

· 药学前沿 ·

用于新型冠状病毒核酸检测的即时检测方法研究进展

鲍瑶菲¹,薛茜茹¹,武海萍²,邹秉杰²,宋沁馨^{1*},周国华^{2,3}

(¹中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室,南京 210009; ²东部战区总医院临床药学科,南京 210002;
³南方医科大学药学院,广州 510515)

摘要 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)引起的新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019, COVID-19)在全世界范围内快速传播,截至2020年9月30日全球感染人数已达3300万人,造成100多万人死亡,给公众的生命健康造成严重威胁。基于实验室的标准化核酸检测方法周转时间长、成本高,因此急需开发便捷检测新冠病毒的方法,实现在资源有限的情况下快速测试以及时控制疫情。本文从提取、扩增、检测3个方面总结了针对新型冠状病毒所开发的核酸即时检测方法(point-of-care testing, POCT),并对整合了这3个步骤的商业化即时检测装置进行简要介绍,以期为COVID-19及其他新兴传染病的紧急应对和快速部署提供参考。

关键词 新型冠状病毒;核酸检测;即时检测;进展

中图分类号 R446.6 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)06-0635-11

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200601

引用本文 鲍瑶菲,薛茜茹,武海萍,等.用于新型冠状病毒核酸检测的即时检测方法研究进展[J].中国药科大学学报,2020,51(6):635-645.

Cite this article as: BAO Yaofei, XUE Qianru, WU Haiping, et al. Advances in point-of-care testing for new corona virus nucleic acid[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(6):635-645.

Advances in point-of-care testing for new corona virus nucleic acid

BAO Yaofei¹, XUE Qianru¹, WU Haiping², ZOU Bingjie², SONG Qinxin^{1*}, ZHOU Guohua^{2,3}

¹Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance of Ministry of Education, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ²Department of Clinical Pharmacy, Jinling Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210002; ³School of Pharmaceutical Science, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract The corona virus disease 2019 (COVID-19) caused by the new coronavirus (SARS-CoV-2) has spread rapidly around the world, posing a serious threat to the public's health. As of September 30, 2020, the number of infected people in the world has reached 33 million, causing more than 1 million deaths. Normalized nucleic acid detection methods based on lab have long turnaround time and high cost. Therefore, there is an urgent need to develop a convenient method to detect SARS-CoV-2, so as to achieve rapid testing and timely control of the epidemic when resources are limited. This review summarizes the point-of-care testing (POCT) methods developed for SARS-CoV-2 in terms of extraction, amplification and detection, and briefly introduces commercial POCT instruments that integrate these three steps, in order to provide references for emergency response and rapid deployment of COVID-19 and other emerging infectious diseases.

Key words SARS-CoV-2; nucleic acid detection; point-of-care testing; advances

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81673390), the Natural Science Foundation of

收稿日期 2020-09-17 *通信作者 Tel:025-80860196 E-mail:songqinxin@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81673390);江苏省自然科学基金资助项目(No. BK20191322);江苏省杰出青年基金资助项目(No. BK20180005);大学生创新创业训练计划项目资助(No. 202010316032S)

Jiangsu Province (No. BK20191322), the Jiangsu Provincial Science Fund for Distinguished Young Scholars (No. BK20180005) and the Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship (No. 202010316032S)

自新型冠状病毒首次出现以来,在全世界范围内快速传播,现已至全球大流行,截至2020年9月30日全球感染人数已达3 300万人,造成100多万人死亡,且确诊人数和死亡人数还在持续增加,给全球经济和公众健康都造成了严重的威胁。国际病毒分类委员会将这种新的冠状病毒正式命名为SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), SARS-CoV-2是一种单链正股RNA病毒,目前用于检测SARS-CoV-2的基因靶标有核衣壳(N)、包膜(E)、刺突(S)、RNA依赖性RNA聚合酶(RdRP)和开放阅读框架1ab (ORF1ab)基因等^[1]。

基于核酸的检测方法具有高灵敏度和低假阴性率的优势,相对其他检测方法(如抗体检测)更灵敏、特异性更好,目前各国检测新冠病毒最普遍方法为对口咽或鼻咽拭子进行基于实验室的病毒RNA的逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-PCR, RT-PCR),这已成为用于确诊新冠感染的金标准,被中国国家卫建委、WHO等作为新冠确诊的重要依据。但这种方式普遍检测时间长(约1.5~2 h),需要昂贵的大型仪器、专门的试剂、专业的操作人员以及在完备的符合生物安全条件的标准实验室中才能进行,并不适合及时检测,这就导致无法在第一时间对疑似病例进行及时快速的检测,迟滞疫情防控工作的进行,对公共安全造成潜在影响。因此急需能够在资源有限的情况下实现快速便捷检测新冠病毒的方法以及时控制疫情,即时检测(point-of-care testing, POCT)^[2]又称床旁检测就成为了对标准实验室检测流程很好的补充,它是指在采样现场进行的、利用便携式分析仪器及配套试剂快速得到结果的一种检测方式。即时检测不仅适用于临床实验室,还可以由受过简单训练的非实验室人员在样品采集现场(例如床旁,医生办公室或急诊室)中进行。此外,即时检测只需要很少的操作步骤,通常无需培训或只需要进行简单培训即可熟练掌握,结果易于读取,具有准确、快速、便携、简便和低成本的优势,有利于更快的临床决策并从专业检测实验室分担工作负荷,加快筛查速度、控制疫情。

本文主要从提取、核酸扩增、检测和商业一体化即时检测方法4个方面总结了目前已有的针对新冠病毒开发的即时检测方法及其原理,以期为检测能力不足及资源匮乏地区新冠核酸即时筛查提供参考,合理利用即时检测可以分担标准实验室的负担,提高各国对疫情快速筛查、及时防控的能力。

1 样本提取

新冠检测可用的样本类型包括肺泡灌洗液、鼻拭子、咽拭子、痰液样本等,其中最常用为鼻咽拭子,但鼻咽拭子的采集需要专业医护人员按照标准的操作规范操作,采集过程中受试者会有不适感且对于医护人员来说有暴露风险。因此选择一种采集更便捷的样本类型将更适合即时检测。早先已有研究发现在唾液中可以检出新冠病毒^[3],唾液样品收集快速、无创,价格低廉并且易于存储,还可以避免收集鼻咽拭子样本的风险,对患者和医疗保健提供者而言更加安全,并且唾液样本采集方便不需要熟练的技术人员,适合非实验室环境甚至居家检测。Lamb等^[4]设计针对开放阅读框ORF1ab的NSP3编码区的逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP),在30~45 min内完成模拟患者唾液样品中特异性检测SARS-CoV-2,与RT-PCR阳性一致率为95% (N=19/20)。SalivaDirect方法^[5]也采用唾液作为检测样本,将核酸提取步骤替换成简单的蛋白酶K和热处理步骤,与基于鼻咽拭子纯化提取的常规RT-PCR方法相比相关性达94%,且该检测流程能与多种RT-PCR试剂盒兼容,极大缩短了检测时间。

