

· 综述 ·

新冠病毒变异株基于核酸扩增检测方法研究进展

伍霞, 张晓, 韩嘉艺, 邢方潇, 叶必雄

中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所 水质量与健康监测室 传染病溯源预警与智能决策全国重点实验室 中国疾病预防控制中心环境与人群健康重点实验室, 北京 100050

通信作者: 叶必雄, E-mail: yebixiong@nieh.chinacdc.cn

【摘要】 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)引起的新冠病毒感染疫情仍在全球范围蔓延, SARS-CoV-2 易发生变异, 导致其变异株传播性、致病性和免疫逃逸能力增强, 对全球造成不可忽视的影响。为有效监测新型冠状病毒感染, 需研发针对变异株准确、灵敏或现场适用的多样化检测技术。本文阐述了 SARS-CoV-2 变异株的基于核酸扩增的检测技术原理及在识别和区分变异株方面的应用, 探讨了方法的优缺点, 对于准确发现并高效检测 SARS-CoV-2 变异株提供参考。

【关键词】 新型冠状病毒; 变异株; 核酸扩增技术

Nucleic acid amplification-based detection methods for SARS-CoV-2 variant detection: research progress review

WU Xia, ZHANG Xiao, HAN Jiayi, XING Fangxiao, YE Bixiong (*Water Quality and Health Monitoring Laboratory, National Key Laboratory of Intelligent Tracking and Forecasting for Infectious Diseases, Key Laboratory of Environment and Population Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 10050, China*)

Corresponding author: YE Bixiong, E-mail: yebixiong@nieh.chinacdc.cn

【Abstract】 The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), continues to spread worldwide. SARS-CoV-2 is prone to mutation, resulting in variants with increased transmissibility, pathogenicity, and immune escape capabilities, posing a significant global threat. To effectively monitor new coronavirus infections, it is necessary to develop diverse detection technologies that are accurate, sensitive, or field-usable for variant identification. This article describes the principles of nucleic acid amplification-based detection techniques for SARS-CoV-2 variants and their applications variant identification and differentiation. It also discusses the advantages and disadvantages of these methods and provides a reference for the accurate identification and efficient detection of SARS-CoV-2 variants.

【Keywords】 SARS-CoV-2; variant; nucleic acid amplification technique

新型冠状病毒感染(coronavirus disease 2019, COVID-19)由新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)引起, 截止到2023年3月10日, 引起的病例超过6.7亿例, 死亡人数超过688万人^[1]。新冠病毒携带刺突(spike, S)蛋白多个突变出现的新谱系引发了全球范围内的更多公共卫生问题^[2]。在刺突蛋白受体结合域(receptor binding domain, RBD)中出现的突变, 会使变异株对宿主细胞表面受体血管紧张素转化酶2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)的亲合力增加, 从而提高病毒的传播性、致病性和免疫逃逸能力^[3]。鉴于此, 需要能够检测变异株的技术来实时监测, 其对公共卫生预防非常重要。本文介绍常见的针对 SARS-CoV-2 变异株的聚合酶链反应(PCR)和等温扩增方法并分析优缺点, 探讨如何高效且快速经济地检测, 这对提高疫情

筛查效率, 对公共卫生防控措施有重大意义。

1 新冠病毒变异株基于核酸扩增的检测技术概述

聚合酶链反应(PCR)是一种以指数级方式扩增核酸分子的技术, 是通过反复热循环, 简便、快速地检测核苷酸多态性和序列变异的方法, 在多个领域均有应用^[4-5], 基于 PCR 的方法可以直接检测病毒 RNA 的存在, 并在几个小时以高通量的方式产生灵敏可靠的结果。实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR)往往是检测 SARS-CoV-2 的首选方法, 能快速测定不同来源不同样本的微量核酸, 具有高灵敏度和高特异性^[6]。其基因分型检测为筛选和鉴定新出现的变异提供了一种经济、快速的解决方案^[7], 随着 SARS-CoV-2 不断变异, 用于检测病毒的 PCR 技术应需不断优化^[8]。



