

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.35.005

高灵敏焦测序结合生物发光分析仪检测甲型 H1N1 流感病毒*

武海萍¹ 刘云龙² 童欢² 马雪萍² 卜莹¹ 周国华^{2Δ}

(1 华东医学生物技术研究所 江苏南京 210002; 2 南京大学医学院附属金陵医院药理科 江苏南京 210002)

摘要 目的:建立基于核酸序列分析的快速、准确、低成本的甲型 H1N1 流感病毒检测方法。**方法:**通过优化焦测序反应体系中 ATP 硫酸化酶和荧光素酶的浓度,建立高灵敏的焦测序反应体系;将该体系应用于低成本、小型化的便携式生物发光分析仪,焦测序分析流感病毒 M、NP、HA 基因片段的核酸序列。**结果:**优化后的焦测序反应体系可检测低至 10 fmol 的 DNA 样本,检测灵敏度较传统焦测序提高了 10 倍以上。对两例样本进行检测,根据所测得的 M、NP、HA 基因特异性片段序列,可以确认其均为甲型 H1N1 感染;另外,对 M2 蛋白阻断剂耐药性标志位点(S31N 突变)的测定结果显示该病毒存在 S31N 突变,为 M2 蛋白阻断剂耐药型。**结论:**高灵敏焦测序体系结合便携式生物发光分析仪成功实现了对甲型 H1N1 流感病毒快速、准确的低成本检测。

关键词:高灵敏焦测序;甲型 H1N1 流感病毒;耐药性突变;便携式生物发光分析仪

中图分类号:R373.13 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)35-6818-05

Detection of Influenza A (H1N1) Virus Using Highly Sensitive Pyrosequencing Combining Bioluminescence Analyzer*

WU Hai-ping¹, LIU Yun-long², TONG Huan², MA Xue-ping², BU Ying¹, ZHOU Guo-hua^{2Δ}

(1 Huadong Research Institute for Medicine and Biotechnics, Nanjing, Jiangsu, 210002, China; 2 Department of Pharmacology, Jinling Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu, 210002, China)

ABSTRACT Objective: To establish a rapid, accurate and low-cost influenza A (H1N1) virus detection method based on nucleic acid sequence analysis. **Methods:** A highly sensitive pyrosequencing system was established by optimizing the concentrations of ATP sulfurylase and luciferase respectively; the nucleic acid sequences of M, NP, HA gene fragments of influenza virus were analysed with a low-cost and portable bioluminescence analyzer by coupling the highly sensitive pyrosequencing system. **Results:** Compared with conventional pyrosequencing system, the sensitivity of the proposed method increased more than 10 times, and as low as 10 fmol of DNA samples can be detected. Based on the pyrosequencing results of the M, NP, HA genes, we confirmed the infection of influenza A (H1N1) virus in the two samples. The sequencing results of the gene coding M2 protein inhibitor drug resistance marker (S31N mutation) proved the presence of S31N mutation, indicating that the virus is M2 protein inhibitor-resistant. **Conclusion:** A rapid, accurate and low-cost detection method of influenza A (H1N1) virus was established by combining the highly sensitive pyrosequencing system with a portable bioluminescence analyzer.

Key words: Highly sensitive pyrosequencing; Influenza A (H1N1) virus; Drug resistance mutations; Portable bioluminescence analyzer

Chinese Library Classification: R373.13 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)35-6818-05

前言

人类与流感的抗争贯穿整个人类的历史,每一次流感的大流行都给人类带来恐惧和挑战,但同时也推动着人类科学技术的进步。2009 年爆发的甲型 H1N1 流感在短时间内造成全世界范围内上百万人感染,死亡病例过万人^[1,2]。该病毒属于正黏病毒科,甲型病毒属,线状单股负链 RNA 病毒。其基因组大小约为 13.6 kb, 包含 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M 和 NS 共八

个基因,分别编码八种结构蛋白(PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2)及两种非结构蛋白(NS1、NS2)^[3,4]。根据 HA 与 NA 的不同亚型组合,甲型流感病毒可分为各种血清型,而众多的血清型是其易于发生遗传变异的基础^[5,6]。世界卫生组织强调甲型 H1N1 流感病毒会在未来数年内以季节性病毒的方式继续传播,各国卫生部门必须保持警惕。

