

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-042

CRISPR/Cas 系统在分子诊断领域的应用研究进展

王珂^{1,2}, 陈文慧¹, 雷春阳¹, 聂舟¹

(¹ 湖南大学化学化工学院, 化学生物传感全国重点实验室, 湖南 长沙 410012; ² 空军军医大学药理学系, 陕西 西安 710032)

摘要: CRISPR/Cas 系统因其高特异性、可编程性和便捷性, 已成为分子诊断领域的重要工具。本文综述了 CRISPR/Cas 系统的技术原理、诊断平台优化及其在精准医学中的应用进展。概述了 CRISPR/Cas 系统的作用机制与分类, 重点讨论了 CRISPR 诊断技术的创新优化策略, 包括基于核酸预扩增 [如 SHERLOCK (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking)、DETECTR (DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter)] 和免扩增的检测方法。探讨了 CRISPR/Cas 技术在感染性疾病 (病原体筛查、耐药性检测)、肿瘤分子分型 (癌症早筛、遗传变异分析) 及非核酸标志物检测中的临床应用。最后展望了该技术的未来发展方向, 包括微型化设备开发、高通量智能化诊断体系构建等, 并分析了其在临床转化中面临的关键挑战 (如灵敏度标准化、成本控制等)。通过总结目前研究, 为 CRISPR/Cas 技术在分子诊断领域的进一步优化和医学应用提供理论参考。

关键词: CRISPR/Cas 系统; 即时检测; 临床转化应用; 微型化设备; 人工智能辅助分子诊断

中图分类号: Q816 文献标志码: A

Advances in the application of CRISPR/Cas systems in molecular diagnostics

WANG Ke^{1,2}, CHEN Wenhui¹, LEI Chunyang¹, NIE Zhou¹

(¹ State Key Laboratory of Chemo and Biosensing, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410012, Hunan, China; ² Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China)

Abstract: The CRISPR/Cas system has emerged as a pivotal tool in molecular diagnostics due to its high specificity, programmability, and ease of use. This review provides a comprehensive overview of the mechanistic principles, diagnostic platform optimization, and applications of CRISPR/Cas systems in precision medicine. We begin with an outline of the classification and molecular mechanisms of CRISPR/Cas systems, highlighting the functional differences among Type I - VI systems. Our focus then shifts to innovative diagnostic strategies, including nucleic acid pre-amplification methods (*e. g.*, SHERLOCK, DETECTR) and amplification-free approaches. These strategies have

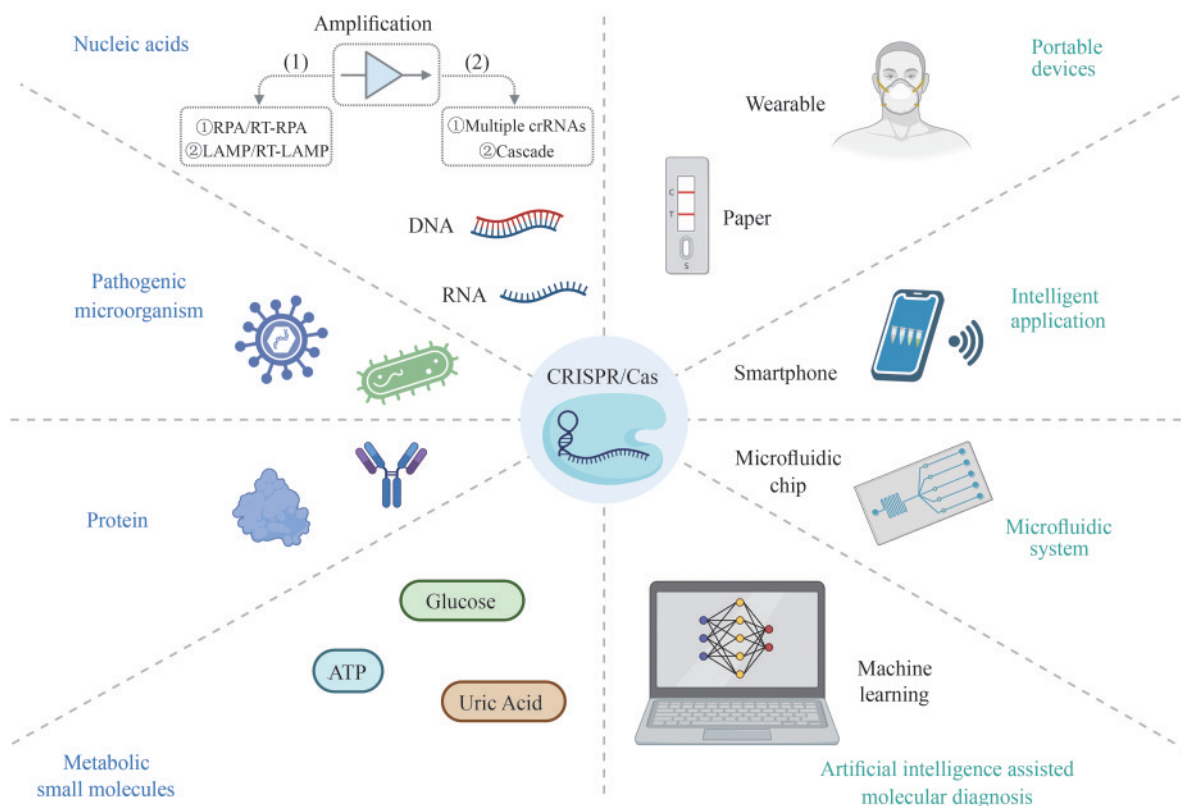
收稿日期: 2025-05-07 修回日期: 2025-06-18

基金项目: 国家自然科学基金 (22034002)

引用本文: 王珂, 陈文慧, 雷春阳, 聂舟. CRISPR/Cas 系统在分子诊断领域的应用研究进展[J]. 合成生物学, 2026, 7(1): 3-31

Citation: WANG Ke, CHEN Wenhui, LEI Chunyang, NIE Zhou. Advances in the application of CRISPR/Cas systems in molecular diagnostics [J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7(1): 3-31

significantly enhanced the sensitivity and specificity of molecular diagnostics, making them more efficient and reliable than conventional techniques. The review then explores the broad clinical applications of CRISPR/Cas technology with infectious diseases, such as pathogen screening and drug-resistance detection, demonstrating remarkable utilization in rapidly identifying pathogens and their resistance profiles. In the field of cancer research, the technology has shown great potential in early screening and genetic variant analysis, which are crucial for developing personalized treatment strategies. Moreover, CRISPR/Cas systems are expanding their diagnostic capabilities to include non-nucleic acid biomarker detection, further solidifying their position as versatile tools in clinical diagnostics. The review also addresses future directions in the field, such as the development of miniaturized devices and high-throughput intelligent diagnostic systems. These advancements are expected to enhance portability, accessibility, and efficiency, enabling rapid point-of-care testing in diverse settings, including resource-limited environments. The integration of CRISPR technology with microfluidics and portable detection devices is particularly promising for enabling rapid and accurate diagnostics at the bedside or in the field. As research continues to evolve, the ongoing refinement of CRISPR/Cas systems is anticipated to significantly improve the accuracy, speed, and accessibility of molecular diagnostics. This progress is expected to lead to better clinical outcomes and more effective public health responses. However, several challenges in clinical translation must be addressed, such as standardization of sensitivity and cost reduction. This review aims to provide a theoretical basis for advancing CRISPR-based diagnostics in biomedical research and to guide the future development of CRISPR/Cas technologies in molecular diagnostics, particularly in overcoming the limitations of traditional diagnostic methods.



Keywords: CRISPR/Cas system; point-of-care testing; clinical translational applications; miniaturized devices; artificial intelligence assisted molecular diagnosis

分子诊断技术作为现代医学和生命科学的重要分支，通过检测生物样本中的核酸、蛋白质等分子标志物，为疾病的早期筛查、诊断、治疗监测和预后评估提供了关键信息。近年来，随着基因组学、转录组学和蛋白质组学等领域的快速发展，分子诊断技术在灵敏度、特异性和检测速度上取得了显著进步。目前，聚合酶链反应（PCR）、测序技术和免疫分析等传统的分子诊断技术仍存在一定的局限性，例如对复杂样本的处理能力不足、对低丰度靶标的检测灵敏度有限，以及对便携化和现场检测的适应性不足。这些问题严重制约了分子诊断技术在临床和公共卫生领域的广泛应用，尤其是资源有限环境中的实际应用。因此，开发新型分子诊断技术以满足日益增长的临床和公共卫生需求已成为研究热点。

CRISPR/Cas 系统作为一种革命性的基因编辑工具，因其特异性和高效性在生物医学领域引起了广泛关注。该系统最初被发现是细菌和古菌中的一种适应性免疫机制，通过识别和切割外源核酸序列来抵御病毒和质粒的入侵。近年来，研究者们发现 CRISPR/Cas 系统不仅在基因组编辑中表现出卓越的效能，还具有巨大的分子诊断潜力。CRISPR/Cas 系统通过其独特的核酸结合和切割活性，能够实现对核酸靶标的高特异性识别，并通过信号放大机制显著提高检测灵敏度。

在分子诊断领域，CRISPR/Cas 技术通过结合核酸扩增、信号转换和便携式检测平台，突破了传统技术的诸多局限性。目前，以 CRISPR/Cas 系统构建的核酸检测方法已通过临床验证，初步成

果符合预期，展现出广阔的应用前景。然而，在实现临床大规模应用之前，CRISPR/Cas 系统仍有一系列挑战亟待解决，包括进一步提升检测特异性、增强对复杂样本的处理能力，以及优化便携式设备的稳定性等。

本文综述了 CRISPR/Cas 系统在分子诊断领域的研究与应用进展，重点介绍了其作用机制、技术优势以及在疾病检测中的具体应用。通过对现有研究的总结和分析，本文旨在为 CRISPR/Cas 技术在分子诊断领域的进一步发展提供参考和依据。

1 CRISPR/Cas 系统的相关介绍

1.1 CRISPR/Cas 系统作用机制与分类

CRISPR/Cas 系统作为细菌和古细菌的适应性免疫机制，通过特异性识别和切割外源核酸抵御病毒入侵。经系统发育分析，Makarova 团队^[1]优化了其分类体系，提出目前普遍采用的两大类（Class I 和 Class II）。根据效应复合体结构差异，现有 CRISPR 系统可分为 6 种主要类型（Type I ~Type VI），见表 1。

在 Class I 系统中，效应器由多亚基复合物构成（如 I 型、III 型和 IV 型），其核心 Cascade 复合物通过 Cas5/6/7/8/11 蛋白的协同作用实现前体 RNA 序列处理、靶标识别及核酸切割。值得注意的是，不同亚型（如 I -A 与 I -E）的复合物组分差异显著增强了系统适应能力^[1]。然而，由于多

表1 CRISPR 效应蛋白的相关特征

Table. 1 Characteristics of CRISPR/Cas system effector proteins

Cas 蛋白	大类	型	靶标	反式切割活性/底物	PAM/PFS 序列
Cas9 ^[2-3]	Class II 系统	Type II	dsDNA	无	3' GC-rich PAM
Cas7-11 ^[4-6] (多亚基复合物)	Class I 系统	Type III	ssRNA	无	—
Cas12a (Cpf1) ^[7]	Class II 系统	Type V	dsDNA/ssDNA	有/ssDNA	5' AT-rich PAM
Cas12b ^[8]	Class II 系统	Type V	dsDNA/ssDNA	有/ssDNA	5' AT-rich PAM
Cas12f (Cas14) ^[9-13]	Class II 系统	Type V	dsDNA/ssDNA	有/ssDNA	5' T-rich PAM
Cas13 ^[14]	Class II 系统	Type VI	ssRNA	有/ssRNA	3' non-G-PFS
Cas3 蛋白 (多亚基复合物) ^[15]	Class I 系统	Type I	dsDNA	有/ssDNA	AAG

注：Cas9 具有反式切割活性，但这种活性的发挥需要依赖 tracrRNA 和 crRNA 形成的复合物，而仅凭 sgRNA 则无法实现^[16]。

亚基结构的复杂性、大分子量及多重调控机制等特征, Class I 系统在分子诊断领域的应用研究相对较少。其中, Cas7-11 由 4 个 Cas7 及 1 个 Cas11 结构域组成的多功能融合蛋白, 具备独立完成 crRNA 介导的 RNA 靶向切割的能力, 这一特性有效简化了操作系统, 省去了复杂的环节与步骤, 使其更为便捷高效^[6] [图 1(a)]。通过工程化修饰 Cas7-11 的 RNA 识别域, 或整合微流控芯片等技术, Cas7-11 系统在多重核酸检测(如病原体筛查、肿瘤标志物检测)领域可与 Class II 系统形成技术互补, 为分子诊断提供多元化解决方案。

Class II 系统通过单个效应蛋白执行功能, 该系统作为基因组编辑的核心工具, 涵盖 II 型、V 型和 VI 型三个分支。其核心酶家族(Cas9、Cas12、Cas13 及 Cas14) 凭借差异化的底物特异性(dsDNA/ssDNA/RNA), 在基因编辑与分子诊断领域实现多元化应用 [图 1(b)]。II 型系统以 Cas9 为标志性蛋白, 通过 crRNA-tracrRNA 复合体 (sgRNA) 定位靶 DNA, 依赖 PAM 序列在 RuvC 与 HNH 核酸酶结构域协同作用下引起双链断裂^[17-18]。V 型系统中, Cas12 家族展现独特功能优势: V-A 型 Cas 蛋白(如 Cas12a) 在 crRNA 引导下, 能够特异性识别与 crRNA 互补且含有 PAM 序列的双链 DNA 靶标, 并通过其 RuvC 结构域依次切割非靶链和靶链, 这个顺式切割活性: 过程使其激活, 激活后的 Cas12a 进而获得对非目标单链 DNA 的非特异性切割能力, 即反式切割活性。其中, 反式切割活性可通过荧光 ssDNA 探针的降解实现信号输出, 已成为一种高效的信号放大方式。此外, 当 Cas12a 遇到与 crRNA 互补的单链 DNA 时, 即使该单链 DNA 不依赖 PAM 序列, 也能激活 Cas12a 的核酸内切酶活性; V-B 型 (Cas12b) 高温稳定特性能够适配现场即时检测 (POCT) 需求^[8]。Cas12f (V-F 亚型, 又称 Cas14) 作为 CRISPR/Cas 系统中已知最小的效应蛋白之一, 大小在 400~700 个氨基酸之间, 通过 crRNA 引导特异性识别单链 DNA 靶标, 并触发非特异性切割任意的 ssDNA, 展现出反式切割活性^[9]。VI 型系统专攻 RNA 调控: Cas13a (VI-A 型) 结合靶 RNA 后, HEPN 结构域构象变化激活非特异 RNase 活性, 可切割周围任意单链 RNA。通过设计多个 crRNA (每个靶标对应

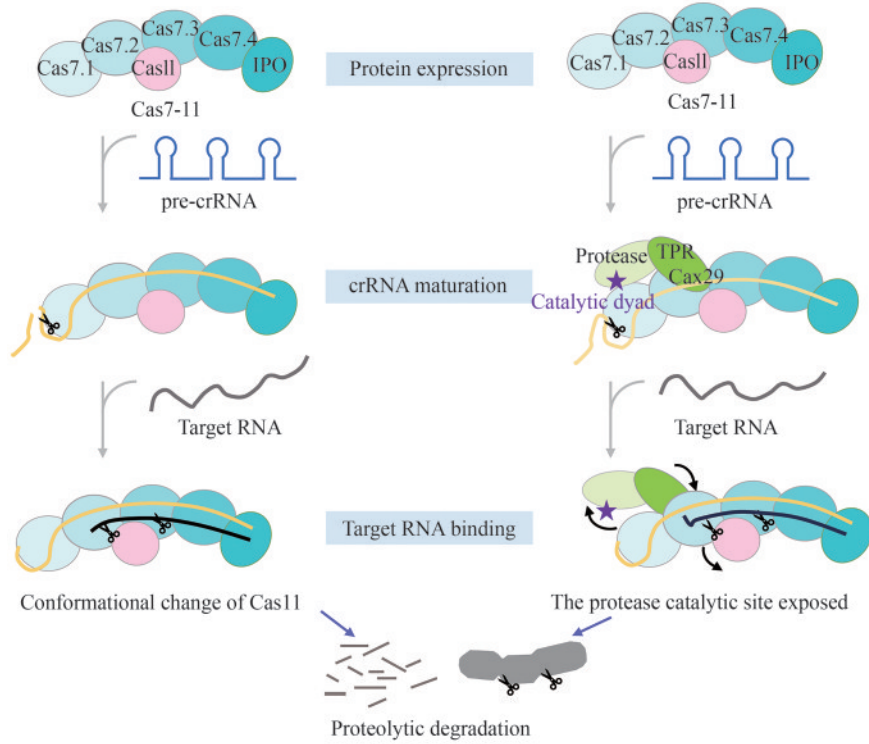
一个 crRNA) 及不同荧光报告探针, 单管反应中可并行检测多靶标^[14, 19-21]。Class II 类系统的模块化特性与功能多样性, 为开发高灵敏、多场景适配的分子诊断技术奠定了基础。

