



次世代定序 (Next Generation Sequencing) 升級運用讓病原無所遁形

邱燕欣¹ · 蘇士閔¹ · 張勝智¹ · 文紀鑾¹ · 林詩舜²

自 1953 年 James Watson 和 Francis Crick 發現去氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid, DNA) 的構造，近代生物學研究開啟了分子生物學的領域，生物學研究從傳統遺傳學，宏觀的物種雜交或自交後生物體的遺傳性狀、表現特徵的統計分析，轉為遺傳訊息傳遞、表達，甚至編輯的分子生物技術開發。而 1977 年 Frederick Sanger 發展雙脫氧鏈終止法 (dideoxy chain-termination method) 又稱桑格法定序技術，奠定了探索遺傳密碼利器開發的始端。

而生物化學材料的研究，如奈米技術 (Nanotechnology) 與高通量螢光影像分析 (High-throughput fluorescence imaging Analysis) 加速了定序技術的演進，2000 年開始陸續有生技公司投入次世代定序技術 (Next Generation Sequencing, NGS) 之研究。NGS 之間的差異迥異，包括 1. 輸出、定序時間；2. 可定序之最大長度；3. 定序

註 1：行政院農業委員會種苗改良繁殖場。

註 2：國立臺灣大學生物科技研究所。

模組；4. 定序後續分析平臺的選擇。NGS 的儀器開發、樣品製備與上機分析，皆有突破性發展，除解序技術更精確外，成本也大幅下降，根據美國國家衛生研究院（National Institutes of Health, NIH）統計，全基金體定序花費自 2008 至今 10 年的時間，費用從 100 萬美金下降至 1 千元美金。

在 2018 年 2 大 NGS 龍頭 Illumina 及 Thermo Fisher 更攜手合作，開發小型解序機型，擴大在科學研究上的應用，依據近 3 年在美國國家生物技術資訊中心（National Center for Biotechnology Information, NCBI）登載搜尋，近 3 年 NGS 文獻發表皆有 6~7 千多篇研究文獻持續發表，其中發表主題逐漸從基礎技術開發，轉向為個人醫療及精準醫學檢定技術的升級運用。運用 NGS 於農業領域的研發雖不似人類醫學研究吸睛，但因 NGS 技術穩定開發，檢定分析成本大幅下降，在病原檢定技術有跳躍式進展。

二、應用 NGS 技術於植物科學研究

基因體的定序技術的開發，加速了各項生物科學的發展。在植物科學領域亦然，研究主題可以藉由 NGS 的導入，增加領域的深度與廣度，不同定序平臺的結合更能夠為研究帶來更多的想法與驗證。應用 NGS 技術於植物科學研究之領域可區分為 6 大部分：

（一）演化與生態分析（Phylogenetic and ecological studies）

在 NGS 技術未廣泛利用以前，非模式植物之基因庫資料相對模式植物來說薄弱。在野外進行生態或演化調查而言，物種的廣泛度與歧異性更是大，鮮少針對生態群進行相關分析。NGS 的發展可以利用物種間的定序資訊比對演化親源性，利用環境進行複合材料的取樣，進行族群定序（metagenomics），瞭解區塊生態間的生物分類。例如土壤材料間的生物族群分析、種子族群的潔淨度；在 2012 年澳洲團隊 Bunce 等人利用 NGS 定序技術進行中藥成分中 DNA 來源分析，抽取材料內的 DNA 後，利用 DNA barcode 引子對增幅特定區域，如植物體 tRNA 的 trnL 區域以及脊椎動物體的粒線體 16S rRNA 等，再進行 NGS 定序後與資料庫比對，瞭解中藥成分是否標示不明、添加不法成分，甚至是瀕臨絕種之保育生物材料。

（二）基因庫建立（Applications for large gene bank collection）

保留生物材料之際，同步進行多種植物基因體組的定序，保留分子資訊材料的多樣性。如果在該屬作物發現可利用之特殊基因，可藉由生物資訊的快速搜尋分類，之後接續挑選利用。

(三) 作物育種與分子標記輔助 (Breeding molecular marker development)

