新型冠状病毒RNA标准物质

许丽^{1†}, 梁文^{1†}, 杨雪¹, 闻艳丽¹, 李兰英¹, 杨镇州¹, 李妍¹, 邓敏⁴, 陆青⁴, 丁敏¹, 任淑贞¹, 孙洁林², 左小磊^{2*}, 王丽华³, 曹程明¹, 胡钧³, 刘刚^{1*}, 樊春海²

1. 上海市计量测试技术研究院, 化学与电离辐射计量技术研究所, 生物计量实验室, 上海 201203;

2. 上海交通大学化学化工学院, 转化医学研究院, 分子医学研究院, 上海 200240;

3. 中国科学院上海高等研究院, 上海 201210;

4. 上海市医疗器械检测所, 上海 201318

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: zuoxiaolei@sjtu.edu.cn; liug@simt.com.cn

2020-04-02 收稿, 2020-04-25 修回, 2020-04-26 接受, 2020-05-06 网络版发表

国家重点研发计划(2018YFF0212800, 2016YFA0201200)、上海交通大学新型冠状病毒防治攻关专项、上海交通大学高峰学科-临床医学项目(20171913)、上海市科研计划项目(20441900402)和国家自然科学基金(21675167)资助

摘要 研制了一种新型冠状病毒(coronavirus, SARS-CoV-2)体外转录RNA标准物质, 用于SARS-CoV-2病毒RNA检测的量值溯源。目标基因范围涵盖已公布的SARS-CoV-2病毒检测的3个主要靶标基因: 核壳蛋白N基因全长(基因组坐标: 28274-29533, GenBank: MT027064.1)、包膜蛋白E基因全长(基因组坐标: 26245-26472, GenBank: MT027064.1)、开放阅读框1ab(ORF1ab)基因片段(基因组坐标: 13321-15540, GenBank: MT027064.1)。通过采用数字聚合酶链式反应(digital PCR, dPCR)方法进行多实验室联合定值, 确定了该标准物质的量值为N、E和ORF1ab基因的拷贝数浓度。研究表明, 该RNA标准物质质量值可靠, 均匀性良好, 稳定性可满足运输要求。进一步地, 通过在临床检验、多家不同原理的病毒检测试剂盒生产企业、方法开发实验室等试用, 验证了RNA标准物质的普适性。这一RNA标准物质的研制为新型冠状病毒检测试剂盒的质量控制提供了计量学依据, 为防控流行性疾病提供了便利。

关键词 新型冠状病毒, 体外转录RNA, 标准物质, 数字PCR, 实时荧光反转录PCR

新型冠状病毒肺炎(COVID-19)是由2019新型冠状病毒(简称新冠病毒)(SARS-CoV-2)感染引起的一种急性传染性疾病^[1], 在全球暴发并迅速流行^[2]。截至2020年3月18日24时, 国内累计报告确诊病例80928例、累计死亡病例3245例^[3]; 全球累计报告确诊病例191127例、累计死亡7807例^[4,5]。

SARS-CoV-2是属单股正链RNA病毒, 巢病毒目, 冠状病毒科, 其基因组全长约29 kb^[6,7]。实时荧光反转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)^[8]可以对SARS-CoV-2的病毒RNA进行准确检测, 由于此方法灵敏、特异性

强、易于普及推广, 该方法成为此次疫情防控中的首推确诊检测方法。国家卫生健康委员会印发的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》, 将RT-qPCR检测新冠病毒核酸阳性为疑似病例确诊的病原学证据之一^[9]。准确可靠的检验技术是疫情防控的关键支撑。然而, 近期的新冠病毒核酸检测出现了阳性率低、检测结果与临床表现不吻合等问题。据推测, 病原学因素、样本因素、人员因素、仪器设备因素、试剂因素等都有可能影响检测而造成假阴性结果^[10]。

核酸标准物质^[11~14]是对核酸检测结果^[15]进行计量

引用格式: 许丽, 梁文, 杨雪, 等. 新型冠状病毒RNA标准物质. 科学通报, 2020, 65: 2363-2370

Xu L, Liang W, Yang X, et al. SARS-CoV-2 RNA reference materials (in Chinese). Chin Sci Bull, 2020, 65: 2363-2370, doi: [10.1360/TB-2020-0359](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0359)

