

出國報告（出國類別：研習）

次世代定序  
(next generation sequencing)  
技術應用於登革病毒之檢測與研究

服務機關：衛生福利部 疾病管制署

姓名職稱：楊正芬 副研究員

派赴國家：日本

出國期間：104 年 12 月 1 日至 14 日

報告日期：104 年 12 月 30 日

## 摘要

登革熱本土疫情，每年均會在南台灣造成流行，今年主要流行的是第二型登革病毒株，但是今年登革熱疫情特別嚴峻，確診病例數已超過歷年紀錄，登革熱重症人數也持續攀升，故此，詳細研究及比對此本土流行登革病毒株序列有其必要性，其結果可望在病毒株適應性及致病性提供新的見解並應用。

本次研習拜訪日本國立感染症研究所 (NIID) 位於戶山庁舎的病毒第一部的蟲媒病毒實驗室(Virology I Arboviral laboratory)與病原體基因組分析研究中心(Pathogen Genomics Center)，主要目的為學習如何使用次世代定序技術(next generation sequencing, NGS)來從事登革病毒株檢測與研究，實驗內容包括：進行登革病毒專一性反轉錄聚合酶反應、全基因體 library 製備、序列分析及註解(annotation)，以及相關的親緣分析等。

## 目次

壹、目的.....	1
貳、過程.....	2
一、行程.....	2
二、實驗研習內容.....	3
參、心得及建議事項.....	19

## 壹、目的

次世代定序技術(next generation sequencing, NGS)發展至今，已是一個成熟的定序技術，它的優勢在於能夠同時進行數百萬條 DNA 的定序，效率遠高過於傳統定序，而且花費遠低於傳統定序，是一個具有快速、高讀值(reads)、花費低及不需 cloning 等優點的定序技術，日本國立感染症研究所 (NIID) 的病毒第一部的蟲媒病毒實驗室(Virology I Arboviral laboratory)與病原體基因組分析研究中心(Pathogen Genomics Center)的研究人員，已經開始利用 NGS 技術進行登革病毒的定序，並已針對登革病毒建立完整及完善的 NGS 分析平台：

VirusTAP。

為提升研檢中心病媒病毒及立克次體實驗室在登革病毒 NGS 分析的檢驗研究水準，此次研習主要目的為學習全套的 NGS 專業技術，包括：利用四對登革病毒專一性引子，進行反轉錄聚合酶反應、製備全基因體 library、分析及註解 (annotation) 序列，以及相關的親緣分析等，利用此技術詳細研究及比對本土流行登革病毒株序列，可望在病毒株適應性及致病性上提供新的見解並應用。

## 貳、過程

### 一、行程

於 12 月 1 日抵達東京後，在 12 月 2 日進入到日本國立感染症研究所進行實驗研習。此次實驗研習的實驗室為病毒第一部的蟲媒病毒實驗室，此實驗室為蟲媒病毒感染，特別是日本腦炎、西尼羅河熱、登革熱及屈公病的診斷機構，和蟲媒病毒的分子流行病學研究，以及日本腦炎疫苗、黃熱病疫苗的免疫反應研究機構。此實驗室並且為世界衛生組織的日本腦炎特別參考實驗室，實驗室主持人是 Dr. Tomohiko Takasaki。在實驗研習的過程中，和蟲媒病毒實驗室的主任研究官 Dr. Shigeru Tajima 以及研究員 Dr. Eri Nakayama 討論實驗相關的理論，並學習實驗操作的過程。12 月 3 日在病原體基因組分析研究中心的研究助理 kato 的協助之下，進行 PCR 產物電泳及膠體片段分離，12 月 4 日繼續進行 MiSeq 定序上機前的製備程序，並完成上機程序，12 月 7 日定序結果完成，隨後數日進行序列分析，成功完成造成今年本土流行的第二型登革病毒株的全長基因序列，以及今年四月份自印尼境外移入的第二型登革病毒株的全長基因序列，此病毒被認為可能是造成今年大流行的病毒株，以及引起登革熱重症病例的病毒株的全長基因序列。在 12 月 9 日進行一場報告，主要的內容為台灣今年登革病毒的分子流行病學概況，主持人為蟲媒病毒實驗室的室長 Dr. Tomohiko Takasaki，與會人士包括蟲媒病毒實驗室及病原體基因組分析研究中心的研究人員，報告時間加上問題與討論約花一個小時。研習結束後，請休假四日，於 12 月 14 日早上搭車前往羽田機場，傍晚返抵台灣。

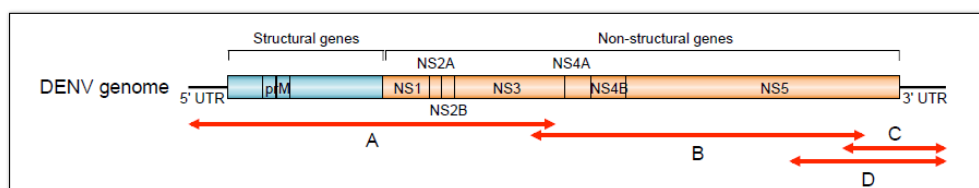
## 二、實驗研習內容

### (一)、利用登革病毒專一性引子組擴增登革病毒全基因

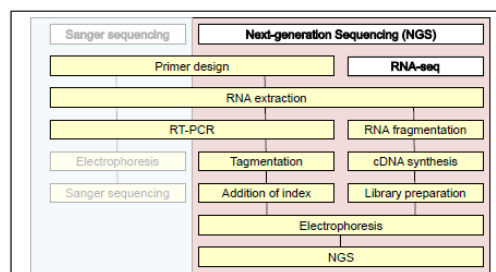
此登革病毒專一性引子組是由 Dr. Shigeru Tajima 所設計，可以合成所有四型登革病毒的基因，共有四對引子組，其序列及相對的基因位置如(圖一)所示，利用 PrimeScript II HiFi One-step RT-PCR 試劑組(Takara Corp. Japan) 進行單步驟反轉錄聚合酶反應，將登革病毒 RNA 反轉錄成 cDNA，反應試劑配置方法如(圖二)所示，此次共有 22 個 RNA 檢體，因此配置 24 倍的試劑量，配置完成後進行分裝，每個 tube 分裝 28ul，再分別加入 2ul RNA 檢體。接著進行單步驟反轉錄聚合酶反應，反應條件如(圖三)所示。反應結束後，各取 10ul 的反應 A、B、C、D 的產物混合均勻，然後取 4ul 於 0.8% agarose gel 進行膠體電泳，檢測 PCR 產物的片段大小，結果如(圖四)所示，大部分的檢體皆有明顯的 PCR 產物，第 14 和 19 號產物量較少，但還是可以看到訊號，唯獨第 20 號檢體，用肉眼無法看到 PCR 產物，可能是因為檢體內登革病毒 RNA 的量太低的緣故。

