

利用高通量测序快速检测 H7N9 禽流感病毒及基因组序列分析

裴广倩^{1,2}, 范航², 安小平², 王伟², 徐晓蒙², 史套兴², 童贻刚²

摘要 目的 探索用高通量测序技术检测咽拭子样本中 H7N9 禽流感病毒的方法。方法 分别提取编号为 106、089 及 024 3 份样本 RNA, 反转录 cDNA 扩增, 用 Ion Torrent 进行高通量测序, 对测序结果进行生物信息学分析。结果 3 个咽拭子样本的测序结果中均能检测出禽流感病毒, 拼接出的基因组序列可以进行生物信息学分析。结论 利用高通量测序技术可以快速地检测 H7N9 禽流感病毒, 并可用生物信息学软件拼接基因组序列及进行序列分析。

关键词 高通量测序; H7N9 禽流感病毒; 生物信息学分析
中图分类号 R 373.19; Q 7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)08-1033-06

禽流感病毒是一种引起禽类、部分哺乳动物及人类传染性疾病的甲型流感病毒, 两个宿主相同的甲型流感病毒之间的 8 个 RNA 片段经常发生重配^[1], 而且其依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶缺少校对功能, 导致其在复制过程中基因组的高突变率, 这 2 个特性使得甲型流感病毒不断进化, 引起人类感染, 有时发生大爆发, 感染人的禽流感病毒亚型主要为 H5N1^[2-3]、H9N2、H7N7。在 2013 年以前, H7N9 仅感染禽类, 并未发现过感染人的情况^[4], 然而, 自 2013 年 2 月 19 日开始, 我国的上海、安徽等东南省市, 陆续新发现了由 H7N9 禽流感病毒引起人感染病例, 患者均出现严重的肺炎和急性呼吸窘迫综合

征 (acute respiratory distress syndrom, ARDS)^[5-6]。H7N9 禽流感病毒是 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感染人类^[7]。随着技术的发展与研究的深入, 高通量测序技术成为快速获得病原体基因组序列的重要手段之一。该研究利用美国 Life Technologies 公司 Ion PGM 高通量测序仪检测 3 个咽拭子样本, 获得了基因组序列并进行了生物信息学分析。

1 材料与方法

1.1 材料 编号为 106、089 及 024 3 份样本均来自于鸡咽拭子: 106 号样本进行鸡胚培养; 089 号样本经过禽流感病毒通用引物荧光定量 RT-PCR 检测, CT 值为 16.2; 024 号样本经过禽流感病毒通用引物荧光定量 RT-PCR 检测, CT 值为 29.9。

1.2 主要试剂 引物合成于明琛志远生物技术有限公司; MagMAXTM Viral RNA Isolation Kit、反转录试剂盒、SuperScript[®] III One-Step RT-PCR System with Platinum[®] Taq DNA Polymerase 均购自于美国 Invitrogen 公司; DNA Polymerase 2XPCR Master Mix 购自于博迈德公司; PCR 产物纯化试剂盒购自于德国 Qiagen 公司; NEBNext[®] Fast DNA Library Prep Set for Ion TorrentTM 购自于 New England Biolabs 公司; Ion ShearTM Plus Reagents Kit、Ion OneTouchTM 200 Template Kit v2 DL、Ion PGMTM Sequencing 300 Kit 及 Ion Torrent 测序仪均购自于美国 Life Technologies。

1.3 方法

1.3.1 引物合成 用于流感病毒的通用反转录引物序列为 Uni12 (M): AGCRAAAGCAGG, 通用引物序列^[8] 分别为: MBTuni-12: 5'-ACGCGTGATCAG-CAAAAGCAGG-3'; MBTuni-13: 5'-ACGCGTGATCAG-TAGAAACAAGG-3'。用于扩增流感病毒的 8 对全长引物序列^[9] 见表 1, 为了扩增低浓度样本中的 H7N9, 以 A/Anhui/1/2013 (H7N9) 基因组为参考序列, 设计合成 35 对小片段引物序列, 见表 2。

