

综述

转录组测序在孟德尔遗传病临床诊断中的应用进展

肖慧 周文浩

(1. 复旦大学附属儿科医院新生儿科, 上海 201102; 2. 上海市出生缺陷防治重点实验室 / 复旦大学儿童发育与疾病转化医学研究中心 / 卫生部新生儿疾病重点实验室 / 复旦大学附属儿科医院, 上海 201102)

[摘要] 目前常用基因 panel 和全外显子组测序 (whole exome sequencing) 检测孟德尔遗传病, 但 DNA 测序诊断率仅 35%~50%。近年来, 转录组测序 (RNA sequencing) 这一技术不断发展, 不仅具有检测新致病变异、分析等位基因特异性表达等优势, 有望促进了解疾病基因型与表型的关系, 还可与基因组测序优势互补, 拓展孟德尔遗传病传统的基因组的诊断手段, 有望成为诊断孟德尔遗传病的常规工具。该文对转录组测序在孟德尔遗传病临床诊断中的应用进展进行综述。 [中国当代儿科杂志, 2020, 22(10): 1138-1142]

[关键词] 孟德尔遗传病; 转录组测序; 突变

Application of RNA sequencing in clinical diagnosis of Mendelian disease

XIAO Hui, ZHOU Wen-Hao. Department of Neonatology, Children's Hospital, Fudan University, Shanghai 201102, China (Zhou W-H, Email: zhouwenhao@fudan.edu.cn)

Abstract: Gene panel and whole exome sequencing are now commonly used to detect Mendelian disease, but the current molecular diagnostic rate of DNA sequencing is only 35%-50%. In recent years, RNA sequencing emerges as a promising diagnostic method. It can detect new pathogenic mutations, and analyze allele-specific expression. This will be helpful to understand the relationship between disease genotype and phenotype, and can complement genome sequencing in order to expand the traditional genomic diagnostic methods of Mendelian disease. RNA sequencing is expected to become a routine tool for diagnosing Mendelian diseases. This article reviews the application of RNA sequencing in the clinical diagnosis of Mendelian disease. [Chin J Contemp Pediatr, 2020, 22(10): 1138-1142]

Key words: Mendelian disease; RNA sequencing; Mutation

遗传病按遗传方式可分为单基因病、多基因病、线粒体病和染色体病。单基因遗传病即孟德尔遗传病, 是由一对等位基因控制的疾病。自2005年起, 第二代基因组测序技术已成为现代检测孟德尔遗传疾病的主要方式, 包括全基因组测序 (whole genome sequencing, WGS)、全外显子组测序 (whole exome sequencing, WES)、靶向目的基因测序等。

鉴于有 85% 的引起孟德尔遗传病的变异位于外显子区域, 目前基因 panel 和 WES 分析是检测孟德尔遗传病的标准方法^[1-2], 但 WES 无法检测结构变异和外显子区域之外的大部分致病变异^[2],

DNA 测序诊断准确率仅有 35%~50%^[3-7]。同时, WES 仅针对编码区检测, 在对基因组 DNA 进行大规模平行测序之前, 需进行外显子富集, 大大增加其成本^[8]。WGS 作为另一种诊断技术, 可检测外显子区外变异, 且在检测结构变异和拷贝数变异方面更可靠^[9-12], 但成本较高昂, 分析工作量较大, 无法对超过 300 万个单核苷酸突变 (single nucleotide variants) 的样品进行精准数据分析, 临床应用范围小于 WES^[13-15]。

