



基于 CRISPR 的 RNA 检测技术在 法医领域的应用和前景分析*

方 贇¹⁾ 王贤森^{2,3)} 谢 伟^{2)**} 孙启凡^{1,3)**}

(¹⁾ 山西医科大学法医学院, 太原 030001; (²⁾ 浙江大学浙江大学药理毒理研究所, 杭州 310058;

(³⁾ 公安部鉴定中心, 法医遗传学公安部重点实验室, 北京 100038)

摘要 成簇规律间隔短回文重复及其相关蛋白 (CRISPR-Cas) 系统作为新型分子检测技术, 为法医领域的 RNA 分析开辟了创新路径。传统 RNA 检测方法因流程繁琐、抗干扰性弱等问题, 难以适应法医学对快速、精准与现场检测的现实需求, 基于 CRISPR-Cas 原理的 RNA 检测技术通过向导 RNA 与 Cas 蛋白的协同识别机制, 整合等温扩增与级联酶促反应机制, 在提升 RNA 检测灵敏度的同时大幅缩短分析时间, 从而突破传统检测的时空限制, 通过试纸条或便携式设备实现无大型设备支持条件下的单分子级检测精度与即时结果判读, 有效推动法医现场检验向高效化发展。但实际应用中仍存在环境干扰、酶活性波动及标准化不足等技术瓶颈亟待解决。后续研究应重点突破多重检测技术瓶颈, 增强检测体系的稳定性, 同时开发微流控集成设备, 并制定统一的质量标准与伦理规范。本文系统梳理了 CRISPR-RNA 检测的技术原理与应用场景, 旨在为相关技术的法医学转化提供理论支撑, 助力法医检验技术的创新发展。

关键词 成簇规律间隔短回文重复 (CRISPR), 成簇规律间隔短回文重复相关蛋白 (Cas), RNA 检测, 刑事技术, 法医现场学

中图分类号 DF795.2

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0099

CSTR: 32369.14.pibb.20250099

现场遗留生物检材中所蕴涵的遗传信息一直是法医学领域研究的重点, 为犯罪现场重建、案件侦破以及追踪溯源提供重大的实际应用价值。由于 RNA 分子稳定性较差, 其作为生物信息载体在法医学中长期未得到充分重视。近年来 RNA 在法医领域的重要性逐渐提升, 其独特的生物学特性成为关键性证据来源, 其组织特异性表达模式 (如血液中 *HBB* mRNA、唾液中 *HTN3* mRNA) 为生物体液来源鉴定提供了高精度工具, 尤其在性侵、凶杀等案件中可有效区分混合样本成分, 这对于重建涉及混合样本的犯罪场景至关重要。此外, RNA 的降解动力学规律及死后特定基因的转录变化 (如缺氧诱导基因、炎症反应标志物) 为死亡时间推断、生前生理状态分析 (如窒息、药物暴露) 开辟了新途径。但是当前 RNA 检测方法 (如逆转录 PCR、RNA 测序) 具有高技术复杂性的特点, 技术要求和成本较高, 仍存在复杂样本干扰及标准化数据库缺失等问题, 影响其法医实践与司法应用。随着检

测技术的革新, 基于成簇规律间隔短回文重复 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 技术的新型 RNA 检测系统 (如 SHERLOCK、DETECTR、FIND-IT) 凭借其高灵敏度、特异性和快速检测优势, 逐渐被应用于 RNA 检测, 尤其是在生物标志物识别、病原体筛查和现场快速分析中。以下从技术原理、技术优势、应用场景、技术挑战与未来展望等方面进行系统分析基于 CRISPR 的 RNA 检测技术在法医领域的应用前景。

1 CRISPR-RNA 检测技术原理

CRISPR 系统是存在于细菌和古细菌一种不断

* 国家重点研发计划 (2022YFC3341002) 资助项目。

** 通讯联系人。

孙启凡 Tel: 010-66269531, E-mail: sunqifan@cifs.gov.cn

谢伟 Tel: 0571-88273572, E-mail: xie_wei@zju.edu.cn

收稿日期: 2025-03-07, 接收日期: 2025-07-31

进化适应的免疫防御机制, 通过利用一段 RNA 来识别并进行有效的靶向 DNA 或 RNA 剪切, 其功能就是识别外源性入侵的核酸序列, 并对其进行特异性降解, 以达到抗病毒的作用^[1]。CRISPR 系统通常与 Cas 蛋白 (如 Cas12a、Cas13) 结合, 通过向导 RNA (crRNA) 靶向识别特定 DNA 或 RNA 序列, 触发 Cas 蛋白的附带切割活性, 实现对目标 DNA 或 RNA 的高特异性检测^[2-3]。值得注意的是, 部分 Cas 蛋白 (如 Cas12a) 本身识别的是 dsDNA 靶标, 但在实际应用中可通过逆转录酶将 RNA 分子转化为互补 DNA 后, 同样能够利用这类蛋白实现 RNA 序列的检测^[4]。这种基于逆转录的级联反应策略, 有效拓展了 DNA 特异性 Cas 蛋白在 RNA 检测中的应用维度。

CRISPR-Cas 系统抵御外来入侵核酸的过程可以分为 3 步: 适应、表达、干扰^[5]。首先是适应, 在细菌遭受病毒入侵时, 一些辅助蛋白如 Cas1 和 Cas2 等将从病毒核酸中获得新的间隔序列并插入 CRISPR 基因座中^[6], 在下次同样的病毒入侵时, CRISPR 基因座在前导区的调控下转录表达包含间隔区的多重复序列 pre-crRNA, 这些 pre-crRNA 会在辅助酶的作用下被切割成拥有单独间隔序列的 guide RNA (gRNA) 或 CRISPR RNA (crRNA)。gRNA 或 crRNA 与 Cas 蛋白结合形成效应复合物, 其中 crRNA 作为向导, 根据互补的特性识别靶标 DNA 或 RNA 序列形成并激活 Cas 蛋白作为核酸酶切割靶标, 从而降解外源入侵核酸^[7]。所有的 CRISPR-Cas 系统都依赖于 gRNA 或 crRNA 进行特异性的靶向。当 gRNA 或 crRNA 的间隔序列部分与原间隔邻接基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 或者原间隔侧翼序列 (protospacer flanking sequence, PFS) 相邻的靶序列杂交后, Cas 核酸酶就会裂解靶核酸^[8]。CRISPR-Cas 系统最常用于基因编辑, 但它同时也是一种精准灵敏的检测工具。在先前的研究中, CRISPR-Cas9、CRISPR-Cas12a 和 CRISPR-Cas13a 均已被发现可以识别和切割特定的 DNA 和 RNA 片段^[9-10]。特别是 CRISPR-Cas12a 和 CRISPR-Cas13a 在被激活后可以反式切割靶序列周围的 DNA 和 RNA, 这一特性可以用于检测病原微生物^[11-12]。基于上述核酸识别与切割的分子机制, 有许多研究团队通过定向改造 Cas 蛋白的靶标响应特性, 逐步拓展 CRISPR 系统的检测维度。其中, 针对 RNA 靶标的检测技术发展尤为迅速, 通过整合 crRNA 引导的序列识别与

