

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.20.002

低拷贝病毒 RNA 捕获及多重实时荧光定量 PCR 检测 *

余 佳 李晓宁 肖君华 李 凯 周宇荀[△]

(东华大学化学化工与生物工程学院 上海 201620)

摘要 目的:为提高 COVID-19 检测灵敏度,减少新冠患者临床假阴性检测结果,本研究建立了一种 SARS-CoV-2 低拷贝假病毒 RNA 捕获方法。**方法:**利用链霉亲和素磁珠,设计并合成生物素探针捕获 SARS-CoV-2 假病毒 RNA;对磁珠用量、生物素探针浓度和洗脱次数等捕获条件进行了优化;参考 WHO 发布的序列,针对 SARS-CoV-2 病毒基因组的 *ORF1ab* 基因和 *N* 基因序列合成引物和 TaqMan 探针,对捕获的 SARS-CoV-2 假病毒 RNA 进行反转录实时荧光定量 PCR 检测。采用一步法和分步法检测、单重和多重实时荧光定量 PCR 检测,并分别比较检测结果。**结果:**本研究设计的生物素探针能富集到距离探针结合位点至少 1.8 K 处的序列,在生物素探针浓度 12.5 μM ,磁珠的工作浓度 333.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,合并 RNA 的两次洗脱液,对低拷贝病毒 RNA 的捕获效率最高。研究得到对低拷贝病毒 RNA 分步法比一步法、多重比单重实时荧光定量 PCR 检测更灵敏,进行分步法、多重实时荧光定量 PCR 检测限低于 10 copies/ μL ,组间和重复实验组之间 CT 值变异系数均小于 1%。所有阴性对照样品在检测中均为阴性。**结论:**本研究优化的链霉亲和素磁珠-生物素探针捕获法是富集 SARS-CoV-2 低拷贝假病毒 RNA 的有效方法,其抽提 RNA 病毒的结果优于一些商业化试剂盒,分步法、多重实时荧光定量 PCR 对 SARS-CoV-2 低拷贝假病毒 RNA 实现了高效检测,这为临床检测低拷贝 RNA 病毒提供了一种参考方案。

关键词:SARS-CoV-2 假病毒;链霉亲和素磁珠;生物素探针;多重实时荧光定量 PCR

中图分类号:Q-33;Q78;Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)20-3806-07

RNA Capture and Multiplex real-time Fluorescence Quantitative PCR Detection of Low Copy Virus *

YU Jia, LI Xiao-ning, XIAO Jun-hua, LI Kai, ZHOU Yu-xun[△]

(School of Chemistry and Bioengineering, Donghua University, Shanghai, 201620, China)

ABSTRACT Objective: To improve the detection sensitivity of COVID-19 and reduce the clinical false negative results, this paper constructed a SARS-CoV-2 RNA capture method which can extract low copy RNA. **Methods:** The biotin probe in this study was designed based on the conserved region of the SARS-CoV-2 genome sequence. Streptavidin magnetic beads-biotin probe capture method was used to capture SARS-CoV-2 pseudovirus RNA by optimizing capture conditions such as magnetic beads concentration, biotin probes concentration and the number of RNA elution times. SARS-CoV-2 pseudovirus was detected by reverse transcription real-time fluorescence quantitative PCR with reference to the SARS-CoV-2 *ORF1ab* and *N* gene primers and TaqMan probes published by WHO. This study used one step and step-by-step real-time fluorescence quantitative PCR detection, single and multiple real-time fluorescence quantitative PCR, and the detection results were compared respectively. **Results:** The biotin probe can capture the RNA sequence at least 1.8K away from the probe binding site in this study. When the biotin probe concentration was 12.5 μM and the concentration of magnetic beads was 333.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$, combined with the twice eluent of RNA, the capture efficiency was the highest for low copy SARS-CoV-2 pseudovirus RNA. The study results showed that the step-by-step method was more sensitive than one-step method and two TaqMan probes were more sensitive than one TaqMan probe for real-time fluorescence quantitative PCR, and the minimum detection limit of the step-by-step and multiple real-time fluorescence quantitative PCR was 10 copies/ μL . The intra-group and repeated experimental groups coefficient of variation was less than 1%. All negative control samples were negative in the study. **Conclusions:** The streptavidin magnetic beads-biotin probe capture method optimized in this study was an effective method to capture SARS-CoV-2 low copy pseudovirus RNA, the results of RNA extraction were better than some commercial kits, step-by-step and multiple real-time fluorescence quantitative PCR have achieved efficient detection of SARS-CoV-2 low copy pseudovirus RNA, which provides a reference solution for clinical detection of low copy RNA virus.

Key words: SARS-CoV-2 pseudovirus; Streptavidin magnetic bead; Biotin probe; Multiplex real-time fluorescence quantitative PCR

Chinese Library Classification(CLC): Q-33; Q78; Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)20-3806-07

* 基金项目:中央高校基本科研业务费专项基金项目(2232020G-04);中央高校基本科研业务费学科交叉重点计划项目(2232020A-07)

作者简介:余佳(1996-),女,硕士研究生,主要研究方向:生物化学与分子生物学,E-mail: yujiax123@163.com

[△] 通讯作者:周宇荀(1968-),女,副研究员,博士,研究方向:分子遗传及分子生物学,E-mail: zhoyuxun@dhu.edu.cn,电话:021-67792652

(收稿日期:2022-02-17 接受日期:2022-03-12)

