PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2021,48(11):1290~1300
www.pibb.ac.cn

核酸检测技术进展及其在SARS-CoV-2核酸检测中的应用*

孟德豪[1)] 张艳芬[2)] 孙玉淼[1)] 高 旭[1,3,4,5,6)] 马 宁[1,3,4,6)**]

([1)] 哈尔滨医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室，哈尔滨 150081；[2)] 哈尔滨医科大学附属第二医院检验科，哈尔滨 150000；
[3)] 黑龙江省基础医学研究所，哈尔滨 150086；[4)] 哈尔滨医科大学北方转化医学研究合作中心，哈尔滨 150081；
[5)] 教育部中国遗传资源保护与疾病防控重点实验室，哈尔滨 150081；[6)] 黑龙江省遗传改变模式动物重点实验室，哈尔滨 150081）

摘要 2020年初至今，新型冠状病毒肺炎（COVID-19）疫情仍在全球多个国家流行，给全球公共卫生安全造成了严重威胁.中国在应对COVID-19的实践中，最先完成病毒核酸测序并共享序列信息，最早有效控制疫情蔓延、恢复生产，并在病毒作用人体机制研究、疫苗研发、中和性抗体发现等环节均处于世界前沿.其中，针对病毒核酸的检测工作——试剂盒研发、检测配套设备研制、10合1混检策略及相关政策制订，有效提高了疫情防控效率、保障了百姓健康.本文就严重急性呼吸系统综合症冠状病毒2（SARS-CoV-2）核酸检测多种方法的原理、优劣势及其配套设备等进行综述.

关键词 新型冠状病毒，核酸检测，CRISPR
中图分类号 Q5，Q7
DOI：10.16476/j.pibb.2021.0036

2020年，新型冠状病毒肺炎（corona virus disease 2019，COVID-19）疫情在全球多个国家爆发，随后呈现出大规模蔓延趋势[1].截至2021年2月3日，全球累计确诊COVID-19患者已超过1亿人次.疫情在全球传播速度之快，使得对严重急性呼吸系统综合症冠状病毒2（severe acute respiratory syndrome coronavirus 2，SARS-CoV-2）快速、准确的实验室诊断显得尤为重要.

SARS-CoV-2是一种正义单链RNA病毒.病毒外观呈表面突起的球形，直径75~160 nm.其RNA基因组含29 903个核苷酸[2]，与SARS-CoV具有高达79%的序列同源性[3]，与MERS-CoV的同源性仅有50%左右[4].在COVID-19疫情初期，中国率先对该病毒进行了全基因组测序，发现其是不同于以往6种冠状病毒（HCoV 229E、HCoV OC43、HCoV NL63、HCoV HKU1、SARS-CoV、MERS-CoV）的第7种致病性冠状病毒[5].

由于针对SARS-CoV-2抗体的检测存在窗口期，同时易受标本中干扰物的影响，使得抗体检测应用于感染者筛查时灵敏度较低.而核酸检测因其采样便捷、灵敏度高，已被广泛用于临床实验室诊断及大规模的快速筛查中，成为我国COVID-19疫情防控工作中的重要环节.

1 核酸检测技术

核酸检测是依托分子生物学等技术对核酸（DNA或RNA）的结构、含量及亚细胞定位等进行定性定量分析，从而帮助临床上对疾病诊断的手段之一[6].常用的检测技术主要有聚合酶链式反应（PCR）、等温扩增、印迹技术、基因测序和基因芯片等.当前，针对SARS-CoV-2主要是通过其ORF1ab基因、N基因和/或E基因片段进行检测[7].

1.1 病毒核酸全基因组测序技术

疫情之初，武汉病毒研究所石正丽研究员利用

* 黑龙江省自然科学基金（H2018006），黑龙江省教育科学规划重点课题（GJB1320181），黑龙江省高等教育教学改革（重点）项目（SJGZ20200109），哈尔滨医科大学附属第二医院中青年创新科学研究基金（2020）和哈尔滨医科大学少帅揭榜项目（HMUMIF-21025）资助.
** 通讯联系人.
Tel：18845166742，E-mail：maning@hrbmu.edu.cn
收稿日期：2021-02-05，接受日期：2021-05-06

下一代测序（next generation sequencing，NGS）技术首次完成了对SARS-CoV-2基因组测序，并共享全球[5]. 华大基因研发了一款基于宏基因组测序技术的试剂盒[8]，能够鉴别诊断出包括SARS-CoV-2在内的多种冠状病毒和呼吸道病毒. 测序技术还能够利用采集的咽拭子、鼻拭子、肛拭子等样品中获取的病毒基因组序列信息，来监测病毒变异，如南非突变株（501Y.V2）、英国突变株（B.1.1.7）及巴西突变株（P.1）. 同时，在不同地区确诊病例关联分析中也能发挥重要作用.

目前，针对SARS-CoV-2基因组的测序技术主要包括3类[9]：探针捕获测序技术、宏基因组测序技术和多重PCR扩增子测序技术. 研究人员通过对8例临床样本进行分析后发现，在针对高病毒载量样本进行检测时，探针捕获测序和多重PCR扩增子测序都有很好的富集效果；而对低病毒载量的样本进行分析时，多重PCR扩增子测序的富集效果是探针捕获测序的10~1 000倍. 这一结果表明，在低病毒载量的情况下，多重PCR扩增子测序具有更高的灵敏度和更低的漏检率，能够弥补荧光定量PCR准确度的不足，适用于病程初期低病毒载量难以确诊患者或感染后无明显症状的潜伏期患者的确诊检测.

然而测序技术检测成本高、周期长，需要复杂设备和专业的分析，故该方法不适于大规模筛查，仅在疫情初始及难以确诊病例的检测中进行应用.

1.2　荧光定量PCR技术

目前，荧光定量PCR技术已作为SARS-CoV-2核酸筛查的主要手段广泛应用[10]. 在近期多个区域的全民核酸筛查及确诊病例的实验室诊断中发挥了重要作用. 该技术利用扩增过程中Taq酶的5'核酸外切酶活性，在子代DNA延伸过程中“切割”与目标序列结合的探针. 当探针被降解后，荧光基团“远离”猝灭基团发出荧光. 荧光信号强度随每轮DNA复制扩增而增加，通过检测扩增过程中荧光强度的增加来确定初始模板情况[11]（图1a）.