此外,RUCDR Infinite Biologics开发的新唾液收集方法将比目前的鼻咽拭子方法更适合进行广泛的人群筛查,提供了一种方便的样品收集方法来开发价格适宜的即时护理测试套件,FDA已为该方法授予了紧急使用授权(EUA)^[6]。唾液作为一种样本收集方法,对COVID-19患者SARS-CoV-2的检测具有良好的准确性,有替代鼻咽拭子用作SARS-CoV-2的即时检测样本的潜力^[3],但唾液中病毒载量在症状出现的第1周最高,随后会随时间

下降^[7], 与鼻咽拭子相比灵敏度有所下降。

目前手动 RNA 提取限制了新冠即时检测的开发和应用, 常规的 RNA 提取意味着更长的周转时间, 更多的人力、试剂的成本, 以及处理临床标本时交叉污染和生物安全的风险。为了优化提取步骤, Zhao 等^[8]利用基于带有羧基涂层的聚氨基酯磁性纳米颗粒(pcMNPs)在 20 min 内从多个样品中进行病毒 RNA 提取, 该方法将裂解和结合合并为一个步骤, 并且 pcMNPs-RNA 复合物可以直接引入后续的 RT-PCR 反应中。

除了新的提取方法外, 免提取方法的开发也是一种解决思路。Wee 等^[9]提出了一种称为直接快速免提取 PCR(DIRECT-PCR)的方法, 使用抗抑制剂的酶和试剂来免除 RNA 提取步骤, 可在 36 min 内在市售便携式 PCR 热循环仪上完成快速直接 PCR 检测, 针对呼吸道样品中的病毒核衣壳(N)基因每个反应最低可检测到 6 个拷贝, 减少了实验室人员的操作时间和生物安全风险且具有便携性, 可在分子生物学实验室之外进行。在基于等温扩增原理开发的方法中发现, 病毒运输介质可能包含一种或多种抑制剂, 将鼻咽拭子直接置于病毒运输介质中不进行 RNA 分离步骤直接进行 RT-LAMP, 会使 RT-LAMP 的有效性降低^[4]。Wei 等^[10]开发了一种直接在鼻咽拭子后的病毒转运介质上检测的方法, 无需事先提取 RNA, 敏感性为 85%, 可以兼容不同制造商的试剂探针。虽然病毒转运介质仍会使检测灵敏度有所降低, 但可以简化工作流程, 缩短周转时间, 更适合即时检测。此外, 超高灵敏度的检测方法也可无需进行额外的样品处理或 RNA 纯化^[11]。

2 核酸扩增

2.1 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

RT-PCR 是目前检测新冠病毒核酸最普遍的方法, 利用该原理开发的试剂盒数量占比也是最多的。RT-PCR 的原理为利用逆转录酶将 RNA 转换为与其互补的 cDNA, 随后 cDNA 的特定区域经过聚合酶链式反应(PCR)进行扩增, 在体系中添加化学发光物质从而扩增在过程中或终点处读取荧光信号以实现检测。

基于实验室的 RT-PCR 应用于即时检测的主要障碍包括: 实时荧光检测仪通常体积较大、操作

复杂需要专业人员、周转时间长等。这些在即时检测上的局限性促使研究人员探索在保持常规 RT-PCR 的灵敏度和特异性的同时简化和缩短流程的方法。在 RT-PCR 的样品扩增阶段, 需要热循环仪来实现温度的程序变化, 但热循环仪成本较高, 在资源缺乏地区难以大量配备。Arumugam 等^[12]开发了一种水浴加热仪器替代 PCR 循环仪, 包含两个水浴: 一个用于变性, 另一个用于逆转录, 然后使用电机操作臂将 PCR 管穿梭在两个水浴之间进行退火延伸步骤, 这台设备造价便宜, 可实现 96 个样本同时处理, 若使用薄膜 PCR 反应管可在 12 min 内完成反应, 与台式 PCR 仪相比速度明显提升, 适合在欠发达地区应用。

2.2 等温扩增

核酸等温扩增无需进行热循环步骤, 可以在恒定温度下快速进行核酸扩增, 是 RT-PCR 最有潜力的替代方法, 能实现与 RT-PCR 相似水平的病毒 RNA 检测且更加适合应用于即时检测。目前用于即时检测的常用的等温扩增技术有环介导的等温扩增(LAMP)、重组酶聚合酶扩增(RPA)和 Nicking 酶辅助反应(NEAR)技术。

2.2.1 逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)

RT-LAMP 原理见图 1, 首先将 SARS-CoV-2 的 RNA 基因组逆转录为 cDNA, 再设计 4 个能与靶基因组上 6 个不同区域结合的特殊设计的引物, 使用具有链置换活性的 DNA 聚合酶替代热变性生成单链模板, 在四引物系统中, 有两个内部引物和两个外部引物。正向内部引物的 3' 末端引发了初始 DNA 链的合成, 随后被正向外部引物引发的合成所取代。正向内部引物的 5' 末端的反向互补序列与置换的 ssDNA 链中的下游序列退火, 形成一个环。然后在每个末端环上的 ssDNA 充当 LAMP 扩增循环的起始, 使目标序列被指数扩增。LAMP 具有很高的特异性和敏感性, 操作简单, 在 60~65 °C 的恒温下不到 1 h 即可完成, 避免了使用热循环仪的麻烦, 并且由于使用了更多的引物因此具有很高的特异性。可以通过添加 pH 敏感染料比色法、浊度法或荧光染料法等进行可视化检测。

Yu 等^[13]开发了名为 iLACO 的资源缺乏地区即时检测方案, 以 ORF1ab 的片段作为靶标, 在 65 °C 的水浴中温育, 每毫升 1 000 个拷贝的浓度可以在 20 min 的反应时间内得出结果, 但还不足以进行低

