

基于 CRISPR-Cas12a 系统的病原体核酸床旁检测技术方法研究的最新进展

王思琦, 吴泽, 余楠(南方医科大学检验与生物技术学院, 广州 510515)

摘要: 病原体核酸检测是精准诊断、治疗和预防感染性疾病的重要环节, 即时、简便的床旁检测 (POCT) 的研制对于实现病原体核酸高效检测意义重大。一种基因编辑工具被发现应用于核酸检测方法高效而实用, 此即成簇的规则间隔的短回文重复序列及其相关蛋白 (CRISPR-Cas) 系统, 其中, 结构简单的 CRISPR-Cas12a 因其强大的靶向结合、反式切割基因片段功能而得以广泛应用。基于 CRISPR-Cas12a 系统的病原体核酸检测方法, 利用等温或变温核酸扩增技术以及光学信号作为检测介质的 POCT 技术, 具有高灵敏度、高特异度和检测流程简化等特点。该文主要介绍基于 CRISPR-Cas12a 系统的病原核酸检测 POCT 技术方法的最新研究进展, 为研制快速、准确的病原体核酸检测方法提供新思路。

关键词: 成簇的规则间隔的短回文重复序列相关蛋白系统; 病原体核酸检测; 床旁检测

中图分类号: R446 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2025) 01-213-08

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2025.01.041

Research Advances in Pathogen Nucleic Acid Point-of-Care Testing Techniques Based on CRISPR-Cas12a System

WANG Siqi, WU Ze, YU Nan (School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Pathogen nucleic acid detection is critical to diagnosing, treating and preventing infectious diseases. To efficiently conduct pathogen nucleic acid detection, the development of point-of-care testing (POCT) with immediacy and simplicity is of great significance. A highly effective and practical gene editing tool discovered for nucleic acid detection is the clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated proteins (CRISPR-Cas) systems. Among them, CRISPR-Cas12a is widely used due to its simple structure and powerful functions of target binding and collateral cleavage of gene fragments. Based on the CRISPR-Cas12a system, the pathogen nucleic acid detection method utilizes isothermal and temperature-variable nucleic acid amplification techniques and optical signals as the detection medium for POCT. It features high sensitivity, specificity and simplified detection procedures. This article mainly introduces the latest research progress of pathogen nucleic acid detection POCT techniques based on the CRISPR-Cas12a system, providing new ideas for developing rapid and accurate pathogen nucleic acid detection methods.

Keywords: CRISPR-Cas; pathogen nucleic acid detection; POCT

成簇的规则间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及其相关蛋白 (CRISPR-associated proteins, Cas) 组成的 CRISPR-Cas 是一种存在于古细菌或细菌中的适应性免疫系统^[1-2]。其中, 结构简单的 CRISPR-Cas12a 系统因其能够进行反式切割, 近年被广泛用于研制新型核酸检测方法, 被视为“新一代诊断技术”^[3-4]。CRISPR-Cas12a 结合床旁检测 (point-of-care testing, POCT) 是病原体核酸检测的重要组成部分, 能够实现高效便捷的分析。本文主要介绍 CRISPR-Cas12a 在快速病原体核酸检测中的应用, 并探讨系统结合主要的等温和变温核酸扩增技术、以光学信

号为介质的 POCT 研究进展, 为感染性疾病防治提供更优的解决方案和思路^[5]。

1 CRISPR-Cas12a 系统

1.1 CRISPR-Cas12a 系统组成及作用 CRISPR-Cas12a 系统的 CRISPR 阵列是短小重复的间隔序列组成的 DNA 片段, 由生物先前感染过的病毒或外源 DNA 构成^[6]。在 CRISPR 阵列表达和成熟过程中, 这串 DNA 被转录成长 RNA 分子, 即 CRISPR RNA 前体 (pre-crRNA); Cas12a 自身具有 RNA 蛋白核酸酶, 可将转录的 pre-crRNA 通过自身引导, 加工成成熟的 crRNA^[7]。

CRISPR-Cas12a 系统通常作用于双链 DNA

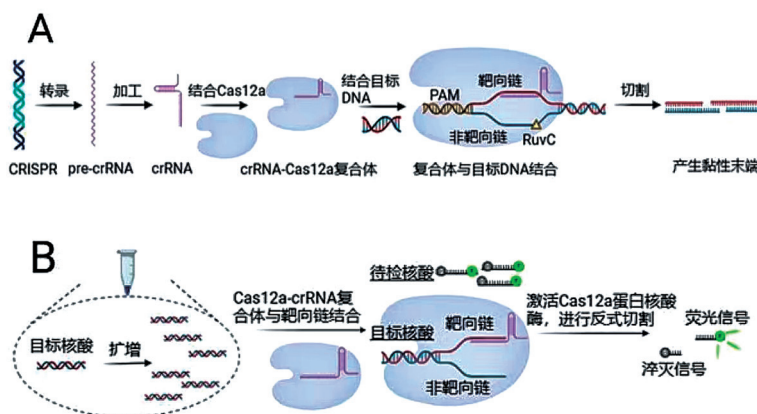
基金项目: 中国博士后科学基金 (2021M701628)。

作者简介: 王思琦 (2003-), 女, 在读本科生, 专业: 医学检验技术, E-mail: 1715166206@qq.com。

通讯作者: 余楠 (1972-), 女, 主任技师, 硕士生导师, 主要从事病原微生物检测技术研究, E-mail: yunanzhujiang@163.com。

(double-stranded DNA, dsDNA): crRNA 与 Cas12a 相互作用后, 形成活性 RNA-蛋白复合物, 后者再与目标 DNA 结合时, 需满足靶向特异性: ① crRNA 与目标 DNA 互补匹配; ② Cas12a 与原间隔序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 识别^[8]。复合物结合目标 DNA 后激活 DNA 蛋白核酸酶结构域 RuvC, 发生切割, 使靶向链 (与 crRNA 互补的 DNA 链) 和非靶向链 (与靶向链互

补的另一条 DNA 链) 交错断裂, 形成黏性末端^[9-10], 见图 1A。黏性末端的产生促进同源重组修复, 有利于外来基因的导入, 从而扩展了编辑范围^[11]。与同属 2 类的基因编辑工具 CRISPR-Cas9 系统相比, CRISPR-Cas12a 系统更简洁, 无需反式激活 crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA) 即可识别目标 DNA 中的 PAM 序列, 基因编辑效率高, 还广泛应用于目标核酸序列的检测^[12-13]。