(圖一)

#### Primer sets to amplify whole dengue virus genome of all four serotype



	Primer	Sequence
A	D1-4.5termf	AGT WGT TAG TCT RYG TGG AC GAC
	D1-4.5769r	TTK GCH CCC ATT TCD GAD ATG TC
B	D1-4.5369f	ATG GAT GAR GCV CAT TTC AC
	D1-4.9999r	AG CAT RTC TTC WGT WGT CAT CCA
C	D1-4.9398f	AAY ACW TTC ACC AAC ATG GAA G
	D1-4.3termr	AGAACC TGT TGR WTC AAC ARC ACC T
D	D1-4.8579f	AT GGT SAC WCA RWT RGC HAT GAC
	D1-4.3termr	AGAACC TGT TGR WTC AAC ARC ACC T



(圖二)

Reaction mix:	x1	x	24	(22 samples)
2xOne step Buffer (3)	15		360	
PrimeScript II RT Enzyme mix (1)	0.6		14.4	
PrimeSTAR GXL (2)	2.4		57.6	
Forward primer (10pmole/uL)	1		24	
Reverse primer (10pmole/uL)	1		24	
Template RNA*	2		48	
Nuclease-free D.W. (7)**	8		192	(uL)

\*variable (1-10 uL)

\*\*fill up to 30 uL with D.W.

(圖三)

45°C, 15 min

94°C, 2 min                      1 cycle

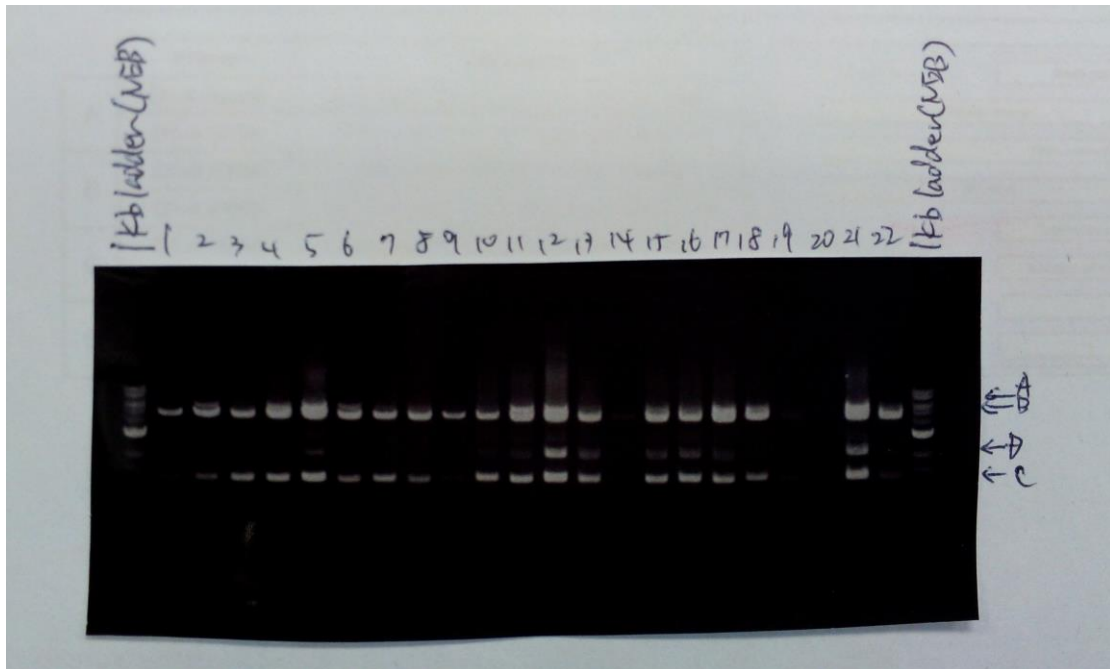
98°C, 10 sec

55°C, 15 sec

68°C, 3 min                      35 cycles

68°C, 1 min                      1 cycle

(圖四)



## (二)、純化登革病毒PCR產物

利用 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) 試劑組進行登革病毒 PCR 產物的純化步驟，加入等體積的 Membrane Binding Solution 至 PCR 產物中，混合均勻後移至 Minicolumn，置室溫 1 分鐘，以 16,000×g 離心 1 分鐘，將 flowthrough 丟棄，加入 700µl Membrane Wash Solution，以 16,000×g 離心 1 分鐘，將 flowthrough 丟棄，再加入 500µl Membrane Wash Solution，以 16,000×g 離心 5 分鐘，將 flowthrough 丟棄，再以 16,000×g 離心 1 分鐘，使任何殘留的酒精蒸發，將 Minicolumn 換至一乾淨的 1.5ml 微量離心管中，加入 50µl 的 Buffer EB (Qiagen)，此 buffer 為另外購買，而不用 kit 內所附的 Nuclease-Free Water，65°C 反應 5 分鐘，以 16,000×g 離心 1 分鐘，將 Minicolumn 丟棄，並將 DNA 貯存於 4°C 或 -20°C。

