

基于规律成簇的间隔短回文重复序列及其相关蛋白技术检测乙型肝炎病毒共价闭合环状DNA方法的建立

王俊文¹ 田原² 范子豪² 徐玲² 高耀² 曹亚玲² 潘桢桢² 张向颖² 宋岩¹ 任锋²

【摘要】目的 建立一种基于规律成簇的间隔短回文重复序列及其相关蛋白(CRISPR/Cas13a)的乙型肝炎病毒(HBV)共价闭合环状DNA(HBV cccDNA)检测方法。**方法** 提取2017年6月至2020年10月于首都医科大学附属北京佑安医院就诊的4例乙型肝炎患者肝脏总DNA后,使用Hind III内切酶和质粒安全性ATP依赖DNA酶(PSAD)分别进行酶切;根据松弛环状DNA(rcDNA)和cccDNA的结构差异,设计特异性扩增HBV cccDNA的引物,对酶切后的产物进行滚环扩增(RCA)和PCR扩增;并筛选crRNA,建立基于CRISPR/Cas13a技术的HBV cccDNA检测新方法。**结果** 利用 α -1-抗胰蛋白酶(A1AT)和HBV表面抗原(HBsAg)引物对双重酶切后的产物进行扩增,验证产物中HBV基因组的存在;利用HBV cccDNA和HBV rcDNA引物对PSDA酶切后的产物扩增,验证了产物中只存在HBV cccDNA;利用RCA后的阳性样本作为模板梯度稀释,然后进行PCR扩增转录后使用CRISPR/Cas13a检测,计算出检测下限为10拷贝/ μ l。**结论** 本研究建立了RCA-PCR-CRISPR-Cas13a的新型检测方法,可对HBV cccDNA进行高灵敏度和高特异性检测,为乙型肝炎患者抗病毒治疗评估、治疗终点的确定以及调整治疗方案提供了有效的监测手段。

【关键词】 肝炎病毒,乙型;共价闭合环状DNA;规律成簇的间隔短回文重复序列及其相关蛋白;微滴数字聚合酶链反应;荧光定量聚合酶链反应

Establishment of a method for the detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA based on clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated proteins technology
Wang Junwen¹, Tian Yuan², Fan Zihao², Xu Ling², Gao Yao², Cao Yaling², Pan Zhenzhen², Zhang Xiangying², Song Yan¹, Ren Feng². ¹Department of Clinical Laboratory, Beijing Chuiyangliu Hospital, Beijing 100022, China; ²Beijing Institute of Hepatology, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China
Corresponding author: Ren Feng, Email: renfeng7512@hotmail.com

【Abstract】Objective To establish a clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated proteins (CRISPR/Cas13a)-based detection method for hepatitis B virus covalently closed circular DNA (HBV cccDNA). **Methods** After extracting the total DNA from the livers of 4 patients with hepatitis B collected in Beijing You'an Hospital, Capital Medical University from June 2017 to October 2020, total DNA was digested with Hind III endonuclease and plasmid-safe ATP-dependent DNase (PSAD), respectively; According to the structural differences between relaxed circular DNA (rcDNA) and cccDNA, primers for specific amplification of HBV cccDNA were designed, and the products after digestion were subjected to rolling circle amplification (RCA) and PCR amplification; And crRNA was screened to establish a new method for HBV cccDNA detection based on CRISPR/Cas13a technology. **Results** Alpha-1 antitrypsin (A1AT) and hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) primers were used to amplify the double digested product to verify the existence of hepatitis B virus genome in the

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2022.05.006

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81770611、82002243); 北京自然科学基金和北京市教委联合资助重点项目(No. KZ202010025035); 首都卫生发展科研专项重点攻关项目(No. 首发2020-1-1151、首发2021-1G-2181); 北京市科技计划“首都临床诊疗技术研究及示范应用”专项课题(No. Z191100006619096、Z191100006619097); 北京市优秀人才培养项目(No. 2018000021469G289); 北京市医院管理中心“青苗”计划专项经费资助(No. QML20201702)

作者单位: 100022 北京, 北京市垂杨柳医院检验科¹; 100069 北京, 首都医科大学附属北京佑安医院/北京肝病研究所²
通信作者: 任锋, Email: renfeng7512@hotmail.com

product; Using HBV cccDNA and HBV rcDNA primers to amplify the product after PSDA digestion, it was verified that only HBV cccDNA exists in the product. The positive sample after RCA was used as a template for gradient dilution, and then PCR amplification was performed and CRISPR/Cas13a detection was used after transcription. The lower limit of detection was calculated to be 10 copies/ μ l. **Conclusions** A novel detection method of RCA-PCR-CRISPR-Cas13a was established, which can detect HBV cccDNA with high sensitivity and high specificity, and provide an effective monitoring method for the evaluation of antiviral therapy of hepatitis B patients, the determination of treatment endpoints, and the adjustment of treatment plans.