前言

2019年新冠肺炎疫情爆发,其具有很强的传播性^[1],直至目前尚未结束,有可能使大流行永久化^[2,3]。导致新冠肺炎疫情的 SARS-CoV-2 是一种新兴的病毒^[4],其具有高致病性和感染力^[5]。据报道,早期新冠患者的临床诊断假阴性结果很常见^[6],在真实 COVID-19 病例中,单次抽样的核酸检测假阴性高达 30% 至 50%^[7]。这可能会耽误患者的确诊,影响患者的及时治疗^[8]。造成假阴性结果的因素有很多^[9],原因之一是早期患者咽拭子或鼻拭子的病毒载量较少^[10,11]。新冠肺炎患者的快速诊断以及治疗是控制疫情的重要步骤^[12]。因此,建立高效的 SARS-CoV-2 核酸检测方法十分重要。

当前,SARS-CoV-2 分子检测国内外研究的方法有很多^[13],Butt 等人研究了同时检测 *ORF1ab* 和 *N* 基因的 RT-LAMP 检测,但该方法检测临床阳性样本的准确率为 95%^[14]。国内也有使用此方法做检测^[15]。Broughton 等人利用 CRISPR-Cas 系统实现了快速检测鼻咽拭子的 SARS-CoV-2 RNA,但是该方法检测临床阳性样本的准确率也为 95%^[16]。国内研究者使用此方法做检测,但作者表示此方法增加了操作步骤及污染的可能性^[17]。为提高 COVID-19 检测灵敏度,Simon Haile 等人研究了磁珠富集 SARS-CoV-2 的 RNA,作者表示需要进一步优化来满足特异性和灵敏度的要求^[18]。国内有研究得到磁珠提取效率高^[19]。目前反转录实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 是通过呼吸样本检测 COVID-19 的常用方法^[20]。

本研究使用链霉亲和素磁珠-生物素探针法更高效捕获低拷贝病毒 RNA 并对一些捕获条件进行了优化,包括:生物素标记的捕获探针浓度和链霉亲和素磁珠用量以及 RNA 洗脱次数进行优化。对商用 RNA 抽提试剂盒与本研究的链霉亲和素磁珠-生物素探针捕获法抽提 RNA 方法进行 qRT-PCR 检测结果比较,最终得到了一种对于低拷贝 SARS-CoV-2 假病毒比商业化试剂盒更高效的 RNA 捕获方法。本研究设计 TaqMan 探针利用 qRT-PCR 检测 *ORF1ab* 和 *N* 基因,并比较了一步法和分步法实时荧光定量 PCR、单重和多重反应对检测灵敏度的影响,得到分步法、多重实时荧光定量 PCR 更灵敏。为检测低拷贝 RNA 病毒提供了一种参考方案。

1 材料与方 法

1.1 材料

SARS-CoV-2 假病毒购自钟鼎生物技术有限公司;链霉亲和素磁珠 (Promega Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles) 购自 Promega 公司;天根 RNA 提取试剂盒 (离心柱型) (SD101) 和天根磁珠法病毒 DNA/RNA 提取试剂盒 (DP438) 购自天根生化科技有限公司;反转录试剂盒 (Termo scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) 购自赛默飞世尔科技有限公司;Probe qPCR Super Mix 试剂盒购自近岸蛋白科技有限公司;一步法 qRT-PCR 试剂盒 (NovoScript® Probe One-Step qRT-PCR Kit (E094-LPAA) 和 NovoScript® Multiplex Probe One Step qRT-PCR Kit (MDG) (E195-nCoV-A & E195-nCoV-B)) 购自近岸蛋白科技有限公司。7500 Real Time PCR System 购自美国 Applied Biosystems 公司;二硫苏糖

醇 (DTT) 购自生工生物工程 (上海) 有限公司;8.5 M 异硫氰酸胍由实验室配制;Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.6) 由实验室配制;0.5 M EDTA 由实验室配制;DEPC 水购自生工生物工程 (上海) 有限公司;普通 PCR 扩增仪购自美国的 Bio-Rad 公司;20× SSC Buffer 购自生工生物工程 (上海) 有限公司;Carrier RNA 溶液购自生工生物工程 (上海) 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 生物素探针的设计和合成 设计并在生工生物工程 (上海) 有限公司合成捕获探针 5'-Biotin-AACGGCAGTACAGACAACACGATG-3',生物素探针 5' 端的生物素会与链霉亲和素杂交。生物素探针也会特异的结合到 SARS-CoV-2 假病毒的基因组,从而捕获到目的序列。

1.2.2 链霉亲和素磁珠捕获 SARS-CoV-2 假病毒 RNA 参考 promega 的 polyAtract system 1000 产品说明书使用链霉亲和素磁珠抽提 SARS-CoV-2 假病毒 RNA。滴度依次为 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 500, 100 copies/mL 的病毒稀释液 (不足 200 μ L 用 PBS 补齐) 200 μ L 各 3 管,每个滴度设置 3 重复。分别取 200 μ L 假病毒溶液加入 400 μ L 预裂解液 (800 μ L 4M 异硫氰酸胍;100 μ L 100 mM Tris, pH 7.6;40 μ L 20 mM EDTA;50 μ L 160 mM DTT;再加 10 μ L RNase-free H₂O 补齐至 1 mL),再加入 3 μ L 6 μ g/ μ L 的 Carrier RNA 混匀,室温放置 10 min,充分裂解病毒。样品裂解液中加入 400 μ L 稀释缓冲液 (含 40 mM DTT 的 0.75×SSC),2.5 μ L 12.5 μ M 生物素标记探针,混匀,70°C 孵育 5 min,自然冷却至室温,放置 10 min。根据说明书对磁珠进行预处理,加入 300 μ L 预处理后的磁珠,混匀,室温孵育 10 min,每 2 min 混匀一次。借助磁力架移去上清,用 800 μ L 0.5×SSC 洗涤 3 次,最后一次尽可能移尽洗涤液。加入 15 μ L 的 RNase-free H₂O,混匀,室温孵育 2 min,借助磁力架将 RNA 溶液移入新的管子中。得到 15 μ L 的 SARS-CoV-2 假病毒 RNA。

