

• 个案分析 •

全外显子组测序检测 22q11.2 微缺失综合征 1 例*

朱朝锋, 时盼来, 焦智慧, 孔祥东

郑州大学第一附属医院遗传与产前诊断中心 450052

关键词: 全外显子组测序; 拷贝数变异; 22q11.2 微缺失综合征**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.16.029**中图分类号:** R446.1**文章编号:** 1673-4130(2021)16-2041-03**文献标志码:** C

22q11.2 微缺失综合征(22q11.2DS)是人类最常见的染色体微缺失综合征,发病率为 1/4 000 ~ 1/2 000^[1],由于其临床表型多样且部分表型不典型,以及分子诊断技术的滞后,实际发生率可能更高。22q11.2DS 大部分是由于非等位基因同源重组导致的新发变异,位于染色体 22q11.2 区域有 0.7~3.0 Mb 片段杂合性缺失,累及多系统异常表现,是引起先天性心脏病、发育迟缓和腭裂综合征的常见遗传性疾病^[1]。22q11.2DS 在胎儿中的患病率约为 1/1 000,如有心脏检测结果异常,则发病率可高达 1/100^[2-3]。因此,对于 22q11.2DS 的早期诊断和预防具有多种优势,能够极大地减少医疗、情感和社会成本。目前,针对 22q11.2DS 进行产前诊断的方法主要包括染色体微阵列分析(CMA)/全基因组拷贝数变异检测(CNV-seq)、荧光原位杂交(FISH)和多重连接探针扩增技术(MLPA)等。但由于国内外关于 22q11.2DS 的研究主要着眼于出生后人群,在产前诊断方面的报道较少,22q11.2DS 表型多种多样,仍然缺乏统一的筛查标准,而且 90% 以上为新发突变,临床上难以针对性地进行产前诊断。近年来,全外显子组测序(trio-WES)技术应用于超声结构异常胎儿的产前诊断的报道越来越多^[4-8]。trio-WES 检测作为一种有效、全面的临床检测手段,不受表型的影响,可一次性检测与大多数疾病相关的基因变异,阳性检出率提高至 30%~60%。本研究通过 trio-WES 技术诊断出 1 例 22q11.2DS,并通过 CNV-seq 方法进行验证,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 孕妇,25 岁,孕 2 产 0,因 2 次胎儿超声异常妊娠史来本科室进行遗传咨询。第 1 次,孕 24 周超声提示胎儿心内膜垫缺失而终止妊娠;第 2 次,孕 20⁺6 周胎儿肺动脉闭锁伴室间隔缺损经遗传咨询后决定终止妊娠。夫妻 2 人非近亲结婚,身体健康,染色体核型检测均正常(图 1)。本研究经本院医学伦理委员会批准(批准号 Ks-2018-KY-36),家系成员均知情同意并签署知情同意书。

1.2 基因组 DNA 的提取 采集孕妇及其配偶的外周血 2 mL,乙二胺四乙酸二钾抗凝,同时采集引产胎儿皮肤组织,按照 QIAamp DNA 提取试剂盒操作说明提取全基因组 DNA,TE 溶液洗脱 DNA,并利用 NanoDrop 紫外分光光度仪测定 DNA 在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度(A)值,得出其浓度及纯度,保持 A_{260}/A_{280} 在 1.7~2.0。

1.3 trio-WES 检测 trio-WES 检测由北京贝瑞和康生物技术有限公司完成。简要过程如下:将提取的基因组 DNA 打断成 250 bp 左右片段,经末端修复、接头连接、纯化后利用 IDT xGen[®] Exome Research Panel 试剂盒进行全外显子片段捕获,构建测序文库。使用 Illumina NovaSeq 测序仪(美国 Illumina 公司)进行读长为 150 bp 的双端高通量测序,测序数据通过质控后进行生物信息学分析。测序数据通过 Cruxome 全外数据分析系统(北京贝瑞基因公司)进行分析。查阅 OMIM、ClinVar、HGMD 数据库进行已知或疑似致病突变筛选,依据美国医学遗传学与基因组学学会发布的序列变异解读标准和指南^[9]对变异进行分级,综合判断变异的致病性。同时对测序数据进行外显子捕获区域基因拷贝数变异(CNV)分析。同批次样本的全外测序数据经质控后均一化计算,分析外显子水平的拷贝数变化。最后根据 ACMG 指南对 CNV 进行评估和致病性分类。

