

• 医药生物技术 •

一种基于荧光 qPCR 检测新型冠状病毒核酸的优化反应体系的建立及相关测试

李学龙¹, 刘军花¹, 刘茜阳², 于琳¹, 吴珊珊¹, 尹秀山^{1,2,3,4,5}

1 沈阳化工大学 制药与生物工程学院, 辽宁 沈阳 110142

2 拜澳泰克 (沈阳) 生物医学集团有限公司, 辽宁 沈阳 110142

3 江苏谱录瑞医疗科技有限责任公司, 江苏 徐州 221000

4 上海耐诺生物科技有限公司, 上海 200000

5 拜澳泰克 (江西) 生物科技有限公司, 江西 赣州 341000

李学龙, 刘军花, 刘茜阳, 等. 一种基于荧光 qPCR 检测新型冠状病毒核酸的优化反应体系的建立及相关测试. 生物工程学报, 2020, 36(4): 732–739.

Li XL, Liu JH, Liu QY, et al. Optimization of a fluorescent qPCR detection for RNA of SARS-CoV-2. Chin J Biotech, 2020, 36(4): 732–739.

摘要: 为实时并快速地检出 SARS-CoV-2 冠状病毒 RNA, 对基于荧光定量聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 的反应体系进行了优化。结果表明, 按照本实验提供的方法操作后, 检测 SARS-CoV-2 冠状病毒所用的 RNA 样本的最小浓度稀释度可调至 1/10 000 (初始值设为 10 ng/μL)。且用于检测 COVID-19 临床阳性样本所测得循环值 (Cycle threshold, Ct) 均低于 35 或 40。其灵敏性测试结果也表明该方法的敏感性较好。同时, 在同等条件下, 与目前市场上的 COVID-19 试剂盒的检测结果基本一致, 并且检测循环数缩短 2 个单位。因此, 本实验所建立的体系适用于前期临床诊断的筛查工作, 为在医学上实现快速诊断提供了工具。

关键词: 新型冠状病毒感染的肺炎-2019 (COVID-19), 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2), N 基因, ORF1a 基因, 荧光实时定量 PCR

Received: February 27, 2020; **Accepted:** April 2, 2020

Supported by: Key Research and Development Plan of Liaoning Province in 2020 (No. 1580441949000), Ganzhou City's First Batch of New Coronavirus-infected Pneumonia Emergency Science and Technology Project.

Corresponding authors: Xiushan Yin. Tel: +86-24-89381101; E-mail: xiushanyin@me.com

2020 年辽宁省重点研发计划 (No. 1580441949000), 赣州市第一批新型冠状病毒感染的肺炎疫情应急科技攻关计划项目资助。

Optimization of a fluorescent qPCR detection for RNA of SARS-CoV-2

Xuelong Li¹, Junhua Liu¹, Qianyang Liu², Lin Yu¹, Shanshan Wu¹, and Xiushan Yin^{1,2,3,4,5}

¹ School of Pharmaceutical and Biological Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, Liaoning, China

² BIOTECH (Shenyang) Biomedical Group Co., Ltd., Shenyang 110142, Liaoning, China

³ Jiangsu Plumway Medical Technology Co., Ltd., Xuzhou 221000, Jiangsu, China

⁴ Shanghai Nano Biotechnology co., Ltd., Shanghai 200000, China

⁵ BIOTECH (Jiangxi) Biotechnology co., Ltd., Ganzhou 341000, Jiangxi, China

Abstract: We optimized a fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay system for rapid and real time detection of SARS-CoV-2 RNA. The results show that the lowest dilution of RNA samples used for the detection of SARS-CoV-2 RNA could reach 1/10 000 (the initial value is set as 10 ng/ μ L). Moreover, the cycle threshold (Ct) for samples of clinically diagnosed COVID-19 was lower than 35 or 40. The sensitivity of this method was satisfactory. The results were consistent with those of the COVID-19 detection kit on the market under the same conditions, but the number of cycles required was shortened by about 2. Therefore, the optimized assay developed in this study can be used in screening and early clinical diagnosis. Our work provides a tool to facilitate rapid clinical diagnosis of COVID-19.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, N gene, ORF1a gene, fluorescence real-time quantitative PCR

