

康健基因tNGS建库方案搭配华大智造 DNBSEQ测序平台赋能病原微生物和耐 药基因检测

本研究基于康健基因AccuGen病原多重检测建库试剂盒、DNBSEQ-E25以及MGISEQ-200测序平台搭配AccuGen病原微生物快速检测软件，精准解析了ZymoBIOMICS™ Microbial Community DNA Standard标准品以及肺泡灌洗液阳性样本中的病原微生物组成和丰度情况，实验结果重复性良好，不同测序仪的检测结果均较为一致，不同菌种均被准确检出。

推荐应用:病原微生物鉴定

推荐机型: DNBSEQ-E25, MGISEQ-200, DNBSEQ-G99, MGISEQ-2000

• 可检测多种微生物和耐药基因, Panel按需定制

AccuGen病原多重检测建库试剂盒基于多重PCR技术可识别临床常见的330种病原体以及150种药物耐药基因, 同时支持定制超5000重的Panel, 精准识别低丰度及相似菌株。

• AccuGen病原微生物快速检测软件可与DNBSEQ平台整合

康健基因AccuGen病原微生物快速检测分析和报告软件一体化, 可安装至DNBSEQ测序平台。

• 组合方案检测效率高

在传染病爆发或迅速蔓延的关键时期, 此组合方案能够实现病原微生物的快速鉴定, 从样本提取至报告产出仅需约11h。

• 可匹配自动化方案

华大智造可为实验流程提供自动化解方案, 能够极大的节约人工成本并提高效率。



背景介绍

近年来，传染病已经成为重大威胁人类健康的疾病之一。此类疾病由多种微生物如细菌、病毒、真菌和寄生虫等引起，给全球带来较大的疾病负担¹。为了应对这一挑战，临床上迫切需要一种既经济又高效的检测方法，以便能够对病原体进行快速鉴定并检测耐药基因。与耗时且低灵敏度的微生物培养鉴定相比，核酸检测技术无需培养即可检测出病原菌，并且检测灵敏度高。16S rRNA PCR可用于检测大多数细菌，但不能识别真菌或多种微生物混合感染，也不能定量区分污染细菌²。宏基因组高通量测序技术(mNGS)可以克服16S rRNA PCR的缺点，检测所有已知/未知病原体，可为多种微生物鉴定提供多维的定量检测结果³。然而，mNGS的无差别采样导致很难排除样本中的人源基因，造成检测成本高且对病原体或耐药基因的检测灵敏度降低的结果⁴，并且无法同时进行DNA和RNA双流程检测⁵。

基于多重PCR的靶向高通量测序技术(tNGS)可通过对预先筛选病原体的特定序列设计panel以扩增目标基因，随后通过高通量测序平台获得富集的核酸信息并通过生物信息学分析结果来鉴定病原体并获得定量结果。tNGS可以消除人源基因的干扰，可以同时兼顾DNA和RNA流程，相较于mNGS成本更低，灵敏度更高，并且支持定制化。目前该技术已用于肺部感染、脑部感染、分枝杆菌感染等病原菌的鉴定以及耐药基因的检测，并被证明具有临床应用潜力^{6,7,8,9}。

本研究利用康健基因AccuGen病原多重检测建库试剂盒搭配华大智造DNBSEQ-E25测序平台完成文库构建与测序步骤，利用AccuGen病原微生物生信分析流程将测序数据与病原微生物专用数据库进行比对并完成后续分析工作。研究表明，该产品方案可高效获得致病病原体种属以及相关抗药信息，并为感染患者提供快速精准的诊断依据和用药指导。

材料和方法

样本制备

本研究将从阳性样本中提取的新冠病毒 (SARS-CoV-2) 和呼吸道合胞 RNA 病毒 (RSV) 的 RNA 与 ZymoBIOMICS™ Microbial Community DNA Standard (货号: D6306) DNA 标准品以大约 5:1 的比例混合, 共四个重复 (以下简称为标准品样本)。同时从 3 个支气管肺泡灌洗液阳性样本中提取病菌核酸 (以下简称为真实样本), 以进行双重验证。以上核酸提取过程均利用 AccuGen 病原 DNA/RNA 共提取试剂盒完成。

