

SARS 冠状病毒实时荧光 RT-PCR 定量检测*

陈苏红 张敏丽 黄坚 丁雨 伯晓晨 王升启**

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 为建立一种快速、准确、特异的 SARS 病毒 RNA 定量检测方法, 根据复合探针荧光定量分析原理, 对 SARS 病毒核酸进行实时荧光定量 RT-PCR 检测. 借助计算机辅助, 对 SARS 病毒基因靶序列以及检测引物和探针进行了优化筛选; 利用体外转录 SARS 病毒 RNA 靶序列, 对 RT-PCR 反应的镁离子浓度参数进行了优化; 比较 Trizol 法、磁珠法、Qiagen 法、煮沸法等 4 种方法提取 RNA 的检测效果, 建立了样本处理方法; 通过对构建的体外转录靶序列模型的检测, 对本方法的灵敏度、特异性、定量线性关系、精确度等进行了评价, 并通过对 42 例临床标本的检测对本方法的检测效果进行了评估. 通过克隆 SARS 病毒核酸靶序列并进行体外转录, 获得了长度约 1.2 kb 的体外转录 RNA 靶序列; 经优化, 荧光 RT-PCR 反应液中的 Mg^{2+} 浓度以 4.0 mmol/L 为最好; RNA 提取方法采用磁珠法效果较好; 本方法的检测灵敏度最低可达 5 个拷贝的体外转录 RNA 分子, 特异性 100%, C_t 值的 CV 值小于 5%. 对临床确诊的 42 份 SARS 病人血清和漱口水标本的检测结果表明, 该方法的检出率为 79%, 与荧光抗体检测法的符合率为 70%. 上述结果表明, 该方法建立的荧光定量 RT-PCR 技术能够快速准确、特异、敏感地对 SARS 病毒核酸进行定量分析, 为临床 SARS 冠状病毒 RNA 的检测提供了新的, 更为有效的检测方法.

关键词 非典型性肺炎, SARS 病毒, 荧光定量 RT-PCR

学科分类号 Q78

近期出现的非典型性肺炎 (SARS) 是一种对人类危害大, 传播速度快且致死率较高的传染性疾 病, 目前尚无有效的预防和治疗药物, 因此, 对非典型性肺炎的早期诊断尤为重要. 早发现非典型性肺炎病情不但可以进行早隔离, 及时切断传染源, 而且可以对非典型性肺炎病人早诊断、早治疗, 从而降低死亡率. 现已确认, 一种 SARS 冠状病毒变种为目前流行的非典型性肺炎主要病原体之一, 对该病原体的检测即可以实现对非典型性肺炎的诊断^[1-3].

目前, SARS 冠状病毒检测和诊断技术的研究和开发主要有两大类^[4]: 基于病毒抗原-抗体反应的免疫学方法; 针对病毒 RNA 的核酸检测技术. 免疫学方法通过抗体检测, 可以了解病毒感染以及疾病发生发展进程. 然而, 由于抗体在病毒感染到一定时期才会出现, 因此, 在作为快速地控制 SARS 暴发的方法时存在局限性. PCR 可以检测出在各种样本 (血液、粪便、呼吸道分泌物、组织切片) 中 SARS 病毒的遗传物质 RNA, 其优点是可以测定严重急性呼吸综合征病毒的基因, 实现早期诊断, 在 SARS 病毒的诊断和检测中具有重要作用.

为了进一步提高对 SARS 病毒核酸的检测水

平, 在 SARS 冠状病毒感染准确定性的基础上进一步对病毒感染数量进行精确定量, 本方法在已有复合探针荧光定量 PCR 技术平台的基础上^[5-9], 建立了用于 RNA 定量检测的实时荧光 RT-PCR 检测方法. 与目前已有的其他方法相比, 该方法用于对 SARS 病毒核酸的检测不仅可以对病毒感染数量进行准确定量, 还可以提高检测的灵敏度、精确度及可靠性, 降低了假阴性和假阳性率. 而且检测过程具有高效、快速、成本低等特点, 为 SARS 冠状病毒的定性定量检测提供了更加有效的方法.

1 材料与方法

1.1 材料

DNA 合成试剂均购自美国 Glen Research 公司, FAM-Phosphoramidite、3'-Dabcyl-CPG 购自 Cruachem (TRANSGENOMICS) 公司, dNTPs、 $MgSO_4$ 、AMV 逆转录酶、T4 DNA 聚合酶、DNA 纯化试剂盒、pGEM T 载体均购自美国 Promega 公司, Trizol

* 国家高技术“863”计划资助项目 (2003AA20820) 和全军医药卫生科研基金课题资助.

