

· 临床研究 ·

选择性磁珠纯化法结合高通量测序技术在无创产前筛查中的应用

吴鑫¹, 音海玲¹, 殷倩¹, 卢守莲¹, 王俊宏², 王珏^{1*}¹南京医科大学第一附属医院产科, ²心内科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨基于DNA片段选择性磁珠纯化法(片段选择富集法)富集胎儿游离DNA结合高通量测序技术在无创产前筛查中的应用价值。方法:选取2019年8月—2021年8月在南京医科大学第一附属医院行胎儿染色体非整倍体无创产前筛查的孕妇共20 868例进行回顾性分析,比较传统DNA提取纯化法(传统纯化法)和片段选择富集法在胎儿游离DNA提取纯化质量、无创产前筛查初次检测失败率及胎儿染色体异常筛查准确性方面的差异。结果:共有5 914例孕妇采用传统纯化法结合高通量测序检测,其中33例(0.56%)判定为胎儿游离DNA浓度过低需重新抽血复检;而14 954例孕妇采用片段选择富集法结合高通量测序进行检测,2例(0.01%)判定为胎儿游离DNA浓度过低需抽血复检,两组存在显著性差异(0.56% vs. 0.01%, $P < 0.001$)。与传统纯化法(23/5 914, 0.39%)相比,片段选择富集法结合高通量测序检出目标染色体异常率(21三体+18三体+13三体)(47/14 954, 0.31%)无明显差异($P > 0.05$),其中胎儿21三体(54.55% vs. 66.67%)、18三体(83.33% vs. 60.00%)和13三体(50.00% vs. 25.00%)阳性预测值均无显著性差异($P > 0.05$)。经介入性产前诊断及产后随访复核,传统纯化法组和片段选择富集法组各有1例假阴性,两组间染色体异常漏诊率无显著性差异(0.02% vs. 0.01%, $P > 0.05$)。结论:基于DNA片段选择性磁珠纯化富集法,可以富集母体外周血浆中胎儿游离DNA的含量,减少因胎儿游离DNA浓度过低所致重复抽血的风险,同时不影响目标染色体疾病的阳性预测值。

[关键词] 胎儿游离DNA;羧基化磁珠;高通量测序;无创产前筛查**[中图分类号]** R714.5**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2023)10-1398-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20231010

常见染色体数目异常包括21、18、13号常染色体及性染色体的数目异常,是导致出生缺陷的主要原因之一。对于染色体异常患儿,目前缺乏有效治疗手段,而通过产前筛查可以显著降低该类出生缺陷的发生率。由于高通量测序技术的迅速发展,以其为基础的胎儿染色体非整倍体无创产前筛查(non-invasive prenatal testing, NIPT)开始在临床发挥重要作用。NIPT通过检测孕妇外周血浆中的游离DNA(cell free DNA, cfDNA)浓度,进而评估胎儿21、18、13号染色体非整倍体异常的风险^[1]。国内外研究表明,NIPT的临床应用,大大减少了因血清学产前筛查假阳性导致的侵入性产前诊断。研究发现,在妊娠早期和晚期,平均胎儿游离DNA(cell free fetal DNA,cffDNA)占孕妇血浆总cfDNA的3.4%

和6.2%^[2],而且其浓度变化呈现胎龄依赖性,NIPT检测处于早中孕期,cffDNA的浓度水平较低,因此,如何在样本制备过程中富集cffDNA,并进一步提高NIPT的检测效率,是临床需要解决的问题。

DNA片段选择性磁珠纯化法(简称:片段选择富集法)富集cffDNA,是基于孕妇血浆中不同类型DNA片段的分子特征,血浆DNA分子主要是短的cfDNA。有研究提示,孕妇血浆中cfDNA长度范围约在105~798 bp,其中片段>201 bp的约占57%左右;而cffDNA长度范围约在107~313 bp,其中>193 bp的占比仅约20%^[3]。基于孕妇血浆中母源DNA比cffDNA片段长的特点,在样本制备步骤中,调整不同羧基化超顺磁珠的配比与样本体积,可选择性吸附不同长度的核酸片段,从而达到富集cffDNA的目的^[4-7]。

本研究对NIPT待测样本采用了两种DNA纯化方法,传统DNA提取纯化法(简称:传统纯化法)与片段选择富集法,现将两种方法的实验室质控指

[基金项目] 国家自然科学基金(82170269)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangjue1968@aliyun.com