溯源, 以及为相关试剂盒的高质量研发和生产提供计量学支撑的保障。然而, 当前缺乏SARS-CoV-2核酸标准物质, 造成RNA定量检测无法量值溯源问题, 影响了试剂盒质量控制和结果确认。针对这一问题, 我们研制了一种SARS-CoV-2体外转录RNA标准物质。根据中国疾病预防控制中心(CDC)^[16]和世界卫生组织(WHO)^[17]的指南, 我们选取的目标基因范围涵盖已公布的SARS-CoV-2病毒3个主要基因: 核壳蛋白N基因全长(基因组坐标: 28274-29533, GenBank: MT027064.1)、包膜蛋白E基因全长(基因组坐标: 26245-26472, GenBank: MT027064.1)、开放阅读框1ab(ORF1ab)基因片段(基因组坐标: 13321-15540, GenBank: MT027064.1); 标准物质质量值为N、E和ORF1ab基因的拷贝数浓度。采用了数字PCR(digital PCR, dPCR)^[18-20]方法联合多家实验室对标准物质进行定值, 并对该标准物质的均匀性、稳定性、保存条件进行了考察, 对量值不确定度及适用性进行了分析。

1 实验

(i) 试剂及仪器。全基因人工合成、引物探针合成(上海百力格生物技术有限公司); 生物分析仪RNA检测试剂盒(RNA 6000 Nano, Agilent); RNA体外转录试剂盒(MAXIscript™ T7 Transcription Kit, Thermo-fisher); RNA纯化试剂盒(GeneJET RNA Purification Kit, Thermofisher); 去除Rnase污染试剂(RNaseZap™, Thermofisher); 焦碳酸二乙酯(DEPC)、二硫苏糖醇(DTT, Sigma); RNA酶抑制剂(RNase Inhibitor, Thermo-fisher); 无核酸酶水(Thermofisher); 一步法dPCR预混液

(one-step RT-ddPCR advanced kit for probes, Bio-rad); 其他生化试剂均为至少分析纯。

实时荧光定量PCR仪(Life Technologies); 微量核酸蛋白定量仪Nanodrop 2000(Life Technologies); 生物分析仪2100型(Agilent); 芯片dPCR仪Quant Studio 3D(Life Technologies); 微滴dPCR仪(QX200, Bio-rad)。

(ii) RNA分子的体外转录。人工合成N基因、E基因、ORF1ab三个片段DNA, 并参照RNA T7体外转录试剂盒的说明书, 在转录体系中加入RNA聚合酶、反应缓冲液、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)、三磷酸尿苷(uridine triphosphate, UTP)、三磷酸胞苷(cytosine triphosphate, CTP)、三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)以及DNA模板, 对3个DNA片段进行体外转录。N基因、E基因片段在37°C反应2 h, ORF1ab在30°C反应2 h。反应结束后在体系中加入Dnase I (每1 μg DNA模板加入2 U)以去除RNA产物里的模板DNA, 37°C反应1 h。反应结束后用RNA纯化试剂盒对产物进行纯化, 去除产物中的酶及盐离子。

(iii) RNA浓度dPCR定值。采用dPCR对RNA分子的浓度进行定值。参考CDC和WHO已报道的检测新型冠状病毒的引物探针^[16,17], 并根据dPCR的扩增效率对引物探针进行适当优化, 最终引物探针序列详见表1。

dPCR方法反应体系: RT-supermix 5 μL、逆转录酶2 μL、300 mmol/L DTT 1 μL、引物浓度400 nmol/L、探针浓度200 nmol/L、RNA 5 μL、除RNA酶水 5 μL; dPCR扩增程序为: 逆转录过程(45°C, 60 min)、预变性(95°C, 10 min)、扩增循环(94°C, 30 s; 58°C, 1 min; 40个循环)、微滴稳定(98°C, 10 min)。

表1 RNA标准物质dPCR定值的引物探针序列及来源

Table 1 The primer and probe sequences for dPCR certification of RNA reference material

引物/探针	序列(5'→3')	来源
N-F	GGGGAACCTCTCCTGCTAGAAT	CDC ^[16]
N-R	CAGACATTTTGTCTCTCAAGCTG	
N-P	FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-TAMRA	
ORF1ab-F	CCCTGTGGGTTTACACTTAA	CDC ^[16]
ORF1ab-R	ACGATTGTGCATCAGCTGA	
ORF1ab-P	FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG-BHQ1	
E-F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	WHO ^[17]
E-R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	
E-P	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ1	

