

「臨床次世代定序實務與應用概論」暑期課程與臺大醫院實習之 2022 下半年心得分享

醫技系四年級 李政德同學

美國太空人阿姆斯壯踏上月球時說：「這是我的一小步，卻是人類的一大步。」太空科技的進步、火箭的發明使人類踏出從星球文明邁向星際文明的第一步。在分子生物學當中，次世代定序成為基因體學中的「火箭」，成為研究基因的強力工具。

時光回溯至大三上學期末，郭靜穎老師藉下課之際，推廣臨床次世代定序(Next Generation Sequencing)暑期課程。在大三的課程當中，郭老師與蘇剛毅老師將次世代定序納入課程當中，從核酸萃取、樣本庫製備、核酸擴增與定序、資料處理、分析，都有非常詳細地介紹。靜穎老師是這次課程的主要推手，與蘇老師都是精通於分子基因領域的教授，上課風格廣受同學們好評，對老師的印象相當深刻、課程品質有保證，激起我對報名課程的興趣。而且過去次世代定序課程僅止於理論介紹，礙於經費、時間與設備要求，並沒有囊括在學期的實驗課程當中，這次暑期課程可以補足這份缺憾，提供一個課程外的絕佳機會進行實際上機操作。爾後與郭老師的一次會談，更讓我決定按下了申請報名的按鍵。

次世代定序在核酸擴增的技術基礎上，根據產牌使用的技術不同，同時對海量的擴增產物進行定序，例如 Illumina 在晶片的 flow cell 固態表面上使樣本進行橋式放大，形成叢聚，再注入標記不同螢光的四種去氧核糖核苷酸(dNTP)，每次 dNTP 接上正在合成的 DNA 序列就會發出螢光，一連串的螢光訊號再被轉化、解讀成序列。本次的核酸抽取使用磁珠系統，與過去使用過的管柱(column)法比較，抽出來的核酸純度與濃度都不錯，感覺比較好用，不過也不能排除剛好是這次抽得比較好，DNA 萃取方法的採用因個人經驗與實驗室習慣而異。感謝郭老師提供這堂課的機會讓我們看到並實際運作 NGS 機台，非常新奇的經驗！這次使用的機型是 Illumina iSeq，機台外觀是全白色的、簡潔有力、有專業感，介面也淺顯易懂、易於操作，將要定序的核酸一起加入反應盒上的樣品裝載井後就可以直接上機、非常方便，一個反應盒的通量是固定的，這次的總樣本量大概只有最高接受量的一半，成本上比較高，但每個樣本的資料量更多，或許對後續的分析有幫助。本文純屬使用心得分享、並無接受任何業配。反應結束後就是次世代定序的重點，資料處理、分析，「去邊」、前處理掉太短、品質差的序列後，進行序列比對(sequence alignment)，再進行鹼基辨認(base calling)、變異辨認(variant calling)。辨認出變異後，再根據資料庫進行變異註解(variant annotation)、變異篩選(variant curation)。

這次分析的經驗告訴我一件很重要的事，該換一台電腦了！我使用的是基本配備 Macbook air 2018，原本是打算作為文書機，因此在性能上並無特別要求，不意外地在進行分析時相當慢，而且運作時機體非常燙，代表他很努力地用有限的「腦容量」在「算數」，所幸最後有成功地跑完所有的資料、得到結果。這次實驗主要檢驗是否有地中海型貧血，就過程而

言，核酸萃取與定序品質都相當好， $260/230=1.95$ ， $260/280=1.8$ ，序列 coverage 相當完整，而分析出來的結果，很幸運地都沒有致病性(pathogenic, likely pathogenic variant)變異，大多都是良性變異(benign variant)，部分是不確定意義的變異(variant of unknown significance, VUS)，有待未來研究商榷。次世代定序是基因分析宇宙中的「火箭」，還是容量超大、偵測器超敏感的「火箭」，是個具備高通量 (high throughput)、高敏感度、高效率的基因分析工具，大範圍的掃描特性讓次世代定序可以檢測出多基因疾病、較大的基因，這些疾病與基因變異就像天空中的有系統的星圖一樣，因為高敏感度，等位基因頻率(allele frequency)較低的變異也可以被偵測到，像銀河中的黑洞，或許我們可以期待基因科學家們如何駕駛這台火箭，找出銀河中的星圖、黑洞，持續為人類找出各式各樣的疾病與基因表徵背後的神祕軌跡。

