

高通量测序 H7N9 禽流感病毒基因组模板制备方法的优化及应用

赵康辰, 郭喜玲, 祁 贤, 葛以跃, 朱 政, 陈 银, 樊 欢, 朱叶飞, 史智扬, 汪 华, 崔仑标*, 周明浩*

(江苏省疾病预防控制中心, 卫生部肠道病原微生物重点实验室, 江苏 南京 210009)

[摘要] **目的:**建立一种较优的高通量测序 H7N9 禽流感病毒基因组模板制备方法,用于 H7N9 禽流感病毒基因组监测。**方法:**分别以 6 碱基随机引物反转录生成单链 cDNA,合成双链 cDNA;流感病毒通用反转录引物 U12 反转录生成单链 cDNA,6 碱基随机引物合成双链 cDNA;U12 引物反转录生成单链 cDNA,通用流感病毒全基因扩增引物混合物生成双链 cDNA 制备高通量测序模板、构建测序文库、测序并分析数据,比较 3 种方法对高通量测序效率的影响,并与传统 Sanger 测序方法比较其测序的准确性,选择其中较优的方法用于高通量测序。**结果:**以 U12 引物反转录 cDNA,通用流感病毒全基因扩增引物混合物生成双链 cDNA 制备的高通量测序模板,在测序簇生成数、覆盖率、单核苷酸多态性及读长等方面均优于另外两种方法。**结论:**本研究建立的 H7N9 禽流感病毒基因组模板制备方法用于高通量测序具有准确性高,周期短,成本相对较低,可同时检测多个样本等特点,可用于大规模 H7N9 禽流感病毒基因组监测。

[关键词] 禽流感病毒;H7N9;模板制备;高通量测序

[中图分类号] R373.19

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)07-1002-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130732

Optimization and application of methods of template preparation for high throughput sequencing avian influenza virus (H7N9) genome

Zhao Kangchen, Guo Xiling, Qi Xian, Ge Yiyue, Zhu Zheng, Chen Yin, Fan Huan, Zhu Yefei, Shi Zhiyang, Wang Hua, Cui Lunbiao*, Zhou Minghao*

(Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Key Laboratory of Enteric Pathogenic Microbiology, Ministry of Health, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:**To establish an optimal method of template preparation for sequencing avian influenza virus (H7N9) genome. **Methods:**Sequencing templates were prepared by using random hexamers primers to synthesize single strand cDNA and double strands cDNA;by using influenza virus specific-U12 primer to synthesize single strand cDNA and using random hexamers primers to obtain double strands cDNA;or by using influenza virus specific-U12 primer to synthesize single strand cDNA and using influenza virus gene-specific primer to obtain double strands cDNA. Sequencing library was constructed by using above template and sequencing. After analysis of the data,the results were compared with Sanger sequencing. The best method for template preparation was selected for high throughput sequencing. **Results:**The cluster pass filter, coverage, single nucleotide polymorphisms (SNPs), and median length were the best in using influenza virus specific-U12 primer to synthesize single strand cDNA and using influenza virus gene-specific primer to obtain double strands cDNA compared with other two methods. **Conclusion:**High accuracy, short turnaround times, relatively low cost and high throughput make this method becoming possible for surveillance of H7N9 viruses evolution.

[Key words] avian influenza virus;H7N9;template preparation;high throughput sequencing

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(7):1002-1006]

[基金项目] 国家科技重大专项课题(2012ZX10004401);江苏省科教兴卫工程(ZX201109,RC2011191);江苏省科技支撑项目(BE2011796)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: lbcui@jscdc.cn, zmh@jscdc.cn

2013 年 2 月开始,一种新的 H7N9 亚型禽流感病毒感染人引起死亡的病例不断被报道^[1],目前已引起 130 例感染,35 例死亡^[2]。散发的人感染禽流感病毒包括 H5、H7 及 H9 亚型,除了高致病性 H5N1 亚型病毒引起大约 60%的病例死亡之外^[3],荷兰曾报道过 1 例人感染高致病性 H7N7 禽流感病毒引发急性呼吸窘迫综合征导致的死亡。季节性流感及低致病性禽流感病毒如 H7N2、H7N3、H7N5 及 H9N2 等可引起轻到中度的流感样症状、结膜炎及下呼吸道感染^[4]。基因序列分析表明新的 H7N9 亚型禽流感病毒为 H7 亚型与 H9N2 亚型基因重配产生的新病毒,病毒的一些关键位点发生改变导致该病毒可感染人类^[5]。序列分析对于研究病毒的进化、致病力、跨物种传播机制等十分重要。高通量测序技术越来越广泛用于病原基因的分析,是大规模监测流感病毒基因组进化的重要手段。高质量测序模板的制备是成功测序的前提,本文报道了基于美国 Illumina 公司 MiSeq 高通量测序仪检测 H7N9 禽流感病毒基因组的模板制备方法,并进行优化,以期利用该技术分析 H7N9 禽流感病毒基因组提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

