

国际工程科技发展战略高端论坛

International Top-level Forum on Engineering Science
and Technology Development Strategy

中國工程院
CHINESE ACADEMY OF ENGINEERING

中国分子诊断技术

CHINA MOLECULAR
DIAGNOSTIC
TECHNOLOGY

高等教育出版社

国际工程科技发展战略高端论坛

中国工程院
CHINESE ACADEMY OF ENGINEERING

International Top-level Forum on Engineering
Science and Technology Development Strategy

中国分子诊断技术

ZHONGGUO FENZI ZHENDUAN JISHU

CHINA MOLECULAR DIAGNOSTIC
TECHNOLOGY



高等教育出版社·北京

内容提要

分子诊断是指应用分子生物学方法检测患者体内遗传物质的结构或表达水平的变化而做出诊断的技术。随着生物学技术的不断进步，分子诊断进入了高速发展阶段。在不久的将来，分子诊断技术以其显著优势和巨大潜力，必将成为保障人类健康的最重要的高科技手段之一。为此，中国工程院 2015 国际工程科技发展战略高端论坛——中国分子诊断技术暨第六届中国分子诊断技术大会围绕“出生缺陷精准预防与诊疗”“遗传与分子诊断新技术、新方向”“肿瘤精准诊疗”“个体化医学检测管理与发展趋势”等主题，就分子诊断领域的发展和未来趋势展开讨论与交流。本书精选了该论坛中八位国内外知名专家的报告，内容涉及单细胞基因组学、我国精准医学的历史与未来、儿童神经系统遗传病、欧洲遗传学研究面临的新挑战等热点问题。

本书是中国工程院“中国工程科技发展战略高端论坛丛书”之一，可供从事分子诊断领域的专业人员包括医务人员、科研工作者以及管理人员参考，也可作为分子诊断相关专业本科生和研究生的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

中国分子诊断技术：汉英对照 / 中国工程院编著.

-- 北京：高等教育出版社，2018.4
(国际工程科技发展战略高端论坛)
ISBN 978-7-04-049365-8

I. ①中… II. ①中… III. ①基因诊断-中国-汉、英 IV. ①R446.7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 018408 号

总 策 划 樊代明

策划编辑 黄慧靖 责任编辑 朱丽虹
封面设计 顾 斌 责任校对 刘娟娟 责任印制 韩 刚

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街 4 号
邮政编码 100120
印 刷 北京汇林印务有限公司
开 本 850mm ×1168mm 1/16
印 张 8.25
字 数 140 千字
购书热线 010-58581118
咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.hepmall.com.cn>
<http://www.hepmall.com>
<http://www.hepmall.cn>
版 次 2018 年 4 月第 1 版
印 次 2018 年 4 月第 1 次印刷
定 价 80.00 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题，请到所购图书销售部门联系调换
版权所有 侵权必究
物 料 号 49365-00

编辑委员会

主 任

程 京

副 主 任

尚 红 陈文祥 丛玉隆 孙诚谊 李 瑶

杨志荣 邢婉丽

委 员:(按姓氏拼音字母排序)

陈宝荣	杜 敏	符生苗	府伟灵	高尚先	黄文方
姜晓峰	康熙雄	李 萍	李 山	李 艳	李冬梅
李捷玮	李金明	李连青	李仁涵	廖 璞	鲁辛辛
欧启水	尚世强	沈 峰	沈佐君	石玉玲	谭耀驹
唐 中	唐林国	田亚平	万腊根	王惠民	王开正
王兰兰	王治国	温 浩	吴炳义	吴柏林	许 斌
徐正梅	严新民	杨 慧	尹爱华	张锦峰	张莉萍
张伟民	赵建宏	周向阳	周永安	邹伟民	

目 录

第一部分 综 述

综述	3
----------	---

第二部分 主题报告及报告人简介

单分子水平上的生命:通往精准医学之路	谢晓亮	9
智力缺陷中的新发(de novo)突变:从基因到基因组,从研究到诊断 ...	Joris A.Veltman	16
中国精准医学:你的技术系统在哪里?	程 京	23
从 DNA 到临床应用:共创中美及全球聋病基因筛查策略	刘学忠	28
儿童神经遗传病的分子诊断价值探讨	封志纯	34
基于孕妇外周血血浆游离 DNA 的产前诊断应用进展	尹爱华	39
分子遗传检测结果报告与解释	李金明	44
靶向结肠癌干细胞:最好的全面的转化医学模式?	林惠国	50
后记		123