1.3.2 RNA 提取 按照 MagMAXTM Viral RNA Isolation Kit 说明书操作: 取 400 μ l 咽拭子样品, 加入 802 μ l 裂解液 (400 μ l Lysis/Binding Soln. Concen-

2014-02-25 接收

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863 计划”(编号: 2012AA022-003); “艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项“十二五”实施计划(编号: 2013ZX10004-605、2013ZX10004-217、2013ZX10004-607、2011ZX10004-001); “重大新药创制”科技重大专项“十二五”实施计划(编号: 2011ZX09401-023); 国家自然科学基金(编号: 81072350); 病原微生物生物安全国家重点实验室开放课题(编号: SKLPBS1113)

作者单位: ¹ 安徽医科大学, 合肥 230032

² 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

作者简介: 裴广倩, 女, 硕士研究生;

史套兴, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: shitaoxing@sina.com

童贻刚, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: tong.yi-gang@gmail.com

表1 流感病毒8对全长引物序列

引物名称	序列(5'-3')	目的 片段	长度 (bp)
PB ₂ -1	AGCRAAAGCAGCTCAATTATATTCA	PB ₂	2 341
PB ₂ -2341R	ACTAGAAACAAGGTCTGTTTTAACTA		
PB ₁ -1	AGCRAAAGCAGGCAACCAATTGCAATG	PB ₁	2 341
PB ₁ -2341R	ACTAGAAACAAGGCATTTTTTCATGAA		
PA-1	AGCRAAAGCAGGTACTGATYCGAAATG	PA	2 233
PA-2233R	AGTAGAAACAAGGTACTTTTTTGGACA		
HA-1	AGCAAAAGCAGGGGAAAATA	HA	1 778
HA-1778R	AGTAGAAACAAGGTGTTTT		
NP-1	AGCAAAAGCAGGGTAGATAA	NP	1 565
NP-1565R	AGTAGAAACAAGGTATTTTT		
NA-1	AGCAAAAGCAGGAGTGAAAA	NA	1 413
NA-4413R	AGTAGAAACAAGGATTTTT		
M-1	AGCAAAAGCAGGTAGATATT	M	1 027
M-1027R	AGTAGAAACAAGGTAGTTTT		
NS-1	AGCAAAAGCAGGGTGACAAA	NS	890
NS-890R	AGTAGAAACAAGGTGTTTT		

表2 35 对小片段引物

引物名称	序列(5'-3')	目的 片段	长度 (bp)
PB ₂ -1	F: ATGTCACAGTCTCGCACTCG R: CCTGCGCGGTATTTTAACC	PB ₂ -1	403
PB ₂ -2	F: ATGGACCAACGACAAGCACA R: TGGCACATCTCCAAAAGCGA	PB ₂ -2	550
PB ₂ -3	F: ATTTGACCCAAGGGACCTGC R: GGATTTAGCGCTGCTTTGC	PB ₂ -3	592
PB ₂ -4	F: CCGAGGCAATCATAGTGGA R: TCCGGACCATTTGATCTCCCA	PB ₂ -4	445
PB ₂ -5	F: TCCAGCACTGAGAGAGTGCT R: CGGAACCCCTCACATTACA	PB ₂ -5	466
PB ₂ -6	F: GCGTGACGTACTGGGAACAT R: CCGAATCCTTTTGCTCGCTG	PB ₂ -6	457
PB ₁ -1	F: AAGTGCCAGTGCAAAATGCT R: GCTGTCAGGCCATTCGATCT	PB ₁ -1	439
PB ₁ -2	F: GCCAGACCTATGACTGGACG R: GGAGGCCAGATTGCTCAAGT	PB ₁ -2	438
PB ₁ -3	F: TGCTGAAAGAGGCAAGCTGA R: TTCCGCTGCTACTTGTGTCC	PB ₁ -3	424
PB ₁ -4	F: AACCCCGGATGTTTCTAGC R: TCCAAAACATGGGCAATCCA	PB ₁ -4	600
PB ₁ -5	F: GGACGGACTCCAATCCTCAG R: GGTTTGGCCCTCCATCTGAA	PB ₁ -5	479
PB ₁ -6	F: GACCAGCAACAGCTCAAATG R: TCGTCTCTCAAGAATCCCCCT	PB ₁ -6	439
PB ₁ -7	F: GGTTTCAGATGGAGGGCCAA R: TTTGCCCTCTGAGCTCTTCA	PB ₁ -7	500
PA-1	F: GTGGACAGTGCTTCAATCC R: TGCCCTGCTTCTTCGTCAA	PA-1	495
PA-2	F: TTGGAAGTACGAGGAGGGAA R: GCTCGGCTCTCAATGCTTA	PA-2	530
PA-3	F: GTGAACGCCAGAATTGAGCC R: GTCAGTCAGTTACACGCT	PA-3	501
PA-4	F: GAGAACATGGCACCGGAGAA R: CCAACCTTGGGTCGGTAAGG	PA-4	484
PA-5	F: TACAGCAGAGGTGTCCTCACT R: AAGGTTCTGCACACCTTCCC	PA-5	582
PA-6	F: ATGGAAATGAGACGCTGCCT	PA-6	410

