

# 无创单基因病的研究进展

胡听听 综述 王继成\* 校审

(广州医科大学附属广东省妇儿医院,广东 广州 510010)

**【摘要】** 预防出生缺陷一直是困扰临床的一大难题,但胎儿游离 DNA(cell-free fetal DNA, cff-DNA)的发现,给临床检测提供了一条新的途径。传统的出生缺陷检测一般是侵入性产前诊断,如穿刺抽取羊水、脐血或绒毛。然而,侵入性产前诊断可能导致 1% 的流产或胎儿感染。随着高通量测序技术和方法的进步,可以精准获取孕妇外周血中胎儿游离 DNA。现在,对 13、18、21 号染色体三体综合征的无创产前筛查(non-invasive prenatal scanning, NIPS)已经大规模临床应用,但是对于胎儿单基因病的无创检测依然处于研究阶段,本文综述了近几年无创单基因病检测研究的新进展,探讨临床应用的发展趋势。

**【关键词】** 无创产前检测; 胎儿游离 DNA; 单基因病

**【中图分类号】** R714.55 **【文献标识码】** A

1997年,Lo等<sup>[1]</sup>证实了母体外周血胎儿游离 DNA(cell-free fetal DNA, cff-DNA)可以诊断胎儿遗传性疾病。最近的临床研究也证实,在单胎妊娠中使用无创产前检测(non-invasive prenatal testing, NIPT)检测 21、18、13-三体比传统的筛查方案具有更低的假阳性和更高的阳性预测值<sup>[2]</sup>。随后,各种方法如雨后春笋一样不断出现。如今,可以在母体外周血中发现全部的胎儿基因组<sup>[3,4]</sup>,这也是各种胎儿遗传性疾病可以通过母体外周血检测的基础。

产前诊断是通过各种方法检测和监测胎儿生长发育状况,检测方法分为有创和无创。传统有创产前检测方法是在血清学检查或超声诊断中发现胎儿可能存在生长发育异常状况,进一步对胎儿染色体进行检测,包括羊水穿刺、绒毛穿刺、脐血穿刺等胎儿细胞学检查。这些穿刺检测方法不仅会造成大约 1% 的流产率,也会对胎儿和母体造成伤害<sup>[5]</sup>。有研究发现,在孕 5 周时,孕妇外周血就可以稳定地检测到 cff-DNA<sup>[6]</sup>,这样可以在早期即可监测胎儿遗传发育状态。通过提早检测胎儿遗传性疾病,可以尽早进行终止妊娠,避免对孕妇产生更多伤害。有研究表明,cff-DNA 主要来源于胎盘滋养层细胞,高度

片段化,在胎儿出生后就从母血中完全清除了,一般不会影响下一胎的检测<sup>[7]</sup>。

现阶段应用于临床的无创产前诊断主要是检测胎儿 21、18、13 和性染色体异常以及血型 RHD 基因的检测<sup>[2]</sup>。随着胎儿全基因组游离 DNA 的发现,单基因病检测成为下一个需要解决的难题。由于孕妇外周血中存在大量孕妇游离 DNA, cff-DNA 大约只占 10%~15%<sup>[8]</sup>,对单基因的检测造成干扰,且需要获取父母或先证者的基因型构建胎儿基因型,从而推测胎儿单基因病遗传状况,所以现阶段无创产前单基因病检测还处于实验探索阶段。经过多年的技术和研究方法的改进,无创产前单基因病检测取得了长足的发展,本综述即以此发展作为主题,论述近几年单基因无创产前诊断的发展状况。

## 1 无创单基因病

单基因病又名孟德尔遗传病,从 OMIM 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)可查的单基因病大约有 8000 多种,平均每个人携带 2.8 个隐性遗传病致病突变。在无创产前胎儿单基因病检测中,由于需要先证者和父母双方的基因型,对于没有临床表型并且没有先证者的家庭,或者对于难以发现的隐性单基因遗传病的家庭,进行无创产前单基因检测很困难。随着技术的发展和医学的改

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2021.04.015

基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(B2019150)

