课题研究·论著

羊水细胞高通量测序与染色体核型分析在产前诊断中的应用研究

何 冰，黄 莉，张 鹏，王世凯，黄悦悦，莫伟英，薛林涛，田 矛，莫耀禧，成俊萍，梁 羽，陈 浩

基金项目：广西科学研究与技术开发计划课题(编号:桂科攻1140003B-66)；广西自然科学基金资助项目(编号:2011GXNSFA018302)；广西卫计委科研课题(编号:Z2014225;Z2014193)

作者单位：530021 南宁,广西壮族自治区人民医院生殖医学与遗传中心(何 冰,黄 莉,张 鹏,王世凯,黄悦悦,莫伟英,薛林涛,莫耀禧,成俊萍),产科(田 矛)；518083 深圳,华大基因研究院(梁 羽,陈 浩)

作者简介：何 冰(1966-),女,研究生学历,学士学位,主任医师,研究方向:生殖医学。E-mail:hb268@sina.com

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

[摘要] **目的** 通过高通量测序技术(即下一代测序技术,next generation sequencing,NGS)检测孕妇羊水细胞DNA,与染色体核型分析进行对比,探索NGS在羊水细胞产前诊断中的应用价值。**方法** 选取孕龄在18~24周之间的高龄妊娠、唐氏综合征生化筛查高风险和(或)彩超显示胎儿异常并同意产前诊断的孕妇101例,抽取孕妇羊水,提取羊水细胞DNA,制备测序文库,应用Ion Proton测序仪检测,所得的DNA序列与人类DNA参考数据库比对并作统计分析,并与同一样本染色体核型分析进行对照分析。**结果** 101例羊水样本处理后经NGS技术检测判定2例染色体数目异常,37例染色体片段缺失/重复;羊水细胞培养检出2例染色体数目异常,2例9号染色体臂间倒位,2例多态性。**结论** 利用高通量测序技术检测孕妇羊水中DNA诊断胎儿染色体数目异常,其特异性与染色体核型分析技术具有较高的一致性,并可检测出缺失/重复。染色体核型分析技术与高通量测序技术相结合在检测出生缺陷上具有较好的临床实际应用价值,并可进一步展开对疾病候选基因的研究。

[关键词] 高通量测序； 羊水细胞； 染色体； 核型分析

[中图分类号] R 714.5 [文献标识码] A [文章编号] 1674-3806(2015)12-1113-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2015.12.01

A comparative study of high-throughput sequencing technology and in situ culture for prenatal diagnosis of amniotic fluid cells *HE Bing, HUANG Li, ZHANG Peng, et al. Reproductive and Genetic Center, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning* 530021, *China*

[**Abstract**] **Objective** To explore the application value of high-throughput sequencing technique(next generation sequencing, NGS) in prenatal diagnosis by using NGS to test fetal free DNA in maternal amniotic fluid. **Methods** The amniotic fluid samples from 101 pregnant women were collected. Their gestational age was between 18 and 24 weeks and had high risks of Down syndrome and/or fetal abnormalities shown by color Doppler ultrasound. The amniotic fluid samples were drawn from the pregnant women and their amniotic fluid DNAs were extracted for preparing a sequencing library. By using Ion Proton, high-throughput sequencing procedure was carried out. The sequencing data were compared with the human reference gene-database and statistically analyzed. Simultaneously, the amniotic fluid was also collected for the chromosome karyotype analysis which compared with the NGS. **Results** By NGS, in 2 out of 101 cases showed chromosomal numerical abnormality, 37 cases of chromosome fragment deletion/duplication. By the standard of chromosomal karyotypic analysis, 2 cases showed chromosomal numerical abnormality, 2 cases showed chromosome 9 inversion, 2 cases showed chromosome polymorphism. **Conclusion** The NGS tested for chromosomal numerical abnormality in the maternal amniotic fluid has the same sensitivity and specificity as the chromosome karyotype analysis and can detect micro-deletion/duplication. The combination of chromosome karyotype

analysis and high throughput sequencing technology has good clinical application prospects in the detection of birth defects.

