

高通量测序技术在遗传性疾病实验诊断中的应用

吴丹 黄欢 孙丽洲*

(南京医科大学第一附属医院 产科,江苏 南京 210029)

【摘要】 高通量测序技术(high-throughput sequencing)又称“下一代”测序技术,具有高准确性、高灵敏性以及高性价比的绝对优势,对于传统医学和疾病研究而言是一次革命性的改变,对遗传性疾病的诊断和筛查起着非常关键的作用。本文介绍了高通量测序技术的作用原理,回顾新一代测序在遗传性疾病临床分子诊断实验室中的应用。随着高通量测序技术的继续发展和个性化医疗的不断普及,不但会给生命科学研究带来更多的资源和便利,而且将对改善人类健康及生活质量起到巨大的作用。

【关键词】 高通量测序技术;遗传性疾病;实验分子诊断

【中图分类号】 R714.53 **【文献标识码】** A

DNA 测序(DNA sequencing)即指测定组成 DNA 分子的核苷酸 A、T、C、G 的排列顺序。

DNA 测序作为一种重要的实验技术,极大地推动了分子生物学的发展,是分子生物学中最常用的研究技术之一。以 Sanger 法为代表的第一代测序技术帮助人们完成了从噬菌体基因组到人类基因组图谱等大量测序工作,但由于其存在成本高、速度慢、通量低等不足,并不是后基因组时代最理想的测序方法。因此,为了满足研究的需要,第二代测序技术出现了,目前比较成熟的高通量测序技术主要包括罗氏公司的 454 测序技术、Illumina 公司的 Solexa 测序技术以及 ABI 公司的 SOLiD 测序技术 3 个主要测序平台^[1]。但第二代测序技术仍有缺点,如读长较短,给后续的序列拼接、组装以及注释等生物信息学分析带来困难,该技术原理建立在 PCR 的基础上,DNA 分子片段的数目比例在扩增前后有相对偏差,在一定程度上影响了基因表达分析,尤其是对大量表达的基因。这些缺点相对制约了第二代测序技术的应用和发展,因此第三代单分子测序技术应运而生。因第三代测序技术采用单分子读取技术,有着更快的数据读取速度,同时不需要 PCR 扩增步骤,进一步降低了测序成本。现有的第三代测序平台主要有 Helicos biosciences 公司的 tSMSTM

(true single molecular sequencing)技术平台、美国 Pacific Biosciences 公司的 SMRT (single molecule real-time)技术平台、美国 Life Technologies 公司的基于 FRET 测序技术和美国 Ion Torrent 公司、英国 Oxford NanoporeNechnologies 公司的纳米孔单分子技术^[2]。本文主要对高通量测序技术作简要介绍,并且回顾新一代高通量测序技术在遗传性疾病临床分子诊断实验室中的应用情况。

1 高通量测序技术简介

高通量测序技术是一次性对几百万到十亿条 DNA 分子进行并行测序,又称为下一代测序技术,其可对一个物种的转录组和基因组进行深入、细致、全貌地分析,所以又被称为深度测序。该技术大都采用了大规模矩阵结构的微阵列分析技术-阵列上的 DNA 样本可以被并行分析,测序主要利用 DNA 聚合酶或 DNA 连接酶和引物对模板链进行一系列的延伸,并且通过精细设备观察并记录连续测序过程中的光学信号。它的特点包括:①通过有序活化或者无序的阵列可以实现大规模的并行化,以提供高密度的信息密度;②不采用电泳,设备易于微型化,大大降低了样本和试剂的消耗量^[3]。高通量测序技术不仅可以用于全基因组测序、转录组和基因表达调控研究、DNA 和蛋白质相互作用研究以及基因组 DNA 甲基化分析^[4],也有助于疾病的诊断及管理^[5]。随着高通