\* 通信作者:王继成, E-mail: jicheng0927@126.com

进,很多胎儿的遗传病现在都可以通过各种方法检测出,包括常染色体显性、隐性遗传病,比如  $\alpha/\beta$  地

中海贫血、遗传性肾上腺增生、软骨发育不全、囊性纤维化等。单基因遗传特点见表 1。

表 1 单基因病遗传特点

常染色体显性遗传	常染色体隐性遗传	X-连锁显性遗传	X-连锁隐性遗传
垂直遗传,后代患病 50%	每个后代患病率为 25%,携带率为 50%	患病女性后代男性患病,患病男性后代男性正常;患病女性的后代男女患病概率相等,概率为 50%	女性患者后代男性有 50% 概率患病,后代女性都正常;男性患者后代都正常

外周血中 90% 是母体 DNA<sup>[4]</sup>,通过检测母体外周血中胎儿新发突变和父方突变,可以间接获取胎儿单基因病携带状况。但是暂时还没有一种方法能直接获得母体外周血中胎儿全部基因组 DNA,故多数研究都停留在试验阶段。现有的技术或方法都旨在提高母血中 cff-DNA 的检测质量,提高疾病检测的灵敏度和特异度。这些方法包括基本的分子生物学检测技术和新发展的下代测序技术或单分子测序技术等,对于不同的疾病需使用不同的方法。而临床应用则需要检测方法操作简单、结果可靠、检测

时间短,以及检测费用低廉。

### 3 常见无创单基因病检测方法和技术

母血血浆中胎儿 DNA 浓度非常低,且大多属于小片段(大多数是小于 200bp)<sup>[8]</sup>,需要合适的提取方法和分析方法检测胎儿 DNA。常见的提取方法有磁珠提取法和柱提法。柱提法有 QIAamp DNA Blood Mini Kit 或者 TIANamp Micro DNA Kit 等,常用的检测技术方法见表 2。

表 2 常用检测技术和方法

技术	方法
聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)	扩增目的片段
PCR-酶切 (PCR-restriction enzyme digestion, PCR-RED)	限制酶消化法
荧光定量 PCR (quantitative fluorescent PCR, QF-PCR)	STR (短串联重复序列) 检测方法
实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)	Taqman 探针; MGB 探针
等位基因特异性 PCR (allele specific PCR, AS-PCR)	基于引物和基于探针的等位基因区分法
肽链核酸 PCR (peptide nucleic acid clamp PCR, PNA-PCR)	引物竞争杂交法
低温变性下复合 PCR (co-amplification at lower denaturation temperature-PCR, COLD-PCR)	根据不同的退火温度特性检测杂合或纯合双链
高效液相色谱 (denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)	根据不同的退火温度特性检测杂合或纯合双链
第二代测序技术 (next generation sequencing, NGS)	测序检测出突变基因
单分子测序	直接检测突变位点
目标捕获测序	探针捕获目标突变序列然后测序

这些方法(见表 2)中测序技术包括一代 sanger 测序,比如 ABI3500 测序平台;二代循环芯片测序法 (cyclic-array sequencing), 比如 Roche454、Illumina Miseq、Ion Torrent 等测序平台;三代测序单分子测序,比如 Heliscope 等测序平台。通过这些技术方法获得的数据进行生物学分析,可以得到胎儿的遗传学信息。分析方法主要有直接检测法,比如检测 Y 染色体异常突变;相对突变剂量法 (relative mutation dosage, RMD),通过检测血浆 DNA 中相对突变剂量进行突变位点分析,主要针对常染色体显性遗传病,比如血友病、RhD 基因检测;相对单体型剂量法 (relative haplotype dosage analysis, RHDO),多用于单基因病的检测,主要使

用单核苷酸多态性 (singlenucleotide polymorphism, SNP) 连锁分析获得胎儿的单体型,从而推测胎儿的等位基因突变点。Lo 等<sup>[3]</sup>在一篇文章中提到,在单体型等位基因检测方面 RHDO 优于 RMD,并且分析方法也更为准确可靠。RHDO 方法主要从下面几个方面检测出胎儿遗传单体型等位基因:首先通过对父母双方和先证者进行 SNP 位点检测,获得所需的 SNP 位点信息,然后进行外周血 cff-DNA 检测,再通过 RHDO 分析计算 cff-DNA 等位 SNP 位点比率,推测出胎儿遗传自父母的单体型。若检测遗传自父方单体型,则选取父方为杂合母方为纯合的 SNP 位点构建胎儿单体型;检测母方遗传的胎儿单体型,则需要选取母方为杂合父方为纯合的 SNP

