DOI:10.12441/spyswjs.20250312003 [文章编号] 1673-1689(2026)02-0013-11

CRISPR/Cas系统在细菌性病原体检测中的研究进展

陈科羽[1] 薛俊欣[2] 钮 冰[1*]

(1. 上海大学生命科学学院,上海 200444; 2. 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心,上海 200135)

摘要:细菌性传染病长期以来对全球公共卫生构成严重挑战。传统的病原体检测方法虽已在临床应用中取得了一定成果,但存在灵敏度低、检测周期长等缺陷。CRISPR/Cas系统作为一种新型的基因编辑工具,凭借其高效、精确的特性被广泛应用于病原体检测领域。作者概述了CRISPR/Cas系统的技术原理及其优缺点,并综述了近年来利用CRISPR/Cas技术检测不同细菌属的研究进展,以期为细菌性病原体的检测提供参考。

关键词:CRISPR/Cas系统;细菌性病原体;快速诊断

Research Progress of CRISPR/Cas Systems in Detection of Bacterial Pathogens

CHEN Keyu[1] *XUE Junxin*[2] *NIU Bing*[1*]

(1. School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China; 2. Technical Centre for Animal, Plant and Food Inspection and Quarantine of Shanghai Customs, Shanghai 200135, China)

Abstract: Bacterial infectious diseases have long posed a serious challenge to global public health. Although conventional pathogen detection methods have made some achievements in clinical application, they still face the limitations of low sensitivity, long time consumption and so on. As new gene editing tools, CRISPR/Cas systems are widely used in pathogen detection because of the high efficiency and accuracy. The author summarized the technical principle, advantages, and disadvantages of CRISPR/Cas systems, and briefly reviewed the research progress of using CRISPR/Cas technology to detect different bacterial genera in recent years, aiming to provide reference for the detection of bacterial pathogens in the future.

Keywords: CRISPR/Cas system; bacterial pathogen; rapid diagnosis

细菌性传染病,如肺炎、结核和霍乱等,对全球公共卫生构成了严重威胁。这类疾病传播速度快、影响范围广,易引发严重的健康危机,同时带来沉重的社会经济负担。如近年来肠出血性大肠杆菌感染、细菌性痢疾等疾病的暴发,均对人类健康造成了巨大威胁[1]。为防控由细菌引起的此类传染病,开发快速准确的细菌性病原体检测技术显得尤为重要。

目前,临床上常用的细菌性病原体检测方法主要包括微生物培养法、免疫学检测、基于核酸的分子生物学技术等。这些方法虽具有较高的特异性和准确性,但仍存在一定的局限性。微生物培养法虽被视为病原体识别与检测的金标准,但其检测过程耗时数天至数周、依赖表型及生化表征,且需要熟练的操作人员,极大地限制了其在快速诊断中的应用[2]。免疫学检测可识别特定细菌的循环抗体,但在急性感染阶段,患者可能尚未产生相应抗体,还可能与无关抗体(如免疫球蛋白M)发生交叉反应,进而导致假阴性结果[3]。近二十年来,基于特定细菌核苷酸序列设计的扩增与检测诊断技术发展迅猛。多数核酸扩增技术以聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)为核

基金项目:国家"十四五"重点研发计划项目(2022YFD1800705)。

通信作者:钮冰(1977—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事生物信息和机器学习交叉领域的研究。E-mail: bingniu@shu.edu.cn

收稿日期:2025-03-12 **修回日期:**2025-05-09

心，凭借其出色的灵敏度与特异性，在病原体检测中展现出较大优势。然而，这类技术对高端仪器和昂贵试剂的依赖严重制约了其在资源匮乏环境中的应用[4]，难以满足现场快速检测的需求[5]。

面对这些挑战，簇状规则间隔短回文重复序列（clustered regularly interspaced short palindromic repeats，CRISPR）及其关联蛋白（CRISPR-associated protein，Cas）组成的CRISPR/Cas系统，作为一种新兴的基因编辑工具，凭借其高特异性和高灵敏度被广泛应用于病原体检测领域[6]。例如，基于CRISPR/Cas系统的生物传感技术可实现对不同基因靶点的快速、精准检测，灵敏度可达1×10^{-3} fmol/L，且能在多种介质中高效稳定运行[7]。此外，CRISPR/Cas系统与核酸恒温扩增技术（如SHERLOCK和DETECTR等新型核酸检测工具）结合，不仅提升了检测性能，更激发了其在现场检测中的应用潜力[8]。因此，CRISPR/Cas系统有望成为下一代病原体检测技术的核心力量，为防控传染病提供更有效的解决方案。

因此，作者综述了近年来CRISPR/Cas系统在细菌性病原体快速检测的研究进展，旨在为CRISPR/Cas快速诊断技术的进一步发展提供参考。

1 CRISPR/Cas系统及其分类

CRISPR/Cas系统最初是细菌和古菌的适应性免疫系统，可通过识别并切割外来DNA保护宿主免受病毒侵袭[9]。该系统已被广泛应用于基因组编辑、转录调控及分子诊断等领域，其核心是通过CRISPR RNA（crRNA）的引导实现对目标DNA或RNA的特异性识别和切割[10]。该系统中的CRISPR序列包含多个由间隔序列（spacers）和重复序列（repeats）组成的区域，当感染细菌或古菌后，可记录外源DNA片段并形成记忆库；而Cas则通过RNA引导、识别并切割特定的外源DNA或RNA，从而发挥免疫防御作用[11]。