量测序技术的不断成熟和费用的逐步降低,测序技术也逐渐从科研走向临床,为临床上的一些遗传性疾病的研究提供了重要的分子依据。

2 在遗传性疾病实验诊断中的应用

2.1 高通量 DNA 测序技术应用于唐氏综合征无创性产前检查(non-invasive prenatal testing, NIPT) 胎儿染色体非整倍体异常是孕妇需要进行产前诊断的主要原因之一,21-三体是胎儿非整倍体异常的最常见类型,每年的发病率为 1/800~1/600^[6]。孕妇血清标志物-甲胎蛋白(AFP)、游离雌三醇(μ E3)和绒毛膜促性腺激素(β -HCG)是目前国内临床应用比较广泛的唐氏综合征孕中期产前筛查的 3 项指标,通过这 3 项指标水平间接反应胎儿的情况,缺点是会出现一定的假阳性和假阴性。传统的产前诊断技术如绒毛、羊水和脐血细胞培养和核型分析有一定的流产率,在实际应用中给孕妇带来了一定的伤害和心理负担^[7]。

2.1.1 NIPT 的简要发展史 1997 年香港中文大学卢煜明教授发现母体外周血浆中存在游离胎儿 DNA,可以作为非创伤性产前诊断的理想材料,并于 1999 年发现唐氏综合征的母体血浆中胎儿游离 DNA 的平均浓度要显著高于正常组,这是最早将胎儿游离 DNA 应用于唐氏综合征诊断的研究。随着分子遗传学的发展,大规模并行基因组测序技术能够检测大量的 DNA 片段,已应用于胎儿性别鉴定、父源性血型基因检测、检测胎儿非整倍体病的诊断等研究。2008 年,卢煜明教授等人^[8]应用高通量 DNA 测序技术对唐氏综合征进行无创性产前诊断,结果特异性较高,假阳性率较低。2010 年 Chiu RW 等^[9]认为该技术对于诊断 21-三体是高效、准确的,但对于 18 和 13-三体的诊断需要提高精准性。2011 年 Chen EZ 等^[10]结合生物信息学分析技术,对 13-三体和 18-三体检测的特异性分别达到了 98.9% 及 98.0%,充分论证了该技术诊断 13-三体和 18-三体的可行性。同年香港中文大学、英国伦敦国王学院医院(King's College Hospital)、深圳华大基因的研究人员在 BMJ 杂志报道^[11],应用 MPGS 检测母血 cfDNA 序列,发现无创产前基因检测的灵敏度为 100%,特异度为 97.9%,阳性预测值为 96.6%,阴性预测值为

100%。2012 年 Dan S 等^[12]对 11 105 例中国孕妇进行胎儿游离 DNA 高通量测序分析,结果 190 例阳性,其中 143 例 21-三体,47 例 18-三体,核型研究最终发现 1 例 21-三体假阳性,1 例 18-三体假阳性,假阴性率为 0,对 21-三体和 18-三体检测的敏感度为 100%,特异性为 99.96%。再次验证了高通量基因测序技术对于检测 21-三体和 18-三体具有高敏感性和特异性,该技术作为产前筛查可以避免 98% 的有创产前诊断。Lo YM^[13]认为提取母体外周血中胎儿游离 DNA 进行大规模基因并行测序技术,在未来的产科实践中扮演着越来越重要的角色,该技术在伦理学、社会学和法律方面都具有无比的优越性。2013 年 Chiu RW^[14]前瞻性地提出最有可能大规模应用于 21-三体综合征的产前筛查是高通量基因测序技术。胎儿染色体非整倍体异常是造成产前诊断的主要原因,大规模并行测序技术为所有孕妇提供了一种检测该疾病的无创产前诊断方法^[15]。

