

高通量测序在动物检疫中的应用进展

孙涛^{1*}, 李明哲¹, 崔淑华¹, 尹伟力²

(1. 山东出入境检验检疫局, 青岛 266002; 2. 烟台出入境检验检疫局, 烟台 264000)

摘要: 面对无法预测、爆发突然及传播迅速的疫情, 快速获知病原信息并真实地反映样品及环境中病原的多样性资料是各国卫生部门及口岸预警的核心工作之一。应用高通量测序技术全面监控研究复杂病原样品, 是协助寻找传染溯源、防控动物疫病可行性的一条重要思路。目前, 高通量测序在动物检疫上的应用与传统的病原研究方式最大的区别在于把病原微生物看成一个整体, 摆脱了对单一病原分离培养的步骤, 直接对样品基质中所有病原进行研究。随着测序技术和数据处理分析能力的飞速发展, 以高通量测序为基础的宏基因组学研究已渗透到各个领域, 在畜产品、养殖环境等样本检测方面显示了重要价值。本文对高通量测序的研究方法及在检验检疫上的应用趋势进行了综述。

关键词: 宏基因组学; 高通量测序; 动物检疫

Progress on application of high-throughput sequencing in animal quarantine

SUN Tao^{1*}, LI Ming-Zhe¹, CUI Shu-Hua¹, YIN Wei-Li²

(1. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China; 2. Yantai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 264000, China)

ABSTRACT: In the face of unpredictable, suddenly broken, rapidly spread epidemic, learning agent information quickly and reflecting the pathogens diversity of samples is one of the core work for the national health authorities and the port early warning. With the application of high-throughput sequencing technologies, monitoring complex samples comprehensively is a good idea to trace or prevent animal epidemic. At present, the biggest difference between the traditional way and the method of high-throughput sequencing in animal quarantine is that the pathogenic microorganisms is regarded as a whole, which gets rid of the cultivation of a single pathogen, and all pathogen in the matrix of the sample are directly studied. With the development of sequencing technology and the data processing analysis, metagenomics research has been applied in all fields and shows very important value, such as animal by-products, farming environment samples. This article briefly summarised the methods and application trends of high-throughput sequencing technologies in inspection and quarantine.

KEY WORDS: metagenomics; high-throughput sequencing; animal quarantine

1 引言

目前, 高通量测序技术以其通量高、速度快、测序深

度灵活等优势广泛用于样品检验研究工作。同时高通量测序具有读长短、数据量大的特点, 对于数据的处理也迎来了一个挑战, 催生出许多针对样品宏基因组特有的算法和

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局基金项目(2015IK194)

Fund: Supported by the Foundation of General Administration of Quality Supervision and Inspection and Quarantine (2015IK194)

*通讯作者: 孙涛, 高级兽医师, 主要研究方向为动物源性食品安全检测。E-mail: suntaosdcq@163.com

*Corresponding author: SUN Tao, Senior Veterinarian, Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, No.70, Qutangxia Road, Shinan District, Qingdao 266002, China. E-mail: suntaosdcq@163.com

工具^[1]。随着测序读长的增加和数据处理能力的飞速发展,可以通过各种手段将某一环境中所有病原同其他微生物区分开来,然后将测得的基因组的核酸文库同现有的数据库进行比对,从而获得样本及环境中病原的构成^[2],这里的环境可以是水体、土壤等无机环境,也可以是各种生物体组织等有机环境。该研究手段不仅可以避免传统的分离培养法、血清法和 PCR 法,迅速鉴定出存在的已知病毒,还可以有效地发现各种未知病毒^[3-5],并可以直观地描绘出各种样本中的病原谱和丰度,有助于了解病毒的分布动态,实时监测一些致病性病原和潜在致病性病原的变化情况,有助于诊断一些新发或不明病原体引发的疾病。

2 动物检疫工作中病原样本检测的主要问题

2.1 送检样本的基质及新发疫病日趋复杂化

目前在检验检疫实际工作当中,所接收的突发疫情样本呈日趋复杂态势,如进境船舶中死亡的禽类尸体、发病的炎症组织样本、粪便样本、疫苗样本以及水、土壤样本等,已经不仅仅局限于出口法检的拭子样品,所有送检样本均具有环境背景复杂、可疑病原含量丰度低、未知亚型病原不确定性大大增加等特点,使得口岸检测及国际贸易中确证新发及未知亚型病原的能力受到极大挑战。原有的常规检测技术主要局限在于:一是新病毒适宜的培养细胞未知,很难通过细胞培养方法进行分离;二是与宿主细胞相比,病毒及其核酸的含量低,而且病毒基因组序列改变或完全未知,不能通过反转录酶-聚合酶链锁反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)方法进行检测。2006 年我国发生的“猪高热综合征”和 2011 年出现的“新生仔猪腹泻”疫情,就是因为缺乏快速有效的未知病原分析鉴定技术,在很长一段时间里对病因众说纷纭,莫衷一是,疫情得不到及时有效的控制,造成疫情蔓延和巨大经济损失,影响到食品安全和国民经济发展。

