

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003020

一代二代联合测序快速鉴定肝豆状核变性及其家系溯源研究

黄 原¹, 何 苗², 范振鑫³, 邓 娟⁴, 李 颖⁴, 王宇杰⁴, 郑小莉¹

(1. 西南医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 泸州 646000; 2. 中国医学科学院输血研究所分子实验室, 成都 610052; 3. 四川大学生命科学学院生物资源与生态环境重点实验室, 成都 610065; 4. 四川大学华西第四医院检验科, 成都 610041)

【摘要】目的:探索二代测序筛选和一代测序验证的快速准确诊断罕见遗传病肝豆状核变性的检测方法和流程。**方法:**提取先证者 DNA 并构建高通量测序文库后通过二代测序鉴定其可能致病位点;再提取包括先证者在内的该家系 13 位成员 DNA, 设计引物并对目标片段 PCR 扩增后进行双相一代测序验证。**结果:**先证者的 *ATP7B* 基因外显子 8 中检测出 1 个杂合错义突变 (rs121907990; chr13:51937570); 家系成员共查出 3 位携带同一杂合错义突变者, 先证者 *ATP7B* 突变来源于母系。**结论:**本研究设计的联合二代测序检测与一代测序验证的肝豆状核变性基因突变位点的快速鉴定技术和流程图, 可能为罕见遗传病基因突变致病位点提供可借鉴的检测模式, 为早期高效精准确诊罕见遗传病提供帮助。

【关键词】肝豆状核变性; *ATP7B* 基因; 一代测序; 二代测序

【中图分类号】R446.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2021-08-27

Combining next-generation sequencing and Sanger sequencing for rapid identification of the genetic mutation diagnosis with family tracing of hepatolenticular degeneration

Huang Yuan¹, He Miao², Fan Zhenxin³, Deng Juan⁴, Li Ying⁴, Wang Yujie⁴, Zheng Xiaoli¹

(1. Teaching and Research Section of Biochemistry and Molecular Biology, College of Preclinical Medicine, Southwest Medical University; 2. Laboratory of Molecular Biology, Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences; 3. Key Laboratory of Bioresources and Ecoenvironment, College of Life Sciences, Sichuan University; 4. Clinical Laboratory Department, The West China Fourth Hospital, Sichuan University)

【Abstract】Objective: To investigate an early, accurate and rapid gene detection method and procedure using next-generation sequencing (NGS) full screening and Sanger sequencing based verification for diagnosing a rare genetic disease, hepatolenticular degeneration. **Methods:** The proband III-3 DNA was extracted and the bioinformatic data of high throughput genomic sequences (HTGS) was established to confirm the possible pathogenic sites by using the NGS; then the DNA of all 13 members of the family was extracted, including the proband, in order to design the primer and amplify the target fragment by PCR, then the possible pathogenic sites were verified by using the biopolar generation sequencing. **Results:** A heterozygous missense mutation (rs121907990; chr13:51937570) was detected on the proband III-3's *ATP7B* gene exon 8. Three family members, II-4, II-5 and III-4, carried the same heterozygous sense mutation, and their genetic pattern showed mutation located on the same chromosome. The proband's *ATP7B* mutation came from the matriarchal origin. **Conclusion:** The rapid identification method and procedural flow chart designed by our research, which combines the NGS technique and Sanger sequencing based verification technique for the pathogenic site in genealogy, has the potential to provide reference for gene diagnosis procedure, and contribute to the timeliness and accuracy of early diagnosis of rare genetic disease.

【Key words】 hepatolenticular degeneration; *ATP7B* gene; Sanger sequencing; next-generation sequencing

作者介绍: 黄 原, Email: yuanhuang@518.gmail,

研究方向: 血液免疫学。

通信作者: 郑小莉, Email: xlzheng1111@126.com。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20220424.1637.015.html>

(2022-04-26)

