

計畫編號：MOHW111-CDC-C-315-124310

衛生福利部疾病管制署 111 年署內科技研究計畫

計畫名稱：重要傳染病原次世代定序檢測方法之發展及應用

111 年度 研究報告

執行單位：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：慕蓉蓉

協同主持人：

研究人員：林鈺棋

研究人員：陳筱蓉

執行期間：111 年 1 月 1 日至 111 年 12 月 31 日

目錄

	頁 碼
計畫中文摘要	3
計畫英文摘要	4
計畫內容	
一、前言	5
二、材料與方法	7
三、結果	11
四、討論	14
五、結論與建議	17
六、參考資料	18
六、圖、表	25

共 (25) 頁

計畫中文摘要：

近年由於環境及氣候變遷，加上國際間全球化趨勢，均增加人類與野生動物接觸的機會，造成人畜共通傳染病傳播風險大幅攀升，例如可能來自猩猩和猿猴的 HIV 病毒、源自於鳥類和家禽的禽流感病毒、可能由蝙蝠傳出的 Ebola 病毒及 SARS，以及在 109 年初於中國武漢市爆發由 SARS-CoV-2 造成全球大流行的 COVID-19 等已陸續浮現並造成嚴重流行疫情，顯示在疫情初期精準檢出病原，以及時掌握感染源並落實防疫工作實為當務之急。

次世代定序(Next generation sequencing，以下簡稱 NGS) 相較於傳統病原體檢測技術，具有高輸出量及檢測多種標的之優勢，已廣泛運用在檢測及基因定序領域。因此，本計畫將應用 NGS 平台之 amplicon based target enrichment，發展全方位人畜共通傳染病原之檢測技術，並運用於新興傳染病檢測及群聚事件調查，及時釐清感染源，以落實防疫措施，降低傳染病造成的衝擊。

關鍵詞：新興傳染病、次世代定序

計畫英文摘要：

keywords : emerging disease, next generation sequencing

Emerging infections have threatened humanity since global warming, dramatic environmental changes resulting in complex interactions between humans and animals. Emergence and evolution of an ever increasing number of human pathogens, originating from animals, such as avian flu, SARS and the SARS-CoV2 resulting in pandemic COVID-19. Rapid detection and identification of emerging infectious pathogens is essential to guide the therapy and predict the outcome.

Next Generation Sequencing (NGS) could resolve the detection limits to the number of targeted pathogens when using traditional techniques. Introducing NGS into a diagnostic setting may revolutionize the investigation of pathogens. Combining amplicon based amplification with NGS will result in target pathogen enrichment and even pathogen typing. Thus, adapting NGS from clinical to public health use benefits monitoring, controlling and preventing infectious diseases.

本文

一、前言：

由於環境及氣候變遷，加上國際交流頻繁的全球化趨勢，自 1940 年起，全球流行的新興傳染病中有 60% 為人畜共通傳染病，其中高達 72% 的感染原為野生動物[1]，包括可能來自猩猩和猿猴的 HIV 病毒[2]、源自於鳥類和家禽的禽流感病毒[3]及可能由蝙蝠傳出的 Ebola 病毒及 SARS[4]。然而，環境及氣候變遷已逐漸改變野生動物的棲息地及生活方式，同時全球都市化的趨勢，也提供野生動物更多的食物及更佳生存條件，將增加人類與野生動物接觸的機會，此外，目前仍有部分地區有嗜吃野生動物的習慣，捕獲及食用過程皆可能會接觸野生動物，均造成人畜共通傳染病較以往更容易傳播[5]。在 109 年年初於中國武漢市爆發 COVID-19，由 SARS-CoV-2 病毒造成，迄今已快速蔓延全球造成嚴重疫情，世界衛生組織已於 109 年 3 月宣布，COVID-19 的疫情規模已達到全球大流行[6]，目前發現該病毒的基因序列與蝙蝠冠狀病毒 RaTG13 具有高達 96% 的相同度[7]，顯示 COVID-19 亦可能為源自動物的人畜共通傳染病。因此，因應與日俱增的新興傳染病，建構完善的監測系統及發展重要傳染病原之檢測技術，將扮演防治的關鍵角色。

從 2004 年次世代定序(Next generation sequencing，以下簡稱 NGS)問世以來，已成為全基因定序及臨床診斷上的利器，由於近年來 NGS 成本大幅