反式切割活性激活策略, 成功构建了多种适配法医学需求的 CRISPR-RNA 检测体系。

1.1 SHERLOCK (specific high-sensitivity enzymatic reporter unLOCKing)

SHERLOCK 技术由哈佛大学 ZHANG Feng 团队于 2017 年首次提出^[13], 通过等温扩增技术 (例如重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA)) 放大待测的 DNA 或 RNA 靶标, 并基于 CRISPR-Cas13 系统识别靶标核酸序列, 可在 2 h 内实现阿摩尔 (amol/L) 级别的检测灵敏度与高特异性^[13]。该技术在次年得到进一步强化, 以 SHERLOCKv2 的形式出现, 取得了多项突破, 将 Cas13 的反应与 RPA 的等温扩增方法联合使用, 在检测能力上取得了显著突破, 包括达到 zmol/L 级别的灵敏度、线性可量化的结果、成本低、检测时间缩短、单碱基错配特异性以及多路复用可以实现四通道靶标检测等优点, 更与侧向流动层析联用实现了基于试纸条的检测, 为核酸检测提供了一种多功能的便携式核酸检测技术^[14] (图 1), 更通过金纳米颗粒显色模式实现了设备依赖性的突破, 这一改进标志着 CRISPR 检测技术从实验室向现场应用的重要转折。在法医学领域, 这种高灵敏度、无需复杂设备的特性为微量生物物证 (如接触 DNA、混合斑 RNA) 的快速检测提供了新思路。其试纸条检测模式与犯罪现场快速筛查需求高度契合, 文献显示已有研究团队尝试将该技术应用于血迹、唾液等法医常见生物样本的 RNA 标记物检测^[15], 但目前在法医学实践中的具体应用案例仍需进一步探索验证。

1.2 OR-DETECTR (one tube RT-RPA/DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter)

OR-DETECTR 技术通过整合逆转录重组酶聚合酶扩增 (RT-RPA) 与 CRISPR/Cas12a 系统, 构建了针对新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 的一体化检测体系^[4]。其核心原理分为两个阶段, 首先利用 RT-RPA 在等温条件下将病毒 RNA 逆转录扩增为双链 DNA (dsDNA), 随后通过 Cas12a 蛋白特异性识别扩增产物中的靶序列 (图 1)。相较于常规检测手段, 该技术在性能与实用性方面具有显著优势。RT-RPA 阶段可在 30 min 内完成 RNA 向 dsDNA 的高效转化, 结合 Cas12a 系统对扩增产物的即时识别, 使总检测时间压缩至 50 min 以内, 较传统 RT-PCR 效率有很大的提升^[4]。实验数据显示其灵敏度达到 10 拷贝/反应, 与商业化试剂盒相当, 同

时依托CRISPR系统的序列双重验证机制,有效区分相似序列的非特异性扩增产物。该技术所具备的快速与高特异性特征,在法医物证检测中具有重要应用潜力。在降解样本(如陈旧血痕、腐败组织)的RNA分析中,其等温扩增机制显著降低了对核酸完整性的依赖性,并为性侵案件中关键生物物证的快速识别与溯源鉴定提供了可行的技术路径^[16]。

1.3 FIND-IT (fast integrated nuclease detection in tandem)

2021年, Liu等结合嗜热菌Csm6 (TtCsm6)与CRISPR-Cas13核酸检测技术开发了一种快速RNA检测技术FIND-IT)适用于即时现场诊断^[17]。FIND-IT的检测原理主要为crRNA将CRISPR-LbuCas13a引导至靶序列上并激活LbuCas13切割活性,激活的LbuCas13a具有反式切割活性,将TtCsm6激活剂在A-U处切割,使得TtCsm6激活剂转变为活性状态。活性的TtCsm6激活剂与TtCsm6的CARF结构域结合并激活TtCsm6的HEPN结构域产生RNA酶活性,以切割荧光-猝灭信号报告分子产生荧光信号(图1)。FIND-IT系统以无需扩增为特点显著降低了检测难度,并且将检测线提高至31拷贝/ μl ,同时检测时间缩短至20 min,大幅提高了CRISPR-Cas13系统实现现场即时检测的能力。相较于单独CRISPR-Cas13a检测技术, FIND-

IT通过TtCsm6介导的信号放大机制,在不依赖RPA核酸预扩增条件下实现单分子级灵敏度,这一创新设计有效规避了单独CRISPR-Cas13a检测技术对复杂仪器设备的依赖。双酶协同作用使检测动力学效率提升3倍,对SARS-CoV-2 RNA的检测灵敏度较单独CRISPR-Cas13系统提高2个数量级。实验验证其特异性超过99%,满足复杂样本检测需求^[17]。但需要指出的是,该技术现阶段仍存在若干应用限制,TtCsm6的嗜热特性可能对常温检测环境下的酶活性维持提出挑战,并且双酶反应体系对温度波动的敏感性也可能影响检测结果的重现性,后续的研究可以挖掘更多新的信号蛋白元件以适配现场所处的不同环境温度,拓展该技术的应用范围。在法医实践场景下,这种无需核酸扩增的检测特性可有效规避扩增产物污染风险,符合犯罪现场物证采集的防污染要求。虽然目前尚未见直接应用于法医研究的公开报道,但其快速检测特性与法医毒理分析中的急性中毒案件检测需求高度匹配。特别是针对某些具有特征性RNA标记物的毒物(如蓖麻毒素)^[18],理论上可在20 min内完成检测,这对提高现场应急处置效率具有潜在应用价值。未来研究可探索将TtCsm6系统与法医特异性生物标记物相结合的技术适配方案。

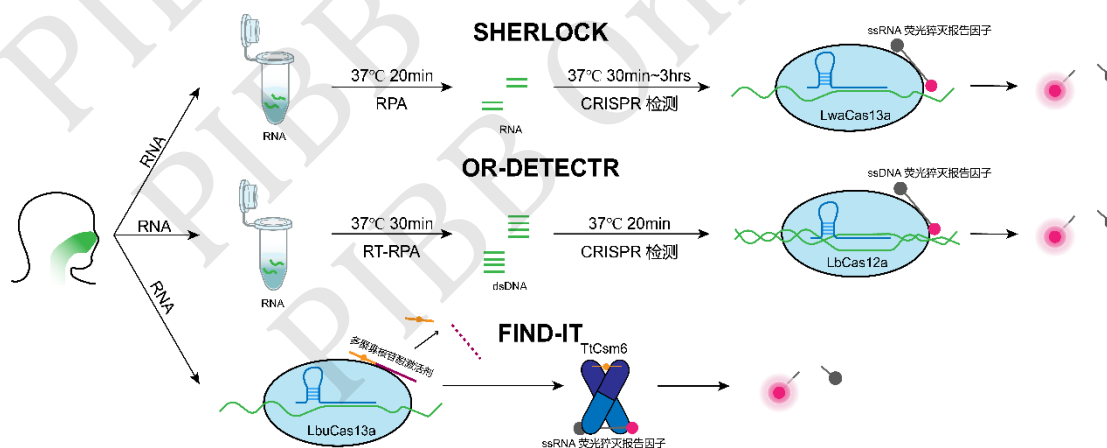


Fig. 1 Schematic diagram of the principles of SHERLOCK, DETECTR, and FIND-IT nucleic acid testing technologies
图1 SHERLOCK、DETECTR和FIND-IT核酸检测技术的原理示意图