2.1.2 NIPT 的假阳性率 2015 年发表在《新英格兰医学杂志》上的 3 项新的研究^[16-18]同时表示 NIPT 测试应谨慎用于包括高妊娠风险孕妇在内的全部孕妇。研究发现 NIPT 假阳性结果的风险相当可观,如果孕妇不进行诊断确诊,很可能导致妊娠终止。尽管 NIPT 测试具有高敏感性和高特异性,这项技术仍然只应该应用于筛查而不是对胎儿核型的诊断与确认。由华盛顿大学团队领导的研究^[17]深入分析了 NIPT 可能产生假阳性结果的原因之一,那就是母亲基因组中存在拷贝数变异。这项研究由加州大学旧金山分校领导,涉及到 16 000 名女性。为了研究各种无创产前检测的表现,贝勒和香港的研究人员重点研究了 307 名妇女,她们获得了阳性的 NIPT 结果,包括 21-三体、18-三体、13-三体、X 单体、XXX、XXY 或 XYY,并转诊到侵入性的诊断检测(这些结果来自 Sequenom 的 MaterniT21 和 SafeT21, BGI 的 NIFTY, Illumina 的 Verifi, Natera 的 Panorama 以及 Ariosa 的 Harmony)。其中 13 个病例羊膜穿刺或绒毛膜取样后的核型分析表明嵌合的存在。剩下 294 个 NIPT 阳性病例,19% (56 个)被证明是假阳性的。其中,对于最常检测到的 21-三体,假阳性率为 9%,XXX、XXY 或 XYY 为

17%,18-三体为23%,13-三体为46%,而X单体高达62%。香港中文大学的研究人员发现至少有8例假阳性的NIPT报告(大部分是21-三体),但却产下健康的婴儿。NIPT产生假阳性结果,涉及几个方面的原因,包括母体的体细胞嵌合、胎盘嵌合、双胞胎消失、母亲的癌症未被检测到以及母亲的拷贝数变异。来自美国华盛顿大学研究团队的结果阐述了几个可能导致NIPT测试产生假阳性结果的原因,即母体基因组在拷贝过程中存在着某些突变。在这一项研究中,他们分析了4名妇女的血液样本。这些妇女接受了Illumina的Verifi检测,并获得了阳性结果,其中有3名是18-三体阳性,另一名是13-三体阳性,但是最终诞下了健康的婴儿。对于两名NIPT检测结果为18-三体阳性的患者,他们在18号染色体上鉴定出重复的区域。研究人员推测,这些重复可能干扰了分析,因为18号染色体的测序读取比其他染色体多。血液中大部分的无细胞DNA都来自母亲,而母体的重复使得读取数量增加,提高了假阳性的机会,而染色体缺失则减少了读取数量,提高了假阴性结果的概率。这个影响取决于无细胞DNA中胎儿的比例、重复或缺失的大小、以及它是否遗传给胎儿。有一名患者的18号染色体上有一段长达1.5 Mb的重复,并遗传给了胎儿,故假阳性结果的概率高了16 000倍。基于拷贝数变异在一般人群中的频率,研究人员估计它们明显提高了NIPT获得假阳性结果的风险。不过,若是考虑母体的拷贝数变异,风险可降低。例如,一旦检测到这样的变异,则这一区域的读取至少应被部分丢弃,或根据需要增加或减少染色体的有效大小。英国伦敦大学学院儿童健康研究所的Lyn Chitty^[19]认为,NIPT的采用将最终“取决于当地的文化和社会因素,包括对残疾的态度、终止妊娠的法律,以及现有的医疗结构”,如现行的筛查项目。

国内研究者也发现了这一现象,例如林颖等^[20]运用高通量测序技术检测胎儿性染色体非整倍体,在5540例孕妇中发现10例异常,G带核型分析只有6例异常,发生率为0.11%,二者的符合率为60%(6/10),因此对于性染色体非整倍体胎儿行高通量测序存在假阳性,还需进一步完善。

2.1.3 国家卫生计生委等相关部门对NIPT的态度 近年来,NIPT已成为行内热门的话题,但由于存在一定的假阳性和假阴性率,2014年2月,国家卫生和计划生育委员会、食药监总局联合发文,叫停基因测序在临床上的所有应用,包括NIPT。2014年12月,国家卫生和计划生育委员会在发布第一批高通量基因测序技术临床应用试点单位名单时,附带发布了《高通量基因测序产前筛查与诊断技术规范(试行)》^[21],审批通过了108家医疗机构开展高通量基因测序产前筛查与诊断(NIPT)临床试点。这远远大于此前医政医管局公布的NIP第三方检验机构的数目,这种举措再一次肯定了医疗机构在未来高通量基因测序临床应用中的重要作用。这也是我国首个NIPT规范,是国家卫生计生委在“叫停令”发出后,用了将近10个月时间反复商讨之后确定的,这也顺应了国际上多个国家都在发布NIPT诊疗指南的趋势。

