

在抗击新冠肺炎的过程中,通过核酸检测发现病毒感染者,已经是大家再熟悉不过的检测方式。针对目前肆虐全球的德尔塔变异毒株,我国自主研发的检测产品能够快速精准识别。那么,核酸检测为什么能发现病毒感染?我们今天就来聊一聊与此有关的科学问题。

核酸检测是怎么发现新冠病毒的



DNA分子扩增技术是核酸检测法关键

所有生物除朊病毒外都含有核酸,核酸包括脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA),新型冠状病毒是一种仅含有RNA的病毒,病毒中特异性RNA序列是区分该病毒与其它病原体的标志物。

新冠病毒的核酸检测就是要检测病毒的RNA基因组的一些有标志性的基因片段,用核酸检测试剂就能检测出来。

在新冠疫情发生初期,中国研究人员在极短时间内就完成了对新冠病毒全基因组序列的解析,并通过与其他相似病毒,如冠状病毒的基因组序列对比,发现了新冠病毒中的特异核酸序列。因此,如果能在受检者样本中检测到新冠病毒的特异核酸序列,就可以判断此人被感染。

检测新冠病毒特异核酸序列,要先将新冠病毒核酸(RNA)逆转录为DNA,再采用PCR(多聚酶链反应)方法进行放大或扩增,以检测特定的基因序列。

PCR的作用是扩增DNA,也就是对选择出的具有特异性的新冠病毒部分独特的基因片段作为靶标DNA,将其序列进行指数级的扩增。每一个扩增出来的DNA序列,都可与预先加入的一段荧光标记探针结合,产生荧光信号。扩增出来的靶基因越多,累计的荧光信号就越强,以此来确定样本中是否有病毒核酸,也即确诊受检者是否被感染。

这种核酸检测技术的关键,是对病毒特异性DNA片段进行扩增。

1953年,沃森和克里克发表了DNA双螺旋结构模型,让人们知道了DNA的分子结构,也开启了从分子上理解生命的时代。但是,人体的一个细胞只有一组DNA,既微小,又难以分离和提取来进行体外研究。要进行DNA分子的研究,必须有一种技术能在体外扩增DNA分子。

1971年,美国麻省理工学院的教授科拉纳等人提出核酸体外扩增的设想,经DNA变性,与合适的引物杂交,用DNA聚合酶延伸引物,并不断重复该过程便可扩增DNA。但是当时技术水平有限,这一设想难以实现。

1976年,就读于美国俄亥俄州辛辛那提大学生物系的中国台湾科学家钱嘉韵,从黄石公园热泉中发现的嗜热菌中提取了高温DNA聚合酶,使得扩增DNA的设想又前进了一步。

PCR技术发明完成最后一脚射门的射手是美国生物化学家凯利·穆里斯。据穆里斯回忆,1983年4月的一个星期五晚上,穆里斯开车去乡下别墅的路上,猛然闪现出多聚酶链反应(PCR)的想法。1985年,穆里斯在Cetus公司工作期间,成功发明了PCR。

PCR发明后,有人赞誉这一发明将生物学划分为两个时代:PCR前时代和PCR后时代。有了PCR技术,可以将任意痕量的DNA分子扩增,应用于各个方面,如诊断疾病、生物个体识别、亲子鉴定、刑事鉴识发现罪犯、产前诊断确诊遗传病等。由于发明了PCR,穆里斯获得了1993年的诺贝尔化学奖。

核酸检测法不仅用于新冠病毒感染的诊断,也广泛用于其他病毒性感染疾病。2003年“非典”期间,中国研究人员研发出巢式PCR技术的核酸检测试剂盒,用以诊断病人。此后,对H7N9禽流感也研发了核酸检测试剂盒。2014年,中国“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项取得一系列重要研究成果,其中新型核酸检测技术一次能对艾滋病、乙型肝炎、丙型肝炎三种病毒同时检测,大大缩短了检测的窗口期。此外,埃博拉病毒、中东呼吸综合征病毒等病毒检测中,都曾使用核酸检测试剂盒。

为何有人经过多次检测才能查出阳性

现在,PCR用在新冠病毒感染的诊断上,是通过快速扩增新冠病毒的特定基因片段来确认受检者是否被病毒感染的。目前常用的是利用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)研发的试剂盒。

