



新冠病毒检测关键技术之 —荧光定量RT-PCR



客服热线：400-898-0321

E-mail: trans@transgen.com.cn

北京全式金生物技术有限公司

www.transgen.com.cn

背景介绍

新冠病毒检测方法

核酸提取+RT实验

qPCR实验概述

qPCR实验设计

qPCR数据分析

新冠病毒检测数据

背景介绍

全球疫情（中国以外）

[点击查看中国疫情](#)

409646 **41285791** **30261579** **1128991**

新增病例

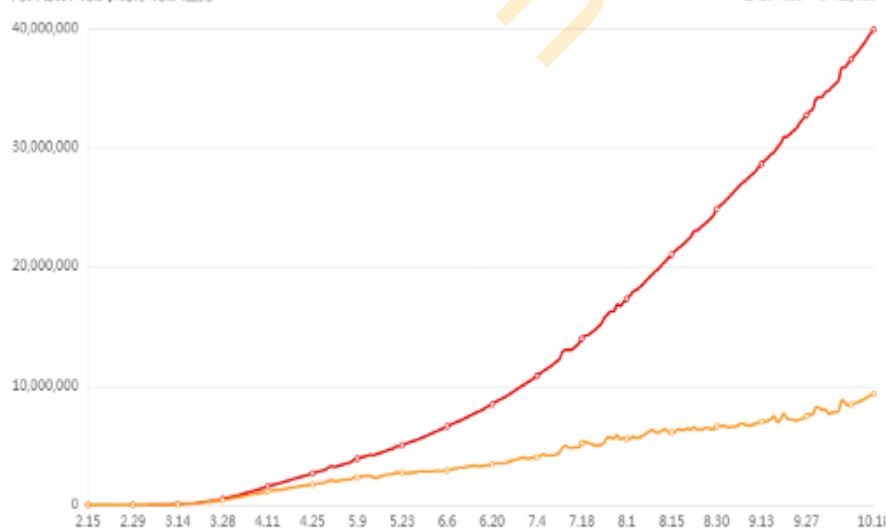
累计确诊

累计治愈

累计死亡

截止 2020.10.22 00:49 | [数据说明](#)

海外累计确诊/现存确诊趋势



累计/现存确诊

治愈/死亡

中国/海外新增

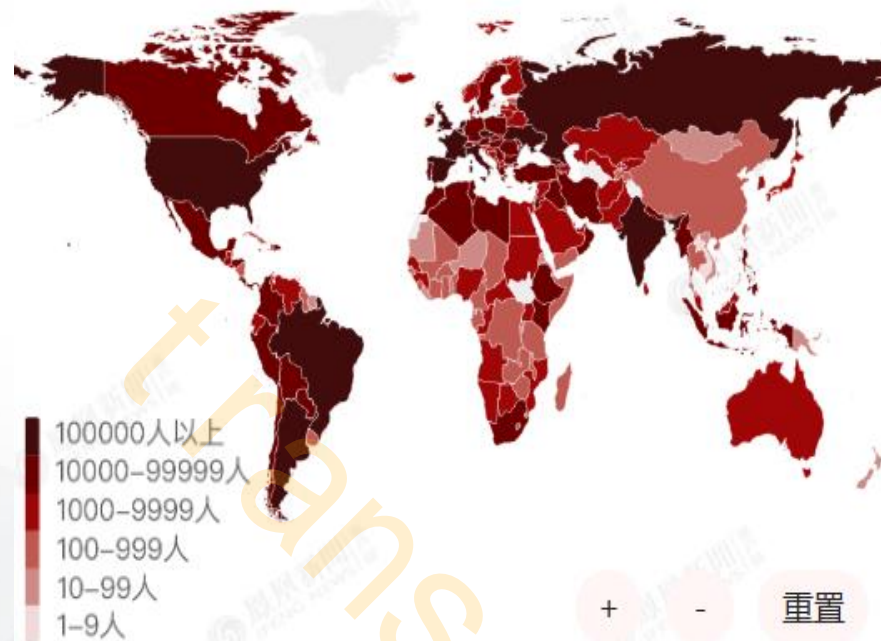
美国

英国

伊朗

意大利

日本



现存确诊

累计确诊

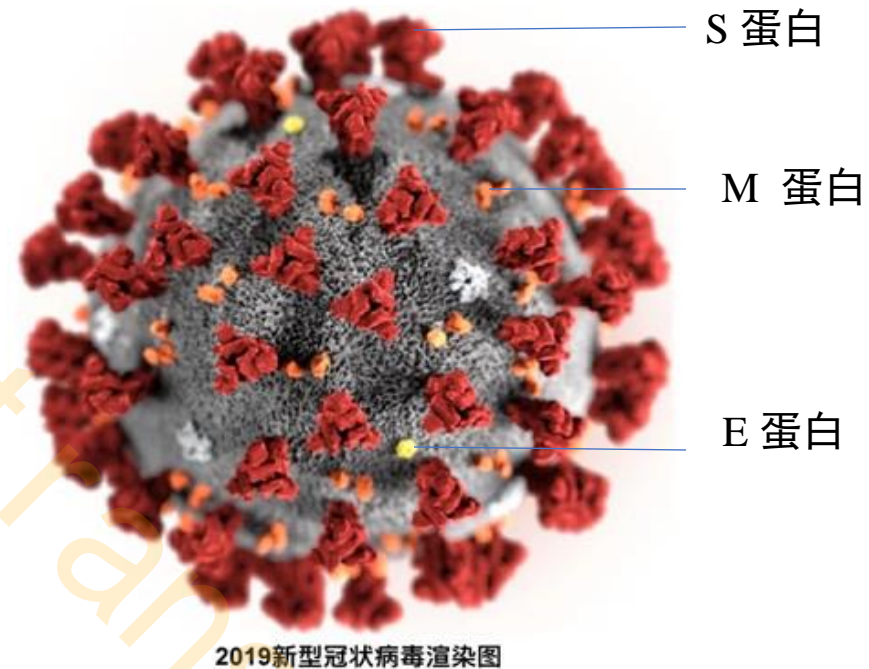
2019新冠病毒（2019-nCoV）

- **病 毒**：新型冠状病毒，**2019-nCoV**；
- **传 染 源**：新型冠状病毒感染的肺炎患者；
- **传播途径**：经呼吸道飞沫传播，亦可通过接触传播，存在粪-口传播可能性；
- **易感人群**：人群普遍易感；
- **潜 伏 期**：平均为7天左右，短的2～3天，长的14天，潜伏期内存在传染性；
- **宿 主**：野生动物。



2019新型冠状病毒（2019-nCoV）

- 既往已知的感染人的冠状病毒有6种，即HCoV-229E、HCoV-OC43、**SARSr-CoV**、HCoV-NL63、HCoV-HKU1和**MERSr-CoV**。
- 2019新型冠状病毒（**2019-nCoV**），属于第七种，因2019年武汉病毒性肺炎病例而被发现，2020年1月12日被世界卫生组织命名。
- 目前研究表明与蝙蝠SARS病毒属于同一家族，但该病毒不是SARS病毒。



新冠病毒诊断方法

- 病毒基因的测序
- 实时荧光定量RT-PCR检测
- 血清学抗体检测

《新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第七版）》发布 附解读

2020-03-04 14:56:24 来源：国家卫健委网站

4日，国家卫生健康委网站发布了《关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第七版）的通知》，提出各有关医疗机构要在医疗救治工作中积极发挥中医药作用，加强中西医结合，完善中西医联合会诊制度，促进医疗救治取得良好效果。试行第七版诊疗方案如下：



荧光定量RT-PCR检测法

- 核酸提取
- RT
- qPCR

核酸模板制备

高品质的RNA模板是后续实验成功的前提

- 样本准备
- RNA提取

[Home](#) / [Publications detail](#) / [Laboratory testing for 2019 novel coronavirus \(2019-nCoV\) in suspected human cases](#)

Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases

样本采集指导（根据参考文献 5 修改）

样本类型	病料收集	运输至实验室	检测前样本保存	备注
鼻咽拭子和口咽拭子	涤纶或涤纶棉签*	4°C	≤5 天: 4°C >5 天: -70°C	鼻咽拭子和口咽拭子应放置在同一根管中, 以增加病毒载量。
支气管肺泡灌洗液	无菌容器*	4°C	≤48 小时: 4°C >48 小时: -70°C	病原体可能会被稀释, 但仍然是非常有价值的样本
气管抽吸物、鼻咽抽吸物或洗鼻液	无菌容器*	4°C	≤48 小时: 4°C >48 小时: -70°C	
痰	无菌容器	4°C	≤48 小时: 4°C >48 小时: -70°C	确保样本来自下呼吸道
组织切片或尸检, 包括肺组织	无菌盐水容器	4°C	≤24 小时: 4°C >24 小时: -70°C	
血清 (2 份, 包括急性期和急性期后 2-4 周的恢复期采集)	血清分离器 (成人: 收集 3-5 毫升全血)	4°C	≤5 天: 4°C >5 天: -70°C	收集双份样本: • 急性期——发病的第 1 周 • 恢复期——发病后 2 至 3 周
全血	收集管	4°C	≤5 天: 4°C >5 天: -70°C	用于抗原检测, 特别是在发病的第一周
尿液	尿液收集容器	4°C	≤5 天: 4°C >5 天: -70°C	