2.1.4 NIPT指南 欧洲人类遗传学学会和美国人类遗传学学会发表联合声明^[22, 23]对临床实践中的无创产前筛查(NIPT)提出了10条建议:①与现有的孕早期筛查方式相比,NIPT在常见的常染色体非整倍体的检测方面有着更高的准确性。然而,NIPT的阳性结果不应该作为最终诊断:有多种原因会导致假阳性结果。因此对于NIPT结果为阳性的孕妇,建议在做出妊娠终止的决定前,应建议进行羊水穿刺等介入性诊断进行确认。②尽管介入性检测率较低的NIPT筛查方式表现更佳,但是不能因此降低预测信息和咨询的标准。这对于为孕妇提供有意义的生育选择尤其重要。要特别留意其他语种、文化背景或健康知识不足的女性对信息的需求。③NIPT在应用于特定染色体检测的同时,也会带来一些其他的检测发现,例如其他染色体异常或大片的插入或缺失。作为检测前咨询的一部分,夫妇双方应该被告知会检出除目标疾病外其他疾病的可能性以及这些额外发现将会带来的影响。针对这些额外发现的检测结果,应该制定相应明确的处理政策以考虑受检者是否愿意接受这些额外检测发现的意愿。④将NIPT产前筛查扩大到性染色体异常和微缺失不仅会引发关于信息和咨询挑战的道德问

题,也可能对 NIPT 的非整倍体检测的使用而大幅减少介入性检测带来逆向的影响。⑤胎儿异常的产前筛查与预防性筛查相结合可能会传递出含混不清的信息,造成咨询意见不足。应该尽可能明确清楚所有产前筛查活动的目的,包含不同目的的产前筛查应该单独列出。如果无法做到,起码在提供相关信息时进行概念性的区分。⑥对于将胎儿异常产前筛查列为国家公共卫生项目的国家,政府和公共卫生部门应发挥积极的作用,确保 NIPT 作为唐氏综合征和其他常见常染色体非整倍体筛查的第二或第一级筛查手段。这需要确保质量控制、NIPT 产前筛查的非实验室因素、人才教育、筛查项目各方面的系统性评价、可用预算范围内的所有孕妇公平获取信息和建立产前筛查进一步创新的管理结构。⑦ NIPT 筛查常见染色体非整倍体可以有多种不同的筛查模式,包括作为替代性的一线筛查检测。如何在这些不同的筛查模式中做出选择,不仅仅要考虑到检测技术本身的技术指标和卫生经济学指标,还应该考虑到是否能够对孕妇提供有意义的生育指导、对孕妇及其家人带来的益处和风险、以及筛查目标和社会可接受的价值观之间的平衡。⑧为了对产前筛查进行充分评估,有必要进一步促进知情选择以及知情选择干预相关方法的研究及验证。转向基于 NIPT 的产前筛查为填补这一知识缺口提供了机会。⑨随着测序技术的快速发展和测序成本的不断降低,对于未来胎儿异常的产前筛查范围的专业性和社会性讨论也变得尤为重要。正如文中所述,道德层面的原因是让产前筛查限于严重先天性儿童异常,而不进一步扩大范围的重要因素。⑩产前筛查为胎儿治疗和自助生育权带来了可能,这为探讨生育自主权和父母责任关系的伦理分析提出了疑问。

鉴于国际上多个国家都发布了 NIPT 指南,国家卫生和计划生育委员会在发布第一批 108 家高通量基因测序试点单位的同时,发布了《高通量基因测序产前筛查与诊断技术规范》,该规范明确了 NIPT 的适用范围,界定了 NIPT 在整体产前筛查与诊断服务体系中的合理定位,规范了临床服务流程和质量控制,有助于提高国内 NIPT 的服务质量和管理水平。刘俊涛教授^[24]结合临床应用实践,对其进行

