



新型冠状病毒SARS-CoV-2检测技术的 研究进展*

张晓元¹⁾ 张艳艳¹⁾ 张小刚¹⁾ 刘霞¹⁾ 陈勉¹⁾ 刘飞^{1,2)**} 张岱州¹⁾ 凌沛学^{1,2)}

(¹⁾ 山东省药学院, 山东省生物药物重点实验室, 山东省多糖类药物工程实验室,
多糖类药物发酵与精制国家地方联合工程实验室, 博士后科研工作站, 济南 250101;

(²⁾ 山东福瑞达医药集团有限公司, 济南 250101)

摘要 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)具有较强的传播能力, 已证实可人传人, 无症状携带者也可传播. 快速、准确诊断新型冠状病毒对控制疫情爆发尤为重要. 论文基于国内外的相关研究进展, 就新型冠状病毒的荧光PCR、等温扩增、基于Cas酶技术、免疫法四大类检测技术进行了详细的分析与梳理, 以期新型冠状病毒及其他流行性病毒诊断及防控提供借鉴和思路.

关键词 新型冠状病毒, 核酸检测, 免疫检测, 聚合酶链式扩增, 反转录

中图分类号 Q5, Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0060

2019年12月, 武汉爆发新型冠状病毒肺炎(COVID-19), 病原体确定为新型冠状病毒(SARS-CoV-2)^[1]. 截至2020年3月底, 中国确诊患者8万余例, 死亡超3 000例. 国外, 特别是意大利、美国、西班牙等感染数字也在急剧攀升, 情况不容乐观. 该病毒已证实比SARS病毒传染性更强, 尤其对中老年人群及患病人群影响极大^[2], 建立起快速检测确诊方法对新冠肺炎早发现、早防控、早治疗都极其重要.

新型冠状病毒属于 β 属冠状病毒, 其遗传物质是单条正义RNA链^[3]. 张永振教授团队利用测序技术确定该RNA病毒的基因组, 并第一时间公布相关病毒序列(GenBank MN908947), 近3万个碱基的长度^[4]. 基于已知基因组序列, 最常用的病毒快速检测技术主要有两大类: 核酸检测和抗原抗体免疫检测. 核酸(DNA或RNA)是病毒的遗传物质, 筛选其独一无二的特征核酸序列进行检测即可确定病原体. 而病毒作为抗原可激发人体免疫反应产生抗体, 抗原抗体特异性相互结合的特性可作为检测的理论基础. 本文综述了可应用于新型冠状病毒检测的技术研究与应用进展, 以期早期诊断和

防控提供关键技术支持.

1 荧光PCR检测技术

聚合酶链式反应(PCR)技术是Mullis等^[5]1985年发明的. 该发明彻底变革了生物化学、分子生物学以及遗传学等领域, 1993年获诺贝尔化学奖. 基于新冠病毒病原体的全基因序列, 生物信息学分析出特征序列, 根据PCR原理^[5]设计扩增上下游引物, 以提取自病人样本RNA为模板, 进行反转录聚合酶链反应(RT-PCR), 利用高温变性打开双链、低温退火引物结合、适温目的基因延伸, 30个左右反复循环即可得到指数级的数量增加, 如可检测到大量DNA目的片段即可判定为阳性样品. 第一代PCR技术, 扩增DNA产物采用琼脂糖凝胶电泳验证, 操作麻烦耗时且易造成产物污染; 第三代数字PCR技术(digital PCR, dPCR)灵敏度高, 可做到复杂样品中核酸准确定量, 但基

* 山东省重点研发计划(2019GSF107040)和济南市高校院所创新团队项目(2019GXRC038)资助.

** 通讯联系人.

Tel: 0531-81213080, E-mail: lfshwu@163.com

收稿日期: 2020-03-11, 接受日期: 2020-04-02

于配套试剂及设备昂贵, 性价比不高, 对新型冠状病毒快速检测的优势不大. 相比之下, 快速、准确、实时、便捷的第二代荧光PCR技术成为新冠病毒检测的主流方法. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)将实时荧光RT-PCR核酸检测技术作成疑似病例确诊检测“金标准”之一^[6].

荧光PCR相比普通PCR在反应体系中加入荧光化学物质, 将PCR扩增与荧光信号的变化产生联系. 常见的有荧光染料(图1a)和探针染料(图1b)两种. 荧光染料如SYBR GreenI, 可特异性与DNA双链小沟结合, 产生数百倍增量的荧光信号; 探针染料, 如最常用的TaqMan探针, 能与目的片段特异性杂交, 5'端标记荧光基团, 3'端标记猝灭基团, 正常情况下两基团距离近, 荧光基团因猝灭不发荧光, PCR扩增时, Taq酶切割探针, 分离荧光基团发出荧光. 结合专门仪器, 可实现实时荧光检测, 方便结果读取, 也防止开盖可能造成的污染, 还可对模板进行定量计算. 国家药监局持续应急审批新型冠状病毒检测产品(2020年3月16

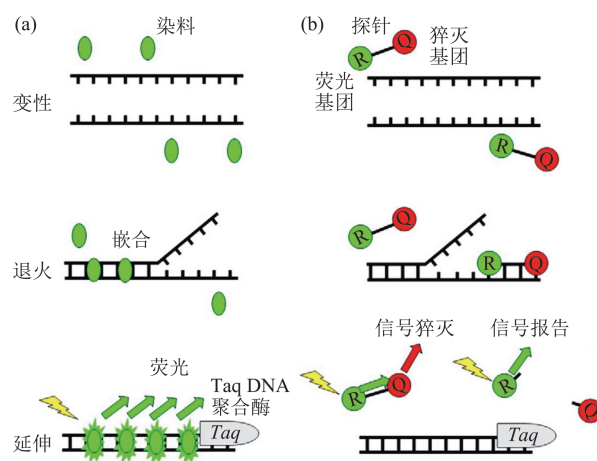


Fig. 1 Detection chemistries for qPCR^[7]: (a) Dye assay and (b) Probe assay

图1 荧光PCR化学检测方法^[7]

(a) 染料法; (b) 探针法.

日发布)共批准19个^[8], 如表1, 其中采用荧光PCR法9个, 扩增靶基因集中在ORF1ab、S、N、E等基因.

