

· 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引起的遗传性溶血性疾病。重型地中海贫血是流行地区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的产前诊断方法主要是有创的产前诊断技术, 但胎儿取材不可避免会存在对母体或胎儿伤害。因此, 安全有效的无创性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。本文对基于孕妇外周血游离胎儿 DNA 的无创产前诊断取材和基于高通量测序的无创检测技术的最新进展进行综述, 并对其发展方向进行展望。

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: R44 **文献标志码:** A

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。地中海贫血广泛流行于东南亚地区、中国南方、印度、北非和地中海地区。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。重型地中海贫血是出生缺陷的主要病因, 给病人、家庭和社会带来巨大的经济和心理负担, 已成为影响社会和谐和发展的公共卫生问题。

胎儿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的产前诊断方法主要是有创的产前诊断技术^[2], 如绒毛活检术、羊膜腔穿刺术或脐静脉穿刺术等。但这些胎儿取材技术, 不可避免会存在对母体或胎

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

儿的伤害，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]。安全有效的无创性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 (cell-free fetal DNA, cffDNA) 的发现、高通量测序 (next-generation sequencing, NGS) 的发展, 使无创产前检测 (non-invasive prenatal test, NIPT) 技术检测 21-三体综合征在临床上得到成功应用, 且 NIPT 检测已知致病基因的单倍体模型和相对位点剂量等方法也已显示出极好的应用前景。这为地中海贫血的 NIPT 提供了可能。本文综述利用 cffDNA 进行 NIPT 的应用研究, 并特别阐述应用 NGS 技术对地中海贫血进行无创产前检测的最新进展。

1 地中海贫血 NIPT 遗传物质的选择

地中海贫血的 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 (fetal nucleated erythrocytes in maternal blood, FNRBC)、孕妇外周血 cffDNA、孕妇尿液胎儿游离 DNA 等。利用 FNRBC 对 β -地中海贫血进行无创性产前诊断已有报道^[4]。但细胞分离过程的复杂性和缺乏可重复性使得 FNRBC 在临床实践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]首次证实了孕妇外周血浆中存在男性胎儿的 cffDNA。cffDNA 的片段含量, 也称为胎儿分数 (fetal fraction), 其长度约为 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], 孕妇在生产后, cffDNA 在其体内被迅速清除, 不会对下一胎次产生影响。目前认为 cffDNA 进入母体血液循环的机制是胎儿游离 DNA、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 cffDNA。多个团队对影响母体内 cffDNA 浓度的因素进行了研究。Scott 等发现 cffDNA 总量随着孕周的增长而增加, 到孕中期可达到孕妇外周血浆总 DNA 的 4%~37%^[9-10]。已发现 cffDNA 受胎儿染色体状态^[11]、妊娠期先兆子痫^[12], 孕妇吸烟状况和一些孕早期筛查参数 (如随着血清 PAPP-A, β -hCG 和 PlGF 的增加而增加) 的影响。母体重量是 cffDNA 最强预测因子之一^[13-14], Rolnik 等^[15]的研究证实, cffDNA 受孕妇体重指数的影响 (body mass

index, BMI) 的影响。

基于以上 cffDNA 的独特生理特性,使其在地中海贫血 NIPT 研究领域具有较好应用前景^[16-17]。目前将 cffDNA 用于产前无创检测单基因遗传病的可行性已被广泛证实^[18-19],已有多个团队对 X-连锁遗传病、21-三体综合征、囊性纤维化、软骨发育不良等^[20-21]多个单基因遗传病进行了无创产前诊断研究。NIPT-PLUS,在无创 DNA 原有 21-、18-、13-三体综合征检测的基础上,增加了 7~20 种疾病,即染色体微缺失/微扩增综合征的染色体整倍体异常^[22]。