1.2.3 核酸捕获实验的条件优化 参考 pregema mRNA 富集试剂盒设置的探针-磁珠加入比例,1000 和 100 copies/mL 的病毒稀释液使用链霉亲和素磁珠富集 RNA 后做后续实时荧光定量 PCR 检测实验。首先对生物素标记的捕获探针浓度进行优化,分别用 12.5 μ M 和 25 μ M 比较检测结果;在最优捕获探针浓度时对磁珠用量 333.33 μ g/mL 和 200 μ g/mL 进行检测比较;在最优捕获探针浓度和最佳磁珠用量配比时对洗脱次数分为 RNA 第一次洗脱液、第二次洗脱液以及两次洗脱的混合 RNA 溶液这 3 组检测结果进行比较;RNA 溶液内磁珠对 qRT-PCR 检测的影响。每组设置 3 个平行对照。

1.2.4 引物和探针 参考国家卫健委发布的引物和探针^[20],分别使用 SARS-CoV-2 基因组 *ORF1ab* 和 *N* 区域内的两个引物对和相应的探针进行实时荧光定量 PCR 检测。

1.2.5 多重定量 PCR TaqMan 探针反应 总反应体系 20 μ L, *ORF1ab* 上游引物:5'-CCCTGTGGGTTTTACTTAA-3'、下游引物:5'-ACGATTGTGCATCAGCTGA-3';*N* 上游引物 5'-GGGGAAGTCTCTCTGCTAGAAT-3'、下游引物 5'-CAGACATTTTGTCTCAAGCTG-3';*ORF1ab* TaqMan 探针:5'-FAM CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG BHQ1-3' 和 *N* TaqMan 探针:5'-FAM TTGCTGCTGCTTGACAGATT TAM-

RA-3',引物浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$,分别上样 1 μL 。探针浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$,加样 0.4 μL ,其中 2 \times ProbeMix 10 μL ,ROX Dye II 0.4 μL ,cDNA 加入 3 μL ,最后加 RNase-free H₂O 至 20 μL 。使用 ABI 7500 Real Time PCR System 进行 TaqMan 检测,反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 循环条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,在 72 $^{\circ}\text{C}$ 荧光收集,进行 45 个循环。

1.2.6 标准曲线的建立 对 SARS-CoV-2 假病毒 10⁷ copies/mL 的病毒液依次进行 10 倍稀释 6 个梯度进行检测得到的 CT 值与其拷贝数的对数构建的标准曲线。96 孔板上机后,设置 7500 程序时选择标准曲线并修改相关参数,利用 ABI 7500 软件自动生成标准曲线。

1.2.7 灵敏度检测 对 SARS-CoV-2 假病毒 10⁶ copies/mL 的病毒液依次进行 10 倍稀释 6 个梯度进行检测得到的扩增曲线,得出检测限。

1.2.8 链霉亲和素磁珠 - 生物素探针捕获法与 RNA 病毒基因组抽提试剂盒 (吸附柱法和非特异性磁珠法) 比较 10⁵, 10⁴, 10³, 500, 100 copies/mL 的假病毒稀释液分别用天根病毒检测用 RNA 提取试剂盒(离心柱型)(SD101)、天根磁珠法病毒 DNA/RNA 提取试剂盒(DP438)和本研究的链霉亲和素磁珠 - 生物素探针杂交法病毒 RNA 抽提这 3 种方法富集病毒 RNA,每组设置 3 个平行对照,对得到的检测结果 CT 值进行比较,包括线性回归方程的相关参数。

1.2.9 实时荧光定量 PCR 一步法和分步法 一步法是反转录 PCR 和实时荧光定量 PCR 在 1 管中进行实验,一步法使用近

岸公司 NovoScript[®] Probe One-Step qRT-PCR Kit (E094-LPAA)试剂盒和近岸公司 NovoScript[®] Multiplex Probe One Step qRT-PCR Kit (MDG) (E195-nCoV-A & E195-nCoV-B)。分步法是反转录 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo K1622)和实时荧光定量 PCR(NovoStart[®] Probe qPCR SuperMix (E091)) 分步进行实验。链霉亲和素磁珠捕获的 SARS-CoV-2 假病毒 RNA。在 20 μL 检测体系中,一步法加入 5 μL RNA,分步法先取 6 μL RNA 进行反转录后取 3 μL cDNA 进行实验,分步法相当于每孔加入的起始 RNA 模板量为 0.9 μL 。一步法加入 RNA 量相当于分步法的 5 倍。各个试剂盒按照说明书进行实验并比较检测结果。每组设置 3 个平行对照。比较一步法和分步法相关的 CT 值和标准曲线。

1.3 统计学分析

同一次实验每个孔做 3 重复,分析组内差异,用上述条件进行 3 次独立重复实验,分析组间差异。得到的数据使用 GraphPad Prism8.0 软件进行统计学分析。根据公式:变异系数(CV)=标准偏差(SD)/平均数,计算出对应的变异系数^[16]。

2 结果

2.1 生物素探针的有效性

链霉亲和素磁珠 - 生物素探针捕获 SARS-CoV-2 假病毒 RNA,该方法至少能富集到距离捕获探针结合位点 1.8 K 处的序列,见图 1,可以捕获距离生物素探针结合位点较远位置处的基因组。

