

新型冠状病毒检测方法的研究进展

王露莹¹, 陈品儒¹, 郑国湾², 漆楠^{1*}, 杨科^{1*}

1. 浙江工业大学 长三角绿色制药协同创新中心, 浙江 杭州 310014

2. 浙江省人民医院 临床医学研究所, 浙江 杭州 310014

摘要: 2019年12月, 一种新型冠状病毒(SARS-CoV-2)在国内爆发, 并迅速蔓延至全球多个国家, 对全球公共卫生安全构成了巨大威胁。为应对新型冠状病毒肺炎(COVID-19)疫情造成的对病毒检测的需求, 国内外企业和科研单位陆续研发出众多病毒检测方法和产品。综述了目前用于新型冠状病毒检测方法的研究进展, 介绍了这些检测技术的原理, 阐明了其优势和限制, 并举了一些有代表性的研究成果。

关键词: 新型冠状病毒; 新型冠状病毒肺炎; 核酸检测; 免疫学检测

中图分类号: R927.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2020)03-0411-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.03.004

Research progress on detection methods of SARS-CoV-2

WANG Lu-ying¹, CHEN Pin-ru¹, ZHENG Guo-wan², QI Nan¹, YANG Ke¹

1. Yangtze River Delta Green Pharmaceutical Collaborative Innovation Center, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

2. Institute of Clinical Medicine, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China

Abstract: At December 2019, a new coronavirus (SARS-CoV-2) broke out in China and spread rapidly to many other countries, threatening global public health security. To satisfy the urgent demand of SARS-CoV-2 detection, many enterprises and research institutions have developed a number of detection methods and products. The research progress on detection methods of SARS-CoV-2 are reviewed in this paper. The principle of these detection techniques is introduced, and their advantages and limitations, as well as some typical research works discusses are illustrated.

Key words: SARS-CoV-2; COVID-19; nucleic acid detection; immunological detection

2019年12月, 一种新型冠状病毒(SARS-CoV-2)在武汉爆发, 并迅速在全国多个地区快速传播。随后全球多个国家和地区相继出现了确诊病例, 疫情呈现全球蔓延的趋势^[1]。截至2020年3月9日, 该病毒已导致全国8万余人感染, 国外其他地区感染人数已达2万余人, 对全球公共卫生安全构成了巨大威胁。

SARS-CoV-2是一种正义单链RNA病毒, 属于冠状病毒β属。SARS-CoV-2的RNA基因组包含29 891个核苷酸, 编码9 860个氨基酸, 鸟嘌呤和胞嘧啶所占比率为38%, 与SARS-CoV的核苷酸同

源性为82%^[2]。SARS-CoV-2的结构蛋白包括S蛋白、N蛋白、M蛋白和E蛋白。其感染宿主细胞的机制与SARS冠状病毒(SARS-CoV)非常相似, 都是通过S蛋白与宿主细胞表面的血管紧张素转换酶2(ACE2)受体结合并与宿主细胞膜融合, 从而进入细胞内部^[3]。

新型冠状病毒肺炎(COVID-19)疫情的快速蔓延, 导致疑似感染者和密切接触者数量激增。尽早进行病毒检测, 不仅可以使感染者获得及时治疗, 降低死亡风险, 还能有效控制传染源, 通过隔离切断传播途径。为满足SARS-CoV-2检测的需求, 国

收稿日期: 2019-03-10

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81803761); 中国博士后科学基金资助项目(2019M652144、2019M652136)

作者简介: 王露莹, 女, 助理研究员, 博士, 研究方向为生物分析技术。E-mail: wangluying@zjut.edu.cn

*通信作者 漆楠, 男, 研究员, 博士, 研究方向为病原微生物与宿主免疫的相互作用。E-mail: qinan@zjut.edu.cn

杨科, 男, 助理研究员, 博士, 研究方向为中药药理、药物设计、心脑血管药理。E-mail: yangyongyao168@sian.com

内外企业和科研单位陆续研发出众多检测产品。截至 3 月 9 日, 获批的试剂盒就有 15 个^[4]。目前用于 SARS-CoV-2 检测的方法主要有核酸检测法和免疫学检测法, 核酸检测法是对病毒 RNA 基因组进行检测, 包括基因测序、荧光定量 PCR、微滴式数字 PCR (ddPCR)、基因芯片和环介导等温扩增 (LAMP) 等技术。免疫学检测法是对病毒抗原或人体免疫反应产生的特异性抗体进行检测, 包括免疫色谱试纸条、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和化学发光免疫分析 (CLIA) 等技术。本文综述了目前 SARS-CoV-2 检测方法的研究进展, 介绍了这些检测技术的原理, 阐明了其优势和限制, 并对新型的病毒检测技术做出了展望, 为理解和发展 SARS-CoV-2 检测方法提供思路。

