

出國報告（出國類別：進修）

器官移植配對排斥評估生物標記之新檢驗技術及次世代高解析 HLA typing

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院

姓名職稱：鄭碩珺醫事檢驗師

派赴國家：美國

出國期間：106 年 10 月 01 日至 106 年 11 月 30 日

報告日期：107 年 1 月 26 日

## 摘要 (200-300 字)

鄭碩珏醫檢師於 2017 年 10 月 01 日至 2017 年 11 月 30 日至美國喬治城大學 C.W. Bill Young 骨髓捐贈者防禦計畫部門(C.W. Bill Young Department of Defense Marrow Donor program)實驗室進行兩個月的進修學習，主要目標為學習次世代高解析定序分析(Next Generation Sequencing)應用於 HLA 分型，美國喬治城大學 C.W. Bill Young 骨髓捐贈者防禦計畫部門實驗室每天招募大量合適的骨髓捐贈者，於實驗室進行 HLA 分型，其具有 CAP(美國病理家協會)認證及 ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics)認證。本次進修除了學習次世代高解析序列分析外，也學習了自然殺手細胞類免疫球蛋白受體分型 (killer cell immunoglobulin-like receptors, KIR typing)、高解析度反序列特異性雜交分型試驗(reverse sequence-specific oligonucleotides, r-SSO HD)和核酸定序法(sequence-based typing, SBT)，回國後，希望可以應用這些新興技術以及處理大量檢驗資訊及結果彙整。

## 目次

壹、進修目的.....	1
貳、進修過程.....	1
參、進修心得.....	5
肆、建議事項.....	5
伍、附錄.....	6

## 壹、進修目的

- 一、學習次世代高解析定序分析(Next Generation Sequencing, NGS)技術應用於人類白血球抗原分型實驗與方法建立。
- 二、自然殺手細胞類免疫球蛋白受體分型 (killer cell immunoglobulin-like receptors, KIR typing)及其單倍體(haplotype)對於骨髓移植的影響。
- 三、學習核酸定序法(sequence-based typing, SBT)操作與判讀。
- 四、應用軟體將 SBT 和高解析度反序列特異性雜交分型試驗( reverse sequence-specific oligonucleotides, r-SSO HD)方法整合並且加速報告判讀及準確性。

## 貳、進修過程

進修日期	進修內容	指導人員
2017.10.01 至 2017.10.03	實驗室安全衛生訓練、資訊安全介紹、參訪人員基本訓練	Eric Banania (Lab Manager)
2017.10.04 至 2017.10.20	次世代高解析定序分析實驗介紹、原廠教育訓練及操作、臨床檢體操作見習	Lihua Hou (Supervisor)
2017.10.22 至 2017.10.31	自然殺手細胞類免疫球蛋白受體分型實驗介紹、能力試驗檢體操作與判讀、單倍體分型與骨髓移植關係介紹	Lihua Hou (Supervisor)
2017.11.1 至 2017.11.17	核酸定序法(SBT)操作與判讀、允收標準	Ruyan Yang (Supervisor)
2017.11.20 至 2017.11.30	SBT 與 r-SSO HD 方法整併與判讀、Ambiguity 處理方法	Bin Tu (Supervisor)

### 一、次世代定序(Next Generation Sequencing, NGS)

#### (一)實驗目的

傳統進行人類白血球抗原分型(Human Leukocyte Antigen, HLA typing)，於器官移植實驗室多採用(sequence-specific primers ,PCR-SSP)和(sequence specific oligonucleotide , SSO)兩種方法，此兩種分析方法屬於中低解析度，因此經常會出現 ambiguity 的問題，而骨髓移植及幹細胞移植實驗室則採核酸定序法(sequence-based typing, SBT)，核酸定序法為高解析檢驗法，除有部分無法分析 ambiguity 的問題外，檢驗步驟長耗時耗人力，而次世代定序分析為一種高速高通量的定序技術，且具有高解析度，除了可以解決 ambiguity 的問題，也可以提高檢驗效率。

