



Precision  
Medicine

精准医学出版工程

精准医学基础系列

总主编 詹启敏

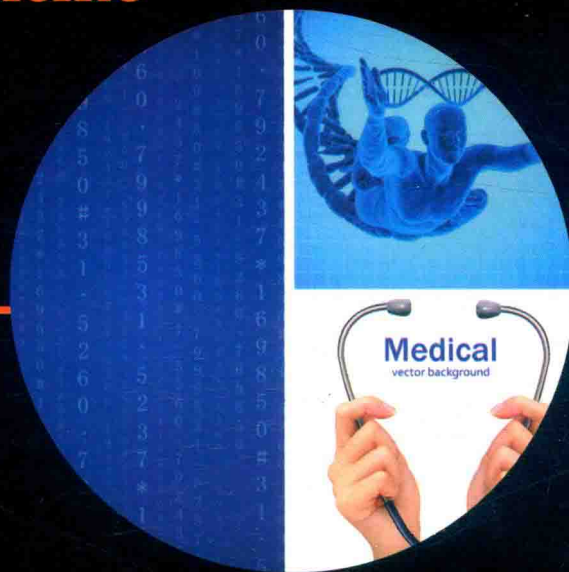
“十三五”国家重点图书出版规划项目

# 新技术与精准医学

## New Technology and Precision Medicine

陈超 等

编著



上海交通大学出版社  
SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY PRESS



国家出版基金项目  
NATIONAL PUBLICATION FOUNDATION

Precision  
Medicine

精准医学出版工程

精准医学基础系列

总主编 詹启敏

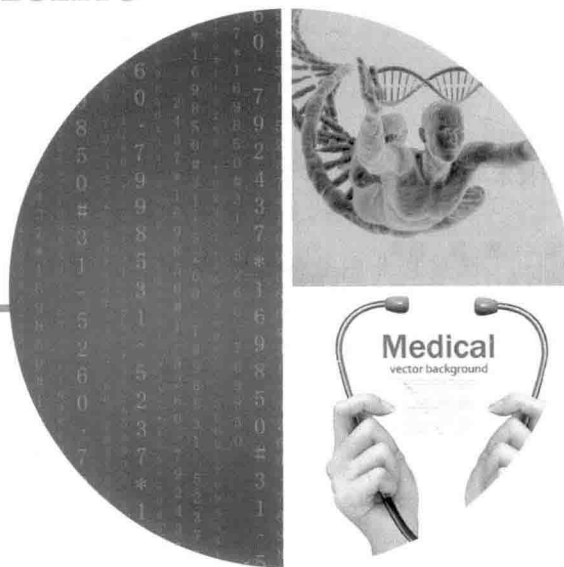
“十三五”国家重点图书出版规划项目

# 新技术与精准医学

## New Technology and Precision Medicine

陈超 等

编著



上海交通大学出版社  
SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY PRESS

## 内容提要

精准医学以疾病相关分子标志物的精准检测为基础,以循证医学的研究结果为依据,为疾病病因诊断和完全合理用药提供个性化的医疗服务,目前已经成为重大疾病治疗的趋势和方向。随着技术的不断发展,疾病精准治疗的技术和手段日益成熟并在临床得到应用。本书系统介绍了目前用于精准医学临床检测的各种新技术,内容包括双脱氧链终止法测序技术、焦磷酸测序技术、扩增受阻突变系统、高分辨率熔解曲线分析技术、荧光原位杂交技术、免疫组织化学技术、实时定量反转录 PCR 技术、生物芯片技术、下一代测序技术、单细胞基因组测序技术、数字 PCR 技术、循环肿瘤细胞检测技术、液态芯片技术、基因组编辑技术等原理、方法和特点及其在精准医学临床检测中的实践与应用。

本书将为应用相关技术方法从事科学研究和临床检测的科研人员及临床医生提供指导和帮助。

## 图书在版编目(CIP)数据

新技术与精准医学/陈超等编著. —上海:上海交通大学

出版社,2017

(精准医学出版工程)

