



應用奈米孔定序技術快速鑑定檢疫害蟲

蔡正隆¹、李蕙宜¹、陳素琴²、葉文斌^{1*}

¹ 國立中興大學昆蟲學系 402202 台中市南區興大路 145 號

² 農業部動植物防疫檢疫署植物檢疫組 100060 台北市和平西路二段 100 號

* 通訊作者 email: wbyeh@nchu.edu.tw

收件日期：2024 年 3 月 20 日 接受日期：2024 年 6 月 20 日 線上刊登日期：2024 年 6 月 28 日

摘要

邊境農產品進口檢疫為防止害蟲入侵的第一道防線，因此快速準確鑑定查驗的害蟲身分有利於制定適宜的因應措施；然而多數害蟲鑑定困難度高，傳統分子鑑定通常無法當天確認物種身分，勢必降低農產品保鮮時效及減緩檢疫效率。為縮短鑑定時程，本研究旨在使用 Oxford Nanopore Technologies (ONT) 的 MinION 定序儀建立實驗室 DNA 條碼 (粒線體 COI 基因) 定序操作流程，包括 ONT 建庫所需之 DNA 濃度、樣本混合的 PCR 產物體積、定序數據量及序列一致性整合分析流程。實驗將檢疫果蠅樣本及農業部動植物防疫檢疫署 (防檢署) 委託分子鑑定的 14 批檢疫樣本進行建庫，在 MinION 定序儀取得 DNA 條碼序列；上機數據共取得 108 萬條解序序列 (reads)，總數據量為 652.88 Mb，序列的 N50 為 614 bp，定序檔案容量為 12.3 Gb。結果顯示樣本的 DNA 濃度與得到的解序序列呈現正相關，成功定序的增幅樣本 DNA 濃度至少需達到 1.92 ng/μl，方能取得 DNA 條碼，此數值可作為未來樣本進行 PCR 時所需濃度之參考。經序列比對結果顯示，果蠅的相似度皆為 100%；防檢署各分署所送樣本，經 GenBank 比對的物種相似度則為 97.72~100%，皆能明確對應至已知物種。因此，檢疫樣本依循 ONT DNA 條碼標準作業流程操作，將可在 1 至 1.5 天內取得序列，若能藉由混合樣本的操作將可降低 ONT 高定序成本費用，有效鑑定邊境截獲之檢疫害蟲，強化邊境檢疫能力，縮短農產品進口檢疫作業時程。

關鍵詞：定序技術、DNA 條碼、檢疫作業、物種鑑定。

前言

世界貿易組織 (World Trade Organization, WTO) 提倡貿易自由、公平及可預測性，促使全球貿易活絡，有害生物擴散的風險也隨著貨櫃、農產品貿易增加，邊境農產品進口的檢疫作業遂成為各國防堵有害生物入侵的第一道防線，可儘早發現即時因應。生物的入侵已造成世界各地鉅額經濟損失

(Zenni *et al.*, 2021)，例如：北美損失累計已達 1.26 兆美元，亞洲則為 4,326 億美元。為積極防杜有害生物入侵，我國應積極發展檢疫有害生物之快速鑑定技術，先行布局以為因應。

20 世紀末至 21 世紀初期，應用 DNA 於分類鑑定為 Avise and Johns (1999)、Caterino *et al.* (2000)、Tautz *et al.* (2002, 2003) 等人所大力提倡；Hebert *et al.* (2003) 更倡議粒線體基因的細胞氧化

色素第一次單元 (cytochrome *c* oxidase subunit I, COI) 5'端序列 (長度約為 650 bp), 可應用於物種鑑定; 目前, COI 基因已廣泛應用於昆蟲物種分類及鑑定 (Kress *et al.*, 2015), 並能作為邊境進口農產品檢疫害蟲鑑定的有力證據; 其優點主要有: 一、各類群昆蟲粒線體基因體序列資料齊全, 易於設計各類昆蟲 COI 專用引子; 二、轉譯區段 (coding region) 具高度保守性, 少有核苷酸插入 (insertion) 或缺失 (deletion), 定序片段長度一致, 可明確比對分析; 三、COI 基因變異速率約為核醣體 12S rDNA 或 16S rDNA 等基因的 3 倍, 種間鑑別效率佳; 四、至今已累計約 23 萬 4 千種昆蟲物種近 800 萬條 DNA 條碼可供比對 (https://www.boldsystems.org/index.php/Public_SearchTerms)。DNA 條碼已成為昆蟲分類的基本分類特徵 (Kanturski *et al.*, 2018, Gopurenko *et al.*, 2021), 亦可有效連結完全變態昆蟲之各生活史階段 (Kress *et al.*, 2015), 使許多幼蟲期缺乏系統研究的昆蟲類群能與成蟲形態連結, 可促進基礎生態研究進展。農業害蟲體型微小、種類繁多, 鑑定至種位階難度高, 即使是訓練有素的分類專家, 也常事倍功半, 費時甚長; 尤其處理大量幼蟲樣本時, 則無法迅速得到正確鑑定結果; 分子鑑定所常用的 DNA 條碼在物種鑑定成效已有目共睹, 並受到分類學者認可, 可應用於農產品進口所截獲之害蟲物種鑑定, 以強化檢疫效能。

近 10 年來, DNA 定序技術日新月異, 隨著高通量定序 (high-throughput sequencing) 技術蓬勃發展而有所突破, 更加速昆蟲多樣性調查與監測之研究進展 (Piper *et al.*, 2019, Chua *et al.*, 2023, Fikáček *et al.*, 2023), 常見技術包括 DNA 條碼、高通量巨量條碼 (megabarcoding)、元條碼 (metabarcoding)、定量 PCR (quantitative PCR, qPCR)、droplet digital PCR (ddPCR) 與 shotgun metagenomics, 這些方法能節省成本並有效快速地應用於成千上萬的樣本分析鑑定, 多數能提供至種的鑑定結果 (Jennifer *et al.*, 2016, Chua *et al.*, 2023, Hebert *et al.*, 2023); 其中, 高通量巨量條碼主要係透過混合樣本方式進行大量標本定序 (Yeo *et al.*, 2021, Hebert *et al.*, 2023), 有效的將形態多樣的節肢動物鑑定至種, 大幅提升基礎研究效能暨其相關生物學之研究效益。

新興的第三代 DNA 定序技術 (Third-Generation Sequencing) 主要優勢為基因體長片段定序, 以 PacBio (Pacific Biosciences) 及