【Key words】 Hepatitis B virus; Covalently closed circular, deoxyribonucleic acid; Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated proteins; Droplet digital polymerase chain reaction; Real-time quantitative PCR

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 是全球性的公共卫生问题, 对人类的健康造成了极大的危害。目前约有2.5亿感染者, 每年有几十万人死于HBV感染引起的肝功能衰竭、肝硬化和原发性肝癌^[1-2]。HBV长期存在的原因是由于共价闭环状(cccDNA)的存在, HBV cccDNA是病毒RNA复制转录的模板, 可以稳定存在于肝细胞核中, 其清除是治愈HBV感染的关键^[3-6]。因此, 只有对HBV cccDNA进行有效地检测, 才能对临床治疗和药物疗效做出正确地评价。

随着规律成簇的间隔短回文重复序列及其相关蛋白[clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated proteins, CRISPR/Cas]系统的快速发展, 不仅广泛应用于基因编辑领域, 而且在分子诊断方面也取得极大发展。科研人员开发出SHERLOCK (specific high sensitivity enzymatic reporter unLOCKing) 和DETECTR (DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter) 等检测方法, 在登革热病毒、寨卡病毒和人乳头瘤病毒等多种病原体检测中展示了较好的特异性和灵敏度^[7-10]。本研究利用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)、滚环扩增 (rolling circle amplification, RCA) 和CRISPR/Cas13a相结合, 建立了高特异性和高灵敏度检测HBV cccDNA的方法, 现报道如下。

资料与方法

一、研究对象

收集2017年6月至2020年10月在首都医科大学附属北京佑安医院就诊的4例临床诊断为乙型肝炎患者的肝组织样本, 经过PCR检测患者的血清HBV DNA载量为 $10^4 \sim 10^8$ 拷贝/ml。

二、试剂与仪器

DNA提取试剂盒QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, 德国); 质粒保护性ATP依赖的DNA酶 Plasmid-safe ATP-dependent DNase (Lucigen, 美国); phi29 DNA 聚合酶 (New England Biolabs, 美国); *Hind* III内切酶 (New England Biolabs, 美国); 琼脂糖 (北京索莱宝科技有限公司); 50 \times TAE 缓冲液 (北京索莱宝科技有限公司); Golden ViewTM核酸染料 (北京博迈德基因技术有限公司); BM 2 000/5 000bp DNA Marker (北京博迈德基因技术有限公司); 6 \times RNA/DNA Loading Buffer (北京博迈德基因技术有限公司); 普通PCR扩增仪 (Bio-Rad, 美国); 电泳槽 (Bio-Rad, 美国); 电泳仪 (Bio-Rad, 美国); 凝胶成像仪 (Bio-Rad, 美国); ViiATM7 Real-Time PCR System荧光定量PCR (Applied Biosystems, 美国); BIO-RAD QX200数字PCR仪 (Bio-Rad, 美国)。

三、引物和探针设计

α -1-抗胰蛋白酶 (α -1 antitrypsin, A1AT) 是一种糖蛋白, 广泛存在于肝脏组织中, HBsAg基因为HBV表面抗原基因, 在NCBI网站下载其引物序列。利用HBV cccDNA与HBV松弛环状DNA (relaxed circular DNA, rcDNA) 基因结构上的差异, 在跨越HBV DNA负链缺口处相对保守位置设计引物和探针, 保证HBV cccDNA扩增的特异性。同样在NCBI网站上找出 β -actin基因序列的引物和探针。RCA引物R1~R8均引用相关文献^[11] (均在HBV基因保守区)。所有引物和探针序列均由生物工程 (上海) 股份有限公司合成 (表1)。

四、肝组织HBV cccDNA的提取

先从患者肝组织中提取总DNA, 然后用*Hind* III内切酶对总DNA进行酶切。*Hind* III酶切体系:

Hind III内切酶1 μl、10× NEB Buffer 5 μl、总DNA 10 μl、DEPC水34 μl，总体积为50 μl。反应条件：37 °C水浴60 min。接着用PSAD酶进行消化。PSAD酶切体系：25 mmol/L ATP 0.8 μl、PSAD（10 U/L）0.4 μl、10× Buffer 2 μl、肝组织DNA产物 8.5 μl，总体积为11.7 μl。反应条件：37 °C水浴12 h过夜，然后70 °C水浴30 min灭活PSAD酶。最终得到HBV cccDNA。

