



李金明 教授

- 国家卫生健康委临床检验中心副主任兼临床分子与免疫室主任。北京协和医学院和北京大学医学部博士生导师。北京协和医学院和北京大学医学部博士生导师。
- 获国务院政府特殊津贴，卫生部有突出贡献中青年专家。中国医学装备协会基因检测分会会长。
- 研究方向为：临床分子诊断及标准化
- 先后以项目负责人承担多项国家自然科学基金（7项）和国家重大专项（2项）课题。以第一和通讯作者发表论文200多篇（其中SCI论文160篇）。个人独立编著、主编及共同主编专著共8部；共同主编（第一主编）全国高等院校本科教材1部。以第一完成人获北京市科技奖二等奖1次和三等奖2次。



国家卫生健康委临床检验中心

National Center for Clinical Laboratories

实时荧光PCR的Ct值及与病毒载量之间的关系

李金明 国家卫生健康委临床检验中心

?

新型冠状病毒核酸检测最常用的检测技术及其在疫情防控中的作用

实时荧光PCR技术的起源及其发展

Ct值及其与原始模板浓度的关系

为什么新冠肺炎患者或病毒感染者Ct值 ≥ 35 (Cut-off为40) 可以解除隔离或出院

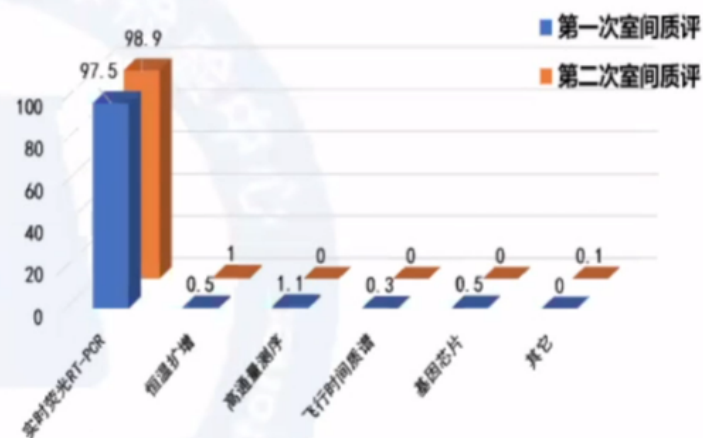
新型冠状病毒核酸检测最常使用的方法

人群筛查和发热门诊等：

- ✓ 实时荧光RT-PCR
- ✓ 等温扩增：SAT、交叉引物恒温扩增

病毒溯源：

- ✓ 靶向高通量测序



实时荧光RT-PCR法是最常用的核酸检测方法

散发疫情及时有效控制的关键是“快”与“准”

核酸检测的“快”与“准”：

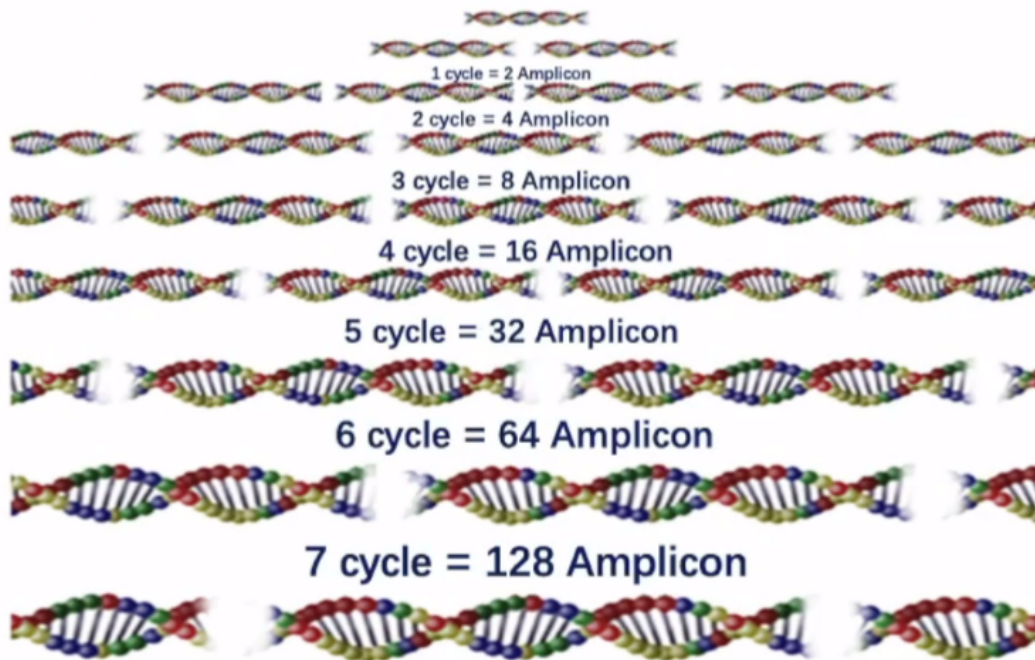
- ✓ 快速发现传染源
- ✓ 迅速控制传染源，切断传播

流调的“快”与“准”：

- ✓ 快速找到潜在的传染源（密接、次密接）
- ✓ 迅速控制潜在的传染源，切断可能的传播



什么是PCR?



