

专家述评

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.001560

基因测序技术的发展与临床应用概述

马路林, 宋一萌, 葛力源

(北京大学第三医院泌尿外科, 北京 100191)

【摘要】基因检测技术是近年来伴随“精准医疗”概念的提出而迅速发展起来的一门科学技术,它可以从基因组机制上阐释遗传学、发育生物学、进化生物学等学科的经典概念,在全基因组水平延伸了染色体高级构象、细胞异质性、功能模块等新概念,为精准医学开辟了应用性新领域。

【关键词】基因测序技术;临床应用

【中图分类号】R331

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-03-19

Overview of progress and clinical application in gene sequencing technology

Ma Lulin, Song Yimeng, Ge Liyuan

(Department of Urology, Peking University Third Hospital)

【Abstract】Gene sequence technology has rapidly developed with the concept of ‘precise medical treatment’ in recent years. It explains the classical concepts of genetics, developmental biology, evolutionary biology and other disciplines from the perspective of genomic mechanisms. New concepts such as high-order chromosome conformation, cellular heterogeneity, and functional modules are extended at the genome level by it, which also opens up new fields of application for precision medicine.

【Key words】gene sequence; clinical application

近年来,随着分子水平的基因检测技术平台不断发展和完善,基因检测成为临床诊断和研究热点。基因检测技术应用于遗传病诊断、无创产检、临床个体用药以及肿瘤监测治疗等领域的科研成果也层出不穷。本文介绍了 4 代组学技术的发展,并比较其优缺点,回顾了该技术近年来在临床研究中的进展,以期对临床科研工作有所帮助。

1 基因组学与基因检测技术的概述

基因组学是伴随“人类基因组计划”发展起来的一门新兴学科,是新世纪科学的奠基学科,已成

为生命科学发展的基础性和引领性学科。20 世纪 50 年代, Watson 和 Crick^[1]提出 DNA 双螺旋结构后,人们对基因的遗传学功能逐渐有所认识,并开始致力于 DNA 序列检测的探索。1975 年 Sanger 等^[2]发明了第一代测序技术并在 1980 年完成了人类历史上第一个基因组序列噬菌体 X174 的测序,标志着人类进入基因组学时代。从 1985 年人类基因组计划提出,到 2001 年人类基因组草图完成,基因组学的研究也从以全基因组测序转向以基因功能鉴定为目标的后基因组时代。

基因检测技术经过近 70 年的发展,从一代双脱氧链测序技术已经发展到即将问世的第四代固态纳米测序技术。测序技术的发展使人们能够方便准确地获取大量的基因组信息,并将其应用于疾病的研究,借此人们逐渐认识到基因变异与疾病发生发展的关系。同时,基因检测技术也越来越多地被应用于疾病的临床诊断和治疗。

作者简介:马路林,医学硕士,教授,博士生导师,主任医师,北京大学第三医院泌尿外科主任,中华医学会泌尿外科分会常委兼肾脏移植学组组长、北京医学会泌尿外科分会副主任委员、中国医师协会泌尿外科分会委员、北京医学会器官移植分会委员。Email: malulin@medmail.com.cn, 研究方向:泌尿系统肿瘤,肾移植。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180329.1629.028.html>
(2018-03-30)

2 四代测序技术的特点比较

最早的基因测序技术可以追溯到 1954 年, Whitfield^[3]使用化学毒素和同位素通过化学降解法进行多聚核苷酸测序。由于该技术操作复杂,随后被 Sanger 发明的双脱氧链终止法所取代。1975 年, Sanger 和 Coulson^[4]开创了“加减法”测定 DNA 序列的技术,随后又引入双脱氧核苷三磷酸(ddNTP),形成了双脱氧链终止法^[5],大大提高了测序的效率和准确性。随后在 Sanger 技术的基础上发展起来的荧光自动测序技术是应用最为广泛的第一代测序技术。第一代测序技术在生命科学研究中发挥了重要作用,人类基因组计划便是依赖第一代测序技术完成的。第一代测序技术的测序读长可达 1 000 bp,准确性高达 99.999%,但是测序成本高、通量低的缺点,影响了其真正大规模应用。在后基因组时代,一代测序技术已经不能满足大规模基因组测序高通量和高质量的需求,从而催生出第二代测序技术。

