

低误差第二代测序技术应用于肿瘤研究和药物致突变性风险评价的进展

寇小旋^{1,2}, 耿兴超¹, 文海若^{1*} (1. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176; 2. 中国药科大学, 南京 210009)

摘要 目的: 探讨低误差第二代测序 (next-generation sequencing, NGS) 技术在肿瘤研究和药物致突变性评价领域的进展。方法: 通过查阅文献、收集资料等方法, 汇总近年来低误差NGS技术进展、优缺点以及在肿瘤研究和药物致突变性/致癌性评价的应用。结果: 传统的NGS技术的背景误差率较高, 限制其在低频率突变检测方面的应用。近年开发的多种低误差NGS技术 (即校正测序错误的NGS, error-corrected next-generation sequencing, ecNGS) 可将NGS的检测误差率降低至 10^{-7} ~ 10^{-4} 或甚至更低, 满足肿瘤临床监测和指导用药的需求。此外, HiFi-Seq和PECC-Seq等技术的最低误差率可降低至 10^{-8} , 可检出药物短期暴露导致的细胞/组织的超低频突变, 有助于在药物研发早期评估其致癌性风险。结论: ecNGS技术目前处于开发阶段, 尚未标准化, 且未在临床、毒理学、风险评估领域推广应用。然而, 该方法可直接检出肿瘤早期病变组织中的突变和药物诱导的组织/细胞突变, 有望取代或补充现有的致突变性试验方法, 纳入相关指导原则, 成为药物早期遗传毒性、致癌性筛查的金标准。

关键词: 第二代测序技术; 致突变性; 致癌性; 肿瘤研究; 超低频测序; 药品监管

中图分类号: R95; R991 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2024)07-0831-008

doi:10.16153/j.1002-7777.2024.07.013

Advances of the Low-Error Next-Generation Sequencing Technology Applied in Cancer Research and Drug Mutagenic Risk Evaluation

Kou Xiaoxuan^{1,2}, Geng Xingchao¹, Wen Hairuo^{1*} (1. National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of Beijing for Nonclinical Safety Evaluation Research of Drugs, Beijing 100176, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract Objective: To explore the advances of low-error next-generation sequencing (NGS) technology in cancer research and drug mutagenicity evaluation. **Methods:** The technical progress, advantages and disadvantages of low-error NGS and its application in cancer research and drug mutagenicity/carcinogenicity evaluation were summarized by reviewing literatures and collecting data in recent years. **Results:** The background error rate of traditional NGS technique is high, which limits its application in low frequency mutation detection. Several low-error NGS technologies developed in recent years (i.e., error-corrected next generation sequencing,

基金项目: 药品监管科学全国重点实验室课题“药品杂质遗传毒性评价新技术和生物标志物研究”(编号 2023SKLDRS0128)

作者简介: 寇小旋 E-mail: 1468021836@qq.com

通信作者: 文海若 E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

ecNGS) can reduce the error rate of NGS to 10^{-7} to 10^{-4} or even lower, meeting the needs of clinical tumor monitoring and drug regulation. In addition, the minimum error rate of ecNGS technologies such as HiFi-Seq and PECC-Seq can be reduced to 10^{-8} , which can detect ultra-low frequency mutations in cell/tissue caused by short-term exposure to drugs, helping to assess their carcinogenicity risk in the early stage of drug development.

Conclusion: The ecNGS technology is currently in the development stage, it has not been standardized, and has not been popularized in clinical, toxicology and risk assessment fields. However, these can directly detect drug-induced tissue/cell mutations and obtain the specific mutation spectrum of drugs, which can be an alternative or supplement method of the existing mutagenicity tests, incorporate relevant guidelines, and become the gold standard for early drug genetic toxicity and carcinogenicity screening.