1.1 CRISPR/Cas系统的分类

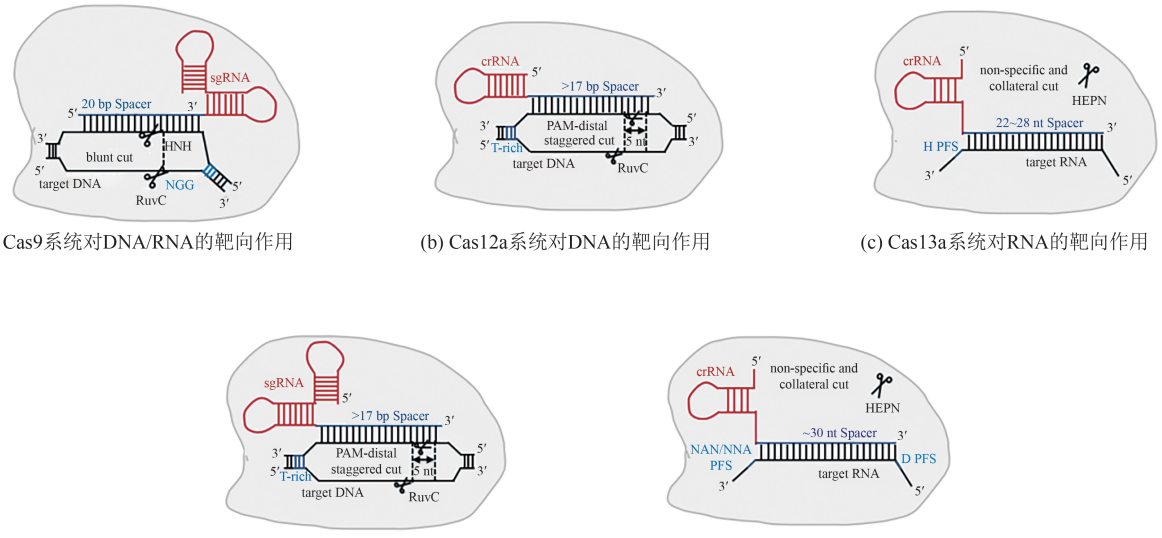
根据Cas效应蛋白质的结构与功能特点，CRISPR/Cas系统可以分为两大类：第一类是基于多Cas效应蛋白质复合体构建的系统，其中各蛋白质组分在CRISPR机制中独立执行一项特定功能；第二类是以单一Cas效应蛋白质为核心的系统，此类系统中的每个蛋白质在CRISPR流程中均展现出多功能特性[12]。

第一类CRISPR/Cas系统是最早被识别的类型，其通过多个蛋白质亚基组成的复合物参与免疫反应，通常具有更为复杂的结构，并可根据Cas特性进一步细分为I型、III型和IV型系统。I型系统是最为常见的类型之一，包含多个子类型（I-A、I-B、I-C、I-D、I-E等），其核心是Cas3，该蛋白质具有DNA解旋酶活性，并参与外源DNA的切割。此外，I型系统的Csm-Cmr复合物能够识别并切割外源DNA或RNA，发挥抗病毒作用。III型系统与I型系统类似，同样具有多个蛋白质亚基，其Cas10通过与其他蛋白质形成复合物，协同识别并降解病毒RNA。近年的研究显示，III型系统在特定细菌中对RNA病毒具有较强的免疫防御作用；IV型系统是近年来才被发现的类型，其具体机制仍在探索之中，但已有研究证实，它与细菌的免疫反应密切相关。

第二类CRISPR/Cas系统包含单一效应蛋白质，这些蛋白质可独立完成外源DNA或RNA的识别与切割，简化了免疫反应过程，其中最具代表性的是II型、V型和VI型系统。II型系统以Cas9为核心，通过与引导RNA（gRNA）结合，特异性地切割DNA。近年来，Cas9的多样化使其在基因组编辑中的应用更加广泛。V型系统的核心蛋白质为Cas12，可识别并切割RNA，该系统主要用于RNA病毒的防御；V型系统具有强大的RNA干扰能力，是治疗RNA病毒的潜在工具。VI型系统是目前的研究热点，尤其在RNA编辑和病毒防御领域，其核心Cas13能够识别并切割RNA分子，不仅具备广泛的RNA干扰能力，还能发挥非特异性切割作用（即旁观效应）。这一特性使得VI型系统不仅能够有效防御RNA病毒，还在RNA编辑和检测方面具有应用潜力。

1.2 用于病原菌检测的CRISPR/Cas系统分类

传统的CRISPR分类方法主要是从生物学及系统本身的角度出发，研究者根据Cas效应蛋白质的靶标分子、切割机制和适用范围，进一步将应用于病原菌检测的CRISPR/Cas系统细分为Cas9、Cas12、Cas13和Cas14，不同CRISPR/Cas系统的工作原理见图1。



(a) Cas9系统对DNA/RNA的靶向作用　(b) Cas12a系统对DNA的靶向作用　(c) Cas13a系统对RNA的靶向作用

(d) Cas12b系统对DNA的靶向作用　(e) Cas13b系统对RNA的靶向作用

图 1　不同 CRISPR/Cas 系统的工作原理

Fig. 1　Working principles of different CRISPR/Cas systems

Cas9 属于II型 CRISPR/Cas 系统，是一种多域核酸酶，其作用机制是通过 crRNA 与 tracrRNA 形成复合体，引导 Cas9 结合至目标 DNA 序列并进行特异性切割[13]。其原间隔序列邻近基序（protospacer adjacent motif，PAM）为 3′ G-rich 序列，可介导平末端切割[14]。Cas9 系统凭借其高效的基因编辑能力，被广泛应用于基因组编辑研究中[15]。CRISPR/Cas9 技术已应用于细菌分型和基因组编辑领域，并在医学检验中展现出巨大应用潜力[16]。此外，Cas9 系统常与荧光传感器、电化学传感器等生物传感器结合，用于开发新型的高通量多通道检测技术，以提高检测的灵敏度和准确性[17]，但其对 G-rich PAM 序列（如 NGG）的依赖性限制了靶标的选择范围，且切割后产生的平末端可能影响后续信号放大效率。

Cas12 属于 V 型 CRISPR/Cas 系统，可切割双链 DNA（dsDNA）和单链 DNA（ssDNA），具有 T-rich PAM 模式，且能介导黏性末端切割[14]。Cas12a 是其中重要的亚型，单个 crRNA 即可发挥作用，而 Cas12b 则需 tracrRNA 与 crRNA 协同作用[18]。Cas12 系统因其独特的反式切割活性备受关注，该活性使 Cas12 在识别目标 DNA 后激活其附属的 ssDNA 切割活性，进而实现对 ssDNA 的广泛降解[19]。这一特性使得 Cas12 系统在核酸检测中具有极高的灵敏度和特异性，适用于多种病原体的快速检测[20]。例如，基于 Cas12 系统的 HOLMES 系统，利用其旁路切割能力实现了低成本、高效率的 DNA 检测[1]。此外，Cas12 系统还被用于开发 SHERLOCK 和 DETECTR 等新型核酸检测工具，这些检测工具在传染性疾病的快速诊断中具有重要的应用价值[21]。

