

# 高通量测序和数字 PCR 应用于无创产前检测胎儿非整倍体研究进展

陈桂芳<sup>1</sup> 杨佳怡<sup>2\*</sup> 高运华<sup>2</sup> 王志栋<sup>2</sup> 吴泉<sup>2</sup>

(1. 沈阳化工大学, 辽宁 沈阳 110142; 2. 中国计量科学研究院, 北京 100029)

**【摘要】** 母体血浆中胎儿游离 DNA 的发现使无创产前检测成为可能。基于高通量测序的无创产前检测已用于临床筛查常见的胎儿染色体非整倍体疾病。测序流程复杂, 质量控制有助于提高高通量测序无创产前检测的准确性和可靠性。数字 PCR 作为核酸定量检测的新技术, 具有快速准确, 流程简单的优势, 有望成为无创产前检测胎儿染色体非整倍体更具成本优势的新方法。本文讨论了高通量测序与数字 PCR 技术在无创产前胎儿非整倍体检测中的应用状况, 分析了检测过程中可能的影响因素与质控参考物质研制, 为理解针对胎儿非整倍体的无创产前检测研究提供了参考。

**【关键词】** 高通量测序; 数字 PCR; 质量控制; 无创产前检测; 胎儿染色体非整倍体

**【中图分类号】** R714.55 **【文献标识码】** A

胎儿染色体非整倍体是产前筛查检测的主要内容, 进行早期产前筛查和诊断有利于优生优育。非整倍体产前检测是采用无创、微创或有创的技术方法, 在一定时间窗口期对孕妇进行检查, 以评估胎儿罹患染色体非整倍体疾病的风险或进一步确诊<sup>[1]</sup>。传统产前诊断方法具有侵入性, 通过羊膜穿刺、绒毛取样以及脐静脉穿刺取样进行染色体核型分析, 有潜在的胎儿流产或感染风险<sup>[2]</sup>, 早孕期、中孕期常规产前筛查通过超声检查联合血清学标记分析, 同时结合孕妇年龄、孕周、体重以及是否存在糖尿病等多项临床信息, 以软件计算风险值进行评估, 但敏感度和特异性有限<sup>[3, 4]</sup>。Lo 等<sup>[5]</sup>于 1997 年在孕妇外周血中发现胎儿游离 DNA (cell-free fetal DNA, cff-DNA), 为胎儿染色体非整倍体无创产前检测 (non-invasive prenatal testing, NIPT) 奠定了基础。

2008 年, Lo 等<sup>[6]</sup>验证了基于孕妇血浆中的 cff-DNA 和大规模基因组测序进行胎儿染色体非整倍体检测的可行性。目前, 基于高通量测序技术的无创产前检测已用于临床筛查胎儿 21-三体、18-三体

以及 13-三体综合征, 在高风险孕妇中表现出很高的灵敏度、特异性以及检出率<sup>[7]</sup>。高通量测序无创产前检测会受到源于胎儿、母体、测序过程以及数据分析等多种因素的影响, 可能出现假阳性或假阴性结果<sup>[8]</sup>。早期, Lo 等<sup>[9]</sup>和 Fan 等<sup>[10]</sup>先后证明单分子定量检测技术可以用于无创产前检测胎儿染色体非整倍体, 但为可靠地检测低丰度的 cff-DNA, 需要大量的 PCR 反应。随着微流控技术的引入, 数字 PCR (digital PCR, dPCR) 技术表现出更高的检测效率和灵敏度。已有研究表明, dPCR 在染色体非整倍体无创产前检测应用中具有更直接、更快速和更具成本效益的发展潜力<sup>[11-13]</sup>。

本文将简要介绍基于孕妇外周血游离 DNA 进行胎儿染色体非整倍体无创 DNA 产前检测的研究进展, 分析影响高通量测序无创 DNA 产前检测结果准确性的可能因素以及现有用于质量控制的核酸标准物质, 并讨论 dPCR 技术应用于无创 DNA 产前检测胎儿染色体非整倍体的原理和优势和最新研究进展。

## 1 染色体非整倍体检测与无创产前检测的研究与发展

染色体非整倍体被定义为正常染色体的“重复”

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2021.04.014

基金项目: 国家自然科学基金(31900433); 国家质量基础的共性技术研究与应用(2017YFF0204604)

\* 通信作者: 杨佳怡, E-mail: yangjy2018@nim.ac.cn

或“缺失”,可能导致早孕期胎儿流产,或者导致新生儿先天性缺陷、发育不良以及多器官功能异常,进行早期产前筛查和诊断有利于优生优育<sup>[1]</sup>。其中,21-三体综合征、18-三体综合征以及13-三体综合征是最常见常染色体非整倍体疾病,是孕妇妊娠期间主要的筛查目标。在临床上传统方法仍然流行,早孕期和中孕期常规筛查项目包括胎儿颈项透明层厚度(nuchal translucency, NT)以及多项血清学指标,包括妊娠相关血浆蛋白-A (pregnancy-associated plasma protein-A, PAPP-A)、人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, hCG)、甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)、游离雌三醇(uE3)、血清

