



遗传代谢性肝病 基因变异检测及分析

南昌大学第二附属医院

汇报人：罗磊

汇报日期：2020年7月30日



目录



- 1、遗传代谢性肝病概况
- 2、测序基本知识
- 3、常见变异的临床讲解
- 4、测序方法的选择



遗传代谢性肝病背景



- 随着我国病毒性肝炎的逐步控制，我国肝病谱已发生深刻变化。遗传代谢性肝病种类繁多，高达500多种，总体发病率不低，该方面的研究已成为国际肝病防治的新趋势。
- 2017年欧洲率先建立罕见肝病咨询网（European Reference Network for Rare Liver Diseases，ERN RARE-LIVER），该咨询网是由全欧洲医疗服务者参与的虚拟网络服务平台，目的是整合全欧洲的专业知识、资源、治疗条件，群策群力来解决复杂或罕见疾病。



遗传代谢性肝病背景



- 2018年3月30日我国成立了中华医学会肝病学分会遗传代谢性肝病协作组。协作组的成立将有助于搭建遗传代谢性肝病临床科研创新和高层次人才培养、学术交流的平台，在筛查我国遗传代谢性肝病的流行现状、提高诊治水平、指导生殖干预等方面发挥积极推动作用。
- 全面深入系统的研究遗传代谢性肝病，符合精准医学的时代要求。



2019年发布罕见病诊疗指南



1. 目前世界上已经确认的**罕见病超过7000种**，全球预计有3亿名罕见病患者，**80%为遗传疾病**，普遍缺乏有效的治疗方法。
2. 《罕见病诊疗指南（2019年版）》是首部关于罕见病的诊疗指南，**涵盖121种罕见病**，其中**涵盖了22种遗传代谢性肝病**体现了我国罕见病诊断、鉴别诊断和治疗的科学性、权威性、规范性、代表性、实用性和指导性。



按代谢物质分类



氨基酸代谢障碍 (7种)

精氨酸酶缺乏病

原发性酪氨酸血症

瓜氨酸血症

鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺乏症

甲基丙二酸血症

N-乙酰谷氨酸合成酶缺乏症

高鸟氨酸血症-高氨血症-同型瓜氨酸尿症

糖代谢障碍 (3种)

半乳糖血症

遗传性果糖不耐受症

糖原累积病 (I型和II型)

脂质代谢障碍 (4种)

中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症

极长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症

多种酰基辅酶A脱氢酶缺乏症

长链3-羟酰基辅酶A脱氢酶缺乏症

胆汁酸代谢障碍 (2种)

先天性胆汁酸合成障碍

进行性家族性肝内胆汁淤积症

金属代谢障碍 (1种)

肝豆状核变性

溶酶体贮积病 (5种)

溶酶体酸性脂肪酶缺乏症

黏多糖贮积症

戈谢病

尼曼匹克病

卟啉病

其中肝脏相关的遗传代谢性疾病 (22种)



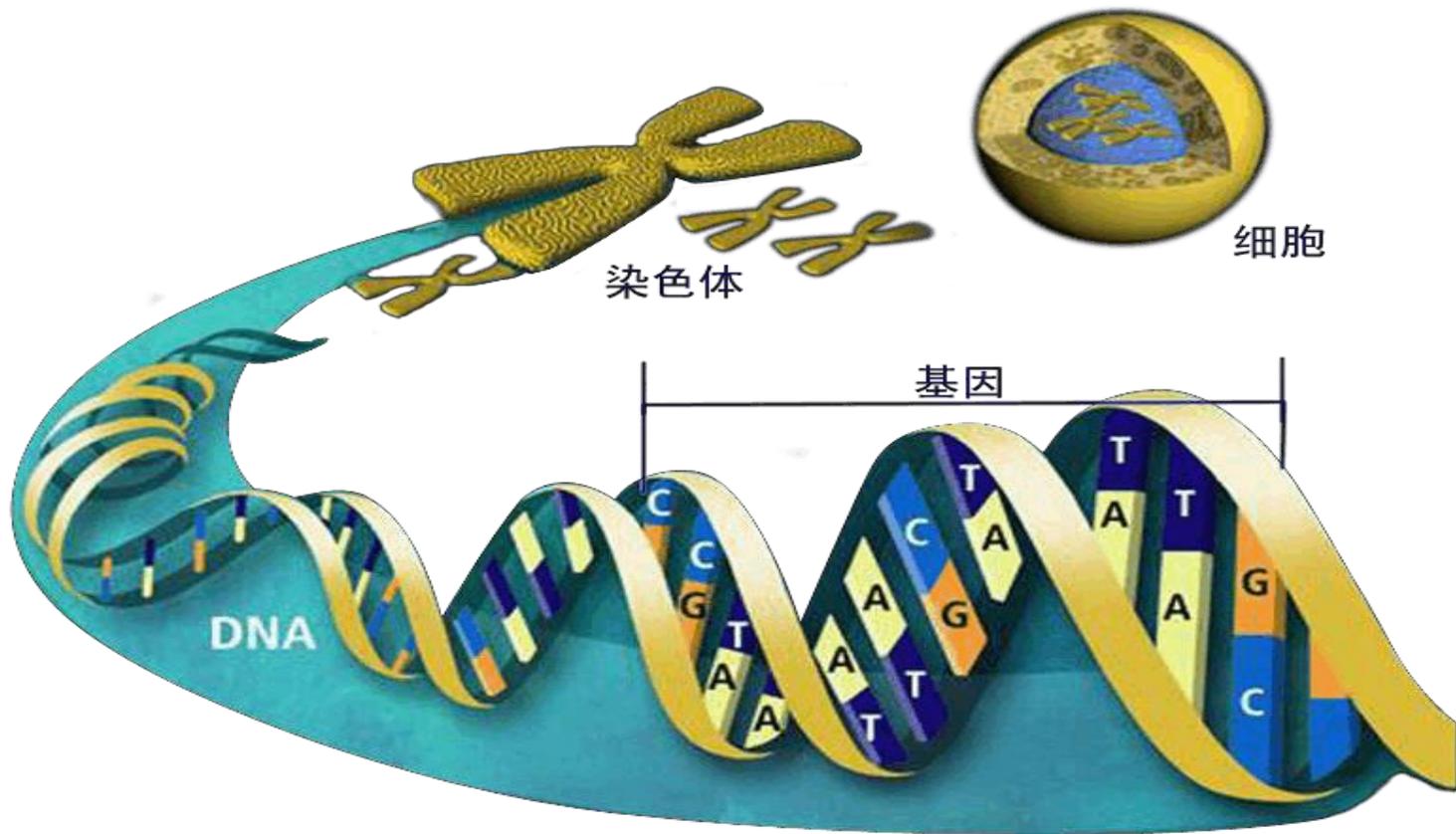
按肝损伤类型



肝细胞损伤为主型	高胆红素血症为主型	胆汁淤积为主型
<ul style="list-style-type: none">• 肝豆状核变性• 糖原累积症• 肝囊性纤维化• 尼曼匹克病• 酪氨酸血症• POEMS综合征• 鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺乏症• 半乳糖血症• 遗传性果糖不耐受症• 卟啉病• 戈谢病	<ul style="list-style-type: none">• Gilbert综合征 (UGT1A1)• Crigler-Najjar综合征• Dubin-Johnson综合征 (ABCC2)• Rotor综合征 (SLCO1B3, SLCO1B1) <p>虽然没有列入指南，但是最常见的遗传代谢性肝病</p>	<ul style="list-style-type: none">• 进行性家族性肝内胆汁淤积；• 先天性胆酸合成缺陷• Alagille综合征• 氧化物酶体生物发生障碍• Zellweger综合征• 溶酶体酸性脂肪酶缺乏症• 黏多糖贮积症



基因测序





不明原因黄疸的一代测序



1. Gilbert 综合征突变热点检测

对常见突变位点的检测显示，在 Promoter 及 gtPBREM 区域存在杂合变异，具体如下：

编号	突变位点	突变区域	突变情况
1	A(TA) ₇ TAA> A(TA) ₆ TAA ⁽¹⁾	Promoter	杂合变异
2	c.-3275T>G ⁽²⁾	gtPBREM	杂合变异
3	c.-3152G>A ⁽²⁾	gtPBREM	未见变异
4	p.G71R(c.211G>A) ⁽³⁾	Exon1	未见变异
5	p.P229Q(c.686C>A) ⁽⁴⁾	Exon1	未见变异
6	p.P364L (c.1091C>T) ⁽⁴⁾	Exon4	未见变异
7	p.Y486D(c.1456T>G) ⁽³⁾	Exon5	未见变异