荧光定量PCR技术灵敏度高、特异性强，可用于诊断较早期感染[12-13]，已成为最重要的SARS-CoV-2核酸检测方法[14]. 据不完全统计，截至2020年11月，中国国家药品监督管理局（NMPA）已批准了24个基于该技术的SARS-CoV-2核酸检测试剂盒（国家药监局应急审批新型冠状病毒抗原检测产品，索引号：XZXK-2020-1548）. 其中，部分产品还获得美国FDA紧急使用授权[15]. 这些产品可针对咽拭子、痰液、肺泡灌洗液、血清及血浆等多种样品中的SARS-CoV-2核酸片段进行检测，极大增加了采样可及性. 限于需要特定的仪器设备，其便携性相对较差，需要特定场所开展检测[16].

荧光定量PCR技术虽被作为SARS-CoV-2核酸检测的“金标准”，但在针对早期感染者的检测时，可能会出现假阴性结果. 特别是针对感染者症状较轻且具有相对较长的潜伏期，该方法可能会发生漏检. 导致出现漏检的原因包括以下几方面：a. 检测人员进行咽拭子取样时操作不规范，导致拭子携带病毒量过低，达不到核酸检测的灵敏度；b. RNA易被环境中（操作环境及操作人）或医疗样本内源性的RNase降解，提取过程未特别注意；c. 检测试剂盒质量不达标. 为了减少漏检情况的发生，需要检测人员在采样过程中严格规范操作，通过对疑似病人多个部位同时采样或同一部位反复检测，来增加SARS-CoV-2的检出几率. 同时，试剂研发人员需实时监控病毒变异情况，以保证与病毒RNA匹配的引物与探针仍能发挥效用. 并且检测试剂盒最低检出限的稳定性及病毒扩增的高效性也应纳入考虑范畴.

1.3　微滴式数字PCR技术

微滴式数字PCR（droplet digital PCR，ddPCR）技术通过将PCR反应体系分割成数万个小液滴进行定量扩增[17]，配合使用数字PCR分析系统，可以实现对病毒核酸的绝对定量.

研究人员利用ddPCR分析系统对103名疑似病例、75名密切接触者及16名康复期患者进行检测，通过与3种不同的荧光定量PCR试剂盒的检测结果进行比较后，发现ddPCR的灵敏度、特异性及准确率分别达到91%、100%和93%，极大提升了荧光定量PCR的灵敏度[18]. ddPCR在检测极限上的表现也十分突出，通过对57例阴性（荧光定量PCR法）的咽拭子样本进行双盲检测后发现，ddPCR较荧光定量PCR的灵敏度最多高500倍，总体灵敏度仍维持在94%左右[19].

ddPCR技术灵敏度高、抗干扰能力强，使其定性分析能够满足临床筛检的基本需求，定量分析能够为疾病的研究和诊治提供更多有用信息. 特别是对隔离人员和无症状患者检测，该方法能够最大程度解决因病毒载量低所产生的漏检情况，可作为疫情期间疑似病例复核的可靠手段. 但ddPCR仍不能完全避免漏检的发生，其潜在漏检因素与荧光定量PCR技术相似. 同时，由于其依赖复杂、昂贵的

分析系统，成本较高，只有在大规模使用时，检测成本才接近荧光定量PCR方法，故该方法尚未在国内普及.

