

遗传病相关个体化医学检测技术 指南（试行）

目 录

1. 本指南适用范围	2
2. 标准术语	2
3. 遗传病检测概述	5
3.1 遗传病的分类及分子基础	5
3.2 遗传病诊断技术发展概况	6
4. 遗传病分子检测前质量控制	7
4.1 遗传咨询	7
4.2 知情同意	9
4.3 样本采集	10
4.4 样本运输、提取与保存	12
4.5 样本的质量控制	14
4.6 样本信息采集与录入	15
5. 遗传病的细胞、分子诊断技术及质量控制	15
5.1 染色体核型分析技术	16
5.2 FISH 技术	17
5.3 实时荧光 PCR 及相关技术	19
5.4 MLPA 相关技术	25
5.5 基因芯片技术	27
5.6 Sanger 测序技术	28
5.7 焦磷酸测序技术	30
5.8 高通量测序技术	33
5.9 时间飞行质谱生物芯片系统 (Sequenom MassARRAY)	35
6. 常见遗传病及诊断方法选择	37
6.1 染色体病	37
6.2 核基因病	39

6.3 线粒体病.....	43
7. 遗传病诊断结果的报告和解释.....	47
7.1 总体原则.....	47
7.2 细胞遗传学实验的检测报告.....	47
7.3 分子遗传学实验的检测报告.....	48
8. 遗传病检测实验室设计要求.....	50
8.1 细胞遗传学检测实验室的设计.....	50
8.2 分子遗传学检测实验室的设计.....	51
8.3 对检测实验室人员及设备的要求.....	51
9. 遗传病个体化医学检测的质量保证.....	53
9.1 标准操作程序（Standard Operation Procedure, SOP）.....	53
9.2 质控品和室内质量控制.....	54
9.3 室间质量评价.....	55
10. 常见遗传病分子诊断示例.....	56
10.1 Duchenne 肌营养不良（DMD/BMD）基因诊断指南.....	56
10.2 地中海贫血基因诊断指南.....	63
11. 附录 A 产前诊断相关知情同意书.....	71
12. 附录 B 基因检测知情同意书.....	74
13. 附录 C 不同诊断方法的优缺点.....	77

前 言

遗传病是指由于基因突变或染色体数目或结构变异导致的疾病。目前，大部分遗传病没有很好的治疗方法，因此根据其发病的分子基础进行有针对性的个体化医学检测就显得十分必要。

本指南由国家卫生计生委个体化医学检测专家委员会编订，是国家卫计委个体化医学检测技术系列指南之一，旨在对遗传病个体化医学检测中所涉及的遗传咨询、诊断技术选择和规范、实验室建设和运行、诊断结果解释等方面进行一般性的技术指导。

本指南起草单位：上海交通大学医学遗传研究所、上海市儿童医院、复旦大学出生缺陷研究中心、河南省人民医院、厦门大学生命科学院、温州医科大学。

本指南起草人：曾溢滔、曾凡一、马端、廖世秀、李庆阁、颜景斌、任兆瑞、王伟、黄淑帧、马竞、秦胜营、梅艳巧、徐沁、贺光、张卉、侯巧芳、王莉、廖逸群、黄秋英、李伟、吕建新。

1. 本指南适用范围

本指南仅对遗传病相关个体化医学检测项目的研究背景、技术要点、有效性评估以及临床应用等进行描述，同时为使用者提供以检测实践为目的的指导建议。本指南主要内容包括：遗传病及相关检测技术发展的概述，不同类型遗传病样本的采集及处理原则和方法，常见遗传病细胞与分子检测方法的介绍，遗传病个体化医学检测实验室的设置及质量控制，常见遗传病的介绍及诊断方法的选择以及分子诊断结果的报告和解释。

本指南主要适用于遗传病个体化医学检测实验室的技术人员，用于规范相关的检测过程，同时对进行遗传病临床咨询及诊治的医师也具有一定的参考价值。

2. 标准术语

- 1) 遗传 (heredity, inheritance): 性状由亲代向子代传递的现象或过程。
- 2) 遗传病 (genetic disease): 由于基因突变或染色体数目或结构变异导致的疾病。
- 3) 医学遗传学 (medical genetics): 应用遗传学的理论与方法研究遗传因素在疾病发生、流行、诊断、预防、治疗和遗传咨询等中的作用机制及其规律的遗传学分支学科。
- 4) 临床遗传学 (clinical genetics): 从临床出发研究遗传因素与疾病的病变过程及其诊治关系的遗传学分支学科，是医学遗传学在临床上的应用。
- 5) 先天性疾病 (congenital disease): 婴儿一出生即存在的疾病。既可能是由于遗传性因素引起，也可能是由于母亲怀孕期接触某些有害的环境因素而导致的胎儿先天异常。
- 6) 出生缺陷 (birth defect): 又称先天缺陷，是指由于先天性、遗传性或不良环境等原因引起的出生时存在的各种结构性畸形和功能性异常。
- 7) 基因诊断 (gene diagnosis): 又称分子诊断，是通过对某个遗传病患者的某一特定基因 (DNA) 或其转录产物 (mRNA) 进行分析并作出诊断的技术。
- 8) 遗传咨询 (genetic counseling): 为患者或其家属提供与遗传疾病相关的知识或信息服务。
- 9) 先证者 (proband): 在家族中首先被确认的遗传病患者。
- 10) 携带者 (carrier): 携带某一特定隐性遗传病致病基因突变的杂合子个体。

- 11) 野生型 (wild type): 基因或生物体在自然界中常见的或非突变型的形式。
- 12) 突变 (mutation): 基因的结构发生改变而导致细胞、病毒或微生物的基因型发生稳定的、可遗传的变化过程。
- 13) 点突变 (point mutation): 基因内单个核苷酸置换所造成的结构改变。
- 14) 缺失突变 (deletion mutation): 由于相邻的多个核苷酸或片段丢失所造成的突变。
- 15) 单核苷酸多态性 (single-nucleotide polymorphis, SNP): 同一物种不同个体基因组 DNA 的等位序列上单个核苷酸存在差别的现象。
- 16) 杂合子 (heterozygote): 又称“杂合体”。在二倍体生物中, 一对同源染色体上特定的基因座上有两个不同的等位基因的个体或细胞。
- 17) 纯合子 (homozygote): 又称“纯合体”。在二倍体生物中, 一对同源染色体上特定的基因座上有两个相同的等位基因的个体或细胞。
- 18) 表型 (phenotype): 一个生物体 (或细胞) 可以观察到的性状或特征, 是特定的基因型和环境相互作用的结果。
- 19) 基因型 (genotype): 一个生物体或细胞的特定基因组成。
- 20) 基因组 (genome): 单倍体细胞核、细胞器或病毒粒子所含的全部 DNA 分子或 RNA 分子。
- 21) 系谱分析 (pedigree analysis): 又称“家谱分析”。分析家系中个成员的表现来推断某一性状或某一疾病在该家系中的遗传方式。
- 22) 等位基因 (allele): 在一对同源染色体的同一基因座上的两个不同形式的基因。
- 23) 显性基因 (dominant gene): 二倍体生物中在杂合状态下表现出相关性状的基因。
- 24) 隐性基因 (recessive gene): 二倍体生物中在杂合状态下不表现, 只在纯合状态下表现出相关性状的基因。
- 25) 易感基因 (susceptibility gene): 在适宜的环境刺激下能够导致遗传病或获得疾病易感性的基因。
- 26) 候选基因 (candidate gene): 通过定位候选或候选基因策略发现遗传病致病基因。
- 27) 单基因病 (monogenic disorder): 由单个基因突变引起的遗传病。突变基因

可在常染色体上或性染色体上，呈显性或隐性。单基因病通常呈现特征性的家系传递模式。

- 28) 多基因病 (multigenic disorder): 指遗传信息通过两对及两对以上致病基因的累积效应所致的遗传病，其遗传效应较多地受环境因素的影响。多基因病有家族聚集现象，但无单基因病那样明确的家系传递模式。
- 29) 染色体病 (chromosomal disorder): 由于染色体数目或结构异常而引起的临床综合征。
- 30) 线粒体病 (mitochondrial disorder): 由于线粒体基因突变导致的一大类疾病。随同线粒体传递，呈母系遗传。
- 31) 表观遗传变异 (epigenetic variation): 基因的核苷酸序列不发生改变的情况下，但由于基因的修饰如 DNA 甲基化、组蛋白的乙酰化等导致基因的活性发生了改变，使基因决定的表型出现变化，且可传递少数世代，但这种变化是可逆的。
- 32) 单亲二倍体 (uniparental disomy): 体细胞中的同源染色体均来自一个亲本的个体。
- 33) CpG 岛 (CpG island): 脊椎动物基因组中由胞嘧啶 (C) 和鸟嘌呤 (G) 组成的串联重复序列。
- 34) 核型分析 (karyotype analysis): 根据染色体的数目、结构和着丝点位置、臂比、随体有无等特征，并借助染色体分带技术对某一生物的染色体进行分析、比较、排序和编号。
- 35) G 带 (G band): 又称“吉姆萨带”。真核生物染色体经胰酶前处理后通过吉姆萨染色产生的带纹。每一条同源染色体都具有独特的带纹，可用于识别特异染色体。
- 36) R 带 (R band): 又称“反带”。中期染色体经磷酸盐缓冲液保温处理，以吖啶橙或吉姆萨染色后所显示的带纹。和 G 带明暗相间带型正好相反。
- 37) 高分辨率显带 (high resolution chromosome banding): 将培养细胞同步化后，用秋水仙碱短暂处理，获得大量晚前期和早中期分裂相，使染色后在较细长的染色体上可显示 550 多条带纹以上的显带技术。
- 38) 荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH): 用特定荧光如生物素等标记探针，与靶 DNA 进行杂交，通过免疫细胞化学过程连接上荧光素标

记物，在荧光显微镜下观察探针标记或位点的技术。

39) Sanger 测序 (Sanger sequencing): 又称“双脱氧法”，“链终止法”。是指由 Frederick Sanger 发明的，以 2,3-双脱氧核苷三磷酸为底物，快速测定 DNA 中核苷酸序列的方法。

40) DNA 芯片 (DNA chip): 一种将大量 DNA 片段按预先设计的方式密集排列在硅片、玻片或塑料片上以便进行高通量检测的系统。

3. 遗传病检测概述

3.1 遗传病的分类及分子基础

由于基因突变或染色体数目或结构变异导致的疾病称为遗传病 (genetic disease)。从人类遗传物质的改变情况分类，遗传病总体上可分为五大类：

3.1.1 染色体病

由于染色体数目或结构异常而引起的临床综合征。通常分为常染色体病和性染色体病两大类。临床上最常见的唐氏综合征属于常染色体数目异常，即第 21 号染色体多了一条，成为 21 三体。染色体病通常不在家系中传递，但也有可传递的，例如染色体平衡易位携带者。目前已知的染色体病有 300 种以上。在自然流产胎儿中有 20~50% 是由染色体异常所致，而新生儿中染色体异常的发生率达到 0.5~1%。

3.1.2 单基因病

由 1 个或 1 对等位基因突变所导致的遗传病。单基因病可分为常染色体显性、常染色体隐性、X 连锁显性、X 连锁隐性遗传病及 Y 连锁遗传病等几大类。现在我们熟知的一些遗传病如色盲、血友病、地中海贫血等，很多都属于单基因病。

3.1.3 多基因病

由多个等位基因控制其发生的疾病。多基因病除了受遗传因素控制之外，还受环境等多种复杂因素的影响。遗传度越高表示遗传因素起的作用越大，反之，则是说明环境因素所起作用越大。多基因病有家族聚集现象，但没有单基因病那样明确的家系传递模式。

多基因病常常是环境与遗传交互作用的结果。高血压、糖尿病以及许多种先天畸形综合征均是常见的多基因遗传病。

3.1.4 线粒体病

线粒体是细胞内氧化磷酸化和形成 ATP 的主要场所，因此有细胞内“动力工

厂”之称。线粒体病是因为线粒体代谢酶缺陷，使得 ATP 合成障碍、能量来源不足导致的一类疾病。由于人体内几乎所有细胞的直接能量都来自于线粒体，因此线粒体病可以导致多系统功能的紊乱。最常见的线粒体病有线粒体耳聋、Kearns-Sayre 综合征、Leigh 综合征等。

3.1.5 体细胞遗传病 (Somatic Cell Genetic Disorders)

目前最常见的体细胞遗传病就是肿瘤。肿瘤起因于遗传物质的突变，不同个体中存在肿瘤遗传易感性的差异。另外，有些导致先天畸形的罕见病也属于体细胞遗传病。

3.2 遗传病诊断技术发展概况

细胞遗传学是遗传学中最先发展起来的学科，也是最基本的学科。1952 年徐道觉等建立了低渗制片的染色体制片技术并使用秋水仙碱获得较多的中期细胞分裂像。在此基础上，1955 年华裔科学家蒋有兴证实了人体细胞染色体数目为 46 条，为人类染色体结构、畸变与疾病关系的研究奠定了基础。随后人们先后鉴定出 21-三体综合征（唐氏综合征）、Turner 综合征等各种染色体病和以费城染色体为标记的慢性粒细胞白血病，标志着人类细胞遗传学的建立。

上世纪 70 年代后期，分子生物学的兴起对临床遗传学的发展起到特别关键的作用。其中美国加州大学旧金山分校教授简悦威（Y.W.Kan）应用 DNA 分子杂交的技术在世界上首次完成了 α 地中海贫血的分子诊断，标志着检验诊断进入基因诊断时代。随着基因诊断技术的不断改进和日臻成熟，其涉及领域和应用范围不断扩大，特别是 80 年代中期聚合酶链反应（PCR）技术的问世，以及 90 年代初人类基因组计划的启动，推动并在发达国家催熟了一个新兴的临床诊断技术——分子诊断。

目前在发达国家分子诊断已经十分系统和普遍地用于单基因遗传病的诊断和遗传咨询，通过对受检者的某一特定基因（DNA）或其转录物（mRNA）进行分析，即能检出病人家系中的致病基因携带者或高危个体，有效地降低了这些疾病的发生率。

目前我国几个主要的医学遗传中心能对包括地中海贫血、甲型血友病、进行性肌营养不良、苯丙酮尿症、脆性 X 综合征、马凡氏综合征、Prader-Willi 综合征、脊髓性肌萎缩症、软骨发育不全、亨廷顿舞蹈病、结节性硬化症、特发性无

精症、两性畸形、成人型多囊肾病、粘多糖贮积症Ⅱ型、遗传性视神经病、成骨不全Ⅰ型、视网膜色素变性等多种常见的遗传病开展分子诊断。

回顾遗传病诊断学 60 多年的发展历史，大致经历了 4 个阶段：

(1) 应用细胞遗传学分析技术对各种染色体病进行诊断；

(2) 利用 DNA 分子杂交技术进行遗传病的基因诊断；

(3) 以 PCR 技术为基础的基因诊断，特别是实时荧光 PCR 的应用，可检测多种遗传病细胞中 mRNA 的表达量。近年来，高分辨率熔解曲线分析和多色熔解曲线分析技术的发展，进一步拓宽了实时荧光 PCR 在分子诊断中的应用范围，可广泛用于各种基因变异的检测。目前以 PCR 技术为基础的基因诊断，依然代表分子诊断的主流；

(4) 大规模并行高通量分析技术，包括上世纪 90 年代出现的生物芯片 (Biochip) 技术和近年来出现的高通量测序技术。与遗传病检测最为相关的生物芯片技术是基因序列检测芯片、基因表达检测芯片和阵列染色体基因组杂交芯片。高通量测序已经在染色体病无创产前检测 (主要针对 21-三体、18 三体和 13 三体) 和多基因检测方面取得了突破性进展，临床应用前景广阔。

纵观遗传病诊断的历史，可以说它是现代生物学和细胞、分子遗传学的理论和技术与医学相结合的典范，更为个体化医学的发展奠定了坚实的基础。

4. 遗传病分子检测前质量控制

4.1 遗传咨询

遗传咨询是为患者或其家属提供与遗传疾病相关的知识或信息服务。此过程主要包括：通过对家族史的解释和医学发病史、遗传规律对疾病的发生和再发风险进行评估；对咨询者进行疾病的遗传、实验室检测、治疗处理及预防的教育，同时提供与疾病有关的各种治疗措施、求助的渠道和对研究方向的认知；辅导咨询者进行知情选择和对所患疾病及其再发风险的认知和接受。遗传咨询范围已从单纯的生育遗传咨询扩大到对包括常见肿瘤等具有遗传倾向疾病的咨询 (对此类疾病，非指导性咨询原则已不适用)。而对咨询者进行疾病相关的遗传学内容的教育和研究信息被列入遗传咨询的范畴。

需进行遗传咨询的指征包括：

1、遗传学筛查和遗传学检测阳性者；

2、高龄孕妇 (一般设定为 >35 周岁) 和曾怀有过遗传病的胎儿或生育过遗

传病患儿的父母；

- 3、父母之一是遗传病患者或携带者；
- 4、反复发作的自发性流产或有长期不孕史的夫妻；
- 5、有遗传病家族史者；
- 6、近亲婚配者；
- 7、有明显环境致畸形物的接触史；
- 8、患有遗传因素相关的常见病如肿瘤等。

遗传咨询中须遵循自愿平等、教育、非指导性、心理关注、信任和隐私保护、伦理道德、法律等原则。咨询师的伦理道德标准和文化背景等对咨询过程具有倾向性的影响。在复杂的遗传学和医学情况下，面对矛盾和不确定的数据时，咨询师对问题的综合分析及如何辅导咨询者作出选择的能力尤为重要。遗传咨询师应为具有遗传学、生物学、心理学、公共卫生学和社会学的相应知识背景，并经国家部门认证具有资质的合格人员。临床遗传医师应由经过医学遗传学专业训练的专科医师担任。某些情况下，可由接受过遗传学培训的儿科、妇产科或内科医师担任。

遗传咨询的目的是增加病人对遗传病的了解、知晓可选择的疾病管理和治疗预防措施和向病人解释疾病的风险和检测的益处。遗传咨询在病人的选择过程中应着重于为病人提供重要的、非倾向性的信息和非指向性的帮助。

遗传咨询的过程为获取信息、建立或证实遗传病的诊断、进行风险评估、为患者提供信息、为患者及其家庭提供必要的心理咨询和采取措施选择的信息和帮助。其中，家族史信息的获取是遗传咨询过程中首要和重要的部分，通常以家系谱的方式来描述和记录先证者及其家庭成员的相互关系和表型特征。在遗传病的诊断中，家系谱应使用国际通用的符号来记录和表示。应由临床遗传专科医师而非普通临床医师或实验室检测人员对遗传病进行诊断。

未来再生育或个体再发风险是遗传咨询者关心的重要问题。对遗传病或先天畸形的发生或再发风险进行评估和计算是遗传咨询师应掌握的基本工具。咨询师须掌握概率的基本运算方法。在无其它因素的影响下，对单基因病的遗传风险评估可按照孟德尔遗传比率结合概率运算法则进行计算。而大多数情况下，如在子代中已发现有患者的情况下，应采用 Bayes 分析方法对遗传风险进行评估。结合已掌握的孟德尔遗传比率、家系中各成员之间的关系、实验室检测结果、疾

病的特定遗传信息（如外显率、人群突变率等），计算特定条件下某个体携带致病基因的后概率，即遗传病的发生风险。对染色体病的风险评估要根据相应的参考评估原则和计算步骤进行。多基因遗传病的再发风险与多种因素有关，关系复杂，通常以经验风险率来表示。尽管肿瘤的发生与基因突变有关，但大部分肿瘤的基因突变为获得性，结构组成性的基因突变所占比例很小，因此，对肿瘤的风险评估通常应用流行病学和遗传风险计算方法相结合的方式进行。

一般情况下，对孟德尔遗传病的咨询较为传统和容易，但仍需注意外显不全、延迟显性、表现度差异、基因多效性、已具有先证者时的再发风险率等问题。对非孟德尔遗传病包括基因组印记与单亲二体、遗传早现与动态突变、表观遗传和DNA甲基化的咨询中，咨询师对信息的清楚传达、能否帮助准确理解是咨询者可作出自我选择的前提。

4.2 知情同意

根据《中华人民共和国侵权责任法》和卫生法规等规定，患者拥有生命权、健康权、隐私权、知情权、同意权等，医务人员在特殊检查中应当向患者告知医疗措施和医疗风险，并征得患者同意。患者不具备完全民事行为能力时，应由其法定代理人或授权委托人代理其行使民事权力；不宜向患者说明的，应当向患者的近亲属说明。

自愿原则是在遗传咨询和遗传检测中必须遵循的一个重要和首要的伦理道德原则，即完全尊重咨询者自己的意愿。国际上普遍实行的原则为当事者必须知情，被检测者和家庭内成员有权利自己作出决定，这种决定不受任何外来压力和暗示的影响。未经病人同意或在不知情情况下进行的遗传学检查视为不合法。

知情同意的主要内容应包括遗传检测的有效性、潜在的益处和风险、检测的局限性、其它的可替代方式等。负责谈话的医师或相关人员应当就疾病的状况、实验检测的目的和意义、需要的标本、完成遗传检测的地点、遗传检测的风险和益处、有无可取代的检测或诊断方式（包括风险和益处）、如不进行实验检测面临的的风险和益处等，对病人解释清楚。病人应有就相关问题进行询问的机会，以便其能对知情选择作出决定。建议采用书面知情同意的方式。以产前诊断和基因检测知情同意书为例，内容应包括：患者拟行检查的名称、目的、局限性、拟行检查日期、拒绝诊疗活动可能发生的后果、检查可能出现的并发症和风险、检查后的注意事项、患者和谈话医生签字。产前诊断和基因诊断的知情同意书见附录

二和附录三。

4.3 样本采集

遗传检测不仅可以用于遗传病的诊断和产前诊断，也可用于疾病的严重程度判断和预后评估等。其样本主要涉及常规样本（如外周血、血斑、尿液、唾液）和产前诊断样本（如羊水、绒毛及脐血）等人体标本。采集样本过程应严格按照卫生部《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》要求，做好生物防护，以避免样品污染和保护实验人员的操作安全。样本采集前应获得待检者的知情同意，并详细记录待检者及样本的相关信息。样本采集所需遵循的细则详见《个性化医学检测质量保证指南》。

4.3.1 常规样本采集

1) 外周血采集

外周血是最常用的体液样本，广泛用于各种细胞生物学和分子生物学检测。外周血采集应根据实验需求确定抗凝剂的种类，常用的抗凝剂有肝素、EDTA 和枸橼酸盐等。EDTA 抗凝血样适用于 DNA 和 RNA 抽提，肝素抗凝血样适用于染色体核型分析和 FISH。采样时轻轻颠倒混匀采血管数次，以确保充分抗凝，动作应轻柔避免溶血。

2) 血斑采集

血斑的采集主要用于新生儿筛查，一般从新生儿足跟针刺采集。在样本运输、保存困难的情况下也可用于成人样本的采集。血片采集后自然晾干，避免阳光及紫外线照射、烘烤以及挥发性化学物质的污染。滤纸干血片需置于密封袋内。

3) 尿液采集

尿液样本主要用于遗传代谢病的筛查以及线粒体突变检测。尿液样本的采集方式取决于送验目的及实验要求。尿液采集前待检者避免摄入大量液体或剧烈运动。采集时也应避免尿道口分泌物、粪便等的混入，必要时采用导尿术采集样本避免污染。

4) 唾液采集

唾液取材方便、无创、提取的 DNA 量多质优，并不亚于全血样本；尤其是唾液标本稳定，可室温长期存放，现已用于人群筛查和遗传病诊断，特别适合边远地区的采样和邮寄。目前市售的唾液样本采集管，均附带唾液核酸保存液，使用十分简便。采集的唾液核酸可室温稳定保存半年以上。

