

· 医药生物技术 ·

实时荧光定量 PCR 快速鉴别新型冠状病毒主要变异株

韩勇军^{1,2}, 刘琪琦²

1 北京工业大学 环境与生命学部, 北京 100124

2 军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 北京 100850

韩勇军, 刘琪琦. 实时荧光定量 PCR 快速鉴别新型冠状病毒主要变异株. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2224-2235.

HAN YJ, LIU QQ. Rapid identification of SARS-CoV-2 main variants using real-time quantitative PCR assay. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2224-2235.

摘要: 为建立一种快速鉴别严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 的 5 种主要变异株的 *TaqMan* 探针实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 体系, 基于 SARS-CoV-2 野生型及变异株 alpha (N501Y、HV69-70del)、beta (E484K、K417N)、gamma (K417T、V1176F)、delta (L452R、T478K) 和 omicron (H655Y、N679K、P681H) 序列设计特异性引物、探针, 建立和优化一种鉴别新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 5 种主要变异株的 *TaqMan* 探针 RT-qPCR 方法, 并进行该方法的特异性、敏感性、鉴别能力评价。该方法可准确区分出 SARS-CoV-2 野生型和突变型, 与其他呼吸道病原体 ($n=21$) 无交叉, 显示高特异性。该方法最低检测限为 2×10^2 拷贝/mL, 操作简单、快速、成本廉价, 可用于监测 SARS-CoV-2 毒株的变异, 精准指导疫情识别与防控。

关键词: 新型冠状病毒; 实时荧光定量 PCR; 变异株

Rapid identification of SARS-CoV-2 main variants using real-time quantitative PCR assay

HAN Yongjun^{1,2}, LIU Qiqi²

1 Faculty of Environment and Life, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

2 Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: A *TaqMan* probe real-time quantitative PCR (RT-qPCR) approach was developed for rapid

Received: January 14, 2022; **Accepted:** February 8, 2022; **Published online:** May 20, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2019YFC1200603)

Corresponding author: LIU Qiqi. E-mail: liuqiqi@bmi.ac.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFC1200603)

identification of SARS-CoV-2 main variants. Specific primers and probes were designed based on the sequence of the SARS-CoV-2 wild and main variants alpha (N501Y, HV69-70del), beta (E484K, K417N), gamma (K417T, V1176F), delta (L452R, T478K) and omicron (H655Y, N679K, P681H) genes. The specificity, sensitivity and performance of the RT-qPCR assay were tested. The assay can identify SARS-CoV-2 wild type and main variants efficiently, and has no crossover with a panel of respiratory pathogens ($n=21$), showing high specificity toward SARS-CoV-2 RNA. The assay's sensitivity was determined to be 2×10^2 copies/mL. In summary, we developed a simple, rapid and cost-effective RT-qPCR assay that enables identification of SARS-CoV-2 main variants. It can be used to monitor the variation of SARS-CoV-2 strain for accurate identification, prevention and control of outbreaks.

Keywords: SARS-CoV-2; real-time quantitative PCR; variant

目前, 全球新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 变异株持续出现, 世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 已宣布了 5 种 SARS-CoV-2 病毒株为关切变异株 (variants of concern, VOC): alpha (B.1.1.7)、beta (B.1.351)、gamma (P.1)、delta (B.1.617.2)、omicron (B.1.1.529)。这些突变株在传播性、致病性或免疫逃逸能力方面可能强于野生型新冠病毒^[1-6]。如 alpha、beta、gamma 变异株均含有 N501Y 突变, 可降低病毒受体结合区域 (receptor binding domain, RBD) 关键残基的极性, 从而提高与血管紧张素转化酶 2 (angiotensin converting enzyme, ACE2) 受体的亲和力^[7-8]; 另外, alpha 和 omicron 均携带 HV69-70del 突变, 其可能导致 S 蛋白构象改变, 有利于病毒逃离宿主的免疫反应^[9]。Beta 和 gamma 变异株不具有 HV69-70del 突变, 在 Beta 变异株的 RBD 内存在 E484K 和 K417N 突变, 使其具备免疫逃逸能力^[10]。Gamma 变异株除了含有 E484K 和 K417N/T 突变, 还含有 V1176F 突变^[11], 其传染性是普通 SARS-CoV-2 的 1.4–2.2 倍。Delta 变异株携带 L452R、T478K 突变, 具有增强 S

蛋白与 ACE 受体的亲和力和降低抗体识别双重作用^[12-13], 可对已接种疫苗的健康人造成突破性感染^[14-15]。目前正在全球迅速蔓延的 omicron 变异株在刺突蛋白 (spike protein, S 蛋白) 有 32 个突变位点, 其 RBD 具有 15 个突变。它的 furin 切割位点附近携带 H655Y + N679K + P681H 三个突变^[16], 研究显示 furin 切割位点可能帮助病毒进入呼吸道的上皮细胞, 而在 furin 切割位点附近出现的突变可能让刺突蛋白更容易被切割, 从而增强病毒的感染能力^[17-18]。

快速准确的分子诊断是控制传染病和疫情暴发的关键工具。现用于检测病毒的分子技术有实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 法^[19]、恒温扩增法、基因测序法和数字 PCR 法等。目前, 针对新冠病毒变异的鉴定主要使用新一代测序方法 (next generation sequencing, NGS), 该方法准确、灵敏度高, 但其操作较复杂、数据分析难度大、检测成本较高、耗时长, 不易实现快速检测。RT-qPCR 技术操作简便、敏感性高, 具有快速且经济的优势。因此, 本研究拟建立一种快速鉴别 SARS-CoV-2 主要变异株的 TaqMan 探针 RT-qPCR 方法, 并对该方法的特异性、敏感性、

