

# 您不能不知道的「次世代基因定序」

乳房外科

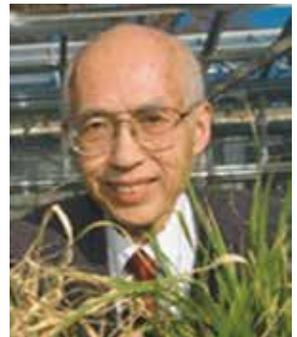
張金堅 教授

## 前言

2023年7月29日健保署宣布，將於2024年第二季把次世代基因定序納入健保，到底次世代基因定序是什麼？大家都仍然不甚明瞭；有次世代，那麼第一代是什麼？有沒有第三代？也是大家心中的謎團，次世代基因定序在醫療領域有什麼用處？大家也是似懂非懂，本文將就基因定序的涵義及其在醫療領域上扮演的角色，做一綜合性的探討與分析，並與讀者分享！

## 基因定序的緣起

美國華裔分子生物學家吳瑞(圖一)，(1928年生於北京，1982年當選中研院院士，2003年當選美國國家科學院院士)，與他的實驗室團隊在1970年於康乃爾大學發展出以互補序列引子(primer)搭配帶有放射標記之核苷酸(nucleotide)的DNA定序技術，並成功驗證這項技術可用於定序在任何DNA序列。七年後，英國分子生物學家Fred Sanger(圖二)發展出更快速的定序方式，因此於1980年二度獲得諾貝爾化學獎(他亦於1958年獲得諾貝爾化學獎)，在1980年代前後，Sanger定序變成主流趨勢，其定序採用會終止互補序列合成過程的核苷酸，因此在定序過程會產生許多長度不一的DNA片段。若將這些特殊核苷酸加上分別對應的A、T、C、G核苷酸的螢光標記，則將所有定序過程中產生的DNA片段依長度進行排序，再用光感應技術偵測各片段末段所顯示的螢光，就能快速讀出整段DNA序列。也因此，Applies Biosystems(ABT)公司於1987年推出了全世界第一台全自動定序儀，而美國國家衛生研究院(NIH)也隨即在1990年正式啟動人類基因體定序計劃(HGP)，2003年人體基因體定序的確認序列被發現，前後共費時13年，但Sanger定序畢竟還是耗時耗錢，因此才有次世代定序的崛起，所謂次世代定序英文叫Next Generation Sequencing，簡稱NGS。



圖一 美國華裔分子生物學家吳瑞



圖二 英國分子生物學家  
Fred Sanger

## 什麼是次世代基因定 (NGS) ?

次世代基因定序 (NGS) 技術，均採大量並聯作業，因此須將整理 DNA 序列或基因體碎裂為許多小片段，再將這些片段進行 PCR 放大，然後以 Sanger 定序或更新的技术進行定序，最後再用強大的電腦將各片段的定序結果依其重疊序列進行整合，組成完整的序列。

目前 NGS 常用的技術共有五種技術 (包括 SOLiD 定序技術、454 pyro 定序、Dye 定序、Combinatorial probe anchor synthesis(cPAS) 及 IonTorrent semiconductor sequencing )，因牽涉到較艱深學理，不擬在此贅述。隨著次世代基因定序技術的問世，大幅縮短了相關研究的解序時間，同時拓展了基因體研究的深度及廣度，目前