No. of	No. Amplicon Cycles Copies of Target
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
20	1,048,576
30	1,073,741,824
40	$\sim 10^{12}$

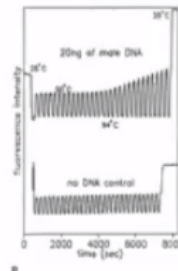
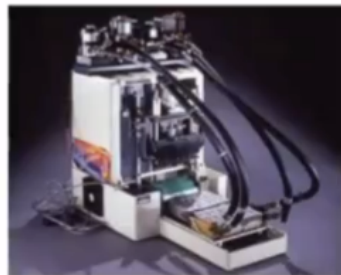
Russell Higuchi的荧光PCR技术探索之路

1986年末 Russell Higuchi来到PCR的诞生地Cetus公司工作

探讨“闭管PCR”的可能（为解决开管产物分析所致的污染问题）

“溴化乙锭”的使用

光导纤维的使用



BIO/TECHNOLOGY VOL. 11 SEPTEMBER 1993

Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions

Russell Higuchi*, Carita Fockler, Gavin Dollinger† and Robert Watson

Roche Molecular Systems, Inc., 1145 Atlantic Ave., Alameda, CA 94501. †Chiron Corporation, 1400 53rd St., Emeryville, CA 94608.
*Corresponding author.

We describe a simple, quantitative assay for any amplifiable DNA sequence that uses a video camera to monitor multiple polymerase chain reactions (PCRs) simultaneously over the course of thermocycling. The video camera detects the accumulation of double-stranded DNA (dsDNA) in each PCR using the increase in the fluorescence of ethidium bromide (EtBr) that results from its binding duplex DNA. The kinetics of fluorescence accumulation during thermocycling are directly related to the starting number of DNA copies. The fewer cycles necessary to produce a detectable fluorescence, the greater the number of target sequences. Results obtained with this approach indicate that a kinetic approach to PCR analysis can quantitate DNA sensitively, selectively and over a large dynamic range. This approach also provides a means of determining the effect of different reaction conditions on the efficacy of the amplification and so can provide insight into fundamental PCR processes.

Received 9 June 1993; accepted 21 July 1993.

Clinical Chemistry 2005, 51 (3) : 661-671

1993年，Higuchi 等首次报道了他设计的Real-time PCR：改造PCR扩增仪以使紫外线照射PCR产物，在PCR反应体系中，加入溴化乙锭（EB）染色，然后用CCD检测荧光信号。

荧光PCR技术的发展

TaqMan probes

双荧光标记的实时荧光PCR方法

分子信标探针

数字PCR

高分辨熔解曲线分析 (HRM)

1991年：Cetus公司的Holland等在Proc Natl Acad Sci U S A上发表了TaqMan® probes技术

1993年：美国Applied Biosystems, Division of Perkin-Elmer的Lee等在Nucleic Acids Research杂志上发表了使用双荧光标记的实时荧光PCR方法

1996年：美国纽约公共卫生研究所(Public Health Research Institute) Tyagi和Kramer在Nat Biotechnol上发表了分子信标(Molecular beacons)方法

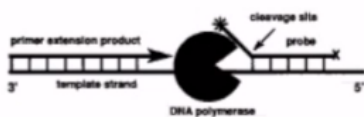
1999年：美国约翰·霍普金斯大学Kenneth Kinzler与同事Bert Vogelstein一起在Proc Natl Acad Sci U S A上发表了“数字PCR”方法

2003年：美国犹他大学Wittwer在Clin Chem上发表了高分辨熔解曲线分析 (HRM)

Proc Natl Acad Sci U S A
1991, Vol. 88, No. 12, pp. 5264-5268

Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase

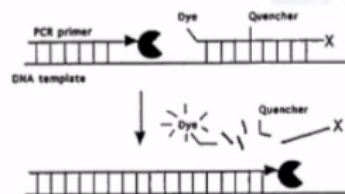
Holland, M. J., Browne, D. J., Gelfand, B., Socoloff, S. H., White, T. L., & Erlich, J. P. (1991). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(12), 5264-5268.



Nucleic Acids Res
1993, Vol. 21, No. 12, pp. 2822-2828

Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes

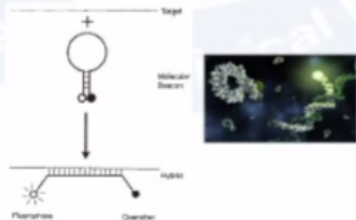
Lee, J. H., Lee, J. H., & Lee, J. H. (1993). *Nucleic Acids Res*, 21(12), 2822-2828.



