

· 综 述 ·

基于胎儿游离 DNA 和高通量测序的地中海贫血无创产前检测的研究进展

贾文广¹, 陈 萍^{2*}

(1. 广西医科大学第一附属医院儿科, 广西 南宁 530021; 2. 广西医科大学地中海贫血防治研究所, 广西 南宁 530021)

摘要: 地中海贫血是由于珠蛋白基因缺陷导致珠蛋白链合成障碍而引起的遗传性溶血性疾病。重型地中海贫血是流行区域出生缺陷的主要病因, 已成为影响社会和谐发展的公共卫生问题。产前诊断是避免重型地中海贫血胎儿出生的唯一有效途径, 通过筛查流行区域地中海贫血基因携带者, 对可能生育重型患儿的高危夫妇实施基因诊断和胎儿产前基因诊断, 可达到干预的目的。目前国内外对地中海贫血主要采用有创产前诊断技术, 但取材不可避免会对母体或胎儿造成伤害, 因此安全有效的无创产前诊断方法和技术一直是遗传性疾病产前诊断的方向和目标。本文综述基于孕妇外周血游离胎儿 DNA 的无创产前诊断应用和基于高通量测序的无创产前检测技术的最新进展, 并展望其发展方向。

关键词: 地中海贫血; 高通量测序; 胎儿游离 DNA; 产前检测; 无创

中图分类号: R 44

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2020)02-0231-07

地中海贫血是由于珠蛋白基因的缺失或缺陷导致珠蛋白链合成障碍引起的遗传性溶血性疾病^[1], 包括 α 、 β 、 $\delta\beta$ 和 γ 等类型, 目前广泛流行于东南亚地区、地中海地区、印度、北非和中国南方。如果夫妇均携带地中海贫血基因, 则可能生育重型地中海贫血患儿, 给病人和家庭带来巨大的经济和心理负担, 现已成为影响社会和谐发展的公共卫生问题。

产前诊断是避免重型地中海贫血胎儿出生的唯一有效途径。通过筛查地中海贫血基因携带者, 对可能生育重型患儿的高危夫妇实施基因诊断和胎儿产前基因诊断, 可达到干预的目的。目前国内外对地中海贫血主要采用有创产前诊断技术^[2], 如绒毛活检术、羊膜腔穿刺术或脐静脉穿刺术等; 然而对胎儿取材不可避免会对母体或胎儿造成伤害, 如导致绒毛膜炎、羊水渗漏、出血、宫内感染、胎儿心动过缓、胎膜早破及流产等风险^[3]。因此, 安全有效的无创产前诊断方法和技术一直是遗传性疾病产前诊断的方向和目标。孕妇外周血中胎儿游离 DNA (cffDNA) 的发现和高通量测序 (又称下一代测序, NGS) 的发展, 使无创

产前检测 (NIPT) 技术在临床检测 21-三体综合征上得到成功应用, 且在已知致病基因的单倍体模型和相对位点剂量等方面也显示出良好的应用前景, 这为地中海贫血的 NIPT 提供了可能。本文综述基于 cffDNA 进行 NIPT 的应用研究, 并阐述应用 NGS 技术对地中海贫血进行 NIPT 的最新进展。

1 地中海贫血 NIPT 遗传物质的选择

地中海贫血 NIPT 是指使用无创手段获取胎儿遗传物质进行基因检测, 确定胎儿的地中海贫血基因突变类型, 以明确是否终止妊娠。目前可以获取的胎儿遗传物质有: 孕妇外周血胎儿有核红细胞 (FNRBC)、孕妇外周血 cffDNA 和孕妇尿液 cffDNA 等。利用 FNRBC 对 β -地中海贫血进行 NIPT 虽已有报道^[4], 但细胞分离过程的复杂性和缺乏可重复性使其在临床实践中的应用受到很大限制, 近年来相关研究报道较少。

早在 20 世纪 90 年代, Lo 等^[5]首次证实了孕妇外

收稿日期: 2019-05-27 录用日期: 2019-12-17

基金项目: 国家自然科学基金 (81960574); 中国医学科学院地中海贫血防治研究重点实验室项目 (2017PT32012)

* 通信作者: cping62@hotmail.com

引文格式: 贾文广, 陈萍. 基于胎儿游离 DNA 和高通量测序的地中海贫血无创产前检测的研究进展[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2020, 59(2): 231-237.