1.2 CRISPR 诊断技术平台的创新与优化

CRISPR 技术应用于核酸诊断方面的显著优势, 源于其分子机制与功能特性的整合。例如, 它通过 crRNA 与靶核酸的互补配对实现单碱基分辨率的精准识别, 可高效鉴别病原体特征序列及宿主基因突变。在 CRISPR/Cas 分子诊断技术中, Cas12 和 Cas13 的反式切割活性机制存在一定差异。Cas12 在结合靶标 DNA 后, 会激活其非特异性的 DNA 切割活性, 能够降解其他单链 DNA 分子, 从而实现信号放大。Cas13 结合靶标 RNA 后, 触发非靶标 RNA 的非特异性降解, 进而产生可检测信号。此外, 这些蛋白的级联信号放大机制依赖于靶标结合激活的非特异性反式切割, 通过报告分子裂解实现信号放大。同时, 高度可编程的设计框架支持 crRNA 序列工程化设计, 使该技术能够适用于 DNA、RNA 及非核酸靶标检测, 并兼容荧光、电化学和比色等多种信号输出模式, 从而为便携式高通量检测平台的工程化构建提供了有力支持。

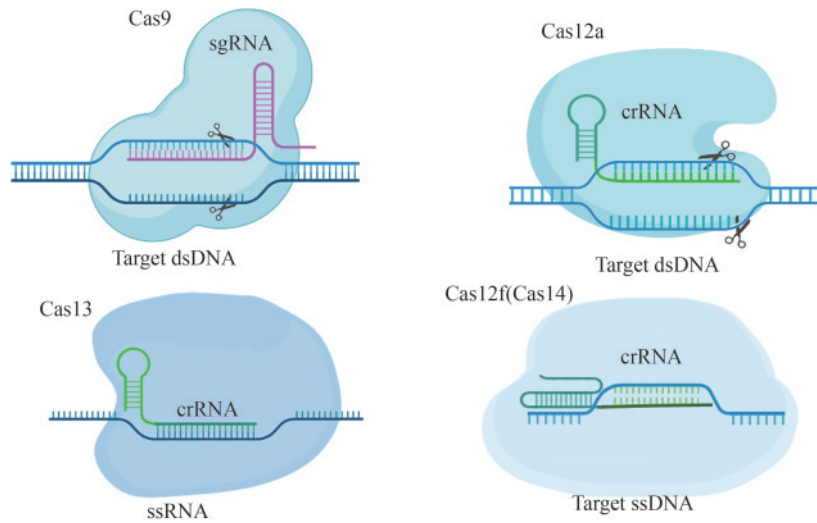
1.2.1 基于核酸预扩增的 CRISPR 诊断技术

CRISPR/Cas 系统虽具备单碱基识别精度, 但其检测灵敏度 (pmol/L~fmol/L 级) 难以满足临床痕量靶标 (如 amol/L 级病毒核酸) 的检测需求。为此, 研究者们通过耦合核酸扩增与 CRISPR 反式切割活性, 构建了“预扩增-CRISPR”协同策略, 使检测灵敏度提升了 3~6 个数量级: ① DETECTR 联用重组酶聚合酶等温扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA) 与 Cas12a 系统^[7], 经 crRNA 引导识别靶 DNA 后激活 ssDNA 荧光探针反式切割 [图 2(a)], 实现人乳头瘤病毒 (HPV) 高危亚型检测 (检测限 10 copies/ μ L); ② HOLMES v2 (one-hour low-cost multipurpose highly efficient system) 整合环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术并优化为 Cas12b 系



(a) Cas7-11 介导的 Csx29 活性调控机制示意图 [6]

(a) Proposed regulatory mechanisms of Csx29 activity by Cas7-11 [6]



(b) 用于生物传感和生物成像的 CRISPR/Cas Class II 类系统核心酶家族的工作机制

(b) Mechanisms of core enzyme families in CRISPR/Cas Class II systems

图 1 用于生物传感和生物成像的 CRISPR/Cas 系统的原理图 [6]

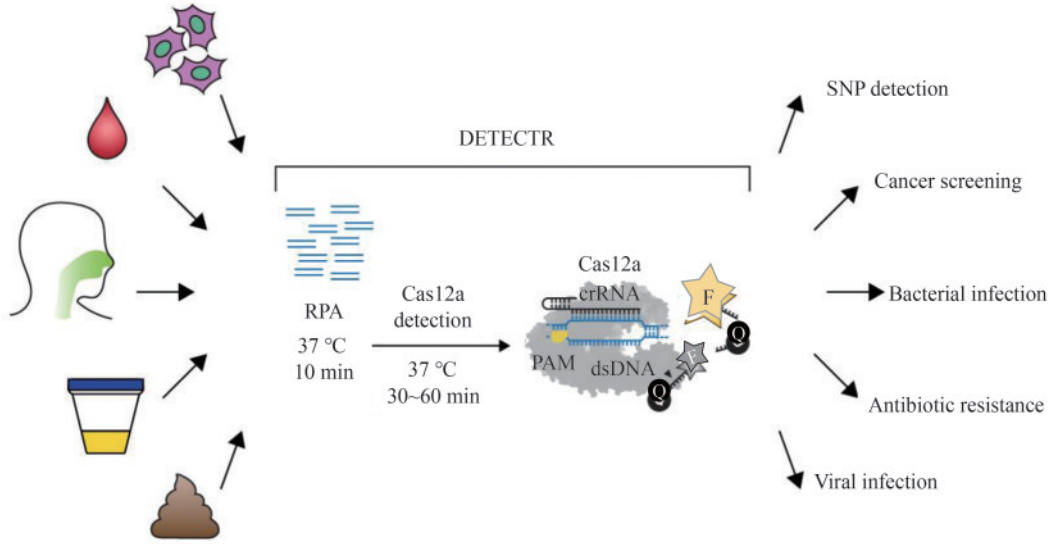
Fig. 1 Schematic diagram of CRISPR/Cas systems for biosensing and bioimaging [6]

统 [图 2(b)], 突破 DNA/RNA 双靶标检测极限 [22]; ③ SHERLOCK 检测方法利用 Cas13a 的 RNA 靶向特性, 结合 RPA 及 T7 RNA 聚合酶构建

级联放大体系 [图 2(c)], 检测灵敏度能够达到 amol/L 级 [14]; ④ 利用核酸序列扩增 (nuclear acid sequence-based amplification, NASBA) 技术和

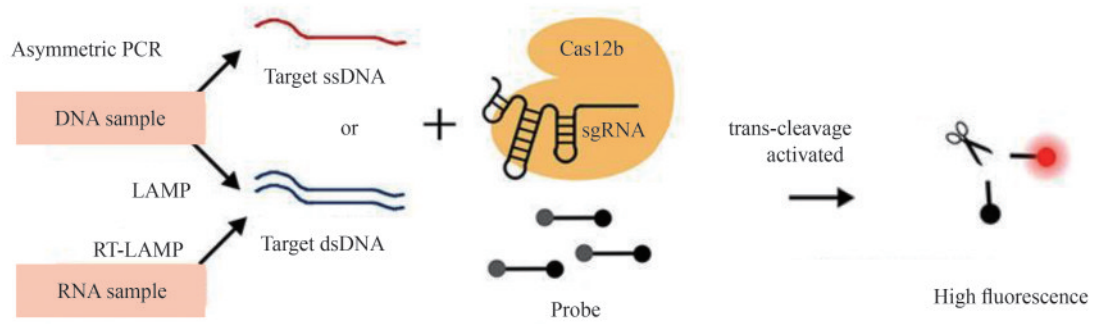
CRISPR/Cas 系统，通过 toehold 开关触发序列设计 [图2(d)]，将 Cas9 特异性切割信号转化为比色响应信号，实现寨卡病毒可视化检测 [23]；⑤

Cas14 采用磷硫酰化引物与 T7 外切酶组合处理 [9]，精准锁定 ssDNA 靶标并激活级联信号传导 [图2(e)]。



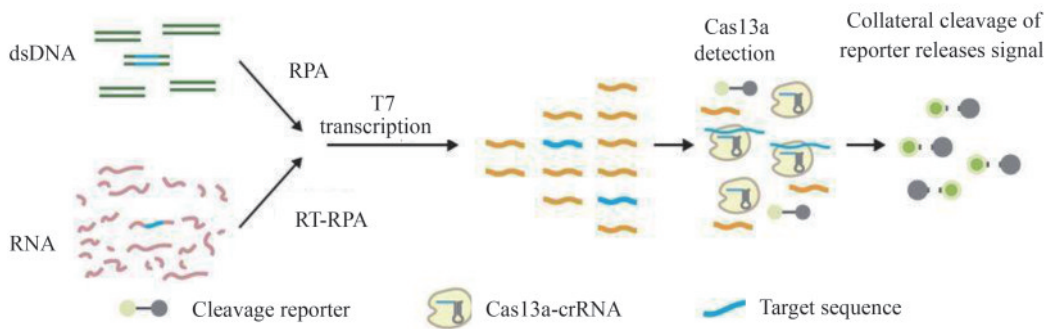
(a) DETECTR 快速现场诊断平台，用于多种临床样本的检测 [7]

(a) Schematic of the CRISPR/Cas12a-based DETECTR methodology for detecting clinical samples in various diagnostic applications [7]



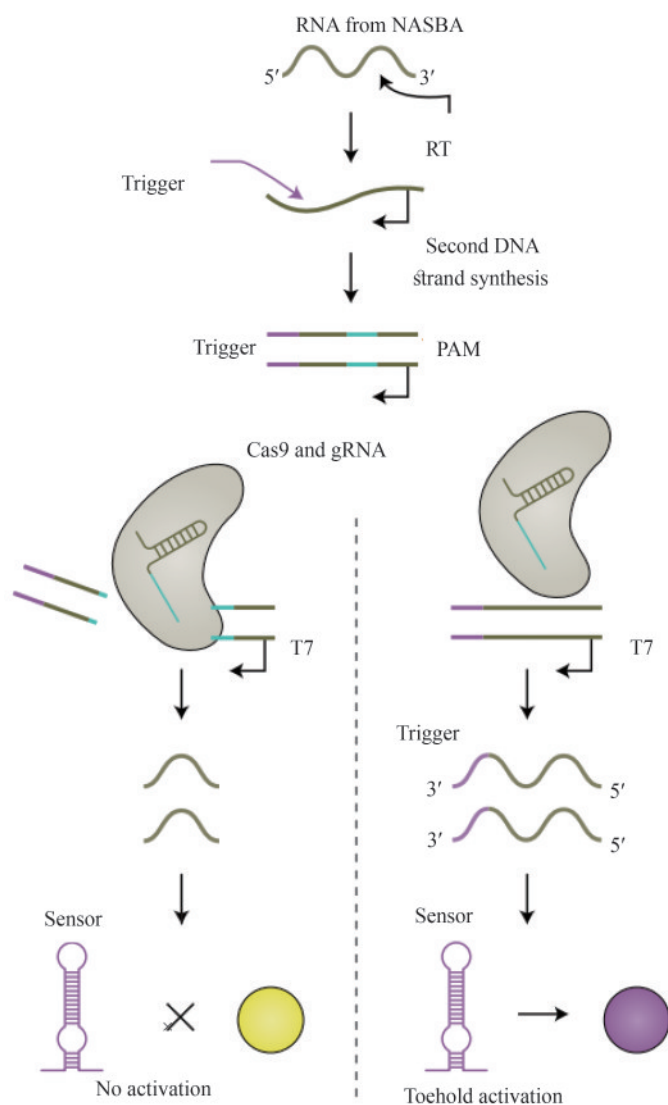
(b) HOLMESv2 检测方法原理图 [22]

(b) Schematic diagram of the HOLMESv2 detection method [22]



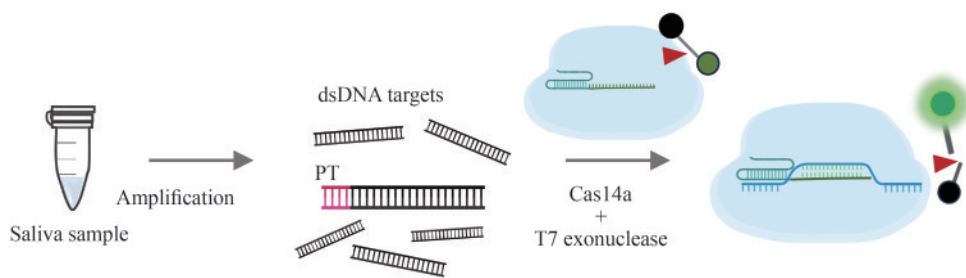
(c) 结合 CRISPR/Cas13a 的 SHERLOCK 系统原理图 [14]

(c) Schematic of the SHERLOCK system combined with CRISPR/Cas13a [14]



(d) 结合 CRISPR/Cas9 的 NASBACC 检测方法原理图 [23]

(d) Schematic of the NASBACC detection method combining CRISPR/Cas9^[23]



(e) CRISPR/Cas14a 用于检测单链 DNA 原理图 [9]

(e) Schematic of CRISPR/Cas14a for detecting ssDNA^[9]

图 2 基于核酸预扩增的 CRISPR/Cas 分子诊断技术原理图 [7, 9, 14, 22-23]

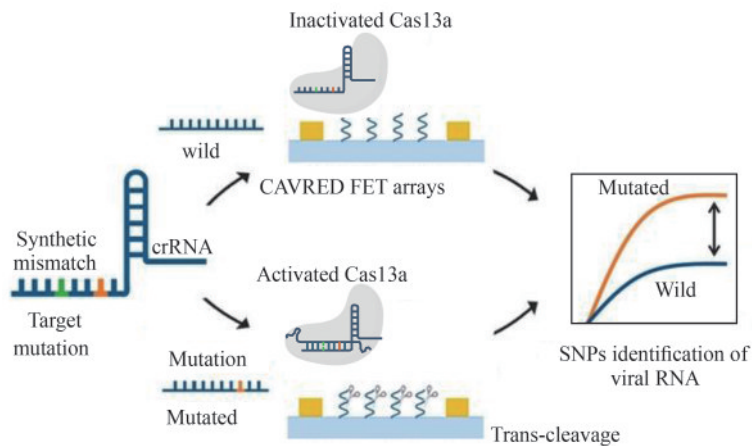
Fig. 2 Schematic of CRISPR/Cas molecular diagnostic technology based on nucleic acid pre amplification [7, 9, 14, 22-23]

1.2.2 基于免核酸扩增的 CRISPR/Cas 分子诊断技术

传统核酸扩增技术虽能提升检测灵敏度，但依赖精密温控设备、多步骤操作及扩增产物污染风险，限制其在 POCT 和资源匮乏场景中的应用。免核酸扩增的 CRISPR 诊断技术通过反式切割驱动的信号放大机制，省去预扩增步骤，直接从原始样本实现单分子级检测，兼具快速、便携（无需复杂仪器）与低污染风险的优势^[24-25]。CRISPR/Cas 技术用于核酸诊断的核心优势源于其分子机制与功能特性：通过 crRNA 与靶核酸的精准互补配对实现单碱基分辨率的特异性识别，可严格区分病原体保守序列及宿主基因突变等目标。关键突破在于 Cas12/Cas13 蛋白的反式切割活性，这种活性在靶标结合后会触发非特异性核酸酶活性。通过持续切割荧光或电化学标记的报告分子，该机制可以将单个靶标信号放大至可检测水平，灵敏度达到单拷贝级别且无需预扩增，从而大幅缩短检测时间并降低交叉污染风险^[26]。

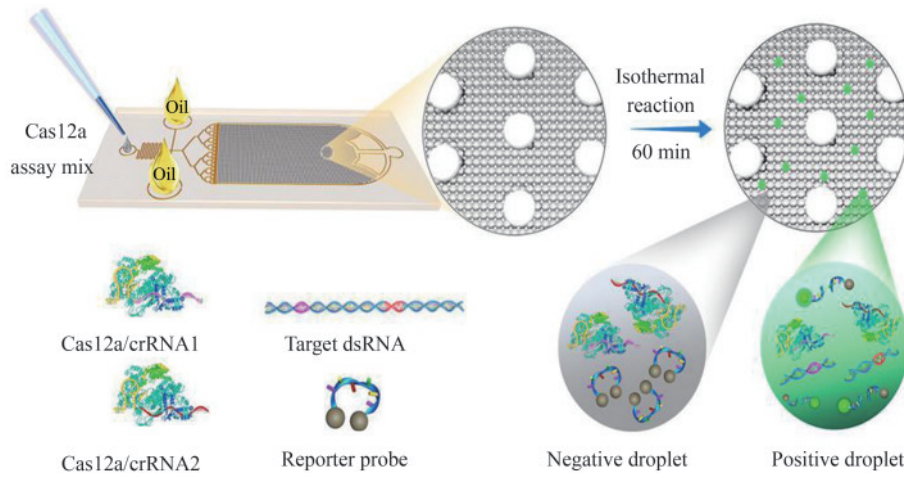
将 Cas 蛋白的反式切割活性与酶级联反应相结合，可显著增强信号放大，从而提升检测灵敏度，例如将 Cas12a 与核酸外切酶联用实现靶标触发的循环切割，检测限可达亚 fmol/L 水平。优化 crRNA 设计（如引入化学修饰或锁定核酸 LNA）及信号报告探针（如调整猝灭基团间距）能够提升信噪比^[27-31]。通过引入场效应晶体管（FET）等新型信号转导模式，CRISPR 识别事件可被实时转化为电信号变化。例如，石墨烯 FET 传感器通过

