

芯片技术及其在医学遗传染色体异常诊疗中的应用指南

ACMG

声明:此实践指导旨在为医疗工作者在进行专业医学遗传咨询时提供参考。此实践指导不能完全保证最佳医疗效果。此指导并未涵盖所有的诊疗手段与检查,也无意摒除某些特定的诊疗手段与检查。遗传咨询专家应基于患者个体差异以及样本差异决定适当的检查与诊疗手段。如对患者使用与本指导不一致的诊疗,决策原因必须加以记录。

1 简介

随着比较基因组杂交芯片以及单核苷酸多样性微阵列分析等微阵列技术在临床上的应用,实验室对于患者在发育迟缓/智力障碍(DD/ID)、先天畸形以及异形的评价体系在近几年产生了很大的变化。患者基因组中无法用经典 G 显带方法检测的小缺失和小重复,现在都能用这些方法检测到。由于这些年全基因组拷贝数微阵列技术在临床应用的日渐广泛,我们在这里对相关指南进行更新。

2 微阵列技术在基因组拷贝数变异中的应用

自从 20 世纪 60 年代晚期染色体显带技术问世以来,细胞遗传学诊断检查已经发生了显著的变化^[2]。一些 DNA 相关技术,例如基因组拷贝数微阵列(细胞遗传学微阵列,即 CMA),已经成为目前临床应用的最新技术^[1]。比较基因组杂交最初是用来通过一次实验进行全基因组不平衡重组的筛查^[1,3-5]。然而传统意义上的比较基因组杂交只有 3~10 Mb^[4]的分辨率,与高分辨率核型分析区别不大^[1],所以后来被微阵列技术加以利用^[6]。芯片比较基因组杂交技术是利用玻璃衬底来附着被克隆的细菌人工染色体(BACs)或被合成的如寡聚核酸(oligos)DNA 片段,从而作为基因组在染色体上的精确定位^[1,7,8]。通过比较患者和标准 DNA 的杂交效率可得出拷贝数差异^[7],单核苷酸多态性杂交芯片可用来检测基因组拷贝数差异,也可以检测拷贝

数中立区的同源性。这种情况下,患者的 DNA 被标记并杂交到微阵列上,通过比较患者及某一已知 DNA 的杂交结果来得出结论^[9]。需要指出的是,并不是所有的基因组拷贝数变异都是病理现象,目前已知正常人平均基因组拷贝数变异在 800 或更多^[10]。

芯片的分辨率及产出取决于其对基因组的覆盖率(探针的长度和间距)^[3,11,12],以及统计时设定的标准。微阵列技术相对于传统细胞遗传学分析具有更高的分辨率,为鉴别染色体异常提供了更加精确、敏感的技术。

3 临床应用

Rauch 等^[13]通过研究不明原因认知障碍患者的遗传诊断,比较了不同遗传学检查的有效性。他们的研究表明,分子核型分析对新型染色体异常仅有不到 0.6%的漏检率。他们指出分子核型分析在认知障碍患者单测试诊断中确诊率最高(28.9%),故作者提议此检查作为一线检测。近日 Miller 等^[14]发表的一篇综述讨论将 CMA 作为发育迟缓/智力障碍(DD/ID)、多种并发先天畸形、自闭症候群(ASD)的一线检测手段。上述基于 21 698 例具有相关症状患者的研究表明,CMA 作为一线检测具有比传统 G 显带染色体核型分析检测手段高 12.2%的确诊率。Hochstenbach 等^[15]通过评估 36 325 例 DD/ID 患者得出结论,CMA 适合作为此类患者的一线检测。他们发现病理性异常达到

19%。Shen 等^[16]研究了 CMA 在自闭症患儿诊断中的应用,并发现 CMA 适用于此类病患的一线检测方案。他们发现核型分析以及脆性 X 染色体检测的检出率分别为 2.23% 和 0.46%,而微阵列的检出率为 18.2% ($n=848$),其中 7% 为显著异常。用 CMA 检测到的新型拷贝数变异(CNVs)以及亚显微缺失和复制,表现出与 ASD 的相关性,这些异常往往位于基因组中与自闭症相关的基因位点^[19,20]。CMA 还被应用到某些用传统方法检测为平衡易位但具有生理性或认知障碍的患者。CMA 检测显示这些易位往往是不平衡易位,数个研究显示大约有 20% 的个体,用传统方法检测显示为新发或家族性平衡易位,但用 CMA 检测时显示为非平衡易位^[21,22]。近期研究表明 CMA 在其他医学应用中也有显著价值。Adam 等报道了 3 例发育迟缓或畸形患者,通过 CMA 检测发现了抑癌基因的微缺失。在另一个病例数更大的研究中,Adams 等^[24]发现大约 0.18% 的患者具有肿瘤易感基因的缺失或获得。2 篇报道的作者都强调了 CMA 在这些检测中的重要性,提示 CMA 除了能为发育迟缓/并发先天性畸形提供遗传学解释,也能为这些患者提供肿瘤易感性信息。