位点,再通过相对剂量计算就可以得出胎儿单体型。这种方法选取的 SNP 位点越多得到的结果也就越可靠准确,但也需要平衡检测费用等。

RHDO 存在的问题是如何获得 cff-DNA 所占母体游离 DNA 的比例。由于个体差异,cff-DNA 的量易受孕周、体重等影响,不容易确定。对于男婴可以通过 Y 染色体确定 cff-DNA 比例,比如选取 Y 染色体上的 SRY 基因进行荧光定量 PCR。然而对于女婴,由于很难选取与母体差异的标志基因,故很难进行定量。一种方法是经过大规模人群筛选,确定 160bp 的片段大多来源于胎儿 DNA,故通过测定该片段的量可以确定 cff-DNA 的量;另一种方法是选取母体和胎儿差异表达的基因进行相对定量。一项研究发现 RASSF1A 基因在母体中是低甲基化的,而在胎盘中是高甲基化的,通过限制酶对低表达的母血 DNA 消化,然后对胎儿特异的 RASSF1A 高甲基化基因进行荧光定量 PCR 测定,

则可确定 cff-DNA 的量<sup>[9, 10]</sup>。Lam 等<sup>[11]</sup>在无创产前诊断 beta 地中海贫血研究中使用 6 号染色体上的父母均为纯合的 SNP 位点获得胎儿 cff-DNA 所占比例,该方法的方程式为  $f = \frac{\sum 2p}{\sum (p+q)}$  (其中 p 是父方遗传的 cff-DNA 数量, q 是母方和母方遗传的 cff-DNA 数量, f 是 cff-DNA 所占比例)。

一项由 Hui 和 Lo 等<sup>[12]</sup>参与的研究证实通过 RHDO 方法可以检测大多数单基因病。他们使用 10Xgenomic 公司的 Linked read 技术,结合二代测序,对 13 个家庭进行 RHDO 分析,包括 Beta 地中海贫血、先天性肾上腺皮质增生症和血友病。该研究团队先对 13 个家庭的父母单倍型进行分析,确定所需的 SNP 位点,然后通过测序检测母血中短片段游离 DNA,通过 RHDO 分析胎儿突变图谱,确定胎儿单基因病遗传突变情况。由于该方法成本高,暂不适用于临床。

#### 4 常见单基因病的无创产前检测(表 3)

表 3 常见单基因病的无创检测

遗传模式	疾病	基因	致病	相关文献
X-隐性遗传	进行性假肥大性肌营养不良	DMD	肌萎缩、肺炎、心肌病	[13]
	甲型血友病	F8	凝血障碍、反复出血、关节畸形	[14]
	乙型血友病	F9	凝血障碍、反复出血、关节畸形	
常染色体隐性遗传	地中海贫血	HBA1、HBA2、HBB	小细胞低色素贫血、严重者死亡	[15]
	遗传性耳聋	GJB2、SLC2、6A4	语前失聪、语言障碍	[16]
	脊髓性肌萎缩症	SMA1、SMA2	肌张力过低、呼吸衰竭	[17]
	枫糖尿症	BCWKDHA	营养障碍、智力低下、严重者死亡	[18]
	苯丙酮尿症	PAH	生长迟缓、智力低下、脑萎缩	[19]
	肝豆状核变性	ATP7B	肝硬化、脑退化	[20]
	先天性肾上腺皮质增生	CYP21A2	雄激素过多、代谢性酸中毒	[21]
	囊性纤维化	CFTR	营养不良、胰腺外分泌功能障碍	[22]
	Leber 遗传性黑蒙	CRB1	视力障碍	[23]
	软骨发育不全	FGFR3	肢体与四肢不成比例、严重者死亡	[24]
常染色体显性遗传	亨廷顿舞蹈症	HTT	尾状核萎缩、意向性震颤	[25]
	原发性肌张力障碍	DYTI	运动障碍	[26]