## (三)、測量DNA濃度

利用 Qubit dsDNA HS Assay (Invitrogen) 試劑組測量純化後的 DNA 濃度，在 0.5 ml 的離心管中加入 197µl 的 Qubit dsDNA HS buffer，再加入 2µl 的 DNA sample，然後加入 1µl 的 Qubit dsDNA HS reagent，震盪以混合均勻，至室溫 2 分鐘後，放入 Qubit® 2.0 Fluorometer 儀器中，選擇 dsDNA 模式進行濃度測量，22 個檢體測得的結果如(表一)所示。

(表一)

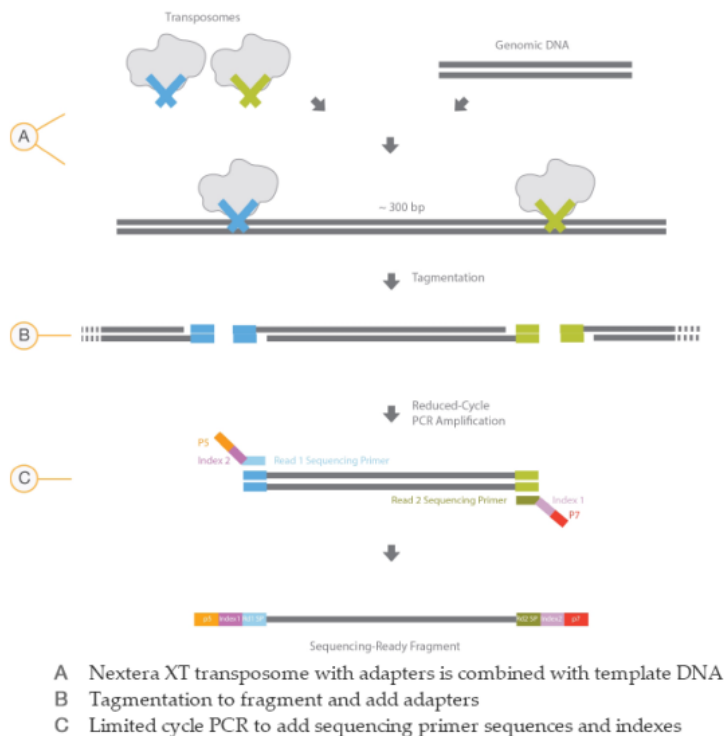
Sample No.	ng/ul	Sample No.	ng/ul
T1	13.1	T12	56
T2	22.9	T13	25.8
T3	21.2	T14	2.53
T4	27.4	T15	33.7
T5	40.1	T16	29.9
T6	20.1	T17	37.9
T7	20.9	T18	21.5
T8	18.9	T19	4.26
T9	8.78	T20	0.629
T10	21.1	T21	51
T11	29.9	T22	20.2



#### (四)、library製備

利用 NexteraXT DNA Library Preparation Kit(Illumina)製備 library，原理如(圖五)所示，利用基因工程產生的 transposome 將 DNA 檢體切成約 300bp 大小的片段，並同時在兩端加上 tag(tagment)一段獨特的 adapter 序列，利用兩端的 adapter 序列進行有限循環的 PCR 反應，將 DNA 進行擴增，並同時在 DNA 兩端再接上 index 序列，所獲得的有雙重 index 序列的 DNA library 就能使用於 Illumina 定序系統。

(圖五)



Tagmentation步驟：

首先用 distilled water 調整 PCR 產物的量至 0.2ng/ul，換算方式如(表二)所示，依據(表二)分別取所需檢體及 distilled water 的體積，混合均勻後，得到 0.2ng/ul 濃度的 PCR 產物，然後在八連排反應管中加入 5ul 的 TD 緩衝液 (Tagment DNA Buffer)、2.5ul 的 0.2ng/ul 濃度的 PCR 產物、2.5ul 的 ATM

(Amplicon Tagment Mix)，混合均勻後，55°C反應 5 分鐘，冷卻至 10°C，加入 2.5ul 的 NT 緩衝液 (Neutralize Tagment Buffer)，室溫反應 10 分鐘。

(表二)

Sample No.	ng/ul	Sample volume	Distilled water volume	Final volume
T1	13.1	1	64.5	65.5
T2	22.9	1	113.5	114.5
T3	21.2	1	105	106
T4	27.4	1	136	137
T5	40.1	1	199.5	200.5
T6	20.1	1	99.5	100.5
T7	20.9	1	103.5	104.5
T8	18.9	1	93.5	94.5
T9	8.78	1	42.9	43.9
T10	21.1	1	104.5	105.5
T11	29.9	1	148.5	149.5
T12	56	1	279	280
T13	25.8	1	128	129
T14	2.53	10	116.5	126.5
T15	33.7	1	167.5	168.5
T16	29.9	1	148.5	149.5
T17	37.9	1	188.5	189.5
T18	21.5	1	106.5	107.5
T19	4.26	1	20.3	21.3
T20	0.629	10	21.45	31.45
T21	51	1	254	255
T22	20.2	1	100	101