利用 Cas13a 介导的 RNA 结合引发表面电荷重排 [图 3(a)]，实现 RNA 的无标记检测，灵敏度可达 0.1 pmol/L^[32]。此外，将 CRISPR/Cas 系统与液滴数字技术相结合，可构建用于直接分子检测的超灵敏生物传感平台。周小明教授团队^[36]构建了 Cas13a 的微体积液滴直接检测体系，结合 pL 级液滴微流控技术，实现了对病原微生物 16S rRNA 的高灵敏度检测。在他们的后续研究工作中，通过 Cas12a 反式切割活性实现单分子计数，灵敏度达 1 copy/ μL ，适用于循环肿瘤 DNA 绝对定量 [图 3(b)]，实现了对任意核酸的免扩增检测^[33]。Rikiya Watanabe 研究团队^[37]开发了一种无扩增数字 RNA 检测系统 SATORI (CRISPR-based amplification-free digital RNA detection)，该方法融合了 CRISPR/Cas13 介导的 RNA 识别机制与微腔阵列技术，通过微孔芯片实现对 SARS-CoV-2 RNA 的单分子检测，灵敏度可达 0.1 copies/ μL 。此外，James J. Collins 团队^[34]通过将 CRISPR/Cas 系统与纳米酶联免疫吸附测定 (NLISA) 相结合，在室温下通过催化金属纳米颗粒 (CrisprZyme) 实现对 Cas13 介导 RNA 的无扩增定量检测，并支持比色法及侧向流动平台判读 [图 3(c)]。该技术兼容多种 Cas 酶，可检测 RNA，已成功应用于急性心肌梗死鉴别和前列腺癌诊断检测。其作为通用型信号催化剂，显著拓展了 CRISPR 诊断的靶标覆盖范围。当前，CRISPR 切割过程易破坏核酸等温扩增模板，致使二者在单管、单步的检测中难以兼容。而分步检测方案不仅操作烦琐，还存在引发气溶



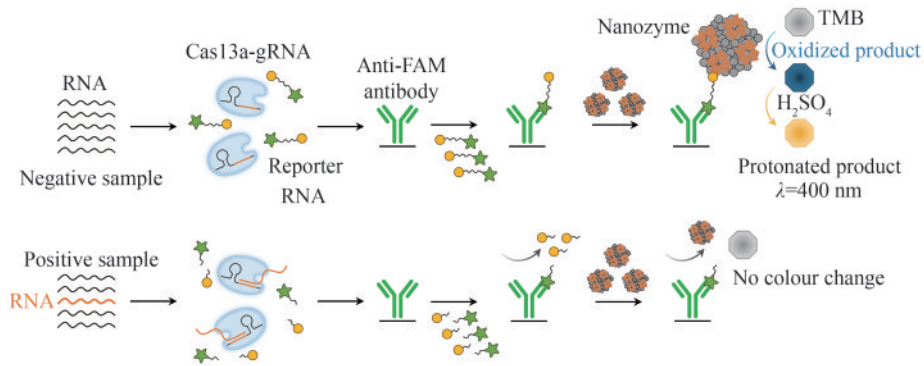
(a) CAVRED 电传感平台工作原理示意图^[32]

(a) Schematic of the CAVRED electric sensing platform^[32]



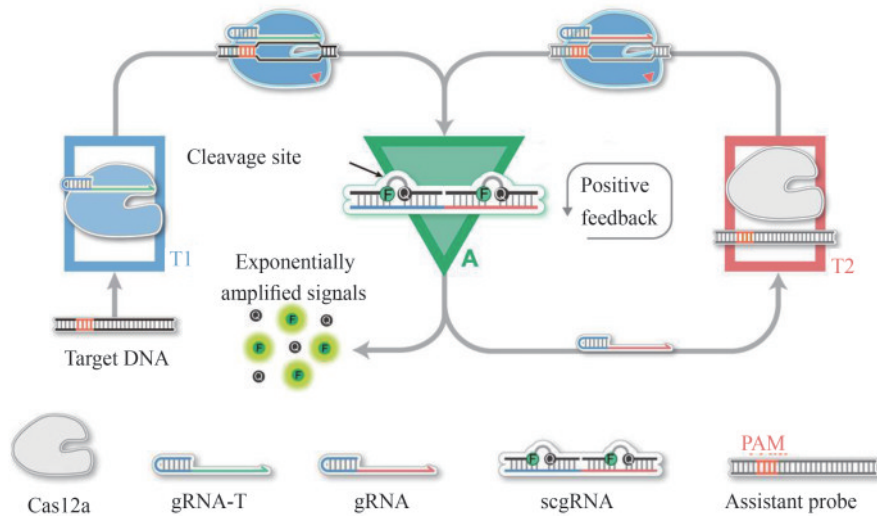
(b) 微滴 Cas12a 用于单分子水平 DNA 定量原理图 [33]

(b) Schematic of Cas12a droplets for the single-molecule level DNA quantification [33]



(c) 结合 CRISPR/Cas 系统与 NLISA 相的 CrisprZyme 检测方法示意 [34]

(c) Schematic of the CrisprZyme detection method combining the CRISPR/Cas system with NLISA [34]



(d) CRISPR/Cas12a 自催化驱动的人工反应网络 CONAN 检测方法原理图 [35]

(d) Schematic of the CONAN detection method driven by CRISPR/Cas12a self-catalytic artificial reaction network [35]

图 3 无核酸预扩增的免扩增 CRSIPR 技术策略 [32-35]

Fig. 3 Amplification-free CRISPR strategy without nucleic acid pre-amplification [32-35]

胶假阳性风险。光控 gRNA 能够在核酸检测中实现不同反应系统的时间激活，从而有效解决上述难题^[29, 31, 38-39]。

在信号放大机制创新方面，研究者提出自催化驱动的 CRISPR 检测系统以突破灵敏度极限。例如，CALSA (CRISPR/Cas 自催化扩增) 通过 LNA 修饰的分裂激活剂构建正反馈回路，利用 Cas12a 反式切割触发级联反应，检测限低至 10 amol/L，适用于单链 DNA 及基因组 DNA 的超敏检测^[40]。笔者团队通过 CRISPR/Cas 自催化驱动的正反馈信号放大系统 CONAN (CRISPR/Cas-only amplification network) [图 3(d)]，其核心机制是当靶标 dsDNA 存在时，含有常规的 Cas12a 反应体系 T1 模块被激活，同时释放 gRNA，游离的 gRNA 进一步与 T2 体系中的 Cas12a 结合，识别体系中存在辅助探针，触发新一轮 Cas12a 激活，荧光信号呈指数级增长^[35]。然而，这种级联放大机制在提升检测灵敏度的同时，也可能因本底信号的非特异性激活引起假阳性扩增。Rashid Bashir 团队^[41]突破单 Cas12a 系统局限，开发了一种内置正反馈回路的 CRISPR-Cascade 核酸检测方法。该方法无需核酸预扩增，通过优化反应温度和封锁核酸修饰等参数，能够在 10 min 内实现 amol/L 级 DNA 的高灵敏检测。该方法能够精准识别耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及 HBV 等血流感染病原体，并构建多重 OR 逻辑门实现综合诊断。此外，研究者们利用表面等离子体共振或纳米孔传感的新型信号输出模式，进一步拓展了检测的应用场景，例如纳米孔传感器通过激活 Cas13a 的切割活性，引起电流变化，从而实现了目标 RNA 实时定量检测。研究者们还通过优化 CRISPR/Cas 反应的关键参数、采用数字化灵敏检测平台、偶联其他更灵敏的信号传感器、设计级联反应以放大输出信号等策略，有效提升了免扩增 CRISPR/Cas 技术的性能。这些免扩增策略通过整合微流控技术、材料科学与分子工程，为病原体即时诊断、肿瘤突变追踪及耐药基因监测提供精准、高效的技术支撑，推动分子诊断向更灵敏、更便携的方向发展。

2 CRISPR/Cas 分子诊断技术的精准诊断和应用场景

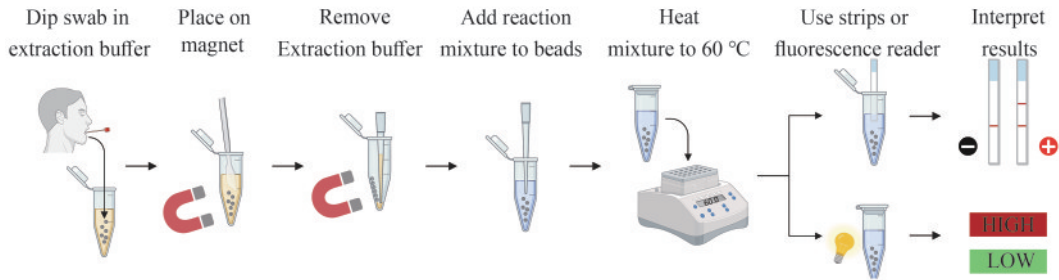
2.1 感染性疾病的精准诊断

感染性疾病仍是威胁人类健康与全球安全的重大挑战。PCR 等病原体检测技术虽灵敏，但单次检测靶标有限，难以应对复杂感染或未知疫情；而高通量测序虽覆盖广，但成本高、耗时长，难以快速普及。

2.1.1 病原体快速筛查

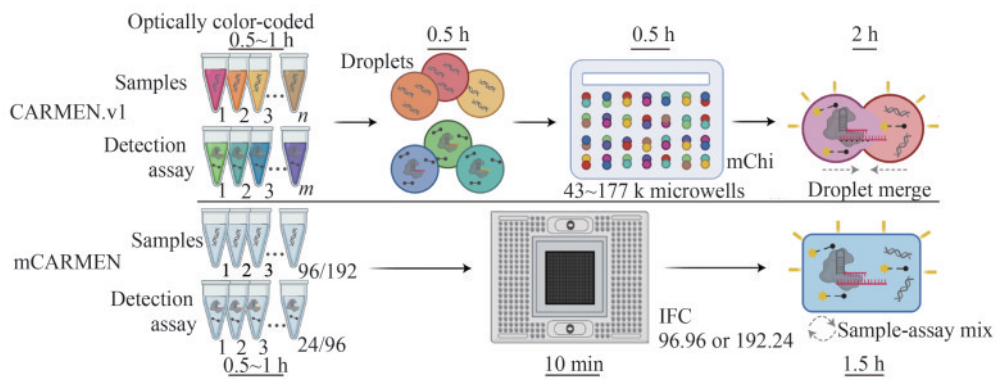
CRISPR/Cas 的分子诊断技术在新冠疫情中的重要应用使得该技术得到了迅速发展。2020 年 5 月，Sherlock Biosciences 的 SARS-CoV-2 检测试剂盒获得美国 FDA 的紧急使用授权 (EUA)，这是 FDA 首次批准使用 CRISPR 诊断技术进行传染病检测^[42-44]。该技术以张锋团队^[19]开发的 SHERLOCKv2 系统为基础，结合了 Cas13、Cas12a 和 Csm6，以便同时检测多种核酸。然而，SHERLOCK 需分步操作和复杂样本处理，增加了交叉污染风险。为此，研究人员^[45]将等温扩增与 CRISPR 整合为单一反应体系，开发了 STOP Covid.v1 技术，通过使用热稳定 Cas12b 酶以及对缓冲液进行优化，使检测流程得以简化，并成功将检测时间缩短至 <1 h。后续的 STOP Covid.v2 通过磁珠富集技术将样本处理时间进一步压缩至 15 min^[44]，并通过一体化反应设计显著提升灵敏度和临床适用性 [图 4(a)]，尤其适用于资源受限环境。从 SHERLOCK 到 STOP Covid 的技术迭代，体现了核酸检测技术在便携性、灵敏度及操作简化方面可持续优化的特点。

为突破传统技术高通量瓶颈，Sabeti 团队^[46]将 Cas13 的高特异性与微流控芯片的微型化特性结合 [图 4(b)]，开发了 CARMEN (combinatorial arrayed reactions for multiplexed evaluation of nucleic acids) 技术，能够同时检测一个样本中 169 种病毒，检测灵敏度达到 fmol/L 级，并能快速整合新发病毒检测模块。该技术的实际成本降低到 1/300 以下，为大规模疾病监测提供低成本、高灵活性方案。然而，CARMEN 在临床转化中面临硬件复杂、通量有限 (单次 8 样



(a) STOP Covid.v2 检测方法的流程图，将裂解和磁珠纯化方法结合，缩短样品提取时间^[44]

(a) Flowchart for the STOP Covid.v2 detection method: combining lysis and magnetic bead purification methods to shorten sample extraction time^[44]



(b) CARMEN v.1 (上) 和 mCARMEN (下) 工作原理示意图^[46]

(b) Schematic of the working principle of CARMEN v.1 (top) and mCARMEN (bottom)^[46]

图4 CRISPR/Cas 系统用于感染性疾病精准诊断的检测方法原理图^[44, 46]

Fig. 4 Schematic diagram of detection methods using the CRISPR/Cas system for precise diagnosis of infectious diseases^[44, 46]

本) 及手动操作烦琐等挑战。为此, 该团队提出 mCARMEN 技术, 通过商用 Fluidigm 微流控芯片将样本通量提升至单次 192 样本 (24 指标) 或 96 样本 (96 指标), 检测成本降至 <13 美元/样本; 优化自动化流程后, 手动操作时间缩短至 5 h 内, 灵敏度在 10 copies/ μL 时提升至 98.4%, 反应速度加快至 1 h 内完成。此外, mCARMEN 结合 Cas13 与 Cas12 系统, 实现 SARS-CoV-2 和流感病毒拷贝数的定量检测, 在 Omicron 暴发期较测序提前 7 天提供监测数据。这些改进使 mCARMEN 从科研工具转化为高灵敏度、高通量、多功能的临床诊断平台, 填补了多重检测、变种追踪和实时响应的技术空白。

2.1.2 耐药性与突变检测

精准诊断技术虽能快速识别病原体, 但仅靠定性或定量检测难以应对复杂治疗场景。耐药性检测通过解析病原体基因型耐药突变 (如 HIV 整

合酶抑制剂耐药突变) 或表型药物敏感性 (如结核分枝杆菌药敏试验), 将诊断维度从“病原识别”拓展至“治疗预测”, 为个体化抗病毒治疗方案的动态调整提供依据, 实现抗病毒个体化动态调整。以 CRISPR/Cas 系统为基础的分子诊断技术凭借其独特优势, 为构建精准诊疗闭环提供了新范式^[47]。南方医科大学郑和平团队^[48]开发了一种结合 PCR 与 CRISPR/Cas13a 的梅毒螺旋体检测方法, 灵敏度较传统的 RT-PCR 方法提高一个数量级, 能够实现单分子检测水平。在临床检测中, 其敏感性和特异性分别为 93.3% 和 100%, 该技术被进一步拓展至梅毒螺旋体谱系鉴定及耐药基因突变检测, 有望在未来应用于治疗后疗效评估。类似地, Pardis Sabeti 团队^[49]开发了 CARMEN 技术, 凭借其快速、多路复用和高通量特性, 此技术在 HIV 耐药突变检测中展现出显著的临床应用潜力。该技术利用 CRISPR/Cas13 系

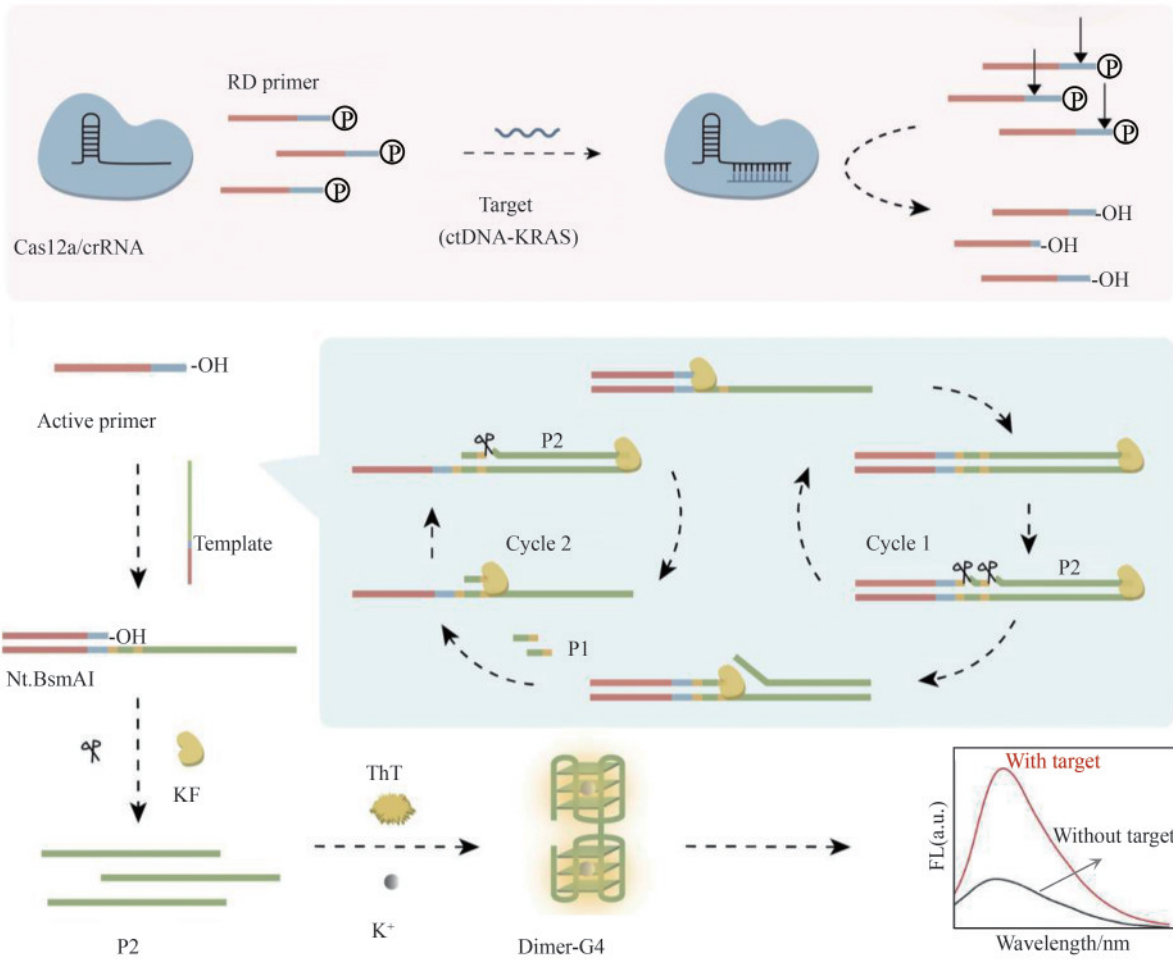
统, 通过设计特异性 crRNA 靶向 HIV 逆转录酶和整合酶基因中的关键耐药突变位点 (如 K103N、M184V 等), 可在单核苷酸分辨率下实现对耐药突变的精准鉴别。实验结果表明, CARMEN 系统成功检测了包含 6 个逆转录酶耐药突变和 21 个整合酶耐药突变的合成靶标, 所有目标突变均被准确识别, 灵敏度与特异性达到临床筛查标准。在对 HIV 感染者样本进行验证时, CARMEN 技术与 Sanger 测序方法的一致性达 90%, 与二代测序方法的一致性达 86%。此外, 即使面对病毒基因组多样性, 该技术仍可通过错配过滤机制维持高精度, 展现出较强的兼容性。这些特性使 CARMEN 技术成为兼具高灵敏度与低成本优势的耐药突变筛查工具, 为抗病毒治疗方案的快速决策提供了分子诊断支持。

