

出國報告（出國類別：研究）

腹瀉病毒之新世代高速核酸定序技術與資料分析研習

服務機關：行政院衛生福利部疾病管制署

姓名職稱：研發替代役 博士後研究員 黃楷超

派赴國家：日本

出國期間：107 年 11 月 18 日至 11 月 23 日

報告日期：108 年 1 月 7 日

摘要

次世代定序在近年的快速發展下，技術已漸趨成熟，其成本也不斷下降，目前已普遍用於疾病診斷、個人基因組資訊分析及檢測生物體中的整體 RNA 表現等基礎研究上。但相較於常規檢驗，次世代定序成本仍顯昂貴，在經費有限的情況下，無法提高送件數量。Nanopore 為英國 Oxford Nanopore Technologies 開發並販售之新型高速核酸定序系統，該公司在 2015 年推出第一代 Nanopore 系統後，經過三年的測試與技術升級，其核酸定序技術已漸趨穩定，在各國疫情爆發時皆有良好的表現。為發展本署 Nanopore 實作與應用能力，本次前往日本國立感染症研究所(NIID)進行研習，學習檢體前處理、建庫、上機與資料分析相關技術，同時與 Oxford Nanopore Technologies 日本分公司人員進行聯合會議，了解 Nanopore 最新技術發展與技術難題討論。

目次

項目	頁數
一.目的與背景簡介	4
二.過程	7
三.心得與建議	13

一.目的與背景簡介

為建置小型化、可供實驗室獨立操作之新世代高速核酸定序平台(Nanopore)平台技術，提升本署疫情爆發時的反應速度與效率，並完善全民防疫網的建立，前往日本國立感染症研究所(NIID)學習檢體前處理、建庫、上機與資料分析相關技術；同時加強本國與日本 NIID 之研究合作與資訊交流。

次世代定序在近年的快速發展下，技術已漸趨成熟，而高通量定序的成本也不斷下降，在全球許多研究室已經可以獨立進行，目前已普遍用於疾病診斷、個人基因組資訊分析及檢測生物體中的整體 RNA 表現等基礎研究上。另外，先前的檢驗技術(如 RT-PCR)礙於檢體量不足，許多的病原體可能無法被測出，現在可以利用次世代定序來改善此缺點。目前，次世代定序在病毒學的運用主要有三大部分，包含：病毒的鑑定(virus discovery)、建構病毒全基因組(whole viral genome reconstruction)與找出病毒在宿主內的基因變化差異(characterization of intra-host variability)。在病毒的鑑定方面，先前文獻已成功利用次世代定序從已知的目標病毒的臨床與環境檢體中鑑別出新型的病毒株。在建構病毒全基因組方面，已成功利用次世代定序將流感病毒、人類免疫缺乏病毒與人類疱疹病毒等其他病毒的全基因體建構完成。在找出病毒在宿主內的基因變化差異方面，同時利用次世代定序將流感病毒在單一個體中序列變異之程度及其類種進行研究。近年發展出許多針對於腹瀉性病毒(諾羅病毒、輪狀病毒等)的次世代定序方式的前處理、核酸萃取及泛用性引子對等方法，應用於群聚事件協助疫情追蹤與調查，較傳統利用片段基因序列來的解析度更高。因此，以諾羅病毒等腹瀉病毒的分子流行病為例，以次世代定序分析病原基因體，對於追蹤、溯源及病原傳播及汙染場所的定義，將更可以明確地應用於未來防治政策制定。然而，針對腹瀉及食源性病毒方面，國際及台灣現今仍缺乏相關資料，

相信在近幾年儀器的普及化及方法的改良後，及加入病毒變異與流行模擬的演化資料，以次世代定序應用於防治疫情將更快速簡便與有效。

經過多年技術改良，次世代定序成本雖已下降，但相較於常規檢驗仍顯昂貴，在經費有限的情況下，無法提高送件數量。本實驗室囿於上述原因，積極開發合適之新世代核酸定序系統，希冀以低成本、快速且可供實驗室獨立操作之新世代核酸定序系統取代現行之次世代定序系統。