微阵列分析不仅能检测某些影响特定基因拷贝数的变异,也能辨别由于基因组断裂被破坏的基因。这种破坏可能是由于破坏编码序列,也可能是由于影响到转录或翻译效率。相关的例子如断裂破坏了转录启动子,也有例子表明 NRXN1 和 CNTN4 基因会被这种情况破坏^[25,26]。Moeschler 等^[27,28]以及 Saam 等^[1,29]指出,正确的诊断能为临床医生提供机会明确治疗方法、预后、复发几率以及避免不必要的检测。

4 检测平台

尽管微阵列分析能有效检测染色体不平衡,最终能提高患者治疗水平^[29],临床医生在下医嘱前应了解不同的临床检测平台特性(例如选择 BAC 还是 oligo,选择针对某组基因还是全基因组或单核苷酸多态性),以及不同平台能提供的不同分辨率和信息量。例如,许多临床医生不了解全基因组寡

聚核苷酸芯片技术能检测到细菌人工染色体芯片技术不能检测到的拷贝数变异^[30],也不了解单核苷酸多态性芯片能检测由于染色体同源引起的长片段同源性(LCSH),2 种异常都增加常染色体隐性风险。

芯片分辨率取决于探针的种类、数量以及探针在基因组的分布情况^[31]。细菌人工染色体探针比寡核苷酸探针(应用于寡核苷酸或单核苷酸多态性芯片)而言更长(BACs 为 75 000~150 000 个碱基,寡核苷酸多为 50~60 个碱基)。这个差异导致了 BAC 芯片对拷贝数变异检测的特异性相对较低。在寡核苷酸芯片中使用更高的探针密度能通过多个相连的探针评估拷贝数,增加检测结果的准确性。寡核苷酸芯片相对于 BAC 芯片具有更高的可重复性和更少实验间差异的特点^[31]。

单核苷酸多态性(SNP)微阵列也能提供全基因组拷贝数分析。此外,SNP 芯片能检测例如片段性染色体同源这一类的“拷贝数中立”异常;此类 LCSH 会引起病变、先天性畸形或认知障碍^[32,33]。SNP 芯片正被越来越多地应用于认知障碍或发育迟缓伴或不伴有并发畸形的诊断^[9,11]。

在下 CMA 检测医嘱时,临床医生需了解不同的检测平台和它们的局限性,需咨询检测实验室芯片是否涵盖目的区域(例如端粒,X 染色体,常见微缺失区域)。临床医生还需了解发现异常结果后,何种后续检测能被使用。另外,对于缺失或复制的情况,应进行对父、母亲的检测(FISH 或有丝分裂中期染色体检测)以甄别插入或遗传性复制引起的染色体重组。此类家庭虽然存在几率低,但复发率高达 50%。随着诊断检测手段的增加,人们开始了解更多可能的以及过去未曾预料到的检测结果。比较基因组杂交芯片以及我们现在了解的良性拷贝数变异就是这样的例子。超过 75 间实验室组成了一个国际协会来解答一些关于芯片检测的问题。国际标准细胞基因组芯片协会(ISCA 协会, <https://isca.genetics.emory.edu/iscaBrowser/>) 致力于标准化和统一 CGH 检测结果的汇报和分类,包括病理性和良性的,以便为临床医生提供最准确和最新的信息^[14]。目前有几个数据库可供参考基因位点及功能:拷贝数变异和最新的病变信息有加州大学圣塔科鲁兹分校数据库 (<http://www.genome.uscs.edu>)、

