

# 分子诊断技术在防控新型冠状病毒肺炎中的应用

赵良

四川绵阳四〇四医院 四川 绵阳 621000

**【摘要】**2019年爆发的新型冠状病毒肺炎对人们的健康和生命安全造成非常严重的威胁。对于病毒应提早预防、及时诊断、尽早隔离。本文提出分子诊断技术在防控新型冠状病毒肺炎中的应用,希望为疫情战争做出贡献。

**【关键词】**分子诊断技术; 新型冠状病毒肺炎; 防控疫情

## 1 前言

新型冠状病毒肺炎(Corona Virus Disease 2019, COVID-19)是由于严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome-coronavirus2, SARS-CoV-2)引发的<sup>[1]</sup>。SARS-CoV-2是属于 $\beta$ 属的冠状病毒,呈球形或椭圆形,外层包膜上有棘突,电镜下呈皇冠状。SARS-CoV-2与SARS病毒的相似度约为79%,均通过血管紧张素转化酶2(ACE2)介导入侵人体细胞。研究发现,SARS-CoV-2与ACE2的结合力约为SARS病毒的4倍,这可能也是COVID-19比SARS传染性更强的原因之一。美国约翰斯·霍普金斯大学调查数据显示,截至2020年9月30日,全球新冠肺炎累计死亡病例已超100万例。SARS-CoV-2对人类而言是一种全新的病毒,其疫苗和特效药还在研制中,提早诊断尽早隔离治疗是目前防治COVID-19最有效的措施。

## 2 新冠肺炎的病原学特点

SARS-CoV-2的病原学特点冠状病毒家族属于病毒目、冠状病毒科。该家族可进一步细分为 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\delta$ 4个属。SARS-CoV-2属于 $\beta$ 属,其基因组序列与SARS-CoV有79.5%的相似性,与MERS-CoV有40%的相似性,与蝙蝠SARS样冠状病毒(bat-SL-CoVZC45)有超过85%的相似性。在进化上,形成了与SARS-CoV和MERS-CoV不同的另外一个分支。SARS-CoV-2直径在50~200nm。它的遗传物质为连续线性单链RNA,基因组全长29891个核苷酸,编码9860个氨基酸(aa),GC含量为38%。基因组的5'和3'端各有一个不翻译区,3'端有PolyA“尾”,内部包含10个基因:开放阅读:1ab(ORF1ab)基因(编码7096aa的多聚蛋白)、棘突蛋白基因(编码1273aa的棘突蛋白)、ORF3a基因、包膜蛋白基因(编码75aa的包膜蛋白)、膜糖蛋白基因(编码222aa的膜糖蛋白)、ORF6基因、ORF7a基因、ORF8基因、核衣壳蛋白基因(编码419aa的核衣壳蛋白)

及ORF10基因<sup>[2]</sup>。

棘突蛋白由S1和S2亚基组成。S1亚基含有信号肽、N末端结构域和受体结合结构域(RBD),负责介导病毒与宿主细胞膜结合;S2亚基包含融合肽、细胞质结构域和跨膜结构域,负责病毒与宿主细胞膜融合。SARS-CoV-2棘突蛋白与SARS-CoV棘突蛋白的氨基酸序列相似度为76.47%,且二者RBD的3D结构相同,因此,SARS-CoV-2棘突蛋白与人原代II型肺泡细胞表面的血管紧张素转换酶2分子也具有很强的亲和性,二者的结合很可能是介导SARS-CoV-2进入人体细胞的关键所在。包膜蛋白和膜糖蛋白均参与病毒的装配。核衣壳蛋白包裹并保护病毒的遗传物质。

## 3 分子诊断技术在防控 SARS-CoV-2 感染中的应用

### 3.1 核酸扩增技术

重组酶介导等温核酸扩增技术(recombinase aided amplification, RAA)是一种新型常温核酸扩增技术,利用大肠杆菌的recA重组酶在常温下可与DNA紧密结合的特性,与引物形成聚合体扫描双链DNA,在与引物同源的序列处使双链DNA解旋。在单链结合蛋白(single-strand binding protein, SSB)和DNA聚合酶的作用下,新的DNA片段可以在体外快速扩增。这个体外DNA扩增的过程不需要高温,一般在37℃或者室温下反应5~20min即可得到与传统高温PCR相同的目的片段。相对于LAMP,RAA法的反应时间缩短,更能满足快速简便检测的需求,反应产物为单一的特定长度的基因片段。但是,RAA检测方法是在较低温度下的扩增反应,引物非特异性结合的可能性会增加,容易造成假阳性。由江苏奇天基因生物科技有限公司研制的SARS-CoV-2核酸等温扩增快速检测试剂盒,目前已经完成3家临床评估,可实现8~15min出检测结果。经与药监局批准的商业化定量PCR试剂盒平行比较,该试剂盒的阳性符合率为100%,阴性符合率100%,总符合

率 100%。

### 3.2 基于实时荧光定量 PCR 的核酸检测

基于实时荧光定量 PCR 的核酸检测具有灵敏度高、特异性强、成本低的优点<sup>[3]</sup>。SARS-CoV-2 的基因组序列公布后,一些研究小组和商业化公司争相研发可以有效检测 SARS-CoV-2 基因组的荧光定量 PCR 体系。此体系的核心是灵敏度高、特异性强的 PCR 引物和荧光探针。理想的引物和荧光探针既能高效地扩增出 SARS-CoV-2 基因组的片段,又能有效区分 SARS-CoV-2 基因组和其他常见冠状病毒及流感病毒的基因组。