由此可知, cffDNA 作为遗传物质用于单基因尤其是 β -地中海贫血的无创产前诊断,具有较好的应用前景。

2 NIPT 的临床应用研究

2.1 在非整倍体染色体疾病中

近年来研究者提出可通过母体血浆中的 cffDNA 对胎儿实施染色体疾病的产前检测。自 2011 年首次引入以来,孕妇人群胎儿非整倍体非侵入性产前检测 (NIPT) 的临床应用迅速增长,现已在全球范围内采用^[7, 23-24]。评估基于 NIPT 的唐氏综合征筛查 (21-三体, T21) 的效能的研究表明,其符合率超过 99%,假阳性率低于 0.1%^[25-26]。虽然该方法还不能替代有创的检测,但这些令人鼓舞的结果刺激学术界的讨论,目前一致的观点认为 NIPT 对胎儿非整倍体有实质性益处,并且也推荐这种方法作为妊娠第 10 周后的高级筛查试验。

2.2 在单基因遗传病中

单基因遗传疾病的非侵入性检测研究的发展也越来越受到关注,目前该领域的挑战之一是需要大量母体血浆中母体游离 DNA 序列背景下靶向捕获低浓度的 cffDNA 突变。诊断单基因疾病的最初尝试集中在针对母体基因组中不存在的父系遗传胎儿突变的方法上。对于符合父亲常染色体显性遗传的疾病,在母体血浆中鉴定这种突变将证明存在受影响的胎儿。该策略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,缺乏携带该突变的父本等位基因将表明怀孕没有该疾病的风险,这可以消除对侵入性诊断程序的需要。该策略的原则已被用于 NIPT 的 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]。

对父系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 RhD 状态 Rh 同种免疫^[34]。一般来说，胎儿性别测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]。胎儿性别决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]，以限制侵入性产前手术的数量仅限于携带男性怀孕的人群。胎儿性别鉴定也有助于治疗常染色体隐性遗传疾病，如 CAH，以防止不必要的地塞米松治疗男性胎儿。

随着高通量测序技术的发展，NIPT 检测母系遗传等位基因和父母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 以能一次并行对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定和一般读长较短等为主要标志，是对传统测序一次革命^[39]。根据测序原理和技术不同，NGS 主要有以下几种分类^[40-42]：454 焦磷酸测序（454 pyrosequencing）、Illumina (Solexa) sequencing、ABI SOLiD sequencing 等。454 焦磷酸测序读取长度相对较大，可对未知基因组从头测序（*de novo* sequencing），判断重复碱基个数时有误差。而目前应用最广泛的是 Illumina (Solexa) sequencing (sequence by synthesis)，该技术在片段化的 DNA 末端链接接头、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 的扩增^[43]；采用边合成边测序的方法，具有读取片段多，适合进行大量小片段测序，但随测序深度的增加，信号发生衰竭，影响测序准确性。ABI SOLiD sequencing 通常每个碱基读取两次，具有很高的准确性，特别适合 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。He 等^[44]通过对在 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%，而使用传统方法发现的携带率仅为 22.0%，从方法学比较证明了 NGS 在敏感性和特异性方面的优越性，提供了对地中海贫血筛查策略的全面评估，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 个 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 中的应用研究

NGS 在 β -地中海贫血 NIPT 中的应用研究按照设计及目的大致可分为 3 类：用于直接检测父源性 β -地中海贫血基因突变位点（夫妇携带不同类型基因突变）、SNP 连锁不平衡间接检测父源性突变（夫妇携带相同基因突变）、识别母源性基因突变位点等。上述研究策略各有优缺点。

4.1 直接检测父源性突变（夫妇携带不同基因突变）

研究人员利用全基因组测序技术^[39]，对外周血游离 DNA 进行了父源性突变位点的检测，成功地检测或排除了父源性突变位点 CD 41/42(-CTTT)和-28 突变。

当夫妇双方携带不同类型基因突变时，这种方法的临床意义重大。因为鉴定未遗传父源性突变等位基因的胎儿将避免对携带不同 β -地中海贫血突变位点夫妇的胎儿进行侵入性产前诊断的需要。但是如果胎儿遗传了父源性突变位点，此类胎儿仍需有创产前检测以避免因同时遗传母亲基因突变而致的重型地中海贫血患儿的出生。另外此类设计方法需要已知夫妇方的基因突变信息，且研究所纳入的父源性基因突变位点较少，不便于大规模实施。

