

核酸等温扩增技术在病毒检测中的应用

肖航^{1,2#}, 王小燕^{1,2#}, 邓兆佳^{1,2}, 廖文静^{1,2,3}, 谢文菁^{1,2}, 彭汉勇^{1,2}

(1. 中国科学院生态环境研究中心, 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085;

2. 中国科学院大学, 北京 100049;

3. 中国科学院大学杭州高等研究院, 环境学院, 杭州 310024)

摘要 病毒是引发人类疾病的主要病原体之一. 传统的聚合酶链式反应(PCR)技术虽然被广泛应用于病毒分子诊断, 但其对温度的要求较为严格, 限制了其在现场诊断中的应用. 为了满足现场快速诊断的需求, 核酸等温扩增技术得到快速发展, 其无需热循环, 可以在恒定温度下实现核酸扩增, 可适应不同的应用场景. 本文综合评述了等温扩增技术在病毒检测领域的最新进展, 从病毒样本采集、核酸提取、等温扩增检测等几个方面分别进行阐述, 探讨了酶辅助等温扩增技术、无酶等温扩增技术以及与多体系串联的级联扩增技术的原理、关键参数及其病毒检测应用, 并对比了市场上相关试剂盒的特点. 此外, 讨论了当前核酸等温扩增技术在病原体检测应用中面临的一些难题, 如提取效率、稳定性和成本等, 提出了未来的发展方向, 为进一步改善现场诊断效率提供了新的思路.

关键词 等温扩增技术; CRISPR 检测; 核酸扩增; 环境病毒; 病毒提取

中图分类号 Q52

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240139

Development of Nucleic Acid Isothermal Amplification Technologies for Virus Detection

XIAO Hang^{1,2#}, WANG Xiaoyan^{1,2#}, DENG Zhaojia^{1,2}, LIAO Wenjing^{1,2,3},
XIE Wenjing^{1,2}, PENG Hanyong^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology,
Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. School of Environment, Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences,
Hangzhou 310013, China)

Abstract Viruses play a significant role in causing human diseases, and traditional PCR techniques have been widely used for their molecular diagnosis. However, the temperature requirements of PCR limit its application in field diagnostics. To address the need for rapid on-site diagnosis, isothermal nucleic acid amplification technologies have emerged as a promising alternative. These technologies enable nucleic acid amplification at a constant temperature without the need for thermal cycling, making them more adaptable for different diagnostic settings. This comprehensive review examines the latest advancements in isothermal amplification technologies for virus detection. It covers various aspects, including viral sample collection, nucleic acid extraction, and isothermal amplification detection.

收稿日期: 2024-03-25. 网络首发日期: 2024-05-15.

联系人简介: 彭汉勇, 男, 博士, 研究员, 主要从事环境分析化学方面的研究. E-mail: hypeng@ceees.ac.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 22276199)、国家重点研发计划项目(批准号: 2022YFC3701302, 2023YFA0915102)和中国科学院先导专项(批准号: XDB0750100)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.22276199), the National Key Research and Development Program of China (Nos.2022YFC3701302, 2023YFA0915102) and the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences(No.XDB0750100).

共同第一作者.

The review explores the principles, key parameters, and applications of enzyme-assisted isothermal amplification, enzyme-free isothermal amplification, and cascade amplification techniques integrated with multiple systems. Furthermore, a comparison of commercially available reagent kits is provided to highlight their respective characteristics. Additionally, the review discusses the current challenges faced by isothermal nucleic acid amplification technologies in pathogen detection, such as extraction efficiency, stability, and cost, and proposes future directions to enhance the on-site diagnostic efficacy of these technologies.

Keywords Isothermal amplification technology; CRISPR assay; Nucleic acid amplification; Environmental viruses; Virus detection

早期诊断对于迅速溯源与控制病毒传播至关重要。在众多分子诊断技术中,基于核酸的方法更适用于快速、灵敏的早期诊断^[1,2]。其中,聚合酶链式反应(PCR)作为核酸分子诊断的金标准,在早期病毒诊断中有重要作用^[3-5]。然而,PCR对温度的要求比较严苛,需要昂贵的仪器设备与专业人员,不利于现场诊断工具的开发。为了简化对控温设备的需求,基于核酸等温扩增技术的分子诊断方法得到快速发展,如环介导等温扩增(LAMP)、重组酶聚合酶扩增(RPA)、指数扩增反应(EXPAR)、催化发夹自组装(CHA)和杂交链式反应(HCR)等,均可在恒定温度下进行扩增反应,无需热循环,更适用于现场快速诊断。为了提高检测方法的灵敏度与特异性,尤其是针对低拷贝数核酸,通常需要将多个核酸扩增体系串联,开发级联扩增体系^[6]。本文综合评述了目前病毒核酸诊断所面临的主要问题,以SARS-CoV-2病毒为主要对象,探讨了病毒RNA样本采集、提取以及检测的关键限制因素,重点讨论了几种主要的等温扩增技术及其病毒检测应用,为开发高灵敏度、高特异性的现场诊断工具提供了新思路。

1 病毒核酸样本采集和前处理

1.1 病毒样本采集

人体样本的病毒载量与采样部位相关,如支气管肺泡灌洗液、纤维支气管镜刷活检、痰、鼻拭子、咽拭子、粪便、血液及尿液等。在SARS-CoV-2病毒检测中,支气管肺泡灌洗液的阳性率最高(93%),其次是痰(72%)、鼻拭子(63%)、纤维支气管镜刷活检(46%)、咽拭子(32%)、粪便(29%)和血液(1%)^[7]。相对而言,采集鼻咽拭子样本对人体损害较小,因此世界卫生组织(WHO)建议门诊患者使用鼻拭子、咽拭子或气管内冲洗液作为上呼吸道样本^[8]。痰液、气管内吸出物和支气管肺泡灌洗液属于下呼吸道样本。使用涤纶或聚酯棉签收集鼻咽和口咽样本,或使用无菌容器收集鼻咽和口咽冲洗液、痰、气管内吸出物和支气管肺泡灌洗液。在测试前,样本应在2~8 °C下运输和储存。鼻或咽冲洗液、痰液、气管内抽吸和支气管肺泡灌洗液的最长保存时间为2 d,鼻和咽拭子、血清和全血的最长保存时间为5 d,超过建议时间的样本应在-70 °C环境下保存。由于采集过程中需要与患者密切接触,且在采样过程中可能刺激呼吸道,引起患者打喷嚏或咳嗽,所产生的气溶胶增加了医护人员的感染风险。

对于气溶胶样本,气溶胶采样器通常利用离心力、惯性等各种物理机制从气流中分离颗粒^[9]。最常用的空气采样器有过滤器、冲击器、旋风分离器、撞击器和水基冷凝采集器^[10-13]。冲击器和旋风分离器有助于收集不同粒径的颗粒以研究靶标病毒在不同粒径上的分布情况^[14],但病毒颗粒以高速冲击到固体收集介质上容易破坏完整性,对后续检测产生不良影响。液体冲击器和水基冷凝采样器以水溶液作为收集介质,不仅可以保持病毒的活力以便进行后续感染性分析,而且省去了病毒从固体收集介质中解吸和释放到保存液或预处理液的过程^[15]。但另一方面,以液体为收集介质的采样器在同样时间内的收集速率和采样体积均低于部分固体基质采样器,如旋风分离器和撞击器。气溶胶过滤器因其可调节的孔径,可通过拦截、惯性撞击和扩散来采集不同粒径范围的颗粒,但过滤步骤可能使病毒脱水,洗脱过程也存在病毒灭活的风险。因此,如果不进行病毒活力测试,具有经济效益且操作简便的气溶胶过滤器是理想的采样选择^[16,17]。

固体表面病毒样本采集主要分为两种应用场景,一是人类在日常生活中频繁接触或使用的环境表

面；二是冷冻储存和运输的食源性表面。低温为病毒的生存和长距离传播提供了适宜的环境^[18]。对于环境表面采样，通常使用预浸有PBS或甘氨酸缓冲液的无菌棉签或拭子(植绒尼龙、棉绒、微纤维和聚酯)进行擦拭^[19]，采样面积根据采样目的和样本类型适当调整，WHO建议采样区域为25 cm²。但考虑到病毒通常以痕量水平不均匀地分布在物体表面，且每次人工采样的面积有限，因此优先选取复合样本以避免漏检。如，对于冷链食品的采样，可选择冰融水、包装袋浸泡液或生鲜食品表面提取物作为复合样本，这种方法可以替代传统的表面采样，更全面地反映被检食物的整体污染情况^[20]。

此外，废水中的病毒监测是区域内对病毒感染程度进行预警的有力手段，可在排便频繁期间在污水处理厂进水口或城市污水管网上游域采样^[21,22]。废水中通常含有大量不溶性杂质、各类有机物以及其它溶解成分，通过离心、过滤和沉降可去除悬浮固体和碎片^[23]。预处理后对废水样本的正式浓缩是后续成功核酸提取和检测的关键步骤，大致可分为两类，一类是添加化学试剂的物理化学方法，另一类是纯物理方法^[24]。聚乙二醇(PEG)沉淀是浓缩病毒最常用的方法之一。较大分子量的PEG通常更利于病毒沉淀，但也可能导致液体黏稠，增大处理过程的操作难度^[25]。因此，根据病毒类型选择合适分子量的PEG至关重要。此外，PEG常与高浓度盐、葡聚糖等其它化学试剂结合，以提高病毒浓缩效率^[26]。铝基絮凝和脱脂乳絮凝也常被用于废水中病毒浓缩，其成本低，更适合处理大体积废水样本和固液混合样本。纯物理方法不添加任何化学试剂，完全依靠各种物理步骤(如离心、过滤、静电吸附)来实现高效的病毒浓缩。荷电滤膜可通过静电吸附收集废水中的病毒，该方法适用于无大量沉积物的小体积废水^[27-29]。含有污泥的废水样本则通常采用离心法实现两相分离^[30]。此外，基于尺寸排阻的超滤常用于处理上层清液样品^[31]。

2 病毒核酸提取

核酸提取是病毒检测的关键步骤，但无论是临床样本还是环境样本，都含有复杂的样品基质，且基因组被包裹在病毒粒子的核衣壳内。因此，检测样本中病毒的第一步是将核酸从病毒中释放，并高效提取病毒核酸分子。与传统免疫检测相比，核酸诊断方法更依赖于样品前处理步骤，去除样品中复杂基质成分，避免对后续扩增检测产生干扰。由于基质中的核酸酶(RNase)易引起RNA降解，不规范的RNA提取方法和操作环境会造成病毒RNA的丢失或降解，从而影响诊断灵敏度^[32]。近年来，核酸提取方法主要基于物理提取法(冷冻研磨法、煮沸法等)^[33]、裂解法[碱性提取法、苯酚-氯仿抽提法、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法和胍盐裂解法等]^[34,35]和固相提取法(磁珠法、二氧化硅法和离心柱法等)^[36-39]。在这些基础方法的改进之上，又开发了一系列核酸提取试剂盒和自动化核酸提取系统^[40,41]。

