



基于催化发夹自组装技术的新型冠状病毒靶RNA快速荧光检测法的建立*

方楚斌¹, 唐田¹, 周琛¹, 张婧², 林华², 朱娅岚¹, 杨加雪¹, 汪川^{1△}

1. 四川大学华西公共卫生学院/四川大学华西第四医院(成都 610041); 2. 成都海关技术中心(成都 610041)

【摘要】目的 建立一种基于催化发夹自组装技术(catalytic hairpin assembly, CHA)的新型冠状病毒(简称新冠病毒)靶RNA荧光检测法,实现对新冠病毒核酸的快速检测。**方法** 根据CHA反应原理,选择新冠病毒核衣壳蛋白基因(N基因, NC_045512.2)上长24 nt的片段作为检测靶点(即靶RNA),设计合成发夹探针H1、H2,并在探针H1上修饰荧光基团和猝灭基团;在室温(25 ℃)下,向探针溶液中加入靶RNA引发CHA反应,通过检测反应过程中荧光强度的变化实现对靶RNA的快速检测;优化检测探针及反应条件,对方法的灵敏度和特异性进行评价。**结果** 成功建立了针对新冠病毒靶RNA的荧光CHA法,可于室温下在30 min内完成检测,该法除具有优良的特异性、可准确区分靶RNA和发生单碱基突变的靶RNA之外,还具有良好的灵敏度,检出限为50 pmol/L。**结论** 本研究所提出的方法实现了对新冠病毒靶RNA简单快速的检测,具有优良的特异性和灵敏度,有望通过进一步优化以用于临床新冠病毒核酸样本的快速检测。

【关键词】 新型冠状病毒 核酸检测 催化发夹自组装 荧光

Development of a Catalytic Hairpin Assembly-Based Fluorescent Assay for the Rapid Detection of SARS-CoV-2 Target RNA

FANG Chubin¹, TANG Tian¹, ZHOU Chen¹, ZHANG Jing², LIN Hua², ZHU Yalan¹, YANG Jiaxue¹, WANG Chuan^{1△}. 1. West China School of Public Health and West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Technology Center of Chengdu Customs, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, Email: wangchuan@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To develop a catalytic hairpin assembly (CHA)-based fluorescent assay for the detection of the target RNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2), so as to realize the rapid nucleic acid testing of SARS-CoV-2. **Methods** A 24-nt segment of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein gene (N gene, NC_045512.2) was chosen as the target RNA and the hairpin motif 1 (H1) and hairpin motif 2 (H2) were designed based on the principle of CHA reaction. The H1 motif was labelled with a fluorophore group as well as a quencher group. When the target RNA was added to the hairpin motifs, CHA reaction was triggered at room temperature (25 ℃), which led to the amplification of fluorescence signal, thereby enabling the rapid detection of the target RNA. After the optimization of the hairpin motifs and the experimental conditions, the sensitivity and the specificity of the testing method were measured to evaluate its performance. **Results** We successfully constructed a CHA-based fluorescent assay specifically for the target RNA of SARS-CoV-2. With this method, testing could be completed at room temperature within 30 min. This testing method exhibited excellent specificity and could be used to accurately distinguish the perfectly-matched target RNA from the target RNA with single-base mutations. In addition, the testing method demonstrated good sensitivity, with a detection limit of 50 pmol/L. **Conclusion** The proposed assay enables the simple and rapid detection of the SARS-CoV-2 target RNA with excellent sensitivity and specificity, showing great promise for further optimization and subsequent clinical application for the rapid detection of SARS-CoV-2 nucleic acid.

【Key words】 SARS-CoV-2 Nucleic acid testing Catalytic hairpin assembly Fluorescence

2019年12月,由一种新型冠状病毒——严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, SARS-CoV-2,下文简称新冠病毒)引发的疫情开始在全球蔓延^[1]。患者通常会出现发热、干咳等流感样症状,部分患者会出现急性呼吸窘迫综合征等严

重症状,并可能发生多器官功能障碍^[2]。目前用于新冠病毒感染诊断的方法主要包括影像学检查^[3-4]、免疫学检测^[5]和核酸检测^[6]等。影像学检查可用于监测病程发展、评估治疗效果,但无法识别部分轻症或无症状患者^[7]。免疫学检测操作简单、方便快捷,但存在检测窗口期,且假阳性率较高。相较而言,核酸检测方法更为准确可靠,其中RT-qPCR法具有较高的灵敏度和特异性。然而,由于其操作繁琐且对实验室条件及操作人员技术要求高,RT-qPCR法在大规模筛查工作中的应用存在一定困难。因此,急需建立一种简单高效的新冠病毒核酸检测方法。

* 成都市科学技术局重大科技应用示范项目(No. 2022-YF09-00011-SN),四川省科学技术厅重点研发项目(No. 2021YFS0005、No. 2021YFS0179、No. 2022YFS0513)和国家自然科学基金(No. 82304196)资助