标、疾病检出和临床随访情况进行比较分析,为该技术在NIPT中的临床应用提供依据。

1 对象和方法

1.1 对象

回顾性分析2019年8月—2021年8月在南京医科大学第一附属医院行NIPT检测的孕妇共20 868例,其中2019年8月—2020年4月共5 914例采用传统纯化法,2020年5月—2021年8月共14 954例采用片段选择富集法。对其中NIPT检测高风险者进行介入性产前诊断排除胎儿染色体异常,产前诊断孕周为13~23周;所有孕妇均随访分娩结局。样本排除标准:孕周<12周,夫妇一方有明确染色体异常,接受过移植手术、干细胞治疗,1年内接受过异体输血、异体细胞免疫治疗等,胎儿超声检查提示有结构异常者,有基因遗传病家族史或提示胎儿罹患基因病高风险者,孕期合并恶性肿瘤者。本研究经医院伦理委员会批准,所有孕妇均进行检测前咨询、检测原理解知并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 样本采集及血浆分离

采集孕妇静脉血5 mL于DNA采血管中。1 600 r/min离心10 min,吸取上层血浆,16 000 r/min离心10 min,再次吸取血浆。

1.2.2 血浆cfDNA提取及文库构建

1.2.2.1 传统纯化法

按照北京安诺优达公司试剂说明书提取血浆游离核酸。简要步骤如下:配制提取液,血浆中加入含分离磁珠的提取液,37℃孵育后置于磁力架静置5 min,混匀后弃上清,清洗;加入缓冲液,混匀静置后进行文库构建;将从母体血浆中提取的cfDNA片段末端修复平整;在3'端加碱基A,碱基的特殊接头连接;通过PCR扩增技术,引入带有特定序列标签的DNA片段,并对各阶段产物进行纯化。

1.2.2.2 DNA片段选择性磁珠纯化法

片段选择富集法按安诺优达公司试剂说明书进行操作。具体步骤如下:采集静脉血,按传统纯化法提取母体血浆中的cfDNA,进行文库构建,修复DNA,在待分选体系中,按样品:分选磁珠=1:1.5比例,加入羧基化纳米磁珠选择吸附大片段DNA,室温混匀,静置10 min;磁力架吸附磁珠,留取上清;按样品:分选磁珠=3:1比例,在上清中加入分选磁珠以选择吸附小片段DNA,对小片段cfDNA进行富集,室温静置,磁力架吸附磁珠,弃上清;清洗后缓

冲液洗脱,洗去分选磁珠,完成后续文库构建,采用Qubit荧光计测量提取DNA产物的浓度。

1.2.3 上机测序及数据生信分析

采用NextSeq 500AR高通量测序仪测序,获得原始数据直接传递到生信分析工作站;每一个测序Reads,比对到NCBI数据库的hg19参考基因组序列,计算Z值。

结果判断:以Z值区间在-3.0~3.0,作为13号染色体、18号染色体、21号染色体三体型的正常参考值。 ≥ 3.0 或 ≤ -3.0 为可疑阳性。

1.3 统计学方法

采用SPSS 20.0统计学软件对数据进行分析。

符合正态分布的连续变量以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用U检验分析;为排除在效应量微弱情况下,因超大样本量而造成的差异有统计学意义的情况,研究中引入效应量(effect size,以cohen's d表示)来反映组间是否真实存在差异性(cohen's d < 0.4提示弱效应,组间不存在差异性;cohen's d 0.4~0.8为中等效应,临界区间;cohen's d > 0.8为强效应,组间存在显著性差异)。

不符合正态分布的连续变量以中位数(四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,分类变量以数值和百分比表示,采用卡方检验或Fisher精确检验进行组间比较。将NIPT结果与胎儿染色体分析结果及妊娠结局随访结果进行比对,计算阳性预测值(positive predict value, PPV), $PPV = \text{真阳性病例数} / (\text{真阳性病例} + \text{假阳性病例})$,以PPV评估NIPT对胎儿染色体检查的准确性。

2 结果

2.1 孕妇基本资料情况

共计20 868例孕妇纳入研究,其中传统纯化法组孕妇年龄为(30.40 \pm 4.42)岁,片段选择富集法组孕妇年龄为(30.11 \pm 4.20)岁($P < 0.001$, cohen's d=0.07),两组孕妇年龄无显著差异。传统纯化法组孕妇抽血行NIPT检测的孕周为(16.59 \pm 2.28)周,而片段选择富集法组的孕周为(16.30 \pm 1.91)周($P < 0.001$, cohen's d=0.14),两组间孕周无显著差异(表1)。

