

id metagenomic diagnostics for suspected outbreak of severe pneumonia[J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(6):1072-1075.

[62] First NGS-based COVID-19 diagnostic[J]. Nat Biotechnol, 2020, 38(7):777.

[63] 宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用专家共识组. 宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用的专家共识[J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(2):151-155.

[64] DULANTO CHIANG A, DEKKER J P. From the pipeline to the bedside: advances and challenges in clinical metagenomics[J]. J Infect Dis, 2020, 221(Suppl 3):S331-S340.

[65] 王丽萍, 曹怡, 曾令佳, 等. 全国基层医疗机构传染病诊断报告现状分析[J]. 疾病监测, 2014, 29(3):176-180.

(收稿日期:2022-03-01 修回日期:2022-10-31)

• 综 述 •

环介导等温扩增技术在 SARS-CoV-2 核酸检测中的应用研究

何桢¹, 高盼², 张丽月¹综述, 刘万红^{1△}审校

1. 武汉大学基础医学院, 湖北武汉 430070; 2. 河北省衡水市第六人民医院检验科, 河北衡水 053200

摘要:严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2(SARS-CoV-2) 的高度传染性导致全球 SARS-CoV-2 感染病例迅速增加。寻找一种较传统实时反转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术更加准确、快速的检测方法对疾病确诊及疫情防控尤为重要。环介导等温扩增技术(LAMP)与反转录酶相结合(RT-LAMP)已成功应用于 SARS 与中东呼吸综合征的检测, 在 SARS-CoV-2 检测中亦表现出潜在优势。该文对 SARS-CoV-2 的结构特点、人类感染机制、LAMP 的检测原理及其在 SARS-CoV-2 检测中的应用研究进展进行详细综述, 以为临床提供一种较 RT-PCR 更加快速、特异且具有明显成本-效益的 SARS-CoV-2 核酸检测方法。

关键词:反转录环介导等温扩增; 实时反转录荧光定量聚合酶链反应; 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.24.025

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2022)24-3064-06

文献标志码:A

Application of loop-mediated isothermal amplification technique in nucleic acid detection of SARS-CoV-2

HE Zhenshuo¹, GAO Pan², ZHANG Liyue¹, LIU Wanhong^{1△}

1. School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430070, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Hengshui Municipal Sixth People's Hospital, Hengshui, Hebei 053200, China

Abstract: The high infectivity of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has led to a rapid increase in the cases of SARS-CoV-2 infection worldwide. It is particularly important to find a more accurate and rapid detection method than the traditional real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for the disease diagnosis and epidemic prevention and control. The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique in combination with reverse transcriptase has been successfully applied for the detection of SARS and MERS, and also shows the potential advantage in the detection of SARS-CoV-2. This paper in detail reviews the structural features of SARS-CoV-2, human infection mechanism, detection principle of LAMP detection and the application study advances in the SARS-CoV-2 detection in order to provide a more rapid, more specific and obvious cost-benefit SARS-CoV-2 nucleic acid detection method for clinic.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; real time reverse transcription polymerase chain reaction; severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

2019 年出现的新型冠状病毒感染给全球公共卫生系统带来了巨大挑战, 2020 年 2 月国际病毒分类委员会将该新型冠状病毒命名为严重急性呼吸系统综

合征冠状病毒 2(SARS-CoV-2), 由 SARS-CoV-2 感染而引起的疾病命名为 COVID-19。虽然 COVID-19 的病死率不及 2003 年的 SARS 以及 2012 年的中东

△ 通信作者, E-mail:157208315@qq.com。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20221028.1052.002.html\(2022-10-28\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20221028.1052.002.html(2022-10-28))