第二代测序技术的核心原理是边合成边测序。以 Genome Analyzer 为例,将基因组 DNA 的随机片段附着到芯片表面,对 DNA 片段进行延伸和桥式扩增,然后利用带荧光基团的四种特殊脱氧核糖核苷酸,通过可逆性终止的边合成边测序技术对待测的模板 DNA 进行测序^[6]。依赖于芯片技术的发展,二代测序技术可以同时读取百万条序列,在大大提高效率的同时降低了成本,是目前生命科学研究领域应用最为广泛的测序手段。第二代测序技术虽然较 Sanger 测序有了巨大的突破,但是其测序的理论基础仍依赖 PCR 技术进行文库构建,在这一过程中可能会引入突变,导致测序错误。

近年来,以单分子测序为特点的三代、四代测序技术应运而生,如 HeliScope 单分子测序仪和纳米孔单分子测序技术等。HeliScope 单分子测序仪是 Helico BioScience 公司开发的第三代测序仪,利用光学信号对 DNA 碱基进行边合成边测序的识别技术,与二代测序有类似之处,但该技术无须对样本进行 PCR 扩增,避免了 DNA 扩增中出现错误^[7]。英国牛津纳米公司研发的 MinION 测序仪是基于纳米孔单分子测序技术的第四代测序技术,在该测序技术平台中,DNA 分子以 1 次 1 个碱基的速度依次通过纳米小孔,利用核酸外切酶的特性来识别出不同

的 DNA 碱基,同时还能检测出碱基是否被甲基化等相关的重要信息^[8]。单分子测序技术实现了 DNA 聚合酶内在自身的反应速度和延续性,使得测序速度以及测序长度都大幅提高,解决了二代测序技术准确度不高、测序耗时长等关键问题。

3 测序技术在疾病诊治中的应用

随着新的测序技术的出现,大规模测序的成本迅速下降,使得测序技术在遗传病、肿瘤学、免疫学、微生物学等方面得到了广泛的应用,尤其是在肿瘤临床领域显现了很高的应用价值。由美国 National Cancer Institute 和 National Human Genome Research Institute 于 2006 年联合启动的肿瘤基因组图谱计划项目,目前共计完成了包括肺癌、胃癌、前列腺癌等共计 36 种癌症的基因图谱,发现了近 10 万个与癌症相关的基因突变。

在肿瘤预防方面,基因检测技术主要应用于易感基因的筛查。乳腺癌的基因组学研究发现 BRCA1/2 突变与女性的乳腺癌和卵巢癌发病密切相关^[9]。美国影星安吉丽娜·朱莉个人基因检查后发现携带有 BRCA1 突变基因,且有乳腺癌家族史,在医生建议下接受了乳腺的预防性切除。安吉丽娜·朱莉的手术将个人基因检测推向了公众视野。近年来,随着众多基因检测公司的兴起,越来越多的患病人群和高风险人群开始选择个人基因组测序,但是普通人群是否建议进行肿瘤易感基因的筛查目前仍有待商榷,相信未来个人基因组的测序将会被应用于多种疾病的诊治,从基因组水平上指导个人的治疗方案,从而达到个体化医疗的目的。

在肿瘤诊断方面,基于肿瘤发生发展的复杂性以及目前对肿瘤本身认识的不足,目前可以用于临床诊断的生物标志物较少且特异性不高。利用全外显子测序或全基因组测序的方法,以期发现肿瘤相关基因,进而筛选出新型治疗靶点或对肿瘤进一步的分子生物学分型,可以用于肿瘤的个体化治疗。在临床应用方面,以乳头状肾细胞癌为例,通过对 161 例乳头状肾细胞癌进行全基因组测序,基于突变类型进一步将乳头状 2 型肾细胞癌进一步分为 3 个亚型,发现不同分型的乳头状 2 型肾细胞癌最终的预后也不尽相同,这为后续靶向药物的研发提供了依据^[10]。