目前，市面上通常采用有机溶剂^[42]、阴离子交换树脂^[43]、磁珠和旋转柱等提取病毒RNA^[44]。有机溶剂法往往利用苯酚-胍-异硫氰酸酯(GITC)或硫氰酸胍-苯酚-氯仿提取RNA。其中，苯酚-胍-异硫氰酸酯(GITC)提取法是一种有机萃取方法，它能够快速使核糖核酸酶(RNases)变性并稳定RNA^[45]。但这种提取方法人工需求量大、耗时且需要使用苛性GITC试剂。此外，残留的盐和有机溶剂也会污染提取的RNA，并且二价阳离子等污染物可能会抑制后续的逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)步骤。硫氰酸胍-苯酚-氯仿提取法是一种高效的单步核酸提取方法，通过将样本直接与试剂(包括醋酸钠、苯酚和氯仿-异戊醇)混合并进行振荡处理。在此过程中，RNA会留在水相，而DNA和蛋白质则被捕获在相间层或苯酚相中。随后，将含有RNA的水相转移到新的试管中，并通过异丙醇沉淀处理来收集RNA^[46]。这种方法能够获取高产量的RNA，并且RNA不易被降解。然而，该方法使用的试剂对操作人员具有一定的危害。与之相比，采用磁性粒子和旋转柱去除有机溶剂和污染物来纯化RNA的方法更为简单且易于自动化，这使其有望被应用于现场快速诊断。目前，已经有多种RNA提取/纯化机器人和试剂盒被开发出来，其中一些已经获得美国疾病控制与预防中心(CDC)的推荐^[32,47]。Ambrosi等^[48]比较了Qiam DSP Virus Spin Kit, Total RNA Purification Kit, Viral Nucleic Acid (DNA/RNA) Extraction Kit和EXTRAzol等4种RNA提取试剂盒的性能，发现这4种方法均能有效提取RNA。但是，与前两种试剂盒相比，Viral Nucleic Acid (DNA/RNA) Extraction Kit的性能较低，而EXTRAzol在病毒载量较低时的提取效率较低，

因此在使用时需要格外注意。

为了降低提取过程中可能产生的污染、简化步骤和缩短周期,同时降低对昂贵核酸提取试剂盒的依赖,免提取病毒检测成为重要的发展方向^[49,50]。Wei等^[51]开发了一种无需RNA提取,直接检测SARS-CoV-2病毒的逆转录环介导等温扩增(Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)方法,仅需加热样品和圆珠敲击的机械裂解,便可释放出病毒RNA。Myhrvold等^[52]开发了一种快速核酸提取方法——HUDSON,对未经提取的样本进行加热和化学还原处理,可有效消除RNase并释放RNA。使用HUDSON处理过的生物样本,如尿液、全血(WB)和唾液,可以直接进行后续扩增反应,而不需要稀释或纯化。Baiker团队^[53]将咽拭子在90 °C下加热5 min后,直接用于SARS-CoV-2病毒RNA的检测,而无需RNA提取和纯化步骤。同时,采用专业的POCT仪器“Genie II”检测荧光信号输出,整个过程仅需35 min,比传统RT-PCR反应快12倍且便宜10倍。此外,将病原体预处理和等温扩增步骤整合到微流控芯片上,实现小型化和一体化检测,也能够避免多步骤核酸提取和纯化所带来的污染与检测时间长的问题^[54],该技术已被应用于尿液中沙眼衣原体的直接检测^[55]。

3 核酸等温扩增技术

基于DNA动态纳米技术的核酸等温扩增技术无需温度循环,从而避免了对昂贵热循环仪器和专业技术人员的依赖。该技术对PCR抑制剂具有耐受性,适合现场对样本进行直接分析,为快速且高成本效益的病毒核酸检测提供了新的可能。按照参与反应的成分可以分为酶辅助核酸等温扩增技术和无酶核酸等温扩增技术。

3.1 酶辅助核酸等温扩增技术

在病毒核酸检测中,最广泛使用的酶辅助核酸等温扩增技术包括环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[56]、重组酶聚合酶扩增(Recombinase polymerase amplification, RPA)^[57]和指数扩增反应(Exponential amplification reaction, EXPAR)^[58]等。

LAMP技术由Notomi等^[56]首次开发出来,其在60~65 °C下进行,需要两组以上的引物集来识别目标基因的6个不同位点,主要包括正向和反向外引物、正向和反向内引物以及环状底物链模板^[59]。LAMP技术检测扩增产物的方法分为非序列依赖性和序列依赖性两大类^[60]。非序列依赖性方法并不直接检测扩增的序列,而是通过观察扩增过程中产生的副产物来实现扩增结果的可视化,如通过检测反应中形成的焦磷酸镁沉淀引起的浊度变化,或者加入金属离子指示剂(如钙蛋白、羟基萘酚蓝)或pH指示剂,从而获得荧光或比色信号^[61]。而序列依赖性方法则直接对扩增后的序列进行识别,通过凝胶电泳、横向流动免疫层析、电化学传感器和荧光染料等方式特异性地识别扩增产物,以产生可视化的信号输出^[62-64]。

Shen等^[62]提出了一种微流控设备“SlipChip”,用于定量检测SARS-CoV-2。该方法通过一对微流体的相对运动来操纵流体,从而形成相互隔离的LAMP反应微液滴腔室,但该设备依赖于不同板上微阵列的精确对齐,操作耗时且难以进一步增加反应腔室总数和密度。随后,他们开发了一种仅通过简单滑动就能形成高密度液滴微阵列的设备“da-SlipChip”,无需进行复杂的对齐步骤^[63]。同时,该方法提供了更高密度的微液滴腔室,显著提高了数字等温扩增技术用于病毒核酸检测的灵敏度,并减少了分析的总等待时间,能够在30 min内检测到最低30个RNA拷贝的信号。为了克服LAMP扩增因高效率而导致的假阳性问题,Suhaimi等^[61]通过移除一种环引物(前向环引物),从而减少了引物之间的非特异性结合,降低了LAMP扩增的假阳性率。同时对反应条件进行了优化,如增加酶的浓度或加入引物结合增强剂,以补偿减少一个引物所导致的扩增速率下降。该方法的检出限为20 copy/ μL ,比色和荧光的检出率为89.5%和92.2%,特异性为97.2%和99%。为了进一步提高LAMP的检测灵敏度,Wang等^[64]开发了一种基于LAMP的一次性电化学传感器芯片,用于非洲猪瘟病毒(ASFV)检测(图1)。该一次性电化学传感器芯片由覆盖聚二甲基硅氧烷膜的丝网印刷电极制备,并将根据病毒设计的引物固定在金纳米颗粒改性的电极上,实现了LAMP反应在电极表面的原位放大。ASFV p54序列能够在

42 min 内被有效检出, 检测范围为 $1.0 \times 10^{-12} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ g/L, 检出限为 3.0×10^{-13} g/L (0.48 copy/ μ L).

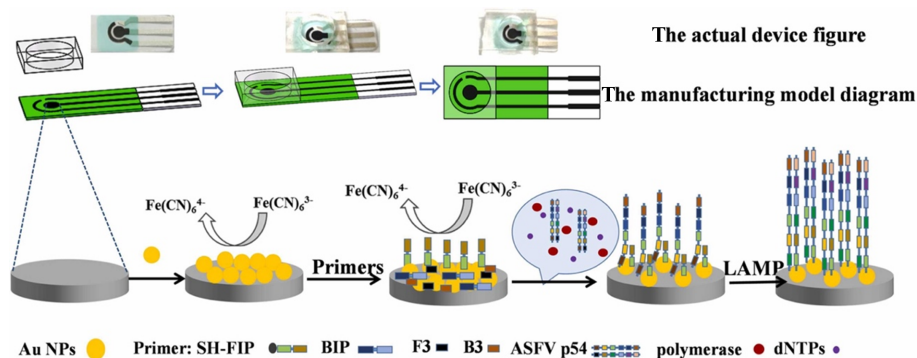


Fig. 1 Schematic diagram of LAMP-based electrochemical sensing chip for African swine fever virus detection^[64]

Copyright 2023, Elsevier.

RPA 可以在 $37 \sim 42$ °C 下进行^[57], 扩增性能与 PCR 相当, 能够满足单拷贝检测^[65]. RPA 用于病毒核酸检测时, 常与可视化检测手段相结合, 如横向侧流免疫分析、凝胶电泳和 UV 响应的荧光探针等. Wu 等^[66]利用琼脂糖凝胶电泳对 RPA 产物进行可视化呈现, 实现了同时对玉米褪绿斑驳病毒 (MCMV) 和甘蔗花叶病毒 (SCMV) 的等温检测, 检出限为 100 copy/ μ L. Khater 等^[67]开发了一种用于检测柑橘衰退病毒 (Citrus tristeza virus, CTV) 的原位 RPA 扩增方法 [图 2(A)]. 这一方法利用金纳米颗粒修饰的传感器和硫醇化 RPA 引物, 在目标序列存在时直接在金电极表面进行扩增. 通过电化学阻抗谱技术进行信号检测, 实现了对 CTV 核酸的定量分析, 检出限达到 1000 fg/ μ L. Wang 等^[68]利用 RPA 技术的高扩增效率及对抑制剂的耐受性, 与特异性核酸酶 *PfAgo* 结合, 开发出一种针对 SARS-CoV-2 关键突变位点 L452E 的快速基因分型方法. 这种方法依赖于 *PfAgo* 酶被 5'-磷酸化的单链 gDNA 激活后的特异性识别和切割能力. 当 *PfAgo* 酶识别到 RPA 扩增产物中的目标序列时, 会发生特异性切割, 生成新的 5'-磷酸化的 DNA 单链 [图 2(B)]. 这一过程会触发第二次切割, 裂解 DNA 分子信标并产生可检测的荧光信号. 这种方法不仅提高了检测的特异性, 还能够快速准确地识别出病毒的关键突变, 对于疾病的诊断和病原体的追踪具有重要意义.

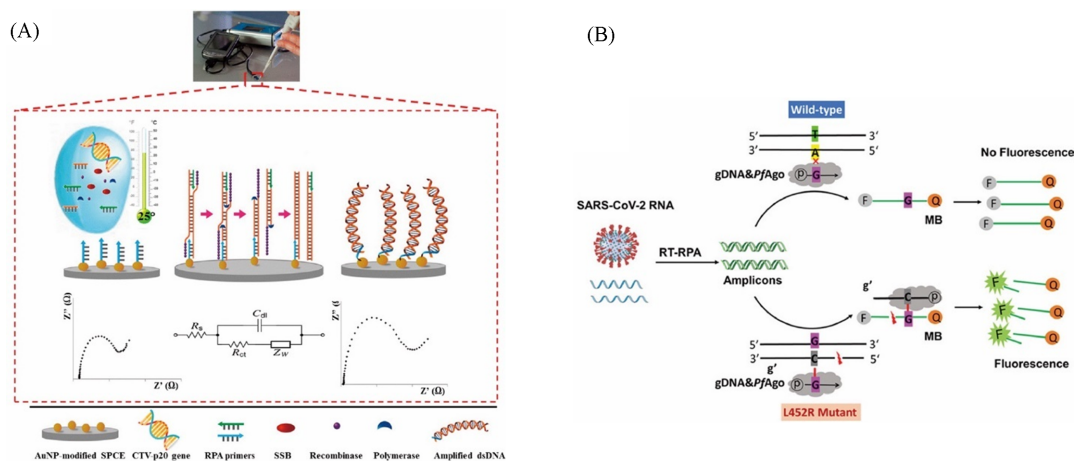


Fig. 2 RPA-based virus detection method

(A) Label-free *in situ* isothermal RPA amplification in electrochemical sensors^[67]. Copyright 2019, American Chemical Society;

(B) fluorescence detection of RT-RPA incorporated *PfAgo* enzyme^[68]. Copyright 2022, American Chemical Society.