呼吸综合征(MERS)^[1-3],但是 SARS-CoV-2 传播速度快、传播能力强等特点使其防控难度显著增加。感染 SARS-CoV-2 的症状主要为干咳、发热、乏力以及肌肉酸痛等^[4-5],该症状与普通流行性感冒症状很难区分,对临床医师通过症状筛查来说是一种巨大的挑战。目前 SARS-CoV-2 在分子诊断中的金标准为实时反转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术^[6-8]。虽然 RT-PCR 技术在检测 SARS-CoV-2 方面具有高度特异性与灵敏度,但它需要特殊的核酸检测实验室以及经验丰富的专业检验人员对结果进行分析,而且检测周期较长,这在发展落后的地区很难实现大规模应用。因此有必要研究一种简单、方便、廉价、特异性强且不需要专门仪器设备的检测方法。环介导等温扩增技术(LAMP)以及基于 LAMP 的各种联合检测技术在 SARS-CoV-2 检测中的迅速发展,使其有望取代传统的 PCR 技术成为一种更加灵敏且特异的 SARS-CoV-2 检测方法。本文详细综述了 SARS-CoV-2 的结构特点、人类感染机制、LAMP 检测原理以及 LAMP 技术在 SARS-CoV-2 检测中的研究进展。

1 SARS-CoV-2 病原学特点

1.1 冠状病毒特点与分类 冠状病毒通常为典型的球形或多形性,得名于刺突蛋白突出的低聚物,这些低聚物在病毒粒子周围形成冠状边缘,形似日冕^[9]。在病毒基因结构方面,冠状病毒都有相似的结构特点,即单股正链 RNA 病毒,全基因组长度 26~32 kb,是套病毒目中最大的一组病毒科。冠状病毒包含一段约 30 kb 不分节段的正义 RNA 基因组,该基因组包含一个 5'帽结构与一个 3'多聚 A 尾结构^[10]。5'帽结构当中包含两个不同区域,即前导序列与非翻译区(UTR),在 5'的 UTR 区域中包含多个 RNA 复制和翻译所需的颈环结构;3'端的 UTR 区域还包括病毒 RNA 复制与合成所需的 RNA 结构。冠状病毒含有 4 种主要的结构蛋白,分别为刺突(S)、膜(M)、包膜(E)、核衣壳(N)蛋白^[11]。

冠状病毒科进一步可细分为 4 个属即 α 、 β 、 γ 、 δ ^[10]。到目前为止能够引起人类感染的冠状病毒主要包括 7 种,分别为 α 属的 HCoV-229E、HCoV-NL63, β 属的 HCoV-OC43、HCoV-HKU1 以及 2003 年的 SARS-CoV、2012 年的 MERS 冠状病毒(MERS-CoV)与 2019 年的 SARS-CoV-2^[12-14]。

1.2 SARS-CoV-2 特点

1.2.1 SARS-CoV-2 结构特点 SARS-CoV-2 是一种单股正链 RNA 有包膜的冠状病毒。基因组大小为 29 891 个核苷酸,编码 9 860 个氨基酸,G+C 含量约为 38%。SARS-CoV-2 基因包含 2 个非翻译区与 1 个编码多聚蛋白的长开放阅读框,基因组排列顺序为 5'-复制酶(ORF1a/b)-结构蛋白[S 蛋白-E 蛋白-M 蛋白-N 蛋白]-3',整个结构缺乏血凝素酯酶基因。在 SARS-CoV-2 中,ORF1a/b 编码 16 种非结构蛋白,约

占整个基因组的 67%,这些非结构蛋白包括两种病毒性半胱氨酸蛋白酶[木瓜蛋白酶样蛋白酶(nsp3)和胰凝乳蛋白酶(nsp5)],RNA 依赖的 RNA 聚合酶(nsp12)、解旋酶(nsp13),以及其他可能参与病毒转录复制的非结构蛋白^[15]。

SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 的主要区别在于 ORF3b、S 蛋白和 ORF8,其中在 S 蛋白 S1 和 ORF8 中尤为明显,这两个位点之前被认为是重组的热点。ZHOU 等^[16]的分析发现,部分 SARS-CoV-2 基因与 SARS-CoV 的核苷酸序列同源性低于 80%。然而,ORF1a/b 区域中用于分类的 7 个保守复制酶域氨基酸序列在 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 中同源性却高达 94.4%。他们还发现,一种蝙蝠冠状病毒(BatCoV RaTG13)的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRp)短区与 SARS-CoV-2 具有极高的序列同源性,全基因组序列一致性高达 96.2%。在所有的序列当中,RaTG13 表现出与 SARS-CoV-2 最近的亲缘关系,这与其他与 SARS 相关的冠状病毒(SARSr-CoVs)形成了截然不同的谱系。其次,在 SARS-CoV-2 中,S 基因所编码的受体结合 S 蛋白与其他 SARS-CoV 的 S 蛋白存在很大差异,而与 RaTG13 S 蛋白的一致性高达 93.1%,SARS-CoV-2 与 RaTG13 的 S 蛋白长度远高于其他与 SARS 相关的冠状病毒 S 蛋白。同样,在 LU 等^[17]的分析中证明 SARS-CoV-2 编码的 S 蛋白较 SARS-CoV 和 MERS-CoV 的 S 蛋白更长。

1.2.2 SARS-CoV-2 的感染机制 冠状病毒的感染机制主要与 S 蛋白相关。S 蛋白是一个相对分子质量约 180×10^3 的跨膜同源三聚体糖蛋白,为 I 类融合蛋白。对于大多数冠状病毒来说,宿主蛋白将 S 蛋白切割处理成两个亚基即 S1 和 S2,它们在预融合构象中以非共价结合形式存在^[18-22]。SARS-CoV-2 的 S1 亚基主要功能区包括 N 端结构域(NTD)、受体结合域(RBD)以及受体结合基序(RBM),S2 亚基包括两个七肽重复序列(HR)即 HR1 与 HR2,跨膜结构域(TM)、胞质域(CP)以及融合肽(FP)^[23]。S1 亚基主要负责与宿主细胞受体结合,而 S2 亚基在介导病毒与宿主细胞融合并进入宿主细胞中起关键作用,HR1 与 HR2 可以相互作用形成六螺旋束(6-HB),从而使病毒与细胞膜接近,以便相互融合。

与 SARS-CoV、MERS-CoV 一样,SARS-CoV-2 S 蛋白 S1 亚基中的 RBD 区域能够特异性识别宿主受体血管紧张素转换酶 2(ACE2),并使其作为自身功能性受体而进入宿主细胞^[16,24-25]。人类 ACE2 由一个 N 端肽酶结构域(PD)与一个 C 端收集素样结构域(CLD)组成,CLD 末端有一个跨膜螺旋和一个约 40 个残基的包内段^[26]。有研究表明,SARS-CoV-2 S 蛋白的胞外域主要与人类 ACE2 的 PD 区域结合,其亲和力和约 15 nmol/L,较 SARS-CoV S 蛋白的亲和力和约 10~20 倍^[27]。另外,SHANG 等^[28]的研究发现,

与 SARS-CoV RBM 区域相比, SARS-CoV-2 RBM 区域形成更大的结合界面, 与人类 ACE2 的接触面积更多, 其原因可能为 SARS-CoV-2 和 SARS-CoV RBM 的一种结构(即人类 ACE2 结合脊的环状构象)存在显著差异。人类和果子狸 SARS-CoV 毒株以及蝙蝠冠状病毒 Rs3367 在这个环状结构中都含有一个 3 个残基基序(脯氨酸-脯氨酸-丙氨酸), 而 SARS-CoV-2 和蝙蝠冠状病毒 RaTG13 都含有甘氨酸-缬氨酸/谷氨酰胺-谷氨酸/苏氨酸-甘氨酸 4 个残基基序, 两个相对庞大的残基和两个柔韧的甘氨酸使这种环状结构差异显著。在 SARS-CoV-2 RBM 区域中, 因为这些结构上的差异, Asn487 和 Ala475 之间形成了一个额外的主链氢键, 导致脊状构象更紧凑, 包含 Ala475 的环更靠近人类 ACE2。因此, SARS-CoV-2 RBM 中的脊与人类 ACE2 N 端螺旋的接触更多。SARS-CoV-2 S 区域对人 ACE2 的高亲和力可能是导致 SARS-CoV-2 在人与人之间更易传播的原因^[29]。