2.2 人类遗传变异与肿瘤分子分型

循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 作为癌症生物标志物, 由肿瘤细胞释放至外周血循环系统中, 对诊断、治疗和预后评估具有重要意义^[50-52]。尽管传统组织活检被视为诊断的金标准方法, 但其存在侵袭性强、取样区域有限以及可能引发潜在并发症等局限性。液体活检作为一种无创诊断方法, 具有广阔的应用前景, 然而, 由于血清中目标 ctDNA 含量极低且易受背景 DNA 干扰, 其检测依然面临巨大挑战。重庆大学霍丹群研究团队^[53]开发了一种超灵敏、无标记的荧光生物传感器用于 ctDNA 检测。通过 CRISPR/Cas12a 切割 RNA-DNA 嵌合引物 (RD primer) 启动指数扩增反应 (EXPAR), 生成富 G 序列并形成二聚体 G-四链体 (Dimer-G4), 结合硫磺素 T (ThT) 实现荧光信号显著增强, 灵敏度达 57 amol/L, 适用于多种肿瘤标志物的广谱检测 [图 5(a)]。四川大学陈飘飘团队^[54]则提出了一种双信号荧光传感器方法, Cas12a 能够特异性识别目标 ctDNA, 并对 G-四链体进行反式切割, 通过竞争性结合 NMM 荧光染料和催化多巴胺生成聚多巴胺 (PDA) 的酶活性, 以荧光信号降低反映 ctDNA 浓度, 用于免标记免分离 ctDNA 快速定量分析, 检测限低至 4 amol/L, 在 40 min 内实现

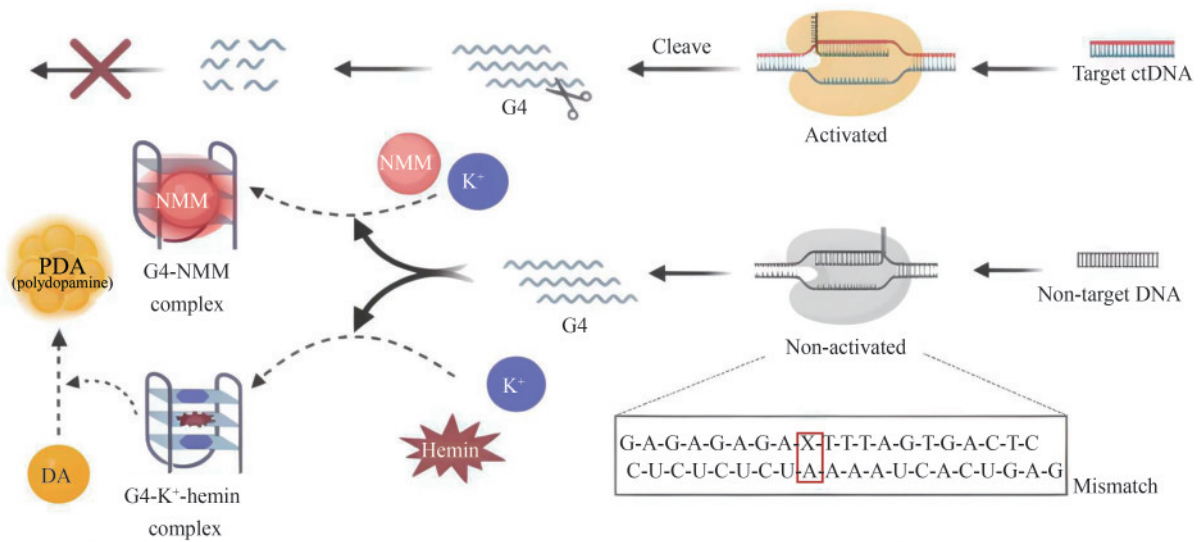
对乳腺癌特异性突变的检测 [图 5(b)]。这两种方法均结合了 CRISPR/Cas12a 的高特异性和 G-四链体的信号放大能力, 避免了复杂标记步骤, 且在血清环境中表现出优异的抗干扰性。前者的策略通过多重扩增实现超低检测限, 而后者的方法操作简便, 适用于资源有限环境。两种技术共同推动了 ctDNA 检测向高灵敏、便捷化及临床实用化发展, 为癌症早期诊断和动态监测提供了互补性解决方案。

microRNA (miRNA) 作为疾病诊断的关键生物标志物, 因其在基因调控和细胞间通信中的核心作用备受关注, 尤其是外泌体 miRNA 因其高稳定性和疾病特异性, 成为无创液体活检的重要靶标^[57-59]。然而, 传统检测方法 (如定量实时聚合酶链反应, RT-qPCR) 依赖复杂的 RNA 提取和扩增步骤, 不仅耗时且可能破坏样本完整性, 难以满足临床对高灵敏度和便捷性的需求^[60-62]。近年来, CRISPR/Cas 系统凭借其精准的分子识别和信号放大能力, 为 miRNA 检测开辟了新路径。例如, 本文作者团队^[55]将 CRISPR/Cas12a 与催化发夹组装 (CHA) 电路耦合, 通过 CHA 将 miRNA 转化为可激活 Cas12a 的 DNA 双链, 实现双重信号放大, 灵敏度达亚 fmol/L 级, 为多靶标检测提供了通用平台 [图 5(c)]。唱凯团队进一步优化 CRISPR/Cas13a 的协同作用^[56], 设计 “Logic-Measurer” 多酶级联电路 [图 5(d)], 整合引物交换反应 (PER) 和外切酶 III 的级联放大, 通过 OR 逻辑门同步检测 miR-21 和 miR-375, 将检测灵敏度提升至 2.1 fmol/L, 并在 315 例乳腺癌样本中验证了 87.3% 的诊断准确率, 凸显临床转化潜力。张开翔团队采用脂质体介导的膜融合策略将 CRISPR/Cas13a 转染到外泌体中, 称为 MFS-CRISPR, 直接测量血浆中的外泌体 miRNA^[63]。通过测量临床样本评估了 MFS-CRISPR 试验, 乳腺癌患者和健康供体的 miR-21 表达差异显著。由于该方法灵敏度高且简便易行, 在癌症诊断和治疗监测方面具有良好的临床应用前景。这些研究将 CRISPR/Cas 系统的特异性识别与不同信号放大方式相结合的策略, 突破了传统灵敏度瓶颈, 推动了 CRISPR/Cas 系统在 miRNA 检测中的应用^[64-65]。



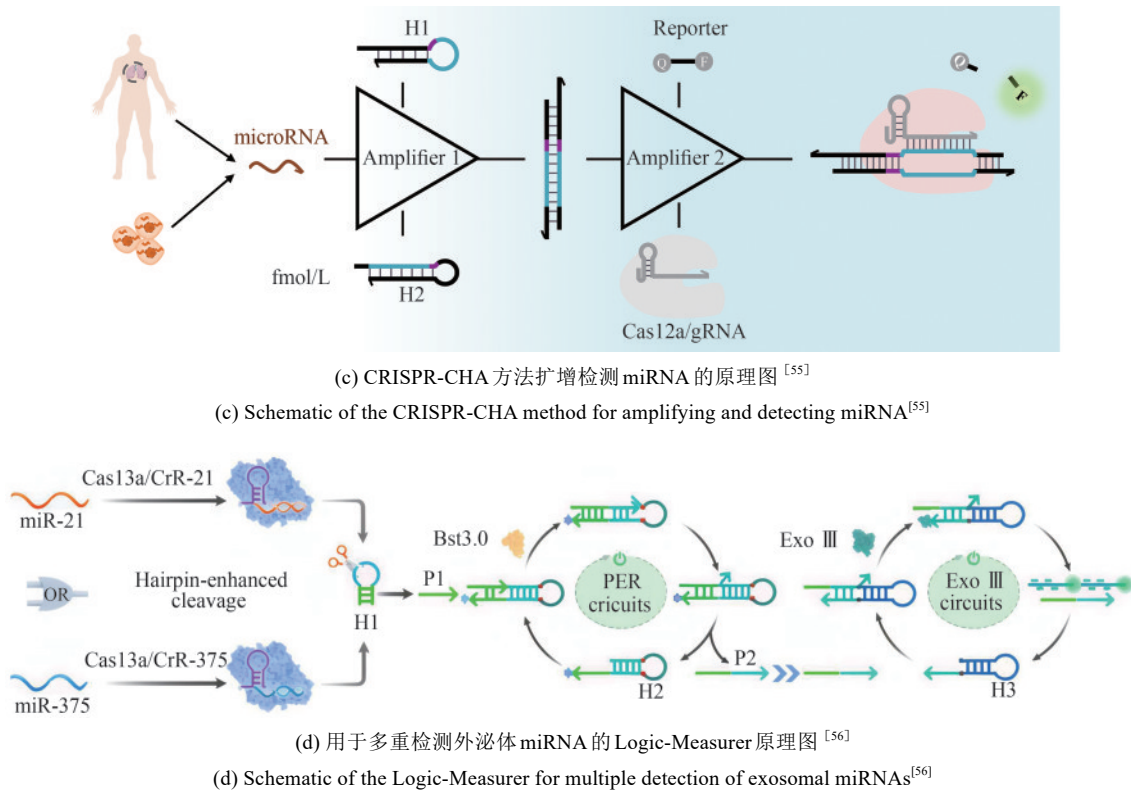
(a) T-Cas12a/EXPAR-DG4 传感策略检测 ctDNA-KRAS 的原理图^[53]

(a) Schematic of the T-Cas12a/EXPAR-DG4 sensing strategy for detecting ctDNA-KRAS^[53]



(b) CRISPR/Cas12a-G 四链体双信号荧光传感器用于 ctDNA 定量分析示意图^[54]

(b) Schematic of the CRISPR/Cas12a-G quadruple stranded dual signal fluorescence sensor for ctDNA quantitative analysis^[54]

(c) CRISPR-CHA方法扩增检测miRNA的原理图^[55](c) Schematic of the CRISPR-CHA method for amplifying and detecting miRNA^[55](d) 用于多重检测外泌体miRNA的Logic-Measurer原理图^[56](d) Schematic of the Logic-Measurer for multiple detection of exosomal miRNAs^[56]图5 CRISPR/Cas系统在癌症生物标志物检测中的应用^[53-56]Fig. 5 Application of the CRISPR/Cas System in Cancer Biomarker Detection^[53-56]

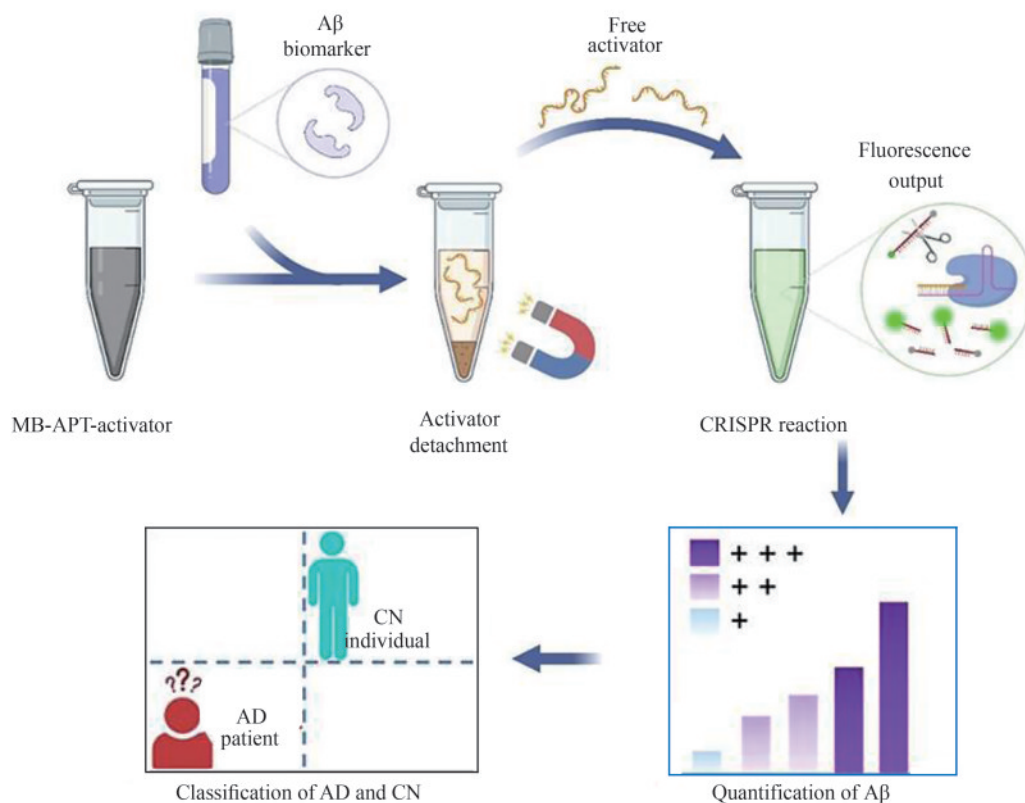
2.3 非核酸生物标志物的多功能传感

2.3.1 蛋白标志物检测

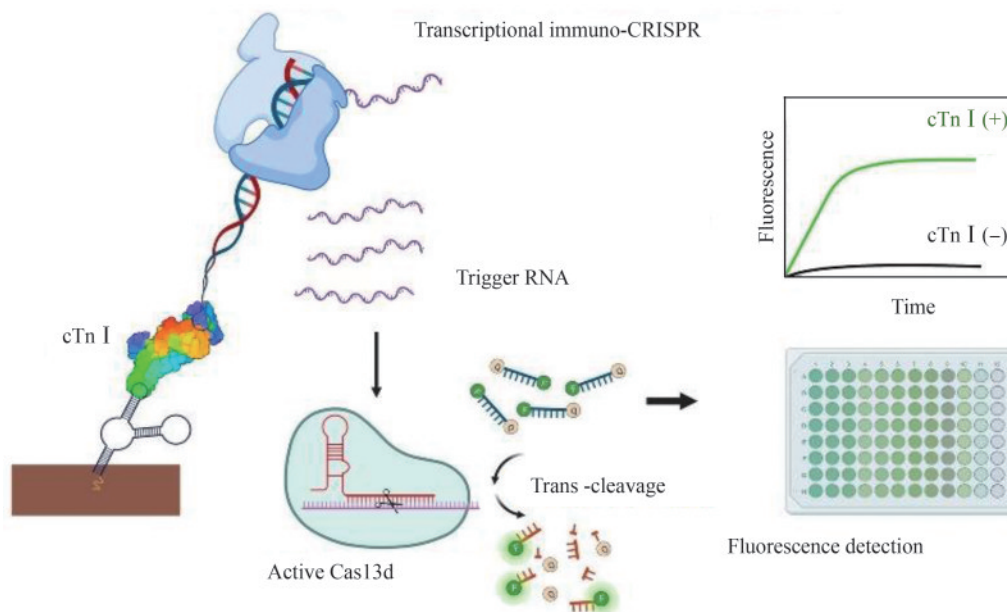
蛋白质标志物的精准检测在疾病早期诊断、疗效评估及机制研究中具有不可替代的作用，但传统方法如酶联免疫吸附测定法（ELISA）仍面临灵敏度较低、检测耗时较长以及对抗体稳定性依赖性强等瓶颈问题。近年来，CRISPR/Cas系统凭借高特异性识别与信号放大能力，为蛋白质检测开辟了新路径，尤其在适配体传感器设计与复杂样本分析中展现出独特优势。

在神经退行性疾病领域，阿尔茨海默病（AD）的早期诊断依赖于脑脊液（CSF）中A β 40/A β 42蛋白的定量检测。刘长春团队开发了一种CRISPR/Cas12a驱动的适配体传感器^[66]，通过利用适配体与A β 蛋白特异性结合，释放DNA激活剂以触发Cas12a的反式切割活性，从而实现对CSF中A β 40和A β 42的超灵敏检测。结合A β 42/A β 40比值，其模块化设计为其他标志物检测提供了通用框架

