

# 团 体 标 准

T/SZAS 17—2020, T/LTIA 08—2020, T/SAS 0006—2020

---

## 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2)核酸 qRT-PCR 方法检测技术 规程

Technical regulation of qRT-PCR for detecting of Severe Acute Respiratory  
Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) nucleic acid

2020 - 06 - 08 发布

2020 - 07 - 08 实施

---

深圳市标准化协会  
深圳市生命科技产学研资联盟 发布  
上海市标准化协会



## 目 次

前 言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语、定义和缩略语 .....	1
4 检测原理 .....	2
5 实验前准备 .....	2
6 样本采集、保存及运输 .....	3
7 检测流程 .....	3
8 结果判定 .....	4
附 录 A（资料性附录） 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2（SARS-CoV-2）核酸 qRT-PCR 检测试剂盒 .....	6

## 前 言

本标准编写格式遵循了 GB/T 1.1-2009 给出的规则编写。

本标准由深圳华大因源医药科技有限公司提出。

本标准由深圳市标准化协会、深圳市生命科技产学研资联盟、上海市标准化协会联合归口。

本标准主要起草单位：深圳华大因源医药科技有限公司、深圳华大基因股份有限公司、深圳海关动植物检验检疫技术中心、深圳市药品检验研究院（深圳市医疗器械检测中心）、上海国际旅行卫生保健中心、北京卓诚惠生生物科技股份有限公司、江苏宏微特斯医药科技有限公司、江苏奇天基因生物科技股份有限公司、北京万泰生物药业股份有限公司、深圳市标准化协会、深圳市生命科技产学研资联盟、上海市标准化协会、深圳华大基因科技有限公司、深圳华大智造科技有限公司，深圳华大生命科学研究院。

本标准主要起草人：申奥、史卫军、宫艳萍、曾少灵、吴红龙、陆晔、徐良、刘尧、林骏、张志强、刘利成、应清界、叶祥忠、姜华艳、但丹、李陶莎、王荣昌、周颖、裘文阳、李倩一、吴昊、武庆超。

本标准为首次发布。

# 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2) 核酸 qRT-PCR 方法检测技术规程

## 1 范围

本标准规定了严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2) 通用qRT-PCR方法(Taqman探针法)的术语、定义和缩略语、检测原理、实验前准备、样本采集、保存及运输、检测流程和结果判定的要求。

本标准适用于开展严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2) qRT-PCR检测技术的机构,通过对疑似感染患者样本中的SARS-CoV-2核酸进行检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 37875-2019 核酸提取纯化试剂盒质量评价技术规范

《新冠病毒实验室检测技术指南(第二版)》(国卫办科教函2020 70号)

《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》

## 3 术语、定义和缩略语

下列术语、定义和缩略语适用于本文件。

### 3.1 术语和定义

#### 3.1.1

**Ct值** cycle threshold

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

#### 3.1.2

**阳性对照品** positive control

由认可机构配制或试剂生产企业配制,有溯源性的含有特定浓度待测靶序列的物质。

#### 3.1.3

**空白对照品** blank control

由认可机构配制或试剂生产企业配制,有溯源性的不含有待测靶序列的物质,通常为无核酸酶水或生理盐水。

### 3.2 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

qRT-PCR: 荧光反转录-聚合酶链反应 (Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic Acid)

Taq酶: Taq DNA聚合酶 (Taq DNA polymerase)

UDG酶: 尿嘧啶DNA-糖基酶 (Uracil DNA Glycosylase)

SARS-CoV-2: 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2)

## 4 检测原理

严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2) 核酸qRT-PCR检测采用PCR扩增和荧光探针相结合的方法, 针对严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2的高度保守序列, 合成特异性引物和特异性的荧光双标记探针。探针的5'端标记荧光素基团, 3'端标记淬灭基团。在PCR扩增过程中, 特异性引物和探针与靶序列结合, 通过Taq酶的DNA聚合酶活性和5'-3'外切酶活性, 在延伸到荧光探针时, 将其切断, 此时荧光素基团和淬灭基团分离, 淬灭作用消失, 荧光信号产生。通过对荧光信号的检测, 实现对样本中SARS-CoV-2核酸的定性检测。

