

在MiSeq™ i100系列测序仪上 执行HIV基因组测序

HIV-1的精确检测和表征



采用Illumina Microbial Amplicon Prep方案快速探查HIV *pol*基因，用于病毒检测和耐药性检测



采用Viral Surveillance Panel v2进行全面的HIV基因组测序，用于追踪病毒进化并检测超过200种其他病毒病原体



灵活的端到端分析流程，在MiSeq™ i100系列测序仪上完成测序并进行DRAGEN™二级分析

简介

获得性免疫缺陷综合征（AIDS）的症状于1981年首次被识别，并在随后数年被归因于人类免疫缺陷病毒1型和2型（HIV-1和HIV-2）感染¹⁻⁴。HIV全球大流行已导致超过8800万人感染，超过4200万人因此丧生。⁵ 仅2023年一年，即报告了约130万例新发感染和63万例死亡。⁶

疾病预防方面的进展和有效抗逆转录病毒药物的研发已在很大程度上使HIV大流行转变为一种可管理的慢性疾病，显著降低了HIV传播和进展为AIDS的风险⁷⁻⁹。然而，HIV在全球各地区弱势人群中持续传播，凸显了对HIV监测的长期必要性。⁸ 通过新一代测序（NGS）进行分子监测可检测出导致抗逆转录病毒药物耐药的变异，追踪HIV传播（包括耐药HIV传播），检测与HIV嗜性相关的变异，并追踪宿主内病毒的进化^{10,11}。特别是，HIV *pol*基因的突变可导致对蛋白酶抑制剂（PI）、核苷类逆转录酶抑制剂（NRTI）、非核苷类逆转录酶抑制剂（NNRTI）以及整合酶链转移抑制剂（INSTI）的耐药性。¹² 因此，HIV *pol*基因是抗逆转录病毒药物耐药基因型检测的重要靶标。

本应用说明展示了采用集成因美纳文库制备、MiSeq™ i100系列测序仪测序和DRAGEN二级分析的NGS工作流程，对HIV阳性血浆和人工样本进行HIV检测和表征（图1）。

方法

样本

HIV阳性血浆样本获自BIOFLUIDS.com，使用QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN，货号52904），通过Mini Spin程序提取RNA，且未在AVL缓冲液中添加载体RNA。^{*} 人工配制样本用于测试：使用从外周血单个核细胞（PBMC）中培养的病毒提取的纯化RNA进行制备，细胞由SeraCare公司提供（表1）。将代表四种主要HIV-1亚型的对照品掺入10 ng人通用参考RNA（UHRR）背景中，最终总起始量分别为：用于Illumina Microbial Amplicon Prep的690病毒拷贝/μL，以及用于Illumina RNA Prep with Enrichment（搭配Viral Surveillance Panel v2）的1176病毒拷贝/μL，以评估不同HIV-1亚型间的性能表现（表1）。¹³

^{*} 充足的病毒核酸起始量对于获得良好性能至关重要。提取方法的考虑，例如使用蔗糖离心（蔗糖梯度）或添加载体RNA，可提高检测灵敏度，尤其对于低滴度样本。¹⁴



图1：用于HIV监测的全面NGS工作流程
将基于扩增子或靶向富集方法的因美纳文库制备与MiSeq™ i100系列测序仪测序及DRAGEN二级分析相结合，实现对HIV的精确基因组表征。

表1: 用于亚型对照的纯化RNA来源

SeraCare产品名称	物料编号	分离株ID
HIV-1纯化RNA亚型C	0400-0079	DJ259
HIV-1纯化RNA亚型B	0400-0078	US1
HIV-1纯化RNA亚型CRF01-AE	0400-0084	POC30506
HIV-1纯化RNA亚型CRF02-AG	0400-0076	POC44951

文库制备

HIV靶向测序通过两种方式进行：使用Illumina Microbial Amplicon Prep（因美纳，货号20097857）进行扩增子测序，以及使用搭配Viral Surveillance Panel v2的Illumina RNA Prep with Enrichment（因美纳，货号20108081）进行靶向富集。

