

# CRISPR-Cas12a 系统在病原体检测领域的最新研究进展

马贤参<sup>a</sup>, 常新昊<sup>a</sup>, 司文喆<sup>ab,c</sup> (北京大学第三医院 a. 检验科; b. 心血管分子生物学与调节肽重点实验室; c. 血管稳态与重构全国重点实验室, 北京 100191)

**摘要:** 成簇规律间隔短回文重复序列-关联蛋白 12a (CRISPR-Cas12a) 体系是一种源自细菌的自然免疫防御机制, 因其高特异性、高灵敏度、无需依赖昂贵设备、操作简便以及成本效益显著等优点, 在核酸分析领域引起广泛的关注。CRISPR-Cas12a 系统能够与扩增技术、生物传感器、拉曼光谱、微流控等相关技术联用, 从而提高检测系统的灵敏度, 减少交叉污染, 缩短检测时间, 极大拓宽了其应用场景。近年来该技术被广泛应用于病毒、细菌、支原体等病原体核酸检测中。该文主要介绍了 CRISPR-Cas12a 系统在上述病原体检测中的研究进展, 深入探讨了其优势和局限性, 旨在推动该技术在病原体的快速识别、精准诊断及现场筛查场景中的深度应用与迭代升级的实践思考。

**关键词:** 成簇规律的间隔短回文重复序列-关联蛋白 12a 系统; 病原体; 核酸检测

**中图分类号:** R-331; R446 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2026)02-192-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2026.02.032

## Recent Advances in the CRISPR-Cas12a System for Pathogen Detection

MA Xiancan<sup>a</sup>, CHANG Xinhao<sup>a</sup>, SI Wenzhe<sup>ab,c</sup> (a. Department of Clinical Laboratory; b. Key Laboratory of Cardiovascular Molecular Biology and Regulatory Peptides; c. State Key Laboratory of Vascular Homeostasis and Remodeling, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China)

**Abstract:** The clustered regulatory interspaced short palindromic repeat - associated protein 12a (CRISPR-Cas12a) system is a natural immune defense mechanism derived from bacteria, which has garnered significant attention in the field of nucleic acid analysis due to its high specificity, high sensitivity, equipment-free operation, simplicity and remarkable cost-effectiveness. The CRISPR-Cas12a system can be integrated with related technologies such as amplification techniques, biosensors, Raman spectroscopy, and microfluidics to enhance the detection sensitivity of the system, reduce cross contamination, shorten the testing time, and broaden the application scenarios. In recent years, the CRISPR-Cas12a technology has been widely applied in nucleic acid detection for pathogens such as viruses, bacteria and mycoplasmas. This article primarily reviews the research advances of the CRISPR-Cas12a system in the aforementioned pathogen detection applications, provides an in-depth analysis of its advantages and limitations, and proposes practical strategies to deepen its implementation and iterative refinement in rapid pathogen identification, precise diagnosis, and on-site screening scenarios.

**Keywords:** clustered regulatory interspaced short palindromic repeat-associated protein 12a system; pathogen; nucleic acid testing

近年来, 受各类新发传染病影响, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术等核酸检测 (nucleic acid testing, NAT) 方法作为一种大样本量的病原体核酸筛查技术发展迅速, 但受各种因素 (如采样地点、采样时间、引物设计、制备和储存等) 影响, 使得检测结果具有较高的假阴性<sup>[1-2]</sup>; 而基因测序技术成本高且速度慢, 不适用于大规模项目。因此, 开发高灵敏度和特异性、具有较低成本、耗时较短的 NAT 新技术有利于更好地应对未来全球公共卫生带来的危机和挑战。

成簇规律间隔短回文重复序列-关联蛋白 12a

(clustered regulatory interspaced short palindromic repeat-associated protein 12a, CRISPR-Cas12a) 来源于细菌中的一种用于应对外来核酸 (如: 病毒核酸、质粒) 入侵的天然免疫防御机制<sup>[3]</sup>。随着 CRISPR-Cas 系统的发现及深入研究, 目前依赖特异性识别靶标后所激发的 Cas 蛋白“附带切割”活性, 已经开发出多项基于 CRISPR-Cas 的核酸检测方法, 它们高效、简便、快速的优点弥补了传统诊断方法的不足<sup>[4]</sup>。本文对 CRISPR-Cas12a 系统的作用机制、与其它技术 (核酸扩增技术、生物传感技术、微流控技术等) 的联合使用进行综述, 并介绍了其在细菌、病毒、支原体

