

遗传相关儿童罕见病临床诊断技术现状、进展与思考

黄金月¹ 张碧丽² 综述 刘薇³ 审校

(天津大学儿童医院(天津市儿童医院) 1. 儿科研究所; 2. 特需病房;

3. 儿童罕见病诊疗中心, 天津 300134)

[摘要] 罕见病指一类发病率低、发病机制复杂、病情严重, 进展迅速的单病种疾病。多数罕见病有遗传背景, 在儿童期即可发病。关注遗传相关儿童罕见病, 早期诊治, 可有效延缓病程, 改善患儿生存质量。得益于各类实验技术的惠及, 很多罕见病得以确诊, 但不容忽视的是罕见病的诊断仍缺乏广泛认识。该文总结遗传相关儿童罕见病目前的实验室诊断技术, 以期为该类疾病的诊治提供线索, 有助于遗传相关儿童罕见病的理论认识和精准医疗。

[中国当代儿科杂志, 2023, 25 (3): 308-314]

[关键词] 罕见病; 遗传; 诊断技术; 儿童

Clinical diagnostic techniques for rare genetic diseases in children: current status, advances, and thoughts

HUANG Jin-Yue, ZHANG Bi-Li, LIU Wei. Institute of Pediatrics, Children's Hospital of Tianjin University (Tianjin Children's Hospital), Tianjin 300134, China (Liu W, Email: lance1971@163.com)

Abstract: Rare diseases refer to a group of single diseases with low incidence rates, complex pathogenesis, severe disease conditions, and rapid progression. Most rare diseases have a genetic background and may occur in childhood. Paying attention to the rare genetic diseases in children and performing early diagnosis and treatment can effectively delay the course of disease and improve the quality of life of children. Many rare diseases can be diagnosed with the help of various experimental techniques, but the diagnosis of rare diseases is still not widely understood. This article summarizes the laboratory diagnostic techniques currently used for rare genetic diseases in children, so as to provide clues for the diagnosis and treatment of such diseases and help to enhance the theoretical understanding and precise medical treatment of rare genetic diseases in children.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2023, 25(3): 308-314]

Key words: Rare disease; Genetics; Diagnostic technique; Child

罕见病, 又称“孤儿病”, 即一类发病率低的单病种疾病。目前全球发现的罕见病有5 000~8 000种, 约80%被认为具有遗传背景, 由于病种繁多, 罕见病患者达总人口数的3%~7%, 其中50%以上为儿童^[1-2]。我国每年新出生的罕见病患者超过20万^[3], 近80%在儿童期起病, 发病机制多与遗传相关, 可造成多系统严重损害, 约1/3的患儿生命周期不超过5岁^[4]。由此可知, 遗传相关儿童罕见病的规范诊疗是罕见病医疗事业的起步

重点。目前, 遗传相关儿童罕见病临床诊治方面存在诸多不足, 早期诊疗困难、医疗保障有限、随访信息及科研数据缺失等。因此, 以遗传相关儿童罕见病为主题, 儿科从业人员为重点, 规范诊疗为目的的医药卫生事业亟待受到重视^[5]。本文总结实验室诊断技术在遗传相关儿童罕见病中的应用, 旨在为该类疾病的诊治提供依据, 增强遗传相关儿童罕见病的理论认知和精准医疗。

多数罕见病的发病机制遵循孟德尔遗传定律。

[收稿日期] 2022-11-03; [接受日期] 2023-01-09

[基金项目] 天津市卫生健康委员会科技项目(ZC20123)。

[作者简介] 黄金月, 女, 硕士, 住院医师。

[通信作者] 刘薇, 女, 教授, 主任医师。Email: lance1971@163.com。

据在线人类孟德尔遗传数据库 (<https://omim.org/statistics/geneMap>) 统计, 截至2022年12月2日已明确6 218种单基因疾病表型, 涉及4 355个致病基因。然而, 通过传统的基因检测手段实现的儿童罕见病诊断不足10%^[6-7]。

1 染色体结构变异检测技术: 遗传相关儿童罕见病诊断的基本遗传学表型依据

1.1 G显带核型分析

G显带核型分析于20世纪60年代问世, 分辨率为5~7 Mb, 是广泛应用于临床一线的细胞遗传学技术, 针对染色体数目/结构异常、多态性改变、易位/倒位、嵌合、衍生等。儿童常见的疾病如13三体综合征、18三体综合征、唐氏综合征、Turner综合征、克兰费尔特综合征(Klinefelter syndrome)等, 多由于染色体数目异常被识别。实验操作便捷, 可直观呈现细胞遗传物质全貌, 在全基因组范围内检测染色体重排。但实验周期长, 分辨率低, 不能检测出染色体微小片段的缺失及重复^[8]。