Table 1 SARS-CoV-2 testing products approved by The National Medical Products Administration

表1 国家药品监督管理局批准的新型冠状病毒检测试剂盒

序号	方法	检测目标 ¹⁾	国械注准号	注册公司
1	荧光PCR法	ORF1ab、N	20203400065	上海伯杰医疗科技有限公司
2	荧光PCR法	ORF1ab、N、E	20203400184	迈克生物股份有限公司
3	荧光PCR法	ORF1ab、N	20203400058	上海捷诺生物科技有限公司
4	荧光PCR法	ORF1ab、N、E	20203400057	上海之江生物科技股份有限公司
5	荧光PCR法	ORF1ab	20203400060	华大生物科技(武汉)有限公司
6	荧光PCR法	ORF1ab、N	20203400064	圣湘生物科技股份有限公司
7	荧光PCR法	ORF1ab、N	20203400063	中山大学达安基因股份有限公司
8	荧光PCR法	ORF1ab、N、E	20203400179	北京卓诚惠生生物科技股份
9	荧光PCR法	ORF1ab、N	20203400212	武汉明德生物科技股份有限公司
10	恒温扩增芯片法	S、N	20203400178	成都博奥晶芯生物科技有限公司
11	胶体金法	IgM/IgG	20203400177	英诺特(唐山)生物技术有限公司
12	胶体金法	IgM/IgG	20203400176	广州万孚生物技术股份有限公司
13	胶体金法	IgM	20203400199	广东和信健康科技有限公司
14	胶体金法	IgM/IgG	20203400239	南京诺唯赞医疗科技有限公司
15	胶体金法	IgM/IgG	20203400240	珠海丽珠试剂股份有限公司
16	磁微粒化学发光法	IgM	20203400182	博奥赛斯(重庆)生物科技有限公司
17	磁微粒化学发光法	IgG	20203400183	博奥赛斯(重庆)生物科技有限公司
18	化学发光微粒子免疫检测法	SARS-CoV-2抗体	20203400198	厦门万泰凯瑞生物技术有限公司
19	联合探针锚定聚合测序法	核酸序列	20203400059	华大生物科技(武汉)有限公司

¹⁾ ORF1ab: 编码非结构蛋白基因; S: 编码刺蛋白基因; N: 编码核壳蛋白基因; E: 编码包膜蛋白基因.

2 等温扩增检测技术

2.1 LAMP环介导等温扩增技术

荧光PCR检测技术缺点也很鲜明, 如需快速精准升降温的PCR仪器, 温度范围一般要求0~100℃, 且反应时间长, 操作要求高等. 寻求仪器要求低、温度恒定、灵敏度高的扩增技术, 是实现病原体快速检测的迫切要求. 环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是2000年日本学者Notomi^[9]在*Nucleic Acids Res*杂志上公开的一种基因诊断技术, 近20年来, 受到了WHO、各国学者和相关政府部门的广泛关注, 在检测病原微生物和传染性疾病预防方面开发出较多的应用. 目前该技术已成功地应用于布鲁氏菌^[10]、羊痘病毒^[11-12]、SARS冠状病毒^[13-14]、禽流感病毒^[15]、HIV^[16]等病原体的检测. 其中, LAMP-TB检测肺炎结核杆菌(TB)方法还被

WHO写进其官方材料中^[17].
LAMP等温扩增技术特点是针对目的基因6个区域设计出4种特异引物F3、B3、FIP、BIP(图2), 在嗜热脂肪芽孢杆菌链置换DNA聚合酶(Bst DNA polymerase)的作用下, 可在60~65℃实现恒温扩增, 15~60 min即可实现10⁹~10¹⁰倍的核酸扩增, 具有操作简单等显著特点. 另外, 终点可视检测是LAMP技术最大亮点, DNA合成时, 从脱氧核糖核酸三磷酸底物(dNTPs)中析出产生大量焦磷酸, pH变化明显^[18], 如与反应溶液中的镁离子反应可产生大量焦磷酸镁沉淀, 呈现白色浑浊沉淀, 以浑浊度作为反应指标, 肉眼观察即可鉴定扩增与否. 其次, 可使用钙黄绿素或羟基萘酚蓝(HNB)等来显色, 肉眼即可清晰判断反应结果^[19]. 尤其是HNB, 灵敏度高, 稳定性强, 显色结果可保持至少2周, 在RT-LAMP方法检测口蹄疫病毒的显色案例中, 50 min内的检测灵敏度可达10³ copies/μl^[20]. 另外, Ooscorbin等^[21]比较了9种