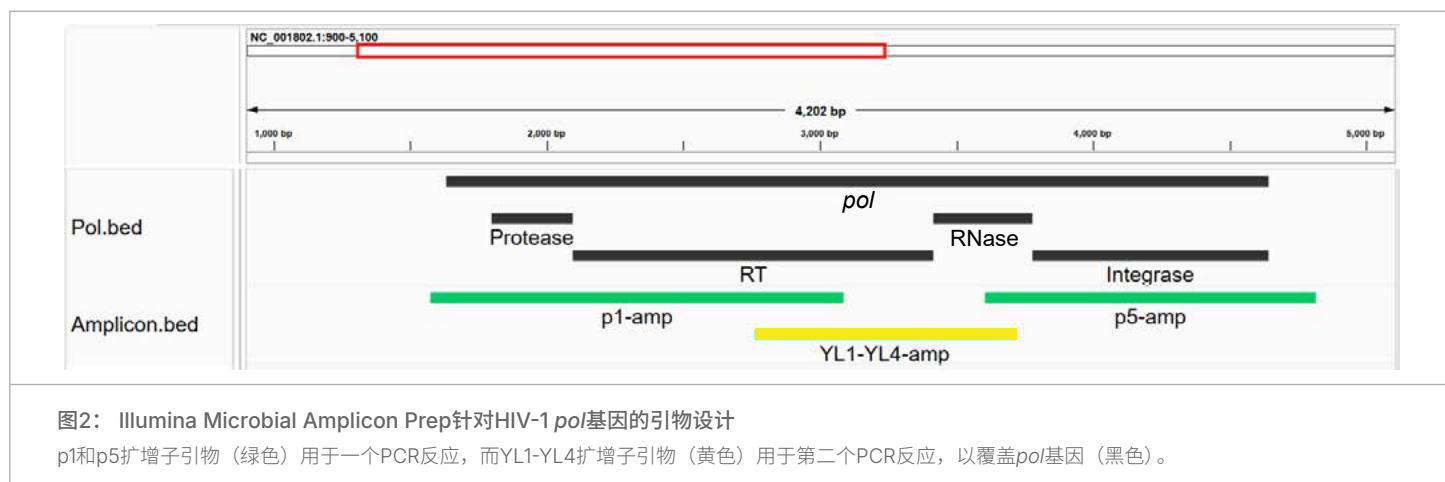
扩增子测序

对于Illumina Microbial Amplicon Prep，定制引物（包括已发表的引物¹⁵和由因美纳科学家设计以确保能扩增多种HIV-1亚型HIV *pol*基因的互补引物）均购自Integrated DNA Technologies（IDT），并稀释至每混池10 μM（表2）。由于靶向*pol*基因的扩增子在HIV-1基因组上的位置存在重叠，引物被分装至两个独立管中，并在两个独立的反应中用于扩增子PCR。此方法可避免小片段扩增子的产生，并支持ARTIC式扩增子方案¹⁶（图2）。

表2: 用于Illumina Microbial Amplicon Prep扩增HIV-1的定制引物

引物名称	引物序列5'-3'
P1-F v2	AAGGGYTGYTGAAATGYGG
P1-R v2	CTGTADTTCTGCTAYTAAMTCTTTTGATGG
P1-F	TTGGAAATGTGGAAAGGAAGGAC
P1-R	CTGTATTTCTGCTATTAAGTCTTTTGATGGG
P5-F	GGAATCATTCAAGCACAACCAGA
P5-F v2	TATGCAYTAGGAATYATTCARGCACA
P5-R	TCTCCTGTATGCAGACCCCAATAT
P5-R v2	TCTCCTGTATGCAGACCCCAATATG
引物名称	引物序列5'-3'
YL1	AGAACCYCCATTCTTGGATGGG
YL1 v2	AAGCATCAAAAGGAACCTCCCTT
YL4	CCTTTGTGTGCTGGTACCCATG
YL4 v2	CCACATGGACAGCAACTATTATG

由因美纳科学家为提高分类覆盖度而设计的互补引物在引物名称中以“v2”表示，由Integrated DNA Technologies提供。



即用型测序文库的制备对Illumina Microbial Amplicon Prep方案进行了轻微调整，包括减少随机六聚体起始量（2.5 μL而非8.5 μL）、RNA起始量（14.5 μL而非8.5 μL），以及酶切法片段化扩增子起始量（p1和p5扩增反应各10 μL、YL1-YL4扩增反应5 μL，DEPC H₂O为5 μL）。

靶向富集

搭配Viral Surveillance Panel v2的Illumina RNA Prep with Enrichment靶向HIV-1和HIV-2的全基因组，可对HIV及约200种其他病毒进行全基因组测序（WGS）。即用型测序文库按照生产商方案制备。

