



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

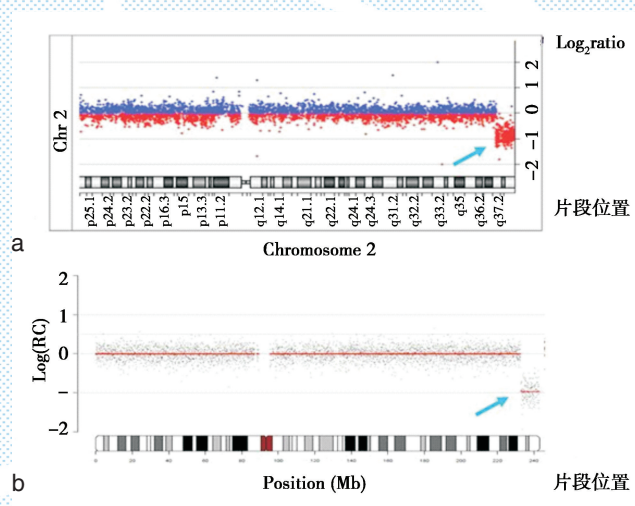
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2016年11月 第8卷 第6期 总第46期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 8 Number 6 November 2016



a: aCGH 结果; b: NGS 结果; 蓝色箭头表示一处染色体缺失 2q37.1q37.3 (232,612,296-242,690,037)

图(P387) aCGH 和 NGS 分析染色体拷贝数变异的比较

Figure (P387) Comparison of chromosomal copy number variants analysis by aCGH and NGS

中山大学 主管

中国科技核心期刊 (中国科技论文统计源期刊)

中国核心期刊 (遴选) 数据库收录期刊

中国期刊全文数据库全文必录期刊

中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊

中文生物医学期刊文献数据库 CMCC 收录期刊

中国生物医学期刊引文数据库 CMCi 收录期刊

中国学术期刊影响因子年报统计源期刊

ISSN 1674-6929



9 771674 692099

1.1>

于月新



1973年3月出生。
1995年毕业于中国医科大学临床医学系，北京301医院妇产科学博士。

主任医师，副教授，中国医科大学、大连医科大学等院校硕士生导师。现任中国人民解放军第202医院生殖医学中心主任、精准医疗

实验室主任。全军妇产科内分泌专业委员会委员，全军产科与围产专业委员会委员，辽宁省中西医结合绝经与内分泌专业委员会常委，沈阳军区高层次科技人才培养对象，沈阳军区医疗成果鉴定委员会成员，沈阳市医疗事故鉴定委员会成员。

于月新教授擅长不孕不育综合诊治、辅助生殖技术、宫腔镜检查与手术等，对生殖内分泌疾病、高危妊娠诊断和处理、危急重症孕产妇的救治、妇科常见病及妇科肿瘤的诊治有丰富的临床与科研经验。完成了辽宁省首例单基因病胚胎植入前遗传学诊断试管婴儿，阻断了遗传病家庭致病基因的继续传递。开展了新生儿遗传代谢病筛查、药物相关基因检测、肿瘤个体化治疗靶向药物检测、肿瘤易感基因突变类型检测、病毒定量及分型检测、胚胎植入前遗传学诊断与筛查（PGD/PGS）、Y染色体微缺失检测、耳聋相关基因检测、无创产前诊断等多个精准医学检测及相关研究。获全军医疗成果一等奖1项，二等奖3项，三等奖2项，辽宁省自然科学二等奖1项。发表论文30余篇。培养和招收硕士研究生10余名。



分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2016 年 11 月 第 8 卷 第 6 期 总第 46 期 Bimonthly Volume 8 Number 6 November 2016

主管 主办	中山大学 《中国家庭医生》杂志社有限公司
顾问 主编 编辑部主任 编辑部 编辑 排版 出版	来茂德 申子瑜 李明 徐伟文 《分子诊断与治疗杂志》编辑部 李晓兰 叶萍萍 李彩珍 钟华安 《中国家庭医生》杂志社有限公司
地址 电话 传真 电子邮箱 刊号	广州市天河区天河北路 179 号祥龙大厦 10~11 楼(510620) (020) 32290177 32290789-206 (020) 32290177 jmdt@vip.163.com ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R
邮发代号 发行单位 发行范围 广告经营许可证 印刷 出版日期 定价	46-283 广东省报刊发行局 国内外公开发行 粤工商广字第 01139 号 广州中大印刷有限公司 2016 年 11 月 18 日 RMB 15.00 元
Responsible Institution Sponsor	Sun Yat-sen University China Family Doctors Magazine Publisher Co. Ltd.
Consultant Editor in Chief Managing Director Editorial Office Editors Typesetting Editing	LAI Maode SHEN Ziyu LI Ming XU Weiwen <JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office LI Xiaolan YE Pingping LI Caizhen ZHONG Huaan China Family Doctors Magazine Publisher Co. Ltd.
Add Tel Fax E-mail CSSN Printing Publish Date Price	10~11 Fl., Xianglog Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620 (020) 32290177 32290789-206 (020) 32290177 jmdt@vip.163.com ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R Guangzhou Zhongda Printing Co., Ltd. 2016.11.18 RMB 15.00

版权归《分子诊断与治疗杂志》所有,本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点,除非特别声明。

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2016年11月 第8卷 第6期

目次

述评

下一代测序技术在遗传病临床检测中的应用 杨学习 (357)

论著

11 339例孕妇无创产前检测结果对比分析 王元丽 唐明珠 杨学习 (363)

应用下一代测序技术对 α 地中海贫血进行胚胎植入前遗传学检测
..... 谢美娟 邓权衡 邓红辉 等 (367)

基于高通量测序技术无创筛查双胎染色体非整倍体及胎儿游离DNA浓度分析
..... 许旭平 谢美娟 甘海燕 等 (375)

下一代测序法对新生儿进行苯丙酮尿症致病突变的筛查 王辉芳 叶倩平 杨旭 等 (380)

微阵列比较基因组杂交技术与二代基因测序检测拷贝数变异的对比
..... 陈新周 王明珠 何丹 等 (385)

运用半导体测序法检测4种遗传病常见突变 王辉芳 梁志坤 叶倩平 等 (389)

采用Amplicon文库构建法对地中海贫血的基因检测 孙玉婷 范冬梅 叶倩平 等 (395)

基于下一代测序平台的结直肠癌KRAS基因检测 李丽娟 罗婉珊 张家彬 等 (401)

广东地区200例正常人耳聋基因突变数据库的建立 邹俊 杨琳艳 罗俊明 等 (407)

综述

人类癌症特异敏感标志物: 循环肿瘤DNA 吴龙 王穗海 梁志坤 (413)

非小细胞肺癌组织中ALK、ROS1、RET融合基因检测方法的比较
..... 郭文靖 朱安娜 吴英松 (418)

p53基因突变检测方法的演进和趋势 张艳霞 杨学习 (424)

专家风采

于月新 (封二)

实验室巡礼

中国人民解放军第202医院精准医疗实验室 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 8 Number 6 November 2016

CONTENTS

COMMENTS

Progress of the applications of next generation sequencing technology in clinical diagnostics of genetic disorders

YANG Xuexi (357)

ORIGINAL ARTICLES

Comparative analysis of the non-invasive prenatal test results among 11 339 pregnant women

WANG Yuanli, TANG Mingzhu, YANG Xuexi (363)

Successful preimplantation genetic detection for alpha thalassaemia by using next generation sequencing technology

XIE Meijuan, DENG Quanheng, DENG Honghui, LU Shaoyue, YANG Xuexi, MA Qiang (367)

Noninvasive prenatal testing for aneuploidy by next generation sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies and its fetal free DNA fraction analysis

XU Xuping, XIE Meijuan, GAN Haiyan, LIANG Rongliang, HAN Erkang, YANG Xuexi, WU Yingsong (375)

Screening of the phenylketonuria of the newborn by the next generation sequencing

WANG Huifang, YE Qianping, YANG Xu, LIANG Zhikun, HU Niya (380)

The comparison between array-CGH with next generation sequencing in the detection of copy number variations

CHEN Xinzhou, WANG Mingzhu, HE Dan, ZHOU Hui, LIN Fangxin, LI Fenxia (385)

Detection of common mutations in four types of genetic disorders by semiconductor sequencing platform

WANG Huifang, LIANG Zhikun, YE Qianping, YANG Xu (389)

Gene diagnostic of thalassemia by the method of constructing amplicon libraries

SUN Yuting, FAN Dongmei, YE Qianping, YANG Linyan, LIANG Zhikun, YANG Xuexi (395)

Based on the next generation sequencing platform for detection colorectal *KRAS* gene

LI Lijuan, LUO Wanshan, ZHANG Jiabin, WANG Qing, WU Yingsong (401)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 8 Number 6 November 2016

CONTENTS

Establishment of a gene mutation database in deafness from 200 health individuals in Guangdong area

ZOU Jun, YANG Linyan, LUO Junming, LIANG Zhikun, YANG Xu, ZHANG Lihong (407)

REVIEWS

ctDNA: a specific and sensitive biomarker for human cancers

WU Long, WANG Suihai, LIANG Zhikun (413)

Comparison of detection methods of *ALK/ROS1/RET* fusion gene in non-small cell lung cancer tissue

GUO Wenjing, ZHU Anna, WU Yingsong (418)

Evolution and trends of the detection methods for *p53* gene mutation

ZHANG Yanxia, YANG Xuexi (424)

• 述 评 •

下一代测序技术在遗传病临床检测中的应用

杨学习*

[摘要] DNA测序技术已广泛应用于生物学研究,很多生物学问题也都可以借助测序技术予以解决。过去10年(2005-2015年),下一代测序技术(next generation sequencing, NGS)逐步从新技术成长为主流的测序技术,并逐渐走进临床诊断领域。NGS以其简单、快速、高分辨率、高通量的特点,在传染性疾病预防、肿瘤的早诊早治、遗传病的早期筛查和诊断、无创产前筛查、胚胎植入前诊断和筛查等领域发挥越来越大的作用,已成为目前临床领域最具有应用前景的技术之一。同时下一代测序技术领域仍在快速发展,新的测序技术及数据分析技术还在不断涌现,序列数据库和测序数据快速增加。下一代测序技术也有助于以更低廉的价格,更全面、更深入地来分析基因组、转录组及蛋白质相互作用组的各项数据。可以预见,各种测序将成为一项广泛使用的常规实验手段,有望给生物医学研究领域和医学临床诊断带来革命性的变革。本文主要针对下一代测序技术在无创产前诊断、遗传病检测、胚胎植入前诊断和筛查中的临床应用进行介绍和评述。

[关键词] 下一代测序; 染色体非整倍体无创产前筛查; 遗传病检测; 胚胎植入前诊断和筛查

Progress of the applications of next generation sequencing technology in clinical diagnostics of genetic disorders

YANG Xuexi*

(School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] DNA sequencing is widely used in biology research, and many biological problems only can be solved by sequencing technology. In the past 10 years (2005–2015), next-generation sequencing has developed from a newborn technology to a mainstream technology, and has been gradually applied to clinical diagnosis. With a simple, fast, high-throughput, and high-resolution feature, next generation sequencing has been believed to be one of the most potential technology in clinical tests, especially in infectious disease prevention, noninvasive prenatal diagnosis, genetic disorders identification and diagnosis, cancer early diagnosis and treatment, and preimplantation genetic screening field. Meanwhile, next-generation sequencing technology is still growing quickly, new sequencing and data analysis methods are constantly emerging, sequence database banks and sequencing data are rapidly increasing. Sequencing technology development lead analysis genome, transcriptome, and protein-protein interaction data more deeply, comprehensively and cheaply. Sequencing will be a widely used method in the routine lab test and will be a revolutionary change in biomedical research and clinical diagnosis. The present paper will briefly review the application of next generation sequencing in the field of noninvasive prenatal diagnosis, genetic disorders diagnosis, preimplantation genetic screening.

[KEY WORDS] Next generation sequencing; Noninvasive prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies; Genetic disorders diagnosis; Preimplantation genetic screening/diagnosis

基金项目: 广东省科技计划(2015A030401040); 广州市科技计划(201604020104)

作者单位: 南方医科大学检验与生物技术学院, 广东, 广州 510515

*通讯作者: 杨学习, E-mail: yxxzb@sohu.com

DNA 测序技术是生命科学领域里一项创造性的发明,从早期基于 Sanger 法开发的第一代自动化测序仪到下一代测序(next generation sequencing, NGS)技术平台的发展,已经使生命研究的基本元素发生了转变——从单一、局部的基因或基因的片段转变成多基因、多片段甚至整个基因组;反过来,这种转变又需要更加强大的测序技术来支持,测序技术与其应用之间的协同关系使得两者的发展在可预见的未来内保持这种趋势,并且为其对生命科学研究和临床应用的巨大前景的推动作用而加速。

近几年国内 NGS 市场异常火爆,测序公司不断涌现。而且已有多家 NGS 公司迅速涌入临床领域,开展基于 NGS 的临床检测服务,如:染色体非整倍体无创产前筛查、百种甚至千种遗传病产前诊断、肿瘤个体化治疗相关基因多态性位点检测、单基因和多基因疾病的易感基因遗传检测和咨询等项目。2014 至 2015 年,国家食品药品监督管理总局(China Food and Drug Administration, CFDA)先后批准了华大基因、中山大学达安基因股份有限公司、北京博奥晶典生物技术有限公司和北京贝瑞和康生物技术有限公司的高通量测序仪和测序试剂,使染色体非整倍体无创产前诊断成为现实,开创了高通量测序在临床应用中的新局面并引起了社会的广泛关注。多家公司相继启动基于 NGS 测序技术的包括肿瘤靶向用药及疗效相关基因位点检测、遗传病筛查和诊断、胚胎植入前诊断和筛查相关试剂盒的 CFDA 注册工作。同时,以华大基因、中科紫鑫科技有限公司、深圳华因康基因科技有限公司、深圳市瀚海基因生物科技有限公司、上海小海龟科技有限公司为代表的公司也积极研发具有自主知识产权的基因测序仪。在不远的将来,NGS 将成为一项广泛使用的常规实验手段,有望给生物医学研究领域和医学临床诊断带来革命性的变革。本文将主要针对 NGS 技术人无创产前诊断、遗传病检测、胚胎植入前诊断和筛查中的临床应用进行介绍,以示其较为系统的面貌。

1 NGS 在染色体非整倍体无创产前诊断中的应用

染色体非整倍体无创产前诊断是 NGS 在临床应用上的一个成功典范,极大地推动了 NGS 在临

床中的应用和发展。染色体非整倍体是最主要的胎儿染色体异常遗传性疾病,以 21 三体、18 三体和 13 三体为主要形式。目前非整倍性染色体疾病尚无有效治疗方法,唯一有效的措施为广泛开展产前筛查与诊断^[1]。但常规唐氏综合征产前筛查普遍存在假阳性和假阴性较高的问题,且通过羊膜穿刺和胎儿绒毛取样获得胎儿 DNA 通常会造成 1% 的流产率^[2]。1997 年,在孕妇血浆和血清中发现了胎儿游离 DNA 片段^[3],这为无创性产前基因检测带来新的希望。2008 年,首次通过对母亲血浆胎儿游离 DNA (cell-free fetal DNA, cffDNA) 进行 NGS 分析来检测三体^[4-5],随后大样本研究表明利用 NGS 技术进行染色体非整倍体的无创产前诊断非常有效^[6]。因其具有无创取样、无流产风险、高灵敏度、高准确性($\geq 99\%$)等特点,通过采集孕妇外周血、提取游离 DNA、采用 NGS 技术、结合生物信息分析这一方法,已成为目前染色体非整倍体产前筛查与诊断技术的主要手段。多个联盟组织[例如,美国妇产科医师协会(the American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG),美国医学遗传学会(the American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG),国际产前诊断学会(the International Society for Prenatal Diagnosis, ISPD)]正在极力推进这项技术的临床应用^[7-9]。在看到 NGS 技术强大能力的同时,我们也必须清醒地意识到胚胎胎盘不一致,嵌合体、胎儿 DNA 浓度、孕妇本身携带微缺失微重复或患有妇科肿瘤、双胎消失综合征等原因对该技术临床应用带来的局限性。尤其是胎儿 DNA 在母体血浆的浓度是影响检测结果的常见因素。胎儿 DNA 在母体血浆中的浓度一般为 10%~15%,但也可能少于 3% 或多于 30%^[10-11],在胎儿 DNA 浓度少于 3% 的样本中使用 NGS 技术其结果是不太可信的。另外,胎儿 DNA 浓度在 3 个方面影响着染色体非整倍体诊断的应用。首先,当胎儿 DNA 浓度增加时,唐氏综合征的结果也会更显著。其次,胎儿 DNA 浓度受孕妇体重影响最大,对于体重较大的孕妇,胎儿 DNA 浓度会低,假阴性比率会增高。最后,在嵌合体中,胎儿 DNA 浓度的有效部分会减少,这也会影响检测的准确性。

2 NGS 在遗传病检测中的应用

NGS 相对于传统的 Sanger 测序法有很多优

点,最明显的是它可以在较短的时间和较低的成本下做批量检测(panel testing)。对于许多表型上类似但由很多不同遗传因素造成的遗传异质性疾病(如遗传性耳聋、先天性肌营养不良、先天性疾病糖基化),以及在同一个通路中不同的基因突变所导致的代谢性疾病全部突变的筛选、有很多变量却有相同靶标的一系列疾病(如线粒体缺陷),NGS是一个有时间和成本效益的技术工具^[12-14]。下文将通过简短介绍基于下一代测序技术的几种遗传性疾病和相应的基因检测试剂盒(panel),讨论下一代测序技术在遗传性疾病检测中的进展以及探讨怎样通过下一代测序技术来解决遗传异质性的问题。

2.1 遗传性耳聋

耳聋是最常见的感觉神经性听力损失出生缺陷疾病。大约2/3的耳聋来源于遗传因素,而剩余的1/3来源于环境^[15-16]。常规芯片和核酸质谱筛查未能发现的阳性样本,对造成听力缺陷的所有基因进行测序是经常采用的方法。绝大部分的实验室对候选基因的编码区和两侧序列用Sanger测序法来进行检测。然而,听力缺陷极大的遗传异质性导致用Sanger测序法将耗费大量的金钱和时间。而NGS技术则可以对大量基因序列进行便宜、快速的多重平行测序。

Shearer等^[17]设计的综合性诊断平台可以检测包括先天性聋视网膜色素变性综合征在内的54个已知的非综合征型耳聋基因。在6个突发性非综合征型耳聋病人里有5个病人在*STRC*、*MYO6*、*KCNQ4*、*MYN14*和*CDH23*上发现了非综合征型耳聋突变位点,包括3个新的突变位点。Licastro等^[18]设计的Usher综合征基因的诊断panel在12个Usher综合征患者中的10例中检测到位于*MYO7A*、*CLRN1*、*GPR98*、*USH2A*和*PCDH15*中的11致病突变。另外2个研究小组则分别设计了针对34个常染色体隐性遗传性非综合征型耳聋基因和24个神经性耳聋基因的检测panel^[19-20]。Sivakumaran等^[19]通过与5个基因(*GJB2*、*CDH23*、*MYO7A*、*EYAI*和*OTOF*)394个变异位点的Sanger法鉴定结果对比,NGS和Sanger法的一致性高于99.99%。Schrauwen等^[20]设计的panel中,24人中9人被确诊,达37.5%。6个患者被发现是纯合子变异,3个患者为复合杂合子变异。结果还显示一位患者可能具有*OTOF*和*SLC26A4*双基因型遗传

模式^[19]。

2.2 遗传性神经肌肉障碍

遗传性神经肌肉障碍(inherited neuromuscular disorders, NMD)是一组导致长期残疾的遗传性疾病,包括超过200种单基因疾病。在这些疾病中,有超过一半的分子机制目前尚不清楚。如果想要准确诊断,通常需要结合临床表现进行大规模一个接一个的基因检测。由于遗传异质性和散发病例缺少等位基因的分离,想要做出诊断十分昂贵、耗时并具有挑战性。NMD关联基因众多,还有一些致病基因特别长,从而使整个基因进行Sanger测序耗时耗力。对于病人来说,这种逐个基因排查法进行病因诊断,增加了检测数,因此会导致诊断的延迟、并使病人接受不必要的检查和治疗,还妨碍了采取针对性有效治疗方案的实施从而增加了疾病在家族中再发的风险。

Vasli等^[21]开发了一种有效的筛查遗传异质性神经肌肉疾病相关基因的panel,包括267个已知的NMD相关基因(1.6 Mb目的区域)。在已鉴定的病人和没有进行分子诊断的病人中,检测到了所有已知的突变位点^[21]。在8个阳性对照组中,所有的突变类型都被检查到。在一例杜氏肌肉萎缩病人检测到了*DMD*(duchenne muscular dystrophy)基因18~44外显子的大片段缺失。在2个共济失调的患者中发现存在于*SETX*的2个突变。还在*RYR1*、*TTN*和*COL6A3*上发现了几个潜在致病性突变位点,并通过Sanger测序和等位基因分离证实^[21]。但Vasli等^[21]未能在4个分子诊断不清楚的病人中寻找致病基因。Xie等^[22]通过panel测序对*DMD*基因突变进行检测,在一个中国家系(包括先证者以及先证者已被诊断出假肥大型肌营养不良的堂兄弟)*DMD*第79号外显子上发现了2个相同的突变位点,其中c.10141C>T, NM_004006.1是其致病性突变,会产生缺失羧基端的截短的肌营养不良蛋白。Valencia等^[23]则针对先天性肌营养不良(congenital muscular dystrophy disorders, CMD)进行panel检测,包括12个基因的321个外显子(65 kb目的区域)。以一个12个CMD基因都通过Sanger测序验证的正常人作为阴性对照,5个具有已知突变的样品作为阳性对照,6个具有CMD临床特征但尚未进行CMD基因检测病人作为研究对象,其诊断率为41%,而单基因检测的诊断率为17%。杜氏肌营养不良和Becker型肌营

营养不良是最常见的儿童肌营养不良症^[24],可以通过对 *DMD* 基因进行基因检测来确诊。Lim 等^[25]设计的 panel 可对 *DMD*/*BMD* 进行全面性的突变谱研究。研究对象包括 25 名患者,其中 16 名无大片段缺失/重复但患有肌营养不良蛋白表达缺陷的患者,9 名是存在大片段缺失/重复的患者。在大部分 (15/16) 没有大片段缺失/重复的患者中都检测到小的突变。以这 16 个患者作为基准,准确地预测出了 9 名已知突变患者的外显子大片段缺失/重复。16 名患者中有 15 名检测到致病性突变,突变检测率及突变类型 (12 个无义突变,2 个引起移码突变小缺失,和一个剪接突变) 与对照方法得到的结果一致。

2.3 线粒体疾病

线粒体疾病的临床表现多样,遗传方式独特,可由核或线粒体基因组的突变引起^[26]。已发现约有 70 个核基因与线粒体疾病有牵连,但仍有许多基因未知。由于线粒体疾病常表现为非特异性,因此同时检测 mtDNA 和 nDNA 的基因突变是有意义的。Vasta 等^[27]设计的包含线粒体基因组以及额外的 1 000 个核基因的 panel,通过对 42 例具有线粒体氧化磷酸化临床及生化特征的无血缘关系幼儿患者的检测,发现 55% (23/42) 患者含有隐性基因或致病突变的 mtDNA 变异体,其中 10 例患者 (24%) 可以确定具有与疾病相关的基因突变,13 例患者 (31%) 具有尚不明确的核基因突变。表明 NGS 技术应用于线粒体相关疾病的临床诊断十分具有潜力。

与传统的通过 Sanger 逐步测序检测关联基因的检测方法相比,基于 NGS panel 设计具有成本和速度优势,适用于多个潜在候选致病基因的高度遗传异质性疾病和由于同一个超大基因多个致病突变位点引起的单基因病的分析。基于 panel 的 NGS 方法的不足在于它不是包含所有与疾病相关的基因和基因区域,这是由于目的片段大小的限制或者刚被发现的未包括在 panel 上的疾病相关基因。全外显子测序和全基因组测序有可能可以对没有明确分子诊断病人中找到致病突变和/或基因,这些可以增加到目前的 panel 中去。然而与靶向 panels 相比,作为常规的分子诊断方法,全基因组或者全外显子组的方法要有更高的覆盖度,并且会降低敏感性和异质性的评估能力^[28]。而在低覆盖率下测序更多的基因将会增加假阴性的风

险,增加假阳性位点的个数,而这些假阳性位点又需要漫长的时间来验证。综合考虑目前 panel 检测的目的区域覆盖度、敏感性和特异性,目前 panel 测序还不能够完全替代 Sanger 测序。把 Sanger 测序法作为验证和补充技术是非常必要的。另外,要将 panel 测序运用到临床,还需要依据具体的捕获方法和测序平台确定每个 panel 的敏感性和特异性。

3 NGS 在胚胎植入前遗传学筛查中的应用

胚胎植入前遗传学诊断 (preimplantation genetic diagnosis, PGD)/胚胎植入前遗传学筛查 (preimplantation genetic screening, PGS) 是指在体外受精过程中,对具有遗传风险患者的胚胎进行种植前活检和遗传学分析,以选择无遗传学疾病的胚胎植入宫腔,从而获得正常胎儿的诊断方法,可有效防止有遗传病患儿的出生。不孕不育已成为当今影响人类繁衍和家庭问题的疾病之一,试管婴儿技术给不孕不育夫妇们带来了希望。但通过试管婴儿方法获得的胚胎 40%~60% 存在染色体异常^[29-30],而染色体异常是导致妊娠失败和自然流产的主要原因,也是体外受精最终失败的主要原因之一^[31]。健康的胚胎是试管婴儿成功的第一步,植入前遗传学筛查技术也因此越来越受到重视。

PGS/PGD 的通用检测手段包括 PCR、荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH), 比较基因组杂交 (array comparative genomic hybridization, aCGH)、NGS 技术等。其中 aCGH、单核苷酸多态性 (single-nucleotide polymorphism, SNP) 关联分析以及 NGS 使得检测结果更为准确。联合应用单细胞全基因组扩增技术和 NGS 可以同时检测单基因病和染色体非整倍性,准确率超过了 99%^[32]。2014 年,世界首例经 NGS 进行单基因遗传病筛查的试管婴儿,在北京大学第三医院诞生^[33]。北京嘉宝仁和医疗科技有限公司、贝瑞和康生物技术股份有限公司、江苏亿康基因科技有限公司、安诺优达基因科技 (北京) 有限公司、苏州贝康医疗器械有限公司等相继通过第三方检验、科研合作等方式为生殖中心提供 PGS/PGD 服务。2016 年,CFDA 相继通过了杭州贝瑞和康基因诊断技术有限公司、北京中仪康卫医疗器械有限公司 (北京嘉宝仁和医疗科技有限公司全资子公司)

司)、苏州贝康医疗器械有限公司关于胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂盒的创新医疗器械特别审批申请,表明 PGS 有望很快走入临床。而且随着测序技术成本大幅度降低、遗传学机制研究的推进和生物信息数据分析的深入,以及国家“全面二胎”政策发布和平均生育年龄的明显提升,基于 NGS 的胚胎植入前染色体非整倍体筛查会有更大市场空间。

4 结语

随着 NGS 的发展,更低成本和更快速度产生大量的测序数据终将提高对遗传性疾病的诊断效率。在最近的几年中,NGS 向临床领域的转入速度正在稳步提升,特别在其绝对优势领域—检测由大量基因引起的遗传异质性疾病或者同时检测某个通路中的很多基因突变的应用上转化更快。我们相信,基于 NGS 的 panel 检测以及仍在快速发展的外显子组检测和全基因组检测在遗传性疾病的检测中将发挥更大的作用。

参考文献

- [1] Tounta G, Kolialexi A, Papantoniou N, et al. Non-invasive prenatal diagnosis using cell-free fetal nucleic acids in maternal plasma: Progress overview beyond predictive and personalized diagnosis [J]. EPMA J, 2011, 2(2):163-171.
- [2] Mujezinovic F, Alfirovic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review [J]. Obstet Gynecol, 2007, 110(3):687-694.
- [3] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum [J]. Lancet, 1997, 350(9076):485-487.
- [4] Chiu RW, Chan KC, Gao Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(51):20458-20463.
- [5] Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(42):16266-16271.
- [6] Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study [J]. BMJ, 2011, 342:c7401.
- [7] American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. Committee Opinion No. 545: noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy [J]. Obstet Gynecol, 2012, 120(6):1532-1534.
- [8] Gregg AR, Gross SJ, Best RG, et al. ACMG statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy [J]. Genet Med, 2013, 15(5):395-398.
- [9] Benn P, Borell A, Chiu R, et al. Position statement from the Aneuploidy Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis [J]. Prenat Diagn, 2013, 33(7):622-629.
- [10] Norton ME, Brar H, Weiss J, et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18 [J]. Am J Obstet Gynecol, 2012, 207(2):137.e1-8.
- [11] Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study [J]. Genet Med, 2011, 13(11):913-920.
- [12] Rehman AU, Morell RJ, Belyantseva IA, et al. Targeted capture and next-generation sequencing identifies C9orf75, encoding taperin, as the mutated gene in nonsyndromic deafness DFNB79 [J]. Am J Hum Genet, 2010, 86(3):378-388.
- [13] Lim BC, Lee S, Shin JY, et al. Genetic diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing technology: comprehensive mutational search in a single platform [J]. J Med Genet, 2011, 48(11):731-736.
- [14] Valencia CA, Rhodenizer D, Bhide S, et al. Assessment of target enrichment platforms using massively parallel sequencing for the mutation detection for congenital muscular dystrophy [J]. J Mol Diagn, 2012, 14(3):233-246.
- [15] Hilgert N, Smith RJH, van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? [J]. Mutat Res, 2009, 681(2-3):189-196.
- [16] Raviv D, Dror AA, Avraham KB. Hearing loss: a common disorder caused by many rare alleles [J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1214:168-179.
- [17] Shearer AE, DeLuca AP, Hildebrand MS, et al. Comprehensive genetic testing for hereditary hearing loss using massively parallel sequencing [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(49):21104-21109.

- [18] Licastro D, Mutarelli M, Peluso I, et al. Molecular diagnosis of Usher syndrome: application of two different next-generation sequencing-based procedures [J]. Plos One, 2012, 7(8):e43799.
- [19] Sivakumaran TA, Husami A, Kissell D, et al. Performance evaluation of the next-generation sequencing approach for molecular diagnosis of hereditary hearing loss [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2013, 148(6): 1007-1016.
- [20] Schrauwen I, Sommen M, Corneveaux JJ, et al. A sensitive and specific diagnostic test for hearing loss using a microdroplet PCR-based approach and next-generation sequencing [J]. Am J Med Genet A, 2013, 161A(1):145-152.
- [21] Vasli N, Böhm J, Le Gras S, et al. Next generation sequencing for molecular diagnosis of neuromuscular diseases [J]. Acta Neuropathol, 2012, 124(2): 273-283.
- [22] Xie S, Lan Z, Qu N, et al. Detection of truncated dystrophin lacking the C-terminal domain in a Chinese pedigree by next-generation sequencing [J]. Gene, 2012, 499(1):139-142.
- [23] Valencia CA, Rhodenizer D, Bhide S, et al. Assessment of target enrichment platforms using massively parallel sequencing for the mutation detection for congenital muscular dystrophy [J]. J Mol Diagn, 2012, 14(3):233-246.
- [24] Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases - a world survey [J]. Neuromuscul Disord, 1991, 1(1):19-29.
- [25] Lim BC, Lee S, Shin JY, et al. Genetic diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing technology: comprehensive mutational search in a single platform [J]. J Med Genet, 2011, 48(11):731-736.
- [26] Valencia CA, Rhodenizer D, Bhide S, et al. Assessment of target enrichment platforms using massively parallel sequencing for the mutation detection for congenital muscular dystrophy [J]. J Mol Diagn, 2012, 14(3):233-246.
- [27] Vasta V, Ng SB, Turner EH, et al. Next generation sequence analysis for mitochondrial disorders [J]. Genome Med, 2009, 1(10):100.
- [28] Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing [J]. Nature, 2008, 452(7189): 872-876.
- [29] Hodes-Wertz B, Grifo J, Ghadir S, et al. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos [J]. Fertil Steril, 2012, 98(3):675-680.
- [30] Fragouli E, Katz-Jaffe M, Alfarawati S, et al. Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure [J]. Fertil Steril, 2010, 94(3): 875-887.
- [31] Chen M, Wei S, Hu J, et al. Can comprehensive chromosome screening technology improve IVF/ICSI outcomes? A meta-analysis [J]. Plos One, 2015, 10(10):e0140779.
- [32] Huang J, Yan L, Lu S, et al. Validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of blastocysts [J]. Fertil Steril, 2016, 105(6):1532-1536.
- [33] Yan L, Huang L, Xu L, et al. Live births after simultaneous avoidance of monogenic diseases and chromosome abnormality by next-generation sequencing with linkage analyses [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(52):15964-15969.

• 论 著 •

11 339例孕妇无创产前检测结果对比分析

王元丽¹ 唐明珠² 杨学习^{3*}

【摘要】目的 探讨不同年龄段及不同高危因素孕妇无创产前检测结果的对比分析。**方法** 回顾性分析2014年12月至2015年8月进行无创产前检测的11 339例孕妇资料,分别计算21、18、13号染色体发生变异的概率。将孕妇按年龄段(<35岁组,35~39岁组和≥40岁组)、孕产史(无不良孕产史组和有不良孕产史组)、受孕情况(自然受孕组和试管婴儿组)分组,分别比较各组间的胎儿患21、18、13-三体综合征的概率。**结果** 11 339例样本中共检出82例胎儿染色体异常者,占样本总数7.2‰(82/11 339),其中,21-三体最常见,所占比例为67.07%(55/82)。≥40岁组阳性发生率2.45%,较<35岁组(0.59%)和35~39岁组(0.61%)差异有统计学意义($P < 0.001$)。孕产史和受孕情况2组的阳性发生率差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 高龄孕妇是胎儿患染色体非整倍体疾病的重要危险因素,应提高无创产前检测在此类人群中的应用。

【关键词】 无创产前检测; 三体综合征; 高龄孕妇

Comparative analysis of the non-invasive prenatal test results among 11 339 pregnant womenWANG Yuanli¹, TANG Mingzhu², YANG Xuexi^{3*}

(1. Guangzhou Darui Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510665; 2. Guangzhou Daan Clinical Laboratory Centre, Guangzhou, Guangdong, China, 510665; 3. School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Objective The objective is to explore non-invasive prenatal test for pregnant women in different age and risk factor groups. **Methods** Non-invasive prenatal test results from 11 339 pregnant women were recorded from December 2014 to August 2015, and the incidence rates of trisomy 21/18/13 variations were calculated. The pregnant women were divided into different groups according to age(<35-years-old group, 35~39-years-old group, and ≥40-years-old group), pregnancy history(normal pregnancy history group and abnormal pregnancy history group) and conception method(natural conception group and IVF group). The incidence rates of trisomy 21/18/13 syndrome within these groups were compared. **Results** In 11 339 cases, 82 were found with fetal chromosomal abnormalities, accounting for 7.2‰ (82/11 339), the trisomy 21 syndrome was the most common with the rate of 67.07% (55/82). The proportion of positive trisomy syndrome in the ≥40-years-old group (2.45%) was statistically significantly different ($P < 0.001$) compared with the <35-years-old group (0.59%) and 35~39-years-old group (0.61%). There was no significant differences of the

基金项目:广东省科技计划下一代基因测序生物信息云分析服务平台及其关键技术研究(2015A030401040);广州市科技计划基于下一代测序技术的唐氏综合征无创筛查系统研发和应用研究(201400000004-4)

作者单位:1. 广州市达瑞生物技术股份有限公司,广东,广州 510665

2. 广州达安临床检验中心,广东,广州 510665

3. 南方医科大学检验与生物技术学院,广东,广州 510515

*通讯作者:杨学习, E-mail: yxxzb@sohu.com

positive trisomy syndrome rate between the pregnancy history and different fertilization ways groups ($P > 0.05$). **Conclusion** The advanced age of the pregnant women is an important risk factor in the fetal chromosomal aneuploidy disease, which should be improved the use of non-invasive prenatal test.

[KEY WORDS] Non-invasive prenatal test; Trisomy syndrome; Advanced maternal age pregnant women

21-三体综合征、18-三体综合征、13-三体综合征发病率占胎儿染色体非整倍体疾病的绝大多数,其中,21-三体综合征最为常见,年发病率为1/800~1/600,占新生儿三体型染色体疾病的70%~80%^[1-2]。随着国家计划生育政策的放宽、外界环境因素影响以及辅助生殖技术的不断进步,高龄孕妇、具有不良孕产史夫妇以及试管婴儿的数量逐渐增多。近年来发达国家试管婴儿的出生比例明显增高,约占新生儿总数的1%~3%^[3-4]。这些都有可能成为出生缺陷发生率升高的因素。目前,利用孕妇外周血游离DNA开展的无创产前检测已成为胎儿染色体非整倍体疾病筛查的临床探索新方向^[2,5]。本研究利用下一代测序技术对孕妇外周血中的游离DNA进行测序,通过生物信息学分析胎儿遗传信息,从而检测胎儿染色体非整倍体疾病,并根据孕妇年龄和不良孕产史等高危因素分组,研究胎儿21、18、13-三体综合征的发生率,为无创产前检测技术在染色体非整倍体疾病高发人群中的应用提供参考。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取2014年12月至2015年8月在广州达安临床检验中心进行无创产前检测的孕12周及以上的单胎妊娠孕妇11 339例,孕妇年龄范围在16~50岁,平均年龄31.34岁,其中高龄(≥ 35 岁)4 033例,有不良孕产史996例,试管婴儿262例。

1.2 方法

1.2.1 标本收集

对孕妇提供遗传咨询并签署知情同意后,按正常静脉采血方式采集7~10 mL静脉血。采血管使用Cell-Free DNA BCTTM管(Streck公司,美国)。采血后轻轻颠倒混匀8~10次,使血液与管内保护剂充分混匀,达到保护作用。采集的血液可常温运输,72 h内送达实验室进行血浆分离,或立即分离后将血浆用干冰运输至实验室。

1.2.2 无创产前检测

使用基因测序仪DA8600和胎儿染色体非整倍体21三体、18三体和13三体检测试剂盒(半导

体测序法)(中山大学达安基因股份有限公司)对标本进行无创产前检测,并使用配套算法对结果进行分析,判断21、18、13号染色体的风险值(正常参考范围值为-3.0~3.0),检测值在正常参考范围内则判为“低风险”,超出则为“高风险”。由广州达安临床检验中心出具筛查报告,并随访获取确诊结果,以核实无创产前检测结果的准确性。

1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件对数据进行统计分析,使用 χ^2 检验进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 整体检测结果

11 339例样品中,无创产前检测为高风险孕妇82例,筛查阳性率为7.2‰(82/11 339),其中21-三体55例,发生率67.07%(55/82),远高于18-三体的29.27%(24/82)和13-三体的3.66%(3/82)。

2.2 不同年龄孕妇组胎儿三体结果比较

将孕妇按年龄组分为 < 35 岁组,35~39岁组和 ≥ 40 岁组。 < 35 岁组共检出阳性43例,发生率0.59%(43/7 306),35~39岁组检出20例,发生率0.61%(20/3 256), ≥ 40 岁组检出19例,发生率2.45%(19/777),结果见表1。 < 35 岁和35~39岁2个组间阳性发生率差异无统计学意义($P > 0.05$), ≥ 40 岁和 < 35 岁、35~39岁组差异具有统计学意义(P 均 < 0.001)。其中,21-三体和18-三体的发生率组间的差异性和总体阳性发生率相似,13-三体发生率在各组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 不同孕产史组胎儿三体结果比较

按照孕产史情况分为无不良孕产史组和有不良孕产史组。无不良孕产史组共检出阳性71例,发生率0.69%(71/10 343),有不良孕产史组共检出阳性11例,发生率1.1%(11/996),结果见表2。有不良孕产史组阳性发生率比无不良孕产史组高,但2组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 不同受孕方式组胎儿三体结果比较

按照受孕方式情况分为自然受孕组和试管婴

表1 不同年龄孕妇组胎儿三体结果比较

Table 1 Comparison of fetal trisomy syndrome results in different women age groups

年龄(岁)	<i>n</i>	21-三体综合征 [<i>n</i> (%)]	18-三体综合征 [<i>n</i> (%)]	13-三体综合征 [<i>n</i> (%)]	总计 [<i>n</i> (%)]
<35	7 306	27(0.37)	15(0.21)	1(0.01)	43(0.59)
35~39	3 256	15(0.46)	3(0.09)	2(0.06)	20(0.61)
≥40	777	13(1.67)	6(0.77)	0(0.00)	19(2.45)
合计	11 339	55(0.49)	24(0.21)	3(0.03)	82(0.72)

表2 不同孕产史组胎儿三体结果比较

Table 2 Comparison of fetal trisomy syndrome results in different women pregnancy history groups

不良孕产史	<i>n</i>	21-三体综合征 [<i>n</i> (%)]	18-三体综合征 [<i>n</i> (%)]	13-三体综合征 [<i>n</i> (%)]	总计 [<i>n</i> (%)]
无	10 343	48(0.46)	20(0.19)	3(0.03)	71(0.69)
有	996	7(0.70)	4(0.40)	0(0.00)	11(1.10)
合计	11 339	55(0.49)	24(0.21)	3(0.03)	82(0.72)

表3 不同受孕方式组三体结果比较

Table 3 Comparison of fetal trisomy syndrome results in different fertilization ways groups

受孕方式	<i>n</i>	21-三体综合征 [<i>n</i> (%)]	18-三体综合征 [<i>n</i> (%)]	13-三体综合征 [<i>n</i> (%)]	总计 [<i>n</i> (%)]
自然受孕	11 077	54(0.49)	24(0.22)	3(0.03)	81(0.73)
试管婴儿	262	1(0.38)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.38)
合计	11 339	55(0.49)	24(0.21)	3(0.03)	82(0.72)

儿组。自然受孕组共检出阳性81例,发生率0.73%(81/11 077),试管婴儿组共检出阳性1例,发生率0.38%(1/262),结果见表3。2组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

21-三体综合征、18-三体综合征、13-三体综合征发病率占胎儿染色体非整倍体疾病的绝大多数,其中,21-三体综合征发病较高,为1/800~1/600^[2]。本研究人群中,筛查阳性率为7.2‰(82/11 339),其中21-三体55例,发生率67.07%(55/82)。这比国内水平稍低,考虑可能与本研究所选择标本来源和年龄范围偏广有关。在国内研究中,Liao等^[6]对1 760例孕妇进行无创产前检测,共报道16例异常,阳性率为9‰。郑静等^[1]对1 566例孕妇进行分析得出,该人群阳性发生率为14.7‰,21-三体

发生率为78.26%。刘丛丛^[7]在对2 152例孕妇无创检测结果的分析发现有22例阳性,综合阳性率为10.2‰。目前,孕期胎儿染色体异常的检测方法主要以侵入性的产前诊断技术为主,均存在一定的流产风险,难以被广大孕妇和家庭接受。而传统的血清学筛查方法检出率为60%~65%,假阳性率高。自1997年胎儿游离DNA被发现存在于孕妇外周血以来,基于下一代测序技术的无创产前检测以其安全、快速以及准确的优势被迅速用于孕妇特别是高龄孕妇的产前染色体非整倍体筛查^[2,5,8-9]。刘丛丛^[7]在对2 152例孕妇无创基因检测的结果分析发现,该技术对21、18、13号染色体非整倍体的检测灵敏度为92.3%~100%,特异性度99.95%~100%。Palomaki等^[10]也通过该技术分析得出,283例染色体非整倍体异常样本复合检出率为98.9%,总的假阳性率仅0.5%。所以,无创产前