抑制素 A(nhibin-A)等<sup>[14, 15]</sup>。同时,结合孕妇情况和预产期有多种组合方案可选择,包括二联筛查(hCG、PAPP-A)、三联筛查(AFP、uE3、hCG)、四联筛查(AFP、uE3、hCG、nhibin-A)等。产前筛查旨在评估胎儿罹患染色体非整倍体疾病的风险,有利于减少不必要的侵入性操作<sup>[1]</sup>。目前,通过羊水穿刺进行核型分析仍是胎儿染色体非整倍体高风险人群进一步确诊的“金标准”。传统筛查方法的检出率不高,侵入性检测对孕妇和胎儿存在一定的风险,人们一直在寻求一种更可靠、更敏感、更安全的方法。表1总结了产前检测胎儿染色体非整倍体的常规筛查方法和确诊手段。

表1 产前筛查和诊断胎儿染色体非整倍体的方法

检查项目	检查窗口期	检出率 (%)	假阳性率 (%)	相关指标	优势与不足
NT 二联筛查	11~13 <sup>±6</sup> 周	60~79	5 <sup>[16]</sup>	PAPP-A、hCG	早期筛查;NT 对技术测量的准确度(0.5mm)要很高;需要结合孕妇年龄等评估风险 <sup>[14, 15]</sup>
三联筛查	15~20 <sup>±6</sup> 周	60~70	5 <sup>[4]</sup>	AFP、uE3、hCG	评估神经管缺损等风险,评估 21-三体、18-三体风险;当发现胎儿异常相对较晚时,不利于妊娠终止;单个标记物敏感性和特异性有限
四联筛查	15~20 <sup>±6</sup> 周	75~80	5	AFP、E3、hCG、nhibin-A	
早孕期绒毛检查、中孕期羊水穿刺、脐带血检查、阴道胎儿镜检	16~20 <sup>±6</sup> 周,血清学筛查显示高风险或高龄孕妇	99 以上	-	染色体核型分析	确诊;侵入性手术后两周内发生的胎儿流产可能与之相关,胎儿丢失率约为 1.5%;手术相关的孕妇阴道流血与胎儿流产风险显著增加 <sup>[17]</sup> ;滋养层细胞与胎儿真实核型不一致时,绒毛取样检查可能出现假性结果

孕妇外周血中 cff-DNA 的发现促进了无创产前检测的发展。无创产前检查也称非侵入性产前筛查,是通过采集孕妇外周血,提取血浆中的游离 DNA(包含 cff-DNA)进行检测和分析。cff-DNA 主要来源于胎盘滋养层细胞,研究表明母体血浆的 cff-DNA 含量受多项母婴特征影响,其占母体血浆总游离 DNA 的比例会随着孕周增加而增加,随孕妇的 BMI 指数增加而减小,但存在个体差异性<sup>[18-20]</sup>。在妊娠 10~21 周之间,cff-DNA 约占母体血浆总游离 DNA 的 10%~20%<sup>[21]</sup>。利用游离 DNA 进行检测分析是困难的:低丰度的 cff-DNA 要求高灵敏度和特异性的检测方法,同时直接获取 cff-DNA 需要克服母体游离 DNA 的“干扰”<sup>[22, 23]</sup>。

为此,研究者开发出特异性识别孕妇血浆中胎儿 DNA/mRNA 的方法:①表观遗传学染色体相对剂量法。DNA 甲基化是一种重要的表观遗传修饰,利用胎儿 DNA 和母体 DNA 存在明显的甲基化差

异,Tong 等<sup>[24]</sup>在位于胎儿 18 号染色体上的特异性低甲基化的 *SERPINB5* 基因位点进行标记,通过在该位点上的等位基因比率检测到 18-三体情况。②单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)等位基因比率法。在母体血浆中胎儿胎盘特异性基因 *PLAC4* 存在单核苷酸多态性,对于杂合的整倍体胎儿,SNP 的 A/G 等位基因应在胎儿基因组中相等地表达 1:1 的 A/G,而在 21-三体胎儿中,SNP 等位基因之一的拷贝异常(A/GG),将产生 2:1 或 1:2 的比率关系。基于此,Lo 等<sup>[25, 26]</sup>通过位于 *PLAC4* mRNA 上 SNP 位点的等位基因比例关系检测 21-三体胎儿,但该方法只适用于 2 个不同等位基因构成的杂合子检测;cff-DNA/mRNA 的特异性标记能针对少数的 SNP 位点或 DNA 甲基化差异位点进行检测,Y 染色体特异性靶位点只能应用于男性胎儿,且只能分析杂合 SNP<sup>[27]</sup>。高通量测序和 dPCR 的使用促进了无创