肝豆状核变性 (hepatolenticular degeneration, HLD) 又称威尔逊病 (Wilson disease, WD), 是一种常染色体隐性遗传罕见病。在世界范围内发病率为 1/3 万~1/10 万^[1], 亚洲发病率高于欧洲发病率, 中国人群发病率高于西方国家发病率, 中国曾有报道称为 5.87/10 000^[2]。全球隐性携带者的概率为 1/90^[3], 流行率约为 1/30 万, 但理论上 WD 的流行率应高于 1/3 万^[4], 诊断病例的数量与理论值之间的差异可能是由于外显率的下降和诊断上的局限性。国内外多项研究表明: 该病临床表现复杂多样, 不同地域不同种族和基因突变类型均存在较大差异^[5-7], WD 患者早期可以取得良好治疗效果, 而晚期常因多器官不可逆损伤导致治疗效果不理想^[8-9]。然而致病基因 *ATP7B* 突变类型迥异 (表 1), 且患者医学实验室辅助检查结果显著不同^[10]。根据临床症状、生物化学指标 (转氨酶、铜蓝蛋白、尿铜等)、角膜 K-F 环、放射学检查和致病基因突变热点的一代测序 (Sanger sequencing)^[11] 等诊断手段的局限性开始显露。高通量测序技术也叫二代测序 (next-generation sequencing, NGS)^[12], 不仅可以提供丰富的遗传学信息, 还能缩短测序时间。但是, 用于临床的数据需要很高的测序深度。怎样帮助未发现有意义明确的致病突变的 WD 患者及其家系进一步明确诊断目前缺乏全面的诊断试剂, 没有共识的检测模式, 可供参考的流程图也是空白。因此, 本文通过构建基于二代测序全面筛选与一代测序验证的方法, 检测肝豆状核变性基因突变位点, 建立一个统一有效的流程, 并对遗传性罕见病的快速鉴定和检测模式提供思路。

表 1 OMIM 数据库已报道的导致肝豆状核变性的基因 *ATP7B* 及其突变位点统计 (更新至 2021 年 7 月 21 日)

<i>ATP7B</i>	SNP ^f	In/del ^g	Duplication ^h	合计
Pathogenic ^a	133	3	55	191
Likely Pathogenic ^b	158	5	17	180
Uncertain significance ^c	329	4	7	340
Conflicting interpretations ^d	118	0	2	120
Likely benign/benign ^e	402	1	4	407

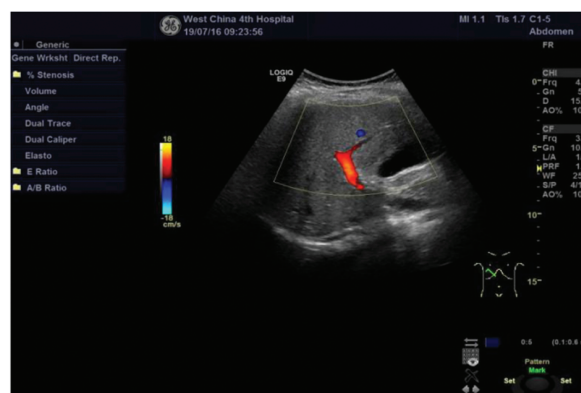
注: a, 致病; b, 可能致病; c, 意义不明; d, 不同研究结论不一致; e, 可能良性/良性; f, 单核苷酸多态性; g, 插入/缺失; h, 加倍

1 材料与方法

1.1 研究对象

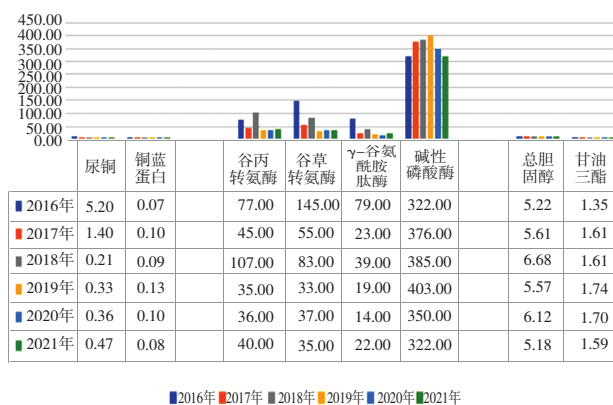
本研究对象来源于四川大学华西第四医院职业病科。依据 2008 年中华医学会神经病学分会公布的肝豆状核变性的临床诊断指南, 研究对象临床症状支持 WD 诊断, 但其外院检测的单基因分析未发现意义明确的致病突变。本研究通过四川大学华西第四医院伦理委员会审查批准备案, 所有基因诊断检测工作均取得被测试者及家属的同意并签署知情同意书。

1.1.1 病例介绍 先证者, 女, 7 岁, 因皮肤巩膜黄染于当地医院就诊, 肝功能转氨酶升高 4 年, 保肝及退黄药物治疗后转氨酶恢复正常且皮肤黄染消退未进一步诊治。2016 年因肝功能提示谷丙转氨酶等明显升高再次入院诊治, 进一步检查尿铜、铜蓝蛋白、腹部彩超、头颅 MR、眼科检查 K-F 环(-) 等, 考虑肝豆状核变性。值得注意的是, 患者院外单基因病全外显子组测序分析结果为未发现意义明确的致病突变。2016 年至 2021 年多次入院监测 (图 1、图 2), 进行驱铜药物治疗。