Oxford Nanopore Technology (ONT) 兩家公司所開發之技術及產品為主; 前者須將樣本送至核心實驗室進行定序; 後者開發的 MinION 定序儀操作簡易, 可在一般分生實驗室操作, 預期將推動各種生物基因體之研究進展。在全球貿易盛行的時代, 落實檢疫工作, 準確、迅速地鑑定如昆蟲、線蟲、病毒及真菌等檢疫有害生物, 並將其阻絕於邊境, 對於制定檢疫管理策略至關重要; 運用 MinION 定序儀可有效定序長片段 DNA 條碼進行物種比對分析, 準確將昆蟲害蟲及病原菌鑑定至種位階 (Knot *et al.*, 2020, Frey *et al.*, 2022)。

本研究主要目的為使用 MinION 定序儀, 建立進口農產品所截獲檢疫害蟲之快速分子鑑定流程, 試驗標的係採用國際重要檢疫物種斑翅果蠅 (*Drosophila suzukii*) 及其他 *Drosophila* 果蠅、以及自進口農產品檢出之害蟲樣本, 並應用 ONT 定序技術建立 DNA 條碼 (粒線體 COI 基因) 定序操作流程, 包括 ONT 建庫所需之 DNA 濃度、樣本混合的 PCR 產物體積、定序數據量及分析比對流程, 以作為日後建立邊境快速鑑定作業流程之參考。

材料與方法

一、ONT DNA 條碼資料建立及應用

- (1) 標本收集與保存: 本研究雙翅目果蠅樣本來自美國同濟、防檢分署及國立中興大學分子生物學研究所曾振圓老師實驗室 (源自臺灣果蠅遺傳資源中心), 共取得斑翅果蠅 (*D. suzukii*)、*D. immigrans*、*D. simulans* 及黑腹果蠅 (*D. melanogaster*) 等 4 種果蠅 14 隻個體樣本 (表一), 另包括各防檢分署檢送分子鑑定的鞘翅目、半翅目、膜翅目、鱗翅目、直翅目及纓翅目等 25 隻個體樣本 (表一), 編號以各目字首為流水號編列, 如 Dip100、Hem101 及 Col1111 分別為雙翅目第 100、半翅目第 101 及鞘翅目第 1111 筆樣本, 建立資訊後以 95% 酒精保存, 冷凍存放 -20°C 冰箱。
- (2) 形態資料建立及 DNA 資料之管理: 依循 DNA Barcode 標準流程 (圖一), 標本均拍照存證, 參考相關昆蟲圖鑑及文獻進行鑑定或請國內外各類群昆蟲學者鑑定。
- (3) DNA 萃取: 每個樣本僅使用 1 隻檢疫害蟲萃取 DNA, 依標本體型決定組織取樣方式, 多數雙翅目、鞘翅目、鱗翅目取一足, 半翅目蚜蟲則取頭胸部組織, 若標本蟲體太小則使用整隻標本,

表一 本研究使用之檢疫害蟲採集資訊、奈米孔 DNA 條碼 PCR 引子對、PCR 產物之 DNA 濃度、定序 demultiplex 的解序序列數與 GenBank 比對的物種相似度

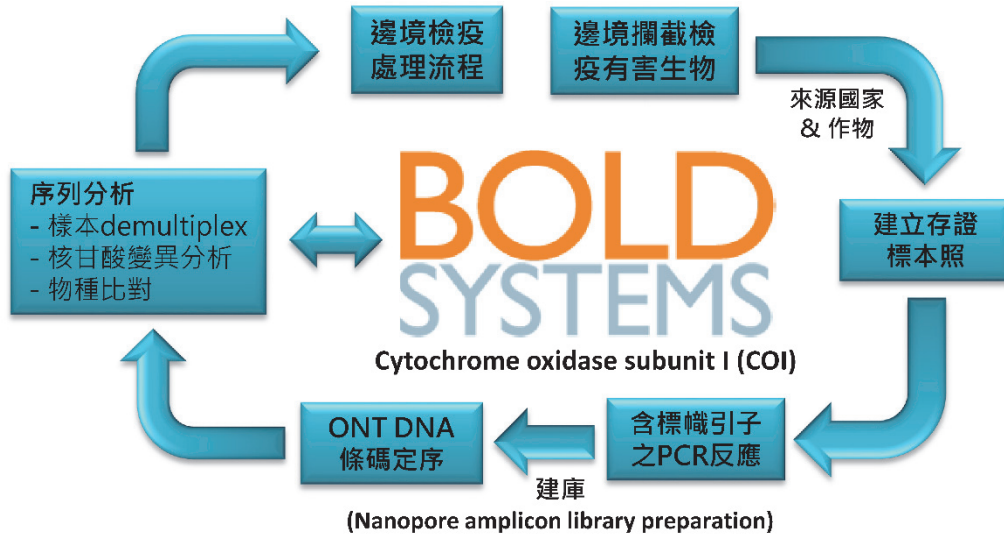
Table 1. Specimen information for quarantine pests, Nanopore tagged primer pairs, DNA concentration of PCR products, demultiplexed sequencing reads, and BLAST species similarities from GenBank