产前检测胎儿染色体非整倍体的发展。

## 2 高通量测序无创产前检测胎儿染色体非整倍体

高通量测序无创产前检测胎儿染色体非整倍体是基于母体血浆中的 cf-DNA 进行大规模平行基因组测序,并结合生物信息学工具,分析胎儿染色体数目异常时相应的游离 DNA 数量的微小差异,进而评估胎儿的染色体非整倍体情况<sup>[6, 28]</sup>。常用的高通量测序技术包括全基因组大规模平行测序和靶向测序。前者为全基因组的低深度测序,随机地测序游离 DNA 片段,读段序列被映射到人类全基因组参考序列图谱上定位到染色体;后者选择性地对染色体基因组上某特定区域扩增后测序,能够增加通量并降低测序成本<sup>[29]</sup>。基于高通量测序的检测平台包括 BGISEQ-100(1000)、Illumina HiSeq 2000、BioElectronSeq4000、MaterniT21 PLUS、NextSeq CN500 等,通过结合生物信息学工具以评估胎儿染色体非整倍体情况。常见的评估标准是基于 Z 检验的方法。Z 检验是利用大量的测序数据符合正态分布,进而比较某 2 个染色体的有效测序数据平均数的差异是否显著<sup>[30]</sup>。根据统计学原理计算得到 Z 值(Z-score)并拟设评估胎儿染色体非整倍体风险的参考阈值,以判断非整倍体高风险或低风险,基于不同测序平台的 Z 值可能不同。

2.1 高通量测序无创产前检测的影响因素 高通量测序无创产前胎儿染色体非整倍体作为一项筛查测试,可能会出现假性结果(与染色体核型分析结果或与胎儿出生后随访结果不一致)。影响因素可能来自母体或胎儿的生物学因素,同时,高通量测序无创产前检测的流程复杂,在标本处理、文库制备、测序以及生物信息学分析等环节的多种因素均可能导致检测失败或检测结果不准确<sup>[31, 32]</sup>。

2.1.1 cf-DNA 分数和生物学影响因素 孕妇血浆中 cf-DNA 含量是影响无创产前检测准确性的关键因素。cf-DNA 占母体血浆总游离 DNA 比例被称为胎儿分数或胎儿比例,以百分比表示。高通量测序无创产前检测要求的最小胎儿分数因不同的方法而异,但随着胎儿分数降低,检出率下降<sup>[33]</sup>。目前建议用于高通量测序检测的孕妇血浆中的胎儿

分数大于 4%<sup>[34]</sup>。研究表明,当孕妇外周血胎儿分数低于 4%时,测序可能无结果或会出现假阴性结果<sup>[35]</sup>。胎儿分数受孕周、孕妇肥胖等影响,是一个重要的质控指标<sup>[18, 19]</sup>。在无创产前检测中,富集 cf-DNA 有利于减少母体游离 DNA 的背景干扰,已有研究者开发了基于凝胶电泳的方法来富集 cf-DNA,以提高胎儿非整倍体无创产前检测的准确性<sup>[36]</sup>。

其他内在的生物因素包括:①限制性胎盘嵌合体(confined placental mosaicism, CPM),是指胎盘与胎儿之间存在核型差异。由于母体血浆中的 cf-DNA 主要来自于胎盘滋养层细胞,当胎儿与胎盘染色体表现不一致,造成胎儿非整倍体检出结果为假阳性或假阴性,即检测结果未显示胎儿的真实情况<sup>[37]</sup>。②双胞胎的游离 DNA 含量无法估算,当出现双胎之一存在染色体非整倍体的现象时,无法估算孕妇血浆中的 cf-DNA 含量或估算值比实际单胎的大,导致检出结果与被“遮盖”的胎儿情况不符<sup>[38]</sup>。③母体染色体嵌合现象即母体的非整倍体低比例嵌合<sup>[39]</sup>,以及母体拷贝数失衡<sup>[40]</sup>。实际上,基于全基因组测序的无创产前检测能检测 21-三体、18-三体、13-三体综合征外,其他染色体数目异常和部分染色体缺失重复的信息也可能检测到,如性染色体非整倍体(sex chromosome aneuploidies, SCAs)、基因组拷贝数变异(copy number variations, CNVs)等。但测序检测是基于总的游离 DNA 进行,无法区分母体游离 DNA 与 cf-DNA,当出现母体非整倍体低比例嵌合以及母体拷贝数失衡情况时,均可能引起胎儿染色体非整倍体检测的假阳性结果,即与胎儿核型分析结果不一致。④其他可能,如母体恶性肿瘤等<sup>[41]</sup>。高通量测序无创产前检测胎儿染色体非整倍体可能会出现一定假阴性率和假阳性率,其阴性结果(低风险)不能总是保证胎儿正常,对于阳性结果(高风险)需要通过有创产前诊断进行验证<sup>[8]</sup>。

2.1.2 测序以及数据分析影响因素 对孕妇血浆标本的分析前处理是成功进行游离 DNA 测序分析是关键步骤,包括血液采集、血浆制备、血浆质量控制(游离 DNA 的均匀性和纯度)以及储存和运输

