

DOI:10.16781/j.0258-879x.2020.04.0365

· 专题报道 ·

上海 2 株严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 的分离与鉴定

彭浩然¹, 李成忠², 唐海琳¹, 薛建亚², 陈志辉², 梁雪松², 朱咏梅², 夏炳辉¹, 朱勇喆¹, 吴俊杰³, 赵兰娟¹, 任浩¹, 江亮亮¹, 何燕华¹, 戚中田^{1*}, 赵平^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)海军医学系生物医学防护教研室, 上海 200433
2. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院感染科, 上海 200433
3. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院呼吸与危重症医学科, 上海 200433

[摘要] **目的** 从新型冠状病毒肺炎(COVID-19)患者鼻/咽拭子样本中分离、培养严重急性呼吸综合征冠状病毒 2(SARS-CoV-2)。**方法** 将来自上海市 COVID-19 患者的 3 份鼻/咽拭子样本以 TPCK 胰酶处理, 然后接种 Vero E6 细胞; 待大部分细胞出现明显病变时, 取细胞培养上清用 qRT-PCR 法检测病毒核酸, 并用反转录 PCR 扩增病毒受体结合区(RBD)基因片段; 将病毒扩增培养后感染接种于 96 孔板中的 Vero E6 细胞, 观察细胞病变效应, 并用免疫荧光法检测病毒蛋白。**结果** 2 份 COVID-19 患者鼻/咽拭子样本接种的 Vero E6 细胞出现明显细胞病变效应, 细胞培养上清中检测出新复制产生的 SARS-CoV-2 核酸, 扩增出的 RBD 序列与早期分离出的 SARS-CoV-2 相应序列完全一致; 病毒感染的 Vero E6 细胞病变迅速, 并能与 SARS-CoV-2 核衣壳蛋白(N 蛋白)单克隆抗体、刺突蛋白(S 蛋白)单克隆抗体及 COVID-19 患者恢复期血清发生反应。**结论** 从 2 份 COVID-19 患者鼻/咽拭子样本中成功分离出 SARS-CoV-2, 为后续开展 SARS-CoV-2 感染与致病机制研究、防治药物与疫苗的研发奠定了基础。

[关键词] 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2; 新型冠状病毒肺炎; 鼻拭子; 咽拭子; 病毒分离

[中图分类号] R 373.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2020)04-0365-06

Isolation and identification of two strains of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from coronavirus disease 2019 patients in Shanghai

PENG Hao-ran¹, LI Cheng-zhong², TANG Hai-lin¹, XUE Jian-ya², CHEN Zhi-hui², LIANG Xue-song², ZHU Yong-mei², XIA Bing-hui¹, ZHU Yong-zhe¹, WU Jun-jie³, ZHAO Lan-juan¹, REN Hao¹, JIANG Liang-liang¹, HE Yan-hua¹, QI Zhong-tian^{1*}, ZHAO Ping^{1*}

1. Department of Biomedical Defense, Faculty of Naval Medicine, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China
2. Department of Infectious Diseases, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China
3. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To isolate the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) from nasal/throat swabs of coronavirus disease 19 (COVID-19) patients. **Methods** Three nasal/throat swab samples from COVID-19 patients in Shanghai were treated with TPCK trypsin and were used to treat Vero E6 cells inoculated in 96-well plates. When most of the cells showed obvious cytopathy, the cell culture supernatants were collected. We then detected the viral nucleic acid by fluorescent quantitative real-time polymerase chain reaction, and amplified the gene fragment of the virus receptor binding domain (RBD) by reverse transcription polymerase chain reaction. After amplification and culture, the virus was used to infect the Vero E6 cells inoculated in 96-well plates. The cytopathy was observed and the virus protein was detected by immunofluorescence. **Results** The Vero E6 cells that cultured with two of three nasal/pharyngeal swab samples showed obvious cytopathic effect and newly synthesized viral nucleic acid was detected in the supernatants of the cell culture. The amplified RBD sequence was completely consistent with the corresponding fragment of SARS-CoV-2 isolated earlier. Virus-

[收稿日期] 2020-03-28 **[接受日期]** 2020-04-08

[基金项目] 国家重点研发计划(2016YFC1200401), 国家科技重大专项(2017ZX10304403-003). Supported by National Key Research and Development Program of China (2016YFC1200401) and National Science and Technology Major Project of China (2017ZX10304403-003).

