

• 技术与方法 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.24.020

硅芯片纳米微流体技术在无创产前基因检测中的应用研究^{*}

周 俊,周 莉,马 莉,郭晓辉[△]
(广东省深圳市人民医院产科 518000)

[摘要] **目的** 分析硅芯片纳米微流体技术在捕捉孕妇外周血中胎儿有核红细胞(fnRBC)和胎盘滋养层细胞(EVT)的应用效果。**方法** 选取 2018 年 5 月至 2019 年 12 月该院产科门诊进行产前筛查的孕妇,利用生物抗原抗体的生化特性辨认,再通过硅芯片纳米微流体技术捕捉最大量的 fnRBC 和 EVT。**结果** 孕妇平均年龄(36.9±2.8)岁,平均孕周(20.2±2.3)周,在 8 mL 母体血中,第 1 次捕捉 fnRBC 平均个数为(20.6±6.1)个/mL,第 2 次为(20.4±5.8)个/mL,两次间差异无统计学意义($t=2.362,P>0.05$);第 1 次捕捉 EVT 平均个数为(67.6±7.9)个/mL,第 2 次为(67.2±8.2)个/mL,两次比较差异无统计学意义($P>0.05$)。免疫荧光鉴定 fnRBC 纯度为(95±2)%,EVT 纯度为(93±1)%。**结论** 通过硅芯片纳米微流体技术能较准确捕捉、分离和识别孕妇外周血液样本中的 fnRBC 和 EVT。

[关键词] 硅芯片;纳米微流体技术;基因芯片;有核红细胞;胎盘滋养层细胞;产前检测

[中图分类号] R715.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)24-4237-08

Study on the application of silicon chip nanomicrofluidic technology in noninvasive prenatal gene detection^{*}

ZHOU Jun,ZHOU Li,MA Li,GUO Xiaohui[△]

(Department of Obstetrics,Shenzhen People's Hospital,Shenzhen,Guangdong 518000,China)

[Abstract] **Objective** To analyze the application effect of silicon chip nanomicrofluidics technology in capturing fetal nucleated red blood cells (fnRBC) and extravillous trophoblasts (EVT) in maternal peripheral blood. **Methods** From May 2018 to December 2019, pregnant women were selected for prenatal screening. The biochemical characteristics of biological antigen antibody were used for identification, and then the largest number of fnrbc and EVT were captured by silicon chip nanomicrofluidic technology. **Results** The mean age of pregnant women was (36.9±2.8) years old, the mean gestational age was (20.2±2.3) weeks. In 8 mL maternal blood, the average number of fnRBCs captured for the first time was (20.6±6.1) pieces/mL, the second time was (20.4±5.8) pieces/mL, the difference was not significant ($P>0.05$); the average number of EVT captured for the first time was (67.6±7.9) pieces/mL, the second time was (67.2±8.2) pieces/mL, the difference was not significant ($P>0.05$). The purity of fnRBC was (95±2)% by twice immunofluorescence identification, and the purity of EVT was (93±1)%. **Conclusion** FnRBCs and EVT cells in peripheral blood samples of elderly women can be accurately captured, separated and identified by silicon chip nanomicrofluidics technology.

[Key words] silicon chip; nano microfluidic technology; gene chip; nucleated red blood cells; placental trophoblast cells; prenatal detection

自 2011 年以来,在临床中已广泛开展基于孕妇体内循环中无细胞 DNA 的非侵入性产前检查(non-invasive prenatal examination, NIPT),但由于孕妇恶性肿瘤和胎儿胎盘镶嵌症等局限性,导致 NIPT 技术无法完全替代侵入性产前筛查。目前, SIMPSON^[1]提出一种胎儿有核红细胞(fetal nucleated red blood

^{*} 基金项目:广东省深圳市科技创新委员会国际合作项目(GJHZ20180413181714541)。 作者简介:周俊(1976—),主任医师,博士,主要从事围生医学、母胎医学的研究。 [△] 通信作者, E-mail:2285902525@qq.com。

cells, fnRBC) 在 NIPT 中应用的方法, 该方法不需要对胎儿进行有创性取样, 并且 fnRBC 是有核细胞, 可携带胎儿完整的遗传信息, 在 NIPT 的应用中具有巨大潜力。但由于 fnRBC 在孕妇体内数量极少, 成功分离 fnRBC 存在较大的技术问题。迄今为止, 已开发出多种技术, 如荧光活化细胞分选、磁活化细胞分选、纳米结构基质和离心等^[2-6] 技术方法用于 fnRBC 的富集, 但都有一定的局限性。此外, 也有研究表明胎盘滋养层细胞 (extravillous trophoblast, EVT) 与母胎免疫和妊娠期母体常见并发症的发生具有密切相关性^[7], EVT 在产前基因检测中具有重要参考价值。本研究设计开发一种新型的硅芯片纳米微流体技术, 在捕捉孕妇外周血 fnRBC 和 EVT 中具有一定优势, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 5 月至 2019 年 12 月本院产科门诊进行产前筛查的孕妇为研究对象。纳入标准: (1) 怀孕 7 周以上并在本院建册产检; (2) 具有胎儿染色体异常危险因素的孕妇 (高龄、生育过染色体异常儿、超声软指标 2 个以上异常等); (3) 存在可能胎盘源性疾病危险因素的孕妇 (妊娠高血压疾病、妊娠期急性脂肪肝、胎儿宫内生长受限、血清学筛查指标异常等); (4) 知情同意自愿参与本研究, 并签署同意后书, 留取孕妇外周血 8 mL, 预处理并离心, 备用。排除标准: (1) 孕妇患有肿瘤病史、输血史; (2) 有免疫治疗史; (3) 双胞胎妊娠。本研究中所使用的产前检测技术已获得国家专利 (专利号: ZL201920958825.2), 同时, 本研究已获得医院科研伦理委员批准, 如实告知孕妇及其家属并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 纳米硅芯片 (PicoBioChip) 制作

