

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2022.03.13

1 例染色体结构变异无精症患者的纳米孔测序临床应用*

王亚, 黄明涛, 刘安, 周冉, 张沁欣, 胡平, 许争峰(南京医科大学附属妇产医院生殖医学国家重点实验室, 南京市妇幼保健院产前诊断中心, 南京 210001)

摘要:目的 评价牛津纳米孔测序技术(oxford nanopore technologies, ONT)在诊断复杂结构变异中的临床应用价值。方法 采集 1 例复杂结构变异的非梗阻性无精症患者外周血样本,以染色体 G 显带核型分析(karyotype analysis)与染色体微阵列分析(Chromosomal microarray analysis, CMA)为参考,进行纳米孔测序寻找致病原因,评价纳米孔测序对变异的检出能力。结果 在该患者的基因组中发现,CMA 检测出 4 个缺失,5 个重复,共计 9 个临床意义不明的染色体拷贝数变异(VOUS),3 例纯合子状态区段(regions of homozygosity, ROH)以及 15q15.3 区段缺失,内含 *PIIP5K1*、*CKMT1B*、*STRC*、*CATSPER2* 基因;纳米孔测序共检测出 6 260 个缺失、5 624 个插入、115 个重复、22 个倒位、32 个易位,共计 12 053 个结构变异,能够注释 5 559 个结构变异影响 2 406 个基因;纳米孔测序鉴定出平衡易位 46,XY,t(1;3)(q22;q28)与染色体核型结果 46,XY,t(1;3)(q21;q27)基本一致,在 *Chr1:156359988-156363186* 区域存在 3 198 bp 缺失,该区域影响的基因有 *TSACC*、*RHBG* 和 *FGF12*。结论 纳米孔测序技术可快速、高效、准确检测人外周血标本中染色体复杂结构变异和受影响的基因,可检测出传统检测方法无法检出的缺失片段,是常规方法的补充,具有重要的临床应用价值。

关键词: 纳米孔测序;结构变异;基因

中图分类号:R446

文献标志码:A

Clinical application of nanopore sequencing in an azoospermia patient with chromosome structural variation

WANG Ya, HUANG Mingtao, LIU An, ZHOU Ran, ZHANG Qinxin, HU Ping, XU Zhengfeng (Department of Prenatal Diagnosis, State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Women's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital, Nanjing 210001, Jiangsu, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the application value of oxford nanopore technology (ONT) in the diagnosis of complex structural variations (SVs). **Methods** The peripheral blood sample of a patient with non-obstructive azoospermia and complex structural variations was collected, and identified by the chromosome G-banding karyotype analysis and chromosomal microarray analysis (CMA), which were taken as the reference methods. Meanwhile, the sample was detected by the ONT to discover the cause of disease, and the detection ability of ONT for variations was evaluated. **Results** A total of 9 copy number variations of uncertain significance (VOUS), including 4 deletions and 5 duplications, 3 regions of homozygosity (ROH) and 15q15.3 (containing *PIIP5K1*, *CKMT1B*, *STRC* and *CATSPER2* genes) deletion were identified by the CMA. A total of 12 053 structural variations, including 6 260 deletions, 5 624 insertions, 115 duplications, 22 inversions and 32 translocations, were identified by the ONT, which could annotate 5 559 structural variations and affect 2 406 genes. The balanced translocation of 46,XY,t(1;3)(q22;q28) detected by the ONT was basically consistent with the result of karyotype analysis [46,XY,t(1;3)(q22;q28)]. In addition, a 3 198 bp deletion in the *Chr1:156359988-156363186* region was detected, which could affect *TSACC*, *RHBG* and *FGF12* genes. **Conclusion** The ONT can rapidly, efficiently and accurately detect the complex structural variations of chromosomes and affected genes in human peripheral blood samples, and deletions that cannot be detected by traditional detection methods, which is a supplement to traditional methods and has important clinical application value.

