



基于微流控的无需预扩增 CRISPR-Cas 生物传感快速检测技术及其应用*

陆安妍 赵 亮** 郭广生 汪夏燕

(北京工业大学化学与生命科学学院化学系, 环境安全与生物效应卓越中心, 心肺脑复苏创新转化北京市重点实验室,
北京工业大学材料循环低碳再生全国重点实验室, 北京 100124)

摘要 CRISPR-Cas 生物传感系统凭借高特异性和可编程性, 已成为核酸快速检测的重要技术平台。传统 CRISPR 诊断高度依赖 PCR 或等温扩增等预扩增步骤, 虽可提高灵敏度, 却增加了操作流程、温控要求和污染控制负担, 限制其在现场快速检测 (POCT) 中的现场化应用。无需预扩增 CRISPR 检测因此受到关注, 而微流控器件凭借微型化、高通量和精确流体操控能力, 可实现反应限域、数字化分区、信号读出和流程集成, 是推动该类方法实用化的重要载体。本文综述 CRISPR-Cas 系统与微流控技术融合的最新进展, 重点讨论 CRISPR RNA (crRNA) 工程化、液滴与微腔阵列数字化检测、物理信号转导界面及片上级联信号放大等策略, 比较不同技术路线在灵敏度提升、操作复杂度、成本和 POCT 适配性方面的特点。本文强调, 微流控并非单一信号增强手段, 而是连接分子识别、反应控制和现场读出的工程平台。最后, 总结其在食品成分真实性鉴别和病原体快速筛查中的应用, 并从低丰度靶标检测、样本基质干扰、器件集成化和自动化“样本入-结果出”系统等方面展望未来发展。

关键词 CRISPR-Cas 系统, 微流控器件, 无需预扩增检测, crRNA 工程化, 数字化检测, 信号转导, 级联信号放大, 现场快速检测

中图分类号 O65, Q7

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0180

CSTR: 32369.14.pibb.20260180

CRISPR-Cas 系统是保护细菌和古细菌免受病毒和质粒感染的重要防御系统^[1-4], 作为一种原核生物获得性免疫系统, 成簇规律间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 与 CRISPR 相关蛋白 (CRISPR-associated protein, Cas) 构成的 CRISPR-Cas 系统其特异性切割原理相对简单: 当其首次被核酸入侵时, RNA 引导的核酸酶将外源核酸片段整合到 CRISPR 基因座; 同种核酸再次入侵时, Cas 蛋白会与转录的 CRISPR RNA (crRNA) 形成核糖核蛋白复合体, 实现对入侵核酸的精准识别与切割^[5]。不同于 Cas9 的靶向剪切, Cas12、Cas13 及 Cas14 等效应蛋白在特异性识别靶标核酸后会被激活产生非特异性的反式切割活性 (trans-cleavage activity), 这种“旁路效应”能够高效降解体系中的报告探针 (单链核酸分子), 从而实现将微观的分子识别转化为可测量的宏观信号^[5-6]。CRISPR-

Cas 系统这种天然的可编程核酸识别机制使其成为理想的生物传感器平台, 目前已在医疗、生物学研究、食品检测等多个领域得到广泛应用, 并成为下一代分子诊断的核心技术平台^[6]。

然而, 当前 CRISPR 诊断技术也面临着一系列的挑战, 特别是由于对核酸靶标预扩增的依赖问题。在分子诊断应用中, CRISPR-Cas 系统尽管具有高特异性优势, 但其检测灵敏度存在固有局限性。例如, 基于 Cas12a 的 1 h 低成本多功能高效系统 (one-hour low-cost multipurpose highly efficient system, HOLMES) 在未结合预扩增技术时, 最低检测浓度约为 0.1 nmol/L, 远未达到临床检测中常

* 国家自然科学基金 (22174007), 北京工业大学杰出学子 (雏鹰) 计划和北京工业大学本科生星火基金 (XH-2025-09-07) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 13810114935, E-mail: zhaoliang@bjut.edu.cn

收稿日期: 2026-04-08, 接受日期: 2026-07-17

需的 amol/L~fmol/L 级别^[7]。为此, 当前主流策略通常将 CRISPR 检测与预扩增步骤协同整合, 即利用等温扩增或聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术预先富集靶标核酸浓度。SHERLOCK^[8-9]、DETECTR^[10] 等技术平台的成功, 正是基于这一策略实现了对 RNA 和 DNA 的超灵敏检测^[10-12]。然而, 预扩增策略的成功实施却带来了一系列不可忽视的技术瓶颈。首先, 预扩增反应需要多种酶类、多条引物, 以及精确的温度控制 (PCR 需要热循环, 等温扩增如重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA)、环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、滚环扩增 (rolling circle amplification, RCA) 也需要特定恒温)^[9, 13]。其次, 预扩增过程易产生非特异性扩增产物或引物二聚体, 可能干扰后续 CRISPR 检测的准确性。最后, 为防止气溶胶污染导致假阳性, 预扩增反应体系通常需与 CRISPR 检测体系在物理或操作流程上严格分离, 这不仅增加了手动操作步骤, 也延长了总检测时间, 并提高了样本交叉污染的风险^[14-15]。更为关键的是, 预扩增步骤的复杂性与现场快速检测 (point-of-care testing, POCT) 的核心需求形成了根本性矛盾^[16-17]。需要指出的是, CRISPR-Cas 系统自身的反应同样需要特定温度条件 (如 Cas12a 最适温度约 37°C, Cas13a 37~42°C)。然而, 预扩增步骤的核心制约并非温度本身, 而在于其引入的多重复杂性。扩增需额外添加聚合酶、重组酶、单链结合蛋白及多对引物, 多酶体系兼容性的优化增加了试剂配方与工程化难度^[13]; 此外, 预扩增产生的非特异性产物可能干扰后续 CRISPR 检测的准确性^[14]。近年来, 无需预扩增的 CRISPR 检测策略已形成系统性的技术框架, 通过催化酶联用、理性设计寡核苷酸、纳米材料信号增强、电化学传感及数字化检测平台等多条路径协同克服信号微弱缺陷, 在保持高灵敏度的同时从根本上规避了扩增相关弊端^[18]。虽已有 SHERLOCKv2、AIOD-CRISPR 等单管不开盖方案^[12, 19], 但这些方案需通过分隔腔室、石蜡封层或微流控芯片整合等手段实现扩增与检测的物理隔离, 设计复杂度随检测通量上升而显著增加。从时间成本看, 即便 RPA 扩增仅需 5~10 min, 叠加 CRISPR 检测步骤后总时间通常仍需 30~60 min, 而无扩增策略可进一步缩短至 15~20 min^[15], 在疫情筛查等对速度要求极高的 POCT 场景中具有实际优势。因此, 摒弃预扩增在

简化操作流程、消除体系内多酶干扰及杜绝气溶胶污染方面的优势依然不可替代。

针对上述挑战, 无扩增 (amplification-free) CRISPR 生物传感策略应运而生, 并正引领着精准分子诊断的新方向^[20]。该策略旨在通过完全摒弃核酸扩增步骤, 从根本上杜绝气溶胶污染并简化操作流程。本文将系统综述该领域的最新进展, 重点聚焦于如何通过 crRNA 的变构与理性设计提升反应动力学, 利用微流控数字液滴与微腔阵列实现单分子级别的物理限域检测, 构建信号转换传感界面将 CRISPR 识别事件转换为电化学以及拉曼散射等易于检出的物理信号, 以及构建非酶信号级联网络以实现信号的次级放大。这些技术的出现不仅从根本上解决了传统 CRISPR 检测对预扩增的依赖, 更为构建真正意义上的便携式、快速、高灵敏分子诊断平台奠定了技术基础。本综述将系统阐述上述无扩增检测策略的技术原理、最新进展, 并重点讨论其与微流控技术的深度融合及在食品安全、病原体检测、肿瘤液体活检等关键应用领域的实践, 最后对该技术面临的挑战与未来发展前景进行展望。

已经有综述聚焦于 CRISPR-Cas 生物传感系统与微纳模态的结合^[16], 从微流控平台和纳米探针两个维度总结了其在 POCT 中的应用进展。本课题组同期发表的文献^[17]则从核酸检测技术发展历程出发, 综述了 CRISPR-Cas 系统与微流控芯片结合的研究进展, 涵盖有扩增与无扩增两类检测策略。本文以无需预扩增为核心线索, 将现有无扩增 CRISPR 检测策略系统归纳为 crRNA 工程化、数字化微流控、物理换能器信号转导及级联信号放大四大类, 并从技术原理层面深入阐述了每一类策略的工作机制与性能特征。在此基础上, 本文进一步聚焦于这些无扩增策略在食品安全真实性鉴别与病原体快速筛查两大应用场景中的具体实践。

1 CRISPR-Cas系统无扩增检测的策略

为了避免预扩增的步骤对检测结果造成的影响, 通常会使用一些无扩增的检测策略, 这些检测策略将 CRISPR-Cas 系统与各种信号转换的传感技术相结合, 如电学、电化学、荧光和纳米颗粒技术等, 实现灵敏且高度序列特异性的检测。为系统阐述无扩增 CRISPR 检测的技术体系, 本文将现有策略归纳为以下方向: crRNA 优化、微液滴等数字化检测平台、信号转换器开发以及级联信号放大系统 (图 1)。下文将分别对其进行详细讨论。

无核酸扩增型CRISPR-Cas检测策略

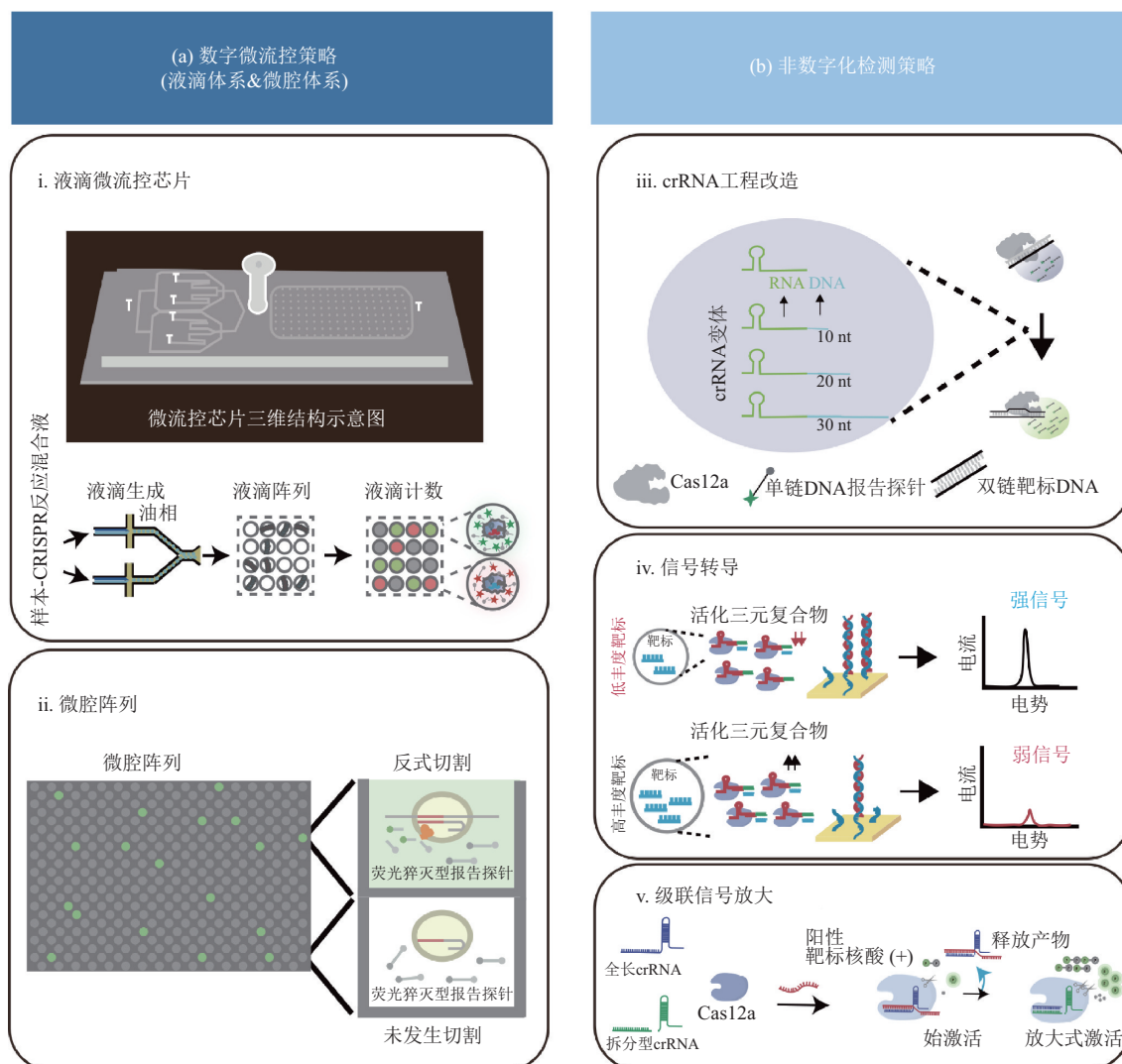


Fig. 1 Schematic illustration for amplification-free CRISPR detection

图1 无扩增CRISPR检测策略示意图

(a) 数字化CRISPR检测平台。(i) 液滴微流控芯片：将反应体系分割为皮升级独立微反应器，实现单分子封装与绝对定量；(ii) 微腔阵列：通过飞升级微孔的静态物理隔离实现高信噪比检测。(b) 非数字化策略。(iii) crRNA优化与报告系统设计：通过理性设计crRNA序列引入化学修饰或变构调控，提升系统特异性，稳定性与反应动力学；(iv) 信号转换型传感界面：将CRISPR识别事件转化为电化学、表面增强拉曼散射等物理信号输出；(v) 级联信号放大系统：通过酶联反应、DNA纳米电路或自催化回路实现对初始信号的指数级放大。