半导体制作流程如下: 首先将 p 型 (100) 硅芯片按照半导体标准清洁程序去除环境污染物, 利用半导体微影蚀刻技术定义出纳米阵列结构, 使用化学沉积法使抗原沉积在硅芯片上, 接着将芯片放置在 HF/H₂O₂ 蚀刻混合溶液中进行蚀刻; 当去除抗原膜后, 形成具有多孔纳米结构的硅芯片; 最后在芯片表面涂布与生物素具有特异性结合作用的链霉亲和素, 增强目标细胞捕捉效率。

1.2.2 细胞影像辨识系统 (CAT)

经过第一阶段细胞捕捉后, 在纳米硅芯片上会摄取到目标细胞与残存的非目标细胞。这些非目标细胞大多是白细胞, 其中, 嗜中性白细胞的抗原表现通常会与目标细胞相似。因此, 需要通过第二阶段的影

像辨识系统来排除嗜中性白细胞并辨识出目标细胞。本研究自主研发的 CAT 能与全自动检测系统搭配, 对芯片上捕捉到的细胞依据特征及形态进行分类, 目前已成功开发出细胞影像辨识软件, 可在 10 倍显微镜下针对疑似循环肿瘤细胞 (CTCs) 或循环胎儿细胞 (CFCs) 进行影像海选, 并以自主开发的细胞型态算法 (CPA) 及机器学习机制, 自动识别出符合撷取条件的目标细胞。依据条件参数的不同, CAT 能识别出 CTCs 或 CFCs。CAT 可显示每个目标细胞的详细信息, 如细胞大小、染色强度及细胞位置等, 供专业人员进一步判读。其中, 每个目标细胞的位置信息能提供后续的“细胞分选撷取仪”明确知道该细胞在芯片上的准确位置。

1.2.3 撷取目标细胞的回收

CAT 识别出 CTCs 或 CFCs 后, 再辅以全自动微组织细胞分选仪撷取技术 (细胞分离), 将其撷取得到的 CTCs 或 CFCs 用于后续细胞培养、蛋白质生物标记特性研究, 或利用荧光原位杂合技术、微数组与次世代定序 NGS 进行基因分析。

1.2.4 母血中的胎儿细胞撷取

每次实验中, 同时使用 4 个纳米硅芯片进行母血中胎儿细胞的撷取, 其中 2 个用于 EVT 的抓取, 另外 2 个用于 fnRBC 的抓取, 每个纳米芯片使用外周血 8 mL, 胎儿细胞的初步抓取是利用专一性抗体辨认胎儿细胞表面抗原的方式进行, 其中 EpCAM⁺ 用以辨认 EVT, 而 CD71⁺ 辨认 fnRBC, 然后用 CK7 和 HLA-G 染色, 利用自行开发的荧光显微镜检查配备内置的自动检测和图像分析系统, 称为细胞分析工具 (Cyto-AuroraCATTM), 可于显微镜下自动辨识胎儿细胞与母体本身的白细胞, 并利用 CK7⁺ (Cytokeratin-7)/HLA-G⁺/CD45⁻/DAPI⁺ (针对 EVT) 与 CD71⁺/GPA⁺ (glycophorin-A)/CD45⁻/DAPI⁺ (针对 fnRBC) 的抗体组合, 进一步利用荧光标定并区分不同的胎儿细胞类型^[8-9]。本研究撷取的目标细胞为 fnRBC 和 EVT。

1.2.5 fnRBC 和 EVT 纯度鉴定

将撷取到的 fnRBC 和 EVT 置于细胞培养皿中进行培养, 而后将 DMEM 细胞悬液移入 fnRBC 和 EVT 培养皿中, 将培养皿放置在 37 °C, 含有 5% CO₂ 的细胞培养箱中进行免疫黏附, 2~3 h 后将培养皿取出, 上下缓慢摇晃, 而后将未黏附的细胞悬液吸取后移入无菌离心管, 吹打混匀, 在室温条件下 800 r/min 离心 5 min, 快速倒去上清液, 加入 1 mL DMEM 完全培养基重悬细胞沉淀, 轻轻吹打制成单细胞悬液, 通过免疫荧光法鉴定 fnRBC 和 EVT 纯度。