## 5 实验前准备

### 5.1 实验室分区

实验室分区应按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》中的实验室区域设计原则, 包括试剂准备区、标本制备区、扩增区、扩增产物分析区。各区仪器和耗材专用。

### 5.2 试剂

5.2.1 RNA提取试剂: 可采用传统的Trizol法, 也可采用其他等效提取试剂盒。

5.2.2 实验过程中用到的水应符合GB/T 6682-2008中4.1条的要求。

5.2.3 荧光RT-PCR检测试剂盒, 参见附录A。

5.2.4 除特别说明以外, 本标准所用试剂均用无DNA/RNA酶污染的容器分装, 不同批号产品的组分之间不可以混用或互换。

### 5.3 仪器与耗材

5.3.1 荧光定量PCR仪。

5.3.2 高速台式冷冻离心机: 最高转速12000 r/min以上。

5.3.3 台式离心机: 离心转速3000 r/min。

5.3.4 混匀仪。

5.3.5 冰箱: 2℃~8℃和-20℃两种。

5.3.6 微量可调移液器及配套带滤芯吸头：10 $\mu$ L、100 $\mu$ L、1000 $\mu$ L。

5.3.7 II级生物安全柜。

5.3.8 Eppendorf 管：1.5mL。

5.3.9 荧光定量 PCR 反应管：包含单管、八联管、96 孔板等形式。

## 6 样本采集、保存及运输

### 6.1 样本采集及处理

对于疑似严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2（SARS-CoV-2）感染的患者，由具有临床资质的医务人员进行样本采集，不同样本类型的采集及处理参照国家卫健委发布的《新冠病毒实验室检测技术指南（第二版）》进行操作。

### 6.2 样本保存

待测样本在2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C条件下保存应不超过24h，若需长期保存应置于-70 $^{\circ}$ C以下，应避免反复冻融（冻融不超过3次）。

### 6.3 样本包装和运输

采集后的标本在生物安全二级实验室生物安全柜内包装。所有标本应放在大小适合的带螺旋盖内有垫圈、耐冷冻的样本采集管里，拧紧，容器外注明样本编号、种类、姓名及采样日期。样本的运输参照《新冠病毒实验室检测技术指南（第二版）》中相关部分进行操作。

## 7 检测流程

### 7.1 样本总 RNA 提取

在样本制备区进行，参照RNA提取试剂盒的说明书取相应量的待检样本于1.5mL Eppendorf管中进行样本总RNA的提取，提取操作应在II级生物安全柜中进行，提取过程中使用到的主要仪器包括高速台式冷冻离心机、混匀仪。RNA提取效率和纯度应满足GB/T 37875-2019第5条的要求。

### 7.2 实时荧光 PCR 检测

#### 7.2.1 反应体系

在试剂准备区进行。

从试剂盒中取出相应的SARS-CoV-2反应液，解冻。将所用试剂在2000 r/min下离心5 s，液体均置于管底后，待用。设所需检测的总数为N，其中N为待检样本、试剂盒阳性对照与空白对照的和，每个样本测试反应体系按照相应检测试剂盒要求进行配制。

根据测试样本的数量计算好各试剂的使用量，向每个荧光定量PCR反应管中分装除待测样本之外的反应混合物液体，盖好管盖后，转移至样本制备区。

#### 7.2.2 加样

在样本制备区进行。

根据相应检测试剂盒要求，在各个设定好的荧光定量PCR管中分别加入7.1中制备的样本RNA溶液、阳性对照品及空白对照品（根据待检临床样品的数量，可适当增加空白对照品数量，空白对照品需随机排放在临床样本中间），盖紧管盖，2000 r/min离心10s。