多伦多基因组变异数据库 (<http://projects.tcag.ca/variation/>), DECIPHER (<http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decip>) 和 ECARUCA^[34]。如前所述,决定使用 CMA 检测的临床医生需了解 CMA 的改进及局限性。CGH 芯片不能检测到易位、倒位平衡染色体重组或是鉴别染色体三体和罗伯逊平衡易位^[13,35,36]。如使用了不当的性别作为对照,一些非整倍性例如 XYY 会被漏检^[31]。由于芯片涵盖范围、标志染色体组成情况以及标志染色体上特定染色体成分的差异,一些标志染色体也会被漏检。有报道显示此检测可被应用于嵌合体,但因准确率较低^[37]而受到质疑^[35,36]。近期 Scott 等^[38]提示带有多余染色体的嵌合体有 10% 能被检出,带有缺失或染色体片段重复的嵌合体能有 20%~30% 的检出率。这些研究结果有待验证。有时当亲本样品缺失或数据库数据不全会影响到对某些罕见拷贝数变异的诠释,且某些微阵列检测不能检出三倍体。

微阵列技术检测不适用于快速检测(例如 STAT 新生儿分析),尤其是疑似染色体三体的情况。目前一个 STAT G 显带染色体分析只需要 48 小时。应用 CGH 芯片,仅杂交一步就需要 48 小时。完成芯片检测一般需要 3~5 天,分析、整合 FISH 结果(研发一个新探针需要几周时间)、分析患者样品以及最终得出结论则需要更长时间。

尽管微阵列是有力的诊断染色体拷贝数变异的工具,但该类检测并不适用于所有的一线检测。例如,传统核型分析更适用于常见的疑似非整倍体(如 21 三体、18 三体或性染色体非整倍性)。在诊断如 Williams 综合征一类研究非常完全的综合征,利用单探针 FISH 会更加经济有效。CMA 不应被用于家族性染色体重组无症状个体或多次流产个体^[14]。最后,CMA 不能检出低水平嵌合体或是多倍体。

5 推荐指南

5.1 在下列出生后个体评估中推荐使用细胞遗传微阵列检测(CMA)作为一线检测手段:

- ① 不符合常见遗传综合征的多种畸形;
- ② 非综合征型的发育迟缓/智力障碍;
- ③ 自闭症症候群。

5.2 推荐使用 CMA 对于某些生长迟缓,言语发育迟缓或其他罕见症状的患儿进行进一步研究检测,

特别是前瞻性研究和后继分析。

5.3 对于使用 CMA 检测出的染色体不平衡重组,推荐有效的随访检查,可以进行对患者及亲本的细胞遗传学/FISH 检查,临床遗传评估及咨询服务。

参考文献

- [1] Manning M, Hudgins L. Use of array-based technology in the practice of medical genetics[J]. *Genet Med*,2007, 9:650-653.
- [2] Trask BJ. Human Cytogenetics:46 chromosomes, 46 years and counting[J]. *Nat Rev Genet*,2002,3:769-778.
- [3] Shaffer LG, Beaudet AL, Brothman AR, et al. Microarray analysis for constitutional cytogenetic abnormalities [J]. *Genet Med*,2007,9:654-662.
- [4] Pinkel D, Segraves R, Sudar D, et al. High resolution analysis of DNA copy-number variation using comparative genomic hybridization to microarrays[J]. *Nat Genet*,1998,20:207-211.
- [5] Bejjani BA, Saleki R, Ballif BC, et al. Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalances: is less more? [J]. *Am J Med Genet*,2005,134:259-267.
- [6] Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 1997,20:399-407.
- [7] Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its application in human genetics[J]. *Clin Genet*,2004,66:488-495.
- [8] Snijders AM, Nowak N, Segraves R, et al. Assembly of microarrays for genome-wide measurements of DNA copy number[J]. *Nat Genet*,2001,29:263-264.
- [9] Bernardini L, Alesi V, Loddo S, et al. High-resolution SNP arrays in mental retardation diagnostics: how much do we gain? [J]. *Eur J Hum Genet*,2010,18:178-185.
- [10] Tyson C, Harvard C, Locker R, et al. Submicroscopic deletions and duplications in individuals with intellectual disability detected by array-CGH [J]. *Am J Med Genet*, 2005,139:173-185.
- [11] Friedman JM, Adam S, Arbour L, et al. Detection of pathogenic copy number variants in children with idiopathic intellectual disability using 500 K SNP array genomic hybridization[J]. *BMC Genomics*,2009,10:526.
- [12] Moeschler JB, Shevell M. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays[J]. *Pediatrics*,2006,117: 2304-2316.
- [13] Rauch A, Hoyer J, Guth S, et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation [J]. *Am J Med*

