· 2019冠状病毒病 ·

纳米孔测序技术在2019冠状病毒病重型患者继发感染诊断中的应用

贾小芳¹, 张小楠¹, 凌云², 张欣宇¹, 田 棣¹, 廖怡馨¹, 易志刚¹, 卢洪洲³

1. 上海市公共卫生临床中心科学研究部, 上海 201508

2. 上海市公共卫生临床中心感染科, 上海 201508

3. 上海市公共卫生临床中心感染与免疫科, 上海 201508

[摘要] 目的:探讨纳米孔测序技术在2019冠状病毒病(COVID-19)重型患者继发感染诊疗中的应用价值。方法:共入组了来自3例COVID-19重型患者的77份临床标本,所有标本均经过热灭活后进行基于磁珠富集的总核酸抽提,构建DNA文库,通过纳米孔测序技术进行病原体检测。测序数据采用Centrifuge软件进行病原体数据库比对和R语言差异分析,以获得病原微生物的鉴定结果。比较纳米孔测序结果与呼吸道病原体筛查多重定量聚合酶链反应(PCR)检测及同一时期临床微生物检验结果,以验证纳米孔测序技术的有效性。结果:纳米孔测序结果显示,44份标本检出病原体(阳性率为57.1%),包括肺炎克雷伯菌、表皮葡萄球菌、屎肠球菌和梭状芽孢杆菌等。其中,肺炎克雷伯菌、表皮葡萄球菌和屎肠球菌均在基于微生物培养的临床微生物检验中检出;肺炎克雷伯菌同时在呼吸道病原体筛查多重定量PCR检测中检出;梭状芽孢杆菌仅在纳米孔测序中检出,综合考虑患者的临床症状进行抗菌药物治疗,患者的感染情况得到控制。结论:纳米孔测序可快速鉴定临床标本中的潜在病原体,辅助COVID-19重型患者的临床诊断和治疗方案的制订。

[关键词] 2019冠状病毒病;严重急性呼吸综合征冠状病毒2;纳米孔测序;宏基因组测序;病原体检测

[中图分类号] R372 **[文献标志码]** A

Application of nanopore sequencing in diagnosis of secondary infections in patients with severe COVID-19

JIA Xiaofang¹, ZHANG Xiaonan¹, LING Yun², ZHANG Xinyu¹, TIAN Di¹, LIAO Yixin¹, YI Zhigang¹, LU Hongzhou³ (1. Scientific Research Department, Shanghai Public Health

收稿日期:2021-06-05 接受日期:2021-10-10 网络预发表日期:2021-12-07

基金项目:上海市科学技术委员会第二批应急科技攻关专项(20411950200);上海市2020年度“科技创新行动计划”医学创新研究专项(20Z11900900);国家自然科学基金(81801991);中国肝炎防治基金会天晴肝病研究基金(TQGB20200164)

第一作者:贾小芳,副研究员,主要从事病原微生物测序等相关研究;E-mail:rain9205@163.com;https://orcid.org/0000-0002-7127-0011

通信作者:卢洪洲,主任医师,教授,博士生导师,主要从事感染性疾病的诊治和发病机制研究;E-mail:luhongzhou@fudan.edu.cn;https://orcid.org/0000-0002-8308-5534

Clinical Center, Shanghai 201508, China; 2. Infectious Disease Department, Shanghai Public Health Clinical Center, Shanghai 201508, China; 3. Department of Infection and Immunology, Shanghai Public Health Clinical Center, Shanghai 201508, China)

Corresponding author: LU Hongzhou, E-mail: luhongzhou@fudan.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0002-8308-5534>