等温扩增方法于 1990 年初开始出现,是一种利用酶来驱动 DNA 或 RNA 在恒定温度下扩增的技术,可用于检测基于核酸分子测定的任何病毒感染^[9-10]。主要有环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR)和重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)3 种技术。等温扩增技术操作流程简单,可分为两大类:(1)通过增加碱液浓度来增加分析信号的技术;(2)在不改变分析物浓度的情况下增加分析信号的技术^[11-12]。

2 新冠病毒变异株基于聚合酶链反应的检测技术(表 1)

2.1 等位基因特异性 PCR 等位基因特异性 PCR (allele specific PCR, AS-PCR)是为分子基因分型开发的一种方法,也称为扩增受阻突变 PCR(amplification refractory mutation system, ARMS-PCR)。这种方法主要是在等位基因特异性引物的 3'端引入错配,具有错配的 3'残基的寡核苷酸将不能作为 PCR 的引物发挥作用,其只需要一个荧光团的单次检测反应便可以进行基因分型^[13-14]。Xu XQ 等^[15]设计了 8 种基于等位基因特异性 RT-qPCR 的检测方法,用于实时鉴别 8 种变异株。针对文中提到的 8 个变异株设计了 2~3 个特征突变位点引物探针的组合,检测方法均达到高灵敏度(90%~100%)和特异性(~100%)。相比病毒全基因组测序,等位基因特异性 PCR 方法检测效率高 1.5 d 且具有成本效益。尤其大多数技术并不能很好的区分 Delta 和 Omicron 变异株, Lee WL 等^[16]用等位基因特异性 RT-qPCR 方法针对从 Q493R 到 Q498R 的突变延伸来定量检测污水中 Omicron 变异株,进行了为期 10 个月的样本检测。其结果验证了此方法对于 Omicron 和 Delta 变异株均体现了较好的特异性,不过这种方法在结果中对于得出准确的变异趋势仍存在受到其他变异株潜在检测交叉反应性影响。

2.2 多重 PCR 多重 PCR 是一种在反应体系同时加入多种特异性引物和探针从而同时扩增多种目的序列的方法,还具有单个 PCR 的灵敏度和特异性^[17],在一次反应中由于引物探针的特异性便能同时检测多个位点从而识别不同变异株。据 Dikdan RJ^[18]报道,可以基于多重定量 RT-PCR 检测方法通过单核苷酸区分分子信标来识别 SARS-CoV-2 变异株的突变,分子信标基于单核苷酸取代设计从而可以选择性结合序列来判断,同时加入多种引物,使用分子信标的靶标区域作

为探针。这种方法具有优异的选择性和特异性,虽说可能会导致假阴性信号,不过这种方法仍可以成为检测变异株的最优选择。此外基于单核苷酸多态性(SNPs)的基因分型方法已经得到广泛开发和应用, Bozidis P 等^[19]开发了多重 PCR 和扩增难治性突变系统(ARMS)的组合方法,设计专门的引物可快速可靠地检测和识别 Omicron 亚谱系以及之前出现过的变异株。Hale R 等^[20]也基于多重 PCR 设计了基因分型的方法,专注于 S 基因的突变设计不同的特异性引物开发多重串联(MT-PCR)检测方法,在低循环数同时快速预扩增所有靶标子,再使用实时 PCR 正常循环数扩增等位基因特异性引物,从而根据 Ct 值差异鉴别野生型或突变型。该方法与 SNP 组合可以识别新的变异型。