常规的流感病毒诊断方法包括血清学诊断、病毒分离和特异性抗体检测等,但这些方法存在特异性不强、操作繁琐、诊断

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31300706);江苏省科技支撑计划 - 社会发展项目(BE2011607);

第 54 批中国博士后科学基金面上资助项目(2013M542575)

作者简介:武海萍(1980-),女,博士,主管药师,主要研究方向:分子诊断,电话:025-84514223, E-mail: fenger19800512@126.com

Δ 通讯作者:周国华, E-mail: ghzhou@nju.edu.cn

(收稿日期:2014-07-19 接受日期:2014-08-15)

时间较长(约2周左右)等缺点,无法满足病毒流行期间处理大量样本的需求^[7-9]。随着分子诊断技术的进步,发展出多种病毒核酸检测方法,例如 RT-PCR、NASBA 等方法能够通过核酸扩增实现对病毒的快速检测^[10-13]。但是上述方法无法准确获得病毒的基因序列信息,而传统的 DNA 测序法又存在成本高、不能快速检测等缺点,因此需要建立一种能够快速、准确、低成本测定病毒核酸序列的方法^[14]。

焦测序是一种基于生物发光分析法测定焦磷酸盐(PPI)的技术,它以单链 DNA 为模板,在 DNA 聚合酶(Klenow)、三磷酸腺苷硫酸化酶(ATP sulfurylase)、荧光素酶(Luciferase)和三磷酸腺苷双磷酸酶(Apyrase)的级联作用下,将 DNA 链延伸产生的 PPI 转化为荧光信号^[15]。该技术不需要电泳和荧光标记,可以实时测定引物后的 DNA 序列,定量性能好、结果准确、可实现自动化,已逐渐发展成为一个重要的分子诊断平台^[16-19]。

传统焦测序反应体系的检测灵敏度较低,必须使用 pmol 数量以上的 DNA 样本,本研究通过增加焦测序反应液中的 ATP sulfurylase 量来抑制其底物 APS 和 Luciferase 的反应,使得在高浓度 Luciferase 条件下,反应体系的背景信号能够控制在很低的水平,而检测信号显著上升,反应灵敏度提高十倍以上;进一步将该高灵敏焦测序反应体系应用于以价格低廉的光敏二极管为检测器的八通道便携式生物发光分析仪,从而建立一种快速、准确、低成本的甲型 H1N1 病毒核酸检测方法。

1 材料与方法

1.1 病毒样本

2 株甲型 H1N1 病毒 RNA 样本(A/JiangSu/212/2009, A/JiangSu/214/2009)由江苏省疾病预防控制中心提供。

1.2 仪器与试剂

EDC-810 型基因扩增仪(Eastwin Life Sciences, Inc., 上海, 中国); Power PAC1000 型电泳仪(BioRad Laboratories, Inc., CA, USA); GeneGenius 凝胶成像系统(SYNGENE, Co., Ltd., Cambridge, UK); 八通道便携式生物发光分析仪(Hitachi Ltd., Tokyo, Japan); 磁珠结合仪(本实验室组装)。

Superscript III reverse transcriptase(Invitrogen, USA); RNA 酶抑制剂、Taq DNA 聚合酶(TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.); PCR 引物(上海 Invitrogen 公司合成, PAGE 级); 琼脂糖(LP0028A, Oxoid Ltd., Hamp shire, England); Tris 碱和溴化乙锭均为 Sangon 生物公司产品; 洗涤缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1.0 mol/L NaCl, pH 7.5); 1× 退火缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0); 磁珠(Dynabeads M-280 streptavidin, Dynal AS, Oslo, Norway); 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、Luciferase 购自 Promega 公司; D-虫荧光素、Apyrase、5'-磷酸化硫酸腺苷(APS)和牛血清白蛋白(BSA)均购自 Sigma 公司; dGTP、dCTP、dTTP、dATPαS 均购自 Mychem 公司; Klenow 和 ATP sulfurylase 为本实验室构建表达; 实验所用其它试剂均为分析纯或优级纯。所有溶液均由灭菌去离子水配制。

1.3 cDNA 合成

取总 RNA 50 ng-2 μg 至 nuclease-free 的小管中, 加入 50-250 ng 随机引物, 0.5 mmol/L 的 dNTP 混合物, 加 DEPC-H₂O 至 13 μL; 65℃ 5 min 后, 置冰上至少 1 min; 在上述小管中加入 5× 第一链合成缓冲液 4 μL, 5 mmol/L DTT, 20 U RNase 抑制剂, 200 U Superscript III Reverse Transcriptase, 加 DEPC-H₂O 至总体积为 20 μL。反转录条件为: 25℃ 5 min, 50℃ 反应 1 h, 70℃ 15 min 中止反应。

