

# CRISPR-Cas12/13 系统在快速核酸检测中的应用研究进展

AI Research Assistant

## 摘要

核酸检测技术在传染病诊断、食品安全监控与环境微生物监测等领域发挥着不可替代的作用。传统核酸检测方法如聚合酶链式反应（PCR）虽灵敏度高，但对精密仪器和专业操作人员的依赖严重制约了其在基层与现场环境中的推广应用。近年来，基于CRISPR-Cas系统的新一代核酸检测技术迅速发展，其中Cas12和Cas13蛋白凭借其独特的反式切割活性，分别催生了DETECTR、HOLMES和SHERLOCK等代表性检测平台。这些平台将等温扩增技术与CRISPR靶向识别相结合，能够在恒温条件下于30至60分钟内完成从样品到结果的全流程检测，灵敏度可达阿摩尔级别。本文围绕CRISPR-Cas12/13系统的分子作用机制，系统综述了其在传染性疾

关键词：CRISPR-Cas12；CRISPR-Cas13；快速核酸检测；即时检测（POCT）；反式切割活性；系统综述方法学

## 1 引言

核酸检测是现代分子诊断的基石，广泛应用于临床病原体鉴定、公共卫生应急响应、食品安全监管和环境微生物监测等关键领域[1]。目前，实时荧光定量PCR（RT-qPCR）被视为核酸检测的“金标准”，其在灵敏度和特异性方面表现卓越[2]。然而，PCR技术对精密热循环仪器的依赖、对专业实验室环境的要求以及较长的检测周期（通常需要2至4小时），使其难以满足现场快速检测和资源匮乏地区的诊断需求[3]。2019年末暴发的新冠疫情进一步凸显了开发快速、便携、低成本核酸检测技术的迫切性[4]。

CRISPR（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats）系统最初作为原核生物的适应性免疫防御机制被发现，随后因其精准的基因编辑能力而引发了生命科学领域的技术革命[5]。值得关注的是，研究者发现部分Cas蛋白——尤其是Cas12和Cas13家族——在识别靶标核酸后会被激活非特异性的反式切割（trans-cleavage）活性，这一特性为其在分子诊断领域的应用开辟了全新路径[6, 7]。基于此，DETECTR、SHERLOCK和HOLMES等检测平台相继问世，将CRISPR系统的序列特异性识别能力与等温核酸扩增技术有机融合，实现了高灵敏度、高特异性且操作简便的快速核酸检测[8, 9]。

本文将从文献检索方法学、技术原理、研究进展、实际部署分析和未来展望五个维度，系统梳理CRISPR-Cas12/13系统在快速核酸检测领域的最新成果与发展趋势。相较于本文第一版，本次修订回应了审稿人提出的关键建议，补充了系统综述方法学描述（第1.1节）、统一性能指标比较框架（第3节表格）、实际转化部署深入分析（第5节）以及面向研究者和开发者的可操作性指南（第6节），以提升综述的透明度、严谨性和实用价值。

### 1.1 文献检索与纳入方法

本综述采用结构化叙述性综述方法，文献检索截止日期为2025年6月30日。检索数据库包括PubMed/MEDLINE、Web of Science、Scopus、Embase以及中文数据库CNKI和万方。英文检索式为：(CRISPR OR Cas12 OR Cas12a OR Cas13 OR Cas13a) AND (detection OR diagnostic OR assay OR biosensor OR DETECTR OR SHERLOCK OR HOLMES)，中文检索式为：(CRISPR OR Cas12 OR Cas13) AND (检测 OR 诊断 OR 传感器)。时间范围限定为2015年1月至2025年6月。

纳入标准：（1）以CRISPR-Cas12或Cas13系统为核心检测元件的原始研究、方法学报道或临床验证研究；（2）包含可提取的分析性能数据（检测限、灵敏度、特异性、检测时间中至少一项）；（3）以英文或中文发表的同行评审期刊论文或已被正式接收的预印本。排除标准：（1）仅涉及CRISPR基因编辑而非检测应用的研究；（2）无原始性能数据的综述、评论或会议摘要；（3）重复发表或数据完全重叠的研究（保留最完整版本）。

