

# 2016 年 CCMG(加拿大医学遗传学会) 染色体微阵列检测指南

冼诗瑶 译 周祎 校

(中山大学附属第一医院 妇产科胎儿中心, 广东 广州 510080)

## 1 基因组微阵列检测能力

1.1 以细菌人工染色体(bacterial artificial chromosomes, BAC)或非多肽寡核苷酸探针为平台的比较基因组杂交微阵列可以检出全基因组内的拷贝数重复和缺失,例如不平衡的显微水平及亚显微水平的染色体重排。

1.2 含有单核苷酸多态性探针(SNP)的微阵列平台可以检出:①全基因组内的拷贝数重复和缺失,例如不平衡的显微水平及亚显微水平的染色体重排;②三倍体;③大片段纯合状态,也被称为杂合性丢失(absence of heterozygosity, AOH);④在全基因组的多个区域中均出现 AOH 者可能提示受检者父母存在血缘关系;⑤受检者父母并非血缘关系,但存在仅局限于单一一条染色体上的 AOH 者,可能提示该染色体存在 UPD。但是,这样的结果也可能出现在非 UPD 的病例上。因此,假如当患者临床特征符合某一印迹综合征时,需要对样本进行进一步的标准化分子检测(例如:甲基化 MLPA),以确认是否确实存在 UPD;⑥SNP 微阵列检测并不适用于作为 UPD 标准化分子检测方法的替代检测手段,因为它并不能检测出所有类型的 UPD。

1.3 分辨率取决于:①探针大小、数量及探针在全基因组中的分布情况;②软件算法及用户对拷贝数检测的参数设置。

## 2 全基因组微阵列的局限性

2.1 以 BAC 或非多肽寡核苷酸探针为平台的比较

基因组杂交微阵列不能检出染色体平衡重排、大片段纯合状态、非平衡重排/非整倍体的低比例嵌合以及多倍体。

2.2 含有 SNP 探针的微阵列平台不可检出平衡重排、非平衡重排/非整倍体的低比例嵌合、四倍体。

## 3 适应症

3.1 产后适应证详见 Canadian College of Medical Geneticists (CCMG) Position Statement —— Use of array genomic hybridization technology in constitutional genetic diagnosis in Canada。

3.2 产后微阵列检测的临床指征:①先天性智力障碍/发育迟缓/自闭症/多发性先天畸形;②明显提示为遗传自平衡易位携带者的或为新发重排者的表型异常个体。

3.3 恶性肿瘤关于用于骨髓、非实质性及实质性肿瘤以及石蜡包埋组织的微阵列分析,详见:the American College of Medical Genetics and Genomics technical standards and guidelines: microarray analysis for chromosome abnormalities in neoplastic disorders。

## 4 申请书书写要求

申请书书写要求包括:①患者姓名及地址;②患者出生日期;③患者性别;④唯一标识码;⑤医师或其他具有资质的检测申请人员的名字;⑥样本来源;⑦样本收集日期;⑧检测要求;⑨检测的临床指征;⑩种族—多态 CNV 频率可能在不同人群中具有差异性。

## 5 样本要求

由于不同组织提取出的 DNA 样本的检测特性及敏感性不一,因此从不同类型组织中提取出的 DNA 标本均需由实验室负责人进行评估确认。

5.1 外周血需要使用适当的抗凝剂来收集 2 份样本,一份用于 DNA 提取,另一份作为备用,以备确证需要或对阳性结果进行进一步的 FISH/G-显带检测。

5.2 组织低传代次数的经培养原始纤维母细胞、唾液、口腔颊拭子,但需要注意的是,对于变异细胞株(即,EBV 感染的淋巴母细胞)应避免行临床试验检测,因为在转化/培养的过程中可能导致检出基因组获得性不平衡改变的风险增加。

## 6 平台的最低要求

6.1 供应商应提供芯片上所有探针的分布及序列的详细信息,以及新批次微阵列装货前的质量控制检测结果。

6.2 产后标本分析 ①全基因组的主体覆盖应使有效分辨率至少达 400Kb;②推荐使用包含有非多态探针的以寡核苷酸为基础的微阵列平台或结合 SNP 及非多态探针的微阵列平台。

## 7 参考 DNA

7.1 每个实验室均应建立一个可靠的男性及女性的参照 DNA 资源,可以是商业化的产品或是经内部委员会(internal review board, IRB)通过的志愿者来源样本。