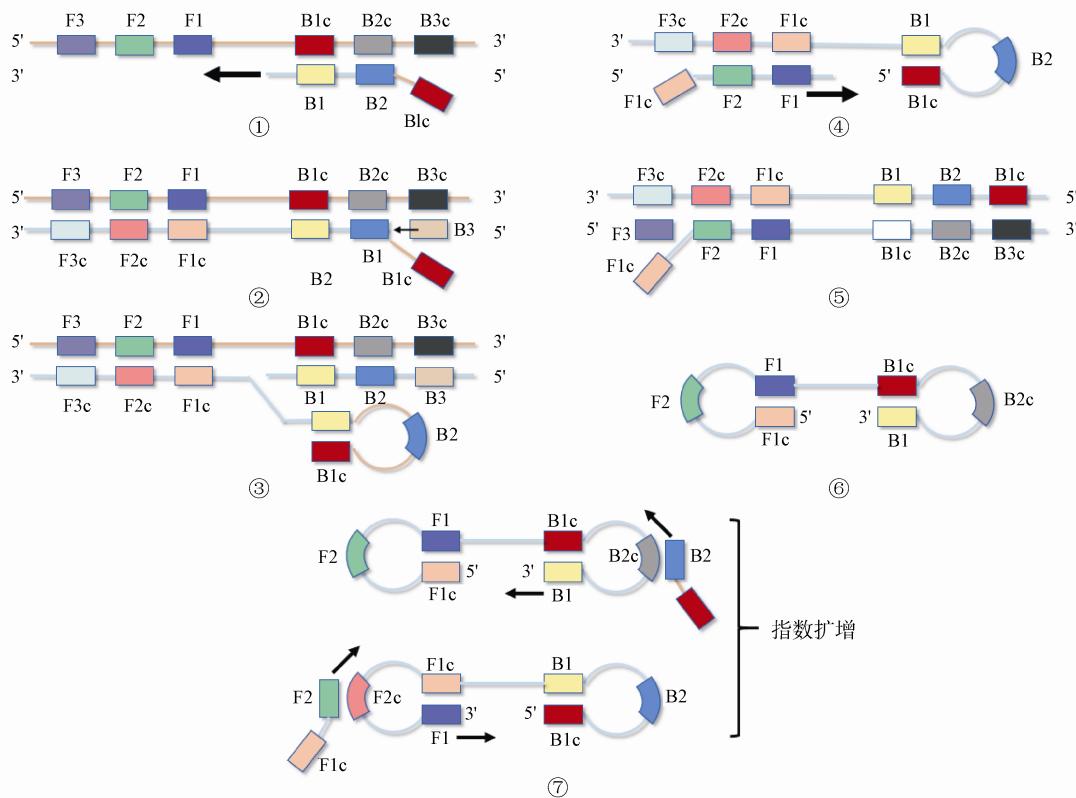


图1 环介导等温扩增技术(LAMP)原理示意图

病毒载量样本的灵敏筛查。为了实现更高的灵敏度和特异性, Yang 等^[14]对不同靶标进行了考察, 发现 ORF1ab 基因具有很高的特异性但灵敏度低, 而 N 基因具有很高的灵敏度但特异性不足, 同时检测 ORF1ab 基因, E 基因和 N 基因可以保证对 SARS-CoV-2 的敏感性和特异性。为了提高扩增效率和耐受性, Lu 等^[15]开发了基于 SARS-CoV-2 的 N 基因的利用高保真 DNA 聚合酶的单步单管耐错配扩增技术, 可除去扩增过程中引物 3' 端的错配碱基, 具有极好的耐受性, 检测限为每个反应 118.6 个拷贝。该分析的检测速度比一般 LAMP 反应更快, 可在不到 20 min 得到结果。作为一种常见的反应平台, 微流控芯片具备将所有试剂存储在芯片上的能力, 能够整合并简化操作步骤, 对于消除对大型设备的需求至关重要, 将微流体设备与等温扩增结合使用可以为大众提供更方便、便宜、便携的新冠检测方法^[16-17]。以上这些 LAMP 方法用于即时检测均需要热板或水浴, Gonzalez 等^[18]报告了一种 3D 打印孵育室的开发, 将靶向 N 基因的比色 RT-LAMP 反应与用于市售 Eppendorf PCR 管的 3D

打印孵育室相结合, 可以允许十二管反应同时进行, 3D 打印孵育室可以大规模生产, 为基于 LAMP 的即时检测提供了一种高成本效益的反应平台。

LAMP 方法灵敏度高、特异性好, 具有恒温反应的优势, 无需使用热循环仪进行温度程序设置, 更加有利于即时检测方法的开发。然而, 由于 LAMP 需在 60~65 °C 下进行扩增, 仍然需要水浴、热板等外部设备提供恒定的温度, 不利于设备小型化便携化, 因此在常温下进行等温扩增的方法在即时扩增领域更有前景。

2.2.2 逆转录重组酶聚合酶扩增(RPA) RPA 也是一种核酸等温扩增方法, 相比于 LAMP 反应温度更低, 在常温下就可以实现反应, 无需外部加热部件。RPA 的原理见图 2, 主要依赖于 3 种酶: 能结合单链核酸的重组酶、单链 DNA 结合蛋白(SSB)和链置换 DNA 聚合酶。重组酶与引物结合形成的蛋白-DNA 复合物靶向模板 DNA 中的同源序列, 通过链置换 DNA 聚合酶发生链置换反应并启动 DNA 合成, 对模板上的目标区域进行指数式扩增。被替换的 DNA 单链与 SSB 结合防止进一步替换以稳

定开放的双链体结构。结果可以通过与 exo 探针结合进行实时荧光定量、也可以与 nfo 探针结合使用侧流试纸条检测或加入染料肉眼可视化检测读取, 更适合应用于即时检测。

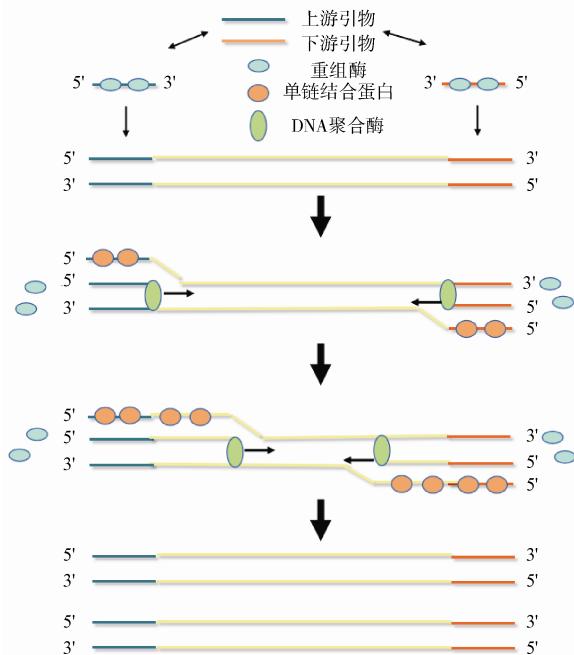


图 2 逆转录重组酶聚合酶扩增(RPA)原理示意图

Behrmann 等^[19]开发了应用 exo 探针的单管 RT-RPA 方法, 与 RT-qPCR 相比具有 100% 的诊断敏感性和特异性, 检测限为每个反应 7.74 个拷贝,