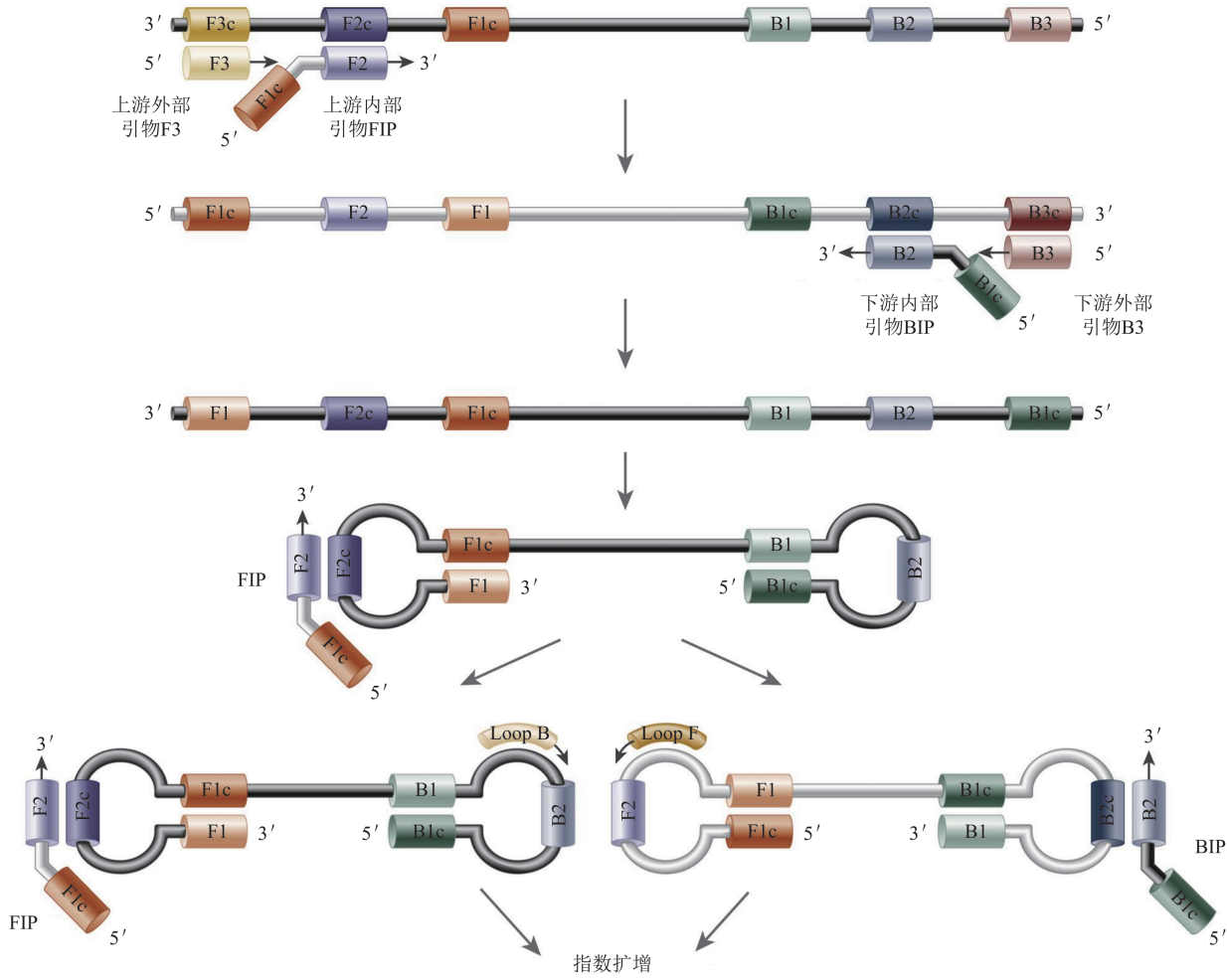


Fig. 2 Loop-mediated isothermal amplification scheme^[22]
图2 LAMP环介导等温扩增方案^[22]

荧光染料,发现 SYTO-9 和 SYTO-82 解决了荧光 PCR 常用荧光染料 SYBRGreen I 和 EvaGreen 对 LAMP 反应存在一定抑制作用、浓度梯度线性不好等问题,实现 LAMP 的实时荧光定量技术.

LAMP 检测技术原理类似 PCR 扩增,用于检测新型冠状病毒类 RNA 病毒,必须先进行反转录再实施,随着耐热型 M-MLV 反转录酶突变体大量商品化,耐热型 M-MLV+Bst 酶的一步法 RT-LAMP 方案已比较成熟. 操作者仅需将反应液、酶、引物和模板按规定量加入 PCR 管中,置于水浴锅或恒温箱反应 30~60 min,结果可肉眼观察,简便快捷,适合基层快速诊断. 沈阳化工大学应用生物学研究所尹秀山等探索出基于 RT-LAMP 的快速检测新型冠状病毒的 iLACO 技术,能够检测低至 10 份拷贝的 *ORF1ab* 基因^[23]. Michael B Chancellor 团队^[24]设计出特异性 RT-LAMP 引物,对 SARS-CoV-2、MERS-CoV、BtCoV 及 MHV 病毒样本特

异性测试,证实仅对 SARS-CoV-2 的样本有反应,可成功地完成人体血清、尿液、唾液、口咽拭子和鼻咽拭子检测.

2.2 重组酶聚合酶扩增技术 (RPA)

重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA), 由 Piepenburg 等^[25] 2006 年发明,被誉为可替代 PCR 的核酸检测领域的革命性创新. RPA 技术主要依赖于 3 种酶: 能结合单链核酸 (寡核苷酸引物) 的重组酶、单链 DNA 结合蛋白 (SSB) 和链置换 DNA 聚合酶 (图 3). 最佳温度为 37°C~42°C, 扩增反应所需时间少于 30 min. 如图 3 所示, 重组酶首先与引物结合形成的蛋白质-引物复合体, 能在双链 DNA 中定位同源序列 (步骤 A~C), 然后, 发生链交换反应并启动 DNA 合成, 达到目标区域指数式扩增, 而被替换的 DNA 链与 SSB 结合, 以防止进一步替换 (步骤 D~F). 整个过程一般可在 10 min 之内获得可检出