2.3 微滴数字 PCR 微滴数字聚合酶链反应(droplet digital PCR, ddPCR)将含有核酸的反应体系分成高度分散的微滴再对每个微滴进行 PCR 反应,依据泊松分布原理、阳性微滴数量和比例定量拷贝数或者浓度^[21]。Perchetti GA 等^[22]通过 ddPCR 特异性检测与 B.1.17 的相关 4 个突变,快速准确区分了 SARS-CoV-2 Alpha 谱系,且无交叉反应扩增的现象。在解析单核苷酸多态性上比 RT-PCR 更敏感,更适合等位基因鉴别来区分变异。Pernet O 等^[23]针对刺突蛋白突变设计 ddPCR 方法来检测变异株,甚至还因为其独特的突变模式检测出来病毒亚谱系。不过这种方法也只能用于评估野生型或突变序列,缺乏用于推断非扩增序列的扩增。在一些污水监测研究中,微滴数字 PCR 可特异性针对 SARS-CoV-2 变异株突变位点设计引物探针检测,灵敏准确地监测当前或变异株中存在的未来突变,并可以监测流行趋势^[24-25]。甚至 Mills MG^[26]通过 RT-ddPCR 检测确认的 419 例阳性样本,其中 99.7% 样本突变与全基因组测序(WGS)结果一致。

3 新冠病毒变异株基于等温扩增的检测技术(表 1)

3.1 LAMP 检测技术 基于环介导的恒温扩增(LAMP)是近年来发展起来的一种新的恒温扩增技术,该技术主要是通过 Bst DNA 酶的链置换功能以及内外引物的相互作用,最终对目的片段进行大量扩增^[27]。LAMP 检测在恒温下对核酸进行指数扩增,反应后无须仪器,只需凭借肉眼观察变色就能知道检测结果,在资源有限的环境中是 RT-PCR 的常用替代检测技术,该技术无须 RNA 提取,无须预处理即可直接使用样本,相对于 PCR 技术是一大亮点^[28]。LAMP 的方法通常用于病原体的序列鉴定,有研究基于 LAMP 原理针对变异

位点 R203M 设计等位基因环引物及其各自的内外引物,根据 2 种反应的扩增效率利用时间间隔可以将 R203M 基因分型,用荧光 Cq 值差方式观察结果,成功地区分出 Delta 变异株^[29]。此外, Talap J 等^[30]基于 RT-LAMP 方法,使用 2 个引物组和结合 2 个分子信标(MB 探针)检测 S 基因的单位点变异,高灵敏和选择性地区分出野生型和特定突变变异株。相对地, Luo Z^[31]针对 LAMP 还设计优化了基于 SARS-CoV-2 N 基因引物,在比色 LAMP 反应系统另外加入钙黄绿素来观察颜色变化判断结果,与 Alpha、Beta、Gamma 和 Omicron 有良好的相容性,在 SARS-CoV-2 诊断中具有可靠的检测能力。

3.2 RPA 检测技术 除 LAMP 外,基于重组酶的等温扩增(RPA)是另一种等温扩增技术^[32]。在等温条件下利用重组酶、DNA 聚合酶和单链结合蛋白进行核酸扩增的技术,也是检测 SARS-CoV-2 灵敏快速的一种替代方法。重组酶聚合酶扩增通常在低温(37~39℃)下扩增^[33],这种方法引物设计简单、无须初始加热步骤且对抑制剂耐受性强,非常适合在资源有限的条件下使用^[34]。Li FY 等^[35]基于荧光探针的实时逆转录重组酶介导扩增技术成功检测了 80 份样本,具有良好灵敏度和特异性,在资源短缺的环境下更适合病原体即时检测(point-of-care test, POCT)筛查。此外,牛梦伟等^[36]基于 RAA 的方法结合 CRISPR 针对 HV69-