[**Abstract**] **Objective:** To explore the application value of nanopore sequencing technique in the diagnosis and treatment of secondary infections in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Methods:** A total of 77 clinical specimens from 3 patients with severe COVID-19 were collected. After heat inactivation, all samples were subjected to total nucleic acid extraction based on magnetic bead enrichment. The extracted DNA was used for DNA library construction, then nanopore real-time sequencing detection was performed. The sequencing data were subjected to Centrifuge software database species matching and R program differential analysis to obtain potential pathogen identification. Nanopore sequencing results were compared with respiratory pathogen qPCR panel screening and conventional microbiological testing results to verify the effectiveness of nanopore sequencing detection. **Results:** Nanopore sequencing results showed that positive pathogen were obtained in 44 specimens (57.1%). The potential pathogens identified by nanopore sequencing included *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium* and *Dolosigranulum pigrum*, et al. *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium* were also detected in clinical microbiological culture-based detection; *Klebsiella pneumoniae* was detected in respiratory pathogen screening qPCR panel; *Dolosigranulum pigrum* was only detected by the nanopore sequencing technique. Comprehensive considerations with the clinical symptoms, the patient was treated with antibiotics against *Dolosigranulum pigrum*, and the infection was controlled. **Conclusion:** Nanopore sequencing may assist the diagnosis and treatment of severe COVID-19 patients through rapid identification of potential pathogens.

[**Key words**] Coronavirus disease 2019; Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; Nanopore sequencing; Metagenomics next-generation sequencing; Pathogen detection

[**缩略语**] 严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2); 2019冠状病毒病 (coronavirus disease 2019, COVID-19); 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)

SARS-CoV-2感染引起的COVID-19已成为影响全球公共卫生健康的重大问题,其中5%~14%的患者可发展成重型^[1-2]。COVID-19重型患者由于免疫功能受损,常合并各类病原体感染,加速疾病进展,影响疾病预后,因此急需一种快捷的检测方法对病原体进行鉴定,以辅助重型患者的诊疗。目前,临床上常用的病原体检测方法有传统

微生物培养和分子免疫学检查等,但这些检测方法存在标本处理过程复杂、花费时间长和病原体检测种类少等缺点。PCR扩增检测RNA/DNA(如多重定量PCR技术)极大地提高了传染病病原体检测的敏感度^[3],但难以检测未知微生物。近年来,随着基因测序检测技术的不断发展,运用宏基因组测序技术可显著提高病原体检测的敏感度,缩

短检测时间,提高对罕见病原体的诊断能力^[4-5]。纳米孔测序是一种新兴测序技术,具有超长读长和可进行实时数据采集的优势,能在短时间内有效地对各类临床标本进行宏基因组测序和病原体鉴定,具有良好的临床应用前景^[6-8]。本研究探讨了纳米孔测序技术应用于COVID-19重型患者标本的病原体检测以辅助临床诊疗的价值。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集来自3例COVID-19重型患者的77份临床标本,包括37份血浆标本、3份鼻咽拭子标本、23份痰液标本、13份肺泡灌洗液标本和1份胆汁标本。入组患者同一时期采集的标本通过微生物培养得到的临床病原体检验结果作为纳米孔测序的参考数据。本研究通过上海市公共卫生临床中心伦理委员会审批(2020-S222-02)。

1.2 仪器和试剂

Bioprep-24R型匀浆器、Auto-Pure20B型核酸纯化系统为杭州奥盛仪器有限公司产品;多重定量PCR检测仪(ViiA7型)为美国Applied Biosystems公司产品;Qubit 3.0荧光定量仪为美国Thermo Fisher公司产品;R9型测序芯片、MinION型测序仪、DNA文库构建试剂盒(货号SQK-RPB004)为英国Oxford Nanopore Technologies公司产品;One Step PrimeScript RT-PCR试剂盒(货号RR064A)为日本TaKaRa公司产品。

1.3 标本前处理和总核酸抽提

测序方案参考文献^[9]。所有标本经过热灭活(55℃灭活50 min)后转移至生物安全二级实验室进行总核酸抽提。方法简要如下:在生物安全柜内,将已热灭活的标本用异硫氰酸胍盐裂解液充分裂解,并使用玻璃珠在Bioprep-24R型匀浆器上自动匀浆,匀浆后的裂解产物采用磁珠吸附法在Auto-Pure20B型核酸纯化系统上进行标本自动核酸抽提,抽提产物最终溶解在50 μL纯净水中。提取的总核酸一部分进行基于多重定量PCR检测的病原体筛查,另一部分用于DNA文库构建和纳米孔测序检测(图1)。每批标本核酸抽提均平行做一份纯净水对照标本,并同时进行后续的文库构建和测序检测分析。