ISBN 978-7-313-18399-6

I. ①新… II. ①陈… III. ①高技术—应用—临床医学—

医学检验 IV. ①R446.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 278596 号

## 新技术与精准医学

编 著:陈 超等

出版发行:上海交通大学出版社

邮政编码:200030

出 版 人:谈 毅

印 制:苏州市越洋印刷有限公司

开 本:787mm×1092mm 1/16

字 数:254 千字

版 次:2017 年 12 月第 1 版

书 号:ISBN 978-7-313-18399-6/R

定 价:158.00 元

地 址:上海市番禺路 951 号

电 话:021-64071208

经 销:全国新华书店

印 张:15.25

印 次:2017 年 12 月第 1 次印刷

版权所有 侵权必究

告读者:如发现本书有印装质量问题请与印刷厂质量科联系

联系电话:0512-68180638

“精准”是医学发展的客观追求和最终目标,也是公众对健康的必然需求。“精准医学”是生物技术、信息技术和多种前沿技术在医学临床实践的交汇融合应用,是医学科技发展的前沿方向,实施精准医学已经成为推动全民健康的国家发展战略。因此,发展精准医学,系统加强精准医学研究布局,对于我国重大疾病防控和促进全民健康,对于我国占据未来医学制高点及相关产业发展主导权,对于推动我国生命健康产业发展具有重要意义。

2015年初,我国开始制定“精准医学”发展战略规划,并安排中央财政经费给予专项支持,这为我国加入全球医学发展浪潮、增强我国在医学前沿领域的研究实力、提升国家竞争力提供了巨大的驱动力。国家科技部在国家“十三五”规划期间启动了“精准医学研究”重点研发专项,以我国常见高发、危害重大的疾病及若干流行率相对较高的罕见病为切入点,将建立多层次精准医学知识库体系和生物医学大数据共享平台,形成重大疾病的风险评估、预测预警、早期筛查、分型分类、个体化治疗、疗效和安全性预测及监控等精准预防诊治方案和临床决策系统,建设中国人群典型疾病精准医学临床方案的示范、应用和推广体系等。目前,精准医学已呈现快速和健康发展态势,极大地推动了我国卫生健康事业的发展。

精准医学几乎覆盖了所有医学门类,是一个复杂和综合的科技创新系统。为了迎接新形势下医学理论、技术和临床等方面的需求和挑战,迫切需要及时总结精准医学前沿研究成果,编著一套以“精准医学”为主题的丛书,从而助力我国精准医学的进程,带动医学科学整体发展,并能加快相关学科紧缺人才的培养和健康大产业的发展。

2015年6月,上海交通大学出版社以此为契机,启动了“精准医学出版工程”系列图

书项目。这套丛书紧扣国家健康事业发展战略,配合精准医学快速发展的态势,拟出版一系列精准医学前沿领域的学术专著,这是一项非常适合国家精准医学发展时宜的事业。我本人作为精准医学国家规划制定的参与者,见证了我国精准医学的规划和发展,欣然接受上海交通大学出版社的邀请担任该丛书的总主编,希望为我国的精准医学发展及医学发展出一份力。出版社同时也邀请了刘彤华院士、贺福初院士、刘昌效院士、周宏灏院士、赵国屏院士、王红阳院士、曹雪涛院士、陈志南院士、陈润生院士、陈香美院士、金力院士、周琪院士、徐国良院士、董家鸿院士、卞修武院士、陆林院士、乔杰院士、黄荷凤院士等医学领域专家撰写专著、承担审校等工作,邀请的编委和撰写专家均为活跃在精准医学研究最前沿的、在各自领域有突出贡献的科学家、临床专家、生物信息学家,以确保这套“精准医学出版工程”丛书具有高品质和重大的社会价值,为我国的精准医学发展提供参考和智力支持。

编著这套丛书,一是总结整理国内外精准医学的重要成果及宝贵经验;二是更新医学知识体系,为精准医学科研与临床人员培养提供一套系统、全面的参考书,满足人才培养对教材的迫切需求;三是为精准医学实施提供有力的理论和技术支撑;四是将许多专家、教授、学者广博的学识见解和丰富的实践经验总结传承下来,旨在从系统性、完整性和实用性角度出发,把丰富的实践经验和实验室研究进一步理论化、科学化,形成具有我国特色的精准医学理论与实践相结合的知识体系。