[作者简介] 彭浩然, 博士, 讲师. E-mail: phran@126.com

*通信作者 (Corresponding authors). Tel: 021-81870988, E-mail: qizt@smmu.edu.cn; Tel: 021-81870998, E-mail: pnzhao@163.com

infected Vero E6 cells showed cytopathies rapidly and could react with the monoclonal antibody against nucleocapsid protein (N protein) and spike protein (S protein) of SARS-CoV-2, and convalescence sera of COVID-19 patients. **Conclusion** Two SARS-CoV-2 strains were successfully isolated from two nasal/throat swab samples of COVID-19 patients in Shanghai, which provides evidence for the mechanism research on the infection and pathogenesis of SARS-CoV-2 as well as the development of drugs and vaccines against SARS-CoV-2.

[Key words] severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; coronavirus disease 2019; nasal swab sample; throat swab sample; virus isolation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2020, 41(4): 365-370]

新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 于 2019 年 12 月被报道^[1-3], 并迅速发展为全球大流行。国际病毒分类委员会将引起此次疫情的新型冠状病毒命名为严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)。中国科学院武汉病毒研究所石正丽团队^[1]从早期的 5 例患者样本中获得了该病毒的全基因组序列, 来自 5 例患者的病毒序列相似性达到 99.9%。尽管该病毒全基因组与严重急性呼吸综合征冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV) /BJ01 株的序列一致性为 79.5%, 但被作为冠状病毒分类标准的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 1ab 中的 7 个保守的复制酶结构域与 SARS-CoV 氨基酸序列一致性高达 94.6%, 提示该新型冠状病毒与 SARS-CoV 属于 SARS 相关冠状病毒 (SARS-related coronavirus, SARSr-CoV) 家族。SARS-CoV-2 基因组序列与该实验室之前从中华菊头蝠分离到的 1 株蝙蝠冠状病毒毒株 RaTG13 基因组的序列一致性为 96.2%, 这提示其储存宿主可能为蝙蝠。SARS-CoV-2 侵入宿主细胞所依赖的受体与 SARS-CoV 相同, 也是血管紧张素转化酶 II (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)。由于 ACE2 的表达分布, 这 2 种冠状病毒主要感染有纤毛的支气管上皮细胞和人肺泡 II 型上皮细胞。多个报道提示穿山甲可能为 SARS-CoV-2 的中间宿主, 但可能不是唯一的中间宿主^[4-5]。

COVID-19 疫情严重威胁人类健康及社会、经济发展, 虽然目前中国国内疫情已得到控制, 但中东、欧洲、北美地区的疫情仍呈暴发态势。面对 COVID-19 全球暴发的严峻态势, 建立 SARS-CoV-2 感染的细胞模型及动物模型对于加快防治产品的研发进程、研判未来疫情进展及长期结局非常迫切。从感染者标本中分离、培养出病毒对于研究病毒的

病原学特征、感染与致病机制、抗病毒药物与疫苗研发至关重要。为此, 在我校生物安全三级 (P3) 实验室获得 SARS-CoV-2 实验活动资质以后, 我们迅速开展了 SARS-CoV-2 的分离、鉴定, 成功从 2 例 COVID-19 确诊患者鼻/咽拭子样本中分离出 SARS-CoV-2, 为后续研究提供了重要支撑。

1 材料和方法

1.1 细胞、试剂、抗体 兔抗 SARS-CoV-2 刺突蛋白 (spike protein, S 蛋白) S1 亚基单克隆抗体、核衣壳蛋白 (nucleocapsid protein, N 蛋白) 单克隆抗体为北京义翘神州科技有限公司产品, SARS-CoV-2 (*ORF1ab/N* 基因) 荧光探针定量试剂盒为上海伯杰生物医药有限公司产品, 青链霉素双抗、Alexa Fluor®488 标记抗兔及抗人 IgG 为美国 Thermo Fisher 公司产品, Vero E6 细胞由复旦大学张荣研究员馈赠。