对于高 RNA 浓度样本, 可在 7 min 内获得结果, 该测定方法是迄今为止 SARS-CoV-2 最快的基于核酸的检测方法之一。Xia 等^[11]提出同时靶向 N 和 S 基因的一管“样品进结果出”方案, 检测限低至每微升 0.2 个拷贝。Tholoth 等^[20]将 RPA 和 LAMP 相结合, 构建了用于检测 COVID-19 的两阶段等温扩增, 称为 COVID-19 Penn-RAMP, 第一阶段在管帽中与外部 LAMP 引物初步反应, 通过 RPA 扩增所有靶标, 第二阶段试管离心或翻转, 混合 RPA 和 LAMP 体系, 启动高度特异性的 LAMP 反应, 进一步组合其他 4 种 RAMP 引物, 这种嵌套结构可以实现更高的灵敏度, 并且对抑制剂有更好的耐受性。

RPA 方法灵敏度高, 无需加热部件在常温下即可扩增, 并且反应速度相较于 LAMP 更快, 然而由于专利原因, 相关试剂需要从指定公司购入, 导致成本提高并且限制了该方法在即时检测上的应用。

2.2.3 切口酶扩增反应(nicking enzyme amplification reaction, NEAR) NEAR 原理见图 3, 反应由逆转录酶、切口酶和恒温扩增 DNA 聚合酶驱动, DNA 模板与引物杂交, 延伸产物被下一个模板置换, 置换产物互补链延伸形成切口酶识别位点, 切口酶识别并切割双链 DNA 中的一条链的特定短序列形成缺口, 恒温扩增的 DNA 聚合酶从引物的 3' 端延伸核苷酸继续合成短序列, 得到 NEAR 扩增双链, 通过切割、延伸循环不断扩增靶标 DNA 模板,

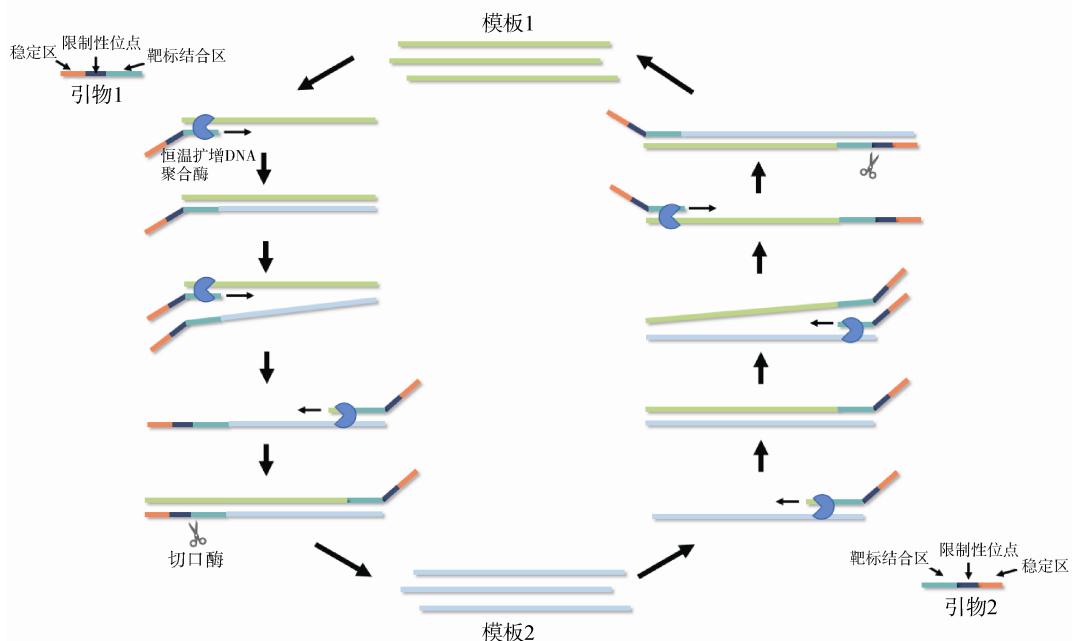


图 3 切口酶扩增反应(NEAR)原理示意图

设计分子信标产生荧光信号用于定量^[21]。NEAR 可达到指数速率扩增,该方法的优势在于速度和灵敏度,缺点在于短序列的设计存在高假阳性的可能。

3 检测方法

3.1 实时荧光检测

实时荧光检测原理为在体系中添加化学发光物质从而扩增在过程中读取荧光信号以实现定量。在 RT-PCR 常用的方法为嵌入荧光染料法和 Taqman 探针法。嵌入荧光染料法是指使用能与 DNA 扩增产物非特异性结合的荧光染料(例如 SybrGreen),Taqman 探针法是指设计包含 5' 荧光团和 3'淬灭基团的短的寡核苷酸探针与 DNA 模板中的序列退火, *Taq* 聚合酶通过其 5'至 3'核酸外切酶活性切割退火的探针上的荧光基团,使其发出荧光。测定扩增产物荧光信号达到荧光阈值时所经历的扩增循环数(Ct)即可进行定量。RPA 在常温下就可以反应,其结果可以通过与 exo 探针结合进行实时荧光定量。Behrmann 等^[19]引入内部淬灭探针(exo-IQ)的概念,猝灭基团通过内部 linker 连接在两个核苷酸之间,克服了 exo 探针对胸腺嘧啶距离的设计限制,该策略大大简化了 exo 探针的设计。在标准化实验室采用的实时荧光检测需要体积较大的实时荧光检测仪,检测人员也需要经过专业训练,因而专门为即时检测开发的商业化检测仪器对实时荧光检测仪进行小型化处理,使其与样本提取扩增整合并且使结果易于读取,更适合即时检测环境,但由于仍需专门的仪器,在成本及推广应用方面存在限制。

3.2 可视化检测

相比于荧光检测需要专门的仪器进行信号读取,可视化检测只需肉眼观察即可,使得结果的读取简单直观,更适合即时检测。可视化检测包括添加 pH 敏感染料比色法、浊度法或荧光染料法等方法。

可视化检测常应用于等温扩增, Park 等^[22]设计针对 Nsp、S 和 ORF8 基因的引物对,应用无色结晶紫实现比色检测,可在 30 min 内得出结果,特异性好,检测限为每个反应 100 个拷贝。Yan 等^[23]通过实时浊度监测和荧光钙黄绿素可视化,平均可在 26.28 min 中检测到 SARS-CoV-2。通过 130 个

临床样本验证,灵敏度和特异性均为 100%。Yu 等^[13]选择了一种新型的核酸染料 GeneFinder™ 以进一步增强荧光信号和灵敏度。可视化检测可以使得等温扩增进一步适应即时检测的使用场景,减少操作人员的专业要求,也不需要专门的设备,但相比于荧光检测,灵敏度会有所下降。而结合智能手机的成像和传感平台可以实现可视化结果的量化^[17,24],相比于目视判定更加客观,可以提高检测准确度。并且使用智能手机应用程序可以快速诊断疾病,监控个人或人群的健康状况,并向云端上传地理和人口数据用于流行病学分析。开发结合智能手机的设备有利于快速、准确地应对当前以及未来的传染病爆发^[25]。