**基金项目:** 北京市科技新星计划(20220484090); 北京市科技新星交叉合作课题(20230484442); 北京市自然科学基金(7232206); 血管稳态与重构全国重点实验室研究基金资助(2024-VHR-SY-13)。

**作者简介:** 马贤参(2001-), 男, 在读博士生, 研究方向: 病原体检测和分子诊断新技术, E-mail: 2110117118@bjmu.edu.cn。

常新昊(2003-), 男, 在读本科生, 专业: 医学检验技术, E-mail: 2210117140@stu.pku.edu.cn, 并列第一作者。

**通讯作者:** 司文喆(1987-), 女, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 分子诊断新技术研究, E-mail: wenzhesi@bjmu.edu.cn。

等检测中的应用情况,为病原体联合检测新技术的开发提供参考。

## 1 CRISPR-Cas12a 系统的概述

2015年MAKAROVA等<sup>[5]</sup>结合对标志性蛋白家族和Cas基因座结构特征的分析将CRISPR-Cas系统分为二个大类、5种类型、16种亚型,Cas12a属于V型CRISPR-Cas系统。Cas12a蛋白包含瓣叶:核酸酶瓣叶(nuclease lobe, NUC)与 $\alpha$ -螺旋识别瓣叶(alpha-helix recognition lobe, REC)<sup>[6]</sup>。REC包含两个主要的结构域,即REC1和REC2;而NUC主要包含RuvC(一种DNA内切酶,包含结构RuvCI、RuvCII、RuvCIII),PAM相互作用(PAM-interacting, PI,能与目标DNA的PAM相互作用),WED I~III以及桥螺旋结构BH<sup>[7]</sup>。WED III亚结构域中有能够将前体RNA(preRNA)加工成成熟CRISPR RNA(crRNA)的核糖核酸酶(ribonuclease, RNase),RuvC和NUC之

间的界面上有能够切割目标DNA的脱氧核糖核酸酶(deoxyribonuclease, DNase)<sup>[6-7]</sup>。

CRISPR-Cas12a系统在细菌中发挥其防御作用主要分为适应、表达、干扰三个阶段<sup>[6,8-9]</sup>。病毒或噬菌体的外源性核酸序列入侵细菌后被Cas1, Cas2蛋白获取并插入到CRISPR序列的两个重复序列之间<sup>[10]</sup>;含有外源性DNA序列的整合CRISPR序列在细菌中被转录成pre-crRNA,然后被Cas12a蛋白加工成成熟的crRNA<sup>[6-9]</sup>;Cas12a蛋白能够与crRNA结合形成Cas12a-crRNA复合物,随后识别目标DNA的PAM位点并与DNA双链中的目标链互补配对,激活Cas12a蛋白的核酸内切酶催化位点活性,从而特异性地切割目标双链DNA,非特异性切割单链非靶标DNA,见图1。基于此,CRISPR-Cas12a系统不仅在病原体核酸检测方面得到应用和推广<sup>[11]</sup>,同时还被认为是一种高效且特异的基因编辑工具<sup>[12-13]</sup>。

