



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112226535 A

(43) 申请公布日 2021.01.15

(21) 申请号 202011032279.3

(22) 申请日 2020.09.27

(71) 申请人 上海纳米技术及应用国家工程研究中心有限公司

地址 201109 上海市闵行区剑川路468号

(72) 发明人 崔大祥 陈晓敏 徐艳 田静
李雪玲 梁辉

(74) 专利代理机构 上海东亚专利商标代理有限公司 31208

代理人 董梅

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/6851 (2018.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表3页 附图1页

(54) 发明名称

一种基于实时荧光RT-PCR的新型冠状病毒核酸快速检测方法

(57) 摘要

本发明提供一种新型冠状病毒核酸快速检测方法,用标记不同的荧光探针在同一个PCR反应管中利用一步法实时荧光RT-PCR方法同时检测新型冠状病毒核酸的ORF1ab、E基因及N基因,根据检测到的Ct值判断是否有病毒RNA存在于样品中。本发明在一个PCR反应管中同时检测新型冠状病毒基因的三个重要区域ORF1ab、E基因和N基因,检测成本低、通量多、灵敏度高、准确性好。本发明操作简单,只需将样品提取的RNA进行实时荧光RT-PCR扩增检测即可。本发明检测速度快,整个检测过程只需要60分钟,满足临床快速检测需求。

1. 一种基于实时荧光RT-PCR的新型冠状病毒核酸检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 合成针对新型冠状病毒核酸的ORF1ab、E基因及N基因的三对引物和探针,探针分别修饰不同的荧光报告基团和淬灭基团;

(2) 在同一PCR反应管中配制一步法的实时荧光RT-PCR反应体系,反应液成分包括1 x PCR缓冲液、步骤(1)中的三对引物/探针、逆转录酶、*Taq* DNA聚合酶、RNA以及DEPC水;

(3) 对步骤(2)配制的RT-PCR反应体系在实时荧光定量PCR仪上进行扩增检测,其反应条件是42°C逆转录反应5分钟,95°C变性10秒,40个循环95°C变性5秒,60°C反应30秒。

2. 根据权利要求1所述的基于实时荧光RT-PCR的新型冠状病毒核酸检测方法,其特征在于,所述的引物/探针同时包括SARS-CoV-2的ORF1ab、E基因及N基因,并且三种探针5'端修饰的荧光报告基团分别为FAM、HEX、ROX及Cy5中的任意三种,3'端的淬灭基团为BHQ1或BHQ2。

3. 根据权利要求1所述的基于实时荧光RT-PCR的新型冠状病毒核酸检测方法,其特征在于,所述的实时荧光RT-PCR反应体系同时包括1 x PCR缓冲液、三对引物/探针、逆转录酶、*Taq* DNA聚合酶、RNA以及DEPC水,并且引物的终浓度为200~400 nM,探针的终浓度为200 nM。

4. 根据权利要求1所述的基于实时荧光RT-PCR的新型冠状病毒核酸检测方法,其特征在于,所述的实时荧光RT-PCR反应条件是42°C逆转录反应5分钟,95°C变性10秒,40个循环95°C变性5秒,60°C反应30秒,并且在40个循环中的60°C阶段同时检测三种荧光探针的荧光信号,根据获得的Ct值判断是否有病毒基因存在于样品中。

一种基于实时荧光RT-PCR的新型冠状病毒核酸快速检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 核酸检测技术领域,具体涉及一种在同一PCR反应管中同时检测新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 的ORF1ab、E基因及N基因的逆转录-实时荧光定量PCR (RT-PCR) 检测方法。

背景技术

[0002] SARS-CoV-2是一种由包膜包被的单股正链RNA病毒,其基因序列与蝙蝠冠状病毒一致性高达96%,在分类学上SARS-CoV-2与高致病的严重急性呼吸综合症人冠状病毒 (SARS-CoV)、中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV) 同属β-冠状病毒。