备注：患者父亲发现在 A(TA)₇TAA>A(TA)₆TAA 与 c.-3275T>G 位点发现纯合变异，c.-3152G>A 杂合变异；患者母亲未发现变异。



不明原因黄疸的Panel测序



变异基因	染色体位置	核酸/氨基酸变化	RS/HGMD-ID	Hom/Het/Hemi*	ACMG分类等级	参考文献
UGT1A1 (NM_000463) promoter	chr2:233757013	c.-3263(- 3279)T>G	rs4124874	Het	Pathogenic	[1]
UGT1A1 (NM_000463) promoter	chr2:233760233- 233760234	c.A(TA)6TAA> A(TA)7TAA	rs34983651	Het	Pathogenic	[2]
ABCB4 NM_018849 exon21	chr7:87046785	c.T2525C p.L842P	.	Het	Uncertain significance	-
ABCB4 NM_018849 exon25	chr7:87037480	c.T3152C p.V1051A	rs1379284893	Het	Uncertain significance	-
ABCB11 NM_003742 exon21	chr2:169801226	c.A2499C p.K833N	rs749186418	Het	Uncertain significance	-

*Hom: 纯合突变; Het: 杂合突变; Hemi: 半合子



不明原因黄疸的全外显子测序



主要检测结果								
序号	基因	染色体位置	转录本编号 核苷酸变化 (氨基酸变化)	基因 亚区	基因型	致病性 分类	相关疾病/遗传模式	家系成员 检出情况

第1 / 8页

样本编号:

DX-WESP-B11 V2.0

1	<i>UGT1A1</i>	chr2: 23468 1059	NM_000463.2: c. 1456T>G (p. Tyr486Asp)	EX5E	纯合	致病	血清胆红素水平数量性状 基因座 1(OMIM:601816)/- Crigler-Najjar 综合征 1 型 (OMIM:218800)/AR Crigler-Najjar 综合征 2 型 (OMIM:606785)/AR Gilbert 综合征 (OMIM:143500)/AR 家族性暂时性新生儿高胆 红素血症 (OMIM:237900)/AR	父亲 (杂 合) /母亲 (杂合)
---	---------------	---------------------	--	------	----	----	---	-------------------------

**遗传模式: AD 表示常染色体显性遗传, AR 表示常染色体隐性遗传, XL 表示 X 染色体连锁遗传, YL 表示 Y 染色体连锁遗传。

**主要检测结果包括: 与临床表型相关的致病/疑似致病变异; 与临床表型相关, 且遗传模式相符的临床意义未明变异。



临床医生的困境



- 1、如何解读一个测序结果？
- 2、如何进一步了解一个变异的性质？
- 3、如何选择一个合适的测序方法？





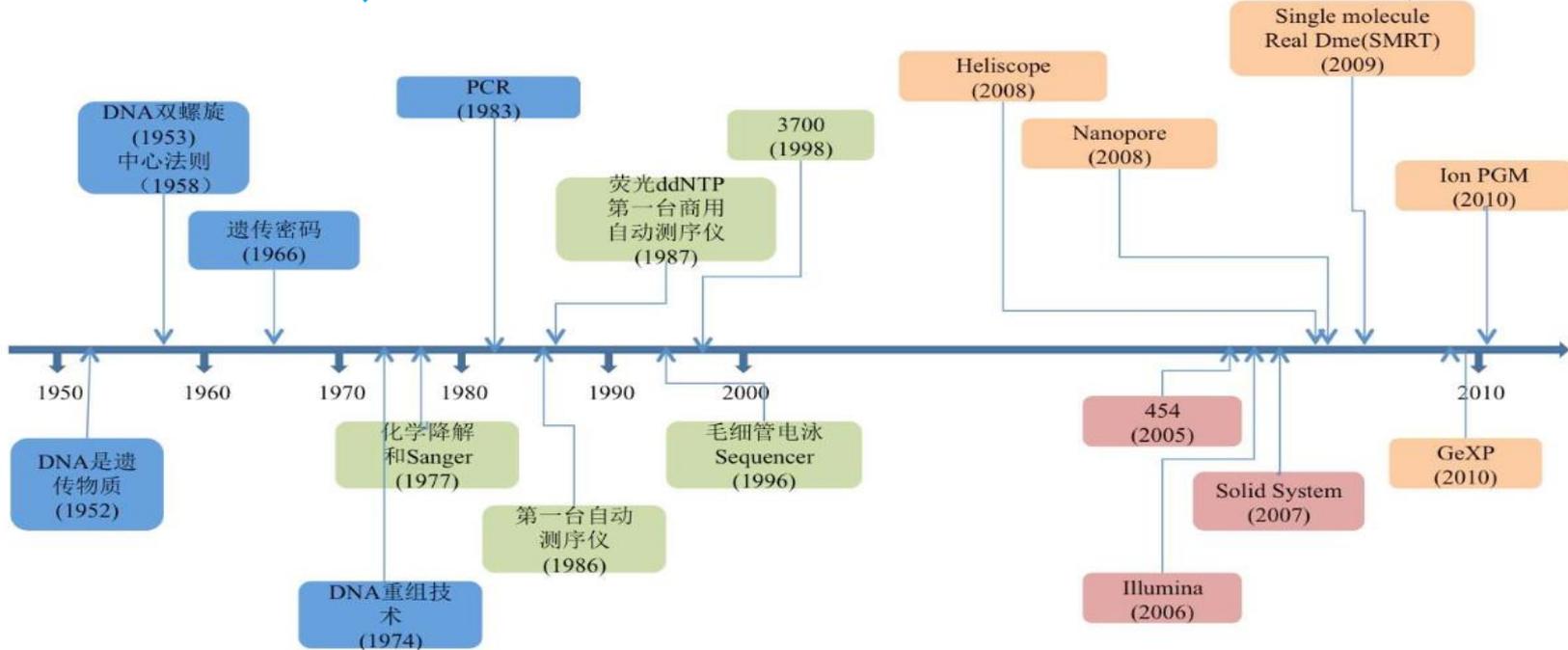
人类测序历史



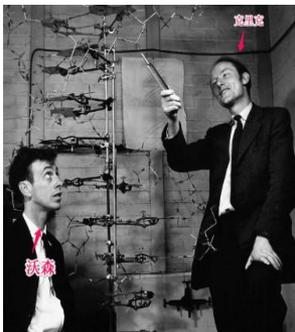
一代测序

二代测序

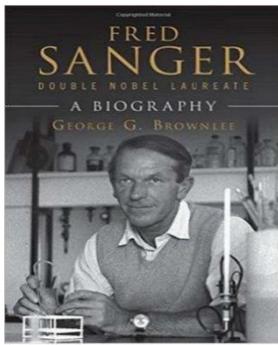
三代测序



1953年 DNA双螺旋结构



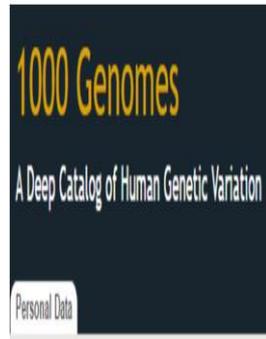
1977年 Sanger 测序



1990-2000 年人类基因组计划



2008-2012 年国际千人基因组计划





人类变异数据库



The Human Gene Mutation Database

at the Institute of Medical Genetics in Cardiff



[Home](#) [Search help](#) [Statistics](#) [New genes](#) [What is new](#) [Background](#) [Publications](#) [Contact](#) [Register](#) [Login](#) [LSDBs](#) [Other links](#) [Edit details](#) [Logout](#)

Gene symbol Go!

Symbol: Missense/nonsense Go!

Gene Symbol	Chromosomal location	Gene name	cDNA sequence	Extended cDNA	Mutation viewer
UGT1A1 <small>(Aliases: available to subscribers)</small>	2q37	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A1 <small>(Aliases: available to subscribers)</small>	NM_000463.2	Not available	Available to subscribers

基因标志

基因位置

基因转录产物序列号

Mutation type	Number of mutations	Mutation data by type (register or log in)
Missense/nonsense 错义/无义变异	98	<input type="button" value="Get mutations"/>
Splicing 调节性变异 内含子区域剪切变异	6	<input type="button" value="Get mutations"/>
Regulatory 启动子或增强子区域变异	1	<input type="button" value="Get mutations"/>
Small deletions	15	<input type="button" value="Get mutations"/>
Small insertions	8	<input type="button" value="Get mutations"/>
Small indels 插入/缺失变异	2	<input type="button" value="Get mutations"/>
Gross deletions	5	<input type="button" value="Get mutations"/>
Gross insertions/duplications	1	<input type="button" value="Get mutations"/>
Complex rearrangements	0	No mutations
Repeat variations	2	<input type="button" value="Get mutations"/>
Get all mutations by type		Available to subscribers
Public total (HGMD Professional 2019.4 total)	138 (164)	

网址: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/validate.php>



基因变异表述方式



Where? 在什么位置?