2 结果与分析

2.1 RNA标准物质的制备及纯度验证

在数据库^[21]中查询SARS-CoV-2基因组序列信息,结合WHO、中国CDC发布的SARS-CoV-2检测指南,设计并制备了RNA标准物质混合物溶液,包含全长N基因、全长E基因、ORF1ab部分序列片段的混合物,3个RNA片段的序列涉及主要基于GenBank ID MT 027064.1,具体信息如下: N基因片段长度1260 nt, 基因位置28274~29533; E基因片段长度228 nt, 基因位置26245~26472; ORF1ab基因片段长度2220 nt, 基因位置13321~15540; 将制备的RNA标准物质分装200瓶, 每瓶

50 μ L, 置于 -80°C 保存. 使用生物分析仪对体外转录RNA分子的纯度进行验证, 结果显示RNA大小符合预期(图1(a))、峰型单一(图1(b))、无DNA及其他杂峰, 证明RNA分子制备成功, 并且纯度良好.

2.2 数字PCR定量方法

为了实现新冠病毒RNA浓度检测的量值传递, 建立清晰的量值溯源链条, 我们研究绝对定量的dPCR方法, 并为RNA标准物质定值, 通过使用RNA标准物质对RT-qPCR试剂盒进行量传和质控, 最终确保RT-qPCR对病毒样品中RNA浓度的准确检测(图2(a)).

数字PCR技术将实时荧光定量PCR体系等量均分

图1 (网络版彩色)SARS-CoV-2 RNA标准物质生物分析仪分析结果. (a) 生物分析仪分析标准物质中3个RNA分子的条带图(带L: RNA ladder; 条带1~2: N基因RNA片段; 条带3~4: E基因RNA片段; 条带5~6: ORF1ab RNA片段); (b) 生物分析仪分析标准物质中3个RNA分子的归一化峰图
Figure 1 (Color online) Analysis of the SARS-CoV-2 RNA RM using a bioanalyzer. (a) Lanes of 3 RNA in our RMs (Lane L: RNA ladder; Lane 1~2: N gene RNA; Lane 3~4: E gene RNA; Lane 5~6: ORF1ab RNA). (b) Normalized peaks of 3 RNA in our RMs

图2 (网络版彩色)原理示意图. (a) 新冠病毒RNA浓度量值溯源图; (b) dPCR定量检测新冠病毒RNA标准物质的原理图
Figure 2 (Color online) Schematic illustration of this work. (a) Traceability chart of SARS-CoV-2 RNA quantification; (b) digital PCR absolute quantification of SARS-CoV-2 RNA RM

到相互隔离的大数量(10000个)微小的反应单元(芯片微孔或者微滴液珠), 经过PCR扩增反应, 反应单元相应地表现为有荧光(阳性)或无荧光(阴性), 通过统计微反应单元的阳性率和泊松分布概率函数计算出核酸模板的拷贝数. 数字PCR的技术特点是, 不需要建立工作曲线, 具有相对较高的准确度, 是一种潜在的绝对定量方法. RNA标准物质采用一步法dPCR法绝对定量(图2(b)). 本方法准备阶段, 将RNA逆转录体系和PCR扩增体系有效融合, 并且直接加入到后续的dPCR分配(芯片或者水油微滴), 经过均匀极限分配, 实现在每一个微小单元中只有1个或者0个RNA分子, 接下来经过PCR扩增之后, 可以通过统计阳性反应孔数量, 基于泊松分布原理, 直接计算出模板RNA的拷贝数浓度. 在满足泊松分布的条件下, dPCR能够绝对定量, 无需建立工作曲线, 回避了PCR荧光信号准确度和一致性带来的偏差, 具有明显更高的可靠性和准确度, 同时也多次被报道应用在核酸标准物质研制中^[11-14].