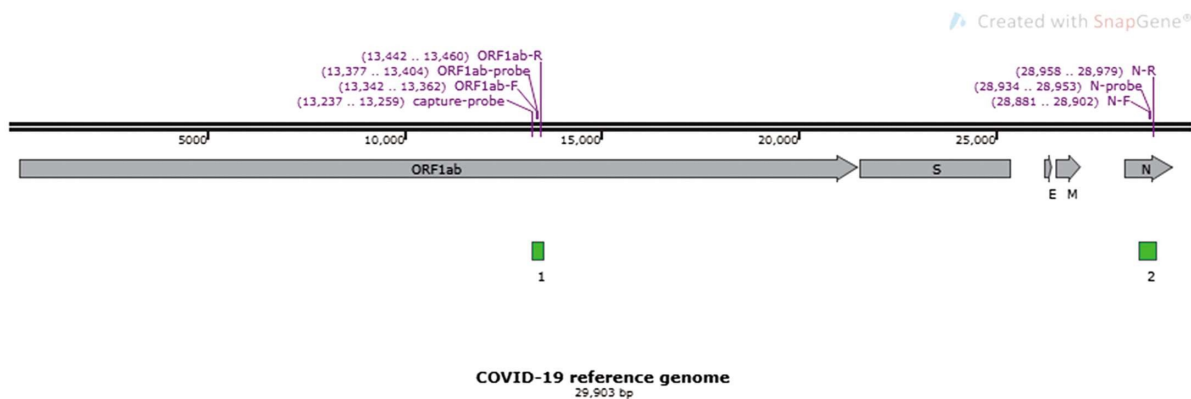


图 1 SARS-CoV-2 假病毒中 *ORF1ab* 和 *N* 基因在新冠参考基因组中对应的位置

Fig.1 Corresponding positions of *ORF1ab* and *N* genes in the reference genome of SARS-CoV-2 pseudovirus

Note: The green marker is the corresponding positions of *ORF1ab* and *N* genes in the reference genome of SARS-CoV-2 pseudovirus.

2.2 链霉亲和素磁珠 - 生物素探针法抽提 RNA 的条件优化结果

2.2.1 生物素探针的浓度优化 图 2 的实验结果显示生物素探针在 12.5 μM 时检测得到的 CT 值更小,富集效率更高。前后所有的实验,在不特意标明的情况下探针浓度为 12.5 μM 。

2.2.2 链霉亲和素磁珠用量的优化 He H 等人研究表明增加磁珠的用量,会降低提取效率^[21]。图 3 的结果显示在磁珠的浓度为 333.33 $\mu\text{g/mL}$ 检测得到的 CT 值更小,效率更高。在不作特殊交代的情况下,前后实验中磁珠的工作浓度均为 333.33 $\mu\text{g/mL}$ 。洗脱液中磁珠存在可能不会影响反转录和 qPCR 过程,有文献记载,PCR 体系中小于 60 $\mu\text{g/mL}$ 磁珠不影响 CT 值^[22],反而可能减少病毒基因组的损失。

2.2.3 RNA 洗脱次数的优化 图 4 结果显示第一次 RNA 洗脱液检测的 CT 值(蓝色扩增曲线)大于第二次 RNA 洗脱液的 CT 值(黄色扩增曲线),合并两次 RNA 洗脱液检测的 CT 值(绿色扩增曲线)小于第二次 RNA 洗脱液的 CT 值,说明第二次 RNA 洗脱液中得到的 RNA 量更多。表明第一次洗脱并不能完全将结合在磁珠上的病毒基因组完全洗脱,并且第一次洗脱后还有大量病毒基因组残余在磁珠上。可能的原因是洗脱前磁珠上残余有洗涤缓冲液,在加入的洗脱液时整个洗脱体系还有一定的离子强度,病毒基因组不能完全解离。因此后续实验均是采取两次洗脱再合并两次洗脱液的方法收集病毒基因组。

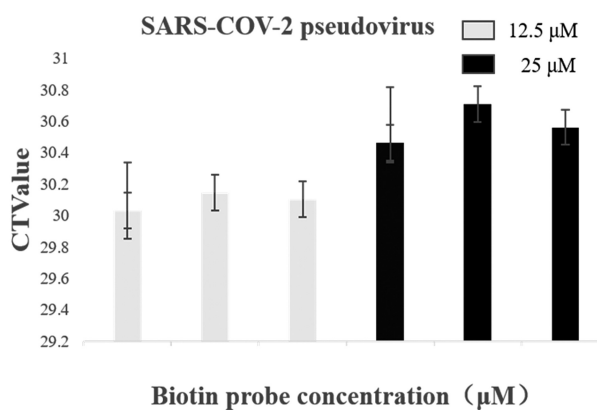


图 2 2 个不同捕获探针浓度的检测结果对比

Fig.2 Comparison of detection results of two different capture probe concentrations

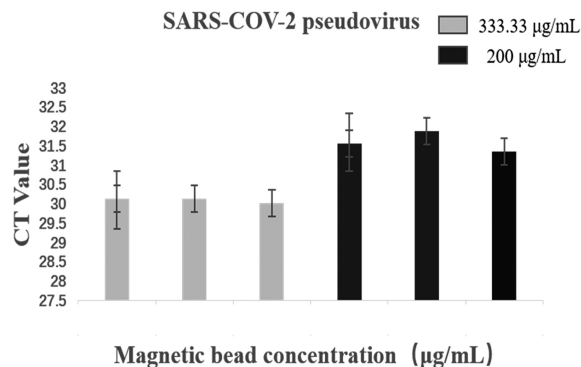


图 3 2 个不同磁珠浓度的检测结果对比

Fig.3 Comparison of detection results of two different magnetic bead concentrations