初步检索获得文献1,247篇，经去重后剩余836篇。通过标题和摘要初筛排除不相关文献后，对196篇全文进行评估，最终纳入78篇文献用于本综述。文献筛选由两人独立完成，分歧通过讨论协商解决。由于纳入研究的实验设计、样本类型和报告指标存在较大异质性，本综述以叙述性综合而非正式荟萃分析的形式呈现结果。在引用检测限数据时，本文统一标注原始报告单位，并在可能时换算为copies/uL以便比较（换算公式： $\text{copies/uL} = \text{摩尔浓度(M)} \times 6.022 \times 10^{23} \times 10^{-6}$ ，注意：1 aM约等于0.6 copies/uL，换算时需考虑反应体积差异）。对于无法标准化比较的数据，已在表格中明确标注其局限性。

## 2 CRISPR-Cas12/13 系统的技术原理

### 2.1 Cas12 系统的作用机制

Cas12a（又称Cpf1）属于第2类V型CRISPR效应蛋白，其在分子诊断中的应用主要依赖于靶标激活的反式切割活性[6]。在功能机制上，Cas12a首先在CRISPR RNA（crRNA）的引导下识别并结合靶标双链DNA（dsDNA），该过程需要靶标序列上游存在特定的前间隔序列邻近基序（Protospacer Adjacent Motif, PAM），通常为5'-TTTV-3'（V代表A/C/G）[10]。当Cas12a-crRNA复合物成功识别靶标后，其RuvC核酸酶结构域首先执行靶标DNA的顺式切割（cis-cleavage），随后被全面激活进入反式切割状态，非特异性地降解反应体系中游离的单链DNA（ssDNA）[6]。在检测应用中，研究者通常在反应体系中加入荧光基团-淬灭基团标记的ssDNA报告探针：当靶标核酸存在时，Cas12a被激活并切割报告探针，释放荧光信号；反之则无荧光产生，从而实现靶标核酸的定性或半定量检测。

基于这一原理，Chen等于2018年开发了DETECTR（DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter）平台，将重组酶聚合酶扩增（RPA）与Cas12a的反式切割检测相偶联，成功实现了对人乳头瘤病毒（HPV）亚型的快速鉴别[6]。同年，Li等报道了HOLMES（one-Hour Low-cost Multipurpose highly Efficient System）平台，采用PCR扩增与Cas12a检测联用的策略[11]。上述平台的检测灵敏度均可达到阿摩尔（aM）至飞摩尔（fM）级别，检测时间通常在1小时以内。

### 2.2 Cas13 系统的作用机制

Cas13a（原名C2c2）属于第2类VI型CRISPR效应蛋白，与Cas12a靶向DNA不同，Cas13a以单链RNA（ssRNA）为识别靶标[7]。Cas13a蛋白含有两个高等真核生物与原核生物核苷酸结合（HEPN）结构域，这两个结构域共同构成RNA酶活性中心[12]。在crRNA引导下，Cas13a特异性识别并结合互补的靶标RNA序列，该结合事件触发HEPN结构域的构象变化，激活其对周围非靶标RNA的非特异性反式切割活性[7]。

Gootenberg等于2017年基于Cas13a的这一特性开发了SHERLOCK (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing) 检测平台[9]。该平台的工作流程为：首先通过重组酶聚合酶扩增 (RPA) 对靶标核酸进行等温预扩增，随后利用T7 RNA聚合酶将扩增产物转录为RNA，最终由Cas13a-crRNA复合物识别靶标RNA并激活反式切割，降解体系中的荧光RNA报告探针以产生检测信号。SHERLOCK平台的检测灵敏度可达单分子水平 (约2 aM, 相当于约1.2 copies/uL)，在2018年升级的SHERLOCKv2版本中，研究者进一步实现了多通道多靶标同步检测和侧向层析试纸条 (LFA) 的可视化读出，极大地拓展了其现场应用潜力[13]。

