

國立臺灣大學醫學院分子醫學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Molecular Medicine

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

以 Exome CNV 再分析全外顯子定序個案之  
致病性拷貝數變異

**Reanalyze Pathogenic Copy Number Variations  
Using Exome CNV in WES Cohort**

許晉婕

Chin-Chieh Hsu

指導教授：簡穎秀博士、李妮鍾博士

Advisor: Yin-Hsiu Chien, Ph.D., Ni-Chung Lee, Ph.D.

中華民國 112 年 7 月

July, 2023

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書

MASTER DISSERTATION ACCEPTANCE CERTIFICATE  
NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

以 Exome CNV 再分析全外顯子定序個案之  
致病性拷貝數變異

Reanalyze Pathogenic Copy Number Variations Using Exome  
CNV in WES Cohort

本論文係 許晉婕 (P10448010) 在國立臺灣大學分子醫學研究所碩士在職專班遺傳諮詢組完成之博士學位論文，於 民國 112 年 7 月 19 日 承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

The undersigned, appointed by the Department / Institute of Molecular Medicine Genetic Counseling Program on 19, July, 2023 have examined a master dissertation entitled above presented by Chin Chieh Hsu (P10448010) candidate and hereby certify that it is worthy of acceptance.

口試委員 Oral examination committee:

吳心怡 林 \_\_\_\_\_

(指導教授 Advisor)\*

胡新瓦 劉揚 \_\_\_\_\_

系主任/所長 Director: 潘俊良

## 誌謝

感謝林口長庚醫院婦產部遺傳諮詢師林毓婷學姊。她是遺傳諮詢組的大大大學姐，並且在林口長庚產科胎兒醫學中心奉獻 30 年。當我感到臨床遺傳知識的不足時，她立刻推薦我來念台大分醫所遺傳諮詢組，並且唆使我找最嚴格、最厲害的老師指導論文，然後一路鼓勵我挺過期中期末考、提論文計畫及口試，陪伴我從 fellow 升上主治。

感謝遠在美國 Oklahoma 的蔡俊慧醫師。我們在臉書的某秘密花園社團相識，那時有網友因發現腹內胎兒帶有 *GJB2* gene 的變異而決定流產，上網討拍。然後有位名為 Anne Tsai 的網友立馬跳出來把她教訓了一頓，振臂疾呼「基因型不代表表現型！」，舌戰群雄揭示產前基因諮詢的重要及限制。我對這位 Anne Tsai 充滿崇拜，雖然在社團內吵得面紅耳赤甚至近乎網路霸凌，但她說的每一句話都是學問、都是事實。我忍不住傳了訊息給她，沒想到她馬上就回覆了我，還打了通來自美國的 messenger 電話給我聊了半個多小時。原來她就是蔡俊慧醫師。後來我告訴她，我考上了台大分醫所遺傳諮詢組，她也強力鼓勵我好好找指導教授，「Nancy for IEM, Nina for NGS」，她說。我們在今年的人類遺傳學會春季會總算碰了面，在我誇張的飆淚後一起留下珍貴的合照。

感謝兩位恩師，李妮鍾教授及簡穎秀教授，願意收留來自隔壁山頭的我及雅淳。小兒科跟產科彷彿是今生與來世，對生命的掌握存在著本質上的極大差異。感謝老師們的課程、門診實習、以及以身作則的生命觀，讓我知道該如何尊重並守護產前的小生命。感謝老師們在論文上的指導，讓我學習使用 MViewer、IGV、各種線上資料庫，一窺 NGS 的皮毛，並見識到什麼叫做「嚴謹」的研究態度。

感謝柯滄銘教授。在碩一開學前因緣際會前往柯 P 的診所見習羊膜穿刺，受柯 P 指導很多臨床遺傳疾病的產前診斷，之後開始了台大的課程，再度回到柯 P 診所見習。柯 P 絕對是婦產科及基因醫學的 role model，他有問必答、再小再蠢的問題都可以向他請教。柯 P 說「在生命面前，我們永遠要謙虛，因為我們所知的，都只是一大片沙灘上的一小塊石頭」，這句話我會記一輩子，並且隨時提醒自己。

感謝宜霖學姊，除了幫我們開門之外還提供許多處理資料時的協助。感謝雅芬學姊，幫我處理 IRB 的流程。感謝秀枝秘書，把屎把尿幫我印了一堆論文初稿。

感謝長庚醫院的師長、前輩、同事們，鼓勵我來念書、cover 我的臨床工作，並時不時丟出難題激發討論。感謝長庚醫院的病人們，帶著來自世界各地的基因報告來挑戰我們、刺激我們進步。希望我們有朝一日可以提供更多協助。

感謝台北長庚婦產科莊雅淳醫師。有雞淳的陪伴同行，才能撐過這有點硬的在職專班。很懷念下課後在她跳上計程車前我們一起大放厥詞說要發明產檢專用 panel，那個無知但卻充滿希望的瞬間。未來我們要繼續一起努力。

感謝遺傳諮詢組的同學們這兩年的照顧與切磋。

感謝我的老爸老媽，幫忙照顧兩隻幼獸讓我專心讀書。感謝我的心肝寶貝平平安安，一直乖乖地等媽媽下課回家。感謝林口長庚醫院外傷骨科賴志揚醫師，接下來換你去念博士班了。

感謝台大分醫所遺傳諮詢組，讓我知道要更謙虛，才能學得更多。

# 中文摘要



## 背景

基因變異常造成許多臨床疾病，小自單一或數個核苷酸變異、大至數千或數萬個鹼基對的拷貝數異常、甚至是染色體數目異常，在臨床基因診斷時均須納入鑑別。全外顯子定序(WES)可精準地分析單一核苷酸異常(SNV)或小範圍的核苷酸插入或缺失(small indel)，亦可利用讀深法(read of coverage)產生 gCNV 檔，分析較大範圍的拷貝數異常(exome CNV)。

## 目的

本研究旨於利用 exome CNV 再次分析 WES 的個案資料，搭配 Decipher 線上資料庫，探討是否可以偵測 SNV 及 small indel 之外的拷貝數異常(CNV)，並提升基因診斷率。

## 方法

將 WES 原始資料以 GATK gCNV caller 工具產出 gCNV 檔，利用 MViewer 篩選>5 Kb 並包含 Mendeliome 基因或 OMIM 基因的 CNV 片段，查詢 Decipher 是否有已知的 CNV syndrome 與該片段重疊，並篩選每段 CNV 是否帶具有高 pLI/pHaplo/pTriplo 值的 Mendeliome 或 OMIM 基因。最後比對高 pLI/pHaplo/pTriplo 值的 Mendeliome 或 OMIM 基因之表現型，嘗試找出與個案表現型符合的致病 CNV 片段，並計算診斷率。

## 結果

在 130 位再次分析的個案中，共有 5 位利用 Exome CNV 找到 CNV syndrome 或致病 CNV(包含 Klinefelter syndrome、Vissers-Bodmer syndrome、1q21.1 recurrent microdeletion、17p11.2 duplication syndrome)，針對拷貝數異常的診斷率為 3.85%。利用 exome CNV，可將 WES 的診斷率自 44.62 提升至 47.69，共 3.07%。

## 結論

Exome CNV 可以成功利用 WES 原始資料偵測拷貝數異常，搭配 Decipher 資料庫參考 pLI/pHaplo/pTriplo 值及 Mendeliome 基因、OMIM 基因之表現型，可以提高 WES 的基因診斷率。然而，本研究流程仍需要更多個案數及驗證。

## 關鍵字

全外顯子定序、次世代定序、拷貝數異常、基因診斷。

# Abstract



## **Background**

Genetic variations bring many clinical diseases, ranging from single nucleotide variation (SNV), small indel to copy number variation or chromosomal diseases. Genetic testing should assess all levels of variations to make precise genetic diagnosis. WES brings much information about SNV and small indel, which is also able to evaluate copy number variation by analyzing reads of coverage (exome CNV).

## **Aim**

Using exome CNV to re-analyze possible pathogenic CNV from the WES cohort, and calculate the genetic yields of WES and exome CNV.

## **Methods**

Total 130 cases were enrolled in the study. We reviewed all the CNVs from the 130 cases that are larger than 5 Kb and containing Mendeliome genes or OMIM genes. The pathogenic CNV was filtered out if compatible with CNV syndrome reported on Decipher, or had genes with high pLI/pHaplo/pTriplo values and similar phenotypes. The diagnostic rate of exome CNV was presented.

## **Results**

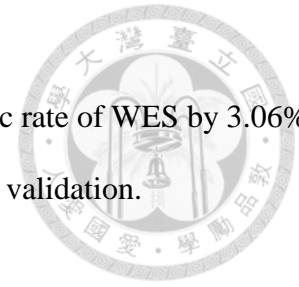
6 of 130 cases were found having pathogenic CNV from exome CNV, including Klinefelter syndrome, Vissers-Bodmer syndrome, 1q21.1 recurrent microdeletion and 17p11.2 duplication syndrome. The diagnostic rate of exome CNV was 3.85%. By adding exome CNV, the diagnostic yield of WES improved to 47.69% from 44.62%.

## **Conclusions**

Exome CNV can detect pathogenic CNV and improve diagnostic rate of WES by 3.06%. However, further study that enrolls more cases is needed to complete validation.

## **Keywords**

Whole exome sequencing, next generation sequencing, copy number variation.



# 目錄



誌謝	3
中文摘要	4
Abstract	5
<b>第一章、 研究介紹 (Introduction)</b>	<b>11</b>
一、 基因體的組成	11
二、 遺傳疾病的成因	11
三、 遺傳疾病的分子診斷	12
四、 遺傳疾病分子診斷在臨床未解的問題	13
五、 用 NGS 診斷拷貝數變異的新進展	14
六、 研究目的	16
<b>第二章、 研究方法及材料 (Material and Method)</b>	<b>17</b>
一、 資料來源	17
二、 WES 使用的平台及 WES SNV/indel 致病性判斷	17
三、 Exome CNV 的產生方式及致病性判斷	17
四、 個案紀錄表內容及分類方式	18
五、 Exome CNV 的初步驗證(validation)	18
<b>第三章、 研究結果 (Result)</b>	<b>19</b>
一、 基本資料分析(demographic data)及研究流程圖(flowchart)	19
二、 CNV 盛行率及種類分布	19
三、 研究流程圖(flowchart)及 Exome CNV 的陽性診斷率	19
四、 Exome CNV 陽性個案列表	20
五、 Exome CNV VUS 個案列表	21
六、 WES SNV 及 exome CNV 的診斷率比較	21
七、 嘗試以 array CGH 驗證 Exome CNV (validation)	21
<b>第四章、 討論 (Discussion)</b>	<b>23</b>
一、 CNV 的形成機轉	23
二、 Deletion v.s. duplication，哪個比較容易致病？	23

三、 現行策略的限制 .....	24
四、 Exome CNV 的優勢與劣勢 .....	25
五、 什麼時候該做 WES? .....	26
六、 產前與產後的遺傳診斷：倫理議題.....	27
七、 未來展望 .....	28
第五章、 研究結論 (Conclusion) .....	29
第六章、 參考資料 (Reference) .....	29



# 圖目錄



圖一、臨床基因醫學的四個步驟：內容及限制。	34
圖二、次世代基因定序製備 DNA 的流程。	35
圖三、次世代基因定序偵測拷貝數異常的四種做法。	36
圖四、數種次世代基因定序偵測拷貝數變異的比較。	37
圖五、GATK gCNV 的實驗流程。	37
圖六、次世代定序的處理流程。	38
圖七、130 位個案帶有 CNV 之種類及個數分布圖。	38
圖八、研究流程圖。	39
圖九、個案 11 在 array CGH 發現的 CNV 片段。	40
圖十、CNV 的形成機轉。	40
圖十一、R. L. Collins 研究中分析的 50 個 HPO 疾病表現型。	41
圖十二、R. L. Collins 研究的摘要示意圖。	41
圖十三、個案 86 的 IGV 可見一段約 2Kb 的擴增，含括 <i>DMD</i> exon 10-11。	42
圖十四、個案 86 的 MLPA 報告顯示為 <i>DMD</i> 基因 exon 10-11 的擴增。	42
圖十五、ClinGen 針對 CNV 判讀的提醒。	43
圖十六、 <i>GBA</i> 基因的 compound heterozygous 可能導致 Gaucher disease。	43

## 表目錄



表一、基本資料分析。 .....	44
表二、CNV 種類及個數統計。 .....	44
表三、exome CNV 陽性個案列表。 .....	45
表四、exome CNV VUS 個案列表。 .....	47
表五、WES SNV 及 exome CNV 的診斷比較。 .....	52
表六、Exome CNV 及 array CGH 的診斷比較及確效(validation)。 .....	52
表七、Exome CNV 及 array CGH 的結果比較列表。 .....	53

# 第一章、研究介紹 (Introduction)



## 一、基因體的組成

基因體(genome)即是一個細胞中所有遺傳物質的集合。人類的遺傳物質為細胞核內的 DNA(deoxyribonucleic acid, 去氧核糖核酸)以及少量的粒線體 DNA(mitochondrial DNA)。在細胞核中, DNA 分子以磷酸根形成鏈結, 並組成雙股螺旋長鏈, 纏繞 histone(組織蛋白)後形成 nucleosome(核小體), 再摺疊形成 chromatin(染色質絲)及 chromosome(染色體)。染色體上的 DNA 經由轉錄形成 RNA (ribonucleic acid, 核糖核酸)、轉譯形成 peptide(胺基酸), 此過程稱為分子生物學的中心法則(central dogma of molecular biology)。peptide 再堆疊成二級構造, 構成 protein(蛋白質)並發揮生理功能。

並非所有 DNA 序列都可以轉譯蛋白質。有些 DNA 序列無法轉錄轉譯出 RNA 及 peptide, 稱為 intron(內插子); 而可以轉錄轉譯出 RNA 及 peptide 的 DNA 片段則為 exon(外顯子)。一段含有一群 intron 及 exon、可轉譯出具有特定功能的蛋白質的 DNA 序列, 即可視為基因(gene)。

人類身上的每一個細胞核中都有 23 對染色體, 包括 22 對 autosome(體染色體)及一對 sex chromosome(性染色體)。這些染色體存有的 DNA 數量共約有三十億個鹼基對( $3 \times 10^9$  base pair), 其中包含約兩萬個 protein-coding gene。而粒線體 DNA 則是位於細胞中的胞器—粒線體內的雙股環狀 DNA, 數量約只有 16 萬個鹼基對( $16.6 \times 10^3$  base pair), 其中僅有 37 個 protein-coding gene。

每個基因都在基因體中佔有一席之地。它們有各自的位置(chromosomal location)、大小(gene size)、功能、以及複雜的調控機制。當基因產生變化時, 可能會影響蛋白質的功能, 改變個體的表現, 甚至導致疾病。

