

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-061

## 合成生物学在下一代基因诊断技术中的应用进展

吕海龙<sup>1, 2, 3</sup>, 王建<sup>2</sup>, 吕浩<sup>4</sup>, 王金<sup>2, 5</sup>, 徐勇<sup>3</sup>, 顾大勇<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 深圳大学医学部生物医学工程学院, 广东省生物医学信息检测与超声成像重点实验室, 广东 深圳 518060; <sup>2</sup> 深圳市第二人民医院, 深圳市转化医学研究院, 广东 深圳 518035; <sup>3</sup> 深圳市第二人民医院检验科, 深圳市医学检验分子诊断重点实验室, 广东 深圳 518035; <sup>4</sup> 深圳市第二人民医院神经外科, 深圳市神经外科重点实验室, 广东 深圳 518037; <sup>5</sup> 上海吐露港生物科技有限公司, 上海 200233)

**摘要:** 近年来, 合成生物学技术取得了飞速的发展, 与此同时也极大地推动了基因诊断领域的技术革新和应用拓展。准确诊断疾病和监测治疗后反应的检测方法对有效的临床管理至关重要, 合成生物学作为一门以设计为导向的学科, 试图重新设计生物系统, 以便以可预测的方式执行新的功能, 对这一领域的最新进展进行综述对疾病的预防、预测、诊断、治疗和预后具有重要意义。本文以该主题作为切入点, 首先介绍了目前合成生物学在基因诊断中的应用类别, 包括已经被开发出来的用于体外和体内的不同生物传感器; 随后介绍了下一代基因诊断技术的发展方向以及基因诊断领域的合成生物学装置和技术进展; 此外, 本文讨论了目前基因诊断领域中存在的技术问题及其在临床应用面临的挑战。最后, 我们提请注意合成生物学中的最新创新, 这些创新可能会对基因诊断的未来应用产生重大影响。

**关键词:** 合成生物学; 基因诊断; 成簇的规律间隔的短回文重复序列; 转化医学; 生物技术

**中图分类号:** Q819 **文献标志码:** A

## Synthetic biology for next-generation genetic diagnostics

LV Hailong<sup>1, 2, 3</sup>, WANG Jian<sup>2</sup>, LV Hao<sup>4</sup>, WANG Jin<sup>2, 5</sup>, XU Yong<sup>3</sup>, GU Dayong<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Guangdong Key Laboratory for Biomedical Measurements and Ultrasound Imaging, School of Biomedical Engineering, School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China; <sup>2</sup>Shenzhen Institute of Translational Medicine, Health Science Center, The First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035, Guangdong, China; <sup>3</sup>Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035, Guangdong, China; <sup>4</sup>Department of Neurosurgery, Shenzhen Key Laboratory of Neurosurgery, the Shenzhen Second People's Hospital, First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen 518037, Guangdong, China; <sup>5</sup>Shanghai Tolo Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 200233, China)

**Abstract:** In recent years, rapid advances have been made for synthetic biology technologies, which contribute greatly to technological innovations and applications in genetic diagnostics. Diagnostic methods for accurate detection

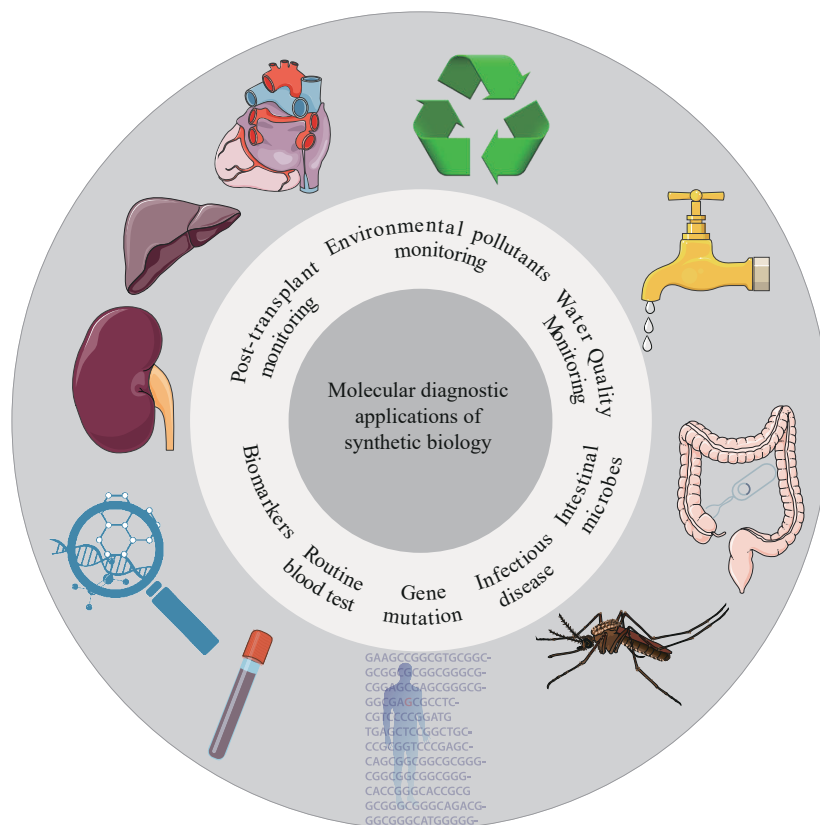
收稿日期: 2022-11-02 修回日期: 2022-12-17

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0903700和2018YFC0809200); 深圳市医疗卫生三名工程 (SZSM202011017)

引用本文: 吕海龙, 王建, 吕浩, 王金, 徐勇, 顾大勇. 合成生物学在下一代基因诊断技术中的应用进展[J]. 合成生物学, 2023, 4(2): 318-332

Citation: LV Hailong, WANG Jian, LV Hao, WANG Jin, XU Yong, GU Dayong. Synthetic biology for next-generation genetic diagnostics[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(2): 318-332

of diseases and monitoring treatment responses are essential for effective clinical managements. Synthetic biology seeks to redesign biological systems to perform new functions in a predictable manner. A review on recent advances in synthetic biology as a diagnostic method for accurate detection of diseases and monitoring therapeutic responses is essential for effective clinical management, and also important for prevention, prediction and prognosis of diseases. In this article, we first describes the categories of synthetic biology applications in genetic diagnostics, including different biosensors that have been developed for both *in vitro* and *in vivo* monitoring. Subsequently, perspectives of the next generation of genetic diagnostic technologies and progress of synthetic biology devices and technologies in genetic diagnostics are highlighted. In addition, we further address the current technical challenges in genetic diagnostics and clinical applications. Finally, we draw attention to the latest innovations in synthetic biology that may have a significant impact on the future applications of genetic diagnostics.



**Keywords:** synthetic biology; genetic diagnostics; CRISPR; translational medicine; biotechnology

合成生物学是一门设计驱动的学科，强调精确控制人工生物系统，虽然合成生物学的定义相对广泛，但它的重点是通过迭代设计和改进，以设计模块化和响应性生物系统，使这一领域区别于许多相关领域，如蛋白质或基因工程的更基础应用<sup>[1]</sup>。自21世纪初作为一门独特的生物工程学科成立以来，合成生物学在我们社会的许多领域