2 LAMP 检测原理

LAMP 首次由日本学者 NOTOMI 等^[30]提出, 是一种在等温条件下对核酸进行扩增的方法。该方法主要包括一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶与 4 种专门设计的引物, 4 种引物能够识别目标 DNA 上的 6 个不同序列。6 个不同序列主要包括 5' 端的 B1、B2、B3 区以及 3' 端的 F1c、F2c、F3c。引物分为内引物与外引物, 内引物当中包括一条上游正向内部引物(FIP)与一条下游反向内部引物(BIP), 每条引物都包含两个不同的序列分别对应目标 DNA 的有义与反义序列(FIP 主要包括 F1c、一段 TTTT 间隔区以及一条与目标基因 3' 端 F2c 互补的 F2 序列; BIP 包括一条与 B1 互补的 B1c 序列、一段 TTTT 间隔区以及 B2 序列), 一条内引物用于第一阶段的启动, 另一条用于第二阶段的自我启动。两条外引物包括下游外部引物 B3(与 B3c 区域互补)与上游外部引物 F3(与 F3c 互补)。外引物引发链置换 DNA 的合成, 释放出单链 DNA, 它作为 DNA 合成的模板, 由第二对内外引物启动 DNA 的合成(即内外引物与目标 DNA 的另一端进行杂交, 产生茎环结构)。在随后的 LAMP 循环中, 一个内引物与产物上的环进行杂交并启动链置换 DNA 的合成, 产生原始茎环 DNA 与一个比原始茎长两倍的新茎环 DNA。最终产物是具有多个靶标反向重复序列的茎环 DNA 结构与具有多个环状结构的花椰菜样结构。

3 LAMP 在 SARS-CoV-2 检测中的应用

迄今为止, 已有大量关于 LAMP 以及基于 LAMP 为基础的联合检测技术应用于 SARS-CoV-2 检测的报道。在这些检测技术中, 检测/扩增一管化、结果可视化、引物组设计以及减少假阳性概率等是研究人员所面临的主要问题。

3.1 检测/扩增一管化方案 SARS-CoV-2 检测中,

简化核酸检测与扩增步骤是缩短检测时间的关键, EL-THOLOTH 等^[31]以 LAMP 为基础, 构建了用于检测 COVID-19 的两阶段等温扩增(COVID-19 Penn-RAMP), 实现了检测与扩增的一管化方案。他们的研究结果显示, 在检测纯化 RNA 目标时 COVID-19 Penn-RAMP 的灵敏度比 COVID-19 LAMP 和 COVID-19 RT-PCR 高 10 倍, 在检测模拟患者标本时, 灵敏度比 COVID-19 LAMP 和 COVID-19 RT-PCR 高 100 倍。但是, 由于当时缺乏 COVID-19 感染病例导致他们无法用真实患者的标本进行测试。随后, LAMB 等^[32]的研究证明, 在经过 RNA 提纯的模拟 SARS-CoV-2 感染以及实际 COVID-19 患者的标本中, RT-LAMP 检测均能在 30~45 min 特异性地检测出 SARS-CoV-2 的存在, 然而, 当对未经 RNA 提纯的 COVID-19 患者标本进行检测时, RT-LAMP 的特异性与灵敏度却显著下降。

3.2 标本处理与优化 TAKI 等^[33]的研究中得出, 在经过 RNA 提纯步骤的唾液与鼻咽拭子标本当中, 利用 RT-LAMP 方法检测的灵敏度与特异性两者均分别为 97% 与 100%。而当检测未经 RNA 提纯的鼻咽拭子与唾液标本时, 两者的灵敏度降低到只有 71% 与 47%。如何在未进行 RNA 提纯的前提下提高检测灵敏度与特异性是困扰研究人员的难题之一。