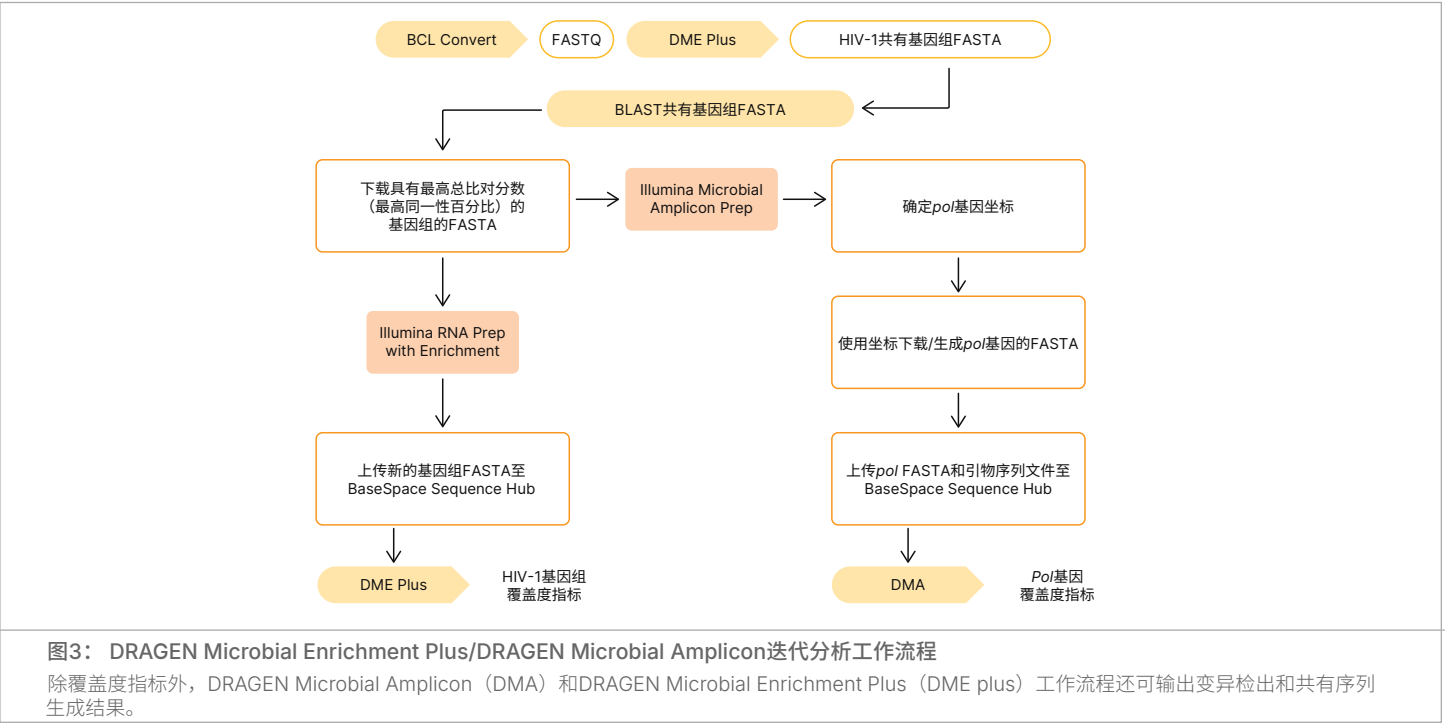
测序

在MiSeq™ i100 Plus测序仪上使用25M流动槽对制备的文库进行测序，运行配置为2×150 bp。

数据分析

测序完成后，使用FASTQ Toolkit App将数据归一化为：0.5M簇/1M双端（PE）read（对于Illumina Microbial Amplicon Prep）；1M簇/2M PE read（对于搭配Viral Surveillance Panel v2的Illumina RNA Prep with Enrichment）。归一化数据使用BaseSpace™ Sequence Hub云端平台中的DRAGEN Microbial Amplicon和DRAGEN Microbial Enrichment Plus应用程序进行分析。这些应用程序也可以通过MiSeq™ i100 Plus测序仪访问。为确定耐药信息，将归一化的FASTQ文件作为公开可用的Stanford数据库的输入。¹⁷