微流控器件具有微型化、自动化和高通量的本征优势，能够将核酸提取、反应和检测等流程集成到方寸芯片上。通过将反应体积压缩至纳升级，微流控器件可以大幅降低试剂消耗和检测时间。在无扩增CRISPR检测领域，微流控平台是实现单分子限域、精密流体操控与现场化部署的核心硬件支撑。根据驱动机制的不同，当前涉及的主要器件可分为以下几类。a. 液滴微流控。目标分子稀释至单拷贝水平后随机封装，经泊松统计即可获得无需标准曲线的直接计数^[21]。b. 微腔阵列。通过光刻或

蚀刻工艺在芯片基底上加工出飞升级固定式微孔，通过静态物理隔离实现更高的信噪比与定量精度。c. 连续流微流控。通过微通道网络在单张芯片上按顺序完成样品预处理、反应及信号采集的全流程贯通，特别适合手持式无扩增检测设备对操作简易性和便携性的要求^[22]。d. 离心微流控。以旋转离心力作为流体驱动力，将多步流体操控集成于一张碟片上，无需外部注射泵，在全自动化样本前处理中具有显著工程优势^[23]。e. 纸基微流控利用滤纸纤维的毛细力被动驱动流体，成本极低，适合作为侧

流层析等信号读出载体, 满足即用即弃的生物安全需求^[24]。

上述器件从皮升级限域的数字化绝对定量到零设备依赖的低成本现场筛查, 为无扩增 CRISPR-Cas 检测系统提供了多样化的硬件平台。其中, 液滴微流控与微腔阵列凭借单分子分区与绝对定量的独特优势, 成为数字化检测方向的核心硬件基础。

1.1 crRNA的优化

作为 CRISPR-Cas 系统的导航模块, crRNA 的结构设计直接决定了靶标识别的动力学参数、切割特异性以及系统在复杂生物样本中的稳定性。在无扩增检测场景下, 由于缺乏指数级信号放大机制, crRNA 性能的微小差异往往会成倍放大。因此, 从序列层面的理性优化到构象层面的动态调控, crRNA 工程化已成为提升无扩增 CRISPR 检测性能的首要环节^[14]。

1.1.1 长度调整与多重靶向

crRNA 长度的调整是影响其结合动力学的基础变量。早期研究发现, 缩短 crRNA 的互补区 (如从 22 bp 减至 18 bp) 能够显著增强 Cas12a 系统对单碱基错配的辨别能力。这是因为较短的互补区对碱基配对的容错性更低, 单个错配对结合自由能的影响更为显著。Chen 等^[25]针对这一问题, 利用单分子实时结合动力学实验证实, 短 crRNA-18 引导的 Cas12a 复合物与完全匹配靶标 (let-7a) 的结合速率远高于单碱基错配靶标 (let-7f), 而长 crRNA-22 对两者几乎无法区分 (图 2a)。然而, 长度缩短的代价是整体结合强度的下降, 这在低丰度靶标检测中可能导致灵敏度损失。针对这一矛盾, 多重 crRNA 策略提供了一种互补性的解决方案。Zeng 等^[26]对同一靶基因的不同保守区域设计多条 crRNA, 使单个靶标 DNA 分子能够同时激活多个 Cas12a-crRNA 复合物。由于每个被激活的 Cas12a 均可独立发挥反式切割活性, 最终的信号输出是多个切割事件的叠加效应 (图 2b)。在非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 检测中, 该策略在无需核酸扩增的条件下将检测灵敏度提升了约 64 倍, 增强了对病毒基因突变的鲁棒性。值得注意的是, 这种策略的成功高度依赖于 crRNA 靶向区域的合理选择, 它们之间既要避免空间位阻, 又要保证靶标序列的保守性。

1.1.2 理性引入错配与高通量筛选

在 crRNA 种子区 (seed region) 人为引入碱基错配, 是一种看似“反常识”却极为有效的特异性

增强策略。这一设计的核心逻辑在于通过在 crRNA 中预埋“弱点”, 人为削弱其野生型序列的结合能力, 而与完全匹配的突变靶标的结合则不受影响。与此互补, Li 等^[27]从 crRNA 互补区长度调控入手, 通过缩短配对区域并引入 3'端随机单链延伸序列, 利用“RESET 效应” (随机延伸序列增强反式切割活性) 在无需预扩增的条件下实现了对任意位置单核苷酸多态性 (single-nucleotide polymorphism, SNP) 的单碱基分辨率识别 (图 2c)。除上述理性设计策略外, 高通量筛选也为 crRNA 优化提供了另一条路径。Spangler 等^[28]通过自动化平台对大规模随机设计的 crRNA 库进行活性测试, 能够快速鉴定出高活性、高稳定性的候选序列, 规避了复杂的序列-结构-功能预测规则的局限。然而, 这种筛选策略的成本和周期仍是其规模化应用的主要障碍。

1.1.3 化学修饰提升crRNA稳定性及Cas蛋白活性

crRNA 作为 RNA 分子, 在复杂生物样本中极易被核酸酶降解, 这是制约无扩增检测稳定性的重要因素。在 crRNA 的 3' 和 5' 端进行磷硫酰 (phosphorothioate, PS) 修饰与单链 DNA (ssDNA) 延伸, 不仅显著增强了其对核酸酶降解的抗性, 这种修饰还能将 LbCas12a 的反式切割活性提升约 5 倍 (图 2d)^[29]。目前对这一现象的机制解释仍不完全清晰, 可能与以下因素相关。首先, 化学修饰稳定了 Cas 蛋白的活性构象; 其次, 末端延伸段优化了报告分子进入催化口袋的微环境; 最后, 修饰改变了 crRNA-Cas 的电荷分布, 增强了与底物的静电相互作用。这一发现为在复杂生物基质 (如血清、食品提取物) 中开发稳健的即时检测平台奠定了结构基础。

1.1.4 变构crRNA设计

传统 crRNA 优化聚焦于序列本身, 而变构 crRNA 则将 crRNA 从静态的向导分子升级为可受外部信号调控的动态开关。这一策略源于对 Cas13a 蛋白变构通路的深入解析。研究揭示, crRNA 重复区的 A(-3) 碱基在变构信号传递中起关键作用。在仅结合 crRNA 时, A(-3) 被排斥在 HEPN1-2 蛋白界面外; 而当靶标 RNA 结合后, A(-3) 插入内部, 与 R377、N378 和 R973 等关键残基相互作用, 触发构象重排并激活远端催化核心 (图 2e)^[30]。基于这一机制, 研究人员构建了变构核酶驱动的 crRNA 开关用于无扩增生物传感^[31]。通过设计一个锁定态 crRNA, 其 3' 端延伸段通过碱

基配对使 crRNA 失活并引入一个靶标响应性变构锤头状核酶 (hammerhead ribozyme)。该核酶在识别靶标 (如 miRNA 或 ATP) 后被激活。激活的核酶特异性切割锁定态 crRNA, 释放出具有活性的天然 crRNA, 最终启动 Cas12a 的反式切割。这种

策略巧妙地将靶标识别、信号转换与 CRISPR 激活串联起来, 不仅实现了对核酸及非核酸靶标 (如小分子代谢物) 的无扩增检测, 还通过与侧流层析技术结合展现了即时检测应用潜力。

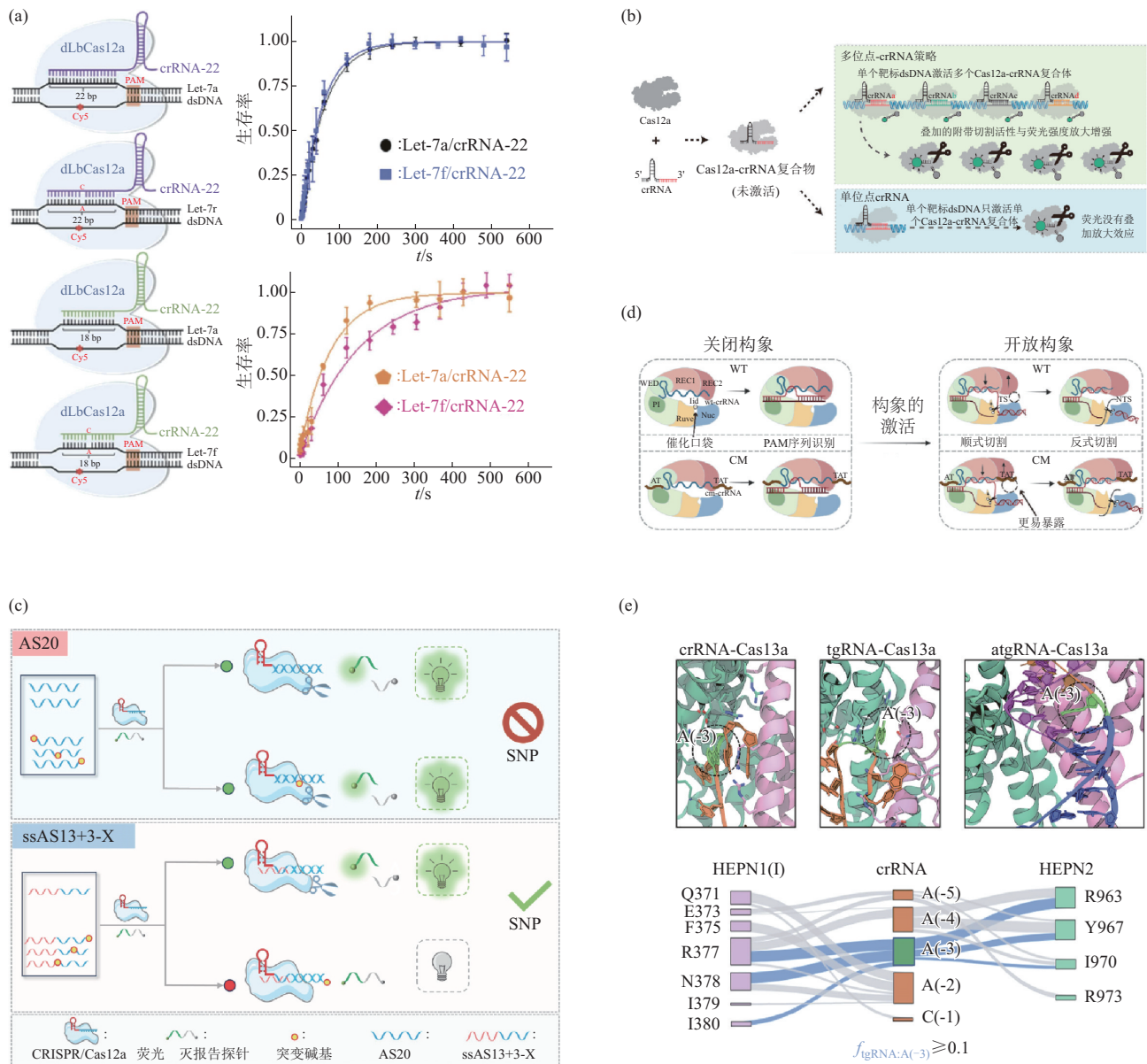


Fig. 2 Schematic illustration of crRNA optimization strategies and mechanisms

图2 crRNA优化策略与机制示意图

(a) crRNA长度对单碱基错配识别能力影响示意图^[25]; (b) 多重crRNA靶向信号放大机制示意图^[26]; (c) crRNA互补区长度调控结合激活链工程化用于SNP识别示意图^[27]; (d) 化学修饰crRNA增强Cas12a反式切割活性示意图^[29]; (e) crRNA变构激活Cas13a关键位点机制示意图^[30]。SNP: 单核苷酸多态性 (single-nucleotide polymorphism)。