都发挥了越来越重要的作用，如医学和环境检测等（图1）。

## 1 合成生物学在基因诊断中的应用

基因诊断是指应用分子生物学方法检测目标



续表

技术类型	方法	原理	应用对象	效果	优点	参考文献
肠道微生物的检测分析	无细胞开关传感器, RT-qPCR	在基于纸张的无细胞反应中使用RNA开关传感器进行按需和简单的微生物组样本分析	肠道微生物群和宿主生物标志物	可以用于快速、廉价地检测毒素mRNA来诊断艰难梭菌感染	快速、廉价,比标准的基于DNA的qPCR诊断更灵敏	[10-11]
传染病诊断	酶报告基因	设计一种专门检测肠道中霍乱弧菌的群体感应信号乳杆菌菌株,并触发一种容易在粪便样本中检测到的酶报告基因的表达	霍乱弧菌	使用含有天然和工程乳杆菌菌株的发酵食品进行预防性饮食干预,可能会阻碍霍乱的进展	可提供快速保护,以抵御霍乱等快速进展的感染	[12]
传染病诊断	新型合成纳米体	通过筛选酵母表面显示的合成纳米体序列库,开发可破坏Spike和ACE2之间相互作用的纳米体	SARS-CoV-2病毒	纳米体 mNb6-tri 对 SARS-CoV-2 的感染具有中和作用	气溶胶介导的纳米体中和剂可以直接传递到气道上皮细胞	[13]
器官移植后检测	mRNA疫苗	设计一种编码ZIKV结构基因的mRNA疫苗,编码prM-E基因产生病毒样颗粒,导致中和抗体滴度高,保护ZIKV感染并赋予杀菌免疫	ZIKV热病毒	改良的mRNA疫苗可以预防ZIKV疾病	可以降低个体对随后暴露于DENV的敏感性风险	[14]
器官移植后检测	酶抑制剂	抑制CMV DNA末端酶复合物的活性,阻止病毒DNA的加工和包装,从而发挥抗病毒作用	巨细胞病毒(CMV)	用于人类巨细胞病毒感染的治疗和预防	与单独使用免疫抑制剂相比有更好的耐受性	[15]
遗传病诊断	基因治疗	以基因矫正的热休克蛋白及其后代作为细胞载体,将分子传递到循环和组织中	自体造血干/祖细胞(HSPCs)	有可能治愈由血液系统发育功能改变引起的单基因遗传性疾病	具有更安全的整合谱	[16]
遗传病诊断	下一代基因测序(NGS)	通过针对所有鱼鳞病相关基因的多基因面板测试,使用NGS进行分子分析	中国人遗传学鱼鳞病	证明遗传性鱼鳞病是一组不同的角化症,扩大了中国人遗传性鱼鳞病的突变谱和临床表型	NGS技术极大提高了遗传性鱼鳞病的诊断效率	[17]
肿瘤基因诊断	工程免疫细胞	利用免疫细胞、核酸和细菌作为底盘的癌症基因电路疗法	肿瘤及癌症	合成生物学可创造出更有效的适应性疗法,使其能够特异性靶向癌细胞,同时保留健康细胞	可按需进行肿瘤及癌症的免疫治疗	[18-20]
基因突变的检测	原核生物核糖核酸调节剂	从头设计一种在体内和无细胞转录-翻译反应中提供超特异性RNA检测能力的原核核糖体调节因子	核糖体调节因子	开发用于与癌症、耐药性和遗传疾病相关的一系列突变的核糖体调节因子	实用,强大的分子探针	[21]

一些研究已经使用了多种报告基因的方法,以确保对不同类型的污染样本有更高的检测效率和灵敏度。最近的一项研究表明,一种转基因大肠杆菌微生物燃料电池(MFC)的生物传感器通过启动子 $P_{i7}$ 和 $P_{cusC}$ 表达*OprF*和*ribB*,可以合成孔道蛋白并在水中检测 $Cu^{2+}$ [2],这种基于MFC的生物传感器克服了传统方法中存在的信号转换和传输问题,为水中 $Cu^{2+}$ 的原位监测提供了一种快速、经济的分析替代方案;另一项工作使用CadR和CadC作为独立的金属感应成分,*mCherry*和*eGFP*作为单一基因结构中的荧光报告基因,以产生一种用于检测生物可利用性镉(Cd)的双传感细菌生物报告基因系统,双色荧光的产生量与镉暴露浓度成正比,使其成为检测生物可利用性镉的功能定量生物传感器[3];PCR检测可以被用于原料

水和饮用水中的原生动植物监测,如鞭毛虫、弓形虫和隐孢子虫[4-5],采用逆转录巢式PCR可检测地下水中的甲型和戊型肝炎病毒(HAV和HEV)[6];基于SYBR green-和TaqMan探针的qPCR系统已广泛应用于水质检测,一项相关研究表明布里斯班河系统中ARG的流行率与污水源和受影响水域之间存在联系[7-8]。此外,工程微生物在降解环境污染物方面具有重要作用,负责降解污染物的基因被识别和修饰,增加了快速降解污染物的潜力,与天然菌株相比,工程微生物被证明是降解污染物的有效替代品[24]。Walter等[25]描述了目前由合成生物学促成的水质监测策略,并将其与之前用于检测3种重点水污染物(粪便中的病原体、砷和氟化物)的方法进行比较,同时解释了工程生物传感器在简化和分散水质监测方面的潜力。

## 1.2 肠道微生物的检测分析

在过去的10年中,我们对肠道微生物组在人类健康中的作用的理 解已经取得了巨大的进展。肠道微生物群在维持人类健康方面起着至关重要的作用,而合成生物学的众多工具和方法为益生菌的微生物工程开辟了新的前沿领域<sup>[26]</sup>。新的基因编辑方法,如CRISPR-Cas9被证明在微生物基因组工程中是有效的<sup>[27]</sup>。研究人员已经证明,一氧化氮感应开关<sup>[9]</sup>或基于整合酶的记忆阵列<sup>[28]</sup>可以在肠道微生物群环境中发挥作用,工程细菌也被开发用于人体其他地方,如根除传染性疾 病<sup>[29]</sup>和癌症诊断<sup>[30]</sup>,这些可以作为肠道内类似系统的基础;此外,益生元、益生菌、工程益生菌或噬菌体已被用于直接操纵肠道微生物群<sup>[31-32]</sup>。Canez等<sup>[33]</sup>研究评估了内源性I型和II型CRISPR-Cas系统对模式生物嗜热链球菌DGCC7710的相对杀伤效率;人工智能(AI)辅助合成生物学(SB)方法的技术革命,在调节益生菌的治疗和营养潜力方面同样发挥重要作用<sup>[34]</sup>。此外,噬菌体通过原位微生物组操纵肠道微生物组的作用也受到关注,基因工程方法已被用于设计噬菌体分泌酶或传递基因,这可能会对肠道中有害细菌的生存产生不利影响<sup>[35]</sup>。

为了确定肠道微生物组及其与宿主的相互作用影响人类健康和疾病的机制。目前对微生物组进行分析的方法通常是利用昂贵、缓慢和复杂的下一代测序。Melissa等<sup>[10]</sup>提出了一个合成生物学平台,在基于纸张的无细胞反应中使用RNA开关传感器进行按需和简单的微生物组样本分析。研究表明,该平台可以在艰难梭状芽孢杆菌感染时快速、廉价地检测mRNA。

开发灵敏的、有选择性的、多重生物传感装置可以大大促进对肠道微生物组的分析以及它们对宿主健康和疾病状况的影响。尽管元基因组学是微生物组分析的黄金标准,但分析粪便样本中关键代谢物或疾病生物标志物的生物传感器可以加速将肠道微生物组的发现转化为临床诊断<sup>[11]</sup>,与血液相比,粪便样本更容易获得,也更适合进行即时诊断(POCT)。许多新的生物标志物可以通过元基因组学或元蛋白组学来预测,这表明未

来有很多机会开发新的生物传感器。在过去的几十年里,材料界为检测蛋白质、小分子、脂质、核酸和其他生物标志物而开发的各种类型的生物传感器做出了艰苦的努力<sup>[36]</sup>。鉴于最近元基因组学和元蛋白组学研究揭示的新生物标志物的鉴定,材料科学家在这一领域有广阔的研究空间,开发各种新型POCT生物传感器用于分析宿主-肠道微生物组的相互作用和监测宿主人类的健康状况。

合成生物学工具具有创建合成药物和其他微生物的潜力,利用其在基因诊断方面的研究成果有助于探究肠道微生物群影响人类健康的机制,也可使合成生物学方法更广泛地用于改进肠道微生物的检测。

## 1.3 疾病诊断领域

基因诊断技术可以准确诊断病毒基因、遗传物质和人类基因的变化等疾病相关因素,并能预测疾病的发生。基因诊断技术具有诊断速度快、灵敏度高、特异性强等优点,可广泛应用于传染病诊断、器官移植后监测、遗传病诊断、肿瘤基因诊断以及基因突变检测等领域,在某些应用领域还可替代其他体外诊断技术,是体外诊断领域的一个重要分支,具有广阔的发展前景。随着合成生物学的成熟,从基础理论到开发下一代治疗方法,合成生物学为人类疾病的基因诊断提供新的见解,经过设计的合成生物学系统正在成为治疗人类疾病的有力工具。

