

# 基因测序技术助力传染病防控

李文杰 王彦杰 赵兴丰 赵丽红 霍春玲 程晓波  
邯郸科技职业学院

DOI:10.12238/bmtr.v6i5.10066

**[摘要]** 传染病由病原体引起,可引发重大公共卫生安全事件。在传染病疫情防控中,速度和效能尤为重要。随着分子生物学的发展,基因测序技术在病原检测中发挥着至关重要的作用,已成为传染病防控中的重要一环。因此,本课题对测序技术的发展进行概述,对其在传染病防控中的应用进行总结分析,旨在强化相关技术发展方向的前瞻性布局,提高科技研发中资源配置的有效性。

**[关键词]** 基因; 测序技术; 传染病

**中图分类号:** R51 **文献标识码:** A

## Gene sequencing technology helps in the prevention and control of infectious diseases

Wenjie Li Yanjie Wang Xingfeng Zhao Lihong Zhao Chunling Huo Xiaobo Cheng  
Handan Vocational College of Science and Technology

**[Abstract]** Infectious diseases are caused by pathogens and can cause major public health security incidents. In the prevention and control of infectious disease epidemics, the speed and effectiveness of infectious diseases are particularly important. With the development of molecular biology, gene sequencing technology plays a vital role in pathogen detection and has become an important part in the prevention and control of infectious diseases. Therefore, this topic summarizes the development of sequencing technology, summarizes and analyzes its role in the prevention and control of infectious diseases, aiming to strengthen the forward-looking layout of the development direction of related technologies, and improve the effectiveness of resource allocation in scientific and technological research and development.

**[Key words]** gene; sequencing technology; infectious disease

### 前言

传染病由病原体引起,能在宿主间传播,传染病引起的突发公共卫生事件严重影响了人类的生命健康。在重大传染病疫情防控中,速度和效能尤为重要,特别是传染病病原体的识别速度;基因突变位点的识别准确度等。科研创新已成为快速、高效进行传染病防控的重要技术保障。基因测序技术已成为传染病防控中的重要一环,在病原检测、基因突变位点识别等环节中发挥着至关重要的作用。因此,本课题对测序技术进行总结分析,旨在强化相关技术发展方向的前瞻性布局,提高科技研发中资源配置的有效性,以期提升应对重大传染病疫情的技术储备。

### 1 基因测序技术的发展概述

基因测序技术发展至今,已有70多年。人类基因组学计划的完成,加速了基因测序技术的发展,从高成本、高耗时,到成本低、高通量,速度快发展的同时,在临床实践和基础研究中的应用更加广泛,在传染病防控中的作用日益凸显。

1.1 第一代基因测序技术。化学裂解法由MAXAM和GILBERT<sup>[1]</sup>提出,利用化学试剂对碱基进行特异性修饰,使磷酸二酯键断裂,

并对5'端磷酸基进行放射性标记,随后通过凝胶电泳进行分离,从而获得目的片段。该方法能够检测双链DNA,且不受因酶反应效率不同造成的误差影响。

但化学裂解法操作繁琐,化学试剂毒性大,放射性同位素标记效率偏低。因此,Sanger双脱氧链终止法应运而生。该方法由ddNTP与dNTP共同参与,在DNA的复制过程中,由于ddNTP不能参与DNA的复制过程,从而使DNA复制结束,产生不同长度的复制链,经电泳分离后,通过统计获得DNA序列<sup>[2]</sup>。

1.2 第二代基因测序技术。第二代DNA测序技术又称下一代测序技术,涵盖了多个测序平台。

454测序技术能够实时检测DNA序列,其原理是将dNT参与的PDNA复制过程与化学信号相关联,通过检测荧光素酶是否产生荧光以及荧光强弱实现测序,能够进行较长长度的准确读取。Solexa测序技术将待测的DNA片段吸附在透明的玻璃表面,首先进行桥式扩增,随后以扩增后的DNA片段为模板,利用带有荧光标记的脱氧核糖核苷酸再次进行扩增,进而进行测定。与454焦磷酸主要不同在于,连接寡核苷酸的流通槽代替了含有微