1 核酸检测法

SARS-CoV-2 的核酸检测主要包括测序和靶标序列识别, 其中靶标序列一般在高度保守的 ORF1ab 基因、N 基因、E 基因中选取。核酸检测的标本可以是痰液、咽拭子、肺泡灌洗液、血液和环境样本。核酸检测前需要对标本进行前处理, 首先裂解细胞和病毒, 释放核酸, 并用磁珠、离心柱、滤膜等提取 RNA, 清洗之后洗脱, 最终得到基因组 RNA^[5]。在检测前, 往往还需要将 RNA 逆转录成互补 DNA (cDNA)。

1.1 基因测序

在未知病毒爆发时, 对病毒进行全基因组测序可以帮助人们了解病毒的遗传信息, 指导核酸检测产品的设计, 并对病毒进行追踪和溯源。Wu 等^[6]最先通过宏基因组测序技术准确地测定了从患者肺泡灌洗液样本中提取病毒的基因序列, 并上传到 GenBank, 为核酸测试剂盒的开发提供了依据。Wang 等^[7]创新性地开发了纳米孔靶向测序 (NTS) 检测方法, 不仅能够检测出 SARS-CoV-2, 还能同时检测出其他常见的呼吸道病毒, 其阳性检出率较荧光定量 PCR 高 43.8%。

测序技术的最大优势在于高敏感性、高准确性, 但由于仪器成本较高, 依赖于专业人员对序列的解读, 且检测时间较长, 目前还不适用于大规模检测。

1.2 荧光定量 PCR

荧光定量 PCR (Taqman 法) 利用 Taq 酶的结合活性和 5'-3'核酸外切酶活性, 在链延伸过程中切割与靶标序列互补配对的 Taqman 探针。TaqMan 探针的两端分别修饰了荧光基团和淬灭基

团, 由于荧光共振能量转移 (FRET) 效应, 荧光呈淬灭状态。在被 Taq 酶切断后, 荧光基团和淬灭基团远离, 荧光基团重新发出荧光。靶标序列每扩增一次都会产生荧光信号, 信号和靶标数量成正比。通过测定荧光达到一定阈值所需循环数 (Ct 值) 来实现靶标定量检测, Taqman 法原理见图 1^[8]。初始靶标核酸的浓度越高, Ct 值越小。

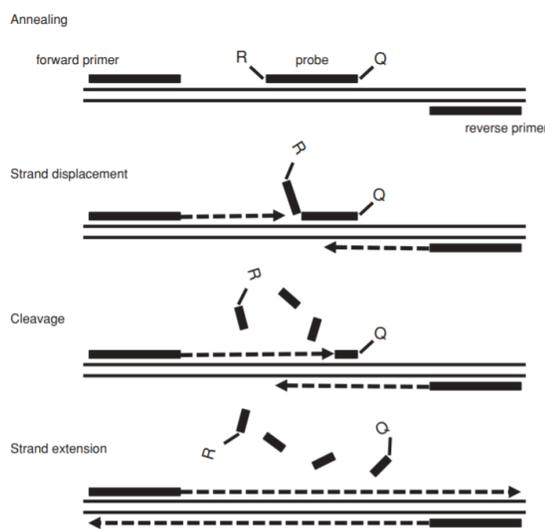


图 1 Taqman 法原理图

Fig. 1 Schematic diagram of Taqman method

由于 RNA 病毒容易发生变异, 为防止错检和漏检, 用于 SARS-CoV-2 检测的 PCR 检测一般会分别在 ORF1ab 基因、N 基因选取两个靶标, 有时还会在 E 基因上选取第 3 个靶标, 有效提高了 SARS-CoV-2 的阳性检出率。

