



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

# 分子诊断与治疗杂志

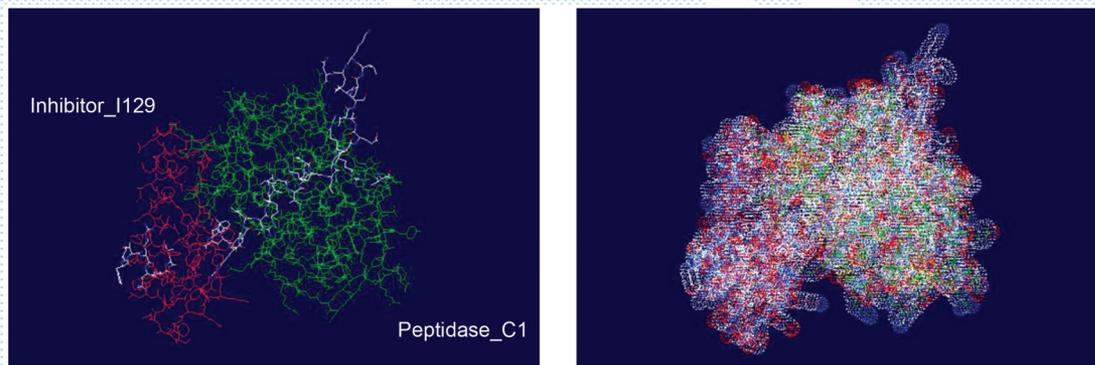
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2017年9月 第9卷 第5期 总第51期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 9 Number 5 September 2017



Swiss-model 曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶三维结构

图(P332) 曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶典型的2个序列分析

Figure(P332) Analysis of 2 classic sequences of *Sm*cathepsin L-like proteinase

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

09>

分子诊断与治疗杂志

二〇一七年九月

第九卷 第五期

中山大学

## 黄宪章



1970年2月出生,1992年毕业于湖北中医药大学医学检验系临床检验专业,2001年武汉大学临床检验诊断学专业硕士研究生毕业,获医学硕士学位,2008年南方医科大学生物化学与分子生物学专业博士研究生毕业,获理学博士学位。2012年,在美国纽约州卫生厅Wadsworth中心做访问学者。

主任技师,教授,博士生导师。现任广东省中医院(广州中医药大学第二附属医院)检验医学部主任、检验教研室主任。中华医学会检验分会青年委员会副主任委员、临床生化组委员,中国医院协会临床检验管理专业委员会委员,中国中西医结合学会检验医学专业委员会副主任委员,中华中医药学会检验医学分会副主任委员,中国医师协会检验医师分会个体化医疗分子诊断检验医学专家委员会和肾脏疾病专家委员会副主任委员,中国生物化学与分子生物学会脂质与脂蛋白专业委员会委员,广东省中西医结合学会检验专业委员会主任委员,广东省中医药学会检验医学专业委员会主任委员,广东省医学会检验分会副主任委员、管理学组组长、生物化学组顾问。医学实验室认可主任评审员,医学参考实验室认可技术评审员。

黄宪章教授长期从事临床检验标准化、代谢病的早期实验诊断与发病机制、疾病实验室风险评估及个体化分子诊断方面的研究工作。负责制定国家标准1项、国家计量标准3项,参与制定国家卫生标准15项;主持国家自然科学基金面上项目1项、2017年国家重点研发计划重点专项子课题1项、国家十二五课题华南分中心课题1项、国家十一五课题子课题1项、省自然科学基金3项、省科技计划项目4项,参与国家自然科学基金2项。获广东省科技进步二等奖2项(第2参与人和第3参与人)、广东省科技进步三等奖1项(第2参与人)、湖北省科技进步三等奖1项(第3参与人)、广州市科技进步三等奖1项(第2参与人)。副主编和参编教材各1本,主编专著6本,副主编专著4本,参编专著5本;作为第一作者和通讯作者发表论文80篇,其中SCI收录22篇。作为第一导师培养博士后2名,博士生5名,硕士生11名。

黄宪章教授长期从事临床检验标准化、代谢病的早期实验诊断与发病机制、疾病实验室风险评估及个体化分子诊断方面的研究工作。负责制定国家标准1项、国家计量标准3项,参与制定国家卫生标准15项;主持国家自然科学基金面上项目1项、2017年国家重点研发计划重点专项子课题1项、国家十二五课题华南分中心课题1项、国家十一五课题子课题1项、省自然科学基金3项、省科技计划项目4项,参与国家自然科学基金2项。获广东省科技进步二等奖2项(第2参与人和第3参与人)、广东省科技进步三等奖1项(第2参与人)、湖北省科技进步三等奖1项(第3参与人)、广州市科技进步三等奖1项(第2参与人)。副主编和参编教材各1本,主编专著6本,副主编专著4本,参编专著5本;作为第一作者和通讯作者发表论文80篇,其中SCI收录22篇。作为第一导师培养博士后2名,博士生5名,硕士生11名。

# 分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2017年9月 第9卷 第5期 总第51期 Bimonthly Volume 9 Number 5 September 2017

主管	中山大学
主办	《中国家庭医生》杂志社有限公司
承办	中山大学达安基因股份有限公司
顾问	来茂德 申子瑜
主编	李明
编辑部主任	郝芬
编辑部	《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑	李晓兰 叶萍萍 李彩珍 黄文珊
出版	《中国家庭医生》杂志社有限公司
地址	广州市天河区天河北路179号祥龙大厦10~11楼(510620)
电话	(020) 32290177 32290789-206
传真	(020) 32290177
电子邮箱	jmdt@vip.163.com
刊号	ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R
邮发代号	46-283
发行单位	广东省报刊发行局
发行范围	国内外公开发行
广告经营许可证	粤工商广字第01139号
印刷	天意有福科技股份有限公司
出版日期	2017年9月18日
定价	RMB 15.00元
<b>Responsible Institution</b>	<i>Sun Yat-sen University</i>
<b>Sponsor</b>	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co. Ltd.</i>
<b>Organizer</b>	<i>DaAn Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University</i>
<b>Consultant</b>	<i>LAI Maode SHEN Ziyu</i>
<b>Editor in Chief</b>	<i>LI Ming</i>
<b>Managing Director</b>	<i>HAO Fen</i>
<b>Editorial Office</b>	<i>&lt;JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY&gt; Editorial Office</i>
<b>Editors</b>	<i>LI Xiaolan YE Pingping LI Caizhen HUANG Wenshan</i>
<b>Editing</b>	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co. Ltd.</i>
<b>Add</b>	<i>10~11 Fl., Xianglog Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i>
<b>Tel</b>	<i>(020) 32290177 32290789-206</i>
<b>Fax</b>	<i>(020) 32290177</i>
<b>E-mail</b>	<i>jmdt@vip.163.com</i>
<b>CSSN</b>	<i>ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R</i>
<b>Printing</b>	<i>TianYi Yofus Technology Co., Ltd</i>
<b>Publish Date</b>	<i>2017.9.18</i>
<b>Price</b>	<i>RMB 15.00</i>

# 分子诊断与治疗杂志

双月刊 2017年9月 第9卷 第5期

## 目次

### 述 评

染色体非整倍体无创产前检测技术质控要点及临床应用进展  
..... 曲守方 于婷 孙楠 等(295)

### 论 著

全外显子及靶向文库捕获测序在多囊肾病基因诊断中的应用比较  
..... 刘维强 张慧敏 李浩贤 等(301)

高通量检测技术对假肥大型肌营养不良分子诊断的研究  
..... 陆静 姚如恩 朱佳谊 等(308)

一种基于液相基因芯片技术对甲型和乙型流感病毒分型检测方法的建立  
..... 陈锦龙 吕刚 张优 等(313)

基于三引物荧光 PCR-毛细管电泳法的 *FMRI* 基因突变检测技术建立及其在自闭症辅助诊断中的应用  
..... 孙莉 杨琳艳 叶倩平 等(319)

32 497 例正常听力孕龄女性耳聋基因携带率与突变谱调查  
..... 刘畅 张彦 丁红珂 等(325)

曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶的生物信息学分析 ..... 李奕基 梁培(328)

实时荧光定量 PCR 检测急性髓系白血病 miR-125b 的表达及临床应用  
..... 王语欣 杨冬琴 周静东 等(334)

乙型脑炎病毒的实时荧光定量逆转录 PCR 检测方法的建立 ..... 孙莉 陈路 王华贵 等(341)

硫酸去氢表雄酮定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)的研制及性能评价  
..... 苏立 贾晨路(347)

### 综 述

下一代测序技术在胚胎植入前遗传学检测中的应用 ..... 谢美娟 杨学习 李明(353)

中国人群常见的药物代谢相关基因多态位点及其检测方法 ..... 杨琳艳 杨旭 范冬梅 等(358)

### 讲 座

体外诊断试剂临床试验核查要点解析 ..... 王嘉明 高旭年(364)

### 专家风采

黄宪章 ..... (封二)

### 实验室巡礼

广东省中医院检验医学部 ..... (封三)

# JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 9 Number 5 September 2017

---

## CONTENTS

### COMMENTS

Quality control and clinical application of non-invasive prenatal test for chromosomal aneuploidy

*QU Shoufang, YU Ting, SUN Nan, LI Lili, CHEN Fang, WU Yingsong, HUANG Jie* ..... (295)

### ORIGINAL ARTICLES

Comparison of the application of whole exome capture sequencing and targeted capture sequencing  
methods in gene diagnosis of polycystic kidney disease

*LIU Weiqiang, ZHANG Huimin, LI Haoxian, SUN Xiaofang* ..... (301)

Analysis of molecular diagnosis in DMD/BMD patients using high throughput detection technique

*LU Jing, YAO Ruen, ZHU Jiayi, WANG Jiwen, WANG Jian* ..... (308)

Development of a method for detecting type influenza virus A and B based on liquid-phase gene chip technology

*CHEN Jinlong, LV Gang, ZHANG You, FU Ruijia, YIN Feifei* ..... (313)

Development of *FMR1* gene mutation detection based on tri-primer fluorescence PCR-capillary electrophoresis  
and its application in auxiliary diagnosis of autism

*SUN Li, YANG Linyan, YE Qianping, YANG Xu, YANG Xuexi* ..... (319)

Investigation on gene carrying rate and mutation spectrum of deafness in 32 497 cases of childbearing-age  
women with normal hearing

*LIU Chang, ZHANG Yan, DING Hongke, WU Jing, MAI Mingqin, ZENG Yukun, LIU Ling, YIN Aihua* ..... (325)

Sequence bioinformatics analysis of cathepsin L-like proteinase from *Spirometra mansoni*

*LI Yiji, LIANG Pei* ..... (328)

Detection and clinical application of miR-125b in acute myeloid leukemia by real-time fluorescence quantitative PCR

*WANG Yuxin, YANG Dongqin, ZHOU Jingdong, LIN Jiang, YAO Dongming, YANG Jing,*

*QIAN Zhen, YANG Lei, QIAN Jun* ..... (334)

# JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 9 Number 5 September 2017

---

## CONTENTS

Development of one-step RT-qPCR for detection of Japanese encephalitis virus infection

*SUN Li, CHEN Lu, WANG Huagui, ZHAO Xiangsheng, HU Xiaoxu, CHI Hongxia, QI Rong, WU Weili* ..... (341)

Development and evaluation of a quantitative assay for dehydroepiandrosterone sulfate:  
chemiluminescence immunoassay

*SU Li, JIA Chenlu* ..... (347)

## REVIEWS

Application of the next generation sequencing technology in preimplantation genetic detection

*XIE Meijuan, YANG Xuexi, LI Ming* ..... (353)

Common gene-related polymorphisms of drug metabolism in Chinese population and their detection methods

*YANG Linyan, YANG Xu, FAN Dongmei, LIANG Zhikun, YE Qianping, YANG Xuexi* ..... (358)

# 染色体非整倍体无创产前检测技术质控要点及临床应用进展

曲守方<sup>1</sup> 于婷<sup>1</sup> 孙楠<sup>1</sup> 李丽莉<sup>1</sup> 陈芳<sup>2</sup> 吴英松<sup>3</sup> 黄杰<sup>1\*</sup>

**[摘要]** 基于下一代测序(next generation sequencing, NGS)技术的染色体非整倍体无创产前检测技术是产前诊断领域的重要突破,其检测原理简单、技术灵敏度和准确性很高,已成为目前非整倍体产前筛查发展及推广的主要方向。但由于NGS技术检测流程复杂,影响因素较多,需要在样本采集、运输、核酸提取、文库构建、上机测序、数据分析各个关键节点进行质控。同时,由于其试剂成分复杂、技术难度大、社会关注度高,也需对注册产品指标进行明确。鉴于此,本文对染色体非整倍体无创产前检测技术质控要点、产品规范要求及临床应用状况进行简要评述。

**[关键词]** 染色体非整倍体无创产前检测;下一代测序;质控要点;产品规范

## Quality control and clinical application of non - invasive prenatal test for chromosomal aneuploidy

QU Shoufang<sup>1</sup>, YU Ting<sup>1</sup>, SUN Nan<sup>1</sup>, LI Lili<sup>1</sup>, CHEN Fang<sup>2</sup>, WU Yingsong<sup>3</sup>, HUANG Jie<sup>1\*</sup>

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China, 100050; 2. China National Genebank, Shenzhen, Guangdong, China, 518083; 3. School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

**[ABSTRACT]** Non-invasive prenatal testing (NIPT) for fetal aneuploidies by next generation sequencing of maternal plasma DNA is a developing, innovative technology. This technology is highly sensitive and specific and has been validated in multiple clinical trials. NIPT has been recommended as the priorities for fetal aneuploidy by several professional societies. However, in consideration of the complicated workflow and many influencing factors, quality control throughout the entire process, such as sample collection and transportation, cfDNA isolation, library construction, sequencing, data analysis, is essential. Likewise, because of complex reagent ingredients, difficult technical requirements and high social concerns, it is also necessary to define the product performance criteria. In view of this, the issue of quality control, specifications and the progress of the clinical application progress of NIPT based on NGS technology will be briefly commented in this paper.

**[KEY WORDS]** NIPT; NGS; Quality control points; Product specification

染色体非整倍体是指相对于人正常的46条染色体而言,细胞中的某一条或几条染色体数目增加或减少,与婴幼儿期显著的发病率和死亡率有着密切的关系。新生儿中染色体异常的发病率为

1/160,其中21-三体综合征(trisomy 21, T21)、18-三体综合征(trisomy 18, T18)和13-三体综合征(trisomy 13, T13)是3种最主要常染色体非整倍体疾病,在新生儿中发病率分别为1/800~1/600、

基金项目:广州市重大科技攻关项目(2014Y2-00220)

作者单位:1. 中国食品药品检定研究院,北京 100050

2. 深圳国家基因库,广东,深圳 518083

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:黄杰, E-mail: jhuang5522@126.com

1/7 000~1/3 500 和 1/6 000~1/5 000<sup>[1]</sup>。针对染色体疾病的产前检测主要以血清学筛查、羊水穿刺为主。但血清学筛查准确度较低,具有5%的假阳性率及20%~40%的漏诊率;羊水穿刺虽然准确度较高,但是对孕妇具有创伤性,有1%的流产风险,不便于大规模的产前检测<sup>[2-3]</sup>。1997年,Lo等人<sup>[4]</sup>在孕妇血浆和血清中发现了胎儿游离DNA片段,这为遗传病的无创性产前基因检测提供了理论基础。2008年,首次通过下一代测序(next generation sequencing, NGS)技术利用母亲血浆游离DNA (cell-free DNA, cfDNA)进行无创染色体非整倍体(non-invasive prenatal testing, NIPT)检测<sup>[5-6]</sup>,随后大样本研究表明该技术非常有效<sup>[7]</sup>。由于基于NGS技术的NIPT具有无创取样、无流产风险、高灵敏度、高准确性( $\geq 99\%$ )等特点,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。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)等多个联盟组织正在极力推进这项技术的临床应用<sup>[8-10]</sup>。2016年7月28日ACMG发表最新声明:NIPT是目前染色体非整倍体最敏感的检测技术手段,没有之一,并且能够在不同年龄人群中替代传统的三体综合征筛查技术<sup>[11]</sup>。但由于NGS技术检测流程复杂,影响因素较多,需要在整个实验流程进行严格质控。同时,由于其试剂成分复杂、技术难度大、社会关注度高,也需明确其产品规范要求。因此,本文对NIPT的基本原理、质控要点、产品规范要求进行简要阐述并对其在国内的发展历程、适应症的拓展及临床应用现状进行简要评述,期望有助于促进NIPT技术和市场的规范、健康、快速、有序发展。

## 1 基本原理

1997年,Lo等人<sup>[4]</sup>研究证实在孕妇的血浆中存在有胎儿游离DNA片段,为无创DNA产前检测技术提供了依据。通过高通量测序技术可以对这些胎儿游离DNA进行检测,利用生物信息学分析软件系统对检测结果进行分析,最终得出胎儿患有21-三体综合征、18-三体综合征和13-三体综合征的风险率。首先在孕妇血浆中的游离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。利用高通量测序仪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。利用生物信息学分析软件系统把这些序列定位到人类基因组参考图谱上,计算出样本的游离DNA序列被分配到每条染色体上的具体数值比例,当胎儿的某条染色体数目发生异常时,其对应的游离DNA序列数量会小幅增加,通过高通量测序技术和生物信息学数据分析可以检测出这种微量变化,从而获得染色体数目的信息,进而实现对21-三体综合征、18-三体综合征和13-三体综合征进行快速的产前辅助诊断。

## 2 质控要点

### 2.1 样品采集、运输

#### 2.1.1 样品采集

NIPT检测样品为孕妇外周血血浆。一般采集5 mL外周静脉全血并分离血浆。使用的采血管可根据实际情况选择EDTA抗凝管或者 Streck Cell-Free DNA BCT管。其中EDTA抗凝采血管采集后4℃保存,8 h内进行血浆分离。Streck Cell-Free DNA BCT采血管具有保护游离DNA不降解及细胞不破碎的作用,可常温保存(18~25℃),72 h内进行血浆分离。两步离心法分离血浆,1 600 r/min 4℃离心10 min,吸取上清血浆,16 000 r/min 4℃离心10 min,吸取上清血浆,立即进行游离DNA的提取或者立即放入-20℃或-80℃冰箱中保存。

#### 2.1.2 保存与运输

全血样本:EDTA抗凝管的外周血在4℃条件下运输,须在8 h内送达并及时分离血浆; Streck Cell-Free DNA BCT采血管外周血常温(18~25℃)运输,72 h内送达并及时分离血浆。血浆样本应在干冰条件下运输,到达后及时存放于-80℃冰箱中。

### 2.2 游离DNA提取

一般使用200~600  $\mu\text{L}$ 血浆提取游离DNA,保证其片段多态性有足够的代表性。提取方法可以使用磁珠法,也可以使用离心柱法。但应在标本制备区进行并设立用于建库的DNA质量控制标准,如规定建库的DNA量并设立最低起始量等。一般要求浓度大于0.05 ng/ $\mu\text{L}$ ,0.1~0.2 ng/ $\mu\text{L}$ 为佳。

### 2.3 文库制备、质控

文库制备应当严格按照标准操作流程进行。多个样本pooling时一般使用barcode对样本进行

区分,每个样本应建立一个或一组唯一的 barcode。每个 barcode 只能用于一个标本,但当样本数量大于标签 barcode 数时,只要不在同一个检测 run,标签 barcode 都是可以重复使用的。应建立文库检测浓度及文库片段分布范围的文库质量控制标准。一般要求文库 DNA 浓度>0.1 ng/ $\mu$ L 且文库长度在 200~300 bp。

## 2.4 测序及数据分析

NIPT 检测主要应用 Z 检验(Z test)。Z 检验是一般用于大样本平均值差异性检验的方法。它是用标准正态分布的理论来推断差异发生的概率,从而比较 2 个平均数的差异是否显著。Z-值的应用条件为大样本量以及数据符合正态分布。

对孕妇血浆游离 DNA 进行全基因组测序,获取 DNA 片段的碱基序列;将碱基序列与人类参考基因组(hg19)进行比对得到碱基序列的确切位置;去除低质量、多匹配和非完全匹配的碱基序列;将每条染色体等分为 50 kb 的窗口,根据碱基序列的位置信息,计算分配到每个窗口的原始读段数,使用局部加权回归方法 Loess 对每个窗口的原始读段数进行校正,以消除测序导致的 GC 偏好性。采用唯一比对的序列进行后续统计,获得大样本样品的总有效数据(total mapped reads<sub>n</sub>)以及比对各个染色体有效数据(mapped to chromosome<sub>nm</sub>)。为了消除不同样本的测序数据量差异对检测结果的影响,分别将各个染色体的有效数据除以总有效数据即获得有效数据百分比(unique reads ratio, UR),见计算公式(1):

$$UR_{nm} = \frac{\text{Mapped to chromosome}_{nm}}{\text{Total mapped reads}_n} \times 100\% \quad (1)$$

其中  $m$  为染色体编号,  $m \in (1...22, X, Y)$ ,  $n$  为大样本样品数。计算大样本样品的 UR 均值及方差,见计算公式(2):

$$UR_{mean_m} = \frac{\sum_{k=1}^n UR_{km}}{n}, SD_m = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (UR_{km} - UR_{mean_m})^2}{n}} \quad (2)$$

其中  $m$  为染色体编号,  $m \in (1...22, X, Y)$ ,  $n$  为大样本样品数。

计算每个样品各个染色体的 Z 值,见计算公式(3):

$$Z_{nm} = \frac{UR_{nm} - UR_{mean_m}}{SD_m} \quad (3)$$

其中  $m$  为染色体编号,  $m \in (1...22, X, Y)$ ,  $n$  为样品数。

根据统计学原理,出现在 Z-值为正负 3 以外的数值,则有 99.9% 的可能为阳性,因此,通常将 Z-值=3 定为参考值分界点。|Z-值|>3 则判断为胎儿染色体非整倍体阳性。如果某个样品的染色体 chr21 的 Z-值大于 3,则认为该样品的 chr21 的 UR 显著( $\alpha < 0.005$ ) 离群,即 chr21-三体。

## 2.5 阴阳性质控

为了控制实验流程的重复性或效率,保证检测有效性,需在检测流程中加入阴阳性质控品,并能够监控从样本 DNA 片段到最终测序结果全过程。阴性对照品、阳性对照品浓度可根据不同测序平台的需求确定。建议每个检测 run 或测序都要进行阴阳性质控品的检测。

## 3 产品规范要求

为规范胎儿染色体非整倍体检测试剂盒(高通量测序法)的产品设计开发、性能评价的诊断试剂技术指标和要求,并为技术审评部门对注册申报资料的技术审评提供参考,中国食品药品检定研究院制定了《基于孕妇游离 DNA 的胎儿染色体非整倍体检测试剂质量控制技术评价指南(高通量测序法)》<sup>[12]</sup>。主要从测序平台的适用性、文库构建和测序策略、数据量控制、阴阳性符合率、嵌合和微缺失微重复检出率、检测限和重复性等方面提出了具体的产品规范要求。

国内下一代测序平台主要分为以 Illumina 公司、华大基因公司为代表光学技术和以 Thermo 公司为代表半导体技术。不同测序平台仪器大小、通量、读长、运行时间及测序成本等特异性参数不同,应结合具体的临床应用需求选择合适的测序平台并进行评估。不同的测序平台要求的测序检测方法和文库构建方法也有所不同,与测序检测方法相对应的文库构建方法应该给予充分的考虑,特别是要求和预期用途匹配。鉴于目前高通量测序技术的复杂程度,在文库构建、测序等技术过程中发生人为错误或意外的情况不能完全避免,应针对文库构建失败率进行限定,国家参考品中的文库构建失败率应不高于 1%。

在母体血液中胎儿的游离 DNA 片段是随机的序列而不是一个固定的序列,尽管其浓度随着孕周增加而增加,但是其序列在每次采样时都会有不同。在现行的国家参考品中,考虑到降低数据量可能导致假阴性和假阳性的发生,单个样本

数据量的要求是不低于 3.5 M reads。采用片段化选择的方式对样本提取的游离 DNA 或文库构建后的产物等过程中进行片段筛选,可以提高胎儿游离 DNA 和母体游离 DNA 的相对比例,但其数据量控制要求仍需进行验证后提供合理的有效数据量控制指标。

NIPT 检测 DNA 除胎儿游离 DNA 和母体游离 DNA 外,可能还有病原体的游离 DNA、试剂中污染物种的 DNA 以及来自环境的 DNA 等。所以应分析样本中胎儿游离 DNA 的量、片段大小等特性。在现行国家参考品中,阴性参考品(其他类型染色体非整倍体和其他染色体正常阴性样本)应不得检出 T21、T18 和 T13 阳性。由于平均胎儿游离 DNA 浓度为 10% 左右,所以阳性参考品包括 10% 浓度的 T21、T18 和 T13 样本,要求检出率达到 100%。70% 胎盘异常嵌合体应全部检出,30% 异常嵌合体可为检出或未检出。对于胎儿微缺失微重复,大于 20 Mb 的微缺失微重复应能检出,其余微缺失微重复参考品应不得检出 T21、T18 和 T13 阳性。检测限参考品的浓度一般为 5% 到 3.5%。要求 5% 浓度检测限参考品(包括流产组织、高 GC、胆红素和细胞系样本)应全部检出,3.5% 浓度检测限参考品应准确检出不低于 50%。此外,为考察试剂的重复性,应建立重复性考核指标。

#### 4 染色体非整倍体无创产前检测技术临床应用进展

作为一个具有良好前景的新兴技术,NIPT 临床应用在国内外经历了无监管、叫停、监管 3 个阶段。2010 年,美国 Sequenom 和 Verinata Health 等公司以第三方实验室的形式相继推出 NIPT 服务。同年北京贝瑞和康以及深圳华大基因也利用相似的技术进入无创产前诊断市场,随后安诺优达、达安基因、诺禾致源等公司相继进入染色体非整倍体无创产前检测市场。普遍采取的市场模式是由测序公司从医院收集样本后提供检测服务,但相关仪器和产品尚未获得医疗器械注册证,市场相对混乱,也严重影响了该技术在医院的推广度和普及率。2014 年 2 月,国家食品药品监督管理总局(China Food and Drug Administration, CFDA)和卫计委针对 NIPT 应用初始的混乱,联合发布《关于加强临床使用基因测序相关产品和技术管理的通知》<sup>[13]</sup>,在全国范围内叫停了 NIPT 服务,但并

非终止这项技术。2014 年 3 月,国家卫计委医政医管局开始接受高通量测序技术的临床应用试点单位申报,并于 2015 年初,由国家卫计委妇幼司下发《国家卫生计生委妇幼司关于产前诊断机构开展高通量基因测序产前筛查与诊断临床应用试点工作的通知》<sup>[14]</sup>,明确规定了 108 家产前诊断机构作为试点单位开展 NIPT 项目。至此,NIPT 第一阶段的临床应用正式开展。同时,2014~2015 年,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。NIPT 的应用逐渐走上正轨。经过了 NIPT 项目 2 年多的试点运营,卫生部门积累了 NIPT 项目开展、质量控制、监管方式等方面的经验。2016 年 8 月 8 日,中国食品药品检定研究院发布《第二代测序技术检测试剂质量评价通用技术指导原则》<sup>[15]</sup>。2016 年 10 月 27 日,卫计委发布了《国家卫生计生委办公厅关于规范有序开展孕妇外周血胎儿游离 DNA 产前筛查与诊断工作的通知》<sup>[16]</sup>,正式废止此前有关高通量基因测序产前筛查与诊断试点机构的相关规定,取消 108 家临床试点单位与 9 家医学检验所的临床试点。这意味着,原则上所有具备相关资质的医疗机构、医学检验所都可开展无创 DNA 产前筛查与诊断。2017 年 3 月 15 日,中国食品药品检定研究院发布《基于孕妇游离 DNA 的胎儿染色体非整倍体检测试剂质量控制技术评价指南(高通量测序法)》<sup>[12]</sup>,进一步对产品规范给予指导性意见。至此,国家卫生部门对 NIPT 的限定性逐步放开,对 NIPT 在合理监管下广泛应用于全国起到巨大的推动作用,翻开了该技术临床应用的新篇章。2016 年中国 NIPT 市场推广约 200 万人份,创造了 30 亿元~40 亿元的销售额。在无创产前领域,无论是技术还是市场推广成熟度,中国都已处于国际领先地位。

2016 年 10 月 27 日,卫计委发布的《国家卫生计生委办公厅关于规范有序开展孕妇外周血胎儿游离 DNA 产前筛查与诊断工作的通知》中明确指出,除孕周小于 12 周;夫妇一方有明确染色体异常;一年内接受过异体输血、移植手术、异体细胞治疗等;胎儿超声检查提示有结构异常须进行产前诊断;有基因遗传病家族史或提示胎儿罹患基因病高风险;孕期合并恶性肿瘤;医师认为有明显

影响结果准确性的其他情形;这7条作为不适用情形外,孕妇或其家属在充分知情同意情况下,皆可选择NIPT<sup>[16]</sup>。随着NIPT在临床应用上的广泛开展,NIPT在产前筛查的适应证又扩大到胎儿微缺失微重复综合征(microdeletion/microduplication syndrome, MD)的检测。MD是除染色体非整倍体之外的另一大引起新生儿出生缺陷的遗传性因素,是一类由于染色体拷贝数变异(copy number variation, CNV)而致的具有复杂表型的综合征性疾病。MD患者往往有智力发育障碍伴有或不伴结构异常。目前对MD的产前诊断多局限在已有先证者的病例或者超声检查异常的病例,没有生化标志物可筛查MD。通过传统的产前筛查方式,如果胎儿携带致病的CNV但是胎儿超声提示未见异常,该样本就错失了产前诊断的机会。自从2011年首例报道应用NIPT进行MD的产前诊断后<sup>[17]</sup>,又有多篇基于NGS技术无创检测MD的相关案例<sup>[17-25]</sup>。这些研究证实了NIPT用于胎儿MD检测的可行性,但需要较目前NIPT方法更高的胎儿游离DNA浓度和测序深度,从经济学角度考虑尚不适宜进行大范围的临床推广。多篇研究通过改进算法提高检测的灵敏度,从而降低微重复微缺失检测所需的测序深度,可以在一定程度上降低成本<sup>[26-29]</sup>。基于此,国外的NIPT检测巨头Natera、Sequenom、Verinata Health等机构扩大了NIPT的筛查范围,开始通过临床实验室改进法案(clinical laboratory improvement amendments, CLIA)认证实验室提供MD的商业检测服务,范围主要涉及22q11.2微缺失(DiGeorge)、Angelman、Jacovsen、1p36微缺失、Cri-du-chat、Prader-Willi、Langer-Giedion和Wolf-Hirschhorn综合征这几种发病率较高的MD综合征。国内的华大基因和贝瑞和康也分别升级了各自NIPT检测的服务范围,同样也提供如22q11.2微缺失、Angelman等综合征的检测结果。同时国际上部分学会和组织也出台了相关指南和共识。ACOG和ISPD在2015年针对NIPT检测更新了指南,ACOG保守地指出对于MD的筛查尚未被临床验证,其灵敏性和特异性也没有确切证据;ISPD则表示NIPT扩增检测应当限定在研究清楚的MD综合征范围内,并结合临床指针共同判断。2016年7月ACMG发表最新声明:对于已知CNVs,医生应该在检测之前充分告知孕妇NIPT检测范围会扩大至CNVs,并且

CNVs检测结果具有较高的假阳性和假阴性。但如果NIPT发现了CNVs,应该进行产前诊断验证<sup>[11]</sup>。结合目前的研究进展和指南建议,用NIPT的方法检测5 Mb以上且具有较为明确临床意义的CNV具有一定可行性,但仍缺乏大规模前瞻性的CNV临床检测数据,用于商业化的临床筛查应慎重使用。

## 5 小结与展望

政策支持和超高的灵敏度使NIPT成为染色体非整倍体临床筛查的主要技术手段。2016年NIPT全国检测数量约200万人次,普及率10%左右。其在大中城市的普及率已大于15%,并有较快的增长率。部分发达地区甚至已经提出利用该技术来基本消灭唐氏综合征。但是,我们还应看到NIPT项目的普及仍有巨大的提升空间,并存在明显的不均衡。偏远地区的NIPT检测无论是就检测数量还是地区覆盖率而言,与发达地区相比均有明显的差距。即使NIPT价格呈逐年下降的趋势,但相对于传统的唐筛项目而言,检测价格仍处于较高水平。并且因为NIPT检测费用并未纳入医疗保险,对于全国绝大多数地区,尤其是县级市及下属区、镇及农村的家庭而言,其检测费用过于昂贵,在无政府补贴的情况下,大部分家庭尚不倾向于进行NIPT检测。同时全国能够开展NIPT检查项目的医疗机构仍处于刚刚放开的阶段,大部分医疗机构在医疗环境和医疗人员技术要求上尚不能满足临床需求。由此,积极提升医疗人员技术水平、大力提高无创产前筛查的总体普及率、尽量减少不同地区检测水平的不均衡性,对降低出生缺陷率、提高整体优生优育水平十分重要。

## 参考文献

- [1] Driscoll DA, Gross S. Clinical practice, prenatal screening for aneuploidy [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(24):2556-2562.
- [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] Pitukijronnakorn S, Promsonthi P, Panburana P, et al. Fetal loss associated with second trimester amniocentesis [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2011, 284(4):793-797.

- [4] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum [J]. *Lancet*, 1997, 350(9076):485-487.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics [J]. *Genetics in Medicine*, 2016, 18(10):1056-1065.
- [12] 中国食品药品检定研究院. 基于孕妇游离DNA的胎儿染色体非整倍体检测试剂质量控制技术评价指南(高通量测序法) [EB/OL]. <http://www.nicpbp.org.cn/CL0149/9176.html>, 2017-03-15/2017-08-04.
- [13] 食品药品监管总局办公厅, 国家卫生计生委办公厅. 关于加强临床使用基因测序相关产品和技术管理的通知, 食药监办械管〔2014〕25号 [EB/OL]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0845/96853.html>, 2014-02-09/2017-08-04.
- [14] 国家卫计委妇幼. 国家卫生计生委妇幼司关于产前诊断机构开展高通量基因测序产前筛查与诊断临床应用试点工作的通知, 国卫妇幼卫便函〔2015〕4号 [EB/OL]. <http://d.dxy.cn/preview/7635345>, 2015-01-15/2017-08-04.
- [15] 中国食品药品检定研究院. 第二代测序技术检测试剂质量评价通用技术指导原则 [EB/OL]. <http://www.nicpbp.org.cn/CL0149/8495.html>, 2016-08-08/2017-08-04.
- [16] 国家卫生计生委办公厅. 关于规范有序开展孕妇外周血胎儿游离DNA产前筛查与诊断工作的通知 [EB/OL]. <http://www.nhfpc.gov.cn/>, 2016-10-27/2018-08-04.
- [17] Wapner RJ, Martin CL, Levy B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(23):2175-2184.
- [18] Wapner RJ, Babiarz JE, Levy B, et al. Expanding the scope of noninvasive prenatal testing: detection of fetal microdeletion syndrome [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2015, 212(3):332.e1-9.
- [19] Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies [J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 86(5):749-764.
- [20] Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, et al. Global variation in copy number in the human genome [J]. *Nature*, 2006, 444(7118):444-454.
- [21] Yatsenko SA, Peters DG, Saller DN, et al. Maternal cell-free DNA-based screening for fetal microdeletion and the importance of careful diagnostic follow-up [J]. *Genet Med*, 2015, 17(10):836-838.
- [22] Peters D, Chu T, Yatsenko SA, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of a fetal microdeletion syndrome [J]. *New England Journal of Medicine*, 2011, 365(19):1847-1848.
- [23] Jensen TJ, Dzakula Z, Deciu C, et al. Detection of microdeletion 22q11.2 in a fetus by next-generation sequencing of maternal plasma [J]. *Clin Chem*, 2012, 58(7):1148-1151.
- [24] Srinivasan A, Bianchi DW, Huang H, et al. Noninvasive detection of fetal subchromosome abnormalities via deep sequencing of maternal plasma [J]. *American Journal of Human Genetics*, 2013, 92(2):167-176.
- [25] Yu SC, Jiang P, Choy KW, et al. Noninvasive prenatal molecular karyotyping from maternal plasma [J]. *Plos One*, 2013, 8(4):e60968.
- [26] Chen S, Lau TK, Zhang C, et al. A method for noninvasive detection of fetal large deletions/duplications by low coverage massively parallel sequencing [J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33(6):584-590.
- [27] Zhao C, Tynan J, Ehrich M, et al. Detection of fetal subchromosomal abnormalities by (下转第 324 页)

# 全外显子及靶向文库捕获测序在多囊肾病基因诊断中的应用比较

刘维强 张慧敏 李浩贤 孙筱放\*

**[摘要]** **目的** 比较全外显子和靶向文库捕获高通量测序对多囊肾病相关基因的检测效率。**方法** 对6份多囊肾病标本(包括一份低比例嵌合变异标本)分别进行全外显子捕获或靶目标捕获2种方法建立文库, Illumina HiSeq 2000 仪器连续双向测序。**结果** 以 *PKD1*、*PKD2* 和 *PKHD1* 3个基因作为目标序列, 靶向捕获法平均测序深度为190倍, 5倍以上测序深度占全部有效序列的85.59%, 靶区域覆盖度95%以上, 但 *PKD1* 第一外显子仍有200~300 bp 区域不能覆盖; 全外显子捕获法平均测序深度为28.34倍, 5倍以上测序深度占全部有效序列的55.35%, 目标区域覆盖度较低, *PKD1* 外显子覆盖度小于40%。**结论** 靶向文库捕获测序法具有较高的敏感性、准确性, 更适合 *PKD* 基因变异的检测, 但高通量测序技术对 *PKD1* 基因检测仍有不足之处。

**[关键词]** 多囊肾病; 靶向捕获; 全外显子

## Comparison of the application of whole exome capture sequencing and targeted capture sequencing methods in gene diagnosis of polycystic kidney disease

LIU Weiqiang, ZHANG Huimin, LI Haoxian, SUN Xiaofang\*

(Key Laboratory for Reproduction and Genetics of Guangdong Higher Education Institutes, Key Laboratory for Major Obstetric Diseases of Guangdong Province, Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510150)

**[ABSTRACT]** **Objective** To evaluate the efficiency of the whole exome capture sequencing method and the targeted libraries capture sequencing method for improving the efficiency of molecular diagnosis of polycystic kidney disease. **Methods** The libraries of 6 tested samples (including 1 sample with low ratio mosaic mutation) were prepared by whole exome capture method and targeted capture method, respectively. Illumina HiSeq2000 was used for sequencing. **Results** The selected target sequence were *PKD1*, *PKD2* and *PKHD1*. The average depth in targeted capture method and whole exome sequencing method is 190 and 28.34, respectively. The ratio of region of target sequence with 5x coverage is 85.59% and 55.35% in targeted capture method and whole exome sequencing method, respectively. Coverage analysis indicated that the average coverage of whole exome sequencing method is less than 40%, which is significantly lower than that of targeted capture method (95%); however, 200~300 base pair of the first exon of *PKD1* uncovered yet using targeted capture method. **Conclusion** Targeted capture method is more suitable for *PKD* gene-based diagnostic using high-throughput sequencing. However, the uncovered region still needs conventional Sanger sequencing for complement.