Nat Biotechnol
1996, Vol. 14, No. 12, pp. 1327-1331

Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization

Tyagi, S., & Kramer, A. (1996). *Nat Biotechnol*, 14(12), 1327-1331.



Proc Natl Acad Sci U S A
1999, Vol. 96, No. 12, pp. 12280-12285

Digital PCR

Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(12), 12280-12285.

Bert Vogelstein

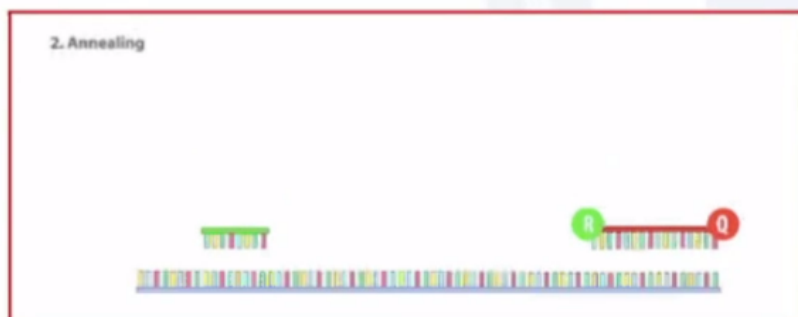
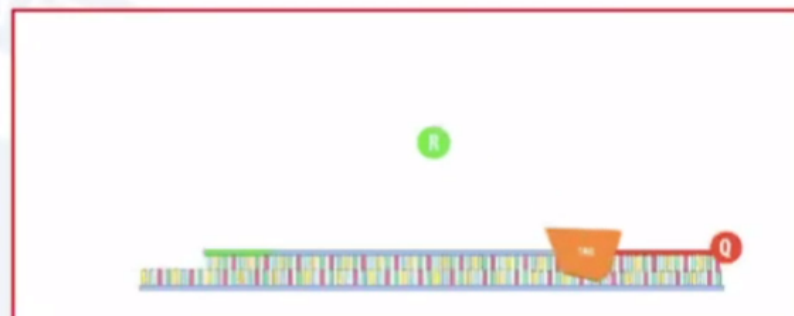
Clin Chem
2003, Vol. 49, No. 12, pp. 2000-2008

Amplicon Melting Analysis with Labeled Primers: A Closed-Tube Method for Differentiating Homozygotes and Heterozygotes

Wittwer, C. T., et al. (2003). *Clin Chem*, 49(12), 2000-2008.

Carl T. Wittwer

TaqMan实时荧光PCR



因为引物和探针的设计，核酸检测在方法学上特异性为100%

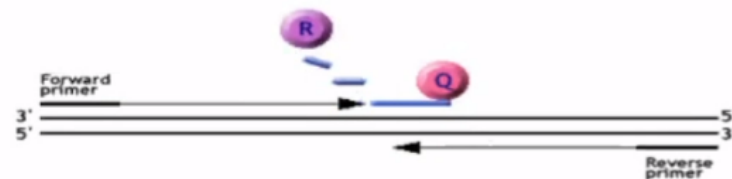
荧光共振能量转移

(Fluorescence resonance energy transfer , FRET)