結束收穫良多的次世代定序課程後，大概準備要實習了。很期待也有點忐忑，在接受一年多的臨床課程後，終於要進入下一階段，也就是真正的臨床領域。因為是從學術體系進入到醫療體系，恰逢疫情期間，醫療體系規定相當繁瑣、複雜，要健檢、補打疫苗，來來去去很麻煩，補打 B 肝與水痘疫苗就跑好幾次醫院，但這些規定也無可厚非，背後都有其道理，醫療體系攸關病人健康，疫苗規定也是為醫療人員著想。實習前有授袍典禮，象徵我們願意為醫療體系付出並恪守相關道德規範，幫我授袍的是醫學院的倪院長，無比榮幸，值得驕傲一生。

實習第一站是鏡檢組，鏡檢主要項目有糞便、尿液、體液檢查，糞便因為在通風櫃操作，加上戴著口罩，並沒有想像中很重的味道，學姊動作

非常俐落，處理檢體都很快，主要學習如何稀釋、製作良好的糞檢片。尿液部分為半自動化，檢查是否有顏色過濃的尿液會導致吸光值判讀偏差，進行稀釋上機即可，尿檢片則需使用十倍濃縮的尿沉渣。體液檢查使用流式細胞儀分析細胞組成為主。品妃組長負責基礎知識教學，學姊很和善，不時會關心我們實習的狀況。

生理組主要是心肺功能，感謝李任光醫師提供寶貴的機會，讓我們在監控室見習心導管手術的進行。這一站對我來說最不上手的，大概就是心電圖的判讀，心電圖室的學姊有耐心地教學、指導，在學習上有很大的進展，心懷感恩。

再來是歷時最久的細菌組，分為一般、血液、厭氧、黴菌四個培養站，血液站的晨青學姊令我印象最深刻，對於同學們的提問都很熱心回答，即使我不斷地問問題、叨擾學姊，學姊都不厭其煩地仔細回答，因為來到細菌室有太多新知識，針對一些鑑定 SOP、判斷依據、指標必須多加確認，學姊在這部份幫了極大的忙，非常感謝。在血液培養站最有記憶點的是血瓶與血瓶培養機，以前從來沒看過類似的培養機台，感到新奇，而血瓶裡的血量之大總會引發我的惻隱之心，生病還要抽那麼多血，應該蠻不舒服的吧？雖然是為了病情分析的必要採檢，難免會不捨。因為細菌生長的关系，部分同學覺得細菌室有股臭味，黴菌室因為有厭氧菌培養箱，更是如此。黴菌室真的很臭，毋庸置疑，但我反而奇妙地喜歡細菌室的味道。或許是因為我喜歡嗜麥芽寡糖單胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)所散發的氣味，有股淡草莓香，自大三下的細菌實驗，我負責培養這株菌

時便是如此，細菌室常常分離出此種菌株。不過氣味是非常主觀的，或許是我比較幸運，不會感到反感。

離開細菌室來到分子檢驗部分，業務包含人類白血球組織抗原分型 (HLA-typing) 跟癌症相關等基因檢測，HLA-typing 關乎器官移植合適度，甚至與藥物過敏有關係，例如帶有 HLA 58:01 的人會對抑制尿酸合成的藥物 allopurinol 過敏，服用會產生嚴重的史蒂芬強生症候群 (Steven-Johnson disease)。

經過在分子檢驗的短暫的一週，我們來到了血液站，主要分為全血計數站、血液腫瘤站與血液凝固站。由於組別安排先來到血液腫瘤站，在這邊學習到各種的白血病，看到各式白血病的血液抹片，爺爺過去就是因為急性白血病而離世，在這站感觸特別深，看到異常抹片時都會在心中祈福病患身體健康。緊接著是血液凝固站，賓賓學姊很活潑，等待實驗結果的時候，如果沒有課程，會跟同學打趣，讓學習氣氛輕鬆一下。論到血凝知識，進裕學長非常厲害，上課常常丟給學生值得思考的問題，或是不論學生問任何問題，往往能立馬回答，反應很迅速。最後一站來到全血計數站，是對血液相態進行的常規檢查，能提供醫師血液的組成狀況以利診斷。

短暫休息一週的期間，回了一趟台南拜訪外公、外婆，看見他們平安健康是做孫子的我最開心的事。經過抽血一週之後來到病毒室，這邊由於疫情的關係，似乎變得特別忙碌，學長姐們百忙之餘仍要抽空指導我們，實在非常感謝也很不好意思麻煩學長姊。富強學長是我看過知識最淵博的人之一，傳遞給我們很多關於病毒檢驗的經驗與思考模式，教學課程內容

豐富還有很多值得一讀的課外補充資料。在病毒室的兩週是實習到目前為止雖然最累但也最充實的一站，學到很多病毒培養、鑑定的技巧，值得未來好好回味，實習所學皆是準備國考、或是成為一位優秀醫檢師的最佳養分。