指数扩增反应 (EXPAR) 是一种独特的等温扩增方法, 将待扩增的短寡核苷酸作为引物进行指数级扩增^[69]. 在 EXPAR 扩增过程中, 目标序列作为触发器, 与模板结合并被 DNA 聚合酶延伸 (反应温度为 60 °C), 形成双链 DNA. 随后, 特定的切口核酸内切酶识别并切割双链中的一条链, 释放一段新的触发

器序列, 该序列又可与另一个模板结合, 启动新一轮扩增反应. 由于每一轮都会生成新的触发器序列, 因此扩增产物呈指数级增长.

在检测病毒 RNA 时, 通常需要逆转录步骤, 而 Dafforn 等^[70]开发了一种无需逆转录步骤的 EXPAR 等温扩增方法, 可以在 10 min 内准确识别 SARS-CoV-2 RNA [图 3(A)]. 该方法的关键在于利用异源双链切口酶(Heteroduplex nicking enzyme)直接识别并剪切 DNA 触发链与 RNA 靶标的异源双链, 从而选择性裂解产生一条短的 DNA 触发链, 随后触发下游 EXPAR 扩增反应, 最后通过荧光染料 SYBR Green 产生信号输出, 检出限低至 7.25 copy/ μ L. 尽管 EXPAR 在模板的 3' 羟基末端修饰了磷酸基团作为阻断剂, 以防止模板分子间互为引物, 但在 EXPAR 过程中仍可能发生非特异性扩增. 针对该问题, Zou 等^[71]设计了一种基于结构可切换的发夹模板的新型等温指数扩增反应(SPEXPAR), 并将其用于典型猪瘟病毒(CSFV)RNA 和凝血酶特征序列检测[图 3(B)]. 该方法无需外源引物探针, 当目标序列存在时, 发夹模板结构改变, 并激活目标链参与循环的 EXPAR 扩增, 通过荧光信号显示检测结果, 其对猪瘟病毒 RNA 的检出限为 43 amol/L.

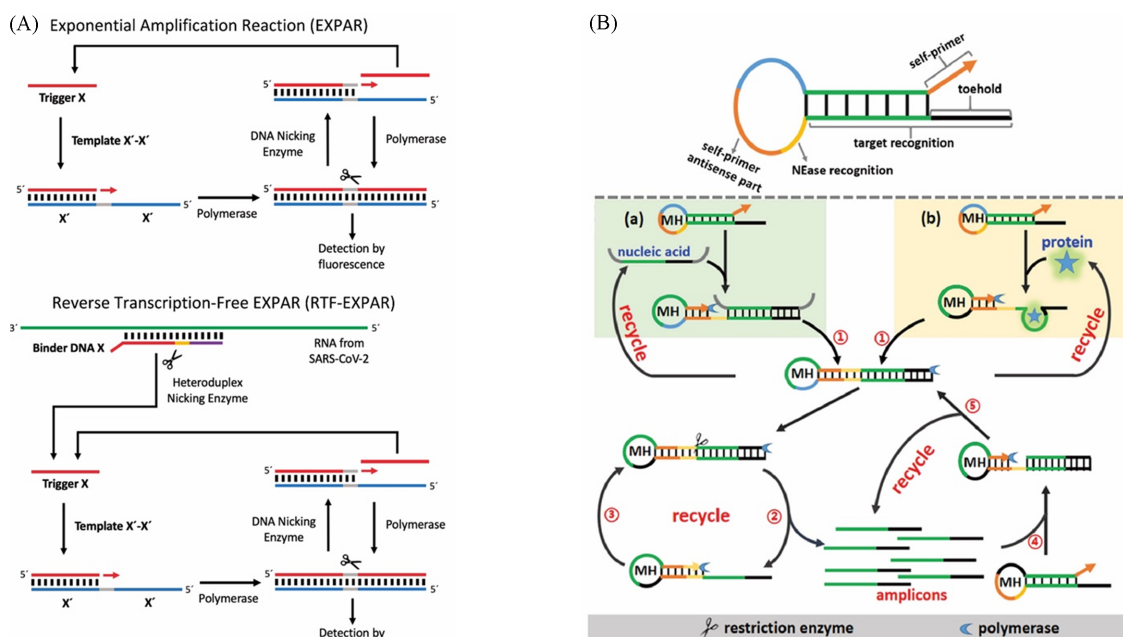


Fig. 3 EXPAR-based virus detection method

(A) Reverse transcription-free EXPAR^[70]. Copyright 2021, National Academy of Sciences; (B) Self-prime EXPAR^[71]. Copyright 2021, American Chemical Society.

除了传统的等温扩增技术外, 核酸序列扩增(NASBA)、链置换扩增(SDA)、滚环扩增(RCA)和解旋酶依赖扩增(HDA)等方法也被应用于病毒核酸检测. NASBA是一种模仿逆转录病毒 RNA 复制的等温扩增方法, 需要逆转录酶、RNase H 和 T7 RNA 聚合酶等 3 种酶^[72]. 然而, NASBA 在病毒检测中存在一些局限性, 如优化 3 种不同酶可能导致成本增加及易产生假阳性信号, 因此需要额外的探针特异性检测方法^[73]. SDA 利用引物和酶的链位移能力来扩增目标序列, 但容易在低温下发生非特异扩增, 并且检测时间较长, 不适合现场放大和检测^[74]. 尽管改进的 SDA 方法, 如 AMC-SDA 技术, 利用特殊的分子对齐器克服了对目标 DNA 特定序列的要求, 提高了病毒 RNA 的检测灵敏度, 但该方法仅限于实验室中的假病毒, 还需要在真实临床样本中验证其性能^[75]. RCA 在检测 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 等病毒方面展现出与 PCR 性能相当的扩增能力, 极具应用潜力, 但需环状模板链进行延伸, 通常要进行多步操作^[76-78]. HDA 是一种利用解旋酶进行 DNA 扩增的简单等温技术, 其降低了反应和分析的复杂性, 减少了样品制备步骤^[78]. 商业试剂盒如 Solana[®]^[79] 和 AmpliVue^[80] 均基于 HDA 技术, 可用于病原体检测, 无需样品制备步骤. 然而, HDA 常常面临引物二聚体和非特异性扩增的风险, 影响了其在病毒检测领域的广泛应用^[81]. 综上所述, 这些扩增方法在病毒核酸检测中都有各自的优缺点和局限性, 需要进一步

的研究和改进,以提高其特异性、灵敏度和适用性,从而满足不同病毒序列的检测需求.

3.2 无酶核酸等温扩增技术

在酶辅助的核酸等温扩增技术中,各类工程酶的生产成本相对较高,而且检测试剂的储存和运输存在巨大的挑战.因此,无酶核酸等温扩增技术的出现具有重要意义.它基于DNA动态技术,尤其是DNA链置换反应,并已开发出多种无酶核酸等温扩增技术,其中常用于病毒核酸检测的策略包括催化发夹自组装(Catalytic hairpin assembly, CHA)^[82]、杂交链式反应(Hybridization chain reaction, HCR)^[83]和熵驱动催化(Entropy-driven catalysis, EDC)^[84].这些创新技术为病毒核酸检测领域带来了新的可能性,可以克服酶辅助技术的成本和储存运输难题,为快速、便捷、低成本的现场检测提供了新的选择.

CHA作为一种基于DNA发夹结构的核酸等温扩增技术,在病毒核酸检测领域得到广泛应用^[85].CHA依赖于两种预先设计的DNA发夹探针,在目标序列出现时能够特异性地结合到发夹A的一部分序列上,促使结构打开,使得发夹A的另一部分序列暴露出来.这段新产生的序列进一步与发夹B的互补序列发生相互作用,并释放目标序列,使其参与下一个循环,从而连续生成大量的信号分子^[82,86].这种循环放大机制使CHA扩增技术具有对低丰度目标序列的高灵敏检测能力,并且可以通过改变探针的序列和结构来适应不同的检测目标和形式.如,Wu等^[87]开发了一种用于检测口咽拭子样本中SARS-CoV-2的CHA-侧流免疫分析(LFIA)方法[图4(A)].该方法通过目标RNA序列触发CHA反应,

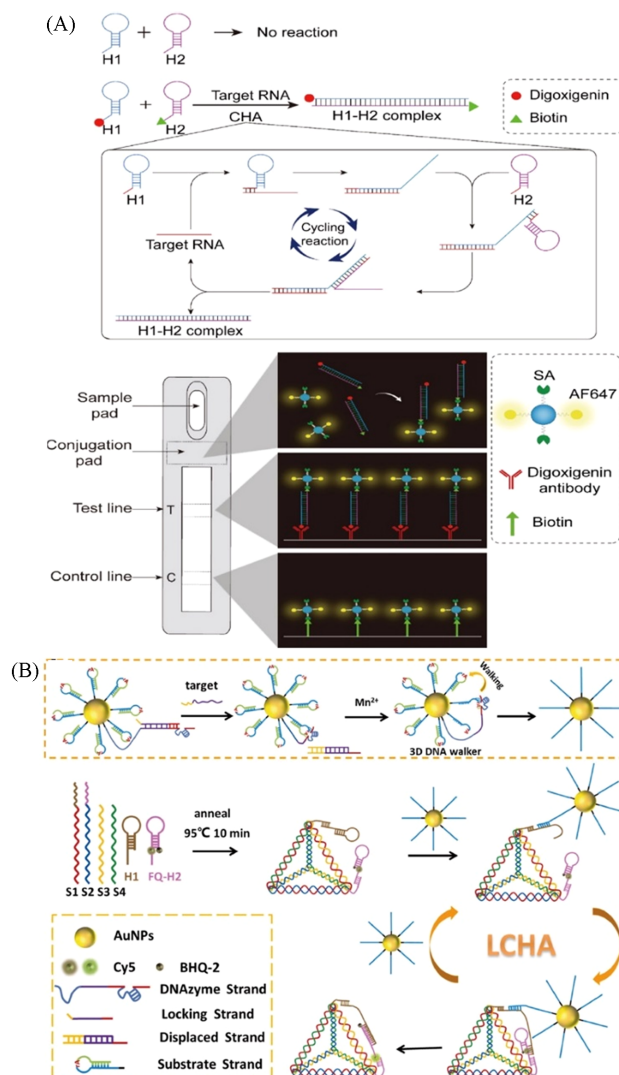


Fig. 4 CHA-based virus detection method

(A) CHA-Lateral flow immunoassay^[87]. Copyright 2021, Elsevier; (B) LCHA-DNA walker fluorescence biosensor^[88]. Copyright 2022, Elsevier.

生成两端分别修饰有地高辛和生物素的DNA双链产物,与标记荧光和链酶亲和素的聚乙烯纳米颗粒混合,其中链酶亲和素与生物素结合,促使DNA双链产物一端修饰到纳米颗粒表面.随后混合物被加入到侧流免疫分析试纸中,被标记有抗地高辛的测试线捕获.而未修饰DNA双链的聚乙烯纳米颗粒则继续向控制线迁移并被生物素捕获,最终通过荧光检测设备量化荧光强度.该方法避免了RNA分离、PCR扩增和复杂的结果分析,因此在90 min内即可实现从鼻咽采样到获得测试结果,且其检出限为2 copy/ μL .