5) 口腔拭子

另一种常用的口腔脱落细胞采集方式为口腔拭子。患者清水漱口后，医用棉签在口腔内侧脸颊粘膜处反复擦拭数次，取出棉签置于灭菌处理后的滤纸上阴干，每位受检者至少提取 3 根。棉签放入干净封口塑料袋内保存。用于 RNA 分析的口腔脱落细胞须保存在 RNA 稳定试剂中。

4.3.2 产前诊断样本采集

产前诊断样本采集主要用于遗传病的产前诊断，样本包括羊水、绒毛、脐血和母血清游离 DNA。采集过程为侵入性有创操作，具有一定的风险性，可能引起出血、羊水渗漏、胎儿丢失、宫内感染等并发症。因此只在有明确医学适应症和无禁忌征的情况下，医患双方签署知情同意书后方能取样。产前样本采集的适应症有：①35 岁以上的高龄孕妇；②血清学筛查高风险；③曾生育过染色体异常患儿；④夫妇一方为染色体异常；⑤有自然流产、畸胎、死胎或新生儿死亡的不良孕产史；⑥遗传病基因携带者；⑦家族有遗传病史，或遗传病患儿生育史；⑧超声检查胎儿或羊水量异常；⑨孕早期接触致畸物质等。禁忌征有：①先兆流产；②术前两次测体温（腋温）高于 37.2℃；③有出血倾向（血小板 $\leq 70 \times 10^9$ ，凝血功能检查有异常）；④有盆腔或宫腔感染征象；⑤无医疗指征的胎儿性别鉴定。产前诊断样本在最终完成实验报告前，均应备份培养以备不时之需。不同样本不尽相同，具体如下：

1) 羊水采集

羊水样本是产前诊断中应用最广泛的标本，通常用于胎儿的染色体核型分析、基因检测和生物化学分析。羊水样本主要通过羊膜腔穿刺获得，但一般早期羊膜腔穿刺（孕 12 周~14 周）使用较少，多被绒毛活检替代；目前主要采用中期羊膜腔穿刺（孕 15 周~23 周）。一般中期羊水采集量约 15ml~20ml，为避免母体污染最初的 1ml~2ml 弃去并更换注射器。

羊水细胞分为成纤维细胞、上皮样细胞和羊膜细胞，其中羊膜细胞最适宜产前细胞遗传学诊断。约有 3.4%~8.6%的羊水培养核型分析时会出现嵌合体，包括真性嵌合体和假性嵌合体。母体污染、羊水细胞自身畸变以及体外培养引起的细胞畸变等因素均可导致假性嵌合体。因此遇到不能明确的嵌合体时，先排除母体污染，必要时进行脐带血检查复核。

以基因检测为目的羊水样本需排除母体污染后，方能进行后续实验。可疑母

体污染的羊水样本需进行培养传代后再进行基因检测。孕早期羊水细胞较少，可经过细胞培养后再用于基因检测。

2) 绒毛采集

绒毛也是产前诊断重要的标本，主要用于孕早期的细胞和分子生物学检测。常于孕 10 周~13 周内，超声引导下，根据绒毛板生长位置经宫颈或腹腔穿刺获得。不同检测目的所需绒毛组织量不同，染色体分析所需绒毛约为 10mg，基因分析 5mg 即可，而生化测定仅需 3~5mg。因此一次绒毛活检取样 20mg 左右可满足所有检测。绒毛标本取材后应由经验丰富的技术人员在显微镜下仔细分离蜕膜和血凝块，并进行充分的红细胞裂解洗涤，这一点至关重要。

由于存在 1%~3%的限制型嵌合（confined mosaicism, CM）情形，即绒毛染色体核型异常，而羊水或脐血核型正常的情况，因此当绒毛染色体核型为嵌合时，为避免限制性胎盘嵌合（confined placental mosaicism, CPM）应进一步采集羊水或脐带血检查胎儿染色体。同时也应告知患者胎盘染色体异常可能阻碍胎盘正常发育，进而影响胎儿的生长发育。

用于基因分析的绒毛标本也应排除母体污染后才能进行检测；大多数情况下，绒毛细胞丰富无需培养可直接进行基因检测；如绒毛组织有母血污染，需充分红细胞裂解和洗涤，并确定无母体核酸污染后才能用于检测。

3) 脐血采集

脐血可用于产前诊断，脐血采集一般在妊娠 18 周后进行，与羊膜腔穿刺相比，技术难度大且手术并发症较高。由于脐带血既可进行快速染色体核型分析，又可直接诊断胎儿血液系统疾病，也能用于孕晚期染色体核型分析，因此在遗传病检测中占有重要地位，但脐血样本也有可能受到母血污染。

4) 母血胎儿游离 DNA 分离

通过孕妇外周血中的胎儿游离 DNA 进行无创产前检查是近年来发展起来的新技术。母血中胎儿游离 DNA 样本的采集时间一般在孕 12 周后，需 EDTA 抗凝血约 5ml~10ml，母血采集时应避免溶血，最好在 4 小时内分离血浆并低温保存。目前母血胎儿游离 DNA 已用于胎儿性别、Rh 血型、以及胎儿染色体非整倍体等的检测。

4.4 样本运输、提取与保存

4.4.1 样本的运输

样本一经采集，需尽快送至检测实验室，运输容器应选择一次性无菌有盖容器，并注明唯一性编号、患者姓名、检测目的以及采集日期。短途运输样本可以在常温下进行，较长时间（如一般用于提取 DNA 的样本超过 8 小时）的运输需要保存于 4℃~8℃。用于母血中胎儿游离 DNA 检测的标本采集后，应尽快分离血浆并-20℃保存，干冰条件下运输。此外，标本的运送还应充分考虑生物安全问题，应符合相应的生物安全要求。样本运输所需遵循的细则详见《个体化医学检测质量保证指南》。

4.4.2 样本的提取

用于细胞遗传学分析的样本可以离心后进行培养或直接实验。而用于分子遗传学检测样本通常需要提取 DNA 或 RNA 进行后续检测。

核酸提取方法的选择可根据实验的目的选择或按照试剂盒说明书进行。酚/氯仿抽提法是最经典的 DNA/RNA 提取方法，但这种方法比较繁琐、使用的试剂有一定毒性，而且提取的样本中可能残留有机试剂，目前使用较少。Trizol 提取法是最常用的 RNA 提取方法，该方法简便、高效，可用于各种类型样本 RNA 的抽提。与其他方法相比，Trizol 提取法最大的特点就是它可以同时分离样本中的 DNA/RNA/蛋白质，但是该方法提取的样本中也可能残留有机试剂。目前市售的试剂盒常采用磁珠吸附或硅胶膜离心柱等方法提取 DNA/RNA，所提核酸一般情况都能满足实验的需求，具体的优缺点不再赘述。凡涉及产前诊断样本的核酸提取，条件允许时可采取单个样本逐一提取以避免样本混淆。

提取 DNA 或 RNA 后，应对其纯度和浓度进行鉴定。目前核酸浓度和纯度分析主要使用分光光度计，测定 260nm、280nm 和 230nm 的吸光度。DNA 样本的 260/280 应在 1.8-2.0 之间，RNA 样本的比值在 2.0 以上。核酸的完整性可通过凝胶电泳判断。合格的 DNA 样本可见 1 条完整的大片段条带，没有弥散性的条带。合格的 RNA 样本可见 3 条 rRNA 条带，没有弥散性条带。随着芯片技术的发展，对 RNA 质控的要求不断提高。以现在常用的 2100 核酸分析仪为例，一般情况下，只有代表 RNA 完整性的 RIN 值大于 7 才可用于表达谱芯片的实验。

4.4.3 样本的保存

细胞遗传学检测样本不宜长期保存，应尽快实验分析。检测靶核酸为 DNA 的样本，可在 2℃~8℃下保存 3 天。而检测靶核酸为 RNA 的样本，应立即冻存于-20℃以下。为使样本中的核酸酶失活，可加核酸酶抑制物，最常用的是异硫

氰酸胍盐 (guanidinium isothiocyanate, GITC), 加入 GITC 的标本可在室温下稳定保存 7 天。GITC 也可与还原剂如 β -巯基乙醇或二巯基乙醇同时使用。此外, 如测定血循环中的 RNA 或母血中胎儿游离 DNA/RNA, 为避免室温放置过久而致核酸降解, 应尽快将 EDTA 抗凝分离后的血浆标本-20 °C 以下低温保存。

样本长期保存所需遵循的细则详见《个体化医学检测质量保证指南》。

4.5 样本的质量控制

4.5.1 样本采集的选择:

不同检测目的对样本的类型和采集量的要求不同, 各实验室可根据检测项目制定所需样本类型、采集量以及特殊要求。常用样本及提取的核酸量见表 1。样本采集量需考虑到实验本身的需求以及复核实验所需量。样本类型的选择应考虑到不影响检测结果的准确性以及采集样本的可能风险, 如甲基化检测不宜选择绒毛标本; 绒毛采集的胎儿流产风险高于羊水采集。此外一些产前诊断, 需要对胎儿父母的样本进行对比分析, 其样本的采集应在同一实验室完成, 并采用与胎儿一致的检测方法进行实验。极少数情况下, 也要考虑到胎儿父亲与胎儿是否存在生物学关系。

表 1. 不同样本类型提取的核酸量

样本类型	对应核酸
全血细胞(7×10^6 白细胞)	DNA: 16~50 μ g
唾液(2ml)	DNA: \approx 100 μ g
口腔拭子(1 个拭子)	DNA: 0.2~2 μ g
组织	DNA: 0.5~3 μ g
(5mg 或 0.5×10^6 细胞)	总 RNA: \approx 10 μ g
干血片(1.2mm 直径)	DNA: 5~20 ng
羊水($1 \sim 2 \times 10^6$ 细胞)	DNA: 7 μ g
绒毛(10mg)	DNA: 5~100 μ g
胎儿游离 DNA/RNA	N/A

注: N/A: 不确定

4.5.2 母体污染的排除:

母体样本污染是产前遗传检测常常面临的问题。通常情况下, 混有母体细胞的羊水或绒毛经培养收获后的细胞大多为胎儿细胞, 因此对细胞遗传学检测影响

较小。而基于 PCR 扩增的核酸检测灵敏度高，微量的母体污染可直接影响检测的准确性，因此必须排除母体污染的样本才能用于遗传检测。常用方法有短串联重复序列分析（short tandem repeats, STRs）和可变数目串联重复标记（variable number tandem repeat, VNTR）。无母体污染的样本才能用于产前分子遗传学检测。

4.5.3 样本的拒收

实验室可对以下不符合检测要求的样本拒绝接收，并将拒收原因反馈给送检单位：①样本采集或运输不当的样本，如抗凝剂使用不正确、溶血或有血凝块、盛放标本的容器或试管破裂及开盖、样本标识不清；②待检者临床诊断分型和检测项目不相符；③影响检测结果的重要信息不完善；④提供的核酸存在质或量的改变，可能影响实验结果。各实验室可根据具体情况制定样本拒收标准。

4.6 样本信息采集与录入

遗传病的病因复杂，同一遗传病不同亚型其致病基因可能不同，临床咨询医生需和实验室人员充分沟通，明确检测项目和临床意义。同时，需要对样本信息进行详细的采集和录入，以便咨询医生对细胞、分子诊断的结果进行正确、合理的解释。

样本相关信息包括但不限于以下内容：患者姓名、出生日期、性别、种族/民族、家族史、检测项目、临床诊断及分型、相关临床检查、采集日期、唯一性标识（应考虑到同一家系不同患者间的联系）、样本类型、送检医院和医生信息等。采集样本时和实验操作前均应进行信息复核。家族史是遗传病基因检测重要信息，要求完善至待检者三代以上的家系资料，包括临床表型、相关检查、发病年龄、病情严重程度等信息。对有明确遗传病家族史的患者，应尽可能采集家族中所有在世患者及正常家系成员。

5. 遗传病的细胞、分子诊断技术及质量控制

目前，遗传病的实验室诊断主要包括细胞遗传学诊断和分子遗传学诊断，其中最常见的是细胞遗传学诊断技术是染色体核型分析技术，此后又发展了染色体荧光原位杂交技术。分子遗传学诊断则以 PCR 技术为基础先后发展出了实时荧光 PCR、多色探针熔解曲线分析、高分辨率熔解曲线分析、多重连接探针扩增技术。随着 Sanger 测序技术、焦磷酸测序技术、基因芯片技术、高通量测序技术和时间飞行质谱生物芯片系统等一系列技术的发展，分子诊断技术从少量样本定性分析阶段进入到了大量样本定量分析的阶段，遗传病诊断水平获得了大幅度的提

高。

5.1 染色体核型分析技术

5.1.1 技术原理

染色体核型分析是根据染色体的数目、结构和着丝点位置、臂比、随体有无等特征，并借助染色体分带技术对某一生物的染色体进行分析、比较、排序和编号。以体细胞分裂中期染色体为研究对象。

染色体核型分析技术可用于各种不同类型样本的分析，其中主要包括：外周血或骨髓；羊水或绒毛等胎儿附属物。

染色体制片有多种显带技术，如 G 显带，R 显带，Q 显带等，目前我国常用的是 G 显带技术。

5.1.2 技术应用示例

染色体核型分析是最常用、最经典的细胞遗传学检测手段，适用于以下方面：

(1) 产前诊断：对羊水、绒毛和脐带血等进行染色体核型分析可帮助诊断胎儿的染色体异常，它是染色体病产前诊断的“金标准”。该技术多用于染色体数目异常和部分可鉴别的染色体结构异常的检测，为上述出生缺陷患儿的早期干预提供依据。

适宜的人群有：夫妇一方为染色体病患者，或曾妊娠、生育过染色体病患儿的孕妇；有不明原因自然流产史、畸胎史、死胎或死产史的孕妇。

(2) 不明原因流产组织的染色体检查：超过一半的孕早期流产都是由遗传缺陷所导致的，其中胚胎染色体数目异常和结构异常是最主要的两个原因。通过染色体核型分析技术可以帮助找到部分自然流产原因。

(3) 诊断染色体病：正常人的体细胞染色体数目为 46 条，染色体的数目和结构发生异常改变可导致染色体病。临床上主要表现为先天性智力低下，生长发育迟缓，多发畸形等。如常染色体数目异常的 21 三体综合征（Down syndrome，也叫唐氏综合征）、13 三体综合征和 18 三体综合征等。Klinefelter syndrome（患者的核型为 47,XXY）和 Turner 综合征（患者的核型为 45,X）等则属于性染色体数目异常。染色体结构异常包括染色体异位、倒位、缺失、重复和环状染色体等。通过染色体核型分析可以辅助诊断这些染色体数目异常和较大片段结构异常类疾病。

5.1.3 质量控制及注意事项

(1) 每份样本至少建立两个独立的培养系统并分别置于不同的培养箱中。注意无菌操作，培养液不能有污染。

(2) 所有试剂和培养液在用于检测前都必须做好预实验和实验记录，操作过程需有完善的 SOP。

(3) 所有技术人员必须经过上岗培训并具有相应资质，两名技术人员完成阅片后必须由高级实验师进行校对再发报告。

(4) 计数及核型分析的细胞数量可根据不同的样本来源、培养条件及检测目的进行调整。

(5) 计数的细胞需轮廓清晰、细胞完整，在所观察的细胞周围没有离散的染色体存在，以免影响计数。染色体形态和分布良好，分布在同一水平面上，最好无重叠，即使有个别重叠，也要能明确辨认，以免差错。

(6) 对于一个样本，要做好结果记录并至少采集存储三张图片。记录单上要有受检者名字、性别、年龄、编号、样本来源、收到日期、检测方法、出报告日期、检测和审核人员签名等。

(7) 对于产前诊断，要严格按操作流程制作染色体核型片以控制母体细胞的污染。如抽取的羊水前 1~2 mL 应弃去不用或做生化检测。采集的绒毛组织要先在显微镜下进行分离等。

(8) 检测失败率要控制在 1% 之内，并积极查找失败的原因予以解决，诊断失败的记录以及相应整改措施的记录至少应保存一年。

(9) 一般玻片保存 5 年，异常核型玻片保存 20 年。细胞培养及染色体标本制备的实验记录按实验室工作日志保存档案，保存期限 5 年以上。

染色体核型分析由于受技术条件和分辨率的限制，不能够诊断所有的染色体病。比如，对于已污染的无法培养的流产组织或对于包括微重复和微缺失在内的小片段染色体异常，可根据不同情况借助荧光原位杂交技术、基因芯片和高通量测序等方法进行诊断。

5.2 FISH 技术

5.2.1 原理：

荧光原位杂交（Fluorescent in situ hybridization, FISH）技术基本原理是采用标记的寡聚核苷酸探针与变性后的染色体、细胞或组织中的核酸进行杂交，然后在荧光显微镜下显影，对待测 DNA 进行定性、定量或相对定位分析。

5.2.2 技术应用示例

(1) **确定异常染色体的来源：**对于用染色体核型分析较难归类的环状染色体、双随体双着丝粒的额外小染色体、染色体附加片段和染色体重排等，可应用 FISH 探针进一步证实染色体带型，确定异常染色体的来源。

(2) **基因定位：**利用特异 FISH 探针与分裂中期细胞 DNA 进行原位杂交不仅可以定位某一基因或特定 DNA 片段在染色体上的位置，还可以根据不同颜色杂交位点的相互位置确定两种或两种以上的基因在染色体上的排列次序。

(3) **产前诊断：**虽然传统的染色体核型分析仍然是产前诊断最主要的方法，但该方法存在耗时长，技术难度大，易受培养条件影响等不足之处。应用 FISH 技术可直接检测未经羊水或绒毛培养的分裂间期细胞，而且具有快速、简便和特异的特点，可作为一种快速产前诊断方法，目前临床上主要用于 13,18,21,X,Y 染色体数目异常的诊断。

(4) **辅助诊断染色体病：**根据目的基因设计特异 FISH 探针可辅助诊断多种染色体病，如染色体异位、倒位、缺失和重复等。和染色体核型分析技术相比，FISH 技术不需要培养就可以用分裂间期细胞进行检测，且可用于分析的细胞数目远远大于染色体核型分析的数目，因此特别适合一些不能用于染色体核型分析的样本。

5.2.3 质量控制及注意事项

(1) 洗脱步骤很关键，增加洗脱时间，升高温度或降低 SSC 溶液盐浓度均可导致信号减弱甚至消失，反之可导致背景信号增强。

(2) 探针和做过 FISH 的片子都要避光保存在 -20⁰C 冰箱中。

(3) 需有两名具有相应资质的专业技术人员计数，两人计数结果误差率应控制在 10% 以内，如果大于 10%，则需另外一位专业技术人员再进行计数。必要时需重新做一次 FISH 以保证结果准确可靠。

(4) 计数的细胞必须是完整的，与其他细胞没有相互重叠。细胞中需有清晰可辨的信号，且在胞核内。避免计数信号在胞核边缘的细胞及异常明亮或者背景很强的细胞，以免影响结果判断。

(5) 对于一个样本，要做好结果记录并至少采集存储两张图片。记录单上要有受检者名字、性别、年龄、编号、样本来源、收到日期、出报告日期和检测者名字等。

(6) 注意做好实验对照，每个所测样本都需有对照的探针同时进行杂交。新批号的试剂或探针在应用前需先做对照的预实验并做好记录。

FISH 检测技术应用基因特异性的探针，可以更准确和更精细地对基因进行定性、定量分析；但另一方面，特异性探针也限制了该技术在基因筛查方面的应用，所以 FISH 技术更适用于特定基因的检测分析。

5.3 实时荧光 PCR 及相关技术

实时PCR (Real-time PCR) 由R.Higuchi于1993年首次报道，国内多称作实时荧光PCR，是指利用荧光染料或荧光探针，在PCR过程中实时检测荧光的变化，获得PCR动力学曲线，借以实现扩增模板的定性和定量分析。简单地说，实时PCR就是PCR的在线分析技术。

5.3.1 实时荧光 PCR 技术

(1) 技术原理

实时荧光PCR的检测化学形式有多种，总体上可分为荧光嵌入染料型和荧光探针型两种。

荧光嵌入染料型是利用双链DNA嵌合染料（如溴化乙锭、SYBR Green I、LC Green和SYTO 9等）来指示扩增产物的变化。由于荧光染料可以嵌合所有双链DNA而发出荧光，因此具有通用性好的优点，但由于易受非特异产物和引物二聚体的干扰而可能造成假阳性结果，特异性较低。

荧光探针型实时PCR是利用与靶序列特异杂交的探针来指示PCR产物的变化。荧光探针的类型主要有TaqMan探针、分子信标、相邻杂交探针、置换探针等。这些探针基本上都是利用荧光共振能量转移原理或者基态荧光淬灭原理，来指示与靶序列杂交前后荧光信号的变化。荧光探针可通过标记不同的荧光基团，实现多种靶序列的同时检测。此外，实时荧光PCR还可以通过一些特殊设计的引物实现，但应用相对较少。

与传统PCR相比，实时荧光PCR具有以下优点：

- 1) 全封闭反应和检测，无需PCR后处理，大大减少了模板污染和假阳性的可能；
- 2) 特异性强，选择荧光探针与靶序列互补杂交进一步提高了检测的特异性；
- 3) 采用对数期分析，摒弃终点分析法，可实现真正意义上的定量；
- 4) 仪器在线式实时监测，结果直观客观，避免人为判断，简便快速；

5) 使用96孔或384孔实时PCR仪可实现高通量检测;

6) 操作简单安全, 自动化程度高。

鉴于以上优点, 探针式实时荧光PCR在不少领域都迅速取代传统PCR, 成为新一代的分子检测“金标准”。

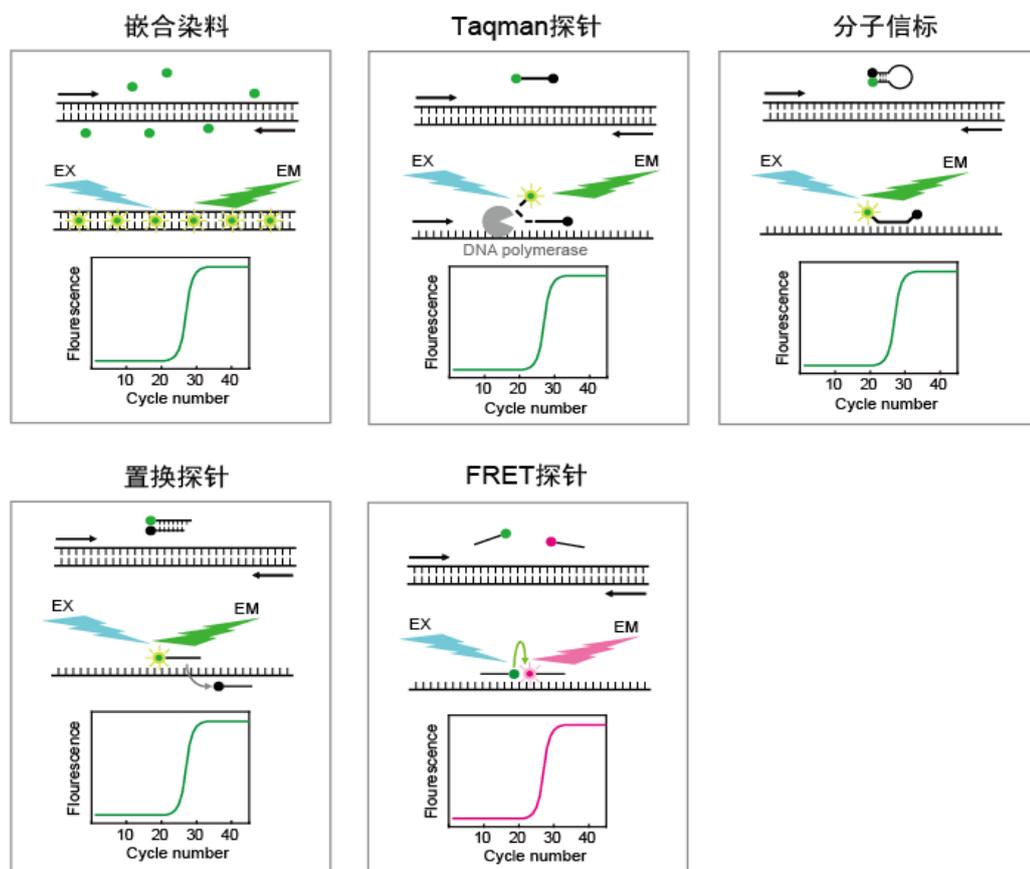


图 1. 实时 PCR 的常用检测化学原理

嵌合染料结合双链 DNA 发出荧光; Taqman 探针在引物延伸时被酶切后释放荧光; 分子信标、置换探针和 FRET 探针均为退火杂交时发出荧光, 其中的 FRET 探针发出荧光来自于染料间荧光共振能量转移。