4.2 SNP 连锁不平衡间接检测父源性突变（夫妇携带相同基因突变）

NIPT 的最大问题是 cffDNA 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，由于无法区分母本和父本等位基因，上述排除父源性等位基因的方法不适用。在这种情况下，亲本单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphism, SNP)标记分析方法提供了解决方案。而随着技术的发展，NGS 技术提供了获得大量的遗传信息，建立特异性识别 cffDNA 的可行性生物信息学分析方法^[24]。

2010 年 Lo 等^[38]首次应用 NGS 技术证实了 cffDNA 包含了整个胎儿基因组，并和母体基因组以相对恒定的比例共存与母体血浆中；同时通过对 SNP 位点的连锁分析，明确区分父母源性的等位基因，有效地达到排除性诊断的目的。Lo 等^[38]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 SPRT(sequential probability ratio test)方法，构建了单体型相对剂量(relative haplotype dosage, RHDO)模型，成功检测到家系中的携带者和对胎儿进行了无创诊断。Lam 等^[43]则通过探针捕获包含 HBB 基因簇的

常见突变位点信息，采用数字 PCR 扩增后计算 RHDO 含量来实现无创基因分析。而 Saba 等^[46]对 37 个孕妇外周血游离 DNA 扩增后，采用 NGS 测序（离子半导体测序），通过构建单倍体模型实现了对 HBBc.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、母源性等位基因位点（父亲纯合母亲杂合的 SNP、父亲杂合母亲纯合的 SNP、父母均为纯合 SNP 但等位基因不同的 SNP）构建了不同的胎儿连锁不平衡模型，根据不同的连锁不平衡单倍体的相对含量，识别确定胎儿的基因状态。这种方法的缺点是，需要夫妇双方大量的遗传信息并进行仔细筛选以构建母源性单倍体、父源性单倍体，这大大增加了检测成本、影响了其检测准确性。由于该方法的复杂性，使得一次纳入的检测位点较少，限制了其推广应用。

4.3 β -地中海贫血 NIPT 识别母源性突变位点的可行性方法

为了扩大使用母体血浆 DNA 分析进行 β -地中海贫血产前检测的范围，制定检测母系遗传突变的策略必不可少。基于突变位点相对剂量（relative mutation dosage, RMD）计算方法是近来用于研究 β -地中海贫血产前检测较多的方法之一^[39]。RMD 方法通常使用实时定量 PCR（RT-PCR）或巢式 PCR(nested PCR)等来完成待检测样本模板数目的比较。而 NGS 的应用，使得 RMD 的获取获得质的进步，也间接的解决了 cffDNA 浓度低，易受母体外周血 DNA 影响的问题。

大规模平行测序（MPS）技术被用于了 β -地中海贫血的 NIPT 检测。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 处携带 A>G 突变；含有与父本突变相关的 SNP 的 DNA 序列读数的检测证实胎儿遗传了父亲的突变；然后通过使用母体和胎儿的基因分型数据构建母体单倍型，其将-28 突变分配给母体 Hap II 并将野生型等位基因分配给母体 Hap I；使用 RHDO 在母体血浆中过表达 Hap I 分析表明，胎儿遗传了母体野生型等位基因，因此是 β -地中海贫血携带者。MPS 技术后来使用扩增子测序检查了塞浦路斯人群中 β -地中海贫血的 NIPT，该测序针对与父本突变等位基因连锁的 β -珠蛋白簇的 SNP；通过选择高度杂合的 SNP，该方法适用于 80%的妊娠，但是仅在 34 个样品中的 27 个中正确确定了父本突变等位基因的存在或不存在，其中 4 个假阴性和 3 个假阳性结果^[41]。

与 RMD 相比, 基于家系 SNP 分析构建的 RHDO 模型生物信息学分析方法, 不仅可以靶向识别突变体而且可以靶向识别野生型等位基因。RHDO 和 RMD 策略均需专业的 SNP 选择技术和大量的夫妇双方的遗传信息, 构建连锁不平衡模型, 以便可以准确的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、操作性复杂、专业技术要求较高此外 RHDO 还需先证者, RMD 需要夫妇双方的基因型。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 RHDO 和 RMD 的误诊率增加。