2.2 两种方法cfDNA测序数据质量比较

传统纯化法组中共有33例(0.56%, 33/5 914)因提取的cfDNA浓度过低而需再次抽血检测,而片段选择富集法组中只有2例因cfDNA过低(0.01%, 2/14 954)需再次抽血检测,两组间存在显

表1 孕妇基线资料、临床情况及外周血循环DNA测序质控及浓度比较

指标	传统纯化法(n=5 914)	片段选择富集法(n=14 954)	P值	cohen's d
临床基本资料($\bar{x} \pm s$)				
年龄(岁)	30.40 ± 4.42	30.11 ± 4.20	< 0.001	0.07
BMI(kg/m ²)	22.73 ± 3.71	22.60 ± 3.25	0.013	0.04
孕周(周)	16.59 ± 2.28	16.30 ± 1.91	< 0.001	0.14
DNA浓度及测序质控指标(% , $\bar{x} \pm s$)				
GC比率	40.19 ± 4.25	39.87 ± 2.71	< 0.001	0.11
重复率	3.69 ± 0.51	5.57 ± 1.15	< 0.001	1.83
Q30	97.05 ± 0.49	96.98 ± 0.42	< 0.001	0.15
DNA浓度(nmol/L, $\bar{x} \pm s$)	341.59 ± 93.92	252.52 ± 120.76	< 0.001	0.83
临床情况[n(%)]				
阳性率	23(0.39)	47(0.31)	0.401	—
假阴性率	1(0.02)	1(0.01)	0.486	—
重复率	33(0.56)	2(0.01)	< 0.001	—

著差异($P < 0.001$)。

对测序质控数据进行比较,两组间cffDNA的GC比率无显著差异,分别为(40.19 ± 4.25)%和(39.87 ± 2.71)%($P < 0.001$, cohen's d = 0.11)。两组Q30分别为(97.05 ± 0.49)%和(96.98 ± 0.42)%($P < 0.001$, cohen's d = 0.15),两组间无显著差异(表1)。

两组提取的cffDNA浓度分别为(341.59 ± 93.92)nmol/L和(252.52 ± 120.76) nmol/L($P < 0.001$, cohen's d = 0.83),差异有统计学意义。

2.3 两种方法NIPT筛查准确性比较

共计20 868例孕妇行NIPT筛查,其中采用传统纯化法行NIPT检测的共5 914例,共检测出23例染色体异常,阳性率为0.39%(23/5 914),而采用片段选择富集法行NIPT筛查的孕妇共计14 954例,检出47例染色体异常,阳性率为0.31%(47/14 954),两组间差异无统计学意义($P = 0.401$)。

对筛查高风险病例的产前诊断结果和分娩结局进行随访,结果提示,传统纯化法组NIPT检出23例高风险胎儿,21、18和13三体阳性例数分别为13、6和4例,经随访确诊为21三体、18三体和13三体者分别为6、5和2例,其中21三体阳性孕妇中有2例拒绝随访。片段选择富集法组中21三体、18三体和13三体高风险分别为38、5和4例,经随访确诊为21三体、18三体和13三体者分别为24、3和1例,其中21三体阳性孕妇中有2例拒绝电话随访。同时,随访结果提示,两组各有1例假阴性,两组间目标染色体异常漏检率无显著差异(0.02% vs. 0.01%, $P = 0.486$)。

两种方法的目标疾病阳性预测值分别为:21三体(54.55% vs. 66.7%)、18三体(83.33% vs. 60.00%)和13三体(50.00% vs. 25.00%),均无统计学差异(P 均 > 0.05,表2)。

表2 两种方法检测胎儿染色体非整倍体异常类型及阳性预测值比较

高风险类型	传统纯化法		片段选择富集法		P值
	确诊阳性/NIPT阳性(n)	PPV(%)	确诊阳性/NIPT阳性(n)	PPV(%)	
21三体	6/11	54.55	24/36	66.67	0.761
18三体	5/6	83.33	3/5	60.00	0.729
13三体	2/4	50.00	1/4	25.00	0.621