1.4 其他检测技术

为解决CRISPR-Cas13a检测依赖实验室设备、操作复杂等问题,研究者通过模块化方式集成核酸提取、扩增、CRISPR反应与信号检测,构建了微

流控芯片与CRISPR-Cas13技术的集成平台,实现了“样本到结果”的全流程自动化核酸检测^[19]。

该系统的核心原理在于将样本预处理、靶标核酸扩增与Cas13检测模块集成于微型芯片中:样本

经裂解与纯化处理后,通过等温扩增技术(如LAMP或RPA)快速富集靶标核酸,随后引导至多通道反应腔室。每一通道预置Cas13-crRNA复合物与荧光报告探针,当Cas13识别靶标RNA后,其旁切活性被激活,从而切割荧光探针并释放信号。通过多波长光学检测,可同时识别多种病原体,如实现流感病毒亚型的区分。微流控技术通过毛细作用或微型气泵精确控制纳升级流体流动,结合冻干试剂的预加载与物理隔离设计,有效避免交叉污染。芯片内部集成加热元件、光学检测模块以及电池供电系统,构建了无需实验室设备的便携式检测平台,可在60 min内完成检测,灵敏达到amol/L水平^[20]。

该技术的显著优势包括:高特异性(与qPCR检测结果一致性>95%)、良好的多重检测能力(多通道荧光读出)、优异的现场适用性(真正实现便携式即用)、以及极低的检测成本。因此,为传染病防控、突发公共卫生事件应急响应及环境病原监测等应用场景提供了一种即时、高效的分子诊断解决方案。此外,基于Cas13对RNA靶标的单碱基分辨能力,该平台还可实现对高度相似序列(如SNP位点)之间的精准区分,显著拓展了其在基因突变检测与精准医学中的应用潜力^[21]。另一研究团队开发了基于Cas13a的电化学传感器,通过设计特异性crRNA,成功在临床样本中检测到L452R突变,灵敏度达到10拷贝/ μ L,且与测序结果完全一致,证明了其在检测SNP位点中的实用价值^[22]。同时,传统RNA检测技术(RT-PCR等)常依赖复杂仪器或荧光标记,而CRISPR系统的模块化设计可与多种信号输出方式结合。有研究提出了一种无需固定探针的电化学策略,将Cas13a与荧光标记的RNA分子信标FAM-RNA-MB(亚甲基蓝)结合在一起,当Cas13a识别靶标RNA并激活反式切割时,FAM标记的ssRNA报告分子被切断,释放电化学信号,从而实现多种病原体RNA的同步检测^[23]。该方法省去了探针的固定步骤,简化了操作流程,检测限低至1 amol/L,且可在60 min内完成,提升了现场检测的可行性。

1.5 技术优势

CRISPR技术凭借其独特的优势在核酸检测领域展现出重要价值。超高的灵敏度能够识别到单分子级的RNA靶标,即便面对微量或降解样本时仍保持稳定性能,为法医学中识别鉴定复杂物证提供了技术保障^[24-25]。同时,在技术开发过程中,许多

研究团队针对不同的应用场景需求形成了不同的解决方案。SHERLOCK系统首次利用Cas13a的反式切割活性将其引入核酸检测领域,并且在二代技术SHERLOCKv2中联合RPA技术使得灵敏度得到极大的提升^[14]。OR-DETECTR系统则通过RT-RPA与Cas12a的协同作用构建了一体化检测流程,其RT-RPA扩增和Cas12检测双阶段反应的设计在保证SARS-CoV-2检测特异性的同时,将总时长压缩至50分钟内,这种时间效率的优势在突发事件中可以展现出独特价值^[4]。相比之下,FIND-IT技术另辟蹊径地采用了嗜热菌TtCsm6蛋白构建起一种级联酶促反应体系,其无需RPA进行预扩增的检测模式不仅将灵敏度提高至单分子级别,更是通过双酶协同作用将检测动力学效率提升3倍^[26]。这3类技术体系在信号放大路径选择上呈现出明显区别:SHERLOCK技术是依靠预扩增来提升灵敏度,OR-DETECTR技术则是通过双重验证以确保其检测的特异性,而FIND-IT技术利用级联酶促反应来实现信号的指数增长。这种无扩增的技术路线为不同应用场景提供了不同的选择^[26]。从设备依赖性角度看,SHERLOCKv2的试纸条显色模式适配资源匮乏地区,而FIND-IT的荧光定量方案更适用于专业检测场景,反映出CRISPR诊断技术生态的逐步完善。

检测流程的快速性可以显著提升检测的效率,常规的CRISPR检测在1~2 h内即可完成,较传统的检测方法(如RT-PCR、RNA测序等依赖精密仪器且耗时较长的技术)缩短了检测时间,对于需要快速诊断和决策的法医现场学场景具有关键意义^[24]。通过设计多重crRNA探针,系统可同步检测多个靶标,这种并行检测能力在混合斑迹鉴定中有明显优势。结合试纸条等简易工具,该技术将大幅降低对设备的依赖与操作的成本,可以使得基层执法机构也能够实现精准检测^[14, 24, 27]。CRISPR系统的技术优势在设备集成中也得到了充分体现。研究者开发的便携式检测系统将核酸提取、快速扩增与CRISPR检测整合于微型平台,例如离心微流控装置可在45 min内完成10个靶标同步分析^[28]。配合试纸条^[14]或手持荧光仪^[27, 29],系统实现“样本进-结果出”的现场检测模式,操作时间压缩至30~60 min^[28]。这些研究展示了CRISPR技术在便携化设备中的应用潜力,特别是在即时检验(POCT)和现场快速检测中的优势^[25]。CRISPR技术的高特异性和灵敏度,结合便携化设备的简便性

和快速性,为核酸检测提供了新的方法和工具,在法医学现场检测中具有广阔的应用前景。

2 CRISPR-RNA 检测技术在法医学领域的应用场景

RNA的表达与活性揭示了基因在特定组织类型和特定时间点的活动情况。当组织受到病理因素影响时, RNA在表达上会出现差异。从法医学角度来看, RNA的表达与降解情况可以提供病理状态的提示或根据表达的组织特异性可以推测出相关组织类型,为侦破案件提供线索^[30]。RNA表达分析已经成为体液鉴定的有力工具,能够准确识别犯罪现场的生物样本个体来源及其体液构成,这对于明确犯罪性质具有关键作用^[31]。RNA的稳定性和对环境变化的抵抗性使其成为推测死亡时间的分子标记物之一,特定的RNA生物标志物可以在死后组织中被检测到,有助于估计死亡时间^[32]。同时, RNA分析也可以用于推断损伤和血痕的形成时间,这对于重建犯罪事件的经过十分重要。通过分析特定的RNA表达情况,可以推断死亡原因,尤其在涉及到器官功能衰竭或特定疾病时^[33]。

2.1 生物体液鉴定与来源分析

RNA在生物体液鉴定与来源分析中具有显著优势,主要体现在高特异性、高灵敏度、动态信息获取能力以及RNA类型的多样化。RNA分子具有组织特异性,能够精确识别体液来源,同时其表达水平可反映基因的实时状态,提供生物活性信息。不同体液中的细胞会表达特定的mRNA,通过检测这些特定的mRNA,可以鉴定体液的来源^[34]。例如,外周血中的*HBA*、*HBB*,月经血中的*MMP7*、*MMP10*,阴道分泌物中的*CYP2B7P*,唾液中的*STATH*、*HTN3*,精液中的*PRM2*、*SEMG1*等基因的mRNA,可作为相应体液的鉴定标志物^[35-36]。相较于传统检测技术,基于CRISPR的RNA检测技术在体液鉴定中展现出独特优势。当前主流的体液鉴定方法如RT-qPCR和免疫层析法仍存在局限性:RT-qPCR依赖精密的温控设备和复杂的引物设计,并且对靶标核酸的质量和长度有较高要求^[37-38]。而免疫层析法对蛋白标志物的识别易受样本降解影响,且灵敏度较低(检测限通常为ng级)。CRISPR技术通过以下特性突破了上述瓶颈:a.其向导RNA可识别约20个核苷酸长度的靶序列,即使在样本降解或微量残留的情况下,仍可实现amol/L至zmol/L级别的检测灵敏度^[39];b.其分子识别机制通过crRNA序列的可编程性,既可

