

出國報告（出國類別：進修）

2022 日本筑波大學附屬醫院基因檢測臨床 應用與臨床檢驗新進展

服務機關：高雄榮民總醫院/病理檢驗部臨床檢驗科

姓名職稱：曾志偉/醫事檢驗師

派赴國家：日本

出國期間：2022/9/26-2022/12/25

報告日期：2023/1/16

摘要

於日本筑波大學附屬醫院臨床檢查部進修，學習傳染病基因檢測與白血病相關人類基因檢測、次世代基因定序技術、智能化醫學實驗室管理與進展。分生室使用聚合酶連鎖反應與電泳法偵測白血病融合基因的存在，用以診斷慢性骨髓性白血病。使用即時聚合酶連鎖反應執行基因定量檢驗，測定體內殘留白血病細胞數，用於復發的早期發現與治療效果的判定。i-Lab 發展無人直升機運送 COVID-19 檢體與氫燃料巴士到偏鄉執行 COVID-19 抗原 PCR 檢驗。NGS 實驗室使用機器人(Maholo)執行 RNA 萃取與製庫等前處理流程，提供研究人員基因定序服務。建議病理檢驗部可新增 Leukemia fusing gene 檢驗項目與 HLA typing 分子檢驗項目，提供更全面的分子檢驗服務。

關鍵字

白血病基因檢測、次世代基因定序、智能化醫學實驗室管理與進展

目次

一、目的.....	4
二、過程.....	4
三、心得及建議.....	16
附錄.....	17

一、目的

病理檢驗部發展智能化之醫學實驗室與精準檢驗醫學，順應現今智慧醫療、數位診斷與精準醫學的潮流，亟需更深入學習基因檢測技術與臨床檢驗新進展，以因應檢驗智能化、新興傳染病檢驗與精準健康檢驗需求。本次學習目標有下列幾項:

1. 傳染病基因檢測與白血病相關人類基因檢測
2. 次世代基因檢測技術
3. 智能化醫學實驗室管理與進展

二、過程

1. 第一週(9/26-10/2):筑波大學附屬醫院規定，COVID-19 疫情期間，前往該院見習人員於到達日本後第 7 天准許進入院區，並提供登機前 72 小時 PCR 檢測陰性報告。故本週待於住宿區(Ninomiya House)自主檢康管理，但日本厚生勞動省並未限制外出，故仍可自由行動。
2. 第二週(10/3-10/10):
 - (1) 筑波大學附屬醫院國際醫療中心(International Medical Center)人員先帶領見習人員(包括我、2 位泰國醫師與 1 位越南醫師)了解醫院設施、員工餐廳與位置。接著到 C 棟 3 樓臨床檢驗部(Clinical Laboratory Department)報到，臨床檢驗部主任 Dr. Yasushi Kawakami 先與我溝通見習內容，包括分子生物學醫學應用(分子病理檢驗、次世代基因檢測)與智能化臨床檢驗。Dr. Yasushi Kawakami 帶領我到相關科室並介紹科室主管，分子生物檢查室技師長 Dr. Nanmoku Toru、i-Laboratory (Tsukuba Medical Laboratory of Education and Research, TMER)理事長 Dr. Komotsu Kyouko。
 - (2) 10 月份我被安排在分子生物檢查室學習基因檢測的臨床應用，本周主要學習基本知識與實驗流程介紹。
 - (3) 基因檢測如何應用於疾病診斷(Genetic testing for Disease Diagnosis)主要分為 2 大方向
 - (a)人體內導致疾病發生的基因分析 Analysis of the gene responsible for disease
 - (b)病原體基因偵測 Genetic Detection of pathogen
 - (4) 基因檢測的種類(Types of genetic tests)包括 4 大類

(a) 感染性疾病(Infectious disease)診斷: 如肝炎病毒(Hepatitis virus)與結核桿菌(Tuberculosis)偵測。

(b) 造血器腫瘤(Hematopoietic tumor)診斷: 如白血病(Leukemia)分類與診斷。

(c) 癌症(Cancer)診斷: 肺癌(Lung cancer)、大腸癌(Colon cancer)、乳癌(Breast cancer)

(d) 遺傳性疾病(Hereditary disease): 鎌刀型紅血球症(Sickle cell disease)、唐氏症(Down's syndrome)

(5) 分子生物檢查室檢驗項目包含白血病分子診斷、免疫相關分子診斷、病原體分子診斷等 58 項，檢體類別包含，周邊血液(Peripheral Blood)、骨髓(Bone Marrow)、唾液(Saliva)、淋巴結(Lymph node)、皮膚切片(Skin biopsy)、周邊血幹細胞(Peripheral Blood Stem Cell)。

(6) 使用 PCR 分子生物學法偵測慢性骨髓性白血病的應用(Examples of genetic testing using a PCR method-CML)