Citation: JIA W G, CHEN P. Research progresses in non-invasive prenatal testing of thalassemia based on cell-free fetal DNA and high throughput sequencing[J]. J Xiamen Univ Nat Sci, 2020, 59(2): 231-237. (in Chinese)



周血浆中存在男性胎儿的 cfDNA. cfDNA 的片段长度为 150~200 个碱基,在母体血液循环中的半衰期为 4~30 min(平均为 16.3 min)^[6-7],孕妇生产后 cfDNA 在其体内被迅速清除,因此不会对下一胎次产生影响.目前认为 cfDNA 进入母体血液循环的机制是其自身以及胎盘细胞、胎儿造血细胞的直接转移^[8].从怀孕 4~5 周开始,孕妇外周血浆中即可检测到 cfDNA,对影响母体内 cfDNA 含量(也称胎儿分数,FF 值)的因素已有相关研究报道:Chiu 等^[9]和 Scott 等^[10]发现 cfDNA 总量随着孕周的增长而增加,孕中期可达到孕妇外周血浆总 DNA 含量的 4%~37%;cfDNA 还受胎儿染色体状态^[11]、妊娠期先兆子痫^[12]、孕妇吸烟状况的影响,并随一些孕早期筛查参数,如血清中妊娠相关血浆蛋白 A(PAPP-A)、 β -人绒毛膜促性腺激素(β -hCG)和胎盘生长因子(PIGF)的增加而增加;此外,母体的体质量是 cfDNA 的最强预测因子之一^[13-14],Rolnik 等^[15]的研究证实 cfDNA 含量受孕妇女质量指数(BMI)的影响.

2 NIPT 的临床应用研究

基于 cfDNA 的生理特性,目前将 cfDNA 用于单基因遗传病 NIPT 的可行性已被广泛证实^[16-17],在 X-连锁遗传病、21-三体综合征、囊性纤维化、软骨发育不良等^[18-19]多种单基因遗传病的研究中均有报道.在原有 21-,18-,13-三体综合征检测的基础上,NIPT-PLUS 的检测范围增加了 7~20 种疾病,包括染色体微缺失/微扩增综合征的整倍体异常^[20].近期的研究^[21-22]显示,cfDNA 在地中海贫血 NIPT 研究领域也有较好的应用前景.

2.1 非整倍体染色体疾病

自 2011 年首次引入基于母体血浆中的 cfDNA 进行产前检测以来,孕妇人群的胎儿非整倍体染色体疾病 NIPT 的临床应用迅速增多,现已在全球范围内采用^[7,23-24].基于 NIPT 的 21-三体综合征筛查效能评估结果表明其符合率超过 99%,假阳性率低于 0.1%^[25-26],虽然该方法还不能完全替代有创检测,但是目前普遍认为 NIPT 对胎儿非整倍体染色体疾病检测有实质性益处,并推荐其作为妊娠第 10 周后的高级筛查手段.

2.2 单基因遗传病

单基因遗传病 NIPT 领域目前面临一项挑战,即需要在母体血浆中的大量母体游离 DNA 序列背景

下靶向捕获低浓度的 cfDNA 突变.诊断单基因疾病的最初尝试集中于检测母体基因组中不存在的父本遗传的胎儿突变.对于父本常染色体显性遗传疾病,在母体血浆中鉴定这种突变可证明存在受影响的胎儿,该策略目前已成功用于检测软骨发育不全^[27]、肌强直性营养不良^[28]和亨廷顿病^[29];对于常染色体隐性遗传疾病,缺乏携带该突变的父本等位基因表明胎儿没有患该疾病的风险,由此可以免去侵入性诊断程序,目前该策略已被用于 β -地中海贫血^[30-31]、囊性纤维化^[32]和先天性肾上腺增生(CAH)^[33]的 NIPT.

对父本遗传等位基因的分析可以提供其他临床相关信息,包括通过评估 Y 染色体序列(SRY、DYS14、ZFX)的存在与否来确定胎儿性别或预测风险妊娠中的 Rh 同种免疫^[34].一般来说,胎儿性别鉴定的测试具有很高的性能等级,显示出近 100%的敏感性和特异性^[35].胎儿性别鉴定在有血友病或杜氏肌营养不良等 X 连锁疾病风险的妊娠中具有临床意义^[36-38],可使侵入性产前手术的数量仅限于携带男性胎儿的人群.此外,胎儿性别鉴定也有助于治疗常染色体隐性遗传疾病(如 CAH),以防止不必要地使用地塞米松治疗男性胎儿.