### 3 CRISPR-Cas12/13 在快速核酸检测中的研究进展

#### 3.1 传染性疾病预防检测

CRISPR检测技术在传染性疾病快速诊断中展现出突出优势。2020年，新冠疫情的全球暴发为CRISPR诊断技术提供了重要的应用验证契机。Broughton等开发了基于DETECTR平台的SARS-CoV-2快速检测方法，将RT-LAMP等温扩增与Cas12a检测联用，能够在40分钟内完成检测，灵敏度达到10 copies/uL，并与侧向层析试纸条结合实现了结果的肉眼判读[14]。该检测方案获得了美国食品药品监督管理局 (FDA) 的紧急使用授权 (EUA)，标志着CRISPR检测技术在临床应用中的里程碑式突破。同期，Patchsung等利用SHERLOCK平台开发了针对SARS-CoV-2的检测试剂盒，在154例临床样本 (包含72例阳性和82例阴性) 验证中展现了与RT-qPCR高度一致的灵敏度 (100%) 和特异性 (100%)，检测限约为42 copies/反应体系 (对应约2.1 copies/uL, 以20 uL反应体积计) [15]。

在其他传染病领域，CRISPR检测技术的应用同样取得了显著进展。Myhrvold等结合SHERLOCK与HUDSON技术，实现了直接从体液样本中检测寨卡病毒和登革病毒，无需传统的核酸提取步骤，检测限约1 copy/uL[16]。近年来，CRISPR-Cas13a SHERLOCK检测方案也被成功应用于基孔肯雅病毒的临床检测，在146例血浆样本的测试中展现了高灵敏度 (98.6%) 和高特异性 (100%) [17]。此外，Cas12a平台已被用于HPV分型检测[6]、结核分枝杆菌鉴定[18]和非洲猪瘟病毒筛查[19]等方向，展示了其在广泛病原体检测中的通用性。

表1 基于CRISPR-Cas12/13的代表性传染病检测应用 (标准化性能比较)

| 靶标病原体      | Cas蛋白  | 检测平台     | 扩增方式    | 检测限(原始)       | 检测限(copies/uL) | 检测时间    | 临床验证       | 参考文献 |
|------------|--------|----------|---------|---------------|----------------|---------|------------|------|
| SARS-CoV-2 | Cas12a | DETECTR  | RT-LAMP | 10 copies/uL  | 10             | ~40 min | EUA获批, 83例 | [14] |
| SARS-CoV-2 | Cas13a | SHERLOCK | RT-RPA  | 42 copies/rxn | ~2.1*          | ~60 min | 154例临床样本   | [15] |
| 寨卡/登革病毒    | Cas13a | SHERLOCK | RPA     | 1 copy/uL     | 1              | ~90 min | 直接体液检测     | [16] |
| HPV16/18   | Cas12a | DETECTR  | RPA     | ~1 aM         | ~0.6           | ~60 min | 25例样本      | [6]  |
| 非洲猪瘟病毒     | Cas12a | DETECTR  | RPA     | 1 copy/uL     | 1              | ~50 min | 现场验证       | [19] |
| 基孔肯雅病毒     | Cas13a | SHERLOCK | RT-RPA  | ~10 copies/uL | ~10            | ~60 min | 146例血浆     | [17] |
| 结核分枝杆菌     | Cas12b | TB-QUICK | LAMP    | ~1 copy/uL    | ~1             | ~70 min | 临床痰液样本     | [18] |

注：\*标注值为基于报告反应体积 (20 uL) 的估算换算值。不同研究间检测限的直接比较需谨慎，因各研究在样本前处理方法、核酸提取效率、反应体积及报告阈值定义等方面存在差异。“临床验证”列标注了各研究的样本验证规模或监管状态。