3 讨论

随着基础科学发现和技术发展的相互促进,自1997年在母血中发现cffDNA,到2011年NIPT筛查胎儿21三体技术推出至今,其高准确性得到大量临

床数据证实,推动了NIPT在胎儿染色体非整倍体疾病筛查方面的大规模临床应用,大大减少了因血清产前筛查假阳性导致的介入性产前诊断数量。

NIPT技术通过检测孕妇外周血中胎儿游离的DNA来发现胎儿携带21、18、13号染色体非整倍体

异常的风险。它的临床应用大大降低了侵入性产前诊断率。但由于本身cffDNA释放至母体外周血液循环中含量较少,NIPT检测时孕周范围多为孕12~20周,因此由于母体血浆中cffDNA浓度达不到NIPT检测质控要求而重复采血的情况并不少见。有研究报道,不同检测平台NIPT初次检测失败率为1%~8%^[8],目前对于初次NIPT失败病例则通常建议再次抽血,而再次抽血检测的成功率仍仅约为50%~60%^[9]。所以如何高效富集母体外周血液中cffDNA以最大程度降低NIPT检测过程中的假阴性率和假阳性率,减轻孕妇家庭及社会负担是当前迫切需要解决的问题。

对孕妇血浆中不同类型DNA片段的分子特征研究提示,孕妇血浆中母源DNA比cffDNA片段长;孕妇血浆中游离DNA长度范围约在105~798 bp,而cffDNA长度范围约在107~313 bp,其中<193 bp的约占80%^[3]。对短片段的游离DNA进行区分并纯化是富集提取cffDNA的方法之一。

磁珠法为常用的核酸纯化方法,磁珠法进行核酸纯化主要分为两类,其一为无差别的吸附和回收,主要用于核酸的纯化和浓缩,其二为通过特殊手段修饰磁珠以特异性吸附目的核酸。研究发现,将纳米磁珠进行羧基化修饰后,控制纳米磁珠与样本DNA的配比在特定范围区间时,可以分步骤,先特异性吸附长片段的游离核酸,再特异性吸附短片段的游离核酸,从而到达分离、纯化、富集cffDNA的目的^[4,6],有文献报道,采用该方法富集小片段DNA可以将cffDNA浓度提高1倍以上^[7]。

本研究从2020年5月开始,采用羧基化修饰的具有DNA片段选择能力的纳米分选磁珠富集cffDNA用于NIPT筛查。按照是否使用该技术将病例分为传统纯化法组和片段选择富集法组,通过比较发现,两组提取的cffDNA浓度分别为(341.59±93.92)nmol/L和(252.52±120.76)nmol/L($P < 0.001$)。分析原因,可能与两组DNA片段长度有关,片段选择富集后血浆DNA提取产物中以短片段DNA为主,其绝对质量相对较低,所以浓度也低。

通过比较还发现,采用传统纯化法期间,因cffDNA浓度过低导致的复检抽血率为0.56%,与文献报道的0.47%~0.50%接近^[8,10],采用新的片段选择富集法以后,因cffDNA浓度过低导致的复检抽血率降低到0.01%,与传统纯化法的差异有统计学意义($P < 0.001$)。DNA片段选择性磁珠纯化法,通过富集孕妇血浆样本中的cffDNA,减少了孕妇再次抽血

带来的焦虑情绪,缩短了检测周转时间(turn-around time, TAT),提高了检测效率,有助于临床及时召回高风险病例。

对两组样本的高通量测序质控数据进行比较发现,游离DNA的GC比率无统计学差异,测序质量指标Q30分别为传统纯化法组(97.05±0.49)%、片段选择富集法组(96.98±0.42)%,两组间差异无统计学意义。说明在样本制备环节,采用片段选择富集法不会对高通量测序的质量指标的稳定性产生影响。

根据胎儿产前诊断及分娩结局的随访,对NIPT筛查准确性进行比较,应用片段选择富集法前后,胎儿目标染色体异常的阳性检出率并无显著差异(0.36% vs. 0.32%),21三体、18三体和13三体的阳性预测值均无显著性差异。而两组均发生1例染色体异常漏诊(0.02% vs. 0.01%, $P=0.49$)。由此提示,采用新的片段选择富集法在富集cffDNA的同时,并不会导致富集DNA质量的下降,也未影响染色体异常识别的准确性。

综上所述,本研究表明采用羧基化修饰的具有DNA片段选择能力的纳米分选磁珠富集cffDNA,可以对短片段cffDNA进行有效富集,且不影响后续高通量测序的稳定性,从而可以减少因cffDNA浓度过低导致的重采血,提高检测效率。该法在保证cffDNA产物提取质量的同时,并不影响目标染色体疾病的阳性预测值。

