

基于 CRISPR-Cas13a 的人腺病毒 B 亚属检测方法的建立

姜雅轩^{1,2}, 韩尧², 孙岩松², 李浩^{*1,2}

1 郑州大学 公共卫生学院, 河南 郑州 450001

2 军事医学研究院微生物流行病学研究所, 北京 100071

姜雅轩, 韩尧, 孙岩松, 李浩. 基于 CRISPR-Cas13a 的人腺病毒 B 亚属检测方法的建立[J]. 微生物学通报, 2024, 51(11): 4725-4735.

JIANG Yaxuan, HAN Yao, SUN Yansong, LI Hao. Establishment of human adenovirus species B detection method based on CRISPR-Cas13a[J]. Microbiology China, 2024, 51(11): 4725-4735.

摘要:【背景】人腺病毒 B 亚属(human adenovirus species B, HAdV-B)可引起呼吸道感染和重症肺炎, 患者死亡率高, 目前缺乏快速、准确的检测方法。【目的】开发一种高特异、高灵敏、操作简便的 HAdV-B 检测方法。【方法】在人腺病毒 E4 基因区筛选出 HAdV-B 的保守序列并选取了特异性重组酶辅助扩增(recombinase-aided amplification, RAA)引物和 CRISPR RNA(crRNA), 建立结合 RAA 技术、CRISPR-Cas13a 系统和消线法核酸测试纸技术(easy-readout and sensitive enhanced, ERASE)的针对 HAdV-B 的核酸快速检测方法。【结果】该方法在 35 min 的检测时间里, 可检测到低至 10^0 copy/ μ L 的 HAdV-B DNA, 该方法的灵敏度与实时荧光定量 PCR 相当, 与其他呼吸道病原体无交叉反应。模拟样本检测结果显示能检测到 C_t 值为 36.19 的弱阳性样本。【结论】本研究建立的针对 HAdV-B 试纸的检测方法能够简单、快速、准确地检测目标核酸, 无需专业核酸检测设备, 为 HAdV-B 的检测提供了新的方法。

关键词: CRISPR; 人腺病毒; 等温扩增; 核酸检测; ERASE 试纸

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2301100)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2301100).

*Corresponding author. E-mail: lihao88663239@126.com

Received: 2024-02-29; Accepted: 2024-05-07; Published online: 2024-06-01

Establishment of human adenovirus species B detection method based on CRISPR-Cas13a

JIANG Yaxuan^{1,2}, HAN Yao², SUN Yansong², LI Hao^{*1,2}

1 College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China

2 Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: [Background] Human adenovirus species B (HAdV-B) can cause respiratory tract infections and severe pneumonia with high mortality rates. Currently, there is a lack of rapid and accurate detection methods for HAdV-B. [Objective] To develop a highly specific, sensitive, and user-friendly detection method for HAdV-B. [Methods] Conserved sequences of HAdV-B were screened in the human adenovirus E4 gene region, and specific recombinase-aided amplification (RAA) primers and CRISPR RNA (crRNA) were selected. We then established a rapid nucleic acid detection method targeting HAdV-B by combining RAA, CRISPR-Cas13a system, and easy-readout and sensitive enhanced (ERASE) nucleic acid test strip. [Results] The established method could detect HAdV-B DNA as low as 10^0 copy/ μ L within 35 min, with the sensitivity comparable to real-time PCR. No cross-reactivity with other respiratory pathogens was observed. The testing results with simulated samples showed that the method can detect the weak positive samples with a Ct value of 36.19. [Conclusion] The test strip assay established in this study for HAdV-B can detect the target nucleic acids in a simple, rapid, and accurate manner without the need for specialized nucleic acid detection equipment, which provides a new method for detecting HAdV-B.

Keywords: CRISPR; human adenovirus; isothermal amplification; nucleic acid detection; ERASE strips

人腺病毒(human adenovirus, HAdV)是无包膜的双链 DNA 病毒,有多种型别,分为 7 个亚属(A-G),可引发多种疾病,主要包括呼吸道感染、眼结膜炎和胃肠道疾病等。其中 B、C、E 亚属可引起呼吸道感染^[1-2]。低龄儿童,免疫低下人群等易感人群在呼吸道感染人腺病毒后可能会引起重症肺炎,死亡率较高,严重危害生命健康^[3-4]。有研究显示,人腺病毒肺炎在免疫缺陷患者中的致死率高达 50%^[5]。人腺病毒 B 亚属即 HAdV-B,主要引起人呼吸道感染,流行的主要型别为 HAdV-3、HAdV-7、HAdV-11、HAdV-14、HAdV-21、HAdV-55,在儿童和成人

中可导致更显著的发病率、更严重的呼吸系统疾病甚至致命感染,有临床研究显示,超过 50%的患有重症肺炎的儿童感染过 HAdV-3、HAdV-7,而且引起的肺炎症状相较于 HAdV-C (HAdV-1、HAdV-2)更严重^[6-10]。HAdV-11、HAdV-14、HAdV-21 存在引起肺炎的相关报道^[11-12]。不同人腺病毒间不断发生基因整合产生新型别的人腺病毒,如 HAdV-55 是 HAdV-11 的六邻体基因整合到 HAdV-14 基因组后得到的新的重组体,在国内广泛传播且与国内成人重症肺炎和急性呼吸窘迫综合征的暴发有关^[13]。目前常用的人腺病毒诊断技术有病毒培养分离、酶联免疫吸附性试