此外, 值得注意的是, 9%~30% 的非编码区突变可通过影响 RNA 的加工和表达引发疾病^[16]。因此, 非编码区及影响 RNA 剪接和表达的编码

[收稿日期] 2020-05-01; [接受日期] 2020-07-14

[作者简介] 肖慧, 女, 博士研究生。

[通信作者] 周文浩, 男, 主任医师。Email: zhouwenhao@fudan.edu.cn。

区的突变位点变化通常需要在RNA水平上进行额外的功能研究^[17-18]。目前基于二代测序技术的RNA水平疾病研究方法包括：转录组测序（RNA sequencing, RNA-seq）、数字基因表达谱测序和小RNA测序等。其中RNA-seq在研究真核生物基因表达调控、癌症的发生机制和治疗策略、生物遗传育种等方面有较大潜力，已广泛应用于遗传学和生物医学领域中^[19]，近5年在PubMed上发表的相关文章已超过13000篇，且有多篇文章报道了利用RNA-seq进行疾病诊断。本文对近几年RNA-seq在孟德尔遗传病临床诊断中的应用进展进行综述。

1 RNA-seq 原理及优势

转录组是连接遗传信息与生物功能的桥梁，在广义上指在相同生理条件下的一个或一群细胞中所能转录出的所有RNA的总和，包括编码RNA及非编码RNA；狭义上指所有mRNA的集合。RNA-seq通过提取所要研究的mRNA，将其反转录成cDNA文库，在DNA小片段两端加上接头，利用高通量测序技术统计相关小片段数计算出不同mRNA的表达量，精确地识别可变剪切位点及编码序列单核苷酸多态性，获得某一物种特定组织或器官在某一状态下几乎所有转录本的序列信息^[20]，现已成为衡量RNA水平和定量转录本多样性的金标准。

WES、RNA-seq均可检测编码区域内的变异^[21]，而使用RNA-seq无需进行外显子富集步骤，比WES更具成本效益^[22]。在检测致病的非编码变异方面，RNA-seq可关注一小组异常基因及其调控元件，比仅使用基于DNA测序数据的研究更具优势^[23]。此外，RNA-seq还具有WES不能取代的转录本表达水平分析、替代剪接模式研究、融合转录本的检测、等位基因特异性表达分析等功能^[24]。综合以上优势，有学者认为RNA-seq有望替代WES，成为诊断单基因病的诊断方法^[22,25]。

2 RNA-seq 在检测致病突变中的应用

RNA-seq可检测编码和非编码变异对基因表达水平和选择性剪接的影响，在诊断罕见遗传病方面前景可观。2017年Cummings等^[26]发表了关

于利用RNA-seq对孟德尔遗传病行基因诊断的队列研究，首次阐释RNA-seq在孟德尔遗传病临床诊断中具有重要意义。该研究以初发肌肉疾病为模型，收集63个被认为可能具单基因突变的肌肉疾病样品进行RNA-seq，与基因型-组织表达（genotype-tissue expression, GTEx）数据库中正常肌肉的表达谱进行比较分析，验证13个患者中已通过基因组分析找到致病变异；在剩余的50个未明确致病变异的患者中，进一步鉴定出了17个患者的致病变异，检出率高达35%，并新鉴定出一导致严重的肌营养不良的COL6A1变异。研究结果显示传统的WGS、WES等DNA检测在剪接异常导致蛋白功能缺陷这一类变异的检测中可能会有大量的漏检，而对病变组织进行RNA测序能发现孟德尔遗传病潜在致病突变。因此，RNA-seq不仅可对前期DNA测序结果进行功能验证，还能直接作为诊断工具鉴定DNA测序中未能鉴定出的剪接变异，表明其在诊断孟德尔遗传病方面具有可行性。

在上述研究的基础上，近年来应用RNA-seq进行孟德尔遗传病致病基因的研究逐步增加，且RNA-seq在WES无法确诊的孟德尔遗传性肌肉疾病中有许多成功案例。杆状体肌病是一种常染色体显性或隐性遗传的肌病，病理特点为肌细胞胞浆中出现杆状体，常见致病基因有TPM3、NEB、ACTA1等。2019年Hamanaka等^[27]利用RNA-seq分析出6例WES未能诊断的杆状体肌病病例中存在异常剪接事件，加以Sanger测序进一步分析，鉴定出NEB基因中的一种新发突变c.1569+339A>G及其同义突变c.24684G>C。2019年Gonorazky等^[28]进一步选择29个家族共70例遗传性神经肌肉疾病患者，从肌肉活组织、成纤维细胞和t-肌管中提取总RNA进行RNA-seq。将其中先前经基因panel或WES鉴定为阴性病例的25个家族中的个体转录组数据与从GTEx数据库获得的对照转录组数据进行比较分析，新检测出36%（9/25）病例，并在编码和非编码区域中鉴定出致病突变，突变的病理机制为转录抑制、外显子跳跃和内含子保留等可变剪切事件。以上两项研究进一步表明，应用RNA-seq可有效检测异常剪接及其相关变异，有助于提高以前未诊断的大部分神经肌肉疾病的确诊率，可作为假阴性孟德尔遗传病临床诊断的

