

# 利用华大智造呼吸道微生物基因组测序组合产品对流感病毒进行鉴定与溯源

本应用简报介绍了使用华大智造MGI系列产品对流感病毒进行文库制备、基因测序、鉴定溯源分析的应用方案 and 具体步骤流程。

推荐应用：病原微生物 - 流感病毒

推荐机型：MGISEQ-200RS

- **实现流感的检测与型别鉴定**

基于 ATOPlex 技术平台的微生物基因组测序组合产品能实现流感病毒的检测、型别鉴定与溯源。

- **提供全套产品组合**

借助自动化建库技术和简明的数据解读软件高效整合多环节流程从而实现从样本输入到报告输出的全套产品组合。



## 背景介绍

流行性感冒是一种由甲型或乙型流感病毒感染引起的急性呼吸道疾病<sup>1</sup>。流感病毒感染的症状一般为轻微的呼吸道症状,伴随发热,喉咙痛,流鼻涕,咳嗽,头痛,肌肉疼痛和疲劳等;严重情况下可导致病毒性或继发性细菌感染肺炎<sup>2</sup>。流感以冬春季多见,而流感病毒容易发生变异,传染性强,人群普遍易感,发病率高,是全球关注的重要公共卫生问题<sup>3</sup>。流感大流行每 10-50 年爆发一次,自二十世纪起,世界范围内共出现过 5 次流感大流行,包括 1918 年的“西班牙流感”、1957 年的“亚洲流感”、1968 年“香港流感”、1977 年“俄罗斯流感”以及 2009 年“H1N1 流感疫情”<sup>4</sup>。其中,西班牙流感(H1N1)造成了全球数千万人患病死亡,亚洲流感(H2N2)和香港流感(H3N2,由 H2N2 演变而来)均造成全球 100 万 -400 万人死亡<sup>4</sup>。因此,对流感流行趋势进行监测,对病毒变异进行追踪,对新型病毒做出预警显得极为重要,而高通量测序技术能完美的解决相关问题<sup>5</sup>。同时,还能为全球流感疫苗株的推荐及抗病毒药物的使用提供数据支撑<sup>6</sup>。

## 研究描述

某地疾病预防控制中心采用华大智造呼吸道微生物基因组测序组合产品（图1），对32（后期展示23）例流感样本进行了病毒鉴定和溯源，鉴定结果与QPCR结果完全一致，符合预期。华大智造呼吸道微生物基因组测序组合产品协助该疾控中心初步建立了流感病毒自主测序和数据分析的能力。

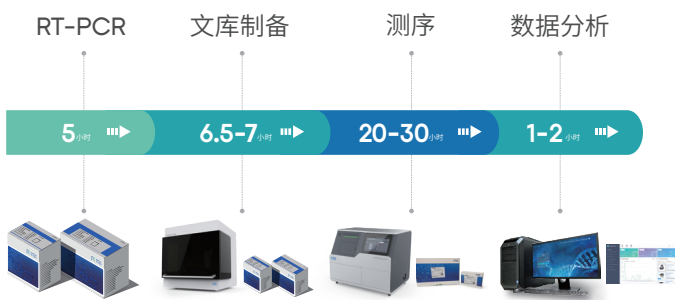


图1.呼吸道微生物基因组测序组合产品从 RT-PCR 扩增、文库制备、高通量测序到数据分析的全流程

## 实验方法

### 样本收集以及 RNA 制备

收集在 RT-qPCR 检测中 Ct 值 < 32 的 23 例拭子样本作为研究对象，利用磁珠法提取试剂盒（硕世生物）进行 RNA 提取。

### 文库制备与测序

23 例样本分别取 18.5 μL RNA，使用 MGIEasy 呼吸道微生物基因组建库试剂盒套装进行文库制备。制备过程依据试剂盒说明书进行操作，具体步骤如下：1. RNA 反转录成 cDNA 后进行多重 PCR（一步法）；2. PCR 产物纯化和定量；3. PCR 产物打断、末端修复、纯化和接头连接；4. 连接产物文库纯化和定量，如图 2。其中，从步骤 2 PCR 产物纯化到最后接头产物纯化过程均是在 MGISP-100 自动化样本制备系统上完成的。

