

新型冠状病毒SARS-CoV-2检测技术研究进展

王熙函^{1#}, 赵 藤^{1#}, 魏小丽^{1#}, 周彩虹¹, 赵梓芊¹, 卫春会², 邓冉冉^{3*}, 殷利眷^{1*}

¹天津科技大学生物工程学院, 食品营养与安全教育部重点实验室, 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津

²酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 宜宾

³邯郸市第一医院妇产科, 河北 邯郸

收稿日期: 2024年6月19日; 录用日期: 2024年7月13日; 发布日期: 2024年7月23日

摘 要

由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)导致的新型冠状病毒感染仍是全世界面临的重要公共卫生事件, 且随着病毒基因组不断发生变异, 新型变异株出现, 病毒传染性和传播能力急剧增强, 对人类健康造成严重威胁。快速、高灵敏、高特异、即时检测新型冠状病毒对疫情防控和疾病快速诊治具有十分重要意义。本文基于国内外相关研究文献, 对目前新型冠状病毒检测方法进行总结和梳理, 包括实时定量RT-PCR、等温核酸扩增技术、CRISPR-Cas核酸检测技术以及高通量测序等核酸检测方法以及酶联免疫吸附法、侧流免疫层析等免疫学方法。进一步, 对不同的新型冠状病毒检测方法进行分析和讨论, 以期新型冠状病毒检测和疫情防控提供方法参考。

关键词

新型冠状病毒, COVID-19, 检测, CRISPR/Cas

Progress in Detection of Novel Coronavirus SARS-CoV-2

Xihan Wang^{1#}, Teng Zhao^{1#}, Xiaoli Wei^{1#}, Caihong Zhou¹, Ziqian Zhao¹, Chunhui Wei², Ranran Deng^{3*}, Lijuan Yin^{1*}

¹College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Tianjin

²Liquor Making Biological Technology and Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Yibin Sichuan

³Department of Gynaecology and Obstetrics, Handan First Hospital, Handan Hebei

*共同第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 王熙函, 赵藤, 魏小丽, 周彩虹, 赵梓芊, 卫春会, 邓冉冉, 殷利眷. 新型冠状病毒 SARS-CoV-2 检测技术研究进展[J]. 临床医学进展, 2024, 14(7): 1041-1049. DOI: 10.12677/acm.2024.1472112

Abstract

Novel coronavirus infection caused by the new coronavirus (SARS-CoV-2) is still an important public health event facing the world, and with the continuous mutation of the virus genome and the emergence of new variants, the infectivity and transmissibility of the virus have increased dramatically, posing a serious threat to human health. Rapid, highly sensitive, highly specific, and real-time detection of the novel coronavirus is of great significance for epidemic prevention and control, rapid diagnosis and treatment of diseases. Based on relevant research literature at home and abroad, this paper summarizes and sorts out the current research progress of novel coronavirus detection methods, including real-time RT-PCR, isothermal amplification nucleic acid detection technology, CRISPR-Cas nucleic acid detection technology, high-throughput sequencing and other nucleic acid detection methods, as well as immunological methods such as enzyme-linked immunosorbent detection and antigen colloidal gold test strip. Furthermore, different detection methods were analyzed and compared in order to provide a reference for novel coronavirus detection and epidemic prevention and control.

Keywords

SARS-COV-2, COVID-19, Detection, CRISPR/Cas

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

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

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



Open Access

1. 引言

2020 年, 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2) 感染疫情在全球暴发和流行, 其感染性强, 传播速度快, 对人类生命健康和社会经济带来严重威胁。此外, SARS-CoV-2 基因组不断发生变异[1], 新变异株的出现致使疫情反复流行。开发快速、灵敏、特异和简便的新型冠状病毒检测技术具有重要意义。

目前已有多种方法用于 SARS-CoV-2 检测, 实验室检测方法主要有核酸检测、基因测序、抗原抗体检测、病毒分离和电镜观察等。这些方法基于不同的生物学原理, 针对病毒的不同靶标, 在灵敏度、特异性、应用场景等方面表现不一, 构成了各具特色的检测体系, 本文主要就核酸分子生物学检测和免疫学检测进行综述。实时定量 RT-PCR 法作为一种流行的分子诊断技术, 在新型冠状病毒感染疫情防控中发挥了重要作用, 但该方法存在基因突变或交叉污染引起的假阳性和假阴性风险, 依赖昂贵的仪器设备, 仍存在许多局限, 不利于现场检测。随着科技的进步, 恒温快速检测技术得到迅速发展并应用于新型冠状病毒检测, 例如, 环介导等温扩增法、重组酶聚合酶扩增、滚环扩增、核酸依赖性扩增检测技术、以及 CRISPR-Cas 核酸检测技术等。除核酸检测外, 也有多种基于抗原抗体反应的免疫学方法用于新型冠状病毒检测, 例如酶联免疫吸附法、免疫层析法、基于免疫反应的生物传感器等。

