会带来沉重的经济负担。隐球菌性脑膜炎的表现差异很大,可表现为亚急性或慢性症状,如头痛、发烧、精神状态改变,或更严重的临床表现,如癫痫和昏迷^[3-4]。因此,在临床实践中亟须开发具有超高灵敏度及高度特异性的新型隐球菌感染诊断新方法。

以PCR技术为代表的核酸检测作为一种新兴

的诊断方法,在新型隐球菌感染的诊断中展现出了巨大的潜力^[5]。但是PCR技术需要热循环设备及独立分区的实验室,且其灵敏度仍不令人满意,因此限制了其临床应用^[6]。RPA-CRISPR Cas12a检测技术是一种基于核酸放大和基因编辑的新兴诊断方法,其结合了等温重组酶聚合酶扩增(RPA)和CRISPR Cas12a特异性剪切系统的优势。RPA是一种在常温下进行的核酸扩增技术,具有快速、敏感的特点^[7],而CRISPR Cas12a系统则能够在相应crRNA引导下高度特异地识别和切割特定的DNA序列。这种技术的组合使得其在短时间内能够检测到极低浓度的靶标DNA,并产生明显的信号^[8-9]。然而,该技术是否能应用于新型隐球菌的核酸诊

断,国内、外研究仍未见报道。本研究旨在开发基于RPA-CRISPR Cas12a的新型隐球菌感染检测技术,该技术有望成为临床诊断的一种创新方法,为临床医生提供更加快速、精准的诊断服务,促进患者的治疗和完善预后管理。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 RPA扩增试剂盒购自TwistDX Inc. (England); LbCas12a及相关缓冲液购自New England Biolabs; 包含新型隐球菌保守序列的质粒样本购自生工生物工程(上海)有限公司; DNA纯化试剂盒购自Invitrogen。本研究中涉及的菌株及临床样本核酸提取与纯化均根据该试剂盒说明书进行。

所有反应均在37℃条件下进行,利用实时荧光PCR仪(上海宏石医疗科技有限公司)监测反应过程中的荧光信号。反应结束后,将反应管置于紫外灯下,肉眼观察管内荧光。

1.2 RPA引物与crRNA的设计与筛选 利用NCBI Blast确定新型隐球菌保守序列,针对保守序列(荚膜相关蛋白mRNA),设计RPA扩增引物及crRNA序列,所有引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成并纯化。针对包含新型隐球菌保守序列,筛选最佳的RPA引物及crRNA,荧光探针序列为FAM-CCCCCC-BHQ1。

1.3 RPA-CRISPR Cas12a检测体系的组成 RPA-CRISPR Cas12a检测体系分别由A和B两个组分准备而成。组分A包含100 nmol/L LbCas12a、100 nmol/L crRNA、400 nmol/L 荧光探针、1×2.1 NEBuffer和15%甘油。组分B包含29.5 μL缓冲液、一个冷冻干燥的反应颗粒、240 nmol/L正向和反向引物、目标序列和超纯水。上述浓度均根据最终反应体系总量21 μL计算。反应时,将10 μL组分A加入管底,将9.5 μL组分B加入管壁,并加入1 μL SuperScript IV反转录酶(100 U/μL)及1 μL RNase H,最后加入0.5 μL 280 mmol/L醋酸镁;经简短离心后进行实时荧光监测。

1.4 RPA-CRISPR Cas12a检测性能评估 首先利

用14株非新型隐球菌的其它酵母菌(包括白念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌、近平滑念珠菌)及细菌(金黄色葡萄球菌、脑膜炎奈瑟菌、肺炎链球菌)评估新型检测方法的特异性。然后利用梯度稀释的质粒样本评估检测方法的最低检测限,在最低检测限浓度下重复测试14次,评估本方法在最低检测限处的稳定性。

1.5 临床标本检测 共收集经真菌培养鉴定后临床确诊的10例肺部及10例中枢神经系统新型隐球菌感染患者的支气管肺泡灌洗液及脑脊液,所有涉及临床样本的实验均经西安交通大学第一附属医院伦理委员会批准。所有参与研究的患者均知情同意。使用本研究中开发的检测方法检测上述样本以评估其临床检测性能。