DRAGEN Microbial Enrichment Plus应用程序执行参考引导的组装；因此，需要选择正确的panel及其相关的由该panel靶向的病毒基因组参考序列集。因此，必须从应用程序的富集panel下拉菜单中选择Viral Surveillance Panel v2。尽管所选应用程序工作流程中使用了一组庞大且多样化的HIV-1参考基因组进行检测和比对，但对于特定样本，可能存在更具代表性的参考基因组，更适合用于分析。因此，我们采用了迭代方法，重新运行DRAGEN Microbial Enrichment Plus或DRAGEN Microbial Amplicon工作流程（图3）。



结果

Illumina Microbial Amplicon Prep的HIV-1 *pol* 基因覆盖度

使用DRAGEN Microbial Enrichment Plus应用程序对来自血浆样本的Illumina Microbial Amplicon Prep测序数据进行分析，检测到HIV-1并生成了一致性HIV-1 FASTA文件，随后将该文件用于BLAST分析以确定代表性的参考序列FASTA文件。为获得*pol*基因-特异性指标，使用Los Alamos国家实验室HIV序列数据库的Gene Cutter工具将HIV-1基因组序列截取至仅含*pol*基因区域。使用DRAGEN Microbial Amplicon应用程序将*pol*输出与参考序列进行比对，结果显示整个*pol*基因的覆盖度为100%（图4）。

对于人工样本，DRAGEN Microbial Enrichment Plus分析在所有Illumina Microbial Amplicon Prep文库技术重复中均检测到HIV-1。使用迭代分析工作流程，对所有样本进行DRAGEN Microbial Amplicon重新分析。DRAGEN Microbial Amplicon分析显示，每个测试的人工样本均获得了完整的*pol*基因覆盖度（图5）。