- “g.” for a genomic sequence (e.g., g.76A>T)
 - “c.” for a cDNA sequence (e.g., c.76A>T)
 - “m.” for a mitochondrial sequence (e.g., m.76A>T)
 - “r.” for an RNA sequence (e.g., r.76a>u)
 - “p.” for a protein sequence (e.g., p.K76A)
-
- cDNA: 特指在体外经过逆转录后与RNA互补的编码氨基酸的DNA链，存在于外显子中，不含内含子序列。
 - 蛋白序列: 特定基因编码蛋白序列。

对于DNA变异的表述，“c.” 优于 “g.” ——直观地得知该变异点在外显子上还是内含子上，会不会造成氨基酸编码改变，与表型联系起来。



基因变异表述方式



What? • 碱基替换:

哪
种
变
异
?

错义变异: 1. *UGT1A1*-c.211G>A(p.G71R)

注: *UGT1A1*基因的cDNA编码序列211位置的G碱基转换为A碱基, 从而使71位的甘氨酸(G)转换为精氨酸(R)。

2. *ATP7B*-c.2333G>T(p.R778L)

注: *ATP7B*基因的cDNA编码序列2333位置的G碱基转换为T碱基, 从而使778位的精氨酸(R)转换为亮氨酸(L)。

无义变异: *SLCO1B1*-c.1738C>T(p.R580Ter)

注: *SLCO1B1*基因的cDNA编码序列1738位置的C碱基转换为T碱基, 从而使778位的精氨酸(R)转换为终止密码子(Ter), 终止后续的氨基酸转录。



基因变异表述方式



- **缺失变异**: *ATP7B*基因- c.525dupA (p.V176SfsX28)

What?

注: *ATP7B*基因的cDNA编码序列525位置的A碱基缺失, 从而使176位的缬氨酸(V)转换为丝氨酸(S), 并引起后续的28个氨基酸发生改变。

哪种变异?

- **插入变异**: *UGT1A1*-A(TA)₇TAA(c.-40-39insTA)

注: *UGT1A1*基因的cDNA编码序列前40-39位置(启动子区域)的插入TA碱基, 影响启动子的转录活性, 进而影响基因的表达。

- **内含子区域变异**: *ATP7B*-IVS18+6C>T;

注: *ATP7B*基因的第18号内含子区域正6位C碱基转换为T碱基, 影响外显子的可变性剪切, 进而影响基因的表达。



氨基酸简写符号目录



氨基酸的简写符号

名称	三字母符号	单字母符号	名称	三字母符号	单字母符号
丙氨酸 (alanine)	Ala	A	亮氨酸 (leucine)	Leu	L
精氨酸 (arginine)	Arg	R	赖氨酸 (lysine)	Lys	K
天冬酰胺 (asparagine)	Asn	N	甲硫氨酸 (methionine)	Met	M
天冬氨酸 (aspartic acid)	Asp	D	苯丙氨酸 (phenylalanine)	Phe	F
半胱氨酸 (cysteine)	Cys	C	脯氨酸 (proline)	Pro	P
谷氨酰胺 (glutamine)	Gln	Q	丝氨酸 (serine)	Ser	S
谷氨酸 (glutamic acid)	Glu	E	苏氨酸 (threonine)	Thr	T
甘氨酸 (Glycine)	Gly	G	色氨酸 (tryptophan)	Tyr	W
组氨酸 (histidine)	His	H	酪氨酸 (tyrosine)	Tyr	Y
异亮氨酸 (isoleucine)	Ile	I	缬氨酸 (valine)	Val	V



临床医生的困境

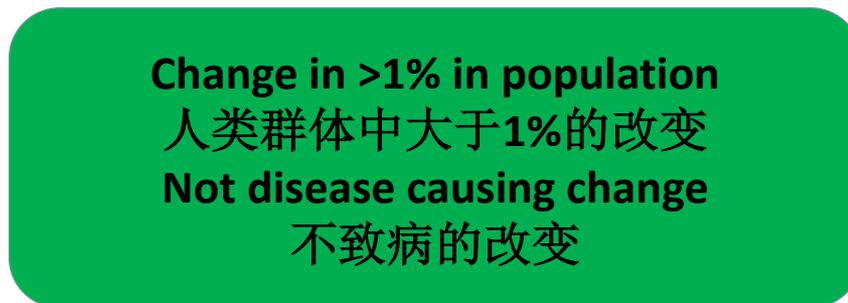
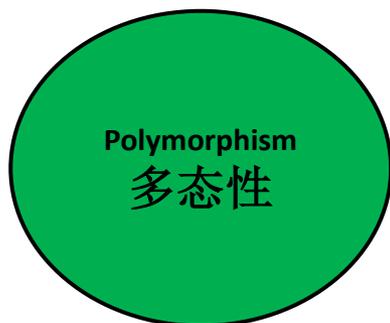
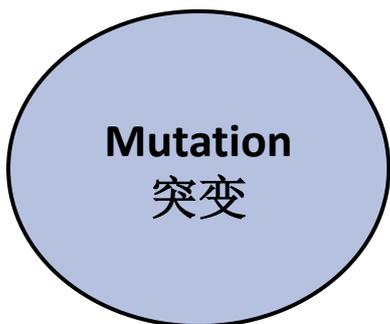


- 1、如何解读一个测序结果？
- 2、如何进一步了解一个变异的性质？
- 3、如何选择一个合适的测序方法？





“突变”与“多态性”的不同





建议使用的词语



Mutation
突变

负面

Polymorphism
多态性

正面

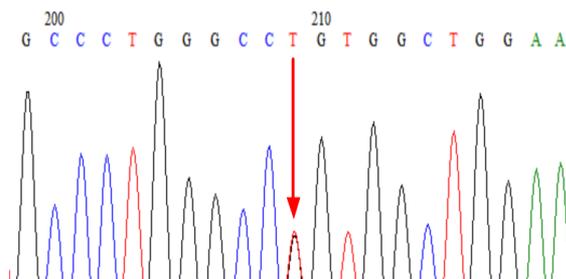
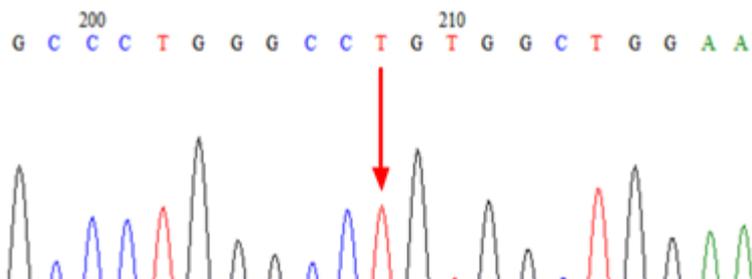
Variant / Alteration 变异
CNV 拷贝数变异
SNV (Not SNP) 单核苷酸变异

建议
使用
中性
词



错义变异(1)

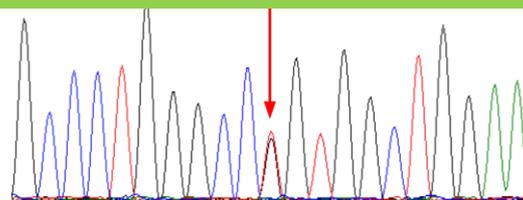
指编码某种氨基酸的密码子经**碱基替换**以后,变成编码另一种氨基酸的密码子,从而使**多肽链的氨基酸种类和序列发生改变**。



Wilson病的莱比锡评分提示: 纯合致病性变异, 积4分, 可直接诊断Wilson病

氨基酸序列分析

ATP7B 774	IALGRWLEHLAK	785
Consensus	IALG WLEHLAK	
7-1F 65	IALGLWLEHLAK	76

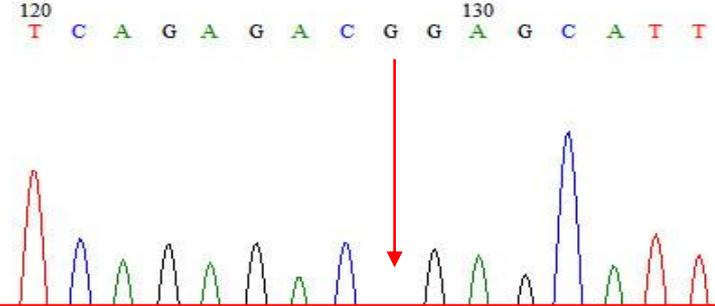
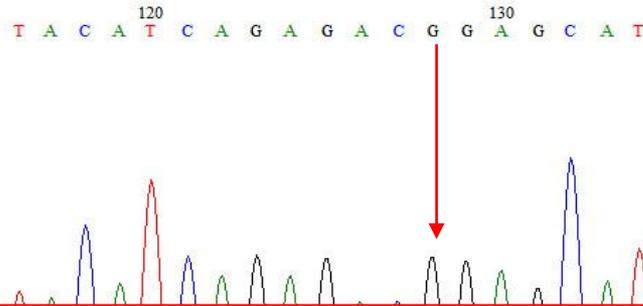