1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

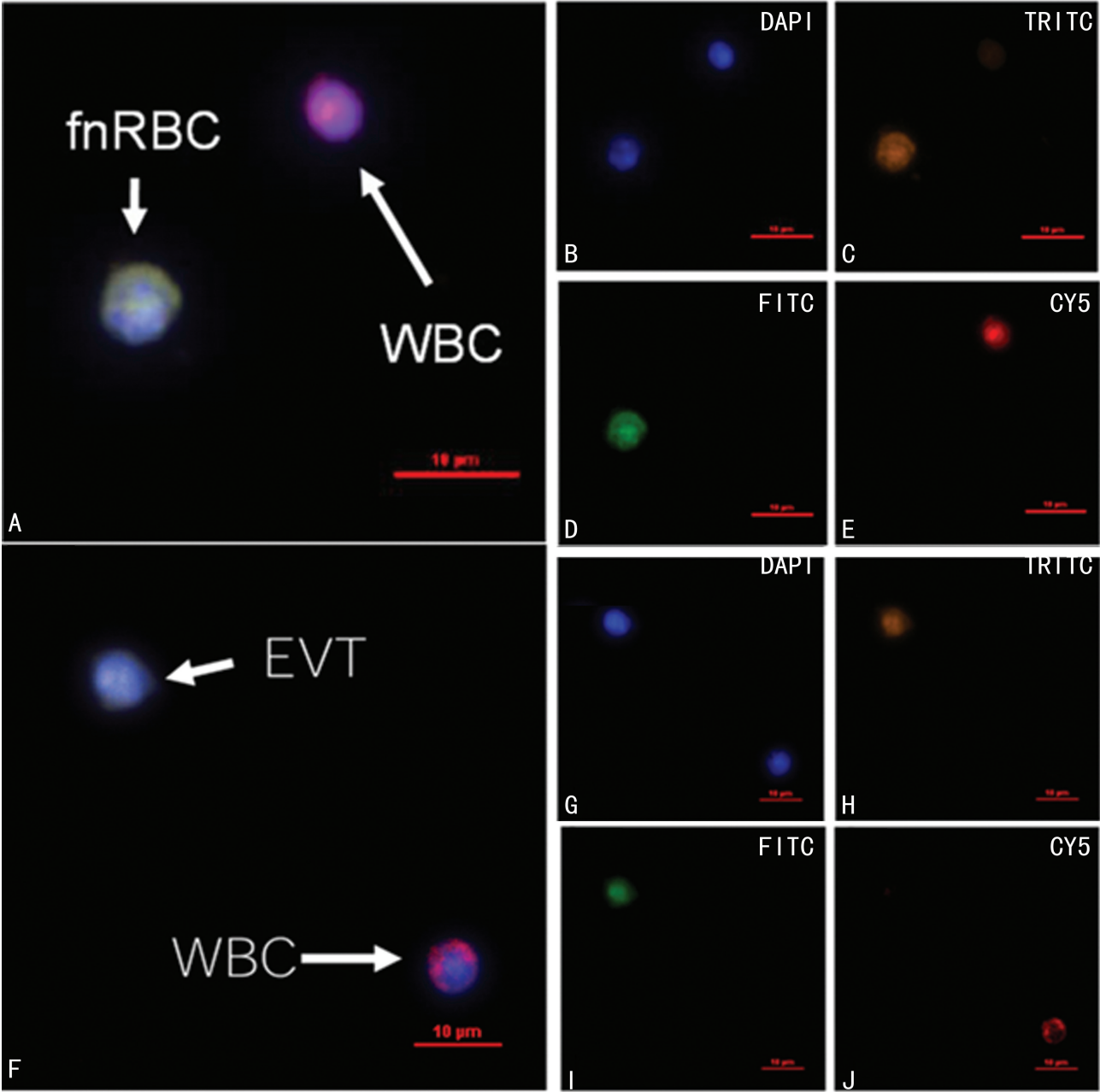
2 结 果

2.1 鉴别 fnRBC、EVT 和母血 WBC

用 TRITC(CD45)标记的抗体识别 fnRBC,用 FITC(CD71)标记的抗体识别 EVT,用 Cy5(GPA)标记的抗体识别母体白细胞,在荧光显微镜下根据细胞大小和显色不同区分 fnRBC、EVT 和母血白细胞。见图 1。