为了进一步提高CHA反应用于病毒核酸检测的速率和灵敏度,Wang等^[88]提出了一种结合局部CHA策略和DNA步行器的荧光生物传感器,用于快速检测寨卡病毒(Zika virus, ZIKV).该方法通过在纳米金颗粒上构建DNA步行器和在DNA四面体上固定CHA反应,显著提升了CHA反应在病毒检测中的灵敏度[图4(B)].首先,由金纳米颗粒构建的DNA步行器在添加寨卡病毒RNA后被激活,开始沿着DNA发夹探针(作为路径)移动.每当DNA步行器“走过”一个发夹探针,就会切割探针并释放出一条触发序列.这些触发序列随后启动第二个阶段,在DNA四面体结构上发生CHA反应,即局部CHA反应.局部CHA反应通过连续的发夹打开,大量释放带有荧光标记的DNA片段,从而产生放大的荧光信号.由于DNA步行器的级联和局部浓度的提高,该方法能够在2 h内实现ZIKV病毒浓度在50 pmol/L~200 nmol/L的线性范围检测,检出限为20 pmol/L.

HCR由Dirks和Pierce^[83]在2004年首次提出,该策略也是基于DNA发夹单体暴露于目标片段后的自组装反应.经典的HCR反应用于核酸等温扩增时,常将待测目标链作为HCR反应体系的触发链,结合相应的信号系统(荧光、电化学或比色法)作为最终输出,并且其原位反应和低背景泄漏显著提高了检测灵敏度.如,Ju等^[89]开发了一种多功能电化学生物传感策略,通过将杂交链式反应(HCR)固定在电极表面实现电化学信号产生,从而用于登革热病毒(DENV)核酸的高灵敏检测.此方法中,首先目标病毒DNA序列释放出启动链,该启动链随后触发电极上修饰的捕获DNA进行HCR反应,形成含生物素的树枝状DNA纳米结构,为辣根过氧化物酶(HRP)标记的亲合素提供结合位点.在添加底物后,这些结构产生的电流信号实现了对DENV的超灵敏检测,检测范围为1.6~1000 pmol/L,检出限达到188 fmol/L,并能区分单碱基突变.通过调整启动链的识别序列,此方法还能扩展到不同DENV核酸片段的检测,显示出优良的可扩展性.Lee等^[90]开发了一种HCR与亲和柱色谱结合的新型诊断系统,用于非洲猪瘟病毒(ASFV)的光学检测(图5).该系统采用磁性颗粒表面发生HCR反应,组装成DNA长链聚合物,改变磁性颗粒表面性质或引入亲和基团,然后引入表面修饰的凝胶柱中进行分离,通过观察分离后通道中磁球颜色变化即可定量分析目标核酸.该检测系统在室温下仅需30 min,即可在猪血清样本中检测出ASFV全基因组中的5个关键基因,检出限为19.8 pmol/L.与之前报道的检测系统相比,该系统采用的HCR反应的靶标序列更长,有效减少了由于非特异性聚合而产生的假阳性信号.

此外,另一种经典的无酶核酸等温扩增技术——熵驱动催化(EDC)也被用于病毒检测.该技术主要通过反应成分的构象熵变化来实现催化循环,与CHA或HCR技术不同,EDC不依赖于反应焓的变化.因此,EDC扩增技术降低了对环境因素(金属盐浓度或pH值等)的依赖性,在等温扩增时更稳定可靠.然而,EDC技术的扩增效率较低,尤其在检测低丰度病毒核酸时,通常需要配合灵敏的输出系统,如电化学发光系统^[84,91,92]或者CRISPR-Cas系统^[92].Zhang等^[91]构建了一种EDC扩增耦合电化学发光生物传感器,通过DNA四面体结构来提高电极上EDC扩增的效率,用于SARS-CoV-2中一个关键基因(RdRp基因)的检测.检测过程中,一个特定的DNA序列(称为S3探针)被修改,以便能够与RdRp基因特异性结合.这个S3探针被附着在含有钌(Ru)的化学发光物质上.当S3探针通过熵驱动的反应与目标RdRp基因结合时,会引发一系列的分子重排,最终导致Ru发光物质靠近电极表面并发出光信号^[91].

综上,等温扩增技术的扩增效率高,达到 10^9 ,与PCR性能相当,而且所需时间短,适用于构建快速检测方法,在核酸分子诊断中得到广泛应用.表1从反应体系所需酶数量、反应温度、时间及扩增效率等方面对比了不同方法的性能.

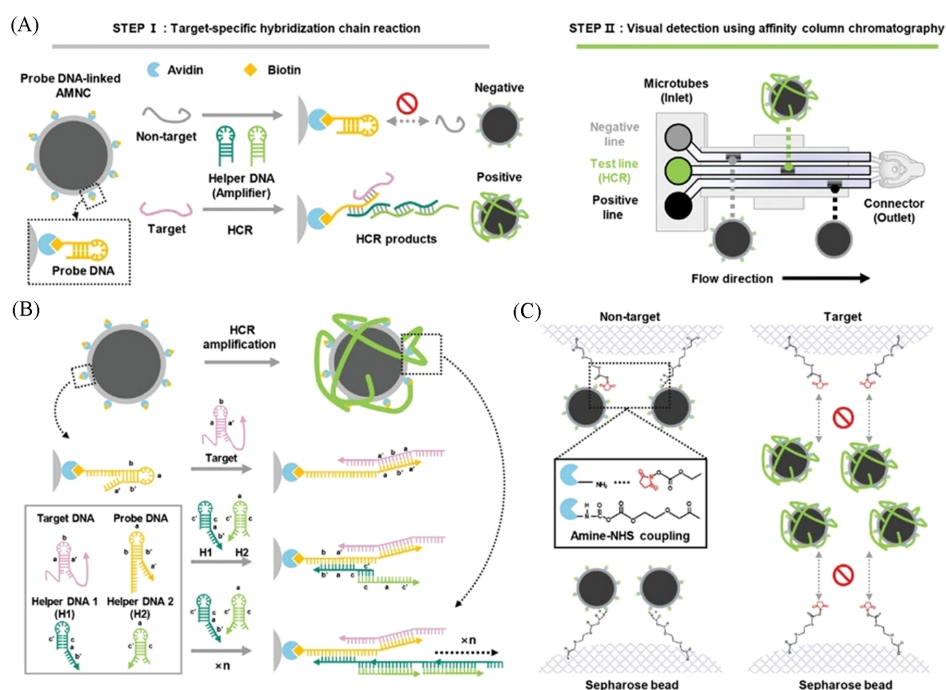


Fig. 5 Schematic illustration of HCR-based enzyme-free chromatography system for visual detection of ASFV^[90]

Copyright 2023, John Wiley and Sons.

Table 1 Summary of isothermal amplification methods

| Method | Enzymes | Temperature/°C | Reaction time/h | Efficiency | Ref. |
|--------|---------|----------------|-----------------|----------------------------------|------|
| NASBA | 2 | ca. 41 | 1.5—2 | 10 ⁶ —10 ⁹ | [73] |
| RCA | 2 | 60—65 | 1—3 | 10 ³ —10 ⁹ | [76] |
| SDA | 2 | 37—70 | 2 | 10 ⁷ | [74] |
| LAMP | 1 | 60—65 | 1—2 | 10 ⁷ —10 ⁹ | [56] |
| HDA | 2 | 37—65 | 0.5—2 | 10 ⁶ | [80] |
| RPA | 3 | 37—42 | 0.5—1.5 | 10 ⁷ —10 ⁹ | [57] |
| EXPAR | 2 | 60 | <0.5 | 10 ⁶ —10 ⁸ | [58] |
| CHA | — | 25—37 | 1 | 7000 (two layers) | [85] |
| HCR | — | 25—37 | — | — | [83] |
| EDC | — | 25—37 | 1 | — | [84] |

3.3 CRISPR-Cas等温级联扩增技术

基于常回文重复序列丛集(CRISPR)的诊断技术是源于细菌和古菌免疫系统中CRISPR和CRISPR相关蛋白酶的发现,CRISPR和CRISPR蛋白酶可以保护生物体免受病毒和质粒的入侵,在基因编辑和病毒检测中发挥重要作用^[93].Cas酶(Cas9^[94],Cas10^[95],Cas12a^[96],Cas12b^[97],Cas13a^[98],Cas13b^[99]和Cas14^[100])在CRISPR技术中发挥着关键作用,其中Cas9,Cas12a,Cas12b和Cas14靶向DNA,Cas10,Cas13a和Cas13b靶向ssRNA.工作原理如下:通过逆转录的方式获得所需互补DNA(cDNA),然后通过等温扩增获得核酸扩增产物(扩增子),CRISPR RNA(crRNA)引导Cas蛋白靶向特定的核酸序列,其单链区域与靶点互补,随后进行特异性切割并触发非序列特异性核酸酶活性,使得Cas酶切割荧光基团和猝灭剂标记的DNA或RNA进而发出荧光以供后续检测^[101].Cas12的靶向序列(约17nt)紧邻原间隔子邻近基序(PAM)(如5'-TTTV),PAM促进了dsDNA靶标的解旋,并使得crRNA与DNA靶标结合,该结合诱导Cas12的构象变化并激活其附带的切割活性以不加区别地切割任何ssDNA.而以ssRNA为靶点的Cas13蛋白无需PAM序列,其对目标序列3'端附近的首个核苷酸有一定偏好(约28nt)^[96,102].成功识别后,Cas13将非特异性地切割ssRNA^[97].

Cas12a 能够特异性识别 DNA 双链, 常常被用于识别等温扩增产物, 进行核酸序列识别及信号放大. 如, Zhang 等^[103]将 CHA 反应设置在级联系统的上游, 而 CRISPR-Cas12a 检测模块则位于下游. 首先利用 SARS-CoV-2 的 RNA 打开发夹 1, 形成双链 DNA-RNA 结构, 然后双链特异性核酶(DSN)针对 DNA-RNA 双链部分进行切割, 而保留单链 DNA 不受影响, 从而释放出可启动 CHA 反应的单链激活序列. 随后, 在激活序列的引导下, 发夹 2 与发夹 3 发生 CHA 反应, 生成含 PAM 区域的 DNA 双链产物, 激活 Cas12a 酶, 进而非特异性切割 DNA 探针, 实现电化学发光信号的恢复. 该方法实现了最低浓度 0.67 fmol/L 的 SARS-CoV-2 RNA 检出. Yigit 等^[104]则将 CRISPR 模块设置在上游, HCR 反应置于级联体系的下游. 在该体系中, Cas12a 酶直接识别病毒的双链 DNA, 用于激活 Cas12a 的非特异性切割功能, 从而释放出能够触发 HCR 反应的 DNA 单链片段. 随着 HCR 反应的推进, 扩增产物逐步积累至可检测的程度, 最后通过凝胶电泳技术定量分析 HCR 产物, 实现了低至 1.5 fmol 的靶标序列检测[图 6(A)]. Li 等^[105]借助 Cas12a 被激活后对 HCR 触发链的裂解能力, 构建了一种 CRISPR-HCR 级联扩增技术. 在此技术中, 若体系内存在病毒 DNA, 则会激活 Cas12a 的非特异性切割活性, 从而切割 HCR 反应的触发链, 阻止 HCR 扩增的发生; 反之, 若体系内无病毒 DNA, 则 HCR 反应顺利进行, 触发显著的信号扩增, 达到 amol/L 级别的检测灵敏度.