目前,由湖北省武汉市发现的可引发人患新型冠状病毒肺炎 (Coronavirus disease, COVID-19) 的病毒 SARS-CoV-2^[1-3],被鉴定为一种含单股正链 RNA (ssRNA) 的 Beta 型冠状病毒 (Betacoronavirus),其核酸结构与 SARS 极其相似,主要包括有 E (Envelope protein gene)、M (Membrane protein gene)、N (Nucleocapsid protein gene)、S (Spike protein gene)、ORF (Open reading frame)和 RdRp (RNA-dependent RNA polymerase gene)^[4](图 1),与蝙蝠和果子狸等野生动物体内所检测到的冠状病毒 (Bat/Paguma larvata-SARS-related CoVs) 具有极高的同源性^[5-6]。该病毒主要借助飞沫方式在人群中进行传播感染。感染者通常会以高热为主的症状,但是在少数报道中显示在未有发病症状却有核酸检测阳性的病例,种种现象也提示该病毒潜在的传染途径及机制仍然存在不确定性。因此,对于这个突发的 COVID-19 疫情的防控,快速并精确地早期诊断是极其重要的一个环节。针对冠状病毒的诊断方法有很多,比如:胸部 CT 扫描^[7]和分子诊断^[8],普通电泳法^[9]、Northern 杂交^[10]、RT-PCR (Reverse

transcription-PCR)^[11]、Real-time RT-PCR^[12]和 NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification)^[13]等方法。最近,虽然 Corman 等^[14]的研究提及 RT-PCR 的方法用于检测 SARS-CoV-2,但实验方法验证数据均依照 SARS 相关病毒分离株核酸检测所得,缺乏真实样本检测结果数据支撑。同样我们依照荧光定量 PCR 的原理建立起一套适用于初步筛查鉴定 SARS-CoV-2 病毒的新体系,并且采用取材于 COVID-19 确诊患者的病毒内容物进行体系测试,同时对未知临床样本进行检测。对比市场上的基因的单通道 RT-PCR 检测试剂盒,该方法的优势在于双通道法增加检测特异性,同时灵敏度高,扩增效率高,为临床医学诊断提供参考价值。

1 材料与方法

1.1 仪器试剂

PCR 扩增仪 (BIORAD-C1000); 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad CFX96 touch)和无核酸酶的 PCR 管等。

体外转录试剂盒 (NEB); 反转录试剂盒

Superscript III Reverse Transcription first strand cDNA (Thermo 公司); 华大基因的 2019-nCoV 检测试剂盒, 编号 60202002; 病毒核酸样本源于中国疾控中心。

引物设计与合成: 以新型冠状病毒 SARS-CoV-2 基因组保守区 N 基因和 ORF1a 基因(WH-human_1 COVID-19 患者分离的 SARS-CoV-2 序列见图 1)为靶点通过 Primer Premier 5.0 等软件进行设计特异性引物和 TaqMan 探针, 在 ORF1a 基因探针的 5'端携带 FAM 基团 (蓝色荧光), 以及 3'端含 BHQ1 (淬灭基团 1), 而在 N 基因的 5'端携带 HEX 基团 (绿色荧光), 以及 3'端含 BHQ2 (淬灭基团 2)。具体序列参见表 1。表中的序列均由 TaKaRa 公司合成。

1.2 样品处理方法

实验样品处理流程包括 SARS-CoV-2 病毒核酸序列的获取、特异靶点捕获、荧光信号读取、实时定量检测等 4 个阶段。对于临床样本, 我们将采集的鼻、咽拭子等经病毒 RNA 提取试剂盒提取纯化获得 SARS-CoV-2 病毒核酸 RNA(该步骤至少需要在 P3 实验室进行, 减少污染源传播),