等<sup>[42-44]</sup>。基于高通量测序平台的主要流程包括游离DNA提取、文库构建、上机测序以及生物信息学分析,每一个环节的质量控制均会影响后续操作以及测序结果的精确度,如DNA提取效率,测序DNA文库浓度等<sup>[7, 30]</sup>。为降低在不同的实验平台进行游离DNA提取定量、文库的定量和质量控制时出错的风险,研究人员开发了可直接在检测中定量cff-DNA分数的工具,包括SeqFF、SANEFALCON、BAYINDIR、DEFRAG等。其中,DEFRAG和BAYINDIR是基于Y染色体的方法,仅适用于怀有男胎的孕妇<sup>[45]</sup>。高通量测序的核心是把测序所得的序列比对到人类参考基因组,通过计数每个染色体的唯一对应的序列数量来获取全染色体拷贝数情况。因此,测序有效数据量、唯一比对序列数等也是控制数据质量的重要元素<sup>[30]</sup>。

GC含量是指样本有效序列中鸟嘌呤(Guanine, G)和胞嘧啶(Cytosine, C)碱基对所占的比率。测序文库构建通常需要进行PCR扩增,PCR扩增过度会导致产生重复序列。同时,GC含量对PCR扩增也会产生影响,GC含量过高或者过低的基因组区域扩增较困难,导致测序数据出现偏差<sup>[46]</sup>。测序过程中,GC含量为40%~50%时测序读取覆盖度较高,GC含量过高或者过低时覆盖度降低,这一性质称为GC偏倚<sup>[47]</sup>。GC偏倚是影响数据分析质量的关键因素,在文库制备(接头连接,PCR扩增)以及测序过程均可能引入GC偏倚。Dineika等<sup>[32]</sup>描述了通过减少GC偏倚和更好地处理基因组重复序列来改善测序数据质量的方法。Strom等<sup>[48]</sup>证明通过GC偏倚校正和统计学处理可以提高高通量测序无创产前检测的阳性预测值。

2.2 高通量测序无创产前检测的质量控制 孕妇血浆中cff-DNA低丰度性质、影响cff-DNA含量变化因素的个体性和复杂性,以及在样品制备、测序和分析过程中引入的技术误差,这些不确定性使得对高通量测序的假阴性和假阳性结果的解释具有挑战性。通过建立和使用高通量测序无创产前检测胎儿染色体非整倍体的参考物质进行质量控制,有助于校准测序数据和评估检测性能<sup>[49]</sup>。理想的参考物质应尽可能地模拟孕妇血浆中游离DNA的组成和片

段长度、分布等特征,为高通量测序无创产前检测胎儿染色体非整倍体的标准化提供物质基础<sup>[50, 51]</sup>。现有参考物质主要有2种形式:临床样本来源的母体血浆参考品以及人工制备的片段化基因组DNA参考品。

临床样本来源的天然母体血浆是理想的参考物质,但来源有限。实现体外制备模拟人体血浆中游离DNA的参考物质的方法主要有2种:超声打断和酶切消化。临床检验中心采用超声打断21-三体、18-三体以及13-三体的人基因组DNA与正常非妊娠女性的血浆混合,制备了模拟游离DNA的参考物质,用于高通量测序无创产前检测染色体非整倍体的室间质量评价<sup>[52]</sup>。与完整的基因组DNA不同,在孕妇血浆中的游离DNA是短片段分子,其中cff-DNA主要来自于胎盘滋养层细胞凋亡末期的DNA片段,母体血浆中的游离DNA长度分布主峰为166bp,并具有以10bp递减的分布规律<sup>[53]</sup>。超声打断的方法获得片段化DNA与天然血浆中的游离DNA的长度(约100~200bp)、组成、分布等特征不完全一致;此外,一些测序检测平台进行生物信息学分析时是基于游离DNA片段大小分布来计算cff-DNA分数,超声打断的片段化DNA参考物质不适用于此类原理测序平台的评估<sup>[51, 54]</sup>。2018年,美国病理学家学会使用临床收集的怀有21-三体、18-三体、13-三体胎儿的孕妇血浆样本进行室间质量评价,但由于来自于同一孕妇的血浆样本有限,无法保证给参与实验室提供相同的参考物质,同时,他们也采用了人工制造的参考物质进行室间质量评价,实验室测试结果显示该参考物质样本的性能不如常规临床样本,且不适用于所有实验室;他们表示临床样本来源的母体血浆是现有参考物质的最好选择<sup>[51]</sup>。

利用核酸酶消化细胞核所得DNA片段与真实的血浆样本游离DNA特征更符合<sup>[50, 55]</sup>。最近,Zhang等利用酶消化细胞核的方法制备了血浆游离DNA参考物质:首先进行细胞系的培养,包括母亲为正常染色体的细胞、胎儿为21-三体、18-三体、13-三体以及正常染色体的细胞,然后提取细胞核,利用酶消化得到产物,按梯度分数进行混合即完成片段

