

·综述·

基于 *PfAgo* 的生物传感器在病原微生物检测中的研究进展李广大^{1,2} 王敬夫² 石晋² 田磊² 丁明超²

¹佳木斯大学口腔医学院,佳木斯 154002; ²口颌系统重建与再生全国重点实验室,国家口腔疾病临床医学研究中心,陕西省口腔疾病临床医学研究中心,空军军医大学口腔医院颌面外科,西安 710032

通信作者:田磊,Email:tianleison@163.com

【摘要】 病原微生物检测是临床感染疾病诊断的常用方法,其高效精准的检测在明确病因和诊断治疗方面尤为重要。随着生物技术和传感器技术的不断发展,智能化和便携化的生物传感器在微生物检测等方面为人类健康作出巨大贡献。目前,学者们发现了一种来源于激烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*)的Argonaute(Ago)蛋白*PfAgo*,在病原微生物检测方面应用广泛。相较于传统微生物检测技术,*PfAgo*酶优势突出,适用于各种复杂环境下的病原微生物快速精准检测。本文简要介绍了*PfAgo*酶的发展、原理及优势,阐述了基于*PfAgo*酶的生物传感器在病原微生物检测等方面的应用案例。综合分析,基于*PfAgo*酶的生物传感器检测技术具有操作简便、试剂消耗少、检测速度快、假阳性率低和自动化程度高等优势,针对病原微生物检测等方面有着十分广阔的发展空间和应用前景。

【关键词】 *PfAgo* 酶; 生物传感器; 病原微生物; 微生物检测

基金项目:军事医学与航空医学重大问题科技攻关项目(2023JSYX32)

引用著录格式:李广大,王敬夫,石晋,等.基于*PfAgo*的生物传感器在病原微生物检测中的研究进展[JOL].中华口腔医学研究杂志(电子版),2025,19(2):124-131.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2025.02.007

Research progress of biosensors based on *Pyrococcus furiosus* Argonaute in detection of pathogenic microorganisms

Li Guangda^{1,2}, Wang Jingfu², Shi Jin², Tian Lei², Ding Mingchao²

¹Stomatology Collage of Jiamusi University, Jiamusi 154002, China; ²State Key Laboratory of Oral & Maxillofacial Reconstruction and Regeneration, National Clinical Research Center for Oral Diseases, Shaanxi Clinical Research Center for Oral Diseases, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author:Tian Lei, Email:tianleison@163.com

【Abstract】 The detection of pathogenic microorganisms is a common method for clinical diagnosis of infectious

diseases, and its efficient and accurate detection is particularly important in the identification of etiology, diagnosis and treatment. With the continuous development of biotechnology and sensor technology, intelligent and portable biosensors have made great contributions to human health in microbial detection. At present, scholars have discovered an Argonaute protein from *Pyrococcus furiosus*, which is widely used in the detection of pathogenic microorganisms. Compared with the traditional microbial detection technology, *Pyrococcus furiosus* Argonaute (*PfAgo*) enzyme has outstanding advantages and is suitable for rapid and accurate detection of pathogenic microorganisms in various complex environments. This article briefly introduces the development, principle and advantages of *PfAgo* enzyme, and expounds the application cases of biosensors based on *PfAgo* enzyme in the detection of pathogenic microorganisms. Comprehensive analysis shows that the biosensor detection technology based on *PfAgo* enzyme has the advantages of simple operation, low reagent consumption, fast detection speed, low false positive rate and high automation, and has a very broad development space and application prospect for pathogenic microorganism detection.

【Key words】 *PfAgo* enzyme; Biosensor; Pathogenic microorganism; Microbial detection

Fund program: Major Scientific and Technological Projects in Military Medicine and Aviation Medicine (2023JSYX32)

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2025.02.007

病原微生物或称病原体,是指可以通过空气、水、血液、消化道和媒介生物等介质传播从而侵犯人体,引起感染甚至传染性疾病的微生物,主要包括细菌、病毒和支原体等^[1-3]。病原体传播轻者可以导致皮肤感染,严重可能危及生命,对人类生命健康及公共卫生安全构成重大威胁^[4]。因此,建立快速、灵敏和特异的病原微生物检测技术对于重大疾病的预防和控制至关重要,对临床疾病的早发现、早诊断、早治疗具有重大意义^[5]。

传统的病原微生物检测方法包括染色法^[6]、平板培养法^[7]、

生化鉴定法^[8]、蛋白质免疫测定法^[9]和核酸扩增法^[10]等,这些方法存在稳定性和敏感性较低、耗时长、成本高和操作复杂等缺点,有些还需要专业的实验室、精密的检测设备及专业技术人员,易发生交叉反应,难以满足新兴、快速演变的病原微生物检测需求。进入21世纪,生物传感器技术^[11]发展迅速,研究者们开始关注如何提高传感器的灵敏度和特异性。这些新型生物传感器不仅在食品安全、环境监测等领域得到了广泛应用,也在医疗诊断中显示出了巨大的潜力。

2019年,He等^[12]首次提出了一种基于来源于激烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*)的Argonaute(Ago),蛋白PfAgo酶的核酸检测方法,称为PfAgo酶介导的核酸检测(PfAgo-mediated nucleic acid detection, PAND)。这一方法首次利用PfAgo酶的特性,应用于病原微生物检测。利用这种靶向切割DNA的特性构建了一系列人工限制性内切酶,因其可以识别DNA的任意区域,对于核酸分子检测具有重要意义。PfAgo酶检测技术的出现为病原微生物的快速、高精度、高效率检测提供了新的研究思路和方法^[13]。本文基于PfAgo酶的生物传感器检测技术在不同病原微生物检测中的研究进展作一综述,为病原微生物检测的研究提供参考,进而推动在病原微生物检测中的应用。