1.2 基于微流控的数字化检测

在无扩增 CRISPR 检测体系中, 微流控技术的

引入不仅是为了降低试剂消耗, 更关键的是利用物理分隔 (physical partitioning) 策略实现单分子水

平的绝对定量。主要原理是通过将连续的反应体系离散化为数以万计的皮升 (pL) 甚至飞升 (fL) 级微反应单元。这种数字化检测模式有效规避了传统体相 (Bulk) 反应中背景噪音对微弱信号的掩盖, 并依据泊松分布统计原理实现无需标准曲线的直接计数^[21, 32]。当样本随机分散至这些微型反应单元时, 大多数反应室不含靶标分子, 而少数含有单个或少数几个靶标分子的反应室会产生特异性信号。通过计数阳性反应室的数目 (而非测量信号强度), 可直接获得靶标分子的绝对数量, 完全无需标准曲线。在构建数字化微流控检测的技术路线方面, 根据微单元构建方式的不同, 该技术主要分为液滴微流控 (droplet microfluidics) 与微腔阵列 (microchamber arrays) 两大主流路径^[33]。

1.2.1 液滴微流控数字化无扩增检测体系

液滴微流控利用不混溶的两相流体 (通常为油包水体系) 生成高度均一的微反应器, 其核心优势在于极高的生成通量与局域浓度效应。以基于 Cas12a 的 PddCas 系统为例, 通过优化缓冲体系 (pH 9.0, Mg^{2+}/Na^{+} 浓度调整) 与引入 C-rich 荧光报告分子, 首先将 Cas12a 的反式切割周转率提升了逾 50 倍^[34]。在此基础上, 微流控芯片将反应体系分割为直径约 20 μm 的皮升级液滴。这种物理限域效应将单个靶标核酸与 Cas 蛋白的局部有效浓度提升了数个数量级, 即使是单分子结合事件也能在极短时间内积累足够的荧光信号 (图 3a, b)^[35-36]。为进一步提升鲁棒性, 人们利用双 crRNA 靶向策略, 通过协同增强识别效率确保单分子事件的可靠检出。实验数据显示, 优化后的 PddCas 平台在临床血清样本中实现了低至 17.5×10^6 copies/L 的检测限, 且在 $10^8 \sim 10^{10}$ copies/L 区间保持优异的线性定量关系 ($R^2 > 0.999$), 应用于 ASFV、EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 等多种病毒 DNA 的直接计数^[36]。值得注意的是, 液滴系统的流动性虽然赋予了其极高的生成速度 (秒级生成万级液滴), 但也对后续的信号读取与液滴稳定性提出了挑战, 通常需要配合流式检测或平面成像系统。

1.2.2 微流控微腔室阵列数字化无扩增检测体系

与液滴系统的动态流动不同, 微腔阵列 (microchamber arrays) 技术侧重于在静态的物理限域微结构中进行分区检测, 这一特性使其天然契合自动化集成与高灵敏度成像。SATORI (single-molecule assay for one-molecule-at-a-time RNA

identification) 技术是该路径的典型代表。SATORI 利用飞升级 (~ 3 fL) 微腔阵列将背景噪音压低至极致, 配合 CRISPR-Cas13a 的高效反式切割, 实现了对单链 RNA 靶标约 10 fmol/L 的快速检测^[37-38]。

微腔阵列的静态属性使其极易与自动化硬件耦合。例如, 升级版的 opn-SATORI 平台集成了定制化移液机器人与自动化显微成像系统, 成功构建了“样本进到结果出”的全自动工作流 (图 3c)^[39]。微腔阵列与磁珠富集技术的结合极大提高了检测的灵敏度, 通过磁珠功能化探针在宏观体积中捕获靶标, 再将其浓缩至微观的反应腔室中, 从而利用从宏观捕获到微观检测的策略有效克服了扩散限制。此外, 也有课题组开发出集成式数字 CRISPR (dCRISPR) 系统, 同样利用磁珠富集, 结合 LtrCas13a 的高活性, 将严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) RNA 的检测限推进至惊人的 6.5 amol/L (约 3.9×10^6 copies/L), 逼近了分子诊断的物理极限^[40] (图 3d)。此外, 为了降低微加工成本, 基于商业化多孔膜的简化策略也应运而生。基于自动化膜分区的自数字分割法 (self-digitization through automated membrane-based partitioning, STAMP) 技术巧妙利用径迹蚀刻聚碳酸酯膜中天然存在的微孔作为反应单元, 通过毛细作用实现样品的自发加载与数字化分区 (图 3e), 整个检测在 30 min 内完成, 检测限达 1 fmol/L。这种方法虽在孔径均一性上略逊于光刻微腔, 但其无需复杂外部设备, 为资源匮乏地区的定量检测提供了极具吸引力的低成本方案^[41]。

1.2.3 微流控数字化技术路径对比

无论是液滴、微腔还是多孔膜, 这 3 种技术的共同本质都是通过物理离散化克服背景信号干扰, 通过泊松分布原理实现绝对定量, 其差异主要体现为通量、精度、设备集成难度和成本 4 个维度的工程取舍。液滴系统通量最高, 每秒可生成数万乃至数十万个反应单元, 定量精度仅次于微腔阵列, 但依赖外部流体驱动和光学成像模块, 集成难度较高, 成本居中, 适合大规模筛查场景。微腔阵列凭借飞升级限域体积实现了最高的定量精度和信噪比, 静态结构天然适配自动化平台的模块化集成, 在结合磁珠富集后的超低丰度 (amol/L 级) 检测中具有不可替代的优势, 但其精密光刻加工导致成本在 3 种路线中最高, 通量受限于腔室数量。多孔膜

方案借助商业化径迹蚀刻膜的毛细作用实现自驱动分区, 无需光刻工艺或外部流体设备, 成本最低, 操作最为简便, 为资源匮乏地区的现场快速检测提供了切实可行的替代路径, 但其定量精度受膜孔径均一性的限制。未来, 随着微加工工艺的标准化与

配套光学检测模块的小型化, 这种融合了数字PCR级定量能力与CRISPR级特异性的无扩增检测平台, 有望成为精准医疗与现场检疫领域的核心工具^[22, 42-44]。

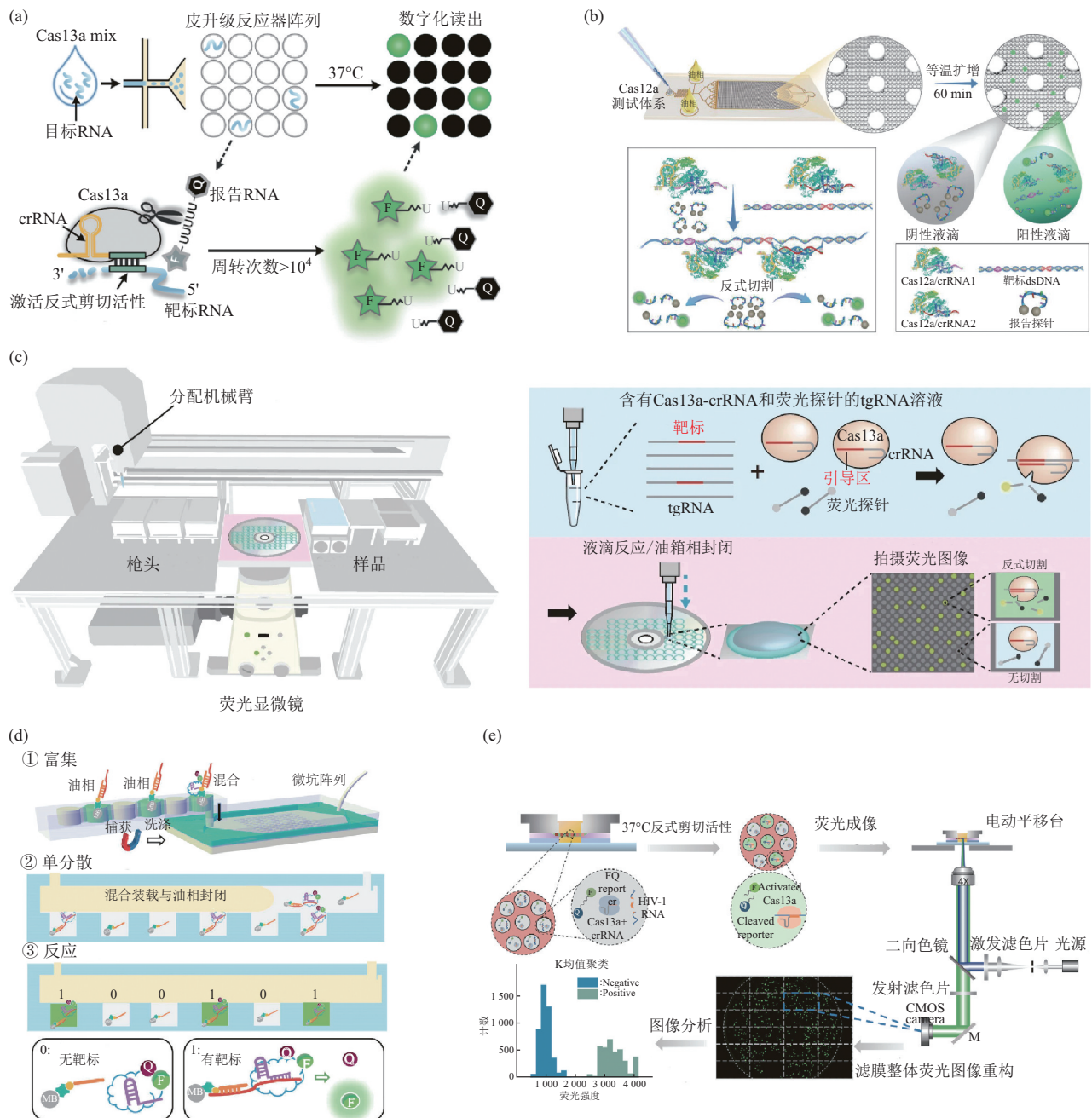


Fig. 3 Schematic illustration of microfluidic-based digital CRISPR detection platforms

图3 基于微流控的数字化CRISPR检测平台示意图

(a) 液滴微流控中Cas13a介导的单分子RNA检测示意图^[35]; (b) 液滴阵列中Cas12a介导的单分子DNA绝对定量示意图^[36]; (c) 自动化微腔阵列平台 (opn-SATORI) 全流程检测示意图^[39]; (d) 磁珠富集结合飞升 (fl) 级微孔阵列的单分子RNA检测示意图^[40]; (e) 基于多孔膜的STAMP数字化CRISPR检测平台示意图^[41]。

1.3 集成电极与纳米界面的CRISPR信号转导策略

数字微流控虽能实现单分子绝对定量检测, 但其对光学显微成像系统的依赖限制了其在资源匮乏场景下的应用。为突破这一瓶颈, 研究者将CRISPR识别事件转换为电化学、拉曼光谱等易于便携式检测的物理信号, 开发出无需精密光学仪器的新型传感平台。本节讨论的传感系统将Cas蛋白的反式切割活性通过电极界面或等离子激元纳米结构直接转换为电化学发光、电流或拉曼散射信号, 从而摆脱了对荧光显微镜或流式细胞仪的依赖^[45]。

1.3.1 基于电化学发光(ECL)传感器的光电耦合的信号放大策略

电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)传感技术通过施加电压触发共反应物(如三丙胺, TPrA)与电极表面修饰的发光标签(如 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)之间的电子转移反应, 生成激发态中间体, 后者回到基态时释放光子, 产生可被光电倍增管检测的发光信号。这种将电刺激与光输出耦合的机制, 在信噪比方面较单纯荧光法有天然优势。将CRISPR系统与ECL技术整合的关键在于构建“信号关闭型”检测模式。典型设计中, DNA四面体纳米结构(tetrahedral DNA nanostructure, TDN)作为刚性支架, 其顶点修饰的ssDNA探针标记有ECL信号分子 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 。该结构通过硫金键固定于金电极表面(图4a)。当靶标DNA存在时, Cas12a-crRNA复合物被激活, 其反式切割活性会非特异性切割TDN顶点的ssDNA, 导致 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 从电极表面脱落, ECL信号显著减弱^[45-46]。该策略已在SARS-CoV-2的S基因和Orf1ab基因检测中表现出pg/L级别的检测限, 并配合便携式ECL分析仪实现了全流程自动化, 检测时间缩短至20 min^[46]。然而, ECL传感器目前仍面临一些挑战, 如需要外接光电倍增管(photomultiplier tube, PMT)进行信号采集, 难以实现真正意义上的芯片化检测。