鉴定能力进行评价。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样本

野生型 SARS-CoV-2 灭活病毒为军事医学研究院微生物流行病学研究所提供; SARS-CoV-2 国家参考品 (批号: 370099-202001) 购自中国食品药品检定研究院; SARS-CoV-2 变异株室间质量评价样本 (编号: NCCL-I-42-02-2021) 由国家卫生健康委临床检验中心 (National Center for Clinical Laboratories, NCCL) 提供。

1.1.2 主要仪器与试剂

CFX96 荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司; 新羿生物数字 PCR 仪购自北京新羿生物科技有限公司; *In vitro* Transcription T7 试剂盒和 One Step PrimeScript™ RT-qPCR 试剂盒购自大连 TaKaRa 公司; QIAamp MinElute Virus Spin 试剂盒购自德国凯杰公司。

1.2 方法

1.2.1 合成 5 种突变株 RNA 片段

人工合成含有 alpha (含 N501Y、HV69-70del)、beta (E484K、K417N)、gamma (K417T、V1176F)、delta (L452R、T478K) 和 omicron (H655Y、N679K、P681H) DNA 片段, 其上游均含有 T7 启动子序列 (5'-TAATACGACTCAC TATA-3'), 测序验证。使用体外转录试剂盒按说明书将其转录为 RNA, 具体步骤为: 按顺序依次添加 10×Transcription Buffer 2 μL, ATP Solution (50 mmol/L)、GTP Solution (50 mmol/L)、CTP Solution (50 mmol/L)、UTP Solution (50 mmol/L) 各 2 μL, RNase Inhibitor (40 U/μL) 0.5 μL, T7 RNA Polymerase (50 U/μL) 2 μL, RNase free dH₂O 6.5 μL, DNA (50 ng/μL) 1 μL, 总体系为 20 μL。将上述溶液

均匀混合后轻微离心, 将转录反应液收集于反应管底部, 42 °C 反应 2 h。转录完成后, 向其加入 20 U/20 μL 反应液的 RNase free DNase I, 混匀, 37 °C 反应 30 min。使用 RNA 纯化试剂盒按照说明书进行操作提取 RNA。数字 PCR 仪定量提取的 SARS-CoV-2 RNA, 用 RNase free dH₂O 将其依次稀释到实验所需要的浓度, -80 °C 保存备用。

1.2.2 引物、探针设计

根据 NCBI 公布的 SARS-CoV-2 核酸序列 (GenBank 登录号: NC_045512) 及近期 SARS-CoV-2 相关进化研究^[20-22], 针对变异株 alpha (N501Y、HV69-70del)、beta (E484K、K417N)、gamma (K417T、V1176F)、delta (L452R、T478K) 和 omicron (H655Y、N679K、P681H) 变异位点设计引物、探针。引物设计在突变位点附近上下游保守区域, 探针设计在突变位点处, 将突变位点放在探针的中间附近位置, 检测野生株的探针使用 FAM 荧光染料标记, 检测突变株的探针使用 HEX 荧光染料标记, 设计原理如图 1 所示。同时, 为确保检测的准确性, 体系中含有检测内源性内标 RNase P (RP) 的引物探针, 所有引物、探针序列如表 1 所示, 均由通用生物系统 (安徽) 有限公司合成并纯化。

1.2.3 RT-qPCR 条件优化

采用方阵法优化引物探针浓度, 使用 TaKaRa 公司的一步法 RT-qPCR 试剂盒 (货号: RR064A) 进行 RT-qPCR 实验, 体系为 60 μL, 其中 2× One Step RT-qPCR Buffer III 30 μL, TaKaRa Ex Taq HS 1.2 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix II 1.2 μL, SARS-CoV-2 上下引物 (100 μmol/L) 各 0.12、0.18、0.24、0.30、0.36 μL, SARS-CoV-2 探针 (100 μmol/L) 各 0.12、0.18、0.24、0.30、0.36 μL, RP-F/RP-R (10 μmol/L) 各 0.24、0.36、0.48、0.60、0.72 μL, RP-P (10 μmol/L)

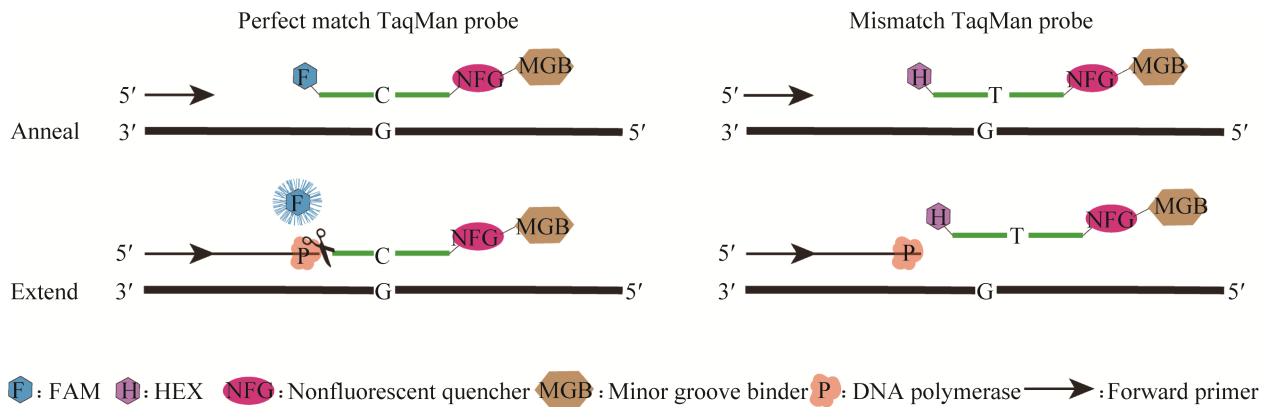


图1 *TaqMan* 探针突变检测的原理图

Figure 1 Principle of *TaqMan* probes for detecting mutations.