## 二、遺傳疾病的成因

當細胞中的遺傳物質 DNA 的內容、數量或是調控中心法則(central dogma)的機制出現變異(variation), 導致製造出的蛋白質功能改變時, 便可能影響細胞

的運作，甚至擴大到組織、器官及系統，使個體產生症狀、造成疾病。這些變異小自單一核苷酸變異(single nucleotide variation, SNV)、數個核苷酸缺失或擴增(small insertion or deletion, indel)，大至數千至數千萬核苷酸拷貝數異常(copy number variation, CNV)，都可能造成疾病。SNV 及 indel 可能因 DNA 編碼改變，造成不同的轉錄、轉譯結果，製造出不同的氨基酸甚至是製造不出氨基酸(missense or non-sense mutation)，而使蛋白質功能改變，因而致病；而 CNV 則可能造成蛋白質的表現減少或增加而導致疾病。

若個體全身上下、包含生殖母細胞都帶有遺傳物質的異常，則可能經由減數分裂製造出亦帶有異常的配子，將疾病傳給下一代，此情形稱為遺傳變異(inherited variation)。即使個體本身未帶有 DNA 異常，仍可能在製造配子時發生核苷酸改變、重組或染色體不分離(non-disjunction)而產生異常的配子，使子代產生疾病，此情形稱為個體變異(de novo variation)。

### 三、遺傳疾病的分子診斷

根據不同的 DNA 變異範圍，需要選擇不同的分子檢驗方式得到基因診斷。

範圍較大或染色體結構上的變異，包括基因體套數異常(如三倍體 triploidy)、染色體數目異常(aneuploidy)、大範圍的拷貝數異常(>5Mb)、染色體轉位(translocation)，可用染色體核型分析(karyotyping)偵測。Karyotyping 可巨觀的審視所有染色體的結構及數目，但針對變異的位置及片段大小卻難以準確定位，僅能以 cytogenetic band 概略的標示異常片段，並偵測大於 5Mb 的拷貝數異常。此外，染色體核型分析需先完成細胞培養，再將細胞停止在細胞分裂中期(metaphase)後打碎細胞、染色、固定、閱片，此實驗過程費時費力，通常無法在兩週內取得結果。

晶片式全基因體定量分析(array-based comparative genomic hybridization, array CGH)利用帶有基因探針的微陣列晶片，可檢測全基因體的基因片段拷貝

數。當基因體中有部分基因片段發生擴增(duplication)或缺失(deletion)時，位於此片段的基因探針訊號就會隨之增加或減少，與其他拷貝數正常的片段相比就會產生訊號強弱的差異，因此可以偵測基因體中的片段拷貝數變異。Array CGH 的解析度與基因探針的密度及分布有關，目前常用的晶片約有 6 至 7.5 萬個探針，通常在基因密集的片段會有較多的探針設計，因此也會有較高的解析度，一般可達 0.05-0.5 Mb。然而，若拷貝數變異的大小小於探針所涵蓋的範圍，或範圍太小不足以使足夠的探針訊號改變，而被視為干擾訊號，則無法被 array CGH 所偵測。此外，若為整倍體(如三倍體 triploidy)的異常，因全基因體的訊號都被放大，無法偵測出片段間的差異，亦無法利用 array CGH 診斷。

當基因變異的範圍小於 array CGH 的解析度，或是僅限於幾個核苷酸的變異，就需要利用聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)、Sanger 定序(Sanger sequence)或次世代定序(next generation sequence, NGS)來偵測小片段的拷貝數異常或是核苷酸序列異常。利用設計引子(primer)將某段已知的基因序列分離後，可經由 PCR 得知其拷貝數是否有異，或利用 Sanger sequence 確認此段基因序列是否有核苷酸序列變異(SNV 或 indel)。而 NGS 則是使用高通量的定序平台，將目標 DNA 打成許多段碎片並同時進行定序後，再依據人類基因圖譜將定序的 DNA 片段拼湊回去，並比對核苷酸變異甚至是拷貝數變異。

面對臨床的遺傳疾病，需了解相關的致病基因有哪些，並尋找可能的變異機制(CNV、SNV 或 epigenetic change 等)。針對目標基因及機制安排上述分子檢驗，並交叉驗證，才能確認基因型(genotype)。而後，還需比對大型族群資料庫及基因型到表現型(genotype-to-phenotype)的文獻，才能確認找到的基因變異是否為真正的致病原因。

#### 四、遺傳疾病分子診斷在臨床未解的問題

利用分子實驗找出 DNA 變異、確認基因的位置及功能、辨識並診斷疾病、回饋到臨床問題，是臨床基因醫學的四個步驟[1]。然而，這四個步驟仍有

實驗或判讀上的限制。(圖一)

在確認 DNA 變異時，需要將所有變異的種類做全盤考量，包括 DNA 序列的變異、轉位、基因劑量的改變等，並選擇適合的分子實驗應證變異。此外，變異的頻率(allele frequency)根據不同種族會有不同表現，盛行的變異種類也有所不同，因此在對照正常族群報告時最好有數目最大、族群最多元、分子實驗數據最完整的資料庫供作分析，然而這是目前全球尚未達成的目標。即使是在實驗動物或電腦上做人類以外的功能性分析實驗，也會因為實驗動物與人類、電腦預測與個案實際表現之間的不一致而有結果的落差。

即使確認 DNA 變異，也可能無法完全解釋基因與疾病的關係。大部分疾病都是多重基因調控，除了複雜的分子交互作用外，更是增加遺傳模式(inherited mode)、臨床症狀表現率(penetrance)、疾病嚴重度(expressivity)、基因多效性(pleiotropy)的複雜度[2]。表觀遺傳學(epigenetics)有多種調控基因表現的機制，如 DNA 甲基化(DNA methylation)、RNA 調控(regulatory RNAs)、組蛋白修飾(histone modification)、細胞分裂穩定性(mitotic stability)及跨世代遺傳(transgenerational inheritance)等，可能在 DNA 序列沒有改變的狀態下使基因體的表現改變[3]。除了基因調控外，來自環境的干擾也可能使相同基因型的個體有不同的表現[4]。

最後，在臨床的多樣性(如患者就醫及生活習慣、國家種族文化差異、醫師診斷及治療的個別化、遺傳諮詢倫理考量等)，以及基因檢驗高成本、高技術要求、高個人化的性質，讓臨床遺傳資訊無法客觀而全面的收集，也是在基因研究發展上的一大挑戰。

## 五、用 NGS 診斷拷貝數變異的新進展

1970 年代開始有高解析度的染色體核型分析，可用於偵測基因體中的微小缺失或擴增(microdeletion or microduplication)[5]，而 1980 年代發展出螢光原位雜交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)，可偵測特定序列的缺失或擴增

[6]。1990 年代 array CGH 開始應用於拷貝數變異的檢查，至今解析度已進步至數十到數百 kb，可作為生殖細胞系(germline)或腫瘤細胞系(somatic)的拷貝數變異篩檢[7-10]。除了全基因體的拷貝數變異篩檢外，針對特定疾病相關的特定序列，可以使用 PCR 或多重連接探針擴增(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)[11]。然而，當次世代基因定序(next generation sequence, NGS)自 2005 年開始蓬勃發展至今，其成本已顯著下降，學界便開始發展以 NGS 偵測拷貝數變異的運算法，並嘗試應用於臨床檢查[12]。

2009 年，新加坡學者 Chao Xie 首先提出利用 NGS 平台進行散彈槍定序(shotgun sequencing)並偵測 CNV 的方式—CNV-seq，強調 reads 的數量才是反映 CNV 的主要關鍵，而非 reads 的長度[12]。然而，shotgun sequencing 漫無目的地捕捉 DNA 片段，需要大量的資料處理及電腦硬體支援，耗費高額的成本及時間，因此更有效率的特定片段目標基因篩查(targeted sequencing of selected regions)、全外顯子基因定序(whole exon sequence, WES)便應運而生(圖二)。Target sequencing 及 WES 利用目標基因片段捕捉或放大(capture or amplification)將定序目標鎖定在特定基因片段或外顯子上，相較於使用散彈槍製備 DNA 的全基因體定序(whole genome sequence, WGS)更可壓低成本、提高效能。加上四種以 NGS 偵測 CNV 的運算原理陸續被提出：1) discordant mate pair; 2) depth of coverage; 3) allele frequency ratio; 4) split read/assembly(圖三)，多種利用 WES 偵測 CNV 的軟體亦逐漸被研發上市[13]。

大部分利用臨床 NGS 數據偵測 CNV 的工具都是使用讀深法(depth of coverage)(圖四)。在特定區域中，若 reads 數量顯著增加，則可能代表拷貝數擴增(duplication)；若減少，則可能代表拷貝數缺失(deletion)。由 Genome Analysis Toolkit(GATK)推出的 CNV 偵測工具—GATK gCNV 即使用讀深法，可利用 WES 或 WGS (whole genome sequencing，全基因體定序)的原始資料尋找 CNV(exome CNV)，擁有優秀的敏感度(sensitivity)，於 2018 年提出後即廣為學界使用(圖五)。[14]

## 六、研究目的

本研究旨於利用 exome CNV 重新分析臺大醫院基因醫學部的 WES 資料庫，希望找到除了 SNV 及 small indel 之外的 pathogenic CNV 診斷，以提升臨床基因診斷率。



## 第二章、研究方法及材料 (Material and Method)

### 一、資料來源

重新分析臺大醫院基因醫學部 WES 資料庫編號 1 至 578 之個案資料，剔除未完成 gCNV 建檔(n=418)、以 GRCh37 版本(n=1)、編碼空號(n=28)、DNA 萃取品質不佳導致異常訊號過多(n=1)等無法判讀的個案，共納入 130 位個案分析其 exome CNV 結果，比對患者臨床表現及 CNV 線上資料庫(Decipher)，計算 exome CNV 的診斷率，並嘗試與患者 WES、array CGH 結果比較。此研究經由臺大醫院研究倫理委員會審查通過(IRB 案號：202304038RIND)並核准執行。研究於 2022 年 7 月 27 日執行至 2023 年 6 月 28 日。

### 二、WES 使用的平台及 WES SNV/indel 致病性判斷

本研究個案群之 WES 使用 Agilent SureSelect V6 及 Roche KAPA HyperExome Probes 捕捉目標基因。個案的定序資料庫(genomic DNA paired-end libraries)以 NimbleGen SeqCap EZ Choice Library 建庫。捕捉後的 DNA 以 Illumina NovaSeq 6000 平台進行定序，讀深可達 100X。定序片段依 GRCh38 拼回排列(alignment)，並利用 Genome Analysis Tool Kit (GATK V3.5)產生 BAM 檔及 VCF 檔。基因變異由 wANNOVAR 註解(annotation)，並依照美國醫學遺傳學會原則(ACMG guideline)判別每個基因變異的致病性[15, 16]。

### 三、Exome CNV 的產生方式及致病性判斷

上述定序結果，由 GATK GermlineCNVCaller (gCNV caller)輸出 CNV 資料 [17]，並利用 MViewer 軟體進行 CNV 篩選。篩選條件為：CNV size >5.0 kb、包含孟德爾遺傳基因(Mendeliome)或包含 OMIM 基因區域。Mendeliome 基因採用 mijnRadboud 公司研發的 Mendeliome panel 2017 年版，而 OMIM 基因則參考 OMIM 線上資料庫公告的基因列表[18]。

篩選出的 CNV 將比對 Decipher 線上資料庫，若此 CNV 片段包含

Decipher 公告的 CNV syndrome，則視此段 CNV 為 positive。若無，則進一步分析 pLI/pHaplo/pTriplo 值。若 CNV 片段為 deletion 且包含 pLI 值>0.9 或 pHaplo 值>0.86 的基因[19, 20]，或為 duplication 且包含 pTriplo 值>0.94 的基因[21, 22]，則進一步查詢這些基因可能造成的臨床表現(G2P、OMIM morbid)。若臨床表現與個案符合，則視此段 CNV 為 positive；若臨床表現與個案不符合但此 CNV 區域的確包含高 pLI/pHaplo/pTriplo 值之基因，則視為 VUS；若 CNV 區域不包含任何高 pLI/pHaplo/pTriplo 值之基因，則視為 negative。

#### 四、個案紀錄表內容及分類方式

收集個案的性別、受檢年紀、臨床主訴、WES 結果分類(pathogenic、likely pathogenic、VUS、likely benign、benign)等資料，並依據系統將臨床主訴分為神經(CNS)、心臟(heart)、肝膽腸胃(gastrointestinal/liver/biliary)、骨骼關節肌肉等軟組織(muscle skeletal)、代謝(metabolism)、惡性腫瘤(cancer)及多重系統症候群(multisystemic/syndromic)等。

#### 五、Exome CNV 的初步驗證(validation)

完成 exome CNV 後，查詢個案是否有接受院內或院外 array CGH 檢查，並核對 CNV 之位置、大小以及致病性判斷是否有落差。

### 第三章、研究結果 (Result)

#### 一、基本資料分析(demographic data)及研究流程圖(flowchart)

表一為 130 位個案的基本資料分析，其中有 76 位個案為小兒科患者，佔 58.46%；51 位個案為成年患者，佔 39.23%；3 位為大於 65 歲之老年患者，佔 2.30%。63 位為男性，佔 48.46%；67 位為女性，佔 51.54%。將個案接受 WES 檢查之主訴原因依系統分類，發現神經學症狀(包含癲癇、神經病變、發展遲緩、自閉症等)患者最多，有 53 位(40.8%)；其次為代謝性疾病 18 位(13.8%)、骨骼關節疾病 15 位(11.5%)、多重系統異常 12 位(9.2%)。

#### 二、CNV 盛行率及種類分布

將每位個案擁有的 CNV 分類統計，發現每位個案平均擁有 8.09 個 Mendeliome CNV(範圍 2-86，中位數 7)及 24.75 個 OMIM CNV(範圍 12-74，中位數 23)(表二)。其中，Mendeliome 擴增佔 59.22%、缺失佔 40.78%；OMIM 擴增佔 35.72%、缺失佔 64.28%。由以上可知，所有人均帶有>5kb、包含 Mendeliome 或 OMIM 基因的 CNV。每個個案的 CNV 種類分布製圖如下(圖七)。

#### 三、研究流程圖(flowchart)及 Exome CNV 的陽性診斷率

本研究共分析 130 名個案。其中，發現有 1 位帶有 deletion 相關的 CNV syndrome，4 位帶有 duplication 相關的 CNV syndrome。31 位帶具有高 pLI/pHaplo/pTriplo 值的基因，但無相關臨床症狀報導(G2P 或 OMIM morbid)，為 VUS。另外 93 位為不帶有 CNV syndrome 相關或高 pLI/pHaplo/pTriplo 值的 CNV 片段，為 negative。Exome CNV 的陽性診斷率為 5/130=3.85%。