验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和实时荧光定量 PCR; 病毒培养分离检测周期通常为 3–21 d, 耗时较长、费时费力; ELISA 技术易出现假阳性; qPCR 技术需专业荧光检测设备, 不能满足资源有限地区的检测需求^[14]。对于人腺病毒感染, 目前尚无特效治疗药物^[15]。因此, 对人腺病毒 B 亚属的快速、准确地检测能够从众多型别的人腺病毒感染中突出需要重点临床观察的对象, 进而指导临床治疗和疾病防控。

样本核酸的预扩增能显著提高核酸检测灵敏度, 重组酶辅助扩增 (recombinase-aided amplification, RAA) 技术是一种快速核酸扩增技术, 相较于传统的 PCR 扩增技术, RAA 扩增技术不需要复杂的热循环步骤, 操作简单且耗时短, 缺点是易发生非特异性扩增, 该技术是在工作温度(37–42 °C)下重组酶与 RAA 引物结合形成复合体, 与引物互补的 DNA 模板位点结合, 在单链结合蛋白辅助下打开 DNA 模板双链, 随后 DNA 聚合酶延伸合成新的互补链, 实现对靶标基因的扩增^[16]。目前, 该技术已应用于多种病原体的核酸检测的扩增步骤中, 是一种具有应用前景的扩增技术^[17]。

簇状规则间隔短回文重复序列及其相关系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated systems, CRISPR-Cas)的发现, 使得核酸诊断技术进一步发展。CRISPR-Cas 系统结合 PCR 和各种等温扩增, 开发成多种灵敏度高、特异性强的核酸诊断工具^[18]。例如, “DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter (DETECTR)” CRISPR-Cas12a 核酸检测技术和“specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking (SHERLOCK)” CRISPR-Cas13a 核酸检测技术^[19–20]。为了满足快速且灵敏的检测要求, 可以将 CRISPR-Cas 系统和侧向流免疫层析技术相结合, 达到简单、快速且准确的核酸

检测目的。在我们既往研究中, 研发出了 CRISPR-ERASE 核酸测试纸(图 1), 该技术是基于 CRISPR-Cas13a 系统, 当 Cas13a 蛋白识别到靶标时, 激活其侧切功能, 剪切两端修饰有 FAM 基团和生物素的报告 RNA。修饰 FAM 基团的被剪切报告 RNA 与 FAM 抗体胶体金颗粒结合, 再与 C 线包被的抗 FAM 抗体结合沉积, C 线显色; 包被有链霉亲和素的 T 线捕获修饰链霉亲和素的被剪切报告 RNA, 而无胶体金的沉积, 不显色; 当未识别到靶标时, T 线的链霉亲和素捕获生物素, 而一端的 FAM 基团因集合携带 FAM 抗体的胶体金在 T 线显色。我们将该试纸检测技术与 RAA 技术结合, 应用于埃博拉病毒、新型冠状病毒和人类免疫缺陷病毒等病原体的核酸检测^[21–23]。该核酸测试纸条不依赖专业的核酸检测仪器, 可实现简单、高效、快速的核酸检测。本研究通过将 RAA 技术和 CRISPR-ERASE 试纸检测技术相结合, 建立一种针对人腺病毒 B 亚属的简单、快速、灵敏且特异的核酸检测方法, 为较早发现可能引起严重呼吸道症状的人腺病毒提供新的检测方法。

1 材料与方法

1.1 样品

含 HAdV-B 保守序列的 PUC57 质粒、荧光报告 RNA、试纸报告 RNA、RAA 引物及 crRNA 由北京天一辉远生物科技有限公司合成(表 1)。甲型流感病毒核酸标准物质(NIM-RM4054)、新型冠状病毒核酸标准物质(GBWE091089)购自国家标准物质资源共享平台。HAdV-1 (BNCC364939)、HAdV-2 (BNCC364932)、HAdV-4 (BNCC363721)、HAdV-5 (BNCC364109)、HAdV-6 (BNCC363394)、HAdV-31 (BNCC370016)核酸标准物质和 HAdV-7 型灭活病毒颗粒(BNCC363510)购自北京北纳创联生物技术有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

RAA 核酸扩增试剂盒基础型, 杭州众测生物科技有限公司; rNTP Mix、T7 RNA 聚合酶和 RNase Inhibitor, New England Biolabs 公司; 无核酸酶水、MgCl₂ 溶液、*TaqMan*TM Fast Advanced Master Mix、HEPES 缓冲液和荧光报告 RNA, 赛默飞世尔科技公司; LwaCas13a 蛋白, 南京金斯瑞生物科技有限公司; MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit, 宝日医生物技术(北京)有限公司。PCR 仪, 赛默飞世尔科技公司; 荧光定量 PCR 仪, 伯乐生命医学产品有限公司; 金属浴, 北京卡尤迪生物科技股份有限公司。

1.3 RAA 扩增

RAA 扩增步骤参考 RAA 核酸扩增试剂盒基础型说明书。扩增体系: A Buffer 25 μL, B Buffer 2.5 μL, RAA-F、RAA-R (10 μmol/L)各 2 μL, 无核酸酶水 3.5 μL, 待扩增的 DNA 5 μL。将反应体系置于金属浴上 39 °C 恒温孵育 30 min 后完成扩增。