2.3 RNA标准物质均匀性分析结果

根据ISO导则^[22]以及我国《JJF1343-2012 标准物质定值的通用原则及统计学原理》中的规定, 我们采用dPCR方法, 对标准物质的均匀性进行了统计检验. 从200瓶样品中随机选取11瓶, 每瓶取样3次, 每次取样10 μ L, 稀释后采用dPCR方法进行检测, 结果见图3. 对RNA标准物质中3个目标基因的拷贝数分别进行方差分析法分析(F 检验), 经计算, 标准物质中包含3个不同基因的 F 值分别为: $F_E=1.363$, $F_N=0.99$, $F_{ORF1ab}=1.47$. 而根据自由度查表得到的临界值 $F_{0.05(10,22)}$ 为2.30, 大于3种基因的 F 值, 因此证明本标准物质中N基因、E基因和ORF1ab基因均匀性良好.

2.4 稳定性检测结果及保存方法优化

单链RNA不稳定, 容易被环境中的RNA酶降解, 因此RNA保护剂的选择对RNA的保存十分关键. 我们前期实验中采用除RNA酶的水溶解保存RNA, 但RNA标本即使在 -80°C 条件下保存, 4 d后的dPCR检测量值就出现了明显的下降. 经过条件优化证明, 用1 mmol/L DTT和0.5 U/ μ L Rnase Inhibitor作为保护剂, 能够有效提高标准物质的稳定性(图4(c)), -80°C 条件下保存30 d之后浓度量值没有发生明显变化.

为确保RNA在运输条件下(干冰运输)的稳定, 对RNA标准物质进行短期稳定性考察^[22]. 考察了RNA标

图3 (网络版彩色)SARS-CoV-2 RNA标准物质均匀性分析结果. 随机从200瓶样品中选取11瓶, 每瓶检测3次. E基因(a)、N基因(b)和ORF1ab(c)RNA片段均匀性检验结果

Figure 3 (Color online) Homogeneity analysis of SARS-CoV-2 RNA RM: 11 units of 200 RMs were randomly analyzed with 3 replications. Homogeneity analysis result of E gene RNA fragments (a), N gene RNA fragments (b) and ORF1ab RNA fragments (c)

准物质在4和 -20°C 条件下保存13 d的短期稳定性. 实验中利用dPCR法测定标物的拷贝数浓度, 将各基因的拷贝数浓度采用线性模型进行分析(此处以E基因的变化情况为例). RNA标准物质在 -20 和 4°C 温度条件下的短期稳定性统计结果表明斜率不显著(图4(c), (d)). 同时, 如果比较E基因首次dPCR定值结果, 及其在 -20 和 4°C 保存13 d之后的dPCR定值结果, 发现 -20°C 保存后 P 值为0.644, 在 4°C 保存后 P 值为0.445, P 值均大于0.05, 说明RNA标准物质在 -20 和 4°C 下保存后, 量值没有发生显著变化, 证明可以在 4°C 条件下保存13 d, 足够满足样品冷链运输需求.

2.5 dPCR多家单位联合定值分析及不确定度评估

研制的RNA标准物质采用4家实验室协同定值. 联合定值实验室经过测试能力考察之后, 按照联合定值方案开展检测工作. 最终汇总全部原始数据后经统计检验确认各组数据无离群值、各组数据等精度、每组数据的平均值之间不存在显著性差异后, 取4家实验室检测结果的平均值为RNA标准物质的标准值. 经过统

图 4 (网络版彩色)不同保存温度条件下RNA标物的稳定性考察结果. (a) RNA在4°C保存13 d; (b) -20°C保存13 d; (c) -80°C保存30 d
Figure 4 (Color online) Stability of SARS-CoV-2 RNA RM under different temperature. (a) Stability after 13 d under 4°C; (b) stability after 13 d under -20°C; (c) stability after 30 d under -80°C

计证明, 多家联合定值结果的重复性好, RSD小于4% ($n=4$). 定值数据如图5(a)~(c)所示. 从dPCR的扩增图(图5(d)~(f))可以看出, dPCR中阳性反应孔的荧光信号和阴性反应的荧光信号信噪比大, 区分明显.

