

培训资料

新一代测序 | 病理学



Dako

Agilent Pathology Solutions

新一代测序： 专为病理学实验室 量身打造



Agilent Technologies

前言

分子诊断是医学诊断和疾病分类的重要手段，且越来越多地应用在癌症的个体化医疗领域 (1)。随着对肿瘤潜在的遗传改变的认知的扩展，最新的研究揭示了一系列有治疗指导意义的基因突变及其他可进行靶向治疗的遗传改变 (2)。这类突变主要有胃肠道间质瘤中的 KIT 突变 (3)、肺癌中的 EGFR、KRAS 和 ALK 突变 (4) 以及黑色素瘤中的 BRAF 突变 (5) 等。基因拷贝变异和结构变异 (如易位) 对诊断和预后也十分重要 (6)。等位基因特异性聚合酶链反应 (AS-PCR)、Sanger 双脱氧测序、焦磷酸测序、多重连接依赖性探针扩增 (MLPA) 或质谱 (MS) 等小规模方法是目前仅有的几种识别此类基因突变的方法。个别细胞遗传学实验室常采用荧光原位杂交 (FISH) 技术测定基因拷贝数和结构变异。

什么是新一代测序？

近年来，随着需要伴随诊断的新分子靶向治疗技术的发展以及用于辅助诊断和预后的实用分子生物标记物不断增多，对检测的需求也在日益增长。组织切片的尺寸在变小，因此需要对越来越少的组织进行越来越多的检测。此时，每次仅检测一个或少数几个生物标记物的技术已经不再适用。新一代测序 (NGS) 可利用更小的组织检测更多的癌症基因组合，从而满足上述需求 (7)。

NGS 或大规模平行测序是可同时对数百万 DNA 小片段进行测序的革新技术，与标准 Sanger 测序法相比，这种方法将大幅增加被测序碱基对的数量。这一新技术是建立在始于二十世纪九十年代中后期测序技术的重大进展之上，并于 2000 年后诞生了第一代新一代测序平台 (8)。

NGS 涵盖了一些不同的方法，相比 Sanger 测序，这些方法都具有更高的通量，DNA 测序成本更低。仪器每次运行将产生超过十亿的短读出序列，从而提供快速、经济而准确的基因组信息 (8)。目前最常见且广泛使用的 Illumina 平台通过合成进行 DNA 测序，该方法采用改进的鸟枪测序法，并对碱基加上荧光染料。使用 NGS 技术可以进行靶标区域测序、全外显子组测序和全基因组测序 (7)。

新一代测序 — 全基因组测序 (WGS)

全基因组测序 (WGS) 可对人基因组中的蛋白质编码和非编码区域进行分析，是同时检测全基因组中置换、重复、插入、缺失、基因和外显子拷贝数变异以及染色体倒位和易位的最全面的方法。然而，WGS 成本较高，对计算机的数据存储和处理性能要求高，且方法通量较低。WGS 得到的序列覆盖深度通常较低，因此限制了低丰度突变检测的灵敏度 (9)。由 WGS 检测到的绝大多数基因组变化的临床意义不明。

新一代测序 — 全外显子组测序 (WES)

外显子组仅占人基因组的 1.5%，但却包括了 85% 的致病突变 (10)。全外显子组测序 (WES) 检测人基因组中的所有蛋白质编码区域。使用该方法进行测序时，先要将 DNA 片段在溶液中与整个基因组中全部蛋白质编码外显子组对应的序列特异性捕获探针进行杂交。WES 可在单次实验中同时检测大量基因置换、重复、插入、缺失以及基因和外显子拷贝数变异。与靶向基因组合相比，该方法还可检测与疾病相关的非肿瘤特异性种系变异。WES 得到的序列覆盖深度通常较低，因此与靶向基因组合相比限制了低丰度突变检测的灵敏度。然而，与 WGS 相比，WES 具有明显的成本和速度优势 (10)。

新一代测序 — 基因组合，杂交捕获

使用杂交捕获方法时，将 DNA 片段在溶液中与基因组中靶标区域对应的序列特异性捕获探针进行杂交。典型的杂交捕获技术包括 Agilent SureSelect、NimbleGen SeqCap 和 Illumina TruSeq (11)。这些检测方法设计用于检测组织中特定基因的目标突变，通常为 50 到数千个突变。杂交捕获可在单次检测中同时测定大量基因的取代、重复、插入、缺失及外显子和基因拷贝数变异。探针也可设计用于捕获重复出现重排的基因中的特定易位断点。当以高覆盖深度 (500-1000x) 进行测序时，这种方法的灵敏度足以检测低丰度突变。与扩增子捕获（下个章节）相比，这种方法特异性更强，且没有 PCR 所导致的假阳性结果。与 WES 或 WGS 方法相比，这种基因组合范围更窄且主要针对更小的目标区域，因此更便宜、更高效。然而，这种方法仅能检测靶标区域中的突变。