### 1.3.1 传染病诊断

传染病对人类文明的各个阶段都造成了严重的破坏,自1928年发现青霉素以来,抗生素一直是大多数细菌感染的主要治疗选择,然而,随着抗生素的发现和使用,耐药细菌也在增加,这些问题促使了人们开始利用合成生物学方法设计新的应对策略。通过工程改造细菌,研究人员已经成功地构建了具有强大遗传回路的全细胞生物传感器,可以精确地检测传染病相关病理及其感染因子。比如一个基于益生菌的诊断系统被Mao等<sup>[12]</sup>用于确定霍乱是由霍乱弧菌引起的急性腹泻病,同时研究人员设计了一种乳杆菌菌株,该菌株可以特异性地检测肠道中霍乱弧菌的群体感应

信号，并增强粪便样品中易于检测的酶报告基因的表达，以此改善霍乱暴发风险人群的疾病监测水平。此外，在针对 COVID-19 的研究中，科学家们分析了数百万种不同的蛋白质序列，以寻找最适合用于合成疫苗的候选序列，研究表明，一些设计的小蛋白具有抗 SARS-CoV-2 病毒棘突蛋白的潜力，例如在细菌或酵母中开发的具有单一结构域的新型合成纳米体，可以直接使 SARS-CoV-2 冠状病毒失效<sup>[13]</sup>。此外，mRNA 疫苗有可能简化疫苗的开发流程，并促进对新出现的传染病的快速反应。Richner 等<sup>[14]</sup>最近开发的 ZIKV 病毒 mRNA 疫苗可以保护细胞或小鼠免受 ZIKV 的侵袭，并减少 DENV 感染的风险。

### 1.3.2 器官移植后监测

在器官移植中，感染和排斥是造成移植物损伤的主要原因，它们因免疫抑制的网络状态而联系在一起。为了更早地诊断和治疗这些情况，并改善患者的长期预后，需要对移植后的患者进行精细的监测。移植后供体特异性人白细胞抗原 (HLA) 抗体 (DSA) 是心脏移植中的一个复杂领域，HLA 抗体检测方法的进步使 DSA 的鉴定具有高精度和灵敏度<sup>[37]</sup>。但持续性 DSA 的存在增加了心脏移植后不良结局的风险，包括抗体介导的排斥反应 (AMR)、移植失败、心脏移植血管病变和死亡率，因此识别特定风险特征对于指导移植后抗体管理至关重要<sup>[38]</sup>。巨细胞病毒 (CMV) 是普遍影响实体器官和异基因造血干细胞移植受者的最重要的病原体之一，而缺乏有效的 CMV-特异性免疫是导致移植后发生 CMV 再激活和临床疾病风险的常见因素，CMV DNA 聚合酶抑制一直是治疗的主要手段，但新批准的一种病毒末端酶抑制剂药物 Letermovir，在预防异基因造血干细胞移植后的 CMV 感染方面具有显著作用，同时合成生物学中免疫学监测的进展可能为移植后 CMV 感染的个体化管理方法提供更多可能<sup>[15]</sup>。

### 1.3.3 遗传病诊断和治疗

当父母基因的特定突变被遗传并且不能正常工作时便会产生遗传性疾病，当遗传病出现症状时，应当避免使用容易引起这种疾病的物质并提供对症治疗以缓解症状，但其潜在的治疗方法尚未被广泛采用。为了克服这一点并实现从根本上

进行治疗，研究人员正在尝试使用基因编辑的方法来治疗基因缺陷。

对自体造血干细胞 (HSPCs) 进行基因编辑有可能治愈由血液系统发育或功能改变引起的单基因遗传性疾病，如免疫缺陷和红细胞及血小板疾病。基因校正后的 HSPCs 及其子代也可以作为细胞载体，将分子输送到循环和组织中，包括中枢神经系统。HSPCs 通过整合病毒载体进行工程修饰，用于治疗单基因血液疾病和代谢性疾病<sup>[16]</sup>。尽管取得了这些成就，但 HSPC 基因治疗 (HSPC-GT) 仍面临一些挑战，在基因编辑方法进入临床领域时，这类基因治疗无法应用于更广泛的疾病。为了确定中国人鱼鳞病的潜在遗传学分子特征，研究人员通过针对所有鱼鳞病相关基因开展了多基因测试，使用下一代测序 (NGS) 进行分析，证明遗传性鱼鳞病是一组不同的角化症，其研究进一步扩大了中国人遗传性鱼鳞病的突变谱和临床表型<sup>[17]</sup>。

遗传病的病理往往比较复杂和棘手，编码每个人的 DNA 序列包含在线粒体基因组、核基因组和微生物宏基因组中，这些疾病的诊断主要围绕下一代 DNA 测序技术的应用<sup>[39]</sup>。然而，将特定的基因诊断转化为靶向基因治疗仍然是未来努力的目标。

### 1.3.4 肿瘤基因诊断

在治疗癌症方面，合成生物学可克服诸如缺乏理想的靶向肿瘤抗原、肿瘤介导的免疫抑制和严重毒性等诸多挑战，并创造出更有效的适应性疗法，使药物能够特异性靶向癌细胞，同时保留健康细胞<sup>[18]</sup>。在癌症的早期阶段，当它还在局部时就进行检测，可以改善病人对大多数癌症类型的医疗干预措施的即时反应。与传统的小分子或生物制剂不同，合成生物学支持的适应性基因回路可以感知多种疾病特征，整合这些信息做出决定，触发组合治疗机制，并被外源性调节，从而允许精确控制治疗的时间、持续时间和定位。筛查工具在降低死亡率方面的成功，极大地激发了人们对早期检测新方法的研究兴趣。嵌合抗原受体 (CAR) T 细胞治疗是临床应用中最有前途的抗癌方法之一<sup>[19]</sup>，在这种策略中，由抗原识别、信号传递和共刺激域组成的合成受体被用来重新编

程T细胞,对靶向肿瘤细胞进行破坏,目前的研究重点是利用传统的CRISPR-Cas9系统或新型编辑器对CAR-T细胞进行精确基因工程改造,将治疗性转基因导入特定的基因组位点,并生成可重复安全和有效的异体通用CAR-T细胞产品,用于按需癌症免疫治疗<sup>[20]</sup>。

合成生物学领域的稳步发展使科学家能够使用基因工程细胞,而不是小分子或生物制品,作为开发新型疗法的基础,利用合成生物学设计基于细胞的治疗药物的策略正在迅速发展,对于开发各种人类疾病的有效治疗方法具有很广阔的前景。

### 1.3.5 基因突变的检测

识别单核苷酸突变的能力对于探测细胞生物学和精确检测疾病至关重要。然而,单碱基变化所提供的杂交能量的微小差异使得在活细胞和复杂的反应环境中识别这些突变具有挑战性。Fan等<sup>[21]</sup>报告了一类新设计的原核生物核糖核酸调节剂,它在体内和无细胞转录-翻译反应中提供了超特异性的RNA检测能力。这些单核苷酸特异性可编程核糖核酸调节剂(SNIPRs)在大肠杆菌中对不同单核苷酸的目标RNA的反应中提供了超过100倍的基因表达差异,并在体外解决了单表观转录组标记。通过利用可编程的SNIPR设计,研究人员实现了一种自动设计算法,以开发与癌症、耐药性和遗传性疾病相关的一系列突变的核糖核酸调节器。将SNIPRs与便携式纸质无细胞反应相结合,可以方便地在临床样本中进行癌症相关突变的等温检测,并通过明确的比色反应鉴定ZIKV病毒菌株。

## 2 下一代CRISPR基因诊断技术介绍

### 2.1 CRISPR系统简介

CRISPR系统是一种高效的基因编辑工具,适用于自然发生的细菌免疫系统,与一种名为Cas蛋白的相关蛋白(如Cas9、Cas12和Cas13)协同工作,用于靶向和操纵核苷酸序列中特定位点的脱氧核糖核酸(DNA)<sup>[40]</sup>。使用CRISPR-Cas系统进行基因组编辑需要一种被称为引导核糖核酸

(gRNA)的重要成分,它协助CRISPR复合物切割目标。通过修改它们的DNA序列,CRISPR-Cas系统具有治疗不可治愈的遗传疾病的潜力,此外,CRISPR-Cas9工具还可以用于生成受基因调控的动物模型,用于药物的发现和开发以及病原体检测<sup>[41]</sup>。在1987年CRISPR首次被报道后,该技术已经逐步发展,目前,CRISPR-Cas9技术介导的基因实验可以在各种模型上进行,如植物、酵母、秀丽隐杆线虫、果蝇、斑马鱼、小鼠和人类<sup>[42]</sup>。CRISPR技术作为一种稳定、高效、简单、广泛使用的基因编辑技术,在短短几年内迅速出现并发展,对医学的许多领域产生了重大的影响,包括遗传学、肿瘤学和传染病<sup>[43]</sup>。