化 DNA 混合物的制备,随后为模拟真实孕妇血浆中的游离 DNA 环境,依据真实血浆组成成分制备了人工血浆,将两者混合,建立了模拟血浆游离 DNA 的参考物质<sup>[50]</sup>。其中,采用核酸酶(DFN 和 MNase)分别消化母系细胞核和胎儿细胞核以产生大小为 160bp 和 140~150bp 的 DNA 片段,以尽可能的模拟天然母体血浆中 cff-DNA 和母体游离 DNA 的大小分布特征。类似的,Jonatan 等<sup>[55]</sup>使用具有亲缘关系的女性及其 21-三体后代的永生细胞系(EBV 病毒诱导永生化的 B 淋巴细胞),通过提取 DNA,酶消化处理(150~200bp),再与人工血浆混合,制备了无创产前检测参考物质。酶消化处理 DNA 片段化与人工血浆混合所得的模拟天然血浆与母体血浆环境仍有差别。目前还未完全清楚游离 DNA 如何产生,这与体内复杂的酶作用有关联,体外酶消化和生理环境中复杂酶作用也不一致<sup>[56]</sup>。

为高通量测序无创产前检测胎儿染色体非整倍体提供合适的参考物质的主要挑战和问题包括:使用孕妇血浆制备参考物质受临床来源所限;人工制备参考物质需要考虑是否具有与真实游离 DNA 相似的特征,同时尽可能多的适应不同的测序平台;人工血浆与母体血浆基质具有一定差异;酶消化细胞核的 DNA 片段产物需要考虑碱基序列组成的 GC 含量是否与孕妇血浆中游离 DNA 相似,以避免在测序过程中受 GC 偏倚的影响。

### 3 数字 PCR 无创产前检测胎儿染色体非整倍体

数字 PCR 是检测和定量核酸的新技术<sup>[57]</sup>。其工作原理在于通过有限稀释,使单个 PCR 反应微室中包含或不包含单个模板 DNA 分子,结合特异性的荧光探针,进行平行扩增反应,通过阳性反应(显示荧光信号)的数量和泊松分布统计即可测定原始样本中 DNA 模板分子的数量。在无创产前检测胎儿染色体非整倍体应用中,利用数字 PCR 具有单分子灵敏度和绝对定量的能力,通过直接定量目标染色体和参考染色体,计算两者拷贝数比值即可判断非整倍体情况<sup>[9, 10]</sup>。整倍体胎儿和非整倍体胎儿的比值应分别为 1 和高于 1,这一程度取决于母体血浆中 cff-DNA 分数,例如当母体血浆中 21-三体胎

儿的游离 DNA 分数为 10% 时,理论比值约为 1.05。数字 PCR 检测非整倍体实验原理和主要操作参考图 1。

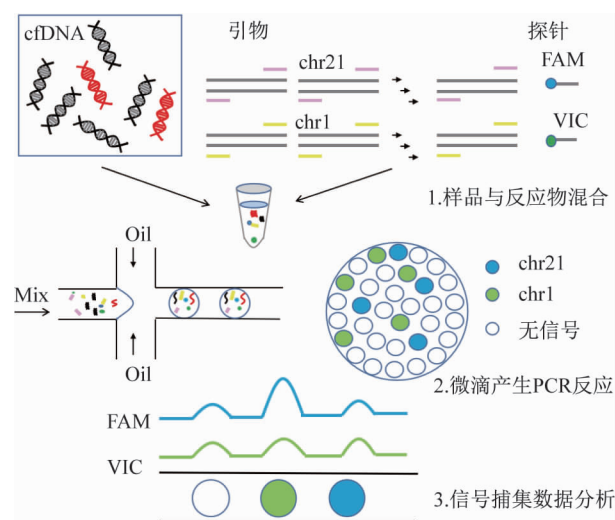


图 1 数字 PCR 检测染色体非整倍体实验原理和主要操作说明图,改编自参考文献<sup>[11]</sup>

3.1 数字 PCR 无创产前检测的优势 数字 PCR 无创产前检测胎儿非整倍体流程简单,可直接获取数据;提取游离 DNA 与数字 PCR 反应试剂混合(包含用于目标染色体和参考染色体中的靶 DNA 分子的引物和探针),随后进行 PCR 扩增,读取发出荧光信号的单元数进一步确定靶 DNA 分子的拷贝数,通过泊松分布结合 cff-DNA 分数计算比值并判断<sup>[11]</sup>。数字 PCR 基于“分而治之”,将单分子通过稀释分离并独自扩增,这样先分离后放大的效果有利于降低本底信号(母体游离 DNA)的影响,从而提高了对低丰度靶 DNA 分子(cff-DNA)的检测灵敏度。高通量测序无创产前检测胎儿染色体非整倍体在临床上的普遍筛查应用存在一定限制:如测序成本较高,采样和获得结果之间需要 1~2 周的检测周期等。与之相比,数字 PCR 无创产前检测具有流程简单,对设备的要求相对较低,检测耗时短,所需的设备和试剂的成本低的优势。目前的研究工作证明数字 PCR 能够实现准确、快速、简便的无创产前检测胎儿染色体非整倍体<sup>[11-13]</sup>。林文楚<sup>[58]</sup>等开发了基于数字 PCR 的检测试剂盒,使用孕妇外周血,约 5h 完成对 1 个样本无创产前检测,其成本约为高通量测序无创产前检测的 1/5。

