

· 实验研究 ·

基于单管式 MIRA-CRISPR/Cas12a 系统对眼内液 HSV 或 VZV 快速检测方法的建立与验证

薛智家¹ 钱升¹ 李希睿¹ 李魁雁^{1,2} 乔磊³

¹徐州医科大学第二临床医学院, 徐州 221004; ²徐州医科大学附属徐州市立医院, 徐州 221116; ³徐州市第一人民医院中心实验室, 徐州 221116

通信作者: 乔磊, Email: leiqiao@whu.edu.cn

【摘要】 **目的** 基于多酶恒温扩增(MIRA)联合成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)/Cas12a 反式切割系统,建立一种快速、特异、灵敏检测眼内液中单纯疱疹病毒(HSV)或水痘-带状疱疹病毒(VZV)的新方法并进行评价。**方法** 以 HSV-UL27 和 VZV-ORF28 保守基因序列为检测靶标并构建标准质粒,分别设计特异性扩增引物和 CRISPR RNA (crRNA);建立 MIRA 体系并筛选 MIRA 最佳引物组合和最佳单链 DNA (ssDNA)报告探针序列;建立 CRISPR/Cas12a 检测体系并优化 Cas12a 与 crRNA 的最佳浓度和比例以及 ssDNA 最佳浓度;建立单管式 MIRA-CRISPR/Cas12a 检测方法,并对其检测限与特异性进行评价;收集 2023 年 1~12 月在徐州市第一人民医院经实时定量 PCR (qRT-PCR)检测 HSV/VZV 的房水或玻璃体核酸提取液样本 111 份,评价本检测方法与时定量 PCR (qRT-PCR)方法的一致性。**结果** 本研究建立的单管式 MIRA-CRISPR/Cas12a 检测方法,可在 37 °C 恒温条件下,于 45 min 内完成;该方法检测灵敏度高且特异性强,针对 HSV 和 VZV 的最低检测限分别为 1 和 10 拷贝/ μ l;HSV 和 VZV 检测与腺病毒,EB 病毒,巨细胞病毒,人类疱疹病毒 6、7 和 8 型无交叉反应性。在眼内液临床样本检测中,本方法对 HSV 的检测灵敏度为 94.12%,特异度为 92.50%,总符合率为 92.98%,与 qRT-PCR 检测法高度一致 ($\kappa=0.838$);本方法对 VZV 的检测灵敏度为 94.73%,特异度为 100%,总符合率为 98.15%,与 qRT-PCR 检测法完全一致 ($\kappa=0.959$)。**结论** 本研究成功建立的单管式 MIRA-CRISPR/Cas12a 核酸检测方法,可快速灵敏且特异性地检测眼内液中 HSV 或 VZV,其性能与 qRT-PCR 法相一致,为病毒性眼病的实验室检测提供了一种新方法。

【关键词】 房水; 玻璃体; 单纯疱疹病毒; 水痘-带状疱疹病毒; 感染性眼病; 多酶恒温扩增; CRISPR/Cas12a

基金项目: 江苏省自然科学基金 (BK20221219); 江苏省大学生创新创业训练计划 (202310313040Z)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20250421-00130

Development and validation of a rapid detection method for HSV or VZV in intraocular fluid based on a single-tube MIRA-CRISPR/Cas12a system

Xue Zhijia¹, Qian Sheng¹, Li Xirui¹, Li Suyan^{1,2}, Qiao Lei³

¹The Second Clinical Medical School, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China; ²Affiliated Xuzhou Municipal Hospital, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221116, China; ³Central Laboratory, Xuzhou First People's Hospital, Xuzhou 221116, China

Corresponding author: Qiao Lei, Email: leiqiao@whu.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish and evaluate a novel method for rapid detection of herpes simplex virus (HSV) or varicella-zoster virus (VZV) in intraocular fluid based on single-tube multienzyme isothermal rapid amplification (MIRA) combined with the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas12a trans-cleavage system. **Methods** The conserved gene sequences HSV-UL27 and VZV-ORF28 were selected as detection targets, and standard plasmids were constructed. Specific amplification primers and CRISPR RNA (crRNA) were designed. The MIRA system was established to screen the optimal primer combinations and the single-stranded DNA (ssDNA) reporter probe sequences. The CRISPR/Cas12a detection system was optimized to determine the optimal concentrations and ratios of Cas12a to crRNA, as well as the optimal ssDNA concentration. A single-tube MIRA-CRISPR/Cas12a detection method was developed, and its limit of detection (LOD) and specificity were evaluated. Total 111 samples of nucleic acid extracted from intraocular fluids (aqueous humor or vitreous) were collected at Xuzhou First People's Hospital from January to December 2023 in Xuzhou First People's Hospital. These

samples were tested to assess the consistency between this method and quantitative real-time PCR (qRT-PCR). This study was approved by the Ethics Committee of Xuzhou First People's Hospital (No. xyyl[2021]104). **Results** The single-tube MIRA-CRISPR/Cas12a detection method established in this study could be completed within 45 minutes under isothermal conditions at 37 °C. The method demonstrated high sensitivity and specificity, with LODs of 1 copy/ μ l for HSV and 10 copies/ μ l for VZV. The detection of HSV and VZV had no cross-reaction with adenovirus, EB virus, cytomegalovirus, and human herpesvirus types 6, 7, and 8. In the detection of clinical samples, compared with the qRT-PCR, this method demonstrated a sensitivity of 94.12% and specificity of 92.50% for HSV detection, with an overall agreement rate of 92.98%, showing high concordance with qRT-PCR ($\kappa=0.838$). For VZV detection, this method achieved a sensitivity of 94.73% and specificity of 100%, with a total concordance rate of 98.15% ($\kappa=0.959$). **Conclusions** This successfully developed single-tube MIRA-CRISPR/Cas12a nucleic acid detection method can provide rapid, sensitive, and specific detection of HSV and VZV in intraocular fluid with performance comparable to qRT-PCR, and provide a novel approach for laboratory detection of viral eye diseases.

[Key words] Aqueous humor; Vitreous body; Herpes simplex virus; Varicella-zoster virus; Infectious ocular diseases; Multienzyme isothermal rapid amplification; CRISPR/Cas12a

Fund program: Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20221219); Jiangsu Training Program of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduate (202310313040Z)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20250421-00130

病毒作为一种常见病原体,可感染眼部多种组织并引发严重炎症反应^[1]。单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)是眼部感染常见病毒^[2],分为 HSV-1 型和 HSV-2 型,其中引起眼部感染的 HSV 主要为 HSV-1 型,可导致疱疹性基质角膜炎、葡萄膜炎、结膜炎等^[3]。HSV-2 型引起眼部感染的情况较少,但也可导致严重的眼部病变。水痘-带状疱疹病毒(varicella-zoster virus, VZV)则主要引起单侧皮肤疱疹、角膜及眼内炎症^[4]。由于眼部组织具有相对免疫赦免特性,病毒感染后难以有效控制,容易引发严重的视力损害甚至致盲^[5]。同时,病毒与其他病原体感染导致的眼病症状和体征易混淆,容易造成误诊或漏诊^[6]。因此,及早进行病原学检测以快速明确病毒类型,对于感染性眼病的及时治疗、并发症的防治及疾病预后的判断十分重要,是实现精准治疗的前提^[7]。

