

焦磷酸測序(Pyrosequencing)技術的原理及應用

賴信志

長庚大學 醫學生物技術暨檢驗學系

以 Sanger 方法為主之 DNA 序列分析技術已廣泛應用於生物醫學研究領域。操作較為繁複及無法於一定時間內處理大量檢體，是此法的主要限制。近年來發展的 pyrosequencing 技術，具有在一定時間內可同時從事多個檢體及短 DNA 序列分析之特點，其各項應用正積極推廣中。

核酸 DNA 序列分析技術是現代生命科學的核心技術之一，廣泛使用於多項生醫研究及應用診斷之領域。目前使用最普遍的 DNA 序列分析技術是以雙去氧核糖酸鏈終止法(dideoxynucleotide termination method)為基礎之 Sanger 方法。在 Sanger 方法的全自動 DNA 序列分析步驟中，DNA 合成反應會產生一系列由短至長的螢光標記 DNA 片段，這些 DNA 片段經平板膠電泳(agarose gel electrophoresis)或毛細管電泳(capillary electrophoresis)程序被分離，接著螢光分子因雷射光的激發而放出螢光，此螢光信號被檢測系統(detector)檢測、記錄而轉讀出 DNA 序列。Sanger 方法的特點為讀序能力較強，每次反應約可得到 1,000 個核糖酸序列，因此可提供較多的 DNA 訊息；但相對的，其缺點為操作較複雜，以及不易於一定時間內分析大量檢體。雖然在很多情況中，我們對 DNA 序列分析的要求是讀序越長越好，但在相當多的分子診斷工作中，往往需在短時間內偵測很多 DNA 檢體，而且只需短短的幾十個核糖酸序列的資訊，就可以提供正確診斷。例如：在臨床分子診斷領域中，對細菌和其他病原微生物的分子診斷，或在偵測單一核糖酸多型性(single nucleotide polymorphism; SNP)時，只需對最具代表性的十幾到幾十個核糖酸片段進行序列分析即可。在這種情況下，Sanger 方法未必是最合適的 DNA 序列分析技術。新發展的焦磷酸測序(pyrosequencing)技術，應該是目前最適合這些應用目的的 DNA 序列分析技術。

Pyrosequencing 技術是新世代的 DNA 序列分析技術(next generation sequencing technology)，是針對短到中等長度的 DNA 序列樣品進行高通量、高精確度(99%精確)和再現性佳的分析技術。其 DNA 序列分析反應之原理不同於傳統 Sanger 方法，係利用幾種生化反應之組合來測定在 DNA 合成時，過程中會產生的焦磷酸基團(PPi)之特徵，進而將 PPi 轉換成 ATP，ATP 再促使螢光素(luciferase)放出冷光(bioluminescence)。此放出的冷光強度經冷光儀(luminometer)偵測後，轉讀出 DNA 序列。該技術特點包括：對 DNA 的序列分析無須進行電泳、DNA 片段無須螢光標記(因此無須螢光分子的激發和檢測裝置)、及在 96 孔盤上進行反應，因此可同時進行多檢體序列分析。但也因反應特性的限制，精準讀序目前只在 20-30 個核糖酸序列左右。有的研究者經過改良，可使該技術的讀序長度增加一倍以上。

Pyrosequencing 的操作基本步驟如下(圖一，A)：

(一)利用 PCR 複製待測序的 DNA。反應中 PCR primer pair 之一為生物素(biotin)所標記。

(二)經 biotin 標定之 PCR 產物與 streptavidin 偶連之 sepharose 微珠(streptavidin-conjugated sepharose beads)進行反應後被純化。

(三)DNA 雙股經加熱變性而分開，成為 pyrosequencing 反應的待測單股 DNA 模板，之後和測序 primer 結合成雜交體。

(四)進行 pyrosequencing 序列分析反應：與 DNA 聚合酶(DNA polymerase)、硫酸化酶(ATP sulfurylase)、螢光素(luciferase)、雙磷酸酶(apyrase)和受質 adenosine 5'-phosphosulfate (APS)、螢光素(luciferin)進行反應。