3.3 侧向流检测

基于纸张的侧向流分析(LFA)成本低,易于制造且与即时检测完全兼容,是居家检测或资源贫乏地区检测的富有潜力的工具。Xia 等^[11]进一步提出一种更简化的甚至可以在家中进行检测的 RT-RPA 方法,设计了 nfo-affinity 探针系统以及用于 RNA 检测的侧向流动试纸条,可以目视检测到最低 1 ag N 基因 RNA,考察发现该方法可以简单地通过使用保温杯来执行。AuNPs 合成便利,表面可以被数百种核酸修饰。可通过由 AuNPs 聚集引起颜色变化进行比色测定,闭管的反应形式可以最大程度地减少操作步骤并避免交叉污染。Moitra 等^[26]用针对 SARS-CoV-2 N 基因的巯基修饰的反义寡核苷酸封闭的 AuNPs 以及 RNaseH 以实现在 10 min 内通过观测沉淀来“裸眼”选择性检测 SARS-CoV-2。但检测限为 0.18 ng/μL RNA,因此仅采用纳米粒子不足以灵敏检测病毒 RNA,将其引入核酸扩增系统中可以增强 SARS-CoV-2 检测的灵敏度和特异性,同时实现可视化侧向流检测。Zhu 等^[27]结合了针对 ORF1ab、N 基因的 RT-LAMP 与基于纳米颗粒的侧向流生物传感器的分析方法,检测限每个反应可达 12 个拷贝,分析灵敏度和特异性均为 100%。从样品收集到得出结果,整个诊断测试可在 1 h 内完成。此外也有商业化仪器采用侧向流技术作为检测方法例如 Accula(Mesa Biotech),避免了使用荧光探针和检测器的需求。

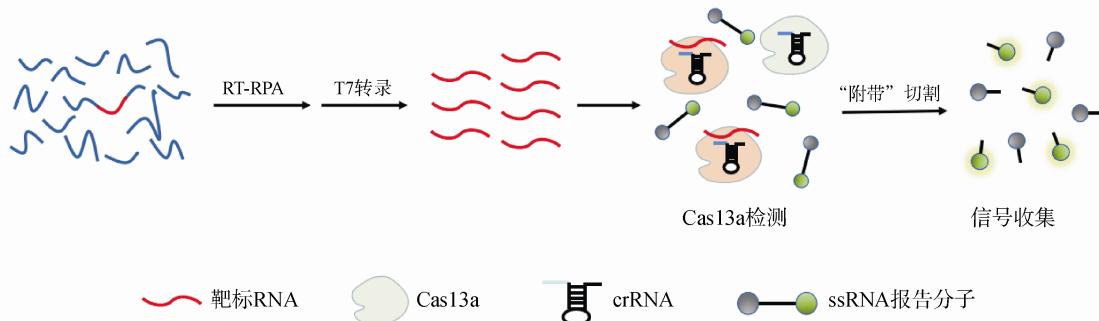
3.4 CRISPR/Cas 检测

CRISPR/Cas 系统是用于基因编辑的常用工具,有准确识别和切割特定序列的能力,而活化的

Cas 酶在特异性切割靶 RNA 的同时能够非特异性地切割周围环境中的 RNA 或 DNA, 可利用这一特性实现核酸检测。

3.4.1 SHERLOCK SHERLOCK (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking) 的原理见图 4, 将病毒 RNA 靶标逆转录为 cDNA 后通过等温扩增技术进行扩增, 扩增的产物被 T7RNA 聚合酶转录回 RNA 以此扩增靶 RNA。Cas13a 是一种非特异性 RNase, 识别并结合靶向扩增的 RNA 产物后被激活, 对附近的非靶向 RNA 进行非特异性反式核酸内切酶切割即“附带”切割, 裂解 ssRNA 报告分子使其从淬灭剂中释放出荧光染料, 用于信号

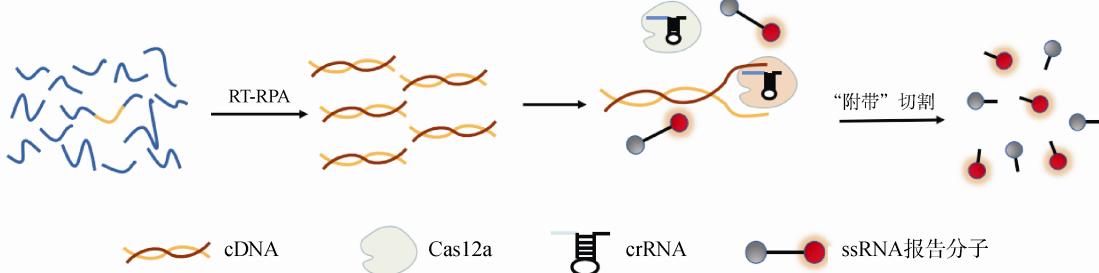
放大和核酸检测, 并允许荧光, 比色, 侧向流动等读出方法来快速检测各种靶标^[28]。Zhang 等^[29]发布了用于检测 SARS-CoV-2 的 SHERLOCK 流程, 靶向 Orf1ab 和 S 基因, RPA 等温扩增后 Cas13 切割, 在商业化试纸条上读取结果, 3 步检测仅需约 1 h, 但只使用合成的 RNA 对新冠病毒 CRISPR 检测的表现进行了评估, 未用患者样本进行检测。Hou 等^[30]在 RNA 提取步骤之后, 用靶向 Orf1ab 的 SHERLOCK 方法得到近单拷贝的灵敏度及良好的特异性。在 52 个患者临床样本中验证具有 100% 的临床灵敏度, 周转时间仅需 40 min, 证明了其诊断潜力。



SHERLOCK 是两步反应: 首先 RT-RPA 扩增再转录回 RNA 进行 Cas13 检测, 由于涉及两个单独的反应步骤, 因此需要进行液体处理和开管, 这不仅增加了复杂性, 而且大大增加了样品交叉污染的可能性, 不适宜在良好控制的实验室环境范围外使用。为了使 SHERLOCK 能在即时检测领域得到更广泛的应用, Joung 等^[31]开发了在一锅中进行 SHERLOCK 测试的方法, 称为 STOPCovid (SHERLOCK Testing in One Pot), 将 LAMP 与 CRISPR 介导的检测步骤相结合, 将经典的两步 SHERLOCK 转化为单步反应, 不需要样本提取, 检测限为 100