母亲: 杂合变异

Wilson病致病基因 (ATP7B) : c. 2333G>T (p. R778L)

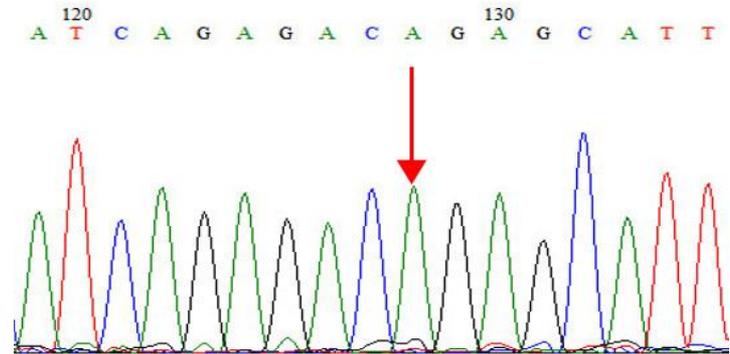


错义变异(2)



UGT1A1-c.211G>A(p.G71R)纯合变异，导致UGT1A1基因活性降低到正常的32%左右，诱发先天性黄疸-Gilbert综合征

	60	70	80
UGT1A1氨基酸序列.txt	QQRGHEIVVLAPDASLYIRDCAFYTLKTYFV		
Exon1氨基酸.txt	QQRGHEIVVLAPDASLYIRDCAFYTLKTYFV		
Consensus	qqrgh eivvl apdaslyird afytlktyfv		



氨基酸序列分析: p. G71R

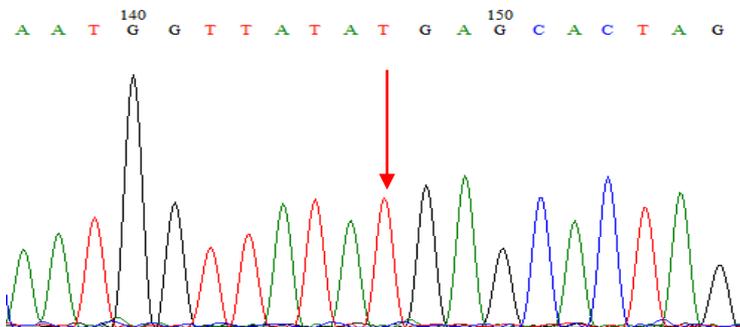
纯合变异



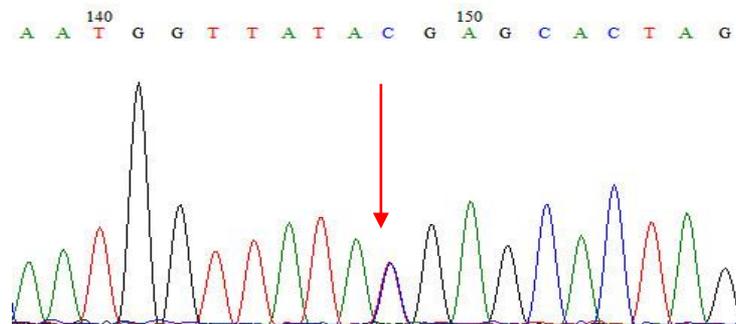
无义突变



无义突变指由于某个碱基的改变使代表某种氨基酸的密码子突变为终止密码子，从而使肽链合成提前终止。



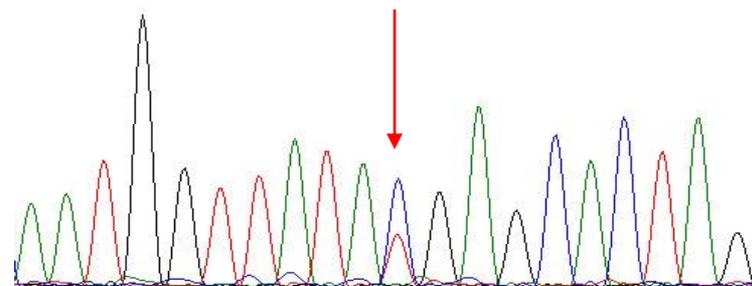
纯合变异 (患者)



杂合变异 (患者父亲)

	560	570	580
SLC01B1-氨基酸序列.txt	LIVKIVQPELKSLALGFHSMVIRAL		
R2氨基酸.txt	...IVQPELKSLALGFHSMVIT..		
Consensus	ivqpelkslalgfhsuvi		

氨基酸序列分析: p. R580Ter



杂合变异 (患者母亲)

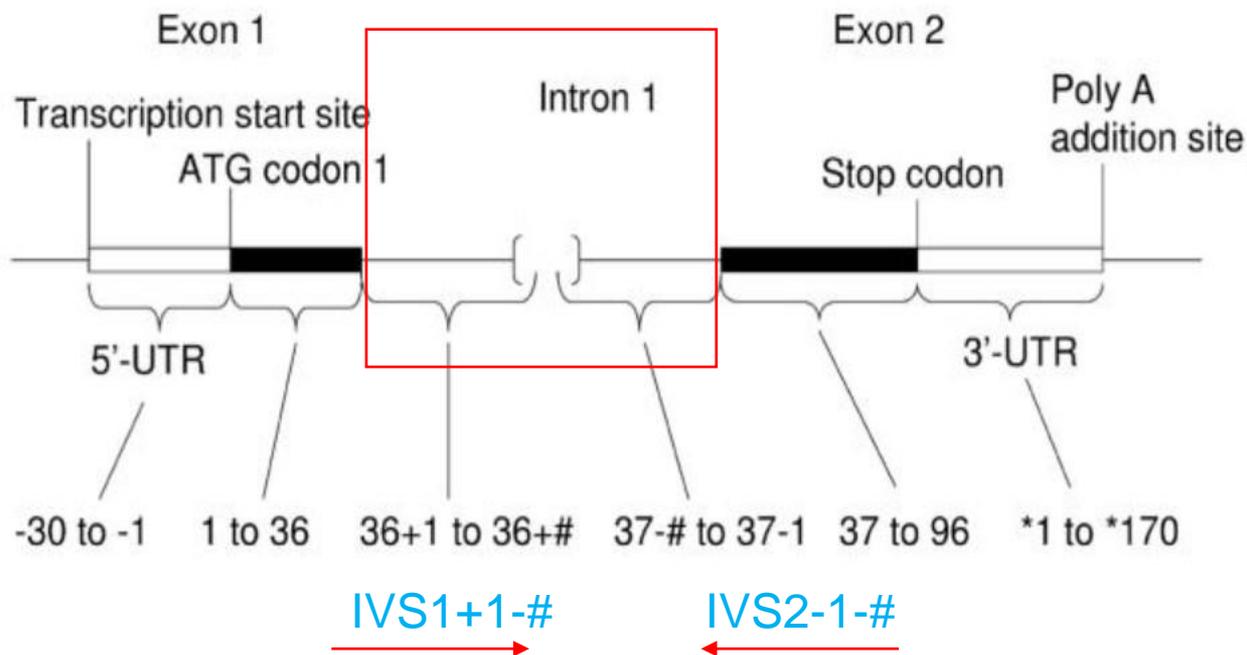
Rotor综合征基因 *SLC01B1*-c. 1738C>T (p. R580Ter)



内含子区域突变（剪切突变）



剪切突变：由于剪接的供体、接纳体部位或其旁侧保守序列的突变，改变RNA前体的剪接方式，使得产生的成熟RNA中含有内含子或缺失外显子序列的一类突变。





内含子区域变异



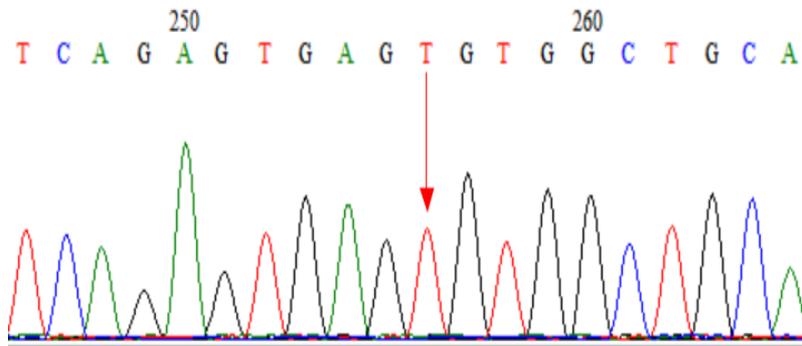
外显子18

内含子18

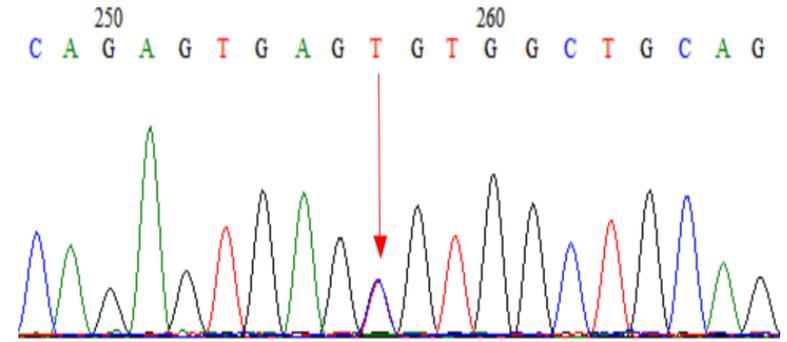
外显子19



IVS18+6C>T(Intron 18)