** 通讯联系人.

Tel: 010-66932211, E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2003-08-07, 接受日期: 2003-09-30

购自 Invitrogene 公司, 氨基磁珠购自 Cortex Biochem 公司, Qiagen RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司.

培养 SARS 冠状病毒 RNA 由浙江省疾病预防控制中心提供; 非典型性肺炎患者血清样本 (经临床确诊及荧光抗体法检测), 由解放军 309 医院提供; 非典型性肺炎患者漱口水样本 (经临床确诊) 由北京市中西医结合医院提供; SARS 冠状病毒阴性血清由解放军 301 医院提供; 健康人漱口水由健康自愿者提供.

iCycler iQ™ 实时 PCR 检测仪为 BIO-RAD 公司产品; 391A 型 DNA 合成仪为 PE 公司产品; Gel Doc 1000 凝胶成像仪为 Bio-RAD 公司产品.

1.2 靶序列选择及探针与引物的设计

根据 SARS 冠状病毒核酸序列的特点^[2,3], 选取其最保守的部位 25 983 ~ 26 123 (cds2) 作为靶序列, 该段序列长度 141 bp, GC 含量 44%, 经

RNAstructure3.7 分析软件的二级结构分析结果表明, 该靶序列无特殊的二级结构, 经计算机及网上 BLAST 特异性分析, 与已知人 DNA 序列和其他病毒无明显的相似性, 说明该片段的特异性也很好. 同时, 选择的靶序列在所有已测序的 9 株 SARS 冠状病毒序列中均能找到完全互补的部分, 因此将其作为检测 SARS 冠状病毒 RNA 的靶序列.

根据复合探针荧光定性定量分析原理, 依照待检靶分子序列, 设计与其中间位置 26 028 ~ 26 045 区间片段负链互补的荧光标记探针 F6, 由 27 个核苷酸组成, 其 5' 端带一荧光素分子, 3' 端带一延伸阻断分子磷酸. 此外, 设计一条与荧光探针 5' 端互补的淬灭探针 Q6, 其 3' 端连接一个淬灭分子对甲基红, 含有 21 个核苷酸.

设计的上游引物 F6 有 24 个核苷酸, 与复合探针相距 9 个核苷酸; 下游引物 Rt6, 与复合探针相距 69 个核苷酸. 引物与探针的序列与位置见表 1.

Table 1 Primers and probes used in the quantitative RT-PCR assay

Primer or probe	Sequence (5'→3')	Length/nt	Position
Forward primer F6	ACGGC TCTTC AGGAG TTGCT AA	22	25 998 ~ 26 019
Reverse primer R6	TTCGT ACTCA CTTC TTGT CTAC A	26	26 073 ~ 26 098
Fluorescent probe P6	FAM-TGGAT CCAAT TTATG ATGAG CCGAC GA	27	26 028 ~ 26 045
Quencher probe Q6	GCTCA TCATA AATTG GATCC A-Dabeyl	21	26 028 ~ 26 048

1.3 探针与引物的合成

引物与探针均用 391A 型 DNA 合成仪合成. 其中荧光探针 5' 端加上一荧光素分子, 3' 端加上一延伸阻断分子磷酸. 淬灭探针 3' 端连接一个淬灭分子-对甲基红. 合成后引物通过反相层析进行纯化, 探针通过薄层色谱法进行纯化^[9].

1.4 RNA 靶序列的体外转录

取浙江省疾病预防控制中心提供的培养 SARS 冠状病毒 RNA 作为逆转录模板, 以 Oligo dT₍₁₆₎ 为引物, 按常规 RT-PCR 方法进行逆转录, 逆转录后的第一链 cDNA 用 F52 (25 474 ~ 25 455)、R53 (26 519 ~ 26 539) 引物扩增. 将扩增产物用 pGEM-T 载体进行克隆, 将克隆产物转化大肠杆菌 JM109, 提取质粒 DNA 进行序列测定.

将含靶序列的质粒 DNA 用限制性内切酶 *Nde* I 酶切线性化并回收, 以该线性化 DNA 为模板, 按 Ribomax™ Large Scale RNA Production Systems-T7 试剂盒所说明的方法进行体外转录, 转录产物经酚氯仿抽提后, 异丙醇沉淀, 然后用无 RNA 酶水稀释

分装.