个拷贝, 可在 1 h 内用商业侧向流试纸条或荧光读数检测, 并通过临床样本进行了验证, 适用于即时检测。

3.4.2 DETECTR Cas12 是 CRISPR-Cas 效应子家族的另一个成员, 具有靶标激活的非特异性单链脱氧核糖核酸酶 (ssDNase) 特性, 是一种 RNA 引导的 DNA 核酸内切酶, 在结合靶序列后会不加区别地裂解 ssDNA。在 DETECTR (DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter) 方法中 (图 5), 病毒 RNA 首先被转化为 DNA, 然后等温扩增后的 DNA 中的特定靶序列激活 Cas12a, Cas12a 依次切



割 ssDNA 报告探针释放肉眼可见的荧光分子, 可实现灵敏且特异的 DNA 检测^[32]。

基于荧光的检测方法相对灵敏度更高且可以实现高通量检测, Huang 等^[33]采用一步式 RT-RPA 方法从鼻拭子提取的病毒 RNA 中扩增靶区域, 并将所得的扩增产物整体转移至 96 孔微量滴定板中进行荧光检测, 使用荧光板读取器进行信号读取, 易于实现自动化, 样品到结果的时间约为 50 min, 检测限为每个反应 2 个拷贝, 灵敏度优于 qPCR 测定法。该方法可以应用于大多数设备齐全的临床实验室中, 但是需要进一步设计适当的设备应用于即时检测, 以使资源缺乏的小型诊所也能进行该测试。CRISPR 还可以使用侧向流试纸条来检测信号, 它不需要任何设备即可快速读取结果, 更适合应用于非实验室环境中的即时检测, 对于单样本测试, 这是一个很好的解决方案, 具有便携低成本的优势, 但使用侧向流试纸条检测结果的方法灵敏度会有所降低^[34-35]。以上开发的方法仍需对样本进行开管进行液体操作, 为了解决这一问题, Ding 等^[36]提出 All-In-One Dual CRISPR-Cas12 (AIOD-CRISPR) 检测方法, 用于核酸扩增和 CRISPR 检测的所有成分都在一个单管反应系统中, 灵敏度能达到每微升 4.6 个拷贝。而 Guo 等^[37]建立了一个集成样品处理方案、重组酶辅助扩增 (RAA) 及 CRISPR 检测的病毒核酸检测平台, 检测限为每毫升 1×10^4 拷贝, 为了使该平台更适合即时检测, 还构建了一个带有蓝色 LED 的便携式暗盒以便实现可视化。

基于 RNA 的 CRISPR/Cas 策略与等温扩增结合的快速核酸检测技术, 可以提高等温扩增测定的灵敏度, 特异性和可靠性, CRISPR 检测还可与侧向流读数耦合, 很适合居家检测的场景, 为下一代分子诊断技术的发展和即时检测的应用展示了广阔前景。

4 商业一体化即时检测方法

商业化即时检测方法通常通过开发配套仪器设备来实现整合提取、扩增及检测过程, 将所有试剂装在一个盒中, 并通过使用机械操作或微流控技术以基本实现自动化、最大程度地减少人工操作, 减少总测试时间, 提高周转速度。

从 2020 年 3 月开始, 美国食品和药物管理局

(FDA) 对多项测试授予了 EUA, 值得注意的是有越来越多基于 RT-PCR 原理的即时检测商业化测试正在被开发。目前获得临床实验室改进修正案的质量标准 (CLIA) 豁免的基于 RT-PCR 原理进行 SARS-CoV-2 测试的即时检测有 Cepheid 公司的 Xpert Xpress SARS-CoV-2 和 Mesa Biotech 公司 Accula SARS-CoV-2^[38]。Xpert Xpress SARS-CoV-2 (Cepheid) 通过 RT-PCR 检测 E 基因和 N2 基因两个靶标, 在大约 45 min 内即可得到结果, 将整个过程自动化, 不需要用户进行特殊培训。许多研究团队将 Xpert Xpress SARS-CoV-2 与基于实验室的 RT-PCR 在临床样本中进行了比较, 显示出极好的一致性 (>99%), 并且发现在较低的病毒水平也能可靠检测^[39]。Mesa Biotech 公司的 Accula 结合了 RT-PCR 分子诊断和侧向流分析技术, 仅需 30 min 即得到结果并且仪器仅手掌大小便于携带。为了评估 Accula 测试的性能, Hogan 等^[40]比较了 100 份鼻咽拭子样品的结果, 总体一致性为 84.0%, 阳性一致性仅有 68.0%。对于病毒载量低的样品, 阳性一致性较低, 易出现假阴性。这表明 Accula 即时检测灵敏度不高, 应仔细考虑即时检测的潜在优势与降低诊断准确性之间的平衡。国内基于 RT-PCR 原理的商业化即时检测装置有圣湘生物科技股份有限公司的 iPonatic 移动分子诊断系统、上海透景生命科技股份有限公司 2019 新型冠状病毒核酸检测试剂盒 (卡式荧光 PCR 法)。iPonatic 采用一步核酸免提取技术, 并搭配快速核酸检测系统, 一站式完成样本裂解、核酸提取、PCR 扩增及结果分析。透景生命的检测卡盒采用磁珠法进行核酸提取, 实现提取扩增全程自动化, 但该方法需要手动装载磁珠和样本, 需要在标准实验室环境下进行。此外还有能够实现多重 PCR (mPCR) 的商业化平台, 例如 QIAstat-Dx (QIAGEN 公司)、BioFire FilmArray (bioMérieux 公司) 等平台。QIAstat-Dx 除了支持液体运输介质外, 还有独特的干拭子直接上样程序, 手动操作少于 1 min, 可在 1 h 内得出结果。BioFire FilmArray (bioMérieux 公司) 利用巢式多重 PCR 结合微流控芯片技术实现 1 h 快速检测, 巢式 PCR 技术可以最大程度排除其他非特异性病原体核酸物质的干扰, 同时提高了检测灵敏度。表 1 列举了目前商业化的基于 RT-PCR 原理的即时检测方法^[38, 41]。

表 1 目前商业化的基于 RT-PCR 原理的即时检测方法

商品名	注册公司	检测靶点	检测时间	检测限
Xpert Xpress SARS-CoV-2	Cepheid	E/N2	45 min	100 拷贝/毫升
Accula	Mesa Biotech	E	30 min	200 拷贝/反应
QIAstat-Dx	QIAGEN	Orf1ab/E	1 h	1 000 拷贝/毫升
BioFire FilmArray	bioMérieux	S/M	45 min	500 拷贝/毫升
COVID-19 Go-Strips	Biomeme	Orf1ab/S	1 h	1.8 基因组当量/微升
WizDx™ COVID-19 CrystalMix PCR kit	Wizbiosolutions	RdRP/E	1 h	10 拷贝/微升
Bosch's rapid COVID-19 test	Bosch Healthcare	/	2.5 h	/
Microchip RT-PCR COVID-19 Detection System	Lumex Instruments	N1/N2	50 min	9×10 ³ 拷贝/毫升
ARIES SARS-CoV-2	Luminex	ORF1ab /N1/N3	20 min	300 拷贝/反应
iPonatic 移动分子诊断系统	圣湘生物	ORF1ab/N	15~45 min	200 拷贝/毫升
2019 新型冠状病毒核酸检测试剂盒(卡式荧光 PCR 法)	透景生命	ORF1ab/N	1~1.5 h	20 拷贝/微升