随后将文库制备成 DNB，在 MGISEQ-200RS 基因测序仪上进行双端 100 个碱基的读长测序（PE100）。

### 数据分析

下机数据通过华大智造自主开发的 FluTrack 软件进行分析，分析流程如图 3 所示。



MGISP-100 自动化样本制备系统



图2.文库制备流程图



图3.数据分析流程图

## 结果

### 文库及测序数据质量检测

对 RT-PCR 产物和连接产物进行定量, 结果如表 1 所示。所有样本均满足 RT-PCR 产物浓度 $\geq 5$  ng/ $\mu$ L, 连接产物浓度 $\geq 0.8$  ng/ $\mu$ L 的要求。将连接产物等摩尔混合后制备成 DNB, DNB 浓度为 30ng/ $\mu$ L, 满足要求( $\geq 8$  ng/ $\mu$ L)。下机数据显示所有样本测序数据的 Q30 均大于 94%, 测序质量优异, 能满足后续分析需求。

样本编号	RT-PCR 产物浓度 (ng/ $\mu$ L)	连接产物浓度 (ng/ $\mu$ L)	Raw_Q30
702	59.2	6.9	95.63%
718	116	4.96	94.91%
736	43.2	6.78	94.85%
91601	59	11.6	94.62%
91602	154	3.96	95.00%
91603	147.5	4.4	95.14%
91604	103.5	5.7	94.88%
91605	58	5.88	95.44%
91606	37.8	13.8	94.47%
91607	137	5.44	94.97%
91608	55	13	95.01%
92301	121	3.94	94.75%
92302	42.2	8.27	94.61%
92305	33	9.44	94.84%
92306	49.4	12.5	94.62%
92309	118	6.68	94.70%
92310	55	12.1	94.61%
92311	45.2	13	94.61%
92312	52	10.8	94.31%
92315	56	7.36	94.74%
C7	53	12.6	94.86%
C10	123	4.87	94.69%
C14	149.5	4.38	94.13%

表1.23例样本的样本编号信息、对应的RT-PCR产物浓度、连接产物浓度以及测序下机数据的Raw\_Q30信息

### FluTrack 分析结果展示

样本的检测结果与 qPCR 检测结果表现出高度的一致性, 所有样本的型别均为乙型流感的 Victoria 系, 结果均符合预期(表 2)。

以 C7 样本为例, 如表 3 组装结果显示, 该样本的 8 个流感病毒片段的组装完整度 $>98\%$ 。FluTrack 软件同时还生成了单个样本的每个病毒片段的测序深度图(如图 3)和进化树溯源分析图(如图 4)。

样本编号	InfluenzaA 鉴定结果	InfluenzaA 数据占比 (%)	InfluenzaB 鉴定结果	InfluenzaB 数据占比 (%)	流感型别	样本 CT 值	一致性 (比较 qPCR)
702	Negative	NA	Positive	99.91%	Victoria	29	一致
718	Negative	NA	Positive	99.97%	Victoria	28	一致
736	Negative	NA	Positive	99.68%	Victoria	31	一致
91601	Negative	NA	Positive	100.00%	Victoria	22	一致
91602	Negative	NA	Positive	100.00%	Victoria	20	一致
91603	Negative	NA	Positive	99.99%	Victoria	23	一致
91604	Negative	NA	Positive	99.93%	Victoria	27	一致
91605	Negative	NA	Positive	99.93%	Victoria	27	一致
91606	Negative	NA	Positive	99.99%	Victoria	20	一致
91607	Negative	NA	Positive	100.00%	Victoria	21	一致
91608	Negative	NA	Positive	100.00%	Victoria	23	一致
92301	Negative	NA	Positive	100.00%	Victoria	26.73	一致
92302	Negative	NA	Positive	99.60%	Victoria	29.98	一致
92305	Negative	NA	Positive	98.43%	Victoria	24.75	一致
92306	Negative	NA	Positive	100.00%	Victoria	21.44	一致
92309	Negative	NA	Positive	100.00%	Victoria	20	一致
92310	Negative	NA	Positive	99.99%	Victoria	25.35	一致
92311	Negative	NA	Positive	99.98%	Victoria	26.98	一致
92312	Negative	NA	Positive	99.99%	Victoria	25.43	一致
92315	Negative	NA	Positive	99.99%	Victoria	24.71	一致
C7	Negative	NA	Positive	100.00%	Victoria	24.14	一致
C10	Negative	NA	Positive	99.96%	Victoria	23.11	一致
C14	Negative	NA	Positive	100.00%	Victoria	23.44	一致