Collection date	ID	Country	Crop	Quarantine Bureau	Primer_F	Primer_R	DNA concentration (ng/μl)	Demultiplexed sequences	Taxon	Similarity (%)
20190111	Dip258	New Zaland	Avocado	Hsinchu	LCO_13_001	HCO_13_001	17.2	1375	<i>D. immigrans</i>	100
-	Dip336-1*	USA	-	-	LCO_13_001	HCO_13_002	6.88	560	<i>D. suzukii</i>	100
-	Dip337-1*	USA	-	-	LCO_13_001	HCO_13_004	8.4	788	<i>D. suzukii</i>	100
-	Dip337-2*	USA	-	-	LCO_13_001	HCO_13_005	6.08	639	<i>D. suzukii</i>	100
20210807	Dip398-1	Japan	Grapes	Hsinchu	LCO_13_001	HCO_13_006	7.74	539	<i>D. simulans</i>	100
20210827	Dip399-1	Japan	Grapes	Hsinchu	LCO_13_001	HCO_13_007	16.4	1487	<i>D. suzukii</i>	100
20210908	Dip403-1	Japan	Grapes	Hsinchu	LCO_13_001	HCO_13_008	2.6	175	<i>D. melanogaster</i>	100
20210908	Dip403-2	Japan	Grapes	Hsinchu	LCO_13_001	HCO_13_009	6.46	431	<i>D. melanogaster</i>	100
20220511	Dip430-1	Australia	Grapes	Kaohsiung	LCO_13_002	HCO_13_001	18.3	5521	<i>D. simulans</i>	100
20220511	Dip430-2	Australia	Grapes	Kaohsiung	LCO_13_002	HCO_13_002	24.2	5195	<i>D. simulans</i>	100
20220511	Dip430-3	Australia	Grapes	Kaohsiung	LCO_13_002	HCO_13_003	29.2	9858	<i>D. simulans</i>	100
-	Dip499-1*	NCHU (lab)	-	-	LCO_13_002	HCO_13_004	32.2	10460	<i>D. melanogaster</i>	100
-	Dip499-2*	NCHU	-	-	LCO_13_002	HCO_13_005	26.2	7788	<i>D. melanogaster</i>	100
-	Dip499-3*	NCHU	-	-	LCO_13_002	HCO_13_006	31	9440	<i>D. melanogaster</i>	100
20230905	Hem2822	Vietnam	Chinese cabbage	Kaohsiung	LCO_13_003	HCO_13_005	30.2	5373	<i>Myzus persicae</i>	100
20230906	Hem2823	Vietnam	Chinese cabbage	Kaohsiung	LCO_13_003	HCO_13_006	10.6	1372	<i>Myzus persicae</i>	100
20230906	Hem2824	Vietnam	Broccoli	Kaohsiung	LCO_13_003	HCO_13_007	36.6	7014	<i>Myzus persicae</i>	100
20230907	Hem2834	USA	Lettuce	Kaohsiung	LCO_13_003	HCO_13_008	3.2	397	<i>Aulacorthum solani</i>	100
20230907	Hem2836	Indonesia	Chinese cabbage	Kaohsiung	LCO_13_003	HCO_13_009	3.48	299	<i>Lipaphis pseudobrassicae</i>	100
20230907	Hem2837	USA	Romaine lettuce	Kaohsiung	LCO_13_003	HCO_13_010	1.92	150	<i>Aulacorthum solani</i>	100
20230907	Hem2838	USA	Lettuce	Kaohsiung	LCO_13_004	HCO_13_001	10.1	2222	<i>Aulacorthum solani</i>	100
20230928	Col935	Japan	Japanese cedar	Taichung	LCO_13_004	HCO_13_003	6.38	2127	<i>Sipalinus gigas</i>	99.85
20230928	Col936	Japan	Japanese cedar	Taichung	LCO_13_004	HCO_13_004	6.38	1860	<i>Sipalinus gigas</i>	99.85
20231002	Col937	USA	Planks	Taichung	LCO_13_004	HCO_13_005	10.0	2687	<i>Silvanus muticus</i>	97.72
20231002	Lep1440	Japan	Apple	Keelung	LCO_13_004	HCO_13_006	34.4	10057	<i>Grapholita molesta</i>	100
20231002	Lep1441	Japan	Apple	Keelung	LCO_13_004	HCO_13_007	32.8	10714	<i>Grapholita molesta</i>	100
20231004	Col932	Japan	Timber	Taichung	LCO_13_004	HCO_13_002	10.0	2835	<i>Silvanus bidentatus</i>	99.85
20231004	Lep1442	Japan	Apple	Keelung	LCO_13_004	HCO_13_008	32.2	4423	<i>Grapholita molesta</i>	100
20231011	Thy37	Japan	Apple	Keelung	LCO_13_004	HCO_13_009	4.32	544	<i>Scirtothrips dorsalis</i>	99.24
20231013	Ort193	Japan	Logs	Taichung	LCO_13_003	HCO_13_003	12.9	2144	<i>Grylodes sigillatus</i>	100
20231020	Lep1459	Japan	Apple	Keelung	LCO_13_002	HCO_13_007	33.2	10082	<i>Grapholita molesta</i>	100
20231020	Lep1460	Korea	Pear	Keelung	LCO_13_002	HCO_13_008	29.8	5024	<i>Grapholita molesta</i>	100
20231024	Lep1461	Japan	Apple	Keelung	LCO_13_002	HCO_13_009	22.6	3099	<i>Grapholita molesta</i>	100
20231024	Lep1462	Japan	Apple	Keelung	LCO_13_002	HCO_13_010	15.6	2011	<i>Grapholita molesta</i>	100
20231024	Hym169-1	Japan	Apple	Keelung	LCO_13_003	HCO_13_004	19.7	4165	<i>Trichogramma chilonis</i>	98.63
20231024	Hym169-2	Japan	Apple	Keelung	LCO_13_003	HCO_13_001	14.5	2802	<i>Trichogramma chilonis</i>	99.54
20231024	Hym169-3	Japan	Apple	Keelung	LCO_13_003	HCO_13_002	20.4	3583	<i>Trichogramma chilonis</i>	99.67
20231025	Thy38	Japan	Apple	Keelung	LCO_13_004	HCO_13_010	5.54	951	<i>Scirtothrips dorsalis</i>	99.39
20231025	Thy39	Vietnam	Snap peas	Taichung	LCO_13_001	HCO_13_003	0.73	3	Unknown	-

組織置入 1.5 ml 微量離心管後，加入 50 μl QuickExtract DNA extraction kit (Epicentre Biotechnologies, Lucigen Corporation, Middleton, WI) 進行研磨，隨後將萃取液置入加熱器以 65°C 加熱 10 min，震盪 15 sec，98°C 加熱 2 min，最後將萃取完成的農業害蟲 DNA 保存於 -20°C 冷凍櫃中。

(4) DNA 增幅：使用改良的通用引子 LCO1490 及

HCO2198 增幅 DNA 條碼 (Folmer *et al.*, 1994)，由於 ONT 定序之 DNA 樣本需混樣，故參考 Fikáček *et al.* (2023) 的通用引子 (表二)，於上下游引子上分別接上 4 組及 10 組標誌序列，共可產生 40 種組合以區分各樣本 PCR 產物。使用 Biometra Tone 熱循環儀 (Biometra, Göttingen, Germany) 進行 PCR 反應，使用流程為 94°C 2 min → 35 個循環



圖一 使用 Oxford Nanopore Technologies 開發之 MinION 儀進行檢疫害蟲 DNA 條碼分析之標準操作流程。
 Fig. 1. Standard operation procedure of DNA barcoding for quarantine pests using the MinION sequencer developed by Oxford Nanopore Technologies.