检测技术在染色体异常筛查中具有很高的应用价值。

医学上将年龄 ≥ 35 岁的初产产妇界定为高龄产妇,随着孕产妇年龄增大,其卵巢内处于减数分裂期的初级卵母细胞在体内停留时间会逐渐延长,且高龄孕产妇更易受内外环境影响,其卵巢功能发生老化和退化,使胚胎期染色体变异的几率增加^[11]。国际和国内相关法规也明确建议应对高龄产妇进行产前诊断^[12]。本研究发现,孕妇年龄 ≥ 40 岁其胎儿发生染色体异常的比例明显高于其他2组($P < 0.001$),35~39岁组虽与 < 35 岁组间阳性发生率差异无统计学意义($P > 0.05$),但其概率也略高于 < 35 岁组。郑静等^[1]在对1 566例标本的三体结果分析中,也发现 ≥ 40 岁组孕妇阳性发生率明显高于35~39岁组与 < 35 组。谭卫荷等^[11]对898例孕妇进行核型结果分析,发现21-三体和18-三体在 ≥ 40 岁组孕妇中发生率也显著高于35~39岁组与 < 35 组。

不良孕产史包括自然流产、死胎和胎儿发育畸形等,在引起不良孕产史的众多因素中,染色体异常是一个重要的病因之一^[3,13]。在本研究中,有不良孕产史组共检出21、18和13-三体11例,发生率1.1%(11/996)。较无不良孕产史组0.69%(71/10 343)无显著差异。不良孕产史多发生在染色体位置异常和多态性核型中。何淑贞等^[3]在对217对有不良孕产史的夫妇进行染色体核型分析中发现有9例异常的核型和55例多态性核型,检出率分别为2.07%和12.67%。其中异常核型包括4例罗伯逊易位,4例平衡易位,1例倒位。汤素环等^[13]对375对不良孕产夫妇进行核型分析发现,有81例异常核型(5.0%),其中51例常染色体异常(6.8%)如相互异位、倒位等。因此,不良孕产史与染色体核型异常之间存在密切联系,而多态性核型如Y染色体异质性等具有遗传效应,会导致胎儿患染色体核型异常疾病概率增加。

随着体外受精技术的不断发展,近年来,发达国家试管婴儿约占新生儿总数的1%~3%,出生比例明显升高^[4]。由于试管婴儿技术采用体外受精—胚胎移植,其过程皆在体外完成,很多因素可引起遗传物质发生改变^[14]。试管婴儿出生缺陷和围产期合并症日益受到人们的关注,许多学者对此做了研究,但研究结论各不相同^[15]。本研究人群中,自然受孕组阳性发生率0.73%(81/11 077),与

试管婴儿组0.38%(1/262)的差异无统计学意义($P > 0.05$),这与许小艳等^[15]的分析相似,该研究对150例试管婴儿和200例自然受孕婴儿的出生缺陷及新生儿期并发症等指标进行比对分析发现,试管婴儿出生缺陷与自然受孕婴儿无显著差异。而米弘瑛等^[14]对43例试管婴儿和50例自然受孕婴儿的出生缺陷及围生期疾病等情况进行比对发现,试管婴儿出生缺陷发生率显著高于自然受孕婴儿。

综上所述,高龄孕妇是胎儿患染色体异常疾病的一个重要危险因素。应用无创产前检测技术对高龄孕妇进行胎儿染色体异常筛查,并结合侵入性产前诊断技术对筛查阳性结果进行核实。这样可降低有创性检测的人数及孕妇的负担。同时,应加强无创产前检测技术在其他出生缺陷疾病方面的研发与应用,提高除21、18、13-三体综合征以外的染色体疾病的准确性,更好地应用于不良孕产史和试管婴儿等高危因素孕妇的异常检测,才能更好地降低新生儿出生缺陷的发生率。

参考文献

- [1] 郑静,卓越,孙大康,等. 不同年龄段孕妇无创DNA产前检测结果对比分析[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(36):6538-6540.
- [2] 丁辰月,吴畏,刘嘉茵. 测序技术在无创产前筛查中的应用及进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2014, 33(3):201-204.
- [3] 何淑贞,蒲育栋,曹金如,等. 217对不良孕产史夫妇细胞遗传学分析[J]. 海南医学, 2016, 27(15):2542-2543.
- [4] 张惠琴,樊蕊,田国华,等. 试管婴儿双胞胎及自然受孕双胞胎临床分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 17(1):63-67.
- [5] 李玉芝,任景慧,林琳华,等. 大规模并行基因组测序技术应用于无创产前染色体非整倍体的研究[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2012, 41(4):475-480.
- [6] Liao C, Yin AH, Peng CF, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of common aneuploidies by semiconductor sequencing [J]. PNAS, 2014, 111(20):7415-7420.
- [7] 刘丛丛. 母血游离胎儿DNA在21-三体、18-三体检前筛查的应用研究[D]. 北京:北京协和医学院, 2012. (下转第406页)

· 论 著 ·

应用下一代测序技术对 α 地中海贫血进行胚胎植入前遗传学检测

谢美娟¹ 邓权衡¹ 邓红辉¹ 卢绍月¹ 杨学习² 马强^{2*}

【摘要】目的 探讨下一代测序(next generation sequencing, NGS)技术在 α 地中海贫血胚胎植入前遗传学检测中的应用。**方法** 选取2对 α 地中海贫血--SEA缺失型携带者夫妇体外受精胚胎活检后的6个胚胎样本应用全基因组扩增(whole genome amplification, WGA)技术、下一代测序技术进行胚胎植入前遗传学检测,同时采用跨越断裂点荧光PCR(gap-PCR)进行平行对照检测。**结果** 2个家系6个胚胎样本的胚胎植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)结果分别为--SEA/ $\alpha\alpha$ 母源携带、--SEA/--SEA、--SEA/ $\alpha\alpha$ 母源携带、--SEA/--SEA、--SEA/ $\alpha\alpha$ 母源携带和--SEA/--SEA;胚胎植入前遗传学筛查(preimplantation genetic screening, PGS)结果分别为45, XX, -5、46, XX、46, XY、47, XY, +1、46, XX和46, XY, +1, -2; Family 1 gap-PCR检测结果为父母均为SEA杂合子; E1为正常、E2为SEA纯合子、E3为正常; Family 2检测结果分别为:父母均为SEA杂合子; E4为SEA纯合子、E5为正常、E6为SEA纯合子。**结论** 结果显示利用NGS不仅可以检测出23对染色体的核型,同时解决了单细胞扩增等位基因脱扣(allele drop-out, ADO)造成的假阳性和假阴性的风险,更具有市场潜力及应用前景。

【关键词】 下一代测序; α 地中海贫血; 胚胎植入前遗传学诊断; 跨越断裂点荧光PCR

Successful preimplantation genetic detection for alpha thalassaemia by using next generation sequencing technology

XIE Meijuan¹, DENG Quanheng¹, DENG Honghui¹, LU Shaoyue¹, YANG Xuexi², MA Qiang^{2*}

(1. Guangzhou Darui Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510665; 2. School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Objective To explore the application of next generation sequencing (NGS) for alpha-thalassemia in preimplantation genetic detection. **Methods** 2 couples with alpha-thalassemia Southeast Asia deletion (--SEA deletion) and their embryos cells obtained after embryonic biopsy were selected to test by whole genome amplification (WGA) and NGS. Gap-PCR was done to all samples as a series of parallel tests. **Results** The PGD results were --SEA/ $\alpha\alpha$, --SEA/--SEA, --SEA/ $\alpha\alpha$, --SEA/--SEA, --SEA/ $\alpha\alpha$ and --SEA/--SEA, respectively. And embryos with the abnormal α gene were confirmed from the maternal side according to genealogical analysis. The PGS results of 6 embryos from 2 families were 45, XX, -5; 46, XX; 46, XY; 47, XY, +1; 46, XX and 46, XY+1-2. Both husbands and wives of the 2 families gap-PCR results were heterozygotes with --SEA deletion. The results of gap-PCR were normal in embryos 1, 3 and 5 while --SEA deletion were

基金项目:广州市科技计划项目健康医疗协同创新重大专项(201400000004-4);广州市重大科技攻关项目子课题(2014Y2-00220);广州市科技计划产学研协同创新重大专项(201604020104);广东省科技计划项目公益研究与能力建设专项(2015A030401040)

作者单位:1. 广州市达瑞生物技术股份有限公司, 广东, 广州 510665

2. 南方医科大学检验与生物技术学院, 广东, 广州 510515

*通讯作者:马强, E-mail:mqqqm2006@163.com

found in embryos 2, 4 and 6 accordingly. **Conclusion** NGS not only can detect karyotype of 46 chromosomes but also avoid the risk of false positive and false negative caused by the allele drop-out (ADO) during the single cell amplification with a huge potential market and wide application prospect.

[KEY WORDS] Next generation sequencing; Alpha thalassaemia; Preimplantation genetic diagnosis; Gap-PCR

α -地中海贫血,是一组因 α -珠蛋白链合成减少或不能合成、 α -链/非 α -链比例失衡为特征的遗传溶血性血红蛋白病。我国南方为 α -地中海贫血的高发区,其携带率也高达8.53%^[1];其中以东南亚(--SEA)缺失型最为常见,其发生率为72.87%~82.87%^[2]。 α -地中海贫血与出生缺陷有密切关系,也给社会和家庭带来了沉重的负担,而目前, α -地中海贫血还没有有效的根治方法,主要以预防为主。因此,采用植入前期胚胎筛查来阻断患儿的出生极为重要。

胚胎植入前遗传学检测主要包括胚胎植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)和胚胎植入前遗传学筛查(preimplantation genetic screening, PGS)2方面。PGD是在胚胎着床之前即对配子或胚胎进行遗传物质分析,选择没有遗传物质异常的胚胎移植,可以有效地阻断患儿的出生;PGS是选择染色体整倍体的胚胎进行移植,进而提高体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET)技术的成功率。

随着我国全面二孩政策的放开,高龄产妇数量猛增,再加上不孕不育率逐年上升,提高妊娠率和妊娠质量已经成为亟待解决的问题。目前,以PGD/PGS为代表的第三代试管婴儿正是解决这些问题的关键技术^[3-4]。此外,NGS具有高通量、自动化、低成本的特征,自2008年以来,全基因组测序费用呈指数级下降,使得NGS在PGD/PGS临床上的应用得到迅速推广。本研究采用NGS对 α -地中海贫血进行胚胎植入前遗传学检测,探讨NGS应用于PGD/PGS临床检测的可行性。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

QIAamp® DNA Mini and QIAamp DNA Blood Mini Kits、The REPLI-g Single Cell Kit 购自德国 Qiagen 公司; Ion Ampliseq™ library kit 2.0、Ion PGM™ Template OT2 200 Kit、Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2、Ion Personal Genome Machine®

(PGM™)、Qubit®2.0 均购自美国 Life Technology 公司; α -地中海贫血基因检测试剂盒(gap-PCR 法)购自中山大学达安基因股份有限公司; Nuclease-Free Water 购自美国 Life Technologies 公司;无水乙醇(分析纯)购自广州化学试剂厂。

1.2 研究对象

2个家系双方均为 α -地中海贫血--SEA 缺失型杂合子夫妇经体外受精胚胎活检后共6个胚胎囊胚期滋养外胚层细胞以及夫妻双方外周血。

1.3 实验方法

1.3.1 全基因组扩增、基因组DNA提取

使用 The REPLI-g Single Cell Kit 对6个胚胎囊胚期滋养外胚层细胞进行全基因组扩增;采用 QIAamp® DNA Mini and QIAamp DNA Blood Mini Kits 对2对夫妇的全血样本进行基因组DNA提取;具体操作步骤参见说明书。

1.3.2 下一代测序

根据测序需要,使用 Ion Ampliseq™ library kit 2.0 将扩增好的DNA构建成文库DNA。PCR 特异性扩增目的片段,在DNA片段两端加上通用测序接头,PCR 扩增文库DNA,磁珠纯化去除杂质;建库后使用 Qubit®2.0 测定文库DNA的浓度;根据每个样本测序数据需求量和测序深度确定文库的混样个数为10个进行模板制备,使用 Ion PGM™ Template OT2 200 Kit 制备测序模板;然后进行阳性模板的富集即去除杂质及扩增失败的测序模板;最后使用 Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2 在 PGM™ 上进行测序。

1.3.3 下一代测序数据分析

将上机测序得到的原始数据利用 Torrent_Server_5.0_VM 软件去除接头序列,通过 Torrent Mapping Alignment Program (TMAP) 软件比对到人类基因组参考序列 hg19 上,通过 samtools 统计覆盖倍数,通过 GATK calling SNP 基因型分析,最后结合家系的 SNP 连锁分析,构建单体型。

1.3.4 gap-PCR

将2对夫妻双方外周血提取的基因组DNA以及6个胚胎全基因组扩增后的基因组DNA采用 α -地中海贫血基因检测试剂盒进行gap-PCR检测,实验操作、结果判读参见说明书。

2 结果

2.1 下一代测序结果

本次研究收集2对地中海贫血携带者夫妇体外受精胚胎活检的6个囊胚期滋养外胚层细胞以及2对夫妻双方外周血基因组样本进行下一代测序。下一代测序检测结果汇总表见表1。

将夫妻双方外周血测序数据及其各自的胚胎

表1 6个胚胎下一代测序结果汇总表

Table 1 Results of 6 embryos detected by NGS

家系	胚胎编号	PGD 结果	PGS 结果
Family 1	Mother 1	--SEA/ $\alpha\alpha$	-
	Father 1	--SEA/ $\alpha\alpha$	-
	E1	--SEA/ $\alpha\alpha$ 母源携带	45,XX,-5
	E2	--SEA/--SEA	46,XX
	E3	--SEA/ $\alpha\alpha$ 母源携带	46,XY
	Mother 2	--SEA/ $\alpha\alpha$	-
Family 2	Father 2	--SEA/ $\alpha\alpha$	-
	E4	--SEA/--SEA	47,XY,+1
	E5	--SEA/ $\alpha\alpha$ 母源携带	46,XX
	E6	--SEA/--SEA	46,XY,+1,-2

表2 Family 1 PGD 结果

Table 2 PGD results of family 1

名称	染色体	位点	Mother 1		Father 1		E1		E2		E3	
			M1	M2	F1	F2	M1	F2	M1	F1	M1	F2
SNP_1	chr16	79609	G	C	G	G	G	G	G	G	G	G
SNP_2	chr16	81639	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A
SNP_3	chr16	84170	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T
SNP_4	chr16	109665	G	G	G	A	G	A	G	G	G	A
SNP_5	chr16	139367	A	A	A	G	A	G	A	A	A	G
SNP_6	chr16	160001	A	A	A	G	A	G	A	A	A	G
SNP_7	chr16	192314	A	G	A	G	A	G	A	A	A	G
SNP_8	chr16	194845	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A
SNP_9	chr16	198093	T	C	T	C	T	C	T	T	T	C
SNP_10	chr16	201183	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C
SNP_11	chr16	207059	T	T	T	G	T	G	T	T	T	G
SNP_12	chr16	211105	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G
SNP_13	chr16	212055	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C
SNP_14	chr16	224619	?	T	?	C	?	C	?	?	?	C
SNP_15	chr16	234632	?	G	?	C	?	C	?	?	?	C
SNP_16	chr16	245079	T	C	T	C	T	C	T	T	T	C
SNP_17	chr16	247888	A	A	A	G	A	G	A	A	A	G
SNP_18	chr16	247938	C	C	C	T	C	T	C	C	C	T
SNP_19	chr16	311853	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G
SNP_20	chr16	311992	A	A	A	C	A	C	A	A	A	C
SNP_21	chr16	312015	T	T	T	C	T	C	T	T	T	C
SNP_22	chr16	312253	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G
SNP_23	chr16	312635	T	T	T	C	T	C	T	T	T	C
SNP_24	chr16	313202	C	C	C	A	C	A	C	C	C	A
SNP_25	chr16	313406	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G
SNP_26	chr16	315557	C	C	C	G	C	G	C	C	C	G
SNP_27	chr16	317393	C	C	C	T	C	T	C	C	C	T
SNP_28	chr16	318474	G	C	G	G	G	G	G	G	G	G
SNP_29	chr16	319511	A	A	A	G	A	G	A	A	A	G
SNP_30	chr16	319725	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C
SNP_31	chr16	764040	G	G	G	A	G	A	G	G	G	A
SNP_32	chr16	866053	A	A	A	G	A	G	A	A	A	G
SNP_33	chr16	882990	A	G	G	G	A	G	A	G	A	G
SNP_34	chr16	883062	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T

“?”表示缺失的碱基

表3 Family 2 PGD 结果
Table 3 PGD results of family 2

名称	染色体	位点	Mother 2		Father 2		E4		E5		E6	
			M1	M2	F1	F2	M1	F1	M1	F2	M1	F1
SNP_1	chr16	79609	G	G	G	C	G	G	G	C	G	G
SNP_2	chr16	79811	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T
SNP_3	chr16	134441	A	A	A	C	A	A	A	C	A	A
SNP_4	chr16	139367	A	A	A	G	A	A	A	G	A	A
SNP_5	chr16	139636	G	G	G	A	G	G	G	A	G	G
SNP_6	chr16	193586	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G
SNP_7	chr16	194845	A	G	A	G	A	A	A	G	A	A
SNP_8	chr16	198093	T	T	T	C	T	T	T	C	T	T
SNP_9	chr16	199540	A	A	A	G	A	A	A	G	A	A
SNP_10	chr16	201183	C	C	C	T	C	C	C	T	C	C
SNP_11	chr16	205035	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G
SNP_12	chr16	207017	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C
SNP_13	chr16	224619	?	T	?	C	?	?	C	C	?	?
SNP_14	chr16	234632	?	G	?	C	?	?	C	C	?	?
SNP_15	chr16	235579	?	C	?	?	?	?	T	T	?	?
SNP_16	chr16	245079	?	T	?	T	?	?	T	C	?	?
SNP_17	chr16	247888	A	A	A	G	A	A	A	G	A	A
SNP_18	chr16	247938	C	T	C	T	C	C	C	T	C	C
SNP_19	chr16	248418	T	C	T	C	T	T	T	C	T	T
SNP_20	chr16	252479	T	T	T	C	T	T	T	C	T	T
SNP_21	chr16	256278	C	C	C	A	C	C	C	A	C	C
SNP_22	chr16	261866	A	T	A	T	A	A	A	T	A	A
SNP_23	chr16	324403	C	C	C	G	C	C	C	G	C	C
SNP_24	chr16	495662	T	C	C	C	T	C	T	C	T	C
SNP_25	chr16	514407	A	A	A	C	A	A	A	C	A	A
SNP_26	chr16	646421	A	A	A	G	A	A	A	G	A	A
SNP_27	chr16	651517	C	C	C	T	C	C	C	T	C	C
SNP_28	chr16	858643	T	C	C	C	T	C	T	C	T	C
SNP_29	chr16	858723	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T

“?”表示缺失的碱基

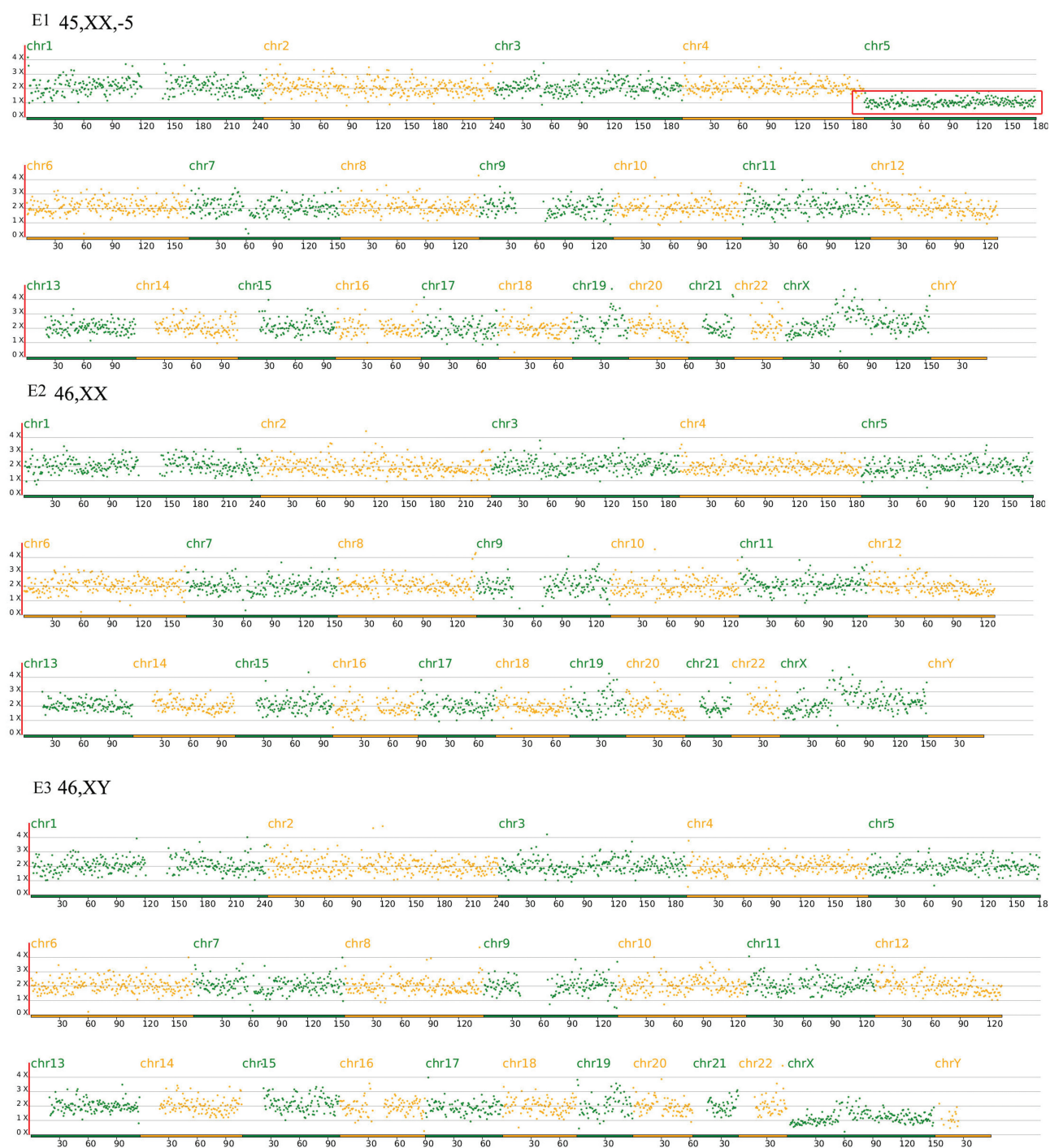
表4 2种检测方法结果比对
Table 4 The comparison results of PGD and gap-PCR

家系	胚胎编号	PGD 结果	gap-PCR 结果
Family 1	Mother 1	--SEA/αα	SEA 杂合子
	Father 1	--SEA/αα	SEA 杂合子
	E1	--SEA/αα 母源携带	正常
	E2	--SEA/--SEA	SEA 纯合子
	E3	--SEA/αα 母源携带	正常
	Mother 2	--SEA/αα	SEA 杂合子
Family 2	Father 2	--SEA/αα	SEA 杂合子
	E4	--SEA/--SEA	SEA 纯合子
	E5	--SEA/αα 母源携带	正常
	E6	--SEA/--SEA	SEA 纯合子

测序数据进行家系的 SNP 连锁分析,构建单体型,进行结果的判断,6例胚胎样本中,PGD 结果分别为 E1:--SEA/ $\alpha\alpha$ 母源携带;E2:--SEA/--SEA; E3:--SEA/ $\alpha\alpha$ 母源携带;E4:--SEA/--SEA;E5:--SEA/ $\alpha\alpha$ 母源携带;E6:--SEA/--SEA,详见表 2、

表 3。

为提高 IVF-ET 的成功率,再将 6 个胚胎进行 PGS 检测,PGS 检测结果分别为 E1:45,XX,-5; E2:46,XX;E3:46,XY;E4:47,XY,+1;E5:46,XX;E6:46,XY,+1,-2。详见图 1、图 2。



横轴表示每条染色体,纵轴表示染色体的倍性;3个胚胎的染色体核型分别为:E1:45,XX,-5; E2:46,XX; E3:46,XY

图1 Family 1 PGS 结果

Figure 1 PGS results of family 1



横轴表示每条染色体,纵轴表示染色体的倍性;3个胚胎的染色体核型分别为:E4:47,XY,+1;E5:46,XX;E6:46,XY,+1,-2

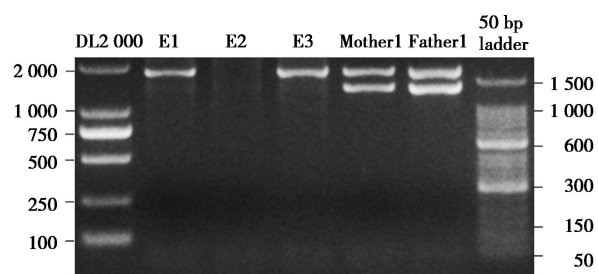
图2 Family 2 PGS 结果

Figure 2 PGS results of family 2

2.2 gap-PCR 检测结果

为了验证本次检测结果的准确性,将2个家系样本同时进行gap-PCR的检测,Family 1检测结果分别为:父母均为SEA杂合子;E1为正常、E2为

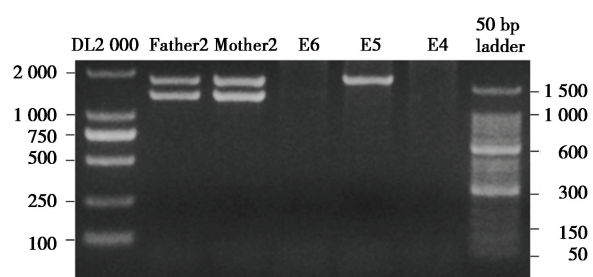
SEA纯合子、E3为正常;凝胶电泳图结果见图3; Family 2检测结果分别为:父母均为SEA杂合子; E4为SEA纯合子、E5为正常、E6为SEA纯合子; 凝胶电泳图结果见图4。



父母均为 SEA 杂合子;1 号胚胎为正常胚胎,2 号胚胎为 SEA 纯合子,3 号胚胎为正常胚胎

图 3 Family 1 gap-PCR 检测结果

Figure 3 gap-PCR results of family 1



父母均为 SEA 杂合子;E4 为 SEA 纯合子、E5 为正常、E6 为 SEA 纯合子

图 4 Family 2 gap-PCR 检测结果

Figure 4 gap-PCR results of family 2

2.3 2 种检测方法结果比对

将 2 种检测方法的检测结果进行对比,详见表 4。结果显示对于 SEA 纯合缺失样本 2 种方法检测结果一致,而经过 WGA 的 PCR 产物对 SEA 携带者则检测结果为正常。

3 讨论

目前 α -地中海贫血 SEA 缺失型的检测,文献报道的 PCR 技术已比较成熟^[5-6]。但 PCR 技术在 PGD 中仍然面临着一些问题,如扩增偏倚和 ADO 等。ADO 即一个细胞内来自双亲的 2 个等位基因只有一个扩增到可供检测的水平,是影响 PGD 准确性的主要因素之一。ADO 的发生率为 5%~20%^[7-8]。其危害在于可导致杂合子胚胎的误诊,是 PCR 技术进行显性遗传病 PGD 可靠诊断的最大障碍。

本次实验中共检测 2 个家系 4 个外周血样本及 6 例胚胎样本。PGD 结果分别为 E1:--SEA/ $\alpha\alpha$ 母源携带;E2:--SEA/--SEA;E3:--SEA/ $\alpha\alpha$ 母源携

带;E4:--SEA/--SEA;E5:--SEA/ $\alpha\alpha$ 母源携带;E6:--SEA/--SEA;此外,在辅助生殖领域,染色体非整倍体也被认为是胚胎植入反复失败的重要原因之一^[9-10]。据文献报道,约 50% 经 IVF 的胚胎存在染色体异常,约 70% 的 IVF 失败由染色体异常导致^[11-12],因此为提高 IVF-ET 的成功率,将 6 个胚胎进行 PGS 检测,PGS 检测结果分别为 E1:45,XX,-5;E2:46,XX;E3:46,XY;E4:47,XY,+1;E5:46,XX;E6:46,XY,+1,-2;最后为了验证本次检测结果的准确性,将 2 个家系样本同时进行 gap-PCR 的检测。对比两者结果发现,对于 SEA 纯合缺失样本 2 种方法检测结果一致,而经过 WGA 的 PCR 产物对 SEA 携带者则检测结果为正常,与 PGD 检测结果不一致;这可能是由于在 PCR 过程中 ADO 所导致的^[13],而本研究采用 WGA 结合 NGS,通过单体型的构建可以推断出该胚胎 2 条 DNA 链的来源从而最终确定其是否携带致病基因;同时,通过低通量的全基因组测序来进行染色体核型的判断,从而选择核型正常且没有致病基因的胚胎进行植入,进而提高体外受精的妊娠率、阻断了地中海贫血患儿的出生。本研究结合 WGA 与 NGS 技术解决了样本微量的问题以及 ADO 造成的假阳性和假阴性的风险;而且还可以准确判断染色体非整倍体,更是解决了一些特殊基因不能直接诊断的局限性、样本污染等问题。

NGS 当前已经广泛应用于无创产前诊断,同时也在 PGD/PGS 领域中应用。国内外均可见到 NGS 应用于 PGD/PGS 的报道。早期有报道称 PGS 不能显著提高植入率和活产率,这可能与早期的 PGS 技术主要是针对部分染色体异常进行检测有关。Kung 等^[14]采用活检的滋养外胚层细胞、卵裂球及已知的细胞系比较了 NGS 和微阵列比较基因组杂交(array-comparative genomic hybridization, aCGH),结果显示,NGS 的敏感度和特异度均为 100%。而早期 PGD 主要应用荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)和 PCR 等技术,存在一定的局限性,Moutou 等^[15]报道了 PCR-PGD 的误诊率为 0.15%,而 FISH-PGD 误诊率为 0.06%。目前尚未见 NGS 进行 PGD 的误诊率的相关报道。PGD/PGS 还存在另外一个重要方面的争议是其子代的安全性问题,但目前尚缺乏大样本、前瞻性随机对照研究。无创胚胎染色体筛查(non-invasive chromosome screening, NICS)应运而生,该

新技术利用了游离在培养液中极微量的 DNA, 通过目前单细胞全基因组扩增技术实现对胚胎染色体的全面筛查, 把从胚胎上提取细胞的活检形式改革成从培养液中提取 DNA 的检测形式, 保护了胚胎样本的完整性和安全性, 但该技术目前尚不成熟, 还存在着 WGA 扩增效率低下、培养液污染等问题, 要真正普遍应用于临床还有待进一步的探索。综合各方面因素本研究建立了基于 NGS 的 PGD/PGS 技术, 它可以获得基因组的全部信息, 通过不同的检测和分析策略, 完全有可能实现对植入前胚胎从染色体异常检测, 到发现单基因突变甚至是新发突变等各个层面信息, 同时该技术也可延伸到其他方面的临床应用, 如无创单基因病产前诊断、HLA 配型、染色体易位正常和携带者的区分以及亲子鉴定等, 更具有市场潜力及应用前景。

参考文献

- [1] Xu XM, Zhou YQ, Luo GX, et al. The prevalence and spectrum of alpha and beta thalassaemia in Guangdong Province: implications for the future health burden and population screening [J]. *J Clin Pathol*, 2004, 57(5):517-522.
- [2] Xu YW, Zeng YH, Deng J, et al. Preimplantation genetic diagnosis for alpha-thalassaemia in China [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2009, 26(7):399-403.
- [3] Xu Y, Chen S, Yin X, et al. Embryo genome profiling by single-cell sequencing for preimplantation genetic diagnosis in a beta-thalassemia family [J]. *Clin Chem*, 2015, 61(4):617-626.
- [4] Natesan SA, Bladon AJ, Coskun S, et al. Genome-wide karyomapping accurately identifies the inheritance of single-gene defects in human preimplantation embryos in vitro [J]. *Genet Med*, 2014, 16(11):838-845.
- [5] Ko TM, Tseng LH, Hsieh FJ, et al. Carrier detection and prenatal diagnosis of alpha-thalassemia of South-east Asian deletion by polymerase chain reaction [J]. *Hum Genet*, 1992, 88(3):245-248.
- [6] Chang JG, Lee LS, Lin CP, et al. Rapid diagnosis of alpha-thalassemia-1 of southeast Asia type and hydrops fetalis by polymerase chain reaction [J]. *Blood*, 1991, 78(3):853-854.
- [7] de Bourcy CF, de Vlaminc I, Kanbar JN, et al. A quantitative comparison of single-cell whole genome amplification methods [J]. *Plos One*, 2014, 9(8):e105585.
- [8] Ning L, Li Z, Wang G, et al. Quantitative assessment of single-cell whole genome amplification methods for detecting copy number variation using hippocampal neurons [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1):1.
- [9] Handyside AH. 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies [J]. *Fertil Steril*, 2013, 100(3):595-602.
- [10] Fiorentino F, Biricik A, Bono S, et al. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos [J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(5):1375-1382.
- [11] Chung MK, Jeong HJ, Lee JH, et al. Comprehensive chromosome analysis of blastocysts before implantation using array CGH [J]. *Mol Cytogenet*, 2013, 6(1):22.
- [12] Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Comprehensive chromosome screening of trophectoderm with vitrification facilitates elective single-embryo transfer for infertile women with advanced maternal age [J]. *Fertil Steril*, 2013, 100(3):615-619.
- [13] Yan L, Huang L, Xu L, et al. Live births after simultaneous avoidance of monogenic diseases and chromosome abnormality by next-generation sequencing with linkage analyses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(52):15964-15969.
- [14] Kung A, Wells D, Munne S, et al. Comparison of next generation sequencing (NGS) and aCGH for PGS [J]. *Human Reproduction*, 2014:17.
- [15] Moutou C, Goossens V, Coonen E, et al. ESHRE PGD Consortium data collection XII: cycles from January to December 2009 with pregnancy follow-up to October 2010 [J]. *Hum Reprod*, 2014, 29(5):880-903.

• 论 著 •

基于高通量测序技术无创筛查双胎染色体非整倍体及胎儿游离DNA浓度分析

许旭平¹ 谢美娟¹ 甘海燕² 梁荣良¹ 韩尔康² 杨学习¹ 吴英松^{1*}

【摘要】目的 评估无创高通量测序方法筛查双胎染色体非整倍体的可行性,并对胎儿游离DNA浓度进行分析。**方法** 收集双胎妊娠样本120例,包括自然双胎67例,辅助生殖技术植入的双胎47例,双胎消失综合征样本6例,并收集68例单胎样本作为对照,采用无创高通量测序方法进行检测。通过Z值进行阴性和阳性判断,根据Y染色体唯一比对条数进行胎儿游离DNA浓度计算,并对三体阳性样本进行核型分析。**结果** 本次实验筛查出2例双胎染色体三体阳性样本,分别为正常/21三体和13三体/18三体,均与核型结果一致。自然双胎妊娠组胎儿游离DNA浓度明显高于辅助生殖技术植入双胎组、双胎消失综合征组和自然妊娠单胎组,*P*值均小于0.05。其他3组间胎儿游离DNA浓度无显著性差异。**结论** 采用无创高通量测序方法进行双胎妊娠染色体非整倍体筛查也是可行的,同时结果分析应该考虑胎儿游离DNA浓度的影响。

【关键词】 无创产前筛查;双胎;染色体非整倍体;高通量测序;胎儿游离DNA浓度

Noninvasive prenatal testing for aneuploidy by next generation sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies and its fetal free DNA fraction analysis

XU Xuping¹, XIE Meijuan¹, GAN Haiyan², LIANG Rongliang¹, HAN Erkang², YANG Xuexi¹, WU Yingsong^{1*}

(1. School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 2. Guangzhou Darui Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510665)

[ABSTRACT] Objective To investigate the feasibility of screening aneuploidy by next generation sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies and analyzing the fetal free DNA fractions. **Methods** The data came from 120 cases of twin pregnancies, including 67 natural twin pregnancies, and 47 *in vitro* fertilization (IVF) assisted pregnancies as well as 6 vanishing twin syndromes. 68 cases of singleton pregnancies were also recruited. All cases underwent noninvasive prenatal testing for aneuploidy by next generation sequencing of maternal plasma DNA. The Z score was calculated to determine aneuploidies for chromosomes 21, 18 and 13. The fetal free DNA fractions were determined by calculating the proportion of Y chromosomal unique reads. **Results** There were 1 case of trisomy 21 (one normal and the other trisomy 21) and 1 case of both trisomy 13 and trisomy 18 (one trisomy 13 and the other trisomy 18) confirmed by karyotyping among twin pregnancies. The fetal free DNA fractions of natural twin pregnancies were

基金项目:广东省科技计划应用型科技研发专项(2015B020233009);广东省科技计划能力建设项目(2015A030401040)

作者单位:1.南方医科大学检验与生物技术学院,广东,广州 510515

2.广州市达瑞生物技术股份有限公司,广东,广州 510665

*通讯作者:吴英松, E-mail: wg@smu.edu.cn

significantly higher than IVF assisted pregnancies, vanishing twin pregnancies and singleton pregnancies ($P < 0.05$). There were no significant differences for fetal free DNA fractions among the latter 3 kinds of pregnancies. **Conclusion** It was feasible to screen chromosome aneuploidy by next generation sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies, and it needs to take fetal free DNA fraction into account during the result analysis.