7.2 推荐使用纵向稳定的参考 DNA。

7.3 对于严格的微阵列分析,应使用与患者同性别的参照 DNA。

## 8 步骤

8.1 实验室应制定关于微阵列试验所有方面的书面流程及质控管理方案。

8.2 实验室应做好对患者检测报告所有分析参数的资料保存。

## 9 分析标准的监控

### 9.1 实验分析前

9.1.1 评估 DNA 质量(例如:利用荧光计/分光光度计/琼脂糖凝胶电泳进行浓度/质量监测)。

9.1.2 文件设备的监控与维护。

9.1.3 用经既往批次芯片检测为异常的标本与新批次的微阵列芯片进行重复杂交,以确认新批次芯片的质量。对新批次的微阵列都需要进行数据质量评估。

9.1.4 对每一新批次的参照 DNA 都应通过进行阳性样本检测与之前批次进行质量对比。

9.1.5 对每一批次的正常对照 DNA 进行质量参数评估时应使用与患者 DNA 一致的检测手段(例如:利用荧光计/分光光度计/琼脂糖凝胶电泳进行浓度/质量监测)。

9.1.6 分析 ①如果可以的话,利用超声/酶消化法对 DNA 的裂解程度进行评估(例如:使用琼脂糖凝胶电泳);②评估 DNA 样本的标记效率(例如:使用分光光度计)

9.1.7 实验分析后 ①尽可能实现微阵列图像的可视性监控,以便检查全芯片的探针杂交情况——排查由于气泡固定及渗漏所引起的不均匀杂交;②确保在微阵列 log<sub>2</sub> ratio 图上不出现明显的人工杂波,因为它可能导致部分异常信号改变的漏诊;③评估分析软件计算出的 QC 数据,并设置数据分析所需的最低 QC 值;④监测微阵列软件算法测出的基因组内的重复及缺失的后续 FISH/QPCR/MLPA 确证结果。

## 10 微阵列数据分析

①实验室内的遗传学分析师应熟悉数据的算法及软件的使用;②在微阵列平台初始建立时即应建立正确的软件算法及诊断参数标准;③当更换分析软件及算法时应将用于原始确证的所有数据进行重新分析;④应确认检测对于嵌合体的检出敏感性或在实验报告中标明实验对嵌合体检出能力的局限性。

## 11 微阵列数据解读

①实验室遗传分析师应熟悉当前可用于分析 CNV 数据的文献及数据库的使用,并应用相关网站工具进行患者报告分析。②实验室应设立自身的内部数据库,以确认本地区人群常见的 CNV 和(或)对于某一特定微阵列平台反复出现的假阳性信号。③实验室遗传分析师应保证用于 CNV 解读的数据库与微阵列平台生成数据所用的人类基因组序列的版本号是一致的。④在进行 CNV 解读时,应综合考虑 CNV 内的基因内容,不平衡片段的大小,该片段是遗传的或是新发的,完全或是部分覆盖已知临床相关区域,或是否已曾在正常人数据库中被报道。由于自健康参照人群中生成的数据常是未经确证的,因此对于某一特定的 CNV 区域应至少曾在两个独立的研究中出现方可认为是一个常见的良性变异。⑤像 16p11.2 这样的与发育障碍易感性相关的新发的复发 CNVs,虽然关于其外显率、表现度和再发风险的相关信息有限,但实验室的遗传分析师应该熟悉它们目前已知的的相关信息。对 CNVs 与表型的关系应给予正确的解读。建议对其进行家系分析以协助判断 CNVs 与疾病状态的关系。⑥如果可以的话,建议对具有临床意义的 CNVs 进行 FISH 和/或 G 显带分析以提供相关的染色体结构信息(如:插入、串联重复、标记)。⑦微阵列、QPCR 或 MLPA 分析可用于父母样本的后续研究以协助判断遗传性的 CNVs。对于可疑的新发 CNVs,如若条件允许,均应对亲本样本进行 FISH 检查,以排查父母为平衡易位携带者的可能。⑧对于亲本的研究,较之全基因组微阵列检查,应优先选择使用 FISH 或目标分子诊断技术进行研究。

## 12 报告结果

12.1 最终报告书写时应考虑到这份报告的阅读者可以是有遗传专业背景的遗传分析师,也可以是没有遗传专业背景的患者。因此书写结果时,应包括 CNVs 的基因组定位和大小以及该区域内所包含的基因信息。已知基因的数量以及具有临床意义的基因信息(例如:OMIM 致病基因)应包含在报告当

