

遗传性骨病的基因诊断进展

郭奕斌

(中山大学中山医学院 医学遗传学教研室, 广东 广州 510080)

【摘要】 遗传性骨病种类、分型繁多, 常规诊断难以确诊, 而基因诊断在遗传性骨病的确诊、分型等方面都发挥着不可或缺的作用。近一、二十年来, 基因诊断技术进展迅猛, 各种检测方法层出不穷。本文重点围绕遗传性骨病的基因诊断技术的最新进展进行综述, 以期对临床诊防工作提供一些有益的启示。

【关键词】 遗传性骨病; 基因诊断; 技术方法

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

遗传性骨病 (genetic skeletal disorders, GSD) 是指由于遗传物质改变导致骨骼畸形的一类遗传性疾病, 它是一大类具有遗传异质性和表型异质性的骨软骨发育不良病。它们大多是发病率很低的罕见病, 但种类繁多, 总发病率大于 1/5000^[1]。这些骨病发病早, 症状明显, 以骨骼塑形、生长、分化、内稳态异常为主要特征, 通常造成患者致残甚至致死, 其发病率与死亡率相当可观, 而且此类骨病还会逐代或隔代遗传, 故危害十分严重, 往往给家庭和社会带来沉重的经济负担, 给患者及其亲属带来巨大的心理负担和精神负担^[2]。

1 遗传性骨病的种类和分组

根据国际骨骼发育异常协会 (International Skeletal Dysplasia Society, ISDS) 制订的分类标准, 2006 年全世界 GSD 统计有 372 种, 分为 37 组, 2010 年更新为 456 种, 分为 40 组, 其中 316 种遗传性骨病与一个或多个致病基因有关, 相关致病基因多达 226 个^[3]。若按北京华大基因公司 2015 年的最新分类 (BGI version), 则分成 497 种, 41 组, 相关致病基因增至 363 个。

2 遗传性骨病的特点

2.1 遗传性 之所以称为遗传性骨病, 是因为它们都是由于遗传物质改变 (基因突变) 而引起的遗传性疾病, 因此可以逐代遗传或隔代遗传, 可以男女相互

遗传 (常染色体遗传, 与性别无直接关系), 也可以男女交叉遗传 (X 连锁遗传, 与性别有直接关系) 等。

2.2 罕见性 它们都属于罕见病, 即罕见性遗传病 (rare genetic diseases), 发病率很低, 通常是万分之一或十万分之一以下。有些罕见病, 至今全世界也只报道寥寥数例。

2.3 多样性 遗传性骨病种类繁多, 至今已报道的就有近 500 种, 临床上相对常见的有: 软骨发育不全、致死性侏儒症、软骨发育低下、假性软骨发育不全、多发性骨骺发育不良、先天性脊柱骨骺发育不良、迟发性脊椎骨骺发育不良、X 连锁低血磷性佝偻病、黏多糖贮积症、干骺端软骨发育不良、软骨生成不全、软骨外胚层发育不良、窒息性胸廓发育不良、短肋-多指 (趾) 综合征及成骨不全等 30 多种^[2,4]。

2.4 高发性 从遗传学的角度来看, 再发风险在 5%~10% 的属于中度风险, 大于 10% 的即属高风险。遗传性骨病即使是最少的 AR 遗传病, 也有 25% 的再发风险, 所以都属于高风险病种。

2.5 危害性 遗传性骨病通常都是致残致死性、危害很严重的遗传性侏儒症, 除了个头矮小、生长发育迟缓外, 通常还有骨骼畸形、智力受损、肝脾肿大、心肺功能异常等, 即使不致死, 也往往致残。

2.6 难治性 由于遗传性骨病通常都是致残致死性的, 因此一旦出现症状, 往往很难治疗, 实际上绝大多数遗传性骨病至今都无确实有效的根治疗法。对症治疗通常只能治标而无法治本, 骨髓移植、酶替代疗法、干细胞治疗费用昂贵甚至超昂贵, 远期疗效

不明确,特别是症状已经显现出来的比如已经智力受损、肝脾肿大、骨骼畸形等,即使花费很多人力、财力,也很难收到预期疗效。而基因治疗目前大多还停留在实验室研究阶段,离应用到临床治疗还有相当长的一段路要走。