△ 通信作者, Email: wangchuan@scu.edu.cn

出版日期: 2024-01-20

催化发夹自组装技术(catalytic hairpin assembly, CHA)最初由YIN等^[9]于2008年提出,是一种不依赖酶的等温核酸扩增技术。CHA技术具有反应体系简单、反应效率高等特点,弥补了常规核酸扩增技术需要依赖酶、反应程序复杂、操作繁琐等不足。借助不同信号捕捉技术,如荧光法^[9]、电化学法^[10]、比色法^[11]以及化学发光法^[12]等,CHA反应可实现多种形式的结果判读;通过联用其他技术,CHA技术还可用于多种目标物的检测,如核酸^[13]、蛋白质^[14]、金属离子^[15]以及细胞^[16]等。本研究拟以新冠病毒N基因(NC_045512.2)的片段为靶RNA,建立一种基于荧光CHA技术的新冠病毒核酸检测方法,探究CHA技术应用于新冠病毒核酸检测的可行性,为实现新冠病毒的快速检测提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 试剂及仪器

$C_4H_{11}NO_3$ 购自于德国neoFroxx有限公司;硼酸购自

于天津市瑞金特化学品有限公司;EDTA-2Na购自于天津福晨化学试剂有限公司;Tris-EDTA缓冲液(10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, pH= 8)购自于北京兰杰柯科技有限公司。除特殊说明,所用试剂均为分析纯。

使用F-4700荧光分光光度计(日立,日本)进行荧光检测,使用Nanodrop 2000超微量分光光度计(赛默飞,美国)进行核酸浓度测定,使用iBright 1500成像系统(赛默飞,美国)进行凝胶成像。

1.2 检测原理

荧光CHA法的原理如图1所示,反应可在室温下(25 ℃)进行。反应体系主要包括两条发夹探针链(hairpin motif 1和hairpin motif 2,即H1和H2)及一条引发链(即新冠病毒靶RNA)。H1、H2可借助自身互补序列各自形成相对稳定的发夹结构。H1的发夹柄上修饰有荧光基团FAM及猝灭基团DABCYL,由于发夹结构的形成,两个基团相互靠近,使得FAM的荧光被DABCYL猝灭。

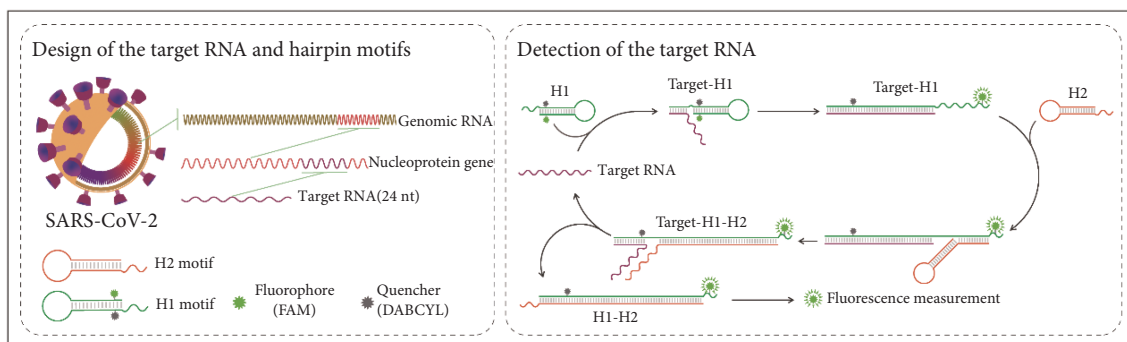


图1 荧光CHA法原理图

Fig 1 Schematic diagram of the CHA-based fluorescent assay

当反应体系中存在靶RNA时,靶RNA可与H1的黏性末端(即toehold链)杂交并引发链置换反应,形成target-H1复合物。Target-H1复合物的生成使H1的发夹结构被打开,进而拉大FAM与DABCYL的距离,使FAM的荧光得到恢复。与此同时,H1上新暴露出的黏性末端又可与H2的toehold链杂交,介导target-H1与H2发生新一轮的链置换反应,形成H1-H2复合物,并将靶RNA置换下来。此后游离的靶RNA继续参与CHA反应,通过多次链置换反应催化更多H1-H2复合物的形成。最终,大量发夹探针H1被打开,反应体系的荧光强度显著提高。

1.3 靶RNA及发夹探针制备

以新冠病毒N基因(NC_045512.2)作为靶基因,根据CHA反应原理,选择N基因上长为24 nt的一个片段作为靶RNA,并对发夹探针H1、H2的序列进行设计。所有寡

核苷酸链的序列信息如表1所示。实验前将寡核苷酸链用Tris-EDTA缓冲液溶解备用,再将H1、H2分别于95 ℃下加热5 min后缓慢降温至室温,以形成正确的发夹结构。