实现体液特异性mRNA标志物的并行检测,也可精准分辨SNP位点,相较RT-qPCR具备更强的信息整合能力^[14];c.其反应不依赖精密的温控设备,与试纸条联用时,无需专业仪器即可完成结果判读,适合现场应用。

CRISPR-RNA检测技术已初步应用于生物体液鉴定中,验证了其在体液鉴定中的应用潜力。文献中报道的SHERLOCK技术成功实现了对外周血中HBA mRNA的检测,其检测限可达0.001 ng,与毛细管电泳相当^[15]。在混合斑迹分析中,该方法可识别低至5%比例的血液成分,且对经DNase I处理的降解样本仍保持超过90%的检出率,整体性能优于传统免疫层析法。近期一项研究通过将逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)与CRISPR-Cas12a系统结合,成功建立了基于*ALAS2* mRNA的血液特异性检测方法,该方法具有较高灵敏度,并能识别混合样本中的微量血液成分^[40]。另一项研究整合RT-RPA与Cas12a的反式切割活性,实现了血液*HBB* mRNA与精液*PRM2* mRNA的同步检测,在无专业设备的条件下完成混合体液的快速分型^[41]。上述进展为CRISPR技术在法医混合斑检测与现场即时分析中的实际应用奠定了坚实基础,展示了其作为下一代分子法医工具的巨大潜力。

当前研究已初步构建起基于RNA特征的体液识别体系,但仍有多个方向值得深入探索。针对CRISPR-RNA检测技术的优化应聚焦两点:a.开发多重crRNA阵列以实现混合体液同步检测,解决现有技术对单一标志物的依赖性问题;b.建立适用于犯罪现场的常温快速检测技术,提高检测稳定性与现场适用性。与主流检测技术相比,CRISPR平台在检测速度、抗干扰能力及成本控制方面已展现出显著优势,但其在法医实践中的标准化验证仍需加强。

2.2 死亡时间(PMI)、损伤和血痕的形成时间以及死亡原因推断

RNA因其动态变化特性与短半衰期,在法医学领域为死亡时间(PMI)、损伤时间、血痕形成时间及死亡原因的推断提供了新思路。传统方法依赖于蛋白质降解或代谢物分析,而RNA检测通过其降解规律与表达模式的变化,可实现更精准的时间关联性判断^[42-43]。例如, β -actin、GAPDH和miR-9等RNA标志物的降解模型已被用于PMI推断^[44-46];损伤相关miRNA(如miR-214a-3p、miR-103a-3p)的表达变化可辅助判断损伤时间^[42];血

痕中 18S rRNA 与 β -actin mRNA 的比值变化则与形成时间相关^[47]；RNA 的昼夜节律变化成为预测 PMI 和血痕沉积时间的潜在生物标志物^[48]。

近年来，CRISPR-RNA 检测技术因其高灵敏度和可编程性，为上述领域提供了潜在的技术突破。其原理基于 RNA 的动态特性：通过 CRISPR-Cas13 系统对特定 RNA 分子的靶向识别与信号放大，检测信号强度的变化可反映 RNA 的表达时间窗口与降解规律，从而推断生物事件的发生时间。例如，组织中 β -actin 等标志物的降解轨迹可辅助 PMI 推断，而血痕中 18S rRNA 的动态变化可映射形成时间。然而，该技术的核心在于实现 RNA 的定量分析。目前研究已在此方向取得进展，如 Kang 等^[49]通过 CRISPR-Cas13 系统开发了高度多重化的 mRNA 定量方法，而 Lamb 等^[50]则利用 Cas13 实现了流感病毒 mini viral RNAs 的精准检测。这些成果表明 CRISPR-RNA 技术在定量检测中的可行性，为其法医学应用奠定了理论基础。

尽管如此，CRISPR 技术应用于时间推断仍面临挑战。首先，需筛选并验证与特定法医学问题（如 PMI 或死亡原因）高度关联的关键 RNA 分子标志物。例如，创伤性脑损伤中某些 miRNA 的异常表达可作为死亡原因的标志物^[51]，而心源性猝死中特定 miRNA 的差异需进一步验证^[52]。其次，技术瓶颈如检测灵敏度、环境干扰（如血痕中 RNA 稳定性）及标准化模型的建立仍需突破。此外，现有文献中 CRISPR 技术在法医学的应用多集中于体液鉴定与病原体检测，其在时间推断领域的实践案例仍有限，需结合传统方法（如蛋白质分析）进行交叉验证以提升可靠性。

当前研究重点集中于两方向：一是开发 CRISPR-RNA 的定量检测体系，二是构建法医学场景下的 RNA 标志物数据库。尽管原理上可行，但实际应用中需解决技术标准化、多标志物联合分析及复杂环境下的稳健性问题。未来，该技术或可作为补充工具与传统方法整合，通过多组学数据融合提高时间推断精度。例如，结合 RNA 动态变化与代谢物浓度变化，或联合 miRNA 与蛋白质降解模型，可能形成更全面的推断框架。

2.3 毒物与药物滥用分析

在法医学领域，RNA 检测为毒物与药物成瘾鉴定提供了新思路。相比传统代谢物检测，RNA 动态表达特征可以追溯药物暴露的时间与强度，尤其适用于微量生物样本分析。例如甲基苯丙胺成瘾

者体内多巴胺转运体 mRNA 的表达水平与用药频率直接相关^[53]。类似的机制也存在于海洛因成瘾者体内的 μ -阿片受体 mRNA 的异常剪接中，且这些分子标记在唾液、毛发等微量样本中仍可检出，同时拓展了物证来源^[54]。针对药物代谢相关的 mRNA，CRISPR 系统通过等温扩增与探针捕获，使得检测的灵敏度可达单分子级别，能精准识别混合斑迹中的生物标记物。此外，药物滥用引发的神经适应性改变也会影响特定 miRNA 的表达，如脑脊液中 miR-212 的持续性高表达可以作为可卡因成瘾的量化指标，可卡因暴露也会导致 miR-30c-5p 水平增加^[55-56]。Demirel 等^[57]研究了甲基苯丙胺使用者死后人脑组织中的腹侧被盖区和伏隔核样本，通过定量逆转录 PCR 发现 miRNA let-7b-3p 过表达，可用作甲基苯丙胺成瘾的诊断和治疗标志物。这类小 RNA 在陈旧血迹等复杂样本中具有优异的稳定性，但传统 RT-PCR 技术因操作繁琐难以实现现场应用^[58-59]。CRISPR 系统则可通过直接识别 miRNA 序列，将检测流程简化为单步反应，30 min 内即可完成检测，弥补了传统检测 miRNA 方法的缺陷。对于 miRNA 检测，CRISPR 系统具备的精确互补配对机制可以区分单碱基差异，这一优势在合成阿片制剂溯源中优势明显。