**[KEY WORDS]** Polycystic kidney disease; Targeted capture; Whole exome

基金项目: 广东省科技厅项目(2014A020212354, 2013B051000087, 201400000004-4, 201400000003-4);  
广东省医学科研基金(A2015327)

作者单位: 广州医科大学附属第三医院, 广东省产科重大疾病重点实验室, 广东省普通高校生殖与遗传  
重点实验室, 广东, 广州 510150

\*通讯作者: 孙筱放, E-mail: xiaofangsun@gzhmu.edu.cn

多囊肾病 (polycystic kidney disease, PKD) 是指在肾脏中发生多个充满液体的囊肿并导致肾脏结构和功能损害的疾病,这种囊肿还可以累及到其他器官<sup>[1]</sup>。根据遗传方式不同,其又分为常染色体显性遗传多囊肾病 (autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) 和常染色体隐性遗传多囊肾病 (autosomal recessive polycystic kidney disease, ARPKD)<sup>[2]</sup>。PKD 疾病严重影响着病人的生活质量和生命健康。

PKD 主要致病基因为 *PKD1*、*PKD2* 和 *PKHD1* 基因。*PKD1*、*PKHD1* 是分别有 46 个和 67 个外显子的大基因,另外 *PKD1* 基因存在假基因,且 PKD 疾病相关基因突变不存在热点,因此,对其分子诊断非常困难并且检测非常费时、费力且技术要求高。目前基于全外显子和目标序列捕获的下一代高通量测序技术 (next generation sequencing, NGS) 已开始应用于 PKD 等遗传性疾病的分子诊断<sup>[3-5]</sup>。本研究对 PKD 患者标本应用全外显子和目标序列文库捕获 2 种方法测序,比较这 2 种方法在 PKD 疾病诊断的效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 对象

选择 *PKD1*、*PKD2*、*PKHD1* 3 个基因为靶目标区域进行效率评估。选取 6 份样本进行全外显子捕获或靶目标文库捕获方法进行测序。为更好地评估这 2 种方法对 PKD 疾病的检测效率,本研究选取的样本中包括一例变异位点为低比例嵌合的 ADPKD 患者标本。

### 1.2 试剂和仪器

DNA 提取方法采用 DNeasy Tissue 试剂盒 (Qiagen 公司,德国),DNA 打断仪 Covaris S2 系统购自美国 Covaris 公司,全外显子捕获和靶目标捕获 2 种文库建立方法分别选用美国 Agilent 公司的 SureSelect 试剂和美国 Roche 公司的定制基因片段捕获芯片,测序试剂和仪器来自美国 Illumina 公司。

### 1.3 文库构建及测序

3  $\mu\text{g}$  基因组 DNA 经 Covaris S2 系统打断为 200~250 bp 大小片段,分别使用美国 Agilent 公司的 SureSelect 测序试剂进行全外显子文库构建和美国 Roche 公司定制的基因片段捕获芯片进行靶目标文库富集。文库经 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 ABI StepOne 进行片段大小、浓度、富集度的检

测,最后利用高通量测序仪 Illumina HiSeq 2500 Analyzers (Illumina, 美国) 连续双向测序 90 个循环,用 Illumina Pipeline software (version 1.3.4) 读出原始测序数据。

### 1.4 数据分析

数据下机后进入信息分析部分。首先对下机的原始数据 (raw reads) 进行测序质量评估,去除低质量以及被接头污染的 reads。随后用 BWA 软件 (Burrows Wheeler Aligner) 与 GRCh37/Hg19 进行序列比对,与此同时进行序列捕获效果评价,用 SOAP-snp 软件和 Samtools 软件分别进行 SNV (single nucleotide variant) 和 Indel (insertion and deletion) 的查询,生成目标区域碱基多态性结果,随后进行数据库的比对,应用 NextGENe 软件找出可疑突变。

## 2 结果

### 2.1 文库质量评价

文库质量经 Tap-Stations 检测,文库片段大小、分子量均符合要求。

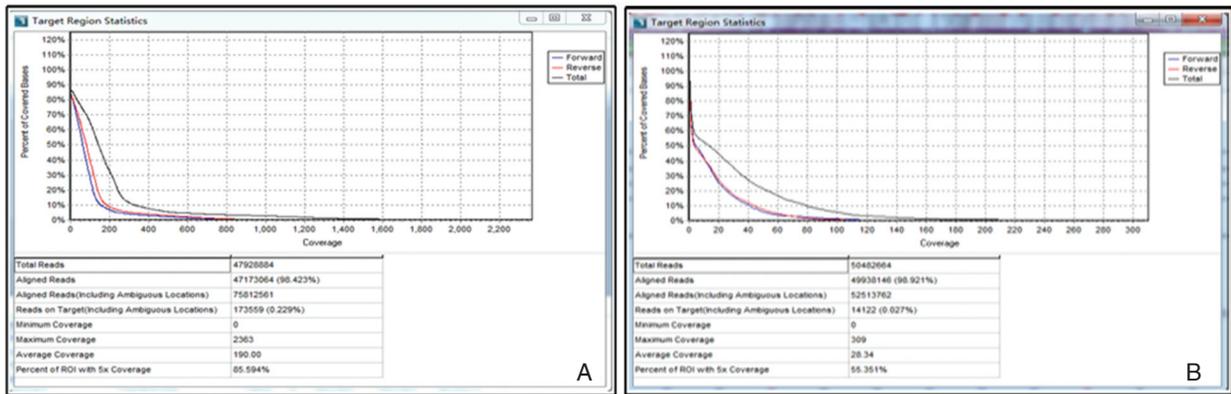
### 2.2 全外显子捕获法和靶目标捕获法 NGS 有效数据分析

通过 NextGENe 软件对原始数据的处理,全外显子捕获法测序平均得到 50 482 664 条有效序列读数,其中与基因组参考序列比对上的序列平均有 49 938 146 条序列,占全部有效序列的 98.92%。以 *PKD1* (NM\_001009944)、*PKD2* (NM\_000297)、*PKHD1* (NM\_138694) 3 个转录本外显子作为目标靶序列比对,平均得到 14 122 条有效靶序列读数,占全部有效序列的 0.03%。平均测序深度为 28.34 倍,5 倍以上测序深度占全部有效序列的 55.35%。

靶目标捕获法 NGS 测序平均得到 47 928 884 条有效序列读数,其中与基因组参考序列比对上的序列平均有 47 173 064 条序列,占全部有效序列的 98.42%。用以上 3 个基因转录本外显子作为目标靶序列比对,平均得到 173 559 条有效靶序列读数,占全部有效序列的 0.23%。平均测序深度为 190 倍,5 倍以上测序深度占全部有效序列的 85.59%,结果如图 1。

### 2.3 全外显子捕获与靶目标捕获法对 *PKD1* 基因测序的数据比较

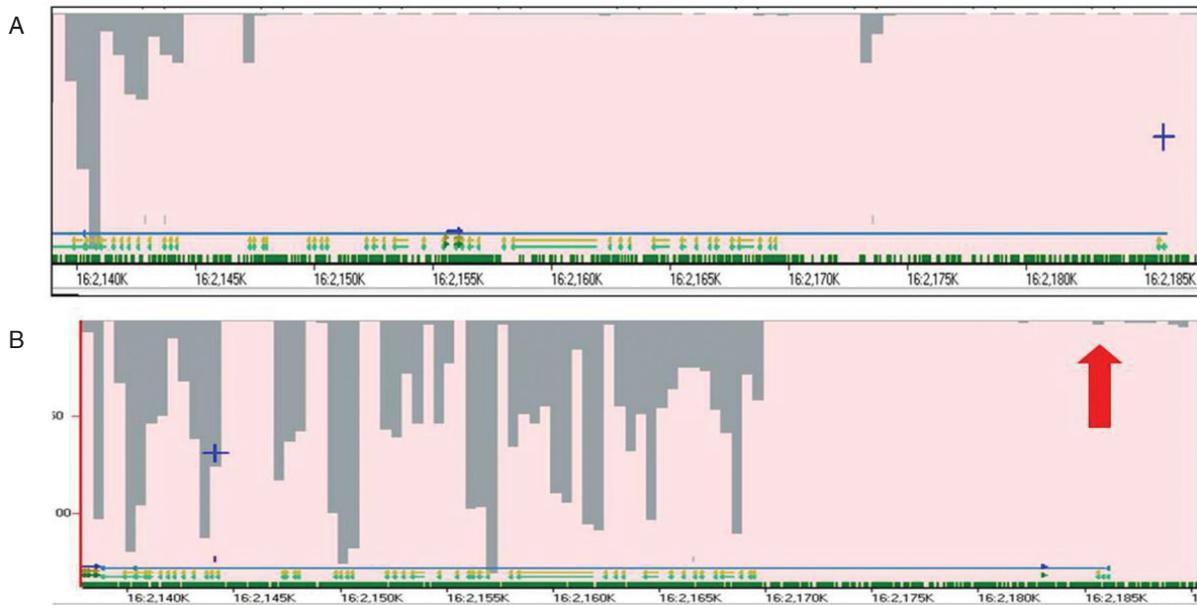
通过比较 2 种不同方法对 *PKD1* 基因的捕获效率,本研究发现靶目标捕获法在覆盖度和测序深度上均要比全外显子捕获法好,见图 2。



A: 靶目标捕获法 NGS 数据显示其捕获的有效靶序列有较高的测序深度或有效测序读数; B: 全外显子捕获法数据对 PKD 靶基因的捕获效率显著降低,且平均测序深度只有 28.34 倍,有部分区域测序覆盖度为 0

图 1 全外显子杂交捕获法和基因芯片靶序列捕获法 NGS 数据分析

Figure 1 Comparison of NGS data between the whole exome capture sequencing and the targeted gene capture sequencing methods



灰色柱长度代表测序数据深度,宽度代表测序覆盖度,图下方黄色、绿色小箭头代表外显子或转录子区。A: 全外显子捕获法对 PKD1 基因测序的结果可见,在 PKD1 第 1 到 33 号外显子间测序数据信号极低,捕获效率差; B: 靶目标捕获法对 PKD1 基因测序的结果可见,除第 1 外显子测序深度偏低外(红色箭头),其他所有外显子均有较好的测序数据结果

图 2 2 种不同方法对 PKD1 基因的捕获效率

Figure 2 Evaluation the capture efficiency of PKD1 gene between the 2 methods

#### 2.4 全外显子捕获与靶目标捕获法对 PKD2 基因测序的数据比较

通过比较 2 种不同方法对 PKD2 基因的捕获效率,发现在覆盖度和测序深度上靶目标捕获法与全外显子捕获法效率没有明显差异,见图 3。

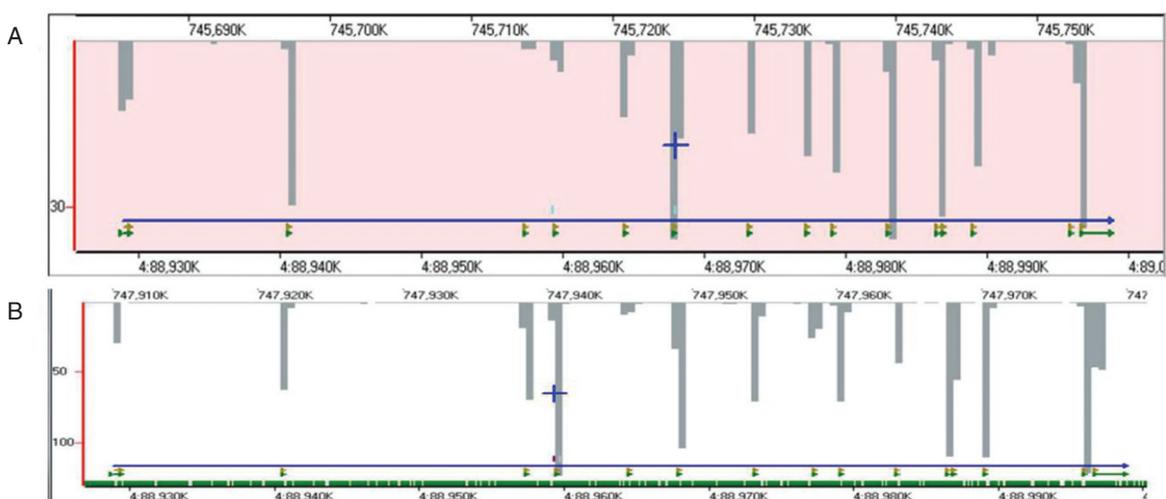
#### 2.5 全外显子捕获与靶目标捕获法对 PKHD1 基因测序的数据比较

通过比较 2 种不同方法对 PKHD1 基因的捕

获效率,发现在覆盖度和测序深度上靶目标捕获法与全外显子捕获法效率没有明显差异,见图 4。

#### 2.6 对测序未覆盖区域的分析

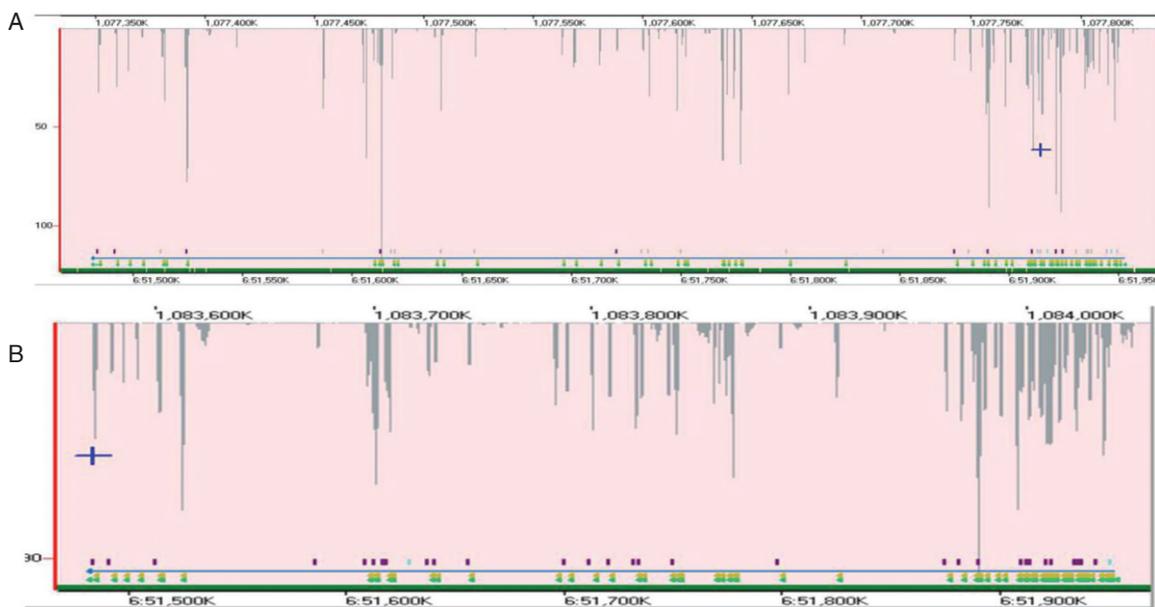
虽然靶目标捕获法相对全外显子捕获法有较好的测序深度和测序覆盖度,但仍有部分区域如 PKD1 第 1 外显子不能完全覆盖。本研究对这部分未覆盖区域进行了分析,以明确缺失区域具体



A: 全外显子捕获法对 *PKD2* 基因测序的数据; B: 靶目标捕获法对 *PKD2* 基因测序的数据。灰色柱长度代表测序数据深度, 宽度代表测序覆盖度, 图下方黄色、绿色小箭头代表外显子或转录子区。分析 2 种方法的测序数据发现, 2 种方法对 *PKD2* 基因的测序数据没有明显的差异, 均能较好地捕获 *PKD2* 基因几乎全部目标序列

图 3 2 种不同方法对 *PKD2* 基因的捕获效率

Figure 3 Evaluation of the capture efficiency of *PKD2* gene between the 2 methods



A: 全外显子捕获法对 *PKHD1* 基因测序的数据; B: 靶目标捕获法对 *PKHD1* 基因测序的数据。灰色柱长度代表测序数据深度, 宽度代表测序覆盖度, 图下方黄色、绿色箭头代表外显子或转录区。分析 2 种方法的测序数据发现, 2 种方法对 *PKHD1* 基因的测序数据没有明显的差异, 均能较好地捕获 *PKHD1* 基因全部目标序列

图 4 2 种不同方法对 *PKHD1* 基因的捕获效率

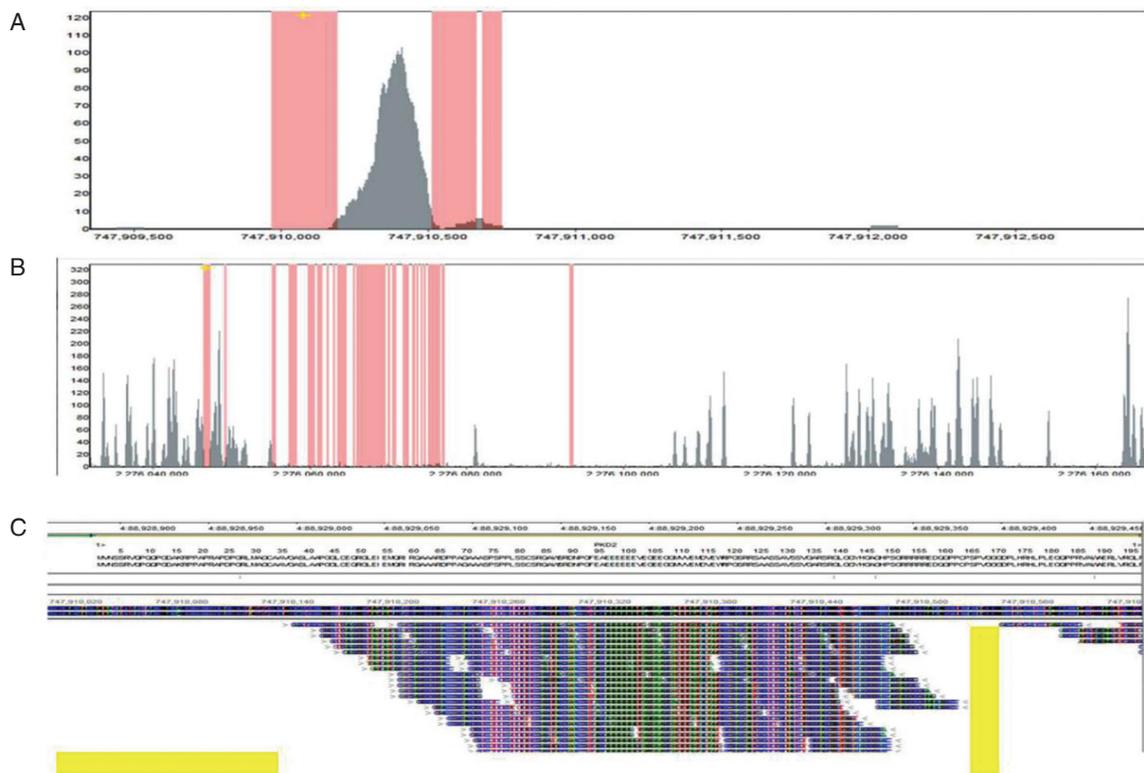
Figure 4 Evaluation of the capture efficiency of *PKHD1* gene between the 2 methods

位置, 方便设计引物进行常规 Sanger 测序弥补。利用 NextGENe 软件可以清楚地发现未覆盖区域的具体位置, 见图 5。

### 2.7 低比例嵌合变异 NGS 结果分析

本研究所选一例样本在 16 号染色体 2168790

号位置发生了错义突变(c.416G>A, p.Trp139Ter), 存在低比例嵌合变异现象。利用全外显子捕获测序法, 由于此区域整个测序深度只有 5 倍左右, 导致嵌合突变没有有效检出。利用靶目标捕获测序 (targeted capture sequencing), 此区间测序浓度达



A: 靶目标捕获法 *PKD1* 第1外显子测序数据,灰色部分为有效测序数据覆盖度和测序深度,左侧红色部分代表未覆盖区域,右侧红色部分代表测序深度小于5倍; B: 全外显子捕获测序法 *PKD1* 基因测序数据,大部分区域均有红色标记,代表这些区域没有测序数据覆盖或覆盖度极低,结果较差; C: *PKD1* 基因第1外显子因本身的结构复杂或GC含量太高导致测序序列没有完全覆盖(黄色标记部分),从NextGENe软件可以明确定位未覆盖区域的确切位置,从而对这部分NGS不能覆盖的区域通过常规Sanger测序进行补充

图5 NGS测序数据未覆盖区域的定位

Figure 5 Identify the uncovered data regions after NGS

到1 830倍,虽然软件自动分析时将此嵌合突变过滤掉,但由于测序深度足够大,经调整参数设置,此错误过滤得以纠正,成功检测出此低比例嵌合,如图6。

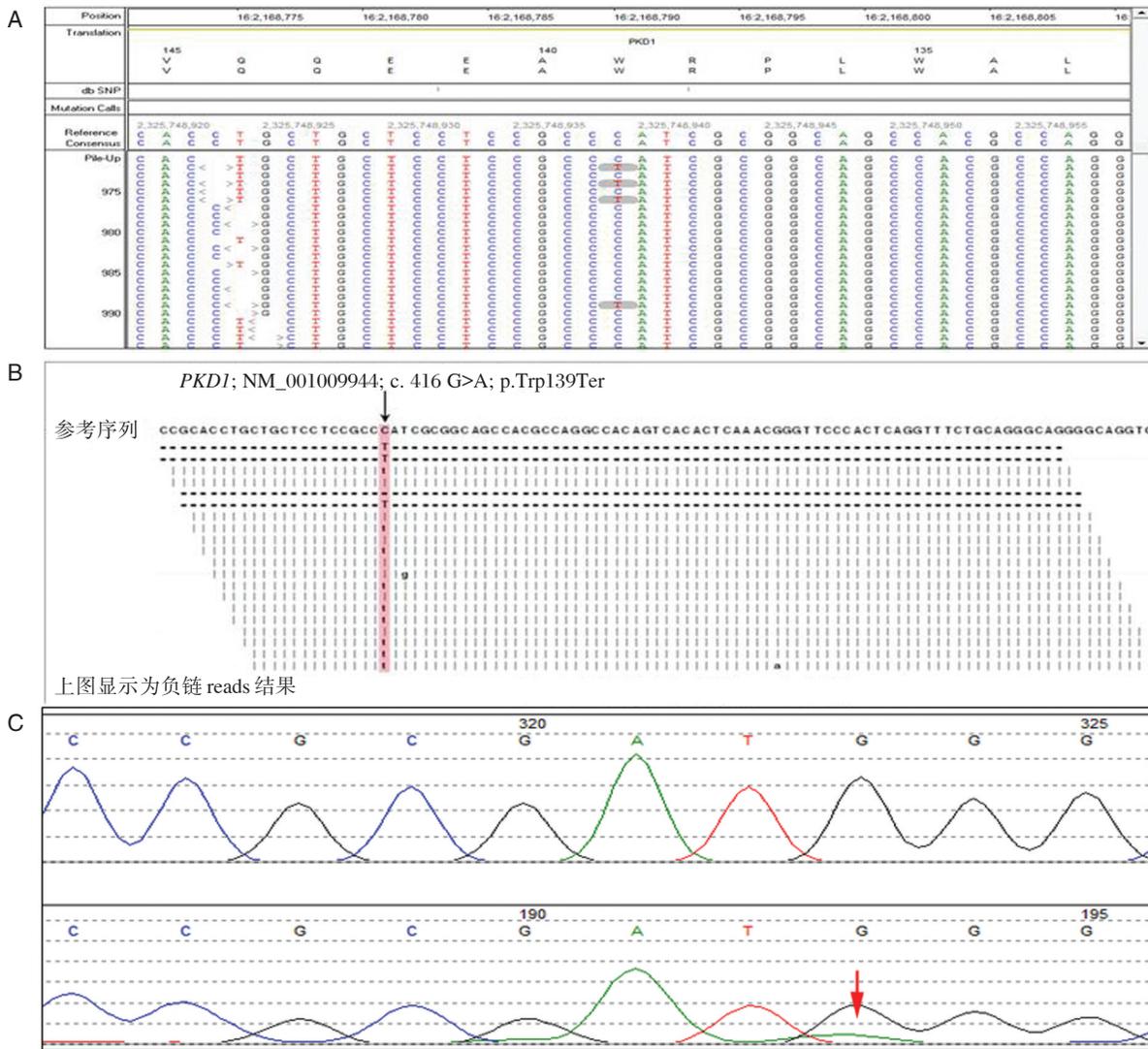
### 3 讨论

PKD疾病基因检测目前常用传统的Sanger测序法,其最主要的缺点就是测序通量太低,一次PCR实验只能检测1个到2个外显子,而PKD疾病由3个基因组成,需测序的外显子总数加起来有120多个,使得整个诊断体系效率偏低。另外,Sanger测序还存在着扩增失败、DNA交叉污染等因素,所有这些因素均导致整个流程成本高、时间长、工作量巨大<sup>[6]</sup>,使得这种基于传统技术基础上的诊断体系很难满足目前临床检测的需求。

NGS技术具有高通量、测序速度快、准确性高、结果稳定等特点。目前利用NGS技术全外显子组测序、目标序列靶向测序的科研和临床应用

已广泛开展<sup>[3, 7-8]</sup>。基于不同的文库构建方法,NGS应用较为普遍的3种模式分别为全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)<sup>[7]</sup>、全外显子测序(whole exome sequencing, WES)<sup>[8]</sup>及靶目标捕获测序<sup>[9]</sup>等。目前,NGS技术已应用于PKD疾病的分子诊断<sup>[10-12]</sup>。

最近有文献比较了全外显子和靶目标测序方法对肿瘤样本的检测效率,发现靶目标测序方法相对全外显子测序方法在结果准确度上更加可靠<sup>[13]</sup>。针对多囊肾病,本研究比较了这2种NGS检测方法的检测效率。虽然全外显子捕获方法相对靶目标测序方法成本偏高,但其可以在全基因范围进行外显子的检测,可以发现除*PKD1*、*PKD2*、*PKHD1*外潜在的新的与多囊肾相关的基因或与肾病相关的基因变异<sup>[14]</sup>。本研究发现虽然全外显子捕获方法在*PKD1*基因的检测效率低于靶目标捕获方法,但其在*PKD2*和*PKHD1*基因的捕获效率上与靶目标捕获方法没有太大差异。因此



A: 靶目标捕获法测序结果发现,在 16 号染色体 2168790 号位置近 15% 读数(reads)存在部分碱基的置换现象,由于变异比例低,软件进行数据过滤时将此变异认为是测序错误自动过滤掉了; B: 经调整参数及运用另一种软件分析,证实此变异为低比例嵌合变异; C: Sanger 测序结果证实此结果为真实变异

图 6 NGS 检测嵌合变异

Figure 6 Detection the mosaic mutation by using NGS

当患者具有典型的多囊肾表型而常规 3 个基因又 没有发现变异的情况下可以考虑使用此方法。

相对于全外显子捕获测序,虽然靶目标捕获 测序捕获的外显子数目较全外显子捕获大幅减 少,但其对目标区域的测序深度有效提高,因此这 种方法有足够量的测序读数进行变异的分析。在 本研究中,我们应用 Roche 公司定制的基因捕获芯 片进行靶目标的捕获。这款定制芯片可以靶向捕 获 222 个基因的 3 093 个外显子以及剪切位点,目 标基因涵盖多囊肾病的 3 个致病基因。通过 Next- GENE 软件对原始数据的预处理,本研究证实靶目

标捕获法测序得到有效序列读数、5 倍以上测序深 度占全部有效序列比例等多个关键指标都要比全 外显子捕获效率更高。分析原因,笔者认为,全外 显子捕获 *PKD1* 基因效率低的主要原因是由于全 外显子捕获探针对部分基因尤其是 GC 含量特别 高的基因如 *PKD1* 的捕获敏感性很差,探针不能有 效与目标区域结合,直接导致目标区域没有数 据。同时由于基因组中存在大量假基因<sup>[15]</sup>,很大 一部分此区域数据被认为是测序错误或样本污染 而被软件自动过滤掉了,导致最终可用的有效数 据大大减少。

靶目标捕获测序方法测序深度的增加也有利于发现低比例嵌合变异。以本研究一例低比例嵌合变异为例,虽然嵌合比例只有15%左右,但由于靶目标捕获在此区域测序深度高达1 830倍,因此仍能灵敏地被检测到。即便如此,NGS方法仍有其不足之处,如对高GC含量的区域NGS方法的捕获效率明显偏低<sup>[16]</sup>,这与本研究发现*PKD1*第一外显子有数百碱基序列没有覆盖到,第42号外显子的测序深度相对其他区域要低很多现象一致。分析原因可能与文库构建时高GC含量导致PCR扩增效率低有关<sup>[17]</sup>。对于此部分数据,本实验利用分析软件明确了未覆盖或低覆盖区域的确切区域及片段大小,可利用一代测序进行补全。

总之,通过比较全外显子捕获方法和靶目标捕获法测序在多囊肾基因变异诊断中的应用,本研究发现靶目标捕获法对于多囊肾基因诊断具有更高的性价比和更高的捕获效率。当然,NGS技术对复杂结构基因、高GC含量区域的检测仍有不足之处,需结合常规Sanger测序进行相互补充。

#### 参考文献

- [1] Harris PC, Torres VE. Genetic mechanisms and signaling pathways in autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124 (6): 2315-2324.
- [2] Ghata J, Cowley BD, Jr. Polycystic kidney disease[J]. *Compr Physiol*, 2017, 7 (3): 945-975.
- [3] Edrees BM, Athar M, Al-Allaf FA, et al. Next-generation sequencing for molecular diagnosis of autosomal recessive polycystic kidney disease [J]. *Gene*, 2016, 591 (1): 214-226.
- [4] Liang WC, Tian X, Yuo CY, et al. Comprehensive target capture/next-generation sequencing as a second-tier diagnostic approach for congenital muscular dystrophy in Taiwan[J]. *PLoS One*, 2017, 12 (2): e0170517.
- [5] Yang T, Meng Y, Wei X, et al. Identification of novel mutations of *PKD1* gene in Chinese patients with autosomal dominant polycystic kidney disease by targeted next-generation sequencing[J]. *Clin Chim Acta*, 2014, 433:12-19.
- [6] Liu W, Chen M, Wei J, et al. Modification of PCR conditions and design of exon-specific primers for the efficient molecular diagnosis of *PKD1* mutations [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2014, 39 (6): 536-545.
- [7] Chen R, Feng Y, Wang X, et al. Whole genome sequences of three Clade 3 *Clostridium difficile* strains carrying binary toxin genes in China [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43555.
- [8] Zhou T, Souzeau E, Sharma S, et al. Whole exome sequencing implicates eye development, the unfolded protein response and plasma membrane homeostasis in primary open-angle glaucoma [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (3): e0172427.
- [9] Feng J, Li Y, Jia Y, et al. Spectrum of somatic mutations detected by targeted next-generation sequencing and their prognostic significance in adult patients with acute lymphoblastic leukemia [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10 (1): 61.
- [10] Kinoshita M, Higashihara E, Kawano H, et al. Technical evaluation: identification of pathogenic mutations in *PKD1* and *PKD2* in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease by next-generation sequencing and use of a comprehensive new classification system[J]. *PLoS One*, 2016, 11 (11): e0166288.
- [11] Mallawaarachchi AC, Hort Y, Cowley MJ, et al. Whole-genome sequencing overcomes pseudogene homology to diagnose autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. *Eur J Hum Genet*, 2016, 24 (11): 1584-1590.
- [12] Borrás DM, Vossen R, Liem M, et al. Detecting *PKD1* variants in polycystic kidney disease patients by single-molecule long-read sequencing [J]. *Hum Mutat*, 2017, 38 (7): 870-879.
- [13] Chang YS, Huang HD, Yeh KT, et al. Evaluation of whole exome sequencing by targeted gene sequencing and sanger sequencing [J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 471:222-232.
- [14] Braun DA, Schueler M, Halbritter J, et al. Whole exome sequencing identifies causative mutations in the majority of consanguineous or familial cases with childhood-onset increased renal echogenicity [J]. *Kidney Int*, 2016, 89 (2): 468-475.
- [15] Zhang Z, Gerstein M. Large-scale analysis of pseudogenes in the human genome [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, 14 (4):328-335.
- [16] LaDuca H, Farwell KD, Vuong H, et al. Exome sequencing covers >98% of mutations identified on targeted next generation sequencing panels [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (2): e0170843.
- [17] Choi M, Scholl UI, Ji W, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106 (45): 19096-19101.

# 高通量检测技术对假肥大型肌营养不良分子诊断的研究

陆静<sup>1</sup> 姚如恩<sup>1\*</sup> 朱佳谊<sup>1</sup> 王纪文<sup>2</sup> 王剑<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的 利用高通量检测技术对假肥大型肌营养不良(DMD/BMD)患者进行分子诊断,检测DMD基因上各种类型的变异,评估组合的分子诊断技术应用于假肥大型肌营养不良患者的价值。方法 对106例临床疑似为假肥大型肌营养不良的患者,利用CNVplex<sup>®</sup>技术检测致病基因拷贝数变异,同时利用靶向捕获及高通量测序检测致病基因单核苷酸水平变异,对患者进行精确的分子诊断。结果 通过组合的高通量检测技术,检测到其中85例患者存在DMD基因的致病性变异,包括62例不同大小的外显子缺失和重复,9例单核苷酸水平小缺失和重复,8例无义变异,2例错义变异和2例剪接位点变异。结论 分子诊断对假肥大型肌营养不良患者意义重大,组合的高通量检测技术能检测到不同类型的致病基因变异,精确的分子诊断结果对假肥大型肌营养不良患者的诊断和家系的遗传咨询有着重要意义。

**[关键词]** 高通量测序; 分子诊断; 基因突变

## Analysis of molecular diagnosis in DMD/BMD patients using high throughput detection technique

LU Jing<sup>1</sup>, YAO Ruen<sup>1\*</sup>, ZHU Jiayi<sup>1</sup>, WANG Jiwen<sup>2</sup>, WANG Jian<sup>1</sup>

(1. Molecular Diagnostic Laboratory, Shanghai Children's Medical Center Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, China, 200126; 2. Department of Neurology, Shanghai Children's Medical Center Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, China, 200126)

**[ABSTRACT]** Objective To perform molecular diagnosis for patients suspected with dystrophinopathy, and to detect pathogenic variants on DMD gene with the aim of evaluation of molecular diagnosis in those patients. Method CNVplex<sup>®</sup> technology and targeted capture combined with high throughput sequencing were used to detect variants of exon level and single nucleotide level respectively in 106 suspected dystrophinopathy patients. Results 85 pathogenic variants were detected through combined detection, including 62 exon deletion/duplication, 9 nucleotide insertion/deletion, 8 nonsense variants, 2 missense variants and 2 splicing variants. Conclusion Molecular diagnosis is important for patients suspected with dystrophinopathy and combined testing strategy manifested better efficiency. The accurate results of molecular diagnosis offers great help in both clinical diagnosis and family genetic counseling.

**[KEY WORDS]** High throughput sequencing; Molecular diagnosis; Genetic variants

假肥大型肌营养不良包括 Duchenne 型肌营养不良 (Duchenne muscular dystrophies, DMD) 和 Becker 型肌营养不良 (Becker muscular dystro-

phies, BMD)。这2种疾病是原发于神经肌肉组织的X连锁隐性遗传的疾病,其共同的分子基础是抗肌萎缩蛋白(dystrophin)编码基因DMD发生

作者单位:1. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心,分子诊断实验室,上海 200126

2. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心,神经内科,上海 200126

\*通讯作者:姚如恩, E-mail: yaoruen@126.com

不同类型的变异<sup>[1]</sup>。随着对 *DMD* 基因研究的深入,利用分子诊断结果作为 *DMD/BMD* 患者的确诊依据,已经越来越得到重视<sup>[2]</sup>。同时,*DMD/BMD* 患者的分子诊断结果对家系其他相关成员的遗传咨询也有着重要的意义<sup>[3]</sup>。

*DMD* 基因是人体最大的基因之一,位于 X 染色体 p21.1 区域,包含 79 个外显子,覆盖基因组范围约 2 Mb。*DMD/BMD* 患者的变异类型大多为外显子组水平的缺失和重复,占 75% 左右<sup>[4]</sup>,而单核苷酸水平的变异也可能导致疾病的发生。因此,常规用于单基因遗传病检测的 Sanger 测序法,通常不作为 *DMD* 基因的分子诊断的首选方法。利用多重连接探针扩增技术(multiple ligation dependent probe amplification, MLPA)检测患者 *DMD* 基因外显子水平的拷贝数,被认为是 *DMD/BMD* 患者分子诊断的有效手段<sup>[5]</sup>,但在未检测到拷贝数变异的患者中,仍需继续寻找单核苷酸水平的变异。因此,同时检测外显子水平的缺失和重复以及单核苷酸水平的变异是提高 *DMD/BMD* 患者分子诊断效率的最佳手段。本研究拟利用基于 MLPA 技术改进的外显子拷贝数检测方法 CNVplex<sup>®</sup>,结合靶向基因捕获高通量测序,检测患者 *DMD* 基因,探讨分子诊断结果对假肥大型肌营养不良患者的诊断和遗传咨询的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

收集 2014 年 2 月至 2016 年 10 月在上海儿童医学中心就诊的疑似假肥大型肌营养不良患者 106 例,均为男性;采集患者及自愿进行家系验证的患者母亲外周血 2 mL EDTA 抗凝,4℃ 保存。使用 QIAamp Blood DNA Mini kit 核酸抽提试剂盒(Qiagen,德国)从外周血抽提所有样本基因组 DNA,经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度仪检测质量,均符合后续实验要求。所有先证者或监护人已经签署参加本研究的知情同意书。

### 1.2 CNVplex<sup>®</sup>检测外显子水平变异

采用天昊生物医药科技(苏州)有限公司针对 *DMD* 基因的 CNVplex<sup>®</sup>检测试剂盒。连接反应、连接产物多重荧光 PCR 扩增、扩增产物荧光毛细管电泳分离均参考试剂盒说明书。PCR 扩增产物用

美国 ABI 公司 ABI3130XL 进行毛细管电泳,原始数据文件采用 GeneMapper4.1 进行目标峰高的数据读取,进而对样本 *DMD* 基因区域的拷贝数进行分析确定,寻找可能存在的外显子水平缺失和重复。

### 1.3 FastTarget 靶向富集及高通量测序

采用天昊生物医药科技(苏州)有限公司设计的 FastTarget 高通量多重 PCR 扩增富集技术对 *DMD* 基因启动子区、5' 非编码区(5' untranslated region, 5' UTR)、编码区、转录终止区、内含子剪切点附近 8 bp 以及有文献报道或数据库记录<sup>[6]</sup>的已知突变序列进行富集,DNA 质量检测、FastTarget 目的区域富集、富集产物定量混合、PCR 扩增引入接头和特异性标签、样本文库定量混合、文库质量检测均参考试剂盒说明书。富集产物采用高通量测序仪 Illumina HiSeq 2000 进行测序突变分析,任何一个目的片段的测序深度至少达到 20 倍。对 *DMD* 基因上检测到的致病性单核苷酸变异,设计特异性的 PCR 扩增引物, Sanger 测序验证。

### 1.4 家系成员检测

在采集到的患者母亲血样的家系中,根据先证者检测到的致病性变异的不同类型,选择特异性的验证方法。若先证者的变异为外显子缺失和重复,则用 CNVplex<sup>®</sup>法对其母亲外周血 DNA 进行验证。若先证者的变异为单核苷酸水平的变异,则用 Sanger 测序法进行验证。

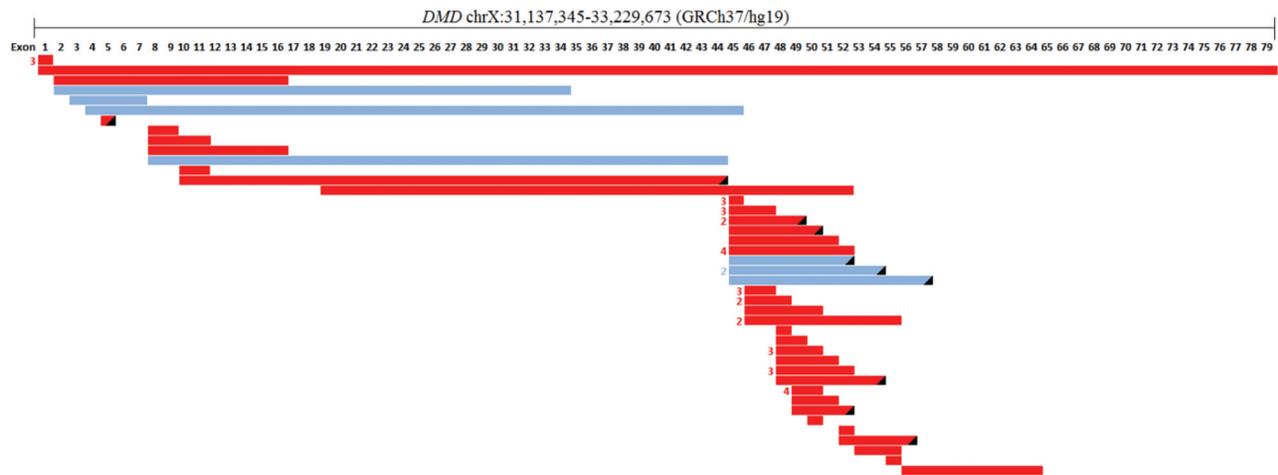
## 2 结果

### 2.1 106 名患者分子诊断结果

在 106 名患者中, CNVplex<sup>®</sup>技术检测到 62 名(51.7%)患者携带有 *DMD* 基因上的致病性拷贝数变异,其中包括 54 个缺失和 8 个重复,变异的大小从覆盖 1 个外显子到整个 *DMD* 基因不等,对所有的拷贝数变异进行阅读框判断,其中 12 个为框内突变,50 个为框外突变,见图 1。通过高通量测序发现 21 名(17.5%)患者存在单核苷酸水平的变异,包括 9 例小缺失和重复,8 例无义变异,2 例错义变异和 2 例剪接位点变异,具体变异情况见表 1,所有变异均通过 Sanger 测序验证。

### 2.2 家系成员验证结果

对 14 例有母亲血样的家系进行致病变异验证



缺失(红色)和重复(蓝色),其中12名框内突变(黑色角标)

图1 62名患者DMD基因外显子水平的变异统计

Figure 1 Eron level variants of DMD gene in 62 patients

表1 21名检测到DMD基因单核苷酸水平致病性变异

Table 1 Single nucleotide level variants of DMD gene in 21 patients

患者	核苷酸改变	蛋白改变	数据库收录
1	c.5899C>T	p.R1967*	是 <sup>[7]</sup>
2	c.10087-1G>C		是
3	c.7818delG	p.Trp2606*	否
4	c.9924delG	p.Lys3308Asnfs*22	否
5	c.9998_10001del	p.Asn3333Metfs*43	否
6	c.8810A>G	p.Gln2937Arg	是 <sup>[8]</sup>
7	c.10033C>T	p.Arg3345*	是 <sup>[9]</sup>
8	c.4130_4131dupAA	p.Ser1378Asnfs*5	否
9	c.3401_3405delTTAAC	p.Leu1134Hisfs*42	否
10	c.377delA	p.Asn126Ilefs*16	是 <sup>[10]</sup>
11	c.8792delA	Glu2931Glyfs*25	否
12	c.4531_4534del	p.Ser1511*	否
13	c.10223+1G>A		是 <sup>[9]</sup>
14	c.5602_5605del	p.Arg1868Glufs*5	是 <sup>[9]</sup>
15	c.1062G>A	p.Trp354*	是 <sup>[4]</sup>
16	c.347T>C	p.Leu116Pro	是 <sup>[2]</sup>
17	c.8608C>T	p.Arg2870*	是 <sup>[7]</sup>
18	c.3409C>T	p.Gln1137*	是
19	c.7066C>T	p.Gln2356*	否
20	c.5632C>T	p.Gln1878*	否
21	c.6283C>T	p.Arg2095*	是 <sup>[11]</sup>

表2 14个家系验证DMD基因变异结果

Table 2 Validation of variants of DMD gene in 14 pedigrees

家系编号	先证者致病变异	母亲验证结果
1	第2-16外显子缺失	杂合携带
2	第53-55外显子缺失	正常
3	第1外显子缺失	正常
4	第48-51外显子缺失	杂合携带
5	第3-11外显子缺失	杂合携带
6	第45-47外显子缺失	杂合携带
7	第45-57外显子缺失	正常
8	第45-52外显子缺失	正常
9	c.4130_4131dupAA p.Ser1378Asnfs*5	杂合携带
10	第45-52外显子缺失	正常
11	第8-11外显子缺失	正常
12	第46-47外显子缺失	杂合携带
13	第48-54外显子缺失	杂合携带
14	第4-45外显子重复	杂合携带

后,发现其中6名患者的变异为新发变异,其余8名患者的母亲为与先证者相同变异的杂合携带者。

### 3 讨论

假肥大型肌营养不良是常见的累及骨骼肌的神经肌肉疾病,DMD患者病情发展快,3岁左右无法独立行走而需依靠轮椅代步,常死于心肌病或呼吸道并发症,寿命一般不超过20岁<sup>[12]</sup>。BMD患者病情相对较轻,进展缓慢,主要表现为四肢近端肌肉无力伴腓肠肌肥大。DMD/BMD发病率较高,约1:5 000<sup>[13]</sup>,对该疾病进行分子诊断,不仅有利于早期准确地诊断疾病,且对家系相关成员的验证将为遗传咨询提供有力的证据<sup>[14]</sup>。DMD基因的致病性变异影响抗肌萎缩蛋白在横纹肌组织中的表达,导致近端骨骼肌进行性萎缩无力和腓肠肌代偿性肥大。在患者中,DMD基因的外显子缺失最常见,2个常见的热点区域分别位于基因中央区域的第44~53号外显子区域,以及靠近基因5'端的第2~20号外显子区域<sup>[15]</sup>。除此之外,导致DMD/BMD发病的变异还包括外显子的重复和单核苷酸水平的变异等。

