

实验三

新冠假病毒核酸提取与等温扩增检测

一、实验目的

1. 了解新冠病毒的生物学特征与防控措施。
2. 熟悉 Trizol 法提取 RNA 的基本原理与步骤。
3. 掌握等温扩增检测的操作步骤及注意事项。

二、实验设计与原理

严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型 (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2, SARS-CoV-2), 简称新冠病毒, 其遗传物质为核糖核酸 (RNA)。Trizol 法是提取组织中总 RNA 的经典方法。Trizol 试剂的主要成分是苯酚, 其作用是裂解细胞, 使细胞中的蛋白质和核酸物质解聚并释放。同时, 在细胞裂解的过程中, Trizol 试剂能保持 RNA 的完整性。待细胞裂解完全后加入氯仿 (又称三氯甲烷) 混匀, 离心后样品可分成水相和有机相。其中, RNA 存在于水相中。收集离心后样品的上层水相, 可通过异丙醇沉淀的方法来提纯水相中的 RNA。Trizol 法对动物、植物、细菌、血液、细胞培养液等提取 RNA 都适用, 且可同时处理大量样品。该方法裂解反应迅速, 提取的 RNA 没有 DNA 和蛋白质污染。但是, Trizol 法提取 RNA 过程中需进行多步低温高速离心, 且 RNA 干燥步骤不易操作, 易造成提取失败。

磁珠具有表面积大、表面负载量大、超顺磁性等特点。经特殊修饰的磁珠可与核酸高效结合, 并且通过磁场控制可快速聚集或分散, 从而使核酸的纯化和分离变得简单快速。磁珠法具有操作简单、速度快且提取的核酸纯度高优势, 可以有效弥补 Trizol 法的不足。适于核酸提取的磁珠应当具有核酸吸附性能好、磁响应时间短、稳定性高、悬浮性好等基本特性。本实验使用粒径约 $1\ \mu\text{m}$ 的硅羟基磁珠, 该磁珠与核酸具有较强的结合能力。由于磁珠的粒径通常与磁响应速度和半沉降速度密切相关, 粒径约 $1\ \mu\text{m}$ 的磁珠磁含量适中, 在控制磁响应时间 (30 s 内) 和半沉降时间 (3 min 以上) 方面具有良好的综合性能。

由新冠病毒感染引起的新型冠状病毒肺炎属于乙类传染病, 该病的传染性强、传播速度快, 按照乙类传染病进行管理。直接使用病毒株进行研究, 一般需要实验室生物安全级别达到 P3 级, 因此科研人员通常使用新冠假病毒进行实验。新冠假病毒包含新冠病毒核酸检测所需靶基因序列, 安全性高, 可作为新冠病毒核酸提取及检测的质控品。

等温扩增技术可在单一温度下进行反应, 不需要热循环仪, 在现场快速检测和临床

诊断方面具有广阔的应用前景。基于核酸的检测方法通常需要靶向目标序列中特异且保守的区域进行扩增。具有高突变率的传染性病原体很难找到稳定的长片段序列并进行引物设计，限制了大多数核酸检测方法的适用性。链交换等温扩增方法使用常规引物，该方法基于 *Bst* DNA 聚合酶的作用，并且可高效扩增目标短序列。同时，由于 *Bst* DNA 聚合酶兼具链置换活性和反转录活性，因此链交换等温扩增方法可实现对 RNA 靶标的高效扩增。

针对新冠病毒核酸为 RNA 且突变率高的特点，本实验使用基于荧光免疫层析的三引物增强链交换等温扩增方法以实现 SARS-CoV-2 快速检测，如图 3.1 所示。根据 *ORF1ab* 和 *N* 基因的特异性保守区域分别设计三条扩增引物以实现病毒 RNA 高效扩增。*ORF1ab* 和 *N* 基因扩增反应可在相同条件下进行。扩增反应结束后，向反应管中加入运行缓冲液，混匀后滴加到试纸条上。使用荧光定量分析仪 Nanoeasy 1700 可以快速读取检测线（Test-line, T 线）和质控线（Control-line, C 线）的荧光信号值。