PCR步驟：

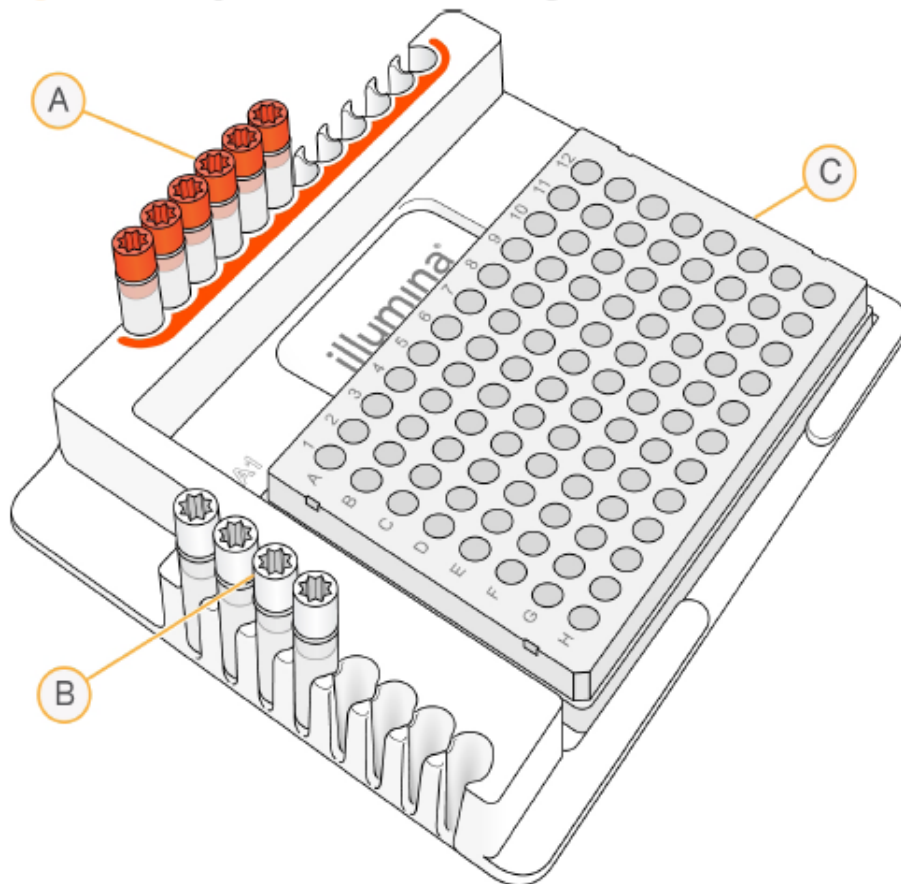
接下來再加入 7.5ul 的 NPM (Nextera PCR Master Mix)，以及各 2.5ul 的 Index primer 1(橘色蓋子)和 Index primer 2 (白色蓋子)，使用的 Index primer 試劑組為 Nextera XT DNA Library Preparation Index Kit v2 Set B

(FC-131-2002)，排列方式如(圖六)所示，此次共有 22 個檢體，編號為 T1~T22，所用 Index primer 1 包括：N724、N726 和 N727，所用 Index primer 2 包括：S502、S503、S505、S506、S507、S508、S510 和 S511，排列方式如(表三)所示，加完之後，混合均勻，接著進行 PCR 反應，反應條件如下所示：

72°C for 3 minutes  
95°C for 30 seconds  
12 cycles of:  
— 95°C for 10 seconds  
— 55°C for 30 seconds  
— 72°C for 30 seconds  
72°C for 5 minutes  
Hold at 10°C

(圖六)

Figure 2 TruSeq Index Plate Fixture Arrangement (24 libraries)



- A Index primer 1 (i7) (orange caps)
- B Index primer 2 (i5) (white caps)
- C NTA plate

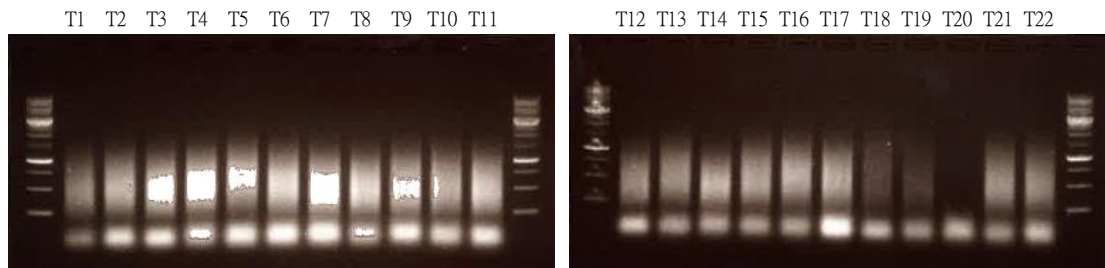
(表三)

Sample no.		Index primer 1		
		N724	N726	N727
Index primer 2	S502	T1	T9	T17
	S503	T2	T10	T18
	S505	T3	T11	T19
	S506	T4	T12	T20
	S507	T5	T13	T21
	S508	T6	T14	T22
	S510	T7	T15	
	S511	T8	T16	

