

基因组测序技术应用于产前诊断胎儿染色体异常的研究

黄莉, 何冰, 王世凯, 薛林涛, 莫伟英, 田矛, 黄悦悦, 莫耀禧, 张鹏, 成俊萍, 梁羽, 陈浩

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(编号:2011GXNSFA018302); 广西科学研究与技术开发计划课题(编号:桂科攻1140003B-66)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院生殖医学与遗传中心(黄莉, 何冰, 王世凯, 薛林涛, 莫伟英, 黄悦悦, 莫耀禧, 张鹏, 成俊萍), 产科(田矛); 518083 深圳, 华大基因研究院(梁羽, 陈浩)

作者简介: 黄莉(1959-), 女, 研究生学历, 学士学位, 主任技师, 研究方向: 生殖医学与遗传。E-mail: hfireli@163.com

通讯作者: 何冰(1966-), 女, 大学本科, 学士学位, 主任医师, 研究方向: 生殖医学。E-mail: hb268@sina.com

[摘要] 目的 探讨基因组测序技术在产前诊断胎儿染色体异常中的价值。方法 选取 2013-12 ~ 2014-05 在广西壮族自治区人民医院就诊, 孕龄在 18 ~ 24 周的高龄妊娠、唐氏综合征生化筛查高风险和(或)彩超显示胎儿异常并同意产前诊断的孕妇 60 例, 抽取孕妇羊水, 提取羊水 DNA, 制备测序文库, 应用 Ion Proton 测序仪检测, 所得的基因序列与人类的参考基因组比对并作统计分析。并与同一样本经细胞培养后进行染色体核型分析进行对照分析。结果 60 例羊水样本处理后经大规模平行基因组测序技术检测判定 3 例为染色体拷贝数异常, 57 例无明显异常; 以羊水细胞染色体核型分析为对照, 检出 6 例异常结果。结论 利用大规模平行基因组测序技术检测孕妇羊水中 DNA 诊断胎儿染色体异常, 其特异性与染色体核型分析技术具有较高的一致性。该技术具有高准确性、高通量、高灵敏度和低成本等优点, 具有临床实际应用价值。

[关键词] 基因组测序技术; 核型分析; 染色体

[中图分类号] R 714.55 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2016)01-0006-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2016.01.02

Prenatal diagnosis of fetal chromosomal abnormality by genomic sequencing technology HUANG Li, HE Bing, WANG Shi-kai, et al. Reproductive and Genetic Center, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To explore the prenatal diagnosis of chromosome abnormality by detecting free DNA in maternal amniotic fluid by using massively parallel genomic sequencing technology. **Methods** The amniotic fluid samples from 60 pregnant women were collected from December 2013 to May 2014 at the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region. Those pregnant women had a gestational age of 18 to 24 weeks and high risks of Down syndrome and/or fetal abnormalities shown by color Doppler ultrasound. The amniotic fluid samples were drawn from the pregnant women and their amniotic fluid DNAs were extracted for preparing a sequencing library. By using Ion Proton, high-throughput sequencing procedure was carried out. The sequencing data were compared with the human reference gene-database and statistically analyzed. Simultaneously, the amniotic fluid cells were cultured for chromosomal karyotyping which compared with the massively parallel genomic sequencing technology. **Results** By massively parallel genomic sequencing, in 3 out of 60 cases showed chromosome copy number abnormalities, 57 cases have no obvious abnormality. By the standard of chromosomal karyotypic analysis, there were 6 chromosomal abnormalities. **Conclusion** Massively parallel genomic sequencing is highly consistent with karyotypic analysis in sensitivity and specificity for prenatal diagnosis of the fetus chromosome abnormalities by detecting amniotic fluid DNA in pregnant women and has great advantages of high accuracy, high throughput, high sensitivity, and low cost in clinical practice.