中。对于考虑为良性的 CNVs 可以不写入最终报告。而实验室对于这一类 CNVs 的报告标准则应作一简要说明,附于最终报告内。

12.2 对于基因出现缺失或打断的常染色体隐性遗传病基因,若其所致疾病症状与患者表型相一致的,应在报告中予以报告并建议对其等位基因进行检测分析。虽然并不常遇到,但是有些时候微阵列分析可以通过提示隐性突变来协助隐性遗传病的诊断。

12.3 实验室应制定针对常染色体隐性遗传病基因携带者的报告规范。虽然并不推荐对所有隐性遗传病携带状态进行报告,但是若此类疾病在受检人群中属于高频携带状态的,可以对其进行报告。

12.4 使用包含 SNPs 的微阵列平台的实验室应制定 AOH 区域的报告规范。

12.4.1 由于血缘一致性所致的多个基因组区域出现 AOH 者:①实验室应制定 AOH 区域的报告标准(例如:纯合区域占常染色体基因组的比例  $\geq 3\%$ ),以及 AOH 大小的报告阈值(例如: $\geq 5\text{Mb}$ )。②建议将以下信息纳入至报告内容内:多个染色体上出现 AOH 区域的现象常见于正常个体中,特别是在父母具有血亲关系或具有共同祖先的孤立人群中多见。此报告结果并非诊断性结果,但 AOH 区域内若存在纯合突变可能导致隐性遗传病发病率增高。

12.4.2 在单一一条染色体上出现 AOH 并且已排除为亲缘所致时:①实验室应建立与印迹综合征相关的染色体(6、7、11、14、15 号染色体)上的 AOH 大小报告阈值。②目前仍没有足够的证据提示用于预测 UPD 的最佳 AOH 大小报告阈值,但按目前的实践中,最常用的截值为大于 8~10Mb。③因为局限于 1 条染色体上的 AOH 并不一定与真正的 UPD 有关,因此,若临床症状与印迹综合征相一致时,应对患者进行 UPD 的标准分子检测(如:对先证者及其父母进行多态标记的分析/甲基化检测)以帮助确诊。

12.5 报告中应包括的内容 ①像其他细胞遗传学报告一样,包括患者的个人相关信息;②分析结果的 ISCN 命名描述;③具有临床意义的结果报告描述, CNVs 内的基因内容(例如:已知基因的数目,

OMIM 致病基因的种类),不平衡片段的大小和位置,以及后续建议;④提供微阵列平台上全基因组的探针覆盖及检测的有效分辨率的相关信息描述,若在具有临床意义区域片段的分辨率有别于基因组余下区域分辨率时,应在报告中体现;⑤所用于参考的基因组序列版本号(例如:GRCh37);⑥用于微阵列数据分析的软件程序;⑦微阵列分析中使用的参照DNA或硅胶对照参考数据集的相关信息;⑧微阵列局限性的相关信息,例如:嵌合体、平衡易位等。

**12.6 报告资质** ①实验室遗传分析师需为经过CCMG/ABMG认证的临床细胞遗传学家和(或)分子遗传学家;②实验室遗传分析师应熟悉染色体结构、异态性、染色体不平衡改变及细胞遗传学命名的相关规则;③如果微阵列技术用于恶性肿瘤分析,那么实验室遗传分析师应至少为经过CCMG/ABMG认证的临床细胞遗传学家或曾经过系统的分子病理学训练。

### 13 报告周期

**13.1 常规报告时间** 90%样本应在标本收集后4周内发放报告。

**13.2 快速出报告者(新生儿)** 90%样本需要在2周内应有一个未有确切微阵列结果的初始报告。

### 14 需被保存的实验室数据文件

那些需要被保存的文件包括:①质控记录;即DNA样本质量、标记效率、微阵列QC测量结果;②所有试剂的批号;③设备维护记录;④微阵列软件发

现的所有经确证或未经确证的异常信号;⑤实验失败及重复实验的记录;⑥相关资料需保存20年。

### 15 欠佳实验样本的处理方法

①如果可以的话,行再次取材;②如果不可以进行再次取材(如死亡后标本),可以将本次CMA报告作为有限的可采信的报告。

### 16 平台的校正

①当实验室将此技术作为诊断手段或需要更换平台时,需要对平台进行校正,至少需要对30份已知异常的标本进行准确检验;②对于微阵列平台升级版本的校正,需要对5份已知异常的标本进行准确检验。

### 17 其他相关指南

- American (Shaffer et al. 2007) and European (Vermeesch et al. 2007) guidelines 9
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) document MM12-A (2006)
- International Standard for Cytogenomic Arrays (ISCA) consensus statement (Miller et al. 2010)
- ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013 (South et al. 2013)