了专业解读。

2.2 高通量测序用于 CNV,拷贝数变异 拷贝数目变异亦称为拷贝数目多态性(copy number polymorphism,CNP),是从 1 kb 至 3Mb 的 DNA 片段的亚微观变异,表现为 DNA 片段的插入、缺失、重复等。利用全基因组扩增后的产物进行高通量测序会检测出大量的 CNVs,有良性的、病理性的以及临床意义不明的,这给数据的分析以及临床应用增加了难度。病理性 CNVs 是与已知的微缺失/微重复或其他临床已知的致病的基因组片段相对应的 CNVs,可能导致出生缺陷、生长发育迟缓、肿瘤或神经退行性病变等,如 Prader-Willi 综合征、Miller-Dieker 综合征、DiGeorge/velocardiofacial 综合征(VCFs)、Smith-Magenis 综合征以及由于 1p、4p 微缺失引起的综合征等^[25]。利用高通量测序技术可以检测到大量的 CNVs,能够发现传统的 G 显带核型分析技术和 FISH 无法发现的染色体缺失、重复。传统的 G 显带核型分析技术虽然是染色体异常诊断的金标准,但是存在细胞培养时间长、且分辨率低、易于污染等缺点。FISH 虽然显著缩短了报告时间,约 1~3 天,但不能检测全部的染色体信息^[26]。Array-CGH 和 SNP-array 是基于基因杂交技术检测 CNVs,分辨率较高,分别约 1Mb 和 1.5Kb,但基因芯片制作难度大,成本高,且只能检测出已知的异常,而高通量测序技术则基于全基因组测序,分辨率最高,技术稳定性高,成本相对低,且能够检测出未知的异常,因此更适合进行 CNVs 的检测。

2.3 高通量测序用于单基因遗传病检测 目前已经确认的单基因隐性遗传病有 1000 多种,常用的检测技术包括基因组测序、基因芯片、液相芯片、变性高效液相色谱分析 DEPLC 等。高通量测序技术能以较短读长对单基因隐性遗传病携带者进行广谱筛查^[27],比如华大医学采用的目标序列捕获+高通量测序技术,通过一套寡核苷酸探针捕获基因组 DNA 中的目标区域(基因的外显子及剪切位点序列),然后进行高通量测序和生物信息学分析,获取目标区域的基因变异信息定位致病突变。如 Sun 等^[28]将 X 染色体外显子组捕获测序(X-exome capture and sequencing)应用于终端骨发育不良(terminal osse-

ous dysplasia)的研究,通过对2例无血缘关系的患者进行测序,确定了FLNA为其致病基因。

2.4 高通量测序用于遗传代谢性疾病(inherited metabolic diseases,IMD) 近年来,利用高通量测序技术进行IMD分子诊断的研究受到越来越多的关注,采用高通量进行IMD实验室筛查和诊断的最大特点是在一管测试中即可对几乎所有IMD致病基因缺陷进行检测,省时、省力、高效,为实施IMD早期干预和治疗赢得时机。目前,NGS技术已用于肌肉型和肝型糖原贮积症^[29]、婴儿型线粒体疾病^[30]、先天性糖基化缺陷病^[31]等IMD的分子缺陷研究。