在技术发展层面，之后的研究可以着重解决毒物药物成瘾检测中的现场实操难题。比如针对唾液、毛发等易受环境影响的微量样本，开发新型常温稳定剂以抑制 RNA 降解，提升在高温高湿条件下保存物证的效能。同时可以探索一些非破坏性的检测技术，比如基于纳米孔测序的实时分析系统，可以在不破坏样本的前提下完成药物代谢相关 RNA 的快速筛查，为后续司法复核保留原始物证。

2.4 生物安全侦察与生物微生物检测

在涉及生物安全和医疗犯罪的场中，针对 RNA 病毒（如 HIV、狂犬病毒、新冠病毒）及细菌毒素 RNA 的快速筛查与精准溯源可以为生物威胁的早期预警与司法证据链的构建提供关键的技术支持。相较于 DNA，相较于 DNA 较高的稳定性，RNA 分子在环境中具有较短的半衰期，这一特性使其能够更精准地反映检测样本的近期活动状态，从而为推断案件时间线提供重要依据，为推断犯罪时间线提供重要依据^[60]。例如，对新冠病毒的 RNA 进行检测可追溯其污染源的时空分布^[61]；炭疽杆菌（*Bacillus anthracis*）毒素基因的 RNA 表达水平则能区分活菌感染与灭活菌体，可以判定案

件性质是否为恶意投放^[62]。同时, 由于RNA病毒缺乏DNA中间体, 其基因组可直接作为感染标志物, 使得检测更具病原特异性。基于CRISPR-Cas系统开发的便携式检测技术, 可在2 h内完成现场样本中痕量RNA的靶向富集与可视化判读, 可以显著提升可疑生物样本(如白色粉末、体液或环境拭子)的筛查效率^[63]。此外, 在一些医疗犯罪场景中, 通过CRISPR核酸检测技术分析患者体内病毒特征性RNA, 可以推断出病毒传播链的时间节点与责任主体, 这在非法血液制品或医疗器械污染案件中具有重要的法医学价值。但当前技术发展仍需重点突破复杂基质样本前处理的瓶颈。

未来着眼于开发基于磁珠捕获的RNA快速纯化技术, 或许可以提升土壤、污水等环境样本中痕量微生物RNA的回收效率。同时, 构建微生物RNA稳定性数据库, 系统研究温度、湿度等环境因素对各类病原体RNA降解速率的影响规律, 或可增强检测结果的时间推断准确性。后续可探索多类型微型化微流控芯片与CRISPR技术的整合应用, 实现犯罪现场同步检测20种以上生物威胁因子的能力, 为生物安全司法鉴定构建多维度的技术防御体系。

3 CRISPR-RNA检测技术挑战与未来发展方向

3.1 技术挑战与局限性

在法医学实践中, CRISPR-RNA检测技术的推广受到多重现实因素的制约。犯罪现场生物样本常受高温、潮湿或微生物污染等环境因素影响, 这些条件容易引发RNA分子链的断裂, 直接提升了检测的难度并且会影响到检测数据可信度^[64]。CRISPR技术对靶标RNA的识别长度通常在20~30个核苷酸, 这样的短片段结构可以在降解环境中表现出更强的稳定性, 这为提升检测可靠性提供了重要技术支撑^[65]。而面对复杂检材中存在的干扰物质, 例如土壤样本中的金属离子或腐败组织内的核酸酶, 这些成分可能通过与CRISPR酶发生非特异性结合而抑制其活性, 为此需要建立系统的样本前处理方案, 通过改进核酸提取工艺有效去除干扰因子, 同时可以引入酶活性保护剂维持检测体系的稳定性^[66]。

技术标准化与伦理规范是将CRISPR-RNA技术引入法医学领域内亟待完善的关键环节。当前法医学界尚未建立针对CRISPR检测的统一质控标准, 包括判定阈值设定和假阳性控制等核心参数,

这种标准化的缺失将会直接影响检测结论的司法采信度^[67]。构建经法庭认可的验证体系, 制定一系列涵盖样本处理、检测流程到结果判读的全链条操作规范, 是成为推动技术落地的必要前提。与此同时, RNA检测可能涉及个体健康敏感信息, 例如肿瘤标志物或遗传疾病相关序列的意外检出, 这引发了个人信息保护与司法取证需求之间的伦理冲突。为此需要建立双重保障机制, 既要完善检测数据的加密存储和权限的管理制度, 也要在法律层面明确检测范围与信息使用边界, 通过制度设计平衡技术创新与伦理风险, 确保该技术在司法实践中的合规应用。

3.2 未来发展方向

在技术研发层面, 构建多重检测体系与提升识别元件crRNA的稳定性是当前研究的核心突破点。通过整合CRISPR技术与微流控芯片平台, 或许能够实现多线程检测体液样本中的生物来源标记、病原体特征及毒物成分, 这种集成化设计不仅缩短了检测周期, 更通过多指标交叉验证显著提升结果的可信度, 为临床诊断与法医分析鉴定提供高效解决方案^[68-69]。针对高度降解的RNA样本, 采用核酸类似物修饰的crRNA展现出独特优势, 例如经LNA或PNA改造的crRNA可增强与靶标RNA的结合强度, 有效克服环境降解导致的信号衰减问题^[70]。引入人工智能技术为系统优化开辟了新路径, 机器学习模型能够通过分析海量RNA序列数据, 精准预测crRNA的靶向效率并自动识别复杂样本中的表达特征, 这种智能化的分析模式既提高了检测灵敏度, 也为探索疾病相关的RNA调控网络提供了新视角^[71]。推动技术标准化与法律适配性是实现成果转化的关键支撑。需将CRISPR-RNA检测纳入司法鉴定技术认证体系, 参照ISO 17025等国际标准建立严格的质量控制流程, 包括设备校准、操作规范与结果复核机制, 确保检测数据具备法律效力, 以确保其在法律程序中的可靠性和有效性, 从而增强该技术在司法领域的可信度。

4 总结与展望

CRISPR-RNA检测技术凭借其高精度检测能力和高灵敏度特征, 能够有效克服法医现场复杂环境干扰, 实现快速精准的物证分析, 这构成了其在现场检验中的关键技术优势。该技术不仅能快速检测20 nt左右长度的RNA片段, 其无需依赖大型仪器的特点更适应现场检测需求。等温扩增与级联酶

促技术的突破性进展,显著提升了检测效率与准确性。结合便携式检测装置的应用,使得RNA检测模式逐步从实验室分析转向现场快速筛查,这种转变将有效缩短检测周期、降低操作风险,同时减少对专业人员的依赖,为法医学实践带来实质性改进。

在实践层面,该技术已覆盖法医学多维度需求。生物体液溯源通过靶向组织特异性mRNA实现混合样本的精准解析,为犯罪现场重建提供关键物证支持。基于RNA降解规律的时间推断模型为死亡时间判定提供了理论依据,但CRISPR技术在此领域的实际应用仍需进一步验证。该技术在毒物滥用分析中也展现出独特优势,其动态RNA表达追踪能力可有效追溯药物暴露历史,甚至检测微量样本中的成瘾标志物。面对生物安全威胁,其快速筛查病原体RNA的特性,在生物安全或医疗犯罪等特殊案件的溯源取证中具有重要战略价值。