降低，已廣泛應用在傳染病原檢測及追蹤，包括不明原因傳染病原檢測、新興微生物(病原)之鑑定分析、微生物全基因體定序、微生物分型、傳染病群聚調查、抗藥性基因分析比對以及微生物菌叢(microbiome)的變化追蹤等[8-15]。目前各 NGS 平台在診斷的應用上，依據數據產出量、讀取片段長度及組裝功能差異，已各自發展多元技術，主要分成三種方法：

1. Metagenomic NGS，可檢測臨床檢體中各種微生物[16]。
2. Target NGS：已廣泛運用於癌症分子診斷，獲得最佳的鑑定力[17]。
3. Target universal multiplex PCR for NGS：常運用於 16s rRNA metagenomics，進行菌種鑑定或微生物族群分析[18]。

相較於傳統病原體檢測技術僅能針對一種或數種已知病原體檢測，NGS 兼具有高輸出量及定序之優勢，亦可突破過去傳統病原體檢測技術檢測標的數目之限制，並可藉由定序方式獲得病原體基因序列甚至進行病原體型別等更多資訊。Target NGS 具備針對個別基因進行偵測的能力，近年發展以 target NGS 為主之 target enrichment 策略偵測病原體，無論是 capture based 或是 amplicon based，均可提高檢測靈敏度 [19]。因此，本計畫將應用 Target NGS 平台，以 amplicon based target enrichment 策略建置發展全方位人畜共通傳染病原檢測技術，並運用於未來新興傳染病及群聚事件調查等，快速釐清感染源，及時落實防疫措施，以降低疫病之衝擊。

二、材料與方法

1、實驗樣本

本計畫陽性對照組樣本使用基因合成並載入載體 pUC57，其序列包含 MERS-CoV、SARS-CoV、SARS-CoV-2、HCoV-NL63、HCoV-229E、HCoV-HKU1 及 HCoV-OC43 等 7 種冠狀病毒部分片段；臨床樣本使用包括 4 例通報不明原因腦炎病例及 1 例通報嚴重特殊傳染性肺炎病例之鼻咽拭子檢體。

2、檢體核酸萃取

利用自動核酸萃取系統 MagNA Pure Compact Instrument (Roche Applied Science) 進行檢體核酸萃取，萃取完成的核酸置於 -80°C 冷凍櫃保存。

3、Target NGS 之基因庫建置及 NGS 定序

本計畫 Target NGS 使用之 Multiplex PCR 引子序列及合成片段長度如表一。Target NGS 基因建庫步驟如下：

樣本 RNA 以反轉錄酶合成 cDNA 後，進行 Multiplex PCR，反應試劑使用 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche)，取 1 μ L 樣本 cDNA 與 1X KAPA HiFi HotStart ReadyMix、200nM forward primer 及 200nM reverse primer 混合，混合物以 Biometra 系統 (Biometra, Analytik Jena) 進行反應，反應條件為 95°C 作用 3 分鐘，再進行 35

次循環反應 (95°C作用 30 秒鐘, 50°C作用 30 秒鐘, 72°C作用 30 秒鐘), 最後 72°C作用 3 分鐘後, 維持在 4°C保存。

將上述 PCR 產物經 AMPure XP beads(Beckman Coulter)純化後, 進行 Index PCR, 反應試劑使用 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix(Roche), 取 5 μ L 磁珠純化之 PCR 產物與 1X KAPA HiFi HotStart ReadyMix 及 10 μ L Nextera DNA UD Indexes 混合, 混合物以 Biometra 系統 (Biometra, Analytik Jena)進行反應, 反應條件為 95°C作用 3 分鐘, 再進行 8 次循環反應 (95°C作用 30 秒鐘, 55°C作用 30 秒鐘, 72°C作用 30 秒鐘), 最後 72°C作用 5 分鐘後, 維持在 4°C保存, 上述 Index PCR 產物經 AMPure XP beads(Beckman Coulter)純化後, 以 Illumina iSeq 定序。

4、Target-enrichment NGS 基因庫建置

本計畫針對 SARS-CoV-2 之棘蛋白基因序列, 設計 Target-enrichment NGS 之引子序列如表一, Target-enrichment NGS 步驟如下:

樣本 RNA 以反轉錄酶合成 cDNA 後, 進行 Multiplex PCR, 反應試劑使用 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix(Roche), 取 1 μ L 樣本 cDNA 與 1X KAPA HiFi HotStart ReadyMix、200nM forward primer