等温扩增由于不需要借助热循环仪, 在恒定温度下即可实现扩增和可视化检测, 因而可以大大减小设备体积, 相对于 RT-PCR 更适合用于资源缺乏地区即时检测的开发。北京航空航天大学、华西医院联合研发出一款针对 ORF/N/E 3 个基因位点的便捷式病原体核酸快速检测仪, 由便携式检测仪和等温扩增检测锥形微孔阵列高通量芯片构成, 能实现高灵敏度、低成本(1 万元/台, 10 元/人份)、快速(25 min)、高通量(64 个)即时检测, 113 例核酸样本检测表明灵敏度大于 95%, 特异性大于 95.3%。优思达公司 EasyNAT 即时分子诊断系统是已获批的一体化等温扩增仪器, 试剂用玻璃化技术预混装在全自动反应管中, 将裂解、磁珠提取、纯化、洗脱、扩增等过程在外部磁导的作用下自动化完成, 整个过程耗时 79 min, 全程密闭检测, 无需专业 PCR 实验室。Abbott 公司的 ID Now 是利用 NEAR 原理的一种商业化即时检测方法, 它设计靶向扩增 SARS-CoV-2 的 RdRp 片段, 可在 5 min 内提供 0.125 copies/μL 的灵敏度。检测阳性样品仅需 5 min, 阴性样品也只需 13 min。用荧光标记的分子信标特异性鉴定扩增的 RNA 靶标。然而, 有

评估显示 ID NOW 与 RT-PCR 阳性一致率仅有约 80%^[42], 这意味着 Abbott 公司的 ID Now 的性能有很大的局限性, 对于强阳性和中等阳性样品, ID NOW 表现良好, 但对于弱阳性样品灵敏度降低^[43], 因此在对疑似患者使用此测试时, 应考虑到灵敏度的问题。等温扩增一体化仪器适合资源缺乏地区以及人流聚集环境下的便携式病原体快速检测, 但目前对于低成本、高准确度、适合即时检测的等温核酸扩增仪的开发仍处于探索阶段, 有广阔的发展前景。

5 总结和展望

相比于基于实验室的标准 RT-PCR 流程, 即时检测方法能够在较短的时间内实现“样本进, 结果出”, 可以促进更快的临床决策, 以社区为单位进行即时检测可以减轻中心医院和实验室的负担。目前已开发出许多为了更好地应用于新冠即时检测而在提取、扩增、检测等方面进行相应改进的方法, 包括简化提取步骤, 优化即时检测场景下基于 RT-PCR、核酸等温扩增等原理开发的方法(表 2)的扩增性能、采用荧光读取、可视化技术、侧向流

表 2 基于不同原理的 SARS-CoV-2 核酸即时检测方法对比

原理	检测时间	优点	缺点
RT-PCR	1 h	灵敏度高; 流程标准化	需要热循环仪; 周转时间相对较长; 需专业人员操作
等温核酸扩增 LAMP	30 min	特异性好, 无需热循环仪, 能恒温进行; 能实现可视化	仍需热板或水浴; 引物设计相对复杂; 成本相对较高
RPA	20 min	无需任何仪器; 操作简单; 反应时间较短; 易应用于即时检测	终点检测相对较复杂; 试剂需要从专门的公司获得; 成本相对较高
NEAR	5~13 min	速度最快; 无需热循环仪, 能恒温进行; 设备小型便携	短序列的设计存在高假阳性的可能; 低拷贝样本易出现假阴性

检测和CRISPR检测以方便结果识别读出等,推动实现准确,快速,便携,简便和低成本的即时检测目标。但目前针对新冠检测的即时检测方法大多为概念研究阶段,距离商品化应用还有距离。而已被批准上市的即时检测方法需要在专门的配套仪器上使用,实现了提取、扩增、检测一体化,极大推动了即时检测的发展,但大多仍然需要专业人员在实验室环境操作,且仪器价格较高、市场占有率小等问题也会限制其在即时检测场景中的应用,此外部分商品化仪器实际检测性能仍有待进一步评估和改进,市场上仍缺少真正能够实现普通大众居家或资源缺乏地区在非实验室环境进行测试的准确可靠的即时检测试剂盒,对于在受控环境之外和非专业训练的工作人员进行测试时的污染和假阳性风险也是即时检测所面临的问题。即时检测方法的开发主要是为了应用于资源短缺地区或待检样品数超过当地检测能力地区的现场即时检测,这就要求理想的研发方法能够具有以下特征:(1)装置尽量小型化、便携化;(2)用户友好,操作简单,方便非专业操作人员的培训;(3)考虑到生物安全问题,尽量设计为免提取密闭自动化操作,减少开盖,保证非专业人员在非实验室环境操作的安全;(4)周转时间短,能在1~2 h或更短时间内出结果;(5)信号读取方便直观,可以直接得出是否为阳性的结果,例如可视化技术。除了为快速控制新冠病毒的传播提供有力支持以外,这些针对新型冠状病毒的即时检测研究成果也可以应用于其他疾病的紧急防御和快速部署,有助于应对未来可能的新兴传染病。

