



台北市醫事檢驗師公會
Taipei Association of Medical Technologists

醫檢學術會刊

2011年10月出刊

理事長：樓漢民	總編輯：張錦標
總幹事：陳瑞川	學術委員：鄭詠慈、許慧文
	出刊日期：100年10月30日

目錄

醫檢學術專題

臨床篩選具有 carbapenemase 之腸內桿菌檢驗流程簡介 程雲詳---2

三軍總醫院 臨床病理科

核酸定序技術之演進 張天耀---13

三軍總醫院 臨床病理科

台北市醫檢師公會「醫檢學術會刊」投稿須知 編輯部---29

專業

臨床篩選具有 carbapenemase 之腸內桿菌檢驗流程簡介

程雲詳

三軍總醫院 臨床病理科

摘要

目前臨床治療廣效性乙內醯胺酶(ESBL、extended-spectrum β -lactamase)的腸內桿菌及其他第三代 cephalosporin 有抗性的腸內桿菌，使用 carbapenem 類的抗生素。愈來愈多腸內桿菌對於 carbapenem 產生抗藥性，其中一種機制為產生 carbapenemase。因此臨床執行腸內桿菌的抗生素敏感性試驗時，應該納入偵測 carbapenemase 的流程。2011 年版的臨床與實驗室標準協會(CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute) M100-S20，將 carbapenem 類的抗生素最低抑菌濃度調整為較嚴格，可以不偵測 carbapenemase 的產生與否。在實驗室尚未更新篩選標準前，仍然要偵測 carbapenemase。初步篩選先觀察 carbapenem 的最低抑菌濃度，大於篩選標準要再做確認試驗。用來篩選 carbapenemase 的藥物有 meropenem、imipenem、ertapenem，依照 CLSI 的篩選範圍初步判斷菌株是否存在 carbapenemase。確認試驗分為表現型的確認試驗與基因型的確認試驗，表現型確認試驗為 modified Hodge test (MHT)與抑制試驗。基因型確認試驗是用聚合酶連鎖反應與定序確認，carbapenemase 的基因有很多種，若是臨床無法檢驗是何種型別的基因型，應該將檢體送至參考實驗室作進一步確認。

關鍵詞: carbapenemase、modified Hodge test

通訊作者：程雲詳

連絡電話：02-8792-3311 # 88092

e-mail: bubudany@hotmail.com

連絡地址：台北市內湖區成功路二段 325 號

民國 100 年 5 月 1 日受理；民國 100 年 10 月 30 日受理刊

Carbapenem 抗藥菌株的出現

Carbapenem 是 β -lactam 類的抗生素，其支鏈是右旋與其他 β -lactam 類抗生素左旋的結構式不同。Carbapenem 類的抗生素目前在臨床上較常使用的包括 imipenem、meropenem 及 ertapenem。這類抗生素主要可以治療對大部份的 β -lactam 產生抗藥的腸道桿菌，尤其是產生 ESBL 之腸道桿菌的後線用藥。但是近期由於抗生素濫用而陸續分離出對於 carbapenem 類的抗生素具有抗藥性的腸道桿菌，這對於臨床治療是一大威脅。腸道桿菌對 carbapenem 類藥物產生抗藥性的機制之一是產生酵素 carbapenemase，而造成 carbapenem 類藥物水解失效。(Queenan and Bush 2007)亦有文獻指出，當細菌本身讓藥物進入體內的通道 porin 蛋白毀損及伴隨表現 cephalosporinase 基因 AmpC 亦可能造成 carbapenem 的抗藥性。但是以感染控制的角度來說產生 carbapenemases 的腸道桿菌最為重要。其原因有二：一為以往發生過大規模群聚感染對 carbapenem 抗藥的菌株主要是因為攜帶 carbapenemase。其二為這些攜帶 carbapenemase 的菌株，carbapenemase 的基因主要存在於質體上面可以藉由水平傳播，傳給其他同種或是不同種的細菌。所以，臨床細菌室如何有效且及時監控會產生 carbapenemase 的腸道桿菌就顯得格外重要。細菌所攜帶的 carbapenemase 依照胺基酸序列不同分為三類：Ambler class A (Serine carbapenemases)、class B (metallo-carbapenemases)、與 Ambler class D (OXA carbapenemases)。class A 與 class D carbapenemase 的胺基酸活化位是 Serine，class B 的活化位是鋅離子。在這些分類中，還可以區分成許多基因型，class A 有 KPC、SME、NMC-A、IMI、PER、GES、SFO、SFC、IBC 及 class B

有 VIM、GIM、SIM、NDM、IMP、SPM，class D 有 OXA、PSE，目前尚有其他新的基因型也陸續被發現(Queenan and Bush 2007)。carbapenemase 的基因可以存在染色體或質體上，但是產生 carbapenemase 的物種可以快速的出現與散布，是以存在質體上的物種可能具有不同菌種間傳遞的能力。

臨床實驗室如何檢測攜帶 carbapenemase 的腸道桿菌

據參考一些文獻與臨床與實驗室標準協會(CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute)所制定的臨床微生物實驗室相關標準 M100-S 系列，在 2009 年後的版本對臨床實驗室篩檢攜帶 carbapenemase 的腸道桿菌開始提及其重要性及建議實驗室進行後續篩檢工作，吾人整理後敘述如下：

1 檢測時機及檢驗流程

根據 2011 CLSI M100 標準中敘述：如果實驗室在進行腸內桿菌 carbapenem 抗生素感受性試驗時是選用 2010 年版本，當 carbapenem 藥物所產生抑制圈或最小抑菌濃度 (MIC) 落在 2010 年的建議篩檢閾值 (breakpoint) (表二) 則必需進行 modified Hodge test (MHT) 確認其是否具有 carbapenemase。但是，如果實驗室所參照的是 2011 年 CLSI M100 將其 carbapenem 抗生素的 MIC 閾值調降則不需執行 MHT 確認試驗。檢測攜帶 carbapenemase 腸內桿菌流程分兩階段，分別為篩選試驗與確認試驗。以 CLSI 提供 carbapenem 最低抑菌濃度或者紙錠擴散試驗初步篩選，若是最低抑菌濃度提高或抑制圈變小，可能是產生 carbapenemase 的菌種。確認試驗用 MHT 與抑制試驗確認表現型，亦可利用聚合酶連鎖反應與定序確認基因型。