及 200nM reverse primer 混合後進行反應，反應條件為 95°C作用 3 分鐘，再進行 35 次循環反應 (95°C作用 15 秒鐘，63°C作用 5 分鐘) 後，維持在 4°C保存。

取上述 PCR 產物 30 μ L，與 Bead-linked transposome 及 Tagmentation Buffer 1 混合後進行反應，反應條件為 55°C作用 15 分鐘後，維持在 10°C保存。將試管放置於磁架，待磁珠完全吸附後去除上清液，再加入 100 μ L TWB，待磁珠完全吸附後去除 (重複 2 次)。將試管離開磁架，加入 20 μ L ddH₂O、20 μ L PCR Mix 及 10 μ L Nextera DNA UD Indexes 混合後進行反應，反應條件為 95°C作用 3 分鐘，再進行 5 次循環反應 (95°C作用 45 秒鐘，62°C作用 30 秒鐘，68°C作用 2 分鐘)，最後 68°C作用 1 分鐘後，維持在 4°C保存，上述 Index PCR 產物經 AMPure XP beads(Beckman Coulter)純化後，以 Illumina iSeq 定序。

5、Bioinformatics 分析

Target NGS 定序資料以 Local Run Manager(illumina)之 PCR Amplicon Module 進行分析。Target-enrichment NGS 定序資料以 BWA 軟體與 NCBI 參考序列進行比對[20]，再利用 metaSPAdes 軟

體進行組裝後獲得組裝序列[21]，最後將組裝序列上傳至
Nextclade(<https://clades.nextstrain.org/>)進行病毒型別分析。

三、 結果

1、 Multiplex PCR 之正確性評估

本年度挑選包括 Enterovirus polyprotein、Enterovirus 71 及 Enterovirus D68 等共 3 種腸病毒加入 Target NGS 之檢測項目，設計片段長度介於 100-300bp 共 3 段序列，並合成該序列之陽性對照組，以測試 Multiplex PCR 之正確性，結果如圖 1 所示。以陽性對照組 DNA 為模板，三對專一性引子確實可合成對應之 PCR 片段，且經 Sanger 定序結果，PCR 片段之序列皆與陽性對照組序列一致，顯示 Multiplex PCR 之正確性。

2、 Target NGS 之靈敏度分析

為分析 Target NGS 之靈敏度，本計畫以 3 組腸病毒陽性對照組 DNA 為樣本，分別稀釋至 10^2 、 10^3 、 10^4 及 10^5 copy numbers 共 4 種濃度，連同陰性對照組（NC 組）共 5 組進行 Target NGS 分析，並以讀取各標的之 reads 數，作為定量標準，結果如圖 2 所示，各標的之讀取 reads 數如下：

(1) NC 組：1-29。

(2) 10^2 組：30-1,712。

(3) 10^3 組：2,241-11,379。

(4) 10^4 組：3,558-57,078。

(5) 10^5 組：7,936-177,988。

依分析結果，Target NGS 可讀取腸病毒陽性對照組之 3 段序列，並可區分各序列差異，且陽性對照組 DNA 濃度越高，讀取 reads 數亦越多，兩者呈現正相關；此外，由於 10^2 組之讀取 reads 數接近 NC 組，為降低背景值影響判讀結果，因此訂 1,000 reads 數作為陽性判定標準。

3、 建立 Target-enrichment NGS 實驗流程

為進一步發展 NGS 運用於重要傳染病原之分型方法，本計畫建立 Target-enrichment NGS 之實驗流程如圖 3，說明如下：

- (1) 萃取樣本 RNA，以 reverse transcriptase 反轉錄成 cDNA。
- (2) 取樣本 cDNA 進行 Multiplex PCR。
- (3) Multiplex PCR 產物經磁珠純化後，進行 Fragmentation。
- (4) Fragmentation 產物經磁珠純化後，進行 Index PCR。
- (5) Index PCR 產物經磁珠純化後，定量後上機。

4、 Target-enrichment NGS 對於不同型別樣本之涵蓋率評估

為評估 Target-enrichment NGS 對於不同型別樣本之涵蓋率及鑑別力，本計畫以 SARS-CoV-2 Omicron (BA.2.3) 變異株之 spike protein 基因序列為模板，設計每段長度約 400 bp 的 PCR 片段共