2 结果

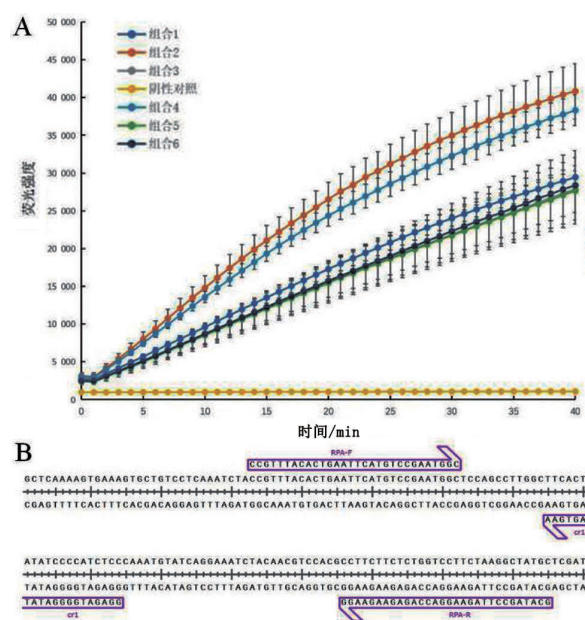
2.1 RPA引物及crRNA筛选结果 共设计6组引物及crRNA组合,图1A中的结果表明,组合2的检测效果最佳,后续研究中均使用组合2。图1B展示了组合2的具体序列及其对应靶标的位置。

2.2 检测体系特异性测试

共选取14株其它类型的酵母菌,包括白念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌及近平滑念珠菌,进行DNA提取后,用本研究中的检测体系进行测试。图2A中的实时荧光定量曲线及图2B中紫外灯下的扩增试管图均表明没有阳性荧光信号产生。

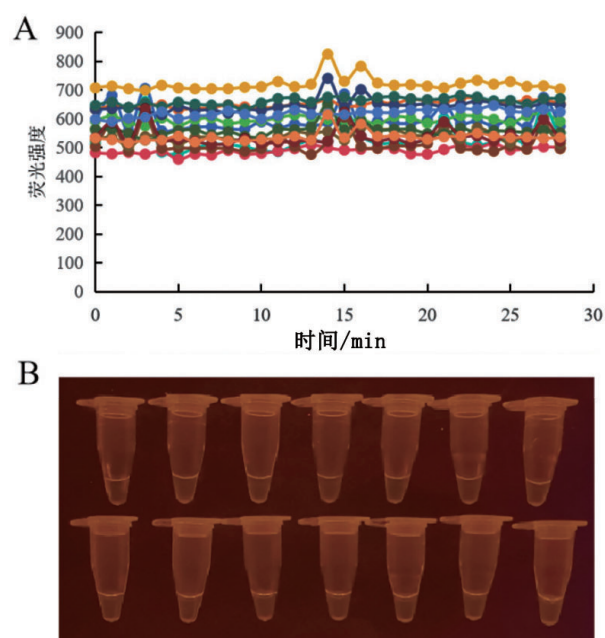
2.3 检测体系的最低检测限 将质粒样本梯度稀释至100 copies/μL、10 copies/μL、5 copies/μL,对上述3个浓度梯度样本进行复孔检测,初步评估本方法的最低检测限。图3中的结果表明,上述3个浓度均可被成功检测。进一步在5 copies/μL浓度下重复测试14次,图4中的结果表明,在该低浓度下14次重复检测均有阳性信号。

2.4 临床样本检测效果 图5中的结果表明,利用本研究中的新方法检测临床确诊的10例肺部及10例中枢神经系统新型隐球菌感染患者的支气管肺泡灌洗液(图5A)及脑脊液(图5B)样本,均可成功扩增,临床符合率为100%。