Keywords: next-generation sequencing technology; mutagenicity; carcinogenicity; cancer research; ultra-low frequency sequencing; drug regulation

癌症的演变可分为启动、促癌和恶性进展3个阶段^[1]。其中,以基因突变、较大范围染色体损伤或重组形式出现的DNA损伤是可遗传效应的分子基础和导致恶性肿瘤发展演变的重要因素^[2]。在药物开展临床试验以前,申报人通常需要向药品监督管理部门提交遗传毒性研究资料,对药物潜在的致癌性风险加以评估,以保护临床研究受试人群的安全。在诸多与致癌性作用相关的评价终点中,致突变性作为肿瘤形成的重要分子基础,是重要的遗传毒性评价检测终点^[3]。

常规的体外致突变性试验包括细菌回复突变试验(Ames试验)、小鼠淋巴瘤细胞TK基因突变试验(mouse lymphoma assay, MLA)等。然而体外试验系统存在一定局限。例如,Ames试验不适用于评价有细菌毒性的受试物和纳米材料,细菌所特有的代谢活化体系也不适宜评价硝基咪唑类化合物。此外,对于N-亚硝基化合物等则需要在特殊代谢活化条件下才能得到阳性结果。而MLA假阳性率较高^[4]。使用正常动物开展的体内Pig-a基因突变试验是近年来步入安全评价领域并广受重视的致突变性评价方法^[5]。然而,该方法仅可检测发生于红细胞的基因突变^[6]。转基因动物试验虽然具有可检出暴露于受试物后肝、肾等不同靶组织的基因突变情况及突变谱的优势,但该方法使用的动物模型难以获取且后期检测所用试剂费用高昂,在我国罕有相关应用报道^[5]。以上所有常规的致突变性评价方法均以表型的改变(菌落、克隆的增加或细胞表面抗原改变等)作为突变发生的观察指标,并非直接考察药物对基因序列引起的改变,结果可能存在

偏倚。

DNA测序技术(DNA sequencing technology)是分子生物学发展历程中的重要里程碑。该方法可较为真实、准确地反映基因组DNA上的遗传信息,使我们获得微生物、植物、动物及人类的全基因组序列^[7]。然而第一代DNA测序技术(Sanger法)成本较高且操作繁琐,通量低,无法满足大规模测序的应用^[8]。因此,在临床上仅适于检测少量的、致病基因位点明确的单基因遗传病。

随着生物信息学的突飞猛进,第二代测序技术(又称下一代测序技术,next-generation sequencing, NGS)应运而生,该方法以聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)和基因芯片技术为基础,可在大规模并行测序的过程中同时执行数百万到数十亿个单独的测序反应^[7]。然而,因常规的NGS错误率较高,难以有效测出基因组上发生的早期超低频突变,需开发更为精准的测序方法以识别药物引起的突变率改变。当前国内外均已开发低误差NGS技术。Francesco等^[9]指出,该方法的应用前景广阔,有望作为监管方法纳入药物安全性评价与监管相关技术指导原则。本文综述现有可用于肿瘤研究和药物致突变性/致癌性风险评估的NGS的技术原理,分析其优势、缺陷以及应用进展,为低误差NGS技术在肿瘤监测、指导临床用药、药物研发与杂质监管领域的应用提供参考。

1 常规NGS技术

第一代测序技术的建立以Sanger法为基础,电泳过程是限制第一代测序技术检测通量的瓶颈^[10]。经过不断改进,以Roche公司的454焦磷酸测序技

术、Illumina公司的Solexa聚合酶合成测序技术及HiSeq技术和ABI公司的Solid连接酶测序技术为标志的NGS技术陆续诞生^[11]。以Illumina平台为例，NGS的原理可以概括为“边合成边测序”。在这一过程中，DNA链被断裂成小片段，然后通过酶促合成反应，将这些小片段重新组装成完整的DNA链。在这一过程中，测序仪捕捉合成过程中产生的信号，并据此推算出DNA序列（图1）。NGS与一代测序检测结果高度一致，但在检测时间和检测通量方面优势突出^[11]，在全基因组测序、全外显子组测序、宏

基因组测序等领域应用广泛^[12]。

尽管具有以上优点，常规NGS经PCR扩增后得到的DNA片段的数目比例可能发生变异，且PCR扩增会引入碱基错配和序列的偏好性，导致DNA片段在扩增后的相对频率和丰度发生变化，NGS平台较短的读长对生物信息学分析也十分不利^[13]。基于上述因素，常规NGS技术的误差率约为 $10^{-4} \sim 10^{-2}$ 。人体的背景突变频率仅为 $10^{-9} \sim 10^{-7}$ ，因此，常规NGS技术无法有效检出肿瘤导致的或由于药物短期暴露诱发的超低频突变。

