

长沙市 4 例输入新型冠状病毒 Omicron 变异株全基因组序列特征分析

黄政¹, 徐明忠¹, 欧新华¹, 向星宇², 湛志飞², 姚栋¹

1. 湖南省长沙市疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410004; 2. 湖南省疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410000

摘要: **目的** 分析长沙市境外输入新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)的全基因组序列特征以及遗传变异情况。**方法** 采用高通量测序方法对 2021 年 12 月的 SARS-CoV-2 进行全基因组测序, 序列进行比对以及进化分析。**结果** 本研究获得 4 株 SARS-CoV-2 全基因组序列, 长度为 29 685 bp。毒株核苷酸序列与 Wuhan-Hu-1 参考株(EPI_ISL_402125)相比, 同源性为 99.6%。与 Omicron 变异株(EPI_ISL_8890653)相比, 同源性为 99.9%。进化树分析表明毒株序列位于 BA.1.1 分支, 与 SARS-CoV-2 Omicron 变异株位于同一分支。氨基酸序列位点分析发现毒株具有典型的 Omicron 序列突变位点。ORF1ab 区域发现 G5494S, K4346R, T5035I 和 E6945D 突变。S 蛋白抗体结合区域发生 R346K 突变。**结论** 长沙市输入的 Omicron 变异株携带已报道可明确导致病毒传播和致病力发生变化的突变位点, 应继续加强疫情应对措施。

关键词: 新型冠状病毒; 奥密克戎; 全基因组序列; 进化分析

中图分类号: R373.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2022)12-1431-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2022.12.006

Characteristics of full-genome sequence of four imported Omicron variants of SARS-CoV-2 in Changsha City

HUANG Zheng¹, XU Ming-zhong¹, OU Xin-hua¹, XIANG Xing-yu², ZHAN Zhi-fei², YAO Dong¹

1. Changsha Municipal Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410004, China;

2. Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410000, China

Corresponding author: YAO Dong, E-mail: 215829363@qq.com

Abstract: Objective To analyze the characteristics and genetic variation based on full-genome of severe acute respiratory

基金项目: 湖南省卫生健康委科研课题项目(202012060458), “基于污水、环境及临床病例 SARS-CoV-2 监测对长沙市 COVID-19 疫情预警可行性研究”

作者简介: 黄政(1988-), 男, 硕士研究生, 主管技师, 研究方向: 病原微生物学。

通信作者: 姚栋, E-mail: 215829363@qq.com。

- [5] 林丽, 吴韶彬, 潘蕴蛟, 等. 2015—2020 年福建省社会组织参与艾滋病防治基金项目情况分析[J]. 中国预防医学杂志, 2021, 22(7):488-491.
- [6] 张宏, 陈剑惠, 林春仲, 等. 2016 年福州市依托社会组织开展 MSM 人群艾滋病监测结果分析[J]. 预防医学论坛, 2018, 24(5):336-340, 343.
- [7] 林春仲, 张宏, 许绍溢, 等. 2018 年福州市依托社会组织开展已婚男男性行为人群艾滋病监测[J]. 预防医学论坛, 2020, 26(6):440-443, 449.
- [8] 陈剑惠, 张宏, 薛洪洪. 2020 年福州市男男性行为人群艾滋病监测分析[J]. 河南预防医学杂志, 2021, 32(12):931-935.
- [9] 刘晨希, 李洁芳, 刘淑君, 等. 中国艾滋病 VCT 服务现状研究进展[J]. 中国艾滋病性病, 2014, 20(8):624-627.
- [10] 周颖, 吴慧华, 黄娟. 南平市 2016—2020 年 AIDS 自愿咨询检测情况分析[J]. 海峡预防医学杂志, 2021, 27(4):41-42.
- [11] 张英, 江超, 万晓宇, 等. 2007—2019 年自贡市 2 199 例艾滋病自愿咨询检测情况分析[J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2021, 19(3):124-128.
- [12] 车双双, 黄玉玲, 张芹, 等. 2016—2020 年南充市艾滋病自愿咨询检测结果分析[J]. 预防医学情报杂志, 2022, 38(1):7-12.
- [13] 甘梦泽, 董敖渤, 康瑞华, 等. 2018 年新报告 HIV-1 感染者省际传播特征分析[J]. 中国艾滋病性病, 2021, 27(2):115-120.
- [14] 殷环, 杨渊, 秦奕, 等. 美国艾滋病流行情况及艾滋病防控策略[J]. 中国艾滋病性病, 2021, 27(4):439-441.
- [15] 何佳晋, 居豪, 吴超. 中国 MSM 人群 HIV 新发感染率及其影响因素的 Meta 分析[J]. 预防医学, 2022, 34(1):70-77.
- [16] 张宏, 陈剑惠, 刘梅艳, 等. 2011—2019 年福州市经性接触传播的男性 HIV/AIDS 病例特征[J]. 预防医学, 2020, 32(9):907-910.
- [17] 石蕾, 卢园, 张春阳, 等. 福州市 2013—2014 年 HIV-1 新发感染情况及同性传播人群流行病学特征分析[J]. 实用预防医学, 2016, 23(7):849-851.
- [18] 刘凤仁, 龙清平, 黄飞雁, 等. 2014—2017 年深圳市龙岗区男男同性传播 HIV 人群 HIV 检测影响因素分析[J]. 实用预防医学, 2019, 26(8):971-974.

syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) from imported cases in Changsha City. **Methods** The high-throughput sequencing technology was used to perform whole genome sequencing of SARS-CoV-2 isolated in December 2021. Nucleotide sequences were compared, and phylogenetic analysis was conducted. **Results** Genome sequences of four SARS-CoV-2 strains were obtained in this research. The full length of genome sequences was 29,685 bp. Based on nucleotide sequences, homology comparison showed that four SARS-CoV-2 strains shared 99.6% and 99.9% similarity with Wuhan-Hu-1 reference strain (EPI_ISL_402125) and Omicron strain (EPI_ISL_8890653), respectively. Phylogenetic analysis revealed that the strains belonged to BA.1.1 branch which SARS-CoV-2 Omicron variants presented. The amino acid sequences revealed that four SARS-CoV-2 strains contained the mutation sites that had been reported in Omicron variants. We also found some novel substitution sites in ORF1ab amino acid sequences, including G5494S, K4346R, T5035I and E6945D, and R346K novel substitution in receptor-binding domain of S sequences. **Conclusion** The imported Omicron variants of SARS-CoV-2 in Changsha City contained all representative mutation sites that had been reported to increase the viral transmission and pathogenicity. We should continue to strengthen prophylactic measures against SARS-CoV-2.

Keywords: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; Omicron; full-genome sequence; phylogenetic analysis

新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2,SARS-CoV-2)于 2019 年底在武汉首次被发现,随后在全世界范围内暴发流行。截至 2022 年 2 月,SARS-CoV-2 在全国范围内累计造成了约 4.34 亿人次感染,594 万人次死亡^[1]。SARS-CoV-2 属于冠状病毒科,β 冠状病毒属。基因组全长约 30 kb,包括 11 个开放阅读框(open reading frames, ORFs)。自疫情发生以来,SARS-CoV-2 基因组序列经历了多次突变,并衍生出了多个变异毒株(variants of concern, VOC),如 Alpha, Beta, Delta 和 Omicron 等^[2]。2021 年 11 月南非向 WHO 报告了名为 B.1.1.529 的 VOC 毒株变种^[3-4]。该毒株命名为 Omicron,携带之前 VOC 毒株的突变位点,被证实具备快速的传播能力,降低与中和抗体的结合,造成免疫逃逸,之后在欧洲等地造成了持续暴发性流行^[5-8]。我国广州市于 12 月 13 日报道首次输入 Omicron 变异株^[9]。12 月 16 日,长沙市从境外航班中检测出 Omicron 变异株。本研究拟对境外输入的 4 株 Omicron 变异株进行全基因组序列特征分析。

1 材料与方法

1.1 样本来源 按照《新型冠状病毒防控方案(第八版)》的要求进行样本采集,于 4℃下送至长沙市疾病预防控制中心实验室。样本保存于-80℃冰箱。

1.2 核酸提取 鼻咽拭子标本采用磁珠法提取病毒核酸(西安天隆科技有限公司),标本用新冠病毒核酸检测试剂盒检测(江苏硕世生物科技股份有限公司)。选取 CT 值小于 30 的标本进行全基因组测序。

