

孕妇外周血中胎儿有核红细胞获取及鉴定的研究进展*

Research Advance of Obtaining and Identifying Fetal Nucleated Red Blood Cells in Maternal Peripheral Blood

袁海, 龙桂芳

YUAN Hai, LONG Gui-fang

(广西医科大学第一附属医院儿科, 广西南宁 530021)

(Department of Pediatrics, the First Hospital Affiliated to Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China)

摘要:从孕妇外周血中获取胎儿有核红细胞是安全、方便,易于被孕妇接受的无创性产前诊断。提取孕妇外周血中胎儿有核红细胞最理想的方法是首先富集孕妇外周血,用胚胎或者胎儿血红蛋白抗体进行标记、识别,应用显微操作技术得到单个有核红细胞,继而扩增单个有核红细胞的基因组 DNA,并进一步应用 STR 连锁分析验证为胎源性,进行遗传病诊断。

关键词:有核红细胞 外周血 胎儿 孕妇 产前诊断

中图分类号:R714.55 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2007)02-0132-05

Abstract: Obtaining fetal nucleated red blood cell (NRBC) from peripheral blood of pregnant women is a safe and convenient approach of non-invasive prenatal diagnosis, which is easily accepted. The ideal method of obtaining it is described as follows: NRBCs were separated from maternal peripheral blood, labeled and identified with antibodies against embryo or fetal cells. Single NRBC was then collected by micromanipulator under microscopic observation followed by the whole genome amplification of single cell. After this, STR linkage analysis was used to verify the fetal origin for further diagnosis of hereditary disease.

Key words: nucleated red blood cell, peripheral blood, fetus, pregnant woman, prenatal diagnosis

传统的产前诊断手段虽然诊断准确率较高,但是对母儿具有危险性,使之长期以来只应用于具有遗传病高发风险的孕早期和孕中期妇女,且不易为孕妇所接受。多年以来,人们致力于寻求一种无创伤性的产前诊断方法。孕妇外周血中存在胎儿细胞这一发现为此项研究提供方向。孕妇外周血中已发现的胎儿细胞有合体滋养细胞、胎儿淋巴细胞、胎儿粒细胞、胎儿有核红细胞(nucleated red blood cell, NRBC)等^[1],其中胎儿 NRBC 具有众多分离及诊断优势,是目前最受关注的用于产前诊断的目的细胞^[2~4]。由于孕妇外周

血中胎儿细胞数量稀少,如何得到足够数量的纯胎儿细胞用于临床产前诊断一直是困扰医学界的难题。随着科学技术的发展,胎儿细胞特异抗体表达的研究以及胎儿细胞筛选、纯化、全基因组扩增技术的发展成熟,使无创性产前诊断取得巨大进步,显示出广阔的临床应用前景。

1 胎儿 NRBC 的数量及富集最佳时期

由于所采用的技术方法不同,富集 NRBC 的数量及最佳时期也有差别。Bianchi 等^[5]应用定量 PCR 对孕妇外周血中胎儿 NRBC 进行定量,结果在 90 例孕 46,XY 胎儿的孕妇外周血中 NRBC 的平均数量为 19 (0~91)/16ml,109 例孕 46,XX 胎儿的外周血中平均数量约为 2(0~24)/16ml。国内马旭等^[6]对 41 例孕 6~14 周的妇女连续每周采血 1 次,应用 PCR

收稿日期:2007-01-31

修回日期:2007-03-21

作者简介:袁海(1979-),男,硕士研究生,主要从事儿童重血液病研究工作。

* 广西科学基金资助项目(桂科攻 0015042)。

技术检测血中 Y 染色体特异锌指蛋白基因 (ZFY), 结果怀男胎的 19 例孕 6 周、11 周、14 周孕妇 ZFY 的检出率分别为 51.3%、68.14%、95.10%, 妊娠女胎的孕妇无一例 ZFY 阳性, 提示胎儿细胞进入孕妇外周血循环的量随妊娠的进展逐渐增多, 他们认为分离胎儿细胞的最佳采血时间是孕 14 周。而 Rodriguez 等^[7]应用双重密度梯度离心和 MACS 分离胎儿细胞, FISH 证实胎源性, 表明胎儿 NRBC 从孕早期到孕中期逐渐增高, 认为孕 15 周是挑选胎儿 NRBC 进行非损伤性产前诊断的最佳时期。