#### 四、Exome CNV 陽性個案列表

表三為 exome CNV 分析為 positive 之個案列表，共有五位個案。

個案 17 為 3 歲女童，因動作及語言發展遲緩、多發性熱痙攣(febrile seizure)及腦白質失養症(leukodystrophy)就醫。Exome CNV 發現個案帶有 16:56192232-58723975 共 2.53 Mb 及 16:46474257-48609957 共 2.14 Mb 的兩段 duplication，前者含括 *CNOT1*、*GNAO1*、*RSPRY1* 基因，可能造成 Vissers-Bodmer syndrome 及 Developmental and epileptic encephalopathy。而後者含括 *SIAH1* 基因，可能造成 *SIAH1*-Associated Neurodevelopmental Disorder。Vissers-Bodmer syndrome 的表現包含智能不足、發展遲緩(運動及語言)、行為異常及過動傾向，少數會合併癲癇、腦部 MRI 結構異常[23]。而 *SIAH1*-Associated Neurodevelopmental Disorder 又稱為 Buratti-Harel syndrome，表現為運動及語言發展遲緩、嬰兒型肌張力低下、臉部異常特徵等[24]。

個案 50 及個案 126 分別為 51 歲及 3 歲男性，就診原因分別為神經退化症狀及癲癇。經 exome CNV 發現兩個個案均有 X 染色體的大片段擴增，為克林菲特症(Klinefelter syndrome)患者。雖然此偶然發現(incidental finding)無法解釋兩個個案的主訴症狀，但因克林菲特症為已知拷貝數異常疾病，故仍歸類為陽性診斷。

個案 67 為 1 歲男童，因生長遲緩、小頭症、震顫等症狀就醫。Exome CNV 發現個案帶有 1:146975637-148483351 共 1.51 Mb 的 deletion，可能造成 1q21.1 recurrent microdeletion syndrome。此疾病為不完全表現(incomplete penetrance)，亦即帶有此 CNV 不一定 100% 會發病。然而，帶有此段 CNV 的患者約有 50% 會有小頭症(microcephaly)表現、30% 有輕度智能障礙、26% 有臉部及眼睛特徵異常，15% 可能合併癲癇，亦可能合併精神及行為異常，包括自閉傾向、注意力不集中及睡眠障礙等。即使如此，GeneReview 仍建議在發展遲緩、智能障礙並合併小頭症的患者，應高度懷疑此疾病[25]。

個案 95 為 1 歲女童，因平腦症(lissencephaly)、癲癇、發展遲緩、小頭症

等症狀就醫。Exome CNV 發現個案帶有兩段位於染色體 17 的 CNV，分別為 17:16939117-18388300 及 17:18636469-20460452，大小分別為 1.45 及 1.82 Mb。此 CNV 可能造成 17p11.2 duplication syndrome(又稱 Potocki-Lupski syndrome)，其表現為認知障礙、發展遲緩、中度智能障礙、行為異常、過動、肌張力低下、吞嚥困難導致生長遲緩、先天性心臟病、低血糖等。然而，帶有遺傳自父母的 17p11.2 duplication 並不能預測表現型，故產前遺傳諮詢仍具挑戰。GeneReview 建議患有肌張力不足合併吞嚥困難及生長遲緩、發展遲緩、過動症的患者，應高度懷疑此疾病。

## 五、Exome CNV VUS 個案列表

表四為帶有 VUS CNV 的個案列表，共有 31 位個案。31 位個案均帶有包括高 pLI/pHaplo/pTriplo 值基因的拷貝數異常，其中 16 位個案的 CNV 含括的基因僅有 OMIM 命名、並無 OMIM 或 G2P 表現型，其他 15 位個案的 CNV 雖然有表現型，卻與個案臨床表現不符，故均歸類於 VUS。

## 六、WES SNV 及 exome CNV 的診斷率比較

依本研究設計之分析流程，在收錄的 130 位個案中，共有 58 位在第一步的 WES 找到 pathogenic 或 likely pathogenic 的 SNV/indel，其診斷率為  $58/130 = 44.62\%$ 。其他 72 位 WES 為 VUS、benign/likely benign 或 negative 的個案，有 4 位經第二步的 exome CNV 找到可能的致病 CNV，可將診斷率提升至  $62/130 = 47.69\%$ ，增加 3.07%。(表五)

## 七、嘗試以 array CGH 驗證 Exome CNV (validation)

本研究收錄的 130 位個案中，僅有 11 位同時接受 array CGH 分析拷貝數異常。(表六、表七)

其中，exome CNV 呈現陽性的 5 位個案中，有 3 位(個案 17、50、95)的 array CGH 分析與 exome CNV 分析完全符合，另外 2 位(個案 67、126)未做

array CGH。

Exome CNV VUS 的 31 位個案中，有 2 位(個案 33、64)在 exome CNV 及 array CGH 的 CNV 位置及大小均符合，並也被 array CGH 評為 VUS；另外 1 位(個案 122)在 exome CNV 找到一個 17.34 Kb 的 duplication，因帶有 pTriplo 值為 0.96 的 *CARD14* 基因，故為 exome CNV VUS；然而此段 CNV 可能因長度太小，無法由 array CGH 偵測，故 array CGH 報告為 negative。其餘 28 位為接受 array CGH 分析，故無法比較。

Exome CNV 為 negative 的 94 位個案中，有 89 位未做 array CGH。其餘 5 位有 1 位同為 array CGH 陰性，而另外 4 位的 array CGH 報告為 VUS。在這 4 位個案中，有 2 位(個案 13、131)在 exome CNV 及 array CGH 看到的 CNV 片段位置、大小均符合，但因 exome CNV 將帶有 OMIM 基因但 pLI/pHaplo/pTriplo 值未達標準的片段列為 negative，而 array CGH 只要 CNV 片段帶有 OMIM 基因即視為 VUS，故出現判讀的出入。而另外 2 位 exome CNV 為陰性、array CGH 為 VUS 的個案(個案 10、11)可能是 exome CNV 偽陰性(false negative)，其中個案 10 在 array CGH 帶有染色體 14 上 86.82 Mb 的擴增，但為鑲嵌型(mosaicism)，異常比例僅有 10%。此鑲嵌型拷貝數異常在 exome CNV 上無法被偵測，無論是 MViewer 或 IGV 均無法顯示，推測原因為異常比例太低，無法被 GATK gCNV caller 識別。另外個案 11 在 array CGH 帶有染色體 4 上 4.53 Mb 的擴增，但在 exome CNV 上亦未被顯示，推測可能原因為此片段僅有一 protein-coding gene，因此在捕捉 WES 目標基因片段時訊號不足(圖九)；此外，此個案之 WES 使用的控制組個數太少，可能導致異常訊號強度不足，無法被分析軟體辨識。

## 第四章、討論 (Discussion)



### 一、CNV 的形成機轉

拷貝數變異肇因於基因片段的重組(recombination)及斷裂，因此常合併有 DNA 序列的重新排列(rearrangement)、基因劑量(dosage)的增減及 gain-of-function 的新 allele 產生[26]。CNV 形成的機轉包括：1)不同 allele 之間同義重組(nonallelic homologous recombination, NAHR)以及 2)同一 allele 之中修復 DNA 序列時製造出的非同義序列(如 nonhomologous end joining, NHEJ)[27]。NAHR 是 DNA 複製時沒有對齊、發生斷裂重組而產生，可能會有一股擴增、另一股缺失的變化產生；而 NHEJ 則是單股 DNA 在修復或複製時接上不同義的序列。在基因體中，在重複片段組成的區域(如 *Alu*、*LINE/L1* region)發生的拷貝數變異常源於 NAHR 的機制；然而大部分人類的 CNV 均來自非同義機制。[28](圖十)

### 二、Deletion v.s. duplication，哪個比較容易致病？

拷貝數異常的研究已有 50 年歷史。許多罕見的 CNV(定義為 allelic frequency <0.1%)常與孟德爾遺傳疾病(Mendelian disease)及複雜性遺傳疾病相關，且 CNV 大小常常大於百萬個鹼基對，故此類疾病也被稱做 genomic disorders，常見如 DiGeorge syndrome(22q11.2 deletion)、Charcot-Marie-Tooth disease type 1A(17p12 deletion)等。Genomic disorders 的表現不一，但最常見的症狀為神經發育遲緩(neurodevelopmental delay)。有些 CNV 片段缺失或擴增造成的症狀會完全相反(如 16p11.2 缺失表現為小頭、擴增表現為大頭)，有些 CNV 片段的缺失或擴增卻會造成不同的疾病(如 17p12 缺失會造成 Charcot-Marie-Tooth disease、擴增會造成 hereditary neuropathy with pressure palsies)[29]。一般認為 CNV 片段中的基因「劑量」(dosage)應該與表現型有關，然而，詳細 CNV 的致病機轉目前仍處不明。

曾有文獻嘗試將人類基因體中對拷貝數變異較敏感的區域標示出來[30,

31]，但僅限於零星區域。直至 2022 年 R. L. Collins[21]利用將近百萬人的基因資料庫，整合所有 allelic frequency <0.1%、大小介於 100Kb 至 20Mb 的罕見 CNV，與 54 種 Human Phenotype Ontology (HPO)分類的疾病表現做關聯分析(圖十一)，並以人工智慧運算計算基因的 pHaplo 值及 pTriplo 值，嘗試客觀地描述 haploinsufficiency(HI)及 triplosensitive(TS)的基因。最後定出  $pHaplo \geq 0.86$ 、 $pTriplo \geq 0.94$  為造成 protein truncation variants (PTV)的高風險閾值(odds ratio $\geq 2.7$ )，並標示出 3635 個拷貝數變異敏感基因。這篇研究標榜公開且免費的分享，希望促進基因醫學領域更多的研究，而 pHaplo 值及 pTriplo 值亦被 Decipher 線上資料庫引用，作為分析拷貝數異常的參考指標。

R. L. Collins 並在研究中提到，雖然整體而言 deletion 比 duplication 有較高的致病風險，但若基因有高 pHaplo 值，通常也會有高 pTriplo 值。亦即容易因缺失而致病的 CNV 區域，也有可能因擴增而致病。(圖十二)

然而，即使有 pHaplo 值及 pTriplo 值做為分析 CNV 的參考，在實際利用 Decipher 篩選可能致病的 CNV 片段時，仍會發現有許多基因缺少 pHaplo 值及 pTriplo 值，而在 Decipher 瀏覽視窗中顯示為黑色(如圖九的 *ADGRL13* 基因即無法查詢 pHaplo/pTriplo)。此外，Decipher 瀏覽視窗僅以 pHaplo 值標示基因，若 pHaplo 值高則為紅色、低則為綠色。然而，此圖像化並未顯示 pTriplo 值，因此在查閱 CNV 片段包含的所有基因時，不能只篩選瀏覽視窗(browser)的顏色，需要將基因列表打開才可同時確認 pHaplo/pTriplo 值。

### 三、現行策略的限制

除了許多基因缺乏 pHaplo/pTriplo 值無法參考外，還有許多原因可能影響本研究利用 exome CNV 的診斷率。本研究鎖定大於 5Kb 的 CNV，雖然可以涵括大範圍的 CNV，但仍會漏掉小如幾個 exon 的缺失。如個案 86 為 9 歲男童，因漸進性肌無力求診，後來經 MLPA 確認帶有 *DMD* 基因 exon 10-11 的擴增，為 Duchenne muscular dystrophy 患者。細看此段擴增大小僅有 2Kb 左右，

在 IGV 上其實可以辨識，在 MViewer 上亦有陳列，但因目標大小設為 5Kb 因此被省略不查。此外，*DMD* 基因在 Decipher 亦缺乏 pHaplo/pTriplo 值，故即使 GATK gCNV caller 可抓出此致病 CNV，但以本研究的篩查策略仍無法成功過濾。(圖十三、圖十四)

不能只看 pHaplo/pTriplo 值的原因還有許多已知的 CNV syndrome 並未包括高 pHaplo/pTriplo 值的基因，如個案 95 的 Potocki-Lupski syndrome (17p11.2 duplication syndrome)。此大片段的 CNV 包含數十個 OMIM 基因，但這些基因的 pHaplo/pTriplo 值都未超過 0.86 或 0.94。然而，此 CNV 區域在 Decipher 及許多大小文獻中都有明確報導與疾病相關，因此，利用線上資料庫同時查閱是否與已知 CNV syndrome 區域重疊應該是先於查閱 pHaplo/pTriplo 值的第一步。

ClinGen 線上資料庫在 CNV 查詢 haploinsufficiency 及 triplosensitive score 的頁面也用醒目視窗提醒，查找致病 CNV 不能只看包括基因的各種參考分數 (pLI、pHaplo、pTriplo)，還必須參考 CNV 片段的大小、位置、缺失或擴增等條件，並對照患者的症狀，考慮 CNV syndrome 不同表現(variable expressivity) 與不完全表現(incomplete penetrance)的特性，才能做出最後判斷。(圖十五)

#### 四、Exome CNV 的優勢與劣勢

撇除後端過濾資料的策略，以 WES 的定序資料產生 exome CNV 的原始資料 gCNV 是有效而可行的。本研究利用 array CGH 做為確效對照，發現經 exome CNV 找到的 CNV 片段與 array CGH 的結果無論位置或大小均高度吻合。這代表病患在接受 WES 分析 SNV/indel 的同時，亦可篩查 CNV 且不須額外付出實驗成本，僅需安排產出 gCNV 檔案並分析的人力及時間。並且，exome CNV 的解析度可小至數 Kb，比起 array CGH 的解析度(180k array 約可達 60-100Kb)[32]有大幅進步，不但可分析 genomic disorder，甚至可細看 exon 等級的 structural variation。此外，合併 WES 產生的 BAM 檔，還可同時分析

single nucleotide polymorphism (SNP)的分布及種類，若有患者父母的定序資料，即能藉此判斷 CNV 的 phase 或是否有 loss of heterozygosity(LOH)現象。這對特定的 imprinting disease (如 Prader Willi Syndrome)具有診斷上的價值。[33]

其他同時利用 WES 及 exome CNV 的研究中報導診斷率可達 36%[32]。在一篇中國的研究中，WES 合併 exome CNV 的診斷率達 41.38%，其中 12.02% 是由 Exome CNV 所貢獻[34]

然而，exome CNV 仍與 WES 分享技術上的缺點，包括針對目標 exon 的探針設計可能影響捕捉品質、GC content 較高的區域難以定序、pseudogene 因過於相似的序列而影響序列回貼(alignment)、表觀遺傳學(epigenetics)的影響仍處未知等[13]。未來若有全基因體定序(whole genome sequencing)或長序列定序(long-read sequencing)，或許可以克服上述限制。