近年来,基于成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及其相关蛋白 Cas12a 构建的反式切割生物传感系统凭借其靶向精准、灵敏度高且操作简单高效等优势,逐渐成为感染性疾病精准检测与科学研究的重要工具^[8],并已广泛用于临床核酸检测领域^[9-11]。多酶恒温扩增(multienzyme isothermal rapid amplification, MIRA)技术是一种新型恒温扩增技术,具有等温扩增、灵敏度高、设备依赖性低等特点^[12],与 CRISPR/Cas12a 系统相结合有望实现快速、灵敏且特异的检测。目前,针对眼部病毒感染的检测方法主要包括抗原抗体免疫学检测、实时定量 PCR(quantitative

real-time PCR, qRT-PCR)和宏基因组高通量测序技术^[13]。抗原抗体检测可在 15~20 min 内检测出结果,同时无需复杂设备,但存在灵敏度低和易发生交叉反应的缺点。宏基因组测序技术具有广谱检测和实现复杂感染精确诊断的优势,但其测序成本高,数据分析周期长^[14]。qRT-PCR 技术作为一种具有高灵敏度、高特异性的病原学诊断方法,已成为当前国内外眼部病毒性感染精准诊断的重要工具^[15-16]。然而,在临床实践中,qRT-PCR 仍存在诸多局限,如扩增循环时间长、荧光探针价格昂贵且不易保存、需要严苛的实验室条件、仪器设备昂贵等^[13,16]。因此,建立一种快速灵敏、特异且经济的检测方法对病毒性眼病的精准诊断和治疗具有重要意义。本研究以病毒性眼病中常见的 HSV 和 VZV 为研究对象,联合 MIRA 技术与 CRISPR/Cas12a 系统,建立一种单管式新型检测方法,并对其灵敏度和特异度等进行评价,以期眼部病毒感染的精准快速检测提供一种新的技术方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床样本来源 收集 2023 年 1—12 月在徐州市第一人民医院临床诊断为感染性眼病患者的眼内液(房水或玻璃体),经 qRT-PCR 实验室检测 HSV/VZV 的核酸提取液样本共 111 份,其中 HSV 阳性 17 份,HSV 阴性 40 份,VZV 阳性 19 份,VZV 阴性 35 份。本研究遵循《赫尔辛基宣言》,经徐州市第一人民医院医学伦理委员会审核批准(批文号:xyyl[2021]104号)。

样本采集获得受检者或其家属的知情同意。

1. 1. 2 主要试剂及仪器 LbaCas12a 蛋白、NEBuffer2.1(美国 NewEngland Biolabs 公司);DNA 恒温快速扩增试剂盒(基础型)[安普未来(常州)生物科技有限公司];HSV 核酸检测试剂盒(XY-EP-0921)、VZV 核酸检测试剂盒(XY-EP-1821,上海烜雅生物科技有限公司);寡核苷酸探针、MIRA 引物、CRISPR RNA(crRNA)及质粒均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。StepOnePlus Real-Time PCR 仪(美国 ABI 公司);Synergy H1 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司);Tanon 4200 凝胶成像系统(上海天能生命科学有限公司)。

1. 2 方法

1. 2. 1 crRNA 设计 在 GenBank 数据库中检索 HSV-1、HSV-2 及 VZV 的基因组序列,通过序列比对,初步筛选 HSV 保守基因(包括 *UL30*、*UL42*、*US6*、*US8*、*US4* 以及 *UL27* 等)与 VZV 保守基因(包括 *ORF31*、*ORF28*、*ORF16*、*ORF62*、*ORF63*、*ORF29*、*ORF4* 以及 *ORF38* 等),然后根据 MIRA 引物及 crRNA 设计原则,对上述基因进行引物设计,综合考虑引物自连、引物二聚体以及引物-crRNA 二聚体等情况筛选可设计出最优 MIRA 引物及 crRNA 的基因作为检测靶基因,最终选择 HSV-*UL27* 基因(Gene ID:24271469, HSV-1/2 间同源性达 87.00%)高度保守区(位点:55015-55220,保守性 100%)及 VZV-*ORF28* 基因(Gene ID:1487712,同源性达 100%)高度保守区(位点:47955-48230,保守性 100%)作为检测靶标,并将其分别装载至质粒上以构建标准质粒。基于前间区序列邻近基序位点(TTTN 或 AAAN),利用在线设计工具 CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/>)及 CRISPOR (<https://crispor.gi.ucsc.edu/>)设计 crRNA(具体序列见表 1),并通过 BLAST 评估其特异性。

1. 2. 2 MIRA 引物设计与最佳引物组合选择 依据 MIRA 引物设计原则,通过 BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)于 crRNA 序列对应模板的两端设计 MIRA 扩增引物,引物长度为 30~35 bp,其中 HSV 引物为 HSV-1 与 HSV-2 共

用引物,对 HSV-1 与 HSV-2 均可检测。将正向和反向引物进行不同组合,并分别对含病毒保守基因片段的标准质粒进行 MIRA 扩增,所得产物经琼脂糖凝胶电泳分析,筛选特异性和扩增效率较好的候选引物对,并进一步通过 CRISPR 反应确定最佳引物组合。

1. 2. 3 MIRA 体系的建立与扩增时间选择 将预混体系 1 [含 29.4 μl A 缓冲液、2 μl 正向引物(10 μmol/L)、2 μl 反向引物(10 μmol/L)及 11.6 μl 无核酸酶水]加入含冻干粉的基础反应单元中,充分混匀后将其均分为 2 份并转至 PCR 管底部;然后将预混体系 2 [含 1 μl(2 ng/μl)质粒和 1.5 μl B 缓冲液]加入上述 PCR 管中,快速充分混匀后置于 39 °C 恒温条件下,分别扩增 10、15、20、25、30 min。扩增产物一方面进行琼脂糖凝胶电泳分析,以确定最佳扩增时间;另一方面作为激活剂,用于建立 CRISPR 检测体系。体系配制过程在冰上操作。

1. 2. 4 CRISPR/Cas12a 体系建立与优化

1. 2. 4. 1 建立 CRISPR/Cas12a 体系 将 1 μl 上述 MIRA 扩增产物快速加入含 2.5 μl(1 μmol/L) Cas12a 酶、2.5 μl(1 μmol/L) crRNA、1.25 μl(10 μmol/L)单链 DNA(single-stranded DNA, ssDNA)探针、5 μl 10 倍反应缓冲液的 CRISPR/Cas12a 预混体系中,补充无核酸酶水至总体积为 50 μl,快速混匀后将其置于荧光检测仪中,激发波长为 488 nm,发射波长为 528 nm,于 37 °C 条件下读取荧光强度,1 次/min,连续检测 20 min。体系配制过程于冰上操作。

表 1 HSV 与 VZV 的 MIRA 引物及报告探针序列
Table 1 Sequences of MIRA primers and reporter probes for HSV and VZV

