

Comparison of 2019-nCoV Nucleic Acid Detection Primers between CDC and WHO

Jirong Ma

College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua Zhejiang
Email: 2213799143@qq.com

Received: Jun. 24th, 2020; accepted: Jul. 8th, 2020; published: Jul. 15th, 2020

Abstract

Human new coronavirus pneumonia caused by the novel coronavirus (2019-nCoV) is epidemic in the world. The epidemic has been basically controlled in China. The key points of prevention and control are shifted from diagnosis and treatment towards patients to the screening of asymptomatic infected persons and the prevention of imported cases. At present, Chinese Center for Disease Control and Prevention (CDC) and the World Health Organization (WHO) recommend two different pairs of 2019-ncov nucleic acid detection primers. As the key of real-time fluorescent RT-PCR virus nucleic acid detection, nucleic acid detection primers have the characteristics of rapid mutation speed, so it is particularly important about whether their sensitivity can adapt to the rapid mutation of 2019-ncov abroad.

Keywords

2019-nCoV, Nucleic Acid Detection Primer, Virus Mutation

CDC与WHO新型冠状病毒核酸检测引物比较

马季荣

浙江师范大学, 化学与生命科学学院, 浙江 金华
Email: 2213799143@qq.com

收稿日期: 2020年6月24日; 录用日期: 2020年7月8日; 发布日期: 2020年7月15日

摘要

新型冠状病毒(2019-nCoV)引发的人新型冠状病毒性肺炎在全球流行, 疫情在中国境内已基本控制, 防控重点由诊治确诊患者转向筛查无症状感染者以及严防境外输入病例。目前中国疾病预防控制中心(CDC)与世界卫生组织(WHO)各推荐两对不同的2019-nCoV核酸检测引物, 核酸检测引物作为实时荧光

RT-PCR病毒核酸检测的关键, 面对病毒具有变异速度极快的特点, 其灵敏度是否能适应境外2019-nCoV的迅速变异变得尤为重要。

关键词

2019新型冠状病毒, 核酸检测引物, 病毒变异

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

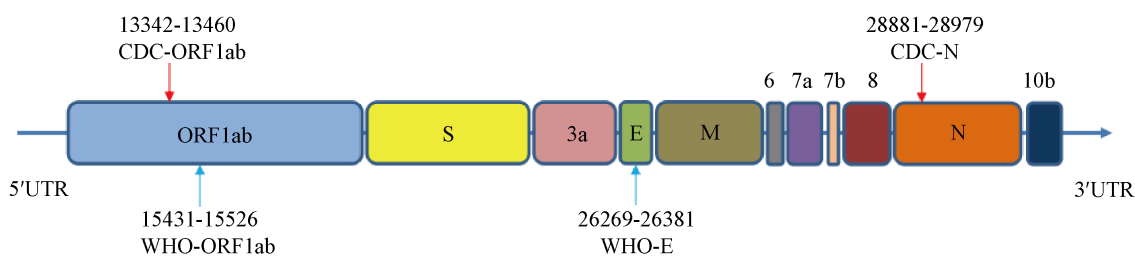
1. 引言

目前, 新冠疫情于国内整体趋于平稳, 境外则日益严重, 全面对外开放的战略面临严峻的考验。国外疫情流行的同时, 病毒也在不断变异, 《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》[1]将实时荧光 RT-PCR 检测新型冠状病毒核酸阳性作为确诊标准, 对入境人员进行核酸检测是保障战疫成果的关键, CDC 与 WHO 各推荐的两对不同病毒核酸检测引物是否会因病毒变异而使得检测准确度下降, 引发人们担忧。本文以新型冠状病毒核酸检测引物配对区域的变异情况来对 CDC 与 WHO 不同检测引物进行比较。

2. 新冠病毒基因组及蛋白结构功能

2.1. 新冠病毒基因组

2019-nCoV 基因组大小约为 29.8 Kb [2] [3], 2019-nCoV 在系统分类上属冠状病毒科(coronaviridae)冠状病毒 β 属(coronavirus), 本文收集的 2019-nCoV 全基因组数据来源于 NCBI 和 2019 新型冠状病毒信息库(https://bigd.big.ac.cn/ncov/release_genome) [4]。共有 14 个开放阅读框(Opening reading frame, ORF) (图 1), 编码 27~28 个蛋白质[5]。