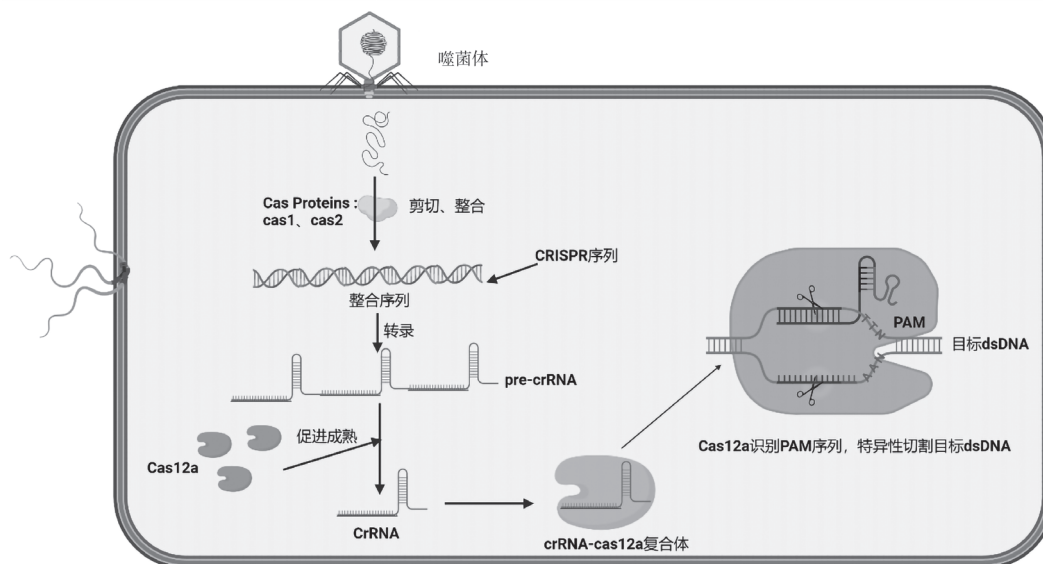


图1 CRISPR-Cas12a系统的作用机制示意图

## 2 CRISPR-Cas12a系统与多种技术联合应用

虽然CRISPR-Cas12a系统本身已经具有高效、特异度强、操作简便等优点,但同时也存在交叉污染、检测所需时间较长等问题,因此限制了该技术的商品化。近年来,许多研究人员尝试将其与其它技术联用,以解决和优化该技术存在的不足。这些联用有的提高了基于CRISPR-Cas12a系统的检测方法的灵敏度,减少了污染率;有的缩减检测步骤从而实现了更快地检测和更少的交叉污染;还有的实现了检测结果的可视化等。这使得该技术在病原体检测领域的应用越来越成熟。比如:将CRISPR-Cas12a系统与荧光信号、电化学信号和商品化试纸条结合,能极大地提高检测效率,简化操作,降低检测成本,尤其是与电化学技术结合能有效提高检测的灵敏度<sup>[14]</sup>。

2.1 与扩增技术联用 2018年CHEN等<sup>[15]</sup>发现RNA引导的DNA结合,会释放出Cas12a非特异性的单链DNA(single-stranded DNA, ssDNA)切割活性,从而完全降解ssDNA分子。基于该原理,他们将Cas12a单链DNase(ssDNase)激活与等温扩增相结合,创建了一种名为DNA内切酶靶向的CRISPR反式报告(DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter, DETECTR)的方法,该方法能达到阿托摩尔(amol,  $10^{-18}$  mol)的DNA检测灵敏度。DETECTR能够快速、特异地检测患者样本中的人类乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)。同年,LI等<sup>[16]</sup>发现Cas12a在形成Cas12a-crRNA-目标DNA三元复合物后,会对非目标ssDNA进行附带切割。利用这一特点,他们以淬灭荧光ssDNA报告物(如:HEX-

N12-BHQ1)为探针,开发了归巢核酸内切酶激活的基于侧向流试纸的、通过酶切实现错配识别的核酸检测系统(homing-endonuclease-activated lateral-flow-strip-based NAT detection with mismatch discrimination by enzymatic cleavage system, HOLMES)。该系统是一种低成本、多用途的高效系统,可用于快速检测靶DNA和靶RNA。在通过酶切实现错配识别的核酸检测系统中,如果反应体系中存在靶DNA, Cas12a-crRNA二元复合物就会与靶DNA形成三元复合物,继而反式裂解体系中的非靶ssDNA报告物,发出HEX荧光(或其他荧光)。该平台虽然具有较高的灵敏度和特异度,但其核酸扩增和靶向检测是两个独立的步骤,增加了交叉污染的风险<sup>[17]</sup>。

2.2 与生物传感技术联用 2019年,DAI等<sup>[18-19]</sup>推出了一种基于系统的电化学生物传感器(electrochemical-CRISPR-Cas12a biosensor, E-CRISPR)。与传统的光学生物传感器相比, E-CRISPR具有更低的成本和更高的便携性。通过优化 Cas12a的体外反式切割活性,该技术成功应用于病毒核酸检测,包括HPV-16和B19细小病毒(Parvovirus B19, PB-19),其灵敏度达到了皮摩尔(pmol,  $10^{-12}$ mol)级。这一进展大大推动了CRISPR-Cas生物传感器技术的发展。2023年,陈思等<sup>[19-20]</sup>介绍了一种创新的Cas12a基础电化学发光生物传感器(electrogenated chemiluminescence biosensor, ECL-biosensor),该传感器可检测无需靶向扩增的HPV-16的基因组DNA。检测中, Cas12a通过其独特的双重识别机制增强了特异性,并利用其反式切割能力来放大信号。同时, L-蛋氨酸稳定的金纳米团簇作为高效的ECL发射体,实现了ECL信号的转换。将 Cas12a与ECL技术结合在一起,检测限可达0.48pmol,整个检测过程可在70min内完成,推动了新一代CRISPR-Cas检测系统的设计。NOURI等<sup>[21]</sup>利用玻璃纳米孔独特的单分子灵敏度和无标记电子传感技术对单链环状DNA(报告基因)进行高灵敏度定量检测,基于单链环状DNA可在目标特异性CRISPR-Cas12a的反式裂解活性下降解的原理,开发并优化了用于分析人类免疫缺陷病毒1型(human immunodeficiency virus-1, HIV-1)的Cas12a检测方法。