1.2 临床样本 鼻/咽拭子样本来源于 2020 年 1 月至 2 月海军军医大学 (第二军医大学) 长海医院收治的 COVID-19 疑似患者, 由本实验室用 qRT-PCR 法从送检的 COVID-19 疑似患者鼻/咽拭子样本中检测出 SARS-CoV-2 核酸阳性样本 3 份。3 份用于 SARS-CoV-2 分离的样本以每管 200 μ L 分装, 冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中。2 份 COVID-19 患者恢复期血清样本分别取自江苏大学附属镇江第三人民医院收治的 2 例确诊 COVID-19 患者 (在患者治疗康复出院 3 周后采集)。健康成年人血清取自本实验室人员。所有样本提供者均签署知情同意书。

1.3 病毒分离 病毒分离全过程均在海军军医大学 (第二军医大学) P3 实验室中进行。病毒分离方法参考复旦大学上海医学院张荣研究员及中国科学院武汉病毒研究所石正丽研究员的相关方法^[1,6]。Vero E6 细胞采用含 10% FBS 的 DMEM 培养液 (含 1% 青链霉素双抗) 于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C、饱和湿度

的孵箱中培养待用。

将 Vero E6 接种于 96 孔细胞培养板, 待细胞汇合度为 90% 左右时加入鼻 / 咽拭子样本进行病毒分离。将冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱的鼻 / 咽拭子样本取出, 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱融化, 然后取出置于冰上, 加入等体积的 DMEM 培养液 (含 $2\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ TPCK 胰酶、1% 青链霉素双抗和 0.2% 牛血清白蛋白), 再置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵箱, 1 h 后吸取鼻 / 咽拭子上清, 加入接种有 Vero E6 细胞的 96 孔板, 每孔 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。将 96 孔板置于孵箱中, 2 h 后吸除上清, 用 PBS 轻轻洗孔 3 次, 随后加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 含适量 TPCK 胰酶的无血清 DMEM 培养液, 置于孵箱中继续培养。24 h 后每天观察细胞是否出现细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE), 待超过 50% 细胞出现 CPE 并从孔底面脱落时, 吸取上清, 避免碰触细胞残骸, 然后高速离心, 小心吸取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 上清传代感染接种于 24 孔板中的 Vero E6 细胞, 取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 上清用 qRT-PCR 法检测 SARS-CoV-2 核酸。

1.4 SARS-CoV-2 核酸检测 用磁珠法全自动核酸提取仪 (杭州奥盛仪器有限公司) 从细胞培养上清中抽提病毒 RNA, 溶解于 $50\text{ }\mu\text{L}$ 无核酸酶水, 然后用 SARS-CoV-2 (*ORF1ab/N* 基因) 荧光探针定量试剂盒检测 SARS-CoV-2 核酸。

1.5 SARS-CoV-2 *S* 基因受体结合区 (receptor binding domain, RBD) 区的扩增和测序 取 $5\text{ }\mu\text{L}$ 抽提的病毒 RNA, 用高保真反转录试剂 (美国 Promega 公司) 进行反转录反应, 反转录引物用随机引物。得到的 cDNA 用高保真 DNA 聚合酶 (日本 TaKaRa 公司) 进行 PCR 扩增, 引物序列: *S773* 5'-GGACAGCTGGTGCTGCAGC-3', *S1718* 5'-GTAGTGTCAGCAATGTCTCTGC-3'。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 切出分子大小与预期 946 bp 相符的 DNA 条带, 回收后测序。引物合成和 PCR 产物测序均由上海博尚生物技术有限公司完成。

1.6 免疫荧光检测与细胞病变观察 将病毒分离第 1 代细胞上清接种于 24 孔板中的 Vero E6 细胞, 超过 50% 细胞出现 CPE 时, 取细胞培养上清, 高速离心去除细胞残骸, 再取 $4\text{ }\mu\text{L}$ 连续 2 倍稀释, 接种于 96 孔板中的 Vero E6 细胞。待最高剂量病毒感染孔超过 50% 细胞出现 CPE 时, 将 96 孔板浸泡于甲醇中, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱灭活病毒并固定细胞 30 min。随后取出 96 孔板, 显微镜下观察细胞并拍