随后对RNA标准物质的不确定度进行评估, 将均匀性、稳定性、定值过程引入的不确定度分量合成, 得到最终RNA标准物质的标准不确定度. 将RNA标准物质特性量值标准值的合成标准不确定度乘以包含因子 k (对应置信概率=95%, $k=2$), 即为RNA标准物质特性量值标准值的扩展不确定度. 标准物质定值结果及不确定度如下: N基因: 标准值 1.0×10^6 copies/μL, 扩展不确定度 1×10^5 copies/μL; E基因: 标准值 2.0×10^5 copies/μL, 扩展不确定度 3×10^4 copies/μL; ORF1ab基因: 标准值 1.2×10^5 copies/μL, 扩展不确定度 2×10^4 copies/μL.

2.6 RT-qPCR适用性考察

为验证RNA标准物质在实际病毒检测过程中的适用性, 研究了RNA标准物质在9种不同RT-qPCR原理的SARS-CoV-2核酸检测试剂盒上的适用性. 所有PCR扩增体系及荧光检测均严格按照相应试剂盒说明书进行操作, RT-PCR结果如图6所示.

本标准物质在设计之初参考了WHO和中国CDC推荐的检测区域, 而这也正是大多数商业化核酸检测

试剂盒的检测靶向区域, 因此理论上, RNA RM应该具有比较广泛的适用性. 我们随机获取市场销售的试剂盒并开展了一系列的适用性检验, 效果良好. 实验证明: (1) 以我们研发的体外转录RNA RM为目标, 使用病毒核酸检测试剂盒开展RT-qPCR实验, 得到扩增效果普遍良好, 以1号试剂盒为例, 3个靶向基因具有明显扩增信号(图6(a)); (2) 根据不同试剂盒检测靶向, 统计所有新冠病毒核酸检测试剂盒的RT-qPCR检测结果, 证明我们的RNA RM目前适用于绝大多数新冠病毒核酸检测试剂盒, C_t 值低于26, 显示典型的阳性信号(图6(b)).

但需要注意的是, 并不是所有检测试剂盒都是全面检测3个国际推荐靶标基因(E、N、ORF1ab), 因此图6(b)仅给出了试剂盒宣称的检测基因结果, 例如2号试剂盒只具有检测E和ORF1ab两个基因的功能. 另外, 随着方法的快速发展, 试剂盒检测位置在不断扩展, 对于ORF1ab这段非常长的基因, RNA RM的覆盖度受到挑战, 正如图6(b)所示, 7和9号试剂盒的ORF1ab检测引物与我们的标准物质匹配性较差, 表现为 C_t 值明显滞后.

3 结语

新型冠状病毒肺炎疫情席卷全球, 给人类生命安全和稳定带来极大威胁. 疑似病例的确诊、隔离

图5 (网络版彩色)RNA标准物质多家联合定值结果. E(a)、N(b)和ORF1ab(c)基因的4家实验室联合定值结果,展示了每一个实验室的8次重复数据、平均值和标准偏差. lab A的数字PCR检测E(d)、N(e)和ORF1ab(f)基因的dPCR原始数据

Figure 5 (Color online) Quantification results of our RNA RM. The analysis results of E (a), N (b) and ORF1ab (c) gene from 4 different laboratories, showing 8 replications, the average and SD of each lab. The dPCR data of E (d), N (e) and ORF1ab (f) gene in lab A

图6 (网络版彩色)RNA标准物质实用性验证实验. (a) 1号试剂盒RT-qPCR扩增曲线; (b) 9种不同SARS-CoV-2核酸试剂盒检测结果汇总

Figure 6 (Color online) Practical verification of our RNA RM. (a) RT-qPCR amplification curve of Kit No.1. (b) All analysis results of 9 kits

和及时治疗对于疫情防控至关重要. 对于病毒RNA基因信息的解析^[23], 让我们在病毒核酸检测方面占得先机, 迅速发展了很多核酸检测方法. 中国CDC更是将病毒核酸检测结果作为确诊和排除的关键依据, 但由于多种因素, 核酸检测出现存在假阴性风险. 由于RNA不稳定, 又缺乏成熟的RNA高准确度绝对定量方法, 限制

了病毒RNA标准物质的研发, 难以实现病毒RNA检测质量控制和量值溯源. 本课题研制的新型冠状病毒体外转录 RNA标准物质, 序列正确、纯度良好、均匀性良好、稳定性满足短期运输要求, 有准确的浓度量值, 可以确保RNA定量检测实现量值传递或者用于试剂盒性能评价, 解决了RNA分析领域缺乏标准物质的难题,