五、RCA扩增

对*Hind* III内切酶和PSAD酶切后的cccDNA

表1 引物及探针序列

名称	序列 (5'→3')
HBV cccDNA-F	GGGGCGCACCTCTCTTTA
HBV cccDNA-R	AGGCACAGCTTGGAGGC
HBV cccDNA-probe	TCACCTCTGCCTAATCATCTC
β-actin-F	ACTGTGCCCATCTACGAGG
β-actin-R	CAGGCAGCTCGTAGCTCTT
β-actin-probe	CGGGAAATCGTGCGTGAC
HBV rcDNA-F	GTTGCCCGTTTGTCTCTAATTC
HBV rcDNA-R	GGAGGGATACATAGAGGTTTCCTGA
A1AT-F	TTCCCTGGTCTGAATGTGTG
A1AT-R	ACTGTCCAGGTCAGTGGTG
HBsAg-F	TCACAATACCGCAGAGTC
HBsAg-R	ACATCCAGCGATAACCAG
R1	ACCTATTCTCTCCC
R2	ATGCAACTTTTTCAC
R3	GGCCACATATTGT
R4	AATCCTCACAATACC
R5	CTAGCAGAGCTTGGT
R6	CCTTTGTCCAAGGGC
R7	TAGAAGAAGAACTCC
R8	CCTATGGGAGTGGGC

注：HBV cccDNA-probe 和 β-actin-probe 为探针序列，5'-端标记 6-FAM，3'-端标记 BHQ1

进行RCA，第一步扩增体系：10× Phi29 DNA聚合酶 Buffer 1 μl、引物（R1~R8）4 μl（每个引物0.5 μl）、HBV cccDNA < 5 μl（适量）、DEPC水补充至10 μl，总体积10 μl。放入普通PCR扩增仪中，反应条件：95 °C，3 min；50 °C，15 s；30 °C，15 s；20 °C，10 min。第二步扩增体系：上一步扩增产物10 μl、Phi29 DNA聚合酶1 μl、10× Phi29 DNA聚合酶 Buffer 1 μl、引物（R1~R8）4 μl（每个引物0.5 μl）、Phi29 BSA 1 μl、4× dNTP mix 3 μl、总体积20 μl。反应条件：30 °C水浴16 h过夜，然后65 °C水浴10 min灭活Phi 29 DNA聚合酶。

六、普通PCR扩增

对RCA后的产物进行普通PCR扩增，分别使用A1AT、HBsAg、HBV cccDNA和rcDNA引物。扩增体系：RCA扩增后模板2 μl、上游引物（10 μmol/L）1 μl、下游引物（10 μmol/L）1 μl、2× Taq Mix 12.5 μl、DEPC水8.5 μl，总体积25 μl。反应条件：94 °C，3 min；94 °C、30 s，58 °C、45 s，72 °C、30 s，35个循环；72 °C，10 min；4 °C，+∞。

七、数字PCR检测

根据BIO-RAD QX200数字PCR仪器操作说明，配置反应体系：2× PCR Mix 10 μl、上游引物（10 μmol/L）0.5 μl、下游引物（10 μmol/L）0.5 μl、探针（10 μmol/L）0.5 μl、ddH₂O 6.5 μl、模板2 μl。PCR扩增条件：95 °C、10 min；94 °C、30 s，60 °C、1 min，40个循环；98 °C、10 min；4 °C +∞。

八、crRNA序列的设计和筛选

按照crRNA序列的设计原则^[12]，在HBV cccDNA上下游引物的序列之间，选择3个位点作为检测HBV cccDNA的crRNA靶位点，并设计相应的crRNA序列（表2）。

表2 crRNA 相关引物序列

名称	序列 (5'→3')
T7-crRNA-F	TAATACGACTCACTATAGGGGATTAGACTACCCCAA
HBV-1-crRNA	GGGGATTAGACTACCCCAAAAACGAAGGGGACTAAAAC TCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTCA
HBV-1R	TGAACAAGAGATGATTAGGC
HBV-2-crRNA	GGGGATTAGACTACCCCAAAAACGAAGGGGACTAAAAC AACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTC
HBV-2R	GAGATGATTAGGCAGAGGTG
HBV-3-crRNA	GGGGATTAGACTACCCCAAAAACGAAGGGGACTAAAAC TTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGT
HBV-3R	ACAAGAGATGATTAGGCAGA

