

DOI: 10.13602/j.cnki.jcls.2018.11.11

• 遗传病基因诊断新进展 •

性染色体数目异常疾病诊断技术研究进展*

郑欣怡, 周裕林(厦门大学公共卫生学院 & 厦门市妇幼保健院分子遗传联合检测研究中心, 福建厦门 361003)

摘要: 性染色体数目异常疾病是一类严重困扰人类生活的综合征, 患者多能生存, 但常有性腺发育不全、多发畸形、不育等异常表现。该病无法治愈, 经激素替代治疗等干预措施可有效缓解症状, 但早期确诊严重依赖于相关临床诊断技术的发展。该文拟就现今常见检测性染色体数目异常技术的发展作一综述, 比较各技术优缺点及评价其在临床诊断中的应用价值, 以方便检验工作者科学合理地采用相关技术, 为临床提供更为准确可靠的实验室依据, 推进对该类疾病的诊治与研究。

关键词: 性染色体数目异常疾病; 染色体核型分析; 荧光原位杂交技术; 染色体微阵列分析技术; 荧光定量 PCR 技术; 多重连接探针扩增技术; 高通量测序技术; 数字 PCR 技术

中图分类号: R446.1; R596.1

文献标志码: A

性染色体数目异常导致的性染色体病是一种常见遗传病, 在新生儿中发病率约为 1/400~1/500, 主要包括克氏综合征(KS, 47, XXY)、特纳综合征(TS, 45, X)、超雄综合征(47, XYY)、超雌综合征(47, XXX)、各种类型嵌合体及多条额外性染色体。这些疾病因缺乏特殊外观不易在生命早期发现, 至青春期由于生长滞后、性征异常、原发闭经等一系列发育障碍表现就诊, 此时已错过治疗最佳时机。国外相关研究发现, 只有约 27% 丹麦性染色体数目异常疾病能在产前被检出, 欧洲 11 个国家性染色体三体异常仅 12% 能在产前或 1 岁内被检出, 澳大利亚约 49% 的 KS 患者能被诊断, 而在产前仅能检出 9.9%, 且出生后 14 岁前检出的仅占 19.2%^[1-3]。该类疾病如能早期确诊, 在青春期前及时给予激素替代及辅助心理指导等治疗措施, 可明显缓解症状, 提高患者生活质量。因此, 早期诊断及及时干预至关重要。本文就该类疾病的诊断技术作一综述, 以期帮助临床开展针对该类疾病的早诊、早治工作。

1 染色体核型分析(chromosomal karyotypes analysis)

传统的染色体核型分析是诊断染色体疾病的金标准, 也是目前开展最广泛的产前诊断技术, 具体操作方法为培养淋巴细胞后, 常规收获并制备染色体标本于显微镜下观察核型。其准确性高、结果稳定, 但存在诊断周期长、标本用量大、操作过程繁琐、对技术人员要求高且受阅片者主观影响大等无法克服的局限^[4]。黄晓莉等^[5]对 1 782 例产妇进行羊膜腔穿刺及羊水细胞培养, 共获核型分析结果 1 775 例, 其中染色体数目异常 45 例(异常率 2.54%), 3 例 47, XXX, 1 例 45, XO; 但实验中穿刺失败 1 例(穿刺成功率 99.94%); 一次羊水培养失败 12 例(成功率 99.33%)。万涛^[6]对 1 000 例因性征异常、不孕不育、闭经、先天性智力低下、习惯性流产等原因入院接受外周血染色体核型分析者分组, 发现 56 例异常(5.6%), 其中数目异常 39 例(69.6%); 不孕不育组(55.56%, 5/9)、婴幼儿表现异常组(94.12%, 32/34)和生产发育异常组(66.67%, 2/3)大多数为染色体数目异常。此

外, 要将染色体核型分析应用于临床, 高质量的细胞培养及收获技术是关键, 羊水穿刺、绒毛活检和静脉血穿刺是创伤性取样, 有致胎儿创伤、畸形或宫内感染风险, 有报道指出可致 0.3%~1% 的胎儿流产^[7]。且一旦穿刺或培养失败, 母婴常难以接受二次取样, 所以一次穿刺及培养成功极为重要。

2 荧光原位杂交技术(fluorescence hybridization in situ, FISH)