RNA提取——常用方法比较

胍盐法

胍盐有效裂解细胞

胍盐抑制RNase, 保持RNA完整

氯仿分相或结合硅胶膜去除蛋白、DNA

提取量大

EasyPure RNA Kit
Viral DNA/RNA Kit
Plant RNA Kit
Blood RNA Kit

TransZol
TransZol Up

CTAB法

CTAB原理裂解释放RNA

避免多糖多酚结合RNA

适合多种植物材料

TransZol Plant

RNA提取——注意事项

- 根本原则：**防止RNA降解**，确保RNase free!
- 避免**外源RNase**：操作细节
- 避免**内源RNase**：材料处理与保存

RNA提取——操作细节

避免外源RNase污染

- 仪器：RNase free耗材、高温或DEPC处理器皿
- 试剂：RNA实验专用、DEPC处理
- 人员：戴口罩、手套
- 环境：RNase free工作区

避免内源RNase污染

- 操作快速！
- 液氮研磨/液氮速冻
- RNA保存试剂

RT实验策略

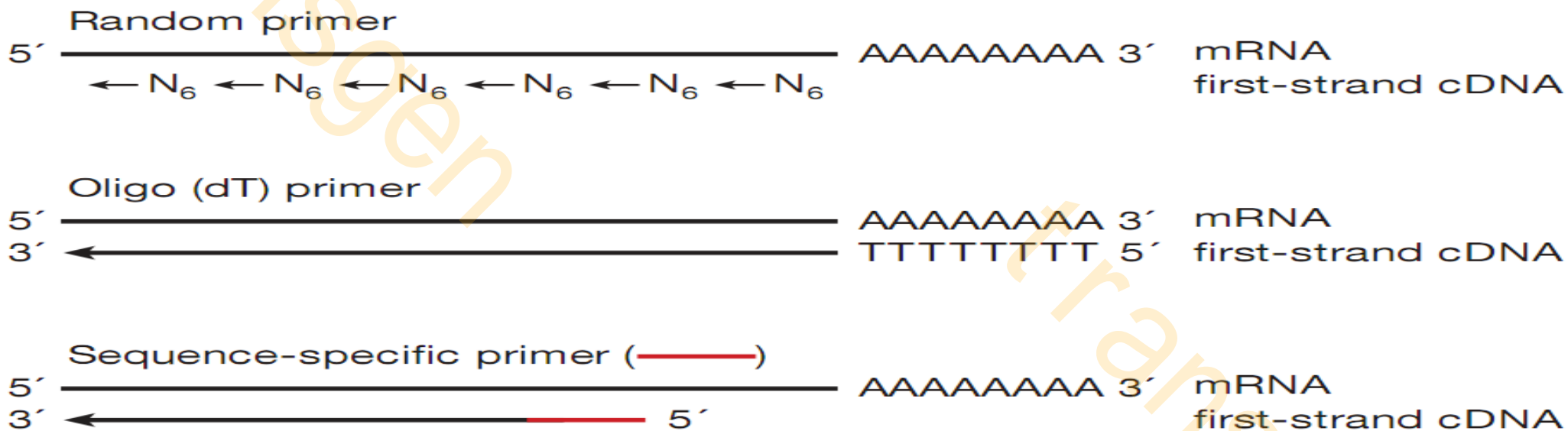
RT效率影响因素

RNA

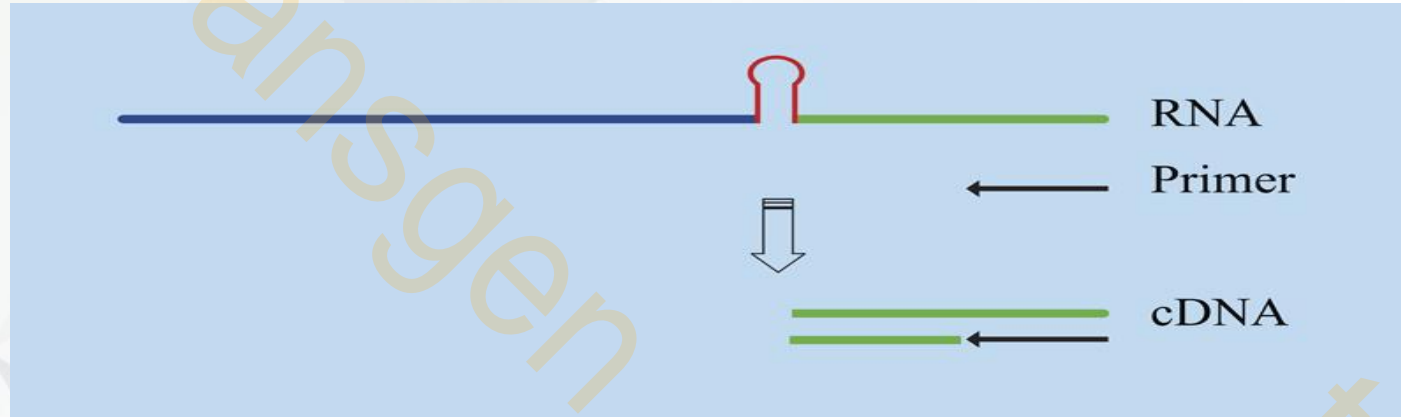
引物

酶

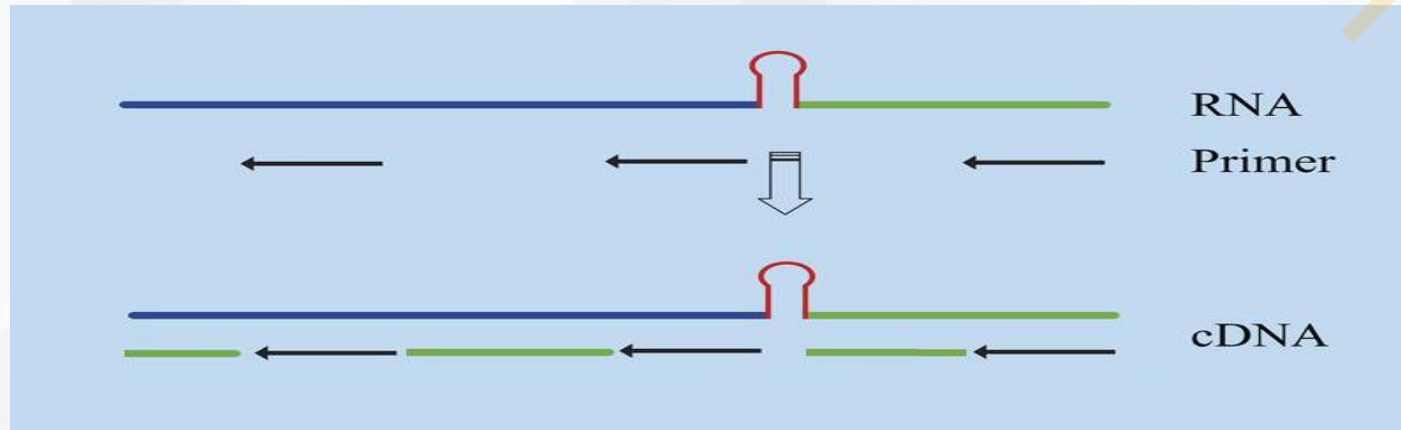
几种RT引物



Oligo(dT)/Random Primer



Oligo(dT)



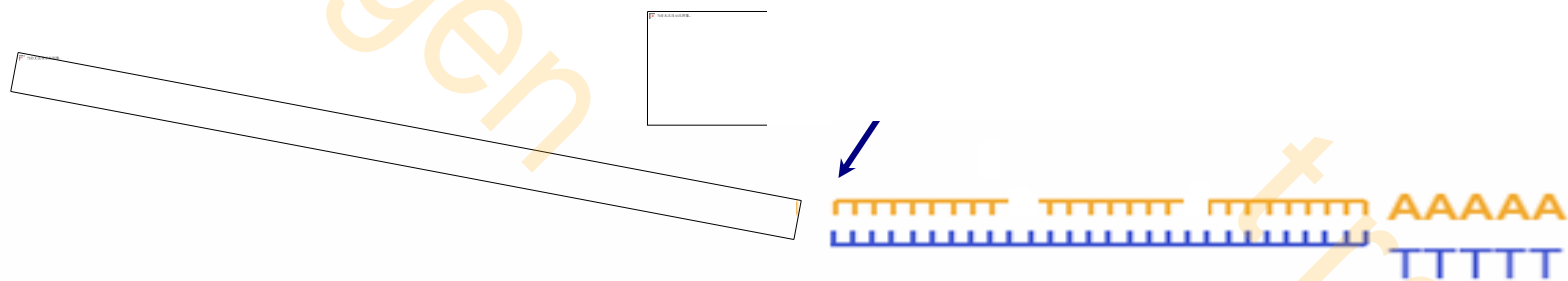
**Oligo(dT)/
Random Primer**

RT效率影响因素——RT酶

- RNase H活性
- 聚合酶活性——合成能力
- 聚合酶活性——保真性
- 热稳定性

RNase H Minus

有助于提升cDNA合成长度



RNase H

RNase H Minus

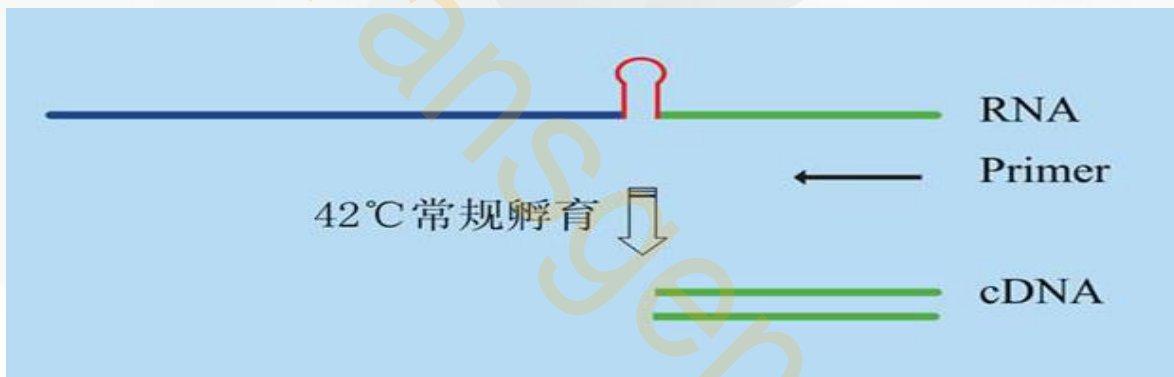
根据RT效率选择RT酶

- **RT酶的动力学范围：对不同浓度RNA模板的RT效率一致时，RNA模板的浓度范围**
- **选择高品质RT酶，动力学范围宽广**
- **对低浓度RNA可以有效RT**
- **对高浓度RNA没有抑制**

RT酶的保真性

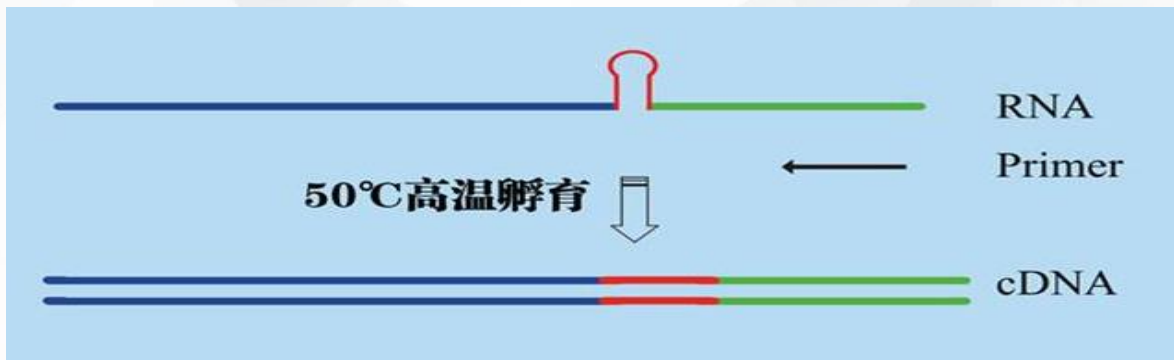
- RT酶保真性低原因：缺乏3' -5' 外切酶活性
- 在RT酶中加入具有3' -5' 外切酶活性的蛋白，赋予其校正功能
- 实现高保真RT-PCR

热稳定性对RT效率影响



常规温度RT

•复杂模板中二级结构阻碍合成

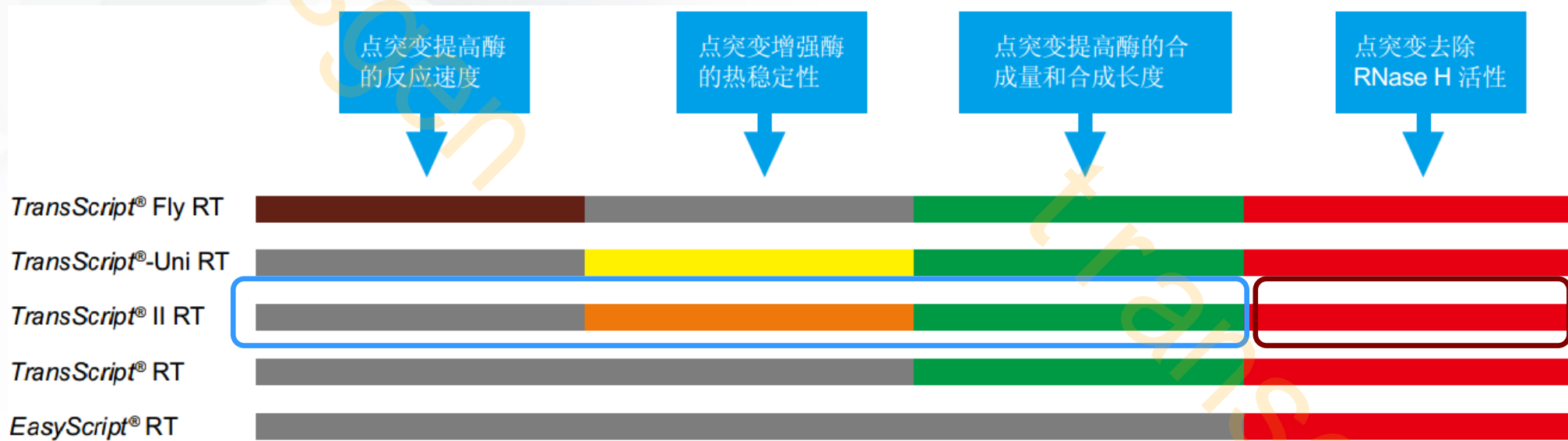


高温RT

•高温打开二级结构，合成继续

•要求RT酶热稳定性高

Trans RT酶系列产品改造原理



DNA聚合酶活性域

RNaseH 活性域

Trans RT系列产品性能比较

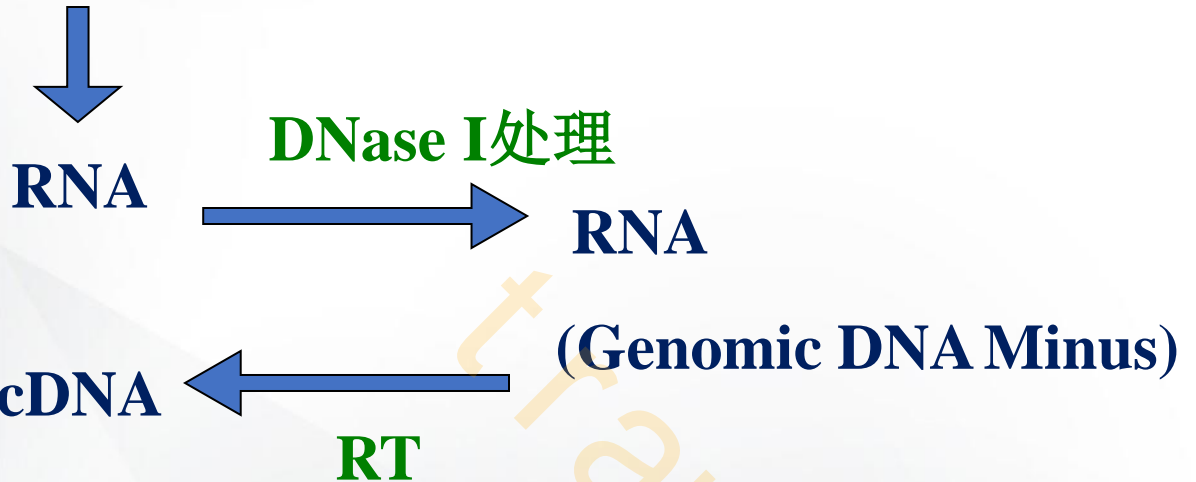
产品	合成长度	反应温度	灵敏度	保真性	适合高GC、复杂模板
EasyScript RT	≤8 kb	42°C	●	●	●
TransScript RT	≤12 kb	42°C	●●	●●	●●
TransScript II RT	≤15 kb	42-55°C	●●●	●●	●●●
TransScript Fly RT	≤12 kb	42°C	●●	●●	●●
TransScript-Uni RT	≤20 kb	42-65°C	●●●	●●	●●●