Wilson患者父亲，纯合变异



Wilson患儿杂合变异

Wilson病致病基因 (*ATP7B*) : IVS18+6C>T(Intron 18)



未知变异致病性的预测



- 各种公开的和商业上可用的预测工具可以帮助解释序列变异。
- 每个工具所使用的算法可能有所不同,但均包括序列变异的影响测定核苷酸和氨基酸水平以及蛋白质变异的潜在影响。其中以SIFT和Polyphen2最为常用。

Table 2 In silico predictive algorithms

Category	Name	Website	Basis
Missense prediction	ConSurf	http://consurftest.tau.ac.il	Evolutionary conservation
	FATHMM	http://fathmm.biocompute.org.uk	Evolutionary conservation
	MutationAssessor	http://mutationassessor.org	Evolutionary conservation
	PANTHER	http://www.pantherdb.org/tools/csnpScoreForm.jsp	Evolutionary conservation
	PhD-SNP	http://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html	Evolutionary conservation
	SIFT	http://sift.jcvi.org	Evolutionary conservation
	SNPs&GO	http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go	Protein structure/function
	Align GVGD	http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php	Protein structure/function and evolutionary conservation
	MAPP	http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/MAPP/index.html	Protein structure/function and evolutionary conservation
	MutationTaster	http://www.mutationtaster.org	Protein structure/function and evolutionary conservation
	MutPred	http://mutpred.mutdb.org	Protein structure/function and evolutionary conservation
	PolyPhen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2	Protein structure/function and evolutionary conservation
	PROVEAN	http://provean.jcvi.org/index.php	Alignment and measurement of similarity between variant sequence and protein sequence homolog



SIFT预测未知变异致病性



- SIFT是一款软件，基于氨基酸序列的同源性和物理性质来预测氨基酸的替换对蛋白质功能是否造成影响，用来评估基因变异的有害程度。
- sift score的取值范围为0-1，可以划分为两个范围。
 - 0-0.05范围内，认为这个变异位点是有害的，会导致蛋白质功能的改变。数值越小，引起蛋白质功能改变的可能性越大；
 - 0.05-1范围内，认为这个变异位点是良性的，数值越接近1，对蛋白质功能的影响越小。

J. Craig Venter™
INSTITUTE

PROVEAN

JCVI Home

PROVEAN Home

→ PROVEAN Tools

PROVEAN Protein

PROVEAN Protein Batch

Human

Mouse

PROVEAN Genome Variants

Human

PROVEAN HUMAN PROTEIN BATCH

This tool provides PROVEAN prediction for all human proteins and variants. It also shows SIFT predictions when precomputed scores are available.

- Input: A list of **human protein variants**. [See example.](#)
- Output: PROVEAN scores and predictions along with available SIFT predictions. [See example.](#)



Polyphen2预测未知变异致病性



- Polyphen2是基于蛋白结构同源性算法的预测原理,采用了Naïve Bayes的机器学习算法来评估SNP引起的氨基酸改变对蛋白质的折叠、互作、构象稳定性影响。
- 预测结果中, SNP也会获得一个得分。
- 但与SIFT不同的是, score越高, 危害性越大。评级有4个标准: unknown、benign、possibly damaging、probably damaging。
- 当score>0.9, 表示这个突变是很可能有害的 (probably damaging), 即该SNP对蛋白质功能有较大影响。



PolyPhen-2 prediction of functional effects of human nsSNPs

[Home](#)

[About](#)

[Help](#)

[Downloads](#)

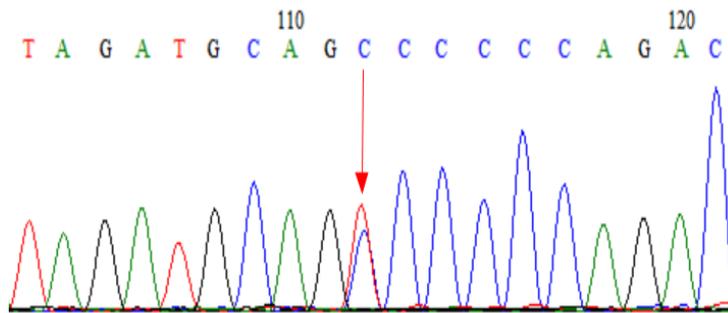
[Batch query](#)

[WHES.db](#)

PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) is a tool which predicts possible impact of an amino acid substitution on the structure and function of a human protein using straightforward physical and comparative considerations. Please, use the form below to submit your query.



Polyphen2预测实例介绍1



ATP7B-c. 3419T>C(p.V1140A)(Exon16): 杂合突变

PolyPhen-2 report for P35670 V1140A (rs1801249)

Query

Protein Acc	Position	AA ₁	AA ₂	Description
P35670	1140	V	A	Canonical; RecName: Full=Copper-transporting ATPase 2; EC=3.6.3.4; AltName: Full=Copper pump 2; AltName: Full=Wilson disease-associated protein; Contains: RecName: Full=WND/140 kDa; Length: 1465

Results

⊕ Prediction/Confidence PolyPhen-2 v2.2.2r398

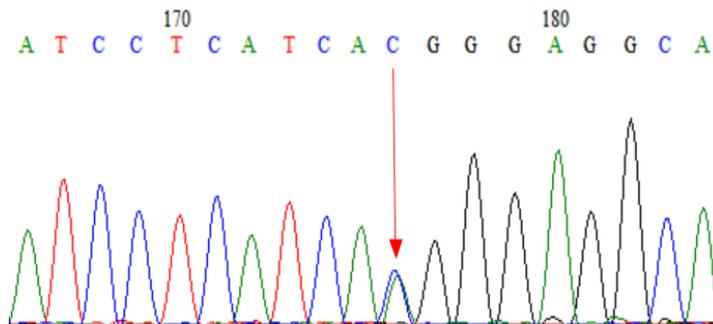
HumDiv

This mutation is predicted to be **BENIGN** with a score of 0.000 (sensitivity: 1.00; specificity: 0.00)

良性突变



Polyphen2预测实例介绍2



ATP7B-c. 3029A > C (p. K1010T) (Exon13): 杂合突变

PolyPhen-2 report for P35670 K1010T

Query

Protein Acc	Position	AA ₁	AA ₂	Description
P35670	1010	K	T	Canonical; RecName: Full=Copper-transporting ATPase 2; EC=3.6.3.4; AltName: Full=Copper pump 2; AltName: Full=Wilson disease-associated protein; Contains: RecName: Full=WND/140 kDa; Length: 1465

Results

⊕ Prediction/Confidence PolyPhen-2 v2.2.2r398

HumDiv

This mutation is predicted to be **PROBABLY DAMAGING** with a score of 0.999 (sensitivity: 0.14; specificity: 0.99)

可能致病性： score越高，危害性越大



致病预测软件的优缺点



优点:

属于在线应用软件，容易获得，免费且操作简单；

详细步骤可参考下面方法；

<https://wenku.baidu.com/view/1dd52c9e2b160b4e777fcf5b.html>

• 缺点:

1) 主要对SNP以及点突变进行功能预测，但Polyphen-2和SIFT预测限于错义突变，其他无义突变（突变为终止密码）、碱基缺失、插入所造成的框移突变，以及起始密码子的突变均不可以预测；

2) 仅仅是预测，具体功能需要细胞学实验验证。



多位点变异分析



Table 5. Scoring system developed at the 8th International Meeting on Wilson's disease, Leipzig 2001 [44].

Typical clinical symptoms and signs		Other tests	
KF rings		Liver copper (in the absence of cholestasis)	
Present	2	>5x ULN (>4 μmol/g)	2
Absent	0	0.8-4 μmol/g	1
Neurologic symptoms**		Normal (<0.8 μmol/g)	-1
0.1-0.2 g/L	1	Normal, but >5x ULN after D-penicillamine	2
<0.1 g/L	2	Mutation analysis	
Coombs-negative hemolytic anemia		On both chromosomes detected	4
Present	1	On 1 chromosome detected	1
Absent	0	No mutations detected	0
TOTAL SCORE	Evaluation:		
4 or more	Diagnosis established		
3	Diagnosis possible, more tests needed		
2 or less	Diagnosis very unlikely		

Wilson病的莱比锡评分提示：杂合变异计1分，而复合杂合变异计4分，可直接诊断Wilson病

*If no quantitative liver copper available, **or typical abnormalities at brain magnetic resonance imaging. KF, Kayser-Fleischer; ULN, upper limit of normal.