A. CRISPR-Cas12a 系统组成及 (顺式) 切割功能示意图; B. 核酸扩增联合 CRISPR-Cas12a 系统反式切割功能检测目标核酸原理示意图 (图 1 示存在目标核酸情况, 报告分子以荧光淬灭信号为例)。

图 1 CRISPR-Cas12a 系统功能示意图

Cas12a 通过识别特定类型的 PAM 序列和切割目标 DNA 片段表现其特异性, 该应用也因此受限: 例如存在序列与 crRNA 或 Cas12a 非特异结合的脱靶现象^[14], 导致未知的目标 dsDNA 不能检出。因此, 应用于核酸检测的 CRISPR-Cas12a 系统的扩增、靶向切割特异性研究很有意义。

此外, Cas12a-crRNA-目标 DNA 三元复合

物形成后, Cas12a 的蛋白核酸酶开始进行反式切割, 对非靶向链等单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 进行切割, 也称附带裂解^[15-16]。由于该功能对单个碱基变异高度特异, 且检出速度快 (通常 1h 即可), 检测灵敏度低至 1 拷贝/ μL ^[17] (见图 2), CRISPR-Cas12a 被广泛应用于核酸检测。

| 辅助技术 | 病原体 | 检测靶标 | 信号读取 | 检测限 | 检测时 | 创新点 | 文献 |
|------|----------------|--------------------|---------------------|--------------------------------------------------|----------|---------------------------------------|----|
| LAMP | TYLCV, ToLCNDV | 病毒-DNA | 荧光信号-手持式可视化仪 | 100 aM | 60 min | 手持式可视化仪 | 27 |
| | | 病毒-DNA ORF基因 | 荧光信号 | 1 拷贝/ μL | 60 min | 纯化huLbCas12a蛋白 | 28 |
| | | 病毒-DNA p72基因 | 荧光信号 | 7 拷贝/ μL | 60 min | 对酶依赖低 | 29 |
| | SARS-COV2 | 病毒-RNA | 荧光信号-温控数字芯片 | 5 拷贝/ μL | 90 min | 数字化热启动; RNA使用 | 31 |
| | | 病毒-RNA N基因 | 侧向层析试纸、荧光信号 | 10 拷贝/ μL | 45 min | 的扩增检测技术均为RT- | 32 |
| | | 病毒-RNA ORF基因 | 荧光信号-智能手机和3D打印检测仪 | 20 拷贝/反应 | 40 min | LAMP, 转化为DNA启动 | 33 |
| | | 病毒-RNA S基因 | 荧光信号-蓝光照射器-肉眼观察 | 5 拷贝 (20 μL RNA模板) | 45 min | 反应 | 34 |
| | HPV 16/18 | 病毒-RNA N/E/ORF1a基因 | 荧光信号-酶标仪 | 3 拷贝/ μL | 40 min | | 35 |
| | | 病毒-肛拭子DNA | 荧光信号 | aM | 60 min | 将检测系统灵敏度提高至aM | 15 |
| | | 病毒-体液DNA | 荧光-生物素-胶体金侧向层析试纸 | 170.6 拷贝/ μL 和151.8 拷贝/ μL | 3h | 直接对体液进行检测 | 38 |
| RPA | LSDV | 病毒-DNA | 荧光信号-双室等温加热荧光检测装置 | aM | 30 min | 双室集成系统 | 67 |
| | | 病毒-DNA | 荧光信号 | 12.1 拷贝/ μL | 30 min | 不对称RPA | 49 |
| | | 病毒-DNA | 荧光信号 | 10 CFU/ μL | 30 min | 定性+定量; 可视化荧光信号 | 40 |
| | 李斯特菌 | 细菌-DNA hly基因 | 荧光信号 | 2 拷贝/reaction | 30 min | 荧光生物和电化学传感器 | 41 |
| | 布鲁氏菌 | 细菌-质粒DNA | 荧光生物传感器、电化学生物传感器 | 5 拷贝/ μL | 90 min | 磁珠纯化方法 | 42 |
| | 结核分枝杆菌 | 细菌-DNA IS6110序列 | 侧向层析试纸、荧光信号 | 1 拷贝/ μL | 60 min | 封闭-锅法 | 44 |
| | 阴道毛滴虫 | 寄生虫-DNA 肌动蛋白 | 侧向层析试纸 (便携式手提箱) | 3.3 拷贝/ μL | - | 非器械的便捷式手提箱 | 45 |
| | 刚地弓形虫 | 寄生虫-DNA B1基因 | 侧向层析试纸、便携式荧光检测仪、蓝光仪 | 0.1 拷贝/ μL (质粒)、10个卵囊/ml (卵囊) | 90 min | 可视化结果 | 46 |
| | 微小隐孢子虫 | 寄生虫-DNA | 侧向层析试纸、手持荧光计 | 0.36个寄生虫/ μL | 10 min | 体系冻干用于现场快速反应; 手持式荧光计; 优化SHERLOCK检测DNA | 48 |
| | 恶性疟 | 寄生虫-DNA | 侧向层析试纸、手持荧光计 | 1.2个寄生虫/ μL | 取+60 min | | |
| RCA | 间日疟 | 寄生虫-含RNA的质粒 | | 2.4个寄生虫/ μL | | | |
| | 卵形疟 | 寄生虫-含RNA的质粒 | | 1.9个寄生虫/ μL | | | |
| | 三日疟 | 寄生虫-含RNA的质粒 | | | | | |
| | 大肠埃希菌O157: H7 | 细菌-DNA | 电化学生物传感器 | 10 CFU/ml | - | 电化学生物传感器 | 51 |
| | SARS-COV2 | 病毒-RNA E基因 | 侧向层析试纸、荧光信号 | 1.625 拷贝/ | 35 min | 多引物RCA | 52 |
| | PRV | 病毒-DNA Ra/cmz序列 | 荧光信号 | 1-10aM | 60 min | 在DNA检测方面具有优势; 可检测SNP | 53 |
| | JEV | 病毒-RNA | 荧光信号 | 1-10aM | 75 min | | |
| | CMV | 病毒-DNA | 荧光信号 | 10 IU/ml | 80 min | 多个靶标集成到单个检测 | 54 |
| | 沙门氏菌 | 细菌-RNA | 荧光信号 | 10 CFU | 150min | 可揭示细胞活性; 三级级联信号扩增 | 55 |