续表2

引物名称	序列(5'-3')	目的 片段	长度 (bp)
	R: AGTGCATGTGTGAGGAAGGAG		
HA-1	F: CTGGGGACAATCACTGGACC R: AACTTGTGGTCTCGCTCCTG	HA-1	474
HA-2	F: CAGGAGCGAGACCACAAGTT R: CCCTGTGCATTCTGGTGTCT	HA-2	433
HA-3	F: ACACCAGAATGCACAGGGAG R: GTGCACCGCATGTTTCCATT	HA-3	579
NP-1	F: AATGGTTAGCGGCATTGGGA R: CGGGGATCCATTCCAGTACG	NP-1	393
NP-2	F: GAGGATGCAACTGCTGTCT R: GGCTGTTTTGAAGCAGACGG	NP-2	553
NP-3	F: CCTGCTTGTGTACGGACT R: AGATGCCCTCTGTTGGTTGG	NP-3	378
NP-4	F: TGTGTCCTCAAGAGACAGCTA R: GGTTCTTGCCTTTTCCTCC	NP-4	366
NA-1	F: AGTATCGCGCCCTGATAAGC R: CCTGTTCTTCCCGTAACA	NA-1	400
NA-2	F: ATGCCCACTAGTGTTCACCG R: AGCCAAGTGTAGCCCCATC	NA-2	375
NA-3	F: GATGGGGCTAACACTTGGCT R: TTGCTGGTCCACCACACTTT	NA-3	260
NA-4	F: GAAGGGGACTGCTATCGAGC R: CCCATCAGGCCAGTTCCATT	NA-4	144
M-1	F: TTGCAGGGAAGAACCAGAT R: CATAGCCTGCACCAATTGCC	M-1	554
M-2	F: TGTGCCACTTGTGAGCAGAT R: AGGCCCTCTTTTCAAACCGT	M-2	436
M-3	F: AGGCAAATGCTGCAGGCTAT R: CAGCATTCTGCTGTTCTGCT	M-3	311
NS-1	F: ACTGTGTCAAGCTTCCAGGT R: TCGCTACAATTGCTCTCTCT	NS-1	464
NS-2	F: TGCCAGCTCCACGCTATCTA R: TCTCTGCTCCACTTCAAGC	NS-2	559

trate 2 μ l Carrier RNA 400 μ l 100% Isopropanol) , 20 μ l 磁珠混合液 (10 μ l RNA Binding Beads ,10 μ l Lysis/Binding Enhancer) 震荡 4 min ,使其充分裂解并吸附核酸 放在磁力架上 溶液变澄清后弃掉上清液 然后加入 300 μ l Wash Solution 1 (加入 100% 异丙醇) 洗涤 2 次 450 μ l Wash Solution 2 (加入 100% 乙醇) 洗涤 2 次 风干乙醇 2 min 最后用 20 μ l RNA-free Water 洗脱。

