

新型冠状病毒2019-nCoV核酸检测试剂盒 (荧光PCR法) 检测原理及检测流程介绍

聂喜芳

内容

content

1

检测原理介绍

2

样本接收流程

3

实验流程要点及结果判读

4

实验室清洁及个人防护

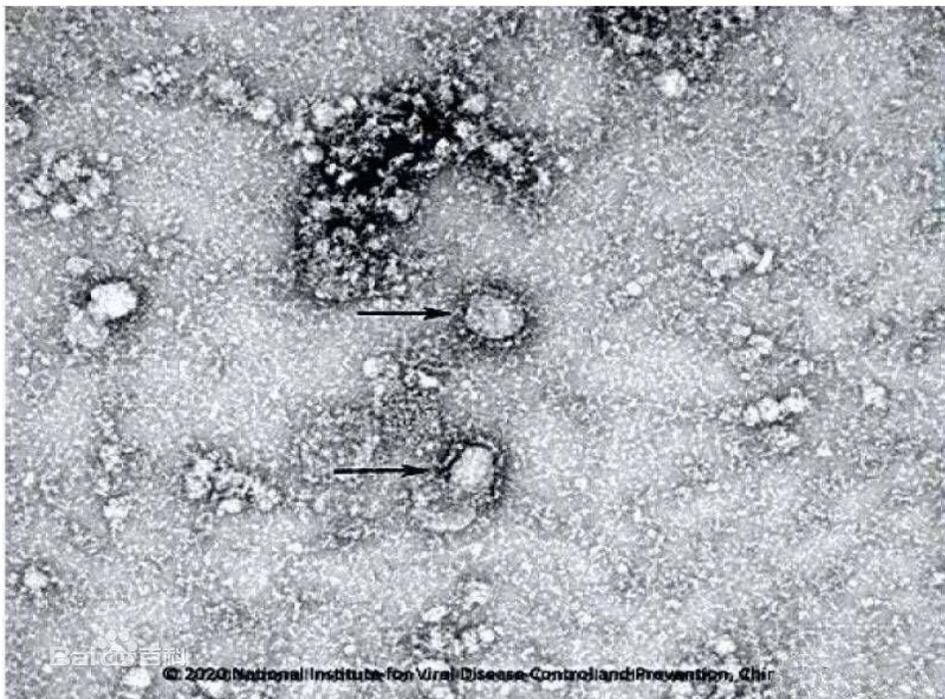
内容

content

检测原理介绍

新型冠状病毒介绍

新型冠状病毒属于 β 属的冠状病毒，基因特征与 SARSr-CoV 和 MERSr-CoV 有明显区别。病毒对紫外线和热敏感， 56°C 30 分钟、乙醚、75%乙醇、含氯消毒剂、过氧乙酸和氯仿等脂溶剂均可有效灭活病毒。基于目前的流行病学调查和研究结果，潜伏期为1-14天，多为3-7天；传染源主要是新型冠状病毒感染的患者，无症状感染者也可能成为传染源；主要传播途径为经呼吸道飞沫和接触传播，气溶胶和粪一口等传播途径尚待明确；人群普遍易感。

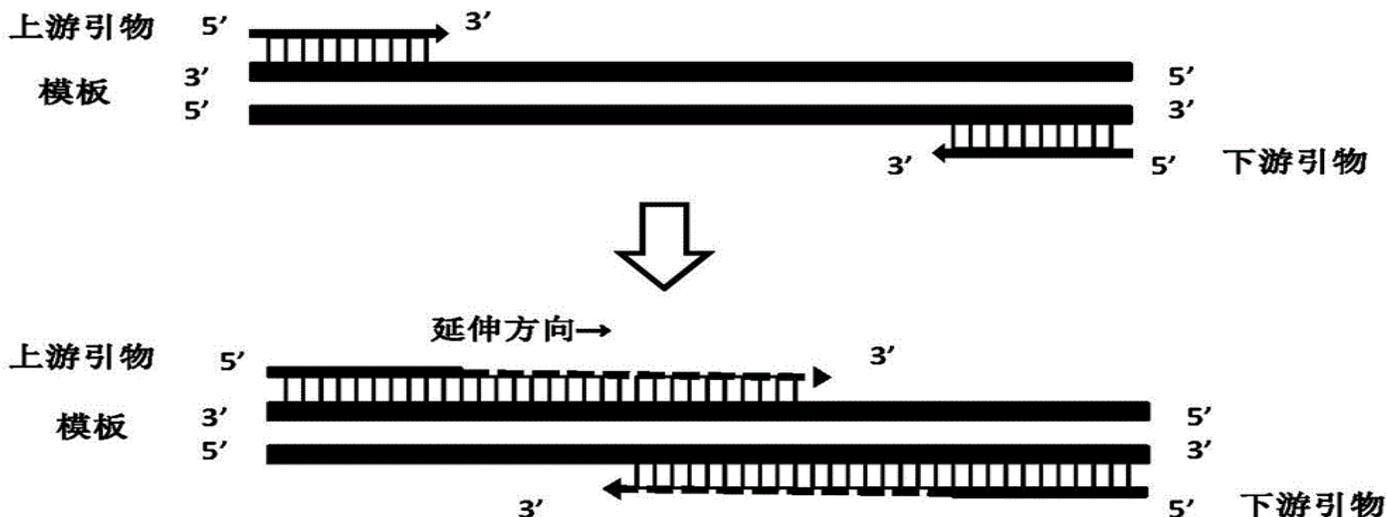


2019新型冠状病毒核酸类型为RNA，基因组大小约为29.8Kbp。国家卫健委发布的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案（试行第四版）》中提到，确诊病例需要有以下病原学证据之一：

1. 呼吸道标本或血液标本等**实时荧光 RT-PCR** 检测新型冠状病毒核酸阳性；
2. 呼吸道标本或血液标本等病毒基因测序，与已知的新型冠状病毒高度同源。

荧光PCR：一种实时监控目的基因PCR扩增的技术

- ◆ 荧光PCR反应基本成分(核酸模板、引物、dNTPs、探针、PCR buffer、聚合酶等)
- ◆ 与传统PCR相同需要经过变性、退火、延伸三个阶段，反应在温度模块里循环进行：
 - > 核酸模板**变性**
 - > 引物、探针与模板**退火**
 - > 引物**延伸** → 新的扩增片段