3 遗传性骨病基因诊断的进展

遗传性骨病几乎都是单基因病。对于基因病,基因诊断被公认是确诊该类疾病最准确、最可靠的诊断技术和金标准,它可以在分子水平甚至在单个碱基发生改变的情况下做出明确诊断。它打破常规的诊断方式,不以疾病的表型为主要依据,而是采用分子生物学的技术和方法,直接检测被检者某一特定基因的结构或者功能是否异常,从而对疾病做出诊断。相对于常规诊断,基因诊断更注重个体基因状态,不仅可以对患者所患疾病做出判断,还可以对表型正常的携带者或者遗传易感者做出前瞻性诊断^[5]。近一、二十年来,基因诊断技术取得了前所未有的进步。下面重点对遗传性骨病的最新基因诊断技术做一综述。

基因诊断通常是在基因定位、基因克隆、基因序列、蛋白结构已经弄清或虽未弄清但与其他遗传标记(genetic marker)的连锁关系已经明确的情况下进行的,大致分为间接诊断和直接诊断2大类。

3.1 间接诊断 间接诊断是指当致病基因本身尚属未知或致病基因虽然已知但其突变尚属未知时,可以通过对患者及其家系成员进行连锁分析或单倍型分析,从而推断受检者是否带有致病基因的一种诊断方法。

连锁分析多使用基因组中广泛存在的各种DNA多态性位点,特别是基因突变部位或紧邻的多态性位点作为遗传标记。RFLP、SSLP、STR、SNP等均可用于连锁分析。通过多位点的连锁分析,还可进行亲子鉴定等。通常,RFLP被认为是第一代遗传标记,SSLP/STR是第二代遗传标记,SNP是第三代遗传标记^[6,7]。

3.2 直接诊断 对于基因序列、结构、功能、突变类型都清楚的,且发生于候选基因内的突变的检测,可以采用直接诊断的方法。直接诊断是指直接检查目的基因本身有无异常。它通常是用基因本身或紧邻

的DNA序列作为探针,或通过PCR扩增产物,以探查基因有无突变、缺失等异常并阐明突变的性质和突变的类型等。直接诊断适用于已知基因异常的疾病,下面将分别介绍。

3.2.1 分子杂交及相关技术 互补的DNA单链能够在一定条件下结合成双链,即所谓的分子杂交。分子杂交技术包括southern blot、northern blot、dot blot、RDB、SSH、western blot等。其中,southern blot、northern blot和dot blot、RDB、SSH也称核酸的分子杂交,用于检测特定的DNA、RNA;western blot又称免疫学测定,用于检测特定的蛋白质。核酸分子杂交是基因诊断的最基本的方法之一,其中,抑制性消减杂交技术、DNA生物传感器检测法比较新颖,本节重点介绍它们。

3.2.1.1 抑制性消减杂交技术(SSH) SSH技术是一种鉴定、分离组织细胞中选择性表达基因的技术,是一种以抑制性PCR(是利用链内退火优于链间退火,使非目的序列片段两端的长反向重复序列在退火时产生“锅柄样”结构,无法与引物配对,从而选择性抑制非目的序列片段扩增)反应为基础,将标准化测试cDNA单链步骤和消减杂交步骤合为一体的技术,它是建立在抑制性杂交和选择性PCR基础上的差异表达基因筛选手段。通过合成2个不同的接头,接于经限制性内切酶消化后的测试cDNA片段的5'末端,将测试和驱动进行两轮杂交^[8,9]。

该技术筛选高效,假阳性率低,因而广泛应用在动物、植物、人类及癌症等研究领域^[6]。但其实验材料是通过PCR扩增获得的,整个过程包括多次酚:氯仿抽提,这些过程可能会使部分基因丢失,这是其不足之处。

3.2.1.2 DNA生物传感器检测法(DNA biosensors) 该技术是由固定有已知的核苷酸序列的单链DNA(ssDNA)的电极(探头)和换能器两部分组成。固定在传感器电极上的ssDNA探针与待测样品的目标DNA杂交,形成双链DNA(dsDNA),杂交反应在传感器电极上直接完成,换能器将杂交过程中所产生的变化转换成电、光、声等物理信号,从而对待检样品进行检测^[10]。

