

新型冠状病毒 SARS-CoV-2 核酸检测

(增强荧光实时反转录 PCR)

操作手册



2020 年 2 月

海康生命科技有限公司

请在进行 ERT-PCR 方法检测新型冠状病毒前通读操作手册

1. 前言:

针对新型冠状病毒肺炎 (Corona Virus Disease 2019, COVID-19) 疫情, 目前公布的对 2019 新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 的核酸检测试剂和方法众多, 多达上百种。经过一线临床一个半月以来的应用, 在核酸检测方面暴露出不少问题, 主要体现在出现显著的假阴性, 甚至引起公众对核酸检测方法应用于筛查和诊断的质疑。此外, 试剂开发中所用标准不一致, 不同试剂供应商所提供的性能指标无法对比, 有研究报道也发现不同机构提供的试剂检测性能存在较大差异。因此, 针对 2019 新型冠状病毒的核酸检测方法, 亟需优化, 以应对持续发展的疫情。

本文描述的是一种可以应用于 2019 新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 检测的核酸检测方法, ——增强荧光实时反转录 PCR (ERT-PCR)。该法相较于一般 RT-qPCR 方法, 灵敏度有较大的优势 (~10 倍的灵敏度), 可以缓解目前临床核酸检测中存在的假阴性问题, 提高检测准确率。

我们认为, 可以针对不同人群选择合适的检测方法, 达到筛查、诊断、核实等目的。本文所描述的 ERT-PCR 核酸检测方法由于其较高灵敏度, 可以应用于诸如社区或隔离人员筛查 (保证筛查的可靠性) 和治愈病人出院前的核查 (避免假阴性)。如有需求, 我们也可向具有相关操作经验的技术人员提供培训, 例如针大学或科研机构的生命科学专业人员, 实现在紧急情况下全民皆兵的最大检测能力。

在检测模式上, 以社区或隔离人员筛查为例 (图 1), 我们也建议在充分了解流行病学信息的情况下, 可以将样本池化 (Pooling) 检测, 比如将 10 个样本池化到 1 个检测反应, 如有出现阳性结果, 则对 10 个样本逐一检测, 这样可以提高检测通量, 达到快速筛查的目的。



图 1 社区筛查流程示例

此外, 为最大限度确保检测人员安全和检测结果可靠性, 本文也强调了在检测过程中需要重点注意的事项, 可供参考。

需要提醒的是, 本方法未经过大样本临床验证, 且 ERT-PCR 流程相对较长 (~5-6 小时), 相关结果也仅限于所测试试剂和仪器, 如应用其它试剂或仪器, 可用阳性对照和阴性对照测试验证后使用。

2. 样本采集流程

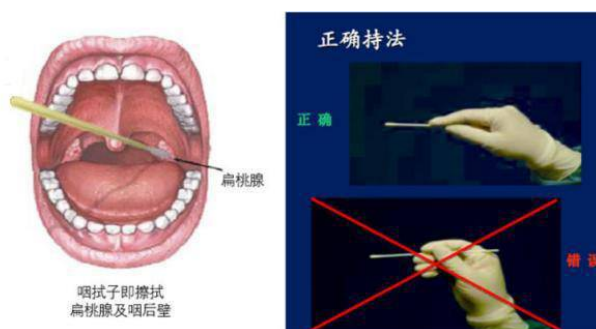
样本采集过程需要注意采集人员的安全防护, 并且在采集样本的第一时间对样本作灭活处理 (采集容器内预置病毒裂解液), 严格按照流程包装后转运至检测机构。

本核酸检测方法适用于口咽拭子、鼻咽拭子、痰液、肺泡灌洗液、尿液、粪便等样本所提取的核酸样本。用于病毒分离和核酸检测的样本应尽快进行检测, 能在 24 小时内检测的标本可置于 4℃ 保存; 24 小时内无法检测的标本则应置于 -70℃ 或以下保存 (如无 -70℃ 保存条件, 则于 -20℃ 冰箱暂存)。

注意: 正确收集样本对检测的准确程度极为重要。以下说明供参考 (本文仅以口咽拭子为例): 每个测试者将提供一个样本收集套装, 其中包括已消毒的样本收集棒, 载有 0.9ml 病毒裂解缓冲液的样本收集管, 一张填写测试者信息的登记