表2.通过FluTrack软件对测序数据的分析结果展示

样本名称	基因名称	片段名称	起始位置(Query)	终止位置(Query)	起始位置(Ref)	终止位置(Ref)	比对长度	片段长度	组装完整度
C7_438_L01	PB1	B-seg1	1	2,369	1	2,369	2,369	2,369	100.00%
C7_438_L01	PB2	B-seg2	1	2,368	13	2,380	2,368	2,396	98.83%
C7_438_L01	PA	B-seg3	1	2,293	3	2,295	2,293	2,305	99.48%
C7_438_L01	HA	B-seg4	1	1,861	1	1,867	1,867	1,882	99.20%
C7_438_L01	NP	B-seg5	1	1,835	10	1,844	1,835	1,844	99.51%
C7_438_L01	NA	B-seg6	1	1,544	1	1,544	1,544	1,557	99.17%
C7_438_L01	M	B-seg7	1	1,189	1	1,190	1,190	1,190	100.00%
C7_438_L01	NS	B-seg8	1	1,082	5	1,082	1,082	1,097	98.63%

表3.C7\_438 基因组组装结果

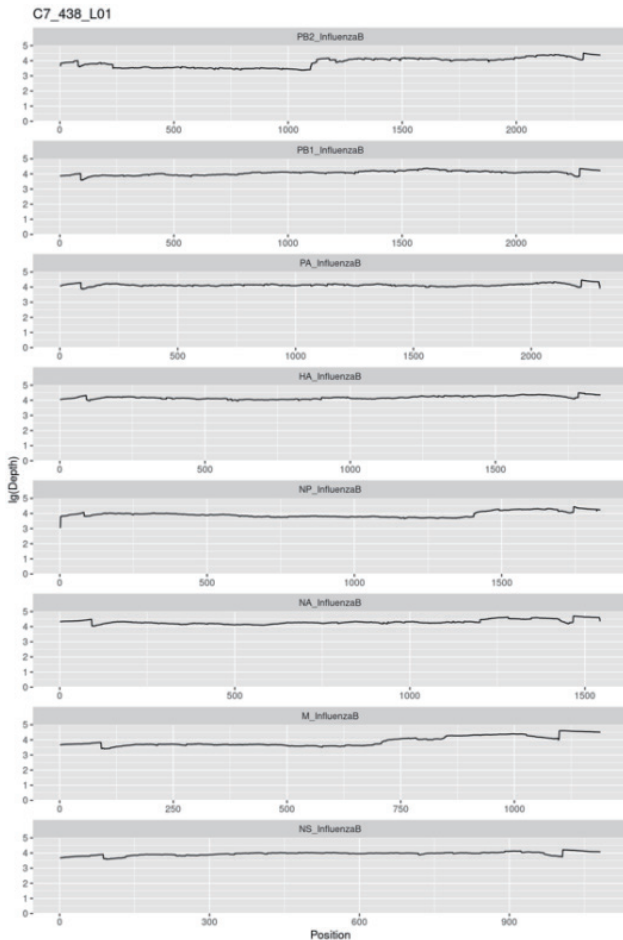


图4.样本C7\_438测序深度分布图

图 4 中的 8 个图分别代表流感的 8 个片段深度分布情况，横坐标代表病毒片段的基因位置，纵坐标代表测序深度（对深度取 lg），从图可知 8 个片段均获得较好的覆盖度