FISH 是采用荧光标记的 DNA 特异性探针与靶细胞中同源序列核酸杂交, 计量信号数来判定相应染色体数目的靶向细胞分子诊断技术, 可对目的 DNA 片段进行定量定位分析, 在染色体数目异常检测方面应用广泛。赵旭亮等^[8]对 654 例孕妇利用核型分析和 FISH 分别进行遗传物质检测, 结果 FISH 在 3 d 内检测出与核型分析一致的非整倍体异常, 而后者检测周期为 12 d 左右。FISH 方法具有特异性强、敏感性高、结果可靠等诸多优势, 但杂交率不能达到 100%, 特别是应用较短的 cDNA 探针时效率明显下降。且目前国内相关试剂价格偏高, 易受技术人员操作水平及探针质量高低的影响等限制了其在临床尤其是大规模人群筛查中的应用。Baumgarther 等^[9]提出了一种多重 FISH, 采用 4 套 6 种标记的 FISH 探针可描绘人类间期细胞中全部 24 条染色体情况, 光谱成像能同时应用 8 种不同的荧光色素标签, 使单细胞 FISH 完全核型分析成为可能。

3 染色体微阵列分析技术(chromosomal microarray analysis, CMA)

染色体微阵列包括比较基因组杂交微阵列和单核苷酸多态微阵列, 美国妇产科医师协会推荐将其用作超声筛查显示异常胎儿的一线基因测试^[10]。该技术具有高效、高集成、微型化、平行化、多样化和自动化等优势, 可广泛应用于生命科学的各个领域^[11-12], 但目前最大的不足是无法识别未知重要变异(variants of unknown significance, VOUS)且不能检测染色体多倍性^[10, 13-14]。Hillman 等^[15]对 243 例孕妇开展了一项

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81572084); 厦门市科技重大专项(3502Z20171006)。

作者简介: 郑欣怡, 1993 年生, 女, 硕士研究生, 从事分子遗传与检测研究。

通信作者: 周裕林, 主任技师, 教授, 博士, E-mail: zhou_yulin@126.com。

基于核型分析和 CMA 的前瞻性队列研究,结果发现 CMA 能揭示核型分析不能检出的异常病例(4.1%,10/243),VOUS 检测率为 2.1%(95%CI:1.3%~3.3%)。多项研究和 Meta 分析^[10,13,15-16]表明,CMA 能检出所有非整倍体异常且可增加核型分析正常病例的染色体不平衡检出率(0.4%~10%)。目前临床认为当超声检测异常或染色体区域存在非典型信号时,CMA 可行更精细的基因水平分析。但如仅针对性染色体数目异常检测,该技术相对成本高昂,性价比差,且不能检测<10%的低水平嵌合体^[12,17]。

4 荧光定量 PCR 技术 (quantitative fluorescence polymerase chain reaction, QF-PCR)

QF-PCR 是目前临床诊断的主流技术,相对于正常 46,XX 或 46,XY 核型,性染色体数目异常表现为拷贝数的差异,通过 QF-PCR 可以快速简易地检出。陈雁等^[4]同时采用单盲法和双盲法进行的一项回顾性和前瞻性结合的临床对比研究发现,QF-PCR 与染色体核型分析结果的阳性一致率达 93.75%,阴性一致率和非嵌合染色体数目异常检出率达 100%。Rostami 等^[18]对 4 058 例产前样本进行了多个短串联重复序列标记的 QF-PCR 检测,发现 98.59% 的样本结果与常规细胞遗传学研究结果一致,其中性染色体数目异常的检测准确率达 92.86%(13/14),仅 1 例假阴性结果(45,X)。de Moraes 等^[19]对 162 例羊水标本进行的多重 QF-PCR 检测显示与核型分析结果一致率为 95.4%。Sun 等^[20]开发出一种基于同源序列分子标记的 SD-QF-PCR 技术,设计了 13 个同源序列作为分子标记,13 对引物和 1 个荧光标记的通用引物能在单管中同时进行多位点检测非整倍体且敏感性和特异性均达 100%。但是,由于 PCR 扩增时受模板、引物、酶等多种因素影响,不同 PCR 反应的扩增效率存在差异,且通过指数增长的 CT 值反应 1.5~2 倍的拷贝数差异,实际检测中存在困难。因此,QF-PCR 检测性染色体数目异常的准确性和重复性一直不是很理想。

5 多重连接依赖探针扩增技术 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)