注: 图 1 来自参考文献[5]。

Figure 1. The schematic structure of 2019-nCoV genome

图 1. 新型冠状病毒(2019-nCoV)基因组结构模式图

2.2. 病毒蛋白及功能

ORF1ab 和 ORF1a 基因位于病毒基因组 5'端, 分别编码 pp1ab 和 pp1a 蛋白, 后剪切为 15 或 16 个非结构蛋白(Non-structure protein, NSP), 包括 NSP1~NSP10 和 NSP12~NSP16, 其中 NSP12 可能为 RNA 依赖型 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA-polymerase, RdRp) [6] [7]。4 种相对保守的冠状病毒结构蛋白基因位于基因组的 3'端, 分别为表面刺突糖蛋白(Spike, S)、小包膜蛋白(Envelope, E)、外膜蛋白(Membrane,

M)、核衣壳蛋白(Nucleocapsid, N) [2] [3]。2019-nCoV 的 S 蛋白是一种位于病毒表面具有融合功能的糖蛋白, 负责冠状病毒与宿主细胞 ACE2 受体结合, 实现病毒感染的第一步[8]。N 蛋白是位于 2019-nCoV 内部的核衣壳蛋白, 常用作冠状病毒检测的靶点[9]。E 蛋白在病毒组装, 释放和致病中起作用[10]。M 蛋白促成形成病毒粒子, 促进膜弯曲, 并与 N 蛋白结合[11]。

3. 新冠病毒实时荧光 RT-PCR 核酸检测

3.1. RT-PCR 核酸检测原理

新冠疫情在国内爆发以来, 国家卫生健康委员会总共推出 7 个版本的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》, 从第一版到第七版病例确诊的金标准依旧是标本的荧光 RT-PCR 核酸检测阳性。RT-PCR 基本原理是根据欲检测病毒的已知保守核酸序列设计高度特异性引物以扩增该部分, 同时另外设计可以结合扩增区段内部区域的 Taq-man 探针, 探针会在 Taq 酶外切酶作用下发生水解进而产生荧光信号, 根据荧光信号与扩增循环数之间的关系可得到实时扩增曲线, 对检测曲线进行分析来判断是否受检对象已感染新型冠状病毒。目前各大商业公司试剂盒中以 2019-nCoV 的 RdRP 基因(位于 ORF1ab 读码框)、E 基因和 N 基因为检测对象, 从而实现对 2019-nCoV 核酸的检测[12]。

3.2. CDC 与 WHO 的新冠病毒核酸检测引物

由核酸检测原理可知, 引物的特异性以及设计区域的保守性对核酸检测准确度有极大的影响。CDC 与 WHO 推荐的 2019-nCoV 核酸检测引物扩增区域不同(表 1), 各有一对引物(CDC-ORF1ab, WHO-ORF1ab)位于病毒的 ORF1ab 区域, 但扩增区域在基因组上相差 1970 bp 的距离。CDC 另外一对引物(CDC-N-F/R)位于病毒核衣壳蛋白(N)区域, WHO 另外一对引物(WHO-E-F/R)位于小包膜蛋白(E)。四对引物在基因组上的相对位置已标注(图 1)。

Table 1. CDC WHO 2019-nCoV acid detection primers

表 1. CDC WHO 2019-nCoV 核酸检测引物

引物名称	序列	基因组区域
CDC-ORF1ab-F	5'-CCCTGTGGGTTTTACACTTAA-3'	13342~13362
CDC-ORF1ab-R	5'-TCAGCTGATGCACAATCGT-3'	13442~13460
CDC-N-F	5'-GGGGAAGTCTCTCTGCTAGAAT-3'	28881~28902
CDC-N-R	5'-CAGCTTGAGAGCAAAATGTCTG-3'	28958~28979
WHO-ORF1ab-F	5'-GTGAAATGGTCATGTGTGGCGG-3'	15431~15452
WHO-ORF1ab-R	5'-TATGCTAATAGTGTTTTTAACATTG-3'	15505~15530
WHO-E-F	5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3'	26269~26294
WHO-E-R	5'-TGTGTGCGTACTGCTGCAATAT-3'	26360~26381