各 0.24、0.36、0.48、0.60、0.72 μL ，上述制备的 RNA 作为模板 25 μL ，无 DNA/RNA 酶水补充至 60 μL 。使用优化好的引物和探针体系优化退火温度，PCR 扩增程序：42 $^{\circ}\text{C}$ 20 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min，95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s，52–62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，45 个循环。在 CFX96 荧光定量 PCR 仪上运行。

1.2.4 锁核酸-MGB 探针 RT-qPCR

针对上述出现等位点特异性问题的探针，设计了锁核酸 (locked nucleic acid, LNA)-MGB 探针，LNA 修饰在突变碱基及附近，序列见表 2，探针均由通用生物系统 (安徽) 有限公司合成并纯化。按照 1.2.3 优化条件进行 RT-qPCR 测试探针鉴别能力。

1.2.5 特异性测试

将中国食品药品检定研究院提供的人冠状病毒 OC43 (HCoV-OC43)、人冠状病毒 NL63 (HCoV-NL63)、人冠状病毒 HKU1 (HCoV-HKU1)、人冠状病毒 229E (HCoV-229E)、中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV)、禽流感 H7N9、H5N1、乙型流感、甲型流感 H1N1 (2009)、H3N2、EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV)、人类副流感病毒 (human parainfluenza

virus, HPIV)、呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV)、嗜肺军团杆菌 (*Legionella pneumophila*, LP)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*, KP)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, SP)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*, HI)、腺病毒 (*Adenovirus*, ADV)、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*, MP)、肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*, CP)、百日咳杆菌 (*Bordetella pertussis*, BP) 以及健康人咽拭子提取的核酸作为模板，同时以 SARS-CoV-2 灭活病毒 RNA 作为阳性对照，无 DNA/RNA 酶水作为阴性对照，利用优化好的反应体系和条件进行 RT-qPCR 扩增，评估该方法的特异性。

1.2.6 敏感性测试

以 2×10^2 拷贝/mL、 1×10^3 拷贝/mL– 1×10^8 拷贝/mL RNA 为模板，以无 DNA/RNA 酶水为阴性对照，利用优化后的 RT-qPCR 进行扩增，确定其敏感性。

1.2.7 鉴别能力测试

对 NCCL 提供的 5 份样本按照本研究建立的实验体系进行盲测，验证该方法的可靠性。

表 1 引物与探针序列

Table 1 Primers and probes used in this study

Primers and probes names	Sequences (5'→3')	5'-end label	3'-end label	Final concentration (μmol/L)
N501Y-F	GTTACTTTCCTTTACAATCATATGGT			0.40
N501Y-R	CAAAAGAAAGTACTACTACTCTGTATGGT			0.40
N501Y-PW	CAACCCACTAATGGTG	FAM	MGB	0.20
N501Y-PM	CAACCCACTTATGGTG	HEX	MGB	0.20
HV69-70-F	TCTTACCTTTCTTTTCCAATGTTAC			0.40
HV69-70-R	TCATTAAATGGTAGGACAGGGTT			0.40
HV69-70-PW	CCATGCTATACATGTCTCTGGG	FAM	BHQ1	0.20
HV69-70-PM	TTCCATGCTATATCTGGGACC	HEX	BHQ1	0.20
E484K-F	CCGGTARCACACCTTGTA			0.40
E484K-R	CCATATGATTGTAAAGGAAAGT			0.40
E484K-PW	AAACCTTCAACACCA	FAM	MGB	0.20
E484K-PM	AAACCTTAAACACCA	HEX	MGB	0.20
K417N/T-F	GTCAGACAAATCGCTCCA			0.40
K417N/T-R	GCCTGTAAAATCATCTGGTA			0.40
K417N/T-PW	CAGCAATCTTCCAG	FAM	MGB	0.20
K417N-PM	CAGCAATATTTCCAG	HEX	MGB	0.20
K417T-PM	CAGCAATCGTTCAG	HEX	MGB	0.20
V1176F-F	TCACCAGATGTTGATTAGG			0.40
V1176F-R	TGAGGCGGTCAATTTCTT			0.40
V1176F-PW	ATGCTTCAGTTGTAAAC	FAM	MGB	0.20
V1176F-PM	TTAATGCTTCATTTGTA	HEX	MGB	0.20
L452R-F	CTTGATTCTAAGGTTGGTGGTA			0.40
L452R-R	AGGTTTGAGATTAGACTTCC			0.40
L452R-PW	ATAATTACCTGTATAGAT	FAM	MGB	0.20
L452R-PM	TAATTACCGGTATAGAT	HEX	MGB	0.20
T478K-F	TTCAACTGAAATCTATCAGGC			0.40
T478K-R	CAATTAAAACCTTBAACACCA			0.40
T478K-PW	CGGTAGCACACCTT	FAM	MGB	0.20
T478K-PM	CGGTAGCAAACCTT	HEX	MGB	0.20
H655Y-F	GGCGTGTTTATTCTACAGGTT			0.40
H655Y-R	GCGCATATACCTGCACCA			0.40
H655Y-PW	TGTTGACATGTTTCAG	FAM	MGB	0.10
H655Y-PM	GTTGACATATTCAGCC	HEX	MGB	0.20
N679K/P681H-F	ACCCATTGGTGCAGGTATAT			0.40
N679K/P681H-R	CAAGTGACATAGTGTAGGCAA			0.40
N679K/P681H-PW	CTAATTCTCCTCGGC	FAM	MGB	0.20
N679K/P681H-PM	CTAAATCTCATCGGC	HEX	MGB	0.20
RP-F	AGATTTGGACCTGCGAGCG			0.08
RP-R	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT			0.08
RP-P	TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG	ROX	BHQ2	0.06

2 结果与分析

2.1 合成 SARS-CoV-2 突变基因的鉴定

根据已公布的 alpha、beta、gamma、delta 和 omicron 变异株序列,人工合成这些 DNA 片段,经测序鉴定正确(图 2)。使用体外转录试

剂盒将其转录为 RNA。经新羿生物数字 PCR 仪定量后稀释使用。

2.2 PCR 条件优化

经优化后,确定反应体系为(60 μ L): $2 \times$ One Step RT-qPCR Buffer III 为 30 μ L, TaKaRa Ex Taq HS 为 1.2 μ L, PrimeScript RT Enzyme

表 2 LNA-MGB 探针序列

Table 2 Sequences of the LNA-MGB probe in this study

LNA-MGB probe name	Sequence (5'→3')	5'-end label	3'-end label	Final concentration (μ mol/L)
T478K-PWL	CGGTAG <u>CAC</u> ACC	FAM	MGB	0.2

Underlined letters respresent LNA bases.