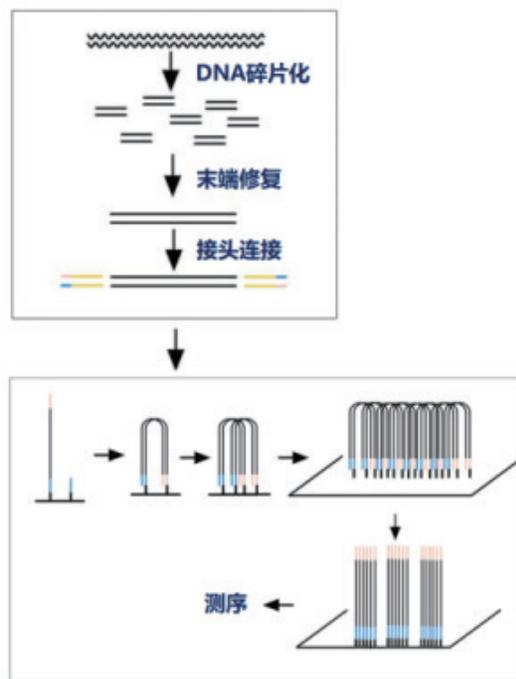


图1 NGS技术原理

2 超低频突变检测技术及在肿瘤研究中的应用

鉴于常规NGS技术的缺陷，研究人员采用多种策略来降低NGS的误差率，从而开发了低误差NGS技术（即校正测序错误的NGS，error-corrected next generation sequencing，ecNGS）。目前，分子一致性测序策略是公认最有效的可降低NGS测序误差率的方法。近年来，已报道的ecNGS包括纳米孔测序（nanopore sequencing）、单分子实时测序（single molecule real-time sequencing，SMRT）、Duplex测序等，可将NGS的检测误差率降低至 $10^{-7} \sim 10^{-4}$ ，甚至更低，从而满足肿瘤临床监测和指

导用药的需求^[14]。与传统的NGS相比，ecNGS的数据质量、测序深度和准确性均有显著提升，作为更为精准的研究工具，在人类肿瘤风险评估领域中的应用日益受到关注。

2.1 纳米孔测序技术

纳米孔测序技术是一项革命性创新。纳米孔是由 α -溶血素的膜穿透蛋白制成的，且只允许单分子DNA通过的小孔。当不同DNA碱基通过纳米孔时，可以不同方式影响通过纳米孔的离子流动，从而在膜的两侧产生不断变化的电信号，后者可被传感器检测到并转化为可读的测序数据^[15-16]。该技术最大的优势是可产生超长读长，序列中出现频率最

高的序列的测序长度可达100 kb以上。此外,该技术还具有直接测序、简单便携和费用低的优点。它通过接头连接同一DNA分子的两条单链,一次测序即可获得两次结果,将错误率降低至5%以下^[16-17]。当前纳米孔测序已用于识别多种癌症(包括白血病、乳腺癌、结肠癌、胰腺癌、脑癌等)的复杂的基因组变异。例如Minervini等^[18]分别用Sanger测序和纳米孔测序鉴定了12例慢性淋巴细胞白血病患者中的TP53突变类型,结果显示,Sanger测序检出其中4人携带TP53突变基因,而纳米孔测序则发现了一个以前未在Sanger测序发现的突变患者,被证明为检测TP53基因突变的有效工具^[18]。