4. 核酸检测引物区域变异情况

本文利用国家生物信息中心(CNCB)/2019 新型冠状病毒信息库(2019nCoV) (https://bigd.big.ac.cn/ncov/release_genome)发布的 2019-nCoV 数据进一步分析统计了病毒基因组上的四对核酸检测引物配对区域变异情况(图 2), 发现 CDC-ORF1ab-F/R, WHO-ORF1ab-F/R 与 WHO-E-F/R 这三对引物与 CDC-N-R 引物配对区域变异病毒株数极低, 变异群体发生率小于 0.01。CDC-N-F 在基因组配对区域变异病毒株数高达 14099 株, 其中 13888 株变异病毒集中在基因组 28881~28883 的位置(图 3), 变异群体发生率大于 0.05, 也就是说该区域的变异有可能会在 2019-nCoV 群体大范围发生[13]。

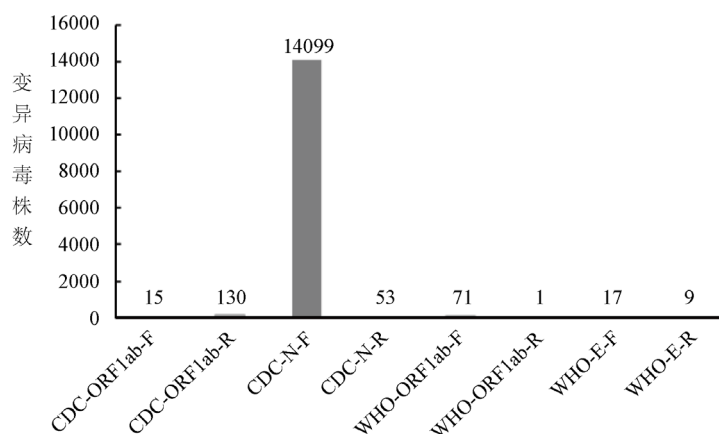


Figure 2. Primer pairing region virus variation

图 2. 引物配对区域病毒变异情况

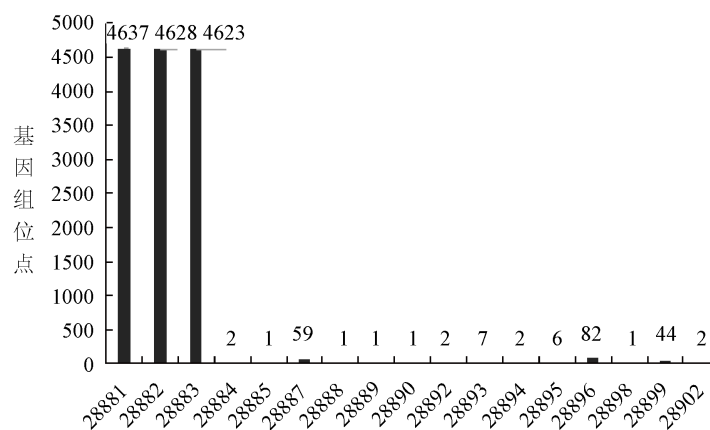


Figure 3. CDC-N-F genome region virus variation

图 3. CDC-N-F 基因组区域病毒变异

5. 小结

实时荧光 RT-PCR 作为新冠疫情防控检测病毒的主要手段，病毒特异性的核酸引物作为其核心组成部分，需要拥有很高灵敏度与准确度，一旦新冠病毒群体在引物配对区域出现变异，必然影响核酸检测精确度，从而导致大量感染者漏诊，进而引起国内疫情形势反弹。