(2) 适用的疾病或突变类型

在遗传病检测领域, 实时荧光PCR的应用并不如在传染病领域以及肿瘤领域, 这是因为遗传病领域所涉及到的检测对象多为序列变异, 而不是传染病领域的靶基因检测或肿瘤领域的体细胞特定稀有突变检测。

序列变异对探针的特异性要求更高, 以常见的单核苷酸多态性 (SNP) 检测为例, 要求探针必须具备识别单个核苷酸变异的能力, 但是对于一个普通的长度为20~30个碱基的荧光探针而言, 一个碱基的变化所引起的熔点变化很小, 这就很难选择一个合适的温度, 使探针仅仅与完全匹配的序列杂交而不与单个碱基不

匹配的序列杂交。因此，经常需要特殊修饰的探针来增加探针的特异性，比如 TaqMan-MGB探针、具有发夹结构的分子信标以及具有双链结构的置换探针等。（方法的局限性，不属于适用范围）。

另一方面，由于遗传病绝大多数都由多个基因位点的核酸变异引起，而实时PCR由于受到仪器检测通道数目的限制，每个反应所能检测变异位点数目十分有限。一般而言，一个四通道的实时荧光PCR仪器，可以允许单个反应使用四种不同荧光标记的探针，每个探针检测一个等位基因型，四种探针只能检测四个等位基因型，也就是两个变异位点，这就大大限制了实时荧光PCR的应用范围。

因此，到目前为止，在遗传病检测领域，实时荧光PCR主要用于少数已知特定突变的检测，所涉及的疾病类型有限。

5.3.2 多色探针熔解曲线分析

(1) 技术原理

多色熔解曲线分析（Multicolor Melting Curve Analysis, 简称MMCA），是指采用不同荧光标记的自淬灭探针，在PCR完成后，检测荧光强度随温度的变化，获得探针与靶序列杂交的熔点（即 T_m 值），根据 T_m 值的变化，判断突变的发生及突变类型（图2）。不同荧光标记的探针可以检测不同位点的突变情况，因此，MMCA是一种多位点突变检测技术。

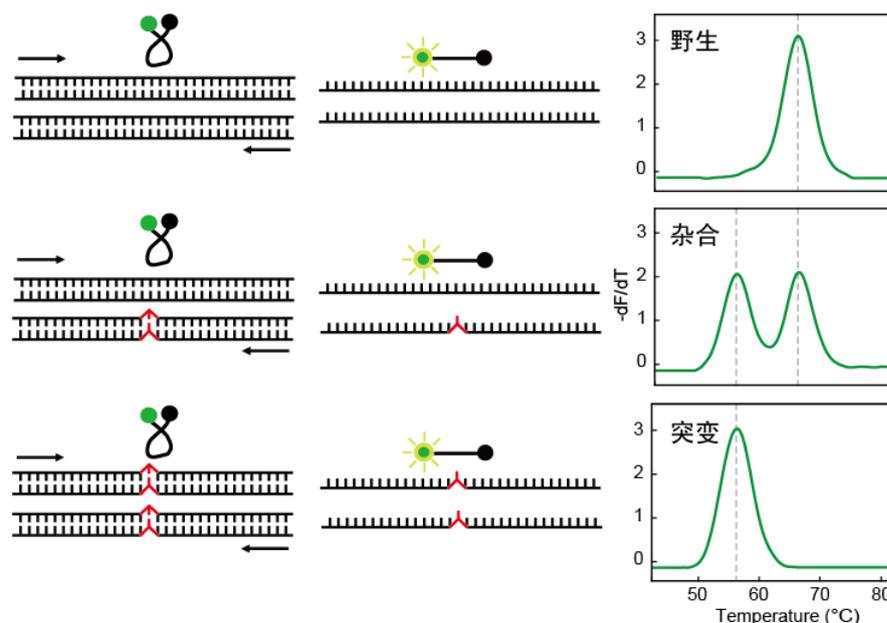


图2. 基于双标记自淬灭探针的熔解曲线分析原理

MMCA技术保留了实时PCR的多个优点，如闭管操作，大大降低了扩增产物

污染的机会、简化了操作等，此外，还具有以下独特优点：

1) 检测准确，重复性好。

MMCA所检测的是突变发生后探针与靶序列的熔点变化，该熔点决定于两者结合的自由能，是一个理论上可预测的、客观存在的数值。因此，在相同的检测条件下，检测结果具有高度的一致性，重复性高，检测结果准确。

2) 检测位点数目多。

MMCA将荧光通道与熔点温度结合起来，大大提高了突变位点的检测数，采用多个不同荧光标记的荧光探针，配合不同的熔点设计，使MMCA的单管检测突变的数目可以轻易达到标准实时荧光PCR检测模式的数倍以上。

3) 适用范围广。

理论上，MMCA适用于任何序列变异的检测。目前，MMCA已成功用于点突变、缺失和插入的检测。

4) 相对实时荧光PCR检测模式，成本更低。

MMCA的试剂组成与实时荧光PCR类似，成本主要是荧光探针，对于一个突变位点而言，实时荧光PCR需要两条不同标记的荧光探针，即突变型特异探针和野生型特异探针，而MMCA只需一条探针即可，因此，在检测相同数目突变位点的情况下，MMCA所需的荧光探针数量要少于实时荧光PCR技术，因此成本更低。

(2) 技术应用示例

MMCA 利用熔点变化检测探针覆盖区的序列变异，具有检测灵敏且重复性好的优点，且多个探针共存可以检测多个基因区域的变异，因此使用范围大大超过常规的实时荧光 PCR 技术。可用于多个突变的基因分型、突变筛查、以及突变位点的识别等。

1) 基因分型

MMCA 可以利用探针杂交区域熔点的变化，方便地对突变的野生型、纯合突变型和杂合突变型加以识别。由于不同的突变引起的熔点存在差异，一般情况下，一条 20~30 个碱基长度的探针可以对其覆盖区的多个突变进行分型而彼此互不干扰。这一能力使得 MMCA 特别适合检测那些涉及多个基因位点突变的各类遗传病。MMCA 适合突变数目在 50 个以内的情况，目前已用于 β -地中海贫血、G6PD、苯丙酮尿症、遗传性耳聋等遗传病的辅助诊断，这些疾病在一个民族或

地区中，涉及到的突变数目一般在几十个左右。

2) 突变筛查

MMCA 可以采用多个探针头尾相接的方式覆盖待测的靶序列，以检测靶序列内有无突变发生。MMCA 在突变筛查方面不受突变类型的影响，具有较其它方法更高的灵敏度，适合随机突变的检测。

3) 突变类型识别

在多数情况下，MMCA 可根据熔点的变化直接给出突变类型。在某些情况下，比如突变类型很多时，单个探针可能无法识别靶序列中发生的所有突变类型，此时，可以采用多个探针重叠覆盖待测区域，这样同一突变可获得多个熔点，这种多个熔点编码一种突变类型的检测方式，可以大大提高突变的识别率。

4) 缺失检测

对于多个片段缺失的检测，MMCA 可将每一个片段赋予一个特定的熔点和荧光检测通道，这样当某一片段缺失时，对应的熔点和荧光检测通道的熔解峰就会消失，从而判断某一片段缺失的发生。目前，MMCA 已经成功用于 α -地中海贫血基因缺失、Y-染色体微缺失等的检测。

5.3.3 高分辨熔解曲线分析

(1) 技术原理

高分辨率熔解曲线分析 (High Resolution Melting Analysis, HRMA) 分析技术由 Carl T. Wittwer 于 2003 年提出，作为一项突变扫描和基因分型检测技术，HRMA 可用于整个 PCR 产物中所有突变的筛查，且无需荧光探针。HRMA 的原理是根据 DNA 序列的长度，GC 含量以及碱基互补性的不同，高分辨地识别熔解曲线的差异，进而对突变进行识别与分析。高分辨熔解对 DNA 序列的识别能力主要由三个因素所决定：检测仪器的分辨率、双链 DNA 嵌入型染料种类和 PCR 产物的纯度。

HRMA 需要配备相应软件的实时荧光 PCR 仪。一般实时荧光 PCR 仪在检测融解过程时，只能执行 1°C/s 精度的荧光监测，而 HRMA 的工作模式则需要执行 0.02°C/s 精度的荧光监测。高精度的温差控制与监测保证了 HRMA 可以准确地表征出熔解曲线间的细微差异，从而灵敏地检测出突变的发生。

HRMA 推荐使用饱和荧光嵌入染料。目前用于 HRMA 的荧光染料均为饱和型染料，如 LC Green、LC Green Plus、SYTO 9 和 Eva Green 等。与不饱和荧光

染料 SYBR Green I 相比，此类染料在 DNA 解链过程中不会发生重新分布。

HRMA 对模板 DNA 纯度要求较高，对影响 PCR 产物熔点的因素，如盐离子浓度等十分敏感，因此，如果待检 DNA 样本带有杂质，可能导致检测结果的误判，因此在 PCR 扩增前应尽量保证待检 DNA 样本的纯度。

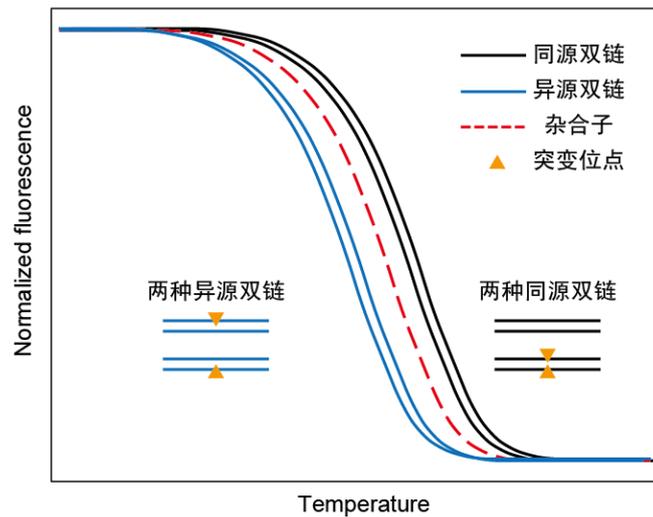


图 3. 高分辨熔解曲线分析的原理

对于杂合子而言，PCR 完成后，存在四种不同的双链：两种同源双链（黑色线条）和两种异源双链（蓝色线条），后者稳定性较低，故熔点低于同源双链。杂合突变因为包含这四个品种，其熔解曲线（红色线条）实际上由这四个品种的曲线合并而成。

（2）技术应用示例

由于 HRMA 分析不受碱基突变位点和种类的限制，可用于突变扫描、基因分型、序列匹配、DNA 甲基化等方面的研究，已经用于多种遗传病的诊断。

1) 基因的突变扫描

大多数 DNA 序列的突变会导致熔解曲线熔点温度的细微差异，HRMA 具备高精度的熔解曲线区分能力，因此常用于基因突变的扫描。HRMA 在遗传病的分子检测中可用于特定突变的筛查和未知突变的发现。

2) 基因分型

HRMA 能够在没有标记荧光探针的情况下，按照熔解曲线形状将绝大多数纯合子与杂合子辨别。杂合突变的熔解曲线会介于纯合野生和纯合突变样本的熔解曲线之间，因此其熔解曲线与纯合野生或纯合突变的熔解曲线间的差异非常细微。这就要求用于 HRM 基因分型的 DNA 样本及标准品必须具备很好的纯度。

3) 序列匹配

在法医鉴定、组织移植、基因型和表型的区别中，对靶 DNA 进行序列匹配比基因分型更重要。根据熔解曲线结果的相似性，HRMA 能够快速确认造血干细胞移植前捐赠者和患者的人类白细胞抗原（HLA）基因型亲缘关系。

4) 甲基化研究

DNA 甲基化状态的改变可导致基因结构和功能异常，在细胞正常功能维持、胚胎发育、遗传印记中扮演着重要角色。HRMA 根据解链温度差异可以反映同源片段之间的序列变化。通过重亚硫酸盐处理 DNA 后，未甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶，尿嘧啶经 PCR 扩增后变为胸腺嘧啶，使甲基化差别转换为碱基序列差别，通过 HRMA 已知甲基化频率的标准品可以得到样本的甲基化频率。

5.4 MLPA 相关技术

多重连接探针扩增技术（Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA）主要用于较大片段基因组拷贝数改变的检测，例如基因外显子的缺失或重复、染色体非整倍体、染色体微缺失/微重复等，也可用于已知SNP或者单碱基突变的分析。近年来发展的甲基化特异性多重连接探针扩增技术（methylation-specific MLPA, MS-MLPA）和逆转录酶多重连接探针扩增技术（reverse transcriptase MLPA, RT-MLPA），则分别用于DNA甲基化和mRNA相对定量分析。

5.4.1 技术原理

MLPA技术的特点在于其探针的设计。每个MLPA探针包括一段靶核苷酸特异性序列、一段填充序列和一段通用的引物序列。在MLPA反应中每一对探针与变性后的待测样本目标序列杂交，经过连接、通用引物扩增、毛细管电泳，在一管反应中实现约45个目标序列的分离，进而比较、分析目的序列的相对拷贝数。

5.4.2 技术应用示例

目前MLPA可用于多种单基因遗传病、染色体病、遗传性肿瘤和遗传药理学等临床检测项目，目前有200余种商品化试剂盒提供。

（1）基因外显子的缺失/重复检测

MLPA是检测外显子缺失/重复的最佳方法之一。目前商品化的MLPA外显子检测试剂盒包含*BRCA1*、*MSH2*、*MSH6*、*MLH1*、*DMD*、*APC*、*NF1*、*NF2*、*VHL*、*FBN1*、*RBI*等近百个基因。

(2) 染色体微缺失/微重复综合征（包括亚端粒缺失综合征）检测和诊断

目前几乎所有已明确的染色体微缺失/微重复综合征都可以通过MLPA技术检测。如猫叫综合征（5p缺失）、无精子因子(AZF)微缺失、Smith-Magenis综合征(17p11.2缺失)、1q21.1微缺失综合征、Wolf-Hirschhorn(4p16.3缺失)、DiGeorge syndrome(22q11缺失)、Sotos syndrome(5q35缺失或重复)，以及亚端粒缺失的筛查和确认等。

(3) 染色体非整倍体分析

目前主要针对13、18、21、X和Y染色体的拷贝数进行分析，是一种快速有效的染色体非整倍体快速诊断技术。由于不需要细胞培养、不需要活细胞、基因组DNA用量相对较小等特点，故MLPA染色体拷贝数分析常用于染色体病的产前诊断。

此外，MLPA技术还可用于甲基化分析和mRNA定量分析，但是应用并不广泛，在此不做详述。

5.4.3 MLPA 技术的特点

- (1) 相对其他拷贝数分析技术成本低廉、操作简单、快速、高通量。
- (2) 可以检测Southern杂交和FISH技术检测不到的小片段重复或者缺失。

5.4.4 MLPA 技术应用的注意事项

(1) MLPA的分析结果取决于待测样本与正常对照样本的相对比较。因此精确的分析结果要求待测样本和对照样本基因组的质/量以及实验操作流程尽量一致。

(2) MLPA用于小的缺失、插入或者已知SNP的检测时，探针设计原则有所不同。

(3) MLPA的技术原理决定了它主要检测较大片段的重复/缺失。在用于检测之前必须首先明白检测疾病的遗传特征、所购试剂盒的检测范围等，才能够正确理解检测结果，形成准确描述的检测报告。比如MLPA对于染色体非整倍体的检测快速高效，但是目前它仅用于分析13、18、21、X和Y染色体的相对拷贝数、不能发现这5对染色体的结构改变、不能检测低于一定比例的非整倍体嵌合体。又比如，MLPA对于脆性X综合征的辅助诊断仅局限于男性*FMR1*和*AFF2*基因启动子区甲基化分析，不能够用于最常见的*FMR1*基因GCC片段重复次数异常测定。

(4) MLPA技术具有高度的特异性和稳定性，其检测结果一般不需要进一

步验证，但特殊情况或者非常见检测结果的判断仍需要谨慎。如MLPA技术用于产前诊断时，需要考虑到胎儿组织中母体细胞污染对结果的可能影响，对于男性胎儿性染色体异常、嵌合体胎儿、携带者胎儿的判断往往需要不同实验方法的确证。部分基因（如DMD）每个外显子仅设计有一对探针，此时，如果出现单个外显子缺失，建议使用其他方法进行确证。

5.5 基因芯片技术

5.5.1 技术简介

生物芯片技术是一项融微电子学、生物学、物理学、化学、计算机科学为一体的高度交叉的新技术，它通过微电子和微加工技术，在玻片、硅片、聚丙烯酰胺凝胶、尼龙膜等载体表面构建微型生物化学系统，以实现核酸片段、多肽分子甚至组织切片、细胞等生物组分的快速、并行、高效的检测分析。与以前传统的检测方法相比，生物芯片技术具有高通量、大规模、集成化、平行性、微型化和自动化等特点。

根据芯片上固定的探针种类的不同，生物芯片包括基因芯片、蛋白质芯片、细胞芯片、组织芯片。另外，根据不同的芯片反应原理，还包括元件型微阵列芯片、通道型微阵列芯片、生物传感芯片等新型生物芯片。

生物芯片中发展最成熟的是基因芯片。基因芯片技术，又称DNA芯片，是指在固相支持物上原位合成寡核苷酸或者直接将大量DNA探针以显微打印的方式有序地固定到支持物表面，然后将之与标记好的样本杂交，通过对杂交信号的检测分析，得出样本的相关信息。

5.5.2 遗传病检测

由于遗传病发生的根本原因是遗传物质发生了改变。检测基因突变对于遗传病的早期诊断具有重要意义。DNA芯片技术可以快速、高效、大规模的进行遗传病的检测。

很多遗传病是由几十甚至上百种突变引起的，如地中海贫血、遗传性耳聋等。利用传统方法对这些位点进行检测耗时又耗力，难以满足临床的需求，因此对多位点的高通量检测就显得尤为重要，基因芯片技术可在短时间内同时检测一种或多种疾病的致病突变位点。此外，近年来发展起来的微阵列比较基因组杂交(aCGH)技术正逐渐应用于染色体病检测，使分辨率获得了大大的提高，能检测到很小范围的基因扩增和缺失。同时分析结果可经计算机软件识别每条染色体，

克服了需要经验丰富的人员识别染色体的限制，为快速全面地分析遗传病 DNA 拷贝数的变化提供了理想的技术手段。因此该项技术的推广应用将能极大的促进染色体遗传病的快速筛查与诊断。

从正常人的基因组中分离出 DNA 与 DNA 芯片杂交就可以得出标准图谱。从病人的基因组中分离出 DNA 与 DNA 芯片杂交就可以得出病变图谱。通过比较、分析这两种图谱，就可以得出病变的 DNA 信息。

在美国，aCGH 和 SNP 芯片已用于产前遗传病检测。美国妇产科医师协会（ACOG）和美国母胎医学会（SMFM）对基因芯片在产前诊断中的应用提出如下建议，也可供我们参考：

（1）对于超声波检查显示胎儿有一处或者多处主要结构异常的孕妇和接受侵入性产前诊断的孕妇，建议进行基因芯片分析，该检测可以取代胎儿核型分析。

（2）如果对胎儿结构正常的孕妇进行有创产前诊断，胎儿核型分析和基因芯片分析可选其一。

（3）由于大多数遗传性变异孕妇年龄无关，因此基因芯片用于产前诊断时不受孕妇年龄必须大于 35 岁的限制。

（4）如果胎儿宫内死亡或者死产，需要进行遗传学分析时，建议对胎儿组织（如羊水、胎盘或妊娠物）进行基因芯片检测。

（5）由于数据有限，基因芯片不适用分析孕早期和孕中期流产的原因。

（6）孕妇在检测前后应做遗传咨询。孕妇必须签署知情同意书，并保存在病史档案中。

孕妇产前基因芯片分析知情同意书至少应包括以下内容：

（1）基因芯片可以识别大多数染色体病和部分单基因病，但会有遗漏。

（2）由于疾病表现差异很大，基因芯片无法预测患者的病情结局。

（3）基因芯片可以用于亲缘关系鉴定。

（4）基因变异不意味一定发病。必要时应同时检测父母双方，从而有助于对结果的解释。

（5）某些遗传病只有到成年才会发病，基因芯片可以检测出此类疾病。

5.6 Sanger 测序技术

5.6.1 技术原理

Sanger 法测序的基本原理及步骤是：利用一种 DNA 聚合酶来延伸结合在

待定序列模板上的引物，直到掺入一种链终止核苷酸为止。每一次序列测定由一套四个单独的反应构成，每个反应含有所有四种脱氧核苷酸三磷酸(dNTP)，并混入限量的一种不同的双脱氧核苷三磷酸(ddNTP)。由于 ddNTP 缺乏延伸所需要的 3-OH 基团，使延长的寡聚核苷酸选择性地在 G、A、T 或 C 处终止。终止点由反应中相应的 ddNTP 而定。每一种 dNTPs 和 ddNTPs 的相对浓度可以调整，使反应得到一组长数百个碱基的链终止产物。它们具有共同的起始点，但终止在不同的核苷酸上，可通过高分辨率变性凝胶电泳分离大小不同的片段，凝胶处理后可用 X-光胶片放射自显影、非同位素标记或荧光标记进行检测。

Applied Biosystems 公司出品的 Sanger 测序仪仍以 Sanger 法为基础，但综合采用毛细管电泳和荧光标记技术，除了简化测序反应之外，也大大提高了 DNA 测序的速度和准确性。测序反应产物加入测序仪后，两极间极高的电势差推动着各个荧光 DNA 片段在凝胶高分子聚合物中从负极向正极泳动，并相互分离，依次通过检测窗口。由激光器发出的极细光束，通过精密的光学系统被导向检测区，在此激光束以与凝胶垂直的角度激发荧光 DNA 片段。DNA 片段上的荧光发色基团吸收了激光束提供的能量而发射出特征波长的荧光。这种代表不同碱基信息的不同颜色荧光经过光栅分光后再投射到 CCD 摄像机上同步成像，经计算机软件分析后显示测序结果。

在整个电泳过程结束时，检测区某一点上采集的所有荧光信号就转化为一个以时间为横轴坐标，荧光波长种类和强度为纵轴的信号数据的集合。经测序分析软件对这些原始数据进行分析，最后的测序结果以一种清晰直观的图形显示出来。

