

纳米孔测序实时检测鼠传巴尔通体

栗冬梅¹, 周若冰¹, 李寿江², 鲁亮¹, 饶华祥³, 宋秀平¹, 李庆多¹, 刘起勇¹

1. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所媒介生物控制室, 传染病预防控制国家重点实验室, 感染性疾病诊治协同创新中心, 北京 102206; 2. 青海省疾病预防控制中心, 青海 西宁 810007; 3. 长治医学院, 山西 长治 046000

摘要: **目的** 以巴尔通体 (*Bartonella* spp.) 作为指示菌基于 MinION 纳米孔高通量测序平台评估一种针对鼠传病原体的实时检测技术。 **方法** 选取巴尔通体培养阳性的野外鼠脾和肺组织样品, 提取全基因组核酸, 应用 16S 核糖体 RNA (16S ribosomal RNA, 16S rRNA) 基因的通用引物进行常规 PCR 扩增后的桑格测序 (Sanger sequencing) 和纳米孔测序, 比较一代测序和三代纳米孔测序的结果, 检验纳米孔测序技术对鼠传病原体检测的可行性和准确性。 **结果** 16S rRNA 基因常规扩增后经桑格测序有 12 份样品未鉴定出巴尔通体, 纳米孔测序全部鉴定出巴尔通体。每份样品用于分类分析的 reads 数为 4~609 424 个, reads 长度以 1 500 bp 为主, 平均准确率为 79.2%~92.0%, 以巴尔通体检出为主, 其 reads 数为 1~77 833 个。应用云端实时分析软件 EPI2ME 在测序开始后 30 min 内即产生鉴定结果。此外, 多个样品还鉴定到布鲁氏菌。原始浓度大小对测序数据产出有影响, 低浓度总数据量和 reads 数量明显减少。清洗步骤可明显降低测序芯片中残留核酸片段, 但是不能完全去除, 残留比平均值为 1.4%。 **结论** 16S 扩增子纳米孔测序, 可用于啮齿动物脏器组织病原体的直接、实时检出鉴定, 纳米孔 MinION 测序便携、简单的操作以及实时数据传输和分析将为现场检测和病原监测工作提供便利。

关键词: 巴尔通体; 纳米孔测序; 16S 扩增子测序; 宏基因组学; 鼠传疾病

中图分类号: Q939.93 文献标识码: A 文章编号: 1003-8280(2021)04-0390-08

DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2021.04.002

Real-time detection of rodent-borne *Bartonella* by nanopore sequencing

LI Dong-mei¹, ZHOU Ruo-bing¹, LI Shou-jiang², LU Liang¹, RAO Hua-xiang³, SONG Xiu-ping¹,

LI Qing-duo¹, LIU Qi-yong¹

1. State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, Department of Vector Biology and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China;

2. Qinghai Center for Disease Control and Prevention, Xining, Qinghai 810007, China;

3. Changzhi Medical College, Changzhi, Shanxi 046000, China

Corresponding author: LIU Qi-yong, E-mail: liuqiyoung@icdc.cn

Supported by the National Science and Technology Major Project of China (No. 2017ZX10303404, 2018ZX10712001)

Abstract: Objective To evaluate a real-time detection technology for rodent-borne pathogens based on the MinION high-throughput nanopore sequencing platform with *Bartonella* spp. as an indicator. **Methods** The whole-genome DNA was extracted from the spleen and lung tissues of wild rodents with positive *Bartonella* culture results. Sanger sequencing following conventional PCR amplification (using universal primers of 16S ribosomal RNA [16S rRNA] gene) and nanopore sequencing was performed and compared, and then evaluate the feasibility and accuracy of MinION nanopore sequencing technology in the detection of rodent-borne pathogens. **Results** By using the first-generation Sanger sequencing after the conventional 16S rRNA gene amplification, *Bartonella* was not identified in 12 samples. In contrast by using the third-generation nanopore sequencing, *Bartonella* was identified in all samples. The number of reads per sample used for taxonomic analysis ranged from 4 to 609 424, and the reads length was mainly 1 500 bp, with the mean accuracies ranging from 79.2% to 92.0%. *Bartonella* was the main pathogen detected, and its number of reads ranged from 1 to 77 833. By using cloud real-time analysis software EPI2ME, the identification results were generated within 30 minutes after the sequencing was started. In addition, *Brucella* spp. was also identified in some samples. The concentration of the original samples had an impact on the amount of sequencing data, with evidence showing that low-concentration samples had significantly less total data volume and number of reads. The cleaning procedure significantly

基金项目: 国家科技重大专项 (2017ZX10303404, 2018ZX10712001)

作者简介: 栗冬梅, 女, 博士, 研究员, 主要从事病原生物学与疾病控制研究工作, E-mail: lidongmei@icdc.cn

通信作者: 刘起勇, E-mail: liuqiyoung@icdc.cn

reduced the residual nucleic acid fragments in the sequencing chip, but could not completely remove them, with a 1.40% residual ratio. **Conclusion** Nanopore sequencing of 16S rRNA gene amplicons can be used for direct and real-time detection and identification of pathogens in organs and tissues from rodents. Nanopore MinION sequencing provides convenience for on-site detection and pathogen monitoring with its portable and simple operation, and real-time data transmission and analysis.