DNA去除与RT同时进行

材料（培养细胞、组织等）

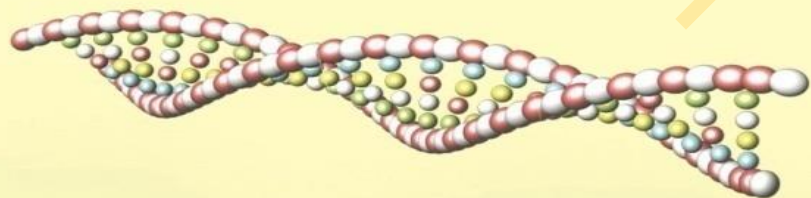
模板制备（RNA提取）

gDNA Removal /RT



- cDNA合成步骤/DNA去除步骤同时进行
- RTase失活/ gDNA Remover失活同时进行

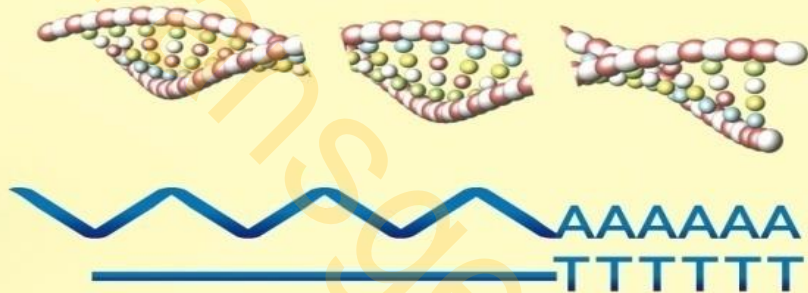
One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix



One-Step



事半功倍



microRNA和CircRNA

microRNA

- microRNA: 高度保守, 长度18 ~ 25 nt
- 在动植物体内广泛存在, 可以抑制特定基因表达, 在表达调控中有重要作用
- 研究基因功能的重要手段
- 疾病诊断及治疗 (外泌体microRNA)

microRNA检测方法

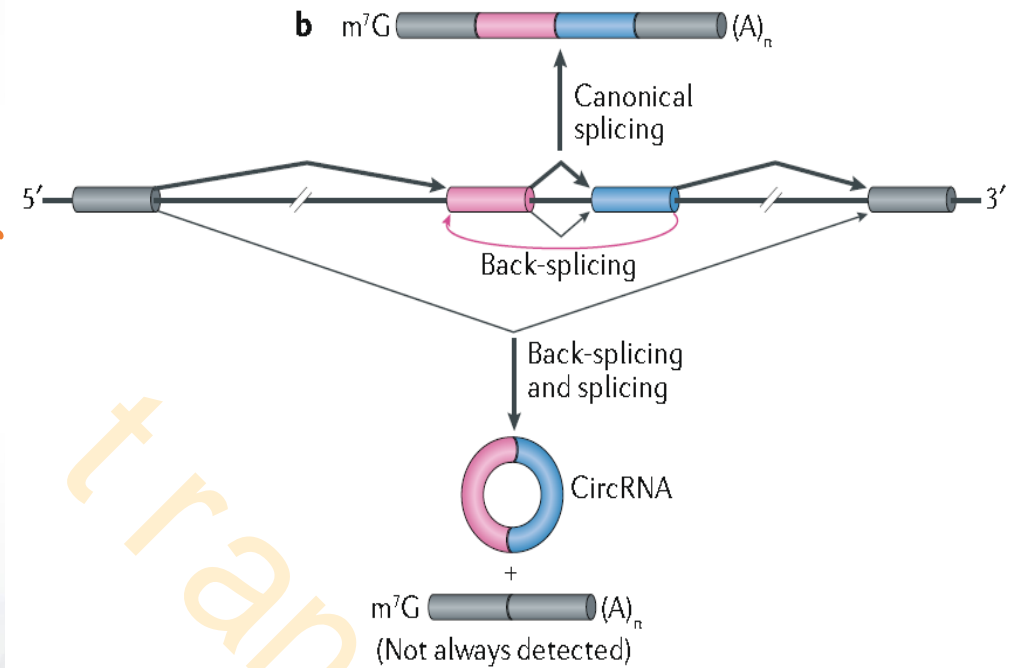
- Northern Blot
- Micro array
- **Real-time RT-PCR (qRT-PCR)**
可高通量检测，也可检测微量miRNA
可区分前体miRNA与成熟miRNA
可区分单碱基差异
易于操作

qRT-PCR检测microRNA ——cDNA合成

- miRNA特异引物
茎-环结构引物
线状引物
- miRNA加尾
Poly-A (*E. coli* Poly-A Polymerase)
adaptor (T4 RNA Ligase)

什么是CircRNA

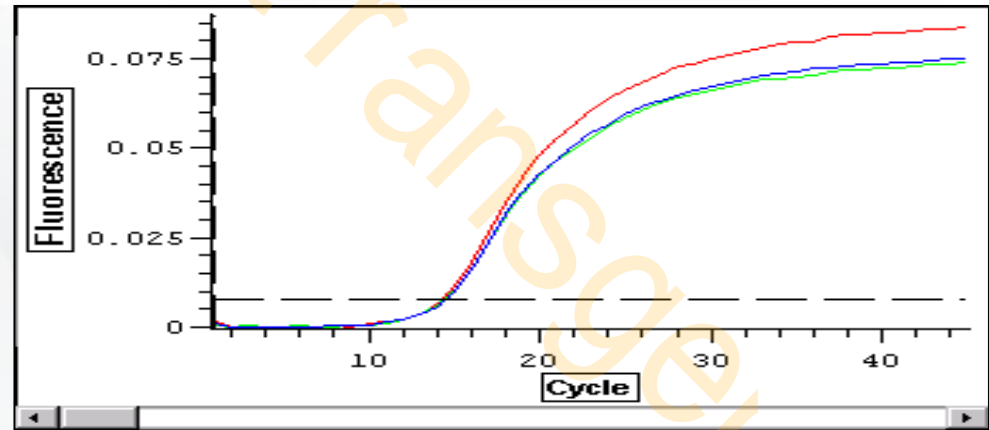
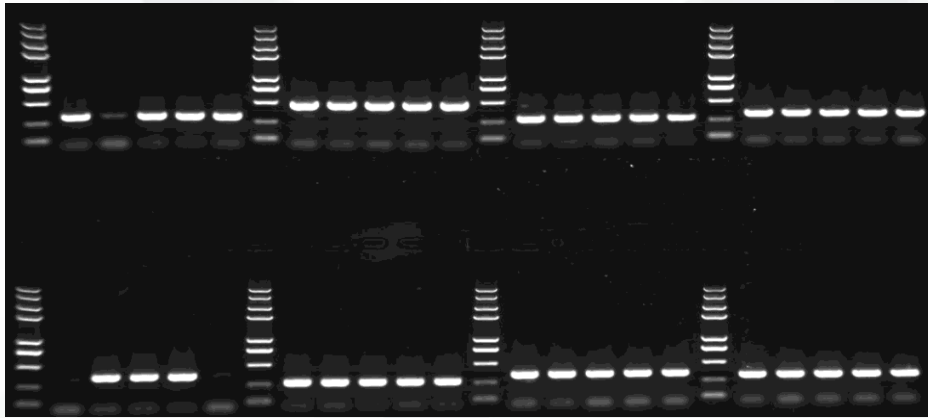
- **Circular RNA**，缩写为**CircRNA**，中文名为**环状RNA**，属于**非编码RNA**，是近年的一个重要研究热点。
- **CircRNAs**是一类不具有**5' 末端帽子**和**3' 末端poly(A)尾巴**、并以**共价键形成环形结构**的非编码RNA分子。
- **CircRNA**主要是通过**back-splicing**的方式产生，明显不同于线性RNA（**linear RNA**）经典的**5'-3'**的模式。
- **CircRNA**在各种动物、植物、昆虫和真菌等均有发现。
- 相比与mRNA等线性RNA，circRNA在机体内的表达量较少，但表达模式却与其线性同源RNA不同，其表达不依赖于其线性的同源RNA。



qPCR实验策略

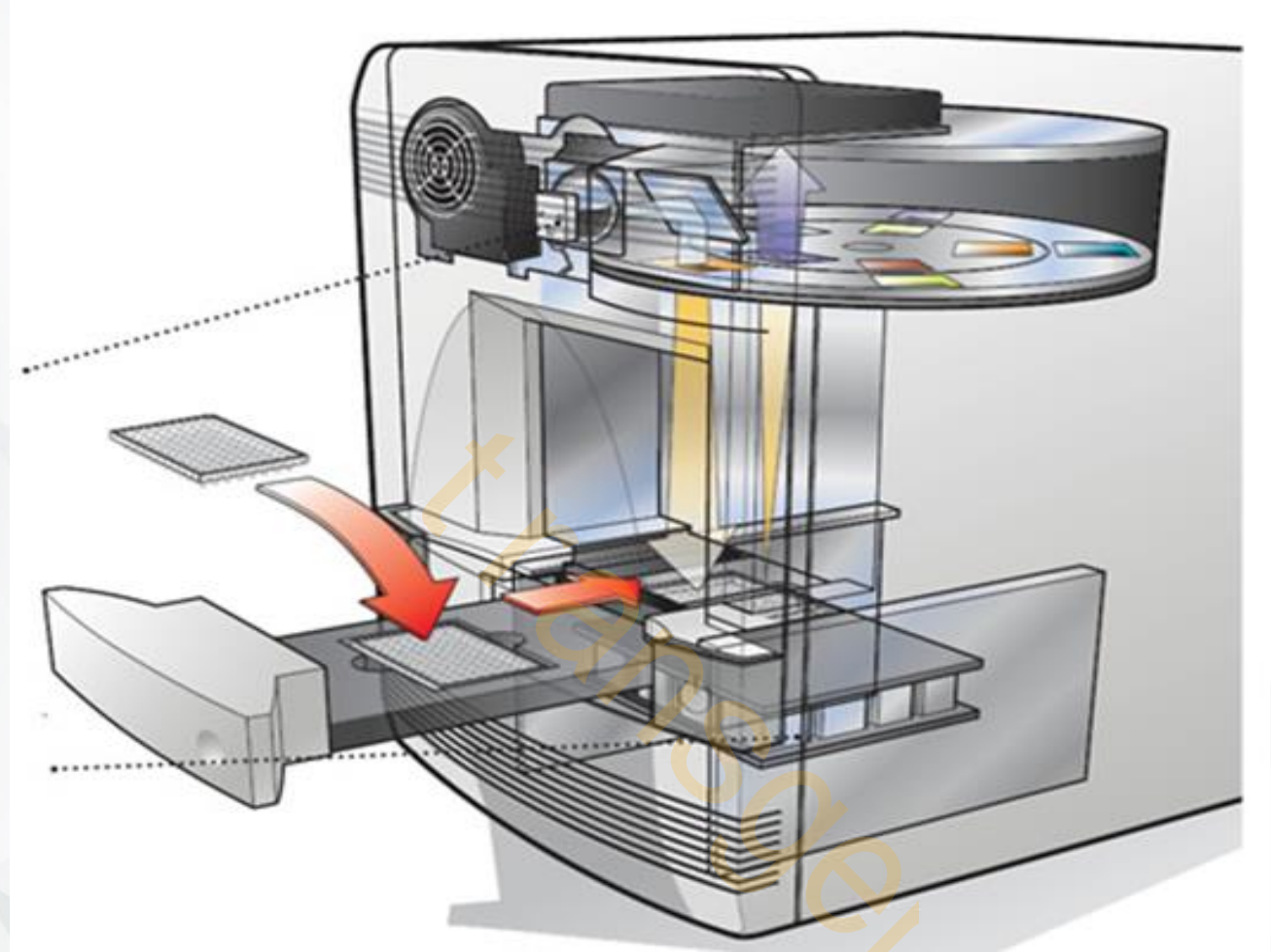
常规PCR与实时荧光定量PCR

- 常规PCR：借助电泳对扩增反应的终产物进行半定量及定性分析
- 实时荧光定量PCR技术：利用荧光信号的变化实时检测PCR扩增反应中每一个循环扩增产物量的变化，最终对起始模板进行精确的定量分析

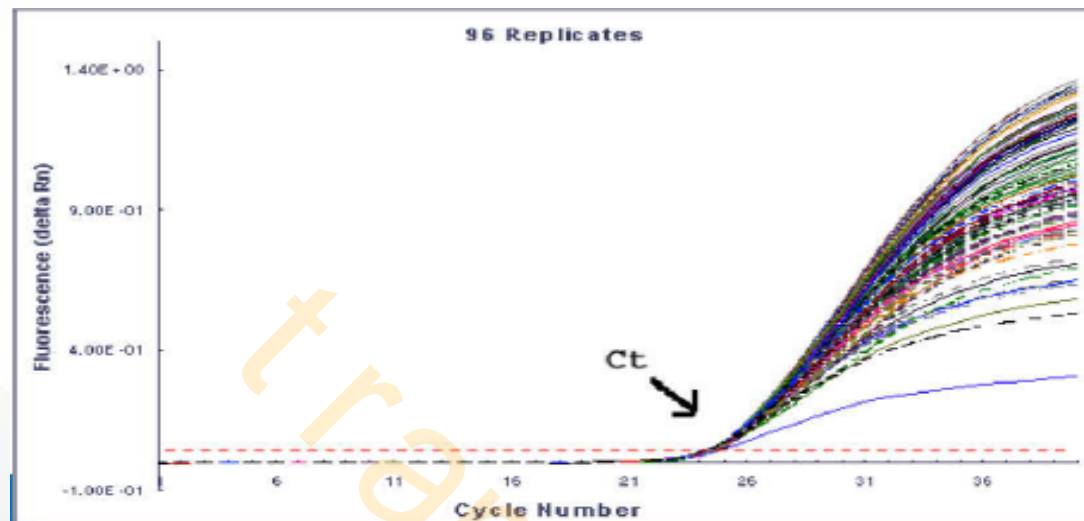
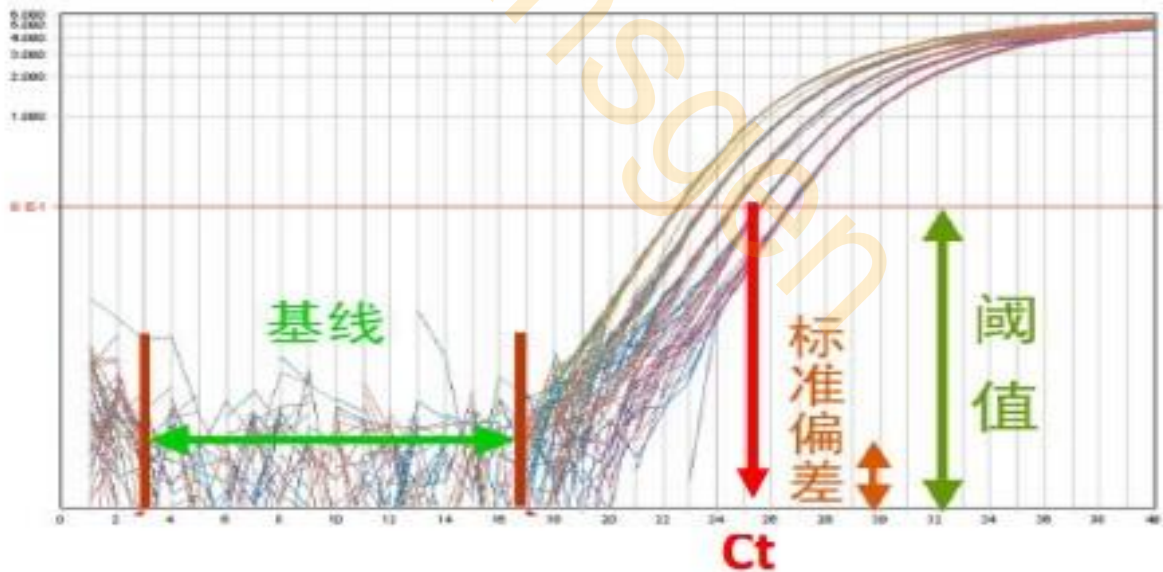