补充。

在识别罕见孟德尔遗传病致病基因方面, 2019年Frésard等^[29]发现血液转录组分析在罕见病的遗传诊断上有较大的适用潜力。使用RNA-seq检测目前人类孟德尔遗传数据库(Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM)数据库中已知的主要罕见病致病基因在血液中的表达情况, 发现70.6%的基因和50%的RNA剪接事件都可在血液转录组中获得相关信息, 证实许多已知的罕见病基因在血液中表达, 整合血液样本的转录组数据有助于提高罕见病患者的诊断率。前期研究人员采集94名罕见病患者的全血样本, 其中80例患者的致病基因无法通过DNA检测确诊, 将所有患者的血液转录组数据与49名正常家庭成员及来自多个数据库中的1594例正常个体的数据进行对照, 发现每个罕见病样本中平均存在343个异常表达的基因, 540个剪接异常的基因, 94个与疾病相关的等位基因特异性表达事件。通过表达、剪接和等位基因特异性表达等参数相结合逐步缩小候选基因, 研究团队最终新检测出6个原未确诊病例的致病基因, 并筛选出5个无法确诊病例中与罕见病表型相关的候选基因, 为后续诊断提供依据。致病突变通常发生在广谱表达的基因上, 血液样本的获取也相对容易, 该研究结果提示除选用肌肉组织之外, 应用血液转录组进行测序不失为一种简便快捷的方法, 不仅扩展了RNA测序的应用范围, 还可极大地简化和推动罕见遗传病的诊疗。

3 RNA-seq 结合 WGS 提高诊断能力

随着第二代测序技术和新统计推算方法的不断完善, 遗传病研究也呈现出双组学及多组学发展趋势。基因组学结合转录组学的研究策略可在DNA层面发现疾病特异性突变, 筛选出突变候选基因, 在RNA层面分析基因转录水平表达差异和调控机制、关键基因在通路的富集情况等, 多层次的分析方法将基因组和转录组紧密联系, 进而利于识别新变异和罕见的非编码区变异, 已在确定致病靶点、疾病机制研究等多方面成功应用, 提高基因组测序的诊断效率。

Starokadomskyy等^[30]应用WGS和RNA-seq

探索X连锁的网状色素异常(X-linked reticulate pigmentary disorder, XLPDR)遗传致病源, 揭示了POLAI基因突变引起XLPDR的原理。XLPDR是一种罕见的具有自发炎症特性的原发免疫缺陷, 研究选取12个XLPDR家系中4例患者, 采用WGS测序分析发现4例患病样本的POLAI内含子区存在突变; 进一步应用RNA-seq并比较患病个体与正常个体细胞系转录组分析结果, 发现患者个体细胞中许多编码I型干扰素调节因子、信号通路和NF- κ B的基因表达上调, 表明POLAI突变激活干扰素调节因子和NF- κ B依赖基因, 进而激活I型干扰素。最后通过细胞功能学并结合DNA及RNA分析结果解释出POLAI内含子突变影响DNA聚合酶 α , 促进I型干扰素的产生, POLAI蛋白和I型干扰素共同影响RNA:DNA综合体合成, 引起XLPDR疾病表型的致病机制。该研究展示整合RNA-seq和WGS分析遗传病发生的多个连续事件, 深入挖掘候选致病因子的优势, 有助于认识疾病表型的遗传基础和分子机制。