本文对现有的 SARS-CoV-2 检测技术研究进行了归纳分析(如图 1 所示), 包括实时定量 RT-PCR、等温核酸扩增技术、CRISPR-Cas 核酸检测技术、高通量测序等核酸检测技术以及酶联免疫吸附法、免疫层析法等免疫学检测技术, 旨在为 SARS-CoV-2 快速精准诊断提供方法参考。

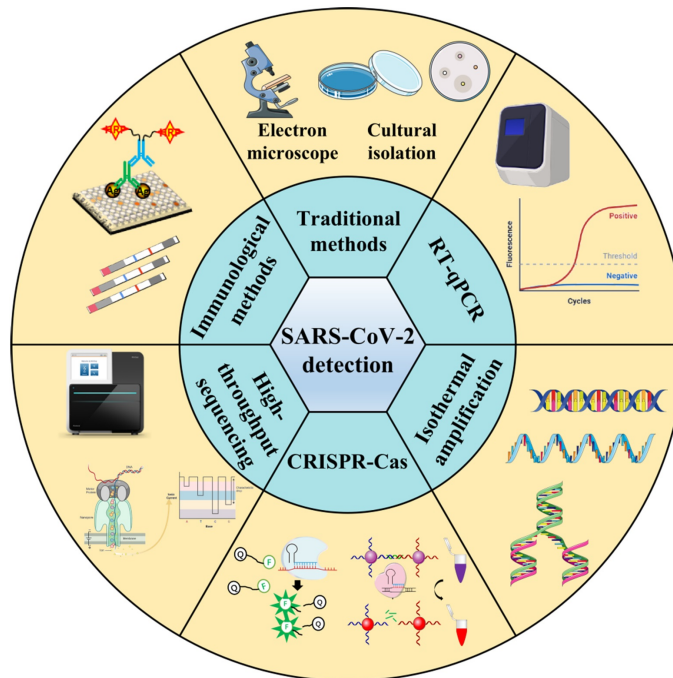


Figure 1. An overview of SARS-CoV-2 detection methods
图 1. 新型冠状病毒检测方法总结图

2. SARS-CoV-2 简介

SARS-CoV-2 是继 2003 年 SARS-CoV 和 2012 年中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)之后本世纪第三个跨物种感染人并导致严重呼吸道疾病的冠状病毒。通过测序技术(Next-generation sequencing, NGS)对病毒的完整基因组序列进行分析,其基因组为单股正链 RNA,基因组长约 30 kb,编码 29 种蛋白质,其中包括 15 种非结构蛋白(nsp1-nsp10, nsp12-nsp16),8 种辅助蛋白(3a、3b、p6、7a、7b、8b、9b 和 orf14)以及 4 种结构蛋白:刺突蛋白(Spike, S),包膜蛋白(Envelope, E),膜蛋白(Membrane, M)和核衣壳蛋白(Nucleocapsid, N)。

SARS-CoV-2 为 RNA 病毒,基因组易发生突变[2]。随着新型冠状病毒不断传播,在全球范围内出现了大量的病毒变异体,从 SARS-CoV-2 首次出现 S 蛋白 D614G 突变到被世界卫生组织列为关切的 Alpha、Beta、Gamma、Delta、Omicron 突变株以及其他一些受关注的突变株,病毒变异株的免疫逃逸能力增强、感染性和传播能力更强[3]。尽管各类疫苗迅速研发并普及,但病毒的不断变异带来了新的挑战,因此,开发快速、精准的新型冠状病毒检测技术对于发现、预防和阻断病毒的传播至关重要。

3. SARS-CoV-2 核酸检测技术

3.1. 实时定量 RT-PCR 技术

实时定量 RT-PCR (Quantitative real-time reverse transcription PCR, RT-qPCR)方法是目前 SARS-CoV-2 检测使用最广泛的方法,具有灵敏度高、特异性强等特点,被认为是新型冠状病毒检测的金标准。其基本原理在于:在逆转录酶作用下, SARS-CoV-2 RNA 逆转录形成 cDNA,根据病毒核酸序列设计特异性的引物和探针针对目的片段进行扩增,并在 Taq 酶外切酶作用下发生水解,释放荧光信号,通过测定荧光达到一定阈值所需循环数(Ct 值)实现靶标定量检测。