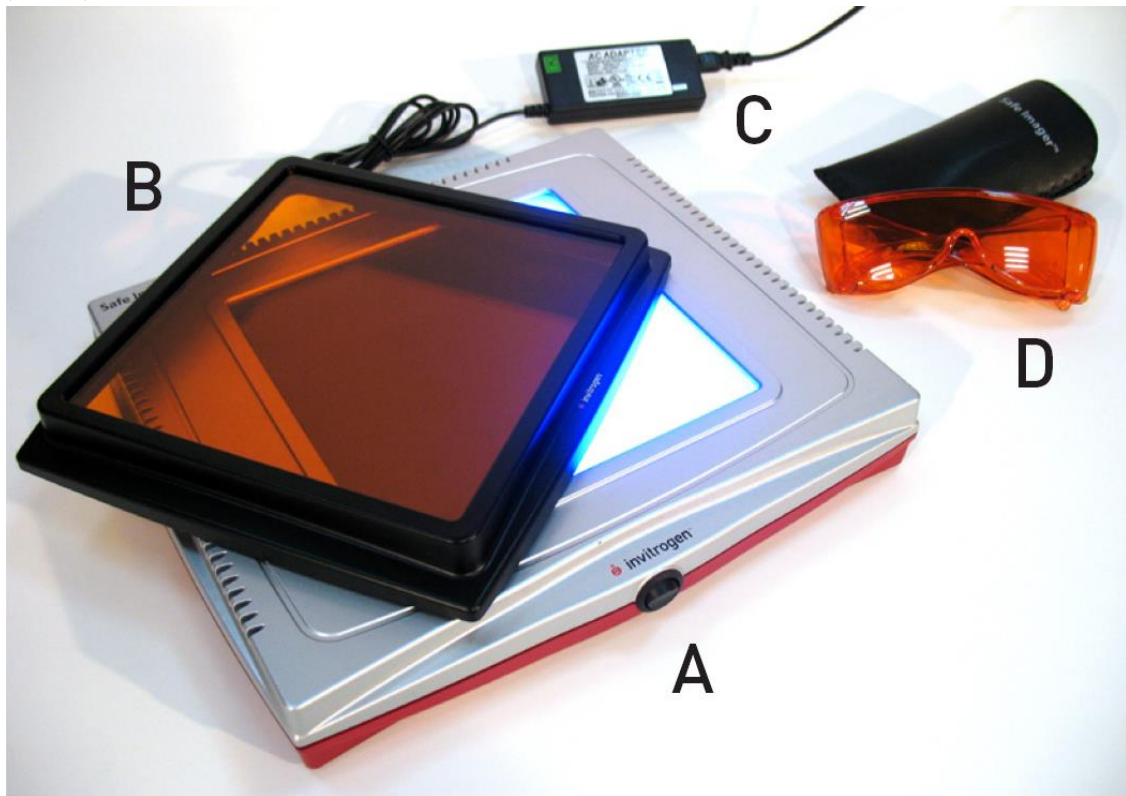
### (五)、電泳回收DNA片段

將 PCR 產物以內含 Gel Red Dye 的 1% agarose 膠體，以 100V 電壓，30 分鐘，進行電泳分離 DNA 片段，電泳完成後，將 agarose 膠體放置於照相系統內照相，電泳結果如(圖七)所示，最底下一排較明顯的 bands 為 primer dimer，進行定序所需的片段大小為 500-750bp，另外我們也會保留 250-500bp 的片段做預備用。然後將 agarose 膠體放置於 Safe Imager™ 2.0 Blue Light Transilluminator (圖八)，進行切膠回收，此時須戴上護目鏡，並於暗房內進行，以拋棄式無菌刀片分別切出 500-750bp 和 250-500bp 片段的 DNA 膠體，置於 15 ml 離心管內，切完後再照一張相，確認回收完全，如(圖九)所示。

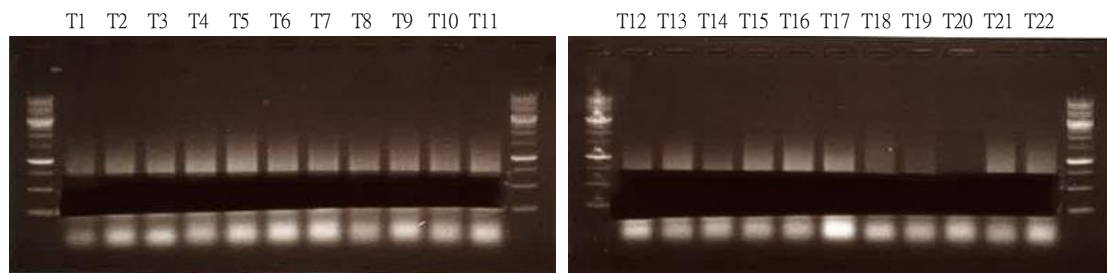
(圖七)



(圖八)



(圖九)



## (六)、純化電泳回收的DNA片段

利用 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) 試劑組進行電泳回收的 DNA 片段的純化步驟，首先須測量切割下來的膠體重量，500-750bp 片段的 DNA 膠體重量為 5.034g，250-500bp 片段的 DNA 膠體重量為 13.389g，每 10mg 的膠體需加入 10ul 的 Membrane Binding Solution，因此 500-750bp 片段的 DNA 膠體需加入 5034ul 的 Membrane Binding Solution，250-500bp 片段的 DNA 膠體需加入 13389ul 的 Membrane Binding Solution，加完後震盪混合均勻，置於 50-65°C 的水浴槽，直到膠體完全溶解。然後將溶解後的膠體混合液移至 Minicolumn，置室溫 1 分鐘，以 16,000xg 離心 1 分鐘，將 flowthrough 丟棄，

重複此步驟，直到所有的膠體混合液都通過 Minicolumn。接著加入 700ul Membrane Wash Solution，以 16,000×g 離心 1 分鐘，將 flowthrough 丟棄，再加入 500ul Membrane Wash Solution，以 16,000×g 離心 5 分鐘，將 flowthrough 丟棄，再以 16,000×g 離心 1 分鐘，使任何殘留的酒精蒸發，將 Minicolumn 換至一乾淨的 1.5ml 微量離心管中，加入 50ul 的 Buffer EB (Qiagen)，此 buffer 為另外購買，而不用 kit 內所附的 Nuclease-Free Water，65°C 反應 5 分鐘，以 16,000×g 離心 1 分鐘，將 Minicolumn 丟棄，並將 DNA 貯存於 4°C or -20°C。

### (七)、測量DNA濃度

利用 Qubit dsDNA HS Assay (Invitrogen) 試劑組測量純化後的電泳回收的 DNA 片段的濃度，在 0.5 ml 的離心管中加入 197ul 的 Qubit dsDNA HS buffer，再加入 2ul 的 DNA sample，然後加入 1ul 的 Qubit dsDNA HS reagent，震盪以混合均勻，至室溫 2 分鐘後，放入 Qubit® 2.0 Fluorometer 儀器中，選擇 dsDNA 模式進行濃度測量，500-750bp 片段的 DNA 測得的濃度為 24.1ng/ul，250-500bp 片段的 DNA 測得的濃度為 14.2ng/ul。