图 2 CRISPR-Cas12a 在病原体核酸检测中的应用汇总

1.2 CRISPR-Cas12a 系统用于核酸检测的特征和原理 近年, CRISPR-Cas12a 系统的反式切割方式在病原体核酸检测技术中得到广泛应用^[18-19]。其主要原理是将带有荧光、生物素、胶体金等信号标记的报告分子与待检核酸结合, 在目标核酸与 crRNA 特异结合后, 激活 Cas12a 蛋白核酸酶活性, 对待检核酸进行反式切割, 导致报告分子信号改变, 从而确定样品中是否存在目标核酸, 见图 1B。

核酸扩增与 CRISPR-Cas12a 系统联合是高效检测病原体核酸的常见手段^[20]。通过核酸扩增, 为后续步骤提供足够量的核酸, 然后放大 CRISPR-Cas12a 系统所结合报告分子的信号强度, 可以准确检测目标核酸, 并且避免了样品病原体核酸浓度过低或标本背景干扰带来的影响^[21-22]。

2 基于 CRISPR-Cas12a 系统的病原体核酸扩增应用

目前, 与 CRISPR-Cas12a 结合发展的新检测技术分别采用了主流的基因扩增技术, 即等温和变温(热循环仪)两大类。其中, 等温技术以环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)和滚环循环扩增技术(rolling circle amplification, RCA)为主^[23], 变温技术以聚合酶链式反应(PCR)技术为主, 详述如下。

2.1 LAMP 结合 CRISPR-Cas12a 的病原体核酸检测系统 LAMP 采用四种(或六种)不同的引物, 特异识别目标基因上的六个(或八个)不同区域, 通过 Bst DNA 聚合酶作用恒温扩增出环状产物^[24]。LAMP 结合 CRISPR-Cas12a 系统首先通过 LAMP 技术对目标 DNA 进行扩增, 然后与 crRNA 特异结合, 激活 Cas12a 蛋白反式切割活性, 再结合相关检测技术和应用读取结果^[25-26]。例如, 系统结合手持式可视化仪^[27], 高效检测植物病毒, 可在 60min 内检测到 100 aM 水平的病毒 DNA。系统还可检测动物病毒猪圆环病毒二型(porcine circovirus 2, PCV2)^[28], 对其开放阅读框 1(open reading frame, ORF)基因的最低检测限为 1 拷贝/ μ l; 用于非洲猪瘟病毒(african swine fever virus, ASFV) p72 基因检测, 最低检测限为 7 拷贝/ μ l^[29]。

除了 DNA 病毒, 该系统也可用于 RNA 病毒的检测。新冠疫情时期研发了许多新型冠状病毒肺炎(SARS-CoV-2)联合检测新技术, 如 CRISPR-Cas12a 结合数字化-LAMP(digital-LAMP, d-LAMP), 可进行绝对定量^[30]; 温控双启动式的逆转录-LAMP(reverse transcription-LAMP, RT-LAMP), 联合逆转录和恒温扩增两步骤, 采用数字芯片检测切割信号, 对 SARS-CoV-2 检测低至 5 拷贝/ μ l^[31]。另一方面, 研究聚焦于检测靶点更具体化和便捷化, 如 RT-LAMP 结合 CRISPR-Cas12a 技术的无污染视觉核酸检测方法^[32],

可检测 RNA 中低至 10 拷贝/ μ l 的核衣壳(nucleocapsid, N)和膜蛋白(envelope protein, E)基因, 本法检测出针对病毒的最佳靶点, 也优化了实验操作。还有研究设计出将 Cas12a 附在试剂盖上的无污染 POCT^[33], 在 RT-LAMP 中筛选出 ORF 基因有最低检测限: 每反应 20 拷贝 RNA。利用相似原理, 有研究通过优化 crRNA^[34], 使 S 基因产生信号最强, 从而提高检测限, 达 5 个拷贝/20 μ l RNA 模板。还有研究实现多重检测 SARS-CoV-2 的 N, E 和 ORF1a 基因^[35], 平均检测限为 3 拷贝/ μ l。这些技术的发展为 SARS-CoV-2 的快速、准确检测提供了多种选择。

对于 microRNA, 有研究提出了创新性 CAL-LAMP 方法^[36], 通过设计特殊的双茎环 DNA 结构(由目标 microRNA 启动并经连接生成), 结合 LAMP 扩增和 CRISPR-Cas12a 系统实现高灵敏、高特异的 microRNA 定量检测, 此设计有效减少了引物二聚体和非特异性扩增的影响, 显著提升了检测体系的特异性和可靠性。

2.2 RPA 结合 CRISPR-Cas12a 的病原体核酸检测系统 RPA 是在恒温条件下利用多种酶在体外模拟 T4 噬菌体内的 DNA 复制系统进行扩增^[37]。CRISPR-Cas12a 与 RPA 结合最早见于 2018 年, 美国加利福尼亚大学 DouDNA 团队^[15]开发的 DETECTR(DNA endonuclease-TargEted CRISPR trans reporter), 检测 16, 18 型人乳头瘤病毒(HPV), 灵敏度达到 aM 级。可用于分析临床患者的肛拭子 DNA。最新研究还实现了体液样本进行 HPV 快速灵敏检测和分型^[38]。

除了病毒, 该系统也可用于其他病原体的检测。例如, 机会性食源性病原体单核细胞增生李斯特菌感染后死亡率为 20% ~ 30%^[39], 研究建立定性+定量检测体系^[40], 结合可视化荧光, 最低可检出细菌 DNA 中 hly 基因(该基因编码溶血素 hemolysin) 10 CFU/ml。布鲁氏菌能够引起人类和牲畜长期受损的疾病, 目前开发了基于 RPA 和 CRISPR-Cas12a 的荧光生物和电化学传感平台^[41], 其中电化学生物传感结合循环伏安图和电化学阻抗谱, 对阳性参考质粒的检测限可达每反应 2 拷贝, 为检测牛奶(食品)样本和血液(临床)样本中的布鲁氏菌属提供有力支撑。由结核分枝杆菌(MTB)引起的结核病检测率低、死亡率高, 系统结合磁珠纯化方法^[42], 实现了对 IS6110 序列的高灵敏度检测, 检测限为 5 拷贝/ μ l, 较传统检测方法需要的样品更少, 周转时间更短。