1.4 多重定量PCR检测

本研究入组的所有标本抽提的核酸均经过多

重定量PCR筛查。多重定量PCR检测采用一步法进行逆转录和基于探针检测的实时定量PCR扩增,检测的病原体包括甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒、鼻病毒、人偏肺病毒AB型、人副流感病毒1、人副流感病毒3、严重急性呼吸综合征冠状病毒、人冠状病毒229E、人冠状病毒NL63、人冠状病毒OC43、人冠状病毒HKU1、人副黏病毒2、人副黏病毒4、腺病毒1型、结核分枝杆菌、肺炎支原体、肺炎衣原体、肺炎链球菌、卡他莫拉汉菌、流感嗜血杆菌、嗜肺军团菌、博卡病毒、腺病毒2型、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、A组乙型溶血性链球菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌和大肠埃希菌。

1.5 DNA文库构建和纳米孔测序

DNA文库构建方法参考SQK-RPB004型试剂盒说明书,文库扩增循环数为30,每个标本用试剂盒中的条形码标记使其带上唯一的序列标签。每个标本单独进行扩增构建文库,通过Qubit3.0进行DNA文库定量,取等量文库标本混合后进行测序上机检测,整个DNA文库构建总时长约4 h。测序文库使用R9型测序芯片上样,在MinION型测序仪上进行纳米孔测序检测,每批标本上机检测时间为24 h。

1.6 测序数据分析和检测结果报告的阈值

测序数据分析在64位Ubuntu 20.04.1 LTS服务器上运行,同一批标本的数据分析和报告输出时长约为2 h。数据分析方法简要如下:纳米孔测序原始文件FAST5在测序过程中进行实时碱基判读(basecalling)转化成FASTQ文件。通过Filtlong(0.2.0版)分析删除低质量(q 值 >7)和片段长度小于100的序列,剩余的序列通过Centrifuge 1.0.4分析进行物种匹配^[10]。每批测序标本检测会平行处理一份纯净水对照标本,同时进行核酸抽提、文库构建和上机检测,数据分析时对照标本中检测到的序列作为参考背景。Centrifuge分析结果再通过R语言进行标本和对照标本中相应物种的差异分析。记录标本检测到特定物种的 uniq_reads_ratio (该物种匹配的非重复DNA片段数目/该标本中检出的总reads数)与纯净水对照标本中相应物种的 uniq_reads_ratio 的比值以2为底数的对数值,即两者差异倍数的对数值($\log_2\text{FC}$)。 $\log_2\text{FC}$ 不低于3,表示该标本物种与对照标本相比差异显著,该物种检出的可信度高; $\log_2\text{FC}$ 1~3时,表示该标本物

临床标本首先通过55 °C热灭活处理,再用玻璃珠匀浆破碎和基于异硫氰酸胍盐裂解的方法抽提标本中的总核酸,获得的总核酸进行DNA文库构建,进一步用纳米孔测序进行分析。测序数据的分析流程:首先去除reads中的接头序列,删除低质量和低复杂性的序列;随后用Centrifuge软件分析,对候选病原体的特定序列进行比对,将微生物reads分类为科、属或种进行鉴定;最后进行R语言分析,通过比较标本和对照中检测到相应物种的reads数比值,最终找出标本中可能存在的病原体。整个测序分析检测流程的总时长约为32 h。

图 1 基于纳米孔测序的宏基因组测序流程图

Figure 1 Workflow diagram of the metagenomics next-generation sequencing assay based on nanopore sequencing

种有可能为试验误差所引起的随机检出。当对照标本中未检测到该物种的reads时,log₂FC为无穷大,此时标本中该物种uniq_reads数越大则表示该物种检测出的置信度越大。