MLPA 是一种高通量、基于 PCR 的非整倍体检测方法,其分辨率高、操作简便、设备要求低、重复性强,相比实时荧光 PCR (real time-PCR, RT-PCR),精准度得到较大提升。Hochstenbach 等^[21]对 527 例羊水标本开展的一项前瞻性研究发现,MLPA 对未培养的羊水细胞进行非整倍体筛查的成功率达 98%,与核型分析一致率达 99.4%,仅出现 2 例假阴性和 1 例假阳性结果。Grandone 等^[22]开展了一项对 15 例核型分析为 X 染色体异常的 TS 患者群体(试验 TS 组)、45 例核型分析诊断为 TS 的患者(TS 组)、74 例青春期前先天性矮小女性(矮身材组)进行 MLPA 检测和核型分析验证的多中心研究,设定阈值为 0.76,发现 MLPA 能检出 TS 组所有 X 非整倍体异常,且嵌合体、X 结构异常和 X 单体的占比分别为 31.11%(14/45)、15.56%(7/45)和 53.33%(24/45);对矮身材组进行 MLPA 和核型分析验证,结果在 MLPA 疑为异常的 10 例中 2 例证实为 TS 8 例假阳性。综合 TS 组和矮身材组结果,其敏感性和特异性分别为 100%(95%CI:0.92~1.00)和 88.89%(95%CI:0.79~0.94),阳性预测值和阴性预

测值分别为 88.5%和 100%。但该检测所需的毛细血管电泳分析在设备、检测通量和成本等方面存在一定限制,导致在临床尚未得到推广。本课题组亦将 RT-PCR 和 MLPA 进行整合提出了 MLPA/RT-PCR 技术^[23],该技术结合了 MLPA 的精确性和 RT-PCR 的定量简易性,弥补了各自的不足,利用不同荧光标记的检测探针分别指示目标基因与内参基因的扩增情况,从而实现目标基因的定量检测,在临床性染色体数目异常检测中具一定应用前景。

6 高通量测序技术 (high-throughput sequencing, HTS)

HTS 在临床基因检测的应用正得到快速发展。该方法具有无创取样、高敏感性、高通量、成本低、再现性好、诊断效率高优点,在部分发达国家儿童遗传性疾病的诊断中已得到广泛应用,我国已有高苯丙氨酸血症、遗传性骨病等遗传代谢病 HTS 平台建立的成功案例^[17]。目前该技术临床主要应用于罕见遗传病的全基因组分析及一些酵母、植物霉菌的整倍体研究^[24-26],在性染色体数目异常检测方面,主要应用于孕妇血浆胎儿游离 DNA 的筛查。张展等^[27]基于 Ion Proton 半导体测序平台进行的 HTS 每次可检测 12~15 个标本,上机测序时间为 1.5 h,整个检测流程仅需 1~1.5 d,其中性染色体异常检出率为 100%(2/2),假阳性率为 33.33%(1/3)。林颖等^[28]对 5 540 例孕妇采集外周血进行游离 DNA 的 HTS 检测和染色体 G 显带分析,结果 HTS 共检出 10 例性染色体非整倍体,6 例与核型分析结果一致(符合率 60%,6/10),包括 3 例 45,X、1 例 47,XXY、2 例 47,XYY。陈亚军等^[29]以核型分析为金标准研究 NIPT 的诊断价值,结果显示性染色体非整倍体检测敏感性为 100%,特异性为 66.7%,阳性预测值为 81.0%。孔令印等^[30]开发出利用染色体特异位点进行 NIPT 的检测体系,对 200 例已知胎儿核型的孕妇血浆样本验证,结果与传统 NIPT 一致性达 100%。然而 HTS 目前仍存在成本高、数据分析量大等不足,相信随着技术成熟进步,检测价格降低,其有望作为性染色体数目异常产前筛查诊断主流技术大大推动该疾病的预防和诊治工作。

7 同源序列-高分辨率熔解曲线技术 (high-resolution melting analysis of segmental duplications, SD-HRM)

SD-HRM 可同时扩增不同染色体上独特的同源序列,对产物进行高分辨率熔解曲线分析,不同拷贝数比例的染色体具有不同的熔解曲线,据此推算出所检染色体的拷贝数。本课题组前期自主开发了此项新型技术,采用实时荧光 PCR 仪结合 HRM 作为检测载体,设计一组 XY 反应,用以分析 X 与 Y 染色体之间的相对数量关系,可快速准确地检测各种常见的性染色体数目异常^[31-33]。经临床验证,其准确性高(敏感性 100%,特异性 98.1%)、操作简便、诊断时间节省(约 2 h)、试剂及仪器成本低廉并具极高检测通量。实时荧光 PCR 仪已被国内各级医院及分子诊断实验室普及,此平台将十分有利于大样本人群筛查的全面推广。