CONTENTS

Part I Review

Review	57
--------------	----

Part II Keynote Speech

Life on the Single Molecule Level: The Way to Precision Medicine	Xiaoliang Xie	65
De Novo Mutations in Intelligence Disorder: From Genes to Genome & From Research to Diagnosis	Joris A. Veltman	74
Chinese Precision Medicine: Where Is Your Technology System?	Jing Cheng	82
From DNA to Clinical Application: To Create a Strategy for Sino-US and Global Deafness Gene Screening	Xuezhong Liu	90
Discussion on Value of Molecular Diagnosis for Neurogenetic Diseases in Children	Zhichun Feng	97
Progress of Prenatal Diagnosis Application Based on Peripheral Blood Plasma Free DNA of Pregnant Women	Aihua Yin	103
Report and Interpretation of Molecular Genetic Test Results	Jinming Li	109
Targeted Colon Cancer Stem Cell: Is It the Best Model of Overall Translational Medicine?	Huiguo Lin	117

第一部分

综 述

综 述

中国工程院 2015 国际工程科技发展战略高端论坛——中国分子诊断技术暨第六届中国分子诊断技术大会,于 2015 年 8 月 26—28 日在贵州贵阳国际会展中心召开。本次会议由中国工程院医药卫生学部主办,由贵州医科大学、贵阳综合保税区管理委员会、清华大学、生物芯片北京国家工程研究中心和中国医药生物技术协会生物芯片分会承办,由中华医学会检验分会、中国医院协会临床检验管理专业委员会、中国医师协会检验医师分会、全国生物芯片标准化技术委员会、中国高科技产业化研究会、美洲华人遗传协会(ACGA)共同协办。来自中国科学院、美国国家科学院等机构的 30 余位国内外著名的院士、专家、学者和近千名医学界人士及企业代表齐聚贵阳,展示了最新的研究成果并交流经验,以期推动行业的发展。

会议围绕“出生缺陷精准预防与诊疗”“遗传与分子诊断新技术、新方向”“肿瘤精准诊疗”和“个体化医学检测管理与发展趋势”四个议题,共进行了 17 场大会报告、3 场技术讲座、11 场卫星会议讲座及圆桌论坛。在大会开场报告中,美国国家科学院、工程院和医学院三院院士,美国总统科学顾问,美国系统生物学研究所所长 Lee Hood 重点介绍了 P4 医学(预测性、预防性、个体化、参与性)的理念、研究成果以及未来的发展趋势,提出了将病后护理转变为全程保健,推动疾病预防和健康维护方法的创新理念,指明了加强学术成果产业化和建立新型健康科学公司是未来精准预防与诊疗领域的发展趋势。

在“出生缺陷精准预防与诊疗”主题会场,美国国家科学院院士、哈佛大学化学与化学生物系讲席教授、北京大学生命科学学院长江学者讲座教授谢晓亮教授,介绍了新一代测序技术,即单分子技术在出生缺陷精准预防与诊疗方面的应用前景。北京协和医院妇产科副主任、主任医师边旭明通过详实的统计数据 and 案例,描述了我国出生缺陷所面临的严峻状况,并对该问题提出了深刻的见解。美国医学遗传学学院院士、美国华人遗传学家协会前会长、哈佛大学医学院波士顿儿童医院子公司 Criatas Genomic 联合创始人及基因组医学首席科学家、复旦大学特聘教授吴柏林教授在其题为“基因组解析大数据的系统分析和精准解读”的大会报告中,介绍了高通量基因组如何通过大数据分析应用于临床精准诊断,并通过多个成功的临床案例讲解了数据系统分析和结果精准解读的全过程。