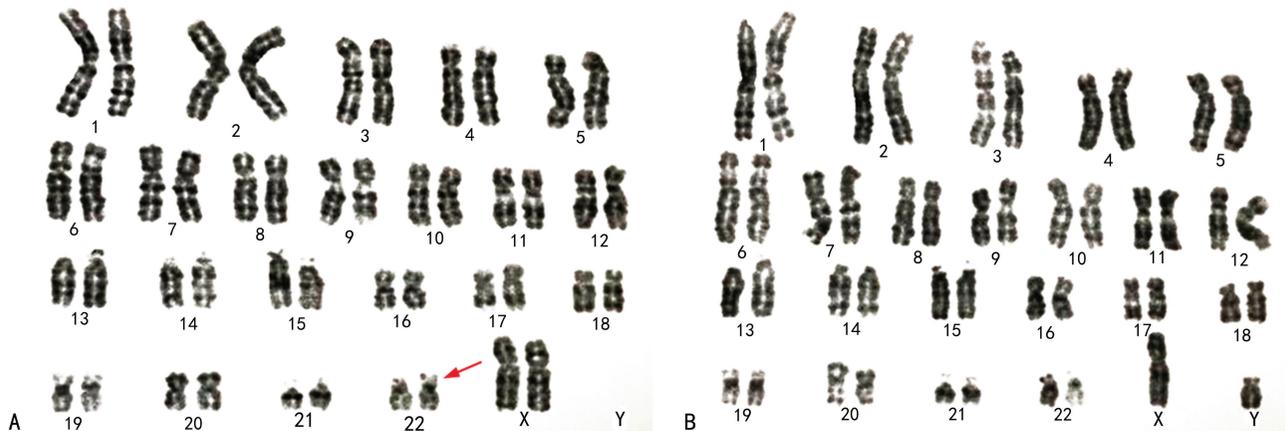
本研究对孕妇本人、配偶及胎儿全外显子组测序数据进行分析未检测到相关致病性单碱基转换/颠换(SNV)、缺失突变(InDel)变异,但是通过对捕获区域 CNV 进行分析,发现胎儿 22q11.2 区域有约 1.41 Mb 的杂合性缺失片段(chr22:18893882-20307516)和 0.86 Mb 的杂合性缺失片段(chr22:20706067-21563420),变异均来自父亲。

1.4 CNV-seq 提取并纯化后的基因组 DNA 通过北京贝瑞和康公司科诺安试剂盒进行建库。构建好的文库通过 Nextseq CN500 测序平台进行单端测序产生 8M 36 bp reads,约为 0.1X 全基因组测序深度。测序数据提交至科诺安分析平台进行 CNV-seq 分

* 基金项目:国家重点研发计划子课题(2018YFC1002206-2)。

析。通过 CNV-seq 方法对胎儿及配偶的全外显子组测序结果进行验证,结果发现,胎儿 22q11.2 区域有

约 2.58 Mb 的杂合性缺失片段 (chr22:18900000-21480000),与配偶的检测结果相同。



注:A 为孕妇染色体结果 46,XX,22ps+,箭头所示 22 号染色体随体增加;B 为配偶染色体检查结果 46,XY。

图 1 孕妇及其配偶外周血染色体核型图

2 讨论

22q11.2DS 的临床表型复杂多样,给临床诊断带来巨大挑战,22q11.2DS 的发生机制目前尚不清楚。22q11.2 区域复杂的基因组结构导致生殖细胞在减数分裂时易发生非同源基因同源重组 (NAHR),NAHR 可引起 22q11.2 再发性缺失^[1,10]。大约 90% 的患者有 3 Mb 大小的典型缺失区域,8% 存在 1.5 Mb 的微小缺失,另外还有一些不典型的小片段缺失和远端缺失。本研究检测的胎儿 22q11.2DS 缺失区域大小约为 2.58 Mb (chr22:18900000-21480000),属于典型缺失区域。胎儿存在先天性心脏结构畸形,且该家系存在 2 次胎儿心脏畸形不良孕产史,疾病与 22q11.2DS 表型相符。本研究中胎儿 22q11.2 缺失区域遗传来自父亲,但父亲表型正常。1 例 22q11.2DS (chr22:21060359-21461607, hg19) 缺失患者主要的临床表征为重度运动和认知障碍、脊柱裂、脊柱侧弯、巨头畸形、脑积水、小脑发育不全、特殊面容等,其母亲携带此缺失片段,无明显临床表征^[11]。1 例 22q11.2DS (chr22:21046144-21460009, hg19) 缺失患者主要的临床表征为运动延迟、智力障碍、新生儿肌张力减退、脑瘫等,其母亲携带此缺失片段,无明显临床表征^[12]。因此,22q11.2DS 表型的多样性被认为是遗传和环境因素共同作用的结果。