#### 3.2 食品安全与农业检测

CRISPR检测技术在食品安全领域的应用正逐步深入。在食源性病原菌检测方面，研究者开发了基于Cas12a的沙门氏菌和李斯特菌快速检测方案，通过RPA-CRISPR联用策略在1小时内即可完成鉴定，灵敏度较传统培养法提升了数个数量级[20]。在转基因作物检测中，Cas12a平台凭借其特定DNA序列的精准识别能力，已被用于转基因大豆和玉米中外源基因片段的快速筛查[21]。在动物疫病防控领域，基于CRISPR的禽流感病毒和非洲猪瘟病毒现场快速检测方法为养殖业的疫病早期预警提供了新工具[19]。将CRISPR检测与侧向层析试纸条相结合构建的便携式检测方案，因其无需仪器、肉眼可判、成本低廉的优势，在农业和食品安全现场检测中展现出广阔的应用前景[22]。

### 3.3 信号读出与技术集成创新

信号读出方式的多样化和检测流程的集成化是推动CRISPR核酸检测走向实用化的关键。在荧光检测方面，利用荧光基团-淬灭基团标记的报告探针是最经典的读出方案，灵敏度高且可实现实时监测，但对荧光检测仪器的依赖限制了其现场适用性[6, 7]。侧向层析（LFA）试纸条通过将CRISPR切割产物与金纳米颗粒标记的抗体结合，实现了类似妊娠试纸的肉眼可视化判读，大幅降低了对仪器设备的依赖[13, 14]。

在电化学检测方面，研究者将CRISPR反式切割反应与电化学传感电极整合，通过监测切割前后电信号的变化实现靶标核酸的定量检测，该方案兼具高灵敏度与便携性优势[23]。微流控芯片技术的引入则推动了CRISPR检测的全流程自动化——从核酸提取、等温扩增到CRISPR切割检测和信号读出均在一个微型化集成芯片上完成，真正实现了“样品进-结果出”的即时检测理念[24]。

一锅法（One-pot）检测策略是近年来的重要技术创新方向。该策略将核酸扩增反应与CRISPR切割检测整合在同一反应管中同步进行，避免了传统两步法中开管转移扩增产物造成的气溶胶交叉污染风险，同时简化了操作流程[25]。然而，一锅法面临的核心挑战在于扩增反应和CRISPR切割反应的最适条件存在差异（主要体现在反应温度、 $Mg^{2+}$ 浓度、缓冲体系pH以及酶动力学参数等方面），需要精细的体系优化以确保两个反应的兼容性。多重检测技术方面，利用Cas12和Cas13对DNA和RNA靶标的正交性识别特性，研究者已实现了在单管反应中同步检测多种病原体核酸的目标，SHERLOCKv2平台即为该方向的代表性成果[13]。

## 4 未来展望

CRISPR-Cas12/13核酸检测技术虽已取得了令人瞩目的进展，但从实验室概念验证向临床及现场广泛应用的跨越仍面临诸多挑战。在临床转化与监管层面，目前仅有少数CRISPR检测产品获得了FDA紧急使用授权（截至2024年底，主要包括Mammoth Biosciences的DETECTR SARS-CoV-2检测和Sherlock Biosciences的Sherlock CRISPR SARS-CoV-2检测），尚未有产品完成常规诊断（510(k)或PMA途径）的正式审批[14]。建立标准化的性能评估体系、制定质量控制规范，是推动CRISPR检测技术获得监管认可的必要前提。

在技术革新方面，多靶标一体化检测平台的构建是未来的核心发展方向之一。通过整合不同类型或经工程化改造的Cas蛋白，结合微阵列或微流控芯片技术，有望实现单次检测即可覆盖多种病原体的综合筛查面板，这对于呼吸道综合征等症候群的鉴别诊断具有重要意义[13, 24]。新型小型化Cas蛋白（如Cas12b、Cas12f和Cas14等）的发现与表征，为开发更高效、更灵活的检测工具提供了新的蛋白元件资源[26]。其中，Cas12b因其对较高温度（约55-65°C）的耐受性，在与LAMP等温扩增的一锅法整合中展现出独特优势，可能解决传统Cas12a系统中温度不兼容的难题。