珠的芯片,终止末端使用的是染料而不是焦磷酸<sup>[2]</sup>。2007年ABI公司推出SOLiD测序技术,与传统测序技术相比,该技术基于连接酶法,边连接边测序,而非边合成边测序。

1.3第三代基因测序技术。第一代测序技术因成本高、通量低,应用受限。第二代测序技术虽然具备了高通量、低成本的优势,但其短读长的短板不容忽视。因此,科研人员对基因测序技术进一步创新,开发出第三代基因测序技术(Third generation sequencing, TGS)。

第三代基因测序技术不需进行PCR扩增,不仅具有高通量、超长读长的优势,而且实现了DNA或RNA的全长测序和全基因组覆盖<sup>[3]</sup>。第三代测序技术主要包括Heliscope单分子测序、实时单分子测序技术(Single-molecule real-time sequencing, SMRT)和纳米孔测序技术(Oxford nanopore technologies, ONT)<sup>[4]</sup>。

其中Heliscope单分子测序技术于2003年提出,虽实现了单分子测序,但并未真正解决二代测序的技术短板。SMRT技术在2011年推出,该测序需要的样品量较少,同时减少了试剂的使用,降低了成本,节省了时,其单分子读取长度可达10kbp,对复杂区域如富GC区、大量串联重复区等的测序结果也具有重要参考价值<sup>[5,6]</sup>。虽然其测序精准率受聚合酶有效工作时间影响<sup>[7-9]</sup>,但通过重复测序可减少测序误差。SMRT能够实现各类基因变异信息的精准检测,具有较好的临床应用前景。

ONT技术无需聚合酶参与,以纳米孔可作为传感器,当DNA经过纳米孔的时候,会使孔内的电流发生短暂的变化,从而根据电流变化强度直接对解链后的DNA单链进行测序。但在测序过程中,碱基前进速度等带有随机性,间隔太短时碱基识别易错失,导致存在较高错误率,限制了纳米孔测序结果价值。因此,不少学者在优化测序体系与开发分析算法等方面着手,对纳米孔测序结果进行校正,显著提高了单序列读长准确度<sup>[10,11]</sup>。

## 2 基因测序技术在传染病防控中的应用

2.1病原监测。目前,我国已形成较为完善的传染病常规监测体系,依靠分子生物学技术、网络信息化、大数据等技术手段为人们的生命安全提供保障。

通过常规化病原监测,可及时掌握当前病原的流行趋势。以流感病毒为例,流感是第一个实行全球监测的传染病,目前主要的流感病毒有甲型、乙型、丙型和丁型流感病毒四种,常发生一定程度的变异。世界卫生组织根据流感监测情况,定期发布流感病毒毒株流行类别,确保疫苗能够针对最有可能流行的毒株发挥作用。可见,测序技术的运用为分析流感病毒的变异情况、流行趋势及高效使用疫苗提供了可靠的数据支撑。

与流感病毒相比,新型冠状病毒更易变异,传播力强,致病性高。特别是一些变异株,如德尔塔、奥密克戎等,在传播能力、致病性和免疫逃逸能力等方面发生了显著变化。新型冠状病毒在新冠肺炎疫情之后被我国纳入传染病监测体系。通过对新冠病毒样本的测序,可及时发现病毒的基因突变位点,有助于了解变异株的传播能力、致病性等特征的变化,为疫情防控策略的制定提供科学依据。

蚊子是重要的病原传播媒介之一,但其携带的病原不易检出。Batovska等<sup>[12]</sup>直接从白纹伊蚊中提取RNA,利用测序技术对反转录产物进行测序,成功获得了病毒基因组全长。随后,不同研究者利用库蚊样本测序,检测到委内瑞拉脑膜炎病毒,并基于序列分析确定为大沼泽地病毒亚型<sup>[13]</sup>。并且,该方法无需额外PCR扩增,小型化、便携式测序仪即可在现场快速开展工作,完成测序和种属鉴定,为常态化监测及疫情的早期发现和处置争取宝贵时间。