该技术灵敏度高,快速经济,无需标记;检测装置简单轻巧,易于实现微型化;检测过程中不受样品

混浊度限制。适合研究碱基错配对 DNA 电子传递性质的影响^[10]。

3.2.2 聚合酶链反应(PCR)及其衍生技术 对于基因突变的检测,在1985以前主要是利用 Southern 印迹法,它可以检出基因的缺失、插入、重组等突变形式,而点突变、微缺失、微插入则很难检出,只能应用 PCR 结合其他方法完成。PCR 技术是突变研究中的重大进展,目前几乎所有的基因突变检测技术都是建立在 PCR 基础之上,并且由 PCR 衍生出许多新方法,目前已达 20 余种,自动化程度也越来越高,分析时间也大大缩短,分析结果的准确性也有很大提高。

PCR 技术目前有许多新的发展,用途日益扩大。本小节重点介绍三引物 PCR、实时荧光定量 PCR、数字 PCR 这几种。

3.2.2.1 三引物 PCR 法(TP-PCR) TP-PCR 是一种不需要限制性内切酶和连接酶的重组 DNA 的方法。可用于拼接融合基因,目的基因中碱基的定点突变,目的基因中某些功能结构域的人工缺失研究,在目的基因中的任何位置插入外源基因片段,进行重组基因的研究。

该法的原理是:TP-PCR 反应体系中有 2 种模板和 3 种引物,可以在同一个反应体系中产生一个重组 DNA 分子。设计合理的中间引物是保证 TP-PCR 反应成功的关键。只有中间引物设计合理才能保证 2 种 DNA 片段在融合位点正确连接。3 条引物的浓度比例是另一个关键因素。要适当调节中间引物的比例使得 TP-PCR 反应获得最理想的结果。实验结果表明,合适的比例范围可有效增加目的片段的扩增,同时减少非特异产物的扩增,一般来说在 1/1000~1/100 范围内比较合适。除此之外,为了保证 PCR 产物的高忠实性,需用高忠实的 DNA 聚合酶来代替 Taq 聚合酶^[11-13]。

TP-PCR 法简便、快捷、经济,可以在所期望的任何位点将 2 种 DNA 片段连接起来,而无需知道 DNA 片段的限制位点。通过 TP-PCR 进行重组操作,可以在几个小时内于一个 PCR 反应体系中完成,无需高档设备仪器和试剂盒,即可实现对所研究的目的基因的改造。该法的突出优点在于无需设计外源的 DNA 序列,即可实现对目的基因的任何常

规性改造,从而避免在原有基因中引入冗余的酶切位点的碱基序列^[11-13]。

3.2.2.2 RT-PCR、RTQ-PCR 和多重巢式 RT-PCR RT-PCR 为逆转录 PCR(reverse transcription PCR)和实时 PCR(real time PCR)共同的缩写。逆转录 PCR 是 PCR 的一种衍生技术。在逆转录 PCR 中,一条 RNA 链被逆转录成为 cDNA,再以此为模板通过 PCR 进行 DNA 扩增。RT-PCR 的指数扩增是一种很灵敏的技术,可以检测很低拷贝数的 RNA。RT-PCR 广泛应用于遗传病的诊断,并且可以用于定量检测 RNA 的含量。

实时为了与逆转录 PCR 相区别,PCR 通常被写作“定量 PCR”(quantitative PCR, qPCR)或者实时荧光定量 PCR(real time quantitative PCR, RTQ-PCR)^[14]。实时 PCR,属于定量 PCR 的一种,以一定时间内 DNA 的增幅量为基础进行 DNA 的定量分析。

多重巢式 RT-PCR 的原理同多重巢式 PCR,不同之处在于所用的模板是 cDNA 而不是 DNA。

逆转录 PCR 可在 RNA 水平检测基因的突变类型和突变效应,它和多重巢式 RT-PCR 有一个共同的缺点就是所提的 RNA 易降解且操作较繁琐。实时荧光定量 PCR 具有灵敏、特异、技术成熟和操作简便等优点,对于临床上明确诊断、具体分型、动态观测肿瘤负荷、选择合适治疗方案、评估治疗效果和预后都有较大价值。在产前监测和产前基因诊断也具有重要意义。