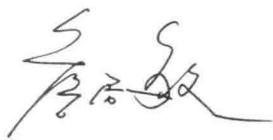
“精准医学出版工程”丛书是国内外第一套系统总结精准医学前沿性研究成果的系列专著,内容包括“精准医学基础”“精准预防”“精准诊断”“精准治疗”“精准医学药物研发”以及“精准医学的疾病诊疗共识、标准与指南”等多个系列,旨在服务于全生命周期、全人群、健康全过程的国家大健康战略。

预计这套丛书的总规模会达到 60 种以上。随着学科的发展,数量还会有所增加。这套丛书首先包括“精准医学基础系列”的 11 种图书,其中 1 种为总论。从精准医学覆盖的医学全过程链条考虑,这套丛书还将包括和预防医学、临床诊断(如分子诊断、分子影像、分子病理等)及治疗相关(如细胞治疗、生物治疗、靶向治疗、机器人、手术导航、内镜等)的内容,以及一些通过精准医学现代手段对传统治疗优化后的精准治疗。此外,这套丛书还包括药物研发,临床诊疗路径、标准、规范、指南等内容。“精准医学出版工程”将紧密结合国家“十三五”重大战略规划,聚焦“精准医学”目标,贯穿“十三五”始终,力求打造一个总体量超过 60 本的学术著作群,从而形成一个医学学术出版的高峰。

本套丛书得到国家出版基金资助,并入选了“十三五”国家重点图书出版规划项目,体现了国家对“精准医学”项目以及“精准医学出版工程”这套丛书的高度重视。这套丛书承担着记载与弘扬科技成就、积累和传播科技知识的使命,凝结了国内外精准医学领域专业人士的智慧和成果,具有较强的系统性、完整性、实用性和前瞻性,既可作为实际工作的指导用书,也可作为相关专业人员的学习参考用书。期望这套丛书能够有益于精准医学领域人才的培养,有益于精准医学的发展,有益于医学的发展。

此次集束出版的“精准医学基础系列”系统总结了我国精准医学基础研究各领域取得的前沿成果和突破,内容涵盖精准医学总论、生物样本库、基因组学、转录组学、蛋白质组学、表观遗传学、微生物组学、代谢组学、生物大数据、新技术等新兴领域和新兴学科,旨在为我国精准医学的发展和实施提供理论和科学依据,为培养和建设我国高水平的具有精准医学专业知识和先进理念的基础和临床人才队伍提供理论支撑。

希望这套丛书能在国家医学发展史上留下浓重的一笔!



北京大学副校长

北京大学医学部主任

中国工程院院士

2017年11月16日

# 前言

近年来,精准医学的发展显示出蓬勃的朝气,最为引人瞩目且最为成熟的是肿瘤领域的相关研究,如肿瘤靶向药物有效性的预测、化疗药物不良反应的评估;另外,心血管药物有效性、安全性的检测也为疾病的个体化治疗提供了重要的依据。如今,精准医学在很多领域已经完成从基础研究到临床应用的转化,新技术的发展,尤其是高通量测序技术的发展使人们离精准医学更近一步。

国家微检测系统工程技术研究中心长期从事精准医学新技术的研发和临床应用,在此领域积累了丰富的经验。为了适应快速发展的精准医学基础研究和临床检测的迫切需求,受“精准医学出版工程·精准医学基础系列”编委会的邀请,我们编写了《新技术与精准医学》这本书。本书涵盖了精准医学近年来发展的新技术方法,还涵盖了临床检测中常用的部分经典技术,同时提供了临床检测样本的制备方法。希望通过本书,向科研工作者系统介绍精准医学新技术的技术原理、实验设计策略及应用范围;向医疗工作者展现新技术在精准医学临床实践中的应用,努力推动新技术的临床转化和应用,同时推动新技术的规范化和标准化,提高精准医学的检测质量。

本书分为三个部分,共计 16 章。第一部分为临床检测样本的制备,为第 1 章,主要包括痕量样本核酸的制备、液体活检样本的制备、石蜡包埋样本的制备等。第二部分为经典的检测方法和目前临床中使用的“金标准”方法,为第 2~9 章,内容涵盖了国家卫生计生委个体化医学检测技术专家委员会制定的《肿瘤个体化治疗检测技术指南(试行)》的全部经典技术,包括双脱氧链终止法测序技术、焦磷酸测序技术、扩增受阻突变系统、高分辨率熔解曲线分析技术、荧光原位杂交技术、免疫组织化学技术、实时定量反转录 PCR 技术、生物芯片技术,该部分主要介绍了各种检测技术的发展过程、原理、实验