一、PfAgo酶简介

PfAgo酶是第一个完整三维结构确定的Argonaute蛋白。2004年首次发现PfAgo酶^[14],它能够在70~100℃高温环境中生存。PfAgo酶的蛋白质结构和功能与其生活环境紧密相关,具备极高的热稳定性^[15],使得PfAgo酶能够在高温下保持活性,减少发生非特异性反应^[13],使其在各种生物技术应用中成为一种理想的检测工具。

PfAgo酶作为一种核酸导向的内切酶,通过小的5'端磷酸化的引导DNA(guide DNA, gDNA)来识别、引导和切割目标基因,其切割机制涉及结构域的相互作用和金属离子的催化作用。PfAgo酶技术原理为根据目标基因序列设计两段gDNA,并依据5'磷酸化的gDNA与PfAgo酶相结合,激活

PfAgo酶活性的特点,对目标基因序列特定的位点进行切割,特定的断裂点位于gDNA对应目标序列5'端的第10个和第11个核苷酸之间。按照碱基互补配对原则,根据切割下来的小段单链DNA(single-stranded DNA, ssDNA)设计荧光探针(Reporter),同时切割下来的小段ssDNA又可以作为二级gDNA与PfAgo酶再次结合切割荧光探针(Reporter),当荧光探针中的淬灭基团(BHQ)远离荧光基团(FAM)时,探针发出特定荧光(图1)。有研究表明,PfAgo酶不仅能够有效地切割单链DNA,并且在特定条件下也能切割双链DNA^[16]。当目标序列为双链DNA时,需要同时加入1对gDNA,分别在双链DNA的2条链上形成断裂点来进行双链DNA的剪切。

二、生物传感器的简介

生物传感器是一种对生物物质敏感并将其浓度转换为电信号进行检测的仪器,通常由识别元件、理化换能器和信号放大装置组成。是通过生物敏感材料作识别元件(包括酶、抗体、抗原、微生物、细胞、组织和核酸等生物活性物质)、适当的理化换能器(如氧电极、光敏管、场效应管和压电晶体等)及信号放大装置构成的分析工具或系统,以实现化学物质的检测。生物传感器具有接受器和转换器的能力,可以将信息转换为其他信号进行分析检测,根据识别元件和信号转换器可分为酶传感器^[17]、免疫传感器^[18]、DNA传感器^[19]、光学传感器^[20]、电化学传感器^[21]、热传感器^[22]、压电传感器^[23]和基于纳米技术的传感器^[24]等。

生物传感器的基本工作原理是利用不同生物元件对特定分析物进行选择识别,再通过转导系统将生物反应产生的信号转化为可量化的指标。这种设备广泛应用于医学诊断、环境监测和食品安全等领域,体现了其在科学研究和实际应用中的重要价值。

三、基于PfAgo酶生物传感器检测技术在病原微生物检测中的应用

有研究表明,基于PfAgo酶生物传感器检测技术可以在复杂样本的检测中高敏感且特异性地检测目标病原菌^[25],及

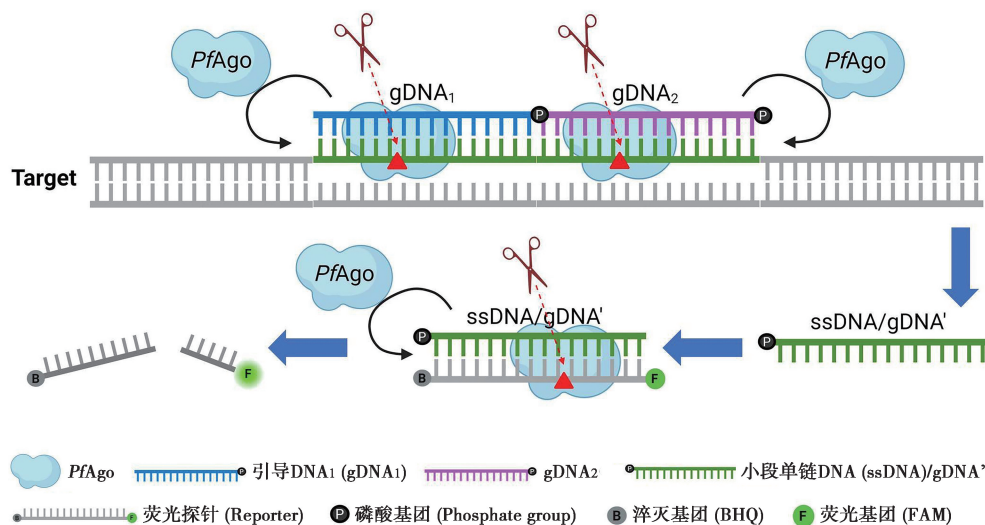


图1 PfAgo原理反应示意图

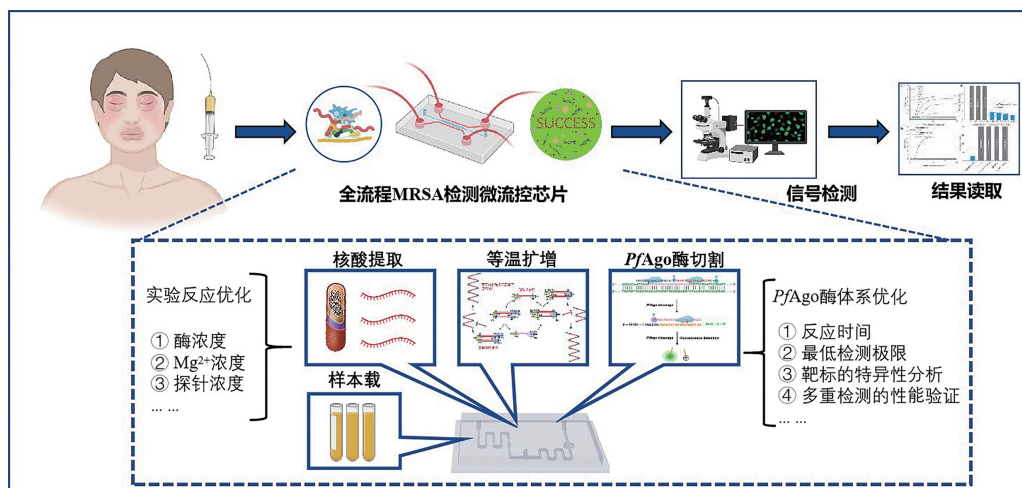


图2 基于 *PfAgo* 的生物传感器检测平台流程图 该检测流程为:首先,对目标样本进行核酸提取;然后,通过核酸扩增技术对目标基因进行扩增,扩增后的基因激活 *PfAgo* 酶切割荧光探针,产生荧光信号;最后,使用生物传感器或视觉图像检测技术对荧光信号进行快速检测。MRSA 为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌。