在“遗传与分子诊断新技术、新方向”的主题会场,程京院士做了题为“中国精准医学:你的技术系统在哪里?”的报告。报告就我国精准医学的历史与未来、精准医学的相关工作如何在我国更好实施以及我国的技术和系统如何构建等方面的问题与参会代表进行了交流。报告以肝癌为例,提出针对不同的疾病和疾病的不同发展阶段,首先应该建立精准的综合检测和诊断平台的理论体系,综合中西医、结合精神和肉体、通过物理和化学的手段适时地选择组合性方案,对没有发生的疾病、即将发生的疾病和已经发生的疾病实施精确的预防、打击和管控。程京院士的精彩报告得到了与会专家的一致认可。教育部长江学者特聘教授、中国医学科学院北京协和医学院基础医学研究所医学遗传学系主任张学教授,在其报告中用大量的实例介绍了单基因病中的致病突变,并强调 NGS(新一代测序)技术可以迅速广泛地用于遗传病的分子诊断。

在“肿瘤精准诊疗”主题会场,美国国家医学院院士、美国总统生物伦理委员会成员、哈佛医学院遗传学系 Paul C. Cabot 讲席教授、布列根和妇女医院医学系 Raju Kucherlapat 教授,通过实例展示了精准医学是如何在癌症等遗传性疾病的诊疗中发挥作用的。他认为,全面了解所有的基因变化将有助于开发癌症的准确治疗方法,NGS 可以替代不同的方法对肿瘤进行测序,从而更好地对癌症进行诊疗。美国得克萨斯大学 MD 安德森癌症中心流行病学系教授兼系主任、转化和公共卫生基因组学中心主任吴息凤教授,通过详实的案例介绍了流行病的预测模型如何用于社区健康管理、预测癌症发生风险,并通过分析结果帮助临床医生对癌症患者进行正确的管理和治疗。

在“个体化医学检测管理与发展趋势”主题会场,中国医科大学副校长、中国医科大学附属第一医院院长、中华医学会检验医学分会前任主任委员尚红教授做了题为“个体化医学检测与精准医学”的报告。报告强调了建立严格和标准的全程检验质量管理体系是临床精准诊疗的基础,针对这一体系目前已开展了相关指南的编写、培训等工作,进而推动个体化医学检测快速规范化的健康发展。国家卫生和计划生育委员会临床检验中心副主任、个体化医学检测专家委员会委员,中国医学科学院北京协和医学院李金明教授,在报告中介绍了高通量测序在新生儿测序领域、临床测序领域等方面所发挥的重要作用,并重点介绍了分子遗传检测报告的标准化问题。

此次大会还安排了“遗传与分子诊断、肿瘤精准诊疗及个体化医学检测”和“出生缺陷精准预防与诊疗”两个分论坛。结合分子诊断与精准医学的背景,来自博奥生物、赛默飞世尔、Illumina、领星生物和凯杰(QIAGEN)公司的企业代表分别介绍了在肿瘤诊疗方面的解决方案和观点。博奥生物健康科学研究院院长孙

义民博士从社会各个领域精英人士早逝以及肝癌防治等实际案例出发,阐述了分子诊断与肿瘤的精准医学应该是“对未病的预测预防、对欲病的早期发现以及对已病的精准治疗”,并介绍了博奥生物在肿瘤预测、早期发现以及预后评价所取得的研究成果。在出生缺陷精准预防与诊疗方面,来自北京博奥晶典生物技术有限公司生命科学服务部的副主任赵建晴博士、医学事业部产品经理王海军以及博奥生物 HLA 分型检测实验室主任刘湘,分别就精准医疗之新型分子标志物环状 RNA 开发平台、呼吸道病原菌核酸检测以及 HLA 基因高分辨分型技术进行了详细的介绍。同时,来自东莞博奥木华基因科技有限公司的技术总监黄铨飞介绍了 BES4000 高通量测序仪和个人基因组数据分析管理软件在遗传病筛查与诊断中的应用。来自北京博奥医学检验所有限公司的市场总监曹洋博士则与参会人员深入交流了染色体异常检测在出生缺陷防治中的应用情况,并介绍了博奥检验在染色体异常检测方面的全面解决方案。