2.2 SMRT

SMRT是由Pacific Biosciences (PacBio)平台推出的可实时监测单个DNA分子的复制过程并直接读取其序列信息的测序技术。该技术主要应用作为测序载体的SMRT Cell芯片和制备好的SMRT-bell文库进行单分子序列结构的测定。其中SMRT-bell文库主要通过将待测DNA片段化,从而形成紧闭的环状单链模板^[19]。每张测序芯片上排列有15万个直径为70纳米的测序微孔(zero model waveguides, ZMWs),每个微孔底部含有DNA合成酶,测序时每孔内至多含一条DNA分子,边合成边测序,平均测序长度为15~20 kb。该技术通过滚环复制对同一条DNA分子多次测序,从而将错误率降低至1%以下。SMRT可检测多种类型的结构变异,在检测长度为50~2000 bp的变异时优势明显^[20]。但在单个分子水平上进行测序的准确率仍有提升空间,且检测通量低于基于罗氏454和Illumina平台的测序技术^[19]。SMRT已应用于癌症诊断。例如Choy等^[21]选取15名健康对照者、13名肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者和13名慢性乙型肝炎病毒感染患者,使用SMRT技术对血浆中的cfDNA(cell free DNA)分子进行测序,分析cfDNA分子的大小分布,并鉴定出癌症患者血浆中cfDNA分子的存在。通过分析每个分子的直接甲基化情况,开发出HCC甲基化评分用于区分癌症患者和非癌症患者。在HCC患者、乙型肝炎病毒携带者和健康个体中,血浆中很大一部分的DNA长度超过1 kb,其中最长的分子为39.8 kb;肿瘤的cfDNA通常比非肿瘤的cfDNA短,与非肿瘤cfDNA相比,肿瘤cfDNA的甲基化水平较低;与单独使用短片段相比,使用长分

子极大地增强了癌症检测的鉴别能力。该研究为基于长cfDNA分子的癌症诊断开启了新的可能性。

2.3 Duplex测序

为克服测序精度的限制,美国华盛顿大学医学院研究了一种双工测序法——Duplex测序。该方法对DNA双链中的每一条均独立标记和测序^[22],极大地减少了测序误差。其原理为将单链随机核苷酸序列引入一条接头链,然后用DNA聚合酶延伸另一条链,产生互补的双链标签,随后对DNA分子两条链的拷贝进行测序,以消除测序错误(存在于单个读数中)和PCR错误(存在于两条链之一的拷贝中)^[23]。Duplex测序可将背景突变频率控制在 10^{-7} 以下,并可直接评估人细胞线粒体DNA随机突变的频率和模式。然而,该方法仅适用于小型基因组或靶向特定基因组,而且效率低,成本相对较高^[22,24]。

Duplex测序已用于检测临床样本的低频率突变。例如,治疗前肿瘤患者的肿瘤组织中变异等位基因频率(variant allele frequency, VAF)为 5×10^{-8} 且均与耐药性无关,但有一半的患者在肿瘤复发前5个月可检出与酪氨酸激酶抑制剂耐药性相关的突变。可见测序结果对治疗药物的选择有重要的指导性意义,有助于评估患者对靶向治疗的反应^[25]。

2.4 瓶颈测序系统

瓶颈测序系统(bottleneck sequencing system, BotSeqS)是一种同时量化线粒体和核基因组中罕见体细胞点突变的NGS。BotSeqS对整个基因组的覆盖率较低,在PCR扩增前对测序文库进行稀释。通过降低单位体积内的DNA序列数量而产生测序瓶颈,增加DNA双链被冗余测序(即,使每个原始DNA分子被读取足够次数)的可能性,并增加随机性、减少测序量。在传统文库中,罕见突变序列通常会被大量野生型序列所掩盖。在BotSeqS的文库中,这些罕见突变在相应的基因组位置上占据了更多的信号^[26],有助于量化正常组织中罕见的体细胞突变^[27]。BotSeqS技术的背景突变频率可达 10^{-7} 以下,适用于大型基因组和全基因组测序^[26]。Hoang等^[26]采用BotSeqS技术对正常人体组织中的基因组进行高通量测序和数据分析,实现了对罕见体细胞突变的定量分析。研究结果证明正常人体组织中的体细胞突变负荷与生物和环境因素有关,变化范围

可涵盖几个数量级。该研究也揭示了正常组织中线粒体的突变模式和核基因组之间的主要差异。结果也揭示了尽管正常组织的突变谱各不相同，但与癌变组织的突变谱相似。这项技术有助于深入了解正常组织中基因改变的数量和性质，并可用于解决有关患病组织基因组的各种基本问题。

