

增强型荧光实时 PCR——高灵敏度 SARS 冠状病毒检测方法

于常海^{1,2,3△}, 刘乐庭^{1,2}, 刘 爽^{1,2}, 封燕芸^{1,2}, 汪沉然¹, 李卉丽¹, 王 辰³, 韩济生¹

(1. 北京大学神经科学研究所, 北京大学基础医学院神经生物学系, 教育部神经科学重点实验室, 北京 100083;
2. 香港基因晶片开发有限公司; 3. 国家防治 SARS 紧急科技行动小组)

[关键词] SARS 病毒; 聚合酶链反应; 诊断技术和方法

[中图分类号] R373.1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-167X(2006)02-0211-G3

严重急性呼吸综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS) 是由 SARS 冠状病毒 (SARS-coronavirus, SARS-CoV) 引起的传染性强、病死率高的疾病^[1-4]。其传播的主要途径是通过近距离呼吸道飞沫传播。目前, 对于 SARS 的致病机制和预防治疗正在研究中。SARS 发病的潜伏期约为 3 ~ 10 d。与其他病毒不同, SARS-CoV 在感染早期的患者体内病毒数量相对较少, 给疾病的早期诊断带来了困难。因此, 需要采用高灵敏度的方法检测才可能避免假阴性结果, 并能及时准确地发现疫情, 报告给政府协调部门, 尽早采取有效的防控措施。鉴于 SARS 给人类健康和社会经济带来的巨大危害, 准确有效地检测疑似人群和环境样本, 对于避免误诊、漏诊, 尽早采取隔离措施防止病毒传播, 以及制定正确的诊疗方案具有重要意义。灵敏、可靠、便捷的检测方法正是布好这第一道防线的重中之重。

1 SARS-CoV 的实验室检测方法

目前, SARS-CoV 的实验室诊断方法主要有 3 类: 血清学方法、病毒培养法和核酸检测法。血清学方法主要是通过酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 和免疫荧光法 (immunofluorescent assay, IFA)^[5] 检测病毒感染后患者体内产生的特异性抗体, 由于存在感染及产生抗体的窗口期, 因此难以对病毒感染进行早期诊断。病毒培养法能够检测活病毒, 而且灵敏度较高, 但操作过程费时, 对实验设备要求较高, 且具有一定的局限性, 如不能检测丧失感染能力或错误包装的病毒颗粒等。核酸检测法是目前实验室常用的检测方法之一, 主要是采用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 的方法对临床样本 (血液、尿、粪便、呼吸道分泌物、痰液、唾液和漱口液等) 的核酸提取物进行体外反转录, 经 PCR 扩增后, 进行定性与定量分析。

根据 SARS-CoV 的遗传信息, 科研人员已研究出若干基于 PCR 技术的 SARS-CoV 检测方法^[1,6-7]。其原理是针对 SARS-CoV 的基因组序列设计特异性引物, 对样本的核酸提

取物进行 PCR 扩增, 通过分析扩增产物判断是否感染病毒。由于其灵敏、快速、便捷的特点, 成为 SARS 爆发期间进行 SARS-CoV 感染最为快速和可行的诊断方法。与常规 PCR 相比, 巢式 PCR (nested PCR) 和荧光实时 PCR (real-time PCR, RT-PCR) 的灵敏度虽然在一定程度上有所提高, 但仍存在一定的局限性。特别是对于模板量极低的样本, 由于检测方法不够灵敏所导致的假阴性结果很可能造成漏诊、误诊, 造成病毒的肆意传播, 危害人类健康。因此, 亟待开发更高灵敏度的检测方法, 以准确、有效地发现感染病毒, 尽早扼制病毒传播^[8-10]。

2 增强型荧光实时 PCR——高灵敏度的 SARS-CoV 检测方法

本实验室从事基因检测研究多年, 在 SARS 流行期间积极参与了 SARS 的早期诊断研究。为克服常规 PCR 方法灵敏度不足的弱点, 我们特别针对 SARS-CoV 设计开发出一种更高灵敏度的新型荧光实时 PCR 技术, 命名为增强型荧光实时 PCR 技术 (enhanced real-time PCR, ERT-PCR)^[11,12], 灵敏度比 RT-PCR 方法高出 100 倍, 更比常规 PCR 高出 10⁷ 倍, 可显著提高 SARS-CoV 的检出率。