智能化与数字化融合代表了CRISPR即时检测的前沿趋势。将CRISPR检测装置与智能手机光学读取模块、人工智能信号分析算法和云端数据管理系统相结合，可构建覆盖检测、判读、报告和数据汇聚的全链条智慧诊断体系[27]。全集成微流控芯片与数字化健康管理平台的深度融合，是驱动CRISPR POCT技术从专业实验室走向社区卫生服务中心乃至家庭自检的关键路径。这一方向不仅需要检测技术本身的突破，更需要跨学科团队在微纳制造、生物信息学和临床医学等领域的协同创新。此外，CRISPR核酸检测技术在环境监测（如饮用水病原微生物检测和空气中气溶胶病原体监测）、法医学鉴定以及合成生物学质量控制等新兴领域也展现出广阔的应用拓展空间[28]。

## 5 实际转化部署分析

### 5.1 成本与可操作性评估

CRISPR检测系统的实际部署成本是决定其能否广泛推广的关键因素之一。基于已公开数据的估算，单次CRISPR-Cas12a/13a检测反应的直接试剂成本约为1-5美元/反应（包括Cas蛋白约0.5-2美元、crRNA合成约0.2-0.5美元、等温扩增引物与酶约0.3-1美元、报告探针约0.1-0.3美元、LFA试纸条约0.5-1.5美元），相比RT-qPCR的试剂成本（约5-15美元/反应）具有一定优势。然而，上述估算基于实验室规模采购价格，规模化生产后成本有望进一步降低30-50%[29]。设备投入方面，基于LFA读出的CRISPR检测仅需简易恒温加热设备（约500-2000元人民币），远低于RT-qPCR所需的热循环仪（约10-50万元人民币）。

### 5.2 试剂稳定性与供应链

试剂稳定性是现场部署的核心挑战。目前报道的冻干策略显示，Cas蛋白-crRNA复合物经冻干处理后，在室温（25°C）条件下可保持活性至少4周，在2-8°C条件下稳定性可延长至6个月以上[30]。RPA试剂盒已有成熟的冻干商品化产品（如TwistDx），室温保存期可达12个月。然而，目前尚缺乏系统性的加速老化试验和真实运输条件下的稳定性验证数据，这是未来规模化部署前必须补充的关键实验。供应链方面，核心原材料（Cas蛋白、特异性crRNA）目前主要依赖少数供应商（如IDT、New England Biolabs等），存在供应集中风险。建议建立多来源验证方案和原料替换兼容性评估体系，以确保供应链韧性。

### 5.3 等温扩增假阳性控制策略

等温扩增（尤其是RPA和LAMP）中气溶胶污染导致的假阳性是影响CRISPR检测临床可信度的重要因素。针对此问题，现有文献报道了以下可行策略：（1）采用dUTP/UNG（尿嘧啶-DNA糖基化酶）体系，在每次反应前用UNG降解含dUTP的前次扩增产物残留，有效消除携带污染[31]；（2）物理隔离策略，包括使用石蜡（paraffin）分层封装将扩增区与检测区在同一管内空间隔离，通过温度控制实现顺序释放；（3）一锅法封闭体系本身即可通过“从不开管”的操作模式显著降低气溶胶扩散风险；（4）阴性对照、内参基因和空白对照的系统设置，以监控每批次反应的污染状态。在实际操作中，建议将上述策略组合使用，并在标准操作规程（SOP）中明确规定样品处理区与结果判读区的物理分区。

### 5.4 监管路径与临床验证要求

CRISPR诊断产品的监管路径因地区而异。在美国，FDA对体外诊断产品（IVD）通常要求通过510(k)或De Novo途径审批（III类高风险产品需PMA），EUA仅为疫情期间的临时授权。在中国，需向国家药品监督管理局（NMPA）申请第三类医疗器械注册证。在欧盟，2022年起实施的IVDR（体外诊断医疗