2 胎儿 NRBC 富集与分离纯化方法

由于孕妇外周血中胎儿 NRBC 的数量很少, 要得到胎儿 NRBC 必需使用高效敏感的方法对其进行富集与分离纯化。目前进行富集分选的方法主要有荧光激活细胞分选法 (fluorescence activated cell sorting, FACS), 磁激活细胞分选法 (magnetic activated cell sorting, MACS), 电荷流式分离法 (charge flow separation, CFS), 密度梯度离心分离法 (density gradient centrifugation) 和 RosetteSep 分离法。

荧光激活的细胞分选法又称流式细胞计数法, 是 Bianchi 于 1990 建立的, 其原理是通过流式细胞仪测定流式差的细胞悬液中单个细胞所发出的散射光和荧光等多种参数, 然后通过细胞分选器将特定的细胞从整个细胞体中分离出来^[8]。流式细胞分选法是目前应用最广泛的细胞自动分析分选技术之一。其优点是分离纯度高, 缺点是价格昂贵, 操作技术复杂、较费时, 不适于在临床推广。

MACS 是 1990 年 Miltenyi^[9]建立的, 其原理是用结合磁性微粒的单克隆抗体标记细胞, 在外加磁场的作用下, 磁激活细胞分选器可将样品中带磁与不带磁的细胞分开, 以达到分离纯化的目的。目前使用较多的单克隆抗体为 Glycophorin A、CD36、CD45 和 CD71, Prieto 等^[10~12]多次使用 2B7.4 单克隆抗体标记 NRBC, 均能更好地收集 NRBC。Yang 等^[13]对孕妇外周血用 CD45、CD71 标记的阴性和阳性免疫磁珠分选、Kleihaur-Betke 染色和 FISH 鉴定的结果显示, 该方法判定男胎的敏感度为 100%, 特异度为 91.7%, 判断女胎的敏感度为 91.7%, 特异度为 100%。MACS 设备简单, 操作亦不复杂, 分离速度快, 适用于作遗传分析。但 MACS 分选的依据只是细胞表面抗原的不同, 需要特殊标记的抗体, 且细胞丢失严重, 必须结合其他的筛选方法才能得到一定纯度的胎儿细胞。

CFS 的原理是利用细胞表面的电荷不同, 在电场力的作用下有不同的迁移速度而达到分离细胞的目的。Wachtel 等^[14]应用此法对 16 例孕妇外周血样进行初步分离, 发现每 20ml 血样中平均有 2000 个 NRBC, 均经与染色体的荧光原位杂交证实。此法的优点是分离迅速, 分离过程不需要抗体, 被分离的细胞具有活性, 但是分离出的有核红细胞纯度不高, 欲得到纯的胎儿细胞, 还需与其他方法合用。

密度梯度离心法可获得不同密度的 NRBC。密度梯度离心法根据形成梯度的多少可分为双重密度梯度离心法、三重密度梯度离心法和连续密度梯度离心法。双重密度梯度离心法和三重密度梯度离心法均不易形成肉眼可见的有核红细胞层, 分离效果较差。而不连续密度梯度离心法对新鲜孕妇外周血进行离心, 有核红细胞层位于 1.075g/ml 和 1.085g/ml 之间。这种方法操作简单, 细胞比例高, 价格低廉, 适合推广到临床。但大多数细胞经密度梯度离心后仍为母源性, 因此需要与其他方法如 MACS、FACS 或者显微操作等合用, 才能较好地分离出胎儿 NRBC。

RosetteSep 分离法的分离液是含有多种单克隆抗体的单抗混合物, 使非靶细胞与全血中的多个红细胞交联, 形成免疫玫瑰花结。这增加了非靶细胞的密度, 当进行密度梯度离心时, 非靶细胞会随着红细胞聚集沉淀, 未被抗体标记的靶细胞即可被收集。此分离不需要如 MACS、FACS 等任何其他特殊仪器设备, 收集的靶细胞可直接用于以后的研究。最近 Bischoff 等^[15]运用 RosetteSep 结合单密度梯度离心法方法分别对 81 例孕妇外周血胎儿细胞进行分离并用 FISH 及 real-time PCR 进行检测, 结果令人满意。