2.5 高通量测序用于其他遗传性疾病的检测(多基因遗传病,如耳聋、甲基丙二酸血症、遗传性多囊肾病基因变异) 高通量测序技术还应用于其他遗传性疾病的检测,如2015年,谢楚杏、曾海生等人^[32]对217例经气相色谱-质谱联用分析技术(GC-MS)首次确诊为遗传性耳聋、甲基丙二酸血症、遗传性骨髓衰竭综合征的患儿,应用目标序列捕获结合高通量测序技术检测其相关疾病基因。结果检测出患儿遗传性耳聋的致病基因为EYA4、SLC26A4、POU3F4、MYO8A、USH1C、CDH23、DFN5、TEC-TA,检出率为92.11%;引发甲基丙二酸血症的致病基因主要为甲基丙二酰辅酶A变位酶(MUT)、MMACHC基因突变,检出率为100%;引发患儿遗传性骨髓衰竭综合征的致病基因为SBDS、FANCD2、RPS19、FANCG、TINF2、FANCB、ELANE,检出率为100%,应用目标序列捕获结合高通量测序技术对遗传性耳聋、甲基丙二酸血症、遗传性骨髓衰竭综合征的突变基因检测,结果准确,方便快捷。遗传性多囊肾病通常由常染色体16p3.3区的PKD1及4q21区的PKD2两个基因突变致病,刘维强等人^[33]研究发现基因芯片靶目标捕获法对诊断多囊肾基因变异的具有更好的测序结果。

2.6 胚胎植入前高通量测序(PGS/PGD) 高通量测序技术在PGS/PGD领域的应用报道不多。欧洲生殖年会亦对第一届会议至第九届会议有关PGS检测的数据结果进行统计显示胚胎染色体异常率为36%(16 784/46 589)。目前所用的取材标本多来自囊胚期,囊胚期胚胎可以提供5~10个滋养层细

胞,多细胞较之于单细胞易于操作,DNA样本量亦比较充裕易于扩增,且囊胚滋养外胚层活检不涉及发育成胎儿部分的内细胞团,从而避免了活检对胚胎所造成的不利影响,而且囊胚的嵌合体率比D3胚胎低,检测结果更为可靠。国内外对单细胞全基因组扩增高通量测序技术应用于胚胎植入前遗传学筛查的研究鲜有报道,张静等人^[34]结合基于DOP-PCR技术原理的高保真性全基因组扩增和高通量测序技术对植入前D3胚胎单细胞进行染色体数目和16Mb以上缺失、重复的筛查,共检测42枚胚胎(D3胚胎28枚,囊胚14枚),D3优质胚胎单细胞染色体数目异常或者>16Mb缺失、重复检出率为60.7%(17/28),单细胞高通量测序技术基于全基因组测序可以实现染色体异常和单基因病的同时检测,虽然建立时间比较短,但高度的灵敏性、准确性、灵活性、运营成本低、产量大等特点使其显示出巨大的优势,随着该技术的进一步完善成熟,将成为PGD/PGS的一个强有力的检测手段。

3 展望

近几年,高通量测序技术的发展突飞猛进,其在处理速度、精确度、敏感性方面都有了质的飞跃,已经成为了生命科学及医学研究的重要技术手段。相信在不久的将来,测序技术将成为临床检测及治疗的常规技术手段,在整个临床研究领域发挥越来越大的作用。

参 考 文 献

- [1] Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008, 9: 387-402.
- [2] 张得芳,马秋月,尹佟明,等. 第三代测序技术及其应用[J]. 中国生物工程杂志,2013(05): 125-131.
- [3] 周晓光,任鲁风,李运涛,等. 下一代测序技术:技术回顾与展望[J]. 中国科学:生命科学,2010(01): 23-37.
- [4] 王兴春,杨致荣,王敏,等. 高通量测序技术及其应用[J]. 中国生物工程杂志,2012,1: 109-114.
- [5] Dixon-Salazar TJ, Silhavy JL, Udpa N, et al. Exome sequencing can improve diagnosis and alter patient management [J]. Sci Transl Med, 2012, 4(138): 138r-178r.
- [6] Ng SB, Turner EH, Robertson PD, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes[J].