最新研究将 RPA 与 CRISPR-Cas12a 系统结合用于快速、特异检测系列寄生虫核酸, 检测限达 0.36 个/ μ l 寄生虫^[43]。针对阴道毛滴虫, 系统采用封闭一锅法^[44], 以肌动蛋白基因为靶标, 检测限低至 1 拷贝/ μ l。另一项研究开发了一种便携式手提检测

箱^[45],检测刚地弓形虫的B1基因,检测限为3.3拷贝/ μl ,手提箱包含了所有必要的检测装备。此外,可视化的微小隐孢子虫检测方法^[46],仅需一台便携式的恒温荧光检测仪,在同一温度下进行RPA和CRISPR-Cas12a的反应,对重组质粒的最低检测限 10^{-2} 拷贝/ μl ,微小隐孢子虫基因组为10个卵囊/ml。同时,经实验验证^[47-48],超灵敏等温冻干一锅SHERLOCK(specific high sensitivity enzymatic reporter unLOCKing)检测试剂盒已开发完成,用于检测疟原虫DNA。

在1.1中提到,CRISPR-Cas12a系统对dsDNA的检测存在PAM序列的限制。根据Cas12a对ssDNA无PAM序列限制的原理^[16],有研究发明了不对称RPA技术^[49]。该技术在反应初期指数式扩增产生dsDNA,随后以线性扩增方式产生大量ssDNA,这些ssDNA成为Cas12a的切割靶标,无需识别PAM序列。该特异扩增技术结合CRISPR-Cas12a系统可以检测块状皮肤病病毒(lumpy skin disease virus, LSDV),检测限达12.1拷贝/ μl ;还可进行MTB耐药菌株和野生菌株基因分型检测。

2.3 RCA结合CRISPR-Cas12a的病原体核酸检测系统 RCA以圆形探针为模板,使用一个短的特异引物或者环形引物,在DNA聚合酶作用下持续进行链式扩增,得到大量与目标DNA相同的长链^[50]。资料表明^[51],RCA结合夹心免疫标记、磁性分离技术,获得扩增的DNA环,随后激活Cas12a活性,发生反式切割;在此基础上,设计了一种检测大肠埃希菌O157:H7超灵敏特异的电化学生物传感器,该方法被证明具有快速、特异和有效的检测方法,检测限低至10CFU/ml。

创新的多引物RCA方法也为检测SARS-CoV-2作出了一定贡献:该方法采用一个单链环状DNA,其中包含一个PAM位点和一个与目标RNA互补的序列,二者结合并经过多引物的RCA,可以将基因组RNA转化并扩增为DNA,再通过荧光信号对E基因进行检测,检测限可达1.625拷贝/ μl ^[52]。

2.4 PCR结合CRISPR-Cas12a的病原体核酸检测系统 PCR是通过控制温度进行“变性-退火-延伸”的体外核酸扩增技术,是最常用的扩增技术之一。CRISPR-Cas12a系统结合PCR应用于核酸检测,有效提高检测灵敏度,如中科院王金团队^[53]开发的HOLMES(one-hour low-cost multipurpose highly efficient system)核酸快速检测平台,可检测伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PRV)等DNA病毒;对于RNA病毒,如日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV),需进行逆转录(即RT-PCR),最终检测限为1~10 aM;系统还能特异分型PRV的Ra, cmz和Bartha-K61菌株。

近年来,依赖于专业昂贵仪器的PCR也出现了便携式装置^[54],结合CRISPR-Cas12a可用于检测唾液和尿液中不同菌种的巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV),检测限为10 IU/ml。还有研究基于该系统建立夹板连接酶-PCR-Cas12a的三级级联信号扩增系统^[55]用于检测沙门氏菌Hila RNA,可区分细胞活性,检测限低至10 CFU。

3 基于CRISPR-Cas12a系统的病原体核酸POCT技术方法的构建

前述核酸扩增是检测前的准备,现有研究还聚焦于将灵敏、特异体现在检测病原体核酸的中、后过程,通常将检测的两个或三个过程集成于一个装置,更能展现基于CRISPR-Cas12a的POCT技术方法的高效性。如将扩增系统和紫外光系统集成,使检测前、中过程一体化,有效控制监测过程,避免污染;又如扩增系统、微流体检测系统、结果读取系统组成的全过程自动装置,操作简洁,性能提升。其中,应用较突出的是以光学信号为介质的POCT方法,检测过程和结果便利、直观。

3.1 以可见紫外光辐射建立的实验信号控制检测系统 CRISPR-Cas12a系统在进行病原体核酸检测时,可能出现Cas12a蛋白在核酸扩增过程中就进行切割的情况,导致目标核酸浓度不足或信号结果不明显。故发明了“两锅法”将扩增体系和切割体系分开^[56],通常是在扩增之后再加入Cas12a蛋白启动切割,然而这种方法容易因为开盖导致气溶胶污染。有研究者利用反应系统对光的敏感特性^[57],将系统设计成了光控制的CRISPR-Cas12a检测装置,实现在检测中监测Cas12a的切割活性,确保切割前先扩增,无需分次加入体系,这种更简单快速的“一锅法”越来越普及^[58]。

光控制CRISPR-Cas12a检测装置由光学系统、加热系统和成像模块三个主要组成部分构成^[59]。该装置的集成使快速检测变得更便捷,床旁检测也更有现实意义。其原理是:在与crRNA互补的核苷酸上,穿插设计有连接子,该连接子在365nm可见紫外光辐射照射后会断裂;当crRNA与该核苷酸结合时,暂时失去活性。RPA完成后,产生足够的扩增子(可通过荧光等信号指示),反应体系暴露在紫外光下,连接子断裂,Cas12a的功能恢复,从而启动切割和检测过程^[60-61]。

CRISPR-Cas12a系统结合RT-RPA的光激活切割的特性,使临床上能够快速对SARS-CoV-2进行核酸检测^[58];还有CRISPR-Cas12a系统结合RCA的光控制一锅法,可以高灵敏检测金黄色葡萄球菌^[62]。这些光控制的新技术正在不断发展壮大,表明了POCT的日益成熟。