2 篩選過程的注意事項

2011 CLSI 標準及 2010 年腸內桿菌 carbapenem 抗生素感受性試驗所建議的標準不同，各抗生素閾值比較如表一所示。當使用自動化儀器做藥物感受性試驗(Ex: Phoenix, Vitek, 或 MicroScan)，儀器可測得最低抑菌濃度的最低濃度要達到 2011 年 CLSI guideline。若是儀器無法達到最低濃度，只能使用 2010 年 CLSI guideline 的標準，且必須篩選具有 carbapenemase 菌株。正確的細菌量對於稀釋的方法與自動化系統都很重要，因為細菌量過高或低都會造成感受性試驗不準確。為了排除人為的技術性誤差，當自動化儀器測定 carbapenem 最低抑菌濃度大於篩選閾值，可以用 meropenem 或 imipenem 的 Etest 作確認(Cohen Stuart and Leverstein-Van Hall 2010)。Etest 判讀上要注意突變菌種比主要菌叢有較高的最低抑菌濃度，而這些少數的菌落仍然要納入判讀的數值內。

3 確認試驗作法介紹

(1) Modified Hodge Test (MHT)

初步篩選懷疑產生 carbapenemase 的菌種，接下來依照 CLSI 提供的方法執行 MHT(CLSI)。使用培養基為 Mueller-Hinton agar，抗生素 ertapenem 10 μ g 或 meropenem 10 μ g。以生理食鹽水或是肉湯培養基，直接調菌或培養生長的方式將 *E.coli* ATCC 25922 配製為 0.5 McFarland 的懸浮液。以生理食鹽水或肉湯培養基 1:10 稀釋，接種在 Mueller-Hinton agar。3~10 分鐘 plate 乾燥後，放置適當數量的紙錠。大 Mueller-Hinton agar 用 1~4 個紙錠，測試菌種 1~6 個，品管菌種 2

個；小 Mueller-Hinton agar 用 1 個紙錠，測試菌種 1 個，品管菌種 2 個。用接種環或棉棒，挑 3~5 個在 blood agar 培養隔夜的菌種。從紙錠的邊緣開始畫出 20~25 mm 的直線，培養在 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 環境空氣(ambient air)溫箱 16~20 小時。

結果判讀的方式：觀察測試菌種或品管菌種的接種線與抑制圈的交界處，有促進生長代表菌株攜帶 carbapenemase (圖一)；沒有促進生長代表菌株沒有 carbapenemase。有部份的測試菌種可能會抑制 *E.coli* ATCC25922 的生長使接種線的周圍沒有細菌生長，此種菌株無法以 MHT 預測 carbapenemase。

以下為建議的品管菌種：*Klebsiella pneumoniae* ATCC-1705 (KPC 陽性)；*E.coli* ATCC 25922 (carbapenemase 陰性)；與 *K.pneumoniae* ATCC BAA1706 (對於 carbapenem 有抗藥性，是 carbapenemase 以外的機制造成，modified Hodge test 陰性)

(2) Carbapenemase 活性抑制試驗

MHT 有高敏感度(95~100%)，但是無法區分各型的 carbapenemase，且因為產生 CTX-M ESBL-或 AmpC 的分離菌株，減少或沒有 porin 的表現，可能會造成偽陽性的結果(Pasteran et al.)。有研究指出，另外再執行抑制試驗，可以排除部份非 carbapenemases 造成的結果。抑制 carbapenemase 活性的試驗是添加各型 carbapenemase 的抑制劑，觀察最低抑菌濃度是否會因此下降，此現象稱為 carbapenem 與抑制劑的協同作用(synergy)。偵測 class A carbapenemase，使用抑制劑 boronic acid (3-aminophenylboronic acid)，偵測 class B

metallo-carbapenemase，使用抑制劑 EDTA(ethylene diamine tetra-acetic acid)，或者 dipicolinic acid (Cohen Stuart and Leverstein-Van Hall 2010)，分類方式如表三。

(3)基因型的確認試驗

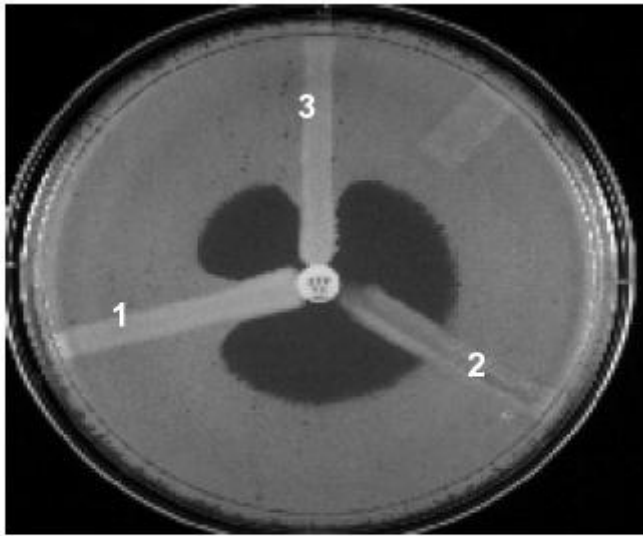
基因型確認試驗是聚合酶連鎖反應與定序 carbapenemase 基因。Carbapenemase 的基因可能會突變，造成實驗室的基因確認結果為陰性。此時應該再送到參考實驗室，做進一步的基因確認(Dallenne et al.)。

4 報告的判讀修正

使用 2010 年的 CLSI guideline，當 MHT 陽性的情況下，ertapenem 最低抑菌濃度 2-4 μ g/mL、imipenem 最低抑菌濃度 2-8 μ g/mL、meropenem 2-8 μ g/mL，報告所有的 carbapenem 為 resistant；MHT 結果陰性，依照原本的判讀標準。使用 2011 年的標準，不需要報告 MHT 的結果。

結論

當腸內桿菌 carbapenem 的抗藥性篩選使用 2011 年 CLIS M100 的標準，可能產生 carbapenemase 的腸內桿菌對於 carbapenem 都判定為 resistant，所以不需要另外執行 MHT；然而，使用 2010 年 CLSI M100 的篩選標準較寬鬆，對於 carbapenem 判定為敏感性，但藥敏試驗結果介於篩檢標準間的菌株可能攜帶產生 carbapenemase，造成篩選出抗藥性菌株。因此，為了避免抗生素治療失敗與抗藥性基因的傳播，隨著腸內桿菌 carbapenemase 的產生，臨床細菌室也要更新檢驗的流程，以增進醫療品質。



圖一.小 Mueller-Hinton agar 執行 MHT (CLSI.)