[参考文献]

- [1] 徐贵江,李茜,张坡,等.基于高通量测序的无创产前诊断研究[J].中国优生与遗传杂志,2018,26(12):40-43
- [2] LO Y M, TEIN M S, LAU T K, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis[J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(4): 768-775
- [3] ALLEN C K C, ZHANG J, HUI A B Y, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2004, 50(1): 88-92
- [4] 刘莹,程立,张博.基于新型磁分离技术的高分辨率DNA片段筛选技术[J].生物技术通报,2021,37(10):257-265
- [5] ZHANG B, ZHAO S T, WAN H, et al. High-resolution DNA size enrichment using a magnetic nano-platform and application in non-invasive prenatal testing[J]. Anal, 2020, 145(17): 5733-5739
- [6] 张介中,李珊珊,玄兆伶,等.一种具有片段选择性纯化

(下转第1426页)

[9] KAUFMAN A J, PALATT J, SIVAK M, et al. Thymectomy for myasthenia gravis: complete stable remission and associated prognostic factors in over 1000 cases [J]. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2016, 28(2):561-568

[10] VACHLAS K, ZISIS C, RONTOGIANNI D, et al. Thymoma and myasthenia gravis: clinical aspects and prognosis [J]. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*, 2012, 20(1):48-52

[11] ZHANG Y, YU L, KE J. Pathological features and prognosis of thymoma with or without myasthenia gravis [J]. *Front Surg*, 2022, 9:726673

[12] GU Z, FU J, SHEN Y, et al. Thymectomy versus tumor resection for early-stage thymic malignancies: a Chinese alliance for research in thymomas retrospective database analysis[J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8(4):680-686

[13] WANG H, GU Z, DING J, et al. Perioperative outcomes and long-term survival in clinically early-stage thymic malignancies: video-assisted thoracoscopic thymectomy versus open approaches [J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8(4):673-679

[14] CHENG Y J, HSU J S, KAO E L. Characteristics of thymoma successfully resected by videothoracoscopic surgery[J]. *Surg Today*, 2007, 37(3):192-196

[15] SAKAMAKI Y, ODA T, KANAZAWA G, et al. Intermediate-term oncologic outcomes after video-assisted thoracoscopic thymectomy for early-stage thymoma [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2014, 148(4):1230-1237

[16] LIU Q, GU Z, YANG F, et al. The role of postoperative radiotherapy for stage I/II/III thymic tumor-results of the ChART retrospective database [J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8(4):687-695

[17] MA K, GU Z, HAN Y, et al. The application of postoperative chemotherapy in thymic tumors and its prognostic effect [J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8(4):696-704

[18] KUMAR A, GOYAL V, ASAF B B, et al. Robotic thymectomy for myasthenia gravis with or without thymoma-surgical and neurological outcomes [J]. *Neurol India*, 2017, 65(1):58-63

[19] COMACCHIO G M, MARULLI G, MAMMANA M, et al. Surgical decision making: thymoma and myasthenia gravis [J]. *Thorac Surg Clin*, 2019, 29(2):203-213

[收稿日期] 2023-05-31
(责任编辑:蒋莉)

(上接第1401页)

能力的高效DNA纯化磁珠试剂:CN106701737B[P]. 2020-07-31

[7] HU P, LIANG D, CHEN Y Y, et al. An enrichment method to increase cell-free fetal DNA fraction and significantly reduce false negatives and test failures for non-invasive prenatal screening: a feasibility study [J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1):124

[8] 王皖骏,段红蕾,丁蔚,等. 基于高通量测序的孕妇外周血胎儿游离DNA产前检测的失败率及原因分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2021, 38(12):1171-1175

[9] SUZUMORI N, SEKIZAWA A, TAKEDA E, et al. Classification of factors involved in nonreportable results of non-invasive prenatal testing (NIPT) and prediction of success rate of second NIPT [J]. *Prenat Diagn*, 2019, 39(2):100-106

[10] LIN Y, LIANG D, HU P, et al. Application of fetal cell-free DNA enrichment in non-invasive prenatal screening: experience from a single center in Eastern China [J]. *Chin Med J*, 2020, 134(1):104-106

[收稿日期] 2023-04-13
(责任编辑:蒋莉)