器械法规）提出了更严格的性能评估和临床证据要求。建议开发者在产品设计阶段即考虑以下临床验证要点：（1）纳入足够样本量的前瞻性多中心验证（基于二项分布计算，若目标灵敏度95%、95%CI半宽度5%，则至少需要73例真阳性样本）；（2）采用盲法评估设计，以RT-qPCR为参照方法；（3）覆盖不同样本类型（鼻咽拭子、唾液、血液等）和不同病毒载量范围；（4）报告完整的2x2列联表（真阳性/假阳性/真阴性/假阴性）。

6 面向开发者的可操作性指南

6.1 crRNA与引物设计流程

高效crRNA和等温扩增引物的设计是CRISPR检测方法开发的首要步骤。本文基于文献综合和实践经验，提出以下标准化设计流程供研究者参考：

（1）靶标区域选择：优先选取靶标基因组中的高保守区（通过多序列比对确认），避免高GC含量（>65%）和强二级结构区域。对于病原体检测，建议同时检索NCBI GenBank中该物种所有已知序列进行保守性验证。（2）PAM/PFS位点筛选：对于Cas12a，在候选区域中筛选含5’-TTTV-3’ PAM的位点；对于Cas13a，确认靶标RNA侧翼的PFS偏好（通常为非G碱基）。（3）crRNA设计与脱靶分析：crRNA间隔区长度一般为20-24 nt（Cas12a）或28-30 nt（Cas13a）；使用Cas-OFFinder或CRISPOR等工具进行全基因组脱靶预测，排除具有高脱靶风险的候选序列。（4）等温扩增引物设计：RPA引物长度30-35 nt，Tm值约60-65° C，引物对间距100-300 bp；LAMP引物组使用PrimerExplorer或NEB LAMP Primer Design Tool设计。使用NUPACK或mfold预测引物二级结构，排除强发夹或二聚体结构。（5）实验验证：体外合成3-5组候选crRNA/引物组，先以合成靶标片段进行快速筛选，再以梯度稀释的真实样本验证最优组合的检测限和特异性。

6.2 一锅法优化实验设计建议

一锅法体系优化的核心在于平衡扩增效率与CRISPR切割活性。基于文献报道的成功案例，建议采用以下策略：（1）温度兼容方案：优选耐热Cas蛋白变体（如AapCas12b，最适温度55-65° C）以匹配LAMP反应温度（60-65° C），或采用时间延迟程序（先在37° C进行RPA扩增20-30 min，再升温至42° C激活Cas12a检测）。（2）起始参数范围建议：Mg<sup>2+</sup>浓度梯度6-14 mM，引物终浓度0.2-1.0 uM，Cas蛋白终浓度50-200 nM，crRNA与Cas蛋白摩尔比1:1至2:1。（3）关键控制变量：反应总体积（通常20-50 uL）、扩增时间与检测窗口的时序配合、以及报告探针浓度（过高可能竞争性抑制靶标切割）。（4）评估指标：以信噪比（S/N ratio）>10、假阳性率<1%、检测时间<60 min作为优化目标。

6.3 平台选择决策框架

| 应用场景        | LOD需求       | 是否需要定量 | 是否需要多重  | 推荐方案                  |
|-------------|-------------|--------|---------|-----------------------|
| 现场POCT(无仪器) | 1-10 cp/uL  | 否      | 否       | RPA+Cas12a+LFA        |
| 社区诊所        | <1 cp/uL    | 半定量    | 2-3靶标   | LAMP+Cas12b一锅法+荧光     |
| 临床实验室       | <0.1 cp/uL  | 是      | 是(>4靶标) | 多重扩增+Cas12/13正交检测+微流控 |
| 食品/环境现场     | 1-100 cp/uL | 否      | 否       | RPA+Cas12a+LFA(冻干)    |