照, 然后用免疫荧光法检测病毒蛋白。一抗包括兔抗 SARS-CoV-2 S 蛋白 S1 亚基单克隆抗体、兔抗 SARS-CoV-2 N 蛋白单克隆抗体和 2 份 COVID-19 患者恢复期血清, 均以 1 : 200 稀释。用健康成年人血清作为 COVID-19 患者恢复期血清的阴性对照。荧光二抗使用 Alexa Fluor®488 标记的抗兔及抗人 IgG。荧光抗体反应以后, 用 DAPI 进行细胞核染色。用全自动细胞成像及分析系统 (BioTek Cytation 5 Imaging Reader, 美国 BioTek 公司) 进行观察、拍照。

2 结果

2.1 病毒分离培养的核酸检测 将 3 份鼻 / 咽拭子样本分别接种 Vero E6 细胞, 接种 24 h 后每隔 12 h 观察细胞 CPE, 2 号和 3 号样本接种孔的 Vero E6 细胞分别在接种后 60 h 和 72 h 出现明显 CPE, 大量细胞脱落。1 号样本接种孔及阴性对照孔细胞未观察到明显 CPE。至接种后的 84 h 和 96 h, 2 号和 3 号样本接种孔中仅有少量贴壁细胞。分别取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 上清抽提核酸, 用 qRT-PCR 法检测 SARS-CoV-2 *ORF1ab/N* 基因。如图 1 所示, 2 号和 3 号样本接种孔分别在 PCR 第 14.8 个和第 10.5 个循环时开始出现 *ORF1ab* 基因扩增曲线 [即循环阈值 (cycle threshold, Ct) 分别为 14.8、10.5], *N* 基因扩增曲线起峰稍晚; 而 1 号样本接种孔和阴性对照孔均未出现扩增曲线。这与细胞上清中的病毒核酸载量高低相符。

2.2 病毒分离培养的细胞病变观察及免疫荧光检测 将经接种于 24 孔板的 Vero E6 细胞再次扩增的病毒上清连续 2 倍稀释感染接种于 96 孔板中的 Vero E6 细胞, 待最高剂量病毒感染孔超过 50% 细胞出现 CPE 时, 用甲醇灭活病毒并固定细胞, 于显微镜下观察细胞形态, 并拍照记录细胞病变。如图 2 所示, 从 2 号和 3 号 2 份鼻 / 咽拭子样本分离出的病毒在感染后 12 h 即可致使细胞出现明显 CPE。分别以 2 种单克隆抗体及 2 份 COVID-19 患者恢复期患者血清为检测抗体, 用免疫荧光法检测 SARS-CoV-2 蛋白。这些抗体均可与从 2 份鼻 / 咽拭子样本中分离出的病毒感染的 Vero E6 细胞结合, 不与未感染病毒的 Vero E6 细胞结合, 健康成人血清不与病毒感染的 Vero E6 细胞结合 (图 3 为从 2 号鼻 / 咽拭子样本中分离出的病毒的免疫

荧光检测结果)。由此可以确定,从2号和3号鼻/咽拭子样本中分别分离出了SARS-CoV-2,下文分别称为S2、S3株SARS-CoV-2。

2.3 病毒S基因RBD区测序 用反转录PCR分别

扩增S2、S3株SARS-CoV-2 S基因的RBD区序列,测序结果如图4所示,2株病毒的S基因RBD区序列与最早完成基因组测序的SARS-CoV-2病毒株(GenBank登录号:NC_045512)RBD区序列一致。