文库构建和测序

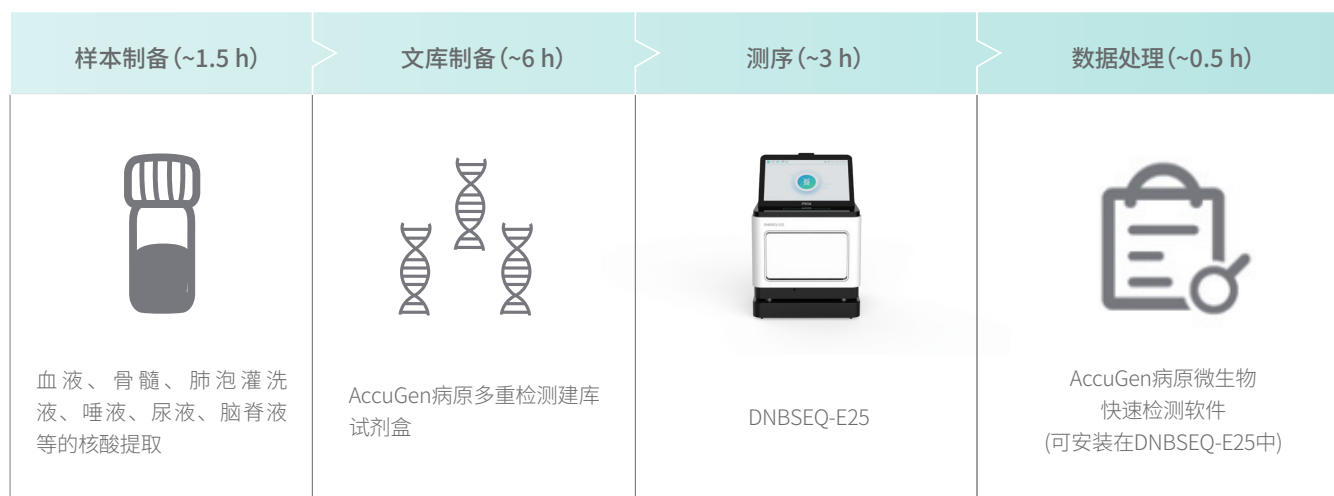
本研究采用 AccuGen 病原多重检测建库试剂盒对上述标准品样本和真实样本完成建库操作。建库过程采用两步 PCR 方法: 第一步 PCR 用于扩增靶向序列; 第二步 PCR 用于添加含有条形码序列的测序通用接头。随后利用 DNBSEQ-E25 或 MGISEQ-200 测序平台, 以单端 50bp (SE50) 的测序策略测序。

生物信息学分析

本研究利用 AccuGen 病原微生物快速检测软件 (可安装在 DNBSEQ-E25 中) 进行分析。分析流程如下: 完成原始数据质控、通过 BWA-mem 进行序列比对、随后进行病原微生物鉴定以及耐药基因检测。此软件可对样品中微生物进行定性与定量分析, 分析结果以清晰易懂的格式呈现, 报告示例如图 1 所示。

