

短片段核糖酸結合偵測(Short Oligo Ligation Detection; SOLiD)技術的原理與應用

王簾讀¹ 蘇玲慧²

1 美商應用生命系統股份有限公司北亞太地區新世代定序事業發展部 2 長庚醫院林口醫學中心 臨床病理科

分子生物學技術突飛猛進的進展下，藉由材料科學與影像系統的協助，DNA 定序技術進入到另一個紀元。與傳統技術截然不同的方法，讓定序的速度提升數百至數千倍；這意味著資料獲得的速度加快，數量大大提升，對於研究工作乃至醫學應用上均有莫大的協助，生物資訊學與醫學資訊學勢必面臨大量資料分析與判讀的挑戰。如何應用新世代定序技術在醫學研究乃至於在臨床上的應用，將是一個熱門探討的議題。

跳脫傳統 Sanger 定序法所發展出來的新世代定序技術(next generation sequencing technology)，將以無與倫比的速度改寫 DNA 定序在生物醫學研究上的應用範圍。

自 1977 年 Fred Sanger 與 Alan R. Coulson 發表了兩篇關於 DNA 定序的論文之後，將傳統生物學研究一舉帶入分子生物學的領域。自此之後整整 30 年的時間，DNA 定序的技術雖然持續的演進，但是基本上還是遵照原始的 Sanger 定序原理來進行。也就是利用一段單股 DNA 做為模板，加上 DNA 複製標定的技術，將 DNA 複製成間隔一個鹼基的不同 DNA 片段，再藉由電泳的方式進行分離與偵測。在 1990 年之前，這樣的實驗過程中，研究人員是利用傳統的放射性同位素標定，加上大型電泳膠片進行定序，再以人工判讀的方式解出 DNA 的序列。進行一次實驗至少需耗時三天，但至多僅能解出數百個核糖酸序列。1990 年之後，藉由人類基因體計畫的推波助瀾，新一代的全自動 DNA 定序儀仍採用同樣的 Sanger 原理進行定序，但改採螢光標定，並加上全自動毛細管電泳與自動判讀設備，讓 DNA 定序進入全自動化的時代。自此之後，擁有數百台全自動 DNA 定序儀的大型基因體中心紛紛設立，繼人類之後，老鼠、水稻、貓、狗、豬、牛、馬等等，我們所熟知的各種生物的基因體也陸續的被解碼。然而，這樣的成功並無法完全滿足研究人員追求大量、更經濟的 DNA 定序需求。因此，新一代的定序技術開始被發展出來。

目前新世代的定序技術由三種完全不同的定序方法作為代表，包括 Pyrosequencing (Roche)、DNA synthesis (Illumina)、與 Short Oligo Ligation Detection (SOLiD; Applied Biosystems)等三種不同技術平台。這些新技術平台的建立，要歸功於材料科學中奈米技術的應用，現就以 Applied Biosystems 於 2007 年上市的 SOLiD 平台來說明。SOLiD 定序儀是以 ligation 為技術核心，再加上以奈米科技製作的大規模反應基板，將 DNA 或 cDNA 以物理性斷裂法均勻打斷，再依據不同應用，將小至 70-90 個核糖酸序列，或大至 1 萬個核糖酸序列的片段回收，並在兩端接上不同 adaptor，再與奈米微粒進行 DNA 複製與放大反應。最後將奈米微粒平鋪於特殊玻片上，置於定序儀中進行定序。SOLiD 新世代定序儀的特色在於偵測 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。此技術平台亦應用了獨特的雙鹼基配對黏合(two base encoding)技術，而大大提升了定序的正確度。目前 SOLiD 系統每次反應可輸出超過 200 億個核糖酸序列的資料，相當於將近 7 倍人類基因體全部序列(30 億個核苷酸序列)的資料量。因為並非所有的研究都需要一次反應就定出如此龐大的序列，為了更有效與經濟的運用資源，SOLiD 設計了多重反應系

統(multiplex)，一次反應可以同時分析 256 個檢體。亦即，可以同時進行 256 個微生物基因體定序反應，而每個反應可得到約 8 千萬個核?酸序列，相當於一般微生物基因體的 15-20 倍的覆蓋率，這將大大降低微生物基因體定序的成本，並縮短所需時間。

新世代的定序方法一推出，一次定序就可以得到超出 100 台 Applied Biosystems 3730XL 毛細管定序儀的序列，但卻僅需數百分之一的成本，讓研究人員眼睛為之一亮；但它相較於傳統 Sanger 方法，有讀序較短，準確率略低的缺點，的確讓某些研究人員無法決定是應該馬上接受，或是繼續沿用傳統方法，因而對新技術保持觀望的態度。不過，陸續發表的關於新世代定序儀的應用，漸漸的讓大家發現，新的研究領域及技術的革命，正逐漸展開。