2.2 样本前处理流程的复杂化

依靠目前现有的技术条件,全面确证送检样品中是否含有病原体成分还有很多技术瓶颈。如样品前处理环节,可疑病原粒子的析出与富集是否足够达到检测底线要求。面对背景复杂的样品,宿主自身庞大的基因组及环境中无关的微生物基因还会将低丰度的病原体核酸淹没。因此,为高效检测病原,前处理步骤就显得十分关键。但在以往应用各类分子生物学检测方法处理样品时,都必须先过滤掉杂质,而这些过滤技术都是基于一些固定的参数,每一次处理都会损失掉很多病原体粒子,这都会造成检出率的下降。因此在宏基因组学研究中,存在的最主要问题是样本中病原核酸的浓缩纯化。同时,为了排除游离核酸的干扰,通常添加核酸酶进行消化,但是这种消化不能达到 100% 的效果,这也会导致测序结果中出现无关序列,大量

的无关序列不仅增加了测序成本,也使后续的数据分析增加了难度。这是高通量测序存在的最主要问题,但同时又是牵涉到测序结果多样性的关键问题。目前,在病毒生态学研究方面,采用低速离心、过滤和核酸酶处理对于病毒病原体的富集已有较好的方法报道^[6-8],但这种方法对于用作高通量测序的诊断样品中目的病原的富集效果却不明显^[9],要慎重选择使用。

2.3 现有检疫技术的瓶颈

以常用的荧光 PCR 技术为例,早在 2004 年,我国就认可应用荧光 PCR 等国家标准检测流感病毒等,其检疫试剂因具有快速、灵敏、易于在基层推广的优点在阻断病原传播中发挥了巨大作用。但在不可培养病毒的实验条件下,由于病毒之间缺少保守的基因标记,特异性 PCR 检测难以系统研究样品中的所有病原信息,传统的分子诊断方法在应对流感病毒的复杂亚型变异时,仅有钓鱼的技能(特异性的探针或抗体),而无撒网的手段(全部序列信息的快速获知),不可避免地造成相关的诊疗一直滞后于流行时的防控或其可能的爆发。目前 WHO 已不再认可将荧光 PCR 方法作为最终确诊的诊断方法,而推荐具有特异、准确优势的高通量基因测序技术作为诊断病原的确诊方法。典型事例即是在 2009 年国外甲型 H1N1 流感疫情爆发时,因国内标准的序列和探针特异性低造成与当时流行的甲型 H1N1 流感病毒难以明确区分,导致假阳性。且每当新型流感病毒出现时,其基因组散在多处变异,造成现有的荧光 PCR 方法不能扩增出引物及探针位置出现变异的情况,这也导致了假阴性结果的出现。

3 高通量测序在动物检疫样本分析上的应用现状

3.1 应用高通量测序解析动物检疫样本的现状

针对上述漏检问题,动物检疫样本的分析正越来越依赖于以高通量测序技术为基础的宏基因组学分析的发展^[10]。由于第一代 Sanger 测序法,通量较低,速度较慢,渐渐不能满足日益增多的数据需求。第二代高通量测序则避免了 Sanger 测序中所需的繁琐克隆过程,减小了工作量,费用也大幅降低。因此,自 2005 年底 454 公司推出革命性的高通量焦磷酸测序系统^[11,12]以来,大量类似的二代深度测序方法在未知基因组信息的情况下用于直接、无偏的病原检测^[13-15]。有些应用范围已延伸到深湖^[16]、温泉^[17]等无机环境和组织病料^[18,19]、内脏^[20]、动物排泄物^[21,22]等有机环境。高通量测序在宏基因组学上的拓展,大大提高了掌握致病性病原复合构成的能力,尽管在一些新病原的发现中没有已知公共卫生意义的病原出现,但宏基因组测序的研究无疑增加了对环境及中间宿主携带病毒多样性的了解,一旦有新发病出现,通过宏基因组学研究,其生物预警的