[KEY WORDS] Noninvasive prenatal testing; Twins; Chromosome aneuploidy; Next generation sequencing; Fetal free DNA fraction

胎儿游离DNA的发现^[1]为无创产前筛查提供了新思路,并且大量临床研究证实高通量测序技术^[2-5]在无创产前筛查中的可行性及优势。近2年,随着高通量测序技术的迅猛发展,利用高通量测序技术进行无创产前检测(non-invasive prenatal testing, NIPT)筛查常见染色体的非整倍体日益受到人们的关注,并以其具有非侵入和准确的特点在各大医院得到了陆续开展。目前国内外学者对无创产前筛查的准确性和可行性评估,主要是针对单胎妊娠孕妇而进行的。虽然Audibert^[6]和Huang等^[7]分别对加拿大人群和中国人群进行了无创产前筛查21和18三体双胎孕妇适用性研究,但是对双胎妊娠孕妇群体的适用性相关研究和报道仍然比较少。因此本研究利用高通量测序技术对双胎妊娠样本进行无创产前筛查,以评估其筛查双胎染色体非整倍体的可行性,并对双胎样本胎儿游离DNA浓度进行分析来评估它对双胎样本的无创产前筛查的影响。

1 对象与方法

1.1 对象

选择2014年12月至2015年11月于达安健康临检中心(广东省广州市)做无创产前筛查的150例中68例怀有男性胎儿的单胎样本作为对照组,217例双胎妊娠中的120例怀有男性胎儿的孕妇样本实验组进行分析,其中包括自然双胎67例,辅助生殖技术植入的双胎47例,双胎消失综合征样本6例。孕妇在采血前均已签署知情同意书并在申请无创产前筛查前均已进行血清学和超声学的检查,且结果提示为高风险。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及血浆分离

用无菌的EDTA抗凝管采集孕妇外周血10 mL。先4 300 rpm低速离心10 min,将上清液转移到无菌的低吸附Eppendorf管内,接着13 600 rpm,

4℃,高速离心10 min^[8],吸取上层血浆并分装到新的Eppendorf管内,冻存于-80℃冰箱。

1.2.2 血浆中游离DNA提取

血浆游离DNA采用金麦格血清游离DNA提取试剂盒(磁珠法)(GenMag,北京),按照说明书进行提取。

1.2.3 测序文库构建

文库构建采用Ion Plus Fragment Library Kit V3和Ion Plus Fragment Library Adapters Kit (Life, 美国),并按照说明书操作。文库构建好后采用Qu-bit® 2.0和dsDNA HS Assay Kit测定浓度,用安捷伦的2100 bioanalyzer(Agilent, 美国)检测DNA片段分布情况。

1.2.4 测序

文库采用Ion OneTouch™ 2仪器进行模板制备,然后使用Ion OneTouch™ ES仪器进行阳性模板富集,接着采用Proton测序仪进行上机测序,试剂采用Ion PI™ Sequencing 200 Kit v3,芯片为Ion PI™ Chip v2(life, 美国),并按照说明书进行操作。

1.2.5 核型分析

测序分析结果为染色体三体阳性的样本,通过告知孕妇三体高风险情况并征求孕妇同意下在医院进行羊水穿刺,并将穿刺物送第三方检测机构进行羊水细胞培养染色体核型分析。

1.2.6 数据分析

测序数据经去低质量、去重复、GC校正等处理后,根据类似文献报道的方法^[9]分别计算出13号染色体,18号染色体和21号染色体的Z值,并以Z值>3判断为该染色体三体阳性。根据Y染色体唯一比对条数进行胎儿游离DNA浓度计算^[10]。采用SPSS 19.0软件进行结果统计,运用单因素方差分析比较自然妊娠双胎组、辅助生殖技术植入的双胎组、双胎消失综合征组和单胎妊娠组4组间胎儿游离DNA浓度、孕周、孕妇年龄和Z值的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 样本基本情况分析

188例样本按妊娠情况分成4组,其中自然妊娠双胎组样本67例,孕妇平均年龄为30.39周岁,平均孕周为17.96周;辅助生殖技术植入双胎组样本47例,孕妇平均年龄为32.30周岁,平均孕周为17.64周;双胎消失综合征组样本6例,孕妇平均年龄为31.83周岁,平均孕周为16.33周;自然妊娠单胎组样本68例,孕妇平均年龄为31.51周岁,平均孕周为17.84周;单因素方差分析结果显示,4组间

孕妇年龄间无显著性差异($F=1.124, P=0.341$),孕周间也未见显著性差异($F=0.268, P=0.848$)。

2.2 双胎妊娠染色体非整倍体检出情况

120例双胎妊娠样本中,一共检出2例染色体三体阳性样本,阳性率约为1.7%,其中一例为自然妊娠,测序结果为21三体阳性;另一例为辅助生殖技术植入的样本,测序结果为13三体和18三体阳性。阳性检出结果与后续的核型分析结果一致,具体情况见表1。另外,病例跟踪结果显示,本次研究所检测的阴性样本中未出现假阴性的案例。

表1 2例染色体三体阳性双胎妊娠样本检测结果
Table 1 Results of 2 cases of trisomy in twin pregnancies

妊娠方式	无创测序结果	Z值			核型结果	
		Chr13	Chr18	Chr21	左侧胎儿	右侧胎儿
自然妊娠	21三体	0.53	0.43	4.93	46,XX	47,XX,+21
辅助生殖技术妊娠	13三体和18三体	5.57	11.33	0.60	47,XX,+13	47,XY,+18

2.3 胎儿游离DNA浓度分析

自然妊娠双胎组样本平均的胎儿游离DNA浓度为14.72%;辅助生殖技术植入双胎组样本平均的胎儿游离DNA浓度为11.25%;双胎消失综合征组样本平均的胎儿游离DNA浓度为11.51%;自然妊娠单胎组样本平均的胎儿游离DNA浓度为11.26%,见表2。单因素方差分析结果显示,4组

间胎儿游离DNA浓度具有显著差异, $F=13.864, P=0.000$ 。组间两两比较分析显示,自然双胎妊娠组胎儿游离DNA浓度明显高于辅助生殖技术植入双胎组、双胎消失综合征组和自然妊娠单胎组, P 值均小于0.05。而其他3组间胎儿游离DNA浓度无显著性差异(图1)。

表2 4组间胎儿游离DNA浓度比较
Table 2 Fetal DNA fractions of 4 groups with different conceptions

组别	样本例数	孕妇平均年龄(岁)	平均孕周(周)	平均胎儿DNA浓度(%)
自然妊娠双胎	67	30.39	17.96	14.72
辅助生殖技术植入双胎	47	32.30	17.64	11.25
双胎消失综合征	6	31.83	16.33	11.51
自然妊娠单胎	68	31.51	17.84	11.26

2.4 染色体Z值

单因素方差分析结果显示,自然双胎妊娠组、辅助生殖技术植入双胎组、双胎消失综合征组和自然妊娠单胎组4个组间13号、18号和21号染色体的Z值均无显著性差异($F_{13}=0.268, P_{13}=0.848$; $F_{18}=0.412, P_{18}=0.744$; $F_{21}=0.745, P_{21}=0.526$)。

3 讨论

自Lo等^[1]发现孕妇血浆中存在胎儿游离DNA后,国内外研究人员针对胎儿游离DNA进行了许多理化性质的研究^[11-13],尤其是在促进无创产前诊断(NIPT)方面取得了突破性的进展^[14-15]。近

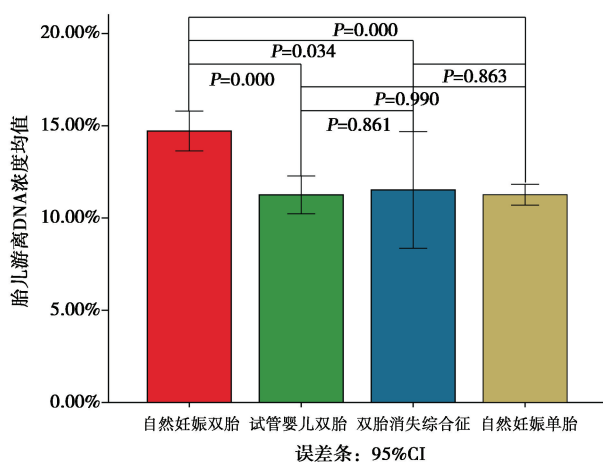


图1 不同妊娠情况下胎儿游离DNA浓度比较

Figure 1 Comparisons of fetal DNA fractions among pregnancies with different conceptions

年来随着高通量测序技术的快速发展,测序仪的不断升级换代,以及配套的分析软件和生物信息学的进步,国家政策支持等,高通量测序筛查常见染色体非整倍体已经初步走进了临床实际运用。高通量测序筛查常见染色体非整倍体具有非侵入性、准确性高,又快速的优点^[14,16-17],受到了孕妇和医院的青睐,并在我国大型医院陆续得到开展。而国内外学者主要是针对单胎妊娠孕妇进行了无创产前筛查的准确性和可行性评估,而针对双胎妊娠孕妇群体的研究和运用仍然比较少且并未成熟。本研究利用高通量测序技术对双胎妊娠样本进行了无创产前筛查双胎染色体非整倍体,并成功筛查出2例染色体三体阳性样本。同时我们的研究结果也显示自然双胎妊娠组、辅助生殖技术植入双胎组、双胎消失综合征单胎组和自然妊娠单胎组4个组间13号、18号和21号染色体的Z值均无显著性差异,即双胎妊娠时对染色体三体的判断值(Z值)造成影响并不大。这在一定程度上说明高通量测序技术筛查常见染色体非整倍体对双胎妊娠样本同样适用。

自然状态下双胎妊娠的概率约为1/90,由于孕妇年龄的增加,近年来医源性促排卵药物的使用,以及避孕药的使用等使得我国双胎妊娠呈现增高的趋势^[18-20],平均可达2%。而高龄孕妇怀有染色体非整倍体胎儿的几率高于正常育龄的孕妇。我国全面放开二胎,高龄孕妇可能会进一步增加。另外辅助生殖技术让不孕不育患者看到了希望,为保证存活率一般都植入2个胚胎,这也人为地增加了双胎妊娠的比例。双胎妊娠发生染色体非整

倍体的风险也高于单胎妊娠^[21]。因此加快促进高通量测序技术筛查双胎染色体非整倍体技术的成熟显得尤为重要。

本次研究筛查出一例一胎为21三体而另一胎为正常胎儿的自然妊娠双胎样本,该病例可能是由于单合子分裂后染色体不分离导致。针对此类情况,孕妇经核型确诊后可以选择实施选择性减胎术而避免三体患儿的出生。本研究还检出1例辅助生殖技术植入双胎染色体三体阳性样本,占总辅助生殖技术植入的双胎样本的2.1%。该样本同时发生了13三体和18三体阳性现象,经核型分析确诊该双胎病例为一胎患有13三体,另一胎患有18三体。该现象提示我们辅助生殖技术植入的双胎患染色体非整倍体的概率可能要高于正常妊娠的孕妇。这可能跟进行辅助生殖技术植入人群的特点有关,但仍然需要更多的研究数据来支持,我们后续将会对该现象做进一步的深入研究。

虽然当我们检测出双胎发生三体阳性时,还未能通过NIPT来判断是其中一个胎儿发生了染色体三体还是2个胎儿都发生了染色体三体,也还未能区分到底是哪一个胎儿发生了三体,但是我们可以减少对阴性样本进行羊水穿刺而给孕妇带来的痛苦和流产风险。

虽然高通量测序技术筛查染色体非整倍体具有很多优点,但也无法回避其受胎儿游离DNA浓度影响这一事实。目前研究发现无创产前筛查的判断值(Z值)受母体血浆中胎儿游离DNA浓度的影响且呈现一定的线性关系^[22]。但胎儿游离DNA浓度低于4%时,NIPT的检测结果很容易出现假阴性^[23]。本研究发现自然双胎妊娠组胎儿游离DNA浓度要明显高于辅助生殖技术植入双胎组、双胎消失综合征单胎组和自然妊娠单胎组,因此在进NIPT结果分析时,应当考虑胎儿DNA浓度所带来的影响,还应对孕妇的不同妊娠情况加以考虑,并根据不同情况作出相应的分析策略调整和结果校正。自然双胎妊娠组胎儿游离DNA浓度要明显高于辅助生殖技术植入双胎组这个可能是由于两者的孕周计算发生不同或者是辅助生殖技术植入的胚胎在孕妇体内生长发育速度不同于同期大小的自然妊娠的双胎而造成的。其中还观察到双胎消失综合征单胎组和自然妊娠单胎组间胎儿游离DNA浓度不存在显著性的差异,这说明胎儿消失后其游离在母体内的DNA会被迅速清除而不会对继续发育的另一胎儿造成影响,

因此这对该类型的孕妇,仍然可以采取高通量测序方法来筛查染色体非整倍体。

综上所述,采用无创高通量测序方法进行双胎妊娠染色体非整倍体筛查也是可行的,同时在进行结果分析应该考虑胎儿游离DNA浓度的影响。

参考文献

- [1] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum [J]. *Lancet*, 1997, 350(9076):485-487.
- [2] Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study [J]. *BMJ*, 2011, 342:c7401.
- [3] Bianchi DW, Rava RP, Sehnert AJ. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(6):578.
- [4] Liao C, Zhengfeng X, Zhang K. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(6):577-578.
- [5] Jeon YJ, Zhou Y, Li Y, et al. The feasibility study of non-invasive fetal trisomy 18 and 21 detection with semiconductor sequencing platform [J]. *Plos One*, 2014, 9(10):e110240.
- [6] Audibert F, Gagnon A. Prenatal screening for and diagnosis of aneuploidy in twin pregnancies [J]. *J Obstet Gynaecol Can*, 2011, 33(7):754-767.
- [7] Huang X, Zheng J, Chen M, et al. Noninvasive prenatal testing of trisomies 21 and 18 by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies [J]. *Prenat Diagn*, 2014, 34(4):335-340.
- [8] Chiu RW, Poon LL, Lau TK, et al. Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma [J]. *Clin Chem*, 2001, 47(9):1607-1613.
- [9] Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study [J]. *BMJ*, 2011, 342:c7401.
- [10] Xu XP, Gan HY, Li FX, et al. A method to quantify cell-free fetal DNA fraction in maternal plasma using next generation sequencing: its application in non-invasive prenatal chromosomal aneuploidy detection [J]. *Plos One*, 2016, 11(1):e146997.
- [11] Finning K, Martin P, Summers J, et al. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study [J]. *BMJ*, 2008, 336(7648):816-818.
- [12] Tsui NB, Kadir RA, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA [J]. *Blood*, 2011, 117(13):3684-3691.
- [13] Zeybek YG, Gunel T, Benian A, et al. Clinical evaluations of cell-free fetal DNA quantities in pre-eclamptic pregnancies [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2013, 39(3):632-640.
- [14] Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(9):799-808.
- [15] Shi X, Zhang Z, Cram DS, et al. Feasibility of noninvasive prenatal testing for common fetal aneuploidies in an early gestational window [J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 439:24-28.
- [16] Jeon YJ, Zhou Y, Li Y, et al. The feasibility study of non-invasive fetal trisomy 18 and 21 detection with semiconductor sequencing platform [J]. *Plos One*, 2014, 9(10):e110240.
- [17] McCullough RM, Almasri EA, Guan X, et al. Non-invasive prenatal chromosomal aneuploidy testing—clinical experience: 100,000 clinical samples [J]. *Plos One*, 2014, 9(10):e109173.
- [18] 李晓洲, 史云芳, 琚端, 等. 孕中期羊水染色体检查双胎23对 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2013, 30(6):759-760.
- [19] Audibert F, Gagnon A. Prenatal screening for and diagnosis of aneuploidy in twin pregnancies [J]. *J Obstet Gynaecol Can*, 2011, 33(7):754-767.
- [20] Alvarado EA, Pacheco RP, Alderete FG, et al. Selective termination in dichorionic twins discordant for congenital defect [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2012, 161(1):8-11.
- [21] 黄轩, 罗艳敏, 黄林环, 等. 双绒毛膜双羊膜囊双胎妊娠一胎染色体非整倍体选择性减胎术20例分析 [J]. *中华围产医学杂志*, 2014, 17(11):733-737.
- [22] Hudecova I, Sahota D, Heung MM, et al. Maternal plasma fetal DNA fractions in pregnancies with low and high risks for fetal chromosomal aneuploidies [J]. *Plos One*, 2014, 9(2):e88484.
- [23] Norton ME, Brar H, Weiss J, et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18 [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2012, 207(2):131-137.

下一代测序法对新生儿进行苯丙酮尿症致病突变的筛查

王辉芳¹ 叶倩平¹ 杨旭² 梁志坤¹ 胡妮娅^{3*}

【摘要】目的 运用基于半导体芯片技术的下一代测序方法对苯丙酮尿症相关基因进行基因测序, 筛查出常见的致病突变位, 探讨半导体测序技术在遗传病检测方面的应用价值。 **方法** 采用 AmpliSeq 方法通过多重 PCR 捕获目的片段, 然后构建文库, 用 Ion Torrent PGM™ 测序仪进行测序反应, 与 Sanger 一代测序法进行结果比较验证。 **结果** 75 个临床检测为苯丙酮尿症样本中有 57 例含致病突变位点, 包括有杂合突变、纯合突变以及复合杂合突变。下一代测序结果与 Sanger 一代测序结果完全一致。 **结论** 半导体测序能准确检测苯丙酮尿症常见致病突变, 对遗传病发病机制的研究及筛查具有一定的应用价值。

【关键词】 苯丙酮尿症; 半导体测序; Ion Torrent PGM™; 基因突变; *PAH* 基因

Screening of the phenylketonuria of the newborn by the next generation sequencing

WANG Huifang¹, YE Qianping¹, YANG Xu², LIANG Zhikun¹, HU Niya^{3*}

(1. Guangzhou Darui Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510665; 2. School of Basic Medical Science, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 3. Department of Clinical Laboratory, the Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi, China, 330006)

[ABSTRACT] Objective To sequence common pathogenic mutations which are related to phenylketonuria by using the next generation sequencing method, and evaluating the application value of Semiconductor sequencing in the field of hereditary disease detection. **Methods** Target genes were captured by AmpliSeq technology, which are based on multiple PCR, and the captured fragments were used for construction of the DNA libraries, which were sequenced by using the Ion Torrent PGM™ sequencing platform. The mutations were verified by Sanger sequencing. **Results** There were 57 samples with mutations in 75 samples, and 10 mutations were detected. These mutations included a heterozygous mutation, homozygous mutation, and compound heterozygous mutations. **Conclusion** Semiconductor sequencing can detect the common mutations of the phenylketonuria accurately, which can be used for mutation detection of these hereditary diseases and to illuminate of the pathogenesis of these disorders.

[KEY WORDS] Phenylketonuria; Semiconductor sequencing; Ion Torrent PGM™; Gene mutation; *PAH* gene

苯丙酮尿症 (phenylketonuria, PKU) 是由于肝脏苯丙氨酸羟化酶 (phenylalanine hydroxylase, *PAH*) 缺乏所致的一种严重的遗传性氨基酸代谢障碍性疾病, 为常染色体隐性遗传病^[1-2]。苯丙酮尿症

患儿出生后若不及时治疗, 会出现智力低下、体格发育迟缓等症状^[2-3]。苯丙酮尿症是少数可治疗的遗传病之一, 尽早发现尽早治疗为其治疗的关键, 应用饮食疗法可以减轻或者控制患者症状^[4-5]。

基金项目: 广州市科技计划项目 (201504301001493); 广州市科技计划项目健康医疗协同创新重大专项 (201508020259)

作者单位: 1. 广州市达瑞生物技术股份有限公司, 广东, 广州 510665

2. 南方医科大学基础医学院, 广东, 广州 510515

3. 南昌大学第一附属医院临床科室, 江西, 南昌 330006

*通讯作者: 胡妮娅, E-mail: 364621603@qq.com

目前对苯丙酮尿症的检测方法有实验室诊断及其他等多种方法。实验室方法包括有 Guthrie 细菌抑制法、荧光光度法、Bio-Rad 酶定量法等。Guthrie 细菌抑制法、酶法和荧光光度法比较,细菌抑制法、酶法操作过程简便、快捷、成本低,不需要特殊设备而适于大规模检测苯丙氨酸的浓度,但准确性、精密度、灵敏度较低,荧光光度法检测快速、微量,其灵敏度和精确度明显高于细菌抑制法、酶法,但单个样本检测费时^[3]。其他检查方法还有头颅核磁共振成像(nuclear magnetic resonance imaging, MRI)检查、脑电图、骨骼 X 射线表现、智力测定、氢质子磁共振波谱检测以及基因检测等方法^[5-7]。而基因诊断与其他生化检测方法相比,其优势在于可从 DNA 水平上检测病因,诊断特异性高,在个体发育任一阶段,对任何含完整遗传物质的细胞都可进行诊断,并且可为产前诊断和潜在的新治疗方法研究提供可参考的依据。

基因诊断技术包括有 PCR 及其衍生技术、短串联重复序列(short tandem repeat, STR)分析技术以及基因测序技术。此 3 种方法相比,PCR 及其衍生技术的可重复性及准确性均有不足,不能明确碱基变异的具体位置与形式,也不能区分基因的多态和突变位点。STR 方法虽经济快速,但其仅适用于 STR 可提供连锁信息的家庭。而测序技术不仅能检测出已知突变位点,还能发现新的 SNP 位点,且 Sanger 一代测序技术则成为分析基因序列的金标准。但是一代测序技术成本高、技术难

度系数大,很难在基层推广,而近年来发展起来的以芯片测序、合成测序和焦磷酸测序为代表的下一代测序技术(next generation sequencing, NGS)能弥补一代测序的不足,可实现快速、通量高的规模化测序。以 Ion Torrent PGM™(个体基因组测序仪)以及更高通量的 Ion Torrent Proton™测序仪为代表的半导体测序技术,其不属于荧光检测、核酸标记的生化技术,与其他下一代测序技术相比更简单、性价比更高,并且具有强大的扩展性^[8-9]。本研究拟采用高通量的半导体测序技术对苯丙酮尿症多个常见致病突变点进行检测,探讨半导体测序技术在遗传病检测中应用的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验对象

实验所用干血斑样本共 75 例,是 2016 年 3 月份在河南地区收集的新生儿筛查样本。

1.2 DNA 提取

采用 MagPure Blood DNA Mini FTA Kit[广州美基(欣研)生物科技有限公司]提取血斑基因组 DNA,操作按试剂盒的说明书进行,提取完成后,用 Qubit® 3.0 荧光计(Life Technologies)检测 DNA 浓度,随后-20℃保存。

1.3 半导体测序

1.3.1 文库构建

根据 GeneBank 中的 PAH 序列(GI:568815586),由 Life Technologies 针对致病突变点(表 1)设计合

表 1 12 个常见突变点详细信息

Table 1 The details of 12 common mutations

染色体	基因名称	突变信息	蛋白质变化	RS 号	MAF 值	临床意义
Chr12	PAH	c.1238G>C	p.Arg413Pro	rs79931499	T=0.000 6/3	With Pathogenic allele
Chr12	PAH	c.1199G>A	p.Arg400Lys	rs199475658	NA	With untested allele
Chr12	PAH	c.1197A>T	p.Val399=	rs199475584	NA	With Pathogenic allele
Chr12	PAH	c.1068C>A	p.Tyr356Ter	rs62516095	C=0.000 03/4	With Pathogenic, other allele
Chr12	PAH	c.735G>A	p.Val245=	rs1042503	T=0.314 9/1577	With untested allele
Chr12	PAH	c.728G>A	p.Arg243Gln	rs62508588	T=0.000 4/2	With Pathogenic, untested allele
Chr12	PAH	c.722G>A	p.Arg241His	rs62508730	T=0.000 10/12	With Pathogenic, untested allele
Chr12	PAH	c.611A>G	p.Tyr204Cys	rs62514927	C=0.000 02/2	other
Chr12	PAH	c.442-1G>A	—	rs62514907	NA	With Pathogenic allele
Chr12	PAH	c.842+2T>A	—	rs62514955	NA	With Pathogenic allele
Chr12	PAH	c.739G>A	p.Gly247Arg	rs62508731	NA	With untested allele
Chr12	PAH	c.809G>A	p.Arg270Lys	rs62514950	T=0.000 008/1	With Pathogenic allele

成引物 Panel, 包含 2 个引物池, 2 个引物池分开进行多重 PCR 扩增, 扩增体系为 10 μ L, 反应条件为: 99 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 99 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火和延伸 4 min, 共 19 个循环; 10 $^{\circ}$ C 保温。扩增产物经 FuPa 酶消化引物, 用 DNA 连接酶将特异性接头序列连接在目的片段两端, 磁珠纯化后进一步扩增反应, 最后经两步磁珠纯化去除较大或较小的片段, 构建成片段大小在 250 bp 左右的基因文库。Qubit[®] 3.0 荧光计对文库浓度进行定量。

1.3.2 模板制备和模板富集

建好的文库等量混合使每个文库的终浓度为 200 pmol/L。用 Ion Torrent OT[™] 进行乳液 PCR 扩增, 将 Ion PGM[™] Enzyme Mix 50 μ L、Ion PGM[™] ISPs 100 μ L、稀释好的文库 2 μ L 和无核酸酶水 248 μ L 加入到 PGM[™] Master Mix 中, 此时体积共 1 000 μ L, 震荡离心后匀速缓慢注入到 Ion One-Touch[™] Reaction Filter 中, 并分 2 次注入 1.7 mL Ion One Touch[™] Reaction Oil, 此过程避免注入气泡, 将 Ion One Touch[™] Reaction Filter 安装在 Ion OneTouch[™] 2 上, 选择相应程序进行反应。模板制备完成后用 One Touch[™] ES 进行模板富集。

1.3.3 Ion Torrent PGM[™] 测序

用 Ion Torrent PGM[™] 测序仪进行测序反应, 首先进行仪器的氯洗和水洗, 然后更换初始化芯片进行初始化反应以调节各位置的 pH 值在 7.45~7.60 范围内, 将 ES 制备的模板 Loading 到 318 芯片上, 安装在测序仪相应位置, 选择预先设置好的 Plan (见表 2), 根据说明书设定测序的所需的 flow 数和上样量, 本实验所检测的文库片段大小为 250 bp, 所需 flow 数为 500, 进行测序反应。测序结束后在 Ion Torrent 服务器上运行插件分析每个样本的 10 个致病位点的突变情况。

表 2 Plan 的参数设置

Table 2 The parameter setting of the plan

选项	选择类型
Library kit type	Ion Ampliseq library 2.0 kit
Templating kit	Ion PGM [™] Hi-Q [™] OT2 200 kit
Sequence kit	Ion PGM [™] Sequencing 200 kit
Chip type	Ion PGM [™] 318 chip
Barcode set	Ionxpress
Mark as PCR duplicates	True
Flow	500

1.4 Sanger 测序

将 DNA 样本及相应的引物打包送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 Sanger 一代测序验证。

1.5 结果判断及统计学方法

试验结果统计分析选用符合方案数据, 即所有符合试验方案要求的受试者样本数据进行统计分析, 主要采用四格表整理试验数据, 阳性代表检测出的含 12 个致病突变点中一个或多个致病位点的样本, 阴性代表没检测出这 12 个致病突变点的样本。半导体测序结果和 Sanger 一代测序验证结果对比采用 Kappa 一致性检验。

2 结果

2.1 半导体测序结果

半导体测序结果显示, 75 个样本中共检测出 57 例样本存在致病突变位点, 都为单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 位点, 包括有杂合突变、纯合突变以及复合杂合突变, 其中杂合突变的 Frequency 在 39~56.4 之间, 纯合突变的 Frequency 在 94.7~100 之间, Coverage 在 30~1 449 之间, 大部分落在 200~600 之间, 平均 Coverage 为 470。具体信息见表 3。

此处野生型指未检测出 12 种常见 PAH 基因致病突变的型别。

2.2 Sanger 测序结果

采用 Sanger 测序法对检测出的突变样本的突变点进行验证, 各被检测标准本中突变位点的检测结果与半导体测序结果完全一致。

2.3 统计学分析结果

试验真实性评价: 灵敏性、特异性、准确性、Kappa 值等指标计算, 见表 4。

分别计算灵敏性、特异性、准确性:

灵敏性 = $57 / (57 + 0) \times 100\% = 100\%$

特异性 = $18 / (0 + 18) \times 100\% = 100\%$

准确性 = $(57 + 18) / (57 + 0 + 0 + 18) \times 100\% = 100\%$

Kappa 值采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计分析。Kappa 值的计算结果都为 1, 结果表明, 半导体测序结果与 Sanger 一代测序验证结果完全一致。

3 讨论

PKU 是现阶段人类了解较为清楚的遗传代谢病之一, 并且是首个可通过饮食控制实现治疗的

表3 75例样本检测结果表

Table 3 75 cases of sample test result

编号	DNA 浓度 (ng/μL)	文库浓度 (ng/μL)	Frequency	Coverage	上机检测突变型别
1	8.82	1.7	47.9/47.2	474/882	PAH:1238G>C 杂合、PAH:1197A>T 杂合
2	7.44	1.22	49.8/47.9	272/417	PAH:1238G>C 杂合、PAH:728G>A 杂合
3	11.2	1.82	100	543	PAH:442-1G>A 纯合
4	3.16	0.767	46.7	242	PAH:611A>G 杂合
5	3.62	0.726	50.9	778	PAH:611A>G 杂合
6	3.6/5.12	0.865	44.3	318	PAH:611A>G 杂合
7	3.3	0.865	49.1	786	PAH:611A>G 杂合
8	5.62/5.42	1.12	95.2	640	PAH:728G>A 纯合
9	4.68	0.182	100	30	PAH:728G>A 纯合
10	4.32/4.02	1.02	48.8	371	PAH:728G>A 杂合
11	7.64	1.62	46.9	351	PAH:728G>A 杂合
12	5.14	0.996	44.9	469	PAH:728G>A 杂合
13	5.58	1.34	49.5	320	PAH:728G>A 杂合
14	5.7	1.49	48.5	417	PAH:728G>A 杂合
15	7.24	1.26	51.4/47.5	417/803	PAH:728G>A 杂合、PAH:473G>A 杂合
16	5.56	1.27	51	497	PAH:842+2T>A 杂合
17	7.62	1.71	52.2	1398	PAH:1068C>A 杂合
18	6.2	0.608	50.8	1449	PAH:1068C>A 杂合
19	5.22	1.14	50.3	1107	PAH:1068C>A 杂合
20	5.2	0.75	94.7	514	PAH:1197A>T 纯合
21	14.1	2.08	43.2	345	PAH:1197A>T 杂合
22	7.24	0.225	48.4	33	PAH:1197A>T 杂合
23	8.46	1.81	45.1	955	PAH:1197A>T 杂合
24	6.37	0.737	49.2/47	2 521/1 418	PAH:1197A>T 杂合、PAH:611A>G 杂合
25	3.76	0.89	46.1/50.4	1 290/1 243	PAH:1197A>T 杂合、PAH:722G>A 杂合
26	16.5	0.899	48.2/57	120/121	PAH:1197A>T 杂合、PAH:728G>A 杂合
27	6.82	1.52	100	781	PAH:1238G>C 纯合
28	13.2	2.06	49.9	383	PAH:1238G>C 杂合
29	6.19	1.52	50.5	766	PAH:1238G>C 杂合
30	26.2	3.95	49.6/53.8	259/673	PAH:1238G>C 杂合、PAH:1068C>A 杂合
31	8.9	1.2	51.3	430	PAH:442-1G>A 杂合
32	14.7	2.23	46.8	565	PAH:442-1G>A 杂合
33	6.1	0.165	43.9	394	PAH:442-1G>A 杂合
34	12.2	2.26	44.7	385	PAH:611A>G 杂合
35	9.82	1.27	55.3	189	PAH:611A>G 杂合
36	11.6	2.24	51.6	1 016	PAH:611A>G 杂合
37	5.2	1.18	50.9	232	PAH:611A>G 杂合
38	7.56	0.509	100	273	PAH:728G>A 纯合
39	4.14	0.177	47.1	85	PAH:728G>A 杂合
40	9.26	1.65	45	812	PAH:728G>A 杂合
41	6.24	0.377	48.8	663	PAH:728G>A 杂合
42	9.58	0.207	51.8	194	PAH:728G>A 杂合
43	5.74	1.37	39	77	PAH:728G>A 杂合
44	8.87	0.994	46	313	PAH:728G>A 杂合
45	7.27	0.593	52	102	PAH:728G>A 杂合
46	9.4	0.368	48.9	490	PAH:728G>A 杂合
47	9.29	1.68	52.9	102	PAH:728G>A 杂合
48	10.3	0.082	56.4	55	PAH:728G>A 杂合
49	8.14	1.3	47	844	PAH:728G>A 杂合
50	8.72	0.736	47.9	231	PAH:728G>A 杂合
51	12.7	1.34	48.6	492	PAH:728G>A 杂合
52	8.92	2.08	46.9/52.3	562/260	PAH:728G>A 杂合、PAH:611A>G 杂合
53	6.52	1.18	48.8/47.1	287/206	PAH:728G>A 杂合、PAH:611A>G 杂合
54	8.72	1.94	47.5/45.8	597/451	PAH:728G>A 杂合、PAH:611A>G 杂合
55	5.68	0.216	45.1/52	50/50	PAH:728G>A 杂合、PAH:722G>A 杂合
56	3.09	0.131	53.7	164	PAH:739G>C 杂合
57	12.3	0.262	48.8	43	PAH:809G>A 杂合
58	9.1	1.68	—	—	野生型
59	15.3	2.38	—	—	野生型
60	19.8	2.81	—	—	野生型
61	10.8	2.45	—	—	野生型
62	9.62	1.76	—	—	野生型
63	5.06	1.12	—	—	野生型
64	6.93	0.791	—	—	野生型
65	7.04	1.22	—	—	野生型
66	2.48/3.36	0.541	—	—	野生型
67	8.08	1.67	—	—	野生型
68	4.04	0.895	—	—	野生型
69	7.42	1.11	—	—	野生型
70	11.4	0.856	—	—	野生型
71	6.12	0.963	—	—	野生型
72	9.1	1.93	—	—	野生型
73	6.78	1.05	—	—	野生型
74	4.38	0.794	—	—	野生型
75	3.28	0.785	—	—	野生型

表4 2种方法检测结果的一致性评测表
Table 4 The consistency of the testing results of the
2 methods

方法		Sanger 一代测序验证		合计
		阳性	阴性	
半导体测序	阳性	57	0	57
	阴性	0	18	18
	总数	57	18	75

遗传病,对此病进行早发现、早确诊、早干预、早治疗,对降低PKU患儿致残率,提高国民素质,具有重大意义。此病具有致病基因为纯合或双重杂合时发病的特点^[10],且此病各地区突变热点存在较大差异。

本实验中我们用 Ion Torrent PGM™ 半导体测序仪对苯丙酮尿症常见的12个致病突变位点进行检
测,75例样本中共检测出57例样本突变,其中46例样本为单个位点突变,11例样本为含2种突变类型的复合突变,包含有11种突变类型,且728G>A为河南地区高发突变点^[10],除此高发热点外,其他突变点在检出的数量上并无明显差异,也进一步反映出苯丙酮尿症突变异质性高,并无绝对突变热点的特征。本实验结果经一代测序验证,结果准确,此外曾有文献报道 Ion Torrent 半导体测序在其他致病突变的检测,如成建等^[11]应用 Ion Torrent 半导体测序技术检测马凡综合征患者 FBN1 基因致病突变点,检测到3个马凡综合征家系和1个马凡综合征的致病基因突变,Sanger 验证结果与半导体测序结果完全一致;周保成等^[12]提取15例确诊为经典型PKU患儿及其父母的外周血DNA,应用 Ion Torrent PGM™ 进行测序检测,共检测出29个突变点,分属17种突变,并发现 p.P292L 的新突变点,且该检测结果与 Sanger 验证结果一致。这些研究作为半导体测序技术应用于遗传病检测的强有力的证据,表明高通量的半导体测序技术应用于遗传病检测的可行性。

在看到实验成功的同时,我们也应注意实验数据所反映出的不足之处。本实验所测得的有几个突变样本 Coverage 值较低,且最大值与最小值相差较大,实验结果的准确性虽经一代测序验证,但较低的 Coverage 值,令结果缺少说服力。究其原因,我们可以从实验结果原始数据可以看出,样本DNA浓度偏低,进而使建库浓度偏低且各样本文库浓度差别大,而较大的浓度差别,易造成混样的不平均,最终在测序结果处体现出样本间 Cov-

erage 差别大。针对这些问题,我们可以从以下几个方面进行解决:(1)优化DNA提取方法或针对不同类型的样本选取更合适的DNA提取试剂盒;(2)对于同一批上机样本,其浓度的测定及混样应由同一个人一次性操作完成,尽量减小误差;(3)提升实验人员的实验操作技能。

此外,我们也应认识到,下一代测序技术也只是一项技术,而若将其应用于疾病检测领域,不仅需要野生型的序列作为对照,还需要明确疾病的致病机制及确切的致病突变点,而且后期还要进行大量的数据分析处理工作,只有各环节的工作都做好了,对疾病的确诊才有意义。

伴随着下一代测序技术的高速发展,我们坚信所面临的难题将会逐步解决,下一代测序技术将在在遗传病检测领域发挥更重要的作用。

参考文献

- [1] 王国强,岳邦振,何彩菊,等. 新生儿苯丙酮尿症筛查结果分析[J]. 大家健康:学术版, 2012, 6(10): 2-4.
- [2] 卢建强,熊继红. 新生儿苯丙酮尿症的筛查与防治概况[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(7): 856-858.
- [3] 银雪花,阳利龙. 苯丙酮尿症筛查检测方法进展[J]. 儿科药学杂志, 2007, 13(6): 61-63.
- [4] 贾晓菲. 苯丙酮尿症常见突变位点检测及中国人群 PAH 基因突变谱的调查[D]. 厦门:厦门大学, 2014.
- [5] 杨志峰. 苯丙酮尿症的临床研究进展[J]. 中国现代医药杂志, 2012, 14(2): 131-132.
- [6] 张瑞,周铁成,郝晓柯,等. 高效液相色谱法及串联质谱法在苯丙酮尿症筛查诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(6): 758-759, 762.
- [7] 李艳霞,潘迎. 新生儿筛查苯丙酮尿症实验方法学进展[J]. 中国儿童保健杂志, 2011, 19(9): 824-826.
- [8] 刘宇轩,张文琼,黄代新. 测序新技术 Ion Torrent PGM 及其法医学应用[J]. 中国法医学杂志, 2015, 30(1): 52-55.
- [9] 朱艳慧. Ion Torrent 测序技术检测 I 型神经纤维瘤病患者 NF1 基因突变[D]. 长沙:中南大学, 2014.
- [10] 赵跃,张宏,夏雪山. 下一代半导体测序技术在遗传性心肌病分子诊断中的应用[J]. 遗传, 2015, 37(7): 635-644.
- [11] 成建,马定远,刘邴,等. 应用 IonTorrent 半导体测序检测马凡综合征患者 FBN1 基因致病突变[J]. 现代妇产科进展, 2015, 24(3): 201-204.
- [12] 周保成,穆原,尹婷,等. Ion Torrent PGM™ 测序仪检测苯丙酮尿症患儿苯丙氨酸羟化酶基因突变[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(12): 898-902.

• 论 著 •

微阵列比较基因组杂交技术与二代基因测序检测拷贝数变异的对比

陈新周¹ 王明珠² 何丹¹ 周慧¹ 林方欣¹ 李粉霞^{2*}

【摘要】目的 对比分析微阵列比较基因组杂交技术(array-based comparative genomic hybridization, aCGH)和第二代基因测序技术(next generation sequencing, NGS)在基因组拷贝数变异(copy number variation, CNV)上的一致性,为临床检测 CNV 提供新的检测方法。**方法** 提取 15 例流产组织临床样本的基因组 DNA,然后分别使用 aCGH 和 NGS 2 种方法对上述 DNA 进行检测,分析对比每个样本的 CNV 的数目。**结果** aCGH 共检测到 CNV 数有 109 个,最小的片段有 16 kb,最大的片段有 34 Mb,其中小于 200 kb 的有 20 个,大于 200 kb 小于 1 Mb 的有 34 个,大于 1 Mb 小于 5 Mb 的有 26 个,大于 5 Mb 小于 34 Mb 的有 29 个。NGS 共检出 68 个 CNV,其中小于 200 kb 的有 3 个,检出率为 15.0%;大于 200 kb 小于 1 Mb 的有 22 个,检出率为 64.7%;大于 1 Mb 小于 5 Mb 的有 20 个,检出率为 76.9%;大于 5 Mb 小于 34 Mb 的有 29 个,检出率为 100.0%。**结论** 对于目前的数据量来说,NGS 在检测大于 5 Mb 的大片段 CNV 上检出率较高,与 aCGH 具有一定的一致性,可以应用于流产组织中 CNV 的检测。对于小片段的 CNV 的检测,需要增加相应的读取的数据量进行检测。

【关键词】 基因组拷贝数变异; 第二代基因测序; 微阵列比较基因组杂交技术

The comparison between array-CGH with next generation sequencing in the detection of copy number variations

CHEN Xinzhou¹, WANG Mingzhu², HE Dan¹, ZHOU Hui¹, LIN Fangxin¹, LI Fenxia^{2*}

(1. Guangzhou Darui Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510665; 2. School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Objective To provide a new method for clinical detection of copy number variants (CNV) by comparing the consistency between array-based comparative genomic hybridization (aCGH) and next generation sequencing (NGS) in the genome copy number variation. **Methods** DNA was extracted from 15 cases of clinical specimens and detected by both aCGH and NGS methods. CNV numbers were analyzed in each sample. **Results** The results showed that aCGH identified 109 CNVs, in that the shortest CNV was 16 KB, and the longest CNV was 34 MB. There were 20 CNVs shorter than 200 kb, 34 CNVs between 200 kb and 1 Mb, 26 CNVs between 1 Mb and 5 Mb, and 29 CNVs between 5 Mb and 34 Mb. NGS identified 68 CNVs, of them 3 were shorter than 200 kb (15%), 22 between 200 kb and 1 Mb (64.7%), 20 between 1 Mb and 5 Mb (76.9%), 29 between 5 Mb and 34 Mb (100%). **Conclusion** NGS has good consistency with aCGH in detecting CNVs longer than 5 Mb. Therefore it can be a reliable method to test the CNV. The performance of NGS in testing the short CNVs, especially the CNVs shorter than 200 kb will have a better result by increasing the read

基金项目:广州市科技计划产学研协同创新重大专项(201604020104);广东省科技计划项目公益研究与能力建设专项(2015A030401040);广州市重大科技攻关项目子课题(2014Y2-00220)

作者单位:1. 广州市达瑞生物技术股份有限公司, 广东, 广州 510665

2. 南方医科大学检验与生物技术学院, 广东, 广州 510515

*通讯作者:李粉霞, E-mail: lifenxia123@qq.com

data.

[KEY WORDS] Copy number variation; Next generation sequencing; Array based comparative genomic hybridization

自然流产(spontaneous abortion, SA)在妊娠中的发生率为10%~15%^[1]。孕12周之前的流产称为早期SA。与同一配偶发生连续2次或多次SA称为复发性流产。早期SA的病因复杂,50%以上的胚胎是由染色体异常造成的,染色体异常包括染色体数目异常,如单体、三体、多倍体;结构异常,如断裂、缺失、易位等。发生SA时的孕周越短,染色体异常的可能性越大。

拷贝数变异(copy number variation, CNV)指人类基因组中广泛存在的缺失、插入、重复和复杂位点的变异,长度为1 kb以上,突变率远高于单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)。越来越多的研究表明^[2-3], CNV与许多疾病有着密切的联系,在许多遗传疾病中扮演着重要的角色,特别是癌症、精神分裂等疾病,引起了研究者的广泛兴趣。随着技术的发展,芯片技术[微阵列比较基因组杂交技术(array-based comparative genomic hybridization, aCGH)或单核苷酸多态性微阵列技术(array single nucleotide polymorphism, SNP array)]也成为最近几年新兴的一种检测方法,能将检出率提高,不过受限于其技术原理,芯片探针无法覆盖的染色体区段将无法检测,这也限制发现新的染色体畸变,进而限制了发现新的染色体疾病的可能。然而高通量测序技术的迅猛发展,使得测序技术用于染色体拷贝数变异(CNV)检测的优越性越来越明显。本研究将通过aCGH和NGS 2种方法对流产组织CNV的检测,探讨NGS能否作为新的CNV的检测方法。

1 材料与方法

1.1 研究对象

研究对象为15例流产组织临床样本。

1.2 试剂

提取DNA所用的QIAamp® DNA Mini Kit试剂盒购自于德国QIAGEN公司, aCGH试剂盒购自于美国Agilent公司, NGS所用的建库试剂盒, 模板制备试剂盒, 测序试剂盒均购自于美国Life Technology公司。

1.3 仪器

aCGH芯片扫描仪SureScan Microarray Scanner

由美国Agilent公司研制。NGS使用的2100生物分析仪由美国Agilent公司研制, Ion One Touch 2和Ion One Touch™ ES由美国Life公司研制, DA8600基因测序仪由中山大学达安基因股份有限公司提供。

1.4 方法

1.4.1 aCGH检测CNV

1.4.1.1 gDNA的提取

按照QIAamp® DNA Mini Kit说明书进行gDNA提取。

1.4.1.2 aCGH芯片上机前处理

将提取的DNA与试剂盒提供的reference进行片段化和随机扩增, 然后使用Cy3和Cy5 2种染料标记DNA, 并纯化标记后的DNA, 使用NanoDrop 2000 UV-VIS分光光度计来检测并计算产量与比活度, 只有产量和比活度符合要求后才能进行下一步的杂交。将符合要求的DNA加入到试剂盒提供的杂交室中, 封闭杂交室并放入杂交箱中进行杂交。

1.4.1.3 上机检测

将芯片从杂交室中取出, 并用纯水和试剂盒提供的Wash Buffer进行清洗, 清洗后使用SureScan Microarray Scanner进行芯片的扫描, 扫描后的图片结果可以使用Agilent公司提供的Agilent CytoGenomics Edition软件进行分析。

1.4.2 NGS检测CNV

1.4.2.1 gDNA的提取

按照QIAamp® DNA Mini Kit说明书进行gDNA提取。

1.4.2.2 构建上机文库

将提取的gDNA按照文库构建试剂盒进行文库构建。首先DNA片段末端的补平, 然后加上末端接头, 最后PCR扩增DNA片段。扩增完后需要对所构建的文库进行检测, 用Qubit检测DNA浓度, 用生物分析仪检测片段长度。

1.4.2.3 DA8600上机测序

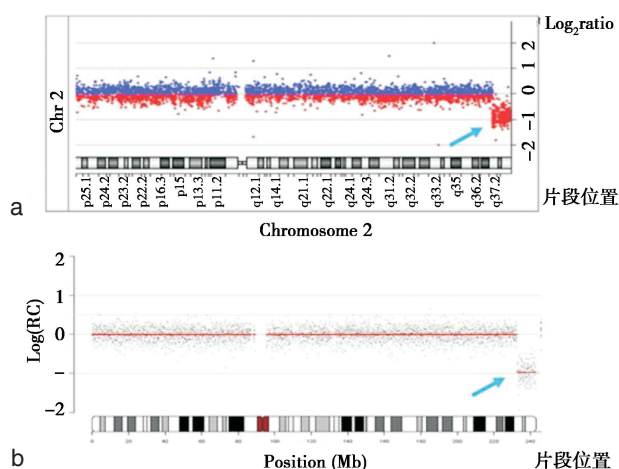
上机测序前, 需要制备上机模板, 并将模板进行富集。将DA8600进行清洗, 先氯洗后再进行水洗, 清洗完后将仪器初始化并设置上机Plan。芯

片上机前需要进行清洗和校准,校准完才能进行上机测序。上机测序结果可以在 DA8600 服务器上查看,利用染色体非整倍体检测数据分析系统进行数据分析,得到每个测序样本的 Z 值,根据参考范围进行结果判断。

2 结果

2.1 实验结果

2 种实验的结果都可以通过检测的 $\log_2\text{ratio}$ 值的大小来判断染色体的拷贝数变异,图 1 为随机选取实验中一个样本的 2 号染色体 2 种结果的对比图,图 1a 为 aCGH 结果,图 1b 为 NGS 的检测结果。2 个结果中都显示出该样本的 2 号染色体在 2q37.1q37.3 (232, 612, 296-242, 690, 037) 片段缺失,如图中蓝色箭头所示。



a: aCGH 结果; b: NGS 结果; 蓝色箭头表示一处染色体缺失 2q37.1q37.3 (232, 612, 296-242, 690, 037)

图 1 aCGH 和 NGS 分析染色体拷贝数变异的比较
Figure 1 Comparison of chromosomal copy number variants analysis by aCGH and NGS

本次研究中, aCGH 共检测到 CNV 数有 109 个,最小的片段有 16 kb,最大的片段有 34 Mb,其中小于 200 kb 的有 20 个,大于 200 kb 小于 1 Mb 的有 34 个,大于 1 Mb 小于 5 Mb 的有 26 个,大于 5 Mb 的有 29 个。NGS 的检测是共有 74 个 CNV,其中小于 200 kb 的有 3 个,检出率为 15.0%;大于 200 kb 小于 1 Mb 的有 22 个,检出率为 64.7%;大于 1 Mb 小于 5 Mb 的有 20 个,检出率为 76.9%;大于 5 Mb 小于 34 Mb 的有 29 个,检出率为 100.0%,见表 1 所示。

表 1 aCGH 与 NGS 的检测染色体拷贝数变异结果对比
Table 1 Comparison of chromosomal copy number variants analysis by aCGH and NGS

片段大小	aCGH 检测数	NGS 检测数	NGS 检出率(%)
0~200 kb	20	3	15.0
200 kb~1 Mb	34	22	64.7
1 Mb~5 Mb	26	20	76.9
5 Mb~34 Mb	29	29	100.0

3 讨论

遗传变异是生命进化演变的基本特征。从细胞遗传学水平看, DNA 的变异主要包括染色体数目的变异和染色体结构的变异。数目变异包括染色体组成倍地增加或减少,以及单条染色体的增加或减少;结构变异主要指染色体片段的重复、缺失、倒位和易位等^[4]。这些变异均会产生相应的遗传学效应,可能会导致变异个体表型发生严重改变,甚至死亡,也可能发生现在未知的或许良性的改变。随着检测技术方法的不断发展,从染色体核型分析到原位荧光杂交,芯片到测序技术的使用,使得对染色体识别精确率逐步提高^[5]。

染色体非整倍体改变仍然是流产胚胎的主要因素,集中在 13、14、15、16、18、21、22 号染色体, X 单体也是早期流产常见的染色体核型^[6]。双重三体较少见,约占流产胚胎所有核型的 0.21%~2.8%^[7]。

本研究中的 15 例流产产物中, aCGH 与 NGS 检出 9 例异常,异常率 60%,与以往报道的异常率 55%~66%^[8]和 51%^[9]基本相符。15 例流产产物检测中,测序显示多态 4 例,还有 2 例检测阳性查询后显示致病性未知,而这些都是流产产物中检出的,多态是否有致病效应存在一定争议,在公共数据库中查出致病性未知的这一部分是需要更多的经验积累,更进一步地研究这些多态和致病性间的关系。但从我们的结果可以看出,以目前的数据量来说,高通量测序技术相对于芯片方法来说,小片段的拷贝数变化并不能全部得到检测,但是大于 5 Mb 的片段的检出率为 100%。若相应的增加数据量,应该会达到更大的分辨率,这一点我们也会继续进行验证。

从对操作要求上来看,与已成相当规模的芯片杂交技术相比, NGS 也有其独到的优势,在 DNA 质量的要求上, NGS 对 DNA 的质量要求不

高,很低的浓度便可以满足实验的要求。而aCGH对于DNA的质量和纯度的要求都很高,如本次使用的安捷伦公司的芯片对于DNA浓度的要求需要在40 ng/ μ L,这就增加了对样本的要求。

本研究中用的测序方法是单端测序,则该测序方法与aCGH方法均不能解决平衡性的易位、倒位、整倍体等问题。而有研究表明随着测序读长的不断增加,NGS通过mate-pair文库或称跨步文库可能实现平衡易位的检测^[10],不久的将来平衡异位可通过测序进行检测,这一个难点的突破将大大的提高测序的价值与意义,将会成为NGS最大的优势。NGS还有其他的优势,如其可以检测新的未知基因变异,同时因其可能更为低廉的高通量优势成本而利于临床推广;此外,与肿瘤发生相关基因的拷贝数变异和基因多态性分析等都有着足够应用的空间和优势^[11-12]。

随着测序技术的不断发展和广泛运用,从产前诊断的游离DNA的测序^[13-14],到流产物、羊水的测序CNV检测,到用母体外周血测序测胎儿CNV检测、单基因疾病检测,到单细胞植入前诊断测序检测、肿瘤游离DNA检测等广泛运用^[15],测序技术用于流产物分析既可较为全面得出导致流产的遗传物质的改变原因,又可积累新染色体疾病的发现,还可用于生殖领域的促进,分析流产原因,测序技术用于胚胎植入前遗传学筛查(preimplantation genetic screening, PGS)可有效提高成功率^[16-17]。

综上所述,对于较大片段的拷贝数变化的检测,NGS技术和aCGH技术的诊断成功率及染色体异常检出率均较高,在早期SA妊娠物核型分析中具有显著优越性,可作为遗传学检测的一种补充技术,也可为流产夫妇进行遗传学病因分析,从而为再次妊娠提供指导,有较高的临床应用价值。

参考文献

- [1] 殷研. 孕妇营养状况与枯萎卵妊娠关系的研究[D]. 北京:中国协和医科大学, 2008, 8-9.
- [2] 卢永娟, 王瑞, 倪华美, 等. 拷贝数变异(CNVs)导致遗传变异的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015, 21: 58-60, 63.
- [3] 马天骏, 邓祯祥, 陈诗哲, 等. DNA拷贝数变异及其研究进展[J]. 中华临床医师杂志:电子版, 2013, 7(14): 6592-6595.
- [4] 夏家辉. 医学遗传学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2004, 166.
- [5] 眭维国, 欧明林, 戴勇, 等. 先天性疾病研究及产前诊断中Array CGH的应用[J]. 国际妇产科学杂志, 2010, 37(2): 81-83.
- [6] Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study[J]. Hum Reprod, 2002, 17(2): 446-451.
- [7] Diego-Alvarez D, Ramos-Corrales C, Garcia-Hoyos M, et al. Double trisomy in spontaneous miscarriages: cytogenetic and molecular approach[J]. Hum Reprod, 2006, 21(4): 958-966.
- [8] Lim JH, Kim MH, Han YJ, et al. Cell-free fetal DNA and cell-free total DNA levels in spontaneous abortion with fetal chromosomal aneuploidy [J]. Plos One, 2013, 8(2): e56787.
- [9] Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, et al. Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage [J]. Hum Reprod, 2012, 27(8): 2297-2303.
- [10] Talkowski ME, Ordulu Z, Pillalamarri V, et al. Clinical diagnosis by whole genome sequencing of a prenatal sample[J]. N Engl J Med, 2012, 367(23): 2226-2232.
- [11] Pan Q, Shai O, Lee LJ, et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing[J]. Nat Genet, 2008, 40(12): 1413-1415.
- [12] Pfifer GP, Besaratinia A. Mutational spectra of human cancer[J]. Hum Genet, 2009, 125(5/6): 493-506.
- [13] 赖允丽, 陈筠, 易升, 等. 无创产前检测的临床应用及随访研究[J]. 重庆医学, 2016, 45(11): 1471-1475.
- [14] 贾蓓, 钟梅. 高通量测序技术在无创产前检测中的应用[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2015, 31(9): 807-810.
- [15] 张小珍, 尤崇革. 下一代基因测序技术新进展[J]. 兰州大学学报:医学版, 2016, 42(3): 73-80.
- [16] 张静. 人类早期胚胎植入前高通量测序遗传学筛查的研究[D]. 天津:天津医科大学, 2015.
- [17] 谭跃球. 下一代测序与PGS[A]. 2015年浙江省医学遗传学学术年会暨高通量基因测序产前筛查与诊断技术研讨会论文汇编, 2015, 10.