1. *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705, 陽性結果; 2. *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706, 陰性結果; 3. 臨床分離菌, 陽性結果

表一 2011 與 2010 年 CLSI carbapenem 抗生素敏感性試驗的閾值

2011 CLSI 閾值	紙錠擴散試驗 (mm)			最低抑菌濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	Susceptible	Intermediate	Resistant	Susceptible	Intermediate	Resistant
Ertapenem	≥ 23	20-22	≤ 19	≤ 0.25	0.5	≥ 1
Imipenem	≥ 23	20-22	≤ 19	≤ 1	2	≥ 4
Meropenem	≥ 23	20-22	≤ 19	≤ 1	2	≥ 4
2010 CLSI 閾值						
Ertapenem	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 2	4	≥ 8
Imipenem	≥ 16	14-15	≤ 13	≤ 4	8	≥ 16
Meropenem	≥ 16	14-15	≤ 13	≤ 4	8	≥ 16



表二. 2010 CLSI 可能產生 carbapenemase 的篩選閾值

	紙錠擴散試驗(mm)	最低抑菌濃度($\mu\text{g/mL}$)
Ertapenem	16-21	2-4
Imipenem	NF	2-8
Meropenem	14-21	2-8

表三. 抑制試驗的判讀(Cohen Stuart and Leverstein-Van Hall 2010)

confirmation test	carbapenemase			AmpC with reduced permeability	ESBL with reduced permeability
	class A	class B	class D		
Modified Hodge test	+	+	+	\pm	\pm
Meropenem \pm boronic acid	+	-	-	\pm	-
Meropenem \pm Cloxacillin	-	-	-	\pm	-
Imipenem \pm EDTA	-	+	-	-	-
Meropenem \pm DPA	-	+	-	-	-



參考文獻

1. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. :Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute;2011.
2. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA. 2010. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. International journal of antimicrobial agents 36(3):205-210.
3. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. 65(3):490-495.
4. Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, Guerriero L et al. Controlling False-Positive Results Obtained with the Hodge and Masuda Assays for Detection of Class A Carbapenemase in Species of Enterobacteriaceae by Incorporating Boronic Acid. 48(4):1323-1332.
5. Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: the Versatile {beta}-Lactamases. 20(3):440-458.

專業

核酸定序技術之演進

張天耀

三軍總醫院臨床病理科病毒血清分生組

摘要

定序技術不論在基礎或臨床實驗室中，都是一項重要的工具。近幾年由於定序方式的不斷演進，漸漸改變傳統的實驗設計流程，也更快速更廣泛地獲得基因體上的資訊。Sanger 的定序方法是目前最常被使用，也就是第一世代的定序方法，現今已使用不同顏色螢光物質標定雙去氧核苷酸(Dideoxynucleotide; ddNTP)，在同一管反應中即可以完成定序反應，產物的分析也從傳統的電泳膠進步到毛細管電泳，並由一根毛細管，進步到 16 根、96 根、甚至 384 根毛細管同時進行分析。

第二世代的定序方法與傳統的毛細管分析法大為不同，第二世代的方式同時可分析數百萬個以上的序列，每一段序列的長度都不長，根據平台的不同約介於 35~250 bps (base pairs)之間，需倚靠強大的電腦運算進行組合。本文就目前發展較為成熟的第二世代定序儀進行介紹，包含 Roche (454) GS FLX sequencer、Illumina genome analyzer 與 Applied Biosystems SOLiD sequencer。

Roche (454) GS FLX 系統乃是利用焦磷酸定序法(pyrosequencing)的原理來讀取序列。欲定序的 DNA 模板先以超音波隨機打斷後，取固定長度的片段，並在兩端接上 adapter，在數十萬計的 agarose beads 上已附著許多與 adaptor 相對的

oligo 序列作為引子，在油滴中進行單條 DNA 模板的 Emulsion PCR，再將 agarose beads 鋪在平板上進行 pyrosequencing，一次只加入一種核苷酸，若與模板可以互補則會聚合在 DNA 上，產生焦磷酸，再經由能量轉換產生光線，就以光線的有無以及強弱來判定模板的序列，每個 bead 可讀出 250 bp 的序列，因此在 7 小時的反應時間內，約可產出 100,000,000 bp 的序列資料。Illumina genome analyzer 在平板上同時進行數千萬個 DNA 合成反應，並讀取序列，而每一段序列讀取長度約 32~40 bp，將 DNA 模板打碎取大小相近的片段，並在兩端接上不同的 adapter，在玻璃平板上先以共價鍵結的方式接上與 adapter 相對應的 oligo 當作引子，以進行 Bridge PCR 反應，每一條 DNA 會產生”一叢”(cluster)DNA，再利用一種可被切除螢光物質的核苷酸(reversible terminator)進行定序反應。Applied Biosystems SOLiD sequencer 是利用 DNA ligase 來進行雜交定序反應，同樣地進行 emulsion PCR，接著會加入一個 8 mer 的 oligonucleotides，這段 oligo 類似 random octomer，但是在第 4、第 5 個核苷酸是已知的，並且分成 4 組標上不同的螢光顏色，待雜交連接完成讀取螢光後，可將螢光片段去除，接續進行定序反應，再依序使用 n-1、n-2、n-3、n-4 的引子進行新的定序反應，即可將序列清楚解讀出來。

次世代定序技術可應用在突變偵測與序列比對、多源基因體研究、尋找調控的基因位置等方面，相信對未來疾病診斷或治療方面會有很大的幫助。過去的梦想都是今日的現實，至於今日的梦想，明日就讓我們拭目以待。



關鍵字：次世代定序技術、Roche (454) GS FLX sequencer、Illumina genome analyzer、Applied Biosystems SOLiD sequencer、pyrosequencing

通訊作者：張天耀

連絡電話：(02) 87923311 ext 88121

e-mail：dubius.tw@yahoo.com.tw

連絡地址：114台北市內湖區成功路二段325號 三軍總醫院臨床病理科

民國100年1月19日受理；民國100年10月30日受理刊

前言

核酸定序技術不論在基礎或臨床實驗室中，都是一項重要的工具。近幾年由於定序方式的不斷演進，漸漸改變傳統的實驗設計流程，也更快速廣泛地獲得基因體上的資訊。以下將從傳統的定序方式切入，探討新世代定序技術的發展與現況。

