

基于分子条形码标记的超深度二代测序技术在儿童急性白血病微小残留病检测中的应用*

王明敏^{1,2}, 肖剑文^{1,3}, 雷小英^{1,2}, 杨山^{4,5△}

(1. 重庆医科大学附属儿童医院血液肿瘤中心, 重庆 400014; 2. 重庆儿童医院儿科研究所, 重庆 400014; 3. 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 重庆 400014; 4. 儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014; 5. 重庆市万盛开发区人民医院儿科, 重庆 400800)

摘要:目的 建立分子条形码(UMI)标记的超深度二代测序(NGS)技术检测儿童急性白血病微小残留病(MRD)的方法,并分析该方法的灵敏度和特异度。**方法** 采集 35 例急性白血病患者初诊及诱导治疗后骨髓标本,初诊时采用 NGS 技术行全外显子组检测并寻找肿瘤基因突变作为 MRD 检测标记,诱导治疗后采用 UMI 标记的超深度 NGS 技术检测肿瘤基因突变率作为 NGS-MRD 指标。流式细胞术(FCM)及 RT-PCR 技术分别寻找 MRD 检测标记,诱导治疗后采用 FCM 及 PCR 技术检测患儿 MRD 水平并进行对比验证。**结果** NGS 技术筛选检测标记的阳性率高于 FCM 及 RT-PCR 技术($P < 0.05$),NGS 技术检测 MRD 的灵敏度也高于 FCM 及 RT-PCR 技术($P < 0.05$)。FCM 及 NGS 技术检测 MRD 的平均值无显著差异($P > 0.05$)。**结论** UMI 标记的超深度 NGS 技术可能成为儿童急性白血病 MRD 检测的新方法。

关键词:分子条形码; 二代测序技术; 儿童; 急性白血病; 微小残留病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.08.007

中图法分类号:R733.11

文章编号:1673-4130(2019)08-0920-05

文献标识码:A

The application of unique molecular identifier labeled super depth next generation sequencing in minimal residential disease detection of pediatric acute leukemia*

WANG Mingmin^{1,2}, XIAO Jianwen^{1,3}, LEI Xiaoying^{1,2}, YANG Shan^{4,5△}

(1. Department of Hematology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China; 2. Pediatric Research Institute of Children's Hospital, Chongqing 400014, China; 3. Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing 400014, China; 4. Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China; 5. Department of Pediatrics, People's Hospital of Chongqing Wansheng District, Chongqing 400800, China)

Abstract: Objective To establish the methods of minimal residential disease (MRD) detection in pediatric acute leukemia (AL) by using unique molecular identifier labeled next generation sequencing (NGS) technique and to analyse its sensitivity and specificity. **Methods** Bone marrow samples were extracted in 35 cases of pediatric AL before and after remission induction. NGS technique was used for WES sequencing at diagnosis and biomarkers for MRD detection were chosen in patient specific tumor gene mutations. Such gene mutations were detected by unique molecular identifier (UMI) labeled super depth NGS technique and frequencies of mutated genes were recorded as MRD level. MRD markers were also seek by flow cytometry (FCM) and reversed transcriptase polymerase chain reactions (RT-PCR), MRD levels were also detected by FCM and PCR technique after remission induction, sensitivity and specificity of three methods were compared. **Results** Positive rates of MRD marker detected by NGS technique were exceed than that by FCM and PCR technique ($P < 0.05$); sensitivities of MRD monitoring by NGS technique were also Superior to FCM and PCR technique ($P < 0.05$). There was no statistical difference for mean value of MRD levels which were measured by FCM and NGS technique ($P > 0.05$). **Conclusion** UMI labeled super depth NGS technique can be used for MRD monitoring in pediatric AL.

Key words: unique molecular identifier; next generation sequencing; children; acute leukemia; minimal residential disease

* 基金项目:重庆市科学技术委员会(cstc2018jsyj-jsyjX0015)。

作者简介:王明敏,女,硕士在读,主要从事血液肿瘤方向研究。△ 通信作者,E-mail:yangshanzu@126.com。

本文引用格式:王明敏,肖剑文,雷小英,等.基于分子条形码标记的超深度二代测序技术在儿童急性白血病微小残留病检测中的应用[J].