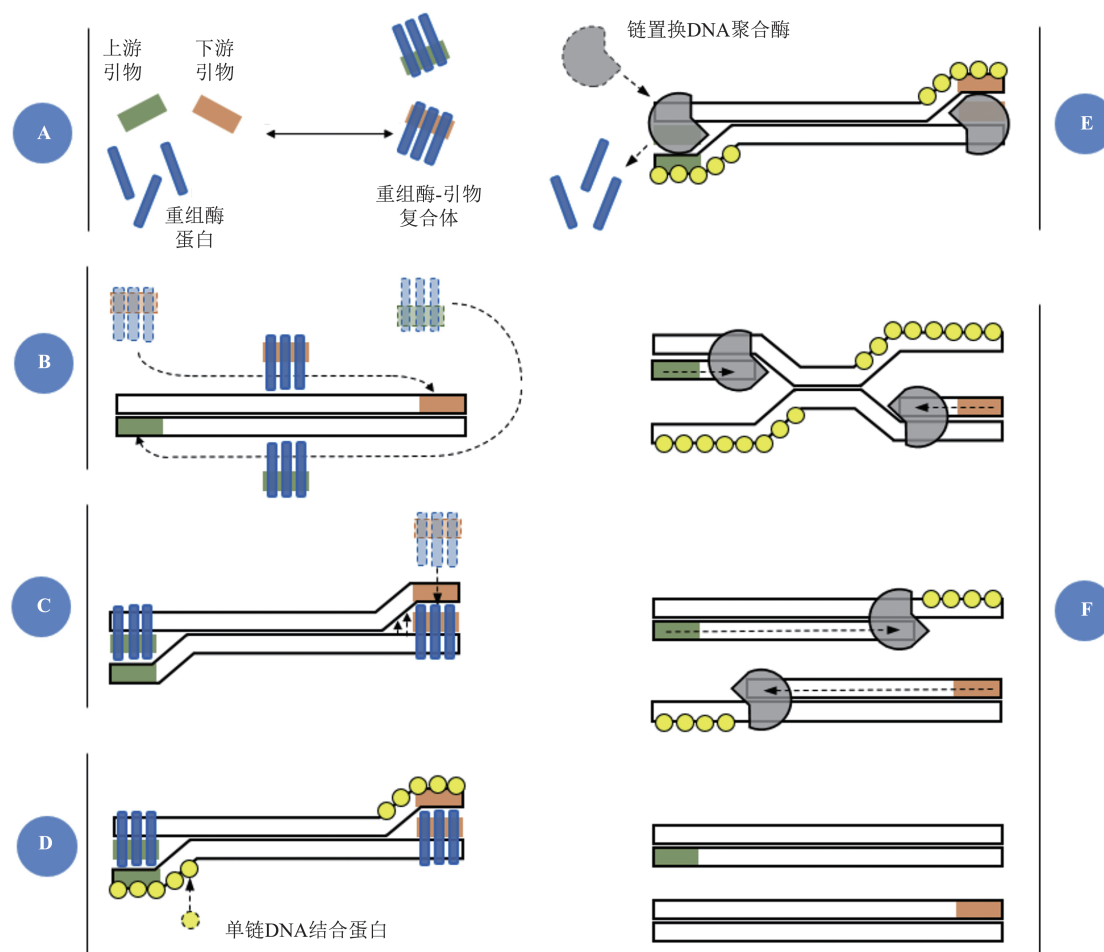


Fig. 3 RPA amplification scheme^[26]

图3 RPA扩增方案^[26]

水平的扩增产物。

相比荧光PCR、LAMP检测技术, RPA技术可常温进行, DNA、RNA均可扩增, 无需温控设备, 无需复杂的样品处理, 灵敏度高, 属于便携式快速核酸检测。目前, 已被广泛应用于艰难梭状芽孢杆菌、结核杆菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌MRSA、淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、沙门氏菌、大肠杆菌STEC等常见致病菌^[27-29]和HIV、埃博拉病毒、马尔堡病毒等十余种致命病毒的检测^[30-31]。冠状病毒检测方面, Abd El Wahed

等^[32]开发了一个能在3~7 min内鉴定MERS-CoV的便携式RT-RPA装置, 显示其强大的应用前景。

3 基于Cas酶检测技术

3.1 SHERLOCK技术

SHERLOCK (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking) 是Zhang团队^[33]2017年基于RPA技术开发的一种靶向RNA的新核酸诊断平台, 将CRISPR相关酶Cas13a改造成快速、廉价、高灵敏度的诊断工具(图4)。

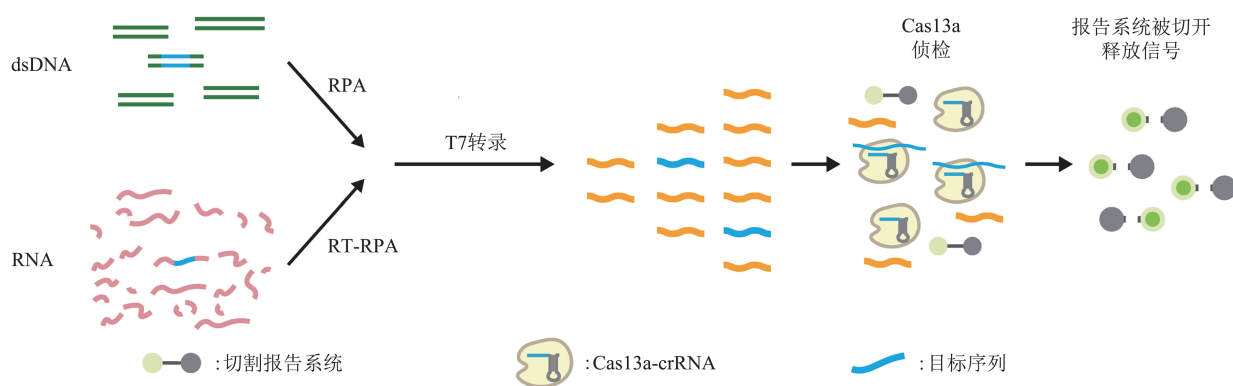


Fig. 4 Schematic of SHERLOCK^[33]

图4 SHERLOCK原理图^[33]

其原理为当Cas13a在crRNA引导下, 侦检到靶RNA序列并结合目标序列时, 会转入一种酶促“激活”状态, 其无区分的RNA酶活性, 即附带切割活性 (collateral cleavage), 会切割RNA报告分子, 当该报告分子被切割时, 会释放可检测到的荧光信号。通常, 为提高分析灵敏度, 样品中双链DNA (dsDNA) 或RNA首先要经RPA或RT-RPA扩增来提高样品中目标含量水平, 并与T7转录相结合, 将扩增DNA转化为RNA。经上述处理, SHERLOCK的灵敏度达到渺摩尔级 (10^{-18} mol/L), 特异性达到单碱基错配。

2018年Zhang团队^[34]对SHERLOCK诊断平台进行一系列优化, 使用不同细菌种类来源的Cas13和Cas12a酶来产生额外的信号, 并添加Csm6酶来放大检测信号, 以增加SHERLOCK的灵敏度, 该方法可准确地定量确定样品中的靶分子水平, 实现一次测试多种靶分子。鉴于荧光信号仍需

仪器来测定, 无法做到“仪器自由”, 团队还创新开发出微型试纸测试方法, 将报告RNA两端的荧光素和猝灭剂置换成生物素标记Biotin和FAM, 类似于妊娠测试条, 进行核酸检测时仅需一张试纸条, 无需电力设备, 无需复杂操作要求, 普通人在有样品存在情况下现场即可显示出病原感染、癌症筛查等的检测结果, 非常易于使用。针对新型冠状病毒, 研究人员已开发出SHERLOCK检测系统^[35], 进一步的优化、生产、测试和验证研究方案正不断进行更新。

3.2 DETECTR技术

2018年Doudna等^[36]发现, Cas12酶家族在crRNA的引导下, 与目标序列结合后, 便切换为激活状态, 疯狂切割体系内其他的单链DNA (ssDNA)。Cas12a这一特点可被用于分子诊断领域, Doudna教授借鉴SHERLOCK技术, 也引入RPA扩增步骤, 创造RPA + Cas12a新的核酸分子

检验技术, 命名为 DETECTR (图 5). 与 SHERLOCK 相比, DETECTR 无需将扩增后的

DNA 产物转录到 RNA.