[**Key words**] High-throughput sequencing technique; Amniotic fluid cells; Chromosome; Karyotype analysis

我国每年大约有 100 万新生儿患有出生缺陷，占新生儿的 5%[1]。出生缺陷会造成人口素质降低并给家庭和社会带来巨大负担。产前诊断是指先天性疾病或遗传性疾病在胎儿期的诊断，是利用非侵入性或侵入性手段对胎儿进行的特异性检查[2]，是预防出生缺陷的有效手段。本研究应用高通量测序技术(NGS)对 101 例高龄高危孕妇羊水细胞进行全基因组测序，并与原位培养染色体核型分析比较，探索 NGS 在羊水细胞产前诊断中的应用价值。现报道如下。

1　对象与方法

1.1　研究对象　选择 2014-03 ~ 2014-05 在广西壮族自治区人民医院就诊的高龄妊娠(年龄≥35 岁)和(或)唐氏综合征生化筛查高风险和(或)彩超显示胎儿异常的孕妇共 101 例作为研究对象，年龄 22 ~ 43(32.8 ±5.0)岁，孕龄 18 ~ 24 周。所有参与者均签署知情同意书。

1.2　实验方法

1.2.1　样本制备　羊水穿刺采用 B 超定位，用穿刺针在无菌条件下经腹行穿刺术，取羊水 30 ml，2 000 转离心 7 min 后弃去上清液。细胞悬液接种于 3 个细胞培养瓶中，置 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中，7 d 换液，每天观察细胞生长情况。当羊水细胞贴壁生长旺盛，倒置显微镜下可见 8 ~ 10 个细胞克隆形成，24 h 后收获细胞。

1.2.2　羊水细胞核型分析　常规制片 G 显带。核型计数不少于 15 个分裂相，异常核型计数 30 个分裂相以上，分析 3 ~ 5 个核型。根据《人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN)(2005)》描述染色体异常核型。

1.2.3　羊水样品 DNA 的提取　将 5 ~ 8 个克隆(平均 0.25 cm^2/克隆)的羊水细胞采用 QIAamp DNA Mini kit(Qiagen)试剂盒提取 DNA，用 TE 溶液洗脱 DNA，Qubit 2.0 定量，1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。

1.2.4　文库制备和 DNA 测序　将羊水 DNA 样本用 bioruptor UCD-200(Diagenode)打断成主带在 150 bp 的小片段。打断后样品用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 主带位置。合格的打断样品用 T4 DNA 聚合酶(T4 DNA Polymerase)、克列诺片段(Klenow Fragment)和 T4 多聚核苷酸激酶(T4 PNK)对片段末端进行修复，再用 T4 DNA 连接酶(T4 DNA ligase)将特异性接头连接在 DNA 片段上，通过 PCR 技术扩增带有接头的目的片段，产生两端有 Ion Torrent 接头的测序 DNA 片段的文库。制备后文库使用 Agilent 2100 Bioanalyzar 检测文库大小及产量，并用 QPCR 检测文库产量。随后将文库片段克隆到离子微球颗粒上并进行乳液 PCR 扩增，将表面带模板的离子微球颗粒转移到 Ion 芯片，通过短暂的离心将离子微球颗粒沉淀到芯片的微孔中，然后将芯片放置在 Ion Proton 测序仪(Life Technologies)上对 101 例样本进行高通量测序。样本 reads 数在 3.3 ~ 9.8 (5.1 ±1.8)M。样本的数据量在 1.4 ~ 4(2.1 ±0.5)G。Q20 的 reads 所占比例在 64.8 ~ 84.6(76.7 ±4.4)%。测序数据有效可用，与参考序列进行比对以后，基因组平均覆盖度为 2.54%，平均深度为 1.16X。所有样本均可以用于染色体数目及微小异常的检测。

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

2　结果

2.1　羊水染色体核型分析结果　101 例羊水进行染色体检测，染色体异常检出率为 1.98% (2/101)(除外染色体多态性以及 9 号染色体臂间倒位)，均为染色体数目异常。

2.2　NGS 结果　根据测序及统计每条染色体的唯一序列片段所得出的结果分析，染色体异常检出率为 1.98% (2/101)，与羊水染色体核型分析染色体

异常一致,其中1例45,X(1/101,0.99%)(见图1,2)和1例47,XX,+18(1/101,0.99%)(见图3,4);测出14例染色体片段缺失(包括45,X)(14/101,13.86%),23例染色体片段重复(包括18-三体)(23/101,22.77%)。