注: 肝脏脂肪肝样变

图 1 先证者 2016 年初诊腹部彩超图



注: 监测项目参考范围: 尿铜 0~1.6 mol/L; 铜蓝蛋白 0.2~0.6 g/L; 谷丙转氨酶 9~50 U/L; 谷草转氨酶 15~40 U/L; γ-谷氨酰转氨酶 7~45 U/L; 碱性磷酸酶 40~179 U/L; 总胆固醇 0~5.5 mmol/L; 甘油三酯 0.2~1.8 mmol/L

图 2 先证者 2016 年至 2021 年临床实验室动态数据图

1.1.2 家系研究 收集先证者和家系成员的完整临床病历或体检资料,调查家族史,分别抽取 13 个家系成员 EDTA-K2 抗凝外周血 5 mL, -80℃ 保存冷链运输至实验室检测前处理。

1.2 DNA 提取与二代测序文库构建

外周血总 DNA 用 QIAamp DNA Blood mini Kit (QIA-GEN, Germany) 严格按照试剂盒说明书标准操作程序提取。应用 Qubit 荧光测浓度、分光光度计测光密度(optical density, OD)_{260 nm/280 nm} 以获取标本准确的总 DNA 浓度、纯度信息。应用文库构建试剂盒(KAPA HyperPlus Kit)、双端接头试剂盒(KAPA Dual-Indexed Adapters)(美国 KAPA 公司),经过酶切、末端修复与加 A 尾、接头连接、连接后纯化、文库扩增、扩增后纯化等步骤构建文库。以 Agilent 2100 生物芯片分析仪(Agilent 2100 Bio-analyzer)及芯片及配套产品(Agilent DNA 1000 reagents)(美国 Agilent Technologies)做质量控制。

1.3 二代测序结果与分析比对

将构建好的 DNA 文库送北京诺禾致源公司以 Illumina HiSeq 4500(美国 Illumina)进行全外显子组测序分析潜在的遗传突变信息。通过计算 Q30 评估测序质量(Q30 表示测序质量值>30 的碱基百分比),将高质量的短序列用软件 Bowtie2(Langmead and Salzberg 2012)比对到人类基因组(版本:hg38)。使用 Bowtie2 中的本地比对算法(local alignment algorithm),选择非常敏感模式(very sensitive model)进行比对。再采用软件 Picard(<http://picard.sourceforge.net>)和大型软件包 GATK(Van der Auwera GA & O'Connor BD, 2020)将比对文件进行后续的多步骤处理,得到测序个体的变异信息结果。最终数据储存格式为基因组重测序的通用格式 Variant Call Format (VCF;<http://www.1000genomes.org/node/101>)。获得高质量的变异信息后,将这些突变位点与 NCBI 的 ClinVar 数据库进行比对与查询,得到与突变位点相关的疾病和文献研究等信息。