目前的 RHDO 和 RMD 策略的敏感性和特异性均不能满足临床产前检测应用的要求。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 (targeted resequencing), 也称为靶向测序, 是 NGS 结合微阵列技术而衍生出来的一种新技术。这项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 技术对这些区段进行测序^[42], 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来降低基于 MPS 的测试的成本。

Lam 等^[43]于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 β 珠蛋白基因区域进行 NGS 测序 (大规模平行测序), 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。结果显示通过对母体血浆游离 DNA 的靶向测序, 在 β -珠蛋白基因区域实现了 206 倍的平均测序深度。RHDO 分析对于从富含靶标的样品获得的测序数据是成功的, 数据分析显示两个胎儿都是 β -地中海贫血的杂合子。

Xiong 等^[39]应用目标区域捕获测序技术, 对 49 例孕妇外周血游离 DNA 进行了分析, 扩增 49 个先前被确定为遗传了父本 β -地中海贫血位点的样本, 然后进行 NGS 测序, 采用 RMD 理论分析测序数据, 结果显示: 48/49 个样本 (98.0%) 遗传了母体地中海贫血等位基因, 对母体基因型的遗传具有 87.5% (95%可信区间: 67.6%~97.3%) 的总体敏感性和 95.8% (95%可信区间: 78.9%~99.9%) 的特异性。

目标区域捕获测序的应用使得从孕妇外周血游离 DNA 中识别较低浓度的胎儿 DNA 成为可能, 这有助于大规模用于已知突变位点的 β -地中海贫血的无创产前检测^[44, 47]。但目前仍缺乏灵敏性、可靠性高的生物信息学分析方法。

5 NGS 在 α -地中海贫血 NIPT 中的应用研究

已有研究显示, 基于 NGS 技术的方法能够根据--SEA 和野生型等位基因 DNA 浓度的定量差异来鉴定胎儿的基因型($\alpha\alpha/\alpha\alpha$, --SEA / $\alpha\alpha$, 和 Hb Bart)^[48]。另外, 基于高通量测序信息的父源型 SNP 或父源性等位基因相关的微卫星标记也用于了 α -地中海贫血无创产前检测的探索^[49-50]。Ge 等研究了五对携带--SEA 夫妇胎儿的基因型, 作者使用目标区域靶向捕获和大规模平行测序(MPS)技术对母体血浆 DNA 分析, 比较母体血浆中相对于正常对照突变拷贝比值, 从而成功检测到所有携带--SEA 胎儿^[51]。针对 α -地中海贫血 NIPT 研究较少, 原因为 α -地中海贫血主要为基因缺失, 而孕妇外周血游离 DNA 为片段化的 DNA, 目前尚无有效区分胎儿是否遗传缺失型突变的方法。

综上, 目前以 cffDNA 为胎儿遗传物质进行地中海贫血无创产前检测的方法和检测位点详见表 1。

表 1 地中海贫血无创产前检测方法及检测位点
Tab. 1 Methods and sites for non-invasive prenatal testing 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
实时 PCR	无	检测/排除父源性位点	不能识别母源性位点	HBB:c.124_127 del TTCT	[30]
数字 PCR、离子半导体 PCR、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	HBB:c.124_127 del TTCT, HBB:c.-78 A>G, HBB:c.118 C>T	[39, 41, 49]
实时 PCR 和巢式 PCR、大规模平行测序、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	HBB:c.124_127 del TTCT, HBB:c.-78 A>G	[40, 44, 47]
目标区域捕获测序	PTG	检测父源性、母源性	特异性有待提高	HBB:c.124_127 del TTCT, HBB:c.316-197 G>T,	[52]
实时 PCR、巢式 PCR、大规模平行测序	RMD	检测母源性位点	突变位点少	HBA:--SEA	[48, 50]

6 问题与展望

得益于 NGS 技术,地中海贫血无创产前检测不断发展。目前 cffDNA 用于地中海贫血无创产前检测的技术瓶颈为母体外周血游离 DNA 背景下如何有效捕获识别胎儿 DNA 以及缺乏在高通量测序后进行有效分析的方法。基于生物信息学的技术策略以及提取高纯度 cffDNA 方法将是未来无创产前检测研究的方向。