· 论 著 ·

运用半导体测序法检测4种遗传病常见突变

王辉芳¹ 梁志坤¹ 叶倩平¹ 杨旭^{2*}

【摘要】目的 运用基于半导体芯片技术的下一代测序方法对地中海贫血、遗传性耳聋、苯丙酮尿症和肝豆状核变性病相关的38个常见致病突变位点进行基因测序,探讨半导体测序技术在遗传病检测方面的应用价值。**方法** 采用AmpliSeq方法通过多重PCR捕获目的片段,然后构建文库,用Ion Torrent Proton™测序仪进行测序反应,进而通过Sanger一代测序法进行结果比较验证。**结果** 33个样本中共检测出15例样本存在功能性遗传变异,其中HBB:52A>T 5例、HBB:84_85insC 3例、HBB:45_46insG 2例、HBB:2T>G 1例、GJB3:538C>T 1例、ATP7B:2333G>T 1例、GJB2:235delC 1例、SLC26A4:IVS7-2A>G 1例,Sanger一代测序结果与下一代测序结果完全一致。**结论** 半导体测序能准确检测该4种遗传病常见突变,对遗传病发病机制的研究及筛查具有一定的应用价值。

【关键词】 半导体测序;下一代测序;Ion Torrent Proton™;遗传病;基因突变

Detection of common mutations in 4 types of genetic disorders by semiconductor sequencing platform

WANG Huifang¹, LIANG Zhikun¹, YE Qianping¹, YANG Xu^{2*}

(1. Guangzhou Darui Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510665; 2. School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Objective 38 common pathogenic mutations which are related to thalassemia, deafness, phenylketonuria and Wilson's disease were detected by using the next generation sequencing method in order to evaluate the application value of Semiconductor sequencing in the field of hereditary disease detection. **Methods** Target genes were captured by AmpliSeq technology, which mainly based on multiple PCR, and the captured fragments were used for construction the DNA libraries, which were sequenced by using the Ion Torrent Proton™ sequencing platform. The mutations were verified by Sanger sequencing. **Results** There were 15 samples with mutations in 33 samples, and 8 mutations were detected. Among these mutations, 5 cases were with HBB:52A>T, 3 cases with HBB:84_85insC, 2 cases of HBB:45_46insG, 1 case of HBB:2T>G, 1 case of GJB3:538C>T, 1 case of ATP7B:2333G>T, 1 case of GJB2:235delC, 1 case of SLC26A4: IVS7-2A>G. The results of Sanger sequencing were the same with the results of the next generation sequencing. **Conclusion** Semiconductor sequencing can detect the common mutations of the 4 kinds of hereditary disease accurately, which can be used for mutation detection of these hereditary disease and to illuminate of the pathogenesis of these disorders.

[KEY WORDS] Semiconductor sequencing; Next generation sequencing; Ion Torrent Proton™; Hereditary disease; Gene mutation

基金项目:广州市科技计划项目(201504301001493)

作者单位:1. 广州市达瑞生物技术股份有限公司,广东,广州 510665

2. 南方医科大学基础医学院,广东,广州 510515

*通讯作者:杨旭, E-mail: yangxu_kuailie@163.com

地中海贫血、遗传性耳聋、苯丙酮尿症及肝豆状核变性病为国内4种常见的高发遗传病,严重影响我国出生人口素质。地中海贫血(thalassemia)(简称“地贫”)是一组全球最常见、对人类健康影响最大的单基因遗传病^[1]。 α -地贫发病相关基因为 *HBA2*, β -地贫发病相关基因为 *HBB*^[2-4]。遗传性耳聋是影响人类健康和致残的常见病,据统计,新生儿中耳聋的发病率为1‰^[5],其中大约一半的耳聋与遗传因素相关^[6-7],相关基因主要有 *GJB2*、*GJB3* 和 *SLC26A4* 等。苯丙酮尿症(phenylketonuria, PKU)是由于肝脏苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase, PAH)缺乏所致的一种严重的遗传性氨基酸代谢障碍性疾病,呈常染色体隐性遗传^[8],该病可分为经典型 PKU 与非经典型 PKU 2 种类型^[9-10]。苯丙酮尿症是可治性的遗传病之一,早期基因诊断可以尽早发现,应用饮食疗法可以减轻或者控制患者症状^[10]。肝豆状核变性(hepatolenticular degeneration, HLD)是一种严重的常染色体隐性遗传病,是由于细胞内铜代谢障碍造成胞内铜过多积聚,而引发的氧化应激反应导致细胞功能受损甚至细胞凋亡,其致病基因为 *ATP7B* 基因^[11-16]。

当今社会,分子生物学发展迅速,用于检测基因变异的方法多种多样,包括有 Sanger 测序法、基因芯片法、液相芯片法、变性高效液相色谱分析法、MassARRAY 分子量阵列技术、SNAP shot 技术、高分辨融解法及高通量的下一代测序技术等。这些技术虽各有优缺点,但就整体而言,测序技术可更直接检测基因序列,不仅可检出已知的 SNP 位点,还可进一步发现出新的 SNP 位点,被广泛用于基因检测领域。

上述4种常见遗传病都存在有临床表现复杂,突变异质性高等特点,因此常规临床诊断很难从根本上确诊,从而延误最佳治疗时间。而近几年高速发展的下一代测序技术,不仅可从基因水平上检测出已知或未知的突变位点,而且克服了一代测序成本高、效率低的缺点,实现了快速、通量高的规模化测序^[17-18],为临床诊断提供必要的依据。本研究拟采用高通量的半导体测序技术同时对上述4种遗传病多个常见致病突变点进行检测,探讨半导体测序技术在遗传病检测中应用的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验对象

实验所用的全血基因组 DNA 样本共 33 例,来自于福建医科大学附属协和医院。33 例样本详细信息见表 1。

表 1 样本详细信息

Table 1 The detailed information of the samples

样本序号	年龄	性别	临床诊断信息
1	4 岁	男	贫血待查
2	31 岁	男	地中海贫血(未特指)
3	25 岁	女	不孕症
4	40 岁	女	妊娠期检查
5	3 岁	男	体检
6	26 岁	女	贫血待查
7	22 岁	女	晚期妊娠
8	27 岁	女	贫血
9	4 岁	男	贫血,低色小细胞性
10	26 岁	女	贫血
11	1 岁	男	贫血待查
12	29 岁	女	贫血
13	28 岁	女	——
14	33 岁	女	——
15	29 岁	男	——
16	20 岁	女	贫血
17	34 岁	女	中期妊娠
18	9 个月	女	贫血
19	27 岁	女	贫血
20	6 岁	女	血小板减少症
21	2 岁	男	细菌感染
22	31 岁	男	失晕
23	4 岁 3 个月	男	先天性软腭裂
24	26 岁	女	中期妊娠
25	25 岁	女	体检
26	14 岁	男	地中海贫血
27	40 岁	男	体检
28	7 岁	男	贫血待查
29	22 岁	女	早孕
30	83 岁	女	白细胞增多症
31	3 岁	男	呼吸道感染
32	35 岁	女	体检
33	28 岁	女	中期妊娠

1.2 半导体测序方法

1.2.1 文库构建

首先利用 Ampliseq 技术针对地中海贫血、遗

传性耳聋、苯丙酮尿症和肝豆状核变性病4种遗传病常见突变点设计引物,包含3个引物池,3个引物池分开进行多重PCR扩增,扩增体系为10 μL,反应条件为:首先99℃预变性2 min;然后99℃变性15 s,60℃退火和延伸4 min进行16个循环数;

最后10℃保存。扩增产物经FuPa酶消化引物,用DNA连接酶将特异性接头序列连接在目的片段两端,磁珠纯化后进行一步扩增反应,最后经两步磁珠纯化去除较大或较小的片段,构建成片段大小在200 bp左右的基因文库。Qubit® 3.0 荧光计对

表2 38个常见突变点详细信息

Table 2 The details of 38 common mutations

染色体	基因名称	突变信息	蛋白质变化	RS号	MAF值	临床意义
chr13	<i>GJB2</i>	c.299_300delAT	p.His100Argfs	rs111033204	NA	致病
chr13	<i>GJB2</i>	c.235delC	p.Leu79Cysfs	rs80338943	—=0.001 6/8	致病
chr13	<i>GJB2</i>	c.176_191del16	p.Gly59Alafs	rs750188782	NA	NA
chr13	<i>GJB2</i>	c.167delT	p.Leu56Argfs	rs80338942	NA	致病
chr13	<i>GJB2</i>	c.35delG	p.Gly12Valfs	rs80338939	—=0.002 4/12	致病
chr1	<i>GJB3</i>	c.538C>T	p.Arg180Ter	rs74315319	T=0.000 2/1	致病
chr1	<i>GJB3</i>	c.547G>A	p.Glu183Lys	rs74315318	A=0.001 0/5	致病
chr7	<i>SLC26A4</i>	c.281C>T	p.Thr94Ile	—	—	—
chr7	<i>SLC26A4</i>	c.589G>A	p.Gly197Arg	rs111033380	NA	致病
chr7	<i>SLC26A4</i>	c.IVS7-2A>G	—	rs111033313	NA	致病
chr7	<i>SLC26A4</i>	c.1174A>T	p.Asn392Tyr	rs201562855	T=0.000 2/1	NA
chr7	<i>SLC26A4</i>	c.1226G>A	p.Arg409His	rs111033305	NA	致病
chr7	<i>SLC26A4</i>	c.1229C>T	p.Thr410Met	rs111033220	T=0.000 2/1	致病
chr7	<i>SLC26A4</i>	c.2162C>T	p.Thr721Met	rs121908363	NA	致病
chr7	<i>SLC26A4</i>	c.2168A>G	p.His723Arg	rs121908362	G=0.000 4/2	致病
chr11	<i>HBB</i>	c.130G>T	p.Glu44Ter	rs33922842	NA	致病
chr11	<i>HBB</i>	c.126_129delCTTT	p.Phe42fs	rs281864900	—=0.001 0/5	致病
chr11	<i>HBB</i>	c.123_124insT	p.Phe43Leufs	rs36029927	NA	NA
chr11	<i>HBB</i>	c.113G>A	p.Trp38Ter	rs33991059	NA	other
chr11	<i>HBB</i>	c.94delC	p.Leu32Cysfs	rs63749977	NA	NA
chr11	<i>HBB</i>	c.92+5G>C	—	rs33915217	G=0.001 2/6	致病
chr11	<i>HBB</i>	c.92+1G>T	—	rs33971440	T=0.000 2/1	致病
chr11	<i>HBB</i>	c.84_85insC	p.Leu29Profs	rs35532010	NA	致病
chr11	<i>HBB</i>	c.79G>A	p.Glu27Lys	rs33950507	T=0.002 8/14	致病
chr11	<i>HBB</i>	c.52A>T	p.Lys18Ter	rs33986703	A=0.001 2/6	致病
chr11	<i>HBB</i>	c.45_46insG	p.Trp16Valfs	rs35383398	NA	致病
chr11	<i>HBB</i>	c.27_28insG	p.Ser10Valfs*14	rs35699606	NA	致病
chr11	<i>HBB</i>	c.25_26delAA	p.Lys9Valfs	rs35497102	NA	致病
chr11	<i>HBB</i>	c.2T>G	p.Met1Arg	rs33941849	NA	致病
chr11	<i>HBB</i>	c.-11_-8delAAAC	—	rs34196559	NA	NA
chr16	<i>HBA2</i>	c.427T>C	p.Ter143Gln	rs41464951	C=0.000 2/1	致病
chr12	<i>PAH</i>	c.842+2T>A	—	rs62514955	NA	致病
chr12	<i>PAH</i>	c.728G>A	p.Arg243Gln	rs62508588	T=0.000 4/2	致病
chr12	<i>PAH</i>	c.611A>G	p.Tyr204Cys	rs62514927	NA	other
chr12	<i>PAH</i>	c.442-1G>A	—	rs62514907	NA	致病
chr13	<i>ATP7B</i>	c.2975C>T	p.Pro992Leu	rs201038679	NA	致病
chr13	<i>ATP7B</i>	c.2804C>T	p.Thr935Met	rs750019452	NA	可能致病
chr13	<i>ATP7B</i>	c.2333G>T	p.Arg778Leu	rs28942074	NA	致病

文库浓度进行定量。

1.2.2 模板制备和模板富集

建好的文库等量混合使每个文库的终浓度为200 pmol/L,根据自己测序的flow数、片段大小以及芯片所能测的数据量等信息确定上样量。用Ion Torrent OT™进行乳液PCR扩增,将Ion PI™ Enzyme Mix 120 μL、Ion PI™ ISPs 100 μL、稀释好的文库和无核酸酶水共400 μL加入到PI™ Master Mix中,此时体积共2 400 μL,震荡离心后分3次匀速缓慢注入到Ion One Touch™ Reaction Filter中,并注入200 μL Ion One Touch™ Reaction Oil,此过程避免注入气泡,将Ion One Touch™ Reaction Filter安装在Ion One Touch™ 2上,选择相应程序进行反应。模板制备完成后用One Touch™ ES进行模板富集。

1.2.3 Ion Torrent Proton 测序

用Ion Torrent Proton™测序仪进行测序反应,首先进行仪器的氯洗和水洗,然后更换初始化芯片进行初始化反应以调节各位置的pH值在一定范围内,将ES制备的模板Loading在PI芯片上,安装在测序仪相应位置,选择预先设置好的Plan进行测序反应。测序结束后在Ion Torrent服务器上运行插件分析每个样本的38个致病位点的突变情况。38个常见致病突变点详细信息见表2。

1.3 Sanger 一代测序验证方法

将DNA样本及相应的引物打包送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行Sanger一代测序验证。

1.4 统计学方法

试验结果统计分析选用符合方案数据,即所有符合试验方案要求的受试者样本数据进行统计分析,主要采用四格表整理试验数据,阳性代表检测出的含38个致病突变点的样本,阴性代表没检测出38个致病突变点的样本。半导体测序结果和Sanger一代测序验证结果对比采用Kappa一致性检验。

试验真实性评价:灵敏性、特异性、准确性、Kappa值等指标计算。

用下列公式计算:

灵敏性= $A/(A+C) \times 100\%$

特异性= $D/(B+D) \times 100\%$

准确性= $(A+D)/(A+B+C+D) \times 100\%$

表3 2种方法检测结果的一致性评测表

Table 3 The consistency of the testing results of the 2 methods

方法		Sanger 一代测序验证		合计
		阳性	阴性	
半导体测序	阳性	A	B	A+B
	阴性	C	D	C+D
	总数	A+C	B+D	A+B+C+D

Kappa值采用SPSS 15.0统计软件进行统计分析。

2 结果

2.1 半导体测序结果

半导体测序结果显示,33个样本中共检测出15例样本存在突变,包含单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)位点、插入、删除的8种突变,其中HBB:52A>T 5例、HBB:84_85insC 3例、HBB:45_46insG 2例、HBB:2T>G 1例、GJB3:538C>T 1例、ATP7B:2333G>T 1例、GJB2:235delC 1例、SLC26A4:IVS7-2A>G 1例。检测的每个碱基位点的Coverage在390~400,其中13例检测突变频率在42.5%~52.8%的为杂合突变型样本,检测突变频率为100%的为纯合突变型样本。突变样本检测结果如表4。

2.2 Sanger 一代测序验证结果

采用Sanger测序法对检测出的突变样本的突变点进行验证,结果与半导体测序结果完全一致。

2.3 统计学分析结果

根据检测结果得知,A=15,B=0,C=0,D=18,灵敏性、特异性、准确性、Kappa值的计算结果都为1,结果表明,半导体测序结果与Sanger一代测序验证结果完全一致。

3 讨论

据估算遗传病在活婴中的发病率为23‰~25‰,但由于人口基数大,遗传病种类多,总体患病人数将会是很大的数目,这无论是对家庭还是对社会都将造成严重的经济和精神负担^[19]。且遗传病在遗传和临床上都具有高度异质性,患儿出生后立即检测出患有某种遗传病也很难治愈,因此,积极开展对新生儿父母的遗传病基因检测或者胎儿产前检测工作,对患者或者及时采取治疗

表4 15例突变样本检测结果

Table 4 The test results of 15 mutational samples

样本序号	突变型别	致病类型	coverage	frequency
1	<i>HBB</i> :52A>T	地贫	400	42.5
2	<i>HBB</i> :45_46insG	地贫	398	49.2
3	<i>HBB</i> :45_46insG	地贫	391	48.6
4	<i>SLC26A4</i> :IVS7-2A>G	遗传性耳聋	398	49
5	<i>HBB</i> :52A>T	地贫	397	49.1
6	<i>HBB</i> :52A>T	地贫	399	46.9
7	<i>HBB</i> :52A>T	地贫	400	46
8	<i>HBB</i> :84_85insC	地贫	395	48.6
9	<i>HBB</i> :84_85insC	地贫	395	48.1
10	<i>HBB</i> :84_85insC	地贫	396	47.2
11	<i>HBB</i> :52A>T	地贫	400	52.8
12	<i>HBB</i> :2T>G	地贫	398	49
13	<i>GJB3</i> :538C>T	遗传性耳聋	399	50.6
14	<i>ATP7B</i> :2333G>T	肝豆状核变性	399	100
15	<i>GJB2</i> :235delC	遗传性耳聋	397	100

并提供生育指导,选择性终止异常胚胎妊娠,可有效防止患病胎儿的出生,并可在胚胎植入前选择正常的胚胎植入,从而诞生出健康的胎儿。

基因测序是遗传病检测的重要手段,Sanger一代测序技术已成为分析基因序列的金标准,但却因费用高、技术难度大等原因很难在基层推广。而近年来以芯片测序、合成测序和焦磷酸测序为代表的下一代测序技术能弥补一代测序的不足,实现快速、通量高的规模化测序。以 Ion Torrent PGM™ 以及更高通量的 Ion Torrent Proton™ 测序仪为代表的半导体测序技术,其不属于荧光检测、核酸标记的生化技术,与其他下一代测序技术相比更简单、性价比更高,并且具有强大的扩展性^[20-21]。

本实验中我们用 Ion Torrent Proton™ 半导体测序仪对地中海贫血、遗传性耳聋、苯丙酮尿症以及肝豆状核变性病常见的38个致病突变位点进行检测,33个样本中共检测出15例样本突变,其中 *HBB*:52A>T 5例、*HBB*:84_85insC 3例、*HBB*:45_46insG 2例、*HBB*:2T>G 1例、*GJB3*:538C>T 1例、*ATP7B*:2333G>T 1例、*GJB2*:235delC 1例、*SLC26A4*:IVS7-2A>G 1例,检测结果与 Sanger 一代测序验证结果完全一致。成建等^[22]应用 IonTorrent 半导体测序检测了马凡综合征患者 *FBN1* 基因致病突变点,检测到3个马凡综合征家系和1个马凡综合征

的致病基因突变,并与 Sanger 验证结果一致。周保成等^[23]提取15例确诊为经典型 PKU 患儿及其父母的外周血 DNA,应用 IonTorrent PGM™ 进行测序检测,共检测出29个突变点,分属17种突变,并发现 p.P292L 的新突变点,且该检测结果与 Sanger 验证结果一致。这些研究作为半导体测序技术应用于遗传病检测的强有力的证据,表明高通量的半导体测序技术应用于遗传病检测的可行性。

虽然半导体测序技术有诸多优点,但是我们也应认识到其自身的不足,如测序有单碱基误差与靶基因目标区域的捕获存在偏倚,导致少量假阴性的产生,这也是目前下一代测序的瓶颈问题,所以对检测出的突变位点还应进行一代测序验证。虽然如此,但半导体测序技术在遗传病检测方面的应用还是值得肯定的。同时,半导体测序技术在遗传病检测方面面临着一些挑战,主要体现在以下方面:(1)多数遗传病遗传机制复杂,遗传异质性高,可能导致部分患者基因型和表型不相符。(2)已报道的致病位点虽然很多,但对患者筛查过程中,少部分病例检测到的可能是一些不能解释的未知突变点,这些突变点致病性还有待验证,如何准确确定突变点与疾病的是否相关是目前遇到的又一难题。针对这些问题,笔者认为

可从以下方面进行解决:(1)改进及增强半导体测序信号传导及转换方式。(2)发展新型统计模型,优化生物学分析处理方法。(3)研究致病机制,搞清楚基因型与表型的关联特征。(4)提升科研人员的专业水平,能认识实验本身及仪器、方法等的不足,在实际操作过程中尽量避免错误,减小误差。

随着半导体测序技术的不断发展,我们相信目前所面临的难题将会逐步解决,更好的发挥半导体测序的优势,在遗传病检测领域发挥更重要的作用。

参考文献

- [1] 胡双林,倪林仙,樊茂,等. 19例地中海贫血的基因诊断[J]. 现代检验医学杂志, 2005, 20(6):76.
- [2] 王燕燕,李晓辉,徐西华. 地中海贫血诊治进展与我国现状[J]. 中国实用儿科杂志, 2013, 28(6): 473-476.
- [3] 熊丽. 运用新一代测序技术对母体血浆中胎儿游离DNA进行 β 地中海贫血无创性产前诊断的应用性研究[D]. 广州:南方医科大学, 2014.
- [4] 张杰,贺静,曾小红,等. 云南省人群地中海贫血遗传多样性的研究[J]. 昆明医科大学学报, 2016, 37(1):28-34.
- [5] Steel KP. Science, medicine, and the future: new interventions in hearing impairment [J]. BMJ, 2000, 320(7235):622-625.
- [6] Posukh O, Pallares-Ruiz N, Tadinova V, et al. First molecular screening of deafness in the Altai Republic population [J]. BMC Med Genet, 2005, 6:12-18.
- [7] Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, et al. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population [J]. Am J Med Genet, 1993, 46(5):486-491.
- [8] 贾晓菲. 苯丙酮尿症常见突变位点检测及中国人群PAH基因突变谱的调查[D]. 厦门:厦门大学, 2014.
- [9] Williams RA, Mamotte CD, Burnett JR. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism [J]. Clin Biochem Rev, 2008, 29(1):31-41.
- [10] 张誌,何蕴韶. 苯丙酮尿症分子遗传学研究进展[J]. 遗传, 2004, 26(5):729-734.
- [11] 查璐琴. 肝豆状核变性的饮食治疗[J]. 中国误诊学杂志, 2004, 4(8):1345.
- [12] 李新华,张欣欣. 肝豆状核变性诊疗进展——美国肝病学会诊疗指南专题报道[J]. 诊断学理论与实践, 2009, 8(2):222-229.
- [13] 乔丽娜. 肝豆状核变性1例报告并文献复习[D]. 兰州:兰州大学, 2013.
- [14] 李光明,范建高. 肝豆状核变性的诊断与治疗进展[J]. 实用肝脏病杂志, 2012, 15(6):493-495.
- [15] 曹海霞,范建高. 特殊人群肝豆状核变性诊治进展[J]. 实用肝脏病杂志, 2015, 18(1):89-92.
- [16] 陈定邦,冯黎,李洵桦. 肝豆状核变性的分子生物学研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(2):120-124.
- [17] 赵跃,张宏,夏雪山. 下一代半导体测序技术在遗传性心脏病分子诊断中的应用[J]. 遗传, 2015, 37(7):635-644.
- [18] 基因测序技术的发展历程[J]. 21世纪商业评论, 2012, 9(11):77.
- [19] 马端. 单基因遗传病检出策略[J]. 诊断学理论与实践, 2014, 13(1):12-15.
- [20] 刘宇轩,张文琼,黄代新. 测序新技术 Ion Torrent PGM 及其法医学应用[J]. 中国法医学杂志, 2015, 30(1):52-55.
- [21] 朱艳慧. Ion Torrent 测序技术检测 I 型神经纤维瘤病患者 NF1 基因突变[D]. 长沙:中南大学, 2014.
- [22] 成建,马定远,刘邗,等. 应用 Ion Torrent 半导体测序检测马凡综合征患者 FBN1 基因致病突变[J]. 现代妇产科进展, 2015, 24(3):201-204.
- [23] 周保成,穆原,尹婷,等. Ion Torrent PGM™ 测序仪检测苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因突变[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(12):898-902.

• 论 著 •

采用 Amplicon 文库构建法对地中海贫血的基因检测

孙玉婷¹ 范冬梅² 叶倩平¹ 杨琳艳¹ 梁志坤¹ 杨学习^{2*}

【摘要】目的 进一步完善现有地中海贫血的检测方法并且建立一种新的基于高通量测序的基因诊断方法,研究 α/β 地中海贫血基因的突变类型及分布情况。**方法** 采用 Amplicon 文库构建法,基于高通量测序平台,对219例地中海贫血患者全血样本进行上机测序与数据分析。**结果** 在219例地中海贫血患者中,共计检测出14种突变类型,包括CD122、CD125、CD142 3种非缺失型 α -地贫突变及IVS-II-654、CD41-42、CD17等11种常见 β -地贫突变型别。此外,通过生物信息学软件作图分析,筛查出--^{SEA}、- $\alpha^{3.7}$ 、- $\alpha^{4.2}$ 3种缺失型 α -地贫。**结论** 本研究进一步完善了基于高通量测序的基因诊断方法,建立了一套 Amplicon 文库构建法,能准确、有效地用于诊断 α/β 地中海贫血基因的缺失与突变类型,对人群筛查,优生优育的遗传咨询,防止该病重症患儿的出生等具有重要意义。

【关键词】 地中海贫血; 基因检测; Amplicon 文库构建; β -突变; α -缺失

Gene diagnostic of thalassemia by the method of constructing amplicon libraries

SUN Yuting¹, FAN Dongmei², YE Qianping¹, YANG Linyan¹, LIANG Zhikun¹, YANG Xuexi^{2*}

(1. Guangzhou Darui Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510665; 2. School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southren Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Objective To further improve the existing diagnostic methods of thalassemia, establish a new method for gene diagnosis base on next generation sequencing and research the mutation type and distribution of alpha/beta thalassemia gene. **Methods** 219 cases of the whole blood samples with thalassemia have been sequenced and analyzed using the method of constructing amplicon libraries, which is based on next generation sequencing platform. **Results** There were total of 14 mutation types detected, including 3 non-deletion of CD122, CD125 and CD142 in alpha thalassemia, 11 kinds of common mutation of IVS-II-654, CD41-42, CD17 and other in beta thalassemia in these 219 cases of the thalassemia patients. In addition, through graphing analysis by Bioinformatics software, 3 type of alpha deletion of --^{SEA}, - $\alpha^{3.7}$ and - $\alpha^{4.2}$ have been screened out. **Conclusion** This study have further improved the gene diagnostic method base on next generation sequencing technology and set up a method of constructing amplicon libraries that can be used for diagnosing the deletion and mutation types of alpha/beta thalassemia gene accurately and effectively. It has a great significance in population screening, genetic counseling of prenatal and postnatal care, disease preventing for newborn with severe mediterranean anemia, etc.

[KEY WORDS] Thalassemia; Genetic diagnostic; Constructing amplicon libraries; Beta mutation; Alpha deletion

基金项目: 广东省科技计划项目(503169728081); 广州市科技计划项目健康医疗协同创新重大专项(201508020259)

作者单位: 1. 广州市达瑞生物技术股份有限公司, 广东, 广州 510665

2. 南方医科大学检验与生物技术学院, 广东, 广州 510515

*通讯作者: 杨学习, E-mail: yxxzb@sohu.com

地中海贫血(thalassemia,简称“地贫”)是一种世界范围内常见的单基因遗传性血液疾病,由珠蛋白基因的缺失或突变所导致珠蛋白肽链合成障碍,造成血红蛋白中的 α -链珠蛋白与 β -链珠蛋白合成比例失衡、红细胞寿命减短的一种慢性进行性溶血性贫血^[1]。

临床上主要分为 α -链珠蛋白地中海贫血及 β -链珠蛋白地中海贫血2大类,其对应的基因分别位于16号染色体短臂(16p13.3)与11号染色体短臂(11p1.2)^[2]。

在我国,长江以南的大部分省区均为地贫的高发区。人群中 α -地贫及 β -地贫基因携带率分别为2.64%,2%~3%^[3-4]。其中 α -地贫以广西、广东、江西、四川等地区多见,发病率分别高达14.95%、4.11%、2.60%、1.92%^[3]。 β -地贫以广西地区为常见,发病率达至6.43%^[5],而个别地区如香港、云南也有高达6%^[4]。

由于地贫仍缺乏有效治疗方法,通过人群筛查实施产前诊断以阻止重症患儿出生及进行新生儿筛查以早期诊断、早期治疗是目前最有效的预防措施。现阶段血液学表型分析是地贫基因携带者筛查的指标,主要包括红细胞指标[如红细胞(red blood cell, RBC)计数、血红蛋白(hemoglobin, HGB)、红细胞比容(hematocrit, HCT)、红细胞平均体积(mean corpuscular volume, MCV)和平均红细胞血红蛋白含量(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCH)等]的测定和血红蛋白分析(包括异常血红蛋白检测、HbA₂和HbF定量测定),但此方法存在其他不能排除的原因,如缺铁性贫血(小细胞低色素症)和某些异常Hb(HbA₂升高),也不能发现静止型地中海贫血(如 $-\alpha^{3.7}/$ 、 $-\alpha^{4.2}/$ 和 $\alpha^{WS}\alpha$ /杂合子等),故地贫基因携带者的确诊仍有赖于基于DNA分析的基因分型。PCR技术是目前用于分子诊断的基础方法,但此技术操作繁琐、过程耗时,对操作者技术水平要求高,难以进行大批样本的筛查。本研究建立了一套Amplicon文库构建法,通过高通量测序平台对地贫基因进行筛查与诊断,旨在为地贫的快速诊断提供一种具有参考价值的、灵敏、简便的基因检测方法。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2014年7月至2015年7月收集来自福建医科

大学附属协和医院及中山大学附属第一医院体检、产检及就诊的地贫筛查病例,对确诊的共计219例地贫患者外周全血样本进行本研究方法的基因检测。其中女性125名,男性94名,年龄在0~86岁,平均年龄为26岁。

1.2 仪器与试剂

干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司);Veriti®96-Well Thermal Cycler(Life Technologies公司,美国);Qubit® 3.0 荧光计(Life Technologies公司,美国);DA8600 测序仪(中山大学达安基因股份有限公司);DNA提取试剂盒:DNeasy Blood & Tissue Kit(50)(Qiagen公司,德国);文库构建试剂盒:Ion Plus Fragment Library Kit与接头试剂盒:Ion Plus Fragment Library Adapters(Life Technologies公司,美国);PCR试剂:Hi-Fi Hotstart Ready Mix(KAPA BIOSYSTEMS公司,美国);E-Gel 预制琼脂糖凝胶电泳系统:E-Gel iBase and E-Gel Safe Imager Combo Kit(Invitrogen公司,美国)。

1.3 方法

1.3.1 DNA的提取

按照DNA提取试剂盒说明书要求提取基因组DNA,得到的DNA溶液要求OD_{260/280}为1.6~1.8之间。DNA溶液可置于(-20±5)℃保存。

1.3.2 文库构建和定量

采用文库构建试剂盒进行文库构建。关键步骤包括对提取的DNA分别进行 α/β -地贫PCR,将PCR产物混合后加入打断试剂置于37℃孵育,再加入stop buffer终止反应,接着加入切口修复酶对DNA片段进行末端修复。使用接头试剂盒,加入P1接头与特异性接头进行连接反应,然后用DNA纯化磁珠进行纯化。

采用E-Gel 预制琼脂糖凝胶电泳系统选择性回收330 bp大小的目的片段,然后用PCR试剂进行扩增,最后用DNA纯化磁珠对产物进行纯化得到可用于测序的文库DNA。

使用Qubit® 3.0 荧光计进行文库定量。文库根据Qubit浓度等量混合,再用Qubit® 3.0 荧光计进行定量,根据以下公式把混合文库稀释到100 pM:稀释倍数=(文库浓度×10⁷)/(660×330)。

1.3.3 模板制备

乳液PCR将文库DNA包被在一个油滴分子里面进行扩增,扩增前一个油滴分子含有一个

DNA 分子,扩增结束后油滴分子破裂,油滴里面的 ISP 磁珠便携带有成千上万个文库 DNA。

1.3.4 上机测序

通过乳液 PCR 扩增的文库模板,经过富集回收,上样至高通量测序芯片。芯片微孔中固定的 DNA 链每延伸一个碱基,就会释放一个质子,导致局部 pH 变化,离子传感器检测 pH 变化,并将化学信号转换成数字信号,从而可以实时判读碱基,最终获得每个 DNA 片段的碱基序列。

1.3.5 基因型检测

选择 Coverage Analysis 和 Variant Caller 插件,选择参考序列 hg19 和目标区域 chr16:215000-236000 与 chr11:5246400-5248600 作为参考分析该区域的覆盖度和测序深度及突变情况。Coverage Analysis 插件运行结束后会出现一个覆盖率 (On Target Rate) 和测序深度 (Sequencing Depth) 的文件,样品覆盖率在 95% 以上, DNA 测序深度在 500* 以上认为测序结果可信; Variant Caller 插件运行结束,每个样品都生成一个即 .xls 格式的位点突变信息表格,下载下来,看是否检测出 hotspot 位点,记录每个样品的突变情况。对于有突变的样本,可根据表格中的突变频率 (Frequency) 判断为纯合突变还是杂合突变, Frequency 值在 40%~60% 即为杂合突变, 90%~100% 则是纯合突变。

运用生物信息学软件分析针对 chr16:215000-236000 区域每个位点覆盖度情况,作图分析缺失型 α -地贫的型别。若在 chr16:221913-221936 和 chr16:223631-223612 范围内有检测峰,且其他位置没有检测峰,则是 α -地贫正常;若在 chr16:219303-219327 和 chr16:225173-225148 范围内有检测峰,且其他位置没有检测峰,则是 4.2 纯合缺失型;若在 chr16:221913-221936 和 chr16:227726-227702 范围内有检测峰,且其他位置没有检测峰,则是 3.7 纯合缺失型;若在 chr16:235908-235888 和 chr16:215284-215308 范围内有检测峰,且其他位置没有检测峰,则是 Sea 纯合缺失型。若除了缺失型对应位置有检测峰,在 chr16:221913-221936 和 chr16:223631-223612 范围内也有检测峰,则是杂合缺失型。

将上述 1.3.1 中对 219 例地贫患者外周全血样本提取所得的 DNA 另外进行一代测序 (金标准测序),以进一步验证本实验结果的准确性。

2 结果

2.1 α/β -地贫基因的检测结果

219 例地贫患者全血样本中,共检出 14 种突变基因类型,包括 CD122、CD125 及 CD142 3 种 α -地贫突变, 11 种 β -地贫突变,分别为 IVS-II-654、CD41-42、CD17、-28、CD27/28、CD71-72、CD14-15、CD26、Initiation codon、IVS-I-1、CD43。其中,突变类型为 IVS-II-654 杂合共检出 39 例,比例最高,占 17.81%,其次为 CD41-42 杂合、CD122 杂合、CD17 杂合、CD142 杂合,所占比例依次为 10.50%、8.68%、5.94%、5.48%,具体信息见表 1。运用生物信息学软件分析,共检出 5 种缺失型 α -地贫。其

表 1 219 例 α/β -地贫基因突变类型和构成比
Table 1 Mutation types of α/β -thalassemia gene and composition ratio in 219 cases

突变类型	碱基变化	n	比例 (%)
IVS-II-654 杂合	C>T	39	17.81
CD41-42 杂合	delCTTT	23	10.50
CD122 杂合	C>G	19	8.68
CD17 杂合	A>T	13	5.94
CD142 杂合	T>C	12	5.48
CD125 杂合	T>C	8	3.65
-28 杂合	A>G	7	3.20
CD27/28 杂合	insC	6	2.74
CD142 纯合	T>C	5	2.28
CD71-72 杂合	insA	3	1.37
CD125 纯合	T>C	2	0.91
CD14-15 杂合	insG	2	0.91
CD26 杂合	G>A	2	0.91
CD41-42 纯合	delCTTT	2	0.91
Initiation codon 杂合	T>G	2	0.91
IVS-I-1 杂合	G>T	2	0.91
CD17 杂合/CD122 杂合	A>T/C>G	2	0.91
CD122 纯合	C>G	1	0.46
CD43 杂合	G>T	1	0.46
CD41-42 杂合/CD122 纯合	delCTTT/ C>G	1	0.46
CD71-72 杂合/-28 杂合	insA/A>G	1	0.46
CD71-72 杂合/CD122 杂合	insA/C>G	1	0.46
IVS-II-654 杂合/CD142 纯合	C>T/T>C	1	0.46
IVS-II-654 杂合/CD41-42 杂合	C>T/ delCTTT	1	0.46
IVS-II-654 杂合/CD71-72 杂合	C>T/insA	1	0.46

中,缺失类型为--^{SEA}杂合所占比例最高,为22.83%,共检出50例,- $\alpha^{3.7}$ 杂合缺失及--^{SEA}/ $\alpha^{3.7}$ 复合缺失,分别检出10例、6例,所占比例为4.57%、2.74%,具体信息见表2。另外,检出12种复合型突变与缺失类型,具体信息见表3。经金标准测序验证,219例地贫患者DNA样本的检测结果,其 α/β -地贫基因缺失或突变的型别与本研究检出各例患者的地贫基因突变类型一一对应,符合率达100%。

表2 219例 α -地贫基因缺失类型和构成比
Table 2 Deletion types of α -thalassemia gene and composition ratio in 219 cases

类型	n	比例(%)
Sea 杂合	50	22.83
3.7 杂合	10	4.57
3.7&Sea 杂合	6	2.74
4.2 杂合	4	1.83
4.2&Sea 杂合	4	1.83
3.7 纯合	3	1.37
Sea 纯合	2	0.91