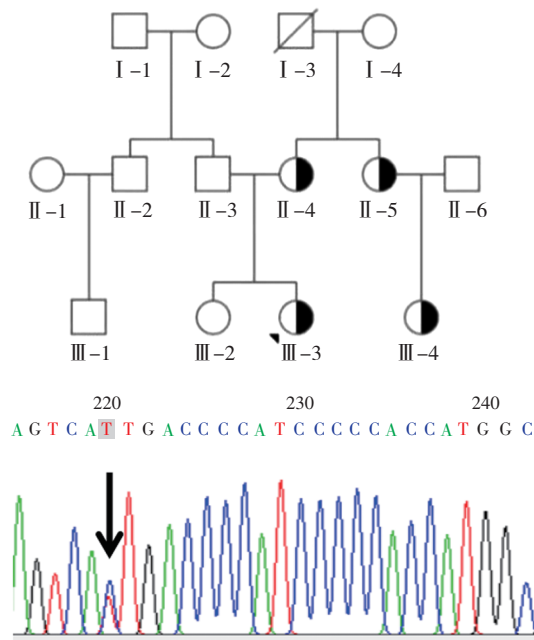
1.4 目标 SNP 的引物设计与一代测序

通过二代测序比对分析,发现先证者 III-3 13 号染色体 51937570 号位点存在非同义突变,因此在这个区域的上下游设计引物对其进行 PCR 扩增和一代测序。正向引物:5'-CCAGGTTGATGCGTATCC-3',反向引物:5'-GGAGAAGAC-AGTTGGAGGA-3'。扩增片段长度 634 bp,覆盖 13 号染色体 51937570 号位点。同时,建立如下 PCR 反应体系:PCR Mix 10 μL(生工生物工程股份有限公司),上下游引物均为 1 μL (10 μmol/L),模板 DNA 2 μL,DEPC 水补足 20 μL。扩增条件为:95℃预变性 1 min;随后 95℃变性 10 s,58℃退火 10 s,72℃延伸 30 s,共 35 个循环,最后 72℃延伸 10 min。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳确定扩增片段准确。将 PCR 扩增产物送至生工生物工程股份有限公司进行一代测序。

2 结果

2.1 二代测序结果分析

先证者 III-3 通过 Illumina 二代测序平台测得了 22.755 Gb 的短序列,Q30 值达到 94.75%,表明整体数据量和数据质量较高,能满足后续分析的要求。通过序列比对、基因分型等生物信息学分析后,在 ATP7B 基因外显子 8 中检测出 1 个杂合错义突变(rs121907990;chr13:51937570)(图 3)。



注:□代表正常男性;○代表正常女性;●代表女性携带者;/-代表已死亡个体;▼表女性先证者

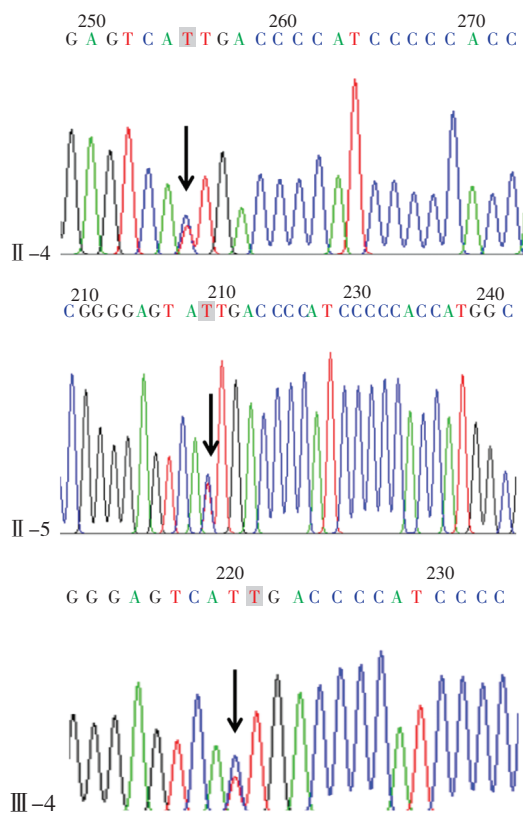
图3 家系图谱和先证者 III-3 二代测序结果

2.2 家系一代测序验证

一代测序 13 位家系成员 PCR 扩增成功并进行双相测序。成功验证先证者 III-3 结果,同时发现 3 位致病基因点突变的携带者:II-4、II-5 和 III-4(图 4),均为同一杂合错义突变。根据遗传系谱图和 WD 常染色体隐性遗传疾病特点推论先证者 III-3 的突变来源于母系,家系突变的遗传方式显示改变位于同一条染色体上。母亲 II-4(22 岁)和父亲 II-3(30 岁)生育先证者 III-3,II-4 无流产史,II-4、II-3 属于非近亲关系;6 年后育 III-2。截止投稿日期,携带者 III-4、II-4、II-5 经连续 3 年检测肝功,血铜蓝蛋白、血铜、尿铜和 B 超等均未发现异常,无临床表现。