随着 NGS 技术的发展,NIPT 用于检测母本遗传的等位基因和父母本共有的等位基因成为可能.

3 NGS 技术的发展及其应用于地中海贫血筛查的优势

NGS 以能一次性对几十万到几百万条 DNA 分子进行测序和一般读取长度较短等为主要标志,是对传统测序的一次革命^[39].根据测序原理和技术的不同,NGS 主要分为 454 焦磷酸测序、Illumina (Solexa) 测序、ABI SOLiD 测序等^[40-42].454 焦磷酸测序读取长度相对较长,可对未知基因组从头(*de novo*)测序,但判断重复碱基数时有误差.目前应用最广泛的是 Illumina (Solexa) 测序,该技术在片段化的 DNA 末端添加接头、公共引物和测序标签,文库中的 DNA 在通过扩增载体时会随机附着在其表面,并通过接头的公共引物实现 DNA 的桥式 PCR 扩增^[43];采用边合成边测序的方法可读取片段多,适合进行大量小片段测序,但随着测序深度的增加信号会发生衰减,影响测序的准确性. ABI SOLiD 测序过程中通常每个碱基读取 2 次,因此具有很高的准确性,特别适合单核苷酸多态性(SNP)检测,但缺点是测序后拼接难.

NGS 技术的应用使得 DNA 测序的经济成本和

时间成本明显下降,这促进了地中海贫血 NIPT 的不断发展. Vermeulen 等^[44]通过对 951 名受试者的研究发现,使用 NGS 筛查的地中海贫血携带率为 49.5%,而使用传统方法筛查的携带率仅为 22.0%,从方法学上证明了 NGS 在敏感性和特异性方面的优越性,并表明 NGS 是一种竞争性筛查方法,尤其是在疾病流行率高的人群中. Shang 等^[45]通过设计基因 panel 对 1 182 名 β -地中海贫血受试者进行基因分析,并与传统筛查方法进行比较,发现 NGS 技术检测地中海贫血基因突变具有明显优势.

4 NGS 在 β -地中海贫血 NIPT 中的应用

4.1 直接检测父源性突变(夫妇携带不同的基因突变)

利用全基因组测序技术,有研究对孕妇外周血游离 DNA 进行了父源性突变位点检测,成功分辨出父源性突变位点 CD 41/42(-CTTT)和-28 突变^[39]. 当夫妇双方携带不同基因突变时,这种方法的临床意义重大. 鉴定未遗传父源性突变等位基因的胎儿可避免对其进行侵入性产前诊断;但如果胎儿经鉴定遗传了父源性突变位点,那么仍需有创产前检测,以避免因同时遗传了母源性突变等位基因而导致的重型地中海贫血患儿出生. 然而此类方法需要已知夫妇双方的基因突变信息,且研究所纳入的父源性基因突变位点较少,故不利于大规模实施.

4.2 SNP 连锁不平衡间接检测父源性突变(夫妇携带相同的基因突变)

NIPT 的最大问题是 cfDNA 容易受到母体游离 DNA 的影响,特别是当夫妇双方携带有相同的 β -地中海贫血基因突变时,由于无法区分父源性和母源性等位基因,上述排除父源性等位基因的方法则不适用. 在这种情况下,亲本 SNP 标记分析方法提供了解决方案,而 NGS 技术有助于获得大量遗传信息,进而通过可行性生物信息学分析方法特异性识别 cfDNA^[24].

2010 年 Lo 等^[38]首次应用 NGS 技术证实 cfDNA 包含整个胎儿基因组和母体基因组以相对恒定的比例共存于母体血浆中,同时通过对 SNP 位点的连锁分析明确区分父源性和母源性等位基因,可有效达到排除性诊断的目的;对父源性和母源性 SNP 的分析通过不同 SNP 对 β -地中海贫血基因突变位点进行捕获,运用序列概率比检验(SPRT)方法构建单体型相对剂量(RHDO)模型,成功检测到家系中的突变基因携带者

并对胎儿进行了无创诊断. Lam 等^[43]则通过探针捕获包含人类 β -珠蛋白(*HBB*)基因簇的常见突变位点信息,采用数字 PCR 扩增后计算 RHDO 来实现无创基因分析. Saba 等^[46]对 37 名孕妇的外周血游离 DNA 扩增后,采用 NGS 技术(离子半导体测序),通过构建 RHDO 模型实现对 *HBB* c. 118C > T 突变位点的无创检测.