Detection Results				QC Information			
1. List of Bacteria Detected				Item	QC Parameter	Detection Results	QC Standard
Type	Name	Latin Name	Seq	Identification of pathogen	Positive control (PC)	Qualified	Qualified
G-	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>		Negative control (NC)	Qualified	Qualified	
Type G (Gram-positive bacteria) / G (Gram-negative bacteria)				Anticopy number	Detection rate of internal reference	100%	100%
				Overall evaluation of sequencing QC	Pass	Qualified	
2. List of Fungi Detected				1. Negative control (NC): Analyze the contamination of the whole detection process; 2. Artificial sequence is selected as PC, and the detection of PC can reflect whether the test is successful.			
7. List of Other Pathogen Detected				3. List of Drug Resistance Genes Detected			
Type	Name	Latin Name	Number of Sequences Detected	Relative	Gene Name	Resistant Drug Category	Gene Information
MC	<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>Chlamydia psittaci</i>	25		WZO	tetracycline antibiotics	WZO is a ribosomal protection protein that confers resistance to tetracycline antibiotics. Its genes are associated with genetic transposons and are found in both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Its resistance mechanism is mainly to protect the target of antibiotic action from the influence of antibiotic combination.
8. List of Suspected Background Microorganisms							
Type	Name	Latin Name	Number of Sequences Detected	Relative			
G+	<i>Neisseria subflava</i>	<i>Neisseria subflava</i>	400	10.00%			
G+	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	90	2.25%			
G-	<i>Haemophilus parvulus</i>	<i>Haemophilus parvulus</i>	31	0.77%			
G-	<i>Corynebacterium granulosum</i>	<i>Corynebacterium granulosum</i>	15	0.37%			

图1. tNGS 报告截图。



结果

DNBSEQ-E25可为康健基因tNGS建库方案提供高质量的测序数据

对于标准品样本，康健基因tNGS建库方案搭配DNBSEQ-E25获得27.75 M reads下机数据，平均Q30为97.85%，barcode拆分率(split rate)为95.55%。对于真实样本共获得24.66 M reads下机数据，Q30为93.65%，barcode拆分率(split rate)为95.86%。以上参数均表明此测序数据质量满足后续的生信分析要求。

样本名称	Total Reads (M)	Q30(%)	Split Rate(%)
标准品(DNA+RNA)	27.75	97.85	95.55
肺泡灌洗液样本	24.66	93.65	95.86

表1. 康健基因tNGS建库方案搭配DNBSEQ-E25得到的基础测序指标。

康健基因tNGS建库方案搭配DNBSEQ-E25可同时对DNA和RNA进行检测

本研究对四个标准品样本中的病原微生物进行检测并计算其丰度。结果显示四个样本中所有病原

体均被检出，同时未有耐药基因被检出(此处未展示)，并且额外掺入的呼吸道合胞病毒(Respiratory Syncytial Virus)相对丰度最高，符合预期。值得注意的是，每个重复样本中检测到的菌群丰度基本一致(SD 值较低)，说明此组合方案的重复性良好，并且能够同时对DNA和RNA进行检测(表2，图2)。