急性白血病(AL)是儿童时期最常见恶性肿瘤,按照细胞来源 AL 可以分为急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓细胞白血病(AML)和急性混合细胞白血病(MPAL)^[1]。微小残留病(MRD)是指白血病经治疗后体内残留白血病细胞的状态,是 AL 独立的预后因素^[2]。目前最为常用的 MRD 检测方法是流式细胞术(FCM)和逆转录 PCR(RT-PCR)技术。但部分患儿无法找到合适标记故无法使用 FCM 方法检测 MRD,且治疗后的残留白血病细胞免疫表型可发生改变,检测结果可能出现假阳性和假阴性^[3];PCR 技术准确可靠,但超过 50%的 AL 患儿初诊时白血病融合基因筛查阴性,故无法使用 PCR 技术检测 MRD 水平^[4]。本研究采用二代测序技术(NGS)对初诊 AL 患儿进行全外显子组测序(WES)并确定特异性的肿瘤基因突变,治疗后采用基于分子条形码(UMI)标记的超深度二代测序(SD-NGS)技术监测其突变基因表达情况,研究 SD-NGS 技术在儿童 AL MRD 监测中的价值,寻找新的 MRD 监测方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 9 月至 2018 年 11 月重庆医科大学附属儿童医院血液科收治 AL 患儿 35 例。其中男性 24 例,女性 11 例,平均年龄(82.31±8.86)个月。所有患儿诊断时年龄均 < 18 岁,且按照 WHO-2016 造血与淋巴组织肿瘤分类标准^[5]完善检查确诊为 AL。Burkitt 白血病、继发性白血病、急性早幼粒细胞白血病、既往接受过抗白血病治疗、合并其它肿瘤性疾病及未能完成诱导缓解疗程患儿未纳入本研究。本研究获得重庆医科大学附属儿童医院伦理委员会批准,所有患儿家属均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 35 例患儿中包括前体 B-ALL(BP-ALL)22 例、T-ALL 4 例、AML 6 例和 MPAL 3 例,MPAL 均为 B-ALL 与 AML 双系列型。患儿均接受一个疗程诱导治疗并达到完全缓解(CR):ALL 及 MPAL 按照改良的 St. Jude Total-XV-ALL 方案^[6]化疗,AML 按照 COG-AML 方案^[7]化疗。CR 定义为^[6-7]:1 个疗程化疗结束,骨髓抑制解除,(1)临床上无明显出血、感染及白血病浸润表现;(2)血常规血红蛋白 > 90 g/L,血小板 > 100 × 10⁹/L,白细胞正常或减低,分类无幼稚细胞;(3)骨髓细胞学提示增生活跃或明显活跃,且白血病细胞 < 5%。采集患儿初诊及诱导治疗结束后骨髓液进行检测,采集患儿父母外周血作为 WES 测序对照样本,若无法获取患儿父母样本则选择诱导治疗结束后患儿口腔黏膜刮片细胞作为对照样本。

1.2.2 FCM-MRD 检测 诊断时采集患儿 EDTA 抗凝骨髓液,利用 8 色流式细胞仪确定 ALL、AML 及 MPAL 患儿白血病相关免疫表型(LAIP)^[8-9]。未能发现 LAIP 标记则均应用以下简易抗体组合^[8-9]:B-

ALL:CD19、CD10 及 CD3;T-ALL:CD3 及 TdT;AML:CD34、CD117、CD33、CD38、CD19、CD56、CD64、CD14 及 HLA-DR 等。

诱导结束后,采集 EDTA 抗凝骨髓液 2 mL 并分离单个核细胞(MNC),根据初诊时 LAIP 选择个体化检测抗体组合或利用简易组合,使用流式细胞仪检测 FCM-MRD。出现下述情况则定义为 FCM-MRD 阳性^[8-9]:正常表达的抗原强度发生改变(增强或减弱)和/或丢失、异常表达其他系别标志、早期和晚期抗原同时表达、幼稚细胞明显增多且均质性表达等。以这些残存细胞占骨髓 MNC 总数比例作为 MRD 数值。ALL 和 AML 分别以 FCM-MRD < 10⁻⁴ 和 FCM-MRD < 10⁻³ 为阴性^[3,9],MPAL 分别记录 ALL 及 AML 细胞群 FCM-MRD 水平。