意义也将极大体现。

早在2013年,Ge等^[23]与杨凡力等^[24]就曾在研究中国蝙蝠带毒的自然本底时,应用宏基因组学分析技术注释到了36个病毒科,建立了野生动物源人兽共患病的监测方法。韩文等^[25]利用宏基因组学理念,通过大规模测序及序列分析获取了猪群样本中未知的6种病毒基因序列。Minakshi等^[26]则从印度山羊体内测得了19185 bp的病毒宏基因组序列,鉴定到了16种血清型的蓝舌病毒。在当前病毒性人兽共患病频发的情况下,病毒宏基因组学的推广大大满足了对环境及中间宿主病毒组系统研究的要求,为预防新疾病出现和已知病毒的变异提供了重要的警示。

3.2 高通量测序数据的生物信息学分析

对第二代测序平台产生的高通量序列片段进行比对的方法一般分为两步:①预处理;②序列比对。预处理方法有2类,即基于哈希表的方法和基于后缀trie的Burrows-Wheeler转换思想^[27-29]。序列比对方法也可分为2类,一是空位种子片段索引,二是Smith-Waterman动态规划算法。杨焱等^[30]使用Illumina和SOLiD 2种平台产生的数据对常用的比对软件SHRiMP、MAQ、BFAST、BWA、BOWTIE等进行了单机测试,结果显示BOW-TIE在对Illumina平台数据进行比对时,在内存使用、比对速度以及准确性等方面表现比其他几种好,BWA比较适合用于比对SOLiD平台产生的数据。在处理第二代以及以纳米孔技术为标志的第三代测序平台高通量数据时,第二代比对技术仍不能完全满足要求。以云计算为基础的新序列比对方法将是未来研究和发展的一个重要方向。

总而言之,高通量测序的数据分析都要取决于应用的类型、测序样本的类型以及要解决的生物问题^[31,32]。但目前仍然还有很多技术瓶颈,譬如其读长普遍较短,虽然它们的测序深度可以在一定程度上弥补读长较短所带来的问题,但在测序后得到的信息往往是海量的,如何从这些海量数据中挖掘有效信息,成为宏基因组学研究的一大难题。通常宏基因组数据在运算组装时,越是短的读长用它们进行拼接就需要越高的覆盖率,但过高的覆盖率则会使拼接的复杂性大大增加,同时也加大了运算量。针对这些问题,Illumina,Applied Biosystem等公司对全基因组“shotgun”(又称鸟枪法)测序数据进行了拼接算法和软件开发生的研究。主要过程就是把读长分组为重叠群(contigs),把重叠群又分组为支架(scaf-folds,即超级重叠群或巨型重叠群),使重叠群以读长形式进行多重排列,并且形成共同序列,而支架则规定了重叠群的方向和顺序以及它们之间缺口的大小。这其中充分运用了各种参数如适度的覆盖率、paired-end数据等,大大提高了拼接效率。以上这些改进在快速查检2011年5月德国北部志贺毒素诱发的大肠杆菌疫情方面发挥了关键作用^[33],仅耗时7.3 h,研究人员就对此一严重的公共健康风险做出了快速响应。

此外,实验样本的meta信息也需要与序列数据整合,高效率的数据存储、提取乃至共享也成为高通量测序分析必不可少的环节。在美国国立生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的诸多数据库中,传统测序数据(如毛细管电泳产生的测序数据)的存储有Trace Archives数据库,但不适合存储高通量测序数据;为此,NCBI在2007年底推出了SRA(sequence read archive)数据库,专门用于存储、显示、提取和分析高通量测序数据。现在随着序列数据的迅速累积、涉及多平台、多物种、多种应用、分层次的SRA数据库已初具规模。其中仅甲型流感病毒一项信息数据已达5868条,但相对于传统核酸信息数据的312152条来说,还有很大潜力可挖。

3.3 在解析病原亚型上的应用

以甲型流感为例,全基因组测序对了解流感病毒的分子生物学特性、基因重配机制、准种分析等发挥了十分重要的作用。传统的方法在监测病毒基因组进化时依然采用Hoffmann等^[34]设计的引物,扩增流感病毒基因组全长,或者以每个基因的特异引物扩增8个基因节段的片段,进行克隆并实施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。Greninger等^[35]率先应用新一代高通量测序法从一个北美患者的样品中测得了覆盖97%的甲型流感病毒的全基因组序列,证实了该病原为甲型H1N1样本。此后,陆续有学者应用二代测序方法检测到了不同亚型的A型流感病毒^[36-41]。Lin等^[42]改进了针对流感病毒的测序方法,没有应用特异性的PCR引物进行扩增,而是直接应用采自感染流感病毒的雪貂肺部RNA样本进行测序,结合Bowtie2比对程序,解决了病毒分型的问题。