1.4 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

配制15%的非变性聚丙烯酰胺凝胶。将靶RNA与探针H1(无荧光基团)、H2充分混匀,室温孵育30 min后取15 μL混合液上样,以100 V恒压电泳1 h。凝胶中预加有0.01% Goldview核酸染料,电泳结束后可直接用凝胶成像仪显影成像。

1.5 荧光检测

将靶RNA与探针H1(有荧光基团)、H2充分混匀,室温孵育30 min后取80 μL混合液加至狭缝比色皿内,用荧光分光光度计扫描荧光光谱。扫描参数如下:光电倍增

表 1 寡核苷酸链序列
Table 1 The sequences of the oligonucleotides

Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')	Remark
H1-6	tgctgtttctctctctcgcggccatgtgtagactaacgcagagacagaaga	toehold length=6 nt
H2-6	tctgcggttagtctacacatggaccgcagagacagaagaacctgtgtagactaac	toehold length=6 nt
H1-8	tgctgtttctctctctcgcggccatgtgtagactaacgcagagacagaag	toehold length=8 nt
H2-8	tctgcggttagtctacacatggaccgcagagacagaagaacctgtgtagactaac	toehold length=8 nt
H1-10	tgctgtttctctctctcgcggccatgtgtagactaacgcagagacaga	toehold length=10 nt
H2-10	tctgcggttagtctacacatggaccgcagagacagaagaacctgtgtagac	toehold length=10 nt
H1-12	tgctgtttctctctctcgcggccatgtgtagactaacgcagagaca	toehold length=12 nt
H2-12	tctgcggttagtctacacatggaccgcagagacagaagaacctgtgtag	toehold length=12 nt
Florescent H1	tgctgtttctctct(DABCYL)ctctcgcggccatgtgtagactaacgcagagaf*(FAM)caga	fluorophore on stem
Florescent H1'	tgctgtttct(DABCYL)ctgtctcgcggccatgtgtagactaacgcagagacaga(FAM)	fluorophore on 3'-end
Perfectly matched target RNA (PT)	accgcagagacagaagaacagca	
Single base deleted target RNA (DT)	accgcagagaca_aagaacagca	
Single base inserted target RNA (IT)	accgcagagacagcaagaacagca	
Single base mismatched target RNA (MT)	accgcagagacacaagaacagca	
60-nt RNA	aaaaagaagaaggcugaugaacucuaagccuu <u>accgcagagacagaagaacagca</u> aaac**	

* Thymine (in bold font) was added for the fluorophore modification; ** the underlined part was the sequence of the target RNA (24 nt).

管电压为 750 V、狭缝宽度为 5 nm、激发光波长为 496 nm、发射光波长扫描范围为 506 ~ 650 nm。将 519 nm 处的荧光强度变化值 ΔF 作为反应信号, 用于方法优化及评价, 其中 $\Delta F = F - F_0$, F 为加入靶 RNA 孵育后反应体系的荧光强度, F_0 则为未加入靶 RNA 孵育后的荧光强度。

2 结果与讨论

2.1 可行性分析

为验证方法的可行性, 本研究分别使用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis, native PAGE) 和荧光光谱扫描对反应产

物进行检测。

图2A为各组反应产物的电泳结果。泳道8、9的条带分别为发夹探针H1和H2。由泳道2、3可知, 将靶RNA与H1混合孵育后, 可形成大小约为50 bp的产物, 即target-H1复合物。泳道6、7对应的反应体系为H1+H2, 其产物条带的位置略高于target-H1条带, 且颜色明显较浅, 表明仅有少量H1和H2发生杂交并形成H1-H2复合物。当反应体系中存在靶RNA时, H1-H2复合物所对应的条带颜色明显变深(泳道4、5), 说明靶RNA的存在显著促进了H1-H2复合物的形成。