第一世代定序技術：Sanger sequencing

這是目前最常使用的定序方式，Sanger 的方法是運用 ddNTP 中止 DNA 複製的反應[1]，使 DNA 的合成停止在特定的核苷酸序列上。早期定序需要將定序反應分成 A、T、C、G 四管，並以放射線同位素標定，但是現今已使用不同螢光顏色物質標定 ddNTP，例如 Big Dye，在同一試管反應中即可完成定序反應，產物的分析也從傳統的電泳膠進步到毛細管電泳，並由一根毛細管，進步到 16 根、96 根、甚至 384 根毛細管同時進行分析。進入西元 1990 年代，定序方式進入高輸出(High throughput)時代。除反應後產物分析的進步之外，模板增幅方式也有很大的改進。先將 DNA 隨機打成短片段，再連接轉殖(clone)到質體上，並放入大腸桿菌(*E. coli*)中進行增殖，挑選出不同的 clone 進行循環定序(cycle sequencing)反應，得到各段序列後，運用電腦軟體將每一段序列拼湊起來，這樣的方式就叫做「shotgun *de novo* sequencing」。經過三十年的不斷進步，以 Sanger 法單段定序的長度已經可達約 1000 bp 左右，大量定序的成本約為每 1 kb 台幣 15 元左右。

第二世代定序技術：Next generation sequencing

次世代的定序方法與傳統的毛細管分析法大為不同。首先，相對於傳統方法同時可分析 96 根毛細管序列，新一代的方式同時可分析百萬個以上的序列。第二，每一段序列的長度都不長，根據平台的不同約介於 35~250 bp 之間，需倚靠強大的電腦運算進行組合。第三，相對於傳統選殖庫(clone library)的方式，特定的轉接引子(adapter)直接接在模板兩端，即可構成基因片段庫(fragment library)，所需要的檢體量大大減少。而各種次世代定序方法也有所不同，如下表所示，以下我們將針對不同的定序方法進行介紹[2]：

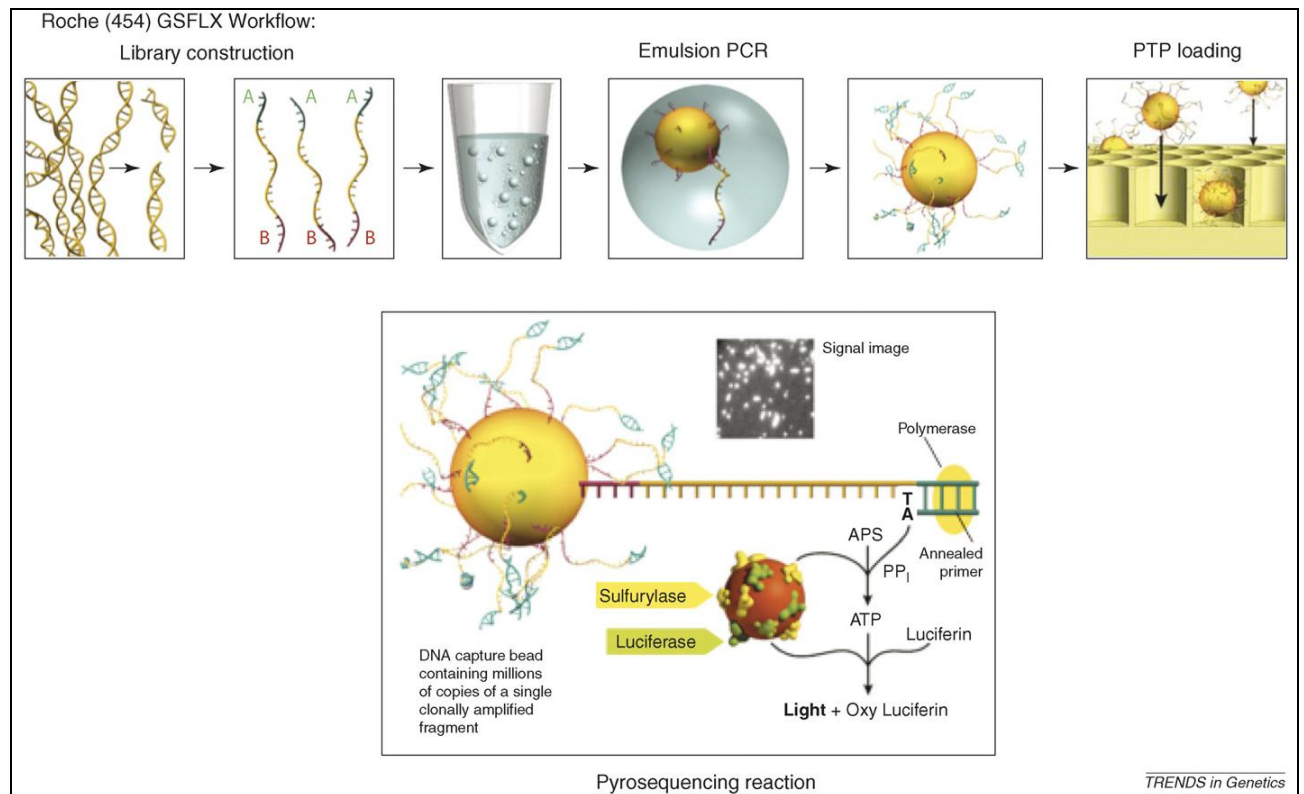
	Platform		
	Roche(454)	Illumina	SOLiD
Sequencing chemistry	Pyrosequencing	Polymerase-based sequencing-by-synthesis	Ligation-based sequencing
Amplification approach	Emulsion PCR	Bridge amplification	Emulsion PCR
Paired ends/separation	Yes/3 kb	yes/200 bp	Yes/3 kb
Mb/run	100 Mb	1300 Mb	3000 Mb
Time/run (paired ends)	7 h	4 days	5 days
Read length	250 bp	32-40 bp	35 bp
Cost per run (total direct ^a)	\$8439	\$8950	\$17,447
Cost per Mb	\$84.39	\$5.97	\$5.81

^aTotal direct costs include the reagents and consumables, the labor, instrument amortization cost and the disc storage space required for data storage/access.