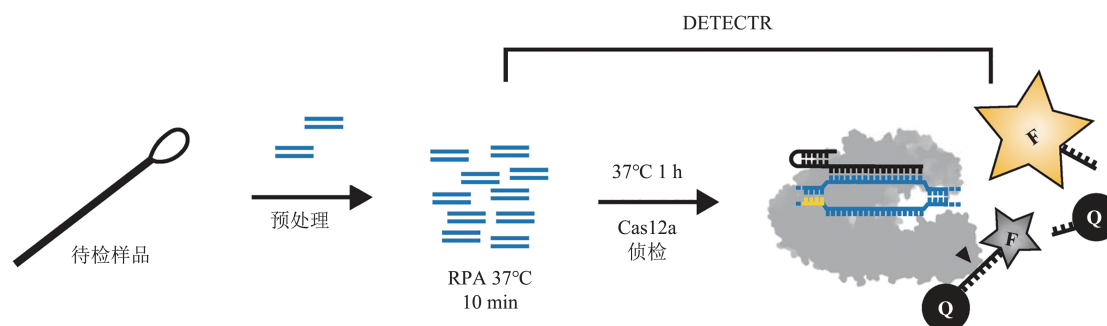


Fig. 5 Schematic of DETECTR^[36]

图5 DETECTR原理图^[36]

DETECTR 检测系统利用单链 DNA 荧光报告基团, 如果 Cas12a 识别到靶序列 (目标病原体或肿瘤基因) 的存在, 它就会被非特异切割, 从而激发荧光. 众所周知, 人乳头瘤病毒 16 型和 18 型 (HPV16 和 HPV18) 能增加患者发生癌症的概率, 是两种特别危险的 HPV 亚型. 运用 DETECTR 进行概念证明, 在试管水平上, 1 h 内即可准确区分两种相似的 HPV 亚型, 可 100% 准确地检测出 HPV16 感染, 92% 准确地检测出 HPV18 感染, 灵敏度达到渺摩尔 (10^{-18} mol/L)^[36]. 因此, DETECTR 具有快速检测患者样品中特定目标的能力, 且具有高选择性和灵敏度. 目前, Mammoth Biosciences 公司已着手对 DETECTR 技术进行商业开发, 目标是提供基于 CRISPR 平台的各种生物传感的检测, 包括新型冠状病毒在内.

3.3 HOLMES 及 HOLMES V2 技术

与 DETECTR 系统利用 Cas12a 蛋白相类似, 中国科学院上海植物生理生态研究所王金博士等^[37]

开发了一种基于 Cas12a 的称为 HOLMES (one-hour low-cost multipurpose highly efficient system) 的系统. 利用 HOLMES 系统, 可 1 h 内快速检测目标 DNA 和 RNA. 其原理在于, 如反应系统中存在目标 DNA, 系统中的 Cas12a/crRNA 二元复合物会与目标 DNA 形成三元复合物, 然后非特异性切割非目标的 ssDNA 并作为报告基因, 激发荧光来进行检测. HOLMES 系统中, PCR 和基于 CRISPR-Cas 的靶标检测为两个独立的步骤, 后续需将 PCR 产物与 Cas 检测系统混合进行靶标检测, 造成操作不便和潜在的交叉污染风险. 王金博士等进一步使用 Cas12b 来升级创建全新的 HOLMES V2 系统 (图 6), 结合 LAMP 等技术将 PCR 和靶标检测整合到一个系统中, 简化了操作程序并避免了交叉污染, 可用于检测 SNP、RNA 病毒、人细胞 mRNA 和 circRNA, 甚至还可用于定量 DNA 的甲基化程度^[38].

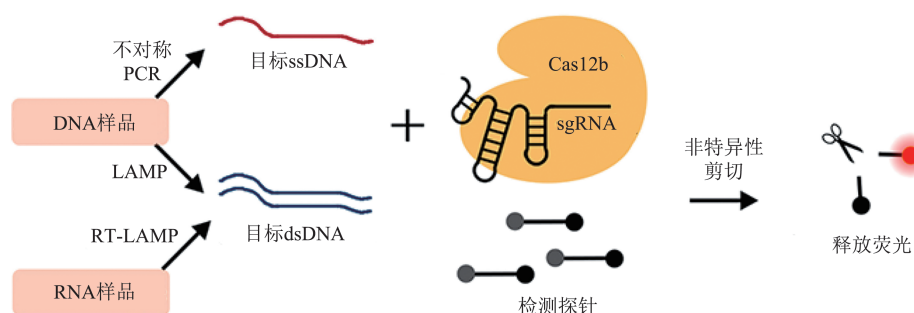


Fig. 6 Schematic of HOLMES V2^[38]

图6 HOLMES V2原理图^[38]

3.4 Cas12aVDet检测技术

借助于Cas13a和Cas12a附带切割活性开发的SHERLOCK、DETECTR和HOLMES系统实现了针对病原体和肿瘤基因的精准检测. 早期检测系统均存在核酸扩增和检测步骤分开, 开盖操作极易造成气溶胶污染, 产生“假阳性”结果. 复旦大学王永明课题组^[39]探索了重组聚合酶扩增和Cas12a切割兼容的体系, 并开发了Cas12aVDet (Cas12a-based visual detection) 可视化检测方法.

该方法首次将RPA核酸扩增试剂和除Cas12a

酶外的Cas12a切割体系试剂混匀后置于管内, Cas12a酶置于管壁上. 首先37℃反应15 min进行RPA扩增. 随后, 将管壁Cas12a酶离心到反应液中, 37℃继续反应15 min进行Cas12a切割. 最后, 在蓝光激发下肉眼观察检测结果, 阳性样本呈现明亮的绿色荧光, 阴性样本无荧光产生(图7). 整个过程30 min内完成, 操作简便, 检测快速, 检测结果肉眼可见, 检测灵敏度达到单分子水平, 在疾病诊断、致病菌检测以及便携式检测设备开发中具有极大的应用潜力.

