

Gilson PIPETMAX® 和新型冠状病毒肺炎 COVID-19 自动化 RT-QPCR workflow



PIPETMAX® 和新型冠状病毒肺炎 COVID-19 自动化 RT-QPCR workflow

MC GSA708CN

Gilson China

14th Feb 2020

| 冠状病毒和新型冠状病毒肺炎 COVID-19 | COVID-19 检测的 RT-QPCR workflow |
| PIPETMAX 和 RT-QPCR 的自动化 | 订货信息 |

冠状病毒和新型冠状病毒肺炎 COVID-19

冠状病毒是属于冠状病毒科-网巢病毒目的一种包膜型正义 RNA 病毒，广泛存在于人类和其他哺乳动物体内。¹ 这些病毒是带有正单链 RNA 基因组和螺旋对称的核衣壳的包膜病毒。冠状病毒的基因组大小大约在 26 到 32 千碱基之间，是 RNA 病毒中最大的一种。

在人类身上，这些病毒会导致呼吸道感染，包括普通的感冒，这种感冒通常是温和的，虽然像严重急性呼吸道综合症 (SARS)、中东呼吸综合症 (MERS) 这样比较少见的病毒可能是致命的。2019 年 12 月，中国武汉报道了一起新的肺炎爆发²，后来确认是由 2019 年新型冠状病毒 (2019-nCoV) 引起的。(图 1) 该疾病被世卫组织正式命名为 COVID-19。常见的感染症状包括呼吸道症状、发烧、咳嗽、呼吸短促和呼吸困难。在更严重的病例中，感染可导致肺炎、严重急性呼吸道综合症、肾功能衰竭甚至死亡。

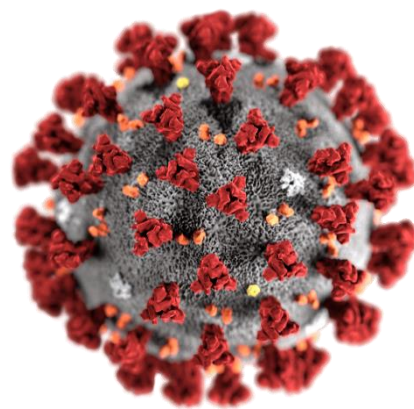


图 1 2019-nCoV 病毒颗粒渲染图

样品收集

提取 RNA

RT-QPCR Assays

COVID-19 检测的 RT-QPCR workflow

逆转录 QPCR (RT-QPCR) 结合 RT-PCR 和 QPCR，通常用于检测呼吸道分泌物中的致病病毒。临床呼吸道样本或其他可接受的样本，并按以下步骤进行测试。(图 2)

图 2 COVID-19 的 RT-QPCR workflow

PIPETMAX 和 RT-QPCR 的自动化

Gilson PIPETMAX® 全自动液样平台消除了液样转移的人为错误风险。单次液样操作量程范围为1 µL -1200 µL, 可以同时运行1至8个通道。可移动式托盘能够适配96和384孔板。(图 3) 双在线移液头可以随时自动切换步骤所需的不同量程, 在运行中移液头无需硬件更换。如果选配更多的移动托盘, 可以满足在运行方法的同时进行下一轮配置, 节约时间。(图 4)



图 3 PIPETMAX® 和 TRILUTION®micro 软件

Pipetmax 的特点

PIPETMAX® 是一套理想的高通量生物分析自动化液样处理方案。桌面式的尺寸可以轻松地适配任何实验室。通过外置式UV/HEPA系统, 能够满足不同实验规范的需求。PIPETMAX®可以提升操作人员的精确度、重现性, 以及不同病毒样品之间的一致性。

- PIPETMAX® 可以消除用户间的误差
- 保护操作人员远离病原体。
- 采用Gilson PIPETMAN® 技术, 确保精准度。
- DIAMOND 带滤芯吸嘴(图 5)可以防止气溶胶污染。
- 一套真正意义上适合任意试剂、试剂盒及方法的开放系统。

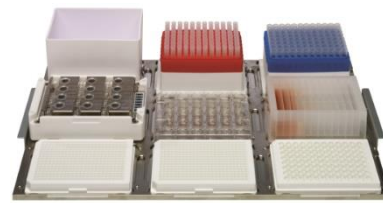


图 4 PIPETMAX 移动托盘

RT-QPCR workflow 3*

核酸提取

RT-QPCR 的实验扩增结果取决于样品模板 RNA 的质量和总量。在进行样品测试前, 应该对 RNA 提取的回收率和纯度进行验证。



图 5 Gilson 易拉装吸嘴 (带滤芯)