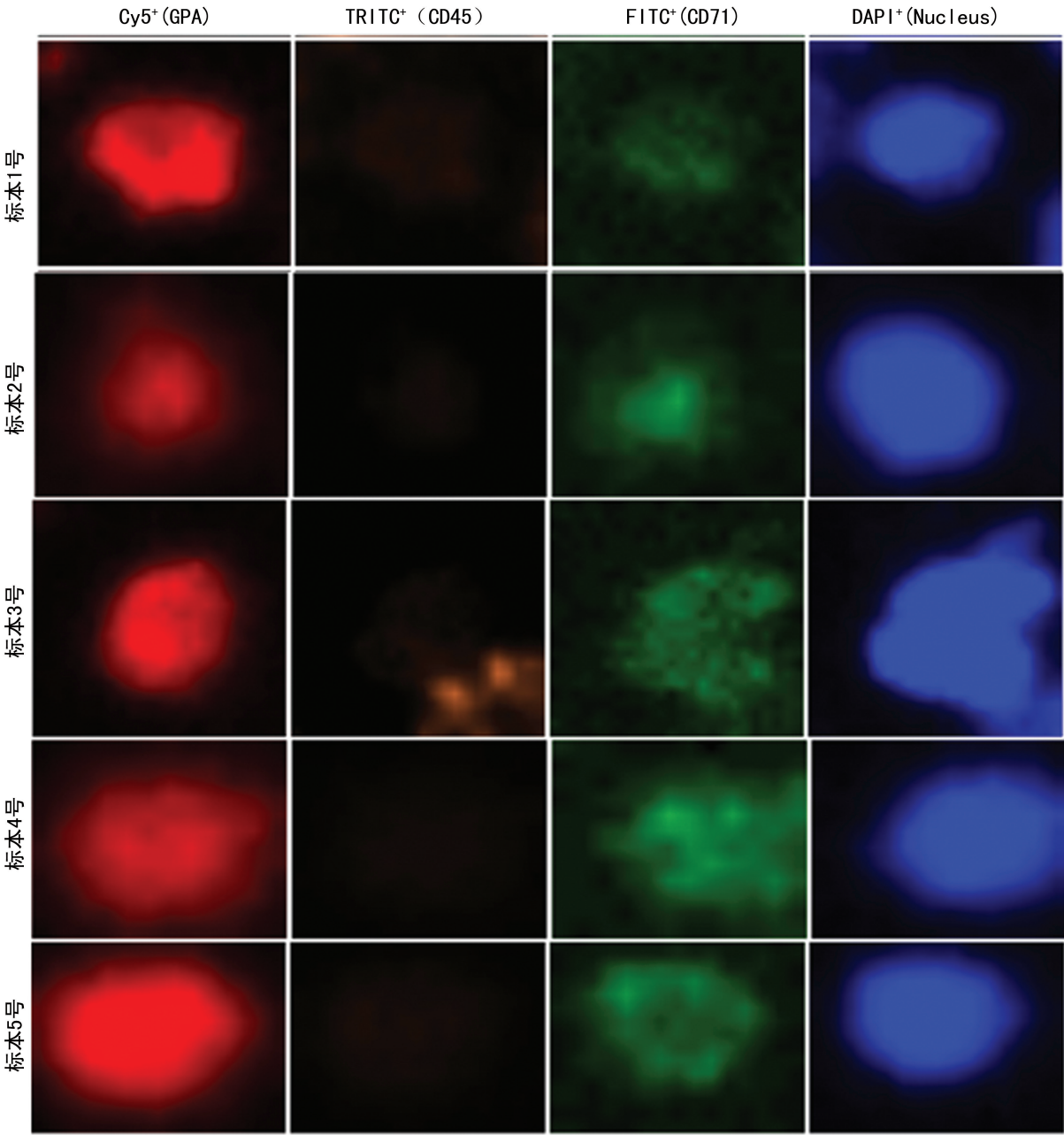
2.2 fnRBC 免疫荧光显示

为最终用母体外周血标本验证硅芯片纳米微流体技术在捕捉分离 fnRBCs 的性能,本研究对 5 例不同年龄和不同孕周被诊断为珠蛋白生成障碍性贫血的孕妇的血液标本进行测试。孕妇平均年龄(36.9 ± 2.8)岁,平均孕周(20.2 ± 2.3)周,通过 Cy5⁺(GPA)、TRITC⁺(CD45)、FITC⁺(CD71)、DAPI⁺(Nucleus)四色免疫荧光染色法进一步验证 fnRBC。在 FISH 显微照片中能较清晰地发现 fnRBC 不同颜色的免疫荧光,见图 2。