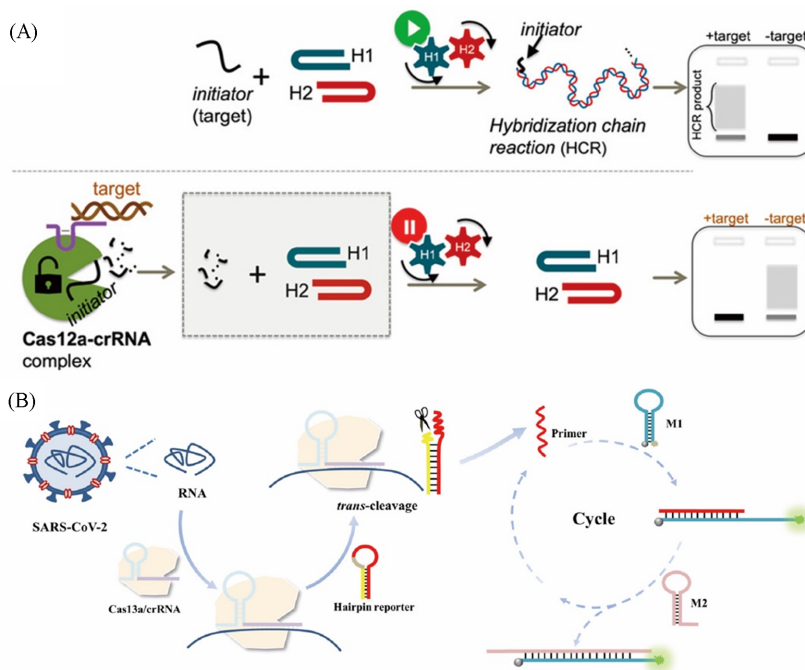


Fig. 6 Enzyme-free nucleic acid isothermal amplification and CRISPR-Cas cascades

(A) HCR and CRISPR-Cas12a system for TCSV and HepBV detection^[104]. Copyright 2021, American Chemical Society;

(B) CHA-Cas13a assay for SARS-CoV-2 detection^[106]. Copyright 2023, American Chemical Society.

Cas13a 蛋白具有直接靶向 RNA 序列的特性, 能够与 CHA 级联, 并直接用于 RNA 病毒的核酸序列检测. 如, He 等^[106]开发了一种基于 CRISPR-Cas13a 和 CHA 的检测方法, 用于高灵敏度和特异性的 SARS-CoV-2 RNA 检测. 如图 6(B)所示, Cas13a 直接靶向 SARS-CoV-2 RNA, 一旦识别到目标 RNA, Cas13a 的非特异性裂解能力便被激活. 这一步仅对 DNA 发夹探针中的 RNA 位点(rU)进行切割, 导致 DNA 单链的释放, 随后触发 CHA 反应, 进而引发荧光信号的恢复. 这一检测过程可在 35 min 内完成, 并实现了最低 84 amol/L 的 SARS-CoV-2 RNA 靶标检出.

与无酶核酸等温扩增和 CRISPR-Cas 的级联体系类似, 酶辅助核酸等温扩增技术也能与 CRISPR-Cas 系统级联, 从而提高病毒检测时的扩增效率和灵敏度. 其中经典的技术有 SHERLOCK (Specific high sensitivity enzymatic reporter unLOCKing)^[98]和 DETECTR (DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter)^[96]. SHERLOCK 技术将 RT-RPA 和 Cas13a 结合, 病毒 RNA 被逆转录为 DNA 模板进行 RPA 扩

增, 随后在 T7 酶的作用下转录为 RNA 单链, 用于激活 Cas13a, 从而非特异性切割荧光 RNA 探针, 产生输出信号. Zhang 等^[98]开发了 SHERLOCK 平台, 并展示了其在登革热和寨卡病毒检测中的应用. 首先从 SARS-CoV-2 中提取 RNA, 在 42 °C 下使用 RT-RPA 指数扩增病毒 RNA 25 min, 生成 dsDNA 产物, 然后用 CRISPR-Cas13 检测指数扩增后的 dsDNA 产物. 因为 Cas13 只能检测 RNA 靶标, 所以使用 T7 RNA 聚合酶将 dsDNA 转录成 RNA 进行后续检测, Cas13 反式切割了一个报告分子, 便于使用侧向流条生成最终的读出信号. 提取的 RNA 样本检测结果为 10 copy/ μ L, 扩增和检测可在约 1 h 内完成. DETECTR 技术则是利用 Cas12a 直接特异性识别 RT-RPA 的 DNA 扩增产物, 从而产生荧光信号. Broughton 等^[97]使用 DETECTR 进行 SARS-CoV-2 检测, 先用 RT-LAMP 扩增提取 SARS-CoV-2 RNA, 生成 dsDNA 产物, 再使用 CRISPR/Cas12 对靶标进行侧链切割检测 dsDNA 产物, 最后使用流动条产生读出信号. 该方法对 SARS-CoV-2 RNA 的检测能够低至 10 copy/ μ L, 并且扩增和检测可在 30 min 内完成, 对 POCT 和现场分析尤其有价值.

然而, 无论是 SHERLOCK 还是 DETECTR, 等温扩增和 CRISPR-Cas 信号放大常分步进行, 会因为开盖操作而引发交叉污染和气溶胶污染. 因此, 等温扩增和 CRISPR-Cas 检测常整合到单管内进行一锅法反应, 从而避免上述问题. RT-RPA 的最佳反应温度(约 40 °C)与 CRISPR-Cas 系统(约 37 °C)比较相近, 因此更容易通过反应体系的优化来实现单管均相反应. Ding 等^[107]设计了不带 PAM 识别位点的 Cas12a, 仅识别 RPA 扩增中正确解离的 DNA 单链, 从而避免了由于 Cas12a 提前激活非特异性切割所引起的扩增效率和特异性的降低; 并且该方法允许两组 Cas12a 在目标链上对称的位置进行信号放大, 进一步提高了检测灵敏度. 基于唾液和鼻咽拭子中 SARS-CoV-2 检测结果之间的相关性, 以及唾液相较于鼻咽拭子样本在降低医护人员感染风险方面的优势, Ning 等^[35]将 RPA 与 CRISPR-Cas12a 结合, 开发出了一种通过手机进行快速、超灵敏和定量检测 SARS-CoV-2 的 CRISPR-FDS 方法, 实现了 0.38 copy/ μ L 的检出限, 但该方法需要通过芯片读取结果, 后期仍需改进. 此外, 通过微流控芯片将扩增和 CRISPR-Cas 信号放大分开, 也能够很好地避免竞争性反应. Hu 等^[108]设计了一种压力辅助和离心驱动的微流体芯片, 用于呼吸道病原体检测. 该芯片拥有独立的放大室和检测室, 两者分开防止了 RPA 和 CRISPR 检测过程之间的相互干扰, 同时降低了交叉污染的风险.

由于 RT-LAMP 的最佳反应温度约为 62 °C, 而 CRISPR-Cas 系统的理想工作温度约为 37 °C, 直接将二者结合用于单管均相反应存在一定的挑战. 为解决这一问题, 研究人员采用了来自嗜热细菌的 Cas12b 酶, 该酶能够耐受高达 65 °C 的温度, 从而与 RT-LAMP 技术实现良好的兼容性. 如, Joung 等^[109]利用 AspCas12 开发了一种集成 RT-LAMP 和 CRISPR-Cas 级联扩增的体系, 在 60 °C 下实现单管反应, 显著提升了对 SARS-CoV-2 RNA 的检测灵敏度. Mahfouz 等^[110]利用热稳定 AapCas12b, TccCas13a 和 HheCas13a 与 LAMP 等温扩增技术开发了一种 CRISPRD(CRISPR-Cas multiplexed diagnostic assay)多路诊断方法, 用于一锅法检测高风险人类乳头瘤病毒(hrHPV)[图 7(A)]. 该方法能够同时灵敏地检测 3 个独立的核酸靶点, 其中 LAMP 的 DNA 双链产物激活 Cas12b 并且非特异性切割 DNA 报告探针, 随后在 T7 酶作用下逆转录生成的 RNA 激活 Cas13 并切割相应的 RNA 报告探针, 最终产生正交信号, 实现多重靶标的同时检测. 同样地, 为了能够进行多路检测, Wang 等^[111]将 RT-LAMP 和 Cas12b 集成到同一管内, 开发了一种“绿-黄-红”三通道的便携式墨盒, 完成单管内一锅反应后, 连接上智能手机便可实现对 SARS-CoV-2 及其变体的实时检测[图 7(B)]. 但是该方法仍需要额外的 RNA 提取步骤, 试剂难以在室温下储存, 不利于实际的现场检测. 除了耐高温的 Cas12b 酶外, 工程化的 enAsCas12a 酶对温度也有显著的耐受性. 基于此, Tan 等^[112]提出了一种用于区分野生型和突变型 SARS-CoV-2 的单管检测方法, 在 60~65 °C 下采用 RT-LAMP 技术扩增目标物, 随后用 enAsCas12a 酶检测 SARS-CoV-2. 该方法可直接应用于鼻咽样本, 无需进行 RNA 纯化, 并且采用 DNA-RNA 杂交引物可提高反应速率. 整个检测过程能在 30 min 内完成, 达到 100% 的检出率.

在结合 RT-LAMP 和 CRISPR-Cas 系统的单管式检测技术中, 为了简化实验流程且降低污染风险, RT-LAMP 试剂通常被放置于试管底部, 而 CRISPR-Cas 蛋白试剂放置于管盖中. 待扩增过程进行一段

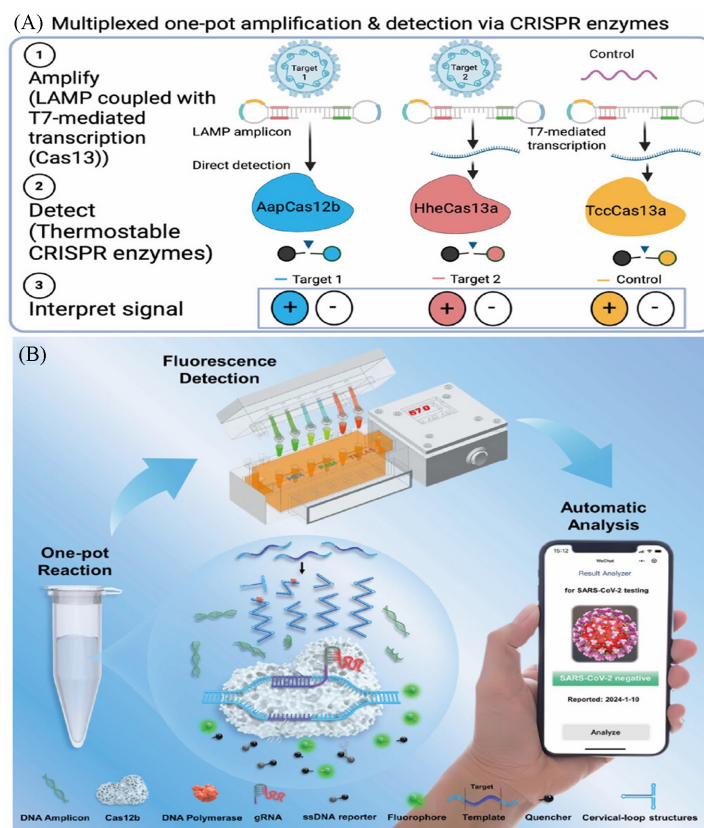


Fig. 7 RPA and CRISPR-Cas based multiplex detection of viruses

(A) CRISPR-Cas multiplexed diagnostic assay for hrHPV detection^[110]. Copyright 2024, American Chemical Society; (B) one-pot CRISPR-based “green-yellow-red” multiplex detection CHA-Cas13a assay for SARS-CoV-2 detection^[111]. Copyright 2024, American Chemical Society.