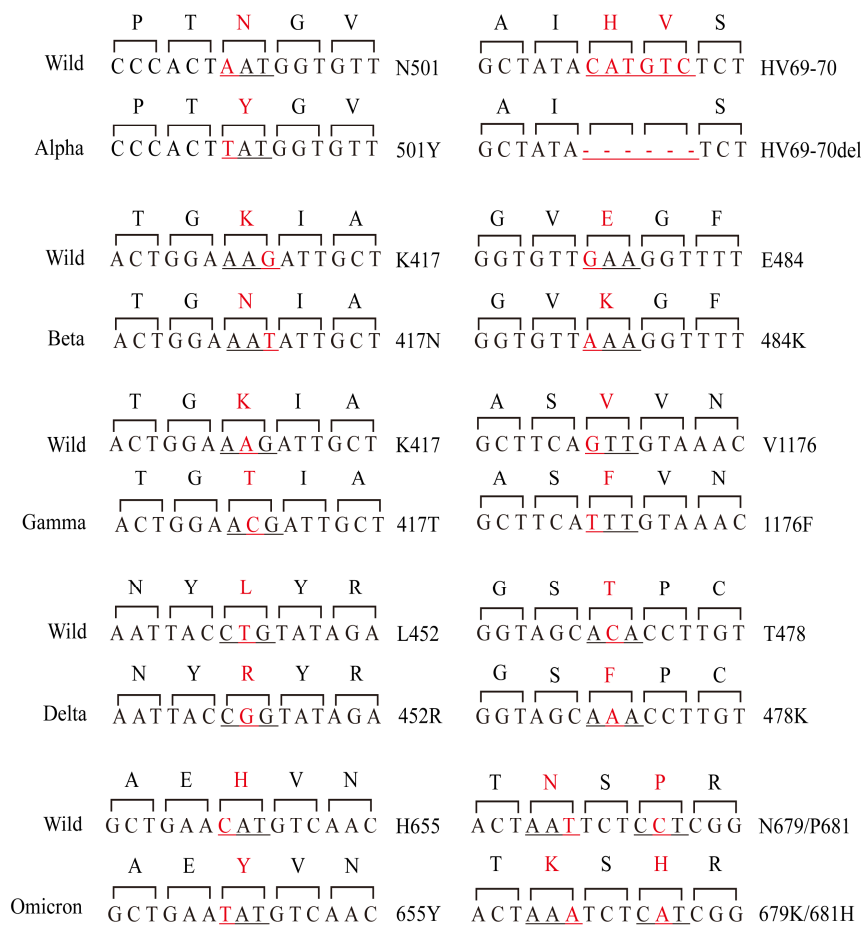


图 2 SARS-CoV-2 野生型和突变型基因片段序列分析

Figure 2 Sequencing analysis of SARS-CoV-2 wild-type and variants gene fragments. The red mark is the mutation site.

Mix II为 1.2 μL , SARS-CoV-2 上下引物、野生型和突变型探针、RP-F/RP-R、RP-P 探针按表 1 浓度配置, 模板为 25 μL , 加无 DNA/RNA 酶水补充至 60 μL 。反应程序为: 42 $^{\circ}\text{C}$ 20 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 45 个循环, 每个循环退火时收集荧光信号。利用野生株基

因和上述构建的突变基因片段验证 RT-qPCR 鉴定 SARS-CoV-2 变异位点的能力, 发现该方法除了 T478K-PW 探针与突变型基因有交叉, 其他探针均可准确区分出野生型和突变型, 且内参基因 RP 均有典型的扩增曲线 (图 3), 表明该方法可用于鉴别 SARS-CoV-2 野生型和突变型基因。