此类设计方法的基本原理是连锁不平衡理论. 利用父源性和母源性等位基因位点(父本纯合母本杂合的 SNP、父本杂合母本纯合的 SNP、父母本均纯合但等位基因不同的 SNP)构建不同的胎儿连锁不平衡模型,再根据不同的连锁不平衡 RHDO 识别并确定胎儿的基因状态. 该方法的缺点是需要获取夫妇双方大量的遗传信息,并进行仔细筛选以构建父源性和母源性单倍体,从而大大增加了检测成本;且由于操作的复杂性,一次纳入的检测位点较少,限制了其推广应用.

4.3 识别母源性突变位点的可行性方法

为了扩大基于母体血浆 DNA 分析进行 β -地中海贫血 NIPT 的应用范围,制定检测母源性遗传突变的策略必不可少. 突变位点相对剂量(RMD)计算方法是近年来应用较多的方法之一^[39]. 该方法通常需要使用实时定量 PCR 或巢式 PCR 等来比较待检测样本的模板数目,而 NGS 的应用使 RMD 的获取得到质的进步,也间接解决了 cfDNA 浓度低且易受母体游离 DNA 影响的问题.

大规模平行测序(MPS)技术被用于 β -地中海贫血 NIPT. Lun 等^[40]检测了一对 β -地中海贫血的夫妇,其中父亲是 CD 41/42(-CTTT)突变的携带者,孕妇为-28 位点携带 A>G 突变:含有与父源性突变相关 SNP 的 DNA 序列读数检测结果证实胎儿遗传了父源性的突变;然后使用母体和胎儿的基因分型数据构建母体单倍型(Hap I 和 Hap II),将携带-28 位点突变定义为母体 Hap II,将携带野生型等位基因定义为母体 Hap I;使用 RHDO 模型在母体血浆中过表达 Hap I,分析表明胎儿遗传了母源性野生型等位基因,因此是 β -地中海贫血携带者. Papasavva 等^[41]使用扩增子测序对塞浦路斯人群进行了 β -地中海贫血 NIPT:针对与父源性突变等位基因连锁的 *HBB* 基因簇 SNP,通过选择高度杂合的 SNP,发现该方法适用于 80%的妊娠,但仅在 34 个样品的 27 个中正确鉴定父源性突变等位基因是否存在,出现 4 个假阴性和 3 个假阳性结果.

与 RMD 方法相比,基于家系 SNP 分析构建 RHDO 模型的生物信息学分析方法对突变型和野生型等位基因均可识别,但也需要专业的 SNP 选择技术

和大量的夫妇双方遗传信息,以便准确地识别母体血浆中母体和胎儿 DNA 序列之间的核苷酸变化,这使得其成本较高且对操作的专业技术要求较高.此外,RHDO 模型还需要先证者,RMD 方法则仅需要夫妇双方的基因型;而当夫妇双方携带相同的基因突变位点时,孕早期的低 FF 值使得两种方法的误诊率均增加.目前 RHDO 和 RMD 策略的敏感性和特异性均不能满足 NIPT 临床应用的要求.影响 RHDO 策略敏感性和特异性的主要原因是构建连锁不平衡时大量遗传信息的识别和后续信息的处理方法;影响 RMD 策略敏感性和特异性的主要原因是 panel 的捕获效率和对测序后野生型和突变位点拷贝数的精确定量.

4.4 目标区域捕获测序技术在 β-地中海贫血 NIPT 中的实践

目标区域捕获测序技术也称为靶向测序,是 NGS 结合微阵列技术衍生出来的一种新技术.该技术首先利用微阵列技术合成大量寡核苷酸探针,这些寡核苷酸探针能够与基因组上的特定区域互补结合从而富集到特定区段,然后用 NGS 技术对这些区域进行测序^[42],可选择性地分析含有致病基因的基因组区域信息数据的比例以降低基于 MPS 的测试成本.