1.4 基因特异性 PCR 扩增

采用基因特异性 PCR 分别扩增 M、NP、HA、NA、M2 基因。100 μL PCR 反应体系中含有引物各 0.2 μmol/L (见表 1), dNTP 0.5 mmol/L, MgCl₂ 3.0 mmol/L, 1× 缓冲液, 2.5 U Taq DNA 聚合酶以及 100-500 ng cDNA 模板。热循环参数为: 94℃ 预变性 3 min; 然后以 94℃ 变性 10 s, 60℃ (M 基因)或者 55℃ (HA 基因)退火 20 s, 72℃ 延伸 40 s, 扩增 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min 使反应完全。反应完成后, 取反应产物 2 μL 在 2.0% 琼脂糖凝胶上进行电泳(1× TAE 电泳缓冲液, 电压 100V, 恒压电 15 min), 凝胶成像系统拍摄电泳图谱。

表 1 用于基因特异性 PCR 扩增的引物序列

Table 1 Primer sequences for gene-specific PCR

Gene	Primer	Sequence(5' to 3')	Length (bp)
M	InfA Forward	gac cra tcc tgt cac etc tga c	106
	InfA Reverse	biotin-agg gca tty tgg aca aak cgt cta	
NP	SW InfA Forward	gca cgg tca gca ctt aty ctr ag	195
	SW InfA Reverse	biotin-gtg rgc tgg gtt ttc att tgg tc	
HA	SW H1 Forward	gtg cta taa aca cca gcc tyc ca	116
	SW H1 Reverse	biotin-cgg gat att cct taa tcc tgt rgc	
M2	Sw-M2-F670	agc tcc agt gct ggt ctg aaa g	231
	Sw-M2-R900	biotin-gac tca ggc act cct tcc gta gaa	

1.5 焦测序用单链的制备

(1)取 10 μL 链亲和素包被的磁珠于 PCR 反应管中, 用磁

铁吸弃上清液, 加 100 μL 洗涤缓冲液洗 2 遍。(2)将磁珠悬浮于 90 μL 洗涤缓冲液中, 然后加入 90 μL PCR 产物, 在磁珠结

合仪中于 37℃ 反应 1 h, 反应过程中通过轻轻振摇 PCR 管使磁珠始终处于悬浮状态。(3) 用磁铁固定磁珠, 吸弃上清液; 用 H₂O 洗涤磁珠 2-3 遍, 每次加入 180 μL H₂O; 加入 0.1 mol/L NaOH 溶液 20 μL, 混匀, 室温放置 10 min 使之变性; 吸出上清液置于另一个 PCR 反应管中, 加入 1 μL 2 mol/L HCl 中和, 即液相单链。(4) 用 100 μL 洗涤缓冲液洗涤固相磁珠 2 遍; 然后用 100 μL 1× 退火缓冲液洗 1 遍; 再将固相磁珠溶于 20 μL 1× 退火缓冲液中, 即固相单链。(5) 分别在固相和液相单链中加入相应的 2 μL 10 μmol/L 测序引物进行退火, 退火条件为: 93℃ 30 s; 55℃ 3 min。4℃ 保存备用。

1.6 焦测序反应

焦测序反应液的组成如下: 0.1 mol/L Tris-HAc (pH 7.7), 2 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Mg (Ac)₂, 0.1 % BSA, 1 mmol/L DTT, 0.4 g/L PVP, 0.4 mmol/L D-luciferin, 5 μmol/L APS, 18 U/ml Klenow, 1.6 U/ml Apyrase, 292 mg/L Luciferase, 10 U/ml ATP sulfurylase。依次加入 dCTP、dTTP、dGTP 和 dATPαS, 对各个与引物退火后的样本单链模板进行序列测定。

便携式生物发光分析仪反应参数: 反应液体积为 40 μL; 气压为 0.29 MPa; dNTP 注射时间为 0.04 s; 反应温度为 30℃; 每个循环反应周期为 120 s。

