

# 新型冠状病毒双重荧光 RT-PCR 检测方法

杨宇<sup>1</sup>, 刘丽娟<sup>1</sup>, 赵婷婷<sup>1</sup>, 李辉<sup>2</sup>, 王莎莎<sup>1</sup>, 徐焕州<sup>1</sup>, 杨鹏飞<sup>1</sup>, 王旺<sup>1</sup>, 孙肖红<sup>1</sup>, 王静<sup>1</sup>

1 中国检验检疫科学研究院卫生检疫研究所, 北京 100123; 2. 上海辉睿生物科技有限公司

**摘要:** **目的** 为快速检测新型冠状病毒, 防控疫情的输入, 建立一种快速的双重实时荧光 RT-PCR 检测方法。 **方法** 对 WHO 公布的单重实时荧光 RT-PCR 检测引物和探针进行重新设计和优化, 建立双重荧光 RT-PCR 反应体系, 分别采用羧基荧光素 (FAM) 和绿色荧光蛋白 (VIC) 荧光基团标记探针, 实现双基因的同时检测。 **结果** 经优化的双重实时荧光 RT-PCR 方法有较好的灵敏度和特异性, 对阳性对照质粒检测灵敏度为 31 拷贝/ $\mu\text{l}$ , 检测健康和普通发热人员咽拭子以及流感病毒无交叉反应。 **结论** 建立了双重实时荧光 RT-PCR 快速检测方法, 提高检测效率和准确度的同时降低了成本, 可用于新型冠状病毒的快速应急检测。

**关键词:** 实时荧光 PCR; 新型冠状病毒; 检测; 交叉反应

**中图分类号:** R183.4 **文献标识码:** B

## Multiplex Real-time PCR method for rapid detection of Novel Coronavirus

YANG Yu<sup>\*</sup>, LIU Li-juan, ZHAO Ting-ting, LI Hui, WANG Sha-sha, XU Huan-zhou,

YANG Peng-fei, WANG wang, SUN Xiao-hong, WANG Jing

*Institute of Health Quarantine, Chinese Academy Of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China*

**Abstract:** **Objective** To establish a rapid, sensitive method to detect Novel Coronavirus which are acute infections with high case fatality rates by multiplex real-time fluorescence quantitative RT-PCR. **Methods** Taqman probes labeled by FAM and VIC. The multiplex real-time quantitative RT-PCR assay was optimized based on the reported mono assay. The sensitivity was evaluated and influenza virus and human swab were using to examine the specificity. **Results** A specic real-time RT-PCR method was developed with the sensitivity of 31copies/ $\mu\text{l}$  for Novel Coronavirus, a synthetic plasmid DNA as a positive control, and no cross reaction was found with Influenza virus and human swab samples. **Conclusion** This multiple assay has good prospects of application for rapid test.

**Key words:** Multiplex Real-time PCR; Novel Coronavirus; Detection; Cross reaction

2012年6月,一名沙特男子因感染新型冠状病毒死亡,受到国际社会的广泛关注。2012年9月23日,世界卫生组织(WHO)公布,一名发病前曾去过沙特麦加的卡塔尔男子被证实感染这种病毒,两例病例分别经荷兰的伊拉兹马斯大学医学中心以及英国卫生保护署的实验室确认为同种新型冠状病毒感染,两者的PCR扩增产物序列同源性达到99.5%<sup>[1-3]</sup>。随后,WHO公布了两个实验室共同建立的荧光定量PCR检测方法,可分别检测新型冠状病毒的编码外膜蛋白的E基因和开放性读码框(ORF)1b基因<sup>[4-5]</sup>。2012年9月27日, Van Boheemen 等利用454高通量测序技术完成新型冠状病毒 HCoV-2012 的全基因组序列,并公布在 Genbank 上,序列号为 JX869059<sup>[6-7]</sup>。本研究对公布的检测方法进行了改进,分别采用 FAM

和 VIC 两种荧光标记探针,并重新设计了 ORF 1b 基因的扩增引物,从而建立了可同时检测两种基因的双重荧光定量 PCR 检测方法。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 试剂 阳性质粒模板、TaqMan 探针、引物由上海辉睿生物科技有限公司合成; AgPath-ID 一步法荧光定量 RT-PCR 试剂盒购自 Ambion 公司; QIAamp 病毒 RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司; 甲型 H1N1 流感病毒疫苗株以及 50 份健康人群及普通发热人群咽拭子样品。

1.1.2 仪器 荧光定量 PCR 仪(型号 Roche480, SmartCyclerII, ABI7500)