3.2.2.3 数字 PCR 技术(dPCR) dPCR 技术是一种新的核酸检测和定量技术,与传统 qPCR/RTQ-PCR 技术不同,dPCR 采用绝对定量的方式,不依赖于标准曲线和参照样本,直接检测目标序列的拷贝数。由于这种检测方式具有比 qPCR 更加出色的灵敏度、特异性和精确性,故得到广泛的应用。这项技术在极微量核酸样本检测、复杂背景下稀有突变检测和表达量微小差异鉴定方面都具有诸多优势,其在基因表达研究、microRNA 研究、基因组拷贝数鉴定、癌症标志物稀有突变检测、致病微生物鉴定、转基因成分鉴定、NGS 测序文库精确定量和结果验证等诸多方面也具有广阔的应用前景。

该技术是采用“分而治之”(divide and conquer)

的策略,将一个标准 PCR 反应分配到大量微小的反应器中,在每个反应器中包含或不包含一个或多个拷贝的目标分子(DNA 模板),实现“单分子模板 PCR 扩增”,扩增结束后,通过阳性反应器的数目“数出”目标序列的拷贝数。

dPCR 是 PCR 领域最激动人心的创新之一,该技术可应用于单细胞分析、罕见肿瘤等位基因检测、产前诊断以及血液中游离肿瘤 DNA、表观遗传学直接相关的 DNA 甲基化定量检测、ChIP 定量鉴定等众多领域^[15-29]。如果将 PCR 技术进行分代的话,那么第一代 PCR 技术就是我们目前最常用的常规 PCR 了,它可通过凝胶电泳获得定性结果。而曾经风靡全球的 qPCR/RTQ-PCR 可称为第二代 PCR 技术,它利用荧光试剂监控扩增,来实现相对定量,在开展基因表达分析时,需要标准曲线或参考基因来协助定量。而 dPCR 则可谓是第三代 PCR 技术,它不再依赖 C_q 值或内参基因,即可确定低至单拷贝的待检靶分子的绝对数目,它是一种核酸分子绝对定量技术,主要采用当前分析化学热门研究领域的微流控或微滴化方法,将大量稀释后的核酸溶液分散至芯片的微反应器或微滴中,每个反应器的核酸模板数少于或者等于一个。这样经过 PCR 循环之后,有一个核酸分子模板的反应器就会给出荧光信号,没有模板的反应器就没有荧光信号。根据相对比例和反应器的体积,就可以推算出原始溶液的核酸浓度。它比 qPCR 更加灵敏、特异、精确,故日益得到广泛的应用。可应用于癌症生物标志物研究和拷贝数变异分析、病原体检测、与 NGS 无缝对接对二代测序结果进行验证、miRNA 表达分析、单细胞基因表达分析、环境监测、食品检测^[15-29]。

3.2.3 PCR 基础上的基因突变检测技术

3.2.3.1 扩增阻碍突变系统/限制性核酸内切酶(amplification refractory mutation system/restriction endonuclease, ARMS/RE) ARMS/RE 双重鉴定法特别适用于种植前基因诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)等需快速特异、准确灵敏检测的项目。此法是将 ARMS^[30,31]与 RE 巧妙结合,在设计 3'端错配碱基的特异引物的同时引入酶切位点。有时一个碱基的错配不一定含有酶切位点,这时可根据限制酶的识别序列,人为设计成双错

配甚至三错配。

ARMS/RE 将 ARMS 法和 RE 法合二为一,具有双重鉴定的效能,即首先用 ARMS 法鉴定一次,然后再用 RE 法鉴定一次,故可大大提高鉴定的准确率。本科室曾用该法用于软骨发育不全的 PGD 研究并获得成功^[32]。但该法也有不足,其不足就是往往需要花费很多时间人为错配碱基才能找到酶切位点,且所用的内切酶多数较罕见,成本较高,且酶易失活,保存期有限。