新一代测序 — 基因组合，扩增子捕获

在扩增子测序中，在 NGS 前利用一组选定的外显子引物通过 PCR 富集靶标基因 (12)。典型的扩增子捕获技术包括 Ion Torrent AmpliSeq、RainDance ThunderBolts 或 Illumina TruSeq 这些纯粹基于 PCR 的方法，以及像 Agilent HaloPlex 这类基于杂交和延伸的扩增子捕获方法。这些检测方法设计用于检测组织中特定基因的目标突变，通常为 1 到 100 个突变。扩增子捕获需要的起始 DNA 较少，一次分析可以同时检测单碱基置换以及多个基因中的重复、插入、缺失等更为复杂的突变。信息学分析相对简单，因为未能定位到引物间基因座的任何读出序列均可被忽略。这种简便性的缺点在于，由于 5' 或 3' 引物不能与易位 DNA 结合，因此这种分析方法从本质上无法对意料之外的融合进行检测。另外，这种方法容易得到等位基因脱扣等假阳性结果，等位基因脱扣这个问题与 PCR 相关，它导致了某特定基

因座上两个等位基因中的一个扩增失败。扩增子捕获与杂交捕获类似，具备检测低丰度突变所需的足够灵敏度，成本更低且速度更快。

癌症 NGS 的独有的挑战和机遇

样品质量

样品质量和类型对 NGS 测序质量有较大影响。许多因素会影响样品中提取出的 DNA 的质量和数量，包括低温缺血、固定和处理等分析前因素（如新鲜冷冻和 FFPE 样品、经过或未经过脱钙处理）、玻片与组织块储存时间长短和条件、肿瘤大小和细胞构成、浸润分数以及活性 (13, 14)。提取前十分有必要由组织病理学家评估切片并确认样本特征、样本质量及提到的其他形态学特征（肿瘤大小、细胞构成、浸润分数与活性）。

临床实验室中制备和储存新鲜或冷冻组织的流程复杂，因此通常对福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 肿瘤组织样本中提取的 DNA 进行分子分析。福尔马林固定会导致 DNA 的断裂或交联，这种组织块的存储时间越长，其 DNA 损伤就越严重 (13, 14, 15)。由于存在这种断裂和交联，FFPE 组织的大多数 NGS 数据均来自于靶标扩增子测序 (16)。研究表明，尽管存在这些问题，临床实验室仍可以使用 FFPE 组织 (17)。

样品和肿瘤异质性

癌症 NGS 中需要重点考虑的一个问题是样本异质性。几乎所有的离体肿瘤样品均含有间质或相邻正常组织等基因正常的组织。测试前，病理学家需要对组织样本进行检测，以确认肿瘤的存在及其活性和细胞构成，并确定样本中的肿瘤组分/浸润分数。因此，许多团体在对异质性癌症样品进行测序时，读取深度中位数高于体质性疾病 DNA 的读取深度。“读取深度”或“覆盖率”反映了基因组特定区域的测序频率。

含 50% 正常组织的肿瘤样品需要读取深度增大一倍才能得到与 100% 纯肿瘤样品相同的检测可靠性。如果肿瘤浸润分数过低，可通过手动剔除非肿瘤组织对样本进行富集。还需要考虑的另一问题是肿瘤异质性，即仅有一部分肿瘤细胞含有特定突变。在较高的读取深度下测序时，NGS 可检测微小的克隆。存在的克隆越多，测定每一种克隆所需的读取深度就越高。通过 NGS 技术我们发现，癌症中通常不存在一种单一的主导性克隆，而是包含多种复杂的亚克隆，各自构成整个肿瘤的一部分 (1)。代表原发肿瘤一部分的克隆在耐药性复发期间可能成为主要克隆。例如，假定肿瘤中不含正常组织，1% 克隆在 100× 覆盖下仅会出现一次。

液体活检

液体活检是评估在血液中循环的 DNA 中的肿瘤突变的新兴方法。这些可通过循环血进行无创评估的 DNA 主要有两种来源：胞外循环肿瘤 DNA (ctDNA) 和循环肿瘤细胞 (CTC)。ctDNA 由与细胞或细胞片段无关的核酸小片段组成 (18)。ctDNA 和/或 CTC 可用于筛查早期癌症、监测治疗反应以及解释某些癌症的耐药机理。与随机采样活检或组织块活检相比，这种方法能更准确地反映整个肿瘤基因组的情况。活检常因肿瘤异质性而受到样品偏差的影响。除病人需要承担高额费用与巨大风险外，某些癌症类型的肿瘤采样仍然困难重重，从而造成可用于基因检测的组织不足的情况。此外，活检仅能反应特定时刻的基因型。因此，NGS 在液体活检应用中的地位越来越重要。虽然液体活检可用于纵向监测，但却还没有专业机构推荐使用此法。这是因为这种方法仍存在很多问题，尤其是在某些案例中发现其对特定突变的检测灵敏度较低。在野生型序列背景下检测稀有突变时仍存在挑战。此外，还需要对分析前的样本采集和