4.1 杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)和贝氏肌营养不良(Beckermuscular dystrophy, BMD) DMD 是一种 X-连锁隐性遗传性肌病,典型临床特征以进行性肌萎缩无力伴小腿腓肠肌假性肥大为主。在人群中一般 3~5 岁发病,20 岁左右便发病死亡,在存活的男婴中其发病率为 1/3600~1/6000<sup>[27]</sup>。BMD 发病率略低,大概 1/18 000,具有 DMD 相似的临床特征,但病情较轻。DMD 基因至少含有 79 个外显子,位于 Xp21.2,长度大约为 2.4Mb。约 70% DMD 患者

存在 1 个或多个外显子大片段缺失或重复,剩余约 30%可能是点突变、小的插入缺失、复杂的微小重排等。Xu 等<sup>[13]</sup>的 1 项对 8 个家庭的研究提出无创产前诊断可以应用于检测 DMD。这 8 个家庭的孕妇都是 DMD 携带者,孕期分布为 17~22 周,他们首先通过目标测序检测出父方、母方和先证者的单体型,选取 SNP 位点进行探针设计。这些探针在 X 染色体上随机分布,包括 1.66M 的外显子区域和 39 319 个高度杂合的 SNP 位点,其中 1243 个 SNP 位点是在 DMD 基因区域。cff-DNA 浓度通过选取

父母 SNP 为纯合的位点,22 号染色体为杂合的 SNP 位点进行检测,浓度差别大概在 3.52%~22.67% 之间。外周血游离 DNA 使用 Illumina HiSeq2000 检测,目标区域测序深度为 36.4,覆盖度为 95.23%,然后通过隐马尔科夫模型隐马尔科夫模型(hidden Markov model, HMM)推测胎儿单体型。该方法得出的结果和有创绒毛膜穿刺结果一致,但由于检测费用高,易受游离胎儿 DNA 浓度和胎儿染色体重组的影响,故暂时还未进入临床应用。

英国伯明翰妇女医院遗传实验室 Michael 团队招募了 2 个研究组对无创产前检测 DMD 进行研究,一组是已经通过有创检测出非整倍体高风险孕妇,另一组是已知孕妇是 DMD/BMD 携带者<sup>[28]</sup>。由于 DMD/BMD 是 X 连锁遗传病,所以只需要通过母亲单体型和先证者单体型确定 SNP 位点进行检测分析。对孕妇外周血游离 DNA 进行目标捕获测序检测后,通过 RHDO 分析,获得胎儿单体型。目标探针检测区域包括 1350 个 SNP 位点,位于该基因的 2.4Mb 范围内(ChrX:31037731-33457670)。结果显示除了 2 个家庭游离 DNA 过低(低于 4%)无法做进一步检测,其他结果都和有创检测结果一致。同时该团队提到需要设计更多的探针检测基因上下游非编码区,因为这些调控区域也可能导致疾病的发生。最后他们谈到可以建立探针数据库和通过检测多种疾病完善方法来降低检测费用。

4.2 脊髓性肌萎缩不良(spinal muscular atrophy, SMA) SMA 是一种常染色体隐性遗传疾病,发病率约为 1/6000~1/10 000。这种病在 2 岁以下小孩致死率很高,给家庭带来巨大痛苦和负担。约 95% 的病人主要由于 SMN1 基因中的 7、8 号外显子缺失。传统的产前诊断方法是通过绒毛或羊水穿刺获取胎儿 DNA,使用多重连接探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)、QF-PCR、DHPLC 等方法检测。2015 年 Chen<sup>[29]</sup>团队的一项研究表明可以通过无创方法检测胎儿 SMA 基因突变。该研究团队招募了 5 个 SMA 携带者家庭,使用目标捕获测序法对 SMN1 基因的 28Kb 编码序列和该基因上下 3M 区域的 2011 个 SNP 位点进行测序,然后通过父母、先证者三方的 SNP 位点进行分析,最后的结果和侵入性产前诊断的结果完全一致。该研究证明该方法的可靠性较高,但受测序深度、SNP 位点信息和目标区域