自 2010 年始中国分子诊断技术大会已连续举办六届,成为我国分子诊断领域的一面旗帜,并产生了很大的影响。分子诊断技术以其显著的优势和巨大的潜力,已成为临床诊断各种技术产品中需求增长最快的技术。与会专家、学者、行业精英以参会为契机,全面掌握分子诊断的全球发展趋势,发展分子诊断创新性技术,积极开展产学研医跨界合作,加大运营模式创新,打通技术服务平台,建立分子诊断技术质量控制体系,以期共同推动分子诊断技术及其产业持续良性发展。

第二部分

主题报告及报告人简介

单分子水平上的生命：通往精准医学之路

谢晓亮

美国哈佛大学,北京大学

摘要:从 20 世纪 90 年代开始,单分子技术迅猛发展,单分子实时成像技术使得我们能够实时观察分子反应过程。单分子技术在生物学中具有很大的意义。我们利用单分子技术实时观察活细胞内的基因表达,为分子生物学的中心法则——转录和翻译的过程——提供了定量的描述。

从 2007 年开始,新一代测序技术的发展使得测序成本迅速下降,但是从单细胞均一地扩增出基因组 DNA 一直是全基因组测序中的主要问题。我们开发的新型单细胞全基因组扩增技术——多重退火循环扩增法 (multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC) 有更好的拷贝数变异检测精度、更低的等位基因脱扣率。MALBAC 技术在单个精子染色体扩增等生殖医学中的应用证实了它在生殖医学中的巨大应用价值。北京大学第三医院乔杰教授利用 MALBAC 技术进行胚胎遗传诊断的相关临床试验进一步证实了 MALBAC 技术可以帮助我们避免单基因遗传病的发生,提高体外授精 (IVF) 的准确率和健康婴儿的出生率。

关键词:单分子;新一代测序;单细胞全基因组扩增;MALBAC;生殖医学

一、单分子实时成像技术

20 世纪 90 年代早期是室温单分子成像最火的时代, Eric Betzig 和 William Moerner 因为在室温单分子成像技术方面的杰出工作分享了 2014 年的诺贝尔化学奖。幸运的是,当时我也从事这方面的研究,1994 年我们发表在 *Science* 的文章实现了单分子动态过程的检测^[1]。我们意识到这些单分子技术在生物化学和分子生物学中具有很大的潜力,所以,我们开始研究生物催化剂——酶。我们从胆固醇氧化酶开始,它能够通过分子氧化酶催化胆固醇的氧化。我们将这种酶分子

固定在琼脂糖凝胶中,然后进行拍照监测胆固醇酶的催化反应。酶作为一种生物催化剂,它在反应完成时不会发生改变,但是这种荧光酶分子会发生自身循环反应,它的荧光状态会随之循环变化,因而相应的荧光强度也随时间发生变化。Lu等实现了对这种单个酶分子催化反应的实时观察^[2]。化学反应的发生是随机的,虽然在统计概率上是可重复的,但是这种随机性是无法重复的。通过分析反应的时间轨迹,我们在单分子水平上对酶催化反应有了很深入的认识。

众所周知,DNA双螺旋结构是20世纪最伟大的发现之一。单分子酶学技术的确具有巨大的实用价值。单分子测序技术即是一个很好的例证。通过使用单个DNA碱基分子,观察四种不同颜色标记的碱基合成到DNA单链中的过程,可以直接实现单分子DNA测序^[3]。最近几年,在基础科学方面,我们利用单分子技术对活细胞内基因表达做了深入的研究^[4-9]。单分子技术使我们能够实时观察活细胞内的基因表达,并为分子生物学的中心法则——转录和翻译的过程——提供了定量的表述。我们能够看到单个荧光蛋白分子自动生成的过程。这些细菌细胞具有相同的基因,但是它们有两种不同的表型——有荧光或者没有荧光。通过视屏,我们捕获到细菌细胞从一种表型到另一种表型的转变过程。我们证明了这是由于单分子的随机事件引起的。

二、单细胞全基因组扩增技术

人的体细胞有46条染色体,是46个不同的DNA分子,包含2万个基因、60亿个碱基。基因组随机发生的突变包括单碱基突变(即点突变)和拷贝数变异。所有这些突变都是随机的。由于只是46条染色体中某个特定DNA分子的一个拷贝发生了变化,我们只能通过单分子技术来解释单个细胞的行为。