1.3.3 逆转录及 cDNA 扩增 取 1 μ l 106 号样品 RNA 进行一步法扩增 加入 25 μ l 2 \times Reaction Mix , 1 μ l 10 μ mol/L MBTuni-12 , 1 μ l 10 μ mol/L MBTuni-13 2 μ l SuperScript[®] III RT/ Platinum[®] Taq Mix , 20 μ l ddH₂O 混匀 放在 PCR 仪上 ,设置程序为:55 $^{\circ}$ C 30 min;94 $^{\circ}$ C 2 min;40 个循环 (94 $^{\circ}$ C 15 s;55 $^{\circ}$ C 30 s;68 $^{\circ}$ C 2 min);68 $^{\circ}$ C 5 min。

取 8 μl 089 号样品 RNA, 加入 1 μl 10 mmol/L dNTP mix, 1 μl 10 $\mu\text{mol/L}$ Uni12 (M), 65 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min, 冰上放置 2 min, 然后加入 2 μl 10 \times RT buffer, 4 μl 25 mmol/L MgCl_2 , 2 μl 0.1 mol/L DTT, 1 μl RNaseOUT (40 U/ μl), 1 μl SuperScript III RT (200 U/ μl), 放在 PCR 仪上, 设置程序为 25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 50 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 冰上 2 min, 最后加入 1 μl RNaseH, 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 20 min, cDNA 合成, 之后用 8 对全长引物进行 PCR 扩增。089 样品的扩增条件见表 3。

表 3 089 样品的扩增条件

基因	PCR 条件
PB ₂ 、PB ₁ 、PA	94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 35 循环 (94 $^{\circ}\text{C}$ 35 s; 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min); 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min
HA、NP、M、NA	94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 35 循环 (94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s; 43 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min); 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min
NS	94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 35 循环 (94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s; 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min); 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min

取 8 μl 024 号样品 RNA 进行反转录, 反转录用 35 对小片段引物 + 8 对全长引物, 扩增时用 35 对小片段引物, PCR 条件设置为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 35 循环 (94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s; 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min); 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。

3 个样本全部扩增完后进行电泳鉴定并分别把扩增产物混合, 用 PCR 纯化试剂盒进行纯化。

1.3.4 Ion Torrent 测序 分别取 100 ng 纯化产物, 用 Ion ShearTM Plus Reagents Kit 酶法打断 7 min, 加入 1.8 倍体积 AMPure XP Beads 纯化, 末端补平, 两端加接头, 加入 1.8 倍体积 AMPure XP Beads 纯化, E-Gel 胶选择片段 (约 390 bp), PCR 扩增, 加入 1 倍体积 AMPure XP Beads 纯化, 2100 鉴定库的片段大小及质量, 文库构建成功以后, 取 20 μl 终浓度为 300 ng/L 的工作库进行油包水 PCR, 随后用碱法将双链 DNA 变单链, 制备模板, 最后将带有模板的微粒溶液离心使其进入到 318C 芯片的微孔中, 上机测序。

1.3.5 生物信息学分析 上机测序后经测序仪自动运行得到测序结果, 测序原始结果以图片形式保存, 测序服务器将图片形式结果解析为 sff 格式的原文件, 并 fastq 格式的测序序列数据。对 fastq 格式的测序序列进行过滤低质量序列、过短序列以及错误序列等处理。选取目前流行的 H7N9 禽流感病毒序列以及部分其他亚型的禽流感病毒序列作为参考序列, 将测序数据使用 CLC Genomic Workbench 软件比对到参考序列中, 通过覆盖参考序列的序列数量、比例以及参考序列被覆盖的长度判断样品中是

否有对应的病毒, 拼接基因组序列, 并且分析其进化, 构建系统发育树。

2 结果

2.1 逆转录后 PCR 扩增电泳鉴定 分别取 5 μl 106 号样本、089 号样本的 8 个全长扩增产物及 024 号样本的任意 8 个小片段扩增产物进行电泳鉴定, 见图 1~3。106 号样本经过凝胶电泳后可观察到明显的 8 条片段相应大小的条带, 089 号样本 M 片段没有条带, 024 号样本扩增出的条带很少。