(a) 日本臨床研究發現白血病患者有 57% 發生染色體異常，此異常原因為發生染色體轉位現象(Chromosome Translocation)，例如 CML 病人的白血病細胞含有第 9 號與第 22 號染色體轉位的費城染色體(Ph chromosome, t(9;22))，導致 2 個來自不同染色體的基因發生重組(Reconstruction)，而產生融合基因(Fusion gene)。如 Chromosome 9 ABL gene 與 chromosome 22 BCR gene 融合形成 BCR-ABL Fusion gene，此融合基因會轉譯出異常蛋白質而發生白血病。因此可以使用 PCR 法來偵測此融合基因，基因偵測法分為定性檢驗與定量檢驗 2 種。

(b) 檢驗流程主要有: 核酸萃取、核酸增幅、核酸分析、核酸解析 4 步驟。

3. 第三週(10/11-10/16):學習基因檢測定性檢驗(Qualitative Genetic Testing): 確認診斷白血病基因的存在。

(1) 核酸萃取(Nucleic acid extraction): 周邊血液或骨髓液加入溶血劑來破壞紅血球，經過離心步驟後，可以分離出白血球細胞，分別使用對應的 commercial kit 來抽取 RNA 或 DNA，筑波大學附設醫院臨床檢查部分生室使用 ISOGEN kit 來抽取 RNA，使用 DNA Extractor WB kit (Sodium iodine method) 來抽取 DNA。

(2) 配置 DNA 或 cDNA 濃度為 50 ng/uL

(a) 使用 NANO DROP 2000 測量 DNA 濃度(ug/uL)= OD 值(260 nm) *50/1000，加入適

- 當 RNase free H₂O 配置成 50 ng/uL。
- (b) 加入 21 uL RNase free H₂O 至 RNA 萃取物，使用 NANO DROP 2000 測量 RNA 濃度 (ug/uL)= OD 值(260 nm) *40/1000，並測量 A260 nm/A280 nm Ration，作為萃取品質指標，此 Ratio 需介於 1.7~1.9 之間。之後加入適當量體積的 RNA 萃取液至反應管，使反應管內有 1 ug RNA 來進行反轉錄作用為 cDNA，再加入適當 RNase free H₂O 配 cDNA 濃度為 50 ng/uL。
- (3) 核酸增幅(Nucleic acid amplification): 設計 2 個引子(Primers)分別可與 ABL gene 與 BCR gene 結合，利用 DNA Polymerase (Taq Enzyme)具抗高溫特性與複製 DNA 能力，在變性(Denature)、引子附著(Primer Anneal)、伸長(Elongation)等 3 步驟循環下，來增幅核酸，增幅倍數可達 10⁶ 倍。所以若檢體具有融合基因，經過 PCR 實驗後，將會有大量的增幅核酸出現，此結果可以利用下一個步驟電泳實驗來確認。
- (4) 電泳確認(Electrophoresis): PCR 增幅的核酸片段可經由電泳實驗來確認
配製 2.5%洋菜膠片(agarose gel)，PCR 產物、陽性品管檢體、陰性品管檢體分別加入染料(dye)後，連同 marker 分別 loading 至不同齒槽內，電氣泳動 40 分鐘。
配置 10% Ethidium Bromide(EtBr)染液，將完成電泳的膠片置入 EtBr 染液槽內染色 15 分鐘。
- (5) 核酸分析與解析: 已染色的膠片置於 UV 照射裝置中，若膠片內有 DNA，則 EtBr 將嵌入 DNA 雙股螺旋結構內，在 UV 光照射下，使 DNA 呈現出橘紅色螢光，DNA 片段的大小可以對應到 Marker 欄而得知(如 645 bp BCR-ABL gene)，檢體可與陽性品管檢體進行比對來判定是否具有融合基因。檢體若有融合基因，與 positive control 相同位置會顯現一條 band 的橘紅色螢光，即為陽性反應，進而幫助診斷是否為 CML。
此外，為了確保核酸萃取步驟的正確性，會使用 GAPDH gene 當作 internal control gene，即在 PCR 步驟時，另外使用 GAPDH gene primers 來擴增此 gene，並同時進行電泳、染色與核酸分析步驟，以確保融合基因來自於檢體的細胞。
- (6) Nest PCR 法 (槽式 PCR 法): 是一種傳統 PCR 法的改良版，目的是為了降低非特異性擴增產物，尤其是當進行的高 PCR cycle 數時更容易發生。做法是進行 2 次 PCR，使用不同的 primers，第一次 PCR 的 primers 增幅序列較長，有較高機率產生出非特異性擴增產

物，第二次 PCR 的 primers 增幅序列較短，且第一次 PCR 非特異性擴增產物不會有第二次 PCR primers 的配對序列，則第二次 PCR 增幅序列特異性可提高。

4. 第四週(10/17-10/23): 學習基因檢測定量檢驗(Quantitative Genetic Testing)