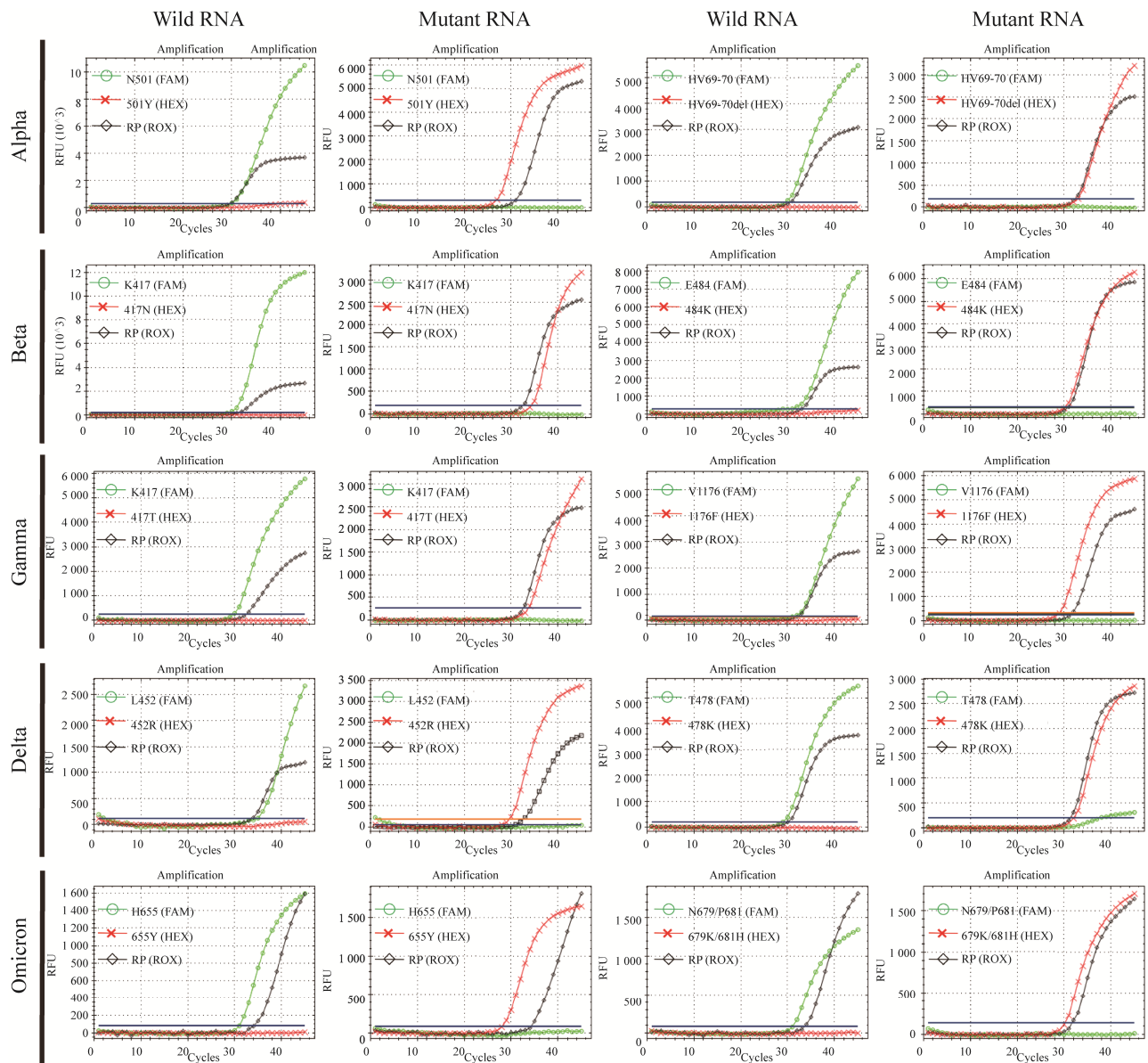


图 3 RT-qPCR 鉴别 SARS-CoV-2 野生型和突变型基因

Figure 3 RT-qPCR identification of SARS-CoV-2 wild-type and variants genes.

2.3 LNA-MGB 探针 RT-qPCR 测试

利用野生株基因和上述构建的突变基因片段验证 LNA-MGB 探针 RT-qPCR 鉴定 SARS-CoV-2 变异位点的能力, 发现与 T478K-PW 探针相比, T478K-PWL 探针可准确区分出野生型和突变型, 无交叉反应, 且内参基因 RP 均有典型的扩增曲线 (图 4), 表明该方法比 MGB 探针具有更强的鉴别 SARS-CoV-2 野生型和突变型基因的能力。

2.4 特异性测试

使用中国食品药品检定研究院制备的 SARS-CoV-2 国家参考品中的 22 种阴性参考品、阳性对照、阴性对照进行特异性验证。结果显示, 只有阳性对照出现扩增曲线, 22 种阴性参考品和阴性对照均无扩增曲线, 表明所建立的方法具有较强的特异性。

2.5 敏感性测试

应用建立的 RT-qPCR 检测方法对稀释不同浓度的 2×10^2 拷贝/mL、RNA (1×10^3 拷贝/mL— 1×10^8 拷贝/mL) 进行该方法敏感性检测。结果显示, 建立的 RT-qPCR 方法对目的 RNA 的最

低检出限均为 2×10^2 拷贝/mL (图 5), 表明本研究所建立方法的敏感性较高。

2.6 鉴别能力测试

在 NCCL 的 5 份样本中, 检出 3 份 delta 阳性, 1 份野生型, 1 份阴性, 均与 NCCL 反馈的结果一致 (表 3)。结果表明, 本实验所建立的体系具备鉴别 SARS-CoV-2 变异株的能力。

3 讨论

随着 SARS-CoV-2 的一些重要位点发生突变, 其逐渐形成了多种传播能力增强、致病性强的变异毒株^[23-24], 值得在全球水平进行关注。快速准确的分子诊断是控制传染病和疫情暴发的关键工具。基因组测序是目前检测 SARS-CoV-2 变异的重要方法^[25-28], 该方法具有较高的准确性, 是检测基因突变的“金标准”, 但其操作复杂耗时、通量低、设备昂贵, 一般实验室普及率低, 不易推广使用^[29]。RT-qPCR 法是一种简单实用的检测基因突变的方法, 具有快速、灵敏度高、特异性强、高通量、高集成和易推广等优点^[30]。

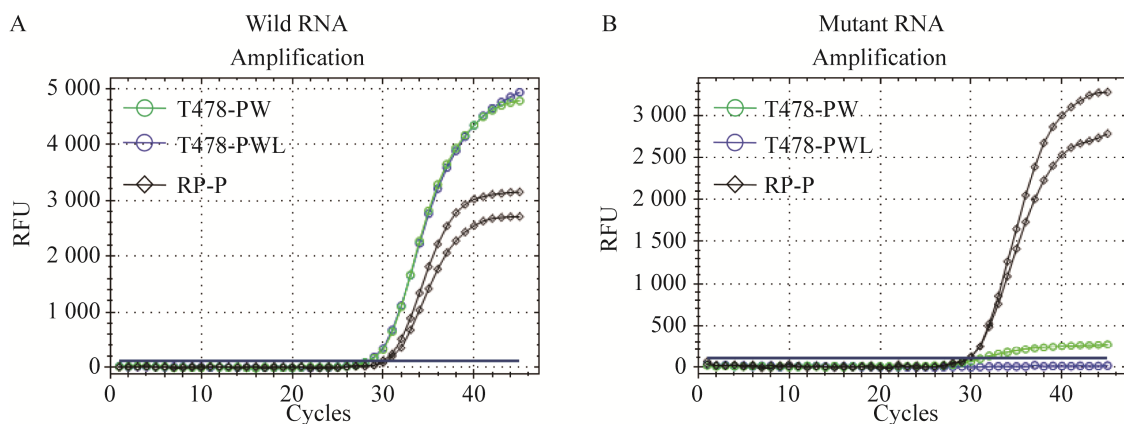


图 4 比较 T478K 野生型 LNA-MGB 探针与 MGB 探针的鉴别性能

Figure 4 Comparison of the analysis performance of T478K wild-type LNA-MGB probe and MGB probe. Detection of wild-type (A) and variants (B) genes using the T478K wild-type LNA-MGB probe and MGB probe.

