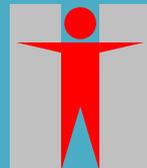


植物類藥材 DNA條形碼檢測法 培訓活動

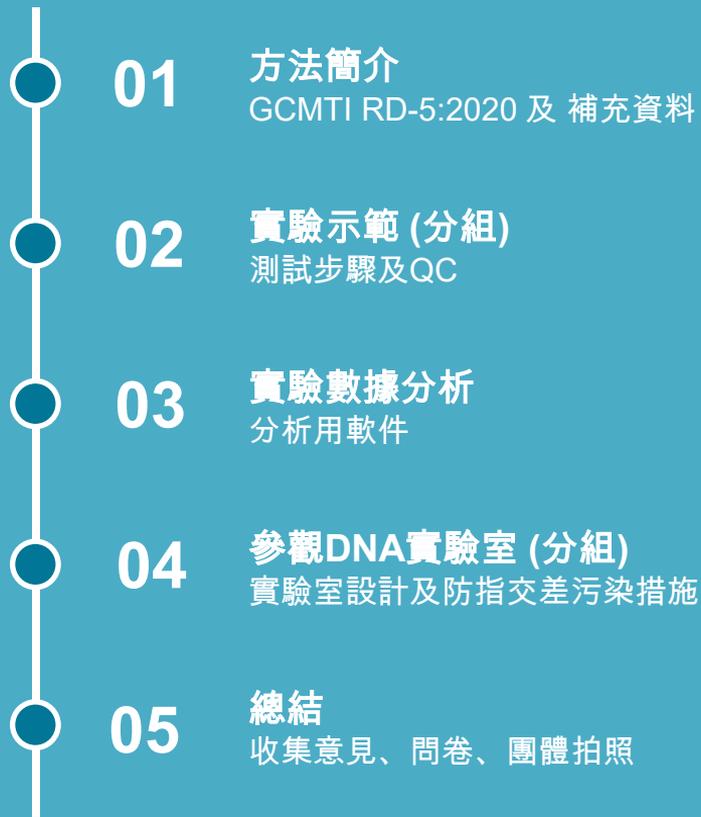
Government of Chinese Medicine Institute
Chinese Medicine Regulatory Office
Department of Health

衛生署中醫藥規管辦公室
政府中藥檢測中心

13-8-2021

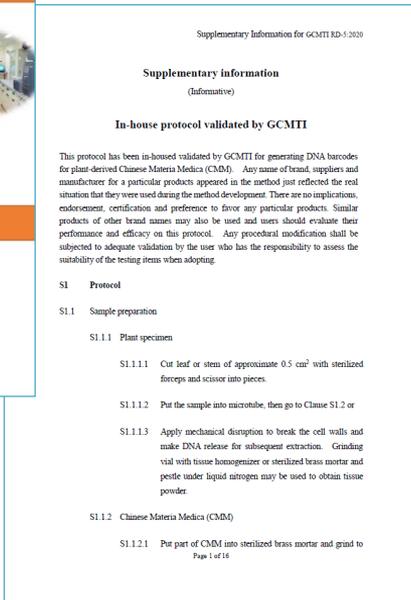
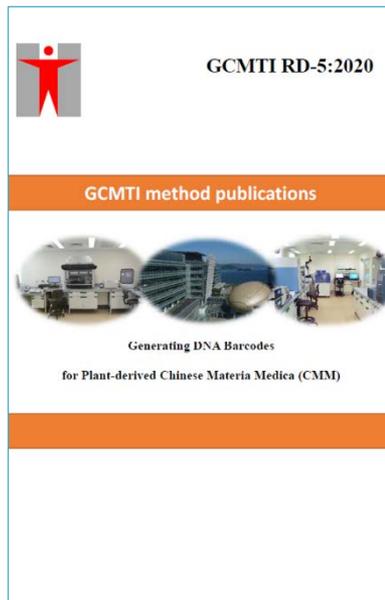


培訓流程



GCMTI方法

https://www.cmro.gov.hk/html/b5/useful_information/gcmti/research/testing_methods/index.html

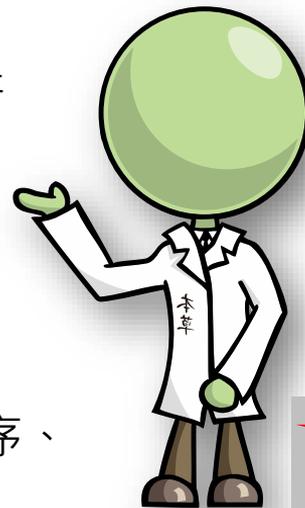


GCMTI RD-5:2020

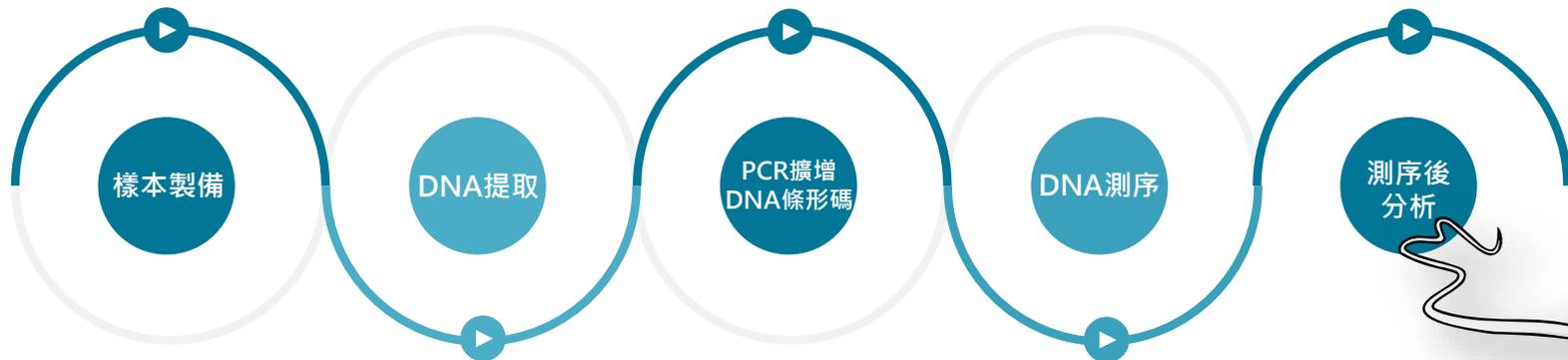
- 方法背景及解說
- 品質控制
- DNA 提取方法
- 引物對及PCR擴增條件

補充資料

- 方法步驟
(試樣製備、DNA 提取、
擴增DNA條形碼、DNA 測序、
測序後分析)

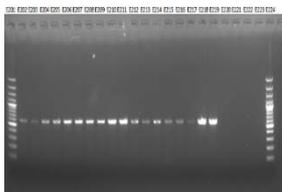


方法步驟



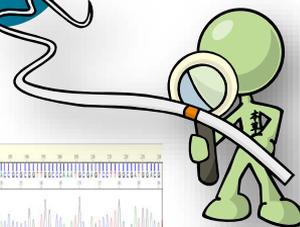
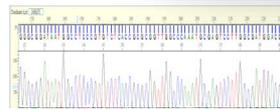
• 研磨

- 自動化DNA提取工作站
- 離心柱 DNA 提取法



- PCR 擴增 3 個條形碼
- PCR 產物檢測
- PCR 產物純化

- DNA 循環測序反應
- DNA 測序產物純化
- 電泳純化 DNA 測序產物



培訓重點

培訓場地	培訓重點
生藥實驗室 (樣品製備)	<ul style="list-style-type: none">• 研磨設備及樣本製備• 步驟重點及技巧
理化及生物實驗-1 (樣品製備)	<ul style="list-style-type: none">• 自動化DNA提取工作站• 離心柱 DNA 提取法• DNA質量評估• 步驟重點及技巧
聚合酶連鎖反應室	<ul style="list-style-type: none">• 建立PCR反應• 步驟重點及技巧
DNA分析實驗室	<ul style="list-style-type: none">• 電泳分析PCR產物• 純化• 建立循環測序反應• 基因分析儀測序分析• 步驟重點及技巧