- ◆ 2019新型冠状病毒是一种RNA病毒，在荧光PCR的反应过程中，需要一步RT-PCR（逆转录-PCR），将RNA逆转录为cDNA。

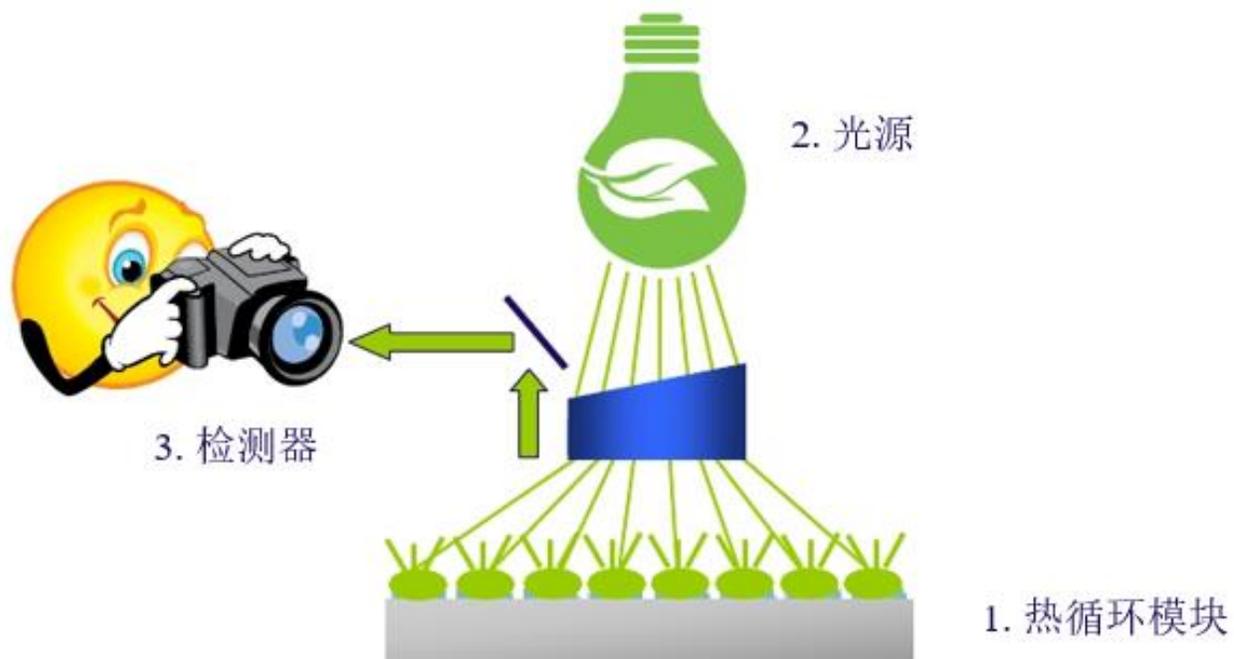
荧光PCR：关键环节引物及探针设计

根据已发布的2019-nCoV全基因组序列，发现基因组水平上其与多种冠状病毒的同源性高达80%以上，需要寻找2019新型冠状病毒的特异区域用于引物和探针设计。通过序列比对寻找某段区域具有2019新型冠状病毒高度特异性，可以特异鉴别2019新型冠状病毒，在此区域设计特异引物和探针用于2019新型冠状病毒鉴定。