計 11 段，並挑選通報檢出 SARS-Cov-2 之臨床檢體，包括 SARS-CoV-2 Omicron 變異株(O1 及 O2)、Delta 變異株(D3 及 D4)及原始株(S5 及 S6)各 2 例共 6 例作為樣本進行評估。該批臨床檢體經萃取核酸後進行 Target-enrichment NGS 檢測，其讀取 reads 分別與 NCBI 序列 SARS-CoV-2 Omicron (OX315743)、Delta(OX014251) 及 human/USA/VA-DCLS-0364/2020 (MT609588)進行比對，結果如圖 4。結果顯示，本計畫運用 Target-enrichment NGS 檢測臨床檢體之讀取 reads，不但可完整涵蓋 SARS-CoV-2 Omicron(BA.2)變異株之 spike protein 基因，對於另一型變異株 SARS-CoV-2 Delta(B.1.617.2)及原始株之 spike protein 基因亦可涵蓋，顯示 Target-enrichment NGS 可有效合成 SARS-CoV-2 不同型別變異株及原始株之 spike protein 基因並完成定序。

5、 Target-enrichment NGS 序列組裝分析

進一步將該 6 例臨床檢體之 Target-enrichment NGS 讀取 reads 進行組裝，分別獲得介於 3,895-4,063bp 之組裝片段，接續將該批組裝片段上傳至 Nextclade 網站進行分析，結果如表二。依據 Nextclade 分析結果，樣本 O1 及 O2 鑑定為 21L (Omicron, BA.2.3.7)，樣本 D3 及 D4 分別鑑定為 21I(Delta, B.1.617.2)與 21A(Delta, B.1.617.2)，樣本 S5 及 S6 則鑑定為

19B，顯示 Target-enrichment NGS 可成功組裝不同型別 SARS-Cov-2 之 spike protein 完整基因，對於不同型別的病毒亦具有良好鑑別力。

四、 討論

本年度優先遴選 3 種腸病毒作為 Target NGS 之標的進行評估，其測試結果靈敏度可達 10^3 copy number，且可有效鑑別 3 種腸病毒，顯示 Target NGS 確實兼具高靈敏度及多標的偵測之優勢；此外，本計畫完成建立 Target-enrichment NGS 技術及實驗流程，以下綜整該技術相較於傳統 NGS 之優勢如下：

- 1、 可組裝長片段序列：由於目前 illumina NGS 定序儀之讀長上限通常為 150bp，少部分可達 250-300bp，因此對於某些長片段或重複序列，將面臨組裝的困難，因此 Target-enrichment NGS 可透過設計涵蓋長片段 PCR 產物克服此 NGS 短片段定序技術之限制。
- 2、 提升檢驗靈敏度：由於 Target-enrichment NGS 可透過 multiplex PCR 將樣本核酸增幅後進行基因建庫，因此相較於傳統 NGS 使用樣本核酸直接進行基因建庫，經過樣本增幅之 Target-enrichment NGS 的靈敏度將大幅提升。
- 3、 避免宿主基因體干擾：傳統 NGS 進行總體基因體學 (Metagenomics) 時遇到最大的難題，就是宿主基因體的干擾。以病毒為例，由於病毒基因體遠比宿主人類為小，且目前尚無完整移除人類基因體的試劑或技術，因此欲藉由總體基因體學方法檢測

臨床檢體內的病毒，將面臨人類基因體的嚴重干擾。因此，Target-enrichment NGS 藉由增幅指定標的之特性，可克服宿主基因體的干擾，大幅提升檢測準確率及效率。

五、 結論與建議

1. 本計畫為第二年計畫，第一年完成建置 Target NGS 技術，共檢測 7 種冠狀病毒，本年度持續新增 3 種腸病毒，合計 10 種檢測標的。
2. 本計畫進一步建立 Target-enrichment NGS 技術，並以 SARS-Cov-2 之臨床檢體作為測試樣本，可用於組裝長片段序列，相較傳統 NGS 具有較佳的檢測靈敏度，有利序列分析及型別鑑定。