表二 奈米孔 DNA 條碼 PCR 反應具標誌之 4 組上游引子 (LCO) 及 10 組下游引子 (HCO)
 Table 2. Four and ten tagged sequences of forward (LCO) and reverse (HCO) primers for Nanopore DNA barcodes

Primer	Tag	Tagged Primer Sequence
LCO_13_001	GCGACAAGCACCG	GCGACAAGCACCGGGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
LCO_13_002	GCTCCTACTGCCA	GCTCCTACTGCCAGGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
LCO_13_003	GTAGCCTATGGCG	GTAGCCTATGGCGGGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
LCO_13_004	GTTAGACAATACT	GTTAGACAATACTGGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
HCO_13_001	ATCCGGTCGGAGA	ATCCGGTCGGAGATAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
HCO_13_002	CTGAGGTGATCAG	CTGAGGTGATCAGTAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
HCO_13_003	AGTGTCTGCTAG	AGTGTCTGCTAGTAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
HCO_13_004	ATAAGCAATTCGA	ATAAGCAATTCGATAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
HCO_13_005	ATCTAACAGGACC	ATCTAACAGGACCTAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
HCO_13_006	CATTATATAGCCA	CATTATATAGCCATAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
HCO_13_007	CCTGATTACGTAA	CCTGATTACGTAATAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
HCO_13_008	CTAATACACACCG	CTAATACACACCGTAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
HCO_13_009	TTATGACCGTTGC	TTATGACCGTTGCTAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
HCO_13_010	TTCTCGGCCGCAT	TTCTCGGCCGCATTAACCTTCAGGGTGACCAAAAAATCA

94°C 40 sec, 45°C 2 min, 72°C 40 sec → 72°C 10 min → 16°C (直至從機中取出樣品)。為驗證 ONT 定序的 DNA 條碼正確性，我們使用通用引子 LCO1490 及 HCO2198 增幅 DNA 條碼，使用流程為 94°C 2 min → 35 個循環 94°C 40 sec, 45°C 1 min, 72°C 40 sec → 72°C 10 min → 16°C，隨後委由國立陽明交通大學腫瘤與免疫學研究中心進行 Sanger 定序，定序結果將與 ONT 定序序列進行正確性比對。

(5) 電泳分析：取 4.5 µl PCR 增幅產物與 1 µl 染劑混合，以 1% 的瓊脂膠進行電泳分析，確認複製產物的產量、大小是否足夠及正確，產物亮度至少須達 40 ng，隨後將剩餘的 PCR 產物用於建庫。

二、ONT 文庫製備與定序

參照 ONT 的 SQK-LSK109 kit 之 Ligation sequencing amplicons 操作指南 (version: PBAC

12_9067_v109_revN_14Aug2019) 及 Fikáček *et al.* (2023) 描述之實驗流程調整本研究樣本品質建立文庫。

(一) 磁珠回收與 PCR 產物混樣

(1) 由於本研究測試的樣本數僅 39 個，故每個樣本 PCR 產物取 7 μl 至一個新的 1.5 ml 微量離心管進行混合，樣本總體積為 273 μl ，加入等量體積且未稀釋的 AMPure XP 磁珠 (Beckman Coulter, USA) 進行純化，輕拍或搖晃來混合，使 DNA 與磁珠結合。

(2) DNA 清洗與洗析

(a) 將微量離心管放在磁座上 2 min，吸取上清液移至新的 1.5 ml 微量離心管，注意勿吸到磁珠。

(b) 微量離心管續留在磁座上，加入 1 ml 70%酒精進行洗滌，輕輕轉動混勻，靜置 2 min 後，吸乾所有液體，重複此步驟 3 次，最後讓磁珠酒精揮發 5 min，勿太久以免造成磁珠因過度乾燥產生裂縫。

(c) 將微量離心管移離開磁座，加入 35 μl ddH₂O 將磁珠沖散，重複洗析 DNA，在室溫下靜置 10 min。

(d) 將微量離心管放回磁座，隨後將上清液移至新的 1.5 ml 微量離心管。

(二) 準備擴增子 (Amplicon) 文庫

(1) 計算 DNA 體積

需要約 200 ng 的 DNA 於文庫製備，使用 Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, USA) 測量 DNA 濃度，測得混樣的 DNA 濃度為 104 ng/ μl ，因此須取 1.9 μl 的 DNA 進行後續實驗。

(2) 修復 DNA 末端並連接 A-tails：在 0.2 ml PCR tube 中，混合加入以下試劑：(a) 1.9 μl ，總量 200 ng 的 DNA；(b) 3.5 μl Ultra II End-prep reaction buffer；(c) 1.5 μl Ultra II End-prep enzyme mix；(d) 加入 ddH₂O，總體積為 31 μl 。使用 PCR 儀器，在 20°C 下靜置 5 min，在 65°C 下加熱 5 min。

(3) 接上 adapters：混合 2.5 μl Ligation Buffer、5 μl NEBNext Quick T4 DNA Ligase 及 1.5 μl Nanopore AMX，體積為 19 μl ，加入至 31 μl end-repaired DNA，

總體積為 50 μl ，在室溫下靜置 10 min。

(4) 片段選擇 (Size selection)：

(a) 將文庫移到一個新的 1.5 ml 微量離心管，將 AMPure XP 磁珠搖勻後，添加與樣本等量體積且未稀釋的 50 μl AMPure XP 磁珠，輕輕拍打混勻，勿使用微量分注器；

(b) 靜置室溫 5 min 後，將文庫移至磁座上，放置 5 min，直到 buffer 變清，將上清液吸乾；

(c) 文庫續留於磁座，添加 125 μl SFB，輕輕轉動以混合，靜置 5 min 後，吸乾所有液體；

(d) 將文庫移至磁座外，使用 7 μl ddH₂O 反覆清洗壁面，將所有的磁珠都沖洗至管壁底下，輕輕拍打混合後，並在室溫下靜置 10 min；

(e) 將試管放回磁座上，待磁珠沉澱凝聚後，將上清液移置一個新的 0.2 ml 微量離心管；

(f) 取用 2 μl 文庫，使用 Qubit 4 測得濃度為 11.9 ng/ μl ，DNA 可在 4°C 下保存 1-2 周，若為 -20°C 則可保存更長時間。

(三) MinION 定序

(1) 準備 priming mix：拿取 1 個新的 1.5 ml 微量離心管，加入 117 μl flush buffer (FB) 與 3 μl flush tether (FLT)，使用微量分注器混合。

(2) 準備文庫：拿取 1 個新的 0.2 ml 微量離心管，加入 5 μl DNA 文庫、15 μl sequencing buffer (SQB) 及 10 μl loading beads (LB)。

(3) 將 Flow Cell (R9.4.1) 放入 MinION Mk1B (MIN-101B)，聽到一喀聲確認卡緊，隨後載入文庫。

(4) 拉動密封片以打開樣本導入開口，使用 200 μl 微量分注器在樣品開口加入 Priming mix，緩慢穩定地將樣本載入 Flow Cell 中，確保樣品端口或微量分注器未有空氣注入。