根据商品化的提取试剂盒制造商的建议方法提取样品, 可以得到高度纯化的 RNA。

质量控制

由于 RT-PCR 的敏感性, 所有检测应该采用严格的质量控制和质量保证流程。所有移液吸嘴均仅使用带滤芯型号。(图 5) 检测控制应与所有测试样品同时进行。

RT-QPCR 实验

RT-QPCR 仪的参数(AB 7500 Fast DX)

步骤	循环	温度	时间
UNG Incubation	1	25°C	2 min
RT incubation	1	50°C	15 min
Enzyme activation	1	95°C	2 min
Amplification	45	95°C 55°C	3 sec 30 sec

混合总管和孔板配置

TaqPath™ 一步法 RT-qPCR 混合总管

步骤 #	试剂	每次反应添加的体积
1	Nuclease-free Water	N x 8.5 µL
2	Combined Primer/Probe Mix	N x 1.5 µL
3	TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix (4x)	N x 5.0 µL
	总体积	N x 15.0 µL

添加样品模板

小心地加入 5.0 µL 样品至样品孔。

添加对照模板

加入 5 µL 的 nCoVPC(CDC 阳性对照) RNA 模板至样品孔。

数据分析及结果

运行完成后，按照仪器厂家的说明对数据进行保存和分析，并在CDC的指导下对数据进行进一步的分析和解读。

其他自动化应用

qPCR方法，尤其是使用TaqMan探针或类似的荧光杂交探针方法，被广泛的应用于各类病原体检测。（图6）

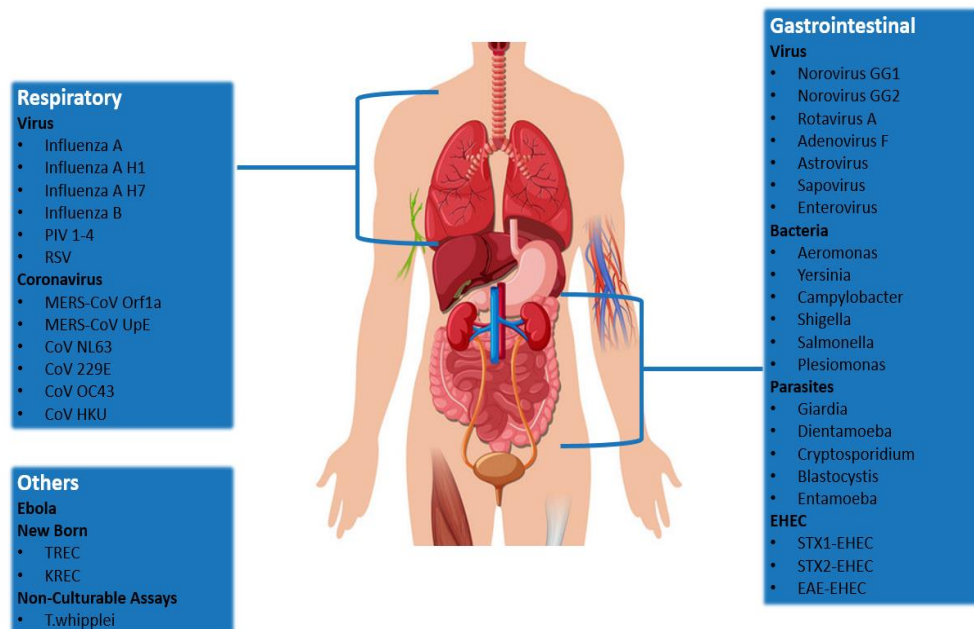


图 6 常规病原体检测实验

从发表报道中看，利用磁珠技术对肠道病毒、乙型肝炎、丙型肝炎、Epstein-Barr 病毒、疱疹病毒、人乳头瘤病毒、乙型流感和 SARS 病毒的核酸检测方法已经实现自动化。⁴

总结

Gilson 的不同液样处理产品，例如 PIPETMAX 自动液样平台，可以和 COVID-19 疾病中 RT-QPCR workflow 结合，满足自动化需求。不断增长的检测量以及检测方法对提高效率以降低成本并保证实验结果有了越来越高的要求，因此分子诊断实验室也向着自动化、集成式、用户操作降低的方向不断发展。

Gilson 自动化液样处理产品可应用于样品处理的各个流程，包括分析前的样品处理、核酸提取、PCR 实验，具有宽泛的自动化和灵活度，提升了测试效率和标准化。(图 7)