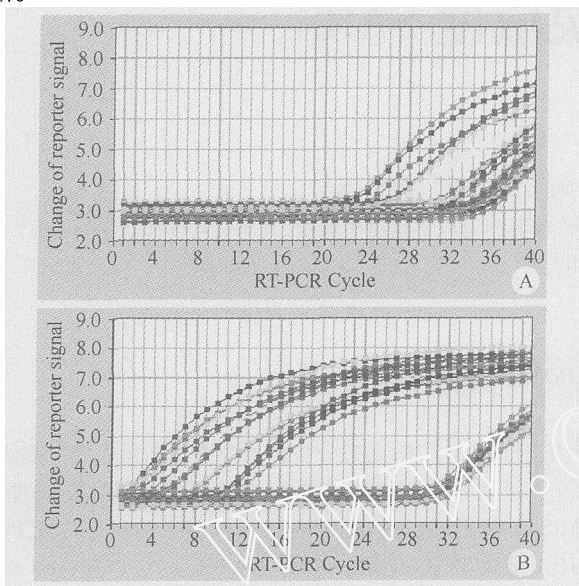
2.1 基本原理

ERT-PCR 技术是在结合常规 PCR 和 TaqMan[®] RT-PCR 技术的基础上开发出来的。该技术首先采用一对针对 SARS-CoV RNA 聚合酶基因的特异性引物对样本进行 PCR 扩增, PCR 产物经测序后证明与目的基因序列一致, 以确保扩增引物的特异性。然后以 PCR 产物为模板, 进行下一步的 TaqMan[®] RT-PCR, 并在反应的每一步中加入适当的阴性对照和阳性对照。分别采用 TaqMan[®] RT-PCR 和 ERT-PCR 对同一批临床病例进行检测, 结果如图 1 所示, 采用 TaqMan[®] RT-PCR 方法所得出的阴性和阳性曲线距离较近, 阳性结果 (偏左的 5 条曲线) 与阴性结果 (偏右的曲线群) 难以区分 (图 1A), 因此很难明确判断阳性和阴性结果; 而采用

基金项目: 国家自然科学基金 (30270426, 30470543) 和北京市自然科学基金 (7032026, 7051004) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270426, 30470543) and Beijing Natural Science Foundation (7032026, 7051004)

△ Corresponding author's e-mail, achy@bjmu.edu.cn

ERT-PCR 方法,所得出的阴性和阳性对照物曲线彼此区分得相当清楚(图 1B),对于模板含量较低的样本也容易进行判断。



The change of normalized reporter signals is calculated by normalizing the reporter signals with the fluorescent signals given by the passive reference. A, RT-PCR; B, ERT-PCR.

图 1 RT-PCR 和 ERT-PCR 扩增曲线图

Figure 1 Amplification curve of RT-PCR and ERT-PCR

2.2 特异性和灵敏度

对于传染性疾病,特别需要有灵敏度高且特异性强的检测方法,以减少假阳性和假阴性的出现,达到对疾病有效准确的诊断。ERT-PCR 正是这样一种有效的检测工具。

该方法的特异性强,采用 NCBI GenBank 数据库中的 BLAST 分析软件如 Blast, Blast 2 sequences^[13,14]对引物和探针进行同源性分析,结果显示,扩增引物和探针与其它序列特别是其它上呼吸道病原体没有明显的同源性。而且利用这些引物和探针对一些已知的单链 RNA 病毒进行扩增,如流感病毒(*Influenza*)、副黏性病毒(*paramyxovirus*)、副流感病毒(*parainfluenza*)、脊髓灰质炎病毒(*polio*),以及从病毒培养中分离出的生物,包括 A 型流感病毒(*Influenza A*)、腺病毒(*adenovirus*)、副流感病毒 3 型(*parainfluenza 3*)、呼吸道融合病毒(*respiratory syncytial virus*)、单纯疱疹病毒 1 型(*herpes simplex virus 1*),结果并未检测到扩增产物,说明该扩增引物是高度特异的^[11]。

将已知浓度($2 \times 10^{2.5}$ TCID₅₀/mL)的样本稀释 10^{15} 倍至浓度为 $2 \times 10^{-12.5}$ TCID₅₀/mL 后,采用该方法仍能准确检出 SARS-CoV,而常规 PCR 方法和 RT-PCR 的检测下限仅为 $2 \times 10^{-5.5}$ TCID₅₀/mL 和 $2 \times 10^{-10.5}$ TCID₅₀/mL。

2.3 临床应用

对 120 例香港收治的 SARS 疑似病例进行检测,结果显示,采用 ERT-PCR 技术检出的阳性率均高于 RT-PCR 和常规 PCR 以及病毒培养法^[11]。说明 ERT-PCR 技术是一种快速、灵敏、准确的诊断方法。由于抗体的产生需要时间,因此在病毒感染早期不能使用血清学方法进行检测,而此时