RHDO 技术,是基于全基因组测序,需要获取夫妇双方的遗传信息,成本高、操作复杂且耗时较长,且单体型的方法需要构建连锁不平衡区域,需要先证者,操作复杂^[53]。RMD 的方法是基于突变位点的频率,理论上可以不依赖于夫妇双方的遗传信息,但是由于统计分析方法的发展滞后于 NGS,以至于目前尚未有特异性和敏感性的计算方法^[54]。且这些方法存在的共同缺陷是入组样本例数少,检测突变位点少。

研究报道提出的假四倍体算法,无需父母基因型可直接对胎儿基因型进行推算。初期的探索研究结果表明,目标区域捕获测序技术,采用母体胎儿共存的假四倍体方法对单基因病和 β -地中海贫血等检测准确率在 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,如何解决多胎妊娠、母体 BMI 较大、子痫等对 NIPT 的影响,另外假四倍体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 beta-thalassaemia using single fetal nucleated erythrocyte from maternal blood[J]. Zhonghua Er Ke Za Zhi, 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]. 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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] 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.
- [17] LI X, YANG T, 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] ZHANG K, YANG X, LIN 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.
- [21] BAYON J C, ORRUNO 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.
- [22] YUAN M, DENG L, YANG Y, et al. Intrauterine phenotype features of fetuses with Williams-Beuren syndrome and literature review[J]. *Ann Hum Genet*, 2019.
- [23] CHIU R W, AKOLEKAR R, ZHENG Y W, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study[J]. *BMJ*, 2011, 342:c7401.
- [24] HUDECOVA I, CHIU R W. 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, GILLE J J, 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] GONZALEZ-GONZALEZ M C, TRUJILLO M J, RODRIGUEZ 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 beta thalassaemia major by examination of maternal plasma[J]. *Lancet*, 2002, 360(9338):998-1000.

[31] LI Y, DI NARO E, VITUCCI A, et al. Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma[J]. *JAMA*, 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 Suppl 1:S119-126.

[35] WRIGHT C F, WEI Y, 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, 5:476.

[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, CLEARLY 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, CHAN K C, 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 beta-thalassaemia mutations using targeted sequencing and relative mutation dosage: a feasibility study[J]. *Bjog*, 2018, 125(4):461-468.

[40] LUN F M, TSUI N B, CHAN K C, 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.

[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 beta-thalassaemia[J]. *Eur J Hum Genet*, 2013, 21(12):1403-1410.

[42] ALTMULLER J, BUDDE B S, NURNBERG 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, JIANG P, LIAO G J, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by targeted massively parallel sequencing of maternal plasma: application to beta-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, YE Y, 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 beta-thalassemia by semiconductor sequencing: a feasibility study in the sardinian population[J]. *Eur J Hum Genet*, 2017, 25(5):600-607.

[47] LUO Y, 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:e597.

[48] SIRICHOTIYAKUL S, CHAROENKWAN P, SANGUANSEMSRI T. Prenatal diagnosis of homozygous alpha-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 alpha-thalassemia in maternal plasma[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e24779.

[50] HO S S, CHONG S S, KOAY E S, 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, HUANG X, LI X, et al. Noninvasive prenatal detection for pathogenic CNVs: the application in alpha-thalassemia[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6):e67464.

[52] YIN X, 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]. *N Engl J Med*, 2018, 379(14):1353-1362.

Advances in non-invasive prenatal testing of thalassemia based on cell-free fetal DNA and next generation 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 a 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. 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 have severely born children can achieve the purpose of intervention. At present, prenatal diagnosis methods for thalassemia are mainly invasive prenatal diagnosis techniques, but 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. This article will review the latest progresses in non-invasive prenatal diagnosis based on cell-free fetal DNA in maternal peripheral blood, as well as non-invasive detection techniques based on next-generation sequencing, and look forward to its development direction.

Keywords: thalassemia; next-generation sequencing; cell-free fetal DNA; prenatal testing; non-invasive