设计策略及各种技术在临床实践中的应用。第三部分为近年来新发展的精准医学相关技术,为第10~16章,包括下一代测序技术、单细胞基因组测序技术、数字PCR技术、循环肿瘤细胞检测技术、液态芯片技术、患者源性直观抗癌药物筛选及基因组编辑技术。

新技术的开发与临床应用需要经过严格的临床验证和规范化、标准化研究,本书的写作既是探索,也是尝试。在创新性基础上,我们努力强调技术的特点及实用性,突出理论与实践相结合;在检测方法选择上,应优先选择国际和国内“金标准”的检测方法,同类方法中优先选择检测结果稳定性和重复性好、特异性高的技术,同时也应考虑样本量、检测项目的多少等。希望本书能为正在或者将要从事检测技术和精准医学工作的科研人员、研究生和高年级本科生以及有兴趣了解这些研究内容的其他人员提供参考。

本书由西北大学国家微检测系统工程技术研究中心陈超主任、戴鹏高教授主持编著。编著工作得到诸多科研院所、高等院校和医疗机构的大力支持和帮助,包括西北大学、西安交通大学医学部、陕西佰美基因股份有限公司、星阵(广州)基因科技有限公司、陕西省干细胞应用工程研究中心等。其中第1章由戴鹏高、李斌、吴劲松执笔,第2章由陈超、蒲俊毅、戴鹏高执笔,第3章由王旬、刘金辉、戴鹏高、陈超执笔,第4章由申剑峰、陈超执笔,第5章由王亚敏、戴鹏高、刘金辉执笔,第6章由王浩、许义松、戴鹏高执笔,第7章由李斌、戴鹏高执笔,第8章由文少佳、王会娟、陈超执笔,第9章由王会娟、韩敏执笔,第10章由吴劲松、王会娟执笔,第11章由吴劲松、王会娟执笔,第12章由康星、王会娟执笔,第13章由刘正斌、王会娟、梁慧执笔,第14章由梁慧、戴鹏高执笔,第15章由吴劲松、王会娟执笔,第16章由戴博、陈超、戴鹏高执笔。李斌对本书文字进行了校对。在此衷心感谢各位专家的辛苦和付出!

本书引用了一些作者的论著及其研究成果,在此向他们表示衷心的感谢!

临床检测新技术与精准医学的发展都极为迅速,目前涉及内容已极为宽泛。作为精准医学基础系列图书,本书虽试图在写作内容上涵盖相关领域的各个方面,但是也难以管中窥豹、挂一漏万,书中如有错谬之处,还期待得到广大读者的反馈信息,以使本书臻于完善。

编著者

2017年11月

# 目 录

|          |                                    |            |
|----------|------------------------------------|------------|
| <b>1</b> | <b>临床检测样本的制备 .....</b>             | <b>001</b> |
| 1.1      | 痕量样本核酸的制备 .....                    | 003        |
| 1.2      | 液体活检样本的制备 .....                    | 007        |
| 1.3      | 石蜡包埋样本的制备 .....                    | 010        |
|          | 参考文献 .....                         | 015        |
| <b>2</b> | <b>双脱氧链终止法测序技术与精准医学 .....</b>      | <b>016</b> |
| 2.1      | 双脱氧链终止法测序技术的原理及技术特点 .....          | 016        |
| 2.2      | 双脱氧链终止法测序技术的实验方案 .....             | 020        |
| 2.3      | 双脱氧链终止法测序技术在精准医学临床检测中的<br>应用 ..... | 023        |
|          | 参考文献 .....                         | 023        |
| <b>3</b> | <b>焦磷酸测序技术与精准医学 .....</b>          | <b>025</b> |
| 3.1      | 焦磷酸测序技术的原理 .....                   | 025        |
| 3.2      | 焦磷酸测序技术的实验方案 .....                 | 027        |
| 3.3      | 焦磷酸测序技术在精准医学临床检测中的应用 .....         | 030        |