3 NRBC 来源的遗传学鉴定

由于从孕妇外周血中富集到的 NRBC 有一部分来源于母亲, 因此需要对 NRBC 进行来源的遗传学鉴定。目前所用细胞表面主要标识有 CD71、CD36 及 GPA (glycophorin A, 血型糖蛋白 A) 受体。然而并非所有的胎儿 NRBC 都表达 CD71, 同时孕妇外周血中也有少量细胞表达 CD71。单独应用 CD71 MCAB 分选胎儿 NRBC 纯度较低, GPA 特异性较强^[16], 但可引起靶细胞凝集而影响分离效果^[17]。细胞内标志有 ζ 珠蛋白、 ϵ 珠蛋白、 γ 珠蛋白^[18,19]。胎儿最早出现的血红蛋白是 Hb Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$) 和 Hb Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$), 随后出现 Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$)。在孕程 12 周后主要为 HbF ($\alpha_2\gamma_2$), 而成人则以 HbA ($\alpha_2\beta_2$) 为主。Albita^[20]发现在正常人外周血中 ζ 珠蛋白也可有所表达, 而 γ 珠蛋白在成人外周血中同样有少量的表达, 但是数量极

微,目前研究较多的是用 γ 珠蛋白抗体,分离胎儿NRBC。但是对于 α 地中海贫血病人,外周血中可有较多的 ζ 珠蛋白^[21],而 β 地中海贫血患者外周血中 γ 珠蛋白表达增多^[22],且妊娠也会使母体 γ 珠蛋白表达增多^[23]。相对于 ζ 、 γ 珠蛋白, ϵ 蛋白在成人红细胞中完全不表达。Choolani^[24]研究表明 ϵ 阳性胎儿NRBC容易与母体 ϵ 阴性NRBC区分开,且在孕12周仍有1/2的 ϵ 阳性细胞可被检测到。Mavrou等^[25]的实验结果也提示, ϵ 珠蛋白是很好的胎儿NRBC鉴定标识物,是孕程早期阶段诊断识别胎儿细胞的有利工具,可用于胎儿NRBC的鉴定。

此外,还可以对Y染色体特异序列进行PCR扩增或用Y染色体特异序列的探针进行荧光原位杂交^[26]。这种方法受胎儿性别的限制。随着显微操作与PCR技术的发展,使得挑取单个细胞进行PEP扩增成为可能。通过挑取富集的单个细胞与母源DNA进行连锁分析能确定有核红细胞的来源,这种方法不受胎儿性别的限制。

NRBC鉴定的方法有荧光素原位杂交(Fluorescence in situ hybridization, FISH),引物原位标记技术(primed in situ labeling, PRINS),引物延伸预扩增法(primer extension preamplification, PEP),多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA),STR-PCR进行胎源性鉴别。

FISH是一种非放射性原位杂交法,它利用特殊的荧光素标记DNA探针,在染色体制片、细胞滴片或组织切片上进行DNA杂交,经免疫荧光显色,可以检测细胞内DNA或RNA序列存在与否,其快速、安全、灵敏度高、特异性强,使快速诊断染色体的异常成为可能,已成为新的产前诊断的方法^[27]。Babochkina^[28]认为由于母体内的高氧环境使得胎儿NRBC发生皱缩,不易被FISH所识别。Shin等^[29]应用五色荧光原位杂交,通过细胞分选标记X,Y,13,18,21号染色体,准确识别非整倍体妊娠。最近,在美国应用电脑软件,开发了实用光谱影像诊断法(applied spectral imaging, ASI),应用skypaint特异性探针作杂交,再以ASI系统成像,最后以skyview光谱核型分析电脑软件运算处理频谱,可分辨出一般摄影机或肉眼无法分辨出的影像颜色。此skypaint探针可显示24种不同颜色,即彩色FISH。

PRINS技术是继原位PCR之后而创建的分子细胞生物学新技术,用于细胞或染色体原位检测DNA或RNA。PRINS技术将PCR技术和原位杂交技术有机结合,兼有放大目的基因和定位的特点。最新的国外研究将该技术应用于染色体异常、单拷贝基