时间后, 通过轻轻摇动试管可使上下试剂充分混合, 从而启动信号检测过程^[113,114]. 如, Chen等^[115]开发了一步检测 SARS-CoV-2的方法, 将 Cas12a 复合物预先加在管盖内壁上, LAMP 扩增后摇晃均匀, Cas12a 识别并切割目标序列释放荧光信号, 通过肉眼即可观察. 该方法整个扩增和检测过程可在 40 min 内完成, 具有极高灵敏度, 避免了气溶胶污染的风险, 同时减少了与其它病毒的交叉反应. Pang等^[114]开发的单管检测法可以在 40 min 内完成, 具有 94% 的临床检出率和 100% 的临床特异性. 此外, 基于 CRISPR 技术和电场控制的微流体诊断可以在 35 min 内检测 SARS-CoV-2^[60].

Cas9 蛋白也能用于构建等温级联扩增体系. 与 Cas12 和 Cas13 相比, Cas9 没有非特异性切割活性(反式切割活性), 因此在构建级联系统时, 通常利用 Cas9 蛋白特异性靶向目标序列, 激活顺式切割活性. Cas9 在核酸检测中主要有两个作用: 富集低丰度目标序列和消耗高丰度核酸, 例如 DASH (Depletion of abundant sequence by hybridization)^[116] 和 FLASH (Finding low abundant sequences by hybridization)^[117] 等技术. 突变的 Cas9nAR 具有类切口酶的单链顺式切割活性, 可用于开发 CRISDA (CRISPR-Cas9-triggered nicking-endonuclease mediated strand displacement amplification)^[118] 和 Cas9nAR (Cas9n-based amplification reaction)^[119], 实现核酸指数级扩增. 此外, 基于 Cas9 的纸基、冻干且无细胞的蛋白质表达技术, 也在 CRISPR 级联扩增系统中得到应用. Collins等^[120]通过在冻干的纸质平台上将 NASBA 等温扩增和“toehold 开关”结合, 实现了寨卡病毒 RNA 的高通量等温扩增. 随后, 他们开发了一个基于 CRISPR/Cas9 的检测模块, 通过 Cas9 特异性识别含有 PAM 区域的扩增双链产物并发生顺式切割, 从而实现单碱基区分寨卡病毒基因型.

目前, 基于等温核酸扩增技术的商业化试剂盒已被广泛应用于多种疾病的诊断, 包括艾滋病病毒 (HIV)、SARS-CoV-2、疱疹病毒和猴痘病毒等^[121]. 这些试剂盒主要基于几种关键的等温扩增技术, 如 NASBA, LAMP, HDA, RPA 和 SDA 等. 例如, 基于 LAMP 扩增技术的商用试剂盒, 主要包括

Loopamp[®], Illumigene(现为 Alethia)和 Eazyplex[®] 3种, 能够用于包括新鲜或冷冻血液、尿液和其它体临床样本的检测^[122]. Loopamp[®]试剂盒通常需要搭配专用的DNA提取套件, 通过简单的煮沸和离心方法进行DNA提取, 这种方式成本较低, 便于进行现场检测, 从而缩短了分析时间. Loopamp[®]还支持使用干血斑样本, 方便室温下的运输和存储. Illumigene 试剂盒通过使用裂解缓冲器和重力纯化柱来简化样品制备, 将DNA提取和结果读数整合在同一套件内, 因此试剂盒的成本较高, 每个样本约需30.6美元^[122]. 与Loopamp[®]和Illumigene(Alethia)相比, Eazyplex[®]无需核酸提取, 能够直接从临床样本中检测多种病原体 and 耐药基因, 极大简化了检测流程, 缩短了从样本采集到结果获取的时间, 检测限低至24 copy/反应^[123].

基于NASBA的试剂盒主要包括NucliSens EasyQ^[124]和OligoC-TesT^[125]等, 应用于HIV-1和HPV等病原体. Saad等^[126]采用OligoC-TesT对苏丹格达里夫州和哈尔顿州的利什曼病进行评估, 结果该试剂盒展现了96.8%的灵敏度和90%的特异性. Deborggraeve等^[127]通过使用自然感染的犬骨髓样本, 将OligoC-TesT的灵敏度与嵌套式线粒体DNA-PCR、嵌套式内转录间隔1-PCR和一种PCR杂交协议进行了比较. 结果表明, OligoC-TesT在检测感染犬方面的检出率达到70%(高于对照组), 在寄生虫浓度超过74条/mL时, 能够检测出100%的阳性样本. 表2中列出了不同的商业试剂盒, 并比较了其分析成本和时间.

Table 2 Summary of reagent kits and assay methods based on isothermal amplification technology

| Product | Technique | Target | Cost | Testing time | Type | Biotech company | Ref. |
|----------------------------|-----------|--|-------------|--------------|---------------|----------------------------------|-------|
| NucliSens EasyQ | NASBA | virus RNA | \$50, 000 | 1 h | Automated | Biomeriux | [128] |
| analysis methods | | | | | | | |
| OligoC-TesT | NASBA | <i>Leishmania</i> parasites DNA | \$26/test | 1 h | Kit | Coris Bio Concept, Belgium | [126] |
| BESst Cassette Type II | HDA | <i>Staphylococcus aureus</i> DNA | \$10/test | 1 h | Kit | BioHelix, USA | [129] |
| Illumigene(Alethia) | LAMP | <i>Clostridium difficile</i> DNA | \$30.6/test | 40 min | Kit | Meridian Bioscience, USA | [130] |
| Loopamp MTBC | LAMP | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | \$5.7/test | 30 min | Kit | Eiken Chemical Co, Japan | [131] |
| Detection Kit [®] | | DNA | | | | | |
| Eazyplex [®] | LAMP | Bacterial pathogens | — | 30 min | Kit | Amplex Diagnostics GmbH, Germany | [123] |
| 3M [™] Molecular | LAMP | <i>Salmonella</i> DNA | — | 75 min | Kit | 3M, USA | [132] |
| Detection System | | | | | | | |
| Genie III | LAMP | Ebola virus RNA | \$13, 000 | 15–20 min | Automated | OptiGene, UK | [133] |
| analysis methods | | | | | | | |
| Solana [®] | HDA | <i>Trichomonas</i> DNA | — | 1 h | Kit | Quidel Corporation, USA | [79] |
| BD ProbeTec [™] | SDA | <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>gonorrhoeae</i> DNA | — | 3 h | Kit/Automated | BD Diagnostics, USA | [134] |
| analysis methods | | | | | | | |

4 结 论

核酸等温扩增技术在单一温度条件下能够快速将病毒核酸从低浓度扩增至可检测水平, 简化了操作流程, 缩短了检测时间, 为病毒的快速分子诊断提供了有效手段. 样本中的病毒采集和核酸提取是病毒检测的核心步骤, 不同类型的样本适用于不同的提取方法. 近年来, 自动化核酸提取系统和免提取的病毒检测方法也逐渐发展起来, 为简化检测流程提供了新的思路.

在探索核酸等温扩增技术用于病毒检测时, 主要基于两类技术: 酶辅助和无酶等温核酸扩增技术. 酶辅助的等温扩增技术因其高效率和高特异性而得到广泛应用, 酶的催化作用不仅加速了核酸扩增过程, 还确保了准确性, 对于检测低浓度的病毒序列至关重要. 然而, 这种技术面临成本和稳定性的挑战, 尤其是在非理想环境下, 酶的活性可能受到严重影响. 同时, 无酶参与的等温核酸扩增技术在操作简便性和稳定性方面表现出色. 这类方法降低了对环境条件的依赖, 从而减少了实验成本. 尽管如此, 与酶辅助技术相比, 无酶扩增策略性能较低, 其扩增效率和特异性有待进一步改善.

结合不同核酸等温扩增技术的优势, 并解决各自的局限性, 是未来的重要发展方向. 通过将不同

体系串联,既具有酶辅助技术的高效率和高特异性,又具备无酶技术的稳定性和成本效益,将兼具高性能和易操作性。此外,引入新型核酸识别与扩增体系,如CRISPR系统,将为病毒检测带来新的可能性。在此基础上,将技术自动化与微流控芯片相结合,可以提高实验的重复性和准确性,包括简化操作流程、快速产出结果、不依赖昂贵的设备和专业人员等,而微流控技术有助于实现高通量和微量样本的快速分析,对于公共卫生监测和大规模筛查非常重要,为疾病防控和公共卫生工作提供更加强大的工具和支持。