在肿瘤治疗方面,靶向药物的出现改善了肿瘤患者的治疗方式和预后,但不是所有人都适合靶向药物的治疗。以非小细胞性肺癌为例,IPASS 研究提示表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)基因突变阳性患者接受吉非替尼治疗明显生存获益;然而 EDNR 突变阴性患者更适合化疗^[11]。这项研究表明以驱动基因的改变作为靶向治疗应用的分子标志物,可以更好地为患者制定个体治疗的策略,减少不必要的靶向治疗。耐药是靶向治疗目前面临的主要障碍,基于新一代测序技术的全基因组化学诱变筛选可以无偏移地鉴定肿瘤细胞的耐药突变,我们期待这些技术在新一代靶向药物的开发和在耐药机制的研究中发挥更大的作用^[12-13]。

在肿瘤监测方面,二代测序技术解决了低丰度样本中检测基因突变的问题,解决了通过肿瘤细胞循环 DNA(ctDNA)、肿瘤细胞循环 RNA(ctRNA)等液体活检技术对患者肿瘤负荷和疗效检测的技术难题。Lohr 等^[14]通过从转移性前列腺癌血清中分离 ctDNA 进行测序分析,比较了 ctDNA 和原肿瘤样本测序结果发现:肿瘤中 90%的早期主干突变和 73%的躯干突变同样可在 ctDNA 中检测出。Wyatt 等^[15]对 45 例转移性前列腺癌活检组织和血浆中 ctDNA 进行测序分析发现,75.6%的游离 DNA(cfDNA)中 ctDNA 的含量大于 2%,且活检组织和 ctDNA 所有体细胞突变一致。此外,Dawson 等^[16]证明了在转移性乳腺癌的监测中,ctDNA 的敏感性和特异性均优于其他循环肿瘤标记物。这些研究表明,ctDNA 的二代测序分析在肿瘤检测方面有巨大的潜力。

综上所述,基因检测技术的发展和基因组计划的实施,改变了生物学的研究模式。全面利用基因检测技术诊治肿瘤等人类重大疾病的时代即将到来。我们期盼基因检测技术不断更新和完善,更期待终有一日我们能够通过最新的技术攻克更多目前无法解释和解决的人类疾病难题。

参 考 文 献

[1] Watson JD, Crick FH. A structure for deoxyribose nucleic acid. 1953[J]. Nature, 2003, 421(6921): 397-398.

- [2] Sanger F, Air GM, Barrell BG, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA[J]. Nature, 1977, 265(5596): 225-246.
- [3] Whitfield PR. A method for the determination of nucleotide sequence in polyribonucleotides[J]. Biochem J, 1954, 58(3): 390-396.
- [4] Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase[J]. J Mol Biol, 1975, 94(3): 441-448.
- [5] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors[J]. Proceedings of the national academy of sciences, 1977, 74(12): 5463-5467.
- [6] Fedurco M, Romieu A, Williams S, et al. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(3): e22.
- [7] Harris TD, Buzby PR, Babcock H, et al. Single-molecule DNA sequencing of a viral genome[J]. Science, 2008, 320(5872): 106-109.
- [8] Jain M, Olsen HE, Paten B, et al. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community[J]. Genome biology, 2016, 17(1): 239.
- [9] Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1[J]. Science, 1994, 266(5182): 66-71.
- [10] Cancer Genome Atlas Research Network, Linehan WM, Spellman PT, et al. Comprehensive molecular characterization of papillary renal-cell carcinoma[J]. N Engl J Med, 2016, 374(2): 135-145.
- [11] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. N Engl J Med, 2009, 361(10): 947-957.
- [12] Shaffer SM, Dunagin MC, Torborg SR, et al. Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance[J]. Nature, 2018, 555(7695): 274.
- [13] Brummel JS, Petljak M, Martincorena I, et al. Genome-wide chemical mutagenesis screens allow unbiased saturation of the cancer genome and identification of drug resistance mutations[J]. Genome Res, 2017, 27(4): 613-625.
- [14] Lohr JG, Adalsteinsson VA, Cibulskis K, et al. Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer[J]. Nature biotechnology, 2014, 32(5): 479-484.
- [15] Wyatt AW, Annala M, Aggarwal R, et al. Concordance of circulating tumor DNA and matched metastatic tissue biopsy in prostate cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2017, 109(12)[Epub ahead of print]
- [16] Dawson SJ, Tsui DWY, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer[J]. N Engl J Med, 2013, 368(13): 1199-1209.

(责任编辑:冉明会)