Lam 等^[43]利用目标区域捕获测序技术,通过溶相杂交进行靶向富集,然后对 2 个家族的 *HBB* 基因区域进行 MPS,进而应用富含靶标的测序数据和亲本单倍型进行 RHDO 分析,以揭示胎儿的 β-地中海贫血状态,结果显示对母体血浆游离 DNA 的靶向测序达到 206 倍的平均测序深度.可见 RHDO 分析对于从富含靶标的样品中获取测序数据是成功的,数据分析显示所测胎儿都是 β-地中海贫血的杂合子.Xiong 等^[39]利用目标区域捕获测序技术对 49 名孕妇的外周血游离

DNA 进行分析,先扩增 49 个已被确定为遗传了父源性 β-地中海贫血位点的样本,然后进行 NGS 并采用 RMD 理论分析测序数据,结果显示 48/49(98.0%)样本遗传了母源性 β-地中海贫血等位基因,对母本基因型遗传的总体敏感性为 87.5%(95%可信区间:67.6%~97.3%),特异性为 95.8%(95%可信区间:78.9%~99.9%).

目标区域捕获测序的应用使得从孕妇外周血游离 DNA 中识别较低浓度的 cfDNA 成为可能,这有助于大规模开展已知突变位点的 β-地中海贫血 NIPT^[44,47],但目前仍缺乏高灵敏性和可靠性的生物信息学分析方法.

5 NGS 在 α-地中海贫血 NIPT 中的应用

基于 NGS 技术的方法能够根据 α-地中海贫血东南亚缺失型(--SEA)和野生型 α-珠蛋白(*HBA*)等位基因 DNA 浓度的差异来定量鉴定胎儿的基因型(αα/αα/--SEA /αα 和 Hb Bart)^[48].基于 NGS 信息的父源性 SNP 或等位基因相关的微卫星标记也被用于 α-地中海贫血 NIPT 的研究^[49-50].Ge 等^[51]研究了 5 对携带--SEA 等位基因夫妇的胎儿基因型,使用目标区域靶向捕获和 MPS 技术对母体血浆 DNA 进行分析,比较相对于正常对照的突变拷贝比值,从而成功检测出所有携带--SEA 等位基因的胎儿.目前针对 α-地中海贫血 NIPT 的研究较少,由于 α-地中海贫血主要为基因缺失,而孕妇外周血游离 DNA 为片段化 DNA,所以尚无有效区分胎儿是否遗传缺失型突变的方法.

综上,目前基于 cfDNA 进行地中海贫血 NIPT 的方法和检测位点详见表 1.

表 1 地中海贫血 NIPT 方法及检测位点
Tab. 1 Methods and testing sites for NIPT of thalassemia

扩增/测序方法	生物信息学方法	应用范围	缺点	检测位点	参考文献
RT-PCR	无	检测/排除父源性位点	不能识别母源性位点	<i>HBB</i> :c. 124_127 del TTCT	[30]
数字 PCR、离子半导体测序、全基因组测序	RHDO	检测/排除父源性位点	不能识别母源性位点	<i>HBB</i> :c. 124_127 del TTCT, c. -78 A>G, c. 118 C>T	[39,41,49]
RT-PCR、巢式 PCR、MPS、目标区域捕获测序	RMD	检测母源性位点	突变位点少,特异性低	<i>HBB</i> :c. 124_127 del TTCT, c. -78 A>G	[40,44,47]
目标区域捕获测序	假四倍体基因组	检测父源性、母源性位点	特异性不高	<i>HBB</i> :c. 124_127 del TTCT, c. 316-197 G>T,	[52]
RT-PCR、巢式 PCR、MPS	RMD	检测母源性位点	突变位点少	<i>HBA</i> :--SEA	[48,50]

6 问题与展望

得益于NGS技术,地中海贫血NIPT不断发展。目前cffDNA用于地中海贫血NIPT的技术瓶颈为母体外周血游离DNA背景下较难有效捕获并识别胎儿DNA,且缺乏在NGS后进行有效分析的方法。因此,提取高纯度cffDNA的方法以及基于生物信息学的技术策略将是未来NIPT研究的方向。