1.3 全基因组测序 核酸采用新型冠状病毒全基因组序列捕获试剂盒(北京微未来科技有限公司)进行富集和扩增。扩增产物纯化后先用 Qubit 2.0 进行核

酸浓度定量,二代测序建库核酸浓度为 1 ng DNA,建库试剂盒采用 Nextera XT DNA 文库构建试剂盒[因美纳(中国)科学器材有限公司]。文库采用 Miseq V2 试剂盒[因美纳(中国)科学器材有限公司]在 Miseq 平台上进行测序。下机数据先用 Fastqc 和 Cutadapt 进行数据质量分析和去接头,筛选后的数据用 Virus Identification Pipeline 软件进行比对分析,数据过滤后再用 SPAdes-3.13.0 软件进行序列拼接与组装。

1.4 序列比对及分析 基因组序列上传至 Pangolin 网站(<https://pangolin.cog-uk.io/>)进行分型。序列比对采用 MAFFT 软件。进化树构建使用 MEGA X 软件,方法为邻接法(NJ 算法),bootstrap 重复值为 1 000 次。

2 结果

2.1 病例结果分析 本次共获得 4 株输入 SARS-CoV-2 全基因组序列,毒株命名为 YJ20215120 至 YJ20215123。4 例输入病例来自南非,均为男性,年龄为 25~47 岁,于 2021 年 12 月 16 日乘坐入境航班抵达长沙,其中 YJ20215120 至 YJ20215122 于当日确诊,YJ20215123 于 12 月 19 日确诊,核酸样本的 CT 值均小于 25,见表 1。

表 1 Omicron 变异株 ORF1ab 和 S 蛋白质编码区氨基酸突变位点对比分析

| 毒株 (GISAID 序列号) | VOC | 性别 | 年龄 | ORF1ab 编码区 ^a | | | | S 编码区 ^a |
|---|---------|----|----|-------------------------|-------|-------|-------|--------------------|
| | | | | 4 346 | 5 035 | 5 494 | 6 945 | 346 |
| SARS-CoV-2/Wuhan-Hu-1 (EPI_ISL_402125) | Alpha | / | / | K | T | G | E | R |
| SARS-CoV-2/SouthAfrica (EPI_ISL_8890653) | Omicron | / | / | K | T | G | E | R |

续表 1

| 毒株 (GISAID 序列号) | VOC | 性别 | 年龄 | ORF1ab 编码区 ^a | | | | S 编码区 ^a |
|----------------------------------|---------|----|----|-------------------------|-------|-------|-------|--------------------|
| | | | | 4 346 | 5 035 | 5 494 | 6 945 | 346 |
| YJ20215120 (EPI_ISL_10584116) | Omicron | 男 | 25 | K | I | S | E | K |
| YJ20215121 (EPI_ISL_10584117) | Omicron | 男 | 47 | K | T | S | E | K |
| YJ20215122 (EPI_ISL_10584118) | Omicron | 男 | 34 | K | T | S | D | K |
| YJ20215123 (EPI_ISL_10584119) | Omicron | 男 | 31 | R | T | S | E | K |

注:a 代表氨基酸序列位点。

2.2 全基因组序列分析 本研究获得 4 株 SARS-CoV-2 全基因组序列,长度为 29 685 bp。输入型 SARS-CoV-2 全基因组序列提交至 Pangolin 网站,分析位于 BA. 1. 1 分支。序列提交至 GISAID 数据库,序列号为 EPI_ISL_10584116 至 EPI_ISL_10584119。

进化树分析发现 4 份毒株与 Omicron(BA. 1)分支处于同一分支,与南非、日本、印度以及美国等地发现的毒株位于同一分支。属于 WHO 确认的 Omicron 变异株,见图 1。

蛋白质编码区核苷酸序列同源性比对分析发现,本研究中的 4 份毒株序列与武汉地区发现的 2019-nCoV 毒株(EPI_ISL_402125)相比,同源性为 99.6%。与 11 月南非地区报道的 Omicron 变异株(EPI_ISL_8890653)相比,同源性为 99.9%。4 株毒株之间的同源性为 100.0%。

