

基于孕妇外周血浆游离胎儿 DNA 的地中海贫血无创产前基因诊断研究进展

王逾男 综述 尹爱华* 审校

(广州医科大学附属广东省妇儿医院, 广东 广州 511442)

【摘要】 地中海贫血是我国长江以南各省发病率最高、影响最大的单基因遗传病,目前尚无有效的治疗方法。在地贫高发地区有效开展婚前、孕前筛查以及对夫妻双方携带同种地贫基因的孕妇进行产前诊断是预防重度患儿出生的首选方法。目前胎儿地贫基因检测基于有创性手术获得胎儿 DNA 进一步基因诊断,有一定的流产和宫内感染的风险。我们迫切需要找到安全、无创、准确、简便、早期诊断的方法,cffDNA 的发现开启了无创产前诊断的新篇章,且基于二代测序平台的 NIPT 技术无创产前诊断胎儿唐氏综合征已广泛应用于临床,其准确性可达 99%,这为地贫无创产前诊断研究提供了新的思路。本文旨在综述基于孕妇外周血浆胎儿游离 DNA 的地中海贫血无创产前诊断技术研究进展。

【关键词】 地中海贫血;无创产前诊断;游离胎儿 DNA

【中图分类号】 R714.55

【文献标识码】 A

地中海贫血(简称“地贫”)是一种因珠蛋白合成障碍所致的遗传性溶血性疾病,分 α 地中海贫血(简称“ α 地贫”)和 β 地中海贫血(简称“ β 地贫”)两种。我国以南方地区多见,尤以广东、广西和海南为甚,是长江以南各省发病率最高、影响最大的单基因遗传病^[1]。目前地贫尚无有效的治疗方法,重度 α 地贫儿一般在出生的 24~48 小时之内死亡,重度 β 地贫儿和部分中间型 α 地贫儿在出生后 3~6 个月开始出现贫血症状并进行性加重,严重者必须依靠输血和联合铁螯合剂的长期治疗,但治疗价格昂贵,而骨髓移植又需要严格的供体,因此目前并没有理想的治疗方法。故在地贫高发地区对夫妻双方携带同种地贫基因的孕妇进行产前诊断是预防重度患儿出生的首选方法。目前胎儿地贫基因检测基于有创性手术获得胎儿 DNA 进一步基因诊断,有一定的流产和宫内感染的风险。我们迫切需要找到安全、无创、准确、简便、早期诊断的方法,cffDNA (cell free fetal DNA, cffDNA) 的发现开启了无创产前诊断的新篇章,而基于二代测序平台的无创产前诊断

技术(next-generation sequencing-based non-invasive prenatal testing, NIPT)诊断胎儿唐氏综合征已广泛应用于临床,其准确性可达 99%^[2]。这些为地贫无创产前诊断研究提供了新的思路。本文旨在综述基于孕妇外周血浆胎儿游离 DNA 的地中海贫血无创产前诊断技术研究进展。

1 cffDNA 的发现与特点

1997 年,Lo 等^[3]选用染色体上特定的 SRY 基因作为胎儿源性 DNA 的研究标记物,首次用常规 PCR 在孕妇血浆中检测到 cffDNA 的存在,为基于孕妇外周血浆中 cffDNA 的无创产前诊断走向临床开辟了道路。

与母亲外周血中的胎儿细胞相比,cffDNA 相对丰富,较胎儿细胞大约多出 20 倍^[3],于妊娠 5 周就能从母体血液中检测到,妊娠 11 周即占母体血浆总 DNA 的 0.39%,并随孕周增长而增加,于妊娠晚期可达母体血浆总 DNA 的 6.2%。而胎盘娩出后,胎儿 DNA 以 16 分钟左右的半衰期从孕妇血浆中清除,产后 2 小时即可从母亲外周血中完全消失。孕妇血浆 DNA 由孕妇自身 DNA 和 cffDNA 混合