Cas13 属于 VI 型 CRISPR/Cas 系统，是一种核糖核酸酶，专门作用于单链 RNA（ssRNA），具有非鸟嘌呤 PAM 模式，可产生近尿嘧啶切割模式[14]。Cas13 系统通过 crRNA 引导识别目标 RNA，结合目标 RNA 后激活自身附属的 RNA 切割活性，从而实现对 RNA 的高效降解[22]。这一特性使得 Cas13 系统在核酸检测中具有极高的灵敏度和特异性，适用于病毒检测、基因分型等领域[23]。例如，CARMEN 微阵列芯片系统和 ERASE 系统利用 Cas13a，可高效、快速地检测新型冠状病毒[1]；CRISPR-Cas13a/SHERLOCK 平台能够检测寨卡病毒和登革病毒，并可区分致病细菌[24]。此外，Cas13 系统也被用于开发低成本、快速的核酸检测平台，但由于 RNA 易降解，需结合恒温扩增技术以确保检测的稳定性。如 SHERLOCKv1 和 SHERLOCKv2 技术，通过结合 RPA 和 T7 RNA 聚合酶实现了对目标 RNA 的高灵敏度检测[8]，其原理见图 2。

Cas14 是一种新型的 CRISPR 相关蛋白质，属于 V 型 CRISPR/Cas 系统，与 Cas12 类似，但可实现无 PAM 特异性切割 ssDNA[18]。其独特的结构使

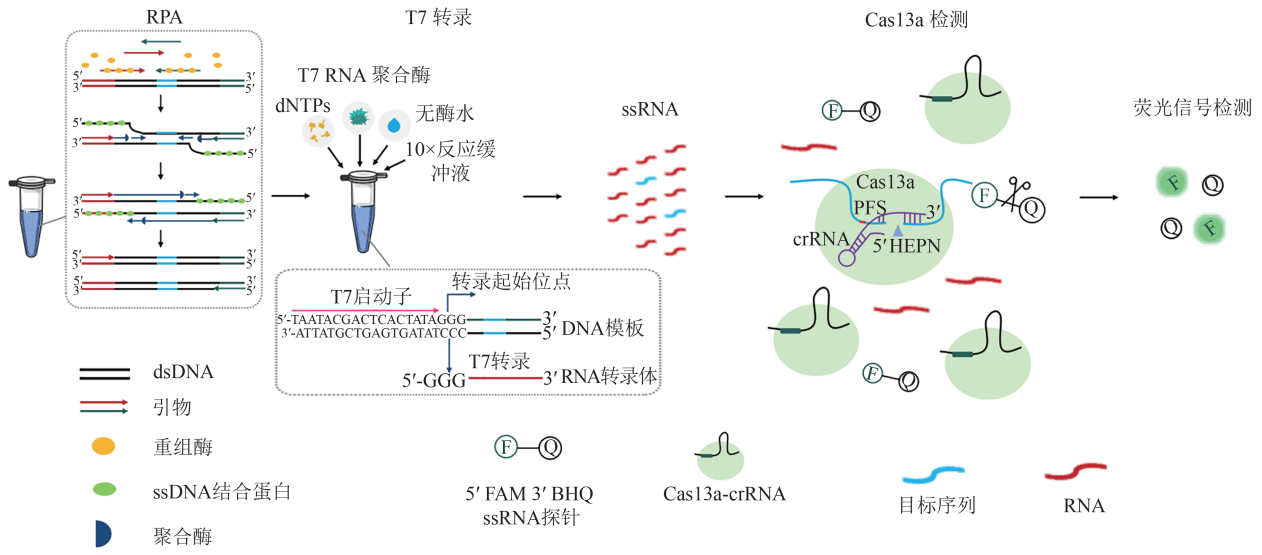


图 2　RPA-CRISPR/Cas13a 检测方法示意图

Fig. 2　Schematic diagram of RPA-CRISPR/Cas13a detection method

其能够在不同应用场景下实现高效的核酸检测。例如，Cas14 系统被用于开发高通量多通道检测平台，通过结合核酸扩增与信号放大技术，实现对病原体的快速、灵敏检测[25]。

综上，Cas12 和 Cas13 系统凭借其反式切割特性，在病原菌检测中表现最优，检测限可达单分子级别；Cas9 和 Cas14 系统通过严格的 PAM 识别或序列互补保障了检测的高特异性；而 Cas13 系统的非特异性切割可能增加假阳性风险，同时需通过 crRNA 设计降低脱靶风险。在适用场景方面，Cas12 和 Cas13 系统适合现场快速检测，Cas14 系统在多重靶标检测中展现出明显潜力，而 Cas9 系统则更适用于实验室精准分型。

2　CRISPR/Cas 系统在细菌性病原体检测中的应用

2.1　CRISPR/Cas 系统在葡萄球菌属检测中的应用

葡萄球菌属（*Staphylococcus* spp.）是一类常见的革兰氏阳性菌，通常以成对或成簇的形式存在。大多数葡萄球菌属细菌对盐的耐受性较强，能够在盐浓度较高的环境中生长，这一特性使其可以在皮肤和黏膜等部位定植。金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*，*S. aureus*）能够产生一系列毒力因子并形成生物膜，对大多数抗生素具有耐药性，且环境适应能力不断增强，已成为全球公共卫生领域的重大挑战[26]。葡萄球菌属可引发从皮肤感染到败血症、肺炎等严重的全身性感染。因此，快速准确地检测葡萄球菌属是预防和治疗感染的关键。

相较于传统荧光定量 PCR（检测限约为 1×10^3 CFU/mL），CRISPR/Cas13a 系统与化学发光共振能量转移（CRET）联用技术[27]实现了检测性能的跃升。该技术分别以氧化铝和金纳米颗粒（AuNPs）作为供体和受体，当 Cas13a 识别金黄色葡萄球菌的 cRNA 并触发 RNA 切割时，化学发光信号增强，使饮用水和牛奶样本的检测限分别降至 20 CFU/mL 和 30 CFU/mL。该技术通过与免疫层析试纸条（ICTS）及智能手机成像技术相结合，实现了 2 h 现场快速检测，且检测限低至 100 CFU/mL。这种方式虽然能提高信号强度，但化学发光底物的稳定性不足与背景信号干扰，可能限制了检测限的进一步降低。同时，RNA 在细胞内环境中的稳定性较差，易发生降解，而 DNA 的稳定性更高，以目标 DNA 作为检测对象能够更好地保持核酸完整性，从而提高检测的灵敏度和准确性。为突破对核酸扩增技术的依赖，付旭冉[28]通过对比 AsCas12a 和 LbCas12a 的反式切割速率，结合重组酶聚合酶扩增（RPA）技术建立了 *S. aureus* 的检测体系，发现 AsCas12a 的检测效果更佳，检测限为 100 CFU/mL。后续该研究团队基于 AuNPs 的金属增强荧光（MEF）效应，构建了一种无需扩增的荧光增强型生物传感方法。经比例优化后的