LALLI 等^[34]通过实验证明, 当对唾液标本进行 65 °C 15 min 以及 95 °C 5 min 加热处理并冷却至 4 °C 后, RT-LAMP 对标本中 SARS-CoV-2 的检测限能够达到 59 个粒子拷贝数, 其灵敏度与特异性得到了显著提高。HOWSON 等^[35]在进行 RT-LAMP 检测之前, 用 Mucolyse™1 : 1 稀释唾液标本, 然后用 10% (w/v) Chelex 100 Resin 再次稀释, 98 °C 加热 2 min, 经过这两步处理的唾液标本利用 RT-LAMP 在短短 5 min 43 s 内就被检测到了 SARS-CoV-2 的存在。他们的实验证明, 对唾液标本的预处理在一定程度上能够缩短检测周期。但是由于唾液预处理以及下游分析过程仍然需要一些特殊的培训以及设备, 使其在大规模核酸检测中的应用仍然受到一定限制。

3.3 基于 LAMP 的联合检测技术 以 LAMP 为基础的联合核酸检测技术正逐渐受到研究人员的关注。例如, 一些研究人员基于 RT-LAMP, 建立了一种基于 CRISPR-Cas12 蛋白快速检测 SARS-CoV-2 的方法^[36]。这种方法能够灵敏且特异性地检测出患者呼吸道标本中 SARS-CoV-2 的存在, 其阳性预测值达 95%, 阴性预测值达 100%。WANG 等^[37]开发了一套基于 CRISPR/Cas12 的“多相复式非连续生产法”用于检测 SARS-CoV-2 的系统, 俗称“一锅法”(opv CRISPR), 将 RT-LAMP 与 Cas12a 裂解整合在一个反应体系中。这与前面 EL-THOLOTH 等^[31]的研究有相似之处, 即 RT-LAMP 试剂在试管底部孵育, 而在试管顶部加入 CRISPR/Cas12a 反应试剂。研究表明

opv CRISPR 的灵敏度与 RT-PCR 相当,比 RT-LAMP 约高 10 倍,Cas12a 的切割提高了 RT-LAMP 的灵敏度,使其检测灵敏度提高到接近单分子水平,opv CRISPR 的诊断结果与美国疾病控制与预防中心(CDC)批准的定量 RT-PCR 检测结果 100% 一致。但是两项研究在面对未提纯的标本时其检测的灵敏度与特异度均出现不同程度的下降。

3.4 引物组设计与结果可视化研究 LAMP 反应需要 6 种引物,到目前为止公开的 LAMP 引物设计工具很少,现有的工具没有充分考虑到 LAMP 反应的复杂性,其次可视化反应容易受外界环境因素影响而使结果产生假阳性,因此特异性的引物组设计以及稳定的颜色变化也是提高灵敏度与特异度不可或缺的步骤。HUANG 等^[38] 分别针对 SARS-CoV-2 的 ORF1a/b、S 基因以及 N 基因区域设计了 4 组引物(O117、S17、N1 和 N15),结果发现,引物 N1 与 S17 的检测限最低均达到 80 copy/mL。然而由于他们所应用的可视化原理主要是通过 pH 的变化来实现,其结果受临床环境因素影响较大,易产生假阳性。在后续的研究中,他们在引物 FIP 的 5' 端连接了 6-羧基荧光素(FAM)使显色结果变得更加稳定,但仍然没有解