六、參考資料

- [1] Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008;451:990-3.
- [2] Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature*. 1999;397:436-41.
- [3] Reperant LA, Kuiken T, Osterhaus AD. Adaptive pathways of zoonotic influenza viruses: from exposure to establishment in humans. *Vaccine*. 2012;30:4419-34.
- [4] Reperant LA, Osterhaus A. AIDS, Avian flu, SARS, MERS, Ebola, Zika... what next? *Vaccine*. 2017;35:4470-4.
- [5] Coronavirus: Why are we catching more diseases from animals? Available at: <https://www.bbc.com/news/health-51237225>.
- [6] WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19. Available at: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.
- [7] Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579:270-3.
- [8] Monira S, Nakamura S, Gotoh K, Izutsu K, Watanabe H, Alam NH, et al. Metagenomic profile of gut microbiota in children during cholera and recovery. *Gut pathogens*. 2013;5:1.
- [9] Koser CU, Ellington MJ, Cartwright EJ, Gillespie SH, Brown NM, Farrington M, et al. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS pathogens*. 2012;8:e1002824.
- [10] Deng X, den Bakker HC, Hendriksen RS. Genomic Epidemiology: Whole-Genome-Sequencing-Powered Surveillance and Outbreak Investigation of Foodborne Bacterial Pathogens. *Annual review of food science and technology*. 2016;7:353-74.
- [11] Brzuszkiewicz E, Thurmer A, Schuldes J, Leimbach A, Liesegang H, Meyer FD, et al. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Archives of microbiology*. 2011;193:883-91.
- [12] Nakamura S, Yang CS, Sakon N, Ueda M, Tougan T, Yamashita A, et al. Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach. *PloS one*. 2009;4:e4219.
- [13] Palacios G, Druce J, Du L, Tran T, Birch C, Briese T, et al. A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases. *The New England journal of medicine*. 2008;358:991-8.
- [14] Clausen PT, Zankari E, Aarestrup FM, Lund O. Benchmarking of methods for

- identification of antimicrobial resistance genes in bacterial whole genome data. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016.
- [15] Cannas A, Mazzarelli A, Di Caro A, Delogu G, Girardi E. Molecular Typing of Mycobacterium Tuberculosis Strains: A Fundamental Tool for Tuberculosis Control and Elimination. *Infectious disease reports*. 2016;8:6567.
- [16] Mohammad HA, Madi NM, Al-Nakib W. Analysis of viral diversity in stool samples from infants and children with acute gastroenteritis in Kuwait using Metagenomics approach. *Virology journal*. 2020;17:10.
- [17] Garziera M, Roncato R, Montico M, De Mattia E, Gagno S, Poletto E, et al. New Challenges in Tumor Mutation Heterogeneity in Advanced Ovarian Cancer by a Targeted Next-Generation Sequencing (NGS) Approach. *Cells*. 2019;8.
- [18] Meenatchi R, Thinesh T, Brindanganam P, Hassan S, Kiran GS, Selvin J. Revealing the impact of global mass bleaching on coral microbiome through 16S rRNA gene-based metagenomic analysis. *Microbiological research*. 2020;233:126408.
- [19] No JS, Kim WK, Cho S, Lee SH, Kim JA, Lee D, et al. Comparison of targeted next-generation sequencing for whole-genome sequencing of Hantaan orthohantavirus in Apodemus agrarius lung tissues. *Scientific reports*. 2019;9:16631.
- [20] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25:1754-60.
- [21] Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res*. 2017;27:824-34.