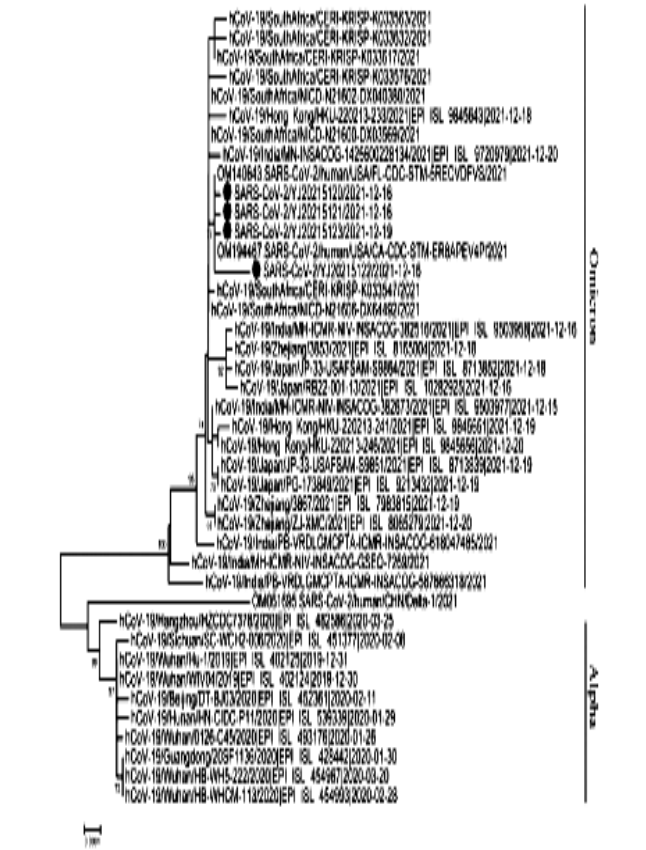
2.3 氨基酸序列分析 氨基酸序列位点分析发现,与 11 月份报道的南非毒株(EPI_ISL_8890653)相比本研究中 4 株毒株具有南非毒株 ORF1ab 序列所具有的突变位点特征(K856R, Δ2083, L2084I, A2710T, T3255I, P3395H, Δ3674-3676, I3758V, P4715L 和 I5967V),另外发现 G5494S 突变, YJ20215123 毒株发生 K4346R, YJ20215120 毒株发生 T5035I, YJ20215122 毒株发生 E6945D。S 样蛋白包含典型 Omicron 变异株氨基酸序列突变位点特征(A67V, Δ69-70, T95I, Δ142-144, Y145D, Δ211, L212I, ins215-217, G339D, R346K, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F),并发现 R349K 突变,见表 1。其中 R346K 突变位于 S 蛋白抗体结合区(receptor binding domain, RBD)。E 序列包含 T9I 突变。M 序列包含 D3G, Q19E, A63T 突变。N 序列包含 P13L, Δ31-33, R203K, G204R。其余 ORF 区域序列保守,与南非株相比未发现新的突变位点。

3 讨论

SARS-CoV-2 已在全球范围内暴发流行,对人类的卫生健康事业和经济社会发展造成严重的打击。自 Omicron 被发现在南非地区流行以来,该毒株传播迅速,已成为全球感染的优势毒株。长沙市于 2021 年 12 月 16 日首次输入 Omicron 变异株,全基因组序列分析表明,4 份毒株包含典型的 Omicron 变异株序列特征,具备快速传播的能力。

进化树研究表明,该市 Omicron 变异株分支内还有其他国家地区的分离毒株,与国内同一时期内的其他毒株不在同一分支,表明毒株在传播过程呈现出遗传变异多样性。

Omicron 变异株共享了之前 VOC 毒株的突变位点,并发生了额外的氨基酸位点突变。研究报道指出, Omicron 变异株共有 50 余个位点突变,其中 S 蛋白中 20 余个, RBD 结合区域 13 个,这些区域位点的突变与血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme 2,