利用育種特殊分子標記，在基因體組定序拼裝後，在生物資訊電腦運算中，加入搜尋序列特徵，分析 SNP 之位點，作後續分析之應用。或利用植物分子標記之分析，加入資訊演算之特徵法，找出可利用於作物品種鑑定之簡單序列重複 (Simple Sequence Repeat, SSR)。

(四) 雜交技術與基因滲透 (Hybridization and introgression)

可利用長度較長、覆蓋率較高的轉錄體組定序，獲得物種的轉錄體組後，可以計算物種基因在同義變異核酸的比率 (Ks 值 = 同義核酸鹼基置換數 / 總同義核酸鹼基位點)。可藉由比較旁系同源基因 (paralogous genes/paralogs) Ks 值，瞭解比較物種間相較於共同始祖之演化關係。

(五) 轉錄體研究 (Transcriptome investigations)

過去常以晶片來進行特定基因的定量熱點分析 (hot spot analysis)。可以利用轉錄體定序進行全面性的比對研究，針對同一生物在不同生理階段或不同組織取樣，觀察時期或是組織在基因的表現差別性。必須注意取樣時期的代表性、差異處理與試驗重複數的適宜性、樣品間比較分析前須進行常態化的步驟 (normalization) 等。

(六) 植物病理研究 (Plant pathology)

可分作病理研究、病原偵測、流行病學族群分析等。可藉由 RNA 定序分析罹病過程中寄主與病原生物的交替作用，寄主植物病程各階段的基因表現與病徵相關性。病原偵測上，可藉由單一物種複合材料的 RNA 全定序、DNA 定序與病原資料庫比對，瞭解該作物病原的族群相，在多樣品的集合下，瞭解特定作物的病原相與區域的演化差異。

三、病原微生物檢定技術運用

過去病原檢定必須瞭解特定病原生物特性，如寄主範圍、病徵表現，並具備培養環境、分子序列資訊或是檢定用血清庫等，方能針對特定病原進行檢定，爾後以使用的目的性，進行去病原處理如莖頂組織培養技術、熱處理技術、或是抗生素等藥劑處理，已達去除特定病原之目的，獲得無特定病原 (Specific Pathogen-Free, SPF) 繁殖材料。在國際植物種源首次輸入引進，皆需要針對輸出國病害進行風險評估，常因為輸出國疫

情不明或研究資訊不足、取得困難，導致輸入引進時程緩慢，影響後續研發。甚者以不當管道攜入罹染特定病原的植物材料，導致外來有害生物之入侵輸入國。

運用 NGS 技術於植物病理研究，不僅可作為病理研究、病原偵測、流行病學族群分析等，也可藉由 RNA 定序分析罹病過程中寄主與病原生物的交替作用，寄主植物病程各階段的基因表現與病徵相關性。病原偵測上，可藉由單一物種複合材料的 RNA 全定序、DNA 定序與病原資料庫比對，瞭解該作物病原的族群相，在多樣品的集合下，瞭解特定作物的病原相與區域的演化差異。

位在美國紐約康乃爾大學校區的波伊斯植物研究院（Boyce Thompson Institute）與國際馬鈴薯中心（International Potato Center，簡稱 CIP）於 2017 年發表小分子核醣核酸（small RNA）分析軟體「VirusDetect」，在取得樣品的小分子核醣核酸序列資料後，去除轉接子（adapter）序列後，上傳分析系統，執行自動化串聯分析，先將小片段序列連結成較長的接合序列（contig 或 consensus sequence），以 BLASTN 及 BLASTX 演算分析並比對 NCBI 資料庫，演算時間依照小分子核醣核酸序列資料大小，約 30 分鐘至 2 小時不等，即可比對出在待測樣品中可能存在的微生物。該團隊運用 CIP 的馬鈴薯材料，成功偵測到待測樣品中含有之前無法有效鑑別的馬鈴薯病毒。

該團隊更進一步以產生病毒病徵的雜草作為分析對象，在完全無病原資料庫的情況下，以 small RNA 進行 VirusDetect 分析，成功比對出罹染的病毒，並經反轉錄酶聚合酶反應（Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR）及基因解序比對確認病毒。