决标本纯化问题。

HUANG 等^[39] 以病毒扩增所需的总时间(TT)以及假阳性率(FP)将所设计出的引物进行评分(总分 4 分,评分越低表明假阳性概率越低)并结合一种生物信息学算法筛选出了 22 种新型特异性引物(N7~N28)。其中,N7、N25 和 N27 的总体表现最好,TT 均小于 20 min,FP 评分均为 1 分。除此之外,他们还设计了 6 对针对 M 基因以及 7 对针对 S 基因的引物。在所有研究的引物中 N7、N27、M 以及 M6 表现最佳。在进一步的研究当中,他们将表现最佳的 4 种引物两两联合,利用多重 RT-LAMP 法对 SARS-CoV-2 感染患者唾液标本不提纯直接检测,其检测限达到了 1.5 copy/ μ L 的病毒载量。临床结果表明该方法与标准 RT-PCR 方法总体灵敏度与特异度相当。在这项研究中他们成功解决了 RNA 提纯问题,一定程度上缩短了检测周期(各种 LAMP 为基础的 SARS-CoV-2 检测方法汇总见表 1)。NAGURA-IKEDA 等^[41] 在自行采集的唾液中,对 SARS-CoV-2 的 6 项分子诊断试验和一项快速抗原试验的临床表现进行评估的实验中证明 RT-LAMP 在临床中应用具有足够的灵敏度与特异度(已上市产品试剂盒列举见表 2)。

表 1 以 LAMP 为基础的 SARS-CoV-2 核酸检测方法总结

文献	国家	检测方法	显色方法	特异性引物 所针对基因片段	是否需要 RNA 提取	TT (min)	最低检测限 (copy/ μ L)	灵敏度 (%)
[31]	美国	COVID-19 Penn-RAMP	结晶紫指示液	ORF1a/b	需要	55~60	7	100
[32]	美国	RT-LAMP	染料结合法(1:10 SYBR green I, 橙到黄)	ORF1a/b 的 NSP3 编码区	需要	30~45	12	95
[36]	美国	CRISPR-based DETECT-TR	侧流层析(荧光素分子捕捉标记核酸)	E、N	需要	40	10	95
[37]	中国	opvCRISPR	荧光显色(蓝光变化)	S	需要	45	5	100
[38]	中国	RT-LAMP	pH 值变化(粉红到黄色)	S、N、ORF1a/b	需要	30	2	—
[39]	中国	Multiplexed RT-LAMP	比色读数	N7+M6、N27+M5	不需要	30~50	1.5	100
[40]	中国	mRT-LAMP	侧流层析(红色条带)	ORF1a/b、N	需要	40	12	100

注:—表示无数据。

表 2 已获批的基于 LAMP 的 SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒

产品名称/试剂盒	生产公司	批准国家	批准时间
六项呼吸道病毒核酸检测试剂盒(恒温扩增芯片法)	成都博奥晶芯生物科技有限公司	中国	2020-02-22
新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒(RNA 恒温扩增-金探针层析法)	武汉中帜生物科技股份有限公司	中国	2020-03-31
新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒(恒温扩增-实时荧光法)	杭州优思达生物技术有限公司	中国	2020-11-20
新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒(恒温 CRISPR 法)	上海伯杰医疗科技有限公司	中国	2021-09-13
iAMP COVID-19 Detection Kit	Atila Biosystems, Inc.	美国	2020-04-10
Sherlock CRISPR SARS-CoV-2 kit	Sherlock Biosciences Inc.	美国	2020-05-06
Color Genomics SARS-CoV-2 RT-LAMP Diagnostic Assay	Color Genomics, Inc.	美国	2020-05-18
AQ-TOP COVID-19 rapid detection Kit	SEASUN BIOMATERIALS, Inc.	美国	2020-05-21

续表 2 已获批的基于 LAMP 的 SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒

产品名称/试剂盒	生产公司	批准国家	批准时间
SARS-CoV-2 RNA DETECTR Assay	UCSF Health Clinical Laboratories, UCSF Clinical Lab China Basin	美国	2020-07-09
Pro-AmpRT SARS-CoV-2 Test	Pro-Lab Diagnostics	美国	2020-08-13
SARS-CoV-2 DETECTR Reagent Kit	Mammoth Biosciences, Inc.	美国	2020-08-31