并在-40--80 °C 条件下保存备用。

然后按照反应体系 20 μ L (如 RNA 取 5 μ L (0.01 pg-1 μ g), 引物探针 (10 μ mol/L) 2 μ L, 反应液(SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix 和 Reaction buffer)10 μ L) 加入 PCR 反应管, 混匀并在低于 2 000 r/min 离心机中离心, 再移至特定的荧光定量 PCR 仪进行孵育反应。并设置激光通路为 FAM (450-490 nm), HEX (515-535 nm), 孵育参数分为两个连续阶段: 50 °C 5 min, 94 °C 2 min 用于 cDNA 合成和 94 °C 5 s, 55 °C 10 s, 循环 35-40 次左右完成 PCR 扩增步骤。反应结束后根据获取的荧光参数分析并解释数据。

1.3 反应体系的效率验证

人工合成 SARS-CoV-2 病毒基因组序列, 利用 NEB 体外转录试剂盒合成目的基因的 RNA 序列, 经 Qiagen 纯化试剂盒纯化 RNA 后, 使用 Thermo 的 RNA 荧光定量试剂盒进行 RNA 精准定量, 然后梯度稀释后来验证试剂反应条件的效率。

精准定量后 RNA 按照以下比例用 DEPC 处理水稀释后进行 PCR 验证: A=1/10, B=1/50, C=1/100, D=1/500, E=1/1 000, F=1/5 000, G=1/10 000。

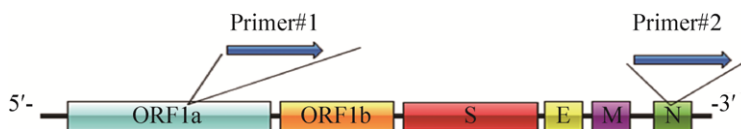


图 1 SARS-CoV-2 基因序列组分图(源于 WH-human_1 genome)

Fig. 1 Sequence composition diagram of SARS-CoV-2 gene (originating from wh-human_1 genome).

表 1 实验中引物序列

Table 1 Primer sequences involved in the experiment

Primer number	Sequences (5'-3')	Size (bp)	Targeted site
F1	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG		
R1	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	100	ORF1a gene
1a-Probe	FAM*-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BHQ1*		
N3_F	GGGAGCCTTGAATACACCAAAA		
N3_R	TGTAGCACGATTGCAGCATTG	72	N gene
N3-Probe	HEX*-AYCACATTGGCACCCGCAATCCTG-BHQ2*		

Note: FAM* and HEX* represent the addition of FAM and HEX fluorescence modifications at the 5' end of the primer, respectively.

1.4 灵敏性试验

通过疾控中心获得的阳性患者的核酸 RNA, 经过 Thermo 的 RNA 荧光定量仪精准定量浓度为 $9.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 用 DEPC 处理水稀释样本后进行 qPCR 验证, 稀释比例如下: A=1/10, B=1/100, C=1/1 000, D=1/10 000, 以确定最佳测试范围。

1.5 临床样品测试

另从辽宁省疾控中心取得已诊断的 218 个样本 (含 25 例阳性和 193 例阴性样本), 我们按照本文建立的实验体系, 在不定量的情况下, 直接进行 qPCR 检测, 验证该方法的临床适用性。

同时也参与测试了辽宁省疾控中心的 44 个样本, 进一步临床验证该体系的可靠性。

1.6 特异性测试

为了解决该实验体系能否排除其他病毒的干扰问题, 我们选择了两种较为常见的病毒, 如甲流病毒、猪流感病毒, 通过测试来验证该体系的特异性能。

1.7 差异性分析

利用上述方法建立的试剂混合液体系与目前市售 SARS-CoV-2 检测试剂盒 (如 BGI kit) 在同样的条件下进行差异性分析。

2 结果与分析

2.1 反应体系的效率验证

将荧光定量后的 SARS-CoV-2 病毒 RNA ($130 \text{ ng}/\mu\text{L}$) 在 7 个不同稀释浓度下进行荧光 PCR 检测, 结果见图 2 所示。当稀释比例为 1/10, 反应循环数 (C_t) < 10 可达到预期阈值。当稀释比例逐渐增大, 反应循环数也不断增加, 呈线性正相关。但当稀释比例增加为 1/10 000 时, 反应循环数 (C_t) 需 20 个就达到预期。由此可以说明该方法所检测浓度的下限可调至 1/10 000。