表3 219例 α/β -地贫基因复合型突变/缺失类型和构成比
Table 3 Compound mutation/deletion types of α/β thalassemia gene and composition ratio in 219 cases

突变类型	缺失类型	n	比例(%)
CD142 纯合	Sea 杂合	4	1.83
CD125 纯合	Sea 杂合	2	0.91
IVS-II-654 杂合	Sea 杂合	2	0.91
CD122 纯合	Sea 杂合	1	0.46
CD142 纯合	4.2 杂合	1	0.46
-28 杂合	3.7 杂合	1	0.46
CD17 杂合	Sea 杂合	1	0.46
CD41-42 杂合	Sea 杂合	1	0.46
CD41-42 杂合/CD122 纯合	3.7 杂合	1	0.46
CD71-72 杂合	Sea 杂合	1	0.46
CD71-72 杂合/-28 杂合	Sea 杂合	1	0.46
IVS-II-654 杂合/CD142 纯合	Sea 杂合	1	0.46

2.2 α -地贫缺失类型的作图分析

运用生物信息学软件分析针对chr16:215000~236000区域每个位点的覆盖度,并作图分析缺失型 α -地贫的型别,在219例地贫患者全血样本中检出5种缺失型 α -地贫,依次包括3.7(纯合/杂合)

缺失、4.2杂合缺失、Sea(纯合/杂合)缺失、3.7&Sea杂合缺失和4.2&Sea杂合缺失,具体峰图见图1~8。

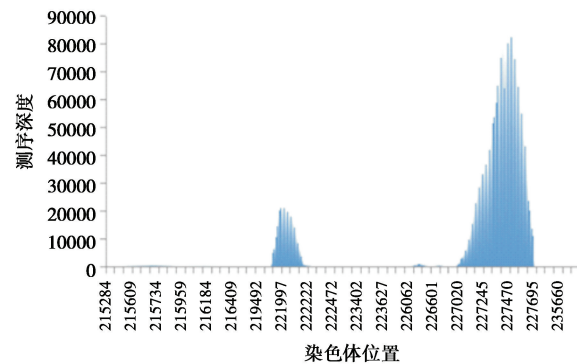


图1 3.7 纯合缺失的检测分析图

Figure 1 Detection and analysis of 3.7 homozygous deletion

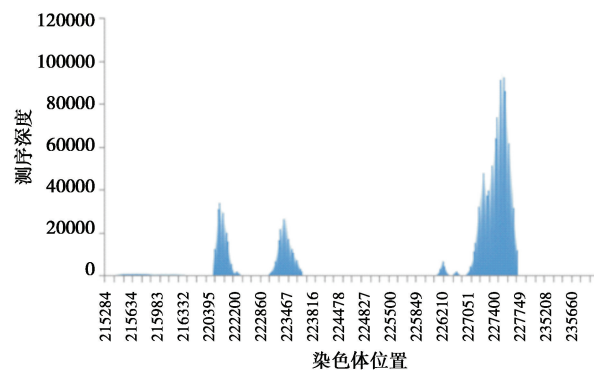


图2 3.7 杂合缺失的检测分析图

Figure 2 Detection and analysis of 3.7 heterozygous deletion

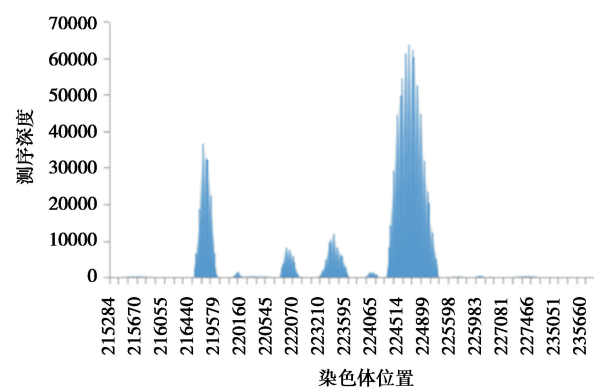


图3 4.2 杂合缺失的检测分析图

Figure 3 Detection and analysis of 4.2 heterozygous deletion

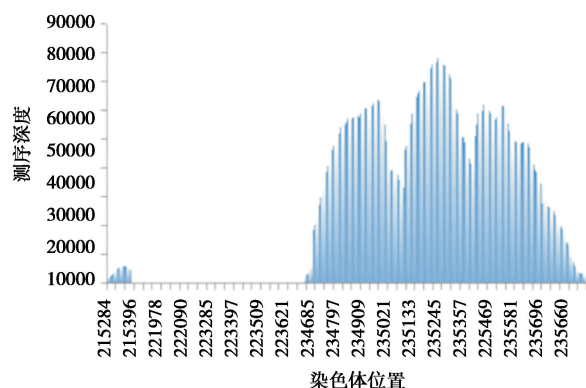


图4 Sea 纯合缺失的检测分析图

Figure 4 Detection and analysis of Sea homozygous deletion

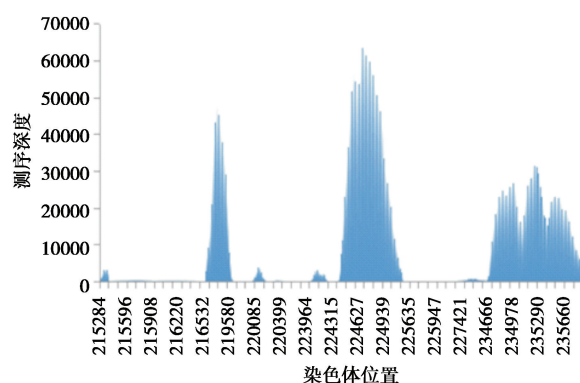


图7 4.2&Sea 杂合缺失的检测分析图

Figure 7 Detection and analysis of 4.2&Sea heterozygous deletion

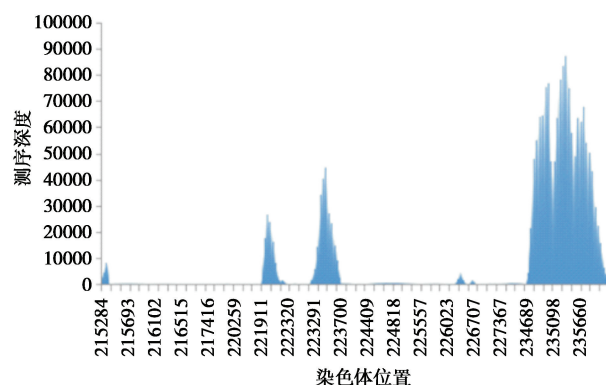


图5 Sea 杂合缺失的检测分析图

Figure 5 Detection and analysis of Sea heterozygous deletion

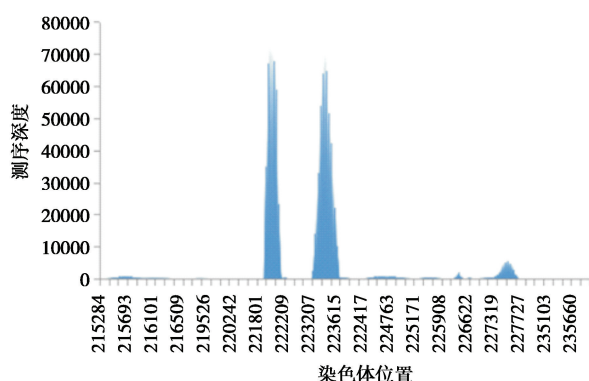


图8 正常对照(非缺失型)的检测分析图

Figure 8 Detection and analysis of normal control (non-deletion)

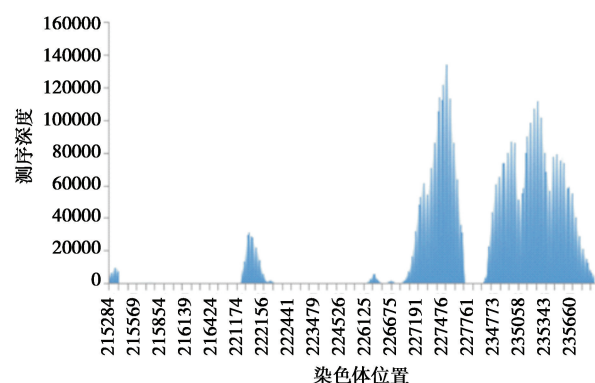


图6 3.7&Sea 杂合缺失的检测分析图

Figure 6 Detection and analysis of 3.7&Sea heterozygous deletion

3 讨论

地贫是我国常见的一种遗传性血红蛋白疾病,由珠蛋白基因的缺失或突变引起珠蛋白肽链合成障碍所致。常见类型有 α -地贫与 β -地贫2种。

基因缺失是 α -地贫最常见的突变类型。目前已鉴定的 α -地贫缺失类型至少有36种,东南亚缺失型(--^{SEA})、右侧缺失(- α ^{3.7})和左侧缺失(- α ^{4.2})是我国最常见的3种缺失类型^[6],国内Barts水肿胎儿的基因型主要为(--^{SEA}/--^{SEA})^[7]。已发现非缺失型 α -地贫基因点突变类型至少有68多种^[8]。

β -地贫绝大多数由 β -珠蛋白基因不同类型的点突变所致,少数是由基因缺失所引起^[7]。目前,全世界已发现200多种 β -珠蛋白基因的突变类型,在我国已报道有49种,其中南方地区报道的有47种^[9-10]。 β -地贫的基因突变有着明显的地域性或群体特异性,在我国最常见的是CD41-42、CD17、-28、CD26、IVS-II-654和CD71-72(+A),此6种突变类型占全部突变类型的95%以上^[11]。

本研究采用Amplicon文库构建法,通过高通量测序技术对219例地贫患者进行基因检测。共

检出 14 种 α/β -地贫突变基因类型, 5 种 α -地贫缺失型基因类型, 12 种复合型 α/β -地贫突变/缺失基因类型, 且经金标准测序验证, 检测结果均符合对应突变型别。其中, IVS-II-654 杂合共检出 39 例, 所占比例为 17.81%, 其次为 CD41-42 杂合、CD122 杂合、CD17 杂合、CD142 杂合, 所占比例依次为 10.50%、8.68%、5.94%、5.48%。与资料所显示的华南地区以 CD41-42 最常见及广东、福建、湖北、香港和台湾等地以 IVS-II-654、CD41-42 最为多见符合^[4]。

运用生物信息学软件分析, 检测出--^{SEA}杂合共 50 例(22.83%), - $\alpha^{3.7}$ 杂合 10 例(4.57%)及--^{SEA}/ $\alpha^{3.7}$ 复合缺失 6 例(2.74%)。与文献所报道的我国南方地区最常见的 α -地贫基因型为--^{SEA}, 其次是- $\alpha^{3.7}$ 、- $\alpha^{4.2}$ 符合, 其基因突变趋势也相似^[12]。

随着分子生物学的日渐成熟及基因诊断的广泛应用, 当前对 α -地贫缺失类型检测的方法主要有: Southern 杂交、实时荧光定量 PCR 结合溶解曲线分析(DC)和 PCR 体外基因扩增等^[3, 6, 8, 13]。用于 β -地贫点突变基因诊断的技术主要有: PCR-反向斑点杂交法(PCR-flow through reverse dot blot, PCR-RDB)、限制性片段长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、高分辨溶解曲线分析系统、基因芯片法等^[11, 14-15]。目前临床实验室普遍采用跨越断裂点聚合酶链反应(Gap-PCR)技术检测 α -地贫缺失类型。其基本原理是设计在 α -链珠蛋白突变基因断裂点两侧的引物在正常情况下由于扩增区域太长而无法扩增, 而缺失型基因扩增区域因缩短而能扩增。该方法简单实用^[14], 能很好地区分正常、杂合子和纯合子^[6], 但由于 α -链珠蛋白基因的高度同源和高 G+C 含量, 使得目的产物难以扩增。另外, 由于 PCR 技术本身的高敏感性, 样品容易受污染而得到假性结果^[3]。非缺失型 α -地贫突变和 β -地贫点突变的常规检测方法为 PCR-反向斑点杂交法(PCR-RDB)技术。其基本条件是固定在膜上的多种特异性探针于同一条件下与 PCR 产物进行杂交。该方法可同时检测几种点突变, 具有快速、简便、灵敏度高和特异性强的特点, 但操作繁琐、难以进行大批量检测^[11], 且易受各种试验因素、条件的影响, 其稳定性和重复性有待提高^[14]。

本研究采用 Amplicon 文库构建法, 基于高通量测序平台技术进行地贫基因诊断, 相较于传统

常规运用的血液学表型分析, 能有效避免后者所存在的漏诊、误诊现象。对比于目前普遍使用的基因检测方法(如 Gap-PCR 和 PCR-RDB 等), 其共同点为同样涉及一个分别针对 α/β -链珠蛋白基因进行 PCR 体外扩增的过程, 其最大的不同之处是关于 α/β -地贫基因缺失及突变的检测, 前者能够同时完成, 且保证准确率, 后者却需分别进行, 存在一定的局限性。现将该方法的优势归纳如下:

同时针对 α -地贫基因缺失类型与 α/β -地贫基因突变类型进行检测, 操作简便化, 能较大程度地避免样本污染, 也不易受各试验条件因素的影响; 效率高, 从试验操作到结果分析的整个流程耗时短; 适用于大批量的临床样本检测, 稳定性高, 重复性好, 准确度强; 所需样本量少, 且对人体造成危害的可能性极低; 能一次性检测多种突变位点及缺失类型, 并可发现新的突变类型, 具有较高的临床与科研价值。由本次检测结果可看出, 此方法能迅速、有效、准确地检测出常见的--^{SEA}、- $\alpha^{3.7}$ 、- $\alpha^{4.2}$ 3 种缺失型及 CD122、CD125、CD142 3 种点突变类型和我国常见的多种 β -地贫基因突变位点。

因此, 本研究所建立的 Amplicon 文库构建法, 基于高通量测序平台技术的基因检测为地贫的诊断提供了快速可靠的参考依据, 对指导优生优育, 防止中、重型地贫患儿出生, 提高人口素质等具有重要意义。

参考文献

- [1] 李长钢. 地中海贫血临床诊治中存在的问题[J]. 临床儿科杂志, 2009, 27(8): 714-717.
- [2] 王燕燕, 李晓辉, 徐西华. 地中海贫血诊治进展与我国现状[J]. 中国实用儿科杂志, 2013, 28(6): 473-476.
- [3] 肖维威, 徐湘民, 徐铃. 中国人缺失型 α -地中海贫血的分子基础及产前基因诊断[N]. 第一军大学学报, 1998, 18(1): 68-72.
- [4] 周玉球, 徐湘民. 中国人 β 地中海贫血的分子基础及产前诊断[J]. 国外医学: 遗传学分册, 1995, 18(3): 132-137.
- [5] Xiong F, Sun M, Zhang X, et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi Zhuang Autonomous Region of southern China [J]. Clinical Genetics, 2010, 78(2): 139-148.

(下转第 423 页)

• 论 著 •

基于下一代测序平台的结直肠癌 *KRAS* 基因检测李丽娟¹ 罗婉珊¹ 张家彬¹ 王庆¹ 吴英松^{2*}

[摘要] **目的** 基于下一代测序技术,检测和分析结直肠癌 *KRAS* 基因的突变情况,以及评估其应用于临床分子诊断中的可行性。**方法** 应用 Ion Proton 半导体测序仪,检测 108 例结直肠癌患者的石蜡包埋组织样本的 *KRAS* 基因突变情况,并与作为金标准的一代测序检测结果进行对比。**结果** 下一代测序检测结果与一代测序检测结果基本一致,符合率为 94%,灵敏度高达 100%。**结论** 通过对 108 例临床样本的检测分析后,该下一代测序检测方法可用于检测结直肠癌 *KRAS* 基因突变情况。

[关键词] 下一代测序;结直肠癌;*KRAS*

Based on the next generation sequencing platform for detection colorectal *KRAS* geneLI Lijuan¹, LUO Wanshan¹, ZHANG Jiabin¹, WANG Qing¹, WU Yingsong^{2*}

(1. Guangzhou Darui Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510665; 2. School of Laboratory Medicine Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] **Objective** Based on next generation sequencing technology, to detect and analyze of *KRAS* gene mutations in colorectal cancer, and to assess the feasibility of its application in clinical molecular diagnosis. **Methods** *KRAS* gene mutation was detected in paraffin embedded tissue samples from 108 cases of colorectal cancer by Ion Proton semiconductor sequencer. The results were compared with the results from Sanger sequencing which is the gold standard. **Results** The results of the next generation sequencing were consistent with the results of gold standard, with the accuracy rate of 94% and sensitivity up to 100%. **Conclusion** Through the detection and analysis of 108 cases of clinical samples, this next generation sequencing method is valid for detection of *KRAS* gene mutation in colorectal cancer.

[KEY WORDS] Next generation sequencing; Colorectal cancer; *KRAS*

RAS 家族之一的 *KRAS* 基因位于 12p12.1, 编码分子量为 21 kD、具有 GTP 酶活性的 p21 蛋白^[1]。*KRAS* 为 EGFR 信号传导通路 RAS-RAF-MAPK 中的重要因子。机体正常的 *KRAS* 基因,通过控制相关路径抑制癌细胞的生长。突变型 *KRAS* 基因,在无需活化 EGFR 的条件下,激活下游信号传导通路,导致细胞的生长、增殖和凋亡发生异常。细胞传导信号的紊乱以及增殖的失控会导致细胞癌变。*KRAS* 基因主要在第 12、13 位密码子

上发生突变,以点突变为主,在第 61 位密码子上可见少数突变^[2]。

KRAS 是人体肿瘤中常见的致癌基因,其中 20%~50% 的结直肠癌患者伴有 *KRAS* 基因突变。其突变出现在结直肠癌的早期阶段,不受治疗的影响而维持稳定状态^[3]。*KRAS* 是第一个对临床治疗结直肠癌的决策产生影响的生物标记物,是帮助了解相关基因和癌症的发展预后、疗效的关键指标。当 *KRAS* 基因为突变型时,则不建议采用

基金项目:广东省科技计划项目应用型专项资金(2015B020233009)

作者单位:1. 广州市达瑞生物技术股份有限公司,广东,广州 510665

2. 南方医科大学检验与生物技术学院,广东,广州 510515

*通讯作者:吴英松, E-mail: wg@smu.edu.cn

EGFR 靶向药物。临床研究表明,当患者本身为 *KRAS* 基因野生型即不存在 *KRAS* 基因突变,服用 EGFR 有关靶向治疗药物,能获得明显的治疗效果。例如非 *KRAS* 基因突变的结直肠癌患者,可受益于西妥昔和帕尼单抗等 *EGFR* 抗体药物^[4]。美国癌症综合网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)提出肿瘤患者必须先检测 *KRAS* 基因突变,再选择 *EGFR* 靶向药物。*KRAS* 基因突变检测已被 NCCN 列为《结肠癌临床治疗指南》与《直肠癌临床治疗指南》临床用药必检项目。

目前,应用下一代测序技术检测 *KRAS* 基因突变的方法有多种。本研究应用 Ion Torrent 半导体测序技术^[5],对 108 例结直肠癌病理样本进行

KRAS 基因的突变检测,并与一代测序检测结果进行对比。旨在探讨下一代测序检测方法在临床检测结直肠癌 *KRAS* 基因突变的可行性。

1 材料与方法

1.1 样本采集

随机选取 2015 年 1 月至 2015 年 12 月宁波市第二医院结直肠癌患者的石蜡包埋组织样本 108 例,其中男性 64 例,女性 44 例,年龄在 32~90 岁,平均年龄 64 岁。本研究经此医院医学伦理委员会批准,且患者均知情同意。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 主要试剂

本研究主要使用的试剂见表 1。

表 1 试剂信息表

Table 1 The information of reagents

试剂名称	货号	厂家
环保脱蜡剂	004TL001-8	广州和实生物技术有限公司
QIAamp DNA FFPE Tissue KIT(50)	56404	Qiagen 公司(德国)
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Q32854	Thermo Fisher Scientific 公司(美国)
Nuclease-Free Water	AM9932	Thermo Fisher Scientific 公司(美国)
Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0	4480441	Thermo Fisher Scientific 公司(美国)
Ion PI™ Hi-Q™ OT2 Reagents 200 kit	A26434	Thermo Fisher Scientific 公司(美国)
Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit	A26433	Thermo Fisher Scientific 公司(美国)

表 2 仪器信息表

Table 2 The information of instruments

仪器名称	货号	厂家
ABI 3500 DX 基因分析仪	4406019	Thermo Fisher Scientific 公司(美国)
小型高速离心机	5430	Eppendorf 公司(德国)
Veriti PCR 仪	4375786	Thermo Fisher Scientific 公司(新加坡)
Qubit®3.0 荧光定量仪	Q33216	Thermo Fisher Scientific 公司(马来西亚)
荧光定量 PCR 仪	ABI7500	Thermo Fisher Scientific 公司(新加坡)
Ion One Touch™ 2.0 System	4474779	Thermo Fisher Scientific 公司(美国)
Ion Proton™ System	4476610	Thermo Fisher Scientific 公司(美国)

1.2.2 主要仪器

本研究主要使用的仪器见表 2。

1.3 检测方法

1.3.1 DNA 提取

采用环保脱蜡剂对石蜡包埋组织样本进行脱蜡处理,按照 QIAamp DNA FFPE Tissue KIT(50)说明书提取样本的 DNA,用 Qubit®3.0 荧光定量仪

定量。

1.3.2 文库构建和定量

采用 Ion AmpliSeq Library™ Kit 2.0 进行文库构建。关键步骤包括:目的片段的 PCR 扩增反应,消除部分引物序列,加 PI 接头和特异性接头以及文库的纯化。

采用 Qubit®3.0 荧光定量仪进行文库定量。根

据下列公式将文库稀释到 200 pmol/L, 稀释后采用荧光定量 PCR 仪定量, 等质量混合后进行模板制备。一次测序反应, 最多可以混合 96 个不同特异性接头的样本(包括阳性质控品和阴性质控品)。

$$\text{稀释倍数} = \frac{\text{文库浓度} \times 10^7}{660 \times 200 \times 2}$$

1.3.3 模板制备与富集

按照 Ion PI™ Hi-Q™ OT2 Reagents 200 kit 说明书进行操作, 适量的上样体积与 ISP 磁珠。关键步骤: 通过反应过滤器形成油包水型, PCR 扩增反应, 离心回收制备好的模板颗粒, Ion One Touch™ ES 的磁珠技术分离得到阳性模板。

1.3.4 上机测序

采用 Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit, 加入质控模板, 退火, Loading 测序芯片, 加测序酶。108 例样本分 2 张芯片进行上机测序。

1.3.5 结果分析

利用测序仪配套服务器和软件进行序列比对和分析。

运行 Variant Caller 和 Coverage Analysis 插件, 得到样本的分析结果。点击“筛选”, 在“Allele Call”选项中, 筛选保留“Homozygous”和“Heterozygous”; 在“Allele Source”选项中, 筛选保留“Hotspot”; 在“Frequency”选项中, 筛选保留“≥ 5”的数值; 在“Coverage”选项中, 筛选保留“≥ 2500”的数值。

1.4 一代测序对照实验

将上述提取的 108 例 DNA 样本同时应用 ABI 3500 DX 基因分析仪及配套试剂进行检测, 运行 SeqScanner 程序, 导入测序结果。按 Find 快捷键, 查找序列“AGTTGGAGCT”。此序列往后的第 1~6 个碱基, 分别为 KRAS 第 12、13 密码子。12 号密码子野生型为 GGT, 13 号密码子野生型为 GGC; 否则为 KRAS 外显子 2 突变, 详见表 3。

表 3 突变信息表

Table 3 The information of mutations

外显子	COSMIC ID	突变名称	碱基变化	查找序列	查找序列往后的碱基序列
2	COSM516	G12C	34G>T	AGTTGGAGCT	TGT
	COSM517	G12S	34G>A		AGT
	COSM518	G12R	34G>C		CGT
	COSM520	G12V	35G>T		GTT
	COSM521	G12D	35G>A		GAT
	COSM522	G12A	35G>C		GCT
	COSM532	G13D	38G>A		GGTGAC

1.5 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计分析软件, 对结果进行一致性检验, 以 $Kappa \geq 0.75$ 为一致性较好。

2 结果

2.1 测序结果分析

通过对 108 例结直肠癌石蜡包埋组织样本测序结果分析, 下一代测序结果检出 65 例为 KRAS 基因野生型并与一代测序结果完全一致, 有 43 例为 KRAS 基因突变型, 其中 37 例 KRAS 基因突变型与一代测序结果完全一致, 具体信息见表 4。

下一代测序检测结果中有 6 例 KRAS 基因突变型与一代测序结果不一致, 见表 5 和图 1。

样本 NBE059、NBE071 下一代测序结果显示

6.7%、9.4% 的突变频率; 对应的一代测序峰图突变碱基荧光信号弱 (灵敏度 < 20%), 不足以判定其为阳性。样本 NBE020、NBE074 和 NBE077 下一代测序结果显示 5.3%、7.4%、5.0% 的突变频率; 对应的一代测序峰图突变碱基峰与背景峰大体一致, 判定其为野生型。样本 NBE069 下一代测序结果有 7.4% 的 Gly12Cys 突变, 对应的一代测序峰图是野生型。

2.2 2 种检测方法相关性分析

以金标准一代测序检测结果为基础, 验证下一代测序检测方法的可行性。通过相应公式计算得到本实验灵敏度为 100%, 特异性为 91.5%, 阳性预测值为 86%, 阴性预测值为 100%, 总符合率为 94%。以及采用 SPSS 20.0 统计分析软件, 计算 $Kappa$ 为 0.881。2 种测序结果统计具体见表 6。

表4 下一代测序检测结果

Table 4	The results of next generation sequencing		
样本名称	COSMIC ID	突变率(%)	覆盖度
NBE004	COSM522	35.9	3972
NBE005	COSM532	33.0	3996
NBE010	COSM532	27.2	3992
NBE014	COSM521	12.7	3988
NBE018	COSM521	21.7	3986
NBE025	COSM521	17.2	3026
	COSM516	24.4	3998
NBE026	COSM521	19.3	3980
NBE028	COSM520	36.4	3990
NBE030	COSM516	35.2	3996
NBE035	COSM518	23.6	3996
NBE036	COSM521	21.0	3968
NBE038	COSM521	28.8	3974
NBE039	COSM521	27.0	3978
NBE043	COSM521	17.9	3980
NBE045	COSM516	12.7	3996
NBE052	COSM532	35.7	3998
NBE054	COSM521	21.2	3994
NBE056	COSM521	43.2	3972
NBE063	COSM517	54.7	3996
NBE064	COSM521	27.5	3970
NBE073	COSM521	26.3	3976
NBE078	COSM516	15.7	3998
NBE079	COSM516	14.9	3998
NBE082	COSM520	11.2	3990
NBE083	COSM532	17.5	3982
NBE085	COSM521	26.9	3976
NBE086	COSM521	23.9	3966
NBE091	COSM521	79.1	3968
NBE092	COSM518	26.3	3992
NBE093	COSM521	14.4	3982
NBE095	COSM516	43.8	3992
NBE097	COSM522	28.7	3978
NBE098	COSM520	23.4	3994
NBE099	COSM521	25.8	3978
NBE100	COSM532	54.5	3996
NBE104	COSM516	36.3	3998
NBE106	COSM520	35.6	3988

3 讨论

作为金标准的一代测序法采用 Sanger 测序原理,4 种荧光染料标记的 ddNTP,经过单引物 PCR 反应,采用毛细管电泳技术,实现目的片段的所有碱基序列的检测。以准确、可靠、检测范围广等为

表5 下一代测序检测结果

Table 5	The results of next generation sequencing		
样本名称	COSMIC ID	突变率(%)	覆盖度
NBE020	COSM521	5.3	3992
NBE059	COSM520	6.7	4000
NBE069	COSM516	7.4	3998
NBE071	COSM532	9.4	3992
NBE074	COSM532	7.4	4000
NBE077	COSM532	5.0	3992

表6 测序结果比较

Table 6	The comparison of sequencing results		
	一代测序 阳性	一代测序 阴性	合计
下一代测序阳性	37(a)	6(b)	43(a+b)
下一代测序阴性	0(c)	65(d)	65(c+d)
合计	37(a+c)	71(b+d)	108(a+b+c+d)
灵敏度= $[a/(a+c)] \times 100\%$, 特异性= $[d/(b+d)] \times 100\%$, 阳性预测值= $[a/(a+b)] \times 100\%$, 阴性预测值= $[d/(c+d)] \times 100\%$, 总符合率= $[(a+d)/(a+b+c+d)] \times 100\%$			

特点,同时具有耗时长、成本高,操作复杂、易污染、灵敏度低等局限性^[6]。主要针对已知突变基因的位点设计引物,所以要明确知道该基因位点的具体信息,对于没有明确的基因位点难以实现测序反应。一代测序的目的在于寻找与疾病相关的特定基因突变,若没有明确突变基因或筛查数量众多的基因则难以完成^[7]。本研究采用下一代测序技术,经过 Ion Proton 半导体测序仪能够检测出目的片段的碱基序列。该系统采用天然核苷酸和聚合酶、无需激发光源、荧光标记、焦磷酸酶化学级联以及照相系统直接实时检测测序时产生的氢离子浓度,有效提高碱基判读准确性^[8]。测序反应开始 5 min 内即开始得到测序数据,单次运行耗时 2 h,测序芯片反应微孔大于 1.6 亿,产出数据量可达 10 G。相比一代测序具有检测快速,通量高,能同时检测出多种不同的突变型别等优势^[9]。

本研究对 108 例结直肠癌临床样本 *KRAS* 基因检测结果显示,一代测序结果有 37 例阳性(突变率 34.3%),下一代测序结果有 43 例阳性(突变率 39.8%),2 种方法符合率为 94%。与国内外相关报告相符合。37 例一代测序阳性样本在下一代测序结果中显示较高的突变频率,此外下一代测序还

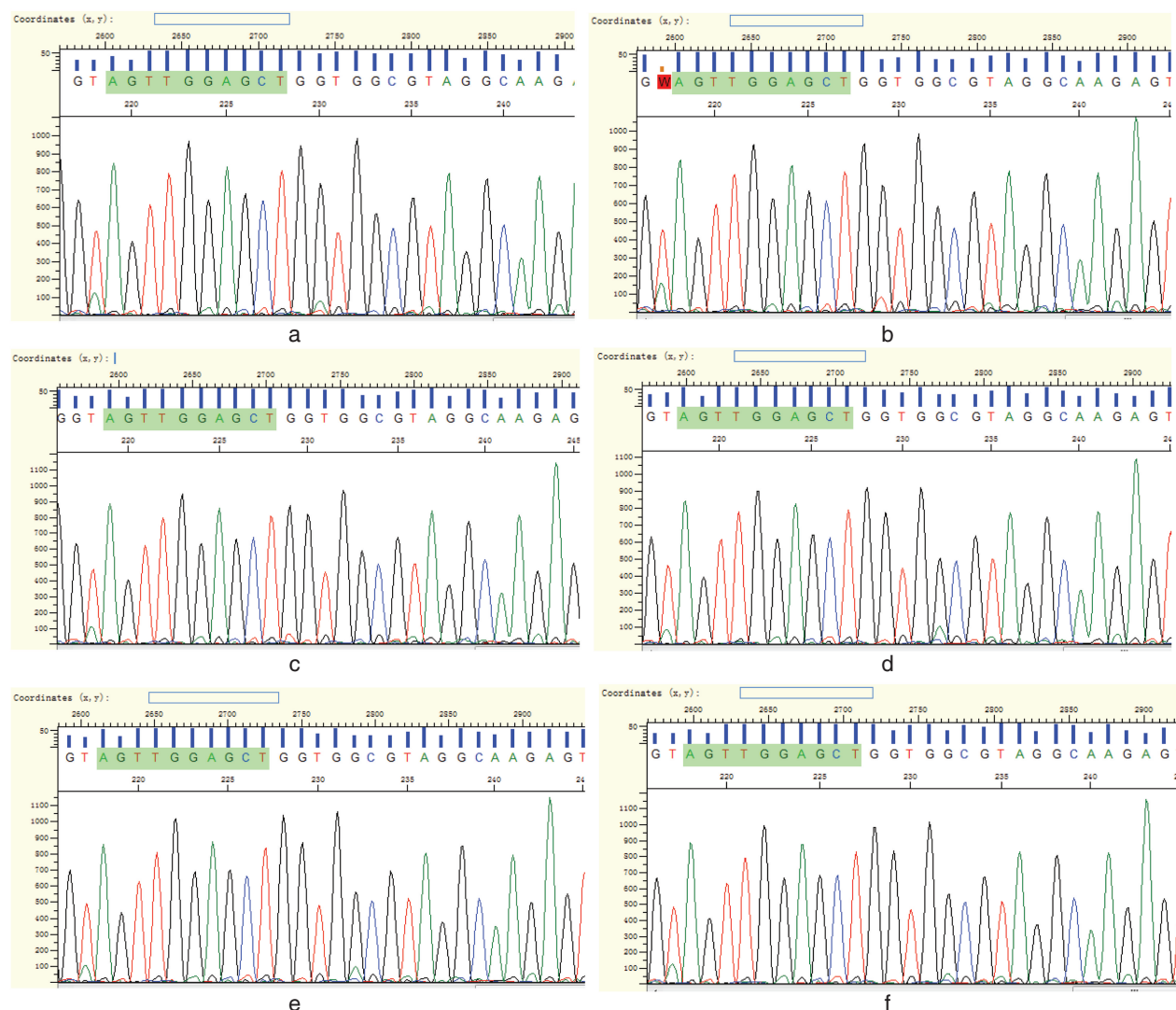


图 a~f 分别是 NBE020, NBE059, NBE069, NBE071, NBE074, NBE077 一代测序检测结果

图 1 一代测序检测结果

Figure 1 The results of Sanger sequencing

检测出 6 例突变频率比较低的样本(突变频率 > 5%, 结果可信)。对应的 6 例一代测序峰图由于突变碱基荧光信号弱(灵敏度 < 20%)或者突变碱基峰与背景峰大体一致, 判定其为野生型。一代测序结果的准确性受测序仪器和设定条件的影响, 背景峰的高低也会影响判定结果。肿瘤异质性较明显时, 一代测序的峰图易受干扰, 不能准确判断突变类型, 因此其灵敏度低^[10]。下一代测序灵敏度高达 100%, 特异性为 91.5%, 阳性预测值 86%, 阴性预测值 100% 以及 $Kappa$ 值 > 0.75, 验证下一代测序结果与一代测序有很好的 consistency。但 2 种检测方法均未检测到第 61 密码子上的突变, 可能是由于样本量少、癌组织处理以及这些突变较少

见。因此需要扩大样本量进行深入研究加以验证。

目前下一代测序技术广泛应用于肿瘤基础科研中, 鉴定肿瘤驱动基因突变, 发现新的突变基因和位点, 并应用于新的药物靶点和生物标志物的研发。在国外, 下一代测序技术在临床诊断领域得到一定的发展。根据相关肿瘤基因组的信息预测药物的疗效, 制订个体化诊疗方案, 并为新药的临床试验筛选合适的患者^[11]。本研究的下一代测序系统具有高通量特点, 一张芯片可以同时检测 1~96 例样本; 并能检测出一代测序无法检测的低频率突变位点, 更好的满足结直肠癌临床分子诊断上的需求^[12]。

参考文献

- [1] Cong T, Xiang D. KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(37):5171-5180.
- [2] Malapelle U, Carlomagno C, de Luca C, et al. KRAS testing in metastatic colorectal carcinoma: challenges, controversies, breakthroughs and beyond [J]. J Clin Pathol, 2014, 67(1):1-9.
- [3] Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer [J]. N Engl J Med, 2013, 369(11):1023-1034.
- [4] Tougeron D, Lecomte T, Pagès JC, et al. Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer [J]. Annals of Oncology, 2013, 24(5):1267-1273.
- [5] Umberto M, Elena V, Roberta S, et al. Ion Torrent next-generation sequencing for routine identification of clinically relevant mutations in colorectal cancer patients [J]. J Clin Pathol, 2015, 68(1):64-68.
- [6] Kothari N, Schell MJ, Teer JK, et al. Comparison of KRAS mutation analysis of colorectal cancer samples by standard testing and next-generation sequencing [J]. J Clin Pathol, 2014, 67(9):764-767.
- [7] Normanno N, Rachiglio A, Roma C, et al. Comment on a comparison of three methods for detecting KRAS mutations in formalin-fixed colorectal cancer specimens [J]. Br J Cancer, 2012, 107(10):1791-1792.
- [8] Lin MT, Mosier SL, Thiess M, et al. Clinical validation of KRAS, BRAF, and EGFR mutation detection using next-generation sequencing [J]. Am J Clin Pathol, 2014, 141(6):856-866.
- [9] Salto-Tellez M, de Castro DG. Next generation sequencing: a change of paradigm in molecular diagnostic validation [J]. J Pathol, 2014, 234(1):5-10.
- [10] Angulo B, Garcia-Garcia E, Martinez R, et al. A commercial real-time PCR kit provides greater sensitivity than direct sequencing to detect KRAS mutations: a morphology-based approach in colorectal carcinoma [J]. Molr Diagn, 2010, 12(3):292-299.
- [11] Xuan J, Yu Y, Qing T, et al. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges [J]. Cancer Lett, 2013, 3409(2):284-295.
- [12] van Allen EM, Wagle N, Stojanov P, et al. Whole-exome sequencing and clinical interpretation of formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples to guide precision cancer medicine [J]. Nat Med, 2014, 20(6):682-688.

(上接第366页)

- [8] 李燕芳, 张兰珍, 田耕, 等. 胎儿游离DNA用于无创产前检测21、18、13三体综合征的临床研究 [J]. 中国妇产科临床杂志, 2015, 16(2):126-129.
- [9] 林洋洋, 徐婉芳, 刘彦慧, 等. 大规模平行测序技术在产前无创检测胎儿染色体异常中的临床应用 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 24(1):52-54.
- [10] Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study [J]. GenetMed, 2012, 14(3):296-305.
- [11] 谭卫荷, 郭晓燕, 张金云, 等. 不同年龄段孕妇妊娠中期羊膜腔穿刺及羊水细胞染色体核型分析结果的对比分析 [J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(1):125-127.
- [12] 沈国松, 张甦, 何平亚, 等. 779例高龄孕妇的产前筛查与诊断结果分析 [J]. 中国产前诊断杂志, 2009, 1(2):29-32.
- [13] 汤素环, 李付广, 谭卫荷, 等. 不良孕产妇的染色体核型分析 [J]. 中国药物经济学, 2015, Z1:245-247.
- [14] 米弘瑛, 李利, 麻新梅, 等. 试管婴儿新生儿情况分析 [J]. 实用医学杂志, 2013, 29(4):593-594.
- [15] 许小艳, 杨景晖, 麻新梅, 等. 试管婴儿新生儿期并发症及出生缺陷分析 [J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 17(4):350-355.

• 论 著 •

广东地区200例正常人耳聋基因突变数据库的建立

邹俊¹ 杨琳艳² 罗俊明² 梁志坤² 杨旭³ 张丽红^{1*}

【摘要】目的 通过对200例广东地区正常人进行耳聋基因突变筛查,获得耳聋相关基因突变检测的数据库,初步筛出良性等位基因突变位点,以在对广东地区人群进行耳聋基因突变检测或筛查时,降低数据分析的时间和增加对结果的风险预测能力。**方法** 提取在广东地区收集到的200例正常男女样本(男女比例为1:1)的外周全血DNA,运用Ampliseq扩增技术以及Life Technologies耳聋基因检测引物池构建基因文库后进行下一代测序,确保每一个样本的测序结果获得足够的数据量,然后分析耳聋基因突变位点。**结果** 建立了使用Life Technologies耳聋基因检测引物池构建基因文库的实验体系;经过数据比对,筛选出200例样本中突变率高达80%~100%的良性等位基因突变点。**结论** 通过对测序结果的分析处理,筛除了针对广东地区人群突变率高但是不致病的良性耳聋基因突变位点,为今后广东地区人群的耳聋基因突变筛查提供参考。

【关键词】 耳聋;下一代测序;良性等位基因

Establishment of a gene mutation database in deafness from 200 health individuals in Guangdong areaZOU Jun¹, YANG Linyan², LUO Junming², LIANG Zhikun², YANG Xu³, ZHANG Lihong^{1*}

(1. Pediatric Surgery of Jiangxi Provincial Children's Hospital, Nanchang, Jiangxi China, 330006; 2. Guangzhou Darui Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510665; 3. School of Basic Medical Science, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Objective To get deafness related gene mutation detection database and preliminarily remove the positive allele mutations, 200 cases of normal people in the Guangdong area were screened, in order to reduce the time of data analysis and increase the ability to predict the risk when detecting the mutation of deafness gene in the population of the Guangdong area. **Methods** Peripheral blood DNA was extracted from 200 normal samples collected in the Guangdong area (male to female ratio of 1:1). Gene library was constructed by using Ampliseq amplification technology and primer pool of deafness genetic testing (Life Technologies), and then next generation sequencing was done. **Results** The experimental system of gene library was established using Life Technologies primer pools of deafness gene detection. Through data comparison, mutation rate between 80% and 100% of 200 samples was selected. **Conclusion** By analysing the sequencing results, deafness gene mutations which were benign and had high mutation rate of population in Guangdong but not pathogenic were removed. That greatly reduced the time of data analysis, increased the ability to predict the results of the risk, which would provide reference for deafness gene mutation screening of Guangdong population in the future.