(A) Roche (454) GS FLX sequencer

此機台開始出現於西元 2004 年，它是利用焦磷酸定序法(pyrosequencing)的原理來讀取序列，DNA 模板先用隨機打斷成固定長度的片段，並在兩端接上轉接引子(adapter)，以便進行 PCR 反應，此系統是利用一種名為「Emulsion PCR」技術，在單一油滴中進行單條 DNA 模板的 PCR 反應。首先，需要數十萬計的洋菜膠微球(agarose beads)，其上已附著許多與 adaptor 序列互補的引子，調整適量的 DNA 與 agarose beads 比例，在油中激烈混合之後，每一顆油滴中會包含一個

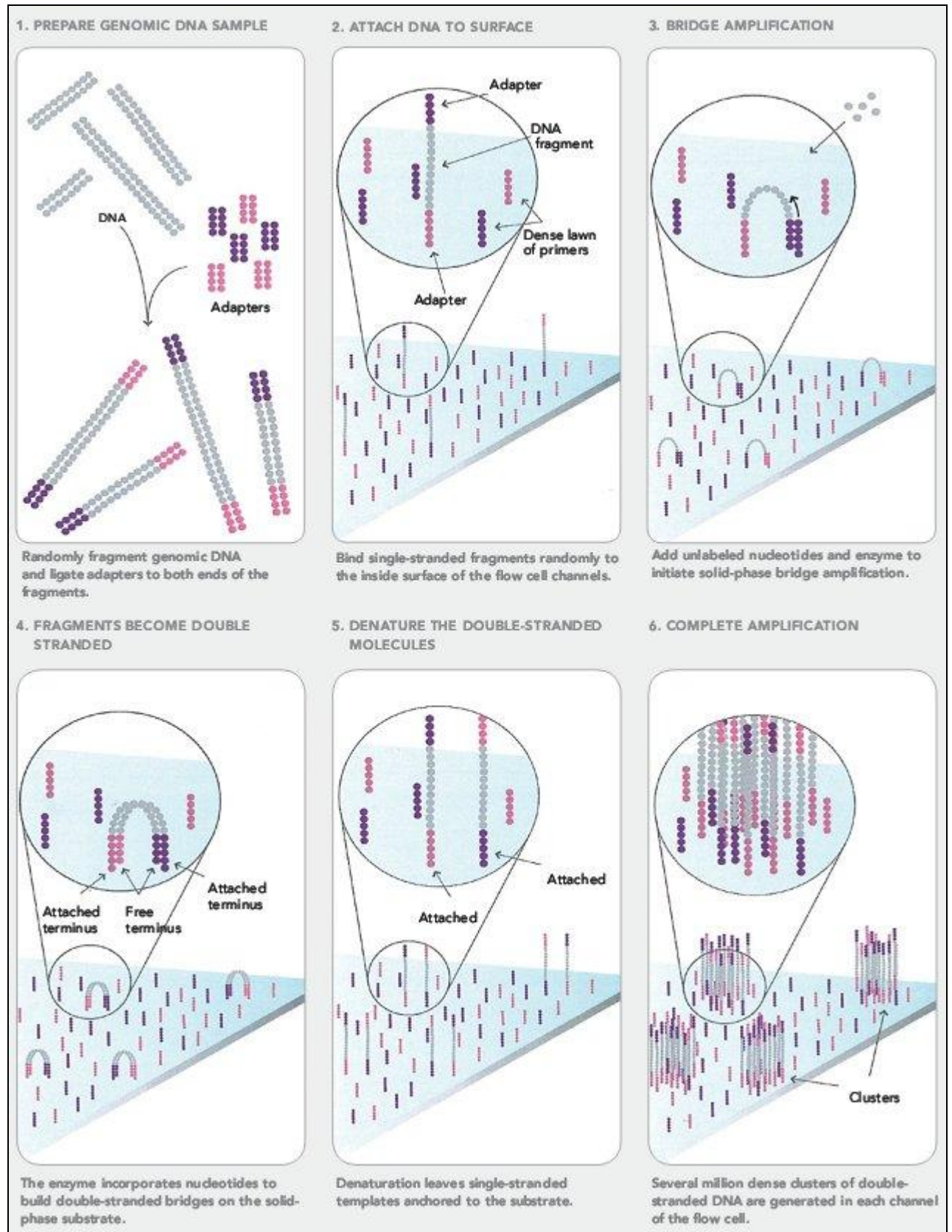
agarose bead 及一條 DNA 模板，當然還必須加入複製所需的酵素及去氧核苷酸 (dNTP)，經過 PCR 反應之後，每一顆 agarose bead 上都是單一且不同的 Clone，並在 bead 上有數百萬條複製產物，接著將這數十萬顆 agarose beads 放入微孔平台(picotiter plate)上，因為平台上每一個孔洞大小約為 44 μm ，只能容許放入一顆 agarose bead。另外將帶有 pyrosequencing 反應的各種酵素磁珠或乳膠珠(遠小於孔洞直徑)放入 well 之中，並在微孔平台上輪流加入 dATP、dTTP、dCTP、dGTP，當微孔平台的各個位置上因有 DNA 合成時，會出現 luciferase 的螢光時，則是相對應的核苷酸種類，將螢光依序照相紀錄起來，就可讀出各 agarose bead 上的序列。以目前羅氏的 454 定序儀 GS-FLX 而言，平均每一個 bead 可讀出 250 bp 的序列，因此在 7 小時的反應時間內，他可以產生出約 100,000,000 bp 的序列資料，相對於傳統的 ABI 3730 定序儀，平均每個檢體可產生 650 bp 序列，7 小時也只能產生約 440,000 bp 的序列資料。454 定序儀的缺點是在進行 emulsion PCR 的反應過程，並非所有 agarose beads 都能包含到一條 DNA 模板，許多 agarose beads 是沒有進行 PCR 反應的，導致並非在微孔平台上的每個孔洞都能產生螢光，相當於一個空包彈。另外如果 adapter 所接上的序列為單一核酸所構成的長鏈 DNA，例如 polyA，也有可能因超過螢光偵測的極限而造成錯誤。



(B) Illumina genome analyzer

此種方法於西元 2006 年建立，其原理是利用 DNA 合成的方式進行定序反應，在平板上同時進行數千萬個 DNA 合成反應，並讀取序列，而每一段序列讀取長度約 32~40 bp，與 454 定序法相同的地方是，同樣將 DNA 模板打碎成固定大小的片段，並在兩端接上不同的 adapter 以進行拱橋(Bridge) PCR 反應。所謂的 Bridge PCR 是指在玻璃平板上先以共價鍵結的方式接上與 adapter 互補的引子，因此有兩種引子會隨機分布在整個平板上，可分別作為 PCR 兩端的引子，將單股的 DNA 模板加到平板上之後，各 DNA 片段可能正接或反接上平板的引子，但不管哪種方向，DNA 都可以再利用周圍的另一種引子去進行 PCR 反應，經過 PCR 循環反應後，單一的 DNA 模板會在周圍形成「一叢」(cluster) DNA，