荧光PCR：一种实时监控目的基因PCR扩增的技术

- ◆ 不同于常规PCR的是，在荧光PCR中往往加入**探针或染料**用于信号捕获，同时需要不同常规PCR仪的QPCR仪。



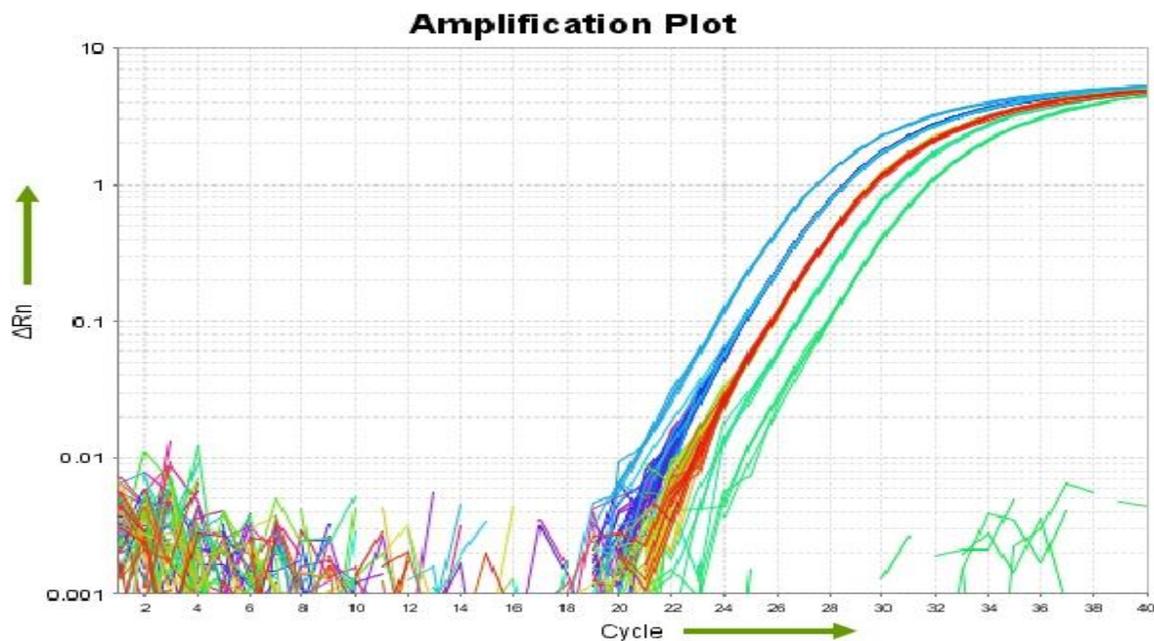
热循环模块、光源、检测器是所有QPCR仪的标配

荧光PCR：一种实时监控目的基因PCR扩增的技术

- ◆ 每个扩增循环结束后，QPCR仪通过不同的滤光片记录荧光信号的增加；通过QPCR软件计算Ct值，用于检测结果分析。



随着PCR扩增循环数的增加，荧光信号被放大



QPCR仪软件计算Ct值

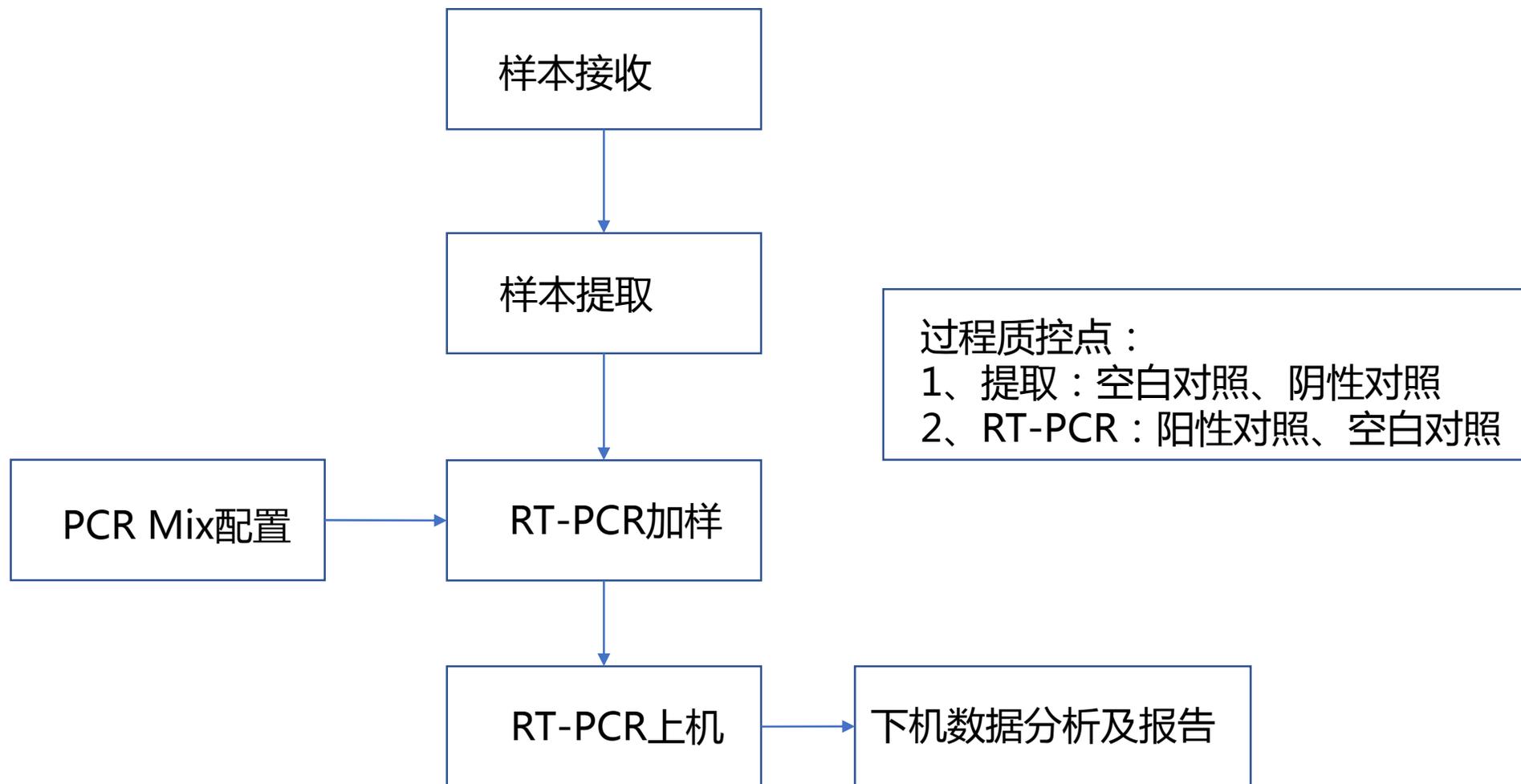
内容

content

实验流程

- ◆ 样本接收
- ◆ 实验流程要点及结果判读
- ◆ 实验室清洁及个人防护

实验流程图



内容

content

样本接收

- 样本接收
- 样本整理
- 异常处理

样本的接收



专用病原样本接收室



快递箱上喷洒75%酒精

拆包

03

华大基因
BGI

文件编号: TJ-R-SMM-007
版本号: A5

签收日期: 2020-01-29

登记人、拆包人确认签字:

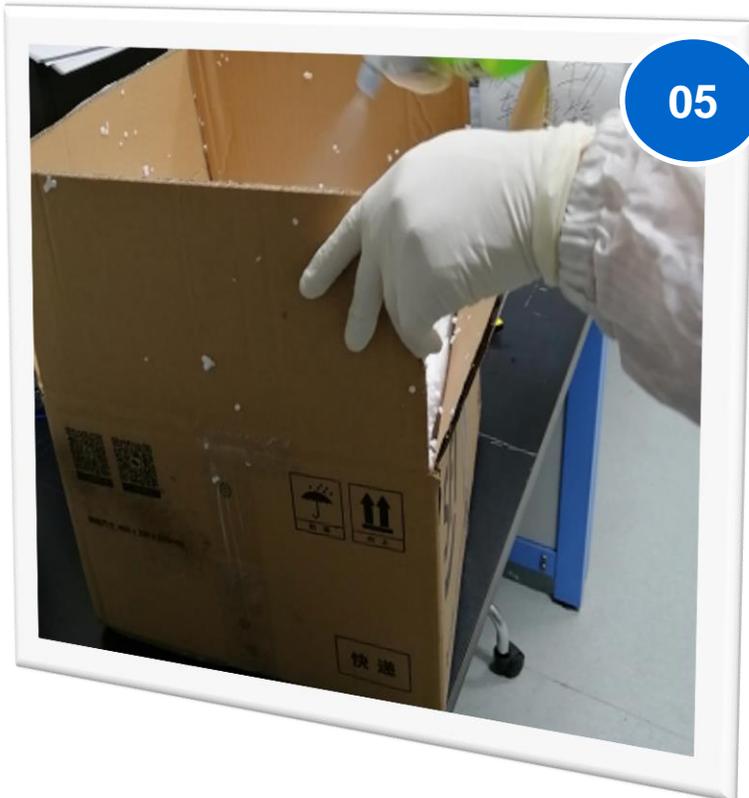
快递到达点钟	快递公司	快递单号	快递外观	内部单号	运输条件
9:00	顺丰	[REDACTED]	合格	[REDACTED] 011	常温

登记快递接收信息：包含样本接收日期、快递公司、快递单号、快递外观、内部单号相关信息



用壁纸刀打开快递外包装箱

拆包



打开快递箱，首先喷洒75%酒精



将样本放置到病原样本专用箱

注意事项：1、拆包环节动作尽量轻缓，避免大幅度动作
2、外包装箱以及填充物进行紫外消毒

样本整理—生物安全柜中操作



垃圾桶套上双层垃圾袋
(外层为医疗垃圾袋，内层为密封袋)