GC 含量的影响,导致该方法敏感性低。

Parks<sup>[17]</sup>的团队使用目标捕获测序法合并 RHDO 方法从父方、母方和先证者的 SNP 连锁分析的到胎儿单体型,检测胎儿 SMA。他们选取了位于 5 号染色体 13.2 区域的包括 SMA1 和 SMA2 基因的 6Mb 区域共 3039 个 SNP 位点,这些位点杂合率大于 40%。检测分析了 13 个家系,灵敏度和特异度为 100%,单体型 SNP 分型的准确度为 99.43%。该方法的缺点为无法检测嵌合的家系、新发突变、异卵双胞胎、器官移植和没有先证者的家系。若使用该方法对双胞胎消失之一的孕妇和 SMA 基因高度重复序列重组难以设计探针的区域的家系进行检测,可能会导致误诊。该方法可以在孕初期进行检测,而不影响后续的妊娠监测。

4.3 地中海贫血 地中海贫血是遗传突变导致珠蛋白合成障碍或缺乏的一种血液疾病,表现为小细胞低色素贫血,严重者需要终生输血,甚至胎死宫内。针对地中海贫血,现有的产前检测手段为绒毛检测、羊水穿刺或脐血穿刺,这可能会导致胎儿畸形、死亡或宫内感染。Lam 等<sup>[11]</sup>使用了目标捕获测序结合 RHDO 分析检测  $\beta$  地中海贫血,对每个家庭都需要重新设计 SNP 位点,但如若父母有亲缘关系则很难选择 SNP 位点。该研究对于已知点突变且容易直接从孕妇外周血游离 DNA 获取突变型,则可以使用 RMD,这样根据不同的情况选择这两种方法,更经济有效。南方医科大学的 Yan 等<sup>[15]</sup>在 2011 年发表的文章中指出,可以对  $\alpha^0$  型地中海贫血(—<sup>SEA</sup>、—<sup>FIL</sup>和 —<sup>THAI</sup>)缺失部位寻找 SNP 位点,排除父方遗传的  $\alpha^0$  型,可以使一半的孕妇免受有创检测。常见的  $\beta$  地中海贫血大多都是 HBB 基因点突变引起的, $\alpha$  地中海贫血大多由相关基因缺失引起。桂林医科大学附属医院的优生遗传实验室尝试通过孕妇外周血 cff-DNA 来检测  $\alpha$  和  $\beta$  地中海贫血,这给地中海贫血携带者孕妇带来希望<sup>[15]</sup>。他们使用的是目标捕获测序结合 RHDO 分析,捕获探针包含 3.7Mb 的目标区域,包括 HBA1、HBA2 和 HBB 基因突变区域。首先通过目标捕获测序检测父母和先证者的单体型,然后测序母体外周血游离 DNA,分析其单体型组成,推测胎儿单体型,最后获得胎儿遗传突变位点。他们招募了 2 个家庭进行研究,一个家庭是 CD17(A>T)的母亲和 CD41-42(-TTCT)的父亲,另一个家庭夫妻双方都是 SEA

杂合缺失。该研究和之前的无创产前检测地中海贫血的新颖点在于他们使用了目标区域高度杂合的 SNP 位点,这样减少了目标区域的范围,进而减少了测序深度,降低了成本,同时区域限制在小范围可以减少重组导致的误差。

4.4 囊性纤维化 囊性纤维化是一种严重的常染色体隐性遗传病,由于外分泌腺异常导致慢性梗阻性肺病、消化系统疾病等,患有该病的半数儿童因感染或心肺衰竭等严重并发症导致死亡。在活婴中发病率为 1/2500 ~ 1/3500,携带率大约为 1/25。Hill<sup>[22]</sup>的研究团队招募了囊性纤维化基因 *CFTR* 突变携带者的孕妇,首先建立一个 *CFTR* 突变基因相关的二代测序 Panel,通过测序方法检测 *CFTR* 基因附近的多个 SNP 位点,然后使用 RMD 分析胎儿基因型。这种方法可以同时检测不同的家庭、不同的突变点和一些其他的不同的情况。和全基因组测序、目标捕获测序等方法相比这种方法具有实效性、时间短、花费少。他们同时还提出在确保准确、安全、有效的情况下,应该站在孕妇角度,从实用和经济角度考虑,这些研究才更有意义。另一项研究针对具有囊性纤维化或 SMA 高风险的 63 个孕妇家庭,进行多种方法组合检测<sup>[26]</sup>。他们首先从孕妇外周血细胞中有核细胞进行 HE 染色,分离大于 15um 的滋养层细胞,进行全基因组扩增,然后使用短串联重复序列(short tandem repeat, STR)方法检测胎儿遗传突变。该方法比起其他检测 cff-DNA 更为直接,实验若设计合理则可以的到可靠的结果,这也给未来无创产前筛查(non-invasive prenatal scanning, NIPS)带来一个新的发展方向。