Nanopore 為英國 Oxford Nanopore Technologies 開發並販售之新型高速核酸定序系統，該公司在 2015 年推出第一代 Nanopore 系統後，經過三年的測試與技術升級，其核酸定序技術已漸趨穩定，在各國疫情爆發時皆有良好的表現。相較於前代次世代定序速率較慢的合成-定序(Sequence by Synthesis)技術，Nanopore 以新研發之技術，利用一含有解旋功能之攜帶蛋白質，將目標核酸牽引至通道蛋白結合，核酸經解旋後以單股形式通過通道蛋白質，藉由核酸通過通道蛋白質造成的電流變化進行解碼與序列分析 (Base calling)，分析該核酸序列。在 Nanopore 的定序晶片上鑲嵌有 512 組通道蛋白質，每組各有四個通道蛋白，在每次開始進行定序前，定序系統會逐一偵測各組通道蛋白質，從中挑選一個狀態最優質之通道蛋白質進行定序，此技術在定序過程中不斷重複進行，藉以保證所有通道蛋白質在定序過程中皆為最良好狀態，提供高速且穩定的定序服務。同時傳統的次世代定序技術在定序前，須將核酸進行片段化，進行短片段定序後再行組裝，該系統優點是合成-定序技術可提供低錯誤率之定序結果，但片段化後的序列組裝常因為重複序列的存在或是過於破碎的片段導致組裝出現困難。而 Nanopore 完美的解決了次世代定序常出現的組裝困境，長片段且完整的核酸不須經過片段化即可通過通道蛋白質進行快速(400 bp/秒)與長片段(平均約 20 kb)的定序。雖其定序錯誤率較傳統次世代定序為高，但可進行多次的定序，利用高覆蓋率校正錯誤區域，可將正確率由 90%提升至 95%以上，提供精準的定序服務。

有別於次世代定序，Nanopore 的結果分析與序列組裝軟體極具多樣化，可依照使用者需求進行修改並運用，但其複雜性並不利於初次建立系統者獨自學習使用，日本 NIID 在此方面有豐富經驗，因此本次前往學習相關技術，利用其經驗協助本署建立 Nanopore 檢驗平台，加強本署檢驗量能，提升疫情反應速率與能力。

二. 過程

(1)行程

本次研習由檢驗與疫苗研製中心，腸道與腹瀉病毒實驗室，研發替代役，博士後研究員黃楷超參加，行程共計 6 日，過程如下：

日期	地點	行程
11 月 18 日	台北-東京	路程
11 月 19 日~11 月 22 日	東京	研習
11 月 23 日	東京-台北	路程

(2)研習內容

新世代高速核酸定序 Nanopore 相關技術

本次赴日本國立感染症研究所(National Institute of Infectious Diseases, NIID)研習的主要內容，為學習 Nanopore 相關技術，實驗步驟包括樣品檢體核酸抽取，上機前處理，樣品上機定序與後端資料分析。研習地點為該所流感研究中心(Influenza Research Center)，由第一室主任研究員 Dr. Fujisaki 指導，同時本平台將使用於腸道腹瀉群聚檢驗，因此前往病毒第二室(Department of Virology II)與相關研究人員討論腹瀉檢體處理與大數據分析經驗。Oxford Nanopore Technologies 在日本設有分公司，其公司與 NIID 有技術交流活動，主要合作對象為漢生病研究中心(Leprosy Research Center)，主任研究員 Dr. Suzuki，此次同時邀請 Dr. Suzuki 與 Oxford Nanopore Technologies 進行聯合會議，了解 Nanopore 最新技術與後續發展方向，並對於技術難題進行討論。

技術討論

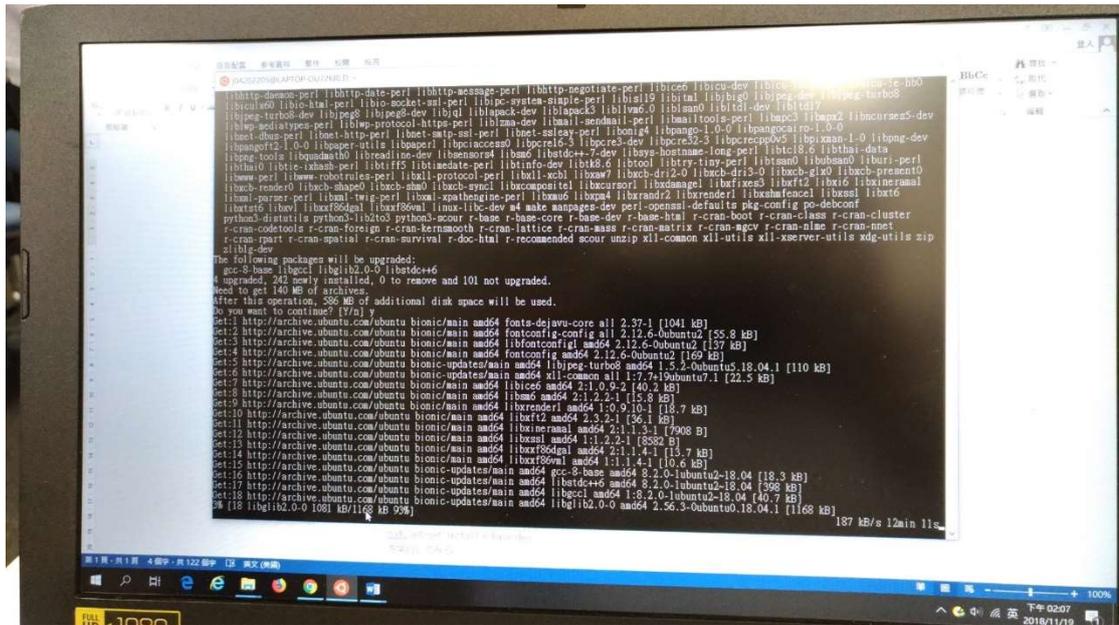
由於本實驗室已在國內初次測試 Nanopore 系統，此次行程著重於前端檢體處理步驟優化與後端資料分析技術學習。檢體前處理包含檢體核酸