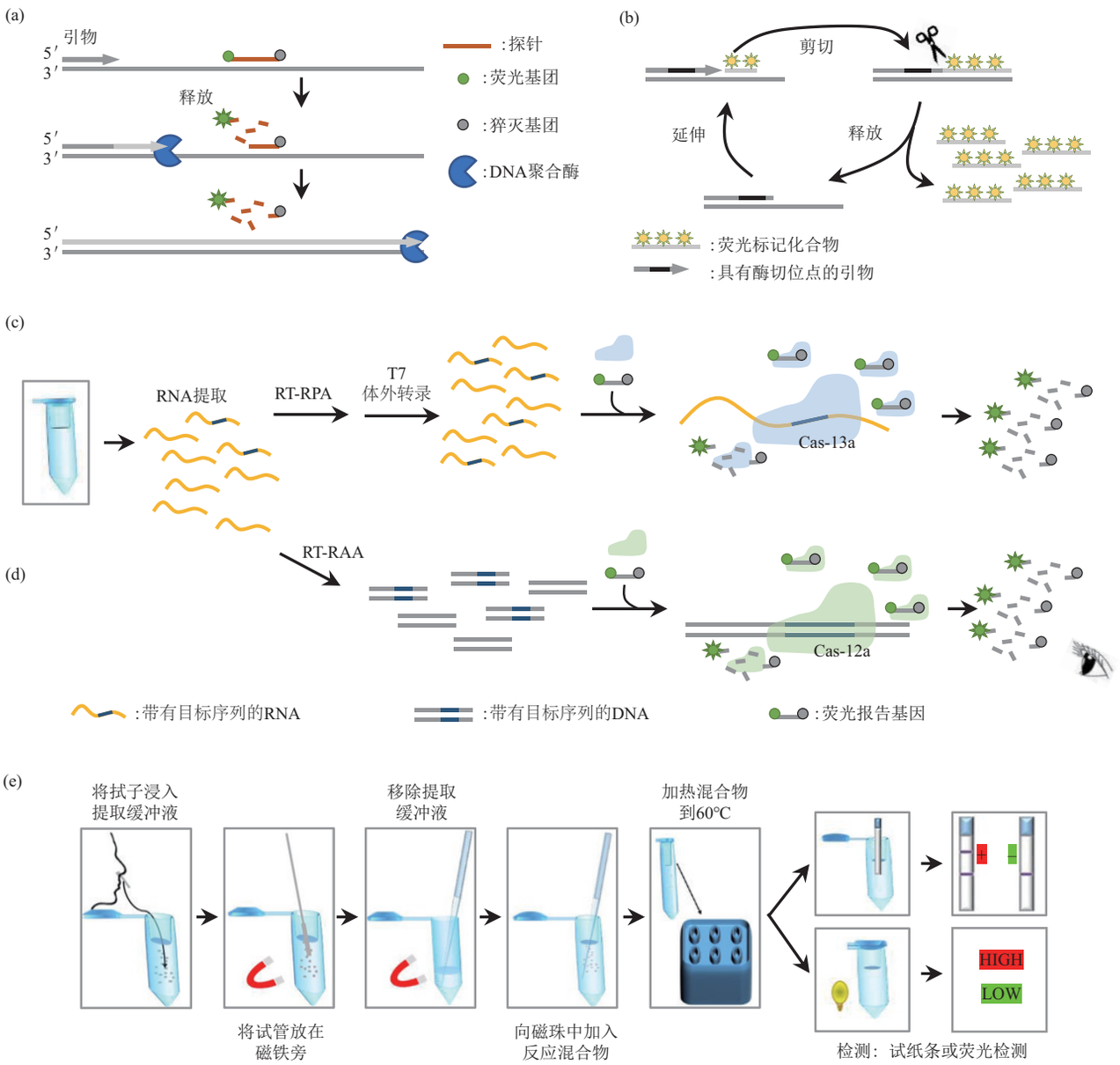

Fig. 1　SARS-CoV-2 nucleic acid detection principles and schematic diagrams

图1　SARS-CoV-2核酸检测原理、流程示意图

（a）荧光定量PCR原理示意图（探针法）.（b）切口酶扩增反应（NEAR）原理示意图（仅显示单侧模板）.（c）SHERLOCK原理示意图.（d）CRISPR-Cas12a-NER流程示意图.（e）STOPCovid.V2流程示意图. NER：naked eye readout（肉眼读数）. RT-RPA：reverse transcription recombinase polymerase amplification（逆转录重组酶聚合酶常温扩增技术）. RT-RAA：reverse transcription recombinase aided amplification（逆转录与重组酶介导的链替换核酸扩增技术）.

1.4　逆转录环介导等温扩增技术

环介导等温扩增（loop-mediated isothermal amplification，LAMP）技术是由日本学者Notomi[20]在2000年开发的一种新型核酸扩增技术. 该技术摆脱了传统PCR对温控的特殊要求，通过在目标序列的6个区域设计4种特异性引物，利用链置换DNA聚合酶，在65°C的恒温条件下即可完成扩增. 因扩增过程中会产生大量的焦磷酸镁白色沉淀使溶液的浊度增加，故可通过浊度变化来实时监测扩增反应[21].

Yu等[22]基于该技术开发了名为iLACO（isothermal LAMP based method for COVID-19，iLACO）的SARS-CoV-2核酸检测方法. 在65℃恒温条件下反应20~30 min，能够检出每微升样本中低至10个拷贝的病毒基因片段，灵敏度极高. 通过向反应体系中引入一种新型核酸染料（GeneFinder™），可进一步提升iLACO的结果读取能力.

Hu等[23]针对SARS-CoV-2的S基因开发出了另一种核酸检测方法，通过与荧光定量PCR的检测结果进行对比，发现该方法具有较高的灵敏度（88.89%，较PCR更高）和特异性（99.00%，与PCR接近）. 同时，所需试剂均可实现冻干处理，无需RNA的提取，即可实现单步、单管反应完成检测，使其极有可能成为理想的床旁检测（point-of-care testing，POCT）产品[23].

LAMP技术无论在检测时间还是操作便捷性上均优于荧光定量PCR技术，但因其化学反应比荧光定量PCR更为复杂，需要更多的引物设计和对靶标基因特异性选择，这无疑增加了应用难度[16]. 同时，当检测样本病毒载量过低或采样及检测试剂盒质量未达要求时，该检测方法会出现假阴性结果，故不适合用于疑似患者的确诊检测. 目前，尚无基于RT-LAMP技术的SARS-CoV-2核酸检测产品进入市场，实际效果仍待验证.

1.5　CRISPR衍生技术的核酸检测

规律成簇的间隔短回文重复（clustered regularly interspaced short palindromic repeats，CRISPR）系统最初于原核生物发现，其具有清除外源核酸的独特免疫机制. 因具备在真核生物中强大的基因编辑、调控及检测能力，CRISPR系统被迅速广泛应用于基础及应用研究[24].

1.5.1　SHERLOCK

Cas13是VI型CRISPR系统中的一员，与Cas9不同，它是一种切割RNA的核酸酶[25]. 目前，研究人员已利用CRISPR/Cas13开展了对埃博拉病毒[26]和寨卡病毒的核酸检测工作，并针对RNA中的N1甲基腺苷（m1A）[27]进行了检测.

SHERLOCK（specific high sensitivity enzymatic reporter unLOCKing）分子诊断平台是Gootenberg等[28]在埃博拉病毒核酸检测基础上，利用Cas13a切割目标序列后对周围RNA产生切割的特性所研发的一种新型核酸检测方法. 通过将带有荧光报告基团的单链RNA引入反应体系，当Cas13a识别目标序列并切割后，会对带有荧光报告基团的单链RNA进行切割，使荧光基团与猝灭基团分离，通过观察荧光信号进而完成检测. 该方法主要包含两个步骤：重组酶聚合酶扩增（recombinase polymerase amplification，RPA）和T7体外转录. 经过以上两步后，即可完成对待测样本中病毒核酸的扩增提取（图1c）. 但该技术精确度略显不足，目前只适用于定性检测.

为此，Gootenberg等[29]针对SHERLOCK进行了改进，升级版的SHERLOCK V2在原有基础上进行了以下4项改进：a. 通过正交4种CRISPR酶（LwaCas13a、PsmCas13b、CcaCas13b、AsCas12a），进行四通道、单反应、多路检测；b. 定量检测病毒核酸载量低至2×10^{-18} mol/L；c. 将Cas13与Csm6相结合[30]，使检测信号灵敏度提升3.5倍；d. 应用侧向流试纸条进行可视化读取. 升级版的SHERLOCK V2克服了对荧光检测设备的依赖，同时也具备了对多种疾病进行定量、大规模检测的能力.

与此同时，Zhang等[31]还发布了其团队应用该技术检测SARS-CoV-2的详细操作流程，以此来推进研究向临床转化. 2020年5月7日，首款基于SHERLOCK V2技术的SARS-CoV-2核酸检测产品——Sherlock™ CRISPR SARS-CoV-2试剂盒[32]获得美国FDA紧急使用授权. 这是FDA首次批准基于CRISPR基因编辑技术的SARS-CoV-2检测产品，也是首次授权将该技术应用于传染病检测中.