Key words: *Bartonella*; Nanopore sequencing; 16S amplicon sequencing; Metagenomics; Rodent-borne diseases

在传染病诊断、病原体检测与监测过程中,检测的时效性和准确性同等重要。特别是在常规监测、疫情暴发处理和追踪溯源时,快速的检测手段起着至关重要的作用。测序技术经历了一代、二代至三代的蓬勃发展后,病原宏基因组学概念应运而生,相关技术方法已经在病原体识别中有所应用^[1-2]。二代测序(next-generation sequencing, NGS),是较早应用于病原体检测与鉴定的测序技术,目前比较成熟,以 Illumina 测序为主。该技术对设备安装和运行环境要求较高,读长较短,测序时间相对较长,测序文库制备和数据处理与分析较复杂,对专业技术要求较高^[3-4]。近年来,三代纳米孔测序技术(nanopore sequencing)凭借其读长长、操作简便、实时读取测序数据和入门简单的特点脱颖而出,也在病原体检测方面展现出良好的前景^[5]。特别是“掌上”纳米孔 MinION 测序仪具有小巧、操作便捷等优势,更加适用于现场工作。目前已实现在太空站、北极冰川这样的极端环境中成功测序^[6]。

纳米孔测序的原理是在纳米孔两端施加一个外加电场,当不同碱基进入蛋白纳米孔时,引起电流不同程度变化,通过识别这种电流信号变化判断穿越纳米孔的碱基类别,从而确定整条核苷酸序列组成。Kilianski 等^[7]用 MinION 测序仪对痘病毒(Poxvirus)和大肠埃希菌(*Escherichia coli*)培养物进行扩增子测序,证明该技术可以准确地识别和区分病毒及细菌种类。近 2 年纳米孔测序技术在水体、动植物和其他环境样品宏基因组、病原体检测鉴定方面已经有越来越多的实际应用。例如,在非洲埃博拉^[8]、拉沙热^[9]和南美寨卡病毒病暴发疫情中快速甄别病原体^[10],在畜牧业中对口蹄疫病毒进行分型研究以及在临床上对各种人体组织和体液进行检测以辅助诊断^[11-12]。

测序技术用于临床感染性疾病病原体检测的优势在于无偏、快速地非靶向检测。但是有时鸟枪式宏基因组测序法对于一些低核酸丰度的组织或体液样品适用较差。针对这种情况,基于扩增子的宏基因组测序也许是一种更好的解决办法,特别是对于细菌的 16S 核糖体 RNA (16S ribosomal RNA, 16S rRNA)扩增子测序既可以降低背景基因组干扰又能够放大细菌存在的信号而提高检测效率^[13-14]。

由于 16S 扩增子纳米孔测序的种种优势和易操作性,本研究测试了 MinION 16S 扩增子测序是否适合直接从鼠类组织样品中快速检测细菌。我们选取巴尔通体(*Bartonella* spp.)培养阳性的样品,提取脾和肺组织 DNA 基因组,应用 16S rRNA 序列的通用引物对其进行常规 PCR 扩增和一代桑格测序(Sanger sequencing),同时进行纳米孔测序,评估 16S 扩增子纳米孔测序技术在鼠传病原体检测中的可行性。

1 材料与方法

1.1 样品来源 选取 2018 年 7 月采集自青海省海西蒙古族藏族自治州(海西州)乌兰县、格尔木市的 16 只巴尔通体分离培养阳性的啮齿动物样品^[15],其中 14 只为长尾仓鼠(*Cricetulus longicaudatus*)、2 只为子午沙鼠(*Meriones meridianus*)。分别提取脾(P)、肺(F)组织核酸 16 份,组织在核酸提取前-80℃保存,未曾冻融。样品信息及巴尔通体菌株鉴定情况见表 1。

1.2 脾、肺组织核酸提取 应用磁珠法提取动物脾、肺组织核酸(组织基因组 DNA 提取试剂盒 AU19014,北京百泰克生物技术有限公司),应用 Qubit 4 荧光计(Invitrogen)和配套试剂盒(Qubit dsDNA HS Assay Kit)测定核酸浓度。

1.3 16S rRNA 基因常规 PCR 扩增和测序 应用引物 fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')-rD1 (5'-AAG GAGGTGATCCAGCC-3')^[16]分别对脾和肺组织核酸扩增。反应体系 50 μl,包括 2×EasyTaq™ PCR SuperMix(北京全式金生物技术有限公司) 25 μl、正反向引物各 1 μl、基因组 DNA 10 μl、无核酸酶水 13 μl。PCR 反应条件为 95℃预变性 1 min; 95℃变性 20 s, 55℃退火 30 s, 65℃延伸 2 min, 25 个循环; 65℃延伸 5 min (SensoQuest Labcycler PCR 仪,德国圣欧)。1%的琼脂糖凝胶电泳 100 V、30 min 观察 PCR 产物,约 1 500 bp 扩增带阳性产物双向测序(北京奥科鼎盛生物科技有限公司)。应用 BLASTn 在线(www.ncbi.nlm.nih.gov)进行核酸序列同源性搜索比较。