AuNC-AuNP纳米探针猝灭效果好、背景信号低，在350 μL反应体系中可将检测时间缩短至30~40 min，实现3.7 fmol/L的超灵敏检测，同时避免了核酸扩增导致的交叉污染问题，在牛奶样本中展现出良好的回收率与定量能力。这一技术将Cas12a的反式切割活性与纳米材料光学特性深度耦合，为检测性能的全面提升提供了有力支撑。

在临床应用方面，Xu等[29]针对脑脊液中*S. aureus*的快速检测需求，设计开发了一体化CRISPR快速检测试剂盒，通过整合核酸扩增与Cas12a反应体系，可在30 min内完成样本检测，灵敏度达到单分子水平。该技术利用特定的寡核苷酸实现反应流程微缩化，将检测周期从传统培养法的数天压缩至30 min，为脓毒症等急重症的快速诊断提供了关键技术支撑。CRISPR系统正通过多学科交叉不断拓展检测范围，未来仍需着力解决多靶标同步检测、复杂基质抗干扰等难题，推动检测技术向更多场景深度渗透。

2.2 CRISPR/Cas系统在埃希氏菌属检测中的应用

埃希氏菌属（*Escherichia* spp.）是革兰氏阴性菌，主要栖息于肠道中，常单独或成对存在，具有运动性，通常具有鞭毛。该属中部分种类，尤其是大肠埃希氏菌（*Escherichia coli*，*E. coli*），是临床上常见的致病菌，可引起腹泻、肠道感染、败血症等疾病。同时，*E. coli*还被视为食品安全中的重要致病因子，尤其是某些毒力株如*E. coli* O157：H7，可通过分泌志贺毒素引发严重的胃肠道疾病。因此，建立快速、灵敏且特异性强的*E. coli*检测方法，对于公共卫生监控和疾病防控具有重要意义。近年来，CRISPR/Cas系统在埃希氏菌属检测中展现出了极高的灵敏度和特异性，为该类病原菌的快速检测提供了新路径。

针对*E. coli* O157：H7的检测，CRISPR/Cas12a与等温扩增技术联用已成为主流策略。在RAA-CRISPR联用方面，Zhu等[30]结合重组酶辅助扩增（RAA）技术和CRISPR/Cas12a技术，研发出一种可通过手持紫外线灯或横向流条实现信息可视化的检测方法。传统实时PCR技术和酶联免疫吸附测定（ELISA）的检测限分别为1×10^3 CFU/mL和1×10^4~1×10^7 CFU/mL，而该方法可在55 min内检测到浓度低至约1 CFU/mL（荧光法）和100 CFU/mL（侧流层析法）的*E. coli*，检测限降低了约1 000倍，且检测速度远优于传感器。

为优化检测灵敏度，通过优化RPA-CRISPR/Cas12a双模式检测平台反应体系[31]，采用荧光法可在40 min内检测到2.4 CFU/mL的*E. coli*；另一模式的侧流层析法虽然灵敏度可降至240 CFU/mL，但45 min的全流程检测速度仍显著优于常规培养法。针对食品基质干扰难题，Lee等[32]研发了一种基于环介导等温扩增（LAMP）和CRISPR/Cas12a系统的*E. coli* O157：H7快速检测方法。该方法可有效解决LAMP技术常见的假阳性问题，对纯培养物的检测限达1.22 CFU/mL，而实时荧光定量PCR的检测限为12.20 CFU/mL，LAMP-CRISPR/Cas12a系统的灵敏度较实时荧光定量PCR提高了10倍。在生菜样本中，通过过滤富集处理，*E. coli* O157：H7的检测限从60.00 CFU/g降至4.80 CFU/g。LAMP技术的等温扩增特性，使其能在较短时间内完成目标DNA的指数级扩增，进而提高检测信号强度，增强检测的可靠性。

因此，单一的CRISPR技术已无法满足当前的检测需求，将CRISPR技术与等温扩增技术相结合，已成为提升检测性能的重要途径。该策略不仅能有效处理复杂样本、弥补CRISPR技术自身的灵敏度局限，还能借助CRISPR的特异性切割能力消除非靶标干扰，在保障检测精度的同时，可在资源有限的环境中快速、简便地检测目标菌，为埃希氏菌属的高效检测提供了可靠方案。

2.3 CRISPR/Cas系统在沙门氏菌属检测中的应用

沙门氏菌属（*Salmonella* spp.）是革兰氏阴性菌，广泛存在于动物体内，尤其常见于鸟类和哺乳动物中。该菌具备鞭毛及运动性，可在肠道内高效移动，是引发食源性疾病的主要致病菌，感染后会导致腹泻、发热等症状。其感染通常与未煮熟的肉类、蛋类等食品密切相关，因此，沙门氏菌的快速检测对疾病防控至关重要。Zhang等[33]利用实时荧光重组酶扩增检测系统，研发了一种典型的沙门氏菌病原体检测方法，其检测限约为5 fg/μL质粒DNA。Zheng等[34]开发的基于多孔金@铂纳米催化剂的敏感光学生物传感器，结合被动三维微混合器，虽能检测到17 CFU/mL的鼠伤寒沙门菌，但该方法并不适用于现场快速检测。

因此，近年来CRISPR/Cas系统凭借其快速、灵敏、特异性强的特点，成为沙门氏菌检测领域的

新兴技术。针对传统PCR-侧流层析技术因引物二聚体导致假阳性的难题，Wang等[35]将CRISPR/Cas9与侧流层析相结合，利用Cas9/sgRNA复合物对目标扩增子进行特异性结合，仅在目标扩增子存在时，试纸条的测试线上才会出现颜色变化，从而有效避免了引物二聚体引起的假阳性问题，提高了检测的准确性。该系统可在100 min内完成从样本处理到结果判读的全流程，通过荧光标记的DNA产物与AuNPs形成可见的颜色变化，能够检测到低至100 CFU/mL的沙门氏菌，且检测结果与传统PCR方法高度一致。为进一步提高检测速度和灵敏度，基于RPA-CRISPR/Cas13a的沙门氏菌单管和两步反应系统[36]应运而生。其中，单管RPA-Cas13a方法可以在20 min内实现166.1 nmol/L的检测限，与qPCR检测限相当；两步RPA-Cas13a方法的总检测时间在45 min内，虽速度相对较慢，但可检测到单个沙门氏菌，灵敏度优于单管法和实时荧光定量PCR法。因此，单管法操作简便快捷、检测时间短，适合于现场快速筛查和资源有限的环境，在样本中沙门氏菌浓度相对较高时，可快速获得准确结果；两步法虽操作复杂、耗时较长，但能检测到更低浓度的沙门氏菌，适用于对检测灵敏度要求较高的场景（如科研试验、食品安全检测中的低丰度样本检测等），可更准确地评估样本中的沙门氏菌污染情况，降低漏检概率。

