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单克隆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，

通过 260 nm 波长处的吸光度值（A_{260}）、260 nm 与 280 nm 波长处的吸光度比值（A_{260}/A_{280}）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，通过 A_{260}、A_{260}/A_{280} 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 通过 A_{260}、A_{260}/A_{280} 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、测序模板和无菌双蒸水。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。

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 10 批以上供试品进行测定，考察 DNA 序列测定的准确性和重复性。

征求意见稿