抽取，由於本實驗室腹瀉檢體為人類糞便檢體，其特性為含有大量人類核酸與腸道細菌核酸，而病毒核酸相對少量，因此抽取病毒核酸步驟前常使用核酸酶(DNase 與 RNase)將非病毒之核酸進行降解，以減少後續定序錯誤之可能性，但此步驟常導致樣品檢體核酸過於稀少，增加定序困難。討論後可利用後續的反轉錄核酸聚合酶反應 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 步驟中，以特定引子進行專一性擴增目標病毒之核酸，避免過多核酸酶處理降低檢體核酸濃度，同時引子可依各檢驗項目需求加以更換。

在核酸抽取後，依照各檢驗項目需求，Nanopore 提供 11 種不同的上機前處理試劑組，大致可依照檢體種類(DNA 或 RNA)，是否進行 PCR 放大與是否需要多種樣品同時上機進行區分並選擇。本實驗室以往選擇將病毒 RNA 經由 RT-PCR 後的 cDNA 直接進行定序，但腸道內含有病毒 RNA 極為稀少，過低 RNA 含量導致定序的結果不佳。經討論後認為可將 cDNA 進行擴增，同時選用另一項上機前試劑組，希冀可增加定序結果，此問題在後續與 Oxford Nanopore Technologies 聯合會議時同樣提出，並得到對方工作人員的相同解答。

後端的定序資料分析部分，Oxford Nanopore Technologies 公司提供自有 EPI2ME 程式，可將定序結果上傳該公司之雲端分析軟體，與核酸資料庫進行序列比對，即時分析該檢體內含之物種。另外網路有數十種不同程式設計者撰寫之分析軟體，可供不同使用者進行下載此用與分析。本次學習之軟體為美國 CDC 使用之分析軟體 IRMA(Iterative Refinement Meta-Assembler)，該軟體主要設計分析具短片段序列之病毒核酸進行分析，但由於該軟體設定運作於 Mac 與 Linux，即使將 Windows 筆記型電腦使用 Ubuntu 模擬 Linux 環境，在運作過程中仍然有許多錯誤點出現，囿於研習時間有限，與流感研究中心(Influenza Research center)第一室主任研究員 Dr. Fujisaki 商談在回國後持續信件聯絡解決問題，研習第一天在認識環境、檢

體處理討論與軟體測試中結束。以下為軟體測試畫面：



腹瀉檢體前處理與全基因體分析討論

本實驗室為腸道腹瀉實驗室，主要檢驗人類腹瀉檢體，與流感研究中心處理之檢體種類不同，為更詳細了解日本 NIID 關於腹瀉檢體處理與全基因分析相關知識，以精進本實驗室之檢驗技術與 Nanopore 檢驗平台開發，故安排第二與第三天前往病毒第二室討論並研習腹瀉檢體相關技術，主要指導者為 Dr. Murakami，其主要研究方向為諾羅病毒之細胞培養。與本實驗室常規檢驗方式相同，病毒第二室對於諾羅病毒之檢驗方式採用即時定量分析系統(Quantitation Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, QRT-PCR)，諾羅病毒依基因型大致分類為 GI-genogroup 與 GII-genogroup，利用其不同序列特性設定引子與探針進行專一性擴增，檢驗是否成功擴增目標區域，判定該檢體是否含有諾羅病毒。在病毒第二室中對於 GI 與 GII 採用分別檢驗方式，而本實驗室已成功整合為 Multiplex，可同時偵測並辨別 GI 與 GII，將其檢驗方式告知，對方雖有興趣，但礙於日本國內法規，無法任意更換檢驗方式。但對方指出在明年度有檢驗方式討論會議，可能會納入討論是否更換為更有效率之檢驗方式，可促進雙方研究技術合作。在討論過程中也安排實作，本次測試對方 QRT-PCR 與常規 Nest-PCR 鑑驗方式，結果與本實驗室比較後，發現對方實驗室的方法靈敏度較高，

