·论著·

2012 年发现的新冠状病毒分子检测方法的建立与探针优化

周为民，陆柔剑，耿合员，李辉，段希洁，杨扬，谭文杰

【摘要】 **目的** 建立 2012 年确定的新冠状病毒的分子检测方法，并筛选优化引物与探针。**方法** 依据最先发表的 208 bp 长的新冠状病毒 1b 片段核酸序列，比对分析后设计合成常规 RT-PCR 引物 1 对及荧光定量 RT-PCR 引物 1 对与 TaqMan 探针 2 条（TZ1，TZ2），同时合成锁核酸修饰的 TaqMan 探针 2 条（LNA-TZ1，LNA-TZ2）。建立检测新冠状病毒感染的常规 RT-PCR 方法与 4 种荧光定量 RT-PCR，分析比较其灵敏度与特异性，同时参照欧洲发表的 2 种荧光定量 RT-PCR 引物与探针对（upE，ORF1b）建立相应方法，以合成的阳性模板比较 6 对荧光定量 RT-PCR 引物与探针的检出灵敏度。**结果** 所合成的常规 RT-PCR 与荧光定量 RT-PCR 引物与探针皆有较好特异性，不能扩增其他人冠状病毒模板及常见呼吸道病毒模板，检出下限达 50～500 拷贝/反应。锁核酸修饰 TaqMan 探针可改善荧光定量 PCR 检测方法的反应性能，经锁核酸修饰的 TaqMan 探针与常规 TaqMan 探针相比，检出率提高 10 倍左右，其中 LNA-TZ1 与 upE 探针对具最佳反应性能。**结论** 本研究所建立的常规 RT-PCR 与荧光定量 RT-PCR 可用于新冠状病毒的分子检测，并推荐使用 LNA-TZ1 与 upE 探针对。本研究为新冠状病毒分子检测方法应用与改进奠定了基础。

【主题词】 冠状病毒属； 分子诊断技术； 核酸类

Molecular detection assays for 2012 identified novel human coronavirus (HCoV) and probe modification with Locked nucleic acid (LNA)

*ZHOU Wei-min**, *LU Rou-jian*, *GONG He-yuan*, *LI Hui*, *DUAN Xi-jie*, *YANG Yang*, *TAN Wen-jie*. * *National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing* 102206, China

Corresponding author: TAN Wen-jie, Email: tanwj28@yahoo.com

【**Abstract**】 **Objective** To develop and optimize the molecular detection assays for recently identified human coronavirus (HCoV) infection. **Methods** Based on the 208 base pair (bp) sequence of novel HCoV reported by HPA of UK, we designed and obtained several pairs of primer (F-1, R-1; F-2, R-2) and Taqman probes (TZ1, TZ2) for detection of novel HCoV. Two of probes were modified with LNA (LNA-TZ1, LNA-TZ2). Then, RT-PCR and various real time RT-PCR assays were developed and optimized in this study. We also compared our assays with the real time RT-PCR assays reported recently by Europe team based on upE or ORF1b target. **Results** The RT-PCR or real time RT-PCR assays for novel HCoV were developed without cross-reactivity with other HCoV and several common respiratory viruses using clinical specimen panel. The analytical sensitivity of assays were less than 50-500 copies per reaction and the detection was improved when Taqman probe modified with LNA-tagged, compared to no LNA-tagged in real time RT-PCR assays. The upE and LNA-TZ1 based assays were better than others. **Conclusion** The molecular detection sensitivity and specificity of TaqMan-based real time PCR assay could be improved when probe tagged with LNA. The upE or LNA-TZ1 based real time RT-PCR assay was recommend for detection of novel HCoV. This study laid a foundation for improving the performance of novel HCoV detection.

【**Key words**】 Coronavirus; Molecular diagnostic techniques; Nucleic acids

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2012.06.001

基金项目：基金项目："十二五"传染病重大专项（2011ZX10004-001）

作者单位：102206 北京，中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所（周为民、陆柔剑、耿合员、段希洁、杨扬、谭文杰）；上海辉睿生物科技有限公司（李辉）

周为民，陆柔剑共同第一作者

通信作者：谭文杰，Email：tanwj28@yahoo.com

万方数据

2012 年 9 月在全球确认了两个发生在中东地区的新冠状病毒感染病例，1 例死亡，1 例重症，两人的临床表现都是急性重症呼吸道感染合并肾衰竭[1-3]。科学家们通过对从患者体内分离的病毒进行基因测序发现，该病毒基因组全长 30 118 bp ((GenBank accession number: JX869059)，基因组结构从 5′端到 3′端依次为：5′-UTR-ORF1ab-S-ORF3 (formed to ORF3a, 3 b, 3 c, 3 d)-E-M-N-3′-UTR。从系统发生上看，该病毒与 bat-CoV-HKU4 和 bat-CoV-HKU5 的亲缘关系比较接近，基因组相似性都为 70.1%，而与 SARS-CoV 基因组相似性为 54.9%，为一种新的人冠状病毒（命名为 HCoV-EMC/2012），属于 β 类冠状病毒的 2c 亚群。