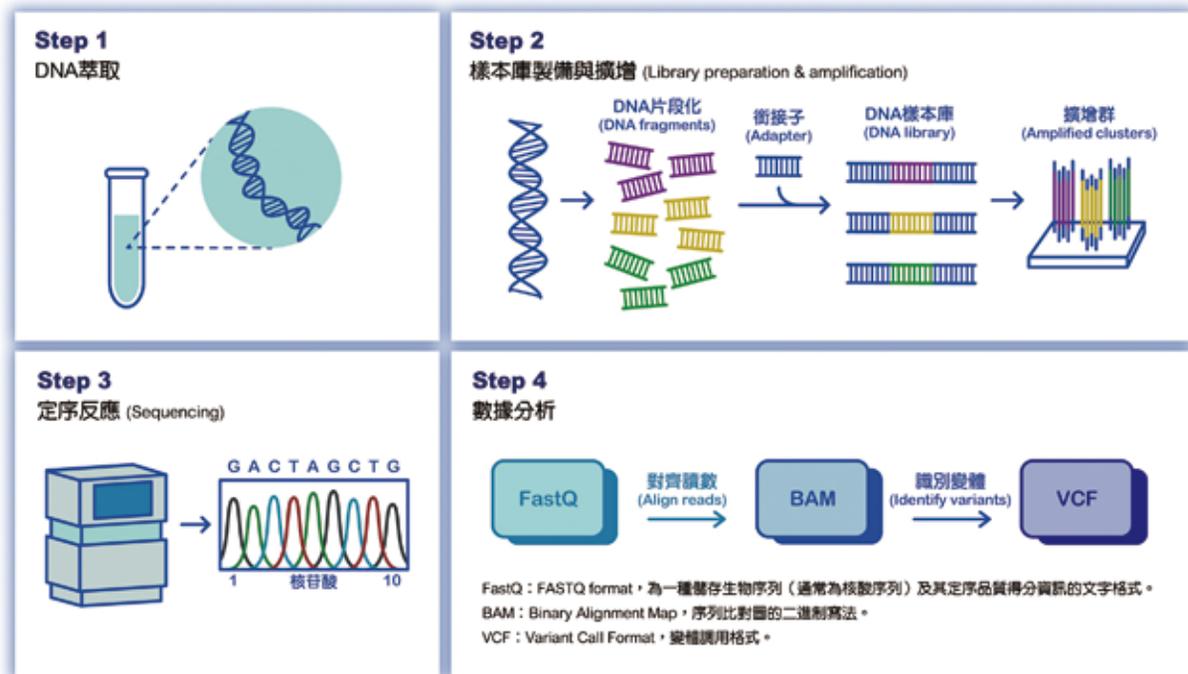
已有儀器與試劑通過美國 FDA 驗證，已廣泛應用，主要以遺傳性疾病、生殖醫學及癌症醫學發展最為快速。

至於次世代基因定序的技術基本原理及操作流程，大約分為樣本庫製備 (library preparation)、樣本庫擴增 (library amplification)、定序反應 (sequencing reaction) 及數據分析 (data analysis) 等四步驟，分述如下：(如圖三)

### 1. 樣本庫製備 (library preparation)

將待測之樣品經核酸萃取後，利用物理性的方法 (如超音波震盪法) 或酵素裁切等方式，將基因序列進行核酸片斷化 (fragmentation)，再將其末端接上銜接子 (adaptor)，以作為樣品庫。

圖三：次世代定序原理及技術



## 2. 樣本庫擴增 (library amplification)

藉由基因片段上的銜接子會與微磁珠 (micro-beads) 或晶片上的互補序列相結合，而固定於固相介質上，進行乳化聚合酶鏈鎖反應 (emulsion PCR) 或橋式聚合酶鏈鎖反應 (bridge PCR)。

## 3. 定序反應 (sequencing reaction)

次世代定序法依不同的定序平台，而有不同的定序原理。如 Roche 454 定序平台是透過焦磷酸定序法 (pyrosequencing) 來定序的，過程中依序置入帶有 4 個不同鹼基的去氧核苷酸，當核酸聚合酶將去氧核苷酸接合時，釋出焦磷酸根離子 (pyrophosphate)，釋出的焦磷酸根因 ATP 硫酸酶 (ATP sulfurylase) 轉換產生 ATP，再藉由冷光酶 (luciferase) 接收 ATP 能量將冷光素 (luciferin) 進行氧化，最後由感測器測得訊號，透過反覆的試劑置換與偵測，得到大量定序的結果。