四、未來展望與結語

在次世代定序技術發展前期，因為定序機臺價位高，單樣品分析成本高。且研究人員必須仰賴專業資訊人員，將定序材料之生物特性、分析之序列特性等篩選條件與資訊人員溝通，將生物描述特性轉為篩選參數。專業資訊人員在高規格的電腦資訊設備及應用程式語言分析巨大數據庫下才能進行相關資訊運算。正因如此，導致許多生物研究人員不敢踏入次世代定序技術應用領域。

近年來因 NGS 機型日益增加，NGS 技術運用的普及性，與耗材、儀器及分析成本逐漸下降有關，多家廠商著力於小型桌上型定序機器開發與推廣，期能成為試驗室常設設備，而期刊：Bioinformatic 甚至在 2009 年推出 NGS 專刊對相關分析軟體與平臺進行介紹，使得更多生物研究人員願意投入資訊研發。試驗人員可藉由計畫技術合作與大專院校租借高規格的電腦資訊空間，並利用雲端操控資料存取，進行工作流程（work flow）設定，納入定序技術來增加相關研究的深度。

種苗改良繁殖場開發健康種苗無特定病原，並利用組織培養技術進行保種與產程規畫與繁殖，過去在產程病理檢定，以分子檢定及血清技術為主。為擴大研發量能與杜絕檢測標地受限，也將具有開發潛力的種苗，導入小分子 NGS 分析，使得病毒無所遁形，在多方確認無病毒及類病毒後進入繁殖系統，提供種苗無病原的品質確認。

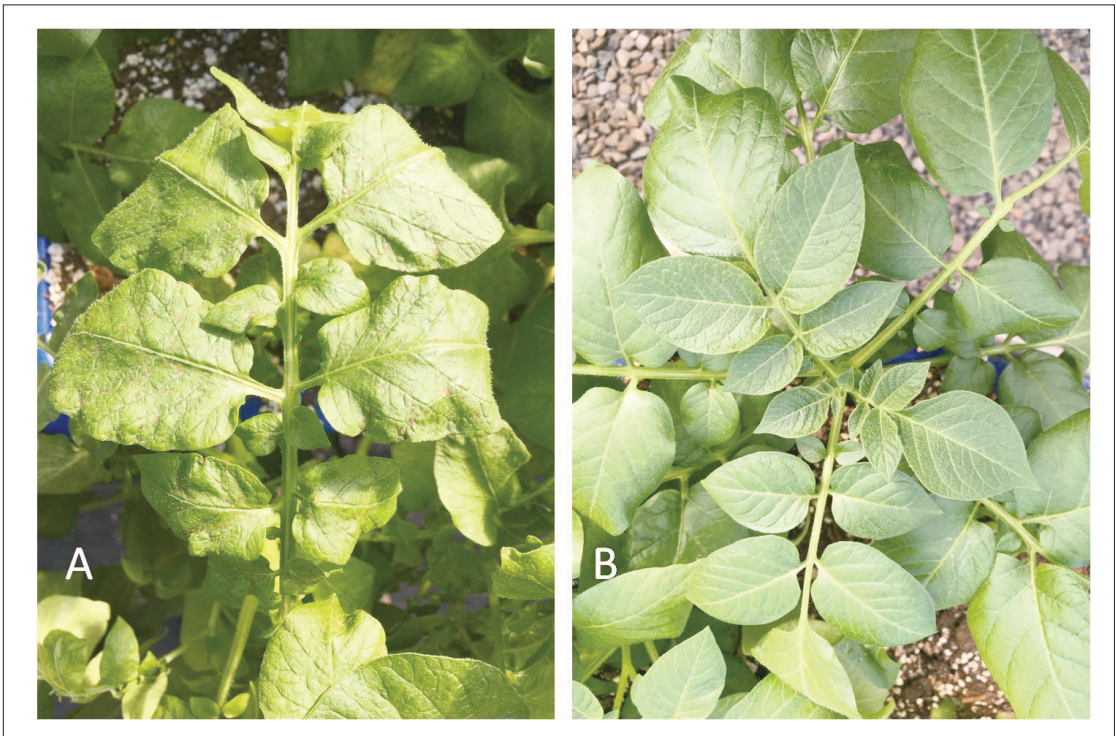


圖 A 罹染病毒的馬鈴薯葉片，圖 B 原罹染病毒馬鈴薯，經生長點組織培養去病毒後，以 small RNA 進行 VriusDetect 分析，確認無罹染病毒。