对于常规检测致病突变为阴性的遗传病家族, 结合RNA-seq与WGS是一种减少突变检测遗漏的有效策略。Nieminen等^[31]结合血液RNA-seq和WGS进行测序, 发现和验证了传统筛选方法经常遗漏的假外显子。家族性腺瘤性息肉病为APC基因突变所致的常染色体显性遗传疾病, 对于常规基因检测突变阴性的息肉病家族, 研究人员通过对血液转录组进行RNA-seq结合WGS分析APC基因, 揭示了与假外显子相关的深度内含子突变。假外显子是前体mRNA内含子区域的潜在外显子, 通常不会剪接成成熟的mRNA, 若假外显子突变激活, 产生可被识别的剪接供体或受体位点, 导致内含子序列插入成熟的mRNA^[32]。在该研究中, RNA-seq发现异常剪接, 预测存在假外显子导致翻译的过早停止, WGS检测APC基因的整个内含子, 进一步发现存在3处内含子突变创建了新的剪接供体位点, 导致将内含子序列插入APC转录物中。研究表明疾病相关假外显子的检测需要同时基于RNA和DNA的证据来证明mRNA内源序列的插入, 并将转录后修饰错误与基因组DNA的深度内含子突变予以区分。

Lee等^[33]开展队列研究更深入探讨WGS结合RNA-seq在罕见孟德尔遗传病临床诊断中的应用。

研究人员收集并筛选出100例先前未明确诊断的罕见病患者（其中大部分患神经肌肉疾病）进行外显子组或基因组测序，并进行RNA-seq。未结合RNA-seq时，100例患者中仅31例通过WES或WGS得到确诊；而结合RNA-seq与WGS分析流程后，新诊断出7例患者的基因变异，将整体的诊断率提升至38%，RNA-seq还可帮助提升18%病例的致病性证据等级。已有多项研究表明，将RNA-seq用于特定外显子组测序阴性患者群体，在明确疾病类型，如线粒体功能障碍^[25]、肌肉疾病^[26-30,34]时，可提高疾病的诊断率。而Lee等^[33]首次系统地将RNA-seq应用于成纤维细胞、肌肉和血液等多种容易获得的患者组织来源，分析普通患者群体中的基因组变异情况，无需预先根据症状或对RNA-seq最合适的组织来源筛选出符合适应证的病例进行临床基因测试，同样提高了诊断率。该研究人员表示，RNA-seq可用于鉴定潜在剪接位点对mRNA的确切影响，鉴定功能丧失型变异是否经历了无义突变所致的mRNA降解，以及帮助寻找等位基因特异性表达的证据，在转录水平上提供关于DNA变异结果的关键信息^[33]。因此未来随着第二代测序成本的不断降低，基因组测序联合RNA-seq有望成为一种针对复杂异质性的未诊断病例更普遍和全面的基因遗传检测方法。

4 以RNA-seq为基础扩展孟德尔遗传病诊治策略

RNA-seq不仅能在转录水平上检测遗传变异，识别造成孟德尔遗传病的异常剪接，还可分析研究样本中等位基因特异性表达，有助于了解基因型与疾病易感性、疾病表型的关联等^[35]。

Chakravorty等^[36]的研究显示，RNA测序协同目的微阵列比较基因组杂交技术（array-based comparative genomic hybridization, aCGH）可提高异常表现的包涵体肌病的检出率。包涵体肌病是由N-乙酰甘露糖胺激酶（*GNE*）基因突变引起的常染色体隐性遗传病，首发症状多为步态异常，下肢远端肌群受累明显而股四头肌相对不受累。该研究中的研究对象首发表现为双侧足下垂和股四头肌轻度无力，股四头肌组织内出现炎症和镶边空泡，这些症状不同于常见症状，因此阻碍了诊断。

研究人员应用aCGH技术鉴定出患者*GNE*基因上游存在一新的7.08 kb缺失，并对活检肌肉组织使用RNA-seq发现*Val727M*等位基因仅单等位基因表达，导致肌肉中*GNE*基因表达减少约50%，由此明确包涵体肌病诊断。该研究提示RNA-seq结合aCGH技术对肌病诊断的重要性，显示RNA-seq对异常表现的肌病更快、更准确的分子诊断的潜力，有助于促进了解疾病基因型与表型的关系。