### 2.2 CRISPR系统原理及分类

CRISPR-Cas系统有三个主要阶段:适应、表达和干扰(图2)。在第一阶段,CRISPR位点通过插入新的间隔序列来适应外来病毒的入侵。在表达过程中,Cas基因被表达,CRISPR序列被转录成一个前体crRNA(Pre-crRNA)。Pre-crRNA通过Cas蛋白等辅助因子的参与转化为成熟的crRNA。随后目标病毒DNA在crRNA和Cas蛋白的联合作用下被识别和破坏<sup>[40]</sup>。

CRISPR-Cas系统分为两类(第1类和第2类),应用最广泛的核酸检测工具如Cas9、Cas12、Cas13和Cas14属于第2类系统。Cas9是应用最广泛的基因组编辑工具,是第一个在原核细胞外使用并在哺乳动物细胞中重新编程进行基因组编辑的工具<sup>[44]</sup>。最近,Wang等<sup>[45]</sup>将CRISPR/Cas9与侧流免疫分析方法结合,开发了CRISPR/Cas9介导的横向流动核酸检测(CASLFA),用于鉴定单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)和非洲猪瘟病毒(ASFV),在1h内检测到数百份基因组样本的高特异性。

作为第2类系统中的V型系统,Cas12a在DNA靶点产生一个5'突出的交错切割,不使用反转录激活的crRNA,与Cas9产生钝端相比,Cas12a产生交错端可能有利于精确定向整合DNA序列等应用,此外,Cas12a可以切割crRNA阵列,生成自己的crRNA<sup>[46]</sup>。基于Cas12a的检测系统

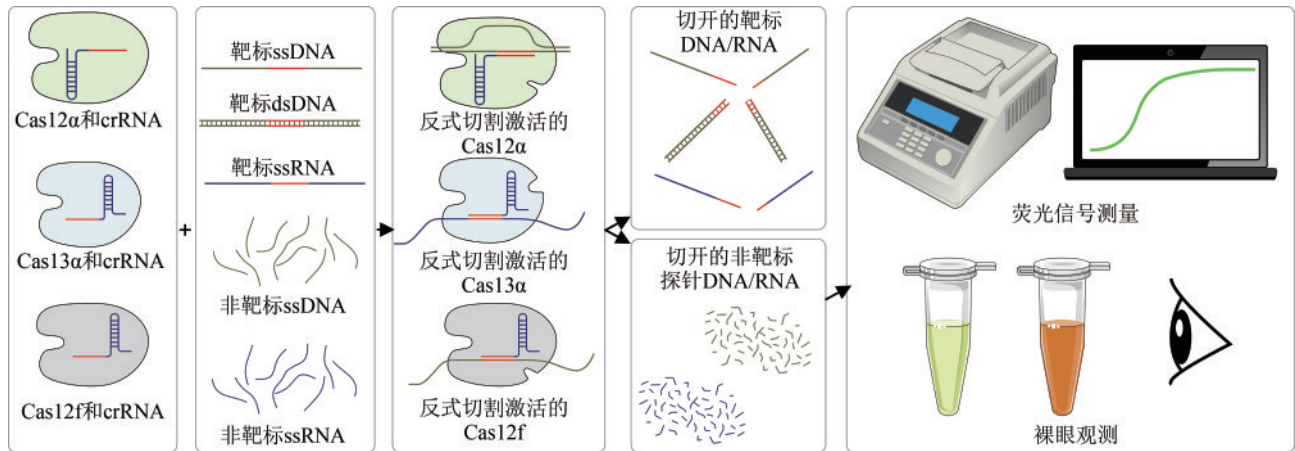


图2 CRISPR 基因诊断原理示意图

Fig. 2 Schematic diagram for CRISPR genetic diagnostics principles

HOLMES 通过 RPA 或 RT-RPA 等温扩增目标核酸，然后结合 Cas12a sgRNA 复合物，触发 ssDNA 荧光基团报告基因的裂解，产生荧光信号。HOLMES 用于检测 DNA 和 RNA 病毒，区分具有高特异性的菌株<sup>[47-48]</sup>。CRISPR 诊断技术利用反式切割活性，在诊断敏感性、特异性、便捷性和灵活性方面显示出巨大的潜力。然而，由于缺乏对 Cas 酶反式切割活力单位的标准化定义，现有的 CRISPR-Dx 系统难以标准化，这无疑阻碍了 CRISPR-Dx 产业的发展，为了解决这个问题，Lv 等<sup>[49]</sup>系统地优化了 Cas12a 的反应体系，然后定义了它的反式裂解单位 (transU)，这项工作对基因诊断行业具有重要的意义。随着该领域的研究不断成熟，CRISPR/Cas 系统有潜力应用于下一代基因诊断技术<sup>[50]</sup>。

### 2.3 CRISPR 基因诊断技术在合成生物学中的应用

在过去的几十年里，在世界范围内爆发了许多疫情，包括寄生虫、真菌、细菌和病毒感染，合成生物学的进展为检测和预防疾病提供了高效、准确和具有成本效益的平台<sup>[51]</sup>。例如，西非的埃博拉疫情 (2013—2016 年)、2002—2003 年的非典以及最近在全球流行的新型冠状病毒病 (corona virus disease 2019, COVID-19)。针对 SARS-CoV-2 感染者在无症状或症状前期时可能具有高度传染性，Huang 等<sup>[52]</sup>开发了一种基于 CRISPR 的快速、灵敏的 SARS-CoV-2 诊断检测方法，该方法利用定制的 CRISPR Cas12a/gRNA 复合物和荧光探针检测

标准 RT-PCR 或等温重组酶聚合酶扩增 (RPA) 产生的目标扩增子，在未配备 qPCR 诊断所需的实时 PCR 系统的地区可进行灵敏检测。

目前，大多数基于 CRISPR 的诊断依赖于靶点预扩增来达到足够的灵敏度以用于临床应用，这限制了定量能力同时也增加了反应的复杂性。Broto 等<sup>[53]</sup>展示了基于 CRISPR-Cas 反应与纳米酶连接的免疫吸附试验的结合，这使得研究人员能够在室温下通过催化金属纳米颗粒 (CrisprZyme) 定量和比色显示出 Cas13 介导的 RNA 检测。CrisprZyme 很容易适应基于侧向流动的试纸条显示出不同的 Cas 酶，并能够感知非编码 RNA，包括 microRNA、长非编码 RNA 和环状 RNA。研究人员成功利用这个平台来识别急性心肌梗死患者，并监测前列腺癌患者的体外和组织活检中的细胞分化。

同时一些等温 DNA 扩增技术声称是需求点 point-of-need (PON) 应用的理想选择，因为它们可以使用单一温度的热源 (如水浴) 进行反应。Zou 等<sup>[54]</sup>研究了几种等温扩增方法，重点是操作简单、成本低、灵敏度高和可重复，以确定最适合于低资源 PON 应用的方法。一些方法被认为是不合适的，因为它们要么涉及多个温度培养，要么相对昂贵，要么需要相对大量的目标 DNA 进行扩增。在所研究的方法中，环路介导的等温扩增 (LAMP) 和重组酶聚合酶扩增 (RPA) 被认为是最适合 PON 应用的方法，因为它们都是单步方法，提供高度敏感和可重复的扩增。加入环状引物后，LAMP 反应的速度大大提高，而环状引物的存在和

核苷酸对自由镁离子的封存也提高了扩增速度。虽然 RPA 和 LAMP 都有一些缺点,但无论哪种等温技术都可以用最少的设备可靠地用于现场诊断。如 SHERLOCK 和 HOLMES 技术利用了 CRISPR-Cas 效应器的不可预测的体外特性,将激活的核酸酶转化为特定核酸结合反应的基本放大器。这些效应器可以连接到多种报告器上,并与等温扩增方法结合使用,以实现在多种场合部署灵敏的基因检测。尽管尚处于起步阶段,但 SHERLOCK 和 HOLMES 技术是快速检测和识别传染病的潜在方法,具有不需要复杂处理的超灵敏检测能力<sup>[55]</sup>。