## 5 结语

通过方法和策略的选择,我们已经能够检测很多的已知的单基因遗传病。虽然母体外周血中 cff-DNA 浓度很低,但检测灵敏度不断提高,4%左右的 cff-DNA 浓度已经能应用到胎儿遗传病的检测。从 cff-DNA 的发现,到非整倍体检测的成熟,到现在胎儿基因组学、表观遗传学、转录组学等各方面开花。通过基因组学,我们不仅可以知晓胎儿非整倍体情况,也可以获取胎儿微缺失/微重复的状况<sup>[30]</sup>;通过表观遗传学,我们可以追踪胎儿生长发育状况,甚至通过对胎儿疾病早期干预,达到治疗的目的<sup>[31]</sup>;通过转录组学,可以更加深刻地认识表达调控等信

息<sup>[32]</sup>。随着非整倍体在临床中的大规模应用,将会有越来越多的遗传性疾病在无创产前诊断中应用,相信随着研究的深入,对胎儿疾病的干预治疗等也会随着胎儿遗传物质的研究而发展。但是面对基因重组、嵌合体、双胎妊娠等还没有一个好的解决方案;对于新发突变,需要不断地改进方法。另一方面,单基因病只占全部遗传性疾病的少部分,应用于临床则需要考虑费用,现今的 NIPS 检测方法大多费时费力费钱,也需要不断改进。现阶段通过加大测序深度,大多数单基因病或新发突变都能通过适当分析得到,但这些方法和策略面对不同疾病类型就需要不断更换,不断重新设计,比如 SNP 位点的选择,使检测成本大幅提升。不过随着研究的方法深入,获得的信息越来越多,技术越来越成熟,测序成本越来越低,相信不久的将来无创产前单基因病也会成为一个临床常规项目。

## 参考文献

- [1] LO YM, CORBETTA N, CHAMBERLAIN PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. *Lancet*, 1997,350(9076):485-487.
- [2] LIAO C, YIN A, PENG C, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of common aneuploidies by semiconductor sequencing[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(20): 7415-7420.
- [3] LO YM, CHIU RW. Noninvasive approaches to prenatal diagnosis of hemoglobinopathies using fetal DNA in maternal plasma[J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2010,24(6): 1179-1186.
- [4] LO YM, CHAN KC, SUN H, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus[J]. *Sci Transl Med*, 2010,2(61):61r-91r.
- [5] GAGNON A, WILSON R, AUDIBERT F, et al. Obstetrical complications associated with abnormal maternal serum markers analytes[J]. *J Obstet Gynaecol Can*, 2008,30(10): 918-949.
- [6] BUSTAMANTE-ARAGONES A, GARCIA-HOYOS M, RODRIGUEZ DE ALBA M, et al. Detection of a paternally inherited fetal mutation in maternal plasma by the use of automated sequencing[J]. *Ann Ny Acad Sci*, 2006,1075(1): 108-117.
- [7] LO YM, ZHANG J, LEUNG TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma[J]. *Am J Hum Genet*, 1999,64(1):218-224.
- [8] CHAN K C, ZHANG J, HUI A B, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma[J]. *Clin*

