基于靶向捕获二代测序技术对 神经肌肉病生物医药监测方法改进

Improvement of Biomedical Monitoring Method for Neuromuscular Diseases Based on Target Capture Second Generation Sequencing Technology

张银冰

Yinbing Zhang

湖北大学

中国·湖北 武汉 430062

Hubei University,

Wuhan, Hubei, 430062, China

基金项目:国家自然科学基金项目

(No.21575109)

【摘要】神经肌肉病(NMD)是一组以运动功能障碍为主要临床特征的遗传性和获得性疾病,总体发病率约为 1/3500。NMD 病变一般发生在运动神经元、周围神经、神经肌肉接头和骨骼肌等部位,肌肉活检结果通常为肌营养不良或神经源性肌萎缩。此类疾病常导致进行性肌无力和肌萎缩,导致严重肢体功能障碍,降低生活质量。

【Abstract】Neuromuscular disease (NMD) is a group of inherited and acquired diseases characterized by motor dysfunction, with an overall incidence of about 1 / 3500. NMD usually occurs in motor neurons, peripheral nerves, neuromuscular joints and skeletal muscles. Muscle biopsy results are usually muscular dystrophy or neurogenic atrophy. Such diseases often lead to progressive muscle weakness and atrophy, leading to serious limb dysfunction and reduced quality of life.

【关键词】神经肌肉病;监测方法;基因组

【Keywords】neuromuscular diseases; monitoring methods; genome

【DOI】10.36012/pmr.v1i3.945

1 引言

目前,针对神经肌肉病生物医药监测方法存在检测结果偏少、误差增大、监测效率低等问题。基于此,本文提出了一种基于靶向捕获二代测序技术对神经肌肉病生物医药监测的改进方法^[1],不仅提高了针对神经肌肉病生物医药监测的准确性,也提高了针对神经肌肉病生物医药的监测效率,对于神经肌肉病生物医药监测方法具有积极的应用价值。

2 研究对象

神经肌肉病包含所有周围神经系统、神经肌肉接头(NMJ)和肌肉系统病变,按照病因分为获得性和遗传性两种类型^[2]。其中,获得性神经肌肉病可进一步分为感染性、外伤性、中毒性、免疫性神经肌肉病,包括病毒感染导致的脊髓灰质炎、多发性肌炎(PM)、产伤性婴儿臂丛神经损害、铅中毒性周围神经损害,自身免疫性重症肌无力(MG)等;而遗传性神经肌肉病则系基因突变引起,如脊髓性肌萎缩症(SMA)、腓骨肌萎缩症(CMT)、先天性肌无力综合征、Duchenne 型肌营养不良症(DMD)、Becker 型肌营养不良症(BMD)等。

3 研究目的

本文的目的在于提供一种针对神经肌肉病生物医药的监测方法,具备监测结果准确可靠、监测效率高的优点,以解决上述背景技术中提出的问题。具体问题有以下几点:

①常规的监测方法中,缺乏对 DNA 样本的定量和扩增处理,导致同一样本的容量、检测方案有限,难以对同一类疾病的多个致病基因进行多组筛查,使得检测结果数量偏少、误差增大;②由于遗传性神经肌肉病的致病基因数目众多,而现有技术中,针对最终结果的比对工作依旧需要较多的人工参与,不仅使得实际监测效率偏低,还浪费了许多科研时间。

4 实施方案

①提取基因组 DNA:提取患者的基因组 DNA,并对提取的基因组 DNA 进行定量操作,装入统一规格的培养皿中;②制备捕获文库:将基因组 DNA 进行片段化;将片段化的基因组 DNA 进行末端修复和 3'末端添加碱基 A;将 3'末端添加碱基 A 的产物连接扩增接头;将连接产物进行 PCR 扩增,富集有效产物;使用探针富集的模板中的目标区域进行捕获;

将捕获的目标片段分离;加上完整接头获得捕获文库,并对捕获到的目标序列进行 PCR 扩增,再对文库进行定量操作;③高通量测序:上机测序,数据分析得到致病位点相关信息,再使用不同引物序列进行前后两次 PCR 扩增,从而产生更多不同标签的引物;④分析总结:通过对所得测序数据与人类基因组的参考序列进行对比,并对所测基因的每个突变位点情况进行分析,得到神经肌肉病相关基因突变位点,并总结所用生物靶向医药中有效成分的作用机理、指标数据;⑤横向比对:通过语义分析算法,从关联文献中提取相关检测结果,生成所用生物靶向医药的综合性能评价。