70del 位点的快速完成检测,为 SARS-CoV-2 变异株检测提供了一种新的思路。

3.3 CRISPR 检测技术 成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)及其相关蛋白(Cas)系统的定向基因编辑技术在病原微生物检测方面有广阔的应用前景,已应用于 SARS-CoV-2 的核酸检测,包括 CRISPR-Cas12a 和 Cas13a 系统实现病原体的现场快速诊断^[37]。CRISPR-Cas, 诊断原理是 CRISPR RN(crRNA)或向导 RNA(gRNA)可以特异性结合靶序列并激活 Cas 酶用于序列特异性切割(顺式)和非特异性序列切割(反式)^[38]。基于 CRISPR 的 SARS-CoV-2 变异株检测,即区分单核苷酸突变的方向包括优化错配位置、修饰向导 RNA 中核苷酸以及使用 2 个向导 RNA 识别特异性突变序列和保守序列。已经通过 Cas9、Cas12 和 Cas13 三种主要类型的 Cas 蛋白区分和检测 SARS-CoV-2 变异株^[39]。据知, Tang GY^[40]等开发一种逆转录重组酶聚合酶扩增(RT-RPA)和 CRISPR-Cas12a 技术相结合的方法通过交换 crRNA 序列来检测和区分 194 个 SARS-CoV-2 样本,在低温 1 h 内便可以看到结果,无须 RNA 提取纯化便能简单快速的区分。相对地, Fasching CL 等^[41]基于 CRISPR 结合 LAMP 方法,比较得出 CasDx1 酶准确识别所有靶向 SNP 突变,在 SNP 分析和谱系分类方面分别达到 97.3% 和 98.9% 的一致性,实现了变异株更简单快速的检测。

表 1 新冠病毒变异株基于核酸扩增的主要检测方法

Table 1 Technology, detection target, detection method and related reference of five commonly used nucleic acid amplification-based methods for SARS-CoV-2 variant detection

检测技术	检测对象	检测方法	参考文献
等位基因PCR	刺突蛋白突变位点	RT-PCR识别病毒核酸	[15]
多重PCR	Omicron 变体	RT-qPCR识别突变片段	[16]
	刺突蛋白突变; omicron变体	单核苷酸区分分子信标多重检测	[18]
	S基因突变	多重串联(MT-PCR)通过ct值差异鉴定	[20]
微滴数字PCR	B.1.1.17; N501Y	ddPCR特异性检测	[22]
LAMP	R203M突变点; Delta	RT-LAMP恒温下使用多个引物鉴定特定区域	[29]
		结合MB探针检测	
	S基因	加入钙黄绿素观察颜色变化	[30]
	Alpha、Beta、Gamma和Omicron		[31]
RPA	HV69-70del突变位点	RT-RAA结合CRISPR快速检测	[36]
CRISPR	N501Y;T478K;HV69-70del突变点	(RT-RPA)和CRISPR-Cas12a结合交换crRNA序列	[40]

4 新冠病毒变异株基于核酸扩增的检测技术优缺点(表 2)

近年来, SARS-CoV-2 在全世界不断传播、变异,其快速变异会影响疫苗免疫效果、人群感染传播规律、疫情趋势判断、防控策略的制定等,而 SARS-CoV-2 的早期诊断对于防控有重要意义,需要高效检测变异株的技术。

等位基因特异性 PCR 为具有已知突变特性的位点设计引物探针可以更快检测变异株,虽说

这种方法对于检测未知变异株存在一定的局限性,但是一种简单、经济、具有高特异性和灵敏度的方法,可作为检测变异株的预筛选方法^[15-16]; SARS-CoV-2 病毒不断变异,多重 PCR 可以同时检测多个突变诊断突变和变异株,从而控制感染提前预警并采取有针对性的措施,而且多重 PCR 协同其他方法如等位基因特异性 PCR 会达到更好的效果,只是这种方法偶尔会得出假阴性的结论^[18]; 数字 PCR 无须标准曲线就能绝对定量,不依赖

Ct 值。尽管存在一些限制，如在临床环境中并未广泛使用，但是这种方法通过使用特殊的微孔板分析混合物微滴可以分析每个分子，受 PCR 抑制剂影响较小，对于低浓度样本也有高灵敏度^[23,26]。

