

# 无创产前诊断单基因病的研究策略及进展

招丽坚<sup>1</sup> 王晨虹<sup>2\*</sup>

(1. 广西壮族自治区人民医院 产科, 广西 南宁 530021;

2. 南方医科大学深圳医院 产科, 广东 深圳 518110)

**【摘要】** 发现母体外周血游离胎儿 DNA 已 20 年, 无创产前诊断领域取得了重大突破, 改变了现有的产前筛查模式。无创产前诊断单基因病已得到越来越多的关注及研究。一些单基因遗传病的无创产前诊断已经应用于临床实践, 其他常见单基因遗传病无创产前诊断也得到了发展。本文针对目前无创性产前诊断常见单基因病的思路、研究现状及进展进行综述。

**【关键词】** 游离胎儿 DNA; 无创产前诊断; 单基因病; 二代测序; 相对突变剂量; 相对单倍体剂量

**【中图分类号】** R714.55 **【文献标识码】** A

自 1997 年发现胎儿游离 DNA (cell free fetal DNA, cffDNA) 以来<sup>[1]</sup>, 无创产前筛查胎儿非整倍体迅速成为学术界的热点, 已取得了令人瞩目的进展, 改变了传统的产前血清学筛查模式<sup>[2]</sup>。分子计数技术如二代测序 (next-generation sequencing, NGS)<sup>[3]</sup> 及数字 PCR 技术 (digital PCR, dPCR)<sup>[4]</sup> 的发展, 促进了无创产前诊断领域取得了突破性的进展。科学家们利用 cffDNA 对单基因病产前诊断进行的探索成绩显著, 使更多的单基因病无创产前诊断 (non-invasive prenatal diagnosis, NIPD) 方法逐渐接近临床实践要求。

## 1 单基因病 NIPD 概述

单基因遗传病 (single gene disorders), 简称单基因病, 是指一对等位基因或一对同源染色体上单个基因发生变异产生的遗传病。突变基因在常染色体上或性染色体上可呈显性或隐性遗传方式。单基因遗传病经典的遗传方式符合孟德尔定律。全世界已知的单基因遗传病有 7000 多种, 总体人群发病率约 1%, 单基因疾病治疗十分困难, 产前诊断高危胎儿遗传状态具有极其重要的意义<sup>[5]</sup>。一些学者认为<sup>[6]</sup>, 某些单基因疾病高危妊娠的无创产前检测具

有诊断性质, 可以看作是侵入性检测的替代方案, 这种观点认为与非侵入性产前检测 (NIPT) 非整倍体原理不同, NIPT 可能因胎盘嵌合体或母体染色体异常而出现假阴性或假阳性结果, 而无创产前诊断单基因疾病不存在上述因素, 因为有明确家族史或超声改变, 针对特定致病基因进行检测, 所以具有诊断性质。

## 2 无创性产前诊断单基因病的思路及研究进展

2.1 存在/不存在策略 单基因疾病种类繁多, 单基因病的无创产前诊断较为复杂, 每一种疾病都有各自无创产前诊断技术的挑战。在妊娠状态下母体血浆中检测到非孕期不存在于母亲基因组的等位基因可以确定在这些等位基因起源于胎儿或可能与胎儿基因组有关, 而某些特异性等位基因缺失表示胎儿为非父系遗传等位基因携带者。基于这种存在/不存在 (presence/absence) 的标准, 已成功应用于父系遗传常染色体显性遗传病、新发突变 (*de novo* conditions) 和双亲携带不同突变类型常染色体隐性遗传病父系遗传等位基因排除性诊断上。

2.1.1 应用于常染色体显性遗传病单基因疾病 无创产前诊断最初的研究是从常染色体显性遗传病和新发突变开始。软骨发育不全 (achondroplasia) 是第一个进入临床实践的单基因遗传病之一<sup>[7]</sup>, 是以肢体短小为特征的常染色体显性遗传性疾病,