1.5.2　DETECTR

Cas12a（又称Cpf1）是一种RNA引导的针对DNA进行靶向切割的核酸酶. 当Cas12a与目标序列结合并切割后，会将其周围的线性和环状ssDNA分子全部切割[33]. 作为细菌适应性免疫系统的组成部分，与Cas9一样，Cas12a也常被作为基因编辑的工具.

Chen等[34]利用Cas12a的特性建立了名为DETECTR（DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter，DETECTR）的核酸检测方法. 通过在反应体系中引入与荧光报告基团相连的单链DNA分子，当Cas12a切割目标序列时，会引发Cas12a切割连接着荧光报告基团的单链DNA，当单链DNA被切断后，报告基团发出荧光，借此判定目标序列的存在.

Broughton等[35]研发了一款基于DETECTR的针对SARS-CoV-2 E基因和N2基因的检测试剂盒. 首先，利用RT-LAMP方法对受检者鼻咽拭子中的

RNA进行提取、扩增，随后利用试纸条对其进行检测，通过观察条带数即可判定结果，检测全程仅耗时45 min. 利用该方法对83份已知的SARS-CoV-2阳性样本进行检测，DETECTR的阳性检出率（positive predictive agreement）可达95%. 有报道称，该项目研究者正在与葛兰素史克公司合作，利用该技术研发一次性家用SARS-CoV-2检测试剂盒，并计划于2021年投入使用.

Wang等[36]也开发出一种基于CRISPR-Cas12a的名为CRISPR-Cas12a-NER的SARS-CoV-2核酸检测方法. 该方法针对SARS-CoV-2的不同基因片段进行特异性crRNA筛选，选取特异性最强的靶向E基因的E-crRNAmix，可清晰检出每微升中低至10个病毒拷贝的样本. 同时，在反应体系中引入标记有猝灭绿色荧光分子的ssDNA报告基因，该报告基因可在485 nm的蓝光下产生肉眼可见绿色荧光，检测全程耗时45 min，肉眼即可观测到结果. 此外，为了获得足够的DNA用于核酸检测以提高阳性结果检出率，他们还在反应体系中引用了逆转录与重组酶介导的链替换核酸扩增（RT-RAA）技术. 但该方法目前仍处在临床试验阶段，尚未进入市场（图1d）.

1.5.3 STOPCovid

Cas12b（又称C2C1）是一种脱靶率低、稳定性好、寿命长、耐高温的小分子核酸酶[37].

基于SHERLOCK[28]技术的SARS-CoV-2核酸检测因涉及液体样本处理、转移等步骤，既增加了操作流程复杂性，又带来环境污染的可能性. 为此，Joung等[38]研发了另一款更为简便的SARS-CoV-2核酸检测方法，被称为STOPCovid（SHERLOCK testing in one pot，STOPCovid）. 该技术可通过两个连续的反应：a. 应用LAMP技术扩增病毒RNA；b. 利用嗜热脂环酸芽孢杆菌的Cas12b酶（*Alicyclobacillus acidiphilus* Cas12b，AapCas12b）介导的切割作用，实现对病毒的核酸检测. 经研究证实，该酶能够在LAMP反应温度下维持足够的活性，并对目标序列进行准确切割.

为了进一步提高反应灵敏度、简化病毒核酸提取过程，Joung等[39]对STOPCovid进行了升级改进，通过引入磁珠使裂解后样本中的RNA被充分富集到磁珠上，在省去乙醇洗涤和洗脱步骤的同时，也使PCR反应的起始RNA数量有所提高. 操作过程的简化使得检测全程耗时只需45 min. 改进后的STOPCovid. V2[39]（SHERLOCK Testing in One Pot.V2，STOPCovid.V2）经双盲检测分析后，灵敏度可达93.1%，特异性可达98.5%. 但目前该方法仍处于临床前测试阶段，实际效果仍待验证（图1e）.

CRISPR技术因其检测灵敏度极高、特异性极强，当目标高效靶基因被选取后，该方法产生漏检的几率相比于其他检测方法有了极大降低，在疾病感染全程保持较好的检测能力. 同时，因其体积小、携带反方便、操作简单，是目前检测SARS-CoV-2感染最有前景的核酸技术. 但该检测技术仍需要进行咽拭子采样，同时检测试剂盒也存在质量是否达标的问题，故二者仍可能为该技术潜在的漏检因素.

1.6 其他

除了上述提及的核酸检测技术外，还有一些检测技术也在此次COVID-19疫情中得以探索. 如：切口酶扩增反应技术[40]（nicking enzyme amplification reaction，NEAR）也被称为“指数扩增反应”（exponential amplification reaction，EXPAR）（图1b）. 基于该原理，雅培公司推出了一款名为ID NOW[41]的SARS-CoV-2核酸检测仪，因其体积小巧、携带方便，使其成为目前FDA批准的第二个检测SARS-CoV-2的POCT产品. 在对高病毒载量样品检测中，ID NOW表现比较出色，可作为SARS-CoV-2的快速检测方法. 但因其一味地缩短时间、提高效率，导致病毒扩增所需时间大大缩短，病毒扩增量大打折扣. 早期感染者因体内病毒尚未大量扩增，低于其检测灵敏度而易发漏检. 同时，随着SARS-CoV-2基因的变异，ID NOW检测中使用的病毒RdRp靶基因可能存在潜在的性能改变，该因素也可能成为导致漏检的潜在因素，建议慎用其作为确诊检测.

为了有效鉴别流感患者和COVID-19患者，实现对感染者的精准诊疗，程京院士团队推出了一款将等温扩增技术[20]与芯片技术[42]相结合的核酸检测芯片——“六项呼吸道病毒核酸检测试剂盒（恒温扩增芯片法）”[43]. 该芯片能够在90 min内对包括SARS-CoV-2（S、N基因片段）在内的6种呼吸道常见病毒进行检测，加入保存液后可直接灭活病毒，操作步骤少且全封闭，有效地减少了医务人员的暴露几率. 同时，芯片阅读仪也已达到移动分析平台（mobile analysis platform，MAP）水平，这为病毒核酸检测的现场部署提供了更大的便利[44]. 以上技术比较及代表产品见表1和表2.