基于 CRISPR 的超灵敏诊断法,可用于现场检测有症状和无症状疟疾中的疟原虫种类。无症状的疟原虫携带者阻碍了疟疾的控制和根除,实现根除疟疾需要对低寄生虫密度感染(每微升血液中小于 100 个寄生虫)进行高度敏感的诊断,并在资源有限的环境中发挥作用。非恶性疟疾也缺乏敏感的护理点诊断,其特点是感染密度较低,可能需要额外的治疗才能彻底治愈。分子方法,如 PCR,具有很高的灵敏度和特异性,但对于 RLS 来说仍然是不切实际的高难度技术。Lee 等<sup>[56]</sup>描述了一种基于 CRISPR 的诊断方法,用于超灵敏地检测和区分恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫和疟疾疟原虫。该团队提出了一种简化的、适用于现场的诊断方法,包括 10 min 的 SHERLOCK 寄生虫快速提取方案,然后用 SHERLOCK 检测 60 min,通过荧光或侧流免疫分析读出进行疟原虫物种特异性检测。优化了一锅式、冻干式、等温式检测,并采用了独立于核酸提取的简化样品制备方法,结果显示这些检测方法能够检测到每微升血液中低于两个寄生虫,这是世界卫生组织建议的检测极限。这项工作为无症状携带者的超灵敏检测建立了一种现场适用的诊断方法,也为非恶性疟疾物种和低寄生虫密度的恶性疟原虫感染建立了快速的临床诊断方法。

图 3 示出了 CRISPR 基因诊断的应用。

## 2.4 CRISPR 技术未来展望

与 ZFN 和 TALEN 相比,CRISPR 技术效率高、成本低、使用方便,被认为是基因编辑最强大的

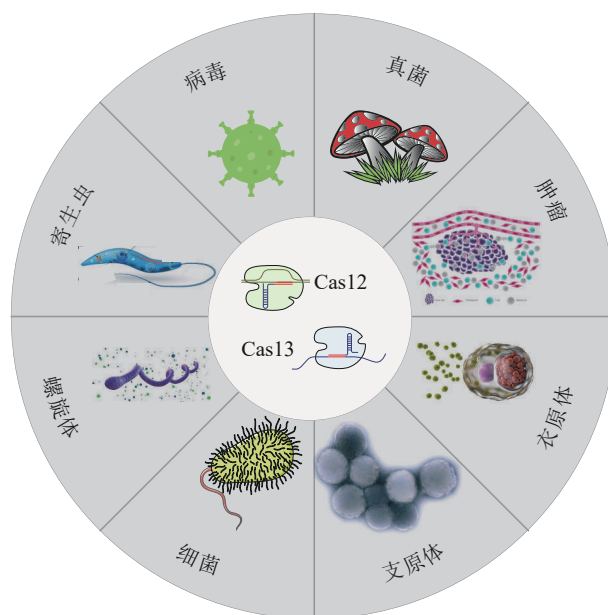


图 3 CRISPR 基因诊断的应用

Fig. 3 Applications of CRISPR genetic diagnostics

工具之一。CRISPR 技术已经彻底改变生物学研究,作为靶向简单或复杂生物体中特定基因序列的首选方法。虽然在提高其效率和目标特异性方面已经取得了重大进展,但仍需要做更多的工作来对其进行持续的改进,比如降低脱靶概率。此外,Cas9/gRNA 表达水平过高和表达持续时间过长也会带来额外风险。尽管 CRISPR 系统的一些局限性限制了它的更广泛应用,但目前仍有大量研究工作正在开发不同的策略来提高其编辑人类、动物和植物细胞的有效性<sup>[57]</sup>。

## 3 基因诊断中用到的合成生物学装置和技术

生物传感器可以在环境监测、病原体检测和生物标志物诊断中实现广泛的应用。虽然传统的诊断平台,如化学传感器和基于 PCR 的检测,能够在实验室条件下进行高灵敏度的检测,但其配置、生产成本和操作要求并不适合在实验室之外的应用。合成生物学、生物电子学和材料科学的最新进展为创建新型微生物传感设备铺平了道路,这些设备将合成生物传感器与最先进的部署平台相结合,创造出独特的生物传感器产品。

### 3.1 嵌入合成生物传感器的可穿戴材料

可穿戴设备通过利用各种物理、化学和生物传感器，以无创或微创的方式实时挖掘生理信息，为临床诊断提供了一种替代途径<sup>[58]</sup>。这些传感器可以以眼镜、珠宝、面罩、腕表、健身带、类似纹身的装置、绷带或其他贴片以及纺织品的形式佩戴。智能手表等可穿戴设备已经证明了其通过生物物理信号对各种疾病（如 COVID-19 和帕金森病）的进展和治疗进行早期检测和监测的能力。下一代可穿戴式传感器能够实时和连续地对物理参数和生化标记物进行多模式或多重测量，这可能是一项变革性的诊断技术，可以对个人的健康状况进行高分辨率的时间记录。

将合成生物学整合到可穿戴设备中可以扩大对生理状态、疾病状态和病原体或毒素暴露的无创监测。然而，合成电路的运行通常需要有活的、工程化的细菌存在，这限制了它们在可穿戴设备中的应用。Nguyen 等<sup>[59]</sup>报告了用冻干的无细胞合成电路（包括基于 CRISPR 的工具）功能化的轻质、灵活的基质和纺织品，可以检测代谢物、化学品和病原体核酸信号。这些可穿戴设备在水溶液中重新水化时被激活，并通过比色法或通过检测荧光和发光输出的光纤网络报告特定分子目标的存在，对核酸的检测极限可与目前的实验室方法（如定量 PCR）相媲美。同时展示了一种带有冻干 CRISPR 传感器的面罩的开发，用于在室温下 90 min 内对 SARS-CoV-2 进行可穿戴的无创检测，除按下一个按钮外不需要额外的用户干预（图 4）<sup>[59]</sup>。该平台是对基于细胞的合成生物学传感器的补充。

实现可穿戴的生物传感器，这些传感器具有稳定性、基因可编程性和高度敏感性。目前，这项技术确实存在一些限制，包括传感器的一次性使用特性，此外，它无法在某些特定环境条件下工作，如高湿度或水下。但这些挑战并非该技术所独有，其他传感器也需在开放的环境下操作，并需要进一步的技术研究来克服这些限制。

### 3.2 无细胞传感器

生物传感器是一种检测工具，它整合了传感器模块的生物识别元素，并将信号转变成快速、可测量的反应。便携式生物传感器可以对慢性病进行密切监测，适用于对临床人群的实时评估，能更精确地确定临床结果。此外，生物传感器是在低资源环境下进行现场诊断的特别有前途的工具。在大量可用的技术中，无细胞表达系统最近有希望成为多功能生物传感器工程的候选者，因为它们支持复杂的基因线路的运行，同时需要的反应量小<sup>[60]</sup>。与全细胞生物传感器相比，无细胞系统可以检测像核酸这样不穿过细胞膜的分子，以及通常对活细胞有毒的分子。除了具有非生物性和非复制性、几乎不需要生物隔离措施外，无细胞表达系统也不会承受改变全细胞生物传感器的进化压力。反应可以在环境温或体温下发生，例如通过将传感器贴在皮肤上，在检测点上免除了像培养箱这样的设备。通过改变提取物和质粒的组成，很容易调整性能，蛋白质的表达量可以通过大量的方法进行优化。无细胞生物传感器可以冻干并在室温下保持稳定达 1 年之久，并可在短