通讯作者:王静, E-mail: wangjing0115@126.com

## 1.2 方法

1.2.1 引物和探针的设计与合成 本研究采用的引物和探针由上海辉睿生物科技有限公司合成,如表 1 所示,首先采用 WHO 公布的引物和探针<sup>[4-5]</sup>,分别实现新型冠状病毒的编码外膜蛋白的 E 基因和开放性读码框(ORF)1b 基因的单基因检测,两条探针均为 FAM 标记。根据试验结果,对 WHO 公布的检测方法进行

优化,根据 Genbank 上公布的新新型冠状病毒全基因组序列<sup>[6]</sup>重新设计(ORF)1b 基因的扩增引物 ORF1b-FP2 和 ORF1b-RP2,将 ORF 1b 基因特异性探针 ORF1b-P 的 5' 端标记 FAM 荧光基团, E 基因特异性探针 upE-P2 的 5' 端标记 VIC 荧光基团,用于建立双重荧光定量 PCR 检测方法。

1.2.2 阳性对照质粒标准品的制备 人工合成外膜

表 1 实时荧光定量 PCR 检测的引物和探针

引物探针名称	WHO 公布的引物和探针序列	本实验优化的双重检测引物和探针序列
ORF1b-FP	TTCGATGTTGAGGGTGCTCAT	GATGTTGAGGGTGCTCATGCT
ORF1b-RP	TCACACCAGTTGAAAATCCTAATTG	GTTGAAAATCCTAATTGTAGAGGC
ORF1b-P	FAM-CCCGTAATGCATGTGGCACCAATGT-BHQ1	FAM-CCCGTAATGCATGTGGCACCAATGT-BHQ1
upE-FP	GCAACGCGCGATTCAAGTT	GCAACGCGCGATTCAAGTT
upE-RP	GCCTCTACACGGGACCCATA	GCCTCTACACGGGACCCATA
upE-P	FAM-CTCTTACATAATCGCCCCGAGCTCG-BHQ1	VIC-CTCTTACATAATCGCCCCGAGCTCG-BHQ1

蛋白的 E 基因和开放性读码框 ORF 1b 基因,并克隆至 pMD19-T 载体中,基因由上海辉睿生物科技有限公司合成,经计算质粒原液的 DNA 拷贝数浓度约为  $3.1 \times 10^{10}$  拷贝/ $\mu\text{l}$ 。

1.2.3 荧光定量 PCR 反应体系与反应条件的优化 按照 AgPath-ID 荧光定量 RT-PCR 试剂盒使用说明采用 SmartCyclerII 荧光检测系统进行最佳反应体系的优化。优化后的反应体系为在 25  $\mu\text{l}$  反应体系中上游引物和下游引物各加入 1  $\mu\text{l}$ , 探针各加入 0.5  $\mu\text{l}$ , 引物和探针的工作浓度均为 10  $\mu\text{mol/L}$ 。RT-PCR 条件为 45 $^{\circ}\text{C}$  30 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$  45 s; 45 个循环。

1.2.4 灵敏性检测 阳性质粒样品分别稀释制成 10 倍差的梯度浓度( $3.1 \sim 3.1 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{l}$ ), 经优化好的反应体系检测该方法的灵敏度, 对每一个浓度的样本, 都做 3 个重复试验, 通过计算 Ct 值的差异来验证方法的重现性。

1.2.5 特异性测试 参照试剂盒说明书, 采用 QIAamp 病毒 RNA 提取试剂盒提取甲型 H1N1 流感病毒疫苗株以及人咽拭子 RNA, 在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上采用优化的条件进行检测。

1.2.6 重复性检测 对每一个浓度的样本, 都做 3 个重复试验, 通过计算 Ct 值的差异来验证方法的重现性。

## 2 结果

2.1 反应条件的建立 采用 SmartCyclerII 定量 PCR 仪优化 E 基因和 ORF 1b 基因的反应条件, 最终确定

最佳退火温度为 45 $^{\circ}\text{C}$  30 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$  45 s; 45 个循环。

2.2 单重荧光定量 PCR 反应 采用 10 倍差的梯度浓度( $3.1 \sim 3.1 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{l}$ )的质粒模板对 2 个基因分别扩增, 3.1 拷贝/ $\mu\text{l}$  的质粒模板扩增 ORF 1b 基因的 Ct 值为 36.5, 在检测的灰度范围区间, 因此采用  $3.1 \times 10^4$ 、 $3.1 \times 10^3$ 、 $3.1 \times 10^2$ 、 $3.1 \times 10^1$  拷贝/ $\mu\text{l}$  的质粒模板进行双重 PCR 扩增反应测试, 确定检测阳性标准品的灵敏度为 31 拷贝/ $\mu\text{l}$ 。