|                                         |            |
|-----------------------------------------|------------|
| 参考文献 .....                              | 034        |
| <b>4 扩增受阻突变系统与精准医学 .....</b>            | <b>036</b> |
| 4.1 扩增受阻突变系统的原理 .....                   | 036        |
| 4.2 扩增受阻突变系统的引物设计策略及实验方案 .....          | 037        |
| 4.3 扩增受阻突变系统在精准医学临床检测中的应用 .....         | 040        |
| 参考文献 .....                              | 044        |
| <b>5 高分辨率熔解曲线分析技术与精准医学 .....</b>        | <b>045</b> |
| 5.1 高分辨率熔解曲线分析技术的原理 .....               | 045        |
| 5.2 高分辨率熔解曲线分析技术的实验方案 .....             | 047        |
| 5.3 高分辨率熔解曲线分析技术在精准医学临床检测中的<br>应用 ..... | 048        |
| 参考文献 .....                              | 053        |
| <b>6 荧光原位杂交技术与精准医学 .....</b>            | <b>055</b> |
| 6.1 荧光原位杂交技术的原理 .....                   | 055        |
| 6.2 荧光原位杂交技术的探针设计及实验方案 .....            | 057        |
| 6.3 荧光原位杂交技术在精准医学临床检测中的应用 .....         | 062        |
| 参考文献 .....                              | 066        |
| <b>7 免疫组织化学技术与精准医学 .....</b>            | <b>069</b> |
| 7.1 免疫组织化学技术的原理 .....                   | 069        |
| 7.2 免疫组织化学技术的实验方案 .....                 | 071        |
| 7.3 免疫组织化学技术在精准医学临床检测中的应用 .....         | 076        |
| 参考文献 .....                              | 079        |

|           |                                 |     |
|-----------|---------------------------------|-----|
| <b>8</b>  | <b>实时定量反转录 PCR 技术与精准医学</b>      | 081 |
| 8.1       | 实时定量反转录 PCR 技术的原理               | 081 |
| 8.2       | 实时定量反转录 PCR 技术的实验优化             | 085 |
| 8.3       | 实时定量反转录 PCR 技术在精准医学临床检测中的<br>应用 | 088 |
|           | 参考文献                            | 089 |
| <b>9</b>  | <b>生物芯片技术与精准医学</b>              | 090 |
| 9.1       | 生物芯片技术的概念和分类                    | 090 |
| 9.2       | 基因(DNA)芯片与 RNA 芯片               | 094 |
| 9.3       | 蛋白质芯片                           | 096 |
| 9.4       | 生物芯片技术的实验方案                     | 098 |
| 9.5       | 生物芯片技术在精准医学临床检测中的应用             | 100 |
|           | 参考文献                            | 104 |
| <b>10</b> | <b>下一代测序技术与精准医学</b>             | 105 |
| 10.1      | 下一代测序技术的概念及分类                   | 105 |
| 10.2      | 下一代测序技术的原理及仪器介绍                 | 110 |
| 10.3      | 下一代测序技术的实验方案                    | 120 |
| 10.4      | 下一代测序技术的数据分析                    | 124 |
| 10.5      | 下一代测序技术在精准医学临床检测中的<br>应用        | 127 |
|           | 参考文献                            | 128 |
| <b>11</b> | <b>单细胞基因组测序技术与精准医学</b>          | 130 |
| 11.1      | 单细胞测序概述                         | 130 |
| 11.2      | 单细胞的分离                          | 131 |

|      |                                   |     |
|------|-----------------------------------|-----|
| 11.3 | 单细胞全基因组扩增 .....                   | 135 |
| 11.4 | 单细胞转录组研究技术 .....                  | 140 |
| 11.5 | 数据分析 .....                        | 143 |
| 11.6 | 单细胞基因组测序技术在精准医学临床检测中的<br>应用 ..... | 144 |
|      | 参考文献 .....                        | 144 |

|           |                                  |            |
|-----------|----------------------------------|------------|
| <b>12</b> | <b>数字 PCR 技术与精准医学 .....</b>      | <b>146</b> |
| 12.1      | 数字 PCR 技术的发展历史 .....             | 146        |
| 12.2      | 数字 PCR 技术的原理 .....               | 148        |
| 12.3      | 数字 PCR 仪器的介绍 .....               | 151        |
| 12.4      | 数字 PCR 仪器的实验方案 .....             | 156        |
| 12.5      | 数字 PCR 技术在精准医学临床检测中的<br>应用 ..... | 159        |
|           | 参考文献 .....                       | 164        |