图2B为各组反应产物的荧光光谱扫描结果。其中, H1组及H1+H2组的荧光信号主要为发夹探针的亚稳态

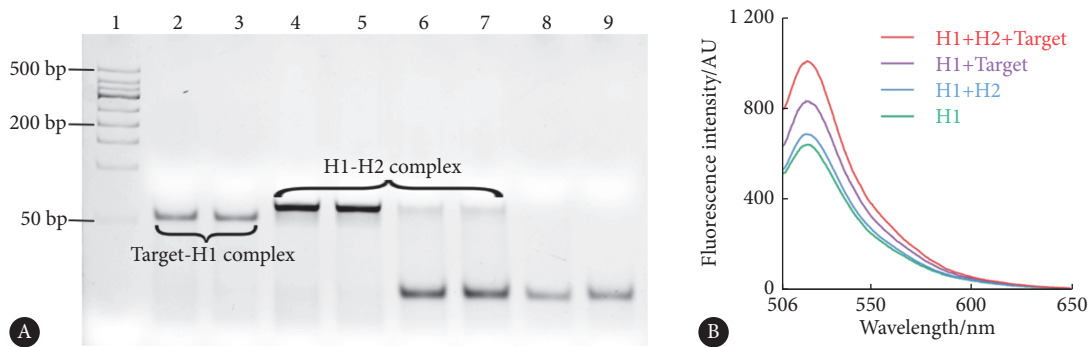


图 2 检测方法可行性分析

Fig 2 Feasibility analysis of the assay

A, The result of Native PAGE. Lane 1: 50 bp DNA ladder; lane 2, lane 3: H1+target RNA; lane 4, lane 5: H1+H2+target RNA; lane 6, lane 7: H1+H2; lane 8: H1; lane 9: H2. The concentrations of the target RNA, H1 and H2 were all 3.3 $\mu\text{mol/L}$. B, The results of fluorescence measurement. The concentrations of the target RNA, H1, and H2 were 10 nmol/L, 300 nmol/L, and 300 nmol/L, respectively.

性质所致: 由于DNA二级结构是处于动态平衡下的结构, H1、H2无法一直保持完整的发夹结构, 因此H1的FAM荧光不会被DABCYL完全猝灭, H1与H2也可在靶RNA不存在的情况下发生一定程度的杂交, 进而导致H1的荧光泄露和非特异性杂交信号的产生。尽管如此, 与H1组相比, H1+H2组、H1+target组及H1+H2+target组的荧光强度仍有不同程度的增加, 且H1+H2+target组荧光强度的增加明显大于其他组, 表明靶RNA的加入能够引发CHA反应, 并促进H1-H2复合物形成, 使反应体系的荧光强度得到显著提高。

2.2 发夹探针优化

Toehold链的长度是影响CHA反应效率的主要因素^[17]; 较长的toehold链可提高CHA反应速率, 但同时也会增加H1和H2的非特异性结合。为确定toehold的最佳长度, 本研究设计并合成不同长度的H1、H2探针。如表1所示, 连字符后的数字代表toehold的长度, 如H1-6、H1-8、

H1-10和H1-12表示H1的toehold长度分别为6 nt、8 nt、10 nt和12 nt。由图3A可知, 随着toehold长度的增加, H1-H2复合物的生成量逐渐增加(泳道3、6、9); 当toehold长度增加为12 nt时, H1、H2间的非特异性结合明显增多(泳道13)。综合考虑, 本研究将10 nt作为H1、H2的最佳toehold长度。

由于基团修饰会影响DNA双链的形成^[18], 本研究设计了荧光基团修饰位点不同的两种H1探针(荧光探针H1和H1'), 对比不同修饰位点对CHA反应结果的影响。如图3B所示, 相较于将荧光基团修饰在H1的3'末端, 将荧光基团修饰在H1发夹柄上可显著降低反应的荧光背景信号。因此, 本研究选择将荧光基团修饰在H1的发夹柄上。

2.3 反应条件优化

为确定荧光CHA法的最佳反应条件, 本研究对发夹探针浓度、反应溶液pH值以及反应时间进行优化。如图4A所示, 随着H1和H2探针浓度的增加, 荧光强度变化

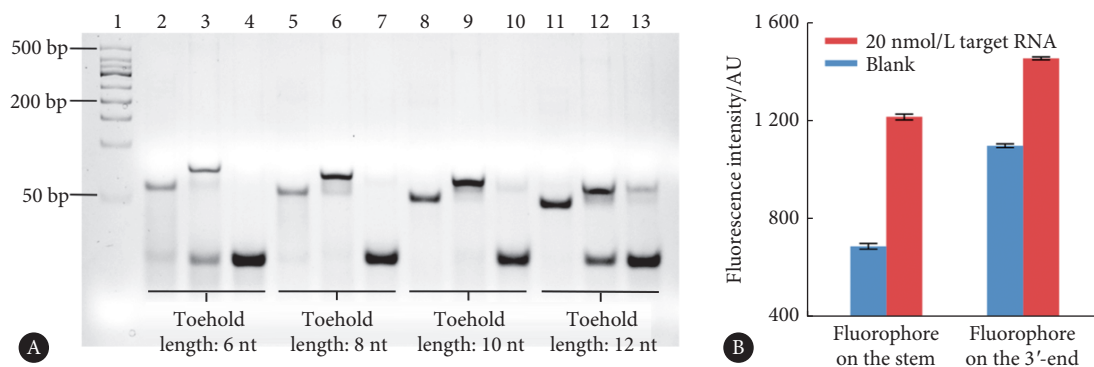


图 3 发夹探针优化

Fig 3 Optimization of the hairpin motifs

A, The result of Native PAGE. Lane 1: 50 bp DNA ladder; lane 2: H1-6+target RNA; lane 3: H1-6+H2-6+target RNA; lane 4: H1-6+H2-6; lane 5: H1-8+target RNA; lane 6: H1-8+H2-8+target RNA; lane 7: H1-8+H2-8; lane 8: H1-10+target RNA; lane 9: H1-10+H2-10+target RNA; lane 10: H1-10+H2-10; lane 11: H1-12+target RNA; lane 12: H1-12+H2-12+target RNA; lane 13: H1-12+H2-12. The concentrations of target RNA, H1, and H2 were all 3.3 $\mu\text{mol/L}$. B, Fluorescence intensity with different kinds of H1 motifs in the presence/absence of 20 nmol/L target RNA. The concentrations of H1 and H2 were both 300 nmol/L. The error bars represent the standard deviation of three independent measurements.