98%的致病基因位于4号染色体短臂 *FGFR3* 基因上的 c.1138G>A 突变<sup>[8]</sup>,部分为新发突变,与父亲高龄所致精子缺陷有关。最早的基于母血胎儿游离DNA无创产前诊断软骨发育不全的文献由日本学者 Saito H 于2000年报道<sup>[9]</sup>。作者采用限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)PCR方法,在1例有软骨发育不全高风险孕妇的外周血浆里检测到 *FGFR3* 基因 c.1138G>A 突变,而该突变不存在于孕妇的白细胞DNA中,推导突变来自胎儿的父亲。羊水细胞直接测序证实存在该突变,婴儿出生后的X线检查显示四肢有轻微的缩短,无创检测结果与出生后诊断一致。随着分子计数技术的发展,检测方法可以更简便和准确,这种检测策略一直应用于父系遗传常染色体显性遗传性疾病的无创产前诊断,除了软骨发育不全,这一策略还在其他常染色体显性遗传病如强直性肌营养不良(myotonic dystrophy)<sup>[10]</sup>、致死性侏儒(thanatophoric dysplasia)<sup>[11]</sup>、亨廷顿病(Huntington disease)<sup>[12]</sup> 验证实验均取得成功。目前在英国等国家,基于母血cffDNA无创产前诊断软骨发育不全和致死性侏儒已在临床应用<sup>[11]</sup>。

2.1.2 应用于常染色体隐性遗传病 存在/不存在策略也被用于无创产前诊断常染色体隐性遗传病,当父母携带不同的突变时,用于确定胎儿父系突变遗传状态,当检测到父系野生型等位基因或未检测到父系突变型等位基因,将表明胎儿不存在严重疾病的风险,可以避免需要侵入性诊断程序,减少50%有创产前诊断的几率。先天性肾上腺皮质增生(congenital adrenal hyperplasia, CAH)<sup>[13, 14]</sup> 是由于6号染色体上编码21羟化酶的 *CYP21* 基因突变导致皮质激素合异常,造成突变纯合子女性胎儿外生殖器男性化。若妊娠第9周生殖器官发育前就开始使用地塞米松治疗则能够预防生殖器官两性化。传统的绒毛穿刺术最早于孕11周进行,而NIPD最早可于6周诊断<sup>[15]</sup>,早期确定受累胎儿可以避免正常胎儿接受不必要的药物治疗,减少用药的副作用。CAH是无创产前诊断最有临床意义的疾病之一。2002年,Chiu等人<sup>[16]</sup>通过一例生育过一个CAH复合杂合子患儿的再次妊娠的夫妇作为疾病模型,首

次提出基于孕妇血浆cffDNA无创性产前诊断常染色体隐性遗传病父系等位基因遗传状态的策略。在研究中该孕妇血浆中检测到父系野生型等位基因,则推断胎儿没有遗传到父亲突变等位基因,胎儿不会是CAH受累儿,不需要产前干预。

囊性纤维化(cystic fibrosis, CF)<sup>[17]</sup>是白人中最常见的致寿命缩短的遗传性疾病,白人中基因携带者占3%。CF是常染色体隐性遗传病,由位于7号染色体长臂编码膜相关蛋白的DNA突变引起,导致外分泌腺功能紊乱,主要影响胃肠道和呼吸系统。2008年,Bustamante A等人<sup>[18]</sup>采用单碱基延伸测序(SNaPshot)的方法,在3例CF高风险孕妇血浆中有2例检测父系突变,排除1例侵入性产前诊断的需要。