A~E:fnRBC;F~J:EVT。

图 1 荧光显微镜下 fnRBC 和 EVT 与母血白细胞(WBC)的鉴别



红色: Cy5⁺ (GPA); 橙色: TRITC⁺ (CD45); 绿色: FITC⁺ (CD71); 蓝色: DAPI⁺ (Nucleus)。

图 2 5 例珠蛋白生成障碍性贫血孕妇外周血中分离的 fnRBCs 的 FISH 显微照片

2.3 通过扫描电子显微镜显示 fnRBC 和 EVT 显微照片

显微照片显示硅芯片表面形貌由具有相同尺寸和空间的图案化纳米结构组成,可见突起处显示为 fnRBC 和 EVT 在硅芯片表面被捕捉,见图 3。

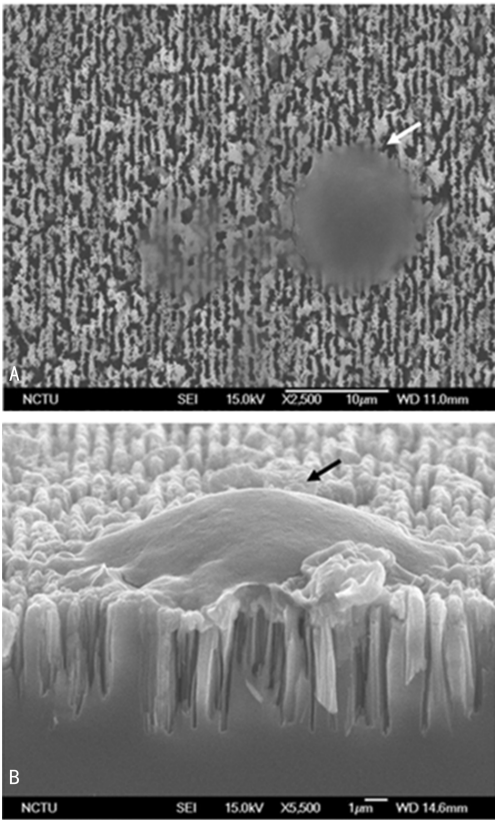
2.4 捕捉 fnRBC、EVT 和鉴定细胞纯度

每次取 8 mL 母体血,通过硅芯片纳米微流体技术,每例孕妇进行两次检测,其中第 1 次捕捉 fnRBC 数量平均值为(20.6±6.1)个/mL,第 2 次为(20.4±5.8)个/mL,两次捕捉数量比较差异无统计学意义($t=2.362,P>0.05$),免疫荧光鉴定 fnRBC 纯度为(95±2)%;第 1 次捕捉 EVT 数量平均值为(67.6±

7.9)个/mL,第 2 次为(67.2±8.2)个/mL,两次比较差异无统计学意义($t=1.592,P>0.05$),免疫荧光鉴定 EVT 纯度为(93±1)%。详见表 1、图 4、5。

表 1 捕捉 fnRBC 和 EVT 数量

标本 编号	年龄 (岁)	孕周 (周 ^{+d})	捕捉 EVT 数量 (个/mL)		捕捉 fnRBC 数量 (个/mL)	
			第 1 次	第 2 次	第 1 次	第 2 次
1	39	18 ⁺⁴	73	75	15	16
2	35	24 ⁺³	62	59	28	27
3	37	21 ⁺¹	65	64	23	25
4	38	23 ⁺⁶	70	71	18	16
5	34	20 ⁺²	68	67	19	18
合计			338	336	103	102



A: 俯视图;B: 侧视图;箭头: fnRBC 和 EVT。

图 3 扫描电子显微镜显微照片

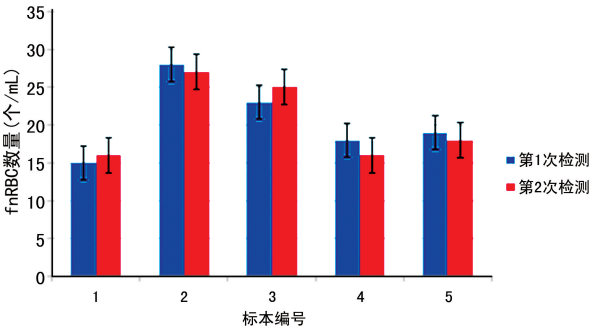


图 4 两次检测捕捉 fnRBC 数量

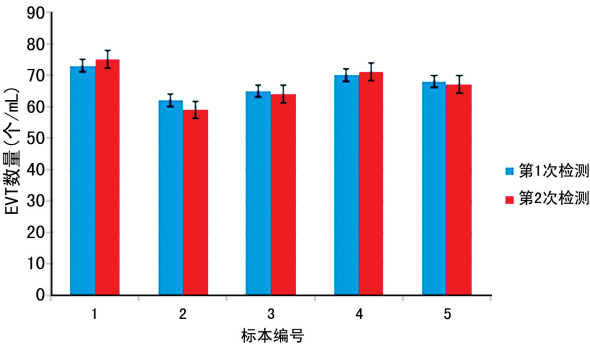


图 5 两次检测捕捉 EVT 数量

3 讨 论

产前筛查对唐氏综合征等出生缺陷的早期诊断和治疗至关重要，目前，主要通过侵入性的方法进行产前检测，如羊膜穿刺术和绒毛取样(CVS)，这些方

法通常伴随着高风险性，如羊水污染或羊水渗漏等^[10-11]，因此，人们对产前筛查的安全性提出了更高的要求。近几年，国内外相关学者在非侵入性方式筛查胎儿遗传性出生缺陷方面进行了深入研究，并开发一种基于无细胞胎儿 DNA(cffDNA)或 fnRBC 的检测方法^[12]，该方法不需要对未发育胎儿检测材料进行有创性取样。cffDNA 在母体血浆中含量丰富，易于收集^[13-15]，唐氏综合征等检出率接近 99%，假阳性率小于 0.1%。目前，cffDNA 在有些医疗机构已被作为产前筛查的生物标志物之一。然而，基于 cffDNA 的产前筛查具有一定的缺陷^[16]：首先，cffDNA 很容易受到母体 DNA 的污染，因此，依据 cffDNA 进行产前无创检测需要深度测序，增加了成本，同时降低了稀有基因突变检测的灵敏度。其次，cffDNA 通常表现出碎片化，很难收集到完整结构，无法检测到基因的反转/融合，对于一些遗传性疾病的检测存在盲区，这些内在不足阻碍了 cffDNA 在单基因缺陷、隐性遗传病等出生缺陷产前筛查中的应用^[17]。作为一种替代方法，fnRBC 是有核细胞，携带胎儿完整的遗传结构，在 NIPT 的应用中具有巨大潜力^[18]。然而，由于孕妇体内 fnRBC 数量极少，如何准确地判断、识别、捕捉和分离 fnRBC 一直是面临的一项技术难题。