基于等温的扩增技术优势在于，其可以在恒定温度下扩增目标核酸从而避免对昂贵热循环仪的要求，即可以用非常简单的加热源，如水浴锅进行，检测速度更快。此外，这种方法允许在很宽的温度范围内进行检测分析，此外，等温扩增中使用的比色指示剂也很容易以低成本获得^[9-10]。固然 LAMP 反应通常会导致在没有靶标的情况下进行非特异性扩增，从而降低灵敏度，不过 LAMP

反应中的 Bst DNA 聚合酶对常见的临床抑制剂具有高度耐受性，而且 LAMP 还具有等温放大等优点^[28]；重组酶等温扩增引物设计简单、无须加热，只是相比 LAMP 技术，重组酶介导的核酸技术体系更复杂，难以在实际工作中得到应用^[34]；基于 CRISPR 的方法适用于即时检测和和资源有限的环境中快速检测主要 SARS-CoV-2 变异株，低扩增温度的条件还可以简化检测操作并避免 Cas 蛋白在热循环过程中失活或扩增产物引起的潜在污染，相对地，这种方法会受到 Cas 酶干扰而影响结果^[39-40]。

表 2 基于核酸扩增的检测方法优缺点汇总

Table 2 Advantages, disadvantages, and related references of five commonly used nucleic acid amplification-based methods for SARS-CoV-2 variant detection

项目	方法	优点	缺点	参考文献
聚合酶链反应(PCR)	等位基因特异性PCR	检测效果好; 周转时间短;	需要了解变异株的突变性质; 交叉反应	[15-16]
	多重PCR	同时检测多个突变位点	假阴性	[18]
	数字微滴PCR	绝对定量; 灵敏准确	经济花费多; 不能推断非扩增序列扩增; 准确性随着突变而变化	[22-23, 26]
等温扩增	LAMP	无须复杂热循环仪; 适用资源有限的实验室	假阳性; 稳定性差	[28]
	RPA/RAA	无须初始加热; 对抑制剂耐受性强	技术体系复杂难以运用	[34]
	CRISPR	特异性高; 快速筛查; 成本低; 快速诊断	病毒载量低的样品灵敏度低; Cas酶干扰	[39-40]

5 总结与展望

监测新型冠状病毒有十分重要的意义，各种检测技术的发展为 COVID-19 的筛查及疫情的控制提供了技术保障。本文针对两类基于核酸扩增的方法对其技术原理和应用特点进行了系统的阐述并且分析了各自的优缺点。且这些基于核酸扩增的诊断方法都能在一定程度上经济高效地检测 SARS-CoV-2 变异株。

目前基因测序技术依然是 SARS-CoV-2 变异株监测的金标准，不过这种方法成本高，仪器试剂昂贵，而且操作繁琐，要求操作人员专业性强等限制了其广泛的应用，本文所述的这些方法虽不会取代测序作为 SARS-CoV-2 变异株检测的参考标准，但是方法成本的降低、易操作及适用资源有限的环境中对于公共卫生应对疫情有重要意义，可以作为变异株检测的替代方法。对于变异株的检测方法研究人员一直在探索操作简单，对于碱基突变有较高灵敏度、特异度的检测方法。随着检测技术的发展，研究人员也在开发精准高效的技术同时将新型冠状病毒与其他呼吸道病毒区分检测，未来多技术联合检测的创新也能实现新型冠状病毒更加精准、快速便捷地检测并应用于其他病原体的检测中。