引物	序列(5'-3')
HSV FP ₁	GAGGAGGTGATCGACAAGATCAACGCCAAGG
HSV RP ₁	GGGTTCTACTTGAGGTCGGTGTGCCAG
HSV FP ₂	CCCCTTCGAGGAGGTGATCGACAAGATCAA
HSV RP ₂	CGAGGGTGTACTTGAGGTCGGTGTCTG
VZV FP ₁	GCCGTCAAATGTTATTAAGTACCAGAGATTA
VZV RP ₁	TAAACACAGAATCCGTATCTCCATATATAACC
VZV FP ₂	ATATTCATAATAACTGGGCCGCAATTTGAAC
VZV RP ₂	GAATCCGTATCTCCATATATAACCTTTACCTC
HSV crRNA	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUACCGGGACGACCACGAGACC
VZV crRNA	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUGGAGAGAACGCUACUUUCA
ssDNA1	FAM-TTATTCCCCC-BHQ1
ssDNA2	FAM-CCCCCCCC-BHQ1

注:HSV:单纯疱疹病毒;VZV:水痘-带状疱疹病毒;MIRA:多酶恒温扩增;crRNA:CRISPR RNA;FP:正向引物;RP:反向引物;ssDNA:单链 DNA;CRISPR:成簇规律间隔短回文重复序列
Note: HSV: herpes simplex virus; VZV: varicella-zoster virus; MIRA: multienzyme isothermal rapid amplification; crRNA: CRISPR RNA; FP: forward primer; RP: reverse primer; ssDNA: single-stranded DNA; CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats

1.2.4.2 Cas12a 酶与 crRNA 浓度及比例优化
CRISPR 体系中保持其他组分不变,设定 Cas12a 酶、crRNA 工作浓度分别为 10、20、40、80 nmol/L,共形成 16 个不同的浓度比例组合。通过检测荧光信号强度,确定 Cas12a 酶与 crRNA 的最佳工作浓度及比例。

1.2.4.3 ssDNA 报告探针的序列选择与浓度优化
ssDNA 探针序列及其浓度会影响 CRISPR/Cas12a 体系中 Cas12a 的酶切效率,为此本研究首先对 ssDNA 序列进行优化。在 1.2.4.2 部分确定的 Cas12a 酶与 crRNA 最佳浓度及比例条件下,分别将 2 种含有不同序列的报告探针 ssDNA1、ssDNA2 加至 CRISPR 体系中,工作浓度均为 250 nmol/L。读取荧光强度并选择信背比高的 ssDNA 作为检测探针。保持其他组分不变,检测 ssDNA 探针工作浓度分别为 31.25、62.5、125、250 和 500 nmol/L 的荧光强度及信背比,以确定 ssDNA 最佳浓度。

1.2.5 单管式 MIRA-CRISPR/Cas12a 检测体系的建立
单管式 MIRA-CRISPR/Cas12a 检测方法:(1)配制 CRISPR/Cas12a 预混体系[含 1.00 μl (1 $\mu\text{mol/L}$) Cas12a 酶、2.00 μl (1 $\mu\text{mol/L}$) crRNA、1.25 μl (10 $\mu\text{mol/L}$) ssDNA 探针、5.00 μl 10 倍反应缓冲液,补充无核酸酶水至总体积为 25.00 μl]并将其加至 0.2 ml PCR 管(平盖)盖内;(2)配置 MIRA 反应体系[含 14.70 μl A 缓冲液、1.00 μl 正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)、1.00 μl 反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)、1.00 μl (2 ng/ μl)质粒、1.50 μl B 缓冲液,补充无核酸酶水至总体积为 25.00 μl]并将其加至 PCR 管底部;(3)轻轻关闭管盖,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温扩增 25 min;(4)扩增完成后,将 CRISPR/Cas12a 体系与 MIRA 体系低速离心混合均匀;(5)目标序列存在时,Cas12a 被扩增产物中保守基因片段特异性激活并反式切割含 FAM 标记的 ssDNA 报告探针,释放荧光信号,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温检测荧光信号 20 min(1 次/min),阳性样本产生显著的荧光信号,阴性样本则无明显信号(图 1)。

1.2.6 MIRA-CRISPR/Cas12a 体系检测限评价
将经浓度梯度稀释(含 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 和 1×10^0 拷贝/ μl)后的标准质粒进行单管式 MIRA-CRISPR/Cas12a 检测,评价该方法的灵敏度,加入无核酸酶水作为阴性对照。同时,使用相同浓度的质粒进行 qRT-PCR 检测,反应体系为:10 μl 2 倍 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix、4 μl (1 $\mu\text{mol/L}$)引物对、1 μl 质粒,补充无核酸酶水至总体积为 20 μl 。PCR 扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变

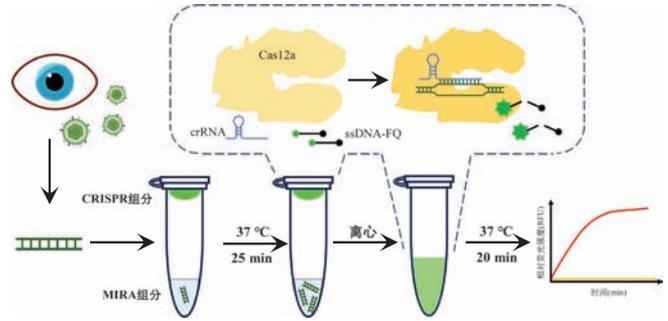


图 1 单管式 MIRA-CRISPR/Cas12a 检测方法原理图 crRNA: CRISPR RNA; ssDNA-FQ: 单链 DNA 报告探针; CRISPR: 成簇规律间隔短回文重复序列; MIRA: 多酶恒温扩增

Figure 1 Schematic diagram of the single-tube MIRA-CRISPR/Cas12a detection method crRNA: CRISPR RNA; ssDNA-FQ: single-stranded DNA reporter probe; CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats; MIRA: multienzyme isothermal rapid amplification

性 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火及延伸 30 s,重复 40 个循环;熔解曲线采集为 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。

1.2.7 MIRA-CRISPR/Cas12a 体系检测特异性评价
对含有腺病毒,EB 病毒,巨细胞病毒,人类疱疹病毒 6、7 和 8 型眼部感染常见病毒的核酸混合物进行单管式 MIRA-CRISPR/Cas12a 检测,评价其特异性,以无核酸酶水作为阴性对照。

1.2.8 临床样本检测
采用本研究建立的 MIRA-CRISPR/Cas12a 检测方法以及 qRT-PCR 检测方法,对 1 μl 眼内液核酸提取物样本进行 HSV 或 VZV 同时平行检测,以评价其灵敏度、特异度及一致性。MIRA-CRISPR/Cas12a 检测方法,最高荧光强度 \geq 无模板对照(no-template control, NTC)平均值+3 \times 标准差为阳性,最高荧光强度 < NTC 平均值+3 \times 标准差为阴性。使用 HSV 核酸测试剂盒(荧光 PCR 法)以及 VZV 核酸测试剂盒(荧光 PCR 法)对眼内液行 qRT-PCR 检测,反应体系:19 μl 反应液、1 μl 酶液、1 μl 核酸提取液,补充无核酸酶水至总体积为 25 μl 。扩增条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 30 s,重复 40 个循环。根据说明书,检测通道 Ct 值 \leq 40 且有明显的指数增长曲线为阳性;样本检测结果 Ct 值 > 40 或无 Ct 值为阴性。