1.3.2 电化学传感器

相较于ECL需要光学检测模块, 电流型电化学传感器直接通过监测氧化还原电流的变化实现定量检测, 更契合便携式诊断设备的硬件要求。其核心机制在于电极表面修饰的报告RNA一端通过硫金键锚定, 另一端标记有电化学活性探针(如二茂铁Fc或亚甲蓝MB)。当Cas13a/crRNA复合物在靶标RNA激活下发挥反式切割活性时, 报告RNA被切割, 电化学探针也随之脱落, 导致峰值电流下降

(图4b)^[47]。

这种信号关闭型设计的关键挑战在于背景泄漏信号的控制。即使在无靶标条件下, Cas13a也可能存在微弱的本底切割活性, 这会导致假阳性。为实现低背景信号, 研究者通过电极界面工程提升传感性能, 例如在电极表面修饰纳米复合材料与金纳米花以增强导电性和比表面积, 并优化探针取向与界面阻断^[48]。此外, 通过精密的界面工程, 例如使用6-巯基-1-己醇回填以优化探针取向并阻断非特异性蛋白吸附, 进一步有效抑制了背景信号, 将SARS-CoV-2检测限推进至2.5~4.5 pg/L, 与逆转录实时荧光定量聚合酶链式反应(reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR)结果高度吻合^[47]。为进一步简化探针修饰流程, 研究者采用了无标记的电化学检测策略。如, 引入错配银探针(mismatch Ag probe, MAP), 当Cas12a激活后, 切割探针导致嵌入的银离子(Ag^+)释放, 通过阳极溶出伏安法直接检测银信号的减弱^[49]。另一种反向设计的E-Si-CRISPR生物传感器则利用Cas12a切割清除电极表面的ssDNA, 抑制后续的银金属化沉积反应, 通过背景信号的显著降低来实现检测, 检测限达3.5 fmol/L^[50]。这类基于银离子的策略虽规避了复杂的氧化还原标记过程, 但银沉积的可控性与重现性仍需工程化验证。

1.3.3 表面增强拉曼散射(SERS)传感器

表面增强拉曼散射(surface-enhanced Raman scattering, SERS)技术通过金属纳米结构(如金纳米颗粒)表面的局域电磁场增强效应, 可将吸附分子的拉曼信号放大 $10^4\sim 10^6$ 倍, 达到单分子检测水平^[51]。与荧光法相比, 拉曼光谱的窄峰宽和抗光漂白特性使其更适合多重检测。然而, SERS技术在生物传感中的应用一直受限于等离子激元热点(plasmonic hotspot)构建的复杂性与稳定性问题^[52]。

CRISPR与SERS的联用提供了两种互补的信号转导模式。第一种策略是利用催化失活的dCas9(nuclease-dead Cas9)作为靶向富集工具。dCas9/gRNA复合物特异性结合靶标核酸后, 将其招募至预修饰SERS标签(如罗丹明B标记的金纳米颗粒)的磁珠表面, 通过空间限域效应使靶标进入SERS热点区域, 直接产生增强的拉曼指纹信号(图4c)^[53]。这种信号开启型设计的优势在于无需切割反应即可输出信号, 但对sdCas9-靶标复合物的

稳定性要求较高。第二种策略是利用 Cas12a 的反式切割活性来实现信号开关转换。譬如 SERS 标签通过单链 DNA 连接链 (single-stranded DNA linker) 连接至磁珠或金纳米结构表面, 当 Cas12a 激活后切割连接链, SERS 标签释放至溶液中, 经磁分离后上清液产生显著的拉曼信号 (图 4d) [54]。该策略在食源性病原体 (如诺如病毒) 检测中展现了强大潜力, 灵敏度达 10^5 copies/L, 且能直接处理复杂基质 (如生菜、牡蛎提取物等) [55]。这种策略不仅保留了 LFA 的直观性与便携性, 同时将灵敏度提升了数个数量级, 代表了 POCT 领域的重要技术演进方向。

综合来看, 上述 3 类信号转换策略各有侧重。ECL 传感器凭借极高的信噪比适合实验室环境下

的高灵敏定量检测, 电流型电化学传感器因硬件需求最低而最适配手持式即时检测设备, 表面增强拉曼散射传感器则在多重检测中潜力最大但成本最高。在工程实现上, ECL 对光电倍增管等的依赖限制了其设备小型化, 电化学传感器的电极长期稳定性仍是制约其性能的瓶颈, 而 SERS 的等离子体热点构建复杂性与批次间一致性有待进一步改善。未来, 将这些传感器与微流控平台深度集成, 如将 SERS 与电化学传感单元整合至同一芯片上实现初筛与确证的联用, 或开发基于场效应晶体管 (field-effect transistor, FET) 的无标记 CRISPR 检测有望在便携性、灵敏度和多重检测能力之间取得更优的平衡, 真正实现 POCT 式的分子诊断实验室。

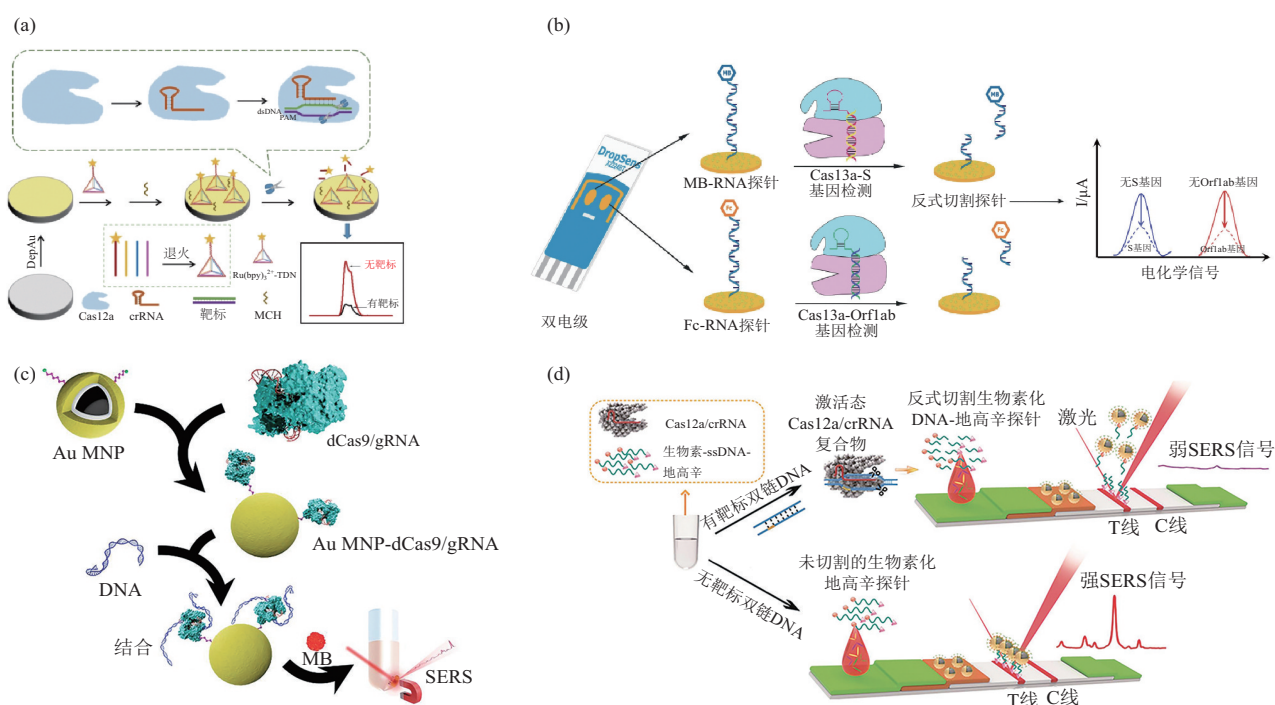


Fig. 4 Schematic illustration of signal-transducing CRISPR biosensors

图4 信号转换型CRISPR生物传感器原理示意图

(a) 基于CRISPR-Cas12a与DNA四面体纳米结构的“信号关闭”型电化学发光传感器示意图 [45]; (b) 基于CRISPR-Cas13a的电化学传感器工作原理示意图 [47]; (c) 基于dCas9的SERS传感器工作原理示意图 [53]; (d) CRISPR-Cas12a介导的SARS-CoV-2检测SERS测定示意图 [54]。

1.4 信号级联放大策略用于无扩增检测

无扩增 CRISPR 检测的最大挑战在于单次靶标识别仅能激活一个 Cas 蛋白复合物, 即使该 Cas 蛋白具有反式切割活性, 其周转数 (turnover number) 仍受限于酶动力学参数, 难以在短时间内产生足够的可检测信号。为突破这一瓶颈, 当前

的众多研究已经开始致力于构建级联放大回路, 即将一次靶标识别事件转化为持续、自增强的信号输出。根据放大机制的差异, 这些策略可归纳为酶构象循环利用、多酶功能串联、DNA 动态电路耦合、自催化正反馈回路以及跨域多重放大 5 大类别。

最简捷的级联放大思路是尽可能利用单个 Cas

蛋白的催化潜力。传统 Cas12a-crRNA 复合物一旦被靶标激活, crRNA 在完成使命后往往随复合物一起失活, 造成催化潜力的浪费。竞争性 crRNA 置换策略巧妙地利用了 Cas12a 激活后的构象变化。当完整 crRNA 引导的 Cas12a 识别靶标并完成第一轮反式切割后, 其构象转变使得分裂 crRNA (split crRNA) 得以竞争性替换原有的完整 crRNA, 重新赋予 Cas12a 识别第二个靶标序列的能力, 启动第二轮反式切割^[56]。这种一次识别两次激活的机制虽设计精巧, 但放大倍数仍受限于 crRNA 置换效率与 Cas12a 的构象稳定性, 难以实现指数级放大。

多酶串联策略将不同酶的功能模块化连接, 形成信号传递链。利用上游酶的输出产物作为下游酶的激活信号或底物, 实现跨酶种的信号传递与放大。例如, Cas12a 的反式切割活性可释放碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP), 后者通过去磷酸化激活激烈火球菌 Ago 蛋白 (*Pyrococcus furiosus* Argonaute, *PfAgo*) 核酸酶, *PfAgo* 进一步切割报告分子产生最终信号 (图 5a)。这种三酶级联技术在鼠伤寒沙门氏菌检测中实现了 23×10^3 CFU/L 的检测限^[57]。然而, 多酶串联也存在一定的局限性, 例如会引入新的背景噪音和反应时间, 不同酶对反应条件 (pH、离子强度、温度) 的要求可能存在冲突, 需要对缓冲体系进行优化, 此外, 多酶串联的鲁棒性较差。因此, 该策略更适合对灵敏度要求极高、但对检测速度容忍度较高的应用场景。

将 CRISPR 模块嵌入 DNA 纳米电路 (DNA nanocircuits), 是实现可编程信号放大的前沿策略。DNA 纳米电路基于立足点介导的链置换 (toehold-mediated strand displacement, TMSD) 反应原理, 通过精密设计的序列互补关系构建分子级逻辑门, 可在等温条件下实现无酶催化的信号放大。譬如以 3D DNA Walker-Cas12a 级联系统为例, 靶标 miRNA 首先激活固定在四面体纳米支架上的 DNA Walker^[58]。类似的设计还包括级联 toehold 链置换反应 (CTSDR)-Cas12a 平台, 其通过 miRNA 触发的 CTSDR 循环产生含前间隔序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 序列的 dsDNA 人工激活子, 后者批量激活 Cas12a, 实现对 miR-21 低至 70.28 fmol/L 的检测 (图 5b)^[59]。这类策略的优势在于其模块化与可编程性, 即通过改变 DNA 序列设计, 可灵活调整放大倍数、反应时间与特异性阈值。但随着系统复杂度的激增, 需要精

确设计十余条寡核苷酸序列, 且在复杂生物样本中的稳定性有待验证。

前述策略虽能实现多级放大, 但本质上仍是单向传递, 也就是信号只能沿设计路径向下游流动。而自催化循环则引入了正反馈机制。下游产物能够回过头来促进上游反应, 形成雪崩效应。这一策略以双 Cas12a 核糖核蛋白 (ribonucleoprotein, RNP) 复合物自催化系统为典型代表 (图 5c)。该系统由 RNP1 (靶标特异性)、RNP2 (发夹 DNA 特异性) 及发夹 DNA 信号放大器构成。当靶标激活 RNP1 后, RNP1 切割发夹 DNA, 其线性化产物作为人工靶标激活 RNP2^[60]。CRISPR-Cascade 方法采用类似原理, 通过封闭核酸 (blocked nucleic acid, BNA) 的循环切割释放实现自催化, 在 10 min 内达到 amol/L 级检测限, 并成功在临床血样中实现对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)、乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 等多病原体的快速检测^[61]。