QIAamp Viral RNA Mini Kit (美国 Qiagen 公司),SuperScript[®]III First-Strand Synthesis System (美国 Invitrogen 公司),ABI BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit,ABI 3130 测序仪 (美国 ABI 公司),Klenow Fragment (3'→5' exo-) (美国 NEB 公司),Nextera XT DNA Sample Preparation Kit、MiSeq Reagent Kit(300-cycles)及 Illumina MiSeq 测序系统 (美国 Illumina 公司),Qubit 2.0 荧光计 (美国 Invitrogen 公司)。

1.1.2 样本来源与病毒分离

7 份 H7N9 感染患者咽拭子、呼吸道分泌物,1 份鸡笼拭子均采自 2013 年 3 月~4 月本省患者及其工作环境。所有样本提取总 RNA,经 H7N9 特异的 real-time RT-PCR 检测,引物探针由中国疾病预防控制中心提供。样本常规处理后 0.2 ml 接种鸡胚,35℃ 孵化 48~72 h,收集尿囊液,提取总 RNA。

1.2 方法

1.2.1 模板制备

本研究采用 3 种方法制备测序模板。

方法 1:参照 SuperScript[®]III First-Strand Synthe-

sis System 推荐方法,在 20 μl 反应体系中以 50 ng 的 6 碱基随机引物反转录生成单链 cDNA,2 U RNase H 37℃ 消化 15 min 后,加入 0.5 U 的 Klenow Fragment (3'→5' exo-),37℃ 1 h 合成双链 cDNA 做为高通量测序模板。

方法 2:以 20 pmol 的流感病毒通用的反转录引物 U12^[6]替代 6 碱基随机引物反转录生成单链 cDNA,然后以 50 ng 的 6 碱基随机引物生成双链 cDNA 做为高通量测序模板。

方法 3:以 U12 反转录生成单链 cDNA,以 1 pmol 的通用流感病毒全基因扩增反向引物混合物生成双链 cDNA 做为高通量测序模板。

1.2.2 文库构建与测序

将双链 cDNA 准确定量后,稀释成 0.2 ng/μl,以 5 μl 作为测序模板,按照 Nextera XT DNA Sample Preparation Kit 说明构建测序文库。主要步骤包括:DNA 的 Tagmentation、PCR 扩增、纯化、文库标化及混合。取 600 μl 混合样加入 MiSeq 测序试剂样品孔,进行 2 × 150 bp 配对末端测序。

1.2.3 传统 Sanger 测序

以 Hoffmann 等^[6]设计的流感病毒通用扩增引物扩增病毒 8 个基因片段全长,回收 PCR 产物,以 ABI BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit 标记产物纯化后,在 ABI 3130 测序仪上进行测序。

1.2.4 序列分析

MiSeq 高通量测序产生的数据以 H7N9 分离株 A/Anhui/1/2013(H7N9)作为参考基因组(GISAID, Accessions Number:EPI439503-EPI439510)进行拼接;传统 Sanger 测序产生的序列经 DNASTar 软件进行拼接。

1.2.5 高通量测序 H7N9 样本

对 8 株 H7N9 分离株,按上述优化的最佳模板制备方法进行模板制备、文库构建、测序及数据分析。

2 结果

2.1 样本检测与病毒分离

8 份原始样本经 H7N9 特异的 real-time RT-PCR 检测均为阳性;接种鸡胚后收获的尿囊液经 H7N9 特异的 real-time RT-PCR 检测也均为阳性,尿囊液血凝效价为 2⁷~2⁹。

2.2 模板制备方法的优化

为研究不同模板制备方法对高通量测序的影响,选择最优的制备方法,将 H7N9 病毒 RNA 稀释成 10⁴ 拷贝/μl,取 5 μl 为模板按上述 3 种方法分

别合成单、双链 cDNA。高通量测序结果显示,方法 3 无论是簇生成数(cluster pass filter, cluster PF)、覆盖率 (coverage), 还是单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 等测序指标都优于方法 1 和 2 (表 1, 图 1)。虽然方法 2 的以上 3 个测序

指标均优于方法 1, 其平均读长 (median length) 286 bp 与方法 3 的 285 bp 类似, 而且在个别区域如 PB1 基因的 5' 端覆盖率高于方法 3, 但方法 2 在基因节段 HA 及 NA 均无覆盖, 整体覆盖率低于方法 3, 故选择方法 3 为最优的模板制备方法。