Servedio V, et al. Human mutation. 2005;25(3):325.

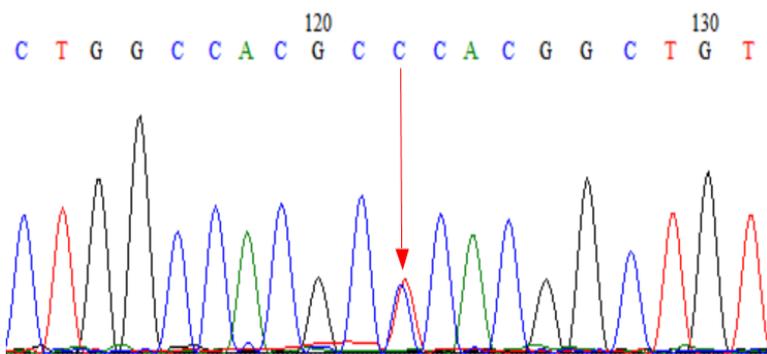
EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. J Hepatol. 2012;56(3):671-685



Wilson病的复合杂合变异

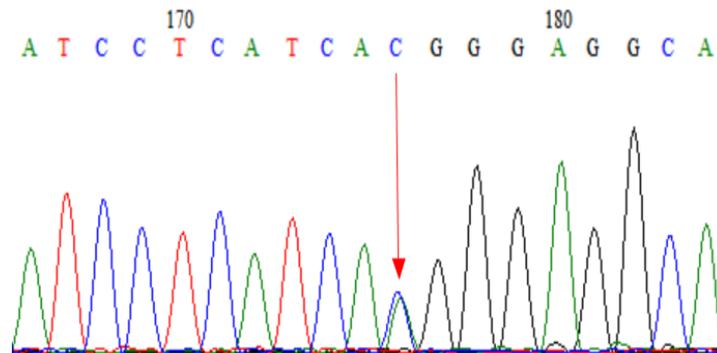


13岁患儿，临床表现为反复ALT异常，K-F环可疑阳性(2分)，化验铜蓝蛋白0.043g/L(2分)，尿铜199.2 μg/24h(1分)，病理提示：慢性肝炎，G2-3/S2-3。



ATP7B-c.2975C>T (p.P992L) (Exon13)

致病性变异，来源于母亲



ATP7B-c. 3029A>C (p. K1010T) (Exon13)

致病性变异，来源于父亲

按照2001年德国Leipzig评分系统，患者仅通过测序分析，即可明确诊断肝豆状核变性（Wilson病）。

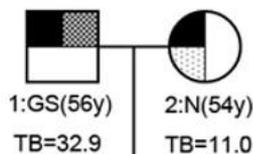


Crigler-Najjar 综合征 II 型家族研究



1A

I 复合杂合突变



杂合突变

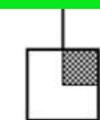


1B



c.-3275T>G 单位点杂合变异：正常人（第三代）
 c.211G>A/c.1456T>G；双位点杂合变异：正常人（第一代祖父）；
 c.211G>A+c.-3275T>G 双位点复合杂合变异：Gilbert综合征
 c.-3275T>G+c.211G>A/c.1456T>G 三位点复合杂合变异：CNS-II

III



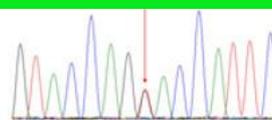
1:N(9y)
TB=5.9



2:N(7y)
TB=13.5



3:N(6y)
TB=7.1



1456T>G(Y486D)

CNS-II 家族谱系图及 *UGT1A1* 基因突变分布情况

I-1 为 Gilbert 综合征；II-1，II-3 与 II-5 为 CNS-II，余均为正常人。



临床医生的困境



- 1、如何解读一个测序结果？
- 2、如何进一步了解一个突变的性质？
- 3、如何选择一個合适的测序方法？

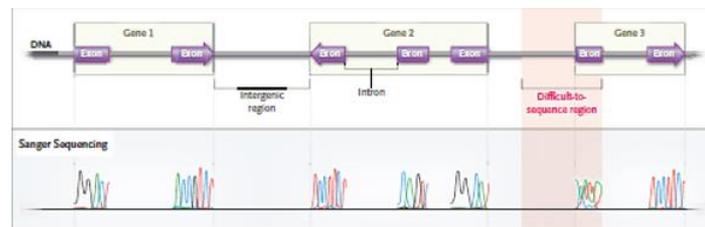




测序才能把突变找出来



一代测序



The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

REVIEW ARTICLE

FRONTIERS IN MEDICINE

Next-Generation Sequencing to Diagnose Suspected Genetic Disorders

David R. Adams, M.D., Ph.D., and Christine M. Eng, M.D.

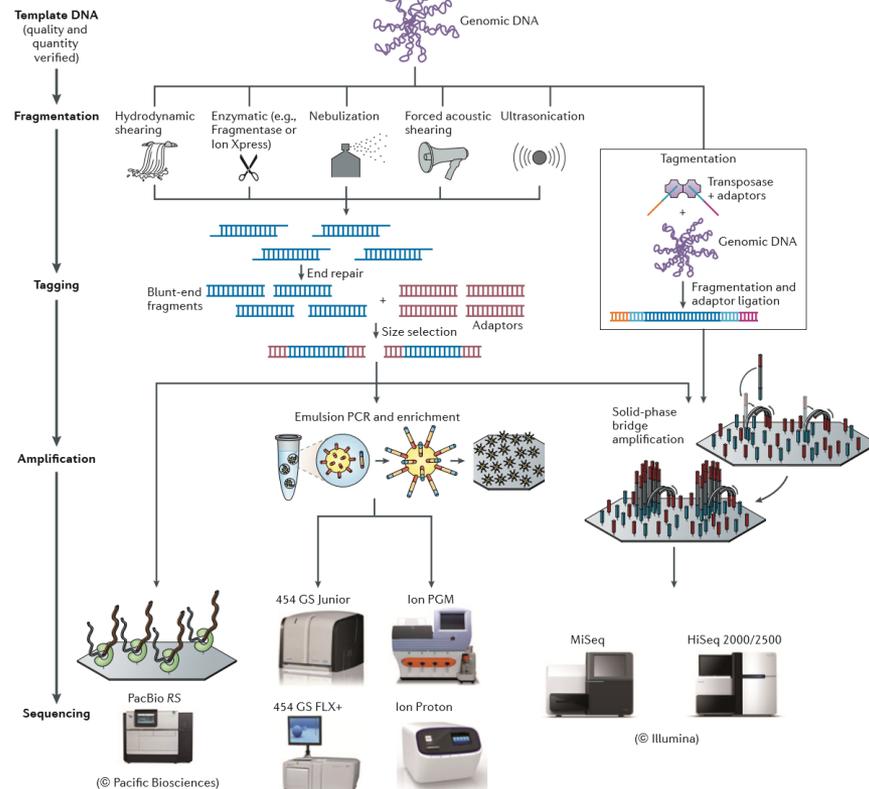
CLINICAL NEXT-GENERATION SEQUENCING IS BEING USED FREQUENTLY IN medical practices in which genetic testing has traditionally taken place — for example, medical genetics and medical subspecialties such as neurogenetics. Emerging diagnostic applications include rapid-reporting approaches in intensive care settings (especially neonatal and pediatric)¹ and use early in the course of complex disease.² Large-scale projects in the United States, China, and elsewhere are exploring and developing the role of clinical next-generation sequencing in precision medicine.^{3,4} This suggests a future in which genomic data will influence medical decision making for a diverse and growing group of patients (see video).

CLINICAL NEXT-GENERATION SEQUENCING AS A DIAGNOSTIC TOOL

From the Office of the Clinical Director, National Human Genome Research Institute, and the Undiagnosed Diseases Program, National Institutes of Health, Bethesda, MD (D.R.A.); and the Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, and Baylor Genetics — both in Houston (C.M.E.). Address reprint requests to Dr. Adams at the Undiagnosed Diseases Program, National Institutes of Health, Bldg. 10, Rm. 10C103E, 10 Center Dr., Bethesda, MD 20892, or at david.adams@nih.gov.

N Engl J Med 2018;379:1353-62.
DOI: 10.1056/NEJMra1711801
Copyright © 2018 Massachusetts Medical Society.

