

## 改寫核酸分子診斷發展的CRISPR-Cas技術

台灣亞太產業分析專業協進會 104 年認證產業分析師

游佩芬

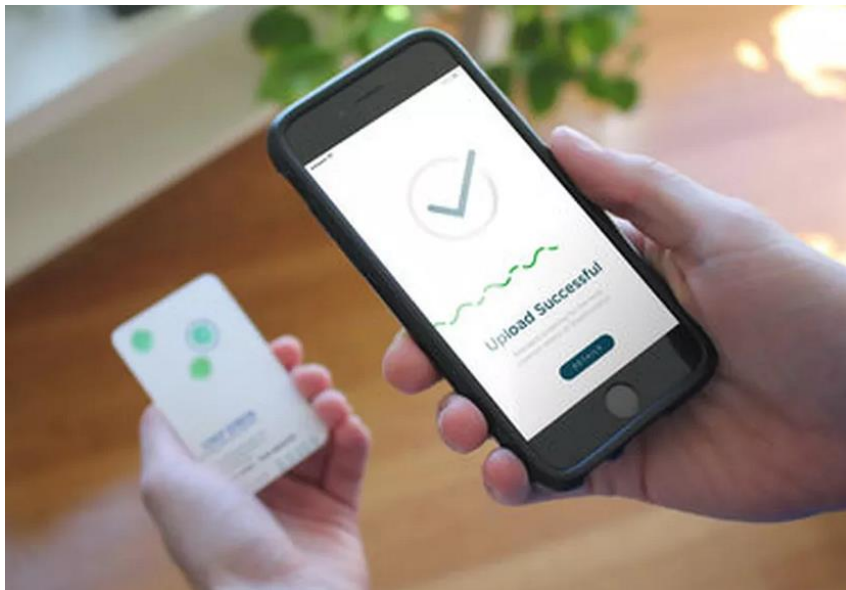
### 一、CRISPR-Cas 跳脫基因編輯單一應用朝精準診斷快速發展

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) 序列最初於 1987 年由大阪大學教授石野良純 (Ishino Yoshizumi) 在研究大腸桿菌基因組中發現，但它們與相關基因 Cas (CRISPR-Associated genes) 在細菌體中作為免疫噬菌體的保護作用的假說直到 2007 年才被實驗證明。相關的研究持續到 2012 年後，CRISPR-Cas 系統開始被應用於生物基因體編輯 (genomic editing)、基因靜默 (gene silencing)、必須基因的篩選等研究，而這些工具在真核生物基因編輯應用由加州柏克萊大學 Jennifer Doudna 教授、麻省理工學院張峰教授所各自率領的兩個團隊在 2012 年後發表並陸續取得專利。自此，CRISPR-Cas9 在疾病治療應用發展一日千里，然而，不過 CRISPR-Cas 系統在診斷應用開發進程快速，將可能比疾病治療應用更快上市。

近期有兩家美國公司-Mammoth Biosciences 與 SHERLOCK Biosciences，不約而同的看上 CRISPR-Cas 的在基因治療以外的應用性，並於近期陸續成立並成功募得千萬美元的資金，展開 CRISPR-Cas 系統在診斷應用的開發：

1. Mammoth Biosciences：2017 年 6 月成立於美國舊金山灣區，創辦團隊成員包含加州大學 CRISPR 團隊 Jennifer Doudna 教授與其學生、史丹佛大學合作夥伴等，目前首輪已募資達 2,450 萬美元。該公司主要開發以 CRISPR 以及兩種 CRISPR 蛋白 Cas12a (Cpf1) 與 Cas13 為基礎的檢測平台 DETECTR™ (DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter)，Cas12a (Cpf1) 可辨識 DNA、Cas13 則可辨識 RNA，兩者整合可應用於同時辨識不同類型之核酸。此外，透過取得 Twist Bioscience 的完整寡核苷酸庫，能夠快速篩選數百萬種獨特的序列診斷。Mammoth Biosciences 願景是開發並商業化更便宜、更快速、可同時多標靶偵測、且不論在居家或醫院都容易操作的檢測產品。目前該公司提供兩種型態的檢測產品，包含簡單的試紙型檢測產品，透過簡單螢光反應，進行判斷；另一種則是於試管中反應，透過智慧手機拍攝呈色結果並將相關資料上傳雲端進行判讀(圖 1)。除了自行開發檢測產品外，該公司擬技術授權合作開發於：