1.2.3 PCR-MRD 检测 诊断时采集患儿 EDTA 抗凝骨髓液,采用多重巢式 RT-PCR(mutiplex RT-PCR)技术行 29 种白血病融合基因筛查^[10]。ETV6/RUNX1、BCR/ABL、TCF3/PBX1、RUNX1/RUNX1 及 CBFb/MYH11 等常见基因阳性者采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术检测标本基因拷贝数、已知浓度标准品浓度,利用待测标本 ABL 浓度作为对照,得出待测标本基因拷贝数、基因拷贝数与 ABL 浓度比值^[11];MLL 重排、SIL/TAL 等少见基因阳性者则采用 RT-PCR 技术复核^[11]。

融合基因阳性患儿诱导结束后,采集 EDTA 抗凝骨髓液分离 MNC 并提取细胞总 RNA,逆转录为 cDNA。上述常见融合基因采用 qRT-PCR 技术定量检测,基因拷贝数 < 10⁻⁴ 为 PCR-MRD 阴性^[3];少见融合基因阳性者采用 RT-PCR 技术定性检测,未见阳性条带为 PCR-MRD 阴性^[3]。

1.2.4 WES、标记选择及 NGS-MRD 检测 采集患儿诊断时 EDTA 抗凝骨髓液并收集对照样本,使用 QIAamp DNA Blood MiniKit(Qiagen)试剂盒提取基因组 DNA,操作按照试剂盒说明书进行。1%琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 分光光度计进行基因组 DNA 定量检测,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值 1.6~1.8 为合格样本,-20 °C 保存。

WES 测序委托上海新培晶医学检验所完成,平均测序深度 150~200 ×。用 Illumina Pipeline software(version1.3.4)读出原始测序数据,采用本课题组前期建立的方法进行数据信息处理及生物信息学分析,明确致病基因突变位点并采用 Sanger 测序进行突变位点鉴定^[12]。检测结果与对照样本进行比较,排除肿瘤遗传易感基因突变。选择突变率与初诊时 FCM 检测到的白血病细胞比例相当的体细胞基因突变作为 MRD 监测的标记物,若符合条件的肿瘤基因突变 > 5 种时,选择突变频率最高的 5 种作为 NGS-MRD 检测的标记。

NGS-MRD 检测委托北京全谱医学检验实验室

完成,流程大致为^[13-14]:按照 qPCR 引物要求设计引物,引物设计完成后,分别在上下游引物 5'端添加 tag 序列(示例引物:上游引物:CGCTCTCCGATC-TacggccagtNNNNNN;下游引物:CGCTCTTC-CGATCTactataggg NNNNNN),其中 NNNNNN 为随机引物。诱导治疗结束后采集 EDTA 抗凝骨髓液并提取 300 μL 基因组 DNA,尽量减少洗脱体积增加浓度并进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物使用 hiseq2500 测序仪器上机测序后,经 bcl2fastq-2.20 转化得到原始 fastq 序列文件,通过 fastp(版本:v0.18.1,参数:-w 6 -l 50 -U --umi_loc per_read --umi_len 15)识别 UMI 并过滤原始 fastq,得到带有 UMI 标记的 clean fastq 并进行突变分析并记录基因突变率,测序深度≥200 000×。突变率<0.001%为阴性;若 2 种及以上基因突变率≥0.001%时以中位值作为 NGS-MRD 检测结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 对三种 MRD 检测方法的灵敏度、特异度等进行分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对样本 *t* 检验,计数资料以率表示,两组率的比较用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 FCM-MRD 结果 35 例患儿 BP-ALL 及 AML 各有 1 例未找到 LAIP,FCM-MRD 检测标记的检出率 93.94%。诱导治疗后 35 例均进行 FCM-MRD 检测,3 例 BP-ALL 和 2 例 MAPL 阳性,阳性检出率 14.29%。FCM-MRD 阳性 BP-ALL 定量结果分别为 0.30%、0.05%和 0.09%;FCM-MRD 阳性 MAPL 均 AML 标记阴性,ALL 标记分别为 0.13%和 5.05%。

