

·基础研究·

光学基因组图谱技术在复杂染色体重排中的应用

何妹婧^{1,2,3}, 张志强^{1,2,3}, 黄乙涓^{2,4}, 徐丽南^{1,2,3}, 陈元球^{2,4}, 方丛^{1,2,3}, 任姿^{1,2,3}

(1. 中山大学附属第六医院生殖中心, 广东广州 510655; 2. 广东省生育力保存工程技术研究中心, 广东广州 510655; 3. 广州市黄埔区中六生物医学创新研究院, 广东广州 510655; 4. 中山大学附属第六医院妇产科, 广东广州 510655)

摘要:【目的】探讨光学基因组图谱技术(OGM)在复杂染色体重排中的应用。【方法】收集2022年1月到2023年6月期间,在中山大学附属第六医院生殖医学中心进行辅助生殖助孕的染色体复杂重排患者5例,对患者进行OGM检测,纳米孔三代测序和胚胎植入前遗传学检测(PGT),并与核型分析、染色体微阵列分析技术(CMA)/基因组拷贝数变异测序(CNV-Seq)的结果分析对比。【结果】相互易位合并插入,相互易位合并倒位,三联易位均能被OGM成功检测,且与纳米孔测序和CMA/CNV-Seq结果相符。OGM成功定位断裂点位置,并与胚胎检测结果验证相符。OGM无法检测到罗氏易位。【结论】OGM因其超长读长,实现了跨越重复区域的检测能力,能够准确定位结构重排,可以有效地辅助复杂染色体重排的临床诊断。

关键词:光学基因组图谱技术;纳米孔测序;复杂染色体重排;胚胎植入前遗传学检测;辅助生殖

中图分类号:R394.3

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2023)06-0943-06

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0625

Application of Optical Genome Mapping Technology in Detecting Complex Chromosomal Rearrangement

HE Shu-jing^{1,2,3}, ZHANG Zhi-qiang^{1,2,3}, HUANG Yi-juan^{2,4}, XU Li-nan^{1,2,3}, CHEN Yuan-qiu^{2,4},
FANG Cong^{1,2,3}, REN Zi^{1,2,3}

(1. Reproductive Center, The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China; 2. Biomedical Innovation Center, The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China; 3. Guangdong Engineering Technology Research Center of Fertility Preservation, Guangzhou 510655, China; 4. Department of Obstetrics and Gynecology, The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China)

Correspondence to: REN Zi; E-mail: renz6@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To investigate the application of optical genome mapping (OGM) technology in detecting complex chromosomal rearrangement.【Methods】We recruited five patients who were diagnosed as complex chromosomal rearrangement at the Reproductive Medicine Center of the Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University from January 2022 to June 2023. They underwent OGM, nanopore sequencing and pre-implantation genetic testing (PGT). The results were compared with the results of karyotype and chromosomal microarray analysis (CMA)/copy number variation sequencing (CNV-Seq).【Results】OGM could detect translocation, invert inversion, and triplet translocation, which were consis-

收稿日期:2023-09-07

基金项目:国家重点研发计划重点专项(2022YFC2703200);国家自然科学基金(82271651)

作者简介:何妹婧,第一作者,研究方向:胚胎植入前遗传学检测,E-mail:heshj8@mail.sysu.edu.cn;任姿,通信作者,副主任医师,
E-mail:renz6@mail.sysu.edu.cn

tent with the results of OGM and CMA/ CNV-Seq. But OGM could not detect Robertsonian translocation.【Conclusion】 Because of its ultra-long reads, OGM realizes the detection across repetitive regions, and it has great advantages when applied in patients with complex chromosome rearrangement or uncertain karyotype analysis. It can accurately locate breakpoints.

Key words: optical genome mapping; nanopore sequencing; complex chromosomal rearrangement; pre-implantation genetic testing; assisted reproduction

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(6): 943-948]