[Key words] Genomic sequencing technology; Karyotypic analysis; Chromosome

目前遗传因素是导致出生缺陷的主要原因,其中染色体数目与结构异常最为常见^[1]。当孕妇的

年龄在 35 岁及以上时生育畸形儿的概率大大增加。此外夫妻双方有一方染色体异常的、孕早期服用可

能致畸药物的孕妇其胎儿畸形的概率均比正常孕妇要高。当前临床常用的检测方法有染色体核型分析、荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 等, 染色体核型分析被公认为金标准。羊水进行细胞遗传学染色体核型分析, 需经过羊水细胞培养、染色体制备及人工显微镜下分析等步骤, 由于其细胞培养时间长, 操作繁琐, 对操作者的技术要求较高, 且诊断范围受限于 G 显带技术的分辨率等缺点, 制约了产前诊断的开展。随着高通量测序技术的不断发展, 大规模平行测序技术 (massively parallel signature sequencing, MPSS) 广泛应用于各类临床及科研检测。本研究中我们利用大规模平行测序对 60 例高龄高危孕妇羊水进行全基因组测序, 现将结果报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择 2013-12 ~ 2014-05 在广西壮族自治区人民医院就诊, 高龄妊娠、唐氏综合征生化筛查高风险和 (或) 彩超显示胎儿异常并且同意产前诊断的孕妇 60 例, 年龄为 22 ~ 43 (32.8 ± 5.0) 岁, 孕龄为 18 ~ 24 周。所有参与者均签署知情同意后抽取羊水 10 ml。

1.2 实验方法

1.2.1 样本的制备 羊水穿刺采用 B 超定位后, 用穿刺针在无菌条件下经腹行穿刺术, 取材羊水 30 ml, 其中一部分用于羊水细胞核型分析, 另一部分用于全基因组测序检测。

1.2.2 羊水细胞核型分析 取羊水细胞 20 ml, 离心后去上清, 细胞悬液接种于 3 个细胞培养瓶中, 置 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中, 5 ~ 6 d 换液, 每天观察细胞生长情况, 当羊水细胞贴壁生长旺盛, 倒置显微镜下可见 8 ~ 10 个细胞克隆形成, 24 h 后即可收获细胞, 常规制片 G 显带。核型计数不少于 15 个分裂相, 异常核型计数 30 个分裂相以上, 分析 3 ~ 5 个核型。根据《人类细胞遗传学国际命名体制 (ISCN) (1995)》描述染色体异常核型。

1.2.3 羊水样品 DNA 的提取 羊水 DNA 采用 QIAamp DNA Mini kit (Qiagen) 试剂盒提取, 用 TE 溶液洗脱 DNA, Qubit 2.0 定量, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。

1.2.4 文库制备和 DNA 测序 提取的羊水基因组 DNA 中有 48 例样本 DNA 提取量不足 100 ng, 达不到建库起始量, 这 48 例样本先用 GenomePlex® Single Cell WGA kit (Sigma) 进行全基因组扩增 (whole genome amplification, WGA), 将 12 例羊水 DNA 与 48

例扩增后的 DNA 样本用 bioruptor UCD-200 (Diagenode) 打断成主带在 150 bp 的小片段。打断后样品用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 主带位置。合格的打断样品用 T4 DNA 聚合酶 (T4 DNA Polymerase)、克列诺片段 (Klenow Fragment) 和 T4 多聚核苷酸激酶 (T4 PNK) 对片段末端进行修复, 再用 T4 DNA 连接酶 (T4 DNA ligase) 将特异性接头连接在 DNA 片段上, 通过 PCR 技术扩增带有接头的目的片段, 产生两端有 Ion Torrent 接头的测序 DNA 片段的文库。制备后文库使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测文库大小及产量, 并用 QPCR 检测文库产量。随后将文库片段克隆到离子微球颗粒上并进行乳液 PCR 扩增, 将表面带模板的离子微球颗粒转移到 Ion 芯片, 通过短暂的离心将离子微球颗粒沉淀到芯片的微孔中, 然后将芯片放置在 Ion Proton 测序仪 (Life Technologies) 上进行测序。

1.2.5 数据分析 把测得的高通量数据和基因组数据库进行比对, 得到每条染色体上唯一比对的序列含量, 根据生物信息学分析, 计算出每条染色体的覆盖深度值, 并转化为衡量染色体异常风险的指数。样本中染色体 DNA (chr N) 所占总 DNA 比例可以表示为覆盖深度 Cov-chr N。然后对深度进行修正, 通过样本染色体的 Cov-ratio 来判断胎儿染色体拷贝数是否异常, 统计检验的值为 Cov-ratio 值, Cov-chr N 以及 Cov-ratio 值计算如下所示: 覆盖深度 Cov-chr N = 样本染色体上 N 上唯一序列片段总数 / 参考序列染色体 N 上唯一序列片段总数; 样本 chr N 的 Cov-ratio = chrN 的修正深度 / 平均修正深度。样本的 Cov-ratio 值 > 1.3 则判定为胎儿染色体重复, Cov-ratio 值 < 0.7 即判定胎儿为染色体缺失。

2 结果

2.1 羊水染色体核型分析结果 60 例羊水进行染色体检测, 其中 54 例检测结果为正常, 6 例检测结果为异常, 异常结果见表 1。

表 1 异常样本核型结果

样 本	核型	测序结果
A	46,XY,1qh+	46,XY
B	46,XX,inv(9)	46,XX
C	47,XX,+13	47,XX+13
D	46,XY,15ps+	46,XY
E	47,XX,+18	47,XY,+18,6q14.1-q14.2(78400395-83908352)×3
F	45,XO	45,XO