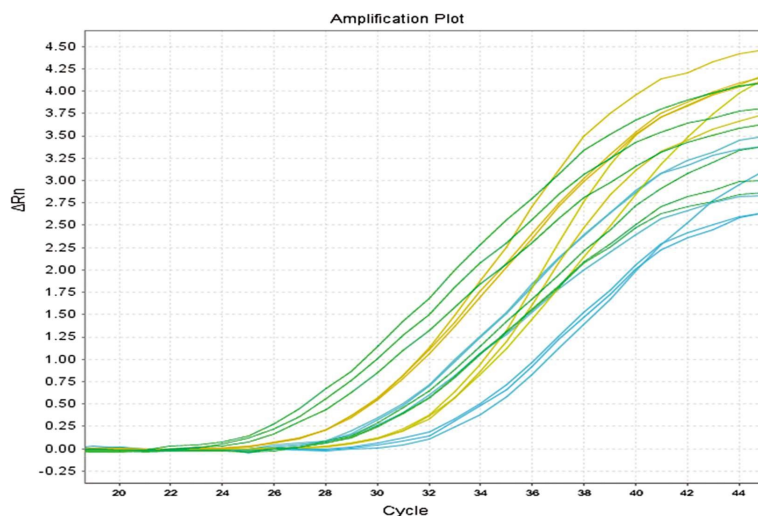


图 4 SARS-CoV-2 假病毒 RNA 第一次洗脱、第二次洗脱和两次合并检测结果的比较

Fig.4 Comparison of first elution, second elution and combined detection results of SARS-CoV-2 pseudovirus RNA

Note: The green amplification curve is the RNA eluent combined twice, the blue amplification curve is the first RNA eluent and the yellow amplification curve is the second RNA eluent.

优化链霉亲和素磁珠富集 RNA 的以上条件，得到在捕获探针浓度 12.5 μM ，磁珠的工作浓度 333.33 $\mu\text{g/mL}$ ，合并 RNA 的两次洗脱液的最优条件下，链霉亲和素磁珠富集 RNA 效率最好。

2.3 多重实时荧光定量 PCR 标准曲线

对 SARS-CoV-2 假病毒 10^7 copies/mL 的病毒液依次进行 10 倍稀释 6 个梯度链霉亲和素磁珠捕获 RNA 后进行检测得到的 CT 值与其拷贝数的对数构建的标准曲线见图 5。结果表明，SARS-CoV-2 假病毒拷贝数的对数与 CT 值之间线性关系良好，相关系数 R^2 为 0.998，扩增效率为 126.268%。标准曲线的线性回归方程为： $Y = -2.92 \times \text{Log}(X) + 36.72$ ，其中 Y 为 CT 值，X 为 SARS-CoV-2 假病毒的拷贝数。

2.4 多重实时荧光定量 PCR 的检测灵敏度和稳定性

利用前面实验得出最优的链霉亲和素磁珠富集 RNA 条件，在不考虑引物扩增效率的前提下，由图 6 可知，此方法富集 SARS-CoV-2 假病毒的效率大于 100%，即病毒滴度小时富集效率更高，可能是因为此时探针 - 磁珠 - 病毒基因组间的相对浓度更合适，而病毒滴度高时，病毒基因组的量超出探

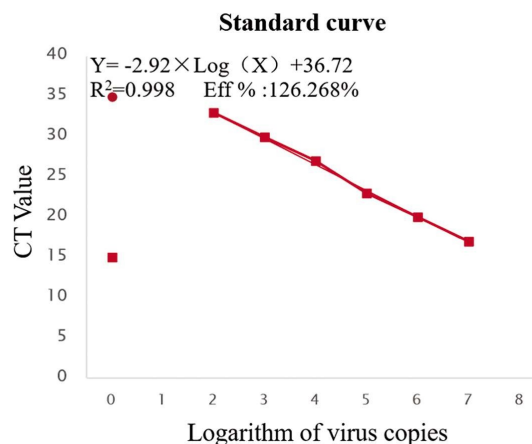


图 5 多重定量 PCR 检测 SARS-CoV-2 假病毒的标准曲线

Fig.5 Standard curve of multiplex qPCR assay for the detection of SARS-CoV-2 pseudovirus

针的量,磁珠负载。多重实时荧光定量 PCR 检测限每个反应低于 10 copies/ μ L,见图 6。

重复实验组之间 CT 值变异系数在 0.097~0.77 范围内,组间变异系数在 0.086~0.78 范围内,均小于 1%。

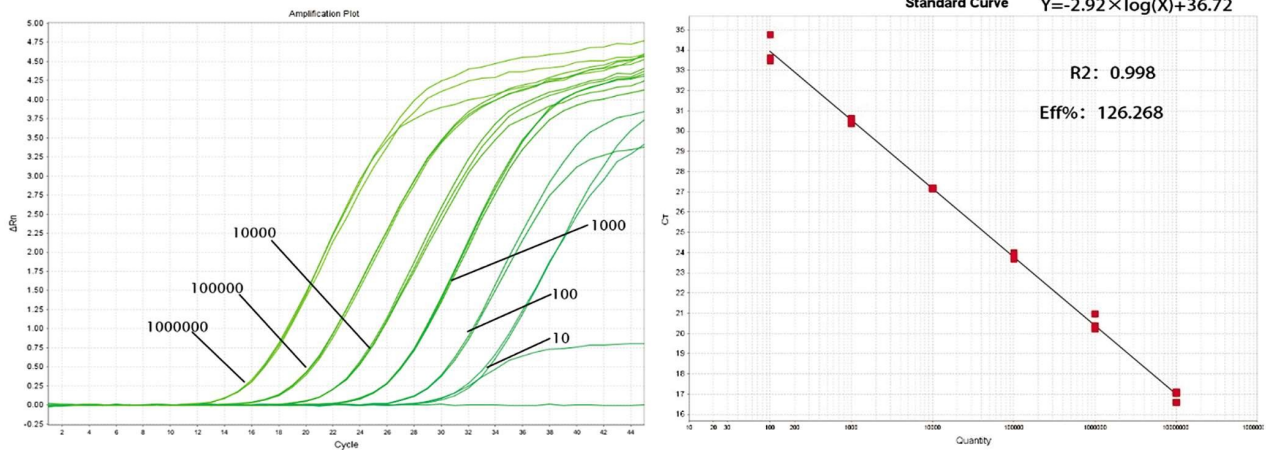


图 6 多重定量 PCR 检测 SARS-CoV-2 假病毒的灵敏度检测结果

Fig.6 Sensitivity for detection of SARS-CoV-2 pseudovirus using multiple quantitative PCR assay