参 考 文 献

- [1] Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, **579**(7798):270–273.
- [2] Luppa PB, Müller C, Schlichtiger A, et al. Point-of-care testing (POCT): current techniques and future perspectives [J]. *Trends Analyt Chem*, 2011, **30**(6):887–898.
- [3] To KK, Tsang OT, Yip CC, et al. Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva [J]. *Clin Infect Dis*, 2020, **71**(15): 841–843.
- [4] Lamb LE, Bartolone SN, Ward E, et al. Rapid detection of novel coronavirus/severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification [J]. *PLoS One*, 2020, **15**(6):e0234682.
- [5] Vogels CBF, Brackney D, Wang J, et al. SalivaDirect: simple and sensitive molecular diagnostic test for SARS-CoV-2 surveillance [J]. *medRxiv*, 2020:2020.08.03.20167791.
- [6] Rutgers. new Rutgers saliva test for Coronavirus gets FDA approval [EB/OL]. (2020-04-13) [2020-09-30]. <https://www.rutgers.edu/news/new-rutgers-saliva-test-coronavirus-gets-fda-approval>.
- [7] To KK, Tsang OTY, Leung WS, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2020, **20**(5): 565–574.
- [8] Zhao Z, Cui H, Song W, et al. A simple magnetic nanoparticles-based viral RNA extraction method for efficient detection of SARS-CoV-2 [J]. *bioRxiv*, 2020:2020.02.22.961268.
- [9] Wee SK, Sivalingam SP, Yap EPH. Rapid direct nucleic acid amplification test without RNA extraction for SARS-CoV-2 using a portable PCR thermocycler [J]. *Genes (Basel)*, 2020, **11**(6):664.
- [10] Wei S, Kohl E, Djandji A, et al. Direct diagnostic testing of SARS-CoV-2 without the need for prior RNA extraction [J]. *medRxiv*, 2020:2020.05.28.20115220.
- [11] Xia S, Chen X. Single-copy sensitive, field-deployable, and simultaneous dual-gene detection of SARS-CoV-2 RNA via modified RT-RPA [J]. *Cell Discov*, 2020, **6**:37.
- [12] Arumugam A, Faron ML, Yu P, et al. A rapid SARS-CoV-2 RT-PCR assay for low resource settings [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2020, **10**(10):739.
- [13] 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 [J]. *Clin Chem*, 2020, **66**(7):975–977.
- [14] Yang W, Dang X, Wang Q, et al. Rapid detection of SARS-CoV-2 using reverse transcription RT-LAMP method [J]. *medRxiv*, 2020:2020.03.02.20030130.
- [15] Lu R, Wu X, Wan Z, et al. A novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of SARS-CoV-2 [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(8):2826.
- [16] Ganguli A, Mostafa A, Berger J, et al. Rapid isothermal amplification and portable detection system for SARS-CoV-2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, **117**(37):22727–22735.
- [17] Sun F, Ganguli A, Nguyen J, et al. Smartphone-based multiplex 30-minute nucleic acid test of live virus from nasal swab extract [J]. *Lab Chip*, 2020, **20**(9):1621–1627.
- [18] Gonzalez-Gonzalez E, Lara-Mayorga IM, Rodriguez-Sanchez IP, et al. Scaling diagnostics in times of COVID-19: colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assisted by a 3D-printed incubator for cost-effective and scalable detection of SARS-CoV-2 [J]. *medRxiv*, 2020:2020.04.09.20058651.

- [19] Behrmann O, Bachmann I, Spiegel M, et al. Rapid detection of SARS-CoV-2 by low volume real-time single tube reverse transcription recombinase polymerase amplification using an exo probe with an internally linked quencher (Exo-IQ) [J]. *Clin Chem*, 2020, **66**(8):1047–1054.
- [20] El-Tholoth M, Bau HH, Song J. A single and two-stage, closed-tube, molecular test for the 2019 novel coronavirus (COVID-19) at home, clinic, and points of entry [J]. *ChemRxiv*, 2020. doi:10.26434/chemrxiv.11860137.
- [21] Van Ness J, Van Ness LK, Galas DJ. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, **100**(8):4504–4509.
- [22] Park GS, Ku K, Baek SH, et al. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays targeting severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) [J]. *J Mol Diagn*, 2020, **22**(6):729–735.
- [23] Yan C, Cui J, Huang L, et al. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2020, **26**(6):773–779.
- [24] Ganguli A, Mostafa A, Berger J, et al. Rapid isothermal amplification and portable detection system for SARS-CoV-2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, **117**(37):22727–22735.
- [25] Yang T, Wang YC, Shen CF, et al. Point-of-care RNA-based diagnostic device for COVID-19 [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2020, **10**(3):165.
- [26] Moitra P, Alafeef M, Dighe K, et al. Selective naked-eye detection of SARS-CoV-2 mediated by N gene targeted antisense oligonucleotide capped plasmonic nanoparticles [J]. *ACS Nano*, 2020, **14**(6):7617–7627.
- [27] Zhu X, Wang X, Han L, et al. Multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nanoparticle-based lateral flow biosensor for the diagnosis of COVID-19 [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, **166**:112437.
- [28] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. *Science*, 2017, **356**(6336):438–442.
- [29] Zhang F, Abudayyeh OO, Gootenberg JS. Protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics [EB/OL]. (2020-03-21) [2020-09-30]. <https://www.broadinstitute.org/files/publications/special/COVID-19>.
- [30] Hou T, Zeng W, Yang M, et al. Development and evaluation of a rapid CRISPR-based diagnostic for COVID-19 [J]. *PLoS Pathog*, 2020, **16**(8):e1008705.
- [31] Joung J, Ladha A, Saito M, et al. Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics [J]. *Preprint. medRxiv*. 2020;2020.05.04.20091231.
- [32] Chen JS, Ma E, Harrington LB, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity [J]. *Science*, 2018, **360**(6387):436–439.
- [33] Huang Z, Tian D, Liu Y, et al. Ultra-sensitive and high-throughput CRISPR-powered COVID-19 diagnosis [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, **164**:112316.
- [34] Lucia C, Federico PB, Alejandra GC. An ultrasensitive, rapid, and portable coronavirus SARS-CoV-2 sequence detection method based on CRISPR-Cas12 [J]. *bioRxiv*, 2020: 2020.02.29.971127.
- [35] Broughton JP, Deng X, Yu G, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2 [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, **38**(7):870–874.
- [36] Ding X, Yin K, Li Z, et al. Ultrasensitive and visual detection of SARS-CoV-2 using all-in-one dual CRISPR-Cas12a assay [J]. *Nat Commun*, 2020, **11**(1):4711.
- [37] Guo L, Sun X, Wang X, et al. SARS-CoV-2 detection with CRISPR diagnostics [J]. *Cell Discov*, 2020, **6**:34.
- [38] FDA. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) EUA Information [EB/OL]. (2020-05-11) [2020-09-30]. <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-legal-regulatory-and-policy-framework/emergency-use-authorization#covidinvitrodev>.
- [39] Moran A, Beavis KG, Matushek SM, et al. Detection of SARS-CoV-2 by use of the Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2 and Roche cobas SARS-CoV-2 assays [J]. *J Clin Microbiol*, 2020, **58**(8):e00772–20.
- [40] Hogan CA, Garamani N, Lee AS, et al. Comparison of the Accula SARS-CoV-2 test with a laboratory-developed assay for detection of SARS-CoV-2 RNA in clinical nasopharyngeal specimens [J]. *J Clin Microbiol*, 2020, **58**(8):e01072–20.
- [41] NMPA: NMPA conducts emergency approval of testing products for 2019-nCoV [EB/OL]. (2020-03-27) [2020-09-30]. <https://www.nmpa.gov.cn/ylqx/ylqxjgdt/20200.27182401511.html>.
- [42] McDonald S, Courtney DM, Clark AE, et al. Diagnostic performance of a rapid point-of-care test for SARS-CoV-2 in an urban emergency department setting [J]. *Acad Emerg Med*, 2020, 10.1111/acem.14039.
- [43] Mitchell SL, George KS. Evaluation of the COVID19 ID NOW EUA assay [J]. *J Clin Virol*, 2020, **128**:104429.