荧光定量PCR仪器工作原理

- 激发光发射源
- 接收装置
- PCR反应模块



qPCR 参数: 扩增曲线

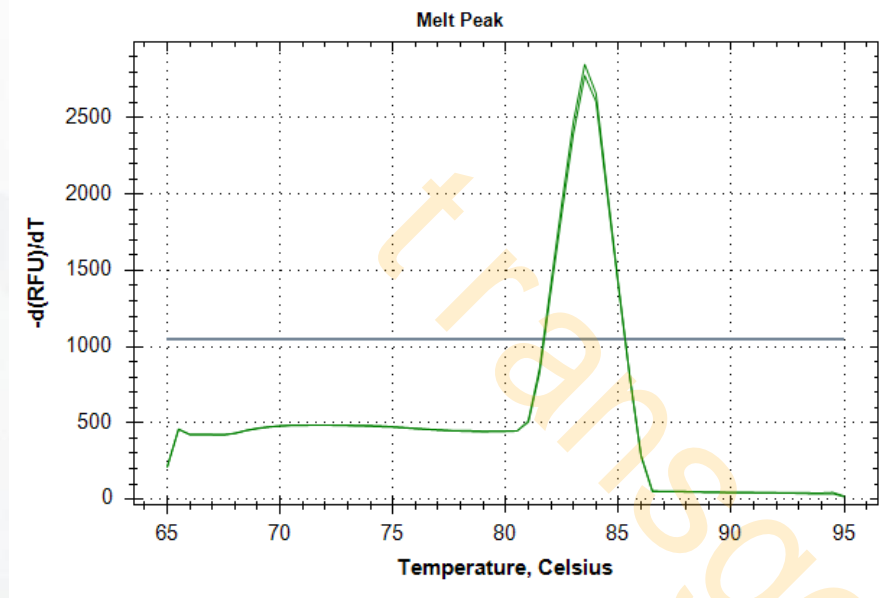
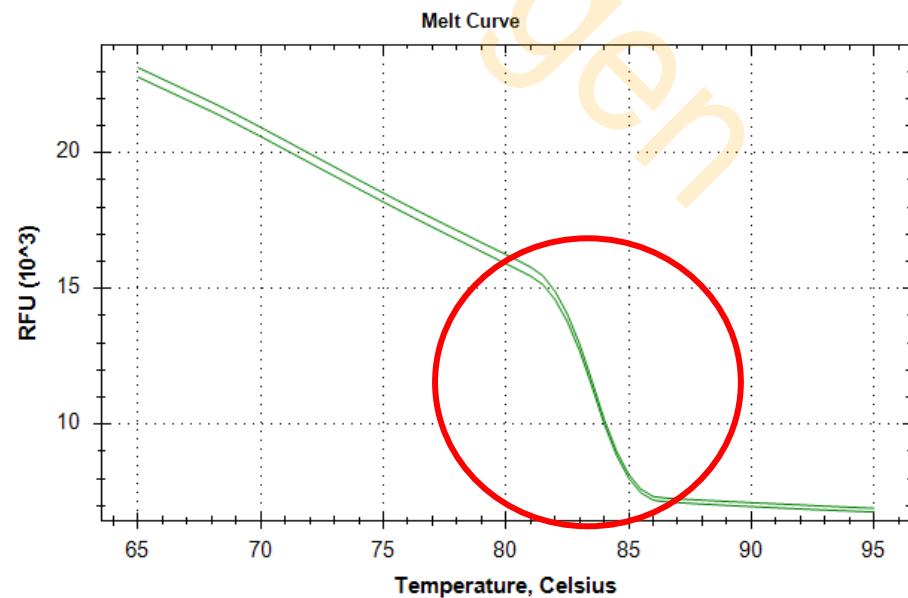


扩增曲线反映qPCR重要指标

溶解曲线(下左): 温度和荧光值的关系, 在扩增结束后进行

处理后溶解曲线(下右): 温度和荧光值的关系, 并取其导数, 更为常用

应用:指示特异性, 最为理想的为单峰; 如出现多峰证明反应不特异或存在引物二聚体



确认反应特异性, 增加数据可信度

qPCR的数学原理

- 理想的PCR反应:

$$X_n = X_0 \times 2^n$$

- 非理想的PCR反应:

$$X_n = X_0(1+Ex)^n$$

- 方程式两边同时取对数得:

$$\lg X_n = \lg (X_0 (1+Ex)^n)$$

整理方程式得:

$$\lg X_0 = (- \lg(1+Ex)) \times n + \lg X_n$$

- 将C(t)和达到C(t)值时终产物的量 $X_{c(t)}$ 带入上式得:

$$\lg X_0 = (- \lg(1+Ex)) \times C(t) + \lg X_{c(t)}$$

n: 扩增反应的循环次数

X_n : 第n次循环后的产物量

X_0 : 初始模板量

Ex: 扩增效率

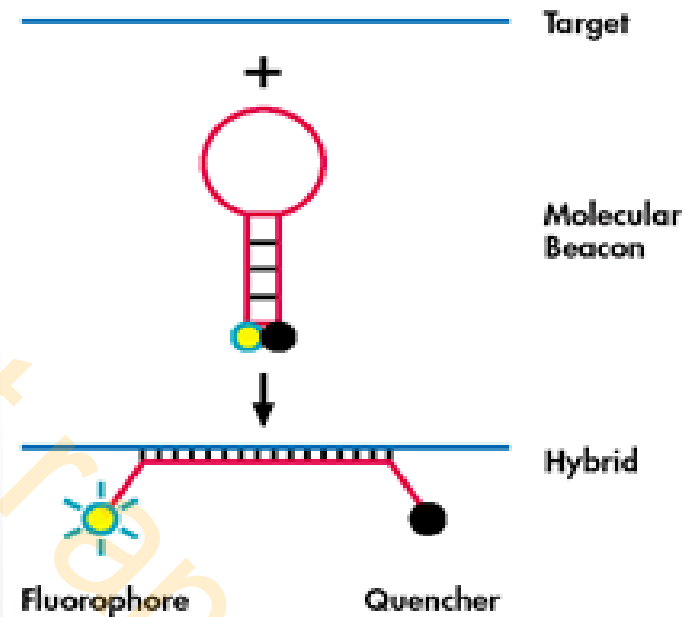
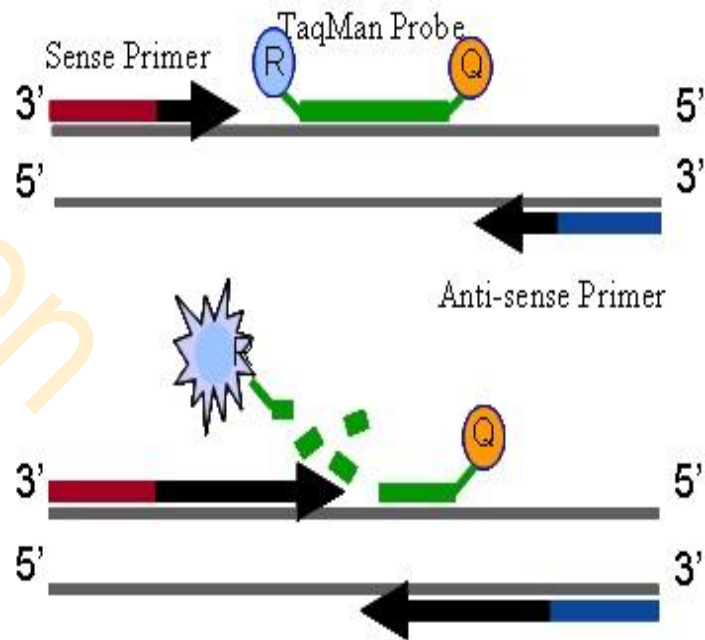
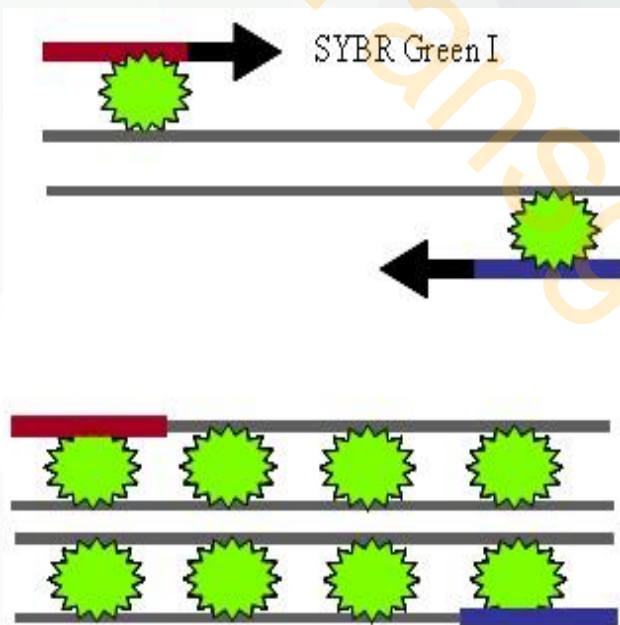
初始浓度的对数与循环数呈线性关系

The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments

Stephen A. Bustin,^{1*} Vladimir Benes,² Jeremy A. Garson,^{3,4} Jan Hellemans,⁵ Jim Huggett,⁶
Mikael Kubista,^{7,8} Reinhold Mueller,⁹ Tania Nolan,¹⁰ Michael W. Pfaffl,¹¹ Gregory L. Shipley,¹²
Jo Vandesompele,⁵ and Carl T. Wittwer^{13,14}

1. 提出发表文章时所要求的**最低限度**的必要**信息标准**。
2. 对qPCR的术语；概念；研究与临床应用；样本的采集、处理和制备；核酸的质量控制；反转录；qPCR过程；数据分析等方面的操作标准和规范都做了详尽的阐述。

qPCR常用定量方式



- 简单
- 成本较低

- 适用于多重PCR
- 特异性较好

- 可进行SNP检测
- 特异性非常好

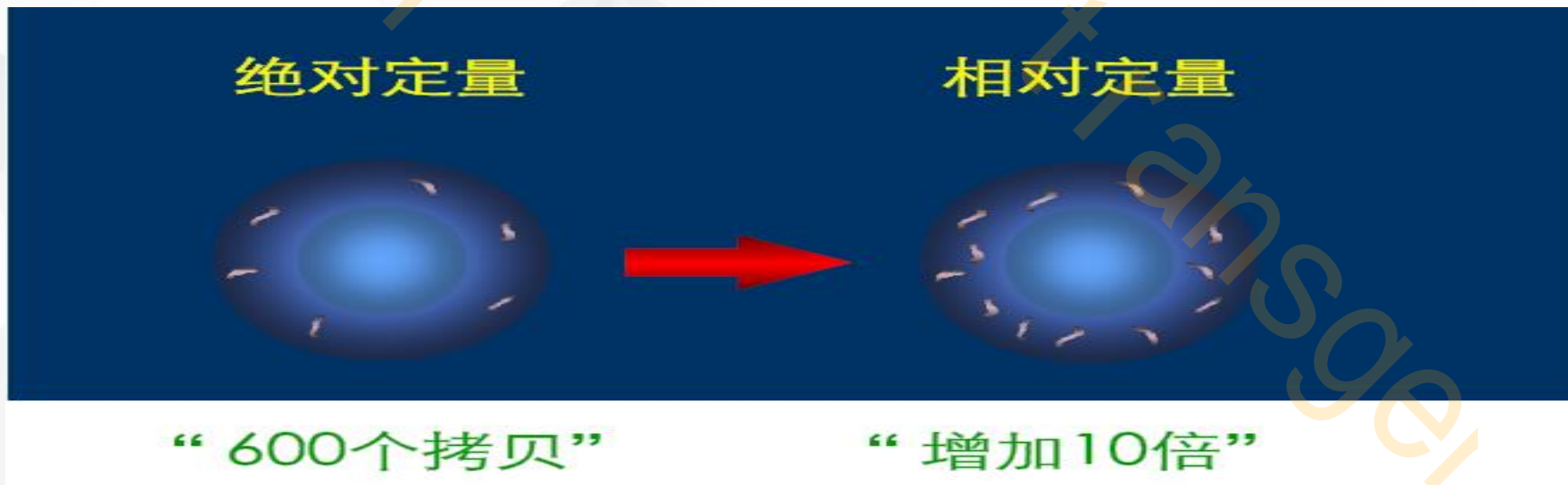
荧光标记方法选择

- 医疗检验
 - TaqMan探针法
 - 特异
 - 准确
- 科研
 - SYBR方法
 - 便宜
 - 方便
 - TaqMan探针法
 - 要求严格的相对定量