九、CRISPR/Cas13a检测体系的构建

根据文献^[9], 配制 CRISPR/Cas13a检测体系: NTP Mix (2.5 mmol/L) 2 μl; RNA酶抑制剂1 μl; LwCas13a蛋白 (25 nmol/L) 1 μl; T7 RNA聚合酶 0.5 μl; MgCl₂溶液 (10 mmol/L) 0.25 μl; HEPES缓冲液 (20 mmol/L) 0.5 μl; crRNA (2 μmol/L) 1.5 μl; 荧光报告RNA (2 nmol/L) 2.5 μl; 无菌无酶水10.75 μl; 扩增产物5 μl, 总体积25 μl。将配好的体系放于荧光定量PCR仪器中, 选择FAM通道检测荧光信号变化。反应条件为: 37℃、15s; 37℃、1 min 45 s (收集荧光), 30个循环。

十、伦理学审查

本研究由首都医科大学附属北京佑安医院伦理委员会审批, 批号: 京佑科伦字 (2020) 132号。患者均签署知情同意书。

十一、统计学处理

应用SPSS 25.0软件进行统计学分析。非正态分布的数据采用中位数 (四分位数) [M (P25, P75)] 表示, 并采用独立样本秩和检验 (Kruskal-Wallis) 进行多组数据的比较, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、CRISPR-Cas13a检测HBV cccDNA方法的建立

在肝组织样本提取的总DNA中, 含有线性DNA、环状DNA、双链DNA、HBV rcDNA和HBV cccDNA。首先利用Hind III内切酶处理后, 环状DNA被消化成线性DNA, 双链DNA也被切割。然后经过PSAD酶切消化后, 线性DNA和松弛环状DNA都被清除, 留下环状闭合的HBV cccDNA和一些DNA片段 (图1)。然后对HBV cccDNA进行RCA扩增和PCR转录扩增, 使HBV cccDNA转录为单链RNA (single-stranded ribonucleic acid, ssRNA)。通过设计和筛选出的crRNA与单链RNA上的靶序列结合, 激活Cas13a蛋白的“附带切割”功能, 剪切带有荧光基团和淬灭基团的荧光报告RNA, 从而发出被仪器检测的荧光信号 (图1)。

二、肝组织总DNA的提取和酶切

从4个肝组织样本中提取总DNA后, 依次使用Hind III内切酶和PSAD酶切消化后, 分别进行琼脂糖凝胶电泳, 见图2。Hind III酶切后的条带亮

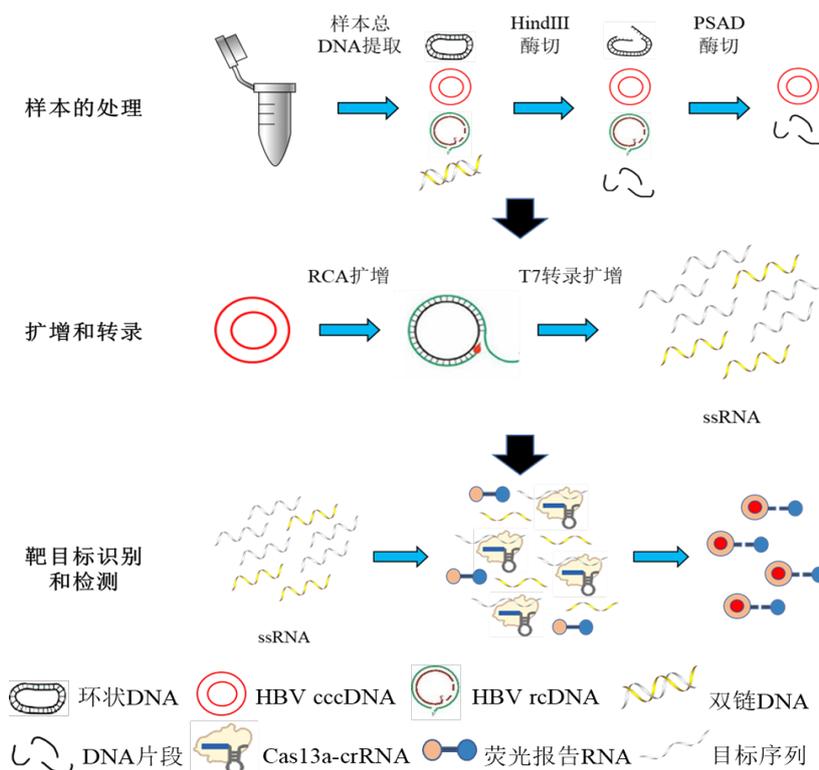


图1 RCA-PCR-CRISPR-Cas13a检测示意图

度基本保持不变,因*Hind* III内切酶只切断了环状DNA和双链DNA,并未进行消化;而经过PSAD酶切后,在图中已不见条带,因PSAD去除了线性DNA、rcDNA和被切断的环状DNA,留下了浓度很低的HBV cccDNA和一些DNA片段。