- (1) 復發的早期發現與治療效果的判定: 白血病人經過治療後，如化學療法 (Chemotherapy)，需進行治療效果的評估，最常測定體內殘留白血病細胞數(Leukemia cell number remaining in the body)。
- (2) 白血病細胞的檢查方法: 檢體為骨髓或血液
 - (a)顯微鏡檢查 Microscopic test
 - (b)染色體檢查 Chromosome banding
 - (c)原位螢光雜交法 FISH (Fluorescence in situ hybridization)
 - (d)基因檢測 Genetic testing
- (3) 白血病細胞檢測敏感度比較
 - (a)顯微鏡檢查與染色體檢查的敏感度是 1000 個正常細胞有一個白血病細胞。One leukemia cell in 1000 normal cells.
 - (b)FISH: 10000 個正常細胞有一個白血病細胞。One leukemia cell in 10000 normal cells.
 - (c)基因檢測 (PCR) Genetic testing: 1,000,000 個正常細胞有一個白血病細胞。對於最少殘留白血病細胞的檢測，以 PCR 法最為靈敏。
- (4) 檢驗流程為: 核酸萃取、核酸擴增、核酸分析、核酸解析 4 步驟。
 - (a) 核酸萃取與上周學習的步驟相同。
 - (b) 核酸擴增與分析: 使用定量 PCR (quantitative PCR, qPCR 或稱為即時聚合酶連鎖反應 Real-Time PCR)。
 - (c) qPCR 儀器在特殊的光學系統偵測下，配合原來的 thermo cycle (PCR cycle)和特別螢光物質，反應中產物量的變化得以被紀錄和分析，利用擴增曲線圖，即作出 PCR 產物量與 PCR cycle 數(Ct 值)圖，可觀察出 DNA 含量的高低，故具有將目標基因擴增與即時偵測螢光強度以定量目標基因的數量。
- (5) qPCR 與傳統 PCR 比較，具下列特徵
 - (a) 可以定量核酸數量。

(b) 因不須進行電泳步驟，可以快速得到報告。

(c) 較少的分析步驟可以減少污染機會。

(6) 檢測方法的種類

(a) 染料嵌入法(Intercalation method): 特殊螢光物質 SYBR Green I 可以結合到 PCR 產物雙股 DNA。此方法的特徵是方便、便宜。

(b) 螢光標幟探針法(Fluorescent-labeled Probe method): TaqMan Probe method，PCR 擴增時，除了加入 Primers 外，另外加入一條特異性的 TaqMan 螢光探針，其 5'端有螢光基團，3'端有淬滅基團(Quencher)，該探針可與模板特異性的結合，結合位點在兩條 primers 之間。當探針完整時，螢光基團和淬滅基團的距離很近，螢光基團發出的螢光訊號會被淬滅基團吸收，使儀器偵測不到螢光訊號。反之，當 DNA 聚合酶執行擴增步驟時，會破壞 TaqMan 螢光探針與模板的結合，並將此探針解離，此時螢光基團發出的螢光訊號不會被淬滅基團吸收，儀器因此偵測到螢光訊號。因只有目標基因的 PCR 產物才會與 TaqMan 螢光探針結合而被偵測到，所以此方法的特異性高，但操作時間較長。

(7) 定量分析種類

(a) 相對定量:對於同一種基因產物，兩個樣本具有不同 copy number 的 DNA，在相同的 PCR 反應下，較少的 PCR cycle 數目(Ct 值)即可擴增至設定的螢光閾值(Threshold)，表示來源 DNA 含有該基因數量較高。如用於比較正常細胞與癌細胞之間基因表現程度。

(b) 絕對定量:若使用已知 DNA 濃度標準品在即時聚合酶連鎖反應器執行 PCR cycle 數，以 DNA 量(Log 值)與 Ct 值建立檢量線，即可應用在絕對定量 DNA。如病毒或微生物的偵測，白血病殘留細胞的定量。

(8) 確認增幅曲線與檢量線

(a) 增幅曲線:需為指數型曲線，標準品曲線之間隔需恆定。

(b) 檢量線: 檢查檢量線斜率與線性(相關係數)。

5. 第五週(10/24-10/30): 本週學習 COVID-19 核酸檢查。

(1) 檢體類別

- (a) Nasopharyngeal swab or Sputum: 疑似確診病患、高危險族群進行手術前、小小孩
- (b) 唾液 Saliva: 一般民眾住院前檢查。

(2) 檢查流程: 檢體採集、檢體前處理、核酸萃取、核酸擴增、結果判讀。

- (a) 檢體前處理: 於 P3 實驗室執行, 檢體先使用乙醇擦拭外部, 雙人核對簽收編號, 取 1mL 唾液至 1mL 生理食鹽水, 離心後取上清液 200 uL 至含有 proteinase K 的緩衝液內, 加熱 56C, 8 分鐘去活化。
- (b) 核酸萃取: 使用 Promega Maxwell 自動萃取機進行 RNA 萃取, 之後萃取液加入 Albumin DNA 作為內品管液(Internal control material)。
- (c) 核酸擴增: 使用 Applied Biosystems Quant Studio 5 Dx 儀器, 利用即時聚合酶連鎖反應原理。