迄今为止，已开发出多种技术，如荧光活化细胞分选、磁活化细胞分选、微流控装置、纳米结构基质和离心等，用于 fnRBC 的捕捉和富集^[19-21]。在这些方法中，用 fnRBC 特异性抗体捕捉细胞的荧光活化细胞分选和磁活化细胞分选方法具有良好的特异性和高通量。然而，相关学者通过验证发现：荧光活化细胞分选存在有细胞回收率低的不足，磁活化细胞分选存在有细胞纯度低的缺陷，并且这两种方法都需要对细胞标本进行离心或细胞裂解等预先处理，存在有引起细胞丢失或者被破坏的风险^[22]。AGHAZ 等^[23]研制了一种微流控器件，通过精确的流量控制和参数设置，实现了 fnRBC 纯度和回收率的提高，该方法通过制作交叉流微滤器，利用模型混合物对 fnRBC 进行分类，实现了胎儿细胞(74.0±6.3)%的回收，能从细胞混合物中去除(46.5±3.2)%的红细胞。CROSNIER 等^[24]也根据红细胞大小和变形特征，设计一种将 fnRBC 从脐血中分离出来的一微柱过滤器装置，平均每毫升母血获得 1.2 个细胞。但上述两种方法都有一些缺点，如低流量、有限的灵敏度和容易堵塞等。而 YANG 等^[25]利用无细胞 DNA 条形码单分子检测技术，结合特异性抗体修饰的纳米结构基质，通过纳米表面与抗原抗体反应的协同作用，对胎儿细胞的捕捉效率有明显提高，特异性抗 CD147 抗体生物改性羟

基磷灰石/壳聚糖可成功地从母体血液循环中回收 fnRBC, 平均每毫升母体血液中可捕捉 14 个 fnRBC, 但由于正常血细胞的非特异性结合, 这种静态分离装置往往导致细胞纯度低^[26-27]。HUANG 等^[28]使用了半乳糖特异性凝集素结合从母体血液中分离 fnRBC, 获得了满意的 fnRBC 回收率, 然而该技术耗时, 并且非特异性吸附会导致纯度降低^[29]。基于密度的离心方法通常依靠密度差分离 fnRBC, 这种方法简单, 但纯度低, 细胞丢失高达 $(40 \pm 10)\%$ ^[30]。YOO 等^[31]使用双密度梯度系统从母体血液标本中回收 fnRBC, 平均每 10 毫升血液标本获得 20.9 个细胞。通过上述论述可见, 目前关于母体外周血中 fnRBC 的识别、捕捉、收集和分离等多种技术方法均存在一定的弊端和不足, 因此, 需要一个稳定、高效、高纯度的 fnRBC 分离平台。

本研究利用生物抗原抗体的生化特性辨认, 再经由半导体芯片的纳米结构设计捕捉最大量 FnRBC、EVT, 可直接进行胎儿染色体及基因芯片检查, 突破了目前 NIPT 胎儿游离 DNA 检测只能检测 13、18 及 21 三对染色体的限制, 只需一次性抽取母体外周血就可以对胎儿 23 对染色体及常见基因拷贝数异常、单基因病进行产前诊断, 更突破了侵入性产前诊断才能直接取得胎儿细胞的限制及时间限制, 最早能在孕 7 周就可检出细胞, 亦远远超前了侵入性产前诊断孕周(孕 12~13 周)的限制。本研究孕妇平均孕周为 (20.2 ± 2.3) 周, 最早 1 例孕周为 18⁺ 周, 两次捕捉到 fnRBC 细胞个数平均值分别为 (20.6 ± 6.1) 、 (20.4 ± 5.8) 个/mL, 捕捉 EVT 细胞个数平均值分别为 (67.6 ± 7.9) 、 (67.2 ± 8.2) 个/mL 均明显高于前期相关学者采取其他方法所捕捉相关细胞的个数^[32-34], 并且本研究对每份标本进行两次检测所捕捉的 fnRBC 和 EVT 细胞数量差异不明显。表明硅芯片纳米微流技术在捕捉高龄产妇早期外周血液中 fnRBC 和 EVT 细胞中性能较为稳定, 出现偏倚和误差的概率较低。同时, 通过免疫荧光法鉴定 fnRBC 纯度为 $(95 \pm 2)\%$ 、EVT 纯度为 $(93 \pm 1)\%$, 均明显高于前期相关学者^[35-37]通过其他技术所捕捉到母体 fnRBC 和 EVT 的纯度, 表明采用硅芯片纳米微流体技术能捕捉到母体外周血中纯度较高的 fnRBC 和 EVT 细胞。