2.3 与拉曼光谱技术联用 表面增强拉曼光谱术(surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)是一种高灵敏度的光谱技术,通过利用金属纳米结构表面来显著增强拉曼散射信号。SERS可以检测极低浓度的分子,甚至达到单分子水平,目前文献报道的SERS与CRISPR-Cas系统的结合主要是针对病毒及细菌的检测<sup>[19,22]</sup>。2021年,LIANG等<sup>[23]</sup>开发了基于拉曼增强效应和CRISPR-Cas12a系统的简

易诊断平台S-CRISPR。该平台使用高活性贵金属纳米材料来提高核酸检测的灵敏度,无需核酸扩增。这种无需扩增的平台可在30~40min的孵育时间内完成,可用于检测鼻咽拭子标本RNA提取物中的SARS-CoV-2衍生核酸。与定量逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR)相比, S-CRISPR的灵敏度和特异度分别达到87.50%和100%。

### 3 CRISPR-Cas12a系统在病原体检测中的临床应用

3.1 病毒核酸检测 核酸检测是诊断病毒性疾病的金标准,当前荧光定量PCR等以PCR为基础的技术是常用的核酸检测方法。核酸检测对于样品的存储环境、核酸提取的实验条件、实验操作的熟练程度及实验环境等都有较高要求,给早期大面积筛查和诊断带来了一些困难。因此,更高效、更便捷的基于CRISPR的平台是检测病毒的一种高可行性的新方法。

WANG等<sup>[24]</sup>建立了基于CRISPR-Cas12a的牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea viral, BVDV)快速现场诊断平台,经过临床试验验证,这种方法具有灵敏度高、特异度强的特点,是BVDV毒株覆盖率高、临床检测可靠快速的实用工具。此外Cas12a还可用于检测番茄花叶病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒,是种植业和畜牧业的高效检测工具<sup>[25-26]</sup>。在传染病检测方面, Cas12a也具有独特的优势,人博卡病毒(human Bocavirus, HBoV)1型对新生婴儿的健康威胁较大, QIAN等<sup>[27]</sup>将重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)技术与Cas12a结合,开发出了RPA-Cas12a荧光测定法,可在40min内完成,具有0.5copies/ $\mu$ l的强特异度和灵敏度,且无需复杂的仪器,未来可能广泛应用于HBoV1感染早期现场诊断。在资源匮乏的地区尤为严重,急需快速而精准的现场诊断方案,王潇团队<sup>[28]</sup>利用CRISPR-Cas13a和Cas12a系统的反式切割特性,分别建立了单靶标的一步检测方法,并整合这两个系统建立了双重靶标检测系统对猴痘病毒核酸进行检测,具有快速、准确、可靠、方便且高效的特性,在现场检测方面前景广阔。此外,基于RPA和CRISPR-Cas12a技术的DETECTR检测平台也可用于特异、快速地检测新型冠状病毒核酸<sup>[29]</sup>。

2024年, WANG等<sup>[22]</sup>设计了一种结合CRISPR-Cas12a系统的SERS技术,用于非洲猪瘟病毒(African Swine fever virus, ASFV)的无扩增基因检测。他们以ssDNA为连接子,在磁珠表面偶联等离激元SERS标签,制备出一种SERS传感探针。靶标ASFV基因激活的Cas12a蛋白在连接子ssDNA上启动反式切割功能,引起SERS标签的释放,导致在集体磁珠(magnetic beads, MBs)上方检测到的SERS信号降低。该技术主要采用两种信号增强策略将液相检测灵敏度从100nmol/L提高到10fmol/L,一个是Cas12a

蛋白的无限反式切割功能,另一个是磁诱导探针的收集。该传感方法实现了血清体系中ASFV基因和病毒样品中提取核酸的SERS检测,具有较高的灵敏度和选择性,相对标准偏差<8%。该传感平台主要用于基因样品的现场检测和快速检测。