常用定量方法

——相对定量vs绝对定量

- 绝对定量
 - 微生物检测：病毒拷贝数
 - 转基因检测：转基因拷贝数
- 相对定量（差异）
 - 基因表达差异



- **绝对定量**
 - 标准曲线由已知浓度的RNA、质粒或合成的寡核苷酸链生成；
 - 定量未知模板；
 - 标准样品和未知样品必须同时反应；
- **相对定量**
 - **$\Delta\Delta\text{CT}$ Method:** 使用内参基因定量所研究样品和参照样品的目的基因；
参照样品基因与目的基因可以同时反应，也可以单独反应；
 - **双标准曲线法:** 对每个样品的内参基因和目的基因都做绝对定量，求出每个样品中内参基因和目的基因的绝对数量，然后根据相对定量的基本公式来求出目的基因的差异表达；

一步法vs两步法qPCR

One Step RT-PCR (One tube)

Gene Specific
primers

RNA

Two Step RT-PCR (Two tubes)

Oligo dT
Random Primers

cDNA

Amplicon

Amplicon

根据实验情况进行选择

- 可进行PCR或qPCR
- 需要基因特异性引物
- 高通量
- 使用同类的RNA(i.e. single cell)
- 适合从大量的RNA样本中得到少量基因（数目）的信息

- 先进行cDNA合成再进行PCR
- 高效的第一链合成
- 可为下游实验提供cDNA
- 适合从少量的RNA样本中得到大量基因（数目）的信息

绝对定量和相对定量实验要求

绝对定量

■ 模板

尽可能选择与目的基因序列相同以保证扩增效率相同

■ 来源

质粒DNA

纯化PCR产物

Reference DNA (genomic DNA)

■ 精度

每次加样要保证在2 μ l以上，减少误差

■ 梯度

至少3个点，最好5个点

相对定量内参基因选择

■ 内参基因的作用

检测样本材料中RNA是否降解

纠正样本加样的差异

校正cDNA合成速率差异

校正PCR抑制剂的影响

■ 常用内参基因

GAPDH

β-actin

18SrRNA

■ 选择

不同的物种选择不同的内参基因，有时候可选择组合内参基因。

引物设计方法和原则

●SYBR-Green引物

引物长度18~30 bp，产物长度范围100~300 bp

G/C 含量: 40~60%

避免引物内含有互补序列 (尤其是3'端)

避免3' 端错配

3'端不能出现连续三个以上的G或C

避免3'端出现T碱基

引物T_m值建议在58℃-62℃之间

设计跨内含子引物

TaqMan探针和引物设计

TaqMan探针

- T_m 值比引物高 10°C
- 没有连续相同的碱基
- 探针位置尽可能地靠近上游引物
- C远远多于G
- 5'端没有G

TaqMan引物

- T_m ($58\sim 60^{\circ}\text{C}$)
- 15 – 30 bases in length
- G+C 含量 30~80%
- 不要有连续4个G
- 3'端不能有连续两个以上的G+C
- 5'端不要有G (A or C preferred)
- 引物之间的 T_m 相差避免超过 2°C
- 扩增长度50~150 bp (max 400)
- 引物跨越内含子



transgen

qPCR实验设计

transgen

t transgen

对照设置

t transgen

阴性对照

- **Negative control: No template (NTC)**
 - 检验是否有模板污染
- **No reverse transcriptase control (NRC):**
 - 检验RNA样品中是否有DNA污染
- **No amplification control (NAC):**
 - 检验是否有聚合酶污染
- **No probe control (NPC):**
 - 检验荧光污染
- **Buffer: Only contains buffer**
 - 检验背景荧光

阳性对照

- **Calibrator:** 可以用带有PCR扩增子的合成的RNA或cDNA寡核苷酸；质粒DNA；克隆到质粒的cDNA；体外反转录的RNA；Reference RNA pools；来自于特定的生物体样本的RNA或DNA及国际上公认的生物学标准物。
- **Standard curve**

定量方式选择

• SYBR Green适用

- 特异性要求不是特别高的反应，分子数（拷贝数）超过1000的反应
- 探针实验前，进行预实验
- PCR条件非常成熟，无二聚体，无非特异扩增

• TaqMan适用

- 特异性要求较高的实验
- 多重PCR（标记不同的荧光基团）
- SNP
- 灵敏度要求较高的实验

参照染料 (ROX)

- **标准化荧光信号**
 - 调整非PCR因素造成的误差，如加样误差
 - 提供较稳定的基线
 - 部分仪器在使用前会使用标准化荧光信号进行校正
- **参照染料的使用由仪器决定**
 - **ABI and Stratagene** 使用**ROX**
 - **Bio-Rad** 使用标准化荧光信号
 - **Roche, Corbett, Cepheid** 和 **MJ Research**不使用内参染料

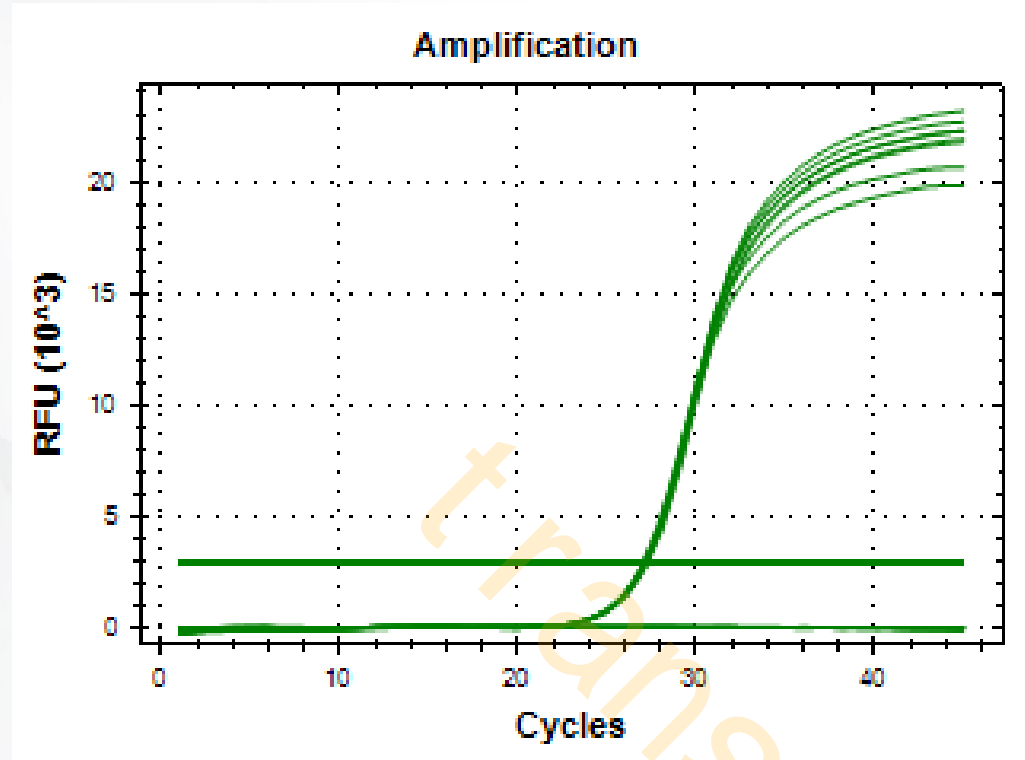
使用内参染料使数据更加准确

判断数据有效性

- 用扩增曲线检验qPCR体系
- 用溶解曲线检验qPCR体系
- 用标准曲线检验qPCR体系
- 用No-Template Control(NTC)检验qPCR体系（引物）
- 用No RT Control检验qPCR体系（模板）

