

次世代定序及基因體研究應用於水產科技之淺說

黃慶輝

水產試驗所水產養殖組

前言

近年來我國的水產養殖業面臨如：氣候變遷或病害等因素所造成的產量不穩定、進口水產品之競爭以致國內水產品價格難以提升、從業人口高齡化及年輕人從事相關產業之意願降低、能源及魚粉等飼料價格提高，造成養殖成本上升及國民對於食品安全要求提升等情況，亟需長期規劃並提出因應方案，此時分子生物學及遺傳學相關研究就成為解決問題的有效工具。

另一方面，隨著分子生物學及遺傳學分析技術的發展，相關研究在水產資源管理、海洋生態、養殖育種及水產品安全等諸多領域皆受到重視，且以往需要龐大時間與預算之全基因體定序 (whole genome sequencing)，因能在短時間內大量定序的次世代定序技術 (next-generation sequencing, NGS) 的問世，大幅降低了定序成本，也促使水產生物之基因體研究逐漸轉向為以大量定序資料作為研究基礎的大數據時代。水生生物為因應生存環境的多樣化適應模式，除可用來發掘對人類生活有用之新物質及促進

相關新產業的發展外，亦為基因體及遺傳學等研究之寶貴資源，更希望次世代定序相關技術的進展亦能加速帶動水產養殖育種的蓬勃發展。

次世代定序及相關基因體研究概況

一個完整的次世代定序流程包含核酸樣本的取得與製備、定序及資料分析等三大過程，由次世代定序技術所得的大量序列資訊，必須經過後續的生物資訊處理，才能進行後續的應用，此過程一般包含：(1)將所獲得的序列資料進行品質管控、篩選，以獲得正確序列資料；(2)將序列資料進行比對 (alignment)、組裝 (assembly) 與獲得序列次數計算 (read count)；(3)將組裝好的序列與現有之序列資料庫比對，確認其完整性及正確性；(4)基因功能性註解 (gene annotation)，對照現有之功能性基因資料以推測該序列為何基因之可能性最高；(5)後續證實及相關試驗分析等。

近年應用遺傳學及基因體學研究於水產

生物之面向及方式已相當多樣化，在此就與次世代定序較為相關之部分進行說明：

一、全基因體定序

顧名思義，全基因體定序的目標是一次解讀生物體完整的基因序列，包含染色體序列及粒腺體完整序列，倘若定序對象為植物還包含葉綠體之完整序列。目前已完成之魚類基因體定序有 22 種，除以物種分類原則外，根據完成定序物種之特性可分為三大類：(1)於生態演化上具有重要地位或特殊性物種 (如八目鰻、銀鮫、腔棘魚、斑點雀鱔、電鰻等)；(2)生物學研究上具有重要性之模式物種 (斑馬魚、青鱗魚、三刺魚等)；(3)具重要經濟價值之食用種類，如大黃魚、大西洋鮭、虹鱒、鮫魚、鱈魚及虎鮐等。在甲殼類方面，已經完成全基因體定序者有水蚤、黑殼蝦及螯蝦等，貝類之相關研究則更少，目前僅有牡蠣及青螺完成全基因體定序 (相關資料整理如附表)。

定序完成之全基因體資料庫的用途十分廣泛，最直接之目的為建立物種之遺傳序列資料庫，倘在近緣物種發現可供育種應用之特殊基因，可利用所建立的資料庫迅速尋找相關基因，供後續挑選利用。除此之外，養殖時倘遭遇病害或氣候影響，欲利用活存個體挑選相關抗逆境基因時，全基因體序列資料庫亦為重要參考之資料；更可尋找目標基因序列之單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 序列特徵，或與目標基因鄰近且高度保守 (conservative) 之簡單序列重複 (simple sequence repeat, 簡稱 SSR) 作為育種之基因標記，為新一代育種研究之重要基石。

二、轉錄體分析 (transcriptome analysis)

廣義之轉錄體 (Transcriptome) 係指一固定生理條件下，細胞內所有轉錄產物的總和，狹義係指細胞內所有 mRNA 的總和，過去常以微晶片陣列 (microarray) 來進行功能性基因的定量熱點分析 (hot spot analysis)，近年來使用次世代定序法分析轉錄體時，可擴展為全面的功能性基因比對研究，並在不同生理階段、不同組織或不同生存環境下對同一種類取樣，觀察整體功能性基因的表現差異，惟必須注意取樣時期的代表性、差異處理與試驗重複數的適宜性及樣品間比較分析前須進行常態化的步驟 (normalization) 等。

因轉錄體分析需定序的序列數量較全基因組定序為少，相對較省時間與成本，且因目標為轉錄產物，可有效針對功能性基因進行研究，因此目前廣泛應用於各種生物體之功能性基因研究，於水產方面亦已應用於多種魚類、蝦類及幾種貝類，如吳郭魚、石斑魚及白蝦之育種頂基因標記等 (如表)；惟研究對象或其近似物種尚無公開之全基因體序列資料或功能性基因研究尚不夠完整時，在進行基因資料庫比對及基因功能性註解時，因資料庫不足，對應到的基因數量就會大幅減少。除此之外，利用長度較長、覆蓋率較高的轉錄體組定序，可用來估算基因滲透 (introgression) 的程度，其方式是藉由比較旁系同源基因 (paralogous genes/paralogs) 的同義變異核酸的比率 (K_s 值 = 同義核酸鹼基置換數/總同義核酸鹼基位點)，以了解比較物種間相較於共同祖先之演化關係。