[KEY WORDS] Deafness; Next generation sequencing; Benign allele

基金项目:广州市科技计划项目(201508020259)

作者单位:1. 江西省儿童医院儿外科, 江西, 南昌 330006

2. 广州市达瑞生物技术股份有限公司, 广东, 广州 510665

3. 南方医科大学基础医学院, 广东, 广州 510515

*通讯作者:张丽红, E-mail:742702096@qq.com

耳聋是一种临床上最常见的、严重影响人类健康和生活质量的疾病,还会给社会带来巨大的压力。其发病原因多种多样,环境影响、单基因突变、多基因复合突变以及环境和遗传因素共同作用等都可能引起耳聋。在所有的耳聋患者中,约有一半属于遗传性耳聋。遗传性耳聋可分为综合征型耳聋(syndromic hearing loss, SHL)和非综合征型耳聋(nonsyndromic hearing loss, NSHL)。目前为止,已有报道的耳聋有数百种,绝大多数的遗传性耳聋属于 NSHL,只有约 30%的遗传性耳聋病例属于 SHL^[1]。NSHL 的遗传模式涉及常染色体隐性、染色体显性、X 连锁及线粒体遗传等,其中线粒体遗传约占 1%^[2]。其中常染色体隐性遗传,约占 77%;常染色体显性遗传,约占 22%^[3]。据遗传学家估计,与耳聋相关的基因约有 200 多个,随着分子遗传学和分子生物学的发展以及人们对遗传性耳聋的研究不断深入^[4],目前近百个耳聋相关基因已经被发现,其中 50 多个非综合征型遗传性耳聋的基因被明确定位克隆。要减少遗传性耳聋的发生,早期的预防与干预很重要,而对遗传性耳聋进行预防与干预,重在对相关基因突变的检测和筛查^[5]。

Ion Torrent 是基于半导体芯片发展起来的新一代革命性测序技术^[6],芯片的可测样本量在提高的同时,相对应而产生的数据量亦是极为庞大的,在分析耳聋相关基因的测序结果时,实验数据量的简化显得越来越重要。通过筛选后,如果建立起针对某一地区的耳聋基因突变数据库,能快速排除人群中普遍存在的相关基因的良性突变位点或者多态位点,就可以为进一步的分析并确定致病性等位基因突变带来很大的方便。本研究对来自广东地区的 200 例正常人全血 DNA 样本进行耳聋基因突变检测,得到测序结果后,对数据进行分析整理后将高突变率的良性等位基因突变位点初步排除,为今后广东地区人群的耳聋基因筛查提供参考,减少样本 DNA 测序及数据分析的工作量。

Ion Torrent 半导体测序技术相关的技术平台包含文库构建、乳液 PCR 和测序。基本原理是在多重 PCR 捕获得到的 DNA 片段两端加上通用的测序接头,构建好可以用于测序的测序文库。利用乳液 PCR 技术对测序文库进行扩增,形成测序模板,通过对阳性模板进行富集以达到测序要求。利用半导体测序系统对构建好的测序模板进

行测序,最终获得每个 DNA 片段的碱基序列。通过生物信息学分析把这些序列定位到人类基因组参考图谱上,分析样本 DNA 序列覆盖到耳聋相关基因的位置区域,统计确定位置的碱基序列信息,是否发生突变,发生突变的频率为多少,即可判断疾病类型,并且判断为杂合突变或是纯合突变,进而实现对耳聋相关基因型别的确定^[7]。与第一代 Sanger 测序技术相比,该技术在很短的时间内能够实现对上百亿个碱基对进行测序的愿望,一次就可以测定几十万到几百万条 DNA 分子的序列,这满足了极短时间内对基因组进行高分辨率检测的要求^[8]。

1 材料和方法

1.1 研究对象和样本

收集来自广东地区正常男女外周全血样本 200 例,其中,男性样本 100 例(来自南方医科大学南方医院),女性样本 100 例(其中 11 例来自南方医科大学南方医院,89 例来自广东地区其他医院),男女比例为 1:1。耳聋患者外周全血样本 50 例(来自南方医科大学南方医院)。使用 QIAamp DNeasy Blood & Tissue Kit 全血 DNA 提取试剂盒(具体操作按试剂盒说明书)对每个样本取 200 μ L 进行基因组提取,后用 Qubit[®]3.0 荧光计和 Nano-100 微量分光光度计检测所提取到的 DNA 浓度和纯度。满足浓度 20~50 ng/ μ L,纯度 OD_{260/280}=1.7~2.0。实验检测前 DNA 样本在 -80℃ 储存。

1.2 文库的制备

使用 200 例样本中提取的全血基因组 DNA 进行基因组文库构建,每个样本取 30 ng 全血基因组进行实验,使用 Ion AmpliSeq[™] Library Kit 2.0 和耳聋基因突变检测引物池 HearingLoss100v1 (IAD2530702)(下称 panel, panel 所覆盖的基因如表 1 所示)(Life Technologies, 美国)制备基因组文库,利用 AMPure XP beads 对文库进行片段选择和纯化:0.5 倍 AMPure XP beads 去除文库中的大片 DNA;1.2 倍磁珠可以捕获理论大小的 DNA 文库片段。

基因组文库构建完成后,用 Qubit[®]3.0 检测文库浓度,Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, 美国)和安捷伦 2100 生物分析仪测定文库片段大小。

表1 耳聋 panel 覆盖的基因
Table 1 Genes in deafness panel

覆盖基因
<i>ACTG1, CCDC50, CDH23, CEACAM16, CLDN14, COCH, COL11A2, CRYM, DFNA5, DIAPH1, ESPN, ESRRB, EYA4, GIPC3, GJB2, GJB3, GJB6, GPSM2, GRHL2, GRXCR1, HGF, ILDR1, KCNQ4, LHFPL5, LOXHD1, LRTOMT, MARVELD2, MSRB3, MYH14, MYH9, MYO15A, MYO1A, MYO3A, MYO6, MYO7A, OTOA, OTOF, PCDH15, DFNB59, POU4F3, PTPRQ, RDX, SERPINB6, SLC17A8, SLC26A4, SLC26A5, SMAC, STRC,TECTA, TJP2, TMC1, TMIE, TMPRSS3, TPRN, TRIOBP, USH1C, WFS1, WHRN, POU3F4, PRPS1, SMPX, USH2A, MIRN96</i>

1.3 模板制备和测序

将每个样本的基因组文库稀释至 100 pmol/L, 将稀释后的文库每 40 个等量混合后, 用 Ion PI™ Ion Sphere™ Particles (ISPs) 通过 One Touch™ 2.0 仪器进行乳液 PCR, 仪器运行结束后, 再用 Ion One-Touch™ ES 富集 ISPs 珠子。将富集后的 ISPs 珠子转到 Ion PI™ Chip v3 测序芯片上, 使用 Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit (Life Technologies, 美国) 试剂在 Ion Proton 测序仪上进行测序。

1.4 数据分析处理

测序完成后, 待仪器内部缓存转载至服务器上后, 则可通过电脑连接服务器选择相应插件进行数据处理和分析, 则通过此步处理后可将测序得到的样本的基因组序列定位到人类基因组参考图谱上, 分析样本 DNA 序列覆盖到耳聋相关基因的位置区域, 统计确定位置的碱基序列信息, 判断是否发生突变。

2 结果

2.1 耳聋突变基因检测文库的构建体系

在试剂盒 Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 提供的使用说明书的基础上, 我们对文库构建的体系进行了优化, 每个样本文库构建起始 DNA 量分别为 19 ng、20 ng、21 ng, 最后确定每个样本文库构建的起始 DNA 量至少为 20 ng (低于 20 ng 时构建的文库浓度低于 0.2 ng/μL, 而文库浓度若低于 0.2

ng/μL, 将得不到测序结果)。因耳聋基因突变检测 panel 有 2 个引物池, 且每个样本用 2 个引物池分别建库, 即每个耳聋基因突变检测引物池进行目的片段扩增 (PCR) 时, 加入的样本 DNA 量至少为 10 ng。所得文库终浓度均可达到 0.5 ng/μL 以上。优化体系及结果如表 2、表 3 所示。

表2 DNA 起始量的优化
Table 2 Optimization of initial dosage of DNA

组分	反应体积 (μL)		
	方法 1	方法 2	方法 3
片段捕获反应液	2	2	2
引物池 (I/II)	5	5	5
DNA	2.5 (19 ng)	2.5 (20 ng)	2.5 (21 ng)
无核酸酶水	0.5	0.5	0.5
Total	10	10	10

每个样本用引物池 I, 引物池 II 分别进行 2 个反应

2.2 检测结果

使用耳聋基因突变检测 panel 构建基因文库后经测序所得数据显示, 该 panel 所覆盖的 63 个耳聋相关基因 (见表 1) 全部检出, 覆盖度达 100%。

200 例正常样本中, 对耳聋相关基因进行突变检测, 其中 50% 以上的基因位点共 35 个, 而本研究中 80%~100% 的样本都存在突变位点共有 25 个 (见表 4)。

表3 文库浓度对比
Table 3 Comparison of library concentration

方法	方法 1				方法 2				方法 3	
编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
浓度 (ng/μL)	0.152	0.180	0.162	0.553	0.537	0.610	0.766	0.832	0.815	

表4 突变频率在80%~100%范围内的基因位点的突变信息

Table 4 Mutation information of gene site which mutation frequency in the range of 80%~100%

编号	基因名称	染色体位置	dbSNP ID	突变名	突变性质	突变样本数目	突变比率
1	<i>COL11A2</i>	chr6	rs2229785	c.2700T>C	Benign	200	100%
2	<i>DFNA5</i>	chr7	rs876305	c.447A>G	Benign	200	100%
3	<i>DFNB31</i>	chr9	rs6478078	c.2256G>C	Benign	200	100%
4	<i>ESRRB</i>	chr14	rs2361293	c.885T>C	Benign	200	100%
5	<i>MYH14</i>	chr19	rs3745509	c.5430G>A	Benign	200	100%
6	<i>MYH9</i>	chr22	rs710181	c.3429T>G	Benign	200	100%
7	<i>MYO15A</i>	chr17	rs2955379	c.7185T>C	Benign	200	100%
8	<i>OTOF</i>	chr2	rs4335905	c.2736G>C	Benign	200	100%
9	<i>TECTA</i>	chr11	rs526433	c.5171G>A	Benign	200	100%
10	<i>TRIOBP</i>	chr22	rs8140958	c.4129T>C	Benign	200	100%
11	<i>WFS1</i>	chr4	rs1801212	c.997G>A	Benign	200	100%
12	<i>ILDRI</i>	chr3	rs2877561	c.1545T>G	Benign	199	100%
13	<i>CCDC50</i>	chr3	rs188384	c.50-4C>G	Benign	198	99%
14	<i>ACTG1</i>	chr17	rs1139405	c.918C>T	Benign	197	99%
15	<i>PCDH15</i>	chr10	rs4935502	c.1304A>C	Benign	197	99%
16	<i>TJP2</i>	chr9	rs2309428	c.1446C>A	Benign	197	99%
17	<i>USH2A</i>	chr1	rs10864219	c.6506T>C	Benign	197	99%
18	<i>CDH23</i>	chr10	rs3802720	c.366T>C	Benign	196	98%
19	<i>HGF</i>	chr7	rs1800793	c.1272-4A>G	Benign	194	97%
20	<i>POU3F4</i>	chrX	rs5921978	c.708G=	Benign	190	95%
21	<i>LOXHD1</i>	chr18	rs1377016	c.6107C>T	Benign	189	95%
22	<i>MYO3A</i>	chr10	rs1999240	c.3937C>A	Benign	179	90%
23	<i>USH1C</i>	chr11	rs2240487	c.1188A>G	Benign	175	88%
24	<i>TMIE</i>	chr3	rs10578999	c.391_393delAAG	Benign	172	86%
25	<i>TMPRSS3</i>	chr21	rs13047838	c.*2G>A	Benign ^[9-10]	160	80%

2.3 数据库建立有效性验证结果

为了验证我们建立起来的耳聋基因突变数据库的有效性,对50例耳聋患者进行耳聋基因突变检测,按照试剂盒 Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 的说明书构建基因组文库,并且进行模板制备和上机测序,分析上机数据,选取其中1例耳聋患者样本在良性突变位点筛选前数据分析的结果与良性突变位点筛选后分析数据的结果进行对比如表5、表6。经过对比可以看出建立数据库后,处理数据时可以直接将良性的突变位点筛选掉,而只显示我们需要的致病的突变位点信息,从而验证了耳聋基因突变数据库的有效性,这样也大大减少了工作量,并且节省了数据分析的时间。

3 讨论

与耳聋相关的基因较多,而且遗传异质性较强,但大多数耳聋是由少数几个基因突变导致的^[11],这为临床开展耳聋基因诊断及产前诊断提供了检测目标基因。目前结合产前诊断,耳聋基因突变检测的目标人群主要有:聋人人群、新生儿以及部分听力正常的人群。新生儿听力筛查中有相当一部分携带 *GJB2*、*SLC26A4* 基因突变或线粒体 DNA 突变的儿童表现为听力正常,但随着年龄增长,听力逐渐下降,表现为迟发性耳聋的症状^[12]。因此,对他们进行基因突变检测,能够有效做到早发现、早预防、早干预,对提高儿童听力健康水平具有重要的意义^[13]。

表5 耳聋患者检测结果(前)

Table 5 Detection results of deafness patient(before)

样本的数据 分析条件	突变位点	突变 频率(%)	测序 深度
	COL11A2:2700T>C	50	485
	DFNA5:447A>G	100	2417
	DFNB31:2256G>C	98.5	2518
	ESRRB:885T>C	0	1649
	MYH14:5430G>A	99.9	1211
	MYH9:3429T>G	100	1847
	MYO15A:7185T>C	50	1168
	OTOF:2736G>C	100	1759
	TECTA:5171G>A	52.3	1494
	TRIOBP:4129T>C	100	1313
	WFS1:997G>A	55.2	1377
	ILDR1:1545T>G	48.9	1762
	CCDC50:50-4C>G	97	700
	ACTG1:918C>T	0	333
	PCDH15:1304A>C	100	1161
	TJP2:1446C>A	56	1318
	USH2A:6506T>C	0	735
	CDH23:366T>C	100	1813
	HGF:1272-4A>G	50	2484
	POU3F4:708G=	48.9	1830
	LOXHD1:6107C>T	49	1677
良性突 变位点 筛选前	MYO3A:3937C>A	0	371
	USH1C:1188A>G	100	1925
	TMIE:391_393delAAG	53	2224
	TMPRSS3:*2G>A	98	466
	GJB3:538C>T	50.5	605
	GJB3:547G>A	0	600
	SLC26A4:281C>T	0	788
	SLC26A4:589G>A	0	537
	SLC26A4:IVS7-2A>G	0	690
	SLC26A4:1174A>T	0	2183
	SLC26A4:1226G>A	0	2194
	SLC26A4:1229C>T	0	2139
	SLC26A4:IVS15+5G>A	0	130
	SLC26A4:1975G>C	0	1057
	SLC26A4:2027T>A	0	1018
	SLC26A4:2162C>T	0	2617
	SLC26A4:2168A>G	0	2625
	GJB2:299_300delAT	0	1222
	GJB2:235delC	0	1223
	GJB2:176_191del16	0	1216
	GJB2:167delT	0	1220
	GJB2:35delG	0	854
	12S_m.1494C>T	0	780
	12S_m.1555A>G	0	138

表6 耳聋患者检测结果(后)

Table 6 Detection results of deafness patient(after)

样本的数据 分析条件	突变位点	突变 频率(%)	测序 深度
	GJB3:538C>T	50.5	605
	GJB3:547G>A	0	600
	SLC26A4:281C>T	0	788
	SLC26A4:589G>A	0	537
	SLC26A4:IVS7-2A>G	0	690
	SLC26A4:1174A>T	0	2183
	SLC26A4:1226G>A	0	2194
	SLC26A4:1229C>T	0	2139
	SLC26A4:IVS15+5G>A	0	130
良性突变 位点筛 除后	SLC26A4:1975G>C	0	1057
	SLC26A4:2027T>A	0	1018
	SLC26A4:2162C>T	0	2617
	SLC26A4:2168A>G	0	2625
	GJB2:299_300delAT	0	1222
	GJB2:235delC	0	1223
	GJB2:176_191del16	0	1216
	GJB2:167delT	0	1220
	GJB2:35delG	0	854
	12S_m.1494C>T	0	780
	12S_m.1555A>G	0	138

随着基因诊断技术的迅速发展,具有低成本、高通量、高自动化程度等特征的第下一代测序技术应运而生,该技术在很短的时间内能够实现对上百亿个碱基对进行测序的愿望,一次就可以测定几十万到几百万条DNA分子的序列,这满足了极短时间内对基因组进行高分辨率检测的要求^[12-14]。针对耳聋相关基因的筛查和检测,目前使用最多的方法是基因测序技术,特别是近年来发展起来的高通量测序技术,已经广泛应用于耳聋基因突变的筛查诊断中。在进行高通量的基因测序过程中,对结果中产生的大量数据进行高效、准确的处理成为一个不容忽视的问题,但由于基因突变具有普遍性、随机性、不定向性等特点^[14],在测序过程中不可避免会有大量的非目标突变位点被检测出来,如果能在繁杂的检测结果中快速的分辨出致病的和新发的基因突变位点信息,则会

为数据分析带来极大的方便。因此,高效的筛除良性突变位点或人群中多态位点的信息是很有必要的。

就耳聋基因突变检测和筛查的现状来看,一方面,根据报道目前还没有成型的耳聋相关基因突变的数据库,而且通过高通量测序法对正常人群或者听力缺陷人群进行基因检测,结果会发现相当一部分耳聋相关的基因突变位点是人群普遍携带的多态位点,如果不将其过滤掉,每次分析数据都需要重复筛除工作,造成不必要的工作负担。另一方面,在耳聋基因的检测方面,目前的生物学和医学实验室的工作重点是针对少量常见的耳聋基因突变位点进行检测,在处理检测结果时,不可避免要将一个大的数据背景排除,其工作量是很大的。同时由于外在环境以及人类个体之间的差异等原因,一些并不常见但又致病的基因突变位点确实是存在的,而且新发的突变位点在不断地出现,因此针对一些不明原因的致聋,我们在筛查常见致病位点的同时,很有必要进行新发位点的查找和验证。而这一工作要开展起来,首先也需要将人群中常见的、耳聋基因相关的非致病的多态位点筛除,以降低数据处理的难度。否则每次在处理数据时就如大海捞针一样,需要在排除众多的多态位点后再一一查找、验证新发致病位点。因此,我们建立起来的针对广东地区的200例正常人耳聋基因突变数据库,经过生物信息学分析,NCBI数据库检索,可以有效地将验证为良性的25个多态位点筛除,这样就解决了前人在进行耳聋基因突变检测是面对的大的数据背景难以排除的难题。并且对数据库的有效性进行了验证,选取50例耳聋样本进行构建基因组文库、模板制备和上机测序,与未使用数据库分析的正常样本的检测结果显示我们建立起来的耳聋基因突变数据库在后续耳聋基因突变位点筛查时可以直接有效地屏蔽掉相应的良性多态位点,这样大大减少了要处理的数据量,降低了数据分析的时间、增加了对结果的

风险预测能力,为今后广东地区人群的耳聋基因突变筛查提供参考。

参考文献

- [1] 韩跃峰, 马士崑. GJB2基因突变在遗传性非综合征性耳聋中的研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(17):2774-2777.
- [2] 王朝霞. 线粒体病的分子诊断[J]. 北京医学, 2014, 36(4):247-249.
- [3] 张秀菊, 程静, 卢宇, 等. 一个常染色体显性遗传非综合征型聋家系分析[J]. 中华耳科学杂志, 2014, 12(1):61-67.
- [4] 王继. 遗传性耳聋的基因研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(3):442-444.
- [5] 陈鑫苹, 符征, 符生苗, 等. 海南地区非综合征遗传性耳聋四个常见基因突变的分析[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(5):34-37.
- [6] 杜玲, 刘刚, 陆建, 等. 高通量测序技术的发展及其在生命科学中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(12):109-115.
- [7] 周东艳. Ion Torrent PGM~(TM)平台下一代测序技术在线粒体病诊断中的应用[D]. 江西:南昌大学, 2014.
- [8] 郭奕斌. 基因诊断中测序技术的应用及优缺点[J]. 遗传 Hereditas(Beijing), 2014, 36(11):1121-1130.
- [9] 陈昊, 谭晓风. 基于下一代测序技术的基因资源挖掘[J]. 植物生理学报, 2014, 50(8):1089-1095.
- [10] 林颖, 蒋涛, 季修庆, 等. 下一代测序技术检测1例假肥大型肌营养不良家系 Dystrophin 基因突变[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(3):185-187.
- [11] 王苹, 吴晓盼, 贾志蓉, 等. 基因检测在遗传性耳聋中的应用[J]. 中华健康管理学杂志, 2008, 2(6):375-377.
- [12] 李磊, 杨涛, 吴皓. 耳聋基因的筛查与诊断[J]. 诊断学理论与实践, 2010, 09(5):409-412.
- [13] 刘爽. 天津市新生儿听力和聋病易感基因筛查情况分析[D]. 天津:天津医科大学, 2013.
- [14] 吴宁. 关于不定向变异和定向变异[J]. 生物学教学, 2010, 35(8):70.

• 综 述 •

人类癌症特异敏感标志物:循环肿瘤DNA

吴龙¹ 王穗海² 梁志坤^{1*}

[摘 要] 循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)是由肿瘤细胞释放到血液循环系统中的DNA,它可作为多种癌症的生物学标志物。ctDNA的检测具有操作简便快速、无创、特异性和高敏感性等特征,以下一代测序(next-generation sequencing, NGS)技术为基础的ctDNA分析方法可通过突变状态反映肿瘤基因组信息,在肿瘤的研究领域和临床应用发挥重要的作用,可决策一个全新的癌症治疗方案。ctDNA作为新兴的“液体活检”靶标,其具有广阔的应用前景和推进精准医疗的实施。本文概括了ctDNA在多种癌症(乳腺癌、肺癌和结直肠癌)中的高频率突变基因、ctDNA的最新检测技术和ctDNA在临床诊断、疗效监控及预后判断中的良好效果,以推动NGS技术为基础的ctDNA检测方法在临床医学中的应用。

[关键词] ctDNA; 下一代测序; 肿瘤; 液体活检

ctDNA: a specific and sensitive biomarker for human cancersWU Long¹, WANG Suihai², LIANG Zhikun^{1*}

(1. Guangzhou darui Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510665; 2. School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Circulating tumor DNA (ctDNA) is a kind of circulating DNA fragments carrying tumor specific sequence alterations and are found in blood. It can be used as a variety of cancer biomarkers. ctDNA can be detected simply, rapidly, non-invasively, with high specificity and sensitivity. The analysis method based on next-generation sequencing (NGS) technologies detecting ctDNA can reflect tumor genomic information by mutation status, and plays an important role in research and clinical application of cancer treatment, and treatment decision-making. As a new "liquid biopsy" target, ctDNA has broad application prospects and will facilitate the implementation of precise care. This article outlines high frequency mutations in the gene of ctDNA in cancers (breast cancer, lung cancer and colorectal cancer), the latest detection technologies of ctDNA, the good effect of tumor diagnosis, prognosis and efficacy monitoring by detecting ctDNA. It can promote the application of NGS technologies by detecting ctDNA in clinical medicine.

[KEY WORDS] ctDNA; Next-generation sequencing; Tumor; Liquid biopsy

组织活检作为癌症诊断、分期和治疗决策的主体,其角色已从简单的组织学检查演变为复杂的遗传分析。尽管它很有效用,但仅代表一个位置单个时间点的状态,往往不足以描述整个恶性肿瘤的情况及其演变过程,因为附近组织可能

包含更多的遗传信息会影响到分期和治疗。而且侵入性和活检固有的选择偏好性也限制了其作为实时监控工具的有用性。为了克服这一缺点,人们开始寻找各种肿瘤生物标志物,如蛋白质标记物,循环肿瘤细胞和循环肿瘤DNA(circulating tu-

基金项目:广东省科技计划应用型科技研发专项(2015B020233009)

作者单位:1. 广州市达瑞生物技术股份有限公司,广东,广州 510665

2. 南方医科大学检验与生物技术学院,广东,广州 510515

*通讯作者:梁志坤, E-mail:zhikun_liang@126.com

mor DNA, ctDNA)等。近几年,研究表明肿瘤患者 ctDNA 所携带的肿瘤突变信息与肿瘤组织具有良好的一致性^[1-3],因此肿瘤循环 DNA 引起了人们的极大关注。Newman 等^[4]发明的高敏感度 ctDNA 定量检测技术:肿瘤个性化深度测序分析方法(cancer personalized profiling by deep sequencing, CAPP-Seq),使得 ctDNA 的检测有了突出的进步,从而使检测血液样品中低浓度 ctDNA 成为可能,进而能够跟踪肿瘤的发展状态。本文就 ctDNA 在多种肿瘤诊疗中应用的情况及在肿瘤的诊断、疗效监测及预后判断等方面的潜在作用进行介绍,以推动下一代测序(next generation sequencing, NGS)技术为基础的 ctDNA 检测方法在临床医学中的应用。

1 ctDNA 的特性

循环肿瘤 DNA(ctDNA)指的是由肿瘤细胞释放到血液循环系统中的 DNA。而细胞游离 DNA(cell free DNA, cfDNA),或者叫血浆游离 DNA,是指血浆中游离存在的 DNA,它们有的来自于正常细胞,有的来自于异常细胞(如肿瘤细胞),还有部分来自于人体外部(如病毒 DNA)。正常 cfDNA 与 ctDNA 的区别在于是否存在突变。体细胞突变,只在癌细胞或癌前细胞的基因组中,通常是单碱基对取代,却不会存在于同一个体的正常细胞的 DNA 中,这样才能保证 ctDNA 作为特异性的生物标记物。

2 肿瘤患者中的 ctDNA

在 20 世纪 40 年代后期第一次在人体循环中发现游离的 DNA,随后在 20 世纪 70 年代分离出了肿瘤特异性遗传物质。然而,ctDNA 检测的发展相当缓慢,甚至落后于产前诊断。ctDNA 面临的挑战包括充满变异,且血液中的 ctDNA 浓度较低,特别是在早期肿瘤,这阻碍了它的快速发展和更好地融入临床实践。幸运的是,靶向选择和扩增方法技术以及测序方法的进步促进了这些微量 ctDNA 的检测。一种被称为磁珠乳液扩增(beads emulsion amplification and magnetics, BEAMing)的方法^[5],它能够靶向选择以增强靶区域的捕获效率,使捕获的灵敏度高达 0.01%^[6]。这样精准的检测能力使研究人员能够探索 ctDNA 的临床适用性,对癌症进行实时监控。

2.1 乳腺癌患者中 ctDNA

转移性乳腺癌需要对肿瘤的负荷进行监控,以确定对治疗的反应,并且选择适宜的生物标志物。Dawson 等^[3]通过对 *PIK3CA* 和 *TP53* 的点突变进行检测,发现 30 位女性中有 29 位(97%)的体细胞基因组发生突变,成功地检测到 ctDNA,其表达水平波动较大,并且波动与肿瘤负荷呈现出显著的相关性。与此同时,ctDNA 比癌抗原 15-3(CA15-3)和循环肿瘤细胞的检测具有更高的灵敏度。Heidary 对转移乳腺癌相关基因(*PCDH20*, *OR4X1*, *ALK*, *DNPEP*, *SH3TC2*, *DDR2*, *MLL3*, *PIK3CA*)的检测,同样发现 ctDNA 水平表现出较大范围的波动^[7]。现在,40% 乳腺癌患者存在 *PIK3CA*(I 类磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)催化亚基)的体细胞突变,而 *PIK3CA* 则是调节 PI3K 信号转导所必须。通过对 COSMIC 数据库的检索同样可以发现乳腺癌患者中的 *PIK3CA* 和 *TP53* 这 2 个基因是高频突变基因^[8]。毫无疑问,在乳腺癌诊断中,ctDNA 将有望成为替代癌抗原 15-3(CA15-3)和循环肿瘤细胞成为新的肿瘤生物标志物,而对 *PIK3CA* 和 *TP53* 进行检测则可以很好反应乳腺癌状态。

2.2 肺癌患者中 ctDNA

Maheswaran 等^[9]在肺癌细胞中检测到 *EGFR* 和 *KRAS* 基因的突变,揭开了肺癌靶向治疗的可能路径。Yung 等^[10]使用数字聚合酶链反应(digital polymerase chain reaction, dPCR)技术在非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)患者的血浆 ctDNA 中检测到表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)突变,其外显子 19 缺失和 L858R 突变频率分别为 17%和 26%,与肿瘤样本的测序结果相比较,肿瘤样本中 *EGFR* 突变的敏感性和特异性分别为 92%和 100%,同时,突变序列的数量和临床应答呈相关关系。Punnoose 等^[11]也观察到在血浆中 ctDNA 中 *EGFR* 突变的状态与相应的肿瘤组织大小是一致的,这意味着可以使用 ctDNA 实时评估突变状态。Wang 等^[12]发现在非小细胞肺癌患者血浆 ctDNA 中,*KRAS* 突变和相应肿瘤组织也呈相关关系,在血浆和肿瘤中 *KRAS* 突变的一致性为 76.7%。美国大约 10%非小细胞肺癌患者、东亚 35%的非小细胞肺癌患者和 *EGFR* 有关^[13-14]。非小细胞肺癌患者中,*EGFR*、*KRAS* 和 *ALK* 几乎是单独起作用的,只要一个突变

代替另一个突变都会影响靶向治疗反应。因此,对 ctDNA 的突变量进行监测可以很好评估肿瘤状态,反应肿瘤是否发生及发生后的变化情况。

2.3 结直肠癌患者中 ctDNA

长期对结直肠癌遗传改变的观察发现,在大肠癌患者血清或血浆中都可以检测到癌基因 *KRAS*、抑癌基因 *TP53* 和 *APC* 的基因突变^[15]。大肠癌患者细胞游离循环 DNA 中第一个鉴别的遗传改变是癌基因 *KRAS* 的突变。大多数出版的文章都致力于此标记的研究,主要有以下几个原因:有原癌基因 *KRAS* 突变在大肠癌发病率较高(约 50%)^[16-17];结直肠癌发生的过程中,甚至是在腺瘤阶段,原癌基因 *KRAS* 突变是最早的遗传改变^[18];大约 80% 的大肠癌患者癌基因表现出 *KRAS* 突变的范围很小,通常在密码子 12,偶尔在密码子 13,少数在第 61 位密码子^[19-20]。通过等位基因特异性引物定量聚合酶链反应技术,对 *KRAS* 第 2 外显子 7 个点突变 (G12V, G12A, G12D, G12S, G12C, G12R 和 G13D) 和 *BRAF* 第 15 外显子点突变 (V600E) 进行分析,结果显示在 *KRAS* 的 7 个第 2 外显子突变和 *BRAF* V600E 突变的检出率分别为 92% 和 100%^[21]。对 COSMIC 数据库检索可以发现,这 7 个最频繁的 *KRAS* 突变占 *KRAS* 总突变的 90%, *BRAF* V600E 突变占有所有 *BRAF* 突变的 98%。ctDNA 中 *KRAS* 基因发生突变位点的一致性,更有利于其作为肿瘤的生物标志物。

3 ctDNA 检测技术

ctDNA 在血液循环中浓度很低且以碎片化呈现,这是 ctDNA 检测的主要挑战。目前,检测和分析 ctDNA 的方法很多,这在杨超等^[22]的文章中有较为详细的介绍。之前大多数方法的灵敏度都偏低,随着 ctDNA 的发展和技术的进步,最近出现几种高灵敏度的检测方法。标记扩增深度测序 (tagged-amplicon deep sequencing, TAM-Seq)、数字聚合酶链反应技术 (digital PCR)、BEAMing、焦磷酸活化的聚合反应 (pyrophosphorolysis-activated polymerization, PAP) 和 CAPP-Seq 等的出现极大提高了检测 ctDNA 的敏感性。使用数字聚合酶链反应技术对晚期胃癌、胰腺癌、卵巢癌、结直肠癌和乳腺癌等的 ctDNA 检出率可达 75% 以上^[23]。使用 CAPP-Seq 方法对非小细胞肺癌设计可检测多类型外显子改变,大于 95% 肿瘤中可以检测到突

变^[4]。对于 ctDNA 在 II-IV 期的 NSCLC 患者,敏感性达到 100%, I 期 NSCLC 患者的敏感性达到 50%,该方法检测 *EGFR* 和 *KRAS* 中频率高于 0.1% 的突变时,检出率为 100%,特异性为 99%。由此可见,CAPP-Seq 可用于局部晚期或转移性 NSCLC 患者的非侵入性肿瘤基因分型。ctDNA 的水平与肿瘤体积显著相关,II、III 期患者在放射治疗过程中肿瘤会出现炎症或纤维化,导致影像学检查无法正确判断肿瘤是否存在,而对 ctDNA 的检测结果可以判断肿瘤的状态。因此,ctDNA 水平与临床预后之间的相关性似乎优于影像学检查,并提供了快速的反应评估。我们设想,对 ctDNA 的检测可以常规应用于临床检测和监测多样恶性肿瘤,从而便于个体化的癌症疗法。

4 ctDNA 的临床应用

随着二代基因测序技术的发展,ctDNA 检测技术可以快速和高效地检测到肿瘤中的基因突变,逐渐成为“液体活检”的主要手段,其临床运用包括以下 3 个方面。

4.1 癌症早期诊断与癌症分期

近年来,在影像学检查结果不明确的情况下,循环生物标志物在评估疾病严重程度方面起到重要作用,如 CA19-9、CA-125、甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP) 和前列腺特异性抗原 (prostatic specific antigen, PSA)。然而很多的恶性肿瘤并不具有可靠的蛋白质标记物,即使在有生物标志物的疾病中,也有可能因为缺乏特异性而无法使用。此外,多数的蛋白质生物标志物在血液循环中持续时间较长,可达数周,要准确评估则需要等到数周或数月后。而 ctDNA 的半衰期短 (约 2 h),可动态评估癌症情况。另外,ctDNA 的检测准确性高,且 ctDNA 水平与肿瘤的大小之间相关程度高,根据 ctDNA 的突变量的进行监测可以很好评估肿瘤状态,进行早期诊断和肿瘤分期。

4.2 肿瘤的疗效评估

ctDNA 可作为安全可靠的疗效评估指标。肿瘤患者在临床治疗过程中通常会产生药物抗性,使得原本有效的药物失去治疗作用,其主要原因可能是基因组成或蛋白调控通路发生改变。例如,原发性结直肠癌患者血浆中的 *NRAS* 和 *KRAS* DNA 片段原本不存在 16 号密码子突变,使用 *EGFR* 阻滞剂治疗后,两者突变频率显著升高,患者

可检出率约46%^[23]。研究发现,大约一半肺癌患者对厄洛替尼和吉非替尼不敏感,主要原因是血浆中 *EGFR* 的 DNA 中发生 T790M 突变^[24]。在结直肠癌中对阻断 *EGFR* 的单克隆抗体西妥昔单抗和帕尼单抗的二次抵抗则与 *KRAS* 突变或 *MET* 基因扩增有关^[25-26]。因此,检测 ctDNA 进行基因分析可动态监测药物的靶向位点是否发生改变,筛选出最佳治疗方案,快速有效地在临床耐药前采取替代药物达到精准施药的效果,避免无效治疗并减少药物产生的副作用。

4.3 复发监测和预后判断

肿瘤切除后,没有检测到 ctDNA 与没有肿瘤复发相关联。此外,各种类型的晚期癌症都能检测到 ctDNA 的存在。2007年,BEAMing 扩增法的开发者美国约翰霍普金斯大学 Vogelstein 和 Kinzler 对18名肠癌患者的 ctDNA 进行了跟踪。研究显示,术后仍能检测到 ctDNA 的患者,基本上都出现了复发,而术后未检测到 ctDNA 的患者,肠癌无复发^[27]。该项研究结果表明,ctDNA 能展现患者对手术的应答情况。研究者在其他癌症中得到了类似结果,包括卵巢癌、乳腺癌以及来自其他器官的肿瘤,比如胰脏、膀胱、皮肤、胃、食道、肝脏和头颈。

与循环肿瘤细胞计数相比,ctDNA 在肿瘤特异性突变的预后判断方面显示出明显的优越性^[28]。在晚期非小细胞肺癌患者的研究结果表明,在基因突变检测方面 ctDNA 显示出较高的灵敏度,同时在与之相匹配肿瘤的突变状态检测方面,ctDNA 也显示出较高的一致性^[29]。ctDNA 适用于手术后的6~8周进行检测,以获得最佳的决策方案^[30]。因此,对血浆 ctDNA 进行检测可以作为癌症患者的预后生物标志物,用来分析患者的复发风险。

5 小结

与传统的组织活检或固相活检相比较,液态活检呈现出巨大的优势。而在液体活检中,ctDNA、比其他的肿瘤标记物具有准确性高、半衰期短等优势。虽然 ctDNA 与其他标志物相比优势明显,但是 ctDNA 的研究仍处于前期阶段,也具有一定的局限性。其一,ctDNA 的样本收集、处理等环节没有标准化流程,各实验室之间存在差异;其二,使用 ctDNA 进行肿瘤分期、临床转移和复发预测时,暂时尚无标准的 ctDNA 标志物及含量的阈值,

或矫正曲线;其三,使用 NGS 进行 ctDNA 检测成本较高,进一步改进检测方法以降低成本显得尤为重要。

综上所述,ctDNA 检测技术是一种操作简便快速、无创、高敏感性和特异性的“液相活检”技术,使用该技术对 ctDNA 进行检测能够突破肿瘤异质性的限制,可反映肿瘤基因组信息,且有利于掌握血液循环中的特异性突变,进行肿瘤的诊断、疗效监测及预后判断等。因而 ctDNA 将会越来越多的用于肿瘤的预防以及个体化治疗的开展,从而推进精准医疗的实施。

参考文献

- [1] Nie K, Jia Y, Zhang X. Cell-free circulating tumor DNA in plasma/serum of non-small cell lung cancer [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(1):7-19.
- [2] Lipson EJ, Velculescu VE, Pritchard TS, et al. Circulating tumor DNA analysis as a real-time method for monitoring tumor burden in melanoma patients undergoing treatment with immune checkpoint blockade [J]. *J Immunother Cancer*, 2014, 2(1):42.
- [3] Dawson SJ, Rosenfeld N, Caldas C. Circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(1):93-94.
- [4] Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage [J]. *Nat Med*, 2014, 20(5):548-554.
- [5] Diehl F, Li M, He Y, et al. BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions [J]. *Nat Methods*, 2006, 3(7):551-559.
- [6] Thress KS, Brant R, Carr TH, et al. EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291 [J]. *Lung Cancer*, 2015, 90(3):509-515.
- [7] Heidary M, Auer M, Ulz P, et al. The dynamic range of circulating tumor DNA in metastatic breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(4):421.
- [8] Lebofsky R, Decraene C, Bernard V, et al. Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types [J]. *Mol Oncol*, 2015, 9(4):783-790.
- [9] Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer

- cells[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(4):366-377.
- [10] Yung TK, Chan KC, Mok TS, et al. Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(6):2076-2084.
- [11] Punnoose EA, Atwal S, Liu W, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(8):2391-2401.
- [12] Wang S, An T, Wang J, et al. Potential clinical significance of a plasma-based KRAS mutation analysis in patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(4):1324-1330.
- [13] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(21):2129-2139.
- [14] Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. *Science*, 2004, 304(5676):1497-1500.
- [15] Lecomte T, Ceze N, Dorval E, et al. Circulating free tumor DNA and colorectal cancer[J]. *Gastroenterol Clin Biol*, 2010, 34(12):662-681.
- [16] Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers[J]. *Nature*, 1987, 327(6120):293-297.
- [17] Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development[J]. *N Engl J Med*, 1988, 319(9):525-532.
- [18] Span M, Moerkerk PT, de Goeij AF, et al. A detailed analysis of K-ras point mutations in relation to tumor progression and survival in colorectal cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 1996, 69(3):241-245.
- [19] Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1998, 90(9):675-684.
- [20] Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study[J]. *Br J Cancer*, 2001, 85(5):692-696.
- [21] Mouliere F, El Messaoudi S, Pang D, et al. Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer[J]. *Mol Oncol*, 2014, 8(5):927-941.
- [22] 杨超, 程昌明, 杨慧敏, 等. 外周血循环肿瘤DNA检测方法及应用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2015, 7(1):60-67.
- [23] Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224):224r.
- [24] Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA[J]. *Nature*, 2013, 497(7447):108-112.
- [25] Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers[J]. *Nature*, 2012, 486(7404):537-540.
- [26] Lecomte T, Berger A, Zinzindohoué F, et al. Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis[J]. *Int J Cancer*, 2002, 100(5):542-548.
- [27] Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics[J]. *Nat Med*, 2008, 14(9):985-990.
- [28] Bidard FC, Madic J, Mariani P, et al. Detection rate and prognostic value of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in metastatic uveal melanoma[J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(5):1207-1213.
- [29] Punnoose EA, Atwal S, Liu W, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(8):2391-2401.
- [30] Diehl F, Li M, Dressman D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(45):16368-16373.

非小细胞肺癌组织中 *ALK*、*ROS1*、*RET* 融合基因检测方法的比较

郭文靖¹ 朱安娜¹ 吴英松^{2*}

[摘 要] 非小细胞肺癌在恶性肿瘤中的发病率和死亡率中高居榜首,是中国首要的一个公共卫生问题。近年出现的分子靶向药能显著改善非小细胞肺癌患者的生存质量,因此对患者突变基因的准确检测显得尤为重要。目前临床上检测非小细胞肺癌患者 *ALK*、*ROS1*、*RET* 融合基因的主要方法有荧光原位杂交、免疫组织化学、逆转录聚合酶链反应以及新兴起的下一代测序,但这4种方法优缺点各异。本文通过比较这几种常见的检测方法,为融合基因检测方法的选择提供参考。

[关键词] 非小细胞肺癌; *ALK/ROS1/RET* 融合基因; 荧光原位杂交; 下一代测序

Comparison of detection methods of *ALK/ROS1/RET* fusion gene in non-small cell lung cancer tissue

GUO Wenjing¹, ZHU Anna¹, WU Yingsong^{2*}

(1. Guangzhou Darui Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510665; 2. School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] The morbidity and mortality of non-small lung cancer is the top rate of malignant tumor. And it's one of the important public health problems in China. In recent years, molecular targeted drugs can significantly improve the quality of life of patients with non-small cell lung cancer. Therefore, it's important to detect mutation accurately. Nowadays there are fluorescence *in situ* hybridization, immunohistochemistry, reverse transcription-polymerase chain reaction as well as next-generation sequencing to detect non-small lung cancer. This article compares the common methods used in clinical, in order to provide references for the choice of fusion gene detection.

