

用于临床诊断的互补微阵列芯片和新一代测序数据的综合基因组分析



概述

在本案例研究中，您将了解到：

- 格林伍德遗传中心 (GGC) 如何在常规基因检测中将 NGS 和微阵列芯片结合以提高诊断效率
- Alissa Interpret 平台如何实现拷贝数和分子变异的无缝整合
- GGC 如何使用该功能解决脆性角膜综合征诊断病例的说明

作者：

Alka Chaubey 博士¹

Michael J. Friez 博士¹

Monica J. Basehore 博士¹

R. Curtis Rogers 医学博士¹

Steven Van Vooren 博士²

1. 格林伍德遗传中心
106 Gregor Mendel Circle
Greenwood, SC 29646

2. 安捷伦科技公司
Lexington, MA

前言

最近，新一代测序 (NGS) 在越来越多临床应用中的诊断价值已逐渐得到证实。人们意图用单一方法取代多种主要分子诊断工具，如 Sanger 测序、qPCR、MLPA 和基于微阵列芯片的拷贝数分析 (aCNA)。然而，从 NGS 数据中提取拷贝数变异 (CNV) 始终是个难题。在本案例研究中，格林伍德遗传中心展示了 NGS 和 aCNA 作为互补方法在临床诊断中的成功应用。本文举例说明了 Alissa Interpret 软件模块作为整合数据分析平台，如何实现 CGH 和 NGS 检测结果的联合分析。

案例

一名 2 月大男婴眼中出现球形角膜、蓝色巩膜和异常红光反射 (图 1)。这些临床表现并不伴有其他相关疾病和家族史。初步诊断指向脆性角膜综合征 (常染色体隐性遗传) 或成骨不全 (常染色体显性遗传)，以用于鉴定导致患者表型的候选基因。



图 1. 本图所示为先证者的体态以及球形角膜和蓝色巩膜的特写

结论汇总

格林伍德遗传中心 (GGC) 实验室利用安捷伦的 Alissa Interpret 实现了对致病基因组变化的快速准确测定，这一工具是 NGS 平台的 Alissa 临床信息学软件中的变异评估和报告自动化模块。GGC 克服了在跨 aCNA 和 NGS 工作流程的整合分析中从 NGS 数据中提取 CNV 的困难，并显著提高了日常实践效率。



方法和结果

最初，格林伍德遗传中心 (GGC) 的细胞遗传学实验室使用 Affymetrix Cytoscan HD 平台进行 aCNA 实验。他们使用 Alissa 的 Intepret 平台分析微阵列芯片数据。在鉴定的 9 个 CNV 区域中，有 6 个为染色体缺失。

这些区域与 OMIM 基因的比对表明在 16 号染色体上有 114.1kb 大小的片段发生拷贝数缺失。这一缺失涵盖整个 ZNF469 位点，已知该位点在胶原纤维的合成过程中具有调节和结构功能，并与 I 型脆性角膜综合征有关。

接着，他们对格林伍德遗传诊断实验室的结缔组织 Panel 所包含的 31 个基因进行基于 NGS 的靶向重测序并采用一个简单的策略来提取疾病的相关变异 (图 2)。

将 NGS 数据与下列公共数据库进行对比以删除良性变异，这些数据库可通过 Alissa Interpret 进行访问：

- Exome Variant Server
- dbSNP
- 1000Genomes

以及 GGC 的常见变异参考数据，如图 3 所示。

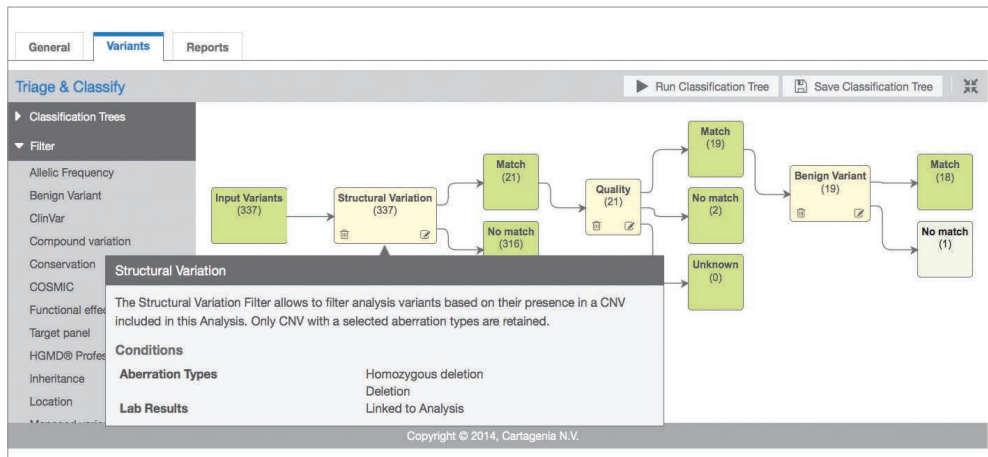


图 2. 格林伍德遗传实验室基于 aCNA 结果的 NGS 数据变异过滤策略

Benign Variant

The Benign Variant filter filters a list of variants based on their presence in a controlled set of benign variants or reference set. Select and configure the sets you want to include in the filtering. Combinations of multiple sets can be applied such that a variant goes to the MATCH output when the variant is found in all, any, or a minimal number of sets.