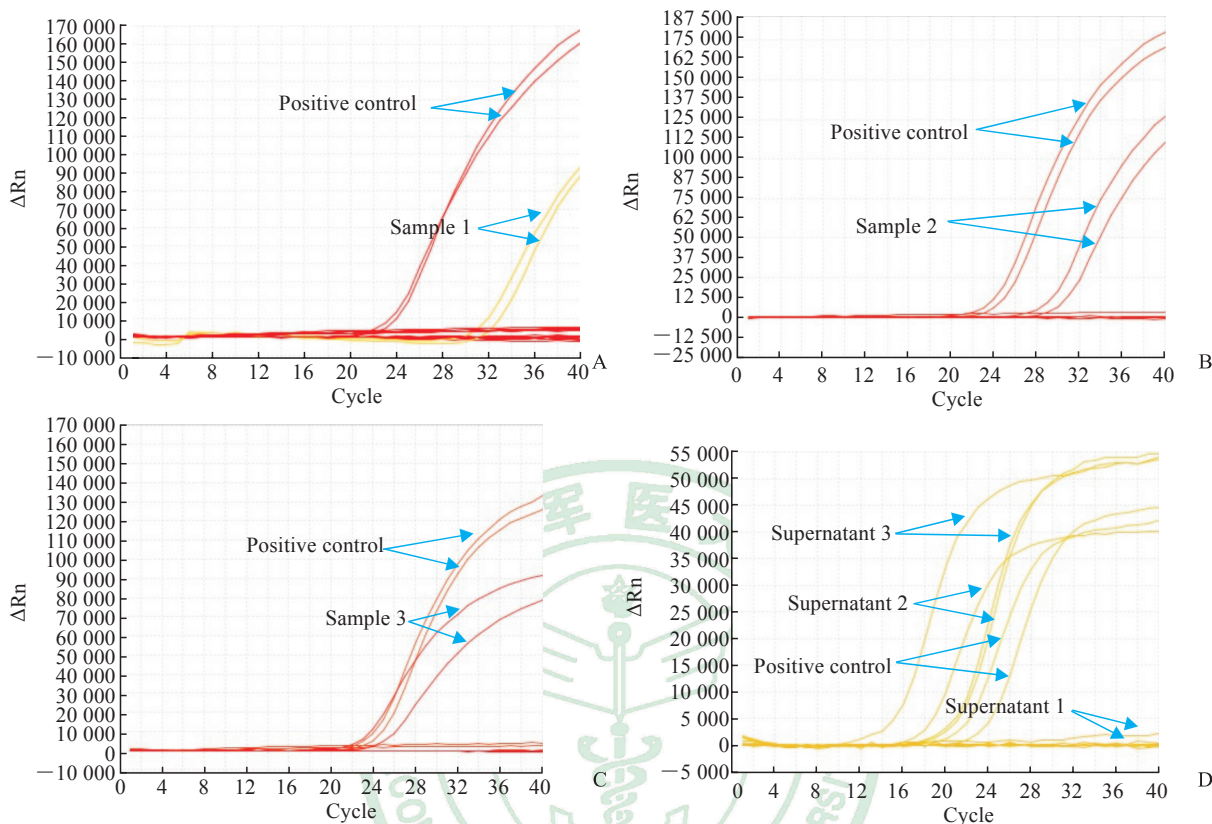


图1 鼻/咽拭子样本及鼻/咽拭子样本接种的Vero E6培养上清中SARS-CoV-2 ORF1ab/N基因的qRT-PCR扩增曲线

Fig 1 qRT-PCR amplification curves of SARS-CoV-2 ORF1ab/N sequence of nasal/throat swab samples and cell culture supernatants of Vero E6 cells cultured with nasal/throat swab samples

A-C: Amplification curves of nasal/throat swab samples 1, 2 and 3, respectively; D: Amplification curve of cell culture supernatants of Vero E6 cells inoculated with nasal/throat swab samples 1, 2 and 3. For each sample tested, the first emerging peak curve is the ORF1ab gene amplification curve, and the next is the N gene amplification curve. SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; ORF: Open reading frame; qRT-PCR: Quantitative real-time polymerase chain reaction; ΔRn: Baseline-corrected normalized reporter