此外，通过对RNA-seq数据研究可以拓展出遗传病诊断的新方法。Mohammadi等^[37]基于RNA-seq及组织特异性基因表达GTEx数据库开发出一种新的方法，即表达变异分析（analysis of expression variation, ANEVA），利用不同等位基因的RNA表达作为基因组的功能读数，比较了整个基因组中母本和父本等位基因的活性水平，通过分析两个等位基因的表达失衡，量化基因变异。研究团队再基于ANEVA开发出ANEVA-DOT方法，在70名孟德尔肌肉疾病患者的等位基因特异性表达数据上进行测试，结果显示ANEVA-DOT技术成功检测出已确诊患者中表达失衡的致病基因，并且在许多未确诊的患者中发现了多个肌肉疾病相关基因，其中一个后被证实为致病基因。相比于DNA测序数据难以解释罕见调节元件变异和鉴定下游靶基因，阻碍其寻找在编码序列之外的罕见变异，ANEVA-DOT技术仅依据转录组数据得到结果，不需检测引起下游基因表达变化的罕见调节元件变异，因而在未知调节元件变异引起的遗传病检测中具有独特的优势，可以作为快速发现罕见遗传病致病基因的强大工具。

在遗传病的治疗方面，有学者提出RNA-seq可用于揭示遗传病的治疗性干预点^[38]，如针对脊髓性肌萎缩症（spinal muscular atrophy, SMA）的反义寡核苷酸治疗。SMA是一类由脊髓前角运动神经元变性导致肌无力、肌萎缩的常染色体隐性遗传病，因存活运动神经元（SMN）蛋白水平不足所致。反义寡核苷酸作为一种人工合成的核苷酸短链，通过碱基互补原则选择性地结合目标RNA并调节基因表达，目前已批准用于SMA的反义寡核苷酸药物nusinersen，可修饰*SMN2*基因的前mRNA的剪接缺陷，从而增加完整长度SMN蛋白的产生^[39]。因此通过RNA-seq了解mRNA水平的遗传变异，RNA-seq也有发挥针对性治疗作用的潜能。

5 结语

RNA-seq能在单核苷酸水平进行检测, 全面快速地获得特定组织或器官在某一状态下的几乎所有转录本信息, 随着第二代测序技术的发展, RNA-seq在临床疾病诊治中具有巨大应用潜力, 特别是肿瘤、遗传病等病症发展过程中基因表达模式发生改变的疾病。相较于基因组测序, RNA-seq能检测特定组织中转录基因编码区的剪接异常, 用于等位基因特异性表达分析检测等, 促进了解遗传变异与遗传疾病之间的关联, 提升基因检测的成本效益。结合RNA-seq与基因组检测技术也实现两种高通量测序技术的优势互补, 拓展了传统的基因组的诊断手段, 有助于候选致病变异进行筛选并提供关于变异的关键信息, 使对孟德尔遗传病的诊断更为行之有效。

但RNA-seq在变异检测中也存在一定的局限性。所有细胞具有基本上相同的基因组或外显子组, 然而并非所有基因都在特定的组织或细胞中表达; 且转录组具有组织和细胞类型特异性, 会随时间及组织内外部刺激产生变化, 所以任何一种组织类型的转录组都不能代表整个外显子组, 使RNA-seq在疾病诊断的选材方面受到限制, 还未能较好适用于部分表现出组织特异性的疾病^[16]。此外, 在转录组测序过程中, 可能出现cDNA逆转录错误, 或存在RNA编辑等情况, 影响RNA-seq检测结果^[39-40], 面对庞大的数据量如何有效识别和筛选出罕见变异仍是一项考验。幸运的是, 现今已积累了在多个组织和数据库中的RNA-seq研究, 这为日后进一步评估特定基因在不同环境中的表达状态, 研究组织功能与基因表达的关系, 预测罕见变异的调控作用等提供了研究基础^[40-43]。相信随着对孟德尔遗传病的研究深入和高通量测序技术的不断发展, 未来RNA-seq有望成为一种临床诊断孟德尔遗传病的常规方法。