扩增曲线

- 平滑
 - 起始无扩增
 - 起峰时间正常
 - NTC和NRC无扩增
- 或扩增起峰较晚



CT值是判断实验成功与否的重要参考

Ct值的可信范围

- 临床检验

小于33

- 科学研究

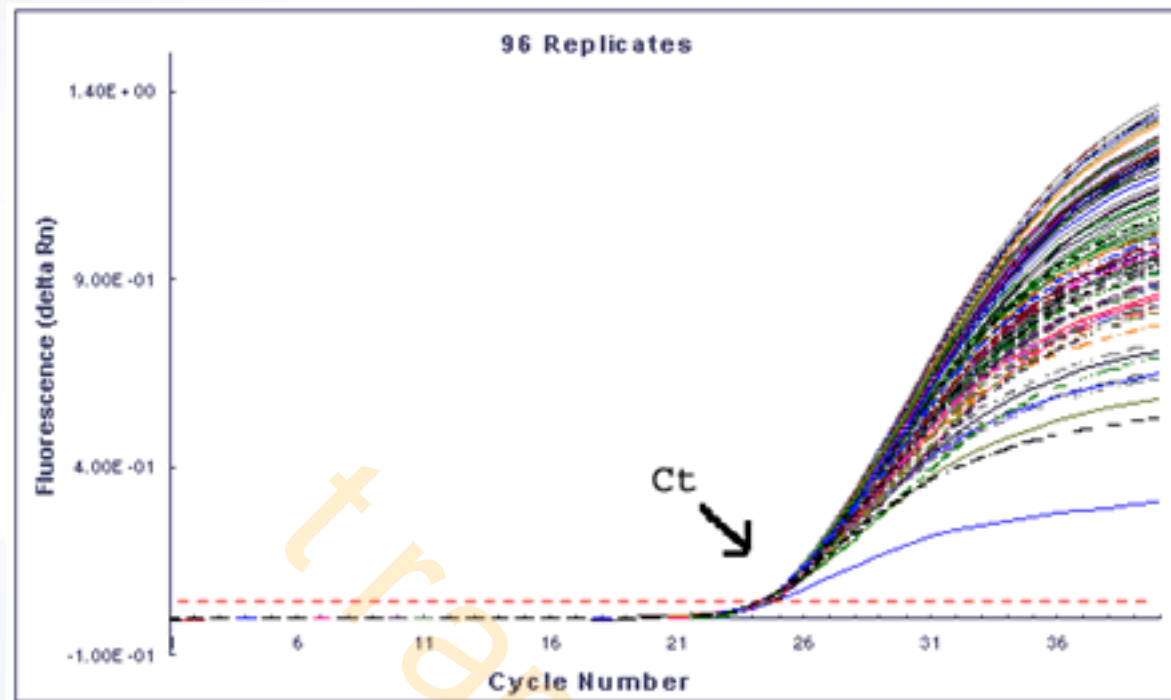
小于38

- 内参基因

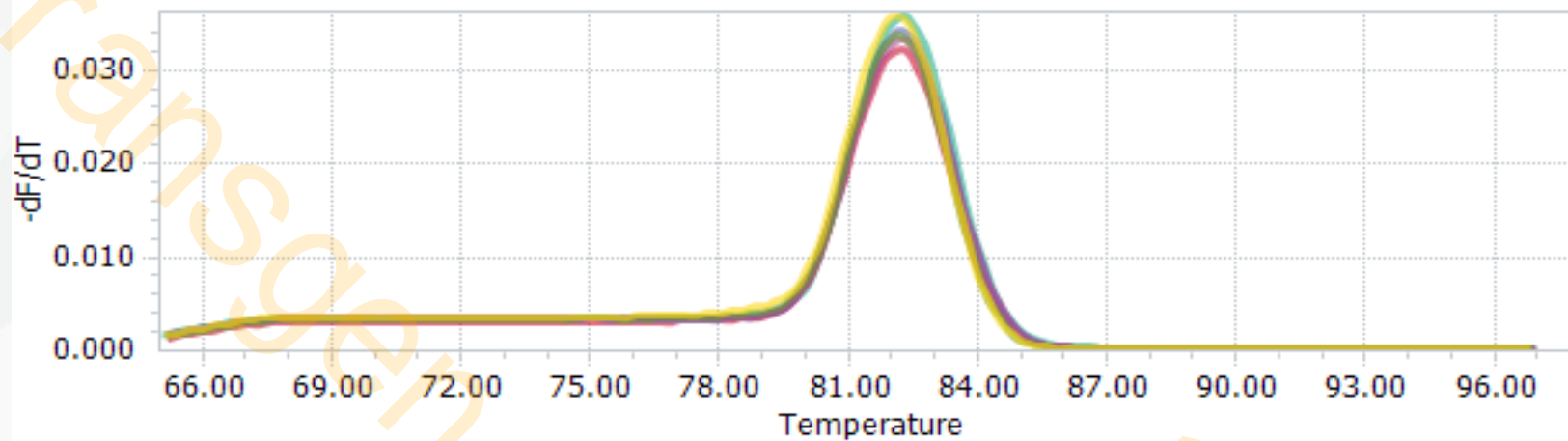
小于20，样品间差距不超过1

- 复孔

不超过0.5



CT值是判断实验成功与否的重要参考



- 呈现单峰
- 峰的宽度较小
- **NTC和NRC均无较高的峰出现**

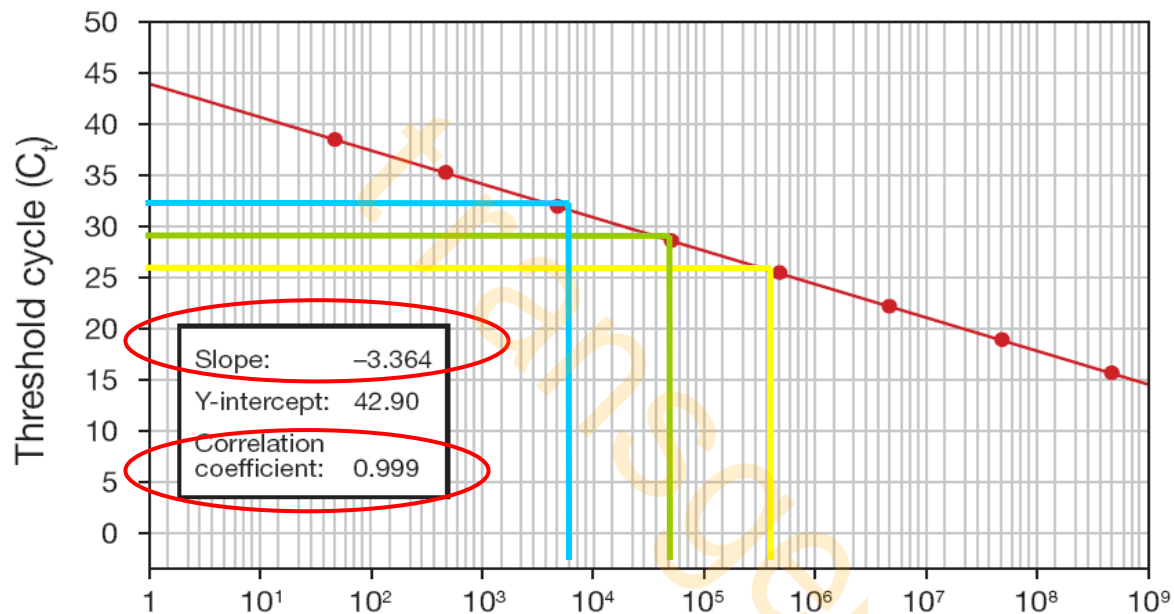
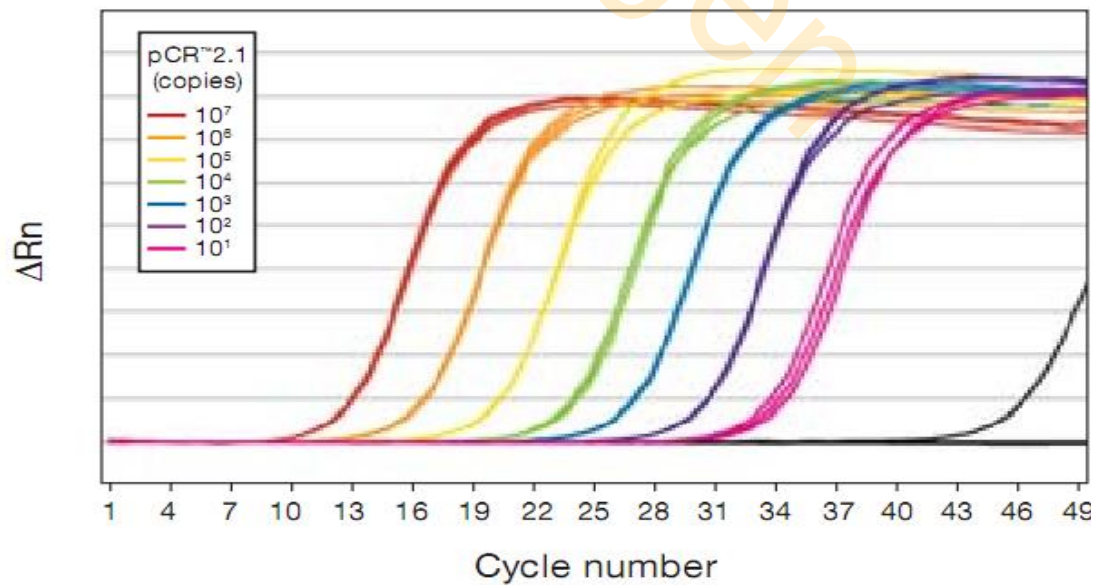
扩增效率

$r^2=0.999$ Slope= -3.364

$E=10^{(-1/slope)} - 1$

$r^2: 0.95 \sim 1$ Slope: -3.58 ~ -3.10

$E: 90\% \sim 110\%$



荧光定量PCR-- NTC

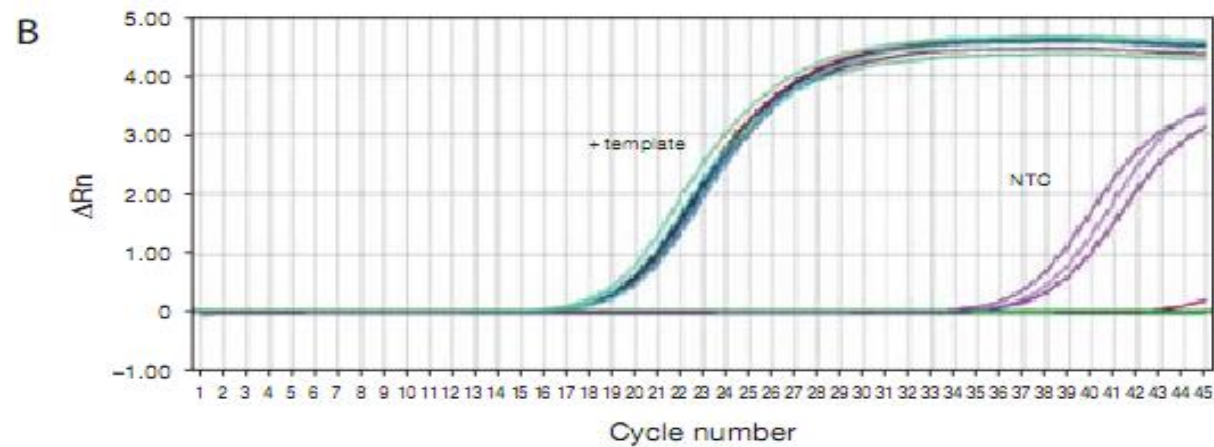
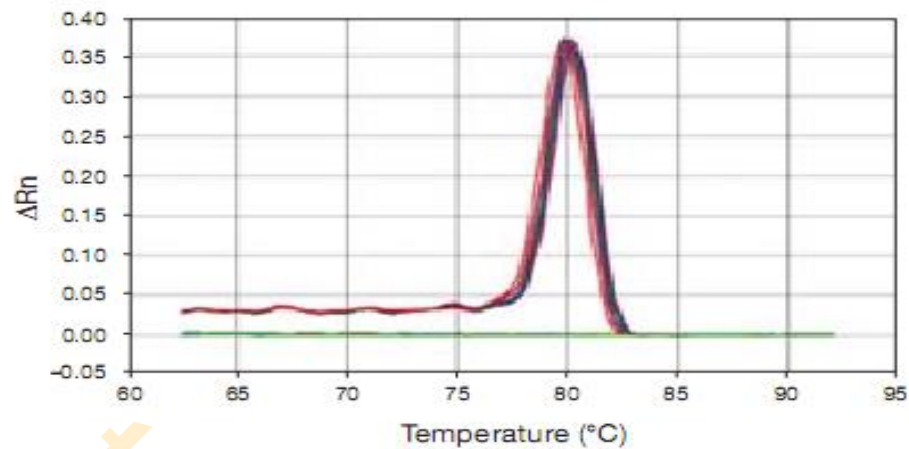
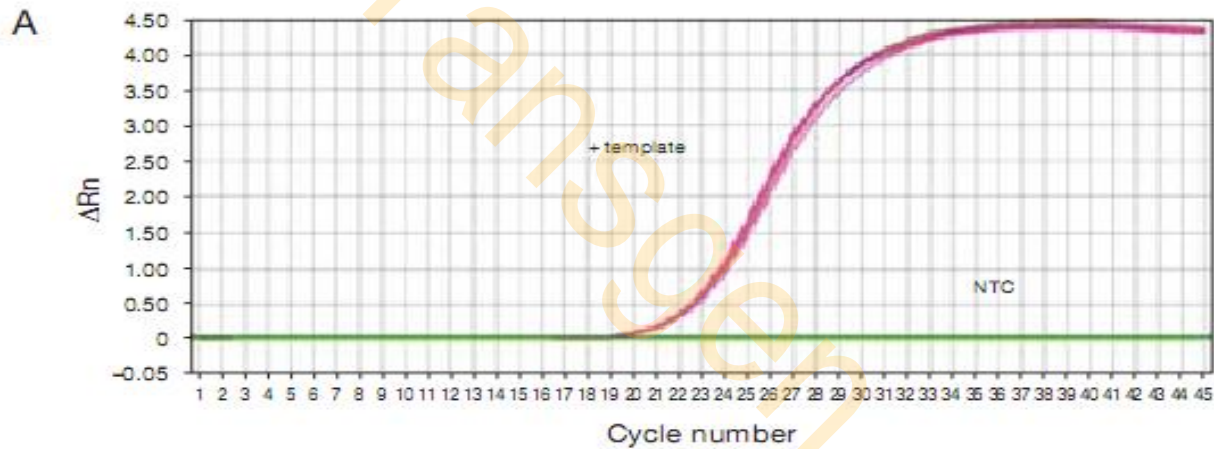
NTC

- NTC—反应是否存在污染
- NTC—引物是否特异，是否会形成引物二聚体

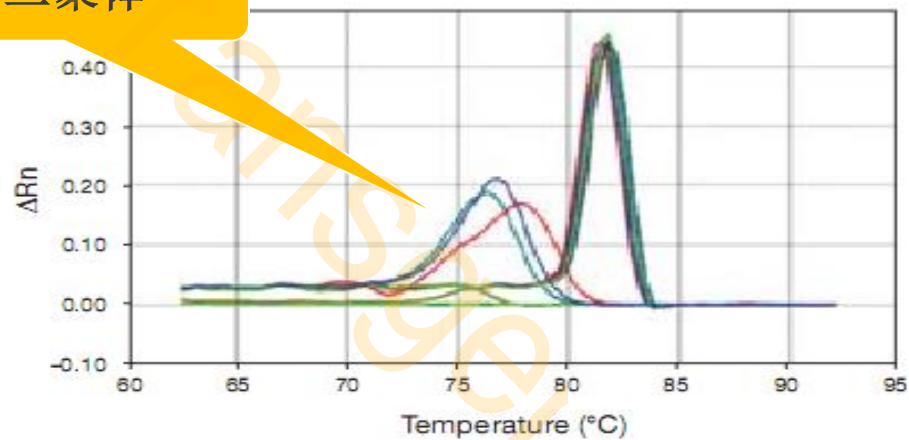
NTC的最佳状况

- NTC无扩增，扩增曲线与基线重合
- NTC的CT值与全管反应物的CT值相差5以上或10以上

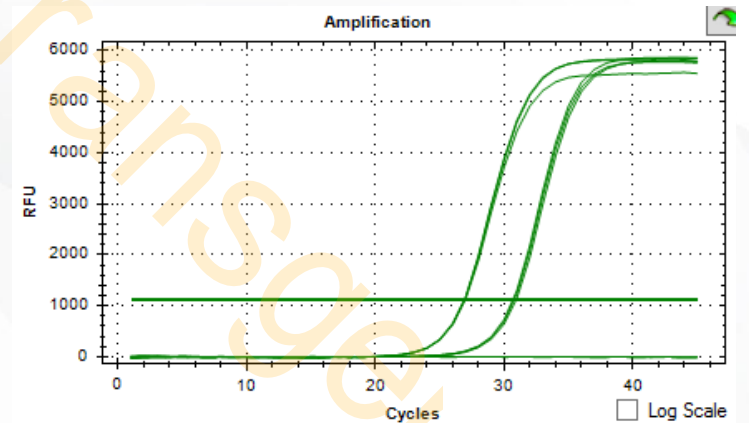
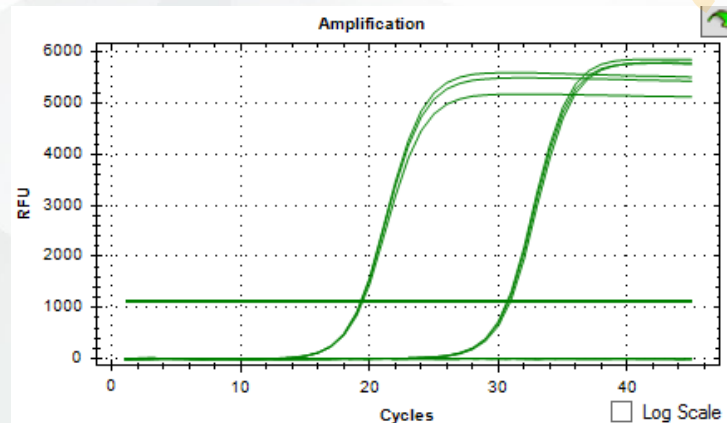
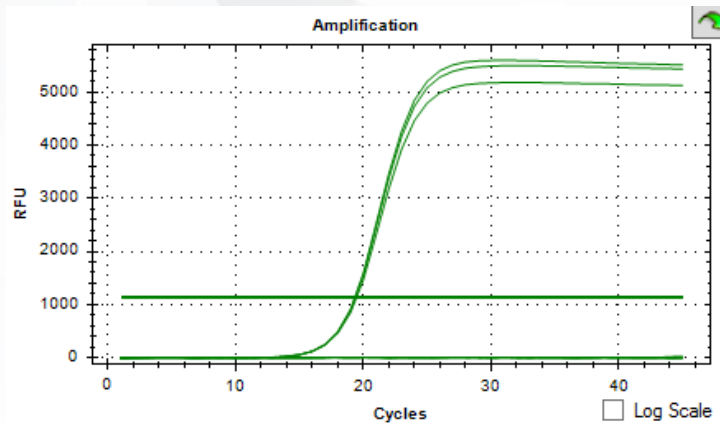
荧光定量PCR-- NTC