(五)四種 dNTP (dATPS、dTTP、dCTP、dGTP)依序被加入反應體系中。在每一輪測序反應中，只加入其中一種。如被加入的 dNTP 與 DNA 模板配對，DNA 聚合酶就可以催化該 dNTP 與 primer 的 3'端形成共價鍵，dNTP 的焦磷酸基團(PPi)就被釋放出來。加入的 dNTP 和釋放出來的 PPi 的莫耳(mole)數目是相等的。接著，ATP sulfurylase 催化 APS 和 PPi 形成 ATP，此 ATP 和 PPi 的 mole 數目也是一致的。利用 ATP 作為能源，luciferase 可將螢光素氧化為氧化螢光素(oxyluciferin)，進而發出與 ATP 量成正比的可見光信號。光信號由 CCD 攝像機檢測，並由 pyrogram™ 轉為波形訊號(圖一，B)。每個波峰的高度(光信號)與反應中加入的核糖核酸數目成正比，例如：若加入 dGTP 的該次反應中，產生兩倍高的波峰，表示此處的 DNA 模板上的序列是兩個與 G 配對的 C。之後，ATP 由 apyrase 降解，消除光信號，並再生反應體系，然後就可以加入下一種 dNTP。如被加入的 dNTP 與 DNA 模板不能配對，以上反應便不發生，dNTP 由 apyrase 直接降解，然後進入下一個反應迴圈。隨著以上過程的迴圈進行，與 DNA 模板互補的 DNA 鏈合成，產生 pyrogram 的波形訊號，並轉為 DNA 序列。

瑞典 Pyrosequencing AB 公司基於 pyrosequencing 技術而研究開發的 PSQ 96 系統是一個理想的遺傳分析技術平臺，它既可進行 DNA 序列分析，又可進行 SNP 檢測及等位元基因頻率測定。實際執行 pyrosequencing 時，可經由生物資訊分析(bioinformatics analysis)，設計三條 primers，其中兩條是成對的(兩條中的一條用 biotin 標記)，用來擴增一特定的標的 DNA 序列，第三條 primer 則作為 pyrosequencing 用。採用偶連 streptavidin 的微珠(Streptavidin Sepharose™ HP, Amersham Biosciences AB, Sweden)和 PSQ™ 96 Sample Preparation Kit(Pyrosequencing AB)及其相關方法將 PCR 雙股分離，轉移至 PSQ 96 SQA Plate 的含 biotin primer 的單鏈 PCR 產物和測序 primer annealing。利用測序試劑盒 SQA Reagent Kits (Pyrosequencing AB)和 PSQ 96 DNA 分析系統進行序列分析，結果用 SQA 軟體進行分析。商品化的 Pyrosequencing kit 之設計特性：(1)受質濃度已最佳化；(2)高品質的 apyrase 保證了所有的 dNTP 被降解，包括 ATP 和 dATP α S；(3)dNTP 降解速率慢於摻入速率，有利於 dNTP 充分摻入；(4)ATP 合成速率快於 ATP 水解速率，使得 ATP 濃度和光產生正比於摻入的 dNTP 數目。

Pyrosequencing 技術測序長度很短，只能偵測 20-30 個核糖核酸序列。但是和任何測序技術一樣，最大讀序長度取決於 DNA 模板的二級結構、核糖核酸組成、PCR 產物品質等相關因數。為了增加信雜比(signal/noise ratio)，因為 DNA polymerase 對 dATPS 的催化效率比對 dATP 的催化效率高，且 dATP α S 不是螢光素酶的受質，因此反應時加入 deoxyadenosine alpha-thio triphosphate (dATP α S)作為 dATP 的替代物。但 dATP α S 是兩種異構體 SpdATP α S 和 RpdATP α S 的混合物，聚合酶只能利用 SpdATP α S。因此，為了得到最佳反應效率，必需使反應體系中保持最佳濃度的 SpdATP α S，但同時增加了相應濃度的無用的 RpdATP α S。dATP α S 被雙磷酸酶降解後的產物是雙磷酸酶的抑制劑，所以隨著反應進行，被雙磷酸酶降解的 dATP α S 的降解產物濃度越來越大，雙磷酸酶的活性越來越低。這可能是 pyrosequencing 技術測序長度很短，只能偵測 20-30 個核糖核酸序列的主要原因之一。新的革新就在於在反應體系中只加入 SpdATP α S，這樣一來可以大大降低 dATP α S 降解