### (八)、MiSeq定序上機前的製備程序

定序使用的儀器為 illumina 公司的 MiSeq 定序儀(圖十)，試劑組為 MiSeq Reagent Kit v3，使用 500-750bp 片段的 DNA 進行定序，將 DNA 濃度稀釋成 1ng/ul，500-750bp 片段的 DNA 測得的濃度為 24.1ng/ul，因此取 1ul 的 DNA 加入 23.1ul 的 Buffer EB (Qiagen) 中，稀釋之後再用 Qubit dsDNA HS Assay 試劑組及 Qubit® 2.0 Fluorometer 儀器確認 DNA 濃度，所測得的濃度為 1.09ng/ul。計算定序時所需的 DNA 量，計算方式如(表四)所示，進行三步驟稀釋，共有兩批檢體要定序，分別取 10ul DNA 與 10ul 0.2N NaOH，混合均勻置室溫 5 分鐘，使雙股 DNA 打開成為單股 DNA，再加入 980ul 的 HT1 buffer 放置於冰上，然後各取上述的混合液 70ul(sample 1)和 130ul(sample 2)加入 800ul 的 HT1 buffer 混合均勻，總計 1000ul 的混合液即可用來做定序。將稀釋完成的

DNA 混合液注入 Flow Cell，Flow Cell 在使用前必須完全擦拭乾淨，然後將 Flow Cell 放入定序儀中，如(圖十一)Ⓐ所示，待 Reagent Cartridge 內的試劑完全溶解後，放入定序儀中，如(圖十一)Ⓑ所示，將 PR2 Bottle 放入定序儀中，如(圖十一)Ⓒ所示，所以試劑及檢體放置完成後即可開始進行定序程序。

(圖十)

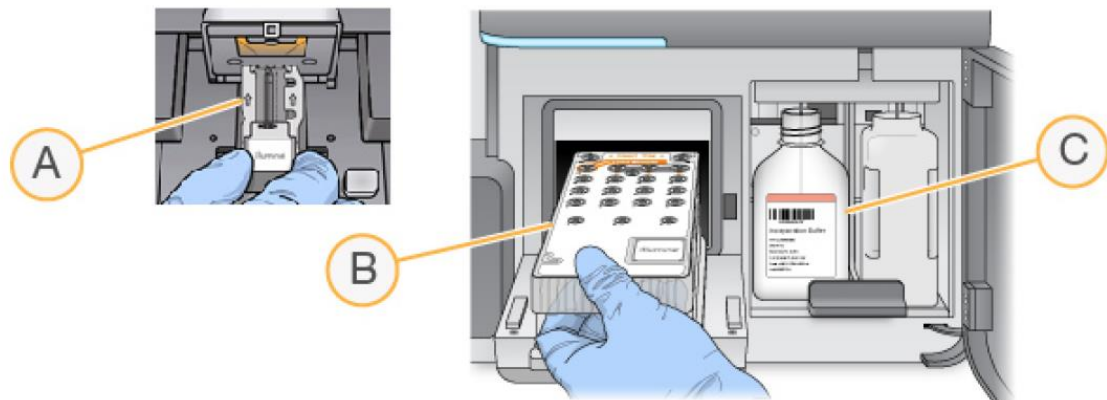


(表四)

2015.12.04 MiSeq 300+8+8+300 mer, MiSeq IDX  
2 step dilution

Sample	Adaptor	Primer	Qubit conc. (ng/ul)	Gel cut fragment size	M.W.	Sample mol conc. fmol/ul (nM)	DNA	0.2N NaOH	total (ul)	1st diluted conc final 20ul (nM)	HTI buffer 4c and all diluted sample 20ul	2nd diluted conc final 1ml (pM)	input diluted sample (ul)	HTI buffer 4c	final conc (pM)	final conc (ng/ul)	putative cluster with final conc of pM (top surface only)	both surface
Taiwan 22 samples	Nextera XT	illumina HP6.8	1.09	625	326700	2.642424242	10	10	20	1.32121212	980	26.424	40	960	1.056969697	0.000436	889,189	1,778,379
Nakayama 51 samples	Nextera XT	illumina HP6.8	1.59	625	326700	3.854545455	10	10	20	1.92727273	980	38.545	90	910	3.469090909	0.001431	2,501,490	5,002,980
													130	870	4.52606			6,781,359

(圖十一)



### (九)、定序結果分析

使用病原體基因組分析研究中心(Pathogen Genomics Center)的團隊，已建置好的分析系統平台 VirusTAP，進行序列分析，分析畫面如(圖十二)所示，首先在 1.Uploading of read file(s)選擇檔案上傳 Read 1 和 Read 2 的 DNA 序列，然後在 2.Quality trimming and adaptor removal 選項中的 5' trim length 選擇 20bp，Trimming method 選擇 Skewer，Minimum remaining sequence length 選擇 100bp，在 3.Read subtraction 選項中的 Remove host genome. 選擇 Human(Homo sapiens)，並且勾選 Remove non-virus reads.，在 4.De novo assembly 選項中的 Assembly method 選擇 A5-miseq+quality trimming (>20x required)，在 5.Homology search/read mapping 選項中的 Search method 選擇 megablast(legacy)，其他選項則保留預設值，然後按下 Exec 鍵，即出現(圖十三)的資料上傳畫面，上傳完成後，會出現(圖十四)資料處理畫面，資料分析完成即會出現(圖十五)的結果畫面，另外還需下載 Genome Jack 一種免費的 NGS 基因組瀏覽器軟體，用來檢視 NGS 的序列資料如(圖十六)所示。



(圖十二)

Login user: richjoyceyang

Total jobs in NIID: 0

[See History](#) [VirusTAP Manual](#) [Log out](#)

[Download Sample Result \(6.8MBytes\)](#)



# VirusTAP

GPH Developing version  
updated on Nov. 20, 2015.

Citation: not yet published

globe has problems  
[Live Stats](#)

VirusTAP is recommended to be run on FireFox.

Run ID: T1

▾

Project name C:\fakepath\T1\_S8\_L001\_R1\_001

## 1. Uploading of read file(s)

Read 1:  T1\_S8\_L001\_...01.fastq.gz

Read 2:  T1\_S8\_L001\_...01.fastq.gz

VirusTAP can accept

- .fastq.gz format.
- ≤10.0 GBytes in total.
- **Original raw sequencing read files only.**
- **Cannot accept fastq.gz file from SRA.**

## 2. Quality trimming and adaptor removal [Figure](#)

5' trim length  bp

Trimming method  Skewer  fastq-mcf.pl

Trim lower than this q-value  ▾

Minimum average quality limit

Minimum remaining  
sequence length  bp

Maximum length  bp

## 3. Read subtraction

Not necessary for PCR/RT-PCR products.