2.3 双重荧光定量 PCR 反应 由图 1 可见, 2 个基因扩增的 Ct 值存在 2.7~3.2 的差异, 为了实现双重荧光定量 PCR 中两种基因扩增效率的一致性, 重新设计 ORF 1b 基因的 PCR 引物 ORF 1b-FP2 和 ORF 1b-RP2(表 1), 重新优化双重 PCR 反应条件, 由图 2 所示, 该方法在 ABI7500 及 Roche480 荧光定量 PCR 仪上均获得较好的双重扩增曲线。图 3 为 Roche480 荧光定量 PCR 仪上同一基因单重和双重扩增曲线的比较, 两者的 Ct 值基本一致, 说明双重扩增反应可获得与单重测试相似的灵敏度。图中双重扩增反应的荧光信号更高可能原因为两次探针标记效率不同。由图 4 的标准曲线可见双重扩增两个基因的标准曲线相关值( $r^2$ )分别为 0.993 和 0.991, 呈明显的线相关性, 说明该方法可用于新型冠状病毒两个基因的双重检测。

2.4 特异性检验 经 blast 序列同源性比对, 所选用的引物和探针与其他的人冠状病毒、流感病毒等呼吸道病毒无同源性。用所建立的双重荧光定量 RT-PCR 方法检测甲型 H1N1 流感病毒疫苗株样品