1.5 SARS 病毒 RNA 的提取

分别按下述 4 种方法处理血清标本. a. Trizol 法: 100 μl 样本加入 1 ml Trizol 裂解液, 混匀, 室温放置 2 min; 加入氯仿 100 μl, 室温放置 2 min; 4℃, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清用等量异丙醇沉淀, 离心后沉淀用 75% 乙醇洗涤, 干燥后用无 RNA 酶水 20 μl 溶解, 取 5 μl 用做 RT-PCR 模板. b. 磁珠法: 400 μl 裂解液 (7.5 mol/L 盐酸胍) 中加入 200 μl 样本, 室温摇动 1 min, 加入磁珠悬液 10 μl, 混合后 70℃ 水浴 5 min, 室温放置 10 min, 然后置磁架上吸去上清, 依次用洗珠液-1 和洗珠液-2 各 1 ml 洗涤磁珠, 再将洗涤后的磁珠加无 RNA 水 10 μl, 80℃ 加热 1 min, 立即置冰浴 5 min, 最后将上述磁珠悬液 5 μl 加入 RT-PCR 反应液中. c. Qiagen 法: 按试剂盒方法进行, 140 μl 样本加入 AVL 裂解液 560 μl, 放置 5 min 后, 加入 560 μl 无水乙醇, 混匀后转移至 Qiagen RNA 纯化柱上, 常温下 8 000 r/min 离心 1 min, 用洗涤液

AW1 500 μl 洗涤, 然后再用洗涤液 AW2 500 μl 洗涤一次, 最后加入无 RNA 酶水 60 μl , 8000 r/min 离心 1 min, 取离心后上清液 5 μl 用做 RT-PCR 模板. d. 煮沸法: 80 μl 样本与 20 μl 裂解液 (20% NP-40) 混合, 煮沸 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清 5 μl 用做 RT-PCR 模板.

1.6 实时荧光定量 RT-PCR 检测

取 RT-mix (上游引物 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 下游引物 0.5 $\mu\text{mol/L}$, dNTPs 混合溶液 0.2 mmol/L, $5 \times$ PCR 反应缓冲液 4 μl , 4.0 mmol/L Mg^{2+}) 13.8 μl , E-mix (AMV 逆转录酶 2 U, TFL DNA 聚合酶 2 U) 0.7 μl , 荧光探针 0.2 μl , 淬灭探针 0.2 μl 按顺序混合, 加入体外转录产物参比品 (1×10^3 copies/ μl) 5.0 μl , 以阴性参比品为阴性对照, 置 PCR 仪上 45 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min 后, 在 iCycler iQTM 实时 PCR 检测仪上进行荧光 PCR 扩增. PCR 循环条件: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s, 扩增 50 个

循环.

2 结 果

2.1 RNA 靶序列模型的体外转录

克隆的靶序列经 M13/PUC 引物 (Reverse: 5' AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG 3'; Forward: 5' CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG 3') 扩增, 扩增产物大小约 1.2 kb, 与预想的结果一致. 经测序鉴定, 与已知目的序列完全一致. 说明成功地获得了正确的靶序列克隆. 含靶序列的质粒 DNA 经体外转录, 获得了与预想结果一致的靶序列体外转录 RNA 产物.

2.2 RNA 提取方法的优化

由实验结果可见, Trizol 法、磁珠法、Qiagen 法提取 RNA 效果较好, 而煮沸法处理效果相对较差. 在 Trizol 法、磁珠法、Qiagen 法的 3 种方法中, 磁珠法操作简便、样本易于富集、成本相对较低. 实验结果见图 1.

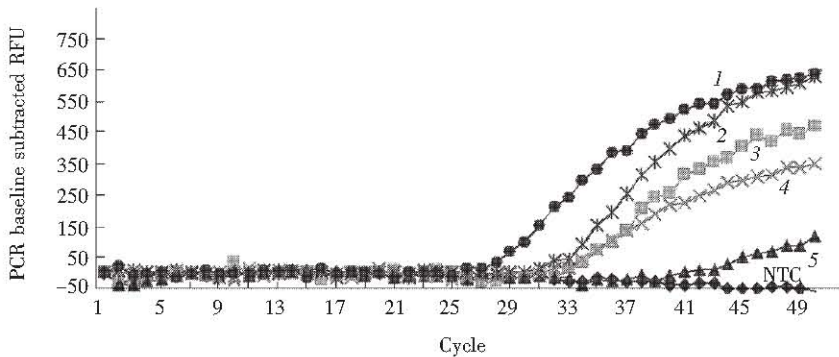


Fig. 1 Comparison of efficiency of different RNA isolation methods

1: untreated RNA; 2: Isolated with magnetic particles; 3: Isolated with Trizol kit; 4: Isolated with Qiagen kit; 5: Isolated by boiling.