Key words: nanopore sequencing; structural variation; gene

结构变异(structure variants, SVs)是一种大于等于 50 bp 的基因组重排的统称^[1],包括:缺失(deletion, DEL)、重复(duplication, DUP)、插入(insertion, INS)、倒位(inversion, INV)、易位(translocation, TRA)等^[2]。由于二代测序技术受到读长较短、PCR 扩增偏好性等影响,使得目前学界对复杂

结构变异(structure variants, SVs)是一种大于等于 50 bp 的基因组重排的统称^[1],包括:缺失(deletion, DEL)、重复(duplication, DUP)、插入(insertion, INS)、倒位(inversion, INV)、易位(translocation, TRA)等^[2]。由于二代测序技术受到读长较短、PCR 扩增偏好性等影响,使得目前学界对复杂

* 基金项目:国家重点研发项目(2018YFC1002402);国家自然科学基金(81971398)。

作者简介:王亚,1990 年生,男,博士研究生,主要从事生殖医学与遗传病检测研究。

通信作者:许争峰,教授,E-mail:zhengfeng_xu_nj@163.com。

染色体结构变异的研究较少,导致结构变异与疾病之间的相关性不明确^[3]。伴随着第三代测序技术的发展,牛津纳米孔测序技术(oxford nanopore technology, ONT)和 PacBio 单分子测序技术(single molecule real time, SMRT)的出现^[4],使得人们认识到结构变异与神经发育障碍^[5-6]、复发性流产^[7]以及男性不育^[8]等疾病密切相关,其中约 10.3%的低生育能力男性中染色体存在异常^[9]。但因二者检测和分析难度较高,尚不能完全进入临床应用阶段。因此,建立完善的纳米孔测序试验和生物信息分析流程,筛选致病性结构变异,是将纳米孔测序技术由基础研究转为临床检测的重要过程。一项 405 例中国人口的结构变异与其表型、疾病和群体的关系的研究率先阐明了结构变异在我国人群基因组不同位置的分布特点和人群特征^[3],该研究对临床上筛选结构变异导致的疾病提供了巨大的帮助。本研究拟对比纳米孔测序与染色体微阵列分析(chromosomal microarray analysis, CMA) 2 种检测方法,分析 1 例复杂结构变异的非梗阻性无精症病例,评价纳米孔测序在复杂结构变异检测的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 标本来源 收集 2019 年 3 月于南京市妇幼保健院诊断为染色体平衡易位的非梗阻性无精症患者外周血标本 1 例(南京市妇幼保健院科研伦理委员会批准文号:[2019] KY-081)。该男性患者年龄 27 岁,婚后正常性生活 3 年不育,查体排除其他基础疾病, Y 染色体微缺失检查结果正常,精液和睾丸穿刺液中未检出生殖细胞。

1.2 主要仪器和试剂 人类外周血提取试剂盒(Cat#13323,德国凯杰公司),纳米孔测序系统及配套的建库测序试剂盒(SQK-LSK109,英国纳米孔测序公司)。微量分光光度计(Nanodrop 2000,美国赛默飞公司),荧光定量仪(Qubit 3.0,美国 Invitrogen

公司),染色体微阵列芯片扫描仪 Affymetrix Gene-Chip system 3000、染色体微阵列芯片 CytoScan HD(美国昂飞公司),自动化 DNA 片段回收系统(BluePippin system,美国 Sage Science 公司),高通量测序仪(PromethION,英国 ONT 公司)。

1.3 染色体微阵列试验 取该患者 300 μ L 外周血提取 DNA,根据染色体微阵列试验流程(美国昂飞公司)进行试验,主要包括基因组 DNA 的消化、连接和 PCR,对 PCR 产物纯化后进行片段化,随后进行标记和杂交,最后进行洗脱、染色和扫描。染色体微阵列使用 CytoScan HD 芯片。使用 Chromosome_Analysis_Suite_4.0 软件进行数据处理和分析。

1.4 纳米孔测序试验 取 2 mL 外周血,提取约 2 μ g DNA($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值为 1.8~2.0, $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ 值为 2.0~2.2)。通过 BluePippin 自动化 DNA 片段回收系统筛选 ≥ 15 kb 的 DNA 片段,纯化后根据纳米孔测序系统及配套的建库测序试剂盒说明书完成建库和上机测序过程,期间清洗 1 次测序芯片,获得更大的数据量。

1.5 数据分析 测序时,通过 Guppy(4.5.3)将 FASTA5 数据实时转换成 FASTQ 数据,随后以 GRCh37 人类参考基因组为参考序列,通过 Minimap2(2.17)软件对 FASTQ 数据进行序列比对。使用 Sniffles^[10](1.0.12)、Nanovar^[11](1.3.2)、cuteSV^[12](1.010)3 种软件分别对上述数据进行结构变异查找,包括:缺失(DEL)、插入(INS)、重复(DUP)、倒位(INV)、易位(TRA),汇总后使用 AnnotSV(2.2)对结构变异进行注释。