七、表

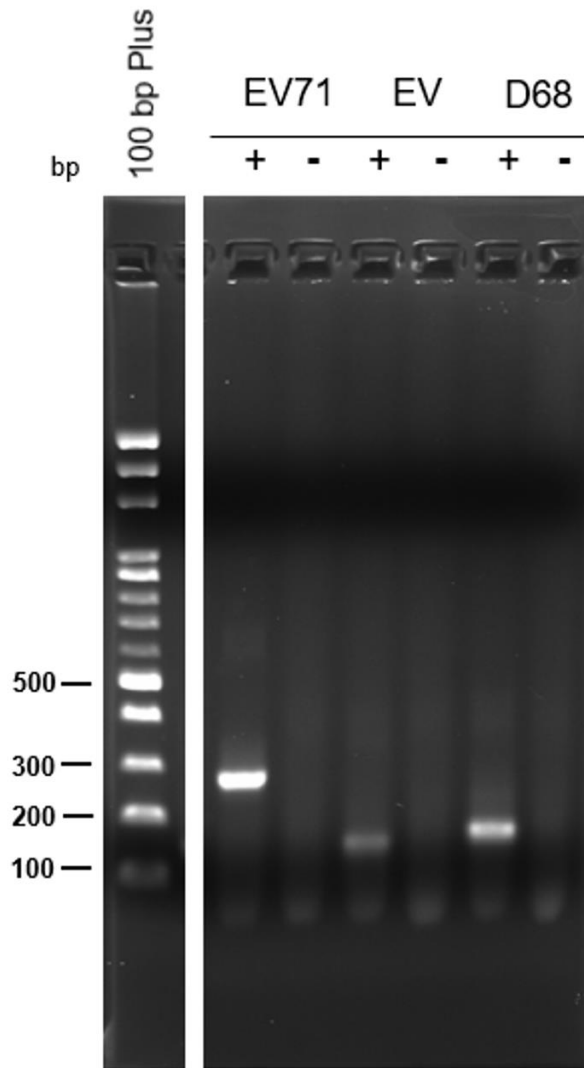
表一：本計畫使用引子序列及合成片段長度

Target	Primer	Sequences(5'-3')	Product sizes(bp)
Enterovirus polyprotein	Ent-F	GACATGGTGYGAAGAGTCTATTGA*	143
	Ent-R	GCTCCGCAGTTAGGATTAGCC*	
Enterovirus 71 VP1	EV71-F	GAGAGCTCTATAGGAGATAGTGTG*	271
	EV71-R	TGCCGTA CTGTGTGAATTAAGAA*	
Enterovirus D68 polyprotein	D68-F	CACYGAACCAGARGAAGCCA*	165
	D68-R1	CCAAAGCTGCTCTACTGAGAAA*	
SARS-CoV-2	Cov2-S1F	AGGGGTACTGCTGTTATGTCTTT	~400
	Cov2-S1R	AGTAGTACCAAAAATCCAGCCTCT	
	Cov2-S2F	GGTTTGATAACCCTGTCCTACCA	
	Cov2-S2R	TCTACCAATGGTTCTAAAGCCGA	
	Cov2-S3F	AGGGAATTTGTGTTTAAGAATATTGATGGT	
	Cov2-S3R	ACTTCAYCAAAAAGGGCACAAGT	
	Cov2-S4F	GGAATCTATCAAACCTTCTAACTTTAGAGTCC	
	Cov2-S4R	AAAGGTTTGAGATTAGACTTCCTAAACA	
	Cov2-S5F	CAGGCTGCGTTATAGCTTGGA	
	Cov2-S5R	CTCAAGTGTCTGTGGATCACGG	
	Cov2-S6F	ACTGAGTCTAACAAAAAGTTTCTGCC	
	Cov2-S6R	TCTGCACCAAGTGACATAGTGT	
	Cov2-S7F	TGCGCTAGTTATCAGACTCAGAC	
	Cov2-S7R	AGATCTTCAATAAATGACCTCTTGCTT	
	Cov2-S8F	ACAAAACACCACCAATTAATAKATTTTGG	
	Cov2-S8R	TGCTGTGGAAGAAAGTGAGTCT	
	Cov2-S9F	GTTTAATGGTATTGGAGTTACACAGAATG	
Cov2-S9R	TGCTGACTGAGGGAAGGACATA		
Cov2-S10F	TGTCAGAGTGTGTACTTTGGACAA		
Cov2-S10R	GCATTAATGCCAGAGATGTCACC		
Cov2-S11F	ACACAGTTTATGATCCTTTGCAACC		
Cov2-S11R	CCAATTGTGAAGATTCTCATAAACAAATCC		

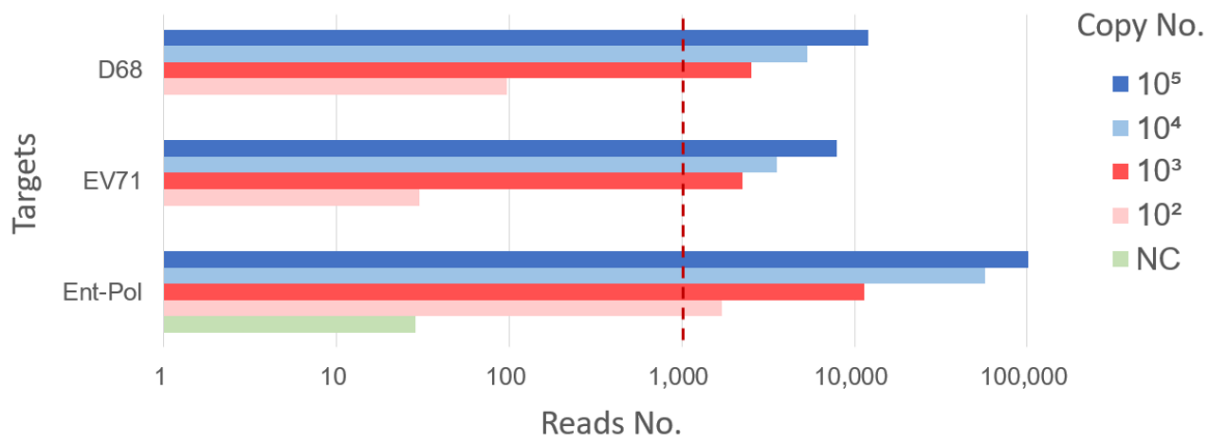
*The Illumina forward and reverse overhang adapter sequences to be added to specific primer.