2 结果

2.1 纳米孔测序检测结果

77份临床标本中,44份检出病原体,阳性率为57.1%。检出的病原体包括可能具备临床诊断价值的肺炎克雷伯菌、狡诈菌、屎肠球菌和表皮葡萄球菌等(表1)。

2.2 纳米孔测序与多重定量PCR检测结果具有一致性

77份临床标本中,多重定量PCR检测结果显示仅4份标本阳性,均为肺炎克雷伯菌。4份标本均来自P2患者,肺泡灌洗液1份、鼻咽拭子1份和痰液2份,Ct值为27.3~35.3(图2)。肺炎克雷伯菌在P2患者标本(表1中7号标本)纳米孔测序检测中也被检出,而多重定量PCR检测结果阴性的病原体在纳米孔测序中也未检出,提示纳米孔测序检测结果与多重定量PCR检测具有一致性。但对于P2患者,多重定量PCR法在多份临床标本中

均检测到肺炎克雷伯菌,而纳米孔测序法仅检出一次,提示相比靶向病原体扩增的多重定量PCR检测,纳米孔测序检测不同标本中的特定病原体敏感度较低。

2.3 纳米孔测序与临床微生物检验结果具有一致性

分析纳米孔测序检测结果,并与临床微生物检验结果进行比较,综合考虑患者的临床症状,检测到一些可能具有临床意义的病原体。如在患者P2的肺泡灌洗液标本(表1中7号标本)中检测到肺炎克雷伯菌,该患者同一时期采集的痰标本的临床微生物检验结果也显示肺炎克雷伯菌阳性。针对此检测结果,综合考虑患者的临床症状,给予头孢他啶阿维巴坦钠和万古霉素联合抗感染治疗,经治疗后患者体温峰值下降,超敏C反应蛋白水平降低,降钙素原水平降低,感染得到相对控制。患者P3痰标本(表1中9号标本)的纳米孔测序检测到屎肠球菌,该患者在同一时期采集标本的微生物检测结果也为屎肠球菌阳性。在患者P1的血标本(表1中2号标本)中检测到表皮葡萄球菌,该患者在同一时期采集标本的微生物检测结果也为表皮葡萄球菌阳性。以上结果提示,纳米

表 1 来自2019冠状病毒病重型患者的77份临床标本经纳米孔测序鉴定的部分潜在病原体**Table 1** Potential pathogens identified by nanopore sequencing in 77 clinical samples from 3 patients with severe COVID-19

标本编号	患者编号	采集日期	标本类型	测序检出的病原体名称	匹配总序列数	log ₂ FC	序列覆盖率(%)	平均覆盖深度	最大覆盖深度
1	P1	2021年1月31日	痰液	黏滑罗斯菌	720	7.87	67.56	2.73	49
				殊异韦荣菌	1401	4.94	36.09	0.10	71
2	P1	2021年2月16日	血浆	表皮葡萄球菌	3251	6.58	1.74	5.01	419
3	P2	2021年1月8日	肺泡灌洗液	嗜麦芽窄食单胞菌	113	3.50	3.32	0.06	8
4	P2	2021年1月8日	血浆	洛非不动杆菌	1137	8.60	14.47	159.01	1110
5	P2	2021年1月12日	血浆	黄体微球菌	1968	6.66	0.28	0.65	390
6	P2	2021年1月17日	血浆	狡诈菌	4216	5.25	1.29	10.20	1762
7	P2	2021年1月27日	肺泡灌洗液	肺炎克雷伯菌	20 019	3.54	3.01	13.20	1561
8	P2	2021年1月31日	血浆	奥斯陆莫拉菌	2241	6.63	4.60	2.34	221
				小韦荣球菌	570	无穷大	0.70	0.38	122
9	P3	2021年2月1日	痰液	尿肠球菌	36 863	5.02	6.20	24.83	3422
10	P3	2021年2月4日	痰液	纤细弯曲杆菌	550	9.97	0.30	1.61	543
11	P3	2021年2月12日	血浆	抗辐射不动杆菌	256	无穷大	11.17	7.01	144
12	P3	2021年2月16日	痰液	人γ疱疹病毒4	137	无穷大	47.70	2.93	30