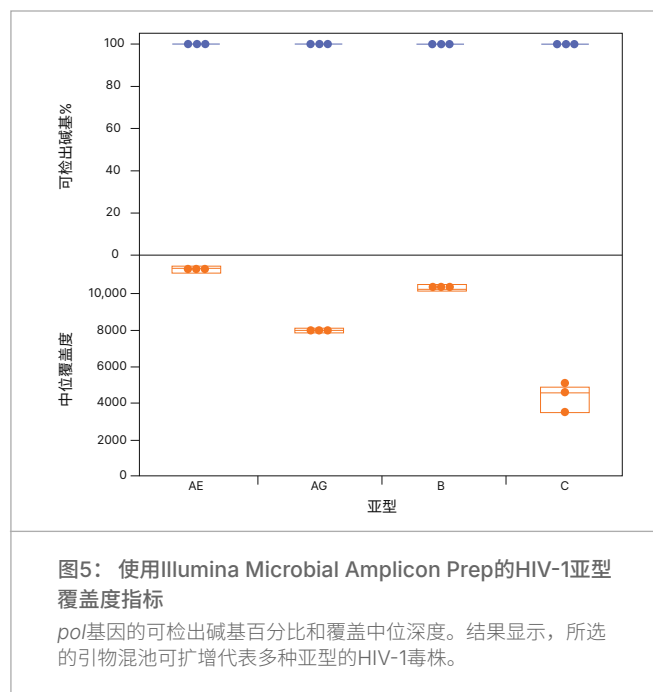


图5：使用Illumina Microbial Amplicon Prep的HIV-1亚型覆盖度指标

*pol*基因的可检出碱基百分比和覆盖中位深度。结果显示，所选的引物混池可扩增代表多种亚型的HIV-1毒株。