目前,许多基于CRISPR-Cas12a的检测方法已经不是简单单一地与其它技术联用,而是多种技术的叠加应用,充分发挥各种技术的检测优点,目的在于开发出符合不同场景病原体检测要求的检测技术。GAYET等<sup>[30]</sup>利用Cas12a对新型水凝胶的调控作用,设计并构建了一种微流控纸基分析装置(microfluidic paper-based analytical devices,  $\mu$  PADS)。该水凝胶由乙二醇-DNA(PEG-DNA)和聚丙烯酰胺-DNA(PA-DNA)组成,可在Cas12a的作用下发生降解,并在数小时内释放其负载的载体(包括小分子、酶、纳米颗粒以及活细胞)。通过将Cas12a敏感的水凝胶整合于 $\mu$  PADS中,实现了将DNA输入信号有效转化为多种视觉和电子读数,可用于诊断。ZHANG等<sup>[31]</sup>提出了一种基于微流控芯片的CRISPR-Cas12a和非萃取逆转录环介导等温扩增(reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)结合的超高通量分析严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2型(SARS-CoV-2)变异体的系统高通量微流控检测系统(mutaSCAN),实现了在有限的资源要求下快速检测SARS-CoV-2及其变异体。MutaSCAN系统能在30min内检测出模拟拭子样本中的SARS-CoV-2病毒,检测结果低至250copies/ml,每轮检测可达96例。该系统对临床样本进行了检测,常规检测和突变检测(22份野生型样本和26份突变型样本)的准确率分别为98%和100%。阴性样本( $n=24$ )未发现假阳性结果。系统具有与黄金标准RT-PCR相媲美的SARS-CoV-2和变异检测能力,能够为变异警报和大流行监测提供超灵活、快速、灵敏和经济的病毒检测。

**3.2 细菌核酸检测** 细菌耐药性突变等问题,对细菌的检测方法提出了新的要求。LIU等<sup>[32]</sup>开发出了一种基于RPA和CRISPR反应系统的高效单管检测平台,用于检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的mecA和clfA基因,该检测系统可在30min内完成检测,且准确度与qPCR一致,还具备高灵敏度和特异度,在社区和医院的即时检测中具有巨大潜力。同样,利用基于RPA和CRISPR-Cas12a技术的DETECTR检测平台,XU等<sup>[33]</sup>设计出了一种快速(<40min)、易于实施且准确的炭疽芽孢杆菌核酸鉴定方法,该方法可以与便携式设备相结合,也可以推广到其他细菌检测应用。此外,RPA-CRISPR-Cas12a系统还被用来检测铜绿假单胞菌的lasB基因,从而实现铜绿假单胞菌的早期

准确识别<sup>[34]</sup>。而将重组酶介导扩增(recombinase aided amplification, RAA)技术与CRISPR-Cas12a系统相结合,ZHU等<sup>[35]</sup>建立了一种针对大肠埃希菌O157:H7的快速超灵敏检测系统,该方法具备特异度高、结果可视化、不需要复杂设备等优点,因此在痕量病原体的原位检测中有广阔的应用前景。在结核分枝杆菌检测方面,JIA等<sup>[36]</sup>将多重交叉置换扩增(multiple cross displacement amplification, MCDA)技术与基于CRISPR-Cas12a的生物传感系统相结合,设计了一种新型检测平台,其临床检测性能高于痰涂片显微镜检查,与Xpert法相当,是一种有前途且有效的结核病感染诊断、监测和预防工具。综上所述,通过与不同技术的结合联用,Cas12a有望实现更快速、灵敏、便捷的细菌检测,有助于解决细菌耐药性等现实难题。

将SERS的高灵敏度检测能力与PCR技术相结合,还能进一步降低检测下限。受CRISPR-Cas12a具有特异性靶DNA激活附带ssDNA裂解活性和脂质体具有信号分子负载特性的启发,LIU等<sup>[37]</sup>提出了一种基于灵敏SERS的现场核酸检测方法。通过脂质体装载两种信号分子4-硝基苯硫酚和半胱氨酸,可分别实现SERS和肉眼对目标DNA的双模式检测,目标核酸浓度转化为SERS信号和可视化信号,最低可分别检测到100amol和10pmol。拓宽了SERS在检测生物标志物方面的应用范围。2022年,ZHUANG等<sup>[38]</sup>利用CRISPR-Cas12a和SERS设计了一种RPA集成微流控纸基分析装置RPA-Cas12a- $\mu$  PAD,用于超灵敏SERS检测。研究者设计了单链DNA来“拉下”SERS纳米探针。Inv A基因的扩增子触发Cas12a的反式裂解活性,这导致链接ssDNA被无差别地剪切。因此,SERS纳米探针的聚集程度取决于伤寒沙门氏菌的浓度。RPA-Cas12a- $\mu$  PAD可在45min内对食品样品进行准确检测。在牛奶和肉类样品中,伤寒沙门氏菌的检测限为3~4 CFU/ml,动态检测范围为1~108 CFU/ml。这项工作扩大了基于CRISPR的诊断范围,并提供了一个新颖、稳健的快速细菌检测平台。