#### (二)實驗方法及操作流程

1. 將 DNA 與引子(primer)，PCR 緩衝液(Polymerase chain reaction buffer)與 Taq 聚合酶混合並進行第一次的 HLA 基因座片段放大，此 primer 設計的位置可以分別得到 HLA A、B、C、DR、DQ、DP 基因座基因的全長。
2. 將 PCR 完的產物進行 DNA 電泳，看 HLA 基因座片段是否成功放大。
3. 進行清理(clean up)步驟，用 AMPure beads 將剩餘的 PCR 試劑移除。
4. 利用超音波將放大完的 HLA 基因座大片段 PCR 產物打斷，原始產物長度約 4000bp，打斷後產物為 700bp。
5. 進行 clean up 步驟，用 AMPure beads 將過小的 DNA 片段移除。
6. 進行末端修復(End repaired PCR)，因為超音波打斷 DNA 產物(Fragmentation)後，有些片段的頭尾會形成鈍端(blunt end)。
7. 進行 DNA 產物大小篩選(Size selection)，利用建議特定濃度的 AMPure beads，可以篩選出想要的 DNA 產物大小。
8. 進行 clean up 步驟，用 AMPure beads 將剩餘的 PCR 試劑移除。
9. 加入腺嘌呤(Adenine)，使每個片段頭尾都含有多個 Adenine，此為進行定序時 primer 黏合的位置。
10. 進行連接 PCR(Ligation PCR)，將不同的 barcode indices 加入，使得不同的 sample 含有不同的 barcode indices，用來標示及區別不同檢體 DNA 的片段，加上 barcode indices 後就總稱為 Library。
11. 進行兩次 clean up 步驟，用 AMPure beads 將剩餘的 PCR 試劑移除。
12. 進行加強 PCR (Enhanced PCR)，將做好的 Library 再一次的 PCR 放大以增加定序時的效率。
13. 將所有不同的檢體 Library 混合至同一管中，此時不同的檢體已含有不同的 barcode indices。
14. 將產物依照所需的大小，利用 BluePippin 機台設計篩選出所要的大小 700bp
15. 利用 Bioanalysis 機台，確定產物最終的位置及大小(bp)。
16. 製備變性(denatured) DNA，將產物加上 0.2N NaOH 反應 5 分鐘。
17. 將 denatured DNA 加上緩衝液和 Internal control (1% phix)，於 96 度下反應 2 分鐘，最終 Library 即製備完成。

### (三)實驗結果

利用數據品質指標判讀實驗結果好壞

1. 晶片上的聚集(Group)密度：若太密或太稀疏的話會導致定序不精確，一般來說 V2 型晶片適合的密度為 950-1200 K/mm (原始注入的 Library 建議濃度為 8-9 pM)，V3 型晶片適合的密度為 1200-1500 K/mm (原始注入的 Library 建議濃度為 14-15 pM)，之後開始定序時，只有一定密度範圍內的鹼基可以被偵測，這種密度指標稱為 Density Passing Field，易即通過光柵的密度比例，通常要大於 80%，若原始濃度太密，能通過光柵的比例會變小。

2. 半峰全寬(FWHM)：表示所偵測訊號的聚集程度，若太寬可能為氣泡所造成，一般數值為 2.8-3.5。
3. 讀的深度(Read depth)：序列平均被讀到的次數，若太少易造成讀的不精確。
4. 標誌指標(Indexing QC)：定序在進行時，可以由實驗監測圖表觀察，由於每個片段都有接上 indices，indexing QC 圖表可以看出每個 index 是否有被讀到平均，藉此可以反應序列平均讀到的次數。
5. 品質分數(Quality score)：鹼基讀錯的機率，通常分為 Q20 和 Q30 兩項，Q20 代表有 1/100 鹼基被讀錯的機率，Q30 則是代表有 1/1000 鹼基被讀錯的機率，所以 Quality score 越高越好，通常一整個實驗要大於 70%，且隨著讀的鹼基數增加，此品質分數的百分比會下降。
6. 錯誤率(Error Rate)和排列比例(% Aligned)：有的實驗室會加入 Internal control, PhiX，實驗結果就可以得知鹼基讀錯的機率和跟參考序列(PhiX genome)比對後排列錯誤的比例，加入 Internal control 只是多一項品質指標，若不加入的話對於實驗也不會影響，最後將結果匯入分析軟體，軟體會自動與參考序列比對得到可能的 HLA 分型結果。