2 结果

2.1 便携式生物发光分析仪的工作原理

随着 DNA 测序技术的迅速发展, 不仅要求能满足高通量检测的测序仪器, 还需要发展快速便捷的低成本检测仪器。便携式生物发光分析仪采用体积小且价格低廉的光敏二极管 (PD, Hamamatsu Photonics K.K) 作为荧光信号的检测器, 其主要结构如图 1 所示, 在空气阀控制下, 四种 dNTP 依次喷射入其下方的反应池中, 反应池在马达驱动下可以将其中的反应液均匀混合, 在反应池下方对应每一反应孔有一个 PD 用以收集反应生成的荧光信号, 经光电转换后输出至计算机。该便携式生物发光分析仪一次可以同时检测 8 个样品, 既满足了一定的通量要求, 又大幅降低了仪器成本, 并且其小型化的设计更利于临床便携使用。但 PD 检测器的不足在于其灵敏度相对较低, 因此需要通过优化测序反应体系来提高焦测序的检测灵敏度。

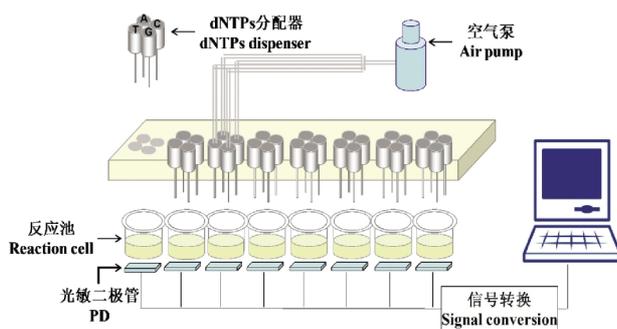


图 1 便携式生物发光分析仪结构示意图

Fig. 1 Schematic of the portable bioluminescence analyzer

2.2 高灵敏焦测序反应体系的建立

在焦测序反应体系中, 由于 APS 的结构与 ATP 相似, 游离的 APS 会被荧光素酶捕获后发出荧光, 因此造成反应液的背景信号很高, 这就限制了焦测序反应的灵敏度。而 APS 作为 ATP 硫酸化酶的反应底物, 通过增大反应液中的 ATP 硫酸化酶浓度至其活性浓度大于 APS 浓度, 降低体系中游离 APS 含量, 则可以在很大程度上限制 APS 与荧光素酶的结合, 从而大大降低焦测序的背景信号。在传统的焦测序反应体系中, APS 浓度为 5 μmol/L, 因此增加 ATP 硫酸化酶的浓度至 10 U/mL (即 0.665 μmol/L) 时, 由于 ATP 硫酸化酶具有八个活性中心, 其活性浓度达到 5.32 μmol/L, 大于反应液中 APS 浓度。在此条件下, 可以简单地通过增加荧光素酶的用量以实现高灵敏度的焦测序反应。图 2 是在使用高浓度 ATP 硫酸化酶 (10 U/mL), 荧光素酶浓度分别为 14.6-292 mg/L 条件下, 对 0.1 pmol 的 DNA 单链进行测序的结果。从测序结果可以看出, 在使用高浓度 ATP 硫酸化酶时, 测序信号随荧光素酶的浓度增大而大幅增高, 而背景信号一直控制在很低的水平, 不干扰 DNA 延伸所产生的荧光信号检测, 从而可以提高焦测序的检测灵敏度。

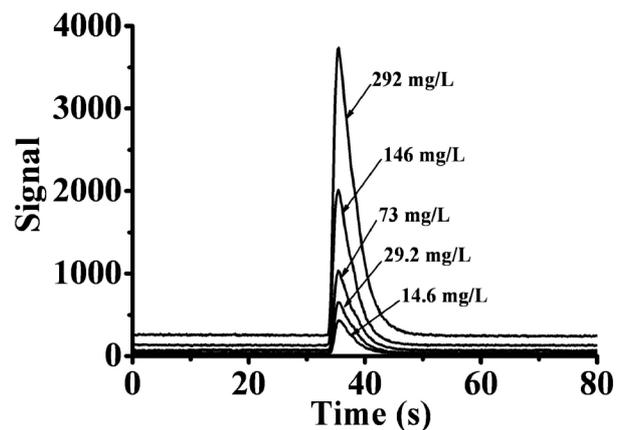


图 2 在高浓度 ATP 硫酸化酶条件下不同荧光素酶浓度对焦测序信号强度的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of Luciferase on the signal strength at a high concentration of ATP sulfurylase