2.2 PCR-MRD 结果 35 例患儿中 10 例检出白血病融合基因,PCR-MRD 检测标记的检出率为 28.57%,分别有 5 例 BP-ALL (TCF3-PBX1 2 例, ZM1Z1-ABL、ETV6-RUNX1 及 MLL/AF9 各 1 例)、1 例 T-ALL (SIL/TAL)、3 例 AML (RUNX1/

RUNXT1 2 例,CBFb/MYH11 1 例)和 1 例 MAPL (BCR/ABL)融合基因阳性。诱导治疗结束后对 10 例初诊融合基因阳性患儿进行 PCR-MRD 检测,2 例初诊 RUNX1/RUNXT1 阳性 AML 患儿 PCR-MRD 阳性,阳性率 20%,其融合基因相对表达值分别为 0.59和 0.004。

2.3 NGS-MRD 结果 35 例初诊时筛选到 1~7 个不同的体细胞肿瘤基因突变致病位点,包括 KIT、KRAS、NRAS、KMT2B、FLT3、ATM、FBXW7、NOTCH1、IKZF3 等,平均检出致病突变(3.03±0.27)个。以上突变作为 NGS-MRD 检测标记,检测标记的检出率为 100%。诱导治疗后,35 例均行 NGS-MRD 检测,20 例结果为阳性,阳性率 57.14%,阳性病例包括 B-ALL 9 例、T-ALL 2 例、AML 6 例及 MPAL 3 例。

2.4 3 种 MRD 检测方法比较 3 种不同方法进行 MRD 标记筛选,NGS-MRD 标记检出率最高(100%),其次为 FCM-MRD(93.94%),而 PCR-MRD 标记检出率最低(28.57%),其阳性率比较,差异有统计学意义(*P*<0.05)。同时对 FCM、PCR 及 NGS 标记 10 例诱导治疗后 MRD 水平进行比较,其灵敏度仍以 NGS-MRD 方法最高(阳性率 60%),差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 1。5 例 FCM-MRD 阳性及 2 例 PCR-MRD 阳性患儿其 NGS-MRD 检测结果均为阳性,见表 2。

表 1 3 种 MRD 检测方法的标记筛选及 MRD 检测结果

项目	FCM		PCR		NGS		df	P
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性		
标记	33	2	10	25	35	0	2	0.000
MRD*	1	9	2	8	6	4	2	0.036

注:*表示 PCR 筛选仅 10 例有阳性标记

表 2 3 种 MRD 检测方法比较阳性结果比较

检测方法	ALL			MPAL		AML	
FCM	0.30%	0.05%	0.09%	0.13%	5.05%	<0.1%	<0.1%
PCR	—	negative	negative	—	—	0.059	0.004
NGS	0.57%	0.089%	0.124%	0.28%	5.98%	2.52%	0.117%

注:—表示无数据;MPAL 的 FCM-MRD 结果为 ALL 细胞群;negative 表示阴性

35 例 FCM-MRD 检测结果平均值为(0.016±0.014)%,NGS-MRD 检测结果平均值为(0.068±0.033)%,进行配对比较,差异无统计学意义(*P*=0.084);如果按照 ALL 及 AML 进行分组比较,差异无统计学意义(ALL:*P*=0.050;AML:*P*=0.190);MPAL 组因样本量较小未作分析。以上结果提示 NGS-MRD 方法的特异性可能不低于其它两种检测方法,见图 1。