Wang 等[4]通过设计特异性引物和探针,靶向 SARS-CoV-2 保守性的 ORF1b 和 N 基因,利用实时定

量 RT-PCR 技术检测 SARS-CoV-2。N 基因检测灵敏度达到单拷贝/反应, ORF1b 基因检测灵敏度达到 10 拷贝/反应, 且荧光强度与靶基因拷贝数具有良好的线性关系。对 23 例疑似 COVID-19 临床样本检测, 通过 N 基因和 ORF1b 检测, SARS-CoV-2 检出率分别是 100% (23/23) 和 62.5% (16/23), 其中 ORF1b 未检出样本均为咽拭子样本, 提示咽拭子样本中病毒载量较低。Merindol 等[5]开展了免核酸提取的实时定量 RT-PCR 方法对新型冠状病毒直接检测, 研究发现样本储存在病毒保存液 UTM 或者分子水中, 可以成功避免 RNA 提取过程直接检测; 而当样本储存在盐水溶液中则需要 RNA 提取步骤。引物探针组合关系到 RT-qPCR 检测灵敏度和特异性, 世界范围内不同机构使用的 SARS-CoV-2 核酸扩增引物和探针组合不同, Vogels 等[6]对四种常见的 SARS-CoV-2 引物探针组合进行评估, 研究发现靶向 SARS-CoV-2 N 基因、开放读码框 ORF1、E 基因和 RdRp 基因的引物探针组合均可以用于检测 SARS-CoV-2, 其中, 靶向 RdRp 的引物探针组合检测灵敏度较低。

实时定量 RT-PCR 方法核酸检测灵敏度和特异性较高、技术成熟, 是目前应用最广泛的 SARS-CoV-2 检测方法。但是, 该方法存在一些局限性, 例如, 依赖昂贵仪器设备, 不适合现场即时检测。此外, 新型冠状病毒易变异, 碱基突变可能影响实时定量 RT-PCR 方法检测灵敏度。Tahan 等[7]对存在 G-U 碱基突变的 SARS-CoV-2 E 基因进行实时定量 RT-PCR 检测, 发现 SARS-CoV-2 检测效率明显降低。

3.2. 等温核酸扩增技术

3.2.1. 逆转录环介导等温扩增

环介导等温扩增法(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种高灵敏度、高特异性的核酸等温扩增方法, 由 Notomi 等人于 2000 年首次提出[8]。该反应由 6 条 DNA 引物和单个 DNA 聚合酶在 65℃ 恒温条件下反应 20~60 min 进行核酸扩增。其中两条引物和一个具有链置换功能的 DNA 聚合酶, 启动新的 DNA 链合成, 形成“环”结构, 然后加入其他引物进行退火, 对目标 DNA 进行循环扩增。逆转录环介导等温扩增法(Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)是将逆转录反应与环介导等温扩增(LAMP)相结合, 直接检测 RNA 目标序列的方法。随着耐热型反转录酶大量商品化, 耐热型 M-MLV 逆转录酶和 Bst DNA 聚合酶联合可实现一步法 RT-LAMP 检测 RNA。

基于逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)的 RNA 检测方法具有简便、快速、高灵敏等特点, 一些研究将其应用于 SARS-CoV-2 RNA 检测。Dao Thi 等[9]利用 RT-LAMP 方法对 768 份咽拭子标本中分离的 RNA 样本进行检测, 结果显示 SARS-CoV-2 RNA 检测灵敏度达到 97.5%, 特异性达 99.7%。此外, 随着扩增反应的进行, 溶液 pH 降低, 结合 pH 指示剂苯酚红, 该研究实现了新型冠状病毒 RNA 可视化检测。哈佛医学院的 Constance Cepko 实验室[10]将病毒内源性核酸酶失活和 RNA 纯化步骤与 RT-LAMP 结合, 进一步提高了 SARS-CoV-2 RNA 检测灵敏性, 灵敏度达到 1 拷贝/微升。