**3.3 其他病原体的核酸检测** 利用Cas12a反式切割的特性,JIA等<sup>[39]</sup>设计了一种名为“MP-MC-DA-CRISPR”的新型检测方法,用于灵敏、特异和快速地检测肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, MP)感染,该方法可检测低至50fg的MP基因组DNA,且与其他病原体无交叉反应,有望成为临床环境中MP感染检测的重要即时检验(point-of-care testing, POCT)方法。通过优化引物等方法,CHEN等<sup>[40]</sup>成功构建了一套基于RPA-CRISPR-Cas12a的新型人型支原体核酸检测系统,检测限为3copies/ $\mu$  l,在临床样本评估中敏感度和特异度均为1.000,在常规检测方面显示出巨大的应用前景,并且高度可用于分子

诊断中的种群筛选。LI Shan团队<sup>[41]</sup>开发了一种使用RPA技术和侧向流动试纸(lateral flow strip, LFS)结合Cas12a的检测方法来检测阴道毛滴虫,最大检测限为1copies/ $\mu$ l,灵敏度高于嵌套式PCR,特别适用于大规模人群筛查,为公共卫生机构监测提供了技术支持。HUANG等<sup>[42]</sup>建立了一种基于Cas12a的检测细粒棘球蚴的方法,目标基因的最低检测限为10copies,测试结果与qPCR结果100%一致,在蓝光下15min内肉眼可见,未来有可能作为现场检测的替代工具。Cas12a也被用于检测真菌产生的毒素如黄曲霉毒素B1和赭曲霉毒素A等<sup>[43-44]</sup>,为真菌感染、中毒检测提供了更多样和便捷的选择。

传统CRISPR-Cas12a系统的DNA扩增和随后的Cas12a裂解两步法检测,整个过程需要至少2h。为了减少检测耗时,WANG等<sup>[45]</sup>提出了一种基于CRISPR-Cas12a的快速核酸检测平台“Cas12aVDet”。该方法将RPA与Cas12a裂解整合在一个反应体系中,可在30min内完成检测,并可避免开盖污染,检测信号可在蓝光下用肉眼观察到。该方法可在单分子水平上检测DNA,支原体污染检测的准确率达100%。

#### 4 展望

CRISPR-Cas12a检测系统具有灵敏度和特异度高、操作便捷、快速、经济等诸多优势,被认为是一种有前途的病原体检测的新技术,为临床检验医学领域所关注。Cas12a只需要识别crRNA就能有效切割单链DNA和双链DNA,因此可以针对多种靶标核酸序列设计对应的CRISPR-Cas12a识别探针。CRISPR-Cas12a系统的另一个潜在应用是结合纳米技术、微流控技术等,开发出便携式、现场快速检测设备用于疫情监测、食品安全检测以及个人健康监测等多个领域。当然,CRISPR-Cas12a系统仍有其局限性,如可能存在脱靶现象导致假阳性结果等,这些问题需要在后续的研究中得到解决。综上所述,随着技术的不断进步和创新,CRISPR-Cas12a有望在未来的病原体检测和分子诊断领域发挥更加重要的作用。