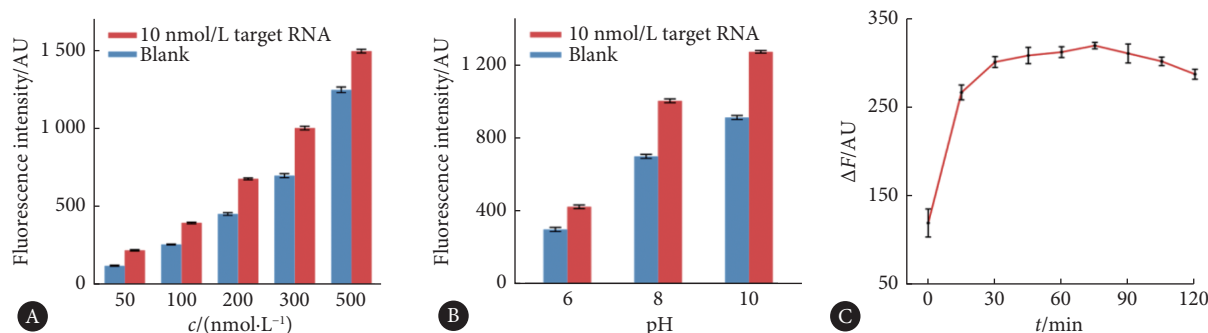


图 4 反应条件优化

Fig 4 Optimization of the experimental conditions

A, Concentrations of H1 and H2; B, pH value of reaction buffer; C, Incubation time (the concentration of the target RNA was 10 nmol/L). The error bars represent the standard deviation of three independent measurements.

量值 ΔF 逐渐变大,并在浓度为300 nmol/L时达到最大值。此后探针浓度增加所引起非特异性荧光强度增加更为明显,因此本研究将300 nmol/L作为H1和H2的工作浓度。同样地,随着反应溶液pH值的升高, ΔF 值逐渐增加,当pH为10时,其 ΔF 值略大于pH为8时的 ΔF 值(图4B)。这可能是因为碱性条件下DNA氢键稳定性差,探针的发夹结构更容易解开,从而造成荧光泄露,使整体荧光水平增高。考虑到pH值过高的环境不适合于核酸链的长期保存,本研究将pH=8作为反应溶液的最佳pH值。如图4C所示, ΔF 值在反应开始的前30 min显著增加,此后变化趋势并不明显。为提高检测效率,本研究将30 min作为最

佳反应时间。

2.4 方法评价

2.4.1 灵敏度及线性范围

利用优化后的荧光CHA法对不同浓度靶RNA进行检测,计算方法的检出限及线性范围。如图5所示,反应体系的荧光强度随靶RNA浓度(50 pmol/L至50 nmol/L)的增加而增强,在1 nmol/L至50 nmol/L范围内荧光强度与靶RNA浓度间存在良好的线性关系($y=23.21x+733.5$, $r^2=0.9982$,其中 y 为荧光强度, x 为靶RNA浓度)。该方法的检出限为50 pmol/L(背景信号平均值+3倍标准差),与其他基于CHA技术的荧光检测法的检出限相当^[9,19-23]。

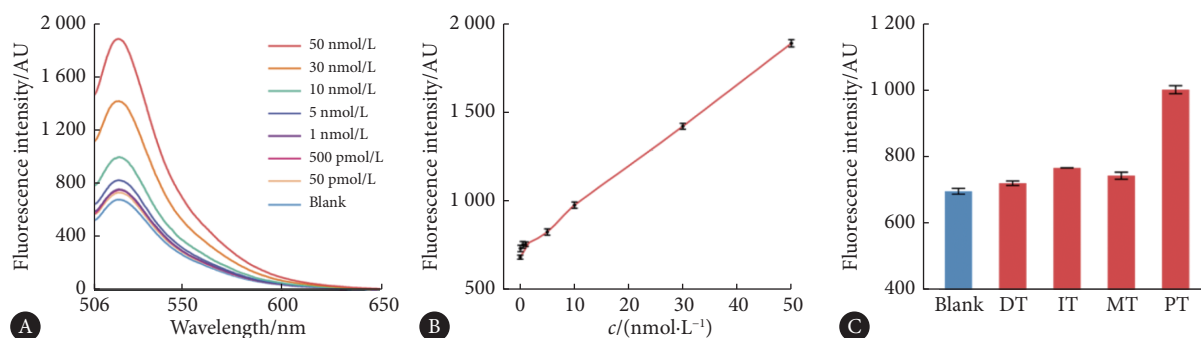


图5 特异性及灵敏度

Fig 5 Specificity and sensitivity

A, Fluorescence spectra with different concentrations of target RNA. B, Fluorescence intensity with different concentrations of target RNA (0 pmol/L, 50 pmol/L, 500 pmol/L, 1 nmol/L, 5 nmol/L, 10 nmol/L, 30 nmol/L, and 50 nmol/L). C, Fluorescence intensity with different kinds of target RNA (10 nmol/L). DT, IT, MT and PT refer to single base deleted target RNA, single base inserted target RNA, single base mismatched target RNA and perfectly matched target RNA, respectively. The error bars represent the standard deviation of three independent measurements.

