

如何使用实时逆转录-聚合酶链反应检测新冠病毒？

文/Nicole Jawerth



随着引起新冠疾病的冠状病毒在全球范围内传播，原子能机构与联合国粮食及农业组织（粮农组织）合作，提供支持和专门知识，帮助各国使用实时逆转录-聚合酶链反应，这是检测、跟踪和研究新冠病毒的最快、最准确的实验室方法之一。

但什么是实时逆转录-聚合酶链反应？它是如何工作的？它与聚合酶链反应有什么不同？此外，它和核技术有什么关系呢？本文对该技术及其工作原理以及一些有关病毒和遗传学的新知识做一个简单的概述。

什么是实时逆转录-聚合酶链反应？

实时逆转录-聚合酶链反应是一种核衍生方法，用于检测包括病毒在内的任何病原体中特定遗传物质的存在情况。最初，该方法使用放射性同位素标记检测目标遗传物质，但随后的改进导致同位素标记被特殊标记物（最常见的是荧光染料）取代。这项技术使科学家几乎可以在过程仍在进行时立即看到结果；而常规的逆转录-聚合酶链反应只能在过程结束时提供结果。

实时逆转录-聚合酶链反应是检测新冠肺炎病毒最广泛使用的实验室方法之一。虽然许多国家已经将实时逆转录-聚合酶链反应用于诊断埃博拉病毒和寨卡病毒等其他疾病，但许多国家在将这种方法用于新冠肺炎病毒和提高国家检测能力方面需要支持。

什么是病毒？什么是遗传物质？

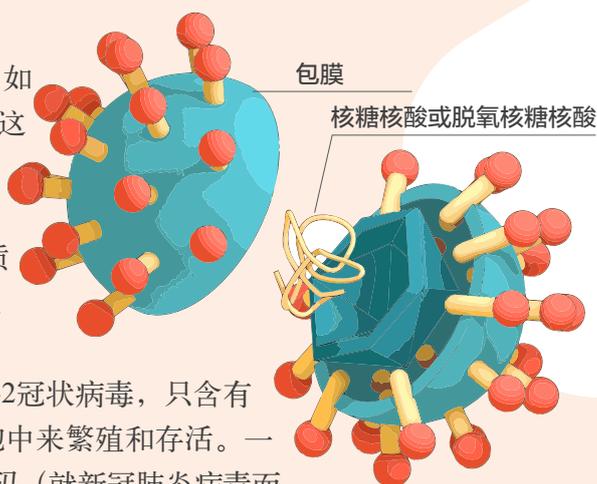
病毒是由分子包膜包围的遗传物质微观包。这种遗传物质可以是脱氧核糖核

酸，也可以是核糖核酸。

脱氧核糖核酸是一种存在于所有生物体（如动物、植物和病毒）中的双链分子，它掌握着这些生物体如何形成和发展的遗传密码或蓝图。

核糖核酸通常是一种单链分子，它复制、转录并传递部分遗传密码给蛋白质，使蛋白质能够合成并执行维持生物体存活和发育的功能。核糖核酸的不同变体负责复制、转录和传递。

一些病毒，如引起新冠肺炎的SARS-CoV-2冠状病毒，只含有核糖核酸，这意味着它们依靠渗透到健康细胞中来繁殖和存活。一旦进入细胞，这种病毒就会利用自己的遗传密码（就新冠肺炎病毒而言是核糖核酸）控制并“重新编程”细胞，将其变成病毒制造工厂。



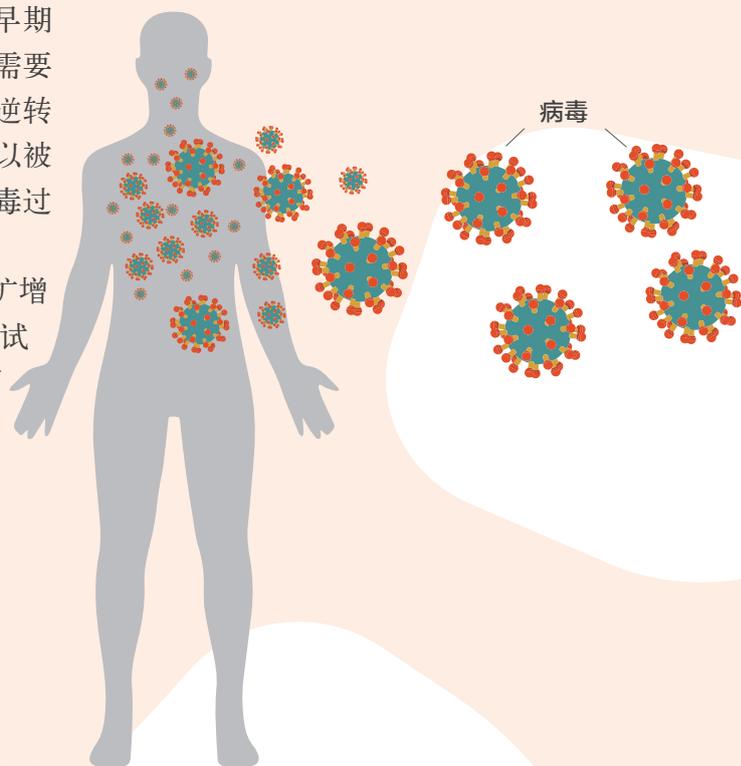
为了使像新冠肺炎病毒这样的病毒能够在体内早期被利用实时逆转录-聚合酶链反应检测到，科学家们需要将核糖核酸转化为脱氧核糖核酸。这是一个被称为“逆转录”的过程。他们这样做是因为只有脱氧核糖核酸可以被复制或扩增，这是实时逆转录-聚合酶链反应检测病毒过程的一个关键部分。