RT-LAMP 检测方法可实现病原微生物的现场快速检测, 提高检测效率, 适合基层快速诊断; 但该方法需要 3 对引物, 引物设计相对复杂。

3.2.2. 重组酶聚合酶扩增技术

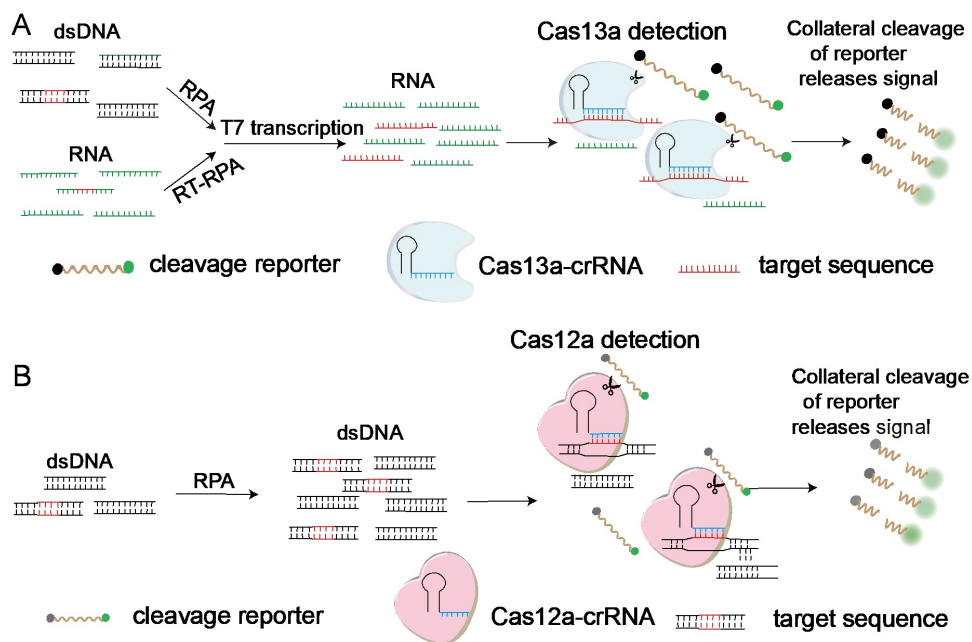
重组酶聚合酶扩增(Recombinase polymerase amplification, RPA)是一种新型恒温核酸扩增技术, 该反应主要依赖 4 种蛋白或酶: 单链 DNA 重组酶、单链 DNA 结合蛋白、链置换 DNA 聚合酶和重组调节蛋白, 可在 37~42℃ 恒温条件下对极少量 DNA 进行高效扩增[11]。与 LAMP 不同, RPA 反应只需要两条引物, 简化了引物的设计。RPA 与逆转录反应结合发展 RT-RPA 方法, 可实现 RNA 快速检测。

张淼源等[12]将 RPA 技术与侧流免疫层析结合建立起 RPA-LFD 检测方法并对新型冠状病毒 N 基因质粒进行检测研究。通过设计特异性的引物和探针, 可在 37℃ 反应 15 min 后检测到扩增产物的存在, 该方法简单快速, 检测限低至 100 fg/反应, 可以实现现场检测。Xia 等[13]将逆转录反应与改良版的 RPA

方法结合, 建立了新型冠状病毒 RNA 高灵敏、现场化的即时检测方法, 称为 RT-ERA (Reverse transcription-enzymatic recombinase amplification)。通过 40℃ 反应 26 min, 新型冠状病毒 RNA 检测灵敏度达到单拷贝。

3.3. CRISPR-Cas 核酸检测技术

由成簇规律间隔短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR)和 CRISPR 相关蛋白(CRISPR-associated, Cas)组成的 CRISPR-Cas 系统是广泛存在于细菌和古细菌中的获得性免疫系统, 用来抵御外来入侵的核酸[14]。在该系统中, 一段转录的 RNA, 也称为 crRNA (CRISPR RNA), 通过碱基互补配对特异性识别外源核酸片段, 并指导 Cas 效应蛋白对特定核酸进行高度特异性的切割(见图 2)。除了特异性核酸切割活性外, Cas12a 和 Cas13a 等效应蛋白表现出特异性核酸激活的非特异性核酸切割活性, 也称为附属核酸切割活性[15] [16]。基于该生物学特性, CRISPR-Cas 系统被开发为一种新型核酸检测技术, 为新型冠状病毒快速、高灵敏、高特异和现场即时检测提供了一种新策略[17]。



注: 该图引自作者已发表文章: Biosens Bioelectron. 2022, 195:113646 [23]。

Figure 2. CRISPR-Cas based assay for detection of SARS-CoV-2 [23]

图 2. 基于 CRISPR-Cas 系统的核酸检测方法原理示意图[23]

Broughton 等[18]于 2020 年报道了一种基于 CRISPR-Cas12a 的新型冠状病毒核酸快速检测方法, 通过与 LAMP 等温扩增技术结合, SARS-CoV-2 N 基因检测灵敏度达到 10 拷贝/微升, 检测时间为 40 min, 对 36 例新型冠状病毒感染样本和 42 例其他病原微生物感染进行检测, 与 RT-qPCR 方法对比, 阳性一致性达到 95%, 阴性样本 100%一致。LAMP 反应一般需要在 55~70℃进行, 而 Cas 蛋白切割反应适宜温度为 37℃, 为进一步简化检测步骤, 张锋实验室[19]利用源自酸性脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus acidiphilus*)的耐热型 Cas12b 蛋白(AapCas12b), 将 LAMP 核酸扩增与 CRISPR-Cas12b 体系结合, 实现 SARS-CoV-2 RNA 一锅法检测。除了经典的荧光法、侧流层析试纸条信号报告方式外, CRISPR-Cas 系统可与多种信号报告分子或生物传感系统结合, 发展高灵敏、可视化、现场化检测方法。例如, Ma 等[20]将 CRISPR-Cas 系统与纳米金比色方法结合, 建立了可视化的新型冠状病毒检测方法。除 CRISPR-Cas12a