1.2.9 MIRA-CRISPR/Cas12a 与 qRT-PCR 的检测耗时及成本
记录 MIRA-CRISPR/Cas12a 与 qRT-PCR 的检测耗时、耗费及仪器使用情况。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 27.0 统计学软件进行统计分析,采用 GraphPad Prism 10 软件作图。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 个

组间比较采用非配对 *t* 检验;多组间总体差异比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Dunnett-*t* 检验。采用 kappa 检验分析检测结果的一致性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 最佳 MIRA 引物

凝胶电泳结果显示,4 种 HSV 以及 VZV 引物对均可扩增出预期大小一致的产物,其中 HSV FP₁RP₁ 与 FP₂RP₁ 引物对存在明显杂带,因此选择特异性更佳的 FP₁RP₂、FP₂RP₂ 引物组合为候选引物对。同理,VZV FP₂RP₁、FP₂RP₂ 引物对特异性高,作为候选引物对。进一步通过 CRISPR 反应验证,HSV FP₁RP₂ 以及 VZV FP₂RP₂ 为最佳引物组合(图 2)。

2.2 最佳 MIRA 时间

HSV 与 VZV 的 MIRA 扩增产物随扩增时间增加逐渐增多,鉴于扩增 25、30 min 后的条带亮度相差不大,但扩增 30 min 后 HSV 产物杂带增多,本研究选择 25 min 作为 MIRA 最佳扩增时间(图 2)。

2.3 Cas12a 与 crRNA 最佳浓度与比例

在 CRISPR 体系其他组分不变的条件下,随着 Cas12a 酶或 crRNA 浓度的增加,荧光强度曲线峰值不断增高且达峰时间明显缩短。当 Cas12a 酶工作浓度为 20 nmol/L、crRNA 工作浓度为 40 nmol/L 时,HSV 和 VZV 荧光曲线在 15 min 内即可达到平台期。综合考虑检测效率和成本因素,在 16 个 Cas12a 酶与 crRNA 浓度比例组合中,Cas12a 酶与 crRNA 最佳比例为 1:2,且工作浓度分别为 20、40 nmol/L(图 3)。

2.4 ssDNA 探针序列与最优浓度

使用 ssDNA2 探针 HSV 检测体系的荧光强度峰值和信背比分别为(38 563±703)RFU 和 32.04±2.66,均高于使用 ssDNA1 探针的(35 785±1 532)RFU 和 23.12±1.66,差异均有统计学意义($t = 2.855, P = 0.046; t = 4.926, P = 0.008$);使用 ssDNA2 探针 VZV 检测体系的荧光强度峰值和信背比分别为(44 524±1 789)RFU 和 35.70±3.26,均高于使用 ssDNA1 探针

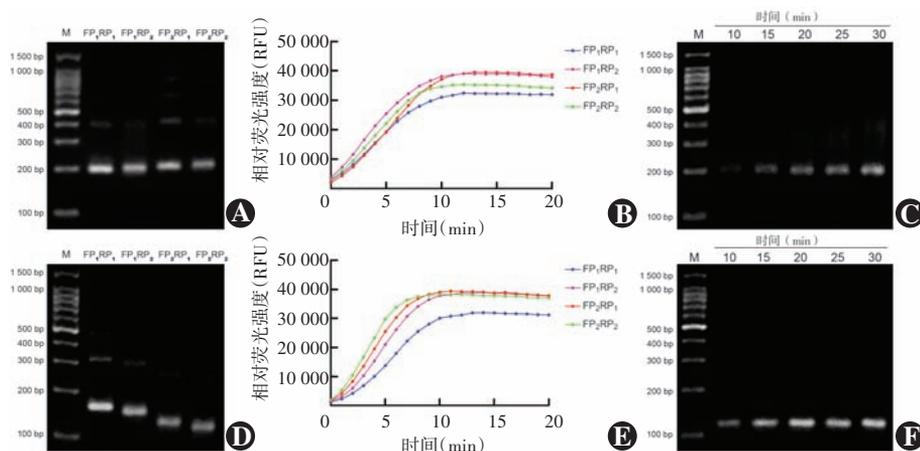


图 2 MIRA 引物及扩增时间选择 A:不同 HSV MIRA 引物对扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图 B:不同 HSV MIRA 引物对随扩增时间的 CRISPR 反应荧光强度变化曲线图 C:HSV MIRA 对不同扩增时间下扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图 D:不同 VZV MIRA 引物对扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图 E:不同 VZV MIRA 引物对随扩增时间的 CRISPR 反应荧光强度变化曲线图 F:VZV MIRA 不同扩增时间下扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图 MIRA:多酶恒温扩增;HSV:单纯疱疹病毒;CRISPR:成簇规律间隔短回文重复序列;VZV:水痘-带状疱疹病毒;M:DNA 分子质量标准参照物;FP:正向引物;RP:反向引物

Figure 2 Selection of MIRA primers and amplification time A: Agarose gel electrophoresis screening of HSV MIRA primers B: Fluorescence intensity curves of CRISPR reactions with different HSV MIRA primer pairs C: Agarose gel electrophoresis for optimizing HSV MIRA amplification time D: Agarose gel electrophoresis screening of VZV MIRA primers E: Fluorescence intensity curves of CRISPR reactions with different VZV MIRA primer pairs F: Agarose gel electrophoresis for optimizing VZV MIRA amplification time MIRA: multienzyme isothermal rapid amplification; HSV: herpes simplex virus; CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats; VZV: varicella-zoster virus; M: DNA marker; FP: forward primer; RP: reverse primer

的(37 180±1 110)RFU 和 24.90±71.81,差异均有统计学意义($t = 6.043, P = 0.004; t = 4.983, P = 0.008$),因此,本研究选择 ssDNA2 探针作为检测探针并进行浓度优化。结果显示,HSV 和 VZV CRISPR 反应中荧光强度和信背比均随着 ssDNA2 探针浓度的增加而升高,差异均有统计学意义($F = 106.200、113.100$,均 $P < 0.001$)。综合考虑荧光强度峰值、反应时间、试剂成本,本研究选择工作浓度为 250 nmol/L 的 ssDNA2 进行后续实验(图 4)。

2.5 单管式 MIRA-CRISPR/Cas12a 检测体系评价

2.5.1 检测限 结果显示 HSV、VZV 最低检测限分别达 1、10 拷贝/ μ l,与 qRT-PCR 检测限相当(图 5、6)。

2.5.2 特异性 与眼部感染常见的其他 6 种病毒核酸混合样本验证结果显示,含有 HSV 或 VZV 的混合样本在 5 min 时荧光信号即明显增强,而单独的混合样本以及阴性对照则无荧光增强,表明 MIRA-CRISPR/Cas12a 检测体系具有高度特异性(图 7)。