Conditions

Match **Any** of the following conditions:

Condition	Value
dbSNP	
dbSNP Allele frequency	0.01
dbSNP Allele count	200
dbSNP Validation Status	validated
dbSNP Suspicion Flag	not suspected false
1000 Genomes	
1000 Genomes Allele frequency	0.01
1000 Genomes Allele count	200
ESP6500	
ESP6500 Allele frequency	0.01
ESP6500 Allele count	200
Gleeson_Exome_reference_set	
Gleeson_Exome_reference_set Allele frequency	0.01
Gleeson_Exome_reference_set Allele count	200
ALL_Exome_reference_set	
ALL_Exome_reference_set Allele frequency	0.01
ALL_Exome_reference_set Allele count	200

图 3. 根据读出序列深度 > 20 (未显示) 等数据质量参数对变异进行限制。随后删除良性变异，即删除私人知识库与公共数据库 (EVS、dbSNP、1000Genomes) 中存在的等位基因频率 > 1% 的变异。格林伍德中心还将自己的外显子组作为参考

然后，格林伍德通过将高度可靠的潜在致病性变异位置映射到该患者的六个缺失区域，在 Alissa Interpret 中合并了 aCNA 和 NGS 的结果（图 4）。

在 16 号染色体的 114.1kb 缺失内只有一个变异——即单个核苷酸缺失，该变异引起剩余的 ZNF469 等位基因发生移码突变（图 5）。从格林伍德发表的文献可以看出，这一结果与该患者结缔组织常染色体隐性遗传病 I 型脆性角膜综合征的表现一致。

Label	Region type	Location	Size	bCHOP1	aDGV5	aDGV6	aDGV6	aDGV6	bDDT1	cbISCA4	cpISCA4	bISCA4	piSCA4	uISCA4	bISCA4	piSCA4	uISCA4	cbISCA5	cpISCA5	piSCA5	bISCA5	piSCA5	BEUCNV251	pGGC1	Browsers	Actions
Likely benign	Deletion	5: 180,378,753 - 180,430,789	52 Kb	●	●	●	●	●																		
Likely benign	Deletion	11: 54,701,619 - 54,788,759	87.1 Kb	●	●	●	●	●																		
Likely benign	Homozygous deletion	15: 87,830,571 - 87,879,196	48.6 Kb	●	●	●	●	●																		
Likely pathogenic	Deletion	16: 88,465,300 - 88,579,362	114.1 Kb	●	●	●	●	●																		
Likely benign	Deletion	17: 43,574,907 - 43,651,158	76.3 Kb	●	●	●	●	●																		
Likely benign	Homozygous deletion	X: 76,324,809 - 76,378,644	53.8 Kb	●	●	●	●	●																		

图 4. 整合 aCNA 数据用于限制潜在致病变异的数量。此处，格林伍德遗传实验室使用六个基于微阵列芯片数据显示拷贝数缺失的区域，来鉴定导致患者表型的候选基因

验证

父系遗传的 114.1kb 缺失会导致父亲和先证者体内 ZNF469 的外显子组序列的基因组剂量降低，因此通过对该缺失进行 qPCR 实验验证了以上结论。

另外，Sanger 测序证实母亲和先证者体内 ZNF469 的杂合子和半合子构型中分别存在引起移码突变的单核苷酸缺失。

Gene	Position	Ref	Patient	Read	Depth	CNV	Type	Transcript	cDNA	Location	Exon	Effect	Protein	Classification	Confirmed	Classification	References	MVL	Other	Similarities	Info	Report	Actions
ZNF469	16,885,500,606	Q	A	326	326	Deletion	deletion	NM_001127464.1	c.8644delA	exonic	2	frameshift	p.Asp2215Afs*8	Pathogenic	Pathogenic								

图 5. 使用实验室过滤策略得到的致病变异的变异列表。该方法鉴定出了杂合缺失区域中的单个移码突变。已知该基因会引起与患者表型一致的常染色体隐性 I 型脆性角膜综合征

总结

总之，上述示例证明，使用 Alissa Interpret 可快速有效地整合基因组数据分析，从而准确测定致病基因组的变化。格林伍德遗传实验室展示了 Alissa 临床信息学平台的特定数据整合功能如何使标准操作规程自动化，从而为实验室的工作流程和日常实践带来显著的效率提升。

可靠结果，完整方案

预期用途声明

Alissa Interpret 软件适用于使用公共、商业和客户内部数据来源的变异存储、可视化和标注。该软件使最终用户能够通过设置流程来执行或自动化执行遗传变异分类，还具备记录变异评估和起草变异分析报告的功能。这种整合能力允许与外部软件系统自动交换变异和报告信息。

Alissa Interpret 软件旨在为接受过培训的实验室专业人员、临床遗传学家和分子病理学家提供决策支持软件平台，以用于在临床信息背景下分析和解析人类样品中的遗传变异。

了解更多信息：

www.agilent.com/lifesciences/alissa

发送邮件至 cad.info@agilent.com

PR7000-0689

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017

2017 年 6 月 30 日，中国出版

5991-8528ZHCN

Alissa Interpret 是美国的 I 类豁免医疗器械、欧洲的 CE IVD 以及加拿大和澳大利亚的 I 类 IVD 器械。



Agilent Technologies