二代测序





第一代测序 (1977年)

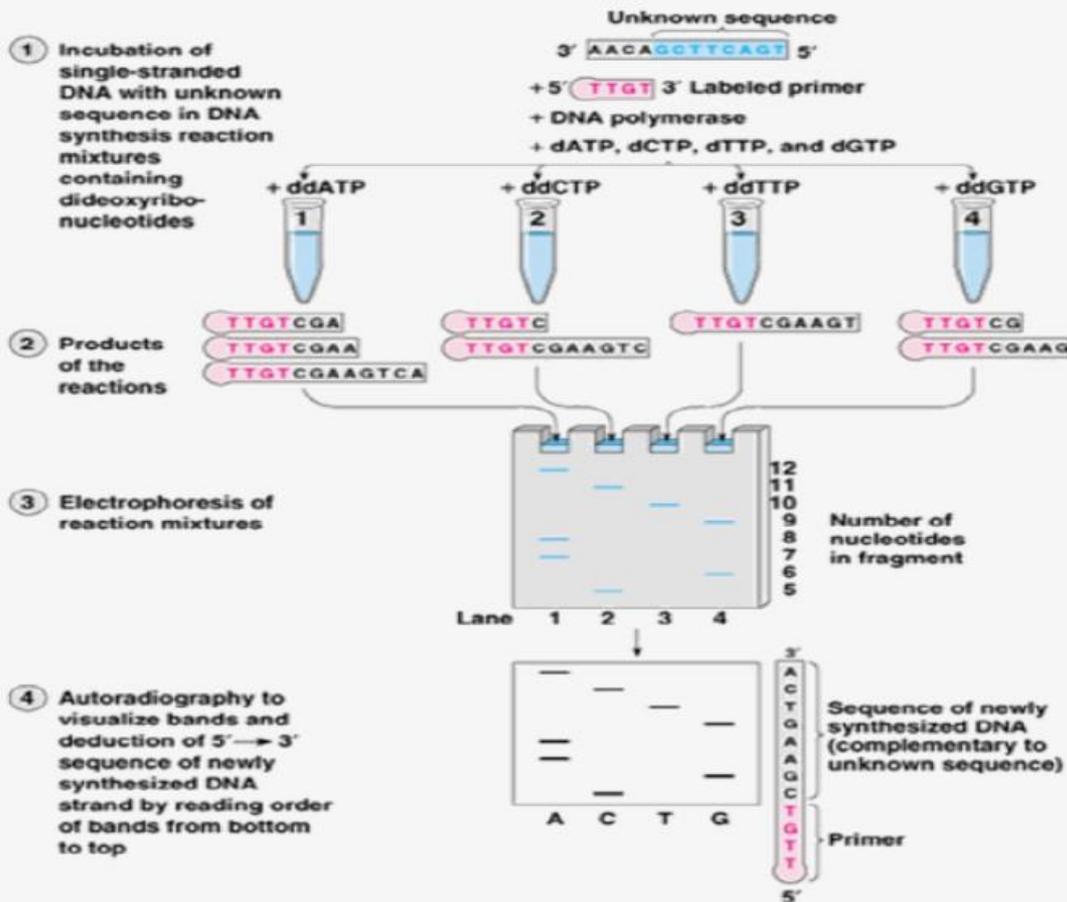


Dr. Fred Sanger

Frederick Sanger was awarded the prize in both 1958 and 1980. He is the fourth person in the world to have been awarded two Nobel Prizes and the only person to receive both in chemistry.

"dideoxy" sequencing technique (Sanger et al., 1977)

DNA双脱氧链终止法测序



©Addison Wesley Longman, Inc.

<http://blog.csdn.net/dylove98>

Sanger测序因准确率高，是基因检测的金标准



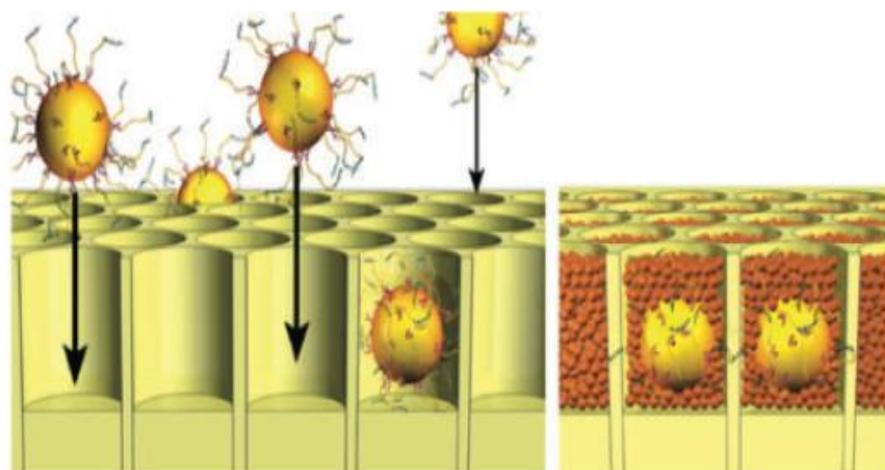
第二代测序 (2005年)



C

Sequencing

7.5 hours



- Well diameter: average of 44 μm
- 400,000 reads obtained in parallel
- A single cloned amplified sstDNA bead is deposited per well

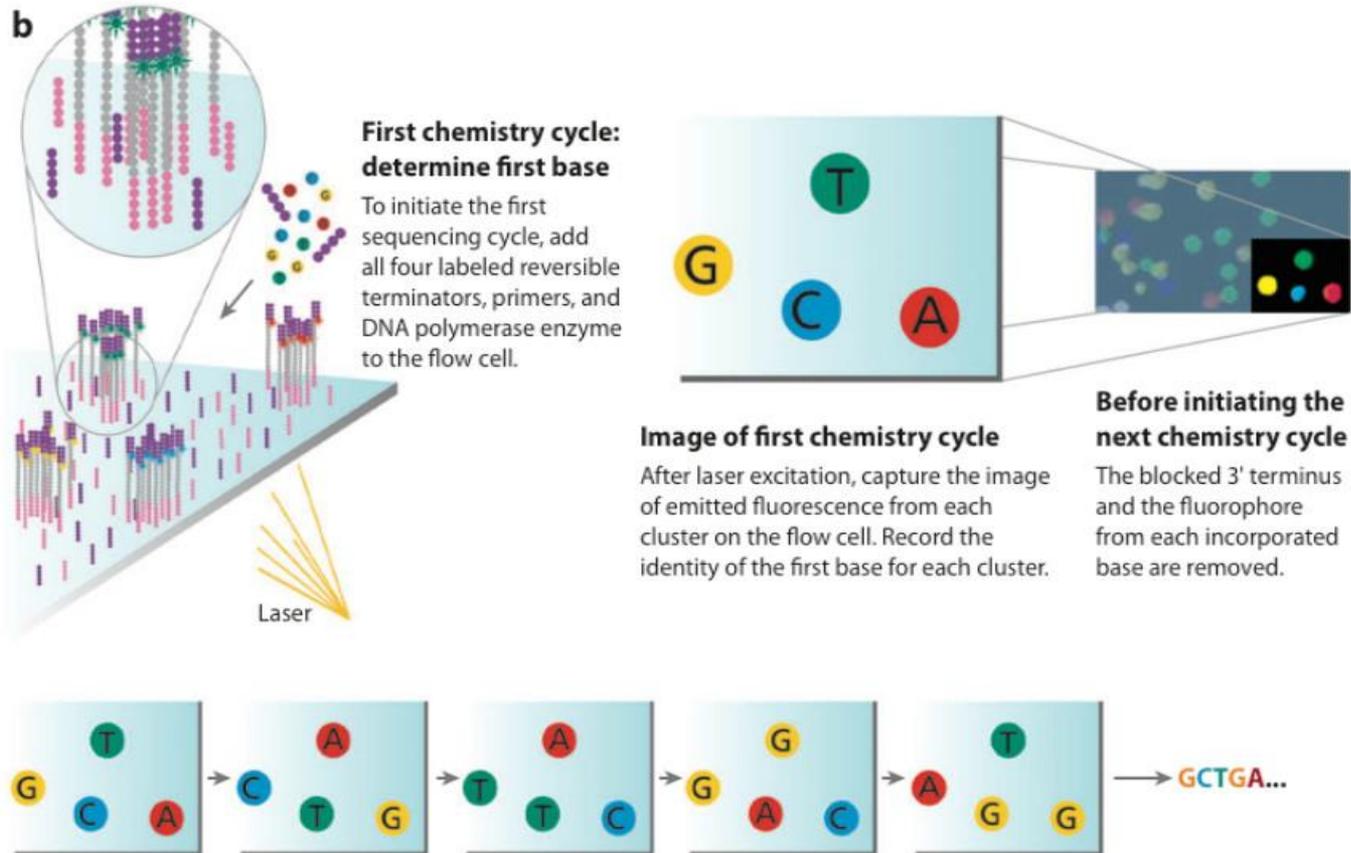
Amplified sstDNA library beads

Quality filtered bases

图5. Roche 454测序流程



第二代测序 (2007年)