## 五、什麼時候該做 WES？

罕見遺傳疾病(rare genetic disease)常是臨床上最具挑戰性的領域。目前已知有 6000-7000 種罕見遺傳疾病，在 50 人中就可能影響 1 人。然而，由於低發生率及個案數稀少，即使罕見遺傳疾病常導致共病甚至死亡，仍然有 50% 以上的罕見遺傳疾病患者無法得到確切診斷。這些患者常經歷「漫長而曲折的診斷之旅」(diagnostic odyssey)，包括許多次專科的會診、多種影像學檢查、各種侵入性檢查(如皮膚或肌肉切片)、重複的實驗室檢查及種類繁複且要價不斐的遺傳學檢查。會以 odyssey 形容，即是這些檢查通常進度緩慢、花費許多金錢、然而結果卻令人失望。有報導指出，這樣的診斷之旅可能進行 5-30 年，然而其中卻有 40% 的患者即使經過漫長的診斷之旅，仍可能得到錯誤診斷。[35]

在過去 30 年，若臨床懷疑罕見遺傳疾病，除了基本的染色體核型分析(karyotype)及全基因體基因晶片(chromosomal microarray analysis)外，還會以分子生物技術(如 Sanger sequence)確認可疑目標基因是否帶有變異。這樣的基因

定序最初是以 gene-by-gene 的方式進行，即第一個基因確認正常後再確認下一個基因。然而，每個基因的定序曠日費時且成本高，因此設計 gene panel 針對某一特定表現型同步確認相關基因，可加快基因診斷效率且節省成本。[35]

隨著次世代定序(NGS)的問世，全外顯子定序(WES)的應用愈加普遍。原本需要先篩選目標基因再行定序的流程，逐漸轉變為先完成所有基因的外顯子定序後再分析目標基因。將 WES 當作第一線(first tier)基因診斷工具已被許多文獻支持，包括針對懷疑單基因疾病(monogenic)的嬰兒、過動症或神經發展遲緩的患者或已接受許多遺傳檢查卻仍無法得到診斷的小兒科患者[36-39]。更有文獻支持 WES 針對不同系統各種表現型，可較 standard care (包含 Sanger sequencing、NGS gene panels、methylation studies、mitochondrial mutation panels)帶來更高的診斷率，因此建議 WES 應成為標準流程。[35, 40, 41]

## 六、產前與產後的遺傳診斷：倫理議題

CNV syndrome 雖然已累積 50 年的文獻經驗，但仍無法解釋不同表現(variable expressivity)與不完全表現(incomplete penetrance)的現象，並且難以預測基因型與表現型的絕對關係[42]。在發病成人或兒童身上，醫師可以完整評估表現型及症狀，再盡可能針對臨床線索使用各種遺傳檢驗工具找尋可能的致病基因型。然而，當此類遺傳檢驗應用在產前的胎兒，反而是先得到基因型的資訊，然後要求預測表現型甚至症狀的嚴重度。在實證文獻未知、答案不明確的情形下，產前的遺傳諮詢是非常困難的。若未來 WES 的成本持續下降，利用 exome CNV 偵測 CNV syndrome 的應用越來越廣泛，很有可能以 exome CNV 取代現行產前常用的 array CGH 去偵測胎兒的拷貝數異常，並可同時取得 WES 資料分析 SNV/indel。屆時，產前遺傳諮詢除了要面對 CNV syndrome，更要加上與 SNV/indel 相關的 single gene disease，包括新生兒代謝疾病(inborn error of metabolism)、帶因者分析(carrier screening)，甚至是晚發性神經退化疾病或是癌症風險基因分析。過多的遺傳資訊，雖然可提供父母胎兒

可能的疾病預測，但是更多的資訊可能落在 VUS 或者無法完全預測表現型。這樣的訊息對父母而言，可能會增加孕期中間的壓力及焦慮，也可能影響產後母嬰依附關係的建立(attachment) [43]。若法律未限制流產，父母可能會因為各種產前基因診斷而選擇終止妊娠，以避免生出異常的寶寶[44]。然而，流產的經驗都可能帶給婦女創傷及壓力，甚至在後續的懷孕可能會出現身心症狀、或是不願意再次懷孕[45, 46]。因此，醫療照護者、學界及政府在這個基因科技飛躍、資訊爆炸並且嚴重少子化的時代，更應該審慎制定相關條例及臨床指引，並提供足夠的遺傳諮詢、心理支持照護，讓願意生孩子的父母們能更了解產前遺傳診斷、更安心的接受檢查，並更有自信的做出任何決定。

## 七、未來展望

本研究執行期間歷經多次搜尋策略的修正及 Decipher 線上資料庫的改版，最後總算定出研究流程及判讀標準。然而目前分析的樣本數太少，無法完成足夠而有效的驗證。下一步應增加個案數，並同時取得至少 20-30 位個案的 array CGH 做驗證，才能讓分析更完整。

此外，exome CNV 可同時搭配 WES SNV/indel，在有變異的基因點位附近以高解析度(2Kb)的 exome CNV 確認是否有微小片段的缺失或擴增，找尋可能的複合異基因合子(compound heterozygous)。(圖十六)

## 第五章、研究結論 (Conclusion)

Exome CNV 可以有效偵測基因體中的拷貝數變異。利用 MViewer 軟體及 Decipher 線上資料庫，篩選>5Kb、包含 CNV syndrome 或高 pHaplo/pTriplo 值基因的 CNV 片段，可將 WES 的診斷率提高 3.07%。



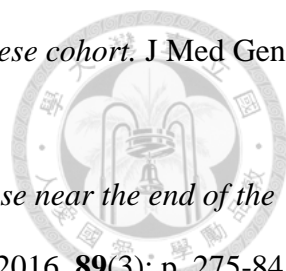
## 第六章、參考資料 (Reference)

1. Hambuch, T.M., et al., *Chapter 2 - Clinical Genome Sequencing*, in *Clinical Genomics*, S. Kulkarni and J. Pfeifer, Editors. 2015, Academic Press: Boston. p. 21-35.
2. McCarthy, M.I., et al., *Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges*. *Nat Rev Genet*, 2008. **9**(5): p. 356-69.
3. Deans, C. and K.A. Maggert, *What do you mean, "epigenetic"?* *Genetics*, 2015. **199**(4): p. 887-96.
4. Jung, H.U., et al., *Gene-environment interaction explains a part of missing heritability in human body mass index*. *Commun Biol*, 2023. **6**(1): p. 324.
5. Yunis, J.J. and M.E. Chandler, *High-resolution chromosome analysis in clinical medicine*. *Prog Clin Pathol*, 1978. **7**: p. 267-88.
6. Trask, B.J., *Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping*. *Trends Genet*, 1991. **7**(5): p. 149-54.
7. Craddock, K.J., W.L. Lam, and M.S. Tsao, *Applications of array-CGH for lung cancer*. *Methods Mol Biol*, 2013. **973**: p. 297-324.
8. Kang, J.U. and S.H. Koo, *Evolving applications of microarray technology in postnatal diagnosis (review)*. *Int J Mol Med*, 2012. **30**(2): p. 223-8.
9. Yoon, S., et al., *Sensitive and accurate detection of copy number variants using read depth of coverage*. *Genome Res*, 2009. **19**(9): p. 1586-92.
10. Kallioniemi, A., et al., *Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic*

- analysis of solid tumors*. Science, 1992. **258**(5083): p. 818-21.
11. Chou, L.S., E. Lyon, and R. Mao, *Molecular diagnosis utility of multiplex ligation-dependent probe amplification*. Expert Opin Med Diagn, 2008. **2**(4): p. 373-85.
12. Xie, C. and M.T. Tammi, *CNV-seq, a new method to detect copy number variation using high-throughput sequencing*. BMC Bioinformatics, 2009. **10**: p. 80.
13. Gordeeva, V., et al., *Benchmarking germline CNV calling tools from exome sequencing data*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 14416.
14. Babadi, M., et al., *Abstract 2287: Precise common and rare germline CNV calling with GATK*. Cancer Research, 2018. **78**(13\_Supplement): p. 2287-2287.
15. Richards, S., et al., *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*. Genet Med, 2015. **17**(5): p. 405-24.
16. Lin, S.Y., et al., *Rapid Trio Exome Sequencing for Autosomal Recessive Renal Tubular Dysgenesis in Recurrent Oligohydramnios*. Front Genet, 2021. **12**: p. 606970.
17. Team, G. *GermlineCNVCaller*. August 03, 2020 11:01; Available from: <https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360047217671-GermlineCNVCaller>.
18. *OMIM Data Downloads*.
19. Lek, M., et al., *Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans*. Nature, 2016. **536**(7616): p. 285-91.
20. Samocha, K.E., et al., *A framework for the interpretation of de novo mutation in human disease*. Nat Genet, 2014. **46**(9): p. 944-50.
21. Collins, R.L., et al., *A cross-disorder dosage sensitivity map of the human genome*. Cell, 2022. **185**(16): p. 3041-3055.e25.
22. Karczewski, K.J., et al., *The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans*. Nature, 2020. **581**(7809): p. 434-443.

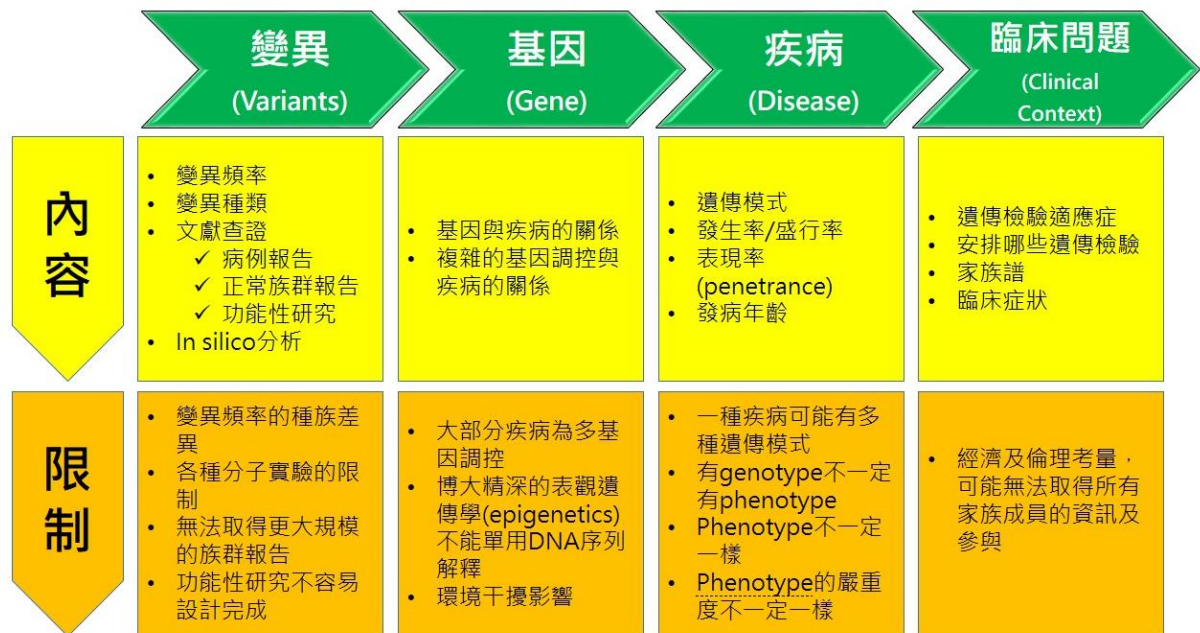
23. # 619033 VISSERS-BODMER SYNDROME; VIBOS.
24. # 619314 BURATTI-HAREL SYNDROME; BURHAS. Available from:  
<https://www.omim.org/entry/619314>.
25. *GeneReviews 1q21.1 Recurrent Microdeletion*.
26. Nord, A., S.J. Salipante, and C. Pritchard, *Chapter 11 - Copy Number Variant Detection Using Next-Generation Sequencing*, in *Clinical Genomics*, S. Kulkarni and J. Pfeifer, Editors. 2015, Academic Press: Boston. p. 165-187.
27. Hastings, P.J., et al., *Mechanisms of change in gene copy number*. *Nat Rev Genet*, 2009. **10**(8): p. 551-64.
28. Kim, P.M., et al., *Analysis of copy number variants and segmental duplications in the human genome: Evidence for a change in the process of formation in recent evolutionary history*. *Genome Res*, 2008. **18**(12): p. 1865-74.
29. Høyer, H., et al., *Copy number variations in a population-based study of Charcot-Marie-Tooth disease*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 960404.
30. Riggs, E.R., et al., *Copy number variant discrepancy resolution using the ClinGen dosage sensitivity map results in updated clinical interpretations in ClinVar*. *Hum Mutat*, 2018. **39**(11): p. 1650-1659.
31. Bragin, E., et al., *DECIPHER: database for the interpretation of phenotype-linked plausibly pathogenic sequence and copy-number variation*. *Nucleic Acids Research*, 2014. **42**(D1): p. D993-D1000.
32. Royer-Bertrand, B., et al., *CNV Detection from Exome Sequencing Data in Routine Diagnostics of Rare Genetic Disorders: Opportunities and Limitations*. *Genes (Basel)*, 2021. **12**(9).
33. Strom, S.P., et al., *A Streamlined Approach to Prader-Willi and Angelman Syndrome Molecular Diagnostics*. *Front Genet*, 2021. **12**: p. 608889.
34. Dong, X., et al., *Clinical exome sequencing as the first-tier test for diagnosing*



- 
- developmental disorders covering both CNV and SNV: a Chinese cohort.* J Med Genet, 2020. **57**(8): p. 558-566.
35. Sawyer, S.L., et al., *Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: time to address gaps in care.* Clin Genet, 2016. **89**(3): p. 275-84.
36. Mergnac, J.P., et al., *Diagnostic yield of clinical exome sequencing as a first-tier genetic test for the diagnosis of genetic disorders in pediatric patients: results from a referral center study.* Hum Genet, 2022. **141**(7): p. 1269-1278.
37. Arteché-López, A., et al., *Towards a Change in the Diagnostic Algorithm of Autism Spectrum Disorders: Evidence Supporting Whole Exome Sequencing as a First-Tier Test.* Genes (Basel), 2021. **12**(4).
38. Stark, Z., et al., *A prospective evaluation of whole-exome sequencing as a first-tier molecular test in infants with suspected monogenic disorders.* Genet Med, 2016. **18**(11): p. 1090-1096.
39. Srivastava, S., et al., *Meta-analysis and multidisciplinary consensus statement: exome sequencing is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with neurodevelopmental disorders.* Genet Med, 2019. **21**(11): p. 2413-2421.
40. Lee, H., et al., *Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders.* Jama, 2014. **312**(18): p. 1880-7.
41. Yang, Y., et al., *Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing.* Jama, 2014. **312**(18): p. 1870-9.
42. Nowakowska, B., *Clinical interpretation of copy number variants in the human genome.* J Appl Genet, 2017. **58**(4): p. 449-457.
43. Allison, S.J., J. Stafford, and D.O. Anumba, *The effect of stress and anxiety associated with maternal prenatal diagnosis on fetomaternal attachment.* BMC Womens Health, 2011. **11**: p. 33.
44. Grossman, T.B. and S.T. Chasen, *Abortion for Fetal Genetic Abnormalities: Type of*