本研究只是通过硅芯片纳米微流技术对识别、捕捉和分离母体外周血中 fnRBC 和 EVT 细胞的数量能力以及技术的稳定性进行了研究。实际分离出来的 fnRBC 和 EVT 细胞还是有限, 并没有达到预期目标, 对孕周小于 18 周产妇外周血中 fnRBC 和 EVT 的捕捉效果还需要进一步地分析。本研究合作小组

已经采用快速 QF-PCR 或 FISH 技术对 fnRBC 进行 3 对常见染色体(21, 13, 18 号)及性染色体进行检测^[26], 下一步将完善 fnRBC 和 EVT 细胞分离技术, 利用二代测序技术、基因芯片对 fnRBC 进行基因微缺失、微重复及相关单基因病检测, 甚至全外显子或全医学基因组检测。同时, 将利用提取到的 EVT, 通过基因芯片对胎盘源性疾病(妊娠期高血压疾病、胎儿宫内生长受限、妊娠期急性脂肪肝等)进行大样本量筛查, 确定目的基因。

综上所述, 可见硅芯片纳米微流体技术能较准确捕捉、识别和分离高龄产妇早期外周血样本中 fnRBC 和 EVT, 为进行全面胎儿染色体及基因芯片检查提供条件。此外, EVT 细胞亦可提供胎盘病变及胎盘基因学的研究依据, 这将有利于提高产前筛查测序精准度及特异度, 同时也大大提高了检测的深度和广度, 对出生缺陷及遗传疾病的早期筛查和防控提供临床诊断依据具有深远意义。

参考文献

- [1] SIMPSON J L. Invasive procedures for prenatal diagnosis; any future left? [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2012, 26(5): 625-638.
- [2] WEI X, AO Z, CHENG L, et al. Highly sensitive and rapid isolation of fetal nucleated red blood cells with microbead-based selective sedimentation for non-invasive prenatal diagnostics [J]. Nanotechnology, 2018, 29(43): 434-442.
- [3] SPELLACY W N, GILBERT-BARNES E, TSIBRIS J C, et al. Umbilical cord knots and cord blood gases, erythropoietin and nucleated red blood cell levels: a study of possible chronic fetal hypoxia [J]. Fetal Pediatr Pathol, 2018, 32(2): 158-161.
- [4] MA G C, LIN W H, HUANG C E, et al. A silicon-based coral-like nanostructured microfluidics to isolate rare cells in human circulation: validation by sk-br-3 cancer cell line and its utility in circulating fetal nucleated red blood cells [J]. Micromachines (Basel), 2019, 10(2): 104-109.
- [5] HE Z, GUO F, FENG C, et al. Fetal nucleated red blood cell analysis for non-invasive prenatal diagnostics using a nanostructure microchip [J]. J Mater Chem B, 2017, 5(2): 226-235.
- [6] TABOR A, ALFIREVIC Z. Update on proce-

- dure-related risks for prenatal diagnosis techniques[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2010, 27(1):1-7.
- [7] MENDES S, TIMÓTEO-FERREIRA F, SOARES AI, et al. Age-related oxidative modifications to uterine albumin impair extravillous trophoblast cells function[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 152(1):313-322.
- [8] CHOO LANI M, MAHYUDDIN A P, HAHN S. The promise of fetal cells in maternal blood[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2018, 26(5):655-667.
- [9] UNAL C, OZKARA H A, TANACAN A, et al. Prenatal enzymatic diagnosis of lysosomal storage diseases using cultured amniotic cells, uncultured chorionic villus samples, and fetal blood cells; Hacettepe experience[J]. *Prenat Diagn*, 2019, 39(12):180-185.
- [10] ZHANG H, YANG Y, LI X, et al. Frequency-enhanced transferrin receptor antibody-labelled microfluidic chip (FETAL-Chip) enables efficient enrichment of circulating nucleated red blood cells for non-invasive prenatal diagnosis[J]. *Lab Chip*, 2018, 18(18):2749-2756.
- [11] LO T K, CHAN K Y, KAN A S, et al. Study of the extent of information desired by women undergoing non-invasive prenatal testing following positive prenatal Down-syndrome screening test results[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2017, 137(3):338-339.
- [12] FENG C, HE Z, CAI B, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies and microdeletion syndrome using fetal nucleated red blood cells isolated by nanostructure microchips[J]. *Theranostics*, 2018, 8(5):1301-1311.
- [13] HUANG C E, MA G C, JOU H J, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidy by circulating fetal nucleated red blood cells and extravillous trophoblasts using silicon-based nanostructured microfluidics[J]. *Mol Cytogenet*, 2017, 39(10):10-14.
- [14] VAN CAMPEN J, SILCOCK L, YAU S, et al. A novel non-invasive prenatal sickle cell disease test for all at-risk pregnancies[J]. *Br J Haematol*, 2020, 190(1):119-124.
- [15] LIU Y, LIU H, HE Y, et al. Clinical performance of non-invasive prenatal served as a first-tier screening test for trisomy 21, 18, 13 and sex chromosome aneuploidy in a pilot city in China[J]. *Hum Genomics*, 2020, 14(1):21-24.
- [16] SINGH R, HATT L, RAVN K, et al. Fetal cells in maternal blood for prenatal diagnosis: a love story rekindled[J]. *Biomark Med*, 2017, 11(9):705-710.
- [17] GÖTHERSTRÖM C, CHAN J, O'DONOGHUE K, et al. Identification of candidate surface antigens for non-invasive prenatal diagnosis by comparative global gene expression on human fetal mesenchymal stem cells[J]. *Mol Hum Reprod*, 2017, 23(3):210-215.
- [18] BEAUDET A L. Using fetal cells for prenatal diagnosis: history and recent progress[J]. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2016, 172(2):123-127.
- [19] WOU K, FEINBERG J L, WAPNER R J, et al. Cell-free DNA versus intact fetal cells for prenatal genetic diagnostics: what does the future hold? [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2015, 15(8):989-998.
- [20] LEE Y K, KIM H J, LEE K, et al. Recent progress in laboratory diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathy: a study by the Korean red blood cell disorder working party of the Korean society of hematology[J]. *Blood Res*, 2019, 54(1):17-22.
- [21] SENER LT, AKTAN M, ALBENIZ G, et al. Identification of red blood cell membrane defects in a patient with hereditary spherocytosis using next-generation sequencing technology and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(5):3912-3922.
- [22] KARNPEAN R, FUCHAROEN G, FUCHAROEN S, et al. Fetal red blood cell parameters in thalassemia and hemoglobinopathies[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2018, 34(3):166-171.
- [23] AGHAZ F, OJAGH SZ, KHANJARI S, et al. The contingent prenatal screening test for down's syndrome and neural tube defects in west of iran[J]. *J Reprod Infertil*, 2019, 20(4):