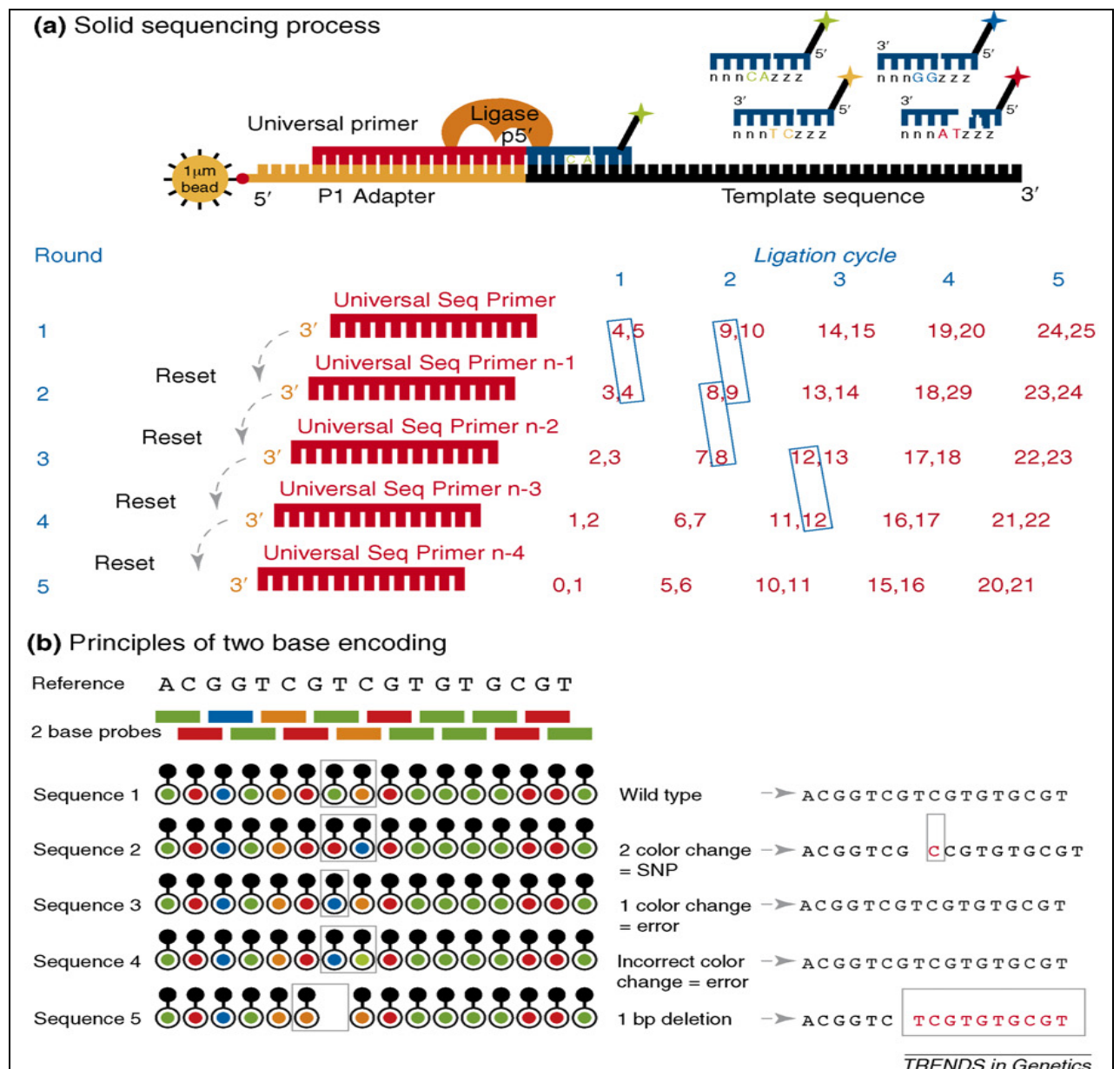
而這一叢內有數百萬條 DNA 且都是單一 Clone，當進行 PCR 反應時，因 DNA 會彎到平板上形成像拱橋一樣的形狀，因此稱為 Bridge PCR。每一叢 DNA 解離成單股後，可成為 DNA 複製的模板，在平板上加入定序的引子，聚合酵素及分別標定不同顏色螢光的 dNTP 後，開始進行 DNA 合成反應，因為 dNTP 上攜帶螢光物質的關係，聚合酵素每次只能接上一個 dNTP，複製的反應就終止了，故只能做單一核酸延長試驗(即所謂 single nucleotide extension)，而藉由不同顏色的螢光，我們可知平板上所有 clone 的第一個核酸序列為何，接著將標定上的螢光物質化學鍵切除(因它屬於 reversible terminator)，聚合酵素則可再合成下一個核酸，這時我們可由各 clone 的螢光顏色知道第二個核酸序列，依此類推，可將每個 clone 約 32~40bp 序列讀取出來，一般而言，這個定序的過程需要 4 天的時間，約可得到 4~5 千萬條這樣的序列，最後再以電腦軟體將序列組合起來(如下圖)。



