

基因测序技术在临床检验领域的应用及国内外监管现状比较研究

刘可君, 郭世富, 崔乐, 黄颖* (中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要: 基因测序技术是现代分子生物学研究中最常用的技术, 从1977年第一代测序技术的出现, 经过四十多年的发展, 基因测序技术取得了重大进展, 尤其以高通量为特点的第二代测序技术正在逐步应用于临床检测中。本文介绍了基因测序技术的发展及国内外第二代测序技术在临床应用中的监管制度和监管建议。

关键词: 基因测序技术; 临床应用; 标准化; 监管

中图分类号: Q75 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2018)11-1520-11

doi:10.16153/j.1002-7777.2018.11.012

Application of Gene Sequencing Technology in the Field of Clinical Testing and Comparative Study on Current Situation of Domestic and International Supervision

Liu Kejun, Guo Shifu, Cui Le, Huang Ying* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract: Gene sequencing technology is the most commonly used technique in modern molecular biology research. Since the emergence of the first generation sequencing technology in 1977, it has made significant progress after development of forty years. Now the second generation sequencing technology characterized by high throughput is applied to clinical testing. This paper introduces the development of gene sequencing technology, its regulatory regime and regulatory recommendations for clinical applications of the second generation sequencing technology at home and abroad.

Keywords: gene sequencing technology; clinical application; standardization; regulation

基因测序技术是分子生物学研究中最常用的技术, 它的出现极大地推动了核酸分析及临床检验的发展。十几年来, 测序技术取得了前所未有的进步, 在基础研究以及医疗领域中已日益显出广阔的应用前景。从测序技术的发展历程来看, 它经历了从简单到复杂, 从单一到全面, 从时间长、成本

高、通量低、手工操作到快速、廉价、高通量、自动化的过程。

1 基因测序技术进展

1.1 第一代测序技术

1977年Maxam和Gibert^[1]报道了通过化学降解测定DNA序列的方法。由于该方法程序复杂、操作繁

琐,后来逐渐被Sanger法取代。

Sanger^[2]法(双脱氧链终止法)在过去的30年里,因测序读长(Read Length)长、准确性高的优点,一直占据着统治地位。其原理是:由于ddNTP的2'和3'都不含羟基,在DNA合成反应中不能形成磷酸二酯键,因此可以被用来中断DNA合成反应。在4个DNA合成反应体系中分别加入一定比例的带有放射性同位素标记的某种ddNTP,通过凝胶电泳和放射自显影后,可以根据电泳带的位置确定待测分子的DNA序列^[2-3],或通过高分辨率毛细管电泳分离大小不同的片段并通过荧光标记识别片段末端碱基,从而获得所测片段的碱基序列^[4]。

此后,在Sanger法的基础上,80年代中期出现了荧光自动测序技术,该方法是用荧光标记代替放射性同位素标记、以荧光信号接收器和计算机信号分析系统代替放射性自显影的自动测序仪^[5-6]。80年代末出现了杂交测序法,该方法检测速度快,采用标准化的高密度寡核苷酸芯片能够大幅度降低检测的成本^[7],但该方法误差较大,且不能重复测定。

传统的化学降解法,双脱氧链终止法以及在它们基础上发展来的各种DNA测序技术(包括荧光自动测序技术、杂交测序技术)统称为第一代DNA测序技术。目前基于荧光标记和Sanger双脱氧链终止法原理的荧光自动测序仪仍被广泛地应用^[8]。第一代测序技术的主要特点是测序读长长,准确性高,但测序成本高、通量低等方面的缺点,严重影响了真正大规模的应用。因而第一代测序技术并不是最理想的测序方法。

1.2 第二代测序技术

随着人类基因组计划的完成,人们进入了后基因组时代,即功能基因组时代,第一代测序技术已经帮助人们完成了从噬菌体基因组到人类基因组草图等大量的测序工作,但传统的测序方法已经不能满足深度测序和重复测序等大规模基因组测序的需求,这促进了新一代DNA测序技术的诞生。新一代测序技术(Next-generation Sequencing, NGS)也称为第二代DNA测序技术,其最显著的特征是高通量、低成本、自动化程度高,它能在很短的时间内完成上百亿个碱基对的测序,一次能对几十万到几百万条DNA分子进行序列测序,满足极短时间内对基因组进行高分辨率检测的要求^[9]。因此,新一代

测序技术又被称为高通量测序技术,该技术提供了一种与基因芯片技术互为补充的新的通量工具,能对一个物种的基因组和转录组的全貌进行全面细致的分析,故又被称为深度测序。其中,Roche公司的Genome SequencerFLX(GS-FLX)测序平台、Illumina公司的Solexa Genome Analyzer测序平台和ABI公司的SOLiD测序平台是第二代测序技术的代表^[10]。

2006年Illumina公司的新一代测序仪Genome Analyzer由Solexa公司研发,利用合成测序的原理,实现自动化样本制备及大规模平行测序。GenomeAnalyzer技术的基本原理是将基因组DNA打碎成约100~200个碱基的小片段,在片段的两个末端加上接头。将DNA片段变成单链后通过接头与芯片表面的引物碱基互补而使一端被固定在芯片上。另外一端随机和附近的另外一个引物互补,也被固定住,形成桥状结构。通过30轮扩增反应,每个单分子被扩增大约1000倍,成为单克隆的DNA簇,随后将DNA簇线性化。在下一步合成反应中,加入改造过的DNA聚合酶和带有4种荧光标记的dNTP。在DNA合成时,每一个核苷酸加到引物末端时都会释放出焦磷酸盐,激发生物发光蛋白发出荧光。用激光扫描反应板表面,在读取每条模板序列第一轮反应所聚合上去的核苷酸种类后,将这些荧光基团化学切割,恢复3'端黏性,随后添加第二个核苷酸。如此重复,直到每条模板序列都完全被聚合为双链。这样,统计每轮收集到的荧光信号结果,就可以得知每个模板DNA片段的序列^[11]。