2012 年 9 月 25 日，英国科学家最先在网上发布了一段 208 bp 长的新冠状病毒序列[4]。2012 年 9 月 28 日欧盟科学家首次报道了针对该病毒的荧光定量（RT-PCR）检测方法[5]。为尽快在我国建立筛查新冠状病毒感染的实验室检测方法，本研究组在 2012 年 9 月 26 日依据最先发表的新冠状病毒 208 bp 长的核酸序列，比对分析后设计合成了常规 RT-PCR 引物 1 对、荧光定量 RT-PCR 引物 1 对与 TaqMan 探针 2 条（TZ1，TZ2），同时合成锁核酸修饰的 TaqMan 探针 2 条（LNA-TZ1，LNA-TZ2）。建立了检测新冠状病毒感染的常规 RT-PCR 方法与 4 种荧光定量 RT-PCR，并与随后欧盟科学家报道的 2 种分子检测方法进行了分析比较。

1 材料

1.1 引物、探针与模板及主要试剂 PCR 引物与探针及包含靶基因的阳性模板质粒（表 1）合成委托上海辉睿生物公司完成；经检测确证的其他人冠状病毒（HCoV-229E，-OC43，-NL63，-HKU1）及常见呼吸道病毒（Influenza A，RSV，piconavirus，HMPV，PIV-1，PIV-2，PIV-3，Adenovirus，bocavirus）阳性的样本为 2008—2010 年采集的鼻咽拭子（本室保存）。Taq 酶试剂盒（QIAGEN）购自北京奥科迪公司；核酸 Marker、各种限制性内切酶、小量质粒提取试剂盒均购自日本 TaKaRa 生物公司；其他化学试剂均为国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 阳性模板的体外转录与样本适用于 RNA 提取：依据引物对所包含靶区合成 DNA 片段，克隆至 pGEM-T 载体 T7 启动子下游。酶切线性化后用 MegaScript T7 体外转录试剂盒（Ambion 公司）进行 RNA 模板的合成，经 DNaseI 消化处理后纯化并定量稀释，并计算其拷贝数。

作为特异性验证的其他冠状病毒与常见呼吸道病毒感染样本为 2008—2010 年采集的鼻咽拭子（本室保存），待检样本各取 140 μl，采用 viral RNA mini Kit（Qiagen）提取 RNA 后溶于 50 μl DEPC 纯水中备用。

表 1 用于常规 RT-PCR 及荧光定量 Rt-PCR 检测新冠状病毒的引物及探针

Tab. 1 The primers and probes used for detection of novel human coronavirus

引物/探针 Primer/probe	序列 Sequences(5′-3′)	靶位 Target	产物长度 Size(bp)	备注 Notes
F1	TGCTAAGAATAGAGCTCGCACTGTT	ORF1a	201	RT-PCR
R1	ACCCATAAGATGCGGATTATCAACA			
F-2	ACTGTTGCAGGCGTGTCCATACTTAGC	ORF1a	109	Real-time
R-2	TAGTACCAATGACGCAAGTCGCTCC			RT-PCR prime
TZ1	FAM-CTAATCGCCAGTACCATCAG -BHQ1			Probe
TZ2	FAM-AGCACAATGACTAATCGCCA -BHQ1			
LNA-TZ1	FAM-CTAATCGCCAGT**ACC**ATCAG -BHQ1			LNA 修饰 Probe
LNA-TZ2	FAM-AGCACAATGACTAA**TCGC**CA -BHQ1			LNA-tagged probe
ORF1b-FP	TTCGATGTTGAGGGTGCTCAT	ORF1b	94	欧洲推荐确证用
ORF1b-RP	TCACACCAGTTGAAAATCCTAATTG			Validation assay
ORF1b-P	FAM-CCCGTAATGCATGTGGCACCAATGT-BHQ1			(Europe)
upE-FP	GCAACGCGCGATTCAGTT	E	74	欧洲推荐筛选用
upE-RP	GCCTCTACACGGGACCCATA			Screening assay
upE-P	FAM-CTCTTCACATAATCGCCCCGAGCTCG-BHQ1			(Europe)