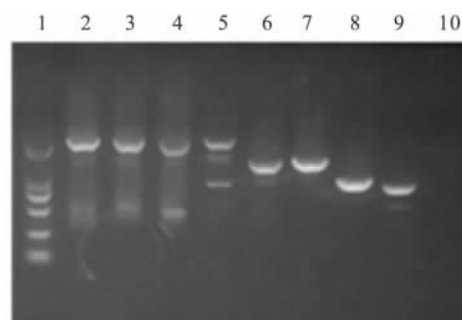


图 1 106 号样本片段扩增

1: BM2000 DNA Marker; 2: PB₂; 3: PB₁; 4: PA; 5: HA; 6: NA; 7: NP; 8: M; 9: NS; 10: 阴性对照 - 水

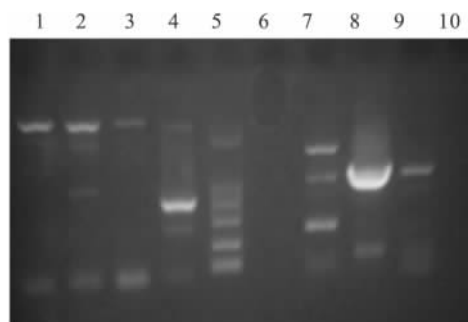


图 2 089 号样本片段扩增

1: PB₂; 2: PB₁; 3: PA; 4: NS; 5: BM2000 DNA Marker; 6: M; 7: HA; 8: NA; 9: NP; 10: 阴性对照 - 水



图 3 024 号样本片段扩增

1: BM2000 DNA Marker; 2: PB₂-2; 3: PB₁-6; 4: PA-3; 5: HA-3; 6: NP-2; 7: NA-4; 8: M-1; 9: NS-2; 10: 阴性对照 - 水

2.2 文库的 2100 鉴定 分别取 1 μL 稀释相应倍数(5 ~ 500 ng/L) 的 3 个样本文库, 加入到 2100 芯片中, 对 DNA 库进行片段大小鉴定及浓度测定, 见图 4 ~ 6。106 号样本稀释 10 倍后片段大小为 366

bp, 浓度为 52 300 ng/L。089 号样本稀释 20 倍后片段大小为 383 bp, 浓度为 36 900 ng/L。024 号样本稀释 50 倍后片段大小为 360 bp, 浓度为 17 200 ng/L。从图中可以看出 3 个库大小及浓度都符合上机要