表 1 不同模板制备方法对高通量测序的影响

Table 1 The influence of different template preparation method for high throughput sequencing

Method	Cluster PF	Coverage	Heterogeneous SNPs	Homogeneous SNPs	Median Length(bp)
1	55 113	0.5	2	9	174
2	842 608	6.3	10	175	286
3	1369 188	9.4	103	179	285

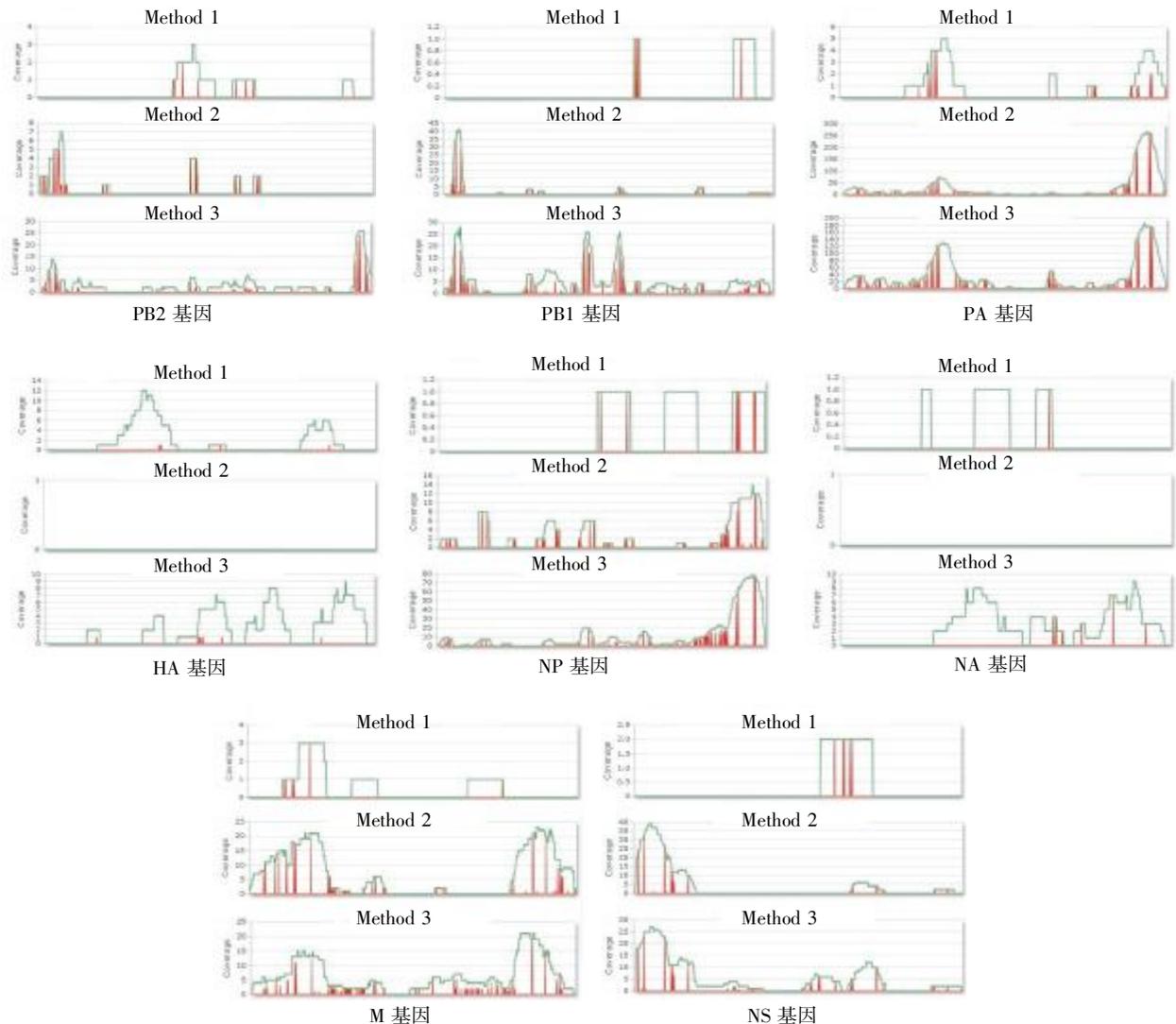


图 1 比较 3 种模板制备方法对高通量检测 H7N9 禽流感病毒基因组覆盖率的影响

Figure 1 Comparing three template preparation methods for high throughput detection on the H7N9 virus genome coverage