2.2 灵敏性试验

根据上述已建立的检测体系, 对来源于一名

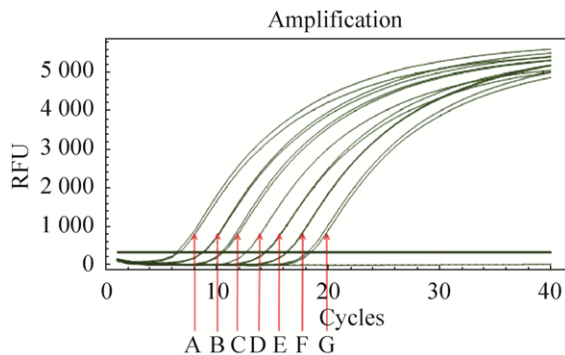


图 2 反应体系效率验证图

Fig. 2 The image of efficiency verification of reaction system. A-G represents four different dilution ratios, respectively: A=1/10, B=1/50, C=1/100, D=1/500, E=1/1 000, F=1/5 000, and G=1/10 000.

确诊病例的阳性 COVID-19 核酸进行荧光 PCR 检测 (图 3), 当浓度以 10 倍的稀释梯度逐渐从 1/10 降低至 1/10 000 时, 其 RFU 结果达到阈值时的循环数 (C_t) 均小于 35, 因此, 此方法符合实际条件下的荧光定量 PCR 扩增情况, 表明该方法具有一定的可靠性。

同时在阳性对照初始值设为 $9-10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 的基础条件下, 浓度稀释比例达到 10 000 倍, 仍有循环数 (C_t) 低于 40 的结果呈现, 由此可知, 此方法对于阳性病毒的最低检测值可达到 1/10 000, 该方法具有良好的敏感性。

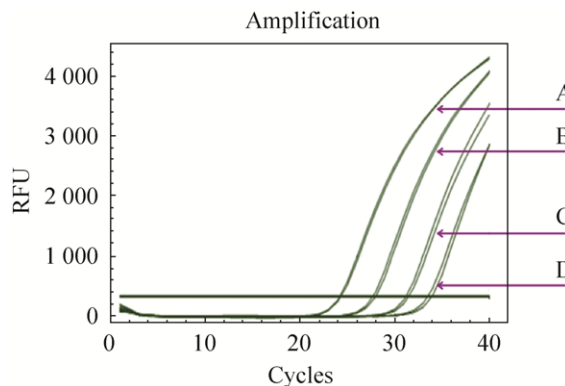


图 3 灵敏性测试结果

Fig. 3 The results of sensitivity test. A-D represents four different dilution ratios, respectively: A=1/10, B=1/100, C=1/1 000, and D=1/10 000.

2.3 临床样品测试

在辽宁省疾控中心得到的 262 例经诊断的核酸样本中, 其中 46 例患者被确诊为阳性患者, 216 例患者被确诊为阴性患者。按照国家卫健委颁布的新冠肺炎诊疗指南第 6、7 版, 将这些样本划分为两组, 分别是 COVID-19 患者组和 COVID-19 非患者组, 进行本实验体系适用性验证, 在测试结果中显示的 Ct 值均与疾控中心的诊断结果基本一致, 非患者组的检测结果均一致, 而患者组中 45 例检测呈阳性, 其中一份漏检, 符合度为 97.83%。因此, 本实验体系符合且适用于初步筛查病毒感染 (表 2)。