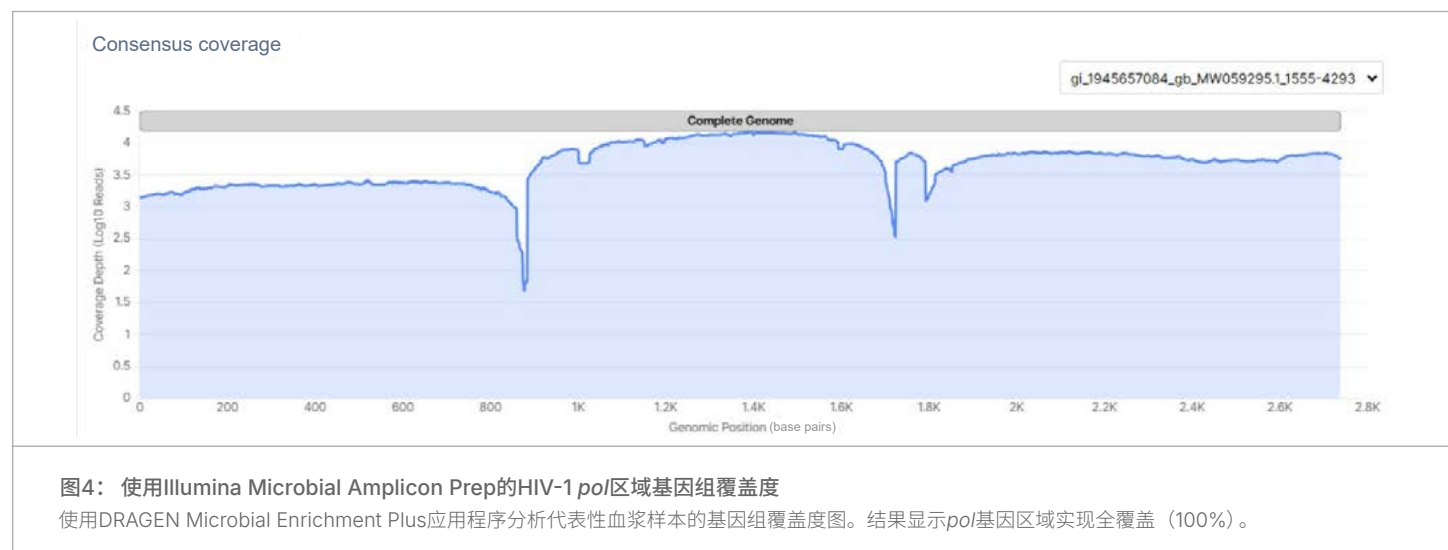
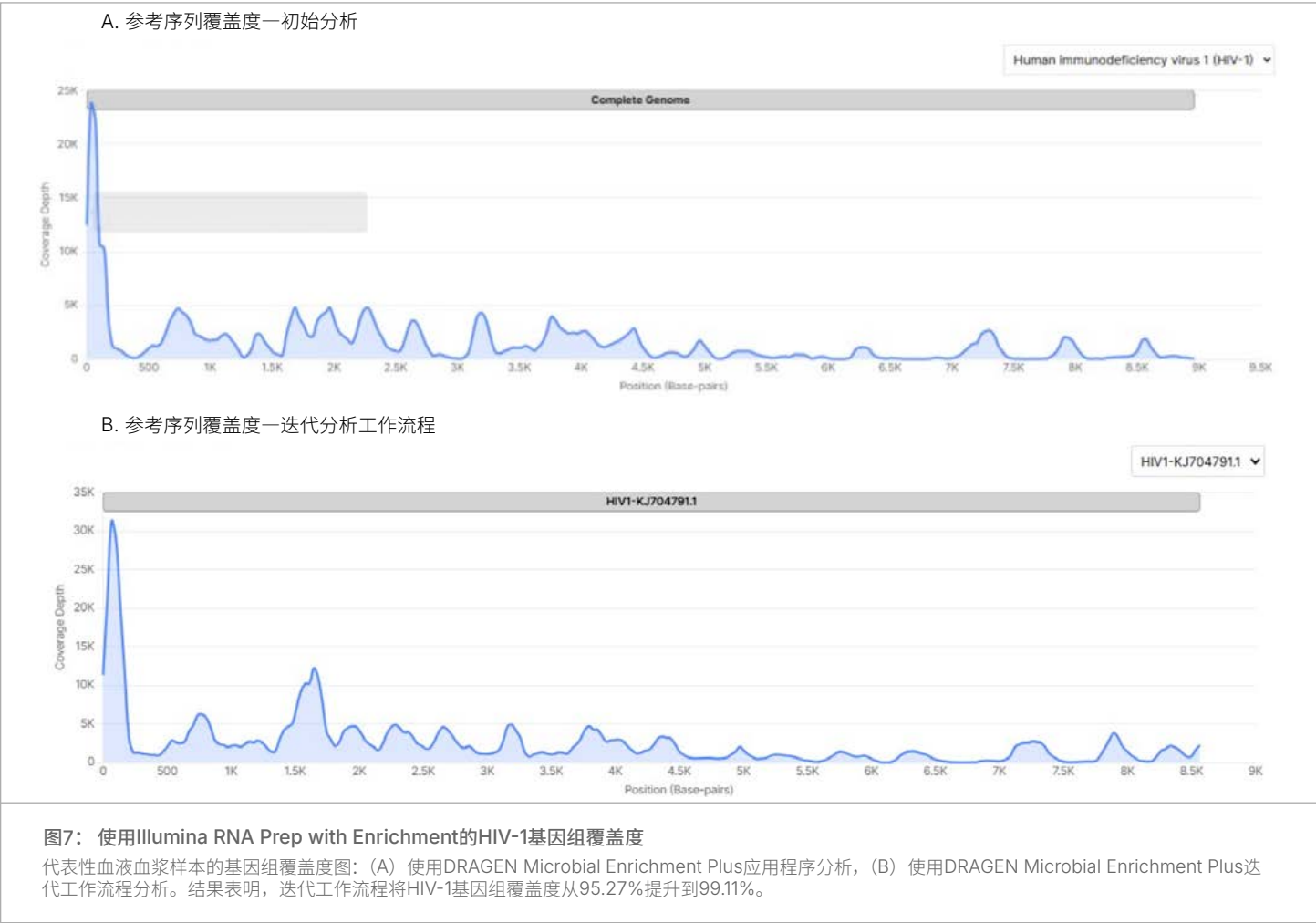
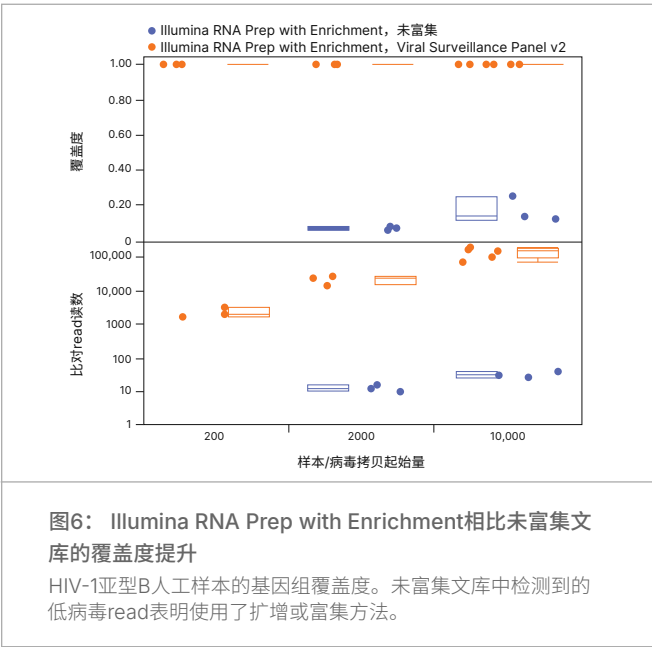