1.6 PCR 鉴定 根据纳米孔测序所得结构变异位置,使用 primer3web(<https://primer3.ut.ee/>)软件设计引物,通过 PCR 扩增结构变异区域并进行 Sanger 测序,确定断裂段碱基序列信息,验证纳米孔测序发现该结构变异的准确性。引物见表 1。

表 1 Sanger 测序引物

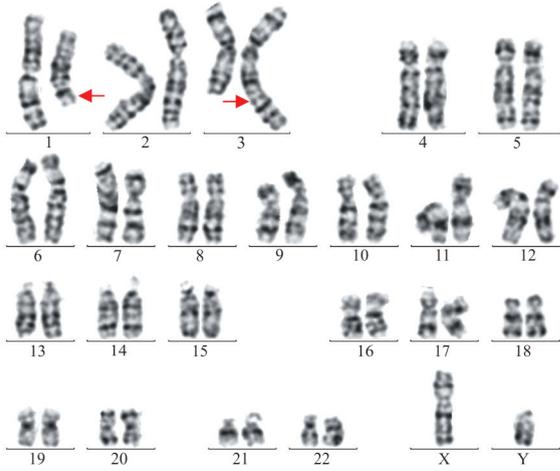
区域	引物名称	序列(5→3')	片段长度(bp)
chr1:156329201-156329778	Chr1_seq_F	TGATCGCTCATCTAGGGTG	803
chr1:156332978-156333069			
chr3:191595582-191595695	Chr1_seq_R	TTAGCTGGGTATGGTGTCCAGC	
chr3:191594205-191595574	Chr3_seq_F	ATACAAAGACTCAGCTTCCCTT	1 849
chr1:156333071-156333550	Chr3_seq_R	CACTGTGACAAGATGTGGAGG	

2 结果

2.1 患者临床信息 患者排除囊性纤维症 CFTR 基因突变、生殖内分泌异常(雄激素不敏感等)、抗

精子抗体阳性、睾丸发育异常(隐睾、先天性无睾症)、双侧睾丸炎、双侧睾丸扭转、双侧精索静脉曲张、肿瘤、药物或毒素、创伤及环境危害等因素, Y

染色体 AZF a、b、c 区域结果均正常,后经外周血染色体 G 显带核型分析发现该患者核型为 46,XY,t(1;3)(q21;q27),属于染色体结构变异(图 1),但该结构变异的致病性尚未可知。



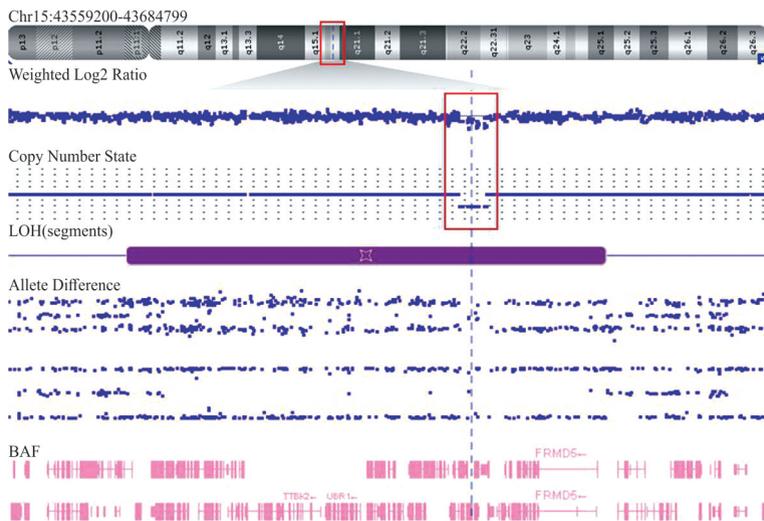
注:红色箭头所示为发生平衡易位的 2 条染色体。

图 1 患者外周血染色体 G 显带核型分析

2.2 染色体微阵列结果 按照美国医学遗传学会指南(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG),染色体微阵列分析发现 9 个临床意义不明的染色体拷贝数变异(VOUS),3 个纯合子状态区段(regions of homozygosity, ROH,表 2)以及 15q15.3 区段缺失(图 2),内含 *PPIP5K1*、*CKMT1B*、*STRC*、*CATSPER2* 共计 4 个 OMIM 基因,可能与隐性遗传方式的 15q15.3 缺失引起的 *STRC* 相关听力障碍有关^[13],此患者为携带者。经过数据分析和数据库比对:(1)根据 ACMG 判读,以上拷贝数变异被判定为 VOUS;(2)15q15.3 区段 126 kb 缺失影响的 3 个基因(*PPIP5K1*、*CKMT1B*、*STRC*) 在 OMIM 数据库中无精子发生相关报道,*CATSPER2* 在精子运动中起着至关重要的作用,该基因的缺失会引起严重的弱畸形精子症^[14-15],但在本病例中为杂合性缺失并不致病。