1.2 荧光标记原位杂交

荧光标记原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization)按照碱基互补配对原则实现标记探针与待测样本的核酸序列原位杂交, 靶向检测染色体数量、三维空间结构变异, 如缺失、易位等。该技术无需细胞培养步骤, 实验周期短。主要应用于常见染色体非整倍体的快速产前诊断; 对产前(或出生后)核型分析结果异常, 但无法判断异常染色体片段的来源或性质者, 进行靶向染色体的验证。与G显带核型分析相比, 荧光标记原位杂交分辨率提高, 为2~6 Mb, 技术标准化, 便于临床广泛应用。但该技术有一定局限性: 受特异性探针的制约, 仅能提供有限染色体信息, 未应用于非常见非整倍体染色体数目或结构异常的疾病; 某些杂合性缺失或单亲二倍体不易检出; 检测结果正常不能除外其他因素的胎儿出生缺陷等^[9]。

1.3 染色体微阵列分析

染色体微阵列分析(chromosomal microarray analysis, CMA)是针对染色体组微小缺失/重复等不平衡重排因素进行全基因组高分辨检测。根据芯片设计与检测原理的区别, CMA技术分为两类: 基于微阵列的比较基因组杂交(array-based comparative genomics hybridization, aCGH)技术和单核苷酸多态性微阵列(single nucleotide polymorphism array, SNP array)技术。CMA能发现额外的、有临床意义的拷贝数变异(copy number variant, CNV), 是目前针对产前超声提示胎儿结构异常者最有效的遗传学诊断方法, 可实现对无法确认产前核型结果异常片段的来源或性质者DNA水平的精细分析^[10]。aCGH技术对致病性CNV的检出率比G显带核型分析高10%以上, 被国际细胞基因组芯片标准协作组(International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium)推荐作为对原因不明的发育迟缓、智力障碍、多种畸形及孤独症谱系障碍患者的首选一线检测技术^[11]。SNP array除能检出CNV外, 还可检测出大多数的单亲二倍体和三倍体。CMA检测性能为>1 kb的CNV, 实现了通量及分辨率的多层优越。然而, CMA仍有其应用困境, 难以检测染色体平衡易位/倒位、<30%的嵌合体无法准确分析; 同一样本, 多方检测结论存在差异; 大量与临床表型不一致的个体CNV为遗传解读及咨询带来巨大挑战。

1.4 单分子光学图谱技术

单分子光学图谱技术是应用单分子高分辨率荧光成像生成酶切位点进行原位基因组DNA切割并进行荧光标记分布检测的方法, 主要用于识别大片段基因组的重排、倒位等致病性结构变异^[12], 该技术适用于新生儿期即起病的遗传代谢性疾病或遗传相关儿童罕见病的诊断。遗憾的是, 微小片段缺失/插入位点仍是其检测盲区, 该类型的检测需要其他分子诊断技术的协助。

各染色体结构变异检测技术总结见表1。

表 1 染色体结构变异检测技术总结

名称	适用范围	诊断定位	疾病示例	优势	局限	文献依据
G 显带核型分析	染色体数目/结构异常、染色体平衡易位/倒位	产前诊断；早期诊断	13 三体综合征、18 三体综合征、唐氏综合征、Turner 综合征、克兰费尔特综合征	传统技术；实验周期长；操作便捷	分辨率低	[8]
荧光标记原位杂交	染色体非整倍体、精子非整倍体、特定微缺失	产前诊断；植入前诊断；遗传咨询	Pallister-Killian 综合征；性发育异常疾病	实验周期短；特异性高	无法检测背景不明的非整倍体遗传病	[9]
CMA	染色体微缺失/微重复	疾病普查；植入筛查；产前诊断	孤独症谱系障碍；先天性多发畸形	高通量；高分辨率	不能检测染色体平衡易位/倒位；易产生临床不明拷贝数变异	[10-11]
单分子光学图谱技术	检测致病性结构变异，基因组内 DNA 插入、缺失、重复、倒位等	罕见病诊断；遗传咨询	肌营养不良	可提供全基因组结构变异/顺序	无法检测微小片段缺失/插入	[12]