$\beta$ -地中海贫血简称 $\beta$ 地贫,是一组以 $\beta$ -珠蛋白链合成减少或缺乏的遗传性血液疾病,导致红细胞血红蛋白生产减少,红细胞生成减少和贫血<sup>[19]</sup>。 $\beta$ 地贫是无创产前诊断研究最多的单基因遗传病之一,其分子基础是位于11号染色体短臂1区5带5亚带(11p15.5)位点上的B珠蛋白(HBB)缺陷所致。在中国南方地区有4类突变最为常见,包括CD41-42(-TCTT)、IVS-2-654(C-T)、T-28(A-G)和CD17(A-T),占突变类型的65%<sup>[20]</sup>。2002年,Chiu等人<sup>[16]</sup>对8对携带不同 $\beta$ 地贫基因突变的夫妻进行无创产前检测。通过特异性等位基因引物(allele-specific primers)和荧光探针及实时PCR(real-time PCR)检测,其中8个胎儿中,6个发现父亲突变,排除2例重型 $\beta$ 地贫胎儿,避免了不必要的产前诊断。对剩下的6例进行侵入性产前诊断发现4个 $\beta$ 地贫基因突变复合杂合子,2例没有遗传到母亲突变基因,为 $\beta$ 地贫突变携带者。2015年Chen JJ等<sup>[21]</sup>对8对携带相同 $\beta$ 地贫突变的夫妇进行无创产前诊断,利用连锁单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphisms, SNP)确定胎儿是否继承父系野生型或突变型等位基因,其基本原则也是通过母血中与父系野生型等位基因连锁的SNP存在与否来预测胎儿的基因型,判断胎儿是否为重型地贫儿,排除有创性产前诊断的需要。3例母血中检测到父系突变型等位基因连锁的SNP,这些孕妇仍

需要传统侵入性产前诊断判断胎儿是否遗传母亲突变导致重型地贫儿。

然而基于存在/不存在原则的方法只能够检测与母亲不同的特异性父源突变是否存在,而无法进一步确定胎儿是否继承了母源突变。这是目前单基因遗传病无创产前诊断的难点,如何进一步明确胎儿是否继承了母源性突变基因是单基因病无创产前诊断技术达到临床应用的基本要求。

## 2 相对变异量/相对单倍体剂量分析

X 连锁遗传病和父母携带有相同突变的常染色体隐性遗传病被认为是单基因遗传病无创产前诊断中最有技术难度的疾病类型,因为需要母体同源 DNA 高背景下,分析从母体遗传来的胎儿等位基因。为了区分胎儿母系遗传等位基因与强大的母体背景基因,需要更灵敏、更准确的检测技术和策略。

**2.1 相对变异量分析** 2008 年,Lo<sup>[22]</sup>团队基于 dPCR 技术平台建立了相对变异量(relative mutation dosage, RMD)理论,该方法通过统计学的序贯概率比试验(SPRT)判断母源性的突变等位基因和野生型等位基因是否平衡存在于母体血浆 DNA 中。在杂合子非孕妇血浆中突变型和野生型等位基因平衡比例为 1:1,而在妊娠期间,胎儿 DNA 释放到母体循环会改变母体相对等位基因 1:1 的平衡状态,偏移幅度取决于胎儿 DNA 含量。当胎儿从父亲遗传了野生型等位基因又从母亲遗传了突变型等位基因,即母儿均为突变型杂合子时,母体血浆 DNA 中野生型等位基因和突变型等位基因保持平衡;当胎儿为突变纯合子或野生纯合子时,母体血浆 DNA 中野生型等位基因和突变型等位基因出现不平衡,表现为突变型等位基因的含量大于或小于野生型等位基因。这种方法可以针对 X 连锁隐性遗传病或夫妻携带相同常染色体隐性遗传病时推导胎儿继承了母亲的哪一个等位基因。

血友病(hemophilia)是一组典型的 X 连锁隐性遗传性出血性疾病,患者几乎全为男性,女性多为致病基因携带者。临床上分为 A、B 二型,分别为凝血因子Ⅷ(FⅧ)和Ⅸ(FⅨ)缺乏所致,FⅧ和 FⅨ基因分别位于 Xq28 和 Xq27 上<sup>[23]</sup>。Tsui 等<sup>[24]</sup>应用

dPCR 检测来自 7 例怀男胎的血友病基因携带者孕妇的 12 例血浆样本,选取 X 染色体上一个杂合子 SNP 进行 RMD 分析,在 12 个样本均中成功检测出胎儿携带状态。