1. 實驗室操作環境明確區分成前PCR擴增區域和後PCR擴增區域
2. 採用"單向流程"的原則處理樣品，從前PCR擴增區域到後PCR擴增區域
3. 相關步驟:
 - 儀器操作
 - 操作建議



樣本製備 - 防止污染措施

操作時的注意事項



手套、消毒劑、吸附墊



每次只處理一份樣本



使用消毒用具



紫外光交聯器

- 實驗前後應使用適當的消毒劑對工作區進行消毒，如：70%乙醇、10%次氯酸鈉、化學劑等
- 樣本前處理時，每次只處理一份，避免交叉污染。處理下一份樣本前，更換手套
- 使用完生物安全櫃和層流櫃前後應照射紫外光
- 器具要高溫高壓消毒，或使用一次性已消毒用具或已照射紫外光消毒的用具
- 不能處理後PCR區的產物
- 實驗室應按個別工作流程及環境設計一套合適的防止污染措施，以上建議謹供參考



樣本製備

補充資料 (S1.1)



- 儀器: 研磨用具
(如使用液氮研磨,應採取合適的預防措施以防止交叉污染)
- 切出部分組織並放入消毒過的研磨用具磨成粉末
- QC
提取陽性對照 (Extraction positive control)
提取空白對照 (Extraction blank control)
(隨機)平行雙樣 (Random) sample duplicate control



DNA提取 - 防止污染措施

操作時的注意事項



手套、消毒劑、吸附墊



紫外光交聯器

- 實驗前後應使用適當的消毒劑對工作區進行消毒，如：70%乙醇、10%次氯酸鈉、化學劑等
- 樣本前處理時，每次只處理一份，避免交叉污染。處理下一份樣本前，更換手套
- 使用完生物安全櫃和層流櫃前後應照射紫外光
- 器具要高溫高壓消毒，或使用一次性已消毒用具或已照射紫外光消毒的用具
- 不能處理後PCR區的產物





DNA提取

GCMTI RD-5:2020 (Annex A)

樣本粉
抹 → 樣品裂解
液 → 恆溫
混勻 → 分離溶液
及組織

離心柱式DNA提取方案(A2)

DNA
吸附 → 漂洗 → DNA
洗脫 → 純化
DNA

自動化DNA提取方案(A1)

珠子
吸附 → 漂洗 → 磁力
分離 → 純化
DNA



全自動核酸萃取系統 (QIAAsymphony SP)

- 搭配全自動條碼讀取功能，可全程追蹤檢體和試劑的即時狀態
- 內附防漏裝置可有效避免過程中產生的交叉污染，另有UV燈及HEPA設備，可有效清除系統內部汙染來源，
- QIAAsymphony® DNA Investigator® Kit (預填充密封試劑盒)



全自動核酸萃取系統 (QIA Symphony SP)

系統運作

1. 上樣 (Input)

- 系統以24個樣本作為一批次進行核酸萃取
- 進行萃取過程中可連續進行批次上樣以提高使用彈性

2. 裂解 (Lysis)

- 整合震盪,加熱和制冷

3. 純化 (Purification)

4. 沖脫 (Elution)



樣本處理如下

自動化DNA提取

QIASymphony DNA Investigator kit

利用磁性粒子吸附DNA的原理在封閉系統中純化DNA

1. 樣本前處理 (人手)
2. 上樣至全自動核酸萃取系統(人手)
3. DNA提取(自動化)

Well 1

- 被棒蓋保護(Rod cover)的磁棒(Magnetic rod)探入樣本液
- 與磁性粒子(Magnetic particles)混和吸附DNA,然後抽離磁性粒子帶去Well 2

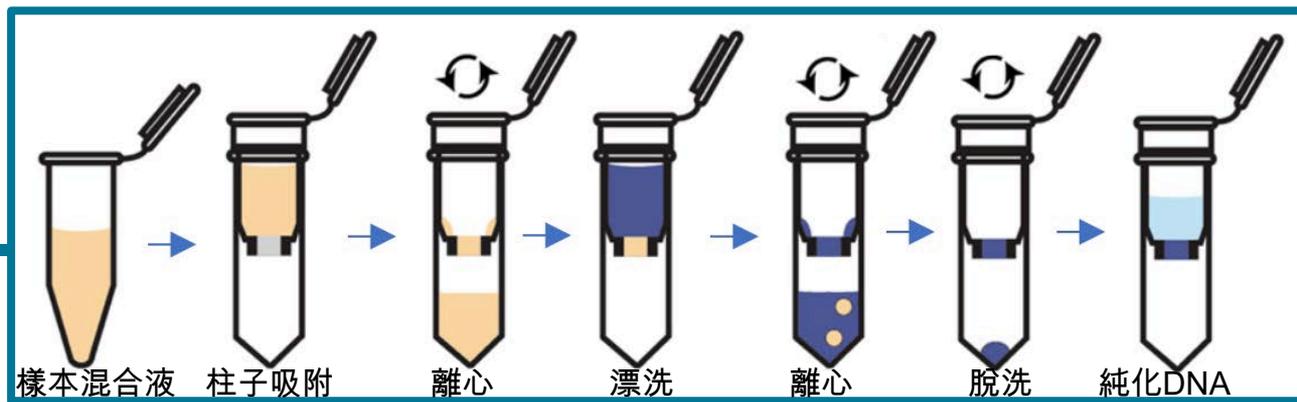
Well 2

- 帶蓋的磁棒釋放帶DNA的磁性粒子
- QIASymphony SP 使用包含 24 個磁杆陣列的磁頭，因此可以同時處理 24 個樣本
- 重複多次漂洗磁性粒子



DNA提取

GCMTI RD-5:2020 (Annex A)



A2.10

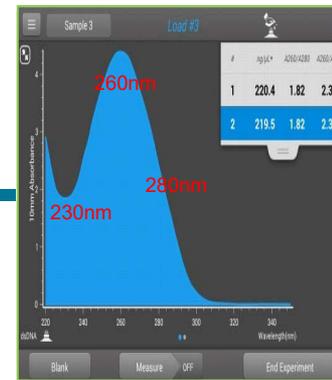
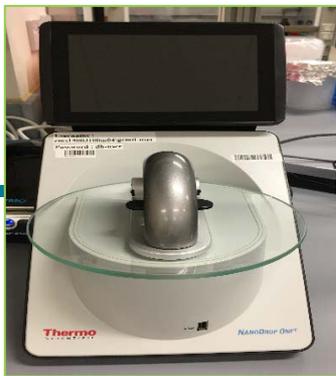
A2.10

A2.17



紫外-可見光分光光度計評估DNA提取物純度

補充資料 (S1.3 & S1.7)



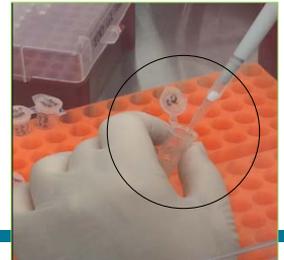
波長 (nm)	吸光度最強的物質
215 - 230	常用緩衝液和溶劑
260	核酸
280	芳香族胺基酸

- DNA提取物純度
 - A260/A280
 - A260/A230
- DNA提取物濃度均一化至10 ng/μL



PCR - 防止污染措施

操作時的注意事項



- 實驗前後和使用適當的消毒劑對工作區及移液槍進行消毒，如：70%乙醇、10%次氯酸鈉、化學劑等
- 器具要高溫高壓消毒，或使用一次性已消毒用具或已照射紫外光消毒的用具
- 使用層流櫃
 - 前後應照射紫外光
 - 使用獨立層流櫃配備 PCR 主混合液試劑，層流氣流可保護試劑，避免試劑受環境和樣本污染
 - 使用獨立層流櫃處理 DNA 提取物，每次只處理一份樣本的試管，避免交叉污染
- 分裝試劑，可減少污染和反覆解凍引致試劑降解
- 注意打開盛載 DNA 提取物的樣本試管時有可能會引致污染
- 使用有濾芯的吸頭進行移液，以阻隔 DNA 提取物的氣懸膠體污染試劑和樣本



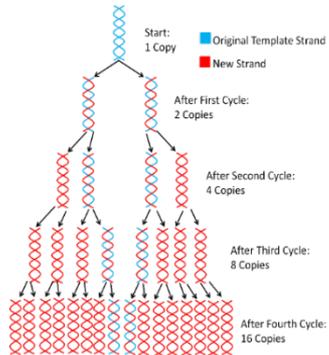
聚合酶連鎖反應 (PCR)