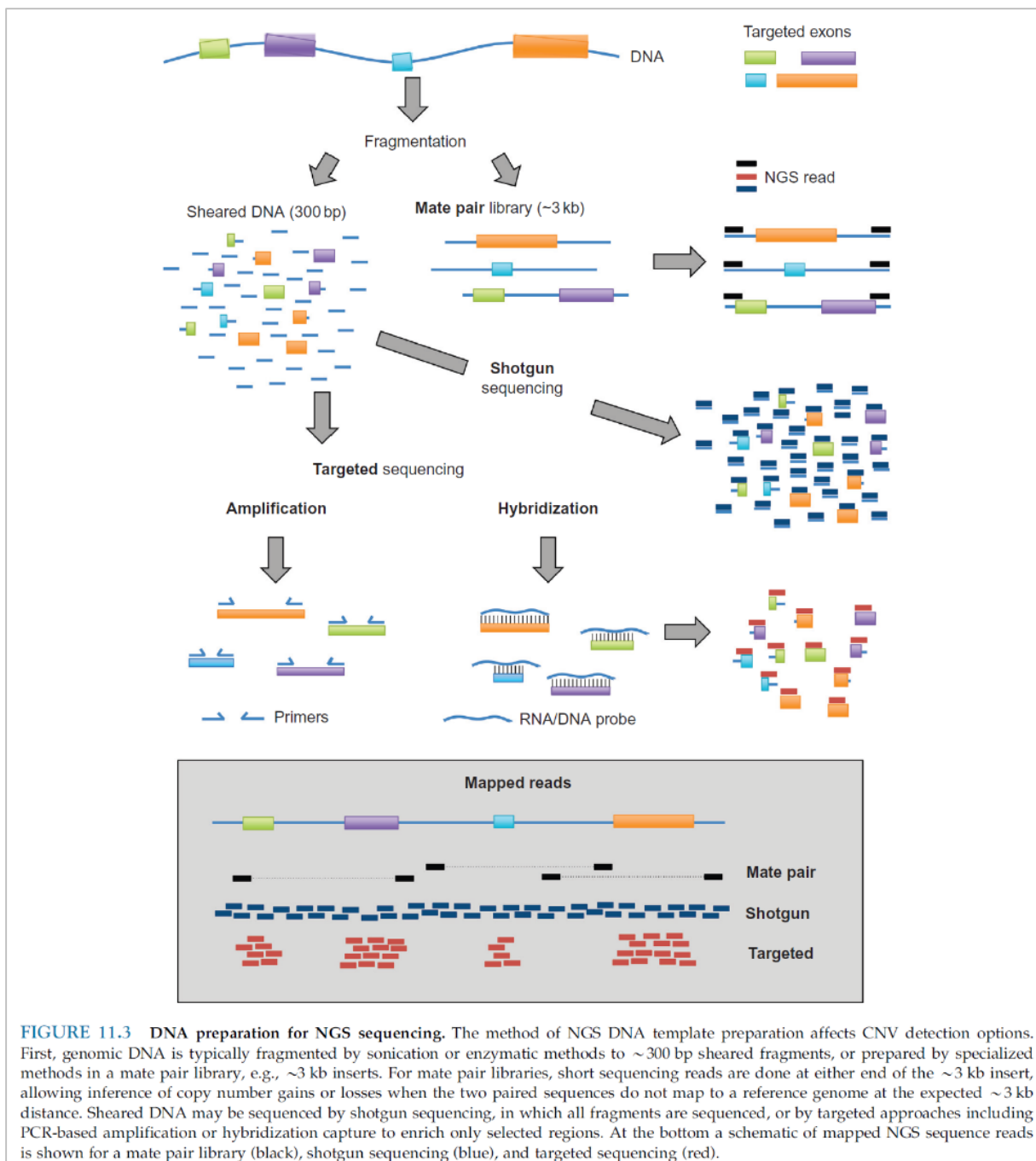
- Abnormality and Gestational Age at Diagnosis*. AJP Rep, 2020. **10**(1): p. e87-e92.
45. Haghparast, E., M. Faramarzi, and R. Hassanzadeh, *Psychiatric symptoms and pregnancy distress in subsequent pregnancy after spontaneous abortion history*. Pak J Med Sci, 2016. **32**(5): p. 1097-1101.
46. Biggs, M.A., et al., *Does abortion increase women's risk for post-traumatic stress? Findings from a prospective longitudinal cohort study*. BMJ Open, 2016. **6**(2): p. e009698.
47. Mehrtash, B., et al., *GATK-gCNV: A Rare Copy Number Variant Discovery Algorithm and Its Application to Exome Sequencing in the UK Biobank*. bioRxiv, 2022: p. 2022.08.25.504851.
48. 「生資無價系列專題」 - *Variant Calling* 的戰況分析. Available from: <https://chungtsai.medium.com/%E7%B2%BE%E6%BA%96%E9%86%AB%E7%99%82-variant-calling-%E7%9A%84%E6%88%B0%E6%B3%81%E5%88%86%E6%9E%90-97e77d0730c8>.

圖一、臨床基因醫學的四個步驟：內容及限制。





圖二、次世代基因定序製備 DNA 的流程。相較於散彈槍定序(shotgun sequencing)，WES 先捕捉並放大目標基因再做定序，可增加讀深(read depth)並節省效能，屬於目標定序(targeted sequencing)的作法。[26]



**FIGURE 11.3** DNA preparation for NGS sequencing. The method of NGS DNA template preparation affects CNV detection options. First, genomic DNA is typically fragmented by sonication or enzymatic methods to ~300 bp sheared fragments, or prepared by specialized methods in a mate pair library, e.g., ~3 kb inserts. For mate pair libraries, short sequencing reads are done at either end of the ~3 kb insert, allowing inference of copy number gains or losses when the two paired sequences do not map to a reference genome at the expected ~3 kb distance. Sheared DNA may be sequenced by shotgun sequencing, in which all fragments are sequenced, or by targeted approaches including PCR-based amplification or hybridization capture to enrich only selected regions. At the bottom a schematic of mapped NGS sequence reads is shown for a mate pair library (black), shotgun sequencing (blue), and targeted sequencing (red).

圖三、次世代基因定序偵測拷貝數異常的四種做法。[26]

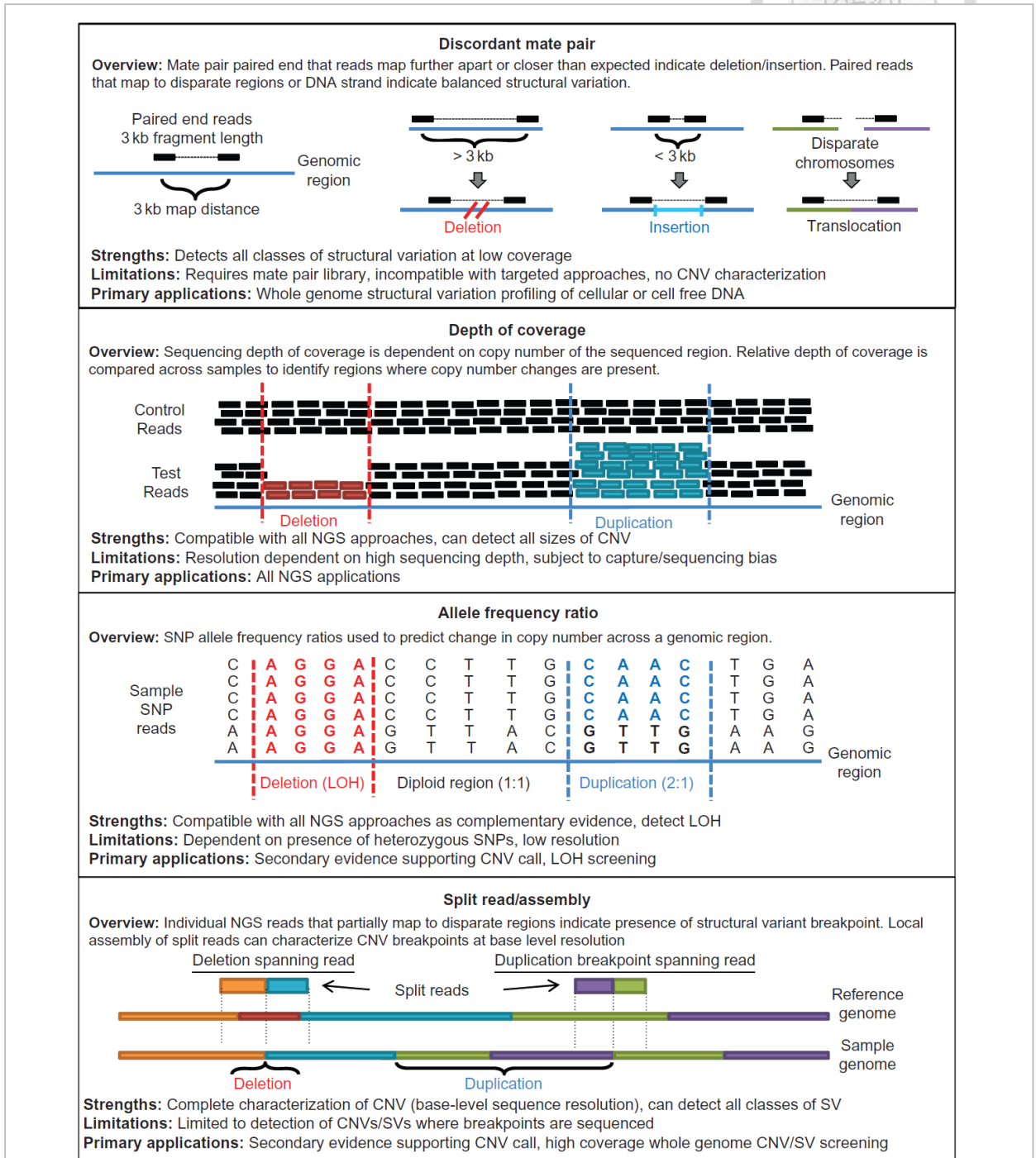


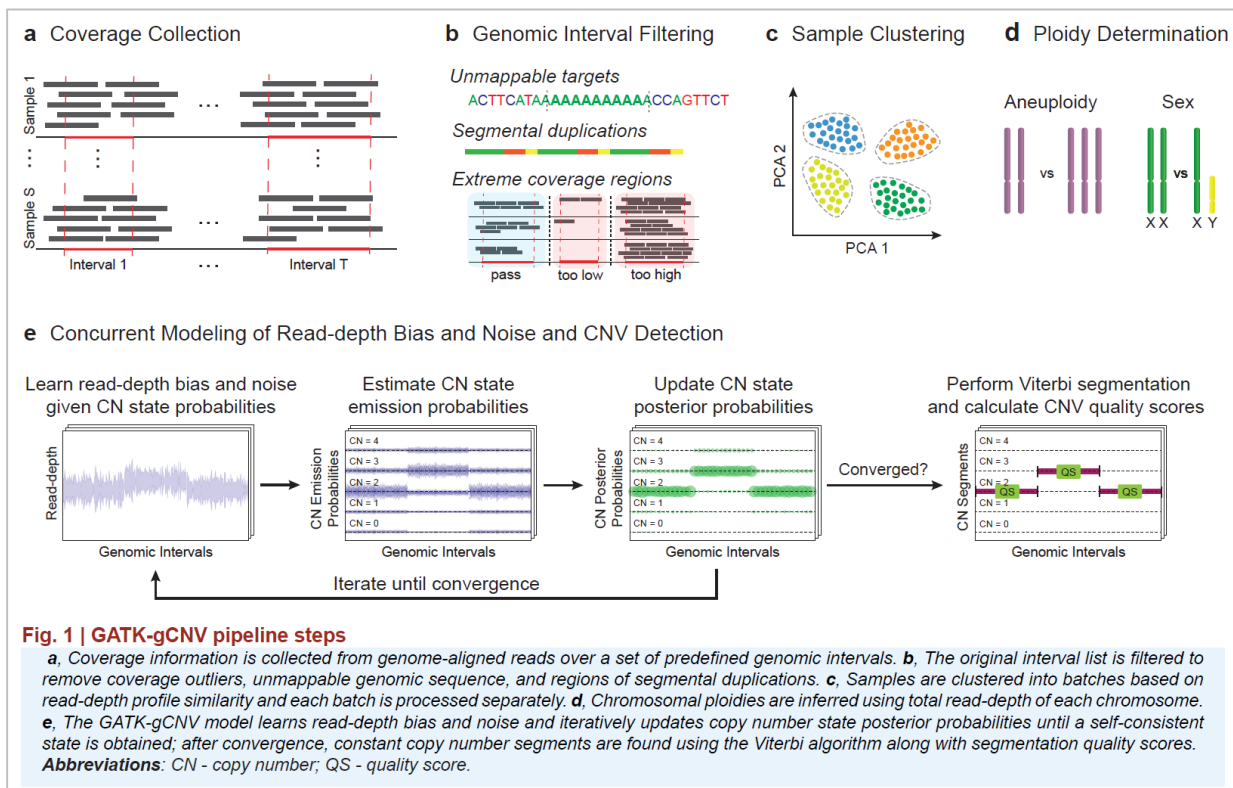
FIGURE 11.4 Conceptual approaches to CNV detection. An overview of four conceptual approaches to CNV detection by NGS, including the strengths and limitations of each approach. Each approach is covered in detail in Figures 11.5–11.8.