时发现潜在的感染风险(图2)。*PfAgo* 酶可以应用于人体或动物中细菌、病毒等感染微生物的检测,还可以应用于水源性致病菌检测^[26]、突变基因检测、碱性磷酸酶和黄曲霉毒素检测等方面,从而保障人们生命健康及饮食安全^[26]。

1. 在细菌检测方面的应用

(1)在人体细菌检测方面的应用:基于 *PfAgo* 酶的生物传感器检测技术在人体细菌检测中的应用正受到越来越多的关注。Li等^[27]报道了基于 *Ago* 酶的新型一步切割方法的生物传感器检测工具(NOTE-Ago),其最低极限检测值(limit of detection, LOD)为1 CFU/mL。该方法利用外切酶 I (Exo I),采用 Tag-specific 引物扩增伤寒沙门菌的 *invA* 基因和金黄色葡萄球菌的 *nuc* 基因,实现了对伤寒沙门菌和金黄色葡萄球菌的检测。在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)中 *mecA* 和 *nuc* 基因检测中,Li等^[28]开发了新型的基于 Argonaute-DNAzyme 串联的生物传感器平台(STAND),利用 LAMP 扩增技术及 *PfAgo* 酶的可编程性和特异性切割能力,结合 DNA 酶的信号放大功能,实现了在1 CFU/mL的单次反应中对双基因同时检测。同时,Chen等^[29]还研发了基于 RPA 和 *PfAgo* 酶的快速检测平台(RPA-*PfAgo*)。该平台可在55 min内实现对MRSA的视觉检测,LOD为 10^2 copies/ μ L。

(2)在食源性细菌检测方面的应用:基于 *PfAgo* 酶的生物传感器检测技术在嗜酸性芽孢杆菌检测中也有优越的效果,Shi等^[30]研发了基于酶辅助内源性 gDNA 生成介导 *PfAgo* 酶的生物检测平台(EGG-PAD),通过选择嗜酸性芽孢杆菌包含 EcoR I 识别位点的基因进行扩增、切割,从而进行核酸检测,LOD为 5.7×10^1 CFU/mL,检测时间仅需2~3 h;同时,Shi等^[31]开发了基于 *PfAgo* 酶的新型检测平台(PAD),LOD为 10^1 CFU/mL。与传统PCR方法进行比较,证实了两种平台的优越性,并证实检测低浓度样本时两种平台都具有明显优势。

此外,基于 *PfAgo* 酶的生物传感器检测还被成功应用于

食品样本的检测,Lin等^[32]研发了基于 RPA 和 *PfAgo* 酶快速检测食品中沙门氏菌的方法,可在40 min内检测出浓度为 1.05×10^1 CFU/mL沙门氏菌,采用 RPA 技术扩增沙门氏菌 *invA* 基因中的特异性片段,筛选高效的 RPA 引物组合和 *PfAgo* 酶的 gDNA,验证了该方法的可行性。在实际食品样品测试中,结果表明其具有较高的灵敏度和良好的适用性,为食品安全检测提供了一种快速、灵敏的新工具。同时,在一项研究中显示聚合酶链反应(PCR)-*PfAgo* 酶平台^[33]被用来检测食品样本中的病原体,其检测结果与传统方法一致。这表明 *PfAgo* 酶能够有效识别可能存在的致病菌,在食品安全监测中具有巨大的发展潜力。

2. 在病毒检测方面的应用

(1)在人体病毒检测方面的应用:由新冠病毒 SARS-CoV-2 引发的 COVID-19 全球疫情期间,为了有效控制疫情的传播,需要快速灵敏地检测识别病毒。基于 *PfAgo* 酶的生物传感器检测技术在病毒检测方面具有独特的生物性能,使得 *PfAgo* 酶成为一种有效的检测工具。Xun等^[34]研发了一种快速、准确、可扩展且便携的 COVID-19 诊断测试系统(SPOT)。该系统通过 LAMP 反应与 Cas12a 基于核酸检测的结合提高了特异性和准确性,减少了假阳性率,与定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测系统灵敏度一致。此外,基于该系统研发了一种可电池供电的手持便携式生物传感器测试装备,降低成本,易于大规模生产。此外,检测结果支持数据集中化管理。该检测系统只需较少的样本处理即可完成高效率检测,操作简易,减少对专业检测人员复杂操作的依赖,加快检测速度,对于当前和未来流行病致病微生物的快速检测和诊断具有重要意义。Zhao等^[35]通过重组酶聚合酶扩增(RPA)和 *PfAgo* 酶联合检测建立 SARS-CoV-2 关键突变 *I452R* 基因的快速、灵敏检测方法。该方法实现了准确鉴定突变型和野生型 SARS-CoV-2 的目的。通过定量 PCR 标准曲线验证了该方法的灵敏度和准确性,为新冠病毒突变检测