GCMTI RD-5:2020 (Annex B)

選擇 + 複製

複製範本DNA

影印某編號文件

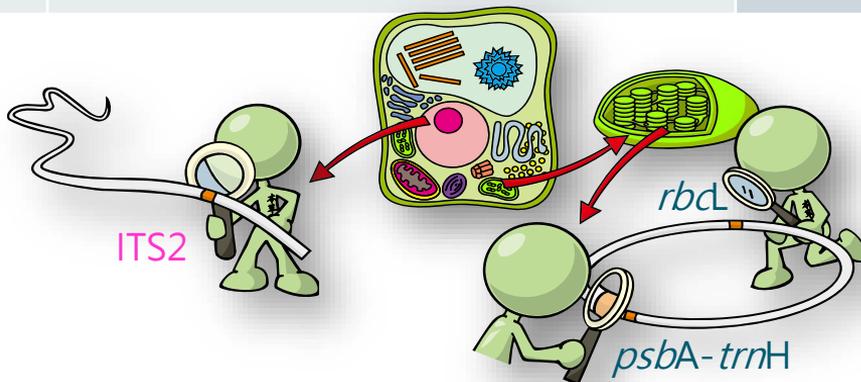


PCR	影印
範本DNA (Template DNA)	文件櫃 (File cabinet)
引物(Primer)	檔索引或文件編號 (File Index or file number)
聚合酶 (Polymerase)	影印機 (Photocopier)
目標DNA條帶 (DNA segment of interest)	副本 (Copies)



引物組合

引物名稱	引物方向	引物序列 (5'-3')	擴增物長度 (bp)	目標區域
CP03F	正向	5' - CGG ACG AGA ATA AAG ATA GAG T - 3'	~ 123	植物葉綠體DNA片段
CP03R	反向	5' - TTT TGG GGA TAG AGG GAC TTG A - 3'		
ITS2F	正向	5' - ATG CGA TAC TTG GTG TGA AT - 3'	~ 500	植物內部轉錄間隔區2 (ITS2)
ITS3R	反向	5' - GAC GCT TCT CCA GAC TAC AAT - 3'		
psbAF	正向	5' - GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C - 3'	~ 500	葉綠體 <i>psbA-trnH</i> 基因間區(<i>psbA-trnH</i>)
trnHR	反向	5' - CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC - 3'		
rbclLaF	正向	5' - ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC - 3'	~ 600	葉綠體二磷酸核酮糖羧化酶大鏈(<i>rbcl</i>)
rbclLaR	反向	5' - GTA AAA TCA AGT CCA CCR CG - 3'		

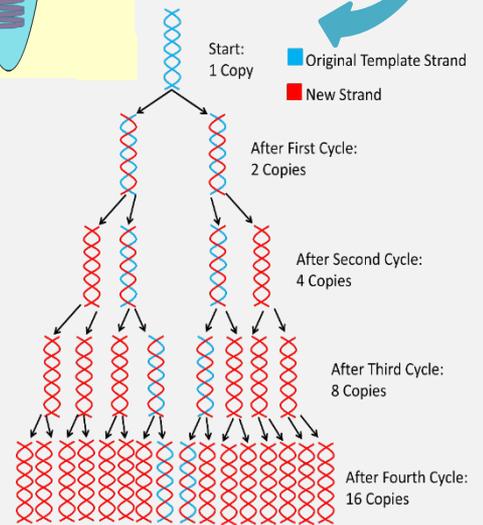
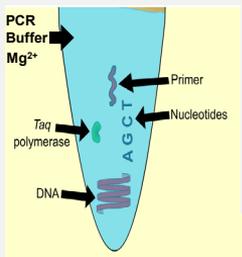


Amplification of a DNA segment of interest

選擇 + 複製

Photocopying of a record of interest

PCR	影印
範本DNA (Template DNA)	文件櫃 (File cabinet)
引物(Primer)	檔索引或文件編號 (File Index or file number)
聚合酶 (Polymerase)	影印機 (Photocopier)
目標DNA條帶 (DNA segment of interest)	副本 (Copies)



聚合酶鏈式反應

(Polymerase chain reaction, PCR)

GCMTI RD-5:2020 (Annex B)

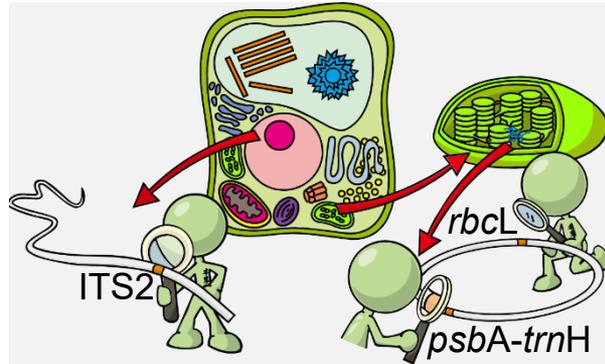
- 是一種用於擴增特定DNA片段的分子生物學技術，而至細胞低含量DNA可達到檢測的水平
- 特異性依賴於與目的DNA片段兩端互補的寡核苷酸引物組合(Oligonucleotide primer pair)
- 現時DNA檢測方法的核心技術



本方法引物範圍

GCMTI RD-5:2020 (4.3)

DNA 條形碼	DNA條形碼的位置
ITS2	<ul style="list-style-type: none">位於植物5.8S和28S核糖體核糖核酸 (ribosomal RNA)之間的內部轉錄間隔區2 (ITS2)，是核糖體 RNA (rRNA) 基因非轉錄區的一部分。進化速率較快，一般用於研究屬間、種間甚至居群間等較低分類等級的系統關係
<i>psbA-trnH</i>	<ul style="list-style-type: none">位於葉綠體基因組光系統II反應中心蛋白D1(<i>psbA</i>)和組氨酸運轉核糖核酸 (<i>trnH</i>)之間的一段非編碼區區域該間區進化速率較快，常用於植物屬間、種間的系統發育研究
<i>rbcl</i>	<ul style="list-style-type: none">位於擬南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)葉綠體基因組(NCBI登記號NC_000932)二磷酸核酮糖羧化酶大鏈(<i>rbcl</i>)的5端方向第1至599個鹼基(除去引物結合位點後，則位於第27至579個鹼基)進化速率較慢，常用於探討科級和科級以上等級的系統發育問題



聚合酶鏈式反應

(Polymerase chain reaction, PCR)

GCMTI RD-5:2020 (Annex B)

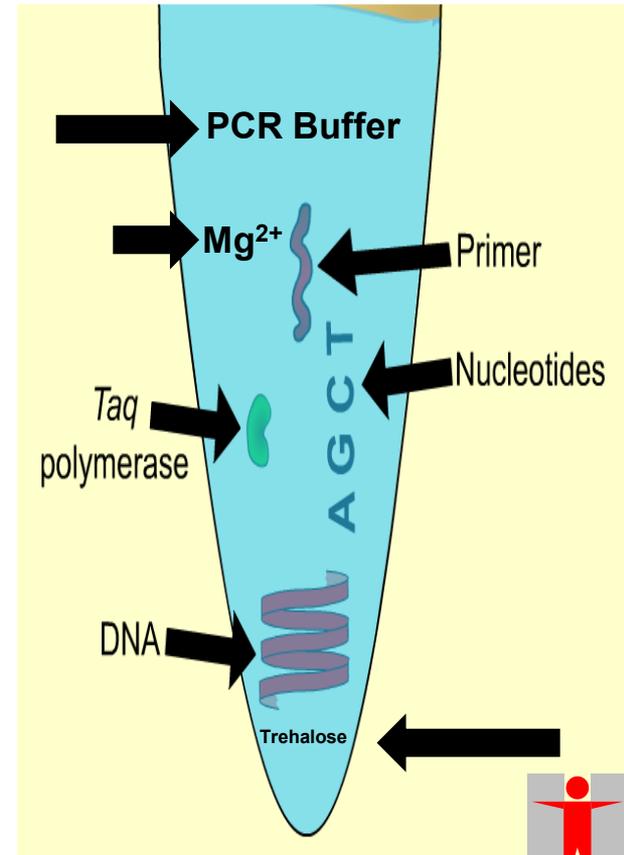
➤ 構建反應系統

- 模板DNA (Template DNA)
- 引物組合 (Primer pair)
- PCR緩沖液 (其中需要Mg²⁺) (PCR master mix included Mg²⁺)
- DNA聚合酶 (Taq DNA Polymerase)
- dNTP混合物 (dNTP mix)