2.3 高灵敏焦测序反应液在便携式生物发光分析仪上的检测灵敏度

为了考察优化后的焦测序反应体系在以 PD 为检测器的便携式生物发光分析仪上的检测灵敏度。以人工合成的标准单链 ADDP-2 (序列为 5'-CTGA-3') 为例, 在便携式生物发光分析仪上分别对 0 fmol、10 fmol、25 fmol、50 fmol、100 fmol、250 fmol ADDP-2 进行了测定, 结果见图 3, 示检测限最低可达 10 fmol 标准单链 (信噪比 S/N=3)。传统焦测序反应体系必须使用 pmol 数量以上的 DNA 样本, 而优化后的焦测序反应体系的灵敏度有了明显提高, 使用与通常相比低一个数量级的几十 fmol 量的 DNA 就可进行测序。

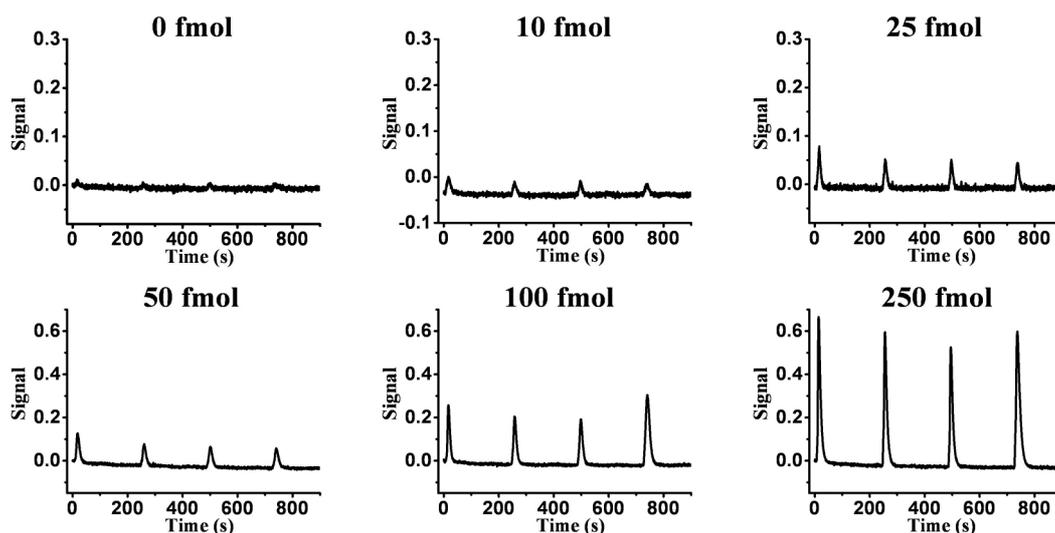


图 3 高灵敏焦测序反应液检测不同量标准单链 ADDP-2 的结果图

Fig. 3 Pyrograms of different amounts of ADDP-2 using highly sensitive pyrosequencing