244-251.

- [24] CROSNIER C, BUSTAMANTE L Y, BART HOLDSON S J, et al. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*[J]. *Nature*, 2011, 480(7378): 534-537.
- [25] YANG X, ZHOU Q, ZHOU W, et al. A cell-free dna barcode-enabled single-molecule test for noninvasive prenatal diagnosis of monogenic disorders: application to β -thalassemia [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2019, 6(11): 1802332.
- [26] NAGARAJAN S, BELAID H, POCHAT-BOHATIER C, et al. Design of Boron nitride/gelatin electrospun nanofibers for bone tissue engineering [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(39): 33695-33706.
- [27] KALEJTA C D, HIGGINS S, KERSHBERG H, et al. Evaluation of an automated process for disclosure of negative noninvasive prenatal test results[J]. *J Genet Couns*, 2019, 28(4): 847-855.
- [28] HUANG Q, CAI B, CHEN B, et al. Efficient Purification and release of circulating tumor cells by synergistic effect of biomarker and sio2 @gel-microbead-based size difference amplification[J]. *Adv Healthc Mater*, 2016, 5(13): 1554-1559.
- [29] LIU H, RUAN M, XIAO J, et al. TiO₂ nanorod arrays with mesoscopic micro-nano interfaces for in situ regulation of cell morphology and nucleus deformation[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(1): 66-74.
- [30] PARK J M, LEE J Y, LEE J G, et al. Highly efficient assay of circulating tumor cells by selective sedimentation with a density gradient medium and microfiltration from whole blood[J]. *Anal Chem*, 2012, 84(17): 7400-7407.
- [31] YOO C E, MOON H S, KIM Y J, et al. Highly dense, optically inactive silica microbeads for the isolation and identification of circulating tumor cells[J]. *Biomaterials*, 2018, 75(6): 271-278.
- [32] KYPRI E, IOANNIDES M, TOUVANA E, et al. Non-invasive prenatal testing of fetal chromosomal aneuploidies: validation and clinical performance of the veracity test[J]. *Mol Cytogenet*, 2019, 54(5): 30-34.
- [33] INKSTER A, THOMAS M A, GAMACHE N S, et al. A challenging prenatal qf-pcr rapid aneuploidy test result caused by a maternally inherited triplication within chromosome Xq26.2 [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2018, 67(2): 125-130.
- [34] HU H J, LEE M Y, CHO D Y, et al. Prospective clinical evaluation of Momguard non-invasive prenatal test in 1011 Korean high-risk pregnant women[J]. *J Obstet Gynaecol*, 2019, 42(7): 1-6.
- [35] MA J, WANG Y, WANG W, et al. Validation of combinatorial probe-anchor ligation-based sequencing as non-invasive prenatal test for trisomy at a central laboratory [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2017, 50(1): 49-57.
- [36] GUANCIALI F P, PALKA C, MORIZIO E, et al. Sequential combined test, second trimester maternal serum markers, and circulating fetal cells to select women for invasive prenatal diagnosis[J]. *PLoS One*, 2017, 12(12): 189-215.
- [37] TECLEAB A, LYASHCHENKO A K, RAI A J. Quad screen test, a multiplexed biomarker assay for prenatal screening to assess birth defects: the columbia university experience using the beckman access2 immunoassay analyzer and benetech PRA [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 85(8): 297-307.

(收稿日期: 2021-02-18 修回日期: 2021-08-08)