Remove rRNAs (16S, 18S, 23S, 28S, 5S, and ITS rRNA)

<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/TARGET/>

Updated on Thu Nov 19 09:21:25 2015

Remove Bacteria genomes

<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Bacteria/>

Remove host genome.

Database for subtraction

Remove host genome.

Database for subtraction

Chicken (Gallus gallus)

Dog (Canis lupus familiaris)

Giant panda (Ailuropoda melanoleuca)

Horse (Equus caballus)

Human (Homo sapiens)

Remove duplicated reads using fastuniq program. [Ref](#)

Remove non-virus reads. [Figure](#)

Virus sequence database

updated on Wed Nov 18 11:37:37 2015

Mapping method for this filter:  bwasw  bwa aln

#### 4. De novo assembly

##### Assembly method

- A5-miseq + quality trimming (>20x required) [Figure](#)
- IDBA + PriceTI method (for low coverage) [Figure](#)
- Platanus + PriceTI method
- SPAdes

#### 5. Homology search / read mapping

Search method

Database

E-value

Gap

Filter


Number of hits

(BLAST nt database updated on Mon Nov 16 16:22:56 2015)

If you have any problem on this site, please contact to [the webmaster](#).

(圖十三)

Login user: richjoyceyang

Total jobs in NIID: 0 

[See History](#) [VirusTAP Manual](#) [Log out](#)  
[Download Sample Result \(6.5MBytes\)](#)



VirusTAP

GPH Developing version Citation: not yet published  
updated on Nov. 20, 2015.

VirusTAP is recommended to be run on Firefox.



### Uploading your data now...

**Do NOT reload!**


This page will be refreshed automatically when the upload finished.



If you have any problem on this site, please contact to [the webmaster](#).


(圖十四)

---



**VirusTAP**  
GPH Developing version  
updated on Nov. 20, 2015.  
VirusTAP is recommended to be run on FireFox.

Citation: not yet published



[To submission page](#)

---

Run ID:   (15' 12/24 11:04) C:\fakepath\T1\_S8\_L001\_R1\_001 ▼

**Project name: C:\fakepath\T1\_S8\_L001\_R1\_001**  
Submitted on 15' 12/24 11:04 (JST)  
Source data: T1\_S8\_L001\_R1\_001.fastq.gz, T1\_S8\_L001\_R2\_001.fastq.gz

**1. Trimming Finished!**

		Process	Read 1	Read 2
5' trim length	20	Original	119,625 (100.00%)	119,625 (100.00%)
Trimming method	skewer	Adapter removal	114,241 (95.50%)	86,069 (71.95%)
Minimum average quality limit	25	Quality trimming	96,665 (80.81%)	59,625 (49.84%)
Trim lower than this q-value	15	rRNA	96,665 (80.81%)	59,625 (49.84%)
Minimum remaining sequence length	100	bacteriaGenome	96,664 (80.81%)	59,623 (49.84%)
Maximum sequence length	0	hostGenome	96,505 (80.67%)	59,536 (49.77%)
		Paired ( <a href="#">fastq</a> )	57,536 (48.10%)	57,536 (48.10%)

**2. Sequence subtraction Processing...**

rRNA	on
Bacteria genome	on
Host genome	on
Subtraction Target	human
Non-virus filter	on

Whole process start 12/24-11:04:44  
Whole process finish

**VirusTAP is processing your data now...**  
This page will automatically be refreshed every 10 seconds.  
The analysis may take several hours. Please be patient.

**You can close this window.** The analysis data can be recalled by following the run history.  
**An e-mail will be send** to the registered address after finish analyzing.

**3. Reads assembly**  
Method a5\_miseq

**4. Homology search**

Database	nt
E-value	1e-10
Filter	F
Gap	T
Number of hits	1
mode	megablast (legacy)

---

(圖十五)

**Project name: T22\_S57\_L001\_R1\_001.reduced**

Submitted on 15/ 12/07 17:08 (JST)

Source data: T22\_S57\_L001\_R1\_001.reduced.fastq.gz, T22\_S57\_L001\_R2\_001.reduced.fastq.gz

**1. Trimming Finished!**

5' trim length	20
Trimming method	skewer
Minimum average quality limit	25
Trim lower than this q-value	15
Minimum remaining sequence length	100
Maximum sequence length	0

Process	Read 1	Read 2
Original	13,851 (100.00%)	13,851 (100.00%)
Adapter removal	13,130 (94.79%)	9,553 (68.97%)
Quality trimming	11,014 (79.52%)	6,692 (48.31%)
rRNA	11,014 (79.52%)	6,692 (48.31%)
bacteriaGenome	11,014 (79.52%)	6,692 (48.31%)
hostGenome	11,013 (79.51%)	6,692 (48.31%)
Paired ( <a href="#">fastq</a> )	6,466 (46.68%)	6,466 (46.68%)
Non-virus filter ( <a href="#">fastq</a> )	6,466 (46.68%)	6,466 (46.68%)

**2. Sequence subtraction Finished!**

rRNA	on
Bacteria genome	on
Host genome	on
Subtraction Target	human
Non-virus filter	on

Number of contigs: 1  
Contig size: 10,686-10,686 bp  
Total: 10,686 bp  
N-statistics  
N10 10,686 1 10,686  
N20 10,686 1 10,686  
N30 10,686 1 10,686  
N40 10,686 1 10,686  
N50 10,686 1 10,686  
N60 10,686 1 10,686  
N70 10,686 1 10,686  
N80 10,686 1 10,686  
N90 10,686 1 10,686  
----

**3. Reads assembly Finished!**

Method	a5_miseq
--------	----------

**4. Homology search Finished!**

Database	nt
E-value	1e-10
Filter	F
Gap	T
Number of hits	1
mode	megablast (legacy)