本研究创新地利用基于MLPA技术改良的CNVplex<sup>®</sup>检测技术,结合FastTarget靶向富集及高通量测序技术,组合应用于检测患者DMD基因外显子水平和单核苷酸水平的变异,试图为患者的分子诊断提供准确的依据。以往的研究认为,MLPA是检测DMD基因外显子水平变异的最佳技术<sup>[16]</sup>,但CNVplex<sup>®</sup>检测技术相较于MLPA在检测探针合成上,更加省时省力。此外通过不同的荧光标记策略,CNVplex<sup>®</sup>可以同时检测基因组上更多位置的拷贝数信息<sup>[17]</sup>。

FastTarget技术针对目的区域设计多重PCR扩增体系,对研究者感兴趣的基因组区域捕获富集并进行高通量测序,该技术方法非常成熟,与Sanger测序法相比检测更加快速、操作简单,与其他高通量测序建库方法相比省去了复杂的建库过程<sup>[18]</sup>。本研究利用这2种检测方法的组合,在106名疑似假肥大型肌营养不良的患者中,成功检测到85个致病性变异,其中外显子水平的变异最小仅覆盖单个外显子,最大覆盖整个DMD基因区域;单核苷酸水平的变异在运用高通量测序方法检出后,均通过Sanger测序法验证。其中9例单核苷酸水平的小缺失和重复以及8例无义变异均会因为终止密码的异常编码而造成截短的蛋白,引起DMD的发生。2例剪接位点变异均未被人类基因突变数据库(Human Gene Mutation Database,

HGMD)和LOVD(Leiden Open Variation Database)数据库收录,但经断裂位点功能预测软件分析(NNSPLICE v9.0)均可能导致异常的RNA剪接。本研究中发现2例错义变异,其中p.Leu116Pro被HGMD收录<sup>[2]</sup>,而p.Gln2937Arg为首次发现的错义变异。虽然在之前的DMD/BMD患者相关分子诊断研究中<sup>[19]</sup>,错义变异的检出率相对较低,但Juan-Mateu等<sup>[20]</sup>研究中认为错义变异也可能导致抗肌萎缩蛋白的异常剪接,从而导致疾病的发生,因此必须通过相关功能试验来判断变异是否具有致病性。本研究所采用的组合检测技术在检测成本和报告周期更加符合临床应用的情况下,达到了与以往研究相同水平的检测阳性率(80.2%)<sup>[4,21]</sup>,进一步证实了分子诊断技术在假肥大型肌营养不良患者诊断中的作用。

Monaco等<sup>[22]</sup>提出的针对DMD基因的“阅读框假说”(reading frame rule)认为症状较严重的DMD患者大多数是由于框外突变(out of frame)所致,而症状较轻的BMD患者则是由于不影响阅读框的框内突变(in frame)导致。约90% DMD/BMD患者符合阅读框规则,因此基于分子诊断结果判断阅读框,从而确定患者为DMD或BMD,可以在患者出现严重的临床症状前明确诊断,早期干预,提高生活质量<sup>[23]</sup>。本研究中12例框内突变患者,后期临床均确诊为BMD,与基于阅读框判断的疾病类型相符。患者在检测到DMD基因致病性变异后,应对家系相关成员进行携带者验证,为遗传咨询提供重要线索,本研究发现8名先证者母亲为DMD基因致病变异杂合携带者。在本研究中仍有21名患者并未通过这2种高通量检测技术寻找到DMD基因的致病性变异,可对患者外周血RNA进行逆转录PCR鉴定转录产物是否正常,并进一步寻找内含子中可能存在的致病性变异<sup>[4]</sup>。此外,也需仔细评估患者临床表型,判断患者是否为肢带型肌营养不良症(limb girdle muscular dystrophy, LGMD)、Emery-Dreifuss肌营养不良症(Emery-Dreifuss muscular dystrophy, EDMD)或其他肌营养不良症,并对其进行鉴别诊断<sup>[24]</sup>。

假肥大型肌营养不良最传统的治疗方法是运用糖皮质激素治疗配合康复理疗。糖皮质激素可以延缓肌力及肌肉功能的衰退,但长时间使用糖皮质激素会出现许多不良反应,并且会出现糖皮质激素耐药情况<sup>[25]</sup>。基因替代治疗有望成为最有

效的DMD/BMD治疗方法,首个批准上市的基因药物deflazacort以外显子跳跃为分子基础,可以成功治疗第51号外显子缺失的患者。德州大学最新研究利用CRISPR-Cpf1修复小鼠模型和人类细胞中DMD基因的缺陷,试图达到治疗疾病的目的,为DMD/BMD患者的分子治疗提供了新思路<sup>[26]</sup>。

准确评估每个患者所携带的DMD基因致病性变异,为其寻找最恰当的分子治疗手段提供了理论依据。

综上所述,利用高通量检测技术,同时检测DMD基因外显子水平的变异和单核苷酸水平的变异,是对DMD/BMD患者进行分子诊断的最佳方法。利用CNVplex<sup>®</sup>和靶向富集高通量测序技术得到的结果,可以帮助早期诊断为DMD/BMD的患者在一定程度上确诊疾病类型,也为患者寻找可行的个体化治疗方案和对患者家系成员的验证及之后的遗传咨询提供了可靠的依据。

#### 参考文献

- [1] Prior TW, Bridgeman SJ. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy [J]. J Mol Diagn, 2005, 7(3):317-326.
- [2] Flanigan KM, Dunn DM, von Niederhausern A, et al. Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort [J]. J Hum Mutat, 2009, 30(12):1657-1666.
- [3] Palmucci L, Mongini T, Chiado-Piat L, et al. Dystrophinopathy expressing as either cardiomyopathy or Becker dystrophy in the same family [J]. J Neurology, 2000, 54(2):529-530.
- [4] Takeshima Y, Yagi M, Okizuka Y, et al. Mutation spectrum of the dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center [J]. J Hum Genet, 2010, 55(6):379-388.
- [5] Ji X, Zhang J, Xu Y, et al. MLPA application in clinical diagnosis of DMD/BMD in Shanghai [J]. J Clin Lab Anal, 2015, 29(5):405-411.
- [6] Aartsma-Rus A, van Deutekom JC, Fokkema IF, et al. Entries in the leiden duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule [J]. J Muscle Nerve, 2006, 34(2):135-144.
- [7] Mendell JR, Buzin CH, Feng J, et al. Diagnosis of duchenne dystrophy by enhanced detection of small mutations [J]. J Neurology, 2001, 57(4):645-650.
- [8] Prior TW, Wenger GD, Papp AC, et al. Rapid DNA haplotyping using a multiplex heteroduplex approach: application to Duchenne muscular dystrophy carrier testing [J]. J Hum Mutat, 1995, 5(3):263-268.
- [9] Deburgrave N, Daoud F, Llense S, et al. Protein- and mRNA - based phenotype - genotype correlations in DMD/BMD with point mutations and molecular basis for BMD with nonsense and frameshift mutations in the DMD gene [J]. J Hum Mutat, 2007, 28(2):183-195.
- [10] van Essen AJ, Busch HF, te Meerman GJ, et al. Birth and population prevalence of Duchenne muscular dystrophy in the Netherlands [J]. Hum Genet, 1992, 88(3):258-266.
- [11] Roest PA, van der Tuijn AC, Ginjaar HB, et al. Application of in vitro myo-differentiation of non-muscle cells to enhance gene expression and facilitate analysis of muscle proteins [J]. Neuromuscul Disord, 1996, 6(3):195-202.
- [12] Hermans MC, Pinto YM, Merkies IS, et al. Hereditary muscular dystrophies and the heart [J]. Neuromuscul Disord, 2010, 20:479-492.
- [13] Dooley J, Gordon KE, Dodds L, et al. Duchenne muscular dystrophy: a 30-year population-based incidence study [J]. Clin Pediatr (Phila), 2010, 49(2):177-179.
- [14] 中华医学会神经病学分会. 中国假肥大型肌营养不良症诊治指南 [J]. 中华神经科杂志, 2016, 49(1):17-20.
- [15] Oudet C, Hanauer A, Clemens P, et al. Two hot spots of recombination in the DMD gene correlate with the deletion prone regions [J]. Hum Mol Genet, 1992, 1(8):599-603.
- [16] Yang J, Li SY, Li YQ, et al. MLPA-based genotype-phenotype analysis in 1053 Chinese patients with DMD/BMD [J]. BMC Med Genet, 2013, 14:29.
- [17] Zhang X, Xu Y, Liu D, et al. A modified multiplex ligation-dependent probe amplification method for the detection of 22q11.2 copy number variations in patients with congenital heart disease [J]. BMC Genomics, 2015, 16:364.
- [18] Jiang T, Tan L, Chen Q, et al. A rare coding variant in TREM2 increases risk for Alzheimer's disease in Han Chinese [J]. Neurobiol Aging, 2016, 42:217.e1-3.

# 一种基于液相基因芯片技术对甲型和乙型流感病毒分型检测方法的建立

陈锦龙<sup>1</sup> 吕刚<sup>1,2</sup> 张优<sup>1</sup> 符瑞佳<sup>1</sup> 尹飞飞<sup>1,2\*</sup>

**[摘要]** 目的 建立能够对甲型流感病毒(influenza virus A, INFA)和乙型流感病毒(influenza virus B, INFB)进行区分的液相基因芯片技术,为甲型和乙型流感病毒的分型提供一种高通量、高灵敏度的检测和鉴定方法。方法 从NCBI的GenBank下载具有代表性的流感病毒基因组序列,利用生物信息学软件BioEdit进行序列比对,分别设计针对INFA和INFB的简并引物和特异性探针,将设计好的引物和探针与GenBank中所有的基因序列进行比对,以验证其特异性。经探针合成、悬浮液相芯片制备和检测条件的优化获得用于甲型和乙型流感病毒分型的液相基因芯片。结果 所检测INFA和INFB均可获得特异性杂交信号,非特异性杂交信号不明显,将2种病毒混合,模拟混合病毒感染也可以得到相应的特异性杂交信号。灵敏度评估结果表明INFA的检测灵敏度为1~10空斑形成单位(plaque forming unit, pfu),而INFB为10~100 pfu。将本方法用于检测11份临床样本,其结果与荧光定量分型逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测的结果一致。结论 本研究初步建立了INFA和INFB的液相基因芯片检测技术,可用于流感病毒的初步筛查和鉴定,并且可以进行混合感染样本的检测,为流感病毒的分型和鉴定提供了一种新的手段。

**[关键词]** 甲型流感病毒;乙型流感病毒;液相基因芯片;病毒分型检测

## Development of a method for detecting type influenza virus A and B based on liquid-phase gene chip technology

CHEN Jinlong<sup>1</sup>, LV Gang<sup>1,2</sup>, ZHANG You<sup>1</sup>, FU Ruijia<sup>1</sup>, YIN Feifei<sup>1,2\*</sup>

(1. Department of Microbiology, Hainan Medical University, Haikou, Hainan, China, 571199; 2. Key Laboratory of Translation Medicine Tropical Diseases, Hainan Medical University, Haikou, Hainan, China, 571199)

**[ABSTRACT]** Objective To develop a microbead-based liquid assay for rapid and high throughput detection and the typing of influenza virus A and B (INFA, INFB). Methods Representative sequences has been downloaded from the GenBank database and aligned with BioEdit software. Specific primers and probes have been designed based on conserved sequences. The specificity of the primers and probes has been tested by blast of them with all the gene sequences in the GenBank database. The microbead-based liquid assay was developed by covalent linkage of the probes and microbeads. Results Specific signals of mean fluorescent intensity have been observed in all of the tested samples. Very low signals have been obtain for non-specific samples. Mixture of both influenza virus A and B can obtain their positive signal respectively. The sensitivity

基金项目:国家自然科学基金课题(31460017,81672072);海南省重点研发计划项目(ZDYF2017091);海南省自然科学基金项目(20158287);海南省高等学校科学研究项目(Hnkyzx2014-08, Hnky2017ZD-16)

作者单位:1. 海南医学院病原生物学教研室,海南,海口 571199

2. 海南医学院热带医学转化重点实验室,海南,海口 571199

\*通讯作者:尹飞飞, E-mail: yinfeifeiff@163.com

of the method for INFA is 1~10 pfu and 10~100 pfu for INFB. 11 clinical samples were detected using this method and the results were consistent with the detection results of real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Conclusion** The microbead-based liquid assay developed in this study for the typing of influenza virus A and B can be used for the detection and typing of influenza viruses. The assay provides a new method for the detection of the viruses.

[KEY WORDS] Influenza virus A; Influenza virus B; Microbead-based liquid assay; Virus typing

流感病毒的感染是世界范围内的重大公共卫生问题。根据核衣壳蛋白和基质蛋白的同源性,流感病毒分为甲、乙和丙型<sup>[1-2]</sup>。甲型流感病毒(influenza virus A, INFA)抗原性易发生变异,可以进一步分为 H1N1、H3N2、H5N1、H7N9 等亚型,多次引起世界范围的大流行。乙型流感病毒(influenza virus B, INFB)只在局部引起小范围的流行,丙型流感病毒只引起人类不明显的或轻微的上呼吸道感染,很少造成流行<sup>[3]</sup>。准确有效的流感病毒检测和分型方法对于临床采取及时有效的治疗方式和控制流感的传播具有重要的意义。但是目前对于流感病毒的检测临床上主要采用实时荧光定量 PCR,其缺点为检测靶标单一,对多靶标检测易出现假阳性结果<sup>[4-5]</sup>。而液相基因芯片作为一种新兴检测技术,利用多标志物并行检测从而提高了检测通量<sup>[6]</sup>。本研究建立了一种能够对甲型和乙型流感病毒进行检测和分型的液相基因芯片技术,为流感病毒的筛查和流行病学本底调查提供重要的技术手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞株与病毒株

本检测所用流感病毒株包括甲型流感病毒 H1N1 (A/PR/8/34, ATCC-VR95) 和 H3N2 (A/Victoria/210/2009 型), 乙型流感病毒 (B/Lee/40, ATCC-VR101)。所有流感病毒在 Vero-E6 细胞系中进行增殖培养。病毒的增殖于中科院武汉病毒研究所 BSL-2 生物安全实验室进行。

#### 1.1.2 所需试剂

M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司(美国), Taq 酶购自宝生物工程(大连)有限公司, 报告分子 Streptavidin-phycoerythrin 购于 Molecular Probes 公司(美国), 杂交缓冲液 TMAC 和微球购自 Luminex 公司(美国)。病毒 RNA 提取试剂盒 QIAamp viral RNA mini kit 购自 Qiagen 公司(美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 病毒的增殖培养和核酸提取

将病毒接种于 Vero-E6 细胞系, 在含 5% FBS 的 DMEM 培养基中置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行增殖培养, 每日在显微镜下观察细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 情况, 当 90% 以上细胞出现 CPE 时, 收集病毒培养液, 分装后 -80℃ 保存备用。根据病毒 RNA 提取试剂盒的说明书提取病毒核酸。

#### 1.2.2 简并引物和特异性探针的设计合成

在 GenBank 下载具有代表性的甲型流感病毒和乙型流感病毒全基因组序列各 100 条以上, 利用 BioEdit (版本 7.0) 软件进行序列同源性比对分析, 在此基础上设计简并引物, 并在简并引物的范围内设计特异性探针。初步设计的引物和探针经过 Blast 比对分析进行进一步的优化设计。正向引物进行生物素 (Biotin) 修饰, 探针进行氨基化和 C<sub>12</sub> 修饰。所有引物和探针由上海英骏生物技术有限公司(中国)合成。

#### 1.2.3 芯片制备

根据 Luminex 公司的说明书, 将检测探针通过共价交联的方式偶联在微球上。4 种检测探针分别偶联到不同编号的微球上, 以利于多重检测。

#### 1.2.4 病毒 RT-PCR 扩增及扩增产物的检测

按照 M-MLV 反转录酶试剂盒说明书进行反转录获得 cDNA 模板, 然后进行 PCR 扩增, PCR 反应体系组成如下: cDNA 模板 5 μL, 20 μmol/L 上下游引物各 1 μL, 10×PCR 缓冲液 5 μL, 10 mol/L dNTP 1 μL, 加水补至 50 μL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 57℃ 复性 30 s, 72℃ 扩增 30 s 扩增, 共 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min, 降温至 4℃。取 5 μL 扩增产物至 96 孔 PCR 管, 向管内加入用 1.5×TMAC 杂交液稀释的 4 种微球至终浓度 150 个/μL, 加入 12 μL TE, 空白对照管加入 17 μL TE, 混匀后于 95℃ 变性 5 min、55℃ 杂交 15 min, 加入报告分子 55℃ 继续孵育 5 min 后用

Luminex 200 系统检测。

### 1.2.5 敏感性评估

将H1N1、H3N2和INFB梯度稀释,获得100 000、10 000、1 000、100和10 pfu/mL的病毒浓度,各取0.5 mL提取病毒RNA,反转录后取1/5做模板进行液相基因芯片检测,即各检测模板量为10 000、1 000、100、10和1 pfu。

### 1.2.6 特异性和重复性检测

所有样本分别进行3次核酸提取、PCR扩增和液相芯片检测,以检测芯片的重复性。通过DNA琼脂糖凝胶电泳检测每对引物的PCR产物的条带是否为特异性。

### 1.2.7 模拟混合病毒感染的检测

将1 000 pfu的H1N1、H3N2和INFB病毒溶液两两组合,模拟H1N1和H3N2、H1N1和INFB、H3N2和INFB混合感染的样本,分别提取RNA并反转录,对模板进行液相基因芯片检测。

### 1.2.8 检测方法的初步应用

对本实验室收集和保存的11份临床样本,用

本文建立的液相基因芯片方法进行检测,同时以H1N1、H3N2和INFB病毒培养液作为阳性对照,并与荧光定量分型RT-PCR方法(上海之江生物科技股份有限公司)进行比较,评价本方法的可靠性及临床实用性。

## 2 结果

### 2.1 引物的设计合成及特异性检测

针对流感病毒型特异性基因M基因分别设计针对流感病毒甲型和乙型的引物和探针<sup>[4-5]</sup>,所设计合成的引物和探针序列如表1。为便于液相基因芯片的优化,针对甲型和乙型流感病毒分别设计2组引物和探针,进行后继系列评价比较。病毒RNA提取后,进行反转录获得cDNA模板,利用设计合成的引物进行PCR扩增,结果如图1所示,引物对INFA-F1/INFA-R1、INFA-F2/INFA-R2、INFB-F1/INFB-R1和INFB-F2/INFB-R2分别扩增出304 bp、359 bp、453 bp和300 bp的特异性条带且无明显非特异性条带产生。

表1 用于甲型和乙型流感病毒分型的引物和探针

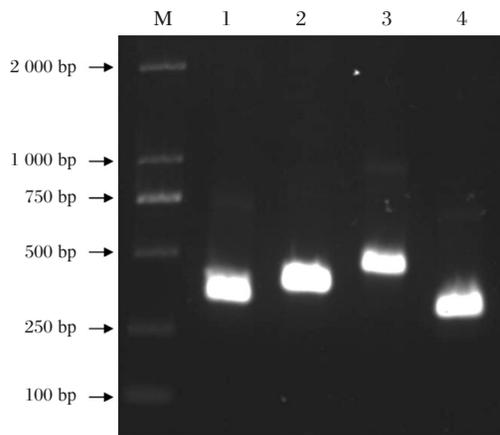
Table 1 The primers and probes used for the typing of INFA and INFB

引物或探针	序列	长度(bp)	修饰
INFA-F1	GATGAGTCTTCTAACCGAGGTC	22	
INFA-R1	CTTGATAGTTTAACTGCTCTATC	24	5' Biotin
INFA-P1	CAGAGACTGGAAAGTGTCTTTGCA	24	5' Amino Modifier C <sub>12</sub>
INFA-F2	CTCATGGAATGGCTAAAGACAAG	23	
INFA-R2	GACCGATGCTGTGAATCAGCAATC	24	5' Biotin
INFA-P2	GAATGGGGACCCGAACAACATGGA	24	5' Amino Modifier C <sub>12</sub>
INFB-F1	GGAGACACAATTGCCTACCTGC	22	
INFB-R1	TGCTTGTCTCGCACAAAAGCAC	23	5' Biotin
INFB-P1	GCTTAACTGATATACAGAAAGCAC		5' Amino Modifier C <sub>12</sub>
INFB-F2	AATGTGTGAGCTTCCATGAAG	21	
INFB-R2	GTTCTTCTGCCAGTTTTTGGAC	22	5' Biotin
INFB-P2	GCTTTGTGCGAGAAACAAGCATCA	24	5' Amino Modifier C <sub>12</sub>

### 2.2 不同液相基因芯片检测效果的比较

分别利用各引物和探针进行PCR和液相基因芯片检测,比较不同的液相基因芯片的检测结果。结果如表2所示,利用引物对INFA-F1/INFA-R1进行PCR并用探针INFA-P1制备液相基因芯片检测,阳性样本H1N1和H3N2的平均荧光值分别为890和785,阴性样本乙型流感病毒平均荧光值为

150,阴性对照结果为28;利用引物对INFA-F2/INFA-R2进行PCR并用探针INFA-P2制备液相基因芯片检测,阳性样本H1N1和H3N2的平均荧光值分别为1 800和1 980,阴性样本乙型流感病毒平均荧光值为98,阴性对照结果为43。2种液相基因芯片比较,引物对INFA-F2/INFA-R2和探针INFA-P2制备液相基因芯片效果较好。利用引物



引物对 INFA-F1/INFA-R1 (1#条带), INFA-F2/INFA-R2 (2#条带), INFB-F1/INFB-R1 (3#条带)和 INFB-F2/INFB-R2 (4#条带)分别扩增出 304 bp, 359 bp, 453 bp 和 300 bp 的特异性条带且无明显非特异性条带产生。M 为 D2000 分子量 Marker

图 1 引物特异性检测

Figure 1 The specificity test of the primers

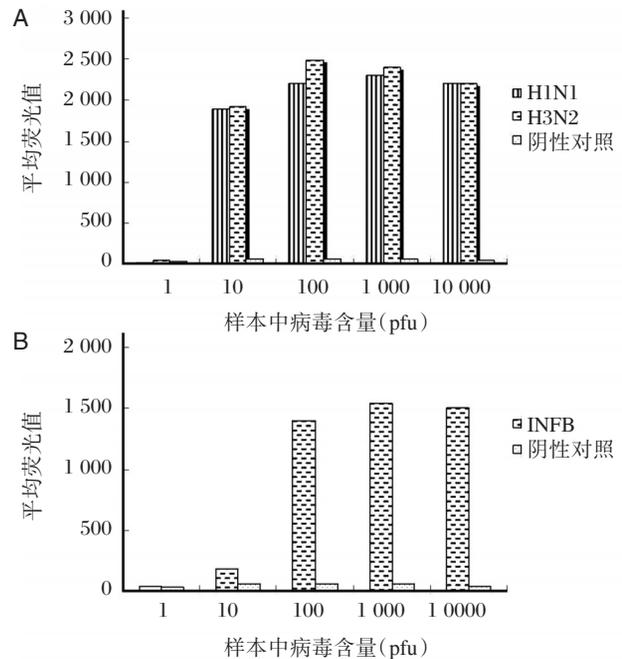
对 INFB-F1/INFB-R1 进行 PCR 并用探针 INFB-P1 制备液相基因芯片检测, 阳性样本乙型流感病毒平均荧光值为 1 540, 阴性样本 H1N1 和 H3N2 的平均荧光值分别为 91 和 87, 阴性对照结果为 59; 利用引物对 INFB-F2/INFB-R2 进行 PCR 并用探针 INFB-P2 制备液相基因芯片检测, 阳性样本 INFB 平均荧光值为 687, 阴性样本 H1N1 和 H3N2 的平均荧光值分别为 149 和 205, 阴性对照结果为 60。2 种液相基因芯片比较, 引物对 INFB-F1/INFB-R1 和探针 INFB-P1 制备液相基因芯片效果较好。

### 2.3 液相基因芯片检测的敏感性的评估

分别对引物对 INFA-F2/INFA-R2 和探针 INFA-P2 制备的液相基因芯片和引物对 INFB-F1/INFB-R1 和探针 INFB-P1 制备的液相基因芯片进行敏感

表 2 不同液相基因芯片平均荧光值的比较  
Table 2 The comparison of the median fluorescence intensity of different microbead-based liquid assay

样本	液相基因芯片对应探针			
	INFA-P1	INFA-P2	INFB-P1	INFB-P2
H1N1	890	1 800	91	149
H3N2	785	1 980	87	205
INFB	150	98	1 540	687
阴性对照	28	43	59	60



A: 利用 H1N1 和 H3N2 病毒评估 INFA 的液相基因芯片检测灵敏度; B: 利用 INFB 病毒评估 INFA 的液相基因芯片检测灵敏度

图 2 液相基因芯片检测敏感性评估

Figure 2 Evaluation of the sensitivity of the assay

性评估, 结果如图 2 所示, INFA 的液相基因芯片检测灵敏度为 1~10 空斑形成单位 (plaque forming unit, pfu), 而 INFB 的液相基因芯片检测灵敏度为 10~100 pfu。

### 2.4 液相基因芯片检测的特异性和重复性

所有样本分别进行 3 次核酸提取、PCR 扩增和液相基因芯片检测, 各样本所用病毒量均为 100 pfu, 结果如图 3 所示, 3 次检测实验的定性结果完全正确, 而且探针间也没有交叉反应, 表明该方法具有良好的特异性和可重复性。

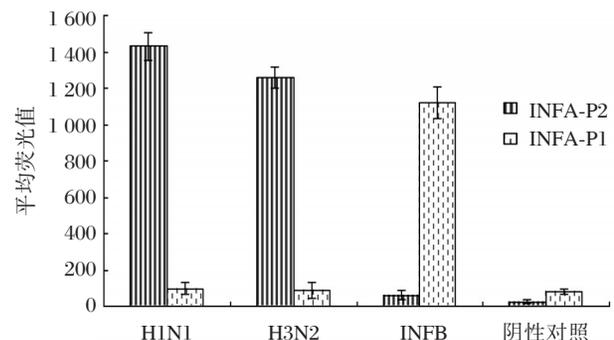


图 3 液相基因芯片特异性和重复性检测结果

Figure 3 Results of the specificity and reproducibility test of the microbead-based liquid assay

### 2.5 模拟混合病毒感染的检测评估

将 H1N1、H3N2 和 INFB 病毒溶液两两组合模拟混合病毒感染,对样本进行液相基因芯片检测,结果如图 4 所示,2 种 INFA 病毒、H1N1 和 INFB、H3N2 和 INFB 分别混合检测,都能特异性检测到相应样本,说明本检测方法能够进行混合种类病毒感染的检测。

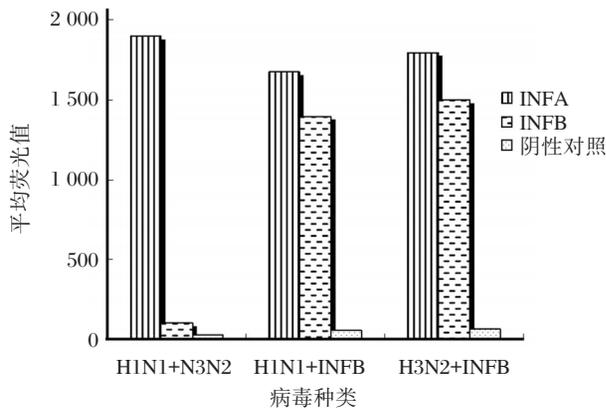


图 4 模拟混合病毒检测结果

Figure 4 The results of the detection of mixed viruses

### 2.6 临床样本的检测结果

检测的 11 份临床样本中,10 份为 INFA,1 份为 INFB,H1N1 和 H3N2 病毒培养液检测结果为 INFA,乙型流感病毒培养液检测结果为 INFB,阴性对照检测结果为无病毒。其结果与荧光定量分型 RT-PCR 方法的结果一致,见表 3。

## 3 讨论

由流感病毒引起的流感是一种世界范围内的传染性疾 病,具有传染性强、传播快、潜伏期短、发病率高等特点,对公共卫生和人们身体健康带来重大威胁。流感的主要表现症状为高热、肌痛、咳嗽、流涕等,可伴有严重的肺炎,甚至可能引起心脏、肾脏等多种重要器官衰竭而导致死亡。对人类危害巨大的季节性流感主要是由甲型流感病毒引起,而乙型流感病毒只在局部引起小范围的流行,由于各型流感病毒所致疾病的治疗和防控策略不同,建立流感病毒分型的快速检测方法,对于流感的早期诊断和制定有效防治策略有重要意义<sup>[7]</sup>。本研究针对甲型和乙型流感病毒的保守基因 M 基因的核苷酸序列设计特异性引物和探针,

表 3 临床样本检测结果

Table 3 The results of clinical samples

样本	液相基因芯片对应探针		检测结果
	INFA-P2	INFB-P1	
1	3 518.5	27	INFA
2	2 662.5	33	INFA
3	3 149	33	INFA
4	3 113.5	19	INFA
5	3 434	35	INFA
6	30	2 672	INFB
7	3 314	32	INFA
8	2 700	25.5	INFA
9	3 424	50	INFA
10	3 573	20.5	INFA
11	3 518.5	62	INFA
H1N1	1 800	91	INFA
H3N2	2 800	65	INFA
INFB	98	1 540	INFB
阴性对照	43	59	无病毒

用于甲型和乙型流感病毒的分型,经过优化选择所设计的液相基因芯片具有很好的重复性和特异性。通过将分型探针偶联在不同种类微球上,建立多重检测体系,可在一个反应中同时诊断甲型和乙型流感病毒,检测 96 个样本所需时间为 5.5 h,从采样到分型检测获得结果可以在一天内完成,而传统的流感病毒分离培养需要 3~5 天的时间<sup>[8]</sup>。液相基因芯片体系由荧光染料编码的微球构成,每种微球上偶联有针对目的核苷酸区段的探针分子,与带有报告分子藻红蛋白的多重 PCR 反应产物进行杂交,当微球通过 Luminex 检测仪,检测结果通过荧光值直接判读,其特异性引物和针对目的核苷酸的探针设计双重保证检测特异性。所以本研究建立的基于液相基因芯片的流感病毒分型检测方法较基于抗原-抗体免疫反应的流感病毒酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测方法,有效避免了抗原抗体交叉反应的干扰<sup>[9]</sup>。同时由于液相基因芯片对流感病毒分型的基础是核酸分子的杂交,其检测的基础是 PCR 产物和探针之间的互补程度,而且每个反应结果的平均荧光值是 100 个微球上的荧光值的平均值,相当于 100 次反应的平均结果,检测结果更加准确<sup>[10]</sup>。近年来很多实验室建立了用于流感病毒分型的多重荧光 RT-PCR 方法,目前

被广泛用于流感病毒的分型<sup>[11-14]</sup>。本研究采用多重 PCR 和液相基因芯片技术相结合的方法,克服了多重荧光检测方法设计难度高的弊端,在一次反应中能同时对甲型和乙型流感病毒进行分型检测,有利于流感病毒快速鉴定和诊断。

本研究对检测引物、探针序列及多重 PCR 条件、杂交条件进行多次优化,选取阳性和阴性探针检测荧光值差异最明显、检测灵敏度相对较高的条件建立流感病毒分型的液相基因芯片,对标准品病毒和 11 份临床样品的检测结果,阳性探针对应的平均荧光值均大于 1 000,而阴性探针和阴性对照对应的平均荧光值均小于 100,较目前应用较多的将大于阴性对照平均荧光值的 2 倍作为阳性结果判断依据更为明确<sup>[15]</sup>。本方法检测灵敏度为 1~100 pfu,与 Beck 等<sup>[16]</sup>报道的利用荧光定量 RT-PCR 分型方法敏感性相当。

本项目建立的方法和流感病毒荧光定量 RT-PCR 分型方法相比,检测结果与其具有较高的一致性,但在高通量检测方面具有明显的优势。因实验条件的限制,本实验检测的临床样本数量较少,未来研究中要扩大样本量来对实验可靠性进行评价。该液相基因芯片检测方法的建立,对流感病毒的临床诊断分型和流感病毒的预防控制具有一定的意义。

## 参考文献

- [1] Barberis I, Myles P, Ault SK, et al. History and evolution of influenza control through vaccination: from the first monovalent vaccine to universal vaccines [J]. *J Prev Med Hyg*, 2016, 57(3):E115-E120.
- [2] Potter CW. A history of influenza [J]. *J Appl Microbiol*, 2001, 91:572-579.
- [3] Poepl W, Hell M, Herkner H, et al. Clinical aspects of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in Austria [J]. *Infection*, 2011, 39(4):341-352.
- [4] Wang C, Wang Q, Hu J, et al. A multiplex RT-PCR assay for detection and differentiation of avian-origin canine H3N2, equine - origin H3N8, human - origin H3N2, and H1N1/2009 canine influenza viruses [J]. *PLoS One*, 2012(1):e0170374.
- [5] Cui D, Zhao D, Xie G, et al. Simultaneous detection of influenza A subtypes of H3N2 virus, pandemic (H1N1) 2009 virus and reassortant avian H7N9 virus in humans by multiplex one-step real-time RT-PCR assay [J]. *Springerplus*, 2016, 5(1):2054.
- [6] Dunbar SA. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high throughput multiplexed nucleic acid detection [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 363(1-2):71-82.
- [7] Bedford T, Riley S, Barr IG, et al. Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift [J]. *Nature*, 2015, 523(7559):217-220.
- [8] Abraham MK, Perkins J, Vilke GM, et al. Influenza in the emergency department: vaccination, diagnosis, and treatment: Clinical practice paper approved by American Academy of Emergency Medicine Clinical Guidelines Committee [J]. *J Emerg Med*, 2016, 50(3):536-542.
- [9] Woźniak-Kosek A, Kempieńska-Mirośławska B, Hoser G. Detection of the influenza virus yesterday and now [J]. *Acta Biochim Pol*, 2014, 61(3):465-470.
- [10] Fraiture MA, Herman P, Taverniers, et al. Current and new approaches in GMO detection: challenges and solutions [J]. *Biomed Res Int*, 2015:392872.
- [11] Cox NJ, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: past and present [J]. *Annu Rev Med*, 2000, 51:407-421.
- [12] Chen Y, Cui D, Zheng S, et al. Simultaneous detection of influenza A, influenza B, and respiratory syncytial viruses and subtyping of influenza A H3N2 virus and H1N1 (2009) virus by multiplex real-time PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(4):1653-1656.
- [13] Kang X, Wu W, Zhang C, et al. Detection of avian influenza A/H7N9/2013 virus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction [J]. *J Virol Methods*, 2014, 206:140-143.
- [14] Cui D, Zhao D, Xie G, et al. Simultaneous detection of influenza A subtypes of H3N2 virus, pandemic (H1N1) 2009 virus and reassortant avian H7N9 virus in humans by multiplex one-step real-time RT-PCR assay [J]. *Springerplus*, 2016, 5(1):2054.
- [15] 史玲莉, 闫冀焕, 李云, 等. 登革病毒悬液芯片分型检测方法的建立 [J]. *国际病毒学杂志*, 2016, 23(3):173-176.
- [16] Beck, ET, Jurgens LA, Kehl SC, et al. Development of a rapid automated influenza A, influenza B, and respiratory syncytial virus A/B multiplex real-time RT-PCR assay and its use during the 2009 H1N1 swine-origin influenza virus epidemic in Milwaukee, Wisconsin [J]. *J Mol Diagn*, 2010, 12(1):74-81.

# 基于三引物荧光PCR-毛细管电泳法的 *FMRI* 基因突变检测技术建立及其在自闭症辅助诊断中的应用

孙莉<sup>1</sup> 杨琳艳<sup>2</sup> 叶倩平<sup>2</sup> 杨旭<sup>3</sup> 杨学习<sup>4\*</sup>

**[摘要]** 目的 对自闭症患者 *FMRI* 基因 5'非编码区 CGG 重复序列及重复数进行检测,探索检测脆性 X 综合征的新方法。方法 应用三引物荧光 PCR-毛细管电泳法(Qseq100™全自动核酸分析系统检测)对 111 例自闭症患者进行筛查,检测其 *FMRI* 基因 5'非编码区 CGG 序列,计算 CGG 重复数,并与 ABI 3500Dx 基因分析仪毛细管电泳测序法进行结果比较验证。结果 111 例临床检测为自闭症的样本中,有 2 例为 *FMRI* 前突变携带者,一例为中间型。与 3500Dx 毛细管电泳测序结果一致。结论 三引物荧光 PCR-毛细管电泳法能够用来检测 *FMRI* 基因 5'非编码区 CGG 重复序列,在脆性 X 综合征发病机制及大规模携带者筛查方面都具有一定的应用价值。

**[关键词]** 自闭症; *FMRI* 基因; 脆性 X 综合征; 三引物荧光 PCR-毛细管电泳

## Development of *FMRI* gene mutation detection based on tri-primer fluorescence PCR - capillary electrophoresis and its application in auxiliary diagnosis of autism

SUN Li<sup>1</sup>, YANG Linyan<sup>2</sup>, YE Qianping<sup>2</sup>, YANG Xu<sup>3</sup>, YANG Xuexi<sup>4\*</sup>

(1. Laboratory of North China Petroleum Administration Bureau General Hospital, Renqiu, Hebei, China, 062552; 2. Guangzhou Darui Biotechnology Co., Ltd, Guangzhou, Guangdong, China, 510665; 3. School of Basic Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 4. School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

**[ABSTRACT]** Objective To detect the repetition of CGG repeats and repeat numbers of 5' non-coding regions of *FMRI* gene in autistic patients, and to explore a new method for detecting fragile X syndrome. Method A total of 111 autistic patients were screened by tri - primer fluorescence PCR and capillary electrophoresis (Qseq100™ automatic nucleic acid analysis system). The *FMRI* gene 5' non-coding region CGG sequence was detected and the CGG repeats were calculated. The results were verified by ABI 3500Dx capillary electrophoresis sequencing. Results Among the 111 cases of autistic samples, 2 cases were *FMRI* pre-mutation carriers and 1 case was intermediate. This result is consistent with the results of 3500Dx capillary electrophoresis sequencing. Conclusion Tri-primer fluorescence PCR-capillary electrophoresis can be used to detect the CGG repeats of 5' non - coding regions of *FMRI* gene. It is of great value to study on the pathogenesis and crowd screening of fragile X syndrome.