#### 参考文献:

- [1] KONG X Q, WANG Y J, FANG Z X, et al. False-positive results of SARS-CoV-2 RT-PCR in oropharyngeal swabs from vaccinators [J]. *Frontiers in Medicine*, 2022, 9:847407.
- [2] RAHBARI R, MORADI N, ABDI M. RRT-PCR for SARS-CoV-2: analytical considerations [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2021, 516: 1-7.
- [3] 赵亚楠,曹啟新,闫彦,等.CRISPR/Cas13系统用于病原体检测的研究进展[J].*检验医学*,2023,38(8):800-804. ZHAO Y N, CAO Q X, YAN Y, et al. Research progress of CRISPR/Cas13 system for pathogen detection[J]. *Laboratory Medicine*, 2023, 38(8): 800-804.
- [4] 张咪咪.CRISPR-Cas技术在病原体核酸检测中的研究进展[J].*国际检验医学杂志*,2023,44(10):1259-1265. ZHANG M M. Research progress of CRISPR-Cas systems in nucleic acid detection of pathogens[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2023, 44(10): 1259-1265.
- [5] MAKAROVA K S, WOLF Y I, ALKHNABASHI O S, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(11): 722-736.
- [6] 党生,张帅,翟景波.CRISPR/Cas12a系统:核酸检测的多功能工具[J].*生物化学与生物物理进展*, 2024, 51(4): 785-796. DANG S, ZHANG S, ZHAI J B. The versatile tool: CRISPR/Cas12a system for nucleic acid detection[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2024, 51(4): 785-796.
- [7] PAUL B, MONTOYA G. CRISPR-Cas12a: functional overview and applications[J]. *Biomedical Journal*, 2020, 43(1): 8-17.
- [8] 周桓,邵艳娜,王涓,等.基于CRISPR/Cas技术的核酸检测研究进展[J].*微生物学报*,2021,61(12):3856-3869. ZHOU H, SHAO Y N, WANG J, et al. Research progress of nucleic acid detection based on CRISPR/Cas technology[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(12): 3856-3869.
- [9] 冯万有,蒙丽娜,陈春,等.CRISPR/Cas系统分类和病原体检测的研究进展[J].*生物技术*,2022,32(2):258-267,251. FENG W Y, MENG L N, CHEN C, et al. Classification of CRISPR/Cas system and application in pathogen detection[J]. *Biotechnology*, 2022, 32(2): 258-267, 251.
- [10] WANG J Y, PAUSCH P, DOUDNA J A. Structural biology of CRISPR-Cas immunity and genome editing enzymes[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(11): 641-656.
- [11] WANG Y H, YANG T M, LIU G F, et al. Application of CRISPR/Cas12a in the rapid detection of pathogens [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2023, 548: 117520.
- [12] 王雅轩,朱晓雁,苏建荣.CRISPR/Cas系统在病原体检测方面的研究进展[J].*中国人兽共患病学报*, 2021, 37(9): 839-844. WANG Y X, ZHU X Y, SU J R. Research progress on the CRISPR/Cas system in pathogen detection[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2021, 37(9): 839-844.
- [13] YAO R L, LIU D, JIA X, et al. CRISPR-Cas9/Cas12a biotechnology and application in bacteria [J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2018, 3(3): 135-149.
- [14] 周建,任雪梅,王馨,等.CRISPR/Cas核酸检测系统的研究进展和未来挑战[J].*检验医学*, 2024, 39(6):608-614. ZHOU J, REN X M, WANG X, et al. Research progress and challenges on CRISPR/Cas nucleic acid diagnosis system[J]. *Laboratory Medicine*, 2024, 39(6): 608-614.
- [15] 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.
- [16] LI S Y, CHENG Q X, WANG J M, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection [J]. *Cell Discovery*, 2018, 4: 20.
- [17] 陈逸凡.CRISPR/Cas技术在病原体检测中的应用[J].*检验医学与临床*,2022,19(7):981-985. CHEN Y F. Application of CRISPR/Cas technology in pathogen detection[J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2022, 19(7): 981-985.
- [18] DAI Y F, SOMOZA R A, WANG L, et al. Exploring the trans-cleavage activity of CRISPR-Cas12a (cpf1) for the development of a universal electrochemical biosensor[J]. *Angewandte Chemie (International ed. in*