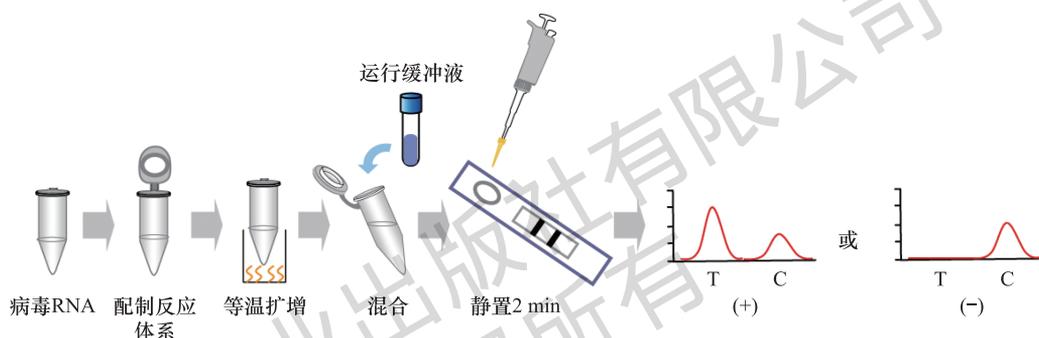


图 3.1 新冠假病毒等温扩增检测流程

三、实验材料与仪器

1. 材料试剂

新冠假病毒，新冠病毒核酸标准物质（高浓度）（中国计量科学研究院），硅羟基磁珠（南京东纳生物科技有限公司），等温扩增引物（南京东纳生物科技有限公司），*Bst* 3.0 DNA 聚合酶 [New England Biolabs (Beijing)]，WarmStart RTx [New England Biolabs (北京)]，dNTPs（10 mmol/L 每个），Trizol 试剂，氯仿，异丙醇，无水乙醇，无酶水，荧光定量试纸条（南京东纳生物科技有限公司），离心管。

2. 实验仪器

恒温孵育设备或基因扩增仪，超微量分光光度计，高速离心机，漩涡混合器，微型离心机，磁分离架，荧光定量分析仪 Nanoeasy 1700（南京东纳生物科技有限公司）。

四、实验步骤

1. 新冠假病毒核酸提取

本实验新冠假病毒核酸提取流程如图 3.2 所示。新冠假病毒核酸提取具体操作步骤如下。

(1) 取 500 μ L 新冠假病毒加入装有 500 μ L Trizol 试剂的 1.5 mL 离心管中，充分振荡混匀，室温下静置 5 min。

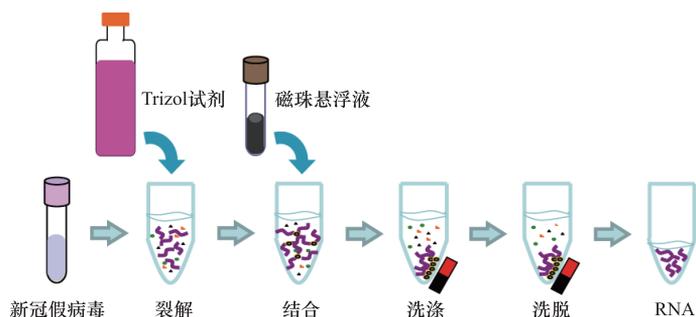


图 3.2 本实验新冠假病毒核酸提取流程

- (2) 加入 200 μL 氯仿，剧烈振荡 15 s，室温下静置 3 min。
- (3) 12000 r/min 离心 5 min，小心吸取上清液移至 1.5 mL 离心管中（注意不要吸取中间絮状薄层）。
- (4) 加入 30 μL 异丙醇和 30 μL 磁珠悬浮液，上下轻柔振荡 3 min，室温下静置 3 min。
- (5) 将离心管置于磁分离架上 1 min，待磁珠完全吸附后，小心吸除液体。
- (6) 将离心管从磁分离架上取下，加入 1 mL 70% 乙醇溶液，上下振荡 30 s。
- (7) 将离心管置于磁分离架上 1 min，待磁珠完全吸附后，小心吸除液体。
- (8) 重复步骤（6）～（7）一次。
- (9) 保持离心管置于磁分离架上，吸尽残余液体，室温放置 5 min。
- (10) 从磁分离架上取下离心管，加入 50 ~ 100 μL 无酶水，56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min，期间振荡混匀 4 ~ 5 次以充分洗脱 RNA（注意不可剧烈振荡）。
- (11) 将离心管放置于磁分离架上 1 min，待磁珠完全吸附后，小心将 RNA 溶液转移至新的无酶管中。
- (12) 取 1.5 μL RNA 溶液测定浓度和纯度，其余保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用（长期保存需放置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ ）。