提供了一种新的技术手段。

Wang等^[36]利用*PfAgo*酶介导的核酸检测方法,建立了一个高度敏感和准确的分子诊断平台PAND,用于大规模筛查COVID-19感染,整个流程大约在1 h内完成。对于临床样本的诊断结果显示,新冠病毒PAND的检测方法与定量RT-PCR测试结果100%一致。Han等^[37]在此基础上又开发了快速且灵敏的单管新冠病毒(SARS-CoV-2)检测平台URPAND,该平台结合了RT-PCR和*PfAgo*酶检测技术,实现了对SARS-CoV-2的*N*基因的高效检测。与传统定量RT-PCR检测试剂盒比较,该平台在30 min内即完成核酸检测,LOD为100 copies/mL,且能够区分SARS-CoV-2的D614G突变株,在大规模样本常规检测中该平台简化了操作流程,降低了气溶胶污染风险,为新冠病毒的早期诊断和变异监测提供了新的方法。Wang等^[38]提出结合*PfAgo*酶和改进的连接酶链反应(ligase chain reaction, LCR)的新型检测方法,用于检测SARS-CoV-2病毒和人乳头瘤病毒(HPV)。通过LCR精确区分单碱基错配,在70 min内实现多重检测。

基于*PfAgo*酶检测技术不仅可以应用于新冠肺炎病毒检测,随着技术的发展应用也日趋广泛,诸如人类寨卡病毒、人细小病毒、呼吸道合胞病毒和猴痘病毒等检测方面展现了其优异的效果。Chen等^[39]研发了基于*PfAgo*酶的寨卡病毒核酸检测系统(ZIKV-PAND)。该系统利用RT-PCR将病毒RNA转换为目标DNA,通过对荧光分子信标可视化处理,实现了对ZIKV的NS5区域的特异性检测,最小可检测浓度为10 nmol/L。Chen等^[40]首次将*PfAgo*应用于B19V的检测,研发一种新型的基于B19V的NS1靶区的PAND平台,该平台利用3种导向RNA来检测B19V的*NS1*基因、独立的原间隔邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)序列设计合成的gDNA识别目标。PAND的LOD约为4 nmol/L。Liao等^[41]利用RT-RPA和*PfAgo*酶技术,研发针对双基因同时检测的检测平台(RT-RPA-*PfAgo*)。可在60 min内分型人呼吸道合胞病毒(HRSV),LOD为1 copy/ μ L。诊断准确率大于95%。He等^[42]构建了一种快速、灵敏、特异的猴痘病毒检测新方法。该方法通过PCR扩增和*PfAgo*酶的切割活性,实现了对猴痘病毒(MPV)的特异性检测。检测时间低于60 min,LOD为1.1 copies/ μ L。

(2)在动植物病毒检测方面的应用:人类流行病的病毒大多来源于生物界的动植物,动植物病毒对人类健康的影响越来越引起重视。只有通过综合的防控措施,才能有效降低动植物病毒对人类健康的影响,保障公共卫生安全。Zhao等^[43]开发了3种基于*PfAgo*酶的新型检测平台,即RAA-*PfAgo*、单罐RT-RAA-*PfAgo*和单罐RT-RAA-*PfAgo*-LFD。用于识别导致仔猪腹泻和死亡的猪冠状病毒(PDCoV),这些平台LOD低至60 copies/ μ L,且不会与其他病毒如猪流行性腹泻病毒(PEDV)、TGEV、RVA、PRV、PCV2或PCV3发生交叉反应。Zhao等^[44]研发了基于*PfAgo*酶的非洲猪瘟病毒(ASFV)检测新平台,即一锅式REPD。显著提高了ASFV检测的特异性和准确性,能够检测到单个ASFV核酸拷贝。Zhao等^[45]设计

了基于RT-RAA技术和*PfAgo*酶检测技术对PEDV检测的方法。该方法可检测出100 copies的PEDV。为动物病毒检测提供了技术支持,并为检测其他病原体提供了新思路。

Liu等^[46]开发了一种重组酶聚合酶扩增-嗜热古生火球菌系统(RPA-*PfAgo*),用于快速检测鹅细小病毒(GPV)。该系统能在1 h内提供检测结果,LOD为 10^2 copies/ μ L。Yu等^[47]还研发了一种结合了*PfAgo*酶和LAMP的新型检测平台,用于快速、超灵敏、可视化地检测鸡传染性腺病毒4型(FAdV-4)。该检测方法只需要50 min,LOD可达5 copies/ μ L。Wang等^[48]创新了基于RPA和*PfAgo*酶的新型检测方法,用于检测影响虾类养殖业的白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)。结果表明,RPA-*PfAgo*酶检测方法具有快速、高灵敏性和特异性的检测WSSV的潜力。

基于*PfAgo*酶的生物学技术不仅在动物病毒检测方面展现出强大的能力,在植物病毒方面也发挥着重要作用。Liu等^[49]研发了新的检测平台RT-RPA-*PfAgo*,通过整合逆转录(RT)技术、RPA技术以及*PfAgo*酶来检测水稻病毒。该平台能够同时检测水稻矮缩病毒(RRSV)、水稻草矮病毒(RGSV)和水稻黑条矮化病毒(RBSDV),LOD在3.13 ~ 5.13 copies/ μ L,能够有效区分3种不同的病毒,强调了其在植物病毒诊断中的潜在应用。

3. 在其他检测方面的应用

Liu等^[16]研发了基于Argonaute蛋白的单管PCR检测平台(A-Star),能够在单管反应中同时完成突变DNA的富集和检测,该方法不需要特定的PAM序列。*PfAgo*酶集成的平台能够有效地检测稀有突变,对于早期癌症的诊断和治疗反应监测具有重要意义。Xiang等^[50]提出了基于*PfAgo*酶的生物传感器用于碱性磷酸酶(ALP)活性分析。该检测平台无需使用有毒化学物质即实现了高效率、高灵敏度的ALP活性分析,在疾病演化基础研究和临床诊断应用方面具有很大潜力。同时,Huang等^[51]将*PfAgo*酶与免疫标记的ALP结合,开发了一种基于*PfAgo*的荧光生物传感器,用于检测非核酸靶标,ALP和黄曲霉毒素B1。实现了对于浓度小于2.7 U/L ALP检测,以及浓度小于29.89 pg/mL黄曲霉毒素B1的检测。该平台为多种靶标提供了一个简单、灵敏和通用的检测平台。