(5) 使用 200 μl 微量分注器在樣品開口緩慢加入 DNA 文庫，並將其全部載入到樣品槽。確保樣品槽或微量分注器端部沒有空氣，讓 DNA 文庫緩緩地進入 Flow

cell。

(6) 連接 MinION Mk1B 至電腦，打開 MinKNOW v. 23.07.15，定序儀加熱並檢查 Flow cell 能用的孔數。

(四) 鹼基判定(Basecalling)：在 GPU 電腦作業系統下，使用軟體 Guppy v. 6.5.7 (Oxford Nanopore Technologies) 將 FAST5 檔案格式轉檔為序列檔，指令為 `guppy_basecaller -i [fast5_dir] -r -s [basecall_output_dir] -c dna_r9.4.1_450bps_hac.cfg--num_callers 1 --gpu_runners_per_device 8 -x auto`。

(五) 多工解訊與序列收集：使用軟體 ONTbarcode 2.2 (Srivathsan *et al.*, 2021) 區分各樣本序列，在 demultiplex 文字文件中記錄樣本名稱、引子序列及引子標記等資訊(表二)，將 basecalling 獲得的 fastq 檔案進行樣本序列區分，設定序列相似度閾值，整合後即為該物種 DNA 序列。相關參數設定為：(a) DNA 條碼長度及最小長度依據通用引子增幅片段設定為 658 bp，產物和引子的搜尋都設定為 100 bp；(b) consensus calling 使用預設值分析(Main consensus calling : 0.3 ; Range of frequencies to assess : 0.2-0.5 ; step size : 0.05)；(c) 遺傳密碼使用無脊椎動物粒線體編碼；(d) consensus by length 設定：coverage 25、50、100、200 和 500，讀取長度的最大誤差：50 bp，consensus by similar setting 的 coverage 設定為 100。軟體分析流程為：(1) 依據 primer 及 tag 進行 Demultiplexing；(2a) 透過長度達成共識：選出與預期條碼長度最接近的解序序列，達到指定的覆蓋率，並使用 MAFFT 進行共識整合；(2b) 透過相似性達成共識：從 2a 中選出與共識最相似的解序序列(相似度> 90%)，並使用 MAFFT 進行共識整合；(3) 透過條碼比較達成共識：從 2a 中選出與共識最相似的解序序列(相似度> 90%)，並使用 MAFFT 進行共識整合。

三、物種的序列比對

將序列上傳至 GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 與 Barcode Of Life Data System (BOLD) 進行序列物種比對，相似度達 97% 以上作為物種鑑定依據 (Hebert *et al.*, 2003)，並下載對應物種 DNA 序列進行親緣分析，確認物種之單源群

特性。

四、DNA 序列排序

使用 SeaView5 (Gouy *et al.*, 2021) 之 Muscle Multiple Alignment 將本研究取得的序列與 GenBank 下載的序列進行排序。

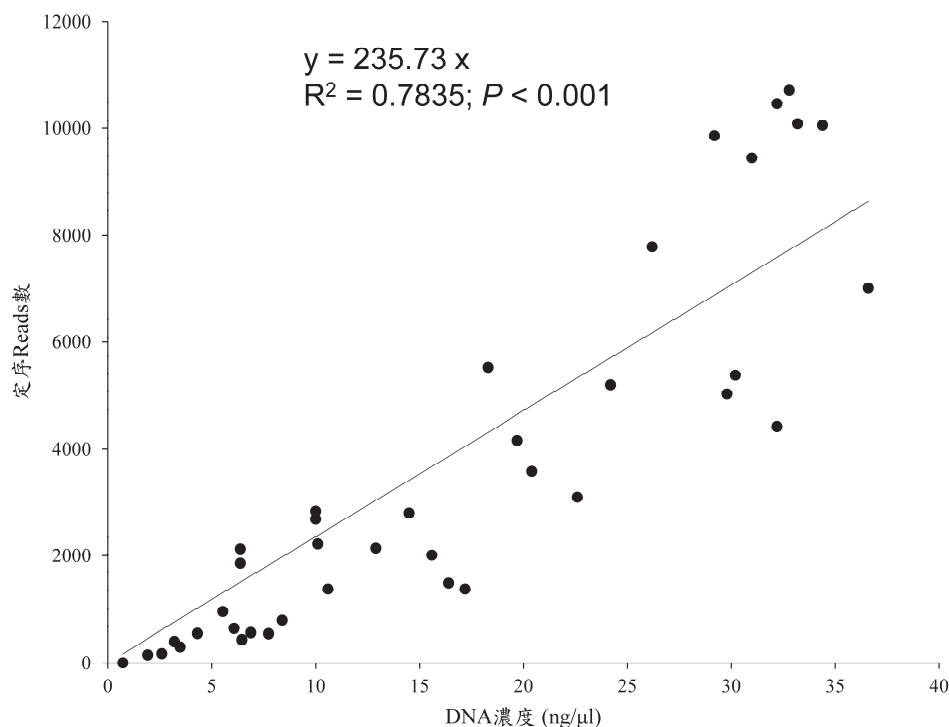
五、親緣分析

排序後的 DNA 序列，使用 MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) 的鄰接歸群法 (neighbor-joining method, NJ) 檢視物種的單源群特性，核苷酸置換模型選用 Kimura 2-parameter，任兩序列比對過程設定為 Pairwise deletion，節點的支持度則使用拔靴值 (Bootstrap method) 檢測，重複取樣數設定為 1,000。

結 果

定序數據收到 108 萬條解序序列 (reads)，總數據量為 652.88 Mb，序列的 N50 為 614 bp，定序檔案容量為 12.3 Gb，上機時間為 2 小時 13 分。樣本進行 demultiplex 後，樣本的解序序列介於 3-10,714 條(表一)；本次測試共成功定序 38 個樣本，其中薊馬 Thy39 濃度極低 (0.76 ng/μl)，僅取得 3 條序列，未能成功取得序列；而次低的蚜蟲 Hem2837 (1.92 ng/μl) 及果蠅 Dip403-1 (2.6 ng/μl)，分別有 150 條及 175 條解序序列，均可成功取得整合序列，並比對到物種；其餘樣本濃度範圍為 3.2~36.6 ng/μl，均可成功整合取得序列。分析顯示樣本的 DNA 濃度與得到的解序序列呈現正相關 ($R=0.89$; $P<0.001$) (圖二)，測試結果顯示 ONT 定序成功的樣本 DNA 濃度至少須達到 1.92 ng/μl，方可取得足夠解序序列進行序列的一致性整合 (consensus) 分析，此數值可作為未來樣本 PCR 時的濃度參考。透過 ONT 定序技術取得之 DNA 條碼序列，與 Sanger 定序比對一致，可確保物種比對結果正確性。

物種鑑定比對上，檢疫害蟲斑翅果蠅及其同屬物種 *D. immigrans*、*D. simulans* 及黑腹果蠅 (*D. melanogaster*) 等 4 種序列上傳至 GenBank 進行物種比對，結果與各樣本對應的物種吻合，序列相似性皆為 100% (表一，圖三)。防檢署各分署檢送的雙翅目 (Dip)、鱗翅目 (Lep)、鞘翅目 (Col)、膜翅目 (Hym)、直翅目 (Ort) 及纓翅目 (Thy) 等 25 個樣本，除上述 Thy39 外，成功取得 24 個樣本序列，



圖二 樣本增幅後的 DNA 濃度與 ONT 解序序列 (reads) 數量之相關性分析。

Fig. 2. Correlation analysis between amplified DNA concentration of samples and the number of ONT sequencing reads.