GenomeAnalyzer系统需要的样品量低至100 ng,文库构建过程简单,减少了样品分离和制备的时间,配对末端读长可达到2×50 bp,每次运行后可获得超过20 GB的高质量过滤数据,且运行成本较低,是性价比较高的新一代测序技术。

2007年Roche公司推出了Genome SequencerFLX(GS-FLX)测序平台,建立在454焦磷酸测序原理上的一种高通量测序。其原理是引物与模板DNA退火后,在DNA聚合酶、ATP硫酸化酶、荧光素酶和三磷酸腺苷双磷酸酶的协同作用下,将引物上每一个dNTP的聚合与一次荧光信号的释放偶联起来,通过检测荧光的释放和强度,达到实时测定DNA序列的目的。此技术不需要荧光标记的引物或核酸探针,也不需要电泳;具有分析结果快速、准

确、高灵敏度和高自动化的特点^[12]。

2007年底,ABI公司推出全新测序技术——SOLiD测序技术,与454和Solexa的合成测序不同,SOLiD是通过连接反应进行测序的。其基本原理是以四色荧光标记的寡核苷酸进行多次连接合成,该测序技术拥有第二代测序反应中最高的通量,是边合成边测序过程中采用连接反应而不是聚合反应。SOLiD测序技术的独特之处在于“双碱基编码”的应用,使每个碱基被阅读两次,校对原始数据而避免错误,以此保证SOLiD系统原始碱基数据的准确率大于99.94%。但其存在的不足是在荧光解码阶段,鉴于其是双碱基确定一个荧光信号,因而一旦发生错误就容易产生连锁的解码错误。目前,该技术多应用在基因组重测序、基因型分析、基因表达分析、小分子RNA、表观组学测序(染色质免疫共沉淀和DNA甲基化)等领域。

第二代测序技术近年来发展很快,应用也日益广泛,其应用范围包括:对未被测序过的生物基因组从头测序^[13]、单核苷酸多态性研究^[14]、转录组及表达谱分析^[15]、小分子RNA研究^[16]以及转录调控研究^[17]。

目前,第二代测序技术在临床上主要应用于寻找疾病的候选基因,可用于单基因病、复杂疾病(如糖尿病、肥胖症等)甚至是癌症的致病基因或易感基因的寻找^[18]。同时,该测序技术极大地促进了胎儿游离DNA的实验室研究,促进了无创性产前基因诊断的发展^[19]。

1.3 第三代测序技术

鉴于一代和二代测序存在依赖于模板扩增以及序列读长限制等缺点,为了补充和进一步完善测序技术,近几年研发出第三代的测序方法——单分子测序技术(Single-molecule Sequencing),主要包括Helico Bioscience公司的单分子测序技术^[20-21]、Pacific Biosciences(PacBio)公司的单分子实时测序技术(Single-molecule Real-time, SMRT)和Oxford Nanopore公司的单分子纳米孔测序技术(The Single-molecule Nanopore DNA Sequencing)^[22-23]等。

Helico Bioscience单分子测序技术是主要利用合成测序理论开发的第一个单分子测序方法,该测序有样本试剂消耗少、通量非常高、不需要PCR扩增或连接酶等优点,适合RNA直接测序或把DNA聚

合酶用逆转录酶代替进行RNA直接测序。然而,由于测序的平均读长相对较短、原始数据准确率相对较低、仪器价格昂贵等缺点,该测序技术需要进一步改进^[24]。

Pacific Bioscience的单分子实时测序技术是第三代测序中应用比较广泛且已商业化的核心技术。该测序是基于荧光标记的边合成边测序技术,对单个DNA分子进行测序。该测序方法与一代和二代测序相比也有不足之处,例如,原始数据准确率低,有效反应孔不足,故通量低等缺点^[25]。

Oxford Nanopore单分子纳米孔测序技术是基于电信号测序的技术,相对于其他测序技术,Oxford纳米孔测序技术的样本处理极其简单,无需DNA聚合酶或者连接酶,也无需dNTPs,因此其测序成本十分低廉,比其他测序技术更有可能实现1000美元基因组目标。然而,该测序技术面临的最大的问题是如何将DNA通过纳米孔的速度减慢,以提高通量和准确率^[26]。

基因测序技术经过几十年的发展,目前已经到了第三代。三代测序技术有各自的优势。第一代测序技术虽然成本高,速度慢,但是对于少量的序列来说,仍是很好的选择;第二代测序技术刚刚商用不久,正在逐渐走向成熟;第三代测序技术有的正在研制,有的则处于试用阶段,相信很快便可进行商业化运作。目前,第二代基因测序技术以其高通量、低成本、重复性好的特点被广泛应用于临床实践中。

2 国内外监管及使用情况

2.1 国外监管主要事件

基因测序技术作为一项重要的技术早已成为生命科学研究的基础支撑技术,广泛应用于生物学及医学研究,特别是一些辅助肿瘤、遗传或者罕见病的临床治疗,甚至药物创新研发。目前,基因测序相关产品和技术已由实验室研究演变到临床使用,对此,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)制定了相关的标准、指南、测序参考品和参考数据集等,旨在完善其监管机制。

2013年11月Illumina公司宣布, MiSeqDx台式新一代测序仪及配套试剂盒已通过美国FDA审批,成为全球首个获得FDA临床认证的新一代测序(NGS)平台^[27]。通过认证的试剂盒除了针对囊

性纤维化的检测之外,还包括通用试剂盒,让临床实验室能够开发他们自己的诊断检测。MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay^[28]旨在同时检测CFTR基因中的139个临床相关的致病突变及变异,包括美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG)和美国妇产科医师学会(ACOG)建议筛查的项目。MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay^[29]则凭借Illumina的靶向重测序技术,为CFTR基因的蛋白编码区域和内含子/外显子边界提供高度准确的数据。