首先是微生物基因體學研究的革命。如前面所介紹的，利用新世代 SOLiD 定序儀，只需一個反應，就可以將 256 個細菌基因體完整的定序。藉此，一個新的 metagenomics 的概念被引進來。早在 2006 年，就已經有利用此一新世代定序技術，針對不同的深海海底微生物的組成進行分析的論文。最近也有研究者將相同的概念應用於人類的腸道菌，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聯。類似的 metagenomic 研究，也將改寫我們目前對微生物基因體學研究的所有概念。除此之外，對於眾多微生物基因體的研究，將會因定序成本的降低，而展開大規模以定序為技術平台的鑑定工作。透過高密度的定序，可以使鑑別的工作更精準；這對於新物種鑑定，或萬一有疫情發生時針對微生物種類的鑑別，將有非常大的助益。

接下來是細胞中基因表現研究的革命。雖然微晶片陣列(microarray)已經對於研究基因表現造成一波革命，但將新世代定序技術應用於研究基因表現，還是有較傳統雜交(hybridization)技術有利的地方。例如，它不需對於被轉錄的序列有任何的了解就可以進行。也就是說，若是表現的基因的轉錄序列沒有被列在微晶片陣列上，它可能會被忽略掉；但利用定序的方法，任何序列只要有表現，就有機會被定序出來，當然這也包含了目前最熱門的 miRNA 序列。若是要針對部分尚未有基因表現標的的物種，進行完整的全基因體定序時，使用新世代的定序技術，只需參考使用近似的基因體序列，就已經可以對未知的基因體序列進行註解及分析了。

同樣的，關於基因調控的研究方法，也開始受到重視。相似於基因表現定序的分析方法，也已經被應用於染色質免疫沉澱技術(chromatin immunoprecipitation)及基因啓動子甲基化分析(methylation analysis)。利用新世代的定序方法，可以快速的定出轉錄因子(transcription factor)在全基因體中可能的結合位置，以及在全基因體中啓動子被不同甲基化程度的分析。由於不會受限於傳統方法必須先知道序列組成的限制，可以預期這方面的應用將會大量的運用於傳統細胞生物學研究之中；若累積的數據越來越多，參考的臨床資料與基因訊息連結性就越有意義，屆時透過基因定序所得的資料來判斷疾病，器官移植時 HLA 型別的高度鑑別，以及在預防醫學方面的應用，就指日可待了。

最後，是醫學研究的革命。在癌症遺傳學的研究中，某些特定的 cancer allele 可以藉由對組織的深入定序而能被偵測出來。尤其是這類偵測中，microdissect 讓所得的癌細胞相對變少，反而使得新世代定序法較傳統 Sanger 定序法來的具有優勢。除了在癌症研究的應用之外，在預防醫學的研究中也越來越受重視。全基因體重新定序，可以將所有的單一核?酸多型性(single nucleotide polymorphism; SNP)以及染色體的拷貝數變異

(copy number variations)完全偵測出來。目前進行中千人基因體計畫(The 1,000 Genomes Project)，就打算在至少一千個人中定序一千個可能與疾病有關的基因，希望能應用於找出疾病關聯性及藥物反應的研究之中；若累積的數據愈來愈多，參考的臨床資料與基因訊息連結性就越來越有意義，屆時透過基因定序所得的資料來判斷疾病，器官移植時 HLA 型別的高度鑑別，以及在預防醫學方面的應用，就指日可待了。

新世代定序技術的發展不過短短兩年的時間，已經累積了超過百篇的生物醫學文獻，也開始應用在各個不同的領域，快速產生巨量的 DNA 序列，勢將成為生物資訊分析的一大挑戰。但以目前相關領域的發展情形來看，不僅定序技術進入了一個新的紀元，生物資訊學勢必需要同時加快腳步共同躍進。在可見的未來，個人藥物基因體學(Pharmacogenomics)的到來是可預期的。預防醫學與疾病檢測的方式，將隨著新世代定序技術的進展，而有所改變。我們期望這些新的進步，可以為人類社會與大自然提供更好的協助與維護，為生命科學的研究開啓另一個嶄新的一頁！

參考文獻

- 1.Schuster SC: Next-generation sequencing transforms today's biology. Nat Methods 2008;5:16-8.
- 2.<http://www.1000genomes.org>
- 3.<http://solid.appliedbiosystems.com>