进而提升RNA测量准确度水平,助力抗击疫情,保障人民身体健康。随着核酸检测方法的发展,扩展RNA标准物质序列范围,进一步提升RNA标准物质的适用性,将成为本领域的研究重点。

参考文献

- Huang C L, Wang Y M, Li X W, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 2020, 395: 497–506
- Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*, 2020, 382: 727–733
- Health Emergency Office National Health Commission. Update on COVID-19 at 24:00 March 18 (in Chinese). http://www.nhc.gov.cn/yjb/new_index.shtml [国家卫生健康委员会卫生应急办公室. 截至3月18日24时新型冠状病毒肺炎疫情最新情况, 2020. http://www.nhc.gov.cn/yjb/new_index.shtml]
- World Health Organization. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Situation Report-58, 2020. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200318-sitrep-58-covid-19.pdf?sfvrsn=20876712_2
- Holshue M L, DeBolt C, Lindquist S, et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *N Engl J Med*, 2020, 382: 929–936
- Cui J, Li F, Shi Z L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17: 181–192
- Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 2020, 395: 565–574
- Corman V M, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 2020, 25: 23–30
- National Health Commission. COVID-19 protocol (trial seventh edition), 2020 (in Chinese). <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml> [国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版), 2020. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>]
- Li Z H, Gao X L, Yang X J, et al. Nucleic acid analysis for the detection of SARS-CoV-2 (in Chinese). *Lab Med Clini*, 2020, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20200317.1710.002.html> [李振昊, 高小玲, 杨小娟, 等. 新型冠状病毒核酸检测分析. 检验医学与临床, 2020, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20200317.1710.002.html>]
- Liang W, Xu L, Sui Z, et al. Quantification of plasmid DNA reference materials for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* based on UV, HR-ICP-MS and digital PCR. *Chem Cent J*, 2016, 10: 55
- Haynes R J, Kline M C, Toman B, et al. Standard reference material 2366 for measurement of human cytomegalovirus DNA. *J Mol Diagn*, 2013, 15: 177–185
- Corbisier P, Pinheiro L, Mazoua S, et al. DNA copy number concentration measured by digital and droplet digital quantitative PCR using certified reference materials. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407: 1831–1840
- Baume M, Cariou A, Leveau A, et al. Quantification of *Legionella* DNA certified reference material by digital droplet PCR. *J Microbiol Methods*, 2019, 157: 50–53
- Zhao Y, Chen F, Li Q, et al. Isothermal amplification of nucleic acids. *Chem Rev*, 2015, 115: 12491–12545
- Chinese Center for Disease Control and Prevention. Primers and probes for the detection of SARS-CoV-2, 2020 (in Chinese). http://www.chinaivdc.cn/kyjz/202001/t20200121_211337.html [中国疾病预防控制中心. 新型冠状病毒核酸检测引物和探针序列, 2020. http://www.chinaivdc.cn/kyjz/202001/t20200121_211337.html]
- World Health Organization. Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR, 2020. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2
- Pinheiro L B, O'Brien H, Druce J, et al. Interlaboratory reproducibility of droplet digital polymerase chain reaction using a new DNA reference material format. *Anal Chem*, 2017, 89: 11243–11251
- Corbisier P, Bhat S, Partis L, et al. Absolute quantification of genetically modified MON810 maize (*Zea mays* L.) by digital polymerase chain reaction. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396: 2143–2150
- Devonshire A S, Whale A S, Gutteridge A, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: Controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406: 6499–6512
- National Genomics Data Center. 2019 Novel Coronavirus Resource (2019nCoV), 2020 (in Chinese). <https://bigd.big.ac.cn/ncov> [国家基因组科学数据中心. 2019新型冠状病毒信息库, 2020. <https://bigd.big.ac.cn/ncov>]
- ISO Guide 35: 2017, Reference Materials General and Statistical Principles for Certification, 2017
- Zhao W M, Song S H, Chen M L, et al. The 2019 novel coronavirus resource (in Chinese). *Hereditas*, 2020, 42: 212–221 [赵文明, 宋述慧, 陈梅丽, 等. 2019新型冠状病毒信息库. 遗传, 2020, 42: 212–221]

Summary for “新型冠状病毒RNA标准物质”