另外, 跨域级联策略不再局限于生化反应网络, 而是将 CRISPR 识别事件转化为化学催化甚至物理信号变化。例如, Cas13a 识别靶标 miRNA 后触发 DNA 切割, 释放葡萄糖氧化酶 (GOx) 催化葡萄糖生成 H_2O_2 , 后者激活纳米酶 (普鲁士蓝纳米颗粒) 催化显色反应, 沉淀物覆盖有机光电晶体管 (OPET) 栅极, 抑制光电流 (图 5d)^[62]。这种跨域整合虽实现了超高灵敏度 (fmol/L 级), 但系统复杂度与成本也达到了当前技术的极限, 其走向实际应用仍需克服多酶体系在不同缓冲条件下的兼容性、批间可重复性以及微纳加工的一致性工程化挑战, 在复杂生物样本中的综合性能亦有待进一步验证。为进一步比较不同技术路线的适用范围, 表 1 从灵敏度提升能力、操作复杂度、成本、POCT 适配性和代表性技术等维度总结了 4 类无需预扩增 CRISPR 检测策略的主要特点。

综合来看, 4 种策略在灵敏度、复杂度、成本和 POCT 适配性之间各有取舍, 形成了互补而非替代的技术格局。crRNA 优化操作简便、成本最低, 适合作为其他策略的基础增强模块; 数字化微流控在绝对定量精度上具有不可替代的优势; 电化学等信号转导策略因硬件需求最低而最适配手持式即时检测设备; 级联放大策略灵敏度虽极高, 但系统复杂度也最高, 目前多处于概念验证阶段。上述策略并非相互排斥, 例如将优化后的 crRNA 嵌入数字

化微流控平台可进一步提升单分子检测的信噪比，将电化学传感界面与级联放大网络耦合则有望在便

携性与灵敏度之间取得更优的平衡。

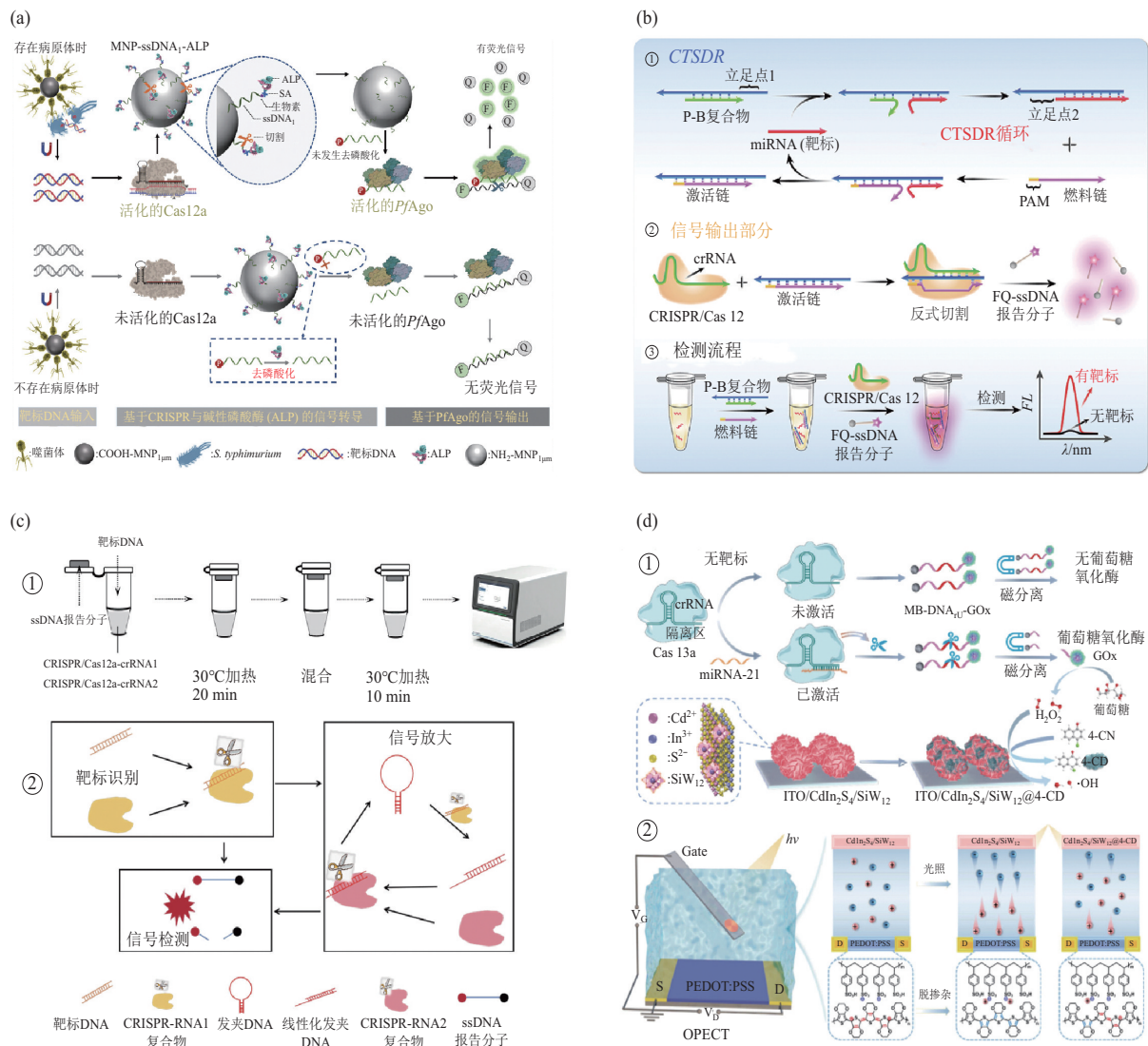


Fig. 5 Schematic illustration of CRISPR cascade signal amplification strategies

图5 CRISPR级联信号放大策略原理示意图

(a) 基于CRISPR-Cas12a与PfiAgo的双酶级联信号放大检测示意图^[57]；(b) 基于级联立足点（toehold）链置换反应与CRISPR-Cas12a的荧光生物传感器原理示意图^[59]；(c) 基于发夹DNA信号放大器的自催化级联CRISPR检测系统示意图^[60]；(d) 基于CRISPR-Cas13a、纳米酶与光电晶体管的重三重信号放大示意图^[62]。

Table 1 Comparison of four amplification-free CRISPR-based biosensing strategies

表1 四种无需预扩增CRISPR检测策略的性能对比

策略	灵敏度提升	操作复杂度	成本	POCT适配性	代表性技术
crRNA工程化	中等	低	低	高	多重crRNA ^[26] 、化学修饰crRNA ^[29]
数字化微流控	高	高	高	中等	PddCas ^[34] 、SATORI ^[39] 、STAMP ^[41]
信号转导传感	中高	中等	中等	最高	电化学传感器 ^[47] 、SERS-LFA ^[54]
级联信号放大	极高	极高	中高	较低	CRISPR-Cascade ^[61] 、CRISPR+纳米酶+OPET ^[62]

“灵敏度提升”以各策略在无需预扩增条件下可达到的检测限范围为参考：crRNA工程化通常提升5~64倍，数字化微流控和级联放大可达amol/L~fmol/L级，信号转导传感因靶标及计量方式不同，检测限可分别达到fmol/L级摩尔浓度或pg/L级质量浓度。POCT：现场快速检测（point-of-care testing）；SERS-LFA：表面增强拉曼散射侧流分析（surface-enhanced Raman scattering-based lateral flow assay）；OPET：有机光电晶体管（organic photoelectrochemical transistor）。PddCas、SATORI和STAMP为数字化CRISPR检测相关平台名称。

2 基于微流控器件的CRISPR-Cas系统无扩增检测的应用

无扩增CRISPR检测技术与微流控器件的深度融合,正在推动分子诊断从实验室走向现场。这种样本进-结果出(sample-to-answer)的技术范式已在食品安全监控、病原体快速鉴定及肿瘤液体活检等关键场景中展现出独特价值。其核心优势在于:通过规避预扩增步骤,不仅缩短了总检测时间(从数小时降至数十分钟),更从根本上消除了气溶胶污染风险,为资源受限环境下的POCT提供了可行路径。

2.1 食品安全检测:从成分溯源到过敏原筛查

传统的qPCR或基因测序虽能实现准确认证,但其对专业人员与精密仪器的依赖限制了在监管现场的应用^[63]。无扩增CRISPR技术通过将检测复杂度从实验室级降至手持设备级,正在重塑食品安全监测的技术格局。肉制品掺假(如以低价猪肉冒充牛肉,或在高档羊肉中混入鸭肉)不仅侵犯消费者权益,更可能引发宗教民俗冲突或过敏反应^[64]。早期的CRISPR检测方案(如CIPAM系统)虽通过集成重组酶辅助扩增(recombinase-aided amplification, RAA)与离心微流控实现了0.1%的掺假检出率,但本质上仍未摆脱核酸扩增的固有风险^[65]。真正的技术跃迁始于多重crRNA策略的引入。通过协同设计多条靶向细胞色素b基因的crRNA,单个靶标DNA分子可同时激活多个Cas12a复合物。这种多crRNA增强型CRISPR(multiple crRNAs enhanced CRISPR, meCRISPR)策略在普通试管中即可完成检测,灵敏度达1.13 mg/L,且无需荧光显微镜等昂贵设备,可用自制便携装置进行孵化与肉眼判读^[66]。然而,当需要对多物种成分进行绝对定量时,数字微流控成为不二之选。CC-drop平台通过机器学习辅助的双通道液滴数字检测,实现了对猪肉与鸭肉成分的同时绝对定量(图6a)。其定量精度较传统试管法提升约 10^7 倍,总检测时间约80 min^[67]。为进一步简化流程,研究人员开发了免标记的DNA-AgNCs荧光探针^[68]。此外,通过将Cas12a的反式切割活性与杂交链式反应(hybridization chain reaction, HCR)耦合,可大量生成具有过氧化物酶活性的G-四链体DNA酶,该酶既能催化底物显色(肉眼判读),又能调控金纳米颗粒聚集产生SERS信号,形成从肉眼初筛到仪器确证的分级检测体系^[69]。

在乳制品领域,山羊奶常被掺入廉价牛乳,可

能引发 α -S1酪蛋白过敏^[70-71]。针对牛源DNA的无扩增检测,SERS传感策略展现了独特的优势(图6b)。通过将ssDNA与普鲁士蓝纳米标签结合,当Cas12a激活后反式切割探针,导致纳米颗粒脱落,残留的普鲁士蓝经碱处理释放铁氰根离子,产生独特的SERS信号,检测限达224 amol/L^[72]。类似的HCR级联放大与双模输出策略同样适用于乳制品检测^[73]。利用电化学结合微流控芯片技术,将样品处理、CRISPR反应与信号检测一体化集成,通过靶标激活Cas12a后切割电极表面修饰的报告DNA,导致电化学标签(如二茂铁)脱落,引起电流信号降低^[74]。

转基因生物(genetically modified organism, GMO)的鉴定是食品安全监管的刚需。针对转基因大豆的检测,研究者开发了具有自验证功能的双模电化学传感器。通过同步采集ECL与快速扫描伏安法(fast-scan voltammetry, FSV)信号并交叉验证(图6c),检测限达0.3 fmol/L,1 h内完成^[75]。在过敏原检测方面,CRISPR系统与适配体技术的结合拓宽了其应用边界。针对溶菌酶(lysozyme)的检测,研究者设计了荧光适配体传感器,利用适配体LYS-80特异性识别溶菌酶后,通过竞争性结合释放cDNA,后者被Cas12a顺式切割,恢复羧基荧光素(carboxyfluorescein, FAM)荧光信号,检测限低至6.10 pmol/L(图6d)^[76]。结合侧流层析(lateral flow assay, LFA)技术,该策略可实现蛋类、乳制品及坚果过敏原的快速筛查^[77]。

2.2 病原体检测:从感染分型到复杂基质

病原体的快速、精准鉴定是控制传染病暴发的关键。无扩增CRISPR检测在该领域的应用呈现出明显的策略分化特征,需要根据样本复杂度、检测目标(定性/定量)及应用场景(临床/现场)灵活选择技术路径^[78-79]。区分细菌性与病毒性感染是临床对症治疗的前提。研究者开发的正交CRISPR-Cas系统整合了Cas13a与Cas14a蛋白,在单一反应体系内实现高特异性双重RNA检测(图6e)。结合卡片辅助离心洗脱法(flinders technology associates card-assisted centrifugation-elution, FTACE)方法进行血样快速处理,全流程在30 min内完成,为发热患儿的快速分型提供了实用工具^[80]。针对环境水样中的大肠杆菌O157:H7,Cas12a-HCR倏逝波荧光检测(Cas12a-HCR evanescent wave fluorescence, CHANCE)平台通过CRISPR-Cas12a与HCR联用,