科学家将转录后的病毒脱氧核糖核酸的特定部分扩增数十万倍。扩增是很重要的，这样，科学家们就不必试图在数百万条遗传信息链中找出微小数量的病毒，而是有足够数量的病毒脱氧核糖核酸靶区，以精确地确认病毒的存在。



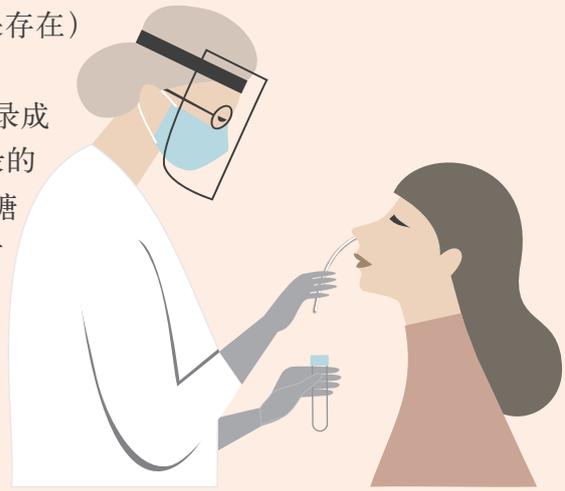
实时逆转录-聚合酶链反应是如何对新冠肺炎病毒进行检测的？

从新冠肺炎病毒聚集的身体部位如人的鼻子或喉咙采集样本。用几种化学溶液处理样本，去除蛋白质和脂肪等物质，只提取样本中存在的核糖核酸。提取的核糖核酸是

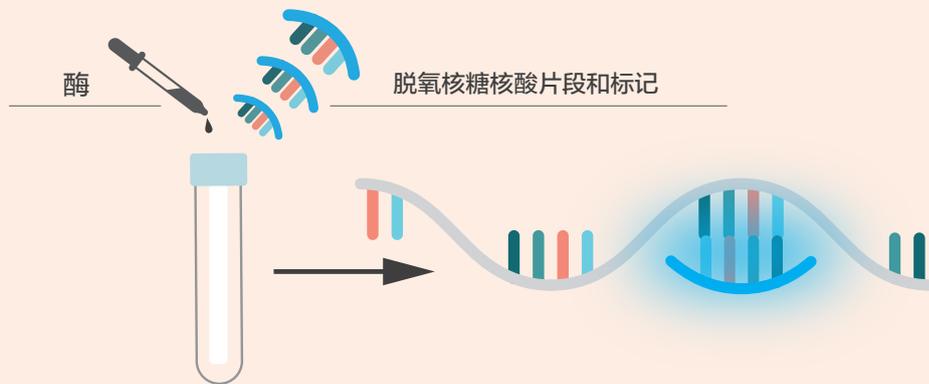


人自身的遗传物质和病毒的核糖核酸（如果存在）的混合体。

这种核糖核酸被利用一种特定的酶逆转录成脱氧核糖核酸。然后，科学家再添加与转录的病毒脱氧核糖核酸的特定部分互补的脱氧核糖核酸短片段。如果样本中存在病毒，这些片段就会附着在病毒脱氧核糖核酸的靶区。一些添加的遗传片段在扩增过程中用于构建脱氧核糖核酸链，而其他的遗传片段则用于构建脱氧核糖核酸并在链上添加标记标签，然后用于检测病毒。