外, CRISPR-Cas13a 也被应用于新型冠状病毒检测。Patchsung 等[21]建立了联合 RT-RPA 的 CRISPR-Cas13a 新型冠状病毒 RNA 检测方法, 并对 154 份鼻咽拭子临床样本进行验证, 荧光法检测灵敏度和特异性均达到 100%。CRISPR-Cas 核酸检测技术具有高灵敏、高特异和可编程等特点, 可应用于变异株特异性检测。Arizti-Sanz 等[22]利用 CRISPR-Cas13a 系统的可编程性, 通过设计突变株特异的 crRNA, 实现了 Alpha、Beta、Gamma、Delta and Omicron SARS-CoV-2 变异株的特异性检测。

CRISPR-Cas 技术利用 crRNA 的特异性识别和 Cas 效应蛋白的核酸酶活性进行快速、灵敏、特异的核酸检测, 正成为一种强有力的分子诊断工具。结合等温核酸扩增技术, 进一步放大了检测信号, 提高了检测灵敏度。此外, CRISPR-Cas 核酸检测系统可与多种生物传感策略相结合, 开发出多种基于 CRISPR-Cas 的生物传感技术, 有望进一步提高新型冠状病毒检测性能。尽管 CRISPR-Cas 核酸检测技术具有诸多优点, 但其也面临一些挑战, 例如靶点序列限制、多重检测、标准化、低背景信号检测等。

3.4. 高通量基因测序技术

高通量基因测序技术是对传统测序的一次革命性改变, 凭借其直接测定基因组序列、通量高等优势, 广泛用于病原微生物核酸检测和未知病原体的发现。宏基因组测序是指对复杂样本直接进行高通量测序、无需分离培养微生物, 具有较高的鉴定灵敏度, 是病原微生物检测和未知病原体发现的有力工具。COVID-19 疫情出现时, 我国科学院率先利用高通量基因测序技术对患者样本进行测序, 获得了 SARS-CoV-2 的全基因组序列, 通过序列比对, 发现其与 SARS-CoV 序列一致性为 79.5%, 均属于 SARS 相关冠状病毒[24] [25]。此外, 通过基因组测序技术, 可以精准检测病毒变异株。Wang 等通过高通量基因测序方法检测 SARS-CoV-2 Omicron 变异株, 对病毒基因组进化做出分析[26]。

纳米孔(Nanopore)测序是新型高通量测序技术, 具备单分子分辨率、读长长、操作便携等独特的优势, 在病原体基因测序、新物种鉴定等领域中展现出极大潜力。Liu 等[27]结合靶向扩增与长读长实时纳米孔测序的优点, 开发出纳米孔靶向测序, 可在 6~10 h 同时检测 SARS-CoV-2 和其他呼吸道病毒, 检测限为 10 拷贝/反应。对其他 5 种常见呼吸道病进行检测, 纳米孔靶向测序对 SARS-CoV-2 的检测特异性达到 100%。61 份 COVID-19 疑似样本经 RT-qPCR 检测为阴性或无结果的样本中, 有 22 份经纳米孔靶向测序(Nanopore Targeted Sequencing, NTS)鉴定为阳性。

4. 免疫学检测技术

免疫学方法是在检测和鉴定特异性微生物方面使用较为普遍的方法。该方法的一般原理是基于抗原-抗体的相互作用。常见的免疫学检测方法包括酶联免疫吸附法、侧流免疫层析法、化学发光免疫法、纳米技术分析法等。

4.1. 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是目前应用最广泛的免疫分析方法之一, 该方法通过将已知的抗原或抗体吸附在固相载体表面, 然后利用酶偶联的抗体或抗原与之孵育, 加入底物进行显色反应, 通过酶标仪对显色结果进行分析, 以表明分析物的存在[28]。新型冠状病毒表面存在多种结构蛋白质, 包含多个抗原表位, 目前研究多使用针对 N 蛋白、受体结合结构域或 S 蛋白的抗体。用抗 SARS-CoV-2 抗体检测的酶联免疫吸附试验测量宿主的体液反应, 包括 IgM 和 IgA, 以确定病毒暴露情况。Liu 等[29]采用重组 SARS-CoV-2 核衣壳蛋白(N)和 spike 蛋白(S)两种酶联免疫吸附检测试剂盒检测 IgM 和 IgG 抗体, 评价其诊断的可行性。214 例患者中, 检测 N IgM 和 IgG 分别成功诊断 146 例(68.2%)和 150 例(70.1%); 采用 S IgM 和 IgG 分别成功诊断 165 例(77.1%)和 159 例(74.3%)。