1.4 Nanopore 文库构建、测序和数据处理

1.4.1 文库构建 Nanopore 测序文库构建包括 PCR 扩增步骤,全部应用 16S 条码试剂盒(16S Barcoding

表 1 啮齿动物及其分离菌株信息
Table 1 Information of rodents and their isolates

样品编号	P/F DNA 浓度(ng/μl)	菌株名称	巴尔通体种类[BLAST 相似性(%)]	宿主种类	采样点	生境
19	122.0/103.0	CL19QHWL	格拉汉姆巴尔通体(<i>Bartonella grahamii</i>) (97.4)	长尾仓鼠	乌兰县哈里哈图	天然林
27	58.0/308.0	CL27QHWL	格拉汉姆巴尔通体(97.1)	长尾仓鼠	乌兰县铜普镇	麦田
29	77.8/240.0	CL29QHWL	格拉汉姆巴尔通体(98.1)	长尾仓鼠	乌兰县铜普镇	麦田
32	732.0/269.0	CL32QHWL	格拉汉姆巴尔通体(99.2)	长尾仓鼠	乌兰县铜普镇	麦田
34	64.9/69.4	CL34QHWL	格拉汉姆巴尔通体(97.4)	长尾仓鼠	乌兰县铜普镇	麦田
43	170.0/121.0	CL43QHWL	格拉汉姆巴尔通体(97.4)	长尾仓鼠	乌兰县可可镇新乐村	麦田、林地
45	144.0/39.2	CL45QHWL	格拉汉姆巴尔通体(97.1)	长尾仓鼠	乌兰县可可镇新乐村	麦田、林地
46	343.0/21.3	CL46QHWL	格拉汉姆巴尔通体(97.6)	长尾仓鼠	乌兰县可可镇新乐村	麦田、林地
50	277.0/29.5	CL50QHWL	格拉汉姆巴尔通体(98.1)	长尾仓鼠	乌兰县可可镇新乐村	麦田、林地
65	38.3/58.1	CL65QHWL	格拉汉姆巴尔通体(97.8)	长尾仓鼠	乌兰县哈里哈图	高原草地
67	48.6/151.0	CL67QHWL	格拉汉姆巴尔通体(97.1)	长尾仓鼠	乌兰县哈里哈图	高原草地
68	50.4/132.0	CL68QHWL	格拉汉姆巴尔通体(96.8)	长尾仓鼠	乌兰县哈里哈图	高原草地
70	378.0/161.0	CL70QHWL	格拉汉姆巴尔通体(97.4)	长尾仓鼠	乌兰县哈里哈图	高原草地
74	70.7/134.0	CL74QHWL	格拉汉姆巴尔通体(97.6)	长尾仓鼠	茶卡盐湖	半荒漠草滩
82	164.0/269.0	MM82QHGM	沙鼠巴尔通体候选种 <i>Candidatus B. gerbillinarum</i> (92.1)	子午沙鼠	格尔木	高原荒漠
85	418.0/476.0	MM85QHGM	沙鼠巴尔通体候选种 <i>Candidatus B. gerbillinarum</i> (96.1)	子午沙鼠	格尔木	高原荒漠

注:P 代表脾组织;F 代表肺组织。

Kit SQK-RAB204, 牛津纳米孔技术公司 Oxford Nanopore Technologies, ONT), 使用含有条形码和 5' 末端标签的特异性 16S 引物(27F: 5'-AGAGTTTGA TCMTGGCTCAG-3'^[17]和 1492R: 5'-GGTACCTTGT-TACGACTT-3'^[18]), 对组织核酸 DNA 进行 PCR 扩增, 实验操作参考操作手册(RAB_9053_v1_revC_19Dec2017), 略作修改。PCR 反应体系 50 μl, 包括 LongAmp Taq 2×Master Mix (NEB) 25 μl、基因组 DNA 10 μl、16S barcode primer 1 μl 和无核酸酶水 14 μl。PCR 反应条件同上述 16S rRNA 基因常规 PCR 扩增。取 1 μl PCR 产物定量浓度, 将剩余产物全部转入 1.5 ml 低吸附离心管, 加入 30 μl 磁珠 (Agencourt AMPure XP Reagent, Beckman), 室温混匀孵育后用 70% 乙醇溶液清洗, 晾干残余乙醇后加入 3~10 μl 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0, 含 50 mmol/L NaCl) 重悬磁珠, 上清液即为纯化后的核酸。等体积吸取所有样品管中核酸, 总体积 15.5 μl, 混匀后取 1 μl 定量浓度, 依浓度值相应加入 1.0~1.4 μl RAP, 室温孵育 5 min 后加入 34 μl Sequencing Buffer (SQB)、25.5 μl Loading Beads (LB), 制备成总体积 75 μl 测序文库。

1.4.2 测序和数据处理 按照操作手册将 30 μl Flush Tether (FLT, Flow Cell Priming Kit, ONT) 和 1 管 Flush Buffer (FLB, Flow Cell Priming Kit, ONT) 混匀, 制备成测序缓冲液 (priming mix), 从 priming port 加入到测序芯片 (Flow Cells R.9.4) 中, 然后将 75 μl DNA 文库从 SpotON sample port 加入到芯片中, 关闭

SpotON sample portpriming port, 将芯片装载到 MinION 测序仪上进行测序。

测序软件为 MinKNOW (MinION Release 19.06.7), 应用 Albacore 软件实时识别碱基 (Basecalling), 运行 14~20 h, 起始电压 180 mV, 输出 fast5 和 fastq 文件。运行 EPI2ME 客户端 (epi2 me-agent-v.2019.7.9-2549693), 选择 16S 流程 (FASTQ 16S v3.2.1) 用于数据质控 (Basecalling 1D-v2.2.8) 和分类 (16S Classification-v2.2.13), 最小质量值 (Min qscore) 为 7, 选择检测 barcode 16S RAB204, 检测文件为 *.fastq 格式。进入 EPI2ME 网站 (<https://epi2me.nanoporetech.com>) 实时查看结果报告。

1.5 测序芯片 flowcell 清洗 应用芯片清洗试剂盒 (Washing kit, EXP-WSH002, ONT) 按照操作说明对测序后的芯片进行清洗。应用溶液 A (Solution A) 清洗芯片后可以加入溶液 B (Solution B) 立即进行文库加载测序, 也可以加入储存缓冲液 (Storage Buffer) 置于 4~8 °C 保存备用。