组成,其中孕妇自身的DNA占90%以上。cffDNA主要来源于滋养层细胞或胎盘细胞的凋亡,少量来源于胎儿血循环或胎儿细胞。约85%的胎儿DNA分子片段长度在100~300 bp之间,而大部分孕妇自身DNA分子片段长度大于1000 bp,这为利用分子片段大小分离法分离母血浆中胎儿DNA提供了可能性^[4]。2010年,Lo团队借助高通量测序技术完成了母血中胎儿的全部组基因组图谱的绘制,证实了利用cffDNA进行胎儿基因检测是完全可行的^[5]。基于以上特点,cffDNA一经发现便成为无创产前诊断最理想的靶标物质。

2 基于孕妇外周血浆游离胎儿DNA的无创产前检查应用研究

cffDNA最先应用是检测cffDNA中的性别决定基因以排除X连锁遗传病和Rhesus D基因为Rh阴性妊娠妇女的胎儿处置提供诊断依据,其检测准确性均可达99%。另外还有胎儿染色体21、18、13-三体、染色体微重复微缺失综合征、父源关系鉴定等检测,而双胞胎子类型鉴别^[6]、囊性纤维化、软骨发育不良、亨廷顿式舞蹈病、地中海贫血等单基因遗传病的产前诊断也迅速成为研究热点。

2.1 染色体非整倍体的检测 2008年第二代测序技术(next-generation sequencing, NGS)技术首次应用于胎儿非整倍体产前基因检测的研究^[7],此后多个团队研究表明,NGS可分辨孕有唐氏综合征患儿的母血中21-三体的总量与孕有正常核型胎儿母血中21-三体的总量的微小差异^[8],以Z值为3作为截断值,可获得特异性100%,敏感性99%的检测结果^[9]。经过相同方法以及标准化Z值分析后,18-三体检测敏感性提高至91.9%、13-三体检测敏感性100%,特异性98%^[9]。目前该方法已广泛应用于临床。本中心从2012年开始研究基于半导体测序平台的胎儿21、18、13-三体的产前基因筛查方法^[10],检测了1760例高风险孕妇,发现9例21-三体,3例18-三体、3例13单体,以及1例XO综合征胎儿,经核型分析验证准确率达99%,2015年获得国家卫计委批准的开展高通量基因测序产前筛查和临床应用试点单位,至今已完成数千例无创21、18、

13-三体产前基因筛查,准确率达99%。

2.2 染色体微重复微缺失综合征的检测 2011年新英格兰杂志报道了1例通过测序检测胎儿12号染色体上4.2M的缺失案例^[11],首次报道了cffDNA在微缺失综合征中的应用研究,此后也有多为学者针对染色体微小结构异常的研究。2012年Jensen等^[12]利用2例已经确诊胎儿为22q11.2综合征孕妇的外周血,经测序发现患者在22q11.2区域的cffDNA片段含量少于正常孕妇。Srinivasan等^[13]随后选取11位胎儿异常核型的孕妇,测序结果提示可检测出所有的21-三体综合征以及微重复微缺失,不适用嵌合体检测,易位样本可通过断裂点附近的小片段缺失判断断裂位置,无法提示平衡易位。通过提高测序深度,发现了诸多染色体核型分析不能分辨的微小病变。本中心从2013年也开始研究无创染色体结构异常的检测,利用母胎游离DNA片段比例建立了估算孕妇游离DNA中胎儿的比例的方法,为无创产前诊断提供了质控。并已完成1476例无创染色体结构异常样本的检测,在测序量为3M reads时,对于大于5M的异常,灵敏度为98.3%,特异度为98.1%。

2.3 妊娠相关疾病 母血浆中cffDNA的增加还可作为多种妊娠相关疾病的临床诊断指标,许多研究定量检测母血中cffDNA的含量,发现在子痫前期、胎盘源性胎儿生长发育受限、胎盘植入、早产、以及妊娠肝内胆汁淤积综合征的孕妇中,母血中cffDNA的含量异常增高^[14],且与疾病严重程度呈正相关,因此cffDNA可作为诸多病理妊娠的诊断指标并可用于动态监测疾病发展变化。但由于其含量个体差异较大,尚不能确定一个最优阈值来指导临床。