(C) Applied Biosystems SOLiD sequencer

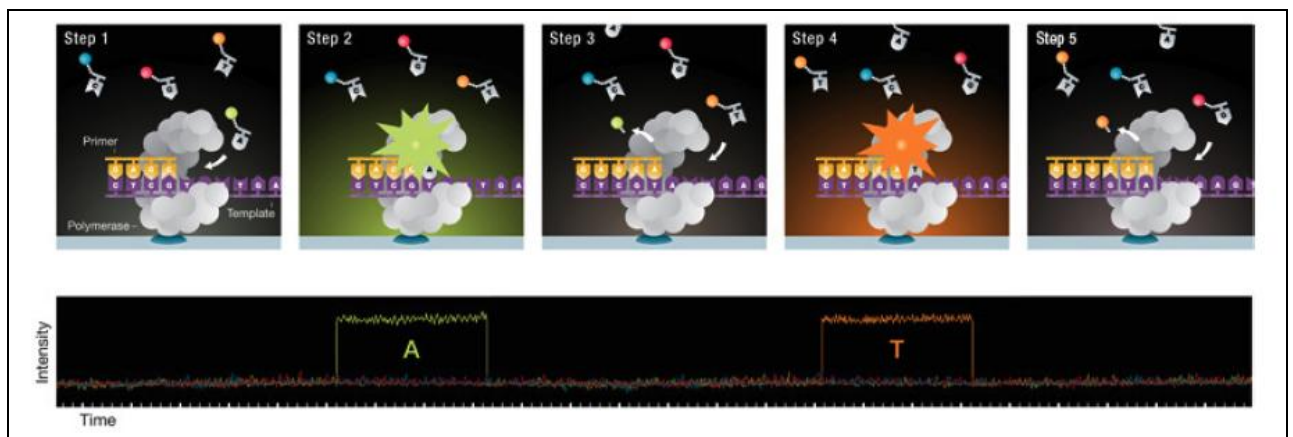
這種定序儀在市場上出現的時間為西元 2007 年 10 月，相對於其他機器是使用聚合酶(polymerase)來進行定序反應，它則是利用 DNA 連接酶(ligase)來進行。SOLiD 的名稱即是代表 Sequencing by Oligo Ligation and Detection，此種定序方法每次需要約 5 天的時間，可產生出 3~4 Gb 的序列。SOLiD 的模板產生是在 1 μ m 的磁珠上進行 emulsion PCR，並將磁珠鋪在特殊處理的玻璃載玻片上，定序反應從 universal 引子黏附到 adapter 上開始，接著會加入一個 8 mer 的 oligonucleotides，這段 oligo 類似 random octomer，但是在第 4 與第 5 個核苷酸是已知的，並且分成 4 組標上不同的螢光顏色(故共有 16 種的 oligo 序列，分別標上不同的 4 種螢光)，例如 nnnACnnn、nnnCAnnn、nnnGTnnn、nnnTGnnn 這四組 oligo 都會標上綠色螢光，因此在磁珠上的模板距離引子 3'尾端(假設此點當成 0)第 4、5 個序列，若是跟以上這幾個 oligo 互補時，oligo 則會被 ligase 與引子黏合起來，此時這個磁珠就會帶有綠色螢光。接下來以化學方法切除掉 oligo 3'端第 6、7、8 三個核苷酸，同時移除螢光，進行下一次的 ligation 反應，而這次我們就可以得知距離引子第 8、9 位置的序列的 4 種可能性，重複反應直到合成 25 個核苷酸停止，這樣就可知道第 4、5；9、10；14、15；19、20 及 24、25 這幾個位置的可能組合。接著洗掉新合成的核苷酸，並使用 n-1 的引子序列進行新的定序反應，所謂 n-1 是指比第一輪所使用的引子往前移動一格，如此在進行 ligation 時，我們就可以得知第 3、4 位置的組合，重複切除尾端 3 個核苷酸後進

行 ligation 的步驟，就可推出第 8、9；13、14；18、19 及 23、24 的序列組合，依此類推。最後再使用 n-2 的引子進行定序，並將之前所獲得的序列組合排列起來，就可以知道每一顆磁珠上 25bp 的正確序列。此種定序方式特殊之處在於藉由 2-base 的兩兩組合，可以讀出非常正確的序列，而不會因為單點螢光錯誤而造成判讀不正確，尤其是在分析 SNP 的時候，就顯得更為重要。

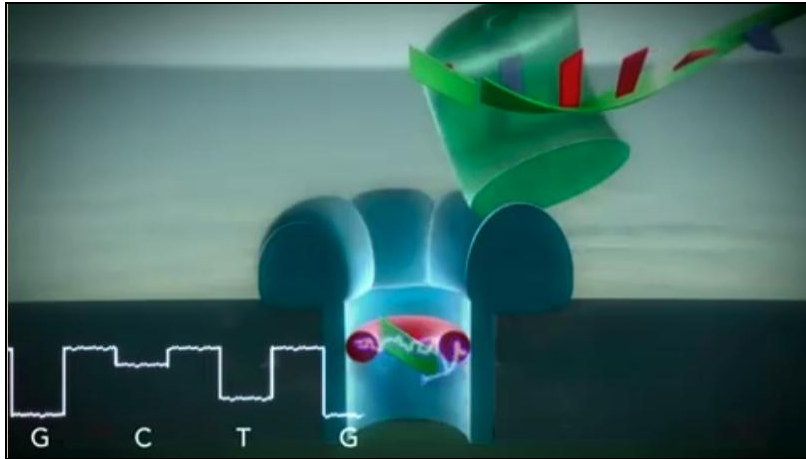


第三世代定序技術：單分子定序技術

第二世代所介紹的三種技術，在產生模板的過程都必須藉由 PCR 的放大來得到足夠的量。但在近期已經有科學家做到能夠以單一分子進行定序，例如 Helicos Bioscience 所發展出的 tSMS (true single molecular sequence) 技術，原理與 Illumina 平台類似，但是其偵測敏感度更高，不需要經過拱橋(bridge) PCR 放大的過程。另一種平台則是 Pacific Bioscience 所發展出來的 SMRT (single molecular real time) 定序技術，其原理是固定聚合酶醱素在平板上，藉由合成不同顏色螢光的核苷酸產生的訊號記錄序列，如下圖：



另外，還有一種所謂奈米孔(nanopore)的技術則是相反過來，在晶片上有許多孔洞並且有 DNA 外切酶(Exonuclease)連接在上面，當 DNA 被分解，依序切下的核苷酸會通過所謂的奈米孔，不同的核苷酸因結構不同，會造成孔洞內微電流不同程度的阻斷，藉此可定出單一條 DNA 序列，但以上這幾種方法還停留在實驗及測試階段，還無法量產機台，還需要再等幾年才能真正應用於定序實驗。



第二、三世代定序的應用

(A) 突變偵測與序列比對

傳統偵測突變的方法必須先經過 PCR 的放大染色體上某一個區域，再進行定序，這在次世代的定序儀也能作到，並且具有更高的敏感度去偵測較低比例的變異。另外研究人員也可以從一台儀器就可以觀察整個基因體上可能的突變情形，當然也包括單核苷酸多樣性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)的分析。而這些應用不止在人體身上，也可以針對其他如細菌、病毒等的微生物，尤其當許多微生物的序列都已經被發表出來後，臨床上所分離出的菌株就可以分析序列，並進行比對，例如抗藥性的變化、或其毒性因子，都可能運用比對來找出突變位置。