表、以及指定测试类型所要求的操作步骤说明书。如果需要收集痰液、粪便或尿液样本会另外多一个较大的且贴有对应标识的样本收集容器。用户需自备消毒溶液（75%酒精或 10%漂白水）、垃圾袋等。拭子样本必须采用合成材料拭子头（如聚丙烯纤维）的塑料杆拭子采集，以避免造成对核酸检测的抑制。

- 1) 打开样本收集套装中的塑料密封小袋，取出里面所有的物品；
- 2) 填写收集管上标签贴纸（已注明【口咽样本】的文字），然后仔细阅读以下操作说明书，按步骤开始操作；
- 3) 撕开样本收集棒外部的纸袋包装，取出收集棒，用其较细一端的无菌拭子收集口咽样品；
- 4) 把这拭子按照正确手势送进测试者口腔中，擦拭咽后壁和扁桃腺多次，其间避免碰到舌头，然后取出拭子；



- 5) 打开载有病毒裂解缓冲液的样本收集管；
- 6) 把已采集好样本的拭子头部均放入收集管，确保它们完全浸入缓冲液中；
- 7) 用消毒溶液抹拭过的剪刀在收集管管口下方处剪断收集棒；
- 8) 拧紧管盖，确保其处于密封状态；
- 9) 上下摇匀收集管 5 次以充分混合；
- 10) 把收集管放进原本小袋内，并封好袋口；
- 11) 用消毒溶液擦拭或喷洒小袋的两侧表面；
- 12) 将样品储存在室温下或 4℃待收集转运；
- 13) 将剪下的拭子手柄经消毒后丢弃。

3. 核酸提取

病毒 RNA 提取可以使用 Qiagen QIAmp Virus RNA Mini Kit (52906)、TransGen EasyPure Viral DNA/RNA kit (ER201)、Zymo Direct-zol™ RNA MicroPrep (R2060) 或其它 RNA 提取试剂盒，并按照试剂盒使用说明操作。剩余未用于核酸检测的提取样本尽快置于 -70℃ 或以下保存（如无 -70℃ 保存条件，则于 -20℃ 冰箱暂存）。

4. 核酸检测

(1) 核酸检测实验材料和试剂配方

• 引物序列

1) RT-PCR (Reverse Transcription PCR):

Target 1 (ORF1ab) :

正向引物 (ORF1ab/F1) : GTGGGGGACAACCAATCACT

反向引物 (ORF1ab/R1) : CTGCACTTACACCGCAAACC

Target 2 (N) :

正向引物 (N/F1) : TGGTGCTAACAAAGACGGCA

反向引物 (N/R1) : GGCAGTACGTTTTTGCCGAG

2) qPCR (使用中国疾控中心推荐的针对新型冠状病毒的 ORF1ab 和 N 基因区域的引物和探针) :

Target 1 (ORF1ab) :

正向引物 (ORF1ab/F2) : CCCTGTGGGTTTTACACTTAA

反向引物 (ORF1ab/R2) : ACGATTGTGCATCAGCTGA

荧光探针 (ORF1ab/Pr) : 5'-FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGTTATGG-BHQ1-3'

Target 2 (N) :

正向引物 (N/F2) : GGGGAAGTCTCCTGCTAGAAT

反向引物 (N/R2) : CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG

荧光探针 (N/Pr) : 5'-HEX-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-BHQ1-3'

3) 内参基因: 人类 RNase P (RP) 基因

正向引物 (RP/F) : AGATTTGGACCTGCGAGCG

反向引物 (RP/R) : GAGCGGCTGTCTCCACAAGT

荧光探针 (RP/Pr) : 5'-HEX-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ1-3'

注意: 可依据 qPCR 仪的滤镜及探针生产商提供的选择, 将 HEX 荧光改为 JOE、NED 或 Cy5。

• 使用试剂与耗材

RT-PCR 试剂盒: 一步法 RT-PCR 试剂盒(本方法使用全式金生物技术有限公司产品 *TransScript*[®] II One Step Enzyme Mix, AH411-02)

qPCR 试剂盒: 实时定量 PCR 试剂盒 (本方法使用赛默飞世尔科技有限公司产品 TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, 4304449)