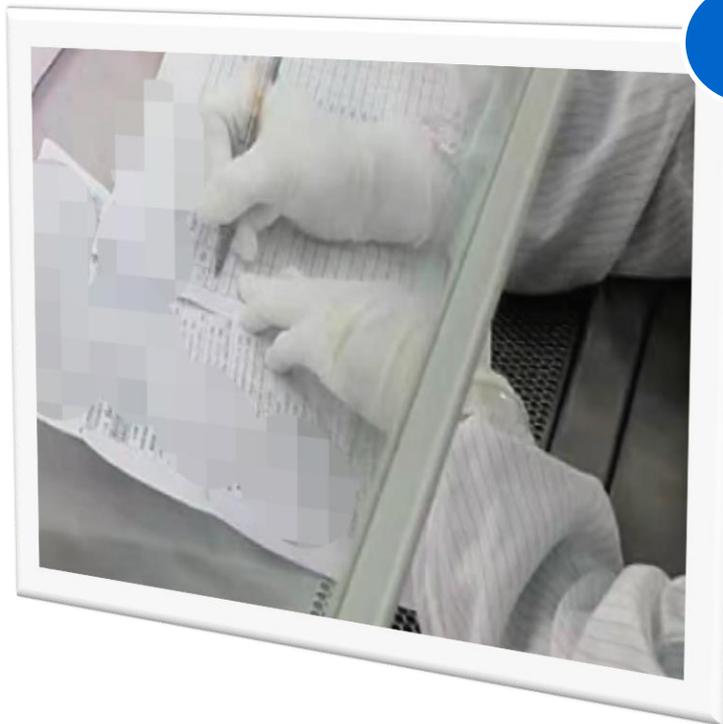
台面喷洒75%酒精，使用纸巾从上到下从左到右进行擦拭清洁

样本整理—生物安全柜中操作



- 1、取出含一层密封袋的样本以及对应的送检单，将纸质版送检单从密封袋中取出，**但装样本的内层密封袋不拆封**
- 2、核对实物样本核对实物样本上样本编号、受检者姓名、样本类型和送检单上的信息是否一致，同时检查样本外观以及质量是否符合接收要求

样本整理—生物安全柜中操作



13

登记样本信息：包括样本数量、
样本外观是否合格相关信息



14

台面喷洒75%酒精，使用纸巾从上
到下从左到右进行擦拭清洁，清洁
后将外层手套弃去放置到垃圾桶

样本整理—生物安全柜中操作

15



将内层垃圾袋密封

16



外层医疗垃圾袋打结

样本整理—生物安全柜中操作



将垃圾放置到医疗垃圾桶
垃圾转运时在垃圾袋外层喷洒
75%酒精后带出实验室

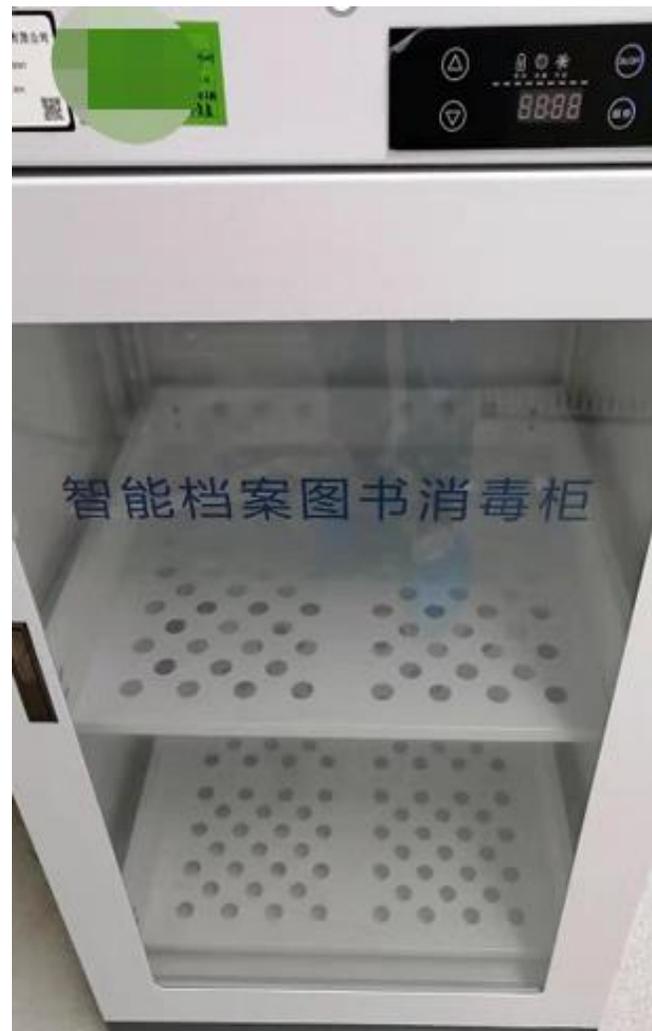


手部消毒，喷洒75%酒精

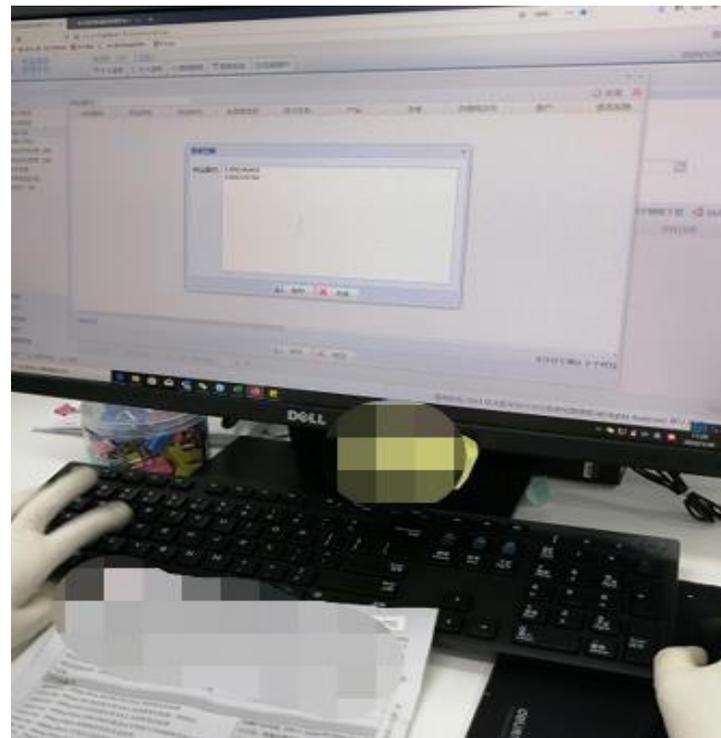
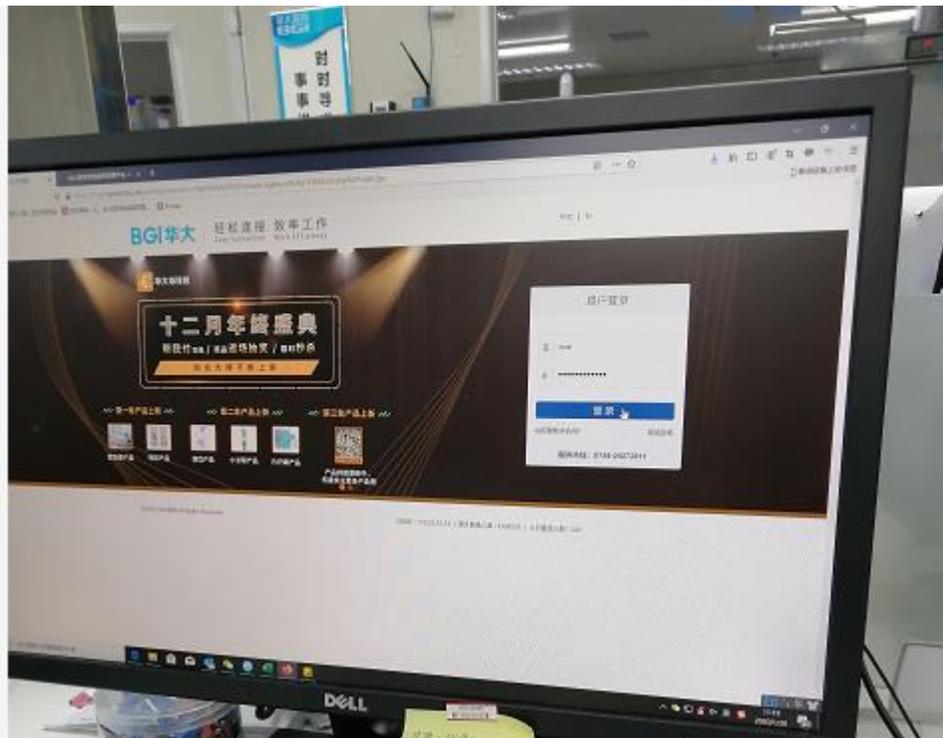
送检单消毒处理