[图6(a)]。在心血管急症诊断中，心肌肌钙蛋白I（cTn I）的快速检测对急性心肌梗死（AMI）至关重要。南京大学张晶晶课题组提出了一种双适配体转录扩增策略（DATAS-Cas13d），通过双适配体结合cTn I触发体外RNA转录，激活Cas13的RNA切割活性，在血清中实现9.3 pmol/L的灵敏度，成本仅为ELISA的一半^[67]。该传感器在10%人血清中的检测限为0.67 ng/mL，且对干扰蛋白（如肌红蛋白）展现出良好的特异性差异，凸显其在急诊应用场景中的实用性与优势[图6(b)]。除了适配体传感器外，CRISPR技术进一步拓展至蛋白酶活性监测及复杂样本的检测。笔者团队针对癌症进展中的关键蛋白酶，例如基质金属蛋白酶2（MMP-2），开发了一种蛋白酶触发转录激活与CRISPR/Cas12a系统联用的新型检测体系，称为PR-Cas^[68]。通过设计蛋白酶激活的RNA聚合酶，将单个蛋白酶切割事件转化为多拷贝gRNA输出[图6(c)]，结合Cas12a的反式切割活性，实现fmol/L级灵敏度。该系统成功应用于临床血清样本



(a) CRISPR 的适配传感器用于定量检测临床脑脊液样本中的 A β 生物标志物及对患者进行分类 [66]
 (a) CRISPR aptamer sensor for quantitative detection of A β biomarkers in cerebrospinal fluid and patient classification [66]



(b) DATAS-Cas13d 蛋白检测系统的构建和作用原理示意图 [67]
 (b) Construction and schematic diagram of the DATAS-Cas13d protein detection system [67]

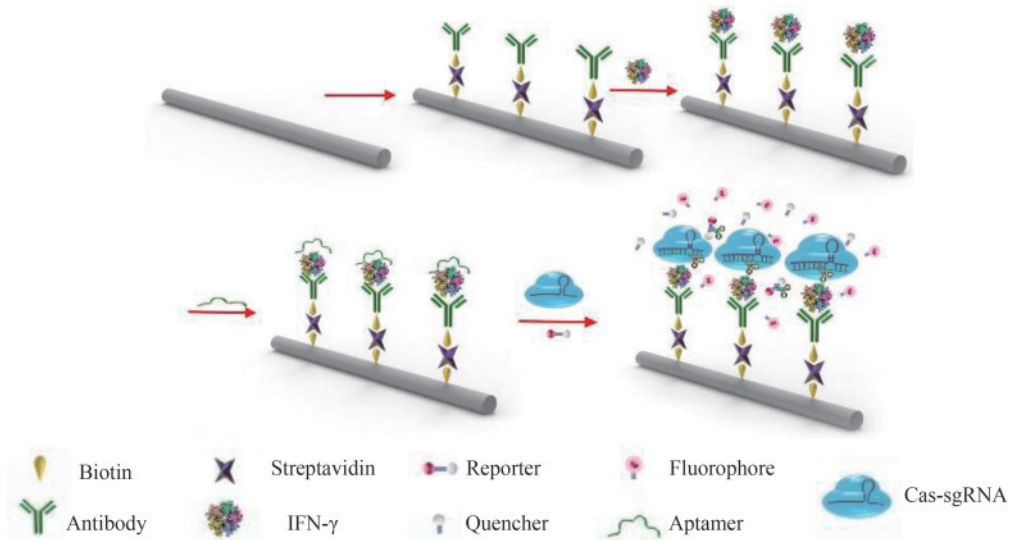
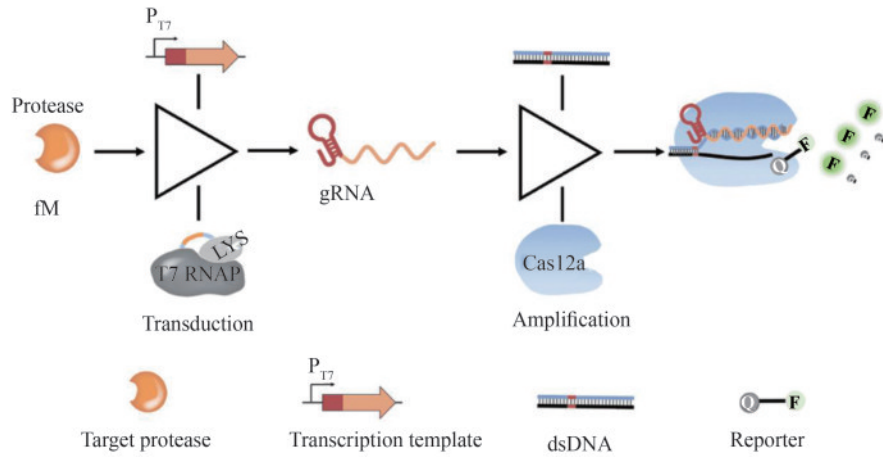


图6 CRISPR/Cas 系统用于检测蛋白的方法^[66-69]

Fig. 6 Methods for detecting proteins based on the CRISPR/Cas system^[66-69]

中 MMP-2 活性分析, 为癌症转移监测提供了新工具。

面对痕量蛋白在复杂生物基质 (如全血、汗液) 中的检测挑战, Ewa Goldys 团队^[69] 提出了 CRISPR/Cas12a 辅助的光纤免疫传感器。通过抗体-适配体夹心结构捕获目标蛋白 γ 干扰素 (IFN- γ), 并触发 Cas12a 切割荧光报告分子 [图 6(d)], CAFI 在 100 μ L 样本中实现 1 fg/mL (58.8 amol/L) 的检测限, 较 ELISA 灵敏度提升千倍。该系统在血清、全血、唾液等多种样本中均

表现优异, 且通过替换抗体/适配体可适配多目标检测。CRISPR 技术通过适配体传感器、蛋白酶活性监测及光纤传感等多元化策略, 突破了传统蛋白检测的灵敏度与样本适应性限制。未来, 进一步整合便携式设备、多种标志物联检及体内实时监测能力, 将推动 CRISPR 蛋白传感器向临床转化迈出关键一步, 为精准医疗提供底层技术支撑。

2.3.2 抗体/代谢物检测

SARS-CoV-2 抗体的定量分析对评估感染后免疫状态、疫苗效力及免疫抑制患者的保护性免疫

水平至关重要。传统的免疫检测方法（如ELISA和化学发光免疫测定）因灵敏度不足且检测操作步骤烦琐，不适合用于POCT^[70-75]。更为重要的是，这些常规检测方法缺乏足够的灵敏度，难以在感染早期检测到抗体，也无法监测免疫功能受损患者体内抗新冠病毒水平的变化，而这类患者在感染新冠病毒或接种疫苗后，抗体血清转化率会大幅降低^[73, 76-80]，难以检测感染早期或免疫抑制患者的低浓度抗体。四川大学李峰团队开发的UCAD（ultrasensitive CRISPR-based antibody detection）方法^[81]，通过将抗体检测转化为CRISPR/Cas12a可识别的DNA条形码信号，灵敏度达到amol/L级[图7(a)]。其核心策略是利用抗体结合诱导的邻近杂交形成双链DNA模板，经RPA放大后激活Cas12a的非特异性ssDNA切割活性，最终通过荧光或侧流层析实现信号输出。在临床验证中，UCAD对197例血清样本（含65例疫苗接种者）进行检测，展现出100%的敏感性和98.5%的特异性。此外，该方法在85例接种疫苗的肾移植受者中检测到73例（85.9%）传统化学发光免疫测定定义为“不可检测”的抗体，并且在第三剂疫苗接种后，成功监测到84.8%患者的抗体水平有显著提升。这一突破为免疫抑制人群的免疫监测提供了关键工具，也为早期感染诊断和流行病学研究奠定了技术基础。

此外，代谢小分子如尿酸、葡萄糖的精准检测是痛风、糖尿病等慢性疾病诊断的关键因素。传统方法依赖复杂仪器（如高效液相色谱，HPLC）或侵入性采样，限制了POCT的应用。张立新团队^[82]提出的CaT-SMelor平台，通过整合变构转录因子（aTF）与CRISPR/Cas12a，将小分子检测转化为DNA信号放大过程[图7(b)]。该平台对尿酸的检测限低至10 nmol/L，在32例临床血清样本中与HPLC和生化分析仪检测结果高度一致。CaT-SMelor展现出高效、低成本的优势，为资源有限环境下的POCT提供了新思路。此外，研究人员设计了一种非侵入性策略，整合葡萄糖氧化酶（GOx）、pistol-like DNAzyme（PLDz）与CRISPR/Cas12a^[83]。GOx催化葡萄糖生成H₂O₂，触发PLDz自剪切并释放Cas12a可识别的DNA片段，通过荧光信号放大实现泪液和唾液中μmol/L

级葡萄糖的检测[图7(c)]。该技术突破了血液采样的局限性，在糖尿病早期筛查中展现出独特优势，其检测限（0.1 μmol/L）显著优于传统电化学传感器，为非侵入性血糖监测开辟了新路径。

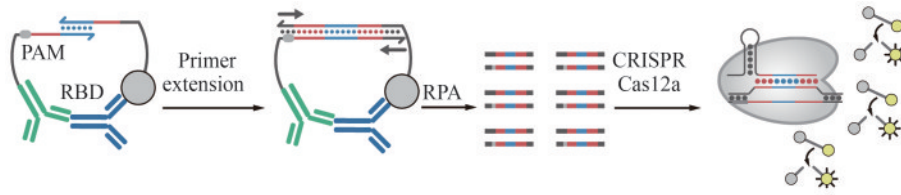
CRISPR技术在生物标志物检测中都遵循着一个通用化设计逻辑，即通过分子识别元件（如抗体、aTF、DNAzyme）将非核酸靶标转化为可编程的DNA信号，进而耦合CRISPR/Cas的级联放大功能。其中，UCAD利用抗体-抗原相互作用触发DNA探针杂交，CaT-SMelor依赖转录因子的变构效应释放DNA模板，而葡萄糖检测则通过酶促反应与DNAzyme剪切级联传递信号。这种模块化设计使CRISPR体系能够灵活适配不同靶标，同时保持高灵敏度和特异性。未来，随着新型识别元件（例如适配体、合成受体）的开发，CRISPR检测有望拓展至肿瘤标志物、环境毒素等更广泛领域。此外，侧流色谱试纸、微流控芯片等便携式技术的集成，将进一步推动其在家庭医疗和资源有限场景中的应用，为精准医疗和公共卫生监测提供多维度的技术支撑。

除了以上提到的应用外，CRISPR/Cas分子诊断技术在农业和环境监测等领域也有诸多应用实例和潜在价值。例如在农业领域，可利用CRISPR/Cas系统与RT-RPA技术结合检测多重植物病原体、马铃薯X病毒、马铃薯Y病毒，利用Cas12a结合RPA技术检测小麦条锈病菌、稻瘟病菌等^[84-89]。利用CRISPR核酸检测系统所具备的高准确性、灵敏度和特异性，能够靶向病原体的疾病相关基因，用于食品和农作物中转基因成分的检测、单核苷酸变异的鉴定，以及农作物中与重要经济性状相关基因的分析^[90]。在环境监测方面，该技术可应用于检测水样、土壤样等环境样品中的病毒、细菌、重金属离子、抗生素及农药残留等有害物质。这些应用充分展现了CRISPR/Cas分子诊断技术的广泛应用前景。

3 CRISPR 诊断技术的未来发展方向

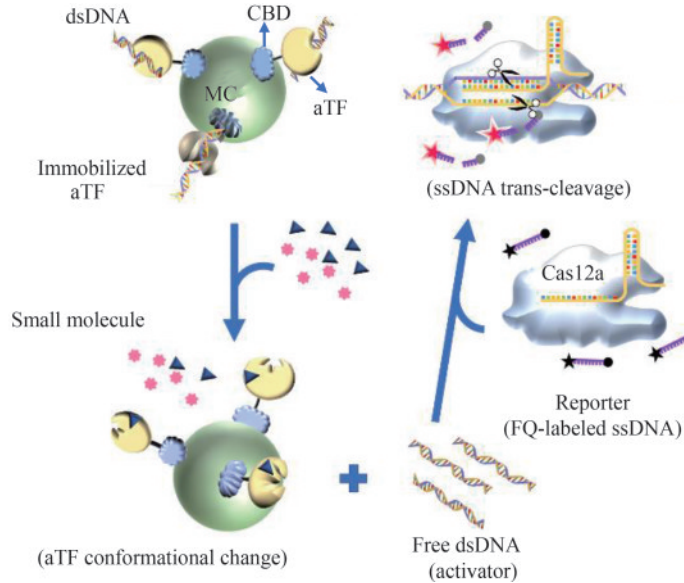
3.1 微型化与集成化技术创新

CRISPR 诊断技术的未来发展聚焦于微型化、



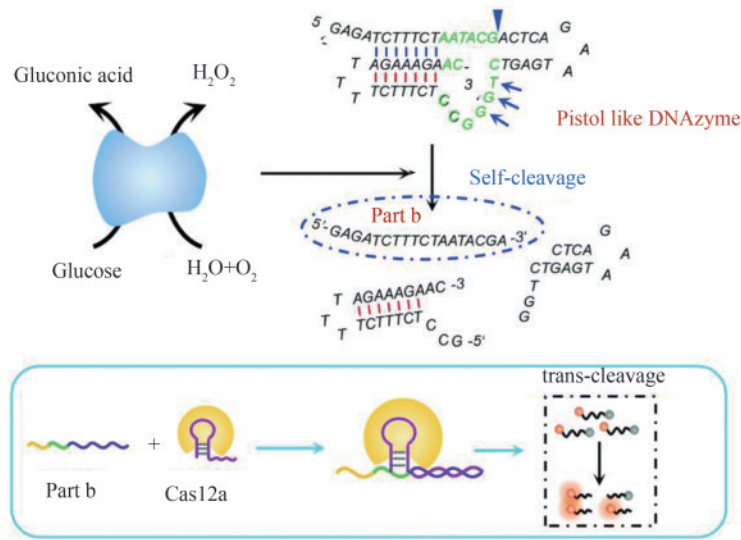
(a) UCAD 的设计原理图 [81]

(a) Design schematic of UCAD [81]



(b) CaT-SMelor 原理图 [82]

(b) Schematic of CaT-SMelor [82]



(c) CRISPR/Cas12a 系统用于检测葡萄糖的原理图 [83]

(c) Schematic diagram of glucose detection based on the CRISPR/Cas12a system [83]

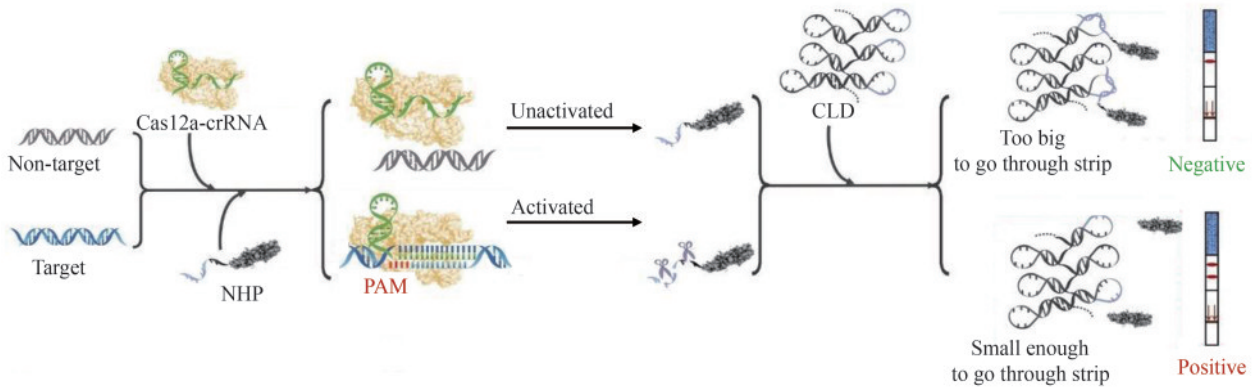
图7 利用 CRISPR/Cas 系统检测抗体/代谢物的方法 [81-83]

Fig. 7 Antibody/metabolite detection technologies utilizing the CRISPR/Cas system [81-83]

高通量检测与跨学科融合，以突破现有技术局限性并拓展应用场景。CRISPR/Cas 诊断技术的微型化与便携化是未来发展趋势中的重点^[91]。微流控芯片作为集成化载体，采用一体化设计理念，整合样本预处理、核酸扩增与 CRISPR/Cas 检测全流程，实现全流程自动化与微型化。例如，将这种芯制成指甲盖大小，用于完成全血样本中 HIV 的核酸提取与检测^[92-93]。智能手机集成化读数系统与可穿戴传感设备的协同创新，正推动 CRISPR 诊断技术向无仪器依赖模式发展。通过将蓝牙或 Wi-Fi 低功耗传输协议与计算技术的融合，智能手机可实时解析试纸条的比色、荧光及电化学信号，并借助深度学习算法实现多模态数据联合判读（如