3.2 以荧光信号建立的信号读取系统 前文方法显

示检测结果多为荧光信号表达,其读取方式多样,包括通过智能手机拍摄荧光信号以读取相关结果等方法^[63]。这些方法的出现将光学信号可视化、便捷化,也推动了 POCT 的迅速发展。CRISPR-Cas12a 系统驱动的荧光检测方法,已经证明可以提高病原体核酸的检测效率和灵敏度^[64-65]。

最新研究开发一种带有集成荧光传感单元的全自动微流体系统^[66],构建便携式的激光器和光谱仪,实现对 ASFV 的定量检测。该系统通过微流体的形式,使 Cas12a 与靶向 ASFV DNA 结合更灵敏。结合后,系统对带有荧光标记的 ssDNA 探针进行切割,一体的激光器激发荧光及光谱仪的转换结果实现检测。这种紧凑的检测系统具有自动化、集成、轻便且价格低廉的特点,因此适用于现场 ASFV 检测或其他基于 DNA 的病原体检测应用。

双室“一锅式”检测(dual-chamber “one-pot” test, DROPT)系统由专用的双室管和便携式等温加热荧光检测装置组成^[67]。该便携式设备将加热系统和荧光强度检测系统集成为一体,且安排了独立隔间,为 RPA 扩增系统和 CRISPR-Cas12a 系统提供稳定的孵育温度,并保证了气密密封,有效避免气溶胶污染。结果的荧光变化可以通过肉眼观察就能区分阳性和阴性结果,此外,装置中的荧光强度检测系统可将结果定性转为定量,即荧光传感装置将读取结果数字化,能够提高结果解释的精度。整个检测过程只需简单的操作即可完成,对非专业操作人员具有高度的用户友好性。

3.3 以金纳米颗粒建立的侧向层析检测系统 有研究基于 CRISPR-Cas12a 系统的切割作用,核酸上的胶体金颗粒(AuNP)会在不同情况下聚集、分散,这种现象在肉眼可以直接观察,经智能手机拍摄转化为灰度图像后可以更敏感地识别,与 AuNP 独特的光学效果和高效的色谱分离性质密切相关^[68]。同时,结合 AuNP 定性的侧向层析检测系统,通过轻便的材料和特异的方法在核酸的 POCT 中体现出高效、便捷的优点,在大型检测仪器受限的场景发挥重要作用^[69]。

目前已经开发了一种基于侧向层析技术的通用检测方法^[70],结合 LAMP 和 CRISPR-Cas12a 系统,检测 HPV16, 18 型的 DNA。该系统工作原理是:将待检 ssDNA 生物素化,以便结合侧向层析试纸共轭垫上的胶体金颗粒-链霉亲和素(AuNP-SA),使检测结果更明显,另外设计了一条与待检核酸互补的 DNA 探针,固定于层析试纸的检测线上。当检测体系中存在目标核酸,CRISPR-Cas12a 系统将反式切割待检核酸,导致无法结合检测线上的互补探针,呈现阴性结果;反之,若检测体系中含目标核酸,则 ssDNA 会在检测线上被捕获,导致阳

性结果。

另一种方法是通过 AuNP 的免疫标记原理检测 ASFV, SARS-CoV-2 等病原体核酸,无需设计 DNA 探针^[71-72]。在此方法中,待检测的 ssDNA 两端结合生物素和荧光素,共轭垫上含有 AuNP-抗荧光素抗体,而检测线上固定有与 AuNP 结合的抗免疫抗体。反应完毕后,如果含有目标核酸,则 ssDNA 被切割,导致检测线上的抗体与 AuNP 结合,呈现阳性结果;反之,则检测线为阴性。

上述这两种方法原理和判定方法虽不同,都彰显了侧向层析检测系统在快速核酸检测中的实用性。这些基于光学视觉信号的 POCT 技术有效推动了 CRISPR-Cas12a 系统在各类病原体核酸检测中发展应用,在临床实践中取得了显著进展,为传染病的高效监测和及时治疗提供了有效手段。

4 总结与展望

综上所述,本文介绍了 CRISPR-Cas12a 系统的特点,在核酸检测中结合应用了多种 POCT 技术,检测更加快速、便捷,整体检测效能大幅提升。随着研究深入,技术日益精进,CRISPR-Cas12a 系统与扩增技术和光学信号相结合日益普及,甚至出现无需扩增的自催化系统^[73],都能满足高灵敏度和高特异度的病原体核酸检测需求。未来,随着对 CRISPR-Cas12a 系统作用机制深入探索,有望在病原体核酸检测等领域研究出更多高效 POCT 技术,为防治感染病提供科学方法,在生物医学领域更广泛应用。

参考文献:

- [1] 吴永彬,李凌. CRISPR/Cas 系统在新型冠状病毒肺炎快速诊断中的应用[J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(3): 1-5. WU Yongbin, LI Ling. Application of CRISPR/Cas systems in the rapid diagnosis of coronavirus disease 2019 [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(3): 1-5.
- [2] KOONIN E V, MAKAROVA K S. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 2019, 374(1772): 20180087.
- [3] LI Shiyuan, CHENG Qiuxiang, LIU Jiakun, et al. Author correction: CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA [J]. Cell Research, 2018, 28(4): 491-493.
- [4] 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 Yao, GAO Hongdan, LIU Jiakun, et al. Research progress of the CRISPR-Cas system in the detecting pathogen nucleic acids[J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(1): 202-216.
- [5] LI Qingnan, WANG Dongxia, CHEN Danye, et al. Photoactivatable CRISPR/Cas12a sensors for biomarkers imaging and point-of-care diagnostics[J]. Analytical Chemistry, 2024, 69(6): 2692-2701.
- [6] PAUL B, MONTROYA G. CRISPR-Cas12a: functional overview and applications[J]. Biomedical Journal, 2020, 43(1): 8-17.
- [7] 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.
- [8] SWARTS D C, VAN DER OOST J, JINEK M. Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR-Cas12a [J]. *Molecular Cell*, 2017, 66(2): 221-233.
- [9] STELLA S, ALCÓN P, MONTOYA G. Class 2 CRISPR-Cas RNA-guided endonucleases: Swiss Army knives of genome editing [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2017, 24(11), 882-892.
- [10] DRONINA J, SAMUKAITE-BUBNIENE U, RAMANAVICIUS A. Towards application of CRISPR-Cas12a in the design of modern viral DNA detection tools (Review) [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 41.
- [11] MAO Zefeng, CHEN Ruipeng, WANG Xiaojuan, et al. CRISPR/Cas12a-based technology: a powerful tool for biosensing in food safety [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 122: 211-222.
- [12] BARRANGOU R, HORVATH P. A decade of discovery: CRISPR functions and applications [J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17092.
- [13] 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 (New York, N.Y.)*, 2018, 360(6387): 439-444.
- [14] 周旭, 王思文, 王秀荣. CRISPR-Cas12a 在病原快速检测中的应用 [J]. *中国兽医科学*, 2022, 52(8): 1031-1037. ZHOU Xu, WANG Siwen, WANG Xiurong. Application of CRISPR-Cas12a in rapid detection of pathogens [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2022, 52(8), 1031-1037.
- [15] CHEN J S, MA Enbo, DOUDNA J A, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. *Science (New York, N.Y.)*, 2018, 360(6387): 436-439.
- [16] SWARTS D C, JINEK M. Mechanistic insights into the cis- and trans-acting DNase activities of Cas12a [J]. *Molecular Cell*. 2019; 73(3): 589-600.
- [17] HUYKE D A, RAMACHANDRAN A, BASHKIROV V I, et al. Enzyme kinetics and detector sensitivity determine limits of detection of amplification-free CRISPR-Cas12 and CRISPR-Cas13 diagnostics[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(27): 9826-9834.
- [18] 张庆勋, 钟震宇, 郭青云, 等. 基于 CRISPR-Cas 系统的病原体检测研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(8): 3190-3199. ZHANG Qingxun, ZHONG Zhenyu, GUO Qingyun, et al. Recent advances of pathogens detection based on CRISPR-Cas system [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 49(8): 3190-3199.
- [19] 李涛. 病原微生物检测新方法及应用研究 [D]. 北京: 中国科学院大学 (中国科学院精密测量科学与技术创新研究院), 2021. LI Tao. Establishment and implement of novel pathogen detection strategies [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences (Innovation Academy for Precision Measurement Science and Technology, CAS), 2021.
- [20] 王亮, 宋毅, 苗立中, 等. CRISPR-Cas12a 在病原检测中的应用进展 [J]. *山东畜牧兽医*, 2023, 44(9): 90-94. WANG Liang, SONG Yi, MIAO Lizhong, et al. Application progress of CRISPR-Cas12a in pathogen detection[J]. *Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2023, 44(9), 90-94.
- [21] ZHU Hanliang, ZHANG Haoqing, XU Ying, et al. PCR past, present and future[J]. *BioTechniques*, 2020, 69(4): 317-325.
- [22] 汪博文, 邬幸梓, 张玉林, 等. CRISPR-Cas12a 在疾病诊断和中医药研究中的应用 [J]. *湖北中医药大学学报*, 2022, 24(6): 115-118. WANG Bowen, WU Xingzi, ZHANG Yulin, et al. Application of CRISPR-Cas12a in disease diagnosis and traditional Chinese medicine research [J]. *Journal of Hubei University of Chinese Medicine*, 2022, 24(6), 115-118.
- [23] 蔡文凯, 蔡水淋, 郝宗杰. 几种主流恒温扩增技术及其优化策略进展 [J]. *海南医学*, 2022, 33(20): 2716-2720. CAI Wenkai, CAI Shuilin, HAO Zongjie. Progress on mainstream constant temperature amplification technologies and its optimized strategy[J]. *Hainan Medical Journal*, 2022, 33(20): 2716-2720.
- [24] WONG Y P, OTHMAN S, LAU Y L, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124(3): 626-643.
- [25] ZHANG Limei, JIANG Hui, ZHU Zixin, et al. Integrating CRISPR/Cas within isothermal amplification for point-of-care assay of nucleic acid[J]. *Talanta*, 2022, 243: 123388.
- [26] YIGCI D, ATCEKEN N, YETISEN A K, et al. Loop-mediated isothermal amplification-integrated CRISPR methods for infectious disease diagnosis at point of care[J]. *ACS Omega*, 2023, 8(46): 43357-43373.
- [27] 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.
- [28] LEI Lei, LIAO Fan, TAN Lei, et al. LAMP Coupled CRISPR-Cas12a module for rapid, sensitive and visual detection of porcine circovirus 2[J]. *Animals(Basel)*, 2022, 12(18): 2413.
- [29] YANG Bo, SHI Zhengwang, MA Yuan, et al. LAMP assay coupled with CRISPR/Cas12a system for portable detection of African swine fever virus [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022, 69(4): e216-e223.
- [30] YIN Weihong, ZHUANG Jianjian, LI Jiale, et al. Digital recombinase polymerase amplification, digital loop-mediated isothermal amplification, and digital CRISPR-Cas assisted assay: current status, challenges, and perspectives[J]. *Small*, 2023, 19(49): e2303398.
- [31] DING Xiong, YIN Kun, LI Ziyue, et al. Sensitive quantitative detection of SARS-CoV-2 in clinical samples using digital warm-start CRISPR assay[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021, 184: 113218.
- [32] BROUGHTON J P, DENG Xianding, YU Guixia, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 870-874.
- [33] CHEN Yanju, SHI Ya, CHEN Yin, et al. Contamination-free visual detection of SARS-CoV-2 with CRISPR/Cas12a: a promising method in the point-of-care detection[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2020, 169: 112642.
- [34] WANG Rui, QIAN Chunyan, PANG Yanan, et al. opvCRISPR: one-pot visual RT-LAMP-CRISPR platform for SARS-cov-2 detection[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021, 172: 112766.
- [35] FIGUEIREDO D, CASCALHEIRA A, GONCALVES