2.3 镁离子浓度优化结果

镁离子浓度是影响 RT-PCR 反应的关键因素之一, 本方法对不同浓度 (2.0 mmol/L、2.5 mmol/L、3.0 mmol/L、3.5 mmol/L、4.0 mmol/L、4.5 mmol/L、5.0 mmol/L) 的 Mg^{2+} 浓度对荧光 RT-PCR 检测效果的影响进行了比较. 检测结果表明: Mg^{2+} 浓度对 C_t 值有明显的影响, 4.0 mmol/L 的 Mg^{2+} 浓度 C_t 值最小, 检测效果最好 (表 2).

Table 2 Impact on threshold cycle (C_t) of concentration of Mg^{2+}

$c(\text{Mg}^{2+}) / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	C_t
2.0	39.87 \pm 1.01
2.5	43.99 \pm 1.04
3.0	37.47 \pm 1.50
3.5	37.09 \pm 0.95
4.0	32.23 \pm 0.85
4.5	35.75 \pm 0.99
5.0	33.45 \pm 0.60

2.4 检测的特异性

为了考察本方法检测的特异性, 对 20 份 SARS 冠状病毒阴性血清以及 20 份健康人漱口水共 40 份, SARS 冠状病毒阴性标本以及 SARS 病毒阳性血清及漱口水各 5 份阳性标本, 进行了荧光 RT-PCR 检测. 全部阴性标本均未检出, 而 10 份阳性标本均被检出. 结果表明, 本方法检测的特异性为 100%, 具有很好的检测特异性.

2.5 检测的灵敏度及定量线性分析

取不同 RNA 载量的体外转录参比品 (1×10^0 、 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 copies/ μl) 各 5 μl , 进行实时荧光 RT-PCR 检

Table 3 Sensitivity of detection with quantitative RT-PCR

Copies of target RNA	C_t
5×10^8	12.01 \pm 0.21
5×10^7	14.19 \pm 0.28
5×10^6	18.49 \pm 0.42
5×10^5	22.77 \pm 0.46
5×10^4	26.39 \pm 0.33
5×10^3	30.73 \pm 0.42
5×10^2	34.73 \pm 0.90
5×10^1	42.06 \pm 1.16
5×10^0	47.13 \pm 1.60

测, 从表 3 可见, 本方法检测的敏感性达 5 个拷贝的体外转录 RNA 分子.

将上述数据进行回归分析, 得到 RT-PCR 实验数据的回归方程 (图 2): $y = -4.207x + 47.044$, 相关系数为 0.993. RT-PCR 实验结果表明, 在 $5 \times 10^1 \sim 5 \times 10^8$ 拷贝范围之间, 样本拷贝数与其相应的 C_t 值具有良好的相关性, 因此, 本方法可对 $5 \times 10^1 \sim 5 \times 10^8$ 拷贝范围内的模板进行准确定量.

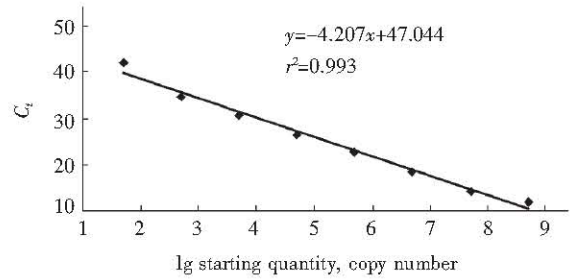


Fig. 2 Linearity analysis of quantitative RT-PCR

2.6 精确度

将不同拷贝数的体外转录产物 (1×10^0 、 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 copies/ μl) 重复测定 5 次, 将 5 次的实验结果进行统计分析, 从而对精密度进行考核. 实验结果见表 4.