1.4 CRISPR 荧光检测

CRISPR/Cas13a 荧光检测体系: rNTP Mix (25 mmol/L) 2 μL, RNase Inhibitor (40 U/μL) 1 μL, T7 RNA 聚合酶(50 U/μL) 0.5 μL, HEPES 缓冲液(1 mol/L) 0.5 μL, MgCl₂ 溶液(1 mol/L) 0.25 μL, 无核酸酶水 10.75 μL, 荧光报告 RNA (2 μmol/L) 2.5 μL, crRNA (100 ng/μL) 1.5 μL, LwaCas13a 蛋白(25 nmol/L) 1 μL, RAA 扩增产物 5 μL。将检测体系置于荧光定量 PCR 仪上 (FAM 荧光通道, 激发光波长 490 nm, 发射光波长 520 nm)恒温 37 °C 孵育, 每 2 min 采集 1 次荧光信号, 共 60 min, 实时监测荧光强度变化。

1.5 CRISPR-ERASE 试纸检测

检测体系: rNTP Mix (25 mmol/L) 4 μL,

RNase Inhibitor (40 U/μL) 2 μL, T7 RNA 聚合酶 (50 IU/μL) 1 μL, HEPES 缓冲液(1 mol/L) 1 μL, MgCl₂ (1 mol/L) 0.5 μL, 无核酸酶水 26.5 μL, 试纸报告 RNA (200 nmol/L) 5 μL, crRNA (100 ng/μL) 3 μL, LwaCas13a 蛋白(25 nmol/L) 2 μL, RAA 扩增产物 5 μL。37 °C 恒温孵育 15 min 后取检测体系加入试纸条加样孔, 等待 3–5 min, 裸眼读取检测结果。

1.6 探针法荧光定量 PCR 检测

PCR 反应体系: *TaqMan*TM Fast Advanced Master Mix 10 μL, qPCR-F、qPCR-R、qPCR-P (10 μmol/L)各 0.5 μL, 无核酸酶水 5.5 μL, 模板 DNA 3 μL, 共 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 次循环; 每个循环结束时采集 1 次荧光信号。

1.7 检测时间的优化

以连续稀释的 HAdV-B 保守序列 PUC57 质粒(10^5 – 10^{-1} copies/μL)为检测模板, 设置 RAA 扩增和试纸检测体系的孵育时间梯度, 对检测时间进行优化。

1.8 模拟样本的检测

向咽拭子保存液中分别加入不同浓度的灭活病毒颗粒 HAdV-B (HAdV-7)和实验室培养病毒 HAdV-B (HAdV-55)作为模拟样本, 使用 MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit 提取样本核酸。先进行荧光定量 PCR 检测, 确定各样本的 C_t 值, 然后进行 CRISPR-ERASE 试纸检测实验。

1.9 数据分析与结果判读

所有实验均进行 3 个独立重复, 并采用独立样本 t 检验进行统计分析。所有实验结果使用 GraphPad Prism 8 进行分析。试纸检测结果判定规则为, 试纸上只出现 C 线未出现 T 线, 判定为阳性; 同时出现 T 线和 C 线, 判定为阴性。

2 结果与分析

2.1 基于 RAA 扩增和 CRISPR 荧光检测 HAdV-B 的可行性验证

选取了 HAdV-B 中可引起呼吸道感染、主要流行且易引起严重临床症状的型别(HAdV-3、HAdV-7、HAdV-11、HAdV-14、HAdV-21、HAdV-55), 在 NCBI 数据库选择了 515 条全基因序列, 经过序列比对分析后, 在 HAdV-B 亚属 E4 区筛选出共 135 bp 的保守序列。在筛选出的保守序列中, 选取了上、下游 RAA 引物和 Cas13a-crRNA (图 2A)。为验证基于 RAA 扩增和 CRISPR 荧光检测 HAdV-B DNA 的可行性, 以含 HAdV-B 保守序列的 PUC57 质粒(10^4 copies/ μL)为检测对象, 通过 RAA 扩增以及 T7 RNA 聚合酶转录获得靶 RNA, 用 crRNA 识别靶 RNA (图 2B), 然后激活 Cas13a 反式切割活性。我们利用荧光报告 RNA 实时荧光监测 Cas13a-crRNA 的反式切割活性。实验结果显示含有 Cas13a-crRNA 复合物和靶 RNA 的样品的荧光强度在 20 min 的检测时间里迅速增加并达到饱和, 在无 Cas13a、crRNA 或靶 RNA 的情况下, 荧光信号无显著变化(图 2C), 并且 Cas13a-crRNA+target 组的检测终点荧光值显著高于其他组, 差异存在统计学意义(图 2D)。这些结果表明 RAA 扩增和 T7 酶转录获得的靶 RNA 可以被 Cas13a-crRNA 复合物准确识别, 并启动其反式剪切活性, 剪切荧光报告 RNA。该系统可准确检测 HAdV-B DNA。

2.2 CRISPR-ERASE 试纸检测 HAdV-B 的灵敏度和特异性评价

为评价 CRISPR-ERASE 试纸检测 HAdV-B 的灵敏度, 首先进行试纸法核酸检测。以 10 倍连续稀释的含 HAdV-B 保守序列的 PUC57 质粒