Table 1　Comparison of advantages and disadvantages of SARS-CoV-2 nucleic acid detection methods

表1　SARS-CoV-2核酸检测方法优、缺点比较

检测方法	优点	缺点	复杂设备	参考文献
基因测序	可对病毒基因组进行高通量、深层次分析处理；特异性强、灵敏度高；可作为结果复核的可靠方法；监测病毒变异	便携性差；需要专业的人员分析结果；检测成本高；检测耗时长	需要	［8-9］
荧光定量PCR	操作简便；特异性强、灵敏度高；普及性好；可利用样本种类多	便携性差；需要设置温度梯度；检测耗时较长；检测结果不稳定；病毒载量低时会出现假阴性结果	需要	［10-14, 16］
ddPCR	实现绝对定量；灵敏度高、抗干扰力强；检测极限好，漏检、错检率低；对疑似患者的阳性检出率高；可作为结果复核的可靠方法	依赖复杂的分析设备；检测成本高；操作过程复杂；需要设置温度梯度；检测耗时长	需要	［17-19］
RT-LAMP	检测耗时短；无需要设置温度梯度；结果观察便利；特异性、灵敏度与荧光定量PCR相近	需要维持恒温的仪器设备；引物设计略有难度	不需要	［16, 20-23］
SHERLOCK	检测耗时短；可进行4通道单反应多路检测；检测极限好；特异性强、灵敏度高；结果观察便利；检测成本低；便携性好	精确度较差，多进行定性分析；涉及到样本的处理、转移等，操作相对复杂；易发生污染	不需要	［25, 28-30, 38］
DETECTR	耗时短、特异性强、灵敏度高；检测极限好；结果观察便利；便携性好	涉及到核酸提取、扩增、转移，易发生污染	不需要	［34-35, 38］
CRISPR-Cas12a-NER	耗时短、特异性强、灵敏度高、检测极限好	——	不需要	［36］
STOPCovid	耗时短、特异性强、灵敏度高；操作步骤简单；污染小；结果观察便利	——	不需要	［38-39］
NEAR	检测耗时极短；操作步骤简单	灵敏度低，漏检率高	不需要	［41］
芯片	检测耗时短；可进行高通量、多种疾病的快速检测；特异性、灵敏度较高便携性好；可直接灭活病毒，减少暴露几率	对突变株可能发生漏检	需要	［42-43］

“——”表示暂无相关信息.

Table 2　Comparison of representative products of SARS-CoV-2 nucleic acid detection methods

表2　SARS-CoV-2核酸检测方法代表产品的比较

检测方法	目标基因	耗时	灵敏度/特异性	代表产品	检测成本	是否获批准	文献
基因测序	全基因	6 h	——	新型冠状病毒核酸检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）	——	NMPA批准	［8］
荧光PCR	ORF1ab N基因	140 min	81.48%/100.00%	新型冠状病毒核酸检测试剂盒（荧光PCR法）	14美元/次	FDA，NMPA，CE批准	［15-16］
ddPCR	ORF1ab N基因	5 h	91.00%/100.00%	QX200	——	CE批准	［18-19］
RT-LAMP	ORF1ab S基因	30~80 min	88.89%/99.00%	——	3.15美元/次	否	［22-23］
SHERLOCK	ORF1ab N基因	60 min	——	Sherlock™ CRISPR SARS-CoV-2试剂盒	995美元/盒	FDA批准	［32］
DETECTR	E基因 N2基因	45 min	——	——	——	否	［35］
CRISPR-Cas12a-NER	E基因	45 min	——	——	——	否	［36］
STOPCovid	N基因	60 min	93.10%/98.50%	——	——	否	［38-39］
NEAR	RdRp基因	5~13 min	——	雅培公司（Abbott）ID NOW	10 000美元/台	FDA批准	［41］
芯片	S基因 N基因	90 min	——	六项呼吸道病毒核酸检测试剂盒	60美元/次	NMPA，CE批准	［25］

“——”表示暂无相关信息；NMPA：中华人民共和国国家药品监督管理局（national medical products administration）；FDA：美国食品和药物管理局（food and drug administration）；CE：欧盟CE认证（CONFORMITE EUROPEENNE）.

2 SARS-CoV-2核酸检测的实施

目前，国内三级综合医院、传染病专科医院、各级疾控机构以及县级医院都已具备SARS-CoV-2核酸检测能力. 相关部门要求，至2021年所有二级综合医院也要具备核酸采样和检测能力，形成联防联控、快速反应的调集机制[45]. 与此同时，检测策略和场所也在不断升级.

2.1 稀释混样检测

为进一步提高PCR检测效率，中国提出了10合1混检策略[46]. 在近期多地的全员核酸检测中，平均单日可完成200万人份筛查，向全球抗疫展示了中国速度，为全球抗疫贡献出中国力量. 但该检测目前仅适用于大人群（人群总体阳性率低于0.1%时）样本的筛查，检测结果不能作为确诊依据. 同时因多样本混合检测使样本被稀释，病毒载量降低的同时，漏检的风险也有所提高. 故应用混检时，必须进行核酸提取，禁用“一步法”直接裂解的方式进行病毒扩增. 在室内质控方面，每批次样本检测时，应在剩余加样孔中设置1个弱阳性质控样本和3个阴性质控样本（2份生理盐水和1份阴性混合样本），3份阴性质控样本随机混入待测样本中间，并且每批次混检还应留取一份阴性样本备查[47]. 目前，混检是缓解大样本检测压力的首选方案，经上述优化后，该方法已能够在很大程度上避免因技术缺陷对结果产生的影响.

2.2 移动方舱核酸检测实验室

作为国人智慧结晶的移动方舱核酸检测实验室（如赛默飞移动方舱核酸检测实验室、上海移动方舱核酸检测实验室），是一种集试剂准备区、标本制备区、扩增分析区和高压消毒区等部分构成的模块化卫生设施，可在短时间内大幅提升核酸检测效率及医疗救治能力. 通过引入PCR扩增仪，使每台方舱实验室检测量达6 000人份/日，1∶10混检可达60 000人份/日. 对急诊、发热门诊患者，2~3 h内即可发出核酸检测报告. 无需复检的标本，当日即可出结果. 对需要复检的标本，时间有所延长，但24 h内也可发出结果. 实现了当天采样、当天检测、当天报告的一站式核酸检测，充分避免了预约难、耗时久的问题. 目前，该实验室对非突变型常规SARS-CoV-2的检测已表现出良好性能，但针对近期病毒变异，需要其结合测序技术，实时更新病毒基因组突变情况，以减少因病毒突变导致的漏检发生，提高对突变病毒阳性检出率.