**[KEY WORDS]** Autism; *FMRI* gene; Fragile X syndrome; Tri - primer fluorescence PCR - capillary electrophoresis

基金项目:广东省科技计划(2015A030401040)

作者单位:1. 华北石油管理局总医院检验科,河北,任丘 062552

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,深圳 518110

4. 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

脆性 X 综合征是 X 连锁不完全显性遗传病<sup>[1-2]</sup>,是最常见的遗传性智力障碍类型之一。其致病基因为 *FMRI* (fragile X mental retardation 1), 位于 X 染色体上的 Xq27.3<sup>[3]</sup>, 该病主要是由于 *FMRI* 基因 5' 非编码区的 CGG 重复序列动态突变导致。根据 CGG 重复数不同可以分为 4 种类型: 全突变 (>200 个 CGG 重复), 前突变 (55~200 个 CGG 重复), 中间型突变 (45~54 个 CGG 重复) 和正常型 (<45 个 CGG 重复)<sup>[4]</sup>。CGG 重复数在亲代向子代传递时可发生动态突变, 由前突变扩展为全突变, 导致相应基因组区域高甲基化而阻止 mRNA 合成, 其产物智力低下蛋白合成被阻断, 该蛋白对胎儿神经发育和结缔组织形成非常重要, 缺乏该蛋白的全突变患者会发病。约有 20% 的前突变型脆性 X 综合征女性携带者晚期易发生“脆性 X 原发性卵巢功能不全”, 而部分前突变型脆性 X 综合征男性携带者在其老年时期易发生“脆性 X 相关震颤-共济失调综合征, 前突变携带者的另一个亚表型是自闭症谱系疾病-学习困难<sup>[5]</sup>。女性前突变携带者中约 15%~30% 是自闭症患者, 而男性自闭症患者中仅约 6% 患有脆性 X 综合征<sup>[6]</sup>。有上述 3 个亚表型之一者即可作为 *FMRI* 基因前突变携带者的候选筛查人群。脆性 X 综合征发病率为女性 1/2 500, 男性 1/1 250<sup>[7]</sup>。在我国智力低下患者中发病率约 6.3%<sup>[8]</sup>。

脆性 X 综合征临床表现程度各异、复杂多样。其主要特征为中度至重度智力低下, 且随着年龄增加病情有加重的趋势。其他临床表现为特殊面容, 如长脸, 招风耳, 青春期以后出现大睾丸, 许多患者还表现为冲动、多动、焦虑、恐惧社交、语言呆板等孤独症行为<sup>[9]</sup>。目前, 大部分脆性 X 综合征患者尚未得到诊断。脆性 X 综合征严重危害儿童生长发育, 早发现、早治疗、早干预能显著改善患儿预后, 且可通过提供产前遗传咨询, 避免家族中再次出现同样的患者。如何建立一个快速、经济、有效的方法进行前突变和全突变筛查, 产前诊断是预防、辅助诊断和遗传阻断的基础。

脆性 X 综合征得以确诊需要从基因水平进行检测, 目前关于脆性 X 综合征的实验室检测方法主要包括基因组 DNA 特异性酶切、荧光探针法、多重连接探针扩增技术 (multiplex ligation dependent probe amplification, MLPA)、Southern blot 法等, 这些技术存在操作难度高、检测耗时长或成本

高等不足。本研究拟采用三引物荧光 PCR-毛细管电泳法进行 *FMRI* 基因 CGG 重复的检测, 探索适合于检测脆性 X 综合征的快捷有效的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 对象

实验所用的全血样本共 111 例, 是由南方医院于 2016 年 9 月份在广州地区收集的自闭症患者样本。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 核酸提取

采用核酸提取或纯化试剂 (广州市达瑞生物技术股份有限公司) 提取样本基因组 DNA, 严格按照试剂盒的说明书进行操作, 提取完成后, 用荧光定量法 (Qubit<sup>®</sup> 3.0 荧光定量仪, Life Technologies, 美国) 进行定量, 以检测 DNA 浓度, 提取的 DNA 于 -20℃ 保存。

#### 1.2.2 引物设计

该方法选取人基因组中编码脆性 X 综合征 *FMRI* 基因的 5' 端非翻译区 (CGG) $n$  重复序列为扩增靶区域, 针对 (CGG) $n$  重复序列区段设计 3 条特异性引物。CGG 重复序列的两端设计用于扩增目标片段 (含 CGG 重复区) 的引物 F、R, 正向引物 F 序列为: 5'-GCTCAGCTCCGTTTCG-GTTTCACTTCCGGT-3', 5' 端带 FAM 荧光; 反向引物 R 序列为: 5'-AGCCCCGCACTTCCACCAC-CAGCTCCTCCA-3'; 在 CGG 重复区域设计用于扩增 CGG 重复序列的引物 M。M 的序列为: 5'-AGCGTCTACTGTCTCGGCACTTGCCCGCCGCCG-3'。

#### 1.2.3 荧光 PCR-毛细管电泳及 3500Dx 毛细管电泳测序

荧光 PCR 反应体系①: 对照样本和受检样本的 PCR 反应体系的体积均为 20  $\mu$ L, 其中含有 80 ng 的模板 DNA, 10  $\mu$ L 的 2 $\times$ GC Buffer I (TaKaRa, 日本), 0.4  $\mu$ L 的 dNTPs (10 mmol/L) (TaKaRa, 日本), 5.2  $\mu$ L 的 PCR 增强剂, 0.3  $\mu$ L 的上游引物 F (10  $\mu$ mol/L), 0.3  $\mu$ L 的下游引物 R (10  $\mu$ mol/L), 0.3  $\mu$ L 的 DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu$ L), 无核酸酶水补足至 20  $\mu$ L。荧光 PCR 反应体系②: 对照样本和受检样本的 PCR 反应体系的体积均为 20  $\mu$ L, 其中含有 80 ng 的模板 DNA, 10  $\mu$ L 的 2 $\times$ GC Buffer I (TaKaRa, 日本), 0.4  $\mu$ L 的 dNTPs (10 mmol/L)

(TaKaRa, 日本), 5.2  $\mu\text{L}$  的 PCR 增强剂, 0.3  $\mu\text{L}$  的上游引物 F(10  $\mu\text{mol/L}$ ), 0.3  $\mu\text{L}$  的下游引物 M(10  $\mu\text{mol/L}$ ), 0.3  $\mu\text{L}$  的 DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ), 无核酸酶水补足至 20  $\mu\text{L}$ 。震荡混匀, 瞬时离心后转入 PCR 扩增仪中, PCR 反应条件为: 98 $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min 后, 进行 30 个扩增反应循环: 97 $^{\circ}\text{C}$  35 s, 62 $^{\circ}\text{C}$  35 s, 68 $^{\circ}\text{C}$  4 min; 最后 68 $^{\circ}\text{C}$  终延伸 10 min。

PCR 反应结束后, 取 1  $\mu\text{L}$  PCR 扩增产物, 加无核酸酶水稀释 10 倍后, 采用 Qseq100<sup>TM</sup> 全自动核酸分析系统进行毛细管电泳检测; 同时取 1  $\mu\text{L}$  PCR 扩增产物, 加 8.5  $\mu\text{L}$  Hi-Di<sup>TM</sup> Formamide 和 0.5  $\mu\text{L}$  GeneScan 600 LIZ<sup>®</sup> size standard, 混匀后 98 $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min, 立即放冰上 2 min, 上 ABI 3500Dx 仪进行毛细管电泳测序检测。通过 3500Dx 毛细管电

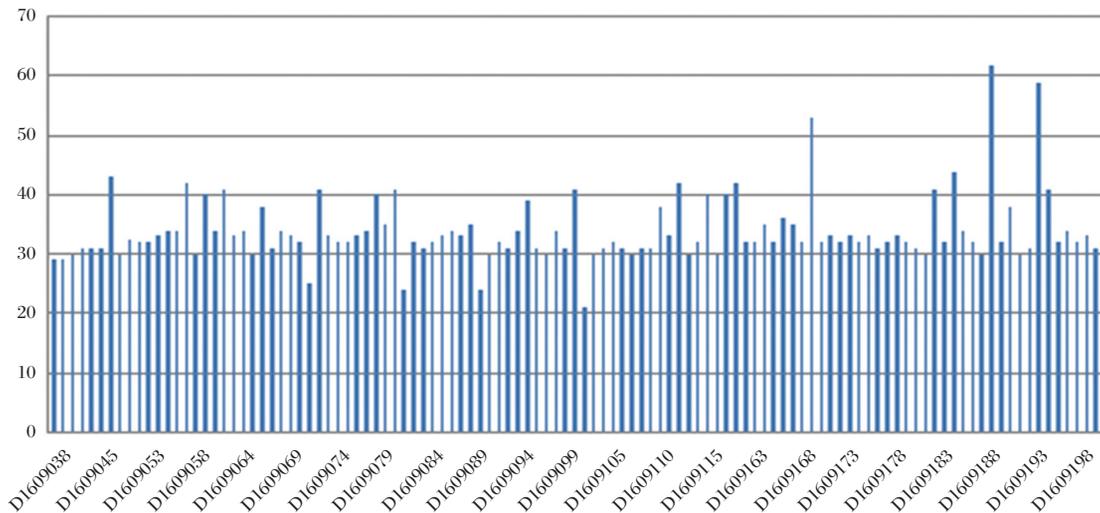
泳测序法, 观察结果图中连续峰中间的小凹陷还能发现 AGG 插入数。

#### 1.2.4 样本 CGG 重复数的计算

根据正常男性对照样本的 CGG 重复数, 采用数学模型获得受检者 CGG 重复数及 AGG 插入信息。

## 2 结果

对 111 例样本和一例正常男性对照样本采用 Qseq100<sup>TM</sup> 全自动核酸分析系统进行毛细管电泳检测, 分析其检测结果(图 1), 所有样本 CGG 重复数范围为 21~62。绝大部分样本属于正常型(<45 个 CGG 重复), 其中 D1609187、D1609192、D1609168 共 3 例样本的 CGG 重复数大于 45。



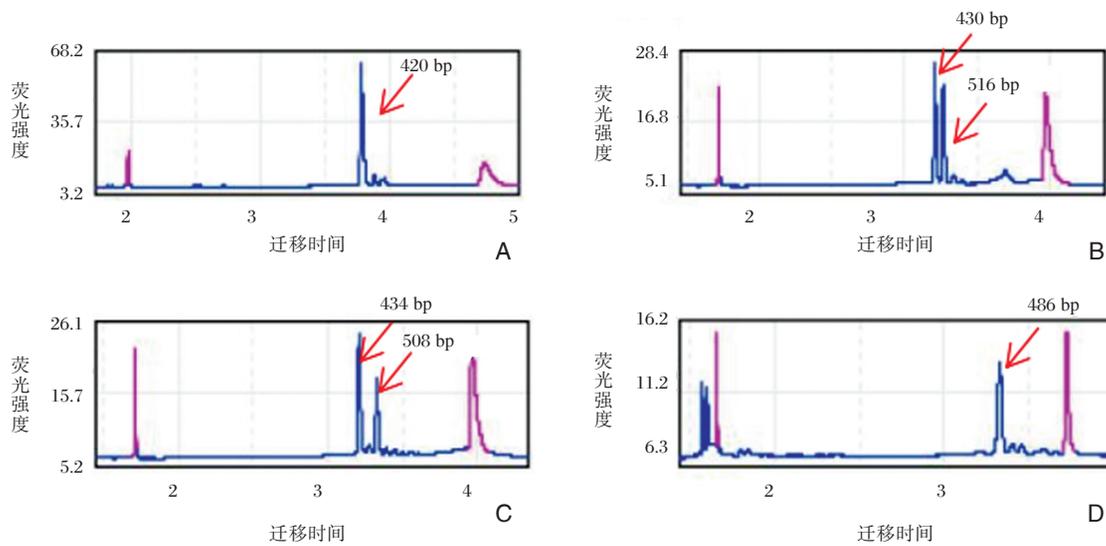
横坐标为样本编号, 纵坐标为 CGG 重复数

图 1 111 例样本检测结果图

Figure 1 Test result of 111 samples

临床检测正常男性样本, Qseq100 毛细管电泳检测其扩增目的片段长度为 420 bp(图 2), 计算得出其 CGG 重复数为 30, 并且和 Qseq100 毛细管电泳检测结果一致的是: 3500Dx 毛细管电泳测序结果显示(图 3A)在 420 bp 处有检测峰, 并且观察该样本的 X 染色体上连续峰中间有 2 处小凹陷(图 3B), 说明 CGG 重复序列中插入了 2 个 AGG。111 例自闭症患者中样本 D1609187, Qseq100 毛细管电泳检测其 2 条 X 染色体上扩增的目的片段长度分别为 430 bp 和 516 bp(图 2B), 计算其 CGG 重复数分别为 33 和 62, 判断为杂合型前突变携带者, 3500Dx 毛细管电泳测序结果显示(图 3C)在 430

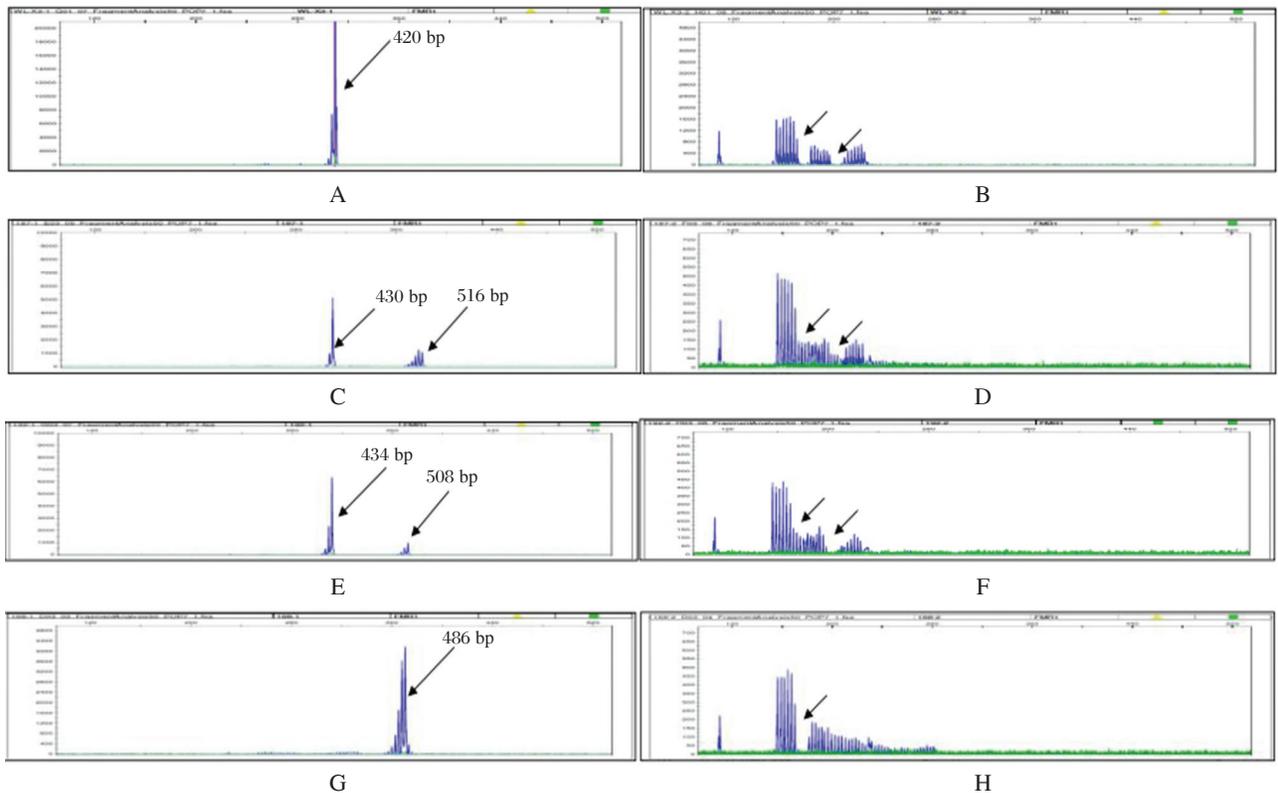
bp 和 516 bp 处有检测峰, 这和 Qseq100 毛细管电泳检测结果一致, 并且观察该样本中一条 X 染色体上连续峰中间有 2 处小凹陷(图 3D), 说明该染色体 CGG 重复序列中插入了 2 个 AGG, 而另一条 X 染色体上连续峰中间并没有凹陷, 说明该 X 染色体 CGG 重复序列中没有 AGG 插入; Qseq100 毛细管电泳检测样本 D1609192 2 条 X 染色体扩增的目的片段长度分别为 434 bp 和 508 bp(图 2C), 计算其 CGG 重复数分别为 34 和 59, 判断为杂合型前突变携带者, 3500Dx 毛细管电泳测序结果显示(图 3E)在 434 bp 和 508 bp 处有检测峰, 这和 Qseq100 毛细管电泳检测结果一致, 并且观察该样



A: 正常男性的 Qseq100 毛细管电泳检测结果; B: 样本 D1609187 的 Qseq100 毛细管电泳检测结果; C: 样本 D1609192 的 Qseq100 毛细管电泳检测结果; D: 样本 D1609168 的 Qseq100 毛细管电泳检测结果

图2 Qseq100 毛细管电泳结果图

Figure 2 The results of Qseq100 capillary electrophoresis



A、C、E、G 分别表示正常男性、D1609187、D1609192、D1609168 经引物 F、R 扩增后, PCR 产物的 3500Dx 毛细管电泳测序结果图, 可以读出每个样本的 CGG 重复数; B、D、F、H 分别正常男性、D1609187、D1609192、D1609168 经引物 F、M 扩增后, PCR 产物的 3500Dx 毛细管电泳测序结果图, 展示了 CGG 重复序列中 AGG 的插入情况

图3 3500Dx 毛细管电泳测序结果图

Figure 3 3500Dx capillary electrophoresis sequencing results

本中一条 X 染色体上连续峰中间有 2 处小凹陷(图 3F),说明该染色体 CGG 重复序列中插入了 2 个 AGG,而另一条 X 染色体上连续峰中间并没有凹陷,说明该 X 染色体 CGG 重复序列中没有 AGG 插入;Qseq100 毛细管电泳检测样本 D1609168 的 X 染色体扩增的目的片段长度为 486 bp(图 2D,计算其 CGG 重复数为 52,判断为中间型,3500Dx 毛细管电泳测序结果显示(图 3G)在 486 bp 有检测峰,这和 Qseq100 毛细管电泳检测结果一致,并且观察该样本的 X 染色体上连续峰中间有一处小凹陷(图 3H),说明 CGG 重复序列中插入了一个 AGG。

### 3 讨论

脆性 X 综合征常表现出自闭症样症状,如社交恐惧、语言呆板甚至言语交流障碍。而且脆性 X 综合征是自闭症谱系障碍最常见的共患病<sup>[10]</sup>。因此进行 *FMRI* 基因前突变携带者筛查,具有自闭症类似表型或者自闭症患者是不可忽视的候选人群。CGG(动态突变的最小重复数为 59)由亲代向子代传递的过程中会发生动态突变,有报道称亲代向子代传递 CGG 时的动态突变除了和 CGG 重复片段长度有关外,还与母亲的年龄以及 CGG 重复序列中 AGG 的插入数密切相关<sup>[11]</sup>。正常的 *FMRI* 基因(CGG) $n$  结构中每隔 9~11 个 CGG 就会有一个 AGG 插入,通过稳定性原理,AGG 的插入能够增加 CGG 的稳定性,限制其扩展<sup>[12]</sup>。缺少 AGG 插入时,CGG 重复数容易扩展,形成前突变。本研究采用三引物荧光 PCR-毛细管电泳法对收集的 111 例自闭症样本进行检测,同时使用 2 种检测系统即 Qseq100™ 全自动核酸分析系统和 ABI 3500Dx 仪进行结果比较验证,Qseq100 毛细管电泳法可直接分析扩展的目的片段长度,进而计算 CGG 重复数的范围,3500Dx 毛细管电泳测序法同样可以根据测出的目的片段长度计算 CGG 重复数,同时还可以分析 AGG 的插入个数从而快速诊断样品特征。该方法首先选取一例临床上已知 *FMRI* 基因 CGG 重复数为 30 的男性样本作为检测对照,毛细管电泳结果显示其 PCR 扩增目的片段长度为 420 bp,在此基础上计算受检样本的 CGG 重复数,并且利用 3500Dx 毛细管电泳测序法对上述方法的检测结果进行验证,发现测序得到的目的片段长度以及计算得出的 CGG 重复数均和 Qseq100 毛细管电泳的结果一致。说明我们针对脆性 X 综合征 *FMRI* 基因

前突变携带的三引物荧光 PCR-毛细管电泳法是可行的,能够准确快速地检测出样本的 *FMRI* 基因 CGG 重复数及 AGG 插入情况。我们对 111 例自闭症样本进行筛查,分析所有样本的 CGG 重复数,其中有 2 例是前突变携带者,1 例是中间型。这些结果表明有脆性 X 综合征患者确实会表现出自闭症样症状,对自闭症患者进行脆性 X 综合征筛查具有一定的实际意义。因而本方法可用于脆性 X 综合征和自闭症的辅助诊断。

目前已有多种筛查及诊断脆性 X 综合征的方法,但每种方法各有其局限性。如细胞遗传学分析虽可以直接观察染色体脆性位点的病变,但检出率较低<sup>[13]</sup>;DNA 连锁分析较细胞遗传学分析增加了可信度,但该技术需要有先证者,致使检测受到一定程度的限制;经典的检测方法 Southern blot 法虽然准确性很高,也有其明显的缺点,该方法对基因组 DNA 质量和数量的要求较高,需用同位素来标记,具有一定的危害性,并且操作繁杂,另外费用昂贵,耗时长。最重要的是 Southern 印迹并不能准确地区分前突变和正常序列<sup>[14]</sup>,也无法准确地计算出受检样本的 CGG 重复数。为此本研究对常规 PCR 法进行改良,通过采用耐高温酶及碱基替代法、添加 PCR 增效剂、提高退火温度和改善扩增条件等多个参数优化,实现对 *FMRI* 基因中 CG 含量较高的重复序列进行扩增。本方法具有操作简单、方便,耗时短,且通过 Qseq100 毛细管电泳法可以准确地计算 CGG 重复数的优点。这种快捷、经济、有效的脆性 X 综合征的检测方法的建立,对前突变携带者的群体筛查、高风险胎儿的产前诊断以及脆性 X 综合征和自闭症的辅助诊断具有较大实际应用价值。

### 参考文献

- [1] Terracciano A, Chiurazzi P, Neri G. Fragile X syndrome [J]. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2005, 137C(1):32-37.
- [2] Crawford DC, Acuna JM, Sherman SL. FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review [J]. Genet Med, 2001, 3(5):359-371.
- [3] Borra VM, Steenackers E, Freitas FD, et al. Localization of the gene for X-linked calvarial hyperostosis to chromosome Xq27.3-Xqter [J]. Bone, 2014, 58(1):67.
- [4] Lozano R, Rosero CA, Hagerman RJ. Fragile X spectrum disorders [J]. Intractable & Rare Diseases Research, 2014, 3(4):134-146.

- [5] 牛曼曼, 韩颖, 秦炯, 等. FMR1 基因前突变的临床表现和分子机制[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31(20):1588-1590.
- [6] 沙莎, 贺学, 袁东亚, 等. 应用三引物荧光 PCR-Sanger 测序法检测 FMR1 全突变者和前突变携带者[J]. 中华医学遗传学杂志, 2016, 33(6):844-848.
- [7] 陈萱, 赵杨, 秦鸣, 等. 应用 Pfu DNA 聚合酶进行脆性 X 综合症的筛查和产前基因诊断[J]. 中国优生与遗传杂志, 2004, 12(3):25.
- [8] 于莉, 段然慧. 智力低下和孤独症等人群中脆性 X 综合症的筛查[J]. 中华医学遗传学杂志, 2015, 32(4):593-596.
- [9] 滕丽萍, 赵正. FMR-1 基因敲除小鼠的焦虑及探索行为分析[J]. 中国保健营养旬刊, 2014(5):3267.
- [10] 于莉, 段然慧. 智力低下和孤独症等人群中脆性 X 综合症的筛查[J]. 中华医学遗传学杂志, 2015, 32(4):593-596.
- [11] Yrigollen CM, Martorell L, Durbinjohnson B, et al. AGG interruptions and maternal age affect FMR1 CGG repeat allele stability during transmission [J]. Journal of Neurodevelopmental Disorders, 2014, 6(1):1-12.
- [12] Yrigollen CM, Tassone F, Durbinjohnson B, et al. The role of AGG interruptions in the transcription of FMR1 premutation alleles[J]. Plos One, 2011, 6(7): e21728.
- [13] 李斌元, 马云, 何淑雅, 等. 脆性 X 智力低下基因 FMR1 中不稳定 DNA 序列的研究[J]. 中华实用医药杂志, 2005, 5(7):579-581.
- [14] Grasso M, Boon EM, Filipovic-Sadic S, et al. A novel methylation PCR that offers standardized determination of FMR1 methylation and CGG repeat length without southern blot analysis[J]. J Mol Diagn, 2014, 16(1):23-31.

(上接第 312 页)

- [19] 白莹, 李双, 宗亚楠, 等. 杜氏/贝氏肌营养不良症 433 个家系的基因突变分析[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(16):1261-1269.
- [20] Juan-Mateu J, Gonzalez-Quereda L, Rodriguez MJ, et al. DMD mutations in 576 dystrophinopathy families: a step forward in genotype-phenotype correlations [J]. Plos One, 2015, 10(8):e0135189.
- [21] Hofstra RM, Mulder IM, Vossen R, et al. DGGE-based whole-gene mutation scanning of the dystrophin gene in duchenne and becker muscular dystrophy patients[J]. Hum Mutat, 2004, 23(1):57-66.
- [22] Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, et al. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus[J]. Genomics, 1988, 2(1):90-95.
- [23] Kesari A, Pirra LN, Bremadesam L, et al. Integrated DNA, cDNA, and protein studies in becker muscular dystrophy show high exception to the reading frame rule[J]. Hum Mutat, 2008, 29(5):728-737.
- [24] Schwartz M, Hertz JM, Svein ML, et al. LGMD2I presenting with a characteristic duchenne or becker muscular dystrophy phenotype[J]. Neurology, 2005, 64(9):1635-1637.
- [25] 许田田, 蓝丹. 假性肥大型肌营养不良的治疗进展[J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 17(3):294-298.
- [26] Zhang Y, Long C, Li H, et al. CRISPR-cpf1 correction of muscular dystrophy mutations in human cardiomyocytes and mice [J]. Sci Adv, 2017, 3(4): e1602814.

(上接第 300 页)

- sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma [J]. Clinical Chemistry, 2015, 61(4):608-616.
- [28] Lo KK, Karampetsou E, Boustred C, et al. Limited clinical utility of non-invasive prenatal testing for sub-chromosomal abnormalities [J]. Am J Hum Genet, 2016, 98(1):34-44.
- [29] Li R, Wan J, Zhang Y, et al. Detection of fetal copy number variants by non-invasive prenatal testing for common aneuploidies [J]. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, 2016, 47(1):53-57.

· 论 著 ·

## 32 497例正常听力孕龄女性耳聋基因携带率与突变谱调查

刘畅<sup>1,2</sup> 张彦<sup>1,2</sup> 丁红珂<sup>1,2</sup> 吴菁<sup>1</sup> 麦明琴<sup>1</sup> 曾玉坤<sup>1,2</sup> 刘玲<sup>1,2</sup> 尹爱华<sup>1,2\*</sup>

**【摘要】**目的 在正常听力孕龄人群中开展耳聋基因携带率与突变谱调查,为耳聋基因筛查、遗传咨询、疾病管理提供数据。方法 32 497例听力正常且无耳聋家族史的孕龄女性在我院医学遗传中心门诊接受遗传咨询后,接受耳聋基因芯片筛查。对于检测结果提示为常染色体隐性遗传耳聋基因突变携带者,建议其配偶进行进一步耳聋基因检测。对于夫妇均为耳聋基因突变携带的家庭,给予遗传咨询与风险评估,必要时提供产前耳聋基因诊断。结果 32 497位听力正常且无耳聋家族史的孕龄女性中,1 181例携带遗传性耳聋基因突变,携带率为3.63%。其中,1 117例携带常染色体隐性遗传的耳聋基因杂合突变,包括4种常见的*GJB2*基因突变665例,2种常见的*SLC26A4*基因突变407例,*GJB3*基因突变45例。此外,64例携带与氨基糖甙类药物诱导性耳聋密切相关的线粒体DNA *12S rRNA*基因突变。结论 在正常听力的孕龄人群中开展耳聋基因携带率与突变谱的研究,对优生优育与遗传咨询具有重要意义。

**【关键词】** 耳聋;携带率;突变谱

### Investigation on gene carrying rate and mutation spectrum of deafness in 32 497 cases of childbearing-age women with normal hearing

LIU Chang<sup>1,2</sup>, ZHANG Yan<sup>1,2</sup>, DING Hongke<sup>1,2</sup>, WU Jing<sup>1</sup>, MAI Mingqin<sup>1</sup>, ZENG Yukun<sup>1,2</sup>, LIU Ling<sup>1,2</sup>, YIN Aihua<sup>1,2\*</sup>

(1. Medical Genetic Center, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511400; 2. Maternal and Children Metabolic - Genetic Key Laboratory, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511400)

**[ABSTRACT]** Objective To better understand the carrier rate and mutation spectrum of genes associated with hearing impairment in the general population, which could be of importance in carrier screening, genetic counseling, and disease management. Methods 32 497 unrelated women of childbearing age with normal hearing and without family history of hearing loss were tested with allele-specific PCR-based universal array. Further genetic tests were provided to the spouses of the screened carriers. For those couples at risk, multiple choices were provided, including prenatal diagnosis. Results Among the 32 497 normal hearing participants, 1 181 subjects carried pathogenic mutations included in the screening chip, which had the carrier rate 3.63%. A total of 665 participating subjects carried one type of the 4 common deafness-causing mutations in *GJB2* gene in the heterozygous state, 407 subjects were found carrying one type of the 2 confirmed pathogenic mutations in *SLC26A4* gene in the heterozygous state, and 45 subjects were found carrying pathogenic mutation in *GJB3* gene in the heterozygous state. In addition, 64 participants were detected

基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(A2016225)

作者单位:1. 广东省妇幼保健院医学遗传中心,广东,广州 511400

2. 广东省妇幼保健院妇幼代谢与遗传重点实验室,广东,广州 511400

\*通讯作者:尹爱华, E-mail: yinaiwa@vip.126.com

to be homoplasmic mutation carriers of mitochondrial DNA *12S rRNA* gene, which was important mechanism of genetic susceptibility to aminoglycoside ototoxicity. **Conclusion** Better understanding about the carrier rate and mutation spectrum of genes associated with hearing impairment in the general population of childbearing age might be important for carrier screening and genetic counseling.

**[KEY WORDS]** Hearing loss; Carrier rate; Mutation spectrum

耳聋是临床上常见的出生缺陷,每1 000名活产儿中便有1~3名新生聋儿<sup>[1-2]</sup>。由于幼儿期是大脑语言中枢发育的重要时期,在这一时期未获得充分的听觉刺激及语言接触的孩童将面临包括语言获取、认知发展、社会心理及社会交往等多方面的障碍<sup>[3-4]</sup>。过半数的语前聋患儿系由遗传性因素所导致的耳聋。鉴于90%~95%的聋病患儿出生于听力正常的家庭<sup>[5]</sup>,在听力正常人群中进行耳聋基因突变携带率与分布情况的调研十分重要,可为耳聋基因筛查、遗传咨询、疾病管理提供流行病学数据<sup>[6]</sup>。本研究拟在听力正常的孕龄人群中开展耳聋基因携带率与突变谱的调查,为遗传咨询与生育指导提供资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 一般资料

本临床研究将2011年1月至2016年4月间在广东省妇幼保健院医学遗传中心门诊寻求孕前/孕早期检查与遗传优生咨询的32 497例听力正常且无耳聋家族史的孕龄女性纳入研究范围,入组人群年龄介于20~40岁,以中国南方人群为主。研究方法和研究对象入组标准经广东省妇幼保健院伦理委员会审核通过。临床上对入组个体进行病史收集及体格检查,包括详细的过往病史、耳聋家族史、不良孕产史、氨基糖甙类药物接触史以及与耳聋相关的潜在致病因素。受检者在充分知情同意情况下,签署知情同意书。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 耳聋基因检测

采集受检者外周血2 mL,提取基因组DNA。使用微阵列芯片法晶芯®九项遗传性耳聋基因检测试剂盒[北京博奥生物有限公司,国食药监械(准)字2009第3400725]对受检者进行*GJB2*基因c. 35 del G、c. 176\_191 del 16 bp、c. 235 del C、c. 299\_300 del AT, *GJB3*基因c. 538 C>T, *SLC26A4*基因c. 2168 A>G、c. 919\_2 A>G,线粒体DNA *12S rRNA*基因m. 1494 C>T、m. 1555 A>

G等中国人群耳聋基因突变热点筛查。根据试剂盒说明书,通过多重不对称等位基因特异性PCR扩增获得大量单链DNA,PCR产物变性后与芯片杂交,芯片洗涤后经晶芯LuxScan10K-B微阵列芯片扫描仪扫描成像并使用配套软件进行结果判读。

#### 1.2.2 遗传咨询及生育指导

根据耳聋基因检测结果给予受检者相应的遗传咨询意见<sup>[7-8]</sup>。对于检测结果提示为常染色体隐性遗传耳聋基因突变携带者,建议其配偶进行进一步耳聋基因检测。如夫妇均携带同一常染色体隐性遗传耳聋基因上的致病突变,则可为其提供遗传风险分析及生育指导,包括胚胎植入前诊断、接受捐赠配子、产前基因诊断等。对于检测结果提示为线粒体遗传耳聋基因突变携带者,遗传咨询中需就其母系遗传方式及其与药物诱导性耳聋间的关系进行充分告知,给予用药指导。

## 2 结果

经检测,本研究所收集的32 497例听力正常且无耳聋家族史的孕龄女性中,1 181例携带遗传性耳聋基因突变,即9种常见致聋基因突变在该人群中的携带率为3.63%。如表1所示,1 181例耳聋基因突变携带者中,1 117例携带常染色体隐性遗传的耳聋基因杂合突变。包括4种常见的*GJB2*基因突变665例,携带率2.05%;2种常见的*SLC26A4*基因突变407例,携带率1.25%;*GJB3*基因突变45例,携带率0.14%。此外,遵循母系遗传规律的线粒体DNA *12S rRNA*基因突变64例,携带率0.20%。

1 117例携带常染色体隐性遗传耳聋基因突变的孕龄女性与配偶一同接受遗传咨询后,735位携带者配偶选择接受进一步耳聋基因检测,包括9种中国人群常见的致聋基因突变位点的芯片检测以及配偶所携带致病基因的外显子序列分析。检测结果提示47对夫妇为相同隐性遗传耳聋基因的突

表1 32 497例正常听力孕龄女性人群耳聋基因携带率与突变谱调查

Table 1 The carrier rate and mutation spectrum of genes associated with hearing loss in 32 497 hearing female of childbearing age

基因	变异	n	携带率(%)
GJB2	c. 35 del G	4	0.01
	c. 176_191 del 16 bp	22	0.07
	c. 235 del C	551	1.70
GJB3	c. 299_300 del AT	88	0.27
	c. 538 C>T	45	0.14
SLC26A4	c. 2168 A>G	64	0.20
	c. 919_2 A>G	343	1.06
mtDNA 12S rRNA	m. 1494 C>T	5	0.02
	m. 1555 A>G	59	0.18

变携带者,根据遗传规律,他们的后代出现致病基因纯合突变的概率约为25%。在接受详细的遗传咨询,并充分了解手术风险与检测局限性的情况下,44对携带致聋突变的夫妇选择了产前耳聋基因诊断。检测结果提示,10例胎儿未携带致聋突变、25例携带杂合致聋突变、9例携带纯合致聋突变或复合杂合突变。根据产前耳聋基因诊断的结果,遗传咨询医师为各家庭提供相应的遗传咨询意见及生活指导。孩子出生后听力评估结果与产前诊断结果相符,我们对孩子的情况进行了定期随访并给予恰当的生活指导<sup>[9]</sup>。此外,3对携带常染色体隐性遗传致聋基因突变的夫妇经充分知情告知后,选择不进行产前耳聋基因诊断。其中一对夫妇生育听力缺失患儿,我们为其提供了早期诊断、干预及援助信息<sup>[10]</sup>。

此外,本次正常听力孕龄女性耳聋基因筛查中检出线粒体DNA 12S rRNA基因突变携带者64例。鉴于线粒体DNA 12S rRNA基因突变是氨基糖甙类药物诱导性耳聋的重要遗传机制<sup>[11]</sup>,且遵循母系遗传模式,我们为突变携带者及其母系亲属提供了详细的用药指导。

### 3 讨论

本研究中32 497例听力的孕龄女性中1 181例携带遗传性耳聋基因突变,该人群中致聋基因突变的携带率为3.63%。本研究样本量较大、入组标准执行严格,因此数据具有较好的代表性

与可信度,可为耳聋基因筛查、遗传咨询、疾病管理提供重要数据资料<sup>[12]</sup>。同时,了解孕龄人群耳聋基因突变携带率与分布情况,有助于选择中国人群中携带率较高、临床表现较重、诊断意义较大的耳聋基因突变位点作为孕前/孕早期耳聋基因筛查的检测位点。

基于该听力正常孕龄女性人群的耳聋基因突变率与携带谱研究,4种常见的GJB2基因突变占检出的基因突变比例为56.31%,其中高加索人群中携带率最高的致聋基因突变GJB2基因c. 35 del G在该主要由中国南方人组成的人群研究中携带率较低,仅占检出突变的0.34%;而在中国耳聋病患群体中检出率最高的致聋突变GJB2基因c. 235 del C位点<sup>[13]</sup>在本研究的听力正常人群中携带率也居首位,约占检出变异的46.66%。此外,在该听力正常人群中SLC26A4基因上2种常见致聋突变c. 2168 A>G与c. 919-2 A>G检出率也较高,共占检出突变的34.46%。而GJB3基因上的耳聋相关变异c. 538 C>T位点则在中国南方人群中携带率较低,约占检出突变的3.81%。此外,与氨基糖甙类药物诱导性耳聋关系密切的线粒体DNA 12S rRNA基因变异m. 1494 C>T与m. 1555 A>G位点约占检出突变的5.42%。

耳聋的发病率在活产儿中高达1‰~3‰,且90%~95%耳聋患儿出生于父母听力正常的家庭,因而在听力的孕龄人群中进行致聋基因携带率与突变谱的研究十分重要,可为耳聋基因筛查、遗传咨询、疾病管理提供重要数据资料。

### 参考文献

- [1] Wu CC, Tsai CH, Hung CC, et al. Newborn genetic screening for hearing impairment: a population-based longitudinal study [J]. Genet Med, 2016. [Epub ahead of print]
- [2] Peng Q, Huang S, Liang Y, et al. Concurrent genetic and standard screening for hearing impairment in 9317 Southern Chinese newborns [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2016, 20(10):603-608.
- [3] Yoshinaga-Itano C, Wiggin M. A look into the crystal ball for children who are deaf or hard of hearing: needs, opportunities, and challenges [J]. Semin Speech Lang, 2016, 37(4):252-258.

# 曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶的生物信息学分析

李奕基<sup>1,2</sup> 梁培<sup>1,2\*</sup>

**[摘要]** **目的** 通过生物信息学预测曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶 (*Smcathepsin L* 样蛋白酶) 的生物学特征及其潜在功能和结构, 为下一步 *Smcathepsin L* 样蛋白酶参与寄生虫和宿主相互作用过程研究提供依据。 **方法** 通过 NCBI 的 ORF finder 工具对 *Smcathepsin L* 样蛋白酶的开放阅读框 (ORF) 进行分析, 利用 ExPASy 网站进行蛋白的物理化学参数、信号肽、跨膜螺旋和潜在分子生物学功能的预测, 通过 NCBI/BLAST 对蛋白保守功能域进行预测。从 NCBI 网站获取不同物种的 cathepsin L 样蛋白酶序列, 并利用 Vector NTI suit 8.0 和 TreeView 软件进行分析。利用 SWISS-MODEL 网站和 SPDBV 4.10 软件分析 *Smcathepsin L* 样蛋白酶的三维空间结构。 **结果** *Smcathepsin L* 样蛋白酶是一个全长基因, 编码 336 个氨基酸。蛋白由 2 个典型的 cathepsin L 样蛋白酶结构域组成, 序列当中有信号肽, 是一个稳定的可溶性蛋白分子。三维空间立体结构分析结果显示 *Smcathepsin L* 样蛋白酶是一个保守的蛋白。*Smcathepsin L* 样蛋白酶编码氨基酸序列与细粒棘球绦虫、链状带绦虫、多房棘球绦虫和人的 cathepsin L 样蛋白酶基因的同源性分别是 50%、50%、49% 和 46%。分子进化分析显示 *Smcathepsin L* 样蛋白酶与日本血吸虫、多房棘球绦虫和链状带绦虫亲源性更近, 而与其他物种, 例如原虫、线虫和哺乳动物亲源性较远。 **结论** *Smcathepsin L* 样蛋白酶可能是一个潜在的分泌蛋白, 该蛋白能在胞外发挥作用, 即在寄生虫的消化、转移、入侵及宿主-寄生虫相互作用中起着重要的作用, 是一个具有潜在研究价值的多功能分子。

**[关键词]** 曼氏迭宫绦虫; cathepsin L 样蛋白酶; 生物信息学分析

## Sequence bioinformatics analysis of cathepsin L-like proteinase from *Spirometra mansoni*

LI Yiji<sup>1,2</sup>, LIANG Pei<sup>1,2\*</sup>

(1. Department of Pathogen Biology, Hainan Medical College, Haikou, Hainan, China, 571199; 2. Key Laboratory of Translational Medicine for Tropical Diseases, Ministry of Education, Hainan Medical University, Hainan, Haikou, China, 571199)

**[ABSTRACT]** **Objective** To provide information and pave the way for further research on cathepsin L-like proteinase of *Spirometra mansoni* (*Smcathepsin L*-like proteinase) which may participate in the interaction between parasite and host. **Methods** The open reading frame of *Smcathepsin L*-like proteinase was identified with open reading frame (ORF) finder tool in NCBI website. ExPASy website was used to

基金项目: 国家自然科学基金课题 (No.81560332, No.81660345); 海南省自然科学基金课题 (No.814298); 海南医学院 2016 年引进人才科研启动经费 (No.2016011); 海南医学院大学生创新创业训练计划项目 (HYCX2016029)

作者单位: 1. 海南医学院病原生物学教研室, 海南, 海口 571199

2. 海南医学院热带病转化医学教育部重点实验室, 海南, 海口 571199

\*通讯作者: 梁培, E-mail: liangpeilp2012@163.com

predict the physical and chemical parameters of protein, signal peptide, transmembrane helices and potential molecular and biological functions. The conserved domains of the protein were detected by NCBI/BLAST home. In order to analyze the homology and phylogenetic tree, sequences of cathepsin L-like proteinase from various species were obtained from NCBI website, and the results were analyzed by Vector NTI suit 8.0 and TreeView software. The three-dimensional structure of *Smcathepsin* L-like proteinase was predicted by SWISS-MODEL and analyzed by SPDBV 4.10. **Results** *Smcathepsin* L-like proteinase is full-length gene and encoded 336 amino acid residues. The protein is composed of 2 classic conserved domains with signal peptide and a stably soluble molecule. It has a conservative cathepsin L-like proteinase in three-dimensional structure. *Smcathepsin* L-like proteinase is homologous to cathepsin L-like proteinase from *Echinococcus granulosus*, *Taeniasolium*, *Echinococcus multilocularis* and *Homo sapiens* with 50%, 50%, 49% and 46% identities, respectively. *Smcathepsin* L-like proteinase clustered with the L-like proteinase from the *Schistosoma japonicum*, *Echinococcus multilocularis*, and *Taeniasolium*, but not with other species like protozoan, trematode and mammal animals. **Conclusions** *Smcathepsin* L-like proteinase is a potential secreted protein, and play a role in extracellular environment, such as digestion, metastasis, invasion and parasite-host interaction. Therefore, *Smcathepsin* L-like proteinase could be a potential important target.