- Nature, 2009, 461(7261): 272-276.
- [7] 向萍霞,刘翎,冷培,等. 游离胎儿 DNA 高通量基因测序技术在产前筛查的临床应用[J]. 实用妇产科杂志, 2013,10: 777-780.
- [8] 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 U S A, 2008, 105(51): 20458-20463.
- [9] Chiu RW, Sun H, Akolekar R, et al. Maternal plasma DNA analysis with massively parallel sequencing by ligation for noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21[J]. Clin Chem, 2010, 56(3): 459-463.
- [10] 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): e21791.
- [11] Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study[J]. Genet Med, 2011, 13(11): 913-920.
- [12] Dan S, Wang W, Ren J, et al. Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11,105 pregnancies with mixed risk factors[J]. Prenat Diagn, 2012, 32(13): 1225-1232.
- [13] Lo YM. Non-invasive prenatal diagnosis by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA[J]. Open Biol, 2012, 2(6): 120086.
- [14] Chiu RW, Lo YM. Clinical applications of maternal plasma fetal DNA analysis: translating the fruits of 15 years of research[J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51(1): 197-204.
- [15] 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 U S A, 2008, 105(51): 20458-20463.
- [16] Cheung SW, Patel A, Leung TY. Accurate description of DNA-based noninvasive prenatal screening[J]. N Engl J Med, 2015, 372(17): 1675-1677.
- [17] Snyder MW, Simmons LE, Kitzman JO, et al. Copy-number variation and false positive prenatal aneuploidy screening results[J]. N Engl J Med, 2015, 372(17): 1639-1645.
- [18] Sentilhes L, Salomon LJ, Vayssiere C. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy[J]. N Engl J Med, 2015, 373(26): 2581-2582.
- [19] 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.
- [20] 林颖,蒋馥蔓,秦岭,等. 孕妇血浆游离 DNA 高通量测序用于胎儿性染色体非整倍体检测的初步探讨[J]. 临床检验杂志, 2013,6: 406-408.
- [21] 编辑部. 信息[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015,12: 125.
- [22] Dondorp W, de Wert G, Bombard Y, et al. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening[J]. Eur J Hum Genet, 2015, 23(11): 1592.
- [23] Dondorp W, de Wert G, Bombard Y, et al. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening. Summary and recommendations[J]. Eur J Hum Genet, 2015, 23(11): 1-13.
- [24] 刘俊涛. 高通量基因测序产前筛查与诊断技术规范解读[J/CD]. 中国产前诊断杂志(电子版), 2016,1: 10.
- [25] 赵和永. 全基因组拷贝数变异检测在产前高通量测序异常信号分析中的应用研究[D]. 山东大学, 2015.
- [26] 谢文美,周凤娟,王强,等. 染色体异常检测技术在产前诊断应用中的研究进展[J]. 临床检验杂志, 2015,2: 134-136.
- [27] 王兴春,杨致荣,王敏,等. 高通量测序技术及其应用[J]. 中国生物工程杂志, 2012,1: 109-114.
- [28] Sun Y, Almomani R, Aten E, et al. Terminal osseous dysplasia is caused by a single recurrent mutation in the FLNA gene[J]. Am J Hum Genet, 2010, 87(1): 146-153.
- [29] Wang J, Cui H, Lee NC, et al. Clinical application of massively parallel sequencing in the molecular diagnosis of glyco-gen storage diseases of genetically heterogeneous origin[J]. Genet Med, 2013, 15(2): 106-114.
- [30] Calvo SE, Compton AG, Hershman SG, et al. Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing[J]. Sci Transl Med, 2012, 4(118): 110r-118r.
- [31] Jones MA, Bhide S, Chin E, et al. Targeted polymerase chain reaction-based enrichment and next generation sequencing for diagnostic testing of congenital disorders of glycosylation[J]. Genet Med, 2011, 13(11): 921-932.
- [32] 谢楚杏,曾海生,刘国军,等. 目标序列捕获结合高通量测序在遗传性疾病的应用研究[J]. 中国热带医学, 2015,7: 792-794.
- [33] 刘维强. 遗传性多囊肾病基因变异诊断体系的建立及应用[D]. 南方医科大学, 2015.
- [34] 张静. 人类早期胚胎植入前高通量测序遗传学筛查的研究[D]. 天津医科大学, 2015.

(收稿日期:2016-7-10)

编辑:宋文颖