2.4.2 特异性

为评价荧光CHA法的特异性,本研究设计并合成带有单碱基突变的靶RNA,包括单碱基缺失靶RNA(DT)、单碱基插入靶RNA(IT)以及单碱基错配靶RNA(MT),对比这些单碱基突变靶RNA与完全匹配的靶RNA(PT)所引起的荧光强度变化。如图5C所示,相较空白对照组,单碱基突变靶RNA和完全匹配靶RNA组(PT组)的荧光强度均有不同程度的提高。然而,PT组的荧光强度增加量 ΔF 明显高于其他单碱基突变组,分别是DT、MT、IT组 ΔF 值的12.6倍、6.5倍和4.4倍,这表明该方法具有较好的序列特异性。

2.4.3 重复性

利用荧光CHA法对6个浓度相同的靶RNA样本进行检测,以评价其重复性。结果显示,6个样本荧光强度值的相对标准偏差RSD为1.4%,表明方法具有良好的重复性。

2.4.4 加标回收实验

为评估荧光CHA法在临床检测中的表现,本研究使用咽拭子样本进行加标回收实验。首先,取健康者的咽

拭子样本,向样本溶液中加入不同浓度的靶RNA,样本1、2、3的加标浓度分别为5 nmol/L, 10 nmol/L, 30 nmol/L。利用所建方法进行检测,并根据工作曲线计算靶RNA的回收率。如表2所示,靶RNA的回收率为99.4%~101.5%,表明方法受样本基质成分的干扰较低。

表2 靶RNA加标回收率

Table 2 Spike recovery rate of the target RNA

Sample	Spiked/(nmol/L)	Measured/(nmol/L)	RSD/(% (n=5))	Recovery/%
Throat swab	0	0.15	9.6	/
1	5	5.21	4.4	101.2
2	10	10.30	1.3	101.5
3	30	29.98	2.0	99.4

此外,本研究又使用带有靶RNA序列的长链RNA(长度为60 nt,序列见表1)进行加标回收实验,以评估方法对长链RNA的检测能力。结果表明,荧光CHA法对60 nt RNA的检测效果与24 nt的靶RNA相当,其检出限为50 pmol/L,荧光强度与RNA浓度在1 nmol/L至

50 nmol/L范围内亦呈现良好的线性关系($y=21.20x+709.2$, $r^2=0.9986$, 其中 y 为荧光强度, x 为RNA浓度)(图6)。如表3所示, 荧光CHA法对长链RNA有良好的回收率, 为

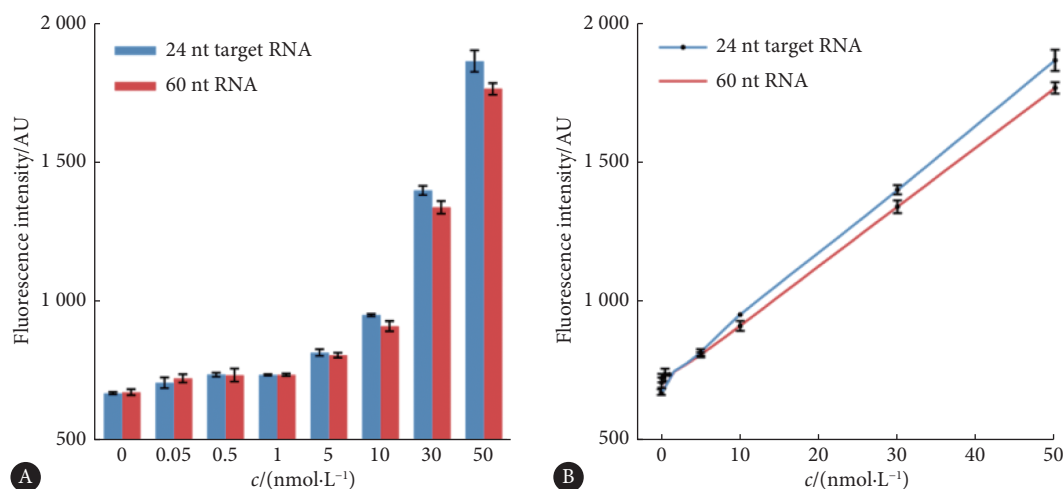


图 6 不同浓度靶RNA与60 nt RNA所对应的荧光强度

Fig 6 The fluorescence intensity with different concentrations of target RNA or 60 nt RNA

A, The fluorescence intensity with different concentrations of target RNA or 60 nt RNA. B, The fluorescence intensity with different concentrations of target RNA or 60 nt RNA (0 pmol/L, 50 pmol/L, 500 pmol/L, 1 nmol/L, 5 nmol/L, 10 nmol/L, 30 nmol/L, and 50 nmol/L). The error bars represent the standard deviation of three independent measurements.