2 结果

2.1 16S rRNA 基因常规 PCR 扩增、测序及鉴定 应用引物 fDI-rDI 分别扩增鼠脾和肺组织核酸, 均出现约 1 500 bp 扩增带; 该扩增带产物切胶纯化后测序, BLAST 搜库 (nt/nr) 显示, 在肺和脾组织样品中鉴定出巴尔通体的样品数量分别为 11 和 9 份, 检出率分别为 68.8% 和 56.2%; 其中 5 份样品的脾和肺组织均鉴定出巴尔通体; 4 份肺和 7 份脾样品鉴定出根

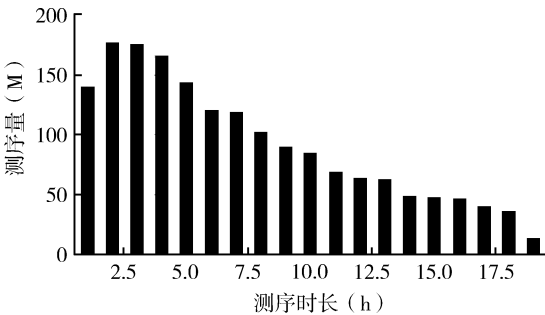
瘤菌和苍白杆菌等其他种属的细菌,有 1 份肺组织样品扩增产物测序无信号。见表 2。

表 2 16S 扩增子常规测序鉴定结果

Table 2 Identification results of 16S amplicons using Sanger sequencing

样品编号	肺组织	脾组织
19	测序无信号	澳洲家鼠巴尔通体(<i>B. rattaustaliani</i>)
27	文森巴尔通体(<i>Bartonella vinsonii</i>)	格拉汉姆巴尔通体(<i>B. grahamii</i>)
29	苍白杆菌(<i>Ochrobactrum</i> sp.)	格拉汉姆巴尔通体
32	格拉汉姆巴尔通体	格拉汉姆巴尔通体
34	格拉汉姆巴尔通体	食酸戴尔福特菌(<i>Delftia acidovorans</i>)
43	格拉汉姆巴尔通体	格拉汉姆巴尔通体
45	格拉汉姆巴尔通体	食酸戴尔福特菌
46	格拉汉姆巴尔通体	食酸戴尔福特菌
50	格拉汉姆巴尔通体	速生食酸菌(<i>Acidovorax facilis</i>)
65	格拉汉姆巴尔通体	格拉汉姆巴尔通体
67	食酸戴尔福特菌	特利波契巴尔通体(<i>B. tribocorum</i>)
68	格拉汉姆巴尔通体	食酸戴尔福特菌
70	格拉汉姆巴尔通体	巴尔通体
74	根瘤菌(<i>Rhizobium lentis</i>)	根瘤菌
82	巴尔通体	食酸戴尔福特菌
85	食酸戴尔福特菌	伊丽莎白巴尔通体(<i>B. elizabethae</i>)

2.2 16S 扩增子 Nanopore 测序结果 全部样品核酸浓度在 5.8~732.0 ng/ μ l, 16S 测序试剂盒含有 12 个测序样品标识(Barcode, BC01~12), 每次最多操作 12 份样品。全部测序样品总数据量[total yield (bases)] 为 22.2~988 400 K, reads 数量为 38~647 576 个, 平均质量得分(average quality score) 为 6.4~9.9, 数据产出主要在 12 h 以内(图 1), 最早 30 min 即可在线(<https://epi2me.nanoporetech.com>) 观察到分类数据。序列长度集中在 1 200~1 600 bp, 以 1 500 bp 的 reads 为主, 数量明显多于其他长度。见图 2。

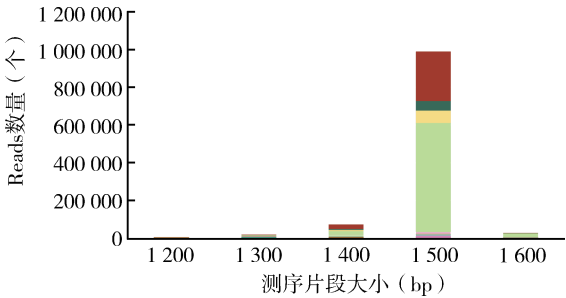


注: 数据结果由 EPI2ME 中 QC and Barcoding [rev.3.10.2] 分析而得。

图 1 测序数据产出的时间分布

Figure 1 Temporal distribution of sequencing data output

每份样品用于分类分析的 reads 数为 4~609 424 个不等, 以巴尔通体检出为主, reads 数为 1~77 833 个, 其中脾组织平均为 7 835 个, 肺组织平