参 考 文 献

- [1] Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., *N. Engl. J. Med.*, **2020**, 382(8), 727—733
- [2] Liu R., Han H., Liu F., Lv Z., Wu K., Liu Y., Feng Y., Zhu C., *Clin. Chim. Acta*, **2020**, 505, 172—175
- [3] Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y. M., Wang W., Song Z. G., Hu Y., Tao Z. W., Tian J. H., Pei Y. Y., *Nature*, **2020**, 579(7798), 265—269
- [4] Zhou P., Yang X. L., Wang X. G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H. R., Zhu Y., Li B., Huang C. L., *Nature*, **2020**, 579(7798), 270—273
- [5] Corman V. M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D. K., Bleicker T., Brünink S., Schneider J., Schmidt M. L., *Eurosurveillance*, **2020**, 25(3), 2000045
- [6] Zhao Y., Chen F., Li Q., Wang L., Fan C., *Chem. Rev.*, **2015**, 115(22), 12491—12545
- [7] Wang W., Xu Y., Gao R., Lu R., Han K., Wu G., Tan W., *J. Am. Med. Assoc.*, **2020**, 323(18), 1843—1844
- [8] Organization W. H., *World Health Organization*, **2020**
- [9] Henningson E. W., Ahlberg M. S., *J. Aerosol. Sci.*, **1994**, 25(8), 1459—1492
- [10] Truysols V. J., Stilianov A. K., Sala L. E., Toledo P. N., Baldovi H. G., Mercader B. J., *J. Hosp. Infect.*, **2022**, 130, 44—51
- [11] Tedeschini E., Pasqualini S., Emiliani C., Marini E., Valecchi A., Laoreti C., Ministrini S., Camilloni B., Castronari R., Patoia L., Merante F., Baglioni S., De R. E., Pirro M., Mencacci A., Pasqualini L., *Front. Public. Health.*, **2023**, 11, 1169073
- [12] Tan K. S., Ang A. X. Y., Tay D. J. W., Somani J., Ng A. J. Y., Peng L. L., Chu J. J. H., Tambyah P. A., Allen D. M., *Front. Public. Health.*, **2023**, 10, 1067575
- [13] Qiu G., Spillmann M., Tang J., Zhao Y. B., Tao Y., Zhang X., Geschwindner H., Saleh L., Zingg W., Wang J., *Adv. Sci.*, **2022**, 9(35), 2204774
- [14] Alonso C., Raynor P. C., Davies P. R., Torremorell M., *PLoS One*, **2015**, 10(8), e0135675
- [15] Silva P. G., Branco P. T. B. S., Soares R. R. G., Mesquita J. R., Sousa S. I. V., *Indoor Air*, **2022**, 32(8), e13083
- [16] Verreault D., Moineau S., Duchaine C., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2008**, 72(3), 413—444
- [17] Bazzazpour S., Rahmatinia M., Mohebbi S. R., Hadei M., Shahsavani A., Hopke P. K., Houshmand B., Raeisi A., Jafari A. J., Yarahmadi M., Farhadi M., Hasanzadeh V., Kermani M., Vaziri M. H., Tanhaei M., Zali M. R., Alipour M. R., *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **2022**, 29(57), 85586—85594
- [18] Feng X. L., Li B., Lin H. F., Zheng H. Y., Tian R. R., Luo R. H., Liu M. Q., Jiang R. D., Zheng Y. T., Shi Z. L., Bi Y. H., Yang X. L., *Virol. Sin.*, **2021**, 36(5), 1069—1072
- [19] Park G. W., Lee D., Treffiletti A., Hrsak M., Shugart J., Vinje J., *Appl. Environ. Microbiol.*, **2015**, 81(17), 5987—5992
- [20] Kong J., Li W., Hu J., Zhao S., Yue T., Li Z., Xia Y., *Foods*, **2022**, 11(11), 1540
- [21] Santiago R. T. M., *Water*, **2022**, 14(4), 599
- [22] Ahmed W., Bivins A., Bertsch P. M., Bibby K., Choi P. M., Farkas K., Gyawali P., Hamilton K. A., Haramoto E., Kitajima M., Simpson S. L., Tandukar S., Thomas K. V., Mueller J. F., *Curr. Opin. Environ. Sci. Health*, **2020**, 17, 82—93
- [23] Buonerba A., Corpuz M. V. A., Ballesteros F., Choo K. H., Hasan S. W., Korshin G. V., Belgiorio V., Barcelo D., Naddeo V., *J. Hazard. Mater.*, **2021**, 415, 125580
- [24] Cervantes Aviles. P., Moreno Andrade. I., Carrillo Reyes. J., *J. Water Process. Eng.*, **2021**, 40, 101947
- [25] Sim S. L., He T., Tscheliessnig A., Mueller M., Tan R. B. H., Jungbauer A., *J. Biotechnol.*, **2012**, 157(2), 315—319
- [26] La R. G., Iaconelli M., Mancini P., Ferraro G. B., Veneri C., Bonadonna L., Lucentini L., Suffredini E., *Sci. Total Environ.*, **2020**, 736, 139652
- [27] Sherchan S. P., Shahin S., Ward L. M., Tandukar S., Aw T. G., Schmitz B., Ahmed W., Kitajima M., *Sci. Total Environ.*, **2020**, 743, 140621
- [28] Jafferali M. H., Khatami K., Atasoy M., Birgersson M., Williams C., Cetecioglu Z., *Sci. Total Environ.*, **2021**, 755, 142939
- [29] Bar Y. M., Flamholz A., Phillips R., Milo R., *eLife*, **2020**, 9, e57309
- [30] Mousazadeh M., Ashoori R., Paital B., Kabdasi I., Frontistis Z., Hashemi M., Sandoval M. A., Sherchan S., Das K., Emamjomeh M. M., *Pathogens*, **2021**, 10(8), 1008
- [31] Qiu Y., Lee B. E., Ruecker N. J., Neumann N., Ashbolt N., Pang X., *J. Virol. Methods*, **2016**, 237, 150—153

- [32] Fang Y., Zhang H., Xie J., Lin M., Ying L., Pang P., Ji W., *Radiology*, **2020**, 296(2), 115—117
- [33] Ali N., Rampazzo R. C. P., Costa A. D. T., Krieger M. A., *Biomed Res. Int.*, **2017**, 9306564
- [34] Chu A. W. H., Chan W. M., Ip J. D., Yip C. C. Y., Chan J. F. W., Yuen K. Y., To K. K. W., *J. Clin. Virol.*, **2020**, 129, 104519
- [35] Ning B., Yu T., Zhang S., Huang Z., Tian D., Lin Z., Niu A., Golden N., Hensley K., Threeton B., *Sci. Adv.*, **2021**, 7(2), eabe3703
- [36] Mondal S., Feirer N., Brockman M., Preston M. A., Teter S. J., Ma D., Goueli S. A., Moorji S., Saul B., Cali J. J., *Sci. Total Environ.*, **2021**, 795, 148834
- [37] Tripathy S., Agarkar T., Talukdar A., Sengupta M., Kumar A., Ghosh S., *Talanta*, **2023**, 252, 123809
- [38] Ma Y. D., Chen Y. S., Lee G. B., *Sens. Actuators B—Chem.*, **2019**, 296, 126647
- [39] Zong N., Gao Y., Chen Y., Luo X., Jiang X., *Anal. Chem.* **2022**, 94(12), 5196—5203
- [40] Gao S., Wang J., Li D., Li Y., Lou C., Zha E., Yue X., Tie Z. Z., *Int. J. Food Microbiol.*, **2020**, 322, 108587
- [41] Xi Y., Xu C. Z., Xie Z. Z., Zhu D. L., Dong J. M., Xiao G., *Mol. Cell. Probes*, **2019**, 45, 8—13
- [42] Chomczynski P., Sacchi N., *Anal. Biochem.*, **1987**, 162(1), 156—159
- [43] Iovieno A., Miller D., Lonnen J., Kilvington S., Alfonso E. C., *J. Clin. Microbiol.*, **2011**, 49(1), 476—477
- [44] Bai Y., Cui Y., Paoli G. C., Shi C., Wang D., Zhou M., Zhang L., Shi X., *Colloid Surface B*, **2016**, 145, 257—266
- [45] Sun N., Deng C., Liu Y., Zhao X., Tang Y., Liu R., Xia Q., Yan W., Ge G., *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1325, 31—39
- [46] Chomczynski P., Sacchi N., *Nat. Protoc.*, **2006**, 1(2), 581—585
- [47] Chu D. K., Pan Y., Cheng S. M., Hui K. P., Krishnan P., Liu Y., Ng D. Y., Wan C. K., Yang P., Wang Q., *Clin. Chem.*, **2020**, 66(4), 549—555
- [48] Ambrosi C., Prezioso C., Checconi P., Scribano D., Sarshar M., Capannari M., Tomino C., Fini M., Garaci E., Palamara A. T., *J. Virol. Methods*, **2021**, 287, 114008
- [49] Barnes K. G., Lachenauer A. E., Nitido A., Siddiqui S., Gross R., Beitzel B., Siddle K. J., Freije C. A., Dighero K. B., Mehta S. B., Carter A., Uwanibe J., Ajogbasile F., Olumade T., Odia I., Sandi J. D., Momoh M., Metsky H. C., Boehm C. K., Lin A. E., Kembal M., Park D. J., Branco L., Boisen M., Sullivan B., Amare M. F., Tiamiyu A. B., Parker Z. F., Iroezindu M., Grant D. S., Modjarrad K., Myhrvold C., Garry R. F., Palacios G., Hensley L. E., Schaffner S. F., Happi C. T., Colubri A., Sabeti P. C., *Nat. Commun.*, **2020**, 11(1), 4131
- [50] Arizti S. J., Freije C. A., Stanton A. C., Petros B. A., Boehm C. K., Siddiqui S., Shaw B. M., Adams G., Kosoko T. T. S. F., Kembal M. E., *Nat. Commun.*, **2020**, 11(1), 5921
- [51] Odiwuor N., Xiong J., Ogolla F., Hong W., Li X., Khan F. M., Wang N., Yu J., Wei H., *Anal. Chim. Acta*, **2022**, 1200, 339590
- [52] Myhrvold C., Freije C. A., Gootenberg J. S., Abudayyeh O. O., Metsky H. C., Durbin A. F., Kellner M. J., Tan A. L., Paul L. M., Parham L. A., Garcia K. F., Barnes K. G., Chak B., Mondini A., Nogueira M. L., Isern S., Michael S. F., Lorenzana I., Yozwiak N. L., MacInnis B. L., Bosch I., Gehrke L., Zhang F., Sabeti P. C., *Science*, **2018**, 360(6387), 444—448
- [53] Mautner L., Baillie C. K., Herold H. M., Volkwein W., Guertler P., Eberle U., Ackermann N., Sing A., Pavlovic M., Goerlich O., Busch U., Wassill L., Huber I., Baiker A., *Virol. J.*, **2020**, 17(1), 160
- [54] Cao G., Xiong Y., Qiu Y., Yang J., Wang Y., Nie F., Huo D., Hou C., *Anal. Chim. Acta*, **2023**, 1280, 341865
- [55] Krolov K., Frolova J., Tudoran O., Suhorutsenko J., Lehto T., Sibul H., Mager I., Laanpere M., Tulp I., Langel U., *J. Mol. Diagn.*, **2014**, 16(1), 127—135
- [56] Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T., *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28(12), e63
- [57] Piepenburg O., Williams C. H., Stemple D. L., Armes N. A., *PLoS Biol.*, **2006**, 4(7), e204
- [58] Tan E., Erwin B., Dames S., Ferguson T., Buechel M., Irvine B., Voelkerding K., Niemz A., *Biochemistry*, **2008**, 47(38), 9987—9999
- [59] Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T., *Nat. Protoc.*, **2008**, 3(5), 877—882
- [60] Wei Z., Wang X., Feng H., Ji F., Bai D., Dong X., Huang W., *Crit. Rev. Biotechnol.*, **2023**, 43(3), 415—432
- [61] Alhamid G., Tombuloglu H., Al-Suhaimi E., *Sci. Rep.*, **2023**, 13(1), 5066
- [62] Yu Z., Lyu W., Yu M., Wang Q., Qu H., Ismagilov R. F., Han X., Lai D., Shen F., *Biosens. Bioelectron.*, **2020**, 155, 112107
- [63] Lyu W., Zhang J., Yu Y., Xu L., Shen F., *Lab Chip*, **2021**, 21(16), 3086—3093
- [64] Yuan R., Wei J., Geng R., Li B., Xiong W., Fang X., Wang K., *Sens. Actuators B—Chem.*, **2023**, 380, 133363
- [65] Crannell Z. A., Rohrman B., Richards K. R., *Anal. Chem.*, **2014**, 86(12), 5615—5619
- [66] Gao X., Chen Y., Luo X., Du Z., Hao K., An M., Xia Z., Wu Y., *ACS Omega*, **2021**, 6(28), 18008—18013
- [67] Khater M., Escosura M. A., Altet L., Merkoci A., *Anal. Chem.*, **2019**, 91(7), 4790—4796
- [68] Zhao C., Yang L., Zhang X., Tang Y., Wang Y., Shao X., Gao S., Liu X., Wang P., *Anal. Chem.*, **2022**, 94(49), 17151—17159
- [69] Van N. J., Van N. L. K., Galas D. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100(8), 4504—4509
- [70] Carter J. G., Orueta I. L., Duprey J. H. A., Carter I. R., Southern C. D., Rana M., Whalley C. M., Bosworth A., Beggs A. D., Hicks M. R., Tucker J. H. R., Dafforn T. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2021**, 118(35), e2100347118
- [71] Chen J., Zhu D., Huang T., Yang Z., Liu B., Sun M., Chen J. X., Dai Z., Zou X., *Anal. Chem.*, **2021**, 93(37), 12707—12713
- [72] Compton J., *Nature*, **1991**, 350(6313), 91—92
- [73] Cordray M. S., Richards K. R. R., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2012**, 87(2), 223—230