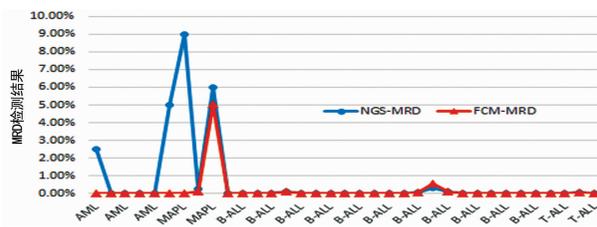


图 1 FCM-MRD 及 NGS-MRD 检测结果

3 讨 论

AL 是儿童期最常见的恶性肿瘤,年发病率 4/10 万~6/10 万,严重威胁儿童生命^[1]。随着诊疗技术进步,儿童 AL 疗效得到不断提高,但终究有部分患儿疾病复发并导致死亡。目前认为,治疗达到 CR 后患儿体内仍剩余微量白血病细胞是导致疾病复发的重要因素^[15]。因此,寻找可靠的指标用于检测 AL 患儿治疗后 MRD 水平对于指导 AL 治疗方案调整非常重要。

目前最为常用的 MRD 检测方法包括:(1)FCM-MRD:即利用 FCM 确定患儿初诊 LAIP,治疗中定期定量随访其表达水平^[8-9]。该方法方便快捷,灵敏度达到 0.001%,是临床最常用的 MRD 检测方法。但部分 AL 患儿无法找到合适检测标记,只能使用简易标记检测 MRD,检查误差较大,本研究的 35 例患儿中有 2 例未找到合适标记;由于治疗后白血病细胞表面的抗原漂移等原因,随着化疗时间延长,FCM-MRD 检测误差也不断增加;APL 等部分 AL 亚型无法使用 FCM 检测 MRD 水平;对于接受异基因造血干细胞移植、CAR-T 疗法等患儿细胞表面抗原发生改变^[15-16],难以应用 FCM 检测 MRD;FCM-MRD 灵敏度为 $10^{-3} \sim 10^{-4}$,相对较低;FCM-MRD 方法受到检测单位技术影响,且难以复核。(2)PCR-MRD:初诊时利用 PCR 技术检测患儿存在的白血病融合基因、治疗后定期随访其基因表达情况^[3]。该方法灵敏度可达 10^{-5} 且特异性强,不受治疗影响;PCR 技术检测到的融合基因类别还可以用于指导诊疗方案调整。因此,长期随访检测时 PCR-MRD 技术可能好于 FCM-MRD 技术^[3]。但文献报道及本课题组前期研究均显示,即使采用 multiplex RT-PCR 技术进行白血病融合基因检测,仍然有超过 50% 的 AL 患儿初诊时白血病融合基因检测阴性^[4-5],不能用该方案检测 MRD;对于常见的融合基因可以采用 qRT-PCR 技术定量检测并客观有效地指导治疗方案调整,而少见的融合基因型则只能采用 RT-PCR 技术定性检测^[11]。因此,需要寻找其它灵敏度高、特异性强的方法用于 AL 患儿 MRD 检测。

各种原因诱发 DNA 损伤并导致的肿瘤基因突变是白血病细胞特异性的标记,全外显子组是人类全部外显子组区域的总称,是致病突变最为集中的区域,如果使用 NGS 技术对初诊 AL 患儿进行 WES 测序,理论上所有的白血病患者都能发现肿瘤细胞基因突变^[17],本研究中 35 例患儿均检测到 1~7 种体细胞肿瘤基因突变。病初检测到的体细胞肿瘤基因突变系白血病细胞突变所致,因此,我们设想将发现的基因突变作为分子标记,治疗后定量随访其突变比例可能是一种灵敏度和特异度均较高的 MRD 检测方法。但每个 AL 患儿基因突变类别存在较大差异,本组患儿初诊时筛选到 1~7 个不同的基因突变位点,若对每种突变都采用 RT-PCR 技术进行 PCR-MRD 检测,则需要设计大量不同的引物和多次反复检测,耗时费力