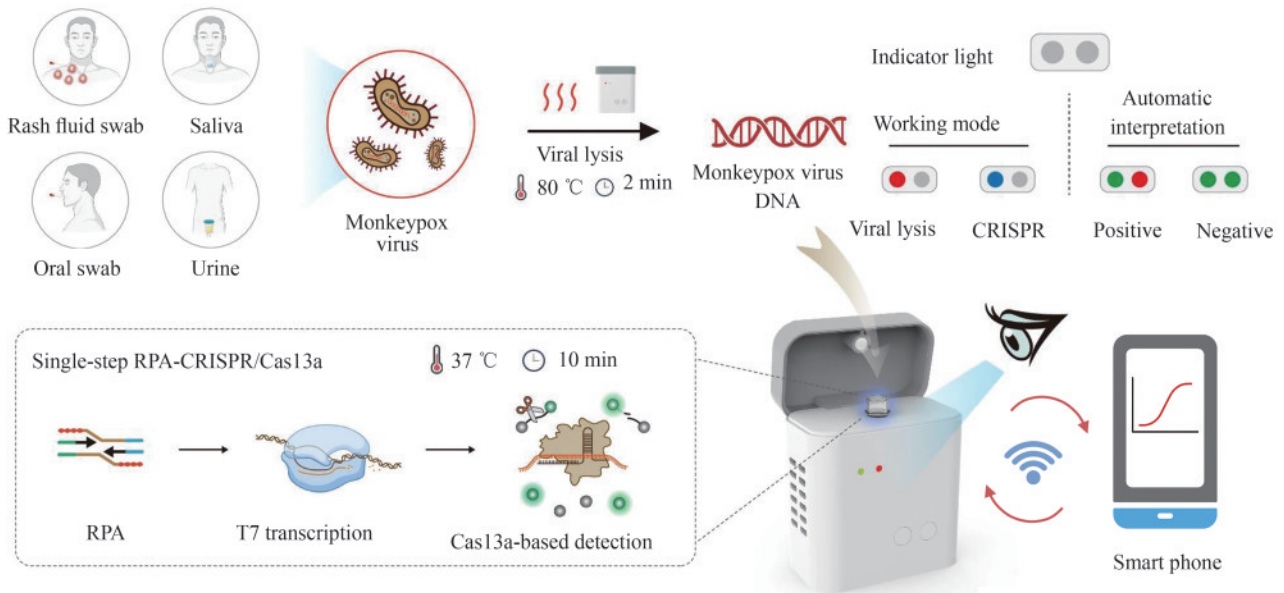
卷积神经网络驱动的图片识别引擎），显著降低设备依赖并提升偏远地区的诊断及可及性^[94]。

李冰凌团队开发了一种名为 CLIPON（CRISPR and large DNA assembly induced pregnancy strip for signal-on detection）的便携式传感平台^[95]，该方法利用商品化早孕试纸在免分离的均相溶液中实现对单链和双链核酸序列的可视化检测 [图 8(a)]。通过设计专属的图像处理 APP 和微流控芯片，CLIPON 检测可进一步实现定量化和便携化。王升启团队^[96]开发了一种 CRISPR 单步检测平台 SCOPE（Streamlined CRISPR On Pod Evaluation），该平台通过简化病毒裂解步骤，在 2 min 内从皮疹液、口腔拭子、唾液和尿液样本中快速释放病毒



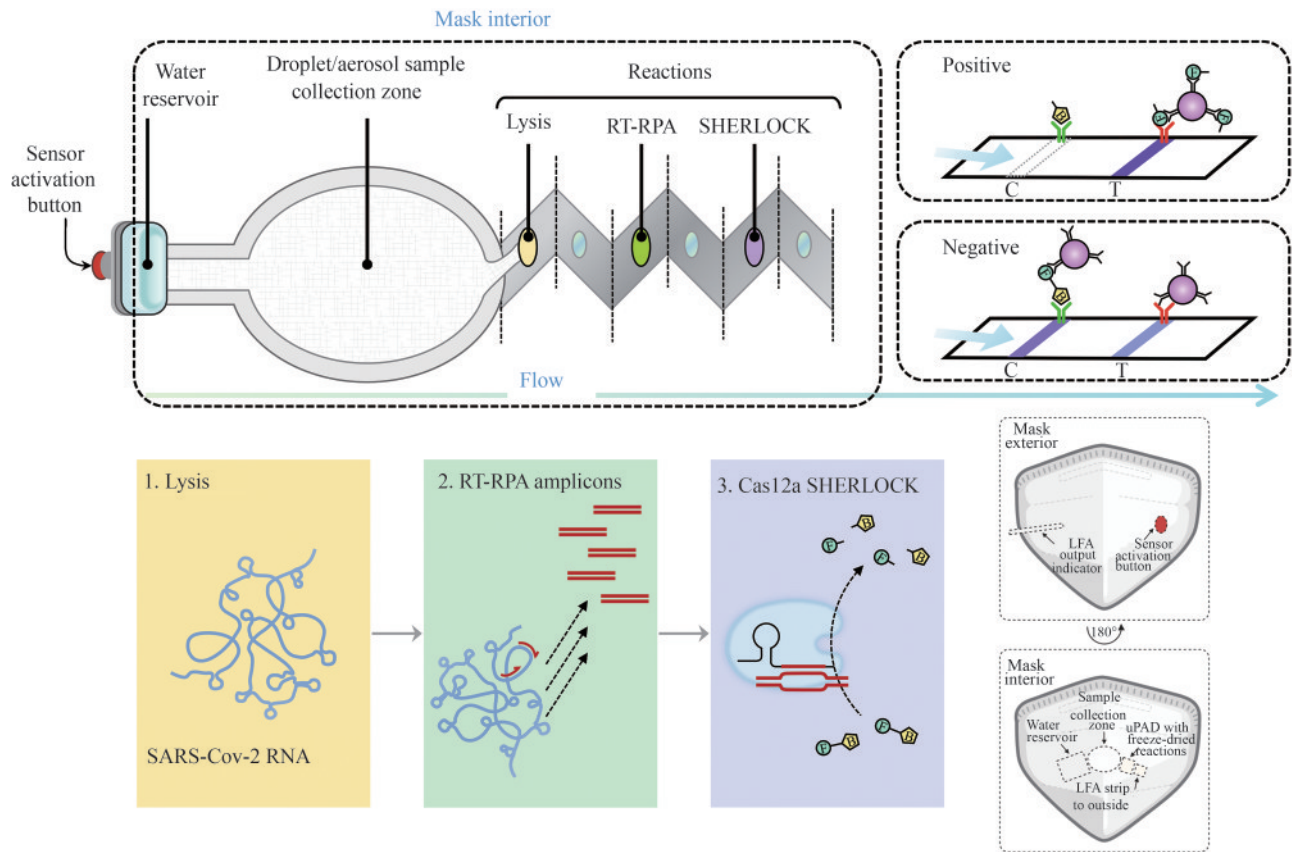
(a) CLIPON 传感器检测双链 DNA 的原理图^[95]

(a) Schematic of the CLIPON sensor for detecting double stranded DNA^[95]



(b) 使用 SCOPE 进行猴痘病毒的 POCT^[96]

(b) Point-of-care testing of monkeypox virus using SCOPE^[96]

(c) 集成在口罩内的 SARS-CoV-2 可穿戴诊断设备^[97](c) SARS-CoV-2 wearable diagnostic device integrated into masks^[97]**图8** CRISPR/Cas 系统在分子诊断中结合微型化与集成化技术^[95-97]**Fig. 8** The CRISPR/Cas system combines miniaturization and integration techniques in molecular diagnostics^[95-97]

核酸，实现高效样本处理 [图8(b)]。随后，通过单步 RPA-CRISPR/Cas13a 反应，只需 10 min 便可对猴痘病毒实现检测。该设备具备反应执行、信号采集和结果解读等功能，整个过程能够在 CPod 这一便携式设备上完成。

此外，可穿戴设备与实时监测技术的创新发展，推动了病原体检测技术向日常应用场景的深度整合。James J. Collins 团队^[97] 利用 CRISPR 技术构建了一种可穿戴式的冻干无细胞合成生物学传感器系统。该传感器在检测灵敏度与特异性方面能达到实验室金标准要求，在常温下通过 N95 口罩无创捕获 SARS-CoV-2 病毒气溶胶，90 min 内完成检测 [图8(c)]。此装置可嵌入硅橡胶、硅织物等柔性基质材料，整体仅重 3 g，能够实时动态监测目标病原体暴露情况。并且无需外接电源，通过比色法实现可视化判读，有效规避了传统体液

样本处理流程。这种可穿戴传感技术的突破性进展将“样本至结果”的检测时间缩短至 30 min 以内，通过微型传感器、低功耗电路与云端数据链的协同创新整合，构建起覆盖个体-社区-医疗机构的三级动态监测体系，为传染病实时防控、慢性病动态管理以及个性化健康监测提供即时精准的技术支持。

在 COVID-19 背景下，微流控技术通过与核酸分析、免疫测定及电化学学生物传感等检测方法的协同创新，显著提升了 SARS-CoV-2 的 POCT 效能^[98-103]。该技术作为多模态检测的集成化平台，兼容核酸扩增、抗原抗体反应及光电信号转换等核心检测原理，其中，CRISPR 微流控平台通过精准整合分子识别与信号放大系统，不仅显著提升了检测灵敏度，也有效拓展了应用场景^[104-105]。相较于传统检测体系，微流控技术具有试剂消耗低、

操作流程自动化、交叉污染风险可控等优势。特定微流控系统的创新设计有效突破了CRISPR检测的技术瓶颈^[106]。例如,纸基微流控系统通过显色反应实现检测结果的可视化判读,简化操作流程^[107];封闭式微流控装置可抑制气溶胶扩散,确保生物安全性^[108-111];离心驱动或电化学集成的微流控模块能够将核酸提取、纯化与检测步骤整合为标准化流程^[112-113];数字微流控技术通过离散液滴操控实现单分子级绝对定量,提高了检测灵敏度^[114-115]。当前研究焦点是针对不同检测方法学特性,选择适配的微流控技术架构,以实现系统自动化与性能优化。这需从微流控芯片的流道拓扑设计、驱动控制单元开发以及配套仪器工程化等维度进行深度创新。未来,基于CRISPR/Cas的微流控诊断技术有望通过多学科交叉融合,在病原体即时诊断、耐药基因筛查及精准医学领域开拓新的技术范式,其多场景应用潜力将推动体外诊断技术向便携化、智能化和网络化方向发展。

3.2 高通量与智能化诊断

随着CRISPR诊断技术逐步向临床级检测发展,实现高通量多靶标分析与智能化结果分析已成为未来发展的核心方向。在多重检测扩展性方面,CARMEN平台通过整合Cas12/Cas13混合体系与荧光编码微流控芯片,实现单次反应对169种病原体的同步鉴别。液滴微流控分选技术(如Drop-CRISPR)将样本分割为百万级微滴,结合Cas蛋白的反式切割活性,实现单分子计数与多靶标分型,显著提升检测通量与灵敏度。随着人工智能(artificial intelligence, AI)的不断发展,尤其是机器学习技术取得的突破性进展,正在促使CRISPR/Cas系统逐渐由基础研究工具向精准化、智能化分子诊断平台转变,这一过程也为CRISPR/Cas系统开辟了新的发展前景。清华大学徐友春团队^[116]提出了一种名为mutaSCAN的无需提取的变异检测策略,该方法无需提取核酸,通过将灵敏的RT-LAMP扩增技术与特异的CRISPR/Cas12a检测技术相结合,在单一微流控芯片单元内实现了高效检测。并且该技术借助创新的冻干策略,解决了两步反应的温度兼容性问题,并成功整合进可变量

微流控芯片。此外,整个流程融合人工智能算法与便捷图像采集设备,从而实现了高通量和自动化的结果读取。mutaSCAN能在30 min内检测96个样本,灵敏度达250 copies/mL,适用于直接检测患者样本中的SARS-CoV-2及其变种。该方法展示了利用微流控多孔板的超高通量分析系统,具备快速检测SARS-CoV-2及其变体的能力,在临床样本检测中具有高准确率,且阴性样本无假阳性现象。该研究团队还通过裂解缓冲液的开发和微流控芯片设计优化,提高了检测的多功能性与现场适用性,并借助人工智能图像识别算法实现了现场结果的自动化读取。临床样本测试表明,mutaSCAN具有高阳性预测一致性与阴性预测一致性。此外,生物信息学与CRISPR技术的协同创新为病原体溯源提供了一种新思路。高通量与智能化的深度融合不仅显著提升了CRISPR诊断技术的通量、灵敏度与准确性,还为其在临床医学、疾病监测及公共健康领域的广泛应用奠定了基础^[117-121]。

相比其他检测方法,CRISPR系统展现出显著优势。首先,CRISPR系统凭借其高特异性和灵敏度,通过crRNA与靶核酸的精准互补配对,实现单碱基分辨率的特异性识别,能够精准区分病原体保守序列与宿主基因突变。其次,CRISPR系统具有强大的可编程性和多功能性,可灵活针对不同病原体和生物标志物进行定制化检测,满足多样性及个性化诊断需求。CRISPR系统的一体化检测能力使其有望实现“样本进-结果出”的全流程自动化检测,从而减少烦琐的操作步骤并降低污染风险。此外,CRISPR系统与人工智能技术相结合,具备智能化的数据处理能力,可快速、准确地分析检测结果。综上所述,CRISPR系统在特异性、灵敏度、可编程性、一体化检测能力及智能化兼容性等方面的优势,使其在高通量与智能化融合领域展现出广阔的应用前景。未来,随着跨学科技术的不断发展,CRISPR诊断平台有望发展为集检测、分析及决策于一体的智能化分子诊断系统。

3.3 临床转化中的核心挑战

尽管CRISPR诊断技术在实验室研究中极具潜力,但其临床转化仍面临诸多挑战。其中,样本

制备的标准化是首要瓶颈^[24]。游离核酸（如循环肿瘤DNA和病毒RNA）的提取效率和纯度对检测灵敏度具有直接影响，然而现有提取方法（如磁珠法和柱提法）在富集低丰度靶标方面能力不足，导致回收率较低。此外，由于痰液、粪便、组织切片等多样化样本的前处理存在差异，这就要求开发通用型裂解试剂与自动化设备，然而目前大多数CRISPR检测仍依赖手动操作，从而导致重复性出现波动。

除了需要解决样本制备的难题，定量检测的可靠性是另一个关键挑战。数字CRISPR技术（如液滴微流控单分子计数）虽能实现绝对定量，灵敏度可达1 copy/ μL ，但因依赖高精度微流控泵与光学检测模块，设备成本高达数万美元，限制了其在基层医疗机构的普及。例如，Quake团队开发的集成化数字PCR-CRISPR联用平台虽将成本降至5000美元，但仍需解决标准曲线稳定性问题。不同样本基质（如血液中的血红蛋白或痰液中的黏蛋白）会对Cas蛋白活性产生抑制效应，导致定量偏差，其相对标准偏差超过25%。CRISPR检测的核心组分包括Cas蛋白和crRNA，需在低温环境下保存以维持活性，从而保证检测结果的可靠性。尽管冻干技术能够延长其保质期，但经过复溶后Cas的蛋白活性会有所损失，影响检测结果的准确性。由于Cas蛋白活性易受温度影响，为确保其在分子诊断中的稳定应用，未来可以探究蛋白储存条件及反应缓冲液优化，或添加蛋白保护剂以防蛋白变性降解，这些措施将有助于提升诊断系统的稳定性和可靠性^[122]。此外，crRNA大规模合成成本远超传统PCR成本。监管审批与临床验证的滞后进一步加剧了商业化难度。

面对技术瓶颈与商业化困境，跨学科协同创新是突破瓶颈的关键。例如，基于CRISPR/Cas12a的高通量微流控检测系统（mutaSCAN）通过整合RT-LAMP与深度学习算法，可在30 min内检测出低至250 copies/mL的病毒样本，每轮可以检测96个样本，适用于多种临床样本的检测与突变筛查。Hayden C. Metsky团队^[123]开发了一种结合生成式机器学习的CRISPR/Cas13a序列设计方法，突破了传统依赖天然序列的局限。他们通过改进ADAPT算法，结合生成对抗网络与进化算法，构

建了用于探索序列空间、设计人工诊断导向序列的软件包。该软件包能够设计出包含错配碱基的人工guide序列。实验结果表明，人工序列较天然序列灵敏度提升3倍，且能精准区分SARS-CoV-2等病原体单核苷酸变异，与二代测序结果一致性达98%。

CRISPR/Cas系统驱动的分诊断技术正在加速从实验室研究向临床应用转化，其核心突破在于推动“样本进-结果出”的实际应用，满足“无需专业设备、快速出结果”的普适化需求^[124-125]。该技术通过整合核酸等温扩增模块与CRISPR/Cas分子识别元件，能够在无复杂仪器支持的条件下，实现复杂生物样本中多重病原体的同步筛查。合成生物学与人工智能的协同创新进一步优化了检测性能。深度学习驱动的crRNA设计算法显著提高了Cas蛋白的靶标识别的特异性，而经过定向进化工程改造的Cas突变可将检测灵敏度提高至单拷贝级别。CRISPR生物传感器因其信号输出可视化特性，在基层医疗与居家自检场景中展现出独特优势。以侧向色谱试纸条为载体构建的检测平台，借助胶体金纳米颗粒或荧光标记探针，实现比色或荧光信号的双模态判读，因此使CRISPR生物传感器成功突破了传统分子诊断对专业设备的依赖^[126-129]。临床验证数据表明，针对甲型/乙型流感病毒及幽门螺杆菌的家用自检试纸已在多中心临床试验中达到90%以上的检测符合率，受试者按照标准化操作流程可在15 min内完成感染状态判读。这种兼具操作简易性和结果可靠性的技术特征，正在推动精准诊断技术向“社区初筛-家庭自检”的分布式应用模式发展。CRISPR试纸条凭借其可视化、便携化优势适用于基层医疗场景，二者互补融合有望构建覆盖“社区筛查-精准分型”的全流程POCT体系。

CRISPR/Cas生物传感器与核酸设计、纳米材料、生物芯片及人工智能等前沿技术的交叉融合，为分子诊断提供了新的可能性，有助于构建更高效、更智能、更具潜力的POCT设备。这种技术融合不仅推动了下一代诊断工具的发展，还为POCT在分子诊断快速检测领域的应用奠定了基础。然而，若要使CRISPR诊断真正实现从实验室到临床的转化，并为全球精准医疗提供普适化的工具，