2. 等温扩增检测

- (1) 新冠病毒 *ORF1ab* 和 *N* 基因等温扩增反应体系如表 3.1 所示。

表 3.1 等温扩增反应体系

组 分	20 μL 反应体系
10 \times isothermal amplification buffer	2 μL
10 mmol/L dNTPs	2 μL
100 mmol/L MgSO ₄	1.2 μL
引物 F	1.5 μL
引物 R	2 μL
引物 En-R	2 μL
<i>Bst</i> 3.0 DNA 聚合酶	0.8 μL
WarmStart RTx	0.4 μL
RNA 模板	3 μL
去离子水	补充至 20 μL

(2) 将(1)中反应体系配制于微型反应管(200 μL型)中,同时设置阳性对照组(新冠病毒核酸标准物质)和阴性对照组(无酶水)。

(3) 等温扩增反应条件:将反应体系混匀后瞬时离心,60℃恒温反应55~60 min。

(4) 取出反应管,每管加入90 μL运行缓冲液,涡旋振荡5 s。

(5) 将混合液全部吸出,滴入试纸条加样口中,室温静置2 min。

(6) 将试纸条插入荧光定量分析仪Nanoeasy 1700,记录T线和C线的荧光信号值。

3. 实验数据记录

实验数据记录表如表3.2所示。

表 3.2 实验数据记录表

检测基因	样本名称	提取的RNA信息(可选内容)			荧光信号值	
		浓度/(ng/μL)	A260/A280	A260/A230	T	C
<i>ORF1ab</i>						
<i>N</i>						

4. Cutoff 值计算

取一定数量(≥10)的阴性样本(不含新冠病毒的咽拭子或唾液样本)提取核酸后,按照表3.1分别配制*ORF1ab*和*N*基因等温扩增反应体系。扩增及检测完成后,记录T线和C线荧光信号值。其中,C线信号值大于0时的T线信号值为有效值。

Cutoff值的计算公式为

$$\text{Cutoff 值} = \text{阴性样本 T 线平均值} + 3 \text{ 倍标准差 (SD)} \quad (3-1)$$

五、实验结果与数据处理

本实验结果与数据处理如表3.3所示。

表 3.3 检测结果与判断

检测基因	C线荧光信号值	T线荧光信号值	结果判断
<i>ORF1ab</i> 和 <i>N</i>	>0	≥ Cutoff 值	阳性
		< Cutoff 值	阴性
	无信号	本次检测无效,建议重新测试	

检测结果判定。当待测样本*ORF1ab*和*N*基因的检测结果均为阳性时,判定为阳性;当待测样本*ORF1ab*和*N*基因的检测结果均为阴性时,判定为阴性;当待测样本*ORF1ab*和*N*基因中只有1个基因检测结果为阳性时,判定为可疑,建议重新采样检测。

六、注意事项

1. 实验需在生物安全柜中进行,整个过程要穿好实验服并规范佩戴口罩和一次性乳胶手套,严格做好个人防护。

2. 涉及RNA提取和扩增的相关耗材需进行RNAase灭活处理(如浸泡于0.1%浓度的DEPC水中1 h以上,高压灭菌20~25 min)或直接使用商品化无菌无酶耗材。

3. Trizol 试剂和氯仿加入离心管后, 应注意保证离心管密闭, 防止振荡时到处滴洒。
4. 新冠假病毒和新冠病毒核酸标准物质应即用即取, 防止 RNA 过快降解。

七、思考习题

1. 本实验提取 RNA 的步骤中磁珠的作用是什么?
2. 新冠病毒检测常用的方法是什么, 与本实验方法相比有哪些异同?
3. 常用的等温扩增方法还有哪些, 试列举 3 个并简述各方法的优缺点。

延伸阅读

严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型 (SARS-CoV-2) 是 2019 年爆发的新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的致病性病原体。该病毒自被发现以来, 已波及全球 231 个国家和地区, 给人类造成了难以估量的社会和经济损失。流行病学调查结果表明, 新型冠状病毒具有很强的人对人和环境对人的传播能力, 可通过飞沫、接触或气体传播。