仅列出核酸匹配的总序列数大于50且相比对照标本差异倍数的对数值(log₂FC)大于3或为无穷大的检测结果。

A: 肺炎克雷伯菌多重定量PCR检测结果(Ct值为32.1); B: 肺炎克雷伯菌的纳米孔测序基因组覆盖率图。

图 2 2019冠状病毒病重型患者P2肺泡灌洗液标本多重定量PCR检测和纳米孔测序结果

Figure 2 qPCR panel and nanopore sequencing results of severe COVID-19 patient samples

孔测序检测与临床微生物检验结果具有一致性,可有效检出 COVID-19 患者标本中的潜在病原体。

2.4 纳米孔测序可检出多重定量PCR检测和临床微生物检验未检出的病原体

纳米孔测序法在患者P2血浆标本(表1中6号标本)中检测到狡诈菌,该结果并未在多重定量

PCR和临床微生物检验中检测到。经查阅文献,发现该菌有存在血流感染的报道,且狡诈菌对左氧氟沙星敏感。经临床专家组讨论,给予患者左氧氟沙星和更昔洛韦抗感染治疗,患者感染症状得到控制,表现为体温峰值下降,炎症指标下调,超敏C反应蛋白水平降低,降钙素原水平降低,白细胞及血小板数呈下降趋势。提示纳米孔测序技术可有效检出常规临床检验方法未检出的未知病原体,检测结果具有临床诊疗参考价值。

3 讨论

近十年来,深度测序技术在传染病病原临床诊断中的应用极大提高了感染性疾病的检测速度和准确度。宏基因组测序既保留了分子检测的主要优势,不需要对病原体进行分离培养,也不依赖于已知的核酸序列设计引物等,可以在一次分析中同时对标本中存在的多种病原体(包括病毒、细菌、真菌和寄生虫)进行检测。该方法可有效提高诊断效率,尤其在未知病原微生物检测中有着无与伦比的优势,有望成为一项无偏倚病原体鉴定和精准医学的诊断工具^[11-15]。宏基因组测序可应用于检测病原体和监测传染病暴发期间的病毒传播和进化,在COVID-19大流行中也得到证实^[16-19]。

与传统的基于边合成边测序技术的检测平台(如Illumina、Ion Torrent和PacBio测序)相比,最近

几年才商业化的基于电流传感的测序方法(如纳米孔测序法)在检测速度和读取长度方面具有显著优势,因此实时数据分析成为可能^[6-7]。该测序方法可应用于对可能造成公共卫生威胁的重要病原微生物进行监测、传染病的诊断以及新发传染病的分子流行病学研究^[20-23]。本研究团队开发了一种基于单细胞转录组测序(SMART-Seq)原理的与纳米孔测序兼容RNA文库制备方案,可实现当日完成从标本制备、文库构建到测序结果产生和报告发出全过程(<8 h)^[9]。本文资料显示,前期开发的纳米孔测序方法在实际临床标本检测中因受到宿主基因组和环境菌的影响,病原体序列的含量极低,故需要适当延长检测时间以提高病原体序列的检出率。本研究中通过6 h标本前处理(包括核酸抽提和文库制备)、24 h的测序上机检测和2 h的数据分析,最快可在采样次日得出检测结果,对于临床及时制订诊疗方案至关重要。

本研究探讨了纳米孔测序技术应用于COVID-19重型患者临床标本的病原体检测以辅助临床诊疗的价值。结果显示,相比于传统的临床微生物检验,纳米孔测序报告检测结果更快(采样次日);与多重定量PCR检测相比,纳米孔测序不受检测目标病原体数量的限制,可检出未知病原体。提示本研究建立的宏基因组测序技术具有较高的应用价值,可快速有效地检测COVID-19重型患者临床标本中的潜在致病菌,协助患者的诊疗。