RHDO技术基于全基因组测序,需要获取夫妇双方的遗传信息,成本高,操作复杂,耗时较长,且需要构建连锁不平衡区域并需要先证者^[53]。RMD方法基于突变位点的频率,虽理论上不依赖于夫妇双方的遗传信息,但由于统计分析方法的发展滞后于NGS,目前尚未有高特异性和敏感性的计算方法^[54]。而这些方法存在的共同缺陷是样本例数少,检测突变位点少。

已有研究报道提出的假四倍体基因组算法,无需父母本基因型即可直接对胎儿基因型进行推算,初期结果表明,目标区域捕获测序技术结合母体胎儿共存的假四倍体基因组方法,对单基因疾病和 β -地中海贫血等的检测准确率在75%左右^[52]。目前需要克服的问题主要是在cffDNA浓度较低时如何准确捕获胎儿突变位点,以及如何解决多胎妊娠、母体BMI较大、子痫等对NIPT的影响;此外,该生物信息分析方法仍需进一步优化。

参考文献:

- [1] RUND D. Thalassemia 2016: modern medicine battles an ancient disease[J]. *Am J Hematol*, 2016, 91(1): 15-21.
- [2] LI D Z, YANG Y D. Invasive prenatal diagnosis of fetal thalassemia[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2017, 39: 41-52.
- [3] TRAEGER-SYNODINOS J, HARTEVELD C L. Preconception carrier screening and prenatal diagnosis in thalassemia and hemoglobinopathies: challenges and future perspectives[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2017, 17(3): 281-291.
- [4] WEI H Y, LONG G, LIN W X, et al. Non-invasive prenatal genetic diagnosis of β -thalassaemia using single fetal nucleated erythrocyte from maternal blood[J]. *Chinese Journal of Pediatrics*, 2007, 45(12): 917-921.
- [5] LO Y M, CORBETTA N, CHAMBERLAIN P F, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. *The Lancet*, 1997, 350(9076): 485-487.
- [6] SWANSON A, SEHNERT A J, BHATT S. Non-invasive prenatal testing: technologies, clinical assays and implementation strategies for women's healthcare practitioners[J]. *Curr Genet Med Rep*, 2013, 1(2): 113-121.
- [7] LO Y M D, ZHANG J, LEUNG T N, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma[J]. *Am J Hum Genet*, 1999, 64(1): 218-224.
- [8] SWARUP V, RAJESWARI M R. Circulating (cell-free) nucleic acids: a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases[J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(5): 795-799.
- [9] CHIU R W K, CANTOR C R, LO Y M. Non-invasive prenatal diagnosis by single molecule counting technologies[J]. *Trends Genet*, 2009, 25(7): 324-331.
- [10] SCOTT F P, MENEZES M, PALMA-DIAS R, et al. Factors affecting cell-free DNA fetal fraction and the consequences for test accuracy[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2018, 31(14): 1865-1872.
- [11] HUDECOVA I, SAHOTA D, HEUNG M M S, et al. Maternal plasma fetal DNA fractions in pregnancies with low and high risks for fetal chromosomal aneuploidies[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88484.
- [12] LO Y M D, LEUNG T N, TEIN M S, et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia[J]. *Clin Chem*, 1999, 45(2): 184-188.
- [13] 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(4): 237-243.
- [14] ASHOOR G, SYNGELAKI A, POON L C Y, 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(1): 26-32.
- [15] ROLNIK D L, YONG Y Q, LEE T J, et al. Influence of body mass index on fetal fraction increase with gestation and cell-free DNA test failure[J]. *Obstet Gynecol*, 2018, 132(2): 436-443.
- [16] GIORGETTI L, LAJOIE B R, CARTER A C, et al. Structural organization of the inactive X chromosome in the mouse[J]. *Nature*, 2016, 535(7613): 575-579.
- [17] ZHANG H, ZHAO Y Y, SONG J, et al. Statistical approach to decreasing the error rate of noninvasive prenatal aneuploid detection caused by maternal copy number variation[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16106.
- [18] ZHANG K, YANG X, LIN G G, et al. Molecular genetic testing and diagnosis strategies for dystrophinopathies in the era of next generation sequencing[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 491: 66-73.