三、HBV cccDNA特异性验证

应用Southern blot方法对双重酶切后的产物进行检测,先对HBV cccDNA探针进行地高辛标记,再检测4个肝组织样本双重酶切后的产物。如图3所示,标记了地高辛的HBV cccDNA探针和地高辛标记的对照组DNA均被检测到,且双重酶切后的产物中亦检测到HBV cccDNA的存在。

利用A1AT和HBsAg引物对双重酶切后产物扩增后,进行琼脂糖凝胶电泳,结果如图4所示。A1AT引物扩增的图中未出现目标条带,因为A1AT广泛存在于基因组中,双重酶切后会被完全消化掉;而HBsAg引物扩增的图中有4个较明显的目标

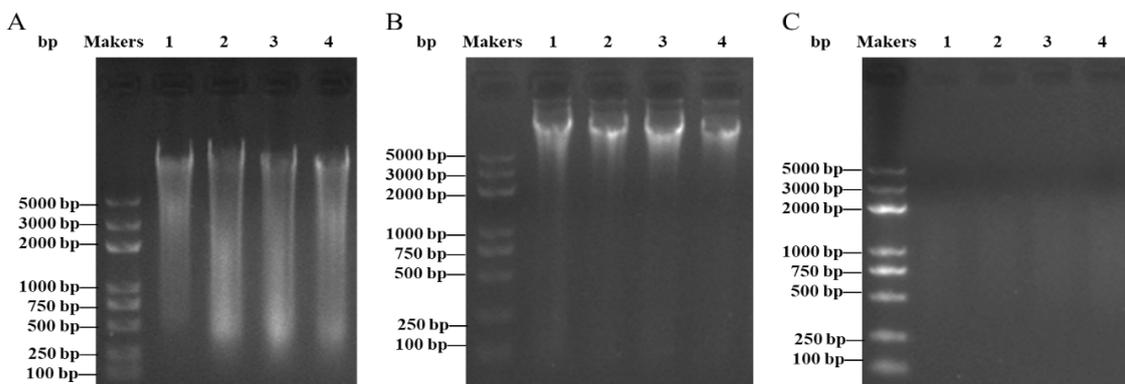
条带,因为HBsAg为HBV特异性基因,提示酶切过的产物中含有乙型肝炎病毒基因组。

利用HBV cccDNA引物对双重酶切后的产物进行扩增,进行琼脂糖凝胶电泳(图5)。图中可见目标条带,提示HBV cccDNA被特异性扩增。

4. 数字PCR检测RCA扩增前后的产物:利用RCA引物对双重酶切后的产物进行扩增,然后应用数字PCR方法检测扩增前后产物中HBV cccDNA的浓度。选取其中1个样本进行检测,如图6所示,RCA扩增前的HBV cccDNA浓度为3 400 拷贝/μl,而RCA扩增后的HBV cccDNA浓度为 5.12×10^4 拷贝/μl。

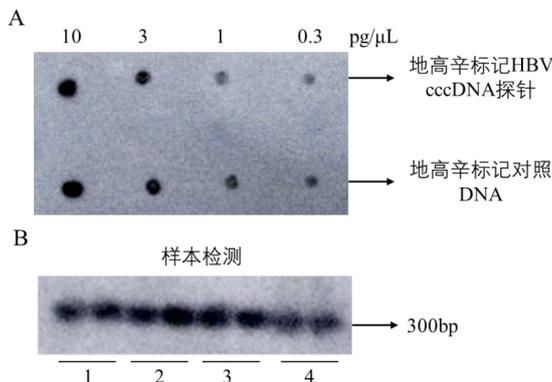
五、crRNA的筛选

利用CRISPR-Cas13a检测方法筛选检测效率最高的crRNA。如图7所示,在检测60 min时,crRNA2荧光强度[(870 000.0 ± 70 000) RFU]显著高于crRNA1[(250 000.0 ± 45 000) RFU]和crRNA3[(140 000 ± 64 000) RFU],故将crRNA2



注: A: 4个肝组织样本的总DNA条带亮度均较明显; B: *Hind* III酶切后的条带亮度基本保持不变; C: PSAD酶切后已不见条带。每个样本进行3次重复实验

图2 肝组织总DNA、*Hind* III内切酶和PSAD酶切后的电泳图



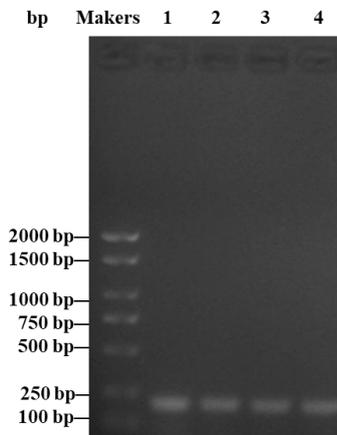
注: A: 地高辛标记HBV cccDNA探针检测结果; B: 双重酶切后的产物检测结果,每个样本做2个重复实验