2.5.3 MIRA-CRISPR/Cas12a 与 qRT-PCR 对眼内液病毒检测结果一致性比较 MIRA-CRISPR/Cas12a 对

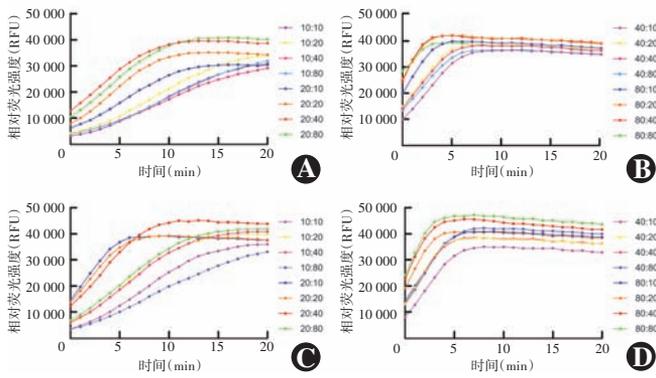


图 3 CRISPR Cas12a 与 crRNA 最适浓度及浓度比优化 Cas12a 与 crRNA 浓度分别为 10、20、40、80 nmol/L, 形成 16 种不同浓度比例组合 A: CRISPR Cas12a 工作浓度为 10、20 nmol/L 时对应不同工作浓度 crRNA 的 HSV 扩增 CRISPR 反应荧光强度曲线图 B: Cas12a 工作浓度为 40、80 nmol/L 时对应不同工作浓度 crRNA 的 HSV 扩增 CRISPR 反应荧光强度曲线图 C: Cas12a 工作浓度为 10、20 nmol/L 时对应不同工作浓度 crRNA 的 VZV 扩增 CRISPR 反应荧光强度曲线图 D: Cas12a 工作浓度为 40、80 nmol/L 时对应不同工作浓度 crRNA 的 VZV 扩增 CRISPR 反应荧光强度曲线图 CRISPR: 成簇规律间隔短回文重复序列; crRNA: CRISPR RNA; HSV: 单纯疱疹病毒; VZV: 水痘-带状疱疹病毒

Figure 3 Optimization of the concentration and ratio for CRISPR Cas12a and crRNA Cas12a enzyme and crRNA concentrations were set at 10, 20, 40, and 80 nmol/L, resulting in 16 distinct concentration combinations A: Fluorescence intensity curves of CRISPR reactions for detecting HSV, with Cas12a working concentrations at 10 and 20 nmol/L and varying crRNA working concentrations B: Fluorescence intensity curves of CRISPR reactions for detecting HSV, with Cas12a working concentrations at 40 and 80 nmol/L and varying crRNA working concentrations C: Fluorescence intensity curves of CRISPR reactions for detecting VZV, with Cas12a working concentrations at 10 and 20 nmol/L and varying crRNA working concentrations D: Fluorescence intensity curves of CRISPR reactions for detecting VZV, with Cas12a working concentrations at 40 and 80 nmol/L and varying crRNA working concentrations CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats; crRNA: CRISPR RNA; HSV: herpes simplex virus; VZV: varicella-zoster virus

HSV 的检测灵敏度为 94.12% (16/17), 特异度为 92.50% (37/40), 总符合率为 92.98% (53/57), 与 qRT-PCR 检测法高度一致 ($\kappa = 0.838$), 进一步经基因测序证实本研究方法检测 HSV 呈阳性而 qRT-PCR 检测结果为阴性的 3 份样本确定为 HSV 阳性。MIRA-CRISPR/Cas12a 对 VZV 的检测灵敏度为 94.73% (18/19), 特异度为 100%, 总符合率为 98.15% (53/54), 与 qRT-PCR 检测法完全一致 ($\kappa = 0.959$) (表 2, 3)。

2.6 MIRA-CRISPR/Cas12a 与 qRT-PCR 的检测耗时及成本比较

qRT-PCR 检测耗时约 90 min 且需依赖荧光定量

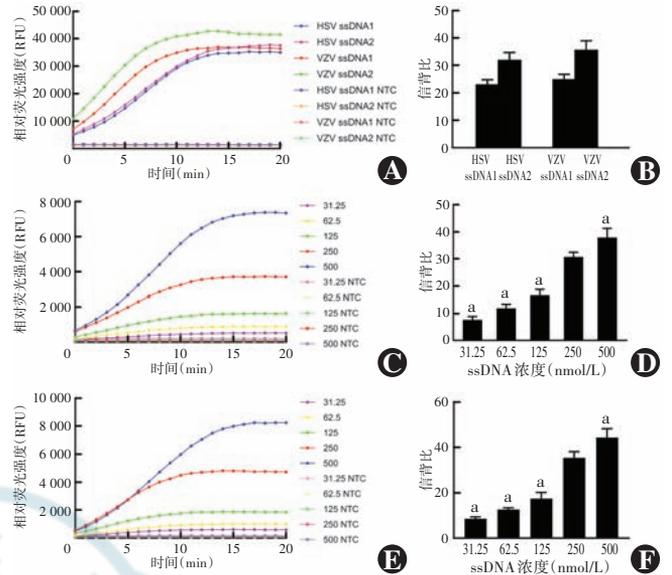


图 4 HSV 和 VZV CRISPR 反应中 ssDNA 序列及浓度优化 A: 不同 ssDNA 探针序列的 HSV 和 VZV 荧光强度曲线图 B: ssDNA1 与 ssDNA2 的 CRISPR 反应荧光信背比比较 $t = 4.926, 4.983$, 均 $P < 0.01$ (非配对 t 检验, $n = 3$) C: 不同工作浓度 ssDNA2 报告探针 HSV 荧光强度曲线图 D: HSV CRISPR 反应体系中不同浓度 ssDNA2 荧光信背比比较 $F = 106.200, P < 0.001$. 与 250 nmol/L 相比, $^a P < 0.01$ (单因素方差分析, Dunnett- t 检验; $n = 3$) E: 不同工作浓度 ssDNA2 报告探针 VZV 荧光强度曲线图 F: VZV CRISPR 反应体系中不同浓度 ssDNA2 荧光信背比比较 $F = 113.100, P < 0.001$. 与 250 nmol/L 相比, $^a P < 0.01$ (单因素方差分析, Dunnett- t 检验; $n = 3$) HSV: 单纯疱疹病毒; VZV: 水痘-带状疱疹病毒; CRISPR: 成簇规律间隔短回文重复序列; ssDNA: 单链 DNA; NTC: 无模板对照

Figure 4 Optimization of ssDNA sequences and concentrations in HSV and VZV CRISPR reactions A: Fluorescence intensity curves of HSV and VZV with different ssDNA probe sequences B: Comparison of the fluorescence signal-to-background ratios in CRISPR reactions between ssDNA1 and ssDNA2 $t = 4.926, 4.983$; both $P < 0.01$ (Unpaired t -test, $n = 3$) C: Fluorescence intensity curves of HSV with different working concentrations of ssDNA2 reporter probe D: Comparison of signal-to-background ratios with different concentrations of ssDNA2 in the HSV CRISPR reaction system $F = 106.200, P < 0.001$. Compared to the 250 nmol/L group, $^a P < 0.01$ (One-way ANOVA, Dunnett- t test, $n = 3$) E: Fluorescence intensity curves of VZV with different working concentrations of ssDNA2 reporter probe F: Comparison of signal-to-background ratios with different concentrations of ssDNA2 in the VZV CRISPR reaction system $F = 113.100, P < 0.001$. Compared to the 250 nmol/L group, $^a P < 0.01$ (One-way ANOVA, Dunnett- t test, $n = 3$) HSV: herpes simplex virus; VZV: varicella-zoster virus; CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats; ssDNA: single-stranded DNA; NTC: no template control