2.2 大规模平行基因组测序结果

2.2.1 测序数据结果 采用 Ion Proton 测序仪对 60 例样本进行大规模平行测序, 样本 reads 数为 $3.3 \sim 9.8(5.1 \pm 1.8)M$, 样本数据量为 $1.4 \sim 4(2.1 \pm 0.5)G$, Q20 的 reads 所占比例为 $64.8 \sim 84.6(76.7 \pm 4.4)\%$, 测序数据有效可用, 与参考序列进行比对以后, 基因组平均覆盖度为 2.54% , 平均深度为 $1.16X$ 。所有样本均可以用于染色体数目及微小异常的检测。

2.2.2 大规模平行基因组测序结果 根据测序及统计每条染色体的唯一序列片段所得出的结果分析, 检测出 1 例 13 三体 (见图 1, 2), 1 例 45, X (见图 3, 4), 1 例 18 三体并伴有 6 号染色体的部分重复 (见图 5 ~ 7)。

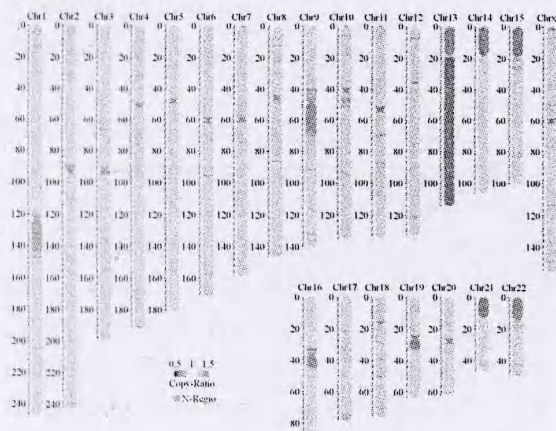


图 1 样本 C 染色体核型图



图 2 样本 C 染色体拷贝数散点图

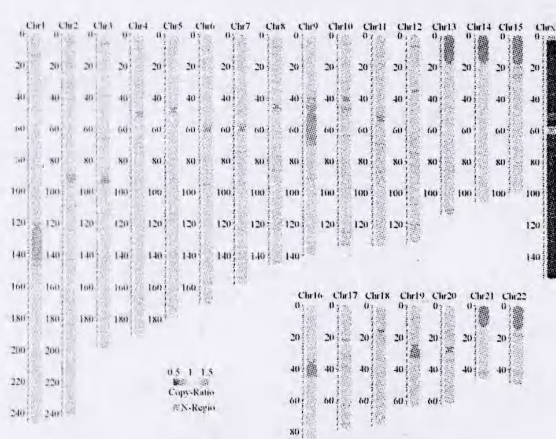


图 3 样本 F 染色体核型图



图 4 样本 F 染色体拷贝数散点图

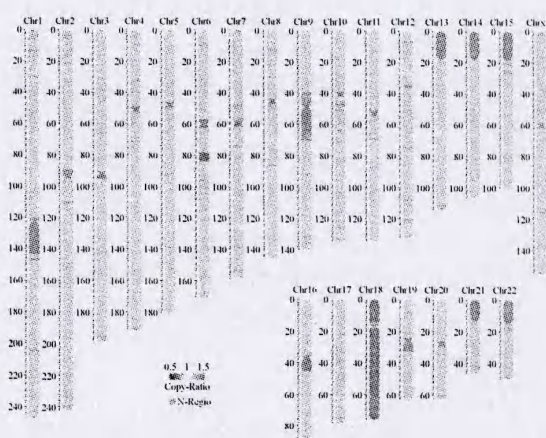


图 5 样本 E 染色体核型图



图 6 样本 E 染色体拷贝数散点图

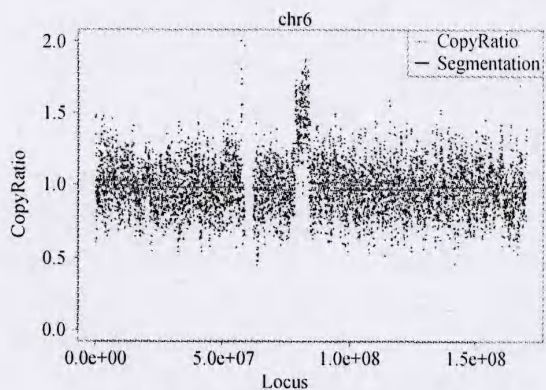


图 7 样本 E 6 号染色体拷贝数散点图

3 讨论

3.1 中期妊娠的胎儿产前诊断一般通过羊膜穿刺术, 采取羊水进行检查。检查项目包括染色体核型分析、羊水甲胎蛋白测定、羊水生化检查等, 以确定胎儿成熟程度和健康状况, 诊断胎儿是否异常或患有某些遗传病。羊水细胞是来自胎儿的脱落细胞, 具有相同的遗传信息, 通过检测羊水细胞遗传信息能够非常准确地反映胎儿的遗传学状态。当前, 染色体核型分析仍然是羊水遗传学检测的主要途径,