3.2.3.2 变性高效液相色谱分析(DHPLC) DH-PLC 是一种高通量筛选 DNA 序列变异的技术,主要用来分析异质性双链结构:①在不变性的温度条件下,检测并分离分子量不同的双链 DNA 分子或分析具有长度多态性的片段;②在完全变性温度条件下,可以区分单链 DNA 或 RNA 分子,适用于寡核苷酸探针合成纯度分析和质量控制;③在部分变性的温度条件下,变异型和野生型的 PCR 产物经过变性复性过程,不仅分别形成同源双链,同时也错配形成异源双链,根据柱子保留时间的不同将同源双链和异源双链分离,从而识别变异型^[33,34]。

该技术可进行基因突变检测、SNP 分析等方面的研究,可检测出含有单个碱基的置换、插入或缺失的异源双链片段,快速高效无毒经济,除了检测已知突变还能检测未知突变,自动化程度高,其敏感性和特异性可达 90% 以上,明显高于单链构象多态性(single strand conformation polymorphism, SSCP)检测技术。但该技术不能检测纯合突变,检测纯合突变需在 PCR 产物中加入野生型扩增产物;不能确定突变的具体位点,也不能确定是哪种突变类型;仪器价格高,分离柱有一定的使用寿命,需定时更换;目前仅用于检测 200~500 bp 大小的 DNA 片段;引物二聚体、非特异扩增产物以及与样品碱基数类似的污染产物将会影响分析,需通过优化 PCR 去除之;PCR 产物浓度必须足够大,否则会导致信噪比下降,分析结果的可靠性也会随之下降^[33,34]。

3.2.3.3 高分辨熔解曲线分析(HRM) 该法主要用于未知突变筛查。根据目标 DNA 序列的长度、GC 含量及碱基的互补性差异,利用 HRM 对样品的基因型进行分析,其分辨精度可达单个碱基的差异。由于每一段 DNA 都有其独特的序列,因而在

加热变性时就会有独特的溶解曲线形状,它可以通过 DNA 分子缓慢升温过程中饱和荧光染料荧光值的变化而得到具体显现。如同 DNA 指纹图谱一样,具有很高的特异性、稳定性和可重复性。根据它们独特的溶解曲线,即突变片段与野生型片段溶解曲线的形状和位置存在差异,就可以对不同的核酸片段进行区分^[35]。

该法在突变筛查中其便捷性、灵敏性与特异性均优于 DHPLC,并且检测成本较低,耗时较少,是近年来发展起来的核酸分析技术。灵敏快速无毒高效,对已知和未知的突变都可检测。但和 DHPLC 一样,不能准确检测具体突变^[35]。

3.2.3.4 多重连接探针依赖性扩增技术(MLPA)

针对基因内每个待检区域设计一对 DNA 探针。每个 MLPA 探针包括 2 个荧光标记的寡核苷酸片段,一段引物序列和一段特异性杂交序列。在 MLPA 反应中,2 个寡核苷酸片段都与靶序列进行杂交,之后使用连接酶连接 2 部分探针。连接反应高度特异,只有当 2 个探针与靶序列特异性序列完全互补,连接酶才能将 2 段探针连接成一条完整的核酸单链;反之,如果靶序列与探针序列不完全互补,即使只有一个碱基的差别,连接反应也无法进行。连接反应完成后,用一对通用引物扩增连接好的探针,每个探针扩增产物的长度都是唯一的,范围在 130~480 bp。最后,通过毛细管电泳分离扩增产物,收集数据,软件分析,得出结论。只有当连接反应完成,才能进行随后 PCR 扩增并收集到相应探针的扩增峰,如果检测的靶序列发生点突变或缺失、重复突变,那么相应探针扩增峰会缺失、降低或增加,根据扩增峰的改变就可判断靶序列是否有拷贝数的异常或点突变存在^[36,37]。

该法高效、特异,在一个 PCR 反应中可以同时扩增数十个探针的连接产物,可用 40~50 对特异探针,一次性检测 40~50 种突变类型,可以检测 45 个核苷酸序列拷贝数的改变,实现了高通量的缺失检测。同时该技术所具有的相对定量能力还能对基因的重复进行判断。但需要毛细管电泳装置,试剂盒价格较高,只能检测已知突变。