5.6.2 技术特点

- (1) 自动化操作。
- (2) 快速，电泳3小时左右即可达到测序要求。
- (3) 新型液体分离胶使读序长度达1100bp，精确读序可达800bp。
- (4) 新型碱基识别与质量评分软件提高了测序准确性。
- (5) 电泳温度可达70℃，有助于去除二级结构的影响。
- (6) 高灵敏度提高了测序模板DNA的浓度适应范围。
- (7) 良好的温控装置保证了片段分析准确性及重现性。

(8) 毛细管内荧光检测，灵敏度高。

(9) 双光束双侧激光激发，荧光信号强度高度均一。

Sanger 法测序是确定基因序列的金标准，但它的准确率仍然无法达到 100%，大约<2%的碱基无法被 Sanger 法测序所识别。因为通量的缘故，它在大基因和多基因的检测方面效率很低。

5.6.3 技术应用示例

目前 Sanger 测序已经广泛用于遗传病的分子检测，在单基因病、线粒体病、单核苷酸多态性检测方面取得了很好的效果。此外，将 Sanger 测序技术与分子克隆技术相结合也可用于 DNA 甲基化位点的检测。

例如，苯丙酮尿症（简称 PKU）是由于苯丙氨酸羟化酶（PAH）基因突变导致苯丙氨酸代谢障碍所致，目前世界范围内已报告了 625 种突变类型，我国也已发现 70 多种突变。对于 PKU 疑似病例，除了常规的新生儿筛查和质谱筛查以外，可通过对 PAH 基因进行 Sanger 法基因测序可以确定病因。可以使用两种测序策略，一是针对已知的热点突变进行测序，但是该技术有可能会遗漏非热点及新发突变；二是对全基因进行测序，可以发现任何的突变。

5.7 焦磷酸测序技术

5.7.1 原理

焦磷酸测序（Pyrosequencing）是由波尔·尼伦和穆斯塔法·罗纳吉于 1996 年提出的一种基于聚合原理的 DNA 测序方法。

焦磷酸测序技术是由 4 种酶催化的同一反应体系中的酶级联化学发光反应。当测序引物与模板 DNA 退火后，在 DNA 聚合酶（DNA Polymerase）、ATP 硫酸化酶（ATP Sulfurytase）、荧光素酶（Luciferase）和三磷酸腺苷双磷酸酶（Apyrase）等 4 种不同酶的协同作用下，将引物上每一个 dNTP 聚合时释放的焦磷酸基团（PPi）与一次荧光信号的释放偶联起来，通过检测荧光的释放和强度，达到实时测定 DNA 序列和定量分析序列变化的目的。

5.7.2 技术应用示例

焦磷酸测序技术是一种新型的酶联级联测序技术，其重复性和精确性可与 Sanger 测序相媲美，而测序速度则大大提高，非常适合对已知的短序列进行重测序分析。在遗传病分子检测中，焦磷酸测序主要用于 SNP 快速筛查、点突变检测和 DNA 甲基化定量分析。

(1) SNP 快速筛查

由于焦磷酸测序技术具备同时对大量样本进行测序分析的能力，因此我们可以对上百个样本中的单个 SNP 位点或同一样本中的多个 SNP 位点进行筛查（图 4），这就为大通量、低成本、快速地进行 SNP 筛查研究提供了非常理想的技术平台。

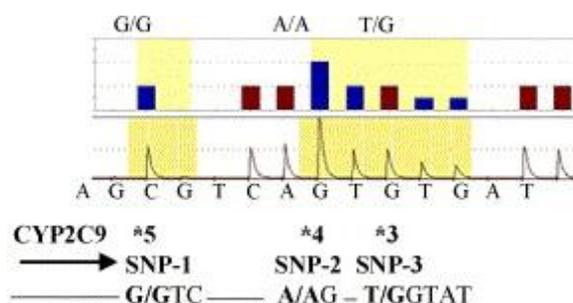


图 4. 采用焦磷酸测序技术同时进行多个 SNP 位点的分析

(2) 线粒体 DNA 杂合突变的定量检测

线粒体 DNA (mtDNA) 是哺乳动物中在核基因组外独立存在的核酸物质。由于线粒体中存在多个 mtDNA 拷贝，因此许多疾病样本中通常会存在杂合突变，即每个线粒体中既存在野生型的 mtDNA，也存在突变型的 mtDNA，而杂合突变往往会导致疾病的发生。焦磷酸测序技术可以进行突变的定量分析，因此能够满足对 mtDNA 杂合突变尤其是低频杂合突变定量检测的要求。

mtDNA 中 m.3243A>G 突变是早发型糖尿病的致病原因之一，许多患者外周血中仅有不到 10% 的杂合突变，常规技术进行检测有一定的困难。利用焦磷酸测序可以对单个位点进行精确定量的特性。如图 5 的结果所示，焦磷酸测序具有很高的检测灵敏度和准确度，可对突变比例在 0.5% 以上的样本进行精确定量。在 73 例早发型糖尿病外周血样本中检出了 m.3243A>G 突变，最高杂合度达 71.9%，最低杂合度为 0.5%。26 个患者配偶样本均未检出 m.3243A>G 突变。

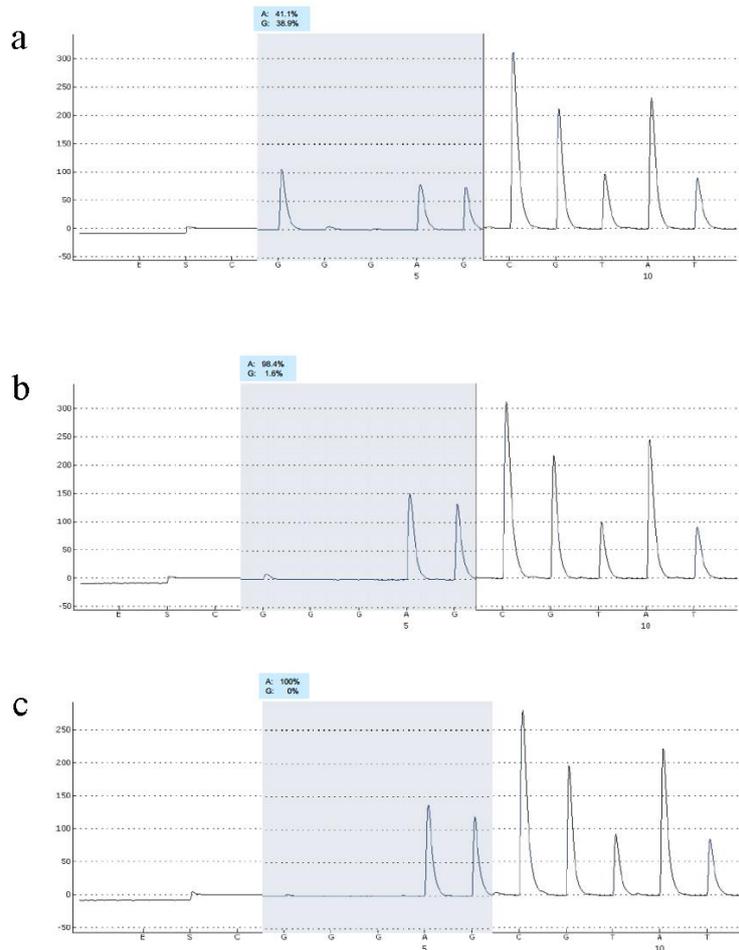


图 5. 应用焦磷酸测序技术定量分析 mtDNA 中 m.3243A>G 杂合突变

a: 高频突变; b: 低频突变; c: 野生型

(3) DNA 甲基化定量分析

目前 DNA 甲基化分析常用亚硫酸氢盐转化的方法, DNA 经亚硫酸氢盐硫化处理后, 双链中的“C”转化为“U”, 通过随后的 PCR 可将“U”转化为“T”, 但亚硫酸氢盐不能使已发生了甲基化的 DNA 的“C”发生上述转化。因此, 甲基化的问题将被转变为 C/T 突变的问题。如前所述, 焦磷酸测序可对特定序列进行定量分析, 这样我们就可以通过计算特定 CpG 位点中 C/T 的比例来进行 DNA 甲基化的定量分析。

Silver-Russell 综合征是一组罕见的遗传病, 大约有 20-65% 的病人存在 11 号染色体上 *H19* 基因 ICR 区域的低甲基化。应用亚硫酸氢盐转化和焦磷酸测序的方法, 可对 Silver-Russell 综合征患儿外周血样本进行上述区域甲基化的定量分析。如图 6 中的结果所示, 患儿样本中检测的 6 个 CpG 位点甲基化水平仅为 20% 左右, 而正常对照样本的甲基化水平均为 50% 左右。

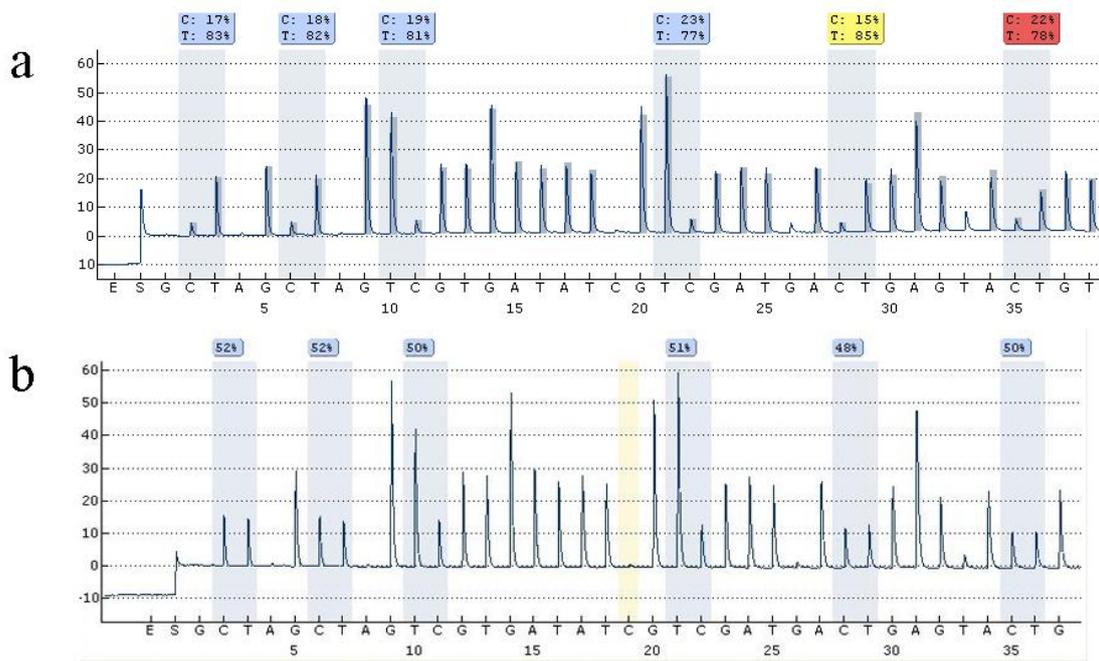


图 6. 采用焦磷酸测序进行 Silver-Russell 综合征样本的甲基化定量分析

a: Silver-Russell 综合征患儿样本; b: 正常对照样本

5.8 高通量测序技术

高通量测序技术又称“下一代”测序技术（"Next-generation" sequencing technology, 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标志。主要有以下几种：大规模平行签名测序（Massively Parallel Signature Sequencing, MPSS）、聚合酶克隆测序（Polony Sequencing）、454 焦磷酸测序（454 Pyrosequencing）、Illumina (Solexa) 测序、ABI SOLiD 测序、离子半导体测序（Ion semiconductor sequencing）和 DNA 纳米球测序（DNA nanoball sequencing）等。

5.8.1 检测原理

不同厂家的产品测序原理不同，主要分为边合成边测序（Sequencing by synthesis, SBS）、基于“DNA 簇”和“可逆性末端终结（Reversible Terminator）”大规模平行测序、4 色荧光标记寡核苷酸的连续连接反应测序和半导体芯片测序。

5.8.2 技术应用

与 Sanger 测序技术相比，新一代测序平台最大的变化是无需克隆这一繁琐的过程，而是使用接头进行高通量的并行 PCR、测序反应，并结合微流体技术，利用高性能的计算机对大规模的测序数据进行拼接和分析。接头的运用，使得高通

量测序技术不再局限于单纯的基因组测序，而是作为一个平台，可以开展全基因表达图谱分析、SNP、小RNA、ChIP、DNA甲基化等诸多研究。

(1) DNA 水平的应用

1) 全基因组测序

个体全基因组测序能够覆盖人体基因组中所有类型的缺陷，提供人体一生的健康预测和指导，将为临床医药的发展带来革命性的变化。

2) 外显子测序

外显子测序是指利用序列捕获技术将全基因组外显子区域 DNA 捕获并富集后进行高通量测序的基因组分析方法。是一种选择基因组的编码序列的高效策略，对研究已知基因的 SNP 和突变具有较大的优势。

全基因组测序和外显子捕获测序均可用于染色体病的产前无创检测。经数十万份的临床检测，21-三体、18-三体和 13-三体的正确检出率平均在 98%左右，较目前医院常规开展的唐氏综合征血清学筛查和 B 超产前筛查明显提高。

此外，应用这 2 种方法检测多基因或大基因变异的效率明显较其它方法具有优势。

(2) RNA 水平的应用

1) 转录组测序

如果基因的调控区发生异常，可使基因的表达水平发生异常，从而影响基因发挥应有的作用，是部分遗传病的发病原因。

转录水平的调控是生物体最主要的调控方式，而建立在高通量测序基础上的转录组测序已逐步取代基因芯片技术成为目前从全基因组水平研究基因表达的主流方法。对同一样本高通量测序可以捕获低表达的基因，而对大量样本同时测序可以获得样本之间的表达差异。此外，研究人员还可以获得转录本表达丰度、转录发生位点、可变剪切和转录本 SNP 等重要信息。

2) 小分子 RNA 测序

较短的序列长度虽然是目前高通量测序难以打破的瓶颈，却正好可以覆盖小分子RNA的长度。对于小分子RNA测序，Sanger测序在引物设计、测序反应等方面存在困难，而且Sanger测序只能针对已有小RNA设计引物。高通量测序技术可实现在无需预先知道序列信息的情况下高通量研究小RNA分子。此外，高通量测序还可检测到低表达的微量小RNA分子。

(3) 表观基因组学应用

1) 转录因子结合位点测序

高通量测序技术可以研究与调控蛋白紧密结合的DNA序列，进而探索二者之间的相互作用以及生物调控的基本模式。这种名为染色质免疫沉淀—高通量测序（ChIP-seq）的技术目前被广泛应用于发现转录因子结合位点等领域。

2) DNA 甲基化测序

高通量测序技术在检测全基因组范围甲基化位点方面也有高效的解决方案。

5.8.3 高通量测序的临床应用

在美国，高通量测序已经为临床服务，其应用范围、益处及局限性见表 2。

表 2. 高通量测序在遗传病诊断中的应用及优缺点

应用领域	益处	局限性
罕见病	诊断，遗传咨询，后代危险性评估，家族危险度分析	许多变异的临床价值有待确认
孕前和产前筛查	告知父母后代患病的可能性	伦理学限制
单基因病的群体筛查	确定疾病类型，提高防治水平，改善疾病结局	由于机制不明，对携带可疑致病突变的未发病家庭存在解释的困难

5.9 时间飞行质谱生物芯片系统（Sequenom MassARRAY）

MassARRAY 时间飞行质谱生物芯片系统（图 10）是为基因组学研究提供兼顾灵敏度和特异性服务的中高通量技术平台，广泛地应用于遗传突变检测、SNP 分型以及 DNA 甲基化定量分析研究，是目前唯一采用质谱法进行直接检测的方法。

5.9.1 检测原理

MassARRAY 系统主要是利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）进行分析，即 PCR 扩增产物或者预处理样本在延伸单碱基后，将制备的样本分析物与芯片基质共结晶，将该晶体放入质谱仪的真空管，而后再用瞬时纳秒（ 10^{-9} s）强激光激发。

由于基质分子经辐射所吸收的能量，可导致能量蓄积并迅速产热，从而使基质晶体升华，核酸分子就会解吸附并转变为亚稳态离子，产生的离子多为单电荷

离子，这些单电荷离子在加速电场中获得相同的动能，进而在非电场漂移区内按照其质荷比率得以分离，在真空小管中飞行到达检测器。具体原理见图 7。

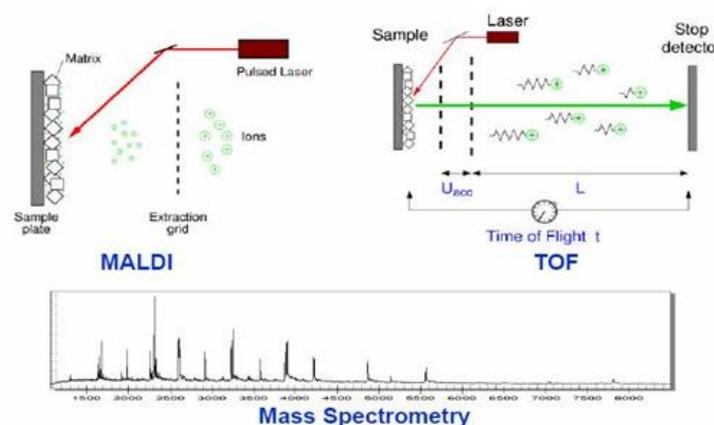


图 7. MassARRAY 系统检测原理

5.9.2 技术特点

MassARRAY 系统的反应体系为非杂交依赖性，不需要各种标记物，实验设计灵活，更可实现高达 40 重反应。

1) 高通量

一张芯片可对 384 个样本进行多重检测；每个体系最多可实现 40 重反应；通量可根据客户要求进行个性化调整。

2) 高性价比

无需荧光标记，仅需合成普通引物，大大降低成本；单个分析成本低；适用范围广，几十到成千上万个样本，同时检测几十到成百上千个位点。

3) 高灵敏度

分析所需样本量少（10ng）；检测精度高；可进行定量分析。

4) 高灵活度、功能多样

适用于 SNP 分型以及 DNA 甲基化定量分析；一张芯片上样本数量和位置可随意选择；一张芯片上样本和位点检测匹配可随意选择。

5.9.3 技术应用示例

Sequenom MassARRAY 是一种中通量的突变检测技术，目前已用于 SNP 分型以及 SNP 位点等位基因频率计算、体细胞突变检测和分析、甲基化定量分析、基因表达定量分析、CNV 检测分析和寡核苷酸质量控制和检测等多个领域得到了应用。

Sequenom 特定 SNP 位点检测采用专业的引物设计和基因分型软件,可对已知的 SNP、突变或甲基化位点进行检测,特别适合于检测位点少于 200 个,样本量大于 500 份的项目,因此几乎适合所有已知突变位点的检测。

6. 常见遗传病及诊断方法选择

6.1 染色体病

6.1.1 染色体数目异常

染色体数目异常可分为非整倍体 (Aneuploid) 和多倍体 (Polyploid)。非整倍体时染色体的数目不是单倍体 (Haploid) 的整倍数,在数目上多或少于整倍体,如 45 或 47 条染色体。常见的非整倍体是某对染色体不是 2 条而是 3 条,称为三体综合征 (Trisomic syndrome),如 13、18 和 21 三体。如果某对染色体缺少 1 条,则称为单体综合征 (Monosomic syndrome)。多倍体时染色体数目是单倍体的整数倍,如三倍体 (triploid) 的 69 条,四倍体 (Tetraploid) 的 92 条。多倍体患者很少见,可见于肿瘤细胞和流产胎儿。

染色体数目异常几乎全是减数分裂不分离 (Non disjunction) 或分裂后期延迟 (Anaphase lag) 的结果。在第一或第二次减数分裂时期,由于两条同源染色体未能分开,而造成子代细胞染色体数目或多或少。

6.1.2 染色体结构异常

染色体局部片段发生异常称为染色体结构异常,常见的异常包括缺失、环状染色体、易位、重复、倒位和等臂染色体等。

(1) 染色体缺失

染色体局部丢失,称为染色体缺失。染色体如果一处出现断裂,无着丝粒的一端常出现丢失,成为末端缺失。如果染色体两处断裂,可造成中间段的丢失。由于遗传基因随染色体断片而丢失,可造成个体出现严重的多发缺陷。

(2) 环状染色体

一条染色体的两端发生断裂,两侧末端片段丢失,断端相互连接,可形成环状染色体。

(3) 易位

当两条非同源染色体同时发生断裂时,断落片段由一条染色体移至另一条染色体的断端上,形成易位染色体。易位可以是平衡性的,也可以是不平衡性的。

在易位发生过程中,可造成染色体片段缺失、基因断裂损伤或位置效应,由

此产生表型异常，称为不平衡易位（Unbalanced translocation）。没有遗传物质丢失且表型正常者，称为平衡性易位（Balanced translocation）。

（4）重复

是指一条染色体的片段移至同源染色体的相应部位，造成同源染色体此片段重复。

（5）倒位

是指一条染色体两处断裂，中间的片段倒转 180°后，再与两断端连接起来，形成倒位。倒位可以发生在两臂间，也可发生在臂内。

（6）等臂染色体

是着丝粒分裂异常所致。正常应是纵裂分开，如果横裂分开，短臂与短臂，或长臂与长臂相接，各形成等臂染色体。

由上可见，断裂是染色体结构重排或结构异常的重要前提。断裂本是常见的生理现象，减数分裂或有丝分裂中均可发生，用姊妹染色单体交换检查方法可查出。尽管断裂经常发生，但大部分可“自愈”，并不引起可察觉的染色体结构变化。断裂后所致染色体的结构畸变的具体原因和机制尚不很清楚，射线照射、病毒感染、药物和环境因素等可促使断裂发生。

6.1.3 染色体病诊断方法的选择

（1）染色体数目异常的检测

方法有传统的染色体核型分析；多色荧光原位杂交技术（Multicolor in situ hybridization, M-FISH），包括染色体涂染（Chromosome painting）和反转染色体涂染（Reverse chromosome painting）；光谱染色体自动核型分析（Spectral karyotyping, SKY）；高通量测序等。

染色体涂染用全染色体或区域特异性探针，通过多彩色FISH使中期细胞特异染色体和间期核呈现不同荧光颜色的条带，常用于识别染色体重组、断裂点分布、鉴别染色体外核物质的起源。反转染色体涂染是用筛选出的畸变染色体与正常染色体杂交来分析畸变染色体的方法，它不仅能区分染色体标志的来源，而且能分辨间隙易位和复杂的标记染色体。

光谱染色体自动核型分析（Spectral karyotyping, SKY）是一项显微图像处理技术，可同时分辨人类的22对常染色体及XY性染色体，并以各种颜色呈现出来。该方法结合了傅立叶频谱、电荷耦合设备成像和光学显微方法，同时计量样本在

可见光和近红外范围内所有点的发射频谱，因而可以使用多个荧光染料的频谱重叠的探针。与一般荧光原位杂交不同的是，SKY同时使用24种染色体的涂染探针，而杂交的靶DNA可以是疾病标本或细胞系的中期染色体。

伴随着基因组和后基因组时代的来临，第一代测序仪已经不能满足高通量测序和重复测序等大规模核酸测序的需求，这就促使自2005年以来诞生了以Roche、Illumina/Solexa和ABI等测序平台为标志的高通量测序技术。

高通量测序通过反复测定同一区域的DNA片段，可以检测包括点突变、基因拷贝数改变和基因重组（染色体移位）等在内的多种基因改变，目前在染色体病的产前检测方面得到了越来越多的应用，全世界平均检测的准确率在97-98%。