2.2病原检测及基因突变分析。目前,已知病原体的监测体系,已较为完善。而不明原因疾病和未知病原增加了临床诊断难度,样本测序与传统实验室诊断相结合对病原检测日益重要。例如,2019年12月下旬,武汉出现不明原因肺炎病例。排除流感、腺病毒等常见病原后无法确定致病病原,随后相关研究者利用二代测序技术成功获得该病原体的基因组序列,并分离出病毒毒株,确定该病原体属于一种新型冠状病毒<sup>[14,15]</sup>,在疫情病原体的认定方面取得重大进展,虽然疫情初期,核酸检测是主要的检测手段,但基因测序技术可以为病毒的诊断和检测提供更深入的信息,可及时掌握病毒的变异位点、变异类型等,加速了人们对包括阿尔法、贝塔、德尔塔等在内的多种新冠变异株的识别,为疫情的定性和防控方向的确定提供了最根本的依据。此外,河南曾于2007-2010年暴发发热伴血小板减少综合征(Fever, thrombocyte-penia and leukopenia syndrome, FTLS)疫情,初始传统的分析检测方法检测到了黄病毒科、日本脑炎病毒等可能微生物,但对于致病的病原无法确定<sup>[16]</sup>。Xu等<sup>[16]</sup>对患者样本进行基因组测序及比对后发现其与已知布尼亚病毒科具有遗传相似性,是布尼亚病毒科白蛉病毒属的新成员。可见,在一些复杂病例中,基因测序可以帮助确定病毒的存在和类型,辅助核酸检测结果的解读,提高诊断的准确性。这对于评估病毒变异对传染性、致病性以及疫苗和药物有效性的影响至关重要,为及时调整防控措施和研发策略提供了可靠依据。

不仅如此,基因测序技术能够得到病原全部基因信息,更深层次的探究病原感染原因。以埃博拉病毒为例,一名患者治愈出院后再复发,PCR检测到了埃博拉病毒,但无法确定是否是原病毒感染,经基因组测序后显示,该序列与初次发病的序列存在两个非编码区的变化<sup>[17]</sup>。提示,博拉病毒具有复发性。

2.3疫情溯源。基因溯源是疫情防控中的重要环节之一,通过测序构建系统发生树等可以对病原进行追溯。2014-2016年,西非爆发埃博拉疫情,Loman团队<sup>[18]</sup>通过测序,发现几内亚流行的病毒也出现于塞拉利昂,提示病毒在2个国家之间传播。对利比里亚的样本测序发现,利比里亚地区序列属于同一簇,进化分析结果显示该地区的埃博拉病毒可能由同一个或亲缘关系较近的祖先进化而来,为疫情防控提供了重要的科学依据。

2016年寨卡病毒疫情暴发,研究者通过对孕妇患者的羊水样本进行高通量测序,获得了该病毒的全基因组,表明寨卡病毒可以穿过胎盘屏障感染胎儿,全基因组系统发育分析显示其与法属波利尼西亚的寨卡病毒具有97-100%的相似度。而Faria等

发起的“巴西寨卡病毒实时分析计划”,发现疫情毒株与来自东南亚及太平洋地区的寨卡病毒亚洲基因型亲缘关系较近,推测寨卡病毒从巴西东北部向中美洲、加勒比海及南美洲其他地区传播,及时的基因溯源为找到病原体潜在的传播途径,确定和切断感染源,提供了重要依据。

### 3 总结与展望

自19世纪霍乱爆发以来,人类历史上经历过黄热病、结核病、疟疾、流感等多个传染病爆发事件,人类文明的进步史也是与传染病的斗争史。从最初,被动的面对不明传染病,到如今对相关传染病进行常规监测、面对不明传染病能够及时确定病原体,展开疫苗研发、药物研发等,可见人们对传染病的防控能力在不断提高。但是,随着国际交流的不断加深,国际大融通也给传染病防控带来了巨大的困难,时效性就显得尤为关键,2019年新冠疫情的爆发恰恰印证了这一点。而测序技术在病原监测、病原体确定、突变位点判定、基因溯源等方面凸显了其不可替代的地位,对传染病防控工作尤为重要。