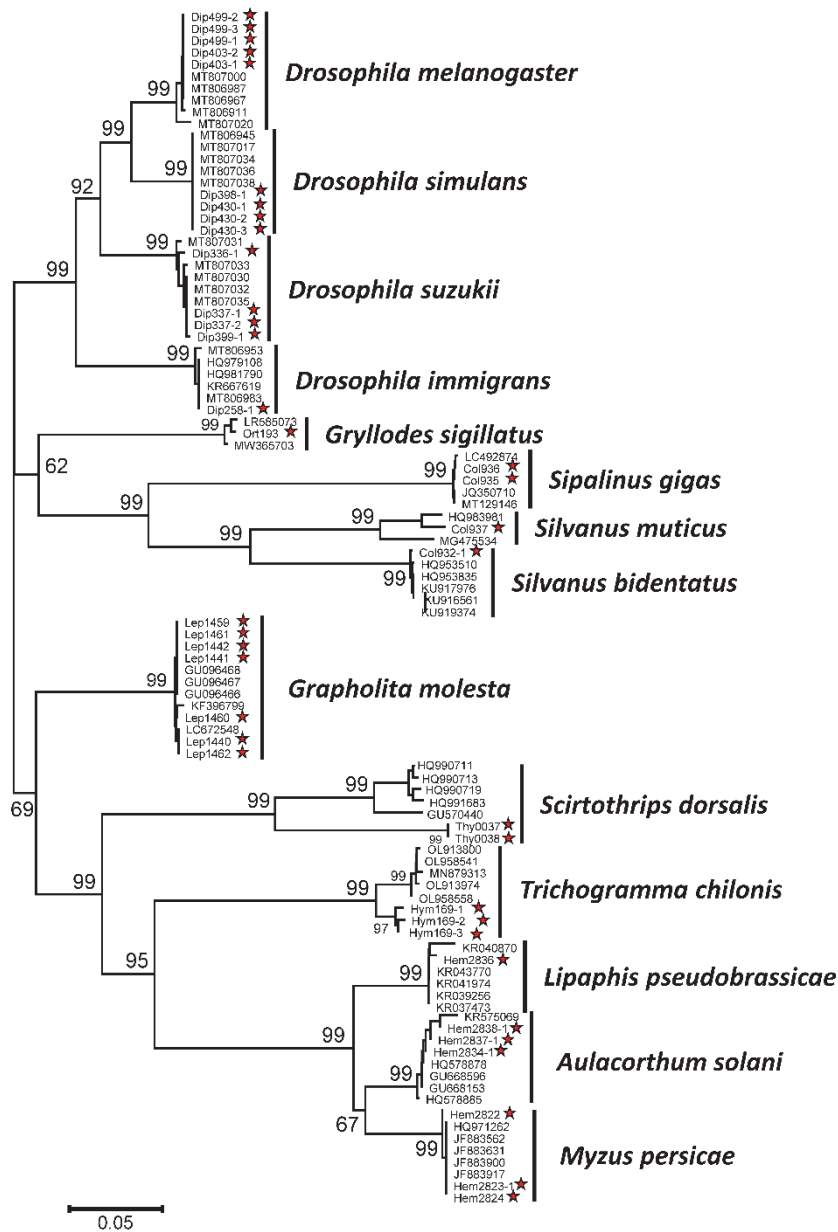
GenBank 比對的物種相似度介於 97.72~100% (表一)；親緣分析結果也顯示，各個樣本序列均與同種的樣本緊密群聚成一個單源群 (圖三)。上述 DNA 變異分析及親緣分析均顯示，藉由 ONT 技術所定序出來的序列，可作為物種鑑定依據。

討 論

本研究應用檢疫害蟲斑翅果蠅及進口農作所檢疫到的害蟲，建立 ONT 定序方法分析流程，除可提供另一項害蟲檢疫技術方法外，也可加速害蟲的鑑定速度，樣本送達後，有可能於 1 天內完成鑑定需求。此方法雖然價格較高，但經由多樣本混樣的方式，將可降低鑑定費用；也如同傳統 DNA 定序方法，測試的樣本無論是成體或幼體均可進行操作。本研究更發現，PCR 的 DNA 濃度大於 1.9 ng/μl，便可經由 ONT 方法組合到準確的 DNA 序列。

昆蟲類群繁多，邊境防檢疫實務常見的昆蟲包括縷翅目、鱗翅目、半翅目、雙翅目及鞘翅目，通用引子並無法成功複製所有物種的 DNA 條碼。本實驗室長期協助防檢疫署使用 DNA 條碼鑑定各類群檢疫害蟲，往昔經驗也顯示，無法使用單一通用引子複製薊馬 DNA 序列；此外，ONT 技術在通用引子加

上 tag 標識序列進行樣本區辨，使得 PCR 複製時未若通用引子順利，造成 DNA 產物濃度較低。改善建議如下：(1) 若有 PCR 增幅效果不佳而造成低濃度的樣本，易造成樣本僅取得少量的解序序列，無法順利進一步成功整合序列，故 DNA 濃度較低的樣本，可加入較多體積的 PCR 產物建庫，提升磁珠純化回收的 DNA 總量，增加定序成功的機率；(2) 先行使用各類群適用的引子增幅 DNA 條碼區段，建庫時再以外接方式黏上區辨樣本的 tag 標識序列，將可大幅提升標的 DNA 定序成功率。在儀器設備部分，ONT 定序原理儀器讀取通過奈米孔的單股 DNA，鹼基位 ATCG 以不同電子訊號記錄，生成的檔案容量龐大，需要高運算的電腦工作站處理分析，應用 GPU 處理器加速將電序號轉檔為 ATCG 序列檔，此部分與傳統定序不同。本研究使用 ONT 定序技術，建立檢疫害蟲 DNA 條碼，可在實驗室建立標準操作流程 (圖一)；樣本取得後，完成存證標本照拍攝、DNA 萃取及 PCR 反應約需 4 小時，建庫操作流程 1 小時後即可上機定序，最快可在 1 至 1.5 天內取得序列，而傳統定序則需考量生技公司的處理上機時間，通常需 3 天時間才能取得序列；顯見 ONT 技術對於鑑識邊境作物有害生物之物種鑑定，的確可有效提高防檢疫流程處理效率。此外，官方的



圖三 使用 Oxford Nanopore Technologies 開發之 MinION 儀定序之 DNA 條碼與 GenBank 上搜尋所得相對物種的親緣分析。物種學名標示於各群旁；★為本研究定序之序列。

Fig. 3. Phylogenetic analysis of DNA barcodes from the ONT sequencer and their corresponding blast sequences from GenBank. Species names were labeled beside each group; ★: sequences acquired in this study.