RMD 的方法也应用于检测常染色体隐性遗传病母系遗传突变。除了应用于  $\beta$  地中海贫血<sup>[22]</sup>,还有镰状细胞性贫血<sup>[25]</sup>和甲基丙二酸血症<sup>[26]</sup>等。

**2.2 相对单倍体剂量分析** 单倍体(haplotype)是单倍体基因型的简称,在遗传学上是指在同一染色体上共同进行遗传的多个基因座上等位基因的组合。通俗的说法就是若干个决定同一性状的紧密连锁的基因构成的基因型。相对单倍体剂量分析(relative haplotype dosage, RHDO)是 2010 年 Lo 等<sup>[27]</sup>利用 NGS 平台建立对母体血浆 DNA 进行全基因组测序,通过同一染色体上相邻的 SNP 位点建构单倍体进行定量比较分析的方法,目的在于通过 SPRT 判断母体血浆中是否存在单倍体相对剂量不平衡现象。RHDO 分析的几个步骤包括确定信息 SNP 和建构母系遗传单倍体,最后推导胎儿基因型。信息 SNP 指相等等位基因座位上父母一方为纯合子而另一方为杂合子的 SNP。RHDO 分析进行单基因常染色体隐性遗传病 NIPD 多数情况下应用于有先症者或纯合子儿童的家庭。首先,通过纯合子儿童和父母 DNA 样本分析,可以确定致病突变基因的同时也确定与致病基因连锁的信息 SNP,用于推导与突变或正常等位基因连锁的亲本单倍体。在双亲为常染色体隐性遗传病杂合子状态下,父系遗传状态通过检测母体血浆中非母源性的父系遗传信息 SNP 和/或突变推导。其次,母系遗传状态是通过分别检测与突变型/野生型等位基因连锁的信息 SNP,并比较两种信息 SNP 比例失衡的情况推导胎母系遗传单倍体。

靶向捕获测序(targeted-sequencing)是指针对感兴趣的目标区域或基因(完整的编码区域全外显子)测序,通过靶区域捕获和扩增的方法富集,然后进行大规模测序,有助于降低大规模筛查特定疾病已知致病位点的成本,在临床诊断方面有着巨大的应用潜力。与全基因组深度测序相比,有针对性地对候选基因组区段或靶向基因进行深度测序不仅可

以降低测序成本,还可以提高测序的效率。使用靶向测序结合 RHDO 分析是单基因疾病无创产前诊断的通用方法。New MI 等人<sup>[28]</sup>采用靶向测序结合 RHDO 方法成功地在早期检测了 14 例 CAH 高危妊娠的胎儿状况。该方法捕获了 *CYP21A2* 基因侧翼 6-Mb 区域,利用每个家系的父母和先证者基因组信息 SNP 构建了父母的单倍型,在母体血浆 DNA 推导出胎儿从父母遗传到的基因型,这样在最早妊娠 5<sup>+</sup>6 周时可以正确预测所有家系的胎儿 CAH 状况。除了 CAH,这种靶向单倍体分析方法已经成功应用在杜氏和贝氏肌营养不良症<sup>[29, 30]</sup>、I 型戈谢病突变<sup>[31]</sup>、先天性耳聋<sup>[32]</sup>等无创产前诊断。

