

①

出國報告（出國類別：研究）

②

美國俄亥俄州州立大學 癌症中心
短期研究

③

服務機關：國立中正大學生命科學系

姓名職稱：陳永恩助理教授

派赴國家：美國

出國期間：100年7月23日-8月25日

報告日期：100年9月8日

摘要:

自人類基因體計畫完成後，基因體研究為現代生物醫學研究之重要領域，此研究依賴 DNA 定序技術。DNA 定序技術從 Sanger 定序開始，到今天的新世代定序技術(Next Generation Sequencing, NGS)，只需要大約 1 週的時間，便可完成全基因定序，但只需 Sanger 原理之自動定序儀數百分之一的成本。本次短期研究的目的，是到美國俄亥俄州州立大學癌症中心，黃慧明教授之實驗室，學習如何利用 NGS 技術，探討卵巢癌細胞中之基因甲基化(DNA methylation)及組織蛋白修飾(histone modification)之改變，以了解卵巢癌形成過程中之表基因改變，以利將來於卵巢癌之診斷、預後以及治療上之應用。

目次

一、目的.....	1
二、過程.....	2
三、心得及建議.....	3
四、附錄.....	4

一、目的

DNA 定序技術突飛猛進，自 1977 年 Fred Sanger 與 Alan R. Coulson 發表了關於 DNA 定序的論文後，生物學研究進入了分子生物學的時代。自此之後的幾十年間，DNA 定序技術雖然持續發展，但基本上還是遵照 Sanger 定序原理，以單股 DNA 做為模板，將 DNA 複製成為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。但自 1990 年人類基因體計畫開始後，新一代的全自動 DNA 定序儀開始出現，雖仍採用同樣的 Sanger 原理進行定序，但改良以螢光標定，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。雖然如此，利用全自動化之 DNA 定序儀於全基因體之分析，仍然非常費時，而且價格昂貴。這樣的情況自 2004 年羅氏公司(Roche)推出全球第一部利用新世代定序技術(Next Generation Sequencing, NGS)的全自動定序儀 454 後，情況便開始改變。454 利用 pyrosequencing 技術，只需要大約 1 週的時間，便可完成全基因定序，但只需 Sanger 原理之自動定序儀數百分之一的成本。接著 Illumina 公司於 2006 年生產另一部利用 NGS 技術的 Solexa, 以及 Applied Biosystems 公司於 2007 年所生產的 SOLiD 後。此後，如 Helicos, Complete Genomics, Pacific Bio 等各種 NGS 技術相繼問世。每 GBase 的價格在 2000 年至 2010 年間已經下降了一千萬倍，而定序速度卻加速了十萬倍，可見 NGS 技術已進入全盛時期。台灣各主要定序或基因體中心，都已配備了 NGS 定序儀，投入 NGS 的研究行列，2011 年開始的國家型計畫亦訂定 NGS 為主要研究工具之一。

目前 NGS 技術已廣泛運用在新物種之全基因體定序、物種以全基因再定序(re-sequencing)、基因表現(gene expression)、細胞突變分析(mutation analysis)、染色質免疫沉澱分析(chromatin immunoprecipitation)及基因啟動子甲基化分析(methylation analysis)等基因體及表基因體研究上。在醫學研究上，目前 NGS 主要應用於癌症遺傳學的研究中，找出導致癌症產生之突變基因。另外也有學者利用 NGS 應用於非侵入性之胎兒產前診斷(non-invasive prenatal diagnosis)。而在預防醫學的研究中，NGS 也應用於單一核酸多型性(single nucleotide polymorphism, SNP) 以及染色體的拷貝數變異(copy number variations, CNV)中。

本次短期研究的目的，是到美國俄亥俄州州立大學癌症中心，黃慧明教授之實驗室，學習如何利用 NGS 技術，探討卵巢癌細胞中之基因甲基化(DNA methylation)及組織蛋白修飾(histone modification)之改變，以了解卵巢癌形成過程中之表基因改變，以利將來於卵巢癌之診斷、預後以及治療上之應用。

二、過程

本次為期 1 個多月的短期研究，是在美國中西部俄亥俄州州立大學(The Ohio State University, OSU) 癌症中心(Comprehensive Cancer Center)，黃慧明教授(Prof. Tim H.-M. Huang)之實驗室進行。黃教授是第一位利用生物晶片探討基因甲基化之科學家，在癌症表基因研究上非常傑出，目前同時是 OSU 綜合癌症生物學研究中心(Integrated Cancer Biology Program, ICBP) 之計劃主持人，他也曾參與台灣國科會研究計劃之審查。

本次研究主要是在黃教授之實驗室，學習如何進行 NGS 之實驗。OSU 之 NGS 設備為 illumina Solexa GAII，由癌症中心之核心實驗室管理。本人所進行之實驗可分為以下幾個部份：