ONT 定序流程主要使用 New England Biolabs 生技公司的 Kit，Roche 生技公司標榜建庫流程更加簡單，後續將瞭解兩者建庫系統，檢視是否能更快速地完成建庫，縮短實驗時間，提升快速鑑定效率。ONT 技術可定序單一標本外，更可混樣處理多標本，混樣越多費用越便宜。舉例來說，一個標本使用 Sanger 定序雙股 DNA 及 PCR 費用為 500 元；Nanopore 建庫一次約為 6600 元，1 個標本的 PCR 費用為 50 元，定序 15 個標本，則每個標本均攤的費用為 490 元，故標本數若達 15 個以上即能與 Sanger 定序費

用打平，若標本數越多，則花費將越便宜。然而考量到標本數較多的情形，為使所有標本皆分配到解序序列，定序將需花費更長的時間。

目前 ONT 定序技術相關研究日益增加，除可應用於檢疫害蟲鑑定外，亦可在農業昆蟲多樣性研究發揮重要角色。此技術曾應用在生物多樣性瀕危的 Ecuadorian Chocó 熱帶雨林進行兩棲爬蟲類調查 (Pomerantz *et al.*, 2018)，能在偏遠的雨林將採集到的標本在 24 小時內成功定序並且比對至物種，準確率 > 99%。由於 MinION 定序儀生成的序列只需

要 30 條解序序列即可達到高準確度，加上可進行混樣，故使用 ONT 定序為快速、經濟有效的大量定序法，不僅可促進生物多樣性研究發展，亦可達到生態保育的目的。Hebert *et al.* (2023) 使用 MinION 能同時定序 100,000 個樣本，從標本 DNA 萃取出 DNA 條碼完成，每個樣本完成定序僅需 0.10 美元，極有可能在二十年內完成普查所有物種的夢想。臺灣近期也有學者應用 ONT 技術瞭解森林落葉層鞘翅目昆蟲多樣性，發現不同種幼蟲對於微棲所環境需求迥異，並與國際專家合作，檢視建立落葉層昆蟲物種多樣性資料庫 (Fikáček *et al.*, 2023, Hu *et al.*, 2024)。然而，目前尚未有研究全面建立農業昆蟲、森林昆蟲及衛生昆蟲的 DNA 條碼，也無法瞭解分析上述昆蟲在臺灣的組成及分布特性，遑論探討臺灣地區各類昆蟲的多樣特性。近 5 年國內投注大量經費在水稻田生態調查相關計畫 (Chen *et al.*, 2023)，若能搭配高通量巨量條碼技術，不僅能進一步檢視水稻田各農業昆蟲多樣性暨建立水稻昆蟲基礎資料，並可套用至各種作物，供作未來防治與監測的重要資料。

昆蟲物種數多，鮮有專家可鑑定所有害蟲種類，在 DNA 條碼資料庫已建立 23 萬餘種昆蟲的基礎上，應用 DNA 條碼將能有效快速確認檢疫攔截到的害蟲身分。防檢署積極組織團隊全面建立檢疫害蟲及國內重要害蟲的 DNA 條碼及快速鑑定技術已行之有年，近期更開發使用 ONT 技術進行檢疫緊急樣本的分子鑑定，最快可在 1 至 1.5 天完成物種鑑定，預期可在農產品進口貿易通關上發揮效益，也符合保鮮需求的農產品之加速通關，提升我國檢疫害蟲分子鑑定的國際聲望及地位。

誌 謝

本研究承蒙農業部動植物防疫檢疫署提供研究經費補助 (112 農科-5.3.3-檢-B5)，特此致謝。感謝國立臺灣果蠅遺傳資源中心 (<http://flycoretw.lifescience.ntu.edu.tw/flycore/>) 丁照棟老師及國立中興大學分子生物學研究所曾振圓老師提供果蠅標本供實驗測試，University of Wisconsin-Madison 的翁逸明博士提供斑翅果蠅浸液標本。同時感謝中興大學昆蟲學系乃育昕老師與其博士班學生李頤瑄小姐協助第三代 MinION 定序儀裝置操作，植物病理學系歐玠暉博士協助分析。

引用文獻

- Avise JC, Johns GC.** 1999. Proposal for a standardized temporal scheme of biological classification for extant species. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7358-7363. doi: 10.1073/pnas.96.13.7358
- Caterino MS, Cho S, Sperling FAH.** 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annu Rev Entomol* 45: 1-54. doi: 10.1146/annurev.ento.45.1.1
- Chen JH, Liao YC, Chiu MC, Yang MM.** 2023. Arthropod communities of rice agroecosystems can be shaped both by local agricultural practices and the surrounding landscape. *Front Environ Sci* 11: 1221247. doi: 10.3389/fenvs.2023.1221247
- Chua PYS, Bourlat SJ, Ferguson C, Korlevic P, Zhao L, Ekrem T, Meier R, Lawniczak MKN.** 2023. Future of DNA-based insect monitoring. *Trends Genet* 39: 531-544. doi: 10.1016/j.tig.2023.02.012
- Fikáček M, Hu FS, Le MH, Huang JP.** 2023. Can immature stages be ignored in studies of forest leaf litter arthropod diversity? A test using Oxford Nanopore DNA barcoding. *Insect Conserv Divers* 17: 31-50. doi: 10.1111/icad.12702
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R.** 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3: 294-299.
- Frey JE, Frey B, Frei D, Blaser S, Gueuning M, Bühlmann A.** 2022. Next generation biosecurity: Towards genome based identification to prevent spread of agronomic pests and pathogens using nanopore sequencing. *PLoS One* 17: e0270897. doi: 10.1371/journal.pone.0270897
- Gopurenko D, Gillespie PS, Minana R, Reynolds OL.** 2021. DNA barcode identification of *Conopomorpha cramerella*