由于其优异的灵敏度和特异性, 荧光定量 PCR 方法是目前应用最广泛的 SARS-CoV-2 检测方法。

1.3 ddPCR

病毒标本采集的操作不当、核酸在抽提过程中的损失以及体内病毒含量过低等都会导致荧光 PCR 方法出现假阴性的情况, 导致漏检。ddPCR 是利用微滴化技术将反应体系分成数万个液滴进行定量 PCR 扩增, 反应完成后利用微滴分析仪读取每个微滴的荧光信号, 从而实现模板 DNA 的绝对定量。其本质是将定量 PCR 的一次检测变成数万次检测^[9]。

ddPCR 技术具有绝对定量和高灵敏度的优势^[10], 其检测下限远低于荧光定量 PCR 方法, 降低了假阴性风险, 大大提高了 SARS-CoV-2 检测的准确性。但 ddPCR 依赖于昂贵的仪器, 成本较高, 因此普及度不高。

1.4 基因芯片

基因芯片是基于核酸杂交原理的检测技术，将大量特异性的寡核苷酸探针以微阵列的形式固定在载玻片等芯片载体上，通过与荧光素标记的标本核酸进行杂交，检测杂交信号的有无和强弱来分析标本中核酸的数量和组成^[11]，基因芯片原理见图 2^[12]。

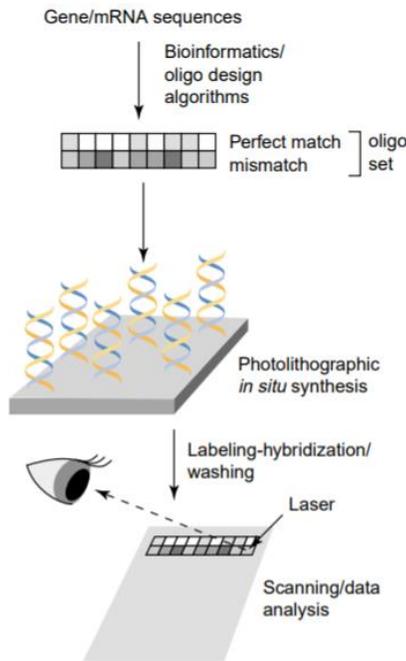


图 2 基因芯片原理图

Fig. 2 Schematic diagram of gene chip

基因芯片技术具有快速、准确、高通量的特点，能一次检测多达几十种靶标。目前，博奥生物研发了能同时检测包括 SARS-CoV-2 在内的 6 种呼吸道病毒的核酸检测试剂盒和基因芯片^[13]。

1.5 LAMP

LAMP 是一种高效准确的 DNA 等温扩增技术，能在 60~65 °C 下实现 DNA 的指数扩增，其扩增效率是 PCR 的 10~1 000 倍。此外，由于 LAMP 针对靶标 DNA 链上的 6 个区段设计了 4~6 条特异性引物，特异性也非常高^[14]。

近日，鲁东大学宣布成功研发基于 LAMP 的 SARS-CoV-2 检测试剂盒^[15]。Yu 等^[16]也基于 LAMP 技术开发了 SARS-CoV-2 的检测方法：iLACO，在蓝光照射下实现肉眼检测。

2 免疫学检测法

免疫学检测法是以抗原抗体可以特异性结合作为检测的基础，可分为基于抗原的检测和基于抗体的检测两大类。抗原是能激发人体免疫反应产生抗

体的物质，SARS-CoV-2 表面的 S 蛋白、N 蛋白等都可以作为抗原表位^[17]。抗原检测的样本主要是咽拭子、痰液和血液。抗体是人体免疫系统产生用于对抗抗原的物质，在人体感染 SARS-CoV-2 后，病毒会作为抗原刺激人体免疫细胞产生抗体，因此可以通过检测人体内是否产生特异性的抗体来间接检测是否感染 SARS-CoV-2。检测的抗体主要分为免疫球蛋白 M (IgM) 和免疫球蛋白 G (IgG) 两类。IgM 是机体初次免疫应答产生的抗体，一经感染，立即产生，但持续时间不长，主要作为早期感染的指标。IgG 是机体再次免疫应答产生的抗体，产生时间晚，持续时间长，主要作为感染和既往感染的指标。同时检测 IgM、IgG 抗体可以提高检测的准确性，减少漏诊。抗体检测的样本主要是血清、血浆或全血。