注：[CMA] 染色体微阵列分析。

2 分子水平遗传学技术：遗传相关儿童罕见病产前筛查、早期遗传诊断的重要依据

2.1 聚合酶链反应

聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR）是应用微量标本对特定核酸或基因实现短期定量指数扩增的技术，多用于点突变、缺失、插入及编码区微小突变等类型的遗传性疾病检测。如脆性 X 综合征，应用荧光定量 PCR 可实现突变基因 CGG 重复序列的准确计算，针对女性杂合子携带者具有良好的筛查效果^[13]。该方法能实现动态突变的检测，也适用于亨廷顿病、肌营养不良、脊髓小脑共济失调^[14]等，对表型正常的携带者或遗传易感性亦可做出远期预判，应用于儿童罕见病产前诊断、危险度分层及家系谱分析等。然而其通量较低，无法诊断重复数较多的携带者和全突变者，对染色体数目/结构异常的嵌合体检出率低。

2.2 基因测序及探针扩增

2.2.1 Sanger 测序 基因检测的“金标准”，应用双脱氧核苷酸末端终止原理，较传统遗传学技术分辨率显著提高。适用于单基因疾病的诊断及胚胎植入前高危胎儿基因诊断；同时应用于遗传代谢性疾病新发位点突变及家系验证。如血友病、地中海贫血等多因点突变/移码突变等致病可应用此技术检测；黏多糖贮积症、眼皮肤白化病、成骨不全等^[15]，病因多为单基因突变，Sanger 测序是该类疾病确诊的主要依据。然而，其仍有不足，

无法匹配没有明确候选基因的大样本筛查；不能检测大片段缺失或拷贝数变异等基因突变的类型。

2.2.2 二代测序 二代测序（next-generation sequencing, NGS）技术具有高通量和低碱基成本的特点，可同时检测大量靶基因，有利于生殖辅助胚胎植入的遗传筛查及无创产前筛查时针对染色体非整倍体病变实现早期诊断。基于 NGS 技术的基因组拷贝数变异测序（copy number variation sequencing, CNV-seq）为大片段缺失/重复及致病性基因组拷贝数变异的基因组异常诊断提供了新型手段^[16]。CNV-seq 可精确检测低至 10~50 ng 的 DNA 样本，以及低至 5% 的染色体非整倍体嵌合，临床适用广泛^[16]。但 CNV-seq 不能发现染色体易位、倒位等平衡性结构重排，无法检测三倍体及多倍体等，若临床高度怀疑胎儿为单亲二倍体，建议用 SNP array 技术辅助诊断^[16]。NGS 的不足主要是需复杂的多步骤测试及质控指标，生物信息分析必须经过性能验证。面对庞大的 NGS 数据信息，结果规范解读、序列数阈值、灵敏性评估尚无统一临床标准。

2.2.3 单分子即时测序技术、纳米孔单分子测序技术 单分子即时测序技术（single molecule real time, SMRT）省略了 PCR 扩增过程，可直接检测甲基化的 DNA 序列或 RNA 序列，降低体外逆转录产生的系统误差，实现组织或细胞内差异表达的精准定位。凭借其超长的读长，可跨域检测重复片段，避免重复序列相似性较高引发染色体比对组装错误的问题，可解释 30%~40% 结构异常

的遗传病^[17]；测序时无GC偏好性，可完成复杂二级结构如发夹结构、茎环结构等的测序。该方法主要用于检测杂合度较高的基因组、大片段的空间结构变异或长 CNV 等^[18]。如 Carney 综合征，发病多为新生突变、开放阅读框的联合基因重组、大部分外显子或整个基因座大片段缺失或 CNV，可通过 SMRT 快速诊断^[19]。遗憾的是，与 NGS 对比，其单碱基识别错误率较高，为 14%~15%^[20]。后来纳米孔单分子测序技术（Oxford nanopore technologies, ONT）技术问世，利用电泳技术测定不同电信号差异识别碱基，随机错误率通过提高测序深度改善，提供了更广泛的基因组变异快速分析，主要有大型结构变异、重复序列、定相、融合转录本等，可解释部分隐匿疾病中全外显子组测序缺乏第二个致病性等位基因的情况^[21]。

2.2.4 多重连接探针扩增技术 一种对 DNA 实现定性和相对定量分析的技术，主要应用于微缺失/重复基因片段及单个核苷酸突变检测，在 mRNA 水平实现定量检测^[22]。多重连接探针扩增