4.2. 侧流免疫层析法

侧流免疫层析法(Immunochromatography assay, ICA)是一种基于抗原抗体反应的简便、快速检测技术,也是现场即时检测的重要工具。利用侧流免疫层析法检测血液或血清样本中的 SARS-CoV-2 抗体或者临床样本中 SARS-CoV-2 抗原,可快速识别检测 SARS-CoV-2 感染。Li 等[30]开发了一种快速、简便、现场化的侧流免疫层析方法,可以在 15 分钟内同时检测人体血液中抗 SARS-CoV-2 的 IgM 和 IgG 抗体。对 397 例经过 PCR 确诊的 COVID-19 患者和 128 例阴性患者的血液样本进行检测分析,临床样本检测敏感性为 88.66%,特异性为 90.63%。侧流免疫层析法具有简便快速的特点,但是检测灵敏度较低。为解决该问题, Serebrennikova 等[31]将金纳米颗粒修饰固定 SARS-CoV-2 抗体,同时结合表面增强拉曼散射信号分子 4-巯基苯甲酸(4-mercaptobenzoic acid, 4-MBA),通过分析检测线拉曼信号,确定是否存在新型冠状病毒抗原。

4.3. 化学发光免疫分析法

化学发光免疫分析(Chemiluminescence immunoassay, CLIA)是一种新型的标记免疫分析技术,是将免疫反应与发光分析相结合建立的一种检测微量抗原或抗体的技术。因其灵敏度高,结果稳定、误差小,分析方法简便快速,已广泛应用于新型冠状病毒检测中。Long 等[32]利用磁性化学发光免疫分析法对 285 个 COVID-19 患者血清样本进行了抗 SARS-CoV-2 的 IgG 和 IgM 检测,结果显示在症状出现 19 天内,100%患者呈现 IgG 阳性,提示病毒特异性的抗体检测可作为核酸检测的补充方法,有助于诊断 RT-qPCR 检测阴性的样本。Cai 等[33]开发了一种基于多肽的磁性化学发光免疫的 COVID-19 血清学诊断方法,利用该方法对 276 个新型冠状病毒感染患者的血清样本和 200 个健康人血清样本进行 IgG 和 IgM 抗体检测,结果表明 IgG 和 IgM 检测阳性比例分别为 71.4%和 57.2%。此外, Lin 等[34]建立了一种基于重组核衣壳抗原的化学发光免疫分析方法,对 29 例健康人群、51 例结核病患者以及 79 例确诊的新冠患者的血浆样本进行病毒特异性抗体 IgM 和 IgG 进行检测,并与商业化的 ELISA 试剂盒进行平行比较,结果表明化学发光免疫法检测灵敏度患者血清中 IgM 和 IgG 抗体的敏感度分别为 60.76%和 82.28%,特异性分别为 92.25%和 97.5%,与 ELISA 方法相比,化学发光免疫法具有更好的灵敏度和特异性。

4.4. 纳米技术分析法

有研究者[35]通过诊断病毒最常用的光学活性纳米材料金纳米颗粒(AuNPs),基于局域表面等离子体共振效应(Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR)导致吸收峰位置的红移,进而导致溶液颜色明显的视觉变化,通常从红色变为蓝色。金纳米颗粒与抗原生物分子(或抗体)的生物偶联,通过在与病毒感染样品相关的抗体(或分析物)偶联时在测试线上显示颜色,在约 525 nm 处表现出最大的光吸收,适合用作免疫测定中的比色纳米探针,提供了一种简单、快速和可靠的病毒检测方法。

免疫学检测方法对设备要求较低,在实际中得到了广泛应用。然而,经典的酶联免疫吸附法由于程序复杂,不适合现场检测。侧流免疫层析法应用方便,但灵敏度不足,不适合精确定量检测。此外,免疫学检测方法受样本基质干扰较大。为了提高检测灵敏度、特异性和简便性,将现有的免疫学方法与其他分析技术(如拉曼和电化学)相结合,开发各种基于免疫的生物传感器,有望提升免疫学检测性能、扩大应用范围。

5. 总结与展望

新型冠状病毒的暴发和流行严重危害人类健康和社会经济,当前世界范围内感染人数仍在持续增加,快速、高灵敏、高特异、即时检测新型冠状病毒具有十分重要意义。本文综述了当前新型冠状病毒检测

的主要方法, 包括实时定量 RT-PCR 方法、等温核酸扩增技术、CRISPR-Cas 核酸检测技术、高通量基因测序等分子生物学方法以及酶联免疫吸附法、侧流免疫层析法、化学发光免疫分析等免疫学检测方法。现有的新型冠状病毒检测技术在疫情防控、病毒检测和疾病诊治方面发挥了重要作用, 同时也暴露出一定的局限性, 多学科交叉以及人工智能融合, 发展自动化、智能化检测技术是一个重要方向。随着科学技术的发展, 相信未来新型冠状病毒等病原微生物检测技术将会更快速、更高灵敏度、更强特异性和更简便。