2.1 免疫色谱试纸条

免疫色谱试纸条的原理是预先在试纸条的检测线 (T 线) 上固定抗体 (抗原检测) 或抗抗体 (抗体检测)，在控制线 (C 线) 上固定二抗，结合垫带有免疫标记的探针。一般探针为胶体金、乳胶粒子或荧光微球等具有比色或荧光信号的微颗粒。在样品垫中加入待测样本，样本流至结合垫时，通过抗原-抗体相互作用与探针结合，形成样本-探针复合物。当流动至 T 线时，复合物会被 T 线上的抗体或者抗抗体捕获，形成标记三明治夹心结构复合物，使 T 线显色，免疫色谱试纸条原理见图 3^[18]。T 线和 C 线同时显色表明待测标本中含有病毒的抗原或者抗体，只有 C 线则表明无病毒抗原或抗体。

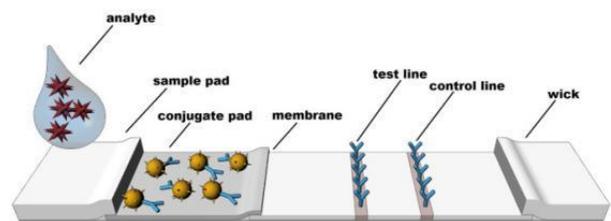


图 3 免疫色谱试纸条原理图

Fig. 3 Schematic diagram of immunochromatographic test strip

为防止漏检、错检，试纸条上可设置多条 T 线用于同时检测多个靶标。免疫色谱试纸条法无需复杂的仪器，操作简单，可直接目视判定结果，检测时间只需十几分钟，适合于现场快速筛查^[19]。但其准确度和灵敏度有限，可以作为 SARS-CoV-2 检测的辅助方法。

2.2 ELISA

ELISA 的原理是预先将特异性抗体(抗原检测)或抗原(抗体检测)固定在固相载体表面,与待测标本形成抗原-抗体复合物后再加入酶标记的抗体或酶标记的抗抗体,形成三元复合物,洗涤后加入底物如四甲基联苯胺,在酶的催化下显色,颜色深浅与待测标本中抗原或抗体的量成正比^[20]。通过酶标仪测得的吸光度(A)值大小来确定标本中病毒的水平。

ELISA 法具有特异性强,灵敏度高的特点,但其通量小,检测时间较长^[21]。

2.3 CLIA

CLIA 是一种将免疫反应与化学发光分析相结合建立起来的新型免疫分析技术。可以分为化学发光标记免疫分析和化学发光酶免疫分析两大类。化学发光标记免疫分析是在磁微粒上固定抗体,用化学发光剂如吖啶酯直接标记抗体(抗原检测)或抗原(抗体检测),与待测标本发生免疫反应形成固相包被复合物,洗涤后,氧化分解发光剂使之发光。化学发光酶免疫分析原理类似,用特定的酶来标记抗体或抗原,发生免疫反应形成固相包被的三元复合物,洗涤后再加入发光剂,在酶的催化下发光剂发光,用化学发光仪检测发光信号^[22]。

CLIA 法是目前最先进的免疫检测技术之一,具有灵敏度高,特异性强,检测范围宽的特点,但依赖于特定的化学发光仪,检测成本较高。

总的来说,免疫检测的敏感性和特异性相较于核酸检测处于劣势,一般作为 SARS-CoV-2 检测的补充方法。

3 其他新型技术

除了传统的病毒检测技术外,一些新型检测技术也不断被开发,推动 SARS-CoV-2 检测方法的发展。

CRISPR-Cas 不仅是一种强大的基因编辑工具,也是有效的核酸检测平台^[23]。具有核酸内切酶活性的 CRISPR-Cas13 和 CRISPR-Cas12 靶标核酸后,其反式切割活性被激活,能分辨切割任意 RNA 和 DNA 单链的报告分子^[24-25]。近日,张峰团队将 CRISPR-Cas13 和免疫色谱试纸条技术结合,实现了 10~100 copy/ μ L SARS-CoV-2 病毒核酸的检测,全程可在 1 h 内完成^[26]。Lucia 等^[27]基于 CRISPR-Cas12 开发了靶向 SARS-CoV-2 ORF1ab 基因的试纸条检测方法,其检测灵敏度达到 10 copies/ μ L。但这些方法尚在实验室阶段,实际效果尚待临床验证。