8 数字 PCR 技术 (digital PCR, dPCR)

近年新发展出的 dPCR 技术通过有限稀释将样本分成多个独立区室以保证每区室最多包含 1 个拷贝的 PCR 模板,PCR 时多个区室同时平行独立扩增,反应完成后通过荧光信

号的有无计数阴性和阳性区室数 经泊松概率分布函数统计数据而无需标准曲线即能获取模板的定量信息。高敏感性、高准确性、检测限低和绝对定量等特点使得该技术在遗传病诊断中的应用越来越受到重视^[34-36]。微流控芯片的最大反应单元数可达百万级 理论上可检出低至 0.000 1% 的靶标样

品浓度。多个关于 dPCR 检测染色体拷贝数的报道显示其在该领域具有一定发展前景^[36-37] ,但目前仪器设备和单个检测成本仍较昂贵 ,通量也较低 ,只能检测已知变异等限制了临床尤其是人群筛查的应用。上述几种检测技术在通量、成本、准确性、标本所需量、检测时间等方面的比较见表 1。

表 1 8 种检测技术的比较

类型	所需标本量	通量	成本	准确性	技能要求	敏感性	精确度	检测周期	DNA 所需量	临床应用优缺点
核型分析	18 ~ 20 mL 羊水 ^[4] ,3 mL 静脉血 ^[6] ,1 mL 脐带血 ^[9]	低	低 (£ 2 442 ^[13])	高 (99.4% ~ 99.9%)	高	低	5 ~ 10 Mb ^[10,13,15]	1 ~ 3 h ^[9,12-13,18]	无需	金标准,有创取样 耗时久
FISH	1 mL 脐带血 ^[9]	低	高	高	高	高	≥5 Mb	3 d ^[9] , 1 ~ 2 h ^[14]	100 ng ^[8]	探针稳定,实验周期短,试剂贵 基因水平的精细分析,不能检测低水平嵌合体
CMA	绒毛>10 mL 羊水>12 mL ^[15]	高	高 (£ 3 118 ^[13])	高	高	高	<0.5 ~ 1 Mb ^[10,13]	<24 h ^[8]	250 ~ 500 ng ^[8]	反应快速,重复性好,结果清晰,对反应条件要求高
QF~PCR	0.5 ~ 1.5 mL 羊水 ^[4,18]	高 (16 ~ 384)	低	低	低	高	1 ~ 2 Mb	<76 h ^[4,13,18]	0.5 ~ 2 ng ^[4] , 5 μL ^[18]	高效,样本易污染,需精确测量 DNA 浓度
MLPA	2.6 mL 血浆 ^[23]	较高 (96 ^[23])	低	高	低	高	1 ~ 2 Mb	<48 h ^[23]	5 μL ^[23]	无创性,不能完全替代核型分析,仅可高精度筛查
HTS	5 ~ 10 mL 抗凝血 ^[28,30] ,600 μL ~ 2 mL 血浆 ^[30]	较高 (16 ~ 70 ^[30])	高	高 (99% ^[30])	高	高	5 ~ 7 Mb ^[10]	1 ~ 1.5 d ^[24]	20 μL (>0.5 ng/μL ^[30])	通量高,省时低廉,大样本人群筛查的有效工具
SD~HRM	10 ~ 15 mg 绒毛,10 mL 羊水 ^[33] ,200 μL 全血 ^[31]	高 (96 ^[31])	低 (0.2 USD/反应 ^[31])	高	低	高 (100% ^[31])	1 ~ 2 Mb	2 h ^[31-33]	5 ~ 50 ng , 25 ng 最适 ^[31]	绝对定量,成本昂贵,只能检测已知变异
dPCR	2 mL 血浆 ^[37]	较低	高	极高	极高 (1/反应单元总数)	极高	1 ~ 3 Mb	数小时内 ^[34-36]	15 pg ^[37]	