[参 考 文 献]

- [1] Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(11): 745-755.
- [2] van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, et al. Ten years of next-generation sequencing technology[J]. *Trends Genet*, 2014, 30(9): 418-426.
- [3] Taylor JC, Martin HC, Lise S, et al. Factors influencing success of clinical genome sequencing across a broad spectrum of disorders[J]. *Nat Genet*, 2015, 47(7): 717-726.
- [4] Wortmann SB, Koolen DA, Smeitink JA, et al. Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice[J]. *J Inher Metab Dis*, 2015, 38(3): 437-443.
- [5] Kress W, Rost S, Kolokotronis K, et al. The genetic approach: next-generation sequencing-based diagnosis of congenital and infantile myopathies/muscle dystrophies[J]. *Neuropediatrics*, 2017, 48(4): 242-246.
- [6] Clark MM, Stark Z, Farnaes L, et al. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases[J]. *NPJ Genom Med*, 2018, 3: 16.
- [7] Powis Z, Farwell Hagman KD, Speare V, et al. Exome sequencing in neonates: diagnostic rates, characteristics, and time to diagnosis[J]. *Genet Med*, 2018, 20(11): 1468-1471.
- [8] Mertes F, Elsharawy A, Sauer S, et al. Targeted enrichment of genomic DNA regions for next-generation sequencing[J]. *Brief Funct Genomics*, 2011, 10(6): 374-386.
- [9] Volk AE, Kubisch C. The rapid evolution of molecular genetic diagnostics in neuromuscular diseases[J]. *Curr Opin Neurol*, 2017, 30(5): 523-528.
- [10] Meienberg J, Bruggmann R, Oexle K, et al. Clinical sequencing: is WGS the better WES?[J]. *Hum Genet*, 2016, 135(3): 359-362.
- [11] Stavropoulos DJ, Merico D, Jobling R, et al. Whole genome sequencing expands diagnostic utility and improves clinical management in pediatric medicine[J]. *NPJ Genom Med*, 2016, 1: 15012.
- [12] Lionel AC, Costain G, Monfared N, et al. Improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels suggests a role for whole-genome sequencing as a first-tier genetic test[J]. *Genet Med*, 2018, 20(4): 435-443.
- [13] Meynert AM, Ansari M, Fitzpatrick DR, et al. Variant detection sensitivity and biases in whole genome and exome sequencing[J]. *BMC Bioinformatics*, 2014, 15(1): 247.
- [14] Lohmann K, Klein C. Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis[J]. *Neurotherapeutics*, 2014, 11(4): 699-707.
- [15] Schuelke M, Øien NC, Oldfors A. Myopathology in the times of modern genetics[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2017, 43(1): 44-61.
- [16] Cirulli ET, Singh A, Shianna KV, et al. Screening the human exome: a comparison of whole genome and whole transcriptome sequencing[J]. *Genome Biol*, 2010, 11(5): R57.
- [17] Darras BT, Jones HR. Diagnosis of pediatric neuromuscular disorders in the era of DNA analysis[J]. *Pediatr Neurol*, 2000, 23(4): 289-300.
- [18] Bönnemann CG, Wang CH, Quijano-Roy S, et al. Diagnostic approach to the congenital muscular dystrophies[J]. *Neuromuscul Disord*, 2014, 24(4): 289-311.
- [19] Stenson PD, Mort M, Ball EV, et al. The human gene mutation database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies[J]. *Hum Genet*, 2017, 136(6): 665-677.