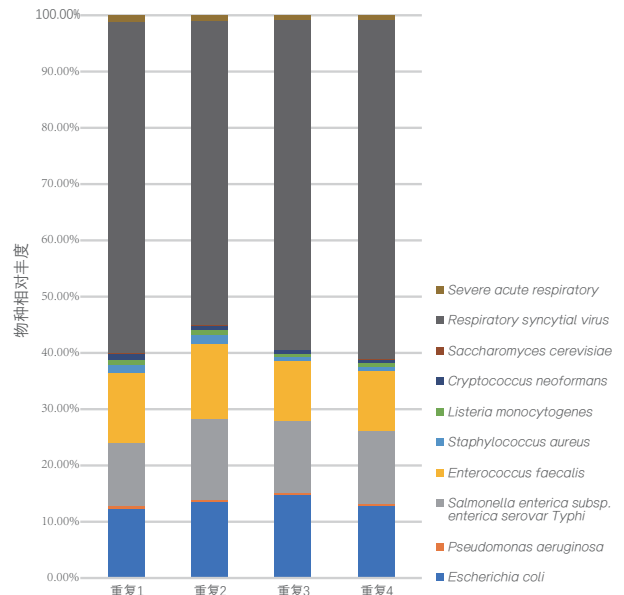


图2. 四个重复样本中的检测到的病原微生物相对丰度。

类型	病菌名称	相对丰度					
		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	均值	SD
G-	<i>Escherichia coli</i>	12.36%	13.44%	14.73%	12.89%	13.36%	0.010
G-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.45%	0.50%	0.34%	0.35%	0.41%	0.001
G-	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi</i>	11.22%	14.41%	12.79%	12.91%	12.83%	0.013
G+	<i>Lactobacillus fermentum*</i>	--	--	--	--	--	--
G+	<i>Enterococcus faecalis</i>	12.50%	13.27%	10.76%	10.56%	11.77%	0.013
G+	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.43%	1.56%	0.76%	0.88%	1.16%	0.004
G+	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.94%	0.86%	0.58%	0.60%	0.75%	0.002
G+	<i>Bacillus subtilis*</i>	--	--	--	--	--	--
F	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0.90%	0.78%	0.55%	0.62%	0.71%	0.002
F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.17%	0.12%	0.10%	0.10%	0.12%	0.000
V	<i>Respiratory syncytial virus**</i>	58.92%	54.00%	58.66%	60.35%	57.98%	0.028
V	<i>Severe acute respiratory**</i>	1.11%	1.05%	0.72%	0.74%	0.91%	0.002

表 2. 每个重复样本中检测到的微生物丰度。*代表非引物设计区域内的物种；**代表添加到微生物标准品中的病毒。G+代表革兰氏阳性菌，G-代表革兰氏阴性菌，F代表真菌，V代表病毒，MC代表支原体等。

仅供研究使用，不适用于临床诊断

华大智造多类测序仪适配康健基因tNGS 建库方案

对三个不同支气管肺泡灌洗液阳性样本(tNGS-5-d、tNGS-11-d以及 S0312-2)中的病原微生物进行验证分析发现,康健基因tNGS建库方案搭配DNBSEQ-E25对真实样本中的真菌,细菌,病毒以及支原体等均能有效检出(表3, 4, 图3A,B, C),并且DNBSEQ-E25对不同阳性样本病菌的鉴定结果与MGISEQ-200的鉴定结果较为一致(图3D,E),MGISEQ-200对不同微生物的鉴定结果亦与Vendor X相当(R^2 均大于0.99)(图3F),进一步证明了利用不同DNBSEQ平台搭配康健基因tNGS建库方案,均可对病原微生物进行准确鉴定。同时对于以上真实样本,均未有耐药基因被检出。

样本	分类	名称	相对丰度	
			Vendor X	MGISEQ-200
S0312-2	G-	<i>Veillonella parvula</i>	0.48%	0.30%
	G-	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.32%	2.77%
	G-	<i>Prevotella intermedia</i>	0.76%	1.74%
	G-	<i>Prevotella denticola</i>	5.78%	1.86%
	G-	<i>Prevotella buccae</i>	0.49%	0.15%
	G-	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0.64%	2.23%
	G-	<i>Neisseria subflava</i>	0.58%	1.55%
	G-	<i>Neisseria</i>	0.14%	0.91%
	G-	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	3.02%	5.25%
	G-	<i>Haemophilus influenzae</i>	79.61%	80.91%
	G+	<i>Parvimonas micra</i>	2.07%	1.15%
	G+	<i>Streptococcus mitis</i>	0.44%	0.07%
	G+	<i>Streptococcus anginosus</i>	1.22%	0.23%
	G+	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3.14%	0.74%
	G+	<i>Streptococcus sanguinis</i>	0.30%	0.14%