方舱核酸检测实验室因其机动性好，展开部署迅速，环境适应性强等诸多优点，在短期内极大地缓解了受检例数激增、医院检测力量不足的现状，为病毒的筛查检测做出了巨大贡献.

2.3 全集成核酸检测移动实验室

为进一步提升检测机动性，中国还推出了首款应用轻型客车搭载的全集成核酸检测移动实验室（博奥生物集团）[48]，该实验室具备独立的发电系统，符合P2+生物安全等级，可灵活、便捷地在边境口岸、聚集性疫区开展工作. 运用该车搭载的咽拭子采样机器人即可完成对受检者口咽拭子采样，将采集的样本经快速灭活处理后直接加入芯片，还可避免常规PCR所需的反复开盖及移液等操作，最大程度降低了操作人员的感染风险及发生样本间交叉污染的概率. 配合使用博奥自主研发的全自动、便携一体化的SARS-CoV-2核酸检测系统，能够精准的区分流感患者和COVID-19患者，以比常规PCR快3倍以上的速度，45 min内完成检测，单日检测量可达500~2 000人份. 同时，应用5G检测直报系统即可实现对疫情信息的实时传送，避免因人为原因出现的数据错报、缓报、漏报等情况的发生，为疫情防控提供了更加有力的支持和保障.

2.4 火眼实验室（气膜版、方舱版）

华大基因推出了一种名为“火眼”的核酸检测场所[49]. 该实验室严格按照P2实验室进行设计，有气膜版和方舱版. 每个气膜仓充实只需要50 min，省去了移动方舱实验室搭建过程中所消耗的精力. 相比全集成核酸检测移动实验室而言，火眼实验室提供了更大的容纳空间以及近乎于常规医院的检测水平.

火眼实验室共设置了五大功能区（样本采集区、样本接收区、试剂准备区、样本制备区、扩增区），具备气锁转换、医废出口、卫生间等辅助转换空间. 通过配备其自主研发的自动化核酸提取仪、高通量测序系统以及QPCR仪等SARS-CoV-2核酸检测设备，在提高样本处理速度的同时，也极大降低了人工操作的风险，实现高通量、大规模检测，具备日检10万份的能力. 同时，“火眼”不仅能够检测常规病毒感染，对于突变毒株的及时发现及检测也表现出了良好的性能，是目前发现SARS-CoV-2突变的有力利器. 正因其低能耗、智能化、易运输、可快速搭建等特点，火眼实验室已陆续在疫情重点区域“服役”，为全球抗疫做出了重要的贡献. 当前为了进一步提升检测效率，研发人员正

商讨并优化各检测环节方案，望为今后疑似病例的检测、高危人群的排查提供更科学判断.

3　SARS-CoV-2病原学及血清学检测

3.1　病原学检测

SARS-CoV-2病原学检测主要包括病毒的分离培养及核酸检测，而病毒培养是诊断SARS-CoV-2感染的先决条件.应用保留的各种标本（如鼻咽拭子、呼吸道分泌物、血液、粪便等）进行培养鉴定，特别是对下呼吸道来源标本（痰或气道抽取物）的检测尤为重要[50].经分离纯化后，利用电子显微镜观察病毒形态结构，结合RT-PCR或/和NGS技术对其进行分析，以此来判定受检者是否感染.该检测方法不仅为临床诊断提供了有效的数据，同时也为今后病毒疫苗研发以及病毒致病机理的研究做出重要铺垫[51].

但因病原学检测涉及分离、培养、纯化病毒等步骤，程序复杂、耗时较长、易受其他因素干扰，故该方法只适用于早期的病毒分析，不适合大规模、快速精准的筛查检测，特别是疫情严重，筛查工作量巨大的情况下，该方法不推荐应用.

3.2　血清学检测

血清学检测因其操作便捷、检测迅速被关注.尤其是胶体金法，用肉眼即可判断检测结果.目前，该方法主要针对SARS-CoV-2特异性IgM抗体和IgG抗体进行检测.但在SARS-CoV-2感染早期，人体可能尚未产生抗体，若在该时段进行血清学检测，存在窗口期，易发生漏检[51].只有当特异性IgG抗体由阴性转为阳性或恢复期较急性期4倍及以上升高时，才能确诊为SARS-CoV-2感染者[50].同时，体内存在的某些干扰物质（如类风湿因子、补体、溶菌酶等）或者标本采集、制备及运输等原因造成标本溶血、标本污染、标本储存时间过长等，都可能使SARS-CoV-2的血清学检测出现假阳性结果.而核酸检测灵敏度较高、稳定性较好，能够检出处于窗口期的感染者，弥补了血清学检测的不足.故血清学检测通常作为核酸检测的补充手段，作为间接证据来判断受检者有无感染SARS-CoV-2[52].在实际筛查检测中建议二者联合应用，以提高SARS-CoV-2感染者的阳性检出率[53].

4　结语与展望

COVID-19疫情仍在全球蔓延，感染人数和死亡人数仍在攀升.因此，快速准确地对SARS-CoV-2核酸检测筛查仍是有效防控疫情的关键.多种方法各有利弊，需要检测人员结合受检者特点、疫情特点等加以选择.同时，还应在操作规范、质量控制及结果读取上进行严格把控，以确保检测结果的真实可靠.相信随着研究的深入，未来的核酸检测能够成为集高通量、自动化、便携式和低成本等诸多优点为一体的高效检测方法，为传染性疾病相关检测提供更广阔的思路.