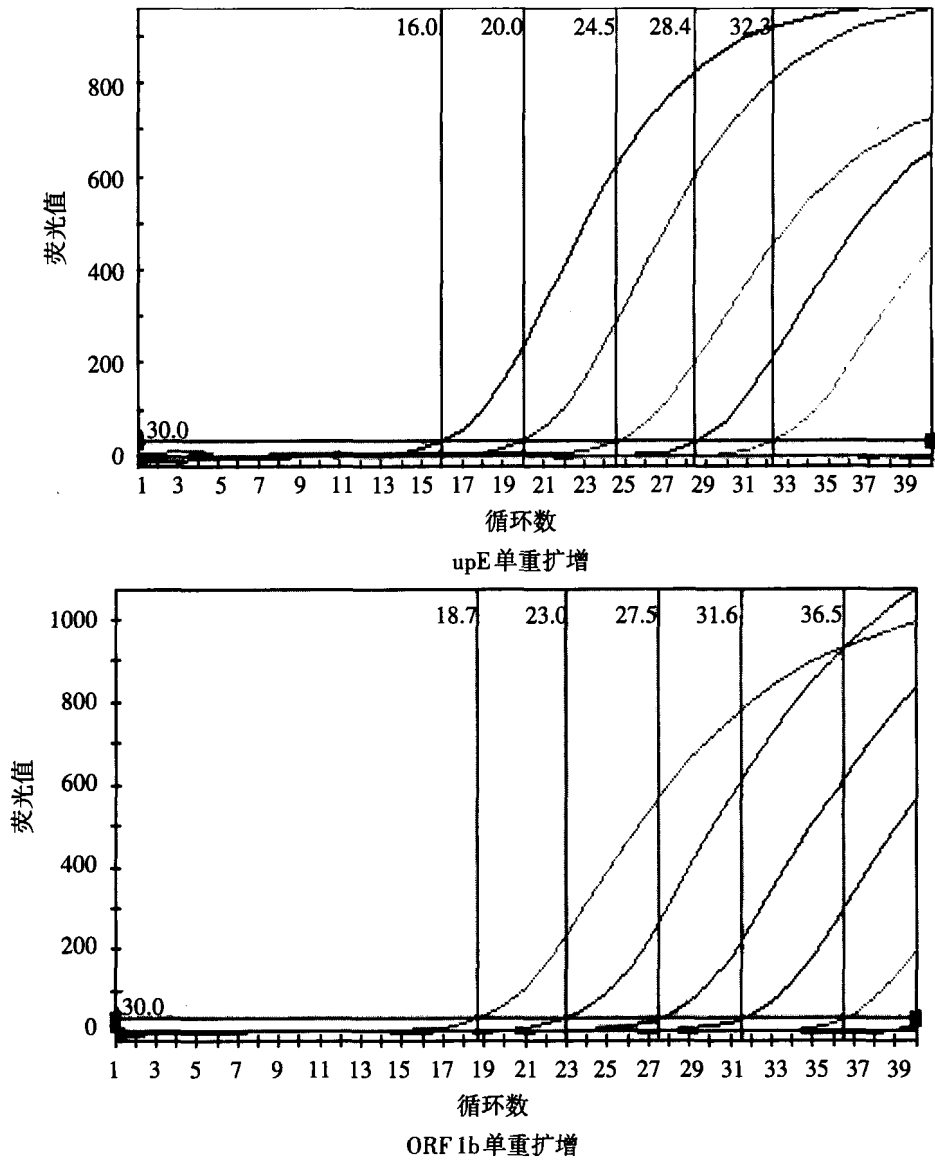
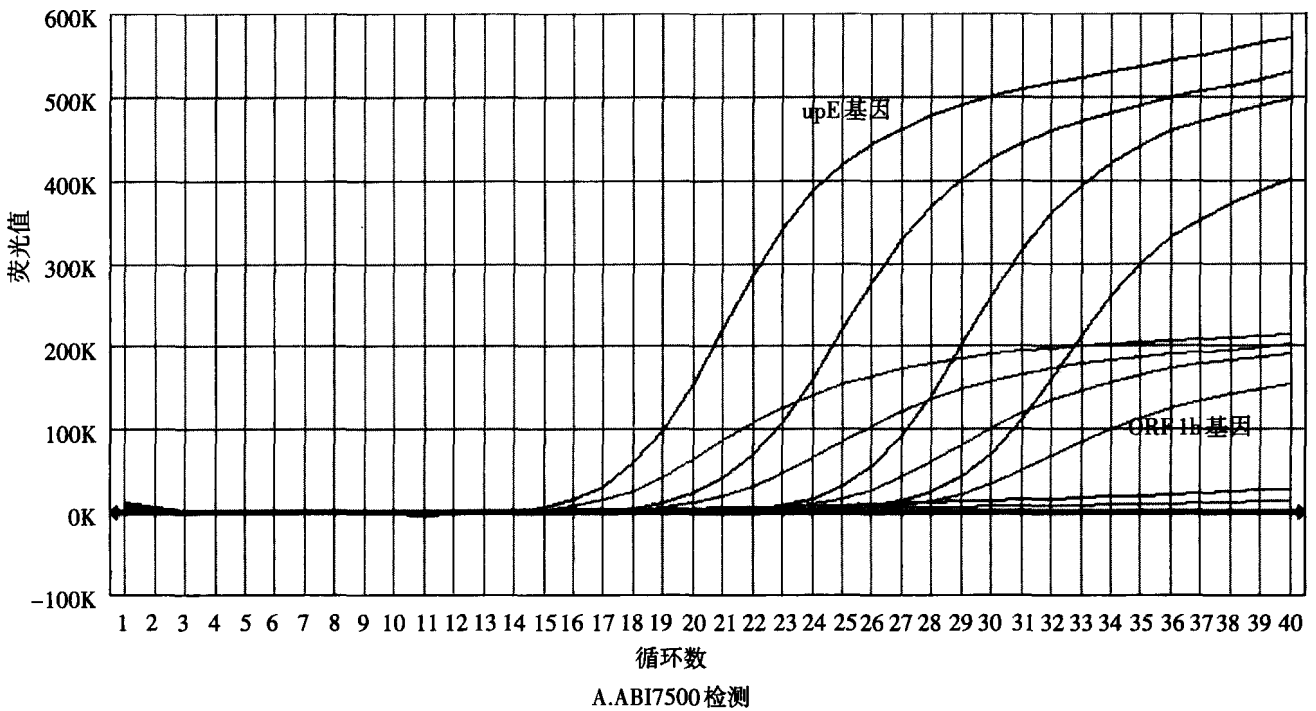