- Genet, 2006, 140: 2063-2074.
- [14] Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: Chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies [J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 86: 749-764.
- [15] Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, et al. Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36, 325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands [J]. *Eur J Med Genet*, 2009, 52: 161-169.
- [16] Shen Y, Dies KA, Holm IA, et al. Clinical genetic testing for patients with autism spectrum disorders [J]. *Pediatr*, 2010, 125: 727-735.
- [17] Ullmann R, Turner G, Kirchhoff M, et al. Array CGH identifies reciprocal 16p13.1 duplications and deletions that predispose to autism and/or mental retardation [J]. *Hum Mutat*, 2007, 28: 674-682.
- [18] Miller DT, Shen Y, Weiss LA, et al. Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders [J]. *J Med Genet*, 2008, 46: 242-248.
- [19] Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism [J]. *Science*, 2007, 316: 445-449.
- [20] Christian SL, Brune CW, Sudi J, et al. Novel submicroscopic chromosomal abnormalities detected in autism spectrum disorder [J]. *Biol Psychiatry*, 2008, 63: 1111-1117.
- [21] Edelmann L, Hirschhorn K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2009, 1151: 157-166.
- [22] Sismani C, Kitsiou-Tzeli S, Ioannides M, et al. Cryptic genomic imbalances in patients with de novo or familial apparently balanced translocations and abnormal phenotype [J]. *Mol Cytogenet*, 2008, 1: 15.
- [23] Adam MP, Justice AN, Schelley S, et al. Clinical utility of array comparative genomic hybridization: uncovering tumor susceptibility in individuals with developmental delay [J]. *J Pediatr*, 2009, 154: 143-146.
- [24] Adams SA, Coppinger J, Saitta SC, et al. Impact of genotype-first diagnosis: the detection of microdeletion and microduplication syndromes with cancer predisposition by aCGH [J]. *Genet Med*, 2009, 11: 314-322.
- [25] Rujesco D, Ingason A, Cichon S, et al. Disruption of the neurexin 1 gene is associated with schizophrenia [J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18: 988-996.
- [26] Roohi J, Montagna C, Tegay DH, et al. Disruption of contactin 4 in three subjects with autism spectrum disorder [J]. *J Med Genet*, 2009, 46: 176-182.
- [27] Moeschler JB. Medical genetics diagnostic evaluation of the child with global developmental delay or intellectual disability [J]. *Curr Opin Neurol*, 2008, 21: 117-122.
- [28] Moeschler JB. Genetic evaluation of intellectual disabilities [J]. *Semin Pediatr Neurol*, 2008, 15: 2-9.
- [29] Saam J, Gudgeon J, Aston E, et al. How physicians use array comparative genomic hybridization results to guide patient management in children with developmental delay [J]. *Genet Med*, 2008, 10: 181-186.
- [30] Miller DT, Shen Y, Wu B-L. Oligonucleotide microarrays for clinical diagnosis of copy number variation [J]. *Curr Protoc Hum Genet*, 2008, 58: 8.12.1-8.12.17.
- [31] Shearer BM, Thorland EC, Gonzales PR, Ketterling RP. Evaluation of a commercially available focused aCGH platform for the detection of constitutional chromosome anomalies [J]. *Am J Med Genet*, 2007, 143A: 2357-2370.
- [32] Bruno DL, Ganesamoorthy D, Schoumans J, et al. Detection of cryptic pathogenic copy number variations and constitutional loss of heterozygosity using high resolution SNP microarray analysis in 117 patients referred for cytogenetic analysis and impact on clinical practice [J]. *J Med Genet*, 2009, 46: 123-131.
- [33] McCarroll SA. Extending genome-wide association studies to copy number variation [J]. *Hum Mol Genet*, 2008, 17: R135-142.
- [34] Van Vooren S, Cossens B, De Moor B, et al. Array comparative genomic hybridization and computational genome annotation in constitutional cytogenetics: suggesting candidate genes for novel submicroscopic chromosomal imbalances syndromes [J]. *Genet Med*, 2007, 9: 642-649.
- [35] Lu X, Shaw CA, Patel A, et al. Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: summary of 2513 postnatal cases [J]. *PLoS ONE*, 2007, 2: e327.
- [36] Xiang B, Li A, Valentin D, et al. Analytical and clinical validity of whole-genome oligonucleotide array comparative genomic hybridization for pediatric patients with mental retardation and developmental delay [J]. *Am J Med Genet*, 2008, 146A: 1942-1954.
- [37] Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2007, 17: 182-192.
- [38] Scott SA, Cohen N, Brandt T, et al. Detection of low-level mosaicism and placental mosaicism by oligonucleotide array comparative genomic hybridization [J]. *Genet Med*, 2010, 12: 85-92.

姚怡心 摘译
许争峰 校对