(10^5 – 10^{-1} copies/ μL)为检测模板, RAA 法 39 °C 等温扩增 30 min, 后将扩增产物加入试纸反应体系中 37 °C 恒温孵育 30 min, 后取检测体系加入试纸条加样孔, 等待检测结果。结果显示, 当质粒模板为 10^5 – 10^0 copies/ μL 时, T 线条带消失, 结果判定为阳性; 当质粒模板为 10^{-1} copies/ μL 时, 试纸 T 线和 C 线均出现条带, 结果与阴性对照一致, 结果判定为阴性, 灵敏度为 10^0 copy/ μL (图 3A)。以相同的梯度稀释含 HAdV-B 保守序列的 PUC57 质粒为模板进行探针法荧光定量 PCR 检测, 结果显示, 检测限为 10^0 copy/ μL , 与试纸法具有相同的检测限(图 3B)。为验证 CRISPR-ERASE 试纸检测 HAdV-B 的特异性, 选取甲型流感病毒(IVA)、新型冠状病毒(SARS-CoV-2)、HAdV-1、HAdV-2、HAdV-4、HAdV-5、HAdV-6 和 HAdV-31 核酸标准物质作为样本, 含 HAdV-B 保守序列的质粒作为阳性对照组(PC)的模板。结果显示, 仅阳性对照组试纸 T 线条带消失, 为阳性; 其余组试纸 T 线和 C 线均出现条带, 为阴性(图 3C), 该方法可特异性地检出 HAdV-B。

2.3 检测时间优化结果

实验结果如图 4 所示, 进行 10 min RAA 扩增后进行 10 min CRISPR 反应的试纸检测灵敏度为 10^2 copies/ μL ; 进行 15 min RAA 扩增后进行 10 min CRISPR 反应的检测灵敏度为 10^1 copies/ μL ; 进行 15 min RAA 扩增后进行 15 min CRISPR 反应的检测灵敏度为 10^0 copy/ μL , 与 30 min RAA 扩增后进行 30 min CRISPR 反应的检测灵敏度相当。结果表明, 15 min 的 RAA 扩增时间加上 15 min 的 CRISPR 反应时间, 考虑到检测过程中存在移液操作, 所以单个检测的时间约为 35 min, 且灵敏度达到 10^0 copy/ μL 。

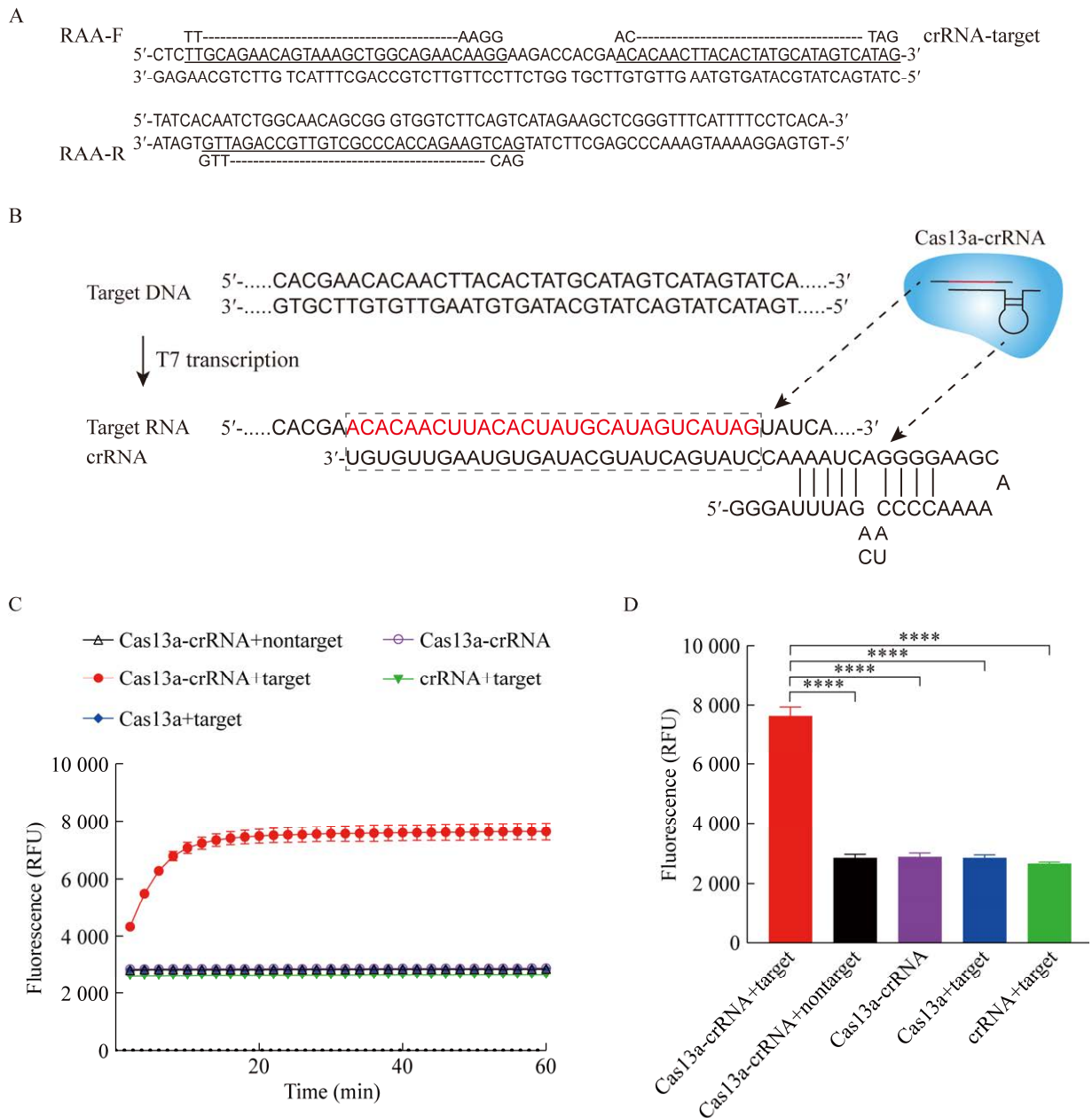


图 2 检测 HAdV-B 的可行性验证 A: RAA 引物和 crRNA 靶点在保守序列上的位置和序列信息. B: Cas13a-crRNA 与检测靶点结合的示意图, 检测靶点以红色标注. C: 基于 RAA 的 Cas13a 系统检测 HAdV-B DNA 的实时荧光曲线. D: 各组在 CRISPR-Cas13a 荧光检测的终点荧光值($n=3$ 次独立重复, 两组独立样本 t 检验, ****: $P<0.0001$)