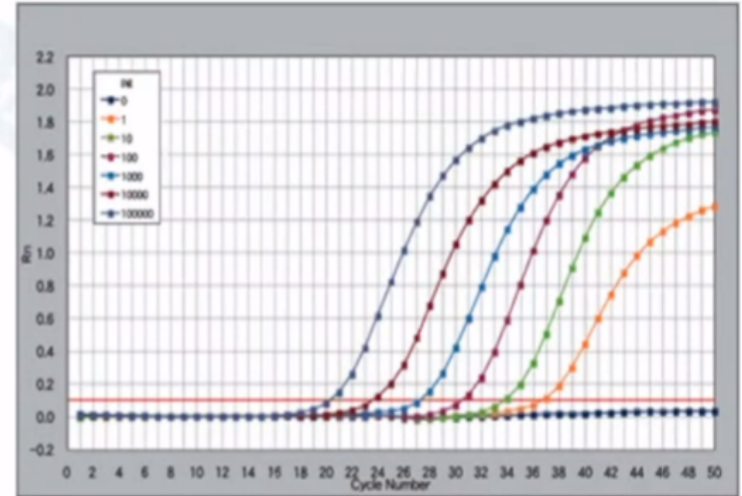
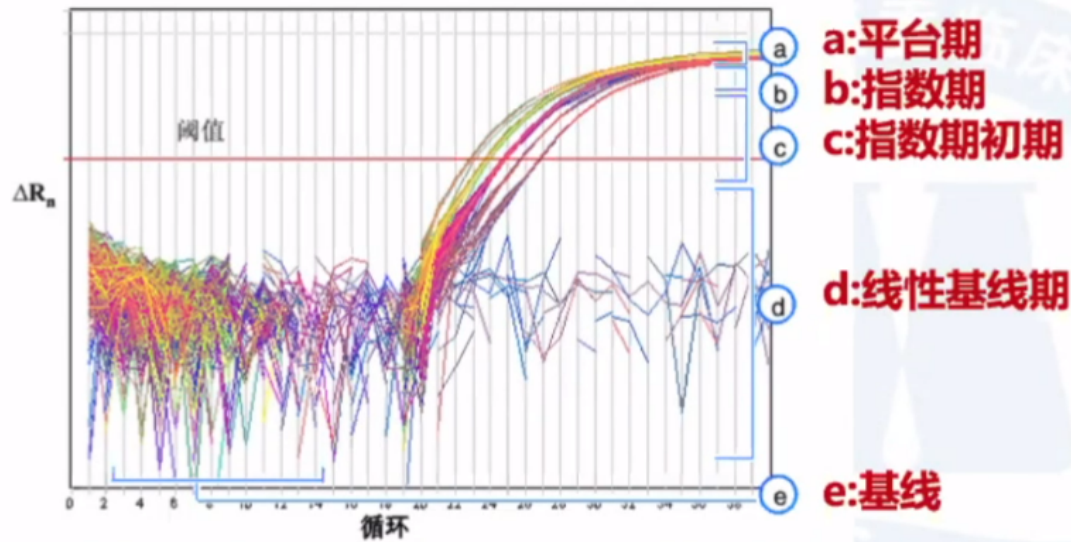
FRET首先是由Föster于1948年提出。

当一个**荧光基团**与一个**荧光淬灭基团**（可以淬灭前者的发射光谱）距离邻近至一定范围时，就会发生荧光能量转移，淬灭基团会吸收荧光基团在激发光作用下的激发荧光，从而使其发不出荧光。但如果荧光基团一旦与淬灭基团分开，淬灭作用即消失。

3. Cleavage.



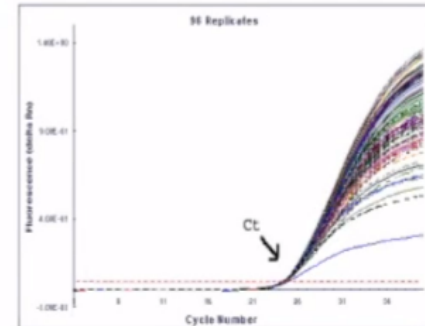
实时荧光PCR的基本理论与概念



基线 (baseline)：是指荧光信号积累但低于仪器的测定限之下的PCR循环。仪器软件通常将基线设为3-15循环时的荧光信号，但通常需要人工设置。

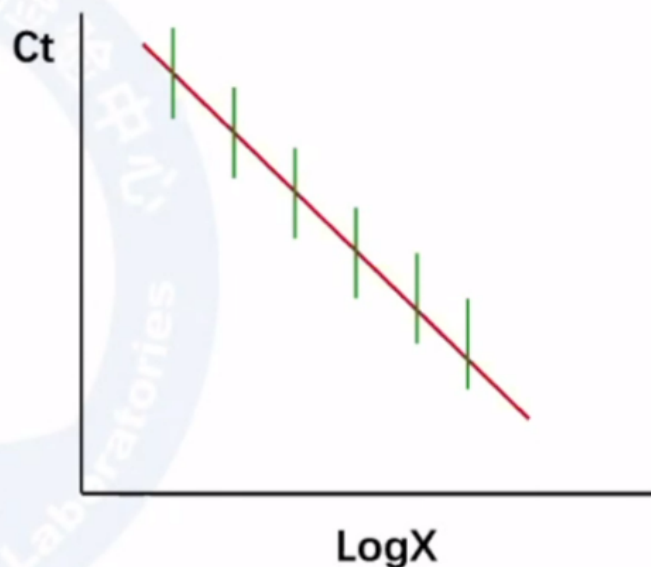
阈值 (threshold)：是指3-15个循环之间的基线荧光信号均值标准差的10倍。高于阈值的荧光信号被认为是真实信号，用于定义样本阈值循环数 (Threshold cycle, C_t)。

C_t 值 (Threshold cycle, C_t)：扩增过程中荧光信号强度超过阈值的PCR循环数。是实时PCR的基本参数，也是获得准确且重现性好的数据的基础。起始模板量越多，高于背景信号所需的PCR循环数越少，反之则越多。