2001年人类基因组计划的完成是人类历史的里程碑。从2007年开始,新一代测序技术的发展使得单个基因组测序的经济和时间成本快速下降,甚至超过了半导体行业摩尔定律的指数下降速度。我的研究团队在2011年也开发了新一代的测序技术。新一代测序技术真正的影响在于个体化医疗。一个很著名的例子是美国好莱坞名演员安吉丽娜·朱莉,她在2013年5月13日宣布因为携带BRCA1基因(该基因能够显著增加乳腺癌和卵巢癌的发病率)而切除双侧乳腺。恰巧在同一天,我在美国国家卫生研究院(NIH)进行项目评审答辩。那时我们计划研发单细胞全基因组扩增技术,我们提出将来会把这项技术应用于体外辅助生殖,以避免发生了基因突变的婴儿出生。评委们看到安吉丽娜·朱莉的消息后,问我下面这个问题:如果我们使用这项技术去筛除BRCA1基因突变的婴儿是否是伦理上可接受的?我在评委面前的回答非常糟糕,我不是非常清楚这个问题的

答案,直到今天我依然不清楚。但是现在我想要告诉大家,北京大学和北京大学第三医院(简称北医三院)合作完成的一项临床研究是伦理上允许的。

我们的技术是单细胞全基因组扩增。从单个的人细胞均一地扩增出基因组 DNA 是新一代测序技术进行全基因组测序的一个主要问题。最早的扩增技术是 PCR。在过去的 30 年,PCR 在生物医学领域发挥了很大的作用,它确实具有单拷贝的灵敏度,如果有一个基因的拷贝,就可以扩增得到该基因大量的拷贝。但是由于 PCR 有很强的序列偏好性(sequence-dependent bias)——某些基因扩增倍数比其他基因多几百万倍——导致它的基因覆盖率很低(6%)。这种序列偏好性是因为 PCR 是指数型扩增。第二种方法叫做多重置换扩增法(multiple displacement amplification, MDA),是由 Roger Lesken 教授在 14 年前开发的^[10]。它的基因覆盖率更高,达到了 60%,但是它仍然是指数扩增,依然有很强的序列偏好性。2012 年年底,我的研究组报道了多重退火循环扩增法(multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC)^[11]。我们的思路是采用线性扩增的方法,只扩增基因组 DNA,用 DNA 发卡保护产物片段。我们首先进行几轮线性扩增,然后再利用 PCR 扩增受保护的产物。

评价全基因组扩增效果的关键参数指标包括等位基因脱扣(allele drop-out, ADO)、假阳性和嵌合体形成。等位基因脱扣是什么?假如 DNA 双链发生了杂合突变,但是扩增过程中只有一条链进行了扩增,那么结果就会表现为纯合突变,此称之为等位基因脱扣。全基因组扩增也可能因为扩增错误发生假阳性情况——如果第一轮扩增发生错误,那么这种错误将会影响到最终的结果。嵌合体形成是两个相隔很远的片段结合在一起。最近我们写了一篇综述来比较 MALBAC、MDA 和 PCR^[12]。结论是 MDA 不具有细胞间的可重复性,MALBAC 有最好的拷贝数变异检测精度,它的等位基因脱扣率也最低。尽管 MALBAC 技术更好,但是相对于 MDA 技术,它不具有数量级的优势。

三、单细胞基因组学在生殖医学中的应用

MALBAC 技术的第一个应用是单个精子细胞中的 23 条染色体的扩增^[13],这项工作是我与北京大学的同事李瑞强一起合作完成的。我们的研究报告紧随 Quake 研究组之后,我们两个研究组都发现了精子细胞中单倍型基因的交叉重组位点,交叉重组的发生率是 1.2%。精子中 50% 的 DNA 来自父亲,50% 的 DNA 来自母亲,但是每个精子细胞都不一样,它们的重组位点(crossover point)都不一致。案例发现,有两个精子细胞是不正常的:一个第 19 号染色体缺失,另外一个第 6 号染色体有两个拷贝。但是幸运的是,这个捐赠者的精子依然属于正常,因为正