图1 样本A染色体核型图

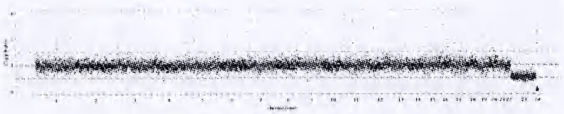

图2 样本A染色体拷贝数散点图

图3 样本D染色体核型图

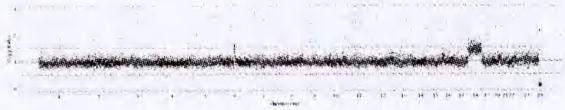

图4 样本D染色体拷贝数散点图

2.3 羊水细胞核型及NGS结果对比 羊水细胞原位培养染色体核型分析与NGS检出结果一致(样本A 45,XO)、(样本D 47,XX,+18),均行胎儿引产。NGS未检出的2例9号染色体臂间倒位(样本B和样本C)和2例染色体多态性(样本E和样本F),出生儿均健康。见表1。

表1 羊水细胞核型及NGS结果对比

样 本	核型分析	测序结果	结局
A	45,XO	45,XO	胎儿引产
B	46,XX,inv(9)	46,XX	出生儿健康
C	46,XY,inv(9)	47,XY	出生儿健康
D	47,XX,+18	47,XX,+18,6q14.1-q14.2(78400395-83908352)x3	胎儿引产
E	46,XY,15ps+	46,XY	出生儿健康
F	46,XY,1qh+	46,XY	出生儿健康

3 讨论

3.1 羊水细胞是来自胎儿的脱落细胞,具有相同的遗传信息,通过检测羊水细胞遗传信息能够非常准确地反映胎儿的遗传学状态。中期妊娠的胎儿产前诊断一般通过羊膜穿刺术,采取羊水细胞进行遗传学检查,对染色体、性连锁隐形遗传、先天性代谢疾病做出产前诊断[1]。目前,羊水细胞染色体核型分析仍然是产前诊断的主要途径。染色体核型分析能很好地检测出整条染色体异常或大范围的染色体变异,但对于较小的重复和缺失核型分析通常不能发现。一般认为10 M以下的变异在常规G带分析中无法检测到,而测序检测能够非常精确判断。引起遗传性疾病的分子机制有多种,常见的有点突变、小片段插入/缺失突变、拼接位点突变、外显子缺失/重复突变、基因重复和复杂重排及基因拷贝数异常等,如心血管系统的先天性心脏病[3]、生殖系统的男性无精子症和少弱精子症[4]、神经系统的智力障碍和孤独症[5]、胎儿颅内间隙异常[6]、迟发型脊椎骨骺发育不良[7]、先天性唇腭裂[8]以及地中海贫血[9]等的病因均为染色体微缺失或微重复。现代高通量基因检测技术,例如生物芯片和新一代测序技术,发现了大量与出生缺陷和生殖障碍疾病相关的遗传学和基因组变异,体现了生命科学、生物医学、信息学、计算数学的交叉和融合的强大生命力[10],可对几十万至几百万个DNA分子进行同时测序,使得对一个物种的转录组和基因组进行细致全貌的分析成为可能。通过改变测序深度,可以对染色体不同大小的缺失/重复进行检测,由此可诊断由染色体微缺失/微重复引起的不明原因流产及胎儿多发畸形。测序技术能很好地检测出微小的染色体异常,诊断耗时短,而且基因功能相关信息是当前用于疾病基因预测信息资源中最具有预测效力的数据,通过对基因