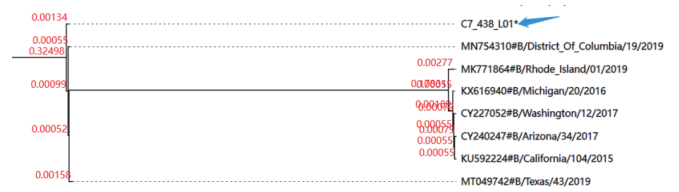


图5.样本C7进化溯源分析图

如图 5 展示的是样本 C7 的进化溯源分析。图中蓝色箭头标记的是 C7\_438 样本，通过枝叶长度系数判断，其与 MN754310#B/District\_Of\_Columbia/19/2019 毒株的进化关系最为相近。

## 总结

基于华大智造自主研发的试剂、自动化样本制备系统、高通量测序平台,以及自主开发 FluTrack 软件的流感组合产品能够对甲型和乙型流感病毒进行全基因组扩增捕获、测序、比对、分型和溯源等。这是一款用于流感病毒鉴定和溯源的理想工具,能够快速、便捷、准确地实现您的研究目标。



基因测序仪 MGISEQ-200RS

## 参考文献

1. Krammer, F. *et al.* Influenza. *Nat Rev Dis Primers* 4, 3, doi:10.1038/s41572-018-0002-y (2018).
2. Sellers, S. A., Hagan, R. S., Hayden, F. G. & Fischer, W. A., 2nd. The hidden burden of influenza: A review of the extra-pulmonary complications of influenza infection. *Influenza Other Respir Viruses* 11, 372-393, doi:10.1111/irv.12470 (2017).
3. Russell, C. J. & Webster, R. G. The genesis of a pandemic influenza virus. *Cell* 123, 368-371, doi:10.1016/j.cell.2005.10.019 (2005).
4. Kilbourne, E. D. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg Infect Dis* 12, 9-14, doi:10.3201/eid1201.051254 (2006).
5. Seong, M. W. *et al.* Genotyping Influenza Virus by Next-Generation Deep Sequencing in Clinical Specimens. *Ann Lab Med* 36, 255-258, doi:10.3343/alm.2016.36.3.255 (2016).
6. Van Poelvoorde, L. A. E., Saelens, X., Thomas, I. & Roosens, N. H. Next-Generation Sequencing: An Eye-Opener for the Surveillance of Antiviral Resistance in Influenza. *Trends Biotechnol* 38, 360-367, doi:10.1016/j.tibtech.2019.09.009 (2020).

## 推荐订购信息

产品类型	产品名称	产品货号
仪器	基因测序仪 MGISEQ-200RS	900-000350-00
	MGISP-100RS 自动化样本制备系统	900-000070-00
软件	MGI FluTrack 软件	970-000225-00
	PFI 微生物快速识别与组装溯源平台	900-000398-00
建库试剂	MGIEasy 呼吸道微生物基因组建库试剂盒套装	940-000549-00
	MGIEasy 双 barcode 环化试剂盒	1000020570
测序试剂	MGISEQ-200RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE100)	1000019846
	CPAS 条形码引物 3 试剂盒 V2.0	1000020834

## 深圳华大智造科技股份有限公司

深圳市盐田区北山工业区综合楼11栋

☎ 4000-688-114

🌐 [www.mgi-tech.com](http://www.mgi-tech.com)

✉ [MGI-service@mgi-tech.com](mailto:MGI-service@mgi-tech.com)

股票简称：华大智造

股票代码：688114



仅供研究使用

版权声明：本手册版权属于深圳华大智造科技股份有限公司所有，未经本公司书面许可，任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制拷贝、编辑或翻译为其他语言。本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技股份有限公司及其提供者所有。

版本：2022年10月版