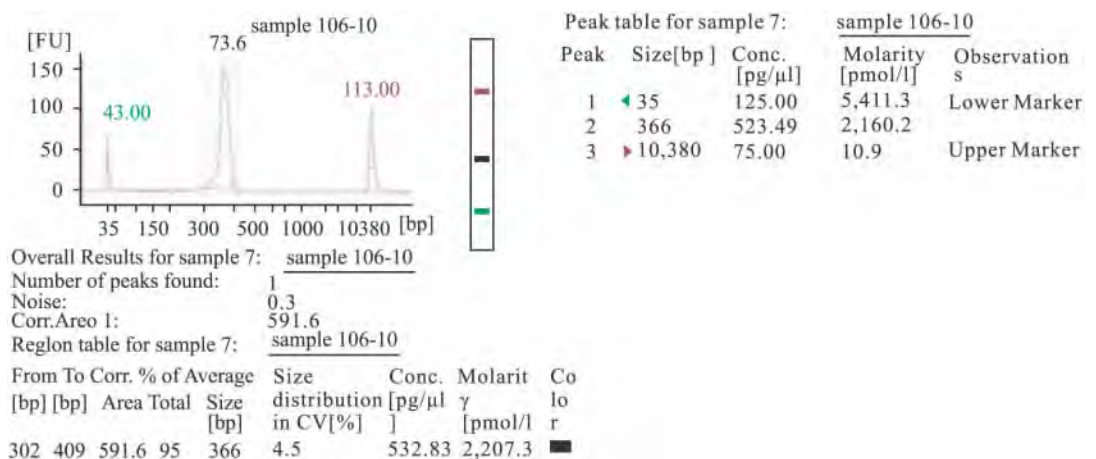


图 4 106 号样本稀释 10 倍后的鉴定

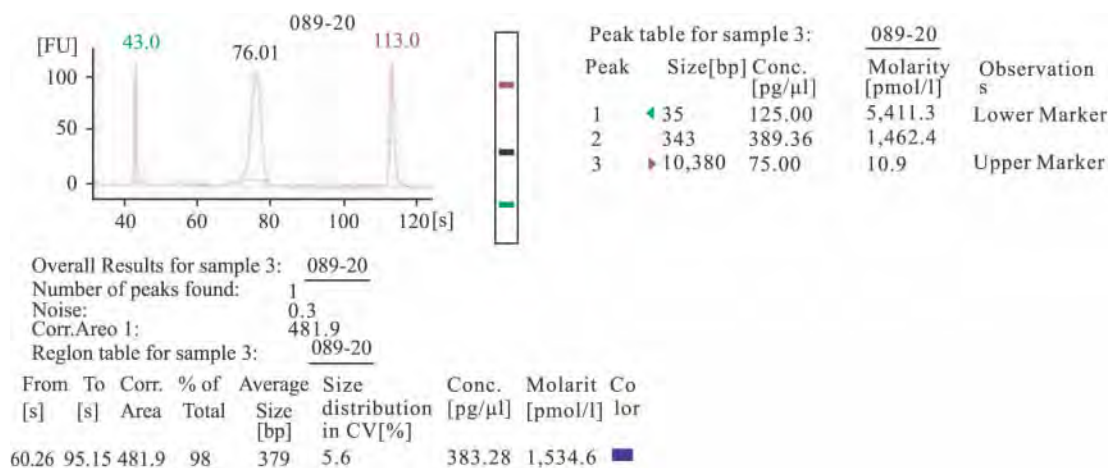


图 5 089 号样本稀释 20 倍后的鉴定

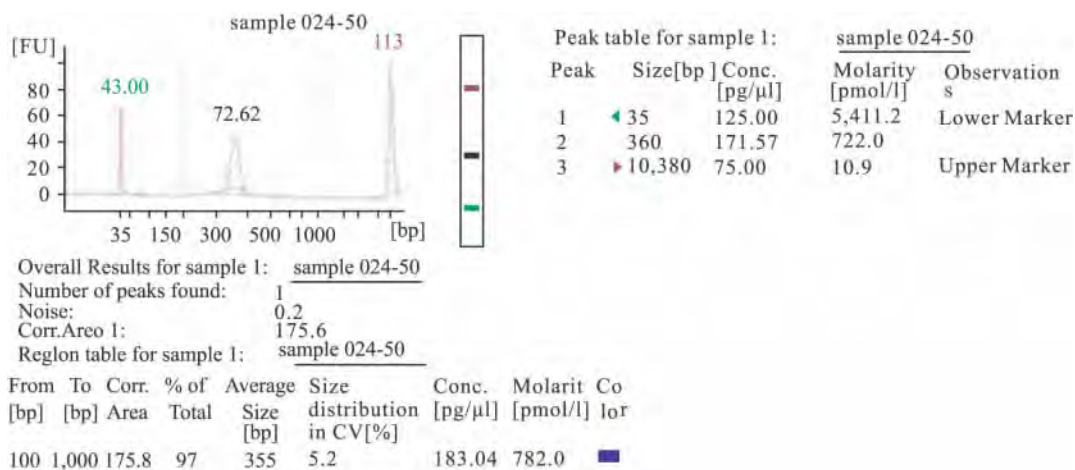


图 6 024 号样本稀释 50 倍后的鉴定

求,文库构建成功。

2.3 Ion Torrent 测序 不同 CT 值的样本用高通量测序都能检测到禽流感病毒,并且病毒含量低的样本测序结果中流感病毒对应的序列较少,相比之下病毒含量较高和培养的样本流感病毒占测序结果的比例较大。106 号样本测得 386 114 条 reads,匹配 reads 数为 379 128,089 号样本测得 181 926 条 reads,匹配 reads 数为 174 130,024 号样本测得 702 696 条 reads,匹配 reads 数为 17 081。