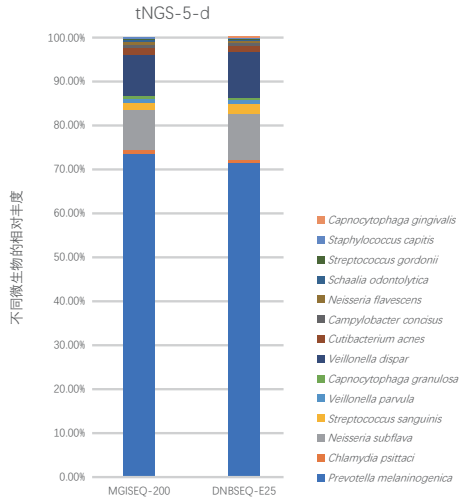
表3. S0312-2的病原微生物相对丰度。

样本	分类	名称	相对丰度		
			DNBSEQ-E25	MGISEQ-200	
tNGS-5-d	G-	<i>Prevotella melaninogenica</i>	71.57%	73.57%	
	G-	<i>Neisseria subflava</i>	10.40%	9.25%	
	G-	<i>Veillonella parvula</i>	0.81%	1.03%	
	G-	<i>Capnocytophaga granulosa</i>	0.39%	0.52%	
	G-	<i>Veillonella dispar</i>	10.68%	9.40%	
	G-	<i>Campylobacter concisus</i>	0.57%	0.58%	
	G-	<i>Neisseria flavescens</i>	0.47%	0.58%	
	G-	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	0.13%	-	
	G+	<i>Streptococcus sanguinis</i>	2.34%	1.54%	
	G+	<i>Cutibacterium acnes</i>	1.40%	1.64%	
	G+	<i>Schaalia odontolytica</i>	0.21%	0.64%	
	G+	<i>Streptococcus gordonii</i>	0.21%	0.17%	
	G+	<i>Staphylococcus capitis</i>	0.18%	0.25%	
	MC	<i>Chlamydia psittaci</i>	0.65%	0.83%	
	tNGS-11-d	G-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42.67%	39.75%
		G-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6.25%	6.36%
G-		<i>Haemophilus influenzae</i>	2.45%	3.24%	
G-		<i>Prevotella melaninogenica</i>	5.53%	7.53%	
G-		<i>Veillonella parvula</i>	0.32%	0.27%	
G-		<i>Prevotella denticola</i>	0.24%	0.46%	
G-		<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0.14%	0.08%	
G-		<i>Prevotella intermedia</i>	0.07%	0.11%	
G-		<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	0.03%	0.03%	
G-		<i>Morganella morganii</i>	0.55%	0.64%	
G-		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.52%	0.37%	
G-		<i>Prevotella buccae</i>	0.20%	0.23%	
G-		<i>Neisseria subflava</i>	0.04%	0.06%	
G-		<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0.02%	0.03%	
G-		<i>Campylobacter concisus</i>	0.02%	0.02%	
G-		<i>Prevotella loescheii</i>	0.01%	0.02%	
G-		<i>Fusobacterium periodonticum</i>	0.03%	0.02%	
G+		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	29.46%	25.37%	
G+		<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	2.54%	3.71%	
G+		<i>Streptococcus mitis</i>	2.44%	2.74%	
G+	<i>Streptococcus anginosus</i>	0.41%	0.73%		
G+	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.08%	0.10%		
G+	<i>Streptococcus sanguinis</i>	0.01%	-		
G+	<i>Schaalia odontolytica</i>	0.01%	0.01%		
G+	<i>Parvimonas micra</i>	5.15%	6.90%		
G+	<i>Streptococcus salivarius</i>	0.05%	0.10%		
G+	<i>Streptococcus intermedius</i>	0.62%	1.00%		
G+	<i>Streptococcus constellatus</i>	0.11%	0.10%		
G+	<i>Streptococcus milleri</i>	0.01%	0.01%		
V	<i>Human betaherpesvirus 7</i>	0.01%	0.01%		