将送检单放置到文件消毒柜进行
消毒处理



SIMS系统操作



使用个人账号登录SIMS系统，进行到样确认操作，核对系统中录入的检测产品、样本类型、受检者姓名和送检单上是否一致，并进行定位孔板分配，病原样本使用独立的冰箱进行存储。

样本泄露处理

一、安全柜外出现样本泄露

- 1、用含有消毒剂（有效氯含量1%次氯酸钠，下同）的吸水巾，从泄露点外1.5米处向内消毒
- 2、覆盖含消毒剂的吸水巾后紫外照射房间2h
- 3、人员撤离至半污染区，进行全身消毒
- 4、房间再次消毒清洁后，使用H₂O₂干雾进行终末消毒

二、安全柜内出现样本泄露

- 1、使用次氯酸钠消毒剂的吸水巾覆盖1h
- 2、开启安全柜内的紫外进行消毒，同时开启房间内的紫外进行消毒
- 3、将破碎物进行清理，对污染区及周边使用次氯酸钠消毒剂再次进行消毒
- 4、保持生物安全柜排风1h。

样本不合格处理

一、样本不合格

- 1、不合格类型：如样本量不足、样本类型不符合要求、样本泄露等
- 2、登记样本不合格信息
- 3、发送重送样通知邮件给前端
- 4、一定及时通知到前端同事

二、信息不合格

- 1、不合格类型：信息未录入物流系统、系统中录入的关键信息有误（如检测产品、样本类型、送检单位、受检者姓名）、实物样本和送检单信息不匹配、缺少送检单、知情同意未签名等
- 2、登记不合格信息
- 3、发送信息异常邮件给前端
- 4、一定及时通知到前端同事

内容

content

实验流程要点及结果判读

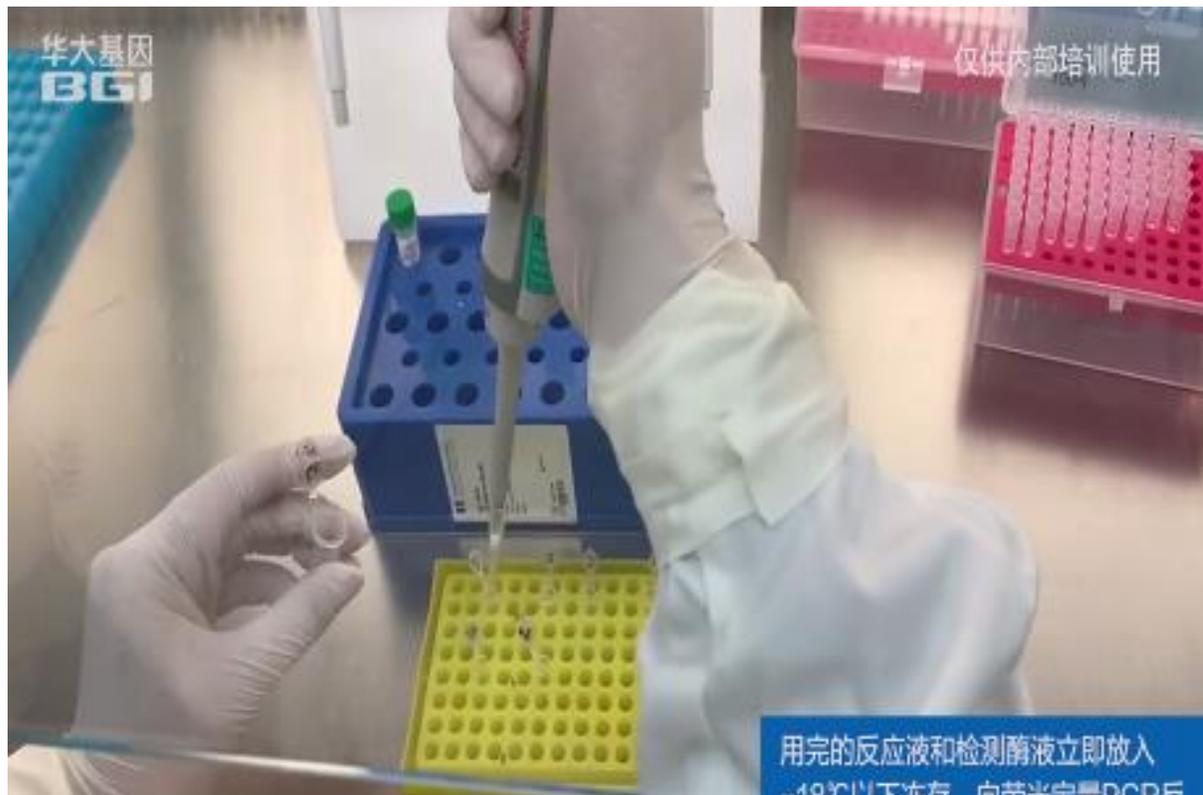
● 样本提取

● RT-PCR

实验流程	操作要点及注意事项
样本出库	<ol style="list-style-type: none">1、打印出库单，样本中心出库；2、病原专用样本转运箱转移样本至提取实验室；3、转运箱需每天用次氯酸钠消毒剂消毒；
灭活	<ol style="list-style-type: none">1、检查样本自封袋是否密封；2、75%酒精擦拭表面；3、56°C水浴灭活30min；
提取： 天根DP315-R； 凯杰 52904； MGIEasy 病毒 DNA/RNA提取试剂盒；	<ol style="list-style-type: none">1、样本开盖生物安全柜操作；2、生物安全柜台面铺保鲜膜（医用无纺布）；3、第一步样本加样结束后需要更换手套，75%酒精擦拭移液器、台面；4、每一步开盖操作后用75%酒精擦拭双手；5、提取关键步骤双人复核（加样本、转管）；6、回溶时注意枪头不要碰到吸附膜；7、操作轻柔，防止产生气溶胶；