处理方法以及定量方法进行标准化。这项技术虽有前景，但需要进行更多研究以便对其进行全面验证 (19, 20)。

提供有用资源、培训资料和指南的专业机构：

美国病理家学会（一般诊断和分子诊断）：

www.cap.org

分子病理学家协会（分子诊断）：

www.amp.org

美国医学遗传学会（遗传病）：

www.acmg.net

美国临床肿瘤学会（癌症诊断和治疗）：

www.nccn.org

美国临床肿瘤学会（癌症诊断和治疗）：

www.asco.org

参考文献

- (1) Ulahannan *et al.* Technical and implementation issues in using next generation sequencing of cancers in clinical practice. *Br. J. Cancer* (2013) 109: 827-835.
- (2) Wong *et al.* Targeted-capture massively-parallel sequencing enables robust detection of clinically informative mutations from formalin-fixed tumours. *Sci. Rep.* (2013) 3: 3494.
- (3) Hirota *et al.* Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* (1998) 279: 577-580.
- (4) Paez *et al.* EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* (2004) 304:1497-1500.
- (5) Davies *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* (2002) 417: 949-954.
- (6) Mitelman *et al.* The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat. Rev. Cancer* (2007) 7: 233-245.
- (7) Types of molecular tumor testing. *My Cancer Genome* (2016) Updated February 8 <https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/types-of-molecular-tumor-testing/>
- (8) Barba *et al.* Historical perspective, development and applications of next generation sequencing in plant virology. *Viruses* (2014) 6: 106-136.
- (9) Gundry *et al.* Direct mutation analysis by high-throughput sequencing: from germline to low-abundant, somatic variants. *Mutat. Res.* (2012) 729: 1-15.
- (10) Choi *et al.* Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2009) 106: 19096-19101.
- (11) Bodi *et al.* Comparison of commercially available target enrichment methods for next generation sequencing. *J. Biomol. Tech.* (2013) 24: 73-86.
- (12) Chang *et al.* Clinical application of amplicon-based next generation sequencing in cancer. *Cancer Genet.* (2013) 206: 413-19.
- (13) Bass *et al.* A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue. *Arch. Pathol. Lab. Med.* (2014) 138: 1520-1530.
- (14) Chen *et al.* Analysis of pre-analytic factors affecting the success of clinical next generation sequencing of solid organ malignancies. *Cancers* (2015) 7: 1699-1715.
- (15) Gilbert *et al.* The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues—which methods are useful when? *PLoS ONE* (2007) 6: e537.
- (16) Kerick *et al.* Targeted high throughput sequencing in clinical cancer settings: formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues, input amount and tumor heterogeneity. *BMC Med. Genomics* (2011) 4: 68.
- (17) Spencer *et al.* Comparison of clinical targeted next generation sequence data from formalin-fixed and fresh-frozen tissue specimens. *J. Mol. Diagn.* (2013) 15: 623-633.
- (18) Bettegowda *et al.* Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* (2014) 6: 224.
- (19) Ma *et al.* "Liquid biopsy" ctDNA detection with great potential and challenges. *Ann. Transl. Med.* (2015) 16: 235.
- (20) Heitzer *et al.* Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin. Chem.* (2015) 61: 112-123.

可靠结果，完整方案。



Agilent Pathology Solutions

www.dako.com

我们的客户代表遍布
100 多个国家/地区

澳大利亚

+61 2 9922 0700

奥地利

+43 1 408 43 34 0

比利时

+32 (0) 16 38 72 20

巴西

+55 11 50708300

加拿大

+1 905 335 3256

中国

+86 21 3612 7091

丹麦

+45 44 85 97 56

芬兰

+358 9 348 73 950

法国

+33 1 64 53 61 44

德国

+49 40 69 69 470

爱尔兰

+353 1 479 0568

意大利

+39 02 58 078 1

日本

+81 3 5232 9970

韩国

+82 2 2194 9577

荷兰

+31 20 42 11 100

挪威

+47 23 14 05 40

波兰

+48 58 661 1879

西班牙

+34 93 344 57 77

瑞典

+46 8 556 20 600

瑞士

+41 41 760 11 66

英国

+44 (0)1 353 66 99 11

美国

+1 805 566 6655

29144 2016MAY05

PR7000-0184

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2016

2016年5月4日，中国出版

5991-6907CHCN



Agilent Technologies