2.3 构建检测模式

基于二代测序全面筛选与一代测序验证的肝豆状核变性基因突变位点的快速鉴定技术构建优化检测模式和简易流程图(图 5)。



注:先证者及家族其他该位点突变的成因均为 C/T 杂合突变,但只有先证者发病

图 4 一代测序发现 3 位致病基因点突变的携带者:
II-4、II-5、III-4

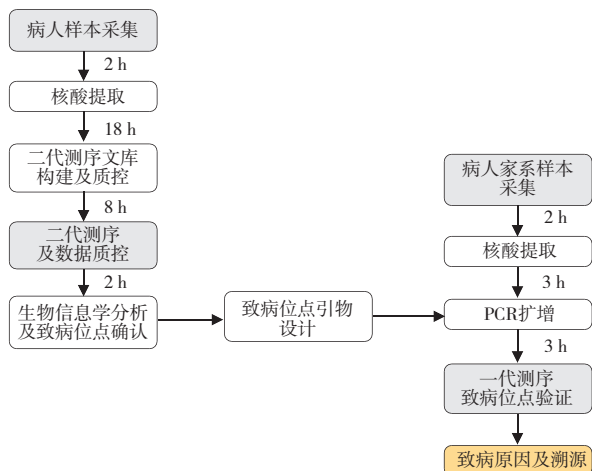


图 5 二代测序检测与一代测序验证的肝豆状核变性基因突变位点简易流程图

3 讨论

3.1 一代测序对 WD 鉴定的不足

ATP7B 基因的致病变异既往多采用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)、限制片段长

度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、单链多态性、变性梯度凝胶多态性 (single strand conformation polymorphism, SSCP)、变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、变性高效液相色谱 (denaturing high pressure liquid chromatography, DHPLC) 等技术获得。如果测序结果不支持诊断但临床怀疑仍很高, 只有一种致病性变异, 则考虑多重结扎相关性探针扩增试验。基于微阵列的比较基因组杂交是评估具有更高敏感性的部分或全部基因缺失或重复的另一种选择^[11-13]。但单基因遗传病 WD 不同突变类型、非编码序列的发生、不同地域突变热点以及上述方法局限性等问题, 造成疾病的漏诊误诊和延迟诊断。如本文先证者 III-3 首次单基因病全外显子组测序分析检测结论为: 未发现意义明确的致病突变。其诊疗过程无法避免耽误时间和浪费金钱。

3.2 二代测序联合参与形成互补

NGS 优势明显: 数据量巨大, 可短时间高效率对人类基因组测序发现大量未知位点, 是个性化医疗和精准用药的基础。高通量筛查的技术进展可能允许检测实验室从 WD 患者中测序整个 *ATP7B* 基因组, 包括翻译的外显子、通常未被研究的重要非编码序列, 覆盖检测所有变异^[14]。本报告的先证者 III-3 早在 7 岁就发现检验结果和临床表型与威尔逊病一致, 但因一代测序分析并不支持诊断, 令临床医生和家属困惑。本研究利用基于二代测序的全外显子组测序技术, 增加新的确证证据, 在 *ATP7B* 基因外显子 8 中检测出 1 个杂合错义突变 (rs121907990; chr13:51937570)。基因结果明确临床诊断, 为患者争取到早期及时有效治疗的突破口。从 2016 年初诊至发稿截止 (图 2), 该患儿通过定期驱铜药物控制和日常生活低铜膳食的全方面管理, 达到满意的生存生活质量。通过分析灵敏度接近 100% 的 NGS 数据, 可以检测到 4 个外显子或大小以上的拷贝数变体, 满足诊断疾病选择临床试验项目准确性敏感性和及时性的需求。但是, 二代测序必须多次测同一个位点和运用较好的数据处理算法, 才能保证结果的可靠性。因此, 对罕见遗传病的诊断应该更谨慎地加入一代测序进行验证。

3.3 本研究流程对罕见病确证的指导性意义和时效性

本研究首次采用对出现临床症状支持诊断 WD

的患者先进行二代测序,再联合一代测序验证其家系成员的肝豆状核变性基因突变位点的技术,有效提高早期诊断率,总实验时间不超过 38 h 的优化流程高效精准。本研究先采用二代测序确诊先证者Ⅲ-3 后,再利用一代测序成本低和速度快的优势。进一步家系研究发现无症状家族成员Ⅱ-4、Ⅱ-5、Ⅲ-4 存在同一杂合错义突变,并证实他们突变的遗传方式来源于同一条染色体。这不仅可以为罕见遗传病基因突变致病位点提供可借鉴的检测模式,还能为产前诊断和遗传咨询以及健康管理提供科学依据。以Ⅲ-4、Ⅱ-4、Ⅱ-5 为例,产前咨询建议有条件者通过抽提胎儿绒毛组织进行 Sanger 测序,作出产前基因测序快速诊断可减低 WD 的出生率。患者的近亲如同胞或子女也建议进行基因筛查,例如Ⅲ-1、Ⅲ-2、Ⅲ-4。由于 WD 发病年龄的无规律性和环境因素、膳食等外因影响,同种基因型也可以有不同的临床表现^[15],再如Ⅱ-4、Ⅱ-5 有遗传病史的家庭成员基因筛查和规律体检与早期诊治和提高生存质量密切相关,同时可降低杂合子基因型携带者不必恐慌和过度医疗。当然不可避免的费用问题可能会影响检测模式的推广,但更重要的是能通过家系溯源为长期健康管理提供科学依据。