表 2 染色体微阵列分析结果

分辨率	片段(kb)	探针	微阵列芯片结果	结果解读
增加 50 kb,25 Marker	401.672	480	46,XY, arr[hg19]2p22.3(32,991,381-33,393,053)x3	临床意义不明
缺失 50 kb,25 Marker	134.381	84	arr[hg19]3q13.11(104,312,291-104,446,672)x1	
	61.072	60	arr[hg19]5p13.3(32,109,541-32,170,613)x3	
	61.362	28	arr[hg19]6p22.1(29,874,679-29,936,041)x1	
	78.978	100	arr[hg19]11q11(55,374,018-55,452,996)x0	
	664.661	216	arr[hg19]14q32.33(106,072,250-106,736,911)x3	
	503.504	602	arr[hg19]15q13.3(31,940,540-32,444,044)x3	
	125.599	76	arr[hg19]15q15.3(43,851,398-43,976,997)x1	
	313.334	140	arr[hg19]22q11.22(22,945,035-23,258,369)x3	
LOH	5 171.622	520	arr[hg19]3p21.31p21.2(46,679,197-51,850,819) hmz	杂合性缺失
5 Mb 和 50SNPs	55 647.445	9 037	arr[hg19]Xp22.33p11.1(2,690,445-58,337,890) hmz	(ROH)
	93 046.836	12 273	arr[hg19]Xq11.1q28(61,932,503-154,979,339) hmz	