实时荧光PCR原始模板量X与Ct值之间关系的数学模型

- ✓ 只要获得未知标本的Ct值，即可从标准曲线（从已知浓度的系列稀释标准品的同时扩增检测得到）上计算出该标本的起始拷贝数
- ✓ 这是采用外部标准品（简称外标）进行实时荧光PCR绝对定量的基本原理。



基本计算公式的推导

$$Y_n = X(1 + E)^n \quad (1)$$

其中， Y_n 为第 n 个循环后扩增产物的量， X 为原模板数， E 为扩增效率， n 为扩增循环数。

在扩增达到阈值线时，此时， $n = Ct$ ，于是，扩增产物的量为：

$$Y_{Ct} = X(1 + E)^{Ct} \quad (2)$$

Y_{Ct} 为荧光信号达到阈值强度时扩增产物的量。在阈值线设定以后，它就是一个常数。
(2) 式两边同时取对数，得：

$$\text{Log}Y_{Ct} = \text{Log}X(1 + E)^{Ct} \quad (3)$$

$$\text{亦即： } \text{Log}Y_{Ct} = \text{Log}X + Ct \times \text{Log}(1 + E)^{Ct} \quad (4)$$

纵坐标为Ct值横坐标为起始拷贝数时的数学模型

$$\text{Log}X = -Ct \times \text{Log}(1 + E) + \text{Log}Y_{Ct} \quad (5)$$

可变换为:

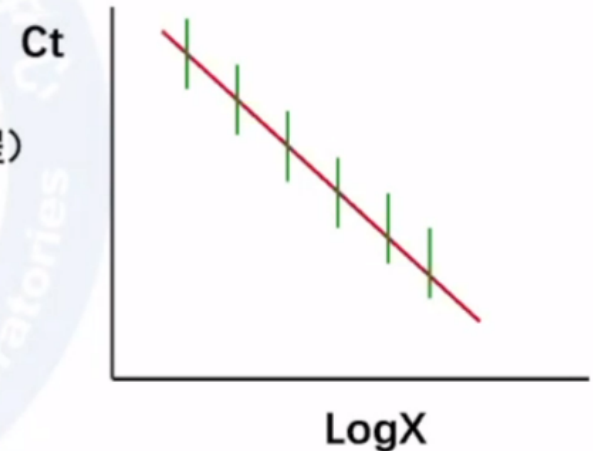
$$Ct = \underbrace{-\frac{1}{\text{log}(1+E)}}_{A} \times \underbrace{\text{Log}X}_{X} + \underbrace{\frac{\text{Log}Y_{Ct}}{\text{Log}(1+E)}}_{B} \quad (6)$$

$$Y = A \times X + B \quad (\text{直线方程})$$

✓ $A = -\frac{1}{\text{log}(1+E)}$, $B = \frac{\text{Log}Y_{Ct}}{\text{Log}(1+E)}$

✓ 如果扩增效率为1 (100%), 则斜率 $A = -\frac{1}{\text{log}2} = -3.32$

✓ 如果扩增效率为0.5 (50%), 则斜率 $A = -\frac{1}{\text{log}1.5} = -5.68$



Ct值大小与原始模板量之间的关系

$$Ct = -\frac{1}{\log(1+E)} \times \text{Log}X + \frac{\text{Log}Y_{Ct}}{\text{Log}(1+E)}$$

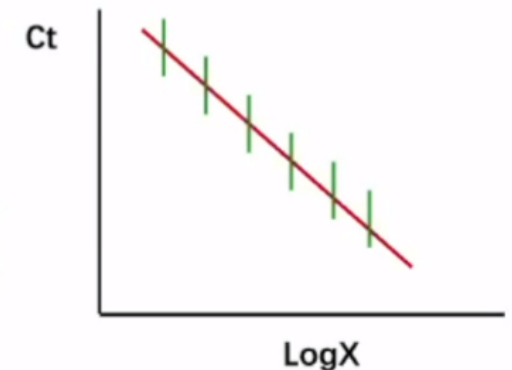
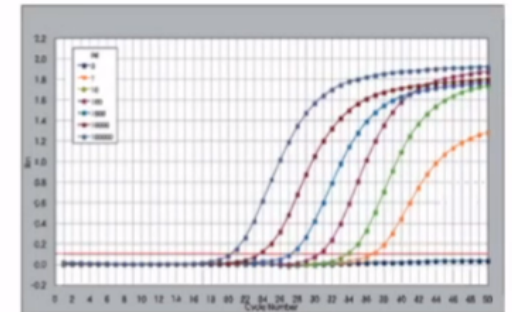
扩增效率如果是100%，则： $Ct = -\frac{\text{Log}X}{\log 2} + \frac{\text{Log}Y_{Ct}}{\text{Log}2}$

$$Ct1(\text{标本1}) - Ct2(\text{标本2}) = -\frac{1}{\log 2} (\text{Log}X1 - \text{Log}X2) = -\frac{1}{\log 2} \text{Log} \frac{X1}{X2}$$