实验流程	操作要点及注意事项
试剂准备与配置	<ol style="list-style-type: none">1、PCR Mix现用现配;2、Mix配置在冰盒上操作;3、独立试剂准备区配置;
PCR加样	<ol style="list-style-type: none">1、独立生物安全柜操作（与提取区分）;2、加样顺序：阴性，样本，阳性;
PCR上机	适用机型：SLAN-96P，stepone，7500或其他具有FAM、VIC/HEX荧光通道PCR仪

RT-PCR



2019-nCoV核酸检测方案 (500人份/天)



- 咽拭子、肺泡灌洗液、痰液等呼吸道样本*
 - 血清，血浆等血标本
 - 病毒培养液等其他标本类型
- **MGIEasy 病毒DNA/RNA提取试剂盒(磁珠法)**
货号：1000020261
- **华大基因新型冠状病毒2019-nCoV核酸检测试剂盒(荧光PCR法)**
- 荧光定量qPCR仪

MGISP-960RS 自动化样本制备系统



主要仪器设备	
1X MGISP-960	8小时，700例样本
1X 荧光定量PCR仪	12小时，700例样本

MGIEasy 病毒DNA/RNA提取试剂盒 (磁珠法) 注册证编号：鄂汉械备20200167

- 提取稳定性好
- 核酸回收率高，保证低浓度样本的提取成功率
- 适用样本广泛，包括咽拭子，唾液，痰液，肺泡灌洗液，血清，血浆，病毒培养液等。
- 适配自动化样本处理系统
- 适配下游应用：PCR, RT-PCR, 芯片杂交，测序等

新型冠状病毒2019-nCoV核酸检测试剂盒 (荧光PCR法) 注册证编号：国械注准2020340060



2019-nCoV核酸检测方案 (1000人份/天)



- 咽拭子、肺泡灌洗液、痰液等呼吸道样本*
 - 血清，血浆等血标本
 - 病毒培养液等其他标本类型
- **MGIEasy 病毒DNA/RNA提取试剂盒(磁珠法)**
货号：1000020261
- **华大基因新型冠状病毒2019-nCoV核酸检测试剂盒(荧光PCR法)**
- 荧光定量qPCR仪

MGISP-960RS 自动化样本制备系统



主要仪器设备	
2X MGISP-960	8小时，1400例样本
2X 荧光定量PCR仪	12小时，1400例样本

MGIEasy 病毒DNA/RNA提取试剂盒 (磁珠法) 注册证编号：鄂汉械备20200167

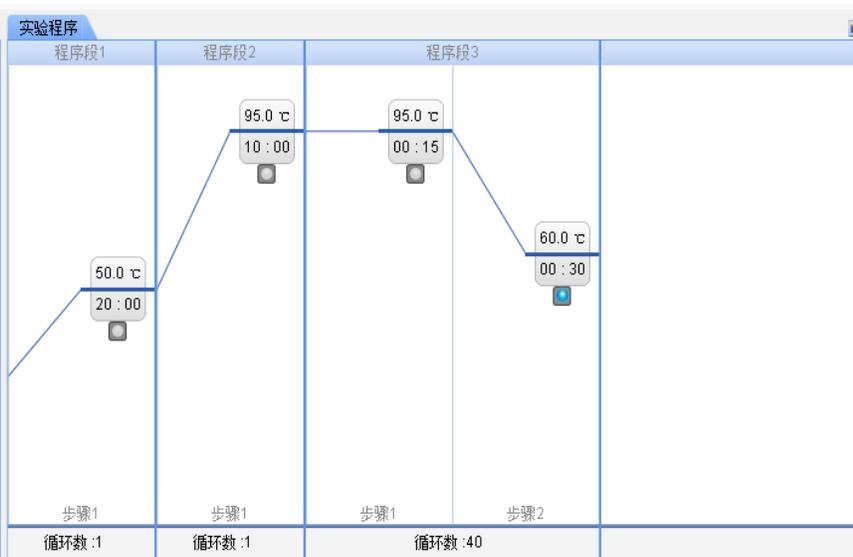
- 提取稳定性好
- 核酸回收率高，保证低浓度样本的提取成功率
- 适用样本广泛，包括咽拭子，唾液，痰液，肺泡灌洗液，血清，血浆，病毒培养液等。
- 适配自动化样本处理系统
- 适配下游应用：PCR, RT-PCR, 芯片杂交，测序等

新型冠状病毒2019-nCoV核酸检测试剂盒 (荧光PCR法) 注册证编号：国械注准2020340060



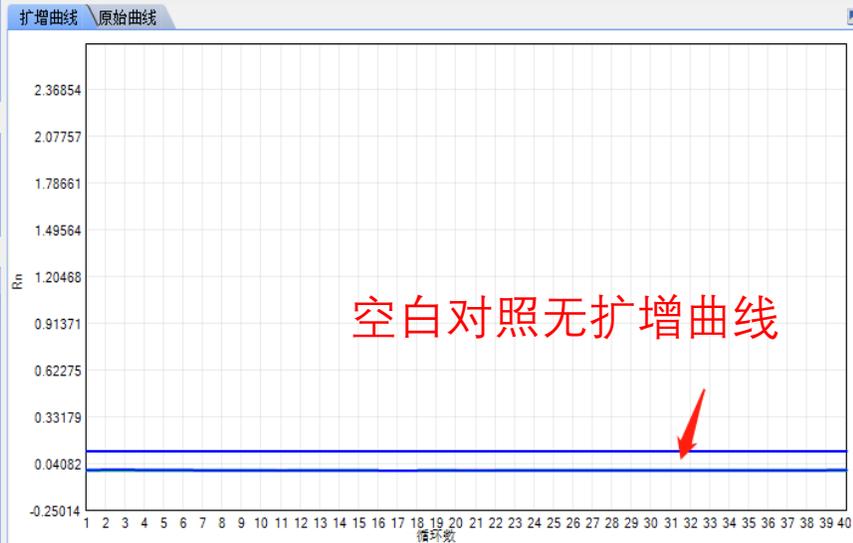
结果判读

反应孔	项目	样本名称	管名	通道	染料	目标	颜色	类型	属性	Ct	浓度	唯一标识	患者姓名	性别	年龄	标本类型
1	A12	XXGZBD	管1	1		FAM	■	阴性对照		NoCt						
2				2		HEX	■	阴性对照		NoCt						