结合便携式倏逝波荧光传感器, 50 min内检测限达 17.4×10^3 CFU/L^[81]。在水产养殖领域, 针对对虾塔拉综合征病毒的无扩增 Cas13a 检测体系, 通过多重 crRNA 组合放大信号, 15 min 内完成检测且与 RT-qPCR 结果高度一致^[82]。类似策略也用于 ASFV 的养殖场筛查^[26]。血浆等复杂基质中的基质抑制效应是无扩增检测的主要障碍。有研究者利用磁珠固定化技术将 Cas12a-crRNA 复合物共价固定在核壳磁性纳米颗粒上, 成功应用于 ASFV 检测^[83]。更精巧的设计来自磁性 CRISPR-Cas12a-

SERS 传感器, 激活的 Cas12a 切割连接 SERS 探针与磁性探针的 ssDNA 连接链, 经磁分离后, 上清液中游离的 SERS 探针产生拉曼信号, 成功用于生菜、牡蛎等复杂基质中诺如病毒的检测, 灵敏度达 10^5 copies/L^[55]。在临床诊断中, PddCas 技术对人乳头瘤病毒 18 型 (human papillomavirus type 18, HPV 18) 与 SARS-CoV-2 的检测表现出 100% 的灵敏度与特异性, 其双基因同步检测能力使其非常适合公共卫生床旁检测^[58]。该技术还成功应用于血清中 ASFV (图 6f)、EBV 及 HBV 的检测, 结果与

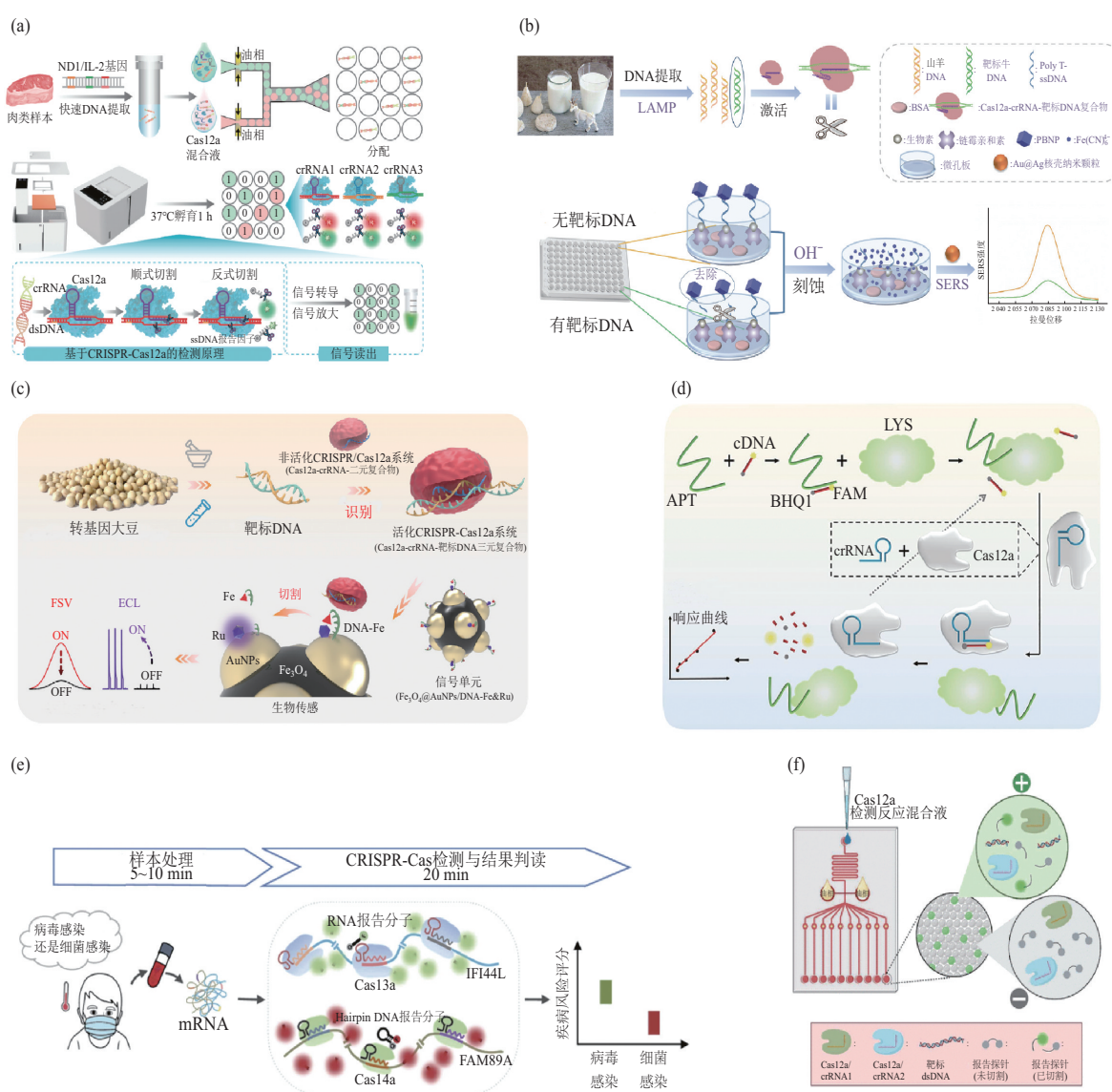


Fig. 6 Schematic illustration of microfluidic-based amplification-free CRISPR detection for food safety and pathogen diagnosis

图6 基于微流控器件的无扩增CRISPR检测在食品安全与病原体诊断中的典型应用实例

(a) CC-drop平台用于肉制品真实性检测的数字化定量示意图^[67]; (b) 基于CRISPR-Cas12a与SERS信号转换的乳制品掺假检测示意图^[72]; (c) 基于CRISPR-Cas12a的双模式电化学传感器用于转基因大豆检测示意图^[75]; (d) 基于CRISPR-Cas12a顺式切割的荧光适配体传感器用于溶菌酶检测示意图^[76]; (e) 正交CRISPR系统用于细菌与病毒感染快速分型检测示意图^[80]; (f) 多重crRNA策略用于非洲猪瘟病毒与鸭源成分同步检测示意图^[84]。

qPCR 完全一致, 实现了绝对定量^[84]。

3 挑战与未来展望

尽管基于微流控的无扩增 CRISPR-Cas 生物传感技术在理论研究和实验室验证阶段均已展现出变革性潜力, 但在临床诊断和商业化应用的过程中, 仍面临一系列从实验室走向产品的系统性工程挑战。首当其冲的是检测标准化与质控体系的缺失。当前, 不同实验室在 Cas 蛋白活性定义、crRNA 设计规则、报告探针序列选择乃至微流控操作参数等方面缺乏统一规范, 导致报道的高灵敏度数据往往难以在不同平台上复现^[85-86]。这种碎片化技术生态不仅制约了无扩增 CRISPR 诊断技术的可比性与迭代效率, 也是获得医疗器械监管审批的主要障碍之一^[87-88]。针对这一问题, 学术与产业界亟须建立从微流控芯片制造到检测性能评估的质控标准, 并推进与现有分子诊断多中心、大样本量临床比对验证^[89-90]。美国食品药品监督管理局及欧盟体外诊断法规等监管框架对新型诊断技术的分析性能与临床效能提出了严苛的数据要求, 而大多数无扩增 CRISPR 平台目前距离满足前瞻性临床试验的统计学要求尚有较大差距^[91-92]。

CRISPR 检测试剂与微流控器件的长期稳定性是制约其即时检测转化的另一关键瓶颈。Cas 核糖核蛋白复合物以及经化学修饰的 crRNA 在溶液状态下对温度、pH 和核酸酶极为敏感, 而现场检测场景通常要求试剂能够耐受常温储运甚至极端环境波动。将无扩增 CRISPR 反应体系通过冷冻干燥或玻璃化固相保存工艺预载于微流控芯片内部, 是解决这一瓶颈的有效路径^[93]。此外, 物理换能器(如纳米材料修饰的电化学或表面增强拉曼散射传感界面)在长期存储中的信号漂移与生物污染问题, 同样需要依赖界面钝化与自校准策略来保证可靠性^[88, 94]。微流控芯片的批量化生产与成本控制是另一关键门槛。以飞升级微腔阵列和液滴微流控为代表的数字化检测方法能够在无扩增条件下绕过标准曲线实现单分子绝对定量, 但目前的芯片制备往往依赖光刻、深反应离子刻蚀(deep reactive ion etching, DRIE)、精密注塑等工艺, 生产周期长且单片成本高^[95]。近年来, 基于 3D 打印、激光切割与热压键合的技术以及纸基与薄膜基微流控平台的发展, 为在保证关键性能参数的前提下大幅压缩芯片制造成本提供了现实可能^[96-97]。

构建真正的“样本入-结果出”全集成式微流

控系统领域公认的终极目标, 但在无扩增策略框架下实现这一点尤为困难。原因在于, 经典的核酸提取与纯化步骤涉及多步流体操控与试剂交换, 若硬性地将这些宏观操作微缩并集成至单一芯片中, 系统的流路设计复杂度将急剧上升, 而这往往与即时检测对操作简易性的核心要求相悖。因此, 开发可直接注入原始样本的新型缓冲化学体系, 结合片上无膜过滤、电泳或水凝胶限域等原位分离策略, 是规避烦琐预处理的方向^[98-99]。

展望未来, 无扩增 CRISPR 诊断技术将朝着高集成度、智能化与多模态化的方向持续演进。基于合成生物学原理定向进化出具有本征更高酶活性的新型 Cas 变体, 或在微流控芯片上构建非酶的级联信号放大网络, 从源头提升检测体系的响应水平, 提供分子工程层面的解决方案^[100-101]。在物理读出层面, 将 CRISPR 识别界面与场效应晶体管、纳米孔或表面增强拉曼散射等高灵敏传感器深度耦合, 有望为单分子级别的直接无扩增检测开辟新路径^[94, 100]。在应用层面, 借助适配体与 DNAzyme 等功能核酸模块的桥接, 检测靶标正从核酸逐步扩展到蛋白质、小分子代谢物乃至重金属离子, 推动即时检测平台向更广泛的健康监控场景渗透^[90, 99]。随着微纳加工、材料科学、合成生物学与人工智能的深度交叉融合, 无扩增 CRISPR 诊断技术有望跨越产业转化过程中的鸿沟, 成为应对新发传染病与支撑个性化精准医疗的基石性技术^[102]。

参 考 文 献

- [1] Qian S, Chen Y, Xu X, *et al.* Advances in amplification-free detection of nucleic acid: CRISPR/Cas system as a powerful tool. *Anal Biochem*, 2022, **643**: 114593
- [2] Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-cas systems in bacteria and Archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*, 2011, **45**: 273-297
- [3] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, *et al.* Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology (Reading)*, 2005, **151**(Pt 8): 2551-2561
- [4] Barrangou R, Doudna J A. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nat Biotechnol*, 2016, **34**(9): 933-941
- [5] Li Y, Liu Y, Tang X, *et al.* CRISPR/cas-powered amplification-free detection of nucleic acids: current state of the art, challenges, and futuristic perspectives. *ACS Sens*, 2023, **8**(12): 4420-4441
- [6] Yi B, Zhou B, Zhou D, *et al.* CRISPR/Cas-powered nucleic acid amplification and amplification-free biosensors for public safety detection: Principles, advances and prospects. *Biotechnol Adv*, 2025, **83**: 108609
- [7] Li S Y, Cheng Q X, Wang J M, *et al.* CRISPR-Cas12a-assisted