适配体是一种单链的寡聚核苷酸,能与特定小分子或蛋白质结合。其与抗原分子的亲和力不输于抗体,且无需动物源,在体外即可制备,稳定性更好,可以替代抗体作为抗原检测的探针^[28]。目前已有不少研究将适配体应用于病毒蛋白和全病毒的检测^[29-30]。相信适配体在发展 SARS-CoV-2 检测方法中将发挥巨大潜力。

通过微加工手段使检测器件集成化,可核酸抽提、扩增、检测等过程的手动操作,实现“样品进结果出”,缩短检测时间,减少操作误差^[31]。目前已有不少企业研发出了相应的产品,如万孚倍特生物有限公司开发了一种全自动多重核酸检测卡,实现高通量的病毒核酸检测^[32];景透生命有限公司开发了荧光 PCR 测试卡,只需插入仪器即可自动完成核酸抽提、扩增和检测^[33]。

相信在国内外科学家的努力下,越来越多的先进检测方法将被发展和应用于 SARS-CoV-2 的检测,使病毒检测更加准确、快速和方便。

4 结语

COVID-19 在全球范围内快速蔓延造成了对 SARS-CoV-2 检测的巨大需求。目前,国内外已开发出上百种检测产品,并正在不断推出新的成果。本文总结了 SARS-CoV-2 检测方法的研究进展,并对未来新型技术的发展做出了展望。在众多方法中,荧光定量 PCR 凭借优异的灵敏度和特异性,成为目前 SARS-CoV-2 检测的“金标准”。基于免疫检测的免疫层析试纸条法具有操作简单、检测时间短的优势,非常适用于现场检测。高通量、自动化、小型化和低成本是未来 SARS-CoV-2 检测方法发展的趋势。随着技术的不断进步,相信会有更加高效准确的病毒检测方法被开发出来,为临床提供更多选择。

参考文献

- [1] Wang C, Horby P W, Hayden F G, *et al.* A novel coronavirus outbreak of global health concern [J]. *Lancet*, 2020, 395: 470-473.
- [2] Chan J F, Kok K H, Zhu Z, *et al.* Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with a typical pneumonia after visiting Wuhan [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 221-236.
- [3] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Krüger N, *et al.* The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS

- coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells [J]. *bioRxiv*, 2020, DOI: 10.1101/2020.01.31.929042.
- [4] 国家药监局继续应急审批新型冠状病毒快速检测产品 [EB/OL]. (2020-03-06) [2020-03-09]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2056/375351.html>.
- [5] 赵升, 姬艳芳, 张璐, 等. 一种快速核酸提取试剂在流感病毒检测中的应用评价 [J]. *中国病毒病杂志*, 2019, 9(2): 135-138.
- [6] Wu F, Zhao S, Yu B, *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China [J]. *Nature*, 2020, DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3.
- [7] Wang M, Fu A, Hu B, *et al.* Nanopore target sequencing for accurate and comprehensive detection of SARS-CoV-2 and other respiratory viruses [J]. *medRxiv*, 2020, DOI: 10.1101/2020.03.04.20029538.
- [8] Johnston J W. Example of use of taqman real-time RT-PCR to analyze bacterial gene transcript levels: *Haemophilus influenza* [J/OL]. (2009-11-12) [2020-03-09]. DOI: 10.1002/9780471729259.mc01d01s15.
- [9] Postel M, Roosen A, Laurent-Puig P, *et al.* Droplet-based digital PCR and next generation sequencing for monitoring circulating tumor DNA: a cancer diagnostic perspective [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2018, 18(1): 7-17.
- [10] 计震华, 戴熙廷, 简苗苗, 等. 微滴式数字聚合酶链反应在传染病检测中的应用 [J]. *检验医学与临床*, 2019, 22: 3379-3382.
- [11] 徐敏, 向华. 流感病毒核酸检测方法研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2011, 32(1): 89-92.
- [12] Barrett J C, Kawasaki E S. Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression [J]. *Drug Discov Today*, 2003, 8(3): 134-141.
- [13] 博奥生物发布芯片试剂盒1.5小时内一次性检测6种呼吸道病毒 [OL]. (2020-02-24) [2020-03-09]. <http://zgcgw.beijing.gov.cn/zgc/yw/kjqy72/1702086/index.html>.
- [14] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): e63.
- [15] 鲁东大学青年博士团队成功研制新冠病毒快速检测试剂盒 [OL]. (2020-03-04) [2020-03-09]. <http://t4.ldu.edu.cn/info/1003/1897.htm>.
- [16] Yu L, Wu S S, Hao X W, *et al.* Rapid colorimetric detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform: iLACO [J]. *medRxiv*, 2020, DOI: 10.1101/2020.02.20.20025874.
- [17] Yan L, Meng B, Xiang J, *et al.* Crystal structure of the post-fusion core of the Human coronavirus 229E spike protein at 1.86 resolution [J]. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2018, 74(9): 841-851.
- [18] Hristov D R, Rodriguez-Quijada C, Gomez-Marquez J, *et al.* Designing paper-based immunoassays for biomedical applications [J]. *Sensors*, 2019, 19(3): 554-578.
- [19] 周梦婕, 李小盼, 代荣阳, 等. 免疫层析试纸条检测技术的研究进展 [J]. *检验医学与临床*, 2019, 22: 3382-3386.
- [20] Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA [J]. *Peptides*, 2015, 72: 4-15.
- [21] Engvall E. The ELISA enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Clin Chem*, 2010, 56: 319-320.
- [22] 黄伟, 陈海燕. 化学发光免疫分析的研究进展 [J]. *数理医药学杂志*, 2015, 28(5): 747-748.
- [23] Wright A V, Nuñez J K, Doudna J A. Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering [J]. *Cell*, 2016, 164(1/2): 29-44.
- [24] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Lee J W, *et al.* Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438-442.
- [25] Chen J S, Ma E, Harrington L B, *et al.* CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity [J]. *Science*, 2018, 360(6387): 436-439.
- [26] Zhang F, Abudayyeh O O, Gootenberg J S. A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics [EB/OL]. (2020-02-14) [2020-03-09]. [https://www.broadinstitute.org/files/publications/special/COVID-19%20detection%20\(updated\).pdf](https://www.broadinstitute.org/files/publications/special/COVID-19%20detection%20(updated).pdf).
- [27] Lucia C, Federico P, Alejandra G C. An ultrasensitive, rapid, and portable coronavirus SARS-CoV-2 sequence detection method based on CRISPR-Cas12 [J]. *bioRxiv*, 2020, DOI: 10.1101/2020.02.29.971127.
- [28] Song K M, Lee S, Ban C. Aptamers and their Biological applications [J]. *Sensors*, 2012, 12(1): 612-631.

- [29] Nguyen V T, Seo H B, Kim B C, *et al.* Highly sensitive sandwich-type SPR based detection of whole H5Nx viruses using a pair of aptamers [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 86: 293-300.
- [30] Ahmad Raston N H, Nguyen V T, Gu M B. A new lateral flow strip assay (LFSA) using a pair of aptamers for the detection of vaspin [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 93: 21-25.
- [31] Choi J R, Hu J, Tang R, *et al.* An integrated paper-based sample-to-answer biosensor for nucleic acid testing at the point of care [J]. *Lab Chip*, 2016, 16(3): 611-621.
- [32] 万孚生物新型冠状病毒呼吸道病原体多重核酸检测卡研发成功 [EB/OL]. (2020-01-20) [2020-03-09]. <https://www.wondfo.com.cn/news-360.html>.
- [33] 创新技术助力疫情防控—上海透景研发出能现场即时检验的卡式荧光 PCR 产品 [OL]. (2020-02-02) [2020-03-09]. <http://www.caclp.cn/forum.php?mod=viewthread&tid=3171542>.