综上所述,本研究筛选出单基因病全外显子组测序分析未发现意义明确的致病突变的儿童 WD 患者并对其进行家系研究。通过基于二代测序全面筛选与一代测序验证的 WD 基因突变位点的鉴定技术以快速明确诊断,同时绘制优化流程图,为罕见遗传病基因突变致病位点确定提供科学依据。如本报道先证者Ⅲ-3 这样的家庭 WD 在中国并不罕见,早期诊断和医学治疗可显著改善 WD 患者的预后。本研究技术检测模式提供了新的分析技术思路和流程路径图,从而获得发现致病突变的机会。值得重视的是,截至发稿日期 OMIM 统计,全球已知的和基因相关的罕见遗传病超过 6 000 种并且每年以 10~50 种的速度递增,遗传性罕见病是全球出生缺陷的主要类型之一,对人类健康构成威胁。本研究构建的联合测序快速鉴定和家系溯源流程,不仅限于 WD,可能对所有遗传性罕见病患者和家庭具备探寻实用性。通过不超过 3 d 的检测和验证,可以精准发现致病基因突变位点,可能为罕见遗传病新发致病突变基因鉴定和家系溯源提供可借鉴的时

效性高、准确可靠的检测模式。

参 考 文 献

- [1] Collet C, Laplanche JL, Page J, et al. High genetic carrier frequency of Wilson's disease in France; discrepancies with clinical prevalence[J]. BMC Med Genet, 2018, 19(1): 143.
- [2] Liu J, Luan J, Zhou XY, et al. Epidemiology, diagnosis, and treatment of Wilson's disease[J]. Intractable Rare Dis Res, 2017, 6(4): 249–255.
- [3] Xie JJ, Wu ZY. Wilson's disease in China[J]. Neurosci Bull, 2017, 33(3): 323–330.
- [4] Ala A, Walker AP, Ashkan K, et al. Wilson's disease[J]. Lancet, 2007, 369(9559): 397–408.
- [5] Purchase R. The treatment of Wilson's disease, a rare genetic disorder of copper metabolism[J]. Sci Prog, 2013, 96(Pt 1): 19–32.
- [6] Mulligan C, Bronstein JM. Wilson disease: an overview and approach to management[J]. Neurol Clin, 2020, 38(2): 417–432.
- [7] Fernando M, van Mourik I, Wassmer E, et al. Wilson disease in children and adolescents[J]. Arch Dis Child, 2020, 105(5): 499–505.
- [8] Lee BH, Kim JH, Lee SY, et al. Distinct clinical courses according to presenting phenotypes and their correlations to *ATP7B* mutations in a large Wilson's disease cohort[J]. Liver Int, 2011, 31(6): 831–839.
- [9] Wu ZY, Wang N, Lin MT, et al. Mutation analysis and the correlation between genotype and phenotype of Arg778Leu mutation in Chinese patients with Wilson disease[J]. Arch Neurol, 2001, 58(6): 971–976.
- [10] Lin CW, Er TK, Tsai FJ, et al. Development of a high-resolution melting method for the screening of Wilson disease-related *ATP7B* gene mutations[J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(17/18): 1223–1231.
- [11] Mak CM, Lam CW, Lai ST, et al. Rapid diagnosis of Wilson disease by a 28-mutation panel: real-time amplification refractory mutation system in diagnosing acute Wilsonian liver failure[J]. Clin Chim Acta, 2008, 398(1/2): 39–42.
- [12] Poon KS, Tan KML, Koay ESC. Targeted next-generation sequencing of the *ATP7B* gene for molecular diagnosis of Wilson disease[J]. Clin Biochem, 2016, 49(1/2): 166–171.
- [13] Lee JY, Kim YH, Kim TW, et al. New novel mutation of the *ATP7B* gene in a family with Wilson disease[J]. J Neurol Sci, 2012, 313(1/2): 129–131.
- [14] Espinós C, Ferenci P. Are the new genetic tools for diagnosis of Wilson disease helpful in clinical practice?[J]. JHEP Rep, 2020, 2(4): 100114.
- [15] Shribman S, Poujois A, Bandmann O, et al. Wilson's disease: update on pathogenesis, biomarkers and treatments[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2021, 92(10): 1053–1061.

(责任编辑:唐秋姗)