- (Snellen, 1904) (Lepidoptera: Gracillariidae) and other moths affecting cacao in Papua New Guinea. *Austral Entomol* 60: 598-609. doi: 10.1111/aen.12559
- Gouy M, Tannier E, Comte N, Parsons DP.** 2021. SeaView version 5: a multiplatform software for multiple sequence alignment, molecular phylogenetic analyses, and tree reconciliation. *Mol Biol Evol* 2231: 241-260. doi: 10.1007/978-1-0716-1036-7_15
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR.** 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Royal Soc B* 270: 313-321. doi: 10.1098/rspb.2002.2218
- Hebert PDN, Floyd R, Jafarpour S, Prosser SWJ.** 2023. Barcode 100K specimens: In a single Nanopore run. *bioRxiv*: 2023. 11. 29.569282. doi: 10.1101/2023.11.29.569282
- Hu FS, Arriaga-Varela E, Biffi G, Bocák L, Bulirsch P, Damaška AF, Frisch J, Hájek J, Hlaváč P, Ho BH, Ho YH, Hsiao Y, Jelínek J, Klimaszewski J, Kundrata R, Löbl I, Makranczy G, Matsumoto K, Phang GJ, Ruzzier E, Schülke M, Švec Z, Telnov D, Tseng WZ, Yeh LW, Le MH, Fikáček M.** 2024. Forest leaf litter beetles of Taiwan: first DNA barcodes and first insight into the fauna. *Deutsche Entomologische Zeitschrift* 71: 17-47.
- Jennifer H, Jozef CO-S, Thomas P, Rebecca L, Jayne H, Neil B.** 2016. DNA barcoding for biosecurity: case studies from the UK plant protection program. *Genome* 59: 1033-1048. doi: 10.1139/gen-2016-0010
- Kanturski M, Lee Y, Choi J, Lee S.** 2018. DNA barcoding and a precise morphological comparison revealed a cryptic species in the *Nippolachnus piri* complex (Hemiptera: Aphididae: Lachninae). *Sci Rep* 8: 8998. doi: 10.1038/s41598-018-27218-2
- Knot IE, Zouganelis GD, Weedall GD, Wich SA, Rae R.** 2020. DNA barcoding of nematodes using the MinION. *Front Ecol Evol* 8: 100. doi: 10.3389/fevo.2020.00100
- Kress WJ, García-Robledo C, Uriarte M, Erickson DL.** 2015. DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends Ecol Evol* 30: 25-35. doi: 10.1016/j.tree.2014.10.008
- Kumar S, Stecher G, Tamura K.** 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33: 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Piper AM, Batovska J, Cogan NOI, Weiss J, Cunningham JP, Rodoni BC, Blacket MJ.** 2019. Prospects and challenges of implementing DNA metabarcoding for high-throughput insect surveillance. *GigaScience* 8: giz092. doi: 10.1093/gigascience/giz092
- Pomerantz A, Peñafiel N, Arteaga A, Bustamante L, Pichardo F, Coloma LA, Barrio-Amorós CL, Salazar-Valenzuela D, Prost S.** 2018. Real-time DNA barcoding in a rainforest using nanopore sequencing: opportunities for rapid biodiversity assessments and local capacity building. *GigaScience* 7: giy033. doi: 10.1093/gigascience/giy033
- Srivathsan A, Lee L, Katoh K, Hartop E, Kutty SN, Wong J, Yeo D, Meier R.** 2021. ONTbarcoder and MinION barcodes aid biodiversity discovery and identification by everyone, for everyone. *BMC Biol* 19: 217. doi: 10.1186/s12915-021-01141-x
- Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP.** 2002. DNA points the way ahead in taxonomy. *Nature* 418: 479. doi: 10.1038/418479a
- Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP.** 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol Evol* 18: 70-74. doi: 10.1016/S0169-5347(02)00041-1
- Yeo D, Srivathsan A, Puniamoorthy J, Maosheng F, Grootaert P, Chan L, Guénard B, Damken C, Wahab RA, Yuchen A, Meier R.** 2021. Mangroves are an overlooked hotspot of insect diversity despite low plant diversity. *BMC Biol* 19: 202. doi: 10.1186/s12915-021-01088-z

Zenni RD, Essl F, García-Berthou E, McDermott SM. 2021. The economic costs of biological invasions around the world.

Neobiota 67: 1-9. doi: 10.3897/neobiota.67.69971

Rapid Identification of Quarantine Pests Using the Nanopore Sequencing Technique

Cheng-Lung Tsai¹, Hui-Yi Li¹, Su-Chin Chen², Wen-Bin Yeh^{1*}

¹ Department of Entomology, National Chung Hsing University, 145 Xingda Rd. Taichung City 402202, Taiwan

² Animal and Plant Health Inspection Agency, Ministry of Agriculture, Executive Yuan, No. 100, Sec. 2, Heping W. Rd., Taipei 100060, Taiwan

* Corresponding email: wbyeh@nchu.edu.tw

Received: 20 March 2024

Accepted: 20 June 2024

Available online: 28 June 2024

ABSTRACT

Border quarantine of crops is the first line of defense against pest invasions. Therefore, rapid and accurate identification of detected pests is crucial to develop appropriate management measures. However, identifying most pests is challenging, and conventional molecular identification methods cannot acquire sequences to confirm species identity within one day. Such delays affect crops' freshness and reduce quarantine measures' effectiveness. This study aims to establish a laboratory DNA barcoding approach for sequencing mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) using the MinION sequencer from Oxford Nanopore Technologies (ONT) to shorten identification time. This procedure evaluates the DNA concentration and PCR product volume required for ONT library preparation, sequencing reads counts, and priors for DNA consensus analysis. We prepared the ONT library using quarantine fruit fly species and 14 batches of border quarantine pests from the Quarantine Bureau. DNA barcodes were obtained using the MinION sequencer, yielding 1.08 million reads, a data volume of 652.88 Mb, an N50 sequence length of 614 bp, and a sequencing file size of 12.3 Gb. Our results show a positive correlation between sample DNA concentration and sequencing reads, establishing a baseline DNA concentration of 1.92 ng/μl for ONT sequencing. Blast results in GenBank confirmed 100% species identity of the four fruit fly species and 97.73-100% for the quarantine pests, enabling accurate species identification. Consequently, DNA barcodes can be obtained within 1 to 1.5 days using the standard procedure of ONT. Although the cost of ONT sequencing is high, mixing multiple samples in a single reaction can be offset. Obviously, the ONT method significantly enhances quarantine capabilities by accelerating pest identification, effectively reducing the quarantine timeline of imported agricultural products.

Key words: Sequencing technique, DNA barcodes, quarantine process, species identification