在特异性与灵敏度协同优化层面，Lee等[37]结合LAMP技术与CRISPR/Cas12a系统，开发出一种侧流层析生物传感器（LFB）。该研究选择不与LAMP引物重叠的21个碱基对的PAM位点，进一步优化crRNA，利用Cas12a切割带有生物素和荧光素标记的ssDNA探针，结合侧流层析试纸条显色，有效规避了LAMP扩增过程中常见的假阳性问题。该检测平台在纯培养物和人工污染食品中的检测限分别为1.22 CFU/mL和1.00~100.00 CFU/g，灵敏度比实时荧光定量PCR低100倍；通过将反应体积微缩化与可视化判读相结合，兼顾了实验室精准分析与现场快速检测的双重需求。

2.4 CRISPR/Cas系统在李斯特菌属检测中的应用

李斯特菌属（*Listeria* spp.）是革兰氏阴性菌，广泛分布于自然环境中，能够在多种食物中生长繁殖。在该菌属中，单核细胞增生李斯特菌（*Listeria monocytogenes*）是主要的致病菌，尤其对免疫功能低下者、孕妇及新生儿危害较大。该菌为人畜共患病原体，人畜感染后主要出现呼吸困难、呕吐等症状，临床死亡率极高。因此，李斯特菌属的早期检测对食品安全及公共卫生具有重要意义[38]。

在应对李斯特菌快速检测的需求中，基于CRISPR系统的技术逐步突破了传统方法的效率瓶颈。Meile等[39]利用合成生物学，通过CRISPR/Cas辅助的噬菌体工程技术，将纳米荧光素酶（*NLuc*）基因插入A511、A006和A500噬菌体基因组中。这些噬菌体携带*NLuc*基因后，可在感染李斯特菌后的24 h内产生生物发光信号，实现1 CFU/g的超灵敏检测，且能区分不同血清型，较EN ISO 11290-1—2017标准中所需的96 h检测周期，检测效率得到显著提升。为进一步缩短检测时间，Yang等[40]开发了一种基于RAA和CRISPR/Cas12a的荧光检测平台，用于高灵敏度检测李斯特菌的核酸。该技术通过RAA技术扩增李斯特菌的特定基因片段（如*hly*基因），再利用Cas12a的顺式切割激活荧光信号，实现可视化检测，检测限低至350 CFU/mL；同时，该方法可在2 h内完成牛肉样本中李斯特菌的检测，检测结果与国家标准方法的检测结果一致，适用于现场快速检测浓度较高的样本。

针对高通量检测场景的短板，Xiang等[41]结合RAA技术和CRISPR/Cas13a系统，开发了一种高通量微流控芯片平台（hMC-CRISPR）。该平台将反应体积压缩至5 μL，可在芯片上同步完成核酸扩增、Cas13a介导的荧光信号释放及自动化数据读取。传统qPCR方法对李斯特菌属的检测限为262 amol/L，其中对单核细胞增生李斯特菌（*Listeria monocytogenes*）、英诺克李斯特菌（*Listeria innocua*）和伊氏李斯特菌（*Listeria ivanovii*）的检测限分别为163.0、12.1、72.1 amol/L；而hMC-CRISPR平台对上述3种菌株的检测限分别为0.40、0.74、0.56 amol/L，较传统qPCR提升了数百倍。该平台独特的设计通过控制转录过程协调扩增与切割效率，既避免了气溶胶污染，又可单次检测8个样本，在保持超低检测限的同时，兼顾了检测通量与试剂经济性。

2.5 CRISPR/Cas系统在分枝杆菌属检测中的应用

分枝杆菌属（*Mycobacterium* spp.）是革兰氏阳性菌，通常呈杆状，具有抗酸染色阳性特征，包括结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）和非结核分枝杆菌（Nontuberculous *Mycobacteria*）[42]。结核分枝杆菌是引起肺结核的主要病原体，而非结核分枝杆菌通常引发慢性感染，尤其在免疫功能受损人群中较为常见[43]。因此，快速、准确地检测分枝杆菌属，尤其是结核分枝杆菌，对于疾病的早期诊断和治疗具有重要意义。

为提高结核病检测的精确性与效率，基于CRISPR系统的新型检测技术通过多维度创新实现了突破性进展。针对现有检测方法中碱基错配导致的假阴性和假阳性问题，Huang等[44]开发的多通道系列压电石英晶体（MSPQC）核酸传感器，结合CRISPR/Cas9系统与银染色技术，将dsDNA转化为导电银线以放大压电信号，使检测限低至30 CFU/mL，检测时间缩短至2.3 h；同时，该传感器可在PAM序列附近10个碱基内区分单碱基错配，显著提升了检测特异性。在此基础上，全基因组测定技术WATSON[45]采用平铺式核酸检测策略，结合CRISPR/Cas13系统与侧流层析技术，实现了血浆中结核分枝杆菌无细胞DNA（cfDNA）的检测。该技术的检测限达2.5~25.0 ag/μL，灵敏度较传统单靶标检测提升了10~100倍；其多区域基因组覆盖设计大幅提高了对活动性肺结核的早期识别能力，适用于资源匮乏地区的即时检测。