由于临床标本中实际病原体序列的含量极低,导致本文资料中临床标本宏基因组测序检出的阳性率较低。针对这个问题,今后可从以下几个方面进行改进。首先,可以运用16S核糖体RNA基因的靶向扩增提高跨种属鉴定临床重要细菌的准确度和敏感度^[24-25]。16S核糖体RNA基因的靶向扩增可极大地减少人类基因组reads的干扰,提高细菌检测的敏感度,特别是对于宿主细胞含量高的标本。用于细菌和真菌核糖体RNA序列定向测序的纳米孔测序方案的开发也将是有效补充。其次,可以通过结合探针靶向序列捕获富集法实现更高的病原体检测敏感度和基因组覆盖率。再次,持续改进测序数据的分析方法,力图实现有效和无偏倚的分析,同时确保检测报告的高重现性。

综上所述,本研究通过纳米孔测序技术检测

了COVID-19重型患者的临床标本,实现了病原体快速鉴定。经过进一步改进,该检测方法可推广至临床其他突发感染性疾病的检测并协助诊断。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] WU Z, MCGOOGAN J M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese center for disease control and prevention[J]. *JAMA*, 2020, 323(13): 1239-1242.
- [2] BERLIN D A, GULICK R M, MARTINEZ F J. Severe COVID-19[J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(25): 2451-2460.
- [3] YANG S, ROTHMAN R E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings[J]. *Lancet Infect Dis*, 2004, 4(6): 337-348.
- [4] 中华医学会检验医学分会. 高通量宏基因组测序技术检测病原微生物的临床应用规范化专家共识[J]. *中华检验医学杂志*, 2021, 43(12): 1181-1195.
Chinese Society of Laboratory Medicine. Expert consensus on clinical standardized application of metagenomics next-generation sequencing for detection of pathogenic microorganisms[J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2021, 43(12): 1181-1195. (in Chinese)
- [5] 孙波, 郑光辉, 高阳, 等. 宏基因组技术在感染性疾病中的应用[J]. *中国临床新医学*, 2021, 14(1): 19-22.
SUN Bo, ZHENG Guanghui, GAO Yang, et al. Application of metagenome technology in infectious diseases[J]. *Chinese Journal of New Clinical Medicine*, 2021, 14(1): 19-22. (in Chinese)
- [6] GRENINGER A L, NACCACHE S N, FEDERMAN S, et al. Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis[J]. *Genome Med*, 2015, 7(1): 99.
- [7] LI Y, HE X Z, LI M H, et al. Comparison of third-generation sequencing approaches to identify viral pathogens under public health emergency conditions[J]. *Virus Genes*, 2020, 56(3): 288-297.
- [8] 黄丹, 陈曦, 刘燕. Nanopore测序技术在临床中的应用进展[J]. *生物化工*, 2021, 7(1): 153-159.
HUANG Dan, CHEN Xi, LIU Yan. Progress of nanopore sequencing technology in clinical application[J]. *Biological Chemical Engineering*, 2021, 7(1): 153-159. (in Chinese)
- [9] JIA X, HU L, WU M, et al. A streamlined clinical metagenomic sequencing protocol for rapid pathogen