Pang等^[52]开发了可重复使用、与智能手机实时交互手持式恒温荧光检测器(WeD-1),用于增强型一锅法LAMP-*PfAgo*检测方法对水生病原体进行双重可视化检测。该检测器无需核酸纯化,对水生病原体进行快速、灵敏且特异的检测,适用于家庭核酸检测和现场快速筛查,为现场快速诊断水生病原体提供了一种有效检测工具。还有研究团队在海产品供应链传染病诊断中开发了一种基于*PfAgo*酶和RPA技术的新型现场检测方法,实现了对虾肝肠胞虫(EHP)感染虾中*sup*基因的定量检测,LOD为1 copy/ μ L。为*PfAgo*酶在水产养殖中多重检测重要病原体奠定了基础^[53]。Zhao等^[54]建立了结合RPA和*PfAgo*酶的鸡滑液囊支原体(MS)的一种通过“双步”序列特异性切割工作的核酸检测器。该方法实现了

40 min 内完成扩增和检测过程,检测灵敏度为2 copies/ μ L。检测结果可通过紫外线和蓝光下直观解读,简化检测仪器和设备,为现场快速检测 MS 提供了一种可靠且操作简便的方法。

四、总结与展望

PfAgo 酶的一个显著优势是其在选择 gDNA 时不需要 PAM 位点^[55],这种特性使得 *PfAgo* 酶在设计和使用 gDNA 时具有更大的灵活性,能够更广泛地应用于不同的识别目标。科研人员可以针对更广泛的基因组区域进行研究,从而提高了生物标志物的检测范围和准确性^[12]。*PfAgo* 酶与 LCR 结合,能够有效地区分单核苷酸多态性。这种能力使得 *PfAgo* 在检测病原体时,能够提供更高的准确率和信号强度,从而提高了诊断的可靠性^[38]。*PfAgo* 酶与 PCR 结合,实现多重核酸检测,可以同时检测多个生物标志物,极大地提高了检测效率和信息量,能够在一次测试中提供更多的检测诊断信息,减少了患者等待结果的时间^[56]。

PfAgo 酶生物传感器技术的发展促进研发操作简单、灵敏度高且快速检测的通用的检测平台^[41],能够针对多种目标进行生物标志物的检测。这种方法不仅适用于特定类型的标志物,还能够扩展到多种不同分子检测应用,极大提高了在临床诊断和生物医学研究中的应用潜力^[51]。*PfAgo* 酶以其优异的性能、简便的操作与快速、精确的检测效果广泛应用于癌症标志物的检测、感染病原体的识别、遗传性疾病的筛查等多个领域使其成为现代生物技术中一种重要的工具,基于 *PfAgo* 检测技术与其他检测平台检测性能对比如表 1 所示。

表 1 基于 *PfAgo* 检测技术与其他检测平台检测性能对比

方法	检测时间 (min)	灵敏度	信号读取	参考文献
ddPCR	> 66	4×10^3 CFU/mL	荧光	[57]
PCR-LFI	78	20 fg	试纸条	[58]
Multiplex RT-PCR	35	10^3 CFU/mL	荧光	[59]
LAMP- <i>PfAgo</i>	65	1 CFU/mL	荧光	[28]
RPA- <i>PfAgo</i>	55	10^2 copies/ μ L	荧光	[29]
CRISPR-Cas9	> 60	10 CFU/mL	荧光	[60]
PCR-Cas14a	> 120	1.23 ng/mL	荧光	[61]
Cas9n-Cas12a	170	1 CFU/mL	荧光	[62]
PCR	120	1 pg	电泳	[63]
RPA-CRISPR	135	8 CFU/mL	荧光	[64]
RT-PCR	65	—	荧光	[65]
LAMP	75	—	荧光	[66]

注:ddPCR 为微滴式数字 PCR;LFI 为侧流免疫层析法;LAMP 为环介导等温扩增;RPA 为重组酶聚合酶扩增;CRISPR 为成簇的规律间隔短回文重复序列;RT-PCR 为反转录聚合酶链反应;“—”为无数据。

然而,基于 *PfAgo* 酶的生物传感器检测方法可能对样本类型有一定的限制,尤其是在处理复杂的生物样本时。例如,某些生物体液中的抑制因子可能会干扰 *PfAgo* 酶的功能,导致检测结果不准确。这要求研究人员在开发使用

PfAgo 酶检测方法时,必须考虑到样本预处理和纯化的必要性,以确保检测的准确性^[41]。尽管 *PfAgo* 酶检测方法不需要复杂的检测设备,但相关试剂和材料的成本仍然可能成为限制其广泛应用的另一个因素。在一些资源有限的地区,成本问题可能是限制了其在公共卫生检测中广泛应用的主要因素之一^[45]。同时,基于酶的生物传感器检测技术在口腔医学领域的应用仍处空白,在面对起病急、进展快、风险大的危及生命健康的口腔颌面部感染疾病中具有极高的应用需求与前景。