22q11.2DS 尚无有效的治疗手段,目前主要是针对其表型(如低钙血症、T 细胞功能缺陷、心脏发育异常、学习和语言能力低下等)进行对症治疗。因此,对 22q11.2DS 进行早期诊断和干预及遗传咨询是预防该病发生的关键。22q11.2DS 发病率高,仅次于唐氏综合征,但由于其临床表型复杂,国内对该病的认识不足,未能建立完善的筛查体系,临床上很多病例仍不能得到确诊。目前, FISH 技术是 22q11.2DS 经典的检测方法,但是其操作相对烦琐且分辨率十分有限。微阵列芯片(包括微阵列比较基因组杂交或单核苷酸多态性微阵列等)能够更精确地了解缺失片段的

长度,多重连接探针扩增检测相对更加简单快速且经济实用,更适用于对先证者确诊后的家系验证。微阵列芯片及近年来发展的 CNV-seq 虽能对全基因组范围内微缺失微重复进行检测,但其分辨率为 100 kb,对于点突变、小片段缺失/重复所致的单基因疾病无法检测。

trio-WES 技术已广泛应用于临床遗传病的检测,但其主要针对相关基因编码区序列的 SNV 和 50 bp 以内插入 InDel,对于染色体拷贝数变异水平的检测效能还缺乏明确结论。本研究显示,利用 trio-WES 技术检测 22q11.2DS 被认为是可行的,并且与当前其他现存检测技术相比具有明显优势。trio-WES 可一次性检测人类基因组中约 20 000 个目标基因,分析相关的致病性 SNV、InDel 变异,同时还能对捕获区域进行 CNV 分析,缩短诊疗时间,将阳性检出率提升至 30%~60%。22q11.2DS 胎儿期临床表现不明确,目前报道的主要是超声检查可见先天性心脏缺陷,其中圆锥动脉干缺陷最常见,其他还有血管异常和左心发育不良。胸腺异常、泌尿系统缺陷及神经系统发育异常也有报道^[11]。大多数结构异常要在 18~24 周通过超声才能检测到,因此要求能够尽快明确诊断。胎儿表型通常不明确,所以 trio-WES 检测可能是目前实现快速诊断的最有效的检测方案^[12]。目前,关于 trio-WES 检测拷贝数变异的报道还较少,张彦^[13]报道了 2 例遗传病家系通过 trio-WES 发现染色体拷贝数变异,片段大小从 11.4 kb 至 13.03 Mb 不等,结果得到了 CMA 等技术的验证。

总之,本研究通过 trio-WES 技术对 2 次孕中期超声心脏发育异常的家系进行测序,对检测发现的 22q11.2DS 缺失区域进行了遗传学分析和 CNV-seq 验证,明确了 22q11.2DS 约 2.58 Mb 杂合性缺失是其致病性变异,为该夫妇进行再次生育给予指导并提供了有效的遗传咨询。trio-WES 技术应用于 22q11.2DS 的基因诊断是可行的。trio-WES 技术应用于其他微缺失微