[KEY WORDS] Non - small cell lung cancer; *ALK/ROS1/RET* fusion gene; Fluorescence *in situ* hybridization; Next generation sequencing

肺癌是当今社会对人群健康和生命威胁最常见的恶性肿瘤之一^[1],分别占男女性恶性肿瘤中的第一位和第二位^[2]。在中国,肺癌发病率和死亡率远高于西方国家,且处于持续上升状态。统计显示2015年新增肺癌患者达22万,死亡人数高达15万^[2]。肺癌根据免疫组化主要分为2大类:非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)和小细

胞肺癌,其中NSCLC约占85%^[3-4]。近几年,肺癌患者中除了存在常见的肿瘤驱动突变基因 *EGFR*、*KRAS*、*BRAF* 外,还检测到存在间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, *ALK*)^[5]、c-ros 原癌基因1酪氨酸激酶(c-ros oncogene 1 receptor tyrosine kinase, *ROS1*)、*RET* 原癌基因(*RET* proto-oncogene, *RET*)基因融合的情况。

基金项目:广东省科技计划项目应用型专项资金(2015B020233009)

作者单位:1. 广州市达瑞生物技术股份有限公司,广东,广州 510665

2. 南方医科大学检验与生物技术学院,广东,广州 510515

*通讯作者:吴英松, E-mail: wg@smu.edu.cn

目前,主要的治疗方式为手术、化疗、放疗。但是随着对肿瘤发病机制和分子生物学的不断深入研究,针对常见肺癌融合基因的靶向药以特异性高,不良反应轻而逐渐进入人们视野。存在 *ALK*、*ROS1* 融合基因的肺癌患者在临床中使用克唑替尼(*crizotinib*)的疗效显著^[6-8]。此外,以小分子酪氨酸激酶抑制剂为代表的靶向药已逐步应用于临床试验,其中卡博替尼(*cabozantinib*)治疗存在 *RET* 融合阳性的 NSCLC 的实验(NCT01639508)已经进入临床试验Ⅱ期^[9],靶向药的出现推动了 NSCLC 治疗的发展。因此,对肺癌患者融合基因的检测,提高患者的生存率具有十分重要的意义。目前临床上检测非小细胞肺癌患者 *ALK*、*ROS1*、*RET* 融合基因的主要方法有荧光原位杂交、免疫组织化学、逆转录聚合酶链反应以及新兴起的下一代测序,但这4种方法优缺点各异。本文通过比较这几种常见的检测方法,为融合基因检测方法的选择提供参考。

1 *ALK*、*ROS1*、*RET* 基因融合及临床表现特征

ALK 是一种跨膜受体的酪氨酸激酶,属于胰岛素受体家族。*ALK* 主要与棘皮动物微管相关蛋白(*echinoderm microtubule associated protein-like 4*, *EML4*)发生融合,*EML4* 结构中的 N 末端碱基区与肿瘤的形成有关。*EML4-ALK* 融合是因为 2 号染色体短臂发生倒位,导致 *EML4* 的 N-末端融合到胞内 *ALK* 激酶区域^[10]。融合后的 *EML4* 启动子可以驱动 *EML4-ALK* 转录活化表达融合蛋白,*ALK* 活化会导致细胞恶性转化。已发现的融合方式有 10 多种,其中以 V1(*EML4* 的 13 外显子断裂)和 V3 变体(*EML4* 的 6 外显子断裂)最常见^[11],常见融合类型见表 1。*ALK* 阳性 NSCLC 是肺癌的一个特定分子亚型,常见于腺癌中,约占全部 NSCLC 的 5%^[12],多见于年轻、不吸烟或少量吸烟的患者^[13]。临床上多用特异性激酶抑制剂治疗 *EML4-ALK* 融合患者,能显著延长生存期,中国国家食品药品监督管理总局(*China Food and Drug Administration*, *CFDA*)已批准克唑替尼用于治疗 *ALK* 融合基因阳性患者。

ROS1 是一种原癌基因,位于 6 号染色体上,属于胰岛素受体家族的一种跨膜酪氨酸激酶,其细胞外区域由 6 个重复序列组成,与纤维连接蛋白具

有高度同源性,而纤维连接蛋白在细胞黏附中伴有重要作用。在 NSCLC 中 *ROS1* 基因与 *SLC34A2*、*CD74* 发生融合占了 50%^[14],主要是由于 6 号染色体易位造成的,常见融合见表 2。*ROS1* 基因发生重排时丢失细胞外区域,保留跨膜和细胞内酪氨酸激酶区域,主要发生在 *ROS1* 基因的 32~36 外显子。*ROS1* 融合基因在 NSCLC 中发生率约为 1%~2%^[15],和 *ALK* 相似,常见于年轻、不吸烟或少量吸烟的腺癌患者中^[16]。

RET 是一种酪氨酸激酶受体,由半胱氨酸组成的细胞外区、跨膜区、催化酪氨酸激酶作用的细胞内区组成,位于 10 号染色体,DNA 全长为 60 kb,含有 21 个外显子,*RET* 参与细胞增殖、神经传导、细胞迁移和细胞分化。由于 10 号染色体发生臂间倒位^[17],导致和 *KIF5B* 发生基因融合,常见与 *RET* 融合基因见表 3。*KIF5B-RET* 融合蛋白包含马达结构域和 *KIF5B* 的卷曲螺旋结构域,通过卷曲螺旋结构域的二聚化作用,该融合蛋白的 *RET* 酪氨酸激酶活性可异常活化,从而促进肺癌的发生。*KIF5B-RET* 融合基因在 NSCLC 中发生率约为 1%~2%^[17],同样常见于不吸烟的肺腺癌患者中^[18]。临床上常用小分子酪氨酸激酶抑制剂进行治疗,有临床报告显示肺癌中携带 *RET* 融合的患者使用卡博替尼、*vandetanib*(凡德他尼)有一定疗效。

2 检测 *ALK*、*ROS1*、*RET* 基因融合的方法及比较

针对 *ALK*、*ROS1*、*RET* 基因融合的患者,临床常用的检测方法有荧光原位杂交(*fluorescence in situ hybridization*, *FISH*)、免疫组织化学(*immunohistochemistry*, *IHC*)、逆转录聚合酶链反应(*reverse transcription-polymerase chain reaction*, *RT-PCR*)以及新兴起的下一代测序(*next-generation sequencing*, *NGS*)。

2.1 荧光原位杂交(*FISH*)

FISH 的基本原理是将 DNA(或 RNA)探针用特殊的核苷酸分子标记,然后将探针按照碱基互补原则特异性结合待检测的单链核苷酸,从而使探针杂交到染色体或 DNA 纤维切片上,再用与荧光素分子偶联的单克隆抗体与探针分子特异性结合来检测 DNA 序列在染色体或 DNA 纤维切片上的定性、定位、相对定量分析。针对检测基因是否融合,可以通过在断裂位置两端设置不同颜色的

表 1 常见与 ALK 融合的基因及外显子位置

Table 1 Common genes fuse with ALK and the location of the exons

常见与 ALK 融合的基因及外显子位置				
<i>EML4-ALK_V1</i> (E13; A20)	<i>EML4-ALK_V3b</i> (E6b; A20)	<i>EML4-ALK_V5a</i> (E2; A20)	<i>EML4-ALK_V6</i> (E13; ins69A20)	<i>ALK p.C1156Y</i> (c.G4374A)
<i>EML4-ALK_V2</i> (E20; A20)	<i>EML4-ALK_V4</i> (E14; ins11del49A20)	<i>EML4-ALK_V5b</i> (E2; ins117A20)	<i>EML4-ALK_V7</i> (E14; del12A20)	<i>ALK p.L1196M</i> (c.C4493A)
<i>EML4-ALK_V3a</i> (E6a; A20)	<i>EML4-ALK_V4alt</i> (E15del19; del20A20)	<i>EML4-ALK_V5alt</i> (E18; A20)	<i>KIF5B-ALK</i> (K17; A20)	<i>KIF5B-ALK</i> (K24; A20)

表 2 常见与 ROS1 融合的基因及外显子位置

Table 2 Common genes fuse with ROS1 and the location of the exons

常见与 ROS1 融合的基因及外显子位置				
<i>CD74-ROS1</i> (C6-R32)	<i>SDC4-ROS1</i> (S2-R32)	<i>LRIG3-ROS1</i> (L16-R35)	<i>SLC34A2-ROS1</i> (S4-R34)	<i>FIG(GOPC)-ROS1(S)</i> (F3-R36)
<i>CD74-ROS1</i> (C6-R34)	<i>SDC4-ROS1</i> (S4-R32)	<i>TPM3-ROS1</i> (T8-R35)	<i>SLC34A2-ROS1</i> (S13 568bp-R32)	<i>FIG(GOPC)-ROS1(L)</i> (F7-R35)
<i>EZR-ROS1</i> (E10-R34)	<i>SDC4-ROS1</i> (S4-R34)	<i>SLC34A2-ROS1</i> (S4-R32)	<i>SLC34A2-ROS1</i> (S13 568bp-R34)	

表 3 常见与 RET 融合的基因及外显子位置

Table 3 Common genes fuse with RET and the location of the exons

常见与 RET 融合的基因及外显子位置		
<i>KIF5B-RET</i> (K15; R12)	<i>KIF5B-RET</i> (K22; R12)	<i>KIF5B-RET</i> (K24; R11)
<i>KIF5B-RET</i> (K16; R12)	<i>KIF5B-RET</i> (K23; R12)	<i>CCDC6-RET</i> (C1; R12)

探针,在发生断裂融合的细胞中,2种颜色的探针相互分离,而在没有发生断裂融合的细胞则表现为2种颜色相互重叠或靠近。

FISH是目前检测肺癌融合基因的“金标准”,确定适合的抗体快速检测 ALK 表达蛋白是否发生融合是初步筛查 ALK 重排的关键^[19]。目前常见的商品化试剂盒有 Cytocell 的 ROS1 Dual Color Break Apart Probe,德国 ZytoVision 的产品 Zyto-Light® SPEC RET Dual Color Break Apart Probe。经 CFDA 批准的试剂盒有益善生物技术股份有限公司的 ALK 基因重排检测试剂盒。虽然 FISH 专业性强,但在一次实验中不能区分不同类型的融合配体,且无法检测 RNA 编码和内含子异常的情况。在结果方面需资深人员进行判断,有不少患者用 FISH 检测结果为阴性,但在药物治疗方面获

得良好的疗效^[20]。由于 FISH 是在细胞层面上进行病理学的分析,但晚期 NSCLC 患者只能提供极小块的活检组织,这导致难以保证有足够细胞进行阳性结果的判读。

2.2 免疫组织化学(IHC)

免疫组织化学根据抗体和抗原之间的结合具有高度的特异性特征,将已知抗体标上荧光素,以此作为探针检查细胞或组织内的相应抗原,在荧光显微镜下观察。当抗原抗体复合物中的荧光素受激发光的照射后会发出一定波长的荧光,从而可以确定组织中的抗原定位或定量。目前商品化的 ALK IHC 染色的抗体主要有 D5F3、5A4^[21],常规的判断方法如下:肿瘤细胞无任何染色,阴性;肿瘤细胞呈浅棕色,且没有任何背景染色,弱阳性;肿瘤细胞呈棕色,阳性;肿瘤细胞呈深棕色,强

阳性^[22]。经美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准上市的试剂盒 VENTANA ALK (D5F3) CDx Assay 采用了兔单克隆抗体检测 ALK 基因融合。IHC 简便易行,价格比 FISH 便宜,操作方法成熟^[23],因而成为临床诊断常用的筛查方法,推荐条件缺乏的实验室可采用此方法进行小样本活检组织的检测,但由于 IHC 阳性判读标准不统一,不能敏感检测出基因蛋白,此方法的准确性等因素仍在评价中^[19],所以对于阳性的样本必须经过 FISH、RT-PCR 或 NGS 中的至少其中一种方法进行确认。

2.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

逆转录聚合酶链反应是先将 RNA 反转录为 cDNA,然后以 cDNA 为模板扩增合成目的片段,结合荧光标记的方法,在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法,即每循环一次收集一个数据,建立实时扩增曲线,得到 Ct 值,从而确定起始模板的拷贝数。CFDA 已认证厦门艾德生物医药科技有限公司的人类 EML4-ALK 融合基因检测试剂盒,但此试剂盒用荧光 PCR 法只能检测少数几种已知与 ALK 融合的基因类型,这严重影响了 RT-PCR 法在临床上检测的应用。RT-PCR 方法是比 FISH、IHC 更为敏感的一种检测方法^[24],但此方法对组织 RNA 质量要求高,需要足够大的引物组以涵盖所潜在的所有融合基因,而且可能存在大量潜在的基因亚型无法检测^[25]。由于 PCR 可能导致非特异性扩增造成假阴性的结果,建议阳性样本再通过直接测序法进行验证^[26]。

2.4 下一代测序(NGS)

NGS 是一种能对几十万到几百万条 DNA 分子进行大规模平行测序的技术。传统获取生物核苷酸序列的方法主要依靠直接测序法,即 Sanger 测序法,其利用双脱氧核苷酸末端终止法的原理完成了对人类基因组序列的测定,但 Sanger 测序法无法检测移位或基因拷贝数变化等基因突变类型,难以完成没有明确致病基因位点及大样本突变位点的筛查,且存在高成本的问题。随着千元测序人类基因组的提出,催生了以高通量、信息量大、灵敏度高、低成本著称的 NGS 技术^[27]。

NGS 各大平台在通量、测序长度、覆盖度、运行时间和测序原理上各异。目前有 illumina 的 Solexa、ABI 的 Solid 和 Life Technologies 的 Ion Tor-

rent 平台。NGS 技术主要用于 3 大方面:针对疾病的靶向基因测序,全外显子测序和全基因组测序^[28]。NGS 技术主要流程包括患者样本的采集, DNA/RNA 的提取,基于多重 PCR 方法的文库构建,目的片段的扩增及富集,上机测序及数据分析。当 FISH 和 IHC 结果异常时,NGS 更被倾向用于进行最终确认^[29]。随着认识到血液中存在循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA),通过 NGS 进行液体活检^[30],无创筛查成为了热门研究方向,此不仅有利于肿瘤的早期诊断,还可以动态观察肿瘤的发生发展,及时调整治疗方法。目前 ThermoFisher 的产品 oncomine fusion panel 已获得 CE-IVD 认证,同时已商品化的试剂盒有 ArcherDx 的 fusionplex™ ALK、RET、ROS1 V2 panel。这 2 款试剂盒都可同时检测 ALK、ROS1、RET 3 个融合基因。NGS 在检测方面所需 RNA 量少至 10 ng,在一次实验中能靶向获取目的片段进行全部融合基因的分析,且准确度高;在数据分析方面,NGS 通量高,信息获取量大,可以明确各融合基因的配体类型^[31],分析自动化,并可以通过优化算法^[32],减少人为判断错误的情况,但是肿瘤异质性的问题会影响结果的准确性。4 种方法相比之下 NGS 更适合大规模普查 NSCLC 的融合基因。

3 展望

肺癌的发生发展涉及到基因、环境,是一个极其复杂的过程。所幸目前的小分子酪氨酸激酶抑制剂对有 ALK、ROS1、RET 融合基因的 NSCLC 患者存在较好的效果,但是为了更大程度延长患者生存期,分子靶向治疗如何结合手术,化疗,放疗等治疗方法是一个需要临床试验不断验证的过程。在常见驱动突变基因 EGFR、KRAS、BRAF 等野生型的非小细胞肺癌患者中,寻找一种高敏感、高特异性检测 ALK、ROS1、RET 融合基因的方法显得十分必要。NGS 作为一种新兴起的检测技术,可同时对相应突变区域进行高深度测序,利用生物信息学最终确认融合变异类型并不断发现新的融合分子类型,从而可以用于临床在最佳治疗时期选择相应的分子靶向药物,同时规避容易耐受的药物,但相对传统在原位进行检测的方法,NGS 仍需多中心、大规模的临床验证。若研究成果能用于临床检测,这对 NSCLC 患者的早期诊断、治疗及预后具有极其重要的价值。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Zeng H, et al. Epidemiology of lung cancer in China[J]. Thoracic Cancer, 2015, 6(2):209-215.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- [3] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. CA: A Cancer Journal For Clinicians, 2016, 66:7-30.
- [4] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA: A Cancer Journal For Clinicians, 2015, 65:87-108.
- [5] Wong DW, Leung EL, So KK, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS[J]. Cancer, 2009, 115(8):1723-1733.
- [6] Yoshida T, Oya Y, Tanaka K, et al. Differential crizotinib response duration among ALK fusion variants in ALK-positive non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2016. Epub ahead of print.
- [7] Solomon BJ, Cappuzzo F, Felip E, et al. Intracranial efficacy of crizotinib versus chemotherapy in patients with advanced ALK-positive non-small-cell lung cancer: results from PROFILE 1014[J]. J Clin Oncol, 2016, 34(24):2858-2865.
- [8] Ettinger DS, Wood DE, Akerley W, et al. NCCN guidelines insights: non-small cell lung cancer, version 4. 2016[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2016, 14(3):255-264.
- [9] 程菊, 茅矛. 肺腺癌的驱动基因突变及相应的靶向治疗[J]. 中国医药生物技术, 2016, 11(2):151-158.
- [10] 徐凌. 非小细胞肺癌 ALK 融合基因研究现状及进展[C]. 第四届安徽肿瘤内科大会暨第二届苏皖肿瘤内科治疗进展学术会议论文集, 2012, 261-266.
- [11] Sakai K, Okamoto I, Takezawa K, et al. A novel mass spectrometry-based assay for diagnosis of EML4-ALK-positive non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(5):913-918.
- [12] Li C, Fang R, Sun Y, et al. Spectrum of oncogenic driver mutations in lung adenocarcinomas from East Asian never smokers[J]. Plos One, 2011, 6(11):e28204.
- [13] 杨衿记, 张绪超, 江本元, 等. EML4-ALK 融合基因为靶点的晚期 NSCLC 个体化治疗研究进展[J]. 癌症进展, 2010, 8(6):538-545.
- [14] Bubendorf L, Büttner R, Al-Dayel F, et al. Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations[J]. Virchows Arch, 2016. Epub ahead of print.
- [15] Lira ME, Choi YL, Lim SM, et al. A single-tube multiplexed assay for detecting ALK, ROS1, and RET fusions in lung cancer[J]. J Mol Diagn, 2014, 16(2):229-243.
- [16] Kim HR, Lim SM, Kim HJ, et al. The frequency and impact of ROS1 rearrangement on clinical outcomes in never smokers with lung adenocarcinoma[J]. Ann Oncol, 2013, 24(9):2364-2370.
- [17] 方震. 非小细胞肺癌中 RET 融合基因的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2015, 35(2):284-288.
- [18] 乔洪源, 欧阳学农, 余宗阳, 等. KIF5B-RET 融合基因在非小细胞肺癌中的研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2013, 19(10):750-753.
- [19] National Comprehensive Cancer Network. Non-small lung cancer (Version 7.2015) [EB/OL]. http://www.nccnchina.org/files/NSCLC_7.2015_active_122214_ZH_FULL_V2.pdf, 2015-02-06/2016-09-20.
- [20] Sun JM, Choi YL, Won JK, et al. A dramatic response to crizotinib in a non-small-cell lung cancer patient with IHC-positive and FISH-negative ALK[J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(12):e36-38.
- [21] Ma H, Yao WX, Huang L, et al. Efficacy of D5F3 IHC for detecting ALK gene rearrangement in NSCLC patients: a systematic review and meta-analysis[J]. Oncotarget, 2016. Epub ahead of print.
- [22] 《常规免疫组织化学初筛 ALK 阳性非小细胞肺癌专家共识》专家组. 常规免疫组织化学初筛 ALK 阳性非小细胞肺癌专家共识[J]. 中华病理学杂志, 2015, 4(7):476-479.
- [23] Mino-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(5):1561-1571.
- [24] Cristina T, Niki K, Vicente P, 等. IHC、FISH 和 RT-PCR 检测对 EML4-ALK 重排的一致性[J]. 临床与病理杂志, 2015, 35(2):189-193.
- [25] 钟山, 张海萍, 白冬雨, 等. 非小细胞肺癌组织中 ALK、ROS1 和 RET 融合基因的表达及其临床意义[J]. 中华病理学杂志, 2015, 44(9):639-643.
- [26] 张绪超, 陆舜, 张力, 等. 中国间变性淋巴瘤激酶 (ALK) 阳性非小细胞肺癌诊断专家共识 (2013 版)

- [J]. 中华病理学杂志, 2013, 42(6):402-406.
- [27] Goodwin S, mcPherson JD, mcCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies[J]. Nature Reviews Genetics, 2016, 17(6): 333-351.
- [28] 姜烈君, 陆晓旭, 黄华艺. 下一代测序技术的临床应用规范化问题——参考美国医学遗传学与基因组学会行业标准[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 8(4):217-221.
- [29] Pekar-Zlotin M, Hirsch FR, Soussan-Gutman L, et al. Fluorescence in situ hybridization, immunohistochemistry, and next-generation sequencing for detection of EML4-ALK rearrangement in lung cancer[J]. Oncologist, 2015, 20(3):316-322.
- [30] Thompson JC, Yee SS, Troxel AB, et al. Detection of therapeutically targetable driver and resistance mutations in lung cancer patients by next generation sequencing of cell-free circulating tumor DNA[J]. Clin Cancer Res, 2016. Epub ahead of print.
- [31] Marchetti A, Pace MV, di Lorito A, et al. Validation of a new algorithm for a quick and easy RT-PCR-based ALK test in a large series of lung adenocarcinomas: Comparison with FISH, immunohistochemistry and next generation sequencing assays[J]. Lung Cancer, 2016, 99:11-16.
- [32] Bianchi V, Ceol A, Ogier AG, et al. Integrated systems for NGS data management and analysis: open issues and available solutions[J]. Front Genet, 2016, 7:75.

(上接第400页)

- [6] 郭柳薇. 地中海贫血基因检测的研究进展[J]. 医学综述, 2006, 12(24):1478-1480.
- [7] 张春丽, 张宁. 1665例2~14岁儿童地中海贫血筛查分析[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(5):706-707.
- [8] 郭柳薇. 分子生物学检测在 α -地中海贫血中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(4):281-285.
- [9] 徐湘民, 张新华, 陈荔丽. 地中海贫血预防控制操作指南[M]. 北京:人民军医出版社, 2011, 3(1):20.
- [10] Xu XM, Zhou YQ, Luo GX, et al. The prevalence and spectrum of alpha and beta thalassaemia in Guangdong Province: implications for the future health burden and population screening [J]. J Clin Pathol, 2004, 57(5): 517-522.
- [11] 唐娟, 张崇林, 蒋群芳. β -地中海贫血基因诊断技术进展及无创产前诊断的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(12):5-6.
- [12] 陆雪梅. 4830例地中海贫血基因突变类型、人群分布及产前基因诊断结果分析[D]. 广西:广西医科大学, 2012.
- [13] 黄金芬. 地中海贫血的产前诊断研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(12):123-125.
- [14] 代宏剑, 温柏平. 地中海贫血的实验室诊断进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2):251-252.
- [15] 黄王莹. β -地中海贫血基因诊断及临床应用[J]. 现代预防医学, 2015, 42(17):3258-3260.

p53 基因突变检测方法的演进和趋势

张艳霞¹ 杨学习^{2*}

[摘 要] *p53* 基因是肿瘤蛋白 P53(tumor protein p53)的编码基因,在维持基因组稳定、调控细胞周期和凋亡及抑制肿瘤血管生成中发挥着重要的作用。*p53* 基因突变信息在肿瘤分子筛查诊断、预防、药物疗法选择等方面具有重要的参考价值。本文分析了 *p53* 基因与 P53 蛋白突变检测的重要性、突变检测方法的发展概况,如传统的 DNA 测序、限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、单链构象多态性(single-stranded conformation polymorphism, SSCP)等 8 类实验室常规基因突变检测策略及酵母中分离的等位基因功能分析技术(separation of gene function analysis in yeast, FASAY),近年来新兴的技术包括生物传感器、芯片、高分辨率溶解曲线(high resolution melting, HRM),及下一代测序技术,以期较为全面地展示现今 *p53* 及 P53 突变检测的整体情况,为 *p53* 或其他基因突变研究者选择突变检测方法提供参考。

[关键词] *p53* 基因; 突变检测; 下一代测序

Evolution and trends of the detection methods for *p53* gene mutation

ZHANG Yanxia¹, YANG Xuexi^{2*}

(1. Guangzhou Darui Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510665; 2. School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] *p53* gene is the tumor protein P53-coding-gene. Tumor protein P53 plays important roles in keeping genomic stability, regulating and controlling cell cycle and cell apoptosis as well as suppressing angiogenesis of tumors. *p53* gene mutation information can provide great reference value for molecular screening or diagnosis, prognosis of tumors and optimal choices in drugs or treatments, etc. By analyzing or introducing *p53* gene and protein P53 and the importance of their mutation detection, development status of methods for their mutation detection, such as 8 categories of traditional and conventional laboratory methods including DNA sequencing, restriction fragment length polymorphism (RFLP), single-stranded conformation polymorphism (SSCP) and separation of gene function analysis in yeast (FASAY), and emerging technologies including bio-sensor chip, high resolution melting (HRM) and the next generation sequencing technology. This review may help readers quickly learn the overall situation of mutation detection of *p53* and P53 and provide investigators with useful reference on the *p53* and other gene mutation detection methods.

[KEY WORDS] *p53* gene; Mutation detection; Next generation sequencing

1993 年, P53 被《科学》(science)杂志选为“年度分子”,具有“基因组卫士”的称号。作为一重要的转录因子, P53 蛋白具有发现并暂停带有损伤 DNA 的细胞分裂、修复损伤 DNA 或激活损伤细胞

的凋亡途径、调控细胞的正常分裂和分化、防止肿瘤发生的功能。然而,研究表明其突变几乎在所有肿瘤中是最高的,超过 50% 的恶性肿瘤存在 *p53* 突变^[1]。*p53* 基因(*p53* gene)的高突变率,提示其

基金项目:南方医科大学课外科学术活动(2009kw109)

作者单位:1. 广州市达瑞生物技术股份有限公司,广东,广州 510665

2. 南方医科大学检验与生物技术学院,广东,广州 510515

*通讯作者:杨学习, E-mail: yxxzb@sohu.com

在肿瘤的发生发展中发挥着关键性的作用,*p53*与P53的突变检测具有重要的临床和科研意义。本文通过文献概述了*p53*基因与P53蛋白突变检测的重要性,并指出它在早期的肿瘤易感性评估及预防、癌症早期诊断、耐药机制及治疗方法的优化、预后判断等方面起重要作用,是肿瘤精准医疗中不可忽视的参考基因之一。其次,重点对*p53*突变检测相关方法的发展历史和趋势进行阐述,并从传统方法、生物传感器等新兴热点技术及下一代测序3个角度简要介绍,特别是下一代测序的发展及其在*p53*基因突变研究中的现状,帮助相关研究者了解*p53*与P53突变检测方法的整体情况,快速选择合适的检测方法。

1 *p53*基因及其突变检测的重要性

*p53*基因,编码P53蛋白,自发现以来一直是肿瘤分子生物学领域最为热门的基因之一。起初,由于癌症病人体内*p53*基因经常发生突变导致其蛋白功能改变,P53蛋白被视为癌蛋白。随后十多年的研究,使科学家们认识到P53实际为抑癌蛋白^[2]。人类*p53*基因位于染色体17p13.区,全长约20 Kb,由11个外显子和10个内含子组成,因编码一种分子质量为53 KDa的蛋白质而得名^[3]。P53蛋白单体全长393个氨基酸残基,至少包括3个功能:N端功能域、DNA结合域(DNA binding domain, DBD)及C端功能域。不同物种之间,DNA结合域的氨基酸序列是进化的保守序列,其编码区为5~8外显子,能与特定的DNA序列结合,既是*p53*基因突变多发区域,也是P53蛋白肿瘤抑制功能的关键区域。因而大多数*p53*突变的研究均集中于5~9号外显子。*p53*的DBD区每个氨基酸都可能发生点突变,但研究报道,R175、G245、R248、R249、R273、R282 6个位点的突变在癌症中高频率出现,且与癌症的发生发展紧密关联,被称为“热点突变”^[4-5]。

*p53*基因突变的类型繁多,主要包括基因片段的缺失、插入缺陷,点突变引起的错义突变,及杂合性缺失。由点突变引起的错义突变比例占总体的80%^[4]。不同的肿瘤中*p53*的突变频率、位点和形式各具特色,其突变的种类、位置和性质主要取决于组织来源和致癌物的性质。目前科学界对于*p53*基因的研究主要关注其在癌症发生和发展方向、癌症之间的分子联结及癌症临床治疗中的预测价值。30多年来,分子生物学的发展提高了*p53*

基因检测的技术水平,特别是高通量测序技术的兴起,使*p53*基因突变检测再次受到行业的关注。*p53*的检测特别是核酸层面上的分析,可以在早期的肿瘤易感性评估^[6]及预防^[7]、癌症早期诊断^[8]、耐药机制及治疗方法的优化^[9-10]、预后判断^[11-14]等方面发挥出更加显著的作用,也是肿瘤精准医疗中不可忽视的参考基因之一。

2 *p53*基因突变检测方法发展概况

用于*p53*突变检测的方法日新月异,本文按技术原理及时间先后综合分类,从传统方法,近年来新兴的技术包括生物传感器、芯片、高分辨率溶解曲线(high resolution melting, HRM),及高通量测序共3大角度进行阐述。

2.1 传统的检测方法

传统的检测方法按原理不同归类,有DNA测序、基于酶的限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)连锁分析技术及其相关改良技术、单链构象多态性(single-stranded conformation polymorphism, SSCP)、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, DHPLC)、变性梯度凝胶电泳法(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、变性梯度毛细管电泳法(degeneration gradient capillary electrophoresis, CDGE)、连接酶链反应(ligase chain reaction, LCR)、免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)等8类实验室常规基因突变检测策略及酵母中分离的等位基因功能分析技术(separation of gene function analysis in yeast, FASAY)^[15]。

前期对几大癌症相关*p53*突变位点的文献研究发现,不管是对*p53*突变位点或单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)的筛查、微卫星多态性位点及其分型分析、杂合性丢失等核酸分析,还是对突变P53蛋白的定性和定量研究,大都使用了上述方法^[16-20]。DNA测序是*p53*突变检测中最受信赖的检测方法,能直接准确地检出序列中的突变位点及类型;但不适合大规模临床样本的分子诊断。DHPLC、RFLP、SSCP、DGGE不能直接检出序列中未知突变的准确位点和类型,但能检出其发生的区域信息,缩减对大量样本*p53*基因序列分析的工作量,在*p53*已知突变检测及未知突变的鉴定研究中占主导地位。免疫组织化学法可直接、快速、廉价、灵敏地检测出*p53*基因的失

活,但变性 P53 的特异性抗体难得,受个体评价标准、存储条件和特殊抗体等的影响容易出现假阴性^[20],灵敏度不如基因测序。如 Takami 等^[21]在研究弥漫型胶质瘤中 *p53* 基因突变和免疫组化的关

系时指出 P53 免疫组化是中度敏感和高度特异的 *p53* 基因突变的提示性标记。各传统方法在 *p53* 和 P53 蛋白突变检测中的典例、突变类别、优缺点如表 1。

表 1 传统 *p53* 突变检测方法简介表
Table 1 Overview of traditional *p53* mutation detection methods

方法名称	<i>p53</i> 突变类别	优缺点
DNA 测序 ^[21]	突变筛选	精确;耗时,成本高
DHPLC ^[23]	单碱基置换、插入或缺失的 异源双链片段 ^[24]	简单快速、自动化进样,灵敏度高,特异性强; 不能直接检出纯合突变,对 PCR 要求高
RFLP ^[16,25]	已知点突变,插入,缺失	特异性高,能确定突变的部位和性质,重复性好, 灵敏度高;过程繁杂,耗时
SSCP ^[26]	点突变、基因分型	简单, <i>p53</i> 基因突变检测中最常用,适合大样本; 受片段长度的限制,存在假阳性,不能检出确切位点
DGGE ^[27]	点突变	简单,可检测片段长达 1kb,适用于大样本检测筛选; 检出率受突变发生位置影响
CDGE ^[28]	点突变	样品少,自动化,发展前景好;不稳定
LCR ^[29]	单个碱基点突变	快速、特异、灵敏,被用于分子诊断
IHC ^[20,21]	蛋白质分子	定性和定量研究,特异性低, 无法直接检测肿瘤中基因突变的状态
FASAY ^[22]	RNA 水平	<i>p53</i> 突变基因蛋白功能的研究,可区分纯合子和杂合子

2.2 生物传感器、生物芯片、高分辨率溶解曲线技术

生物传感器、生物芯片、高分辨率溶解曲线技术都是近年来的热点技术。生物传感器便宜、一次性、微型化、便携化,适用于大量临床样本 *p53* 突变检测^[18,29]。基因芯片比 Southern Blot 等传统探针技术简单、通量高、集成化、应用性强,相比直接测序,突变点的检测数目更多、速度更快、准确性更高。如 Affymetrix 公司的 *p53* 基因芯片,适用于肿瘤的早期诊断和易感性判断。高分辨率溶解曲线分析技术是在实时荧光 PCR 的基础上发展而来的,闭管操作,低污染,准确率高、通量高、经济、简单方便,且不受 DNA 突变位置或类型影响,后期数据分析处理方法简单易懂,适用于基因分型、短片段重复序列分析、序列匹配、突变扫描、RNA 编辑及甲基化扫描等研究^[30-31]。然而,基因芯片灵敏度低、探针不稳定、仪器成本高,HRM 的灵敏度、精确度及系统的稳定性也有待提高。

2.3 下一代测序的发展及其在 *p53* 基因突变研究中的概况

下一代测序(next-generation sequencing, NGS) 又称高通量测序(high-throughput sequencing)或大规模平行测序(massively parallel signature sequencing, MPSS),是比基因芯片更高通量、更低成本的研究方法。自 2005 年 Roche 公司推出的第一台高通量测序仪来,市场上主要有 3 大成熟的高通量平台即 Roche 公司的 GS FLX 测序系统, Illumina 公司的 Solexa 基因组分析仪和 ABI 公司的 SOLiD 测序仪。早期,3 类平台存在通量太大、实验周期长、成本高的问题,常应用于重大项目的大规模测序或基础研究领域,不适应医疗领域的临床诊断、分子诊断。为满足中小实验室研究及医院检测的需求,3 大公司相继推出了低成本、低通量的测序平台,如 Life Tech 的 Ion Torrent(Personal Genome Machine、Proton)、Illumina 的 Miseq 及 Roche 的 GS Junior^[32]。Ion Torrent 平台将半导体芯片技术

与化学反应独特地结合起来,利用检测DNA合成时释放的氢离子造成电位差(pH改变)的原理进行测序,能直接将序列信息转变成电信号,避免了原3大高通量平台所需的复杂精密的光学拍照系统,还有多种测序长度及芯片的通量大小可供选择。具有快速、准确、灵活、成本低、操作简单等优势。Miseq是Illumina的个人型测序系统,在单个仪器上整合了扩增、测序及数据分析的功能,并配备专门的样本制备试剂盒,大大缩减了人工操作和仪器运行的时间;还具有强大的数据处理功能,可使用其内置软件进行拼接、比对等基本分析,也能借助在线BaseSpace系统,利用其中专业的大型数据分析软件,很大程度地解决了中小型客户在数据分析和存储等方面的困难。GS Junior也是精巧型测序仪,具有长读长的独特优势,适应医院及中小实验室对特定基因进行长片段测序。此外,更多的中等通量的测序平台正被研发出来。

下一代测序能检出肿瘤基因组内基因的点突变、碱基替换、拷贝数改变和插入与缺失等,研究者们纷纷将其用于肿瘤全基因组、转录组、全外显子组等研究。但前期对国内外p53突变位点与癌症相关性的文献研究过程中发现,目前国内单独使用下一代测序检测p53的案例相对稀少,但个别案例使用全外显子捕获测序法筛查了肝癌^[33]和肺癌^[34]突变位点,并以Sanger法或质谱法进行检验,指出下一代测序技术在体细胞突变位点鉴定或筛查中具有可行性。不同的是国外已经有大量p53突变相关研究使用了通量测序,并与一代测序、FASAY、核酸质谱^[35]及免疫组化等传统技术做了对比实验。由于肿瘤细胞异质性等原因,不同的案例对于下一代测序在p53突变检测中的效果说法不一。

总体而言,基于个体的异质性,单独检测p53基因突变的参考价值是有限的,在肿瘤或其他疾病与基因的相关性研究中,多数情况下同时检测其他相关的参考基因和位点所得的综合信息更有意义。虽然下一代测序的特异性和灵敏度还有待提高,但其在突变比例高的已知样本检出率较高,较其它方法通量高、快速、经济,有望成为精准医疗时代中检测p53等基因突变的得力手段。

3 总结和展望

p53突变类别多、位点多,已有的检测方法各有优缺,至今尚未出现一种能独立取代所有p53突

变研究的方法。p53突变检测方法朝高灵敏度、高精度、实时、快速、经济、自动化、突变类型集成化的趋势发展。因此,实际中应结合具体研究目的、p53的突变类型和客观条件,合理、综合其中一种或多种方法以快速准确地检出p53突变。下一代测序具有高效、所需DNA量少、可同步分析多个基因、多种突变类别的独特优势,且随着组织微切割、靶向捕获和肿瘤细胞捕获技术、等温扩增PCR等精准技术的出现,其费用高、周期长、错误率高、读长短等问题的逐步得到解决,已经成为精准医疗时代中最引人注目、最得力的分子诊断技术。

参考文献

- [1] Olivier M, Eeles R, Hollstein M, et al. The IARC P53 database: new online mutation analysis and recommendations to users [J]. Human mutation, 2002, 19 (6):607-614.
- [2] Ben DY, Prideaux VR, Chow V, et al. Inactivation of the p53 oncogene by internal deletion or retroviral integration in erythroleukemic cell lines induced by Friend leukemia virus [J]. Oncogene, 1988, 3 (2): 179-185.
- [3] Miller C, Mohandas T, Wolf D, et al. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17 [J]. Nature, 1986, 319(6056):783-784.
- [4] 李大虎, 张令强, 贺福初. 突变体 p53 研究进展 [J]. 遗传, 2008, 30(6):697-703.
- [5] Muller PA, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities [J]. Cancer cell, 2014, 25(3):304-317.
- [6] Wu D, Zhang Z, Chu H, et al. Intron 3 sixteen base pairs duplication polymorphism of p53 contributes to breast cancer susceptibility: evidence from meta-analysis [J]. Plos One, 2013, 8(4):e61662.
- [7] Bhowmik A, Das S, Bhattacharjee A, et al. MDM2 and P53 Polymorphisms as Predictive Markers for Head and Neck Cancer in Northeast Indian Population: Effect of Gene-Gene and Gene-Environment Interactions [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16 (14):5767-5772.
- [8] 李琪, 肖贵华, 程长浩, 等. 非小细胞肺癌 BALF 中 RAR-β 基因甲基化与 p53 突变检测及相关性研究 [J]. 重庆医学, 2015, 44(23):3206-3209.
- [9] Elhag R, Mazzio EA, Soliman KF. The effect of silibinin in enhancing toxicity of temozolomide and etoposide in p53 and PTEN - mutated resistant glioma cell

- lines[J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(3):1263-1269.
- [10] 代晓丽, 刘静, 罗瑛, 等. 靶向作用 p53 药物的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(7):912-916.
- [11] Malcikova J, Pavlova S, Kozubik KS, et al. P53 mutation analysis in clinical practice: lessons from chronic lymphocytic leukemia[J]. *Human mutation*, 2014, 35(6):663-671.
- [12] Uji K, Naoi Y, Kagara N, et al. Significance of P53 mutations determined by next-generation "deep" sequencing in prognosis of estrogen receptor-positive breast cancer[J]. *Cancer letters*, 2014, 342(1):19-26.
- [13] Bally C, Adès L, Renneville A, et al. Prognostic value of P53 gene mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia treated with azacitidine[J]. *Leuk Res*, 2014, 38(7):751-755.
- [14] Morikawa T, Kuchiba A, Liao X, et al. Tumor P53 expression status, body mass index and prognosis in colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(5):1169-1178.
- [15] 江铁山. 几个与癌症相关基因 (AP-2 β , P53, NOD2) 的研究[D]. 长沙:湖南师范大学, 2005.
- [16] 铁剑, 解云涛, 徐晔, 等. p53 基因 codon 72 多态性与乳腺癌术后放疗疗效相关性分析[J]. *中国肿瘤临床*, 2015, 42(3):152-156.
- [17] 张海勇, 危晓莉, 王玲玲, 等. 结直肠腺癌中神经内分泌细胞微卫星改变和 p53 基因突变的检测[J]. *中华病理学杂志*, 2013, 42(1):10-14.
- [18] Altintas Z, Tothill I. Biomarkers and biosensors for the early diagnosis of lung cancer[J]. *Sensors & Actuators B Chemical*, 2013, 188(188):988-998.
- [19] 张萌. 毛细管电泳在癌症诊断中的应用研究[J]. *职业技术*, 2015, 14(12):88-89.
- [20] Watanabe G, Ishida T, Furuta A, et al. Combined immunohistochemistry of PLK1, p21, and p53 for predicting TP53 status: an independent prognostic factor of breast cancer[J]. *Am J Surg Pathol*, 2015, 39(8):1026-1034.
- [21] Takami H, Yoshida A, Fukushima S, et al. Revisiting P53 mutations and immunohistochemistry—a comparative study in 157 diffuse gliomas[J]. *Brain Pathol*, 2015, 25(3):256-265.
- [22] Malcikova J, Stano-Kozubik K, Tichy B, et al. Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Leukemia*, 2015, 29(4):877-885.
- [23] Kim HW, Lee HM, Hwang SH, et al. Patterns and biologic features of p53 mutation types in Korean breast cancer patients[J]. *J Breast Cancer*, 2014, 17(1):1-7.
- [24] 杜明, 丰有吉. DHPLC 和 DDF 检测散发性卵巢癌 p53 基因突变的应用[J]. *中国临床医学*, 2006, 13(1):108-111.
- [25] 金明娟, 张勇晶, 张爽爽, 等. P53 基因多态性与结直肠癌易感性的关联研究[C]//全国肿瘤流行病学肿瘤病因学学术会议论文集, 2007.
- [26] 俞星, 金昱. 延边地区 P53 基因-72 密码子多态性与宫颈癌预后的相关性[J]. *延边大学医学学报*, 2015(4):252-254.
- [27] Sørli T, Johnsen H, Vu P, et al. Mutation screening of the TP53 gene by temporal temperature gel electrophoresis (TTGE) [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1105:315-324.
- [28] Lian DS, Zhao SJ. Capillary electrophoresis based on the nucleic acid detection in the application of cancer diagnosis and therapy [J]. *Analyst*, 2014, 139(14):3492-3506.
- [29] Sun Y, Lu X, Su F, et al. Real-time fluorescence ligase chain reaction for sensitive detection of single nucleotide polymorphism based on fluorescence resonance energy transfer[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 74:705-710.
- [30] 陈斌, 雷秀霞, 周小棉. 高分辨率熔解曲线技术及其在分子诊断中的应用进展[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2009, 1(2):120-124.
- [31] Ihle MA, Fassunke J, König K, et al. Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p. V600E and non-p. V600E BRAF mutations[J]. *BMC cancer*, 2014, 14(1):1.
- [32] 李明辉, 杨振兴, 侯睿, 等. 下一代测序技术在临床检测中的应用[J]. *生物产业技术*, 2013, 6:18.
- [33] 代继红. 原发性肝癌基因突变谱的鉴定及分化相关基因表达特征的分析[D]. 上海:华东理工大学, 2013.
- [34] 胡桂林. 肺癌组织内不同肿瘤细胞群体异质性与基因组变异[D]. 北京:中国科学院北京基因组研究所, 2012.
- [35] Quinn AM, Hickson N, Adaway M, et al. Diagnostic mutation profiling and validation of non-small-cell lung cancer small biopsy samples using a high throughput platform[J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(5):784-792.