随着科技的不断进步,*PfAgo* 酶生物传感器检测方法应用前景广阔,*PfAgo* 酶检测技术将持续优化与改进。未来的研究应集中在提升 *PfAgo* 酶的多重检测能力,使其能够同时检测多种病原体,提高检测效率。开发便携式、自动化的检测设备,使 *PfAgo* 酶能够实现实时检测,这将大大地提高公共卫生应对能力。结合人工智能和机器学习技术,开发智能化的检测系统,能够自动识别和分析检测结果,提高检测的准确性和效率。未来的 *PfAgo* 酶检测技术也应向实时监测发展,尤其是在公共卫生、环境监测和农业领域,激发实时病原体监测潜力,做到快速响应潜在的病原体威胁。为了推动 *PfAgo* 酶检测技术的广泛应用,国际合作与标准化工作显得尤为重要。通过制定统一的检测标准和协议,促进技术的推广与应用。*PfAgo* 酶生物传感器检测方法有望在未来的科学研究和公共卫生领域中发挥更为重要的作用。这一系统的灵敏性、特异性、快速性和便捷性,使其成为现代生物医学检测的重要工具,为疾病预防治疗提供了强有力的支持,期待其在未来的科学研究与实际应用中发挥更大的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Zhang D, Bi H, Liu B, et al. Detection of pathogenic microorganisms by microfluidics based analytical methods [J]. Anal Chem, 2018, 90(9):5512-5520. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b00399.
- [2] Lee H, Yoon Y. Etiological agents implicated in foodborne illness world wide [J]. Food Sci Anim Resour, 2021, 41(1):1-7. DOI: 10.5851/kosfa.2020.e75.
- [3] Torgerson PR, de Silva NR, Fèvre EM, et al. The global burden of foodborne parasitic diseases: An update [J]. Trends Parasitol, 2014, 30(1):20-26. DOI: 10.1016/j.pt.2013.11.002.
- [4] Yi Y, Han Y, Cheng X, et al. Three - dimensional surface - enhanced raman scattering platform with hotspots built by a nano-mower for rapid detection of MRSA [J]. Anal Chem, 2022, 94(49):17205-17211. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c03834.
- [5] Trinh TND, Lee NY. Nucleic acid amplification-based microfluidic approaches for antimicrobial susceptibility testing [J]. Analyst, 2021, 146(10):3101-3113. DOI: 10.1039/d1an00180a.
- [6] Opota O, Jatton K, Greub G. Microbial diagnosis of bloodstream infection: Towards molecular diagnosis directly from blood [J]. Clin Microbiol Infect, 2015, 21(4):323-331. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.02.005.

- [7] Law JW, Ab Mutalib NS, Chan KG, et al. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications, advantages and limitations [J]. *Front Microbiol*, 2015, 5:770. DOI:10.3389/fmicb.2014.00770.
- [8] Mazur F, Tjandra AD, Zhou Y, et al. Paper-based sensors for bacteria detection [J]. *Nat Rev Bioeng*, 2023, 1 (3) : 180-192. DOI:10.1038/s44222-023-00024-w.
- [9] Zhang SX, Li X, Wu JP, et al. Molecular methods for pathogenic bacteria detection and recent advances in wastewater analysis [J]. *Water*, 2021, 13(24):3551. DOI:10.3390/w13243551.
- [10] Trinh TND, Lee NY. Advances in nucleic acid amplification-based microfluidic devices for clinical microbial detection [J]. *Chemosensors*, 2022, 10 (4) : 123. DOI: 10.3390/chemosensors10040123.
- [11] Yao Y, Huang W, Chen J, et al. Flexible and stretchable organic electrochemical transistors for physiological sensing devices [J]. *Adv Mater*, 2023, 35 (35) : e2209906. DOI: 10.1002/adma.202209906.
- [12] He R, Wang L, Wang F, et al. *Pyrococcus furiosus* Argonaute-mediated nucleic acid detection [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2019, 55(88):13219-13222. DOI:10.1039/c9cc07339f.
- [13] Swarts DC, Hegge JW, Hinojo I, et al. Argonaute of the archaeon *Pyrococcus furiosus* is a DNA-guided nuclease that targets cognate DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(10):5120-5129. DOI:10.1093/nar/gkv415.
- [14] Kropocheva EV, Lisitskaya LA, Agapov AA, et al. Prokaryotic argonaute proteins as a tool for biotechnology [J]. *Mol Biol*, 2022, 56(6):854-873. DOI:10.1134/S0026893322060103.
- [15] Blesa A, César CE, Aaverhoff B, et al. Noncanonical cell-to-cell DNA transfer in *Thermus* spp. is insensitive to argonaute-mediated interference [J]. *J Bacteriol*, 2015, 197 (1) : 138-146. DOI:10.1128/JB.02113-14.
- [16] Liu Q, Guo X, Xun G, et al. Argonaute integrated single-tube PCR system enables supersensitive detection of rare mutations [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49 (13) : e75. DOI: 10.1093/nar/gkab274.
- [17] Alvarado-Ramírez L, Rostro-Alanis M, Rodríguez-Rodríguez J, et al. Enzyme (single and multiple) and nanozyme biosensors: Recent developments and their novel applications in the water-food-health nexus [J]. *Biosensors (Basel)*, 2021, 11 (11) : 410. DOI:10.3390/bios11110410.
- [18] Chen H, Zhang J, Huang R, et al. The applications of electrochemical immunosensors in the detection of disease biomarkers: A review [J]. *Molecules*, 2023, 28(8):3605. DOI: 10.3390/molecules28083605.
- [19] Melinte G, Hosu O, Cristea C, et al. DNA sensing technology a useful food scanning tool [J]. *TrAC Trends Anal Chem*, 2022, 154:116679. DOI:10.1016/j.trac.2022.116679.
- [20] Chen C, Wang JS. Optical biosensors: An exhaustive and comprehensive review [J]. *Analyst*, 2020, 145 (5) : 1605-1628. DOI:10.1039/c9an01998g.
- [21] Singh A, Sharma A, Ahmed A, et al. Recent advances in electrochemical biosensors: Applications, challenges, and future scope [J]. *Biosensors (Basel)*, 2021, 11 (9) : 336. DOI:10.3390/bios11090336.
- [22] Ramanathan K, Danielsson B. Principles and applications of thermal biosensors [J]. *Biosens Bioelectron*, 2001, 16 (6) : 417-423. DOI:10.1016/S0956-5663(01)00124-5.
- [23] Skládal P. Piezoelectric biosensors: Shedding light on principles and applications [J]. *Microchim Acta*, 2024, 191 (4) : 184. DOI: 10.1007/s00604-024-06257-9.
- [24] Ramesh M, Janani R, Deepa C, et al. Nanotechnology-enabled biosensors: A review of fundamentals, design principles, materials, and applications [J]. *Biosensors (Basel)* 2023, 13 (1) : 40. DOI:10.3390/bios13010040.
- [25] Qiao JL, Jia JY, Peng WP, et al. Rapid, on-site and yes-or-no detection of *Salmonella typhimurium* in foods using Argonaute-enabled assay [J]. *Sens Actuator: B. Chem*, 2024, 404:135263. DOI:10.1016/j.snb.2023.135263.
- [26] Yu ZR, Shao Y, Dong YL, et al. LAMP combined with *Pyrococcus furiosus* Argonaute for the ultrasensitive and highly specific point-of-care test platform for *Listeria monocytogenes* detection [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2024, 207:116640. DOI: 10.1016/j.lwt.2024.116640.
- [27] Li Y, Kou J, Han X, et al. Argonaute-triggered visual and rebuilding-free foodborne pathogenic bacteria detection [J]. *J Hazard Mater*, 2023, 454:131485. DOI:10.1016/j.jhazmat.2023.131485.
- [28] Li Y, Tang X, Wang N, et al. Argonaute-DNAzyme tandem biosensing for highly sensitive and simultaneous dual-gene detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Biosens Bioelectron*, 2024, 244:115758. DOI: 10.1016/j.bios.2023.115758.
- [29] Chen W, Zhang J, Wei H, et al. Rapid and sensitive detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* through the RPA-PfAgo system [J]. *Front Microbiol*, 2024, 15:1422574. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1422574.
- [30] Shi Y, Tan Z, Li W, et al. Enzyme-assisted endogenous guide DNA generation-mediated *Pyrococcus furiosus* Argonaute for *Alicyclobacillus acidoterrestris* detection [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(2):1354-1360. DOI:10.1021/acs.jafc.3c07881.
- [31] Shi Y, Tan Z, Wu D, et al. *Pyrococcus furiosus* argonaute based *Alicyclobacillus acidoterrestris* detection in fruit juice [J]. *Food Microbiol*, 2024, 120:104475. DOI:10.1016/j.fm.2024.104475.
- [32] Lin L, Luo Q, Li L, et al. Recombinase polymerase amplification combined with *Pyrococcus furiosus* Argonaute for fast *Salmonella* spp. testing in food safety [J]. *Int J Food Microbiol*, 2024, 417:110697. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110697.
- [33] Guo BY, Zhao Y, Zhou CY, et al. The detection of *Salmonella* in food based on PCR combined with *Pyrococcus furiosus* Argonaute [J]. *Microchem J*, 2024, 206:111311. DOI: 10.1016/j.microc.