并被公认为金标准。染色体核型分析能很好地检测出整条染色体异常或大范围的染色体变异,但对于微小的异常则不能很好地检出。而测序技术却能很好地检测出微小的染色体异常,但是其临床应用目前并没有相应的指导方案。因此,本研究对细胞核型分析与测序检测进行对比,希望能对这一新技术的临床应用进行一些探讨。高通量测序技术对于传统医学和疾病研究是一次革命性的改变,特别是对未来个性化医疗的普及和发展起着非常关键的作用^[2]。目前高通量测序已经被应用于遗传性疾病的诊断、肿瘤的早期筛查等,在产前筛查及诊断领域,测序技术已可以进行“无创”产前染色体筛查^[3,4],然而在羊水诊断方面报道较少。国内开展“无创”产前较多,这一技术确实拥有诸多优点,值得推广,但是无创技术并不能取代羊水检测,即使检出异常仍需羊水检测确认。另外,无创技术目前一般只对5条染色体进行分析,其他染色体的异常仍然需要羊水检测。因此,本研究主要对羊水的传统细胞核型分析与测序技术检测进行对比。

3.2 临床上染色体异常仍然以16、18、21号染色体的数目异常居多,因此传统核型检测能够满足大部分的临床需求,随着研究的进步,越来越多的微缺失和微重复综合征被发现^[5],且研究也发现,先天性心脏病、一些发育迟缓或畸形也与染色体的微小变异有关^[6],因此随着微缺失和重复检测方法进步及费用的降低,这些技术必然会进入临床检测中,如何正确处理常规核型分析与染色体微小变异的检测是必须有相应指导原则的。

3.3 本研究对60例羊水样本进行分析后发现,核型分析找到了6例异常情况,其中3例染色体数目异常样本与测序结果一致,但另有3例则存在差异。有2例染色体形态变异(样本A、D)在测序分析中没有发现问题,根据经验,一般认为染色体形态变异不会导致临床疾病^[7],这在测序中的对应解释就是形态变异并不是核酸序列出现异常,因此出现临床症状的可能性不大,这一结果也为染色体形态变异更科学的解释提供了证据。然而,出现形态上的变异是否完全没有临床意义目前还没有结论,这些变异也有可能是由于表观遗传改变等问题导致^[8],因而我们还需要更加深入地研究这些问题。另一例是9号染色体倒位(样本B)在测序中没有发现,这是由于目前技术本身导致的,常规测序技术(也包括芯片技术)无法检测出平衡倒位/易位等情况,其根本原因在于测序技术能检测到的只是核酸数量是否

出现增加或减少,在平衡易位/倒位的情况下,细胞内的核酸数量不出现变化,因此常规的测序技术无法检测出问题。虽然现在已经有测序方法能够对平衡易位/倒位进行检测,但这些方法技术难度大、检测时间长、样本DNA质量要求高^[9],羊水的检测由于提供的DNA有限,且时间要求较严,因此很难在临床上实际应用。而在样本E中,除了18号染色体重复,测序还检测到其6号染色体上出现了一个5 M大小的重复区域,这是测序检测的优势。染色体上较小的重复和缺失核型分析通常不能发现,一般认为10 M以下的变异在常规G带分析中无法检测到,而测序检测能够非常精确判断。因此测序检测在微小变异检测中有明显优势。

3.4 研究表明,与核型分析相比,大规模平行基因组测序技术的特异性、敏感性与染色体核型分析技术具有较高的一致性,且能精确分析微小变异,而出现的不一致情况也不影响临床结果判定。而且相比羊水核型分析,利用Proton测序进行分析理论上只需要3 d即可得到结果,在时间上有较大优势,由于也不需要进行羊水培养,减少了羊水培养问题导致检测失败的可能性,具有很高的临床应用价值。而且随着检测样本的增加及生物信息分析方法的优化,大规模平行基因组测序技术应用于胎儿染色体异常产前诊断的局限性将会越来越小,因此重新制定羊水产前检测的临床指导势在必行。