可在較低的 Ct 值成功辨識諾羅病毒，可能與其使用試劑組有關，待回國後測試是否可重複，另外與病毒第二室室長 Dr. Someya 討論後續合作事宜。下圖為與

Dr. Someya 合照：

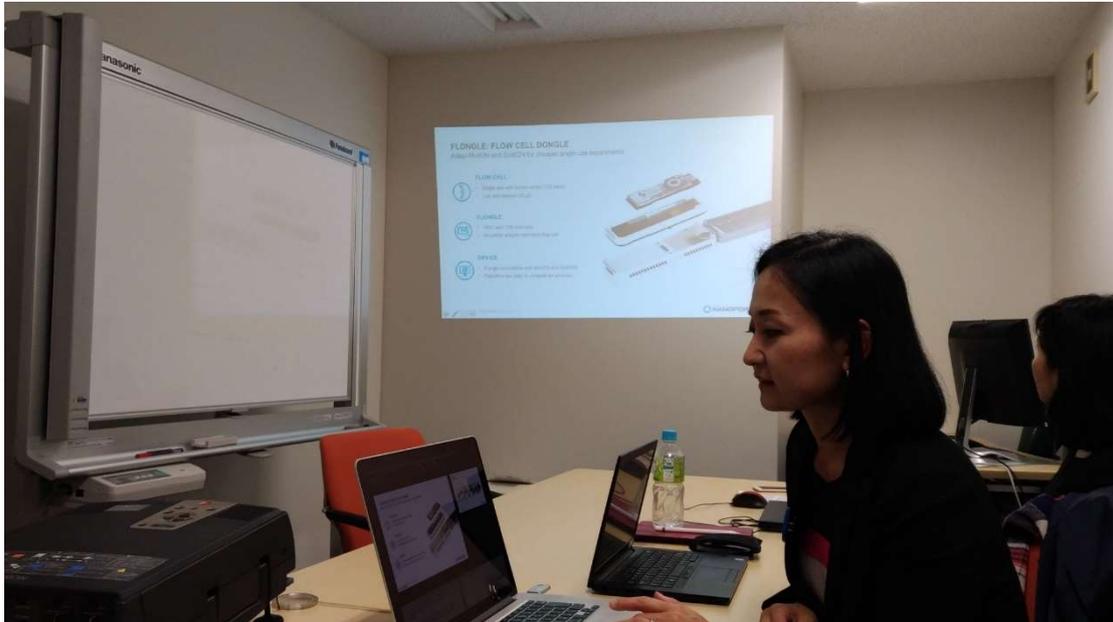


諾羅病毒為病毒性腹瀉主要病因，其次還有輪狀病毒與沙波病毒，本次同時與病毒第二室專責研究輪狀病毒的 Dr. Yoshiki 與研究沙波病毒的 Dr. Oka 進行討論，了解其最新檢驗方式與全基因體分析相關技術，希冀可運用於本實驗室對於相關病毒的全基因體分析技術，同時帶回適合本實驗室使用之技術與資訊，研習第二天與第三天在實作與實驗方式討論中結束。

Oxford Nanopore Technologies 公司人員聯合會議與實際上機

本次研習除了經驗分享與增進技術討論外，另外特別安排實際上機，藉由實際操作及時討論步驟的優缺點，實作地點回到流感研究中心(Influenza Research Center)，由第一室主任研究員 Dr. Fujisaki 帶領，使用該實驗室之流感檢體進行樣品前處理與實際上機。在前處理過程中，針對各項步驟的細節進行細部討論，如是否步驟等待時間與試劑配置比例，可以得到操作流程(Protocol)以外的細節，優化實驗步驟與效率。上機與步驟討論在第四天上午完成，上機需等待 8 至 12 小時，當天下午由漢生病研究中心(Leprosy Research center)主任研究員 Dr.Suzuki 安排與 Oxford Nanopore Technologies 公司人員進行聯合會議，該