复杂染色体重排 (complex chromosomal rearrangement, CCR) 是涉及三条或三条以上染色体或具有两个以上断点的组成结构重排^[1]。CCR 可以是平衡或者不平衡的, 即不存在或存在染色体拷贝数目的改变。CCR 也是罕见的, 目前全球报道病例约 260 例^[2-4]。2012 年 Madan^[5] 提出将 CCR 分为四类。类型 I: 染色体断裂的次数等于畸变中涉及的染色体数目, 是简单的三联易位等。类型 II: 断裂的数目比涉及的染色体数目多一个, 包括倒位。类型 III: 断裂的数量大于涉及的染色体的数量, 包括插入。类型 IV: 断裂数目大于染色体数目, 同时观察到“中间片段”, 指位于衍生染色体中间的染色体片段。长期以来, 显带细胞遗传学, 荧光原位杂交, 染色体微阵列分析技术 (chromosome microarray analysis, CMA), 基因组拷贝数变异测序 (copy number variation sequencing, CNV-Seq), 全基因组测序 (whole genome sequencing, WGS) 都逐步运用于 CCR 的检测, 不同检测技术有不同的优势和局限性。光学基因组图谱技术 (optical genome mapping, OGM) 是最近发展起来的一种可以直接对荧光标记的超长 DNA 分子进行成像的技术^[6]。它将线性化的高分子量 DNA 链电泳通过纳米通道并拍照, 其平均读长超过 200 kbp, 因此可以更容易地跨越重复区域和其他复杂的作图区域^[7]。本研究对 5 例核型分析为复杂染色体重排的患者进行 OGM 检测, 探讨 OGM 技术在辅助诊断复杂染色体重排的可行性。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本研究收集并分析了 2022 年 1 月到 2023 年 6 月期间, 在中山大学附属第六医院生殖医学中心进行辅助生殖助孕的染色体复杂重排或核型分析存疑的患者 5 例, 均进行了 OGM 检测和 CMA/CNV-seq 检测, 部分患者进行了纳米孔三代测序。其中 3 例成功获得囊胚并进行 PGT。本研究通过了中山大学附属第六医院生殖医学伦理委员会的审批 (批件号: 2017ZSLYEC-016S), 并获得了受检人员的知情同意。

1.2 光学基因组图谱检测

1.2.1 抽提超长 DNA 分子 采集患者的外周血样本 2 mL, EDTA 抗凝管保存。采用 SP Blood & Cell Culture DNA Isolation Kit v2 试剂盒 (Bionano Genomics, 美国), 利用 DNA 吸附磁盘富集样本中的超长 DNA 分子。使用 Qubit® 3.0 荧光计 (Invitrogen, 美国) 测量 DNA 浓度, 范围应在 36~150 ng/μL。

1.2.2 序列特异荧光标记和 DNA 骨架染色 采用 DLS DNA Labeling Kit 试剂盒 (Bionano Genomics, 美国) 对 DNA 分子序列进行特异性荧光标记和染色。参照说明书利用荧光转移酶 DLE-1 (Bionano Genomics, 美国) 进行全基因组标记, 采用透析法纯化去除游离荧光基团, 再使用 DNA 骨架染料 (Bionano Genomics, 美国) 对双链 DNA 分子骨架进行染色。标记染色后的 DNA 产物采用 Qubit® 3.0 荧光计 (Invitrogen, 美国) 测量 DNA 浓度, 范围应在 4~12 ng/μL。

1.2.3 Saphyr 芯片检测 取 20 μL 标记染色后的

DNA 样品加到 Saphyr Chip G2.3 芯片 (Bionano Genomics, 美国), 按照仪器的标准操作说明, 将芯片插入 Saphyr 仪器上运行。

1.2.4 数据分析 自带 Bionano Access v1.6.1 软件进行数据分析, 并参考基因组 hg38 进行多重局部比对, 完成超长的基因组组装图谱, 确定染色体结构变异的类型和断裂位点。

1.3 CMA 检测

1.3.1 DNA 提取 采集患者的外周血样本 2 mL, EDTA 抗凝管保存。使用 SDS 方法提取高分子量基因组 DNA, 并按照官方说明书, 使用试剂盒 QIA-GEN[®] Genomic kit (Cat# 13343) 进行纯化。随后通过 1% 琼脂糖凝胶电泳评估提取的 DNA 的降解和污染情况。使用 Qubit[®] 3.0 荧光计 (Invitrogen, 美国) 测量 DNA 浓度。

1.3.2 芯片杂交与分析 采用 Human Omni Zhong-Hua-8 Bead Chip (Illumina, 美国) 基因芯片进行杂交, 特别覆盖中国人群的常见变异和稀有变异, 参照厂家标准操作说明书。数据分析根据既往发表文献^[8]进行。

1.4 纳米孔测序

1.4.1 文库制备 使用 NanoDrop[™] One 紫外-可见光谱仪 (Thermo Fisher Scientific, 美国) 测量 QIA-GEN[®] Genomic kit 纯化后 DNA 的纯度。OD 260/280 值应在 1.8 到 2.0 之间, OD 260/230 值应在 2.0 到 2.2 之间。