注:●代表本研究中 Omicron 变异株。

图 1 4 例 Omicron 变异株全基因组核苷酸序列进化树分析

ACE2)受体以及抗体结合相关,因此会降低抗体的结合效率^[10-11]。Omicron 变异株被发现以来,存在 K417N(K440N)和 S446K 两个分支,长沙市发现的毒株属于 K417N(K440N)分支。Starr 等^[12-13]指出,携带有 K417N 突变位点的毒株,能有效降低与中和抗体的结合。本研究中 4 份毒株 S 蛋白中包含已被报道的 S477N、Q498R 和 N501Y 位点突变,这些突变位点被证明与 ACE2 受体的结合能力增强,能加速病毒的传播^[14-15]。毒株 S 蛋白中含有的 T478K、E484A 突变以及 69~70 的缺失突变等被报道与中和抗体结合以及宿主免疫逃逸相关^[16]。另外在 S 蛋白序列的 RBD 结合区域发现了 R346K 突变以及 ORF1ab 序列的 K4346R、T5035I、G5494S 和 E6945D 突变,这些新的突变位点表明 Omicron 变异株在不同宿主人群中仍然在持续不断的进化,但这些突变位点的生物学功能有待进一步研究。有报道指出 ORF8 序列中的 382 bp 片段缺失会导致毒株的毒力减弱,该市的 Omicron 变异株序列不存在 382 bp 片段的缺失^[17]。

综上,长沙市输入的 Omicron 变异株携带可明确导致加速病毒传播,中和抗体结合效率降低和能造成免疫逃逸相关的基因突变位点,应继续加强疫情应对措施。研究中的 Omicron 变异株全基因组序列可以为该地疫情防控措施的制定以及疫苗的研究提供帮助。

参考文献

- [1] WHO. Coronavirus disease (COVID-2019) situation reports [EB/OL]. (2022-03-02) [2022-03-04]. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/>.
- [2] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. Lancet, 2020, 395(10223):497-506.
- [3] Wang L, Cheng G. Sequence analysis of the emerging SARS-CoV-2 variant Omicron in South Africa [J]. J Med Virol, 2022, 94(4):1728-1733.
- [4] Sharma V, Rai H, Gautam DNS, et al. Emerging evidence on Omicron (B.1.1.529) SARS-CoV-2 variant [J]. J Med Virol, 2022, 94(5):1876-1885.
- [5] Vanmechelen B, Logist AS, Tony WB, et al. Identification of the first SARS-CoV-2 lineage B.1.1.529 virus detected in Europe [J]. Microbiol Resour Ann, 2022, 11(2):e0116121.

- [6] Khandia R, Singhal S, Alqahtani T, et al. Emergence of SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) variant, salient features, high global health concerns and strategies to counter it amid ongoing COVID-19 pandemic [J]. Environ Res, 2022, 209:112816.
- [7] Saxena SK, Kumar S, Ansari S, et al. Characterization of the novel SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) variant of concern and its global perspective [J]. J Med Virol, 2022, 94(4):1738-1744.
- [8] Hoffmann M, Krüger N, Schulz S, et al. The Omicron variant is highly resistant against antibody-mediated neutralization: implications for control of the COVID-19 pandemic [J]. Cell, 2022, 185(3):447-456.
- [9] Jia HL, Wang H, Cao L, et al. Genetic analysis of a SARS-CoV-2 Omicron variant from a Chinese traveller returning from overseas [J]. Emerg Microbes Infect, 2022, 11(1):306-309.
- [10] Lupala CS, Ye YJ, Chen H, et al. Mutations on RBD of SARS-CoV-2 Omicron variant result in stronger binding to human ACE2 receptor [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 590:34-41.
- [11] Rath SL, Padhi AK, Mandal N. Scanning the RBD-ACE2 molecular interactions in Omicron variant [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 592:18-23.
- [12] 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 [J]. Cell, 2020, 182(5):1295-1310.
- [13] Greaney AJ, Loes AN, Crawford KHD, et al. Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies [J]. Cell Host Microbe, 2021, 29(3):463-476.
- [14] Wibmer CK, Ayres F, Hermanus T, et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma [J]. Nat Med, 2021, 27(4):622-625.
- [15] Koley T, Kumar M, Goswami A, et al. Structural modeling of Omicron spike protein and its complex with human ACE-2 receptor: molecular basis for high transmissibility of the virus [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 592:51-53.
- [16] Greaney AJ, Starr TN, Gilchuk P, et al. Complete mapping of mutations to the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain that escape antibody recognition [J]. Cell Host Microbe, 2021, 29(1):44-57.
- [17] Su YCF, Anderson DE, Young BE, et al. Discovery and genomic characterization of a 382-nucleotide deletion in ORF7b and ORF8 during the early evolution of SARS-CoV-2 [J]. mBio, 2020, 11(4):e01610-e01620.

收稿日期:2022-03-04