[0003] 疫情初期,在疫苗和抗病毒药物匮乏的情况下,早期诊断和隔离成为治疗COVID-19患者和控制疫情传播的有效措施。至今,SARS-CoV-2核酸检测仍是COVID-19诊断的金标准。根据我国《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第八版)》的要求,对COVID-19疑似病例的确诊需满足实时荧光RT-PCR检测SARS-CoV-2核酸阳性,或通过基因测序,与已知的SARS-CoV-2高度同源;治愈者出院需满足连续两次呼吸道标本核酸检测阴性。与基因测序法相比,实时荧光RT-PCR检测快速、灵敏度高、成本低,而且根据标准曲线可以对患者体内的病毒进行相对定量,从而有助于监视疾病进程,帮助临床医生制定合理的治疗方案。基于上述优势,实时荧光RT-PCR方法仍被作为当前检测SARS-CoV-2的金标准。

[0004] 自新冠疫情发生以来,大量的应急试剂盒被研发,截至2020年7月13日,国家药品监督管理局已批准了16个SARS-CoV-2核酸检测(荧光PCR法)试剂盒。基于SARS-CoV-2的基因序列与其他高致病冠状病毒高度相似,我国临床诊断优先推荐使用能同时检测SARS-CoV-2开放读码框1ab (ORF1ab) 和核壳蛋白 (N) 基因区域的实时荧光RT-PCR试剂盒。然而,目前的新冠病毒核酸检测试剂盒几乎都是单基因单管检测,因此需要消耗大量的试剂,导致检测成本高。另外,临床上一些假阴性结果使得实时荧光RT-PCR的检测准确性备受质疑。多项研究表明,对不同的SARS-CoV-2核酸检测试剂盒的检测性能进行比较分析发现,不同厂家的病毒核酸检测试剂对弱阳性样品的检测能力有差异,部分试剂的准确性、灵敏度及重复性欠佳。此外,较长的检测时间也限制了实时荧光RT-PCR对疑似人群的大规模筛查。

[0005] 因此,优化和改善实时荧光RT-PCR检测方法对于更好地大规模筛查疑似患者和控制疫情非常重要。

发明内容

[0006] 鉴于现有技术的上述缺陷,本发明目的在于提供一种在同一PCR反应管中同时检测SARS-CoV-2的ORF1ab、E基因及N基因的核酸检测方法,该检测方法简单、快速、通量多、成本低,同时该方法能保证检测的灵敏度和准确性,易于大规模推广。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供了一种利用一步实时荧光RT-PCR法对SARS-CoV-2的ORF1ab、E以及N基因在同一PCR反应管中同时检测,所述方法包括以下步骤:

(1) 参考中国疾控预防控制中心 (Zhu N, et al., N Engl J Med. 2020, 382, 727-

733)和Corman等(Corman VM, et al., Euro Surveil. 2020, 25.)公布的SARS-CoV-2核酸检测引物和探针序列,制备针对SARS-CoV-2的ORF1ab基因、E基因及N基因的特异性引物和探针。引物和探针序列见表1:

表 1 引物和探针序列	
基因	序列(5'→3')
ORF1ab	
正向引物 Seq. ID No.1	CCCTGTGGGTTTTACTTAA
反向引物 Seq. ID No.2	ACGATTGTGCATCAGCTGA
探针 Seq. ID No.3	CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG
E 基因	
正向引物 Seq. ID No.4	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT
反向引物 Seq. ID No.5	ATATTGCAGCAGTACGCACACA
探针 Seq. ID No.6	ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG
N 基因	
正向引物 Seq. ID No.7	GGGGAACTTCTCCTGCTAGAAT
反向引物 Seq. ID No.8	CAGACATTTTGTCTCTCAAGCTG
探针 Seq. ID No.9	TTGCTGCTGCTTGACAGATT

[0008] 探针的5'端和3'端分别修饰有荧光报告基团和淬灭基团,5'端的荧光报告基团分别选择FAM、HEX、ROX及Cy5中的任意三种,3'端的淬灭基团为BHQ1或BHQ2。

[0009] (2)提取人咽拭子、痰液或肺泡灌洗液等样本中的RNA。

[0010] (3)配制一步法的实时荧光RT-PCR反应体系,建立SARS-CoV-2三重基因检测体系,使用步骤(1)所述的引物/探针对,以步骤(2)制备的RNA模板进行一步法的实时荧光RT-PCR扩增反应。一步法的实时荧光RT-PCR反应体系包括1 x PCR缓冲液、三对引物/探针(200~400 nM引物和200 nM探针)、逆转录酶、*Taq* DNA聚合酶、RNA以及DEPC水。