注: 不同颜色代表不同批次测序。

图 2 16S 扩增子 Nanopore 测序片段大小分布

Figure 2 Distribution of fragment size of 16S amplicon using nanopore sequencing

均为 4 203 个; 巴尔通体鉴定的平均准确率(average accuracy) 为 79.2%~92.0%。见表 3。

表 3 16S 扩增子 Nanopore 测序结果

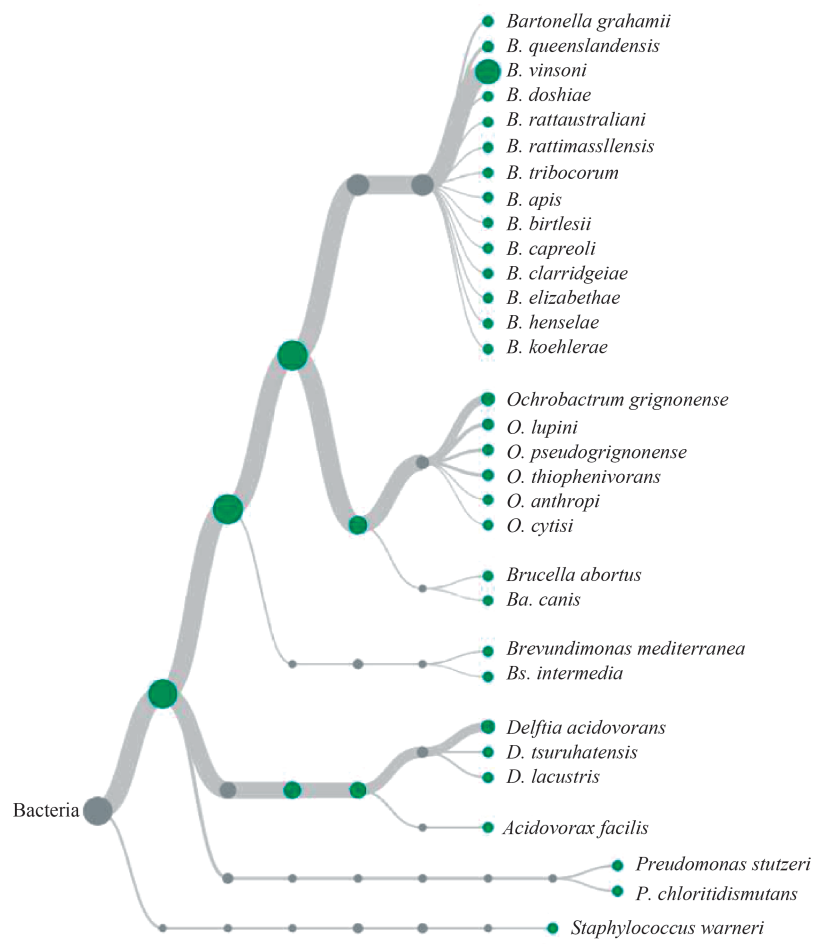
Table 3 Sequencing results of 16S amplicon using nanopore sequencing

样品编号	巴尔通体				布鲁氏菌			
	Reads 数量 (个)		平均准确率 (%)		Reads 数量 (个)		平均准确率 (%)	
	肺	脾	肺	脾	肺	脾	肺	脾
19	5	1	83.9	79.2	0	0	-	-
27	1 420	5 470	89.5	89.5	1	48	86.8	87.0
29	32	88	84.5	87.0	1	0	80.0	80.0
32	8	10	87.8	85.9	0	0	-	-
34	251	235	87.4	87.4	0	0	-	-
43	3 316	1 673	87.3	87.3	69	5	85.9	84.6
45	4	1 967	87.9	89.5	0	2	-	86.1
46	3	5	88.1	86.4	0	0	-	-
50	1 626	308	88.9	89.2	137	0	87.1	87.1
65	4 978	76	89.1	88.6	2	0	84.5	84.5
67	94	189	88.9	92.0	0	0	-	-
68	33	257	89.3	88.9	0	0	-	-
70	521	11 362	85.4	89.3	2	17	85.4	84.5
74	237	3	89.0	89.4	0	0	-	-
82	28 840	25 879	89.2	89.1	38	30	86.1	85.6
85	25 886	77 833	89.2	89.2	36	100	85.6	85.9

注: - 表示无值。

除巴尔通体外还鉴定出布鲁氏菌 (*Brucella* sp.) 和其他一些细菌。Reads 数量较多的为支原体 (*Mycoplasma* sp.)、苍白杆菌 (*Ochrobactrum* sp.)、戴尔福特菌 (*Delftia* sp.)、食酸菌 (*Acidovorax* sp.)、假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 和短波单胞菌 (*Brevundimonas* sp.) 等。见图 3。

2.2.1 样品核酸浓度对测序结果的影响 选择 2 个样品的核酸稀释 10 倍后扩增, 纯化后用于制备测序文库的产物浓度较原始样品降低 4~8 倍。2 个样品成功用于分析的 reads 差别较大, 总数据量和 reads 数量明显降低 1 个数量级以上; 样品核酸稀释前后所测序列平均长度基本一致; 在稀释后的样品中用



注:分类数据结果由EPI2ME中16S Classification [rev.3.0.0] 分析而得。

图3 MinION 纳米孔测序结果分类

Figure 3 Taxonomic tree based on nanopore MinION sequencing results

于分类的 reads 数明显减少 1 个数量级以上, 鉴定精度 >85.0% (表 4)。样品稀释前后的测序质量和分

表 4 核酸样品稀释前后的测序结果比较

Table 4 Comparison of sequencing results before and after the dilution of the nucleic acid samples

样品名称	产物纯化后浓度 (ng/μl)	总数据量 (kb)	测序质量评分	平均测序长度 (bp)	用于分类的 reads 数量 (个)	巴尔通体 reads 数量 (个)	巴尔通体 reads 构成比 (%)	平均精确度 (%)
F19	8.6	23 400.0	9.8	1 479	15 107	3 267	21.6	89.4
F19 ⁻¹	1.1	298.5	9.7	1 470	187	20	10.7	89.1
F70	2.0	1 200.0	8.2	1 247	736	521	70.8	85.4
F70 ⁻¹	0.5	101.3	8.3	1 101	56	39	69.6	85.3

注: F 代表肺组织; -1 代表稀释 10 倍。

2.2.2 测序芯片残留 (carryover) 芯片清洗前后总 reads 的平均值分别为 105 336 和 1 411 个, 残留比为 0.9%~3.0%, 平均值为 1.4%; 检出巴尔通体的 reads 平均值分别是 16 541 和 218, 残留比为 0~1.4%, 平均值为 1.0%。见表 5。