9 小结及展望

性染色体数目异常疾病是致儿童先天畸形、智能低下、生长发育迟缓、性分化异常 成人不孕不育的重要病因之一。如能早期对无症状儿童筛查 ,及早确诊治疗 ,可大大缓解疾病危害性。但现有检测技术在成本、通量和操作简便性等方面均存在一些不足 限制了针对该类疾病开展大规模人群筛查的应用。如何发展出更为准确快速、廉价高效的新型检测技术 尤其是符合早期大规模筛查需要的实用实验室技术 ,为临床诊治提供更为可靠的实验室依据 还需广大临床检验工作者的共同努力。

10 参考文献

[1] Viuff MH ,Stochholm K ,Uldbjerg N , et al. Only a minority of sex chromosome abnormalities are detected by a national prenatal screening program for Down syndrome [J]. Hum Reprod ,2015 ,30 (10) : 2419-2426.
 [2] Boyd PA ,Loane M ,Garne E et al. Sex chromosome trisomies in Europe: prevalence ,prenatal detection and outcome of pregnancy [J].

Eur J Hum Genet ,2011 ,19(2) : 231.
 [3] Herlihy AS ,Halliday JL ,Cock ML , et al. The prevalence and diagnosis rates of Klinefelter syndrome: an Australian comparison [J]. Med J Australia ,2011 ,194(1) : 24-28.
 [4] 陈雁 ,朱宇宁 ,吕时铭. 单管 5 色荧光标记 QF-PCR 在常见染色体数目异常检测中的研究 [J]. 中华检验医学杂志 ,2017 ,40(1) : 50-54.
 [5] 黄晓莉 ,梁喆. 1 775 例高危产妇羊水染色体核型分析 [J]. 现代医药卫生 ,2018 ,34(10) : 1492-1495.
 [6] 万涛. 外周血染色体核型分析在染色体病诊断中的价值研究 [J]. 中外医学研究 ,2018 ,16(19) : 56-58.
 [7] 陈亚军 ,彭正科. 无创产前检测与有创染色体核型分析在产前诊断中联合应用的研究 [J]. 中国优生与遗传杂志 ,2018 ,26(7) : 35-37 ,140.
 [8] 赵旭亮 ,张曼 ,贾建安. 荧光原位杂交技术在产前诊断的应用价值 [J]. 中国优生与遗传杂志 ,2018 ,26(2) : 31-32 ,45.
 [9] Baumgartner A ,Ferlatte CH ,Polyzos AA , et al. Full karyotype interphase cell analysis [J]. J Histochem Cytochem ,2018 ,66(8) : 595-606.