的分析，可以提前预知疾病，从而进行医学干预。

3.2　本研究101例羊水样本中NGS检测到染色体异常率为1.98%，与染色体核型分析结果一致。有4例存在差异即2例9号染色体臂间倒位和2例多态性，NGS未能检测出。一般认为，染色体异染色质区的多态性改变不会导致临床疾病[11]，这在测序中的对应解释就是异染色质区域多数为高度重复DNA序列，并不包含可表达的基因，出现在此区域的染色体变异为重复序列的DNA增减造成，并不表现出可知的临床症状[12]。9号染色体臂间倒位也是最常见的染色体结构改变，一般认为也是一种人群多态性改变，并不产生临床症状。但多数学者认为inv(9)与生殖失败有一定的关系，许多学者报道inv(9)和习惯性流产及生育畸形儿有关。近年对inv(9)结构的研究很多，inv(9)是一种多态现象，还是属结构异常，应从倒位的区带进行分析，即inv(9)其倒位是位于异染色质区内(即q12)，还是位于异染色质区外，如果在异染色质区内，则是由几乎不含编码的高度重复的DNA序列的增加或减少所致。因此inv(9)位于q12的次缢痕区属异染色质区内，它的遗传效应具有稳定性及家族性，不属结构异常。如果位于异染色质区外，属结构异常，则其遗传效应决定于重复或缺失片段的长短及其所含基因的致死效应，将导致流产、死胎或生育出缺陷儿。由于用细胞遗传学传统的G显带很难将inv(9)的区带明确定位分类。因此，inv(9)的倒位是发生在于异染色质区内，还是发生于异染色质区外，测序等技术可以进一步确定[13]。

3.3　与核型分析相比，高通量测序技术的特异性、敏感性与染色体核型分析技术具有较高的一致性，且能精确分析微小变异，同时受个人主观影响较小，结果重复性好。相比羊水核型分析，利用Proton测序进行分析理论上只需要3 d即可得到结果，在时间上有较大优势，由于不需要进行羊水培养，减少了羊水培养问题导致检测失败的可能性。在平衡易位/倒位的情况下，细胞内的核酸数量不出现变化，常规的测序技术无法检测出异常。虽然通过增加测序深度能够对平衡易位/倒位进行检测，但成本高昂，技术难度大，样本DNA质量要求高[14]，很难在临床上普及应用。染色体核型分析与高通量测序联合应用在提高出生缺陷检测率和预测疾病上有着相互补充的作用，具有较好的临床实际应用价值，并可进一步展开对疾病候选基因的研究。

参考文献

1　朱俊真，张　宁，彭彦辉. 产前诊断学[M]. 北京：中国科学技术出版社，2005：1－132.

2　边旭明，邬玲仟，姜玉新. 实用产前诊断学[M]. 北京：人民军医出版社，2011：187.

3　闫亚妮，吴青青，姚　苓，等. 胎儿先天性心脏病与染色体及22q11微缺失异常的临床研究[J]. 西安交通大学学报(医学版)，2014，35(2)：249－253.

4　丁显平，谢婷婷，魏　霞，等. 精子发生障碍患者Y染色体微缺失分子诊断[J]. 生殖与避孕，2006，26(3)：184－188.

5　钟　南，张　茜. 儿童孤独症的分子生物学研究进展[J]. 中国实用儿科杂志，2008，23(3)：165－167.

6　高　健，王方娜，马丽爽，等. 微阵列比较基因组杂交技术在产前诊断胎儿颅内间隙异常的应用[J]. 中国妇幼保健，2014，29(8)：1221－1224.

7　吕峻峰，麻宏伟. X-连锁迟发性脊椎骨骺发育不良遗传学研究进展[J]. 国外医学(遗传学分册)，2004，27(4)：245－247，240.

8　杨树楷，万伟东. 非综合征性唇腭裂的遗传学研究进展[J]. 东南大学学报(医学版)，2011，30(5)：801－809.

9　李世音，周　浩，秦海涛. 单基因遗传病与拷贝数变异的研究进展[J]. 医学综述，2014，20(16)：2881－2884.

10　刘嘉茵，吴柏林. 现代遗传学/基因组学在生殖医学领域的应用展望[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志，2014，33(3)：149－153.

11　Yuan Y, Jiang F, Hua S, et al. Feasibility study of semiconductor sequencing for noninvasive prenatal detection of fetal aneuploidy [J]. Clin Chem, 2013, 59(5):846－849.

12　Dunham I, Shinmizu N, Roe BA, et al. The DNA sequence of human chromosome 22[J]. Nature, 1999, 402(6761):489－495.

13　刘剑丽，时瑞兰. 91例染色体形态异常与妊娠不良结局分析[J]. 中国优生与遗传杂志，2012，20(9)：31－32.

14　Boland JF, Chung CC, Roberson D, et al. The new sequencer on the block: comparison of Life Technology's Proton sequencer to an Illumina HiSeq for whole-exome sequencing [J]. Hum Genet, 2013, 132 (10): 1153－1163.

[收稿日期　2015－07－13][本文编辑　黄晓红]