- English), 2019, 58(48): 17399-17405.
- [19] 陈思, 林昱坤, 宋春燕, 等. 基于CRISPR/Cas系统的核酸生物传感器[J]. 生物化学与生物物理进展, 2023, 50(8): 1782-1796.
- CHEN S, LIN Y K, SONG C Y, et al. CRISPR/Cas-based biosensors for nucleic acid detection[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2023, 50(8): 1782-1796.
- [20] LIU P F, ZHAO K R, LIU Z J, et al. Cas12a-based electrochemiluminescence biosensor for target amplification-free DNA detection [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 176: 112954.
- [21] NOURI R Z, JIANG Y Q, LIAN X L, et al. Sequence-specific recognition of HIV-1 DNA with solid-state CRISPR-Cas12a-assisted nanopores (SCAN) [J]. ACS Sensors, 2020, 5(5): 1273-1280.
- [22] WANG H M, SU A L, BAO C X, et al. A CRISPR/Cas12a-SERS platform for amplification-free detection of African swine fever virus genes [J]. Talanta, 2024, 267: 125225.
- [23] LIANG J J, TENG P J, XIAO W, et al. Application of the amplification-free SERS-based CRISPR/Cas12a platform in the identification of SARS-CoV-2 from clinical samples[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2021, 19(1): 273.
- [24] WANG M X, CHANG J T, HAN Y X, et al. A CRISPR/Cas12a-based platform for rapid on-site bovine viral diarrhea virus diagnostics[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2024, 23(8): 2872-2876.
- [25] 董铮, 赵振兴, 范奇璇, 等. 基于RPA-CRISPR/Cas12a的番茄花叶病毒可视化检测方法的建立[J]. 植物保护, 2024, 50(4): 235-241.
- DONG Z, ZHAO Z X, FAN Q X, et al. Establishment of RPA-CRISPR/Cas12a-based visual detection of *Tomato mosaic virus*[J]. Plant Protection, 2024, 50(4): 235-241.
- [26] 于晶雪, 韦珊珊, 覃绍敏, 等. 基于CRISPR/Cas12a-RT-RAA的猪繁殖与呼吸综合征病毒快速检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51(8): 3237-3246.
- YU J X, WEI S S, QIN S M, et al. Establishment of a rapid detection method for porcine reproductive and respiratory syndrome virus based on CRISPR/Cas12a-RT-RAA[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 51(8): 3237-3246.
- [27] QIAN W D, WANG X F, WANG T, et al. Development of RPA-Cas12a-fluorescence assay for rapid and reliable detection of human bocavirus 1[J]. Animal Models and Experimental Medicine, 2024, 7(2): 179-188.
- [28] WANG X, RAO Q, LU Z R, et al. Rapid and sensitive Cas13a/Cas12a-based one-pot dual-target strategy to detect monkeypox virus and its co-infected viruses[J]. Science Bulletin, 2023, 68(24): 3142-3148.
- [29] 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 Y B, LI L. Application of CRISPR/Cas systems in the rapid diagnosis of coronavirus disease 2019[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(3): 1-5.
- [30] GAYET R V, DE PUIG H, ENGLISH M A, et al. Creating CRISPR-responsive smart materials for diagnostics and programmable cargo release[J]. Nature Protocols, 2020, 15(9): 3030-3063.
- [31] 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.
- [32] LIU Y J, LIU H, YU G L, et al. One-tube RPA-CRISPR Cas12a/Cas13a rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Analytica Chimica Acta, 2023, 1278: 341757.
- [33] XU J H, BAI X R, ZHANG X L L, et al. Development and application of DETECTR-based rapid detection for pathogenic *Bacillus anthracis* [J]. Analytica Chimica Acta, 2023, 1247: 340891.
- [34] ZHANG W J, QU H, WU X, et al. Rapid, sensitive, and user-friendly detection of *Pseudomonas aeruginosa* using the RPA/CRISPR/Cas12a system[J]. BMC Infectious Diseases, 2024, 24(1): 458.
- [35] ZHU L S, LIANG Z D, XU Y T, et al. Ultrasensitive and rapid visual detection of *Escherichia coli* O157:H7 based on RAA-CRISPR/Cas12a system[J]. Biosensors, 2023, 13(6): 659.
- [36] JIA N, WANG C H, LIU X M, et al. A CRISPR-Cas12a-based platform for ultrasensitive rapid highly specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical application [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2023, 13: 1192134.
- [37] LIU J H, CHEN J H, WU D, et al. CRISPR-/Cas12a-mediated liposome-amplified strategy for the surface-enhanced raman scattering and naked-eye detection of nucleic acid and application to food authenticity screening[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(29): 10167-10174.
- [38] ZHUANG J W, ZHAO Z Y, LIAN K, et al. SERS-based CRISPR/Cas assay on microfluidic paper analytical devices for supersensitive detection of pathogenic bacteria in foods [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2022, 207: 114167.
- [39] JIA N, ZHOU J, XIAO F, et al. A CRISPR-Cas12a-based platform for ultrasensitive, rapid, and highly specific detection of *Mycoplasma pneumonia* in clinical application [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023, 11: 1022066.
- [40] CHEN J L, HUANG Y E, XIAO B, et al. Development of a RPA-CRISPR-Cas12a assay for rapid, simple, and sensitive detection of *Mycoplasma hominis* [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 842415.
- [41] LI S, WANG X C, YU Y H, 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.
- [42] HUANG F Q, LI X, ZHOU Y L, et al. Optimization of CRISPR/Cas12a detection assay and its application in the detection of *Echinococcus granulosus* [J]. Veterinary Parasitology, 2024, 331: 110276.
- [43] MAO Z F, WANG X J, CHEN R P, et al. Upconversion-mediated CRISPR-Cas12a biosensing for sensitive detection of ochratoxin A [J]. Talanta, 2022, 242: 123232.
- [44] WU Z H, SUN D W, PU H B. CRISPR/Cas12a and G-quadruplex DNAzyme-driven multimodal biosensor for visual detection of *Aflatoxin B1* [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2023, 302: 123121.
- [45] WANG B, WANG R, WANG D Q, et al. Cas12aVDet: A CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(19): 12156-12161.