但现阶段该技术体系仍存在若干关键问题需要突破。样本前处理步骤的繁琐性、酶活性易受环境干扰以及标准化流程缺失,直接影响检测结果的稳定性与可重复性。通过优化反应条件、建立统一操作规范以及开发集成化检测装置,有望克服现有技术障碍。随着对CRISPR作用机制的深入研究,其应用场景将持续扩展。通过跨学科技术整合与设备微型化创新,未来可能构建出兼具高效性与便携性的新型检测系统。总体而言,该技术为法医现场RNA检测提供了创新解决方案,其快速精准的特点将助力提升检验效率,为案件侦破工作提供更可靠的技术支撑。

参考文献

- [1] Jinek M, Jiang F, Taylor D W, *et al.* Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 2014, **343**(6176): 1247997
- [2] East-Seletsky A, O'Connell M R, Knight S C, *et al.* Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature*, 2016, **538**(7624): 270-273
- [3] Qi L S, Larson M H, Gilbert L A, *et al.* Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, **152**(5): 1173-1183
- [4] Sun Y, Yu L, Liu C, *et al.* One-tube SARS-CoV-2 detection platform based on RT-RPA and CRISPR/Cas12a. *J Transl Med*, 2021, **19**(1): 74
- [5] Yang H, Patel D J. Structures, mechanisms and applications of RNA-centric CRISPR-Cas13. *Nat Chem Biol*, 2024, **20**(6): 673-688
- [6] Jackson S A, McKenzie R E, Fagerlund R D, *et al.* CRISPR-cas: adapting to change. *Science*, 2017, **356**(6333): eaal5056
- [7] Liu L, Li X, Wang J, *et al.* Two distant catalytic sites are responsible for C2c2 RNase activities. *Cell*, 2017, **168**(1/2): 121-134.e12
- [8] Pickar-Oliver A, Gersbach C A. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, **20**(8): 490-507
- [9] Park R J, Wang T, Koundakjian D, *et al.* A genome-wide CRISPR screen identifies a restricted set of HIV host dependency factors. *Nat Genet*, 2017, **49**(2): 193-203
- [10] Shmakov S, Abudayyeh O O, Makarova K S, *et al.* Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-cas systems. *Mol Cell*, 2015, **60**(3): 385-397
- [11] Huang Z, Fang J, Zhou M, *et al.* CRISPR-Cas13: a new technology for the rapid detection of pathogenic microorganisms. *Front Microbiol*, 2022, **13**: 1011399
- [12] Li S Y, Cheng Q X, Liu J K, *et al.* CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA. *Cell Res*, 2018, **28**(4): 491-493
- [13] 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
- [14] 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
- [15] 姚乾威, 何红霞, 胡胜, 等. SHERLOCK-HBA 检测方法的建立及其在血液鉴别中的应用. *生物化学与生物物理进展*, 2024, **51**(8): 1971-1982
- [15] Yao Q W, He H X, Hu S, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2024, **51**(8): 1971-1982
- [16] Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR. *Cells*, 2021, **10**(8): 1931
- [17] Liu T Y, Knott G J, Smock D C J, *et al.* Accelerated RNA detection using tandem CRISPR nucleases. *Nat Chem Biol*, 2021, **17**(9): 982-988
- [18] 梁龙辉, 程茜, 杨畅, 等. 一种基于新型RNA底物的蓖麻毒素体外脱嘌呤活性检测方法及应用. *分析化学*, 2021, **49**(10): 1694-1706
- [18] Liang L H, Cheng X, Yang Y, *et al.* *Chin J Anal Chem*, 2021, **49**(10): 1694-1706
- [19] Li P, Xiong H, Yang B, *et al.* Recent progress in CRISPR-based microfluidic assays and applications. *Trac Trends Anal Chem*, 2022, **157**: 116812
- [20] Xiang X, Li F, Ye Q, *et al.* High-throughput microfluidic strategy based on RAA-CRISPR/Cas13a dual signal amplification for accurate identification of pathogenic *Listeria*. *Sens Actuat B Chem*, 2022, **358**: 131517
- [21] Chen Y, Zong N, Ye F, *et al.* Dual-CRISPR/Cas12a-assisted RT-RAA for ultrasensitive SARS-CoV-2 detection on automated centrifugal microfluidics. *Anal Chem*, 2022, **94**(27): 9603-9609