3.2 数字 PCR 无创产前检测的研究进展 在早期研究中,Fan 等<sup>[10]</sup>证明利用数字 PCR 定量检测可以判断 21 号染色体非整倍体异常:使用 21-三体细胞系基因组 DNA 和人细胞系基因组 DNA 的混合物,结合特异性荧光探针标记 21 号染色体和 12 号染色体(参考染色体)进行扩增反应,结果显示两者拷贝数比值大于 1(正常为 1)。随后的研究表示为在临床上可靠的检测母体血浆中低丰度的 cff-DNA,需要进行数千至数万 PCR 反应<sup>[9, 10, 13]</sup>。随着微控流技术的引入,数字 PCR 实现了高通量,自动化的快速发展,在无创产前检测中表现出优良的技术性能<sup>[59, 60]</sup>。

基于微滴式数字 PCR (droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR),可以实现自动化反应混合物的制备和液滴的产生,可以进一步提高测试的效率和通量。同时,在多重数字 PCR 中,通过设计不同引物,即可在一次 PCR 反应同时对多个靶基因进行特异性扩增,提升检测效率。El Khatibi 等的<sup>[13]</sup>建立微滴式数字 PCR 无创产前检测 21-三体,采用水解探针对 4 个靶基因标记,对 213 例孕妇血浆游离 DNA 进行定量检测,结果显示

特异性为 98%,敏感性为 94%。Lee 等<sup>[12]</sup>利用大小分级的方法来提高 cff-DNA 分数,并设计数字 PCR 无创产前检测胎儿 21-三体,共测试 877 名孕妇血浆样品,结果显示其灵敏度为 100%,特异性为 99.64%,准确度为 99.66%。随着 PCR 反应数增加,多重数字 PCR 的引物和探针设计也更加复杂。考虑到大量特异性探针会产生高背景荧光,影响阳性反应信号的检测,Tan 等<sup>[11]</sup>建立了基于锁核酸通用型探针 (locked nucleic acid-TaqMan, LNA-TaqMan) 的多重微滴式数字 PCR,用于无创产前检测胎儿染色体非整倍体(21-三体),成功鉴定了 30 份临床血浆标本的三倍体情况,检测结果与高通量测序完全一致,每个样本约 4.5h 完成测试。其中,锁核酸(locked nucleic acid, LNA)是一种核酸类似物,与 DNA 有很好的亲和活性,将 LNA 参入到探针中可以提高对目的序列的亲和力同时可以提高探针的 Tm 值,进而使探针设计的更短,有利于检测短的 DNA 片段,提高检测的灵敏度。表 2 总结了上述 3 个基于微滴式数字 PCR 进行无创产前检测胎儿染色体非整倍体的实验设计信息。

表 2 基于数字 PCR 进行无创产前检测胎儿染色体非整倍体

目标染色体	参考染色体	检测位点	cut-off 值
21 号染色体		SETD4, CBR1, UBE2G2, CLDN14	Target/Control=1.15
	1 号染色体	RAB1F	
	2 号染色体	FOSL2	
21 号染色体	18 号染色体	BRWD1, LTN1, NCAM2, RUNX1 CTIF, RIT2, SMAD4, TCF4	Target/Control=1.05
21 号染色体	18 号染色体	保守序列,共 20 个位点 保守序列,共 20 个位点	Target/Control=1.05

基于现有研究提示,可以得出以下经验:为提高数字 PCR 无创产前检测的准确度和可靠性,在游离 DNA 的量确定的情况下,可以增加引物对的数量,以增加数字 PCR 检测到的目标 DNA 分子的数量;引物选择应避免引物对之间的相互作用<sup>[11]</sup>。对于较低 cff-DNA 分数的样品,可以富集 cff-DNA<sup>[12]</sup>。通过建立灰度区(在检测中考虑为数据波动导致无法给出明确的高风险或者低风险结果建立的阈值范围),灰区内的样本结果通过再测试来获得准确的结果<sup>[11, 13]</sup>。引物和探针的设计可以选择目标染色体和参考染色体上的保守序列,在此基础上筛选易于扩增、稳定性好,GC 含量适中的序列<sup>[58]</sup>。

#### 4 总结与展望

2016 年,我国出台了孕妇外周血胎儿游离 DNA 产前筛查与诊断相关规定,临床已经开始使用基于高通量测序的无创产前胎儿染色体非整倍体筛查检测项目。随着大规模平行测序技术的应用逐步进入临床,无创产前检测的质量控制和标准化也越来越重要。基于 cff-DNA 的研究主要集中在各种检测方法和测试的发展方面,对质量控制和标准化的研究关注较少。制定参考标准有助于提高临床诊断的准确性、可靠性以及标准化。数字 PCR 是检测和定量核酸的新技术,近期的研究表明数字 PCR 无