(B) 多源基因體研究

當人體受到某種病原感染，傳統的方式可能需要培養或純化後才能對病原進行鑑定，但是如果我們可以運用大量定序分析的方法，就可以知道究竟有那些

微生物在上面，基本上人體各部位都有許多共存的微生物，如皮膚、口腔等等，藉由次世代的定序方法，我們可將組成各個微環境的微生物都找出來，進而研究出這些微生物與人之間的互動關係。這樣的應用不侷限於人體，例如土壤或海洋中的菌種組成等，次世代序列分析的方法都可以告訴我們究竟「誰在那裡？」。

(C) 尋找調控的位置

目前研究蛋白質與染色體的關係通常會使用一種ChIP (chromatin immunoprecipitation)的方法，將有蛋白質結合上去的DNA片段沈澱下來，再去分析DNA序列。因為次世代的定序方法可以大量快速的完成，我們甚至能夠建立起一個資料庫，確認此蛋白質會辨認DNA上那些位置，進而瞭解蛋白質如何去調控整個細胞的基因表現。另外我們可以類似的方法去瞭解DNA包裹的過程，如藉由DNA與不同組蛋白(histone)的結合，瞭解DNA是如何纏繞，又在那些情況下會解開，這都是我們很想知道的答案，而快速且大量的定序對回答這樣的問題十分有幫助。基本上，如果能夠快速獲得序列資料，當然應用上一定不僅於以上所舉的例子，尤其是對於一些複雜的疾病，是由多重因子不只一個基因改變所造成的，整個基因體的定序一定可以讓我們更快找出問題發生的所在。

結論

最後要提到的是「1000 genomes」的計畫，他的目的是要將約1200位來自全世界各地的人進行基因體的定序，進而找出人類遺傳的差異性，並建立起這些常見變異的分類，包括SNP、重複次數的改變、染色體插入或缺失變異等等，其



中參與的國家有英國、中國、美國等，檢體的來源也是從不同種族所得來的。「1000 genomes」計畫已經公布一些初步的結果，這些結果都是提供給大眾使用的，相信對未來疾病診斷或治療方面會有很大的進展。過去的梦想都是今日的現實，至於今日的梦想，明日就讓我們拭目以待吧！

參考文獻

1. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12):5463-7.
2. Mardis ER. 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* 24(3):133-41.



台北市醫檢師公會「醫檢學術會刊」投稿須知

99/4/20 制定

醫檢學術會刊主要報導醫檢學術之刊物，包括：原著(original study)、綜說(review article)、臨床案例報告(case report)、醫檢新知、醫檢技術、及實驗室管理等，每月以網路刊登發行。醫檢學術會刊編輯委員對來稿有刪改權及刊載決定權，以下為本會刊之投稿須知：

學術相關稿件：

1. 醫檢學術會刊歡迎醫學檢驗相關報導或其他論述文章，以未曾刊登其他雜誌者為限，文稿以中文撰寫為原則。
2. 學術會刊撰寫格式
 - (1) 原著：題目、作者、服務單位、關鍵詞(2~3個)、摘要(500字內)、前言、材料與方法、結果、討論、參考文獻。
 - (2) 綜述：題目、作者、服務單位、關鍵詞(2~3個)、摘要(500字內)、前言、內容(段落主題)、結論、參考文獻。
 - (3) 案例報告：題目、作者、服務單位、關鍵詞(2~3個)、摘要(500字內)、前言、案例報告內容、討論、參考文獻。
 - (4) 其他如實驗室管理、檢驗醫學倫理等：比照綜述格式。

首頁：包括題目、作者、摘要(500字內)、關鍵詞(2~3個)、服務單位、連絡作者姓名、服務單位、連絡地址及電話、e-mail信箱網址。

本文 (第二頁)：依上述各屬性文章撰寫格式撰寫主文。

表格及圖片說明頁：依本文順序置於本文之後。



3. 版面設定：上：2.54cm、下：2.54cm、左：3.17cm、右：3.17cm。文章內容規定：中文字體以標楷體、英文以 Times New Roman；字型大小 12，標題字型大小 14，行間距為二空格(double spaced)。
4. 會刊內容以電腦打字黑白稿方式呈現，所附圖片及圖表必須清晰，圖、表備註說明以中文方式撰寫。
5. 醫檢學術會刊內容引用他人資料要註明出處；參考資料按引用(參考)先後順序列出。
6. 參考資料的書寫方式，依照 CBE (Council of Biological Editors)手冊原則。
期刊：請按(a)作者姓名。(b)發表年份。(c)篇名。(d)期刊名稱包括卷數、號數及起訖頁數，依序撰寫。書籍：請按(a)著者姓名。(b)出版年度。題目，起訖頁數，編者姓名，(c)書名，卷數或版數。(d)出版商(發行所)，出版地。依序撰寫，五位作者以上時請列出前四位作者，後加上 et al.(斜體字)。作者人數在四位以內者，則全部列出。參考文獻必須標示於句尾 [*]。

範例：

- (1) Benamer H, Steg PG, Benessiano J, Vicaut E, et al.1998. Comparison of the Prognostic value of C-reactive Protein and Troponin I in patients with unstable angina pectoris. Am J Cardiol. 82: 845-850.
 - (2) 何敏夫。2000。第七章醣類，250-258 頁，何敏夫著，臨床化學，第三版。合記圖書出版社，台北。
7. 一般稿件篇幅約為 3000 字內。



稿件範例

首頁

投稿題目

作者

服務單位

摘要

(300~500 字)

關鍵詞：2~3 個

通訊作者：

連絡電話：

e-mail:

連絡地址：

民國??年?月?日受理；民國??年 ? 月 ???日受理刊登



第二頁

原著：依序撰寫

引用文獻

前言



XXXXXXx [1]

材料與方法

結果

討論

參考文獻

綜述：依序撰寫

引用文獻

前言



XXXXXXx [1]



內容(段落主題)

主題一

主題二

主題三

以此類推

結論

參考文獻

案例報告：依序撰寫

前言

引用文獻

XXXXXX [1]

案例報告內容

討論



參考文獻

其他如實驗室管理、檢驗醫學倫理：依序撰寫

前言

引用文獻



XXXXXX [1]

內容(段落主題)

主題一

主題二

主題三

以此類推

結論

參考文獻