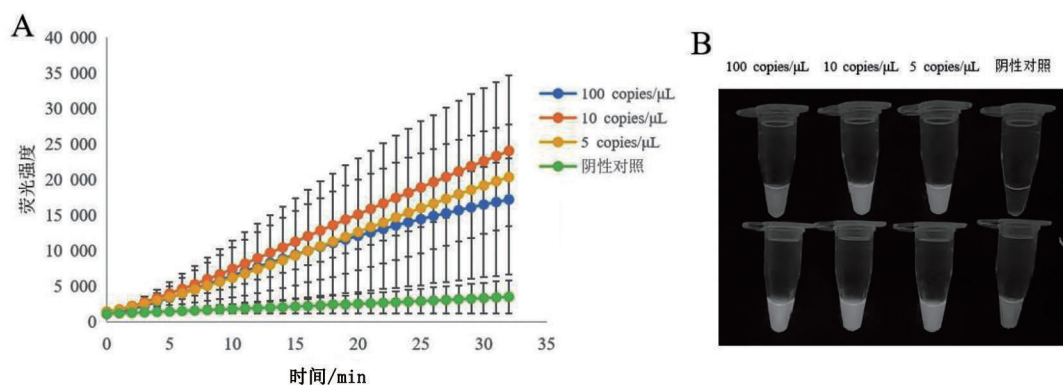
A: 引物及 crRNA 组合筛选; B: 最佳引物及 crRNA 组合及靶标序列。