2.4 生物信息学分析 以 A/Anhui/1/2013 (H7N9) 基因组为主要参考序列,辅助部分 H9N2 的基因组序列,将测序数据使用 CLC Genomic Workbench 软件比对到参考序列中,结果显示 3 个样本的 8 个片段都可以检测出并且可以判断其类型,106 号样本为 H9N2 禽流感病毒,089 号样本及 024 号样本均为 H9N2 与 H7N9 混合型。其中 106 号样本的 mapping 结果如图 7 所示。将 3 个样本的 HA、NA 基因序列分别经过 Blast,选取与之同源性较高的几个毒株构建系统发育树,分析之间的亲缘关系,其中 024 号样本的 HA 基因进化树如图 8、9 所示,结果显示 024 号样本的 H9 基因与选取的几个毒株不在一个分支上,亲缘关系较远,而 H7 基因与其他几个毒株在一个分支上,亲缘关系较近。

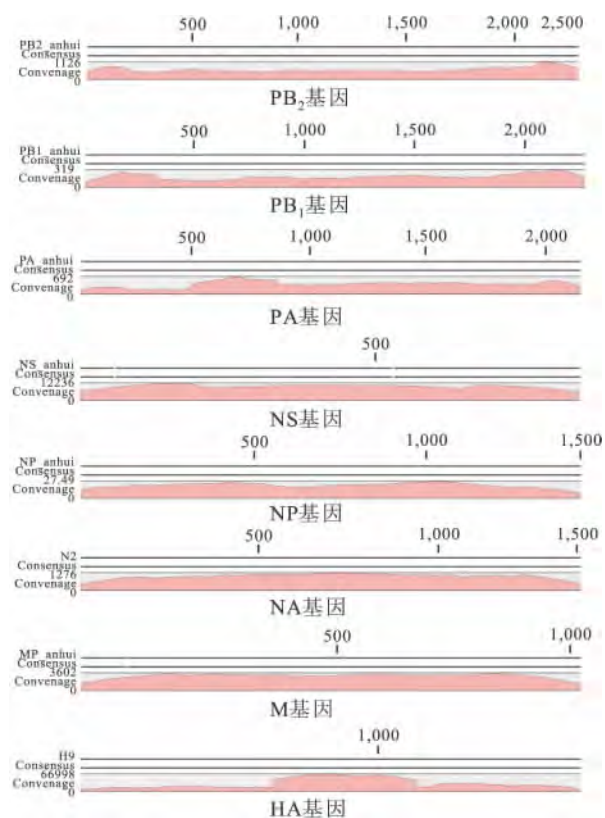


图7 106号样本 CLC 的 mapping 图



图8 024号样本的 H9 基因系统发育树



图9 024号样本的 H7 基因系统发育树

3 讨论

传统的检测流感病毒,获取基因组序列的方法是以基因特异引物扩增 8 个基因片段,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,该方法操作比较繁琐,费时,费力。自从 2005 年高通量测序仪问世以来,高通量测序技术不断的迅速发展,从通量到读长得到了极大的改善,具有标准化流水作业的文库构建流程,避免了常规实验中的细菌转化、培养以及单克隆的挑选等,而且短时间可以获得大量有效的数据,这对于快速获取病原体的全部遗传信息具有重要意义。Ion Torrent 高通量测序技术基于半导体技术,具有简单、快速、准确、灵活和低成本等显著优势,是中等规模测序项目的最佳选择。2012 年, Bowman et al^[10] 利用 Ion Torrent 高通量测序技术分析了 H3N2 基因组。