注：LNA 修饰碱基以黑体下划线表示

Note: LNA residues in the probe are indicated in bold and line

万方数据

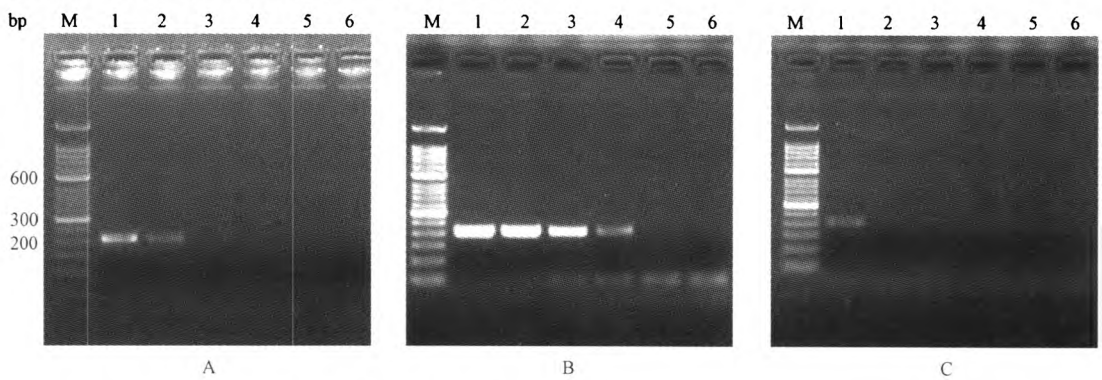
1.2.2 常规 RT-PCR 方法检测：阳性模板为倍比稀释的体外转录 RNA（london205），阴性对照为 PBS，引物序列见表 1。反应体系为 25 μl，包含：5 × QIAGEN one-step RT-PCR buffer：5 μl dNTP：1 μl；QIAGEN one-step enzyme mix：1 μl；引物（5 mmol/L）：2 μl（F-1 与 R-1 各 1μl），加水至 20 μl 后，每反应管中加入模板 5 μl。扩增条件设定为：50℃，30 min；95℃，15 min，94℃，30 s，60℃（或 55℃，68℃）30 s，72℃，45 s 共 40 个循环，72℃ 10 min。反应结束后取 5 μl 产物在 2% 琼脂糖胶电泳，观察结果。

1.3 荧光定量 RT-PCR 方法检测 荧光定量 RT-PCR 检测在 ABI7000 仪器上进行。阳性模板为 10 倍稀释的体外转录 RNA（london205 或 EO195），阴性对照为 PBS，引物与探针对参见表 1。反应体系为 25 μl，包含：2 × RT-PCR buffer：12.5 μl；25 × RT-PCR enzyme mix：1 μl；引物（5 mmol/L）：2 μl；探针（5 mmol/L）：0.5 μl；Detection enchancer：1.67 μl；加水至 20 μl 后，每反应管中加入相应模板 5 μl。扩增条件设定为：45℃，10 min；95℃，10 min；95℃，15 s，55℃，15 s，60℃，45 s，共 40 个循环。结果判定：*Ct* 值≤37 时为阳性。*Ct* 值在 37 与 40 之间需重复并用另一靶位的其他方法复合验证。

2 结果

2.1 常规 RT-PCR 方法检测 以体外转录并 10 倍稀释的阳性 RNA 为模板对引物 F1 与 R1 进行 RT-PCR 验证，并比较了 3 种退火温度。结果（图 1）显示：引物 F1 与 R1 可扩增出预期特定大小条带，在退火温度为 60℃ 时，其灵敏度最好，检出下限为 50 拷贝/反应。在同上条件下采用引物 F1 与 R1 进行 RT-PCR，以本室前期保存的其他冠状病毒（HCoV-229E，-OC43，-NL63，-HKU1 样本各 4 份）及常见呼吸道病毒（Influenza A，RSV，鼻病毒，HMPV，副流感病毒 1，2，3，腺病毒与博卡病毒样本各 2 份）鼻咽拭子样本核酸提取物作为模板，皆不能扩出特定大小条带。表明引物 F1 与 R1 用于新冠状病毒检测具有较好特异性。

2.2 荧光定量 RT-PCR 方法检测 以体外转录并 10 倍稀释的阳性 RNA 为模板对引物 F-2 与 R-2 及 4 种 TaqMan 探针（TZ1，TZ2，LNA-TZ1，LNA-TZ2）进行荧光定量 RT-PCR 验证，结果显示引物 F-2 与 R-2 及 4 种探针皆可扩增出靶基因，其中锁核酸修饰的 TaqMan 探针（LNA-TZ1，LNA-TZ2）反应性能与检出下限（50 拷贝/反应）优于常规 TaqMan 探针（TZ1 与 TZ2，检出下限为 500 拷贝/反应）。我们随后参照欧盟科学家报道的引物与探针及靶基因（upE，ORF1b）进行合成，并复建相应荧光定量 RT-PCR 检测方法，将其反应性能与检出下限与我们建立的基于锁核酸修饰的 TaqMan 探针进行了分析比较（表 2）发现：4 种方法检出下限皆为 50 拷贝/反应，但从反应性能来看，LNA-TZ1 与 upE 最佳，明显优于 ORF1b 及 LNA-TZ2。