圖四、數種次世代基因定序偵測拷貝數變異的比較。讀深法(depth of coverage)是大部分臨床 NGS 偵測 CNV 所使用的原理。[26]

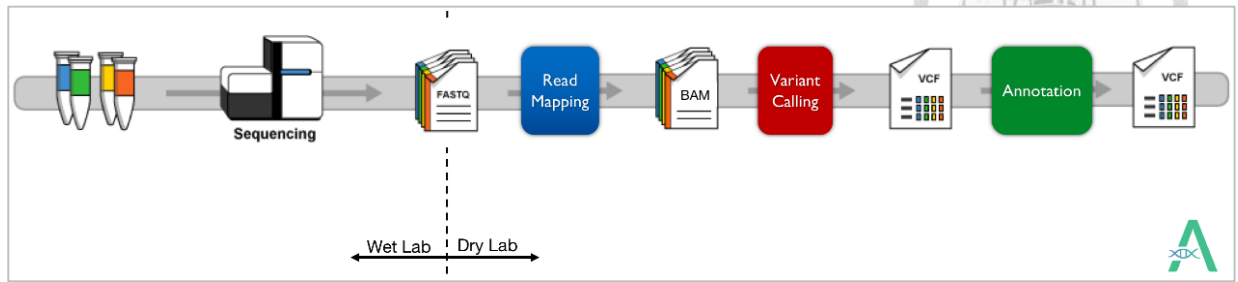


Approach	Scope	Clinical Example	Per Sample Cost	DNA Preparation	Primary CNV Methods	CNV Detection Resolution
Targeted sequencing: selected regions	Selected genes/exons	Cancer gene panel	Low	Capture or amplification	Depth of coverage	Coverage dependent, all CNVs possible
Targeted sequencing: whole exome	All coding exons	Rare disorder	Medium	Capture or amplification	Depth of coverage	Coverage dependent, currently multi-exon
Whole genome	Full genome	Tumor profiling	High	Shotgun, mate pair library	Depth of coverage, mate pair, split read, allele frequency	Variable, all structural variants possible
Cell-free DNA	Variable	Trisomy 21 detection	Variable	Variable	Depth of coverage, mate pair	Variable, generally very large CNVs

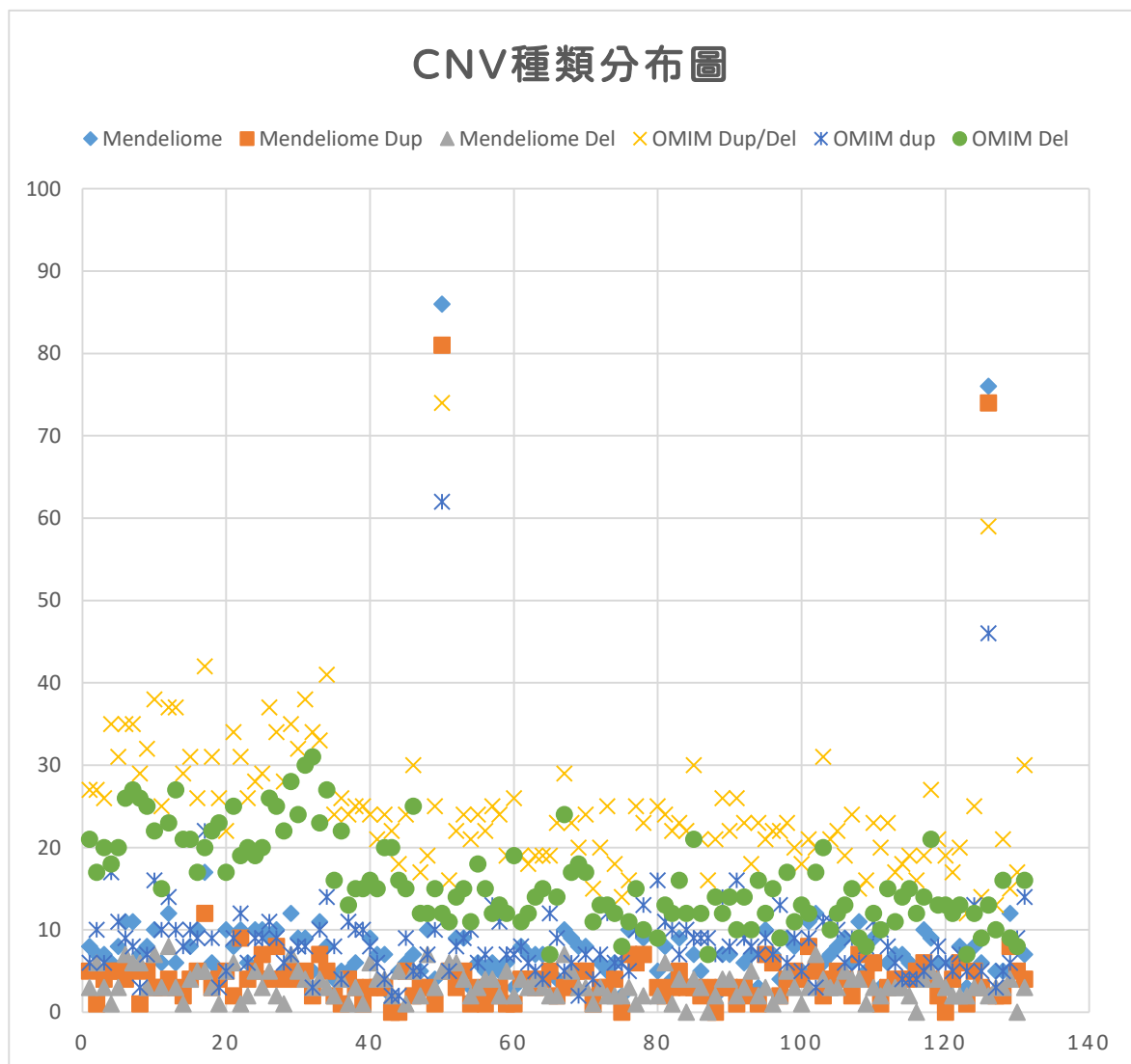
圖五、GATK gCNV 的實驗流程。[47]



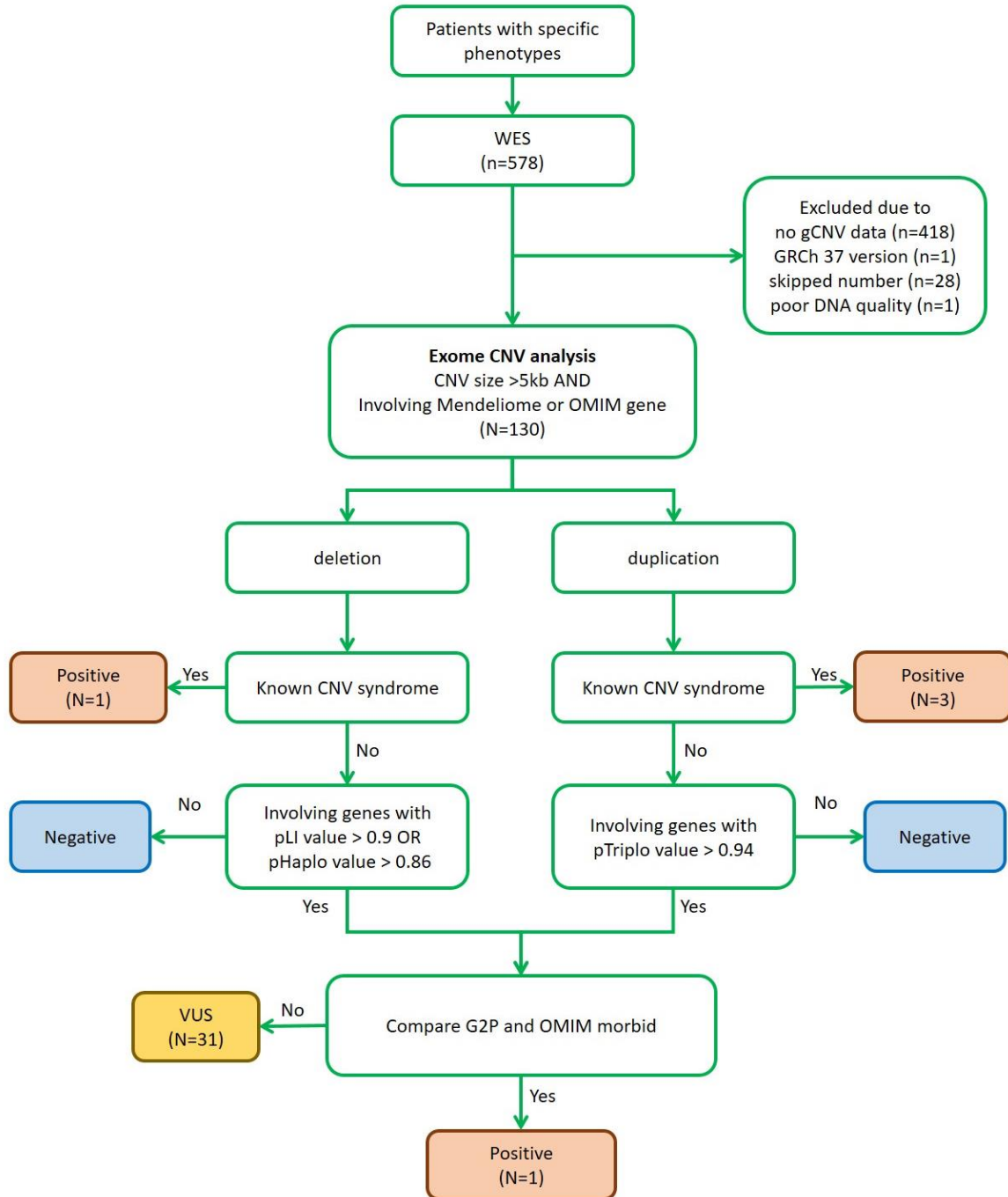
圖六、次世代定序的處理流程。[48]