目标信息	通道	分析类型	基线起点	基线终点	基线优化	自动阈值	手动阈值	数字滤波
1 FAM	1	定性	6	12	自动优化	<input type="checkbox"/>	0.12	<input type="checkbox"/>
2 HEX	2	定性	6	12	自动优化	<input type="checkbox"/>	0.12	<input type="checkbox"/>

孔板选择器	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		XXGZBD										XXGZBD
B		XXGZBD										
C		XXGZBD										
D		XXGZBD										
E		XXGZBD										
F		XXGZBD										
G		XXGZBD										
H												XXGZBD



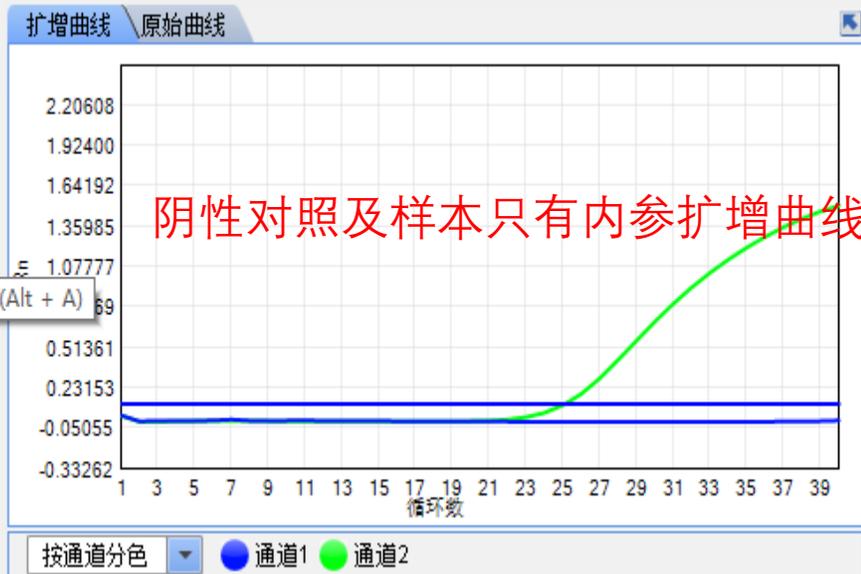
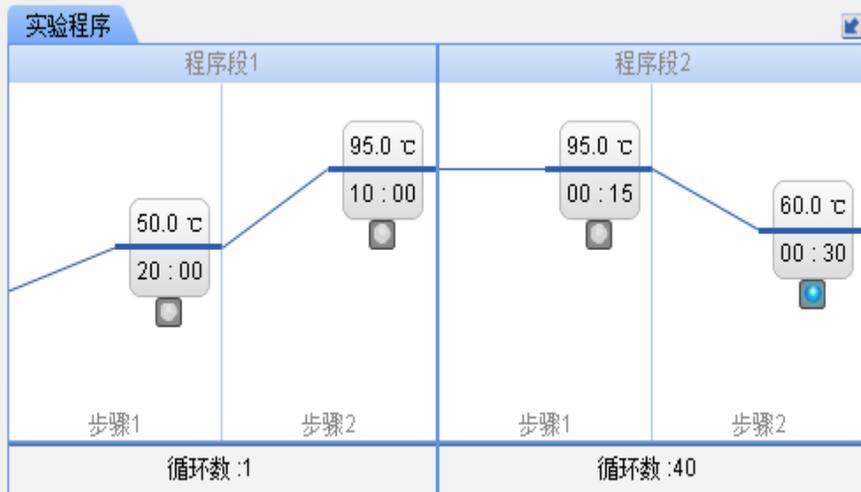
结果判读

反应孔	项目	样本名称	管名	通道	目标	颜色	类型	属性	Ct	浓度
1	D2	2019新型冠状病毒	管1	1	fam	■	待测样品		NoCt	
2				2	vic	■	待测样品		25.10	

目标信息	通道	分析类型	基线起点	基线终点	基线优化	自动阈值	手动阈值	数字滤波
1 fam	1	定性	6	12	自动优化	<input type="checkbox"/>	0.12	<input type="checkbox"/>
2 vic	2	定性	6	12	自动优化	<input type="checkbox"/>	0.12	<input type="checkbox"/>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2019新...	2019新...	2019新...			2019新...						
B	2019新...	2019新...	2019新...									
C	2019新...	2019新...	2019新...									
D	2019新...	2019新...	2019新...									
E	2019新...	2019新...	2019新...									
F	2019新...	2019新...	2019新...									
G	2019新...	2019新...										
H	2019新...	2019新...										

● 待测样品 ● 阳性对照 ● 阴性对照



结果判读

软件界面展示了实验数据、程序设置及扩增曲线分析结果。

反应孔信息表

反应孔	项目	样本名称	管名	通道	染料	目标	颜色	类型	属性	Ct	浓度	唯一标识	患者姓名	性别	年龄	标本类型
1	H12	XXGZBD	Y	管1	1	FAM	■	待测样品		25.26						
2				2	HEX	■	待测样品			23.01						

基本参数

目标信息	通道	分析类型	基线起点	基线终点	基线优化	自动阈值	手动阈值	数字滤波
1 FAM	1	定性	6	12	自动优化	<input type="checkbox"/>	0.12	<input type="checkbox"/>
2 HEX	2	定性	6	12	自动优化	<input type="checkbox"/>	0.12	<input type="checkbox"/>

孔板选择器

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	XXGZBD	XXGZBD	XXGZBD									
B	XXGZBD	XXGZBD	XXGZBD									
C	XXGZBD	XXGZBD	XXGZBD									
D	XXGZBD	XXGZBD										
E	XXGZBD	XXGZBD										
F	XXGZBD	XXGZBD										
G	XXGZBD	XXGZBD										
H	XXGZBD	XXGZBD										XXGZBD

实验程序

程序段1: 步骤1 (循环数:1) 50.0 °C (20:00) → 95.0 °C (10:00)

程序段2: 步骤1 (循环数:1) 95.0 °C (00:15)

程序段3: 步骤1 (循环数:40) 95.0 °C (00:15) → 60.0 °C (00:30)

