

“采用双末端大规模平行测序对孕妇尿液中的胎儿 DNA 的高分辨率分析”点评

郑枫芸

(复旦大学生物医学研究院, 上海 200032)

1 论文题目及原文摘要

1.1 论文题目

High Resolution Size Analysis of Fetal DNA in the Urine of Pregnant Women by Paired-End Massively Parallel Sequencing

1.2 摘要

Background Fetal DNA in maternal urine, if present, would be a valuable source of fetal genetic material for noninvasive prenatal diagnosis. However, the existence of fetal DNA in maternal urine has remained controversial. The issue is due to the lack of appropriate technology to robustly detect the potentially highly degraded fetal DNA in maternal urine.

Methodology We have used massively parallel paired-end sequencing to investigate cell-free DNA molecules in maternal urine. Catheterized urine samples were collected from seven pregnant women during the third trimester of pregnancies. We detected fetal DNA by identifying sequenced reads that contained fetal-specific alleles of the single nucleotide polymorphisms. The sizes of individual urinary DNA fragments were deduced from the alignment positions of the paired reads. We measured the fractional fetal DNA concentration as well as the size distributions of fetal and maternal DNA in maternal urine.

Principal Findings Cell-free fetal DNA was detected in five of the seven maternal urine

samples, with the fractional fetal DNA concentrations ranged from 1.92% to 4.73%. Fetal DNA became undetectable in maternal urine after delivery. The total urinary cell-free DNA molecules were less intact when compared with plasma DNA. Urinary fetal DNA fragments were very short, and the most dominant fetal sequences were between 29 bp and 45 bp in length.

Conclusions With the use of massively parallel sequencing, we have confirmed the existence of transrenal fetal DNA in maternal urine, and have shown that urinary fetal DNA was heavily degraded.

2 论文核心内容及点评

传统产前分子遗传诊断主要采用侵入性取样方法,如绒毛膜取样、羊膜腔穿刺等,可能造成自然流产、胎儿损伤、羊水持续渗漏感染及栓塞等严重后果,非侵入性产前诊断是临床运用的新方向。

香港中文大学的卢煜明教授是非侵入性产前诊断技术的首创者。早在 1997 年,他率先发现孕妇外周血中存在游离的胎儿 DNA,2010 年开发出一种新的非侵入性检测技术,即通过母亲的血液样本获得胎儿的全基因组图谱。他们采用双末端大规模平行测序技术 (paired-end massively parallel sequencing) 对血浆 DNA 分子进行测序,通过比对寻找匹配的胎儿 DNA 序列。

大规模平行测序技术 (massively parallel sequencing, MPS) 是基于 Sanger 测序的高通量基因测序新技术,是目前三大主要的二代测序技术之一。构建末端配对测序 (paired-end sequencing) 的

DNA文库,为基因组进一步拼接提供定位信息。此技术因高准确性、高灵敏度及运行成本相对较低等优势,被越来越多地应用于基因组学研究中。

今年,卢煜明教授的研究团队又运用 MPS 在另一种临床上重要的体液—孕妇尿液中检测游离的胎儿 DNA。本研究结果发表在 2012 年 10 月的《Science Translational Medicine》上,第一作者是 Nancy Bo Yin Tsui。

孕妇的尿液中如果存在胎儿 DNA,那么将成为非常宝贵的无创产前诊断资源。然而,胎儿 DNA 是否存在孕妇尿液中一直存在争议。问题或许在于目前缺乏恰当的技术手段检测存在于母亲尿液中,可能大部分已降解的胎儿 DNA。

尿液中的游离 DNA 主要有 2 个来源:尿道细胞降解的 DNA 和血浆透过肾脏滤过屏障排泄到尿液中的 DNA。血浆中的胎儿 DNA 在母体分娩后被迅速清除,半衰期为 16 分钟,一种可能的机制是血浆中的胎儿 DNA 穿越肾脏屏障排泄到母亲的尿液中。作者基于此假设,采用 MPS 来精确测量母体尿液中胎儿 DNA 分子的片段大小、浓度的高分辨率谱。

他们分别收集了孕妇在分娩前用导尿管收集的尿液和自然排泄的尿液,并以 1 例男性和 1 例非孕女性的尿液为对照,通过实时荧光定量 PCR 检测 *Leptin* 基因 DNA 片段(*LEP*)的浓度,发现自然排泄的尿液中游离胎儿 DNA 的浓度显著高于导尿管收集的尿液(图 1)。

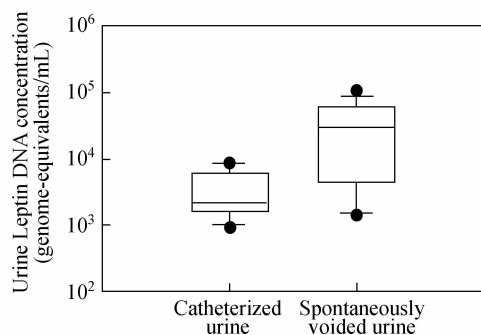


图 1 导尿管收集的尿液和自然排泄的尿液中 *LEP* 基因 DNA 片段的浓度比较

接着,作者通过特异的单核苷酸多态(SNP)等位基因序列来识别胎儿的 DNA。主要原理是根据母亲为纯合子(AA)基因型而胎儿为杂合子(AB)的

SNP 进行确定。计算胎儿特异的等位基因(B 等位基因)和与母体共享等位基因(A 等位基因)的数目,通过公式获得胎儿 DNA 占孕妇尿液的百分数。7 个尿样中共检测到 5 个样本中含胎儿游离 DNA,浓度范围在 1.92%~4.73%,分娩后的产妇尿中检测不到胎儿游离 DNA。