4 总结与展望

SARS-CoV-2 感染的爆发给全球社会经济带来了巨大的灾难,也导致生命科学等领域的爆发式发展,尤其在分子诊断领域。SARS-CoV-2 变异毒株的不断出现是全球分子诊断领域所共同面临的一项巨大挑战,RT-LAMP 作为一种新型检测技术在 SARS-CoV-2 检测方面正表现出越来越突出的优势^[42-44]。LAMP 的不断改进与完善使其逐渐克服了之前的瓶颈,例如引物组设计、标本处理以及可视化等问题。而在 ZHU 等^[40]的研究当中,利用多重 RT-LAMP 与纳米颗粒侧流生物传感器相结合的方法,成功解决了检测结果显色等问题,显著降低了外部环境因素的干扰。

与传统 RT-PCR 相比,LAMP 虽然不能定量,但却表现出了更高的灵敏度与特异度。更重要的是,LAMP 对 SARS-CoV-2 的检测只需几十甚至几分钟就能够简单通过肉眼对结果进行识别。这在 SARS-CoV-2 大流行期间对 SARS-CoV-2 感染疑似病例进行大规模筛查至关重要。以 LAMP 为基础的联合检测技术有望取代传统的 RT-PCR 技术,成为一种对 SARS-CoV-2 检测更加快速、简便且具有明显成本效益的方法。

参考文献

- [1] GUARNER J. Three emerging coronaviruses in two decades[J]. *Am J Clin Pathol*, 2020, 153(4): 420-421.
- [2] RAJGOR D D, LEE M H, ARCHULETA S, et al. The many estimates of the COVID-19 case fatality rate[J]. *Lancet Infect Dis*, 2020, 20(7): 776-777.
- [3] SUN Q, QIU H, HUANG M, et al. Lower mortality of COVID-19 by early recognition and intervention: experience from Jiangsu Province[J]. *Ann Intensive Care*, 2020, 10(1): 33.
- [4] CHEN H, GUO J, WANG C, et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women; a retrospective review of medical records[J]. *Lancet*, 2020, 395(10226): 809-815.
- [5] TIAN S, HU N, LOU J, et al. Characteristics of COVID-19 infection in Beijing[J]. *J Infect*, 2020, 80(4): 401-406.
- [6] XU Y, LI X, ZHU B, et al. Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding[J]. *Nat Med*, 2020, 26(4): 502-505.
- [7] UDUGAMA B, KADHIRESAN P, KOZLOWSKI H N, et al. Diagnosing COVID-19: the disease and tools for detection[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(4): 3822-3835.
- [8] KONRAD R, EBERLE U, DANGEL A, et al. Rapid establishment of laboratory diagnostics for the novel coronavirus SARS-CoV-2 in Bavaria, Germany, February 2020 [J]. *Euro Surveill*, 2020, 25(9): 2000173.
- [9] DAVIES H A, MACNAUGHTON M R. Comparison of the morphology of three coronaviruses[J]. *Arch Virol*, 1979, 59(1/2): 25-33.
- [10] FEHR A R, PERLMAN S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1282: 1-23.
- [11] WU A, PENG Y, HUANG B, et al. Genome Composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China[J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 27(3): 325-328.
- [12] DROSTEN C, GÜNTHER S, PREISER W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(20): 1967-1976.
- [13] ZAKI A M, VAN BOHEEMEN S, BESTEBROER T M, et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(19): 1814-1820.
- [14] ZHU N, ZHANG D, WANG W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(8): 727-733.
- [15] CHAN J F, KOK K H, ZHU Z, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 221-236.
- [16] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [17] LU R, ZHAO X, LI J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus; implications for virus origins and receptor binding[J]. *Lancet*, 2020, 395(10224): 565-574.
- [18] BELOUZARD S, CHU V C, WHITTAKER G R. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(14): 5871-5876.
- [19] BOSCH B J, VAN DER ZEE R, DE HAAN C A, et al.