步骤2 (循环数:40) 60.0 °C (00:30)

扩增曲线 / 原始曲线

图中显示了扩增曲线，Y轴为荧光信号强度（范围从-0.26687到2.50004），X轴为循环数（范围从1到40）。图中包含两条扩增曲线：一条绿色曲线（阳性对照）和一条蓝色曲线（样本）。两条曲线均呈现出典型的S型扩增曲线特征。图中有红色文字标注“阳性对照及样本两条扩增曲线”和红色箭头指向曲线。

结果判读

The screenshot displays a laboratory software interface with the following components:

- Top Menu:** Includes options like '新建', '打开', '关闭', '保存', '另存为', '加密', '患者报告', '实验表格', '实验数据', '快捷实验', '保存', '调用', '表格选项', '常用选项', '外部标准曲线', '选项', '通道选择', and '实验分析'.
- Reaction Information Table (反应孔信息表):**

反应孔	项目	样本名称	管名	通道	染料	目标	颜色	类型	属性	Ct	浓度	唯一标识	患者姓名	性别	年龄	标本类型
1	E1	XXGZBD	管1	1	FAM		蓝色	待测样品		NoCt						
2				2	HEX		绿色	待测样品		NoCt						
- Basic Parameters (基本参数):**

目标信息	通道	分析类型	基线起点	基线终点	基线优化	自动阈值	手动阈值	数字滤波
1 FAM	1	定性	6	12	自动优化	<input type="checkbox"/>	0.12	<input type="checkbox"/>
2 HEX	2	定性	6	12	自动优化	<input type="checkbox"/>	0.12	<input type="checkbox"/>
- Well Selection (孔板选择器):** A grid showing wells A-H and 1-12. Wells A-D and F-H are marked with 'XXGZBD'. Well E is highlighted in orange.
- Temperature Profile (实验程序):** A graph showing temperature changes over time. Key points include 50.0 °C at 20:00, 95.0 °C at 10:00, 95.0 °C at 00:15, and 60.0 °C at 00:30. Steps are labeled as 步骤1 and 步骤2 with cycle counts.
- Amplification Curve (扩增曲线):** A graph showing fluorescence intensity (F) over cycles. The y-axis ranges from -0.26887 to 2.50004. The x-axis shows cycles from 1 to 40. A red arrow points to a flat line at approximately 0.04056, indicating no amplification.

样本内参未出现扩增，检测失败

1. 如果待测样本FAM通道扩增曲线呈S型曲线，且Ct值 ≤ 38 ，则为新型冠状病毒核酸检测阳性。
2. 如果待测样本FAM通道检测扩增曲线不呈S型曲线，样本Ct值为0或者无Ct值，且VIC/HEX通道检测Ct值 ≤ 32 ，为新型冠状病毒核酸检测阴性。
3. 如果待测样本FAM通道检测扩增曲线呈S型曲线，且检测样本Ct值为 > 38 时，需重新检测。若重新检测的Ct值 > 38 ，则报告为检测阳性；若重新检测的扩增曲线不呈S型曲线且无Ct值，内参（VIC/HEX）检测Ct ≤ 32 时，报告为检测阴性。
4. 如果待测样本FAM通道检测扩增曲线不呈S型曲线，样本Ct值为0或者无Ct值，且内参（VIC/HEX）检测Ct > 32 或无数值时，需重新检测。

内容

content

实验室清洁及个人防护

● 实验室清洁

● 个人防护

流程	操作要点及注意事项
实验前清洁	<ol style="list-style-type: none">1、清水擦拭实验台，75%酒精擦拭实验过程用到的仪器2、生物安全柜紫外照射20min后开启通风30min3、清水清洁实验室地面
实验后清洁	<ol style="list-style-type: none">1、75%酒精擦拭使用仪器2、DNA zap/RNA zap擦拭生物安全柜台面3、实验结束后生物安全柜保持通风30min，保证柜内空气清洁，紫外开启1h4、次氯酸钠消毒剂拖地，房间紫外开启1h5、医疗垃圾当天高压灭菌（121℃，1h）
终末消毒	<p>过氧化氢干雾灭菌，建议：</p> <ol style="list-style-type: none">1、样本量 > 50例/天时，每2-3天进行终末消毒2、样本量 > 100例/天时，每天进行终末消毒
生物安全防护	<ol style="list-style-type: none">1、生物安全二级实验室，B2级生物安全柜2、样本接收及提取实验人员均需穿戴无菌连体实验服，佩戴N95口罩；护目镜及双层手套

实验室清洁-终末消毒



个人防护

华大基因 BGI	实验室人员穿脱防护用品 的流程 (nCoV)	适用实验室	执行新型冠状病毒 检测的实验场所	文件编号	页数	版本	分发号
		起草人/日期		TJ-SOP-LM-WL-020	第1页 共1页	A0	/
参考文献	国家卫生健康委办公厅关于印发医疗机构内新型冠状病毒感染预防与控制技术指（第一版）的通知 医务人员穿脱防护用品的流程						

穿		
要点	防护用品	顺序
摘除饰品 手表、戒指、手链等	/	1
75%酒精	手部清洁	2
头发全部放到帽子里面	帽子	3
4.1口罩绑带上下交叉; 4.2鼻夹按到鼻梁; 4.3做深呼吸实验 (口罩有起伏为正确, 无起伏说明漏气则应调整口罩至合格)	N95口罩	4
隔离服如有不干胶粘条则需拉开使其紧密贴到防护服上	隔离服	5
/	袖套	6
/	鞋套 (短) 鞋套 (长)	7
检查手套气密性	/	8
手套压在袖套以上	内层手套	9
/	护目镜/面屏	10
检查手套气密性	中层手套	11
12.1在生物安全柜操作时必需佩戴 12.2检查手套气密性	外层手套	12



脱 (动作要慢)		
顺序	防护用品	要点
1	外层手套	在生物安全柜操作佩戴的外层手套必需脱在生物安全柜内
2	/	75%酒精手部消毒
3	鞋套 (长) 鞋套 (短)	卷起鞋套外层朝内
4	护目镜/面屏	放入酒精桶消毒
5	隔离服+袖套	从上到下, 从内向外翻卷, 保证隔离服内层朝外
6	脱中层手套	/
7	/	75%酒精手部消毒
8	摘N95口罩	手不要碰触其他部位且口罩由内向外翻卷
9	/	75%酒精手部消毒
10	摘内层手套	手套不要碰到皮肤, 手套从内向外翻卷
11	摘帽子	由内向外翻卷
12	/	75%酒精手部&全身消毒

注意: 脱下来的防护用品全部放入医疗垃圾袋, 作为医疗垃圾处理

THANK YOU