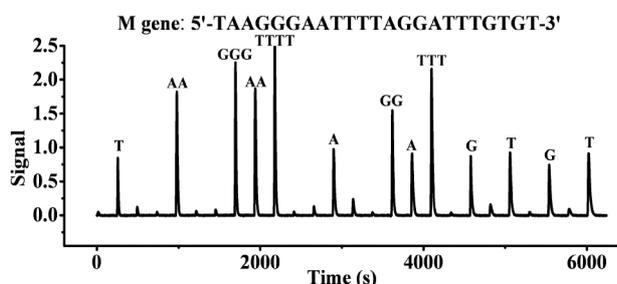


图 4 H1N1 病毒 M 基因焦测序检测结果

Fig. 4 Pyrogram of H1N1 virus M gene

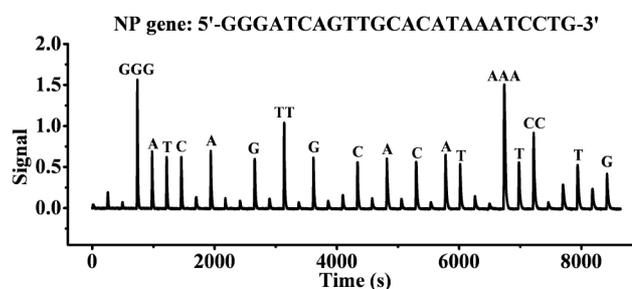


图 5 H1N1 病毒 NP 基因焦测序检测结果

Fig. 5 Pyrogram of H1N1 virus NP gene

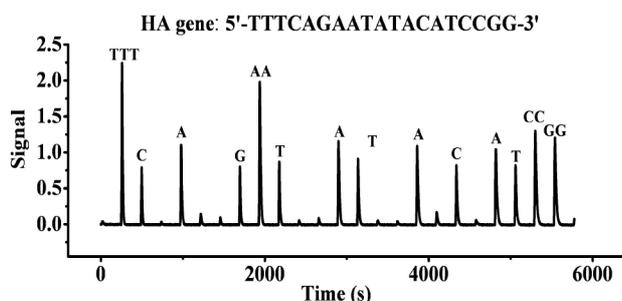


图 6 H1N1 病毒 HA 基因焦测序检测结果

Fig. 6 Pyrogram of H1N1 virus HA gene

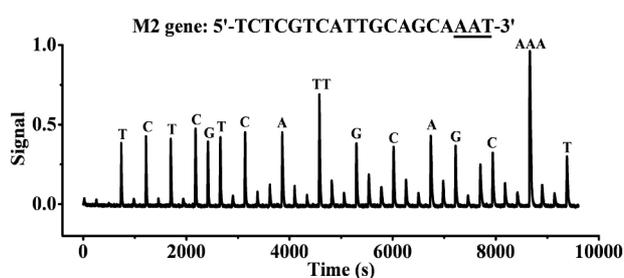


图 7 H1N1 病毒 M2 基因焦测序结果

Fig. 7 Pyrogram of H1N1 virus M2 gene

2.4 甲型 H1N1 病毒基因特异性序列测定

我们以焦测序技术为检测平台,通过将高灵敏的焦测序反应体系应用于以 PD 为检测器的八通道便携式生物发光分析仪,从而对甲型 H1N1 病毒进行快速、准确、低成本的短片段序列分析。我们采用与 WHO 公布的此次甲型 H1N1 实时荧光 PCR 检测相同的引物序列,对两例已确诊的甲型 H1N1 病毒 RNA 样本进行检测,分别扩增甲型 H1N1 上 M、NP、HA 基因的特异性片段,并用焦测序法进行序列分析。各基因片段的测序结果见图 4-图 6,各单链的焦测序检出长度为 20-30 bp。

根据所得的各基因片段的长约 20-30 bp 的正向链序列,与 NCBI 中已公布的此次流行的甲型 H1N1 病毒序列进行 blast 比对分析,序列一致,因此从病毒基因序列上可确诊该两例样本为甲型 H1N1 感染。

M2 蛋白阻断剂(如金刚烷胺、金刚乙胺)是用于治疗甲型流感的一大类抗病毒药物,病毒 M2 基因序列中是否存在 S31N(AGT/C to AAT/C)突变,是检测该病毒是否为 M2 蛋白阻断剂耐药的一个重要的分子标记。我们对所扩增的包含该突变位点的 M2 基因片段进行焦测序分析,结果如图 7,测得的病

毒序列为“5'-T CTC GTC ATT GCA GCA AAT-3'”，转化为氨基酸序列即“LVIAAN”，划线标记序列即为待检测的突变位点处，结果示该病毒 M2 基因序列中存在 S31N 突变，与 WHO 公布的此次流行的猪流感 H1N1 病毒为 M2 蛋白阻断剂耐药型的结论一致。

3 讨论

目前病毒核酸检测方法存在检测成本高、操作繁琐等问题，因此需要建立一种准确、简便、低成本的检测方法。焦测序能够实现快速准确的核酸序列分析，但目前市售的 PyroMark ID 定量遗传分析系统，荧光信号通过光电耦合器 (CCD) 收集，仪器价格昂贵，大大增加了焦测序的检测成本^[9]。焦测序仪的核心部件光电转换器主要有光电倍增管 (PMT)、CCD 和 PD 三种，其中以 PMT 灵敏度最高，但因体积偏大，难以实现阵列化，故不被商品化仪器所采用；而 PD 体积小，且价格低廉，不足之处在于其检测灵敏度较低。为此，本研究对焦测序反应体系进行优化，通过增加 ATP 硫酸化酶的量显著提高了焦测序的检测灵敏度，并应用于低成本、小型化的便携式生物发光分析仪。利用所建立的方法对 H1N1 流感病毒进行核酸序列分析，并对病毒耐药性位点进行检测，均得到准确的检测结果。