產物的濃度，維持雙磷酸²較長時間的活性。目前這個革新可以使 pyrosequencing 技術的測序長度增加最少一倍，達到 50 至 100 個以上的核²酸序列。

Pyrosequencing 技術在 mycobacteria 鑑定之應用

Mycobacteria 鑑定乃經由傳統之培養及生理、生化反應鑑定等。目前的方法並非最佳化，諸如引起肺結核的結核分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*)，其生長緩慢，經常要培養幾週才能得到足夠的菌體，供進行生理及生化反應鑑定。其檢測和鑑定費時，且敏感度與專

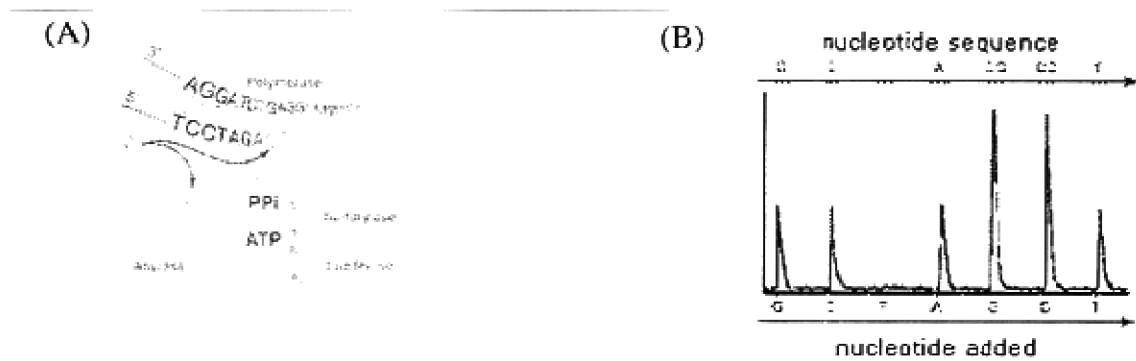
一度均不高，使得診斷與治療均受到影響。隨著分子生物學的發展，對於細菌的鑑定及分型便能提供比傳統方法更為準確的診斷方式。雖然目前對 mycobacteria DNA 的分析方法也有很多種，例如：定量 PCR、雜交(包括基因晶片)、和以 Sanger 法為基礎的 DNA 序列分析等。其中只有 DNA 序列分析是黃金標準，如對 16S rRNA 和其它基因(如：hsp65、ESAT-6、CFP-10 等)的序列分析，便可以用來診斷很多不同種，或同種但不同亞種/株系之 mycobacteria。因此，利用 PCR 和 pyrosequencing 技術的序列分析，將可提供一個快速、簡單、可靠的細菌鑑定方法。此方法速度快，幾個小時即可得到結果，而且結果非常精確。

Pyrosequencing 技術在 SNP 研究中的應用

除了 DNA 序列分析外，pyrosequencing 還可以進行已知 SNP 的分析和 SNP 頻率確定。SNP 研究大致分為兩個部分，一是 SNP 資料庫的建立，二是 SNP 之意義及功能之研究。在大規模基因組測序能力的研究單位中，依賴 Sanger 法測序，一種生物的所有 SNP 的資料庫便可建立起來。但還需加上每個 SNP 的功能研究，才有意義。對已發現的 SNP 的功能的研究包含 SNP 頻率分析，及 SNP 位點的核²酸種類的證實等。對於前者，pyrosequencing 是這樣進行的：假設研究者手中有若干份來自不同個體的基因組 DNA 樣品，要檢測這些不同樣品的同一 SNP 的頻率，那麼研究者可以混合這些樣本的基因組 DNA，然後做一次 PCR，進行一次測序，研究者就可以得到該 SNP 在這些樣本中的頻率。如果研究者已經有了各個樣本的 PCR 產物，也可以將 PCR 產物混合後進行一次 pyrosequencing，就可以知道該 SNP 頻率。如果是 SNP 位點的核²酸種類的證實，需要首先得到特定 SNP 所在的 DNA 片段，即 PCR 產物，然後在 SNP 位點的上游和/或下游設計測序引子，這樣便可透過對十幾個核²酸序列的測定，確定 SNP 位點的核²酸種類，以及 SNP 位點上下游十幾個核²酸的序列。