2.5 多重实时荧光定量 PCR 检测方法 (一步法和分步法) 的比较

见表 1,3 个一步法实时荧光定量 PCR 试剂盒(E094-LPAA、E195-nCoV-A 和 E195-nCoV-B) 的检测结果的 CT 值大致相同。一步法加入模板的量相当于分步法的 5 倍,理论上比分步法的 CT 值相差约小 2.3。在病毒滴度高时这个差值几乎与 2.3

相近。与分步法相比一步法在病毒滴度高时的 CT 值和分步法差不多,并且一步法重复实验之间的数值很不稳定,会出现没有 CT 值的情况。分步法的反转录引物是随机引物,一步法的引物是 qPCR 引物本身。病毒滴度小时,一步法不如分步法灵敏。在不特别交代的情况下,前后 qRT-PCR 实验均采用分步法。推测在检测低拷贝病毒时分步法比一步法灵敏。

表 1 分步法和一步法的检测结果对比

Table 1 Comparison of detection results between step-by-step method and one-step method

Virus titer copies/mL	target gene	step-by-step qRT-PCR		one-step qRT-PCR	
		Probe qPCR Super Mix kit CT Mean(correction value)	E094-LPAA CT Mean	E195-nCoV-A CT Mean	E195-nCoV-B CT Mean
10 ⁵	ORF1ab/N	25.8017(23.5017)	24.6088	23.2199	23.0555
10 ⁴	ORF1ab/N	27.5381(25.2381)	26.5679	26.7248	26.2686
10 ³	ORF1ab/N	30.0537(27.7537)	29.9475	29.9412	29.7131
500	ORF1ab/N	32.7838(30.4838)	31.47	31.818	30.9709
100	ORF1ab/N	33.90947(31.60947)	33.7253	33.5822	33.1814

Note: Correction value refers to the theoretical CT value obtained when the initial amount of RNA added in one-step method and step-by-step method is the same.

2.6 实时荧光定量 PCR 方法(两重和单重 PCR) 的比较

图 7 中,病毒 RNA 是链霉亲和素磁珠-生物素探针捕获法富集的,使用分步法 qRT-PCR。分别以 N 或 ORF1ab 为参考时,两重(两对引物同时扩增(绿色扩增曲线))的 CT 值普遍比单重(ORF1ab 或 N)的低,检测灵敏度更高。两重实时荧光定量 PCR 反应中 N 和 ORF1ab 这 2 个序列的 TaqMan 探针的荧光基团相同,这 2 个基因位点信号叠加提高了检测灵敏度。

2.7 链霉亲和素磁珠-生物素探针捕获 RNA 法与吸附柱法和非特异性磁珠抽提法比较

表 2 中显示了在病毒滴度高时,链霉亲和素磁珠法富集的 RNA 检测后的 CT 值大于天根吸附柱法,说明链霉亲和素磁珠在病毒滴度高时富集 RNA 的效率低。而在病毒滴度小时,链霉亲和素磁珠法的 CT 值小于天根吸附柱法和天根磁珠法,说明

链霉亲和素磁珠在病毒滴度小时富集 RNA 的效率高。qRT-PCR 检测结果显示病毒滴度小时,链霉亲和素磁珠-生物素探针捕获法效率最高。推测链霉亲和素磁珠-生物素探针捕获法更利于纯化滴度小的病毒基因组。

3 讨论

本研究优化后的链霉亲和素磁珠-生物素探针捕获方法实现了低拷贝病毒 RNA 的高效富集。首先对链霉亲和素磁珠-生物素探针捕获法富集 RNA 的一些条件进行了优化,包括生物素探针和磁珠用量及 RNA 洗脱次数,得到在生物素探针浓度 12.5 μ M,磁珠的工作浓度 333.33 μ g/mL,合并 RNA 的两次洗脱液条件下链霉亲和素磁珠富集 RNA 的效率最优。使用最优条件富集的 RNA 对商用检测试剂盒与 qRT-PCR 检测 RNA