## 二、自然殺手細胞類免疫球蛋白受體分型 (killer cell immunoglobulin-like receptors, KIR typing)

### (一)實驗目的

KIR 基因為位於 19 號染色體上的一群基因總稱，總共有 17 種基因會表現 14 種蛋白，但不是每個人都會表現所有 17 種基因，而且 17 種基因又分為著絲粒群和端粒群，也分為 A 和 B 兩群，不同組合的 KIR 基因可以組合成不同的 KIR 基因單倍體，臨床上研究顯示，如果在 HLA 基因相合下，同樣 KIR 基因單倍體的受贈者和捐贈者，其血液幹細胞移植成功機率會上升，而且也可以用來增加治癒急性骨髓性白血病 (Acute myeloid leukemia, AML) 的機率，不過對於急性淋巴性白血病(Acute lymphoblastic leukemia, ALL)的病人則沒有影響。目前 KIR 基因的分型採用分生方法，SSO (sequence specific oligonucleotides)和 SSP (sequence specific primer)。有些型別需要再以 SBT 來細分，雖然目前 KIR 基因在臨床意義上尚未完全了解，不過仍然可以提供臨床移植的參考。

### (二)實驗方法及操作流程

1. 先用 SSP 法測定有哪些型別的 KIR 基因存在：將 DNA、特異性引子、PCR 緩衝液與 Taq 混合並進行特異性的片段放大，特異性引子為根據不同 KIR 型別設計 primer。將 PCR 完的產物進行 DNA 電泳，經由被放大的特異性片段即可判斷有哪些 KIR 基因存在。

2. 再來進行 SSO 法，採用試劑商設計的套組，藉由不同微珠反應來判斷 KIR 基因型別，SSO 法相較於 SSP 法解析度更高，並且結果也可以跟 SSP 法比較。
3. 最後一步為 SBT，若於 SSP 和 SSO 法，發現 2DL5 基因存在，則要細分 2DL5A 和 2DL5B 基因，其會影響單倍體基因型別的不同。
4. 有些特殊的融合或刪除變異基因需要以特殊的 SSP 法判定，像是 2DP1(Fusion gene) 和 2DS4 (Deletion in exon4)基因。

### (三)實驗結果

1. 先比較 SSP 法和 SSO 法兩者結果是否相合，若有則加做特殊的 SSP 法，進一步確定融合或刪除的變異基因是否存在，SSO 法單一微珠的結果也可以幫助判斷這些變異基因存在與否。
2. 若有存在 2DL5 基因，則必須再進行 SBT 法結果判斷其分型。
3. 將所有基因分類成著絲粒(Centromeric)和端粒(Telomeric)基因兩大族群。
4. 這些基因又分為 A 型和 B 型，其中屬於 B 型的單倍體捐贈者，可以提高受贈者存活的機率。

## 三、SBT 和 r-SSO HD 方法比較與整合判讀

### (一) 實驗目的

目前最常用來操作高解析度的 HLA 分型方法為 r-SSO HD 法和 SBT 法，但是兩種方法各有優缺點，r-SSO 法常常會遇到 Ambiguity 的問題，而 SBT 法則是有相位 (Phasing)的問題。r-SSO 法原理為利用 DNA 產物與微珠上特異性的序列結合來判斷 HLA 型別，而 SBT 法則是直接讀 DNA 序列來判斷，兩者方法學不同，因此同一檢體以兩種方法學不同的檢驗方法所得出的結果可以互相比較及補足，所以若同一檢體以 r-SSO 和 SBT 兩種方法操作，不僅可以增加解析度，還可以縮短分析時間。

### (二)實驗結果

不同人分別操作 r-SSO 法和 SBT 法，兩組人不能得知對方的結果，將結果送給同一人彙整，經由軟體比對 r-SSO 和 SBT 結果後，原本 Ambiguity 的結果，99%以上都只剩單一結果，若還有 Ambiguity 存在，則針對特異序列設計出的 primer 再進行一次 SBT，若沒有將兩者整合比較，則必須花很多時間再進行下一步的特異 primer SBT，因此將 r-SSO 法和 SBT 法結果整合可以省下很多時間。