因的异常以及肿瘤相关基因变异等研究^[30]均有成功报道,从而揭示了其强大的临床应用潜力。Krabchi^[31]对12例妊娠中期孕男性胎儿的孕妇,取3ml外周血未经富集运用FISH和PRINS技术进行标记,通过荧光显微镜识别胎儿XY细胞,可以得到2~6个胎儿细胞。我国陈汉平等^[32]采用PRINS、PEP和巢式聚合酶链反应方法检测孕妇外周血中单个胎儿细胞的性别决定区Y基因(SRY)基因片段的结果表明,PRINS检测SRY基因的敏感性97.56%,特异性100%,在三种方法中最高,PEP技术加PCR方法检测SRY基因的敏感性为97.39%,特异性为99.17%,也远高于巢式聚合酶链反应的80%和87.5%。证实PRINS和PEP-PCR这两种检测技术敏感性高、特异性强,适用于单细胞基因的检测。最近,Krabchi^[33]又运用双色PRINS技术对孕妇外周血中分离的胎儿细胞XY染色体进行不同颜色标记,其鉴别效果与FISH相似,但在耗时和费用方面却优于FISH。

PEP主要以15个碱基的随机寡核苷酸为引物,在DNA聚合酶的作用下,通过多次热循环反应,使原有的基因组拷贝数放大数十倍,取小份产物可以进行多位点PCR扩增或重复扩增特异基因序列,以证实实验结果^[34]。有研究表明,单个拷贝的二倍体细胞用PEP技术可使其78%的基因组序列增加30倍以上^[35]。Sekizawa等^[34]首次成功地应用胎儿NRBC,经过PEP进行全基因组扩增,对Duchenne型肌营养不良症(DMD)进行产前诊断。此技术解决了孕妇外周血中胎儿细胞数量少,难以成为临床实用的非创伤性产前诊断方法的难题。

MDA能够提供高度均一完整的全基因组序列,确保最低的位点扩增误差,使产物与模板的遗传序列信息保持一致,是一种真正意义的全基因组扩增方法^[36]。在100 μ l反应体系中,从100fg到10ng的起始模板扩增后的DNA产物都能一致地保持在20~30 μ g,十分稳定^[37],且平均长度>10kb,能更有效的解决胎儿细胞模板量不足的问题。

STR(shot tandem repea,短串联重复序列)是由长度为1~6个碱基的核心序列串联重复而成,由于重复数目的差异而构成STR等位基因的遗传多态性。采用STR的多态位点结合PCR来扩增获得STR多态片段。STR位点扩增片段长度等位基因传递符合孟德尔遗传规律,代表胎儿的DNA仅有一半与孕妇外周血DNA基因型相同,另一半与父亲相同,则可确定血浆中检出了胎儿DNA。这对确定细胞的来源是否为胎源性有着重要的判断价值。该技术对男女

性胎儿均能检测到,弥补了检测 SRY 基因鉴定胎儿 DNA 受胎儿性别限制的缺陷,从而可以作为判断所取细胞的来源。韦红英等^[38]对 28 例轻型地中海贫血孕妇外周血中获取的 298 个 NRBC 进行 PEP-PCR 后,运用 STR-PCR 进行胎源性鉴别,结果证实其中胎儿 NRBC130 个,占 43.6%。

4 结束语

孕妇外周血中胎儿细胞的发现为非侵入性产前诊断提供了一个新的发展前景。目前最理想的提取孕妇外周血中单个胎儿有核红细胞的方法是首先取孕妇外周血进行富集,用胚胎或胎儿血红蛋白抗体进行标记、识别,应用显微操作技术得到单个有核红细胞,继以各种 PCR 技术扩增单个有核红细胞的基因组 DNA,并进一步应用 STR 连锁分析验证为胎源性,进行遗传病的诊断。

无创性产前基因诊断方法目前已有了突破性进展,但仍有一些问题有待不断探讨解决。比如,胎儿 NRBC 在母外周血中的量及最佳富集时间,寻找敏感的胎儿 NRBC 特异性标记避免母血污染,操作步骤的简化以及如何降低实验费用使之广泛应用于临床。相信随着生物技术的成熟,从孕妇外周血提取胎儿 NRBC 进行产前诊断将广泛应用于临床。