(3) 結果判讀: 依據下列判定原則, 品管液 Ct 值確認、二重複變異確認、增幅曲線圖形確認

(a) 測定系統確認:

- (i) 陰性品管液: 若呈現陽性報告, 重新檢驗。
- (ii) 陽性品管液 Ct 值與增幅曲線確認: 若不良, 重新檢驗。

(b) 檢體狀態確認

- (i) 若內品管液低度表現, 即 Ct 值過高, 表示 PCR 過程瑕疵, 重新檢驗。
- (ii) 若內品管液表現良好, 檢體陰性報告, 可直接發出。
- (iii) 若內品管液表現良好, 檢體陽性報告, 則再將原始檢體進行第二種方法檢驗, 如 GeneXpert 儀器。

6. 第六週(10/31-11/6): 本週在 i-Laboratory 見習, 學習自動化檢驗系統管理。

(1) I-Laboratory 介紹

- (a) 因筑波大學附設醫院臨床檢驗部的臨床生化檢驗、血清免疫檢驗與血液檢驗是外包給商業實驗室集團 LSI Medience 經營(Life Science Institute Medience), 此集團在日本有 1 個中央實驗室, 20 個衛星實驗室, 57 個 branch office, 在日本屬於第 3 大商業檢驗集團, 除了臨床檢驗外, 尚有食品檢驗、運動員禁藥檢驗, 涵蓋範圍非常廣, 甚至還有生產檢驗儀器。
- (b) i-Laboratory 建立於 2010 年, 是屬於 LSI Medience 在筑波市的衛星實驗室, 負責茨

城縣的檢驗需求，檢體來源除了筑波大學附屬醫院外(約佔 72,6%)，還包括周邊醫院與診所(約佔 27.4%)。i-Laboratory 人員非醫院編制內人員，醫檢師人數約 30 位，24 小時運作，若有特殊檢驗項目，會送至東京的中央實驗室。i-Lab 也做少部分的 NGS，有 Illumina NextSeq 550 儀器，主要是研究用。另有提供 ISO 15189 認證諮詢，實驗室主管內藤麻美(Naito Asami)也是日本適合性認定協會 (The Japan Accreditation Board for conformity Assessment, JAB) 評審委員。

(c) 實驗室理事長小松京子(Komatsu Kyouko)醫學博士，在日本檢驗界舉足輕重，多次受邀到台灣演講，今年韓國 IFBLS (The International Federation of Biomedical Laboratory Science)也受邀去演講「New normal, New Lab」。

(d) 實驗室主管是另一位內藤麻美(Naito Asami)，我的見習內容是由她安排，除了與實驗室課長討論實驗流程、品管、認證事務外，也安排參觀 Abbott Japan 公司。

(e) 實驗室 TLA (Total Laboratory Automation)系統是 Hitachi 公司系統，於 2016 年建置，但屬舊款，離心機與檢體儲存冰箱是使用離線方式，軌道系統接 2 套生化機(共 4 模組)(LaboSPECT 008)，4 台免疫機，另外還有 4 台免疫機是單機操作，儀器非常多，是集團以租賃方式建置。

(f) i-Lab 也做少部分的 NGS，有 Illumina NextSeq 500 儀器，主要是研究用。

(2) 我也分享了我們的 TLA 建置過程，包括與 Beckman Coulter 合作的 Workflow Analysis，科內進行的 QCC 過程。

(3) 11/6 與分生室技術長南木融(Dr. Nanmoku Toru)、醫檢師山崎慎介(Yamazaki Shinsuke)、i-Lab QC manager 永井友和(Nagai Tomokazu)一起參加於水戶市(Mito)舉行的茨城縣臨床檢查技師學會年會。

7. 第七週(11/7-11/13):本週在 i-Laboratory 見習檢驗品質管理系統。

(1) 外部精度調查與改善紀錄: 由 Nagai 品管課長與我討論能力試驗執行方式與結果分析。日本有許多能力試驗機構，包括臨床衛生檢查技師會(Japanese Association of Medical Technologists : JAMT)、日本醫師會(The Japan Medical Association)、日本衛生檢查所協會(The Japan Association of Health Inspection Stations)，此外試劑供應商亦提供實驗室間比對的資料。能力試驗檢體支數 2 支，結果評估等級分 ABC 三級，JAMT

分級標準: A 級為 $\text{standard} \pm 15\%$, B 級為 $\text{standard} \pm 20\%$, 其餘評定為 C 級。其餘能力試驗機構評級標準為 A 級為 $<\pm 1\text{SDI}$ 、B 級為 $1\text{SDI} <X> 2\text{SDI}$ 、C 級為 $>2\text{SDI}$ 。若 i-Lab 能力試驗結果為 C 級, 則需作改善紀錄回覆給 JAMT 與東京總部。