Pyrosequencing 在腫瘤基因甲基化研究的應用

甲基化研究對於基因的調控和腫瘤的發生有非常密切的關係。在一般正常的細胞中，基因調控區 CpG island 處於非甲基化的狀態。而當細胞發生癌變後，這些 CG 區域往往呈現甲基化狀態。腫瘤的發生，以及一些遺傳病的出現，和基因甲基化有非常密切的關係。Pyrosequencing 技術能夠快速地檢測甲基化的頻率，對樣品中的甲基化位點進行定性及定量檢測，藉以了解那些 DNA 序列位點發生甲基化，每個位點的甲基化程度是多少，以及這些位點的甲基化和疾病的相關性等。



圖一 Pyrosequencing 反應圖示 (A) 與 pyrogram 轉換所得之波形訊號 (B)

參考文獻

1. Ahmadian A, Ehn M, Hober S: Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta* 2006;363:83-94.
2. Borman AM, Linton CJ, Miles SJ, et al: Molecular identification of pathogenic fungi. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:7-12.
3. Bushman FD, Hoffmann C, Ronen K, et al: Massively parallel pyrosequencing in HIV research. *AIDS* 2008;22:1411-5.
4. Clarke SC: Pyrosequencing: nucleotide sequencing technology with bacterial genotyping applications. *Expert Rev Mol Diagn* 2005;5:947-53.
5. Diggle MA, Clarke SC: Molecular methods for the detection and characterization of *Neisseria meningitidis*. *Expert Rev Mol Diagn* 2006;6:79-87.
6. Diggle MA, Clarke SC: Pyrosequencing: sequence typing at the speed of light. *Mol Biotechnol* 2004;28:129-37.
7. Langae T, Ronaghi M: Genetic variation analyses by pyrosequencing. *Mutat Res* 2005;573:96-102.
8. Franca LT, Carrilho E, Kist TB: A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys* 2002;35:169-200.
9. Liu J: Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20:214-21.
10. Marsh S: Pyrosequencing applications. *Methods Mol Biol* 2007;373:15-24.
11. Ronaghi M, Elahi E: Pyrosequencing for microbial typing. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;782:67-72.
12. Owen-Hughes T, Engholm M: Pyrosequencing positions nucleosomes precisely. *Genome Biol* 2007;8:217.

13. Ronaghi M: Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 2001;11:3-11.
14. Ronaghi M, Elahi E: Discovery of single nucleotide polymorphisms and mutations by pyrosequencing. *Comp Funct Genomics* 2002;3:51-6.
15. Ronaghi M, Shokralla S, Gharizadeh B: Pyrosequencing for discovery and analysis of DNA sequence variations. *Pharmacogenomics* 2007;8:1437-41.
16. Shames DS, Minna JD, Gazdar AF: Methods for detecting DNA methylation in tumors: from bench to bedside. *Cancer Lett* 2007;251:187-98.
17. Skarke C, Kirchhof A, Geisslinger G, et al: Rapid genotyping for relevant CYP1A2 alleles by pyrosequencing. *Eur J Clin Pharmacol* 2005;61:887-92.
18. Tenover FC: Rapid detection and identification of bacterial pathogens using novel molecular technologies: infection control and beyond. *Clin Infect Dis* 2007;44:418-23.
19. Wang L, Luhm R, Lei M: SNP and mutation analysis. *Adv Exp Med Biol* 2007;593:105-16