1. DNA 之斷裂(sonication): 要進行一個好的 NGS 實驗，首先要能產生平均長 200bp 之 DNA 片段。黃老師實驗室所使用的斷裂器為 Covaris S-series 之 sonicator(圖 1)，只需要 4 分鐘時間，便可產生平均長度為 200bp 之 DNA。若所斷裂的為 formaldehyde crosslink 之 DNA，則需要 10-15 分鐘來完成 200bp 左右之 chromatin；
2. 若要進行為 DNA 甲基化之實驗，便需要利用 Invitrogen 之 methylMiner kit(註 1) 進行甲基化 DNA 之純化，其原理是利用 MBD binding protein 對有甲基化 DNA 的 affinity 進行沉澱；
3. 接著要進行 NGS library 之備製，這也是最困難的步驟，當中包括: end repair、addition of “A” bases、adapter ligation、size selection 及 PCR amplification。詳細步驟可參閱 illumina 之文件 “preparing samples for ChIP Sequencing of DNA” (ChIP-Seq_single_end_Sample_Prep_11257047_RevA[1].pdf)
4. 把 PCR 產物純化後，便要進行 Agilent Bioanalyzer 分析已製行之 library 的品質 (QC check, 圖 2)，若有 primer dimer 的出現，便要利用 Beckman Agencourt AMPure XP beads 進行額外的純化。
5. 最後就是 NGS 定序，本步驟由 OSU 核心實驗室進行，使用 illumina Solexa GAII(圖 3)single-read sequencing 36bp platform 大約需要 2 天半的時間。
6. 定序結束後，數據會傳送到 OSU 生物資訊核心實驗室進行生物資訊分析 (bioinformatics analysis)，先是利用 human genome,hg19 版本進行對比(alignment)，之後就可利用 illumina Genome Studio 軟體進行分析。

三、心得及建議

I. OSU 人員任用之調查

在 OSU 以訪問學者上班的第一天，要先到保安部進行背景調查，包括打指紋，看看是否有犯案紀錄，與恐怖份子是否有關聯，背景調查通過後才可以拿到職員証(圖 4)。這對新進人員非常不方便，但當美國本土安全非常重要，所以可以體諒。

2. OSU NGS 核心實驗室

OSU 癌症中心之 NGS 設備是由 NCI(美國國家癌症中心)之經費補助而設立的，由於是使用國家經費補助，核心實驗只是收取基本工本費用，每個樣本約 USD950(包括 cluster generation 費用)。反觀目前由國家型計劃所支持的相同平台定序費用，是 OSU 的兩倍。由於 NGS 技術將本是基因體研究之重要工具，建議相關單位可以在中南部設立 NGS 核心實驗室，收取工本費用，針對中南部之學校研究單位提供 NGS 服務。

3. OSU 生物資訊核心實驗室

生物資訊為成功之基因體實驗之不可缺乏之實驗，OSU 生物資訊核心實驗室之成員為醫學資訊系(medical informatics) 之成員，以每次 USD10 之低廉價格，對定序資料提供簡單之生物資訊分析服務。除此之外，該核心實驗也能以研究合作之方式，提供深入之生物資訊分析服務。相對目前國內，普遍缺乏針對 NGS 資訊分析之研究人員，建議教育相關單位應招攬國外相關人才回國服務，並設立核心實驗室，以提供生物資訊分析服務，提高研究水準。

4. OSU 之癌症中心研究氣氛

OSU 癌症中心位於一棟 10 層高的研究大樓(圖 5)，實驗室為開放式設計，方便彼此交流，經驗分享。另外癌症中心每週都有許多演講，及定期之學術交流活動，例如 research day 等，增進校內彼此之間的研究合作。

結語

本次出國研究收獲良多，感謝中正大學之補助，可以學習到最新之 NGS 技術。反觀本國在 NGS 研究上仍有許多進步空間，而中正大學仍沒有 NGS 相關設備，建議相關單位可以補助中正大學購置 NGS 設備，提升本校之生物醫學研究品質。

四、附錄

註 1: Invitrogen Methylminer Kit:

<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/ME10025>



圖 1:Covaris S-series sonicator

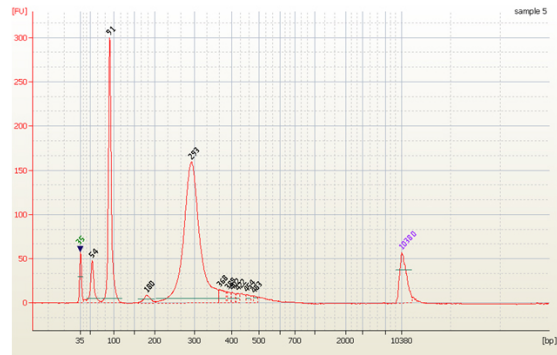


圖 2:Bioanalyzer QC check



圖 3:illumina Solexa GAI



圖 4:OSU
工作証



圖 5:OSU 癌症研究大樓