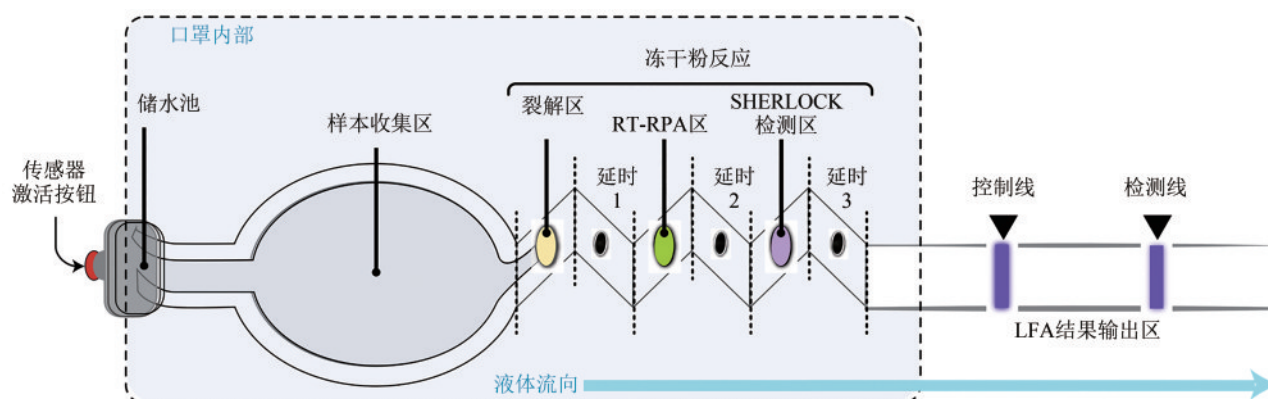


图 4 可穿戴式集成 SARS-CoV-2 检测功能的口罩工作原理示意图<sup>[59]</sup>

Fig. 4 Schematic diagram for the working principle of masks integrated with SARS-CoV-2 detection functions<sup>[59]</sup>

短1 h内提供快速反应。工程化的无细胞转录和翻译系统与电化学平台的结合进一步实现了多重生物标志物检测<sup>[61]</sup>。向更广泛的临床样本开放无细胞生物传感器，并通过系统优化确保其可靠性，将有助于提供便携式、低成本的诊断工具，以应对全人类的健康威胁。

### 3.3 基因电路和化学反应网络

微生物群在健康和疾病中的作用正吸引着研究人员的注意力，他们寻求将微生物用于诊断和治疗的技术。合成生物学的最新进展可能使我们能够剖析宿主-微生物群的相互作用。研究人员已经为在人类肠道中占主导地位的稳定的共生细菌开发了能够感知、计算、记忆和响应信号的复杂的基因线路。

生物体利用复杂的化学反应网络(CRN)来执行高度复杂的任务，如自组织和导航，具有这种信息处理功能的合成CRN的发展可以为基因诊断、智能治疗、主动分离和适应性材料的进一步发展带来机会。Lai等<sup>[62]</sup>开发了一种非线性DNA I/O控制器，为使用DNA作为具有复杂动态行为的合成CRN的可能分子提供了若干见解。值得注意的是，他们提出的共生合作性策略显示了通过对DNA序列的编程进行调节的更丰富和更精细的手段，特别是与下游过程的结合可以对Sigmoidal模块的超敏特征产生实质性的变化，使原本不对称和适度超敏的模块能够构建出高度超敏的装置。通过该方法得到的编程CRN可以随意表现出对不同复杂程度的配体的动态反应，这可能为智能基因诊断和治疗带来机会。Kim等<sup>[63]</sup>引入了一种合成细胞-细胞黏附逻辑，并建立了多细胞界面模式的精确工程、预测模型和算法编程。通过成群的黏附机制、对界面几何的定量控制以及利用黏附介导的发育组织者和形态生成场的类似物来演示界面的生成，利用平铺和四色映射概念，确定了用于创建通用目标图案的算法。这种合成的四位粘连逻辑推进了实际应用，如人类可读的分子诊断、生物表面的空间流体控制和可编程的自生长材料。

快速、准确地检测SARS-CoV-2的RNA和

感染该病毒的宿主血清抗体将有助于确定患有COVID-19、曾感染该病毒或接种过该病毒疫苗的人的免疫状况。Najjar等<sup>[64]</sup>描述了一种3D打印芯片的开发和应用，它通过多路电化学输出，可在2 h内同时检测唾液中的SARS-CoV-2 RNA以及血浆中的抗SARS-CoV-2免疫球蛋白。该设备可以从未经处理的唾液中提取、浓缩和扩增SARS-CoV-2 RNA，并将基于Cas12a的酶检测与酶联免疫吸附法相结合，在使用了SARS-CoV-2的刺突S1、核衣壳和受体结合域抗原功能化电极上进行(图5)<sup>[64]</sup>。廉价的微流控电化学传感器用于在多通道即时诊断，可能有助于对新冠病毒感染和免疫的广泛监测。

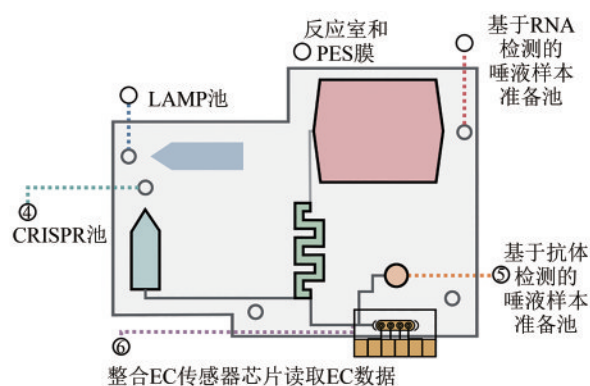


图5 微流控芯片多路电化学传感器原理示意图<sup>[64]</sup>

Fig. 5 Schematic diagram for multi-channel electrochemical sensor developed on microfluidic chip<sup>[64]</sup>

### 3.4 细胞试剂生产技术的应用

在细菌中过量生产酶，然后将其冻干，会产生“细胞试剂”，可直接用于进行分子生物学反应<sup>[65]</sup>。细胞试剂在各种基因诊断中的应用，如TaqMan qPCR，其灵敏度没有降低。在合成生物学的基石中，如DNA片段的Gibson组装，只需添加细胞试剂就可以构建新的质粒。细胞试剂大大降低了生产、储存和实施的复杂性和成本，这些特点有助于在资源匮乏条件下细胞试剂的获取和使用。

在生物技术、医疗研究和教育领域常用的大多数分子生物学技术在很大程度上依赖于纯化的功能蛋白试剂。例如，核酸扩增和基因编辑，基因诊断和合成生物学的基石通常依赖于纯化的

DNA和RNA聚合酶、核苷酸和连接酶的活动。然而，这些蛋白质试剂的纯化需要大量的时间、专业知识、设备和基础设施的投资，目前主要是在工业规模上进行。例如，需要培养大批量（几百毫升到几十升）的表达蛋白质的细菌培养物，随后使用一套复杂的程序来处理，以裂解细菌并将感兴趣的蛋白质从不需要的细菌和提取缓冲液中分离出来。为了促进这些生产渠道，通常需要对蛋白质进行标记修饰，以便在处理后将它们去除，这会给纯化过程增加额外的步骤，使其变得复杂。此外，大多数需要的蛋白质需要保持在稳定的冷链中（4~8 °C），这不仅提高了纯化和储存的基础设施成本，而且还对运输和使用点的储存提出了要求。

因此，蛋白质试剂的可负担性和可获得性会受到很大限制，特别是在资源贫乏或偏远地区。相反，简化这些酶和蛋白质的生产、运输和储存，有可能减少应用所需的成本、时间、专业知识和基础设施，从而提高可及性。简化蛋白质试剂的生产和使用方法有助于促进小规模局部生产的发展。为了提高世界范围内分子生物学试剂的可负担性和应用性，研究人员已经开发了一些方法，通过消除蛋白质纯化来简化试剂的生产，相反，使用冻干细菌作为“细胞试剂”。与纯化的同类试剂相比，这些细胞试剂不仅性能极好，而且在环境温度下长期稳定，细胞试剂的表现与纯化的试剂相当，扩增效率、检测限和结果、时间都与用纯酶进行的相同反应相当。

#### 4 存在的问题和面临的挑战

合成生物学被描述为以工程科学为基础的生物技术的一个新领域。然而，从诞生之日起，合成生物学的每一步前沿进展都伴随着人们对其安全风险和伦理问题的高度关注。首先是研究人员错误使用合成生物学技术带来的安全风险：一是在一项新技术发展的初期，研究人员往往因盲目追求预期效果而急功近利、误入歧途；二是研究人员目前尚无法准确预知合成生物学技术的潜在风险与未知后果；三是合成生物学作为新兴科技，其技术发展往往超前于行政监管和法律规范的进

程。2018年，覃重军团队<sup>[66]</sup>使用CRISPR-Cas9基因编辑技术创建了第一个具有单个线性染色体的真核生物（SY14酵母）。这项合成生物学研究展示了一种探索真核生物进化的染色体结构和功能的方法，但同时也激起公众对于科学家人为创造非自然生命的想象和期待，再次引发了人们对合成生物学安全与伦理问题的广泛关注。