图1 单基因实时荧光 RT-PCR 扩增曲线



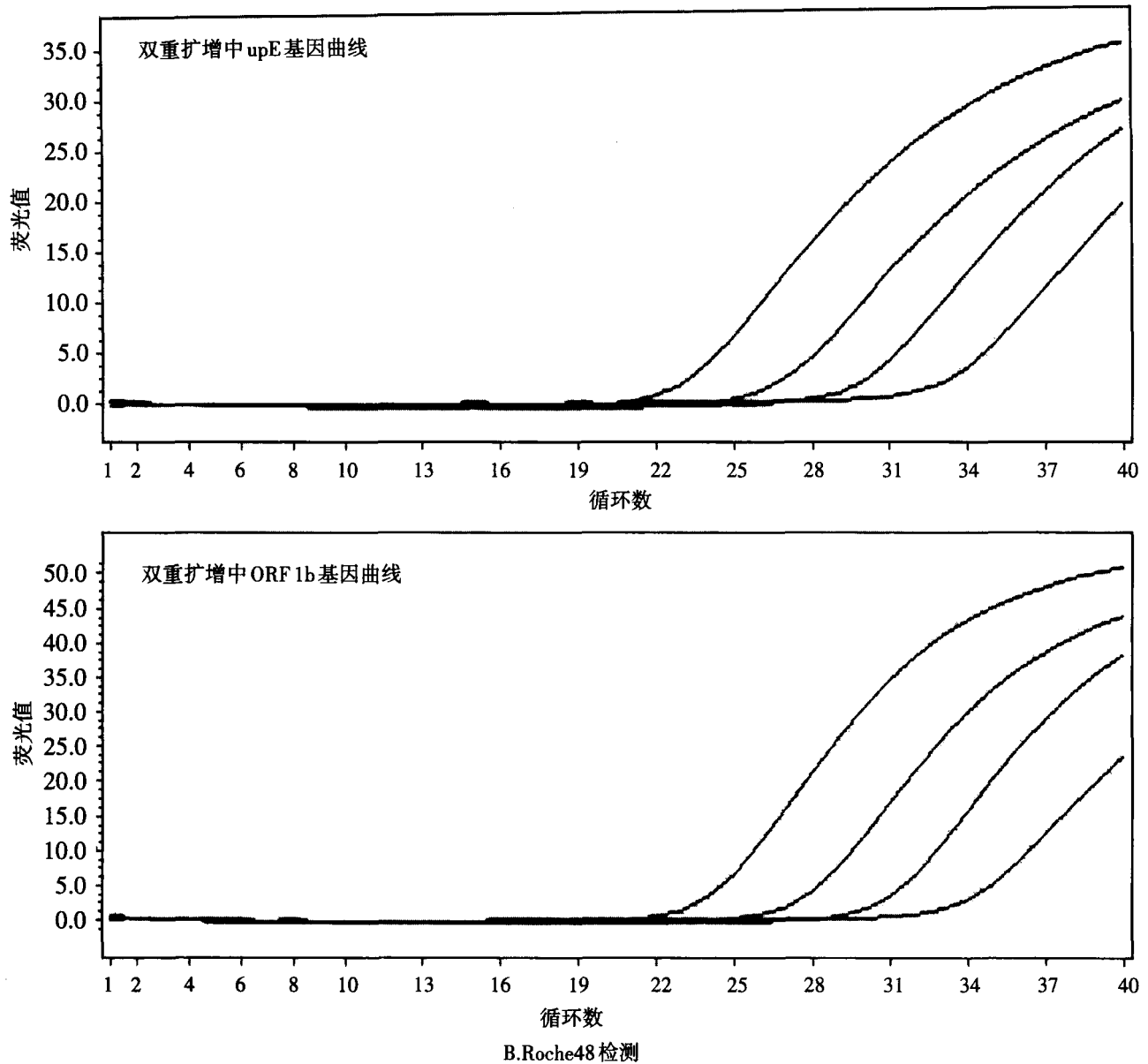


图2 双重实时荧光 RT-PCR 反应扩增曲线

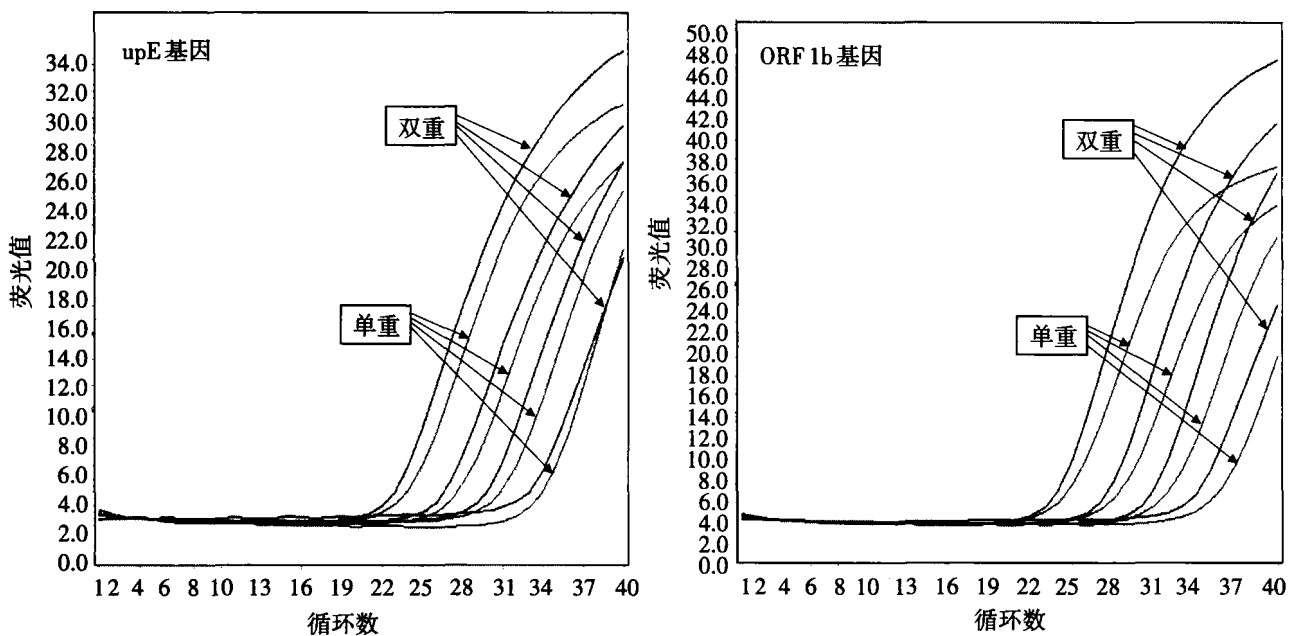


图3 同一基因单重扩增曲线和双重扩增曲线比较

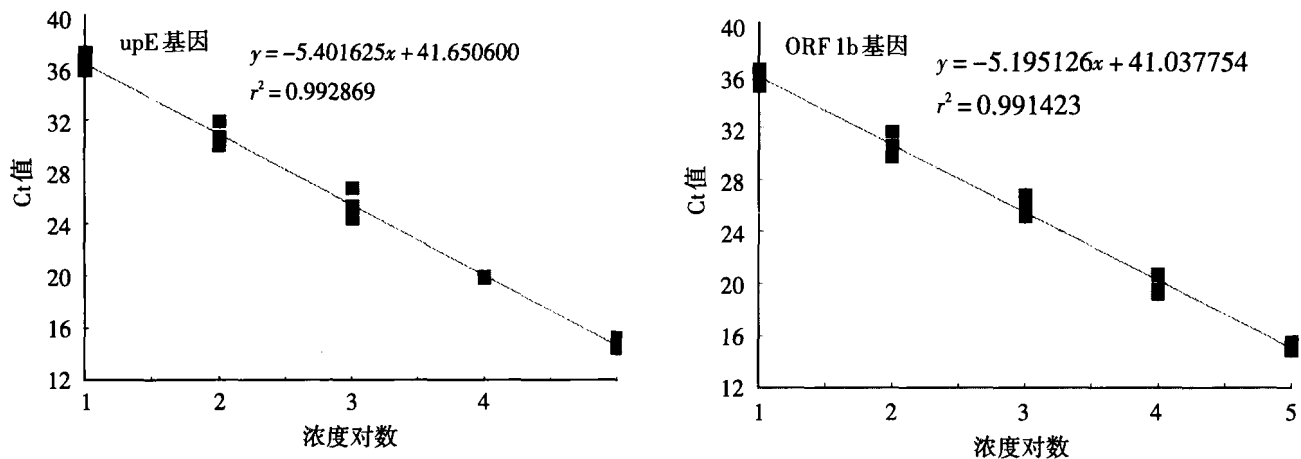


图4 双重实时荧光 RT-PCR 反应标准曲线

和健康人群、发热人群咽拭子,结果均为阴性,说明该方法有较好的特异性。

**2.5 重复性检测** 分别在质粒模板  $3.1 \sim 3.1 \times 10^4$  个拷贝范围内,每个浓度 3 次重复扩增,5 个浓度下 ORF 1b 基因 3 次检测对应 Ct 值的平均值分别为 15.22、19.86、24.99、30.37 和 36.07,其变异系数(CV 值)分别为 0.33%、2.07%、1.18%、0.76% 及 4.29%,试验间数据平均变异系数为 1.08%。upE 基因对应 Ct 值的平均值分别为 14.56、19.82、24.92、30.18 和 35.61, CV 值分别为 7.99%、3.79%、4.75、1.37% 及 1.10%,试验间数据平均变异系数为 3.80%。说明方法具有很好的重现性。