基金项目

中国博士后科学基金会(项目号: 2021M702460), 题目: 基于 CRISPR-Cas12a 的新型冠状病毒及其突变体快速可视化检测新方法研究。

参考文献

- [1] 周焯真, 张世豪, 陈嘉仪, 等. 新型冠状病毒 SARS-CoV-2 的变异和进化分析[J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(2): 152-158.
- [2] 罗晓君, 章文贤. 冠状病毒的结构及生物学特性概述[J]. 生物学教学, 2020, 45(7): 4-6.
- [3] Tao, K., Tzou, P.L., Nouhin, J., Gupta, R.K., de Oliveira, T., Kosakovsky Pond, S.L., *et al.* (2021) The Biological and Clinical Significance of Emerging SARS-CoV-2 Variants. *Nature Reviews Genetics*, **22**, 757-773. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00408-x>
- [4] Liu, Y., Wang, Y., Wang, X., Xiao, Y., Chen, L., Guo, L., *et al.* (2020) Development of Two Taqman Real-Time Reverse Transcription-PCR Assays for the Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. *Biosafety and Health*, **2**, 232-237. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2020.07.009>
- [5] Merindol, N., Pépin, G., Marchand, C., Rheault, M., Peterson, C., Poirier, A., *et al.* (2020) SARS-CoV-2 Detection by Direct rRT-PCR without RNA Extraction. *Journal of Clinical Virology*, **128**, Article ID: 104423. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104423>
- [6] Vogels, C.B.F., Brito, A.F., Wyllie, A.L., Fauver, J.R., Ott, I.M., Kalinich, C.C., *et al.* (2020) Analytical Sensitivity and Efficiency Comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR Primer-Probe Sets. *Nature Microbiology*, **5**, 1299-1305. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0761-6>
- [7] Tahan, S., Parikh, B.A., Droit, L., Wallace, M.A., Burnham, C.D. and Wang, D. (2021) SARS-CoV-2 E Gene Variant Alters Analytical Sensitivity Characteristics of Viral Detection Using a Commercial Reverse Transcription-PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **59**, e00075-21. <https://doi.org/10.1128/jcm.00075-21>
- [8] Notomi, T. (2000) Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, **28**, 63e. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- [9] Dao Thi, V.L., Herbst, K., Boerner, K., Meurer, M., Kremer, L.P., Kirrmaier, D., *et al.* (2020) A Colorimetric RT-LAMP Assay and Lamp-Sequencing for Detecting SARS-CoV-2 RNA in Clinical Samples. *Science Translational Medicine*, **12**, eabc7075. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc7075>
- [10] Rabe, B.A. and Cepko, C. (2020) SARS-CoV-2 Detection Using Isothermal Amplification and a Rapid, Inexpensive Protocol for Sample Inactivation and Purification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **117**, 24450-24458. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011221117>
- [11] Piepenburg, O., Williams, C.H., Stemple, D.L. and Armes, N.A. (2006) DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLOS Biology*, **4**, e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>
- [12] 张淼源, 卢佩珊, 李佳宁, 等. 重组酶聚合酶侧流层析技术检测新冠病毒核酸快速诊断方法的初步建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2022, 38(7): 577-581.
- [13] Xia, S. and Chen, X. (2020) Single-Copy Sensitive, Field-Deployable, and Simultaneous Dual-Gene Detection of SARS-CoV-2 RNA via Modified RT-RPA. *Cell Discovery*, **6**, Article No. 37. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0175-x>
- [14] Harrison, M.M., Jenkins, B.V., O'Connor-Giles, K.M. and Wildonger, J. (2014) A CRISPR View of Development. *Genes & Development*, **28**, 1859-1872. <https://doi.org/10.1101/gad.248252.114>
- [15] Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Lee, J.W., Essletzbichler, P., Dy, A.J., Joung, J., *et al.* (2017) Nucleic Acid Detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, **356**, 438-442. <https://doi.org/10.1126/science.aam9321>
- [16] Chen, J.S., Ma, E., Harrington, L.B., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J.M., *et al.* (2018) CRISPR-Cas12a Target