3 讨论

啮齿动物是巴尔通体的主要宿主动物之一, 目前从其体内分离到 20 余种巴尔通体, 在鼠群中感染

率相当高^[19], 有些鼠传巴尔通体具有致病性, 如格拉汉姆巴尔通体^[20-21]和伊丽莎白巴尔通体^[22-23], 是啮齿动物中常见的鼠传巴尔通体。我们选择巴尔通体作为指示菌检验纳米孔测序效果, 较之于人工模拟样品能更好地反应样品检测的实际情况^[24], 是较为理想的自然样品。啮齿动物是很多致病菌的自然宿主, 能传播包括鼠疫、钩端螺旋体病、恙虫病、地方性斑疹伤寒、野兔热和巴尔通体病在内的多种疾病^[25], 检测和监测相关病原体在鼠群中的流行动态是预防

表 5 测序芯片清洗前后 reads 数量的比较

Table 5 Comparison of the number of reads before and after cleaning the sequencing chips

标识码 (Barcode, BC) ^a	清洗后 reads 数量(个)	前次测序 reads 数量(个)	残留比 (%)	清洗后巴尔通体 reads 数量(个)	前次测序巴尔通体 reads 数量(个)	残留比 (%)
BC01	8 539	647 576	1.3	372	28 840	1.3
BC02	937	75 548	1.2	325	25 879	1.3
BC03	756	60 854	1.2	316	25 886	1.2
BC04	4 552	312 742	1.5	1 117	77 833	1.4
BC05	99	8 048	1.2	0	4	0.0
BC06	84	9 395	0.9	20	1 967	1.0
BC07	23	1 764	1.3	19	1 420	1.3
BC08	116	9 597	1.2	67	5 470	1.2
BC09	195	15 793	1.2	33	3 267	1.0
BC10	6	203	3.0	0	20	0.0
BC11	218	17 178	1.3	131	11 362	1.2
平均值	1 411	105 336	1.4	218	16 541	1.0

注:a 表示一个样品对应 1 个标识码 Barcode。

和控制这些传染病发生和流行的关键一环,高效的检测和监测手段是这一环节中应该具备的基本条件。

目前,对于很多病原体已具备较为高效的检测技术,如常规 PCR 和荧光定量 PCR、多种等温扩增技术、多重检测技术、芯片和微流控技术^[26],这些方法均是针对特异性核酸的靶标性检测方法,无法针对未知病原体进行筛选。二代和三代高通量 16S 扩增子和鸟枪法宏基因组测序已广泛应用于环境样品的物种丰度和组成结构研究。近年关于病原体检测识别的报道和研究日渐增多,对于应用于临床诊断和实验室研究的宏基因组(病原)测序在国内外已形成了系统的操作标准并得到专家的广泛认同^[27-28],逐渐呈现推广普及的趋势。因为三代测序发展较晚,所以目前应用于病原体检测的二代测序更多,但是三代测序仪 MinION 因测序片段长读长、方便携带和检测时间短而具有其独特的优势^[29-31]。为评价该技术用于鼠传病原体检测的可行性,本研究选择了巴尔通体感染阳性的鼠类样品进行检测。

MinION 测序后 30 min 内开始产生数据,同时进行碱基识别和分类分析。序列长度以 1 500 bp 的 reads 为主,数量明显多于其他长度,说明扩增、测序文库制备、上样和实时芯片测序步骤没有问题,产生了预期长度片段。全部脾和肺组织样品在纳米孔测序中均检测巴尔通体,不同样品的巴尔通体 reads 数差别比较大,平均准确率为 79.2%~92.0%。此外,纳米孔测序不但检出巴尔通体,数个样品中脾和肺组织中还检测到布鲁氏菌,该菌是布鲁氏菌病的致病菌,动物宿主多为牛、羊、猪和犬,啮齿动物带菌虽不多见,但也有报道^[32-33]。除巴尔通体和布鲁氏菌这 2 类致病菌外,还鉴定到一些环境微生物。宏基

因组测序分析比对出大量菌群,包括很多环境微生物也是常见的现象,如何判断其与样品的关系问题,包括对一些不明原因的、新发病原体的确认,众多背景细菌会干扰对结果的判断,特别是与疾病的关联,要结合综合判断。应该结合样品的背景信息、临床、流行病学调查信息、病理学以及研究的目的。在宏基因组测序中大量数据的产生与测序技术和生物信息分析相关,但不是关键问题,对结果意义的判断主要取决于对研究目标的认知和相关知识库中的储备。

一般来说,待测样品带菌与否和带菌量多少直接影响最后的检测结果。16S 扩增子测序的优势就在于可以放大检测样品全基因组中细菌的成分,易于检出和识别,即便如此,样品中靶核酸起始浓度也会影响测序结果。本研究中所用 16S 扩增子纳米孔测序 16S 条码试剂盒推荐起始核酸用量为 10 ng,但是实际样品情况复杂,含有大量宿主动物的背景核酸,病原体核酸含量未知,如果盲目参照试剂盒操作手册稀释样品或许影响检出效果。本研究选择 2 个样品进行稀释,测试实验结果发现稀释原始样品浓度可降低测序数据量,特别是用于分类的 reads 明显减少,说明起始样品浓度是影响测序结果的直接因素,对序列长度分布和分类分析影响不大。样品经稀释后平均 reads 长度基本没有变化,不影响每个 reads 搜库分类鉴定,但会影响丰度较低的靶标,导致在样品中低丰度的病原体不能被检出,因此我们建议这类样品在第一步 PCR 扩增前不需要稀释。

测序芯片可以重复使用,这样可以增加芯片的使用效率和最大数据产出,ONT 公司为此提供了芯片清洗方法和相应试剂盒,说明这一步骤可以去除大部分前次文库中的核酸片段。此外,在少量研究