参考文献:

- [1] KOLVRAA S, CHRISTENSEN B, LYKKE-HANSEN L, et al. The fetal erythroblast is not the optimal target for non-invasive prenatal diagnosis: preliminary results [J]. *J Histochem Cytochem*, 2005, 53: 331-336.
- [2] KITAGAWA M, SUGIURA K, OMI H, et al. New technique using galactose-specific lectin for isolation of fetal cells from maternal blood [J]. *Prenat Diagn*, 2002, 22(1): 17-21.
- [3] LIM TH, TAN AS, GOH VH. Relationship between gestational age and frequency of fetal trophoblasts and nucleated erythrocytes in maternal peripheral blood [J]. *Prenat Diagn*, 2001, 21(1): 14-21.
- [4] LO YM, MOREY AL, WAINSCOAT JS, et al. Culture of fetal erythroid cells from maternal peripheral blood [J]. *Lancet*, 1994, 344(8917): 264-265.
- [5] BIANCHI DW, WILLIAMS JM, SULLIVAN LM, et al. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies [J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 61(4): 822-829.
- [6] 马旭, 王毅, 王琳, 等. 经孕妇外周血采集胎儿细胞行产前诊断的最佳时间探讨 [J]. *中华妇产科杂志*, 1997, 32(5): 293-295.
- [7] RODRIGUEZ DE ALBA M, PALOMINO P, GONZALEZ-GONZALEZ C, et al. Prenatal diagnosis on fetal cells from maternal blood: practical comparative evaluation of the first and second trimesters [J]. *Prenat Diagn*, 2001, 21(3): 165-170.
- [8] BIANCHI DW, FLINT AF, PIZZIMENTI MF, et al. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87: 3279-3283.
- [9] MILTENYI S, MULLER W, WEICHEL W, et al. High gradient magnetic cell separation with MACS [J]. *Cytometry*, 1990, 11(2): 231-238.
- [10] PRIETO B, CANDENAS M, VENTA R, et al. Isolation of fetal nucleated red blood cells from maternal blood in normal and aneuploid pregnancies [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2002, 40(7): 667-672.
- [11] PRIETO B, CANDENAS M, LADENSON JH, et al. Comparison of different CD71 monoclonal antibodies for enrichment of fetal cells from maternal blood [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2002, 40(2): 126-131.
- [12] ALVAREZ FV, OLANDER J, CRIMMINS D, et al. Development, characterization, and use of monoclonal antibodies made to antigens expressed on the surface of fetal nucleated red blood cells [J]. *Clin Chem*, 1999, 45(9): 1614-1620.
- [13] YANG YH, JEE KJ, KIM SK, et al. Prenatal genetic diagnosis from maternal blood: simultaneous immunophenotyping and FISH of fetal nucleated erythrocytes isolated by negative and positive magnetic activated cell sorting [J]. *Yonsei Med J*, 2000, 41(2): 258-265.
- [14] WACHTEL SS, SAMMONS D, TWITTY G, et al. Charge flow separation: quantification of nucleated red blood cells in maternal blood during pregnancy [J]. *Prenat Diagn*, 1998, 18(5): 455-463.
- [15] BISCHOFF FZ, MARQUEZ-DO DA, MARTINEZ DI, et al. Intact fetal cell isolation from maternal blood: improved isolation using a simple whole blood progenitor cell enrichment approach (RosetteSep) [J]. *Clin Genet*, 2003, 63(6): 483-489.
- [16] BIANCHI DW, ZICKWOLF GK, YIH MC, et al. Erythroid-specific antibodies enhance detection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood [J]. *Prenat Diagn*, 1993, 13(4): 293-300.
- [17] TROEGER C, HOLZGREVE W, HAHN S. A comparison of different density gradients and antibodies for enrichment of fetal erythroblasts by MACS [J]. *Prenat Diagn*, 1999, 19(6): 521-526.
- [18] 秦文斌. 血红蛋白病 [M]. 北京: 人民卫生出版社,