尽管RT-PCR试剂盒检测比较可靠,但是在最开始也有假阴性,即检测不出实际上已被病毒入侵的感染者。出现核酸检测假阴性的原因有多方面。一是刚开始研发的试剂盒质量不是很高,但后来经过改进,这一质量短板得到解决。另一个原因是,患者在做前几次检测的时候,病毒还没有充分感染人体细胞,病毒有一个逐渐进入细胞的过程。因此,有的人经过多次检测才查出病毒核酸阳性。

中国国家卫健委颁布的《新型冠状病毒实验室检测技术指南》规定,采集标本的种类里有上呼吸道标本(咽拭子、鼻拭子、鼻咽抽取物),下呼吸道标本(深咳痰液、呼吸道抽取物、支气管灌洗液、肺泡灌洗液、肺组织活检标本),血液标本,血清标本,后来又增加了粪便、肛拭子。但在实际操作中,采取最多的是咽拭子、鼻拭子之类的上呼吸道标本。

由于新冠病毒通常出现在感染肺部深处的组织和细胞,因此下呼吸道标本对检测来说是最好的,病毒多、最易检测出来。但是,深肺组织样本不好采集,而病人咳嗽的时候,一些病毒是可以被带到上呼吸道,而且病毒也可以感染上呼吸道,因此上呼吸道标本(咽拭子、鼻拭子、鼻咽抽取物)已成为标准采样。

核酸检测的过程包括样本采集、样本处理、核酸提取、进行PCR检测等多个步骤,现在整个平均检测时间需要2-3个小时。由于它是直接对采集标本中的病毒核酸进行检测,特异性强、敏感度相对较高,因此是当前新冠病毒感染检测的主要手段。

延伸阅读

抗体检测和抗原检测也是新冠病毒感染诊断方法

除了核酸检测,现在对新冠病毒感染的诊断也采用另一种常用的方式,即抗体测试法。一般情况下,人被新冠病毒感染后,免疫系统会产生抗体来攻击病毒,因此,检测抗体也是一项可靠的判断人是否被病毒感染的方式。不过,由于在病毒感染早期,人体内可能还没有产生抗体,存在检测的窗口期,因而抗体检测法只能作为确诊的补充诊断手段或应用于聚集性疫情溯源。

抗体检测包括胶体金法和磁微粒化学发光法,其中胶体金法平均检测时间为15分钟左右,磁微粒化学发光法一般需要30-60分钟。

以胶体金法为例,试剂中含有病毒抗原,通过抗原检测抗体的存在。机体感染新冠病毒后,病毒的特定蛋白会刺激免疫系统引起抗体应答。胶体金法就是要检测出人体是否有新冠病毒抗体。如果人被新冠病毒感染并在血液中含有抗体,就能与试剂上的新冠病毒的抗原成分结合,形成抗原抗体复合物,在检测线处聚集为红色反应线,证明是阳性(被感染),反之则是阴性。

另外,诊断是否被新冠病毒感染,还可以采用抗原检测试剂(盒)。试剂纸或卡上包被有新冠病毒抗体,通过抗体检测抗原的存在。新冠病毒的抗原成分主要有N蛋白、E蛋白和S蛋白等,当把取样获得的咽拭子、鼻拭子、痰液、血清、血浆等样本滴入试剂盒时,如果这些样本中有病毒抗原,就会与试剂上的新冠病毒抗体形成抗原抗体复合物,检测线处聚集出现红线,很快就能得出结果。现在,国内一些公司生产的新冠抗原检测试剂已能快速精准识别德尔塔变异毒株,这是因为该试剂(盒)含有德尔塔的S蛋白处的特异变化的基因序列。但是,抗原检测需要更高的敏感性,由于新冠病毒主要侵犯肺泡等下呼吸道,从鼻咽、口咽等上呼吸道取样,不一定能采集到病原体,或者取样中所含病毒数量较少。因此,抗原检测和抗体检测一样,都是诊断新冠病毒感染的辅助手段。

不可不知

新冠病毒感染与新冠肺炎不是一回事儿

需要说明的是,确诊新冠病毒感染与确诊新冠肺炎并不是一回事儿,前者只是病毒感染,后者则是在病毒感染后出现症状。

目前确认新冠病毒感染的金标准还是核酸检测。同时,抗体检测和抗原检测可以作为补充证据。

如果要确诊为新冠肺炎,还得加上CT片证据,以及临幊上出现的症状,如是否发热、咳嗽,呼吸是否困难等来确诊新冠肺炎,并判断是轻症还是重症,抑或是无症状感染,从而采取相应的治疗和预防措施。

张田勘/文 据《北京日报》