3.2.3.5 蛋白截短测试法(protein truncation test, PTT) 本方法是从蛋白质水平的变化来检测

基因突变,它主要检测导致开放阅读框架改变的碱基缺失或插入突变等。检测时须提取细胞 mRNA,将待测靶基因逆转录为 cDNA,所用逆转录引物含一段 T7 启动子和真核细胞翻译起始序列,逆转录产物在无细胞提取液中翻译为相应的蛋白质。如果基因突变导致了开放阅读框架的改变,那么合成的蛋白质经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离时会出现比正常蛋白质或长或短的蛋白产物^[38,39]。

本法突变检出率高,一次可处理大量的样品,并可检测 4~5 kb 片段的突变。但不能检测不影响开放阅读框架的突变,且需要抽提组织 mRNA。另外,移码突变如果太靠近基因的 5' 端或 3' 端,用聚丙烯酰胺凝胶电泳也无法检测出,由差异剪切所形成的异构体也会影响结果的分析。

3.2.4 基因芯片技术(DNA chip)

用于检测已知突变,是 90 年代后发展的一项 DNA 分析新技术。按应用的不同,基因芯片可分为基因表达谱芯片和寡核苷酸芯片;按核酸探针的不同,可分为寡核苷酸芯片和 cDNA 芯片;按介质的不同,可分为玻璃片、硅片、尼龙膜、陶瓷和微型磁珠等;按用途的不同,可分为表达谱芯片、诊断芯片、测序芯片、毒理芯片和指纹图谱芯片等;按点样方法的不同,可分为光刻基因芯片、机械微型点样基因芯片、液体喷射技术基因芯片等;按制备方法的不同,可分为原位合成和直接点样^[40]。基因芯片技术集合了集成电路计算机、激光共聚焦扫描、荧光标记探针和 DNA 合成等先进技术,可用于基因定位、DNA 测序、物理图谱和遗传图谱的构建等。在基因突变检测方面也有广阔的前景。DNA 芯片技术将生物技术和信息技术有机结合,是今后基因诊断的发展方向 and 趋势^[40-42]。

该技术检测信息高通量,自动化程度高,一次可检测众多突变位点,具有很大的发展潜力,将在基因突变检测中发挥非常重要的作用,可用于疾病临床早期诊断和批量筛选,确定疾病亚型和选择最佳治疗方案,也可用于耐药基因的筛选以及新药的研发。PCR 核酸诊断技术虽经典,但难以满足现今检验、检疫需求,而“微流控芯片技术”既含盖微流体操作系统又满足实验结果的分析功能。由于芯片“实验

室”排污很少,故被称作是一种“绿色”技术^[41,42]。芯片技术虽然优点众多,但成本高,技术含量高,目前普及推广还有一定难度。

3.2.5 DNA 序列分析(DNA sequencing) DNA 序列分析是一种非常重要的基因诊断技术,被称为是基因诊断的金标准。近 10 年来发展非常迅速,从第一代 Sanger 法测序开始,经历第二代的高通量测序技术,至今已发展到第三代—单细胞测序技术。

关于 1~3 代测序技术的原理、优缺点、在基因诊断中的应用以及三代测序技术特点的比较,详见文献^[43],本文不再赘述。

4 未来展望

随着医学技术的不断发展,凭借人体基因密码预测遗传性骨病的风险性和发展进程,做到早检测、早预防、早治疗,基因诊断技术在临床的应用将有更加广阔的前景。展望未来,我们可以预见:①染色体水平与基因水平的检测将结合得更加紧密;②高通量、自动化、低成本获得更大发展;③PCR 技术将以优化反应和拓展应用为主,随着反应速度、延伸范围和检测成本的不断优化,PCR 技术将继续引领现代分子生物学的发展;④无创性产检将相当普及,PGD 也将进入到一个更普及的阶段;⑤群体筛查的项目将更多,技术手段将更高、更快捷、更准确;⑥随着仪器成本的降低、小型化,试剂、试剂盒的大量研发,个体化、自主化检测程度将更加提高;⑦临床与基础研究结合将更加密切,研究成果将更加及时应用于临床防治,转化医学得到充分体现;⑧每个人一生的生老病死有望在胚胎早期就被解读、破译,疾病的预防有望得到更早期、更有效的控制;⑨可以为基因治疗寻找更多新的治疗靶点,从而促进基因治疗的迅猛发展。