2.4 单基因病的检测 单基因遗传病是由一对等位基因控制的遗传性疾病,它的遗传方式遵循孟德尔分离定律。位于不同染色体上的致病基因,其遗传方式也不同,可分为常染色体显性遗传病、常染色体隐性遗传病、伴X染色体显性遗传病、伴X染色体隐性遗传病、伴Y染色体遗传病5种。目前,利用cffDNA检测胎儿单基因疾病的研究主要集中在常染色体遗传疾病以及X-连锁疾病的诊断中,研究

疾病包括软骨发育不良^[15]、多发性内分泌瘤 2A 型^[16]、阿佩尔综合征^[17]、强直性肌营养不良^[18]、亨廷顿舞蹈症^[19]等共 14 种,其中,地中海贫血的研究最为热烈,其他疾病由于人群发病率较低,仅有少量小样本的研究报道。

3 地中海贫血无创产前诊断的研究进展

3.1 地中海贫血无创产前诊断应用概述 地中海贫血无创产前诊断研究至今大致分为 3 个阶段:第一阶段检测父源性致病位点,适用于检测父母双方携带不同的地贫致病位点时此方法仅能通过阴性结果排除胎儿致病纯合子的可能。针对不同疾病,突变位点可能为点突变,也可能是几个碱基的缺失和重复,各研究者根据突变类型不同选择不同的扩增方法以及分析方法进行研究。第二阶段检测父源性遗传序列中杂合度高的 STR 位点或 SNP 位点,此方法改进了单纯检测父源性致病基因的方法,扩大了检测范围,即夫妻双方拥有相同的突变位点,也可通过可提供信息的 SNP 位点排除胎儿的纯合突变,阴性的结果可避免进一步的检测,亦因无需分离 cfDNA,减低了技术难度。但此方法仍局限于检测来自父亲的基因突变位点,且需建立与各突变连锁的有诊断价值的 SNP 数据库,限制了其发展。第三阶段的检测借助数字 PCR,高通量测序技术等结合单倍型的相对定量诊断策略,此方法采用二代测序技术对目标区域进行捕获或者数字 PCR 技术针对含突变位点区域分别进行正常和突变等位基因的短片段扩增,对母血浆总的游离 DNA 中的含 SNP 位点的序列进行定量检测,分析目标区域中的一组由 SNP 构成的单倍体剂量,确定双亲单倍体型及 cfDNA 的单倍体信息,从而推断胎儿的基因型。

3.2 α 地贫无创产前诊断的应用 从 2002 年开始国内外研究者就开始了无创地贫的探索,迄今为止国内外共有 10 篇文献进行了相关研究。其研究方向有:①排除性诊断:因双亲携带相同类型致病基因,无法通过检测父源性致病位点来排除父源性遗传,借助检测父源性致病基因连锁的与母体不同的 STR 及 SNP 位点可达到排除诊断目的。此方法需要在检测前筛选父母双方 STR/SNP 位点,若夫妇

双方候选位点相同,则不能通过这种方法检测。Ho 等^[20]2006 年发表了利用 SEA 断裂范围内两个 STR 位点排除父源性水肿胎的文章,可排除 1/3 水肿胎患儿;Yan 等^[21]于 2011 年利用 SEA 缺失范围内 9 个 SNPs 排除父源性水肿胎,诊断率 49.3%。②确定性诊断:通过检测缺失后重新拼接的片段,或选择断裂范围内的 marker,定量检测拷贝数。Chen^[22]、Tungwiwat^[23]、Pornprasert^[24, 25]优化了 gap-PCR 方法,将 PCR 引物设置于 SEA 缺失断裂点两端,半巢氏 PCR 扩增,探针或染料荧光定量,发现孕有重度 α 地贫儿的孕母外周血中扩增拷贝数高于孕有其他基因型胎儿的孕妇,但是没有统计学意义。Long 等^[26]选择 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 基因之间、无其他同源性的一段基因作为目的基因。共管扩增 α 珠蛋白链上部分基因,毛细管电泳分析胎儿两种产物峰面积来检测 Bart's 水肿胎,cfDNA 富集依靠琼脂糖凝胶电泳回收,39 例水肿胎中检出 30 例。Chen^[27]、Pornprasert 和 Srichotiyakul^[28]等针对野生型以及 SEA 缺失片段设计两对引物,分别用多重 PCR、双等位基因特异性 PCR、QF-PCR 扩增,应用毛细管电泳或定量 ROC 曲线分析不同胎儿基因型孕母外周血中两种产物的比例,统计推算重度地贫儿 ΔCT 值;在 Pornprasert 试验中,他们仅从 7 例水肿胎的样本中检测出 3 例;Sirichotiyakul 则可区分 79.2% 的重度地贫儿与非重度地贫儿。Ge 等^[29]应用探针捕获 SEA 缺失范围内 SNPs 位点,借助二代测序,选择父母双方纯合的 SNP 位点为靶位点,利用拷贝数变异,排除水肿胎,但是因为此方法对胎儿浓度要求较高,仍需要进一步研究。