参　考　文　献

[1] Wang C, Horby P W, Hayden F G, *et al*. A novel coronavirus outbreak of global health concern. Lancet, 2020, **395**(10223): 470-473

[2] Wu F, Zhao S, Yu B, *et al*. Author correction: a new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature, 2020, **580**(7803): E7

[3] Xu X, Chen P, Wang J, *et al*. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. Sci China Life Sci, 2020, **63**(3): 457-460

[4] Lu R, Zhao X, Li J, *et al*. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. Lancet, 2020, **395**(10224): 565-574

[5] Zhou P, Yang X L, Wang X G, *et al*. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature, 2020, **579**(7798): 270-273

[6] Huggett J, Green C, Zumla A. Nucleic acid detection and quantification in the developing world. Biochem Soc Trans, 2009, **37**(Pt 2): 419-423

[7] Zhu N, Zhang D, Wang W, *et al*. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. N Engl J Med, 2020, **382**(8): 727-733

[8] 华大集团.华大旗下华大基因新型冠状病毒检测试剂盒和华大智造DNBSEQ-T7测序系统均获国药监局应急审批[M/OL].深圳: 华大集团, 2020[2021-01-05]. https://www.genomics.cn/news/info_itemid_5678.html
BGI. BGI's Gene Novel Coronavirus Detection Kit and MGI's DNBSEQ-T7 Sequencing System Both Received Emergency Approval From The National Medical Products Administration[M/OL]. Shenzhen: BGI, 2020[2021-01-05]. https://www. genomics.cn/news/info_itemid_5678.html

[9] Xiao M, Liu X, Ji J, *et al*. Multiple approaches for massively parallel sequencing of SARS-CoV-2 genomes directly from clinical samples. Genome Med, 2020, **12**(1): 57

[10] Shen M, Zhou Y, Ye J, *et al*. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. J Pharm Anal, 2020, **10**(2): 97-101

[11] Johnston J W. Example of use of taqman real-time RT-PCR to analyze bacterial gene transcript levels: haemophilus influenzae. Curr Protoc Microbiol, 2009, **15**: 1D.1.1-1D.1.13

[12] Wan Z, Zhang Y, He Z, *et al*. A melting curve-based multiplex RT-qPCR assay for simultaneous detection of four human coronaviruses. Int J Mol Sci, 2016, **17**(11): 1880

[13] Noh J Y, Yoon S W, Kim D J, *et al*. Simultaneous detection of severe acute respiratory syndrome, Middle East respiratory syndrome, and related bat coronaviruses by real-time reverse transcription PCR. Arch Virol, 2017, **162**(6): 1617-1623

[14] Corman V M, Eckerle I, Bleicker T, *et al*. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. Euro Surveill, 2012, **17**(39): 20285

[15] U. S. FDA. Real-Time Fluorescent RT-PCR Kit for Detecting SARS-CoV-2 was Authorized by The U. S. FDA for Emergency Use [M/OL]. New York: U. S. FDA, 2021[2021-01-28]. https://www.fda.gov/

[16] 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

[17] Hindson B J, Ness K D, Masquelier D A, *et al*. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. Anal Chem, 2011, **83**: 8604-8610

[18] Dong L, Zhou J, Niu C, *et al*. Highly accurate and sensitive diagnostic detection of SARS-CoV-2 by digital PCR. Talanta, 2021, **224**: 121726

[19] Suo T, Liu X, Feng J, *et al*. ddPCR: a more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens. Emerg Microbes Infect, 2020, **9**(1): 1259-1268

[20] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al*. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res, 2000, **28**(12): E63

[21] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, *et al*. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Biophys Res Commun, 2001, **289**(1): 150-154

[22] Yu L, Wu S, Hao X, *et al*. Rapid detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform. Clin Chem, 2020, **66**(7): 975-977

[23] Hu X, Deng Q, Li J, *et al*. Development and clinical application of a rapid and sensitive loop-mediated isothermal amplification test for SARS-CoV-2 infection. mSphere, 2020, **5**(4): e00808-20

[24] Wright A V, Nuñez J K, Doudna J A. Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. Cell, 2016, **164**(1-2): 29-44

[25] Freije C A, Myhrvold C, Boehm C K, *et al*. Programmable inhibition and detection of RNA viruses using Cas13. Mol Cell, 2019, **76**(5): 826-837

[26] Qin P, Park M, Alfson K J, *et al*. Rapid and fully microfluidic Ebola virus detection with CRISPR-Cas13a. ACS Sens, 2019, **4**(4): 1048-1054

[27] Chen Y, Yang S, Peng S, *et al*. N1-Methyladenosine detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. Chem Sci, 2019, **10**(10): 2975-2979

[28] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Lee J W, *et al*. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. Science, 2017, **356**(6336): 438-442

[29] 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

[30] Garcia-Doval C, Schwede F, Berk C, *et al*. Activation and self-inactivation mechanisms of the cyclic oligoadenylate-dependent CRISPR ribonuclease Csm6. Nat Commun, 2020, **11**(1): 1596

[31] Zhang F, Abudayyeh O O, Gootenberg J S. A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics[M/OL]. Boston: McGovern Institute for Brain Research, 2020[2021-01-05]. https://broad.io/sherlockprotocol

[32] U.S. FDA. Sherlock CRISPR SARS-CoV-2 Kit was Authorized by The U.S. FDA for Emergency Use[M/OL]. New York: U.S. FDA, 2020[2021-01-05]. https://www.fda.gov/

[33] Swarts D C. Making the cut(s): how Cas12a cleaves target and non-target DNA. Biochem Soc Trans, 2019, **47**(5): 1499-1510

[34] 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

[35] Broughton J P, Deng X, Yu G, *et al*. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. Nat Biotechnol, 2020, **38**(7): 870-874

[36] Wang X, Zhong M, Liu Y, *et al*. Rapid and sensitive detection of COVID-19 using CRISPR/Cas12a-based detection with naked eye readout, CRISPR/Cas12a-NER. Sci Bull, 2020, **65**(17): 1436-1439

[37] Teng F, Cui T, Feng G, *et al*. Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering. Cell Discov, 2018, **4**: 63

[38] Joung J, Ladha A, Saito M, *et al*. Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics. medRxiv, 2020, 2020.05.04.20091231

[39] Joung J, Ladha A, Saito M, *et al*. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing. N Engl J Med, 2020, **383**(15): 1492-1494

[40] Nie S, Roth R B, Stiles J, *et al*. Evaluation of Alere i Influenza A&B for rapid detection of influenza viruses A and B. J Clin Microbiol, 2014, **52**(9): 3339-3344

[41] Basu A, Zinger T, Inglima K, *et al*. Performance of Abbott ID Now COVID-19 rapid nucleic acid amplification test using nasopharyngeal swabs transported in viral transport media and dry nasal swabs in a New York City Academic Institution. J Clin Microbiol, 2020, **58**(8): e01136-20