PCR 仪完成, 每份样本耗费 45~55 元; 本研究建立的 MIRA-CRISPR/Cas12a 法 45 min 内即可完成检测且无需复杂设备, 每份样本所需成本低于 32 元, 较 qRT-PCR 法有明显成本优势。

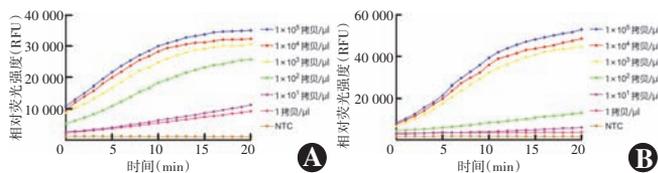


图 5 HSV 和 VZV 单管式 MIRA-CRISPR/Cas12a 体系检测限评价 A: 不同浓度 HSV 标准质粒 CRISPR 反应荧光强度曲线图 B: 不同浓度 VZV 标准质粒 CRISPR 反应荧光强度曲线图 HSV: 单纯疱疹病毒; VZV: 水痘-带状疱疹病毒; MIRA: 多酶恒温扩增; CRISPR: 成簇规律间隔短回文重复序列; NTC: 无模板对照

Figure 5 Evaluation of the limit of detection for single-tube MIRA-CRISPR/Cas12a system for HSV and VZV A: Fluorescence intensity curves of CRISPR reactions with different concentrations of HSV standard plasmids B: Fluorescence intensity curves of CRISPR reactions with different concentrations of VZV standard plasmids HSV: herpes simplex virus; VZV: varicella-zoster virus; MIRA: multienzyme isothermal rapid amplification; CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats; NTC: no template control

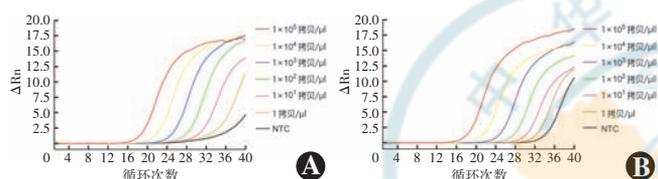


图 6 HSV 和 VZV qRT-PCR 检测限分析结果 A: 不同浓度 HSV 标准质粒 qRT-PCR 扩增曲线 B: 不同浓度 VZV 标准质粒 qRT-PCR 扩增曲线 HSV: 单纯疱疹病毒; VZV: 水痘-带状疱疹病毒; qRT-PCR: 实时定量 PCR; NTC: 无模板对照

Figure 6 Analysis of the limit of detection for HSV and VZV via qRT-PCR A: qRT-PCR amplification curves of HSV standard plasmids at different concentrations B: qRT-PCR amplification curves of VZV standard plasmids at different concentrations HSV: herpes simplex virus; VZV: varicella-zoster virus; qRT-PCR: quantitative real-time PCR; NTC: no template control

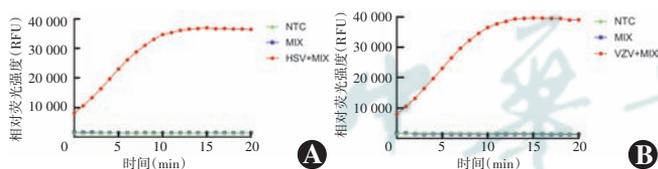


图 7 HSV 和 VZV 单管式 MIRA-CRISPR/Cas12a 体系特异性评价 A: HSV 单管式 MIRA-CRISPR/Cas12a 体系检测病毒混合核酸样本荧光强度结果 B: VZV 单管式 MIRA-CRISPR/Cas12a 体系检测病毒混合核酸样本荧光强度结果 HSV: 单纯疱疹病毒; VZV: 水痘-带状疱疹病毒; MIRA: 多酶恒温扩增; CRISPR: 成簇规律间隔短回文重复序列; NTC: 无模板对照; MIX: 腺病毒、EB 病毒、巨细胞病毒、人类疱疹病毒 6、7 和 8 型核酸混合物

Figure 7 Specificity evaluation of the single-tube MIRA-CRISPR/Cas12a system for HSV and VZV A: Fluorescence intensity results of the single-tube MIRA-CRISPR/Cas12a system for detecting mixed viral nucleic acid samples for HSV B: Fluorescence intensity results of the single-tube MIRA-CRISPR/Cas12a system for detecting mixed viral nucleic acid samples for VZV HSV: herpes simplex virus; VZV: varicella-zoster virus; MIRA: multienzyme isothermal rapid amplification; CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats; NTC: no template control; MIX: nucleic acid mixture containing adenovirus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, human herpesvirus 6, human herpesvirus 7 and human herpesvirus 8

表 2 MIRA-CRISPR/Cas12a 与 qRT-PCR 对眼内液 HSV 检测结果一致性比较
Table 2 Consistency comparison between MIRA-CRISPR/Cas12a and qRT-PCR for HSV detection in intraocular fluid

MIRA-CRISPR/Cas12a	qRT-PCR		总计
	阳性	阴性	
阳性	16	3	19
阴性	1	37	38
总计	17	40	57

注: MIRA: 多酶恒温扩增; CRISPR: 成簇规律间隔短回文重复序列; qRT-PCR: 实时定量 PCR; HSV: 单纯疱疹病毒
Note: MIRA: multienzyme isothermal rapid amplification; CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats; qRT-PCR: quantitative real-time PCR; HSV: herpes simplex virus

表 3 MIRA-CRISPR/Cas12a 与 qRT-PCR 对眼内液 VZV 检测结果一致性比较
Table 3 Consistency comparison between MIRA-CRISPR/Cas12a and qRT-PCR for VZV detection in intraocular fluid

MIRA-CRISPR/Cas12a	qRT-PCR		总计
	阳性	阴性	
阳性	18	0	18
阴性	1	35	36
总计	19	35	54

注: MIRA: 多酶恒温扩增; CRISPR: 成簇规律间隔短回文重复序列; qRT-PCR: 实时定量 PCR; VZV: 水痘-带状疱疹病毒
Note: MIRA: multienzyme isothermal rapid amplification; CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats; qRT-PCR: quantitative real-time PCR; VZV: varicella-zoster virus

3 讨论

近年来,基于 CRISPR-Cas 系统的病原核酸检测技术,凭借其靶向精准、快速便捷等特点,在即时检测领域受到广泛关注^[12],而 MIRA 技术可在恒定温度下快速扩增目标核酸序列。本研究将 MIRA 与 CRISPR/Cas12a 系统相结合,建立了一种用于眼内液中 HSV 或 VZV 核酸检测的新方法。

尽管引发眼部感染的 HSV 主要为 HSV-1 型,但 HSV-2 型也可导致严重眼部感染^[3,17],因此,本研究在 HSV crRNA 和引物设计过程中,选取编码 gB 糖蛋白且在 HSV-1、HSV-2 型中均高度保守的核酸序列区作为检测靶标,以期可同时检出 HSV-1 和 HSV-2。对于 VZV,则针对编码 DNA 聚合酶的保守基因序列设计 MIRA 引物和 crRNA。琼脂糖凝胶电泳和荧光检测结果显示,本研究筛选出的 HSV 与 VZV 最佳引物组合可特异性识别靶标,同时不会与眼部感染常见的腺病毒、EB 病毒以及巨细胞病毒等发生反应,表明 MIRA-CRISPR/Cas12a 检测方法具有高度特异性。