### 3 讨论

1937 年首次从小鸡体内分离出冠状病毒(coronaviride, CoV)。病毒颗粒的直径 60~200 nm,呈球形或椭圆形,包膜上有形状类似日冕的棘突,不同的冠状病毒的棘突有明显的差异。冠状病毒为最大单股正链 RNA 病毒,独特的胞浆内非连续性转录模式,易于发生基因组的变异与重组。冠状病毒分为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  3 个属,其中,  $\alpha$ 、 $\beta$  属仅对哺乳动物致病,  $\gamma$  属主要引起鸟类感染<sup>[8-10]</sup>。

人冠状病毒(HCoV)常引起普通感冒、腹泻或胃肠炎、下呼吸道感染或肺炎,主要通过直接接触分泌物或经气溶胶、飞沫传播,也可经粪口途径传播,潜伏期一般为 3~10 d。冠状病毒引起的严重病例报道多见于婴幼儿、老人和免疫功能低下的人群,包括流感样疾病、慢性支气管炎急性发作等。冠状病毒全球分布,春、秋季节会略有升高<sup>[8-10]</sup>。冠状病毒引起全球普遍关注缘自 2003 年一种从未引起人类疾病的新型冠状病毒所致的严重急性呼吸综合症,这种新的病毒被命名为 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)<sup>[11-13]</sup>。研究表明, SARS-CoV 是动物中 SARS 样冠状病毒在

反复与人接触中跨种属突变后产生的,但对其原始宿主、中间宿主,以及如何跨种属突变造成人间流行尚不清楚<sup>[12-13]</sup>。在 SARS-CoV 发现后,又有 3 种新的引起呼吸系统疾病的 HCoV (HCoV-NL63, HCoV-HKU1 与 HCoV-2012)被相继发现<sup>[14-16]</sup>。针对本次新发的 HCoV-2012,由于其流行病学特征尚不清楚,建立针对该型冠状病毒检测方法用于疾病诊断和后期防控具有重要意义。

此次新型冠状病毒 HCoV-2012 感染疫情引起全球普遍关注<sup>[1-7]</sup>。WHO 发布警告、制定病例定义、通报病例情况;欧美等国家已采取了加强口岸监测和实验室检测、发布赴中东地区的旅游健康提示等应对措施;欧盟进行风险评估、制定病例定义、开展监测<sup>[18]</sup>;英国制定病例定义、开展监测;我国香港特区将新型冠状病毒感染病例列入法定报告传染病;香港卫生防护中心已加强了在机场、港口等口岸和公立医疗机构的监测力度。目前新型冠状病毒 HCoV-2012 感染仅确认 2 例,临床表现都是急性重症呼吸道感染合并急性肾衰竭,还没有证据表明该病毒能够在人与人之间进行传播,其感染及出现的疾病之间的病因学关联尚未得到证明。病毒的传染源、储存宿主、传播途径、潜伏期、隐性感染尚不清楚,尚不能排除通过动物感染人类的可能性。WHO 发布了临时病例定义来帮助各国加强针对这种新病毒的健康保护措施。近期曾往沙特、卡塔尔等中东地区,出现上呼吸道感染后,如果症状加重或呼吸困难,建议立刻就诊并进行实验室检测。虽然病毒的传播能力尚不清楚,但由于为新病毒,建议遵循高传染性严重呼吸道感染疾病的指南进行病例管理。基于临床、流行病学和实验室检测指标将病例分为“调查病例”、“疑似病例”和“确诊病例”,对于“调查病例”和“疑似病例”也建议严格按呼吸道疾病隔离,参与病例检查救护的检疫人员和医务人员穿戴全套个人防护装备。

目前新型冠状病毒感染的诊断包括临床症状结合旅行史、X 射线检测和病原体检测。对于病原体检测,常用的方法中病毒分离仍是金标准,但由于需要时间长以及生物安全要求三级实验室标准,血清学检测中诊断抗原抗体等研制时间不足,目前可行的是进行核酸的分子检测(PCR 技术与荧光定量 PCR 技术),其特点是快速敏感,可用于快速筛查,后续可通过 PCR 扩增产物测序确证结果的特异性和准确性。本实验建立的新型冠状病毒双重荧光定量 RT-PCR 检测方法检测流感病毒正常人和普通发热人员咽拭子样本未发现交叉反应,对阳性对照质粒检测灵敏度为 31 拷贝/ $\mu\text{L}$ ,表现较好的敏感性和特异性。采用双重荧光复合检测两段特征序列,提高检测效率和准确度的同时降低了成本,可用于新型冠状病毒的快速应急检测。