每个样品取 DNA 2 μ g 用于文库制备。使用 BluePippin 全自动核酸片段回收系统 (Sage Science, 美国) 回收长片段 DNA。使用试剂盒 Ultra II End Repair/dA-tailing Kit (Cat# E7546) 修复 DNA 片段末端并进行连接反应。使用 LSK109 试剂盒中的接头进行进一步的连接反应, 并使用 Qubit[®] 3.0 荧光计 (Invitrogen, 美国) 量化文库片段。

1.4.2 纳米孔测序分析 按照仪器的标准操作说明, 将文库上样到 PromethION 测序仪 (Oxford Nanopore Technologies, 英国) 上运行测序。参考基因组 hg19, 使用 sniffles.2.0 软件进行数据分析。

1.5 胚胎培养及活检样本检测

1.5.1 胚胎培养 患者获取卵子后, 均采用卵胞浆内单精子注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 进行授精。采用 G-Series 序贯培养基 (Vitrolife, 瑞典), 在 37 $^{\circ}$ C、体积分数 6% CO₂、5% O₂ 培养箱中行胚胎培养。在 D5/D6 天, 对患者的囊胚行活检, 活检方法参考《胚胎植入前遗传学诊断/筛查技术专家共识》^[9], 活检样本转移至 PCR 管中并离心。

1.5.2 全基因组扩增及二代测序 活检样本采用多次退火环状循环扩增技术 (multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC) 进行单细胞全基因组扩增, 采用 ChromInst 一步法完成全基因组扩增和建库 (XK-008-024 亿康基因, 中国)。采用 Illumina HiSeq 2500 高通量测序平台进行二代测序, 数据使用 ChromGo 软件 (亿康基因, 中国) 进行 CNV 分析。

2 结果

2.1 病例一的结果

染色体核型结果为: 46, XX, t(1;2)(q42.1;q31), ins(6)(q11p22.3p25), t(8;?) (p23.1;?) (附图 1A)。CNV-seq 报告提示 seq[hg19] dup(13)(q33.3q34) chr13: 110180000_111180000dup, 临床意义未明。OGM 检测结果为: OGM[GRCh38] 46, XX, t(1;2)(q32.2q24.1), ins(6)(q12p22.3p25.2), ins(11;8)(q14.1;p22p21.2) (附图 1B), OGM[GRCh38] 13q33.3q34(109531378-110510480)x3。对比核型分析结果, OGM 检测的 6 号染色体插入长臂片段定位准确, 短臂被插入位置由 q11 更改为 q12; 1 号和 2 号染色体相互易位的定位差距较大, 相差 1 个区; 确认 8 号染色体短臂片段插入 11 号染色体长臂 (附图 1C)。检测到 13 号染色体重复位置与 CNV-seq 结果基本一致。

纳米孔测序检测到 1 号和 2 号染色体易位 (附图 2A) 以及 6 号染色体反向内插入 (附图 2B), 检测到 8 号染色体片段不连续 (附图 2C), 但未检出 11 号染色体的插入和 8 号染色体的 CNV 缺失。纳米

孔测序的CNV检测到[hg19]chr13:110181918_111160866 dup,该结果与OGM提示位置更接近。该患者属于CCR类型Ⅲ。患者行辅助生殖助孕共获得22枚囊胚,PGT结果示18枚胚胎染色体拷贝数异常,例如:46, XN, -1q(q32.2→q44, ~38 mb, ×1), +2q(q24.1→q37.3, ~84 mb, ×3), -8p(p22→p21.2, ~9 mb, ×1)(附图1D), del(6)(p25.2p22.3)(~21.60 mb), del(8)(p22p21.2)(~9.00 mb)(附图1E),并且根据异常胚胎CNV结果推测出染色体断裂点位置信息(附表1,断裂点位置均转换为基因组GRCh38)。三种检测方法提示的1号,6号和8号染色体的断裂点位置均一致,2号染色体断裂点位置OGM结果与其它两种方法相差约800 kb。参考OGM和纳米孔测序的结果,病例一的最终染色体核型为:46, XX, t(1;2)(q32.2q24.1), ins(6)(q12p22.3p25.2), ins(11;8)(q14.1;p22p21.2)。

2.2 病例二的结果

染色体核型结果为:46, XX, ? inv(8)(q24.1q24.2)t(8;19)(q24.2;p13.2)(附图3A)。OGM检测结果为:OGM[GRCh38] 46, XX, t(8;19)(q24.13;p13.12),8号染色体长臂内未检测到倒位信号(附图3B, C)。Nanopore测序结果为检测到染色体相互易位,断裂点分别为[hg19]chr8:126,869,819(附图4A)和[hg19]chr19:14,363,373(附图4B),未检出染色体倒位。患者的1枚囊胚行PGT提示结果异常:46, XN, +8q(q24.13→q24.3, ~18 mb, ×3), -19p(×1, mos, ~41%)(附图3D),提示8号染色体断裂点位置与OGM,纳米孔测序结果均一致(附表1)。该患者不属于CCR类型Ⅱ,仅为简单相互易位。参考OGM和纳米孔测序的结果,病例二的最终染色体核型为:46, XX, t(8;19)(q24.13;p13.12)。