参考文献

- [1] 约翰霍普金斯大学冠状病毒资源中心. The Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. COVID-19 map[EB/OL]. [2024-03-18]. <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>.
- [2] Wolf JM, Wolf LM, Bello GL, et al. Molecular evolution of SARS-CoV-2 from December 2019 to August 2022[J]. *Journal of Medical Virology*, 2023, 95(1): e28366.
- [3] 杨静远, 李永鑫, 张新. 新型冠状病毒变异株分子诊断的研究现状[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2023, 15(8): 1283-1287.
- [4] Kalendar R, Shustov AV, Akhmetollayev I, et al. Designing allele-specific competitive-extension PCR-based assays for high-throughput genotyping and gene characterization[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2022, 9: 773956.
- [5] 梁海燕, 刘文鑫, 杨志刚等. 温核酸扩增技术进展[J]. *中国医学创新*, 2017, 14(16): 145-148.
- [6] Sule WF, Oluwayelu DO. Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: challenges and prospects[J]. *Pan African Medical Journal*, 2020, 35(2): 121.
- [7] Umunnakwe CN, Makatini ZN, Maphanga M, et al. Evaluation of a commercial SARS-CoV-2 multiplex PCR genotyping assay for variant identification in resource-scarce settings[J]. *PLoS One*, 2022, 17(6): e0269071.
- [8] Li XH, Wang J, Geng JP, et al. Emerging landscape of SARS-CoV-2 variants and detection technologies[J]. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 2023, 27(2): 159-177.
- [9] Vindeirinho JM, Pinho E, Azevedo NF, et al. SARS-CoV-2 diagnostics based on nucleic acids amplification: from fundamental concepts to applications and beyond[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 799678.
- [10] Jiang H, Li Y, Lv XF, et al. Recent advances in cascade isothermal amplification techniques for ultra-sensitive nucleic acid detection[J]. *Talanta*, 2023, 260: 124645.
- [11] Bodulev OL, Sakharov IY. Isothermal nucleic acid amplification