Huang等[46]聚焦于提升结核病诊断的特异性与灵敏度，开发了CRISPR-TB技术。该技术利用Cas12a gRNA复合体激活非特异性核酸酶活性，可检测出血液中低至99.7 pmol/L的结核分枝杆菌cfDNA，灵敏度显著优于常规PCR方法（415.0 pmol/L）。该技术不仅提高了检测灵敏度和特异性，还能在治疗过程中快速监测cfDNA浓度变化，2 h内即可完成从样本处理到结果判读的全流程检测，为HIV感染儿童等特殊人群提供了高效的诊断工具。与此同时，Wu等[47]利用CRISPR/Cas14系统研发了结核分枝杆菌检测试剂盒，通过特异性crRNA和sgRNA的协同作用，实现了对结核分枝杆菌复合群的超灵敏检测，检测限低至99.7 pmol/L，检测时间<2 h。该试剂盒不仅在检测限上表现优异，还在药物筛选和疗效评估方面展现出更广阔的应用前景。这些技术的协同发展标志着结核病诊断已从单一靶标检测向多维度、全流程检测转型，为结核病的精准诊疗提供了技术支撑。

2.6 CRISPR/Cas系统在链球菌属检测中的应用

链球菌属（*Streptococcus* spp.）是革兰氏阳性菌，通常呈链状排列。其中，肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）是链球菌属中的重要病原体，对青霉素的敏感性较高[48]。链球菌属的检测对于明确感染源、预防感染传播至关重要。传统检测方法主要包括血清学鉴定、病原菌培养和PCR检测，这些方法虽然已广泛应用于临床诊断中，但存在检测周期长的局限，其中血清学鉴定需耗时数天，病原菌培养通常需要24~48 h甚至更长时间。

近年来，基于CRISPR-Cas系统的分子诊断技术呈现多元化发展态势，研究者通过技术整合策略，满足差异化的检测需求。免抽提一步法CRISPR辅助检测技术（extraction-free one-step CRISPR-assistant detection）[49]通过整合LAMP与CRISPR/Cas12b技术，实现“样本进—结果出”的闭环流程，可在1.5 h内完成痰液样本快速预处理和实时荧光读取，进而实现肺炎链球菌的快速检测。该平台在临床验证中展现出92.9%的灵敏度和100.0%的特异性，检测限为28.2 zmol/L，略高于实验室标准，但具有操作简便、免核酸提取的优势，且可在蓝光下肉眼判读结果，为肺炎链球菌的居家筛查提供了可能。

针对实验室环境的高灵敏度需求，Li等[50]研制了一种集成微流控芯片和RPA-T7-Cas13a系统的自动化核酸检测平台。该平台通过旋转阀辅助完成样品预处理与核酸提取，采用RPA-T7-Cas13a单室反应系统检测B组链球菌（GBS）DNA，将检测限降至0.89 amol/L，较传统PCR技术提升了6倍，准确率达100%；同时，可在30 min内自动完成从核酸提取到微流控芯片荧光图像分析的全过程，实现检测结果的可视化。但该平台的设备成本较高、结构相对复杂，更适用于实验室开展高精度、高通量检测，因此，研发更便携的设备以满足现场快速检测需求仍需进一步探索。Cheng等[51]研发的RPA-CRISPR/Cas12a侧流层析技术展现出独特优势，该技术基于AuNPs聚集产生颜色变化，结合

LFB 试纸条，实现了化脓性链球菌（*Streptococcus pyogenes*）的快速检测。其中，侧流法的检测限为 16.60 amol/L，荧光法的检测限达 1.66 amol/L，展现出极高的灵敏度；整个检测过程仅需约 10 min 的样本处理、10 min 的 RPA 扩增、10 min 的 Cas12 反应和 3 min 的 LFB 结果输出，无需额外放大即可在 33 min 内肉眼观察到结果，适用于现场快速检测和资源有限地区使用。

综上，家庭自测试剂侧重操作便捷性，微流控系统强化了自动化与检测灵敏度，而侧流层析法则在检测成本与时效性之间实现了平衡。未来需突破设备微型化和多重检测能力两大核心难题，推动链球菌属分子诊断技术向普惠化、智能化方向发展。

3 展望

CRISPR/Cas 系统作为一种新型基因编辑和检测技术，凭借其高效、精确的切割能力，不仅简化了病原体检测流程，还显著提升了检测的灵敏度和特异性。本文深入探讨了 CRISPR/Cas 系统在细菌性病原体检测中的应用，该系统的高特异性与高灵敏度使得其在低丰度病原体检测中表现突出，对疾病的早期诊断和及时治疗至关重要，尤其在传染病防控领域具有重要意义。然而，CRISPR/Cas 系统存在非特异性结合的问题，可能导致假阳性结果，对临床诊断而言是一大挑战。因此，优化 CRISPR/Cas 系统的特异性、减少非特异性结合，是未来该领域的研究重点，这不仅能提高检测准确性，还能增强该技术在复杂样本中的适用性。

在研究单一 CRISPR/Cas 技术的同时，多技术融合的潜力也日益凸显。CRISPR/Cas 系统与其他核酸扩增技术（如重组酶辅助扩增和 LAMP 等）的结合，展现出强大的协同效应。这种技术融合不仅提高了检测的灵敏度，还大幅缩短了检测时间，对于需要快速响应的公共卫生事件而言至关重要。此外，人工智能技术的兴起还可从多个维度提升 CRISPR 检测系统的性能。在 crRNA 设计优化方面，机器学习可预测靶标序列的二级结构、PAM 兼容性及脱靶风险等，进而设计出高特异性 crRNA，减少非靶标结合引发的假阳性问题[52]；同时，利用人工智能技术进行数据解析可显著提升检测效率，通过训练卷积神经网络识别荧光信号、侧流层析试纸条颜色变化或微流控芯片图像，能够实现检测结果的自动化、标准化分析，降低人为误判风险。

CRISPR/Cas 系统在实现现场快速检测方面具有巨大潜力。随着便携式设备与微流控技术的不断发展，CRISPR/Cas 系统可被集成到便携式检测设备中，实现在资源匮乏环境中的快速检测。例如，通过试剂冻干技术与常温稳定酶的开发，可减少对冷链运输的依赖，延长试剂保存期。其次，微型化设备与智能手机集成是实现现场检测的关键。基于纸基微流控芯片的 CRISPR 检测装置，结合手机摄像头与图像分析 APP，可实现“样本进—结果出”的一体化检测。这种现场检测能力对于控制传染病的传播、提高全球公共卫生水平至关重要，尤其在偏远地区或紧急情况（如自然灾害或疫情暴发）下，快速准确的现场检测能够显著提高应急响应速度与处置效率。

综上所述，CRISPR/Cas 系统在细菌性病原体检测中的优势与挑战并存，但随着多技术融合与现场快速检测的持续发展，这些挑战有望被逐步克服。随着技术的不断进步与创新发展，CRISPR/Cas 系统将在未来的病原体检测中发挥更加关键的作用，为全球公共卫生安全贡献重要力量。

参考文献

[1] WU Y F. Application of CRISPR-Cas in pathogen detection [J]. Highlights in Science, Engineering and Technology, 2023, 45: 239-244.