- [19] BAYÓN J C, ORRUÑO E, PORTILLO M I, et al. The consequences of implementing non-invasive prenatal testing with cell-free foetal DNA for the detection of Down syndrome in the Spanish National Health Service: a cost-effectiveness analysis[J]. *Cost Eff Resour Alloc*, 2019, 17: 6.
- [20] YUAN M Z, DENG L B, YANG Y J, et al. Intrauterine phenotype features of fetuses with Williams-Beuren syndrome and literature review[J]. *Ann Hum Genet*, 2020, 84(2): 169-176.
- [21] GERSON K D, O'BRIEN B M. Cell-free DNA: screening for single-gene disorders and determination of fetal rhesus D genotype[J]. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2018, 45(1): 27-39.
- [22] LI X Z, YANG T Y, LI C S, et al. Prenatal detection of thalassemia by cell-free fetal DNA (cffDNA) in maternal plasma using surface enhanced Raman spectroscopy combined with PCR[J]. *Biomed Opt Express*, 2018, 9(7): 3167-3176.
- [23] CHIU R W K, AKOLEKAR R, ZHENG Y W L, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study[J]. *Brit Med J*, 2011, 342: e7401.
- [24] HUDECOVA I, CHIU R W K. Non-invasive prenatal diagnosis of thalassemias using maternal plasma cell free DNA[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2017, 39: 63-73.
- [25] NORTON M E, WAPNER R J. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(26): 2582.
- [26] BIANCHI D W, PARKER R L, WENTWORTH J, et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(9): 799-808.
- [27] LI Y, PAGE-CHRISTIAENS G C M L, GILLE J J P, et al. Non-invasive prenatal detection of achondroplasia in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF MS assay[J]. *Prenat Diagn*, 2007, 27(1): 11-17.
- [28] 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.
- [29] GONZÁLEZ-GONZÁLEZ M C, TRUJILLO M J, RODRÍGUEZ DE ALBA M, et al. Huntington disease-affected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR[J]. *Prenat Diagn*, 2003, 23(3): 232-234.
- [30] CHIU R W, LAU T K, LEUNG T N, et al. Prenatal exclusion of β -thalassaemia major by examination of maternal plasma [J]. *The Lancet*, 2002, 360 (9338): 998-1000.
- [31] LI Y, DI NARO E, VITUCCI A, et al. Detection of paternally inherited fetal point mutations for β -thalassaemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma [J]. *J Am Med Assoc*, 2005, 293(7): 843-849.
- [32] BUSTAMANTE-ARAGONES A, GALLEGU-MERLO J, TRUJILLO-TIEBAS M J, 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.
- [33] CHIU R W, LAU T K, CHEUNG P T, et al. Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study [J]. *Clin Chem*, 2002, 48(5): 778-780.
- [34] HILL M, LEWIS C, JENKINS L, et al. Implementing noninvasive prenatal fetal sex determination using cell-free fetal DNA in the United Kingdom[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12(Sup 1): S119-S126.
- [35] WRIGHT C F, WEI Y H, HIGGINS J P, et al. Non-invasive prenatal diagnostic test accuracy for fetal sex using cell-free DNA a review and meta-analysis[J]. *BMC Res Notes*, 2012, 5(1): 476.
- [36] TSUI N B, KADIR R A, CHAN K C, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA[J]. *Blood*, 2011, 117(13): 3684-3691.
- [37] PARKS M, COURT S, CLEARY S, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies by relative haplotype dosage [J]. *Prenat Diagn*, 2016, 36(4): 312-320.
- [38] LO Y M D, CHAN K C A, 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.
- [39] XIONG L, BARRETT A N, HUA R, et al. Non-invasive prenatal testing for fetal inheritance of maternal β -thalassaemia mutations using targeted sequencing and relative mutation dosage: a feasibility study[J]. *Int J Obstet Gy*, 2018, 125(4): 461-468.
- [40] LUN F M F, TSUI N B Y, CHAN K C A, 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 USA*, 2008, 105(50): 19920-19925.
- [41] PAPASAVVA T, VAN IJCKEN W F, KOCKX C E, et al. Next generation sequencing of SNPs for non-invasive prenatal diagnosis: challenges and feasibility as illustrated by an application to β -thalassaemia[J]. *Eur J*