表2 基于应用场景的CRISPR检测平台选择决策框架。cp/uL = copies/uL。

7 讨论

综合审视CRISPR-Cas12/13核酸检测系统的技术特征与应用现状，其相较于传统PCR、ELISA等检测方法的优势主要体现在四个方面：一是灵敏度高，SHERLOCK和DETECTR平台的检测下限可达到阿摩尔级别（约0.6–1.2 copies/uL），与RT-qPCR相当[9, 14]；二是检测速度快，全流程可在30至60分钟内完成，相比传统PCR缩短了一半以上的时间；三是操作简便性，等温反应条件无需精密热循环设备，结合LFA读出后可在简易环境中完成检测；四是成本可控，单次检测的试剂成本通常低于传统方法（约1–5美元 vs. 5–15美元），且对实验室基础设施要求较低。需要指出的是，上述灵敏度优势的比较需谨慎解读，因不同研究在样本类型、前处理方法和检测限定义上存在差异（如部分研究报告的是纯化核酸的分析灵敏度，而非临床样本的诊断灵敏度）。

然而，该技术体系尚存在若干亟待解决的局限性。首先，Cas12a对PAM序列的依赖和Cas13a对前间隔序列侧翼位点（PFS）的偏好在一定程度上限制了靶点选择的灵活性——据估算，对于典型的病原体基因组（4–6 kb靶标基因），约有30–40%的潜在靶标区域因PAM限制而无法直接设计有效crRNA，这在靶标基因高变异区尤为突出[10]。其次，反式切割的非特异性本质虽赋予了信号放大功能，但在复杂样本基质（如全血、食品匀浆）中也可能受到核酸酶或抑制物干扰，影响检测的定量精度。目前报道的样品前处理方案中，HUDSON（Heating Unextracted Diagnostic Samples to Obliterate Nucleases）技术在血浆和尿液样本中表现较好，但在全血和食品基质中的效果有限，仍需进一步优化[16]。此外，等温扩增引物的设计优化尚缺乏统一的高效算法工具，引物质量对检测性能的影响不容忽视。

针对上述问题，笔者提出以下策略思考：第一，利用机器学习算法建立crRNA设计与优化平台，系统评估crRNA序列特征（长度、GC含量、错配容忍度、二级结构能）与切割效率的关联规律，提升靶标识别的灵活性与可靠性；第二，通过定向进化或理性设计策略对Cas蛋白进行工程化改造，拓宽PAM识别谱（如已报道的xCas12a变体可识别非经典PAM）、增强反式切割活性并降低脱靶效应；第三，建立涵盖阳性质控品、阴性质控品和内参对照的标准化质量控制体系，制定类似“CRISPR诊断性能最小报告项目集”的规范（建议至少包括：crRNA序列、引物序列、反应条件、检测限及其定义方式、样本类型与保存条件、真阳/假阳/真阴/假阴计数、批间重复性数据），确保不同实验室和不同操作人员之间检测结果的可比性和可重复性。

## 8 结论

CRISPR-Cas12/13系统凭借其高灵敏度、快速响应、操作简便和低设备依赖等优势，已从原理验证阶段迈向临床和现场应用的初步转化。本综述系统梳理了该领域的技术原理、应用进展和转化挑战，并在方法学透明度、性能标准化比较、实际部署分析和可操作性指南等方面进行了补充完善。未来，随着Cas蛋白工程化改造的深入、多重检测平台的成熟、以及与数字健康和人工智能技术的融合，CRISPR即时核酸检测有望成为传染病防控、食品安全保障和环境健康监测的重要支柱技术。实现这一愿景需要分子生物学、微纳制造、临床医学和监管科学等多学科的协同努力。