且成本高、质控也难以进行,并不适用于临床。治疗后患儿的白血病细胞及其基因突变比例均非常低,如果使用 NGS 测序检测突变比例则需要超高深度进行检测,即 SD-NGS 测序^[16]。但 NGS 测序的文库构建、目标区域捕获过程中都涉及到 DNA 聚合酶和扩增,这样会引入一些原始样本基因组上并不存在的错误以及扩增的偏好性^[17];测序环节则取决于不同的测序读长、base calling 算法及检测的突变类型等,它的测序错误率可达 1-0.05%^[18]。这些系统错误,使得人们利用 SD-NGS 测序技术检测低频突变时,难以区分到底是真实的样本突变还是由于这些系统错误所造成的假阳性。因此,直接进行 SD-NGS 测序检测 MRD 的假阳性概率明显增加,使用显著受限。

UMI 又称分子条形码或分子标签^[19],是对原始样本基因组打断后的每一个片段都加上一段特有的标签序列,经文库构建及 PCR 扩增后一起进行测序。UMI 通常由 10 nt 左右随机序列或简并碱基组成。有别于样品标签。UMI 是针对同一个样本中的不同片段加上的标签序列,而样品标签是用于区分不同样本而加上的标签序列,每一个样本只有一个相同的样品标签,但可以有成千上万的分子条形码^[20]。这样,根据不同标签序列就可以区分同一样本中成千上万不同的片段,在后续数据分析中可以通过这些标签序列来排除系统错误,分辨哪些是 PCR 扩增及测序过程中的随机错误造成的假阳性突变,哪些是患者真正携带的突变,从而提高检测的灵敏度和特异度^[18]。以本研究示范的上游引物为例,整个引物序列分为以下几个部分:(1)CGCTCTCCGATCT:为每个目的基因都专门设计的一个标签序列,随着 PCR 扩增后可以作为样品标签区分不同的目的基因;(2)acggccagt:系目的基因的上游引物,PCR 扩增的目的基因序列;(3)NNNNNN:随机引物,评估扩增后是否发生随机错误。

目前广泛应用的 NGS 测序技术的特点是广覆盖和测序深度较低,可以较好地检出高频突变,但频率较低尤其是突变率低于 1% 的时候误差较大。而 UMI 标记的 NGS 技术的优点在于可以同时兼顾测序深度,检出极低频率的突变,但同时又不增加测序的假阳性误差。既往 UMI 技术主要用于微量 DNA 检测,如:考古、物种鉴定及公安机关侦查鉴定等^[19]。AL 患儿化疗后残留的白血病细胞极少,如果采用传统 NGS 测序技术则误差较大,因此本研究设计并建立使用 UMI 技术标记后的 SD-NGS 技术进行 MRD 检测。

对于 ALL 及 MPAL 的 ALL 细胞群,FCM 快捷方便且可靠性较高,已经成为 MRD 检测的常规方法^[8],而对于 AML 和 MPAL 患儿的 AML 细胞群,FCM 检测的应用尚有争议^[21-22]。本研究采用的 NGS-MRD 技术灵敏度(10^{-5})稍高于 FCM-MRD 技术(10^{-4});而对于 AML 和 MPAL 患儿的 AML 细胞

群, NGS-MRD 技术的灵敏度则明显高于 FCM-MRD 技术 (10^{-3})。PCR-MRD 灵敏度虽然较高, 但超过 50% 的 AL 患儿无法采用 PCR-MRD 技术。

4 结 论

总之, 随着科学技术的不断进步, NGS 技术和 WES 测序已经在白血病诊疗中得到广泛应用。本课题组首先采用 WES 测序技术给每个 AL 患儿都能够找到合适的肿瘤基因突变位点作为 MRD 分子标记, 再采用 UMI 标记的 SD-NGS 技术对基因突变位点进行检测, 结果显示 NGS-MRD 技术的灵敏度和特异度都不低于 FCM-MRD 和 PCR-MRD 技术, 且通过 WES 测序还可以发现对治疗方案和预后具有指导意义的基因突变, 可能是一种新的白血病 MRD 检测方法。但本研究的样本量较小, 且对于不同亚型的 AL 患儿本方法对于指导临床诊疗是否具有相同效果尚需进一步研究。

参考文献

[1] AMOON A T, OKSUZYAN S, CRESPI C M, et al. Residential mobility and childhood leukemia[J]. *Environ Res*, 2018(164):459-466.

