

新世代定序儀讓微生物無所遁形

尹開民

今年（2011 年）5 月德國流行一種出血性的大腸桿菌 O 104，這隻大腸桿菌 460 萬個鹼基對（base pairs, bps），3 天內就完成定序，並且依據定序結果進行比對分析（alignment），找出此菌特定的區域（specific domains），5 天內就發展出 Real time PCR 快速檢測試劑組，真是不容易，這要歸功於新世代定序儀（Next-generation sequencer）。

新世代定序儀

現今分子生物學技術突飛猛進，藉由材料科學與影像系統的協助，DNA 定序進入到另一個新的紀元。傳統定序以 Sanger 雙去氧核糖核苷酸（ddNTPs）合成終止法為主，此方法的限制是操作較為繁瑣，且無法於一定時間內處理大量樣品。新世代定序儀技術上完全跳脫傳統 Sanger 的定序法，具高通量輸出，定序功能更為強大，主要技術包含半導體晶片測序法（Ion Torrent）、焦磷酸測序（Pyrosequencing）及短片段核苷酸結合偵測（Short Oligo Ligation Detection）等 3 種，分述如下。

一、半導體晶片測序法

儀器名稱叫做 Ion Torrent，製造廠商為 Life Technologies（USA），它是利用含有 120 萬個小洞的半導體晶片進行測序，當 DNA 進行鏈延長時，每併入 1 個核苷酸，就會釋放出 1 個氫離子（ H^+ ），造成 pH 值改變（pH 值約下降 0.02），再由晶片測定 pH 值的變化，藉此非常快速的，每跑 1 個小時就可以讀出約 1,000 萬個 bps。



Ion Torrent 儀器外觀

二、焦磷酸測序 (Pyrosequencing)

儀器名稱叫做 454 Genome Sequencer，製造廠商為 ROCHE (USA)，原理是在 DNA 合成過程中，會產生焦磷酸基團(PPi)，接著硫酸化酶(ATP sulfurylase)進而將 PPi 轉換成 ATP，ATP 再促使螢光素酶 (Luciferase)放出冷光 (Bioluminescence)，而放出的冷光強度經冷光儀(Luminometer)偵測後，轉讀出 DNA 序列。該技術可同時進行多檢體序列分析，一次可完成 80 萬條 DNA 的定序。



三、短片段核苷酸結合偵測 (Short Oligo Ligation Detection)

儀器名稱叫做 SOLiD，製造廠商為 Applied Biosystems (USA)，SOLiD 定序儀是以奈米科技製作大規模的反應基板，偵測 DNA 序列時，是以微粒點影像訊號來取代傳統電泳膠片上的亮帶(Band) 訊號，因此能一次讀取更多的序列資訊，並設計了多重反應系統，只需一次反應，可同時分析 256 個檢體，亦即能將 256 個細菌基因體完整的定序，這將大大降低微生物基因體定序的成本及時間。



SOLID Sequencer 外觀

新世代定序儀的應用

新世代定序儀廣泛用於生物醫學研究及診斷，如德國流行大腸桿菌 O 104 緊急生物感染性樣品的鑑識；結核分枝桿菌等不易培養且生長緩慢之致病微生物的檢測；病毒檢測；腫瘤基因甲基化的研究及偵測單一核苷酸多型性等。目前應用於環境基質的檢測並不多，不過由於新世代定序儀，具有不需將微生物培養出菌落，就能進行微生物菌群 (Metagenomics) 分析之優點，且具高通量輸出，定序功能非常強大的特點，有許多專家學者已開始利用新世代定序儀進行 Metagenomics 的應用，如人類腸道菌的研究，將腸道中所有細菌的基因體完整

解出，希望能找出腸道菌和胃癌及胃潰瘍之間的關係；還有深海海底微生物的菌群分析等，相同概念其實也可以應用在空氣、地下水、地面水、飲用水、微生物製劑、生物膜及污染場址等微生物菌群的分析，微生物不管是可培養的或是不可培養的，皆能輕易的被鑑識，無所遁形，將有利於本署各業務處進行各種微生物的管制，及各污染場址的復育等，相信新世代定序儀將為環境保護開啓另一個嶄新的功能。