2.3 病例三的结果

染色体核型结果为:45, XY, inv(12)(q13q21), rob(13;14)(q10;q10)(附图5A)。OGM检测结果为:OGM[GRCh38] 46, XY, inv(12)(q13.12q21.31)(附图5B, 5C)。OGM未检测到罗氏易位,12号染色体倒位结果与核型分析一致,但可以更精确地定

位到亚带。患者的3枚囊胚行PGT检测后1枚提示13单体(附图5D),结果与罗氏易位相符。该患者属于CCR类型Ⅱ。参考OGM的结果,病例三的最终染色体核型为:45, XY, inv(12)(q13.12q21.31), rob(13;14)(q10;q10)。

2.4 病例四的结果

染色体核型结果为:46, XX, t(1;10;4)(q32;p11.2;q12)(附图6A)。OGM检测结果为:OGM[GRCh38] 46, XX, t(1;10;4)(q32.3;p12.31;q12),和核型分析的结果基本一致,其中1号和4号染色体的断裂点定位一致,10号染色体的断裂点则稍有区别,由长臂1区1带更改为1区2带。该患者属于CCR类型Ⅰ。患者未获得胚胎行PGT。参考OGM的结果,病例四的最终染色体核型为:46, XX, t(1;10;4)(q32.3;p12.31;q12)。

2.5 病例五的结果

染色体核型结果为:46, XX, ins(16?)(p11.2;?)(附图7A),染色体核型C显带未见该位置深染。患者CMA结果显示[GRCh37]chr16:(32,524,765-33,814,547) ×4,存在1.2 M左右4倍重复,为良性变异(附图7B)。OGM检测结果为:OGM[GRCh38] 46, XX 16p11.2(32,318,954-33,806,979) ×8(附图7C)。由OGM结果可见,OGM显示16号染色体的p11.2位置存在1.5 mb左右的8倍重复,相比CMA结果,OGM在该位置探针密度更高,其结果能更好的解释染色体核型看到结果,进一步明确了该片段的性质,不符合PGT指征,为患者后续选择常规辅助生殖技术方案提供了明确依据。参考CMA及OGM的结果,病例五的最终染色体核型为:46, XX。

3 讨论

本研究中,OGM展示了其在染色体复杂结构重排或染色体核型分析存疑的患者中的巨大检测优势,它能够准确定位结构重排,可以有效地辅助复杂染色体重排的临床诊断。尤其在涉及多条染色体的复杂染色体重排(病例一)中,核型分析和纳

米孔测序均只能提示到4条染色体发生重排,而OGM检测到了5条染色体的重排,染色体核型结果怀疑8号染色体与未知片段倒位,而OGM成功检测到8号染色体缺失的片段插入到了11号染色体。患者CNV-seq和纳米孔测序均未检测到8号染色体CNV缺失,纳米孔测序检测到8号染色体片段缺失、不连续,侧面验证了OGM的结果,但核型分析和纳米孔测序均无法检测到8号染色体片段的去向。因此,OGM对比其他两种方法学更具有优势,由于该区域序列重复性高,而OGM技术由于其超长DNA分子的光学识别,读长可达200 kb,实现了跨越重复区域的检测,为明确临床诊断和后续治疗提供了依据。

病例二的染色体核型分析所怀疑的8号染色体倒位,OGM检测提示不存在倒位,结果与纳米孔测序验证一致。在病例五中,核型分析提示其16号染色体短臂疑似有片段插入,外院CMA检测报告提示未见异常,而OGM提示16p11.2(32,318,954-33,806,979)存在8倍重复。经确认,CMA检测到[GRCh37]chr16:32,524,765-33,814,547位置存在1.2M左右4倍重复,因其为良性变异并未体现在报告结果中。OGM结果提示的重复倍数和CMA结果不同,我们没有证据表明OGM的结果更准确。因此OGM弥补了核型分析分辨率低、结果不确定的缺点,经CMA验证结果基本一致。CMA仅可检测CNV,提示不平衡的染色体重排,而OGM可以同时检测有无发生平衡的染色体结构重排。同时也提示我们在临床工作中,当CMA或全基因组测序报告与核型分析提示不一致时,不能仅依赖报告结果,而需核实原始数据以追踪异常片段来源。