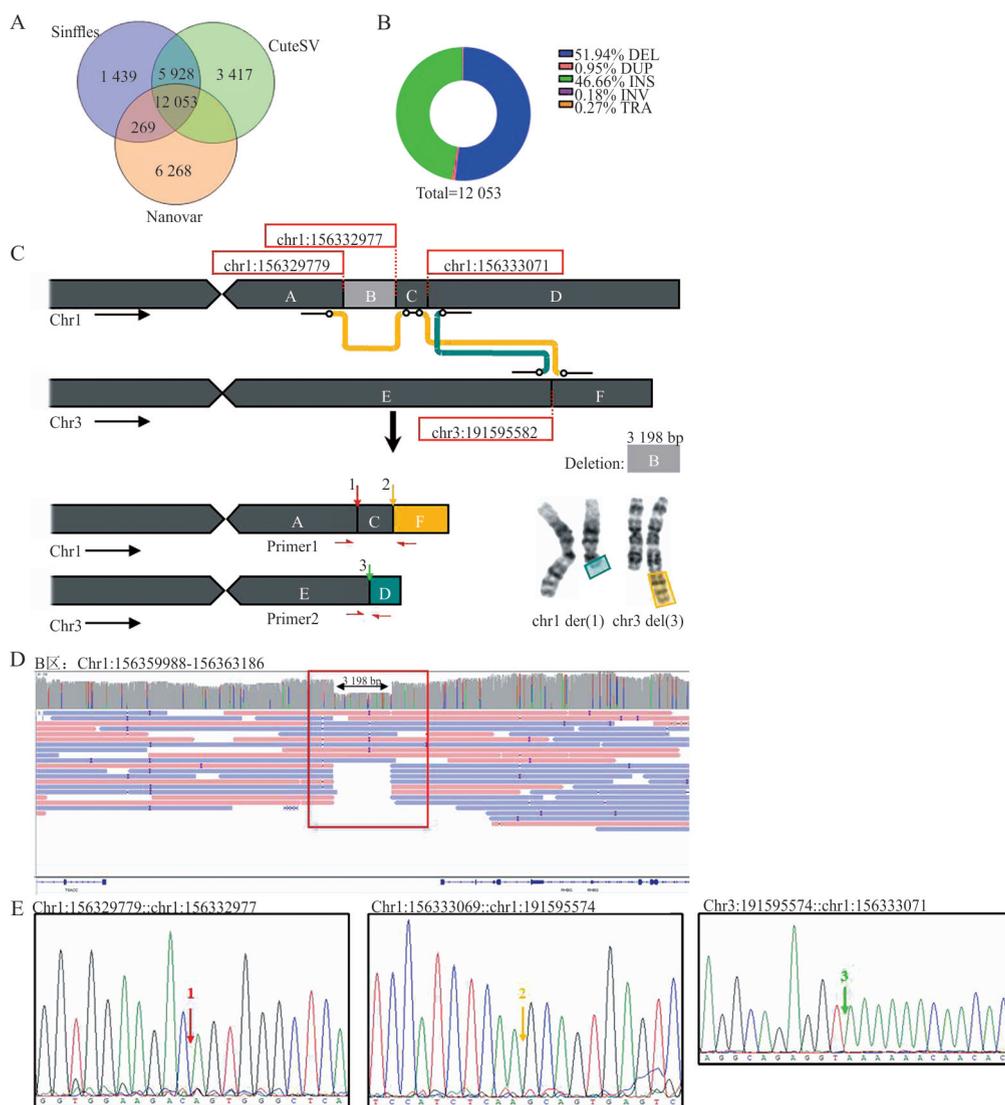


注:Weighted Log₂ Ratio, Log₂ 比率加权值;Copy Number State,拷贝数状态;LOH (segments),杂合性缺失;Allele Difference, 等位基因差异;BAF, B 等位基因频率。

图 2 患者染色体 15q15.3 区段存在 126 kb 缺失

2.3 纳米孔测序结果 下机数据通过 NanoPlot 质量控制后,平均读长为 18 259.8 bp,平均测序质量为 13.4, N50 长度为 24 816.0 bp。本研究中 Sniffles、NanoVar 和 CuteSV 3 种工具均鉴定出的 12 053 个结构变异为高可信度变异(图 3A),其中缺失 6 260 个、插入 5 624 个、重复 115 个、倒位 22 个、易位 32 个(图 3B)。此外,通过 AnnotSV 对测序结果进行注释,发现结构变异在基因组中的分布如下:UTR 区 782 个,Exon 区 3 796 个,Intron 区 957 个,其他区域 24 个,影响 2 406 个基因。与染色体核型结果相比,纳米孔测序精确定位了该结构变异的断裂点位置分别位于 *chr1:156329779-156333071* 和 *chr3:191595575*。根据断裂端人为将 1 号染色体分

为 A、B、C、D 4 个区域,3 号染色体分为 E、F 2 个区域(图 3C)。结果显示,在 1 号染色体 B 区缺失 3 198 bp(图 3D),C 区与 A 区拼接。因此,通过对序列分析,针对 2 个断裂区域设计引物进行 PCR 扩增并 Sanger 测序,结果确认 1 号染色体长臂存在 3 198 bp 缺失,最终形成新的 1 号衍生染色体。3 号染色体断裂段与 1 号染色体 D 区拼接后,形成新的 3 号衍生染色体(图 3C、3E)。综上,将该不育男性患者复杂的染色体结构变异更加精准地描述为:Seq[GRCh37]t(1;3)(q21;q27)g.[chr1:pter_cen_156329779: cher1: 156332977-156333069: chr3: 191595582_qter]g.[chr3: pter_cen_191595574: chr1:156333071_qter]。



注:A,3 种结构变异分析软件韦恩图;B,取交集后结构变异不同类型占比;C,染色体复杂结构变异地铁模式图;D,IGV 发现 1 号染色体存在 3 198 bp 缺失;E,平衡易位断裂点 Sanger 测序峰形图。

图 3 纳米孔测序数据分析与验证

3 讨论

CMA 是近些年临床常用的高分辨率全基因组检测技术,对于多数染色体的拷贝数变异、微缺失和重复的检出能力较强^[16]。在拷贝数变异和大片段缺失的情况下建议使用 CMA 检测,而在本病例中发现 15q15.3 区段缺失,其中就包括新发现的 *STRC* 听力障碍杂合缺失。但鉴于探针数目和分布的限制,该方法并没有检出 1 号染色体 3 198 bp 缺失,因此,该方法结果为阴性并不能排除在无探针区域的染色体异常,需用其他检测手段弥补。

笔者通过对 1 例非梗阻性无精症外周血染色体 G 显带核型分析、CMA 和纳米孔测序等技术分析后证实,纳米孔测序技术验证了 CMA 发现的 15q15.3 区段缺失片段大小为 126 kb,包括 *PPIP5K1*、*CKMT1B*、*STRC* 和 *CATSPER2* 基因;明确了染色体核型为 46,XY,t(1;3)(q22;q28),并进一步明确断裂点处的精确位置和影响基因,包括 *TSACC*、*RHBG* 和 *FGF12*;此外,在平衡易位中还发现了 1 号染色体存在 3 198 bp 缺失以及 5 559 个能够被注释的结构变异。以上结果提示,基于纳米孔测序鉴定出的结构变异影响的基因可能成为明确该名非梗阻性无精症患者致病原因的重要补充手段,但基于目前的数据分析能力和对结构变异的解读能力,笔者没能找到该男性不育的致病基因。