- nucleic acid detection. *Cell Discov*, 2018, **4**: 20
- [8] Broughton J P, Deng X, Yu G, *et al.* CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol*, 2020, **38**(7): 870-874
 - [9] Kellner M J, Koob J G, Gootenberg J S, *et al.* SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc*, 2019, **14**(10): 2986-3012
 - [10] Chen J S, Ma E, Harrington L B, *et al.* CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 2018, **360**(6387): 436-439
 - [11] Myhrvold C, Freije C A, Gootenberg J S, *et al.* Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science*, 2018, **360**(6387): 444-448
 - [12] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Kellner M J, *et al.* Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, 2018, **360**(6387): 439-444
 - [13] Martzy R, Kolm C, Krska R, *et al.* Challenges and perspectives in the application of isothermal DNA amplification methods for food and water analysis. *Anal Bioanal Chem*, 2019, **411**(9): 1695-1702
 - [14] Li H, Xie Y, Chen F, *et al.* Amplification-free CRISPR/Cas detection technology: challenges, strategies, and perspectives. *Chem Soc Rev*, 2023, **52**(1): 361-382
 - [15] Talebian S, Dehghani F, Weiss P S, *et al.* Evolution of CRISPR-enabled biosensors for amplification-free nucleic acid detection. *Trends Biotechnol*, 2024, **42**(1): 10-13
 - [16] Zhao L, Zhao Z, Li N, *et al.* The nucleic acid detection using CRISPR/Cas biosensing system with micro-nano modality for point-of-care applications. *Talanta*, 2025, **286**: 127457
 - [17] 赵梓豪, 赵亮, 汪夏燕. 核酸检测与基于 CRISPR 生物传感的微流控即时检测技术的研究及应用. *化学进展*, 2025, **37**(10): 1397-1409
Zhao Z H, Zhao L, Wang X Y. *Prog Chem*, 2026, **37**(10): 1397-1409
 - [18] Lau C H, Huang S, Zhu H. Amplification-free nucleic acids detection with next-generation CRISPR/dx systems. *Crit Rev Biotechnol*, 2025, **45**(4): 859-886
 - [19] Ding X, Yin K, Li Z, *et al.* Ultrasensitive and visual detection of SARS-CoV-2 using all-in-one dual CRISPR-Cas12a assay. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 4711
 - [20] Zhang Y, Walker R S K, Sunna A, *et al.* Droplet digital CRISPR for nucleic acid detection. *Adv Sci*, 2026, **13**(14): e17470
 - [21] Shan X, Gong F, Yang Y, *et al.* Nucleic acid amplification-free digital detection method for SARS-CoV-2 RNA based on droplet microfluidics and CRISPR-Cas13a. *Anal Chem*, 2023, **95**(45): 16489-16495
 - [22] Li X, Wang T, Liu X, *et al.* Advances of engineered microfluidic biosensors via CRISPR/Cas in bacteria and virus monitoring. *Chem Eng J*, 2024, **491**: 152038
 - [23] Yuan H, Miao Z, Wan C, *et al.* Recent advances in centrifugal microfluidics for point-of-care testing. *Lab Chip*, 2025, **25**(5): 1015-1046
 - [24] Dalgan S, Wei Q. From lab to market: paper-based CRISPR diagnostics and commercialization pathways. *Adv Sens Res*, 2025, **4**(10): e00036
 - [25] Chen K, Sun W, Zhong M, *et al.* Single-molecule assay guided crRNA optimization enhances specific microRNA detection by CRISPR-Cas12a. *Sens Actuators B Chem*, 2024, **406**: 135389
 - [26] Zeng M, Ke Y, Zhuang Z, *et al.* Harnessing multiplex crRNA in the CRISPR/Cas12a system enables an amplification-free DNA diagnostic platform for ASFV detection. *Anal Chem*, 2022, **94**(30): 10805-10812
 - [27] Li Q N, Huang H R, Li R Y, *et al.* Position-independent single-nucleotide polymorphism discrimination by CRISPR/Cas12a via rational activator strand engineering. *Biosens Bioelectron*, 2025, **289**: 117929
 - [28] Spangler J R, Leski T A, Schultzhau Z, *et al.* Large scale screening of CRISPR guide RNAs using an optimized high throughput robotics system. *Sci Rep*, 2022, **12**(1): 13953
 - [29] Wan Y, Li S, Xu W, *et al.* Terminal chemical modifications of crRNAs enable improvement in the performance of CRISPR-cas for point-of-care nucleic acid detection. *Anal Chem*, 2024, **96**(41): 16346-16354
 - [30] Sinha S, Molina Vargas A M, Arantes P R, *et al.* Unveiling the RNA-mediated allosteric activation discloses functional hotspots in CRISPR-Cas13a. *Nucleic Acids Res*, 2024, **52**(2): 906-920
 - [31] Su M, Zhang H S, Liu H, *et al.* Allosteric ribozyme-driven crRNA switch for the amplification-free detection of biomolecules. *Biosens Bioelectron*, 2025, **280**: 117450
 - [32] Zhang Y, Liu H, Tang S Y, *et al.* Double-emulsion droplet digital CRISPR/Cas12a for amplification-free, absolute quantification of nucleic acids at attomole levels. *Chem Eng J*, 2025, **512**: 162098
 - [33] Ma L, Zhao X, Hou J, *et al.* Droplet microfluidics for biomedical applications: emerging trends and future developments. *Microsyst Nanoeng*, 2026, **12**: 53
 - [34] Xue Y, Luo X, Xu W, *et al.* PddCas: a polydisperse droplet digital CRISPR/cas-based assay for the rapid and ultrasensitive amplification-free detection of viral DNA/RNA. *Anal Chem*, 2023, **95**(2): 966-975
 - [35] Tian T, Shu B, Jiang Y, *et al.* An ultralocalized Cas13a assay enables universal and nucleic acid amplification-free single-molecule RNA diagnostics. *ACS Nano*, 2021, **15**(1): 1167-1178
 - [36] Yue H, Shu B, Tian T, *et al.* Droplet Cas12a assay enables DNA quantification from unamplified samples at the single-molecule level. *Nano Lett*, 2021, **21**(11): 4643-4653
 - [37] Shinoda H, Taguchi Y, Nakagawa R, *et al.* Amplification-free RNA detection with CRISPR-Cas13. *Commun Biol*, 2021, **4**(1): 476
 - [38] Iida T, Shinoda H, Watanabe R. SATORI: amplification-free digital RNA detection method for the diagnosis of viral infections. *Biophys Physicobiol*, 2023, **20**(3): e200031
 - [39] Shinoda H, Iida T, Makino A, *et al.* Automated amplification-free digital RNA detection platform for rapid and sensitive SARS-CoV-2 diagnosis. *Commun Biol*, 2022, **5**(1): 473
 - [40] Wang D, Wang X, Ye F, *et al.* An integrated amplification-free digital CRISPR/cas-assisted assay for single molecule detection of RNA. *ACS Nano*, 2023, **17**(8): 7250-7256
 - [41] Nouri R, Jiang Y, Politza A J, *et al.* STAMP-based digital CRISPR-Cas13a for amplification-free quantification of HIV-1 plasma viral loads. *ACS Nano*, 2023, **17**(11): 10701-10712
 - [42] Liu J, An T, Peng J, *et al.* An amplification-free digital droplet

- assay for influenza A viral RNA based on CRISPR/Cas13a. *Analyst*, 2025, **150**(6): 1151-1157
- [43] Avaro A S, Santiago J G. A critical review of microfluidic systems for CRISPR assays. *Lab Chip*, 2023, **23**(5): 938-963
- [44] Shen J, Chen Z, Xie R, *et al.* CRISPR/Cas12a-assisted isothermal amplification for rapid and specific diagnosis of respiratory virus on an microfluidic platform. *Biosens Bioelectron*, 2023, **237**: 115523
- [45] Yu L, Peng Y, Sheng M, *et al.* Sensitive and amplification-free electrochemiluminescence biosensor for HPV-16 detection based on CRISPR/Cas12a and DNA tetrahedron nanostructures. *ACS Sens*, 2023, **8**(7): 2852-2858
- [46] Liu X, Zhou S, Sun R, *et al.* An amplification-free CRISPR/Cas13a-powered dry chemistry-based electrochemiluminescence gene sensor for ultrasensitive RNA detection. *Sens Actuators B Chem*, 2025, **426**: 137048
- [47] Kashefi-Kheyraadi L, Nguyen H V, Go A, *et al.* Ultrasensitive and amplification-free detection of SARS-CoV-2 RNA using an electrochemical biosensor powered by CRISPR/Cas13a. *Bioelectrochemistry*, 2023, **150**: 108364
- [48] Heo W, Lee K, Park S, *et al.* Electrochemical biosensor for nucleic acid amplification-free and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA via CRISPR/Cas13a trans-cleavage reaction. *Biosens Bioelectron*, 2022, **201**: 113960
- [49] Lee Y, Lee J H, Lee T, *et al.* Amplification-free CRISPR/Cas12a-based electrochemical biosensor with enhanced sensitivity for viral detection. *ACS Sens*, 2025, **10**(6): 4361-4370
- [50] Suea-Ngam A, Howes P D, DeMello A J. An amplification-free ultra-sensitive electrochemical CRISPR/Cas biosensor for drug-resistant bacteria detection. *Chem Sci*, 2021, **12**(38): 12733-12743
- [51] Bao C, Liu X, Liang C, *et al.* CRISPR/Cas-SERS sensing platforms: a frontier technology for next-generation fast, low-cost, ultra-micro biosample detection. *J Raman Spectrosc*, 2025, **56**(10): 959-973
- [52] Du Y, Ji S, Dong Q, *et al.* Amplification-free detection of HBV DNA mediated by CRISPR-Cas12a using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal Chim Acta*, 2023, **1245**: 340864
- [53] Kim H, Lee S, Seo H W, *et al.* Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-mediated surface-enhanced Raman scattering assay for multidrug-resistant bacteria. *ACS Nano*, 2020, **14**(12): 17241-17253
- [54] Pang Y, Li Q, Wang C, *et al.* CRISPR-cas12a mediated SERS lateral flow assay for amplification-free detection of double-stranded DNA and single-base mutation. *Chem Eng J*, 2022, **429**: 132109
- [55] Zhou C, Zhang Y, Yang X, *et al.* A magnetic CRISPR/Cas12a-SERS nanobiosensor for amplification-free and ultrasensitive detection of norovirus in water and food samples. *Anal Chim Acta*, 2025, **1363**: 344133
- [56] Moon J, Liu C. Asymmetric CRISPR enabling cascade signal amplification for nucleic acid detection by competitive crRNA. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 7504
- [57] Chen R, Zhao J, Han M, *et al.* DNA extraction- and amplification-free nucleic acid biosensor for the detection of foodborne pathogens based on CRISPR/Cas12a and argonaute protein-mediated cascade signal amplification. *J Agric Food Chem*, 2023, **71**(46): 18037-18045
- [58] Yin L, Man S, Ye S, *et al.* CRISPR-Cas based virus detection: recent advances and perspectives. *Biosens Bioelectron*, 2021, **193**: 113541
- [59] Li X, Zhang D, Gan X, *et al.* A cascade signal amplification based on dynamic DNA nanodevices and CRISPR/Cas12a trans-cleavage for highly sensitive microRNA sensing. *ACS Synth Biol*, 2021, **10**(6): 1481-1489
- [60] Chen D, Sun M, Li B, *et al.* Cascade CRISPR/cas enables more sensitive detection of toxoplasma gondii and listeria monocytogenes than single CRISPR/cas. *Microorganisms*, 2025, **13**(8): 1896
- [61] Lim J, Van A B, Koprowski K, *et al.* Amplification-free, OR-gated CRISPR-Cascade reaction for pathogen detection in blood samples. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2025, **122**(11): e2420166122
- [62] Zhang L, Hou L, Cai H H, *et al.* Cascading CRISPR/cas and nanozyme for enhanced organic photoelectrochemical transistor detection with triple signal amplification. *Anal Chem*, 2024, **96**(35): 14283-14290
- [63] Deng R, Xu L, Zhang Y, *et al.* CRISPR-based nucleic acid assays for food authentication. *Trends Food Sci Technol*, 2024, **145**: 104351
- [64] Zhao G, Wang J, Chanyu Y, *et al.* Alkaline lysis-recombinase polymerase amplification combined with CRISPR/Cas12a assay for the ultrafast visual identification of pork in meat products. *Food Chem*, 2022, **383**: 132318
- [65] Xiang X, Lu J, Tao M, *et al.* High-throughput identification of meat ingredients in adulterated foods based on centrifugal integrated purification-CRISPR array. *Food Chem*, 2024, **443**: 138507
- [66] Chen Y, Yang T, Qian S, *et al.* Multiple crRNAs-assisted CRISPR/Cas12a assay targeting cytochrome b gene for amplification-free detection of meat adulteration. *Anal Chim Acta*, 2022, **1231**: 340417
- [67] Zhao Z, Wang R, Yang X, *et al.* Machine learning-assisted, dual-channel CRISPR/Cas12a biosensor-in-microdroplet for amplification-free nucleic acid detection for food authenticity testing. *ACS Nano*, 2024, **18**(49): 33505-33519
- [68] Chen J, Liu J, Wu D, *et al.* CRISPR/cas precisely regulated DNA-templated silver nanocluster fluorescence sensor for meat adulteration detection. *J Agric Food Chem*, 2022, **70**(44): 14296-14303
- [69] Liu J, Chen J, Jia S, *et al.* CRISPR/Cas12a triggered SERS and naked eye dual-mode biosensor for ultrasensitive and on-site detection of nucleic acid via cascade signal amplification. *Sens Actuators B Chem*, 2024, **404**: 135249
- [70] Wen Y, Huang S, Lei H, *et al.* A dual and rapid RPA-CRISPR/Cas12a method for simultaneous detection of cattle and soybean-derived adulteration in goat milk powder. *Foods*, 2024, **13**(11): 1637
- [71] Huang S, Liu Y, Zhang X, *et al.* A rapid RPA-CRISPR/Cas12a detection method for adulteration of goat milk powder. *Foods*,