2.5 Nanorate测序

Nanorate测序 (NanoSeq) 也是一种双工测序方案，该技术主要用限制性内切酶片段代替超声和末端修复这些可能导致高误差的因素，并引入非A双脱氧核苷酸 (ddBTPs) [28]。NanoSeq可将在细胞群体的单个DNA分子中每10亿碱基对的错误控制在5个之内，比典型突变率低2个数量级[29]，足以评估所有人体组织中DNA突变情况。双重测序的理论误差率为每个碱基对的误差 (即两条链上出现2个早期和互补PCR错误的概率) 不超过 10^{-9} 个。该比率低于人体组织的典型突变负荷，使得在任何组织中独立克隆的体细胞突变研究成为可能。NanoSeq的背景突变频率在 10^{-8} 以下，灵敏的同时优化了重复率，提高了效率[28]。Sanger研究团队使用该技术研究了不同组织中非分裂细胞的体细胞突变，并对干细胞和分化细胞进行比较。结果发现，在血液和结肠中分裂较慢和分裂较快的干细胞的突变数量相似[28]。很少分裂的肌肉细胞和非分裂的神经元细胞的测序分析表明，它们具有与血细胞相同的突变速率和模式。这提示导致体细胞基因突变的主要过程不是细胞分裂，独立于细胞分裂的突变过程是体细胞诱变的重要原因。此外，NanoSeq也可用于体外突变剂的筛选。该方法无需分离单细胞即可进行检测，将细胞模型暴露于不同的致突变剂后，可在整个基因组和时间内定量检测细胞的突变情况，而不需要单细胞检测[28]。

2.6 CarcSeq技术

CarcSeq技术通过独特的分子标识序列来构建单链一致性序列，从而实现纠错和低误差测序[30]，用于定量检测突变分数大于 10^{-4} 的热点癌症驱动突变 (cancer driver mutations, CDMs)。Faske等[28]连续12或24周经口给予雌性Sprague Dawley大鼠0、30或100 mg·kg⁻¹氯卡色林，并采用超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定氯卡色林和N-亚硝基氯卡色林在受试物制剂、血浆和肝脏样品中的含量。尽管大鼠的血液和肝脏中未检出N-亚硝基氯卡

林，CarcSeq检测结果发现氯卡色林可导致大鼠乳腺DNA中*Pik3ca H1047R*突变 (该突变可以在正常组织中检测到，是人类乳腺癌中最常见的突变类型之一) 增加，且变化具有剂量效应相关性。氯卡色林本身为非遗传毒性致癌物，且正常大鼠和人乳腺组织中也存在*Pik3ca H1047R*突变。因此，上述结果提示氯卡色林可通过促进*Pik3ca H1047R*自发突变克隆增殖诱导乳腺癌的发生。该研究首次证明，CarcSeq可灵敏地识别非遗传毒性致癌物的致癌性风险，且所需时间短于检测肿瘤效应所需时间。可见，CarcSeq在人类癌症风险评估中具有一定优势，可应用于遗传毒性杂质的监管中。将该技术与短期传统啮齿动物试验整合，更可在减少动物使用的同时提供致癌性风险评估数据[30]。

3 NGS在致突变性评价中的应用

近年来，已有将超低频测序技术应用于药物致突变性风险评价中的应用实例。例如PacBio公司在SMRT的基础上最新开发的HiFi-Seq (high-fidelity sequencing) 测序技术。与仅能识别改变报告基因表型的突变分析方法的传统方法不同，HiFi-Seq几乎可以检测来自任何DNA区域的所有替代突变，灵敏度可达 10^{-8} 。该技术通过对环状分子的DNA链进行重复测序，可产生几乎准确无误的共识读数，准确度高达99%。Miranda等[31]使用HiFi-Seq评估莫诺拉韦 (molnupiravir, MOV) 对大肠杆菌的致突变性作用，及MOV和N4-羟基胞苷 (N4-hydroxycytidine, NHC) 在小鼠淋巴瘤L5178Y细胞和人淋巴母细胞TK6细胞中的致突变性作用。结果提示，MOV和NHC具有相同的致突变性作用机制，且该机制在不同的哺乳动物细胞类型中都存在。可见，HiFi-Seq检测全基因组超低频替代突变的技术可以应用于药物致突变风险预测问题中。

