

CNV-seq 是否应成为产前诊断常规?

胡平 王艳 许争峰*

(南京医科大学附属妇产医院、南京市妇幼保健院 产前诊断中心,江苏 南京 210004)

【中图分类号】 R714.55

【文献标识码】 A

我国出生缺陷发生率约为 5.6%^[1],很大一部分是由染色体畸变所引起,主要包括染色体数目异常、大片段异常和染色体微缺失微重复。染色体畸变涉及多个基因,可引起多种组织和器官发育异常,绝大部分症状严重,且无有效治疗手段,受累终生,危害严重,产前诊断是现阶段预防染色体畸变的最重要手段。

有别于常规的出生后遗传病诊断,产前诊断有着明显的特点和困难。首先,由于在宫内,胎儿症状无法进行直接观察,也不能获得更多的辅助检查信息,导致很多重要的临床信息丢失;其次,胎儿发育异常或者畸形有着很强的遗传异质性,同一种表型可能涉及几十种染色体综合征;另外,很多染色体综合征临床表型有着不同的表现度或外显率,往往同一种综合征在胎儿期有着很大的表型差异,尤其是有些微缺失/微重复在胎儿时期临床表征一般较轻、线索很少,很容易漏诊。因此,高效、理想的产前遗传学诊断技术应包含以下技术特征:高分辨率、快速、全基因组检测,可同时检测基因组剂量变化和染色体结构变异。

核型和染色体微阵列分析(chromosomal microarray analysis,CMA)技术现已成为了产前诊断的一线技术。核型作为染色体畸变的金标准已使用多年,可检测大的结构变异和染色体数量变化,但是其分辨率低,小于 5~10M 就无法检测,费时费力,通量难以提升,且存在一定的培养失败风险。相比于核型分析,CMA 技术具有快速、准确、精准、客观、通量高的优势,可以检测出染色体数目异常、大

片段异常、微缺失微重复、单亲二倍体(uniparental disomy,UPD)、三倍体等,但是无法检测结构变异。两者联合应用可以基本覆盖所有的染色体畸变以及结构异常,满足产前遗传学诊断的需求,大大提升了检测的阳性率。其他的检测技术如 FISH、MLPA、QF-PCR、BOBs 等,逐渐成为了辅助补充手段,在特定情况下使用。

高通量测序技术的出现为染色体畸变以及拷贝数变异(copy number variation,CNV)检测提供了新的手段。2009 年 *BMC Bioinformatics* 首次报道了一种名叫拷贝数变异测序(copy number variation sequencing,CNV-seq)的技术,可以在全基因组范围内检测 CNV。CNV-seq 对 DNA 进行全基因组低深度高通量测序,采用短序列比对分析和 counts 计算统计来检出 CNV;该技术与芯片有着完全不同的原理,一个是基于 DNA 分子杂交信号计算,一个是基于比对 counts 的计算统计,但均可以实现 CNV 的检测。该技术的出现为 CNV 的检测提供了一种新的方案,且和芯片一样具有快速、方便、准确的优势,丰富了 CNV 检测的技术方法。

CNV-seq 技术首先被用于果蝇的染色体 CNV 检测以及肿瘤基因组的检测^[2,3],后续被逐渐用于人类遗传病相关 CNV 检测。2013 年 Hayes JL^[4]报道了对 39 例儿童样本进行了 aCGH 芯片(8×60K, BlueGnome)和 CNV-seq 检测的比较分析,CNV-seq 对 11 例阳性均检出,与芯片有着很好的一致性。2014 年 Liang D^[5]采用 SNP-array 和 CNV-seq 对 72 例(62 例儿童和 10 例流产样本)样本进行染色体综合征的检测比较分析,发现 SNP-array 和 CNV-seq 的一致性为 100%。2015 年 Liu

S^[6]对64例流产物采用CNV-seq与核型进行了平行比对,CNV-seq除了1例三倍体无法检测漏检,其他非整倍体检出完全一致,还意外发现了一个核型漏检的22q11.2微缺失。2015年Cohen K^[7]采用CNV-seq技术对aCGH(BlueGnome)检测失败的9例产前诊断样本进行分析,准确地发现了致病性CNV,证明了CNV-seq对于DNA质量不好的样本也可以有效检测。这些小规模的研究提示CNV-seq技术对于染色体畸变检测具有应用潜力。

后续开展了一些更大规模的产前诊断临床应用评估研究。2016年许争峰团队^[8]报道了CNV-seq(low-pass sequencing)对多种样本类型共计570例的大样本检测分析,包括流产、死产、羊水、脐带血、外周血,检出的阳性样本均得到了验证。2016年Zhu XY^[9]采用CNV-seq和SNP-array(Affymetrix CYTOSCAN HD)芯片对115例先天性心脏病胎儿样本进行比对分析,发现两者均检出21例染色体畸变,一致性为100%。2018年报道^[10]采用CNV-seq进行大规模的临床前瞻性研究,在3398例超声检查正常和软指标异常的产前诊断样本中,发现3%(112例)异常,所有染色体异常均得到验证,相比于核型可以增加0.97%的阳性检出率。2018年Wang J^[11]开展了3429例产前诊断样本前瞻性研究,分为3类样本:高龄、高风险、超声软指标,检出的致病性染色体异常均得到了验证,CMA与CNV-seq有着良好的一致性,作者提出CNV-seq可作为产前诊断的一线检测手段。