#### 参考文献

- [1] 世界卫生组织. Novel coronavirus infection in the United Kingdom Global Alert and Response (GAR) [EB/OL]. [2012-09-23]. <http://www.who.int/csr/don/20120923/en/index.html>.
- [2] 欧洲疾病预防控制中心. Epidemiological update: two cases of a novel coronavirus laboratory confirmed [EB/OL]. [2012-09-24]. <http://www.ecdc.europa.eu/en/press/news/Pages/News.aspx>,
- [3] 欧洲疾病预防控制中心. RAPID RISK ASSESSMENT: Severe respiratory disease associated with a novel coronavirus [EB/OL]. [2012-09-24]. <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/RRA-Novel-coronavirus-final20120924.pdf>.
- [4] VM Corman, I Eckerle, T Bleicker, et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction [J]. *Eurosurveillance*, 2012, 17(39):20285.
- [5] 世界卫生组织. Interim case definition as of 29 September - WHO [EB/OL]. [2012-09-20]. [http://www.who.int/csr/disease/coronavirus\\_infections/en/](http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/en/).
- [6] 美国国立生物技术信息中心. Human betacoronavirus 2c EMC/2012, complete genome, GenBank: JX869059.1 [EB/OL]. [2012]. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/407076736?report=genbank&log\\$=nucltop&blast\\_rank=1&RID=7VZ7M5E501N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/407076736?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=7VZ7M5E501N),
- [7] 荷兰伊拉兹马斯大学医学中心. Novel Betacoronavirus Qetection [EB/OL]. <http://www.virology-bonn.de/index.php?id=40>.
- [8] Patrik CY, Susanna KP, Yi Huang, et al. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping [J]. *experimental Biology and Medicine*, 2009, 234:1117-1127.
- [9] Van Elden LJ, van Loon AM, van Alphen F, et al. Frequent detection of human coronaviruses in clinical specimens from patients with respiratory tract infection by use of a novel real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction [J]. *J Infect Dis*, 2004, 189(4):652-657.
- [10] Marshall JA, Bruggink LD. Review Laboratory diagnosis of norovirus [J]. *Clin Lab*, 2006, 52(11-12): 571-581.
- [11] A. Bermingham, P. Heinen, M. Iturriza-Gomara, et al. Laboratory diagnosis of SARS [J]. *Phil. Trans. R. Soc. Lond*, 2004, 359: 1083-1089.
- [12] Pfefferle S, Schopf J, Kogl M, et al. The SARS-coronavirus-host interactome: identification of cyclophilins as target for pan-coronavirus inhibitors [J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(10):e1002331.
- [13] Barnard DL, Kumaki Y. Recent developments in anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus chemotherapy [J]. *Future Virol*, 2011, 6(5):615-631.
- [14] Elie Moes, Leen Vijgen, Els Keyaerts, et al. A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium [J]. *BMC infectious diseases*, 2005, 5:6.
- [15] Balboni A, Battilani M, Prosperi S. The SARS-like coronaviruses: the role of bats and evolutionary relationships with SARS coronavirus [J]. *New Microbiol*, 2012, 35(1):1-16.
- [16] Aramburo A, van Schaik S, Louie J, et al. Role of real-time reverse transcription polymerase chain reaction for detection of respiratory viruses in critically ill children with respiratory disease: Is it time for a change in algorithm [J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2011, 12(4):160-165.
- [17] Chen YN, Wu CC, Bryan T, et al. Specific real-time reverse transcription-polymerase chain reaction for detection and quantitation of turkey coronavirus RNA in tissues and feces from turkeys infected with turkey coronavirus [J]. *J Virol Methods*, 2010, 163(2):452-458.
- [18] 欧洲疾病预防控制中心. In focus: New laboratory diagnostic protocols for novel human coronavirus [EB/OL]. [2012-09-28]. [http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/microbiology/pages/activities\\_microbiology\\_cooperation.aspx](http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/microbiology/pages/activities_microbiology_cooperation.aspx).

收稿日期: 2012-10-16

读者·作者·编者

### 本刊对来稿署名的要求

本刊对作者来稿的署名要求: 一篇文章的作者姓名一般以不超过 10 名为好, 并按序排于文题名下。单名两字间不留空。作者的汉语拼音姓名是姓在前, 首字母大写, 名在后, 复名第一字母大写, 如张国宁应写成 ZHANG Guo-ning。作者之间以“,” 隔开。

本刊编辑部