图3 Southern blot检测双重酶切后的产物

用于本研究CRISPR-Cas13a检测系统。

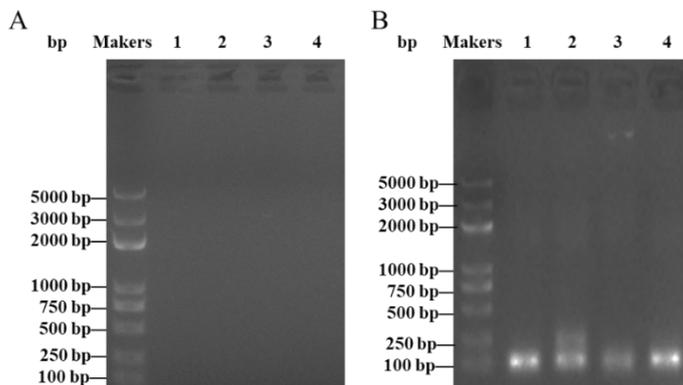
六、CRISPR-cas13a检测系统

由数字PCR结果得到其中1个样本的HBV cccDNA浓度 5.12×10^4 拷贝/ μl ，然后以此为模板进行梯度稀释，分别稀释为 1×10^4 拷贝/ μl 、 1×10^3 拷贝/ μl 、 1×10^2 拷贝/ μl 、 1×10^1 拷贝/ μl 和 1×10^0 拷贝/ μl 。再利用CRISPR-Cas13a系统分别进行检测。如图8所示，在30 min时， 1×10^4 拷贝/ μl 、 1×10^3 拷贝/ μl 、 1×10^2 拷贝/ μl 、 1×10^1 拷贝/ μl 荧光强度与阴性对照差异具有统计学意义 ($H = 19.42$ 、 $P < 0.001$)， 1×10^0 拷贝/ μl [(230 000 \pm 5 000) RFU]和阴性对照[(220 000 \pm 6 200) RFU]差异无统计学意义。故该方法的最低检出限为10拷贝/ μl 。由此本研究建立了RCA-PCR-CRISPR-Cas13a检测方法。



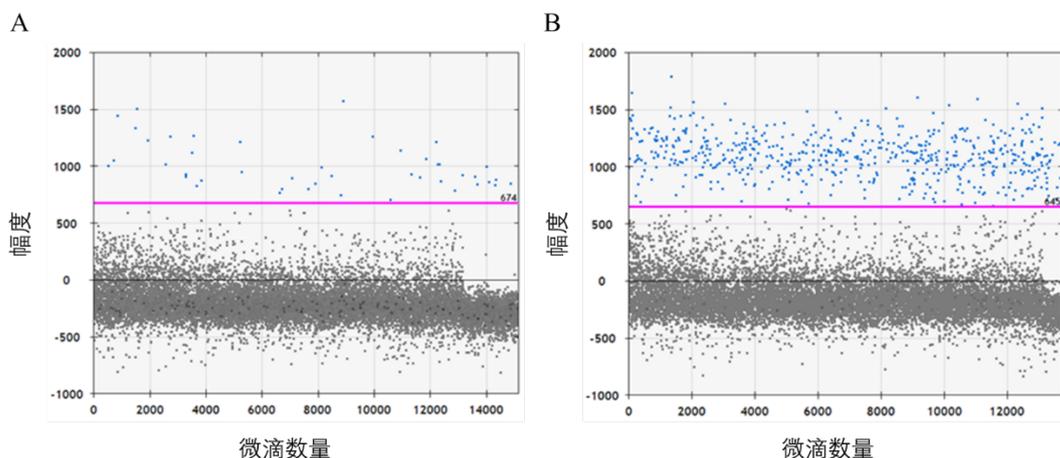
注：HBV cccDNA引物扩增双重酶切后的产物，出现了较明显的目标条带。每个样本进行3次重复实验

图5 双重酶切后HBV cccDNA引物扩增的电泳图



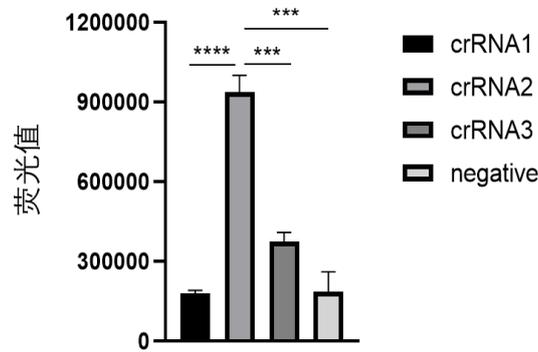
注：A：A1AT引物扩增双重酶切后的产物，未出现目标条带；B：HBsAg引物扩增双重酶切后的产物，出现4个较明显的目标条带。每个样本进行3次重复实验