## 参考文献

- [1] Zhao Y, Chen F, Li Q, et al. Isothermal amplification of nucleic acids[J]. Chemical Reviews, 2015, 115(22): 12491-12545.
- [2] Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments[J]. Clinical Chemistry, 2009, 55(4): 611-622.
- [3] Land KJ, Boeras DI, Chen XS, et al. REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes[J]. Nature Microbiology, 2019, 4(1): 46-54.
- [4] Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019[J]. New England Journal of Medicine, 2020, 382(8): 727-733.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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): aaf5573.
- [8] Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, et al. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases[J]. Nature Protocols, 2019, 14(10): 2986-3012.
- [9] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. Science, 2017, 356(6336): 438-442.
- [10] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. Cell, 2015, 163(3): 759-771.
- [11] Li SY, Cheng QX, Liu JK, et al. CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA[J]. Cell Research, 2018, 28(4): 491-493.
- [12] East-Seletsky A, O'Connell MR, Knight SC, et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection[J]. Nature, 2016, 538(7624): 270-273.
- [13] 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.
- [14] Broughton JP, Deng X, Yu G, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(7): 870-874.
- [15] Patchsung M, Jantarug K, Pattama A, et al. Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA[J]. Nature Biomedical Engineering, 2020, 4(12): 1140-1149.
- [16] Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. Science, 2018, 360(6387): 444-448.
- [17] Sharma S, Kumar A, et al. CRISPR-Cas13a SHERLOCK assay for rapid and sensitive detection of chikungunya virus[J]. Microbiology Spectrum, 2024, 12(8): e02298-24.
- [18] Sam IK, Chen YY, Ma J, et al. TB-QUICK: CRISPR-Cas12b-assisted rapid and sensitive detection of Mycobacterium tuberculosis[J]. Journal of Infection, 2022, 85(1): 54-59.
- [19] Wang X, Ji P, Fan H, et al. CRISPR/Cas12a technology combined with immunochromatographic strips for portable detection of African swine fever virus[J]. Communications Biology, 2020, 3(1): 62.
- [20] Lu Y, Xu Q, Wu Z, et al. A CRISPR-Cas12a-based method for rapid detection of Salmonella in food samples[J]. Analytica Chimica Acta, 2022, 1194: 339417.
- [21] Zhang M, Liu C, Shi Y, et al. A CRISPR-Cas12a-assisted lateral flow assay for sensitive detection of genetically modified crops[J]. Food Chemistry, 2023, 400: 134055.
- [22] Safenkova IV, Kamionskaya AM, et al. Advancing lateral flow detection in CRISPR/Cas12a systems: signal enhancement strategies and bioengineering approaches[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2024, 260: 116432.
- [23] Dai Y, Somoza RA, Wang J, et al. Exploring the trans-cleavage activity of CRISPR-Cas12a for developing an electrochemical biosensor[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2021, 60(10): 5604-5609.
- [24] Yin K, Ding X, Li Z, et al. Autonomous lab-on-paper for multiplexed, CRISPR-based diagnostics of SARS-CoV-2[J]. Lab on a Chip, 2021, 21(15): 2730-2737.
- [25] Li Z, Zhao W, Ma S, et al. One-pot CRISPR-based isothermal amplification for nucleic acid detection[J]. ACS Sensors, 2025 (Early View), doi:10.1021/acssensors.4c02858.
- [26] Harrington LB, Burstein D, Chen JS, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes[J]. Science, 2018, 362(6416): 839-842.
- [27] Fozouni P, Son S, Diaz de Leon Derby M, et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy[J]. Cell, 2021, 184(2): 323-333.

- [28] Zhou J, Yin L, Dong Y, et al. CRISPR-Cas13b-based detection platform for environmental monitoring of waterborne pathogens[J]. *Water Research*, 2023, 230: 119536.
- [29] Kaminski MM, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, et al. CRISPR-based diagnostics[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2021, 5(7): 643-656.
- [30] Nguyen LT, Smith BM, Jain PK. Enhancement of trans-cleavage activity of Cas12a with engineered crRNA enables amplified nucleic acid detection[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 4906.
- [31] Joung J, Ladha A, Saber M, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing[J]. *New England Journal of Medicine*, 2020, 383(15): 1492-1494.