Whole process start 12/07-17:08:38  
Whole process finish 12/07-17:12:53

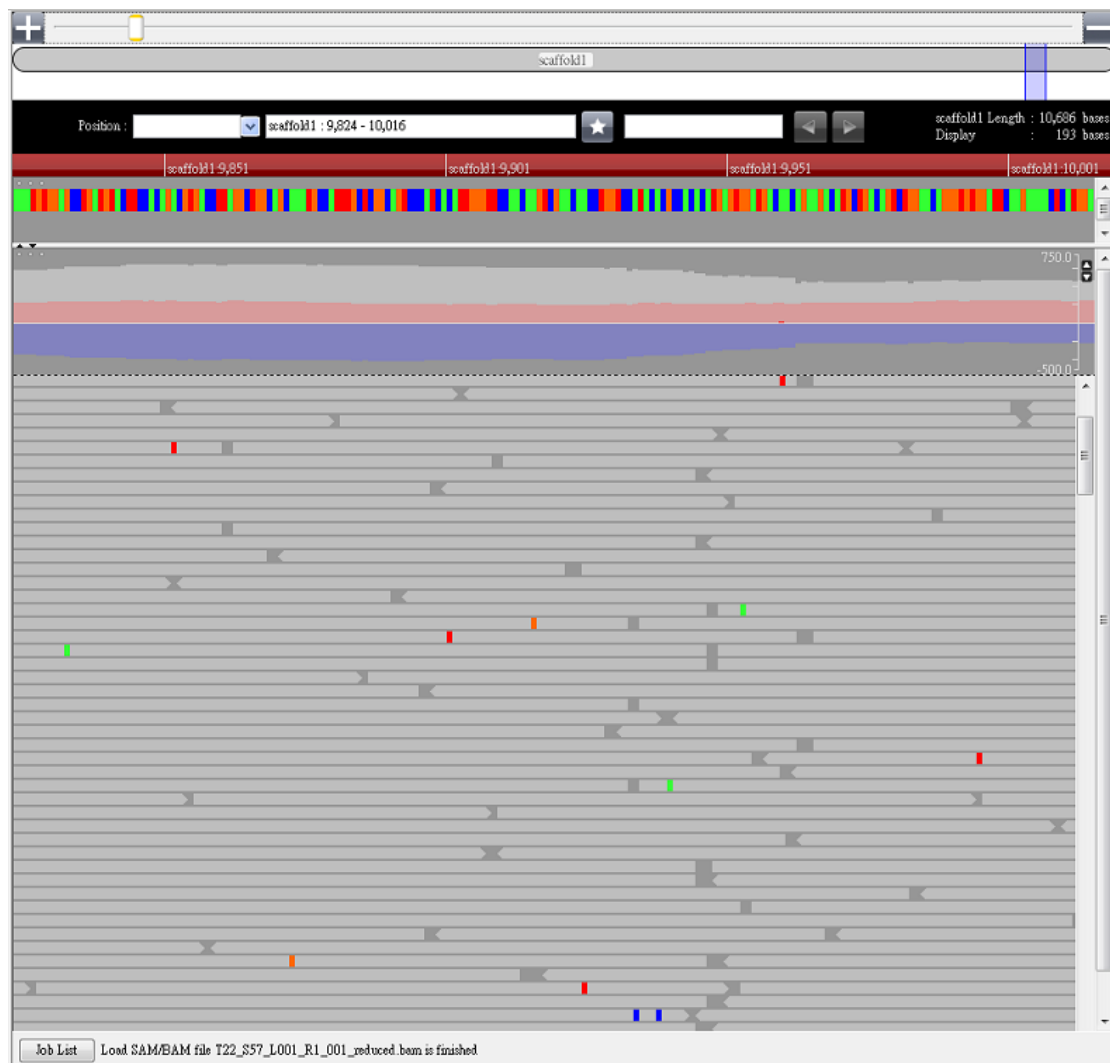
Show/Hide non virus

[scaffold1](#) (10686 nt, 128x).



Dengue virus 2 isolate MKS-2032, complete genome [KC762675.1](#)

(圖十六)



### 參、心得及建議事項

次世代定序技術(next generation sequencing, NGS)與傳統定序方法的最大差異在於，傳統定序方法是將目標區域經由 PCR 反應放大後，進行較長讀長的定序(約 1000bp 左右)，而 NGS 則是將欲定序的核酸片段化後，再進行短讀長的定序，依據各家定序平台技術的不同而略有差異，定序長度大概介於 35~700 bp。NGS 的優勢在於能夠同時進行數百萬條 DNA 的定序，效率遠高過於傳統定序，而且花費遠低於傳統定序，是一個具有快速、高讀值( reads)、花費低及不需 cloning 等優點的定序技術，由於病毒的基因大小相對於細菌或人類基因要小得多，若是能合併多個檢體同時進行 NGS 定序，定序所需費用又能更有效的降低。

登革病毒屬於 RNA 病毒，因為其 RNA 聚合酶缺乏校正能力，因此在複製時很容易產生錯誤，即使是單一感染其基因差異性也很大，而 NGS 正好是研究基因差異性和演化及臨床結果的最適當工具，在 HIV 和 HCV 等病毒已有許多應用的例子。而 NIID 的病毒第一部的蟲媒病毒實驗室(Virology I Arboviral laboratory)與病原體基因組分析研究中心(Pathogen Genomics Center)的研究人員，也已經開始利用 NGS 技術進行登革病毒的定序，可以從病人血清中直接定出登革病毒序列，不需經過時間冗長的病毒分離的過程，能夠更快速地獲得登革病毒序列資訊，他們也藉由此技術，在同一病人中偵測到同時感染兩種型別的登革病毒的案例。藉由此次研習的機會，我也習得整個登革病毒 NGS 定序的流程，每年本土登革熱流行疫情爆發時，為因應本土流行疫情之研判，本署每年花在登革病毒定序的費用不在少數，為求時效性及降低花費，建議本署未來應當編列經費，建立一套完整的 NGS 分析系統。