- [22] Chen Z, Wu C, Yuan Y, *et al.* CRISPR-Cas13a-powered electrochemical biosensor for the detection of the L452R mutation in clinical samples of SARS-CoV-2 variants. *J Nanobiotechnology*, 2023, **21**(1): 141
- [23] Dong J, Wu X, Hu Q, *et al.* An immobilization-free electrochemical biosensor based on CRISPR/Cas13a and FAM-RNA-MB for simultaneous detection of multiple pathogens. *Biosens Bioelectron*, 2023, **241**: 115673
- [24] Wang Y, Chen H, Lin K, *et al.* Ultrasensitive single-step CRISPR detection of monkeypox virus in minutes with a vest-pocket diagnostic device. *Nat Commun*, 2024, **15**(1): 3279
- [25] Kaminski M M, Abudayyeh O O, Gootenberg J S, *et al.* CRISPR-based diagnostics. *Nat Biomed Eng*, 2021, **5**(7): 643-656
- [26] 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
- [27] Fozouni P, Son S, Díaz de León Derby M, *et al.* Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy. *Cell*, 2021, **184**(2): 323-333.e9
- [28] Zhang Y, Guo Y, Liu G, *et al.* Portable all-in-one microfluidic system for CRISPR - Cas13a-based fully integrated multiplexed nucleic acid detection. *Lab Chip*, 2024, **24**(14): 3367-3376
- [29] Arizti-Sanz J, Freije C A, Stanton A C, *et al.* Streamlined inactivation, amplification, and Cas13-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 5921
- [30] Bauer M, Gramlich I, Polzin S, *et al.* Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval—a pilot study. *Leg Med (Tokyo)*, 2003, **5**(4): 220-227
- [31] Courts C, Gosch A, Rothschild M. RNA analysis in forensic molecular biology. *Dtsch Arztebl Int*, 2024, **121**(11): 363-369
- [32] Pasaribu R S, Auerkari E I, Suhartono A W, *et al.* A small RNA, microRNA as a potential biomolecular marker to estimate post mortem interval in forensic science: a systematic review. *Int J Legal Med*, 2023, **137**(5): 1313-1325
- [33] 王玉卓, 贺欢, 邹晓莉, 等. RNA在法医学中的研究应用进展. *中国司法鉴定*, 2012(1): 57-61
Wang Y Z, He H, Zou X L, *et al.* *Chin J Forensic Sci*, 2012(1): 57-61
- [34] Hanson E K, Ballantyne J. RNA profiling for the identification of the tissue origin of dried stains in forensic biology. *Forensic Sci Rev*, 2010, **22**(2): 145-157
- [35] 赵一霞, 王哲, 胡胜, 等. 一步法mRNA体液鉴定体系的建立及应用. *刑事技术*, 2024, **49**(6): 594-601
Zhao Y X, Wang Z, Hu S, *et al.* *Forensic Sci Technol*, 2024, **49**(6): 594-601
- [36] Liu Z, Wang J, Li Z, *et al.* mRNA for body fluid and individual identification. *Electrophoresis*, 2025, **46**(1/2): 44-55
- [37] Lynch C, Fleming R. One-step endpoint RT-PCR assays for confirmatory body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet*, 2023, **64**: 102856
- [38] Kubo S, Niimi H, Kitajima I. Improved reverse transcription-recombinase polymerase amplification assay for blood mRNA screening: comparison with one-step RT-qPCR assay. *Forensic Sci Int Genet*, 2023, **63**: 102808
- [39] Liu L, Li X, Ma J, *et al.* The molecular architecture for RNA-guided RNA cleavage by Cas13a. *Cell*, 2017, **170**(4): 714-726.e10
- [40] Lynch C R H, Martin O L, Billington C, *et al.* Towards the identification of body fluids using RT-LAMP isothermal amplification coupled with CRISPR-Cas12a. *Forensic Sci Int Genet*, 2025, **74**: 103167
- [41] Su C W, Hsu Y C, Tsai L C, *et al.* Rapid detection of blood using a novel application of RT-RPA integrated with CRISPR-Cas: ALAS2 detection as a model. *Forensic Sci Int Genet*, 2024, **73**: 103098
- [42] 宋炳辉, 何婷, 傅俊江. 非编码RNA在法医学时间有关推断中的应用研究进展. *刑事技术*, 2024, **49**(4): 401-409
Song B H, He T, Fu J J. *Forensic Sci Technol*, 2024, **49**(4): 401-409
- [43] Song B, Qian J, Fu J. Research progress and potential application of microRNA and other non-coding RNAs in forensic medicine. *Int J Legal Med*, 2024, **138**(2): 329-350
- [44] Singh P, Ali W, Sandhu S, *et al.* Post-mortem interval estimation using miRNAs of road traffic accident cases: a forensic molecular approach. *Sci Justice*, 2023, **63**(4): 485-492
- [45] Tian J, Lam T G, Ross S K, *et al.* An analysis of RNA quality metrics in human brain tissue. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2025, **84**(3): 236-243
- [46] Cianci V, Mondello C, Sapienza D, *et al.* microRNAs as new biomolecular markers to estimate time since death: a systematic review. *Int J Mol Sci*, 2024, **25**(17): 9207
- [47] 许炎, 蒋巍, 平原, 等. 应用RNA分析技术推断现场血痕形成时间. *法医学杂志*, 2010, **26**(5): 340-342
Xu Y, Jiang W, Ping Y, *et al.* *J Forensic Med*, 2010, **26**(5): 340-342
- [48] Gosch A, Bhardwaj A, Courts C. TrACES of time: Transcriptomic analyses for the contextualization of evidential stains - Identification of RNA markers for estimating time-of-day of bloodstain deposition. *Forensic Sci Int Genet*, 2023, **67**: 102915
- [49] Kang B, Zhang J, Schwoerer M P, *et al.* Highly multiplexed mRNA quantitation with CRISPR-Cas13. *bioRxiv*, 2023. DOI: 10.1101/2023.08.16.553527
- [50] Lamb C H, Pitre E M, Ajufo S, *et al.* Quantification of influenza virus mini viral RNAs using Cas13. *RNA*, 2024, **31**(1): 126-138
- [51] Albano G D, Stassi C, Argo A, *et al.* An overview on the use of miRNAs as possible forensic biomarkers for the diagnosis of traumatic brain injury. *Int J Mol Sci*, 2023, **24**(7): 6503
- [52] Bernini Di Michele A, Onofri V, Pesaresi M, *et al.* The role of miRNA expression profile in sudden cardiac death cases. *Genes*, 2023, **14**(10): 1954
- [53] Jayanthi S, McCoy M T, Chen B, *et al.* Methamphetamine downregulates striatal glutamate receptors via diverse epigenetic mechanisms. *Biol Psychiatry*, 2014, **76**(1): 47-56
- [54] Grettton S K, Droney J. Splice variation of the mu-opioid receptor and its effect on the action of opioids. *Br J Pain*, 2014, **8**(4): 133-138
- [55] Hollander J A, Im H I, Amelio A L, *et al.* Striatal microRNA

- controls cocaine intake through CREB signalling. *Nature*, 2010, **466**(7303): 197-202
- [56] Dykxhoorn D M, Wang H, Da Fonseca Ferreira A, *et al.* microRNA-423-5p mediates cocaine-induced smooth muscle cell contraction by targeting *Cacna2d2*. *Int J Mol Sci*, 2023, **24**(7): 6584
- [57] Demirel G, Tanoglu E G, Aslyuksek H. Evaluation of microRNA let-7b-3p expression levels in methamphetamine abuse. *Rev Assoc Med Bras* (1992), 2023, **69**(4): e20221391
- [58] Kroh E M, Parkin R K, Mitchell P S, *et al.* Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*, 2010, **50**(4): 298-301
- [59] Gowen A M, Odegaard K E, Hernandez J, *et al.* Role of microRNAs in the pathophysiology of addiction. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2021, **12**(3): e1637
- [60] Chin A W H, Chu J T S, Perera M R A, *et al.* Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *Lancet Microbe*, 2020, **1**(1): e10
- [61] Corman V M, Landt O, Kaiser M, *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*, 2020, **25**(3): 2000045
- [62] Hoffmaster A R, Fitzgerald C C, Ribot E, *et al.* Molecular subtyping of *Bacillus anthracis* and the 2001 bioterrorism-associated anthrax outbreak, United States. *Emerg Infect Dis*, 2002, **8**(10): 1111-1116
- [63] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Lee J W, *et al.* Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 2017, **356**(6336): 438-442
- [64] Żarczyńska M, Żarczyński P, Tomsia M. Nucleic acids persistence-benefits and limitations in forensic genetics. *Genes*, 2023, **14**(8): 1643
- [65] Yuan A, Sha R, Xie W, *et al.* RNA-activated CRISPR/Cas12a nanorobots operating in living cells. *J Am Chem Soc*, 2024, **146**(39): 26657-26666
- [66] Yin L, Man S, Ye S, *et al.* CRISPR-Cas based virus detection: recent advances and perspectives. *Biosens Bioelectron*, 2021, **193**: 113541
- [67] Yu Z, Xu J, She Q. Harnessing the LdCsm RNA detection platform for efficient microRNA detection. *Int J Mol Sci*, 2023, **24**(3): 2857
- [68] Razavi Z, Soltani M, Pazoki-Toroudi H, *et al.* CRISPR-microfluidics nexus: advancing biomedical applications for understanding and detection. *Sens Actuat A Phys*, 2024, **376**: 115625
- [69] Xu Z, Chen D, Li T, *et al.* Microfluidic space coding for multiplexed nucleic acid detection via CRISPR-Cas12a and recombinase polymerase amplification. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 6480
- [70] Sakovina L, Vokhtantsev I, Vorobyeva M, *et al.* Improving stability and specificity of CRISPR/Cas9 system by selective modification of guide RNAs with 2'-fluoro and locked nucleic acid nucleotides. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(21): 13460
- [71] Metsky H C, Freije C A, Kosoko-Thoroddsen T F, *et al.* CRISPR-based surveillance for COVID-19 using genomically-comprehensive machine learning design. *bioRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.02.26.967026

Analysis of The Application and Prospects of CRISPR-based RNA Detection Technology in Forensic Science*

