

金纳米颗粒在CRISPR/Cas12a生物传感诊断系统中的研究进展

张芸翎, 阳 苹*

重庆医科大学附属第一医院医学检验科, 重庆

收稿日期: 2025年3月24日; 录用日期: 2025年4月19日; 发布日期: 2025年4月27日

摘 要

金(Au)是化学性质最稳定的元素之一, 金纳米颗粒(AuNPs)是金的微小颗粒, 以其独特的物理和化学特性, 已成为纳米科技领域的明星材料。这些颗粒在药物递送、核酸检测和生物传感等领域的应用前景备受瞩目。特别是, AuNPs与CRISPR-Cas12a系统的结合, 为开发新型高灵敏度生物传感器提供了新的思路。本文旨在综合评述CRISPR-Cas12a作用机制、AuNPs的特性及其在CRISPR-Cas12a生物传感应用的研究进展, 以为未来的生物检测技术发展提供参考。

关键词

金纳米颗粒, CRISPR-Cas12a, 生物传感

Research Progress of Gold Nanoparticles in CRISPR-Cas12a Biosensing Diagnostic System

Yunling Zhang, Ping Yang*

Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing

Received: Mar. 24th, 2025; accepted: Apr. 19th, 2025; published: Apr. 27th, 2025

Abstract

Gold (Au) is one of the most chemically stable elements, and gold nanoparticles (AuNPs) are tiny particles of gold. Thanks to their unique physical and chemical properties, AuNPs have become a star material in the field of nanotechnology. These particles hold significant promise for applications in drug delivery, nucleic acid detection, and biosensing, among other areas. In particular, the combination of AuNPs with the CRISPR-Cas12a system provides new ideas for developing novel

*通讯作者。

文章引用: 张芸翎, 阳苹. 金纳米颗粒在 CRISPR/Cas12a 生物传感诊断系统中的研究进展[J]. 临床医学进展, 2025, 15(4): 2959-2968. DOI: 10.12677/acm.2025.1541262

high-sensitivity biosensors. For example, colorimetric methods based on AuNPs and CRISPR-Cas12a allow for single-copy detection of SARS-CoV-2, while integration with SERS technology can achieve a detection limit of 50 fM. This paper aims to provide a comprehensive review of the mechanism of CRISPR-Cas12a, the characteristics of AuNPs, and the research progress in their application to CRISPR-Cas12a biosensing, in order to offer a reference for the advancement of future bio-detection technologies.

Keywords

Gold Nanoparticles, CRISPR-Cas12a, Biosensing

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

CRISPR-Cas12a 系统因其高度特异性和灵敏度, 在生物传感领域展现出巨大潜力。同时, 金纳米颗粒(AuNPs)凭借其独特的光学、电学和催化特性, 在多个领域得到广泛应用。将这两种先进技术相结合, 不仅可以充分发挥各自的优势, 还能克服单一技术的局限性, 为开发新一代生物传感器提供了创新途径。本综述将详细介绍 CRISPR-Cas12a 的作用机制、AuNPs 的特性, 以及将两者结合所组成的各种生物传感的检测原理、具体案例、主要特征等多个方面, 最后我们对全文进行了简要总结并展望了该领域未来可能的研究方向。

2. CRISPR/Cas12a 作用机制

由成簇规律间隔短回文重复序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR)及其相关蛋白(CRISPR-associated proteins, Cas)组成的 CRISPR/Cas 系统是一种细菌和古细菌的适应性免疫系统, 用于防止外来移动遗传元件的侵害[1]。该免疫系统分为两大类, CRISPR/Cas12a (也称为 Cpf1), 属于 2 类 V 型 RNA 引导的 DNA 核酸内切酶。CRISPR/Cas12a 利用与目标 DNA 互补的成簇规则间隔的短回文重复系统 RNA (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats RNA, crRNA)进行引导, 以识别并绑定含有特定前间隔序列邻近基序(Protospacer Adjacent Motif, PAM)的 DNA 目标。在 crRNA 与目标 DNA 链的配对过程中, 形成了一个 R-loop 结构, 这一结构的生成触发了 Cas12a 的 RuvC 结构域的活化。随后, 活化的 RuvC 结构域首先对非靶链进行切割, 然后继续切割靶链, 这一连续的切割过程称为顺式切割。靶链被切断后, Cas12a 的 RuvC 结构域仍然保持活性, 它将开始非特异性地切割周围的单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA), 这一过程称为反式切割[2]-[4]。这种独特的反式切割活性已经被巧妙地应用于开发多种高灵敏度的核酸检测技术。并且与经典的 Cas9 相比, Cas12a 具有一些独特优势。首先, Cas12a 只需要 crRNA 而不需要额外的 tracrRNA 就能有效识别并切割特定 DNA 序列从而呈现出更简约的系统; 其次, Cas12a 识别富含 T 的 PAM 序列(通常为 5'-TTTN-3'), 从而具有更广泛的序列编辑范围[5]。除此之外, 据研究, Cas12a 还具有高特异性、低脱靶效率等优势[6]。因此, 近年来, 对 Cas12a 的研究不断深入, 有望在未来为人类健康和疾病治疗带来更多的创新和突破。