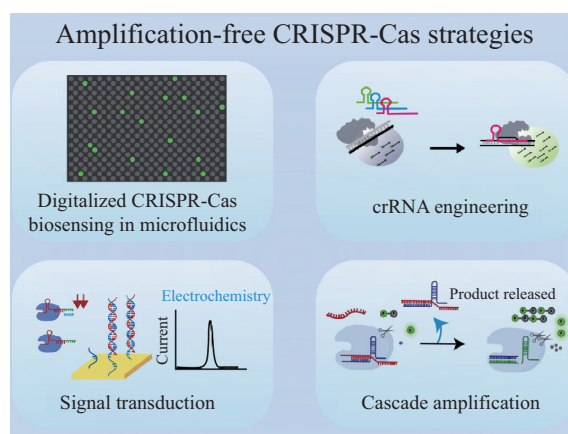
- 2023, **12**(8): 1569
- [72] Pan R, Liu J, Wang P, *et al.* Ultrasensitive CRISPR/Cas12a-driven SERS biosensor for on-site nucleic acid detection and its application to milk authenticity testing. *J Agric Food Chem*, 2022, **70**(14): 4484-4491
- [73] Wu X, Lou X, Zhou H, *et al.* Detection and absolute quantification biosensing tools for food authentication: CRISPR/Cas, digital CRISPR and beyond. *Trends Food Sci Technol*, 2024, **145**: 104349
- [74] Guo Y, Guo W, Wu Z, *et al.* A microfluidic chip-based electrochemical biosensor coupled with CRISPR/Cas12a for simultaneous detection of foodborne pathogens. *Anal Chem*, 2025, **97**(49): 27266-27275
- [75] Ge H, Wang X, Xu J, *et al.* A CRISPR/Cas12a-mediated dual-mode electrochemical biosensor for polymerase chain reaction-free detection of genetically modified soybean. *Anal Chem*, 2021, **93**(44): 14885-14891
- [76] Li L, Li M, Qiu Y, *et al.* A sensitive CRISPR/Cas12a-assisted fluorescent aptasensor for rapid detection of food allergens. *Int J Biol Macromol*, 2024, **274**: 133444
- [77] Sun Y, Zhong K, Nie L, *et al.* State-of-the-art in food safety: the potential of CRISPR/Cas-based lateral flow assay technology in the field of food analysis. *Food Saf Heal*, 2025, **3**(2): 155-171
- [78] Wu X, Su Y, Xu Y, *et al.* A bioinspired microfluidic nucleic acid sensing platform for rapid and simultaneous screening of viral respiratory infections. *ACS Sens*, 2025, **10**(6): 4634-4645
- [79] Shang Y, Xiang X, Ye Q, *et al.* Advances in nanomaterial-based microfluidic platforms for on-site detection of foodborne bacteria. *TrAC Trends Anal Chem*, 2022, **147**: 116509
- [80] Liu F, An T, Zhou C, *et al.* Amplification-free orthogonal CRISPR/Cas system for rapid discrimination of bacterial vs viral infection in febrile children. *Sens Actuators B Chem*, 2024, **418**: 136319
- [81] Song D, Han X, Xu W, *et al.* Target nucleic acid amplification-free detection of *Escherichia coli* O157: H7 by CRISPR/Cas12a and hybridization chain reaction based on an evanescent wave fluorescence biosensor. *Sens Actuators B Chem*, 2023, **376**: 133005
- [82] Liu J, Li Y, Cao H, *et al.* Amplification-free CRISPR-Cas13a assay for detection of Taura syndrome virus. *Aquac Rep*, 2023, **30**: 101552
- [83] Pal T, Liu Z, Chen J. CIMNE-CRISPR: a novel amplification-free diagnostic for rapid early detection of African Swine Fever Virus. *Biosens Bioelectron*, 2025, **273**: 117154
- [84] Yee B J, Ali N A, Mohd-Naim N F B, *et al.* Exploiting the specificity of CRISPR/cas system for nucleic acids amplification-free disease diagnostics in the point-of-care. *Chem Bio Eng*, 2024, **1**(4): 330-339
- [85] Gao Z, Gao Y, Wang S, *et al.* Application progress and biosafety challenges of gene editing and synthetic biotechnology in diagnosis, treatment and prevention of infectious diseases. *Biosaf Heal*, 2025, **7**(5): 312-322
- [86] Wu H, Chen X, Zhang M, *et al.* Versatile detection with CRISPR/Cas system from applications to challenges. *TrAC Trends Anal Chem*, 2021, **135**: 116150
- [87] Wei L, Wang Z, She Y, *et al.* CRISPR/Cas multiplexed biosensing: advances, challenges, and perspectives. *Anal Chem*, 2025, **97**(23): 11943-11958
- [88] Qiao J, Bai B, Bo T, *et al.* CRISPR/Cas-powered electrochemical sensors for food safety detection: current state of the art, challenges, and future prospects. *Trends Food Sci Technol*, 2025, **166**: 105396
- [89] Li B, Gu X, Zeng W, *et al.* Ultrasensitive nucleic acid testing: from foundational research to clinical translation. *ACS Nano*, 2025, **19**(47): 40304-40344
- [90] Wang Z, Wang Q, Zhang J, *et al.* CRISPR-driven diagnostics: molecular mechanisms, clinical efficacy and translational challenges. *Clin Transl Med*, 2025, **15**(10): e70482
- [91] Pan Z, Xu L, Fan Z, *et al.* CRISPR-based diagnostics for infectious diseases: mechanisms, advancements and clinical transformation prospects. *Front Cell Infect Microbiol*, 2026, **16**: 1769226
- [92] van Dongen J E, Segerink L I. Building the future of clinical diagnostics: an analysis of potential benefits and current barriers in CRISPR/cas diagnostics. *ACS Synth Biol*, 2025, **14**(2): 323-331
- [93] Lu C, Chen J, Zhang S, *et al.* Development of a vitrified CRISPR/Cas12b-based assay for rapid genotyping of *SLCO1B1* SNPs without DNA amplification. *Anal Methods*, 2025, **17**(9): 2083-2093
- [94] Zhou X, Ye C, Xie M, *et al.* Advances in the application of CRISPR technology in pathogen detection: amplification-based and amplification-free strategies. *Front Cell Infect Microbiol*, 2025, **15**: 1645699
- [95] Liao P, Jiang M, Chen Z, *et al.* Three-dimensional digital PCR through light-sheet imaging of optically cleared emulsion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, **117**(41): 25628-25633
- [96] Zhao L, Wang X. 3D printed microfluidics for cell biological applications. *TrAC Trends Anal Chem*, 2023, **158**: 116864
- [97] Li N, Zhang W, Jin Z, *et al.* A 3D printed meridian-arrayed microfluidic device for dual-physical fields induced highly efficient intracellular delivery. *Anal Chem*, 2025, **97**(29): 15991-16003
- [98] Wang X, Zhong L, Zhang W, *et al.* CRISPR digital sensing: from micronano-collaborative chip to biomolecular detection. *ACS Nano*, 2025, **19**(22): 20427-20451
- [99] Zhang J, Zhu M, Yan H, *et al.* Split CRISPR/Cas systems: pioneering solutions for molecular diagnostics challenges. *Biosens Bioelectron*, 2026, **293**: 118177
- [100] Zhang J, Lv H, Li L, *et al.* Recent improvements in CRISPR-based amplification-free pathogen detection. *Front Microbiol*, 2021, **12**: 751408
- [101] Li Y, Zhao L, Kang W, *et al.* Multiplexed CRISPR/Cas and Argonaute detection technology: strategies, challenges, and perspectives. *TrAC Trends Anal Chem*, 2025, **191**: 118329
- [102] Ghouneimy A, Aman R, Jiang W, *et al.* Harnessing CRISPR-Cas systems for point-of-care diagnostic applications. *TrAC Trends Anal Chem*, 2025, **193**: 118417

Microfluidic-based Pre-amplification-free CRISPR-Cas Biosensing for Rapid Detection: Technologies and Applications*

LU An-Yan, ZHAO Liang**, GUO Guang-Sheng, WANG Xia-Yan

(State Key Laboratory of Materials Low-Carbon Recycling, Beijing Key Laboratory of Cardiopulmonary-Cerebral Resuscitation Innovation and Translation, Center of Excellence for Environmental Safety and Biological Effects, Department of Chemistry, College of Chemistry and Life Science, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Graphical abstract



Abstract CRISPR-Cas-based biosensing systems have become important platforms for rapid nucleic acid detection because of their programmable sequence recognition and high specificity. In many diagnostic workflows, the CRISPR reaction is coupled with polymerase chain reaction or isothermal pre-amplification to enrich low-abundance targets before readout. This design improves sensitivity, but it also introduces additional primers and enzymes, requirements for temperature control and reaction compatibility, and a higher demand for contamination management. These factors make the whole assay less convenient for integrated and field-deployable point-of-care testing. Developing pre-amplification-free CRISPR assays is therefore not simply a pursuit of shorter protocols, but a way to simplify molecular diagnosis at the system level, especially in settings where rapid decisions, closed workflows, and minimal manual operation are required. Microfluidic devices provide an important engineering route for this purpose. Their small reaction volumes, precise fluid manipulation, high-throughput partitioning, and compatibility with portable readout make it possible to integrate target confinement, reaction control, signal acquisition, and quantitative analysis on a chip. Droplet microfluidics and microwell arrays can divide a sample into large numbers of independent microreactors, enabling digital counting

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (22174007), Outstanding Students Project for Undergraduates BJUT, and the Spark Fund for Undergraduates, Beijing University of Technology (XH-2025-09-07).

** Corresponding author.

Tel: 86-13810114935, E-mail: zhaoliang@bjut.edu.cn

Received: April 8, 2026 Accepted: July 17, 2026

of rare recognition events. Continuous-flow, centrifugal, and paper-based microfluidic formats further provide options for automated operation, low-cost fabrication, and on-site use. In this context, microfluidics is not only a signal-enhancement method, but also a platform that connects CRISPR molecular recognition with practical assay implementation. This review summarizes recent progress in microfluidic-based pre-amplification-free CRISPR-Cas biosensing for rapid detection. We focus on four related technical directions. crRNA engineering, including spacer-length tuning, multi-crRNA design, chemical modification, and allosteric regulation, can improve recognition kinetics, nuclease stability, and mismatch discrimination. Digital microfluidic detection based on droplets or microwell arrays converts single-molecule recognition events into countable positive partitions, thereby improving quantitative capability without target pre-amplification. Physical signal transduction interfaces couple CRISPR activity to electrochemical, electrochemiluminescent, fluorescent, or surface-enhanced Raman scattering readouts, making weak molecular signals easier to detect with portable instruments. On-chip cascade signal amplification strategies further enhance output intensity through enzymatic reactions, DNA circuits, nanomaterials, or cross-domain amplification modules while avoiding direct amplification of the target nucleic acid. Together, these strategies show that the performance of a pre-amplification-free assay depends not only on biochemical recognition, but also on how the reaction is confined, amplified, transduced, and operated. In addition to describing these mechanisms, this review compares different strategies in terms of sensitivity improvement, operational complexity, cost, and suitability for point-of-care testing. Representative applications in food authenticity identification and rapid pathogen screening are also discussed to illustrate how these platforms perform in practical scenarios. Finally, we analyze the remaining challenges, including the detection of low-abundance targets in complex matrices, on-chip sample preparation, device-to-device reproducibility, long-term reagent storage, and standardization. Future development will likely depend on tighter integration of sample processing, CRISPR reaction, signal readout, and data interpretation, ultimately moving pre-amplification-free CRISPR diagnostics toward automated and user-friendly sample-to-answer systems.

Key words CRISPR-Cas system, microfluidic device, pre-amplification-free detection, crRNA engineering, digital detection, signal transduction, cascade signal amplification, point-of-care testing

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0180

CSTR: 32369.14.pibb.20260180