[KEY WORDS] *Spirometra mansoni*; Cathepsin L-like proteinase; Bioinformatics analysis

曼氏迭宫绦虫 (*Spirometra mansoni*, *Sm*), 属于迭宫绦虫属, 其成虫和裂头蚴都能够寄生于人, 引起人兽共患寄生虫病。曼氏迭宫绦虫成虫主要寄生于猫科动物的小肠内, 偶尔寄生于人体。而幼虫曼氏裂头蚴 (*Sparganum mansoni*) 是主要致病阶段, 在人体内寄生引起裂头蚴病 (Sparganosis), 裂头蚴能够寄生在人体的各种组织引起严重的损害, 比如引起严重的眼部疾病、组织损伤和脑部功能紊乱。曼氏迭宫绦虫分布在我国、日本、韩国和泰国等东南亚国家<sup>[1]</sup>。在我国, 裂头蚴病主要分布于 27 个省、市、自治区, 感染人数超过 1 000 人<sup>[1-2]</sup>。

组织蛋白酶 (cathepsin) 是在动物组织细胞内 (主要是溶酶体) 发现的一类蛋白酶, 包括丝氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶等, 其中半胱氨酸蛋白酶类包括组织蛋白酶 B、F、H、K、L、O、S、V、W 和 X<sup>[3]</sup>。20 世纪 80 年代组织蛋白酶 L 才被鉴定和测序, 到目前为止从组织蛋白酶 A 到组织蛋白酶 Z 均已有报道<sup>[4]</sup>。半胱氨酸蛋白酶在寄生生物中起着极为重要的作用, 除了基本的蛋白降解代谢功能外还参与寄生虫免疫逃避, 脱囊/形成囊脱鞘孵化以及细胞组织入侵等部分, 同时寄生虫半胱氨酸蛋白酶具有较好的抗原性, 已作为血清诊断疫苗以及药物研制的靶标分子得到应用<sup>[5]</sup>。纯化的猪带绦虫囊尾蚴的可溶性重组半胱氨酸蛋白酶 TsCL-1 具有生物活性, 其水解活性能被半胱氨酸蛋白酶特异性抑制剂 E-64 所抑制, 同时 TsCL-1 重组蛋白有较好的免疫原性和

抗原性, 这为猪囊尾蚴病的诊断与检测提供了一种简便、快捷、价格低廉的技术手段<sup>[6]</sup>。在华支睾吸虫中, 半胱氨酸蛋白酶重组蛋白对检测血清中特异性 IgG 具有较高敏感性和特异性, 是华支睾吸虫一个有潜在血清学诊断价值的重组蛋白抗原<sup>[7]</sup>。而对贾第虫组织蛋白酶 B 的研究发现, 其为贾第虫病毒复制相关分子<sup>[8]</sup>。在旋毛虫中, 组织蛋白酶 F 具有胚胎致死性, 同时其可作为治疗旋毛虫病的潜在药物靶标<sup>[9]</sup>。有研究证明天冬氨酸组织蛋白酶 D 在顶复门寄生虫的蛋白运输机制中具有重要的作用, 在疟原虫、扁形动物、线虫和昆虫中引起血液消化, 并是多酶蛋白水解复合物的组成成分, 同时具有作为抗寄生虫病的新有效干预策略的潜在靶标<sup>[10]</sup>。

在本次研究中, 我们对曼氏迭宫绦虫的 cathepsin L 样蛋白酶进行了潜在生物化学特性的生物信息学分析。为进一步探讨 cathepsin L 样蛋白酶在曼氏迭宫绦虫生长发育过程中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 *Smcathepsin* L 样蛋白酶核酸序列分析

从狗肠中分离的成虫用来构建曼氏迭宫绦虫的 cDNA 文库, 得到的 EST 标签由上海联众基因科技研究院完成测序, 编码 *Smcathepsin* L 样蛋白酶的 cDNA 序列从该文库调取, 其开放阅读框 (open reading frame, ORF) 是通过利用 ExPASy

(<http://www.expasy.org/>)中的 ORF finder tool 进行查找。

### 1.2 Smcathepsin L 样蛋白酶氨基酸序列分析

Smcathepsin L 样蛋白酶蛋白的物理化学参数是通过 ExPASy ProtParam 获取,并利用 ExPASy 网站进行该蛋白的信号肽和跨膜螺旋的预测。Smcathepsin L 样蛋白酶的保守功能域是通过 NCBI/BLAST HOME 进行检测。

### 1.3 同源性和分子进化树分析

为了进行同源性和分子进化树分析,我们通过 NCBI 获取了不同物种的 Smcathepsin L 样蛋白酶序列,利用生物信息学分析软件 Vector NTI suit 8.0 和 TreeView 进行结果分析。

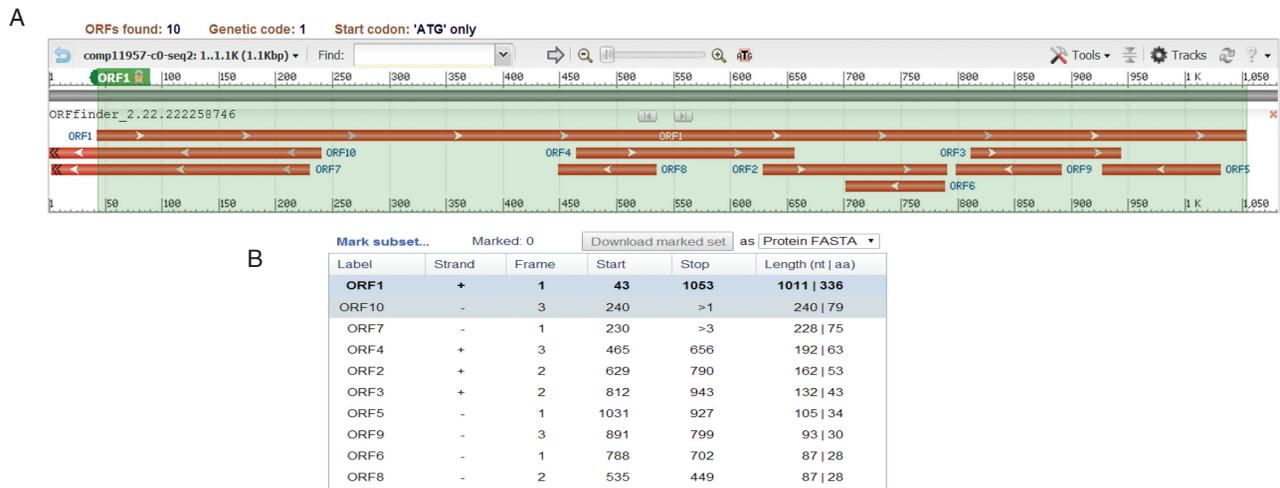
### 1.4 Smcathepsin L 样蛋白酶结构模型构建

Smcathepsin L 样蛋白酶三维空间结构是利用编码蛋白氨基酸通过 SWISS-MODEL 进行预测和 SPDBV 4.10 进行结果分析。在 RAMPAGE 服务器使用拉氏构象图(Ramachandran plot)(<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) 检验最优预测模型。

## 2 结果

### 2.1 核酸序列分析

ORF finder 结果显示 Smcathepsin L 样蛋白酶核酸序列是全长序列,由 1 011 个碱基对组成,见图 1。



A: Smcathepsin L-like proteinase 保守功能域; B: Smcathepsin L-like proteinase 开放阅读框

图 1 曼氏迭宫绦虫 cathepsinL 样蛋白酶的开放阅读框

Figure 1 The open reading frame of Smcathepsin L-like proteinase

### 2.2 编码氨基酸的特征

Smcathepsin L 样蛋白酶蛋白由 336 个氨基酸组成,如图 2 所示。氨基酸组成部分主要为 Gly、Leu、Val、Ala 和 Ser,分别占 9.5%、7.7%、7.7%、7.1%和 7.1%。预测该蛋白的理论分子量是 38.0 kDa,理论 pI 值是 8.28。该蛋白在哺乳动物中的半衰期是 30 h,在酵母和大肠埃希杆菌中体内表达的半衰期分别大于 20 h 和 10 h。该蛋白是一个稳定的蛋白,其不稳定系数是 32.06。预测的 C 值、S 值和 Y 值都高于 0.5,这提示了该蛋白有信号肽,如图 3A 所示。跨膜螺旋分析结果显示了该蛋白不是一个跨膜蛋白,可能是一个可溶性的蛋白分子,如图 3B 所示。

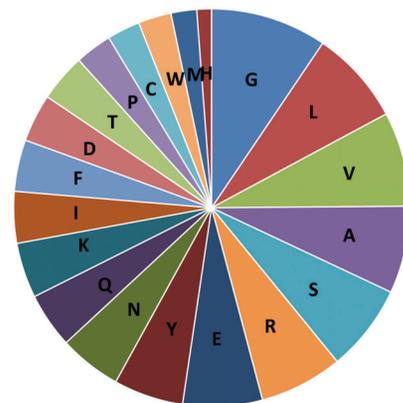
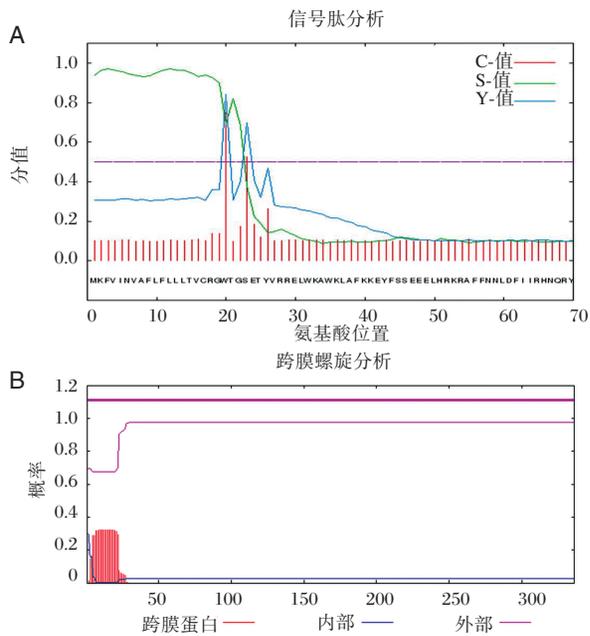


图 2 曼氏迭宫绦虫 cathepsinL 样蛋白酶的氨基酸组成

Figure 2 Amino acid composition of Smcathepsin L-like proteinase



A: 曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶信号肽分析; B: 曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶跨膜螺旋分析

图3 曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶的功能区域分析  
Figure 3 Analysis of *Smcathepsin* L-like proteinase functional domain

### 2.3 同源性和进化树分析

通过 *Smcathepsin* L 样蛋白酶的多序列比对,

结果如图 4 显示, *Smcathepsin* L 样蛋白酶编码氨基酸序列与细粒棘球绦虫、链状带绦虫和多房棘球绦虫的 cathepsin L 样蛋白酶基因的同源性分别是 50%、50%、49%。该蛋白是含有 Inhibitor\_I129 和 Peptidase\_C1 2 个结构域, 其中 Peptidase\_C1 结构域含有 4 个活性位点(图 4 红色方框)和 5 个 S2 亚单位(图 4 黑色方框)。不同物种间 4 个活性位点氨基酸高度保守, 而 5 个 S2 亚单位氨基酸变异较大。

*Smcathepsin* L 样蛋白酶的分子进化树结果显示 *Smcathepsin* L 样蛋白酶与日本血吸虫、多房棘球绦虫和链状带绦虫亲源性更近, 而与其他例如原虫、线虫和哺乳动物亲源性较远, 见图 5。

### 2.4 Smcathepsin L 样蛋白酶结构模型

*Smcathepsin* L 样蛋白酶的保守功能区有 2 个: Inhibitor\_I129 结构域和 Peptidase\_C1 结构域。该结构域的组成分别是 32 (aa)-91 (aa)、121 (aa)-335 (aa), 其中, 2 个结构域分别由红色和绿色下划线显示出来, 见图 4。通过 SWISS-MODEL 对 *Smcathepsin* L 样蛋白酶的三维空间结构进行预测, 如图 6B 所示。根据 Ramachandran plots 分析结果表明这个结构模型是最优化的(最合理区以及允许残基数占比分别为 85.5% 和 11.2%, 在允许区内总计占 96.7%)。

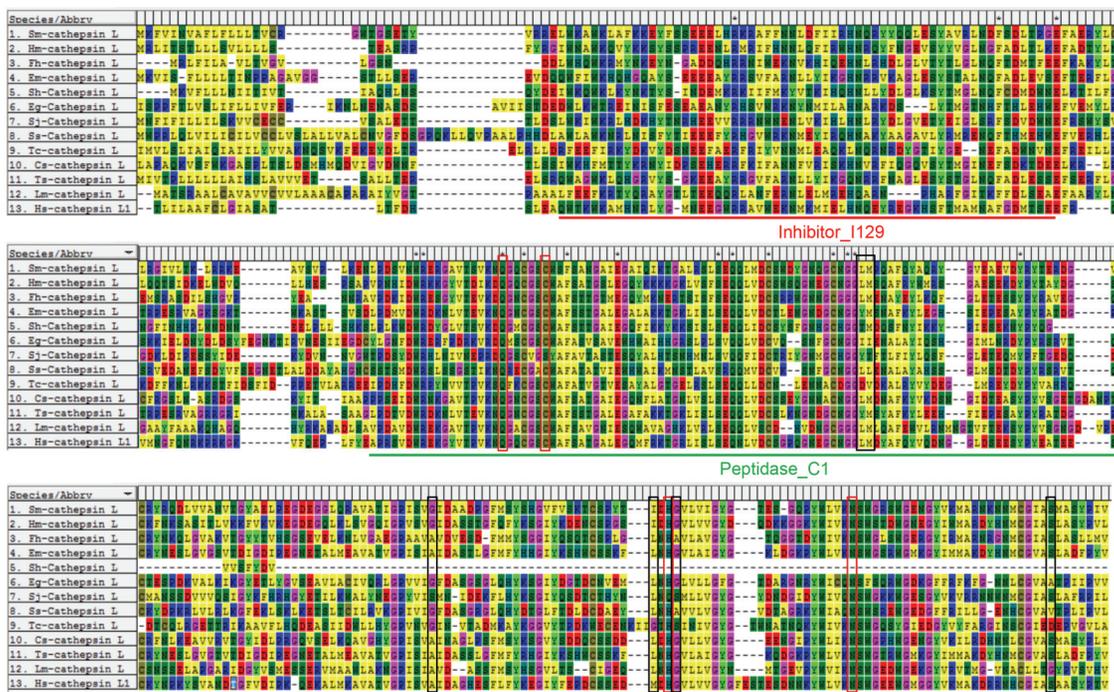


图4 曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶与其他物种 cathepsin L 样蛋白酶的序列比对

Figure 4 Alignment of *Smcathepsin* L-like proteinase amino acid sequence with cathepsin L-like proteinase from other species

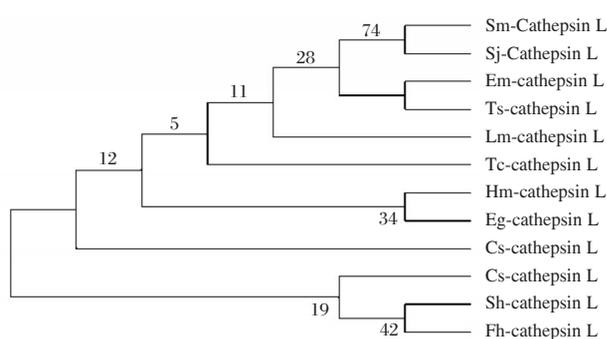
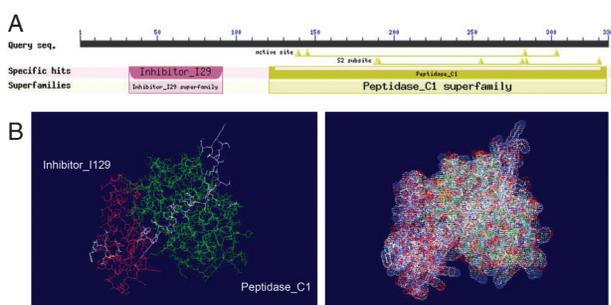


图5 曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶的分子进化树

Figure 5 Molecular evolution tree of the *Smcathepsin* L-like proteinase



A: 曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶的保守功能域; B: Swiss-model 曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶的三维结构

图6 曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶典型的2个序列分析

Figure 6 Analysis of 2 classic sequences of *Smcathepsin* L-like proteinase

### 3 讨论

组织蛋白酶分布广泛,从低等到高等的各种类群生物体中均有被发现,在生物界已发现 20 余种<sup>[11]</sup>。组织蛋白酶 L 是绦虫的一类重要的半胱氨酸蛋白酶,其参与绦虫生命周期的多种活动,在寄生物中起着极为重要的作用<sup>[12-14]</sup>。

在本实验研究中,曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶是第一次被鉴别和进行生物信息学分析。并对曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶的结构和潜在的功能特征进行了描述。在本实验研究中,我们从曼氏迭宫绦虫成虫的 cDNA 文库中分离得到其 cathepsin L 样蛋白酶的全长序列(图 1),该序列由 336 个氨基酸组成。曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶的理论分子量是 38 kDa,含有信号肽,但它不是一个跨膜蛋白,提示其可能是一个潜在的分泌蛋白<sup>[15]</sup>。*Smcathepsin* L 样蛋白酶的保守结构域的预

测表明其属于 C1A 肽酶家族,该家族在溶酶体蛋白的降解中起到作用<sup>[16]</sup>。另外,进化树分析结果显示,曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶与日本血吸虫、多房棘球绦虫和链状带绦虫亲源性较近,这可能是由于它们都属于蠕虫,说明此蛋白在生物学和生物化学方面具有一定的相似作用。在日本血吸虫成虫消化道内发现了组织蛋白酶 B 和 L,水解来源于宿主的红细胞以满足寄生虫的生长、发育和生存需要<sup>[17-18]</sup>。因此,曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶通过分泌到细胞外来为寄生虫营养供应方面发挥作用。

本研究表明不同物种间 4 个活性位点氨基酸高度保守,半胱氨酸和组氨酸是肽酶 C1 家族的催化残基,形成催化二聚体。其他 2 个残基在催化作用中起着重要的作用,其中谷氨酰胺在催化半胱氨酸之前,被认为是有助于氧离子洞的形成,而天冬酰胺残基识别催化性组氨酸的咪唑环<sup>[19-20]</sup>。同时发现 5 个 S2 亚单位氨基酸变异较大。木瓜蛋白酶的特异性主要决定于位于该疏水区的疏水氨基酸或芳香族氨基酸残基,那么曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶具有其特异性。比如肝片吸虫的 cathepsin L 样蛋白酶在 S2 亚单位偏好脯氨酸并且能够水解胶原蛋白<sup>[21]</sup>。结构域 Inhibitor\_1129 作为前肽,作为单一结构域蛋白或蛋白质内部单一或双重结构域的肽蛋白酶抑制剂。在很多情况下,他们是合成大的前体蛋白的一部分,作为前多肽原或者作为 N 端结构域与未激活的肽酶或酶原有关。这个结构域能够阻止酶作用底物接近活性位点,其通过与另一个肽酶的相互作用或通过自动催化切割激活酶原而去除 N 端抑制剂结构域<sup>[22-23]</sup>。S2 亚单位是木瓜蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶主要的底物特异性亚单位,该单位可容纳底物 P2 侧链的大体积疏水性或芳香残基。组织蛋白酶 B 除外,由于在口袋的底部存在一个谷氨酸,其在此亚位点容易接受精氨酸<sup>[24-25]</sup>。目前,伪异盘并殖吸虫(*Pseudo Paragonimus*)的电脑模拟三维结构和肝片吸虫的组织蛋白酶原 L1 的晶体结构已经有报道<sup>[26-27]</sup>。蛋白质特定的功能都是由其特定的构象所决定的,为此进一步的研究曼氏迭宫绦虫 cathepsin L 样蛋白酶的空间结构显得尤为重要。

cathepsin 多序列比对结果显示 cathepsin L 样蛋白酶的编码氨基酸序列与人 cathepsin L 样蛋白酶序列相似性仅有 46%,同源性相对较低,因此,

*Smcathepsin L* 样蛋白酶有望成为控制人类裂头蚴病的有价值的疫苗靶点。此外,还有研究表明<sup>[28]</sup> 寄生虫的重组 *cathepsin L* 样蛋白酶具有较好的免疫原性和抗原性,那么对曼氏迭宫绦虫 *Smcathepsin L* 样蛋白酶免疫原性和抗原性仍需进一步的研究,以确定其在寄生虫和宿主间的相互作用,以进一步开展免疫诊断和为治疗研究奠定基础。综上所述,*Smcathepsin L* 样蛋白酶将是一个具有潜在研究价值的多功能分子。

### 参考文献

- [1] Hong Q, Feng J, Liu H, et al. Prevalence of *Spirometra mansoni* in dogs, cats, and frogs and its medical relevance in Guangzhou, China [J]. *Int J Infect Dis*, 2016, 53:41-45.
- [2] Mo Z, Li X, Lei Z, et al. Clinical analysis of 25 sparganosis cases [J]. *Zhong guo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi*, 2013, 31(3):218-220.
- [3] Zhou J, Zhang Y, Li Q, et al. Evolutionary history of cathepsin L (L-like) family genes in vertebrates [J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(9):1016-1025.
- [4] 曾广智, 谭宁华, 贾锐锐, 等. 组织蛋白酶及其抑制剂研究进展 [J]. *云南植物研究*, 2005, 27(4):337-354.
- [5] Sajid M, Mckerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms [J]. *Mol Biochem Parasit*, 2002, 120(1):1-21.
- [6] 宋军科. 猪囊尾蚴半胱氨酸蛋白酶 TsCL-1 基因的原核表达及生物学特性研究 [D]. 陕西: 西北农林科技大学, 2010.
- [7] 江文才. 华支睾吸虫半胱氨酸蛋白酶基因克隆、表达及血清学诊断效果评价 [D]. 江苏: 江苏省血吸虫病防治研究所, 2011.
- [8] 田甜. 贾第虫组织蛋白酶 B 基因干扰对虫体生长和贾第虫病毒 mRNA 的影响 [D]. 吉林: 吉林大学, 2013.
- [9] 曲自刚. 旋毛虫组织蛋白酶 F 的功能鉴定及药物靶标筛选 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [10] Sojka D, Hartmann D, Bartosova-Sojkova P, et al. Parasite cathepsin D-like peptidases and their relevance as therapeutic targets [J]. *Trends Parasitol*, 2016, 32(9):708-723.
- [11] Lecaille F, Kaleta J, Bromme D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design [J]. *Chem Rev*, 2002, 102(12):4459-4488.
- [12] Robinson MW, Corvo I, Jones PM, et al. Collagenolytic activities of the major secreted cathepsin L peptidases involved in the virulence of the helminth pathogen, *Fasciola hepatica* [J]. *PLoS NTD*, 2011, 5(4):e1012.
- [13] Yoonuan T, Nuamtanong S, Dekumyoy P, et al. Molecular and immunological characterization of cathepsin L-like cysteine protease of *Paragonimus pseudohectrotremus* [J]. *Parasitol Res*, 2016, 115(12):4457-4470.
- [14] Chung YB, Kita H, Shin MH. A 27 kDa cysteine protease secreted by newly excysted *Paragonimus westermani* metacercariae induces superoxide anion production and degranulation of human eosinophils [J]. *Korean J Parasitol*, 2008, 46(2):95-99.
- [15] Liang P, He L, Xu Y, et al. Identification, immunolocalization, and characterization analyses of an exopeptidase of papain superfamily, (cathepsin C) from *Clonorchis sinensis* [J]. *Parasitol Res*, 2014, 113(10):3621-3629.
- [16] Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures [J]. *Nucleic Acid Res*, 2017, 45(D1):D200-D203.
- [17] Noya O, De Noya BA, Ballen DE, et al. Immunogenicity of synthetic peptides from the Sm31 antigen (cathepsin B) of the *Schistosoma mansoni* adult worms [J]. *Parasite Immunol*, 2001, 23(11):567-573.
- [18] 徐丛荣. 日本血吸虫组织蛋白酶 B 基因的克隆、表达及初步鉴定 [D]. 福建: 福建医科大学, 2007.
- [19] Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases [J]. *Biochem J*, 1993, 290 (Pt 1):205-218.
- [20] Lewis SD, Johnson FA, Shafer JA. Effect of cysteine-25 on the ionization of histidine-159 in papain as determined by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Evidence for a his-159--Cys-25 ion pair and its possible role in catalysis [J]. *Biochemistry*, 1981, 20(1):48-51.
- [21] Corvo I, Cancel M, Cappetta M, et al. The major cathepsin L secreted by the invasive juvenile *Fasciola hepatica* prefers proline in the S2 subsite and can cleave collagen [J]. *Mol Biochem Parasit*, 2009, 167(1):41-47.
- [22] Olonen A, Kalkkinen N, Paulin L. A new type of cysteine proteinase inhibitor--the salarin gene from *Atlan*

# 实时荧光定量PCR检测急性髓系白血病 miR-125b 的表达及临床应用

王语欣<sup>1</sup> 杨冬琴<sup>1</sup> 周静东<sup>1</sup> 林江<sup>2</sup> 姚东明<sup>2</sup> 杨静<sup>1</sup> 钱震<sup>1</sup> 杨磊<sup>1</sup> 钱军<sup>1\*</sup>

**[摘要]** 目的 采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)法检测急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)中微小RNA-125b(microRNA-125b, miR-125b)转录本含量,初步评价其在AML临床诊断中的意义。方法 建立扩增miR-125b转录本的SYBR Green I染料法qPCR,对miR-125b转录本克隆质粒进行扩增,评价其在AML诊断中的特异性、重复性和灵敏度。并对69例AML患者的骨髓单个核细胞标本进行初步检测并评价其临床相关性。结果 该方法能定量检测骨髓标本中miR-125b的表达水平,熔解曲线呈单峰,在 $10^3\sim 10^8$  copies/ $\mu$ L范围内有良好的线性关系( $R^2=0.999$ )并且检测重复性良好。结果显示69例AML患者中miR-125b表达水平明显高于25例对照组,差异有显著统计学意义( $P=0.001$ )。在初发AML的不同亚型中,M3型的miR-125b表达水平高于其他亚型,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。miR-125b表达水平与非M3型AML患者的年龄、性别、外周血白细胞计数、血小板计数、血红蛋白含量、FAB分型、核型分组之间均无相关性( $P>0.05$ )。4例初诊AML患者在获得完全缓解后miR-125b表达水平较治疗前有所降低。结论 所建立的实时荧光定量PCR方法能敏感、特异地检测骨髓单个核细胞标本中miR-125b的表达水平,为进一步临床应用研究奠定了方法学基础。miR-125b异常高表达是AML中的一个常见分子事件,检测其表达可能有助于AML患者的辅助诊断和疾病状态监测。

**[关键词]** 实时荧光定量PCR; miR-125b; 急性髓系白血病

## Detection and clinical application of miR-125b in acute myeloid leukemia by real-time fluorescence quantitative PCR

WANG Yuxin<sup>1</sup>, YANG Dongqin<sup>1</sup>, ZHOU Jingdong<sup>1</sup>, LIN Jiang<sup>2</sup>, YAO Dongming<sup>2</sup>, YANG Jing<sup>1</sup>, QIAN Zhen<sup>1</sup>, YANG Lei<sup>1</sup>, QIAN Jun<sup>1\*</sup>

(1. Department of Hematology, Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu, China, 212002; 2. Laboratory Center, Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu, China, 212002)

**[ABSTRACT]** Objective To evaluate the method of real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) for detecting miR-125b transcript in patients with acute myeloid leukemia (AML) and further investigate the characteristics and clinical implication of miR-125b in AML. Methods The reaction system and reaction condition of qPCR with SYBR Green I was established to detect the expression of miR-125b to evaluate its specificity, repeatability and sensitivity in AML diagnosis. Afterwards, the samples of bone marrow mononuclear cells from 69 AML patients were evaluated. Results The method can detect the expression

基金项目:国家自然科学基金项目(81270630);江苏省六大人才峰会项目(2015-WSN-115);镇江市社会发展项目(SH2015058);江苏大学临床医学科学发展基金会项目(JLY20140018)

作者单位:1. 江苏大学附属人民医院血液科,江苏,镇江 212002

2. 江苏大学附属人民医院中心实验室,江苏,镇江 212002

\*通讯作者:钱军, E-mail: qianjun0007@hotmail.com

level of miR-125b in AML patients. The melting curve showed a single peak, the PCR products was specific, a good linear relationship in the range of  $10^8$  copies/ $\mu\text{L}$  to  $10^3$  copies/ $\mu\text{L}$  ( $R^2=0.999$ ), and the detection was repeatable. The expression level of miR-125b in 69 AML patients was significantly higher than those in 25 controls ( $P=0.001$ ). In different subtypes of AML, the expression level of miR-125b in M3 was higher than that in other subtypes, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). There was no correlation between the expression of miR-125b and the age, gender, peripheral blood leucocyte counts, platelet count, hemoglobin content, FAB classifications and karyotypes ( $P>0.05$ ) in non-M3 AML patients. The levels of miR-125b expression of 4 patients in the observation group decreased after complete remission. **Conclusions** The SYBR Green I qPCR for miR-125b was a sensitive, reliable quantitative assay, and it can be used in the diagnosis of AML and the disease therapy evaluation. The increased-expression of miR-125b may be a common molecular event in AML, and detecting its expression level could be used for auxiliary diagnosis and monitoring disease.

[KEY WORDS] Real-time quantitative PCR; miR-125b; Acute myeloid leukemia

急性髓系白血病 (acute myelocytic leukemia, AML) 是起源于髓系祖细胞的一类造血系统恶性克隆性疾病。其表现为白细胞在骨髓等造血组织中大量增殖,使正常造血功能混乱,导致凶险的感染、出血、器官浸润等,严重危害人类生命健康。微小 RNA (microRNA, miRNA) 广泛存在于从线虫到人类的多种真核生物中,近年来因发现其参与多种重要生物学过程如调控个体发育、细胞代谢、增殖、分化和凋亡等而备受关注<sup>[1-2]</sup>。miR-125b 是 miR-125 家族成员之一,大量研究表明 miR-125b 功能多样,在实体肿瘤中既可起抑癌基因的作用,也可以起促癌基因的作用<sup>[3-5]</sup>,miR-125b 在多种血液系统恶性肿瘤中表达异常,在白血病的发生和发展中起到十分重要的作用。比如 miR-125b 在伴有染色体异常的骨髓异常增生综合症、AML 和急性淋巴细胞性白血病中异常高表达<sup>[6-8]</sup>;miR-125b 可通过抑制多种靶基因加速诱导 AML 发生、发展等<sup>[9]</sup>。因此,研究结果提示 miR-125b 与白血病发病机制关系密切,具有非常重要的临床意义和应用前景。而寻找一种灵敏度高、操作简便且成本低廉的检测方法是目前 miR-125b 应用于临床研究亟需解决的问题。本研究采用 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 技术检测 miR-125b 在 AML 患者骨髓标本中的表达水平,初步探讨 miR-125b 在 AML 临床诊断和预后判断中的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

69 例 AML 患者均来自江苏大学附属人民医院接受住院治疗的初诊病例,所有患者诊断分型

按照法、美、英分型系统 (French-American-British classification systems, FAB) 和 WHO 2008 版标准<sup>[10-11]</sup>;其中 AML 正常核型 24 例、AML 伴 t(8;21)6 例、AML 伴 t(15;17)14 例、AML 伴 +8 染色体异常 3 例、AML 伴 -5/5q- 染色体异常 1 例、AML 伴复杂核型 9 例、其他核型类型 9 例、无资料 3 例。FAB 分型中 M1 型 5 例、M2 型 27 例、M3 型 14 例、M4 型 15 例、M5 型 8 例。对照组 25 例为非恶性血液病患者 (缺铁性贫血及免疫性血小板减少性紫癜)。本研究经医院伦理委员会批准,所有研究对象均已签署知情同意书。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 骨髓单个核细胞 (bone marrow mononuclear cells, BMMNCs) 的分离、RNA 提取和逆转录

全部患者均于初诊时抽取骨髓 10 mL,肝素抗凝,用 Ficoll 密度梯度离心法分离 BMMNCs,应用 mirVana miRNA 试剂盒提取总 RNA (Ambion, 美国),经紫外分光光度法测定计算提取的总 RNA 含量及浓度,-80℃ 保存备用。逆转录总体积共 20  $\mu\text{L}$ ,含蒸馏水 14  $\mu\text{L}$ 、缓冲液 4  $\mu\text{L}$ 、RNA 1  $\mu\text{L}$ 、逆转录酶 1  $\mu\text{L}$  (MiScript Reverse Transcription Kit, Qiagen 公司, catalog no. 218061)。反应条件为:① 37℃ 1 h,② 95℃ 5 min,随后 4℃ 保持。

#### 1.2.2 qPCR

引物设计采用 Primer Premier 5.0 软件,miR-125b 引物序列上游为 5'-CCCTGAGACCCTA-ACTTGTG-3',下游引物为 miRNA 通用下游引物。U6 作为内参管家基因,其上游引物为 5'-GT-GCTCCCTGCTTCGGCAGCACATATAC-3',下游引物为 5'-AAAAATATGGAACGCTTCACGAATTTG-3',引物由上海华大基因科技有限公司合

成。反应在 ABI 7500 扩增仪 (ABI, 美国) 上进行, 扩增条件为 94℃ 预变性 15 min, 94℃ 变性 15 s、55℃ 退火 30 s、70℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环, 溶解曲线程序为 95℃ 15 s、60℃ 60 s、95℃ 15 s、60℃ 15 s。选取 miR-125b 与 U6 表达  $\Delta CT$  值最小的 1 例对照标本作为对照。miR-125b 表达采用如下公式:  $N_{miR-125b} = (E_{miR-125b})^{\Delta CT_{miR-125b} (control - sample)} \div (E_{U6})^{\Delta CT_{U6} (control - sample)}$ , PCR 扩增效率  $E = 10^{(-1/slope)}$ ;  $\Delta CT$  指对照与标本之间 miR-125b 和 U6 循环阈值 (CT) 值的差异。

### 1.2.3 标准曲线的制作

重组 miR-125b 质粒作为阳性模板: 用凝胶回收试剂盒 (Axygen, 美国) 将扩增产物纯化回收, miR-125b 全序列与 pMD<sup>®</sup> 19-T 克隆载体 (Takara, 日本) 连接过夜重组载体, 随后重组质粒转化, 通过质粒 DNA 小量试剂盒 (Axygen, 美国) 提取质粒, 测序鉴定 (上海华大基因科技有限公司); 从  $10^8$  copies/ $\mu$ L 开始进行 10 倍稀释, 建立阳性模板梯度, 进行 qPCR 扩增检测。扩增后根据扩增曲线设定统一阈值, 然后根据其浓度及各浓度对应的 Ct 平均值绘制标准曲线。

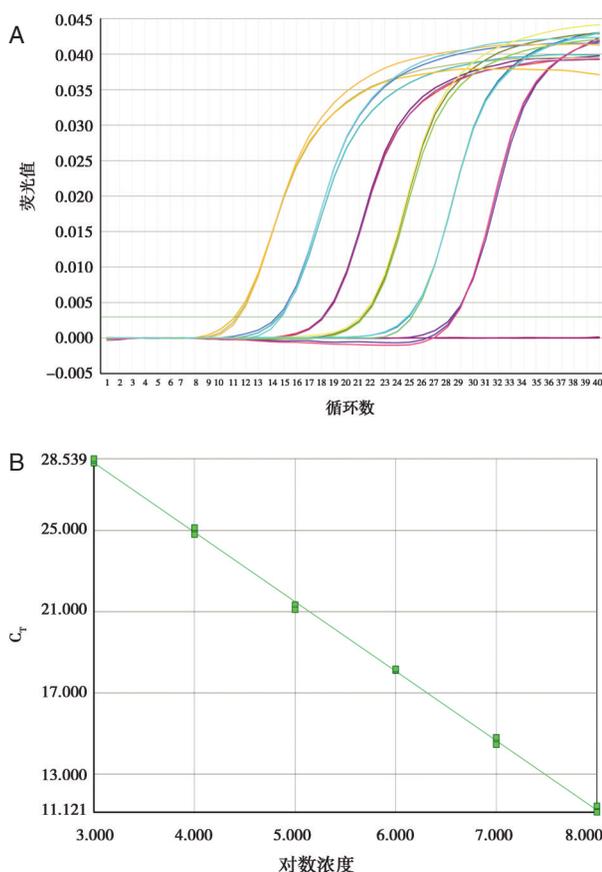
### 1.2.4 统计学分析

应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 分类变量之间的差异统计采用卡方检验或 Fisher 确切概率法; 连续性变量之间的差异统计使用 Kruskal-Wallis (多组间比较) 或 Mann-Whitney U 检验 (两组间比较)。miR-125b 表达在 AML 中的诊断价值采用接收者操作特征曲线 (receiver operating characteristic, ROC) 及曲线下面积 (area under the ROC curve, AUC) 进行评价; 所有分析均设定 P 值为双侧分布, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 qPCR 法的灵敏度、重复性、特异性和扩增效率

检测 miR-125b 阳性模板的扩增曲线 S 型 (图 1)。解离曲线分析显示扩增产物为单一溶解峰。在  $10^8 \sim 10^3$  copies/ $\mu$ L 的范围内 Ct 值和不同浓度 miR-125b 质粒呈良好线性关系, 标准曲线相关度 ( $R^2$ ) 为 0.999, 标准曲线的斜率 (slope) 为 -3.422。制作成标准曲, 重复性良好 (图 1)。同样, U6 质粒阳性模板标准曲线重复性良好,  $R^2 = 0.998$ , slope = -3.298。对不同浓度 miR-125b 质粒和 U6 质



A: miR-125b 重组质粒的荧光扩增结果; B: miR-125b 重组质粒的标准扩增曲线

图 1 不同浓度 miR-125b 重组质粒 qPCR 荧光扩增结果及其标准曲线

Figure 1 Fluorescence amplification and standard curve of recombinant miR-125b plasmid in different concentrations

粒分别扩增 6 次, 在  $10^8 \sim 10^3$  copies/ $\mu$ L 的范围内重复性良好 (表 1)。

表 1 不同浓度 miR-125b 和 U6 基因扩增 6 次的变异系数  
Table 1 Coefficient of variation of amplification of 6 times on different concentrations of miR-125b and U6 genes

基因		CV (%)					
		$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$
miR-125b	批内	1.16	1.23	2.85	2.30	0.89	2.13
	批间	2.45	2.72	3.27	2.27	1.62	3.38
U6	批内	0.98	2.14	1.09	0.68	0.45	0.30
	批间	1.20	3.01	1.55	0.85	1.32	0.79

### 2.2 qPCR 法检测 AML 患者中 miR-125b 的表达情况

25 例对照组和 69 例 AML 患者标本均可见扩

增曲线,但表达程度不同(图2)。25例对照的  $N_{miR-125b}$  为 0.03%~100% (中位 0.68%), AML 患者标本的  $N_{miR-125b}$  为 0.03%~6983.49% (中位 5.12%)。与对照组相比,AML 患者 miR-125b 表达水平较对照组显著上调( $P=0.001$ )。进一步分析 miR-125b 在 FAB 分型中不同亚型的表达水平差异,发现 miR-125b 在各个亚型中的表达水平均高于对照组,而其中 miR-125b 在 M3 型中表达水平最高且差异有统计学意义( $P<0.05$ )(图3)。

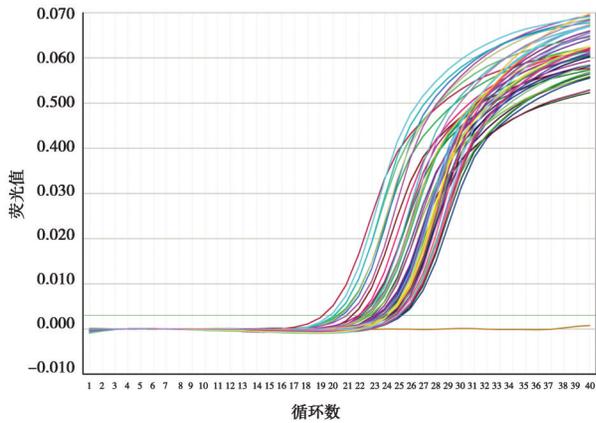


图2 部分 AML 患者及对照组骨髓标本中 miR-125b 荧光定量 PCR 扩增曲线

Figure 2 PCR amplification curve of miR-125b in part of bone marrow of AML patients and controls

### 2.3 miR-125b 表达的鉴别诊断意义

应用 ROC 曲线评估 miR-125b 可否作为 AML 患者辅助诊断的一个潜在标记。结果显示 miR-125b 表达水平可作为鉴别对照组与研究组的参考标志( $AUC=0.723$ , 95% 置信区间为 0.619~0.827,  $P=0.001$ )。在 miR-125b 表达水平为 4.7% 时,诊断 AML 的敏感性和特异性分别为 53% 和 92%(图4)。

### 2.4 miR-125b 的表达与临床参数相关性

本研究以 ROC 曲线 cut-off 值为界将总体 AML 患者分为 miR-125b 低表达组与高表达组。miR-125b 高表达组与低表达组的性别、年龄、血小板计数差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),而 miR-125b 高表达组的患者外周血白细胞计数、血红蛋白量与原始细胞计数低于 miR-125b 低表达组( $P<0.05$ )。miR-125b 高、低表达组间的 FAB 分型、不同核型以及染色体危险程度分型比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。其中,在 M1-M5 不同亚型中,

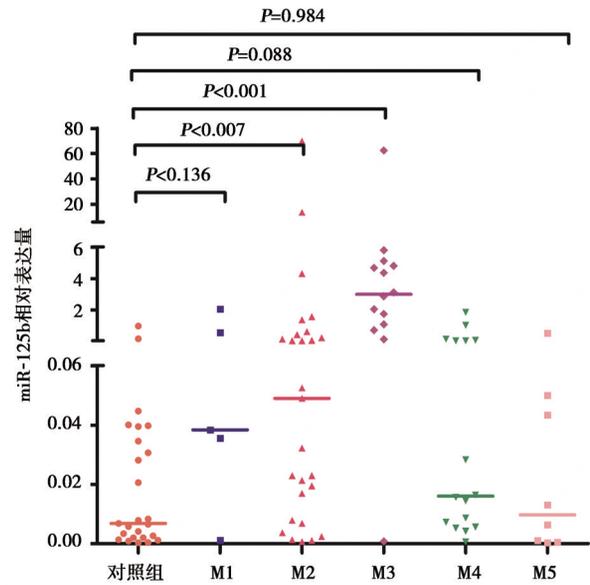


图3 对照组与 AML 患者 FAB 各亚型中 miR-125b 的相对表达含量

Figure 3 Relative expression levels of miR-125b in controls and AML according to FAB classification

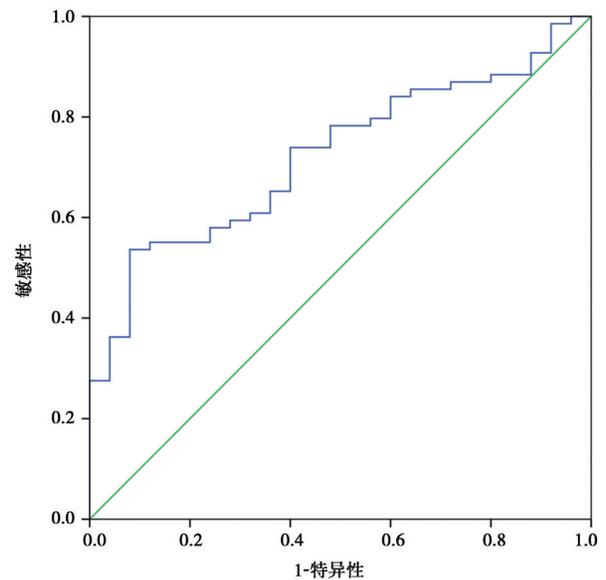


图4 miR-125b 表达水平辅助诊断 AML 的 ROC 曲线

Figure 4 ROC curve analysis through using miR-125b for discriminating AML patients