|           |                                   |            |
|-----------|-----------------------------------|------------|
| <b>13</b> | <b>循环肿瘤细胞检测技术与精准医学 .....</b>      | <b>166</b> |
| 13.1      | 循环肿瘤细胞的起源和演化 .....                | 167        |
| 13.2      | 循环肿瘤细胞的生物学特征 .....                | 168        |
| 13.3      | 循环肿瘤细胞的检测方法 .....                 | 170        |
| 13.4      | 循环肿瘤细胞检测技术在精准医学临床检测中的<br>应用 ..... | 174        |
|           | 参考文献 .....                        | 176        |

|           |                          |            |
|-----------|--------------------------|------------|
| <b>14</b> | <b>液态芯片技术与精准医学 .....</b> | <b>178</b> |
| 14.1      | 液态芯片技术的发展历史 .....        | 178        |
| 14.2      | 液态芯片系统的主要平台技术 .....      | 179        |
| 14.3      | 液态芯片系统的技术方案 .....        | 182        |

|           |                            |            |
|-----------|----------------------------|------------|
| 14.4      | 液态芯片技术在精准医学临床检测中的应用 .....  | 188        |
|           | 参考文献 .....                 | 190        |
| <b>15</b> | <b>患者源性直观抗癌药物筛选 .....</b>  | <b>192</b> |
| 15.1      | 患者源性直观抗癌药物筛选概述 .....       | 192        |
| 15.2      | 患者源性肿瘤组织异种移植 .....         | 193        |
| 15.3      | 三维细胞培养 .....               | 197        |
|           | 参考文献 .....                 | 200        |
| <b>16</b> | <b>基因组编辑技术与精准医学 .....</b>  | <b>202</b> |
| 16.1      | 基因组编辑技术的发展简史 .....         | 202        |
| 16.2      | 基因组编辑技术的原理 .....           | 205        |
| 16.3      | 基因组编辑技术的案例分析 .....         | 208        |
| 16.4      | 基因组编辑技术面临的问题和发展趋势 .....    | 211        |
|           | 参考文献 .....                 | 213        |
|           | <b>附录 单链测序文库制备方法 .....</b> | <b>216</b> |
|           | <b>缩略语 .....</b>           | <b>218</b> |
|           | <b>索引 .....</b>            | <b>222</b> |

# 1

## 临床检测样本的制备

在核酸分析中,核酸样本的质量是决定研究成功与否的关键因素。对于新兴的高技术手段,如下一代 DNA 测序、数字 PCR 等,核酸样本的前处理同样至关重要。目前,临床上有许多痕量物质,如血液及尿液中的微生物、代谢产物,指纹,毛发等。这类痕量样本的前处理仍然是一个巨大的挑战,得到的核酸数量少,质量低,结果重复性差,因此难以广泛应用于临床。本章主要介绍高通量测序前的样本制备,附带介绍其他新兴技术的样本制备。

核酸提取的难易程度通常取决于样本的细胞组成。从样本类型看,核酸分离从难到易依次是植物、真菌、微生物和动物。植物细胞具有细胞壁和(或)多糖、多酚、单宁、色素等次生代谢产物,提取的 DNA 可能被多酚氧化成棕褐色,或者与多糖、单宁等物质结合成黏稠的胶状物,获得的 DNA 通常产量低、质量差、易降解。微生物中,低等真菌的细胞壁成分以纤维素为主,酵母菌的细胞壁成分以葡聚糖为主,而高等真菌的细胞壁成分则以几丁质为主,有的真菌还含有甘露聚糖等多糖。这些多糖结构致密、机械强度高,难以被化学降解,细胞壁含有多糖的微生物细胞需要通过特殊试剂和(或)剧烈条件处理,才能释放 DNA。细菌可以分为革兰阳性菌和革兰阴性菌两大类,它们细胞壁的主要成分都是肽聚糖,肽聚糖中 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸之间  $\beta$ -1,4 糖苷键的联结能被溶菌酶切断,导致肽聚糖支架被破坏,引起细菌裂解。革兰阳性菌细胞壁中肽聚糖占 90%,因此细胞壁较厚。革兰阴性菌细胞壁中肽聚糖含量少,其核酸的提取比革兰阳性菌容易。病毒成分与动物细胞相同,并且病毒主要聚积在细胞内,对其进行核酸提取时会同时得到动物细胞的核酸。动物细胞没有细胞壁,也没有太多的次生代谢类物质,因此其细胞基因组(包括人类细胞基因组)的核酸提取相对容易。