- [10] Stosic M ,Levy B ,Wapner R. The Use of chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis [J]. *Obstet Gyn Clin N Am* ,2018 ,45 (1) : 55-68.
- [11] Batzir NA ,Shohat M ,Maya I. Chromosomal microarray analysis (CMA) a clinical diagnostic tool in the prenatal and postnatal settings [J]. *Pediatr Endocr Rev P* ,2015 ,13(1) : 448-454.
- [12] 杨继青 ,朱宝生. array-CGH 在产前诊断染色体疾病中的应用 [J]. *临床检验杂志* ,2012 ,30(11) : 909-912.
- [13] Mrcog SHM ,Frcpath MM ,Frcog MDKD. The use of chromosomal microarray in prenatal diagnosis [J]. *Obstet Gynaecol* ,2013 ,15(2) : 80-84.
- [14] 谢文美 ,周凤娟 ,王强 ,等. 染色体异常检测技术在产前诊断应用中的研究进展 [J]. *临床检验杂志* ,2015 ,33(2) : 134-136.
- [15] Hillman SC ,McMullan DJ ,Hall G *et al.* Use of prenatal chromosomal microarray: prospective cohort study and systematic review and meta-analysis [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol* ,2013 ,41(6) : 610-620.
- [16] Korostelev S ,Totchiev G ,Kanivets I ,*et al.* Association of non-invasive prenatal testing and chromosomal microarray analysis for prenatal diagnostics [J]. *Gynecol Endocrinol* ,2014 ,30(sup1) : 13-16.
- [17] 吴燕明 ,傅启华 ,余永国. 全基因组芯片扫描分析技术在基因组疾病诊断中的应用 [J]. *中华检验医学杂志* ,2017 ,40(5) : 341-344.
- [18] Rostami P ,Valizadegan S ,Ghalandary M *et al.* Prenatal screening for aneuploidies using QF-PCR and karyotyping: a comprehensive study in iranian population [J]. *Arch Iran Med* ,2015 ,18(5) : 296-303.
- [19] de Morase RW ,de Carvalho MB ,de Amorim-Fiho AG ,*et al.* Validation of QF-PCR for prenatal diagnoses in a Brazilian population [J]. *Clinics (Sao P) Paulo* ,2017 ,72(7) : 400.
- [20] Sun L ,Fan Z ,Long J ,*et al.* Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy for chromosomes 21 ,18 ,13 ,X and Y using segmental duplication quantitative fluorescent PCR (SD-QF-PCR) [J]. *Gene* ,2017 ,627 : 72-78.
- [21] Hochstenbach R ,Meijer J ,Van dBj *et al.* Rapid detection of chromosomal aneuploidies in uncultured amniocytes by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) [J]. *Prenat Diagn* ,2005 ,25(11) : 1032-1039.
- [22] Grandone A ,Del VBF ,Torella A *et al.* Multiplex ligation-dependent probe amplification accurately detects turner syndrome in girls with short stature [J]. *Horm Res Paediatr* ,2016 ,86(5) : 330.
- [23] Guo Q ,Zhou Y ,Wang X *et al.* Simultaneous detection of trisomies 13 ,18 and 21 with multiplex ligation-dependent probe amplification-based real-time PCR. [J]. *Clin Chem* ,2010 ,56(9) : 1451-1459.
- [24] 谢国化 ,沈立松. 下一代测序技术临床应用现状和发展趋势 [J]. *中华检验医学杂志* ,2017 ,40(7) : 483-485.
- [25] Wei CL ,Pais M ,Cano LM ,*et al.* nQuire: a statistical framework for ploidy estimation using next generation sequencing [J]. *BMC Bioinformatics* ,2018 ,19(1) : 122.
- [26] Knaus BJ ,Grünwald NJ. Inferring variation in copy number using high throughput sequencing data in R [J]. *Front Genet* ,2018 ,9 : 123.
- [27] 张展 ,刘丽莎 ,张琳琳 ,等. 基于 Ion Proton 半导体测序平台的无创产前基因检测技术的可行性研究 [J]. *中华检验医学杂志* ,2014 ,37(11) : 861-865.
- [28] 林颖 ,蒋馥蔓 ,秦岭 ,等. 孕妇血浆游离 DNA 高通量测序用于胎儿性染色体非整倍体检测的初步探讨 [J]. *临床检验杂志* ,2013 ,31(6) : 406-408.
- [29] 陈亚军 ,彭正科. 无创产前检测与有创染色体核型分析在产前诊断中联合应用的研究 [J]. *中国优生与遗传杂志* ,2018 ,26(7) : 35-37 ,140.
- [30] 孔令印 ,王挺 ,贺权贵 ,等. 染色体特异位点筛选方法在无创产前检测中的应用 [J]. *临床检验杂志* ,2017 ,35(3) : 165-168.
- [31] Fu DM ,Zhou YL ,Zhao J ,*et al.* Rapid screening for Klinefelter syndrome with a simple high-resolution melting assay: a multicenter study [J]. *Asian J Androl* ,2018 ,20(4) : 349-354.
- [32] Guo Q ,Xiao L ,Zhou Y. Rapid diagnosis of aneuploidy by high-resolution melting analysis of segmental duplications [J]. *Clin Chem* ,2012 ,58(6) : 1019.
- [33] Zhou Y ,Xiao L ,Wu Q ,*et al.* Rapid prenatal diagnosis of common numerical chromosomal abnormalities by high-resolution melting analysis of segmental duplications. [J]. *Genet Test Mol Biomarkers* ,2014 ,18(3) : 141-148.
- [34] Morley AA. Digital PCR: A brief history [J]. *Biomol Detect Quantif* ,2014 ,1(1) : 1-2.
- [35] Huggett JF ,Cowen S ,Foy CA. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool [J]. *Clin Chem* ,2015 ,61(1) : 79-88.
- [36] Quan PL ,Sauzade M ,Brouzes E. dPCR: A Technology Review [J]. *Sensors (Basel)* ,2018 ,18(4) .Pii.E1271.
- [37] Karakas B ,Qubbaj W ,Al-Hassan S ,*et al.* Noninvasive digital detection of fetal DNA in plasma of 4-week-pregnant women following in vitro fertilization and embryo transfer [J]. *PLoS One* ,2015 ,10(5) : e0126501.

(收稿日期: 2018-07-17)

(本文编辑: 许晓蒙)