3. AuNPs 特性

金纳米颗粒(AuNPs)因其独特的物理、化学和光学特性而在多个领域得到广泛应用[7]-[9]。包括局域

表面等离子体共振(Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR)、表面增强拉曼散射(Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS)、金属增强荧光(Metal-Enhanced Fluorescence, MEF)、猝灭荧光、电化学、电催化以及其他生物学特性,使其成为理想的生物传感材料。这些特性不仅可以单独应用,还可以组合使用,特别是通过与 CRISPR/Cas12a 系统结合,显著提升了生物传感器的灵敏度、特异性和实用性。本节将详细介绍 AuNPs 的主要特性,这些特性为其与 CRISPR/Cas12a 系统结合应用奠定了基础。

3.1. 局域表面等离子体共振(LSPR)特性

LSPR 是 AuNPs 最独特、最重要的光学性质之一。当 AuNPs 暴露在光线下时,他们附近的自由电子振荡与入射光的电磁场发生共振,引起光的吸收和散射现象,这种共振现象在紫外可见吸收光谱表现为共振吸收峰,同时产生颜色[10]。不同尺寸、形状、结构的 AuNPs 的共振吸收峰的波长不同,导致其颜色不同(红色到紫色)[11],基于这种颜色变化的可观测性为其在比色传感器中的应用提供理论支持。

3.2. 表面增强拉曼散射(SERS)特性

SERS 特性指当光照射到纳米结构金属表面时,自由电子与光相互作用产生共振,形成局部增强的电磁场,从而增强拉曼散射信号[12],实现低浓度分子的高灵敏度检测。有研究表明,SERS 增强可能源于纳米颗粒之间的纳米间隙,即“热点”,当分子处于热点中,会产生很强的拉曼散射[13]。当金纳米颗粒聚集或形成特定结构(如纳米间隙)时,会在这些“热点”区域产生极强的电磁场,从而增强拉曼信号,反之则减弱,通过检测 SERS 的变化从而应用于生物传感装置。

3.3. 金属增强荧光(MEF)或猝灭荧光特性

荧光基团发射受到 AuNPs 的 LSPR 效应影响,AuNPs 表面产生的强烈局部电磁场能够改变荧光基团的密度以及激发速率,导致荧光增强,但若荧光基团与 AuNPs 距离过近,则可能因为荧光共振能量转移(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)或非辐射能量转移导致荧光猝灭[14]。因此,当荧光基团位于 AuNPs 不同空间位置时,会产生不同的荧光效应。从而为 AuNPs 应用于荧光生物传感器提供理论支撑。

3.4. 电化学特性

电极材料作为电化学传感器的关键部件,在制备高性能电化学传感器中起着至关重要的作用[15]。而 AuNPs 具有高电子密度和介电性质,以及出色的电子转移效率[16],能够促进电极表面和固定分子之间电子转移,因此成为制造电化学传感器的理想材料之一。

3.5. 电催化特性

AuNPs 除了作为传递电子的媒介,同时具有高比表面积和丰富的活性位点特性[17],使其在催化领域同样具有优异表现。这种电催化特性使 AuNPs 在生物传感器开发中扮演重要角色。

除此之外,AuNPs 还具有良好的生物相容性、低毒性、稳定性、易修饰性等多种特性,为其与 CRISPR/Cas12a 系统相结合提供了良好基础。

4. AuNPs 在 CRISPR/Cas12a 生物传感应用

近年来,金纳米颗粒(AuNPs)因其独特的光学性质以及良好的稳定性、可修饰性、简单易合成等特点而在 CRISPR/Cas12a 生物传感系统中得到广泛应用。通过利用金纳米颗粒各种特性,科研人员实现了比色法、催化还原、表面增强拉曼散射等多种生物传感体系,并与 CRISPR/Cas12a 系统的反式切割活性相

结合, 为细菌、病毒、蛋白质等多种物质的现场即时检测提供了新的可能性。

4.1. 比色生物传感器

基于 AuNPs 的比色检测是指通过改变 AuNPs 的聚集或分散致使其吸收峰的改变, 并且其胶体溶液从红色变成紫色或从紫色变成红色[18]。通过利用 AuNPs 独特的距离依赖性光学性质, Yuan 等人[19]设计了一种通用的 AuNPs-DNA 探针, 该探针能与通用 ssDNA 杂交形成聚集状态, 并将其与 CRISPR/Cas12a 特异性识别结合起来用于检测非洲猪瘟病毒(African Swine Fever Virus, ASFV)。当溶液中存在靶标时, CRISPR/Cas12a 系统激活, 在特异性切割目标 DNA 的同时非特异性切割通用 ssDNA, 致使 AuNPs-DNA 探针分散, 溶液从而呈现红色状态。当不存在靶标时, 聚集的 AuNPs-DNA 探针由于表面等离子共振效应, 导致吸收峰红移从而呈现紫色状态, 再通过低速离心, 使 AuNPs 聚集物停留在管底部, 留下澄清的上清液呈现无色状态。该方法实现了靶标检测可视化。