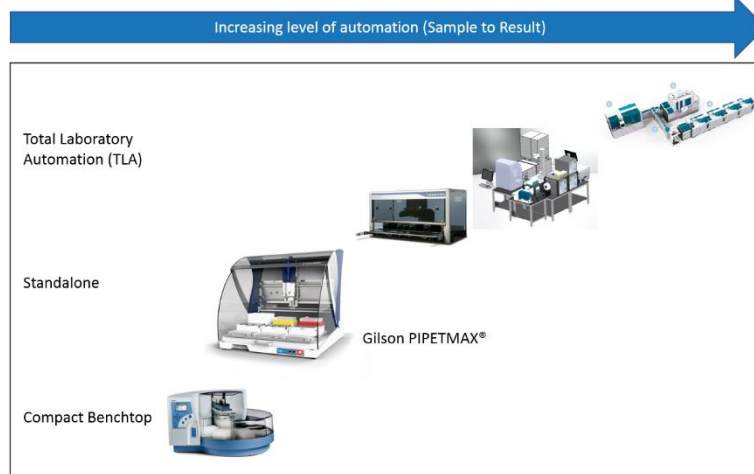


图 7 分子诊断和筛选应用中不同级别的自动化方案

*本文中的 RT-QPCR 流程参考于美国 CDC 在 2020 年 2 月 4 日发布的指引，由于情况的不断变化可能与实际环境的操作流程有所不同。本文展示了 PIPETMAX 可以被用于协助完成 RT-QPCR 方法。

订货信息

订货编号	描述
------	----

GPMXCV

PIPETMAX nCOV QPCR 套装

- includes* PIPETMAX 268 W EXTERNAL SAFETY INTERLOCK ×1
 HOOD, PMAX INTERLOCK HEPA/UV AIR SCIENCE ×1
 PIPETMAX MAX8X200 PIPETTE HEAD ×1
 PIPETMAX MAX8X20 PIPETTE HEAD ×1
 PIPETMAX 268 TRAY 384 WELL ×1
 MICROAMP SHORT 96 PCR TUBE RACK ×6
 PIPETMAX TIP RELOAD BLOCK ×5
 BIN, TIP DISPOSAL ANNEALED ×1
 RACK, CODE 496 PCR TUBES ×1
 RACK, CODE 424 PT PSV TMP FLP CAP 1.5-2ML ×1
 RACK, CODE 496 PT PSV TMP 96 PCR TUBE ×1
 DSF200ST BLISTER REFILL 384-Certified (960 tips/pack) ×3
 DSF10ST BLISTER REFILL 384-Certified (960 tips/pack) ×3
 PROTOCOL BUILDER V1 LICENSE ×1
 Software, TRILUTION micro v3 for PC ×1
 Computer for PIPETMAX ×1
 Installation and Training- 1 Day ×2

附录

PIPETMAX 技术参数

Volumetric Specifications For Transfers	最大允许误差					
	移液头	体积 (μL)	系统误差 (μL)	随机误差 (μL)	系统误差 (%)	随机误差 (%)
	MAX 8×20	1	±0.08	≤0.05	8.00	5.00
		10	±0.15	≤0.10	1.50	1.00
		20	±0.25	≤0.12	1.25	0.60
	MAX 8×200	20	±0.50	≤0.16	2.50	0.80
		100	±1.00	≤0.30	1.00	0.30
		200	±2.00	≤0.50	1.00	0.25
	MAX 4×1200	50	±4.00	≤0.70	8.00	1.40
		120	±4.00	≤0.70	3.33	0.58
600		±6.00	≤1.50	1.00	0.25	
1200		±9.60	≤1.80	0.80	0.15	

Pipette Heads and PIPETMANDIAMOND Tips (Sterilized option available for some tips)	移液头	PIPETMAN® DIAMOND 吸嘴	PIPETMAN® 移液头体积量程(μL)
	MAX 8×20	DL10	1-10
		DF10	1-10
		DF30	1-20
		D200	1-20
	MAX 8×200	D200	20-200
		DF200	20-200
	MAX 4×1200	D1200	100-1200
		DF1200	100-1200

联系我们

如果您有任何问题，欢迎联系 cnSST@gilson.com。

参考

1. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* **395**, 497–506; 10.1016/S0140-6736(20)30183-5 (2020).
2. Jon. Read et al. nCoV-2019 early epidemic predictions.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Real-Time RT-PCR Panel for Detection 2019-Novel Coronavirus.
4. Tewari, D., Zellers, C., Acland, H. & Pedersen, J. C. Automated extraction of avian influenza virus for rapid detection using real-time RT-PCR. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **40**, 142–145; 10.1016/j.jcv.2007.07.011 (2007).