报道中也提到了关于测序芯片重复使用会产生残留的问题^[34-35],也有研究者在 ONT 公司网站上的 Community 中讨论关于残留问题,但这方面的详细数据较少。在本研究中,我们提供了较为详细的数据,发现经过清洗的芯片再次应用时,可见上次测序实验产生的少量 reads,在分析过程中可通过 Barcode 将其排除,但是如果 2 次实验均使用同样的 Barcode,则无法鉴别 Barcode 相同的样品而产生数据混淆。这种情况出现时,如果用于分析样品细菌群落结构,对于丰度较高的细菌物种影响不大,但低丰度物种则可产生明显干扰。如果用于样品中病原体的检测则可能会出现假阳性结果,直接导致错误判断。

在测序过程中发现,上样操作非常重要,如果将气泡引入测序芯片,导致纳米孔堵塞,测序“活孔(active pores)”数量显著减少,测序质量明显下降。MinION 测序成功与否的一个关键决定因素是在测序启动后执行 MUX(Multiplexer)扫描时识别的有效纳米孔数目^[6]。每个测序芯片包含 2 048 个纳米孔,由于生产、储存、运输和操作等因素会导致实际“活孔”数量减少,因此,在使用前需要进行质检,观察“活孔”数量,低于 800 个,为不合格芯片。我们在使用过程中没有遇到过 >2 000 个“活孔”的芯片,通常在 1 000~2 000 个范围内,是可以正常测序的。

16S rRNA,是原核生物核糖体中 30S 亚基的组成部分,因其结构与功能的高度保守性,可反映物种间的亲缘关系,常被用作细菌系统分类研究中的分子钟,有“细菌化石”之称。16S 扩增子测序相较鸟枪法宏基因组测序操作简单、快速、数据量少和分析方便,既可以规避对仪器设备和操作人员的高要求,又可以一次性扩大病原体检测范围。本研究应用小量样本尝试评估此技术在鼠传细菌性病原检测中的应用,初步认为具有可行性。下一步,有必要进行更多大样本感染样品的宏基因组测序,加快对这一新检测手段进行客观评判,标准化地应用于传染病病原体检测和监测工作中。MinION 的便携式测序使得临床的即时检验(point-of-care testing, POCT)、野外现场样品实时微生物检测以及环境样品微生物组成的实时监控等需求成为现实。当然,在实验过程中试剂冷藏、网络畅通和电力供应充足等需求必须得到满足。总之,随着基因组测序技术和高通量测序数据处理方法的发展,实用性的要求将越来越高,更便捷、快速和经济的测序平台势必会更加适应基层卫生疾病控制人员和科研人员的需求。

志谢 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所张雯博士在实验

过程中给予帮助,特此志谢

利益冲突 无

参考文献

- [1] Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection[J]. Annu Rev Pathol, 2019, 14:319-338. DOI:10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751.
- [2] Schlager R, Chiu CY, Miller S, et al. Validation of metagenomic next-generation sequencing tests for universal pathogen detection[J]. Arch Pathol Lab Med, 2017, 141(6):776-786. DOI:10.5858/arpa.2016-0539-RA.
- [3] Palacios G, Druce J, Du L, et al. A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases[J]. N Engl J Med, 2008, 358(10):991-998. DOI:10.1056/NEJMoa073785.
- [4] Xu BL, Liu LC, Huang XY, et al. Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leukopenia syndrome (FTLS) in Henan province, China: discovery of a new bunyavirus[J]. PLoS Pathog, 2011, 7(11):e1002369. DOI:10.1371/journal.ppat.1002369.
- [5] 叶福强, 张锦海, 汪春晖. 纳米孔测序技术在病原体现场快速确认中的应用与挑战[J]. 中华卫生杀虫药械, 2019, 25(4):374-378. DOI:10.19821/j.1671-2781.2019.04.021.
Ye FQ, Zhang JH, Wang CH. Application and challenge of nanopore sequencing technology in rapid identification of pathogens in the field[J]. Chin J Hyg Insect Equip, 2019, 25(4):374-378. DOI:10.19821/j.1671-2781.2019.04.021.
- [6] Castro-Wallace SL, Chiu CY, John KK, et al. Nanopore DNA sequencing and genome assembly on the international space station[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):18022. DOI:10.1038/s41598-017-18364-0.
- [7] Kilianski A, Haas JL, Corriveau EJ, et al. Bacterial and viral identification and differentiation by amplicon sequencing on the MinION nanopore sequencer[J]. GigaScience, 2015, 4(1):12. DOI:10.1186/s13742-015-0051-z.
- [8] Hoenen T, Groseth A, Rosenke K, et al. Nanopore sequencing as a rapidly deployable Ebola outbreak tool[J]. Emerg Infect Dis, 2016, 22(2):331-334. DOI:10.3201/eid2202.151796.
- [9] Kafetzopoulou LE, Pullan ST, Lemey P, et al. Metagenomic sequencing at the epicenter of the Nigeria 2018 Lassa fever outbreak[J]. Science, 2019, 363(6422):74-77. DOI:10.1126/science.aau9343.
- [10] Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples[J]. Nat Protoc, 2017, 12(6):1261-1276. DOI:10.1038/nprot.2017.066.
- [11] Hansen S, Dill V, Shalaby MA, et al. Serotyping of foot-and-mouth disease virus using oxford nanopore sequencing[J]. J Virol Methods, 2019, 263:50-53. DOI:10.1016/j.jviromet.2018.10.020.
- [12] Moon J, Jang Y, Kim N, et al. Diagnosis of Haemophilus influenzae pneumonia by nanopore 16S amplicon sequencing of sputum[J]. Emerg Infect Dis, 2018, 24(10):1944-1946. DOI:10.3201/eid2410.180234.
- [13] Moon J, Kim N, Kim TJ, et al. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by nanopore 16S amplicon sequencing: A pilot study