- The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein; structural and functional characterization of the fusion core complex [J]. *J Virol*, 2003, 77 (16): 8801-8811.
- [20] BURKARD C, VERHEIJE M H, WICHT O, et al. Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(11): e1004502.
- [21] KIRCHDOERFER R N, COTTRELL C A, WANG N, et al. Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein [J]. *Nature*, 2016, 531(7592): 118-121.
- [22] MILLET J K, WHITTAKER G R. Host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus after two-step, furin-mediated activation of the spike protein [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(42): 15214-1529.
- [23] XIA S, ZHU Y, LIU M, et al. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17 (7): 765-767.
- [24] WAN Y, SHANG J, GRAHAM R, et al. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan; an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus [J]. *J Virol*, 2020, 94(7): e00127-20.
- [25] LETKO M, MARZI A, MUNSTER V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses [J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5(4): 562-569.
- [26] DONOGHUE M, HSIEH F, BARONAS E, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9 [J]. *Circ Res*, 2000, 87(5): E1-E9.
- [27] WRAPP D, WANG N, CORBETT K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation [J]. *Science*, 2020, 367(6483): 1260-1263.
- [28] SHANG J, YE G, SHI K, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2 [J]. *Nature*, 2020, 581(7807): 221-224.
- [29] CHAN J F, YUAN S, KOK K H, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission; a study of a family cluster [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 514-523.
- [30] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63.
- [31] EL-THOLOTH M, BAU H H, 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/OL]. *ChemRxiv*, [2021-12-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/nihpreprints/>.
- [32] LAMB L E, BARTOLONE S N, 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.
- [33] TAKI K, YOKOTA I, FUKUMOTO T, et al. SARS-CoV-2 detection by fluorescence loop-mediated isothermal amplification with and without RNA extraction [J]. *J Infect Chemother*, 2021, 27(2): 410-412.
- [34] LALLI M A, LANGMADE J S, CHEN X, et al. Rapid and extraction-free detection of SARS-CoV-2 from Saliva by colorimetric reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. *Clin Chem*, 2021, 67(2): 415-424.
- [35] HOWSON E L A, KIDD S P, ARMSON B, et al. Preliminary optimisation of a simplified sample preparation method to permit direct detection of SARS-CoV-2 within saliva samples using reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) [J]. *J Virol Methods*, 2021, 289: 114048.
- [36] BROUGHTON J P, DENG X, YU G, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2 [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 870-874.
- [37] WANG R, QIAN C, PANG Y, et al. opvCRISPR: One-pot visual RT-LAMP-CRISPR platform for SARS-CoV-2 detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 172: 112766.
- [38] HUANG W E, LIM B, HSU C C, et al. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2 [J]. *Microb Biotechnol*, 2020, 13(4): 950-961.
- [39] HUANG X, TANG G, ISMAIL N, et al. Developing RT-LAMP assays for rapid diagnosis of SARS-CoV-2 in saliva [J]. *EBioMedicine*, 2021, 75: 103736.
- [40] ZHU X, WANG X, HAH 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.
- [41] NAGURA-IKEDA M, IMAI K, TABATA S, et al. Clinical evaluation of self-collected saliva by quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR), direct RT-qPCR, reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification, and a rapid antigen test to diagnose COVID-19 [J]. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(9): e01438-20.
- [42] SHERRILL-MIX S, VAN DUYNE G D, BUSHMAN F D. Molecular beacons allow specific RT-LAMP detection of B. 1. 1. 7 Variant SARS-CoV-2 [J]. *J Biomol Tech*, 2021, 32(3): 98-101.
- [43] ZHANG Y, CHEN M, LIU C, et al. Sensitive and rapid on-site detection of SARS-CoV-2 using a gold nanoparticle-based high-throughput platform coupled with CRISPR/Cas12-assisted RT-LAMP [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2021, 345: 130411.
- [44] CARTER J G, ORUETA ITURBE L, DUPREY J H A, et al. Ultrarapid detection of SARS-CoV-2 RNA using a reverse transcription-free exponential amplification reaction, RTF-EXPAR [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(35): e2100347118.