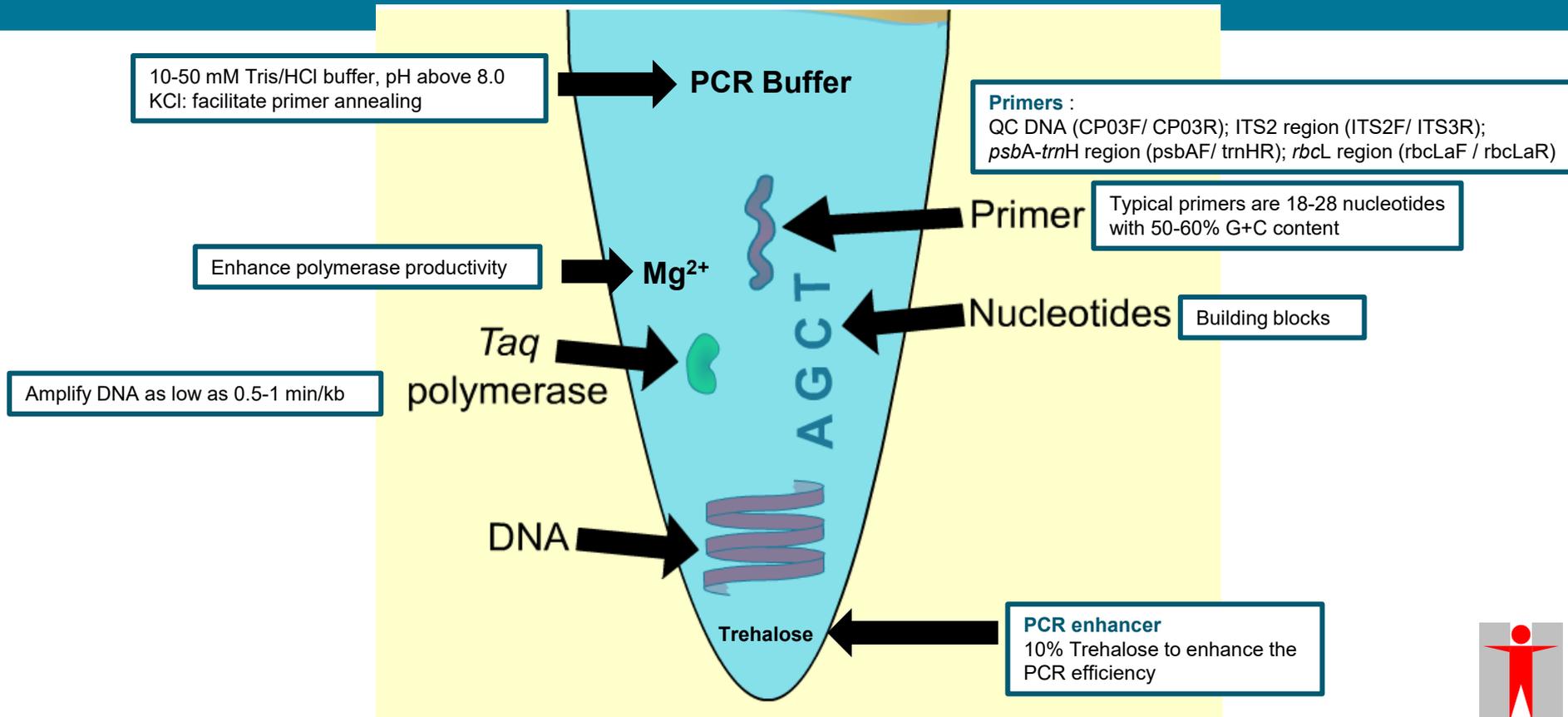
➤ 引物組合

- PCR擴增技術的重要部份
- 一對約18-30個鹼基(bp)的寡核苷酸
- 界定DNA擴增範圍
- 引物組合需跟DNA模板可互補(結合)，否則PCR無法進行

構建反應系統



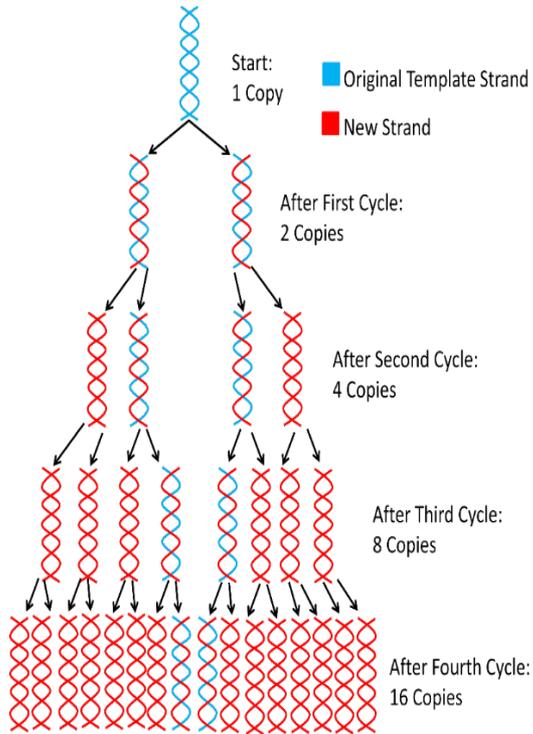
Overview of PCR Components



PCR 熱循環儀



1 copy → 2 copies → 4 copies → 2^n



聚合酶鏈式反應

(Polymerase chain reaction, PCR)

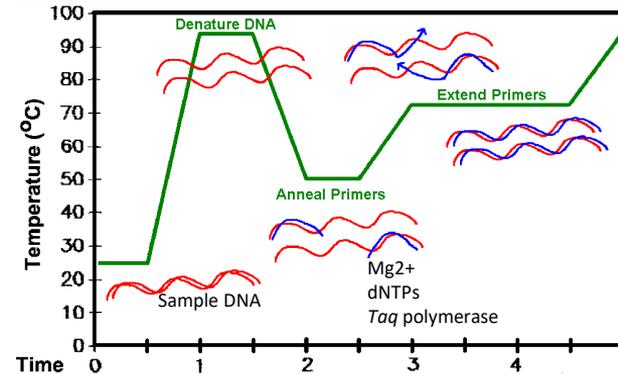
GCMTI RD-5:2020 (Annex B)

➤ 溫度升降循環

- 變性 (denature)
 - 退火 (annealing)
 - 延申 (extension)
-
- 退火溫度影響引物組合及模板DNA的結合

引物組合：

QC DNA (CP03F/ CP03R);
ITS2的範圍 (ITS2F/ ITS3R);
*psbA-trnH*的範圍 (psbAF/ trnHR);
*rbcL*的範圍 (rbcLaF / rbcLaR)