1 型单纯疱疹病毒(Herpes Simplex Virus Type 1, HSV-1)感染角膜时可引起单纯疱疹病毒性角膜炎, 是全球最常见的致盲性眼病之一[20]。实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR)在检测 HSV-1 方面具有很高的灵敏度和特异性, 是临床常用的检测方法[21]。但其需要专业的检测人员以及设备, 严重阻碍了在偏远或基层等资源有限的地区的早期诊断。Huang 等人[22]通过将上述原理与环介导等温扩增(Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP)结合起来, 在保证特异性的前提下实现了 7.3 拷贝/ μL 的检测灵敏度。这是 LAMP-Cas 12a 联合 AuNPs 技术首次用于检测 HSV-1。并且作者发现该方法不仅提高了早期诊断率而且可以进一步指导临床治疗。

Zhang 等人[23]将硫醇化的 ssDNA 通过硫-金键锚定在 AuNPs 从而呈现离散状态并将其作为 CRISPR/Cas12a 的通用底物。通过使用逆转录重组酶聚合酶扩增技术(Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification, RT-RPA)扩增 SARS-CoV-2 基因组的 ORF 1ab 和 N 区, 产生大量的靶标 dsDNA 激活 Cas12a, AuNPs 表面所修饰的 ssDNA 解离, AuNPs 逐渐聚集致使表面等离子共振能力转移, 吸收峰红移, 液体颜色也从红色变为紫色。该方法可在 60 分钟内实现单拷贝的检测效率, 实现了 SARS-CoV-2 的快速、便携、高灵敏度、高特异性、肉眼可视化检测。

比色生物传感器结合了 AuNPs 的光学特性和 CRISPR/Cas12a 系统的高特异性, 为多种病原体的快速、简便检测提供了有效方法。这种技术特别适合在资源有限的地区进行现场检测, 有助于疾病的早期诊断和防控。

4.2. SERS 生物传感器

近年来由于表面增强拉曼散射(SERS)其独特的指纹信息、超高灵敏度、抗光漂白等特征在半导体、药物检测和疾病诊断等多个领域成为研究热点[24]-[27]。AuNPs 作为简单可控、高灵敏度的 SERS 基底, 在基于 SERS 的生物传感器中发挥重要作用并得到广泛应用[28]。随着对 CRISPR/Cas12a 检测系统的深入研究, 科学家们将 CRISPR/Cas12a 复合物激活状态下非特异切割 ssDNA 活性与修饰后的 AuNPs 所构建的 SERS 纳米探针结合, 通过放大 SERS 信号实现了病毒、细菌的无扩增、无污染、超灵敏、高特异、定量、快速检测。Ma 等人[29]将拉曼报告分子 4-巯基苯甲酸(4-MBA)和巯基化的 ssDNA (DNA1 和 DNA2) 连接到 AuNPs 上来制备两种连接不同 ssDNA 的 SERS 纳米探针。而预先制备的接头 ssDNA 能通过复杂的双链碱基配对分别与两种 SERS 纳米探针杂交。当 SARS-CoV-2 靶标存在时, 激活的 Cas 12a 以非特异性方式裂解接头 ssDNA, 从而阻止 SERS 纳米探针的聚集, SERS 纳米探针均匀地分散于溶液中产生强 SERS 信号。反之, 当 SARS-CoV-2 靶标不存在时, 接头 ssDNA 与 SERS 纳米探针交联, 并在轻度离心后沉积于容器底部, 在上清液中检测到可忽略的 SERS 信号。值得注意的是作者通过设计一个管中管

容器, 巧妙地实现了 RNA 逆转录、Cas12a 反式切割和 SERS 纳米探针交联的步骤集中在单一的处理容器中。

Du 等人[30]将 4-氨基苯硫酚(4-ATP)拉曼报告分子连接到 AuNPs 上(AuNPs@4-ATP), 并通过用巯基和生物素修饰 ssDNA 连接到链霉亲和素磁性球上用作 SERS 探针。磁性球通过与金纳米颗粒形成热点, 即贵金属纳米颗粒间隙的高强度局域电场, 增强 SERS 拉曼光谱信号。当靶基因序列激活 CRISPR/Cas12a 复合物触发非特异性 ssDNA 切割活性时, 连接的 AuNPs@4-ATP 被释放, 导致磁分离后 SERS 强度降低。因此靶基因浓度与 SERS 强度成反比, 从而实现在 50 min 内对乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, HBV) DNA 的快速、高灵敏度、定量检测, 检测范围为 0.1 pM 至 1 nM。

SERS 生物传感器结合了 AuNPs 的优异 SERS 增强效果和 CRISPR/Cas12a 系统的高特异性, 为病毒、细菌的超灵敏检测提供了新的方法。这种技术不仅可以实现无扩增、无污染检测, 还具有定量分析能力, 同时克服了传统的荧光染料探针在成像检测中易光漂白且光稳定性差, 以及单细胞水平靶标物浓度较低导致荧光信号较弱这两个显著缺点。在疾病早期诊断和精准医疗方面具有广阔的应用前景。