2014年2月,瓶中基因组联盟(Genome in a Bottle)发布了标准基因型的参考品和参考数据集。2014年10月,由FDA牵头的第三期国际生物芯片/高通量基因测序数据质控联盟在Nature Biotechnology期刊上发布专题文章,系统地评估了不同高通量测序仪间对RNA-seq数据的质控和可重现性,发布了高通量RNA测序参考品和参考数据集^[30]。

2015年7月,EuroGentest和欧盟人类遗传学会对基于NGS的遗传病诊断进行评估和验证,并制定了NGS诊断指南。该指南可做补充材料,帮助诊断实验室有效应用NGS技术并指导NGS的资质认证。该指南主要针对罕见病和单基因疾病的NGS诊断,主要专注于基因panels的靶向分析、特定的捕获分析以及从全外显子测序中提取可用数据^[31]。

2016年5月13日,美国FDA在其网站上发布《基于二代基因测序的传染病诊断器械:微生物鉴定及耐药性和毒力标志物的检测》,该指南适用于那些使用靶向测序或宏基因组测序检测传染病病原或耐药性及毒力标志物是否存在的二代基因测序器械,不适用于那些检测核酸之外其他品种的设备,也不适用于那些旨在筛选血液、细胞或组织的供体的设备^[32]。

2016年7月,美国国立卫生研究院宣布投入5500万美元用于精准医疗计划,并建立至少包含100万名志愿者的全国精准医疗研究,同时FDA公布了两份NGS体外诊断指南草案,并于2018年4月12日发布了这两份指南文件的最终版本,这是FDA首次正式发布的NGS指南,这标志着FDA对NGS的监管进入成熟阶段。

指南一:《基于NGS的遗传性疾病体外诊断指南》将为遗传性疾病的NGS检测提供设计、开发及

验证指导建议;测试开发人员可遵循该指南为检测方案的上市做准备;该指南中的建议适用于遗传性疾病的检测,无论结果直接面向患者还是医务人员均可适用,但当检测结果直接面向消费者时,需增加额外的建议和管理。该指南不适用于仅以诊断为目的的NGS检测,也不适用于以筛查、微生物基因检测、风险预测、细胞游离DNA检测、胎儿检测、胚胎植入前遗传检测、肿瘤基因组检测、RNA测序或伴随诊断为目的的检测,因为这些检测具有该指南未包含的其他特征^[33]。

指南二:《使用公共人类遗传差异数据库来支持基于NGS的体外诊断的临床有效性》中所讨论的遗传变异数据库只包括人类遗传变异,不包含用于微生物基因组鉴定、抗菌素耐药性检测以及标记毒性的数据库,本指南对分类和解释遗传变异的软件也不适用。

该指南建议测试研发人员使用可公开访问的遗传数据库中的信息来验证检测方案能否准确预测疾病,而不仅仅局限于各个单位的独立数据^[34]。

2016年12月19日,美国FDA批准了Foundation Medicine公司的FoundationFocusCDxBRCA产品,成为市场上第一个基于二代测序的伴随诊断试剂盒。该产品被批准用于鉴定携带BRCA突变的晚期卵巢癌患者,是基于福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)的卵巢肿瘤组织,采用NGS技术检测BRCA1和BRCA2突变的伴随诊断试剂盒^[35]。

2017年3月,美国分子病理学学会(AMP)和美国病理学会(CAP)公布了基于二代测序的肿瘤panels验证指南,以提高实验室测序结果的质量,为患者提供更好的临床医疗服务。具体指南发表于《The Journal of Molecular Diagnostics》杂志上,包括了靶向测序方法和数据分析的概述、新检测方法的注意事项以及试验验证和质量控制指标的实施建议^[36]。

2017年6月22日美国FDA批准了首个基于NGS技术、可以分析3种非小细胞肺癌(NSCLC)治疗中的反应变化的伴随诊断试剂盒,这是FDA批准的第一个可筛查多个标志物的肿瘤二代基因测序检测^[37]。这项产品由赛默飞世尔科技公司开发,产品名称为Oncomine DX Target Test,是用于筛查NSCLC患者的BRAF、ROS1和EGFR突变二代基因测序检测。

2017年6月29日,美国FDA批准了Illumina公司开发的Praxis Extended RAS Panel,该产品在MiSeqDx系统上运行,分析KRAS和NRAS基因中的56个变异,用于筛选适宜帕尼单抗(Panitumumab)治疗的转移性结直肠癌患者^[38]。

2017年11月,美国分子病理学会(AMP)与美国病理学会(CAP)组织相关方制定并发布了《NGS生物信息流程验证标准和指南》,主要内容涵盖临床NGS生物信息流程验证的17条共识建议。涵盖了实验室NGS生物信息流程从设计、开发到运营的多条使用建议,强调经过合格培训的分子专业人员是确保NGS检测质量的关键因素^[39]。

2017年11月15日,美国FDA宣布已批准纪念斯隆·凯特琳癌症研究中心(Memorial Sloan Kettering Cancer Center,简称MSK)基于二代测序技术的癌症基因检测分析平台MSK-IMPACTTM,它是一个更加灵活、全面的癌症基因检测平台,由MSK病理科开发。它基于二代测序技术,能够一次对病人肿瘤468个基因的基因突变及遗传变异进行快速、灵敏的检测,可对患者这些基因上所有的重要区域进行测序,并能够检测到基因上所有蛋白编码区突变、拷贝数变化(CNAs)、启动子突变和基因组重排^[40]。