此外，国内栾洋课题组[32]自主开发了一种分子一致性测序技术 (pair-end and complementary consensus sequencing, PECC-Seq)。为提高NGS在超低频突变检测中的准确性和成本效益，PECC-Seq采用了一种简单的不需要进行PCR的测序工作流程，并利用双链DNA中缩短的成对末端的重叠和互补链的信息来提高全基因组测序数据的共识建立效率[32]。该技术通过调整超声条件、超声缓冲液、对文库制备中由超声引起损伤的单链进行末端修复等方法，将测序错误率低至 10^{-8} 以下[33]。人

淋巴瘤细胞TK6细胞分别经DMSO（溶剂对照）、 $6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 甲磺酸甲酯（methyl methanesulfonate, MMS）或 $12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ *N*-亚硝基-*N*-乙基脲（*N*-Nitroso-*N*-ethylurea, ENU）处理4 h后，提取细胞基因组DNA并进行PECC-Seq分析。结果显示，DMSO、MMS和ENU处理的TK6突变频率分别为 0.76×10^{-6} 、 1.14×10^{-6} 和 2.85×10^{-6} ，比单核苷酸变异（single nucleotide variants, SNV）的频率低2个数量级，提示PECC-Seq可以有效地将背景误差频率由 10^{-3} 降低至 10^{-7} ~ 10^{-6} ，PECC-Seq在检测全基因组超低频突变方面有很大的潜力^[32]。栾洋课题组进一步使用当前评价药物致突变性的金标准——*gpt* delta转基因小鼠基因突变试验与之进行比较，发现PECC-Seq在定量测定马兜铃酸I（aristolochic acids I, AAI）诱导的剂量依赖性突变中具有较高的敏感性。此外，PECC-Seq可特异地阐释AAI、苯并[a]芘（Benzo[a]pyrene）、ENU

和*N*-亚硝基二乙胺（*N*-Nitroso-*N*-ethylurea and *N*-nitrosodiethylamine）的不同全基因组突变特征，并揭示了喹啉在普通小鼠模型中的突变特征。上述结果证明了PECC-Seq在检测致突变剂诱导的全基因组体细胞突变方面具有很高的敏感性和特异性，展示了PECC-Seq可作为体细胞诱变定量和体内致突变性检测的可靠的新工具^[33]。

4 小结

NGS可实现单次完成几十万到几百万条DNA分子的测序，性价比高^[34]。近年来，已报道多种ecNGS致突变性评价的方法，并在临床肿瘤监管、指导用药、药物监管方面取得一定进展，有望成为监管毒理学的新锐力量。本文综述了低误差二代测序技术的进展，包括二代测序方法的技术原理、优点和缺点及其在癌症风险评估和药物致突变性风险评价中的应用（表1），为相关技术研发提供参考。

表1 不同NGS应用于药物致突变性/致癌性检测的优、缺点

NGS类型	适用范围	优点	缺点	应用领域	误差率
Nanopore ^[15-16]	大型基因组和全基因组	读长达900kb;直接测序,节省时间和成本;灵活便携;单分子测序	错误率较高	癌症诊断;药物研发;微生物学	3%~5%
SMRT ^[19-20,35]	全基因组	平均读长达10~15kb;测序速度快;直接测序	错误率较高	癌症诊断;药物研发	3%~15%
DupSeq ^[22-24]	小型基因组或靶向特定基因组	错误率低	拷贝数量大,测序效率低;测序深度高,成本高;不适用于大型基因组	癌症风险评估;癌症诊断;健康风险监测与疾病预防	$\sim 10^{-7}$
BotSeqS ^[26-27]	大型基因组和全基因组	错误率低	测序深度高,成本高;拷贝数量大,成本高	癌症风险评估;基因组学	$\sim 5.2 \times 10^{-7}$
NanoSeq ^[28-29]	大型基因组	测序效率高;错误率低	基因组位点在偏倚,覆盖度小于30%	癌症风险评估;药物致突变性评价;健康风险监测与疾病预防	$\sim 5 \times 10^{-9}$
HiFi-Seq ^[31]	全基因组	平均读长达17kb;高准确性;基因组覆盖均一	测序较为复杂;对酶试剂和建库过程的均一性要求较高	检测基因组变异;癌症风险评估;药物致突变性评价;微生物学	$\sim 10^{-8}$
CareSeq ^[30]	突变分数大于 10^{-4} 的热点癌症驱动突变	检测速度快	在短期重复剂量的啮齿动物研究中的灵敏性有待证明	癌症风险评估;遗传毒理学	10^{-4} ~ 10^{-5}