ERT-PCR 技术则可顺利检测出样本中的 SARS-CoV。特别是对于感染早期病毒载量极低的情况下,ERT-PCR 技术也可准确判断样本中是否含有 SARS-CoV。因此,采用该技术可在疾病的极早期明确判断是否感染病毒,缩短诊断时间,为治疗疾病以及控制病毒扩散争取更多的时间。在 SARS 流行期间,应用 ERT-PCR 技术对北京多家医院收取的临床样本检测,得到了很好的结果,充分验证了该方法的灵敏度、特异性和可行性。

此外,我们还利用 ERT-PCR 对 5 例已经康复的 SARS 患者进行跟踪监测。结果表明,患者在感染后的第 6~9 周内虽然 SARS 病征已经消失,但仍然能够检测到 SARS-CoV 的存在^[15]。提示这些残留在患者体内的 SARS-CoV 很可能成为导致疫情再次爆发的传染源。而这些残余的病毒由于含量低,很容易被忽略。因此,采用高灵敏度的检测方法进行跟踪监测,以避免携带者将病毒传播到健康人群,导致 SARS 再次爆发,是极为必要和重要的。

3 小结与展望

核酸扩增技术特异性强、灵敏度高、操作简便易行,是目前实验室常用检测方法之一。基于 PCR 的 SARS-CoV 检测方法很多,但在病毒载量较低的情况下,检测方法的灵敏度就成为快速诊断、有效控制病毒扩散的关键因素。由于 SARS 的临床症状非常不稳定^[16],与普通肺炎不易区分,而且某些患者体内的病毒载量较低,使用普通方法不易检测。因此,开发并应用可靠的高灵敏度检测手段不仅可以有效检测病毒、判断疫情,而且可以广泛应用到一线的医疗工作者及环境的监测。

但是,灵敏度高的检测手段同时常常会伴随假阳性的出现,因此在分析检测结果的时候,应注意多种方法的有机结合,以得出准确的诊断结果^[12]。不言而喻,将没有经过严格证实的阳性结果报告出来,造成公众恐慌,影响社会安定,其损失是极其严重的。

目前对于 SARS 的研究主要集中在疫苗和抗 SARS 药物的开发,而忽略了“第一道防线”——检测监测技术的巩固和加强。ERT-PCR 方法的建立已为我们展开了一个新的简便易行且高度敏感的技术平台,成为对付有可能卷土重来的 SARS 疫情的强有力武器。其高度灵敏的特点使该项技术不仅仅局限于 SARS-CoV 的检测,对于其他传染性疾病的检测,环境监测,药物开发以及基础研究都具有广泛的应用价值^[17,18]。

[志谢: 特别感谢黄乾亨基金会,新世纪论坛,黄英豪先生,于品海先生的基金资助。感谢中国数码信息有限公司。感谢香港特区政府工商及科技局创新科技署生物科技总监彭慧冰博士及新世纪论坛马逢国议员和蓝鸿震先生对本研究的支持。感谢卫生部和科技部国家疾病预防控制中心 SARS 行动小组(北京)的协助。感谢香港中文大学威尔士亲王医院微生物科谈兆麟、陈基湘为本研究提供一些样本。]

参考文献

- [1] Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348: 1967-1976.
- [2] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus