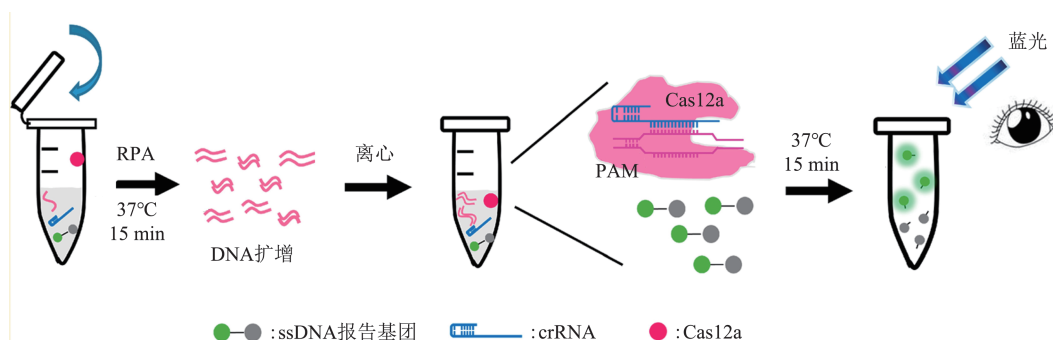


Fig. 7 Schematic of Cas12aVDet^[39]

图7 Cas12aVDet原理图^[39]

4 免疫检测方法

免疫检测利用抗原与抗体特异性结合的原理. 新型冠状病毒表面存在多种结构蛋白质, 包括多个抗原表位, 以此来制备抗体检测抗原的存在, 可直接证明样本中含有新型冠状病毒; 另一方法是测定人体内产生的抗体. 病毒感染人体后, 会刺激免疫细胞产生特异性抗体, 主要为IgM和IgG两类^[40], 目前对新型冠状病毒的这两类抗体的产生和持续时间还没有系统性研究. 通常情况下, IgM抗体为机体初次免疫应答最早产生的抗体, 产生快速, 但维持时间短、消失快, 可作为早期感染的指标, 适用于早期诊断和排除疑似病例. IgG抗体为机体再次免疫应答产生的主要抗体, 产生晚、维持时间长、消失慢, 可作为感染和既往感染的指标, 适用于提高诊断准确性, 减少漏诊.

免疫法快速检测一般采用试纸检测(1条红线阴性, 2条红线阳性), 大多数基于抗原抗体的胶体金原理(图8). 目前国家审批19种检测试剂盒(表1), 有7种采用免疫检测法, 检测目标均为IgM/IgG, 尚无新型冠状病毒抗原检测试剂盒批

准. 胶体金法检测IgM/IgG抗体原理基于免疫层析平台(图8b), 胶体金标记的能与IgM/IgG抗体特异结合的抗原固定在结合垫上, NC膜上检测线处固定抗人IgM/IgG抗体, 质控线处固定特异识别重组抗原His/Fc等标签抗体. 当待测样品滴加至样品垫加样处, 样品向试纸吸水垫处移动, 如含有IgM/IgG抗体, 抗体与结合垫上的金标抗原结合, 形成抗原抗体复合物, 随后被检测线上的抗人IgM/IgG抗体捕获, 并显色. 若待测样品中不含IgM/IgG抗体, 检测线不显色. 同时质控线上抗体与金标抗原特异结合而显色, 以验证试纸正常. 抗原检测原理与抗体检测类似, 如检测线上形成“标记抗体-抗原-捕获抗体”复合物, 会显色, 说明待测样本阳性(图8a).

免疫检测仅需十几分钟, 无需特殊仪器, 但灵敏度和特异性与相应制备的抗体、抗原特异性密切相关, 同时几乎无法检测潜伏期和感染初期的病人, 此时人体内无抗体产生. 另外, 抗体检测容易因血液标本中的一些干扰物质(如类风湿因子、非特异IgM、溶血所致的高浓度血红蛋白等)的存在而出现“假阳性”结果, 所以抗体检测必须采用

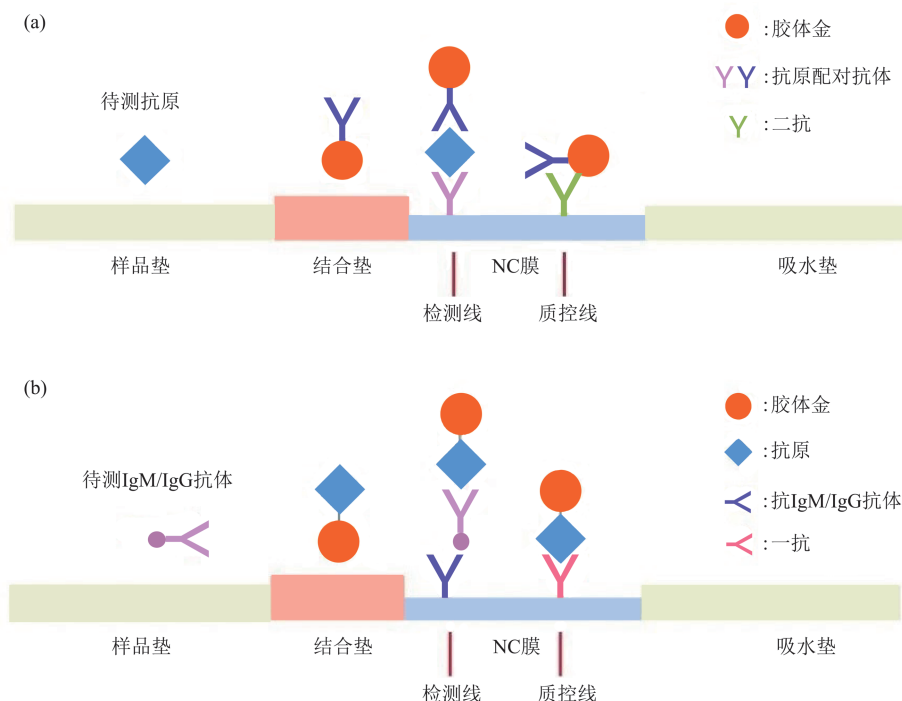


Fig. 8 Schematic of colloidal gold immunoassay

图8 胶体金免疫检测原理图

IgM 和 IgG 同时检测且通常需多次动态检测来确认. 鉴于上述原因, 目前免疫检测尚不能作为新冠肺炎确诊和排除的唯一依据, 可用于大规模的人群筛查, 发现“无症状感染者”, 控制病毒的传播.