综上所述,缺失型 α 地中海贫血的无创产前基因诊断技术较为单一,分为排除性诊断与确定性诊断两种,排除性诊断需筛选与确定一组人群特异性标签 SNP/STR 位点,应用时将标签 SNP/STR 在夫妻间进行分析,检测两者间不同的靶点,此方法费时费力,且不具有普适性,难以走向临床。确定性诊断无论是通过 Gap-PCR 检测缺失后重新拼接的片段,或选择断裂范围内的 marker,定量检测拷贝数,均对胎儿 DNA 浓度要求较高,且方法均不稳定,检出率都较低,亦难以达到临床检测的标准。

3.3 β 地贫无创产前诊断的应用 自2002年以来,国内外已有多篇文献对无创产前检测 β 地贫进行了多种方法学的探讨,包括数字PCR,单个位点碱基延伸反应,位点特异性实时PCR,以及基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术(MALDI-TOF)等。

与 α 地贫类似,排除性诊断方法研究者们将研究重心聚焦于检测父亲致病性SNP/STR上,Papavasava等^[30]选用 β 珠蛋白基因中4个塞浦路斯人高度杂合的11个SNP位点,并结合单体型分析的方法,成功地对10个家系中8个样本进行了父源遗传分析。Li等^[31]则利用MALDI-TOF质谱技术,达到了100%的敏感度和92.1%的特异度,但该方法仅用于东南亚人群中最常见的5种父源突变,也未对母亲来源的致病位点进行分析。此类研究受引物中SNP位置及数量影响较大,需要建立有效地突变连锁有诊断价值的SNPs数据库,而且没有从数据中获得母亲的遗传给胎儿的位点信息。故排除性诊断的临床应用受到了限制。

二代测序技术的发展,极大地促进了基于cfDNA进行的分子检测的灵敏度。Lo团队^[32]对 β 地贫家系进行全基因组水平的高通量测序,通过孕妇外周血血浆DNA获得了胎儿和孕妇的全基因组图谱,并成功地检出1例 β 地贫携带者。该研究通过父亲中的SNP位点推导父源胎儿基因组,利用父亲纯合但母亲杂合的SNP位点推导母源胎儿基因组,然后用RHDO(relative haplotype dosage, RHDO)分析法对孕妇血浆中单体型的相对含量进行计算。RHDO的基本原理为,母本染色体成对存在,来自母本父亲的DNA与来自母本母亲的DNA比例为1:1,因胎儿会释放一些母本DNA进入到母亲血浆中,导致1:1失衡。通过此原理经过统计算法,得到胎儿从母本遗传的基因组。此方法存在测序成本高昂,操作复杂,耗时较长,RHDO分析方法复杂等问题,从而限制了其在临床中的应用。后续的研究使用目标区域捕获方法对特定区域进行检测。Lam等报道液相杂交方法进行目标区域的捕获测序,研究中对不同单基因的多个基因组区域同时进行分析,捕获覆盖度达200次以上,以检测

HBB基因簇上数千个SNPs,然后用目标区域同样使用RHDO方法进行分析。此方法的局限性在于人工定制捕获探针,实验周期长,及捕获效率低以及RHDO不是直接对突变位点进行检测,不同种的疾病,需要在待测基因上下游选择足够多的有效SNP及多个家系特异性SNP,且针对SNP信息不足的区域检测效果不佳等问题。