尽管合成生物标志物这一新生领域充满希望，但研究者目前对一些疾病发病机制的了解仍存在空白，需要在解决技术挑战以指导未来发展的同时加以填补。特别是对疾病发生早期的生物学以及前体病变了解仍然有限，但传感器工程策略往往需要此类信息作为指导，这突显了合成生物领域对疾病早期基因诊断的挑战。

在肠道微生物检测领域，由于饮食的高度复杂性，了解饮食材料的组成和功能与对肠道微生物群的影响之间的关系仍然是一个重大挑战。回答这些问题将有助于更好地设计用于治疗肠道微生物相关疾病的材料 and 治疗方法。人类的肠道微生物群是非常复杂、多样和动态的，此外，人类肠道微生物群的大多数物种需要高度特定的培养条件，而且没有在体外培养过。所以全面分析肠道微生物群及其与宿主的交流是极具挑战性的。因此，各种高通量技术已经被开发出来以应对这一挑战。例如，元基因组学、元转录组学和代谢组学已经为剖析肠道微生物群提供了很好的工具。然而，仅靠分类学构成不足以了解微生物途径。关于微生物群物种的空间和时间分布、遗传学、蛋白质、代谢物及其相关的微生物途径和宿主-微生物群相互作用的关键信息在很大程度上仍然缺失，但上述信息对真正理解人类生理学至关重要。使用益生菌补充剂和粪便微生物群移植来治疗人类消化道疾病，引发了人们对工程化肠道共生菌在活体诊断和治疗方面的兴趣<sup>[67]</sup>。随着基因组编辑、DNA合成和测序以及基因电路设计自动化的不断进步，我们能够快速有效地构建人工基因电路，使肠道共生生物体能够感知和响应体内环境信号。然而，挑战依然存在，这些挑战主要与对微生物群的动态和功能及其与人类宿主的相互作用的机制理解不足有关，特别是对消化道疾病。

CRISPR基因诊断方法容易适应，高度特异，

适合在 POCT (临床现场检测) 使用。然而, 仍有一些限制, 比如严重依赖等温扩增步骤来提高灵敏度, 一般来说, 灵敏度比同等的 qPCR 测试低。尽管 SHERLOCK 有更高的灵敏度的报道, 但这只针对某些目标, 而且需要使用更大的样本输入和扩增反应量, 这增加了成本, 在大多数情况下是不现实的。由于交叉抑制作用, 目前批准的诊断方法通过使用单独的扩增和检测步骤来最大限度地提高敏感性, 这增加了交叉污染和处理错误的风险。

各种交叉技术, 包括生物正交化学、CRISPR/Cas 和合成基因电路, 为研究人员提供了设计强大的新一类诊断测试的工具。作为一类新兴技术, 必须对这些技术的相对优势和劣势进行评估。展望未来, 基因诊断的持续验证和技术发展对于达到临床使用所需的性能至关重要。一些技术策略, 包括通过高通量筛选或靶向化学和信号复用来优化探针, 可以设计出具有高疾病特异性所需分类能力的更具选择性的检测。此外, 将机器学习应用于基因诊断中产生的化学或生物信号, 单独或与其他方式结合, 将提供前瞻性的统计分类器, 在独立的队列中进行验证。本文中描述的新兴诊断工具必须经过严格的基准测试, 包括在临床前和临床层面与标准测试进行比较, 以确保其具有足够的灵敏性和特异性。

### 参 考 文 献

- [1] TAN X, LETENDRE J H, COLLINS J J, et al. Synthetic biology in the clinic: engineering vaccines, diagnostics, and therapeutics[J]. *Cell*, 2021, 184(4): 881-898.
- [2] ZHOU T Y, LI R, ZHANG S T, et al. A copper-specific microbial fuel cell biosensor based on riboflavin biosynthesis of engineered *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(1): 210-222.
- [3] HUI C Y, GUO Y, WU J, et al. Detection of bioavailable cadmium by double-color fluorescence based on a dual-sensing bioreporter system[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 696195.
- [4] TRIVIÑO-VALENCIA J, LORA F, ZULUAGA J D, et al. Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia[J]. *Parasitology Research*, 2016, 115(5): 1789-1797.
- [5] PINTO-DUARTE V A, HÉRNANDEZ-ARANGO N M, MARIN-GALLEGO B J, et al. Detection of *Giardia duodenalis* and *Toxoplasma gondii* in soil and water samples in the Quindío River Basin, Colombia[J]. *Food and Waterborne Parasitology*, 2022, 28: e00175.
- [6] BAE K S, LEE S W, LEE J Y, et al. Development of diagnostic systems for wide range and highly sensitive detection of two waterborne hepatitis viruses from groundwater using the conventional reverse transcription nested PCR assay[J]. *Journal of Virological Methods*, 2022, 299: 114344.
- [7] JIA J, GUAN Y J, CHENG M Q, et al. Occurrence and distribution of antibiotics and antibiotic resistance genes in Ba River, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 642: 1136-1144.
- [8] AHMED W, GYAWALI P, HAMILTON K A, et al. Antibiotic resistance and sewage-associated marker genes in untreated sewage and a river characterized during baseflow and storm-flow[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 632850.
- [9] CHEN X J, WANG B J, THOMPSON I P, et al. Rational design and characterization of nitric oxide biosensors in *E. coli* Nissle 1917 and mini SimCells[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(10): 2566-2578.
- [10] TAKAHASHI M K, TAN X, DY A J, et al. A low-cost paper-based synthetic biology platform for analyzing gut microbiota and host biomarkers[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3347.
- [11] TAKAHASHI M K, TAN X, DY A J. Cell-free paper-based analysis of gut microbiota and host biomarkers[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2022, 2433: 351-374.
- [12] MAO N, CUBILLOS-RUIZ A, CAMERON D E, et al. Probiotic strains detect and suppress cholera in mice[J]. *Science Translational Medicine*, 2018, 10(445): eaao2586.
- [13] SCHOOF M, FAUST B, SAUNDERS R A, et al. An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive Spike[J]. *Science*, 2020, 370(6523): 1473-1479.
- [14] RICHNER J M, HIMANSU S, DOWD K A, et al. Modified mRNA vaccines protect against Zika virus infection[J]. *Cell*, 2017, 168(6): 1114-1125.e10.
- [15] MEESING A, RAZONABLE R R. New developments in the management of cytomegalovirus infection after transplantation[J]. *Drugs*, 2018, 78(11): 1085-1103.
- [16] TUCCI F, SCARAMUZZA S, AIUTI A, et al. Update on clinical *ex vivo* hematopoietic stem cell gene therapy for inherited monogenic diseases[J]. *Molecular Therapy*, 2021, 29(2): 489-504.
- [17] CHENG R H, LIANG J Y, LI Y, et al. Next-generation sequencing through multi-gene panel testing for diagnosis of hereditary ichthyosis in Chinese[J]. *Clinical Genetics*, 2020, 97(5): 770-778.
- [18] WU M R, JUSIAK B, LU T K. Engineering advanced cancer therapies with synthetic biology[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2019, 19(4): 187-195.