2.3 高通量测序 H7N9 禽流感病毒基因组

为验证模板制备方法 3 高通量测序检测 H7N9 禽流感病毒基因组的效果, 以该方法制备 8

株 H7N9 分离株的测序模板, 用 MiSeq 高通量测序仪进行测序。结果 8 个样本的 8 个基因节段均可成功检测(表 2), 基因组覆盖率从 246.1 到 8 251.6,

其中一个代表性样本的基因组覆盖率如图 2 所示。

为验证高通量测序结果的准确性,以传统

Sanger 测序法对部分基因节段进行测序,结果与高通量测序结果完全一致,证明了高通量测序 H7N9 禽流感病毒基因组的准确性。

表 2 高通量测序 8 株 H7N9 病毒基因组

Table 2 High throughput sequencing of eight H7N9 virus strains genome

Sample	Cluster PF	Coverage	Heterogeneous SNPs	Homogeneous SNPs	Median Length(bp)
1	1 427 191	4 946.2	7	16	220
2	1 978 852	872.5	270	25	296
3	3 073 295	2 475.1	18	57	247
4	764 896	246.4	16	10	214
5	2 111 665	2 869.3	5	16	245
6	2 366 662	1 361.6	7	9	254
7	2 506 852	8 251.6	17	6	241
8	968 299	783.8	14	9	219

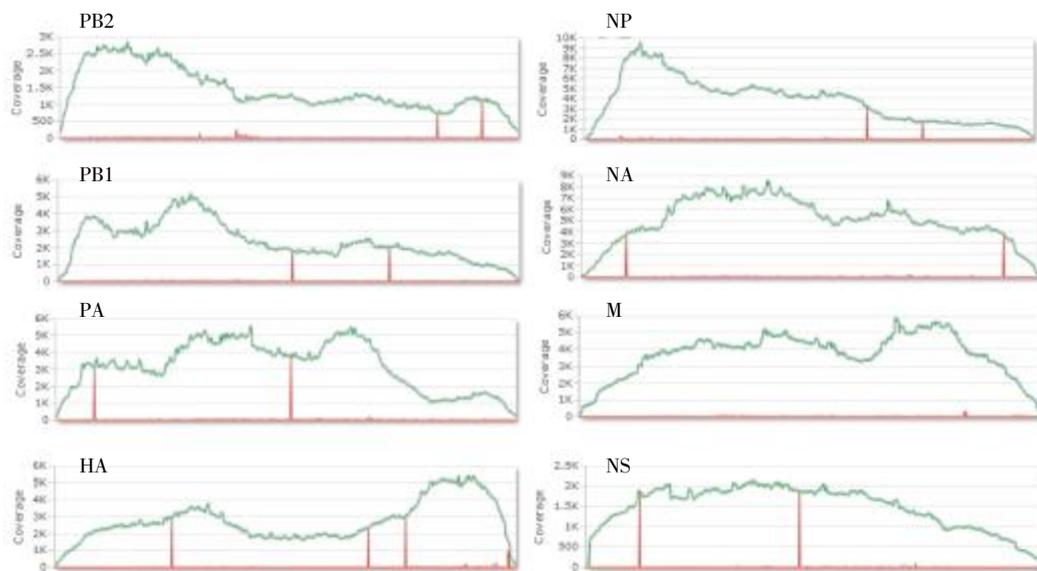


图 2 代表性样本方法 3 模板制备方法检测 H7N9 禽流感病毒基因组 8 个基因节段的覆盖率

Figure 2 H7N9 virus genome 8 gene segments coverage of one representative sample by template preparation method 3

3 讨论

现有序列分析研究表明,新的 H7N9 亚型禽流感病毒 HA 基因与 NA 基因来自禽和候鸟的 H7 亚型流感病毒,而其他 6 个节段来自 H9N2 亚型禽流感病毒^[1]。该病毒的发现引起了广泛关注^[7-13]。目前病毒的来源还不清楚,现有研究发现该病毒 HA 基因的受体结合位点如 Q226L 突变提高了结合人受体的能力, PB2 基因 E627K 突变增加了毒力,而 D701N 突变也和哺乳动物适应性相关^[14], NA 基因的 E120V、H276Y、R294K 突变与奥司他韦耐药性相关^[15],上海 1 例 H7N9 分离株 A/Shanghai/1/2013 已观察到 R294K 突变。这些观察提示必须加强对该