图4：使用Illumina Microbial Amplicon Prep的HIV-1 *pol*区域基因组覆盖度

使用DRAGEN Microbial Enrichment Plus应用程序分析代表性血浆样本的基因组覆盖度图。结果显示*pol*基因区域实现全覆盖（100%）。

使用Illumina RNA Prep with Enrichment的HIV-1 基因组覆盖度

DRAGEN Microbial Enrichment Plus分析在不同病毒拷贝起始量下，于部分未富集和所有Viral Surveillance Panel v2–富集的文库中检测到HIV-1（图6）。初始DRAGEN Microbial Enrichment Plus分析为HIV-1检出样本生成了覆盖度图。对于一份代表性血浆样本，HIV-1基因组95.27%的区域被覆盖（≥ 1× 深度），中位深度为757.5×，比对read为114,150条（图7A）。使用BLAST和核苷酸数据库对该分析产生的一致性基因组序列进行分析。评分最高的HIV-1基因组被用作迭代DRAGEN Microbial Enrichment Plus分析工作流程的起始量。这使得覆盖度指标更高，基因组覆盖度达到99.11%（≥ 1×深度）（图7B）。



耐药突变检测

使用[斯坦福HIV药物耐药性数据库](#)分析来自Illumina Microbial Amplicon Prep和Illumina RNA Prep with Enrichment两种方法（针对B亚型，10K病毒拷贝数起始量）的归一化FASTQ文件，使用默认参数（最低read深度阈值 ≥ 50 ，核苷酸混合阈值 $\leq 2\%$ ，突变检测阈值 $\geq 10\%$ ）评估DRM的存在。在这两种分析方法生成的数据中均未检测到主要或次要的PI、NRTI/NNRTI或INSTI突变。两种分析方法均检测到了由SeraCare提供的HIV-1基因组序列的其他预测突变（ $n = 24$ ）（图8）。