5 结 语

SARS-CoV、MERS-CoV 及 SARS-CoV-2 等人类高致病性病毒的肆意横行给全球经济造成较大损失, 也给人类的健康带来严重威胁. 病毒感染最初确诊一般基于病毒株的分离与鉴定、全基因组测序技术, 至少需 2 d 以上时间, 不适合后续感染的大量筛查诊断. 荧光 PCR 核酸检测虽然是目前新冠病毒肺炎的确诊指标, 可靠性较好, 但也存在一定局限性, 比如实验场地要求高 (三级甲等医院, P3 级别防护、认证基因扩增实验室)、过程相对繁琐、检验流程耗时较长、成本相对较高. 另外, 新型冠状病毒遗传物质 RNA 易裂解, 样本的采集、存储及处理方式等多方面因素均可影响检测结果, 导致“假阴性”比较多, 检出率仅 30%~50%, 不少患者需进行多次检测. 免疫 IgM/IgG 抗体检测, 无需核酸提取步骤, 快速简便, 但鉴于潜伏期和感染 7 d 内人体无抗体产生, 治愈的患者也存在有抗体, 其

不能用作新冠肺炎确诊和排除的唯一依据, 可作为核酸检测的补充, 联合检测将显著提高检测的灵敏度, 减少误诊率或漏诊率.

包括新型冠状病毒在内的病原体快速检测技术与人类健康息息相关, 一直是全球研发的热点. 核酸检测技术经历由基础性 PCR 技术到多重 PCR、巢式 PCR、荧光定量 PCR、数字 PCR 等技术改进, 涌现出环介导 LAMP、依赖解旋酶 HDA、重组酶介导 RPA、链置换 SDA、依赖核酸序列 NASBA、滚环式 RCA 等多种等温扩增技术, 解决了 PCR 技术的变温仪器依赖性问题, 实现技术上突破升级. 近两年, 随着基因编辑 CRISPR-Cas 系统研究深入, 利用 Cas9、Cas12、Cas13 等核酸酶特性开发出 SHERLOCK、DETECTR、HOLMES、Cas12aVDet 等系列新检测技术, 在病原菌、病毒等诊断检测方面, 均已展现出强大的应用前景.

随着科学技术尤其是新测序技术、免疫学和分子生物学的发展, 相信新的快速检测技术也将不断涌现. 如纳米孔技术 (nanopore) 在实验室研究阶段就被认定具有高效率和高准确度的特性, 武汉大学等联合团队创新开发出纳米孔靶向测序技术 (nanopore targeted sequencing, NTS), 首次实现测

序后4 h内高敏感性、高准确性同时检测 SARS-CoV-2 和其他10大类、40种呼吸道病毒,其最低检测限高于目前广泛使用的qPCR的100倍^[41]。未来快速检测技术开发上,敏感度、特异性、量化、检测时间、多重化、高通量和抗干扰性等性能指标将是快速诊断试剂研发关注的重点,可携带性、简易度、应用广度、保质期、是否需冷链配运输等即时检测可操作性也需开展深入研究。另外,国内的科研机构和企业更要加强自主创新意识,研发具有自主知识产权的核心技术,因为RPA、SHERLOCK、DETECTR技术虽好,但均存在“卡脖子”专利壁垒,无法成为中国科研机构和医疗系统放心引进和利用的技术。

参 考 文 献

- [1] 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
- [2] Phan T. Novel coronavirus: From discovery to clinical diagnostics. *Infect Genet Evol*, 2020, **79**:104211
- [3] Phelan A L, Katz R, Gostin L O. The novel coronavirus originating in Wuhan, China: challenges for global health governance. *JAMA*, 2020, **323**(8):709-710
- [4] Wu F, Zhao S, Yu B, *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 2020, **579**(7798):265-269
- [5] Saiki R K, Scharf S, Faloona F, *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, **230**(4732):1350-1354
- [6] 国家卫生健康委办公厅. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)的通知[EB/OL]. [2020-03-03]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>
National Health Commission of the People's Republic of China. Notice on the Issuance of COVID-19 Protocol (trial seventh edition) [EB/OL]. [2020-03-03]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>
- [7] Kim J, Lim J, Lee C. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. *Biotechnol Adv*, 2013, **31**(8):1358-1373
- [8] 国家药品监督管理局. 国家药监局持续应急审批新型冠状病毒检测产品[EB/OL]. [2020-03-16]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2056/375802.html>
National Medical Products Administration. State Food and Drug Administration Emergency Approval of Novel Coronavirus Test Products[EB/OL]. [2020-03-16]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2056/375802.html>
- [9] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(12):E63
- [10] Patra S, Tellapragada C, Vandana K E, *et al.* Diagnostic utility of in-house loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR targeting virB gene for direct detection of *Brucella melitensis* from clinical specimens. *J Appl Microbiol*, 2019, **127**(1):230-236
- [11] Murray L, Edwards L, Tuppurainen E S M, *et al.* Detection of capripoxvirus DNA using a novel loop-mediated isothermal amplification assay. *BMC Veterinary Research*, 2013, **9**(1):90
- [12] Batra K, Kumar A, Kumar V, *et al.* Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Capripoxvirus. *Veterinary World*, 2015, **8**(11):1286-1292
- [13] Kim J H, Kang M, Park E, *et al.* A simple and multiplex loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of SARS-CoV. *BioChip Journal*, 2019, **13**(4):341-351
- [14] 吕恒, 张锦海, 陈凤娟, 等. SARS冠状病毒环介导等温扩增可视化检测方法的建立. *实用预防医学*, 2013(04):15-19
Lv H, Zhang J H, Chen F J, *et al.* Practical Preventive Medicine, 2013(04):15-19
- [15] 王辰雨, 胡敬东, 史玉颖, 等. 禽流感病毒LAMP快速诊断方法的建立. *浙江农业学报*, 2014, **26**(3):576-580
Wang C Y, Hu J D, Shi Y Y, *et al.* *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2014, **26**(3):576-580
- [16] Zhao X, Chen X, Zhang Y, *et al.* Development and evaluation of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of human immunodeficiency virus type 1. *Indian J Med Microbiol*, 2012, **30**(4):391-396
- [17] World Health O. The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: policy guidance. Geneva: World Health Organization, 2016
- [18] Tanner N A, Zhang Y, Evans T C J B. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques*, 2014, **58**(2):59-68
- [19] Goto M, Honda E, Ogura A, *et al.* Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques*, 2009, **46**(3):167-172
- [20] Lim D R, Kim H R, Park M J, *et al.* An improved reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and specific detection of serotype O foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods*, 2018, **260**:6-13
- [21] Osborn I P, Belousova E A, Zakabunin A I, *et al.* Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). *Biotechniques*, 2016, **61**(1):20-25
- [22] Alhassan A, Li Z, Poole C B, *et al.* Expanding the MDx toolbox for filarial diagnosis and surveillance. *Trends in Parasitology*, 2015, **31**(8):391-400
- [23] Yu L, Wu S, Hao X, *et al.* Rapid colorimetric detection of COVID-19 coronavirus using a reverse tran-scriptional loop-mediated

- isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic plat-form: iLACO. medRxiv, 2020: 2020.02.20.20025874(DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.02.20.20025874>)
- [24] Lamb L E, Bartolone S N, Ward E, *et al.* Rapid detection of novel coronavirus (COVID-19) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. medRxiv, 2020: 2020.02.19.20025155(DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.02.19.20025155>)
- [25] Piepenburg O, Williams C H, Stemple D L, *et al.* DNA detection using recombination proteins. Plos Biol, 2006, **4**(7): 1115-1121
- [26] Lobato I M, O'sullivan C K. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. Trends in Analytical Chemistry, 2018, **98**(1): 19-35
- [27] Kersting S, Rausch V, Bier F F, *et al.* Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens. Mikrochim Acta, 2014, **181**(13-14): 1715-1723
- [28] Daher R K, Stewart G, Boissinot M, *et al.* Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications. Clin Chem, 2016, **62**(7): 947-958
- [29] Raja B, Goux H J, Marapadaga A, *et al.* Development of a panel of recombinase polymerase amplification assays for detection of common bacterial urinary tract infection pathogens. J Appl Microbiol, 2017, **123**(2): 544-555
- [30] Euler M, Wang Y, Heidenreich D, *et al.* Development of a panel of recombinase polymerase amplification assays for detection of biothreat agents. J Clin Microbiol, 2013, **51**(4): 1110-1117
- [31] Boyle D S, Lehman D A, Lillis L, *et al.* Rapid detection of HIV-1 proviral DNA for early infant diagnosis using recombinase polymerase amplification. mBio, 2013, **4**(2): 1-8
- [32] Abd El Wahed A, Patel P, Heidenreich D, *et al.* Reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for the detection of middle East respiratory syndrome coronavirus. Plos Curr, 2013, **5**(8): 813-818
- [33] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Lee J W, *et al.* Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. Science, 2017, **356**(6336): 438-442
- [34] 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
- [35] Zhang F, Omar O A, Jonathan S G. A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics. [EB/OL]. [2020-02-14]. <https://broad.io/sherlockprotocol>
- [36] 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
- [37] Li S Y, Cheng Q X, Wang J M, *et al.* CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. Cell Discov, 2018, **4**: 20
- [38] Li L, Li S, Wu N, *et al.* HOLMESv2: a CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation. ACS Synth Biol, 2019, **8**(10): 2228-2237
- [39] Wang B, Wang R, Wang D, *et al.* Cas12aVDeT: a CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection. Anal Chem, 2019, **91**(19): 12156-12161
- [40] Coico R, Sunshine G. Immunology: a short course. 7th Edition. West Sussex: Wiley Press, 2015: 47-65
- [41] Wang M, Fu A, Hu B, *et al.* Nanopore target sequencing for accurate and comprehensive detection of SARS-CoV-2 and other respiratory viruses. medRxiv, 2020: 2020.03.04.20029538(DOI: [10.1101/2020.03.04.20029538](https://doi.org/10.1101/2020.03.04.20029538))

Research Progress of New Coronavirus SARS-CoV-2 Detection Technology*

ZHANG Xiao-Yuan¹⁾, ZHANG Yan-Yan¹⁾, ZHANG Xiao-Gang¹⁾, LIU Xia¹⁾,

CHEN Mian¹⁾, LIU Fei^{1,2)**}, ZHANG Dai-Zhou¹⁾, LING Pei-Xue^{1,2)}

(¹⁾Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Key Laboratory of Biopharmaceuticals, Engineering Laboratory of Polysaccharide Drugs, National-Local Joint Engineering Laboratory of Polysaccharide drugs, Postdoctoral Scientific Research Workstation, Jinan 250101, China;

²⁾Shandong Freda Pharmaceutical Group Company, Jinan 250101, China)

Abstract The new coronavirus SARS-CoV-2 has a strong transmission ability and has been confirmed to be transmissible from person to person. Asymptomatic carriers can also be a source of transmission. Rapid and accurate diagnosis of the new coronavirus is particularly important to control the outbreak. Based on the relevant research progress at home and abroad, this paper analyzes and combs the four major detection technologies of new coronaviruses such as fluorescent PCR, isothermal amplification, Cas enzyme technology and immunoassay, in order to provide references and ideas for the diagnosis, prevention and control of new coronaviruses and other epidemic viruses.

Key words new coronavirus, nucleic acid detection, immune detection, PCR, reverse transcription

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0060

* This work was supported by grants from Shandong Provincial Key Research and Development Program (2019GSF107040) and Jinan Innovation Team Project of Colleges and Universities (2019GXRC038).

** Corresponding author.

Tel: 86-531-81213080, E-mail: lfshwu@163.com

Received: March 11, 2020 Accepted: April 2, 2020