引物二聚体



- RT反应中的阴性对照，即不加入RT酶的反应
- 目的：检测RNA中是否有基因组DNA的残留
- 将No RT Control产物与正常cDNA同时进行qPCR
- 观察其结果，判断正常cDNA的扩增结果是否可信、该RNA是否可



荧光定量PCR标准数据参考范围

数据名称	参考范围
T_m	>80℃
CT	18~30 cycles
R²	>0.95
Slope	(-3.58)~(-3.10)
Efficiency	90%~110%
NTC	CT(NTC) =N/A CT(NTC) - CT(样品) ≥ 5
NRC	CT(NTC) =N/A CT(NTC) - CT(样品) ≥ 5

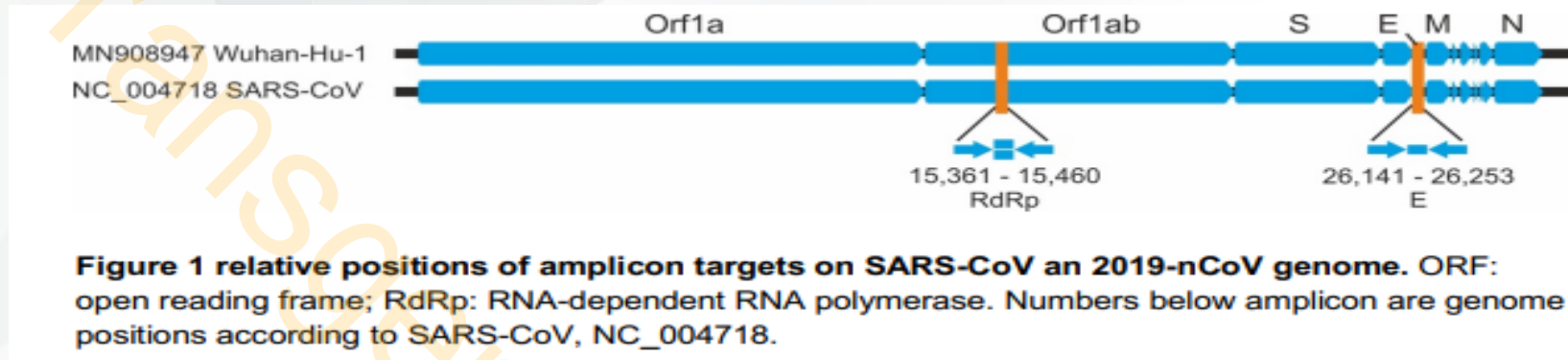
微量材料的有效qPCR

- 一步法qRT-PCR定量cDNA
- “C to C” (Cell to cDNA)

新冠病毒核酸检测结果

WHO发布检测2019-nCoV时所用各引物探针序列

<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>



Country	Institute	Gene targets
China	China CDC	ORF1ab and N
Germany	Charité	RdRP, E, N
Hong Kong SAR	HKU	ORF1b-nsp14, N
Japan	National Institute of Infectious Diseases, Department of Virology III	Pancorona and multiple targets, Spike protein
Thailand	National Institute of Health	N
US	US CDC	Three targets in N gene
France	Institut Pasteur, Paris	Two targets in RdRP



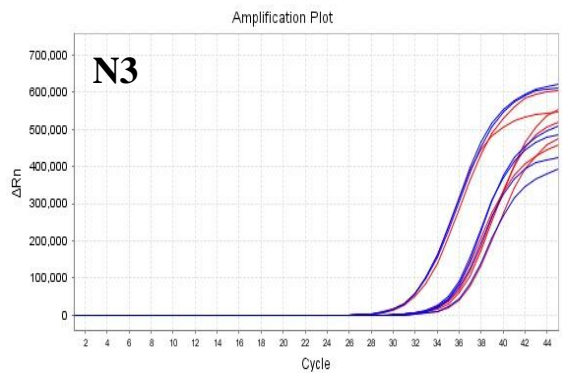
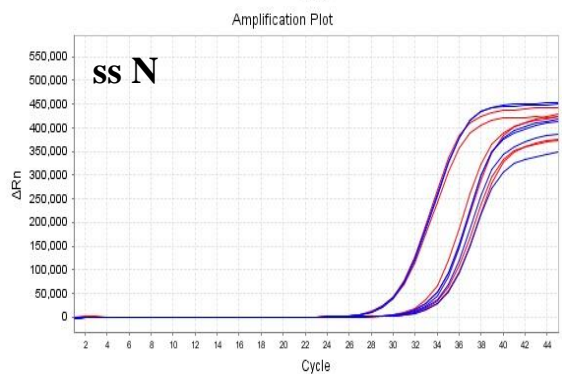
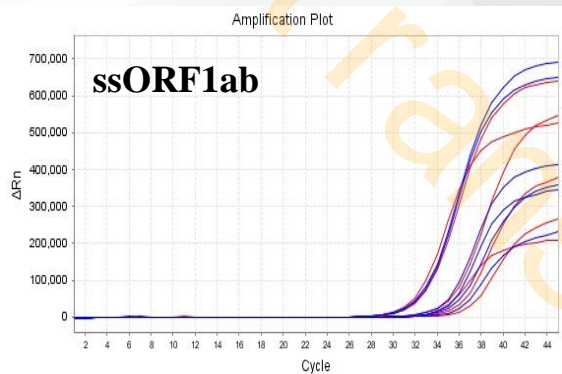
引物组合

四重测试	引物选择 (上海计量院标品)					
	序号	通道1 (FAM)	通道2 (VIC / HEX)	通道3 (TexRed)	通道4 (Cy5)	稳定检测限
	4	ORF1ab F/R3	N F / R	N3 F / R	RP NF2 / R	
	6	SS_ORF-F1 / SS_ORF_R1 / SS_ORF_P2	SS_N_F1 / SS_N_R3 / SS_N_P1	N3 F / R	RP NF2 / R	10--6/4
	8	SS_ORF-F1 / SS_ORF_R1 / SS_ORF_P2	E F/R VIC	N3 F / R	RP NF2 / R	10--6/4
	11	ORF1ab F/R3	SS_N_F1 / SS_N_R3 / SS_N_P1	N3 F / R	RP NF2 / R	
三重测试	引物选择					
	序号	通道1(FAM)	通道2 (VIC / HEX)	通道3(TexRed)	通道4(Cy5)	
	5	ORF1ab F/R3	N F/R		RP NF2 / R	500copy/ml
	上海计量院标品					
	13	SS_ORF-F1 / SS_ORF_R1 / SS_ORF_P2	SS_N_F1 / SS_N_R3 / SS_N_P1		RP NF2 / R	10--7
	14	SS_ORF-F1 / SS_ORF_R1 / SS_ORF_P2	N F/R VIC		RP NF2 / R	10--7
	15	SS_ORF-F1 / SS_ORF_R1 / SS_ORF_P2		N1 F/R TexRed	RP NF2 / R	10--6/2
	16	SS_ORF-F1 / SS_ORF_R1 / SS_ORF_P2		N3 F/R	RP NF2 / R	10--6/2
单重测试	引物选择					
	序号	通道2 (VIC / HEX)				
	5	E F/R				
	10	SS_N_F1 / SS_N_R3 / SS_N_P1				

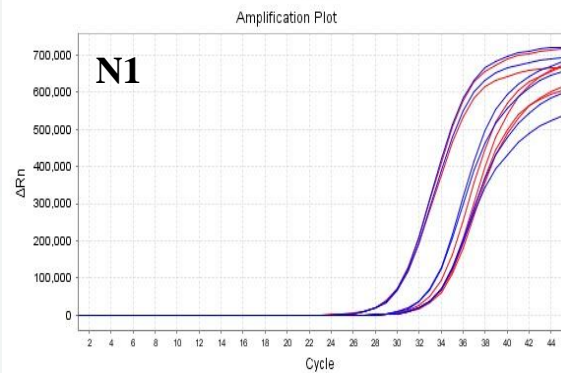
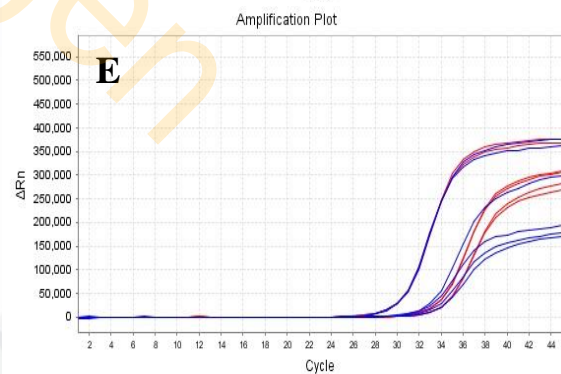
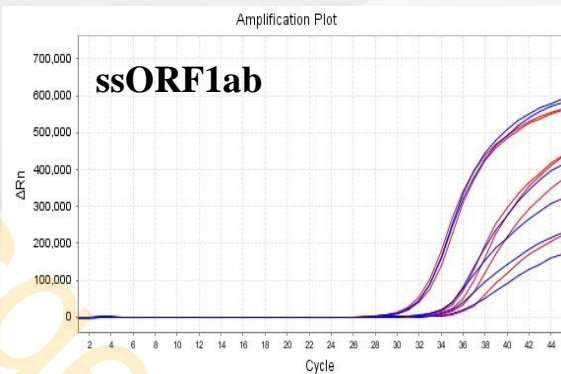
利用11种引物探针Mix进行检测2019-nCoV。

AQ322 检测2019-nCoV标准品

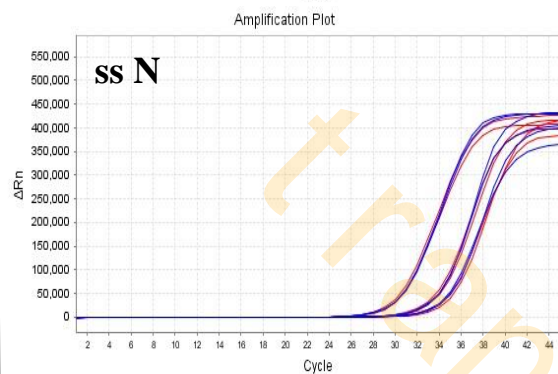
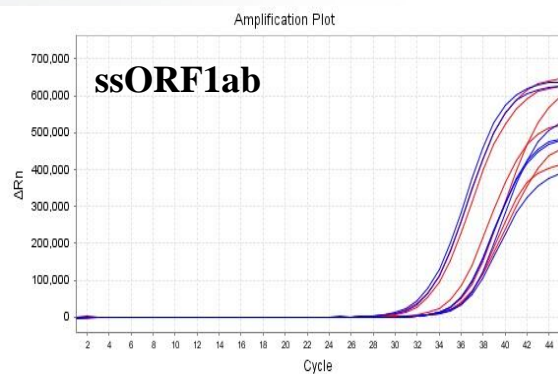
四重PPMix 6



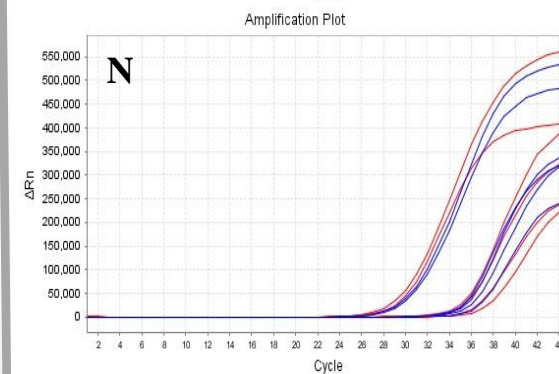
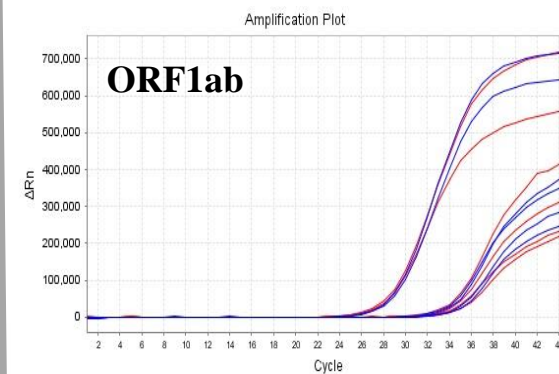
四重PPMix 7