创产前检测胎儿染色体非整倍体可以实现高灵敏度的实时检测且更具成本效益,随进一步研究发展有望用于常规临床检测。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Gynecologists ACOOA. Practice bulletin no. 163: screening for fetal aneuploidy [J]. *Obstet Gynecol*, 2016, 127(5):979-981.
- [ 2 ] FARIS M, ZARKO A. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review [J]. *Obstet Gynecol*, 2007, 110(3): 687-694.
- [ 3 ] NORTON ME, BRAR H, WEISS J, et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18 [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2012, 207(2): 137. e1-e8.
- [ 4 ] MALONE FD, CANICK JA, BALL RH, et al. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(19): 2001-2011.
- [ 5 ] LO YM, NOEMI C, PAUL FC, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum [J]. *Lancet*, 1997, 350(9076): 485-487.
- [ 6 ] ROSSA WK, CHAN KC, YUAN G. et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105 (51): 20458-20463.
- [ 7 ] GIL MM, QUEZADA MS, REVELLO R, et al. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: meta-analysis [J] *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 45 (3): 249-266.
- [ 8 ] MENNUTI MT, CHERRY AM, MORRISSETTE JJ, et al. Is it time to sound an alarm about false-positive cell-free DNA testing for fetal aneuploidy? [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2013, 209(5):415-419.
- [ 9 ] LO YM, LUN FM, CHAN KC, et al. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(32):13116-13121.
- [10] FAN HC, QUAKE SR. Detection of aneuploidy with digital PCR [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(19): 7576-7579.
- [11] TAN C, CHEN X, WANG F, et al. A multiplex droplet digital PCR assay for non-invasive prenatal testing of fetal aneuploidies [J]. *Analyst*, 2019, 144(7):2239-2247.
- [12] LEE SY, KIM SJ, HAN SH, et al. A new approach of digital PCR system for non-invasive prenatal screening of trisomy 21 [J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 476(1):75-80.
- [13] EL KHATTABI LA, ROUILLAC SC, LE TESSIE D, et al. Could digital per be an alternative as a non-invasive prenatal test for trisomy 21: a proof of concept study [J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155009.
- [14] SPRINGER D, ZIMA T, ARNOSTOVA L. Stability of free beta-hCG in the routine screening of Down syndrome in the first trimester of pregnancy [J]. *Prague Med Rep*, 2008, 109 (2-3): 134-141.
- [15] ORLANDI F, DAMIANI G, HALLAHAN TW, et al. First-trimester screening for fetal aneuploidy: biochemistry and nuchal translucency [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 1997, 10(6): 381-386.
- [16] DRISCOLL DA, GROSS SJ. First trimester diagnosis and screening for fetal aneuploidy [J]. *Genet Med*, 2008, 10(1): 73-75.
- [17] ENZENSBERGER C, PULVEMAVHER C, DEGENHARDT J, et al. Fetal loss rate and associated risk factors after amniocentesis, chorionic villus sampling and fetal blood sampling [J]. *Ultraschall Med*, 2012, 33(7): E75-E79.
- [18] ASHOOR G, SYNGELAKI A, POON LCY, et al. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11 - 13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2013, 41: 26-32.
- [19] ASHOOR G, POON L, SYNGELAKI A, et al. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11 - 13 weeks' gestation: effect of maternal and fetal factors [J]. *Fetal Diagn Ther*, 2012, 31:237-243.
- [20] WANG E, BATEY A, STRUBLE C, et al. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell - free DNA in maternal plasma [J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33(7):662-666.
- [21] LUNFMF, CHIU RWK, CHAN KC, et al. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma [J]. *Clin Chem*, 2008, 54(10): 1664-1672.
- [22] LO YM TEIN MS, LAU TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis [J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 62(4):768-775.
- [23] LO YM, CHIU RW. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids[J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(1):71-77.
- [24] TONG YK, CHUN MD, CHIU RW, et al. Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: theoretical and empirical