圖七、130 位個案帶有 CNV 之種類及個數分布圖。

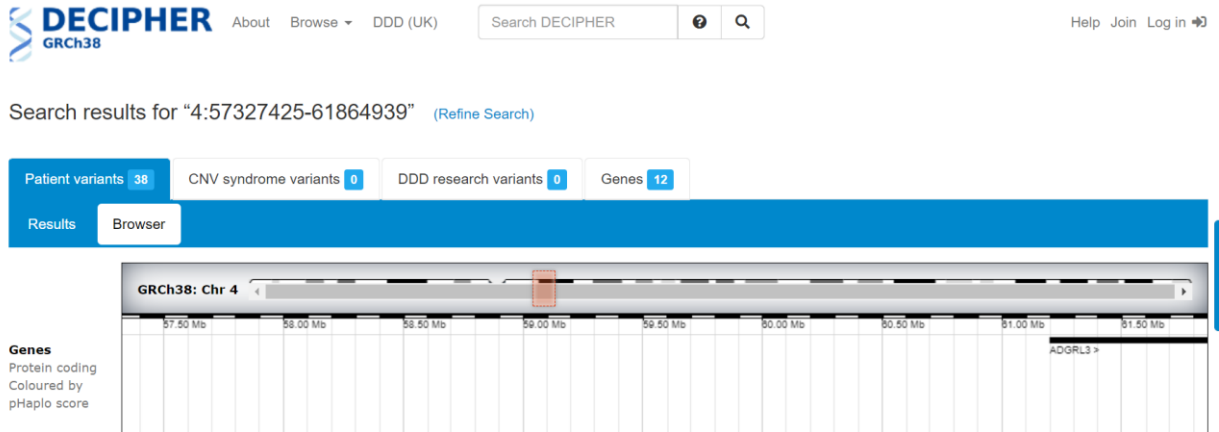


圖八、研究流程圖。

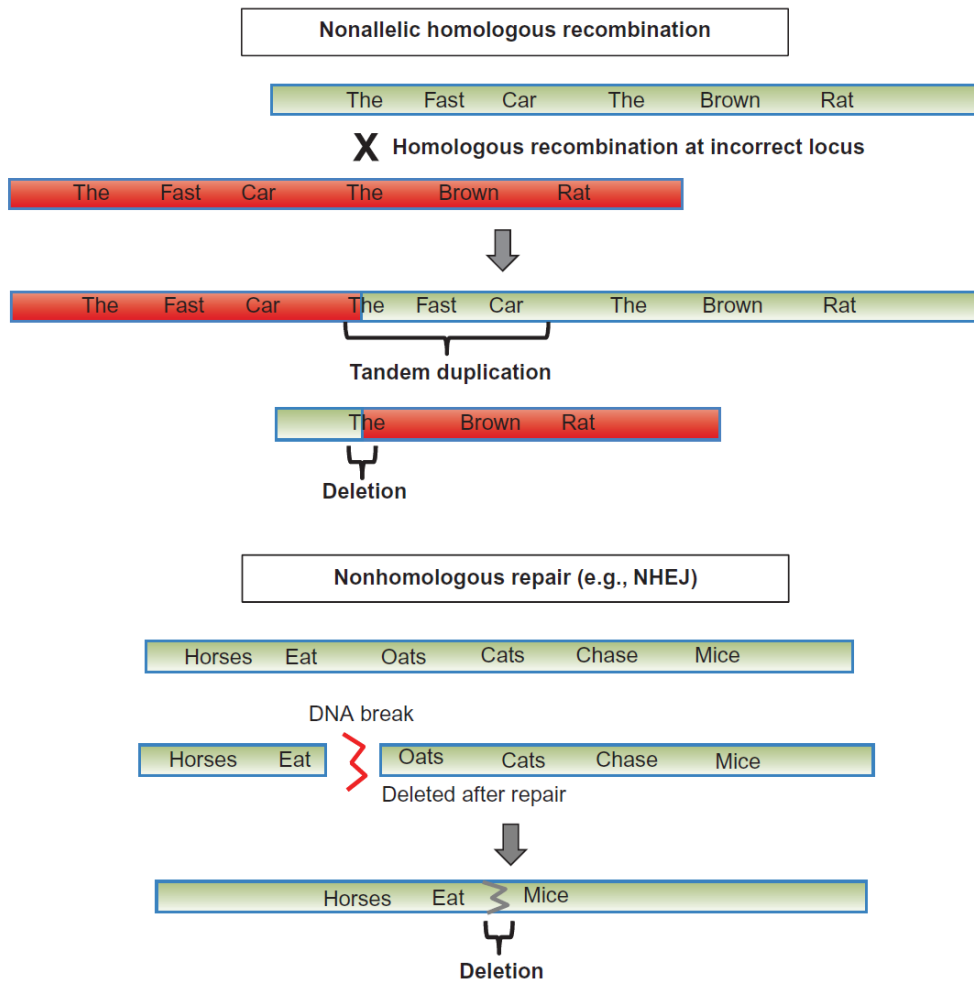


圖九、個案 11 在 array CGH 發現的 CNV 片段。僅有一 protein coding gene：

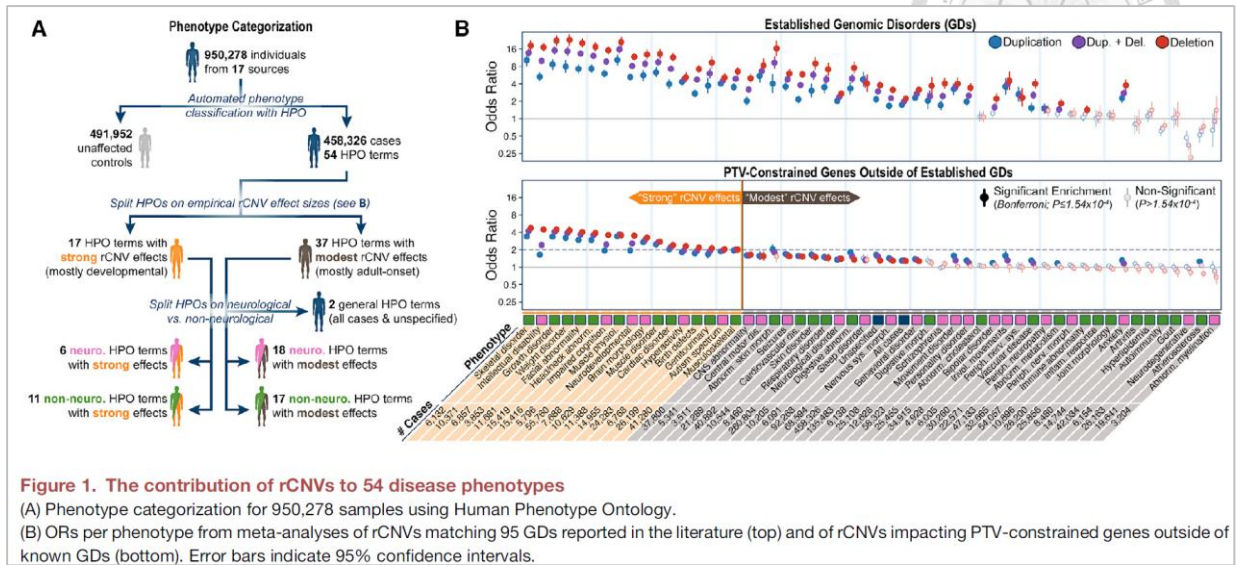
*ADGRL13*。



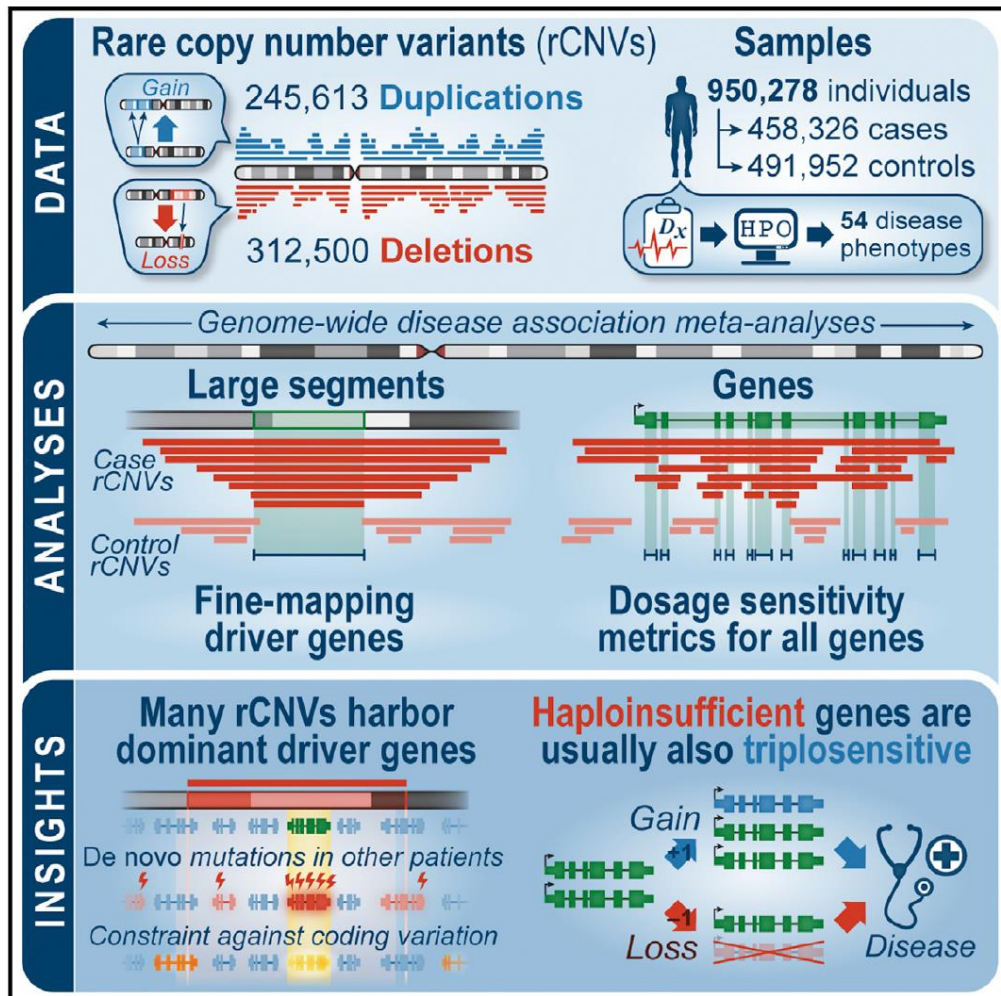
圖十、CNV 的形成機轉。[26]



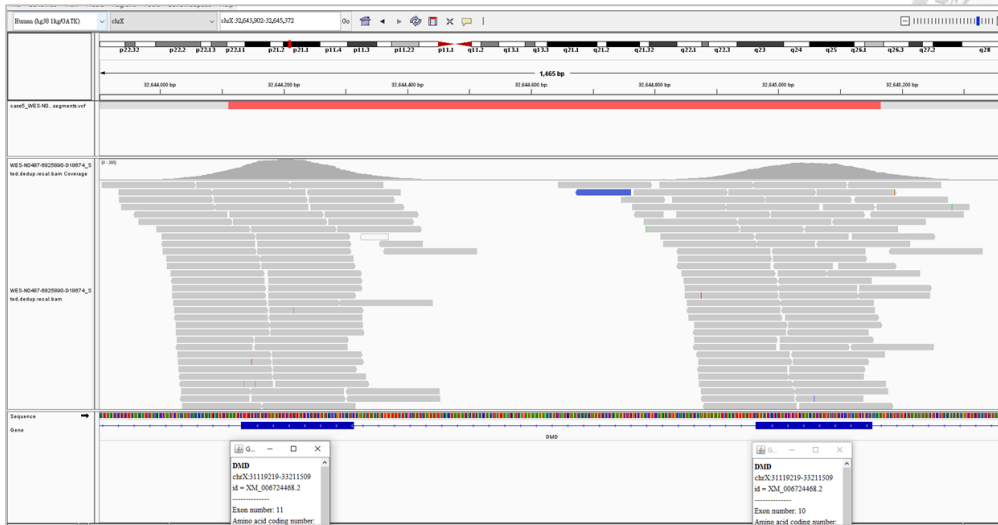
圖十一、R. L. Collins 研究中分析的 50 個 HPO 疾病表現型。[21]



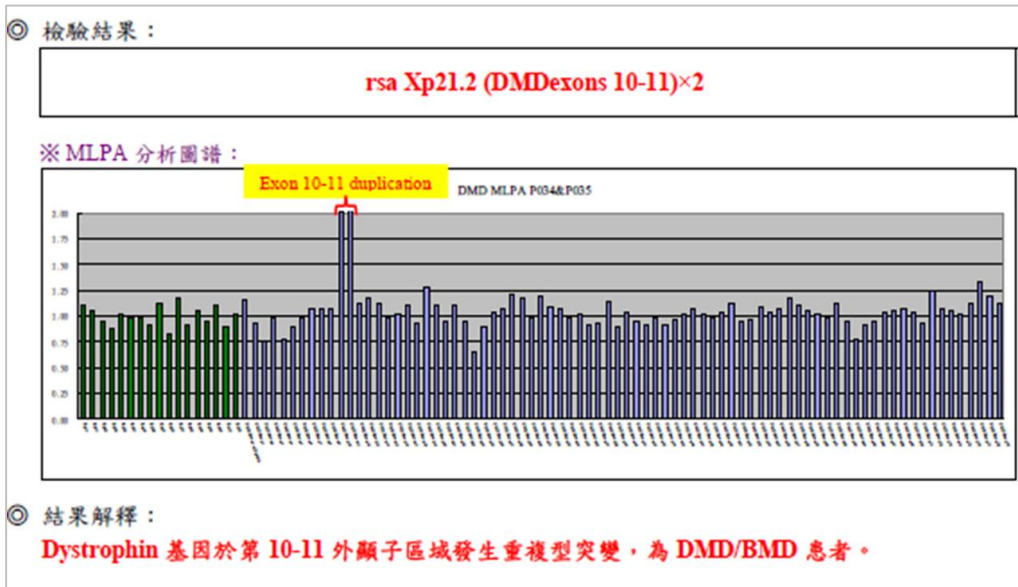
圖十二、R. L. Collins 研究的摘要示意圖。[21]



圖十三、個案 86 的 IGV 可見一段約 2Kb 的擴增，含括 *DMD* exon 10-11。



圖十四、個案 86 的 MLPA 報告顯示為 *DMD* 基因 exon 10-11 的擴增。



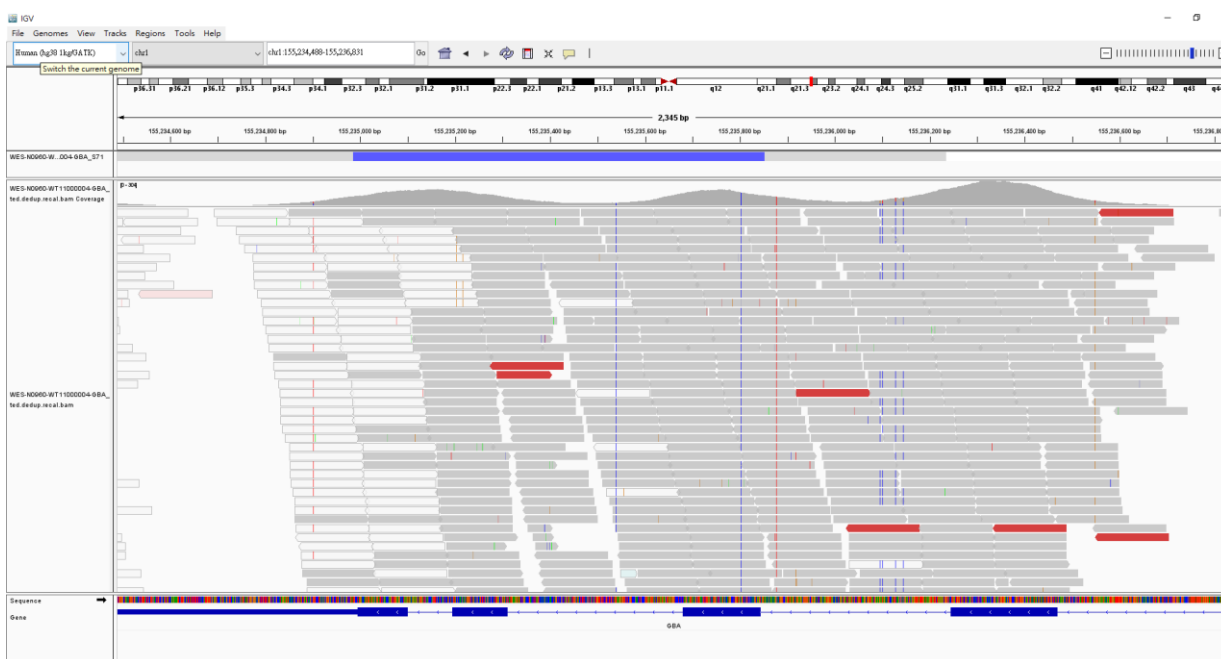


圖十五、ClinGen 針對 CNV 判讀的提醒。

**DISCLAIMER**

The loss of function score should be used to evaluate deletions, and the triplosensitivity score should be used to evaluate duplications. CNVs encompassing more than one gene must be evaluated in their totality (e.g. overall size, gain vs. loss, presence of other genes, etc). The rating of a single gene within the CNV should not necessarily be the only criteria by which one defines a clinical interpretation. Individual interpretations must take into account the phenotype described for the patient as well as issues of penetrance and expressivity of the disorder. ACMG has published guidelines for the characterization of postnatal CNVs, and these recommendations should be utilized ([Genet Med \(2011\)13: 680-685](#)). Exceptions to these interpretive correlations will occur, and clinical judgment should always be exercised.

圖十六、*GBA* 基因的 compound heterozygous 可能導致 Gaucher disease。



表一、基本資料分析。

	個數 N(比例%)
<b>年齡</b>	
0-17	76(58.46%)
18-65	51(39.23%)
66-	3(2.30%)
<b>性別</b>	
男	63(48.46%)
女	67(51.54%)
<b>主訴系統</b>	
CNS (seizure, neuropathy, intellectual disability, autism)	53 (40.8)
Heart (cardiac, vascular)	10 (7.7)
Gastrointestine, liver, biliary system	9 (7.0)
Kidney and genitalia	9 (7.0)
Skeleton, joints and skins	15 (11.5)
Metabolism (hyperlipidemia)	18 (13.8)
Cancer	4 (3.1)
Multisystem, syndromic	12 (9.2)

表二、CNV 種類及個數統計。

	Mendeliome			OMIM Dup/Del		
	Deletion	Duplication	Total	Deletion	Duplication	Total
Number (N)	429	623	1052	2068	1149	3217
Mean (N)	3.30	4.79	8.09	15.91	8.84	24.75
Percent (%)	40.78	59.22	100.00	64.28	35.72	100.00

表三、exome CNV 陽性個案列表。

Num ber	Age/ Sex	Chief complaints	CNV location	CNV size	Deletion/ duplication	Involving genes	pLI	pHaplo	pTriplo	Phenotype (G2P or OMIM morbid)
17	3/F	leukodystrophy, motor and speech delay, recurrent febrile seizure	16:56192232- 58723975	2.53 Mb	Dup	<i>CNOT1</i>	1.00	1.00	1.00	Holoprosencephaly, with or without pancreatic agenesis Vissers-Bodmer syndrome (VIBOS) (impaired intellectual development, speech delay, motor delay, and behavioral abnormalities)
						<i>GNAO1</i>	1.00	0.94	0.99	Developmental and epileptic encephalopathy
						<i>RSPRY1</i>	1.00	0.87	0.99	Spondyloepimetaphyseal dysplasia, Faden-Alkuraya type
			16:46474257- 48609957	2.14 Mb	Dup	<i>SIAH1</i>	0.85	0.86	0.96	SIAH1-Associated Neurodevelopmental Disorder
16:50025129- 50807670 (VUS)	782.54 Kb	Dup	<i>CYLD</i>	1.00	0.99	0.98	Brooke-Spiegler syndrome (skin tumors) Cylindromatosis Frontotemporal dementia and/or amyotrophic lateral sclerosis 8 Trichoepithelioma			
50	48/M	Niemann-Pick disease, vertical gaze palsy, splenomegaly, dementia, NPC1 NPC2, neurodegeneration, Parkinson	X: 8532951- 155545285	147.01 Mb	Dup	-	-	-	-	XXY syndrome