我国于2020年1月20日,将新型冠状病毒肺炎纳入乙类传染病管理。至此,中国目前的法定传染病有甲、乙、丙3类,共40种。其中不乏传播能力强、致病力强的疾病,我国对传染病监测工作的重视也说明了传染病防控工作仍是一个十分重要的公共卫生问题。如果不能对其进行早期识别,并给予针对性的防控措施,一旦发生传播,将形成影响严重的公共卫生事件,对人类造成巨大威胁。

因此,自第一代测序技术诞生以来,研究者通过不断地技术突破,开发出了第二代、第三代测序平台,旨在为公共卫生安全提供保障。虽然,测序技术仍有不足之处,但随着分子生物学的发展,测序平台不断推陈出新,新一代测序技术必定逐渐完善,在传染病防控中的作用将日益凸显,未来基因测序技术必将对人类健康产生重大影响。

#### [项目来源]

2023年度邯郸市哲学社会科学规划研究课题,科研创新在传染病防控中的作用研究,项目编号:2023211,主持人:李文杰。

#### [参考文献]

- [1]MAXAMA M,GOLBE R T W.A new method for sequencing NDA[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1977,74(2):560-564.
- [2]林燕敏,门振华,陈业强,等.基因测序技术发展及生物医学应用[J].齐鲁工业大学学报,2016,30(5):24-28.
- [3]沈吟琴.第三代测序技术在地中海贫血基因检测和产前诊断中的应用价值研究[D].南昌大学医学部,2023.
- [4]谭聃,欧铜.第三代测序技术的研究进展与临床应用[J].生物工程学报,2022,38(09):3121-3130.
- [5]Long J,Sun L,Gong F,etal. Third-generation sequencing: A novel tool detects complex variants in the alpha-thalassemia gene[J].Gene,2022,822:146332.
- [6]Zhuang J,Chen C,Fu W,etal.Third-Generation Sequencing

as a New Comprehensive Technology for Identifying Rare alpha- and beta-Globin Gene Variants in Thalassemia Alleles in the Chinese Population [J].Arch Pathol Lab Med,2023,147(2):208-214.

[7]Loomis EW, Eid JS, Peluso P, et al. Sequencing the unsequenceable: expanded CGG-repeat alleles of the fragile X gene[J].Genome Res,2013,23(1):121-128.

[8]Rhoads A,Au KF.PacBio sequencing and its applications [J].Genomics Proteomics Bioinformatics, 2015,13(5):278-289.

[9]Shin SC,Ahn DH,Kim SJ,etal.Advantages of single-molecule real-time sequencing in high-GC content genomes[J].PLoS One,2013,8(7):e68824.

[10]Karst SM,Ziels RM,Kirkegaard RH,etal.High-accuracy long-read amplicon sequences using unique molecular identifiers with Nanopore or PacBio sequencing[J].Nat Methods,2021,18(2):165-169.

[11]Rauluseviciute I, Drablos F, Rye MB. DNA methylation data by sequencing: experimental approaches and recommendations for tools and pipelines for data analysis[J].Clin Epigenetics,2019,11(1):193.

[12]Batovska J, Lynch S E, Rodoni B C, et al. Metagenomic arbovirus detection using MinION nanopore sequencing[J]. J Virol Methods,2017,249:79-84.

[13]Russell J A,Campos B,Stone J,etal.Unbiased strain typing of arbovirus directly from mosquitoes using nanopore sequencing: a field-forward biosurveillance protocol[J]. Sci Rep,2018,8(1):5417.

[14]Zhou P, Yang X L, Wang X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. Nature,2020

[15]Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China[J]. Nature,2020.

[16]Xu B,Liu L,Huang X,etal.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.

[17]Jacobs M,Rodger A,Bell DJ,etal.Late Ebola virus relapse causing meningoencephalitis:a case report[J].Lancet, 2016, 388(10043):498-503.

[18]Quick J,Loman N J,Duraffour S,etal.Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance[J].Nature,2016, 530(7589):228-232.

#### 作者简介:

李文杰(1985--),女,汉族,河北省邯郸市人,博士研究生,职称职务:讲师,医药卫生系副主任 研究方向:脂质代谢,传染病学,分子生物学。