- (2) 決策支援系統 Decision Support System (DSS): 利用臨床疾病診斷指引與整合檢驗報告資訊, 設計邏輯與反射檢驗(algorithms and reflex testing)程式, 提升檢驗醫囑適當性, 輔助醫師臨床診斷。
- (3) Data Management: i-Laboratory 擁有自己的機房, 管理實驗室資訊系統與資料儲存, 並與醫院資訊系統連結, 使用 ISMS (Information Security Management System) Methodology 來管理數據, 確保資訊安全, 包含下列 CIA 元素
 - (a) 機密性(Confidentiality): 只有經授權者才可使用資料
 - (b) 完整性(Integrity): 保持資料安全性
 - (c) 可用性(Availability): 確保被授權者可以取得想要的資訊檢驗大數據亦提供臨床研究。整個資訊管理系統通過 ISO/IEC27001 驗證。
- (4) 檢體運送時間討論: 品管課長 Nagai 分享他的一篇文章, Transportation time of inpatient specimen to the Laboratory and its effect on test results, 討論血液採集後到實驗室接收時間與檢驗報告的影響, 結果顯示為離心檢體的 Glucose、hANP、IP 等項目檢驗報告會隨時間增加而下降, K 檢驗報告會隨時間增加而增加, 筑波大學附設醫院病房檢體, 採檢至 i-Lab 平均時間為 91 分鐘, 我建議應加入量測不確定度概念, 比較檢體數據變異與儀器變異, 並設定實驗室允收時間, 回饋給病房單位, 持續改善採檢至實驗室簽收時效。
- (5) 委託檢體管理: i-Laboratory 亦承接筑波市週邊區域醫院與診所的檢驗作業, 檢體運送由 LSI Medience 收檢團隊執行, 每日 18:30 會送到實驗室, 檢驗單使用 QR code 或畫卡(使用光學讀卡機讀取檢驗資訊), 尚未建立雲端檢驗系統供使用者操作。實驗室內部流程有雙人核對、簽收、貼條碼、執行檢驗, 常規檢驗項目時效為當日小夜班或大夜班完成, 特殊檢驗項目則再後送至東京中央實驗室執行檢驗。而在筑波市有一個檢體處理中心 (Service Center), 負責處理茨城縣所有後送至東京中央實驗室的檢體, 收檢團隊也是約 18:00-19:00 會送回檢體, 經過整理、點收後, 於 22:00 後送至東京中央實驗室。

8. 第八週(11/14-11/20): 本週學習主題: New approach, and new normal for current laboratory。

- (1) LSI Medience 透過 i-Laboratory 與 TMER (Tsukuba Medical Laboratory of Education and Research)與筑波大學建立長久的產學合作關係，推動檢驗醫學教育與研究。
- (2) TMER (Tsukuba Medical Laboratory of Education and Research) 是一非營利組織，負責檢驗醫學與醫療專業人員訓練。建立生物檢體資料庫，供研究學者與機構使用，並促進筑波大學附屬醫院與日本國內及海外研究機構進行研究計畫合作，並將研究成果應用於臨床檢驗與治療。
- (3) 從 2011 年起，TMER 與 IFBLS (The International Federation of Biomedical Laboratory Science)合作進行 Foreign Trainee Invitation Program，接受來自許多國家的醫檢師進行醫學檢驗訓練，目標是提升受訓者國家醫療照護水準，並建立雙方友好關係。截至 2022 年，已接受訓練來自 12 個國家 13 位受訓者，於 2011 年與 2019 年分別有一位台灣醫檢師來此接受生理學檢查與細胞學檢驗訓練。
- (4) 本周適逢一位來自菲律賓醫檢師 Leila 接受血液學檢驗訓練(Education Program of TMER 2022 (Hematology))，我的訓練內容也就與她一起執行。
- (5) 學習白血病細胞顯微鏡檢查，邀請東京大學醫學部附屬醫院 Jona Masahiro 博士授課與顯微鏡教學。並至筑波大學附屬醫院病房與門診見習骨髓採集流程，至臨床檢查部見習骨髓抹片製作與染色，使用 May-Grunwald's Stain 與 Giemsa's stain。
- (6) 參觀氫燃料巴士(Hydrogen fuel cell buses)
日本經歷過 2011 年大海嘯災難與 2019 年 COVID-19 疫情肆虐後，認知受災地區災害預防管理與支持的重要性，因此政府為因應災害預防與控制感染性疾病，推行 Strategic Innovation Promotion Program 計畫，結合筑波大學、筑波市與 Toyota 汽車公司，開發氫燃料巴士(Hydrogen fuel cell buses)，車體內部改裝為 COVID-19 核酸檢測實驗室，有自動化核酸萃取機與核酸分析儀，符合 P2 實驗室規格，電力供應使用巴士的氫燃料，經過測試可持續供電給實驗室使用一周，示範實驗室由 i-Laboratory 人員執行 COVID-19 核酸檢測，此氫燃料巴士在疫情期間會至偏鄉地區，定點為疑似確診者居民執行 COVID-19 核酸檢測。此外，當災區收容所需要電力時，此氫燃料巴士亦可提供臨時電力供應功能。
- (7) 參觀筑波大學創新醫療研究機構(Innovative Medical Research Institute)