5 研究步骤

①利用纯化柱纯化、磁珠纯化或酚氯仿等提取方法,提取基因组 DNA,并对提取的基因组 DNA 进行基于荧光定量原理的定量装置定量或 Q-PCR 定量以及电泳定量操作,然后分别装入统一规格的培养皿(玻璃材质)中;②制备捕获文库:将基因组 DNA 利用超声破碎、转座酶酶切以及限制性内切酶酶切等方法进行片段化;将片段化的基因组 DNA 进行末端修复和 3'末端添加碱基 A;将 3'末端添加碱基 A 的产物连接扩增接头;将连接产物进行 PCR 扩增,采用 DNA 聚合酶对捕获到的目标序列进行 PCR 扩增,富集有效产物;使用探针针对富集的模板中的目标区域进行捕获;将捕获的目标片段分离;加上完整接头获得捕获文库,并对捕获到的目标序列进行 PCR 扩增,采用 DNA 聚合酶对捕获到的目标序列进行 PCR 扩增,再对文库进行基于荧光定量原理的定量装置定量或 Q-PCR 定量以及电泳定量操作;③高通量测序:上机测序,数据分析得到致病位点相关信息,再使用不同引物序列进行前后两次 PCR 扩增,从而产生更多不同标签的引物;④分析总结:通过对所得测序数据与人类基因组的参考序列进行对比,并对所测基因的每个突变位点情况进行分析,得到神经肌肉病相关基因突变位点,并总结所用生物靶向医药中有效成分的作用机理、指标数据;⑤横向比对:通过语义分析算法,从关联文献中提取相关检测结果,生成所用生物靶向医药的综合性能评价。

所述步骤②的探针包括检测 CLCN1、SCN4A、CACNA1S、KCNJ2、TIA1、GNE、MYH7、NEB、FLNC、SEPN1、POMT2、VCP、DMD、MYOT、LMNA、CAV3、CAPN3、DYSF、SGCG、SGCA、SGCB、SGCD、TCAP、TRIM32、POMT1、ANO5、FKTN、BAG3、AGL、DAG1、PLEC 以及 EMD 的探针。

所述步骤③中第一次 PCR 扩增所采用的引物序列如下:

Primer F: 5'-ACACTCTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCG

ATCT-3';

Primer R: 5'-GTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3'。

第二次 PCR 扩增所采用的引物序列如下:

TrueSeq Universal Primer:

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3';

TrueSeq Primer-Index X:

5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATNNNNNNGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3'。所述 NNNN NN 部分采用多种不同的碱基组合。

所述步骤⑤中的具体流程为使用计算机(在处理器中预先写入相应的算法)分别计算同一产品类别的多个生物医药产品的综合得分数据,并按照得分高低进行排序,根据现有的试验数据与这些生物医药产品的公开数据进行比对,最后将比对后的结果重新排序并对外展示。

6 研究结果

对照组一:本对照组内容和实施例内容基本相同,相同之处不再重述,不同之处在于:取消步骤②和步骤③中的 PCR 扩增处理,直接对捕获文库进行上机测序。

对照组二:本对照组内容和实施例内容基本相同,相同之处不再重述,不同之处在于:不采取步骤⑤,采用人工试验一一比对、总结评价。

通过分析总结得出神经肌肉病相关基因突变位点和所用生物靶向医药中有效成分的作用机理、指标数据,并通过语义分析算法进行横向比对,生成所用生物靶向医药的综合性能评价,节约试验时间,提高针对神经肌肉病生物医药的监测效率。

7 讨论

本文涉及生物医药技术领域,尤其为一种针对神经肌肉病生物医药的监测方法,包括以下步骤:①提取基因组 DNA;②制备捕获文库;③高通量测序;④分析总结;⑤横向比对。本文不仅提高了针对神经肌肉病生物医药监测的准确性,也提高了针对神经肌肉病生物医药的监测效率。

参考文献

- [1]陈土容,黄美欢,曹建国.神经肌肉病运动功能评估量表的应用进展[J].中国康复理论与实践,2018,24(9):1043-1047.
- [2]赵燕,卢正娟,刘卓,等.二代测序在遗传性神经肌肉病分子生物学中的应用[J].中风与神经疾病杂志,2017,34(6):569-571.