就必须突破技术、成本与监管等多方面的瓶颈。否则，这些限制将极大阻碍CRISPR诊断技术的广泛应用。

4 总结

CRISPR/Cas系统作为近年来分子生物学领域的重要技术突破，已在分子诊断领域展现出巨大的应用潜力^[130-131]。尽管该技术在病原体检测、遗传突变识别及个体化诊疗等方面取得了诸多重要进展，但其在实际应用过程中的若干关键问题仍亟待解决，尚未完全满足临床诊断对高通量、高灵敏、便携化和低成本的综合需求。分析CRISPR/Cas系统当前存在的主要挑战（图9），并探讨未来的可能发展方向，对于推动其在分子诊断领域的深入应用具有重要的理论与实践意义^[132-134]。

首先，检测的特异性与准确性仍是制约CRISPR诊断系统进一步向临床推广的关键问题。虽然Cas蛋白系统具有高度可编程性，能够通过crRNA序列与靶标核酸的互补配对实现特异性识别，但在复杂生物样本中仍存在一定概率的非特异性识别或脱靶效应^[135-136]。尤其在高序列相似性的病原体分型或单碱基突变检测中，如何有效避免误识别和信号噪声，取决于更加精细的引导

RNA设计策略以及对Cas效应蛋白活性的工程优化^[137-138]。目前已有研究提出通过双重识别机制、crRNA剪切位点精准调控或Cas蛋白突变体筛选来提高系统特异性，然而，这些策略仍处于实验验证阶段，距离实现临床转化仍有较大距离。

其次，检测流程的简化与样本前处理标准化是实现CRISPR/Cas系统现场化应用的关键因素。与理想的“一步法”分子诊断平台相比，当前多数CRISPR系统仍需依赖核酸提取、扩增与信号读取的多步骤反应流程，常与等温扩增技术（如RPA、LAMP）协同使用以提升检测灵敏度，这在一定程度上增加了操作复杂性与污染风险，不利于现场快速部署^[139-140]。未来的发展应侧重于高集成度平台的构建，例如采用微流控技术的全封闭检测芯片，或无需核酸提取的原位反应体系，以推动真正意义上的“样本到结果”一体化解决方案的实现。

此外，定量检测能力不足是当前CRISPR/Cas分子诊断亟待突破的技术难题。由于多数检测系统采用终点读数策略，难以对反应动力学过程进行精确监测，这限制了其在病毒载量监测、药物反应追踪等临床场景中的应用价值。如何将CRISPR检测系统与荧光实时监控、电化学分析或数字微滴技术等平台融合，发展出具有高通量、

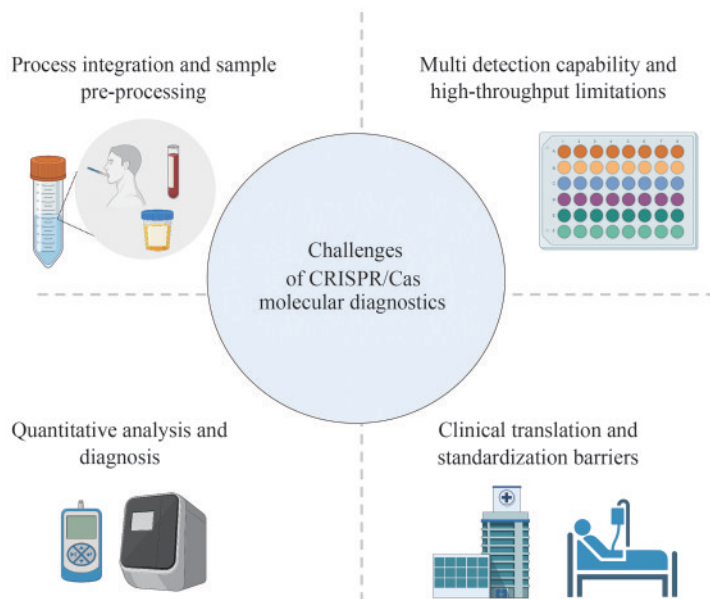


图9 CRISPR/Cas系统在分子诊断中的挑战

Fig. 9 The Challenges of CRISPR/Cas system in molecular diagnosis

定量化、自动化特征的新一代检测体系，是未来重要的发展方向。此外，多重检测能力的提升与高通量平台的构建也是该领域研究关注的重点。由于Cas效应蛋白的非恒定信号输出以及不同靶标之间的反应条件差异，CRISPR系统在实现多靶标同时检测方面仍面临较大挑战。尽管已有诸如SHERLOCKv2、CARMEN等多重检测方案提出，可借助微流控阵列、条形码编码及空间分隔策略实现大规模样本处理，但受限于其设备依赖性与操作复杂性，距离普及化尚需时日。因此，开发反应条件统一、读数方式标准化的多重检测平台，是提升CRISPR系统临床适应性的重要任务。

尽管面临上述诸多挑战，CRISPR/Cas系统在分子诊断领域的前景依然广阔。从技术演进趋势来看，该系统具有持续优化的潜力。例如，近年来陆续发现的新型Cas效应蛋白在分子量、切割机制、靶向能力等方面展现出更高的多样性与灵活性，为构建更高效、更便携的诊断平台提供了丰富的工具选择。同时，人工智能算法与大数据技术的引入，有望在引导RNA设计、靶标识别、结果判读等多个环节提高系统效率与智能化水平。更为重要的是，CRISPR分子诊断技术在应对突发公共卫生事件、推动个体化精准诊疗以及促进基层医疗可及性等方面，展现出其独特的战略价值。特别是在COVID-19疫情防控中，CRISPR诊断平台凭借其快速响应能力、高灵敏度和现场适应性，已展现出相较传统PCR方法的显著优势。展望未来，随着跨学科融合的不断深化，CRISPR/Cas系统有望与传感材料、微纳器件、可穿戴设备等新兴技术结合，逐步构建起面向疾病预警、健康监测及疾病管理全生命周期的分子诊疗新应用场景。

综上所述，CRISPR/Cas系统作为新一代分子诊断技术，虽然在发展过程中仍面临诸多技术与应用层面的挑战，但其在灵敏性、特异性、操作便捷性等方面的独特优势，决定了其在未来生命健康科技领域的重要地位。通过持续的技术革新与跨领域协同合作，有望推动该技术加速从实验室走向临床，实现其在公共健康、疾病精准诊疗及全球卫生治理中的广泛应用。

参 考 文 献

- [1] MAKAROVA K S, WOLF Y I, IRANZO J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of Class 2 and derived variants[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(2): 67-83.
- [2] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, ESSLETZBICHLER P, et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13[J]. *Nature*, 2017, 550(7675): 280-284.
- [3] ZHOU W H, HU L, YING L M, et al. A CRISPR-Cas9-triggered strand displacement amplification method for ultrasensitive DNA detection[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 5012.
- [4] HU C Y, VAN BELJOUW S P B, NAM K H, et al. Caspase is a CRISPR RNA-guided, RNA-activated protease[J]. *Science*, 2022, 377(6612): 1278-1285.
- [5] STRECKER J, DEMIRCIOLU F E, LI D, et al. RNA-activated protein cleavage with a CRISPR-associated endopeptidase[J]. *Science*, 2022, 378(6622): 874-881.
- [6] YU G M, WANG X S, ZHANG Y, et al. Structure and function of a bacterial type III-E CRISPR-Cas7-11 complex[J]. *Nature Microbiology*, 2022, 7(12): 2078-2088.
- [7] 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.
- [8] TONG X H, ZHANG K, HAN Y, et al. Fast and sensitive CRISPR detection by minimized interference of target amplification[J]. *Nature Chemical Biology*, 2024, 20(7): 885-893.
- [9] HARRINGTON L B, BURSTEIN D, CHEN J S, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes[J]. *Science*, 2018, 362(6416): 839-842.
- [10] KARVELIS T, BIGELYTE G, YOUNG J K, et al. PAM recognition by miniature CRISPR-Cas12f nucleases triggers programmable double-stranded DNA target cleavage[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(9): 5016-5023.
- [11] WU Z W, ZHANG Y F, YU H P, et al. Programmed genome editing by a miniature CRISPR-Cas12f nuclease[J]. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17(11): 1132-1138.
- [12] WANG Y J, WANG Y N, PAN D, et al. Guide RNA engineering enables efficient CRISPR editing with a miniature *Syntrophomonas palmitatica* Cas12f1 nuclease[J]. *Cell Reports*, 2022, 40(13): 111418.
- [13] WANG Y N, TANG N, JI Q J. Systematic trans-activity comparison of several reported Cas12f nucleases[J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2025, 43(12): 1339-1347.
- [14] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438-442.

- [15] YOSHIMI K, TAKESHITA K, YAMAYOSHI S, et al. CRISPR-Cas3-based diagnostics for SARS-CoV-2 and influenza virus[J]. *iScience*, 2022, 25(2): 103830.
- [16] CHEN J Y, CHEN Y, HUANG L L, et al. Trans-nuclease activity of Cas9 activated by DNA or RNA target binding[J]. *Nature Biotechnology*, 2025, 43(4): 558-568.
- [17] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [18] ZHAN T Z, RINDTORFF N, BETGE J, et al. CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2019, 55: 106-119.
- [19] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, KELLNER M J, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 439-444.
- [20] KNOTT G J, EAST-SELETSKY A, COFSKY J C, et al. Guide-bound structures of an RNA-targeting A-cleaving CRISPR-Cas13a enzyme[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2017, 24(10): 825-833.
- [21] WANG B B, ZHANG T L, YIN J, et al. Structural basis for self-cleavage prevention by tag: anti-tag pairing complementarity in type VI Cas13 CRISPR systems[J]. *Molecular Cell*, 2021, 81(5): 1100-1115.e5.
- [22] LI L X, LI S Y, WU N, et al. HOLMESv2: a CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(10): 2228-2237.
- [23] PARDEE K, GREEN A A, TAKAHASHI M K, et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components[J]. *Cell*, 2016, 165(5): 1255-1266.
- [24] LI H M, XIE Y, CHEN F M, et al. Amplification-free CRISPR/Cas detection technology: challenges, strategies, and perspectives[J]. *Chemical Society Reviews*, 2023, 52(1): 361-382.
- [25] MYHRVOLD C, FREIJE C A, GOOTENBERG J S, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 444-448.
- [26] ZAGHLOUL H, EL-SHAHAT M. Recombinase polymerase amplification as a promising tool in hepatitis C virus diagnosis [J]. *World Journal of Hepatology*, 2014, 6(12): 916-922.
- [27] WAN Y Z, LI S, XU W F, et al. Terminal chemical modifications of crRNAs enable improvement in the performance of CRISPR-Cas for point-of-care nucleic acid detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 96(41): 16346-16354.
- [28] YANG H, EREMEEVA E, ABRAMOV M, et al. CRISPR-Cas9 recognition of enzymatically synthesized base-modified nucleic acids[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(4): 1501-1511.
- [29] HU M L, QIU Z Q, BI Z R, et al. Photocontrolled crRNA activation enables robust CRISPR-Cas12a diagnostics[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(26): e2202034119.
- [30] ROSSETTI M, MERLO R, BAGHERI N, et al. Enhancement of CRISPR/Cas12a trans-cleavage activity using hairpin DNA reporters[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(14): 8377-8391.
- [31] HU M L, LIU R H, QIU Z Q, et al. Light-start CRISPR-Cas12a reaction with caged crRNA enables rapid and sensitive nucleic acid detection[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(23): e202300663.
- [32] CHEN D, HUANG W T, ZHANG Y, et al. CRISPR-mediated profiling of viral RNA at single-nucleotide resolution[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(30): e202304298.
- [33] YUE H H, SHU B W, TIAN T, et al. Droplet Cas12a assay enables DNA quantification from unamplified samples at the single-molecule level[J]. *Nano Letters*, 2021, 21(11): 4643-4653.
- [34] BROTO M, KAMINSKI M M, ADRIANUS C, et al. Nanzyme-catalysed CRISPR assay for preamplification-free detection of non-coding RNAs[J]. *Nature Nanotechnology*, 2022, 17(10): 1120-1126.
- [35] SHI K, XIE S Y, TIAN R Y, et al. A CRISPR-Cas autocatalysis-driven feedback amplification network for supersensitive DNA diagnostics[J]. *Science Advances*, 2021, 7(5): eabc7802.
- [36] TIAN T, SHU B W, JIANG Y Z, et al. An ultralocalized Cas13a assay enables universal and nucleic acid amplification-free single-molecule RNA diagnostics[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(1): 1167-1178.
- [37] SHINODA H, IIDA T, MAKINO A, et al. Automated amplification-free digital RNA detection platform for rapid and sensitive SARS-CoV-2 diagnosis[J]. *Communications Biology*, 2022, 5: 473.
- [38] LIU P F, LIN Y T, ZHUO X H, et al. Universal crRNA acylation strategy for robust photo-initiated one-pot CRISPR-Cas12a nucleic acid diagnostics[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2024, 63(23): e202401486.
- [39] CHEN Y, XU X L, WANG J C, et al. Photoactivatable CRISPR/Cas12a strategy for one-pot DETECTR molecular diagnosis[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(27): 9724-9731.
- [40] SUN K, PU L, CHEN C, et al. An autocatalytic CRISPR-Cas amplification effect propelled by the LNA-modified split activators for DNA sensing[J]. *Nucleic Acids Research*, 2024, 52(7): e39.
- [41] LIM J, VAN A B, KOPROWSKI K, et al. Amplification-free, OR-gated CRISPR-Cascade reaction for pathogen detection in blood samples[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2025, 122(11): e2420166122.
- [42] TANG Y N, GAO L, FENG W, et al. The CRISPR-Cas toolbox for analytical and diagnostic assay development[J]. *Chemical*

- Society Reviews, 2021, 50(21): 11844-11869.
- [43] BROUGHTON J P, DENG X D, YU G X, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(7): 870-874.
- [44] JOUNG J, LADHA A, SAITO M, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing[J]. The New England Journal of Medicine, 2020, 383(15): 1492-1494.
- [45] JOUNG J, LADHA A, SAITO M, et al. Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics[PP/OL]. medRxiv(2020-05-08) [2025-03-01]. <https://doi.org/10.1101/2020.05.04.20091231>.
- [46] WELCH N L, ZHU M L, HUA C, et al. Multiplexed CRISPR-based microfluidic platform for clinical testing of respiratory viruses and identification of SARS-CoV-2 variants[J]. Nature Medicine, 2022, 28(5): 1083-1094.
- [47] YAN M Y, ZHENG D D, LI S S, et al. Application of combined CRISPR screening for genetic and chemical-genetic interaction profiling in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Science Advances, 2022, 8(47): eadd5907.
- [48] CHEN W T, LUO H, ZENG L H, et al. A suite of PCR-LwCas13a assays for detection and genotyping of *Treponema pallidum* in clinical samples[J]. Nature Communications, 2022, 13: 4671.
- [49] ACKERMAN C M, MYHRVOLD C, THAKKU S G, et al. Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13[J]. Nature, 2020, 582(7811): 277-282.
- [50] JAHR S, HENTZE H, ENGLISCH S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells[J]. Cancer Research, 2001, 61(4): 1659-1665.
- [51] UNDERHILL H R, KITZMAN J O, HELLWIG S, et al. Fragment length of circulating tumor DNA[J]. PLoS Genetics, 2016, 12(7): e1006162.
- [52] MERKER J D, OXNARD G R, COMPTON C, et al. Circulating tumor DNA analysis in patients with cancer: American society of clinical oncology and college of American pathologists joint review[J]. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2018, 142(10): 1242-1253.
- [53] DONG J B, LI X Y, DENG L Y, et al. CRISPR/Cas12a cleavage-mediated isothermal amplification lights up the dimeric G-quadruplex signal unit for ultrasensitive and label-free detection of circulating tumor DNA[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2024, 404: 135292.
- [54] ZHAO X, LIU W J, QU R L, et al. Target-activated CRISPR/Cas12a recognize multifunctional G-quadruplex and dual fluorescent indicators enable rapid non-extraction analysis of circulating tumor DNA in breast cancer[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2025, 430: 137372.
- [55] PENG S, TAN Z, CHEN S Y, et al. Integrating CRISPR-Cas12a with a DNA circuit as a generic sensing platform for amplified detection of microRNA[J]. Chemical Science, 2020, 11(28): 7362-7368.
- [56] XIE Z W, ZHAO S, DENG R J, et al. Logic-measurer: a multienzyme-assisted ultrasensitive circuit for logical detection of exosomal microRNAs[J]. ACS Nano, 2025, 19(12): 12222-12236.
- [57] KIM V N. microRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2005, 6(5): 376-385.
- [58] CALURA E, FRUSCIO R, PARACCHINI L, et al. MiRNA landscape in stage I epithelial ovarian cancer defines the histotype specificities[J]. Clinical Cancer Research, 2013, 19(15): 4114-4123.
- [59] ZHENG H, ZHANG L N, ZHAO Y R, et al. Plasma miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e77853.
- [60] MILANEZ-ALMEIDA P, MARTINS A J, GERMAIN R N, et al. Cancer prognosis with shallow tumor RNA sequencing [J]. Nature Medicine, 2020, 26(2): 188-192.
- [61] TIAN B, MINERO G A S, FOCK J, et al. CRISPR-Cas12a based internal negative control for nonspecific products of exponential rolling circle amplification[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(5): e30.
- [62] XING S, LU Z D, HUANG Q, et al. An ultrasensitive hybridization chain reaction-amplified CRISPR-Cas12a aptasensor for extracellular vesicle surface protein quantification[J]. Theranostics, 2020, 10(22): 10262-10273.
- [63] ZHANG J L, GUAN M T, MA C H, et al. Highly effective detection of exosomal miRNAs in plasma using liposome-mediated transfection CRISPR/Cas13a[J]. ACS Sensors, 2023, 8(2): 565-575.
- [64] YANG Q Q, DONG M J, XU J L, et al. CRISPR/RNA aptamer system activated by an AND logic gate for biomarker-driven theranostics[J]. Journal of the American Chemical Society, 2025, 147(1): 169-180.
- [65] YAN H, WEN Y J, TIAN Z M, et al. A one-pot isothermal Cas12-based assay for the sensitive detection of microRNAs [J]. Nature Biomedical Engineering, 2023, 7(12): 1583-1601.
- [66] JIA Z Y, MAGHAYDAH Y, ZDANYIS K, et al. CRISPR-powered aptasensor for diagnostics of Alzheimer's disease[J]. ACS Sensors, 2024, 9(1): 398-405.
- [67] FENG Z Y, LIU R, LI X, et al. Harnessing the CRISPR-Cas13d system for protein detection by dual-aptamer-based transcription amplification[J]. Chemistry- A European Journal, 2023, 29(10): e202202693.
- [68] LIU F, CHEN R, SONG W L, et al. Modular combination of proteolysis-responsive transcription and spherical nucleic acids for smartphone-based colorimetric detection of protease biomarkers[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(7): 3517-3525.