SARS-CoV-2 RNA reference materials

Li Xu^{1†}, Wen Liang^{1†}, Xue Yang¹, Yanli Wen¹, Lanying Li¹, Zhenzhou Yang¹, Yan Li¹, Min Deng⁴, Qing Lu⁴, Min Ding¹, Shuzhen Ren¹, Jieli Sun², Xiaolei Zuo^{2*}, Lihua Wang³, Chengming Cao¹, Jun Hu³, Gang Liu^{1*} & Chunhai Fan²

¹ Biometrology Laboratory, Chemical and Ionizing Radiation Metrology Institute, Shanghai Institute of Measurement and Testing Technology, Shanghai 201203, China;

² Institute of Molecular Medicine, Institute of Translational Medicine, School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

³ Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China;

⁴ Shanghai Testing & Inspection Institution for Medical Devices, Shanghai 201318, China

† Equally contributed to this work

* Corresponding authors, E-mail: zuoxiaolei@sjtu.edu.cn; liug@simt.com.cn

Coronavirus disease (COVID-19) is an acute infectious disease caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Reverse transcription real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was the firstly authorized method for the detection of SARS-CoV-2 RNA. As this method is sensitive, specific, it has been widely recognized as the golden standard for the diagnosis of COVID-19. Unfortunately, several false-negative cases have been reported after the outbreak of COVID-19, probably due to the quality of the kits or the improper operation of RT-qPCR. Nucleic acid reference materials (RM) are the key element for the metrology traceability and quality control of SARS-CoV-2 RNA detection, but the development of RNA RM remains a challenge in the biology metrology field. Two main problems are the low stability of the RNA sample and the lack of proven absolute quantification methods.

To establish the measurement traceability for SARS-CoV-2 RNA detection, a novel RNA reference material (RM) was developed. The RM is a mixed solution of 3 *in vitro* transcribed RNA molecules which cover different key target sequences of SARS-CoV-2 gene: The full-length of nucleoprotein (N) gene (28274-29533, GenBank: MT027064.1), the full-length of envelope protein (E) gene (26245-26472, GenBank: MT027064.1), and partial sequence of open reading frame 1ab (ORF1ab) (13321-15540, GenBank: MT027064.1). The purity of the transcribed RNA molecules was verified by a biological analyzer. The results showed that the molecular length of all the RNA molecules were consistent with our design. The clear peaks of our RNA RMs strongly demonstrated good purity.

For absolute quantification of RNA RMs, we studied digital PCR (dPCR) for RNA samples. Digital PCR evenly partitioned the sample and PCR reaction solution to a very large number of units, on a microporous chip or in the liquid droplets, etc. After a PCR amplification reaction, the fluorescence signal was detected for each unit individually, with a binary readout of “0” or “1” for negative and positive results respectively. Through the statistics of positive results based on the Poisson distribution, the copy number of RNA sample was accurately determined without standard curves needed. Digital PCR has significantly higher reliability and accuracy. Mainly based on the PCR primers and probes for SARS-CoV-2 detection suggested by the Chinese CDC and WHO, we optimized the key factors of dPCR towards improved amplification efficiency. Through digital PCR measurements by 4 laboratories, the certified values of concentration (copies/μL) were assigned for the N gene, E gene, and ORF1ab gene in the mixed RM.

Single-stranded RNA is unstable and easy to be degraded by RNase in the environment, thus the optimization of RNA protectants is very important for the stability of RNA RMs. During the study of the stability, we found that a proper protector (1 mmol/L DTT and 0.5 U/L Rnase Inhibitor) can effectively increase the valid storage life of our RNA RM. Based on the latest data, the concentration of our RNA RMs was stable for at least 30 d under −80 °C storage and 13 d under −4 °C storage.

In order to verify the applicability of our RNA RM in the actual virus detection process, we analyzed our RMs using 9 SARS-CoV-2 nucleic acid detection kits. These virus RNA detection kits were from different manufacturers with various detection principles, that are being applied in laboratories for virus detection. Finally, our RNA RMs showed high generalizability among 9 kits. The development of RNA RM provides the metrological basis for the quality control of SARS-CoV-2 detection kits.

SARS-CoV-2, *in vitro* transcribed RNA, reference material, digital PCR, reverse transcription real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

doi: [10.1360/TB-2020-0359](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0359)