TMER 的 Komatsu 理事長安排參訪位於筑波大學創新醫療研究機構的 Robotic Biological Institute Inc.，該機構自行研發檢驗前處理機器人，目前執行次世代基因定序前處理，包括核酸萃取與建庫(Library Preparation)，整個前處理過程在密閉的無塵室執行，無塵室內亦配置 PCR 機器，從試劑的配置與檢體的添加，完全是自動化的控制並精準的執行每個實驗步驟至實驗完成。目前配置 4 台機器人，除執行筑波大學研究室委託處理的研究檢體外，亦接受外部機構委託檢體。

9. 第九週(11/21-11/27): 緩衝週，自我學習，參加一場線上數位化核酸定量技術介紹，準備報告資料。

(1) Digital PCR: 為第三代的 PCR 系統，是一種基於 PCR 反應(DNA 聚合酶鏈鎖反應)的單分子絕對定量技術。主要是利用卜瓦松分布(poisson distribution)原理來進行稀釋樣本數，將樣本分配在上千或上萬個微小反應孔中，進行螢光偵測，來達到絕對定量目的。Digital PCR 在應用上比傳統 PCR 及 qPCR 來說具有多項優點，如高精準度，為絕對定量的系統、無需製作標準曲線、再現性高、對於 PCR 抑制物耐受性高。利用不同螢光標定之引子來辨識目標序列，系統可偵測 5 種螢光，可應用於不同領域之研究，如白血病融合基因檢測、Rare mutation, Copy number variation, Gene expression，可於 2 個小時內完成檢測。

10. 第十週(11/28-12/4): 開始學習次世代基因定序。

(1) 在村谷匡史教授(Masafumi Muratani, Ph.D.)實驗室學習，他是筑波大學醫學醫療系生命醫科學域基因生物學教授，他的專長是利用筑波科學城市這個資源豐富的環境，開發獨特而有趣的研究項目。由 i-Laboratory 石橋紀世課長帶領實驗操作。

(2) RNA 純化: 組織均勻化，送到實驗室的組織浸泡在 RNA later(QIAGEN)溶液內，將組織轉移至 1 mL Trizol 溶液內(使用 RNA free 的 eppendorf)，並使用電動攪拌機將組織絞碎，4 度 C 冰存備用。

(3) RNA 萃取: 使用筑波大學 Robotic Biological Institute 研發之機器人(Maholo)執行 RNA 萃取步驟，使用 New England BioLab 公司萃取試劑。

(4) RNA QC: 使用 Nanodrop 儀器測定 RNA 濃度，再使用 Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Pico kit 來分析 RNA 品質。

(5) MiSeq 儀器清洗: 每 30 天需清洗一次。準備 Tween 20 與二次蒸餾水, 先配置 10% Stock Solution, 再稀釋為 0.5% 的 working solution, 依照原廠步驟清洗 3 次。

11. 第十一週(12/5-12/11):本週學習 NGS 前處理實驗流程, 實驗室使用 QIAGEN 公司試劑, 執行 Human Comprehensive Cancer panel 檢驗, 包含下列步驟。

- (1) Fragmentation, end-repair and A-addition: 使用酵素, 隨機切斷基因為 200-400 base pairs 長度的片段。
- (2) Adapter ligation: 使用 DNA ligase 在 DNA 片段的 5'端加入 adapter 序列, 此序列用於 NGS 定序時辨識用, 包含 UMIs (unique molecular indices)和 sample index。
- (3) Cleanup of adapter-ligated DNA: 使用磁珠(Magnetic beads)與 80% ethanol 來執行清洗步驟。
- (4) Target enrichment: 使用 DNA 聚合酶將含有 adapter 的 Target DNA 擴增 2 倍。
- (5) Cleanup of target enrichment: 使用磁珠(Magnetic beads)與 80% ethanol 來執行清洗步驟。
- (6) Real-time PCR for checking target enrichment: 定量 Target DNA 的濃度, 用以決定製備 DNA Library 時 PCR 步驟的 cycle 數。
- (7) Universal PCR: 使用 PCR 原理, 執行適當的 cycle 數來製備 DNA Library。
- (8) Cleanup of Universal PCR: 依 QIAGEN 公司試劑說明書操作。
- (9) Library QC: 使用 Agilent D1000 ScreenTape System 作 Library QC, 此系統可以分析 35-1000 bp 分子大小的 DNA, 分析原理為電泳法。