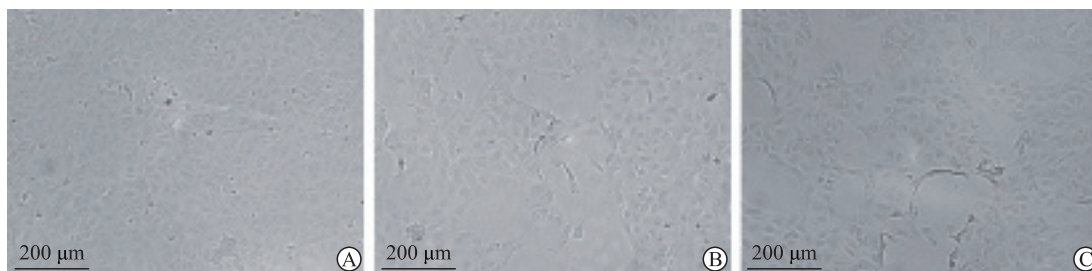


图2 SARS-CoV-2感染的Vero E6细胞的细胞病变效应

Fig 2 The cytopathic effect of Vero E6 cells infected with SARS-CoV-2

A: Mock (cell supernatant from normal Vero E6 cells) infected cells; B: Cells infected by virus from nasal/throat swab sample 2; C: Cells infected by virus from nasal/throat swab sample 3. SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

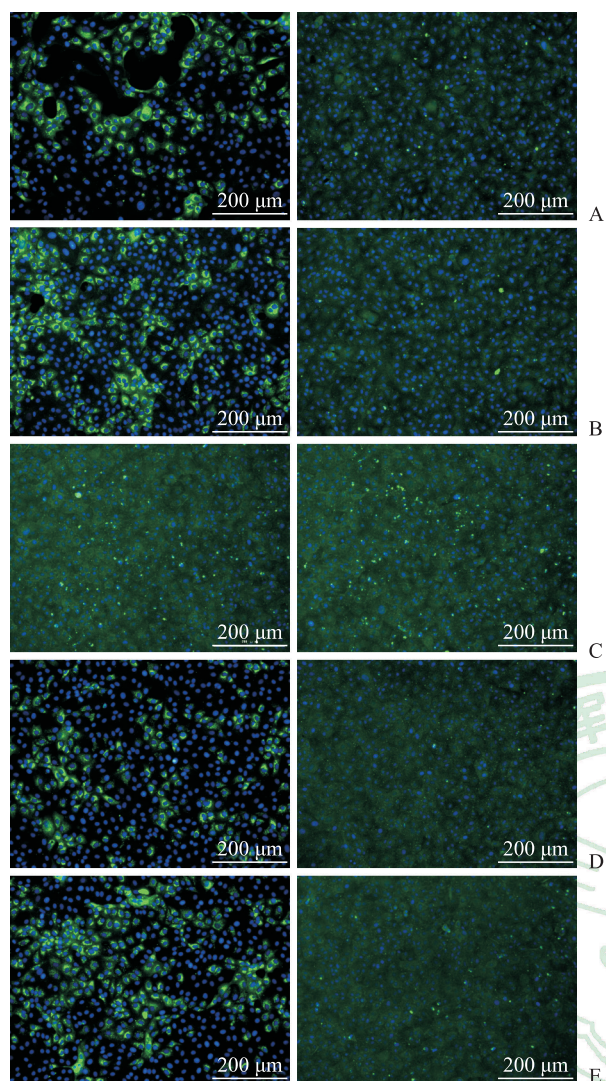


图3 免疫荧光检测 SARS-CoV-2 蛋白

Fig 3 Assay of SARS-CoV-2 proteins using immunofluorescence technique

A: Convalescent serum 1; B: Convalescent serum 2; C: Serum of a healthy adult; D: Rabbit anti-N monoclonal antibody; E: Rabbit anti-S1 monoclonal antibody. The left panel shows Vero E6 cells infected with SARS-CoV-2 isolated from nasal/throat swab sample 2, and the right panel shows cells without virus infection. SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; N: Nucleocapsid protein; S1: Spike protein S1 subunit

3 讨论

冠状病毒属于套式病毒目 (*Nidovirales*) 冠状病毒科 (*Coronaviridae*) 冠状病毒属 (*Coronavirus*)，是一类有包膜的单股正链 RNA 病毒，基因组长约 30 kb，是基因组最长的 RNA 病毒^[7]。根据冠状病毒基因组结构和系统发生学分析，冠状病毒科可分为 α 、 β 、 γ 和 δ 4 个属， α 和 β 属的冠状病毒一般感染哺乳类动物和人， γ 和 δ 属