其它耗材: 移液枪 (2.5 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L 量程)、配套移液枪量程的专用滤芯枪头、RNase-free water、阳性对照标品、0.2mL PCR 管、qPCR 管 (八联排管或 96 孔 PCR 板)、一次性乳胶手套、1.5mL 离心管、2mL 离心管、马克笔、10%漂白剂 (1: 9 Clorox)、离心管架、PCR 管架、冰盒等。

• 试剂配置与保存条件

试剂需保存在-20 $^{\circ}$ C。荧光探针对光敏感, 因此建议避光保存 (用铝箔纸包住试管), 配置反应液时应在暗房。配置反应液时应注意防止被阳性样本污染, 建议选取单独的房间或生物安全柜进行此项操作。

注意: 反复冻融试剂可能降低试剂反应灵敏度。阁下可根据检测频率将反应试剂以适当体积分管保存, 以避免反复冻融。

• 适用仪器设备

本方法已在 BIO-RAD CFX96[™] 荧光定量 PCR 仪、ABI StepOnePlus 荧光定量 PCR 仪、The Applied Biosystems Veriti[™] 96-Well Thermal Cycler 上经过验证, 其它定量 PCR 仪亦可经测试后使用。

(2) ERT-PCR 操作程序

A. 实验前期准备

- 1) 实验室整体紫外灭菌 30min;
- 2) 所需耗材放入二级生物安全柜, 并紫外灭菌 30min;
- 3) 紫外灭菌后, 所有相关设备都需用 10% 漂白水消毒;

B. 第一部分 (RT-PCR)

- 1) 在使用各组分前分别解冻、混匀、离心;
- 2) 将反应组分按照表 1 除模板外的双重反应体系 (ORF1ab 和 N 基因) 和表 2 的单重反应体系 (RP, 内参) 按体积由大到小分别加入反应体系, 最后充分混合形成反应液;
- 3) 分装 19 μ L 到 PCR 管;
- 4) 按先后顺序分别加入 1 μ L 的 RNase-free water (阴性对照)、RNA 样品和阳性对照, 每完成一个加样应迅速盖上管盖;
- 5) 轻弹管壁混和溶液, 然后瞬时离心。
- 6) 当所有 PCR 反应准备就绪, 将全部 PCR 管放入 PCR 仪, 并使用表 3 循环条件设定 PCR 仪进行扩增。

表 1. RT-PCR 双重反应体系

Component	Volume (μ L)
ORF1ab/F1 (10 μ M)	0.5
ORF1ab/R1 (10 μ M)	0.5
N/F1 (10 μ M)	0.5
N/R1 (10 μ M)	0.5
2 \times TS II One-Step Reaction Mix	10
RNase-free water	6.6
<i>Transcript</i> [®] II One Step Enzyme	0.4
RNA template	1
Total volume	20

表 2. RT-PCR 单重反应体系

Component	Volume (μ L)
RP/F (10 μ M)	0.5
RP/R (10 μ M)	0.5
2 \times TS II One-Step Reaction Mix	10
RNase-free water	7.6
<i>Transcript</i> [®] II One Step Enzyme	0.4
RNA template	1
Total volume	20

表 3. RT-PCR 程序

Temperature	Time	Cycle
50°C	30min	1 cycle
94°C	2min	
94°C	30sec	10 cycles
60°C (A decrease of 1 °C is applied after each cycle)	30sec	
72°C	30sec	
94°C	30sec	40 cycles
56°C	30sec	
72°C	30sec	
72°C	5min	
72°C	5min	1 cycle

注意:

- 在独立的安全柜中准备反应液，过程中安全柜不可有任何样本或阳性对照物；准备好溶液后，把反应缓冲液移到另一安全柜加样。
- 实验时 RNA 样本应放在冰上。
- 建议 PCR 过程中检测样本设置重复 (Duplicate)，以便得到可靠的实验结果。
- 为了验证阴性实验结果不是由于样本中存有 PCR 抑制物而导致 PCR 呈阴性反应，我们建议实验过程中设置 Spiking 对照* (Spiking control)：在测试样本中加 1 µl 的阳性对照作为 Spiking 对照，同时进行 PCR 反应。
- 所有实验必须在二级生物安全柜中进行。