- considerations [J]. *Clin Chem*, 2006, 52(12): 2194-2202.
- [25] LO YM, TSUI NBY, CHIU RW, et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection [J]. *Nat Med*, 2007, 13(2):218-223.
- [26] POON L, LEUNG T, LAU T, et al. Presence of fetal RNA in maternal plasma [J]. *Clin Chem*, 2000, 46(11): 1832.
- [27] LO YM. Noninvasive prenatal detection of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis: a review of the current state of the art [J]. *BJOG*, 2009, 116(2):152-157.
- [28] 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 U S A*, 2008, 105(42):16266-16271.
- [29] Benn P, Cuckie H, Pergament E J, et al. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects [J]. *Ultrasound Obstet & Gynecol*, 2013, 42(1): 15-33.
- [30] 曲守方, 于婷, 孙楠, 等. 染色体非整倍体无创产前检测技术质控要点及临床应用进展 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2017, 9(05): 295-300.
- [31] THUNG DT, BEULEN L, HEHIR-KWA J, et al. Implementation of whole genome massively parallel sequencing for noninvasive prenatal testing in laboratories [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2015, 15(1):111-124.
- [32] CHANDRANANDA D, THORNE NP, DEVIKA G, et al. Investigating and correcting plasma DNA sequencing coverage bias to enhance aneuploidy discovery [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1) e86993.
- [33] FIORENTINO F, BONO S, PIZZUTI F, et al. Response to "The importance of determining the limit of detection of non-invasive prenatal testing methods"[J]. *Prenat Diagn*, 2016, 36(4):304-311.
- [34] CANICK JA, PALOMAKI GE, KLOZA EM, et al. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies [J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33(7):667-674.
- [35] EHRICH M, DECIU C, ZWIEFELHOFER T, et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood; a study in a clinical setting[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2011, 204(3):205. e1-11.
- [36] LIANG B, LI H, HE Q, et al. Enrichment of the fetal fraction in non-invasive prenatal screening reduces maternal background interference [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 17675.
- [37] GRATI FR, MALVESTITI F, FERREIRA JCPB, et al. Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results[J]. *Genet Med*, 2014, 16(8): 620-624.
- [38] GIL MM, QUEZADA MS, BREGANT B, et al. Cell-free DNA analysis for trisomy risk assessment in first-trimester twin pregnancies[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2014, 35(3): 204-211.
- [39] YAN LW, CHEN Y, TIAN F, et al. Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing [J]. *Clin Chem*, 2014, 60(1): 251-259.
- [40] SNYDER MW, SIMMONS LE, KITZMAN JO, et al. Copy-number variation and false positive prenatal aneuploidy screening results[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(17):1639-1645.
- [41] BIANCHI DW, CHUDOVA D, SEHNERT AJ, et al. Noninvasive Prenatal testing and incidental detection of occult maternal malignancies[J]. *JAMA*, 2015, 314(2):162-169.
- [42] HIDESTRAND M, STOKOWSKI R, SONG K, et al. Influence of temperature during transportation on cell-free DNA analysis[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2012, 31(2):122-128.
- [43] CHIU R, POON L, LAU TK, et al. Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma[J]. *Clinical Chemistry*, 2001, 47(9):1607-1613.
- [44] MÜLLER SP, BARTELS I, STEINW, et al. Cell-free fetal DNA in specimen from pregnant women is stable up to 5 days [J]. *Prenat Diagn*, 2011, 31(13):1300-1304.
- [45] VAN BEEK DM, STRAVER R, WEISS MM, et al. Comparing methods for fetal fraction determination and quality control of NIPT samples [J]. *Prenat Diagn*, 2017, 37(8):769-773.
- [46] CHEN EZ, CHIU RW, SUN H, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): 0021791.
- [47] DOHM JC, LOTTAZ C, BORODINA T, et al. Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(16):e105.
- [48] STROM CM, ANDERSON B, TSAO D, et al. Improving the positive predictive value of non-invasive prenatal screening (NIPS)[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3):e0167130.
- [49] HARDWICK SA, DEVESON IW, MERCER TR. Reference standards for next-generation sequencing [J]. *Nat Rev Genet*, 2017, 18(8): 473-484.



- [50] ZHANG R ,DING J S,GAO P , et al. Generation of highly biomimetic quality control materials for noninvasive prenatal testing based on enzymatic digestion of matched mother-child cell lines[J]. Clin Chem,2019, 65(6):761-770.
- [51] Deans ZC,Allen S, Jenkins L, et al. Ensuring high standards for the delivery of NIPT worldwide: Development of an international external quality assessment scheme[J]. Prenat Diagn, 2019,39(5):379-387.
- [52] ZHANG R, ZHANG H Y, LI Y L, et al. External quality assessment for detection of fetal trisomy 21, 18, and 13 by massively parallel sequencing in clinical laboratories[J]. J Mol Diagn, 2016, 18(2):244-252.
- [53] 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): 61ra91.
- [54] YU SC, CHAN KC, ZHENG YW, et al. Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(23): 8583-8588.
- [55] JONATAN B, SYLVIE G, ANDRÉ C, et al. Development of reference materials for noninvasive prenatal aneuploidy testing by massively parallel sequencing: a proof-of-concept study [J]. J Appl Lab Med, 2019, 4(1):50-60.
- [56] AUCAMP J, BRONKHORST AJ, BADENHORST CPS, et al. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature[J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2018, 93(3):1649-1683.
- [57] VOGELSTEIN B , KINZLER KW . Digital PCR[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(16):9236-9241.
- [58] 林文楚, 朱琦, 偶健. 质控品及其制备方法, 试剂盒及检测胎儿 21 和 18 三体综合征的方法: 中国, CN201910222905. 6 [P]. 2019-08-09.
- [59] RAGNIMV. Prenatal diagnosis by droplet digital PCR[J]. Blood, 2017, 130(3):240-241.
- [60] CAMUNAS J, LEE H, HUDHINAS L, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of single-gene disorders by use of droplet digital PCR [J]. Clin Chem, 2018, 64(2): 336-345.

(收稿日期:2020-11-26)

编辑:宋文颖