M3 亚型中 miR-125b 高表达的频率显著高于其他亚型分组[93% (13/14) 与 44% (24/55),  $P<0.001$ ]。在非 M3 型 AML 患者中,结果显示 miR-125b 基因的表达水平与年龄、性别、血红蛋白量、外周血白细胞计数、血小板计数、染色体分组等均无统计学

意义( $P>0.05$ )(表2)。

## 2.5 miR-125b 表达在 AML 随访中的意义

对 miR-125b 表达水平较高的 4 例初诊 AML

患者的骨髓标本进行治疗前后的检测,结果显示,患者病情获得完全缓解后的 miR-125b 表达水平较治疗前均明显下降(图 5)。

表 2 总 AML 患者与非 M3AML 患者中 miR-125b 表达水平与临床资料分析

Table 2 Comparison of clinical characteristics of miR-125b expression between whole AML and non-M3 patients

临床参数	总 AML 患者			非 M3 患者		
	低表达组 (n=32)	高表达组 (n=37)	<i>P</i>	低表达组 (n=27)	高表达组 (n=28)	<i>P</i>
性别(男/女)	19/13	22/15	1.000	16/11	19/9	0.582
年龄(岁)	54 (21~93)	54 (21~87)	0.714	55 (21~93)	62 (23~87)	0.389
中位白细胞计数( $\times 10^9/L$ ,范围)	23 (1.0~582.0)	6 (0.3~185.4)	0.005	19.4 (1.5~197.7)	10.6 (0.8~528.0)	0.447
中位血红蛋白含量(g/L,范围)	76 (34~138)	69 (32~131)	0.048	75 (53~133)	69 (32~138)	0.197
中位血小板计数( $\times 10^9/L$ ,范围)	40 (4~447)	37 (9~264)	0.399	41 (4~447)	40 (11~264)	0.452
中位骨髓原始细胞(%)	60.0(6.0~97.5)	34.5 (1.0~92.0)	0.023	60.0 (6.0~94.0)	60.0 (19.0~97.5)	0.437
FAB 分型			0.006			0.399
M1	3	2		1	4	
M2	13	14		12	15	
M3	1	13		-	-	
M4	9	6		9	6	
M5	6	2		5	3	
核型危险程度			0.039			0.285
良好	6	14		4	2	
中等	22	14		19	17	
不良	4	6		4	6	
无资料	0	3		0	3	
核型类型			0.001			0.196
正常	13	11		10	14	
t(8;21)	5	1		4	2	
t(16;16)	0	0		0	0	
t(9;22)	0	0		0	0	
t(15;17)	1	13		-	-	
11q23	0	0		0	0	
+8	2	1		2	1	
-5/5q-	0	1		0	1	
-7/7q-	0	0		0	0	
复杂	4	5		4	5	
其他	7	2		7	2	
无资料	0	3		0	3	
CR(+/-)	12/20	18/19	0.466	10/17	9/19	0.781

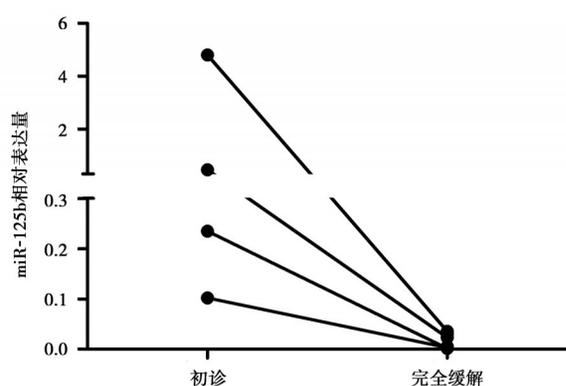


图5 4例AML患者治疗前后miR-125b表达的变化

Figure 5 The levels of miR-125b expression of 4 patients in the AML patients before and after complete remission

### 3 讨论

miRNAs转录后的调节功能影响着机体各种重要的生理和病理活动过程,其表达变化通常与各种疾病的发生发展密切相关。已有研究报道miR-125b参与白血病的发生发展,在伴有染色体异常和基因突变的AML中表达增高且其表达水平与疾病状态有关<sup>[12-13]</sup>。这些重要研究提示miR-125b可能有助于今后AML的诊断与病情监测。

要将miRNAs作为疾病诊断的生物学标志物,需要建立标准而规范的提取方法和检测方法。随着miRNAs在肿瘤发生发展中的重要性被逐渐重视,miRNAs的检测技术也取得了快速发展,主要包括有传统的表达文库克隆、Northern blot和逆转录聚合酶链反应(reverse transcription PCR, RT-PCR),还包括基因芯片技术、高通量测序等新型技术。其中RT-PCR以其特异性强、灵敏度高、快速便捷、价格低廉等优点,被认为是目前定量检测miRNAs的金标准<sup>[14-15]</sup>。本研究运用SYBR Green I染料标记技术建立的一种qPCR方法对骨髓标本中miR-125b进行定量检测。该方法无需设计探针,引物设计相对容易,操作简便,成本低廉,适用于推广应用<sup>[16]</sup>。本研究结果表明SYBR Green I qPCR检测miR-125b方法具有良好的特异性、重复性和灵敏性。本文采用相对定量法,可用于检测骨髓标本中miR-125b的表达水平。数据分析显示,69例AML患者中miR-125b表达水平高于对照组( $P=0.001$ )。同时在AML不同亚型中miR-125b表达水平存在差异,其

中M3型miR-125b表达水平远高于其他亚型,提示miR-125b异常高表达与急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)密切相关。这与Zhang<sup>[17-18]</sup>、Li等<sup>[19]</sup>的研究结果一致。有报道称,miR-125b可以干扰人类CD34<sup>+</sup>细胞分化,抑制白血病细胞NB4和HL60向末端(粒系和单核系)分化,揭示了miR-125b在APL抑制分化功能<sup>[6]</sup>。在非M3型AML患者中,miR-125b高低表达组与AML亚型、血液学参数和完全缓解率均无相关性( $P>0.05$ )。ROC曲线分析表明miR-125b表达对于AML具有中等诊断价值。

同时,我们对4例AML患者进行了监测,发现缓解后miR-125b表达水平较治疗前明显下降,提示miR-125b表达可能作为一个分子标志用于疾病状态的监测。但同时本研究病例数较少,ROC曲线分析显示敏感性和特异性不高,因此用miR-125b诊断、鉴别诊断及评价疾病的预后仍需进一步研究。

综上所述,本研究建立的SYBR Green I qPCR检测miR-125b是一种简便、可靠、准确、快速的高通量定量检测方法,易于临床实验室推广应用,有助于大样本的临床研究。miR-125b异常高表达是AML中的一个常见分子事件,检测其表达可能有助于AML患者的辅助诊断和疾病状态监测。

### 参考文献

- [1] Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ. The long and short of microRNA[J]. Cell, 2013, 153(3): 516-519.
- [2] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(4): 259-269.
- [3] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(16): 7065-7070.
- [4] Huang L, Luo J, Cai Q, et al. MicroRNA-125b suppresses the development of bladder cancer by targeting E2F3[J]. Int J Cancer, 2011, 128(8): 1758-1769.
- [5] Li Q, Han Y, Wang C, et al. MicroRNA-125b promotes tumor metastasis through targeting tumor protein 53-induced nuclear protein 1 in patients with non-small-cell lung cancer[J]. Cancer Cell Int, 2015, 15: 84.
- [6] Bousquet M, Quelen C, Rosati R, et al. Myeloid cell differentiation arrest by miR-125b-1 in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with the t(2; 11)(p21; q23) translocation[J]. J Exp Med, 2008, 205(11): 2499-2506.

- [7] Sonoki T, Iwanaga E, Mitsuya H, et al. Insertion of microRNA-125b-1, a human homologue of lin-4, into a rearranged immunoglobulin heavy chain gene locus in a patient with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia*, 2005, 19(11): 2009-2010.
- [8] Chapiro E, Russell LJ, Struski S, et al. A new recurrent translocation t(11; 14)(q24; q32) involving IGH@ and miR-125b-1 in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia [J]. *Leukemia*, 2010, 24(7): 1362-1364.
- [9] Enomoto Y, Kitaura J, Shimanuki M, et al. MicroRNA-125b-1 accelerates a C-terminal mutant of C/EBPalpha (C/EBPalpha-C(m))-induced myeloid leukemia[J]. *Int J Hematol*, 2012, 96(3): 334-341.
- [10] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group [J]. *Ann Intern Med*, 1985, 103(4): 620-625.
- [11] Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes [J]. *Blood*, 2009, 114(5): 937-951.
- [12] Shaham L, Binder V, Gefen N, et al. MiR-125 in normal and malignant hematopoiesis[J]. *Leukemia*, 2012, 26(9): 2011-2018.
- [13] 谢晶晶, 陈捷, 翁丹丹. 微小R-125b在初发急性髓系白血病中的表达情况及临床意义[J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(10): 1433-1435.
- [14] 王勤熙, 姚见儿, 顾国浩. microRNAs的定量分析技术及其应用[J]. *临床检验杂志*, 2012, 30(9): 650-652.
- [15] 邓开凤, 戴盛明. 实时荧光定量PCR检测血清/血浆microRNAs临床应用前的准备[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2015, 7(3): 211-216.
- [16] 叶燕, 申娟娟, 鞠少卿. 微小RNA检测方法的研究进展[J]. *中华检验医学杂志*, 2013, 36(8): 689-692.
- [17] Zhang H, Luo XQ, Feng DD, et al. Upregulation of microRNA-125b contributes to leukemogenesis and increases drug resistance in pediatric acute promyelocytic leukemia[J]. *Mol Cancer*, 2011, 10: 108.
- [18] Zhang H, Luo XQ, Zhang P, et al. MicroRNA patterns associated with clinical prognostic parameters and CNS relapse prediction in pediatric acute leukemia[J]. *PLoS One*, 2009, 4(11): e7826.
- [19] Li Z, Lu J, Sun M, et al. Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(40): 15535-15540.

(上接第327页)

- [4] Ching TY, Crowe K, Martin V, et al. Language development and everyday functioning of children with hearing loss assessed at 3 years of age [J]. *Int J Speech Lang Pathol*, 2010, 12: 124-131.
- [5] Mitchell RE, Karchmer MA. Chasing the mythical ten percent: parental hearing status of deaf and hard of hearing students in the United States [J]. *Sign Language Stud*, 2004, 4: 138-163.
- [6] Yin A, Liu C, Zhang Y, et al. The carrier rate and mutation spectrum of genes associated with hearing loss in South China hearing female population of child-bearing age [J]. *BMC Med Genet*, 2013, 14: 57.
- [7] Yin A, Liu C, Zhang Y, et al. Genetic counseling and prenatal diagnosis for hereditary hearing loss in high-risk families [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2014, 78(8): 1356-1359.
- [8] 刘畅, 丁红珂, 吴菁, 等. 遗传性耳聋的产前诊断与遗传咨询 [J]. *中国产前诊断杂志(电子版)*, 2015, 7(4): 35-39.
- [9] Hunter LL, Meinzen-Derr J, Wiley S, et al. Influence of the WIC program on loss to follow-up for newborn hearing screening [J]. *Pediatrics*, 2016, 138(1): e20154301.
- [10] Ravi R, Gunjawate DR, Yerraguntla K, et al. Follow-up in newborn hearing screening - a systematic review [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2016, 90: 29-36.
- [11] Wu J, Hao Z, Fu D, et al. Mitochondrial mutations associated with aminoglycoside ototoxicity and hearing loss susceptibility identified by meta-analysis [J]. *J Med Genet*, 2015, 52(2): 95-103.
- [12] 袁永一, 戴朴. 遗传性聋的精准医疗 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2016, 30(1): 1-5.
- [13] Dai P, Yu F, Han B, et al. GJB2 mutation spectrum in 2,063 Chinese patients with nonsyndromic hearing impairment [J]. *J Transl Med*, 2009, 7: 26.

· 论 著 ·

## 乙型肝炎病毒的实时荧光定量逆转录PCR检测方法的建立

孙莉<sup>1</sup> 陈路<sup>2</sup> 王华贵<sup>3</sup> 赵相胜<sup>2</sup> 胡小许<sup>2</sup> 迟洪霞<sup>4</sup> 祁荣<sup>4</sup> 吴伟立<sup>3\*</sup>

**[摘要]** 目的 建立一种可以准确、快速、特异检测乙型肝炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)的一步法实时荧光定量逆转录PCR(reverse transcription-quantitative real time PCR, RT-qPCR)体系。方法 参照NCBI数据库的乙型肝炎病毒全基因组序列,经过一致性比对分析,在乙型肝炎病毒保守的3'非翻译区(3'untranslated region, 3'UTR)区段,设计相应的特异性引物以及Taqman-MGB探针,优化检测体系及反应条件,建立一步法RT-qPCR方法。利用登革热、森林脑炎病毒、肠道病毒71型(EV71)、柯萨奇病毒A16型(CoxA16)、狂犬病毒培养物和临床诊断为登革热及手足口病人的血清样本检测其交叉反应。选择15例疑似脑炎症状的病人血清样本,以国家食品药品监督管理总局(CFDA)批准的乙型肝炎病毒检测试剂盒作对照试剂盒,检测其临床适用性。结果 所建立的乙型肝炎病毒一步法RT-qPCR检测方法重复性试验Ct值的变异系数CV在0.46%~0.53%之间,最低可检出5 copies/反应样本。检测体系与登革热、森林脑炎病毒等黄病毒及EV71、CoxA16、狂犬病毒培养物等未发现交叉反应;64份临床诊断为登革热和手足口病人的血清样本检测也均为阴性。15份疑似乙型肝炎感染的病人血清样本的检测结果与国家食品药品监督管理总局批准的乙型肝炎病毒检测试剂盒检测结果一致,但本方法操作步骤更少,检测时间更短。结论 本实验建立的乙型肝炎病毒一步法实时荧光RT-qPCR检测方法具有较高灵敏度、特异性,可用于乙型肝炎病毒的检测。

**[关键词]** 乙型肝炎病毒; Taqman-MGB; 流行性乙型肝炎; RT-qPCR

### Development of one-step RT-qPCR for detection of Japanese encephalitis virus infection

SUN Li<sup>1</sup>, CHEN Lu<sup>2</sup>, WANG Huagui<sup>3</sup>, ZHAO Xiangsheng<sup>2</sup>, HU Xiaoxu<sup>2</sup>, CHI Hongxia<sup>4</sup>, QI Rong<sup>4</sup>, WU Weili<sup>3\*</sup>  
(1. Clinical Laboratory of Huabei Oil Field Hospital, Renqiu, Hebei, China, 062552; 2. Beijing Macro & Micro-test Bio - Tech Co., Ltd. Beijing, China, 101300; 3. Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China, 100101; 4. Gastroenterology Department of Huabei Oil Field Hospital, Renqiu, Hebei, China, 062552)

**[ABSTRACT]** Objective To establish a sensitive and specific one - step reverse transcription - quantitative real time PCR (RT - qPCR) method for detection of Japanese encephalitis virus (JEV) infection. Methods Based on the whole genome sequence of the encephalitis virus in the NCBI database, the corresponding specific primers and Taqman - MGB Probe were designed in the 3' untranslated region (UTR) of the Japanese encephalitis virus. The detection system and reaction conditions were optimized. The cross - reactivity was measured by using dengue fever virus, forest encephalitis virus, enterovirus 71 (EV71),

作者单位:1. 华北石油管理局总医院检验科,河北,任丘 062552  
2. 北京宏微特斯生物科技有限公司,北京 101300  
3. 中国科学院北京基因组研究所,北京 100101  
4. 华北石油管理局总医院消化科,河北,任丘 062552

\*通讯作者:吴伟立, E-mail: wuwl@big.ac.cn

注:孙莉和陈路为并列第一作者

coxsackie virus A16 (CoxA16), rabies virus cultures and clinical sera samples of clinically diagnosed dengue fever and hand-foot-mouth patients. 15 patients with suspected encephalitis were enrolled in this study. The Japanese encephalitis virus test kit was registered by the China Food and Drug Administration (CFDA) used as a control kit to detect its clinical applicability. **Results** The repeatability test revealed that coefficient of variation (CV) of Ct value is 0.46%~0.53%. The sensitivity attends to 5 copies/reaction. No cross-reactions were found to dengue, forst encephalitis virus, EV71, CoxA16, rabies virus. The test result of 37 dengue fever and 27 hand-foot-mouth patients were also negative. The results of present developed method to suspended patients are consistent with the CFDA approved kit while with less manual handling steps and shorted operating time. **Conclusion** The developed one-step RT-qPCR method for detection of encephalitis virus infection with high sensitivity and specificity is suitable to the clinical use.

[KEY WORDS] Japanese encephalitis virus; Taqman-MGB; Epidemic encephalitis type B; RT-qPCR

流行性乙型脑炎又称为日本乙型脑炎,简称乙脑,是由日本乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)引起的一种中枢神经系统感染的急性传染病,也是一种人兽共患的自然疫源性疾病,临床上以高热、意识障碍、抽搐、呼吸衰竭及脑膜刺激为特征。乙脑病毒为单股正链RNA黄病毒(Flavivirus)。病毒RNA只含一个开放阅读框(open reading frame, ORF),编码3个结构蛋白(C蛋白、PrM/M蛋白、E蛋白)和7个非结构蛋白(NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b、NS5)。根据E蛋白基因序列的同源性,可将JEV分为进化关系上存在明显差异的5个基因型(I、II、III、IV和V),各基因型的分布有一定的区域性<sup>[1,2]</sup>。乙脑是亚洲最常见的一种病毒性脑炎,每年至少50 000例临床病例,其中多数为10岁以下儿童,导致约10 000人死亡,另有约15 000例留有长期的神经-精神性后遗症<sup>[3]</sup>。我国是乙脑流行的高发地区,近年来虽经对儿童实施计划免疫接种,使发病率明显下降,但目前发病人数仍占世界乙脑病例的80%以上。乙脑临床上与近年高发的肠道病毒感染引起的脑炎也难以区分<sup>[4]</sup>。因此构建快速、灵敏、准确的JEV检测方法对控制JEV引起的急性脑炎具有重要意义。目前比较常见的乙脑诊断方法有病毒分离、血清学诊断和常规逆转录聚合酶链反应(reverse transcription PCR, RT-PCR)检测。由于JEV病毒载量低,利用细胞和小鼠来分离培养JEV具有分离困难且工作量大,检测时间长的缺点,临床应用有较大局限性<sup>[5,6]</sup>。血清学诊断则存在灵敏度较低的缺点。实时荧光定量逆转录PCR(reverse transcription-quantitative real time PCR, RT-qPCR)与上述方法相比具有特异性高、本底低、结果易分析等优点,已经成功应用于病原体检测、等

位基因检测、信号传导等研究中<sup>[7]</sup>。本研究以乙脑病毒基因组保守的3'非翻译区(3'untranslated region, 3'UTR)区设计引物和Taqman-MGB探针,建立了准确、特异的JEV一步法实时检测体系。

## 1 材料及方法

### 1.1 毒株与样本

登革病毒1型、2型、3型、4型,森林脑炎病毒,狂犬病毒,肠道病毒71型(enterovirus 71, EV71),柯萨奇病毒A16型(coxsackie virus A16, CoxA16)分离培养株均来自于中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所。

37例临床诊断为登革热血清样本由广州疾病预防控制中心提供。27份临床诊断为手足口病的病人血清由华北石油管理局总医院收集。15份发热伴有脑炎症状的病人急性期(发病1~5天)和恢复期血清由华北石油管理局总医院收集。

### 1.2 主要试剂和仪器

病毒核酸提取试剂盒(QIAamp<sup>®</sup>Viral RNA Mini Kit)购自德国QIAGEN公司;DH5 $\alpha$ 感受态细胞、QuantOne Step qRT-PCR Kit (Probe) (FP304)购自天根生化科技(北京)有限公司;PAR-1重组表达载体由本实验室自主研发保存。乙型脑炎病毒抗体IgG检测试剂盒(酶联免疫吸附法)、流行性乙型脑炎病毒核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)来自于北京华大吉比爱生物技术有限公司。

StepOnePlus<sup>™</sup>PCR荧光仪(ABI,美国),Nano-Drop 2000[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],超声波细胞粉碎机(JY92-II,宁波新芝生物科技股份

有限公司)。

### 1.3 引物探针设计与合成

本研究所用的序列信息来自于 NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 下载所有上传的乙脑序列信息, 输入自主研发的一致性分析软件分析得到相对保守的 UTR 区域序列, 利用 ABI 软件包 Primer Express3.0 设计的特异引物及 Taqman-MGB 探针均由上海 invitrogen 公司合成。其序列及标记信息分别为: RT-F (5' CCAGTCTATTCCCAGGTGTCAA3'); RT-R (5' GCTGTAGAGGAGGTGGAAGGAC3'); RT-P (5' FAM-TGCGGGGTCTCCT-MGB 3')。

### 1.4 参考品的构建与定量

乙脑病毒定量参考品为体外重组构建的乙脑病毒 UTR 基因假病毒, 具体步骤如下: 体外合成乙脑病毒 UTR 基因的保守区域, 将该片段与表达载体 pAR-1 连接后转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 筛选阳性克隆, 经测序验证序列为乙脑病毒 UTR 基因序列。然后将阳性菌株 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h 左右加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 进行诱导 4 h 以表达假病毒 RNA, 3 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 采用超声裂解液重悬, 超声破碎(40%振幅, 350 W, 停 5 s, 超声 5 s, 30 个循环), 8 000 r/min 冷冻离心 10 min, 收集上清并加入 DNase 消化, 即为制备的假病毒溶液。

利用 Thermo scientific Nano Drop 2000 分光光度计, 测定其 OD 值, 通过公式  $(6.02 \times 10^{23} \text{ 拷贝数/摩尔}) \times (\text{浓度 g}/\mu\text{L}) / (\text{MW g}/\text{mol}) = \text{copies}/\mu\text{L}$  换算为拷贝数。

### 1.5 病毒核酸提取

采用 QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit 试剂盒, 按照说明书进行提取 RNA, 提取的总 RNA 于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

### 1.6 一步法 RT-qPCR

一步法反应体系严格按照 QuantOne Step qRT-PCR Kit (Probe) 使用说明书进行配制, 30  $\mu\text{L}$  反应体系包括 2 $\times$ QuantOne Step Probe RT-qPCR Master Mix 15  $\mu\text{L}$ , HotMaster Taq Polymerase (2.5 U/ $\mu\text{L}$ ) 1.2  $\mu\text{L}$ , Quant Rtase 0.7  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物 0.75  $\mu\text{L}$ , 探针为 0.5  $\mu\text{L}$ , 模板 4  $\mu\text{L}$ , 去离子水补充到 30  $\mu\text{L}$  体系。对 RT-qPCR 反应体系中引物和探针浓度进行筛选, 以获得最佳扩增效率和最好的荧光强度。默认设置 40 个循环, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,

58 $^{\circ}$ C 扩增 45 s。检测仪器为 ABI StepOnePlus<sup>™</sup> PCR 荧光仪。

### 1.7 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测

15 份发热伴有脑炎症状的血样采用 ELISA 进行抗体 IgG 检测, 乙型脑炎病毒抗体 IgG 检测试剂盒 (酶联免疫吸附法) 来自于北京华大吉比爱生物技术有限公司。双份阳性的样本进行倍比稀释测定滴度变化。

### 1.8 重复性试验

同一 PCR 板上以 10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup> copies/ $\mu\text{L}$  的乙脑病毒核酸为模板, 各重复测定 6 孔, 计算检测乙脑病毒 Ct 的平均值 ( $\bar{X}$ ) 公式 (1) 和标准差 (SD) 公式 (2), 按如下公式 (3) 计算变异系数 (CV)。

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (1)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n-1}} \quad (2)$$

$$CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\% \quad (3)$$

### 1.9 灵敏度检测

将提取好的标准品 RNA 从 10<sup>5</sup> copies/ $\mu\text{L}$  开始进行 10 倍系列稀释到 10<sup>1</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>1</sup> 4 个梯度, 并进一步对倍稀释 4 个梯度 (5、2.5、1.25、0.625) 后进行荧光检测。

### 1.10 特异性检测

登革病毒 1 型、2 型、3 型、4 型, 森林脑炎病毒, EV71, CoxA16, 狂犬病毒培养物提取 RNA 后, 经荧光 PCR 检测并统一稀释至 1 $\times$ 10<sup>7</sup> copies/ $\mu\text{L}$ , 检测是否有交叉反应。37 份临床诊断为登革热病人的血清样本和 27 份临床诊断为手足口病人的血清样本分别经核酸提取后, 检测是否存在交叉反应。

对来自于华北石油管理局总医院 15 例发热病人血清样本分别应用北京华大吉比爱生物技术有限公司流行性乙型脑炎病毒核酸检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)、乙型脑炎病毒抗体 IgG 检测试剂盒 (酶联免疫吸附法) 和本检测体系同时进行检测。对来自于广州疾病预防控制中心 37 例临床诊断为登革热血清样本和 27 份临床诊断为手足口病的病人血清采用本检测体系进行检测。

## 2 结果

### 2.1 一步法荧光检测体系的建立

在 30 μL 的反应体系中,当上下游引物工作浓度为 10 μmol/L 加入 0.75 μL, Taqman-MGB 探针工作浓度为 10 μmol/L 加入 0.5 μL, 退火温度为 58℃, 其余反应成分及程序均按照试剂说明书配置

时,能获得最佳荧光吸收信号。建立最佳的检测体系。

### 2.2 重复性检测结果及分析

将提取定量后的假病毒 RNA 稀释为 10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup> copies/μL 重复测定 6 次,进行荧光检测。通过计算得到:3 个稀释度样品 6 个重复反应获得的 Ct 值的变异系数 CV 在 0.46%~0.53% 之间,数据详见表 1。

表 1 一步法 RT-qPCR 重复性测试结果

Table 1 The reproducibility test results of one-step RT-qPCR

浓度梯度	重复性测试 CT 值						CV(%)
	第 1 孔	第 2 孔	第 3 孔	第 4 孔	第 5 孔	第 6 孔	
10 <sup>3</sup>	29.58	29.24	29.36	29.18	29.52	29.24	0.45
10 <sup>4</sup>	25.55	25.79	25.39	25.25	25.57	25.46	0.53
10 <sup>5</sup>	22.58	22.44	22.35	22.59	22.22	22.46	0.46

### 2.3 灵敏度验证及最低检测限的分析

将提取定量后的假病毒 RNA 按 10 倍梯度从 10<sup>5</sup> 稀释至 10<sup>1</sup> copies/μL, 并进一步对比稀释至 0.625 copies/μL, 经检测发现:从 10<sup>5</sup> copies/μL 开始标准品稀释到 10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>1</sup> 5 个梯度,进行荧光检测,能得到线性关系良好的扩增曲线,见图 1。进一步对比稀释,在浓度为 5 copies/μL, 重复 20 次,18 次可以获得荧光,见图 2,表明可以达到 5 copies/μL 的最低检测限。

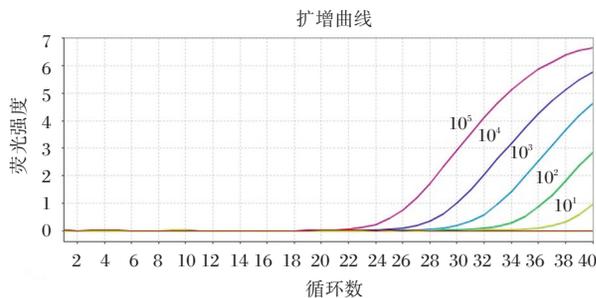


图 1 梯度稀释的 RNA 标准品扩增曲线

Figure 1 Serial dilutions RNA standard amplification curve

### 2.4 一步法 RT-qPCR 的特异性结果及分析

利用该检测体系对登革病毒 1 型、2 型、3 型、4 型,狂犬病毒,森林脑炎病毒, EV71, CoxA16 病毒培养物进行 3 次重复检测,所有扩增结果显示均为阴性,结果见图 3。

来自于广州疾病预防控制中心 37 例临床诊断为登革热血清样本和河北石油管理局总医院收集

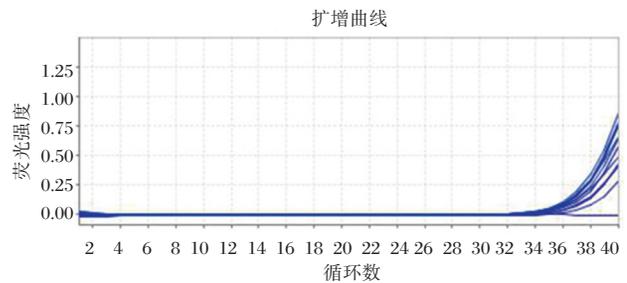


图 2 5 copies/反应时重复检测 20 次扩增曲线

Figure 2 Amplification curve of 5 copies / reaction for 20 repeats

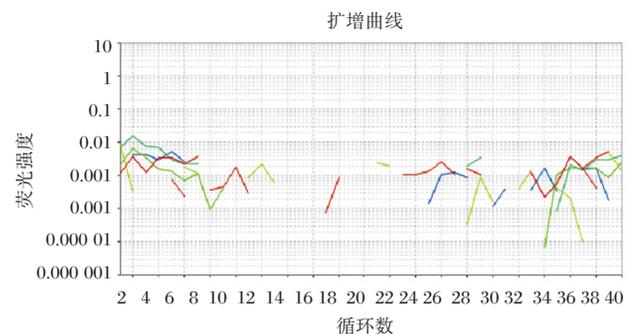


图 3 其它能够引起脑炎的相关病毒分离培养物扩增曲线

Figure 3 Amplification curve of other related virus isolation Cultures that can cause encephalitis

的 27 份临床诊断为手足口病的病人血清样本,本检测体系检测结果均为阴性。

对来自于华北石油管理局总医院 15 例发热病人血清样本分别应用 2 种荧光定量逆转录 PCR 和

ELISA 方法同时进行检测,检测结果见表2。13例经2种实时荧光PCR检测均为乙脑病毒阳性,其对应的双份血清ELISA抗体检测结果显示9例存在阳转和4例存在4倍升高。2例样本实时荧光PCR检测为阴性,其中一例样本双份血清检测结果均为阴性,一例样本双份血清结果均为阳性,但滴度无显著改变。

表2 15例发热病人3种方法检测结果  
Table 2 The detection results of 15 fever patients by 3 methods

检测方法	检测结果	
	阳性	阴性
吉比爱PCR-荧光探针法	13	2
吉比爱酶联免疫吸附法	14	1
本检测体系	13	2

### 3 讨论

JEV是一种危害严重的人畜共患的虫媒病毒,主要由蚊子和较小的蝉传播,人类通常是终末宿主,因此对人类的健康及养殖业有较大的威胁。国内尽管通过大规模使用疫苗使发病率大幅度下降,但近年来乙脑疫情出现了重新上升的趋势,部分地区时有暴发或流行且JEV仍是引起病毒性脑炎的主要病原<sup>[8]</sup>。病毒性脑炎的早期诊断能有效减轻免疫引起的脑组织损伤,降低后遗症发生率及死亡率,也是治疗成功的关键<sup>[9]</sup>。传统的实验室检测主要采用病毒分离培养、酶联免疫吸附试验、脑电图和影像学检查的方法诊断病毒性脑炎。JEV分离培养是检测的“金标准”,但由于其低通量和低灵敏性的缺点,不适合大规模临床应用。ELISA的方法虽然也可对JEV进行检测,但是会与其他黄病毒属病毒(如登革病毒)出现交叉反应。同时上述检测方法整个过程操作复杂,耗时长,无法起到对病毒快速诊断的作用。与传统检测技术相比,核酸检测方法由于灵敏度和特异性方面的优势,已成为实验和临床诊断常用的检测手段<sup>[10]</sup>。其中,实时荧光定量PCR技术既保持了传统PCR技术灵敏度高等特点,又克服了传统PCR技术中存在的假阳性和不能准确定量的缺点,并且具有实验重复性好、省时省力、快速、特异性好等特点。实时荧光定量PCR技术已经成熟应用于多种细菌及病毒性疾病的临床诊

断<sup>[11-12]</sup>。然而针对JEV的实时荧光定量PCR检测方法相对较少。

本研究建立了检测乙脑病毒的一步法RT-qPCR检测体系,相比于传统的乙脑病毒实验室检测方法,该检测方法在灵敏度、特异性以及操作方便性、时效性等方面具有极大优势。其重复性试验Ct值的变异系数CV在0.46%~0.53%之间,低于研究报道的CV<sup>[13]</sup>。本研究建立的JEV检测体系灵敏度更高,最低可以检测到5 copies/反应的假病毒稀释液,低于目前已报道的荧光定量PCR最低检测限(10 copies/反应)<sup>[14]</sup>。通过检测临床常见的同种属相近的及引起症状相似的其他病原体,相互之间不存在交叉反应。表明本研究建立的检测体系能够特异的对乙脑病毒进行检测。应用本检测体系与北京华大吉比爱生物技术有限公司研制的流行性乙型脑炎病毒核酸测试剂盒(PCR-荧光探针法)、乙型脑炎病毒抗体IgG检测试剂盒(酶联免疫吸附法)分别对15份发热病人样本进行检测,对比本检测体系与同类试剂盒的一致性、灵敏性、实用性等。发现本检测体系与吉比爱PCR-荧光探针法检测试剂盒结果一致,检出的13例阳性样本也与ELISA检测结果吻合。其中,ELISA检测方法较2种PCR-荧光探针方法多检出一例阳性,后续临床验证排除乙脑病毒感染。表明ELISA法会出现假阳性结果。而本研究建立的乙脑病毒一步法RT-qPCR检测方法可以提高对乙脑病毒的检出率和准确率,相比于ELISA检测方法具有明显优势<sup>[15-16]</sup>。

本研究建立的一步法RT-qPCR检测体系结合应用原有RT-PCR和实时荧光PCR的优势,使逆转录和荧光定量PCR扩增过程同步进行。相对于传统的逆转录和PCR分开进行,既减少了cDNA二聚体的形成,提高扩增反应效率;同时减少操作步骤,缩短检测时间。本检测体系在85 min内可完成对乙脑病毒的快速检测,比吉比爱的PCR-荧光探针法检测试剂盒检测时间缩短了近30 min。而乙脑病毒感染的早期诊断可以有效减轻免疫引起的脑组织损伤,降低乙脑病毒感染后遗症的发生率及死亡率。

综上所述,本研究建立的乙脑病毒一步法RT-qPCR检测体系具有较强的特异性和较高的敏感性,并进一步简化了操作步骤,缩短了检测时间,能够实现乙脑病毒的早期快速检测。可为乙脑病毒的临床诊断和疫情暴发时的实验室应急诊断提供快速有效的实验室筛查手段。

## 参考文献

- [1] Arroyo J, Guirakhoo F, Fenner S, et al. Molecular basis for attenuation of neurovirulence of a yellow fever Virus/Japanese encephalitis virus chimera vaccine (ChimeriVax-JE) [J]. *J Virol*, 2001, 75 (2): 934-942.
- [2] 张慧艳, 高晓艳, 崔世恒, 等. 我国新出现的基因V型乙脑病毒全基因组分子特征[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2015, 35(2):81-86.
- [3] 方挺, 郭延波, 潘兴强, 等. 2005-2010年浙江省宁波市流行性乙型脑炎流行病学分析[J]. *疾病监测*, 2012, 27(3):192-194.
- [4] 蔡宝祥. 近年来我国流行性乙型脑炎研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2009, 41(8):1-4.
- [5] 高正琴, 岳秉飞, 贺争鸣. 乙脑病毒 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(10):1928-1931.
- [6] 孙圣福. 日本乙型脑炎实验室诊断方法的研究和应用[D]. 武汉:华中农业大学, 2004.
- [7] Kutuyavın IV, Afonina IA, Mills A, et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(2):655-661.
- [8] 赫晓霞, 王环宇, 付士红, 等. 2010年福建省流行性乙型脑炎病毒监测[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2012, 26(2): 81-83.
- [9] 腾伟禹. 单纯疱疹病毒性脑炎的治疗[J]. *实用药物与临床*, 2006, 9(5):272-274.
- [10] Mahony JB. Detection of respiratory viruses by molecular methods [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2008, 21 (4): 716-747.
- [11] 管义祥, 沈剑虹, 居兴云, 等. 基因学快速检测脑脊液常见细菌感染的方法[J]. *中华神经科杂志*, 2012, 45(8):586-589.
- [12] 钟菲菲, 戴赛飞, 刘子音, 等. 实时荧光PCR检测技术在冷冻禽畜肉沙门氏菌快速分型检验中的应用[J]. *食品安全导刊*, 2017, 03X(9):87-88.
- [13] 刘卫滨, 付士红, 宋宏, 等. 乙型脑炎病毒 TaqMan PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2005, 25(8):656-662.
- [14] 霍红. 流行性乙型脑炎病毒 TaqMan 荧光定量PCR检测方法的建立及应用[D]. 北京:中国农业科学院, 2014:43.
- [15] Ravi V, Desai A, Balaji M, et al. Development and evaluation of a rapid IgM capture ELISA (JEV-Chex) for the diagnosis of Japanese encephalitis [J]. *J Clin Virol*. 2006, 35(4):429-434.
- [16] 高晓艳, 付士红, 王环宇, 等. 流行性乙型脑炎病毒 IgG 抗体捕获酶联免疫吸附试验检测方法的建立[J]. *疾病监测*, 2010, 25(2):107-110.

(上接第 333 页)

- tic salmon (*Salmo salar* L.) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) [J]. *Biochimie*, 2003, 85(7):677-681.
- [23] Groves MR, Taylor MA, Scott M, et al. The prosequence of procaricain forms an alpha-helical domain that prevents access to the substrate-binding cleft [J]. *Structure*, 1996, 4(10):1193-1203.
- [24] Lecaille F, Authie E, Moreau T, et al. Subsite specificity of trypanosomal cathepsin L-like cysteine proteases. Probing the S2 pocket with phenylalanine-derived amino acids [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268(9):2733-2741.
- [25] Bromme D, Bonneau PR, Lachance P, et al. Engineering the S2 subsite specificity of human cathepsin S to a cathepsin L- and cathepsin B-like specificity [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(48):30238-30242.
- [26] Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, et al. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers [J]. *BBA-Biomem*, 2012, 1824(1): 68-88.
- [27] Stack CM, Caffrey CR, Donnelly SM, et al. Structural and functional relationships in the virulence-associated cathepsin L proteases of the parasitic liver fluke, *Fasciola hepatica* [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(15): 9896-9908.
- [28] 刘莉娜. 曼氏迭宫绦虫半胱氨酸蛋白酶的表达与鉴定及其用于裂头蚴病血清学诊断的研究[D]. 河南: 郑州大学, 2015.

## 硫酸去氢表雄酮定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)的研制及性能评价

苏立\* 贾晨路

**[摘要]** 目的 研制硫酸去氢表雄酮定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法),并对其试剂盒性能进行评价。方法 利用竞争抑制法,对原料进行筛选,建立硫酸去氢表雄酮定量测定试剂盒。并分别对本试剂盒的准确性、最低检测限、线性、重复性、特异性、参考范围及样本对比方面进行评价。结果 经过筛选,选用反应模式:磁微粒包被羊抗鼠 IgG-鼠抗硫酸去氢表雄酮单克隆抗体-吖啶酯标记 DHEAS-BSA;对此方法建立的试剂盒进行方法学评价,最低检测限可达 1.84  $\mu\text{g/dL}$ ,线性在 0~1 500  $\mu\text{g/dL}$  之间,相关系数  $r=0.999\ 8$ ,准确度的回收率为 105.38%,重复性均小于 8%;建立了健康人参考范围(女性: 47.9~407.5  $\mu\text{g/dL}$ ,男性 97.1~522.5  $\mu\text{g/dL}$ ),与西门子 ADVIA Centaur 测定结果显著相关,线性方程为  $y=1.078\ 13+0.992\ 16x$ ,相关系数  $r=0.994\ 7$ ,2种试剂盒的测定结果具有较高的一致性。结论 本研究建立的硫酸去氢表雄酮定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)各项性能均达到了临床检验的要求,为国产化 66 硫酸去氢表雄酮定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)的研发奠定了基础,有望用于临床血清硫酸去氢表雄酮的检测。

**[关键词]** 硫酸去氢表雄酮;化学发光免疫分析法;定量测定试剂盒

### Development and evaluation of a quantitative assay for dehydroepiandrosterone sulfate: chemiluminescence immunoassay

SU Li\*, JIA Chenlu

(The Neonatal Disease Screening Center, The Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450052)

**[ABSTRACT]** Objective To develop and evaluate the performance of the Dehydroepiandrosterone sulfate quantitative determination kit: chemiluminescent immunoassay. Methods The method of competitive inhibition was used to screen the raw materials and to establish the Dehydroepiandrosterone sulfate quantitative determination kit with chemiluminescent immunoassay. The performance of accuracy, limit of detection, linearity, repeatability, analytical specificity, reference interval and samples comparison were determined. Results After screening, the reaction mode of magnetic particle coated goat anti mouse IgG-mouse anti DHEAS antibody-acridine ester labeled DHEAS-BSA was selected. The limit of detection was less to 1.84  $\mu\text{g/dL}$ . This assay was designed to be linear across the measurement range of 0~1 500  $\mu\text{g/dL}$  with value  $r=0.999\ 8$ . The recovery rate was 105.38%. The repeatability was less than 8%. The DHEAS reference interval of healthy population was established (female: 47.9~407.5  $\mu\text{g/dL}$ , male: 97.1~522.5  $\mu\text{g/dL}$ ). The determination results of serum samples were significantly correlated with results tested by SIEMENS ADVIA Centaur assay with the linear equation was  $y=1.078\ 3+0.992\ 16x$  and the value  $r=0.994\ 7$ . The results of these 2 assays showed high consistency. Conclusion All the performance characteristics of this kit reached the requirements for clinical detection and

作者单位:郑州大学第三附属医院新生儿疾病筛查中心,河南,郑州 450052

\*通讯作者:苏立, E-mail:29715562@qq.com

laid a foundation for establishing the domestic quantitative assay of dehydroepiandrosterone sulfate, which is able to apply to the clinical determination of serum DHEA-S.