C. 第二部分 (qPCR)

- 1) 在第一步 RT-PCR 程序运行过程中按照表 4 (ORF1ab 和 N 基因) 和表 5 (RP, 内参基因) 准备 qPCR 反应液；
- 2) 向 qPCR 八联排管中分装 18µL/管，放上 qPCR 管盖，无需盖紧，用塑封袋或者带盖盒子封装好运送至加样实验室；
- 3) 取第一步 RT-PCR 产物作为模板，加入 2µL 到反应液，每完成一个加样应迅速盖上管盖；
- 4) 准备就绪后，将全部 PCR 管放入实时 PCR 仪；
- 5) 选择 FAM 通道 (Reporter: FAM, Quencher: None) 和 HEX 通道 (Reporter: HEX, Quencher: None) 检测样本 ORF1ab 和 N 基因和 RP 内参基因；
- 6) 使用表 6 的 qPCR 循环条件运行程序。

表 4. qPCR 双重反应体系

Component	Volume (µL)
ORF1ab/F2 (10µM)	0.4
ORF1ab/R2 (10µM)	0.4
ORF1ab/Pr (10µM)	0.4
N/F2 (10µM)	0.4
N/R2 (10µM)	0.4
N/Pr	0.4
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X)	10

RNase-free water	5.6
PCR product	2
Total volume	20

表 5. qPCR 单重反应体系

Component	Volume (μL)
RP/F (10μM)	0.4
RP/R (10μM)	0.4
RP/Pr (10μM)	0.4
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X)	10
RNase-free water	6.8
PCR product	2
Total volume	20

表 6. qPCR 程序

Temperature	Time	Signal	Cycle
50°C	2min	-	1 cycle
95°C	10min	-	
95°C	15sec	-	40 cycles
60°C	45sec	Collect the signals of FAM and HEX	

注意:

- 可依据选择的探针荧光，将 HEX 通道改为 JOE、NED 或 Cy5。
- 请使用与实时 PCR 仪配套或推荐的 PCR 管及耗材。
- 在独立的安全柜中准备反应缓冲液，过程中安全柜不可有任何样本或阳性对照物；准备好溶液后，把反应液移到另一房间的安全柜加样。

(3) 实验对照选取

阳性对照

采用混合 ORF1ab (12800 bp-14000 bp) 和 N 基因 (28274 bp-29533 bp) 片段体外转录 (IVT) 产物 RNA 作为阳性对照加入反应体系，建议拷贝数为 1000 copies/μL。

阴性对照

使用稀释引物探针和准备反应液时所用的 RNase-free water 充当阴性对照。

内参基因对照

为了保证样本的阴性结果不是来源于取样失败，所有的临床样本均需进行 RP 基因检测确保样本质量。

*Spiking 阳性对照

阴性的实验结果有几个可能性：1. 样本中不存在目的片段；2. 样本中目的片段的量低于检测值；3. 样本中存在 PCR 抑制物。实验过程中设计 Spiking 对照 (Spiking control) 目的为检验是否发生 PCR 抑制。如果样本中加入阳性对照后的扩增结果 Ct 值接近 40 (或者接近阴性对照的 Ct 值)，说明样本中存在 PCR 抑制物，则此次阴性的实验结果不能作为正确的结果，需重新进行样本 RNA 提取和 PCR 扩增。

(4) 检测结果的解释

对各通道阈值分别设定为自动阈值线，一般来说：

- 1) 阳性对照的 FAM 通道 (ORF1ab) 和 HEX 通道 (N) Ct 值均为 ≤ 32.0 ，并出现典型的扩增曲线；并且阴性对照无 Ct 值或 Ct 值为 0；否则视为检测结果无效，需重做。
- 2) 样品在 FAM 通道 (ORF1ab) 和 HEX 通道 (N) 检测出的 Ct 值 ≤ 32.0 ，且出现典型的扩增曲线，结果有效，可直接报告样品为阳性。
- 3) 样品在内参基因 RP 的 HEX 通道检测的 Ct 值 ≤ 35.0 ，在 FAM 通道 (ORF1ab) 和 HEX 通道 (N) 无 Ct 值或 Ct 值为 0，结果有效，可直接报告样品未阴性。
- 4) 检测样品在 FAM 通道 (ORF1ab) 和 HEX 通道 (N) 的 Ct 值为 $35.0 < Ct < 40.0$ 时，建议重做。重做结果扩增曲线完全不起峰者为阴性；若 Ct 值仍介于 35.0 和 40.0 之间，且扩增曲线有明显的指数增长特性者，可报告样品为阳性。
- 5) 检测结果按照表 7 进行解释。