4.3. 荧光生物传感器

当荧光基团位于金纳米颗粒不同位置时表现为不同影响(增强、抑制或不影响)[31], Choi 等人[32]使用 DNA 功能化金纳米颗粒(AuNPs)的金属增强荧光特性(MEF)来检测细胞游离 DNA (Cell-free DNA, cfDNA)。cfDNA 源自癌细胞的凋亡、坏死和主动释放[33], 由于其在诊断癌症等疾病方面的巨大潜力而引起广泛关注。但因 cfDNA 在血液和其他体液中的丰度较低, 尚未在临床中广泛应用。Choi 等人[32]通过对两个不同尺寸的金纳米颗粒进行 DNA 功能化(大尺寸的 AuNPs 表面连接 9 nm 长的 ssDNA, 小尺寸的 AuNPs 表面连接异硫氰酸荧光素(Fluorescein Isothiocyanate, FITC)标记的 7 nm 长的 ssDNA。当两种尺寸的 AuNPs 表面所修饰的 ssDNA 通过碱基互补部分配对时, FITC 由于靠近大尺寸 AuNPs 而保存猝灭状态。当目标 cfDNA 存在时, CRISPR/Cas12a 系统被激活, 从而使两种尺寸 AuNPs 之间的非靶标 ssDNA 被非特异性切割, 而不能被切割的 dsDNA 区域, 保持小尺寸 AuNPs 与 FITC 之间的最佳距离从而诱导增强金属荧光效应。因此在 30 分钟内实现乳腺癌基因 1(BRCA-1)的 1 fm 至 100 pm 的超灵敏检测。并且无需扩增, 克服了扩增方法所带来的昂贵、耗时、假阳性以及需要专业设备及技术人员的局限性。

HPV-16/18 是高危型乳头瘤病毒, 是导致宫颈癌的主要原因之一[34]。Fu 等人[35]通过将 CRISPR/Cas12a 系统与荧光染料和巯基标记的 DNA 链修饰的金纳米颗粒相结合, 通过利用 AuNPs 的荧光猝灭作用实现了在非扩增状态下 10 fm 的检测水平, 与传统的 ssDNA 报告基因相比, 低了两个数量级。实验过程金纳米颗粒发挥了两个关键作用: 第一, 由于金纳米颗粒表面的负电荷和局部高盐离子浓度, AuNPs 可以显著提高核酸报告基因在生物流体中的稳定性。第二, 通过优化金纳米颗粒表面 DNA 链的密度和长度等相关因素, 金纳米颗粒表现出更高的猝灭效率, 从而降低信号背景, 提高荧光生物传感器的信号背景比。

荧光生物传感器结合 AuNPs 和 CRISPR/Cas12a 系统, 为 cfDNA、HPV 等重要疾病标志物的超灵敏检测提供了有效方法。这种技术克服了传统扩增方法的局限性, 因其操作简便、检测迅速且灵敏度高, 该方法在疾病早期诊断与个性化医疗领域前景广阔。

4.4. 电化学生物传感器

为了提高某些疾病的早期诊断率, 需要开发多种高灵敏度、高特异性生物传感器, 而电化学传感器在其中扮演着重要角色[36]。AuNPs 因其良好的生物相容性以及优异的导电性能成为制备一系列电化学传感器最佳材料之一。Wu 等人[37]通过改进基于 CRISPR/Cas12a 的通用电化学生物传感器(E-CRISPR)

[38], 将靶 DNA 的识别转化为电极上 ssDNA 报告分子的大量切割, 实现了 SARS-CoV-2 Delta 变体飞摩尔水平的检测, 从而为建立高效、稳健、全面、准确的即时检测(Point of Care Testing, POCT)系统提供可能。该团队首先在金电极(AuE)上进行 AuNPs 修饰(AuE-AuNPs), 以通过电沉积增加电导率和比表面积达到增强传感性能的目标, 然后将电化学标签亚甲基蓝(Methylene Blue, MB)通过硫醇键与单链 DNA 相连(MB-ssDNA)作为报告基因, 最后将 MB-ssDNA 固定在金纳米颗粒修饰的金电极上。当靶标存在时, Cas12a 的反式切割活性被激活, 与 MB 相连的 ssDNA 被无差别切割, 使 MB-ssDNA 从金纳米颗粒修饰的工作电极表面掉落。实现了电子传递在 Cas12a 的反式切割活性激活前后的变化, 而这种变化可以被检测。近期, 该电化学传感器还被应用于检测金黄色葡萄球菌[39]。

结合 AuNPs 和 CRISPR/Cas12a 系统的电化学生物传感器, 为快速、高灵敏度、高特异性的疾病诊断提供了有力工具。这种方法在 SARS-CoV-2 变体和细菌检测中的成功应用, 展示了其在公共卫生领域的巨大潜力。