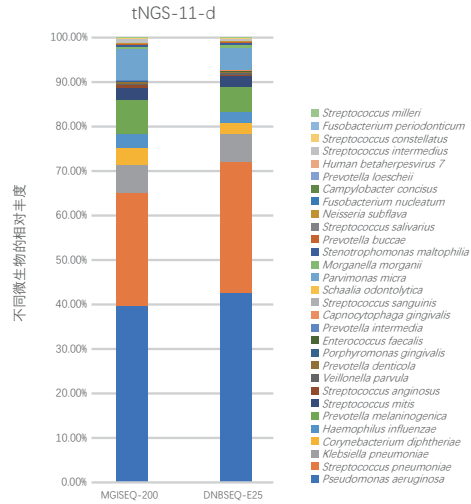
表4. tNGS-5-d和tNGS-11-d样本的病原微生物相对丰度。

仅供研究使用, 不适用于临床诊断

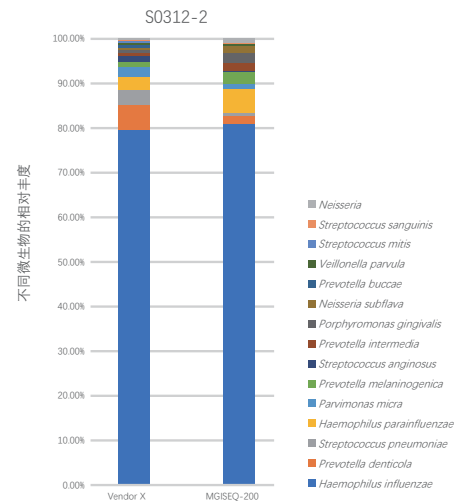
A



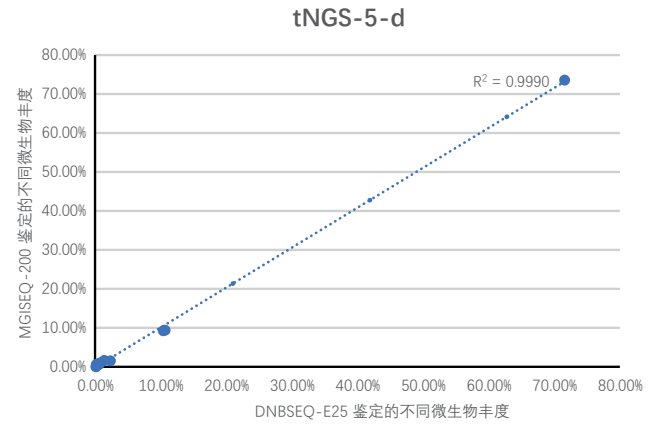
B



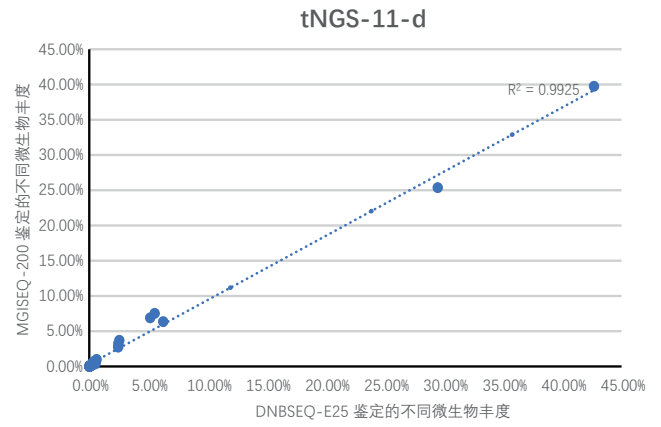
C



D



E



F

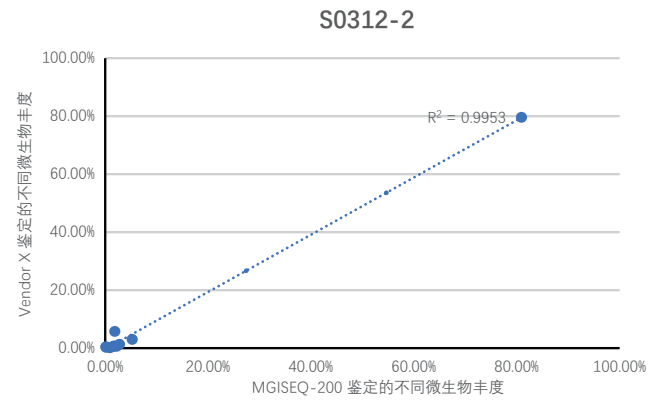


图3. 利用不同测序仪对真实阳性样本进行鉴定获得的病原微生物组成及比较分析。

仅供研究使用，不适用于临床诊断

总结

本研究通过使用标准品样本和真实阳性样本对康健基因tNGS建库方案进行双重验证分析发现：康健基因tNGS建库方案搭配DNBSEQ-E25可以输出高质量的测序数据，搭载康健基因生信分析平台进行分析可对病原微生物进行准确鉴定，实验结果重复性良好，且不同测序仪间的检测结果也较为一致。同时，此组合方案也适用于其他各种样本类型如肺泡灌洗液和痰液等病原体的准确鉴定。