### 7.2.3 仪器检测通道选择

分别设置严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2（SARS-CoV-2）各检测靶标与内参基因的PCR反应荧光信号收集条件。具体设置方法应参照试剂盒使用说明书。

### 7.2.4 实时荧光 PCR 反应程序

在检测区进行。将7.2.2中离心的荧光定量PCR反应管放入荧光定量PCR仪内，记录样本摆放顺序。反应条件应包括以下步骤，如表1。

表 1 实时荧光 PCR 反应步骤

步骤	循环数	作用	收集荧光信号
1	1 cycle	逆转录	否
2	1 cycle	预变性	否
3	35-45cycle	扩增	是

检测结束后，根据扩增后形成的荧光曲线和Ct值判定结果。

## 8 结果判定

### 8.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过空白对照品扩增曲线的最高点为准。

### 8.2 质控标准

以下标准需在同一次实验中同时满足，否则本次实验无效，需重新进行。

#### 8.2.1 空白对照品

空白对照中严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2（SARS-CoV-2）靶基因通道与内参通道均无扩增曲线，且无Ct值。

#### 8.2.2 阳性对照品

严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2（SARS-CoV-2）靶基因通道与内参通道均出现典型的S型扩增曲线，并且内参和靶标基因检测Ct值满足相应试剂盒设定阳性要求。

#### 8.2.3 待测样本

内参通道扩增曲线呈S型，且检测Ct值满足试剂盒设定的阳性要求。

### 8.3 结果描述及判定

#### 8.3.1 阴性判定



如果待测样本严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2（SARS-CoV-2）靶基因通道扩增曲线不呈S型曲线，且样本无Ct值，同时内参通道检测Ct值满足试剂盒阳性判断要求，则判为阴性，表明样本中未检出SARS-CoV-2核酸。

### 8.3.2 阳性判定

如果待测样本严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2（SARS-CoV-2）靶基因通道扩增曲线呈S型曲线，同时相应Ct值满足试剂盒阳性判断要求，且内参通道检测Ct值满足试剂盒阳性判断要求，则判为阳性，表明样本中检出SARS-CoV-2核酸。。

### 8.3.3 疑似处理

如果待测样本严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2（SARS-CoV-2）靶基因通道扩增曲线呈S型曲线，且Ct值不满足试剂盒阳性判断要求，建议重复试验，重复结果满足阳性判断要求，或者重复试验结果Ct值仍不满足试剂盒阳性判断要求，但靶基因通道扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，否则为阴性。

附录 A  
(资料性附录)

严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2) 核酸 qRT-PCR 检测试剂盒

A.1 试剂盒组成

试剂盒包括以下成分。

表A.1 试剂盒组成信息

组成成分 (50 人份/盒)	组成说明
SARS-CoV-2 反应液	扩增反应试剂及检测引物、探针
SARS-CoV-2 检测酶液	Taq 酶, 逆转录酶, UDG 酶
SARS-CoV-2 阳性对照品	病毒靶标基因假病毒与内参假病毒混合液
SARS-CoV-2 空白对照品	无 DNA/RNA 酶的灭菌水

A.2 说明

A.2.1 SARS-CoV-2 反应液中含有特异性引物、探针及各种离子

A.2.2 SARS-CoV-2 检测酶液, 配置反应时需要放置在冰盒上。

A.3 功能

试剂盒可用于人体样本中相关样本 (血浆、血清样本、痰液样本、肺泡灌洗液样本、咽拭子样本、鼻拭子样本等) 中新型冠状病毒 SARS-CoV-2 核酸的检测。

A.4 使用时注意事项

在检测过程中, 必须严防不同样本间的交叉污染。

反应液分装时应避免产生气泡, 上机前检查各反应管是否盖紧, 以免荧光物质泄露污染仪器。