这些研究证实了CNV-seq是一种染色体畸变分析的可行手段,可检测全基因组范围内的包括染色体非整倍体、大片段异常、微缺失微重复,为CNV的检测提供了一种快速方便的新型技术手段,CNV-seq对于染色体畸变的检测准确性与芯片相当。此外,与芯片相比,CNV-seq存在以下优势:①对于DNA样本的兼容性高和需求更小,最低仅需要10~50ng基因组DNA,远低于芯片的200ng。临床实践中部分的新鲜羊水DNA样本量确实较少,且DNA完整性欠佳,不能达到芯片的上样质控要求,而CNV-seq可以克服这些缺点,适合羊水等产前样本。②随着测序技术的广泛应用,测序成本不断下

降,CNV-seq在价格方面有着明显的优势,价格比芯片便宜很多,降低了该技术的应用门槛,让更多的患者得到此项技术服务。③近几年高通量测序技术已经得到了大量推广和普及,CNV-seq所需要的测序仪是可以与其他项目如NIPT共用,可以一机多用,避免了额外购买昂贵的染色体芯片专用设备,因此CNV-seq技术的普及和推广也更容易。作为一种新型的技术,CNV-seq很大程度上解决了很多机构对于CNV的检测问题,引起了业内的广泛关注,2019年邬玲倩等发表了CNV-seq产前诊断的专家共识,对该技术的临床应用进行了规范,对于该技术以后的应用推广起到了良好的促进作用。

值得注意的是,现阶段CNV-seq技术在产前诊断中应用仍要注意以下问题:①相比于核型与CMA,CNV-seq无法检测UPD、多倍体和结构变异,会导致漏诊,建议采用QF-PCR结合CNV-seq可以同时检测出多倍体。②相比于芯片,芯片探针的位点设置和选择是有偏向性的,在致病基因区域设置的探针更密更多,CNV-seq由于是全基因组随机测序,测序位点没有偏向,测序覆盖的均一性更好,也可以检测出更多的CNV。因此,会增加更多的VOUS,尽管有助于新基因的发现,但是在临床中也额外增加了分析解读和临床咨询的工作量。③市场上主流的芯片,其探针位点往往多是经过大量样本的多轮测试和挑选,已经是一个标准化的产品,成熟稳定可靠,每款的检测效能是非常明确的。CNV-seq技术在产品标准化方面仍然需要加强提升,不同的测序仪器、测序体系、测序深度、测序方案以及分析计算算法^[12],都会影响着结果的准确性和一致性,尤其是CNV断点的判断准确性是否可靠,有时候这对于产前诊断CNV分析十分重要。④迄今为止,CNV-seq在临床应用的文献报道仍然不多,仅仅十余篇,而在产前诊断中的应用研究更少,集中在我国几个实验室,对于CNV-seq在产前诊断中的全面评估,现有数据显然是不够的。仍然需要更多的研究数据支撑,尤其缺乏一些与核型或者CMA的平行比较研究和多中心联合评估研究,特别是评估CNV-seq对病理性CNV的检测灵敏度、特异性、适应证等,需要更为明确的数据,为遗传咨

询和产前诊断提供精确和全面的信息。

随着分子检测技术的发展和遗传诊断要求的不断提高,整合 CNV 和结构变异(structural variation,SV)是大势所趋。染色体 SV 是芯片技术无法克服的困难,但已有文献报道测序技术可以解决这个问题,CNV-seq 技术如果能整合检测 SV 的功能,克服芯片的这个缺陷,将 CNV 和 SV 检测结合在一个体系中完成,提高检测效率、节省检测成本、节约时间,或许可以替代现有的核型和芯片检测技术,显著提升出生缺陷遗传病的防控水平。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 中国出生缺陷防治报告[R/OL]. <http://www.gov.cn/gzdt/2012-09/12/content-2223371.htm>,2012-09-12.
- [2] Daines B, Wang H, Li Y, et al. High-throughput multiplex sequencing to discover copy number variants in *Drosophila* [J]. *Genetics*, 2009,182(4):935-941.
- [3] Campbell PJ, Stephens PJ, Pleasance ED, et al. Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing [J]. *Nat Genet*, 2008,40(6):722-729.
- [4] Hayes JL, Tzika A, Thygesen H, et al. Diagnosis of copy number variation by Illumina next generation sequencing is comparable in performance to oligonucleotide array comparative genomic hybridization[J]. *Genomics*, 2013, 102(3):174-181.
- [5] Liang D, Peng Y, Lv W, et al. Copy number variation sequencing for comprehensive diagnosis of chromosome disease syndromes [J]. *J Mol Diagn*, 2014, 16(5):519-526.
- [6] Liu S, Song L, Cram DS, et al. Traditional karyotyping vs copy number variation sequencing for detection of chromosomal abnormalities associated with spontaneous miscarriage [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 46(2):472-477.
- [7] Cohen K, Tzika A, Wood H, et al. Diagnosis of fetal submicroscopic chromosomal abnormalities in failed array CGH samples: copy number by sequencing as an alternative to microarrays for invasive fetal testing [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 45(4):394-401.
- [8] Dong Z, Zhang J, Hu P, et al. Low-pass whole-genome sequencing in clinical cytogenetics: a validated approach [J]. *Genet Med*, 2016,18(9):940-948.
- [9] Zhu X, Li J, Ru T, et al. Identification of copy number variations associated with congenital heart disease by chromosomal microarray analysis and next-generation sequencing [J]. *Prenat Diagn*, 2016, 36(4):321-327.
- [10] Wang J, Chen L, Zhou C, et al. Identification of copy number variations among fetuses with ultrasound soft markers using next-generation sequencing. *Sci Rep*, 2018, 8(1):8134.
- [11] Wang J, Chen L, Zhou C, et al. Prospective chromosome analysis of 3429 amniocentesis samples in China using copy number variation sequencing [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2018, 219(3): 287. e1-287. e18.
- [12] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14):1754-1760.

(收稿日期:2019-06-14)

编辑:宋文颖