美国FDA将该产品与肿瘤伴随诊断类产品(CDx类)进行了区分,批件中明确该类产品的检测结果不与任何特定治疗产品联用。美国FDA初步明确了肿瘤个体化基因分级策略:第一类需有明确药物治疗用途的基因,如用于伴随诊断类产品;第二类是具有显著临床意义的生物标志物,通过提供分析性能有效性数据及文献、指南等支持性数据进行确认;第三类为具有潜在临床意义的生物标志物,通过提供分析性能有效性数据、文献报道数据或药物体外临床前研究等数据进行确认^[41]。这一思路在MSK-IMPACT产品中得到了具体体现。

在这个审评过程中,美国FDA也另辟蹊径把原来按照CLIA法案进行评审自建医学检验实验室(Lab-Developed Test)的部门—美国纽约州卫生部也纳入了美国FDA,作为其第三方评审机构。这一项改革措施反映了美国FDA越来越重视对注册申请人和临床检测机构的审评和入市要求,越来越关注临床检测机构的整体服务和服务的结果。

2017年11月30日,美国FDA宣布已批准

Foundation Medicine公司针对多种实体瘤的下一代测序体外诊断(IVD)检测产品——FoundationOneCDx(F1CDx)。相较于11月15日FDA批准的MSK基于下一代测序的癌症基因检测产品,F1CDx可谓“有过之而无不及”。这款产品除了可检测324个基因的突变,还可以检测TMB和MSI两个基因组特征,是FDA批准的首款获得突破性认定的癌症NGS体外诊断检测产品^[42]。

此外,对于五种类型的肿瘤,包括非小细胞肺癌、黑色素瘤、乳腺癌、结肠直肠癌和卵巢癌,这款产品测试可以用作伴随诊断,以判断哪些患者可能受益于FDA批准的癌症靶向疗法。F1CDx可以检测多个FDA批准的靶向疗法对应的基因突变,而此前的检测大多只涵盖单一的突变,真正意义上改变了之前“一药一检测”的模式,避免了重复检测。

现阶段,癌症基因检测结果已经成为患者靶向用药的重要参考指标。2018年3月16日,为了让更多癌症患者拥有基因检测的机会,美国医疗保险和医疗补助服务中心(CMS)最终确认了癌症患者下一代测序(NGS)检测的医保覆盖方案。此次确定的医保覆盖范围涵盖了诊断性实验室检测,并取消了部分临床性能限制要求。晚期癌症(如复发性、转移性、难治性或Ⅲ或Ⅳ期癌症)患者利用下一代测序技术进行的基因检测被纳入全国医保。

此次美国公布的针对晚期癌症患者基因检测的医疗保险覆盖范围(NCD)或许能够为我国相关监管部门提供参考经验,制定更为有效的基因检测的监管政策,最终推动个体化医疗的创新发展。

2.2 国内监管主要事件

目前,第二代测序技术在我国被广泛应用于临床实践,包括实体瘤分析、血液肿瘤分析、遗传病分析和传染病分析;无创产前检测(Noninvasive Prenatal Test, NIPT);胚胎植入前遗传学诊断/筛查(Preimplantation Genetic Diagnosis/Preimplantation Genetic Screening, PGD/PGS)。鉴于这一快速发展的领域,2014年2月,原国家食品药品监督管理总局(以下简称CFDA)和原国家卫生和计划生育委员会(NHFPC)暂停了临床二代测序检测,随后颁布了一系列二代测序检测监管要求。

CFDA主要是对测序链上的仪器、试剂、分析

软件进行监管。CFDA要求所有二代测序商业检测系统在临床使用之前都需要进行认证,包括打包在一起并销售给实验室的试剂、仪器和软件。2014年2月,CFDA和原卫计委联合发布通知明确指出,基因测序产品需经CFDA审批注册^[43]。

2014年6月30日,CFDA批准了华大基因申报的高通量基因测序仪BGISEQ-100和BGISEQ-1000及检测胎儿染色体非整倍体(21号染色体三体、18号染色体三体、13号染色体三体)的试剂盒,使用半导体测序法和联合探针锚定连接测序法^[44]。

2014年7月24日,中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局、中国国家标准化管理委员会发布了《高通量基因测序技术规程》,该标准规定了高通量基因测序技术的术语与定义,测量的原理、技术指标、相关主要仪器、测序试剂及测序方法的要求^[45]。

2014年11月4日,CFDA再次批准了达安基因的基因测序仪和胎儿染色体非整倍体21三体、18三体和13三体检测试剂盒(半导体测序法)医疗器械注册^[46]。到目前为止,CFDA已批准按照第三类医疗器械管理的二代测序仪9台,测序试剂盒19个[胎儿染色体非整倍体(T21、T18、T13)检测试剂盒、特定基因突变检测试剂盒、特定基因分型检测试剂盒]及按照第一类医疗器械备案管理的测序反应通用试剂盒3个。

2014年末,原国家卫计委医政医管局发布了关于《开展高通量基因测序技术临床应用试点工作的通知》,首次公布了北广两地第一批高通量测序技术临床应用试点单位。通知中共涉及3个专业(遗传病诊断、产前筛查与诊断、植入前胚胎遗传学诊断),批准了7家北广两地的试点机构,其中包括安诺优达、博奥、华大、达安基因在内的第三方检验机构。

随后,原卫计委妇幼保健服务司就发布了《关于产前诊断机构开展高通量基因测序产前筛查与诊断临床应用试点工作的通知》,审批通过了109家医疗机构开展高通量基因测序产前筛查与诊断(NIPT)临床试点。这远远大于此前医政医管局公布的NITP第三方检验机构的数目,充分肯定了医疗机构在未来高通量基因测序临床应用中的重要作用。

2016年4月23日,中国临床肿瘤学会(CSCO)

和中国肿瘤驱动基因分析联盟(CAGC)联合发布了《二代测序(NGS)技术应用于临床肿瘤精准医学诊断的共识》,旨在为二代测序(NGS)技术应用于临床肿瘤驱动基因分析提供相关指导性建议并规范临床实践^[47]。