- [74] Walker G. T., Little M. C., Nadeau J. G., Shank D. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89(1), 392—396
- [75] Zhang C., Zheng T., Fan H., Zhang T., Han D., *ACS Appl. Bio. Mater.*, **2021**, 4(5), 3805—3810
- [76] Daubendiek S. L., Ryan K., Kool E. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117(29), 7818—7819
- [77] Wang B., Potter S. J., Lin Y., Cunningham A. L., Dwyer D. E., Su Y., Ma X., Hou Y., Saksena N. K., *J. Clin. Microbiol.*, **2005**, 43(5), 2339—2344
- [78] Vincent M., Xu Y., Kong H., *Embo Rep.*, **2004**, 5(8), 795—800
- [79] Gaydos C. A., Schwebke J., Dombrowski J., Marrazzo J., Coleman J., Silver B., Barnes M., Crane L., Fine P., *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **2017**, 17(3), 303—306
- [80] Kowalski R. P., Karenchak L. M., Dhaliwal D. K., Mammen A., *Eye Contact Lens.*, **2018**, 44, S244—S248
- [81] Barreda G. S., Miranda C. R., De L. S. A. N., Miranda O. A. J., Lobo C. M. J., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2018**, 410(3), 679—693
- [82] Li B., Ellington A. D., Chen X., *Nucleic Acids. Res.*, **2011**, 39(16), e110
- [83] Dirks R. M., Pierce N. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, 101(43), 15275—15278
- [84] Li Y., Luo Z., Zhang C., Sun R., Zhou C., Sun C., *TrAC-Trends Anal. Chem.*, **2021**, 134, 116142
- [85] Luo Z., Li Y., Zhang P., He L., Feng Y., Feng Y., Qian C., Tian Y., Duan Y., *TrAC-Trends Anal. Chem.*, **2022**, 151, 116582
- [86] Yin P., Choi H. M., Calvert C. R., Pierce N. A., *Nature*, **2008**, 451(7176), 318—322
- [87] Zou M., Su F., Zhang R., Jiang X., Xiao H., Yan X., Yang C., Fan X., Wu G., *Sens. Actuators B: Chem.*, **2021**, 342(1), 129899
- [88] Liang G. X., Ye S. Y., Yu H. M., Zhao K. R., Liu P. F., Liu Z. J., Wang L., *Sens. Actuators B: Chem.*, **2022**, 354, 131199
- [89] Fu J., Wu J., Zhang R., Wu Q., Ju H., *Sens. Actuators B: Chem.*, **2021**, 345(15), 130436
- [90] Lee H., Lee S., Park C., Yeom M., Lim J. W., Vu T. T. H., Kim E., Song D., Haam S., *Small*, **2023**, 19(26), e2207117
- [91] Fan Z., Yao B., Ding Y., Zhao J., Xie M., Zhang K., *Biosens. Bioelectron.*, **2021**, 178, 113015
- [92] Zhang K., Fan Z., Ding Y., Zhu S., Xie M., Hao N., *Environ. Sci.: Nano*, **2022**, 9(1), 162—172
- [93] Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E., *Science*, **2012**, 337(6096), 816—821
- [94] Huang M., Zhou X., Wang H., Xing D., *Anal. Chem.*, **2018**, 90(3), 2193—2200
- [95] Santiago F. A., Hall L. N., Nemudraia A., Nemudryi A., Krishna P., Wiegand T., Wilkinson R. A., Snyder D. T., Hedges J. F., Cicha C., *Cell Rep. Med.*, **2021**, 2(6), 100319
- [96] Chen J. S., Ma E., Harrington L. B., Da Costa. M., Tian X., Palefsky J. M., Doudna J. A., *Science*, **2018**, 360(6387), 436—439
- [97] Broughton J. P., Deng X., Yu G., Fasching C. L., Servellita V., Singh J., Miao X., Streithorst J. A., Granados A., Sotomayor G. A., *Nat. Biotechnol.*, **2020**, 38(7), 870—874
- [98] Gootenberg J. S., Abudayyeh O. O., Lee J. W., Essletzbichler P., Dy A. J., Joung J., Verdine V., Donghia N., Daringer N. M., Freije C. A., Myhrvold C., Bhattacharyya R. P., Livny J., Regev A., Koonin E. V., Hung D. T., Sabeti P. C., Collins J. J., Zhang F., *Science*, **2017**, 356(6336), 438—442
- [99] Myhrvold C., Freije C. A., Gootenberg J. S., Abudayyeh O. O., Metsky H. C., Durbin A. F., Kellner M. J., Tan A. L., Paul L. M., Parham L. A., *Science*, **2018**, 360(6387), 444—448
- [100] Harrington L. B., Burstein D., Chen J. S., Paez E. D., Ma E., Witte I. P., Cofsky J. C., Kyrpides N. C., Banfield J. F., Doudna J. A., *Science*, **2018**, 362(6416), 839—842
- [101] Gootenberg J. S., Abudayyeh O. O., Kellner M. J., Joung J., Collins J. J., Zhang F., *Science*, **2018**, 360(6387), 439—444
- [102] Kellner M. J., Koob J. G., Gootenberg J. S., Abudayyeh O. O., Zhang F., *Nat. Protoc.*, **2019**, 14(10), 2986—3012
- [103] Yang F., Wang W., Zhang M., Tao W., Wang Y., Shi J., Ding Y., Xie M., Zhang S., Fan Z., Zhang K., *Environ. Sci.: Nano*, **2022**, 9(9), 3417—3426
- [104] Kachwala M. J., Smith C. W., Nandu N., Yigit M. V., *Anal. Chem.*, **2021**, 93(4), 1934—1938
- [105] Zhao R., Yu C., Lu B., Li B., *RSC Adv.*, **2022**, 12(17), 10374—10378
- [106] Yang Y., Yi W., Gong F., Tan Z., Yang Y., Shan X., Xie C., Ji X., Zheng Z., He Z., *Anal. Chem.*, **2023**, 95(2), 1343—1349
- [107] Ding X., Yin K., Li Z., Lalla R. V., Ballesteros E., Sfeir M. M., Liu C., *Nat. Commun.*, **2020**, 11(1), 4711
- [108] Peng R., Lu Z., Liu M., Hu F., *Sens. Actuators B: Chem.*, **2024**, 399(15), 134838
- [109] Joung J., Ladha A., Saito M., Kim N. G., Woolley A. E., Segel M., Barretto R. P., Ranu A., Macrae R. K., Faure G., *N. Engl. J. Med.*, **2020**, 383(15), 1492—1494
- [110] Ghouneimy A., Ali Z., Aman R., Jiang W., Aouida M., Mahfouz M., *ACS Synth. Biol.*, **2024**, 13(3), 837—850
- [111] Chen S., Wu C., Qian C., Pang Y., Guo K., Wang T., Bai L., Qian F., Ye Z., Liu Z., Qiao Z., Wang Y., Wang R., *Anal. Chem.*, **2024**, 96(7), 3145—3152
- [112] Ooi K. H., Liu M. M., Tay J. W. D., Teo S. Y., Kaewsapsak P., Jin S., Lee C. K., Hou J., Maurer S. S., Lin W., Yan B., Yan G., Gao Y. G., Tan M. H., *Nat. Commun.*, **2021**, 12(1), 1739
- [113] Wang R., Qian C., Pang Y., Li M., Yang Y., Ma H., Zhao M., Qian F., Yu H., Liu Z., *Biosens. Bioelectron.*, **2021**, 172, 112766
- [114] Pang B., Xu J., Liu Y., Peng H., Feng W., Cao Y., Wu J., Xiao H., Pabbaraju K., Tipples G., *Anal. Chem.*, **2020**, 92(24), 16204—16212
- [115] Chen Y., Shi Y., Chen Y., Yang Z., Wu H., Zhou Z., Li J., Ping J., He L., Shen H., *Biosens. Bioelectron.*, **2020**, 169, 112642
- [116] Gu W., Crawford E. D., O'Donovan B. D., Wilson M. R., Chow E. D., Retallack H., DeRisi J. L., *Genome. Biol.*, **2016**, 17, 41

- [117] Quan J., Langelier C., Kuchta A., Batson J., Teyssier N., Lyden A., Caldera S., McGeever A., Dimitrov B., King R., Wilhelm J., Murphy M., Ares L. P., Travisano K. A., Sit R., Amato R., Mumbengegwi D. R., Smith J. L., Bennett A., Gosling R., Mourani P. M., Calfee C. S., Neff N. F., Chow E. D., Kim P. S., Greenhouse B., DeRisi J. L., Crawford E. D., *Nucleic Acids. Res.*, **2019**, *47*(14), e83
- [118] Zhou W., Hu L., Ying L., Zhao Z., Chu P. K., Yu X. F., *Nat. Commun.*, **2018**, *9*(1), 5012
- [119] Wang T., Liu Y., Sun H. H., Yin B. C., Ye B. C., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **2019**, *58*(16), 5382—5386
- [120] Pardee K., Green A. A., Takahashi M. K., Braff D., Lambert G., Lee J. W., Ferrante T., Ma D., Donghia N., Fan M., Daringer N. M., Bosch I., Dudley D. M., O'connor D. H., Gehrke L., Collins J. J., *Cell*, **2016**, *165*(5), 1255—1266
- [121] Oliveira B. B., Veigas B., Baptista P. V., *Front. Sens.*, **2021**, *2*, 752600
- [122] Morris U., Aydin S. B., *Diagnostics*, **2021**, *11*(2), 336
- [123] Egerer R., Edel B., Löffler B., Henke A., Rodel J., *J. Clin. Virol.*, **2021**, *138*, 104817
- [124] De M. C., Koppelman M., Montes B., Ferre V., Soriano V., Cuypers H., Segondy M., Oosterlaken T., *J. Virol. Methods*, **2005**, *127*(1), 54—59
- [125] Garrido C., Zahonero N., Corral A., Arredondo M., Soriano V., De M. C., *J. Clin. Microbiol.*, **2009**, *47*(4), 1031—1036
- [126] Saad A. A., Ahmed N. G., Osman O. S., Al B. A. A., Hamad A., Deborgraeve S., Buscher P., Schoone G. J., Schallig H. D., Laurent T., Haleem A., Osman O. F., Eltom A. M., Elbashir M. I., El S. S., *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2010**, *4*(8), e776
- [127] Carson C., Quinell R. J., Holden J., Garcez L. M., Deborgraeve S., Courtenay O., *J. Clin. Microbiol.*, **2010**, *48*(9), 3325—3330
- [128] Capaul S. E., Gorgievski H. M., *J. Clin. Virol.*, **2005**, *32*(3), 236—240
- [129] Tong Y., Lemieux B., Kong H., *BMC Biotechnol.*, **2011**, *11*(1), 1—7
- [130] Noren T., Unemo M., Magnusson C., Eiserman M., Matussek A., *APMIS*, **2014**, *122*(2), 155—160
- [131] Rakotosamimanana N., Lapierre S. G., Raharimanga V., Raheison M. S., Knoblauch A. M., Raheinandrasana A. H., Rakotoson A., Rakotonirina J., Rasolofo V., *BMC Infect. Dis.*, **2019**, *19*(1), 542
- [132] Lim H. S., Zheng Q., Miks K. M., Turner M., Yuk H. G., *J. Food Prot.*, **2015**, *78*(6), 1203—1207
- [133] Kurosaki Y., Magassouba N., Oloniniyi O. K., Cherif M. S., Sakabe S., Takada A., Hirayama K., Yasuda J., *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2016**, *10*(2), e0004472
- [134] Van D. P. B., Williams J. A., Fuller D., Taylor S. N., Hook E. W., *J. Clin. Microbiol.*, **2017**, *55*(1), 155—164

(Ed.: N, K)