现选择其中两个 COVID-19 阳性样本, 在不定量的情况下, 按照阴性样本、COVID-19#1、COVID-19#2 和阳性样本的顺序上样, 并对每个样本设置 2 个复孔, 结果如图 4 显示, 阳性对照循环数 (Ct) 为 22–24 之间, COVID-19#1 号患者的循环数 (Ct) 为 28–30 之间, COVID-19#2 号患者的循环数 (Ct) 为 32–34 之间。因此, 说明本实验中所提供的新体系可以初步用于疑似病例检测 SARS-CoV-2 病原感染程度。但由于本次实验没有进行定量操作, 所以无法判断 1 号患者的感染程度大于 2 号患者的感染程度。

表 2 临床诊断样本测试

Table 2 Clinical diagnostic sample test

Patient ID	COVID-19 diagnosis sample from CDC		The testing results in our systems
	Infected groups	Non-infected group	Coincidence rate (%)
001–050	5	45	100
051–100	7	43	100
101–150	5	45	100
151–200	5	45	100
201–250	19	31	94.74 (18+/19+)
251–262	5	7	100
Total	46	216	97.83 (45+/46+)

Note: Coincidence rate (%) refers to the data obtained by comparing the number of positive samples tested in this experimental system with the known clinical positive samples.

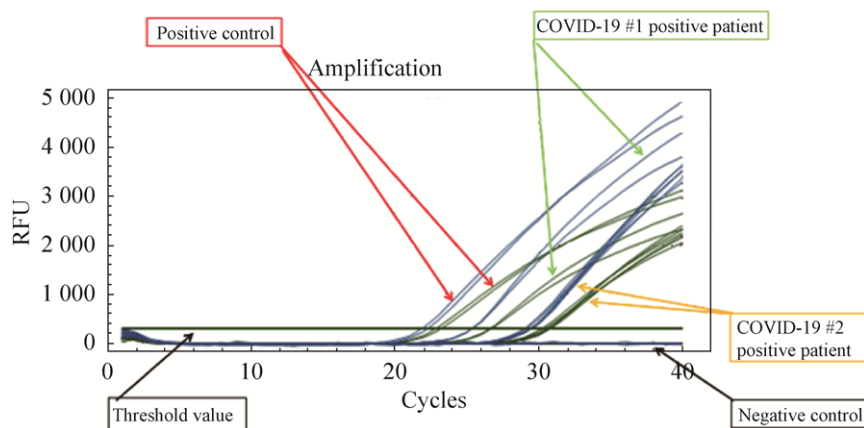


图 4 临床样品检测图谱

Fig. 4 The diagram of clinical sample test.

2.4 特异性测试

实验中为了验证该体系的特异性,我们进行了两种甲流病毒和猪流感病毒对 SARS-CoV-2 病毒的干扰性测试实验,具体的测试结果见图 5。图中显示的甲流病毒 (Influenza A virus) 和猪流感病毒 (Swine influenza) 的扩增曲线图近乎为一条平行于横坐标轴的直线,而 SARS-CoV-2 的检测曲线迅速增长,这说明本实验体系可以排除甲流和猪流感病毒等干扰。

2.5 差异性分析

为了验证本实验所采用的方法与上市的试剂盒的差异性 (图 6A 为上市试剂盒检测结果,图 6B 为本实验方法输出的结果)。在同等上样量情况下,产生的结果一致,并且本实验体系检测循环数 (Ct) 为 22,而 BGI 试剂盒测试循环数 (Ct) 为 24。由此说明该检测体系的灵敏度稍高于 BGI 试剂盒。同时,实验中采用双通道检测不仅增加检测特异性,而且降低假阳/阴性率,可初步用于检测 SARS-CoV-2 病毒的感染情况。

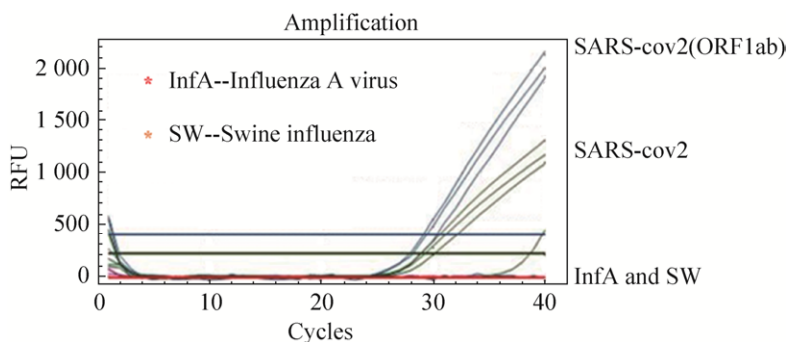


图 5 特异性测试结果图

Fig. 5 Results of specificity test.