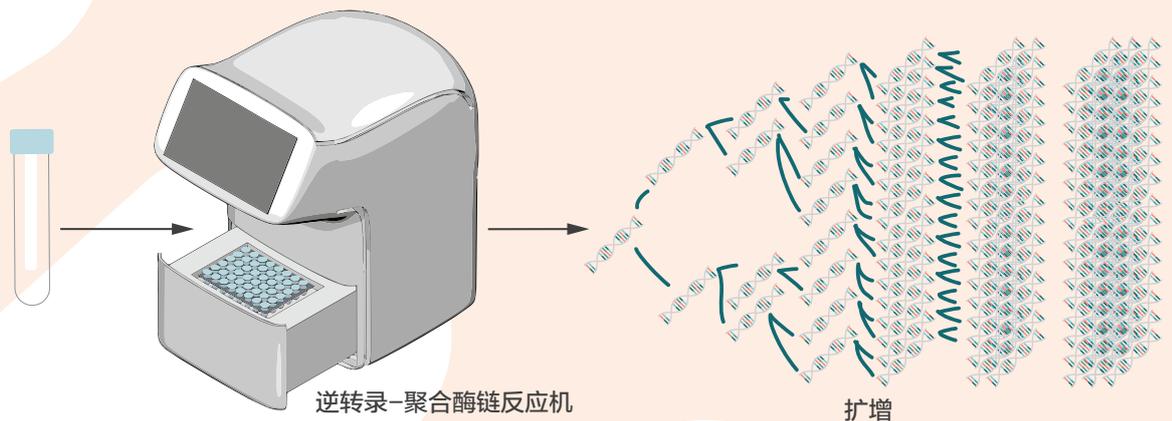


随后，这种混合物被放入逆转录-聚合酶链反应机器中。该机器在加热和冷却混合物的温度中循环，从而引发特定的化学反应，产生新的、相同的病毒脱氧



核糖核酸靶区拷贝。这个循环一遍又一遍地重复，继续复制病毒脱氧核糖核酸的靶区。每循环一次都使先前的数量倍增：两份拷贝变成四份，四份变成八份，以此类推。一个标准的实时逆转录-聚合酶链反应装置通常要经过35次循环，这意味着在这个过程中结束时，从样本中存在的每一条病毒链中产生大约350亿个新的病毒脱氧核糖核酸靶区拷贝。

当病毒脱氧核糖核酸靶区的新拷贝被构建时，标记标签会附着在脱氧核糖核酸链上，然后释放出荧光染料，由机器的计算机测量并实时显示在屏幕上。计算机跟踪样本中每次循环后的荧光量。当荧光量超过某一荧光水平时，就证实病毒存在。科学家们还监测需要多少次循环才能达到这个水平，以估计感染的严重程度：循环越少，病毒感染越严重。



为什么要用实时逆转录-聚合酶链反应方法？

实时逆转录-聚合酶链反应技术具有高度的敏感性和特异性，可以在短短的三小时内提供可靠的诊断，而通常实验室平均需要六到八小时。与其他可用的病毒分离方法相比，实时逆转录-聚合酶链反应的速度明显较快，并且由于整个过程可以在封闭的试管内完成，因此污染或出错的可能性更低。它仍然是可用的检测新冠肺炎病毒的最准确方法。

然而，实时逆转录-聚合酶链反应不能用于检测过去的感染，尽管这对了解病毒的发展和传播很重要，因为病毒仅在特定的时间窗口内存在于体内。要检测、跟踪和研究过去的感染，特别是那些可能在没有症状的情况下发展和传播的感染，必须采用其他方法。

什么是聚合酶链反应，它与实时逆转录-聚合酶链反应有什么不同？

逆转录-聚合酶链反应是聚合酶链反应的一种变体。这两种技术使用相同的过程，只是逆转录-聚合酶链反应增加了核糖核酸到脱氧核糖核酸的逆转录步骤，以进行扩增。这意味着聚合酶链反应用于病毒和细菌等已经含有脱氧核糖核酸的病原体进行扩增，而逆转录-聚合酶链反应用于含有核糖核酸但需要转录为脱氧核糖核酸的病原体进行扩增。这两种技术都可以“实时”进行，这意味着结果几乎可以立即看到，而“常规”使用时，结果只能在反应结束后才能看到。

聚合酶链反应是用于检测引起埃博拉、非洲猪瘟和口蹄疫等疾病的病原体（包括病毒）的最广泛使用的诊断检测方法之一。由于新冠肺炎病毒只含有核糖核酸，所以采用实时或常规的逆转录-聚合酶链反应进行检测。

20多年来，原子能机构与粮农组织合作，特别是通过其兽医诊断实验室网，为来自世界各地的专家使用实时逆转录-聚合酶链反应方法提供了培训和设备。最近，该技术还被用于诊断其他疾病，如埃博拉、寨卡、中东呼吸综合征和严重急性呼吸综合征，以及其他主要动物疾病。它还被用来检测主要的人畜共患疾病，即也可以感染人类的动物疾病。