Figure 2 The feasibility of detecting HAdV-B. A: The sequence and location of RAA primers and crRNA target in the conserved sequence. B: Schematic of ssRNA target detected *via* the Cas13a-crRNA, the target site is highlighted in red. C: The real-time fluorescence curve of the RAA-based Cas13a system for detecting HAdV-B DNA. D: The final fluorescence value of each group was detected by CRISPR-Cas13a fluorescence system ($n=3$ independent replicates, unpaired two-tailed Student's t -test, ****: $P<0.0001$).

2.4 模拟样本检测评估

模拟样本检测结果如图 5 所示, 3 个 HAdV-7 模拟样本的 C_t 值为 28.70、32.34 和 35.70, 试纸法 3 次重复实验均检出; 3 个 HAdV-55 模拟样本的 C_t 值为 29.09、32.46 和 36.19, 试纸法 3 次重复实验均检出; 说明该方法可稳定检出 C_t 值为 35.70 和 36.19 的弱阳性样本。

3 讨论与结论

人腺病毒可通过飞沫、空气在人群中迅速传播, 引起的呼吸道感染常聚集暴发。人腺病

毒 B 亚属相较于其他型别的人腺病毒有更大可能引起呼吸道感染和重症肺炎, 重症肺炎病程相对较长, 临床救治困难, 患者死亡率较高, 并且治愈后易出现肺部后遗症^[24]。目前尚无针对 HAdV 感染的特异性抗病毒药物和相应的疫苗, 仅美国军队使用过针对 HAdV-4 和 HAdV-7 的口服肠包衣疫苗, 临床上的人腺病毒治疗以对症支持、免疫调节治疗和针对并发症的治疗为主^[25]。因此, 有必要对 HAdV 进行检测和分型, 以指导抗病毒治疗和降低疾病严重程度。本研究建立了针对 HAdV-B 的新的检测