[2] KOOTALLUR B, THANGAVELU C, MANI M. Bacterial identification in the diagnostic laboratory: how much is enough? [J]. Indian Journal of Medical Microbiology, 2011, 29(4): 336-340.

[3] BURSLE E, ROBSON J. Non-culture methods for detecting infection [J]. Australian Prescriber, 2016, 39(5): 171-175.

[4] CALIENDO A M, GILBERT D N, GINOCCHIO C C, et al. Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases[J]. Clinical Infectious Diseases, 2013, 57(Suppl. 3): S139-S170.

[5] KOSACK C S, PAGE A L, KLATSER P R. A guide to aid the selection of diagnostic tests[J]. Bulletin of the World Health Organization, 2017, 95(9): 639-645.

[6] 潘兴，林永红，杨柳，等. CRISPR/Cas系统在感染性疾病诊断中的应用进展[J]. 国际检验医学杂志，2023，44（20）：2542-2548.
PAN X，LIN Y H，YANG L，et al. Advances in the application of CRISPR/Cas systems in the diagnosis of infectious diseases[J]. International Journal of Laboratory Medicine，2023，44（20）：2542-2548.（in Chinese）

[7] 徐文娟，宋丹，陈丹，等. 基于CRISPR/Cas生物传感原理的病原菌检测技术研究进展[J]. 中国生物工程杂志，2021，41（8）：67-74.
XU W J，SONG D，CHEN D，et al. Research progress of pathogen detection technologies based on CRISPR/Cas biosensor[J]. China Biotechnology，2021，41（8）：67-74.（in Chinese）

[8] 李红招，王浩，尹睿，等. 基于CRISPR/Cas系统的病原核酸检测技术研究进展[J]. 浙江大学学报（农业与生命科学版），2023，49（5）：618-632.
LI H Z，WANG H，YIN R，et al. Research advances on pathogenic nucleic acid detection technology based on CRIPSR/Cas system[J]. Journal of Zhejiang University（Agriculture & Life Sciences），2023，49（5）：618-632.（in Chinese）

[9] ZHANG Q，RHO M，TANG H X，et al. CRISPR-Cas systems target a diverse collection of invasive mobile genetic elements in human microbiomes[J]. Genome Biology，2013，14（4）：R40.

[10] JIANG F G，DOUDNA J A. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms[J]. Annual Review of Biophysics，2017，46：505-529.

[11] MOJICA F J M，DÍEZ-VILLASEÑOR C，GARCÍA-MARTÍNEZ J，et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements[J]. Journal of Molecular Evolution，2005，60（2）：174-182.

[12] LI Y，LI S Y，WANG J，et al. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing[J]. Trends in Biotechnology，2019，37（7）：730-743.

[13] 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.（in Chinese）

[14] KWON S，SHIN H Y. Advanced CRISPR-Cas effector enzyme-based diagnostics for infectious diseases，including COVID-19[J]. Life，2021，11（12）：1356.

[15] 高哲，张荣荣，贾天军. CRISPR/Cas9系统在传染病诊疗中的应用进展[J]. 中国免疫学杂志，2022，38（9）：1150-1154.
GAO Z，ZHANG R R，JIA T J. Advances in application of CRISPR/Cas9 system in diagnosis and treatment of infectious diseases[J]. Chinese Journal of Immunology，2022，38（9）：1150-1154.（in Chinese）

[16] 印晓静，胡嘉波，韩崇旭，等. CRISPR/Cas9在医学检验中的研究进展及应用[J]. 中华检验医学杂志，2019，42（5）：381-385.
YIN X J，HU J B，HAN C X，et al. The technical development and application prospects of CRISPR/Cas9 in laboratory medicine[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine，2019，42（5）：381-385.（in Chinese）

[17] 梁锐敏，邹盈盈，邱烨. CRISPR/Cas：可应用于病毒检测和抗病毒治疗的前沿技术[J]. 激光生物学报，2023，32（6）：502-516.
LIANG R M，ZOU Y Y，QIU Y. CRISPR/Cas：promising technology for virus detection and antiviral therapy[J]. Acta Laser Biology Sinica，2023，32（6）：502-516.（in Chinese）

[18] GOSAVI G，YAN F，REN B，et al. Applications of CRISPR technology in studying plant-pathogen interactions：overview and perspective[J]. Phytopathology Research，2020，2（1）：21.

[19] 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.

[20] 陈欢，王宇，黄钰，等. 基于CRISPR/Cas系统的病原微生物检测体系构建研究进展[J]. 微生物学报，2022，62（9）：3271-3288.
CHEN H，WANG Y，HUANG Y，et al. Research progress in construction of pathogenic microorganism detection system based on CRISPR/Cas system[J]. Acta Microbiologica Sinica，2022，62（9）：3271-3288.（in Chinese）

[21] 谷小妤，汪桂华，鞠少卿，等. 基于CRISPR/Cas系统诊断平台的研究进展[J]. 中华检验医学杂志，2020，43（1）：96-100.
GU X Y，WANG G H，JU S Q，et al. Research progress of diagnosis platforms based on CRISPR/Cas system[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine，2020，43（1）：96-100.（in Chinese）

[22] BAYOUMI M，MUNIR M. Potential use of CRISPR/Cas13 machinery in understanding virus-host interaction[J]. Frontiers in Microbiology，2021，12：743580.

[23] 李青松，赵聪平，刘静，等. CRISPR-Cas13a系统在病原体检测应用中的最新研究进展[J]. 现代检验医学杂

志，2024，39(3)：199-204.
LI Q S，ZHAO C P，LIU J，et al. Recent advances in the application of CRISPR-Cas13a systems in pathogen detection[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine，2024，39(3)：199-204.(in Chinese)

[24] 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.

[25] 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.(in Chinese)

[26] 杨洋洋，徐云凤，郭卫平，等. 一株产细菌素乳酸菌的筛选鉴定及对金黄色葡萄球菌的抑菌作用[J]. 食品与机械，2024，40(11)：35-40.
YANG Y Y，XU Y F，GUO W P，et al. Screening and identification of a bacteriocin-producing lactic acid bacterium and its antibacterial effect on *Staphylococcus aureus*[J]. Food & Machinery，2024，40(11)：35-40.(in Chinese)

[27] TAO X Q，YUE L，TIAN T，et al. Sensitive and on-site detection of *Staphylococcus aureus* based on CRISPR/Cas13a-assisted chemiluminescence resonance energy transfer[J]. Analytical Chemistry，2024，96(22)：9270-9277.