（2）染色体畸变的检测

染色体畸变可以通过传统细胞遗传学（染色体核型分析、FISH，M-FISH，CGH）和分子生物学方法（PFGE，Southern blotting，Northern Blotting，Fluorescence Dosage analysis）进行检测。近年出现的以微阵列比较基因组杂交技术（Array-based comparative genomic hybridization, aCGH）为代表的基因芯片技术异军突起，有望取代其它检测方法。

aCGH 技术结合了比较基因组杂交技术（CGH）和微阵列芯片技术（Micro-array）的优势，在分子遗传学中广泛应用于全基因组水平的拷贝数分析。它具有高通量、高分辨、高灵敏度、操作自动化等优势，用外周血、脐血、羊水、绒毛或流产组织中提取的DNA为标本，不仅能检出染色体的非整倍体、大片段的缺失和重复，而且可以发现核型分析等常规技术手段难以检出的因染色体微缺失、微重复、三倍体、单亲二倍体(UPD)及杂合性缺失导致的多达120余微缺失微重复综合征，以及目前临床上尚未定论的染色体微缺失。

6.2 核基因病

6.2.1 单基因遗传病

单基因遗传病是一个或一对等位基因突变引起的遗传病。正常基因发生了突变，称为突变基因。基因突变有3种结果：（1）原有功能不发生改变；（2）导致疾病；（3）促进进化。

完整的基因包括编码区和调控区，不同区域突变的意义不同。编码区的突变可能导致蛋白质序列出现异常，而调控区突变则有可能影响基因的表达水平。这两类突变都可以是单基因病的病因。

目前单基因病已报道 7000 余种，不同民族、不同区域可能存在不同的基因变异位点。因此，不能盲目用国外已报道的突变位点作为中国人群的突变位点进行诊断，必须建立中国人单基因病突变谱库。

(1) 基因的编码区异常

1) 点突变

① 碱基置换突变

一个碱基的改变而造成的突变称为碱基置换突变，其中一个嘌呤为另一个嘌呤所取代，一个嘧啶为另一个嘧啶所取代的置换称为转换。而一个嘌呤为一个嘧啶所替代，一个嘧啶为一个嘌呤所替代则称为颠换。

② 同义突变

同一种氨基酸常有数个密码子，如果一个碱基的改变虽然可使密码子改变，却没有发生氨基酸的改变，这种突变称为同义突变。同义突变不会影响蛋白质的功能。

③ 错义突变

一个碱基的改变使某一氨基酸的密码子变为另一氨基酸的密码子，结果造成蛋白质氨基酸序列发生改变，称之为错义突变。这种突变有的可以影响蛋白质的功能，有的则不产生影响。

④ 无义突变

一个碱基的改变使得原有氨基酸的密码子变为终止密码子，称为无义突变。无义突变可以由碱基置换产生，例如，酪氨酸密码子 UAG 变为无义密码子 UAG。也可以由移码产生，例如野生型的一部分核苷酸顺序是...AAG、GUC、GCU、AGG...，它所编码的氨基酸是.....赖氨酸、缬氨酸、丙氨酸、丝氨酸。由于核苷酸 G 的插入而成为...AAG、GGU、CGC、UAG...时，它所编码的氨基酸便成为赖氨酸、甘氨酸、精氨酸、无义密码子 UAG，肽链合成就此为止。

⑤ 移码突变

一个或少数几个相邻核苷酸的增加或减少，造成这一位置之后的编码区域发生移位，使得原有的密码子发生错误，称为移码突变。

2) 缺失突变

由于 DNA 片段的缺失而发生基因突变。缺失的范围如果包括两个基因，可称为多位点突变。由缺失造成的突变不会发生回复突变。所以严格地讲，缺失应

属于染色体畸变。

3) 插入突变

一个基因的 DNA 中如果插入一段外来的 DNA，其结构便被破坏。插入的 DNA 可以通过切割而去除，准确的切割可以使突变基因回复成为野生型基因。

(2) 基因的调控区序列异常

基因的调控区主要包括启动子、3'非翻译区 (3'UTR)、增强子和沉默子等。调控区的异常可以分为 DNA 序列异常和修饰异常。

1) 调控区 DNA 序列异常

① 启动子序列变异

人类基因的启动子是 RNA 聚合酶结合位点周围的一组转录调控元件，每一个元件长度约为 7-20bp。启动子包括至少一个转录起始点以及一个以上的调控元件。这些元件中最具典型意义的是 TATA 盒，它的共有序列是 TATAAAA。TATA 盒通常位于转录起始点上游-25~-30bp，控制转录起始的准确性及频率。TATA 盒是基本转录因子 TFIID 结合位点。除 TATA 盒外，GC 盒 (GGGCGG) 和 CAAT 盒 (GCCAAT) 也是很多基因常见的，它们通常位于转录起始点上游-30~-110bp 区域。转录起始位点发生变异可以影响转录产物的长短，调控元件及其周边序列的变异可以影响基因的转录水平，从而导致疾病的发生。

② 增强子序列变异

增强子是远离转录起始点 (1~30kb)、决定基因的时间或空间特异性表达、增强启动子转录活性的 DNA 序列，其发挥作用的方式通常与方向和距离无关。增强子也是由若干有功能的元件组成，有些元件既可在增强子，也可在启动子中出现。这些元件是特异转录因子结合 DNA 的核心序列。通常情况下，没有增强子存在，启动子不能表现活性。没有启动子时，增强子也无法发挥作用。增强子序列变异可以影响基因的表达水平。

③ 沉默子序列变异

某些基因含有的一种负性调控元件，当其结合特异蛋白因子时，对基因转录起阻遏作用甚至导致基因表达沉默，称为沉默子。沉默子序列发生变异时，可能促使某些基因表达水平上升。

2) 调控区 DNA 修饰异常

① DNA 甲基化

基因调控区如果存在 CpG，其中的胞嘧啶 C 就有可能发生甲基化。如果发生甲基化的 CpG 处于重要的调控元件中，就会减弱甚至沉默基因的表达。

②DNA 羟甲基化

5-羟甲基胞嘧啶（5hmC）是新发现的一种的修饰碱基，以低水平存在于哺乳动物的多种细胞类型中。5hmC 是 10-11 易位（TET）家族的酶通过氧化 5-甲基胞嘧啶（5mC）产生的。

5hmC 不仅能够降低 MeCP 蛋白的甲基化结合结构域(MBD)与甲基化 DNA 的亲中性，具有潜在的参与基因表达调控的转录调节功能，而且参与了 DNA 去甲基化过程。5hmC 分布具有组织特异性，可能成为某些遗传病的分子标志物。

3) 基因剪接区序列异常

DNA 和 RNA 测序结果表明，90%的人类基因存在一个以上的剪接变异体或亚型，这一情况称为可变剪接，可以发生基因剪接的区域称为基因剪接区。一个基因通过可变剪切产生多种具有不同的生物学功能的蛋白质。可变剪切使人类基因组产生更多的转录产物，据估计大约多出 20000 个蛋白质。可变剪切是一个严格规范的过程，许多人类疾病与错误调节的剪接相关。

6.2.2 多基因遗传病

多基因遗传病是指遗传信息通过两对及两对以上致病基因的累积效应所致的遗传病，其遗传效应较多地受环境因素的影响。与单基因遗传病相比，多基因遗传病不是只由遗传因素决定，而是遗传因素与环境因素共同起作用。

在多基因病中，遗传因素所起的作用大小叫遗传度，用百分数表示。如精神分裂症的遗传度为 80%，表明在该病的形成过程中，遗传因素占据了 80%的份额，而环境因素所起的作用则相对较小。

多基因遗传病的易患性是属于数量性状，它们之间的变异是连续的。符合孟德尔式遗传规律的单基因病的遗传性状是属于质量性状，它们之间的变异是不连续的。

6.2.3 核基因病中突变诊断的方法选择

(1) 缺失突变的诊断

部分单基因病是由于较大片段的缺失引起的。比如， α 地贫中绝大多数病人存在 α 珠蛋白基因的缺失。对于这类突变常用检测的方法有 Southern blotting，实时 PCR，多重连接探针扩增技术（MLPA）等。具体方法的选择可根据缺失片

段的大小、实验室具备的条件来确定。随着基因芯片和高通量测序技术的发展，它们越来越多地应用于缺失突变的检测。

(2) 点突变的诊断

点突变是单基因病中最常见的一种突变方式。目前常用的检测方法主要包括限制性片段长度多态性分析 (RFLP)、PCR 加 Sanger 法测序、变性高压液相色谱技术 (dHPLC)、MassARRAY、实时 PCR、多色熔解探针分析、HRM 等。

高通量测序技术目前开始应用于点突变的检测。由于该项技术的检测通量很高，因此它可以同时对一组相关基因的突变进行检测，这不仅能够提高单基因病突变的检出率，而且大大降低了常规分子诊断对临床诊断和生化检测信息的依赖性。

(3) 基因甲基化修饰的诊断

目前甲基化修饰的检测主要分为全基因组检测和特定基因检测两个不同的层次。

全基因组甲基化主要采用高通量测序和甲基化芯片的方法。它们通过 5 甲基胞嘧啶抗体富集甲基化的区域，然后进行高通量的检测。

特定基因甲基化检测主要采用甲基化特异 PCR (MSP)、HRM、焦磷酸测序等方法。这些方法的共同之处在于检测之前均需对 DNA 样本进行亚硫酸氢盐处理。

6.3 线粒体病

线粒体病是指以线粒体功能异常为主要病因的一大类疾病。除线粒体 DNA 突变直接导致的疾病外，编码线粒体蛋白的核基因突变也可引起线粒体病，但这类疾病表现为孟德尔遗传方式。通常所指的线粒体病即线粒体 DNA 突变所致的线粒体功能异常。

线粒体病是一组多系统疾病，因中枢神经系统和骨骼肌对能量的依赖性最强，故临床症状以中枢神经系统和骨骼肌病变为特征，常见的线粒体病包括 Leber 遗传性视神经病、线粒体脑肌病、氨基糖苷类药物性耳聋、线粒体糖尿病等。

线粒体病通常累及多个系统，表现型有高度差异。不同的 mtDNA 突变可导致相同疾病，而同一突变也可引起不同表型，并且通常与突变 mtDNA 的异质性水平和组织分布相关。

6.3.1 线粒体基因组的结构特点

线粒体是一种存在于大多数细胞中的由两层膜包被的细胞器，直径在 0.5 到 10 微米左右。不同细胞的线粒体在大小、数量及外观等方面上都有所不同。线粒体是细胞内氧化磷酸化和合成三磷酸腺苷（ATP）的主要场所，为细胞的活动提供了能量，所以有“细胞动力工厂”之称。除了为细胞供能外，线粒体还参与诸如细胞分化、细胞信息传递和细胞凋亡等过程，并拥有调控细胞生长和细胞周期的能力。

线粒体拥有自身的遗传物质，称为线粒体 DNA（mtDNA）。mtDNA 为环状双链 DNA 分子，外环为重链（H），内环为轻链（L）。mtDNA 基因排列非常紧凑，无内含子序列。人类 mtDNA 长 16569bp，包含 37 个基因，其中 22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因（12S 和 16SrRNA）和 13 个多肽基因。

6.3.2 线粒体 DNA 的突变类型

确定一个 mtDNA 是否为致病性突变，有以下几个参考标准：

- （1）突变发生于高度保守的序列，或者突变位点有明显的功能重要性；
- （2）突变可引起呼吸链缺损；
- （3）正常人群中未发现该 mtDNA 突变类型，在来自不同家系但有类似表型的患者中发现相同的突变；
- （4）有异质性的存在，而且异质性程度与疾病严重程度存在相关性。

mtDNA 的点突变 2/3 发生于编码 tRNA 和 rRNA 的基因，1/3 点突变发生于编码 mRNA 的基因。大片段缺失往往涉及多个基因，可导致线粒体氧化磷酸化功能下降，产生的 ATP 减少，从而影响组织器官的功能。

常见的大片段缺失有以下几种：

- （1）8483~13459 缺失：见于 KSS 综合征和缺血性心脏病；
- （2）8637~16073 缺失：见于与衰老有关的退行性病变；
- （3）4389~14812 缺失：能量代谢严重破坏。

mtDNA 突变率比核基因组 DNA 高 10~20 倍，其原因在于：

- （1）mtDNA 中基因排列紧凑，任何突变都可能会影响到基因组内某一重要功能区域；
- （2）mtDNA 是裸露的分子，不与组蛋白结合；
- （3）mtDNA 位于线粒体内膜附近，直接暴露于呼吸链代谢产生的超氧离子和电子传递产生的羟自由基中，极易受氧化损伤；

(4) mtDNA 复制频率较高，复制时不对称；

(5) 缺乏有效的 DNA 损伤修复能力。

6.3.3 线粒体基因遗传方式

在精卵结合时，卵母细胞拥有上百万拷贝的 mtDNA，而精子中只有很少的线粒体，受精时几乎不进入受精卵。因此，受精卵中的线粒体 DNA 几乎全都来自于卵子，来源于精子的 mtDNA 对表型无明显作用，这种双亲信息的不等量表现决定了线粒体遗传病的传递方式不符合孟德尔遗传，而是表现为母系遗传 (Maternal inheritance)，即母亲将 mtDNA 传递给她的儿子和女儿，但只有女儿能将其 mtDNA 传递给下一代。

人体不同类型的细胞含线粒体数目不同，通常有成百上千个，而每个线粒体中有 2~10 个 mtDNA 分子。绝大多数细胞中有多种 mtDNA 拷贝，其拷贝数存在器官组织的差异性。

由于细胞中存在多拷贝的 mtDNA，因此线粒体病会表现出不同于核基因病的胞内异质性水平变化。异质性细胞的表现型依赖于细胞内突变型和野生型 mtDNA 的相对比例，能引起特定组织器官功能障碍的突变 mtDNA 的最少数量称阈值。阈值易受突变类型、组织、老化程度变化的影响，个体差异很大。

线粒体病的临床多样性与发育阶段有关。突变 mtDNA 随年龄的增加在细胞中逐渐积累，因此线粒体病的表现会因年龄增长而渐进性地加重。

6.3.4 常见线粒体病

(1) Leber 遗传性视神经病

Leber遗传性视神经疾病 (Leber hereditary optic neuropathy, LHON) 是一种罕见的眼部线粒体疾病。于1871年由Leber医生首次报道，因主要症状为视神经退行性变，故又称Leber视神经萎缩。常有家族病史，有时可有类似多发性硬化症的症状。

线粒体DNA突变是LHON发病的分子基础。目前已经报道10个LHON相关的原发突变，位于编码线粒体呼吸链复合体 I 的亚基上，其中三个原发位点ND4 m.11778G>A, ND1 m.3460G>A和ND6 m.14484T>C突变占95%以上。这些突变导致进化中高度保守的氨基酸发生改变，使编码蛋白质空间结构和功能稳定性发生改变，从而造成线粒体功能障碍和ATP代谢功能障碍，最终造成视网膜神经节细胞退行性变导致视力损伤。

(2) 氨基糖苷类药物性耳聋

氨基糖苷类药物性耳聋是指由于使用氨基糖甙类抗生素（Aminoglycoside antibiotics, AmAn）而导致的耳聋。对常规量AmAn易感的耳聋具有母系遗传的倾向，以线粒体12S rRNA基因m.1555A>G突变和m.1494 C>T突变最为常见。

(3) 糖尿病

糖尿病是由遗传和环境因素相互作用而引起的，一些2型糖尿病患者具有明显的遗传背景，其中部分患者发病与线粒体基因突变有关，1992年van den Ouweland等首次发现1个糖尿病家系带有线粒体tRNA^{Leu}（UUR）基因突变即m.3243A>G的点突变，mtDNA点突变或缺失可影响β细胞功能。1997年美国糖尿病学会将其归为特殊类型糖尿病中β细胞遗传性缺陷疾病。随后陆续有线粒体tRNA^{Lys}基因c.8296A>G；tRNA^{Leu}（UUR）基因：m.3256C>T，m.3264T>C，m.3205C>T；ND1基因m.3316G>A，m.394T>C，m.3423G>T；12srRNA基因m.1438A>G，m.1310T>C等多个与糖尿病有关的位点突变报道。

尽管线粒体基因突变与糖尿病的关系在国内外已进行大量研究，发现了几十个突变位点，但tRNA^{Leu}(UUR) m.3243A>G仍是目前国际上唯一公认的线粒体糖尿病致病突变，也是国内外报道最多，发病率较高的单基因糖尿病突变位点。

(4) MERRF综合症

MERRF综合症（Myoclonus Epilepsy and Ragged-red Fibers, MERRF），即肌阵挛性癫痫伴碎红肌纤维病。是一种罕见的、异质性母系遗传并具有多系统紊乱的症状。主要病变位于mtDNA基因组中赖氨酸转移RNA基因（MT-TK）。突变位点为m.8844A>G、m.8356T>C、m.8363G>A和m.8361G>A。m.8844A>G突变占所有突变的80%，其余三个突变约为10%。mtDNA第8344位点（位于tRNA^{Lys}基因处）A→G的碱基置换，破坏了tRNA^{Lys}中与核糖体连接的TΨC环，结果影响了OXPHOS复合体I和复合体IV的合成，造成OXPHOS功能下降，导致患者多系统病变。

(5) MELAS综合症

MELAS综合症又称线粒体肌病脑病伴乳酸酸中毒及中风样发作综合症（Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like Episodes, MELAS），是最常见的母系遗传线粒体病。在儿童期发作，累计多个器官系统的疾病。

MELAS的分子特征是线粒体tRNA的点突变，约有80%的患者是线粒体tRNA^{Leu(UUR)}基因的3243A→G的碱基置换，该位点是转录终止子的结合部位，进化上高度保守，突变导致tRNA^{Leu(UUR)}基因结构异常，转录终止因子不能结合，rRNA和mRNA合成的比例发生改变。

m.3243A>G异质性程度与疾病严重程度呈正相关。肌组织中m.3243A>G突变型mtDNA达40%~50%时，出现CPEO、肌病和耳聋，达90%时，可出现复发性休克、痴呆、癫痫、共济失调等。

7. 遗传病诊断结果的报告和解释

遗传病细胞与分子检测是在遗传咨询基础上开展的实验室检测。而实验室的检测结果也必须由临床咨询医师结合病人的临床症状进行合理的解释。遗传病的实验室检测报告也应与现有的或已建立的实验室检测报告的标准一致。

7.1 总体原则

检测报告中应当包括以下内容：

1、检测样本的识别信息包括病人姓名、病人出生日期（产前诊断应同时列出目前年龄和孕周）、标本采集时间、实验编码、标本类型、送检医生、检测方法、报告时间等。

2、对检测到的结果有清楚的描述。必要时需包括检测的正常范围、阳性判断值（Cut-off）等。

3、针对相应的遗传检测目的，应对实验结果有解释性的表述（可能包括对风险率的估计）。

4、对遗传检测实验的局限性（如实验技术的局限性和临床有效性、非父源性等）应有清楚的解释和描述。

5、在估计风险率的结果报告中，需清楚描述用以计算风险率的信息和数据。

6、实验检测结果需有实验室负责人和审核人的签字。

7.2 细胞遗传学实验的检测报告

检测报告中需包括进行检测的意义、染色体计数和核型分析所采用的细胞数目、细胞培养的时间、条件和应用的显带方法、ISCN核型描述、嵌合体问题的解决方法、结果与临床的相关性、异常结果的可能解释、对家庭或病人进一步检查的建议、结果意义的讨论和对是否进行遗传咨询的建议等。

7.2.1 中期荧光原位杂交（FISH）的报告

大多数情况下，中期 FISH 应视为常规核型分析的辅助检测手段。各实验室应对每个检测实验的临床有效性、敏感性和特异性进行评估后再应用于临床检测中。临床有效性的要求应根据每个实验室所采用的实验或仪器而不同。检测结果报告中应包括：试剂来源和应用的探针（基因标记或位点标记）、分析的细胞数目、实验的局限性。

中期荧光原位杂交仅提供疑似位点的探针部位信息，不能替代完整的核型分析。对以下情况的检测结果的解释需谨慎：

- （1）在现有的全染色体的探针组合尚不能均匀覆盖目的染色体的情况下，长度较短的染色体的延伸区域的结果；
- （2）基于重复序列的探针所产生的隐性结果；
- （3）在应用 FISH 检测染色体微小缺失时，所用探针并不是疾病的候选或疑似基因时。

另外在结果报告中，根据检测实验室自己所建立的参考范围的有效性，应当对嵌合体的可能性进行相应描述。若怀疑有微重复，在解释中期 FISH 结果时需谨慎，某些情况下建议采用间期 FISH 结果进行解释。

7.2.2 间期（核）荧光原位杂交（FISH）的报告（不包括各种情况）：

间期荧光原位杂交仅提供疑似位点的探针部位信息，不能替代完整的核型分析。检测到的染色体异常如应用常规核型分析可检测到，建议应用常规核型分析进行确认。如检测到的染色体异常为其他实验室或以往实验已检测到，经重复 FISH 实验仍检测到同样的异常，则不必再进行染色体分析。当探针为非疑似的疾病基因，检测到的结果为微缺失或微重复时，应对方法的局限性进行描述。

7.3 分子遗传学实验的检测报告

针对不同的检测方法，应在实验室内建立相应的检测结果判断和诊断标准。尤其应对检测方法的选择、实验标记物的选择（连锁分析的标记物）、检测系统、阳性标记（如 PCR 产物的长度）等进行临床有效性、敏感性和特异性的质量评估。

分子遗传学检测的报告中应包括实验 / 疾病检测的原因、采用的检测方法、检测的目的位点、个体的基因型、检测到的突变位点、结果的解释（临床意义）、需要进行的随访建议、遗传咨询建议等详细内容。如检测方法为连锁分析方法，检测报告中应包括家系和基因型信息。需要指出的是，任何的遗传学检测报告都

应注意保护患者和其他家庭成员的隐私。因此，建议检测实验室为临床医生和先证者提供不同版本和不同信息的实验检测报告。

在检测报告中，检测实验室可根据不同的检测方法为病人或临床医师提供专业的实验报告解读，以帮助临床医生作出正确诊断。但需注意，检测报告的解读不能替代临床医生进行诊断。所有的检测结果应由两名以上人员进行独立解读，其中一名必须为实验室主任或实验室负责人或其他有资质的人员。对所有存在问题或数据不一致的结果，必须在具有另外的补充实验分析情况下，由具备资格的人员进行判断处理。检测结果可参考应用已知基因型的家族内成员作为对照进行分析解释。由于定量分析结果的可靠性明显小于定性（阴 / 阳性）分析结果，因此必须应用内部对照来确保检测的准确性。对 PCR 分析，需考虑到不同扩增产物的可能性。

以 DNA 测序为例，结果的报告和解释还应包括以下内容：

- 1、预测碱基的变异与已知基因结构和其它数据的相关性、碱基变异对基因的影响。
- 2、报告中需注明单核苷酸在基因库（Genebank）中参考序列的位置和变化、相应的蛋白质变化的标准位置。
- 3、碱基的错义变异需注明是否代表突变、多态性或稀有变异。对每个遗传病，实验室均应首先以相应的数据库为参考依据。如检测到的变异为新的突变，而突变的性质和意义目前可能并不明确，应当在报告中表明。
- 4、如未检测到突变，报告应对此阴性结果的可能性原因进行的解释和描述。例如，可能为检测的敏感度<100%、测序仅局限在基因的编码区而突变可能在未涵盖的内含子或启动子区、应用的测序方法并不能检测到大的基因缺失和重复，其它基因也可能导致疾病等。