- 1984;37-81.
- [19] WEATHERALL D J, CLEGG J B. The thalassemia Syndromes [M]. 3rd ed. Oxford: Blackwell scientific Publications, 1981: 19-84.
- [20] ALBITAR M, PESCHLE C, LIEBHABER SA. Theta, zeta, and epsilon globin messenger RNAs are expressed in adults [J]. *Blood*, 1989, 74(2): 629-637.
- [21] CHUNG SW, WONG SC, CLARKE BJ, et al. Human embryonic zeta-globin chains in adult patients with alpha-thalassemias [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984, 81(19): 6188-6191.
- [22] WEATHERALL D J. Single gene disorders or complex traits: lessons from the thalassaemias and other monogenic diseases [J]. *BMJ*, 2000, 321 (7269): 1117-1120.
- [23] DEMARIA MA, ZHENG YL, ZHEN D, et al. Improved fetal nucleated erythrocyte sorting purity using intracellular antifetal hemoglobin and Hoechst 33342 [J]. *Cytometry*, 1996, 25(1): 37-45.
- [24] CHOOLANI M, O'DONNELL H, CAMPAGNOLI C, et al. Simultaneous fetal cell identification and diagnosis by epsilon-globin chain immunophenotyping and chromosomal fluorescence in situ hybridization [J]. *Blood*, 2001, 98(3): 554-557.
- [25] MAVROU A, KOLIALEXI A, ANTSAKLIS A, et al. Identification of fetal nucleated red blood cells in the maternal circulation during pregnancy using anti-hemoglobin-epsilon antibody [J]. *Fetal Diagn Ther*, 2003, 18(5): 309-313.
- [26] COVONE AE, KOZMA R, JOHNSON PM, et al. Analysis of peripheral maternal blood samples for the presence of placenta-derived cells using Y-specific probes and McAb H315 [J]. *Prenat Diagn*, 1988, 8(8): 591-607.
- [27] FELDMAN B, EBRAHIM SA, HAZAN SL, et al. Routine prenatal diagnosis of aneuploidy by FISH studies in high-risk pregnancies [J]. *Am J Med Genet*, 2000, 90(3): 233-238.
- [28] BABOCHKINA T, MERGENTHALER S, DE NAPOLI G, et al. Numerous erythroblasts in maternal blood are impervious to fluorescent in situ hybridization analysis, a feature related to a dense compact nucleus with apoptotic character [J]. *Haematologica*, 2005, 90(6): 740-745.
- [29] SHIN J C, ROSS H L, ELIAS S, et al. Detection of chromosomal aneuploidy in endometriosis by multi-color fluorescence in situ hybridization (FISH) [J]. *Hum Genet*, 1997, 100(3/4): 401-406.
- [30] RUSSO A. PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage [J]. *Am J Med Genet*, 2002, 107(2): 99-104.
- [31] KRABCHI K, GROS-LOUIS F, YAN J, et al. Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques [J]. *Clin Genet*, 2001, 60(2): 145-150.
- [32] 陈汉平, 王陶然, 徐晓燕, 等. 对孕妇外周血中胎儿细胞进行基因检测的三种方法比较 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2004, 21: 187-189.
- [33] KRABCHI K, GADJI M, YAN J, et al. Dual-color PRINS for in situ detection of fetal cells in maternal blood [J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 334: 141-149.
- [34] SEKIZAWA A, KIMURA T, SASAKI M, et al. Prenatal diagnosis of duchenne muscular dystrophy using a single fetal nucleated erythrocyte in maternal blood [J]. *Neurology*, 1996, 46(5): 1350-1353.
- [35] ZHANG L, CUI X, SCHMITT K, et al. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(13): 5847-5851.
- [36] DEAN FB, HOSONO S, FANG L, et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(8): 5261-5266.
- [37] HOSONO S, FARUQI AF, DEAN FB, et al. Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples [J]. *Genome Res*, 2003, 13(5): 954-964.
- [38] 韦红英, 龙桂芳, 林伟雄, 等. 引物延伸预扩增后 STR 分型在鉴定孕妇外周血中胎儿有核红细胞的应用 [J]. *中华血液学杂志*, 2006, 27(10): 687-689.

(责任编辑: 邓大玉)