**2.3 RMD/RHDO 区别** 当评估胎儿母系遗传突变时,RMD 或 RHDO 分析提供了一个有力的工具。RHDO 是基于 NGS 的单倍型相对剂量分析,而 RMD 是基于 dPCR 单个突变位点平衡状态的比较。RHDO 概念与 RMD 相似,但不同的是,RHDO 不依赖于特异性突变检测,避免了针对特异性突变的设计检测,而检测并定量信息 SNP 是 RHDO 的关键步骤。与仅通过一个特定的基因突变或 SNP 来测量等位基因比例的 RMD 不同,RHDO 检测母体单倍型的平衡与否,它使用更多的测序序列(read),而不是仅仅分析直接围绕突变位点的 read,通过对一个单倍型多个 SNP 位点的测试,增加了检测的稳定性,因而 RHDO 更敏感,检测结果更可靠。而 NGS 具有高通量、高数据量产出、高效率及低成本等优点已使 NGS 成为一项常规技术应用于无创性产前诊断领域。NGS 联合强大的 RHDO 分析可以检测更多的单基因病。

### 3 无创产前诊断单基因病的挑战

NGS 和 dPCR 的出现,结合 RMD 和 RHDO,使单基因病无创产前诊断取得更进一步的发展。但无创产前诊断单基因病在临床实践应用仍然面临着巨大挑战。

**3.1 针对不同的单基因病需要制定检测实验** 检测父系常染色体显性遗传病或新发突变相对简单直接,也最早应用于临床实践。对于常染色体隐性遗传病或 X 连锁遗传病,需要构建父母的单倍型是限

制无创产前诊断单基因病发展的一个主要原因。目前已开发出各种分子技术用于解决构建父母单倍体的问题<sup>[33]</sup>,但这些分子技术成本昂贵且费时费力不适用于临床实践。

**3.2 定位罕见单基因病致病位点困难** 特殊情况下需要进行家系分析,有些单基因疾病致病基因种类繁多,突变基因跨越区域长,需要通过纯合子或复合杂合子先症者确定突变基因。例如 Duchenne 型肌营养不良症(DMD)是最常见的进行性肌营养不良症,是一种严重致死性 X 连锁隐性遗传病,DMD 为抗肌萎缩蛋白遗传性缺陷所致,基因定位于 Xp21.2,全长 2.4Mb,有 79 个外显子,为迄今人类认识的最大的致病基因。DMD 基因庞大,突变发生率高,突变类型复杂多样,包括单个或多个外显子缺失,基因片段重复,单个碱基互换、缺失或插入等<sup>[34]</sup>,患儿的临床表现与病情程度有关。通过先症者和母亲基因组比对,可以明确致病基因,用于靶向设计捕获探针进行 NIPD。无创产前诊断常染色体隐性遗传病,例如 CAH 也需要对双亲及先症者的核心家系(trios)基因组 DNA 进行比对分析,确定致病位点和信息 SNP。

**3.3 胎儿游离 DNA 比例低** 另一个利用孕妇外周血进行单基因疾病无创产前诊断面临的主要挑战是:①母体 DNA 高背景;②cffDNA 与母源性 DNA 高度相似,只有一个或几个碱基的差别<sup>[35]</sup>。准确定量胎儿游离 DNA 比例是无创产前诊断单基因病的前提。如果有一个可靠的、费用低廉的方法选择性地富集母体血浆中短片段 cffDNA 的方法,检测胎儿 DNA 序列将大大简化。虽然随着二代测序和数字 PCR 技术的发展有了些进步,但很难在大范围的实验室实现这些检测条件,这些技术离常规临床检测仍然还很远。

### 4 无创产前诊断单基因病的前景

**4.1 部分单基因病无创产前诊断技术已应用于临床** 英国是无创产前诊断单基因病技术临床转化最好的国家之一。英国国民医疗保健(National Health Service, NHS)遗传学实验室提供基于 cffDNA 的单基因病 NIPD,目前已经应用于临床实