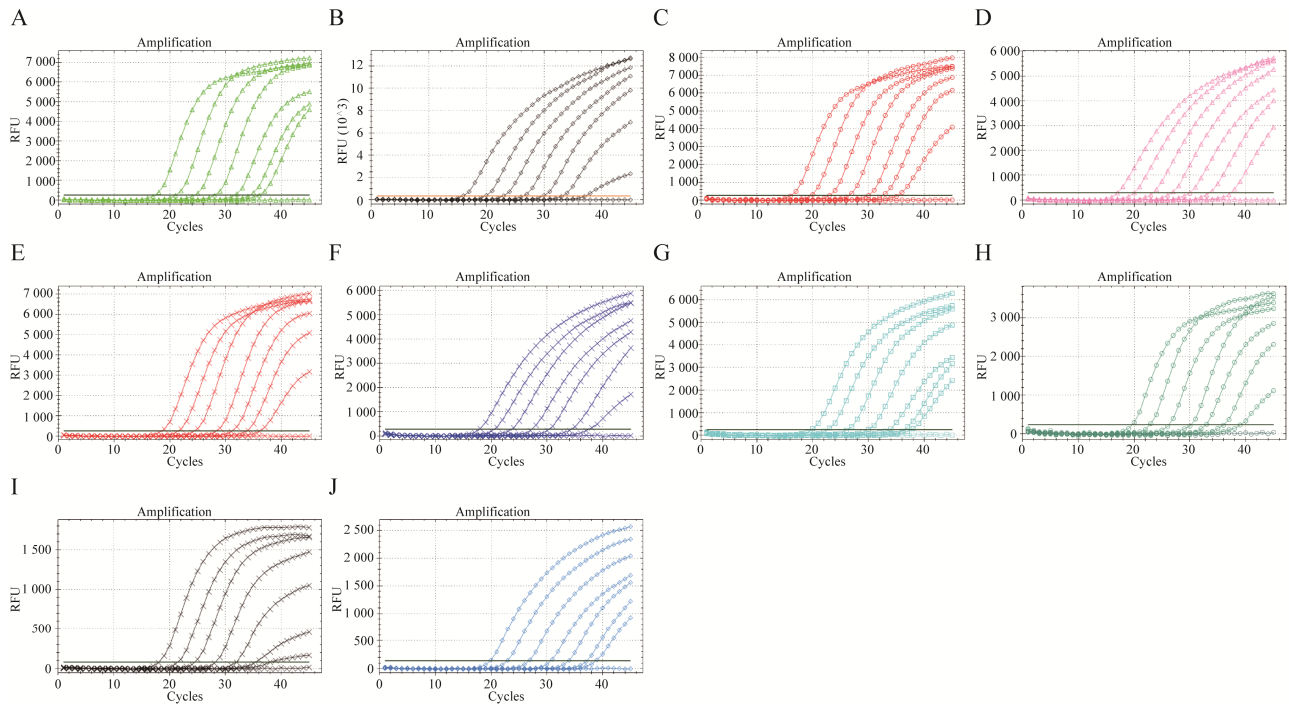


图 5 RT-qPCR 检测靶标 RNA 的敏感性评价

Figure 5 Evaluation of the sensitivity of RT-qPCR to detect target RNA. A–J are the amplification curves of detecting mutant genes 501Y, HV69–70del, 417N, 484K, 417T, 1176F, 452R, 478K, 655Y and 679K+681H, respectively. The template concentration corresponding to the amplification curve from left to right on each figure is 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 2×10^2 , 0 copies/mL, respectively.

表 3 SARS-CoV-2 变异株测试

Table 3 SARS-CoV-2 variants test

Sample ID	The testing results in our systems	Variants	The results of feedback from NCCL
202121	452R+, 478K+	Delta	Delta
202122	L452+, T478+	Wild	Wild
202123	452R+, 478K+	Delta	Delta
202124	–	–	–
202125	452R+, 478K+	Delta	Delta

Note: “+” means detected, “–” means not detected.

目前已报道的 RT-qPCR 检测 SARS-CoV-2 变异的方法主要包括等位基因特异性 PCR (AS PCR, 也称 ARMS PCR)^[31]、高分辨率溶解曲线分析法 (high resolution melting, HRM)^[32-33]、数字 PCR 技术^[34-35]等。ARMS PCR 是目前比较常用的 qPCR 检测方法, 该方法操作简单、快速, 成本低, 但突变型等位基因特异性引物容易错

配至野生型等位基因并发生延伸, 从而产生假阳性结果。HRM 无需使用特异性标记探针, 不受突变种类和突变位点的限制, 具有高灵敏度和特异性、高通量、操作简单灵活、成本低等优点, 但该方法对仪器的分辨率要求高, 一般荧光定量 PCR 仪无法满足, 不易推广使用。数字 PCR 技术突变检测灵敏度较高, 但在实际应