的冠状病毒主要感染鸟类。除 SARS-CoV-2 外，尚有 6 种可感染人类的冠状病毒：人冠状病毒 (human coronavirus, HCoV) -229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、SARS-CoV 和中东呼吸综合征冠状病毒 (Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)^[8-9]。HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63 和 HCoV-HKU1 致病性较低，一般仅引起轻微的呼吸道症状。而 SARS-CoV、MERS-CoV 及引起本次疫情的 SARS-CoV-2 均为高致病性冠状病毒，能够引起人类严重下呼吸道感染^[8-9]。该 3 种病毒均属于 β 属冠状病毒。

冠状病毒膜表面的 S 蛋白以三聚体形式存在，可分为 S1 和 S2 两个结构域。S1 介导病毒与宿主细胞膜表面受体的结合，S2 介导病毒包膜与宿主细胞之间的膜融合。在游离的病毒颗粒表面，S 蛋白并未被加工为 S1 和 S2 两个独立亚基，而是一条完整的多肽^[10-12]。在病毒侵入宿主细胞时，S 蛋白被宿主细胞表面的蛋白酶切割为 S1 和 S2 两个亚基，病毒的感染性显著增强^[10-12]。这一特性对于病毒的分离培养具有重要意义，细胞培养液中的动物血清可抑制宿主细胞蛋白酶活性，从而影响病毒的细胞侵入效率。

我们将 3 份鼻/咽拭子样本分别接种 Vero E6 细胞，从病毒核酸载量较高的 2 号和 3 号鼻/咽拭子样本中成功分离出 SARS-CoV-2，而 1 号鼻/咽拭子样本接种的 Vero E6 细胞经过 5 d 培养及上清盲传 2 代均未检测到病毒复制。其原因除了与 1 号鼻/咽拭子样本病毒载量相对较低有关以外，还可能与 1 号鼻/咽拭子的采集和处理方式与 2 号、3 号鼻/咽拭子样本不同有关。1 号鼻/咽拭子样本使用干脱脂棉拭子采集，用含 10% FBS 的 DMEM 培养液对鼻/咽拭子进行吹洗，以洗脱鼻/咽拭子上的黏膜上皮细胞和病毒颗粒。而 2 号和 3 号鼻/咽拭子样本则使用无血清病毒采样管进行采集。3 个样本的运输和保存条件一致。我们推测，1 号样本中含有的 FBS 抑制了 Vero E6 细胞表面的蛋白酶活性，从而不利于病毒的细胞侵入，这也可能与病毒分离失败有关。我们在病毒培养过程中发现，相对于无血清培养基，在含有 5% FBS 的培养基中病毒复制速度明显降低，引起 CPE 的时间也明显延迟。这也提示鼻/咽拭子样本中存在的 FBS 不利于病毒分离。

1	TTC	ACT	GTAG	AAAA	AGGAAT	CTAT	CAA	AACT	TCTA	ACTTTA	GAGT	CCA	ACC	AAC	AGA	AATCT	ATT	GTT	AGAT	TTC	CTA	AAT	TG	CA	AACT	TG	TG	CC	CT	TTTG		
S2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
S3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
101	GTGA	AGTTTT	TAAC	GCCACC	AGAT	TG	CAT	CTGT	TTAT	GC	TTGA	AAC	AGG	AAG	GAA	TCA	GCA	ACT	GTGT	TGCT	GAT	TAT	TCT	GT	C	TAT	ATA	AIT	CCGC			
S2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
S3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
201	ATCA	TTTCC	ACTT	TAAGT	GTT	ATG	GAGT	GTCT	C	TACT	AAAT	TAA	ATG	ATCT	CTG	CTT	TACT	AAT	G	TAT	G	CAG	AT	CA	TTT	G	AAT	T	AG	AGG	TGAT	
S2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
S3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
301	GAAG	TCAGAC	AAAT	CGCTCC	AGGG	CAA	AACT	GGAA	AAG	ATTG	CTG	A	TATA	AA	AATTA	CCAG	ATG	AT	TAC	AGG	CTG	CGT	TAT	AG	T	AG	CT	T	AG	AAT	TCTA	
S2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
S3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
401	ACA	ATCTTGA	TTCT	AAGTT	GGT	GGT	AAT	ATA	AT	TACCT	GTAT	A	GAT	TG	TTAG	GAA	GT	CT	CA	AACT	CTCA	ACCT	TTT	GAG	AG	A	GAT	ATT	CA	ACT	GAAAT	
S2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
S3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
501	CTAT	CAGGCC	GGT	AGCACAC	CTT	GTA	ATGG	TGTT	G	AAGG	TTTA	AT	GTT	ACT	TT	CCTT	ACA	AT	CAT	AT	GGT	TT	CCA	AC	CA	T	AT	G	G	TTG	GTTAC	
S2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
S3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
601	CAAC	CATACA	GAG	TAGTAGT	ACT	TT	CTTTT	GAA	CT	TCTAC	ATG	C	ACC	AGC	AACT	G	TTG	T	G	GG	AC	T	A	AA	AG	T	TT	G	T	A	AAAT	G
S2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
701	TCA	ATTCAA	CTTC																													
S2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
S3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