- J. Rapid, multiplex detection of SARS-CoV-2 using isothermal amplification coupled with CRISPR-Cas12a [J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 849.
- [36] ZHANG Mai, WANG Honghong, WANG Hui, et al. CRISPR/Cas12a-assisted ligation-initiated loop-mediated isothermal amplification (CAL-LAMP) for highly specific detection of microRNAs[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(22): 7942-7948.
- [37] 许淑莹, 王冬梅, 欧阳松应. 基于 RPA 的病原体快速诊断策略 [J]. 福建师范大学学报 (自然科学版), 2024, 40(1): 34-44.
- XU Shuying, WANG Dongmei, OUYANG Songying. RPA-based rapid diagnostic strategies for pathogens[J]. Journal of Fujian Normal University(Natural Science Edition), 2024, 40(1): 34-44.
- [38] TSOU J H, LENG Qixin, JIANG Feng. A CRISPR test for detection of circulating nuclei acids[J]. Translational Oncology. 2019, 12(12): 1566-1573.
- [39] 李文静, 刘凌云, 解媛, 等. 产单核细胞李斯特菌分子分型技术的最新研究进展 [J]. 现代检验医学杂志, 2023, 38(6): 200-204.
- LI Wenjing, LIU Lingyun, XIE Yuan, et al. Advances in molecular typing techniques of *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2023, 38(6): 200-204.
- [40] 陈大伟, 李兵兵, 魏明月, 等. 基于 RPA/CRISPR-Cas12a 技术的单核细胞增生李斯特菌快速检测方法建立 [J]. 肉类研究, 2023, 37(9): 46-51.
- CHEN Dawei, LI Bingbing, WEI Mingyue, et al. Development of a rapid detection method for *Listeria monocytogenes* based on recombinase polymerase amplification combined with CRISPR-Cas12a technology [J]. Meat Research, 2023, 37(9): 46-51.
- [41] XU Jianhao, MA Jianfeng, LI Yanwei, et al. A general RPA-CRISPR/Cas12a sensing platform for *Brucella spp.* detection in blood and milk samples[J]. Sensors and Actuators, B: Chemical, 2022, 364: 131864.
- [42] AI Jingwen, ZHOU Xian, XU Teng, et al. CRISPR-based rapid and ultra-sensitive diagnostic test for *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Emerging Microbes & Infections, 2019, 8(1): 1361-1369.
- [43] LI Xin, DANG Zhisheng, TANG Wenqiang, et al. Detection of parasites in the field: the ever-innovating CRISPR/Cas12a[J]. Biosensors (Basel), 2024, 14(3): 145.
- [44] LI Shan, WANG Xiaocen, YU Yanhui, et al. Establishment and application of a CRISPR-Cas12a-based RPA-LFS and fluorescence for the detection of *Trichomonas vaginalis*[J]. Parasites & Vectors, 2022, 15(1): 350.
- [45] LEI Rong, LI Limei, WU Pinshan, et al. RPA/CRISPR/Cas12a-based on-site and rapid nucleic acid detection of *Toxoplasma gondii* in the environment[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(5): 1772-1781.
- [46] 王丽, 李珊, 李璐, 等. 微小隐孢子虫 RPA-CRISPR/Cas12a 可视化检测方法的建立及应用 [J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(12): 4793-4804.
- WANG Li, LI Shan, LI Lu, et al. Establishment and application of the RPA-CRISPR/Cas12a visual diagnostic method for *Cryptosporidium parvum* [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 50(12): 4793-4804.
- [47] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. Science (New York, N.Y.), 2017, 356(6336): 438-442.
- [48] LEE R A, DE PUIG H D, NGUYEN P Q, et al. Ultrasensitive CRISPR-based diagnostic for field-applicable detection of *Plasmodium species* in symptomatic and asymptomatic malaria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A, 2020, 117(41): 25722-25731.
- [49] CAO Gaihua, YANG Nannan, XIONG Yifan, et al., Completely free from PAM limitations: asymmetric RPA with CRISPR/Cas12a for nucleic acid assays[J]. ACS Sensors, 2023, 8(12): 4655-4663.
- [50] GU Lide, YAN Wanli, LIU Le, et al. Research progress on rolling circle amplification (RCA)-based biomedical sensing[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2018, 11(2): 35.
- [51] CHEN Zhibao, MA Li, BU Shengjun, et al. CRISPR/Cas12a and immuno-RCA based electrochemical biosensor for detecting pathogenic bacteria[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2021, 901: 115755.
- [52] ZHU Zaobing, GUO Yongkun, WANG Chen, et al. An ultra-sensitive one-pot RNA-templated DNA ligation rolling circle amplification-assisted CRISPR/Cas12a detector assay for rapid detection of SARS-CoV-2[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2023, 228: 115179.
- [53] LI Shiyuan, CHENG Qiuxiang, WANG Jin, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection[J]. Cell Discovery, 2018, 4: 20.
- [54] MONK C H, YOUNGQUIST B M, BRADY A D, et al. Development of a CRISPR-Cas12a rapid diagnostic for human cytomegalovirus[J]. Antiviral Research, 2023, 215: 105624.
- [55] ZHOU Changyu, LI Wenjing, ZHAO Yu, et al. Sensitive detection of viable salmonella bacteria based on tertiary cascade signal amplification via splintR ligase ligation-PCR amplification-CRISPR/Cas12a cleavage[J]. Analytica Chimica Acta, 2023, 1248: 340885.
- [56] KAMINSKI M M, ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, et al. CRISPR-based diagnostics[J]. Nature Biomedical Engineering, 2021, 5(7): 643-656.
- [57] 胡飞, 刘艳飞, 李希晨, 等. 基于 CRISPR/Cas12a 的核酸便捷化检测方法和现场快速便携式检测装置 [J]. 中国激光, 2022, 49(15): 157-166.
- HU Fei, LIU Yanfei, LI Xichen, et al. Convenient nucleic acid detection method and point-of-care detection device based on CRISPR/Cas12a molecular diagnosis [J]. Chinese Journal of Lasers, 2022, 49(15): 157-166.
- [58] JOUNG J, LADHAA, 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.
- [59] HU Menglu, QIU Zhiqiang, BI Zirong, et al. Photocontrolled crRNA activation enables robust CRISPR-Cas12a diagnostics [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A, 2022, 119(26): e2202034119.
- [60] CHEN Yong, XU Xiaoling, WANG Jiachun, et al. Photoactivatable CRISPR/Cas12a strategy for one-pot DETECTR molecular diagnosis[J]. Analytical Chemistry, 2022, 94(27): 9724-9731.
- [61] HU Menglu, LIU Ruhan, QIU Zhiqiang, et al. Light-start CRISPR-Cas12a reaction with caged crRNA enables rapid and sensitive nucleic acid detection [J]. Angewandte Chemie, 2023, 62(23): e202300663.
- [62] WU Qian, JIANG Song, HUANG Yong, et al. A one-pot