通常在染色体 G 显带结果提示受检者染色体存在结构变异,而 CMA 结果无法解释致病原因的情况下,纳米孔测序在重构复杂结构变异的染色体,寻找断裂点及其影响的基因等方面具有明显优势,我国人群^[3]以及国外人群^[1]的结构变异数据库已经建立,但是对于纳米孔测序技术得到的一万多个结构变异的解读仍然存在很大的困难。随着 Cas9 介导的目标片段富集技术和 Read Until 程序算法的不断发展,使得目标区域靶向测序成为可能,而这项技术的发展将为人群遗传疾病的精准检测奠定基础。相信在不久的将来,随着纳米孔测序准确度和深度的提升,人类基因组目标区域定制测序的时代即将到来。

4 参考文献

[1] Beyter D, Ingimundardottir H, Oddsson A, et al. Long-read sequencing of 3, 622 Icelanders provides insight into the role of structural variants in human diseases and other traits[J]. Nat Genet, 2021, 53(6): 779-786.

- [2] Sudmant PH, Rausch T, Gardner EJ, et al. An integrated map of structural variation in 2, 504 human genomes[J]. Nature, 2015, 526(7571): 75-81.
- [3] Wu ZK, Jiang ZH, Li T, et al. Structural variants in the Chinese population and their impact on phenotypes, diseases and population adaptation[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 6501.
- [4] Hu TS, Chitnis N, Monos D, et al. Next-generation sequencing technologies: an overview[J]. Hum Immunol, 2021, 82(11): 801-811.
- [5] Pauper M, Kucuk E, Wenger AM, et al. Long-read trio sequencing of individuals with unsolved intellectual disability[J]. Eur J Hum Genet, 2021, 29(4): 637-648.
- [6] Wang Y, Tan JX, Wang Y, et al. Diagnosis of Shashi-pena syndrome caused by chromosomal rearrangement using nanopore sequencing[J]. Neurol Genet, 2021, 7(6): e635.
- [7] Madjunkova S, Sundaravadanam Y, Antes R, et al. Detection of structural rearrangements in embryos[J]. N Engl J Med, 2020, 382(25): 2472-2474.
- [8] Mikelsaar R, Nelis M, Kurg A, et al. Balanced reciprocal translocation t(5;13)(q33;q12) and 9q31.1 microduplication in a man suffering from infertility and pollinosis[J]. J Appl Genet, 2012, 53(1): 93-97.
- [9] Bourrouillou G, Dastugue N, Colombies P. Chromosome studies in 952 infertile males with a sperm count below 10 million/ml[J]. Hum Genet, 1985, 71(4): 366-367.
- [10] Sedlazeck FJ, Rescheneder P, Smolka M, et al. Accurate detection of complex structural variations using single-molecule sequencing[J]. Nat Methods, 2018, 15(6): 461-468.
- [11] Tham CY, Tirado-Magallanes R, Goh Y, et al. NanoVar: accurate characterization of patients' genomic structural variants using low-depth nanopore sequencing[J]. Genome Biol, 2020, 21(1): 56.
- [12] Cretu Stancu M, van Roosmalen MJ, Renkens I, et al. Mapping and phasing of structural variation in patient genomes using nanopore sequencing[J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 1326.
- [13] Nishio SY, Usami SI. Frequency of the *STRC*-*CATSPER2* deletion in *STRC*-associated hearing loss patients[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 634.
- [14] Avidan N, Tamary H, Dgany O, et al. *CATSPER2*, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene[J]. Eur J Hum Genet, 2003, 11(7): 497-502.
- [15] Lin SY, Ke M, Zhang YQ, et al. Structure of a mammalian spermiation channel complex[J]. Nature, 2021, 595(7869): 746-750.
- [16] Armour CM, Dougan SD, Brock JA, et al. Practice guideline: joint CCMG-SOGC recommendations for the use of chromosomal microarray analysis for prenatal diagnosis and assessment of fetal loss in Canada[J]. J Med Genet, 2018, 55(4): 215-221.

(收稿日期:2021-08-12)

(本文编辑:许晓蒙)