[KEY WORDS] Dehydroepiandrosteronesulfate; Chemiluminescence immunoassay; Quantitative determination kit

去氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA), 3 $\beta$ -羟基-5-雄烯-17-酮, 亦称脱氢异雄酮。血清中脱氢表雄酮大部分以硫酸结合物(DHEA-S)的形式存在。DHEA-S主要来源于肾上腺皮质网状带, 具有微弱的雄激素活性, 是人体血循环中最为丰富的甾体物质<sup>[1]</sup>。

女性的DHEA-S几乎全部来源于肾上腺皮质, 是女性绝经前75%和绝经后100%的雄激素来源。在21~45岁月经正常的育龄女性中, 血清DHEA-S与年龄呈负相关, 可作为评估卵巢储备功能的一项参考指标, 为临床诊治提供参考<sup>[2-3]</sup>。而多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)患者血清中的DHEA-S与性激素结合球蛋白(sex hormone binding globulin, SHBG)之间存在负相关关系, 联合检查对PCOS的诊断具有一定的参考价值<sup>[4]</sup>。

本研究的目的在于建立一种灵敏度、线性范围、精密度等方面能够与进口厂家试剂盒相近甚至更好的试剂盒。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试剂

山羊抗鼠IgG、山羊抗兔IgG、鼠抗硫酸去氢表雄酮、兔抗硫酸去氢表雄酮、人工抗原DHEAS-BSA和吖啶酯均来自苏州亚科科技股份有限公司; 硫酸去氢表雄酮企业标准品、质控品由广州市达瑞生物技术股份有限公司制备; 伯乐质控品购自Bio-Rad公司。

#### 1.1.2 样本

健康人群血清样本及临床血清样本均来自郑州大学第三附属医院。

#### 1.1.3 仪器

全自动化学发光免疫分析仪, 型号: Caris200, 来源于厦门优迈科医学仪器有限公司。

#### 1.1.4 耗材

样本杯、反应杯及枪尖均购自厦门优迈科医学仪器有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 磁珠包被

磁微粒用Binding Buffer(0.1 mol/L MES, pH=5)洗涤5次后加入新配置的活化剂活化30 min; 用Binding Buffer洗涤5次, 加入抗体, 室温下反应16 h; 用含2% BSA的Tris缓冲液洗涤两次, 定容后于2~8℃保存。

#### 1.2.2 吖啶酯标记

将0.05 mg 吖啶酯加入到0.5 mg DHEAS-BSA中, 置于摇床上, 室温避光反应6 h; 然后用葡聚糖凝胶色谱柱分离纯化, 流动相为PB(pH=6.3)。纯化后于2~8℃保存。

#### 1.2.3 全自动化学发光免疫分析实验

1.2.3.1 包被羊抗鼠IgG二抗 向反应杯中加入样本50  $\mu$ L、包被羊抗鼠IgG的磁微粒50  $\mu$ L、鼠抗硫酸去氢表雄酮单克隆抗体50  $\mu$ L, 在37℃条件下反应14 min, 再加入按1:5 000稀释的吖啶酯标记的DHEAS-BSA, 继续在37℃条件下反应15 min。用洗液清洗4遍后将反应杯内洗液全部吸出, 加入预激发液100  $\mu$ L, 混合均匀, 再加入100  $\mu$ L激发液并即刻检测发光值。

1.2.3.2 包被羊抗兔IgG二抗 向反应杯中加入样本50  $\mu$ L、包被羊抗兔IgG的磁微粒50  $\mu$ L、兔抗硫酸去氢表雄酮多克隆抗体50  $\mu$ L, 在37℃条件下反应14 min, 再加入按1:5 000稀释的吖啶酯标记的DHEAS-BSA, 继续在37℃条件下反应15 min。用洗液清洗4遍后将反应杯内洗液全部吸出, 加入预激发液100  $\mu$ L, 混合均匀, 再加入100  $\mu$ L激发液并即刻检测发光值。

1.2.3.3 包被鼠单抗DHEA-S抗体 向反应杯中加入样本50  $\mu$ L、包被鼠抗硫酸去氢表雄酮单克隆抗体的磁微粒50  $\mu$ L, 在37℃条件下反应14 min, 再加入按1:5 000稀释的吖啶酯标记的DHEAS-BSA, 继续在37℃条件下反应15 min。用洗液清洗4遍后将反应杯内洗液全部吸出, 加入预激发液100  $\mu$ L, 混合均匀, 再加入100  $\mu$ L激发液并即刻检测发光值。

1.2.3.4 包被兔多抗DHEA-S抗体 向反应杯中加入样本50  $\mu$ L、包被兔抗硫酸去氢表雄酮多克隆

抗体的磁微粒 50  $\mu\text{L}$ , 在 37 $^{\circ}\text{C}$  条件下反应 14 min, 再加入按 1:5 000 稀释的吡啶酯标记的 DHEAS-BSA, 继续在 37 $^{\circ}\text{C}$  条件下反应 15 min。用洗液清洗 4 遍后将反应杯内洗液全部吸出, 加入预激发液 100  $\mu\text{L}$ , 混合均匀, 再加入 100  $\mu\text{L}$  激发液并即刻检测发光值。

### 1.2.4 分析性能评价

**1.2.4.1 最低检测限** 将零浓度校准品进行测定, 重复测定 20 次, 计算 20 次测定结果发光值的平均值 (mean,  $M$ ) 和标准差 (standard deviation,  $SD$ ), 得出  $M-2SD$  的发光值, 根据零浓度校准品和相邻校准品的浓度-发光值的结果进行两点回归拟合得出一次方程, 将零浓度校准品的平均值  $M-2SD$  的发光值代入上述方程中, 求出对应的浓度值, 即为最低检测限。

**1.2.4.2 线性** 将浓度接近线性范围上限的高值样本按一定比例稀释为 5 个浓度, 其中低值浓度样本需接近线性范围下限。每一浓度样本均重复测试 2 次, 计算其平均值, 将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合, 并计算线性相关系数  $r$ 。

**1.2.4.3 准确度** 将浓度接近线性范围上限 (允许其浓度偏差为  $\pm 20\%$ ) 的硫酸去氢表雄酮样品 (A) 加入到血清或其他相应基质的样品 B 中, 所加入 A 的体积宜不超过总体积 (A+B) 的 10%, 将样品 (A+B) 重复测试 2 次并计算其平均值, 根据公式 (1) 计算回收率  $R$ 。

$$R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_s} \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $R$ -回收率;  $V$ -样品 A 液的体积;  $V_0$ -样品 B 液的体积;  $C$ -样品 B 液加入 A 液后的检测平均浓度;  $C_0$ -样品 B 液的检测浓度;  $C_s$ -样品 A 液的浓度。

**1.2.4.4 重复性** 将低、中、高浓度样本各重复检测 10 次, 计算 10 次测量结果的平均值 ( $M$ ) 和标准差 ( $SD$ ), 计算公式为: 变异系数 (variable coeffi-

cient,  $CV$ )  $CV = SD/M \times 100\%$ 。

**1.2.4.5 分析特异性** 测定一定浓度的 DHEA、皮质醇、醛固酮、雌二醇, 各检测 2 次, 并计算其交叉反应率。

### 1.2.5 参考值范围建立

测定健康人群空腹血清, 采用百分位数法建立本试剂盒健康人群空腹硫酸去氢表雄酮参考值范围。

### 1.2.6 样本比对

西门子公司硫酸去氢表雄酮测定试剂盒 (化学发光法) 作为对照试剂, 对临床样本进行测定, 计算并分析本试剂盒测定结果与西门子对照试剂的相关性及一致性。

## 1.3 统计学方法

用 OrigiPro 7.5 对不同反应模式的浓度梯度 DHEAS 的剂量-反应拟合 Hill 曲线, 选择线性关系较好的曲线对应的反应模式。用最小二乘法将零浓度校准品和相邻校准品及梯度浓度样本的测定结果进行计算及分析, 得到新建立试剂盒的最低检测限及线性相关系数  $r$ 。用 SPSS 24.0 分别将健康男性和健康女性的测定结果进行直方图分析、百分数法和正态分布分析, 得到健康男性和健康女性测值的直方图、正态分布曲线及 95% 置信区间。

## 2 结果

### 2.1 反应模式的选择

分别用羊抗鼠 IgG、羊抗兔 IgG、鼠抗硫酸去氢表雄酮单克隆抗体、兔抗硫酸去氢表雄酮多克隆抗体包被磁微粒, 并用吡啶酯标记 DHEAS-BSA, 以竞争抑制法建立 DHEA-S 的化学发光免疫分析法, 检测浓度梯度的 DHEA-S。将剂量-反应拟合 Hill 曲线, 由表 1 结果可以看出, 4 个反应模式均显示 Hill 曲线线性关系较好, 其中磁微粒包被羊抗鼠 IgG 的线性关系为优,  $R^2$  达到 0.993 1。

表 1 浓度与发光值的 Hill 曲线方程

Table 1 Hill curve equation of concentration and luminescence

磁微粒包被物	吡啶酯标记物	Hill 曲线方程	$R^2$
羊抗鼠 IgG	DHEAS-BSA	$y = 15\,213\,072x^{-1.338\,77} / (107.001\,07^{-1.338\,77} + x^{-1.338\,77})$	0.993 1
羊抗兔 IgG	DHEAS-BSA	$y = 8\,049\,195x^{-0.693\,23} / (40.039\,89^{-0.693\,23} + x^{-0.693\,23})$	0.928 6
MAB DHEAS	DHEAS-BSA	$y = 11\,544\,528.45x^{-1.023\,83} / (34.489\,53^{-1.023\,83} + x^{-1.023\,83})$	0.963 8
PAB DHEAS	DHEAS-BSA	$y = 3\,274\,917.45x^{-0.671\,78} / (5.677\,7^{-0.671\,78} + x^{-0.671\,78})$	0.915 8

## 2.2 分析性能评价

### 2.2.1 试剂盒定标与质量控制

试剂定标后分别测量企业质控品及第三方质控品,得到定标结果如图1质控结果如表2所示,两者结果均在质控标示范围内,实验结果准确可靠。

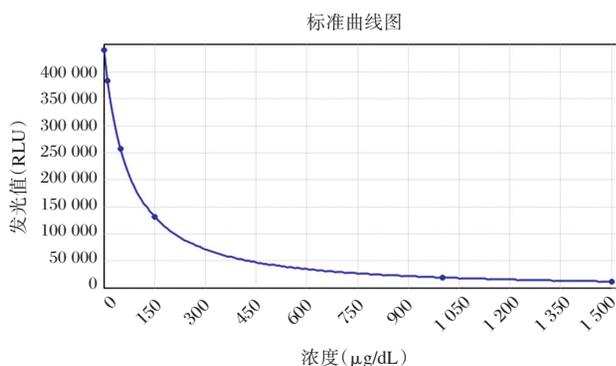


图1 硫酸去氢表雄酮标准曲线  
Figure 1 Master curve of DHEA-S

表2 质控品测量结果

Table 2 Measurement results of control

质控	测量次数	测量值 (μg/dL)	质控范围 (μg/dL)	是否符合质控标准
企业质控品 I	3	26.26	17.50~32.50	符合
企业质控品 II	3	161.20	105~195	符合
企业质控品 III	3	990.20	1 050~1 950	符合
Bio-Rad 质控品 1	1	59.66	34.10~70.70	符合
Bio-Rad 质控品 2	1	120.71	73.5~153	符合
Bio-Rad 质控品 3	1	401.50	250~518	符合

### 2.2.2 最低检测限

根据零浓度校准品和相邻校准品的浓度-发光值的结果进行两点回归拟合得出一次方程,将零浓度校准品的平均值 M-2SD 的发光值代入上述方程中,得到的结果如表3。

表3 最低检测限检测结果 (n=20)

Table 3 Measurement results of sensitivity (n=20)

标准品浓度 (μg/dL)	M	SD	M-2SD 发光值	最低检测限 (μg/dL)
0	435	124.95	8 355.73	418 413
				1.84

### 2.2.3 线性

用浓度约为 1 500 μg/dL 的高值样本按一定比例稀释为 5 个浓度,每一浓度样本均重复测试 2 次,计算其平均值,将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,得到曲线方程为:  $y = -0.002 15 + 0.000 7x$ , 线性相关系数  $r = 0.999 8$ , 由此可知试剂在 0~1 500 μg/dL 的测定范围内线性相关性良好(见表4、图2)。

表4 线性检测结果

Table 4 Measurement results of linearity

样本	稀释比例	理论浓度 (μg/dL)	测定浓度 (μg/dL)	偏差 (%)
1	1	1 500	1 464.61	-2.36
2	2/3	1 000	1 009.38	0.94
3	0.1	150	148.52	-0.99
4	1/30	50	50.40	0.80
5	1/150	10	10.14	1.40

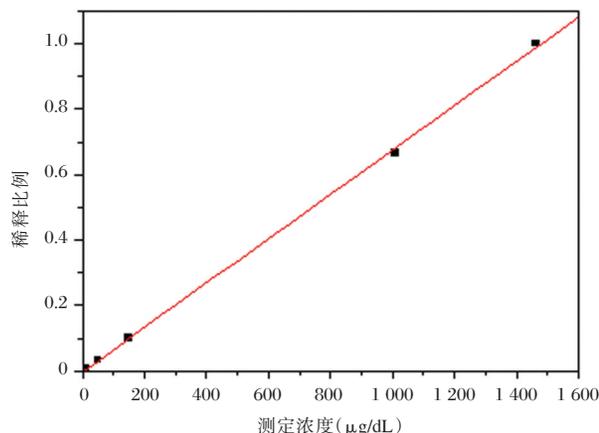


图2 硫酸去氢表雄酮线性拟合  
Figure 2 Linear fitting of DHEA-S

### 2.2.4 准确度

将浓度接近 1 500 μg/dL 的硫酸去氢表雄酮样品 100 μL (A) 加入到 900 μL 相应基质的样品 B 中,将样品 A、B 和 (A+B) 重复测试 2 次并计算其平均值,根据公式(1)计算回收率 R,结果见表5。

表5 准确度检测结果

Table 5 Measurement results of accuracy

样本	测试值 1	回收率 (%)
A	9.54	
B	163.52	105.4
A+B	1 470	

### 2.2.5 重复性

用浓度分别为  $(25 \pm 5) \mu\text{g/dL}$ 、 $(150 \pm 30) \mu\text{g/dL}$  和  $(1\ 000 \pm 200) \mu\text{g/dL}$  的样本各重复检测 10 次, 计算 10 次测量结果的平均值 (M) 和标准差 (SD), 再计算变异系数 (CV), 结果显示该试剂重复性良好, 见表 6。

表 6 重复性检验结果 (n=10)

Table 6 Measurement results of repeatability (n=10)

样本浓度 ( $\mu\text{g/dL}$ )	平均浓度 M ( $\mu\text{g/dL}$ )	SD	变异系数 CV (%)
25	25.54	0.71	2.8
150	150.79	4.62	3.1
1 000	997.34	35.47	3.6

### 2.2.6 分析特异性

测定一定浓度的 DHEA ( $4\ 000 \mu\text{g/dL}$ )、皮质醇 ( $10\ 000 \mu\text{g/dL}$ )、醛固酮 ( $5\ 000 \mu\text{g/dL}$ )、雌二醇 ( $5\ 000 \mu\text{g/dL}$ ), 各检测 2 次, 得到测量浓度小于  $3 \mu\text{g/dL}$ , 其交叉反应率小, 见表 7。

表 7 分析特异性

Table 7 Result of analytical specificity

干扰性物质	干扰物浓度 ( $\mu\text{g/dL}$ )	测定浓度 ( $\mu\text{g/dL}$ )	交叉反应率 (%)
脱氢表雄酮	4 000	1.79	0.04
皮质醇	10 000	1.09	0.01
醛固酮	5 000	1.46	0.03
雌二醇	5 000	1.42	0.03

### 2.3 参考值范围建立

本试剂盒对 370 例健康人血清样本进行检测, 其中男性样本 177 例, 女性样本 193 例, 分别用 SPSS 24.0 软件进行分析, 并按照百分数法<sup>[5]</sup>对测定结果进行分布排序, 得到正常人 95% 置信区间 (女性:  $47.9 \sim 407.5 \mu\text{g/dL}$ ; 男性:  $97.1 \sim 522.5 \mu\text{g/dL}$ ), 结果如图 3、图 4 所示。

### 2.4 样本比对

测定 218 例样本, 与西门子公司的硫酸去氢表雄酮测定试剂盒 (化学发光法) 作测值进行比对, 计算并分析本试剂盒测定结果与西门子对照试剂的相关性及一致性。

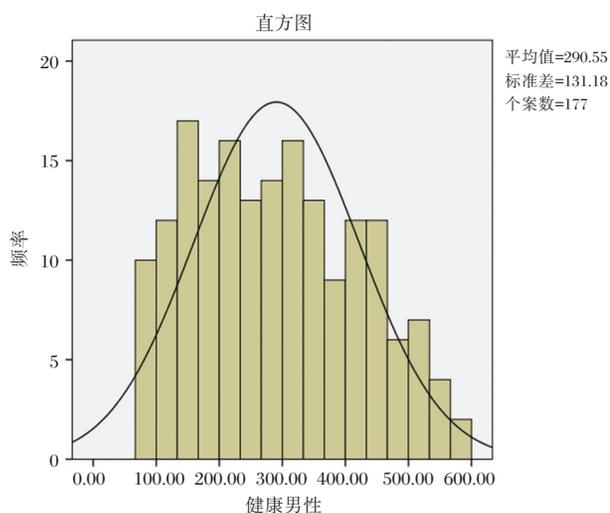


图 3 177 例健康男性 DHEAS 测值直方图

Figure 3 Histogram of DHEAS in 177 health male

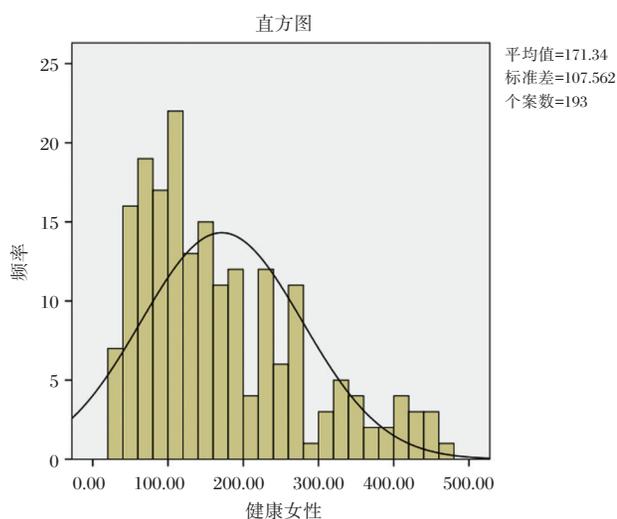


图 4 193 健康女性 DHEAS 测值直方图

Figure 4 Histogram of DHEAS in 193 health female

2 种试剂测定结果线性相关方程为  $y=1.078\ 13+0.992\ 16x$  (斜率 95% 置信区间为  $0.985\ 15 \sim 0.999\ 17$ ,  $P < 0.01$ ), 相关系数  $r=0.994\ 7$  (图 4), 由此可知两者具有良好的相关性。

采用 Bland-Altman 统计下方法对 2 种试剂测值进行分析, 以 2 种试剂测值的平均值为横坐标, 2 种试剂测值的比值为纵坐标, 结果显示两者比值的均值为 1.01, 95% 置信区间为  $(0.79 \sim 1.24)$ , 其中在 95% 置信区间外占总样本数的 4.13% ( $9/218$ ) (图 5), 由此分析 2 种试剂盒的测定结果一致性较高。

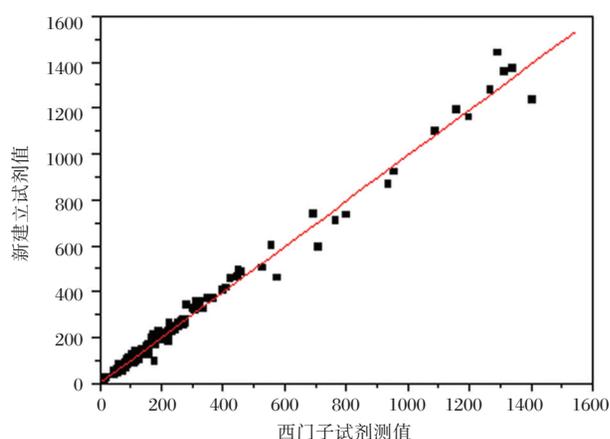


图5 2种试剂样本测值相关性散点图

Figure 5 The scatter plot of correlation analysis of 2 assays

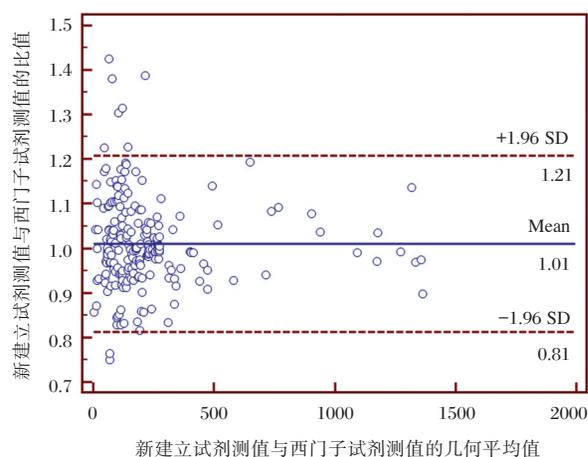


图6 2种试剂 Bland-Altmen 分析比对图

Figure 6 Bland-Altmen Plot assays with 2 reagents

### 3 讨论

DHEA-S 的检测在临床上具有重要的意义, 而 DHEA-S 的定量测定方法有很多, 其中以色谱法最为普遍。2015 年 Patrick 等人<sup>[6]</sup> 用色谱/串联质谱法同时测定 10 种内源性类固醇激素; 2017 年 Zang 等人<sup>[7]</sup> 开发了可以同时测定人血清中 9 种羟基雄激素及其结合物的方法——液相色谱-电喷雾串联质谱法 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)。质谱、色谱等方法具有灵敏度、精密度和准确度高以及特异性好等优点, 但由于仪器成本高昂, 在普通的临床检验中推广应用成本非常高。为了有效降低检测成本, 有研究者通过联合化学发光免疫分析法和 LC-MS 分析不同类型 PCOS 的雄激素水

平, 除有力证明血清睾酮、雄烯二酮、DHEA-S 以及雌激素指数均为诊断 PCOS 高雄激素血症的敏感指标外, 也呈现了化学发光免疫分析法和 LC-MS 对 PCOS 高雄激素血症的诊断具有一致性这一重要结果<sup>[8]</sup>。

上述的 LC-MS 和免疫诊断技术配合使用虽有效减少单纯 LC-MS 应用所带来的高成本、耗时长等缺点, 但在现代临床检验和生命科学研究中, 单纯的免疫诊断技术的使用更为普遍和易于推广。免疫诊断技术的日新月异, 使传统的手工操作复杂, 反应时间长, 对环境污染性强的低端检测技术逐步被新型的化学发光免疫分析技术所取代, 化学发光免疫分析具有速度快, 结果精确, 灵敏度高, 通常可测定纳克级或皮克级的化学成分。为肿瘤<sup>[9]</sup>、糖尿病<sup>[10]</sup>、性腺分泌异常, 甲状腺功能障碍<sup>[11]</sup>等疾病提供了有力的诊断工具。本研究中建立的试剂盒同样具有化学发光免疫分析的特点, 最低检测限可达 1.84  $\mu\text{g/dL}$ , 线性在 10~1 500  $\mu\text{g/dL}$  之间 (西门子、雅培: 最低检测限: 3  $\mu\text{g/dL}$ ; 线性范围: 0~1 500  $\mu\text{g/dL}$ ), 相关系数  $r=0.9998$ , 准确度的回收率为 105.38%, 重复性均小于 8%, 并且与 DHEA、皮质醇、醛固酮、雌二醇交叉反应值小于最低检测限, 特异性良好。

市场上硫酸去氢表雄酮的检测以进口试剂盒为主, 本文作者对各个进口厂家硫酸去氢表雄酮 (化学发光免疫分析法) 试剂盒的反应模式进行比较分析, 可以看到除了与雅培包被抗 DHEA-S 抗体外, 贝克曼包被山羊抗兔 IgG 二抗, 罗氏、西门子 2 个进口厂家均采用磁珠包被链霉亲和素的反应模式, 该模式可以利用链霉亲和素系统的信号放大作用达到更好的灵敏度。本研究在不同的反应模式中比较、选择了与这几个进口厂家不一样的模式, 该方法则是利用了二抗的信号放大作用, 提高灵敏度, 除此之外还可以使得标记和检测更加灵活。

本研究新建立的试剂盒精密度、分析灵敏度和检测范围等性能与进口厂家相比, 有很大的竞争优势。为更好地满足临床检测的需要, 本文作者未来将对该试剂盒进行覆盖线性范围的大量样本进行检测和比对, 并研究该试剂盒的各项稳定性进行验证和评估, 有望替代国外昂贵试剂应用于临床检测。

## 下一代测序技术在胚胎植入前遗传学检测中的应用

谢美娟 杨学习 李明\*

**[摘要]** 以下一代测序技术(next-generation sequencing, NGS)为代表的基因组学技术的迅猛发展给全面深度的染色体筛查和基因诊断提供了机会。NGS也迅速应用于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)临床检测中,成为常规检测技术,经济与可靠使其具有更广阔的应用前景。单细胞全基因组扩增(whole genome amplification, WGA)技术的进步使得NGS在PGD和PGS的临床应用中能够更加全面了解植入前胚胎的遗传学信息,可以检测到更加细微的差异;基于NGS技术的PGS和PGD将给移植成功率和试管婴儿(*in-vitro* fertilization, IVF)出生率带来明显提升。本文主要介绍PGD/PGS的定义、传统的PGD/PGS检测技术,单细胞全基因组扩增技术以及NGS在PGD/PGS中的应用。

**[关键词]** 胚胎植入前诊断; 胚胎植入前筛查; 下一代测序

### Application of the next generation sequencing technology in preimplantation genetic detection

XIE Meijuan, YANG Xuexi, LI Ming\*

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

**[ABSTRACT]** With the rapid development of genomics technology, next-generation sequencing (NGS) offered an opportunity for comprehensive chromosome screening and gene diagnosis. NGS can also be applied to preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS) and becomes a routine clinical detection technology. In addition, the economy and reliability of NGS makes it have a wider application prospects. The progress of whole genome amplification (WGA) of single cell leads to the clinical use of NGS in PGD and PGS more comprehensive to learn the genetic information of preimplantation embryos. The comprehensive chromosome screening and gene diagnosis for embryonic genome will improve the success rate of embryo transplantation and raise the birth rate, which makes NGS more and more irresistible in PGD and PGS. In this review, the PGD/PGS definition, technology of whole genome amplification and the application of NGS in PGD/PGS will be discussed.

**[KEY WORDS]** Preimplantation genetic diagnosis; Preimplantation genetic screening; Next-generation sequencing

2015年12月9日《Reproductive Biology and Endocrinology》杂志报道了辅助生殖技术(assisted reproduction techniques, ART)生育治疗的国际调查结果,与前2年相比,不孕患者的数量逐年上

升<sup>[1]</sup>;尽管体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET)可以用于不孕的治疗,但这个过程还是低效的,成功率仍然较低。胚胎植入前遗传学检测主要包括胚胎植入前遗传学

基金项目:国家自然科学基金(81302327);广州市重大科技攻关项目子课题(2014Y2-00220)

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:李明, E-mail: mingli2006\_2006@126.com

诊断 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 和胚胎植入前遗传学筛查 (preimplantation genetic screening, PGS), 是指在人工辅助生殖过程中, 对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子宫, 从而获得正常胎儿的诊断/筛查方法。这2种技术建立在 IVF 基础之上, 可直接筛选有问题的、不健康的胚胎, 挑选正常的胚胎植入子宫, 可阻断致病基因的纵向传递, 降低反复流产率, 提高患者的临床妊娠率, 避免因引产给孕母带来的身心创伤。PGD 和 PGS 作为 ART 的工具应用也在逐渐增多<sup>[2-6]</sup>。本文主要介绍 PGD/PGS 的定义、传统的 PGD/PGS 检测技术、单细胞全基因组扩增技术 (whole genome amplification, WGA) 技术以及下一代测序基因组扩增技术 (next-generation sequencing, NGS) 在 PGD/PGS 中的应用。

## 1 PGD/PGS 概况

早在 60 年代, Edwards 就提出了胚胎植入前遗传学诊断的设想<sup>[7]</sup>, 直到 1990 年 Handyside 等<sup>[8]</sup>对 1 例性连锁遗传病夫妇成功地进行了 PGD, 并获得妊娠, 标志着 PGD 应用于辅助生殖临床的开始。PGD 是通过早期胚胎部分细胞进行遗传学分析和筛查, 将无遗传病的胚胎移植入宫腔, 从而获得健康的胎儿。我国第一例 PGD 在 2000 年由中山大学附属第一医院庄广伦实验室完成, 随后姚元庆团队也在这方面陆续有报道<sup>[9]</sup>; PGD 发展至今, 其诊断的疾病种类也在逐渐增加, 从最初对单基因遗传病的诊断到染色体异常、人类肿瘤易感基因的分析、线粒体病、人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 配型胚胎的检测等<sup>[2]</sup>。

PGS 又称“PGD-非整倍体筛查”, 是指运用 PGD 相同的技术手段检测早期胚胎染色体数目和结构, 从而挑选正常的胚胎植入子宫, 以期获得正常的妊娠, 提高患者的临床妊娠率, 降低多胎妊娠。研究发现, 随着女性年龄的增长, 胚胎染色体异常的发生率逐年增高<sup>[10]</sup>, 胚胎中的染色体异常是造成 IVF 反复失败和早期流产的重要原因<sup>[11-12]</sup>。因此, PGS 主要针对的人群为女方高龄、不明原因反复流产、IVF 反复失败以及男性导致的不孕不育等。自 Munné 等<sup>[13]</sup>在 1993 年第一次报道了对胚胎进行 PGS 以后, 经 PGS 诞生的婴儿也

越来越多<sup>[14-15]</sup>。

## 2 传统的 PGD/PGS 检测技术

首例成功诞生的经 PGD 合并表型正常的婴儿采用的是 PCR 技术, 该技术主要用于性别和单基因病的诊断, 然而该技术存在着 5%~20% 的等位基因脱扣发生率<sup>[16]</sup>。荧光原位杂交 (fluorescent *in situ* hybridization, FISH) 作为最初 PGD/PGS 标准技术用于染色体检测, 可以筛选出染色体正常的胚胎, 使得更多的不孕夫妇孕育了自己的健康后代<sup>[17]</sup>。此方法简单快速, 但由于探针的交叉影响并不能一次全面地检测所有染色体。而且容易受到细胞固定和信号重叠等因素的影响, 导致分辨率和准确率降低。随后, 为了填补分子遗传学与细胞遗传学间的空白, 比较基因组杂交 (comparative genomic hybridization, CGH) 技术出现, 其优点是可以分析全部染色体, 临床上很多生殖中心采用该方法对高风险产生非整倍体胚胎的夫妇进行胚胎染色体非整倍性改变的全面检测<sup>[18]</sup>以及 PGD<sup>[19]</sup>。但它分析时间长, 不能检测出多倍体, 也不能检出平衡的、复杂的染色体畸变。单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 芯片技术可检测全部染色体非整倍体和部分单基因遗传病, 并为每枚胚胎提供独特的 DNA 图谱; 但其耗时过长, 且成本高、数据分析困难。总体来说, CGH 和 SNP 芯片技术的临床应用在一定程度上改善了不孕夫妇的临床结局<sup>[20-21]</sup>, 但这些技术又有各自的局限。随着众多报道<sup>[22-23]</sup> NGS 应用于无创产前筛查得到了高检出率与准确度, 学者们开始考虑将 NGS 应用于 PGD/PGS, 以选出优质胚胎进行植入。

## 3 单细胞全基因组扩增技术

NGS 是单细胞水平上对基因组进行测序的利器, WGA 是下一代测序在 PGD 和 PGS 临床应用的关键一步, 其高度均一性和保真度是精确测定拷贝数变异 (copy number variation, CNV) 和单核苷酸变异 (single nucleotide variants, SNV) 等基因组变异的必要条件。WGA 与测序技术结合能够全面了解胚胎植入前的遗传学信息, 但扩增产量及 SNV 识别假阳性及假阴性的能力限制了当前流行的 WGA 方法。WGA 技术发展至今主要分为 2 种类型: 基于热循环以 PCR 为基础的 WGA 技术,

如简并寡核苷酸引物 PCR (degenerate oligonucleotide primer PCR, DOP-PCR)、连接反应介导的 PCR (ligation mediated PCR, LM-PCR)、扩增前引物延伸反应 (primer extension pre-amplification, PEP) 以及多次退火环状循环扩增技术 (multiple annealing and looping-based amplification, MALBAC) 技术等; 基于等温反应不以 PCR 为基础的 WGA 技术, 如多重置换扩增 (multiple displacement amplification, MDA)。这里主要介绍临床上较为常用的 2 种单细胞 WGA 技术, MDA 和 MALBAC。

### 3.1 MDA

MDA 的原理是六聚体引物与变性 DNA 随机结合, 在等温以及 Phi 29 聚合酶作用下, 发生链置换合成反应, 每个置换后的单链作为模板, 与引物结合, 可扩增获得高产量 DNA。MDA 作为一种可获得高产量以及高保真产物的 WGA 方法, 减少扩增偏倚, 而且产物片段大小高于其他 PCR 方法, 该方法在 2002 年首次被报道<sup>[24]</sup>。MDA 具有产量高、扩增片段长 (平均片段长度可达 10 kb)、均一性好、保真性高、覆盖率高等优点; 但是也有报道其存在一定的缺陷: 受细胞模板起始量影响大, 当扩增模板起始量极少时, 其扩增产物的覆盖率、准确度下降<sup>[25]</sup>; 还存在一定的等位基因脱扣 (allele dropout, ADO) 率且其 ADO 率也与起始模板量有关<sup>[26]</sup>。MDA 方法部分程度上解决了扩增偏向的问题, 实现了比 PCR 更均一的扩增, 该酶的高保真性也阻止了错误的进一步扩大。

### 3.2 MALBAC

2012 年, 哈佛大学谢晓亮在《Science》上发表了单细胞全基因组扩增新技术 MALBAC, 即多次退火环状循环扩增技术<sup>[27]</sup>。MALBAC 利用特殊的引物, 使得扩增子结尾互补成环, 防止了 DNA 的指数性扩增, 解决了扩增偏倚, 同时保持了 90% 以上的基因组扩增覆盖度, 使得检测单细胞中较小的 DNA 序列变异变得更容易, 分辨率提高, 可以检测单基因突变, 以及同时检测多个基因。2014 年 9 月世界上首例经 MALBAC 基因组扩增高通量测序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。MALBAC 技术具有单细胞的基因测序覆盖率高 (能够达到 93%)、ADO 率低、扩增偏倚低以及单细胞扩增起始模板量低等优点; 但其也存在一定的缺点, 比如 DNA 酶保真性较低, 因此 DNA 复制时错误率较高, 这样会导

致假阳性结果的出现。此外, 谢晓亮等<sup>[28]</sup>在 2015 年 9 月又发表其单细胞测序技术新成果, 他们开发出了一种基于乳液的扩增方法来抑制扩增偏移检测单细胞拷贝数变异 (CNV), 同时以高精度检测单核苷酸变异 (SNV)。单细胞测序技术解决了用组织样本测序时或样本少无法解决的细胞异质性难题。

对于 MDA 和 MALBAC 技术的优劣, 业界还没有统一的定论, 在低深度测序中 (25×), 两者的覆盖度均可, 均一度各执说法。关于 2 种方法优劣的比较分析已有文献报道<sup>[29-30]</sup>, 可基于特定的实验目的选择不同的扩增方法, 对于 CNV 的检测可以选用 MALBAC, 而 MDA 则由于其高保真性可用于 SNV 的检测。

## 4 NGS 在 PGD/PGS 中的应用

Audibert 等<sup>[1]</sup>的调查结果也显示参与调查的生育学家们期望更多的使用 PGD、PGS 和其他提高着床率的技术。随着胚胎发展实时检测技术及 PGD/PGS 技术的出现, 胚胎选择成为不孕治疗最有发展前景的领域。目前, NGS 技术具有数据准确度更高、实验重复性更好等优势, 且随着其价格不断下降, 其在 PGD/PGS 方面已经有了一定的应用, 也是被认可的技术, 只是方法学上仍在不断改进。单细胞全基因组扩增技术的不断进步, 使得单基因遗传病和染色体病可以同时进行诊断, 这对一个胚胎的筛选有了相对更为精准的结果, 进而提高筛选后再植入的成功率。近几年, 利用低通量全基因组测序以及针对致病基因进行目标区域靶向捕获的 NGS 应用于 PGD/PGS 的成功案例报道逐渐增多。Treff 等运用下一代测序技术对多种单基因病如囊性纤维化 (cystic fibrosis, CF)、沃克华宝综合症 (Walker-Warburg syndrome, WWS)、家族性自律神经失调 (familial dysautonomia, FD)、抗维生素 D 性佝偻病 (vitamin D-resistant rickets, VDRR)、神经纤维瘤 (neurofibromatosis1, NF1) 等进行 PGD, 检测结果与传统方法相比可靠性达到 100%<sup>[31]</sup>; 国内也有许多的成功案例被报道: 姚元庆团队采用下一代测序技术分析单细胞水平的染色体拷贝变化, 选择正常胚胎植入, 于 2014 年 9 月顺利分娩健康女婴<sup>[32]</sup>。谢晓亮、乔杰、汤富酬团队在国际上首次建立了一种采用下一代测序同时进行突变位点、染色体异常、以及连锁分析检测的方

法,并利用该技术成功帮助2个病例(一例是常染色体显性遗传疾病,另一例是发生在X染色体上的隐性遗传疾病),进行胚胎筛选后,这2对夫妇均已得到健康的后代<sup>[33]</sup>。2013年,我国湘雅医院团队报道了采用NGS检测囊胚的PGS成功病例<sup>[34]</sup>;2014年Fiorentino等<sup>[35]</sup>则对190例卵裂球WGA产物进行染色体非整倍体CGH与NGS检测方法的比较,结果表明NGS有高度的一致性,相比之下在成本和精确性上,NGS更有优势。到目前为止,NGS应用于胚胎植入前非整倍体改变筛查中的价值已得到证实。这些成功案例均表明NGS技术应用于PGD/PGS已经比较成熟。但同时NGS在PGD/PGS中的应用还受到一定限制,例如暂时还不具备检测嵌合型的胚胎、单亲二倍体以及检测分辨率有限等,有待于测序技术的进一步完善,或者联合其他技术手段达到最佳的诊断。另一方面,NGS在PGD/PGS中的应用依赖于WGA技术的进步,而WGA还存在一定程度的ADO、扩增偏倚等问题,因此,需要更多的探索来改进现有的技术,更多的研究来进一步明确其诊断价值。

## 5 展望

一直以来,PGD/PGS活检的遗传物质从卵子的第一极体、第二极体、卵裂期胚胎的卵裂球到囊胚滋养外胚层细胞,都存在着争议;极体活检被认为仅能反映母方的遗传信息且容易发生退化影响诊断效率;卵裂期以及囊胚期胚胎则存在着高嵌合率等,此外,PGD/PGS是通过侵入性操作获得诊断结果,其对子代的影响还需要长期大样本的随访。因此,研发一种安全又有效的筛查技术十分必要。以谢晓亮带领的研发团队宣布了全球首例接受无创胚胎染色体筛查(non-invasive chromosome screening, NICS)的试管婴儿于无锡市妇幼保健院生殖中心健康诞生。无创PGS/PGD技术的出现,将彻底解决因为胚胎活检存在的安全争议,也意味着在不久的将来,可以更好的服务于临床。2015年卫计委妇幼保健服务司发布了《关于辅助生殖机构开展高通量基因测序植入前胚胎遗传学诊断临床应用试点工作的通知》,审批通过了13家医疗机构开展高通量基因测序植入前胚胎遗传学诊断(PGD)临床试点,也意味着NGS将更加的普遍广泛地用于临床PGD/PGS。

## 参考文献

- [1] Audibert C, Glass D. A global perspective on assisted reproductive technology fertility treatment: an 8-country fertility specialist survey [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2015, 13: 133.
- [2] Yan L, Wei Y, Huang J, et al. Advances in preimplantation genetic diagnosis/screening [J]. *Sci China Life Sci*, 2014, 57(7):665-671.
- [3] Milachich T. New advances of preimplantation and prenatal genetic screening and noninvasive testing as a potential predictor of health status of babies [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 20(6):749-762.
- [4] Sengupta SB, Dhanjal S, Harper JC. Quality control standards in PGD and PGS [J]. *Reprod Biomed Online*, 2016, 32(3):263-270.
- [5] Dahdouh EM, Balayla J, Audibert F, et al. Technical update: preimplantation genetic diagnosis and screening [J]. *J Obstet Gynaecol Can*, 2015, 37(5):451-463.
- [6] Cimadomo D, Capalbo A, Ubaldi FM, et al. The impact of biopsy on human embryo developmental potential during preimplantation genetic diagnosis [J]. *Biomed Research International*, 2016, 2016(4):1-10.
- [7] Fragouli E. Preimplantation genetic diagnosis: present and future [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2007, 24(6):201-207.
- [8] Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, et al. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification [J]. *Nature*, 1990, 344(6268):768-770.
- [9] Wang H, Wang L, Ma M, et al. A PGD pregnancy achieved by embryo copy number variation sequencing with confirmation by non-invasive prenatal diagnosis [J]. *J Genet Genomics*, 2014, 41(8):453-456.
- [10] Heffner LJ. Advanced maternal age - how old is too old? [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(19):1927-1929.
- [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] Munne S, Lee A, Rosenwaks Z, et al. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos [J]. *Hum Reprod*, 1993, 8(12):2185-

- 2191.
- [14] Wilton L, Williamson R, McBain J, et al. Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridization [J]. *N Engl J Med*, 2001, 345(21):1537-1541.
- [15] Krieg SA, Lathi RB, Behr B, et al. Normal pregnancy after tetraploid karyotype on trophoctoderm biopsy [J]. *Fertil Steril*, 2009, 92(3):1169.
- [16] Wells D, Sherlock JK. Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification [J]. *Prenat Diagn*, 1998, 18(13):1389-1401.
- [17] Kyu LC, Hyun JJ, Mi MD, et al. Efficacy and clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis using FISH for couples of reciprocal and Robertsonian translocations: the Korean experience [J]. *Prenat Diagn*, 2004, 24(7):556-561.
- [18] Munne S. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy and translocations using array comparative genomic hybridization [J]. *Curr Genomics*, 2012, 13(6):463-470.
- [19] Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(7):1925-1935.
- [20] Franssen MT, Musters AM, van der Veen F, et al. Reproductive outcome after PGD in couples with recurrent miscarriage carrying a structural chromosome abnormality: a systematic review [J]. *Hum Reprod Update*, 2011, 17(4):467-475.
- [21] Tan YQ, Tan K, Zhang SP, et al. Single-nucleotide polymorphism microarray-based preimplantation genetic diagnosis is likely to improve the clinical outcome for translocation carriers [J]. *Hum Reprod*, 2013, 28(9):2581-2592.
- [22] 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]. *Genet Med*, 2012, 14(3):296-305.
- [23] 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.
- [24] Dean FB, Hosono S, Fang L, et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(8):5261-5266.
- [25] Ling J, Zhuang G, Tazon-Vega B, et al. Evaluation of genome coverage and fidelity of multiple displacement amplification from single cells by SNP array [J]. *Mol Hum Reprod*, 2009, 15(11):739-747.
- [26] Sun G, Kaushal R, Pal P, et al. Whole-genome amplification: relative efficiencies of the current methods [J]. *Leg Med (Tokyo)*, 2005, 7(5):279-286.
- [27] Zong C, Lu S, Chapman AR, et al. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell [J]. *Science*, 2012, 338(6114):1622-1626.
- [28] Fu Y, Li C, Lu S, et al. Uniform and accurate single-cell sequencing based on emulsion whole-genome amplification [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(38):11923-11928.
- [29] de Bourcy C F, De Vlaminck I, Kanbar J N, et al. A quantitative comparison of single-cell whole genome amplification methods [J]. *Plos One*, 2014, 9(8):e105585.
- [30] 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.
- [31] Treff NR, Fedick A, Tao X, et al. Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease [J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(5):1377-1384.
- [32] Wang H, Wang L, Ma M, et al. A PGD pregnancy achieved by embryo copy number variation sequencing with confirmation by non-invasive prenatal diagnosis [J]. *J Genet Genomics*, 2014, 41(8):453-456.
- [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.
- [34] Yin X, Tan K, Vajta G, et al. Massively parallel sequencing for chromosomal abnormality testing in trophoctoderm cells of human blastocysts [J]. *Biol Reprod*, 2013, 88(3):69.
- [35] 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.