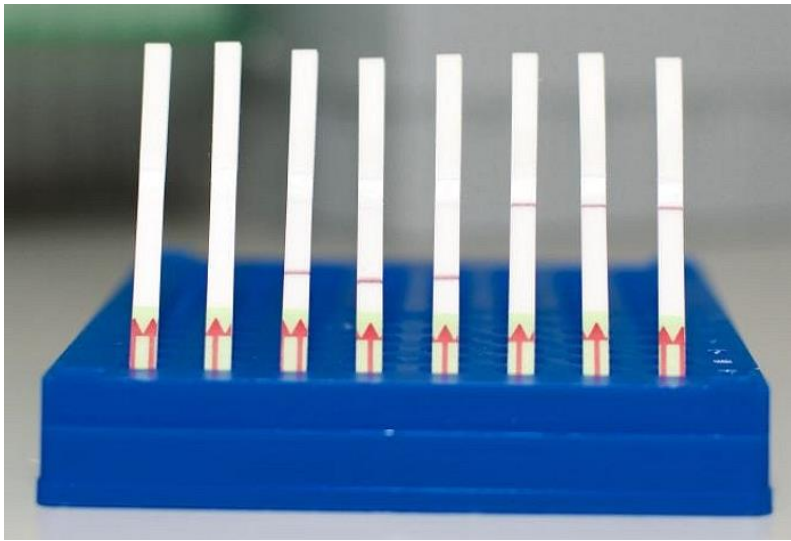
- I. 醫療：包含癌症早期診斷、非侵入式產前檢查、感染疾病偵測、基因分型等。
- II. 農業：鑑定土壤微生物體學、植物與動物病原、作物基因分型等。
- III. 食品安全：細菌或病毒汙染、種源鑑定等。
- IV. 環境監控：由環境檢體中偵測特定物種，並能對新興疾病快速反應。
- V. 生物恐攻(Bioterrorism)：檢測有害生物製劑和法醫基因分型



資料來源：Mammoth Biosciences 官網

圖 1、Mammoth Biosciences 的 DETECTR 系統可透過手機上傳反應結果並分析

2. SHERLOCK Biosciences：2019 年 3 月剛成立的 Sherlock Biosciences 則是由 MIT 張峰教授與其研究夥伴 Jim Collins 教授等共同創辦，目前種子資金募集已達 3,500 萬美元。Sherlock Biosciences 主要技術來自 MIT & Harvard University 的 Broad Institute 授權的 SHERLOCKv2 與 INSPECTR 整合的 SHERLOCK™ 平台(Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing)，這個平台使用 CRISPR 以及 Cas12a、Cas13a(C2c2) 蛋白，並整合基於合成生物學技術之 INSPECTR™ 平台，可於室溫下試紙輕鬆編程偵測單一核酸差異的(SNP)序列。這些平台允許在沒有複雜儀器和各種設備的情況下檢測和量化檢測標的。其靈活性和模組化開闢了廣泛的潛在應用和提供可擬定後續治療的檢測結果，可應用於包括癌症精準診斷、感染鑑定、食品安全、家庭測試和現場疾病檢測等。



資料來源：Broad Institute 官網

圖 2、應用 SHERLOCK™ 平台所開發的 INSPECTR 檢測 Zika 與 Dengue 病毒

### 三、CRISPR-Cas 操作的精準、簡單與快速，是實現醫療第一線精準診斷的不二利器

自 2016 年起，美國紅十字會對於每一位捐血者血液實施茲卡病毒(RNA 病毒)基因檢測以確保用血安全，發現 4 百萬名的捐血者檢體總檢測金額高達 4,200 萬美元(相當於一個檢體 10 美元左右)，僅驗出 8 位是陽性帶原者(相當每花 530 萬美元檢測找出一位帶原者)，有批評者認為這樣的檢測方式不僅耗費檢測時驗室資源，應該有更有效率、便宜且精準的檢測方法<sup>1</sup>。