2016年8月8日,中国食品药品检定研究院发布第二代测序技术检测试剂质量评价通用技术指导原则,本指导原则主要针对第二代测序(NGS)技术检测试剂产品质量提出指导性要求,涉及基本原则、主要原材料、检测流程及性能评价等方面。本指导原则是对企业和检验人员的指导性文件,但不包括注册审批所涉及的行政事项,亦不作为法规强制执行,如果有能够满足相关法规要求的其他方法,也可以采用,但是需要提供详细的研究资料和验证资料。应在遵循相关法规的前提下使用本指导原则^[48]。同时,中国食品药品检定研究院提供五个与高通量测序相关的国家参考品,分别是高通量测序用外周血胎儿染色体非整倍体(T21、T18和T13)国家参考品、胚胎植入前染色体非整倍体国家参考品、高通量测序用肺癌游离脱氧核糖核酸基因突变国家参考品、高通量测序用肠癌游离脱氧核糖核酸基因突变国家参考品、测序仪性能评价用脱氧核糖核酸国家参考品。

为加强医疗器械产品注册工作的监督和指导,进一步提高注册审查质量,CFDA组织制定了胎儿染色体非整倍体(T21、T18、T13)检测试剂盒(高通量测序法)注册技术审查指导原则,并于2017年4月1日发布^[49]。

2017年至2018年中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局、中国国家标准化管理委员会先后发布了GB/T 33681.1-2017高通量基因测序样本预处理方法第1部分(动物组织样本预处理)^[50]、GB/T 35537-2017高通量基因测序结果评价要求^[51]和GB/T 35890-2018高通量测序数据序列格式规范^[52]。这些标准的发布逐步对高通量测序的各个环节进行了规范。

近几年,CFDA为了应对不断涌现的新技术和不断增长的临床需求,已经推行了几个特殊审批通道加速审批,但产品依然需要达到准确性和临床获益这两项要求才能进入通道。

3 讨论

目前,临床用第二代基因测序技术已经商业

化,并逐渐走向成熟。国内已有多家公司以二代测序为主营业务,其中华大基因和贝瑞和康均在2017年成功上市。华大基因是目前国内最大的基因测序中心,约占20%~30%的市场份额。目前,高通量测序仪及其配套试剂仍然是Illumina和Thermo Fisher占据绝对的市场垄断地位。国内厂家正在积极寻求突破,国内华大基因、瀚海基因、华因康公司能制造国产的测序仪,其中只有华大基因具有可统计的市场占有率。国内高通量测序仪器的研究和开发已取得明显进步,随着第二代测序技术的普遍应用,国内外许多公司正积极开发和商业化更多临床实验室的应用产品,已应用在无创产前检测、胚胎植入前遗传学诊断/筛查、癌症肿瘤的诊断追踪、药物临床试验开发、感染性微生物的快速鉴定等多个方面。

3.1 测序技术应用于临床对医学检验领域的影响

NGS测序服务并非仅仅是测序,这只是其中的一步。整个过程实际上包括:样本处理(提取、建库及捕获)、上机测序、架构算法及数据处理,医学注释对应解读及问题解决。从测序仪测序得到的原始数据,需要后期经过基因组的比对,数据的过滤筛选等多个步骤才能得到基因组上的变异信息,从而为疾病的诊断和治疗提供参考。因此,这些环节中有一个步骤出现问题,都会对检测结果的判定产生影响。

近年来,美国食品药品监督管理局、美国医学遗传学与基因组学学会、美国病理学家协会为有效评估二代测序方法的可靠性、分析过程监控和变异报告方法制定了规范。然而,实验室实施这些指南仍然是一项挑战。

同时在医学伦理方面,遗传学家和伦理学家在医生应该从患者基因中检测何种信息、多少信息应该被告知其家庭,以及谁应该拥有和控制这些基因数据等议题上存在分歧。伦理问题普遍存在于任何医疗阶段和过程,随着我国法制的健全,全民素质的提高和自我保护意识的加强,人们对医学服务质量要求越来越高,医学伦理规则也应随之不断更新,在以保护病人数据为核心的基础上,提高医疗信息资源利用,扩大医疗数据对全人类的贡献^[53]。

3.2 标准化需求

目前,国内二代测序仪没有强制性国家标准

或行业标准,二代测序仪器开发投入大,研发周期长,容易导致资源的错配和浪费,由于二代测序技术在临床应用前景光明,急需建立符合国情的二代基因测序仪的强制性技术标准,规范仪器的研究和开发。第二代测序技术的发展同样为医疗机构带来巨大的挑战;尽管要求试点实验室在临床扩增检验实验室的规范下进行二代测序检测,但二代基因测序缺乏统一行业规范和检测标准,导致不同实验室不同平台检测结果无法比较。这意味着需要对二代基因测序实验操作部分和生物信息分析部分建立执行标准和质控监测事项。包括建立标准操作流程、验证流程、质量管理体系、数据可靠性验证等。生物信息分析部分应包括:变异结果描述、附带结果报道、数据储存和版本可追溯性等。此外,标准品应用应贯穿在二代基因检测整个流程中。

3.3 LDT实验室

NGS在临床应用中由于仪器设备复杂,检测试剂通常需要根据不同检测方法需求配制,操作技术难度较大,对操作人员技术能力要求高,对结果解释的临床水平要求高,因此这类检测项目离不开医学检验部门自建检测方法(Laboratory Developed Tests, LDT)。LDT通常是指医学检验部门自行研发、验证和使用的检测方法,仅在医学检验部门内部使用,不作为商品出售给其它医学检验部门、医院及个人。