- Hum Genet, 2013, 21(12): 1403-1410.
- [42] ALTMÜLLER J, BUDDE B S, NÜRNBERG P. Enrichment of target sequences for next-generation sequencing applications in research and diagnostics[J]. Biol Chem, 2014, 395(2): 231-237.
- [43] LAM K W G, JIANG P Y, LIAO G J W, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by targeted massively parallel sequencing of maternal plasma: application to β -thalassemia [J]. Clin Chem, 2012, 58(10): 1467-1475.
- [44] VERMEULEN C, GEEVEN G, DE WIT E, et al. Sensitive monogenic noninvasive prenatal diagnosis by targeted haplotyping[J]. Am J Hum Genet, 2017, 101(3): 326-339.
- [45] SHANG X, PENG Z Y, YE Y H, et al. Rapid targeted next-generation sequencing platform for molecular screening and clinical genotyping in subjects with hemoglobinopathies[J]. EBioMedicine, 2017, 23: 150-159.
- [46] SABA L, MASALA M, CAPPONI V, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of β -thalassemia by semiconductor sequencing: a feasibility study in the sardinian population [J]. Eur J Hum Genet, 2017, 25(5): 600-607.
- [47] LUO Y Q, JIA B, YAN K, et al. Pilot study of a novel multi-functional noninvasive prenatal test on fetus aneuploidy, copy number variation, and single-gene disorder screening[J]. Mol Genet Genomic Med, 2019, 7(4): e00597.
- [48] SIRICHOTIYAKUL S, CHAROENKWAN P, SANG-UANSERMSRI T. Prenatal diagnosis of homozygous α -thalassemia-1 by cell-free fetal DNA in maternal plasma [J]. Prenat Diagn, 2012, 32(1): 45-49.
- [49] YAN T Z, MO Q H, CAI R, et al. Reliable detection of paternal SNPs within deletion breakpoints for non-invasive prenatal exclusion of homozygous α -thalassemia in maternal plasma[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24779.
- [50] HO S S Y, CHONG S S C, KOAY E S C, et al. Noninvasive prenatal exclusion of haemoglobin Bart's using foetal DNA from maternal plasma [J]. Prenat Diagn, 2010, 30(1): 65-73.
- [51] GE H J, HUANG X, LI X C, et al. Noninvasive prenatal detection for pathogenic CNVs: the application in α -thalassemia[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e67464.
- [52] YIN X J, DU Y, ZHANG H, et al. Identification of a de novo fetal variant in osteogenesis imperfecta by targeted sequencing-based noninvasive prenatal testing [J]. J Hum Genet, 2018, 63(11): 1129-1137.
- [53] BOWDIN S, GILBERT A, BEDOUKIAN E, et al. Recommendations for the integration of genomics into clinical practice[J]. Genet Med, 2016, 18(11): 1075-1084.
- [54] ADAMS D R, ENG C M. Next-generation sequencing to diagnose suspected genetic disorders[J]. New Engl J Med, 2018, 379(14): 1353-1362.

Research progresses in non-invasive prenatal testing of thalassemia based on cell-free fetal DNA and high throughput sequencing

JIA Wenguang¹, CHEN Ping^{2*}

(1. Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. Thalassemia Research Institute, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: Thalassemia is an inherited hemolytic disease caused by deficiency or defect in the globin genes leading to a disorder in the synthesis of globin chains. Severe thalassemia seriously endangers people's health and is the main cause of birth defects in the epidemic area. It has become a public health problem affecting social harmony and development. Prenatal diagnosis of the fetus is the only effective way to avoid a fetus with severe thalassemia. By screening the thalassemia gene carriers in the epidemic area, genetic diagnosis and fetal prenatal genetic diagnosis of high-risk couples who may produce children with severe thalassemia achieve the purpose of intervention. At present, prenatal diagnosis methods for thalassemia are mainly invasive techniques, however, these fetal materials are inevitably harmful to the mother or fetus. Therefore, safe and effective non-invasive prenatal diagnostic methods and techniques have always been the direction and goal of prenatal diagnosis of hereditary diseases. In this article, we review the latest progresses in non-invasive prenatal diagnosis application based on cell-free fetal DNA in maternal peripheral blood, as well as non-invasive testing techniques based on high throughput sequencing, and predict its future development.

Keywords: thalassemia; high throughput sequencing; cell-free fetal DNA; prenatal testing; non-invasive