Illumina公司的Solexa和HiSeq应该说是目前全球使用量最大的第二代测序机器，将测序价格降到1000美金以内的推行者。 42



测序费用变化



Cost per Genome





一代与二代测序方法的比较



名称	读长	目标基因	优点	缺点	检测变异类型
Sanger测序	600-1000bp	单个	金标准、读长较长、准确度高、数据分析简单	通量较低、成本较高	SNV、InDel
NGS	300bp	多个至全部	通量较高、平均成本较低、能检测多种变异类型	样本制备、检测分析流程较复杂	SNV、InDel、CNV

注：CNV：拷贝数变异；SNV：单核苷酸变异；InDel：基因组小片段插入
NGS：第二代测序，目前广泛应用于临床的有全外显子测序与Panel测序



全外显子基因检测



- 可检测人类基因组中约**2万**多个基因外显子区，其中覆盖率达到95%以上的基因数为**18105**个；
- 解读包括OMIM数据库中明确致病关系的**4000**多个基因，**超过5000种**疾病，并检测**68种**微缺失微重复综合征。

OMIM Gene Map Statistics

OMIM Morbid Map Scorecard (Updated July 22nd, 2020) :

Total number of phenotypes* for which the molecular basis is known	6,699
Total number of genes with phenotype-causing mutation	4,300

* Phenotypes include (1) single-gene mendelian disorders and traits; (2) susceptibilities to cancer and complex disease (e.g., BRCA1 and familial breast-ovarian cancer susceptibility, [113705.0001](#), and CFH and macular degeneration, [134370.0008](#)); (3) variations that lead to abnormal but benign laboratory test values ("nondiseases") and blood groups (e.g., lactate dehydrogenase B deficiency, [150100.0001](#) and ABO blood group system, [110300.0001](#)); and (4) select somatic cell genetic disease (e.g., GNAS and McCune-Albright syndrome, [139320.0008](#) and IDH1 and glioblastoma multiforme, [147700.0001](#).)



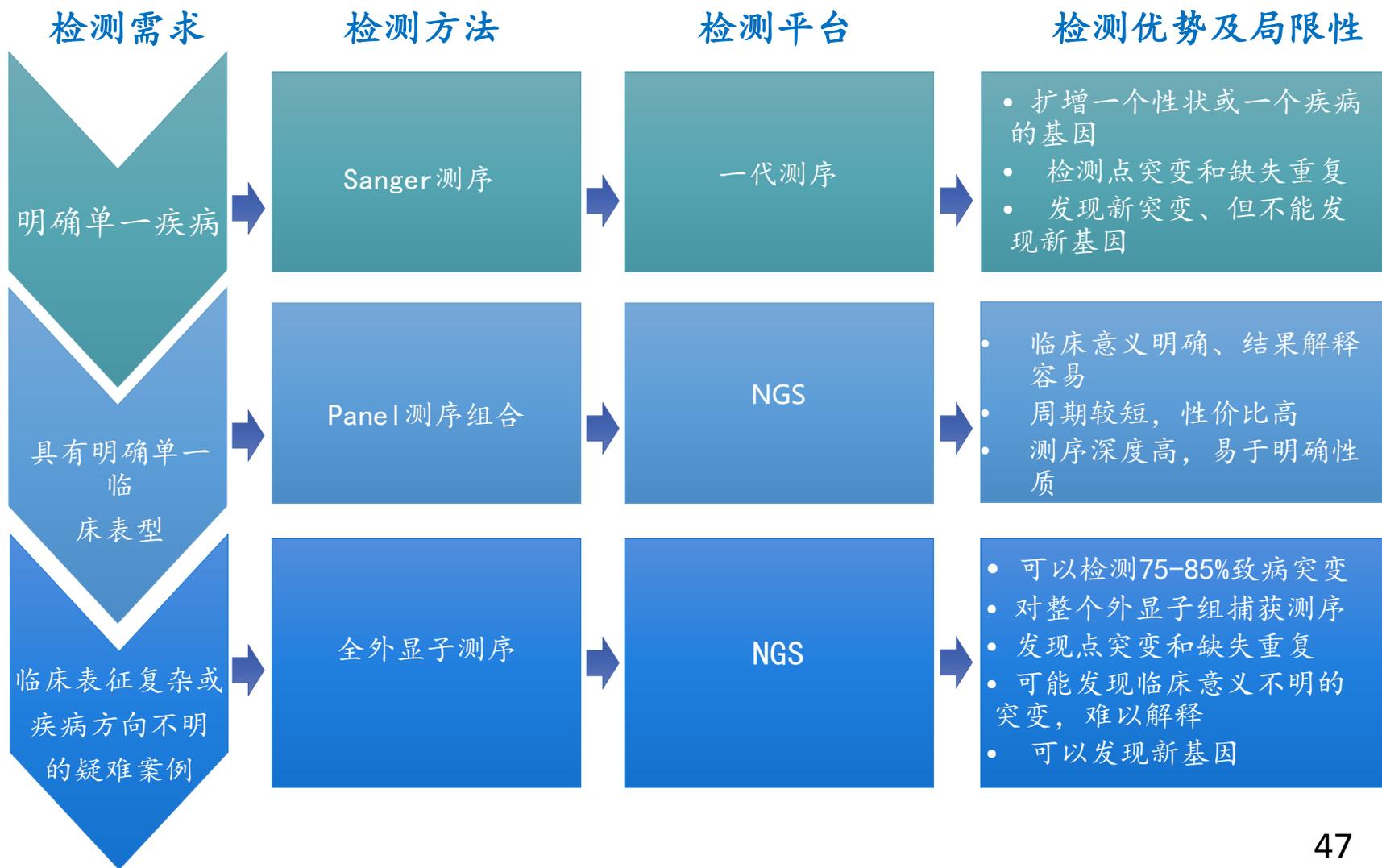
全外显子检测与Panel比较



检测方法	全外显子	Panel
检测范围	检测2万多个编码蛋白的基因，检测范围广	仅检测某一类疾病或特定表型的相关基因，不同公司的Panel，候选基因数量均不同，总体检测范围小
检测成本	总价较高	总价稍低，但可能会漏检
产品更新	无需更新	基因数量易滞后，需频繁更新捕获探针
数据分析能力	变异信息量极大，对数据分析解读能力要求较高	变异信息较少，数据分析解读比较容易
数据回顾价值	一次性检测所有编码区涵盖已知致病和未知基因，数据价值较高，可随着数据库更新进行重新分析	仅检测和分析明确致病基因，数据重分析价值不大
科研价值	可挖掘新的致病基因	无法挖掘新的致病基因



测序方法的选择





二代测序是万能的吗？



二代测序阴性可能性原因

一、未知致病基因

二、复杂疾病

三、技术局限性：

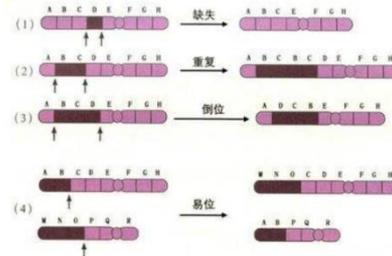
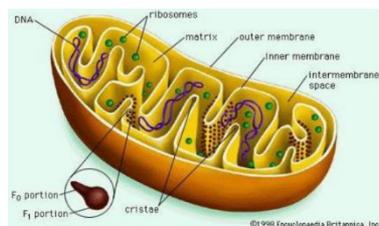
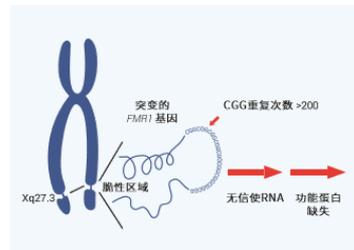
- 1、染色体末端的重复区域；
- 2、线粒体基因中的突变；
- 3、易位倒位等无拷贝数变化的染色体异常；
- 4、动态突变；
- 5、调控序列；
- 6、单亲二倍体；
- 7、甲基化

四、覆盖度不够漏检

五、解读范围外

六、假阴性

(流程、转录本、低覆盖度、解读、基因集更新不及时)





总结



- 遗传代谢性肝病种类繁多，整体发病率不低，不容忽视，我们需要从基因测序的角度出发，争取早诊断早治疗。
- 学习测序基础知识，了解不同突变的性质及意义，有利于进一步明确遗传代谢性肝病的诊断，判断其预后。
- 了解不同测序方法的优缺点，有的放矢的选用其中的一种或联合多种方法，可显著提高遗传代谢性肝病的基因诊断成功率，为遗传代谢性肝病这类罕见病提供更好的治疗奠定坚实的基础。



感谢导师段钟平教授对我的教导和培养！

感谢郑素军教授和孙水林教授对我科研的帮助！

感谢白洁师妹和梁晨师妹给我提供测序数据！

THANK YOU

南昌大学第二附属医院感染性疾病科