2016年第8卷中文总目录

述 评

- GPC3 在肝癌诊治中的价值及存在问题 谢春梅 徐伟文(1)
- 我国葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症的分布特征和基因突变 林芬 杨辉 杨立业(73)
- EB 病毒感染的核酸检测:标本类型的选择 郭建巍(145)
- 下一代测序技术的临床应用规范化问题
- 参考美国医学遗传学与基因组学会行业标准 姜烈君 陆晓旭 黄华艺(217)
- 下一代测序(NGS)技术的发展及在肿瘤研究的应用 邵向阳 徐伟文(289)
- 下一代测序技术在遗传病临床检测中的应用 杨学习(357)

论 著

- 血清 GPC3 在中国人群和国外人群诊断原发性肝癌的价值:一项基于 meta 分析的比较研究 银一臻 徐伟文(7)
- 4R22 修饰的紫杉醇脂质体对肺癌细胞多药耐药的逆转作用 周毅 王赫 朱丽娜(17)
- 29 例男性乳腺癌临床分析 韩娜 王晓稼(23)
- 采用 ERIC-PCR 与 PFGE 分析鲍曼不动杆菌基因型和同源性并对比方法学差异 闻海丰 冯忠军 秦瑾 等(27)
- 乌海市 3 918 例女性 HPV 基因分型结果的分析 武燕红 吕伟 郑海燕 等(32)
- 三种实验室检测方法在儿童传染性单核细胞增多症的诊断应用 邓坤仪 彭建明 范汉恭 等(37)
- 米非司酮治疗围绝经期功能失调性子宫出血的临床疗效观察 王静(42)
- 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)c.1311C>T/IVS-1193T>C 与 3'-UTR 的多态性探讨 林芬 杨辉 吴教仁 等(78)
- 应用微阵列比较基因组杂交技术检测乳腺癌患者共有拷贝数变异的初步研究 周慧 何丹 杨学习 等(82)
- 高效 hCu, Zn-SOD-PTD 融合蛋白的表达及其穿膜功能的研究 王晓勋 纪少华 李瑞明 等(88)
- 广西壮族儿童肥胖与黑素皮质素受体基因 rs17782313 位点多态性的关系 唐宁 陈艺丹 曾婷 等(94)
- 2 638 例细胞 DNA 定量分析法筛查宫颈癌的意义 刘国生 王晓亮 郑建琼 等(99)
- Hsa-miR-21 的生物学信息分析 陈晓华 曹小龙 黎秀月 等(104)
- 靶向 *c-myc* 基因的 siRNA 基因干扰对大肠癌 Lovo 细胞增殖与凋亡的影响 刘集鸿 蒋楠楠 张丽科(109)
- 细胞蜡块宫颈液基细胞 P16 在检测宫颈肿瘤中的作用 刘镜文 陈莉 吴秋良(114)
- 胰腺浆液性微囊性腺瘤临床诊治观察 原玉芬 张新莲 张静芳(119)
- 一例 I 型神经纤维瘤病患者的 *NF1* 突变检测及家系分析 过丹丹 卢鑫鑫 黄肖利 等(150)
- UCP2* 基因 rs660339 多态性与壮族儿童青少年单纯性肥胖的相关性分析 李伍高 李哲涛 黄际卫 等(155)
- miR-196a2 基因多态性在广西人群中的分布 罗宏成 温旺荣 李珉珉 等(160)
- 2014 年广州新塘地区手足口病病原体基因检测结果分析 杨勇 孙伟 李峥嵘 等(165)
- B 族溶血性链球菌(GBS)感染对妊娠结局的影响 赵小娅 谢月英 周旭丽 等(170)
- 促排卵药雷洛昔芬对小鼠着床窗期子宫内膜 COX-2 和 LPAR3 表达的影响 沈英杰 陈彩蓉 周秀琴 等(174)
- NT-proBNP 在小儿病毒性心肌炎诊断和心功能评估中的应用 李舟文(178)
- 心脏型脂肪酸结合蛋白和 D-二聚体及高敏肌钙蛋白 T 在急性冠状动脉综合征早期诊断中的应用
- 皮红泉 李德华 卢盛祥 等(182)
- Treg 细胞和 IL-12 在肺结核合并老年慢性支气管炎患者外周血中的表达及意义
- 肖天津 张乐平 古中东 等(188)
- 某国产 NAT 试剂盒应用于血液筛查的评价与应用 陈志忠 李结敏 廖扬勋 等(192)
- 法医学常用 15 个 STR 基因座的突变分析 邱平明 陈玲 余嘉欣 等(222)

- 中国型 $\alpha\gamma^*(\alpha\gamma\delta\beta)^0$ 地中海贫血的基因诊断和临床特征分析····· 王继成 秦丹卿 骆明勇 等(227)
- 一种快速甄别总肠道病毒的基因分型方法····· 欧志英 吴韶清 尹应先 等(231)
- 中国广东地区汉族人群 P 选择素糖蛋白配体-1 *Met62Ile* 基因多态性与冠心病的相关性探讨
····· 明凯华 雷秀霞 邹愉 等(237)
- 地中海贫血实验室筛查指标评价····· 陈熙 肖克林 罗茗月 等(242)
- 耐碳青霉烯类抗生素肺炎克雷伯菌耐药基因检测及分析····· 涂海健 陈淑娟 林群英 等(246)
- ZEB1 在散发性伯基特淋巴瘤中的表达及意义····· 张守华 黄慧 徐红艳 等(252)
- Ⅱ型登革病毒非结构蛋白 1 多克隆抗体制备和免疫特征分析····· 杨小猛 赵丹 杜丽伟 等(256)
- 2006-2015 年东莞市无偿献血者丙肝病毒感染情况分析····· 钟炽辉 张玉翌 黄志森 等(261)
- 广东地区育龄妇女人细小病毒 B19 感染筛查结果分析····· 何天文 黄滨梅 王逾男 等(265)
- 酒精对肝脏蛋白酶体成熟的影响····· 张莉 阎明 江堤 等(268)
- 游离金雀异黄素和大豆苷元大鼠尿液排泄动力学研究····· 邹慧琴 刘亚兰 余梦杰(272)
- 运用全外显子组测序技术诊断非综合征性耳聋基因变异····· 刘维强 张慧敏 余国就 等(297)
- 广西玉林特殊教育学校耳聋相关基因突变分析····· 李伍高 严提珍 唐宁 等(303)
- 非特殊型浸润性乳腺癌 *HER-2* 检测方法的对比研究····· 成玉霞 赫淑倩 董贺 等(308)
- 沉默 *Kin17* 表达抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖····· 孙振亚 梁琳 何洁婷 等(316)
- 云南昆明地区非小细胞肺癌 *EGFR* 突变情况研究····· 苏国苗 杨哲 边莉 等(321)
- 河池地区乙型肝炎病毒基因型分布的相关性研究····· 唐毓凡 韦桂宁(325)
- 玉林 437 例高危型人乳头瘤病毒感染与宫颈上皮内瘤变的分析····· 李继慧 黎华辉(328)
- 11 530 例佛山市妊娠晚期妇女 B 族链球菌感染情况的回顾性分析····· 庄锡伟 孟霞 杨康 等(332)
- 地中海贫血产前遗传筛查流程简化的风险评估····· 肖奇志 李恋湘 谢建红 等(336)
- 维生素 D 缺乏影响受孕及胚胎发育的小鼠动物模型研究····· 王波 王雪云(341)
- 11 339 例孕妇无创产前检测结果对比分析····· 王元丽 唐明珠 杨学习(363)
- 应用下一代测序技术对 α 地中海贫血进行胚胎植入前遗传学检测····· 谢美娟 邓权衡 邓红辉 等(367)
- 基于高通量测序技术无创筛查双胎染色体非整倍体及胎儿游离 DNA 浓度分析
····· 许旭平 谢美娟 甘海燕 等(375)
- 下一代测序法对新生儿进行苯丙酮尿症致病突变的筛查····· 王辉芳 叶倩平 杨旭 等(380)
- 微阵列比较基因组杂交技术与二代基因测序检测拷贝数变异的对比····· 陈新周 王明珠 何丹 等(385)
- 运用半导体测序法检测 4 种遗传病常见突变····· 王辉芳 梁志坤 叶倩平 等(389)
- 采用 Amplicon 文库构建法对地中海贫血的基因检测····· 孙玉婷 范冬梅 叶倩平 等(395)
- 基于下一代测序平台的结直肠癌 *KRAS* 基因检测····· 李丽娟 罗婉珊 张家彬 等(401)
- 广东地区 200 例正常人耳聋基因突变数据库的建立····· 邹俊 杨琳艳 罗俊明 等(407)

综 述

- 单基因遗传病基因诊断技术研究进展····· 郭奕斌 梁宇静 郭东炜(46)
- CD-DST 技术:为肿瘤细胞量“身”定药····· 徐伟 李文迪 邓天颖 等(54)
- 单细胞转录组测序的方法原理及应用····· 朱翔 浦春 武其文(61)
- 低密度粒细胞在自身免疫性疾病中的病理生理作用····· 周丽彬 周剑涛 丁海峰(66)
- 口腔鳞状细胞癌肿瘤标记物的研究····· 邵婷如 赵萌 吕晓智(123)
- Toll 样受体 4 与结直肠癌的相关性····· 赵祥梅 戴盛明(130)
- 遗传性结直肠癌基因检测及其在临床上的应用规范化问题····· 姜烈君 陆晓旭 黄华艺(135)
- 胞外信号调节激酶促进 DNA 损伤反应的作用机制····· 魏凤香 张蕾 王绍娟(196)
- Gilbert 综合征及 Crigler-Najjar 综合征诊断方法····· 刘雪梅 骆子义(201)
- 强直性脊柱炎及其相关基因 *HLA-B27* 检测的研究现状····· 白世杰 托娅 张保平 等(206)

登革病毒治疗性抗体的基础研究进展	尹庆庆 王建宇 陈强 等(277)
HBV 核苷(酸)类似物耐药突变及其检测技术的临床应用	巢薇 何宝玉(346)
克雅病的分子诊断	罗生辉 蔡继勇(352)
新型肿瘤标志物人附睾蛋白4的临床应用	王雅菲 王丽娟 托娅(356)
人类癌症特异敏感标志物:循环肿瘤DNA	吴龙 王穗海 梁志坤(413)
非小细胞肺癌组织中 <i>ALK</i> 、 <i>ROS1</i> 、 <i>RET</i> 融合基因检测方法的比较	郭文靖 朱安娜 吴英松(418)
<i>p53</i> 基因突变检测方法的演进和趋势	张艳霞 杨学习(424)

讲 座

体外诊断试剂临床试验方案的设计要求	王嘉明 雷孝锋 李尔华 等(70)
《创新医疗器械特别审批程序(试行)》解读	杨勇 雷孝锋 李尔华 等(142)
浅谈医疗器械临床试验过程的质量控制和监查要点	林凯容 雷孝锋 陈琼 等(212)
《医疗器械生产监督管理办法》解读	刁春芳 黄海琪 高旭年(287)

专家风采

刘新光	(封二)
陶爱林	(封二)
黄彬	(封二)
鲁凤民	(封二)
吴英松	(封二)
于月新	(封二)

实验室巡礼

广东省医学分子诊断重点实验室	(封三)
广东省过敏反应与免疫重点实验室	(封三)
中山大学附属第一医院检验医学部	(封三)
北京大学医学部鲁凤民教授实验室	(封三)
南方医科大学生物技术学院抗体工程研究所	(封三)
中国人民解放军第202医院精准医疗实验室	(封三)

Total Contents (Volume 8, 2016)

COMMENTS

- The applications of GPC3 in the diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma as well as its remaining issues
XIE Chunmei, XU Weiwen (1)
- The distribution characterization and gene mutation of Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in China
LIN Fen, YANG Hui, YANG Liye (73)
- What kind of specimen is used for epstein-barr virus nucleic acid detection
GUO Jianwei (145)
- The standardization of the next generation sequencing technologies in clinical application :
 in reference to the ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing
JIANG Liejun, LU Xiaoxu, HUANG Huayi (217)
- Advances in next-generation sequencing (NGS) technology and their application in cancer research
SHAO Xiangyang, XU Weiwen (289)
- Progress of the applications of next generation sequencing technology in clinical diagnostics of genetic disorders
YANG Xuexi (357)

ORIGINAL ARTICLES

- Significance of circulating glypican-3 in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a comparative study between the
 population in China and that from other countries by using meta-analysis
YIN Yizhen, XU Weiwen (7)
- Overcoming the drug resistance in lung cancer cells with 4R22-modified paclitaxel liposome treatment
ZHOU Yi, WANG He, ZHU Lina (17)
- Clinical analysis of 29 cases of male breast cancer
HAN Na, WANG Xiaojia (23)
- Comparison between PFGE and ERIC-PCR for genotyping and homologous analysis of *Acinetobacter baumannii*
WEN Haifeng, FENG Zhongjun, QIN Jin, YU Wenjing (27)
- Analysis of HPV genotypes in 3 918 female patients in Wuhai city
WU Yanghong, LV Wei, ZHENG Haiyan, WANG Zhen, PEI Liucheng (32)
- Application of 3 laboratory tests in the diagnosis of infectious mononucleosis in children
DENG Kunyi, PENG Jianming, FAN Hangong, YANG Haixia, WU Jianzhuo (37)
- Clinical efficacy of mifepristone in the treatment of perimenopausal dysfunctional uterine bleeding
WANG Jing (42)
- The investigation of polymorphism on G6PD c.1311C>T/IVS-1193T>C and 3'-UTR (untranslated regions)
LIN Fen, YANG Hui, WU Jiaoren, YANG Liye (78)
- Preliminary study of common copy number variations of breast cancer patients detected by array-based comparative
 genomic hybridization technology
ZHOU Hui, HE Dan, YANG Xuexi, LI Fenxia (82)
- Study on expression and trans-membrane activity of human Cu, Zn-SOD-PTD
WANG Xiaoxun, QI Shaohua, LI Ruiming, LIANG Qingle (88)
- Relationship between SNP rs17782313 variation in *MC4R* gene and obesity in zhuang nationality children
TANG Ning, CHEN Yidan, ZENG Ting, QIN Zhengxue, YAN Tizhen, LUO Shiqiang, LI Wugao, LI Jingwen, WANG Qiuhua, LI Zhetao (94)
- The significance of the DNA quantitative analysis in screening of 2 638 cervical cancer patients
LIU Guosheng, WANG Xiaoliang, ZHENG Jianqiong, ZENG Shoukui, ZHOU Wei (99)
- Analysis on biological information of hsa-miR-21
CHEN Xiaohua, CAO Xiaolong, LI Xiuyue, HE Jingcai, ZHANG Xiaona, LUO Rongcheng (104)
- The effect of the interference on the siRNA with targeted *c-myc* gene on the proliferation and apoptosis of colorectal cancer Lovo cell
LIU Jihong, JIANG Nannan, ZHANG Like, DENG Ning (109)
- The detection of P16 in cervical tumor saved in wax block by cervical fluid cytology
LIU Jingwen, CHEN Li, WU Qiuliang (114)
- Observation of clinical diagnosis and treatment of serous microcystic adenoma of pancreas
YUAN Yufen, ZHANG Xinlian, ZHANG Jingfang (119)
- NF1* mutation detection and pedigree analysis in a patient with neurofibromatosis type 1
GUO Dandan, LU Xinxin, HUANG Xiaoli, CHEN Xijun, ZHANG Biao, ZHENG Jiaying, WU Yanan (150)
- Association of *UCP2* gene rs660339 single nucleotide polymorphism with simple obesity in Chinese Zhuang children adolescents
LI Wugao, LI Zhetao, HUANG Jiwei, YAN Tizhen, LI Jingwen, XU Zehui, TANG Ning (155)

Distribution of genetic polymorphism of miR-196a2 gene in Guangxi population	
LUO Hongcheng, WEN Wangrong, LI Minmin, WEI Ying, TAN Tan, WEI Yesheng	(160)
Analysis on the gene detection results of hand-foot and mouth disease in the Guangzhou Xingtang area in 2014	
YANG Yong, SUN Wei, LI Zhengrong, WANG Dan	(165)
Influence of group B streptococcus (GBS) infection on pregnancy outcome	
ZHAO Xiaoya, XIE Yueying, ZHOU Xuli, XIE Gang, WEN Jia, HONG Wei	(170)
Effects of ovulation induction by raloxifene treatment on the expression of COX-2 and LPAR3 in mouse uterine endometrium during periimplantation period	
XIAN Yingjie, CHEN Cairong, ZHOU Xiuqin, YAN Qiuxia, LIANG Xiaoqing, ZHAO Xiaoying	(174)
Application of precursor of B-type natriuretic peptide for the diagnosis of viral myocarditis and assessment of heart function in children	
LI Zhouwen	(178)
Human heart-type fatty acid-binding protein, D-dimer and High-sensitive cardiac troponin T in the early diagnosis of acute coronary syndrome	
PI Hongquan, LI Dehua, LU Shengxiang, WANG Weihao, DENG Lehua	(182)
Expression of regulatory T cells and interleukin-12 in aged patients with active pulmonary tuberculosis complicated with chronic bronchitis	
XIAO Tianjin, ZHANG Leping, GU Zhongdong, HUANG Yanping	(188)
Evaluation and application of a domestic NAT kit used for blood screening	
CHEN Zhizhong, LI Jieming, LIAO Yangxun, LIANG Jianfeng, YU Wenchao, TANG Xiaoying, LIANG Liting, HUANG Juming, LU Qianwen, CHEN Shangliang	(192)
Mutations of 15 Short Tandem Repeat Loci for forensic application	
QIU Pingming, CHEN Ling, YU Jiaxin, LU Huijie, NIU Mufei, LIU Chao	(222)
Genetic research and clinical analysis of deletional Chinese $\gamma^*(\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia	
WANG Jicheng, QIN Danqing, LUO Mingyong, HE Tianwen	(227)
A rapid genotyping assay for primary total enterovirus screening	
OU Zhiying, WU Shaoqing, YIN Yingxian, LI Lixia, ZHOU Rong, XU Yi, GONG Sitang	(231)
Investigate the relationship between P-selectin glycoprotein ligand-1 M62I gene polymorphism and coronary heart disease in China Guangdong Han Population	
MING Kaihua, LEI Xiuxia, ZOU Yu, YANG Na, XU Banglao, HUANG Ziyi	(237)
Evaluation of laboratory index for screening thalassemia	
CHEN Xi, XIAO Kelin, LUO Mingyue, MAI Guangxing, XIA Yong	(242)
Detection and analysis of the drug resistant genes associated with carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
TU Haijian, CHEN Shujuan, LIN Qunying, XU Guanghui	(246)
Expression of ZEB1 in sporadic Burkitt lymphoma and its clinical significance	
ZHANG Shouhua, HUANG Hui, XU Hongyan, WU Yan, ZENG Songtao, HUANG Chuansheng, YANG Wenping	(252)
Preparation and immune signature analysis of anti-dengue virus type 2 nonstructural protein 1 in vitro	
YANG Xiaomeng, ZHAO Dan, DU Liwei, CHEN Xiang, JIANG Lifang	(256)
Analysis of HCV infection among voluntary blood donors in Dongguan city from 2006 to 2015	
ZHONG Chihui, ZHANG Yuzhao, HUANG Zhisen, HE Ziyi, ZENG Tao	(261)
Screening results on human parvovirus B19 infection in women of childbearing age in Guangdong area	
HE Tianwen, HUANG Binmei, WANG Yunan, ZHONG Zhicheng, CHEN Keyi, YIN Aihua	(265)
Effect of alcohol on proteasome assembly in hepatic tissue	
ZHANG Li, YAN Ming, JIANG Di, SUN Xianjiu, ZUO Haijun, LIU Meihong	(268)
Investigation of urinary pharmacokinetics of free genistein and daidzein in rats	
ZOU Huiqin, LIU Yalan, YU Mengjie, WANG Haipeng, WANG Yu, XIE Baogang, ZHANG Shouhua	(272)
Identification of gene variations in patients with nonsyndromic deafness by using whole-exome sequencing method	
LIU Weiqiang, ZHANG Huimin, YU Guojie, SUN Xiaofang	(297)
Analysis of deafness-related gene mutations in hearing loss patients in Yulin special education school of Guangxi	
LI Wugao, YAN Tizhen, TANG Ning, LI Zhetao, TANG Xiangrong, YANG Yan, CAI Ren, LI Jingwen	(303)
Comparison of different methods for HER-2 status detection in non-special invasive breast carcinoma	
CHENG Yuxia, HE Shuqian, DONG He, SUN Qing	(308)
Silencing of <i>Kin17</i> inhibits proliferation of breast cancer MDA-MB-231 cells	
SUN Zhenya, LIANG Lin, HE Jieting, WANG Lingling, ZENG Tao	(316)
Study on mutation of <i>EGFR</i> gene in non-small cell lung cancers in Kunming of Yunnan	
SU Guomiao, YANG Zhe, BIAN Li, PAN Guoqing	(321)
Distribution and correlation research of hepatitis B virus genotypes in Hechi area	
TANG Yufan, WEI Guining	(325)
Investigation of cervical intraepithelial neoplasia in 437 high-risk human papilloma virus infected patients from Yulin	
Li Jihui, Li Huahui	(328)
Retrospective analysis of 11 530 cases of group B streptococcus infection in the late pregnancy women in Foshan	
ZHUANG Xiwei, MENG Xia, YANG Kang, LIANG Weida	(332)
The risk assessment of prenatal genetic screening procedure simplified for thalassemias	
XIAO Qizhi, LI Lianxiang, XIE Jianhong, LI Lei, WANG Ge, ZHANG Jingwei, LONG Ruoting, ZHOU Yuqiu	(336)

Effect of vitamin D deficiency on the pregnancy and embryonic development in mouse model	
WANG Bo, WANG Xueyun	(341)
Comparative analysis of the non-invasive prenatal test results among 11 339 pregnant women	
WANG Yuanli, TANG Mingzhu, YANG Xuexi	(363)
Successful preimplantation genetic detection for alpha thalassaemia by using next generation sequencing technology	
XIE Meijuan, DENG Quanheng, DENG Honghui1, LU Shaoyue, YANG Xuexi, MA Qiang	(367)
Noninvasive prenatal testing for aneuploidy by next generation sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies and its fetal free DNA fraction analysis	
XU Xuping, XIE Meijuan, GAN Haiyan, LIANG Rongliang, HAN Erkang, YANG Xuexi, WU Yingsong	(375)
Screening of the phenylketonuria of the newborn by the next generation sequencing	
WANG Huifang, YE Qianping, YANG Xu, LIANG Zhikun, HU Niya	(380)
The comparison between array-CGH with next generation sequencing in the detection of copy number variations	
CHEN Xinzhou, WANG Mingzhu, HE Dan, ZHOU Hui, LIN Fangxin, LI Fenxia	(385)
Detection of common mutations in four types of genetic disorders by semiconductor sequencing platform	
WANG Huifang, LIANG Zhikun, YE Qianping, YANG Xu	(389)
Gene diagnostic of thalassemia by the method of constructing amplicon libraries	
SUN Yuting, FAN Dongmei, YE Qianping, YANG Linyan, LIANG Zhikun, YANG Xuexi	(395)
Based on the next generation sequencing platform for detection colorectal KRAS gene	
LI Lijuan, LUO Wanshan, ZHANG Jiabin, WANG Qing, WU Yingsong	(401)
Establishment of a gene mutation database from in deafness 200 health individuals in Guangdong area	
ZOU Jun, YANG Linyan, LUO Junming, LIANG Zhikun, YANG Xu, ZHANG Lihong	(407)

REVIEWS

Research advance in genetic diagnosis of monogenic inherited diseases	
GUO Yibin, LIANG Yujing, GUO Dongwei	(46)
Advance of collagen gel droplet-embedded culture drug sensitivity test in anticancer chemotherapy: a personalized medicine in cancer treatment	
XU Wei, LI Wendi, DENG Tianying, ZHANG Zhigao, DU Hongyan	(54)
Principle and application of single cell transcriptome analysis	
ZHU Xiang, PU Chun, WU Qiwen	(61)
Pathophysiological effect of low-density granulocytes in autoimmune diseases	
ZHOU Libin, ZHOU Jiantao, DING Haifeng	(66)
Investigation on the tumor markers of oral squamous cell carcinoma	
SHAO Tingru, ZHAO Meng, LV Xiaozhi	(123)
The relationship of toll-like receptor 4 and colorectal cancer	
ZHAO Xiangmei, DAI Shengming	(130)
Genetic testing of inherited colorectal cancer and its laboratory standards in clinical application	
JIANG Liejun, LU Xiaoxu, HUANG Huayi	(135)
The mechanism of ERK1/2 kinases facilitate DNA damage response	
WEI Fengxiang, ZHANG Lei, WANG Shaojuan	(196)
Diagnostic methods in Gilbert and Crigler-Najjar syndromes	
LIU Xuemei, LUO Ziyi	(201)
Research status of ankylosing spondylitis and the detection of its related gene HLA-B27	
BAI Shijie, TUO Ya, ZHANG Baoping, WANG Lijuan, WANG Yafei	(206)
Recent progress in basic research concerning the therapeutic anti-dengue antibodies	
YIN Qingqing, WANG Jianyu, CHEN Qiang, ZHOU Xiaohong	(277)
Hepatitis B virus nucleos (t) ide analogues drug resistance mutations and the clinical application of variation loci detection	
CHAO Wei, HE Baoyu	(346)
The molecular diagnosis of creutzfeldt-jakob disease	
LUO Shenghui, CAI Jiyong	(352)
The clinical application of the new tumor marker of human epididymis 4	
WANG Yafei, WANG Lijuan, TUO Ya	(356)
ctDNA: a specific and sensitive biomarker for human cancers	
WU Long, WANG Suihai, LIANG Zhikun	(413)
Comparison of detection methods of ALK/ROS1/RET fusion gene in non-small cell lung cancer tissue	
GUO Wenjing, ZHU Anna, WU Yingsong	(418)
Evolution and trends of the detection methods for p53 gene mutation	
ZHANG Yanxia, YANG Xuexi	(424)

2016年第8卷作者索引(按汉语拼音字母顺序排列)

B

白世杰(3):206
边莉(5):321

C

蔡继勇(5):352
蔡稔(5):303
曹小龙(2):104
巢薇(5):346
陈彩蓉(3):174
陈柯艺(4):265
陈莉(2):114
陈玲(4):222
陈强(4):277
陈琼(3):212
陈尚良(3):192
陈淑娟(4):246
陈熙(4):242
陈喜军(3):150
陈相(4):256
陈晓华(2):104
陈新周(6):385
陈艺丹(2):94
陈志忠(3):192
成玉霞(5):308

D

戴盛明(2):130
邓红辉(6):367
邓坤仪(1):37
邓乐华(3):182
邓宁(2):109
邓权衡(6):367
邓天颖(1):54
刁春芳(4):287
丁海峰(1):66
董贺(5):308
杜红延(1):54
杜丽伟(4):256

F

范冬梅(6):395
范汉恭(1):37
冯忠军(1):27

G

甘海燕(6):375
高旭年(1):70
(2):142
(3):212
(4):287
龚四堂(4):231
古中东(3):188
过丹丹(3):150
郭东炜(1):46
郭建巍(3):145
郭文靖(6):418
郭奕斌(1):46

H

韩尔康(6):375
韩娜(1):23
何宝玉(5):346
何丹(2):82
(6):385
何静彩(2):104

何洁婷(5):316
何天文(4):227
(4):265
何子毅(4):261
赫淑倩(5):308
洪威(3):170
胡妮娅(6):380
黄滨梅(4):265
黄传生(4):252
黄海琪(4):287
黄华艺(2):135
(4):217
黄慧(4):252
黄际卫(3):155
黄钜明(3):192
黄肖利(3):150
黄延平(3):188
黄志森(4):261
黄子宜(4):237

J

江堤(4):268
江丽芳(4):256
姜烈君(2):135
(4):217
蒋楠楠(2):109

L

雷孝锋(1):70
(2):142
(3):212
雷秀霞(4):237
李德华(3):182
李尔华(1):70
(2):142
李粉霞(2):82
(6):385
李继慧(5):328
李结敏(3):192
李静文(2):94
(3):155
(5):303
李磊(5):336
李丽娟(6):401
李丽霞(4):231
李恋湘(5):336
李珉珉(3):160
李瑞明(2):88
李文迪(1):54
李伍高(2):94
(3):155
(5):303
李哲涛(2):94
(3):155
(5):303
李峥嵘(3):165
李舟文(3):178
黎华辉(5):328
黎秀月(2):104
梁剑锋(3):192
梁丽婷(3):192
梁琳(5):316
梁清乐(2):88
梁荣良(6):375
梁伟达(5):332
梁小青(3):174

梁宇静(1):46
梁志坤(6):389
(6):395
(6):407
(6):413
廖扬勋(3):192
林方欣(6):385
林芬(2):73
(2):78
林凯容(3):212
林群英(4):246
刘超(4):222
刘国生(2):99
刘集鸿(2):109
刘镜文(2):114
刘美红(4):268
刘维强(5):297
刘雪梅(3):201
刘亚兰(4):272
龙若庭(5):336
卢绍月(6):367
卢盛祥(3):182
卢鑫鑫(3):150
陆慧洁(4):222
陆倩文(3):192
陆晓旭(2):135
(4):217
罗宏成(3):160
罗俊明(6):407
罗茗月(4):242
罗荣城(2):104
罗生辉(5):352
罗世强(2):94
骆明勇(4):227
罗婉珊(6):401
骆子义(3):201
吕伟(1):32
吕晓智(2):123

M

马强(6):367
麦光兴(4):242
孟霞(5):332
明凯华(4):237

N

牛牧斐(4):222

O

欧志英(4):231

P

潘国庆(5):321
彭建明(1):37
裴刘成(1):32
皮红泉(3):182
浦春(1):61

Q

杞少华(2):88
秦丹卿(4):227
秦瑾(1):27
覃正学(2):94
邱平明(4):222

S

邵婷如(2):123
邵向阳(5):289
苏国苗(5):321
孙青(5):308
孙伟(3):165
孙贤久(4):268
孙筱放(5):297
孙玉婷(6):395
孙振亚(5):316

T

谭县(3):160
谭晓颖(3):192
唐明珠(6):363
唐宁(2):94
(3):155
(5):303
唐向荣(5):303
唐毓凡(5):325
涂海健(4):246
托娅(3):206
(5):356

W

王波(5):341
王丹(3):165
王格(5):336
王海鹏(4):272
王赫(1):17
王辉芳(6):380
(6):389
王继成(4):227
王嘉明(1):70
王建宇(4):277
王静(1):42
王丽娟(3):206
(5):356
王玲玲(5):316
王明珠(6):385
王庆(6):401
王秋华(2):94
王绍娟(3):196
王穗海(6):413
王蔚浩(3):182
王晓稼(1):23
王晓亮(2):99
王晓勋(2):88
王雪云(5):341
王雅菲(3):206
(5):356
王毓(4):272
王逾男(4):265
王元丽(6):363
王珍(1):32
闻海丰(1):27
文佳(3):170
魏凤香(3):196
(6):325
韦叶生(3):160
韦颖(3):160
温旺荣(3):160
吴键卓(1):37
吴教仁(2):78
吴龙(6):413

吴秋良(2):114
吴韶清(4):231
吴艳(4):252
吴英松(6):375
(6):401
(6):418
武其文(1):61
伍严安(3):150
武燕红(1):32

X

夏勇(4):242
洗英杰(3):174
肖克林(4):242
肖奇志(5):336
肖天津(3):188
谢宝刚(4):272
谢春梅(1):1
谢纲(3):170
谢建红(5):336
谢美娟(6):367
(6):375
谢月英(3):170
徐邦牢(4):237
徐红艳(4):252
徐伟(1):54
徐伟文(1):1
(1):7
(5):289
徐翼(4):231
许光辉(4):246
许旭平(6):375
许泽辉(3):155

Y

阎明(4):268
颜秋霞(3):174
严提珍(2):94
(3):155
(5):303
杨海霞(1):37
杨辉(2):73
(2):78
杨康(5):332
杨立业(2):73
(2):78
杨琳艳(6):395
(6):407
杨娜(4):237
杨文萍(4):252
杨小猛(4):256
杨旭(6):380
(6):389
(6):407
杨学习(2):82
(6):357
(6):363
(6):367
(6):375
(6):395
(6):424
杨艳(5):303
杨勇(2):142
杨勇(3):165
杨哲(5):321
叶倩平(6):380

(6):389
(6):395
银一臻(1):7
尹爱华(4):265
尹庆庆(4):277
尹应先(4):231
余国就(5):297
余梦杰(4):272
余嘉欣(4):222
余文潮(3):192
于文静(1):27
原玉芬(2):119

Z

曾守遼(2):99
曾松涛(4):252
曾涛(4):261
(5):316
曾婷(2):94
张保平(3):206
张彪(3):150
张慧敏(5):297
张家彬(6):401
张静芳(2):119
张婧惟(5):336
张乐平(3):188
张蕾(3):196
张莉(4):268
张丽红(6):407
张丽科(2):109
张守华(4):252
(4):272
张晓娜(2):104
张新莲(2):119
张艳霞(6):424
张玉璽(4):261
张志高(1):54
赵丹(4):256
赵萌(2):123
赵祥梅(2):130
赵小娅(3):170
赵晓英(3):174
郑海燕(1):32
郑佳莹(3):150
郑建琼(2):99
钟焜辉(4):261
钟志成(4):265
周慧(2):82
(6):385
周丽彬(1):66
周剑涛(1):66
周荣(4):231
周维(2):99
周晓红(4):277
周秀琴(3):174
周旭丽(3):170
周毅(1):17
周玉球(5):336
朱安娜(6):418
朱丽娜(1):17
朱翔(1):61
庄锡伟(5):332
邹慧琴(4):272
邹俊(6):407
邹愉(4):237
左海军(4):268

2016年第8卷主题词索引(按汉语拼音字母顺序排列)

- 14-3-3 蛋白(5):352
4R22(1):17
I 型干扰素(1):66
I 型神经纤维瘤病(3):150
II 型登革病毒(4):256
*ALK/ROS1/RET*融合基因(6):418
Amplicon 文库构建(6):395
ATM(3):196
ATR(3):196
blaKPC(4):246
B 型钠尿肽前体(3):178
B 族链球菌(5):332
B 族溶血性链球菌(3):170
c-myc(2):109
ctDNA(6):413
CD4⁺CD25⁺CD127⁺调节性 T 细胞(3):188
CD-DST(1):54
Crigler-Najjar 综合征(3):201
DNA(5):325
DNA 损伤反应(DDR)(3):196
D-二聚体(3):182
EB 病毒(3):145
EB 病毒 DNA(1):37
EB 病毒抗体(1):37
E 蛋白二聚体依赖性表位(4):277
FISH(5):308
G6PD 缺乏症(2):78
GBS 检查(5):332
Gilbert 综合征(3):201
GPC3(1):1
(1):7
IHC(5):308
Ion Torrent PGM™(6):380
(6):389
hsa-miR-21(2):104
hTERT(2):109
HBV DNA(3):192
HCV RNA(3):192
HE4(5):356
HER-2(5):308
HIV RNA(3):192
HLA-B27(3):206
KRAS(6):401
Kin17(4):316
Lovo 细胞(2):109
Lynch 综合征(2):135
miR-196a2(3):160
MYH 相关性息肉(2):135
NF1 基因(3):150
p53 基因(6):424
P16(2):114
PAH 基因(6):380
PCR(4):246
PSGL-1(4):237
qPCR(5):308
Survivin(2):109
Tau 蛋白(5):352
Toll 样受体 4(2):130
UCP2 基因(3):155
UGT1A1(3):201
UTR(2):78
ZEB1 蛋白(4):252
 α 地中海贫血(6):367
 α -缺失(6):395
 β 地中海贫血(4):227
 β 地中海贫血(4):227
 β -突变(6):395
- B
靶向治疗(1):1
白细胞介素 12(3):188
半导体测序(6):380
(6):389
鲍曼不动杆菌(1):27
- 胞外信号调节激酶(ERK1/2)(3):196
苯丙酮尿症(6):380
变异(5):297
标本(3):145
表达(3):174
表皮生长因子受体(5):321
表型-基因型(5):336
丙肝病毒(4):261
丙肝抗体(4):261
病理(2):119
伯基特淋巴瘤(4):252
- C
肠道病毒(3):165
(4):231
肠道病毒 71 型(3):165
肠杆菌科基因间重复序列聚合酶链式反应(1):27
常见耐药变异(5):346
超广谱 β -内酰胺酶(4):246
传染性单核细胞增多症(1):37
- D
大肠癌(2):109
大鼠(4):268
蛋白酶体(4):268
蛋白酶体成熟蛋白(4):268
蛋白质氧化损伤(4):268
蛋白转导域(2):88
单纯性肥胖(2):94
(3):155
单核苷酸多态性(3):155
(3):160
单基因病(1):46
单细胞分离(1):61
导流杂交分型技术(5):328
登革病毒(4):277
第二代基因测序(6):385
低密度粒细胞(1):66
地中海贫血(4):242
(5):336
(6):395
凋亡(2):109
东莞(4):261
动物模型(5):341
短串联重复序列(STR)(4):222
- E
恶性胸腔积液(5):356
耳聋(5):297
(5):303
(6):407
- F
发病率(2):73
发生(2):130
法医学证学(4):222
发展(2):130
非结构蛋白 1(4):256
非特殊型浸润性乳腺癌(5):308
非小细胞肺癌(5):321
(6):418
肺癌(5):356
肺结核(3):188
肺炎克雷伯菌(4):246
分子分型(4):231
分子流行病学(4):231
- G
感染(3):170
肝细胞癌(1):1
高龄孕妇(6):363
高敏肌钙蛋白 T(3):182
高通量测序(1):61
(6):375
- 高效液相色谱(4):272
宫颈病变(1):32
(2):99
宫颈上皮内瘤病变(5):328
宫颈肿瘤(2):114
功能失调性子宫出血(1):42
冠心病(4):237
- H
核苷(酸)类似物(5):346
核酸检测(3):192
黑素皮质素(2):94
化疗(1):54
环氧化酶 2(3):174
回顾性分析(5):332
- J
疾病靶向的基因组测序(4):217
技术方法(1):46
急性冠状动脉综合征(3):182
基因(4):246
基因沉默(5):316
基因多态性(2):94
(3):201
(5):237
基因分型(1):32
(4):325
基因检测(2):135
(6):395
基因突变(2):73
(2):78
(5):303
(5):321
(6):380
(6):389
基因诊断(1):46
(3):201
(4):227
基因组拷贝数变异(6):385
家族性腺瘤样息肉(2):135
检测方法(3):206
浆液性微囊性腺瘤(2):119
结直肠癌(2):130
(6):401
精准医疗(4):289
酒精性肝病(4):268
- K
抗非结构蛋白 1 抗体(4):256
抗体依赖性增强效应(4):277
拷贝数变异(2):82
柯萨奇病毒 A 组 16 型(3):165
克雅病(5):352
口腔(2):123
跨越断裂点荧光 PCR(6):367
- L
老年慢性支气管炎(3):188
雷洛昔芬(3):174
良性等位基因(6):407
临床疗效(1):42
临床特征(1):23
鳞状细胞癌(2):123
卵巢癌(5):356
- M
脉冲场凝胶电泳(1):27
慢性乙型肝炎(5):346
美国医学遗传学和基因组学会(4):217
酶联免疫吸附试验(4):265
米非司酮(1):42
免疫组织化学(2):114
(4):252
- 膜攻击复合物(4):256
目标捕获二代测序(3):150
- N
耐药肺癌细胞(1):17
耐药突变(5):346
男性(1):23
内化作用(2):88
逆转录-聚合酶链反应(3):165
尿液排泄动力学(4):272
- P
胚胎发育(5):341
胚胎植入前遗传学诊断(6):367
胚胎植入前诊断和筛查(6):357
平均红细胞体积(4):242
平均血红蛋白含量(4):242
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症(2):73
- Q
强直性脊柱炎(3):206
全基因组测序(4):217
全基因组扩增(1):61
全外显子组测序(5):297
- R
染色体非整倍体(6):375
染色体非整倍体无创产前筛查(6):357
人群(1):7
人乳头状瘤病毒(1):32
(5):328
人铜锌超氧化物歧化酶(2):88
人细小病毒 B19(4):265
人源中和抗体(4):277
妊娠结局(3):170
妊娠晚期(5):332
溶血磷脂酸受体 3(3):174
乳腺癌(2):82
乳腺癌细胞(5):316
乳腺肿瘤(1):23
胚蛋白(5):352
胚蛋白基因(5):352
- S
三体综合征(6):363
三阴性(5):316
筛查(2):99
生物利用度(4):272
生物膜(2):88
生物学信息(2):104
实时荧光定量 PCR(3):170
受孕力(5):341
手足口病(3):165
(4):231
双胎(6):375
- T
胎儿游离 DNA 浓度(6):375
体外药敏检测(1):54
体质指数(3):155
突变(4):222
突变检测(3):150
(6):424
突变扩增阻滞系统(5):321
突变位点检测(5):346
- W
外显子组测(4):217
外周血单个核细胞(3):145
围绝经期(1):42
维生素 D(5):341
微小 RNA(2):104
微阵列比较基因组杂交(2):82
微阵列比较基因组杂交技术(6):385
- 微阵列芯片技术(5):303
无创产前检测(6):363
无创产前筛查(6):375
- X
细胞 DNA 定量分析(2):99
细胞蜡封(2):114
细胞增殖(5):316
细胞周期阻滞(3):196
下一代测序(4):217
(6):357
(6):367
(6):389
(6):401
(6):407
(6):413
(6):424
下一代测序(NGS)(5):289
献血者(4):261
小儿病毒性心肌炎(3):178
心功能评估(3):178
心脏型脂肪酸结合蛋白(3):182
新生儿(3):170
新一代测序(6):418
性别(4):237
血红蛋白(4):242
血红蛋白变异体(4):336
血浆(3):145
血液安全(4):261
血液筛查(3):192
- Y
液基细胞学(2):114
液体活检(6):413
遗传病(6):389
遗传病检测(6):357
遗传筛查(5):336
遗传性结直肠癌(2):135
胰腺(2):119
乙型肝炎(5):325
乙型肝炎 E 抗原(5):325
乙型肝炎病毒(5):346
异型淋巴细胞(1):37
荧光原位杂交(6):418
游离金雀异黄素和大豆苷元(4):272
育龄妇女(4):265
原发性肝癌(1):7
原核表达载体(2):88
- Z
诊断(1):1
(1):7
(2):119
(3):178
致病机制(3):206
治疗(2):119
治疗性抗体(4):277
肿瘤(1):54
(2):104
(5):289
(6):413
肿瘤标志物(1):1
(2):123
中性粒细胞(1):66
中性粒细胞胞外诱捕网(1):66
种族(3):160
转录组(1):61
转染(2):109
壮族(2):94
紫杉醇脂质体(1):17
自身免疫性疾病(1):66
综合治疗(1):23

中国人民解放军第202医院精准医疗实验室

中国人民解放军第202医院精准医疗实验室位于沈阳市和平区光荣街5号，实验室以全军计划生育优生优育技术研究所实验室为主体，包括国家卫计委高通量基因测序产前筛查与诊断试点实验室、辽宁省产前诊断中心、辽宁省男性生殖重点实验室、军区生殖医学重点实验室等。现有技术人员22名，其中高级职称7名、中级职称2名、初级职称13名，博士4名、硕士14名。实验室内设国家标准基因扩增实验室，同时设有一代测序、二代测序、杂交捕获、基因芯片、电泳、串联质谱仪、时间飞行质谱仪等，细胞遗传实验室拥有ABI PCR扩增仪、ABI实时荧光定量PCR扩增仪、ABI 3500 DX基因测序仪、LIFE二代测序仪、全自动染色体分析工作站等，设备总值约4000余万元。

该实验室可对临床样本中的乙型肝炎病毒、沙眼衣原体等18种病原微生物进行定量及分型检测；可对高危及低危人乳头瘤病毒进行基因分型；可进行新生儿遗传代谢病筛查、药物相关基因检测、肿瘤个体化治疗靶向药物检测、肿瘤易感基因突变类型检测、遗传病基因诊断、胚胎植入前遗传学诊断与筛查、Y染色体微缺失检测、耳聋相关基因检测；可进行羊水、绒毛、脐血穿刺产前诊断；可进行高通量测序无创产前基因检测。实验室连续多年参加卫生部临检中心室间质评，成绩优秀，是目前国内开展分子诊断项目最全、技术力量雄厚的实验室之一。承担博士后基金、军队医药卫生基金、国家自然科学基金、军队“十二五”、“十三五”专项、总后卫生部重点项目、辽宁省自然科学基金等多项研究。研究成果获军队科技进步二等奖5项、三等奖12项。获国家发明专利1项。在国内外重要期刊发表研究论文100余篇，参编专著3部。培养硕士研究生10名。

学科带头人于月新教授擅长不孕不育综合诊治、辅助生殖技术、宫腔镜检查与手术等，对生殖内分泌疾病、高危妊娠诊断和处理、危急重症孕产妇的救治、妇科常见病及妇科肿瘤的诊治有丰富的临床与科研经验。现担任全军妇产科内分泌专业委员会委员、全军产科与围产专业委员会委员、辽宁省中西医结合绝经与内分泌专业委员会常委、沈阳军区医疗成果鉴定委员会成员、沈阳市医疗事故鉴定委员会成员，是沈阳军区高层次科技人才培养对象。



→ 公司简介

中山大学达安基因股份有限公司依托中山大学雄厚的科研平台,以分子诊断技术为主导,集临床检验试剂和仪器的研发、生产、销售以及全国连锁医学独立实验室临床检验服务为一体的生物医药高科技集团公司,拥有7家研究机构、50多家全资或合资的下属企业。由公司自主研发的荧光定量PCR检测(FQ-PCR)系列产品在国内的市场覆盖率稳居行业第一。



→ 公司优势

- ★ 自主品牌的通道空间
- ★ 完善的售前和售后服务
- ★ 中山大学雄厚的科研平台
- ★ 自主知识产权的临床诊断试剂
- ★ 国内专业诊断产品供应商的首选之一

→ 企业使命

达生命之源, 安健康之本

- ★ 不断完善创新机制,以全面的技术创新、管理创新、经营模式创新,探索生命的奥秘,以一流的产品和服务推动公司的不断成长。
- ★ 关爱社会、回馈社会,推动健康产业的发展。

→ 多元化产品系列



公司总部

地址: 广州市高新技术开发区科学城香山路19号(510665)
电话: 020-32290789 传真: 020-32290158

营销中心

电话: 020-32068328 传真: 020-32068820
Http: //www.daangene.com