用中存在一些限制,在一般临床实验室普及率低,价格昂贵,样本制备、操作比较费时费力。近期,Zhang 等^[36]开发了一种双自淬灭探针实时 PCR (dual self-quenching probe real-time quantitative PCR, DSQP-qPCR) 分析方法,用于筛选含有 E484 突变的 SARS-CoV-2 变异株。该检测方法具有较高的灵敏度和特异性,但 G 淬灭效率偏低,影响荧光增量,另外,该方法只能适用于鸟嘌呤或胞嘧啶突变,使用具有局限性。*TaqMan*-MGB 探针可显著提高其 T_m 值,通过缩短探针长度可明显提高配对与非配对模板的 T_m 差异,对单一碱基突变具有较强的区分能力^[37],但在实际应用中无法做到每个 MGB 探针完全无交叉检测。LNA 是一种与核苷酸结构相似的寡核酸衍生物,与 DNA 杂交具有更强的热稳定性,其单个碱基差异导致的 ΔT_m 值与相同序列的 DNA 双链相比可高出 3–8 °C,具有较高的单碱基错配识别能力^[38]。

本研究利用 *TaqMan* 探针 RT-qPCR 技术建立了一种快速鉴别 SARS-CoV-2 主要变异株 (alpha、beta、gamma、delta、omicron) 方法,针对每个突变位点设计 2 种 *TaqMan*-MGB 探针(由于 HV69-70 位点有 6 bp 缺失突变,使用普通 *TaqMan* 探针即可作出鉴别),用两种荧光染料分别标记野生型和突变型探针,在 1 个 PCR 反应管中同时检测 2 种基因型。经优化测试,发现除了 T478K-PW 探针与突变型基因有交叉,其他探针均可准确区分出野生型和突变型。针对 T478K-PW 探针出现的等位位点特异性问题,设计了 LNA-MGB 探针,发现与 T478K-PW 探针相比,T478K-PWL 探针可准确区分出野生型和突变型,无交叉反应。同时,为了确保检测结果的准确性,体系中加入人 RP 基因作为内源性内部控制,以监测样品中的核酸提取质量和 PCR 反应抑制物。

本研究建立的 *TaqMan* 探针 RT-qPCR 检测体系与其他冠状病毒或常见呼吸道感染病原体无交叉、特异性强,该方法最低检测限为 2×10^2 拷贝/mL,灵敏度高。从样品提取到出结果,整个实验过程只需约 2.5 h,操作简单。随着新型冠状病毒肺炎 (corona virus disease 2019, COVID-19) 大流行,越来越多的实验室采用 RT-qPCR 方法快速检测 SARS-CoV-2,已具备了这方面的检测设备和技术能力,更易推广本方法的使用。

由于 SARS-CoV-2 一直处于进化变异中,若新的变异位点位于本研究设计的序列上,可能导致检测失败。SARS-CoV-2 变异种类繁多,本研究只设计了目前 WHO 列出的 5 种 VOC 的检测,无法区分其他变异体,例如 B.1.525 和 B.1.526 变异体,它们也存在 E484K 和其他位点突变^[39],对于这类变异体无法鉴别。

总之,本研究利用 *TaqMan* 探针 RT-qPCR 技术建立了一种快速鉴别 SARS-CoV-2 主要变异株方法,可实现准确、快速、廉价的检测,及时监测 SARS-CoV-2 毒株的变异情况,对传染源进行追踪溯源,为动态评估疫苗对变异株的有效性提供依据。

REFERENCES

- [1] Chen JH, Wang R, Wang ML, et al. Mutations strengthened SARS-CoV-2 infectivity. *J Mol Biol*, 2020, 432(19): 5212-5226.
- [2] Bal A, Destras G, Gaymard A, et al. Two-step strategy for the identification of SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 and other variants with spike deletion H69-V70, France, August to December 2020. *Euro Surveill*, 2021, 26(3): 2100008.
- [3] Feder KA, Pearlowitz M, Goode A, et al. Linked clusters of SARS-CoV-2 variant B.1.351 - Maryland, January-February 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2021, 70(17): 627-631.
- [4] Galloway SE, Paul P, MacCannell DR, et al. Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 lineage - United