4.5. 催化还原生物传感器

金纳米颗粒因其简单的制备过程、可控的表面活性位点、可调的尺寸而成为理想催化剂, 并在过去几年里引起广泛关注[40]。科学家们将 4-硝基苯酚作为比色探针利用金纳米颗粒的催化活性, 实现了对凝血酶、玉米赤霉烯酮、鼠伤寒沙门菌的检测[41]-[43]。Abnous 等人[44]将 CRISPR/Cas12a 的反式切割特性以及 AuNPs 的催化活性相结合, 并利用核酸适配体、滚环扩增(Rolling Circle Amplification, RCA)实现了黄曲霉毒素 M1 (Aflatoxin M1, AFM1)的可视化、高灵敏检测。当 AFM1 不存在时, 核酸适配体与 crRNA 结合激活 CRISPR/Cas12a 系统的反式切割活性, AuNPs 表面所修饰的引物、溶液中的挂锁探针被无差别切割, AuNPs 从而裸露在 4-硝基苯酚溶液中, 其催化活性使 4-硝基苯酚还原为 4-氨基苯酚, 溶液从黄色变为无色状态。反之, 当 AFM1 存在时, 核酸适配体与 AFM1 通过共价键形成生物共轭体, 导致核酸适配体不能与 crRNA 结合, 不能激活 CRISPR/Cas12a 系统的反式切割活性。未被激活的 CRISPR/Cas12a 系统不能非特异性切割锚定在 AuNPs 上的引物以及游离在溶液中的挂锁探针。此时挂锁探针的两端可以连接在引物上形成环状模板并在加入 T4 DNA 连接酶和 phi 29 DNA 聚合酶后在 AuNPs 表面形成成长的 ssDNA, 从而阻止 4-硝基苯酚靠近 AuNPs 表面, 溶液保持黄色状态。该方案不仅具有较高的准确性以及肉眼可视性, 而且无需复杂的设备仪器, 为 AFM1 的便携式检测提供新思路。

催化还原生物传感器充分利用了 AuNPs 优异的催化活性, 通过与 CRISPR/Cas12a 系统的结合, 实现了对多种生物分子的可视化、高灵敏检测。这种方法操作简单, 无需专业设备, 为现场快速检测提供了新的可能性。

4.6. 侧向层析(LFA)生物传感器

侧向层析检测(Lateral Flow Assay, LFA)因其简单、便携、快速等多种优势而广泛应用于生物医学、环境监测、食品安全等领域。LFA 的功能依赖于共轭生物材料在干燥结合垫上的预固定性。当含有待检测样本的液体利用毛细管作用通过各区域, 并与各区域的附着物相互作用而产生指示性视觉线条[45][46]。AuNPs 因其具有良好的生物相容性、稳定性、易修饰性而成为侧向层析检测的常用标记物。将 RPA 扩增技术、CRISPR/Cas12a 系统特异性靶标识别与侧向层析检测可视化相结合, 实现靶物质的即时检测已得到广泛应用[47]-[49]。例如, 近期 Zhang 等人[50]将该项技术用于检测铜绿假单胞菌, 该技术在侧向层析试纸条的共轭垫涂有金纳米颗粒和抗异硫氰酸荧光素(FITC)抗体的复合物。链霉亲和素(SA)和山羊抗小鼠 IgG 分别固定在硝酸纤维素(NC)膜上对应于 C 线和 T 线的位置。RPA 扩增之后, 如果没有靶标存在, Cas12a 的反式切割保持失活状态, 由生物素通过 ssDNA 连接 FITC 所组成的报告基因不能被切割。

完整的报告基因以及金纳米颗粒和抗 FITC 抗体的复合物被 SA 在 C 线被捕获。当靶标存在时, Cas12a 的反式切割活性被激活, ssDNA 被裂解导致 FITC 和生物素分离。FITC 被释放, 被 T 线捕获, 产生可视化信号。实现了铜绿假单胞菌的快速、灵敏、便携检测。为在偏远、资源有限的地区实现铜绿假单胞菌的早期诊断及治疗提供有效手段。然而由于细菌遗传变异, 单基因检测可能出现假阴性结果, 并且为了加快检测速度, 作者牺牲了 RPA 扩增时间, 从而导致低浓度的靶标 DNA 未能被检出, 增加假阴性率。同时, 由于 LFA 自身局限性难以做到定量检测, 这将成为未来不断改进 LFA 方法的动力和方向。

LFA 生物传感器结合了 AuNPs 标记、RPA 扩增和 CRISPR/Cas12a 靶标识别等技术, 为各类病原体的现场快速检测提供了一种简便有效的解决方案。

5. 展望

科学家们始终致力于开发出一种快速、精准、低成本效益的检测方法。特别是 2019 年底爆发的新型冠状病毒(COVID-19)全球大流行, 对应用于不同场景的快速检测需求急剧增加。CRISPR/Cas 系统的发现以及应用为实现快速检测提供了新思路, 尤其是 CRISPR/Cas12a 技术以其广泛的检测能力、精准的靶向性能、简化的操作流程等多种优势展现出巨大潜力。AuNPs 因其具有局域表面等离子体共振(LSPR)、表面增强拉曼散射(SERS)、金属增强荧光(MEF)或猝灭荧光、电化学、电催化、易修饰性等多种优异性能在不同领域得到广泛应用。将 AuNPs 独特的物理、化学和光学性质与 CRISPR/Cas12a 系统的反式切割相结合开发出多种生物传感器, 包括比色、SERS、荧光、电化学、催化还原和侧向层析等方法, 为不同场景下的快速检测提供了新的可能性。未来, 随着对 CRISPR/Cas12a 系统和 AuNPs 技术的深入研究, 我们有理由相信这些创新方法将推动家庭健康管理、环境检测、医疗诊断等跨学科领域的不断进步。