- method based on rolling circle amplification and light - activated CRISPR/Cas12a reaction for simple and highly sensitive detection of *Staphylococcus aureus*[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 477: 146814.
- [63] 付强强, 吴泽, 郑磊. 智能手机医学检验新技术的进展、问题和发展方向[J]. 华西医学, 2021, 36(8): 1007-1010. FU Qiangqiang, WU Ze, ZHENG Lei. Progress, problems and development direction of the new technology of smartphonebased medical examination [J]. West China Medical Journal, 2021, 36(8):1007-1010.
- [64] HUANG Zhen, NING Bo, YANG H S, et al. Sensitive tracking of circulating viral RNA through all stages of SARS-CoV-2 infection [J]. the Journal of Clinical Investigation, 2021, 131(7): e146031.
- [65] HUANG Zhen, LACOURSE S M, KAY A W, et al. CRISPR detection of circulating cell-free Mycobacterium tuberculosis DNA in adults and children, including children with HIV: a molecular diagnostics study[J]. the Lancet. Microbe, 2022, 3(7): e482-e492.
- [66] HE Qian, YU Dongmei, BAO Mengdi, et al. High-throughput and all-solution phase African Swine Fever Virus (ASFV) detection using CRISPR-Cas12a and fluorescence based point-of-care system[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2020, 154: 112068.
- [67] CAI Yiyuan, ZHUANG Liang, YU Jibin, et al. A dual-chamber “one-pot” CRISPR/Cas12a-based portable and self-testing system for rapid HPV diagnostics[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2024, 405: 135295.
- [68] MA Long, YIN Lijuan, LI Xiaoyuan, et al. A smartphone-based visual biosensor for CRISPR-Cas powered SARS-CoV-2 diagnostics[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2022, 195: 113646.
- [69] VAN DONGEN J E, BERENDSEN J T W, STEENBERGEN R D M, et al. Point-of-care CRISPR/Cas nucleic acid detection: recent advances, challenges and opportunities [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2020, 166: 112445.
- [70] MUKAMA O, YUAN Ting, HE Zhixu, et al. A high fidelity CRISPR/Cas12a based lateral flow biosensor for the detection of HPV16 and HPV18[J]. [J]. Sensors and Actuators B Chemical, 2020, 316(Suppl 10):128119.
- [71] XIONG Yifan, CAO Gaihua, CHEN Xiaolong, et al. One-pot platform for rapid detecting virus utilizing recombinase polymerase amplification and CRISPR/Cas12a[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(12): 4607-4616.
- [72] BHATT A, FATIMA Z, RUWALI M, et al. CLEVER assay: a visual and rapid RNA extraction-free detection of SARS-CoV-2 based on CRISPR-Cas integrated RT-LAMP technology[J]. Journal of Applied Microbiology. 2022; 133(2): 410-421.
- [73] DENG Fei, LI Yi, YANG Biyao, et al. Topological barrier to Cas12a activation by circular DNA nanostructures facilitates autocatalysis and transforms DNA/RNA sensing[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 1818.
- 收稿日期: 2024-03-23
修回日期: 2024-05-14
- (上接第198页)
- reform: course, experience and prospect[J]. Educational History Studies, 2023, 5(4): 4-15.
- [4] 时广利, 孙勇. 雨课堂在临床免疫学检验教学中的应用探讨[J]. 继续医学教育, 2023, 37(6): 61-64. SHI Guangli, SUN Yong. Discussion on the application of rain classroom in clinical immunology examination teaching[J]. Continuing Medical Education, 2023, 37(6): 61-64.
- [5] 江晓, 孙建安, 岳启安, 等. 医学检验技术专业创新创业教育与专业教育融合的探索与实践[J]. 检验医学与临床, 2023, 20(9): 1334-1336. JIANG Xiao, SUN Jian'an, YUE Qi'an, et al. Exploration and practices of the integration of innovation and entrepreneurship education and professional education in medical laboratory technology specialty[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2023, 20(9): 1334-1336.
- [6] 曹丽, 贾晓兰, 盖丽娜, 等. 立德树人视域下医学检验技术专业教员队伍课程思政的实践能力探讨[J]. 教育观察, 2022, 11(13): 92-94, 107. CAO Li, JIA Xiaolan, GE Lina, et al. Exploration of the practical ability of ideological and political work of the training of faculty of medical laboratory technology from the perspective of moral education and talent cultivation[J]. Survey of Education, 2022, 11(13): 92-94, 107.
- [7] 杨梦娇, 周宇. 检验科临检室实习生带教方法改进效果的探讨[J]. 继续医学教育, 2023, 37(9): 81-84. YANG Mengjiao, ZHOU Yu. Discussion on improvement effect of intern teaching method in inspection room of laboratory[J]. Continuing Medical Education, 2023, 37(9): 81-84.
- [8] 徐颜美, 王小中, 胡龙华, 等. 基于雨课堂在临床生物化学检验技术专业课程教学改革实践[J]. 实验与检验医学, 2021, 39(2): 486-488. XU Yanmei, WANG Xiaozhong, HU Longhua, et al. The practice of teaching reform in the course of clinical biochemical laboratory technology based on the rain classroom[J]. Experimental and Laboratory Medicine, 2021, 39(2): 486-488.
- [9] 贾克利, 李恒, 贺志安. 地方院校医学检验技术专业教育的探索与实践[J]. 现代职业教育, 2021(33): 22-23. JIA Keli, LI Heng, HE Zhian. Exploration and practice of medical laboratory technology education in local colleges[J]. the Modern Occupation Education, 2021(33): 22-23.
- [10] 杜鸿, 温会燕, 王敏, 等. 本科医学检验专业增设网络授课的教学模式及展望[J]. 航空航天医学杂志, 2021, 32(3): 337-339. DU Hong, WEN Huiyan, WANG Min, et al. The teaching mode and prospect of additional network teaching in undergraduate medical laboratory specialty[J]. Journal of Aerospace Medicine, 2021, 32(3): 337-339.
- [11] 徐海瑛, 肖亚利, 刘安丽. 基于雨课堂+智慧职教云平台的病理学混合式教学模式探索[J]. 中国教育技术装备, 2023(24): 150-153. XU Haiying, XIAO Yali, LIU Anli. Exploration of blended teaching mode in pathology teaching based on rain classroom + smart vocational education cloud platform[J]. China Educational Technology & Equipment, 2023(24): 150-153.
- 收稿日期: 2024-03-10
修回日期: 2024-04-05