- associated with severe acute respiratory syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348: 1953-1966.
- [3] Peiris JS, Lai ST, Poon LL, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome [J]. *Lancet*, 2003, 361: 1319-1325.
- [4] Lee N, Hui D, Wu A, et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348: 1986-1994.
- [5] Stohr K. A multicentre collaboration to investigate the cause of severe acute respiratory syndrome [J]. *Lancet*, 2003, 360: 1730-1733.
- [6] Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome [J]. *Science*, 2003, 300: 1394-1399.
- [7] Marra MA, Jones SJ, Astell CR, et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus [J]. *Science*, 2003, 300: 1399-1404.
- [8] Patrick DM. The race to outpace severe acute respiratory syndrome (SARS) [J]. *CMAJ*, 2003, 168: 1265-1266.
- [9] Falsey AR, Walsh EE. Novel coronavirus and severe acute respiratory syndrome [J]. *Lancet*, 2003, 361: 1312-1313.
- [10] McIntosh K. The SARS coronavirus; rapid diagnosis in the limelight [J]. *Clin Chem*, 2003, 49: 845-846.
- [11] Lau LT, Fung YW, Wong FP, et al. A real-time PCR for SARS-coronavirus incorporating target gene pre-amplification [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312: 1290-1296.
- [12] Yu AC. The difficulties of testing for SARS [J]. *Science*, 2004, 303: 468-469.
- [13] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 3389-3402.
- [14] Tatusova TA, Madden TL. Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences [J]. *FEMS Microbiol Lett*. 1999, 174: 247-250.
- [15] Fung YW, Lau LT, Wong PF, et al. Use of clinical criteria and molecular diagnosis to more effectively monitor patients recovering after severe acute respiratory syndrome coronavirus infection [J]. *CID*, 2004, 39: 604-606.
- [16] La Montagne JR, Simonsen L, Taylor RJ, et al. Severe acute respiratory syndrome: developing a research response [J]. *J Infect Dis*, 2004, 189: 634-641.
- [17] Fung YW, Lau LT, Yu AC. The necessity of molecular diagnostics for avian flu [J]. *Nat Biotech*, 2004, 22: 267.
- [18] Yu AC, Lau LT, Fung WY. Boosting the sensitivity of real-time PCR SARS detection by simultaneous reverse transcription and target gene pre-amplification [J]. *New Eng J Med*, 2004, 350: 1577-1579.

(2005-08-11 收稿)
(本文编辑:刘淑萍)

Enhanced-real time PCR: A highly sensitive method for SARS-coronavirus detection

YU Chang-hai^{1,2,3,Δ}, LIU Le-ting^{1,2}, LIU Shuang^{1,2}, FENG Yan-yun^{1,2}, WANG Chen-ran¹, LI Hui-li¹, WANG Chen³, HAN Ji-sheng¹

(1. Neuroscience Research Institute, Peking University; Department of Neurobiology, School of Basic Medicine, Peking University; Key Laboratory for Neuroscience of the Ministry of Education, Beijing 100083, China; 2. Hong Kong DNA Chips Limited; 3. National Emergency Action on SARS Research [Beijing Group])

SUMMARY An enhanced real-time polymerase chain reaction (ERT-PCR) assay to detect the coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome (SARS-Cov) has been designed for detection of SARS-Cov with high sensitivity and easy-to-interpret results, in which a target gene pre-amplification step preceded TaqMan real-time fluorescent PCR. The limit of detection of the ERT-PCR method was 10^{-2} higher than the standard real-time PCR assay and 10^{-7} higher than conventional PCR methods. The increased sensitivity of the assay would have major benefits in screening suspected SARS patients rapidly and efficiently and may help control the spread of SARS and other infectious diseases during future outbreak.

KEY WORDS SARS virus; Polymerase chain reaction; Diagnostic techniques and procedures

· 消息 ·

北京大学分子医学研究所心力衰竭机制研究获得新进展

北京大学分子医学研究所程和平实验室与美国马里兰大学合作者在美国《国家科学院院报》(*PNAS*, 2006, 103: 4305-4305.)上报道了有关心力衰竭疾病钙信号转导研究方面的最新成果,该成果对认识心脏疾病机制具有重要意义。

人类心脏搏动受细胞内钙信号如“钙火花”所调控。该实验室在自发性高血压大鼠心力衰竭模型中发现,心脏肌肉细胞中横管系统(一种亚细胞结构)呈现无序化,造成钙信号分子间错位和脱耦联,表现为耦联成份的钙信号减弱,并伴随有不同步的脱耦联钙信号。这一新发现解释了临床上心力衰竭心脏的“钙悖论”现象,即心脏心力衰竭同时兼具收缩力下降的缺钙表征,以及钙依赖性心律失常的钙超载表征。这一发现对于认识心脏疾病病理机制,从而有效地预防和治疗心力衰竭具有重要意义。

1993年,当时旅美学者程和平与合作者在心肌细胞中首次发现心脏亚细胞信号“钙火花”,随后证明钙火花广泛存在于多种细胞体系中,这是细胞钙信号转导领域最为重要的发现之一,该项成果的原始论文被誉为一百多年以来10篇最杰出的心肌研究论文之一。2005年8月23日*PNAS*又刊登北京大学分子医学研究所程和平教授、周专教授和北京大学医学部王宪教授等关于神经元钙火花的存在及生理功能的研究论文,这是他们在北京大学独立完成的重要研究成果。程和平教授最近已经辞去美国国家卫生研究院(NIH)资深研究员终身职位,到北京大学分子医学研究所主持钙信号转导实验室工作。

(北京大学分子医学研究所)