从统计分析结果来看，病毒基因组在 CDC 检测的 ORF1ab 区与 WHO 检测的 ORF1ab 区与 E 区相对保守，因此实际新型冠状病毒检测盒表现跟之前不会有大的改变，但新型冠状病毒基因组在 CDC-N-F 区域前三个碱基发生变异的病毒株数大，变异群体的发生率大于 0.05，则说明这部分的变异很可能在病毒整个群体中扩散，导致使用该引物的核酸检测试剂盒的筛查阳性率下降，而发生该变异的新冠病毒群体在地域上的具体分布则有待于进一步的研究分析。

结合不断更新新冠病毒变异信息库对新冠病毒核酸检测引物的特异性进行分析，将核酸检测试剂盒检测能力与不断变异的病毒基因组信息保持同步，对于有效检测出该疾病具有非常重要的价值和意义。

参考文献

- [1] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第七版) [EB/OL].

- <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7652m/202003/a31191442e29474b98bfed5579d5af95.shtml>, 2020-03-04.
- [2] Wu, F., Zhao, S., Yu, B., *et al.* (2020) A New Coronavirus Associated with Human Respiratory Disease in China. *Nature*, **579**, 265-269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- [3] Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., Meng, Y., Wang, J., Lin, Y., Yuan, J., Xie, Z., Ma, J., Liu, W.J., Wang, D., Xu, W., Holmes, E.C., Gao, G.F., Wu, G., Chen, W., Shi, W. and Tan, W. (2020) Genomic Characterisation and Epidemiology of 2019 Novel Coronavirus: Implications for Virus Origins and Receptor Binding. *The Lancet*, **395**, 565-574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- [4] Li, X., Wang, W., Zhao, X., *et al.* (2020) Transmission Dynamics and Evolutionary History of 2019-nCoV. *Journal of Medical Virology*, **29**, 501-511. <https://doi.org/10.1002/jmv.25701>
- [5] Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., Meng, J., Zhu, Z., Zhang, Z., Wang, J., Sheng, J., Quan, L., Xia, Z., Tan, W., Cheng, G. and Jiang, T. (2020) Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe*, **27**, 325-328. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001>
- [6] Chen, Y., Liu, Q. and Guo, D. (2020) Emerging Coronaviruses: Genome Structure, Replication, and Pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, **92**, 418-423. <https://doi.org/10.1002/jmv.25681>
- [7] van Boheemen, S., de Graaf, M., Lauber, C., Bestebroer, T.M., Raj, V.S., Zaki, A.M., Osterhaus, A.D., Haagmans, B.L., Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J. and Fouchier, R.A. (2012) Genomic Characterization of a Newly Discovered Coronavirus Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome in Humans. *mBio*, **3**, e00473-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00473-12>
- [8] Li, F. (2016) Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual Review of Virology*, **3**, 237-261. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>
- [9] Cui, L., Wang, H., Ji, Y., Yang, J., Xu, S., Huang, X., Wang, Z., Qin, L., Tien, P., Zhou, X., Guo, D. and Chen, Y. (2015) The Nucleocapsid Protein of Coronaviruses Acts as a Viral Suppressor of RNA Silencing in Mammalian Cells. *Journal of Virology*, **89**, 9029-9043. <https://doi.org/10.1128/JVI.01331-15>
- [10] Schoeman, D. and Fielding, B.C. (2019) Coronavirus Envelope Protein: Current Knowledge. *Virology Journal*, **16**, Article No. 69. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0>
- [11] Siu, K.L., Chan, C.P., Kok, K.H., Chiu-Yat Woo, P. and Jin, D.Y. (2014) Suppression of Innate Antiviral Response by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus M Protein Is Mediated through the First Transmembrane Domain. *Cellular & Molecular Immunology*, **11**, 141-149. <https://doi.org/10.1038/cmi.2013.61>
- [12] 解放日报. 国内首个!沪研新型冠状病毒检测试剂盒通过检验[EB/OL]. <http://sh.people.com.cn/BIG5/n2/2020/0124/c134768-33743398.html>, 2020-02-05.
- [13] Zhao, W.M., Song, S.H., Chen, M.L., *et al.* (2020) The 2019 Novel Coronavirus Resource. *Hereditas (Beijing)*, **42**, 212-221.