图1 引物及 crRNA 筛选结果



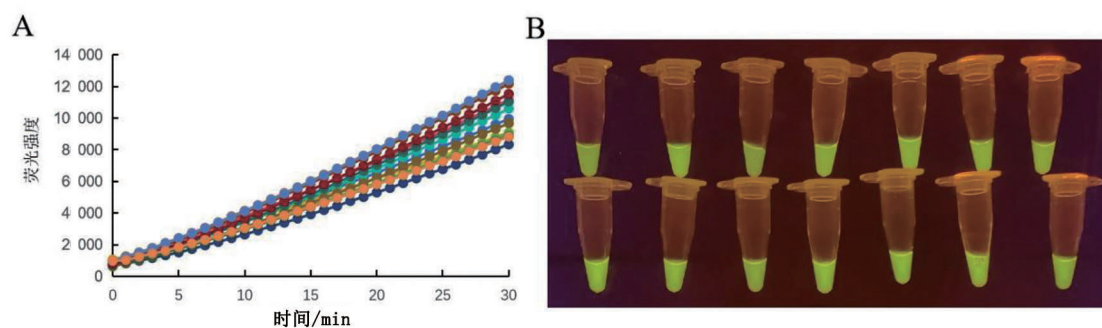
A: 实时荧光定量曲线; B: 紫外灯下扩增试管图。

图2 特异性测试结果



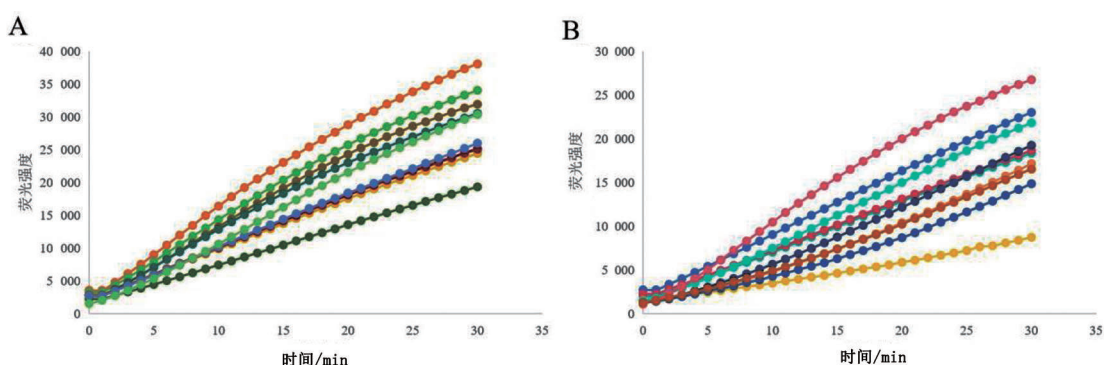
A: 实时荧光定量曲线; B: 紫外灯下扩增试管图。

图3 最低检测限测试结果



A: 实时荧光定量曲线; B: 紫外灯下扩增试管图。

图4 5 copies/μL 浓度下 14 次重复测试结果



A: 支气管肺泡灌洗液; B: 脑脊液。

图5 临床标本检测结果

3 讨论

新型隐球菌感染在临床上是一种需要重点关注的真菌,特别是对于免疫功能受损的患者,如HIV/AIDS患者或接受免疫抑制治疗的患者^[10]。新型隐球菌感染最常见的临床表现是隐球菌性脑膜炎,这是一种严重的中枢神经系统感染,常常导致死亡。除了脑膜炎外,隐球菌感染还可引起其他器官的病变,包括肺部、皮肤和软组织等,对患者的健康构成严重威胁^[11]。

目前临床诊断新生隐球菌感染的方法主要包括印度墨汁染色、隐球菌荚膜抗原检测及真菌培养鉴定^[12]。墨汁染色是一种常见的、简便的诊断方法,尤其适用于初级医疗机构和资源匮乏地区。但其灵敏度较低,在感染丰度低时可能会造成漏诊^[13]。隐球菌荚膜抗原检测具有更高的敏感性,但其本质作为抗原抗体反应,在交叉反应发生的情况下可能造成误诊^[14]。真菌培养鉴定是确诊新型隐球菌感染最可靠的方法,能够确定病原体的种类并评估其对抗真菌药物的敏感性。然而,这种方法需要较长的操作时间和专业的实验室设备和技术,并且可能存在环境污染风险^[15]。

在新型隐球菌感染诊断方面,本研究开发的RPA-CRISPR Cas12a检测技术已成功应用于细菌^[16]和病毒^[17]的检测,因此其在真菌诊断方面同样具有巨大的应用前景。与传统方法相比,首先,它能够在短时间内快速检测到新型隐球菌的核酸序列,无需复杂的培养过程,从而缩短了诊断时间;其次,这种技术具有高度的特异性,能够准确区分新型隐球

菌和其他真菌及细菌的感染,避免了误诊。本方法操作简便、成本较低,反应条件温和(在37℃条件下等温进行),不需要多区分割的多间实验室,同样适用于资源匮乏地区新型隐球菌感染的诊断。此外,本研究中开发的方法检测目标为mRNA,当检测到RNA存在,则表明存在活菌感染。相比之下,死菌不会进行转录活动,因此不会释放RNA。通过本技术检测RNA的存在与否,可以帮助区分活菌和死菌感染,为精准诊断和预后评估提供支持^[18]。

本研究具有一定的局限性,例如,用于检测的临床样本数量有限,未来仍须开展大样本量的前瞻性研究,进一步系统评估本方法的临床实际应用潜能。

综上,本研究开发的基于RPA-CRISPR Cas12a的高敏核酸诊断方法有助于提高新型隐球菌感染的早期诊断率和准确性,为患者提供更及时、有效的治疗,减少疾病的严重后果,对于临床实践具有重要意义。

参考文献:

- [1] SHAHEEN A A, SOMAYAJI R, MYERS R, et al. Epidemiology and trends of cryptococcosis in the United States from 2000 to 2007: a population-based study[J]. International journal of STD & AIDS, 2018, 29(5): 453-460.
- [2] KIM L, FERRAZ C, CORBISIERO M F, et al. Glucocorticoids as a risk factor for infection and adverse outcomes in non-HIV and non-transplant patients with cryptococcal meningitis[J]. Mycoses, 2024, 67(3): e13709.
- [3] MOHAMED S H, NYAZIKA T K, SSEBAMBULIDDE K, et al. Fungal CNS infections in Africa: the neuroimmu-