病毒基因组进化的监测,为控制疫情提供支撑。

传统的方法监测病毒基因组进化通常采用 Hoffmann 等设计的方法扩增流感病毒基因组全长,或者以基因特异引物扩增 8 个基因节段的片段,进行克隆,选择阳性克隆进行 Sanger 测序,然后进行序列的拼接,构建病毒基因组,该方法耗时长,劳动力成本高,不适合大规模检测使用。自从 2005 年高通量测序仪问世以来,高通量测序技术经历了飞速的发展,从通量到读长,从速度到测序成本都得到了极大的改善,相信不久的将来高通量测序仪将进入普通的分子生物学实验室。Bowman 等^[16]建立了以流感病毒通用及特异引物扩增 H3N2 基因组,并利用了 IonTorrent 高通量测序分析病毒基因组的方法。

该方法以高通量测序替代传统的 Sanger 测序,仍然需要 PCR 扩增,以 PCR 产物构建测序文库,如果 PCR 扩增失败将不能进行下游的测序。本研究方法 3 建立的模板制备技术,不需要进行 PCR 扩增,直接以病毒 RNA 制备测序模板,避免了 PCR 扩增失败的可能。而且测序模板用量极低,只需要 1 ng 的双链 cDNA,其他高通量测序技术一般需要至少 50 ng 的核酸模板。以本研究建立的方法检测 8 份样本,从模板制备、文库构建到测序及数据分析等过程在 2 d 内即可完成,与传统的 Sanger 测序方法相比极大地节约了时间;理论上,根据试剂盒的测序通量,用本方法可以同时检测 24~96 个样本,每个样本测序成本平均在千元以内,较传统方法大大地节约了测序时间和成本。

综上所述,本研究建立优化了一种用于高通量测序的 H7N9 禽流感病毒基因组模板制备方法并利用该方法检测新 H7N9 禽流感病毒基因组。该方法的准确性高,全基因组测序时间短,通量大,成本相对较低,可同时检测多个样本,适合大规模监测 H7N9 禽流感病毒基因组,同时该方法对今后其他禽流感病毒亚型或其他病毒的全基因组测序模板的制备具有借鉴意义。

[参考文献]

- [1] Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(20):1888-1897
- [2] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 5月6日-5月13日人感染 H7N9 禽流感疫情信息[EB/OL]. [2013-05-14]. <http://www.moh.gov.cn/mohwsyjbg/s3578/201305/abeb7ebe0f3c43ecb6ce683bde9278a1.shtml>
- [3] Peiris JS, de Jong MD, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(2):243-267
- [4] 汤奋扬, 霍翔, 李亮, 等. 甲型 H1N1 流感重症病例的危险因素 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2010, 30(9):1262-1265
- [5] Kageyama T, Fujisaki S, Takashita E, et al. Genetic analysis of novel avian A (H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013 [J]. *Euro Surveill*, 2013, 18(15):1-15
- [6] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses [J]. *Arch Virol*, 2001, 146(12):2275-2289
- [7] Hvistendahl M, Normile D, Cohen J. Influenza. Despite large research effort, H7N9 continues to baffle [J]. *Science*, 2013, 340(6131):414-415
- [8] Uyeki TM, Cox NJ. Global concerns regarding novel influenza A (H7N9) virus infections [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(20):1862-1864
- [9] Horby P. H7N9 is a virus worth worrying about [J]. *Nature*, 2013, 496(7446):399
- [10] Alcorn T. As H7N9 spreads in China, experts watch and wait [J]. *Lancet*, 2013, 381(9875):1347
- [11] Guan Y, Farooqui A, Zhu H, et al. H7N9 Incident, immune status, the elderly and a warning of an influenza pandemic [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2013, 7(4):302-307
- [12] Belser JA, Davis CT, Balish A, et al. Pathogenesis, transmissibility, and ocular tropism of a highly pathogenic avian influenza A (H7N3) virus associated with human conjunctivitis [J]. *J Virol*, 2013, 87(10):5746-5754
- [13] Li Q. Preliminary report: Epidemiology of the avian influenza A (H7N9) outbreak in China [J]. *N Engl J Med*, 2013 [Epub ahead of print]
- [14] Chen Y, Liang W, Yang S, et al. Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterisation of viral genome [J]. *Lancet*, 2013, 381(9881):1916-1925
- [15] Nguyen HT, Fry AM, Gubareva LV. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods [J]. *Antivir Ther*, 2012, 17 (1 Pt B):159-173
- [16] Bowman AS, Sreevatsan S, Killian ML, et al. Molecular evidence for interspecies transmission of H3N2pM/H3N2v influenza A viruses at an Ohio agricultural fair, July 2012 [J]. *Emerging Microbes and Infections*, 2012; e33

[收稿日期] 2013-05-07