假如： Ct 值1(标本1) - Ct 值2(标本2) = -1或-2或-3，即标本1的浓度(X_1)是标本2的浓度(X_2) ($-\frac{1}{\log 2} \times \text{Log} \frac{X1(2X_2 \text{或} 4X_2 \text{或} 8X_2)}{X2} = -1 \text{或} -2 \text{或} -3$) 的2倍或4倍或8倍

- ✓ 浓度稀释2倍，Ct值升高1.00
- ✓ 浓度稀释3倍，Ct值升高1.58
- ✓ 浓度稀释4倍，Ct值升高2.00
- ✓ 浓度稀释5倍，Ct值升高2.32
- ✓ 浓度稀释8倍，Ct值升高3.00
- ✓ 浓度相差10倍，Ct值相差3.32

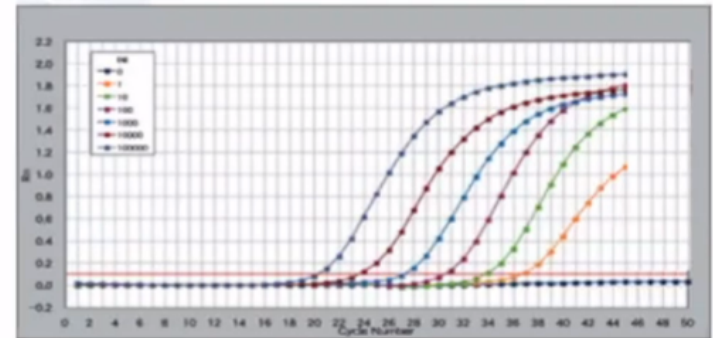
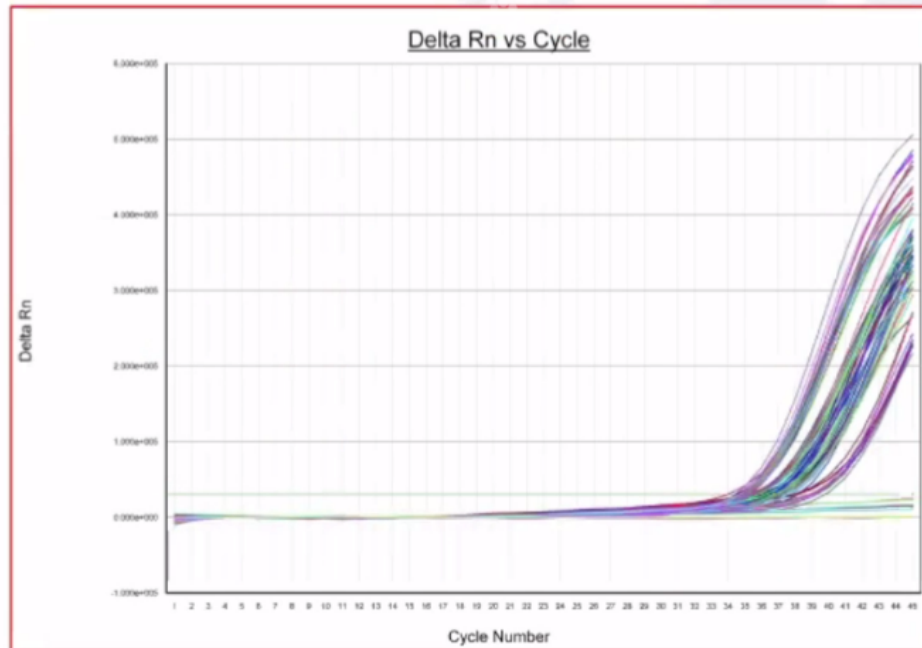
轻松一下：如果稀释6倍呢？