具体来看, 未来的研究方向可能包括: 1) 进一步提高检测方法的灵敏度、特异性和准确性; 2) 开发多重检测平台, 实现对多种目标物的同时检测; 3) 优化仪器设备, 开发便携式、智能化的检测系统; 4) 评估在复杂生物样品中的检测性能, 扩大应用范围; 5) 探索新的信号放大机制和检测原理, 推动技术创新; 6) 注重实际应用需求, 促进成果转化和产业化。

通过对上述关键问题的持续探索和攻关, 我们有信心推动 CRISPR/Cas12a 和 AuNPs 技术在诊断、监测、预防等领域的广泛应用, 为人类健康和可持续发展做出贡献。

参考文献

- [1] van der Oost, J., Jore, M.M., Westra, E.R., Lundgren, M. and Brouns, S.J.J. (2009) Crispr-Based Adaptive and Heritable Immunity in Prokaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, **34**, 401-407. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.05.002>
- [2] Chen, J.S., Ma, E., Harrington, L.B., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J.M., et al. (2018) CRISPR-Cas12a Target Binding Unleashes Indiscriminate Single-Stranded DNase Activity. *Science*, **360**, 436-439. <https://doi.org/10.1126/science.aar6245>
- [3] Swarts, D.C. and Jinek, M. (2019) Mechanistic Insights into the Cis and Trans-Acting DNase Activities of Cas12a. *Molecular Cell*, **73**, 589-600.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.021>
- [4] Bhatia, S., Pooja, and Yadav, S.K. (2023) CRISPR-Cas for Genome Editing: Classification, Mechanism, Designing and Applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, **238**, Article 124054. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124054>
- [5] Paul, B. and Montoya, G. (2020) CRISPR-Cas12a: Functional Overview and Applications. *Biomedical Journal*, **43**, 8-17. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2019.10.005>
- [6] Chen, P., Zhou, J., Wan, Y., Liu, H., Li, Y., Liu, Z., et al. (2020) A Cas12a Ortholog with Stringent PAM Recognition Followed by Low Off-Target Editing Rates for Genome Editing. *Genome Biology*, **21**, Article No. 78. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-01989-2>
- [7] Kim, H.S., Lee, S.J. and Lee, D.Y. (2022) Milk Protein-Shelled Gold Nanoparticles with Gastrointestinally Active Adsorption for Aurotherapy to Brain Tumor. *Bioactive Materials*, **8**, 35-48.