106 号样本经过鸡胚培养,浓度较高,采用一步法扩增,几乎能获得病毒基因组全长序列。089 号样本,浓度相对较低,采用上述方法,很难获得病毒基因组全长序列,8 个片段中有些片段扩增效率较高,就会获得很高的覆盖度,而扩增效率低的某些片段将无法获得理想的结果。所以,对于浓度较低的样品采用分布扩增法,即反转录后分别用特异性引物扩增 8 个片段。对于浓度极低的 024 号样本,由

于样本中模板浓度很低,并且病毒核酸不完整,用 Uni2(M) 扩增只能获得靠近 3' 端的大量产物,很难扩增出片段的全长。因此根据 H7N9 的 8 个片段设计 35 对小片段引物,在反转录过程中加入 35 对小片段引物和 8 对全长引物,使断裂的 vRNA,也能被转录成 cDNA,随后用 35 对小片段引物进行扩增,PCR 产物长度主要在 400 ~ 500 bp,相对容易得到基因组全长序列。高通量测序数据结果验证了这 3 种方法的可行性。综上所述,本研究建立了用高通量测序技术检测咽拭子标本中 H7N9 禽流感病毒的方法,无论在样本中的病毒含量高或者低,都能有充分的数据用于检出并判段其型别。相对来说,高病毒含量的样本更容易对已知病原体做出检验。

参考文献

- [1] Li C, Hatta M, Watanabe S, et al. Compatibility among polymerase subunit proteins is a restricting factor in reassortment between equine H7N7 and human H3N2 influenza viruses [J]. *J Virol*, 2008, 82(23): 11880-8.
- [2] Peiris J M, de Jong M D, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(2): 243-67.
- [3] Gambotto A, Barratt-Boyes S M, de Jong M D, et al. Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus [J]. *The Lancet*, 2008, 371(9622): 1464-75.
- [4] 朱闻斐,高荣保,王大燕,等. H7 亚型禽流感病毒概述 [J]. *病毒学报*, 2013, 29(003): 245-9.
- [5] 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): 1888-97.
- [6] Wen Y M, Klenk H D. H7N9 avian influenza virus-search and re-search [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2013, 2(4): e18.
- [7] 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): 20453.
- [8] Zhou B, Donnelly M E, Scholes D T, et al. Single-reaction genomic amplification accelerates sequencing and vaccine production for classical and Swine origin human influenza A viruses [J]. *J Virol*, 2009, 83(19): 10309-13.
- [9] Chan C H, Lin K L, Chan Y, et al. Amplification of the entire genome of influenza A virus H1N1 and H3N2 subtypes by reverse-transcription polymerase chain reaction [J]. *J Virol Methods*, 2006, 136(1-2): 38-43.
- [10] Bowman A S, Sreevatsan S, Killian M L, et al. Molecular evidence for interspecies transmission of H3N2pM/H3N2v influenza A viruses at an Ohio agricultural fair, July 2012 [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2012, 1(10): e33.

Detection of avian influenza A (H7N9) virus by high-throughput sequencing and genomic sequence analysis

Pei Guangqian^{1,2}, Fan Hang², An Xiaoping², et al

(¹Anhui Medical University Hefei 230032; ²State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology Beijing 100071)

Abstract Objective To explore the methods of high-throughput sequencing for avian influenza A (H7N9) virus detection from throat swabs. **Methods** RNA was extracted from three throat swab specimens, followed by reverse transcription, amplification of the cDNA, and then the cDNA amplicons were sequenced with Ion Torrent. Finally the sequencing data were analyzed using bioinformatics software. **Results** Avian influenza A (H7N9) virus could be detected from throat swab specimens by direct sequencing the cDNA amplicon using next-generation sequencing technique, and the genome sequences could be rapidly determined. **Conclusion** High-throughput sequencing is a powerful tool for detection of avian influenza A (H7N9) virus and the genome sequences can be analyzed using bioinformatics software.

Key words high-throughput sequencing; avian influenza A (H7N9) virus; bioinformatics analysis