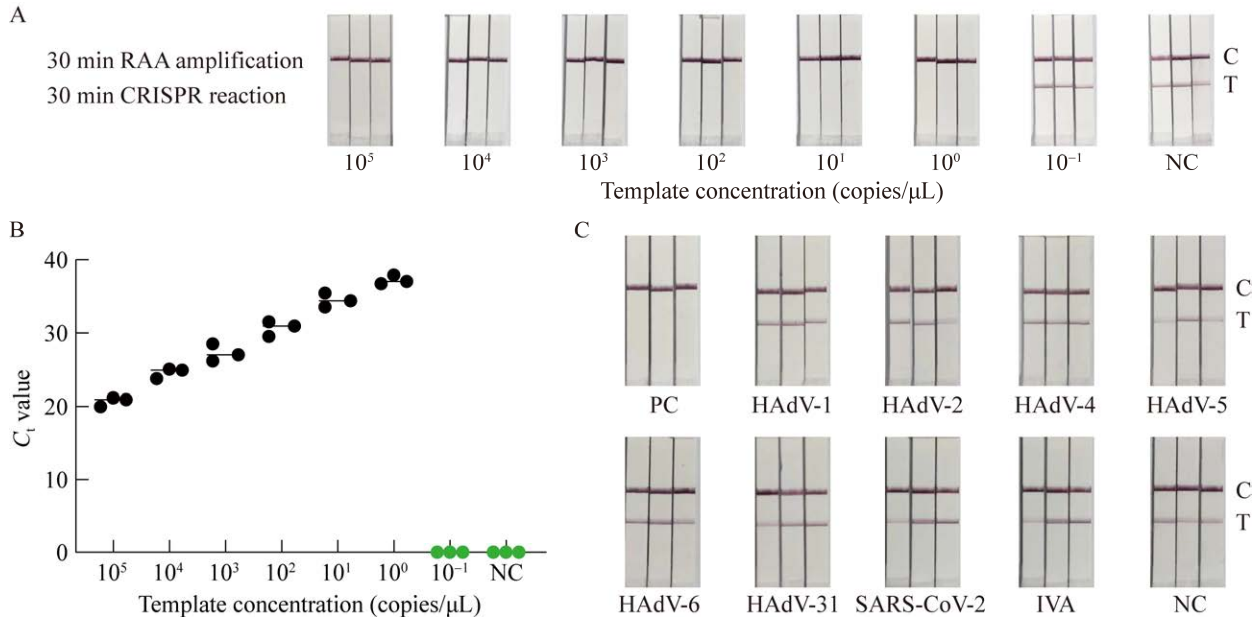


图 3 CRISPR-ERASE 试纸检测方法的灵敏度与特异性评价 A: CRISPR-ERASE 试纸检测 HAdV-B DNA 的灵敏度. B: 荧光定量 PCR 检测 HAdV-B DNA 的结果. C: CRISPR-ERASE 试纸法检测 HAdV-B 特异性实验(PC: 1×10^5 copies/μL; IVA: 1.71×10^3 copies/μL; SARS-CoV-2: 1.1×10^3 copies/μL; HAdV-31: 5.7×10^5 copies/μL; HAdV-1: 4.8×10^5 copies/μL; HAdV-2: 3.8×10^5 copies/μL; HAdV-5: 9.4×10^5 copies/μL; HAdV-6: 8.0×10^5 copies/μL; HAdV-4: 2.5×10^5 copies/μL; NC 为阴性对照组, 是以无酶水为 RAA 扩增模板) Figure 3 Sensitivity and specificity evaluation of CRISPR-ERASE. A: The specificity assay of CRISPR-ERASE detection for HAdV-B DNA. B: Real time PCR detection results of HAdV-B DNA. C: The sensitivity assay of CRISPR-ERASE detection for HAdV-B DNA (PC: 1×10^5 copies/μL; IVA: 1.71×10^3 copies/μL; SARS-CoV-2: 1.1×10^3 copies/μL; HAdV-31: 5.7×10^5 copies/μL; HAdV-1: 4.8×10^5 copies/μL; HAdV-2: 3.8×10^5 copies/μL; HAdV-5: 9.4×10^5 copies/μL; HAdV-6: 8.0×10^5 copies/μL; HAdV-4: 2.5×10^5 copies/μL; NC: Negative control; nuclease-free water was used as RAA amplification template).

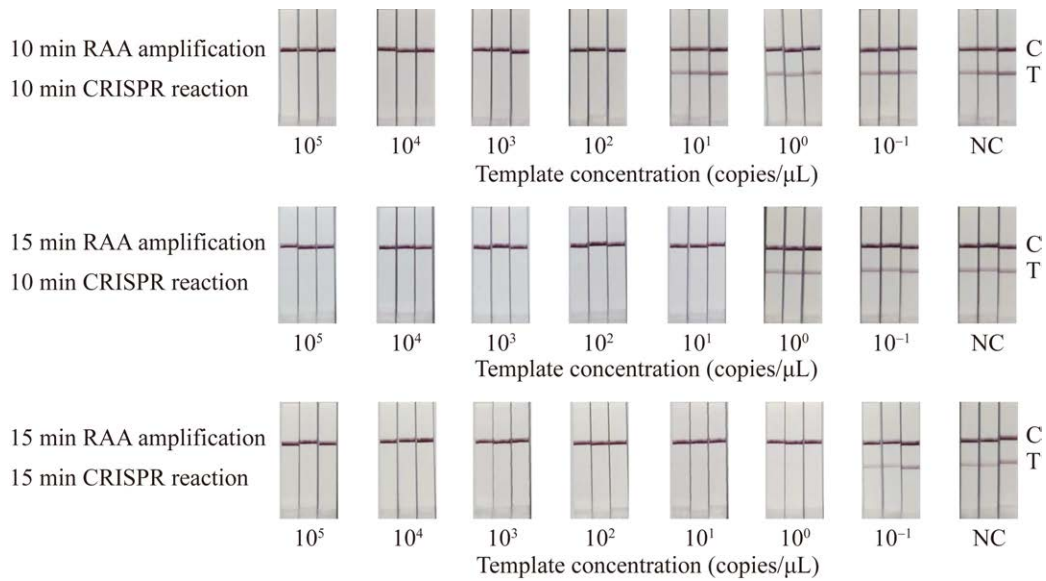


图 4 CRISPR-ERASE 试纸检测时间的优化 NC 为阴性对照组, 以无酶水为 RAA 扩增模板

Figure 4 Optimization of CRISPR-ERASE test strip detection time. NC: Negative control, nuclease-free water was used as RAA amplification template.

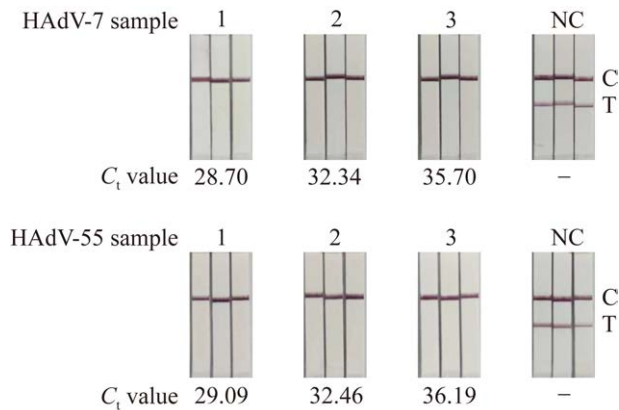


图 5 CRISPR-ERASE 试纸法检测 HAdV-B 模拟样本 CRISPR-ERASE 试纸法与荧光定量 PCR 检测 HAdV-B 模拟样本的结果对比(C_t: 荧光定量 PCR 循环阈值; NC: 阴性对照, 以无核酸酶水为 RAA 扩增模板; C: 质控线; T: 检测线; -: 未检测到)

Figure 5 CRISPR-ERASE detected HAdV-B simulated samples. Comparison of the results of CRISPR-ERASE and qPCR assay for HAdV-B simulated samples (C_t: Cycle threshold; NC: Negative control, nuclease-free water was used as RAA amplification template; C: Control line; T: Test line; -: Undetected).