快速精准的检测对于防止新型冠状病毒传播至关重要。病毒核酸检测 (Nucleic Acid-based Tests, NAT)、CT 成像和免疫学检测是临床诊断 SARS-CoV-2 感染的主要手段。其中, 应用最广泛的检测方法是实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 技术。但是, qPCR 技术需要精密的仪器、昂贵的试剂及训练有素的实验人员, 并且耗时相对较长 (1.5 ~ 2.5 h)。上述这些问题都限制了 qPCR 在现场即时检测 (Point-Of-Care Testing, POCT) 场景中的应用, 尤其是在资源条件相对有限的实验室或检测平台。因此, 迫切需要一种简单、快速且灵敏的等温扩增方法以满足 SARS-CoV-2 的快速需求, 该方法需要与 PCR 法类似, 且与其他紧密相关的人类致病性冠状病毒, 如中东呼吸综合征病毒 (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS-CoV)、严重急性呼吸综合征冠状病毒 (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus, SARS-CoV) 等产生交叉反应性。

链交换扩增技术是 2016 年报道的一种新型等温扩增技术, 与环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal AMPLification, LAMP) 需要 2 ~ 3 对引物 (靶向 6 ~ 8 个区域) 不同, 链交换等温扩增技术仅需一对常规引物即可在 *Bst* DNA 聚合酶作用下实现对靶序列的高效稳定扩增。同时, 该方法适用于短片段 (小于 125 nt) 的扩增, 具有用时短、特异性高、适用范围广等的优点。众所周知, 核酸的检测方法需要对靶标上独特且保守的序列进行扩增。然而, 具有高突变率的传染性病原体 (如流感病毒) 很难找到稳定的长序列进行引物设计, 这极大地限制了大多数核酸检测方法的使用。链交换等温扩增使用一对常规引物即可高效扩增短序列靶标, 弥补了现有核酸检测方法在检测具有高突变率的传染性病原体方面的短板, 在现场快速筛查病原微生物及临床检测等方面具有重要的应用潜力。

为了实现对高突变率的 SARS-CoV-2 的现场即时检测, 本实验编写人员曾建立并验证了一种基于荧光免疫层析的三引物增强链交换等温扩增 (Tri-primer-enhanced Strand Exchange Amplification, TSEA) 方法。该方法基于编码病毒 RNA 依赖性的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA Polymerase, *RdRP*) 和核衣壳蛋白 (Nucleocapsid protein, *N*)

基因的特异性保守区域，并分别设计链交换扩增引物。其中，*RdRP* 基因位于编码多肽 *ORF1ab* 的基因片段上，因此检测 *RdRP* 基因同时也可检测 *ORF1ab* 基因。在此基础上，为了更高效地扩增新冠病毒 RNA，可以添加增强逆转录引物以有效提高扩增反应效率。同时，*Bst* 3.0 DNA 聚合酶和 WarmStart RTx 协同使用提高了反应的稳定性和特异性。通过反应体系和反应条件的优化，两个靶基因的扩增可在相同条件下进行。为了提高荧光免疫层析方法对荧光信号传感的敏感性，可以利用功能荧光微球作为信号放大探针。使用荧光定量分析仪 Nanoeasy 1700 可以快速对扩增产物进行数字化定量，且无假阳性或假阴性的结果。核酸检测可在 1 h 内完成。更重要的是，未来可根据新型冠状病毒的变异情况灵活调整引物设计以适应检测需求，具有重要的潜在应用价值。

回顾抗击新冠期间，面对突如其来的疫情，科学家们积极投身科技抗疫、砥砺创新建功，把论文写在抗击疫情的第一线，把研究成果应用到抗疫实践中。疫情发生后，以钟南山院士为组长的专家组临危受命，开展实地考察并及时提出防控救治方案，为党中央决策提供了可靠依据。陈薇院士率领团队攻坚克难，研制出国内第一个正式进入临床试验的疫苗。张伯礼院士力推中医药尽早介入、全程参与病人救治，造就了中医国家队进驻的江夏方舱医院所有病人零转重、零复阳，医护人员零感染的奇迹。还有许多科技工作者在新冠疫情期间展现出了非凡的创新精神，他们通过科研和实验，为疫情的防控和治疗提供了重要的理论和技术支持。此外，众多企业在疫情期间展现出了卓越的企业家精神。例如，在医疗设备短缺的情况下，一些企业主动转型生产口罩、防护服等紧急物资，为疫情防控提供了坚实的支持。科学家和企业家们展现了不屈不挠、敢于创新、勇于担当的共同精神风貌。

参考资料