综上所述,当父母携带不同的 β 地贫致病位点时,排除性诊断是有诊断价值的;当父母携带 β 地贫致病位点相同时,排除性诊断需要通过寻找父母不一致的SNP位点来解决,此类研究受引物中SNP位置及数量影响较大。目前主流的非创产前检测方法均基于父母及胎儿单体型。其存在的问题包括:对胎儿及父母进行全基因组SNP分析,成本昂贵;数字PCR的单体型鉴定,操作复杂烦琐,实验的成功受GC含量和分析区域的SNP分布影响;且RHDO不是直接对突变位点进行检测,不同种的疾病,需要在待测基因上下游选择足够多的有效SNP及多个家系特异性SNP;由于cfDNA含量较低而导致扩增效率低,且无法解决特异性扩增带来的偏差;需要人工定制捕获探针,导致实验周期长。故迄今, β 地贫的非创产前诊断还无法走向临床。

4 地中海贫血无创产前诊断的展望

地贫无创产前诊断是产前诊断临床应用研究领域的重要发展方向,可对胎儿进行早期的无创检测。迄今为止,由于全基因组SNP分析成本昂贵,数字PCR的单体型鉴定操作复杂烦琐,捕获探针效率低且人工定制导致实验周期长,cfDNA含量较低而导致扩增效率低,且无法解决特异性扩增带来的偏差等原因地贫无创产前诊断还无法走向临床。而针对无创单基因病循环单分子扩增和重测序技术^[33]的无创产前检测方法的发现,大大提高cfDNA在扩增中的利用率,同时引入了barcode序列,消除了因扩增特异性带来的不同序列比例的影响,理论上有望应用于地中海贫血无创产前检测。我们寄希望于更多方法学的探索与发展,推动地中海贫血无创产前诊断技术早日走向临床。

参考文献

- [1] Aihua Yin, Bing Li, Mingyong Luo, et al. The prevalence and molecular spectrum of alpha- and beta-globin gene mutations in 14,332 families of Guangdong Province, China[J]. PLoS One, 2014,9(2): e89855.
- [2] Fuman Jiang, Jinghui Ren, Fang Chen, et al. Noninvasive Fetal Trisomy (NIFTY) test: an advanced noninvasive prenatal diagnosis methodology for fetal autosomal and sex chromosomal aneuploidies[J]. BMC Med Genomics, 2012,5: 57.
- [3] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet, 1997, 350(9076): 485-487.
- [4] Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, et al. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms[J]. Clin Chem, 2004,50(6): 1002-1011.
- [5] 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.
- [6] Qu JZ, Leung TY, Jiang P, et al. Noninvasive prenatal determination of twin zygosity by maternal plasma DNA analysis[J]. Clin Chem, 2013,59(2): 427-435.
- [7] Chiu RW, Chan KC, Gao Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008,105(51): 20458-20463.
- [8] Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U et al. , Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008,105(42): 16266-16271.
- [9] Fan HC, Quake SR. Sensitivity of noninvasive prenatal detection of fetal aneuploidy from maternal plasma using shotgun sequencing is limited only by counting statistics[J]. PLoS One, 2010,5(5): e10439.
- [10] Liao C, Yin AH, Peng CF, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of common aneuploidies by semiconductor sequencing [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014,111(20): 7415-7420.
- [11] Peters D, Chu T, Yatsenko SA, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of a fetal microdeletion syndrome[J]. N Engl J Med, 2011, 365(19): 1847-1848.
- [12] Jensen TJ, Dzakula Z, Deciu C, et al. Detection of microdeletion 22q11. 2 in a fetus by next-generation sequencing of maternal plasma[J]. ClinChem, 2012,58(7): 1148-1151.
- [13] Srinivasan A, Bianchi DW, 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.
- [14] Geifman-Holtzman O, Ober BJ. Prenatal diagnosis: update on invasive versus noninvasive fetal diagnostic testing from maternal blood[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2008,8(6): 727-751.
- [15] Lim JH, Kim MJ, Kim SY, et al. Non-invasive prenatal detection of achondroplasia using circulating fetal DNA in maternal plasma[J]. J Assist Reprod Genet, 2011,28(2): 167-172.
- [16] Macher HC, Martinez-Broca MA, Rubio-Calvo A, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 2A using COLD-PCR combined with HRM genotyping analysis from maternal serum[J]. PLoS One, 2012,7(12): e51024.
- [17] Au PK, Kwok YK, Leung KY, et al. Detection of the S252W mutation in fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in fetal DNA from maternal plasma in a pregnancy affected by Apert syndrome[J]. Prenat Diagn, 2011,31(2): 218-220.
- [18] 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(2): 301-302.
- [19] González-González MC, García-Hoyos M, Trujillo-Tiebas MJ, 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.
- [20] Ho SS, Chong SS, Koay ES, et al. Microsatellite markers within—SEA breakpoints for prenatal diagnosis of HbBartshydrops fetalis[J]. Clin Chem, 2006,53(2): 173-179.
- [21] Yan TZ, Mo QH, Cai R, et al. Reliable detection of paternal SNPs within deletion breakpoints for non-invasive prenatal exclusion of homozygous alpha-thalassemia in maternal plasma[J]. PLoS One, 2011,6(9): e24779.
- [22] Chen Y, Ou QS, Zhou HR. Detection of deletional alpha-thalassemia from free fetal DNA in maternal plasma[J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2010,18(3): 679-682.
- [23] Tungwiwat W, Fucharoen S, Fucharoen G, et al. Development and application of a real-time quantitative PCR for prenatal detection of fetal alpha(0)-thalassemia from maternal plasma[J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1075: 103-107.
- [24] Pornprasert S, Sukunthamala K, Kunyanone N, et al. Semi-