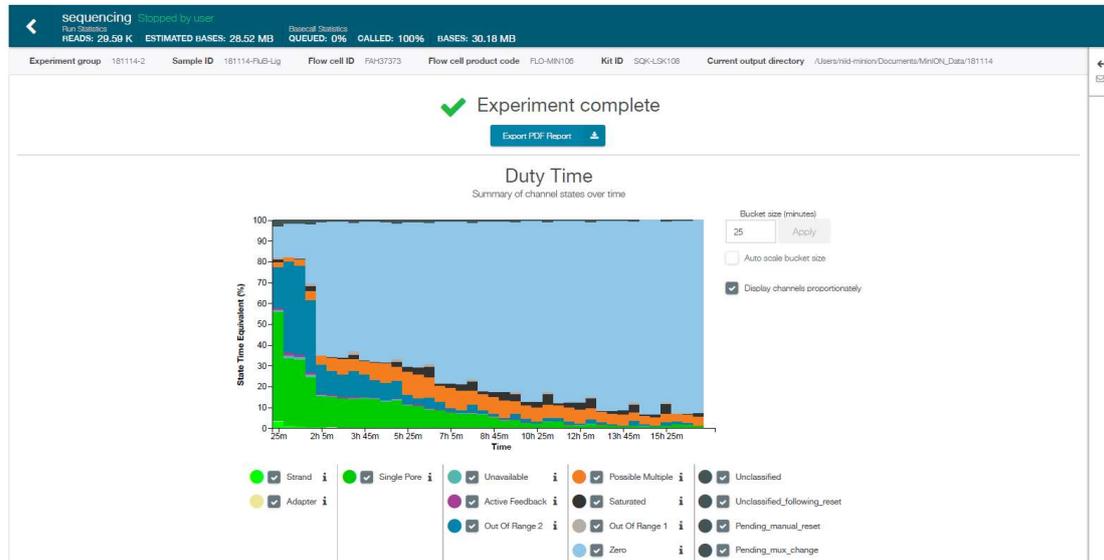
會議為小型會議，會中除 Dr.Suzuki 與兩位 Oxford Nanopore Technologies 公司人員外，另有流感研究中心(Influenza Research center)第一室主任研究員 Dr. Fujisaki，第五室研究室研究員 Dr. Takahashi 與本人參與，可直接反應問題與技術討論。下圖為 Oxford Nanopore Technologies 公司人員簡報中：



在會議中了解近期 Oxford Nanopore Technologies 開發方向與未來產品，並針對實際上機發現的問題進行疑問解答，囿於時間短暫，半天的會議討論著墨不多，但留下聯絡方式可供後續討論。下圖為會議後合照：



會議結束後隔天，由 Dr. Fujisaki 將上機結果傳送給本人，本次實際上機結果如下：



三.心得與建議

心得

本次奉派前往日本 NIID 流感研究中心研習新世代高速核酸定序技術著實獲益良多。在此感謝本署長官給予此次寶貴的研習機會，使本人在此次研習機會中，除學習定新世代高速核酸定序技術外，同時增加利用外語與他國科學家進行科學性討論的經驗，在學術性生涯中是極為重要的經驗。可惜此次研習時間過於短暫，在研習過程中不斷聽到對方抱怨是否可延長研習時間，方可進行更細項的討論與學習。新世代高速核酸定序系統除了前置的檢體核酸抽取與上機前處理外，最重要的是後續的資料分析。前半部可利用嫻熟的實驗室分子生物操作經驗，針對實驗步驟進行優化，但後半部的資料分析涉及跨領域知識，需要使用大量的程式設計與生物資訊相關知識，上述部分無法在短暫的一兩天討論中徹底補足，仍需要更多的時間進行連絡與學習。在回國後已利用赴日學習技術成功進行 Nanopore 定序，並完成初步資料分析，但後續的細部資料處理，仍需要更多的時間學習與交流。

建議

1. 大數據分析已成為未來實驗室或檢驗單位的趨勢，但除了傳統分子生物技術外，還需要眾多跨領域人才與知識，方能建立完善。署內長官雖有足夠遠見，經常派員前往國外學習相關經驗，但囿於經費與研習時間過短，且不同語言造成學習效率緩慢，無法完整且有效率的學習。建議可與國內學術研究單位加強聯繫合作，如鄰近昆陽實驗室的中央研究院經常舉辦生物資訊或大數據分析的研習課程，可積極合作並派員學習，相信有足夠的時間與經驗，同時在相同的語言環境學系下，學習效率與問題解答都可獲得很大的改善，補完本署大數據分析技術方面的缺口。

2. 除新技術的學習以外，檢驗實驗室必須提供檢驗人員足夠的資源，在日常檢驗工作外，可以進行新技術的開發與新知識的研究。目前本實驗室經費在日常檢驗花費支出後，所剩經費資源並不足以提供檢驗人員進行上述研究開法，建議未來可提供額外的研究經費，以利檢驗人員發展新技術，精進檢驗技術與效率，完善國內防疫網。