Table 4 Precision and reproducibility of quantitative RT-PCR

Copies of target RNA	C_{t1}	C_{t2}	C_{t3}	C_{t4}	C_{t5}	C_t	SD	CV/%
5×10^1	40.86	39.73	41.40	40.00	42.30	40.86	1.05	2.56
5×10^2	38.13	36.93	37.02	36.88	37.39	37.27	0.52	1.39
5×10^3	33.45	33.13	32.52	32.68	33.11	32.98	0.37	1.13
5×10^4	29.19	29.50	29.12	29.15	29.22	29.24	0.15	0.52
5×10^5	26.23	25.59	25.36	25.83	26.02	25.81	0.34	1.33
5×10^6	23.00	22.00	22.08	22.18	22.53	22.34	0.41	1.84
5×10^7	20.10	19.62	19.98	19.68	19.99	19.87	0.21	1.06

对上述结果的统计分析表明, 本方法检测的精密度很好, 不同 RNA 载量样本 5 次重复实验结果 CV 值小于 5%. 其中第二轮 PCR 检测样本 5 次重复实验结果 C_t 值的 CV 值小于 2%.

2.7 临床标本检测

通过对检测结果的统计分析 (表 5) 可看到, 对于 20 份血清标本, 本方法与临床诊断结果的符合率为 75%, 对于 22 份漱口水标本, 本方法与临

床诊断结果的符合率 (检出率) 为 82%, 就全部标本来说, 本方法与临床诊断结果的符合率 (检出率) 为 79%.

此外, 比较了荧光抗体检测法与本试剂盒的检测效果, 20 份临床血清样品中, 两法检测均为阳性的有 13 份, 均为阴性的有 1 份, 二者的符合率达 70%, 说明两种方法具有一定的可比性.

Table 5 Statistic analysis of clinical sample detection

Specimen type	Cases	Number of positive	Ratio of positive
Serum	20	15	75%
Throat wash	22	18	82%
Total	42	33	79%

3 讨 论

本方法建立的复合探针实时荧光定量 RT-PCR 技术能够准确、特异、敏感地对 RNA 靶序列模板进行定量分析^[6-9], 与其他实时 PCR 技术相比, 不仅具有较大的动力学检测范围 (近 10 万倍的起始靶模板量)、避免了 PCR 扩增的污染问题, 可同时对多种不同靶基因以及大量样品进行分析等, 还具有以下特点: a. 采用非荧光淬灭剂, 本底低; b. 对扩增产物影响较小; c. 长探针上的延伸阻断分子防止引物二聚体形成及非特异性荧光的产生; d. 探针设计、合成、标记及纯化方便。

本实验室以前建立的复合探针技术检测的靶序列模板为基因组 DNA 或质粒, 可以直接进行荧光 PCR 检测, 而 SARS 病毒靶序列模板为 RNA, 因此, 在 PCR 前必须对靶序列进行有效的逆转录, 然后才能进行 PCR 扩增, 本方法通过多次实验, 成功地解决了检测 RNA 时逆转录到 PCR 过程的转换。使复合探针法在 RNA 检测方面得到进一步的应用。

为了便于建立 SARS 冠状病毒 RNA 实时荧光 RT-PCR 检测方法, 对各种检测条件进行优化, 使检测方法具有统一的标准, 以及建立检测过程的阳性/阴性对照, 本方法通过克隆 SARS 病毒靶序列然后进行体外转录的方法, 建立靶序列体外转录参比品, 以其作为模拟 SARS 病毒 RNA 进行了各种检测条件的优化等研究, 而且将其作为检测过程的阳性对照, 取得了较好的效果。

由于 SARS 病毒在标本如血清, 漱口水等中的含量很少, 尤其是疑似或早期 SARS 病人, 有可能因为病毒量太少或因处理过程中的损失而回收太少导致检测不出, 从而导致假阴性。因此, 一方面, 本方法在以前研究基础上, 采用套式 PCR, 即在模板 RNA 逆转录后通过两轮 PCR 的方法检测标本的病毒核酸, 大大提高了检测的敏感度和阳性标本的检出率, 另一方面, 对样本处理方法进行了研究, Trizol 法、磁珠法、Qiagen 法处理样品效果较

好, 而煮沸法处理效果相对较差。对 Trizol 法、磁珠法、Qiagen 法、煮沸法等 4 种样本处理方法进行了研究, 从中选择了操作简便、样本易于富集、成本相对较低的磁珠法作为最终采用的样本处理方法, 在实际应用过程中取得了很好的效果。