总结

MiSeq™ i100系列测序仪结合Illumina Microbial Amplicon Prep与搭配Viral Surveillance Panel v2的Illumina RNA Prep with Enrichment进行高质量文库制备，展现了其在HIV-1检测和耐药分析中的靶向测序能力。Illumina Microbial Amplicon Prep以更简单的工作流程提供了HIV *pol*基因的更深覆盖度，而搭配Viral Surveillance Panel v2的Illumina RNA Prep with Enrichment的富集方法则实现了HIV毒株的全基因组覆盖。本应用说明表明，MiSeq™ i100系列测序仪是一个灵活、端到端的HIV表征NGS工作流程的组成部分，可根据用户需求进行定制。

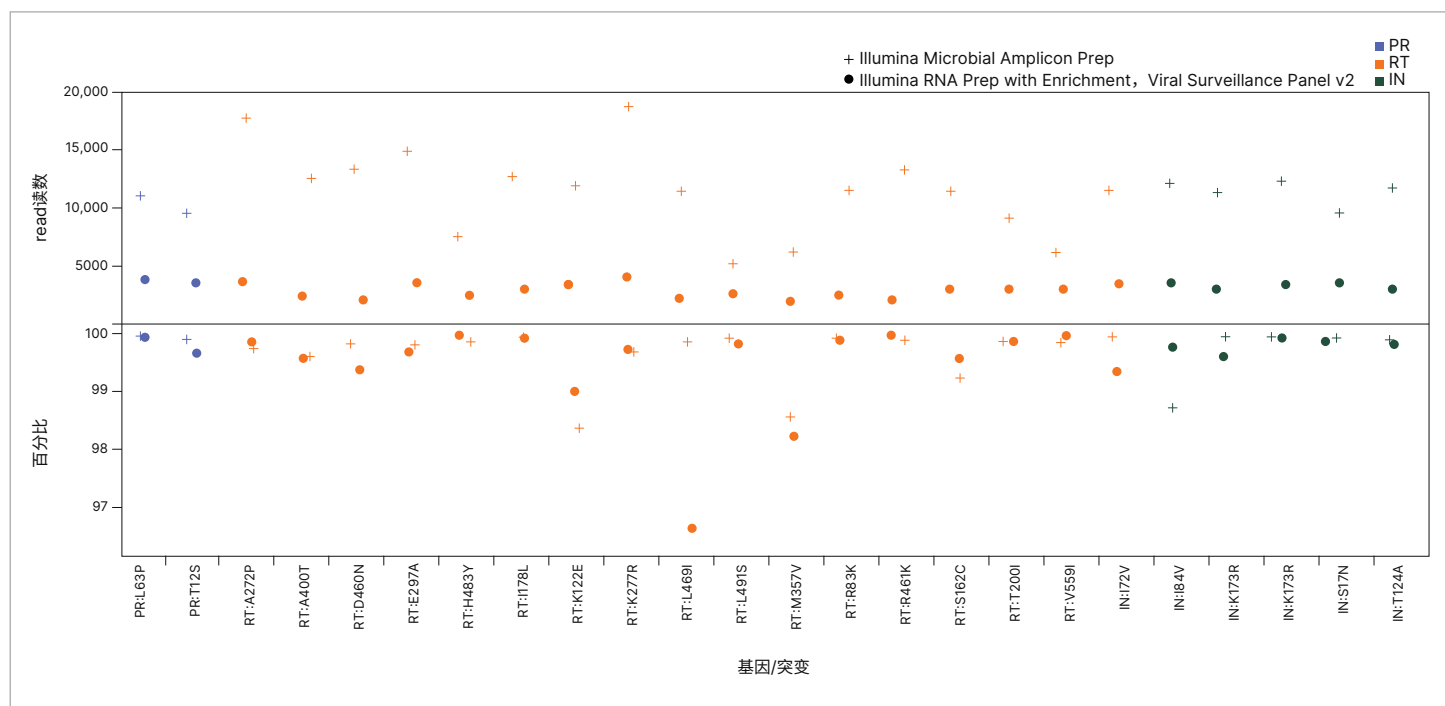


图8：使用Illumina Microbial Amplicon Prep和Illumina RNA Prep with Enrichment进行DRM检测

含亚型B的人工样本*pol*基因中检测到的突变及其相关相对频率与read读数。X轴标注指代基因：参考氨基酸：突变氨基酸。

了解更多→

MiSeq™ i100系列测序仪

Illumina Microbial Amplicon Prep

Viral Surveillance Panel v2

参考文献

- Greene WC. [A history of AIDS: looking back to see ahead](#) [published correction appears in *Eur J Immunol*. 2008 Jan;38(1):309]. *Eur J Immunol*. 2007;37 Suppl 1:S94-S102. doi:10.1002/eji.200737441
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. [Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome \(AIDS\)](#). *Science*. 1983;220(4599):868-871. doi:10.1126/science.6189183
- Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. [Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses \(HTLV-III\) from patients with AIDS and at risk for AIDS](#). *Science*. 1984;224(4648):500-503. doi:10.1126/science.6200936
- Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. [Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses \(HTLV-III\) from patients with AIDS and pre-AIDS](#). *Science*. 1984;224(4648):497-500. doi:10.1126/science.6200935
- World Health Organization. The Global Health Observatory HIV. [who.int/data/gho/data/themes/hiv-aids](#). Published July 2024. Accessed May 20, 2025.
- World Health Organization. HIV data and statistics. [who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/hiv-strategic-information/hiv-data-and-statistics](#). Published July 2024. Accessed May 20, 2025.
- Sharp PM, Hahn BH. [Origins of HIV and the AIDS pandemic](#). *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011;1(1):a006841. doi:10.1101/cshperspect.a006841
- Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. [HIV infection](#). *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15035. Published 2015 Oct 1. doi:10.1038/nrdp.2015.35
- Swinkels HM, Nguyen AD, Gulick PG. [HIV and AIDS](#). [Updated 2024 Jul 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-.
- Yu F, Wen Y, Wang J, et al. [The Transmission and Evolution of HIV-1 Quasispecies within One Couple: a Follow-up Study based on Next-Generation Sequencing](#). *Sci Rep*. 2018;8(1):1404. Published 2018 Jan 23. doi:10.1038/s41598-018-19783-3
- Ouyang F, Yuan D, Zhai W, Liu S, Zhou Y, Yang H. [HIV-1 Drug Resistance Detected by Next-Generation Sequencing among ART-Naïve Individuals: A Systematic Review and Meta-Analysis](#). *Viruses*. 2024;16(2):239. Published 2024 Feb 2. doi:10.3390/v16020239
- Jones LR, Moretti F, Calvo AY, et al. [Drug resistance mutations in HIV pol sequences from Argentinean patients under antiretroviral treatment: subtype, gender, and age issues](#). *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(8):949-955. doi:10.1089/AID.2011.0287
- Hemelaar J, Elangovan R, Yun J, et al. [Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990-2015: a systematic review, global survey, and trend analysis](#) [published correction appears in *Lancet Infect Dis*. 2020 Mar;20(3):e27. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30747-9]. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(2):143-155. doi:10.1016/S1473-3099(18)30647-9
- Chaillon A, Gianella S, Dellicour S, et al. [HIV persists throughout deep tissues with repopulation from multiple anatomical sources](#). *J Clin Invest*. 2020;130(4):1699-1712. doi:10.1172/JCI134815
- Winters MA, Coolley KL, Girard YA, et al. [A 6-basepair insert in the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1 confers resistance to multiple nucleoside inhibitors](#). *J Clin Invest*. 1998;102(10):1769-1775. doi:10.1172/JCI4948
- Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, et al. [Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples](#). *Nat Protoc*. 2017;12(6):1261-1276. doi:10.1038/nprot.2017.066
- Rhee SY, Gonzales MJ, Kantor R, Betts BJ, Ravela J, Shafer RW. [Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database](#). *Nucleic Acids Res*. 2003;31(1):298-303. doi:10.1093/nar/gkg100

Illumina中国

上海办公室 • 电话 (021) 6032-1066 • 传真 (021) 6090-6279
 北京办公室 • 电话 (010) 8441-6900 • 传真 (010) 8455-4855
 技术支持热线 400-066-5835 • chinasupport@illumina.com
 市场销售热线 400-066-5875 • china_info@illumina.com • www.illumina.com.cn

© 2026 Illumina, Inc. 保留所有权利。所有商标均为因美纳公司或其各自所有者的财产。
 关于具体的商标信息，请访问www.illumina.com.cn/company/legal.html。
 M-GL-03571 v1.0



因美纳企业动态



因美纳市场助手



因美纳中国官方商城

illumina®