参 考 文 献

[1] 第十五届国际骨质疏松研讨会暨第十三届国际骨矿研究学术会议文集[C]. 2015, p. 147. 中国·北京。
 [2] 郭奕斌,李荣. 罕见遗传性骨病大家系调查[J]. 中华骨科杂志, 2014, 34(8):880-882.
 [3] Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders; 2010 revision. Am

J Med Genet Part A. 2011, 155:943-968.

- [4] 郭奕斌. 罕见骨病研究进展——二十多种罕见骨病的基因诊断和产前/植入前诊断[C]. 第一届粤京沪鲁罕见病学学术交流会议暨广东省医学会第二次罕见病学学术会议, 2015, p45-52. 中国·广州。
 [5] OMIM Entry Statistics. Gene description[EB/OL]. <http://omim.org/statistics/entry>, 2015-06-15/2015-06-17.
 [6] 基因诊断[EB/OL]. <http://baike.baidu.com/view/94960.htm?func=retitle>, 2015-03-11/2015-06-17.
 [7] 复杂基因[EB/OL]. <http://hanyu.iciba.com/wiki/150455.shtml>, 2014-05-24/2015-06-17.
 [8] Liu D, Li J, Cao L, et al. Analysis of differentially expressed genes in two immunologically distinct strains of *Eimeria maxima* using suppression subtractive hybridization and dot-blot hybridization[J]. Parasit Vectors, 2014, 7(1):259.
 [9] 曹振龙, 郝江叶, 周艳芬, 等. 利用 SSH 方法筛选与鉴定 AC3 基因缺失小鼠主要嗅觉表皮内的差异表达基因[J]. 遗传, 2014, 36(6):574-583.
 [10] Jung J, Kim S J, Lee K W, et al. Approaches to label-free flexible DNA biosensors using low-temperature solution-processed InZnO thin-film transistors[J]. Biosens Bioelectron, 2014, 55:99-105.
 [11] 邓朝阳, 宋贵生, 徐军望, 等. 一种简单易行的重组方法——三引物 PCR 法[J]. 科学通报, 2002, 47(16):1247-1249.
 [12] 朱艳, 陈永井, 邱玉华, 等. TP_PCR 法构建抗人 CD28 嵌合抗体双启动子昆虫杆状病毒重组转移载体[J]. 生物工程学报, 2005, 21(5):832-836.
 [13] Chen YX, Liu H, Zhang WB, et al. A novel tri-primer PCR method (TP-PCR) for rapid construction of fpg gene[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(3):359-364.
 [14] 严昕, 王均永, 吴小末, 等. 实时荧光定量 PCR 检测原发性肝癌中 hNTKL-BP1 基因的表达[J]. 复旦学报(自然科学版), 2007, 3:411-416.
 [15] Baker M. Digital PCR hits its stride[J]. Nature Methods, 2012, 9(6):541-544.
 [16] Marx V. PCR: paths to sensitivity[J]. Nature Methods, 2014, 11(3):241-245.
 [17] Miotke L, Lau BT, Rumma RT, et al. High sensitive detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single colordroplet digital PCR[J]. Anal Chem, 2014, 86(5):2618-2624.
 [18] Coudray-Meunier C, Fraisse A, Martin-Latil S, et al. A comparative study of digital RT-PCR and RT-PCR for quantification of hepatitis a virus and norovirus in lettuce and water