- identification[J]. **Sci Rep**, 2021, 11(1): 4405.
- [10] KIM D, SONG L, BREITWIESER F P, et al. Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences[J]. **Genome Res**, 2016, 26(12): 1721-1729.
- [11] MILLER S, NACCACHE S N, SAMAYOA E, et al. Laboratory validation of a clinical metagenomic sequencing assay for pathogen detection in cerebrospinal fluid[J]. **Genome Res**, 2019, 29(5): 831-842.
- [12] MATRANGA C B, ANDERSEN K G, WINNICKI S, et al. Enhanced methods for unbiased deep sequencing of Lassa and Ebola RNA viruses from clinical and biological samples[J]. **Genome Biol**, 2014, 15(11): 519.
- [13] TANG P, CROXEN M A, HASAN M R, et al. Infection control in the new age of genomic epidemiology[J]. **Am J Infect Control**, 2017, 45(2): 170-179.
- [14] LU R, ZHAO X, LI J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding[J]. **Lancet**, 2020, 395(10224): 565-574.
- [15] SIMNER P J, MILLER S, CARROLL K C. Understanding the promises and hurdles of metagenomic next-generation sequencing as a diagnostic tool for infectious diseases[J]. **Clin Infect Dis**, 2018, 66(5): 778-788.
- [16] ZHANG X, TAN Y, LING Y, et al. Viral and host factors related to the clinical outcome of COVID-19[J]. **Nature**, 2020, 583(7816): 437-440.
- [17] WU F, ZHAO S, YU B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China[J]. **Nature**, 2020, 579(7798): 265-269.
- [18] 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, 579(7798): 270-273.
- [19] ZHU N, ZHANG D, WANG W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019[J]. **N Engl J Med**, 2020, 382(8): 727-733.
- [20] SCHMIDT C J, BLESSING C F, FIMPLER C L, et al. Nanopore sequencing in a clinical routine laboratory: challenges and opportunities[J]. **Clin Lab**, 2020, 66(6).
- [21] FAUVER J R, PETRONE M E, HODCROFT E B, et al. Coast-to-coast spread of SARS-CoV-2 during the early epidemic in the United States[J]. **Cell**, 2020, 181(5): 990-996.e5.
- [22] LU J, DU PLESSIS L, LIU Z, et al. Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 in Guangdong province, China[J]. **Cell**, 2020, 181(5): 997-1003.e9.
- [23] FARIA N R, QUICK J, CLARO I M, et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas[J]. **Nature**, 2017, 546(7658): 406-410.
- [24] SABAT A J, VAN ZANTEN E, AKKERBOOM V, et al. Targeted next-generation sequencing of the 16S-23S rRNA region for culture-independent bacterial identification - increased discrimination of closely related species[J]. **Sci Rep**, 2017, 7(1): 3434.
- [25] WATTS G S, YOUENS-CLARK K, SLEPIAN M J, et al. 16S rRNA gene sequencing on a benchtop sequencer: accuracy for identification of clinically important bacteria[J]. **J Appl Microbiol**, 2017, 123(6): 1584-1596.

[本文编辑 沈 敏 余 方]

· 学术动态 ·

蔡志坚教授团队研究成果揭示细胞外囊泡生成新机制

2021年10月8日,浙江大学基础医学院、浙江大学医学院附属第二医院蔡志坚教授团队在《细胞外囊泡杂志》(*Journal of Extracellular Vesicles*)在线发表了题为“Neddylation of Coro1a determines the fate of multivesicular bodies and biogenesis of extracellular vesicles”的研究论文(DOI:10.1002/jev2.12153)。该文首次揭示了蛋白质泛素化修饰参与调控细胞外囊泡的生成,并鉴定出首个晚期内体/多囊泡体膜上通过直接结合RAS癌基因家族成员7(Rab7)并介导Rab7招募的哺乳动物蛋白,从而以全新的视角展示细胞外囊泡生成调控的机制及囊泡胞内运输的过程。

研究人员明确泛素化的Coro1a定位于多囊泡体膜,并与Rab7直接结合,介导其多囊泡体的招募。Rab7被活化后,促进多囊泡体靶向输送至溶酶体。Coro1a在泛素化修饰的过程中,UBE2F、TRIM4分别是Coro1a泛素化修饰的E2连接酶和E3连接酶,K233是Coro1a泛素化的修饰位点。研究人员发现,靶向Coro1a可显著抑制肿瘤模型小鼠的肿瘤进展,证实了Coro1a是细胞外囊泡生成调控的理想靶点,具有治疗细胞外囊泡相关疾病的潜能。

博士研究生费雪枫和李志杰为论文第一作者。研究得到国家重点研发计划和国家自然科学基金资助。