全外显子或全基因组二代测序的报告和解释还应包括以下：

- 1、所有检测到的基因变异均应根据国际标准进行评估和分类；
- 2、对变异所导致的基因功能或基因产物和对疾病的可能性影响以及现有的证据进行评估；
- 3、对覆盖大范围表型的检测，还应对是否与病人的临床表现相符进行对比评估；
- 4、如检测到多个具有临床意义的变异，每个变异与临床表现的相关性都应

涉及到。

偶然发现的可能变异或不具有临床意义，检测实验室应建立相应的程序和标准。应根据国际标准对检测到的变异进行标注 (www.genenames.org)。变异的标注方式应包括基因名称、杂合 / 纯合性，cDNA 命名、蛋白质命名、外显子序号等。在检测报告中应清楚标明，是否检测到了可解释病人疾病的突变。如突变并不明确解释疾病，应对可能的情况进行解释。在检测报告中还应列出相应的支持证据。当采用的二代测序方法尚不能覆盖所有基因，应在检测报告中注明实际可覆盖的基因和基因区域。在应用二代测序的检测报告中，应清楚注明检测的局限性，并对数据处理方法和过程予以描述。

8. 遗传病检测实验室设计要求

实验室设置的基本原则是能够确保检测过程的正常运行、确保检测结果的准确性、确保实验室的可持续发展、及确保实验室工作人员的安全。本部分主要描述涉及检测过程的实验室设置。实验室设置所需遵循的具体原则详见《个体化医学检测质量保证指南》。实验室的安全保护设施与措施可参照《实验室生物安全通用要求》(GB19489-2008)和《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则(WS 233-2002)》。

8.1 细胞遗传学检测实验室的设计

主要指开展染色体核型分析、FISH 等细胞遗传学检测的实验室。实验室的设置应根据开展工作的内容、工作量的多少、工作人员多少、以及各单位具体情况安排。一般应当具有以下基本设置：

8.1.1 制片室

进行标本接种、收获、制片、染片的场所。需配置耐酸碱水池、耐酸碱实验操作台等、冰箱、电热干燥箱、离心机等仪器，以方便使用。

实验室最好具备通风橱或者其他通风换气设施，减少冰乙酸、甲醇等挥发性试剂对操作者的影响。

8.1.2 培养室

用作细胞的接种培养。培养室需放置超净工作台、培养箱、紫外线光源（固定及可移动紫外灯）、冰箱等设备仪器。对于羊水细胞、绒毛等较为珍贵、重复取样可能性差的样本，培养室最好具备缓冲间和风淋的无菌室，以最大程度减少污染的可能性。

培养室应设在实验室最里面的位置，以利于防止空气流通引起污染。部分细胞培养试剂的配制也可在培养室进行。

8.1.3 阅片室

观察分析核型的场所。需配备显微镜，电脑、打印机、办公桌等；根据工作量和单位条件可配置全自动细胞遗传工作站（Cytovision Genetic Workstation），进行 FISH 检测的实验室还必须设置暗室、配备荧光显微镜。

8.1.4 资料室

用于储存和管理染色体玻片和其他信息档案。

8.1.5 准备室

普通试剂配制及清洗玻璃仪器的场所。应配备天平、pH 计、冰箱、恒温干燥箱、高压蒸汽灭菌器、其他玻璃器皿及各种日常应用物品。使用非一次性玻璃器皿的单位，还应当具备耐酸碱水池，和适当的生物污染物处理系统。

8.2 分子遗传学检测实验室的设计

目前使用的临床分子生物学检测实验主要是基于 PCR 扩增、探针杂交或者核酸测序技术。因此，分子遗传学检测实验室的基本设置参考《医疗机构临床基因扩增检验工作导则》进行。涉及临床基因扩增技术的，实验室分区、空气流向、人员工作流向、实验室各区域工作注意事项等也应符合《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》的要求。

此外，临床分子生物学实验室还应当特别注意以下方面：（1）实验室一般会涉及有毒、有害化学试剂或者具有生物污染的血液、体液、组织样本。因此，分子实验室还应当配备安全防护、急救设备和污染物处理措施。（2）涉及产前诊断的分子检测实验室，其样本及实验记录的管理应当符合《产前诊断技术管理办法》相关文件，实验室设计时需考虑这类资料管理的特殊要求。（3）部分试剂、分子检测设备对环境的特定要求。

8.3 对检测实验室人员及设备的要求

8.3.1 对检测人员的要求

检测人员是完成遗传病检测的关键要素。遗传病个体化检测对检测人员的要求主要表现在以下方面。

人员数量与岗位配置：实验室应当配备适当数量的人员，并保证所有人员得到适当的岗位职责配置，以保证检测结果的准确性和检测过程的高效率。一般来

讲遗传病检测实验室应当设置遗传咨询医师、实验室主任、技术负责人、实验室主管以及普通的技术人员等岗位。

人员的资质要求：不同岗位的工作人员应当分别具备相应的技术及理论能力。我国目前尚无临床医学遗传专业技术职称，不同岗位人员的资质要求可以参考美国医学遗传学会（The American College of Medical Genetics and Genomics，ACMG）的相关文件，并结合实验室和本机构具体情况具体实施。从事分子遗传检测的 PCR 技术人员一般应当经过临床基因扩增检验技术人员上岗培训，取得 PCR 上岗证。从事遗传病产前筛查/产前诊断和新生儿遗传代谢病筛查的技术人员，还应当符合《产前诊断技术管理办法》相关配套文件《从事产前诊断卫生专业技术人员的基本条件》、《新生儿疾病筛查技术规范》的相应要求。

人员的管理：实验室应当有计划地对相关检测人员进行资格确认、培训、考核和监督，其目的是保持和提高检测人员的质量意识、技术水平和业务能力，确保人员的素质满足检测要求。实验室应当建立相应的检测人员的技术管理程序文件，保证培训、考核等管理活动的目的性和有效性。检测技术人员需进行上岗培训和在岗持续培训。同时实验室的技术主管还要对检测人员进行定期考核，尤其是当检测人员发生以下情况时：人员的职责发生改变；实验室的政策、过程、程序、技术方法更改；人员离岗时间达到 6 个月以上等。

8.3.2 设备维护和校准

实验室应设立常用仪器的维护及校准制度，以保证检测工作正常运转。

实验室应对检验有较大影响的关键设备建立设备档案，档案应至少包括：

- （1）设备及其软件的名称；
- （2）制造商名称、型式标识、系列号或其他唯一性标识；
- （3）制造商的说明书（如果有），或指明其地点；
- （4）所有检定/校准报告或证书；
- （5）设备接收/启用日期和验收记录；
- （6）设备使用和维护记录；
- （7）设备接收/启用日期和验收记录；
- （8）设备的任何损坏、故障、改装或修理记录。

实验室应按不同仪器设备说明书或维护保养规程委托国家法定部门或厂家对仪器设备进行定期保养维护和校准，并保留校准记录。当校准产生修正因子时，

设备管理员应将最近一次的修正因子标识在设备的明显部位，确保操作人员得到正确应用。

使用人员发现仪器设备有过载或错误操作、或显示的结果可疑、或通过其他方式表明有缺陷时，应立即停止使用，并报告相关负责人做好记录；对不能立即恢复使用的设备加贴故障标识，如可能应将其储存在规定的地方直至修复；修复设备恢复使用之前必须经过相应的校准或者确认。

9. 遗传病个体化医学检测的质量保证

9.1 标准操作程序（Standard Operation Procedure, SOP）

遗传病个体化检测实验室应当建立 SOP 文件体系，以保证检测各环节的标准、有序进行，确保检测结果的真实性、准确性和可重复性。SOP 文件及其相关记录表单的编写应当注意确保准确性和可操作性，一般由技术管理部门组织编写、审核、发放和修订，实验过程中应严格执行 SOP，不能擅自修改。遗传病个体化检测实验室 SOP 文件包括但不限于以下要素：

- （1）仪器设备的维护保养程序；
- （2）仪器设备的校准程序；
- （3）仪器设备的操作程序；
- （4）标准物质的管理和核查程序；
- （5）临床标本的收集程序；
- （6）临床标本的处理（核酸纯化）程序；
- （7）临床标本的贮存程序；
- （8）检测方法的选择及使用程序
- （9）核酸扩增及产物检测、分析的操作程序（可根据实验室开展项目生成针对不同具体检测方法的多个 SOP 文件）；
- （10）标准方法证实与非标方法确认程序；
- （11）室内质量控制程序；
- （12）试剂的质检操作程序；
- （13）实验室消耗品购买、验收和贮放程序；
- （14）实验室废弃物及生物污染的处理程序；
- （15）实验室的清洁程序；
- （16）文件控制程序；

- (17) 记录/报告的制作和保管程序
- (18) 电子数据保护程序
- (19) 保密管理程序
- (20) 实验室安全管理程序；
- (21) 纠正和预防措施程序
- (22) 抱怨/投诉处理程序；
- (23) 实验室人员管理程序。

9.2 质控品和室内质量控制

9.2.1 质控品的使用与要求

遗传病检测实验一般包含如下程序：样本处理、细胞培养或者酶切/扩增/杂交、目标检测与分析。在所有环节中应当尽可能使用适当的质控品进行质控。涉及人基因组的检验项目，可包含如下质控品：（1）阴性质控品：判断假阳性反应，人类遗传病检测中应当使用经过确认的正常对照或者标准品；（2）阳性质控品：判断假阴性反应，需要考虑纯合子、杂合子等不同阳性情况；（3）内对照：监测提取/酶切/扩增/杂交等环节的效率是否符合要求；（4）空白对照（无模板）：检测实验体系是否存在外源污染。此外，根据实验特点，还应当适时采用标准分子量 marker、片段长度 marker 等对照品进行质控。

实验室应当保证外来质控品的稳定性和同质性，以避免质控品本身带来的影响。质控品应当首选标准品，在无标准品或标准品不易获得的情况下，阴性质控品也可以选用经过确证的已知阴性样本；阳性质控品也可以选用经过确证的已知阳性样本，或者经过验证的疾病相关细胞系或体外构建的含已知突变基因的质粒等，优选的原则是对照标本的特征尽可能接近临床样本。在检测目标可能存在多种突变可能性或者复杂复合突变，检测结果不可预测时，可以采用最常见的一种突变作为阳性对照，此时，若出现对照之外的结果，应当考虑验证实验进行确认。

9.2.2 室内质量控制

人员、实验室设备/设施、试剂与耗材、检测与分析方法，均可能影响遗传病检测实验质量的可靠性。实验室应当对涉及检测各阶段（检测前、检测中、检测后），可能存在不确定性或者产生偏差与错误的环节进行有计划的监督和内部质量控制。室内质量控制应当包含所有的检测项目，分为日常质控与阶段性质控两种形式进行。遗传病检测的室内质量控制应当符合《个体化医学检测质量保证

指南》要求。

(1) 日常室内质量控制

遗传病检测的各个环节均应当根据实验特征设置质控措施。一般检测实验中需要同时设立阴性质控（正常对照）、阳性质控、内对照，基于 PCR 的检测实验还应当设立不含模板的空白对照。质控样本要与待检样本同时检测。对分子诊断中的定量检测，如游离 DNA 浓度等，可以采用标准曲线或者统计学方法进行室内质量控制。一次检测中质控品的设置数目与检测系统的稳定性、试剂的稳定性、罕见突变质控品的可获得性、检测样本的数目等相关。一般情况下可按照以下原则设定室内质量控制：1) 如果只检测 1 个基因突变，且标本量不多于 30 份，一套质控样本即可。部分基于正常对照进行结果判断的相对定量实验，可适当增加阴性（正常）对照品的数量。2) 当同时检测多个突变基因时，可以根据实验室自身的条件，可只设立能最灵敏地反映检测问题的 2 个或 3 个突变基因的阴阳性质控，下次检测改用跟上次不同的基因突变的阴阳性对照，依次类推，循环往复。

进行产前诊断的检测项目，除了考虑外源污染外，还应当考虑到母体细胞污染的可能性。因此，除外以上对照的设置，必要时应当进行母体污染排除实验。

实验室还应当常规对每批次检测试剂进行验收、质检，并确保其正确储放和使用。

(2) 阶段性质控

除了在日常质控中使用标准品或者对照品外的，还应当根据情况，有计划地采用留样复测、同一样本的人员比对、不同方法同一样本比对、标准品检测、设备期间核查等方式对检测系统的稳定性、仪器设备、新进人员等环节进行阶段性质控。

(3) 实验室应当规定室内质量控制相关的内容包括：

质控品的来源；质控品的制备方案（如为自制质控品）；质控样本的数量；质控样本的放置；质控规则；失控的判定规则；失控的处理和改进措施。

9.3 室间质量评价

室间质量评价是指实验室与本机构之外其他的独立实验室分析同一标本，通过收集、比对不同实验室间的检测记录和结果，判断、评价本实验室的检测能力。遗传病个体化检测实验室的室间质量评价活动应当符合《个体化医学检测质量保证指南》要求。实验室应当参加室间质量评价。如该项目未开展室间质量评价，

需每年进行三家以上实验室，每次涉及3份以上样本的实验室比对。比对实验室应当首选经过遗传病检测质量管理认证的机构，有条件的实验室也可参加美国病理学会（CAP）和美国医学遗传学会（ACMG）组织的分子遗传能力验证项目。

实验室应对每份室间评价结果进行分析和总结。室间质量评价结果不合格或实验室比对结果不符合的，应当分析原因，并采取相应的预防/纠正措施。

实验室室间质量评价应包括但不局限于：室间质评年度计划；室间质评样本检测记录及结果上报程序；对不符合结果分析及整改措施。

10. 常见遗传病分子诊断示例

10.1 Duchenne 肌营养不良（DMD/BMD）基因诊断指南

10.1.1 概述

Duchenne 肌营养不良（DMD，OMIM # 310200）是神经肌肉系统中最常见的X连锁隐性遗传病。患者绝大多数为男性个体，国外报道，DMD发病率为活产男婴的1/3500。通常在4—5岁时发病，主要临床特征是骨骼肌的进行性无力、萎缩和腓肠肌的假性肥大及血清肌酶显著增高。肌电图表现为肌源性损害，肌肉收缩时动作电位波幅降低、间隙缩短，单个运动单位的范围和纤维密度减少，多项电位中度增加。肌肉活检可见肌纤维横切面变圆、直径大小不一，肌纤维萎缩变性，脂肪及结缔组织增生。患者血清学指标中磷酸肌酸激酶（CPK）高度升高（后期升高不明显），并伴有肌红蛋白（Mb）、丙酮酸激酶（PK）活性升高，醛缩酶和谷草转氨酶也可增高，尿中肌酸增加，肌酐减少。本病可累及心肌和心脏传导系统，出现心电图异常改变该病预后不良，通常在20岁左右因呼吸和心力衰竭死亡。

与DMD的临床表现相似但预后较好的称为贝克尔肌营养不良（Becker Muscular Dystrophy，BMD，OMIM # 300376），发病率约为1/30000。BMD症状较轻，患者寿命较长，且有生育能力，一般以12岁能否还能行走来区分DMD和BMD。

进行性肌营养不良的致病基因是位于X染色体Xp21.2区的DMD基因（也称抗肌萎缩蛋白基因，*dystrophin*）。DMD基因是目前已发现的最大的人类基因之一。该基因的总长约2300kb（2.3Mb），含79个外显子，cDNA全长13974bp，编码分子量为427kd，含有3685氨基酸的肌细胞膜骨架蛋白，该蛋白与糖蛋白结合形成复合体后发挥稳定细胞膜的作用。而在DMD/BMD病人中，由于缺乏抗肌萎

缩蛋白，故细胞膜变得不稳定，导致肌细胞的坏死。*DMD*基因的部分缺失或重复是导致*DMD*和*BMD*发生最主要的病因。目前对*DMD*/*BMD*尚无有效的治疗方法，因此应用简便、准确的方法检测致病基因携带者及提供产前基因诊断就成为预防与减少发病的唯一有效途径。

10.1.2 *DMD*/*BMD* 的基因诊断

(1) *DMD*/*BMD* 基因诊断技术的发展

上世纪八十年代中期，人们从人类X染色体Xp21区中分离得到一系列基因组探针，并对这个区域的RFLP进行了大量的研究，因此RFLP连锁分析是那一时期对*DMD*和*BMD*进行基因诊断的主要途径。

随着*DMD*基因全长cDNA探针的应用，人们发现*DMD*基因的部分缺失是导致*DMD*和*BMD*最主要的分子病因，并发现了缺失的热点，因而针对这些热点的多重PCR技术应运而生，逐渐发展成为对相关病人进行基因诊断的主要技术。此外，RT-PCR的分析技术也逐渐引入*DMD*和*BMD*的基因诊断中，用于对外显子缺失、mRNA拼接异常的检测。

由于*DMD*基因内的短串连重复序列(CA)_n多态性的发现，基于PCR技术的多态性连锁分析也成为对非缺失型*DMD*和*BMD*病人进行基因诊断以及检测携带者的有效手段。

2002年，多重连接探针扩增 (Multiplex Ligation-dependent Probes Assay, MLPA)技术的出现成为*DMD*基因诊断史上具有标志性的事件。该技术因其灵敏、准确和高效等的优点，已成为临床基因诊断*DMD*基因片段缺失或重复最主要的技术手段，MLPA商业化的基因诊断试剂盒已广泛应用于临床实践，取得了很好的效果。

虽然，*DMD*基因诊断的技术日益丰富、完善，但是由于该基因庞大、突变类型繁多，常规的基因诊断技术很难对所有病人都进行准确的基因诊断，总有数量不少的病人无法检出突变，对该疾病的诊断和预防带来了很大的困扰。近年来，以高通量DNA测序技术为代表的新一代基因诊断技术发展迅速，已经能够在全基因组的水平进行准确的分子诊断，因此人们开始考虑采用这些技术进行*DMD*的基因诊断。目前高通量测序技术已应用于*DMD*基因突变的检测，对缺失型和非缺失型的*DMD*病人均能进行有效的基因诊断。

(2) 基因缺失/ 重复的检测

Southern印迹法是检测基因缺失/重复的经典方法,但操作较为复杂,且费时。PCR技术的应用使得缺失突变的检测变得更简便、直观,目前DMD/BMD的临床基因诊断主要采用多重外显子PCR扩增法和多重连接探针扩增(MLPA)技术,可以对DMD基因的79个外显子进行缺失/重复分析。此外,还有各种定量检测基因片段缺失的方法可供选择,例如定量-PCR(Quantitative-PCR, Q-PCR)、多重可扩增探针杂交(Multiplex Amplifiable Probe Hybridization, MAPH)等。

联合应用上述各种DNA分析手段,对于DMD患者基因缺失/重复的综合检测能力达到98%。用芯片杂交技术替代电泳来分析MLPA的检测结果,可以克服电泳分析受片段的长度限制,提高了单次检测的效率。

(3) 非缺失型的检测

对于非缺失型DMD突变,应用dHPLC或HRM可以筛查出突变所在的扩增片段,然后通过PCR产物直接测序,确定突变细节。还可应用PCR方法扩增DMD基因内和两端的短串连重复序列(Short Tandem Repeats, STR),并在家系中作遗传连锁分析对DMD进行基因诊断、产前诊断以及杂合子和携带者的检测。

(4) 高通量测序技术在 DMD 基因诊断中的应用

近年来,人们通过特定序列芯片捕获和高通量测序技术结合已经可以对染色体上特定的区域进行高通量、精确的测序。以 DMD 基因为例,过去由于 Sanger 测序技术上的限制无法对全长基因进行测序,使得基因诊断过程中留下了较多的空白点。现在,可以通过芯片捕获的方法来获得 DMD 基因的全长序列或全外显子序列,然后应用高通量测序技术对这些序列进行高通量测序,从而一次性获取待检样本中该基因缺失、重复或点突变的信息,极大地提高了 DMD 基因诊断的效率和准确性。目前国内外已有多家公司和研究机构开展了相关的研究工作,有些已经推向了市场。虽然该技术现在还未得到官方机构的批准,但是相信不用多久,高通量测序技术将在 DMD 基因诊断中发挥重要的作用,并深刻地改变 DMD 基因诊断的流程。

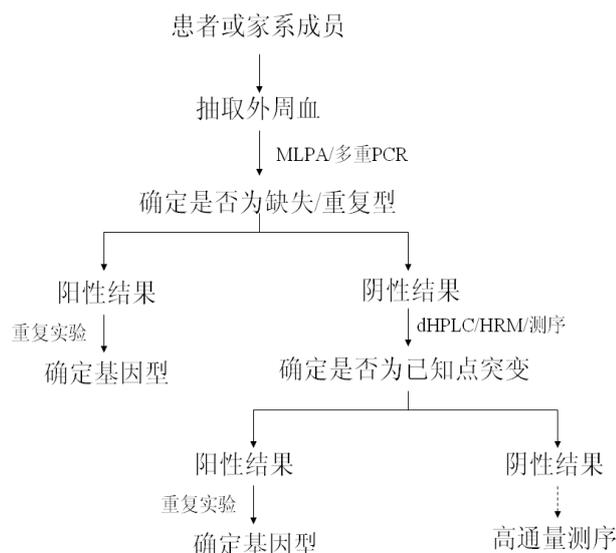


图 8. *DMD* 基因诊断流程

10.1.3 杂合子（携带者）检测

DMD/BMD 是 X 连锁隐性遗传病，女性携带者生育男性患儿的风险是 50%，因此，确定女性携带者身份具有重要的意义。有两类女性需确定携带者身份：患者的姐妹、患者母亲的女性亲属。

(1) 检测缺失/重复突变携带者

应用基因剂量分析，可以较准确地判断女性亲属是否为携带者。*MLPA* 方法是同时检测缺失和重复两种突变携带者的主要方法。

(2) 连锁分析检测携带者

对于有家族史的非缺失突变家系，应用 *DMD* 基因内部和两端的串联重复序列（STR）多态性的检测，并通过连锁分析，确定母亲传递给患儿的 *DMD* 基因标记，进而对家族性病例的女性血亲进行携带者身份诊断。而对于散发病例，临床上排除其他疾病后，通过连锁分析可以判断相关女性是否携带风险基因。但由于多数散发病例是由新生突变所致，母源基因不一定存在缺陷，因此不能确定是否真的是携带者。

10.1.4 *DMD* 的产前诊断

(1) 产前诊断对象

已生育过 *DMD* 患儿，或有 *DMD* 家族史的孕妇需要对有风险的胎儿进行产前诊断。在妊娠的早期或中期，通过胎儿材料的 DNA 分析，针对性地检测胎儿是否存在与先证者相同的基因缺陷。因此产前诊断的前提是事先要进行先证者的

分析，确定其基因突变的细节及在该家系中实行产前诊断的途径和策略。

(2) 产前基因诊断的策略

4.2.1 首先进行胎儿性别鉴定，如为女性胎儿，通常就不再进行后续的基因分析；

4.2.2 对于先证者为缺失或重复型病例，男性胎儿的DNA样品采用多重外显子PCR扩增法或MLPA对缺失型病例进行检测；

4.2.3 对于先证者为非缺失或重复型病例，目前可采用STR连锁分析法，确定母亲传递给患儿的DMD基因标记，根据胎儿是否遗传到这一标记，从而对风险胎儿做出产前诊断。如果先证者已明确了基因点突变类型，可以应用dHPLC或HRM以及测序技术对胎儿做出产前基因诊断。

(3) 产前诊断的标本

1. 在孕 10-12 周可由妇产科采集绒毛标本，应避免母体组织的污染。
2. 在孕 18-22 周可由妇产科抽取羊水标本。实验室在接受羊水标本时，应与申请人一起对标本外观进行检查，包括浑浊度、颜色、悬浮物等，并同时签字认可。