本研究通过优化 MIRA 与 CRISPR/Cas12a 体系,显著缩短了核酸扩增和荧光信号检测时间,整个分析过程可在 45 min 内完成;同时可检测出极低含量的目标 DNA,其中 HSV、VZV 检测限分别为 1、10 拷贝/ μl ,其灵敏度与 qRT-PCR 方法相当。此前, Pilllet 等^[18]建立了一种针对 HSV 与 VZV 的多重 qRT-PCR 检测方法,对 HSV-1、HSV-2 以及 VZV 的检测限分别为 196.65、91.8 和 414.07 拷贝/ml,但是该方法严格依赖实验室环境与仪器设备,耗时长且无法实现即时检测; Reddy 等^[19]以 HSV-1 ULI-UL2 基因为靶标,建立了一种环介导等温扩增法检测 HSV-1,其灵敏度为 10 拷贝/ μl ,但检测时长达 75 min,并且该方法引物设计更复杂; Dou 等^[20]基于 CRISPR 建立了多步阶跃计时安培-光电化学法,该方法可定量分析 HSV-1 核酸,最低可检出 3 amol/L 靶标模板 HSV-1 DNA,但其耗时长且技术复杂。与既往研究^[18-20]相比,本研究建立的 MIRA-CRISPR/Cas12a 检测方法,操作过程简单、耗时间短、无需复杂仪器设备且所需费用低。

由于 MIRA 组分和 CRISPR 组分不相兼容,大部分等温扩增结合 CRISPR 的核酸检测方法采用两步法^[21-22],即先对靶标进行扩增,然后将扩增组分加入 CRISPR 系统中进行反应,在转移扩增产物过程中易导致样品污染,造成假阳性结果^[23]。本研究中,将 CRISPR 体系和 MIRA 体系分别加入管盖和管底,待 MIRA 反应 25 min 后,将 CRISPR 组分离心入管底并混匀,建立了单管式 MIRA-CRISPR/Cas12a 检测方法,其可有效避免开盖造成的气溶胶污染。同时,通过实验条件优化,以 37 °C 作为单管最适反应温度,实现全程等温检测,使整个检测过程更加简便。但是,当把 MIRA 扩增体系与 CRISPR/Cas12a 检测体系于单管中混合时,可能引入一些潜在干扰因素: MIRA 扩增体系中的多种酶以及缓冲溶液的组分可能会影响 Cas12a 的酶切活性进而导致检测灵敏度降低^[24];另外,扩增时间也是一种潜在干扰因素,扩增时间过长可能产生非特异性扩增,进而导致假阳性结果^[25]。本研究对此进行优化后减少了这些潜在干扰因素对检测结果的影响。

本研究进一步使用临床样本对建立的单管式 MIRA-CRISPR/Cas12a 检测方法的灵敏度、特异度及符合率等进行了评价,结果显示本研究方法与 qRT-PCR 方法具有高度的一致性 (HSV: $\kappa = 0.838$; VZV: $\kappa = 0.959$)。值得注意的是,本研究方法在 qRT-PCR 检测呈阴性的 3 份样本中成功检出 HSV。这可能与本研究方法以 HSV-1 型和 HSV-2 型的高度

保守区为靶标,对 HSV-1 型和 HSV-2 型均可检出,而大多数商品化 PCR 试剂盒主要针对 HSV-1 型保守区有关,表明本研究方法在眼内液病原检测中具有良好的临床应用价值。但需要强调的是,尽管眼内液检测可为临床精准诊疗提供重要的参考,但其应在临床适应证范围内规范开展,不能盲目扩大眼内液检测的适用范围,加重患者经济负担^[26]。

本研究建立的方法目前仍需核酸提取步骤,无法对临床样本直接进行检测,因此仍存在一些局限性。未来,可通过整合基于纳米磁珠或核酸纤维隔离膜的核酸快速提取步骤实现更为简单快速的检测^[27];也可通过化学还原或热变性裂解法灭活样本中的核酸酶以实现临床样本的直接检测^[28]。另外,本研究样本量较小,后续还需增加样本量验证该方法在临床实践中的可行性;并且检测结果仍需依靠仪器检测荧光强度进行评价,不便于进行现场即时检测,后续本课题组将探索通过蓝光灯照射,用肉眼观察进行定性检测的可行性^[29]。此外,该方法目前无法实现 HSV 与 VZV 同时检测,体系仅限于单靶标检测。未来,本课题组拟通过基因微阵列芯片将针对 HSV 与 VZV 的 CRISPR/Cas12a 检测体系置于不同检测孔中,以实现 HSV 和 VZV 的双重检测,并探索与其他常见病毒的多重检测。

综上,本研究建立的单管式 MIRA-CRISPR/Cas12a 检测方法是一种灵敏度高、特异性强、操作简单且设备依赖性低的病原核酸检测方法,可快速检测眼内液中 HSV 及 VZV,为病毒性眼病的实验室检测提供了一种新方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

志谢 感谢本次科研及论文写作过程中同事宫朝举、徐青、张翼鹏、刘海洋、管莉娜的大力支持

作者贡献声明 薛智家:实验设计、数据收集、文章撰写;钱升:实验设计、数据整理与分析;李希睿:研究实施、数据整理;李甦雁:研究指导、论文修改;乔磊:实验设计、数据分析、论文修改及定稿

参考文献

- [1] 王文吉. 常见眼内病毒感染性病变[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2016, 16(1): 3-6. DOI: 10.14166/j.issn.1671-2420.2016.01.002.
Wang WJ. Common intraocular virus infection[J]. Chin J Ophthalmol Otorhinolaryngol, 2016, 16(1): 3-6. DOI: 10.14166/j.issn.1671-2420.2016.01.002.
- [2] Lobo A, Agelidis AM, Shukla D. Pathogenesis of herpes simplex keratitis: the host cell response and ocular surface sequelae to infection and inflammation[J]. Ocul Surf, 2019, 17(1): 40-49. DOI: 10.1016/j.jtos.2018.10.002.
- [3] 张宇, 任胜卫. 单纯疱疹病毒性角膜基质炎角膜新生血管的研究进展[J]. 中华眼科杂志, 2019, 55(12): 956-960. DOI: 10.3760/