## 4. 數據分析 (data analysis)

將定序後的大量資訊與現有的資料庫進行比對 (mapping) 及計數 (counting) 分析，設法還原原始待測基因片段序列。

## 次世代基因定序技術在臨床上的應用

誠如上述，次世代基因的技術可以廣泛應用遺傳性疾病，生殖醫學及癌症醫學方面 (如表一)，由於本人的專長投入在癌症治療領域，所以以下將會介紹次世代基因定序在癌症診斷中扮演的角色為主，次世代基因在癌症治療的應用是做一個全面的腫瘤基因檢測，找出可能與腫瘤相關的基

因，其中有部分基因突變，是使腫瘤不受控制地擴展最主要的原因，稱之為主驅動基因。一旦發現這類主驅動基因，我們可以相應地用一些針對性藥物作腫瘤治療。目前在治療肺癌上最主要應用次世代排序分析的情況是在擴散性非小細胞肺癌上，尤其是當中最常見的一種稱為肺腺癌的肺癌。因為我們知道超過八成半以上的肺腺癌患者都有我前前提及過的主驅動基因，而其中超過六成以上有適合的標靶藥可以使用。這些標靶藥大部份都以口服形式服用，功效比傳統化療藥的藥效為高，同時副作用更少。(圖四)

國際上有四種基因突變，分別是 EGFR、ALK、ROS-1 以及 BRAF，一般都會建議用標靶藥物作為一線治療。另外有超過五種以上主驅動基因有相關藥物可以使用，為晚期肺癌病人帶來一線生機，其他如乳癌、大腸直腸癌、黑色素瘤、