- nested Taqman real-time quantitative PCR for noninvasive prenatal diagnosis of Bart's hydrops fetalis[J]. J Med Assoc Thai, 2012,95(1): 6-9.
- [25] Pornprasert S, Sukunthamala K, Kunyanone N, et al. Analysis of real-time PCR cycle threshold of alpha-thalassemia-1 Southeast Asian type deletion using fetal cell-free DNA in maternal plasma for noninvasive prenatal diagnosis of Bart's hydrops fetalis[J]. J Med Assoc Thai, 2010, 93(11): 1243-1248.
- [26] Long XJ, Long GF, Lin WX. Noninvasive prenatal diagnosis of Hb Bart's hydrops fetus using cell-free fetal DNA in maternal plasma[J]. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi, 2009, 30(3): 175-178.
- [27] Chen P, Li MJ, Li MQ, et al. Prenatal gene diagnosis of paternally inherited alpha-thalassemia by detecting fetal DNA in maternal plasma[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2007, 87(22): 1540-1544.
- [28] Sirichotiyakul S, Charoenkwan P, Sanguansermisri T. Prenatal diagnosis of homozygous alpha-thalassemia-1 by cell-free fetal DNA in maternal plasma[J]. Prenat Diagn, 2012, 32(1): 45-49.
- [29] Ge H, Huang X, Li X, et al. Noninvasive prenatal detection for pathogenic CNVs: the application in alpha-thalassemia [J]. PLoS One, 2013,8(6): e67464.
- [30] Papasavva T, Kalikas I, Kyrii A, et al. Arrayed primer extension for the noninvasive prenatal diagnosis of β -thalassemia based on detection of single nucleotide polymorphisms[J]. Ann N Y Acad Sci, 2008,1137(1): 302-308.
- [31] Li Y, Wenzel F, Holzgreve W, et al. Genotyping fetal paternally inherited SNPs by MALDI-TOF MS using cell-free fetal DNA in maternal plasma: influence of size fractionation[J]. Electrophoresis, 2006, 27(19): 3889-3896.
- [32] Lo YM, Lun FM, Chan KC, et al. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007,104(32): 13116-13121.
- [33] 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.

(收稿日期:2015-09-15)

编辑:宋文颖