图4 A1AT和HBsAg引物扩增双重酶切后产物的电泳图



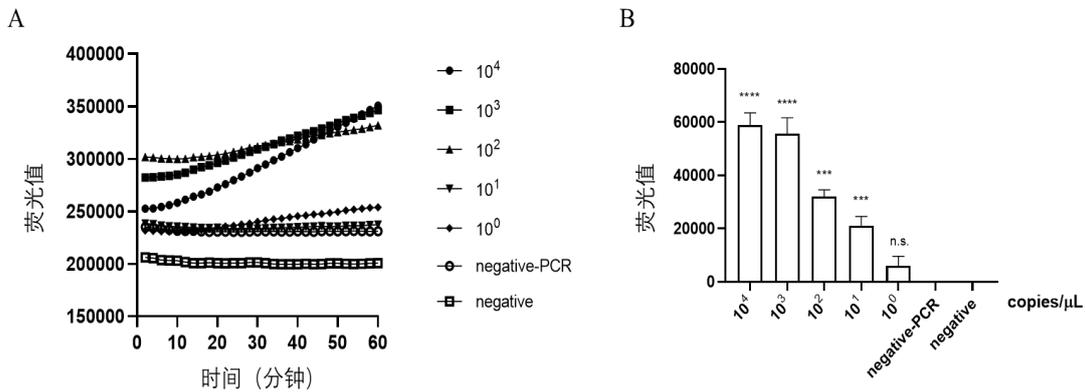
注：A：数字PCR检测RCA扩增前产物的阳性微滴数量较少；B：数字PCR检测RCA扩增后产物的阳性微滴数量显著增加。进行3次重复检测

图6 数字PCR检测RCA扩增前后的微滴散点图



注：在检测60 min时，crRNA3的荧光值最高。每个crRNA检测进行3次重复

图7 crRNA的筛选



注：A：CRISPR-Cas13a系统检测梯度稀释的HBV cccDNA样本；B：A图在30 min时扣除背景的荧光值。每个梯度的浓度进行3次重复检测（*：P < 0.05、**：P < 0.01、***：P < 0.001）

图8 CRISPR-cas13a系统的检测

讨论

HBV能够长期存在于乙型肝炎患者的肝脏中，当其进入肝细胞后，会在细胞质中脱掉核衣壳，形成rcDNA，接着rcDNA进入细胞核中，在DNA聚合酶和拓扑异构酶的作用下形成HBV cccDNA^[13-15]。目前，临床上对于HBV感染者的抗病毒治疗只能达到抑制作用，而不能彻底清除^[16]。HBV cccDNA是RNA病毒合成的模板，导致病毒抗原如HBeAg和HBsAg以及子代病毒的产生。因此有效监测HBV cccDNA是否被清除是乙型肝炎患者治疗效果的重要手段。目前检测HBV cccDNA的方法有Southern blot印迹杂交、实时荧光定量PCR、巢式PCR和数字PCR等方法^[17-19]，存在灵敏度和特异性较低、操作步骤繁琐、需要精密设备和成本较高等一些缺点，不利于临床的使用和推广^[20-21]。本研究通过在跨越负链缺口处设计引物，并利用Hind III内切酶和PSAD双重酶切，首先经过A1AT和HBsAg引物扩增，验证了HBV基因组的存在；然后

对PSAD酶切前后cccDNA和rcDNA的扩增，验证了rcDNA被完全清除，仅留下cccDNA。充分证明了本研究对HBV cccDNA检测具有较高的特异性。

在2016年，CRISPR-Cas13a系统被发现具有核酸检测功能。Abudayyeh等^[22]发现Cas13a能够特异性靶向切割单链RNA，并在切割后保持活性，继续切割其他非靶标RNA，这种特性被称为“附带切割”。之后经过研究人员不断开发，CRISPR-Cas13a系统被用于埃博拉病毒、登革热病毒、寨卡病毒和禽流感病毒等多种病原体，且能够达到单碱基阿摩尔级的特异性和灵敏度^[7, 23-25]。本研究利用CRISPR-Cas13a结合RCA和PCR技术，通过设计和筛选序列保守性crRNA，大大提高了检测的灵敏度，使HBV cccDNA的检测下限达到了10 拷贝/μl。此外，CRISPR-Cas13a系统检测时间短，成本较低，易于操作，为推广HBV cccDNA的临床检测提供可行方案。