OGM定位染色体断裂点的准确度高,经由纳

米孔测序和胚胎二代测序结果验证:9个断裂点中8个定位完全一致;1个定位相差约800 kb(病例一的2号染色体断裂点),OGM方法定位于158 085 000±3 kb,而纳米孔测序定位于158 972 134,两者相差较大,因此我们采用异常胚胎的二代测序进行验证,检测到断裂点位置为158 800 000±200 kb,与纳米孔测序结果几乎一致,尽管NGS的精确度较低,我们认为纳米孔测序的结果可能更接近真实断裂点位置;另外OGM检测到的11号染色体断裂点,而纳米孔测序和胚胎NGS均未检测到。OGM的分辨率可达到500 BP,远高于核型分析(5 mb)和二代测序(100 kb),能够接近三代测序(1 BP)的分辨率,同时价格比三代测序更低,因此可以作为分析染色体重排的有效手段。

虽然OGM技术显示了其较高的分辨率和准确性,但仍有其局限性。OGM和纳米孔测序均无法检测罗氏易位(病例三),而罗氏易位在人群中的携带率约为1.23/1 000,在不孕不育人群中约占2%~3%^[10],且染色体核型分析对患者更经济,因此染色体核型分析仍有其不可替代性,比OGM技术更适合运用在人群筛查中。

OGM作为一个新兴技术,已有研究者将其成功运用在检测隐匿性染色体重排变异^[11]和血液肿瘤细胞基因组分析^[12]等领域。在本研究中,OGM技术展示了其在染色体复杂结构重排或染色体核型结果有疑问的患者中的检测优势。随着人类基因组图谱的完善和检测成本的降低,OGM有望能得到更多的临床应用。



附表
Appendix table



附图
Appendix figure

参考文献

- [1] 吴琼,葛运生,孔辉,等.一例罕见复杂染色体重排产前诊断[J].中国优生与遗传杂志, 2022(4):30.
Wu Q, Ge YS, Kong H, et al. Prenatal diagnosis of a rare complex chromosome rearrangement [J]. Chin J Birth Health Heredity, 2022(4):30.
- [2] Lazarczyk E, Drozniewska M, Pasinska M, et al. Complex balanced chromosomal translocation t(2;5;13)(p21;p15;q22) in a woman with four reproductive failures[J]. Mol Cytogenet, 2014, 7: 83.
- [3] Vafaeie F, Ale Rasoul M, Rahnama M, et al. Identification of balanced and unbalanced complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 1, 11, and 15[J]. Cureus, 2021, 13: e16166.
- [4] Liao Y, Wang L, Zhang D, et al. Identification of a balanced complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 3, 18 and 21 with recurrent abortion; case report[J]. Mol Cytogenet, 2014, 7: 39.
- [5] Madan K. Balanced complex chromosome rearrangements: reproductive aspects [J]. Am J Med Genet A, 2012, 158A (4) 947-963.
- [6] Mantere T, Neveling K, Pebrel-Richard C, et al. Optical genome mapping enables constitutional chromosomal aberration detection[J]. Am J Hum Genet, 2021, 108: 1409-1422.
- [7] Dremsek P, Schwarz T, Weil B, et al. Optical genome mapping in routine human genetic diagnostics—its advantages and limitations[J]. Genes, 2021, 12(12): 1958.
- [8] Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen)[J]. Genet Med, 2020, 22(2): 245-257.
- [9] 《胚胎植入前遗传学诊断/筛查专家共识》编写组. 胚胎植入前遗传学诊断/筛查技术专家共识[J]. 中华医学遗传学杂志, 2018, 35(2): 151-155.
Consensus of experts on preimplantation genetic diagnostic screening. Consensus among experts on preimplantation genetic diagnosis/ screening technology [J]. Chin J Med Genet, 2018, 35(2): 151-155.
- [10] Xie Y, Xu Y, Wang J, et al. Preliminary analysis of numerical chromosome abnormalities in reciprocal and Robertsonian translocation preimplantation genetic diagnosis cases with 24-chromosomal analysis with an aCGH/SNP microarray[J]. J Assist Reprod Genet, 2018, 35: 177-186.
- [11] Zhang S, Pei Z, Lei C, et al. Detection of cryptic balanced chromosomal rearrangements using high-resolution optical genome mapping[J]. J Med Genet, 2023, 60: 274-284.
- [12] Sahajpal N, Mondal A, Tvrdik T, et al. Clinical validation and diagnostic utility of optical genome mapping for enhanced cytogenomic analysis of hematological neoplasms [J]. J Mol Diagn, 2022, 24: 1279-1291.

(编辑 余菁)