A：退火温度为 55℃；B：退火温度为 60℃；C：退火温度为 68℃

1 至 5 孔为不同浓度阳性模板（依次为50 000，5000，500，50，5 拷贝）；6 为阴性对照孔；M 为相对分子质量标记带

图 1 常规 RT-PCR 不同扩增条件下的检测结果

A：Annealing at 55℃；B：Annealing at 60℃；C：Annealing at 68℃

Lane 1：5.00E4 copies/reaction；Lane 2：5.00E3 copies/reaction；Lane 3：5.00E2 copies/reaction；Lane 4：5.00E1 copies/reaction；Lane 5：5.00E0 copies/reaction；Lane 6：negative control；Lane M：50 bp DNA ladder maker

Fig. 1 The different condition of RT - PCR amplification test results

万方数据

表 2 应用不同引物及探针对进行荧光定量检测时的平均 *Ct* 值

Tab. 2 The average Ct value of real time RT-PCR assays using different pairs of primer and probe

模板拷贝数 Template copy number	TZ1	LNA-TZ1	TZ2	LNA-TZ2	upE	ORF-1b
5.00×10^4	24.97	22.2	25.76	23.44	20.31	22.43
5.00×10^3	28.53	24.99	29.52	25.00	23.81	26.06
5.00×10^2	31.56	28.38	33.45	28.31	27.01	29.66
5.00×10^1	35.32	31.78	36.01	32.04	29.94	32.66
5.00	-	35.91	-	35.35	33.03	36.37

以本室前期保存的其他冠状病毒（HCoV-229E,-OC43,-NL63,-HKU1 样本各 4 份）及常见呼吸道病毒（Influenza A, RSV, 鼻病毒, HMPV, 副流感病毒 1,2,3, 腺病毒与博卡病毒样本各 2 份）鼻咽拭子样本核酸提取物作为模板，在同上条件下进行荧光定量 RT-PCR，皆不能扩出特定大小条带。表明 6 种荧光定量 RT-PCR 用于新冠状病毒检测具有较好特异性。

3 讨论

我们根据英国科学家最早发现的病毒序列设计并优化了引物及探针。我们的结果初步表明：本研究所建立的常规 RT-PCR 与荧光定量 RT-PCR 方法具有较好灵敏度与特异性，皆可应用于 2012 年新冠状病毒感染的筛选检测。优化后探针（LNA-TZ1）的反应性能与检出下限与欧盟实验室验证优化后的最佳 upE 检测方案探针相同。本研究首次在国内将相关引物探针的实验室验证与应用结果进行分析报道。

锁核酸（Locked nucleic acid, LNA）是一种经过修饰的类寡核苷酸衍生物，包括 A,C,G,T,U,mC 六种碱基，结构中 β-D-呋喃核糖的 2′-O、4′-C 位通过缩水作用形成刚性的结构[6]。我们的研究结果亦表明：锁核酸修饰 TaqMan 探针可改善新冠状病毒荧光定量 PCR 检测方法的反应性能，经锁核酸修饰的 TaqMan 探针与常规 TaqMan 探针相比，检出率提高 10 倍左右，平均 *Ct* 值降低 2 以上。

迄今为止，经实验室检测确定的 2012 年新冠状病毒感染只有 2 例，还没有证据表明新冠状病毒能够在人与人之间进行传播[3]。因临床资料有限，其生物学性状、传播特性、致病性及分子流行病学有待进一步研究。

4 参考文献

[1] ProMED-mail. Novel coronavirus - Saudi Arabia: human isolate Archive Number: 20120920.1302733 20 September 2012 21:51:30 CEST. Available from: http://www.promedmail.org/direct.php? id = 20120920.1302733.

[2] Health Protection Agency (HPA). HPA Press release. Acute respiratory illness associated with a new virus identified in the UK. London: HPA; 2012. [Accessed 25 Sept 2012]. Available from: http://www.hpa.org.uk/NewsCentre/NationalPressReleases/2012PressReleases/120923acuterespiratoryillnessidentified/

[3] Bermingham A, Chand MA, Brown CS, et al. Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. Euro Surveill, 2012, 17(40): pii = 20290.

[4] Health Protection Agency (HPA). Partial genetic sequence information for scientists about the Novel Coronavirus 2012. London: HPA; 2012. [Accessed 25 Sep 2012]. Available from: http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/RespiratoryViruses/NovelCoronavirus/respPartialgeneticsequenceofnovelcoronavirus/

[5] Corman VM, Eckerle I, BleickerT, et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. Euro Surveill, 2012, 17: pii = 20285.

[6] Braasch DA, Corey DR. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. Chem Biol, 2001, 8: 1-7.

（收稿日期：2012-10-04）

万方数据