- [J]. Int J Med Microbiol, 2019, 309(6): 151338. DOI: 10.1016/j.ijmm.2019.151338.
- [14] Tessler M, Neumann JS, Afshinnikoo E, et al. Large-scale differences in microbial biodiversity discovery between 16S amplicon and shotgun sequencing [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 6589. DOI: 10.1038/s41598-017-06665-3.
- [15] Rao HX, Li SJ, Lu L, et al. Genetic diversity of *Bartonella* species in small mammals in the Qaidam Basin, western China [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 1735. DOI: 10.1038/s41598-021-81508-w.
- [16] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. J Bacteriol, 1991, 173(2): 697-703. DOI: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991.
- [17] Zeng YH, Koblížek M, Li YX, et al. Long PCR-RFLP of 16S-ITS-23S rRNA genes: A high-resolution molecular tool for bacterial genotyping [J]. J Appl Microbiol, 2013, 114(2): 433-447. DOI: 10.1111/jam.12057.
- [18] Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(1): e1. DOI: 10.1093/nar/gks808.
- [19] 马洁琼, 栗冬梅, 陈忠科, 等. 鼠传巴尔通体流行概况 [J]. 疾病监测, 2018, 33(1): 7-14. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2018.01.004.
- Ma JQ, Li DM, Chen ZK, et al. Epidemiological characteristics of rodent-borne *Bartonella* [J]. Dis Surveill, 2018, 33(1): 7-14. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2018.01.004.
- [20] Serratrice J, Rolain JM, Granel B, et al. Bilateral retinal artery branch occlusions revealing *Bartonella grahamii* infection [J]. Rev Med Interne, 2003, 24(9): 629-630. DOI: 10.1016/s0248-8663(03)00224-8.
- [21] Kerkhoff FT, Bergmans AMC, van Der Zee A, et al. Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(12): 4034-4038. DOI: 10.1128/JCM.37.12.4034-4038.1999.
- [22] Mexas AM, Hancock SI, Breitschwerdt EB. *Bartonella henselae* and *B. elizabethae* as potential canine pathogens [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(12): 4670-4674. DOI: 10.1128/jcm.40.12.4670-4674.2002.
- [23] Julieta C, Amairani MR, Sonia TC, et al. First report of bacillary angiomatosis by *Bartonella elizabethae* in an HIV-positive patient [J]. Am J Dermatopathol, 2019, 41(10): 750-753. DOI: 10.1097/DAD.0000000000001439.
- [24] Cuscó A, Catozzi C, Viñes J, et al. Microbiota profiling with long amplicons using Nanopore sequencing: full-length 16S rRNA gene and whole *rrn* operon [J]. F1000Research, 2018, 7: 1755. DOI: 10.12688/f1000research.16817.1.
- [25] Meerburg BG, Singleton GR, Kijlstra A. Rodent-borne diseases and their risks for public health [J]. Crit Rev Microbiol, 2009, 35(3): 221-270. DOI: 10.1080/10408410902989837.
- [26] 刘宁伟, 刘威, 黄留玉. 多重核酸检测技术研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2016, 27(4): 596-600. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0002.2016.04.031.
- Liu NW, Liu W, Huang LY. Advances in research on nucleic acid-based multiplex detection technologies [J]. Lett Biotechnol, 2016, 27(4): 596-600. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0002.2016.04.031.
- [27] 李颖, 麻锦敏. 宏基因组测序技术在中重症感染中的临床应用专家共识(第一版) [J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32(5): 531-536. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200228-00095.
- Li Y, Ma JM. Expert consensus for the application of metagenomic next generation sequencing in the pathogen diagnosis in clinical moderate and severe infections (first edition) [J]. Chin Crit Care Med, 2020, 32(5): 531-536. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200228-00095.
- [28] Quince C, Walker AW, Simpson JT, et al. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis [J]. Nat Biotechnol, 2017, 35(9): 833-844. DOI: 10.1038/nbt.3935.
- [29] Tagini F, Greub G. Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: A pathogen-oriented review [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2017, 36(11): 2007-2020. DOI: 10.1007/s10096-017-3024-6.
- [30] Menaughton AL, Roberts HE, Bonsall D, et al. Illumina and Nanopore methods for whole genome sequencing of hepatitis B virus (HBV) [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 7081. DOI: 10.1038/s41598-019-43524-9.
- [31] Koskela KA, Kalin-Mänttari L, Hemmila H, et al. Metagenomic evaluation of bacteria from voles [J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2017, 17(2): 123-133. DOI: 10.1089/vbz.2016.1969.
- [32] Tiller RV, Gee JE, Frace MA, et al. Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia [J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(17): 5837-5845. DOI: 10.1128/AEM.00620-10.
- [33] 武少卿, 刘日宏, 杨哲宇. 啮齿动物布鲁杆菌病的自然疫源性研究进展 [J]. 疾病监测与控制, 2015, 9(4): 246-247.
- Wu SQ, Liu RH, Yang ZY. The research progress of the natural focus Brucellosis of rodent [J]. J Dis Monitor Control, 2015, 9(4): 246-247.
- [34] Greninger AL, Naccache SN, Federman S, et al. Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis [J]. Genome Med, 2015, 7: 99. DOI: 10.1186/s13073-015-0220-9.
- [35] Tyler AD, Mataseje L, Urfano CJ, et al. Evaluation of Oxford nanopore's MinION sequencing device for microbial whole genome sequencing applications [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 10931. DOI: 10.1038/s41598-018-29334-5.

收稿日期: 2021-03-02 本文编辑: 陈秀丽