美国作为在基因检测开发最早、专利数量最多、市场化程度最高的国家,在基因检测监管方面积累了很多宝贵的经验和教训,得到WHO专文推荐^[54]。在美国,FDA负责LDT上市前审批,包括分析性能评估和临床应用评估,而医疗保障服务中心(Centers for Medicare & Medicaid Services, CMS)负责医学检验实验室操作、检测过程和人员能力的监管。

美国FDA按照体外诊断产品的危险和复杂程度,将其分为三类:I类风险程度较低,由CMS依据《临床实验室改进修正案(Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, CLIA'88)》对实验室和科研实验室进行监管。II类风险程度中等,按照FDA上市前通知510(K)流程,对申报产品与指定的同等产品进行等效性比对。III类风险程度最高,这类产品被裁定与市场上同类产品不具备等效性时,须通过上市前批准流程(Premarket

Approval, PMA) 批准。与510(K)不同的是, PMA需要通过一定规模的临床试验证实其安全性和有效性。由于最初FDA认为当时的LDT是简单和低风险, 将之归入I类体外诊断产品范畴^[55]。

然而, 随着科技的发展, 诞生了基于基因检测的LDT, 其显著特点主要包括: 进行基因检测的独立实验室和公司越来越多并且大多数都在进行相关技术的研发^[56], 检测时所使用的仪器设备或软件更为复杂; 操作技术难度较高; 对操作人员素质和技术能力要求高; 结果分析高度依赖高科技分析软件 and 数据处理系统; 临床中的应用越来越广泛, 因此对临床有效性的要求更加严格, 这些特征导致了其潜在风险的与日俱增。

为此, FDA于2014年10月3日正式发布了《LDT 监督管理框架草案》^[57-58]。根据该草案, FDA将参考现行的IVD管理规范对LDT进行严格的监管。不同于CMS基于复杂程度的监管原则, FDA对LDT的监管是基于风险程度的监管^[56]。

欧盟对LDT没有明确的监管措施, 许多科研试剂和临床医学检验实验室自建检测项目已用于临床检测。在欧盟地区, 以前IVD上市由各成员国监管部门根据IVD Directive (Council Directive 98/79/EC) 要求审批。然而2017年5月5日, 欧盟通过其官方渠道 (Official Journal) 正式发布IVDR[REGULATION (EU) 2017/746]新法规, 将取代现行的Council Directives 98/79/EEC, 由指令 (Directive) 升级为法规 (Regulation), 提高了文件的约束力; IVDR是由欧盟委员会拟议并经欧洲议会和理事会认可的法律, 将从根本上改变CE标志的机制和欧盟监管IVD器械的方式。IVDR过渡期为5年, 2022年5月4日起强制实行^[55]。然而LDT并不在监管范围之内, 这也就造成了在欧盟LDT没有相关机构监管的局面。

我国目前还没有类似美国关于LDT的明确的定义及范围, 尽管CFDA批准了一些个体化医学检测检验项目, 但仍有许多实验室所使用的试剂为自配试剂或实验方法为自建方法。我国现有的检验项目注册审批制度和收费管理制度也在很大程度上影响了LDT在临床应用中的时效性。单纯强调必须完全采用得到批准的商品化检测试剂 (方法) 将阻碍这些新技术新项目的临床应用, 将影响对疾病发生发展的进一步深入认识和理解, 影响临床医学科学的

进一步发展。为此, 2016年3月3号, 国家卫生计生委官方网站发布“国家卫生计生委办公厅关于临床检验项目管理有关问题的通知”, 强调对临床意义明确、特异性和敏感性较好、价格效益合理的临床检验项目, 应当及时论证以满足临床需求; 以及通过合理设置审核程序、优化流程、提高效率, 使得符合要求的临床检验项目在第一时间能够使用^[59]。这相当于是为临床实验室自建项目开启绿色通道。随着基因检测技术的不断发展和临床需求的不断扩大, 未来我国基因检测的监管需要国家药品监督管理局和卫健委的协作配合, 不断完善未来我国对基因检测的监管。在安全有效的前提下, 逐步放开和鼓励有条件的医学检验部门适当发展LDT, 满足日益增长的个体化医学和精准医学的临床需求。

总之, 随着新一代测序技术的进步和精准医学在临床应用的推进, 我国已经从基础研究、产品分类管理、产品上市管理、临床应用管理及标准化等多方面逐步加强和完善对该领域的监管。在确保安全性和有效性的同时寻求合适的方法, 保证该领域的创新性, 促进精准医疗的发展和进步。相信随着科技的发展, 相关管理监督机制的逐步完善, 今后会有更为高效、便捷的基因测序新技术诞生, 基因测序技术也将会更好地应用于更多的临床实践中。

参考文献:

- [1] Maxam AM, Gilbert W. A New Method for Sequencing DNA [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74 (2): 560-564.
- [2] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA Sequencing with Chain-terminating Inhibitors. [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74 (12): 5463-5467.
- [3] Sanger F. The Term Inalpeptides of Insulin. [J]. Biochem J, 1949, 45 (5): 563-574.
- [4] Huang XC, Quesada MA, Mathies RA. DNA Sequencing Using Capillary Arrayelectrophoresis [J]. Anal. Chem, 1992, 64 (18): 2149-2154.
- [5] 聂志扬, 肖飞, 郭健. DNA测序技术与仪器的发展[J]. 中国医疗器械信息, 2009, 15 (10): 13-16.
- [6] Simith LM, Fung S, Hunkapiller MW, et al. The Synthesis of Oligonucleotides Containing an Aliphatic Amino Group at the 5' Terminus: Gynthesis of Fluorescent DNA Primers for Use in DNA Sequence Analysis[J]. Nucleic Acids Research, 1985, 13 (7): 2399-2412.