3.4 在样本功能基因注释中的应用

目前为止,从一些有价值的样本宏基因组文库中已经注释到了相当多的新编码基因,如生物催化剂基因、抗生素抗性基因以及编码转运蛋白基因等^[43-45]。其基本方法均以活性测定为基础,通过建立和优化合适的筛选方法,从基因库中获得所需特征的克隆。例如对具有特殊功能的克隆子进行直接检测,利用其在选择性培养基上(如含有化学染料和不可溶的或发光的酶反应底物)的表型特征进行筛选,这种方法具有较高的灵敏度,使得较少的克隆子都能被检测到。另一种方法是基于异源基因的宿主菌株与其突变体在选择性条件下功能互补生长的特性进行的。通过功能性筛选的方法可以快速地从多个克隆子中鉴定出全长基因,并由此获得这些功能基因的产物,为工业、医药和农业提供了一些具有潜在活性的天然产物或蛋白质。Courtois等^[46]就曾利用柯斯载体构建了含5000个克隆子的环境基因组文库,并采用PCR序列分析的方法,筛选出编码聚酮合成酶的新基因;Yun等^[47]选用pUC19为克隆载体

构建大肠杆菌基因组文库,利用活性筛选方法从30000个重组子中筛选出一个含淀粉酶基因(amyM)的克隆子。然而随着方法和技术的改进,现在只需构建少量克隆子就能得到新基因,如Voget等^[48]利用培养和直接筛选相结合的方法快速地鉴定出4个克隆子中含有12个可能编码琼脂水解酶的基因。

3.5 在解析样本群落进化特征上的应用

梅运军^[49]通过对环境样本提取总DNA构建PCR扩增子真菌ITS文库,并利用Illuminate Miseq双末端测序以及生物信息学软件分析样本的 α -、 β -生物多样性。样本经Illuminate Miseq平台获得了153363条Filter reads,506个OTUs。样本中包含子囊菌门、罗兹菌门(Rozellomycota)、担子菌门、球囊菌门、结合菌门、壶菌门和未分类的真菌,取得了恩施富硒区真菌群落结构与硒含量相关的结论,并判定炭角菌属、拟青霉属、叉四枝孢属、杯梗孢属和明梭孢属为该富硒区的优势真菌属。2016年, Ma等^[50]对秦皇岛水产养殖基地的超微型浮游生物各个类群进行了多样性研究,发现海水生态系统中超微型浮游生物的丰度和多样性对褐潮的发生具有较高敏感性,为消解褐潮的机制提供了新的角度和思路。

4 总结与展望

近几年高通量测序技术的应用拓展并深化了科学研究领域的视野。(1)通过基因的核酸序列,已经鉴定出了大量的目标病原基因,为相应的蛋白序列及基因功能研究提供了捷径。(2)基因多态性等信息的获得对遗传图谱的绘制、基因克隆、进化关系的理解更为透彻,从而促进了对病原群落中生物多样性的研究。(3)高通量测序技术提高了实验技术的准确性,尤其是对低丰度病原的复杂样本,通过大量数据的解析可有效发现未知病原,防止漏检。(4)高通量测序技术在灵敏性、可操作性方面的优势将会拓宽动物检疫研究领域的发展,其对数据处理的轻便性也会大大促进病原演变的基础研究和比较基因组学研究。

因此,应用高通量测序辅以宏基因组学的数据解析可有效获知病原信息,真实地反映样品及环境中病原的多样性资料,是将来全面监控研究饲养、屠宰、运输、加工等环节的复杂病毒样品并协助寻找传染溯源的有效手段。作为防控动物疫病传播可行性的一条重要思路,深化宏基因组学解析的研究将是我们下一步亟待解决的工作难点。