- <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.06.026>
- [8] Liu, W., Ayupova, T., Wang, W., Shepherd, S., Wang, X., Akin, L.D., *et al.* (2024) Dynamic and Large Field of View Photonic Resonator Absorption Microscopy for Ultrasensitive Digital Resolution Detection of Nucleic Acid and Protein Biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics*, **264**, Article 116643. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2024.116643>
 - [9] He, Y., Zhou, J., Fu, R., Liu, Y., Wang, Y., Liu, H., *et al.* (2022) The Application of DNA-HRP Functionalized Aunp Probes in Colorimetric Detection of Citrus-Associated Alternaria Genes. *Talanta*, **237**, Article 122917. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122917>
 - [10] Petryayeva, E. and Krull, U.J. (2011) Localized Surface Plasmon Resonance: Nanostructures, Bioassays and Biosensing—A Review. *Analytica Chimica Acta*, **706**, 8-24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.08.020>
 - [11] Wang, W., You, Y. and Gunasekaran, S. (2021) LSPR-Based Colorimetric Biosensing for Food Quality and Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **20**, 5829-5855. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12843>
 - [12] Qian, X.-. and Nie, S.M. (2008) Single-Molecule and Single-Nanoparticle SERS: From Fundamental Mechanisms to Biomedical Applications. *Chemical Society Reviews*, **37**, 912-920. <https://doi.org/10.1039/b708839f>
 - [13] Le Ru, E.C. and Auguié, B. (2024) Enhancement Factors: A Central Concept during 50 Years of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *ACS Nano*, **18**, 9773-9783. <https://doi.org/10.1021/acsnano.4c01474>
 - [14] Ou, J., Zhou, Z., Chen, Z. and Tan, H. (2019) Optical Diagnostic Based on Functionalized Gold Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, Article 4346. <https://doi.org/10.3390/ijms20184346>
 - [15] Xiao, T., Huang, J., Wang, D., Meng, T. and Yang, X. (2020) Au and Au-Based Nanomaterials: Synthesis and Recent Progress in Electrochemical Sensor Applications. *Talanta*, **206**, Article 120210. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120210>
 - [16] Ielo, I., Rando, G., Giacobello, F., Sfameni, S., Castellano, A., Galletta, M., *et al.* (2021) Synthesis, Chemical-Physical Characterization, and Biomedical Applications of Functional Gold Nanoparticles: A Review. *Molecules*, **26**, Article 5823. <https://doi.org/10.3390/molecules26195823>
 - [17] Chen, T., Lu, Y., Xiong, X., Qiu, M., Peng, Y. and Xu, Z. (2024) Hydrolytic Nanozymes: Preparation, Properties, and Applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, **323**, Article 103072. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.103072>
 - [18] Yang, J., Wang, X., Sun, Y., Chen, B., Hu, F., Guo, C., *et al.* (2022) Recent Advances in Colorimetric Sensors Based on Gold Nanoparticles for Pathogen Detection. *Biosensors*, **13**, Article 29. <https://doi.org/10.3390/bios13010029>
 - [19] Yuan, C., Tian, T., Sun, J., Hu, M., Wang, X., Xiong, E., *et al.* (2020) Universal and Naked-Eye Gene Detection Platform Based on the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/cas12a/13a System. *Analytical Chemistry*, **92**, 4029-4037. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05597>
 - [20] Rowe, A.M., St. Leger, A.J., Jeon, S., Dhaliwal, D.K., Knickelbein, J.E. and Hendricks, R.L. (2013) Herpes Keratitis. *Progress in Retinal and Eye Research*, **32**, 88-101. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.08.002>
 - [21] Hoarau, G., Haigh, O., Vauloup-Fellous, C., Boucher, R., Rouquette, A., Faure, P., *et al.* (2023) Diagnostic Performance of Real-Time Quantitative PCR in Tear Samples in Various Subtypes of Herpes Simplex Keratitis. *Journal of Clinical Microbiology*, **61**, e0088523. <https://doi.org/10.1128/jcm.00885-23>
 - [22] Huang, M., Chen, Y., Zheng, L. and Yao, Y. (2023) Highly Sensitive and Naked-Eye Detection of Herpes Simplex Virus Type 1 Using LAMP-Crispr/Cas12 Diagnostic Technology and Gold Nanoparticles. *Heliyon*, **9**, e22146. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22146>
 - [23] Zhang, W.S., Pan, J., Li, F., Zhu, M., Xu, M., Zhu, H., *et al.* (2021) Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Coupled with Crispr-Cas12a for Facile and Highly Sensitive Colorimetric Sars-Cov-2 Detection. *Analytical Chemistry*, **93**, 4126-4133. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00013>
 - [24] Liu, H., Gao, X., Xu, C. and Liu, D. (2022) SERS Tags for Biomedical Detection and Bioimaging. *Theranostics*, **12**, 1870-1903. <https://doi.org/10.7150/thno.66859>
 - [25] Demirel, G., Gieseck, R.L.M., Ozdemir, R., Kahmann, S., Loi, M.A., Schatz, G.C., *et al.* (2019) Molecular Engineering of Organic Semiconductors Enables Noble Metal-Comparable SERS Enhancement and Sensitivity. *Nature Communications*, **10**, Article No. 5502. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13505-7>
 - [26] Choi, N., Dang, H., Das, A., Sim, M.S., Chung, I.Y. and Choo, J. (2020) SERS Biosensors for Ultrasensitive Detection of Multiple Biomarkers Expressed in Cancer Cells. *Biosensors and Bioelectronics*, **164**, Article 112326. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112326>
 - [27] Huang, X., Sheng, B., Tian, H., Chen, Q., Yang, Y., Bui, B., *et al.* (2023) Real-Time SERS Monitoring Anticancer Drug Release along with SERS/MR Imaging for Ph-Sensitive Chemo-Phototherapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **13**, 1303-1317. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.08.024>
 - [28] Chen, R., Li, S., Ren, S., Han, D., Qin, K., Jia, X., *et al.* (2024) Micro-/Nanostructures for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Recent Advances and Perspectives. *Advances in Colloid and Interface Science*, **331**, Article 103235.