表 3 60 nt RNA加标回收率

Table 3 Spike recovery rate of the 60-nt RNA

Sample	Spiked/(nmol/L)	Measured/(nmol/L)	RSD/(n=5)	Recovery/%
Throat swab	0	0.33	8.3	/
1	5	5.04	7.7	94.2
2	10	10.01	4.1	96.8
3	30	29.66	2.4	97.8

3 小结

本研究建立了一种基于CHA技术的新病毒靶RNA快速荧光检测法(荧光CHA法)。相较传统的核酸扩增法, 荧光CHA法弥补了反应程序复杂、对实验条件及技术人员要求高的不足。该方法不依赖酶, 操作便捷, 可在室温条件下进行, 30 min内即可完成检测。该方法具有良好的特异性和灵敏度, 能够区分靶RNA和发生单碱基突变的靶RNA, 对靶RNA的检测限为50 pmol/L, 与其他同类型方法的检测限相当。此外, 相较其他研究, 本研究还验证了该方法对长链待测物的检测效能, 结果显示, 该方法在针对60 nt RNA样本的检测上亦有良好表现, 进一步表明该方法在实际核酸样本检测中具有一定可行性。不仅如此, 通过对探针序列进行简单调整, 荧光CHA法还可应用于其他核酸靶点的检测。然而, 该方法仍存在背景信号较高的问题, 目前尚无法直接用于临床

94.2%~97.8%。上述结果表明, 荧光CHA法具有良好的抗基质干扰能力, 有望用于临床新冠病毒核酸样本的检测。

核酸样本的检测, 为应用于实际临床检测, 仍需要更进一步的研究工作以降低检测反应的背景信号、提高检测灵敏度。

综上所述, 本研究所建立的方法成功实现了对新型冠状病毒靶RNA的快速检测, 且有望通过进一步优化以应用于实际临床样本检测。另一方面, 该方法的提出为新冠病毒等病原体的检测提供了更多选择, 也为CHA技术在疾病快速筛查方面的应用提供了新的思路。