[2] SCHUURHUIS G J, HEUSER M, FREEMAN S, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party[J]. *Blood*, 2018, 131(12):1275-1291.

[3] 唐雪, 宪莹, 温贤浩, 等. 流式细胞术及 PCR 技术在儿童急性 B 淋巴细胞白血病微小残留病监测中的价值[J]. *现代医药卫生*, 2018, 34(4):502-505.

[4] 邓俊琳, 温贤浩, 郭玉霞, 等. 儿童急性淋巴细胞白血病分子遗传学与临床特征分析[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2018, 49(1):151-154.

[5] LEONARD J P, MARTIN P, ROBOZ G J. Practical implications of the 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid and myeloid neoplasms and acute leukemia[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(23):2708.

[6] EBEID E, KAMEL M, MOUSSA H, et al. ZAP-70 as a possible prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2008, 20(2):121-126.

[7] RAMAMURTHY R, HUGHES M, MORRIS V, et al. miR-155 expression and correlation with clinical outcome in pediatric AML: A report from children's oncology group[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2016, 63(12):2096-2103.

[8] THEUNISSEN P, MEJSTRIKOVA E, SEDEK L, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*, 2017, 129(3):347-357.

[9] LANGEBRAKE C, CREUTZIG U, DWORZAK M, et al. Residual disease monitoring in childhood acute myeloid

leukemia by multiparameter flow cytometry; the MRD-AML-BFM Study Group[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(22):3686-3692.

[10] PALLISGAARD N, HOKLAND P, RIISHØJ D C, et al. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia[J]. *Blood*, 1998, 92(2):574-588.

[11] 肖剑文. 31 种融合基因在儿童急性白血病中的表达及临床意义[D]. 重庆:重庆医科大学, 2017.

[12] 姚新原, 温贤浩, 宪莹, 等. 二代测序技术在儿童 T 淋巴瘤细胞淋巴瘤全外显子测序中的应用[J]. *分子影像学*, 2018, 38(4):1-4.

[13] PENG Q, VIJAYA SATYA R, LEWIS M, et al. Reducing amplification artifacts in high multiplex amplicon sequencing by using molecular barcodes[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1):589.

[14] NEWMAN A M, LOVEJOY A F, KLASS D M, et al. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA[J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(5):547-555.

[15] 童春容, 王卉, 杨君芳, 等. 流式细胞术定期监测微量残留病可预测急性白血病复发—单中心 163 例研究[J]. *中华血液学杂志*, 2011, 32(11):748-751.

[16] YE B, SMERIN D, GAO Q, et al. High-throughput sequencing of the immune repertoire in oncology: Applications for clinical diagnosis, monitoring, and immunotherapies[J]. *Cancer Lett*, 2018(416):42-56.

[17] MONTANO A, FORERO-CASTRO M, MARCHENAMENDOZA D, et al. New challenges in targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia by NGS approaches: an update[J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(4):110.

[18] SCHMITT M W, KENNEDY S R, SALK J J, et al. Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(36):14508-14513.

[19] KIVIOJA T, VAHARAUTIO A, KARLSSON K, et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers[J]. *Nat Methods*, 2012, 9(1):72-U183.

[20] SMITH T, HEGER A, SUDBERY I. UMI-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy[J]. *Genome Res*, 2017, 27(3):491-499.

[21] OSSENKOPPELE G, SCHUURHUIS G J. MRD in AML: does it already guide therapy decision-making? [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2016(1):356-365.

[22] PAIETTA E. When it comes to MRD, AML ≠ ALL[J]. *Blood*, 2012, 120(8):1536.