[28] 付旭冉. 基于核酸酶Cas12a新型生物传感方法的构建及其在食源性致病菌检测中的应用[D]. 无锡：江南大学，2022.

[29] XU X，LI B，ZHANG L，LIU J. Kit for detecting staphylococcus aureus，comprises aptamer comprising specific nucleotide sequence and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 12a (Cas12a) reaction system，where reagent in reaction system comprises CRISPR RNA：CN117368171A[P]. 2024-01-09.

[30] 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.

[31] LUO J W，XU D H，WANG J B，et al. A dual-mode platform for the rapid detection of *Escherichia coli* O157：H7 based on CRISPR/Cas12a and RPA[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry，2024，416(15)：3509-3518.

[32] LEE S Y，OH S W. Filtration-based LAMP-CRISPR/Cas12a system for the rapid，sensitive and visualized detection of *Escherichia coli* O157：H7[J]. Talanta，2022，241：123186.

[33] ZHANG X P，GUO L C，MA R R，et al. Rapid detection of *Salmonella* with recombinase aided amplification[J]. Journal of Microbiological Methods，2017，139：202-204.

[34] ZHENG L Y，CAI G Z，QI W Z，et al. Optical biosensor for rapid detection of *Salmonella typhimurium* based on porous Gold@Platinum nanocatalysts and a 3D fluidic chip[J]. ACS Sensors，2020，5(1)：65-72.

[35] WANG H Y，WU Q，ZHOU M Y，et al. Development of a CRISPR/Cas9-integrated lateral flow strip for rapid and accurate detection of *Salmonella*[J]. Food Control，2022，142：109203.

[36] AN B L，ZHANG H B，SU X，et al. Rapid and sensitive detection of *Salmonella* spp. using CRISPR-Cas13a combined with recombinase polymerase amplification[J]. Frontiers in Microbiology，2021，12：732426.

[37] LEE S Y，OH S W. Lateral flow biosensor based on LAMP-CRISPR/Cas12a for sensitive and visualized detection of *Salmonella* spp.[J]. Food Control，2023，145：109494.

[38] 程晓艳. 几种食源性致病菌快速检测技术的建立[D]. 青岛：中国海洋大学，2012.

[39] MEILE S，SARBACH A，DU J M，et al. Engineered reporter phages for rapid bioluminescence-based detection and differentiation of viable *Listeria* cells[J]. Applied and Environmental Microbiology，2020，86(11)：e00442-e00420.

[40] YANG Y J，KONG X X，YANG J L，et al. Rapid nucleic acid detection of *Listeria monocytogenes* based on RAA-CRISPR Cas12a system[J]. International Journal of Molecular Sciences，2024，25(6)：3477.

[41] XIANG X R，LI F，YE Q H，et al. High-throughput microfluidic strategy based on RAA-CRISPR/Cas13a dual signal amplification for accurate identification of pathogenic *Listeria*[J]. Sensors and Actuators B：Chemical，2022，358：131517.

[42] 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所，中国防痨协会人兽共患结核病专业分会. 分枝杆菌菌种中文译名专家共识[J]. 中国人兽共患病学报，2023，39(3)：205-220.
National Institute for Communicable Disease Control and Prevention，Chinese Centre for Disease Control and Prevention，Zoonotic Tuberculosis Sub-association of Chinese Antituberculosis Association. Expert consensus on the Chinese translation of *Mycobacterium* nomenclature[J]. Chinese Journal of Zoonoses，2023，39(3)：205-220.(in Chinese)

[43] BECCARIA M，FRANCHINA F A，NASIR M，et al.

Investigating bacterial volatilome for the classification and identification of mycobacterial species by HS-SPME-GC-MS and machine learning[J]. Molecules, 2021, 26(15):4600.

[44] HUANG J, LIANG Z, LIU Y, et al. Development of an MSPQC nucleic acid sensor based on CRISPR/Cas9 for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Analytical Chemistry, 2022, 94(32):11409-11415.

[45] THAKKU S G, LIRETTE J, MURUGESAN K, et al. Genome-wide tiled detection of circulating *Mycobacterium tuberculosis* cell-free DNA using Cas13 [J]. Nature Communications, 2023, 14:1803.

[46] HUANG Z, 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.

[47] WU G, REN Y, DU Z. New CRISPR/Cas14 system used in preparation of products for detecting *Mycobacterium tuberculosis* composite, distinguishing *Mycobacterium tuberculosis* composite, screening medicines for tuberculosis includes guide sequence targeting *Mycobacterium tuberculosis* composite flora target sequence: CN119040488A[P]. 2024-11-29.

[48] 刘宝, 杨焕婕, 杜艳, 等. 2012年中国西南地区Whire Union革兰阳性球菌耐药性监测[J]. 中国抗生素杂志, 2014, 39(7):529-533.
LIU B, YANG H J, DU Y, et al. Whire Union survey of antimicrobial susceptibility of Gram-positive cocci isolated in Southwestern China in 2012 [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2014, 39(7): 529-533. (in Chinese)

[49] QIU X T, LIU X P, WANG R X, et al. An extraction-free one-step CRISPR-assisted detection platform and a potential *Streptococcus pneumoniae* at-home self-testing kit [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 233:123483.

[50] LI Z, HUA L Y, XIE L M, et al. Automated microfluidic nucleic acid detection platform-integrated RPA-T7-Cas13a for pathogen diagnosis[J]. Analytical Chemistry, 2023, 95(17):6940-6947.

[51] CHENG Y, LYU J W, HAN J F, et al. A specific and ultrasensitive Cas12a/crRNA assay with recombinase polymerase amplification and lateral flow biosensor technology for the rapid detection of *Streptococcus pyogenes* [J]. Microbiology Spectrum, 2024, 12(10): e00345-e00324.

[52] 孙秀兰, 付旭冉, 鲍琦, 等. 新一代诊断技术:CRISPR系统及其在分子诊断中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(7):57-70.
SUN X L, FU X R, BAO Q, et al. Next generation diagnostic technology: CRISPR system and its application in molecular diagnostics [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(7):57-70. (in Chinese)