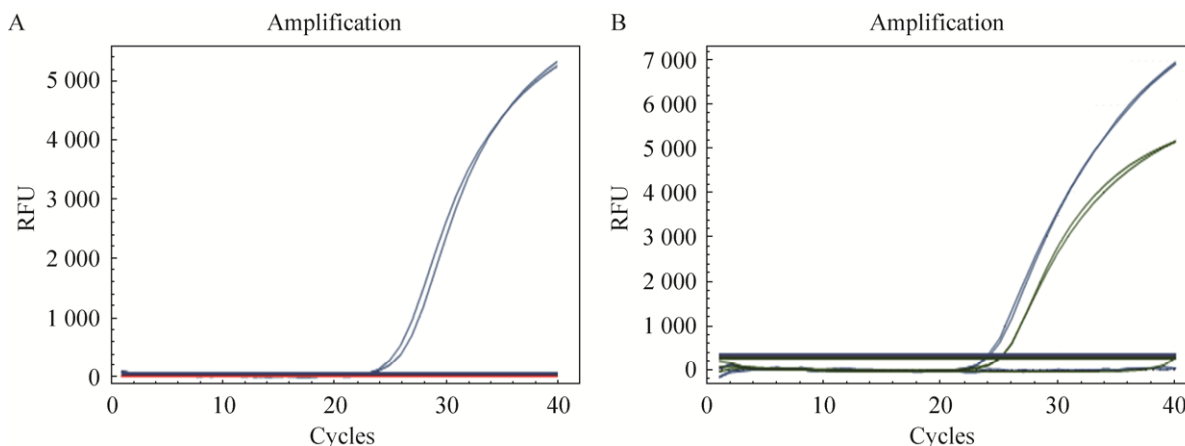


图 6 对比目前上市试剂盒结果分析图

Fig. 6 The analysis diagram of the method adopted in this experiment comparing to current market kit about COVID-19. (A) The result of BGI kit test. (B) The method provided in this experiment. The four lines refer that the two channels of the two samples respectively show the amplification curves, such as blue referring to FAM-ORF1a/b gene, and green referring to the HEX-N gene in the B diagram.

3 讨论

对于在湖北武汉地区突发的 SARS-CoV-2 病毒而引起的严重肺部炎症,目前尚无特异性治疗药物,而且关于该病毒的入侵机制也不甚清楚。虽然最近在一些 COVID-19 相关研究取得重大进展,比如 Wrapp 等^[15]直接揭示 SARS-CoV-2 病毒的 Cryo-EM 结构,随后, Yan^[16]等报道了结合 SARS-CoV-2 Spike 糖蛋白后的人肺泡细胞的 ACE2 (Angiotensin-converting enzyme 2) 的 Cryo-EM 结构,表明 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 具有相似感染人肺部细胞的机制。同时,最近有几篇文章同样报道了人细胞表面受体 ACE2 和 SARS-CoV-2 的 Spike 糖蛋白之间的传递媒介,并提出一些阻断剂,如 TMPRSS2 抑制剂^[17]以及 SARS-CoV S 鼠多克隆抗体(交叉中和性抗体)^[18],进一步深入了解了病毒的入侵机制,为 COVID-19 疫苗的研制提供了理论基础。但是,在一些地区出现数例核酸检测阳性的患者中,却没有出现普遍的高热等发病症状。鉴于该病毒传播能力较强,易潜伏,且可引起同流感相似的症状,因此,除了依赖于高热等体征变化来判别感染,在病毒的高发区实施全面筛查是非常有必要的。在本试验中,利用荧光定量实时 PCR 技术建立的优化体系,直接将患者 RNA 提取物进行病毒检测,省略多步扩增的过程,且在初始定量为 10 ng/ μ L 条件下,检测量的下限可调整至 1/10 000 (即 0.001 ng/ μ L),提高了病毒检测灵敏度。在与目前上市的 COVID-19 检测试剂盒的测试项目中,该实验体系采用双通道检测体系可明显减少非特异性结果的出现,同时本体系的实验操作时间 (45–50 min) 远低于目前上市的试剂盒操作时间 (通常为 90 min)。经过一系列的临床样本的测试流程,该方法可以用于早期初步的筛查 COVID-19,或与临床 CT 诊断联用可直接且更精确地确诊 SARS-CoV-2 病毒感染情况。目前,基于此方法现已开发了一款基于荧光定量检测 SARS-CoV-2 的试剂盒产品 (编