综上，本研究建立了RCA-PCR-CRISPR-Cas13a检测HBV cccDNA的方法，能够高特异性

和高灵敏度的检测乙型肝炎患者肝组织内的HBV cccDNA, 为指导乙型肝炎患者的用药提供及时有效的信息, 具有重要的临床意义。

参 考 文 献

- [1] Razavi-Shearer D, Gamkrelidze I, Nguyen MH, et al. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*,2018,3(6):383-403.
- [2] Revill PA, Chisari FV, Block JM, et al. A global scientific strategy to cure hepatitis B[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*,2019,4(7):545-558.
- [3] Fung S, Choi H, Gehring A, et al. Getting to HBV cure: The promising paths forward[J]. *Hepatology*,2022,76(1):233-250.
- [4] Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy[J]. *Gastroenterology*,2004,126(7):1750-1758.
- [5] Lai CL, Wong D, Ip P, et al. Reduction of covalently closed circular DNA with long-term nucleos(t)ide analogue treatment in chronic hepatitis B[J]. *J Hepatol*,2017,66(2):275-281.
- [6] Wong G, Gane E, Lok A. How to achieve functional cure of HBV: Stopping NUCs, adding interferon or new drug development?[J]. *J Hepatol*,2022,76(6):1249-1262.
- [7] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. *Science*,2017,356(6336):438-442.
- [8] Chen JS, Ma E, Harrington LB, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. *Science*, 2018,360(6387):436-439.
- [9] Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. *Science*,2018,360(6387):444-448.
- [10] Kaminski MM, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, et al. CRISPR-based diagnostics[J]. *Nat Biomed Eng*,2021,5(7):643-656.
- [11] 李忠斌. 慢性乙型肝炎耐药患者外周血单个核细胞HBV cccDNA 耐药相关基因突变特点研究[D]. 中国人民解放军医学院, 2012.
- [12] Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, et al. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases[J]. *Nat Protoc*,2019,14(10):2986-3012.
- [13] Lucifora J, Protzer U. Attacking hepatitis B virus cccDNA--The holy grail to hepatitis B cure[J]. *J Hepatol*,2016,64(Suppl 1):S41-S48.
- [14] Tsai KN, Kuo CF, Ou JJ. Mechanisms of hepatitis B virus persistence[J]. *Trends Microbiol*,2018,26(1):33-42.
- [15] Hoofnagle JH. Reactivation of hepatitis B[J]. *Hepatology*,2009,49 (Suppl5):S156-S165.
- [16] 潘玉, 王莉娜, 宋正霞, 等. 恩替卡韦与干扰素治疗HBeAg阳性慢性乙型肝炎的疗效[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*,2016,10(4):392-395.
- [17] 田原, 徐玲, 范子豪, 等. 基于微滴数字PCR技术建立HBV共价闭环状DNA的检测方法[J]. *临床肝胆病杂志*,2021,37(8):1806-1810.
- [18] Xu CH, Li ZS, Dai JY, et al. Nested real-time quantitative polymerase chain reaction assay for detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA[J]. *Chin Med J (Engl)*,2011,124(10):1513-1516.
- [19] Caviglia GP, Abate ML, Tandoi F, et al. Quantitation of HBV cccDNA in anti-HBc-positive liver donors by droplet digital PCR: A new tool to detect occult infection[J]. *J Hepatol*,2018,69(2):301-307.
- [20] Li X, Zhao J, Yuan Q, et al. Detection of HBV covalently closed circular DNA[J]. *Viruses*,2017,9(6):139.
- [21] Zhang H, Tu T. Approaches to quantifying hepatitis B virus covalently closed circular DNA[J]. *Clin Mol Hepatol*,2022,28(2):135-149.
- [22] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. *Science*,2016,353(6299):f5573.
- [23] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6[J]. *Science*,2018,360(6387):439-444.
- [24] Qin P, Park M, Alfson K J, et al. Rapid and fully microfluidic Ebola virus detection with CRISPR-Cas13a[J]. *ACS Sens*,2019,4(4):1048-1054.
- [25] Liu Y, Xu H, Liu C, et al. CRISPR-Cas13a nanomachine based simple technology for avian influenza A (H7N9) virus on-site detection[J]. *J Biomed Nanotechnol*,2019,15(4):790-798.

(收稿日期: 2022-06-24)
(本文编辑: 孙荣华)

王俊文, 田原, 范子豪, 等. 基于规律成簇的间隔短回文重复序列及其相关蛋白技术检测乙型肝炎病毒共价闭环状DNA方法的建立[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2022,16(5):320-327.