续表 1

NGS类型	适用范围	优点	缺点	应用领域	误差率
PECC-Seq ^[32-33]	大型基因组和全基因组	错误率低；测序效率高，成本低	无法获得基因的突变特征	替代经典体内致突变试验；基因编辑工具的脱靶效应；健康风险监测与疾病预防；药物致突变性评价	$\sim 3.7 \times 10^{-8}$

ecNGS技术目前处于开发阶段，尚未标准化，且未在临床、毒理学、风险评估领域推广应用。然而，该方法可直接检出肿瘤早期病变组织中的突变和药物诱导的组织/细胞突变，有望取代或补充现有的致突变性试验方法，纳入相关指导原则，成为药物早期遗传毒性、致癌性筛查的金标准，纳入ICH S1/S1B (R1)《药物致癌性试验指导原则》和常规毒理学研究^[14]。

参考文献：

[1] 韩苏夏, 蔡梦娇. 自噬在肿瘤治疗策略中的角色[J]. 西部医学, 2018, 30 (9): 1249-1251, 1256.

[2] 黄芳华. ICH遗传毒性结果评价和追加试验策略指导原则介绍——ICH S2 (R1) 人用药物遗传毒性试验和结果分析指导原则介绍 (二) [J]. 药物评价研究, 2009, 32 (2): 81-83.

[3] 文海若, 兰洁, 叶倩, 等. 天然药物成分致突变性风险预测与评价方法研究进展[J]. 药物评价研究, 2022, 45 (7): 1221-1226.

[4] 郭雅娟, 王雪, 淡墨, 等. 生物医用纳米材料的遗传毒性及其致毒机制研究进展[J]. 药物分析杂志, 2018, 38 (1): 50-55.

[5] 王亚楠, 文海若, 王雪. 遗传毒性基因突变评价方法的研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2019, 31 (5): 406-411.

[6] 文海若, 叶倩, 于敏, 等. 杂质遗传毒性评价与研究方法[J]. 中国药物评价, 2021, 38 (5): 365-370.

[7] 魏晓峰, 李波廷, 廖晨希, 等. 测序技术在葡萄酒研究中的应用[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2021 (1): 56-60.

[8] 董天宇. DNA测序技术[J]. 当代化工研究, 2018 (11): 71-73.

[9] Marchetti F, Cardoso R, Chen CL, et al. Error-corrected

Next-generation Sequencing to Advance Nonclinical Genotoxicity and Carcinogenicity Testing[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2023, 22 (3): 165-166.

[10] 谢浩, 赵明, 胡志迪, 等. DNA测序技术方法研究及其进展[J]. 生命的化学, 2015, 35 (6): 811-816.

[11] 李妍, 徐兴祥. 第二代测序技术在实体瘤诊治方面的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26 (24): 4035-4042.

[12] 赵熙萌, 张燕香, 马同辉, 等. 下一代测序技术在癌症诊疗中的应用及研究进展[J]. 药学进展, 2023, 47 (6): 404-416.

[13] 张国林, 景荣先, 刘昆梅, 等. 新一代测序技术进展及其在药品质量控制中应用和发展趋势[J]. 药物分析杂志, 2021, 41 (1): 1-12.

[14] Marchetti F, Cardoso R, Chen CL, et al. Error-corrected Next Generation Sequencing—Promises and Challenges for Genotoxicity and Cancer Risk Assessment[J]. Mutation Research, 2023, 792: 108466.

[15] 庄子, 孟雨桐, 刘润旸, 等. 纳米孔测序技术及其在病原学诊断中的应用进展[J]. 江苏大学学报 (医学版), 2023, 33 (6): 502-508.

[16] Jain M, Olsen HE, Paten B, et al. The Oxford Nanopore MinION: Delivery of Nanopore Sequencing to the Genomics Community[J]. Genome Biology, 2016, 17 (1): 239.