践的常染色体显性遗传和新发突变单基因病检测项目包括软骨发育不全、致死性侏儒、Apert综合征、及排除性诊断父系遗传的囊性纤维化突变基因<sup>[36]</sup>,这些技术在过去几年已逐渐被应用到其他欧洲国家临床遗传实践中。但由于单一单基因遗传病发病率低,需要基于特定疾病专门定制检测方案且检测方法和工作流程复杂,没有良好的商业前景,不容易普及。然而,现实中十分需要单基因疾病 NIPD,尤其是有地域特征的单基因遗传病,例如世界范围内最常见的单基因遗传病-地中海贫血,发展无创产前诊断技术意义重大,目前很多研究以地贫作为疾病模型进行单基因病 NIPD 研发,也取得令人瞩目的进步。相信随着技术和数据分析的不断进步将有助于扩大 NIPD 测试范畴。

4.2 技术进步带动单基因病无创产前诊断技术的发展 连锁标记构建单倍体为无创产前诊断单基因病更广泛的应用带来了希望。但使用基于连锁信息 SNP 的 RHDO 分析进行单基因常染色体隐性遗传病 NIPD 的局限性在于该方法通常应用于有先症者或纯合子儿童的家庭。对于无先症者的携带者夫妇,NIPD 更具挑战性。令人振奋的进展是 2016 年,Lo<sup>[37]</sup>团队研发了的一种普遍适用于单基因疾病 NIPD 的概念验证研究方法,这种方法可以不依赖先症者提供特定疾病的突变或 DNA 信息。研究者将长 DNA 片段化并用条形码(barcode)标记,深度测序后,基于条形码将 DNA 片段重新组装成单倍体,然后进行母体血浆 DNA 测序和 RHDO 分析,以推测胎儿的突变状态。但该检测方案操作繁琐,耗时长,费用昂贵,目前还在进行该方法灵敏度和准确性的评估,尚未成熟应用于临床实验。相信经过科学家们的探索,总有一天能找到便捷、准确、经济的检测方式应用于临床。

## 5 结语

继无创产前诊断胎儿非整倍体在全球范围内广泛应用于临床实践后,无创诊断单基因遗传病已经得到越来越多的关注,随着现代生物技术与生物信息统计学的快速发展和不断完善,更多无创产前诊断单基因遗传疾病的方法应用于临床实践将是指日

可待。

## 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] Allyse M, Minear MA, Berson E, et al. Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges[J]. *Int J Womens Health*,2015,7:113-126.
- [3] van Dijk EL, Auger HLN, Jaszczyszyn Y, et al. Ten years of next-generation sequencing technology[J]. *Trends in Genetics*,2014,30(9):418-426.
- [4] Barrett AN, Chitty LS. Developing noninvasive diagnosis for single-gene disorders; the role of digital PCR[J]. *Methods Mol Biol*,2014,1160:215-228.
- [5] WHO. Control of hereditary disorders; Report of WHO Scientific meeting (1996), 1996[C].
- [6] Verhoef TI, Hill M, Drury S, et al. Non-invasive prenatal diagnosis (NIPD) for single gene disorders: cost analysis of NIPD and invasive testing pathways[J]. *Prenat Diagn*,2016,36(7):636-642.
- [7] Lench N, Barrett A, Fielding S, et al. The clinical implementation of non-invasive prenatal diagnosis for single-gene disorders: challenges and progress made[J]. *Prenat Diagn*, 2013,33(6):555-562.
- [8] Bellus GA, Hefferon TW, Ortiz DLR, et al. Achondroplasia is defined by recurrent G380R mutations of FGFR3[J]. *Am J Hum Genet*,1995,56(2):368-373.
- [9] Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, et al. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma[J]. *Lancet*,2000,356(9236):1170.
- [10] 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.
- [11] Chitty LS, Khalil A, Barrett AN, et al. Safe, accurate, prenatal diagnosis of thanatophoric dysplasia using ultrasound and free fetal DNA[J]. *Prenat Diagn*,2013,33(5):416-423.
- [12] Gonzalez-Gonzalez MC, Trujillo MJ, Rodriguez DAM, et al. Huntington disease-unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR[J]. *Prenat Diagn*,2003,23(3):232-234.
- [13] Pang SY, Wallace MA, Hofman L, et al. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency[J]. *Pediatrics*, 1988,81(6):866-874.

