

DNA 测序技术指导原则

本指导原则用于指导药品生产和检验过程中 DNA 序列的测定,可用于鉴定动植物类药材、动物源性原材料与辅料、微生物、生物制品生产检定用菌毒株、动物细胞基质等。

为规范 DNA 测序技术中涉及的模板制备、测序反应、产物纯化、测序和结果分析等,特制定本指导原则。

一、定义及要求

DNA 测序技术系指分析 DNA 碱基构成和碱基顺序的技术,即用于确定 DNA 片段中腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)的构成和排列方式。一般采用双脱氧链终止法进行 DNA 测序。其原理是利用 2', 3'-双脱氧核苷三磷酸(2', 3'-ddNTP)作为链终止试剂,通过 DNA 聚合酶催化和引物延伸产生一系列长度相差一个碱基的寡核苷酸,进行电泳分离,通过放射自显影或荧光确定 DNA 的序列。除双脱氧链终止法外, DNA 测序技术还包括边合成边测序、单分子实时测序、纳米孔测序等技术。DNA 测序分析可分为手工测序和自动测序,当前以自动测序为主流。

DNA 测序实验室应具备分子生物学实验室的基本条件,避免外源污染对 DNA 测序结果的干扰。对生物制品生产检定用菌毒株和动物细胞基质进行 DNA 测序时,应符合相应级别的生物安全要求,严格遵守相关法律、法规。操作人员应具备相应的分子生物学实验技能,并能熟练使用 DNA 测序仪。

二、基本内容

(一) 测序模板制备

测序模板应为单一来源 DNA,包含质粒 DNA、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增产物回收的 DNA 等。测序模板制备过程中应防止外源 DNA 污染,避免外部因素对测序模板的破坏和降解。

1. 质粒 DNA 的制备

样品经平板培养挑取用质粒转化的单菌落接种到含有适当抗生素的培养基中,振荡培养获得细菌培养物,分离质粒 DNA 作为测序模板。

通常采用十二烷基硫酸钠(SDS)碱裂解法从细菌培养物中分离质粒 DNA。采用电泳或限制性核酸内切酶消化的方法对所获得的质粒 DNA 进行完整性鉴定,一般通过 260nm 波长处的吸光度值(A₂₆₀)、260nm 与 280nm 波长处的吸光度比值(A₂₆₀/A₂₈₀)分别检测质粒 DNA 的浓度和纯度。

2. PCR 扩增产物 DNA 的制备

样品经 DNA 提取、PCR 扩增和产物回收后,制备的目的 DNA 片段作为测序反应的模板。

在 DNA 提取前,动植物类中药材需采用适宜的方式去除外源污染;动物源性原材料与辅料的取样应有代表性,固体样品应研磨至细粉,液体样品应充分混匀;微生物、生物制品生产检定用菌毒株和动物细胞基质需获得纯培养株。在 DNA 提取过程中需针对不同样品采用相应的提取方法,所获得的 DNA 应具有合适的浓度、纯度和完整度。DNA 提取效果依据不同样品类型来确定,一般通过 A₂₆₀、A₂₆₀/A₂₈₀ 分别检测 DNA 的浓度和纯度。

提取的 DNA 经 PCR 扩增达到指数级倍增,退火温度、最佳循环数可根据检测要求和检测对象确定。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯或蓝光(一般用 470nm 波长)照射下迅速切取目的条带所在位置的凝胶块,采用 PCR 产物凝胶回收试剂盒进行回收。PCR 产

物也可不经琼脂糖凝胶电泳，直接采用 PCR 产物纯化试剂盒进行回收。回收的 PCR 扩增产物 DNA 一般通过 A₂₆₀、A₂₆₀/A₂₈₀ 对其浓度和纯度分别进行检查。

（二）DNA 测序

制备的测序模板经测序反应和产物纯化后获得不同长度的寡核苷酸，进行自动化测序。

1. 测序反应和产物纯化

测序反应为单链模板的线性扩增，即在测序反应体系中只加入一条测序引物。反应体系包含缓冲液、DNA 聚合酶、脱氧核糖核苷三磷酸（dNTPs）、荧光标记的 ddNTPs、测序引物、测序模板和灭菌的纯化水。测序引物由测序模板的来源信息确定。

根据目标序列的长度选择合适的测序反应程序，并采用适宜方法对测序反应的产物进行纯化，通常采用乙醇醋酸钠法，获得不同长度的荧光标记寡核苷酸。

2. 上机测序

将不同长度的荧光标记寡核苷酸加入上样板，根据所使用的荧光标记方法、毛细管长度和电泳胶的种类选择相应的运行和分析模式，不同长度的荧光标记寡核苷酸由小到大依次通过检测窗口，激光器发出激光并激发 ddNTPs 上的荧光标记，电荷耦合元件图像传感器（charge-coupled device, CCD）记录荧光信号，根据荧光信号识别为对应的碱基和质量值（Q 值），获得 DNA 测序峰图（trace file）。

（三）结果分析

1. 测序峰图质量评估

基于碱基 Q 值对测序峰图的质量进行评估，依据供试品类型确定测序峰图的质量要求，对于质粒 DNA 测序峰图，去除引物后峰图的平均 Q 值需大于 30，Q 值小于 20 的碱基数占总碱基数的百分比需小于 1%；对于 PCR 产物测序峰图，除满足上述要求外，还需去除两端低质量序列，且剩余测序峰图的长度需大于 PCR 产物长度的 50%。不合格的测序峰图不能用于序列拼接和结果判定。

2. 序列拼接

双向测序峰图使用相应的软件进行序列拼接，正反向测序峰图的重叠区域（overlap）需大于目的 DNA 序列长度的 50%，不一致碱基（替代、插入或缺失）的确定依据 Q 值的高低，但占总碱基数的比例需小于 1%。

3. 拼接结果质量评估

依据供试品的类型和结果判定标准，对拼接获得的一致性序列（consensus sequence）进行质量评估，一致性序列不合格的不能用于结果判定。

（四）结果判定

将获得的 DNA 序列与标准核酸序列数据库的标准核酸序列（标准核酸序列的建立参照 9109 标准核酸序列建立指导原则）进行比对。判定标准为：对于动植物来源供试品，测序结果与标准核酸序列的差异应控制在物种的种内差异水平；对于微生物来源的供试品，测序结果与标准核酸序列的差异应控制在适宜的菌株鉴定水平；对于生物制品生产检定用菌毒株和动物细胞基质等供试品，其核心序列应与标准核酸序列完全一致或核心序列所编码的氨基酸序列应与标准核酸序列所编码的氨基酸序列完全一致。

三、方法学考察

除了考察 DNA 测序技术的各种影响因素，包括模板制备、测序反应、产物纯化、仪器配置等，还应进行常规的分析方法学验证，并按建立的 DNA 测序方法对至少 3 批供试品进行测定，考察 DNA 序列测定的准确性和重复性。