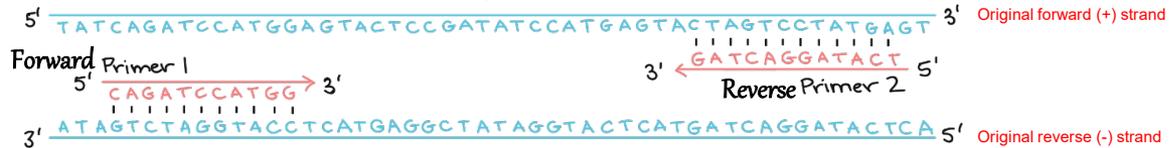


Complementary DNA & Directions

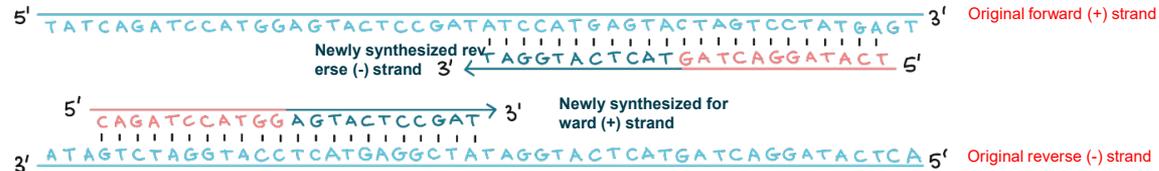
Complementary DNA strands



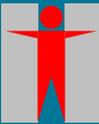
Primer binds to denaturated DNA strands



Taq polymerase extends primers



十項事情可以影響PCR的成功率



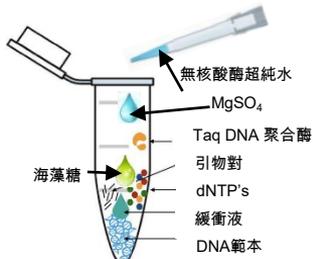
事項	
1	太多或降解的dNTP <ul style="list-style-type: none">• 太多的dNTP會抑制反應• dNTPs對冷凍/解凍非常敏感
2	未混合氯化鎂 氯化鎂在冷凍時形成濃度梯度，使用前需要渦旋
3	錯誤的氯化鎂濃度
4	PCR反應中存在抑制物 <ul style="list-style-type: none">• 要確保知道DNA的來源。氯仿、苯酚、EDTA、SDS和其他離子劑以及乙醇都會抑制你的PCR
5	使用不合適的緩衝液

事項	
6	太多的酶 <ul style="list-style-type: none">• PCR中過多的酶會導致PCR產物被弄污
7	引物濃度不正確 <ul style="list-style-type: none">• 引物太少會導致不能產生到PCR產物• 引物太多導致產生引物二聚體(Primer dimer)，不能達致足夠的擴增量
8	錯誤的PCR程式 <ul style="list-style-type: none">• 在開始熱循環之前檢查PCR程式• 非常容易在不經意間改變程式
9	範本過多或不足 <ul style="list-style-type: none">• 範本太多，會使所有引物結合而抑制PCR• 範本太少，擴增物可能不能檢測得到
10	引物設計不當 <ul style="list-style-type: none">• 避免自互補、成對引物之間的互補和過長的寡聚物 (>30bp)



PCR擴增DNA條形碼

GCMTI RD-5:2020 (Annex B2.); 補充資料 (S1.4.1 - S1.4.6)

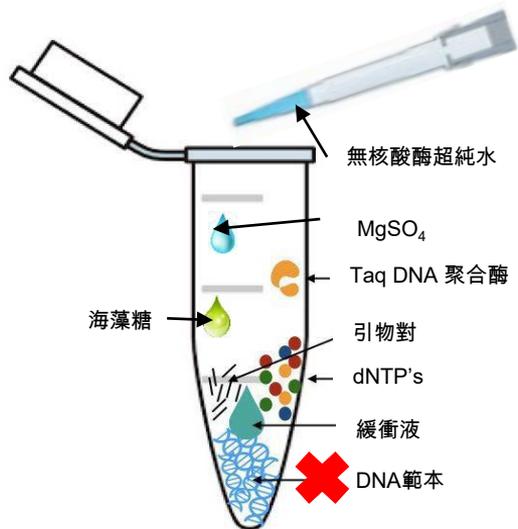


PCR試劑條件 - 目標DNA

試劑	植物葉綠體DNA片段	ITS2	psbA-trnH	rbcL
	最終濃度	最後濃度	最後濃度	最後濃度
DNA範本	20 ng	30 ng	30 ng	30 ng
10X PCR緩衝液(不含Mg ²⁺)	1 X	1 X	1 X	1 X
50 mM MgSO ₄	1.5 mM	2.0 mM	2.0 mM	2.5 mM
5 mM dNTPs	0.2 mM @ dNTP	0.2 mM @ dNTP	0.2 mM @ dNTP	0.05 mM @ dNTP
10%海藻糖	-	-	-	5%
10 μM 正向引物	0.2 μM	0.1 μM	0.1 μM	0.1 μM
10 μM 反向引物	0.2 μM	0.1 μM	0.1 μM	0.1 μM
Taq DNA聚合酶 (5 U/μL)	0.625 U 對每次反應	1.0 U 對每次反應	1.0 U 對每次反應	0.6 U 對每次反應
無核酸酶超純水	加無菌超純水至25 μL	加無菌超純水至25 μL	加無菌超純水至25 μL	加無菌超純水至25 μL

PCR擴增DNA條形碼

GCMTI RD-5:2020 (Annex B2.); 補充資料 (S1.4.7)



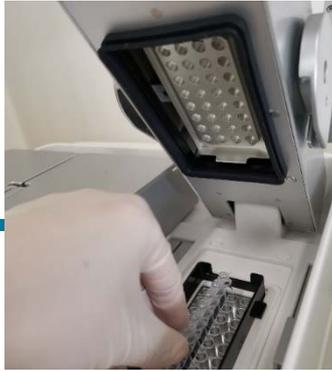
- QC

PCR 空白對照 (PCR negative control) : 是PCR試管不加入任何樣品或對照品DNA範本



PCR擴增DNA條形碼

GCMTI RD-5:2020 (Annex B3.); 補充資料 (S1.4.8)



PCR反應條件

植物葉綠體DNA片段			ITS2			<i>psbA-trnH</i>			<i>rbcl</i>		
溫度	時間	循環次數	溫度	時間	循環次數	溫度	時間	循環次數	溫度	時間	循環次數
95°C	10 分鐘	1	94°C	5 分鐘	1	94°C	5 分鐘	1	94°C	4 分鐘	1
94°C	30 秒		94°C	30 秒		94°C	1 分鐘		94°C	30 秒	
55°C	30 秒	40	56°C	30 秒	40	56°C	1 分鐘	30	55°C	30 秒	35
72°C	30 秒		72°C	45 秒		72°C	1.5 分鐘		72°C	1 分鐘	
72°C	7 分鐘	1	72°C	10 分鐘	1	72°C	7 分鐘	1	72°C	10 分鐘	1
4°C	∞	--	4°C	∞	--	4°C	∞	--	4°C	∞	--



後PCR擴增區 - 防止污染措施

操作時的注意事項



- 實驗前後應使用適當的消毒劑對工作區進行消毒，如：70%乙醇、10%次氯酸鈉、化學劑等
- 器具要高溫高壓消毒，或使用一次性已消毒用具或已照射紫外光消毒的用具
- 使用完生物安全櫃和層流櫃前後應照射紫外光
- 只可在後PCR區打開盛載PCR擴增物的試管
- 用有濾芯的吸頭
- 實驗室應按個別工作流程及環境設計一套合適的防止污染措施，以上建議謹供參考



操作流程 - 核酸測序

補充資料 (S1.5 – S1.8)

PCR擴增
(S1.5-S1.6)

PCR純化
(S1.7)

循環測序
(S1.8.1)

測序純化
(S1.8.2)

毛細管電泳
(S1.8.3)

數據分析
(S1.9)



PCR 產物檢測

補充資料 (S1.5)



瓊脂糖凝膠電泳儀
(Agarose gel electrophoresis)

- E-gel® EX Agarose gel 2%
- 上樣量: 5 μ L PCR擴增物 (~500 ng)
- 100 bp DNA ladder
- CCD: SYBR Safe filter



自動化電泳儀 (QIAxcel Advanced System)

- QIAxcel DNA High Resolution Kit
- Best resolution:
- 100–500 bp: 10 bp
- 500 bp – 1 kb: 50 bp



電泳檢測PCR產物 - 結果判定

補充資料 (S1.10)