参考文献

- 1 Nicopoullos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, et al. The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection? [J]. Hum Reprod, 2008, 23(2): 240-250.
- 2 平捷. 高通量测序技术在个性化医疗中的应用[D]. 上海交通大学, 2012.
- 3 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诊断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): 475-477.
- 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 Nat Acad Sci USA, 2008, 105(51): 20458-20463.
- 5 胡玲玲. 两个罕见chr16端粒起始的包括 α 基因簇大片段重排突变的地中海贫血遗传家系鉴定[D]. 南方医科大学, 2014.
- 6 杜玉荣, 杨焕杰, 谭震, 等. 22q11微缺失与先天性心脏病的关系的研究[J]. 遗传, 2005, 27(6): 873-876.
- 7 Yuan Y, Jiang F, Hua S, et al. Feasibility study of semiconductor sequencing for noninvasive prenatal detection of fetal aneuploidy [J]. Clin Chem, 2013, 59(5): 846-849.
- 8 刘剑丽, 时瑞兰. 91例染色体形态异常与妊娠不良结局分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2012, 20(9): 31-32.

- 9 Boland JF, Chung CC, Roberson D, et al. The new sequencer on the block: comparison of life technology's proton sequencer to an Illumina HiSeq for whole-exome sequencing[J]. Hum Genet, 2013, 132(10):

1153-1163.

[收稿日期 2015-07-03][本文编辑 刘京虹]

课题研究·论著

体外培养神经元缺氧时细胞红蛋白基因表达的变化

杨汉华, 马海然, 肖丹萍

基金项目: 汕头市医疗重点科技计划项目(编号: 汕府科 2012-113 号)

作者单位: 515041 广东, 汕头大学医学院第二附属医院儿科[杨汉华(现在深圳坪山新区妇幼保健院, 深圳大学妇幼保健院儿科工作), 肖丹萍]; 惠州市中心人民医院儿科(马海然)

作者简介: 杨汉华(1978-), 男, 医学硕士, 主治医师, 研究方向: 新生儿缺氧缺血性脑损伤研究。E-mail: drsam@126.com

[摘要] 目的 探讨体外培养神经元在缺氧时细胞红蛋白(cytoglobin, Cygb)基因表达的变化规律。方法 运用无血清培养技术进行胎鼠皮质神经元培养6 d, 用免疫组织化学方法进行纯度鉴定, 随机分为4组, 其中3个实验组分别置于0.5%~0.9% O₂中8、16、24 h, 对照组置于正常环境。用CCK8试剂盒测试细胞生存率, 用Real-time PCR方法检测不同时间点Cygb基因表达的情况。结果 神经元纯度鉴定纯度>99%; 缺氧后神经元Cygb基因的表达随时间增长而递增。结论 体外培养神经元缺氧时Cygb基因表达增强, 提示Cygb可能在神经细胞缺氧时发挥重要作用。

[关键词] 细胞红蛋白; 神经元; 基因表达; 缺氧缺血性脑损伤**[中图分类号]** R 363 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2016)01-0010-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2016.01.03

Expression of cytoglobin gene in hypoxic neurons in vitro YANG Han-hua, MA Hai-ran, XIAO Dan-ping, et al. Department of Pediatric, the Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Guangdong 515041, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and changes of cytoglobin(Cygb) gene on hypoxic neurons in vitro. **Methods** The primary cortical neurons from newborn rats were cultured in a serum-free culture system. The neurons were identified by polyclonal antibody against neuron specific enolase on the 6th day and were randomly divided into 4 groups for assessing cell viability by CCK8 and for observing the gene expression of Cygb by Real-time PCR at 0 h, 8 h, 16 h, 24 h after hypoxic injury was induced with the concentration of oxygen between 0.5% and 0.9%. **Results** The purity of neurons was more than 99%; Expression of RNA Cygb was increased in a time-dependent manner, and there was significant difference in each group($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of Cygb in neurons increases rapidly after hypoxic injury indicating that Cygb may have an important function in the process of protecting hypoxic neuron injury.

[Key words] Cytoglobin; Neurons; Gene expression; Hypoxic-ischemic encephalopathy

细胞红蛋白(cytoglobin, Cygb)是新发现的脊椎动物的第四种携氧球蛋白, 国外^[1,2]以及我们^[3,4]之前的研究初步显示它在神经细胞的细胞核及细胞浆

均有表达, 而且表达可被缺氧所诱导, 并受缺氧诱导因子调控^[1,2], 因而Cygb是一种新的缺氧反应基因^[5]。我们之前的研究已发现新生大鼠缺氧缺血性脑损伤