方法——CRISPR-ERASE 试纸法, 该方法能检出 10⁰ copy/μL 的 HAdV-B 核酸, 并且与其他型别 HAdV、新型冠状病毒和甲型流感病毒无交叉反应。该方法的优势在于: (1) 扩增阶段不需要复杂的热循环步骤, 检测阶段是基于免疫胶体金层析核酸检测技术, 可以快速、便携地检测 HAdV-B 核酸; (2) 基于 CRISPR-Cas13a 系统的 HAdV-B 核酸检测具有良好的灵敏度与特异性。这些优势有助于在人腺病毒疫情暴发时, 简单、快速、准确地检测可能引起严重临床症状的人腺病毒 B 亚属, 为临床治疗及病毒传播的防控提供指导。

CRISPR 是大多数细菌和古菌中的一种获得性免疫系统, 可以保护它们免受病毒入侵。它可以识别并结合外源病毒基因片段, 然后转录成特异性 crRNA。crRNA 引导具有核酸内切酶活性的 Cas 蛋白识别并降解特定的靶序列。近年来, 研究人员发现一些 Cas 蛋白(如 Cas13a) 具有额外的裂解活性, 使其能够利用 CRISPR/Cas

技术构建分子诊断方法。例如, Gootenberg 等利用 CRISPR/Cas13a 结合重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)来检测核酸分子。此外,通过对报告 RNA 两端修饰生物素和小分子抗原 FAM 基团,开发出了一种适用于侧向流免疫层析(lateral flow immunochromatography assay, LFIA)的 CRISPR/Cas13a 快速核酸检测技术,该技术已应用于 SARS-CoV-2 的检测^[20]。然而,这种 CRISPR 核酸测试纸以 T 线显色为阳性判读标准,存在由于主观判读 T 线而导致检测结果出现假阳性的风险。本研究中的 CRISPR-ERASE 核酸测试纸以 T 线完全消除为阳性判断标准,在一定程度上降低了假阳性的风险,并且灵敏度有所提高。

该方法在 HAdV-B 的检测中具有良好的灵敏度与特异度,而且快速、简单、方便,但该方法还存在些许不足之处:(1)仅检测了人腺病毒的 B 亚属,不能区分 B 亚属中具体型别的人腺病毒;(2)需要真实的临床样本来验证该方法的检测效果;(3)检测前需要核酸提取步骤,在现场检测中的应用受到限制。上述局限性可以在未来的工作中进一步研究和解决。可探索在真实临床样品中加入裂解液而无需核酸提取直接检测 HAdV,或者探索加热裂解样本中的病毒后直接检测的可行性。

综上所述,此项研究为目前人腺病毒的检测提供了一种直观、快速的方案,这将有助于解决人腺病毒感染的全球公共卫生问题。

REFERENCES

- [1] 杨传宇, 赵林清. 人腺病毒流行病学研究进展[J]. 病毒学报, 2021, 37(3): 732-739.
YANG CY, ZHAO LQ. Progress in epidemiological study of human adenovirus[J]. Chinese Journal of Virology, 2021, 37(3): 732-739 (in Chinese).
- [2] CONTRERAS GSP, VALENCIA DC, LIZAMA L, ZUÑIGA DV, CARVAJAL LFA, LLANOS SA. An old acquaintance: could adenoviruses be our next pandemic threat?[J]. Viruses, 2023, 15(2): 330.
- [3] 李茂花, 刘庆, 张胤, 甘旭, 杨蓓, 蹇亚丹. 84 例儿童人腺病毒肺部感染及其 DNA 基因分型[J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32(24): 3763-3766.
LI MH, LIU Q, ZHANG Y, GAN X, YANG B, JIAN YD. Human adenovirus pulmonary infection in 84 children and DNA genotypes[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2022, 32(24): 3763-3766 (in Chinese).
- [4] 王涛, 杜虹, 张野, 申焕君, 杨晓飞, 伊宏煜, 李梦苑, 谷孙泽栋, 胡海峰, 连建奇. 人腺病毒 55 型致成人肺炎的临床特征及外周血淋巴细胞亚群分析[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(3): 191-197.
WANG T, DU H, ZHANG Y, SHEN HJ, YANG XF, YI HY, LI MY, GU S, HU HF, LIAN JQ. Clinical characteristics and peripheral blood lymphocyte subsets of HAdV55 pneumonia in adult patients[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2021, 20(3): 191-197 (in Chinese).
- [5] LION T. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2014, 27(3): 441-462.
- [6] PANDA S, BANIK U, ADHIKARY AK. Bioinformatics analysis reveals four major hexon variants of human adenovirus type-3 (HAdV-3) as the potential strains for development of vaccine and siRNA-based therapeutics against HAdV-3 respiratory infections[J]. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 2020, 85: 104439.
- [7] LIN MR, YANG SL, GONG YN, KUO CC, CHIU CH, CHEN CJ, HSIEH YC, KUO CY, FANG CW, TSAO KC, HUANG YC. Clinical and molecular features of adenovirus type 2, 3, and 7 infections in children in an outbreak in Taiwan, 2011[J]. Clinical Microbiology and Infection: the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2017, 23(2): 110-116.
- [8] WO Y, LU QB, HUANG DD, LI XK, GUO CT, WANG HY, ZHANG XA, LIU W, CAO WC. Epidemic features of HAdV-3 and HAdV-7 in pediatric pneumonia in Chongqing, China[J]. Archives of Virology, 2015, 160(3): 633-638.
- [9] BAUTISTA-GOGEL J, MADSEN CM, LU XY, SAKTHIVEL SK, FROH I, KAMAU E, GERBER SI, WATSON JT, COOPER SS, SCHNEIDER E. Outbreak of respiratory illness associated with human adenovirus type 7 among persons attending Officer Candidates