- cma. j. issn. 0412-4081. 2019. 12. 017.
Zhang Y, Ren SW. Research progress of corneal neovascularization in herpes stromal keratitis [J]. Chin J Ophthalmol, 2019, 55 (12) : 956-960. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2019. 12. 017.
- [4] Labetoulle M, Boutolleau D, Burrel S, et al. Herpes simplex virus, varicella-zoster virus and cytomegalovirus keratitis: facts for the clinician[J]. Ocul Surf, 2023, 28 : 336-350. DOI: 10. 1016/j. jtos. 2021. 07. 002.
- [5] Ruiz-Lozano RE, Salan-Gomez M, Rodriguez-Garcia A, et al. Wessely corneal ring phenomenon: an unsolved pathophysiological dilemma[J]. SurvOphthalmol, 2023, 68 (4) : 713 - 727. DOI: 10. 1016/j. survophthal. 2023. 02. 009.
- [6] Davis SA, Bovellet R, Han G, et al. Corneal collagen cross-linking for bacterial infectious keratitis[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2020, 6 : CD013001. DOI: 10. 1002/14651858. CD013001. pub2.
- [7] 郑美琴, 郑钦象, 楼永良, 等. 规范病原学诊断路径促进感染性眼病精准医疗[J]. 中国临床新医学, 2021, 14(3) : 231-237. DOI: 10. 3969/j. issn. 1674-3806. 2021. 03. 03.
Zheng MQ, Zheng QX, Lou YL, et al. Standardizing etiological diagnostic pathways to promote precision medicine of ocular infections [J]. Chin J New Clin Med, 2021, 14(3) : 231-237. DOI: 10. 3969/j. issn. 1674-3806. 2021. 03. 03.
- [8] Wang X, Shang X, Huang X. Next-generation pathogen diagnosis with CRISPR/Cas-based detection methods [J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1) : 1682-1691. DOI: 10. 1080/22221751. 2020. 1793689.
- [9] Ma L, Yin L, Li X, et al. A smartphone-based visual biosensor for CRISPR-Cas powered SARS-CoV-2 diagnostics[J]. BiosensBioelectron, 2022, 195 : 113646. DOI: 10. 1016/j. bios. 2021. 113646.
- [10] Li F, Ye Q, Chen M, et al. Cas12aFDet: a CRISPR/Cas12a-based fluorescence platform for sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* serotype 4c[J]. Anal Chim Acta, 2021, 1151 : 338248. DOI: 10. 1016/j. aca. 2021. 338248.
- [11] Liu S, Tao D, Liao Y, et al. Highly sensitive CRISPR/Cas12a-based fluorescence detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. ACS Synth Biol, 2021, 10(10) : 2499-2507. DOI: 10. 1021/acssynbio. 1c00103.
- [12] Zheng W, Tang H, Ye B, et al. Fast, portable and sensitive detection of group B streptococcus DNA using one-pot MIRA-CRISPR system with suboptimal PAM[J]. Talanta, 2024, 279 : 126574. DOI: 10. 1016/j. talanta. 2024. 126574.
- [13] 陶勇. 眼内液病原学检测的研究进展[J]. 中华眼科杂志, 2018, 54(7) : 551-556. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2018. 07. 019.
Tao Y. Research on examination of intraocular fluid for diagnosis of infectious ocular diseases [J]. Chin J Ophthalmol, 2018, 54 (7) : 551-556. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2018. 07. 019.
- [14] Zhang D, Zhang J, Du J, et al. Optimized sequencing adaptors enable rapid and real-time metagenomic identification of pathogens during runtime of sequencing[J]. Clin Chem, 2022, 68(6) : 826-836. DOI: 10. 1093/clinchem/hvac024.
- [15] 马君鑫, 王林农, 周如侠, 等. 实时荧光探针定量 PCR 法在坏死性基型单纯疱疹病毒性角膜炎病原检测中的应用[J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(5) : 446-450. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 05. 012.
Ma JX, Wang LN, Zhou RX, et al. Application of real-time PCR in pathogenic detection of necrotizing herpes stromal keratitis[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(5) : 446-450. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 05. 012.
- [16] Hoarau G, Haigh O, Vauloup-Fellous C, et al. Diagnostic performance of real-time quantitative PCR in tear samples in various subtypes of herpes simplex keratitis [J/OL]. J Clin Microbiol, 2023, 61 (12) : e0088523[2025-04-10]. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10729708/>. DOI: 10. 1128/jcm. 00885-23.
- [17] Labib BA, Chigbu DI. Clinical management of herpes simplex virus keratitis[J]. Diagnostics (Basel), 2022, 12(10) : 2368. DOI: 10. 3390/diagnostics12102368.
- [18] Pillet S, Verhoeven PO, Epercieux A, et al. Development and validation of a laboratory-developed multiplex real-time PCR assay on the BD Max System for detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus DNA in various clinical specimens[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(6) : 1921-1926. DOI: 10. 1128/JCM. 03692-14.
- [19] Reddy AK, Balne PK, Reddy RK, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of retinitis caused by herpes simplex virus-1[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(2) : 210-213. DOI: 10. 1111/j. 1469-0691. 2010. 03216. x.
- [20] Dou B, Zhang Y, Gao H, et al. CRISPR/Cas12a-based MUSCA-PEC strategy for HSV-1 assay[J]. Anal Chim Acta, 2023, 1250 : 340955. DOI: 10. 1016/j. aca. 2023. 340955.
- [21] Yang L, Chen G, Wu J, et al. A PAM-free one-step asymmetric RPA and CRISPR/Cas12b combined assay (OAR-CRISPR) for rapid and ultrasensitive DNA detection [J]. Anal Chem, 2024, 96 (14) : 5471-5477. DOI: 10. 1021/acs.analchem. 3c05545.
- [22] Uno N, Li Z, Avery L, et al. CRISPR gel: a one-pot biosensing platform for rapid and sensitive detection of HIV viral RNA[J]. Anal Chim Acta, 2023, 1262 : 341258. DOI: 10. 1016/j. aca. 2023. 341258.
- [23] Chen Y, Shi Y, Chen Y, et al. Contamination-free visual detection of SARS-CoV-2 with CRISPR/Cas12a: a promising method in the point-of-care detection [J]. BiosensBioelectron, 2020, 169 : 112642. DOI: 10. 1016/j. bios. 2020. 112642.
- [24] Shen S, Wang W, Ma Y, et al. Affinity molecular assay for detecting *Candida albicans* using chitin affinity and RPA-CRISPR/Cas12a[J]. Nat Commun, 2024, 15 (1) : 9304. DOI: 10. 1038/s41467-024-53693-5.
- [25] Ding X, Clark KD, Varona M, et al. Magnetic ionic liquid-enhanced isothermal nucleic acid amplification and its application to rapid visual DNA analysis[J]. Anal Chim Acta, 2019, 1045 : 132-140. DOI: 10. 1016/j. aca. 2018. 09. 014.
- [26] 中华医学会眼科学分会眼免疫学组. 中国葡萄膜炎诊疗中眼内液检测专家共识(2020年)[J]. 中华眼科杂志, 2020, 56(9) : 657-661. DOI: 10. 3760/cma. j. cn112142-20200305-00141.
- [27] Huang Z, Lyon CJ, Wang J, et al. CRISPR assays for disease diagnosis: progress to and barriers remaining for clinical applications [J/OL]. Adv Sci (Weinh), 2023, 10(20) : e2301697 [2025-04-16]. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10369298/>. DOI: 10. 1002/adv. 202301697.
- [28] Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13 [J]. Science, 2018, 360 (6387) : 444-448. DOI: 10. 1126/science. aas8836.
- [29] Qin C, Liu J, Zhu W, et al. One-pot visual detection of african swine fever virus using CRISPR-Cas12a [J]. Front Vet Sci, 2022, 9 : 962438. DOI: 10. 3389/fvets. 2022. 962438.

(收稿日期:2025-07-22 修回日期:2025-11-25)

(本文编辑:骆世平 刘艳)