表二、6 例臨床檢體之 Nextclade 分析結果

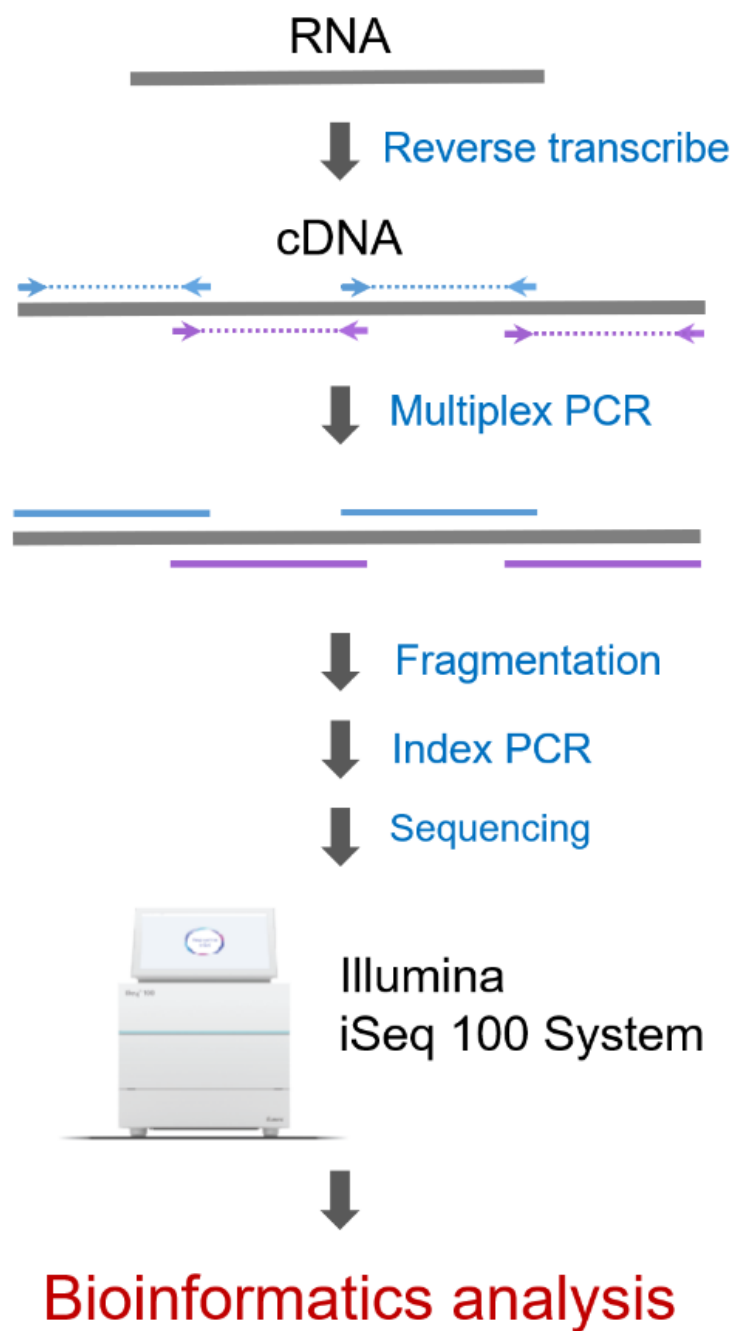
Sample	Size (bp)	Clade	Nextclade
O1	3895	21L(Omicron)	BA.2.3.7
O2	4056	21L(Omicron)	BA.2.3.7
D3	4063	21I (Delta)	B.1.617.2
D4	3949	21A(Delta)	B.1.617.2
S5	4017	19B	A.18
S6	3920	19B	A.18