- 2024.111311.
- [34] Xun GH, Lane ST, Petrov VA, et al. A rapid, accurate, scalable, and portable testing system for COVID-19 diagnosis [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2905. DOI: 10.1038/s41467-021-23185-x.
 - [35] Zhao CJ, Yang LH, Zhang X, et al. Rapid and sensitive genotyping of SARS-CoV-2 key mutation I452R with an method [J]. Anal Chem, 2022, 94(49): 17151-17159. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c03563.
 - [36] Wang F, Yang J, He RY, et al. *PfAgo*-based detection of SARS-CoV-2 [J]. Biosens Bioelectron, 2021, 177: 112932. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112932.
 - [37] Han R, Wang F, Chen WP, et al. A fast and sensitive one-tube SARS-CoV-2 detection platform based on RTX-PCR and *Pyrococcus furiosus* Argonaute [J]. Biosensors (Basel), 2024, 14(5): 245. DOI: 10.3390/bios14050245.
 - [38] Wang LY, He RY, Lv B, et al. *Pyrococcus furiosus* Argonaute coupled with modified ligase chain reaction for detection of SARS-CoV-2 and HPV [J]. Talanta, 2021, 227: 122154. DOI: 10.1016/j.talanta.2021.122154.
 - [39] Chen YH, Zhang XY, Yang X, et al. *PfAgo*-based zika virus detection [J]. Viruses, 2024, 16(4): 539. DOI: 10.3390/v16040539.
 - [40] Chen WR, Qiu LY, Luo T, et al. Novel nucleic acid detection for human parvovirus B19 based on *Pyrococcus furiosus* argonaute protein [J]. Viruses, 2023, 15(3): 595. DOI: 10.3390/v15030595.
 - [41] Liao JY, Feng XY, Zhang JX, et al. RT-RPA-*PfAgo* detection platform for one-tube simultaneous typing diagnosis of human respiratory syncytial virus [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2024, 14: 1419949. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1419949.
 - [42] He P, Zhou WH, Wei HP, et al. Fast and ultrasensitive detection of monkeypox by a *Pyrococcus furiosus* argonaute system coupled with a short amplification [J]. Viruses, 2024, 16(3): 382. DOI: 10.3390/v16030382.
 - [43] Zhao Y, Zhang TJ, Zhou CY, et al. *Pyrococcus furiosus* argonaute based detection assays for porcine deltacoronavirus [J]. ACS Synth Biol, 2024, 13(4): 1323-1331. DOI: 10.1021/acssynbio.4c00045.
 - [44] Zhao Y, Yang M, Zhou CY, et al. Establishment of a simple, sensitive, and specific ASFV detection method based on *Pyrococcus furiosus* argonaute [J]. Biosens Bioelectron, 2024, 254: 116230. DOI: 10.1016/j.bios.2024.116230.
 - [45] Zhao Y, Zhou CY, Guo BY, et al. *Pyrococcus furiosus* Argonaute-mediated porcine epidemic diarrhea virus detection [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2024, 108(1): 137. DOI: 10.1007/s00253-023-12919-0.
 - [46] Liu YQ, Chen LH, Zhang ZX, et al. Development and application of a novel recombinase polymerase amplification - *Pyrococcus furiosus* argonaute system for rapid detection of goose parvovirus [J]. Poult Sci, 2024, 103(10): 104141. DOI: 10.1016/j.psj.2024.104141.
 - [47] Yu ZR, Shi DM, Dong YL, et al. *Pyrococcus furiosus* argonaute combined with loop-mediated isothermal amplification for rapid, ultrasensitive, and visual detection of fowl adenovirus serotype 4 [J]. Poult Sci, 2024, 103(10): 103729. DOI: 10.1016/j.psj.2024.103729.
 - [48] Wang Y, Chen YK, Tang YX, et al. A recombinase polymerase amplification and *Pyrococcus furiosus* Argonaute combined method for ultra-sensitive detection of white spot syndrome virus in shrimp [J]. J Fish Dis, 2023, 46(12): 1357-1365. DOI: 10.1111/jfd.13853.
 - [49] Liu Y, Xia WQ, Zhao W, et al. RT-RPA-*PfAgo* System: A rapid, sensitive, and specific multiplex detection method for rice-infecting viruses [J]. Biosensors (Basel), 2023, 13(10): 941. DOI: 10.3390/bios13100941.
 - [50] Xiang YQ, Ke WK, Qin YQ, et al. *PfAgo*-based dual signal amplification biosensor for rapid and highly sensitive detection of alkaline phosphatase activity [J]. Microchim Acta, 2024, 191(7): 439. DOI: 10.1007/s00604-024-06516-9.
 - [51] Huang ZZ, Wei LY, Zhou YN, et al. Guide DNA dephosphorylation - modulated *Pyrococcus furiosus* Argonaute fluorescence biosensor for the detection of alkaline phosphatase and aflatoxins B1 [J]. Biosens Bioelectron, 2024, 265: 116692. DOI: 10.1016/j.bios.2024.116692.
 - [52] Pang FB, Zhang T, Dai FY, et al. A handheld isothermal fluorescence detector for duplex visualization of aquatic pathogens via enhanced one-pot LAMP-*PfAgo* assay [J]. Biosens Bioelectron, 2024, 254: 116187. DOI: 10.1016/j.bios.2024.116187.
 - [53] Yang LH, Guo B, Wang Y, et al. *Pyrococcus furiosus* Argonaute combined with recombinase polymerase amplification for rapid and sensitive detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* [J]. J Agric Food Chem, 2023, 71(1): 944-951. DOI: 10.1021/acs.jafc.2c06582.
 - [54] Zhao YL, Zhang YH, Wu WQ, et al. Rapid and sensitive detection of *Mycoplasma synoviae* using RPA combined with *Pyrococcus furiosus* Argonaute [J]. Poult Sci, 2024, 103(3): 103244. DOI: 10.1016/j.psj.2023.103244.
 - [55] Lim JM, Kim HH. Basic principles and clinical applications of CRISPR-based genome editing [J]. Yonsei Med J, 2022, 63(2): 105-113. DOI: 10.3349/ymj.2022.63.2.105.
 - [56] Wu ZY, Yu L, Shi WF, et al. Argonaute protein-based nucleic acid detection technology [J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1255716. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1255716.
 - [57] Kelley K, Cosman A, Belgrader P, et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a duplex droplet digital PCR assay [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(7): 2033-2039. DOI: 10.1128/JCM.00196-13.
 - [58] Zhang HW, Ma LY, Ma LN, et al. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pork using a nucleic acid-based lateral flow immunoassay [J]. Int J Food Microbiol, 2017, 243: 64-69. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.003.