- [19] SHIMABUKURO-VORNHAGEN A, BÖLL B, SCHELLON-GOWSKI P, et al. Critical care management of chimeric anti-gen receptor T-cell therapy recipients[J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2022, 72(1): 78-93.
- [20] DIMITRI A, HERBST F, FRAIETTA J A. Engineering the next-generation of CAR T-cells with CRISPR-Cas9 gene editing[J]. Molecular Cancer, 2022, 21(1): 78.
- [21] HONG F, MA D, WU K Y, et al. Precise and programmable detection of mutations using ultraspecific riboregulators[J]. Cell, 2020, 180(5): 1018-1032.e16.
- [22] RYLOTT E L, BRUCE N C. How synthetic biology can help bioremediation[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2020, 58: 86-95.
- [23] PARUCH L. Molecular diagnostic tools applied for assessing microbial water quality[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2022, 19(9): 5128.
- [24] YAASHIKAA P R, DEVI M K, KUMAR P S. Engineering microbes for enhancing the degradation of environmental pollutants: a detailed review on synthetic biology[J]. Environmental Research, 2022, 214(Pt 1): 113868.
- [25] THAVARAJAH W, VEROSLOFF M S, JUNG J K, et al. A primer on emerging field-deployable synthetic biology tools for global water quality monitoring[J]. Npj Clean Water, 2020, 3: 18.
- [26] DOU J, BENNETT M R. Synthetic biology and the gut microbiome[J]. Biotechnology Journal, 2018, 13(5): 1700159.
- [27] RAMACHANDRAN G, BIKARD D. Editing the microbiome the CRISPR way[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2019, 374(1772): 20180103.
- [28] MIMEE M, TUCKER A C, VOIGT C A, et al. Programming a human commensal bacterium, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to sense and respond to stimuli in the murine gut microbiota[J]. Cell Systems, 2015, 1(1): 62-71.
- [29] SINGH R P, SHADAN A, MA Y. Biotechnological applications of probiotics: a multifarious weapon to disease and metabolic abnormality[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2022, 14(6): 1184-1210.
- [30] MILLS H, ACQUAH R, TANG N, et al. The use of bacteria in cancer treatment: a review from the perspective of cellular microbiology[J]. Emergency Medicine International, 2022, 2022: 8127137.
- [31] CRESCI G A M, LAMPE J W, GIBSON G. Targeted approaches for *in situ* gut microbiome manipulation[J]. JPEN Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 2020, 44(4): 581-588.
- [32] BOBER J R, BEISEL C L, NAIR N U. Synthetic biology approaches to engineer probiotics and members of the human microbiota for biomedical applications[J]. Annual Review of Biomedical Engineering, 2018, 20: 277-300.
- [33] CAÑEZ C, SELLE K, GOH Y J, et al. Outcomes and characterization of chromosomal self-targeting by native CRISPR-Cas systems in *Streptococcus thermophilus*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2019, 366(9): fnz105.
- [34] KUMAR P, SINHA R, SHUKLA P. Artificial intelligence and synthetic biology approaches for human gut microbiome[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(8): 2103-2121.
- [35] VOORHEES P J, CRUZ-TERAN C, EDELSTEIN J, et al. Challenges & opportunities for phage-based *in situ* microbiome engineering in the gut[J]. Journal of Controlled Release, 2020, 326: 106-119.
- [36] BARANI M, RAHDAR A, SARGAZI S, et al. Nanotechnology for inflammatory bowel disease management: detection, imaging and treatment[J]. Sensing and Bio-Sensing Research, 2021, 32: 100417.
- [37] NJUE F, CHIH S. When to intervene for donor-specific antibody after heart transplantation[J]. Current Opinion in Organ Transplantation, 2019, 24(3): 271-278.
- [38] SU J A, BAXTER-LOWE L A, KANTOR P F, et al. The clinical impact of donor-specific antibodies on antibody-mediated rejection and long-term prognosis after heart transplantation[J]. Current Opinion in Organ Transplantation, 2019, 24(3): 245-251.
- [39] ROTH T L, MARSON A. Genetic disease and therapy[J]. Annual Review of Pathology, 2021, 16: 145-166.
- [40] BHARATHKUMAR N, SUNIL A, MEERA P, et al. CRISPR/Cas-based modifications for therapeutic applications: a review[J]. Molecular Biotechnology, 2022, 64(4): 355-372.
- [41] LIN H F, LI G, PENG X W, et al. The use of CRISPR/Cas9 as a tool to study human infectious viruses[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 590989.
- [42] SHARMA G, SHARMA A R, BHATTACHARYA M, et al. CRISPR-Cas9: a preclinical and clinical perspective for the treatment of human diseases[J]. Molecular Therapy, 2021, 29(2): 571-586.
- [43] KANG K, SONG Y, KIM I, et al. Therapeutic applications of the CRISPR-Cas system[J]. Bioengineering, 2022, 9(9): 477.
- [44] PICKAR-OLIVER A, GERSBACH C A. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019, 20(8): 490-507.
- [45] WANG X S, XIONG E H, TIAN T, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay[J]. ACS Nano, 2020, 14(2): 2497-2508.
- [46] KLEINSTIVER B P, SOUSA A A, WALTON R T, et al. Engineered CRISPR-Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(3): 276-282.
- [47] CHEN J S, MA E B, HARRINGTON L B, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. Science, 2018, 360(6387): 436-439.
- [48] LI S Y, CHENG Q X, WANG J M, et al. CRISPR-Cas12a-as-

- sisted nucleic acid detection[J]. *Cell Discovery*, 2018, 4: 20.
- [49] LV H L, WANG J, ZHANG J, et al. Definition of CRISPR Cas12a trans-cleavage units to facilitate CRISPR diagnostics[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 766464.
- [50] LI Y, LI S Y, WANG J, et al. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(7): 730-743.
- [51] KHAN A, OSTAKU J, ARAS E, et al. Combating infectious diseases with synthetic biology[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(2): 528-537.
- [52] HUANG Z, TIAN D, LIU Y, et al. Ultra-sensitive and high-throughput CRISPR-powered COVID-19 diagnosis[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2020, 164: 112316.
- [53] BROTO M, KAMINSKI M M, ADRIANUS C, et al. Nanozyme-catalysed CRISPR assay for preamplification-free detection of non-coding RNAs[J]. *Nature Nanotechnology*, 2022, 17(10): 1120-1126.
- [54] ZOU Y P, MASON M G, BOTELLA J R. Evaluation and improvement of isothermal amplification methods for point-of-need plant disease diagnostics[J]. *PLoS One*, 2020, 15(6): e0235216.
- [55] MUSTAFA M I, MAKHAWI A M. SHERLOCK and DETECTR: CRISPR-Cas systems as potential rapid diagnostic tools for emerging infectious diseases[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2021, 59(3): e00745-e00720.
- [56] LEE R A, PUIG H, NGUYEN P Q, et al. Ultrasensitive CRISPR-based diagnostic for field-applicable detection of *Plasmodium* species in symptomatic and asymptomatic malaria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(41): 25722-25731.
- [57] MANGHWAR H, LINDSEY K, ZHANG X L, et al. CRISPR/Cas system: recent advances and future prospects for genome editing[J]. *Trends in Plant Science*, 2019, 24(12): 1102-1125.
- [58] KIM J, CAMPBELL A S, DE ÁVILA B E F, et al. Wearable biosensors for healthcare monitoring[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(4): 389-406.
- [59] NGUYEN P Q, SOENKSEN L R, DONGHIA N M, et al. Wearable materials with embedded synthetic biology sensors for biomolecule detection[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(11): 1366-1374.
- [60] RHEA K A, MCDONALD N D, COLE S D, et al. Variability in cell-free expression reactions can impact qualitative genetic circuit characterization[J]. *Synthetic Biology*, 2022, 7(1): ysac011.
- [61] SADAT MOUSAVI P, SMITH S J, CHEN J B, et al. A multiplexed, electrochemical interface for gene-circuit-based sensors[J]. *Nature Chemistry*, 2020, 12(1): 48-55.
- [62] LAI W, XIONG X W, WANG F, et al. Nonlinear regulation of enzyme-free DNA circuitry with ultrasensitive switches[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(9): 2106-2112.
- [63] KIM H, SKINNER D J, GLASS D S, et al. 4-Bit adhesion logic enables universal multicellular interface patterning[J]. *Nature*, 2022, 608(7922): 324-329.
- [64] NAJJAR D, RAINBOW J, SHARMA TIMILSINA S, et al. A lab-on-a-chip for the concurrent electrochemical detection of SARS-CoV-2 RNA and anti-SARS-CoV-2 antibodies in saliva and plasma[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2022, 6(8): 968-978.
- [65] BHADRA S, POTHUKUCHY A, SHROFF R, et al. Cellular reagents for diagnostics and synthetic biology[J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0201681.
- [66] SHAO Y Y, LU N, WU Z F, et al. Creating a functional single-chromosome yeast[J]. *Nature*, 2018, 560(7718): 331-335.
- [67] OOIJEVAAR R E, TERVEER E M, VERSPAGET H W, et al. Clinical application and potential of fecal microbiota transplantation [J]. *Annual Review of Medicine*, 2019, 70: 335-351.



**通讯作者：**顾大勇(1972—)，男，博士，主任技师，博士生导师、博士后合作导师。研究方向为生物芯片、生物传感技术。

E-mail: wanhood@163.com



**第一作者：**吕海龙(1988—)，男，博士，博士后。研究方向为合成生物学及CRISPR分子诊断技术开发。

E-mail: lvhailong8828@163.com