- techniques and their use in Bioanalysis[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2020, 85(2): 147 – 166.
- [12] Islam MM, Koirala D. Toward a next-generation diagnostic tool: a review on emerging isothermal nucleic acid amplification techniques for the detection of SARS-CoV-2 and other infectious viruses[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1209: 339338.
- [13] O'Meara D, Ahmadian A, Odeberg J, et al. SNP typing by apyrase-mediated allele-specific primer extension on DNA microarrays[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(15): e75.
- [14] Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(7): 2503 – 2516.
- [15] Xu XQ, Deng Y, Ding JH, et al. Real-time allelic assays of SARS-CoV-2 variants to enhance sewage surveillance[J]. *Water Research*, 2022, 220: 118686.
- [16] Lee WL, Armas F, Guarneri F, et al. Rapid displacement of SARS-CoV-2 variant Delta by Omicron revealed by allele-specific PCR in wastewater[J]. *Water Research*, 2022, 221: 118809.
- [17] 官昭瑛, 李慧敏, 何曼文, 等. 多重 PCR 技术在快速检测中的应用[J]. *山东化工*, 2021, 50(3): 85 – 88.
- [18] Dikdan RJ, Marras SAE, Field AP, et al. Multiplex PCR assays for identifying all major severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 variants[J]. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2022, 24(4): 309 – 319.
- [19] Bozidis P, Petridi E, Gartzonika K, et al. An ARMS-multiplex PCR targeting SARS-CoV-2 omicron sub-variants[J]. *Pathogens*, 2023, 12(8): 1017.
- [20] Hale R, Crowley P, Dervisevic S, et al. Development of a multiplex tandem PCR (MT-PCR) assay for the detection of emerging SARS-CoV-2 variants[J]. *Viruses*, 2021, 13(10): 2028.
- [21] Lou XY, Yan H, Su LX, et al. Detecting the neuraminidase R294K mutation in avian influenza A (H7N9) virus using reverse transcription droplet digital PCR method[J]. *Viruses*, 2023, 15(4): 983.
- [22] Perchetti GA, Zhu HY, Mills MG, et al. Specific allelic discrimination of N501Y and other SARS-CoV-2 mutations by ddPCR detects B.1.1.7 lineage in Washington State[J]. *Journal of Medical Virology*, 2021, 93(10): 5931 – 5941.
- [23] Pernet O, Weissenhaus M, Stafylis C, et al. SARS-CoV-2 viral variants can rapidly be identified for clinical decision making and population surveillance using a high-throughput digital droplet PCR assay[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 7612.
- [24] Van Poelvoorde LAE, Picalausa C, Gobbo A, et al. Development of a droplet digital PCR to monitor SARS-CoV-2 omicron variant BA. 2 in wastewater samples[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(3): 729.
- [25] Heijnen L, Elsinga G, De Graaf M, et al. Droplet digital RT-PCR to detect SARS-CoV-2 signature mutations of variants of concern in wastewater[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 799: 149456.
- [26] Mills MG, Hajian P, Bakhsh SM, et al. Rapid and accurate identification of SARS-CoV-2 Omicron variants using droplet digital PCR (RT-ddPCR)[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2022, 154: 105218.
- [27] 黄旭春, 关丽梅, 况文东, 等. 可视化 LAMP 技术快速检测新冠病毒的方法[J]. *江西科学*, 2021, 39(4): 593 – 596,621.
- [28] Jiang WJ, Ji WQ, Zhang Y, et al. An update on detection technologies for SARS-CoV-2 variants of concern[J]. *Viruses*, 2022, 14(11): 2324.
- [29] Yang JN, Hu XJ, Wang WZ, et al. RT-LAMP assay for rapid detection of the R203M mutation in SARS-CoV-2 delta variant[J]. *Emerging Microbes and Infections*, 2022, 11(1): 978 – 987.
- [30] Talaga J, Shen MZ, Yu LS, et al. RT-LAMP assay combining multi-fluorescent probes for SARS-CoV-2 RNA detection and variant differentiation[J]. *Talanta*, 2022, 248: 123644.
- [31] Luo Z, Ye CH, Xiao H, et al. Optimization of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for robust visualization in SARS-CoV-2 and emerging variants diagnosis[J]. *Chemical Engineering Science*, 2022, 251: 117430.
- [32] Fan XX, Li L, Zhao YG, et al. Clinical validation of two recombinase-based isothermal amplification assays (RPA/RAA) for the rapid detection of African swine fever virus[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1696.
- [33] Cherkaoui D, Heaney J, Huang D, et al. Clinical validation of a rapid variant-proof RT-RPA assay for the detection of SARS-CoV-2 [J]. *Diagnostics*, 2022, 12(5): 1263.
- [34] Malaga JL, Pajuelo MJ, Okamoto M, et al. Rapid detection of SARS-CoV-2 RNA using reverse transcription recombinase polymerase amplification (RT-RPA) with lateral flow for N-protein gene and variant-specific deletion-insertion mutation in S-protein gene[J]. *Viruses*, 2023, 15(6): 1254.
- [35] Li FY, He P, Xiong DY, et al. A reverse transcription recombinase-aided amplification method for rapid and point-of-care detection of SARS-CoV-2, including variants[J]. *Viruses*, 2021, 13(9): 1875.
- [36] 牛梦伟, 李浩, 杨兰, 等. 基于 RAA-CRISPR 的新型冠状病毒变异位点快速检测方法的建立[J]. *军事医学*, 2023, 47(3): 161 – 168.
- [37] 杜悦. 基于 CRISPR-Cas 系统的新型冠状病毒及 D614G 突变位点的快速检测[D]. 郑州: 郑州大学, 2021.
- [38] Liang YH, Lin HQ, Zou LR, et al. CRISPR-cas12a-based detection for the major SARS-CoV-2 variants of concern[J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9(3): e0101721.
- [39] Xiao HY, Hu JY, Huang C, et al. CRISPR techniques and potential for the detection and discrimination of SARS-CoV-2 variants of concern[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2023, 161: 117000.
- [40] Tang GY, Zhang ZL, Tan W, et al. RT-RPA-cas12a-based assay facilitates the discrimination of SARS-CoV-2 variants of concern [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2023, 381: 133433.
- [41] Fasching CL, Servellita V, Mckay B, et al. COVID-19 variant detection with a high-fidelity CRISPR-cas12 enzyme[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2022, 60(7): e0026122.