- [7] 邱超, 孙含丽, 宋超. DNA测序技术发展历程及国际最新动态[J]. 硅谷, 2008, (17): 127-129.
- [8] 解增言, 林俊华, 谭军, 等. DNA测序技术的发展历史与最近进展[J]. 生物技术通报, 2010, (8): 64-70.
- [9] Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, et al. Accurate Multiplex Polony Sequencing of an Evolved Bacterial Genome[J]. *Science*, 2005, 309 (5741): 1728-1732.
- [10] Shendure J, Ji H. Next-generation DNA Sequencing[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26 (10): 1135 - 1145.
- [11] 于亮. 新一代测序技术之三国时代(上): Illumina[J]. 生物通, 2009, 68: 5-7.
- [12] 张耘. 基因测序的技术研发及发展趋势[EB/OL]. (2016-11-30) [2018-02-28]. 上海情报服务平台, 第一情报—生物与医药, <http://www.istis.sh.cn/list/list.aspx?id=10408>.
- [13] Huang S, Li R, Zhang Z, et al. The Genome of the Cucumber, *Cucumis Sativus*L[J]. *Nat Genet*, 2009, 41 (12): 1275-1281.
- [14] Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, et al. A Map of Human Genome Sequence Variation Containing 1.42 Million Single Nucleotide Polymorphisms[J]. *Nature*, 2001, 409 (6822): 928-933.
- [15] Morozova O, Hirst M, Marra MA. Applications of New Sequencing Technologies for Transcriptome Analysis [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2009, 10: 135-151.
- [16] Morin RD, O' Connor MD, Griffith M, et al. Application of Massively Parallel Sequencing to MicroRNA Profiling and Discovery in Human Embryonic Stem Cells [J]. *Genome Res*, 2008, 18 (4): 610-621.
- [17] Ouyang Z, Zhou Q, Wong WH. ChIP-Seq of Transcription Factors Predicts Absolute and Differential Gene Expression in Embryonic Stem Cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106 (51): 21521-21526.
- [18] 郭奕斌. 基因诊断中测序技术的应用及优缺点遗传[J]. 遗传, 2014, 36 (11): 1121-1130.
- [19] Nepomnyashchaya YN, Artemov AV, Roumiantsev SA, et al. Non-invasive Prenatal Diagnostics of Aneuploidy Using Next-generation DNA Sequencing Technologies, and Clinical Considerations [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2013, 51 (6): 1141 - 1154.
- [20] Clarke J, Wu HC, Jayasinghe L, et al. Continuous Base Identification for Single-molecule Nano-pore DNasequencing [J]. *Nat Nanotechnol*, 2009, 4 (4): 265 - 270.
- [21] Steinmann KE, Hart CE, Thompson JF, Milos PM. Helicos Single-molecule Sequencing of Bacterial Genomes[J]. *High-Throughput Next Generation Sequencing*, 2011, 733: 3 - 24.
- [22] Maitra RD, Kim J, Dunbar WB. Recent Advances in Nano-pore Sequencing[J]. *Electrophoresis*, 2012, 33 (23): 3418 - 3428.
- [23] Ying YL, Cao C, Long YT. Single Molecule Analysis by Bio-logical Nanopore Sensors[J]. *Analyst*, 2014, 139 (16): 3826 - 3835.
- [24] Harris TD, Buzby R, Babcock Hazen, et al. Single-molecule DNA Sequencing of a Viral Genome[J]. *Science*, 2008, (320): 106-109.
- [25] Eid J, Fehr A, Gray J, et al. Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules[J]. *Science*, 2009, (323): 133-138.
- [26] Clarke J, Wu Hai-Chen, Jayasinghe L, et al. Continuous Base Identification for Single-molecule Nanopore DNA Sequencing[J]. *Nature Nanotechnology*, 2009, (4): 265-270.
- [27] U. S. Food and Drug Administration. ILLUMINA, INC. C/O LEANNE KIVIHARJU, SENIOR DIRECTOR, REGULATORY AFFAIRS 5200 ILLUMINA WAY SAN DIEGO, CA 92122[EB/OL]. (2013-11-19) [2018-02-27]. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf12/k123989.pdf.
- [28] U. S. Food and Drug Administration. MiSeqDx Cystic Fibrosis System Premarket Notification. 510(k) Summary [EB/OL]. (2013-11-18) [2018-02-27]. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf12/k124006.pdf.
- [29] U. S. Food and Drug Administration. Illumina MiSeqDxTM Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay [EB/OL]. (2013-11-18) [2018-02-27]. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf13/k132750.pdf.
- [30] 石乐明. MAQC国际研究计划第十六次会议纪要, 生物大数据标准化研究: 实现个性化医疗的关键 [EB/OL]. (2014-12-15) [2018-02-27]. <https://max.book118.com/html/2017/0610/113124156.shtm>.
- [31] 仪器信息网. 重磅来袭: 欧盟先出台NGS诊断指南(38条声明, 6大方向) [EB/OL]. (2015-12-