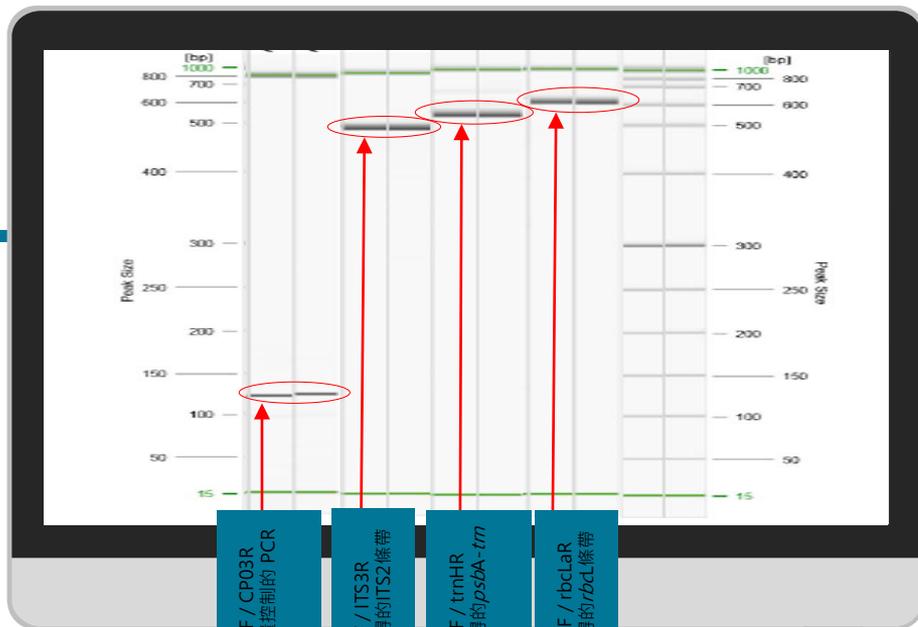
電泳檢測PCR產物的螢光信號的結果

用途	CP03F / CP03R 引物對	ITS2F / ITS3R 引物對	psbAF / trnHR 引物對	rbcLaF / rbcLaR 引物對	PCR 產物 長度 (bp)
植物葉綠體DNA片段測試 ^a	+				~123
ITS2測試 ^b		+			~500
<i>psbA-trnH</i> 測試 ^b			+		~500
<i>rbcL</i> 測試 ^b				+	~600

註解:

a = CP03F / CP03R 引物對用於檢查可擴增的植物 DNA。 "+" 表示PCR陽性結果，DNA條帶無需進行後續 DNA 序列分析。

b = "+" 表示檢測到的目標DNA條帶，其PCR產物需通過後續DNA序列分析作進排序。



引物對為CP03F / CP03R
植物 DNA 質量控制的 PCR
產物

引物對為ITS2F / ITS3R
樣本獲PCR獲得的ITS2條帶

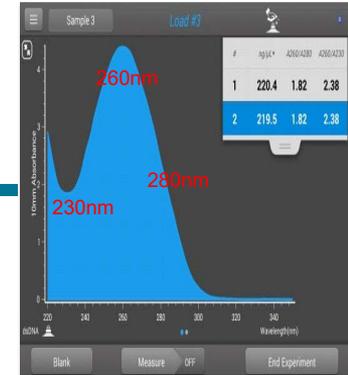
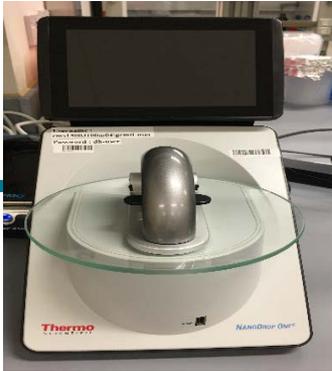
引物對為psbAF / trnHR
樣本獲PCR獲得的*psbA-trnH*
條帶

引物對為rbcLaF / rbcLaR
樣本獲PCR獲得的*rbcL*條帶



紫外-可見光分光光度計評估PCR產物純度

補充資料 (S1.7.7 & S1.7.8)



- PCR產物純度
 - A260/A280 : 1.7 - 1.8
 - A260/A230 : 1.8 - 2.2
- PCR產物濃度均一化至5 ng/μL



核酸測序技術

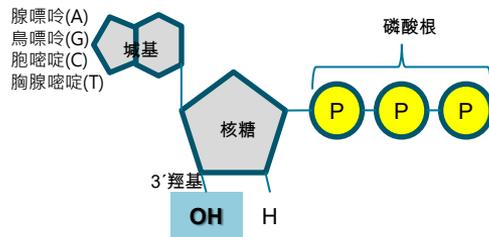
桑格測序 (Sanger sequencing)

- 也被稱作雙脫氧終止法

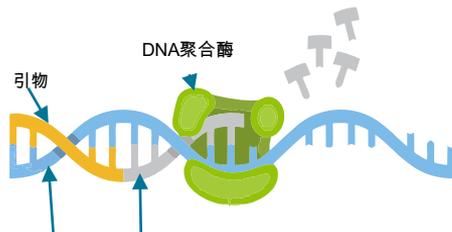
構建反應系統

- 目標DNA片段
- 反應體系緩沖液
- 使用單一引物
 - 樣本分別進行正向及反向引物分析
- DNA聚合酶
- dNTP/ddNTP螢光混合物
 - dNTP 與 ddNTP 相對濃度的調節，使反應擴增得到一組長幾百至幾千城基的鏈終止產物

dNTP (去氧核糖核苷酸三磷酸 Deoxynucleoside triphosphate)

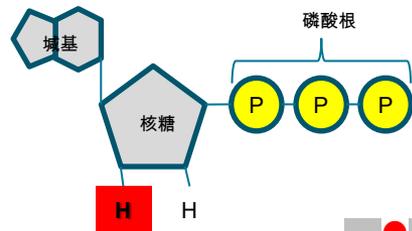


延申

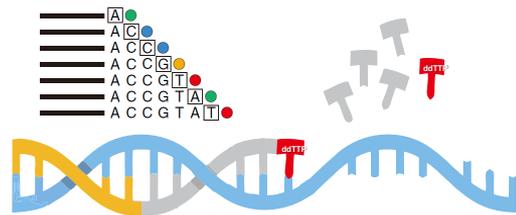


目標DNA片段 目標DNA片段的複製鏈

ddNTP (雙脫氧核苷三磷酸 Dideoxy nucleoside triphosphate)



終止延申



當遇到ddNTP時，由於ddNTP缺乏延伸所需要的3-OH基團，使延長的寡聚核苷酸選擇性地在G、A、T或C處終止

測序與PCR的區別

PCR	測序
要兩條引物	只用一條引物
只要dNTP	需要dNTP和ddNTP
產物只有一條片段	產物是系列片段

核酸測序技術

桑格測序 (Sanger sequencing)

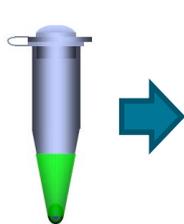
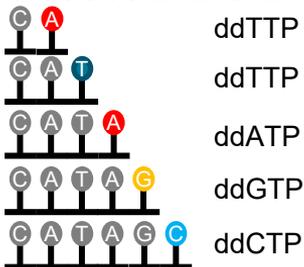
毛細管電泳法

- 測序PCR的產物是一系列長短不等的片段，片段之間依次只相差一個碱基
- 通過電泳，將測序產物按長短排列，根據螢光的顏色讀出每個片段的最後一個碱基，得到DNA序列

基因分析儀 - 毛細管電泳

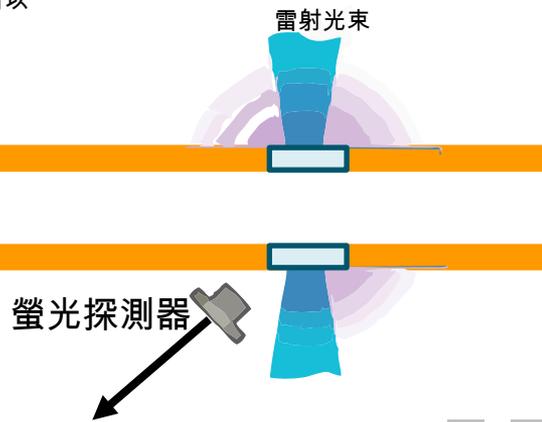
原DNA序列

C A T A G C T G T T T C C T G N



因為ddNTP分別螢光標致了4個不同顏色，所以4種終止物可以在一起進行循環測序反應

毛細管陣列 (聚合物及電緩衝液)



循環測序

補充資料(S1.8.1 – S1.8.2)



DNA循環測序試劑條件

試劑	最終濃度
BigDye® Terminator v3.1 循環測序試劑	0.25X
BigDye 測序緩衝液	0.75X
正向或反向引物 (用於 PCR 的相同引物)	0.16 pmol/μL
純化PCR產物	約 25-35 ng
無核酸酶超純水	最終容量至 20 μL