(4) 产前诊断的步骤

a. 获取知情同意书

所有 DMD/BMD 产前诊断的申请者必须签署知情同意书。在知情同意书中应特别告知：

- 1) 目前应用的基因诊断技术和手段只能对约 60% 的 DMD/BMD 患者做出诊断；
- 2) 由于 *DMD* 基因庞大，重组率较高，可能引起诊断信息的错误；
- 3) 若需对高风险胎儿进行产前诊断时，需说明只有当先证者的突变情况通过分子遗传学检查确定下来后，才能在技术上对家系中高风险胎儿进行实验诊断；
- 4) 书面告知申请者产前诊断风险，包括标本污染、新突变的发生及其他实验室风险；
- 5) 产前诊断的绒毛和羊水标本获取是一个有创过程，由于个体差异的存在，孕妇可能面临不利后果。

申请者在充分了解上述风险后，签署上述知情同意书，书面陈述已理解各

告知书说明的内容，愿意承担该诊断带来的风险，并书面提出产前诊断申请。

b. 胎儿性别检测

如果胎儿为男性，则继续对胎儿进行 DNA 分析，确定胎儿是否获得突变等位基因。如果是女性胎儿，可以停止基因诊断。

c. 基因诊断

如果胎儿被鉴定为男性，且排除了标本的母源污染后需进行基因分析。为了保证产前诊断的准确性，应该采用两种不同的诊断技术独立进行基因分析。

1) 如果对先证者和家系已完成了预先的基因分析，则针对性地选择检测位点：

缺失型突变：多重外显子 PCR + MLPA；

重复型突变：连锁分析 + MLPA；

点突变：连锁分析 + 突变点检测（HRM、dHPLC 或测序）

2) 如果没有进行过预先分析的家系，可以试用下列诊断程序：

首先采用多重外显子 PCR 技术检测是否存在缺失型突变，同时用其它方法（如 MLPA）作相应的验证。如果为“非缺失型”突变，在时间充裕时，应进行 DNA 测序。

必须注意，在对胎儿 DNA 样品进行基因分析的同时，应对先证者采用同样的技术进行分析。

然而，*DMD* 基因庞大，基因内重组率高达 13% 以上。在对非缺失型病例进行产前诊断或进行家族性病例携带者检测时，要注意检测重组事件。应在基因两端各选取一个多态性位点，与基因内至少一点多态性位点进行三点联合分析。一旦检测到染色体互换，对于胎儿基因型的推断就要考虑其可靠性。可以进一步分析外祖父的血样，确定致病基因来源的同时，确定孕妇的两个基因的单体型，从而判断染色体互换是发生在先证者，还是发生在胎儿。一般是发生了互换的基因携带变异的可能性最大。最稳妥的策略是鉴定先证者的突变细节，然后对胎儿进行甄别。

(5) 产前诊断结果的验证

产前诊断的胎儿出生后，需留取脐带血分别进行血清肌酶生化测定和 DNA 分析，验证产前诊断结果的准确性。胎儿如被引产，胎儿标本应保留送检，以验证产前诊断的结果。

(6) 质量控制

- 1) 进行产前诊断实验的人员需经系统的培训并取得相应的技术资质；
- 2) 家系分析在产前诊断中必不可少，应防止仅对胎儿单个样品进行产前诊断；
- 3) 基因诊断时必须严格设置突变阳性、阴性和反应体系对照；
- 4) 检测产前诊断样品时，每份标本至少进行两次独立的分析，或采用两种不同的技术来检测同一份样品；
- 5) 严防母源性污染，应常规使用 21 号染色体上的 STR 标记检测，既可以排除胎儿 21 三体的可能，又可以帮助确认是否存在母源污染。
- 6) 防止 PCR 实验的污染，对于所有的 PCR 程序，必须认真确保模板 DNA 和试剂不被外源性的 DNA 和 PCR 产物污染。
- 7) 建立产前诊断样品的运送、接受登记和保存制度，样品保存至少 5 年，严格避免不同个体样品间的误判，并保证满足必要的样品核查的需要。

最后需要说明的是终止妊娠的操作须在遗传咨询基础上，当事人知情选择的前提下实施。

10.1.5 基因诊断和产前诊断报告

出具基因诊断和产前诊断报告应包括下列内容：

(1) 受检申请者的一般情况：实验室名称、标本编号、申请人姓名、性别、年龄、申请时间、临床诊断、家族史、家系成员尤其是先证者的其他临床检查结果等。

(2) 基因诊断技术信息：采用的技术方法，大致程序、诊断标准、基因异常灵敏度或检出率等。

(3) 基因诊断结果描述：性别决定 *SRY* 基因的扩增结果以及 *DMD* 基因外显子缺失或重复的情况，以及各种对照的结果。说明该基因诊断结果的可靠程度。

(4) 建议：包括遗传咨询以及需进行的其他检查等。

(5) 报告时间与签字审核。诊断报告签发人应具有国家行业管理规定要求的资质。

10.1.6 遗传咨询

(1) 新生突变与生殖腺嵌合

DMD 病例中，新生突变常见，这是 DMD 的另外一个特点，表现为没有家

族史、散发性。严格的新生突变是指发生在减数分裂过程中的差错，再次发生的可能性不高。但 *DMD* 基因中存在高度重复的结构，决定了该基因不仅在减数分裂过程中易发生差错，而且在有丝分裂的过程中也发生差错，不仅在女性的两条 X 染色体之间发生，在男性的一条 X 染色体内也可以发生。

在临床分析中，即使母亲外周血的分析结果显示为多态性杂合情况，也难以判断一个散发病例是严格意义上的新生突变还是生殖腺嵌合或体细胞嵌合。当母亲为生殖腺嵌合时，再次生育的风险取决于突变卵母细胞所占的比例，虽然可以排除患儿的姨母是携带者的可能，但患者的姐妹是否为携带者，需要同时分析患者、患者父母及姐妹的 DNA 方能确定，判断的依据如同家族性病例。由于这种不确定性，在临床实践中对于散发病例的再次妊娠都应该提供产前诊断。

(2) 突变基因的亲源分析

在散发病例中，有些突变可能来自外祖父，也可能来自更上一辈的女性祖先。以前我们注意到上辈女性来源的突变，而忽视了父源突变。在遗传咨询时要注意，应该分析患者突变基因的亲源，如果为外祖父来源的突变，则姨母的携带者身份不能轻易排除。

(3) 女性携带者患病风险

DMD 为 X 连锁隐性遗传病，女性携带者一般不患病，但由于女性的 X 染色体存在莱昂化(Lyonization)现象，有少数携带者会因不幸的莱昂化而得病。由于杂合子女性个体的组织中还有一些细胞是正常的（缺陷基因所在的 X 染色体失活），因而相对于男性患者来说，症状要轻。

10.2 地中海贫血基因诊断指南

10.2.1 概述

地中海贫血(thalassemia, 简称地贫)是最常见的人类单基因遗传性血液病,其分子特征是珠蛋白基因的缺失或突变,导致所编码的珠蛋白肽链合成减少或缺如,致使组成血红蛋白的珠蛋白链比例失衡,从而引起红细胞损伤和溶血的贫血性疾病。根据受累珠蛋白基因的不同,地中海贫血可分为不同类型,其中 α 珠蛋白基因表达减少称为 α 地中海贫血(α -thalassemia, 简称 α 地贫[OMIM 141800]), β 珠蛋白基因表达减少称为 β 地中海贫血(β -thalassemia, 简称 β 地贫[OMIM 141900])。

地贫在全球广为流行,主要分布在热带和亚热带疟疾高发地区,至少有 5 亿

人携带血红蛋白变异基因，WHO 的人类遗传病计划将地贫列为在发展中国家开展人群预防的六大疾病之一。我国长江以南的广大地域为该病的高发区，人群中基因携带者检出率约为 1~23%，其中，尤以两广地区为甚，广西地贫携带率高达 23.98%（ α -地贫 17.55%， β -地贫 6.43%），广东地贫携带率为 11.07%（ α -地贫 8.53%， β -地贫 2.54%）。

α 和 β 地贫属常染色体隐性遗传病，杂合子为基因携带者，通常无临床表现，但血液学检查呈现小细胞低色素血象。重型 α -地贫（Hb Bart's 胎儿水肿综合征）为致死性疾病，重型 β -地贫患儿只能靠输血维持生命，缺乏正规治疗的患儿多在童年夭折，目前除造血干细胞移植外，尚无其它有效的治疗方法，通过遗传筛查和产前诊断，选择性淘汰严重受累胎儿是目前最有效的手段。

10.2.2 地中海贫血的诊断

（1）临床诊断

根据临床贫血程度及血液学表型特征和家系谱分析完成。常规血液学测定呈现小细胞低色素贫血像是地贫特征性的表型，血红蛋白各组分的测定出现 HbA 水平降低和 HbA₂ 水平变化（降低为 α 地贫，升高为 β 地贫）以及 HbF（胎儿血红蛋白）水平升高等是临床诊断该病的重要指标，为进一步实施基因诊断和产前诊断提供依据。

缺铁性贫血的血液学检测也会出现小细胞低色素血象，需要与地贫相鉴别。通过检测血清铁、铁蛋白和总铁结合力等可诊断缺铁性贫血，血红蛋白组分的分析有助于地贫的诊断。需要指出的是，地贫和缺铁性贫血在婴幼儿期常常会同时存在，在正规补铁治疗二个月后血色素仍无明显升高的情况下需高度警惕两种疾病的同时存在，在该病高发地区人群中进一步进行血红蛋白分析以及 α 地贫和 β 地贫的基因诊断尤为必要。

（2）基因诊断和产前诊断

基因诊断结果对于地贫的确诊是必须的，并可用于预测临床表型和病情进展；同时，基因诊断还是基因携带者确诊的检测指标和进行高风险胎儿产前诊断的有效手段。通过产前诊断预防受累重型胎儿出生是目前国际公认的有效对策， α 和 β 地贫的产前诊断一般在妊娠早、中期通过抽取高风险胎儿的绒毛、羊水或脐带血进行，基于家系成员 DNA 分析的基因诊断是 α 和 β 地贫产前诊断的基本和常规手段。

10.2.3 地中海贫血的基因诊断

(1) α 地中海贫血

1) 中国人 α 地中海贫血的基因缺陷

a. α 珠蛋白基因的缺失

这是引起 α 地贫最主要的分子病因。人类 α 珠蛋白基因位于16号染色体，每条染色体上有两个 α -珠蛋白基因座位，正常基因型为 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ，如缺失1个 α 珠蛋白基因，称静止型 α -地贫，基因型为 $\alpha\alpha/-\alpha$ ，临床上无症状且可无阳性血液学表型；如缺失2个 α 珠蛋白基因，称标准型 α -地贫，基因型为 $\alpha\alpha/--$ 或 $-\alpha/-\alpha$ ，临床上无贫血症状，但血液学检查科呈现平均红细胞体积（MCV）和平均红细胞血红蛋白（MCH）的降低；如发生三个 α 珠蛋白基因的缺失，则产生HbH病，基因型为 $-\alpha/--$ ， α 珠蛋白肽链的合成受到较严重的影响，临床上表现出中间型地贫的症状，血色素含量多数在70-100g/L,并伴有肝脾肿大及轻度黄疸，血液学检查除有平均红细胞体积（MCV）和平均红细胞血红蛋白（MCH）的降低外，网织红细胞含量升高，并有H包涵体，血红蛋白电泳分析发现快速泳动的异常血红蛋白区带，它是由过剩的 β 珠蛋白肽链聚合而形成的 β 四聚体—HbH(β 4)。如四个 α 珠蛋白基因全部缺失，基因型为 $--/--$ ，不能合成 α 珠蛋白肽链，临床上称为HbBart's水肿胎儿综合征，患病胎儿在出生前或产后半小时内即已死亡。

b. α 珠蛋白基因点突变

除 α 珠蛋白基因的缺失是导致 α 地贫最主要的分子病因外，也发现一些 α 珠蛋白基因的点突变可引发 α 地贫，这类 α 地贫称之为非缺失型 α 地贫。在中国已报道了12种非缺失型 α 地贫，最常见的突变类型有三种，即Hb Constant Spring [HBA2: c.427T>C]，Hb Quong Sze [HBA2: c.377T>C]和Hb Westmead [HBA2: c.369C>G]。

2) α 地中海贫血的基因诊断技术

前面已经述及，在中国人中引起 α 地贫的分子缺陷主要是 α 珠蛋白基因缺失，以及HbCS, HbQS和HbWS点突变等，这些分子缺陷之间相互组合，形成不同类型的 α 地贫类型，因此，在中国人对 α 地贫进行基因诊断归根结底是要鉴定出 α 珠蛋白基因缺失数目或突变类型。Southern印迹杂交、MLPA、特异性扩增缺失断裂区的gap-PCR和实时PCR技术是目前用于缺失型 α 地贫诊断的4种主要的基因诊断方法，而Southern印迹杂交是诊断 α 珠蛋白基因缺失及其类型的的

金标准,目前已成熟的非同位素 Southern 印迹杂交技术可发展成为临床实验室诊断 α 地贫的基本技术,但由于 Southern 印迹杂交技术操作烦琐和耗时,目前主要用于研究目的的样品鉴定,难以作为临床诊断实验室的常规检测手段。gap-PCR,特别是近年来发展的一次可同时检测多种缺失类型 α 地贫的多重 gap-PCR 技术和实时 PCR 技术,简单实用,值得推广。非缺失型 α 地贫的诊断可采用反向点杂交技术和多色探针熔解曲线分析法,必要时可采用 DNA 测序等。

(2) β 地中海贫血

1) 中国人 β 地中海贫血的分子缺陷

β 地贫除极少数是由于基因缺失引起以外,绝大多数是由于 β 珠蛋白基因点突变(包括单个碱基的取代、个别碱基的插入或缺失)所致。这些点突变分别导致转录受阻, mRNA 前体剪接加工错误,或合成不稳定的珠蛋白肽链等,这些分子缺陷最终使体内 β 珠蛋白肽链合成缺如(β^0)或减少(β^+),引起与 α 珠蛋白肽链合成速率的不平衡,出现溶血性贫血的表型。迄今为止,在中国人 β 地贫患者中已发现了 50 种突变类型,其中 HBB:c.124_127 del TTCT、HBB:c.316+654 C>T、HBB:c.52A>T、HBB:c.-78A>G、HBB:c.216_217 insA、c.79G>A 和 HBB:c.92+1 G>T 等 7 种突变占中国人所有 β 地贫基因的 90%以上,不过这些常见的 β 地贫基因的发生频率在各省市区以及不同民族之间存在着差异性。我国是一个地域辽阔,人口约占世界五分之一的多民族国家,因此根据不同地区、不同民族的 β 地贫基因类型和分布频率来制定相应的基因诊断和产前诊断策略以及遗传咨询等具有重要的意义。

2) β 地中海贫血的基因诊断技术

根据 β 地贫分子缺陷特点,当前对该病基因诊断主要是以检测点突变为主,并已经建立和发展了基于 PCR 技术的适合检测中国人常见 β 地贫突变的基因诊断方法。近年来由于 DNA 测序技术的迅猛发展和价格的不断下降,越来越多地应用于未知突变类型的 β 地贫的基因诊断。

a. PCR 结合反向点杂交(reverse dot blot, RDB)技术

RDB 是当前我国对 β 地贫进行基因诊断和产前诊断的首选方法。根据 β 地贫已知突变位点的特异核苷酸序列合成一组等位基因特异性寡核苷酸(allele-specific oligonucleotide, ASO)探针(长度一般为 18-20 个碱基),将这一组生物素标记的 ASO 探针固定在杂交膜上,然后与 PCR 扩增的样品 β 珠蛋白基

因 DNA 片段杂进行杂交，经过严格条件下的杂交和洗膜，通过抗生物素辣根过氧化物酶（POD）催化底物显色而产生杂交信号，从而可以在 1 个杂交反应中同时分析同一样品中可能存在的多个点突变，杂交信号的检测达到检测特异 β 地贫突变。该技术方便、快速、准确、实用，并有一定的检测通量，目前可对 17 种[c.124_127 del TTCT、c.316+654 C>T、c.52A>T、c.216_217insA、c.-78A>G、c.79G>A、c.94delC、c.84_85insC、c.92+1 G>T、c.130G>T、c.-82C>A、c.-79A>G、c.-80T>C、c.45_46insG、c.-11_-8delAAAC, c.2T>G 和 c.92+5G>C]占中国人 β 地贫突变类型总数 99%的点突变作出明确的基因诊断。

对于应用 RDB 技术未能检测到突变类型但临床表型非常符合 β 地贫者，则可通过对全长 β 珠蛋白基因的测序来鉴定患者的突变类型。DNA 测序可出现三种结果：第一种是已报道过的罕见突变类型，且与表型相符，则可诊断被检测个体的 β 地贫表型有该种突变所致；第二种是过去尚未报道过的突变类型，此时需对突变序列进行功能分析，只有证明这种新发现的突变序列造成功能缺陷或障碍，才能确定此突变乃导致 β 地贫表型的分子病因；第三种结果是未检测到基因突变或检测到的突变不能解释临床表型，则提示受检者 β 地贫表型可能为基因调控机制等其他原因所致，需要由专门的研究机构或实验室进行深入的研究。

b. 多色探针熔解曲线分析技术

多色探针熔解曲线分析技术利用荧光探针与匹配程度不同靶序列杂交形成双链杂交体熔点的差异，结合探针所标记荧光基团的类型，即可在单个 PCR 反应中实现对个位点及多种突变的同时检测。在用于 β 珠蛋白基因突变检测时，首先根据已知的 β -地贫突变设计相应的自淬灭荧光探针，并设计对应的扩增引物，经不对称 PCR 扩增后，在多色荧光 PCR 仪上进行由低温到高温的熔解曲线分析，最后根据熔解曲线分析结果中未知样本与野生型对照在各检测通道的熔点（ T_m ）值的差异来判定待检测样本是否含有 β 地贫突变及突变的类型。该技术简便、快速、无 PCR 后处理、检测通量高，且自动化前景强，非常适合临床使用。利用该技术，目前已可对 24 种（c.-140C>T, c.-123A>T, c.-78A>G, c.-79A>G, c.-80T>C, c.-81A>C, c.-82C>A, c.45_46insG, c.48_49insG, c.52A>T, c.79G>A, c.91A>G, c.92+1G>T, c.92+5G>C, c.84_85insC, c.113G>A, c.[115delA; 120G>A], c.216_217insT, c.216_217insA, c.130G>T, c.315+2delT, c.124_127delTTCT, c.315+5G>C, c.316-197C>T）中国人 β 地贫突变进行检测和基因分型。

c. 多重等位基因特异性 PCR 分析

这是上世纪 90 年代推出的一种简便、快速和可靠检测 β 贫突变的基因诊断技术，针对前述中国人发病频率最高的五种突变类型（c.124_127delTTCT、c.316+654 C>T、c.52A>T、c.216_217 insA 和 c.79G>A(即 HbE)），设计和合成五组 PCR 引物，把突变基因与正常等位基因所不同的那一个或几个碱基设计在这些引物的 3'端，通过适当的组合和调整，组成一个多重等位基因特异性 PCR（MAPCR）体系，根据 PCR 产物中是否产生相应的特异长度扩增带，不但可以直接检测出被检样品是否具有这种突变，而且可以判断是该种突变的杂合子还是纯合子。

3) 中间型 β 地中海贫血

中间型地贫是指临床表型较重型患者为轻，病情较为良性的一种 β 地贫类型，约占 β 地贫病例总数的 10%。近年来的研究表明，中间型 β 地贫的发生主要由 β 地贫杂合子复合 α 珠蛋白基因增多、 β 地贫纯合子复合 α -地贫、 β^0 地贫与 β^+ 地贫双重杂合子、 β 地贫复合 HPFH 或 δ β 地贫和 β 地贫纯合子复合 KLF1 突变等原因所致。

由于导致中间型 β 地中海贫血的分子基础较为复杂，因此对此类病人进行基因诊断时必须从多方面考虑，除了对 β 地贫的突变类型作出鉴定外，还需系统分析包括 α 珠蛋白基因突变和重复变异（拷贝数）、 β 珠蛋白基因簇缺失、以及 KLF1 基因突变等，才能对中间型 β 地贫作出准确的基因诊断。

10.2.4 产前诊断的步骤

(1) 对象

α 地贫产前诊断的主要对象已生育过 HbBart's 水肿胎儿和/或夫妻双方都是标准型 α 地贫个体（基因型为 $\alpha\alpha/--$ ）的家庭。由于我国南方的 Hb H 病为常见疾病，且该病的贫血程度有很大的差异，一般不威胁患儿的生命，故在医疗实践中，HbH 病胎儿高风险夫妇的产前诊断是一个涉及医学伦理和医疗风险的十分敏感的事件。在当事人强烈要求，和有先证者病史和/或基因诊断证明的情况下，可以考虑将 HbH 病高风险夫妇作为产前诊断对象。 β 地贫产前诊断的重点对象是已生育过重型 β 地贫患儿和/或夫妻双方孕前检查明确为 β 地贫携带者的家庭。

产前诊断的前提是需对家庭成员特别是要求作产前诊断的夫妻双方的基因型有明确的基因诊断结果，并在遗传咨询基础上，当事人签署知情同意书的情况下实施。

(2) 遗传咨询

遗传咨询是产前诊断必须的环节，所有地贫产前诊断的申请者必须建立的遗传咨询的基础上。接诊医生或临床遗传咨询医师在遗传咨询过程中，应向要求产前诊断的孕妇和亲属提供诊断和胎儿有关信息，包括遗传规律、胎儿出现各种基因型和罹患地贫的风险率、疾病的严重程度及其危害和预后；并详尽介绍产前诊断的方法、实施过程、成功率和局限性；羊膜腔穿刺术是一种创伤性手术过程对母亲和胎儿都有可能产生危害和风险，以及尽量采用减少并发症的措施等。在遗传咨询中获得的任何信息没有当事人的同意，绝对不能透露给他人，已确保当事人的隐私权。

产前诊断必须充分尊重孕妇及其亲属的意愿，保证孕妇和亲属的知情同意权。在签署书面知情同意后，医务人员方可实施产前诊断。

(3) 签署知情同意书。

在知情同意书中应特别告知：

- 1) 目前应用的基因诊断技术和手段；
- 2) 由于基因诊断技术的局限可能引起诊断信息的错误；
- 3) 对高风险胎儿进行产前诊断时，需说明原则上只有明确先证者和双亲的地贫突变类型的情况下，才能在技术上对家系中高风险胎儿进行实验诊断；
- 4) 书面告知申请者产前诊断风险，包括标本污染、新突变的发生及其他实验室风险；
- 5) 产前诊断的绒毛和羊水标本获取是一个有创过程，由于个体差异的存在，孕妇和胎儿可能面临不利后果。

申请者在充分了解上述风险后，签署知情同意书，书面陈述已理解各告知书说明的内容，愿意承担该诊断带来的风险，并书面提出产前诊断申请。

(4) 技术程序

1) 样品采集

进行产前诊断的样品需满足家系分析的要求，胎儿双亲和先证者一般采集外周血，胎儿取材可根据技术条件和求诊者要求采用绒毛、羊水或脐带血，这些材料用于提取用于产前分子诊断的 DNA。