- 14) [2018-02-27]. <http://www.instrument.com.cn/news/20151214/179980.shtml>.
- [32] U. S. Food and Drug Administration. Infectious Disease Next Generation Sequencing Based Diagnostic Devices: Microbial Identification and Detection 4 of Antimicrobial Resistance and Virulence Markers [EB/OL]. (2016-05-13) [2018-02-27]. <https://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm500441.pdf>.
- [33] U. S. Food and Drug Administration. Considerations for Design, Development, and Analytical Validation of Next Generation Sequencing (NGS) - Based In Vitro Diagnostics (IVDs) Intended to Aid in the Diagnosis of Suspected Germline Diseases [EB/OL]. (2016-07-08) [2018-02-27]. <https://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm509838.pdf>.
- [34] U. S. Food and Drug Administration. Use of Public Human Genetic Variant Databases to Support Clinical Validity for Genetic and Genomic-Based In Vitro Diagnostics [EB/OL]. (2016-07-08) [2018-05-10]. <https://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm509837.pdf>.
- [35] U. S. Food and Drug Administration. FoundationFocus™ CDxBRCA Technical Information Summary [EB/OL]. (2016-07-08) [2018-03-02]. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf16/p160018c.pdf.
- [36] Lawrence J, Jennings, Maria E, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing - Based Oncology Panels [J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2017, 19 (3) : 341-365.
- [37] U. S. Food and Drug Administration. FDA grants regular approval to dabrafenib and trametinib combination for metastatic NSCLC with BRAF V600E mutation [EB/OL]. (2017-06-22) [2018-03-02]. <https://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm564331.htm>.
- [38] U. S. Food and Drug Administration. FDA granted marketing approval to the Praxis Extended RAS Panel [EB/OL]. (2017-06-29) [2018-03-02]. <https://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm565785.htm>.
- [39] Somak Roy, Christopher Coldren, Arivarasan Karunamurthy. Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines: A Joint Recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists [J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2018, 20 (1) : 4-27.
- [40] U. S. Food and Drug Administration. FDA unveils a streamlined path for the authorization of tumor profiling tests alongside its latest product action [EB/OL]. (2017-11-15) [2018-03-02]. <https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm585347.htm>.
- [41] U. S. Food and Drug Administration. CDRH'S APPROACH TO TUMOR PROFILING NEXT GENERATION SEQUENCING TESTS [EB/OL]. (2017-11-30) [2018-03-02]. <https://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/InVitroDiagnostics/UCM584603.pdf>.
- [42] U. S. Food and Drug Administration. FDA grants marketing approval to FoundationOne CDx in vitro diagnostic [EB/OL]. (2017-11-30) [2018-03-02]. <https://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm587387.htm>.
- [43] 国家市场监督管理总局, 食品药品监管总局办公厅, 国家卫生计生委办公厅关于加强临床使用基因测序相关产品和技术管理的通知 [EB/OL]. (2014-02-09) [2018-03-02]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0845/96853.html>.
- [44] 国家市场监督管理总局. 第二代基因测序诊断产品批准上市 [EB/OL]. (2014-07-02) [2018-03-02]. <http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL0051/102239.html>.
- [45] 中国国家标准化管理委员会. 高通量基因测序技术规程 [EB/OL]. (2014-07-24) [2018-03-02]. <http://c.gb688.cn/bzgk/gb/showGb?type=online&hcno=D6A50D19A0F85483909F04E1E4D21A87>.
- [46] 国家市场监督管理总局. 医疗器械/数据查询 [EB/OL]. (2014-11-04) [2018-03-02]. <http://app1.sfda.gov.cn/datasearch/face3/base.jsp?tableId=26&tableName=TABLE26&title=%B9%FA%B2%FA%C6%F7%D0%B5&bcId=118103058617027083838706701567>.
- [47] 中国首部二代基因测序技术临床应用共识出台 [J]. 肿瘤防治研究, 2016, 43 (6) : 544.
- [48] 中国食品药品检定研究院. 第二代测序技术检测试剂质量评价通用技术指导原则 [EB/OL]. (2016-08-08) [2018-03-02]. <http://www.nicpbp.org.cn/CL0149/8495>.

- html.
- [49] 国家食品药品监督管理总局. 胎儿染色体非整倍体 (T21、T18、T13) 检测试剂盒 (高通量测序法) 注册技术审查指导原则[EB/OL]. (2017-04-01) [2018-03-02]. <http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL0087/171363.html>.
- [50] 国家标准信息公共服务平台. GB/T 33681.1-2017高通量基因测序样本预处理方法第1部分: 动物组织样本预处理[EB/OL]. (2017-05-12) [2018-03-02]. <http://www.std.gov.cn/gb/search/gbDetailed?id=5DDA8BA0A3E718DEE05397BE0A0A95A7>.
- [51] 国家标准信息公共服务平台. GB/T 35537-2017高通量基因测序结果评价要求[EB/OL]. (2017-12-29) [2018-03-02]. <http://www.std.gov.cn/gb/search/gbDetailed?id=6171341D909524B5E05397BE0A0A6FDC>.
- [52] 国家标准信息公共服务平台. GB/T 35890-2018高通量测序数据序列格式规范[EB/OL]. (2018-02-06) [2018-03-02]. <http://c.gb688.cn/bzgk/gb/showGb?type=online&heno=3EE019B0135404CE790692FAF5E6A85E>.
- [53] 贾效伟, 宋艳双, 陆祖宏. 基于组学技术临床检验大数据研究的伦理问[J]. 中华医学科研管理杂志, 2016, (29): 11-13.
- [54] 毛舒燕, 梁婧文. 测序技术发展状况及相关专利分析[J]. 中国医药生物技术, 2015, 10(3): 271-285.
- [55] REGULATION (EU) 2017/746 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL. Official Journal of the European Union[EB/OL]. (2017-05-05) [2018-02-27]. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1527231006999&uri=CELEX:32017R0746>.
- [56] 刘东来, 石大伟, 张春涛. 美国对实验室研发诊断试剂的监管之路[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(3): 244-252.
- [57] Senate and House of Representatives of the United States of America in Congress: Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988[EB/OL]. [2018-03-05]. https://en.wikipedia.org/wiki/Clinical_Laboratory_Improvement_Amendments.
- [58] Senate and House of Representatives of the United States of America in Congress: Federal Food, Drug, and Cosmetic Act[EB/OL]. [2018-03-05]. https://en.wikipedia.org/wiki/Federal_Food,_Drug,_and_Cosmetic_Act.
- [59] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 国家卫生计生委办公厅关于临床检验项目管理有关问题的通知[EB/OL]. (2016-03-03) [2018-02-27]. <http://www.nhfp.gov.cn/yzygj/s7659/201603/4949119e603448bbb17db1db7ab6d363.shtml>.

(收稿日期 2018年4月4日 编辑 邹宇玲)