前述兩家公司以基於 CRISPR-Cas 系統所開發的核酸檢測應用，除了可在兩小時內完成檢測，也可以如驗孕試紙般無需特殊儀器、核酸萃取等反應即可完成；在精準度上則可檢測  $10^{-18}$ ~ $10^{-21}$  molar 的微量標的，甚至可用以區分單點突變，展現較傳統檢測優異的特性(表 1)。

表 1、CRISPR-Cas 檢測系統比較

主要檢測系統	需時	價格(美元)	註
Cas12a (Cpf1) 與 Cas13	<1 小時	< \$1/檢測	<ul style="list-style-type: none"> <li>● DETECTR™</li> <li>● 合併使用技術：重組酶聚合酶擴增(RPA)*</li> <li>● 靈敏度：10<sup>-21</sup> molar</li> </ul>
Cas12a、 Cas13a(C2c2)	<2 小時	\$0.61/檢測	<ul style="list-style-type: none"> <li>● SHERLOCK™</li> <li>● 合併使用技術：重組酶聚合酶擴增(RPA)*、T7 transcription</li> <li>● 無需核酸萃取</li> <li>● 靈敏度：10<sup>-21-18</sup> molar，並具有單一鹼基錯誤配對的專一性</li> </ul>

註：#NASBA(nuclear acid sequence based amplification)：依賴核酸序列的等溫擴增技術，反應溫度僅需 42°C 進行,可以在 2 小時左右將模板 RNA 擴增約 10<sup>9</sup>~10<sup>12</sup> 倍

\* RPA(recombinase polymerase amplification)：重組酶聚合酶擴增技術，可於室溫下反應。

資料來源：工研院產科國際所 ITIS 研究團隊(2019/04)

目前的核酸分子診斷檢測仍面臨需要複雜儀器、繁瑣操作步驟、無法應用於不同檢體、無法同時多標靶檢測、價格昂貴等挑戰，以致於不能大量應用在第一線的基層醫療單位(POC)進行精準診斷，以控制傳染病或其他疾病診斷。CRISPR-Cas 的檢測應用將改寫這個狀況，促成精準診斷的實現。

### 三、結論

CRISPR/Cas 的應用技術因具有操作方便、作用位置精確、價格便宜等優點，短短的數年間即成為生醫科學研究基因功能的重要工具，也很快地被應用於遺傳疾病與癌症的治療方法開

發。而隨著多樣化的 Cas 蛋白的發現，由於可應用於辨識不同類別的核酸標的，其應用於核酸分子檢測的潛力無窮。

相較於傳統核酸分子檢測產品耗時、費工(檢體需經前處理、核酸萃取等步驟、需要有經驗的人員操作)、價昂(需要儀器)等缺點，CRISPR-Cas 分子檢測系統不僅具有快速、簡易便宜(無需複雜操作與儀器)、同時針對不同類型核酸(DNA、RNA)以及不同序列的(甚至僅單一核酸差異)多標靶偵測，更具有高敏感性( $10^{-18} \sim 10^{-21}$  molar)與高專一性(單一核酸差異)，相當適合於定點照護的第一線分子檢測應用，相信很快將有機會實現產品化，成為可以平價、普及化的新世代精準醫療檢測技術。

## 參考資料：

1. Evan M. Bloch et. al., Revisiting Blood Safety Practices Given Emerging Data about Zika Virus, N Engl J Med 2018; 378:1837-1841

(本文作者為工研院產科國際所執行產業技術基磐研究與知識服務計畫產業分析師)

原文出處：ITIS 智網 <http://www.itis.org.tw/>