[0011] (4)对步骤(3)配制的RT-PCR反应体系在实时荧光定量PCR仪上进行扩增检测,其反应条件是42℃逆转录反应5分钟,95℃变性10秒,40个循环95℃变性5秒,60℃反应30秒,并且在40个循环中的60℃阶段同时检测探针的三种荧光信号。

[0012] 与现有技术相比,本发明的有益效果包括:

(1)本发明提供了一种在同一PCR反应管中同时检测SARS-CoV-2的ORF1ab、E基因及N基因的实时荧光RT-PCR核酸检测方法,检测通量多,极大地降低了检测成本。

[0013] (2)本发明提供的检测方法操作方便,流程简单,只需要将样品提取的RNA进行实时荧光RT-PCR检测即可。

[0014] (3)采用优化的一步法的实时荧光RT-PCR方法,使得提取的病毒RNA在1小时即可完成核酸检测,满足临床快速检测需求。

[0015] (4)本发明提供的检测方法灵敏度高(可检测出5拷贝病毒RNA)、准确性好,检测结果稳定性好、重复性好,具有重要的应用潜力。

附图说明

[0016] 图1为实施例1检测含SARS-CoV-2样品检测曲线图。

[0017] 图2为实施例1检测不含SARS-CoV-2样品检测曲线图。

具体实施方式

[0018] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0019] 所用引物和探针均由上海百利格生物技术有限公司合成,RT-PCR试剂均购自Takara公司。

[0020] 实施例1:

(1)取200 μ L咽拭子样品,使用TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.5.0提取样品中的RNA,具体步骤按试剂盒操作说明。

[0021] (2)配制25 μ L的RT-PCR反应体系,该体系包括1 x PCR缓冲液、三对引物/探针(见表2)、0.5 μ L逆转录酶PrimerScript RT Enzyme Mix、0.5 μ L DNA聚合酶 TaKaRa Ex Taq HS (5U/ μ L)、5 μ L步骤(1)提取的RNA以及DEPC水

表2 引物和探针序列和浓度

基因	序列(5'→3')	终浓度 (nM)
ORF1ab		
正向引物 Seq. ID No.1	CCCTGTGGGTTTTACTTAA	400
反向引物 Seq. ID No.2	ACGATTGTGCATCAGCTGA	400
探针	FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG-BQ1	200
E 基因		
正向引物 Seq. ID No.4	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	200
反向引物 Seq. ID No.5	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	200
探针	HEX-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BQ1	200
N 基因		
正向引物 Seq.No.7	GGGGAAGTCTCCTGCTAGAAT	200
反向引物 Seq. ID No.8	CAGACATTTGCTCTCAAGCTG	200
探针	ROX-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-BQ2	200

[0022] (3)采用Stratagene Mx3000P实时PCR扩增仪(Agilent公司)对步骤(2)配制的RT-PCR反应体系按照表3进行扩增检测,并且在40个循环中的60℃(表3步骤3)阶段同时检测FAM、HEX及ROX荧光信号。结果判断:根据荧光PCR仪显示的Ct值判断结果。附图1为实施例检测含SARS-CoV-2样品的检测曲线图,附图2为实施例检测不含SARS-CoV-2样品的检测曲线图

步骤	温度	时间	循环数
1	42℃	5 min	1
2	95℃	10 s	1
3	95℃	5 s	40
	60℃	30 s	

[0023] 实施例2:

(1)取100 μL咽拭子样品,使用TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.5.0提取样品中的RNA,具体步骤按试剂盒操作说明。

[0024] (2)配制25 μL的RT-PCR反应体系,该体系包括1 x PCR缓冲液、三对引物/探针(见表4)、0.5 μL逆转录酶PrimerScript RT Enzyme Mix、0.5 μL DNA聚合酶 TaKaRa Ex Taq HS (5U/μL)、6 μL步骤(1)提取的RNA以及DEPC水