表三、exome CNV 陽性個案列表。(續)

Num ber	Age/ Sex	Chief complaints	CNV location	CNV size	Deletion/ duplication	Involving genes	pLI	pHaplo	pTriplo	Phenotype (G2P or OMIM morbid)
67	1/M	Failure to thrive, Microcephaly, high T2WI in globus pallidus, tremors	1:146975637- 148483351	1.51Mb	Del	-	-	-	-	1q21.1 recurrent microdeletion (Intellectual disability, Microcephaly, Short stature)
95	1/F	lissencephaly, epilepsy, developmental delay, microcephaly	17:16939117- 18388300	1.45Mb	Dup	-	-	-	-	Potocki-Lupski syndrome (17p11.2 duplication syndrome) (Autism, Hyperactivity, Short attention span, Short stature)
			17:18636469- 20460452	1.82Mb	Dup	-	-	-	-	
126	3/M	Epilepsy , Seizure	X: 8465706- 155524640	147.06 Mb	Dup	-	-	-	-	XXY syndrome
			17:80181430- 80198774 (VUS)	17.34kb	Dup	<i>CARD14</i>	0.00	0.85	0.96	Psoriasis

表四、exome CNV VUS 個案列表。

Num ber	Age/ sex	Chief complaints	CNV location	CNV size	Deletion/ duplication	Involving genes	pLI	pHaplo	pTriplo	Phenotype (G2P or OMIM morbid)
4	3/M	hearing impairment, atresia of left external auditory canal, VSD (ventricular septal defect), r/o CHARGE syndrome	7:74752088-74758891	6.80 Kb	Dup	<i>GTF2I</i>	0.96	0.83	0.97	none
12	0/F	Pelizaeus-Merzbacher Disease, leukodystrophy, Neurometabolic, Optic nerve coloboma, Moring glory optic nerve	8:3284079-3409667	125.59 Kb	Del	<i>CSMD1</i>	1.00	0.92	0.05	none
15	1/F	Imperforate anus with rectovestibular fistula , Congenital anomalies of kidney and urinary tract (CAKUT)	7:74752088-74777369	25.28 Kb	Dup	<i>GTF2I</i>	0.96	0.83	0.97	none
21	0/F	Citrullinemia, CIT2(-)	7:70775268-70787488	12.22kb	Dup	<i>AUTS2</i>	1.00	0.99	0.97	Syndromic Intellectual Disability
29	34/F	r/o Bartter Syndrome, hypokalemia	1:151364464-151430890	66.43kb	Dup	<i>POGZ</i>	1.00	0.98	0.98	Intellectual Disability
			7:74752088-74758891	6.80kb	Dup	<i>GTF2I</i>	0.96	0.83	0.97	none
33	4/M	hypotonia, joint hyperlaxity, collagenopathy, congenital myopathy, developmental and moter delay	9:126690820-127980207	1.29Mb	Dup	<i>LMX1B</i>	1.00	0.99	0.96	Nail-Patella Syndrome
						<i>STXBP1</i>	1.00	0.99	0.96	Epileptic Encephalopathy Early Infantile Type 4
			**similar patient** Decipher #270873 (unspecified pathogenecity) Conductive hearing impairment, Delayed speech and language development, Moderate global developmental delay							

表四、exome CNV VUS 個案列表。(續)

Num ber	Age/ sex	Chief complaints	CNV location	CNV size	Deletion/ duplication	Involving genes	pLI	pHaplo	pTriplo	Phenotype (G2P or OMIM morbid)
46	2/F	X-linked hypophosphotemic Rickets	21:43068504-43107532	39.03kb	Del	<i>U2AF1</i>	0.99	0.99	0.97	Intellectual disability
51	13/F	Long Qt syndrome, Polycystic kidney, funnel chest	1:151364534-151430849	66.31kb	Dup	<i>POGZ</i>	1.00	0.98	0.98	White-Sutton syndrome (hypotonia, sensorineural hearing impairment, visual defects, joint laxity, and gastrointestinal difficulties)
58	0/M	Adrenoleukodystrophy, r/o peroxisomal disease, albinism, abnormal NBS	1:151364534-151430849	66.31kb	Dup	<i>POGZ</i>	1.00	0.98	0.98	White-Sutton syndrome (hypotonia, sensorineural hearing impairment, visual defects, joint laxity, and gastrointestinal difficulties)
62	1/F	r/o Rasopathy, Noonan related spectrum, short stature	7:74752071-74758868	6.80kb	Dup	<i>GTF2I</i>	0.96	0.83	0.97	none
64	46/F	Russell-Silver syndrome, Hemihypotrophy, asymmetry, Schizencephaly	2:213007351-213375227	367.88kb	Del	<i>IKZF2</i>	0.99	0.99	0.85	none
65	8/M	myoclonic astatic epilepsy, heterotopia, brain malformation	11:116846386-116957065	110.68kb	Dup	<i>SIK3</i>	1.00	0.98	0.96	Spondyloepimetaphyseal dysplasia, Krakow type
69	21/F	Amennorhea, dominant, Hypogonadotrophic hypogonadism	7:74752071-74758868	6.80kb	Dup	<i>GTF2I</i>	0.96	0.83	0.97	none

表四、exome CNV VUS 個案列表。(續)

Num ber	Age/ sex	Chief complaints	CNV location	CNV size	Deletion/ duplication	Involving genes	pLI	pHaplo	pTriplo	Phenotype (G2P or OMIM morbid)
71	21/F	Neuromuscular, Neurodegeneration	9:26842282- 27330661	488.3kb	Del	<i>TEK</i>	1.00	0.92	0.32	Venous malformations, multiple cutaneous and mucosal, Glaucoma
72	28/F	Ataxia, Migraine, Cerebellar atrophy, Neurometabolic	1:151364534- 151430849	66.31kb	Dup	<i>POGZ</i>	1.00	0.98	0.98	White-Sutton syndrome (hypotonia, sensorineural hearing impairment, visual defects, joint laxity, and gastrointestinal difficulties)
74	50/F	Renal cell carcinoma and lung cancer	5:32107959- 32143874	35.91kb	Dup	<i>GOLPH3</i>	0.24	0.57	1.00	none
80	24/M	Cardiomyopathy, LV noncompaction	1:27830803- 27850465	19.66kb	Dup	<i>PPP1R</i>	0.99	0.87	1.00	none
82	13/M	Inflammatory bowel disease, Crohn disease	11:120112385 -120128717	16.33kb	Del	<i>TRIM29</i>	0.00	0.86	0.64	Intellectual disability
83	27/F	Inflammatory bowel disease, Crohn disease	5:139322453- 139330224	7.77kb	Dup	<i>MATR3</i>	1.00	0.97	0.99	Amyotrophic lateral sclerosis 21, Intellectual disability
90	4/M	Autistic behavior, borderline mentality, selective autism	1:151364534- 151430849	66.31kb	Dup	<i>POGZ</i>	1.00	0.98	0.98	White-Sutton syndrome (hypotonia, sensorineural hearing impairment, visual defects, joint laxity, and gastrointestinal difficulties)

表四、exome CNV VUS 個案列表。(續)

Num ber	Age/ sex	Chief complaints	CNV location	CNV size	Deletion/ duplication	Involving genes	pLI	pHaplo	pTriplo	Phenotype (G2P or OMIM morbid)
92	1/M	motor delay, Hypotonia, short stature	21:43068504- 43094797	26.29kb	Del	<i>U2AF1</i>	0.99	0.99	0.97	none
96	2/F	febrile seizure, epilepsy, vaccine encephalopathy, seizure, Severe Myoclonic Epilepsy in infancy	17:46170835- 46223741	52.91kb	Dup	<i>KANSL1</i>	1.00	0.96	0.96	Chromosome 17q21.31 duplication syndrome (intellectual disability, microcephaly)
100	18/F	Epilepsy, SCN1A, Tuberous sclerosis	1:151364534- 151430849	66.31kb	Dup	<i>POGZ</i>	1.00	0.98	0.98	White-Sutton syndrome (hypotonia, sensorineural hearing impairment, visual defects, joint laxity, and gastrointestinal difficulties)
101	7/M	Marfan syndrome	7:74753807- 74777365	23.56kb	Dup	<i>GTF2I</i>	0.96	0.83	0.97	none
104	13/M	Inflammatory bowel disease, Ulcerative colitis	9:33817160- 33920399	30.38kb	Dup	<i>UBE2R2</i>	0.98	0.92	0.97	none
107	15/M	Cardiovascular, Marfan syndrome	Y:23229568- 24796151	1.57mb	Del					AZFb+AZFc, oligospermia (CNV syndrome)
108	47/F	OI/EDS, Cardiovascular-bradycardia Fhx, Thyroid cancer FHx, Bone	5:139293674- 139331677	7.77kb	Dup	<i>MATR3</i>	1.00	0.97	0.99	Amyotrophic lateral sclerosis
119	58/F	Breast cancer	16:69677210- 69917892	240.68kb	Dup	<i>WWP2</i>	0.16	0.82	1.00	none
						<i>NFAT5</i>	1.00	1.00	1.00	none

表四、exome CNV VUS 個案列表。(續)

Num ber	Age	Chief complaints	CNV location	CNV size	Deletion/ duplication	Involving genes	pLI	pHaplo	pTriplo	Phenotype (G2P or OMIM morbid)
121	0/F	Rasopathy, Mega cisterna magna, mild hypotonia	21:43066250- 43095547	29.30kb	Del	<i>U2AF1</i>	0.99	0.99	0.97	none
122	4/F	r/o Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism, type I, short stature, moyamoya, high pitched voice	17:80181430- 80198774	17.34kb	Dup	<i>CARD14</i>	0.00	0.85	0.96	psoriasis
129	16/F	Idiopathic hypogonadotropic hypogonadism, Primary amenorrhea, Idiopathic hypogonadotropic hypogonadism, Kallmann syndrome	21:43094462- 43169849	75.39kb	Del	<i>U2AF1</i>	0.99	0.99	0.97	none
			7:74752071- 74758868	6.80kb	Dup	<i>GTF2I</i>	0.96	0.83	0.97	none

表五、WES SNV 及 exome CNV 的診斷比較。

	WES (SNV & indel)			
	pathogenic/likely pathogenic	VUS	Benign/likely benign	negative
Exome CNV positive	1	1	0	3
Exome CNV VUS	11	12	0	8
Exome CNV negative	46	33	3	12

表六、Exome CNV 及 array CGH 的診斷比較及確效(validation)。

個數(N)	Array CGH					
	Pathogenic/likely pathogenic	VUS	Benign/likely benign	Negative	Not done	Total
Exome CNV positive	3	0	0	0	2	5
Exome CNV VUS	0	2	0	1	28	31
Exome CNV negative	0	4	0	1	89	94
Total	3	6	0	2	119	130

表七、Exome CNV 及 array CGH 的結果比較列表。

Num ber	Age/ sex	Chief complaints	NGS-based result	NGS-based CNV location	NGS-based CNV size	Deletion/ duplication	Array CGH result	Array CGH CNV location	Array CGH CNV size	Deletion/ duplication
10	9/F	progressive motor regression	Negative	undetectable			VUS	14: 20052038- 106871264	86.82 Mb	Dup (mosaic 10%)
11	0/M	Seizure, Hypoparathyroidism, Canavan syndrome (Leukodystrophy), Subcortical white matter	Negative	undetectable			VUS	3:122172818- 122308437	136 Kb	Dup
							VUS	4:57327425-61864939	4.53 Mb	Dup
13	3/M	global delay, lactic acidosis, high CK	Negative	7:33905631- 34153392	247.76 Kb	Dup	VUS	7:33751776-34350519	599 Kb	Dup
17	3/F	leukodystrophy, motor and speech delay	positive	16:56192232- 58723975	2.53 Mb	Dup	pathogenic	16:46455602- 58769428	12.3 Mb	Dup
				16:46474257- 48609957	2.14 Mb					
				16:50025129- 50807670	782.54 Kb					
				16:51137082- 51151331	14.25kb					

表七、Exome CNV 及 array CGH 的結果比較列表。(續)

Num ber	Age/ sex	Chief complaints	NGS-based result	NGS-based CNV location	NGS-based CNV size	Deletion/ duplication	Array CGH result	Array CGH CNV location	Array CGH CNV size	Deletion/ duplication
33	4/M	hypotonia, joint hyperlaxity, collagenopathy, congenital myopathy, motor delay, normal creatine kinase, COL6A1, developmental and moter delay	VUS	9:126690820- 127980207	1.29Mb	Dup	VUS	9: 124988129- 128039106	3.05 Mb	Dup
50	48/M	Niemann-Pick disease, vertical gaze palsy, splenomegaly, dementia, NPC1 NPC2, neurodegeneration, Parkinson	positive	X: 8532951- 155545285	147.01 Mb	Dup	pathogenic	Xp22.33q28	155.75 Mb	Dup
64	46/F	Russell-Silver syndrome, Hemihypotrophy, asymmetry, Schizencephaly	VUS	2:213007351- 213375227	367.88kb	Del	VUS	2: 212831105- 15251928	2.42 Mb	Del
			Negative	2:213862475- 214436753	574.28kb					
			Negative	2:214728445- 215138238	409.79kb					
67	1/M	Failure to thrive, Microcephaly, high T2WI in globus pallidus, tremors	positive	1:146975637- 148483351	1.51Mb	Del	Not done			Del
75	1/F	Hypotonia, chubby face, taper finger	negative				negative			

表七、Exome CNV 及 array CGH 的結果比較列表。(續)

Num ber	Age/ sex	Chief complaints	NGS-based result	NGS-based CNV location	NGS-based CNV size	Deletion/ duplication	Array CGH result	Array CGH CNV location	Array CGH CNV size	Deletion/ duplication
95	1/F	lissencephaly, epilepsy, developmental delay, microcephaly	positive	17:18636469- 20460452	1.82Mb	Dup	pathogenic	17:16919369- 20289856	3.37 Mb	Dup
				17:16939117- 18388300	1.45Mb					
122	4/F	r/o Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism, type I, short stature, moyamoya, high pitched voice	VUS	17:80181430- 80198774	17.34kb	Dup	negative			
126	3/M	Epilepsy , Seizure	positive	X: 8465706- 155524640	147.06 Mb	Dup	Not done			
			VUS	17:80181430- 80198774	17.34kb	Dup				
131	24/M	polyneuropathy	negative	2:43832564- 43982442	149.88kb	Dup	VUS	2:43823900-43981032	157 Kb	Dup