- Binding Unleashes Indiscriminate Single-Stranded DNase Activity. *Science*, **360**, 436-439. <https://doi.org/10.1126/science.aar6245>
- [17] Li, Y., Li, S., Wang, J. and Liu, G. (2019) CRISPR/Cas Systems towards Next-Generation Biosensing. *Trends in Biotechnology*, **37**, 730-743. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.005>
- [18] Broughton, J.P., Deng, X., Yu, G., Fasching, C.L., Servellita, V., Singh, J., *et al.* (2020) CRISPR/Cas 12-Based Detection of SARS-CoV-2. *Nature Biotechnology*, **38**, 870-874. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>
- [19] Joung, J., Ladha, A., Saito, M., Kim, N., Woolley, A.E., Segel, M., *et al.* (2020) Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK One-Pot Testing. *New England Journal of Medicine*, **383**, 1492-1494. <https://doi.org/10.1056/nejmc2026172>
- [20] Ma, L., Yin, L., Li, X., Chen, S., Peng, L., Liu, G., *et al.* (2022) A Smartphone-Based Visual Biosensor for CRISPR-Cas Powered SARS-CoV-2 Diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, **195**, Article ID: 113646. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113646>
- [21] Maturada, P., Krittapas, J., Archiraya, P., *et al.* (2020) Clinical Validation of a Cas13-Based Assay for the Detection of SARS-CoV-2 RNA. *Nature Biomedical Engineering*, **4**, 1140-1149.
- [22] Arizti-Sanz, J., Bradley, A., Zhang, Y.B., Boehm, C.K., Freije, C.A., Grunberg, M.E., *et al.* (2022) Simplified Cas13-Based Assays for the Fast Identification of SARS-CoV-2 and Its Variants. *Nature Biomedical Engineering*, **6**, 932-943. <https://doi.org/10.1038/s41551-022-00889-z>
- [23] Yin, L., Man, S., Ye, S., Liu, G. and Ma, L. (2021) CRISPR-Cas Based Virus Detection: Recent Advances and Perspectives. *Biosensors and Bioelectronics*, **193**, Article ID: 113541. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113541>
- [24] Lu, R., Zhao, X., Li, J., *et al.* (2020) Genomic Characterisation and Epidemiology of 2019 Novel Coronavirus: Implications for Virus Origins and Receptor Binding. *The Lancet*, **395**, 565-574.
- [25] Zhou, P., Yang, X., Wang, X., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., *et al.* (2020) A Pneumonia Outbreak Associated with a New Coronavirus of Probable Bat Origin. *Nature*, **579**, 270-273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- [26] Wang, L. and Cheng, G. (2021) Sequence Analysis of the Emerging Sars-cov-2 Variant Omicron in South Africa. *Journal of Medical Virology*, **94**, 1728-1733. <https://doi.org/10.1002/jmv.27516>
- [27] Wang, M., Fu, A., Hu, B., Tong, Y., Liu, R., Liu, Z., *et al.* (2020) Nanopore Targeted Sequencing for the Accurate and Comprehensive Detection of SARS-CoV-2 and Other Respiratory Viruses. *Small*, **16**, e2002169. <https://doi.org/10.1002/smll.202002169>
- [28] Engvall, E. (2010) The ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical Chemistry*, **56**, 319-320. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.127803>
- [29] Liu, W., Liu, L., Kou, G., Zheng, Y., Ding, Y., Ni, W., *et al.* (2020) Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detecting Antibodies against SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Microbiology*, **58**, e00461-20. <https://doi.org/10.1128/jcm.00461-20>
- [30] Li, Z., Yi, Y., Luo, X., Xiong, N., Liu, Y., Li, S., *et al.* (2020) Development and Clinical Application of a Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. *Journal of Medical Virology*, **92**, 1518-1524. <https://doi.org/10.1002/jmv.25727>
- [31] Serebrennikova, K.V., Byzova, N.A., Zherdev, A.V., Khlebtsov, N.G., Khlebtsov, B.N., Biketov, S.F., *et al.* (2021) Lateral Flow Immunoassay of Sars-Cov-2 Antigen with SERS-Based Registration: Development and Comparison with Traditional Immunoassays. *Biosensors*, **11**, Article 510. <https://doi.org/10.3390/bios11120510>
- [32] Long, Q., Liu, B., Deng, H., Wu, G., Deng, K., Chen, Y., *et al.* (2020) Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients with COVID-19. *Nature Medicine*, **26**, 845-848. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0897-1>
- [33] Cai, X., Chen, J., li Hu, J., Long, Q., Deng, H., Liu, P., *et al.* (2020) A Peptide-Based Magnetic Chemiluminescence Enzyme Immunoassay for Serological Diagnosis of Coronavirus Disease 2019. *The Journal of Infectious Diseases*, **222**, 189-193. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa243>
- [34] Lin, D., Liu, L., Zhang, M., Hu, Y., Yang, Q., Guo, J., *et al.* (2020) Evaluations of the Serological Test in the Diagnosis of 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Infections during the COVID-19 Outbreak. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **39**, 2271-2277. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03978-6>
- [35] Santos, S.A.S.B., Cunha, R.L.J., Carvalho, C.I., *et al.* (2022) Nanotechnology Meets Immunology towards a Rapid Diagnosis Solution: The COVID-19 Outbreak Challenge. *RSC Advances*, **12**, 31711-31728. <https://doi.org/10.1039/d2ra05096j>