- [20] Zhang H, He L, Cai L. Transcriptome sequencing: RNA-seq[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1754: 15-27.
- [21] Ozsolak F, Milos PM. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(2): 87-98.
- [22] Chepelev I, Wei G, Tang Q, et al. Detection of single nucleotide variations in expressed exons of the human genome using RNA-Seq[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(16): e106.
- [23] Short PJ, McRae JF, Gallone G, et al. *De novo* mutations in regulatory elements in neurodevelopmental disorders[J]. *Nature*, 2018, 555(7698): 611-616.
- [24] Ku CS, Wu M, Cooper DN, et al. Exome versus transcriptome sequencing in identifying coding region variants[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2012, 12(3): 241-251.
- [25] Wirka RC, Pjanic M, Quertermous T. Advances in transcriptomics: investigating cardiovascular disease at unprecedented resolution[J]. *Circ Res*, 2018, 122(9): 1200-1220.
- [26] Cummings BB, Marshall JL, Tukiainen T, et al. Improving genetic diagnosis in Mendelian disease with transcriptome sequencing[J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(386): eaal5209.
- [27] Hamanaka K, Miyatake S, Koshimizu E, et al. RNA sequencing solved the most common but unrecognized NEB pathogenic variant in Japanese nemaline myopathy[J]. *Genet Med*, 2019, 21(7): 1629-1638.
- [28] Gonorazky HD, Naumenko S, Ramani AK, et al. Expanding the boundaries of RNA sequencing as a diagnostic tool for rare Mendelian disease[J]. *Am J Hum Genet*, 2019, 104(5): 1007.
- [29] Frésard L, Smail C, Ferraro NM, et al. Identification of rare-disease genes using blood transcriptome sequencing and large control cohorts[J]. *Nat Med*, 2019, 25(6): 911-919.
- [30] Starokadomskyy P, Gemelli T, Rios JJ, et al. DNA polymerase- α regulates the activation of type I interferons through cytosolic RNA: DNA synthesis[J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(5): 495-504.
- [31] Nieminen TT, Pavicic W, Porkka N, et al. Pseudoexons provide a mechanism for allele-specific expression of APC in familial adenomatous polyposis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(43): 70685-70698.
- [32] Romano M, Buratti E, Baralle D. Role of pseudoexons and pseudointrons in human cancer[J]. *Int J Cell Biol*, 2013, 2013: 810572.
- [33] Lee H, Huang AY, Wang LK, et al. Diagnostic utility of transcriptome sequencing for rare Mendelian diseases[J]. *Genet Med*, 2020, 22(3): 490-499.
- [34] Gonorazky H, Liang M, Cummings B, et al. RNAseq analysis for the diagnosis of muscular dystrophy[J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2016, 3(1): 55-60.
- [35] Kremer LS, Bader DM, Mertes C, et al. Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15824.
- [36] Chakravorty S, Berger K, Arafat D, et al. Clinical utility of RNA sequencing to resolve unusual GNE myopathy with a novel promoter deletion[J]. *Muscle Nerve*, 2019, 60(1): 98-103.
- [37] Mohammadi P, Castel SE, Cummings BB, et al. Genetic regulatory variation in populations informs transcriptome analysis in rare disease[J]. *Science*, 2019, 366(6463): 351-356.
- [38] Kremer LS, Wortmann SB, Prokisch H. "Transcriptomics": molecular diagnosis of inborn errors of metabolism via RNA-sequencing[J]. *J Inherit Metab Dis*, 2018, 41(3): 525-532.
- [39] Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, et al. Nusinersen versus sham control in infantile-onset spinal muscular atrophy[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(18): 1723-1732.
- [40] Krupp M, Marquardt JU, Sahin U, et al. RNA-Seq Atlas - a reference database for gene expression profiling in normal tissue by next-generation sequencing[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(8): 1184-1185.
- [41] Li X, Kim Y, Tsang EK, et al. The impact of rare variation on gene expression across tissues[J]. *Nature*, 2017, 550(7675): 239-243.
- [42] Papatheodorou I, Fonseca NA, Keays M, et al. Expression Atlas: gene and protein expression across multiple studies and organisms[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D246-D251.
- [43] Kim P, Park A, Han G, et al. TisGDB: tissue-specific gene database in cancer[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D1031-D1038.

(本文编辑: 邓芳明)