以一个简单的公式描述核酸终产物质量如下：基因组质量/细胞 $\times$ 细胞数量 $\times$ 纯化效率=核酸终产物质量。研究者通常知道某一实验需要的核酸起始量，根据这个公式，可以倒推出所需要的细胞数量，以及最终纯化得到的核酸质量所在范围。

研究者很少有机会直接测量样本中的细胞数量，通常根据样本体积估算细胞的数量。以人的白细胞为例，正常人的白细胞浓度为  $2 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  个/ml。对于组织来说，先假定其完全由细胞组成，不含有细胞外基质；再假定单个细胞的质量为  $1 \sim 1.5$  ng，体积为  $500 \sim 4\,000 \mu\text{m}^3$ ，根据样本的质量或者体积，就可以估算出细胞的数量。

样本的细胞数量是核酸纯化策略和方法需要考虑的一个重要因素。医学中需要分析的细胞数量范围在一个到几十万个之间，根据细胞数量不同采取的纯化策略是完全不同的。对于几千和几万个细胞，商品化试剂盒都能胜任；对于几百个细胞，商品化试剂盒依然能用于分离核酸；但是，如果样本中含有稀有细胞类型或者稀有突变，纯化过程导致的细胞损失，会给后续的基因分析带来假阴性结果。对于少于 100 个细胞的样本，通常采用单细胞核酸提取方法。对于病原微生物，由于其数量随时间变化，也有个体差异，因此给纯化策略带来了不确定性。常用的商品化试剂盒都不能满足少量微生物样本纯化的需要，因此造成临床检测的灵敏度不高。

研究者应该事先估计单个细胞基因组的质量。人体一个细胞内含有 46 条染色体，约 60 亿个碱基对，质量为  $6 \sim 10$  pg。对于其他物种单个细胞基因组的质量，可以以此类推。例如，大肠杆菌细胞的拟核有 1 个 DNA 分子，长度约为 4 700 000 个碱基对，据此估算其基因组质量为几飞克(fg)，其余细菌可以以此类推。对同等数量的细胞来说，单个细胞基因组质量越大，纯化效率越高。

研究者还应该估计各种纯化方法的纯化效率。通常，各种核酸纯化方法的纯化效率在  $10\% \sim 30\%$ 。具体测量每种纯化方法的效率，可以选择一系列已知细胞数量的样本作为标准品，通过测定终产物质量，推算出平均纯化效率。但要注意，各种方法的最佳纯化效率，是指在一定的细胞数量范围内。样本细胞数量高于此值或低于此值，其纯化效率都会下降，甚至导致纯化失败。纯化失败的原因在于样本的损失量在某些步骤是恒定的。比如，离心柱中的硅胶膜会非特异地吸附一定量的核酸，无法被洗脱下来。如果过柱前核酸的量已经接近这个值，过柱后就无法回收核酸。因此，对于痕量样本来说，首先要判断该纯化方法能否用于该样本，其次应考虑回收过程的损失，最后计算该方法的纯化效率。

综上,根据“基因组质量/细胞 $\times$ 细胞数量 $\times$ 纯化效率=终产物质量”这个公式推算出所需样本的体积后,采取 5~10 倍的样本进行试验,能够提高成功率。

## 1.1 痕量样本核酸的制备

### 1.1.1 感染中微生物核酸混合样本前处理的重要性

目前,对于微生物感染的病原鉴定,微生物培养仍然是“金标准”。但是目前微生物分离培养的阳性率不到 20%,加上用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)等核酸序列分析方法,病原鉴定的成功率也不到 40%。大量病例的病原微生物无法鉴定,造成了抗生素的滥用及无效治疗。目前,通过下一代测序、数字 PCR 等技术从血液、脑脊液、尿液中鉴定未知的病原微生物,日益引起医学研究者的重视并且研究人员已经成功地从各种体液样本中分离鉴定出多种病原微生物<sup>[1]</sup>。