- [14] New MI, Abraham M, Gonzalez B, et al. Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(7):2611-2616.
- [15] Khattab A, Yuen T, Sun L, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia[J]. *Endocr Dev*, 2016, 30:37-41.
- [16] Chiu RW, Lau TK, Cheung PT, et al. Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study[J]. *Clin Chem*, 2002, 48(5):778-780.
- [17] Southern KW, Munck A, Pollitt R, et al. A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe[J]. *J Cyst Fibros*, 2007, 6(1):57-65.
- [18] Bustamante-Aragones A, Gallego-Merlo J, Trujillo-Tiebas MJ, et al. New strategy for the prenatal detection/exclusion of paternal cystic fibrosis mutations in maternal plasma[J]. *J Cyst Fibros*, 2008, 7(6):505-510.
- [19] Weatherall DJ. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden[J]. *Blood*, 2010, 115(22):4331-4336.
- [20] Colah R, Gorakshakar A, Nadkarni A. Global burden, distribution and prevention of beta-thalassemias and hemoglobin Edisorders[J]. *Expert Rev Hematol*, 2010, 3(1):103-117.
- [21] Chen JJ, Tan JA, Chua KH, et al. Non-invasive prenatal diagnosis using fetal DNA in maternal plasma: a preliminary study for identification of paternally-inherited alleles using single nucleotide polymorphisms[J]. *BMJ Open*, 2015, 5(7):e7648.
- [22] Lun FM, Tsui NB, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(50):19920-19925.
- [23] Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights[J]. *Mol Pathol*, 2002, 55(2):127-144.
- [24] Tsui NB, Kadir RA, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA[J]. *Blood*, 2011, 117(13):3684-3691.
- [25] Barrett AN, McDonnell TC, Chan KC, et al. Digital PCR analysis of maternal plasma for noninvasive detection of sickle cell anemia[J]. *Clin Chem*, 2012, 58(6):1026-1032.
- [26] Gu W, Koh W, Blumenfeld YJ, et al. Noninvasive prenatal diagnosis in a fetus at risk for methylmalonic acidemia[J]. *Genet Med*, 2014, 16(7):564-567.
- [27] 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.
- [28] New MI, Tong YK, Yuen T, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia using cell-free fetal DNA in maternal plasma[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(6):E1022-E1030.
- [29] Yoo SK, Lim BC, Byeun J, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of duchenne muscular dystrophy: comprehensive genetic diagnosis in carrier, proband, and fetus[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(6):829-837.
- [30] Xu Y, Li X, Ge H, et al. Haplotype-based approach for non-invasive prenatal tests of Duchenne muscular dystrophy using cell-free fetal DNA in maternal plasma[J]. *Genet Med*, 2015, 17(11):889-896.
- [31] Zeevi DA, Altarescu G, Weinberg-Shukron A, et al. Proof-of-principle rapid noninvasive prenatal diagnosis of autosomal recessive founder mutations[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(10):3757-3765.
- [32] 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.
- [33] Browning SR, Browning BL. Haplotype phasing: existing methods and new developments[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(10):703-714.
- [34] Takeshima Y, Yagi M, Okizuka Y, et al. Mutation spectrum of the dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center[J]. *J Hum Genet*, 2010, 55(6):379-388.
- [35] Hudecova I, Chiu RW. Non-invasive prenatal diagnosis of thalassemias using maternal plasma cell free DNA[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2017, 39:63-73.
- [36] Drury S, Mason S, McKay F, et al. Implementing noninvasive prenatal diagnosis (NIPD) in a National Health Service Laboratory; from dominant to recessive disorders[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 924:71-75.
- [37] Hui WW, Jiang P, Tong YK, et al. Universal haplotype-based noninvasive prenatal testing for single gene diseases[J]. *Clin Chem*, 2017, 63(2):513-524.

(收稿日期:2017-06-29)

编辑:宋文颖