表 7. 检测结果的解释

ORF1ab基因	N基因	RP基因	结果解释	建议
+	+	±	确诊	/
其中一个为阳性		±	无结论	重新采样检测
-	-	+	无感染	/
-	-	-	结果无效	重新采样检测

注意：

- 对于核酸检测结果的解读，需要做综合全面的分析，对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
- 不合理的采样、处理和转运，以及样本类型和核酸提取方法对结果的准确性都会产生影响，特别容易导致出现假阴性结果，可能的情况下，需要用不同的试剂或检测方法进行确认。
- 对 ERT-PCR 方法，在应用于样本检测前，需要首先对方法验证，以阳性样本（梯度稀释模板）信号 N 基因 ≤ 20.0 和 ORF1ab 基因 ≤ 32.0 和阴性样本无 Ct 值为标准，说明试剂、操作无问题以及仪器适用。

(5) ERT-PCR 核酸检测实验特别注意事项

实验前：

1、在实验之前操作者首先应按照生物安全二级实验室的个人防护要求做好个人防护（生物安全二级实验室的个人防护包括：医用防护口罩或 N95 口罩、乳胶手套、工作服外隔离衣、医用防护帽、加手卫生，酌情可戴防护镜），实验应在生物安全二级实验室进行；

2、基因扩增区存在污染的风险，应设专门的扩增区域或在单独的专用实验室进行扩增，必须和核酸提取、试剂配制区域有严格的物理分割；

3、不同操作区域的工作服不得混穿，特别是基因扩增区的工作服，建议仅在扩增区域或扩增实验室内使用；

4、实验前应将生物安全柜使用 10%漂白剂清洁，然后打开紫外灯照射 30 分钟后方可进行实验，实验所需枪头盒、离心管和 PCR 反应管等物料均用 10%漂白剂喷洒表面后方可放入实验工作台。

实验中：

5、在试剂配置区配置反应体系，充分混匀后分装、离心，由专人或通过传递窗将配置好的反应液传递到加样专用实验室，在加样生物安全柜内，逐一将样本核酸加入到对应的反应管中，并加盖密闭好 PCR 反应管；每批次检测需要同时检测 1 个阳性对照和 3 个阴性对照；

6、配置反应液或稀释样本均用移液枪吸打混匀，避免震荡，而产生气溶胶污染；

7、移液时，避免经过未盖好的孔的上方；

8、分装试剂建议每次更换新吸头，并使用带滤芯枪头，避免反复使用带来体积误差和交叉污染；应准备《体系加样登记表》，确保加样过程准确无误；

9、打开 PCR 密闭管盖时应特别谨慎，建议更换新手套，防止手套等接触管盖内部带入污染风险；

10、ERT-PCR 流程中第一步 RT-PCR 结束后将扩增产物取出后需进行离心，确保管壁上残留产物也被收集到；

11、在所有空置的孔中加入 20 μ L RNase-free water 并盖好，以避免反应过程中加热变形而影响检测。

实验后：

12、实验操作完成后，需用 10%漂白剂清洁消毒实验室台面和地面；产生的废弃耗材当场清理出实验区域；打开紫外灯对实验空间进行不少于 30 分钟的消毒处理；

13、所有新型冠状病毒相关医疗垃圾均需经湿热高压灭菌后再作为普通医疗垃圾由专业机构回收处理，且垃圾袋上应标注“新型冠状病毒医疗垃圾”的相关信息。

如阁下需要更加详细的资料，请与海康生命科技有限公司技术支持人员联系。

5. 技术支持

在使用过程中，如阁下需任何技术咨询，可在办公时间内致电：

	中国大陆地区	其它国家/地区
电话：	+ (8610) 8712-8966	+ (852) 3902-2951
办公时间	周一至周五：09:00-17:45	09:00-17:30

办公时间以外，请致电+ (86) 17191084100 (中国大陆地区) 或+ (852) 9886 9647 (其它国家/地区)，阁下也可通过电话留言、传真或电邮与我们的技术人员联系，我们会在第一时间及时反馈。

搜索微信号（与技术支持手机电话同号）或扫描右侧二维码添加联系人

传真号码： + (852) 2111 9762 (其它国家/地区)

电邮地址： technical@haikanglife.com

公司网址： <http://www.haikanglife.com>



备注：*标注为可选项

中国大陆地区

其他国家/地区