图4 2株 SARS-CoV-2 与最早测序的 SARS-CoV-2 病毒株 (GenBank 登录号: NC_045512) S 基因 RBD 区序列的比对

Fig 4 Sequence alignment of S gene RBD between two SARS-CoV-2 strains and the earliest sequenced SARS-CoV-2 strain (GenBank accession: NC_045512)

S2 and S3: SARS-CoV-2 isolated from nasal/throat swab sample 2 and 3. SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; S: Spike protein; RBD: Receptor binding domain

我们通过用 qRT-PCR 检测病毒核酸、观察病毒引起的细胞病变、用免疫荧光方法检测病毒蛋白、对病毒 S 基因 RBD 区进行扩增和测序等方法, 确认从 2 例 COVID-19 患者鼻 / 咽拭子样本中分别分离出 SARS-CoV-2。这为开展 SARS-CoV-2 病毒学、感染与致病机制研究及检测、预防、治疗技术与产品的研发提供了重要支撑。

志谢 感谢复旦大学上海医学院张荣研究员、易志刚副研究员为病毒分离提供宝贵建议并馈赠 Vero E6 细胞, 感谢中国疾病预防控制中心谭文杰研究员为病毒分离提供宝贵建议, 感谢在本实验室学习和工作过的朱分禄博士和王路博士提供个人生物防护帮助。

[参考文献]

[1] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, HU B, ZHANG L, ZHANG W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. Nature, 2020, 579: 270-273.
 [2] ZHU N, ZHANG D, WANG W, LI X, YANG B, SONG J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019[J]. N Engl J Med, 2020, 382: 727-733.
 [3] WU F, ZHAO S, YU B, CHEN Y M, WANG W, SONG Z G, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China[J]. Nature, 2020, 579: 265-269.

[4] KANDEEL M, IBRAHIM A, FAYEZ M, AL-NAZAWI M. From SARS and MERS CoVs to SARS-CoV-2: moving toward more biased codon usage in viral structural and nonstructural genes[J/OL]. J Med Virol, 2020. doi: 10.1002/jmv.25754.
 [5] ZHANG T, WU Q, ZHANG Z. Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak[J/OL]. Curr Biol, 2020, 30: 1346-1351.e2. doi: 10.1016/j.cub.2020.03.022.
 [6] 张荣, 易志刚, 王玉燕, 滕峥, 徐巍, 宋武慧, 等. 新型冠状病毒上海株 (nCoV-SH01) 的分离和鉴定[J]. 微生物与感染, 2020, 15: 16-21.
 [7] BRIAN D A, BARIC R S. Coronavirus genome structure and replication[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2005, 287: 1-30.
 [8] FORNI D, CAGLIANI R, CLERICI M, SIRONI M. Molecular evolution of human coronavirus genomes[J]. Trends Microbiol, 2017, 25: 35-48.
 [9] 闻玉梅. 冠状病毒的致病性及防控[J]. 微生物与感染, 2020, 15: 3-6.
 [10] SCHOEMAN D, FIELDING B C. Coronavirus envelope protein: current knowledge[J/OL]. Virol J, 2019, 16: 69. doi: 10.1186/s12985-019-1182-0.
 [11] LI F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins[J]. Annu Rev Virol, 2016, 3: 237-261.
 [12] BELOUZARD S, MILLET J K, LICITRA B N, WHITTAKER G R. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein[J]. Viruses, 2012, 4: 1011-1033.

[本文编辑] 孙岩