12. 第十二週(12/12-12/18):本週學習基因定序步驟

- (1) Illumina Mi Seq:利用 Clonal Single Molecule Array (CSMA)與 Reversible Terminator 技術, 在此機器上進行 cluster generation、sequencing 及 data analysis, 並可在此平台上進行樣品定序與分析, 可選擇性傳送資料至雲端伺服器做數據備份及分享。最大通量為 56 小時產生 15Gb 的序列資訊, 每條序列讀長為 300 個鹼基對。可應用於目標區域定序(targeted region sequencing), MiSeqDx 已獲得美國食品藥物管理局(US Food and Drug Administration, FDA) 認可為檢測囊性纖維化(Cystic Fibrosis)相關基因變異的體外診斷(In Vitro Diadnosis, IVD)儀器。

(2) Illumina Next Seq 500

(3) Data analysis: 轉檔方式: BCL→FASTQ: 每個檢體會有 8 片段序列資料，包含 Forward 4 片段、Reverse 4 片段→執行 concatenate: 每個檢體序列連接為 2 片段→ 將資料輸入 CLC workbench 進行拼裝整合，產生出 Read.bam 檔 →再轉成 Bedgraph → 資料輸入 UCSC(University of California Santa Cruz)網站進行序列比對，此資料庫提供人類與老鼠全基因體資料。

13. 第十三週(12/19-12/25):本週整理 NGS 學習報告與辦理離院手續。

高通量定序技術於臨床分子檢驗的應用

- (1) 癌症相關基因檢測: 針對癌症挑選數個到數百個可能的致癌基因獲益癌基因，以目標區域定序方式找出在這些基因上發生的變異，這些變異可以作為癌症分類、惡化程度、預後評估、決定治療方式與標靶藥物使用等用途。液態切片(liquid biopsy)是以血液等體液為檢體，偵測其中的癌細胞或是游離的癌細胞基因片段，藉此檢測癌症存在、了解癌組織的基因型，以評估治療手段與作為預後指標。
- (2) 遺傳疾病檢測: 遺傳疾病的成因有些是單一基因的缺陷，有些是粒線體的基因變異，藉著 NGS 的高通量與高準確性，可以快速的定序出整個基因序列並且鑑定出疾病相關基因的變異，加速診斷遺傳疾病的效率。
- (3) 產前診斷: 可利用 NGS 來測定胎兒的染色體異常，尤其是非等倍體疾病(aneuploidy)，如唐氏症的第 21 號染色體三體(trisomy)。只需抽取母親血液，檢測內含胎兒的 DNA，是一種非侵入性產前診斷(non-invasive prenatal testing, NIPT)，與傳統採集胎兒羊水比較，風險較低，已逐漸普及。
- (4) 人類白血球抗原分型(Human Leukocyte Antigen, HLA): HLA 為人類體細胞的表面抗原，每個人都具有獨特的 HLA 型別組合，可作為生物標誌。HLA 包含多個基因，每個基因長度很長且變異很大，傳統的方法僅能作大略分型，利用 NGS 可以對 HLA 作準確的分型，並且可同時解讀 HLA-A、B、C、DRB1、DPB 等多個 HLA 位點。
- (5) 免疫組譜(Immune Repertoire): 指免疫細胞中 T 細胞受體(T-cell receptor, TCRs)與 B 細胞受體(B-cell receptors, BCRs)的組成。在特定病原體或抗原的刺激下，特定 T 細胞與 B 細胞會大量增殖，導致整體的免疫組譜改變。因此藉由分析免疫組譜的變化，能找出辨識

病原體或特定抗原的免疫細胞。如分析感染 COVID-19 病人的免疫組譜，可以找到產生對抗 SARS-CoV-2 中和抗體的 B 細胞和有效辨識 SARS-CoV-2 的毒殺性 T 細胞，這些資訊為 COVID-19 提供可能的治療與研究方向，顯示將免疫組譜分析應用於新興傳染病的研究具有相當的潛力。

- (6) 臨床微生物檢測: 可應用於鑑定未知病原體、檢測抗藥性病源株以及宏觀基因體研究。利用 NGS 分析未知病原體的病患檢體，經過序列比對、組裝與鹽化圖譜分析，可以協助鑑定出病原體與推測其傳播途徑，或是檢測出病原族群中少量的抗藥性病原株，這些資訊有助於預防疫情爆發與設定治療方針。

(參考資料來源:醫學分子檢驗第六版、五南圖書出版公司)

三、心得及建議

1. 心得:感謝院部長官、部主任與科主任的支持，讓我有機會可以前往日本學習基因檢測技術與見習檢驗新發展。筑波大學附屬醫院總床數 800 床，平均每日門診病人數 1667 人，全職員工數 1964 人，醫院規模雖不及本院，但除了臨床服務外，因與筑波大學結合，研究資源豐沛，研究能量強大，加上接受許多國際研究學者進駐與臨床醫療人員見習，整體醫院國際化程度頗高，著重在教學與研究方面，這與我在台灣職場的感受差異很大。在見習期間，除了學習豐富的專業技能與知識外，我也觀察到日本醫檢師工作態度非常認真，「一生懸命」的把檢驗工作做好，同時享受戶外生活與熱愛運動，這是值得我們學習。