微生物的富集和最大限度地去除人源基因是高通量测序的关键。临床上检测血液样本时,患者往往已经使用了抗生素,而且免疫系统也对外源微生物进行了清除,样本中病原微生物的含量甚微。而且,血液中存在大量的白细胞,不仅数量多,而且白细胞基因组远远大于微生物基因组。脑脊液样本中白细胞数量较少,但是脑脊液的取样量有限,只能有几百微升到几毫升。尿液和胸腔积液等样本取样方便,含有人的细胞少,但微生物数量也少,目前研究不多。总之,在痕量样本检测中,人源性基因组的去除极其重要。因为人类基因组远远大于微生物基因组,高通量测序中的扩增过程具有偏倚性,主要扩增占有优势的人源基因组,而微生物基因组的信息被掩盖。尽管目前的方法都尽量去除人源基因组,但最终高通量测序得到的读取数据 90%以上仍是人源基因的信息。

### 1.1.2 方案的确定

针对不同的病原微生物,前处理有不同的方案。原则上分为选择血清和选择白细胞 2 种。病毒一部分寄生在细胞内并在细胞内复制,一部分游离在细胞外,通用方案是分离血清中的病毒壳粒,放弃游离病毒核酸和血细胞中的病毒核酸。对于细菌,要考虑是胞外菌还是胞内寄生菌,前者选择血清,后者选择细胞。目前,对于真菌鉴定的报道

很少,由于真菌的基因组比较大,通常选用血清。

因此,样本制备方案的选择要根据医师先前临床诊断的结果,以及临床表现、影像学、血清学和生化检测结果。因此,高通量测序检测也分为未知病原微生物检测方法和定向病原微生物检测方法。对于未知病原微生物的检测,通常采用病毒学的样本前处理方案,因为病毒感染的临床症状不明显,而且即使是胞内寄生菌,也有一部分细菌在胞外,或者有细菌基因游离在细胞外。换言之,病毒的前处理方案更适用于所有微生物的鉴定。细胞的样本制备方案也不可忽视,除了胞内寄生菌外,胞外菌和很多真菌也特异或者非特异性吸附在细胞表面,在除去细胞的时候也会导致目标样本的损失。

### 1.1.3 未知病毒全基因组测序的样本前处理方案

未知病毒全基因组测序的样本前处理方案是目前最常用的方案,迄今为止已有几十篇文献发表。下面以此方案为基础,再讨论该方案的问题,以及各种样本的变通策略。

#### 1.1.3.1 体液中病毒壳粒的分离

以血液中病毒壳粒的分离为例描述其基本过程。如前所述,目前病毒的鉴定主要是从体液中分离病毒壳粒进行后续分析。其基本实验方案为分离血清,用 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤血清,在 $37^\circ\text{C}$ 使用 DNase I 和(或)RNase 作用 2 h,去除游离的人源核酸和其他核酸。然后用商品化的微量核酸提取试剂盒提取病毒核酸。

脑脊液中白细胞数目比较少,往往通过离心无法得到白细胞沉淀并将其去除,所以目前的方案仍然是采用血清中病毒壳粒的分离方法。但是病毒核酸提取过程中,白细胞的基因组被一并提取,造成最终测序读取数目中,人源基因数目过高,有可能降低甚至掩盖病毒的读取数。

对于尿液、胸腔积液,目前尚无病毒分离后进行高通量测序的研究。

#### 1.1.3.2 体液中病毒鉴定的主要问题

##### 1) 人源细胞的去除

如何去除脑脊液中的白细胞,可行的方法是采用核孔膜过滤。实验室过滤常用的 $0.45\ \mu\text{m}$ 和 $0.22\ \mu\text{m}$ 的纤维素膜不适用于少量白细胞的去除。这些滤膜会非特异性吸附微生物和其他生物,会降低病毒回收率。

目前,常用核孔膜作为过滤材料。核孔膜是由聚碳酸酯制备的,又称核径迹蚀刻微