DNA循環測序反應條件

溫度	時間	循環次數
96 °C	1 分鐘	1
96 °C	10 秒	25
50 °C	5 秒	
60 °C	4 分鐘	
4 °C	∞	--

- PCR 產物應進行雙向測序，即每一樣本分別進行正向及反向引物循環測序
- 基於雙向測序，每個 DNA 條形碼應獲得兩個電泳圖



Typical high quality sequencing data

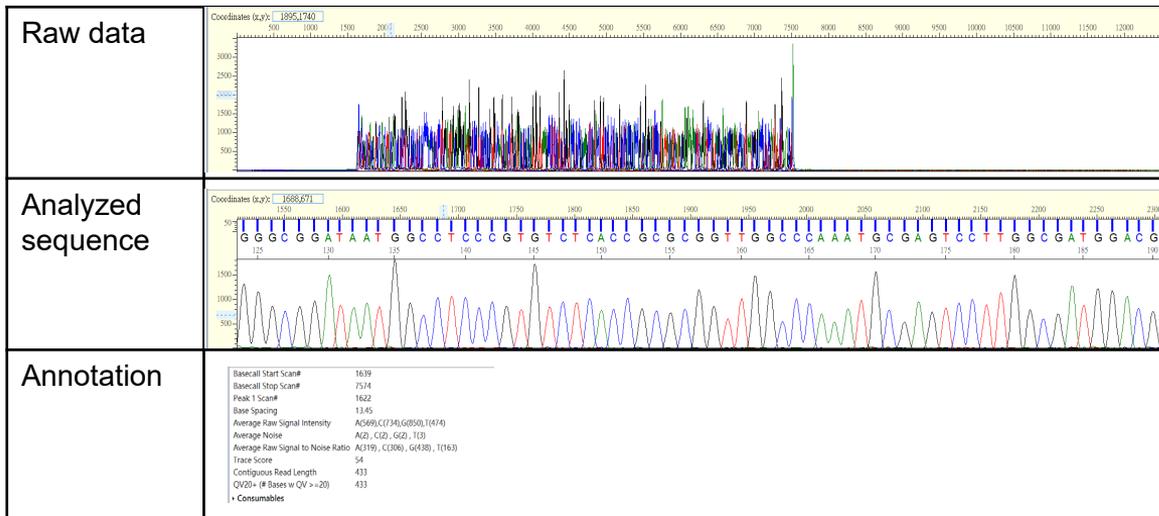
補充資料 (S1.8.3)

“Raw data”

- well-formed and distinctive signal colored peaks;
- Peaks tightly resolved with evenly height;
- Minimal fluorescence overlap from one peak to the next with a sharp peak top;
- Consistent peak spacing throughout the trace
- High signal to noise ratio

“Analyzed sequence”

- Absence of background signals in analyzed sequence.
- High trace score ≥ 20 and Contiguous Read Length (CRL). Trace with trace score < 20 shall not be used for post sequencing analysis.



The operator shall not proceed to post sequencing analysis if problematic sequencing data are found



Sequencing positive and negative control

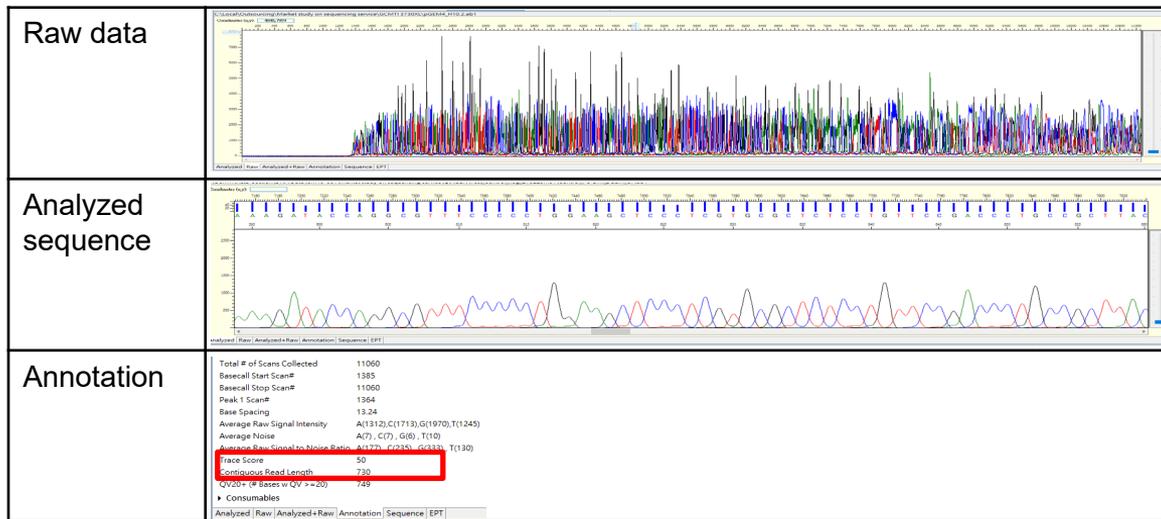
補充資料 (S1.8.3)

Cycle sequencing positive control (pGEM)

- Govern the validity of a batch of cycle sequencing analysis and the performance of capillary electrophoresis.
- After trimming QV<20 bases at the 5' beginning, the minimum CRL in the analyzed sequence should be at least 650 bp with trace scores ≥ 20 .

对照序列信息

```
1 AATTCCTCC AGGGCTGGT GAGGCTGGT TATATTACT GTAACTGT CTACTACTC TGAATCTT GCTCTCTT
81 CTCCTCATG TCTCACTC CTGAAACAT GGGCGTAT GTTCTTTTG CTTCCCTGT CTCAGAAAG CTAGGCGCA
161 GATGAGAGC ACCAGACTA ATATGACAC CTCCTCTTA TAGATGCGA ATCCATAT AGGGCTGGT CTCCTGG
241 AGTGAAGA AGTTTCAGG DGAAGTAGG AGCAATCCA GGTATATA TGTCTCCG CAAAGAGG GGGCGGAGA
321 GGAAGACT GTCCGGGGC TAAATTATG CAAAAGGC TCTTGTGA ACATGATC CACTGGAT CACTAATG
401 GGAATCAT ATTCATAG GATGATGT TCTCTAGG CAGAGAGA GCAGCAATA GATCTATA AAGATATA
481 GATATATA GATCTCAT TATCTTGG GTTATAGG CAGATGCA ACATATAT GTTCTTCC TTCTCTG
561 TCTTCATA CCACTCCTT GCGCGGCC ATTAGACA CTCGTGTA GATAGAGA TATTATTC GTCTCTGA
641 CTCTGATG GTGGAAAT ATCTGATT TATAGAGG TGGTATTC CAGATATA TGGATGAA AAGGCTCTT
721 GCTGTGCA CCGTAGAG AGTACAGC CAGAGAGT TGTCTGTA TGGTATAT AGGATAGT
801 GTTTTAGT GTTAAAGT AAGAGACT AACCAAAC ACATCCGC TGCTGATG TAGTATAT TTTTACTT
881 AATCTAAT TTGCTAAA CATAAGCC GCCTTCAG CACTACTCA ATGTTTAT CATGAGAT AGTTTGAGA
961 TGGGTGAG TGTGTGCA GTTGGACA AGCTCCCT ATTAGACC CTGACTCA AGCTCAAG GGAAGAAC
1041 CTCCTGAG GAGTGGCC ATACAGCA CAGTACTC AATGATTT TTGAGTGC AGCTCTCA AGGATAAA
1121 TCGAACCT AAGGGAGC CCGATTAG AGTTTAGG GGAAGCCG CAACTGCG GAGAGAAA GGAAGAAAG
```



Sequencing positive and negative control

補充資料 (S1.8.3)