- nology of cryptococcal meningitis[J]. *Frontiers in immunology*, 2022, 13: 804674.
- [4] ZHAO Y B, YE L X, ZHAO F J, et al. Cryptococcus neoformans, a global threat to human health[J]. *Infectious diseases of poverty*, 2023, 12(1): 20.
- [5] DANTAS K C, DE FREITAS- XAVIER R S, SPINA LOMBARDI S C F, et al. Comparative analysis of diagnostic methods for the detection of *Cryptococcus neoformans* meningitis[J]. *PLoS neglected tropical diseases*, 2023, 17(3): e0011140.
- [6] MBANGIWA T, STURNY-LECLÈRE A, LECHIILE K, et al. Development and validation of quantitative PCR assays for HIV-associated cryptococcal meningitis in sub-Saharan Africa: a diagnostic accuracy study[J]. *The lancet microbiome*, 2024, 5(3): e261-e271.
- [7] GAO X Z, CAO Y D, GAO Y Z, et al. Efficient detection of *Streptococcus pyogenes* based on recombinase polymerase amplification and lateral flow strip[J]. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of clinical microbiology*, 2024, 43(4): 735-745.
- [8] KIM H, JANG H, SONG J, et al. A CRISPR/Cas12 trans-cleavage reporter enabling label-free colorimetric detection of SARS-CoV-2 and its variants[J]. *Biosensors & bioelectronics*, 2024, 251: 116102.
- [9] LIN H Q, LIANG Y H, ZOU L R, et al. Combination of isothermal recombinase-aided amplification and CRISPR-Cas12a-mediated assay for rapid detection of major severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 variants of concern[J]. *Frontiers in microbiology*, 2022, 13: 945133.
- [10] CHANG C C, HARRISON T S, BICANIC T A, et al. Global guideline for the diagnosis and management of cryptococcosis: an initiative of the ECMM and ISHAM in cooperation with the ASM[J]. *The lancet infectious diseases*, 2024(23): S1473-S3099.
- [11] RAJASINGHAM R, SMITH R M, PARK B J, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis[J]. *The lancet infectious diseases*, 2017, 17(8): 873-881.
- [12] HSIAO P J, CHENG H, KAO Y H, et al. Comparison of laboratory diagnosis, clinical manifestation, and management of pulmonary cryptococcosis: report of the clinical scenario and literature review[J]. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 2022, 524: 78-83.
- [13] ZHANG X, LIN Y Q, CHEN H X, et al. Diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing in central nervous system cryptococcosis using cerebrospinal fluid[J]. *Infection and drug resistance*, 2023, 16: 6175-6183.
- [14] ZIMMET A N, CULLEN G D, MISCHÉ L, et al. Disseminated cryptococcosis with gastrointestinal involvement and false-negative cryptococcal antigen testing due to postzone phenomenon: a case report and review of the literature[J]. *BMC infectious diseases*, 2023, 23(1): 217.
- [15] FERNANDES R, SABINO R, CUNHA C, et al. Multicentric study on the clinical mycology capacity and access to antifungal treatment in Portugal[J]. *Mycopathologia*, 2024, 189(1): 15.
- [16] YANG H T, LIU A B, MA F F, et al. Establishment of portable *Pseudomonas aeruginosa* detection platform based on one-tube CRISPR/Cas12a combined with recombinase polymerase amplification technology[J]. *International journal of clinical chemistry*, 2024, 554: 117760.
- [17] MA L, ZHU M J, MENG Q F, et al. Real-time detection of Seneca Valley virus by one-tube RPA-CRISPR/Cas12a assay[J]. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2023, 13: 1305222.
- [18] KINDONGO O, LIEB G, SKAGGS B, et al. Implication of polymerase recycling for nascent transcript quantification by live cell imaging[J]. *Yeast*, 2024, 41(4): 279-294.

本文引用格式:

叶 辛, 刘伊诺, 张 蕾, 等. 基于 CRISPR Cas12a 的等温核酸检测技术用于新型隐球菌高敏诊断的临床研究[J]. 广西医科大学学报, 2024, 41(4): 483-488. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.04.001

YE X, LIU Y N, ZHANG L, et al. Clinical study of isothermal nucleic acid detection technology based on CRISPR Cas12a for highly sensitive diagnosis of *Cryptococcus neoformans*[J]. *Journal of Guangxi medical university*, 2024, 41(4): 483-488. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.04.001