研究者还测量了胎儿和母体 DNA 在尿液中的大小分布。他们将匹配序列与人基因组参考序列(hg18)进行位置比对,推导每例尿液中的 DNA 片段大小。尿液中胎儿游离 DNA 分子的总体完整性低于血浆中的游离 DNA(图 2),这些 DNA 片段一般很短,大部分长度在 29~45bp 之间。

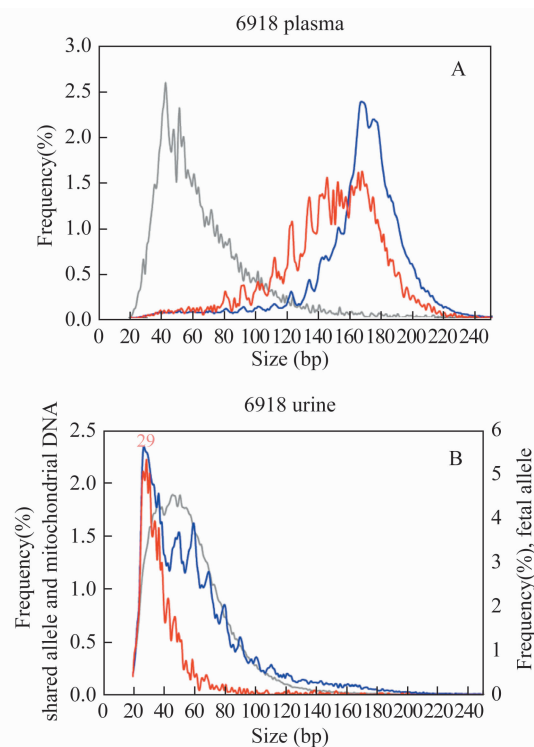


图 2 孕妇血浆与尿液 DNA 片段分布比较
注:A:6918 号孕妇血浆;B:6918 号孕妇尿液。红色曲线为胎儿 DNA,蓝色曲线为母体 DNA,灰色曲线为线粒体 DNA

虽然与血浆相比,孕妇尿液中胎儿 DNA 片段更短,浓度和检出率(71%)偏低,并且此研究局限于妊娠晚期,但这种摸索性的大胆尝试,为产前诊断的方法学研究领域开拓了新思路。如果今后能扩大样本量,进行规模性、系统性的研究,则将能为临床提供有意义的数据。相信在未来几年,随着先进的技术手段的运用,检测胎儿 DNA 进行非侵入性产前诊断将在临床上有更广泛的应用。

产前诊断中的染色体芯片与核型分析:孰优孰劣

刘邓浩 摘编

2012 年 12 月 6 日出版的第 367 卷《新英格兰医学杂志》的封面论文主题为基因芯片,本文为其中一篇,标题为“Chromosomal Microarray versus Karyotyping for Prenatal Diagnosis”。哥伦比亚大学医学中心为主的研究人员历时四年进行了一项临床试验,评估了基因芯片在产前诊断中的应用前景,并与传统染色体核型分析进行了比较。

染色体微阵列基因芯片检测在北美已经作为评价儿童发育迟缓和结构畸形的一个主要诊断工具。而在产前诊断领域,对胎儿染色体进行可视化的核型分析是目前的标准方法。在美国国家儿童健康与人类发展研究院主导下,项目研究目的是评估基因芯片在产前诊断中的准确性、有效性以及可能的新增功能。研究的检测样本来源于 29 个产前诊断中心的 4406 名孕妇,每份标本被一分为二,其中传统核型分析由一家中心实验室完成,基因芯片分析由

四家实验室之一承担。这些孕妇的高危因素包括高龄产妇(46.6%)、唐氏综合征血清学筛查异常(18.8%)、超声结构异常(25.2%)及其他(9.4%)。研究结果表明,98.8%的样本可用于芯片检测,87.9%的样本无需组织培养即可直接检测。基因芯片技术可以识别出传统核型分析所能检测的所有非整倍体和不平衡重排,但对识别平衡易位和胎儿三倍体却无能为力。

研究人员同时指出,有时核型分析并未检测到,但超声检查发现胎儿生长或结构异常的这类病例中,有 6%都可以通过芯片检测发现染色体的缺失或重复。对于高龄产妇或产前筛查呈阳性的病例来说,在核型分析为正常时,有 1.7%却可以经由芯片检测到异常,从而提供更多的细胞遗传学信息。因此,在未来,基因芯片有望取代核型分析成为评价胎儿染色体异常的候选标准方法。

基因芯片技术更有利于揭秘死产的原因

刘邓浩 摘编

本文标题为“Karyotype versus Microarray Testing for Genetic Abnormalities after Stillbirth”,与前一篇文章一起发表于 2012 年 12 月第 367 卷的《新英格兰医学杂志》上。来自于得克萨斯大学医学分校的研究者使用基因芯片微阵列技术对死产婴儿的染色体进行分析研究,研究表明这种微阵列技术相比过去的核型分析技术更为有效。

在美国 160 例孕妇生育过程中就会有一例发生死产,6%~13%的死产与染色体异常有关,事实的情况可能更高。该项研究借助于涵盖 5 个地区人群

的 59 家医院的死产联合研究网络,采用标准化的尸检和核型分析流程,进行了长达两年半的研究分析。通过对比 532 例死产婴儿的核型分析结果以及基因芯片分析结果表明:在所有病例中,基因芯片技术比核型分析提高染色体异常诊断率 41.9%(其中宫内死胎病例提高 34.5%;产后死产病例提高 53.8%),可见对于合并先天异常的死产遗传病因分析时,芯片技术更具价值。另外使用基因芯片技术还可以检测出婴儿机体染色体微小缺失或者遗传信息的额外碎片,这些都是核型分析所不能检测出来的。而且