重复综合征还需要更多的数据评估和验证。

参考文献

- [1] MCDONALD-MCGINN D M, SULLIVAN K E, MARIANO B, et al. 22q11.2 deletion syndrome[J]. Nat Rev Dis Primers, 2015, 19(1):15071.
- [2] WAPNER R J, MARTIN C L, LEVY B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis[J]. N Engl J Med, 2012, 367(23):2175-2184.
- [3] GRATI F R, GOMES D M, DUPONT C, et al. Prevalence of recurrent pathogenic microdeletions and microduplications in over 9 500 pregnancies[J]. Prenat Diagn, 2015, 35(8):801-809.
- [4] YANG Y, MUZNY D M, REID J G, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders[J]. N Engl J Med, 2013, 369(16):1502-1511.
- [5] NORMAND E A, BRAXTON A, NASSEF S, et al. Clinical exome sequencing for fetuses with ultrasound abnormalities and a suspected Mendelian disorder[J]. Genome Med, 2018, 10(1):74.
- [6] FU F, LI R, LI Y, et al. Whole exome sequencing as a diagnostic adjunct to clinical testing in fetuses with structural abnormalities[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2018, 51(4):493-502.
- [7] PETROVSKI S, AGGAWAL V, GIORDANO J L, et al. Whole-exome sequencing in the evaluation of fetal structural anomalies: a prospective cohort study[J]. Lancet, 2019, 393(10173):758-767.
- [8] LORD J, MCMULLAN D J, EBERHARDT R Y, et al. Prenatal exome sequencing analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): a cohort study[J]. Lancet, 2019, 393(10173):747-757.
- [9] RICHARDS S, AZIZ N, BALE S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology[J]. Genet Med, 2015, 17(5):405-424.
- [10] MORROW B E, MCDONALD-MCGINN D M, EMANUEL B S, et al. Molecular genetics of 22q11.2 deletion syndrome[J]. Am J Med Genet A, 2018, 176(10):2070-2081.
- [11] HACIHAMADIOĞLU B, HACIHAMADIOĞLU D, DELIL K. 22q11 deletion syndrome: current perspective[J]. Appl Clin Genet, 2015, 8:123-132.
- [12] BEST S, WOU K, VORA N, et al. Promises, pitfalls and practicalities of prenatal whole exome sequencing[J]. Prenat Diagn, 2018, 38(1):10-19.
- [13] 张彦. 医学外显子组测序检测遗传病拷贝数变异的初步探索[J]. 中山大学学报(医学版), 2019, 40(1):144-149.

(收稿日期:2020-10-23 修回日期:2021-03-20)

• 个案分析 •

1 例血、尿免疫固定电泳图谱不一致的处理与分析

成平, 周翔, 张三勇, 姜文玲, 许向青, 朱雪婧, 夏运成

中南大学湘雅二医院肾内科/肾脏疾病与血液净化学湖南省重点实验室, 湖南长沙 410011

关键词: 单克隆免疫球蛋白; 免疫固定电泳; 游离轻链; β 巯基乙醇

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.16.030 **中图法分类号:** R446.1

文章编号: 1673-4130(2021)16-2043-03 **文献标志码:** C

近年来,单克隆免疫球蛋白(M蛋白)相关疾病逐渐受到临床医生的关注与重视,涉及科室广泛,除血液科、肾内科对相关检查有较深了解外,大部分科室(如心内科、神经内科、消化内科、脊柱外科、老年病科、风湿免疫科等)对M蛋白检测技术和结果解读知之较浅,以致不能精准判断患者的病情进展及疗效。免疫固定电泳是利用区带电泳的分离作用与抗体特异性免疫沉淀标记作用相结合的定性检测技术,是目前对M蛋白检测与分型应用最多、最广的技术^[1-2]。免疫固定电泳结果的解读存在较多主观因素,需要检验技术人员具有扎实的理论基础知识和丰富的阅片经验。本文拟借助1例不常见免疫固定电泳结果的处理与分析,以期提高临床、检验相关人员对M蛋白检测技术的深入了解和重视,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者,女,57岁,发现无诱因双下肢

水肿半月余。门诊检查示:尿蛋白定性4+,血清蛋白36.9 g/L,血肌酐55.1 μ mol/L,以“蛋白尿待查”收入中南大学湘雅二医院肾内科。否认肝炎、结核等急慢性传染病史,否认高血压及心脏病史,否认糖尿病及肾脏病史,无外伤及手术史,无药物过敏史,无输血史,预防接种史不详。查体:体温36.5 $^{\circ}$ C,脉搏86次/分,呼吸20次/分,血压122/78 mm Hg。精神可,查体合作,问答切题,其他查体无阳性指征。

1.2 方法

1.2.1 免疫固定电泳 采用美国海伦娜(Helena)公司的全自动电泳仪 spife3000 及其原装免疫固定电泳试剂盒,按照标准操作规程对血清、尿液标本分别进行电泳和结果分析。 β 巯基乙醇处理:常规处理血清标本的 β 巯基乙醇浓度为1%,处理时间15~20 min。本文采用 β 巯基乙醇处理尿液标本,为避免稀释尿液标本,采用798 μ L 尿液标本加入2 μ L β 巯基乙醇(硫