- samples[J]. *Int J Food Microbiol*, 2015, 201:17-26.
- [19] Kinugasa H, Nouso K, Tanaka T, et al. Droplet digital PCR measurement of HER2 in patients with gastric cancer[J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(10): 1652-1625.
- [20] Doi H, Takahara T, Minamoto T, et al. Droplet digital polymerase chain reaction (PCR) outperforms real-time PCR in the detection of environmental DNA from an invasive fish species[J]. *Environ Sci Technol*, 2015, 49(9):5601-5618.
- [21] Zhu G, Ye X, Dong Z, et al. Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of EGFR-activating mutations in plasma cell-free DNA from patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. *J Mol Diagn*, 2015, 17(3): 265-272.
- [22] Hayden RT, Gu Z, Sam SS, et al. Comparative evaluation of three commercial quantitative cytomegalovirus standards by use of digital and real-time PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(5):1500-1505.
- [23] Tanaka H, Yamamoto S, Nakamura A, et al. Hands-off preparation of monodisperse emulsion droplets using a poly (dimethylsiloxane) microfluidic chip for droplet digital PCR [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(8):4134-4143.
- [24] Huang H, Li S, Sun L, et al. Digital detection of multiple minority mutants and expression levels of multiple colorectal cancer-related genes using digital-PCR coupled with bead-array[J]. *Plos One*, 2015, 10(4):e0123420.
- [25] Floren C, Wiedemann I, Brenig B, et al. Species identification and quantification in meat and products using droplet digital PCR (ddPCR) [J]. *Food Chem*, 2015, 15: 173:1054-1058.
- [26] Devonshire AS, Honeyborne I, Gutteridge A, et al. Highly reproducible absolute quantification of mycobacterium tuberculosis complex by digital PCR[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(7): 3706-3713.
- [27] Zhang BO, Xu CW, Shao Y, et al. Comparison of droplet digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring EGFR gene mutation[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(4):1383-1388.
- [28] Kinz E, Leihner A, Lang AH, et al. Accurate quantitation of JAK2 V617F allele burden by array-based digital PCR[J]. *Int J Lab Hematol*, 2015, 37(2):217-224.
- [29] Doi H, Uchii K, Takahara T, et al. Use of droplet digital PCR for estimation of fish abundance and biomass in environmental DNA surveys[J]. *Plos One*, 2015, 10(3):e0122763.
- [30] Liu W, Hu T, Chen Y, et al. Development and validation of a tetra-primer amplification refractory mutation aystem-polymerase chain reaction combined with melting analysis-assay for clinical JAK2 V617F mutation detection[J]. *Mol Diagn Ther*, 2014, 18(5):579-585.
- [31] Cheng C, Zhou Y, Yang C, et al. Detection of rare point mutation via allele-specific amplification in emulsion PCR [J]. *BMB reports*, 2013, 46(5):270-275.
- [32] 李荣, 毕博文, 沈晓婷, 等. 软骨发育不全植入前遗传学诊断的方法学研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2014, 6(6): 372-377.
- [33] Liu W, Smith DI, Rechtzigel KJ, et al. Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) used in the detection of germline and somatic mutations [J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(6):1396-1400.
- [34] DHPLC 变性高效液相色谱原理 [EB/OL]. http://blog.sina.com.cn/s/blog_4d82e72b01000axl.html. 2007-07-22/2015-06-17.
- [35] Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics [J]. *Pharmacogenomics*, 2007, 8(6):597-608.
- [36] Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(12):e57.
- [37] 胡晓, 李文, 卢光琇. 多重连接依赖性探针扩增技术及其应用进展[J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(2):362-365.
- [38] Necker J, Kovac M, Attenhofer M, et al. Detection of APC germ line mosaicism in patients with de novo familial adenomatous polyposis: a plea for the protein truncation test [J]. *J Med Genet*, 2011, 48(8):526-529.
- [39] 瞬时基因表达技术 [EB/OL]. http://blog.sina.com.cn/s/blog_4e0c3abb010096ph.html, 2008-05-09/2015-06-17.
- [40] 概述基因芯片技术原理等 [EB/OL]. <http://www.zhonghualw.com/xumushouyi/net201202090638543029.html>, 2012-02-09/2015-06-17.
- [41] 基因芯片技术 [EB/OL]. <http://wenda.so.com/q/1378647361064338?src=140>, 2013-09-08/2015-06-17.
- [42] 滕牧洲, 马文丽. 走进医学研究领域的基因芯片技术[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2014, 6(6):361-365.
- [43] 郭奕斌. 基因诊断中测序技术的应用及优缺点[J]. *遗传*, 2014, 36(11):1121-1130.

(收稿日期:2015-07-21)

编辑:宋文颖