[17] Ho SS, Urban AE, Mills RE. Structural Variation in the Sequencing Era[J]. Nature Reviews Genetics, 2020, 21 (3): 171-189.

[18] Wang Y, Zhao Y, Bollas A, et al. Nanopore Sequencing Technology, Bioinformatics and Applications[J]. Nature Biotechnology, 2021, 39 (11): 1348-1365.

[19] 刘梦, 庄蕾, 余忠祥, 等. 单分子测序技术 (SMRT) 在微生物研究领域中的应用[J]. 科技与创新, 2022 (14): 166-170.

- [20] Audano PA, Sulovari A, Graves-lindsay TA, et al. Characterizing the Major Structural Variant Alleles of the Human Genome[J]. *Cell*, 2019, 176 (3) : 663-675.
- [21] Choy LYL, Peng W, Jiang P, et al. Single-molecule Sequencing Enables Long Cell-free DNA Detection and Direct Methylation Analysis for Cancer Patients[J]. *Clinical Chemistry*, 2022, 68 (9) : 1151-1163.
- [22] Schmitt MW, Kennedy SR, Salk JJ, et al. Detection of Ultra-rare Mutations by Next-generation Sequencing[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109 (36) : 14508-14513.
- [23] 王建华, 严智昌. 多发性骨髓瘤微小残留病及其检测方法[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18 (58) : 79-81.
- [24] Salk JJ, Schmitt MW, Loeb LA. Enhancing the Accuracy of Next-generation Sequencing for Detecting Rare and Subclonal Mutations[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2018, 19 (5) : 269-285.
- [25] Menon V, Brash DE. Next-generation Sequencing Methodologies to Detect Low-frequency Mutations: “Catch me if you can” [J]. *Mutation Research: Reviews in Mutation Research*, 2023, 792: 108471.
- [26] Hoang ML, Kinde I, Tomasetti C, et al. Genome-wide Quantification of Rare Somatic Mutations in Normal Human Tissues Using Massively Parallel Sequencing[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113 (35) : 9846-9851.
- [27] Mitiushkina NV, Yanus GA, Kuligina ESh, et al. Preparation of Duplex Sequencing Libraries for Archival Paraffin-embedded Tissue Samples Using Single-strand-specific Nuclease P1[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23 (9) : 4586.
- [28] Abascal F, Harvey LMR, Mitchell E, et al. Somatic Mutation Landscapes at Single-molecule Resolution[J]. *Nature*, 2021, 593 (7859) : 405-410.
- [29] American Association for Cancer Research. Sequencing Tool Sheds New Light on Somatic Mutations[J]. *Cancer Discovery*, 2021, 11 (7) . <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-NB2021-0349>.
- [30] Harris KL, Walia V, Gong B, et al. Quantification of Cancer Driver Mutations in Human Breast and Lung DNA Using Targeted, Error-corrected CarcSeq[J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2020, 61 (9) : 872-889.
- [31] Miranda JA, Mckinzie PB, Dobrovolsky VN, et al. Evaluation of the Mutagenic Effects of Molnupiravir and N4 - hydroxycytidine in Bacterial and Mammalian Cells by HiFi Sequencing[J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2022, 63 (7) : 320-328.
- [32] You X, Thirupathi S, Liu W, et al. Detection of Genome-wide Low-frequency Mutations with Paired-end and Complementary Consensus Sequencing (PECC-Seq) Revealed End-repair Derived Artifacts as Residual Errors[J]. *Archives of toxicology*, 2020, 94 (10) : 3475-3485.
- [33] You X, Cao Y, Suzuki T, et al. Genome-wide Direct Quantification of in Vivo Mutagenesis Using High-accuracy Paired-end and Complementary Consensus Sequencing[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51 (21) : e109.
- [34] 王海. 高通量测序技术新名词的理解和辨析[J]. *中国科技术语*, 2017, 19 (4) : 51-54.
- [35] 盛杰, 王玉欣, 齐江发, 等. 单分子测序技术在肿瘤诊断中的应用研究进展[J]. *生物工程学报*, 2020, 36 (2) : 180-188.

(收稿日期 2024年3月5日 编辑 郑丽娥)