三、總體基因體學分析 (Metagenome analysis)

總體基因體學為一直接由環境中取得所有遺傳物質的研究，也可稱為環境基因體學、生態基因體學或群落基因體學。其中最具代表性的為環境（如水生動物、水體或土壤）中微生物基因體多樣性之相關研究。早期研究微生物基因必須將環境中之基因 DNA 或 RNA 轉殖進入大腸桿菌內，再利用複製選殖方式，分析在自然環境中複製選殖特定基因（通常為 16S rRNA）的多樣性，但因有許多種類微生物難以於生物體外或人工環境培養，此方法無法完全反映環境中微生物的組成狀況。近年相關研究使用霰彈槍 (shotgun) 或更具效率的次世代定序法以獲得環境樣本中所有微生物成員的所有基因的樣本基因，由於這些新型的研究方法提供了強大工具，能完整的反應環境中的微生物多樣性，這些微生物組成研究有可能徹底改變對整個生命世界的理解。

次世代定序法對於微量 DNA 的偵測靈敏度大幅提升，現在允許總體基因體學之相關分析以比以前更大的規模和細節進行調查，如生物體生存時的生命活動（如排泄及生殖行為）會直接排放 DNA 至環境中，從環境樣本，如水體進行生物體遷徙或生態過程之相關研究亦隨之興起。在水產養殖方面，可利用次世代定序法，比較野生個體及養殖個體之腸道內共生微生物種類的差異，或從水生生物之腸道內尋找可供改善水質及養殖

環境、分解有毒物質之共生微生物，進而精進水產養殖技術。類似之方法也可應用於食品安全方面，以次世代定序法針對植物體 tRNA 的 tmL 區域以及動物或微生物之粒線體 16S rRNA，進行食品成分中 DNA 來源分析，定序後與資料庫比對，瞭解食品成分的標示是否與實際成分不符合、是否有致病性微生物繁殖，甚至偵測食品中是否用了禁止利用之保育種類，在農漁業之相關應用十分廣泛。

結語

在水產領域如遺傳育種、海洋生態甚至是食品安全方面，皆可考量應用次世代定序技術來增加研究的深度與廣度，在不同的水產研究相關領域提供有效的基因序列資料輔助；且隨著次世代定序技術發展，定序機臺價格、樣品分析之耗材成本、及資料分析之技術門檻持續下降，使得次世代定序技術能夠更容易的被應用，期待這樣的科技進步亦能持續推進未來水產養殖科技的發展。

主要參考文獻：

1. 邱燕欣、林詩舜 (2014) 淺談次世代定序技術 (Next Generation Sequencing, NGS) 發展與其應用, 種苗科技專訊, 88: 13-17。
2. 独立行政法人水産総合研究センター (2010) 水産ゲノム研究戦略。
3. Dunisławska et al. (2017) Next generation sequencing in animal science-a review, Animal Science Papers and Reports, 35(3): 205-224.

目前完成全基因組定序之魚類、甲殼類及貝類物種

中 文 名 稱	英 文 名 稱	學 名	完 成 年 份
魚 類			
虎鮐	tiger pufferfish	<i>Takifugu rubripes</i>	2002
黑青斑河鮐	greenspotted pufferfish	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	2004
澳洲銀鮫	elephant fish	<i>Callorhinchus milii</i>	2007
青鱗魚	medaka	<i>Oryzias latipes</i>	2007
大西洋鱈	Atlantic cod	<i>Gadus morhua</i>	2011
三刺魚	three-spined stickleback	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	2012
八目鰻	lamprey	<i>Petromyzon marinus</i>	2013
腔棘魚	coelacanth	<i>Latimeria chalumnae</i>	2013
花斑箭尾魚	platyfish	<i>Xiphophorus maculatus</i>	2013
白斑狗魚	Northern pike	<i>Esox lucius</i>	2014
電鰻	electric eel	<i>Electrophorus electricus</i>	2014
斑點雀鱔	spotted gar	<i>Lepisosteus oculatus</i>	2014
大黃魚	yellow croaker	<i>Larimichthys crocea</i>	2014
虹鱒	rainbow trout	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	2014
弗氏假鰷鱗	turquoise killifish	<i>Nothobranchius furzeri</i>	2015
大西洋鮭	Atlantic salmon	<i>Salmo salar</i>	2016
鯰魚	channel catfish	<i>Ictalurus punctatus</i>	2016
鯨鯊	whale shark	<i>Rhincodon typus</i>	2017
斑馬魚	zebrafish	<i>Danio rerio</i>	2017
透頭大銀魚	clearhead icefish	<i>Protosalanx hyalocranium</i>	2017
烏鯉	Northern snakehead	<i>Channa argus</i>	2017
扁嘴副帶鰐魚	Antarctic dragonfish	<i>Parachaenichthys charcoti</i>	2017
甲殼類			
水蚤	water flea	<i>Daphnia pulex</i>	2007
黑殼蝦	cherry freshwater shrimp	<i>Neocaridina denticulata</i>	2014
大理石螯蝦	marbled crayfish	<i>Procambarus virginalis</i>	2018
貝 類			
太平洋牡蠣	Pacific oyster	<i>Crassostrea gigas</i>	2012
蓮花青螺	owl limpet	<i>Lottia gigantea</i>	2013