## 參、進修心得

一、 美國喬治城大學C.W. Bill Young骨髓捐贈者防禦計畫部門實驗室分為兩大區塊，分別為骨髓捐贈勸募小組，和分析捐贈者的HLA分型的實驗室，另外也接受美國其他醫院委託進行異體骨髓血液幹細胞移植專門檢驗診斷業務，主要進行HLA分型，具有CAP(美國病理家協會)認證及ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics)認證。一星期大約有300-400件HLA分型檢驗，由於檢體量很大，比較多機會遇到比較罕見的HLA型別，故對於如何判斷結果有很大的幫助，適合本院進行交流與學習。

二、 關於人員配置，其人員編制架構完整值得學習，美國喬治城大學 C.W. Bill Young骨髓捐贈者防禦計畫部門實驗室分別有兩位實驗室主任，一位負責行政工作，也就是骨髓移植招募中心，另一位則是負責實驗室，包括彙整研究和檢驗結果，與其他實驗室開會討論，臨床運作上，依照實驗項目的不同，分別有不同的 supervisor，負責研究開發，實驗難題處理和結果最終判讀，每個部門再分別有 5-6 位研究助理負責實驗操作及初步分析實驗結果。

三、 實驗室檢體主要來源為口腔拭子(buccal swab)，收到檢體時馬上進行標號及 DNA 萃取，萃取完的 DNA 直接分裝於 96 孔盤進行下一步的實驗準備，剩餘的 DNA 則保存於-80°C 冰櫃，由於檢體量非常大，所以在檢體標示及操作上會額外進行標示的品管，主要用來判斷 96 孔盤方向是否錯誤，因為可能盤子於操作中轉向，導致最後結果錯誤，所以每一盤會挑出其中一個檢體，放到同一批實驗的最後一盤子重複操作，避免錯誤，隨後進行高解析度的 r-SSO 與 SBT 法判別 HLA 分型，實驗約兩天可以得知結果，進行比對，經由實驗室 supervisor 確定最終報告然後發出。

## 肆、建議事項

一、 美國實驗室於開發新興技術 NGS 已有一段時間，故技術純熟，NGS 步驟繁複，且不同廠商所設計的機型，其操作流程與方法也不太相同，但 NGS 為未來研究與檢驗趨勢，雖然臺灣目前並沒有很多使用者，但建議可以多方面培育人才，學習 NGS 等新興技術，以因應未來趨勢，提升整體競爭力，進一步也可以提供資訊給臨床醫師參考。

二、 本次所見習的實驗室，其檢體量很大且人員眾多，故在管理上就非常重要，定期演練異常狀況，而在檢體的標示每一步驟都有設計品管，避免出錯，目前實驗室雖然人員與檢驗量與美國相比為小規模，但是這些管理與品管還是值得我們學習的地方。另外在人才培育上，實驗室主管們會定期舉辦教育訓練，指導實驗室成員，除了複習日常操作的實驗技術原理、討論困難案例外，也提供目前檢驗技術趨勢，讓大家在學習的目標。

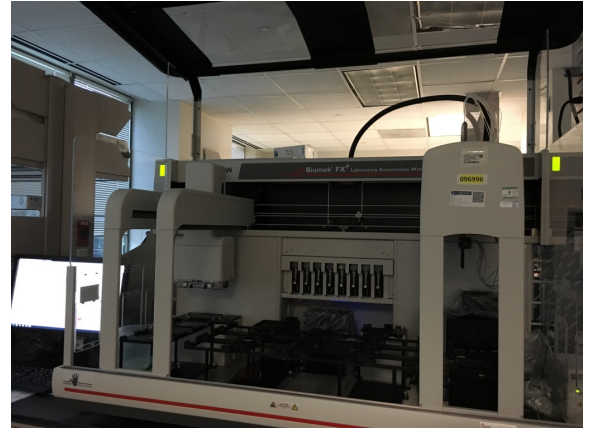


伍、附錄

C.W. Bill Young 實驗室



BIOMEK FX<sup>P</sup> 自動化工作平台



MiSeq 次世代定序機台