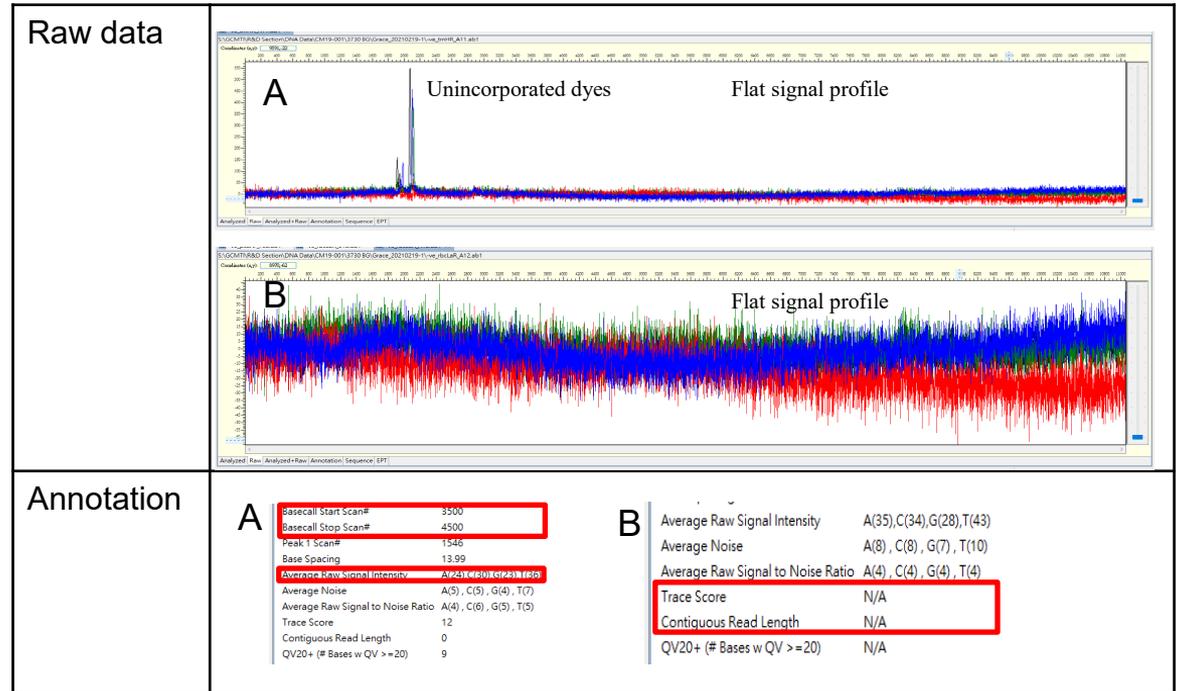
Cycle sequencing negative control (CSNC)

Raw data

- Raw data without signal should be obtained, which is a flat signal profile without or with a sharp peak of unincorporated dyes at early scan number in raw data; and

Annotation

- Overall scanning gives trace score and contiguous read length of 'N/A'.



DNA測序後分析

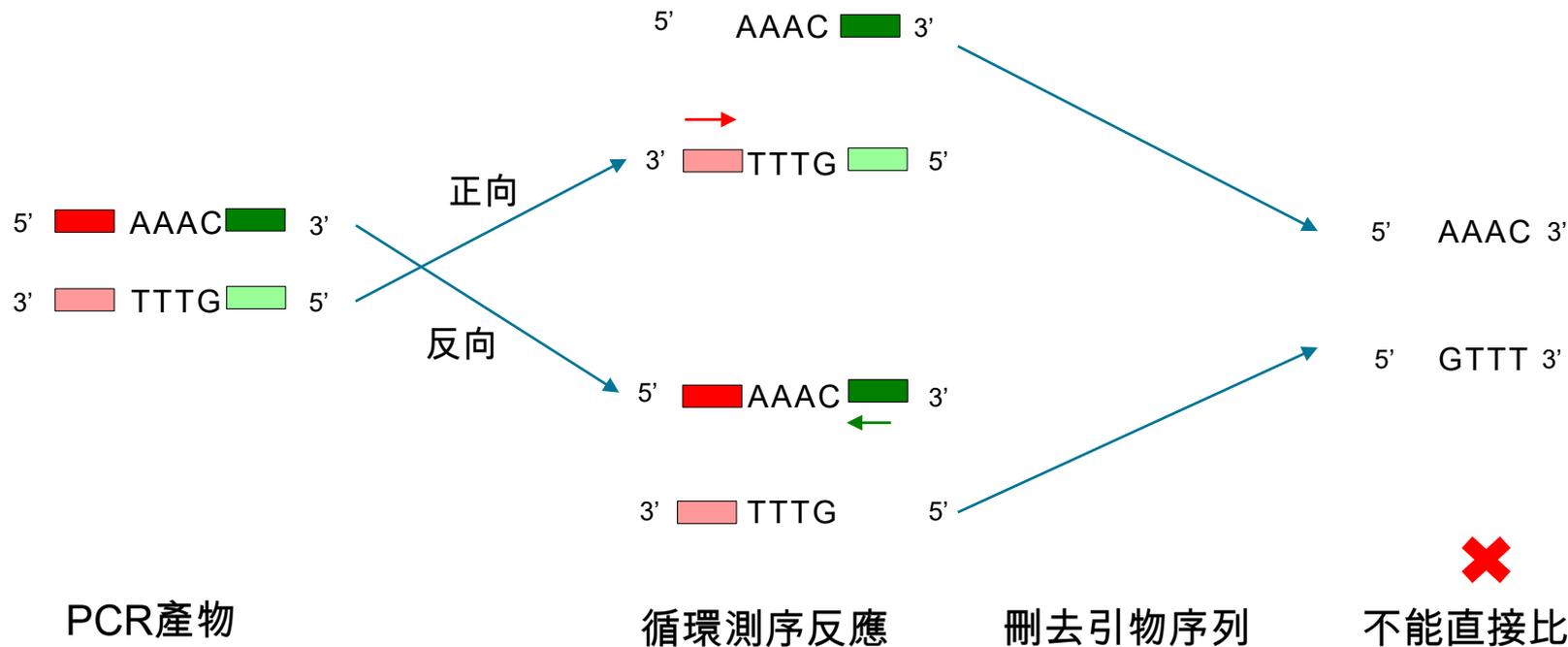
補充資料S1.9

- 獲取一致性序列
- 進行測序後分析時，應檢查雙向測序：
 - 刪除低質量和引物結合位點的鹼基；
 - 將正向和反向測序結果拼接成 FASTA 格式的一致性序列；
 - 其中一個測序方向中的不確定鹼基(“N”)，可由另一測序方向，相同位置而高質量的鹼基互補。



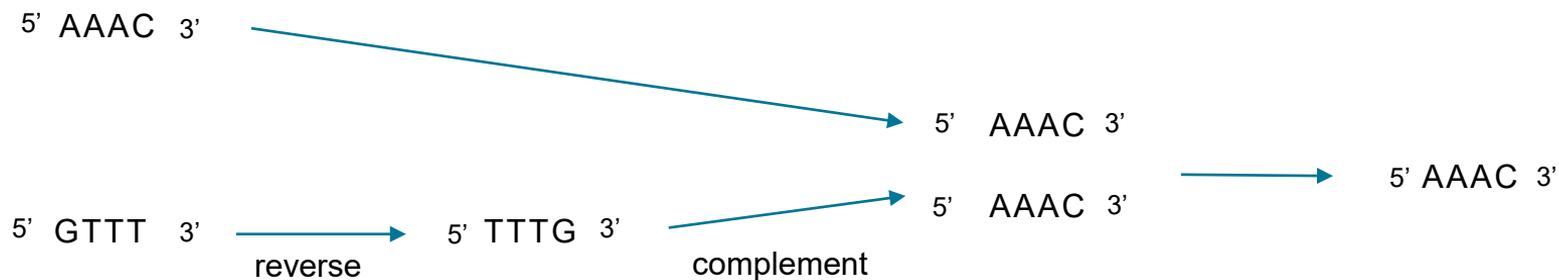
雙向測序分析

合併序列(1)



雙向測序分析

合併序列(2)



不能直接比較

比較後得出序列



DNA序列分析工具

序列質量及引物刪除

- Sequence scanner software

序列拼接

- MEGA
- BioEdit
- CodonCode Aligner

ITS2 序列註解

- <http://its2-old.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/cgi-bin/index.pl?annotator>



多謝

政府中藥檢測中心

網址：https://www.cmro.gov.hk/html/b5/useful_information/gcmti/index.html

電郵地址：gcmti@dh.gov.hk