2. 建議

- (1) 本部正值建置 NGS 實驗室，見習後發現尚缺乏許多設備，如 PCR machine、real-time PCR、Nanodrop 核酸定量儀等，及缺乏有許多小儀器，如振盪器、小烏龜離心機，因分子病理科已自行執行多項分子檢驗項目，若能將 NGS 實驗室與分子病理實驗室整合，將可加快建置速度與節省成本投資。
- (2) 配合 NGS 實驗室建置，分子病理檢驗可新增 Leukemia fusing gene 檢驗項目與 HLA typing 分子檢驗項目，提供更全面的分子檢驗服務。
- (3) 本部完成智能化門診檢驗系統與全自動生化免疫軌道檢驗系統(Total Laboratory Automation, TLA)，堪稱具備先進臨床檢驗設備與技術，除醫技系實習生教學外，可接

受國內外醫檢師臨床技能教育與訓練，有助於激發本部臨床醫檢師思維與增加國際視野，並可與國內外醫檢師建立友好關係與交流。

附錄

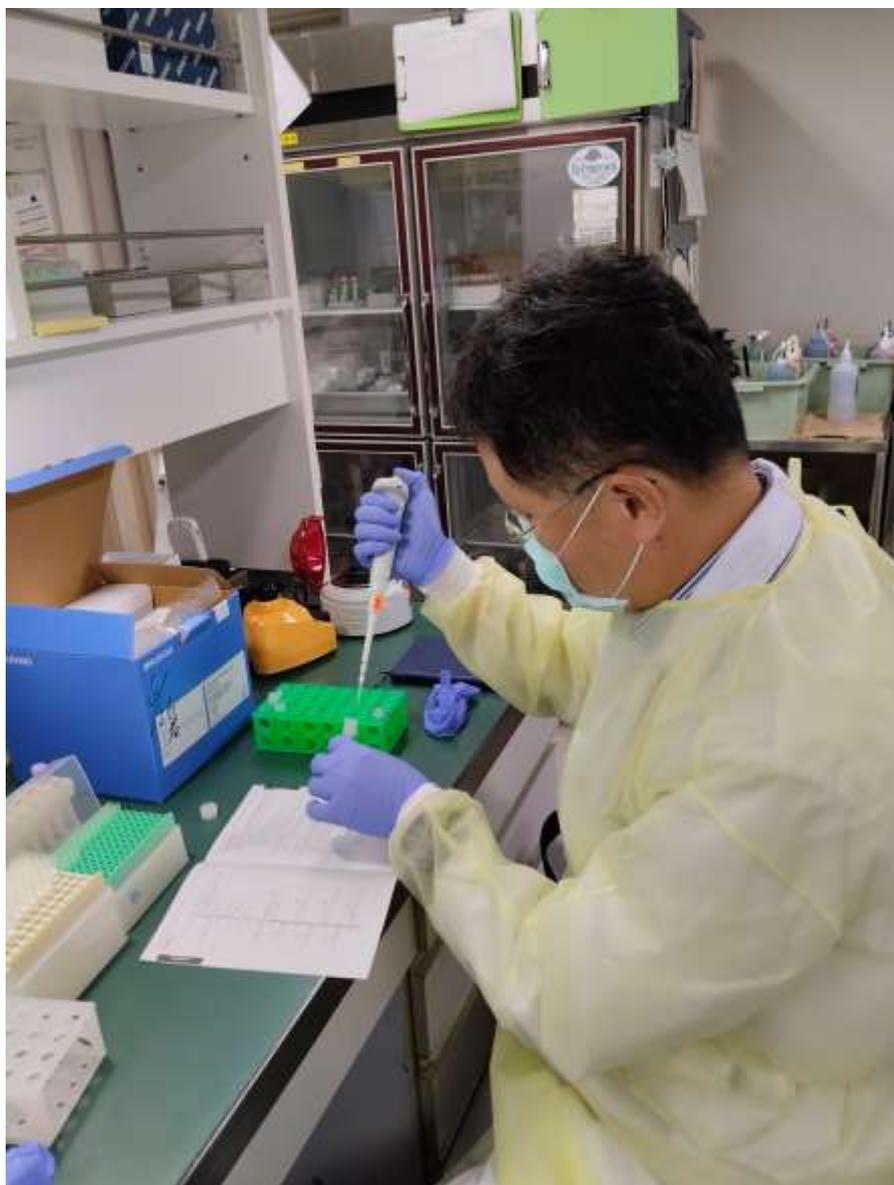


圖 1:操作 RNA 萃取實驗



圖 2:操作核酸電泳實驗



圖 3:參加茨城縣臨床検査學會年會



圖 4: 拜會筑波大學附屬醫院院長 HARA Akira 教授



圖 4: 與 Mutarani 教授 NGS 實驗室課長、醫檢師合影



圖 4: 結訓時與臨床檢查部主任 Kawakami 教授及 i-Lab 主管合影