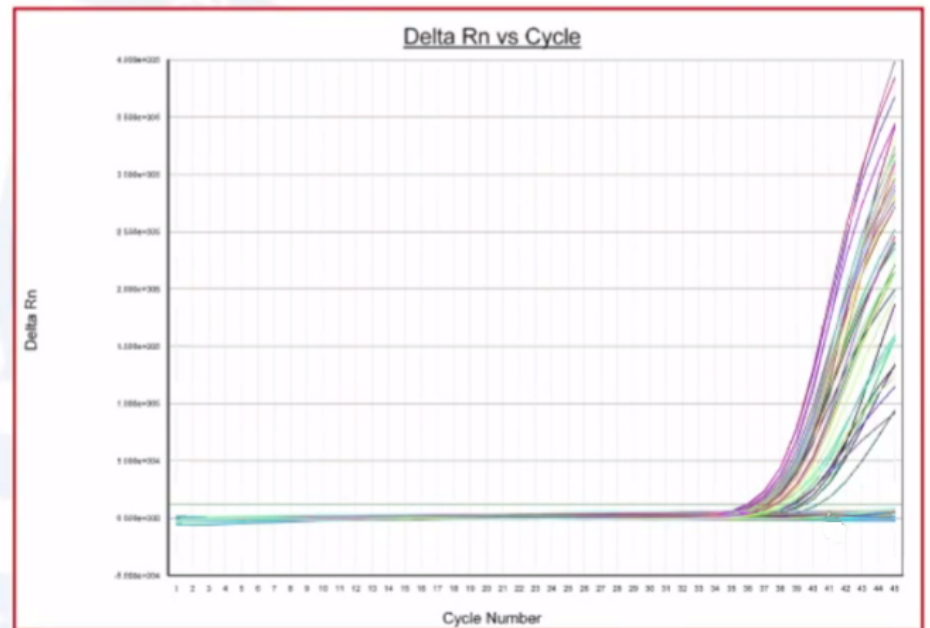
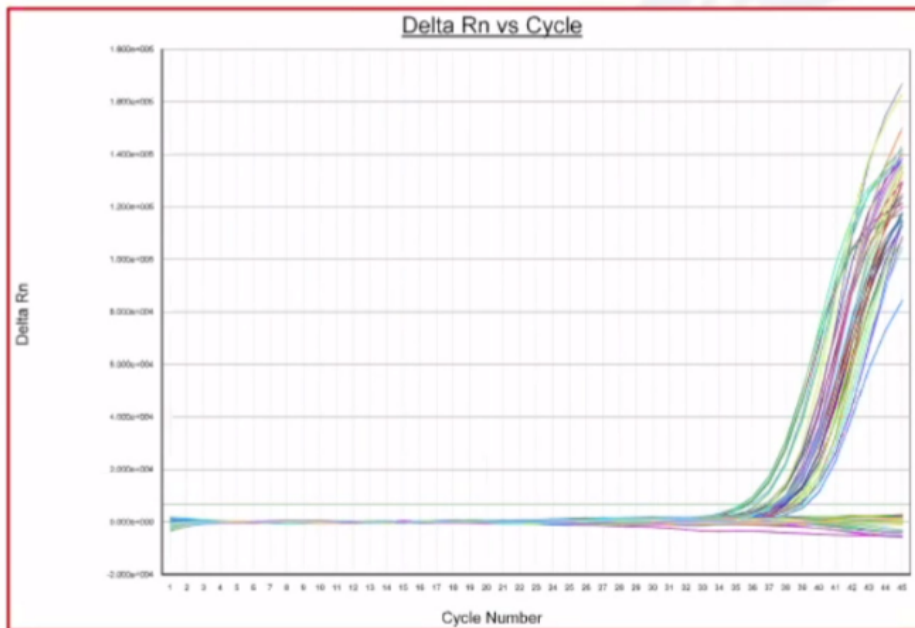
Ct值大小与原始模板量之间的关系

问题：

- ✓ 如果一个新冠病毒核酸检测试剂盒（实时荧光RT-PCR方法），扩增循环数45，**Cut-off值**（即界限值）**40**，检测限为**200copies/mL**，如果某个患者咽拭子样本检测的Ct值是**30**，请问：该患者咽拭子中病毒载量大约是多少？
- ✓ 如果Ct值是**31**，该患者咽拭子中病毒载量大约又是多少？



一个样本3倍倍比稀释（浓度分别为约111、37和12 copies/mL），用一个检测限为200 copies/mL的试剂盒检测，每一浓度21个重复，得到如图左（仅显示ORF1ab曲线）



问题？

- ✓ 最新版（第九版）诊疗方案出来了，**Ct ≥ 35就不需要隔离或可以出院了**，那作为我们检验科来说，如果**Ct值介于35到40之间的话**，我们是判读**阳性**呢？还是**阴性**呢？
- ✓ 连续两次新型冠状病毒核酸检测**阴性**（**荧光定量PCR方法，界限值低于35**，采样时间至少间隔24小时）怎么解释？

新冠病毒核酸检(混采)				大学第一附属医院检验报告单		样本编号: 2123	
姓名:	病人类型, 住院	床号:	标本类型:	咽拭子			
性别: 男	住院号: ZY01000	费用: 01	采样时间:	2021-12-08 19:10:26			
年龄: 58岁	送检科室: 入院接诊处(2)	送检医生:	检测	测: 奥飞湿关节炎			
项目名称	检测方法	结果	Ct值	检测下限	单位		
新型冠状病毒(SARS-CoV-2)核酸检测	荧光定量PCR技术	阴性(-)	>35	500copies/mL			
备注:							
送检时间: 2021-12-08 19:26		报告时间: 2021-12-08 21:25		检验员:		审核员:	
此报告只对样本负责, 如有疑问请在报告日期两天内与检测部门联系, 检测部门地址: 河南省郑州市金水区龙子湖中环路12号, 联系方式: 0571-56279230. 项目名称前有*标识的, 为豫卫医【2021】31号文件规定的临床检验结果互认项目(2021							