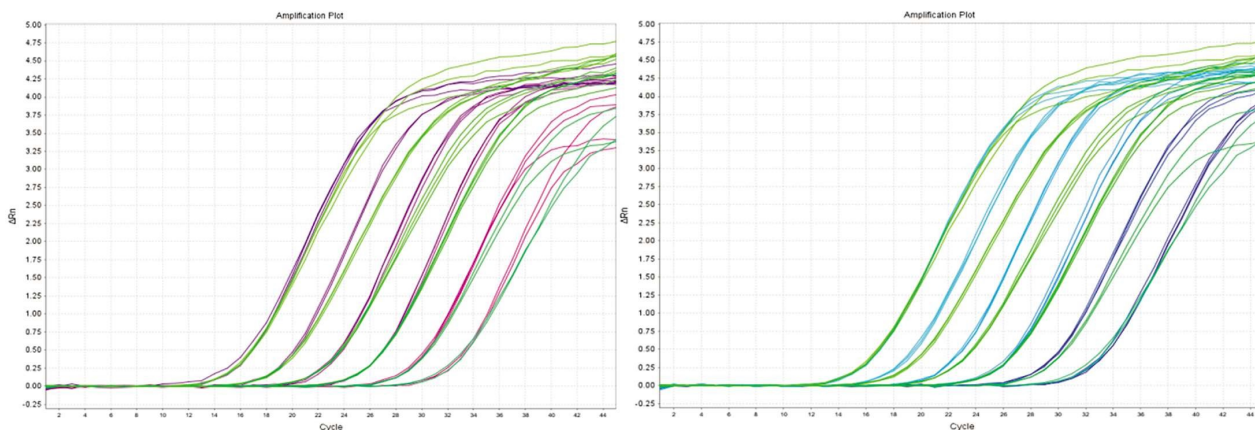


图 7 多重定量 PCR 和单重定量 PCR 检测 SARS-CoV-2 假病毒的比较

Fig.7 Comparison of multiple quantitative PCR and one primer quantitative PCR in the detection of SARS-CoV-2 pseudovirus

Note: In Fig.7, the left figure shows the comparison of double and single qPCR with *ORF1ab* gene (purple) as the reference, and the right figure shows the comparison of double and single qPCR with *N* gene as the reference.

表 2 3 种不同抽提 SARS-CoV-2 假病毒 RNA 方法的检测结果比较

Table 2 Comparison detection results of three methods for extracting SARS-CoV-2 pseudovirus RNA

Virus titercopies/mL	Streptavidin magnetic	TIANamp RNA Kit	TIANamp RNA Kit	CT1-CT2	CT1-CT3
	bead method	(SD101)	(DP438)		
	CT1	CT2	CT3		
10 ⁵	26.29695129	23.9995149	25.03576914	2.297436396	1.261182149
10 ⁴	29.28876686	27.90206591	29.65491168	1.386700948	-0.366144816
10 ³	32.97022756	31.46543248	33.23138936	1.504795074	-0.261161804
500	33.30329386	32.83163452	33.58368683	0.471659342	-0.280392965
100	33.57980601	36.00658417	35.5854187	-2.426778158	-2.005612691

方法进行比较,发现多重 TaqMan 探针检测的效果在病毒滴度小时,效率最高,可检测到 10 copies/ μ L。最后对商用 RNA 抽提试剂盒与本研究的链霉亲和素磁珠 - 生物素探针捕获法抽提 RNA 方法进行 qRT-PCR 检测结果比较,发现在病毒滴度小时,CT 平均差值更大,链霉亲和素磁珠 - 生物素探针捕获法富集 RNA 比商用试剂盒更高效。

目前正流行的由 SARS-CoV-2 病毒导致的新冠肺炎疫情强调了适当准备和应对的紧迫性^[23]。由于全球化,疫情大流行,给社会和卫生系统带来了负担^[24,25]。早期检测和隔离阳性患者是抑制人际传播和缓解疾病爆发的最有效方法^[26]。对于呼吸道病毒性疾病(如流感或 COVID-19),采集并测试咽拭子是否存在病毒 RNA。检测前的 RNA 有效分离是确保检测方法的高特异性和灵敏度的关键一步^[27]。He H 等人的研究表明整个样品制备和核酸分离过程可在 30 min 内完成^[21]。本研究优化后的链霉亲和素磁珠 - 生物素探针捕获法可在 30 min 左右实现低拷贝病毒 RNA 抽提,耗时接近。病毒 RNA 富集过程中 Carrier RNA 的加入提高了捕获效率,可能是 Carrier RNA 对低拷贝病毒核酸沉淀有良好的影响^[28]。目前没有相关的文献记载使用本研究的 Promega Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles 纯化病毒 RNA。Klein S 等人研究了 SiMAG-N-DNA magnetic beads 纯化 SARS-CoV-2 病毒 RNA 的高通量筛查^[29],作为商业 RNA 抽提试剂盒的补充。总体而言,商业试剂盒在发

生大流行病时无法提供足够的灵活性和可用性。因此,研究高效核酸分离方法是必要的。

目前 COVID-19 可用的诊断技术有病毒基因检测、人体抗体检测和病毒抗原检测,其中 qRT-PCR 病毒基因检测是最可靠的技术^[30]。对于磁珠提取的 RNA 样品,使用 CT 值检测限 40 来判断是否确定为阳性^[31]。为实现高效检测,Mdugama B 等人检测出 N 基因灵敏度 8.3 copies/ μ L^[20],本研究的检测灵敏度低于 10 copies/ μ L,灵敏度相近。虽然我们研究的假病毒能检测到低于 10 拷贝,但是临床样本咽拭子和鼻拭子的复杂性,包括一些酶的干扰,会影响检测限。qRT-PCR 实验包括一步检测和分步检测。一步检测将反转录和 PCR 放大整合到单个管中,从而使检测过程快速且可重复。然而,这种检测 RNA 的有效捕获和放大不显著。分步检测是反应按顺序在两个单独的管子中进行,因此比较耗时,但与一步检测相比,分步法更灵敏^[32]。qRT-PCR 是目前检测方法中的金标准^[33],但是此方法耗时长并需要昂贵的检测仪器。我们提出的低拷贝病毒 RNA 富集方案还需进一步优化满足临床样本阳性标准品的需要。后续尝试用此方案富集其他 RNA 病毒的核酸。COVID-19 的数据发展非常迅速,毫无疑问,随着更多研究的提供,本文的某些细节可能会发生变化。

参考文献 (References)

[1] Gao J, Quan L. Current Status of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2