- States, December 29, 2020-January 12, 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2021, 70(3): 95-99.
- [5] Loconsole D, Centrone F, Morcavallo C, et al. Rapid spread of the SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 in southern Italy (December 2020-March 2021). *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18(9): 4766.
- [6] Dejnirattisai W, Shaw RH, Supasa P, et al. Reduced neutralisation of SARS-CoV-2 omicron B.1.1.529 variant by post-immunisation serum. *Lancet*, 2022, 399(10321): 234-236.
- [7] Starr TN, Greaney AJ, Hilton SK, et al. Deep mutational scanning of SARS-CoV-2 receptor binding domain reveals constraints on folding and ACE2 binding. *Cell*, 2020, 182(5): 1295-1310.e20.
- [8] Zhu X, Mannar D, Srivastava SS, et al. Cryo-electron microscopy structures of the N501Y SARS-CoV-2 spike protein in complex with ACE2 and 2 potent neutralizing antibodies. *PLoS Biol*, 2021, 19(4): e3001237.
- [9] Kemp SA, Collier DA, Datir R, et al. Neutralising antibodies in spike mediated SARS-CoV-2 adaptation. *medRxiv*, 2020, DOI:10.1101/2020.12.05.20241927.
- [10] Wibmer CK, Ayres F, Hermanus T, et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat Med*, 2021, 27(4): 622-625.
- [11] Francisco RDS Jr, Benites LF, Lamarca AP, et al. Pervasive transmission of E484K and emergence of VUI-NP13L with evidence of SARS-CoV-2 co-infection events by two different lineages in Rio Grande do Sul, Brazil. *Virus Res*, 2021, 296: 198345.
- [12] Dougherty K, Mannell M, Naqvi O, et al. SARS-CoV-2 B.1.617.2 (delta) variant COVID-19 outbreak associated with a gymnastics facility-Oklahoma, April-may 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2021, 70(28): 1004-1007.
- [13] Lopez Bernal J, Andrews N, Gower C, et al. Effectiveness of covid-19 vaccines against the B.1.617.2 (delta) variant. *N Engl J Med*, 2021, 385(7): 585-594.
- [14] Hacısuleyman E, Hale C, Saito Y, et al. Vaccine breakthrough infections with SARS-CoV-2 variants. *N Engl J Med*, 2021, 384(23): 2212-2218.
- [15] Wang R, Chen JH, Yuta H, et al. Emerging vaccine-breakthrough SARS-CoV-2 variants. *ArXiv [Preprint]*, 2021 Sep 9: arXiv: 2109.04509v1.
- [16] Kumar S, Thambiraja TS, Karuppanan K, et al. Omicron and Delta variant of SARS-CoV-2: a comparative computational study of spike protein. *J Med Virol*, 2022, 94(4): 1641-1649.
- [17] Coutard B, Valle C, De Lamballerie X, et al. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res*, 2020, 176: 104742.
- [18] Benton DJ, Wrobel AG, Xu PQ, et al. Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature*, 2020, 588(7837): 327-330.
- [19] 李学龙, 刘军花, 刘茜阳, 等. 一种基于荧光 qPCR 检测新型冠状病毒核酸的优化反应体系的建立及相关测试. *生物工程学报*, 2020, 36(4): 732-739.
- Li XL, Liu JH, Liu XY, et al. Optimization of a fluorescent qPCR detection for RNA of SARS-CoV-2. *Chin J Biotech*, 2020, 36(4): 732-739 (in Chinese).
- [20] Cabecinhas ARG, Roloff T, Stange M, et al. SARS-CoV-2 N501Y introductions and transmissions in Switzerland from beginning of October 2020 to February 2021-implementation of Swiss-wide diagnostic screening and whole genome sequencing. *Microorganisms*, 2021, 9(4): 677.
- [21] Winger A, Caspari T. The spike of concern-the novel variants of SARS-CoV-2. *Viruses*, 2021, 13(6): 1002.
- [22] Alizon S, Haim-Boukobza S, Foulongne V, et al. Rapid spread of the SARS-CoV-2 delta variant in some French regions, June 2021. *Euro Surveill*, 2021, 26(28): 2100573.
- [23] Li QQ, Wu JJ, Nie JH, et al. The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity. *Cell*, 2020, 182(5): 1284-1294.e9.
- [24] Weisblum Y, Schmidt F, Zhang FW, et al. Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *eLife*, 2020, 9: e61312.
- [25] Álvarez-Díaz DA, Laiton-Donato K, Franco-Muñoz C, et al. SARS-CoV-2 sequencing: the technological initiative to strengthen early warning systems for public health emergencies in Latin America and the Caribbean. *Biomedica*, 2020, 40(Supl. 2): 188-197.
- [26] Meredith LW, Hamilton WL, Warne B, et al. Rapid implementation of SARS-CoV-2 sequencing to investigate cases of health-care associated COVID-19: a prospective genomic surveillance study. *Lancet Infect Dis*, 2020, 20(11): 1263-1272.
- [27] Appa A, Chamie G, Sawyer A, et al. SARS-CoV-2 PCR and antibody testing for an entire rural community: methods and feasibility of high-throughput testing procedures. *Arch Public Health*, 2021, 79(1): 125.

- [28] Aldobyany A, Touman A, Ghaleb N, et al. Correlation between the COVID-19 respiratory triage score and SARS-CoV-2 PCR test. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 7: 605689.
- [29] Alpert T, Vogels CBF, Breban MI, et al. Sequencing SARS-CoV-2 genomes from saliva. *medRxiv*, 2021, DOI:10.1101/2021.06.21.21259289.
- [30] Wang HY, Jean S, Eltringham R, et al. Mutation-specific SARS-CoV-2 PCR screen: rapid and accurate detection of variants of concern and the identification of a newly emerging variant with spike L452R mutation. *J Clin Microbiol*, 2021, 59(8): e0092621.
- [31] Erster O, Mendelson E, Levy V, et al. Rapid and high-throughput reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) assay for identification and differentiation between SARS-CoV-2 variants B.1.1.7 and B.1.351. *Microbiol Spectr*, 2021, 9(2): e0050621.
- [32] Banada P, Green R, Banik S, et al. A simple reverse transcriptase PCR melting-temperature assay to rapidly screen for widely circulating SARS-CoV-2 variants. *J Clin Microbiol*, 2021, 59(10): e0084521.
- [33] Hale R, Crowley P, Dervisevic S, et al. Development of a multiplex tandem PCR (MT-PCR) assay for the detection of emerging SARS-CoV-2 variants. *Viruses*, 2021, 13(10): 2028. DOI:10.3390/v13102028.
- [34] Perchetti GA, Zhu HY, Mills MG, et al. Specific allelic discrimination of N501Y and other SARS-CoV-2 mutations by ddPCR detects B.1.1.7 lineage in Washington State. *J Med Virol*, 2021, 93(10): 5931-5941.
- [35] Heijnen L, Elsinga G, De Graaf M, et al. Droplet digital RT-PCR to detect SARS-CoV-2 signature mutations of variants of concern in wastewater. *Sci Total Environ*, 2021, 799: 149456.
- [36] Zhang Y, Wei YQ, Yang SY, et al. Rapid and accurate identification of SARS-CoV-2 variants containing E484 mutation. *Innovation (N Y)*, 2022, 3(1): 100183.
- [37] Kutuyavin IV, Afonina IA, Mills A, et al. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(2): 655-661.
- [38] Latorra D, Campbell K, Wolter A, et al. Enhanced allele-specific PCR discrimination in SNP genotyping using 3' locked nucleic acid (LNA) primers. *Hum Mutat*, 2003, 22(1): 79-85.
- [39] Annavajhala MK, Mohri H, Zucker JE, et al. A novel SARS-CoV-2 variant of concern, B.1.526, identified in New York. *medRxiv*, 2021, DOI:10.1101/2021.02.23.21252259.

(本文责编 郝丽芳)