参考文献

- [1] Koduru SV, Tiwari AK, Leberfinger A, *et al.* A Comprehensive NGS data analysis of differentially regulated miRNAs, piRNAs, lncRNAs and sn/snoRNAs in triple negative breast cancer [J]. J Cancer, 2017, 8(4): 578–596.
- [2] Edwards RA, Rohwer F. Viral metagenomics [J]. Nat Rev Microbiol, 2005, 3(6): 504–510.
- [3] Capobianchi MR, Giombini E, Rozera G. Next-generation sequencing technology in clinical virology [J]. Clin Microbiol Infect, 2013, 19(1): 15–22.
- [4] Smits TH, Guerrero-Prieto VM, Hernandez-Escarcega G, *et al.* Whole-genome sequencing of *Erwinia amylovora* strains from Mexico detects single nucleotide polymorphisms in rpsL conferring streptomycin resistance and in the avrRpt2 effector altering host interactions [J]. Genome Announc, 2014, 2(1): 1213–1229.
- [5] Aflitos S, Schijlen E, Jong H, *et al.* Exploring genetic variation in the tomato (*Solanum* section *Lycopersicon*) clade by whole-genome sequencing [J]. Plant J Cell Mol Biol, 2014, 80(1): 136–148.
- [6] Duhaime AC, Beckwith JG, Maerlender AC, *et al.* Spectrum of acute clinical characteristics of diagnosed concussions in college athletes wearing instrumented helmets: clinical article [J]. J Neurosurg, 2012, 117(6): 1092–1099.
- [7] Duhaime MB, Deng L, Poulos BT, *et al.* Towards quantitative metagenomics of wild viruses and other ultra-low concentration DNA samples: a rigorous assessment and optimization of the linker amplification method [J]. Environ Microbiol, 2012, 14(9): 2526–2537.
- [8] Duhaime MB, Sullivan MB. Ocean viruses: rigorously evaluating the metagenomic sample-to-sequence pipeline [J]. Virology, 2012, 434(2): 181–186.
- [9] Hall RJ, Wang J, Todd AK, *et al.* Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery [J]. J Virol Methods, 2014, 195(1): 194–204.
- [10] Solonenko SA, Ignacio-Espinoza JC, Alberti A, *et al.* Sequencing platform and library preparation choices impact viral metagenomes [J]. BMC Genomics, 2013, 14(5): 320.
- [11] Rogers YH, Venter JC. Genomics: massively parallel sequencing [J]. Nature, 2005, 437(7057): 326–327.
- [12] Sandmann S, de Graaf AO, van der Reijden BA, *et al.* GLM-based optimization of NGS data analysis: A case study of Roche 454, Ion Torrent PGM and Illumina NextSeq sequencing data [J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0171983.
- [13] Djikeng A, Kuzmickas R, Anderson NG, *et al.* Metagenomic analysis of RNA viruses in a fresh water lake [J]. PLoS One, 2009, 4(9): e7264.
- [14] Frey KG, Herrera-Galeano JE, Redden CL, *et al.* Comparison of three next-generation sequencing platforms for metagenomic sequencing and identification of pathogens in blood [J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 96.
- [15] 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.
- [16] Steward GF, Preston CM. Analysis of a viral metagenomic library from 200 m depth in Monterey Bay, California constructed by direct shotgun cloning [J]. Virol J, 8(6): 287–300.
- [17] Schoenfeld T, Patterson M, Richardson PM, *et al.* Assembly of viral metagenomes from Yellowstone hot springs [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(13): 4164–4174.
- [18] Shan T, Lan D, Li L, *et al.* Genomic characterization and high prevalence of bocaviruses in swine [J]. PLoS One, 6(4): e17292.
- [19] Ng TF, Manire C, Borrowman K, *et al.* Discovery of a novel single-stranded DNA virus from a sea turtle fibropapilloma by using viral metagenomics [J]. J Virol, 2009, 83(6): 2500–2509.