表一：何時需要進行次世代基因定序檢測？

### • 當目標基因(Target Gene)很多時

如先天性耳聾、遺傳性巴金森氏症、早發性失智症、粒線體疾病、視網膜色素沉積症、先天性黃疸、藥物相關基因等。

### • 目標基因(Target Gene)的表現子(exons)很多時

家族性乳癌及卵巢癌症候群、家族性大腸直腸癌、結節硬化症、馬凡氏症候群、多囊性腎病變、家族性高膽固醇血症、威爾森氏症、裘馨氏肌肉失養症等。

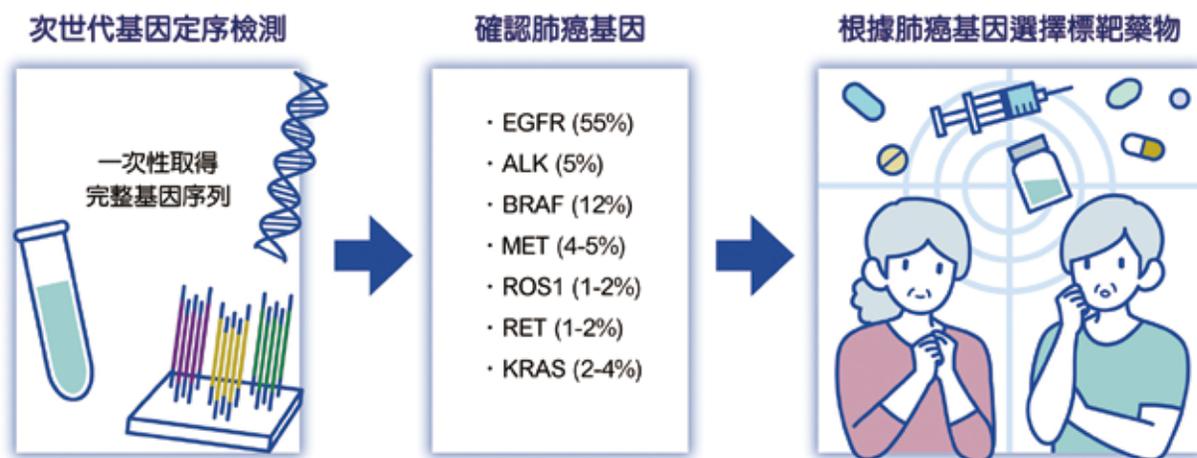
### • 沒有目標基因時

總體基因體 (如胃腸道細菌)、全表現子定序、全基因體定序等。

### • 需要定量時

總體基因體、體突變、癌症復發病人追蹤等。  
非侵入性產前檢測、癌症患者由周邊血檢測癌症基因體等。

圖四：利用次世代基因檢測，精準治療癌症（以肺癌為例）



卵巢癌及前列腺癌等亦有次世代定序的檢測。

台灣每年約 12 萬人罹癌，許多病患在治療前會做次世代基因定序（NGS）看基因突變位點，以決定用何種標靶藥物，健保署在 2023 年七月底表示，很多治療癌症的標靶藥物已經上市，這些藥物要針對特定的基因位點突變才會有效，但這些突變位點一定得做基因定序才能得知，因此要使用這些藥物前就得先做檢驗，確定位點後搭配對應藥物，治療才有效。健保署預估的時程是在 2023 年底前完成討論，2024 年搭配特管辦法上路，最快第二季或第三季開始給付。

目前健保有給付 15 種癌症標靶藥物、對應 8 種癌症。肺癌、乳癌、大腸直腸癌和卵巢癌等癌症類別有較多的標靶藥物可使用。目前還未決定哪些癌症、哪段治療療程可適用基因定序給付，「給付要針對有效的藥，以及給付時機，看是終身一次給付，或是其它治療方式無效後才給付，這牽涉給付人數多寡，會影響全額或部分給付，

這都環環相扣」。日本、南韓目前已經將次世代基因定序有條件納保，日本是鎖定常規治療無效的患者才給付次世代基因序列，韓國則是採取每人一次的定額給付。

次世代基因定序要花多少錢？以台大醫院基因分子診斷實驗室公布的檢驗項目及費用表，癌症用的「癌症藥物基因檢驗」一次要價 3 萬 8500 元。健保署署長石崇良表示，這要看基因位點的多寡，如果要檢測的位點多，最高可能達十幾萬元，「給付多少位點？誰可以開檢驗單？哪些實驗室符合檢測資格？這些都是要討論的題目」。但隨著次世代基因定序的技術進步，其價格會慢慢降低，相信將來一定會被廣泛應用。總之，新興標靶治療或免疫療法都必須透過生物標記（biomarker）的檢測來尋找治療的標的，生物標記多為基因突變而特殊表現在癌細胞，若一個一個突變基因檢測，恐無法因應臨床治療。次世代基因定序技術一次可以檢測多個基因，提供醫師診療的有利工具，選對標靶藥物治療較有效。

然而次世代定序技術畢竟在臨床上仍是較新穎而且有許多未知因素的技術，在國外亦有其規範，像 2020 年及 2023 年相繼在歐洲腫瘤醫學會議，亦有相關規定，大致對一些癌症，像肺癌、乳癌、大腸直腸癌、前列腺癌，都有嚴格的規定，另外一些臨床試驗則有所謂伴隨式之次世代基因檢測，更重要的是，如果檢測出來的基因突變沒有對應標靶藥物可使用，就算是檢測出來，也無法改變現有的治療選擇，此乃目前較難突破的困境。於 2021 年健保署已擬定次世代定序診斷納入健保給付之流程，分為提案、評估、討論及監測等四個階段，由醫療院所或學會提出申請，經健保署搜集資料評估，再交由專家諮詢會議及健保署共同擬定會議討論核定。

## 第三代基因定序 (Non-PCR Sequencing) 從研究走向應用

雖然次世代基因定序的數據輸出量與定序效能越來越強大，能在短時間精確地分析大量的基因序列資訊，但因為其讀長較短（通常 50-200bp），需要有參考序列或是繁雜的組裝演算 (assembling algorithm) 才能達到精準的結果。倘若遇到長片段的重複序列，或是全新物種的基因序列，就容易增加 NGS 定序錯誤的機率，因此第三代定序需求也就應運而生。第三代定序技術又稱為單分子 DNA 定序，是通過現代光學、高分子、奈米技術等手段來區分鹼基信號差異的原理，以達到直接讀取序列信息的目的，所謂的第三代定序是指不需要透過 PCR 增大的過程，直接對單一條長片段的 DNA 進行的基因定序，由於單一片段的 DNA 定序讀長較長，可以大幅減少序列組裝的複雜性，也較能夠判斷基因體中的高重複性序列的正確性，尤其在一些全新物種的基因體分析研究最能展現

