

新興生物科技技術講座

定序原理介紹與工作坊

第三代定序 Oxford nanopore



柯惠棉老師講解儀器使用

生物科技系／余亮儀

為提升本校學生對新興生物科技技術的相關知識，生物科技系敬邀東吳大學微生物學系柯惠棉助理教授進行專題講座與工作坊。本次專題講座分為上午的專題演講及下午的工作坊，上午場的專題演講著重於介紹第三代定序的原理及發展優勢，下午場的工作坊則讓學生動手操作，以培養學生的實作能力。

在過去第三代定序的技術尚未問鼎人世時，若在較嚴酷、偏遠的地方發現新興疾病，我們通常無法及時地將病原菌基因組解碼，這可能導致疾病的快速傳播、人群的大量死亡。Oxford nanopore 公司開發了一種稱為 Mk1C 的掌上型第三代定序機器，不需連接電腦也能判讀數據，大大增加了野外調查的可行性。而第三代定序主要原理是利用 Flow cell 上細小的奈米孔洞，當經過純化步驟的 DNA 流經奈米孔洞時，機器會偵測其電流變化，不同的鹼基會產生不同的電流訊號，我們便能透過電流訊號將基因體完整的解碼。



雖然第三代定序原理看似簡單，但定序前仍需進行一些繁複的程序，包括 DNA 的萃取與純化、建立測序文庫 (Library)。其中建庫可分為 DNA 修復與終端準備 (DNA repair and end-prep)、銜接子的連接與清理 (Adapter ligation and clean up)、啟動與裝載流通槽 (Priming and loading the flow cell)。而本次工作坊的實作內容是由純化 DNA 的步驟開始進行，利用 AMPure beads 與 DNA 結合，依據不同比例會有不同的純化結果，又第三代定序通常偏好於判讀長片段 DNA 以便基因體的完整定序，因此本次實驗使用了 DNA : Beads = 1 : 0.5 的比例純化大片段 DNA，並移除小片段 DNA。最後進行數據分析時可藉由顏色確認奈米孔洞的健康度，當數據呈淺綠或深綠，代表孔洞的健康度十分良好，反之，若數據呈淺藍或深藍，代表孔洞可能死亡，因此在加入樣本時需格外注意，避免將氣泡一併帶入 Flow cell 中，使數據無法精準呈現。

本次活動也吸引了生科系學生對於新興科技的好奇心，直到工作坊結束時，仍有許多同學與講師進行問題討論，期盼未來能藉由各式專題講座、工作坊，與時俱進的更新學生的專業知識。(本文作者為生物科技系學生)



學生實際操作