号: BIO2020-02)。整个流程操作简便,一个反应 1 h 以内可完成操作,大大提升了检测效率,至少解决此次突发事件的某些地区出现的试剂短缺等重大问题。综上所述,这项研究的结果提示我们优化后的 RT-PCR 检测方法可用于快速且准确筛查 SARS-CoV-2 病毒感染情况。

REFERENCES

- [1] Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 2020, 579(7798): 265–269, doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.
- [2] Hui DS, Azhar EI, Madani TA, et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int J Infect Dis*, 2020, 91: 264–266.
- [3] Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*, 2020, doi: 10.1038/s41564-020-0695-z.
- [4] Chan JFW, Kok KH, Zhu Z, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microb Infect*, 2020, 9(1): 221–236.
- [5] Chen Y, Liu QY, Guo DY. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol*, 2020, 92(4): 418–423.
- [6] Xu XT, Chen P, Wang JF, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(3): 457–460, doi: 10.1007/s11427-020-1637-5.
- [7] Lei JQ, Li JF, Li X, et al. CT imaging of the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) pneumonia. *Radiology*, 2020: 200236, doi: 10.1148/radiol.2020200236.

- [8] Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, et al. Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia [published online ahead of print, 2020 Jan 31]. *Clin Chem*, 2020; hvaa029, doi: 10.1093/clinchem/hvaa029.
- [9] 刘军花, 李学龙, 刘茜阳, 等. 一种基于琼脂糖凝胶电泳法检测 SARS-CoV-2 的新方法[EB/OL]. *微生物学杂志*: 1-5. [2020-04-07] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1186.q.20200302.0849.002.html>.
- [10] Gildow FE, Reavy B, Mayo MA, et al. Aphid acquisition and cellular transport of Potato leafroll virus-like particles lacking P5 readthrough protein. *Hypopathology*, 2000, 90(10): 1153-1161.
- [11] Shirato K, Nao N, Katano H, et al. Development of genetic diagnostic methods for novel coronavirus 2019 (nCoV-2019) in Japan. *Jpn J Infect Dis*, 2020, doi: 10.7883/yoken.JJID.2020.061.
- [12] Poon LLM, Chan KH, Wong OK, et al. Early diagnosis of SARS coronavirus infection by real time RT-PCR. *J Clin Virol*, 2003, 28(3): 233-238.
- [13] Keightley MC, Sillekens P, Schippers W, et al. Real-time NASBA detection of SARS-associated coronavirus and comparison with real-time reverse transcription-PCR. *J Med Virol*, 2005, 77(4): 602-608.
- [14] Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*, 2020, 25(3). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
- [15] Wrapp D, Wang NS, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 2020, 367(6483): 1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507.
- [16] Yan R, Zhang Y, Li Y, et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, 2020, 367(6485): 1444-1448. doi:10.1126/science.abb2762.
- [17] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *cell*, 2020, S0092-8674(20)30229-4. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052.
- [18] Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 2020, S0092-8674(20)30262-2. doi:10.1016/j.cell.2020.02.05.

(本文责编 郝丽芳)