表 4 引物/探针序列和浓度		
基因	序列(5'→3')	终 浓度 (nM)
ORF1ab		
正向引物 Seq. ID No.1	CCCTGTGGGTTTTACTTAA	400
反向引物 Seq. ID No.2	ACGATTGTGCATCAGCTGA	400
探针	FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG-BQ1	200
E 基因		
正向引物 Seq. ID No.4	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	200
反向引物 Seq. ID No.5	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	200
探针	HEX-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BQ1	200
N 基因		
正向引物 Seq. ID No.7	GGGGAACCTTCTCCTGCTAGAAT	400
反向引物 Seq. ID No.8	CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG	400
探针	ROX-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-BQ2	200

[0025] (3) 采用Stratagene Mx3000P实时PCR扩增仪对步骤(2)配制的RT-PCR反应体系按照表3进行扩增检测,并且在40个循环中的60℃(表3步骤3)阶段同时检测FAM、HEX及ROX荧光信号。结果判断:根据荧光PCR仪显示的Ct值判断结果。

[0026] 实施例3:

(1) 取200 μL咽拭子样品,使用TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.5.0提取样品中的RNA,具体步骤按试剂盒操作说明。

[0027] (2) 配制20 μL的RT-PCR反应体系,该体系包括1 x PCR缓冲液、三对引物/探针(见表5)、0.5 μL逆转录酶PrimerScript RT Enzyme Mix、0.5 μL DNA聚合酶 TaKaRa Ex Taq HS (5U/μL)、5 μL步骤1提取的RNA以及DEPC水

表 5 引物/探针序列和浓度		
基因	序列(5'→3')	终浓度 (nM)
ORF1ab		
正向引物 Seq. ID No.1	CCCTGTGGGTTTTACTTAA	400
反向引物 Seq. ID No.2	ACGATTGTGCATCAGCTGA	400
探针	FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG-BQ1	200
E 基因		
正向引物 Seq. ID No.4	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	200
反向引物 Seq. ID No.5	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	200
探针	HEX-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BQ1	200
N 基因		
正向引物 Seq. ID No.7	GGGGA ACTTCTCCTGCTAGAAT	200
反向引物 Seq. ID No.8	CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG	200
探针	Cy5-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-BQ2	200

[0028] (3) 采用Stratagene Mx3000P实时PCR扩增仪对步骤(2)配制的RT-PCR反应体系按照表3进行扩增检测,并且在40个循环中的60℃(表3步骤3)阶段同时检测FAM、HEX及Cy5荧光信号。结果判断:根据荧光PCR仪显示的Ct值判断结果。

SEQUENCE LISTING

<110> 上海纳米技术及应用国家工程研究中心有限公司

<120> 一种基于实时荧光RT-PCR的新型冠状病毒核酸快速检测方法

<130> 2020

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 人工序列

<400> 1

ccctgtgggt ttacactta a 21

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 人工序列

<400> 2

acgattgtgc atcagctga 19

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 人工序列

<400> 3

ccgtctgcgg tatgtgaaa ggttatgg 28

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 人工序列

<400> 4

acaggtacgt taatagtaa tagcgt 26

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 人工序列
<400> 5
atattgcagc agtacgcaca ca 22

<210> 6
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 人工序列
<400> 6
aactagcca tccttactgc gcttcg 26

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 人工序列
<400> 7
ggggaacttc tcctgctaga at 22

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 人工序列
<400> 8
cagacatttt gctctcaage tg 22