# 中国人群常见的药物代谢相关基因多态位点及其检测方法

杨琳艳<sup>1</sup> 杨旭<sup>1</sup> 范冬梅<sup>1</sup> 梁志坤<sup>1</sup> 叶倩平<sup>1</sup> 杨学习<sup>2\*</sup>

**[摘要]** 药物代谢个体差异的一个重要来源是遗传多态性即药物代谢相关基因的多态性。中国人群中药物代谢酶基因多态性的系统性分析已发现了很多潜在的功能性多态性位点,因此建立起针对中国人群的药物代谢酶基因多态性的检测技术,对常见的药物代谢相关基因多态位点的检测以及针对这些多态性位点建立个性化用药技术具有重要的意义。检测药物代谢基因多态性大多采用传统的聚合酶链式反应(PCR)和限制性片段长度多态性(RFLP)等方法,随着基因诊断的快速发展,高通量、快速准确的基因多态性检测方法开始发展起来,如基因芯片法、下一代测序技术等。本文对药物代谢酶基因多态性位点及其检测方法进行综述。

**[关键词]** 药物代谢; 基因多态性; 下一代测序技术

## Common gene-related polymorphisms of drug metabolism in Chinese population and their detection methods

YANG Linyan<sup>1</sup>, YANG Xu<sup>1</sup>, FAN Dongmei<sup>1</sup>, LIANG Zhikun<sup>1</sup>, YE Qianping<sup>1</sup>, YANG Xuexi<sup>2\*</sup>

(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]** An important source of individual differences in drug metabolism is genetic polymorphism which relates to polymorphisms of drug metabolizing genes. A systematic analysis for polymorphisms of drug metabolizing enzyme genes in Chinese population has identified many potential functional SNPs. Establishment of an assay for the drug metabolizing enzyme gene polymorphisms in Chinese population is very significant. The methods based on conventional polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) are traditionally used to detect polymorphisms of drug metabolizing genes. With the rapid development of gene diagnosis, high throughput, fast and accurate genetic polymorphism detection methods, such as gene microarray, next generation sequencing, have been developed for it. This review focuses on the drug metabolizing enzyme gene polymorphisms and detection methods and the recent progress is also discussed.

**[KEY WORDS]** Drug metabolism; Genetic polymorphism; Next generation sequencing

药物在体内的作用过程包括药物的吸收、生物转化、分布和排泄等一系列过程。而其中的生物转化即为药物代谢,指的是药物在体内经过吸收、重新分布以后,在药物酶的作用下其化学结构

发生一系列变化的过程。药物化学结构的变化包括其化学成分分子的缩合、降解以及分子功能团的增减和变换等。经生物转化后,药物相应的理化性质随之发生改变,进而导致其毒理和药理活

基金项目:广州市科技计划项目(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

性的变化<sup>[1-2]</sup>。对药物的代谢过程进行研究可以明确药物中发挥药效的活性成分,阐明药物的科学内涵,促进质量控制和剂型改进,进而指导临床用药。因此药物代谢研究对临床用药具有重要的指导意义。

遗传因素和环境因素共同影响着药物代谢酶活性的个体差异。其中与药物效应密切相关的药物相关基因即编码体内关键药物代谢酶的基因发生变化是主要的遗传影响因素。药物相关基因发生的诸如单核苷酸多态性、基因缺失或重复等分子结构变异,可能会引起药物在作用靶点、转运蛋白和代谢酶等水平上发生遗传差异,从而引起药物在体内的药效和代谢发生变化,对药物的治疗效果产生影响,甚至会出现严重的药物不良反应,进而造成药物代谢和反应的个体差异<sup>[3]</sup>。

与药物效应相关的基因型分布具有较大的种族与地区差异,很多欧美人群的相关数据不能直接应用到中国人群。建立起中国人群药物代谢酶基因多态性检测技术,对常见的药物代谢相关基因多态位点的检测以及针对这些多态性位点建立个性化用药技术具有重要的意义。

本文在前人研究的基础上,对中国人群常见的药物代谢相关基因的多态位点及其对药物代谢过程的影响、常用检测方法特别是下一代测序技术在药物代谢基因多态性的检测中的应用进行综述。

## 1 中国人群中常见药物代谢相关基因的多态位点及其在药物代谢中的作用

### 1.1 P450 酶系及相关调控基因

CYP450 在还原状态下可以和一氧化碳相结合,在 450 nm 的波长处有最大吸收峰,是存在于人体肝脏的具有混合功能的氧化酶。CYP450 是药物代谢的最主要途径,是最重要的药物代谢酶系,其负责的药物代谢超过 80%,催化的氧化反应类型极广,与代谢性药物的相互作用关系也最为密切<sup>[4]</sup>。

CYP450 的活性存在种族和个体差异,即具有遗传多态性。用药情况应根据患者的个体情况而异,这就需要首先确定患者与药物代谢相关的基因型,接着对其代谢类型做出判断,进而针对不同的个体确定不同的用药量,以达到最好的疗效。但从临床用药的现状来看,个体化用药的目标还没有实现,主要原因有:一是 CYP450s 基因型鉴定技术还不完善;二是 CYP450s 基因型与表现型

的关系研究得还不够深入<sup>[5]</sup>。因此,针对这一现状,发展经济、高效、准确的 CYP450s 相关基因型鉴定技术,深入开展 CYP450s 基因型与表现型关系的研究工作对于降低药物不良反应、指导个体化临床用药具有重要意义。

#### 1.1.1 CYP1A2

CYP1A2 在人类肝脏中普遍存在,在肝脏的线粒体和内质网中有大量分布,脑、肠道、肺等组织中有少量的分布,约占肝脏 CYP450 酶总量的 13%<sup>[6]</sup>。CYP1A2 主要的突变体为 CYP1A2\*11,是由 CYP1A2 基因 c.558C>A 的突变引起其蛋白质(p.Phe186Leu)的改变,进而导致其酶活性的降低。CYP1A2\*7 是由于 c.1253+1G>A 突变引起剪切缺陷(splicing defect)<sup>[5]</sup>。

#### 1.1.2 CYP2C8

占 CYP2C 亚族 26% 的 CYP2C8 酶,在肝脏中的含量较高,占肝酶总量的 7%,在肝外其他组织中也有少量的分布,是 CYP2C 亚族成员中发现最晚的一个<sup>[7]</sup>。据统计,临床上约 5% 的药物代谢需 CYP2C8 的参与,另外该酶在血管紧张度和血压的调节以及一些内源化合物的代谢过程中也发挥着重要作用<sup>[8]</sup>。

已经报道的 CYP2C8 突变体有 20 多种,其分布特点是具有明显的地区性和种族性。其中,CYP2C8\*2 的突变频率为 6%~28%,主要见于黑种人中。突变频率分别为 13% 和 6% 左右的 CYP2C8\*3 和 CYP2C8\*4 2 种突变体主要分布在白种人中<sup>[9]</sup>。而 CYP2C8\*5 至 CYP2C8\*14 的突变体突变频率很低(<0.2%),主要见于亚洲人群<sup>[10]</sup>。

#### 1.1.3 CYP2C9

CYP2C9 同样也具有基因多态性,据报道至少存在 2 种不同的等位基因即 CYP2C9\*2 和 \*3<sup>[11]</sup>。作为 CYP2C 亚家族的主要成员,CYP2C9\*3 是中国人群中最常见的突变型,占 8%~10%,而其他突变型占不到 1%<sup>[12]</sup>,CYP2C9 具有显著的地区和种族差异。基因突变后可能会导致酶活力的下降,进而引起代谢能力的降低,CYP2C9\*3 突变是其酶活性下降的主要原因。

CYP2C9 基因编码区有多处单核苷酸多态存在。第一个被发现的是 CYP2C9\*2,由于 3 号外显子的 430 位 C>T,导致 144 位 Arg 变为 Cys。CYP2C9\*2 与 CYP2C9\*1 相比缺少 Ava II 的识别位点(GGACT),因此可以使用 PCR 检测 P450

*CYP2C9\*2*。第二个多态的位点是 *CYP2C9\*3*, 7号外显子的 1075 位 A>C, 导致 359 位的 Ile 变为 Leu。 *CYP2C9\*4* 是一种很少出现的等位基因, 只在一位日本病人中发现过, 在日本的健康人和其他人种中均未发现过, 该基因 7 号外显子的 1076 位 T>C, 导致 359 位 Ile 变为 Thr<sup>[13]</sup>。

#### 1.1.4 *CYP2C19*

De Morais 等<sup>[14]</sup>发现弱代谢者产生的主要原因是 *CYP2C19* cDNA 的 5 号外显子中发生 c.681G>A 突变, 导致了一个新的异常的拼接位点的出现, 异常的拼接使位于外显子 5' 端的前 40 bp 的碱基缺失, 在之后的转录过程中 mRNA 的阅读框架也发生改变, 进而导致翻译提前终止, 结果生成的蛋白质是无功能的酶蛋白, 其结构上缺乏血红素结合位点。该突变体被称为 *CYP2C19\*2*。该突变存在于约 73%~83% 的日本人和白种人弱代谢者中<sup>[15]</sup>。另外, 突变频率较高的突变体有 *CYP2C19\*5*、*CYP2C19\*8* 和 *CYP2C19\*3* 等。 *CYP2C19\*5* 表现为 c.1297C>T 突变, 并导致氨基酸产生 p.Arg433Trp 的改变。 *CYP2C19\*8* 表现为 c.358T>C 突变, 导致氨基酸序列产生 p.Trp120Arg 的改变。而突变体 *CYP2C19\*3* 则表现为 c.991A>G 突变, 导致氨基酸序列产生 p.Ile331Val 的变化, 以及 c.636G>A 突变<sup>[15]</sup>, 导致氨基酸序列产生 p.Trp212X 的改变, 翻译提前终止, 丧失酶活性, 造成弱代谢者的发生<sup>[14]</sup>。

#### 1.1.5 *CYP3A4* 和 *CYP3A5*

*CYP3A4* 是人类药物代谢酶中最主要的异构酶, 约占肝脏 CYP 酶总量的 25%<sup>[16]</sup>, 肠道中也有大量 *CYP3A4* 酶的表达。临床上约有 50% 药物需经 *CYP3A4* 代谢<sup>[17]</sup>, 该酶的代谢底物类型较多。目前为止, 在中国人群中已发现的 *CYP3A4* 突变体主要有 *CYP3A4\*3* (c.1334T>C)、*CYP3A4\*4* (c.352A>G)<sup>[18]</sup>、*CYP3A4\*5* (c.653C>G)<sup>[19]</sup> 和 *CYP3A4\*18* (c.878T>C)。FK506 是常用的免疫抑制药, 主要用来预防肾脏移植后免疫排斥反应。其具有比环孢素更强的免疫抑制作用和肝肾安全性。在口服 FK506 后, 主要利用肝脏和肠道中的 *CYP3A4* 和 *CYP3A5* 进行代谢, 因此推测造成 FK506 药动力学个体差异的主要原因可能是 *CYP3A4*、*CYP3A5* 的基因多态性。在已发现的 *CYP3A4* 的数十个 SNPs 中, IVS10 上的 *CYP3A4\*18B* (82266G>A) 是目前在中国人群中最高发的突变体<sup>[20]</sup>。与 *CYP3A4* 基因相似, *CYP3A5* 基因具有很大的表达

差异性, 其中最常见突变体是 *CYP3A5\*3*, 即 IVS3 上产生 c.219-237A>G 突变, 进而导致异常剪切的 mRNA 的形成, 编码形成的蛋白质表现出不稳定的特性, *CYP3A5* 代谢酶在携带该突变的患者体内不表达, 导致对相应底物的代谢效率下降, 因此该突变被认为是影响 *CYP3A5* 蛋白表达水平的最主要因素<sup>[21]</sup>。

#### 1.1.6 *CYP2E1*

*CYP2E1* 的代谢底物较多, 其中大部分为前毒物和前致癌物, 少部分为药物。该基因也具有基因多态性。在中国人群中主要发现两种该基因的突变体, 即 *CYP2E1\*2* 和 *CYP2E1\*3*。 *CYP2E1\*2* 表现为 c.227G>A 突变, 并引起氨基酸 p.Arg76His 的改变, 进而导致其酶活性降低。 *CYP2E1\*3* 则表现为 c.1165G>A 突变, 并引起氨基酸 p.Val389Ile 改变的产生, 但对酶活性并无明显影响<sup>[22]</sup>。

#### 1.1.7 *CYP2D6*

研究表明 *CYP2D6* 酶参与临床上 20%~25% 的常用处方药的药物代谢<sup>[23]</sup>, 如异喹啉(肾上腺素能阻断药物)、司巴丁等。 *CYP2D6* 已知的等位基因变异超过了 90 个, 同样也具有基因多态性, 其中某些突变导致弱代谢表型的产生, 使代谢能力下降, 某些突变导致强代谢表型的产生, 使代谢能力增加<sup>[24]</sup>。

*CYP2D6* 的基因多态性具有种族和地区差异, 在高加索人和非洲人群中, *CYP2D6\*5* 的突变频率类似, 在东方人群中没有发现 *CYP2D6\*3* 和 *CYP2D6\*4* 突变的存在, 因此只有很少的慢代谢者。在中国人群和日本人群中发现了 *CYP2D6\*10* 突变体, 表现为氨基酸 p.Pro34Ser 突变的产生, 这是导致东方人 *CYP2D6* 酶活性降低的主要原因<sup>[25]</sup>。据统计东方人的 *CYP2D6\*10* 基因突变频率高达 50%, 而高加索人仅为 5%, 这是后者代谢率高于前者的重要原因<sup>[24]</sup>。

## 1.2 叶酸代谢关键酶

甲硫氨酸合酶还原酶(methionine synthase reductase, MTRR)和亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)等是叶酸代谢过程中的关键酶。叶酸相关代谢酶的编码基因同样也存在单核苷酸多态性, 例如常见的 *MTRR* 基因的 c.66A>G、*MTHFR* 基因的 c.665C>T 突变和 c.1286A>C 突变, 这些突变可能会影响其相应编码产物的活性, 进而影响叶酸的代谢<sup>[26]</sup>。

综上所述,细胞色素 P450 与叶酸代谢关键酶都具有遗传多态现象,其酶的活性存在明显的种族和个体差异。药物代谢酶的多态性是药物作用个体差异的分子基础,因此,从理论上讲,临床用药也应该根据其特点因人而异,实行个体化用药,而这要求我们首先要有简便、快速、较成熟的药物代谢酶基因的基因型鉴定技术,进而明确基因型与表型之间的关系,最终推动个体化用药的发展和实施。

## 2 药物代谢基因多态性研究的方法

药物代谢酶特别是细胞色素 P450 介导的药物代谢是药物体内代谢过程的关键环节,是机体药物暴露、潜在毒性以及发挥疗效的重要决定因素。加强相关药物代谢催化活性分析研究,对于揭示药物的代谢调控机制、生物氧化机理以及新药筛选评价的新方法和新技术的发展具有十分重要的理论和现实意义。随着药物代谢相关基因结构与功能研究的深入,相关的交叉学科和新技术的引入与融合,促进了药物代谢细胞色素酶催化活性检测技术研究的快速发展。近年来在药物代谢产物及其结构分析方面有了长足的发展,气相色谱法(gas chromatography, GC)、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)和毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)都可以用来检测药物的代谢产物。如果体内代谢产物的含量较高,首先可以累积制备相应代谢产物,然后借助核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)的方法对其结构进行分析。目前质谱法药物分析应用广泛,特别是色谱与质谱联用,为药物代谢产物的分离、鉴定提供了快速、有效的分析手段。

国外所报道的有关药物代谢相关基因多态性的资料多为西方人群资料,而中国人群相关数据知之甚少。随着药物基因组学和基因检测技术的发展,通过对中国人群重要药物代谢酶基因多态性的系统性分析,发现了很多潜在的功能性多态位点,建立起中国人群药物代谢酶基因多态性检测技术,对常见的药物代谢相关基因多态位点的检测以及针对这些多态性位点建立个性化用药技术具有重要的意义。林莉等<sup>[27]</sup>曾利用实时荧光 PCR 法检测 DPYD\*9 等位基因的单核苷酸突变,对 PCR 产物进行熔解曲线分析以确定基因型,虽然这种方法通用性好而且价格较低,但是从质粒

DNA 标准品的构建到设计引物再到荧光定量 PCR 以及 Sanger 测序验证,实验操作复杂。娄莹等<sup>[28]</sup>利用直接测序法检测 VKORC1、CYP2C9 等 6 种基因多态性对中国汉族人群华法林稳定剂量的影响,结果发现 VKORC1-1639G>A、CYP2C9\*3,是影响中国人华法林稳定剂量的最主要的遗传因素,检测上述 2 种基因多态性对指导华法林个体化用药有一定的临床意义。

目前在检测药物代谢基因多态性方面,人们倾向于采用限制性片段长度多态性和聚合酶链式反应的方法。2010 年李宗吉等<sup>[29]</sup>利用该技术对宁夏回族人群 CYP3A4\*6 等位基因多态性进行了研究,证实了在宁夏回族人群中 CYP3A4 基因的第 9 号外显子区有突变存在,其等位基因的突变频率为 0.005。限制性片段长度多态性聚合酶链反应(polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)比较成熟,但是由于更多高效的方法被开发,现在仅在一些经济条件较一般的实验室应用。该技术的优点是操作简单、特异性高、重复性好,且能对未知点突变进行分析,但是对于已知序列的点突变而言则操作起来并不是十分简便,因为并不是所有的突变位点都可以与其邻近碱基构成酶切位点,而某些内切酶价格特别昂贵也会大大增加检测成本,现在大多是结合其他方法进行点突变筛查<sup>[30]</sup>。

在药物基因组学研究的初期阶段,建立快速、高通量、准确的基因多态性检测和基因分型技术是对大量受试人群进行筛查、对群体样本进行统计以及对基因功能进行分析的关键。基因芯片技术是近年发展起来的一种程序化、自动化、规模化的分析基因结构与研究基因表达的新型技术,可同时进行多位点、多基因的多态性分型检测,具有灵敏度高、信息容量大等特点,因此在基因分型方面有一定的应用和发展空间。但其缺点是芯片造价成本较为高昂,并不能广泛使用于临床检验。

DNA 测序技术从以 Sanger 法为代表的第一代测序技术发展到如今的高通量测序(high-throughput sequencing, HTS)技术<sup>[31]</sup>,经历了曲折而漫长的发展过程。随着基因诊断技术的迅速发展,对大规模的基因组进行更加精细化的研究成为一种客观需要,这就要求对基因组进行深度以及重复测序,这时具有低成本、高通量、高自动化程度等特征的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<sup>[32]</sup>。这种高通量的测序技术不仅可以一次并行测定几十万到几百万条DNA分子的序列,而且读长一般较短。该技术极大地促进了胎儿游离DNA(cell free fetal DNA)的实验室研究,促进了无创性产前基因诊断的发展。目前基于NGS平台,建立胎儿21、18、13三体综合征的产前基因诊断技术已应用于临床,其他如性染色体非整倍体、双胎妊娠染色体非整倍体、胎儿染色体结构异常疾病、孟德尔单基因病以及妊娠相关疾病的研究也因NGS的出现获得了显著的进步。该技术还具有挖掘信息多的特点,因其采用了多通道测序,能反应丰富的物种信息,加之愈发丰富的各种数据库,能直接反应出代谢情况及信号通路等。杨琳、卢宇蓝等<sup>[33]</sup>为探讨阿司匹林药物相关基因位点在不同种族人群中位点基因频率差异,采用高通量核苷酸测序技术对人类阿司匹林遗传多态基因位点进行全外显子组测序,检测数据共涉及38个阿司匹林药物相关的多态性位点,共33个基因。其中10个变异位点(26%)影响药物有效性;28个变异位点(74%)影响药物毒性和(或)不良反应。另外杨琳、董辰等<sup>[34]</sup>采用全外显子组测序的方法,对12个基因中27个药物相关的多态性位点进行检测,探讨了华法林药动和药效相关基因位点的人群频率差异,为华法林药物基因组学研究提供了基础数据。由此可见,在药物代谢基因多态性检测中应用高通量测序技术是可行的,而且将是一种趋势。虽然目前该方法在药物代谢基因多态位点的检测中还没有得到广泛的应用,但是随着高通量测序技术的发展,它给人类带来的方便以及福利不断地展现出来,而且已经成为临床诊断和科研的热点,药物基因组学的快速发展、特别是药物代谢机理的阐明都需要这样的技术来推动,相信不久的将来,高通量测序在CYP450等药物代谢基因多态性的研究中将会占有一席之地。

### 3 前景展望

从第一代Sanger测序法的问世,到如今各种高通量测序技术被广泛应用,海量的遗传奥秘陆续被揭开,而且测序技术一直向着耗资少、速度快、准确

率高以及高通量的方向发展。测序技术不断地给生命科学和生物医学研究领域带来新的突破与发现。基因检测成为临床诊断和科学研究的热点,得到了突飞猛进的发展,不断涌现出越来越多的科研和临床新成果。而且,基因检测已经从单一的遗传疾病范畴扩展到复杂疾病和个体化应用等更加广阔的领域,其临床检测范围包括遗传疾病的诊断和基因携带的检测以及基因药物检测,应用范围也不断扩大,目前可用于指导个体化用药等诸多方面的研究。随着药物基因组学和遗传药理学的深入研究与发展,药物代谢机理和途径及其相关的遗传学基础得以阐明,患者的药物代谢相关遗传信息可通过高通量的半导体测序快速、高效的获得,并被存储备份由本人保管。在患者就医过程中,医生可根据患者携带的药物代谢相关的基因型资料,分析患者的药物基因多态性,并提供合理的药物选择以及给药剂量,使给药方案更加合理并具有更强的可实施性。这样医生就可以科学地有根据地决定该使用哪种药物,使用剂量如何,使治疗效果达到最佳。与此同时可以不必采取事后补救措施来弥补药物不良反应带来的恶果,从根本上预防和降低药物的不良反应的发生,最大限度地减轻患者的痛苦和经济负担。因此药物相关的基因检测,将会推动药物治疗向着安全性和有效性的方向发展。需要注意的是应用高通量测序的手段进行药物代谢相关基因多态性检测时,必须使测序的反应条件及体系标准化,同时做好质控,避免出现不必要错误。

### 参考文献

- [1] Pelkonen O. Prediction of drug metabolism and interactions on the basis of in vitro investigations [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2005, 96(3):167-175.
- [2] ZHU LY, SHEN H, WU Jie. Effects of Radix Glycyrrhizae on in vitro liver metabolism of aconitine evaluated by LC-MS/MS [J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(11):1923-1928.
- [3] 王丽,徐小微. 药物相关基因检测对临床合理用药的指导意义[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(21):1865-1868.
- [4] 魏春燕,吴逢波,徐珽. CYP450与药物相互作用[J]. 中国药业, 2014, 23(6):17-19.
- [5] 成碟,徐为,刘昌孝. 细胞色素P450(CYP450)遗传多态性研究进展[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(12):1409-1414.

- [6] 王黎青. 中国人群 CYP1A2、CYP2E1、CYP3A4 基因多态性与茶碱体内清除率的相关性研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
- [7] 吴秀君, 郭涛. 细胞色素 P450 2C8 基因多态性及其对药物代谢影响的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2013, 29(3):234-237.
- [8] Nebot N, Crettd S, d'Esposito F, et al. Participation of CYP2C8 and CYP3A4 in the N-demethylation of imatinib in human hepatic microsems[J]. Br J Pharmacol, 2010, 161(5):1059-1069.
- [9] Pechandova K, Buzkova H, Matouskova O, et al. Genetic Polymorphisms of CYP2C8 in the Czech Republic [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2012, 16(7):812-816.
- [10] Glowka F, Karaaniewicz-Lada M, Grzeskowiak E, et al. Clinical pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers in wild type of CYP2C8 and CYP2C9 patients with rheumatoid arthritis[J]. Eur J Drug Metab Pharmacokin, 2011, 36(3):167-173.
- [11] 陈琿, 蔡泓敏, 冯端浩, 等. CYP2C9 和 CYP2C19 基因多态性对药物代谢的影响及个体化用药研究进展[J]. 中国药物应用与监测, 2014, 11(4):240-243.
- [12] Yoon YR, Shon JH, Kim MK, et al. Frequency of cytochrome P4502C9 mutant alleles in a Korean population [J]. Br J Chin Pharmacol, 2001, 51(3):277-280.
- [13] 陈骥, 王睿. 药物代谢酶细胞色素 P450 2C9 研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(6):601-606.
- [14] De Morales SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, et al. The major ge-netic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans [J]. J Biol Chem, 1994, 269(22):19-22.
- [15] 兰冰, 康龙丽. 细胞色素 P4502C19 遗传多态性的研究进展[J]. 国外医学:医学地理分册, 2015, 36(2):159-164.
- [16] 魏晓冬, 张峰, 李娟, 等. CYP3A4 基础与临床研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(11):2180-2182.
- [17] 陈欣, 李玉珍, 方翼. CYP3A4 代谢药物的特点及其多态性的研究现状[J]. 中国药房, 2010, 21(22):2097-2099.
- [18] Hsieh KP, Lin YY, Cheng CL, et al. Navel mutations of CYP3A4 in Chinese[J]. Drug Metab Dispos, 2001, 29(3):268-273.
- [19] Dai D, Tang J, Rose R, et al. Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 299(3):825-831.
- [20] Qiu XY, Jiao Z, Zhang M, et al. Association of MDR1, CYP3A4\*18B and CYP3A5\*3 polymorphisms with cyclosporine pharmacokinetics in Chinese renal transplant recipients [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2008, 64(11):1069-1084.
- [21] Hustert E, Haberl M, Burk O, et al. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism [J]. Pharmacogenetics, 2001, 11(9):773-779.
- [22] Hu Y, Osearson M, Johansson I, et al. Genetic polymorphism of human CYP2E1: characterization of two variant alleles [J]. Mol Phamacol, 1997, 51(3):370-375.
- [23] 王槐. CYP2D6 基因多态性在维吾尔族中的分布频率及体外代谢活性差异分析[D]. 北京: 中央民族大学, 2013.
- [24] Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data [J]. Drug Metab Rev, 2002, 34(1/2):83-448.
- [25] 韩璐, 刘洁. CYP2D6 基因多态性及对药物代谢的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(1):105-110.
- [26] 陈坤, 宋亮, 金明娟, 等. 叶酸代谢酶基因多态与结肠癌易感性的关系[J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(6):429-432.
- [27] 林莉, 苏红, 邹德勇, 等. 实时荧光 PCR 法检测 DPYD\*9 等位基因的单核苷酸突变[J]. 军事医学科学院院刊, 2006, 30(3) 233-236.
- [28] 姜莹, 韩璐璐, 李彦, 等. 六种基因多态性对中国汉族人群华法林稳定剂量的影响[J]. 中华医学遗传学杂志, 2014, 31(3):367-371.
- [29] 李宗吉, 王健, 王惠成, 等. 宁夏回族人 CYP3A4\*6 等位基因多态性的研究[J]. 宁夏医科大学学报, 2010, 32(1):30-32.
- [30] Hong Y, Liu T, Hofacre C, et al. A restriction fragment length polymorphism-based polymerase chain reaction as an alternative to serotyping for identifying Salmonella serotypes [J]. Avian Dis, 2003, 47(2):387-395.
- [31] 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.
- [32] 郭奕斌. 基因诊断中测序技术的应用及优缺点[J]. 遗传, 2014, 36(11):1121-1130.
- [33] 杨琳, 卢宇蓝, 王慧君, 等. 基于 620 份全外显子组数据的阿司匹林药物基因组学分析[J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(5):332-336.
- [34] 杨琳, 董辰, 王慧君, 等. 儿童华法林药动和药效相关基因型频率和通路富集研究[J]. 中国循证儿科杂志, 2016, 11(1):34-37.

# 体外诊断试剂临床试验核查要点解析

王嘉明 高旭年\*

国家食品药品监督管理总局根据《医疗器械监督管理条例》、《医疗器械注册管理办法》(食品药品监管总局令第4号)、《体外诊断试剂注册管理办法》(食品药品监管总局令第5号)、《医疗器械临床试验质量管理规范》以及体外诊断试剂临床试验技术指导原则等相关要求,制定了《医疗器械临床试验现场检查要点(2016年)》。2016年6月8号,国家食品药品监督管理总局发布了总局关于开展医疗器械临床试验监督抽查工作的通告(2016年第98号),通告指出国家食品药品监管总局将按照《医疗器械临床试验现场检查要点(2016年)》里的检查内容,采用回顾性检查的方式,对国家食品药品监管总局在审医疗器械注册申请中2016年6月1日前开展的临床试验项目实施抽查,第一批次的抽查于2016年6月至2016年10月开展。

《医疗器械临床试验现场检查要点》(2016年)里的第二部分是关于体外诊断试剂临床试验的现场核查要点,故新开展体外诊断试剂临床试验需根据该部分内容来规范试验整个过程,做到符合检查要求。本文将对体外诊断试剂临床试验核查要点的内容进行简要解析。

## 1 临床试验机构选择要求

### 1.1 所需资质

因目前国家还未设立专门的医疗器械临床试验机构,故开展体外诊断试剂临床试验时,需选择药物临床试验质量管理规范(good clinical practice, GCP)资质在有效期内的医疗卫生单位(GCP资质可于国家食品药品监督管理总局的网站 <http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL0001/>上

www.sfda.gov.cn/WS01/CL0001/上查询),或至少为省级医疗卫生单位(特殊使用目的体外诊断试剂,可于市级以上疾病预防控制中心、专科医院或检验检疫所、戒毒中心等单位开展)。

### 1.2 所需条件

临床试验单位应具有相适应的专业技术人员、仪器设备、场地等,除特殊使用目的体外诊断试剂外,临床试验都应于相适应的临床科室开展,以确保整个临床试验能够有效顺利开展。

## 2 伦理审查方面要求

根据法规要求(特殊使用目的的体外诊断试剂,可能涉及到于市级以上疾病预防控制中心、专科医院或检验检疫所、戒毒中心等试验单位开展的情况,这些单位可能未设有伦理委员会,未能开展伦理审查。该情况在确保于受试者几乎没有风险的前提下可出具无伦理委员会的说明及免除伦理审查的申请),开展临床试验均需通过伦理委员会的审查并取得伦理审查批件。

## 3 临床试验备案方面要求

所有临床试验于试验开展前,申办者需向其所在地的省食品药品监管局进行临床试验备案(备案需填写备案申请表并将所有临床试验机构的伦理审查批件及临床试验协议的复印件作为附件提交)，“国家食品药品监督管理总局关于医疗器械临床试验备案有关事宜的公告(2015年第87号)”的附件1为备案申请表。

基金项目：“863”计划重点项目(2011AA02A101);广州市科技计划(2014Y2-00220)

作者单位:中山大学达安基因股份有限公司产品注册与知识产权部,广东,广州 510065

\*通讯作者:高旭年, E-mail:gaoxunian@126.com

## 4 临床试验前准备要求

### 4.1 试验方案

在试验前要保证所有临床试验单位所使用的方案的一致性。国家食品药品监督管理总局发布的体外诊断试剂临床试验技术指导原则对临床试验方案的内容有要求,建议在方案设计中尽量包含对试剂盒的各项指标的验证。

### 4.2 操作培训

根据方案制定相关标准操作规程,对参加试验的所有研究者进行临床试验方案及试验用体外诊断试剂使用的培训,进行培训记录。

### 4.3 文件物品

向临床试验单位移交试验用体外诊断试剂及相关文件物品。例如:试验用考核试剂盒、对照试剂盒、相关配套仪器、相关试验耗材等等。

## 5 知情同意方面要求

根据经验,大多数体外诊断试剂的临床试验是可以免知情同意的(需向伦理委员会提交免除知情同意的申请),对于特殊用途体外诊断试剂的情况(例如检测人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV),肺结核(tuberculosis, TB)等国家有严格控制的样本或需要为试验额外收集)、经临床试验机构伦理委员会审查得出需签署知情同意的情况,则需要签署知情同意书。

## 6 临床试验实施方面要求

### 6.1 预实验

正式开展临床试验前需进行临床试验的预试验,以保证临床试验工作人员确实掌握试验用体外诊断试剂及相应仪器的操作方法、技术性能等,并验证试验单位是否满足试验条件等。

### 6.2 试验记录

临床试验操作人员需严格按临床试验方案进行试验并记录临床试验的原始数据、病例报告表等。

### 6.3 试验监察

申办者需委派监察员对临床试验的全过程实施监查,并出具监查记录报告。建议体外诊断试剂的监查一般在试验开始前期、中期、末期各进行一次监查即可,具体可根据临床试验实际情况制订。

### 6.4 数据统计

临床试验统计分析人员(可为第三方统计单位亦或为临床试验参加人员)需按照方案规定的方法完成对临床试验数据的统计分析,可根据实际需要增加统计内容但方案中规定的统计要求需做到。

## 7 临床试验数据管理要求

### 7.1 试验样本

临床试验样本收集过程中应记录病例筛选入选情况并保证样本的筛选、入选及完成例数与临床试验报告中的信息相符,保证入选的为方案规定要求的样本,进行筛选入选的病例应具有可溯源性,保证样本的真实性。

### 7.2 试验数据

临床试验过程中生成的检测报告或结果中的数据需保证可溯源性,保证检测报告或结果中的数据真实有效并可追溯到原始上机文件等。

### 7.3 设备记录

临床试验单位的仪器设备应保存有使用记录,使用记录应与临床试验相吻合。使用记录建议至少保存至完成临床试验后10年。

临床试验数据管理要求是对临床试验能够还原再现的规定,所有的临床试验过程均需做好相关记录。

## 8 试验用试剂物品管理要求

### 8.1 检验报告

根据法规要求,体外诊断试剂应先取得具备资质的检测机构(例如:中国食品药品检定研究院等)出具的结论合格的产品检验报告后,才能于临床试验单位开展临床试验。

### 8.2 相关记录

在临床试验开始前,与试验单位进行试验用试剂交接时需留有交接记录、运输记录等,试验单位在进行临床试验时需留有对试剂的保存记录、使用登记记录等,试验完成后试验单位需留有未使用的剩余试剂退回记录及试验用掉的试剂销毁或处理记录等。相关记录建议至少保存至完成临床试验后10年。

### 8.3 说明书要求

保证试验用试剂物品的运输条件、储存温度、储存条件、储存时间、安全有效期等符合试剂说明书的要求。

## 9 临床试验用样本管理要求

### 9.1 样本记录

试验用样本需有样本来源记录、编盲记录、保存记录、使用记录、留存记录、销毁记录等,以保证整个临床试验过程中所使用的样本符合临床试验方案的要求。

### 9.2 重复使用

试验用样本除有特殊情况外不建议重复使用。

## 10 递交申报的资料要求

保证申报注册时,申报所使用的临床试验方

案、临床试验报告、数据汇总表等相关临床试验资料与临床试验机构所保存的资料的一致性,不得擅自进行修改。

## 11 总结

本文是对《医疗器械临床试验现场检查要点》(2016年)中第二部分体外诊断试剂的临床试验核查要点内容进行简要解析,该部分内容规范了整个体外诊断试剂的临床试验过程,以确保整个临床试验能够在规范、条理、完善、真实的情况下开展,使体外诊断试剂的临床试验有一个完善的法规指导和要求。

(上接第 352 页)

### 参考文献

- [1] Labrie F, Martel C, Bélanger A, et al. Androgens in women are essentially made from DHEA in each peripheral tissue according to intracrinology [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 168:9-18.
- [2] Cinar N, Harmanci A, Aksoy DY, et al. Adrenocortical steroid response to ACTH in different phenotypes of non-obese polycystic ovary syndrome [J]. *J Ovarian Res*, 2012, 5(1):42.
- [3] Köşüş N, Köşüş A, Kamalak Z, et al. Impact of adrenal versus ovarian androgen ratio on signs and symptoms of polycystic ovarian syndrome [J]. *Gynecological Endocrinology*, 2012(8):611-614.
- [4] Cinar N, Cetinozman F, Aksoy DY, et al. Comparison of adrenocortical steroidogenesis in women with post-adolescent severe acne and polycystic ovary syndrome [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2015, 29(5):875-880.
- [5] 金丕焕,陈峰. 医学统计方法[M]. 3版,上海:复旦大学出版社,2009,11:25.
- [6] Caron P, Turcotte V, Guillemette C. A chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous profiling of ten endogenous steroids, including progesterone, adrenal precursors, androgens and estrogens, using low serum volume [J]. *Steroids*, 2015, 104:16-24.
- [7] Zang T, Tamae D, Mesaros C, et al. Simultaneous quantitation of nine hydroxy-androgens and their conjugates in human serum by stable isotope dilution liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 165(Pt B):342-355.
- [8] 邓小艳,邓艳芹,胡雅君. 联合 LC-MS 和化学发光免疫法分析不同类型 PCOS 的雄激素水平 [J]. *现代妇产科进展*, 2017, 1(26):29-32.
- [9] 赵继学,王静岩. 观察化学发光免疫法在肿瘤生物标志物检验中的运用效果 [J]. *中国继续医学教育*, 2017, 9(1):66-67.
- [10] 黄良欣. 化学发光法检测血清胰岛素、C 肽的临床效果评价 [J]. *临床医学研究与实践*, 2017(1):93-95.
- [11] 李凌云,郭振秀,王岩,等. 化学发光免疫法对甲状腺激素及其抗体检测的临床价值探讨 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2016, 16(12):12-13.

## 广东省中医院检验医学部

广东省中医院(广州中医药大学第二附属医院)检验医学部(以下简称检验医学部)是一个集医、教、研于一体的综合性医学实验室,下设总院检验科、二沙岛医院检验科、芳村医院检验科、大学城医院检验科、医学校准实验室等科室。2004年二沙岛医院检验科成为国内首家通过ISO/IEC 17025检测实验室认可的医院检验科;2005年总院、二沙岛医院和芳村医院的检验科同时通过了ISO 15189医学实验室认可;2010年大学城医院检验科通过医学实验室认可。2013年医学校准实验室成为国内首批通过ISO/IEC 17025认可的校准实验室并获得ISO 15195医学参考实验室认可;2016年校准实验室进入国际检验医学量值溯源联合委员会(Joint Committee on Traceability on Laboratory Medicine, JCTLM)参考测量服务列表,并于同年10月正式成为JCTLM成员单位。

检验医学部有各类专业技术人员156人,其中博士15人(含博士后4人),硕士56人;正高职称13人(正教授1人,研究员2人),副高职称31人;医学实验室认可主任评审员5人,技术评审员15人。检验医学部总面积超过7000平方米,开展检测项目数超过500项,2016年为临床提供检测近5000万项次。科室配置有生化免疫流水线、血细胞分析流水线、全自动微生物分析系统、VITEK MS质谱仪、SCIEX API5500和Waters TQ-S高效液相色谱串联质谱联用仪、流式细胞仪等大型仪器设备。

检验医学部以临床检验标准化、细菌耐药机制及细菌分类学研究、代谢病的早期实验诊断与发病机制、疾病实验室风险评估及个体化分子诊断等为研究方向。近5年来,承担国家自然科学基金、“863”计划子课题和十一五、十二五、十三五课题,以及省自然科学基金等科研课题115项。目前,在研国家自然科学基金共7项,在研省部级科研课题23项。获国家食品药品监督管理局生产批文1项;国家发明与实用新型专利6项,制定国家标准1项、国家计量标准3项,参与制定国家卫生标准15项,参与研制标准物质5项。近5年发表学术论文300多篇,SCI收录40余篇。主编教材1本,副主编教材2本,参编教材5本;主编专著11本,副主编和参编专著多本。获广东省科技进步二等奖2项、三等奖2项,中华中医药学会科学技术二等奖1项,广州市级科技进步奖三等2项,广州中医药大学科技一等奖1项、二等奖1项。检验医学部目前有博士生导师3人,硕士生导师8人。近3年已培养博士生5名和硕士生28名;在读硕士研究生9名,博士研究生3名,博士后3名。

学术带头人庄俊华,担任中国中西医结合学会检验医学专业委员会名誉主任委员,中华中医药学会检验医学分会名誉主任委员,全国卫生产业企业管理协会医学检验专家委员会副主任委员等学术职务。目前的研究方向为临床检验标准化和实验室管理、类风湿关节炎的发病机制与早期实验诊断。



### → 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

### → 多元化产品系列



### → 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。



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