- <https://doi.org/10.1016/j.cis.2024.103235>
- [29] Ma, L., Zhang, W., Yin, L., Li, Y., Zhuang, J., Shen, L., *et al.* (2023) A Sers-Signalled, Crispr/Cas-Powered Bioassay for Amplification-Free and Anti-Interference Detection of Sars-Cov-2 in Foods and Environmental Samples Using a Single Tube-in-Tube Vessel. *Journal of Hazardous Materials*, **452**, Article 131195. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131195>
- [30] Du, Y., Ji, S., Dong, Q., Wang, J., Han, D. and Gao, Z. (2023) Amplification-Free Detection of HBV DNA Mediated by Crispr-Cas12a Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, **1245**, Article 340864. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.340864>
- [31] Badshah, M.A., Koh, N.Y., Zia, A.W., Abbas, N., Zahra, Z. and Saleem, M.W. (2020) Recent Developments in Plasmonic Nanostructures for Metal Enhanced Fluorescence-Based Biosensing. *Nanomaterials*, **10**, Article 1749. <https://doi.org/10.3390/nano10091749>
- [32] Choi, J., Lim, J., Shin, M., Paek, S. and Choi, J. (2020) Crispr-Cas12a-Based Nucleic Acid Amplification-Free DNA Biosensor via Au Nanoparticle-Assisted Metal-Enhanced Fluorescence and Colorimetric Analysis. *Nano Letters*, **21**, 693-699. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c04303>
- [33] Song, P., Wu, L.R., Yan, Y.H., Zhang, J.X., Chu, T., Kwong, L.N., *et al.* (2022) Limitations and Opportunities of Technologies for the Analysis of Cell-Free DNA in Cancer Diagnostics. *Nature Biomedical Engineering*, **6**, 232-245. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00837-3>
- [34] de Sanjose, S., Quint, W.G., Alemany, L., Geraets, D.T., Klaustermeier, J.E., Lloveras, B., *et al.* (2010) Human Papillomavirus Genotype Attribution in Invasive Cervical Cancer: A Retrospective Cross-Sectional Worldwide Study. *The Lancet Oncology*, **11**, 1048-1056. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(10\)70230-8](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(10)70230-8)
- [35] Fu, X., Shi, Y., Peng, F., Zhou, M., Yin, Y., Tan, Y., *et al.* (2021) Exploring the Trans-Cleavage Activity of Crispr/Cas12a on Gold Nanoparticles for Stable and Sensitive Biosensing. *Analytical Chemistry*, **93**, 4967-4974. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00027>
- [36] Bezuneh, T.T., Fereja, T.H., Kitte, S.A., Li, H. and Jin, Y. (2022) Gold Nanoparticle-Based Signal Amplified Electrochemiluminescence for Biosensing Applications. *Talanta*, **248**, Article 123611. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123611>
- [37] Wu, C., Chen, Z., Li, C., Hao, Y., Tang, Y., Yuan, Y., *et al.* (2022) Crispr-Cas12a-empowered Electrochemical Biosensor for Rapid and Ultrasensitive Detection of Sars-Cov-2 Delta Variant. *Nano-Micro Letters*, **14**, Article No. 159. <https://doi.org/10.1007/s40820-022-00888-4>
- [38] Dai, Y., Somoza, R.A., Wang, L., Welter, J.F., Li, Y., Caplan, A.I., *et al.* (2019) Exploring the Trans-Cleavage Activity of CRISPR-Cas12a (cpf1) for the Development of a Universal Electrochemical Biosensor. *Angewandte Chemie International Edition*, **58**, 17399-17405. <https://doi.org/10.1002/anie.201910772>
- [39] Huang, L., Yuan, N., Guo, W., Zhang, Y. and Zhang, W. (2023) An Electrochemical Biosensor for the Highly Sensitive Detection of Staphylococcus Aureus Based on Srca-CRISPR/Cas12a. *Talanta*, **252**, Article 123821. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123821>
- [40] Yuan, X., Ge, L., Zhou, H. and Tang, J. (2023) Size, Composition, and Surface Capping-Dependent Catalytic Activity of Spherical Gold Nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **287**, Article 122082. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.122082>
- [41] Chen, Z., Tan, L., Hu, L., Zhang, Y., Wang, S. and Lv, F. (2015) Real Colorimetric Thrombin Aptasensor by Masking Surfaces of Catalytically Active Gold Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **8**, 102-108. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b08975>
- [42] Taghdisi, S.M., Danesh, N.M., Ramezani, M., Emrani, A.S. and Abnous, K. (2018) Novel Colorimetric Aptasensor for Zearalenone Detection Based on Nontarget-Induced Aptamer Walker, Gold Nanoparticles, and Exonuclease-Assisted Recycling Amplification. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **10**, 12504-12509. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b02349>
- [43] Su, Z., Wei, S., Shi, X., Wang, X., Zhang, L., Bu, X., *et al.* (2023) Smartphone-Assisted Colorimetric Detection of Salmonella Typhimurium Based on the Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol by B-Cyclodextrin-Capped Gold Nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, **1239**, Article 340672. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340672>
- [44] Abnous, K., Danesh, N.M., Ramezani, M., Alibolandi, M., Nameghi, M.A., Zavvar, T.S., *et al.* (2021) A Novel Colorimetric Aptasensor for Ultrasensitive Detection of Aflatoxin M1 Based on the Combination of CRISPR-Cas12a, Rolling Circle Amplification and Catalytic Activity of Gold Nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, **1165**, Article 338549. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338549>
- [45] Posthuma-Trumpie, G.A., Korf, J. and van Amerongen, A. (2008) Lateral Flow (Immuno)Assay: Its Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats. A Literature Survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **393**, 569-582. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2287-2>

-
- [46] Kakkar, S., Gupta, P., Singh Yadav, S.P., Raj, D., Singh, G., Chauhan, S., *et al.* (2024) Lateral Flow Assays: Progress and Evolution of Recent Trends in Point-of-Care Applications. *Materials Today Bio*, **28**, Article 101188. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2024.101188>
- [47] Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Kellner, M.J., Joung, J., Collins, J.J. and Zhang, F. (2018) Multiplexed and Portable Nucleic Acid Detection Platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, **360**, 439-444. <https://doi.org/10.1126/science.aag0179>
- [48] Li, Z., Ding, X., Yin, K., Avery, L., Ballesteros, E. and Liu, C. (2022) Instrument-Free, CRISPR-Based Diagnostics of Sars-Cov-2 Using Self-Contained Microfluidic System. *Biosensors and Bioelectronics*, **199**, Article 113865. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113865>
- [49] Bhardwaj, P., Nanaware, N.S., Behera, S.P., Kulkarni, S., Deval, H., Kumar, R., *et al.* (2023) CRISPR/Cas12a-Based Detection Platform for Early and Rapid Diagnosis of Scrub Typhus. *Biosensors*, **13**, Article 1021. <https://doi.org/10.3390/bios13121021>
- [50] Zhang, W., Qu, H., Wu, X., Shi, J. and Wang, X. (2024) Rapid, Sensitive, and User-Friendly Detection of *Pseudomonas Aeruginosa* Using the RPA/CRISPR/Cas12a System. *BMC Infectious Diseases*, **24**, Article No. 458. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09348-3>