香港大学与北京疾病预防控制中心等单位合作,建立了 SARS-CoV-2 的实时荧光定量 PCR 检测体系。该体系中的两套引物和荧光探针分别针对 SARS-CoV-2 的 ORF1ab 基因和核衣壳蛋白基因所设计。该体系具有很高的检测灵敏度,对低至 10 个拷贝的分子仍可检出。使用该体系对 1 例 SARS-CoV-2 感染者的痰液标本和 1 例 SARS-CoV-2 感染者的咽拭子标本进行检测,均呈现阳性结果;而对其他冠状病毒(OC43、NL63、HKU1、229E)、乙型流感病毒及腺病毒等感染的呼吸道标本的 RNA 进行检测时,均呈现阴性结果,显示了良好的特异性。中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所则在其官网公布了自己设计的 SARS-CoV-2 核酸检测引物和荧光探针的序列,其两套引物和探针分别针对 ORF1ab 及核衣壳蛋白基因设计。

基于实时荧光定量 PCR 的核酸检测试剂盒虽原理大体相同,但在实际应用中,其性能还是有一定的差异。当前,随着疑似患者数量的增多,以及实时荧光定量 PCR 检测向基层单位的延伸,部分地区也出现了气溶胶污染导致 PCR 假阳性、标本质量不佳导致 PCR 假阴性、疾病病程导致病毒核酸水平低于 PCR 检测限等问题。解决这些问题需要从 3 个方面入手:(1)尽量挑选熟练的专业操作人员在标准 PCR 室中进行检测,优化采样部位、采样手法及标本运输条件,具体分析患者病程阶段;(2)研发灵敏度更高的、一步法闭管操作的荧光定量 PCR 检测试剂盒或数字 PCR 检测试剂盒;(3)实时荧光 PCR 结合免疫学方法在提高新冠病毒检出率方面的研究和设计

### 3.3 高通量基因测序检测技术

纳米孔测序技术直接对核酸片段进行全长读取,从而进行长读长序列的高通量基因测序,同时具有极高的精确度,高样本检测效率。该技术已被应用于许多科学方面的研究,包括人类遗传学、癌症研究和环境应用等,还被应用于多种疾病暴发情况,目前已有多个团队采用纳米孔基因测序技术对新型冠状病毒进行高通量基因组测序检测。JASPER FUK-WOO CHAN 等使用纳米孔测序技术对新型冠状病毒进行研究。样本来源于确诊

的 2 名患者及其他 5 名家族成员,采用全基因组测序方法。样本中提取核酸,去除宿主 DNA 后,应用不依赖序列的单引物扩增方法,用特异性引物 A (5'GTTTC-CCACTGGAGGATA-N9-3') 将 DNA 酶处理的 RNA 进行逆转录为 cDNA,利用 Klenow 片段 (3'→5'exo-) 进行 cDNA 第二条链的合成(新英格兰生物实验室,马萨诸塞州伊普斯维奇)。用引物 B (5'-GTTTCCACT-GGAGGATA-3') 进行 PCR 扩增,获得扩增的 cDNA 文库。进行纳米孔测序文库构建,文库准备完成即可进行测序,采用 R 9.4.1 进行 12~48 小时测序。利用 MEGAX 软件构建进化树,进行数据分析。他们发现了一种与蝙蝠 SARS 样冠状病毒 bat-SL-CoVZXC21 (NCBI 登录号 MG772934) 和 bat-SL-CoVZC45 (NCBI 登录号 MG772933) 关系最为密切的新型冠状病毒,且其中 2 名患者的病毒株基因组序列完全一致,提示为同一病毒株感染。且 2 名患者家属也存在同一病毒株感染情况,故提示该病毒具有传染性。实验发现,痰样本来源的循环阈值比咽拭子样本来源早 8~13 个循环,表明下呼吸道病毒载量较高,提示临床初筛阴性患者可以重复检测上呼吸道样本或下呼吸道样本。

纳米孔具有的长读长优势,对未知新型肺炎病原体检测、鉴定具有重要意义。利用纳米孔技术,在建库时不同样本添加不同的 barcode 以区分样本信息,对于不同样品之间的异同点,对检测新型肺炎家族聚集性或人传人现象具有重大意义。不同样本来源提示病毒载量的多少,有利于临床初筛阴性样本针对病毒载量高的部位重新取样、检测,降低漏诊率,对疫情控制具有重要作用。

## 4 结语

分子诊断技术在新型冠状病毒肺炎的诊断和病情监控方面起到很好的作用。随着世界各地疫情的暴发,在对疫情进行抗争过程中,逐渐研发出各种防控技术。而分子诊断技术在监测病毒变异、明确病毒致病机理等方面做出一定的贡献,但是分子诊断技术具备较高使用优势的同时,还具备一定的劣势,这就需要在实际应用过程中,与不同技术之间进行配合,使其能够发挥更大的作用。

### 【参考文献】

- [1] 刘婉彤,童梅,林福玉.分子诊断技术的临床应用进展[J].生物技术通讯,2020,v.31;No.158(02):118-128.
- [2] 黄永杰,李晓童,王桂珍等.1例新冠肺炎合并常见呼吸道病原体共感染病例研究[J].分子诊断与治疗杂志,2020,012(005):557-560.
- [3] 张孟娟.医疗机构新冠肺炎防治技术分析[J].临床研究,2020,v.28(06):190-192.