本文所建立的方法实现了对病毒核酸进行快速准确的序列分析，而低成本的便携式生物发光分析仪使得该方法有望推广至基层医疗单位、疾控中心等部门。除流感病毒外，该方法同样能够适用于其他病原微生物的核酸序列分析，为疾病防控提供了有力的工具。

参考文献(References)

- [1] Investigators A I, Webb S A, Pettila V, et al. Critical care services and 2009 H1N1 influenza in Australia and New Zealand [J]. *N Engl J Med*, 2009,361(20):1925-1934
- [2] Dawood F S, Jain S, Finelli L, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans[J]. *N Engl J Med*, 2009,360(25):2605-2615
- [3] Garten R J, Davis C T, Russell C A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans[J]. *Science*,2009,325(5937):197-201
- [4] Smith G J, Vijaykrishna D, Bahl J, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic[J]. *Nature*,2009,459(7250):1122-1125
- [5] Jefferies S, Earl D, Berry N, et al. Effectiveness of the 2009 seasonal influenza vaccine against pandemic influenza A (H1N1)2009 in healthcare workers in New Zealand, June-August 2009 [J]. *Euro Surveill*, 2011,16(2):19761
- [6] Dang Y, Lachance C, Wang Y, et al. Transcriptional approach to study porcine tracheal epithelial cells individually or dually infected with swine influenza virus and *Streptococcus suis* [J]. *BMC Vet Res*,2014, 10(1):86
- [7] Le Q M, Kiso M, Someya K, et al. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus[J]. *Nature*,2005,437(7062):1108
- [8] Lu X, Liu F, Zeng H, et al. Evaluation of the antigenic relatedness and cross-protective immunity of the neuraminidase between human influenza A (H1N1) virus and highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus[J]. *Virology*,2014,454-455:169-175
- [9] Zu R, Dong L, Qi X, et al. Virological and serological study of human infection with swine influenza A H1N1 virus in China [J]. *Virology*, 2013,446(1-2):49-55
- [10] Segawa T, Kobayashi Y, Sase Y, et al. Easy-to-use rapid gene amplification method for direct detection of RNA and DNA viruses in sera and feces from various animals [J]. *J Virol Methods*,2014,201: 31-37
- [11] Wang J, Tai W, Angione S L, et al. Subtyping clinical specimens of influenza A virus by use of a simple method to amplify RNA targets [J]. *J Clin Microbiol*,2013,51(10):3324-3330
- [12] Cha W, Ma Y, Saif Y M, et al. Development of microsphere-based multiplex branched DNA assay for detection and differentiation of avian influenza virus strains [J]. *J Clin Microbiol*,2010,48 (7): 2575-2577
- [13] Chen Y, Liu T, Cai L, et al. A one-step RT-PCR array for detection and differentiation of zoonotic influenza viruses H5N1, H9N2, and H1N1[J]. *J Clin Lab Anal*,2013,27(6):450-460
- [14] Fouchier R A, Bestebroer T M, Herfst S, et al. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene [J]. *J Clin Microbiol*,2000,38 (11): 4096-4101
- [15] Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate[J]. *Science*,1998,281(5375):363-365
- [16] Chen Z, Fu X, Zhang X, et al. Pyrosequencing-based barcodes for a dye-free multiplex bioassay[J]. *Chem Commun (Camb)*,2012,48(18): 2445-2447
- [17] Royo J L, Hidalgo M, Ruiz A. Pyrosequencing protocol using a universal biotinylated primer for mutation detection and SNP genotyping[J]. *Nat Protoc*,2007,2(7):1734-1739
- [18] Deyde V M, Sheu T G, Trujillo A A, et al. Detection of molecular markers of drug resistance in 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses by pyrosequencing [J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2010, 54(3):1102-1110
- [19] Liu Y, Wu H, Ye H, et al. A simplified pyrosequencing protocol based on linear-after-the-exponential (LATE)-PCR using whole blood as the starting material directly[J]. *Anal Methods*,2014(6):1384-1390
- [20] Deng Y M, Caldwell N, Hurt A, et al. A comparison of pyrosequencing and neuraminidase inhibition assays for the detection of oseltamivir-resistant pandemic influenza A(H1N1) 2009 viruses[J]. *Antiviral Res*,2011,90(1):87-91