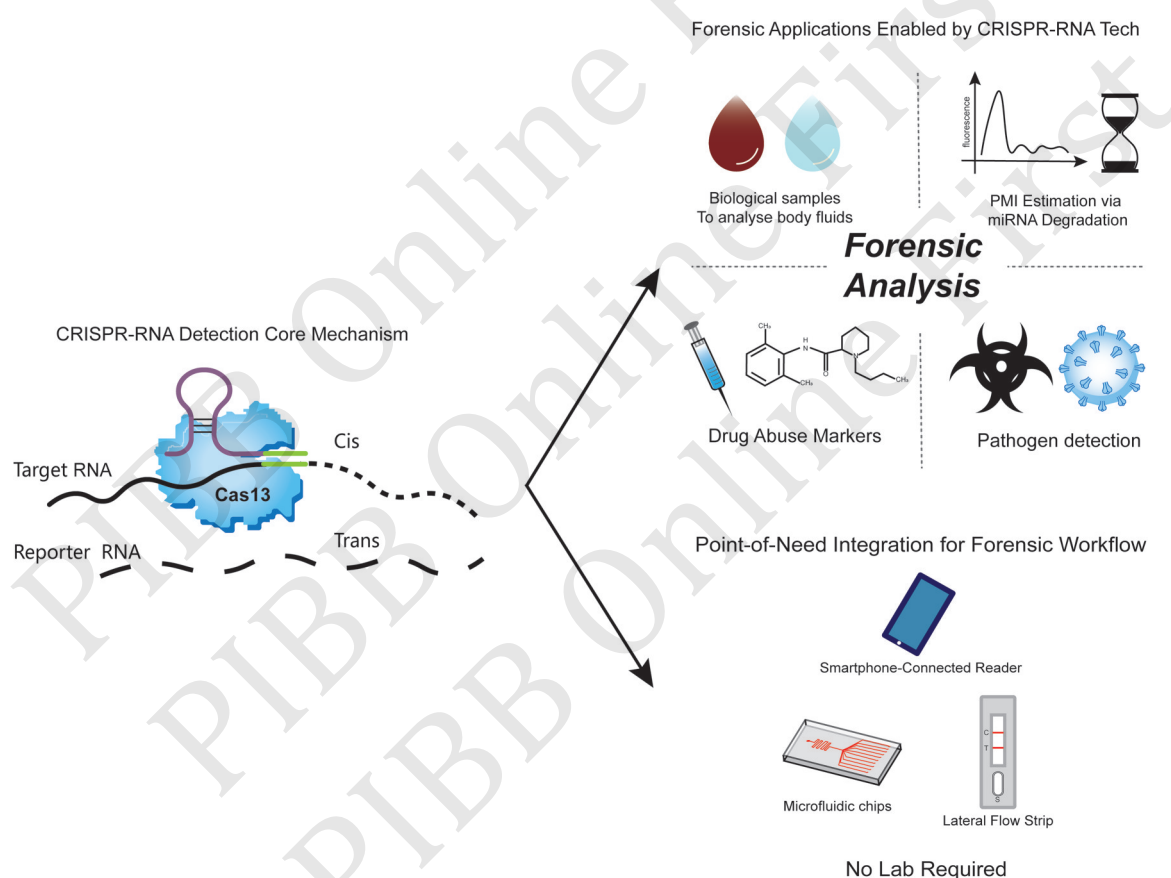
FANG Yun¹⁾, WANG Xian-Miao^{2,3)}, XIE Wei²⁾, SUN Qi-Fan^{1,3)}

¹⁾College of Forensic Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

²⁾Institute of Pharmacology and Toxicology, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

³⁾Institute of Forensic Science, Key Laboratory of Forensic Genetics (Ministry of Public Security), Beijing 100038, China)

Graphical abstract



Abstract The emergence of the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) and CRISPR-associated proteins (Cas) system represents a revolutionary paradigm shift in molecular diagnostics, offering transformative potential for RNA analysis within the rigorous demands of forensic science. Conventional forensic RNA detection methodologies, such as reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) or microarray analysis, are significantly hampered by inherent limitations including complex, multi-step protocols requiring sophisticated laboratory infrastructure, pronounced susceptibility to inhibitors prevalent in complex forensic matrices (*e.g.*, humic acids, heme, indigo dyes), and often inadequate sensitivity for trace or degraded samples typical of crime scenes, thereby failing to meet the critical operational imperatives of forensic practice: rapidity, high specificity, sensitivity, portability, and robustness against interference. This review posits

that CRISPR-Cas-based RNA detection technology provides a groundbreaking solution by leveraging the programmable, sequence-specific recognition conferred by the synergistic interaction between a designed guide RNA (gRNA) and Cas effector proteins (*e.g.*, Cas12a, Cas13a, Cas14). Upon target RNA binding, specific Cas enzymes undergo conformational activation, exhibiting collateral cleavage activity—a unique catalytic amplification mechanism where the enzyme non-specifically cleaves surrounding reporter molecules, enabling ultra-high sensitivity. To further enhance detection limits, CRISPR-Cas systems are strategically integrated with isothermal pre-amplification techniques like recombinase polymerase amplification (RPA) or loop-mediated isothermal amplification (LAMP), which efficiently amplify target RNA at constant temperatures, eliminating the need for thermal cyclers. This powerful cascade—isothermal pre-amplification followed by CRISPR-mediated sequence-specific recognition and collateral signal amplification—achieves exceptional sensitivity, often down to the single-molecule (attomolar) level, while drastically reducing analysis time to potentially 30 – 60 min. Crucially, the compatibility of CRISPR-Cas detection with simple, equipment-free readout systems, such as lateral flow strips (LFS) for visual colorimetric results or portable fluorescence/electrochemical sensors, facilitates true point-of-need (PON) forensic analysis directly at crime scenes, morgues, or field labs. This enables rapid applications like specific body fluid identification (*e.g.*, distinguishing menstrual blood via miRNA, identifying saliva *via* mRNA), post-mortem interval (PMI) estimation through RNA degradation/expression patterns, donor age inference via age-related RNA markers, tissue identification, and microbial forensics, thereby accelerating investigative leads, minimizing sample degradation risks, and optimizing resource allocation. However, significant challenges impede widespread adoption, including persistent environmental interference inhibiting enzymes, fluctuations in Cas/amplification enzyme activity affecting reproducibility, a critical lack of standardized protocols and validated quality assurance/quality control (QA/QC) frameworks essential for forensic reliability and court admissibility, and current limitations in multiplex detection capability. Consequently, future research must prioritize overcoming multiplexing bottlenecks for comprehensive analysis, enhancing system robustness through Cas protein engineering and optimized reagents, developing fully integrated, sample-to-answer microfluidic or lateral flow devices for user-friendly field deployment, and collaboratively establishing universally accepted validation guidelines, performance standards, and stringent QA/QC procedures. Furthermore, the urgent development of clear ethical guidelines governing the use of this highly sensitive technology, particularly concerning RNA data privacy and potential misuse, is imperative. This review systematically outlines the principles, forensic applications, current limitations, and future trajectories of CRISPR-RNA detection, with the authors' conviction that focused efforts addressing these challenges will translate this technology into a cornerstone of next-generation forensic practice, driving unprecedented efficiency and innovation in field investigations and laboratory analysis to enhance justice delivery.

Key words clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR), CRISPR-associated proteins (Cas), RNA detection, forensic criminalistics, forensic field investigations

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0099

CSTR: 32369.14.pibb.20250099

* This work was supported by a grant from the National Key Research and Development Program of China (2022YFC3341002).

** Corresponding author.

SUN Qi-Fan. Tel: 86-10-66269531, E-mail: sunqifan@cifs.gov.cn

XIE Wei. Tel: 86-571-88273572, E-mail: xie_wei@zju.edu.cn

Received: March 7, 2025 Accepted: July 31, 2025