通过用体外转录产物以及临床标本的检测, 对本方法的灵敏度、定量线性关系、特异性、精确度等指标的分析, 说明本方法各项检测指标与同类方法相比较较好, 而且通过对一定数量临床标本的检测, 较高的检出率和符合率也说明本方法的准确度和可信度较高。

总之, 本方法建立的复合探针实时定量 RT-PCR 技术能够快速准确、特异、敏感地对 SARS 病毒核酸进行定性和定量分析, 为及时、准确地进行 SARS 冠状病毒的临床诊断提供了更加有效的方法, 使 SARS 病人的早诊断, 早隔离, 早治疗成为可能, 将成为非典型性肺炎防治的强有力工具。

参 考 文 献

- 1 Rota P A, Oberste M S, Monroe S S, *et al.* Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, 2003, **300** (5624): 1394 ~ 1399
- 2 秦鄂德, 祝庆余, 彭文明, 等. 重症急性呼吸综合症病例尸解肺组织中新型 SARS 冠状病毒部分聚合酶基因的序列测定. *军事医学科学院院刊*, 2003, **27** (2): 81 ~ 83
Qin E, Zhu Q, Peng W, *et al.* *Bull Acad Mil Med Sci*, 2003, **27** (2): 81 ~ 83
- 3 Marra M A, Jones J M, Astell C R, *et al.* The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*, 2003, **300** (5624): 1399 ~ 1404
- 4 杨瑞馥. 重症急性呼吸综合症 (SARS) 的病原与检验. *军事医学科学院院刊*, 2003, **27** (2): 81 ~ 83
Yang R X. *Bull Acad Mil Med Sci*, 2003, **27** (2): 81 ~ 83
- 5 王升启. 一种复合基因探针的结构和用途. *中国发明专利公报*, CN1261665A. 2000-08-02
Wang S Q. Structure of complex probe and its application. *Chinese patent documentation*, CN1261665A. 2000-08-02
- 6 Wang S Q, Wang X H, Chen S H, *et al.* A new fluorescent quantitative polymerase chain reaction technique. *Anal Biochem*, 2002, **309**: 206 ~ 211
- 7 陈苏红, 张敏丽, 王升启, 等. 一种快速定量检测炭疽杆菌方法的建立. *中华医学检验杂志*, 2003, **26** (2): 98 ~ 100
Chen S H, Zhang M L, Wang S Q, *et al.* *Chin J Lab Med*, 2003, **26** (2): 98 ~ 100
- 8 陈苏红, 王小红, 张敏丽, 等. 复合探针荧光定量 PCR 方法的建立. *生物技术通讯*, 2003, **14** (2): 127 ~ 130
Chen S H, Wang X H, Zhang M L, *et al.* *Letters in Biotechnology*, 2003, **14** (2): 127 ~ 130
- 9 Ota N, Hirano K, Warashina M, *et al.* Determination of interactions between structured nucleic acids by fluorescence resonance energy transfer (FRET): selection of target sites for functional nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26** (3): 735 ~ 743

Development of Real Time RT-PCR Assay for The Quantitation of SARS-Associated Coronavirus *

CHEN Su-Hong, ZHANG Min-Li, HUANG Jian, DING Yu, BO Xiao-Chen, WANG Sheng-Qi **

(*Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*)

Abstract In order to develop an assay for rapid, specific, quantitative detection of SARS-associated coronavirus, the primers and quantitative probes were designed and applied to detect coronavirus, based on the principle of complex probes quantitative assay. Sensitivity, specificity, reproducibility and range of quantitation of this method were determined. The quantitative RT-PCR for coronavirus with complex probes and an easy to handle and high efficiency method for isolation RNA from sample were established. The detect limit is 5 copies RNA per reaction and no negative samples or other RNA/DNA were detected with this method. It allows for a high sample throughput. It shows a very good precision, the coefficient of variation of threshold cycle was less than 5%. 42 clinical SARS samples were detected with this quantitative RT-PCR, the rate of SARS samples can be detected was 79%. It can be concluded that the method established for quantitation of SARS-CoV is highly sensitive, rapid and easy to handle and shows a very good reproducibility, it can be applied to clinical diagnosis.

Key words atypical pneumonia, SARS associated coronavirus, real time RT-PCR

* This work was supported by grants from State 863 High-Technology R&D Project of China (2003AA20820) and Military Fund for Research on Medicine and Health.

** Corresponding author. Tel: 86-10-66932211, E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

Received: August 7, 2003 Accepted: September 30, 2003