三重PPMix 13



三重PPMix 1



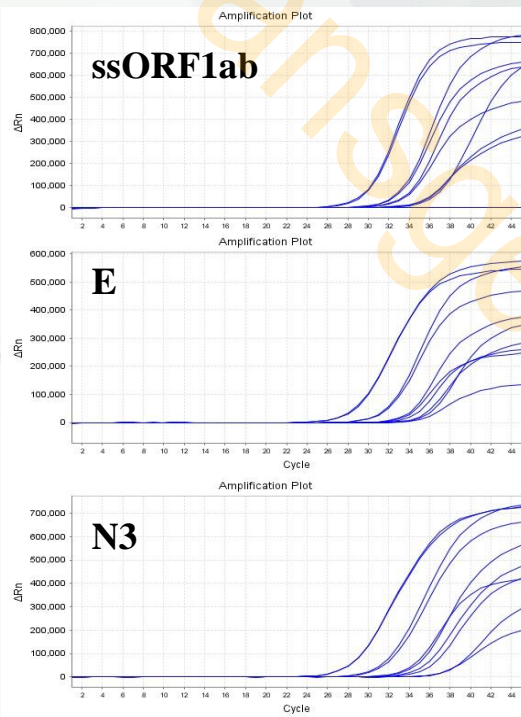
2019-nCoV标准品来自上海计量院；

标准品倍比稀释: 10^{-5} 、 10^{-6} 、 $10^{-6}/2$ ；

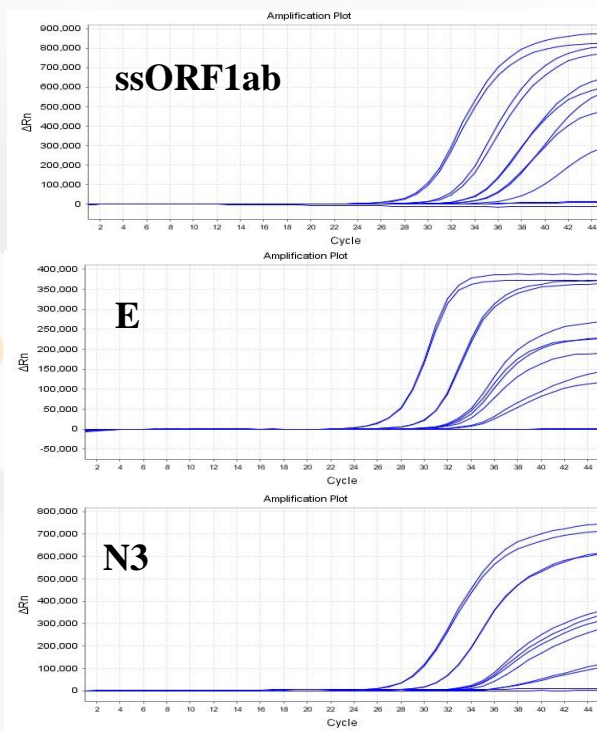
AQ322检测结果显示，2019-nCoV标准品的三重和四重均扩增成功。

AQ322 检测2019-nCoV标准品

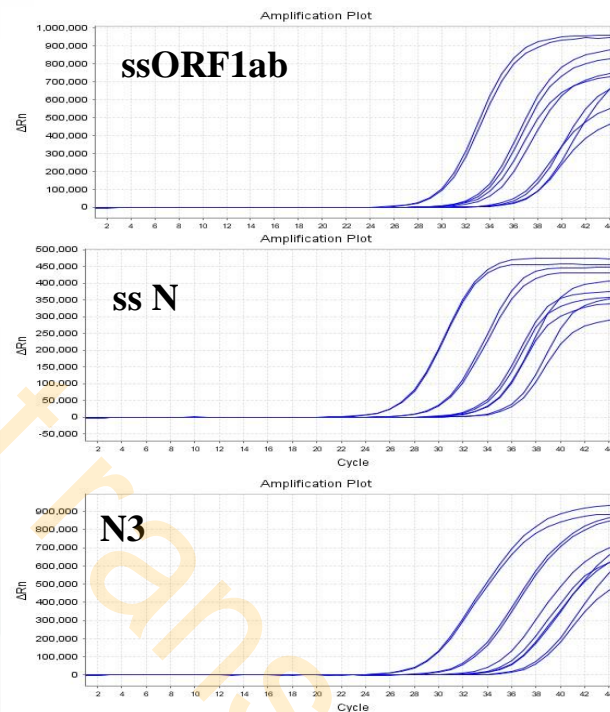
四重PPMix 4



四重PPMix 8



四重PPMix 11



上海计量院标品: 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 $10^{-6}/2$ 、 10^{-7} ;

AQ322可以成功检测4/8/11 三种引物组合的基因, 灵敏度 $10^{-6}/2$;

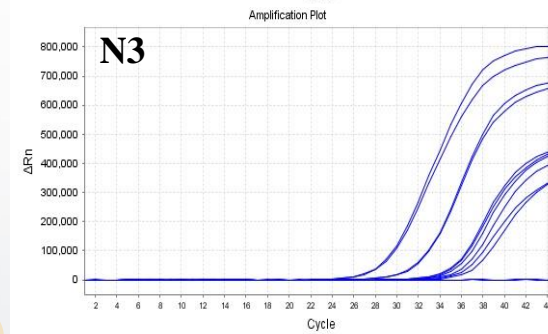
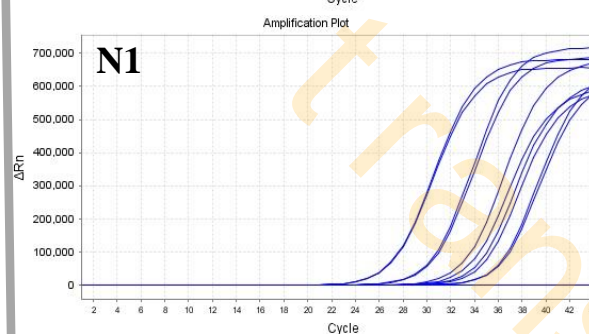
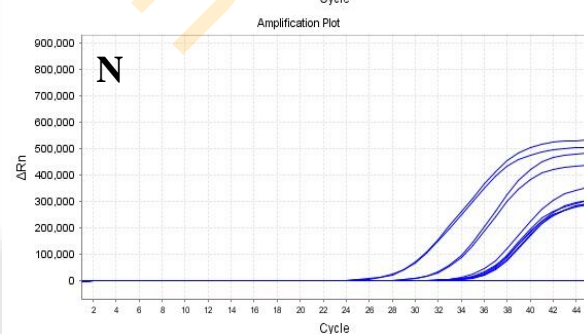
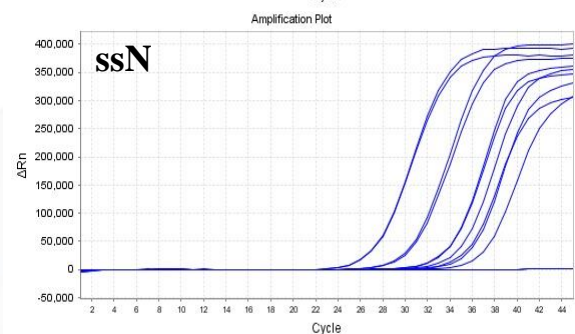
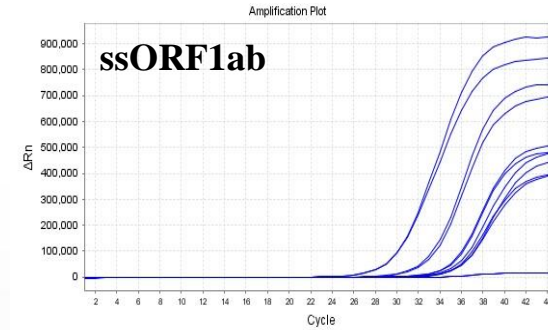
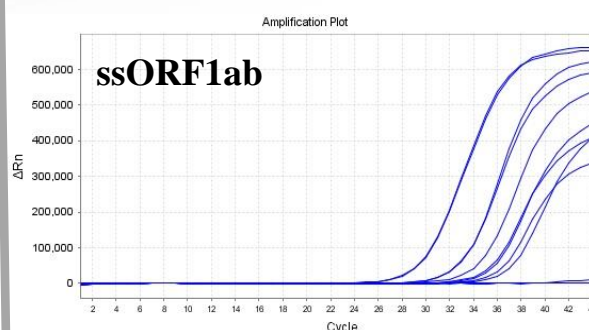
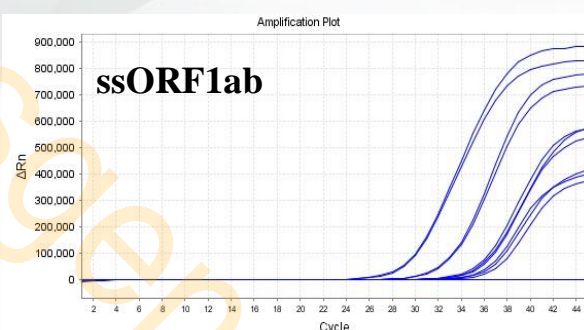
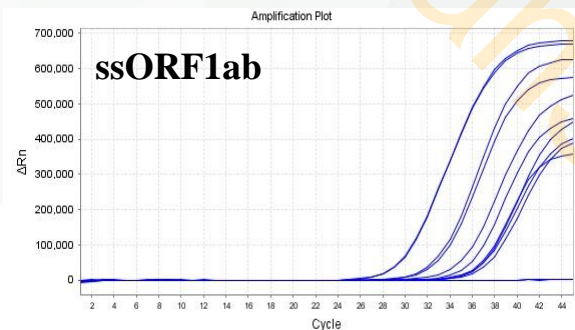
AQ322 检测2019-nCoV标准品

三重PPMix 13

三重PPMix 14

三重PPMix 15

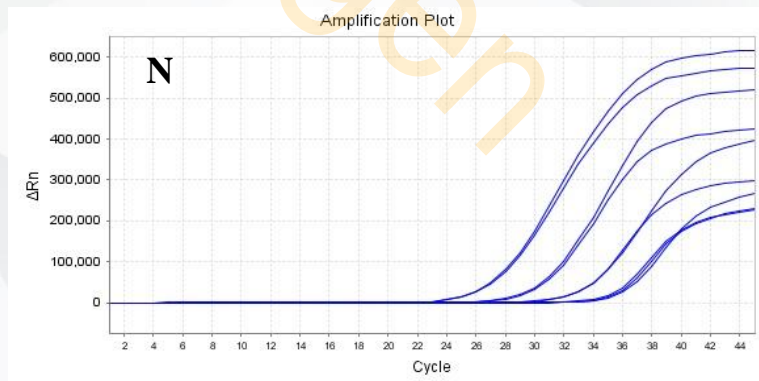
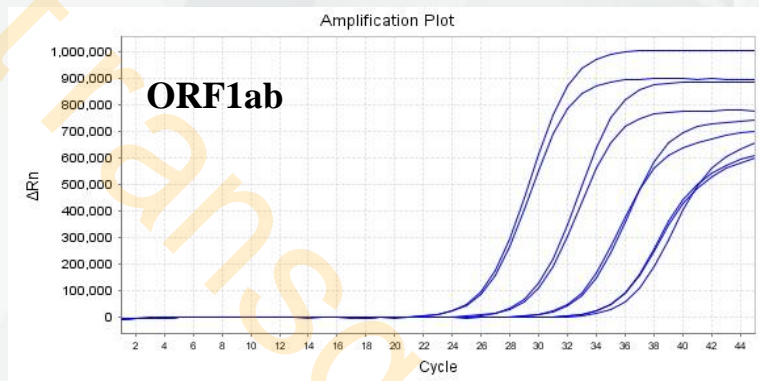
三重PPMix 16



上海计量院标品倍比稀释: 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 $10^{-6}/2$ 、 10^{-7} ;

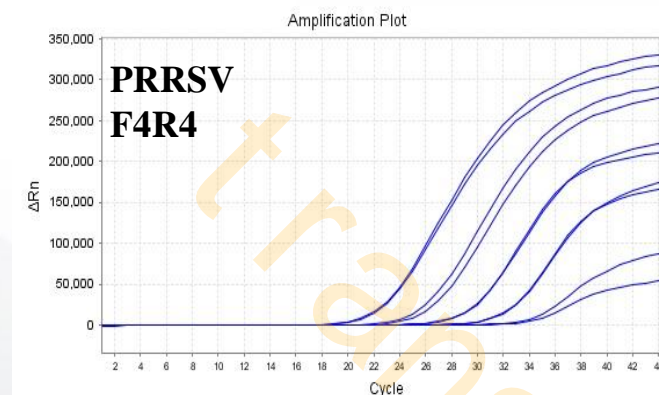
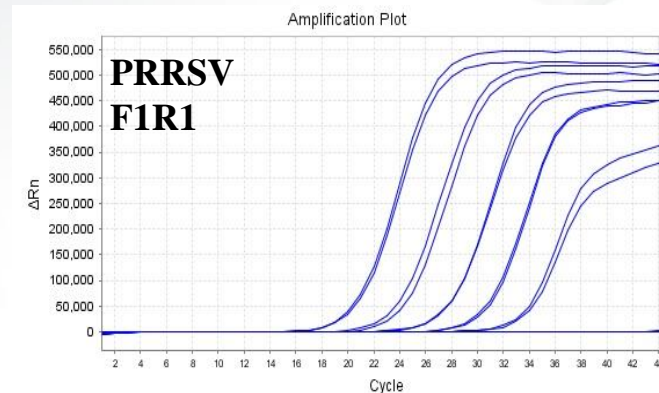
AQ322可以成功检测13/14/15/16 四种引物组合基因, 13号和14号基因检测灵敏度 10^{-7} ;

转录RNA检测结果



转录RNA: 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、500 copy/ml;

PRRSV 两重检测结果



PRRSV上样量: 1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、0.1 pg;

AQ322可以成功检测转绿RNA模板中的ORF1ab和N基因，灵敏度可达到1000 copy/ml；而检测PRRSV灵敏度达到0.1 pg。

背景介绍

新冠病毒检测方法

核酸提取+RT实验

qPCR实验概述

qPCR实验设计

qPCR数据分析

新冠病毒检测数据



谢谢!

www.transgen.com.cn

北京全式金生物技术有限公司