- Infection and Future Developments: A Review [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e928552
- [2] Harrison A G, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis [J]. *Trends Immunol*, 2020, 41(12): 1100-1115
- [3] Hu B, Guo H, Zhou P, et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(3): 141-154
- [4] Wu S, Shi X, CHEN Q, et al. Comparative evaluation of six nucleic acid amplification kits for SARS-CoV-2 RNA detection[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2021, 20(1): 38
- [5] Rastogi M, Pandey N, Shukla A, et al. SARS coronavirus 2: from genome to infectome[J]. *Respir Res*, 2020, 21(1): 318
- [6] Ren J G, Li D Y, Wang C F, et al. Positive RT-PCR in urine from an asymptomatic patient with novel coronavirus 2019 infection: a case report[J]. *Infect Dis (Lond)*, 2020, 52(8): 571-574
- [7] Zhang J, Li K, Zheng L, et al. Improving Detection Efficiency of SARS-CoV-2 Nucleic Acid Testing [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 558472
- [8] Zhang Y, Wang C, Han M, et al. Discrimination of False Negative Results in RT-PCR Detection of SARS-CoV-2 RNAs in Clinical Specimens by Using an Internal Reference[J]. *Virol Sin*, 2020, 35(6): 758-767
- [9] Braunstein G D, Schwartz L, Hymel P, et al. False Positive Results With SARS-CoV-2 RT-PCR Tests and How to Evaluate a RT-PCR-Positive Test for the Possibility of a False Positive Result [J]. *J Occup Environ Med*, 2021, 63(3): e159-e62
- [10] Zhou Y, Pei F, Ji M, et al. Sensitivity evaluation of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) RT-PCR detection kits and strategy to reduce false negative[J]. *PLoS One*, 2020, 15(11): e0241469
- [11] Wikramaratna P S, Paton R S, Ghafari M, et al. Estimating the false-negative test probability of SARS-CoV-2 by RT-PCR [J]. *Euro Surveill*, 2020, 25(50): 2000568
- [12] Majumder J, Minko T. Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19[J]. *AAPS J*, 2021, 23(1): 14
- [13] Ji T, Liu Z, Wang G, et al. Detection of COVID-19: A review of the current literature and future perspectives [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 166: 112455
- [14] Butt A M, Siddique S, An X, et al. Development of a dual-gene loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection assay for SARS-CoV-2: a preliminary study[J]. *medRxiv* 2020.04.08.20056986
- [15] 申梁, 汪娇, 蓝佳明, 等. 基于逆转录环介导等温扩增技术的 SARS-CoV-2 检测方法的建立[J]. *国际病毒学杂志*, 2021, 28(03): 245-250
- [16] Broughton J P, Deng X, Yu G, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2[J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 870-874
- [17] 王彦贺. 基于 "消线法" CRISPR 侧向流层析试纸的新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 核酸检测技术研究[D]. 军事科学院, 2021
- [18] Haile S, Nikiforuk A M, Pandoh P K, et al. Optimization of magnetic bead-based nucleic acid extraction for SARS-CoV-2 testing using readily available reagents[J]. *Journal of Virological Methods*, 2022, 299: 114339
- [19] 张云丽, 王鑫, 邵玲, 等. 不同核酸提取方法 SARS-CoV-2 核酸检测性能比较[J]. *检验医学*, 2021, 36(05): 530-534
- [20] Mdugama B, Kadhiresan P, Kozlowski H N, et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(4): 3822-3835
- [21] He H, Li R, Chen Y, et al. Integrated DNA and RNA extraction using magnetic beads from viral pathogens causing acute respiratory infections[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 45199
- [22] Bai Y, Cui Y, Suo Y, et al. A Rapid Method for Detection of Salmonella in Milk Based on Extraction of mRNA Using Magnetic Capture Probes and RT-qPCR[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 770
- [23] Singh D, Yi S V. On the origin and evolution of SARS-CoV-2[J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53(4): 537-547
- [24] Muralidar S, Ambi S V, Sekaran S, et al. The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2 [J]. *Biochimie*, 2020, 179: 85-100
- [25] Mattioli I A, Hassan A, Oliveira O N, JR., et al. On the Challenges for the Diagnosis of SARS-CoV-2 Based on a Review of Current Methodologies[J]. *ACS Sens*, 2020, 5(12): 3655-3677
- [26] Aahirwar R, Gandhi S, Komal K, et al. Biochemical composition, transmission and diagnosis of SARS-CoV-2 [J]. *Biosci Rep*, 2021, 41(8): BSR20211238
- [27] Bordi L, Piralla A, Lalle E, et al. Rapid and sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA using the Simplexa COVID-19 direct assay [J]. *J Clin Virol*, 2020, 128: 104416
- [28] Ambrosi C, Prezioso C, Checconi P, et al. SARS-CoV-2: Comparative analysis of different RNA extraction methods [J]. *J Virol Methods*, 2021, 287: 114008
- [29] Klein S, Muller T G, Khalid D, et al. SARS-CoV-2 RNA Extraction Using Magnetic Beads for Rapid Large-Scale Testing by RT-qPCR and RT-LAMP[J]. *Viruses*, 2020, 12(8): 863
- [30] Yuce M, Filiztekin E, Ozkaya K G. COVID-19 diagnosis -A review of current methods[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 172: 112752
- [31] Sule W F, Oluwayelu D O. Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: challenges and prospects[J]. *Pan Afr Med J*, 2020, 35(Suppl 2): 121
- [32] Islam K U, Iqbal J. An Update on Molecular Diagnostics for COVID-19 [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 560616
- [33] Rahbari R, Moradi N, Abdi M. rRT-PCR for SARS-CoV-2: Analytical considerations[J]. *Clin Chim Acta*, 2021, 516: 1-7