[42] Rando O. Nucleic acid platform technologies. Cold Spring Harb Protoc, 2019, **2019**(9):10.1101/pdb.top096388

[43] 国家药品监督管理局 . 国家药监局应急审批新型冠状病毒快速检测产品 . 北京 : 国家药品监督管理局 , 2020: XZXK-2020-1488. https://www. nmpa. gov. cn/ylqx/ylqxjgdt/20200311194501487.html
National Medical Products Administration. The National Medical Products Administration Urgently Approves SARS-CoV-2 Rapid Test Products. Beijing: National Medical Products Administration, 2020: XZXK-2020-1488. https://www. nmpa. gov. cn/ylqx/

ylqxjgdt/20200311194501487.html

[44] Hardick J, Metzgar D, Risen L, *et al*. Initial performance evaluation of a spotted array Mobile Analysis Platform (MAP) for the detection of influenza A/B, RSV, and MERS coronavirus. Diagn Microbiol Infect Dis, 2018, **91**(3): 245-247

[45] 国务院办公厅. 关于印发进一步推进新冠病毒核酸检测能力建设工作方案的通知. 索引号: 000014349/2020-00082. 北京: 国务院办公厅, 2020
General Office of the State Council of the People's Republic of China. Notice on The Issuance of The Work Plan to Further Advance The Capability Building of SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection. Reference No. 000014349/2020-00082. Beijing: General Office of the State Council of the People's Republic of China, 2020

[46] 国务院联防联控机制. 关于印发新冠病毒核酸10合1混采检测技术规范的通知. 北京: 国务院联防联控机制, 2020
The Joint Prevention and Control Mechanism of The State Council. Notice on The Issuance of The Technical Specifications for The 10-in-1 Hybrid Detection of SARS-CoV-2 Nucleic Acid. Beijing: The Joint Prevention and Control Mechanism of The State Council, 2020

[47] 国务院联防联控机制. 关于印发新冠病毒核酸筛查稀释混样检测技术指引的通知. 北京: 国务院联防联控机制, 2020
The Joint Prevention and Control Mechanism of The State Council. Notice on The Issuance of Technical Guidelines for The Detection of Diluted and Mixed Samples for SARS-CoV-2 Nucleic Acid Screening. Beijing: The Joint Prevention and Control Mechanism of the State Council, 2020

[48] 博奥生物集团有限公司. 解密博奥全集成新冠检测移动实验室[M/OL]. 北京: 博奥生物集团有限公司, 2020[2021-01-05]. http://cn.capitalbio.com/gxba/xwzx/gsxw/2020nsjd/28358.shtml
Capitalbio Corporation. Decrypt Capitalbio Corporation's Fully Integrated SARS-CoV-2 Detection Mobile Laboratory[M/OL]. Beijing: Capitalbio Corporation, 2020[2021-01-05]. http://cn.capitalbio.com/gxba/xwzx/gsxw/2020nsjd/28358.shtml

[49] 华大集团. 火眼实验室[M/OL]. 深圳: 华大集团, 2020[2021-01-05]. https://www.genomics.cn/huoyan/index.aspx
BGI. Huo-Yan Laboratory[M/OL]. Shenzhen:BGI,2020[2021-01-05]. https://www.genomics.cn/huoyan/index.aspx

[50] 国家卫生健康委员会办公厅. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)的通知. 北京: 国家卫生健康委员会办公厅, 2020
The National Health Commission of The People's Republic of China. Notice on The Issuance of COVID-19 Diagnosis and Treatment Program (Trial Seventh Edition). Beijing: The National Health Commission of The People's Republic of China, 2020

[51] 邱峰, 王慧君, 张子康, 等. 新型冠状病毒SARS-CoV-2的实验室检测技术. 南方医科大学学报, 2020, **40**(2): 164-167
Qiu F, Wang H, Zhang Z, *et al*. Journal of Southern Medical University, 2020, **40**(2): 164-167

[52] Du Z, Zhu F, Guo F, *et al*. Detection of antibodies against SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. J Med Virol, 2020, **92**(10): 1735-1738

[53] Krajewski R, Gołębiowska J, Makuch S, *et al*. Update on serologic testing in COVID-19. Clin Chim Acta, 2020, **510**: 746-750

Progress in Nucleic Acid Detection Technology and Its Application in SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection*

MENG De-Hao[1)], ZHANG Yan-Fen[2)], SUN Yu-Miao[1)], GAO Xu[1, 3, 4, 5, 6)], MA Ning[1, 3, 4, 6)**]

([1)]*Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Harbin Medical University, Harbin* 150081, China;

[2)]*Department of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin* 150000, China;

[3)]*Heilongjiang Institute of Basic Medicine, Harbin* 150086, China;

[4)]*Translational Medicine Research and Cooperation Center of Northern China, Harbin Medical University, Harbin* 150081, China;

[5)]*Key Laboratory of Preservation of Human Genetic Resources and Disease Control in China, Ministry of Education, Harbin* 150081, China;

[6)]*Key Laboratory of Genetically Modified Model Animals of Heilongjiang Province, Harbin* 150081, China)

Abstract Up to now, the COVID-19 is still prevalent in many countries around the world, and threatens health security of global public seriously. China not only developed the reagent kits for detecting of SARS-CoV-2 nucleic acids and testing equipment, but also established 10 in 1 mixed detection strategy and related policies which have improved the efficiency of epidemic prevention and control, and ensured the health of the people. This review summarizes the principles, advantages, disadvantages and supporting equipment of various methods for the detection of SARS-CoV-2.

Key words SARS-CoV-2, nucleic acid detection, CRISPR

DOI：10.16476/j.pibb.2021.0036

* This work was supported by grants from the Natural Science Foundation Project of Heilongjiang Province (H2018006), the Education Science Planning Key Project of Heilongjiang Province (GJB1320181), the Higher Education Teaching Reform (Key) Project of Heilongjiang Province (SJGZ20200109), Innovative Scientific Research Fund of the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University (2020) and HMU Marshal Initiative Funding (HMUMIF-21025).

** Corresponding author.

Tel：86-18845166742，E-mail：maning@hrbmu.edu.cn

Received：February 5，2021 Accepted：May 6，2021