DNBSEQ-E25是一款小巧轻便的基因测序仪，仪器占桌面积仅0.1 m²，运行速度快，对实验室环境要求低，安装、维护简便，大大降低了测序的门槛，非常适合病原微生物检测、小型基因组测序等应用，

MGISEQ-200是一款小巧灵活的桌面型基因测序仪，提供不同硬件配置选择，以适配不同的应用场景及多元化的预算要求。MGISEQ-200提供不同规格的载片及配套试剂套装，满足数据产出在10Gb~150 Gb范围内的应用需求，包括低深度全基因组测序、靶向捕获/多重测序、小型基因组测序、RNA测序、全外显子组测序等。

DNBSEQ-E25和MGISEQ-200均可搭配康健基因的tNGS建库方案和生信分析平台，实现病原体的快速精确检测，极大地推动传染病等相关研究，减轻疾病负担。



DNBSEQ-E25 基因测序仪

参考文献

1. Paul J. Introduction to Infectious Diseases[M]//Disease Causing Microbes. Cham: Springer International Publishing, 2024: 1-63.
2. Huang Z, Wu Q, Fang X, et al. Comparison of culture and broad-range polymerase chain reaction methods for diagnosing periprosthetic joint infection: analysis of joint fluid, periprosthetic tissue, and sonicated fluid[J]. International orthopaedics, 2018, 42: 2035-2040.
3. McCombie W R, McPherson J D, Mardis E R. Next-generation sequencing technologies[J]. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2019, 9(11): a036798.
4. Chiu C Y, Miller S A. Clinical metagenomics[J]. Nature Reviews Genetics, 2019, 20(6): 341-355.
5. Li S, Tong J, Li H, et al. L. pneumophila Infection Diagnosed by tNGS in a Lady with Lymphadenopathy[J]. Infection and Drug Resistance, 2023: 4435-4442.
6. Chao L, Li J, Zhang Y, et al. Application of next generation sequencing-based rapid detection platform for microbiological diagnosis and drug resistance prediction in acute lower respiratory infection[J]. Annals of Translational Medicine, 2020, 8(24).
7. Gao D, Hu Y, Jiang X, et al. Applying the pathogen-targeted next-generation sequencing method to pathogen identification in cerebrospinal fluid[J]. Annals of Translational Medicine, 2021, 9(22).
8. Huang C, Chen H, Ding Y, et al. A microbial world: could metagenomic next-generation sequencing be involved in acute respiratory failure?[J]. Frontiers in cellular and infection microbiology, 2021, 11: 738074.
9. Li B, Xu L, Guo Q, et al. GenSeizer: a multiplex PCR-based targeted gene sequencing platform for rapid and accurate identification of major mycobacterium species[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2021, 59(2): 10.1128/jcm. 00584-20.

推荐订购信息

产品类型	产品名称	产品货号
测序仪	基因测序仪DNBSEQ-E25RS	900-000490-00
自动化仪器	基因测序文库制备仪 MGISP-100RS	900-000070-00
软件	AccuGen病原微生物快速检测软件*	/
提取试剂	AccuGen病原DNA/RNA共提取试剂盒 (50 rxn)	961-000013-00
建库试剂	AccuGen病原多重检测建库试剂盒 (96 rxn)	961-000014-00
测序试剂	DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂套装(FCL SE100)	940-000573-00

*相关产品可登录康健基因官网进行查阅订购

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

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：2024年4月版

撰稿：张含菲

责任编辑：王其伟

审稿：江遥