- School, Quantico, Virginia, 2017[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2020, 221(5): 697-700.
- [10] TIAN XG, FAN Y, WANG CB, LIU ZW, LIU WK, XU Y, MO CC, YOU AP, LI X, RONG X, ZHOU R. Seroprevalence of neutralizing antibodies against six human adenovirus types indicates the low level of herd immunity in young children from Guangzhou, China[J]. Virologica Sinica, 2021, 36(3): 373-381.
- [11] 韦仙琴. 成人社区获得性腺病毒肺炎 7 例病例分析并文献复习[D]. 南宁: 广西医科大学硕士学位论文, 2020. WEI XQ. Community-acquired adenovirus pneumonia in adults: seven cases analysis and review of the literature[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi Medical University, 2020 (in Chinese).
- [12] 陈娜, 马超楠, 赵敏. 呼吸道感染腺病毒基因分型研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(8): 741-743, 749. CHEN N, MA CN, ZHAO M. Genotyping of adenoviruses responsible for respiratory infection[J]. Journal of Pathogen Biology, 2014, 9(8): 741-743, 749 (in Chinese).
- [13] SUN B, HE HY, WANG Z, QU JX, LI XY, BAN CJ, WAN J, CAO B, TONG ZH, WANG C. Emergent severe acute respiratory distress syndrome caused by adenovirus type 55 in immunocompetent adults in 2013: a prospective observational study[J]. Critical Care, 2014, 18(4): 456.
- [14] 冯冠榕, 田丽平, 鲁会军, 金宁一, 李楠, 肖朋朋. 腺病毒诊断方法的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(2): 241-244, 250. FENG GR, TIAN LP, LU HJ, JIN NY, LI N, XIAO PP. Advances in the study of methods of diagnosing adenovirus[J]. Journal of Pathogen Biology, 2021, 16(2): 241-244, 250 (in Chinese).
- [15] GAVIN PJ, KATZ BZ. Intravenous ribavirin treatment for severe adenovirus disease in immunocompromised children[J]. Pediatrics, 2002, 110(1): e9.
- [16] 吕蓓, 程海荣, 严庆丰, 黄震巨, 沈桂芳, 张志芳, 李轶女, 邓子新, 林敏, 程奇. 用重组酶介导扩增技术快速扩增核酸[J]. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(10): 983-988. LÜ B, CHENG HR, YAN QF, HUANG ZJ, SHEN GF, ZHANG ZF, LI YN, DENG ZX, LIN M, CHENG Q. Recombinase-aid amplification: a novel technology of *in vitro* rapid nucleic acid amplification[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2010, 40(10): 983-988 (in Chinese).
- [17] 毛迎雪, 刘蒙达, 张皓博, 曲瑶, 南文龙, 苏华彬, 刘建柱, 孙淑芳, 胡莉萍, 樊晓旭. 重组酶介导等温扩增技术(RAA)在病原微生物检测中的应用进展[J]. 中国动物检疫, 2024, 41(1): 60-66. MAO YX, LIU MD, ZHANG HB, QU Y, NAN WL, SU HB, LIU JZ, SUN SF, HU LP, FAN XX. Advances on application of recombinase aided amplification in detection of pathogenic microorganisms[J]. China Animal Health Inspection, 2024, 41(1): 60-66 (in Chinese).
- [18] ABUDAYYEH OO, GOOTENBERG JS, KONERMANN S, JOUNG J, SLAYMAKER IM, COX DBT, SHMAKOV S, MAKAROVA KS, SEMENOVA E, MINAKHIN L, SEVERINOV K, REGEV A, LANDER ES, KOONIN EV, ZHANG F. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. Science, 2016, 353(6299): aaf5573.
- [19] WANG JY, DOUDNA JA. CRISPR technology: a decade of genome editing is only the beginning[J]. Science, 2023, 379(6629): eadd8643.
- [20] GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, KELLNER MJ, JOUNG J, COLLINS JJ, ZHANG F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6[J]. Science, 2018, 360(6387): 439-444.
- [21] 李小辉, 粟斌, 寇志华, 吴昊, 张彤, 孙岩松, 韩尧, 乔惠丽, 李浩, 姜太一. 基于 CRISPR-Cas13a 和 RT-RAA 的 HIV 核酸检测方法的建立[J]. 中国艾滋病性病, 2022, 28(3): 264-270. LI XH, SU B, KOU ZH, WU H, ZHANG T, SUN YS, HAN Y, QIAO HL, LI H, JIANG TY. Establishment of HIV nucleic acid detection method based on CRISPR-Cas13a and RT-RAA[J]. Chinese Journal of AIDS & STD, 2022, 28(3): 264-270 (in Chinese).
- [22] 王彦贺, 董雪, 杨明娟, 李浩, 孙岩松. 基于 CRISPR 的埃博拉病毒核酸检测方法的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(2): 125-130. WANG YH, DONG X, YANG MJ, LI H, SUN YS. Development of a method for CRISPR-based nucleic acid detection of the Ebola virus[J]. Journal of Pathogen Biology, 2021, 16(2): 125-130 (in Chinese).
- [23] LI H, DONG X, WANG YH, YANG L, CAI K, ZHANG XL, KOU ZH, HE L, SUN SH, LI TY, NIE Y, LI XF, SUN YS. Sensitive and easy-read CRISPR strip for COVID-19 rapid point-of-care testing[J]. The CRISPR Journal, 2021, 4(3): 392-399.
- [24] HONG JY, LEE HJ, PIEDRA PA, CHOI EH, PARK KH, KOH YY, KIM WS. Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis[J]. Clinical Infectious Diseases, 2001, 32(10): 1423-1429.
- [25] 席华龙, 顾韩雪, 孙博, 谷铁军. 人腺病毒疫苗的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(4): 493-498. XI HL, GU HX, SUN B, GU TJ. Progress in research on human adenovirus vaccine[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2021, 34(4): 493-498 (in Chinese).