- [20] Day JM, Ballard LL, Duke MV, *et al.* Metagenomic analysis of the turkey gut RNA virus community [J]. *Virol J*, 2010, 7 (1): 313–321.
- [21] Li L, Victoria JG, Wang C, *et al.* Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses [J]. *J Virol*, 2010, 84(14): 6955–6965.
- [22] Zhang T, Breitbart M, Lee W H, *et al.* RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses [J]. *PLoS Biol*, 2006, 4(1): e3.
- [23] Ge X, Li Y, Yang X, *et al.* Metagenomic analysis of viruses from bat fecal samples reveals many novel viruses in insectivorous bats in China [J]. *J Virol*, 2012, 86(8): 4620–4630.
- [24] 杨凡力, 王意银, 郑文成, 等. 中国部分地区蝙蝠携带病毒的宏基因组学分析[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(5): 586–600.
- Yang FL, Wang YY, Zheng WC, *et al.* Metagenomic analysis of bat virome in several regions of China [J]. *Chin J Biotech*, 2013, 29(5): 586–600.
- [25] 韩文, 罗玉子, 赵碧波. 基于宏基因组学的猪群样本病毒探测方法的建立[J]. *微生物学报*, 2013, 53(2): 197–203.
- Han W, Luo YZ, Zhao BB. Metagenomics-based detection of swine viruses [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2013, 53(2): 197–203
- [26] Minakshi P, Singh R, Ranjan K, *et al.* Complete genome sequence of bluetongue virus serotype 16 of goat origin from India [J]. *J Virol*, 2012, 86(15): 8337–8338.
- [27] Girardot C, Scholtalbers J, Sauer S, *et al.* Je, a versatile suite to handle multiplexed NGS libraries with unique molecular identifiers [J]. *Bmc Bioinform*, 2016, 17(1): 419–424.
- [28] Kilian B, Graner A. NGS technologies for analyzing germplasm diversity in genebanks [J]. *Brief Funct Genom*, 2012, 11(1): 38–50.
- [29] Teng S. NGS for sequence variants [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 939(11): 1–20.
- [30] 杨辉, 刘娟. 第二代测序序列比对方法综述[J]. *武汉大学学报: 理学版*, 2012, 58(5): 463–470.
- Yang Y, Liu J. The survey of sequence alignment methods based on the second generation sequencing [J]. *J Wuhan Univ: Sci Ed*, 2012, 58(5): 463–470.
- [31] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. *Nat Methods*, 2010, 7(5): 335–336.
- [32] Fosso B, Santamaria M, Marzano M, *et al.* BioMaS: a modular pipeline for Bioinformatic analysis of Metagenomic AmpliconS [J]. *BMC Bioinform*, 2015, 16(7): 203–213.
- [33] Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, *et al.* Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22751.
- [34] 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.
- [35] Greninger AL, Chen EC, Sittler T, *et al.* A metagenomic analysis of pandemic influenza A (2009 H1N1) infection in patients from North America [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13381.
- [36] Chan CH, Lin KL, 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.
- [37] Ghedin E, Laplante J, DePasse J, *et al.* Deep sequencing reveals mixed infection with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus strains and the emergence of oseltamivir resistance [J]. *J Infect Dis*, 2011, 203(2): 168–174.
- [38] Hoper D, Hoffmann B, Beer M. A comprehensive deep sequencing strategy for full-length genomes of influenza A [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19075.
- [39] Jiao P, Cao L, Yuan R, *et al.* Complete genome sequence of an H10N8 avian influenza virus isolated from a live bird market in Southern China [J]. *J Virol*, 2012, 86(14): 7716.
- [40] Kuroda M, Katano H, Nakajima N, *et al.* Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer [J]. *PLoS One*, 2010, 5(4): e10256.
- [41] Wang KC, Chen GQ, Jiang WM, *et al.* Complete genome sequence of a hemagglutination-negative avian paramyxovirus type 4 isolated from china [J]. *Genome Announc*, 2013, 1(2): e0004513.
- [42] Lin Z, Farooqui A, Li G, *et al.* Next-generation sequencing and bioinformatic approaches to detect and analyze influenza virus in ferrets [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2014, 8(4): 498–509.
- [43] Daniel R. The metagenomics of soil [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(6): 470–478.
- [44] Lorenz P, Liebeton K, Niehaus F, *et al.* Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13(6): 572–577.
- [45] Riesenfeld CS, Goodman RM, Handelsman J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes [J]. *Environ Microbiol*, 2004, 6(9): 981–989.
- [46] Courtois S, Cappellano CM, Ball M, *et al.* Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(1): 49–55.
- [47] Yun J, Kang S, Park S, *et al.* Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(12): 7229–7235.
- [48] Voget S, Leggewie C, Uesbeck A, *et al.* Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(10): 6235–6242.
- [49] 梅运军. 富硒矿区真菌群落特征初步研究[J]. *生物技术*, 2017, 34(1): 53–57.
- Mei YJ. Preliminary studies of fungal community features in selenium-rich [J]. *Biotechnol*, 2017, 34(1): 53–57.
- [50] Ma Y, Wang M, XIA J, *et al.* Studies on abundance and diversity of microplankton during brown tide around Qinhuangdao area [J]. *Period Ocean Univ China*, 2016, 46(6): 142–150.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



孙涛, 高级兽医师, 主要研究方向为动物源性食品安全检测。
E-mail: suntaosdcq@163.com