- [69] DENG F, LI Y, QIAO L C, et al. A CRISPR/Cas12a-assisted on-fibre immunosensor for ultrasensitive small protein detection in complex biological samples[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1192: 339351.
- [70] AINSWORTH M, ANDERSSON M, AUCKLAND K, et al. Performance characteristics of five immunoassays for SARS-CoV-2: a head-to-head benchmark comparison[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2020, 20(12): 1390-1400.
- [71] GEURTSVANKESSEL C H, OKBA N M A, IGLOI Z, et al. An evaluation of COVID-19 serological assays informs future diagnostics and exposure assessment[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 3436.
- [72] RHOADS D D, CHERIAN S S, ROMAN K, et al. Comparison of Abbott ID now, DiaSorin simplexa, and CDC FDA emergency use authorization methods for the detection of SARS-CoV-2 from nasopharyngeal and nasal swabs from individuals diagnosed with COVID-19[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2020, 58(8): e00760-20.
- [73] WHITMAN J D, HIATT J, MOWERY C T, et al. Evaluation of SARS-CoV-2 serology assays reveals a range of test performance [J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(10): 1174-1183.
- [74] ELLEDGE S K, ZHOU X X, BYRNES J R, et al. Engineering luminescent biosensors for point-of-care SARS-CoV-2 antibody detection[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(8): 928-935.
- [75] YAO Z, DRECUN L, ABOUALIZADEH F, et al. A homogeneous split-luciferase assay for rapid and sensitive detection of anti-SARS CoV-2 antibodies[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 1806.
- [76] LONG Q X, LIU B Z, DENG H J, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19[J]. *Nature Medicine*, 2020, 26(6): 845-848.
- [77] AGNOLON V, CONTATO A, MENEGHELLO A, et al. ELISA assay employing epitope-specific monoclonal antibodies to quantify circulating HER2 with potential application in monitoring cancer patients undergoing therapy with trastuzumab[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 3016.
- [78] ZHANG W, DU R H, LI B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 386-389.
- [79] ACHARYA A P, NAFISI P M, GARDNER A, et al. A fluorescent peroxidase probe increases the sensitivity of commercial ELISAs by two orders of magnitude[J]. *Chemical Communications*, 2013, 49(88): 10379-10381.
- [80] CARTER Q L, DOTZLAF J, SWEARINGEN C, et al. Development and characterization of a novel ELISA based assay for the quantitation of sub-nanomolar levels of neopeptide exposed NITGE-containing aggrecan fragments[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2007, 328(1/2): 162-168.
- [81] TANG Y N, SONG T R, GAO L, et al. A CRISPR-based ultrasensitive assay detects attomolar concentrations of SARS-CoV-2 antibodies in clinical samples[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 4667.
- [82] LIANG M D, LI Z L, WANG W S, et al. A CRISPR-Cas12a-derived biosensing platform for the highly sensitive detection of diverse small molecules[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3672.
- [83] ZHANG C Y, YAO H F, MA Q, et al. Ultrasensitive glucose detection from tears and saliva through integrating a glucose oxidase-coupled DNAzyme and CRISPR-Cas12a[J]. *Analyst*, 2021, 146(21): 6576-6581.
- [84] WHEATLEY M S, WANG Q, WEI W, et al. Cas12a-based diagnostics for potato purple top disease complex associated with infection by ‘*Candidatus* *Phytoplasma trifolii*’-related strains[J]. *Plant Disease*, 2022, 106(8): 2039-2045.
- [85] AMAN R, MAHAS A, MARSIC T, et al. Efficient, rapid, and sensitive detection of plant RNA viruses with one-pot RT-RPA-CRISPR/Cas12a assay[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 610872.
- [86] MARQUÉS M C, SÁNCHEZ-VICENTE J, RUIZ R, et al. Diagnostics of infections produced by the plant viruses TMV, TEV, and PVX with CRISPR-Cas12 and CRISPR-Cas13[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(7): 2384-2393.
- [87] MAHAS A, HASSAN N, AMAN R, et al. LAMP-coupled CRISPR-Cas12a module for rapid and sensitive detection of plant DNA viruses[J]. *Viruses*, 2021, 13(3): 466.
- [88] RAMACHANDRAN V, WEILAND J J, BOLTON M D. CRISPR-based isothermal next-generation diagnostic method for virus detection in sugarbeet[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 679994.
- [89] KANG H X, PENG Y, HUA K Y, et al. Rapid detection of wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae triticum* pathotype using genome-specific primers and Cas12a-mediated technology[J]. *Engineering*, 2021, 7(9): 1326-1335.
- [90] GONG X Y, WANG Z H, BASHIR M, et al. Recent application of CRISPR/Cas in plant disease detection[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2025, 189: 118251.
- [91] LIU G Z. Advancing CRISPR/cas biosensing with integrated devices[J]. *ACS Sensors*, 2025, 10(2): 575-576.
- [92] LI X T, WANG T Y, LIU X H, et al. Advances of engineered microfluidic biosensors via CRISPR/Cas in bacteria and virus monitoring[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2024, 491: 152038.
- [93] LI Z Y, UNO N, DING X, et al. Bioinspired CRISPR-mediated cascade reaction biosensor for molecular detection of HIV using a glucose meter[J]. *ACS Nano*, 2023, 17(4): 3966-3975.
- [94] GE H, FENG J Y, HUANG L B, et al. Development of a highly sensitive, high-throughput and automated CRISPR-based device for the contamination-free pathogen detection[J].

- Biosensors and Bioelectronics, 2025, 278: 117323.
- [95] TANG Y D, QI L J, LIU Y C, et al. CLIPON: a CRISPR-enabled strategy that turns commercial pregnancy test strips into general point-of-need test devices[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, 61(12): e202115907.
- [96] WANG Y X, CHEN H, LIN K, et al. Ultrasensitive single-step CRISPR detection of monkeypox virus in minutes with a vest-pocket diagnostic device[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 3279.
- [97] 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.
- [98] JI M H, XIA Y, LOO J, et al. Automated multiplex nucleic acid tests for rapid detection of SARS-CoV-2, influenza A and B infection with direct reverse-transcription quantitative PCR (dirRT-qPCR) assay in a centrifugal microfluidic platform[J]. *RSC Advances*, 2020, 10(56): 34088-34098.
- [99] LIN Z, ZOU Z Y, PU Z, et al. Application of microfluidic technologies on COVID-19 diagnosis and drug discovery[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2023, 13(7): 2877-2896.
- [100] CHEN Y, ZONG N, YE F D, et al. Dual-CRISPR/Cas12a-assisted RT-RAA for ultrasensitive SARS-CoV-2 detection on automated centrifugal microfluidics[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(27): 9603-9609.
- [101] LIM J, AHN J W, MAENG I, et al. TwinDemic detection: a non-enzymatic signal amplification system for on-site detection of multiple respiratory viruses[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2025, 424: 136933.
- [102] NGUYEN H Q, NGUYEN V D, PHAN V M, et al. Development of a self-contained microfluidic chip and an Internet-of-things-based point-of-care device for automated identification of respiratory viruses[J]. *Lab on a Chip*, 2024, 24(9): 2485-2496.
- [103] NGUYEN P Q M, WANG M, ANN MARIA N, et al. Modular micro-PCR system for the onsite rapid diagnosis of COVID-19[J]. *Microsystems & Nanoengineering*, 2022, 8: 82.
- [104] SHAN X Y, GONG F, YANG Y X, et al. Nucleic acid amplification-free digital detection method for SARS-CoV-2 RNA based on droplet microfluidics and CRISPR-Cas13a[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(45): 16489-16495.
- [105] PENG R B, LU Z C, LIU M, et al. RT-RPA-assisted CRISPR/Cas12a for rapid and multiplex detection of respiratory infectious viruses based on centrifugal microfluidics[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2024, 399: 134838.
- [106] CHEN J, YANG D Q, JI D Z, et al. A fully automated point-of-care device using organic electrochemical transistor-enhanced CRISPR/Cas12a for amplification-free nucleic acid detection[J]. *Advanced Functional Materials*, 2025, 35(27): 2420701.
- [107] XU J, SUO W H, GOULEV Y, et al. Handheld microfluidic filtration platform enables rapid, low-cost, and robust self-testing of SARS-CoV-2 virus[J]. *Small*, 2021, 17(52): 2104009.
- [108] WANG D, WANG X D, YE F D, et al. An integrated amplification-free digital CRISPR/Cas-assisted assay for single molecule detection of RNA[J]. *ACS Nano*, 2023, 17(8): 7250-7256.
- [109] YIN B F, WAN X H, SOHAN A S M M F, et al. Microfluidics-based POCT for SARS-CoV-2 diagnostics[J]. *Micromachines*, 2022, 13(8): 1238.
- [110] LI Z Y, DING X, YIN K, et al. Instrument-free, CRISPR-based diagnostics of SARS-CoV-2 using self-contained microfluidic system[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 199: 113865.
- [111] FU Q, TU Y P, CHENG L, et al. A fully-enclosed prototype 'pen' for rapid detection of SARS-CoV-2 based on RT-RPA with dipstick assay at point-of-care testing[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2023, 383: 133531.
- [112] XIAO Y J, ZHOU M F, LIU C G, et al. Fully integrated and automated centrifugal microfluidic chip for point-of-care multiplexed molecular diagnostics[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2024, 255: 116240.
- [113] LI P T, XIONG H W, YANG B, et al. Recent progress in CRISPR-based microfluidic assays and applications[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2022, 157: 116812.
- [114] CUI J Q, LIU F X, PARK H, et al. Droplet digital recombinase polymerase amplification (ddRPA) reaction unlocking *via* picoinjection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 202: 114019.
- [115] LIU F X, CUI J Q, PARK H, et al. Isothermal background-free nucleic acid quantification by a one-pot Cas13a assay using droplet microfluidics[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(15): 5883-5892.
- [116] ZHANG L, WANG H L, YANG S, et al. High-throughput and integrated CRISPR/Cas12a-based molecular diagnosis using a deep learning enabled microfluidic system[J]. *ACS Nano*, 2024, 18(35): 24236-24251.
- [117] LI X H, LIU M L, MEN D H, et al. Rapid, portable, and sensitive detection of CaMV35S by RPA-CRISPR/Cas12a-G4 colorimetric assays with high accuracy deep learning object recognition and classification[J]. *Talanta*, 2024, 278: 126441.
- [118] ZHAO J H, KONG D R, ZHANG G H, et al. An efficient CRISPR/Cas cooperative shearing platform for clinical diagnostics applications[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2024, 63(52): e202411705.
- [119] HUANG B C, GUO L, YIN H, et al. Deep learning enhancing guide RNA design for CRISPR/Cas12a-based diagnostics[J]. *iMeta*, 2024, 3(4): e214.
- [120] WESSELS H H, STIRN A, MÉNDEZ-MANCILLA A, et al. Prediction of on-target and off-target activity of CRISPR-Cas13d guide RNAs using deep learning[J]. *Nature*

- Biotechnology, 2024, 42(4): 628-637.
- [121] XU T, ZHANG Y, LI S J, et al. Deep learning-enhanced hand-driven microfluidic chip for multiplexed nucleic acid detection based on RPA/CRISPR[J]. *Advanced Science*, 2025, 12(21): 2414918.
- [122] LI Z H, ZHAO W C, MA S X, et al. A chemical-enhanced system for CRISPR-based nucleic acid detection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 192: 113493.
- [123] MANTENA S, PILLAI P P, PETROS B A, et al. Model-directed generation of artificial CRISPR-Cas13a guide RNA sequences improves nucleic acid detection[J]. *Nature Biotechnology*, 2025, 43(8): 1266-1273.
- [124] HUANG Z, LYON C J, WANG J, et al. CRISPR assays for disease diagnosis: progress to and barriers remaining for clinical applications[J]. *Advanced Science*, 2023, 10(20): 2301697.
- [125] WENG Z Y, YOU Z, YANG J, et al. CRISPR-Cas biochemistry and CRISPR-based molecular diagnostics[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(17): e202214987.
- [126] ZHOU T T, SHEN G L, ZHONG L L, et al. crRNA array-mediated CRISPR/Cas12a coupling with dual RPA for highly sensitive detection of *Streptomyces aureofaciens* Tü117 from hypertension with multi-signal output[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2025, 282: 117493.
- [127] MAO Z F, CHEN R P, HUANG L, et al. CRISPR analysis based on Pt@MOF dual-modal signal for multichannel fluorescence and visual detection of norovirus[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2025, 273: 117153.
- [128] HU M L, YUAN C Q, TIAN T, et al. Single-step, salt-aging-free, and thiol-free freezing construction of AuNP-based bioprobes for advancing CRISPR-based diagnostics[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(16): 7506-7513.
- [129] XIONG E H, JIANG L, TIAN T, et al. Simultaneous dual-gene diagnosis of SARS-CoV-2 based on CRISPR/Cas9-mediated lateral flow assay[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(10): 5307-5315.
- [130] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S. CRISPR diagnostics [J]. *Science*, 2021, 372(6545): 914-915.
- [131] ZUO X L, FAN C H, CHEN H Y. Biosensing: CRISPR-powered diagnostics[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2017, 1: 91.
- [132] 杜瑶, 高宏丹, 刘家坤, 等. CRISPR-Cas系统在病原核酸检测中的研究进展[J]. *合成生物学*, 2024, 5(1): 202-216.
- DU Y, GAO H D, LIU J K, et al. Research progress of the CRISPR-Cas system in the detecting pathogen nucleic acids[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2024, 5(1): 202-216.
- [133] 李金成, 肖美娇, 陈渝萍. 基于CRISPR/Cas的体外核酸检测体系的研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2024, 44(9): 73-87.
- LI J C, XIAO M J, CHEN Y P. Progress in *in vitro* CRISPR/cas-based nucleic acid detection[J]. *China Biotechnology*, 2024, 44(9): 73-87.
- [134] PACESA M, PELEA O, JINEK M. Past, present, and future of CRISPR genome editing technologies[J]. *Cell*, 2024, 187(5): 1076-1100.
- [135] TENG F, GUO L, CUI T T, et al. CDetection: CRISPR-Cas12b-based DNA detection with sub-attomolar sensitivity and single-base specificity[J]. *Genome Biology*, 2019, 20(1): 132.
- [136] CAO L X, WANG Z Y, LEI C Y, et al. Engineered CRISPR/Cas ribonucleoproteins for enhanced biosensing and bioimaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2025, 97(11): 5866-5879.
- [137] GUAN X, YANG R, ZHANG J Y, et al. Programmable multiplexed nucleic acid detection by harnessing specificity defect of CRISPR-Cas12a[J]. *Advanced Science*, 2025, 12(4): 2411021.
- [138] MOLINA VARGAS A M, SINHA S, OSBORN R, et al. New design strategies for ultra-specific CRISPR-Cas13a-based RNA detection with single-nucleotide mismatch sensitivity[J]. *Nucleic Acids Research*, 2024, 52(2): 921-939.
- [139] YE X Y, WU H Y, LIU J H, et al. One-pot diagnostic methods based on CRISPR/Cas and Argonaute nucleases: strategies and perspectives[J]. *Trends in Biotechnology*, 2024, 42(11): 1410-1426.
- [140] DING X, YIN K, LI Z Y, et al. Ultrasensitive and visual detection of SARS-CoV-2 using all-in-one dual CRISPR-Cas12a assay[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 4711.



通讯作者: 聂舟(1982—),男,博士,教授,博士生导师。研究方向:围绕功能核酸理性设计及其生物传感与成像、细胞信号通路调控应用等方面开展了深入研究,系统建立了基于物理/化学信号响应型核酸工具调控细胞受体信号通路的细胞功能重编程技术,以及RNA结构靶向活细胞/活体成像技术。

E-mail: niezhou@hnu.edu.cn



第一作者: 王珂(1995—),女,博士,讲师。研究方向:基于CRISPR/Cas系统的可编程分子识别与信号放大机制,开发工程化高灵敏、高特异的生物传感平台,用于环境监测及疾病诊断等生命科学场景中的创新应用。

E-mail: wangke123@fmmu.edu.cn