- [59] Wang HY, Kim S, Kim J, et al. Multiplex real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant staphylococci directly from positive blood cultures[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(6): 1911-1920. DOI:10.1128/JCM.00389-14.
- [60] Guk K, Keem JO, Hwang SG, et al. A facile, rapid and sensitive detection of MRSA using a CRISPR - mediated DNA FISH method, antibody - like dCas9/sgRNA complex [J]. Biosensors Bioelectronics, 2017, 95: 67 - 71. DOI: 10.1016/j.bios.2017.04.016.
- [61] Tao ZZ, Wang BH, Cui Q, et al. A signal-off Cas14a1 - based platform for highly specific detection of methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Anal Chim Acta, 2023, 1256:341154. DOI:10.1016/j.aca.2023.341154.
- [62] Hu YZ, Qiao YF, Li XQ, et al. Development of an inducible Cas9 nickase and PAM - free Cas12a platform for bacterial diagnostics [J]. Talanta, 2023, 265: 124931. DOI: 10.1016/j.talanta.2023.124931.
- [63] Duraiswamy S, Agarwalla S, Lok KS, et al. A multiplex Taqman PCR assay for MRSA detection from whole blood[J]. PLoS One, 2023, 18(11):e0294782. DOI:10.1371/journal.pone.0294782.
- [64] Wei LY, Wang ZL, Wang J, et al. Aptamer-based colorimetric detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using a CRISPR/Cas12a system and recombinase polymerase amplification [J]. Anal Chim Acta, 2022, 16: 1230. DOI: 10.1016/j.aca.2022.340357.
- [65] Sahibzada S, Pang S, Hernández-Jover M, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of MRSA across different pig age groups in an intensive pig production system in Australia[J]. Zoonoses Public Health, 2020, 67(5):576-586. DOI:10.1111/zph.12721.
- [66] Chen CG, Zhao QY, Guo JW, et al. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using simultaneous detection of *mecA*, *nuc*, and *femB* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. Curr Microbiol, 2017, 74(8): 965 - 971. DOI:10.1007/s00284-017-1274-2.

(收稿日期:2024-12-11)

(本文编辑:王嫚)