面对《新冠肺炎诊疗方案（第九版）》的重大调整，我们核酸检测人应该做些什么？

来源: 郭... 2实验诊断
2022-03-18 12:50

3月15日，国家卫健委医政管理局发布最新版新冠病毒肺炎诊疗方案，方案中对我国的防疫政策首次做出重大调整，主要包括：

1. 轻型病例实行集中隔离管理，不再收入定点医院，避免造成医疗机构床位紧张。
2. 解除隔离管理及出院标准修

张文宏回应第九版诊疗方案中CT值变化

看看新闻Knews
2022-03-17 11:15

3月17日10:00，上海举行第125场新冠肺炎疫情防控工作新闻发布会，介绍上海市疫情最新情况。有记者提问：请问张文宏主任，刚才介绍了第九版诊疗方案

作为一名核酸检测人，我们最应关注的就是：

- ✓ 1. 解除隔离管理及出院标准修改，由**核酸检测阴性改为核酸检测Ct值 ≥ 35**。
- ✓ 2. 核酸检测**Ct值大于35时，不算作核酸阳性**。

← 完全错误的理解

想跟我们新冠核酸检测实验室各位同道说的是

这个**轻型解除隔离管理**和**普通型、重型等的出院**标准，与我们**非定点医院**和**非针对隔离点人员检测**的实验室**核酸检测及结果报告**无关!!!

通俗一点讲：**原来怎么报还怎么报!**只不过**原来没报Ct值的可以增报一下**
这个不是给核酸检测实验室用的!

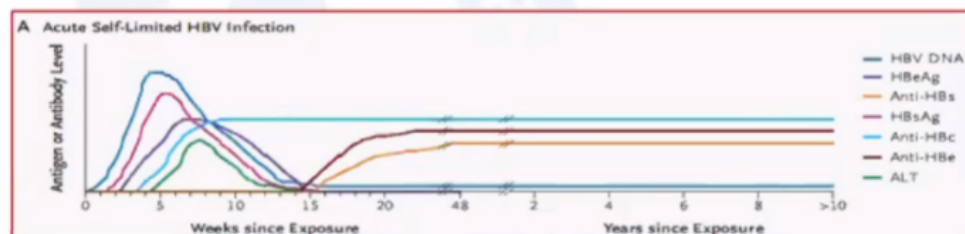
是给**隔离点管理者**和**定点医院的临床医生**用的!

为什么要这么改？

有一类疾病，叫自限性疾病？

一些急性感染：

- ✓ 病毒性感冒（如流感病毒、腺病毒、呼吸道合胞病毒、冠状病毒等所致）
- ✓ 甲型和戊型肝炎
- ✓ 水痘
- ✓ 轮状病毒肠炎
- ✓



自限性疾病：

- ✓ 是指疾病在发展到一定程度后，靠机体调节能指病情发展并逐渐恢复痊愈的疾病。
- ✓ 当病原体入侵人体导致感染后，虽然会令人出现发热、咳嗽、流涕等临床症状，但这些症状持续时间短，有时候即使不经特殊治疗，病情也会好转。

有临床症状 → 完全恢复至正常（恢复期）

2022年3月18日下午国新办举行“从严抓好疫情防控工作”新闻发布会

国家卫生健康委医政医管局局长焦雅辉：

- ✓ 实践研究证明，在恢复期的患者，Ct值 ≥ 35 的时候，样本中是分离不出活病毒的，这意味着这样一些患者已经不具有传染性了。所以，像这样的患者，就可以出院，可以回家。
- ✓ 之所以作出这样的调整，也是为了让**我们更加充分地提高医疗资源的利用效率**。
 - 一方面，我们能够把这些真正需要住院治疗的病例集中收治到医院里面来，保证医疗救治的效果。
 - 另一方面，也让我们有更加充足的医疗资源为广大人民群众提供正常的医疗保障和医疗服务。
- ✓ 作出这个调整，也可以说是更加全面地落实和体现了我们**人民至上和生命至上的原则**。



THANKS

“The development of general ability for independent thinking and judgment should always be placed foremost, not the acquisition of special knowledge.”

(**独立思考和独立判断的一般能力，应当始终放在首位，而不应该将专业知识放在首位。**)

--阿尔伯特·爱因斯坦 (Albert Einstein)



Albert.Einstein(1879~1955)

Reading makes a full (**读书使人充实**), deep thinking people (**思考使人深邃**), talk to us sober (**交谈使人清醒**).

-- 本杰明·富兰克林 (Benjamin Franklin)



(Benjamin Franklin (1706-1790))

唯有思考，才能深邃