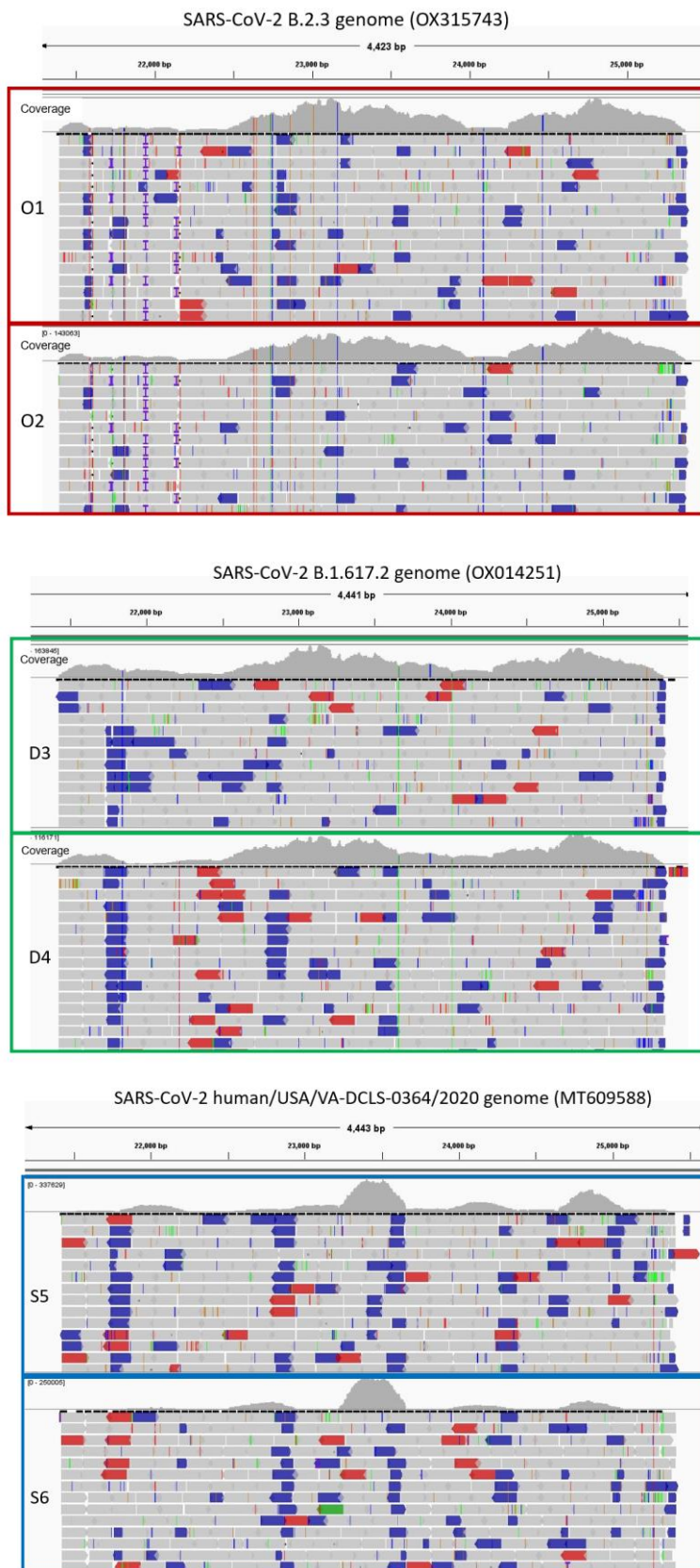
圖一、三種腸病毒陽性對照組 PCR 片段之電泳分析圖。



圖二、三種腸病毒陽性對照組之Target NGS靈敏度分析。



圖三、本計畫建立 Target-enrichment NGS 之實驗流程。



圖四、臨床檢體 Target-enrichment NGS 讀取 read 與 NCBI 序列之比對。

111 年度科技研究計畫期末執行進度審查意見回復表

計畫名稱：重要傳染病原次世代定序檢測方法之發展及應用

計畫主持人：慕蓉蓉

填報日期：111.12.21

*修正處請在報告中以紅字標示

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處頁碼
1	可更明確定出實驗室採用 NGS 檢測之標的、質與量。	謝謝委員意見，將於未來計畫呈現。	
2	NGS 平台在國內外都已是成熟技術。CDC 要自行建立平台，需評估成本效益及任務導向。	本署為執行防疫任務，於流行疫情時需自行進行病原 NGS 全基因定序，才能有效縮短檢驗時效，於第一時間將檢驗結果快速提供本署決策長官，作為擬定防疫措施之參考。本計畫將持續切合本署業務職掌並評估成本效益。	
3			
4			
5			

備註：如有修正期末報告內容，請註明頁碼，並務必於 111 年 12 月 21 日
前至 GRB 系統完成資料抽換。