* * *

作者贡献声明 方楚斌负责数据审编、正式分析、研究方法和初稿写作, 唐田和周琛负责监督指导和审读与编辑写作, 张婧和林华负责监督指导, 朱娅岚和杨加雪负责正式分析和验证, 汪川负责论文构思、经费获取、研究方法、项目管理 and 监督指导。所有作者已经同意将文章提交给本刊, 且对将要发表的版本进行最终定稿, 并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution FANG Chubin is responsible for data curation, formal analysis, methodology, and writing--original draft. TANG Tian and ZHOU Chen are responsible for supervision and writing--review and editing. ZHNAG Jing and LIN Hua are responsible for supervision. ZHU Yalan and YANG Jiaxue are responsible for formal analysis and validation. WANG Chuan is responsible for conceptualization, funding acquisition, methodology, project administration, and supervision. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests All authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] ZHU N, ZHANG D, WANG W, *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*, 2020, 382(8): 727–733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
- [2] HU B, GUO H, ZHOU P, *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(3): 141–154. doi: 10.1038/s41579-020-00459-7.
- [3] BAI H X, HSIEH B, XIONG Z, *et al.* Performance of radiologists in differentiating COVID-19 from Non-COVID-19 viral pneumonia at chest CT. *Radiology*, 2020, 296(2): E46–E54. doi: 10.1148/radiol.2020200823.
- [4] YE Z, ZHANG Y, WANG Y, *et al.* Chest CT manifestations of new coronavirus disease 2019 (COVID-19): a pictorial review. *Eur Radiol*, 2020, 30(8): 4381–4389. doi: 10.1007/s00330-020-06801-0.
- [5] ZHOU Y, WU Y, DING L, *et al.* Point-of-care COVID-19 diagnostics powered by lateral flow assay. *Trends Analyt Chem*, 2021, 145: 116452. doi: 10.1016/j.trac.2021.116452.
- [6] YOO H M, KIM I H, KIM S. Nucleic acid testing of SARS-CoV-2. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 6150. doi: 10.3390/ijms22116150.
- [7] KUO B J, LAI Y K, TAN M L M, *et al.* Utility of screening chest radiographs in patients with asymptomatic or minimally symptomatic COVID-19 in Singapore. *Radiology*, 2021, 298(3): E131–E140. doi: 10.1148/radiol.2020203496.
- [8] YIN P, CHOI H M, CALVERT C R, *et al.* Programming biomolecular self-assembly pathways. *Nature*, 2008, 451(7176): 318–322. doi: 10.1038/nature06451.
- [9] DUAN Z, LI Z, DAI J, *et al.* Nucleotide base analog pyrrolo-deoxycytidine as fluorescent probe signal for enzyme-free and signal amplified nucleic acids detection. *Talanta*, 2017, 164: 34–38. doi: 10.1016/j.talanta.2016.10.079.
- [10] LI Q, ZENG F, LYU N, *et al.* Highly sensitive and specific electrochemical biosensor for microRNA-21 detection by coupling catalytic hairpin assembly with rolling circle amplification. *Analyst*, 2018, 143(10): 2304–2309. doi: 10.1039/c8an00437d.
- [11] CHEN C, LI N, LAN J, *et al.* A label-free colorimetric platform for DNA via target-catalyzed hairpin assembly and the peroxidase-like catalytic of graphene/Au-NPs hybrids. *Anal Chim Acta*, 2016, 902: 154–159. doi: 10.1016/j.aca.2015.10.030.
- [12] BI S, YUE S, WU Q, *et al.* Triggered and catalyzed self-assembly of hyperbranched DNA structures for logic operations and homogeneous CRET biosensing of microRNA. *Chem Commun (Camb)*, 2016, 52(31): 5455–5458. doi: 10.1039/c6cc01308b.
- [13] ZHAO X, ZHU Z, ZHOU R, *et al.* An enzyme-free three-dimensional DNA walker powered by catalytic hairpin assembly for H5N1 DNA ratiometric detection. *Microchem J*, 2021, 170: 106728. doi: 10.1016/j.microc.2021.106728.
- [14] HAO T, WU X, XU L, *et al.* Ultrasensitive detection of prostate-specific antigen and thrombin based on gold-upconversion nanoparticle assembled pyramids. *Small*, 2017, 13(19): 10.1002/smll.201603944. doi: 10.1002/smll.201603944.
- [15] ZHAO J, JING P, XUE S, *et al.* Dendritic structure DNA for specific metal ion biosensor based on catalytic hairpin assembly and a sensitive synergistic amplification strategy. *Biosens Bioelectron*, 2017, 87: 157–163. doi: 10.1016/j.bios.2016.08.032.
- [16] LIU J, ZHANG Y, ZHAO Q, *et al.* Bifunctional aptamer-mediated catalytic hairpin assembly for the sensitive and homogenous detection of rare cancer cells. *Anal Chim Acta*, 2018, 1029: 58–64. doi: 10.1016/j.aca.2018.04.068.
- [17] YAO J, ZHANG Z, DENG Z, *et al.* An enzyme free electrochemical biosensor for sensitive detection of miRNA with a high discrimination factor by coupling the strand displacement reaction and catalytic hairpin assembly recycling. *Analyst*, 2017, 142(21): 4116–4123. doi: 10.1039/c7an01224a.
- [18] ZIMMERS Z A, ADAMS N M, GABELLA W E, *et al.* Fluorophore-quencher interactions effect on hybridization characteristics of complementary oligonucleotides. *Anal Methods*, 2019, 11(22): 2862–2867. doi: 10.1039/c9ay00584f.
- [19] DAI J, DUAN Z, CAO M, *et al.* Rapid DNA detection based on self-replicating catalyzed hairpin assembly using nucleotide base analog pyrrolo-deoxycytidine as fluorophore. *Talanta*, 2018, 181: 142–146. doi: 10.1016/j.talanta.2018.01.007.
- [20] YE T, PENG Y, YUAN M, *et al.* Target-induced in-situ formation of fluorescent DNA-templated copper nanoparticles by a catalytic hairpin assembly: application to the determination of DNA and thrombin. *Mikrochim Acta*, 2019, 186(12): 760. doi: 10.1007/s00604-019-3927-2.
- [21] YANG T, FANG J, GUO Y, *et al.* Fluorometric determination of microRNA by using an entropy-driven three-dimensional DNA walking machine based on a catalytic hairpin assembly reaction on polystyrene microspheres. *Mikrochim Acta*, 2019, 186(8): 574. doi: 10.1007/s00604-019-3689-x.
- [22] GU J, QIAO Z, HE X, *et al.* Enzyme-free amplified detection of miRNA based on target-catalyzed hairpin assembly and DNA-stabilized fluorescent silver nanoclusters. *Analyst*, 2020, 145(15): 5194–5199. doi: 10.1039/d0an00545b.
- [23] LI Q, LIANG X, MU X, *et al.* Ratiometric fluorescent 3D DNA walker and catalyzed hairpin assembly for determination of microRNA. *Mikrochim Acta*, 2020, 187(6): 365. doi: 10.1007/s00604-020-04324-5.

(2023-03-11收稿, 2024-01-02修回)

编辑 刘 华



开放获取
Open Access

© 2024 《四川大学学报(医学版)》编辑部 版权所有
Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Science)*