2) 操作流程

目前主张的具体步骤是（以孕期筛查为例）：

- 1) 在孕早、中期进行孕妇及其配偶的地贫表型筛查，若双方均为阳性携带者，尽快进行分子诊断确定基因型；
- 2) 在明确地贫基因型的情况下，于孕早、中期取羊水和双亲外周血进行基于家系分析的产前基因诊断，胎儿采样也可在孕 10-14 周取绒毛或于孕 17-23 周穿刺取脐血。并用前述的基因诊断技术对胎儿 DNA 标本进行突变类型的检测；
- 3) 采用的技术方法与签署基因诊断的方法相同；
- 4) 若产前诊断结果胎儿为重型地贫（Hb Bart's 水肿胎儿、 β 地贫基因纯合子或复合杂合子），根据孕妇和亲属的意愿可尽快安排终止妊娠；
- 5) 无论终止妊娠与否，胎儿或出生新生儿的血液样品应保留送检，以验证产前诊断的结果。终止妊娠的操作须在遗传咨询基础上，当事人知情选择的前提下实施。

(5) 医学诊断报告

书面诊断报告应包括以下信息：

- 1) 一般信息：受检者姓名、标本采集日期、实验室收到标本日期、实验室编号、标本编号、送检医师的姓名；
- 2) 检测结果：家系成员（双亲、先证者和胎儿）的基因型分析及其个体临床表型解释说明或遗传咨询意见。

诊断报告的签发人应具有国家行业管理规定要求的资质。

(6) 携带者检测和人群筛查

由于地贫基因携带者多数为无症状个体，高风险夫妇或拟婚对象的发现只有通过血液学筛查和进一步的分子检测才能确定，故通过在高发区普通人群中进行大规模人群筛查可以主动发现地贫基因携带者，然后对高风险家庭实施产前诊断。目前外周血检查是发现携带者最有效的途径。所采集的新鲜外周血应在一个工作日内进行血液学检测，按临床常规采集抗凝血送检进行全血细胞分析和 Hb 分析，若发现 MCV 和 MCH 降低以及 HbA₂ 含量变异则提示收件个体为地贫携带者的可能，必要时进一步进行 α 和 β 珠蛋白基因致病突变及其基因型分析。

(7) 婚育指导

可告知高风险夫妇咨询对象，他们也有避免生育重型 α 地贫患儿风险的其他选择，包括：（1）避免妊娠；（2）收养；（3）采用他人正常精子或卵子供体完成妊娠；（4）通过植入前遗传诊断（PGD）筛选含正常珠蛋白基因的胚胎完成妊娠。

11. 附录 A 产前诊断相关知情同意书

1 羊膜腔穿刺术知情同意书

患者_____，_____岁，因_____需要作羊膜腔穿刺进行产前诊断胎儿有无异常。羊膜腔穿刺术是一项相对安全的中孕期有创性介入性产前诊断技术，存在但不局限于以下医疗风险：

- 1) 孕妇有发生出血、羊水渗漏、流产的可能。
- 2) 穿刺有损伤胎儿的可能性。
- 3) 因孕妇子宫畸形、胎盘位于子宫前壁、腹壁太厚、羊水量少等原因，可能发生羊水穿刺失败。
- 4) 如术前孕妇存在隐性感染或术后卫生条件不佳，有发生宫内感染及胎儿感染死亡的可能。
- 5) 疼痛、紧张等刺激有诱发孕妇出现心脑血管意外的可能。

鉴于当今医学技术水平的限制，患者的个体差异以及其他无法预知的原因，即使在医务人员已认真履行了工作职责和严格执行操作规程的情况下，上述风险仍有可能发生。医务人员将严格按照医疗技术规范进行操作，尽最大努力减少上述风险的发生。由于先天遗传疾病目前尚无有效治疗方法，一旦发生将给家庭及社会带来沉重负担，尽管存在上述风险，但仍有必要进行此项检查，希望患者及家属理解并予以配合。

孕妇方应提供真实有效的病史材料。

孕妇方已从分了解该检查的性质、目的、风险性和必要性，对其中的疑问已得到经治医生的解答。经本人及家属慎重考虑后同意接受产前诊断并愿将本次妊娠的最终结局及时与医方沟通。为确认上述内容为双方意思的真实表达，医方已履行了告知义务，孕妇方已享有充分知情和选择的权利，签字生效。

孕妇签字：_____ 日期：_____

家属签字：_____ 与孕妇关系：_____

电话：_____ 地址：_____

医生签字：_____ 日期：_____

2 绒毛取材术知情同意书

患者_____，_____岁，因_____需要作绒毛取材术进行产前诊断。绒毛取材术是一项相对安全的早孕期有创性介入性产前诊断技术，存在但不局限于以下医疗风险：

- 1) 孕妇有发生出血、流产的可能。
- 2) 穿刺有损伤胎儿的可能性。
- 3) 因孕妇子宫畸形、胎盘位于子宫前壁、腹壁太厚、胎盘太薄等原因，可能发生绒毛取材失败。
- 4) 如术前孕妇存在隐性感染或术后卫生条件不佳，有发生宫内感染及流产的可能。
- 5) 疼痛、紧张等刺激有诱发孕妇出现心脑血管意外的可能。

鉴于当今医学技术水平的限制，患者的个体差异以及其他无法预知的原因，即使在医务人员已认真履行了工作职责和严格执行操作规程的情况下，上述风险仍有可能发生。医务人员将严格按照医疗技术规范进行操作，尽最大努力减少上述风险的发生。由于先天遗传疾病目前尚无有效治疗方法，一旦发生将给家庭及社会带来沉重负担，尽管存在上述风险，但仍有必要进行此项检查，希望患者及家属理解并予以配合。

孕妇方应提供真实有效的病史材料。

孕妇方已从分了解该检查的性质、目的、风险性和必要性，对其中的疑问已得到经治医生的解答。经本人及家属慎重考虑后同意接受产前诊断并愿将本次妊娠的最终结局及时与医方沟通。为确认上述内容为双方意思的真实表达，医方已履行了告知义务，孕妇方已享有充分知情和选择的权利，签字生效。

孕妇签字：_____ 日期：_____

家属签字：_____ 与孕妇关系：_____

电话：_____ 地址：_____

医生签字：_____ 日期：_____

3 经皮脐血管穿刺术知情同意书

患者_____，_____岁，因_____需要作经皮脐血管穿刺术进行产前诊断。经皮脐血管穿刺术是一项相对安全的中孕期有创性介入性产前诊断技术，存在但不局限于以下医疗风险：

- 1) 孕妇有发生出血、胎盘出血、血肿、胎盘早剥、羊水渗漏、胎膜早破、胎死宫内、晚期流产等手术并发症。
- 2) 胎儿并发症包括感染、出血、严重的心动过缓、脐带压塞或血栓形成，以及穿刺造成的胎儿损伤。
- 3) 因孕妇子宫畸形、胎盘位于子宫前壁、腹壁太厚、脐血管异常等原因，可能发生穿刺失败。
- 4) 如术前孕妇存在隐性感染或术后卫生条件不佳，有发生宫内感染及胎儿感染死亡的可能。
- 5) 疼痛、紧张等刺激有诱发孕妇出现心脑血管意外的可能。

鉴于当今医学技术水平的限制，患者的个体差异以及其他无法预知的原因，即使在医务人员已认真履行了工作职责和严格执行操作规程的情况下，上述风险仍有可能发生。医务人员将严格按照医疗技术规范进行操作，尽最大努力减少上述风险的发生。由于先天遗传疾病目前尚无有效治疗方法，一旦发生将给家庭及社会带来沉重负担，尽管存在上述风险，但仍有必要进行此项检查，希望患者及家属理解并予以配合。

孕妇方应提供真实有效的病史材料。

孕妇方已从分了解该检查的性质、目的、风险性和必要性，对其中的疑问已得到经治医生的解答。经本人及家属慎重考虑后同意接受产前诊断并愿将本次妊娠的最终结局及时与医方沟通。为确认上述内容为双方意思的真实表达，医方已履行了告知义务，孕妇方已享有充分知情和选择的权利，签字生效。

孕妇签字：_____ 日期：_____

家属签字：_____ 与孕妇关系：_____

电话：_____ 地址：_____

医生签字：_____ 日期：_____

11. 附录 B 基因检测知情同意书

根据对您或您的孩子病情的进一步了解和目前已获得的实验检测结果，您或您的孩子可能患有_____疾病。此疾病为某种特定基因引起的遗传病，即由人体的基因缺陷所导致。这些缺陷可为构成基因的单个核苷酸的突变、片段缺失、置换或序列重复等。这些异常改变可以是从父母遗传来的，也可以来源于自身。但都存在遗传给下一代的可能。我们希望您能了解检测技术的局限性及潜在的风险。

1、本检测所指的检测方法并不适于检测染色体的数目及结构异常、某些DNA大片段的缺失、拷贝数变异以及特殊类型的突变。

2、该方法所采用的DNA来自于受检者的血液或体细胞，而非来自生殖细胞，因此并不能排除嵌合现象所致的基因解读偏差。

3、由于目前人类对疾病认识水平的局限性，进行DNA序列分析的目的是为了了解该疾病的发病原因或评估遗传风险。如未检出特定基因的致病突变位点，即为阴性结果，并不能排除患某种疾病的可能性。因为，目前大多数单基因遗传病的发病也可能和其它未知基因或难以检测到、或无法确定的基因突变类型有关。

4、由于目前对某些基因认识的不足，对检出的特定基因突变，在某些情况下，可能并非引起该病的致病基因突变，需要进一步进行验证和研究。

5、基因检测技术并非常规临床检测项目，主要用于辅助明确临床诊断或科研研究。检测结果并不一定能指导治疗方案。

6、由于采用的检测技术和实验方法的局限性，并非总是能检测到致病的基因。

7、由于不可抗拒因素如采血管破裂、实验试剂异常、病人身体状况、血样的异常等造成的实验检测无法进行，受检者需配合检测机构再次取样。

8、医生已尽可能详细说明以避免受检者或家庭成员在检测过程中及知晓检测结果后可能出现的不同程度的精神压力和负担。但对由此产生的家庭纠纷和精神压力，医生和检测机构并不承担任何责任。

9、在完成本项检测后，剩余血样或DNA可能会用于复查验证以及进行继续研究。你可能并不会被告知结果。如果您同意您或被监护人的血样被保存使用，请在相应栏目下签字。

10、医疗及检测机构承诺对病人及家人的信息保密，不会公开泄露有关信

息。病例资料可能会被该项目检测者、医疗机构内相关人员、研究者和合法机构查阅。

本人_____作为患者，已通过医生的解释，充分了解到_____疾病基因检测项目：

1、进行基因检测的意义、预期目的和必要性。

2、基因检测存在一定的局限性，并非所有致病基因都能监测到；

3、该基因检测方法的局限性以及余值风险；

4、基因检测可能出现以下几种结果：“检测到基因的突变”表明检测结果支持所测基因序列的异常。但在有些情况下，仍需其它检测确定为致病基因。

“检测到正常的基因”表明检测结果可以排除所测基因的异常；

“未检测到基因的突变”表明可以排除所测基因的特定突变类型，但仍然有可能某些超过检测能力的基因突变，因此并不意味着完全排除基因的异常。

“检测到基因的缺失”表明检测结果支持所测基因的特定范围内存在缺失。但在有些情况下，缺失所引起的临床症状并不清楚，仍需进行研究。

“未检测到基因的缺失”表明在界定的基因特定检测范围内，可以排除所检测范围的基因缺失，并不意味着完全排除其它缺失的存在。

5、我承诺提供的信息资料真实、完整。

6、我授权医疗机构自行或委托检测机构对采集的样本进行基因检测，并可对 所获取的实验数据和剩余样品用于科学研究。

我已经知晓上述所有内容，申请对我本人或被监护人进行基因检测。

受检者 / 父母签名：

与受检者关系：

签名日期：

见证人：

检测机构代表签名：

检测机构：

签名日期：

12. 附录 C 不同诊断方法的优缺点

方法名称	简述	优点及用途	不足
染色体核型分析	根据染色体的长度、着丝点位置、臂比、随体的有无等特征，并借助染色体分带技术对某一生物的染色体进行分析、比较、排序和编号	<ol style="list-style-type: none"> 1. 成本低，结果直观。 2. 不仅能够显示染色体数量变异还可显示结构异常。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 检测样本需要培养，实验周期长。 2. 仅能分析分裂中期细胞，不能分析分裂间期细胞。 3. 分辨率有限。
荧光原位杂交	采用标记的寡聚核苷酸探针与变性后的染色体、细胞或组织中的核酸进行杂交，在荧光显微镜下显影，对待测 DNA 进行定性、定量或相对定位分析。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 无需培养，实验周期短。 2. 探针的灵敏度和稳定性高。 3. 可显示分裂中期也可显示分裂间期染色体数量或结构的变化。 4. 可同时观察几种探针的定位。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 主要用于已知特定基因的分析，不适用于分析未知基因。 2. 分辨率有限。 3. 不是所有的基因位点目前都有相应探针。
qPCR	一种在 PCR 进行过程中，动力学检测扩增产物累积的模式。可对原始模板进行定量，故又称定量 PCR。同时，由于检测模式为荧光，又称荧光 PCR。常用的检测化学包括荧光染料和荧光探针两种，前者主要使用 SYBR Green I, 后者则包括 5'-水解探针、分子信标、置换探针等多种探针形式。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 闭管操作，降低扩增产物污染机会； 2. 操作简便，可实现高通量检测； 3. 可定量检测； 4. 利用不同荧光标记的探针，可以同时检测数个基因位点或者突变位点。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 主要用于已知序列或者突变的检测，扩增片段较短，一般< 200bp； 2. 受仪器检测通道数目限制，且每一个等位基因都需要一个探针，可同时检测的靶序列数和突变位点数目有限； 3. 检测突变的特异性受探针类型以及设计方式影响很大；

方法名称	简述	优点及用途	不足
HRM	一种高密度实时检测扩增产物融解过程中荧光信号变化的测量技术, 据此可判断模版中是否有突变发生及突变发生率。可在配有 HRM 分析软件的实时 PCR 仪器上进行。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 可进行突变筛查, 突变率半定量分析, 小片段基因分型, 甲基化检测; 2. 闭管操作, 降低扩增产物污染机会; 3. 操作简便, 可实现高通量检测。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 用于突变筛查时, 需要测序确认具体突变类型; 2. 对于纯合突变、缺失突变的检测能力有限; 3. 采用饱和型荧光嵌入染料, 为单色检测模式。
多色探针熔解曲线分析	一种实时检测单链扩增产物与自淬灭探针杂交后产物融解过程中荧光信号变化的测量技术, 据此可以判断模版中是否有突变发生及突变类型。由于自淬灭探针可以采用不同荧光基团标记的探针, 故称多色。可在普通多通道实时 PCR 仪器上进行。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 可进行多个突变的同时检测、基因分型。适用于多种突变类型, 包括点突变、缺失、插入、有限重复等; 2. 闭管操作, 降低扩增产物污染机会; 3. 操作简便, 可实现高通量检测。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 对于单个探针覆盖区的多个突变, 可以明确检出, 但识别能力有限。 2. 使用双标记的自淬灭探针会造成成本增加。 3. 需要使用多通道的实时 PCR 仪器。
MLPA	结合探针杂交技术、核酸连接技术、和多重扩增技术(multiplex PCR, mPCR) 对待测样本进行DNA/RNA序列定性或半定量的一种分析方法。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 可以检测一代测序、DHPLC 所不能检测的拷贝数变化; 2. 可以检测到 Southern 杂交和 FISH 技术检测不到的单基因小片段重复或者缺失; 3. 操作简单、高通量、快速。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 不能用于单个细胞的检测; 2. 不适合检测未知的点突变类型; 3. 不能检测染色体的平衡易位。
基因芯片	在固相支持物上原位合成寡核苷酸或者直接将大量 DNA 探针以显微打印的方式有序地固定到支持物表面, 然后将之与标记好的样本杂交, 通过对杂交信号的检测分析, 得出样本的相关信息。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 可检测一个基因的多个突变; 2. 可检测多个基因的多个突变; 3. 既可判断纯合突变, 也可判断杂合突变; 4. 快速。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 只能检测已知突变; 2. 对操作环境要求较高。

方法名称	简述	优点及用途	不足
Sanger 测序	利用一种 DNA 聚合酶来延伸结合在待定序列模板上的引物，直到掺入一种链终止核苷酸为止。每一次序列测定由一套四个单独的反应构成，每个反应含有所有四种脱氧核苷酸三磷酸(dNTP)，并混入限量的一种不同的双脱氧核苷三磷酸(ddNTP)。由于 ddNTP 缺乏延伸所需要的 3-OH 基团，使延长的寡聚核苷酸选择性地在 G、A、T 或 C 处终止。可通过高分辨率变性凝胶电泳分离大小不同的片段，凝胶处理后可用 X-光胶片放射自显影、非同位素标记或荧光标记进行检测。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 可精确检测长度 800bp 以内 DNA 序列上的碱基变异； 2. 快速准确，是碱基变异检测的金标准。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 通量低； 2. 对 GC 含量较高和重复序列的检出有困难。
焦磷酸测序	由 4 种酶催化的同一反应体系中的酶级联化学发光反应。将每一个 dNTP 聚合时释放的焦磷酸基团 (PPi) 与一次荧光信号的释放偶联起来，通过检测荧光的释放和强度，达到实时测定 DNA 序列和定量分析序列变化的目的。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 可定量分析 DNA 序列的变化程度，定量精确度较高，可用于线粒体杂合突变分析； 2. 可用于 DNA 甲基化定量分析 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 主要用于已知序列测序，不太适合分析未知序列； 2. 仅适合较短序列分析，无法进行全基因组分析； 3. 分析成本较高。
高通量测序	一次可对几十万到几千万条 DNA 分子进行序列测定，读长为数十到数百 bp，需要强大的生物信息学分析能力，才能完成对检测结果的判断。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 高通量； 2. 可根据临床需求，设计基因数量不等的捕捉芯片，一次性检测数个到数万个基因。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 存在一定比例的假阳性和假阴性； 2. 成本较高； 3. 对生物信息学分析能力要求极高。

方法名称	简述	优点及用途	不足
时间飞行质谱生物芯片系统 (MassARRAY)	利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 进行分析, 即 PCR 扩增产物或者预处理样本在延伸单碱基后, 将制备的样本分析物与芯片基质共结晶, 将该晶体放入质谱仪的真空管, 而后用瞬时纳秒 (10^{-9} s) 强激光激发, 进而在非电场漂移区内按照其质荷比率得以分离, 在真空小管中飞行到达检测器。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 灵敏、可靠; 2. 可以设计最高达 40 重的 PCR 反应和基因型检测; 3. 对数十到数百个 SNP 位点进行数百至数千份样本检测时, 具有最佳的性价比, 特别适合于对全基因组研究发现的进行验证。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 只能检测已知位点; 2. 中等通量; 3. 检测位点较少时成本较高。

参考文献

1. 曾溢滔. 遗传病的基因诊断和基因治疗. 上海科技出版社, 54-153, 1999
2. 曾溢滔. 人类血红蛋白. 科学出版社, 2002
3. 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程 (第三版). 2006
4. 赵寿元主编. 遗传学名词 (第二版) 全国科学技术名词审定委员会. 科学出版社, 2006
5. 陆国辉, 徐湘民. 临床遗传咨询, 北京大学医学出版社, 2007
6. 左伋. 医学遗传学. 人民卫生出版社, 155-162. 2008
7. 边旭明. 实用产前诊断学. 人民军医出版社, 188-189, 2008
8. 徐湘民. 地中海贫血预防控制操作指南. 人民军医出版社, 2011
9. 管敏鑫. 医学遗传学. 高等教育出版社, 143-148. 2012
10. 贺林, 马端, 段涛. 临床遗传学. 上海科技出版社, 2013
11. GB/20032302-T-361, 临床实验室定量测定室内质量控制指南. 北京: 中国标准出版社, 2007
12. 中华人民共和国卫生部. 胎儿常见染色体异常与开放性神经管缺陷的产前筛查与诊断技术标准, 中华人民共和国卫生行业标准. WS 322.2-2010, 201
13. 中华人民共和国卫生部. 新生儿疾病筛查技术规范, 中华人民共和国卫生行业标准, 2010
14. 医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法 .
<http://www.moh.gov.cn/mohyzs/s3586/201012/49981.shtml>, 2010-12-1.
15. WS 322.2-2010. 胎儿染色体异常的细胞遗传学产前诊断技术标准. 2010
16. Griffiths AJF, Wessler SR, Carroll SB, Doebley J. Introduction to Genetic Analysis (10 ed.). New York: W.H. Freeman and Company. 2012
17. Kristin G, Barbara Zehnbaauer, Jessica K, et al. Molecular Methods for Clinical Genetics and Oncology Testing; Approved Guideline—Third Edition, 2012
18. Young ID. Introduction to Risk Calculation in Genetic Counseling, 3rd edition, Oxford University Press. 2006
19. Harper PS. Practical Genetic Counseling. 7th Edition. CRC Press. 2010
20. Ross LF, Saal HM, David KL, Anderson RR; American Academy of Pediatrics; American College of Medical Genetics and Genomics. Technical report: Ethical

- and policy issues in genetic testing and screening of children. *Genetics in Medicine*. 15(3):234-45. 2013
21. National Society of Genetic Counselors' Definition Task Force: Resta R, Biesecker BB, Bennett RL, Blum S, Hahn SE, Strecker MN, Williams JL. A new definition of Genetic Counseling: National Society of Genetic Counselors' Task Force report. *Journal of Genetic Counseling*. 15:77-83. 2006
 22. Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, Ketterling RP, Olson SB, Quigley DI, Rao KW, Tepperberg JH, Tsuchiya KD, Wiktor AE, a Working Group of the American College of Medical Genetics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: Fluorescence in situ hybridization *Genetics in Medicine* 13: 667–675. 2011
 23. Ravine D, Suthers G. Quality standards and samples in genetic testing. *J Clin Pathol*. 65(5):389-393. 2012
 24. South ST, Lee C, Lamb AN, Higgins AW, Kearney HM; Working Group for the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision. *Genetics in Medicine*. 15(11):901-909. 2013
 25. Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, Das S, Grody W W., Hegde MR., Lyon E, Ward BE., Molecular Subcommittee of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations. *Genet Med*. 10(4):294-300. 2008
 26. Professional Guidelines for Clinical Cytogenetics. 2009
 27. American College of Medical Genetics. Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories [EB/OL]. 2007
 28. Hsu LYF. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities through amniocentesis. In: Milunsky A, editor. *Genetic disorders and the fetus: diagnosis, prevention and treatment*, 3rd ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 155. 1992

29. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Document MM1-A. Molecular Diagnostic Methods for Genetic Diseases; Approved Guideline. Vol. 20, No. 7. 2000
30. NHS Fetal Anomaly Screening Programme: Amniocentesis and Chorionic Villus Sampling. Policy, Standards and Protocols. 2008
31. American College of Medical Genetics: Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories.
32. Harada S, Korf BR. Overview of molecular genetic diagnosis. *Curr Protoc Hum Genet.* 2013
33. Morozova O, Marra MA. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics.* 92:255–264. 2008
34. CLSI:Quality Management for Molecular Genetic Testing ; Approved Guideline. CLSI document MM20-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012
35. CLSI: Molecular Methods for Clinical Genetics and Oncology Test; Approved Guideline-Third Edition. CLSI document MM01-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012
36. Zeng F, Ren ZR, Huang SZ, Kalf M, Mommersteeg M, Smit M, White S, Jin C L, Xu M, Zhou DW, Yan JB, Chen MJ, Beuningen R, Huang SZ, Dunnen J, Zeng YT, Wu Y. Array-MLPA: Comprehensive Detection of Deletions and Duplications and Its Application to DMD Patients. *Human Mutation.* 29:190–197. 2008
37. Zeng YT, Huang SZ: Disorders of hemoglobin in China. *J Med Genet.* 24(10):578-583. 1987