出它的優勢。但是，也就因為第三代定序只針對單一的 DNA 分子進行定序，不像 NGS 能夠以增加定序深度 (Sequencing Depth) 來提昇定序的品質，因此仍然具有較高的錯誤率 (5-30%)，主要應用在一些植物和微生物的新物種基因序列分析或是容易發生甲基化的高重複性基因序列 (CPG island)，目前多用於研究用途，尚未出現成熟的臨床應用 (有部分研究將三代基因定序應用於 HLA-genotyping)。

第三代定序比較具有代表性的平台包括較早期的 Helicos Bioscience 的 tSMS (True Single Molecule Sequencing)、Pacific Bioscience 的 SMRT (Single Molecule Real-Time sequencing) 和後期異軍突起的 Oxford Nanopore Technologies。(如表二)

總之，第三代定序目前雖然技術上已漸趨穩定，但由於定序成本仍然偏高，目前多僅只有用於需要精準解讀長片段重複序列的研究用途 (動物、植物、微生物的新物種 de novo 定序) 和表觀遺傳學 (Epigenetics) 的基因修飾 (例如：甲基化) 研究。

**目前健保有給付 15 種癌症標靶藥物、對應 8 種癌症。肺癌、乳癌、大腸直腸癌和卵巢癌等癌症類別有較多的標靶藥物可使用。**



表二 第三代 Third Generation Sequencing 基因定序

平台 / 廠商	特點 / 優劣勢	現況
Helicos Bioscience	將待測 DNA 單股化接上 poly-A 序列固定於晶片表面，再透過與四種 dNTP 的 DNA 聚合反應與螢光訊號的偵測進行定序。 讀長 (30-35bp) 短，定序效率低。	技術授權給與美國的 SeqLL 公司和中國的賀建奎教授創立的瀚海基因 (Direct Genomics)。
Pacific Bioscience	將 DNA 聚合酶固定於極小的孔槽內進行 DNA 聚合反應，定序出單一 DNA 分子的序列。 讀長長，平均可達到 30kb 以上。 儀器與定序費用高。	2018 年 11 月，被定序巨擘 Illumina 相中完成併購，未來可望整合長讀長定序和短讀長定序的優勢。
Oxford Nanopore Technologies	採用電泳技術驅動單一 DNA 分子穿過細小的奈米孔洞，偵測 ATCG 四種電位訊號進行定序。 讀長長，最高可達 100kb，如果是超高讀長長模式，甚至可達 300kb。 設備與定序費用平實，設備輕巧具可攜帶性。	2015 年 5 月，Oxford Nanopore Technologies 發表全球第一款由 USB 電源驅動的行動化定序儀 - MinION。

## 結語

次世代定序的優勢在於強大的定序效能，能夠同時定序數百萬個基因片段，並透過生物資訊的演算方法進行拼接，適合發展大範圍的廣泛性篩檢，目前最成熟而廣泛的應用莫過於非侵入性胎兒染色體基因檢測 (NIPT/NIFTY/NIPS)，還有針對基因遺傳疾病和遺傳性癌症的廣泛性帶因篩檢 (Expand Carrier Screening)，甚至是全外顯子定序 (Whole Exon Sequencing; WES) 和全基因體定序 (Whole Genome Sequencing; WGS)，都非常適合採用次世代定序的技術平台。尤其在癌症醫學方面，面對個人化量身訂做的精準醫學時代，健保署也因應世界趨勢，即將核准次世代基因技術之健保給付，相信將來基因檢測的應用與需求，與日俱增，對於癌症診療必然扮演極重要的角色。