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 人工序列
<400> 9

ttgctgctgc ttgacagatt 20

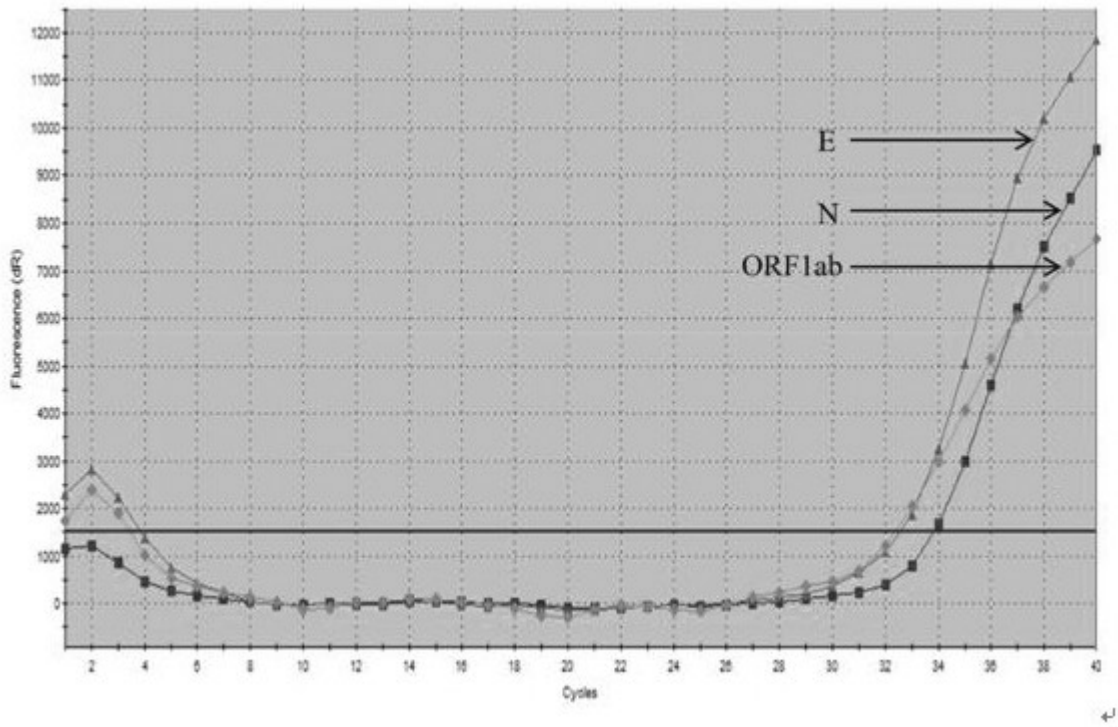


图1

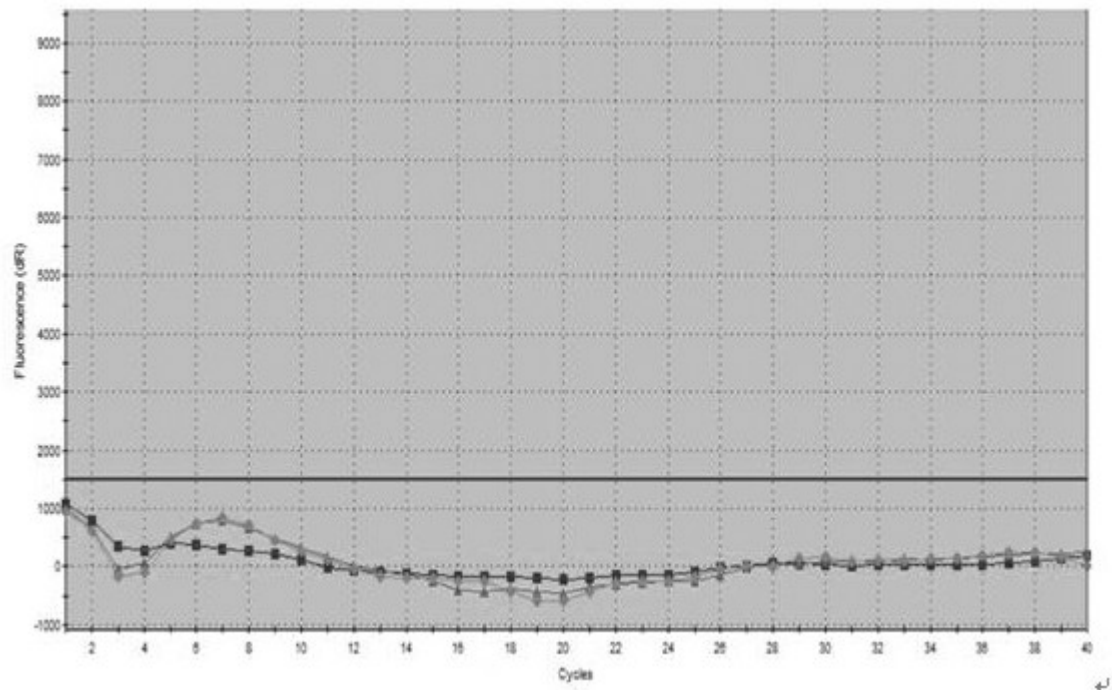


图2