- Chem, 2004,50(1):88-92.
- [9] CHAN K C, DING C, GEROVASSILI A, et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis[J]. Clin Chem, 2006,52(12):2211-2218.
- [10] WHITE H, DENT C, HALL V, et al. Evaluation of a novel assay for detection of the fetal marker RASSF1A: Facilitating improved diagnostic reliability of noninvasive prenatal diagnosis[J]. Plos One, 2012,7(9):e45073.
- [11] LAM K, PEIYONG J, LIAO G, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by targeted massively parallel sequencing of maternal plasma; application to  $\alpha$ -thalassemia [J]. Clin Chem, 2012,58:1467-1475.
- [12] HUI WWI, JIANG P, TONG YK, et al. Universal haplotype-based noninvasive prenatal testing for single gene diseases[J]. Clin Chem, 2017,63(2):513-524.
- [13] XU Y, LI X, GE H, et al. Haplotype-based approach for noninvasive prenatal tests of Duchenne muscular dystrophy using cell-free fetal DNA in maternal plasma[J]. Genet Med, 2015,17(11):889-896.
- [14] TSUI N, KADIR R, CHAN K A, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA[J]. Blood, 2011,117(13):3684-3691.
- [15] YAN T, MO Q, CAI R, et al. Reliable detection of paternal SNPs within deletion breakpoints for Non-Invasive prenatal exclusion of homozygous  $\alpha$ 0-Thalassemia in maternal plasma [J]. Plos One, 2011,6(9): e24779.
- [16] MENG M, LI X, GE H, et al. Noninvasive prenatal testing for autosomal recessive conditions by maternal plasma sequencing in a case of congenital deafness[J]. Genet Med, 2014,16(12):972-976.
- [17] PARKS M, COURT S, BOWNS B, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy by relative haplotype dosage[J]. Eur J Hum Genet, 2017,25(4):416-422.
- [18] YOU Y, SUN Y, LI X, et al. Integration of targeted sequencing and NIPT into clinical practice in a Chinese family with maple syrup urine disease[J]. Genet Med, 2014,16(8):594-600.
- [19] DUAN H, LIU N, ZHAO Z, et al. Non-invasive prenatal testing of pregnancies at risk for phenylketonuria[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2019, 104(1):F24-F29.
- [20] LV W, WEI X, GUO R, et al. Noninvasive prenatal testing for wilson disease by use of circulating Single-Molecule amplification and resequencing technology (cSMART) [J]. Clin Chem, 2014,61(1):172-181.
- [21] MA D, GE H, LI X, et al. Haplotype-based approach for noninvasive prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma DNA sequencing[J]. Gene, 2014,544(2):252-258.
- [22] HILL M, TWISS P, VERHOEF TI, et al. Non-invasive prenatal diagnosis for cystic fibrosis: Detection of paternal mutations, exploration of patient preferences and cost analysis; Non-invasive prenatal diagnosis for cystic fibrosis [J]. Prenat Diagn, 2015,35(10):950-958.
- [23] BUSTAMANTE-ARAGONES A, VALLESPIN E, ALBA M, et al. Early noninvasive prenatal detection of a fetal CRB1 mutation causing Leber congenital amaurosis[J]. Mol Vis, 2008,14:1388-1394.
- [24] CHITTY L, FIELDING S, BARRETT A, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia and thanatophoric dysplasia: Next-generation sequencing allows for a safer, more accurate, and comprehensive approach: Non-invasive prenatal diagnosis using next-generation sequencing[J]. Prenat Diagn, 2015,35(7):656-662.
- [25] GONZÁLEZ-GONZÁLEZ M, GARCIA-HOYOS M, TRUJILLO-TIEBAS M, et al. Improvement in strategies for the non-invasive prenatal diagnosis of Huntington disease[J]. J Assist Reprod Genet, 2008, 25(9-10):477-481.
- [26] AMICUCCI P, GENNARELLI M, NOVELLI G, et al. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma[J]. Clin Chem, 2000, 46:301-302.
- [27] BRADLEY D. Newborn screening for Duchenne muscular dystrophy[J]. Neonatology, 1998, 3:27-34.
- [28] PARKS M, COURT S, CLEARY S, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies by relative haplotype dosage[J]. Prenat Diagn, 2016,36(4):312-320.
- [29] CHEN M, LU S, LAI Z, et al. Targeted sequencing of maternal plasma for haplotype-based noninvasive prenatal testing of spinal muscular atrophy[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2017, 49(6):799-802.
- [30] SRINIVASAN A, BIANCHI D, HUANG H, et al. Noninvasive detection of fetal subchromosome abnormalities via deep sequencing of maternal plasma [J]. Am J Hum Genet, 2013, 92(2):167-176.
- [31] LISTER R, PELIZZOLA M, DOWEN R, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences[J]. Nature, 2009, 462(7271):315-322.
- [32] KOH W, PAN W, GAWAD C, et al. Noninvasive in vivo monitoring of tissue-specific global gene expression in humans [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014,111(20):7361-7366.

(收稿日期:2021-10-19)

编辑:宋文颖