技术（multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA）可对由于部分外显子缺失或重复导致进行性假肥大性肌营养不良实现半定量基因分析，识别携带者杂合缺失情况^[23]。甲基化特异性多重连接探针扩增（methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification, MS-MLPA）是检测目的序列甲基化程度的 MLPA，代表病种为天使综合征和 Prader-Willi 综合征，这两种疾病的致病区域位于 Prader-Willi 综合征/天使综合征判别区，MS-MLPA 可以明确先证者染色体性质，利用甲基化程度区分父源缺失型及母源二体型，该方法特异度及准确度均在 95% 以上^[24]，样本 DNA 要求量远小于 PCR，对于新生儿及无法获得更多血量的儿童是优选^[25]。与 CMA 技术相比，更加简便、经济，结果易于分析。MLPA 技术也有其局限性，对于非靶向区域的缺失或重复无法检测，对染色体平衡重排也无法识别。

各分子水平遗传学技术总结见表 2。

表 2 分子水平遗传学技术总结

名称	适用范围	诊断定位	疾病示例	优势	局限	文献依据
PCR	基因类型点突变	产前诊断；疾病筛查	脆性 X 综合征、亨廷顿病、肌营养不良、脊髓小脑共济失调	灵敏度高；可重复性强	无法诊断重复数多的携带者/全突变者	[13-14]
Sanger 测序	单基因突变	单基因疾病诊断；功能验证	血友病、地中海贫血、黏多糖贮积症、苯丙酮尿症、眼皮肤白化病、成骨不全、X 连锁低磷性佝偻病	结果直接；准确	不适用于无候选基因或候选基因过多	[15]
NGS	同时检测大量靶基因	产前筛查；植入前筛查；罕见病遗传咨询	Kabuki 综合征、Schinzel-Giedion 综合征、地中海贫血	高通量；低碱基成本	无法鉴别三碱基重复、同源性基因疾病；随机错误率高	[15-16]
SMRT、ONT	检测高度杂合的基因组大结构变异	新的罕见疾病病种/位点突变；甲基化诊断	Carney 综合征、糖原贮积症 I a 型	可提供全基因组结构变异/顺序	无法检测微小片段缺失/插入	[17-21]
MLPA	DNA 定性及相对定量微缺失/重复；量化 mRNA	产前筛查；肿瘤疾病诊断指标	13、18、21、X、Y 等染色体非整倍体疾病；进行性假肥大性肌营养不良、天使综合征、Prader-Willi 综合征	高效；自动化	无法检测部分嵌合体；女性三倍体/平衡易位	[22-25]

注：[PCR] 聚合酶链反应；[NGS] 二代测序技术；[SMRT] 单分子即时测序技术；[ONT] 纳米孔单分子测序技术；[MLPA] 多重连接探针扩增技术。

3 功能基因组学技术：遗传相关儿童罕见病与时俱进的后基因时代

人类基因组计划的进展提示结构基因组学仅是生物学的一隅，功能基因组学更有利于揭示生物遗传本质。因此，阐述功能基因组学技术特

点，能更好地促进对疾病发展的探索。

3.1 转录组测序技术

转录组测序技术（RNA sequencing, RNA-seq），原理是将 RNA 反转录成碱基互补 DNA，对全基因组的互补 DNA 进行高通量测序，计算不同 mRNA 的表达量，分析转录本的结构与表达，呈现

全转录组信息的检测方法^[26]。该技术主要应用于致病因素由 RNA 介导的疾病，鉴定因剪接位点突变诱发转录水平蛋白质障碍的罕见疾病；可对细胞异质性进行无偏差识别，有利于监测发育和分化期间细胞的动态变化。DeLaughter 等^[27]利用单细胞 RNA 测序技术（single-cell RNA sequencing）发现 *Nkx2.5* 基因在心肌细胞成熟及心室构建中的作用，有助于探索心脏发育过程中细胞动态改变对先天性心脏病的研究意义。RNA-seq 减少了意义不明变异的干扰，有效提高诊断准确率。目前应用受阻因素有样本不易收集、RNA 降解快、对数据分析人员专业能力要求高。若这些问题妥善解决，将有力推动 RNA-seq 在遗传相关儿童罕见病临床中的开展。

3.2 蛋白质组学技术

蛋白质组学技术是分离、鉴定及定量细胞、组织或器官内蛋白质，分析获取生物信息的技术^[28]。单基因遗传疾病通常是由特定基因中的位点变异引起蛋白质异常所致，通过发现特异性蛋白分子或印迹揭示疾病的发病机制，可作为早期诊断分型、靶向治疗及预后评估的依据；应用蛋白质组学技术有助于致病机制的定位及分型，从

分子水平证实蛋白生成与疾病发生的关联性^[29]。各组织对氧化代谢耐受阈值不同，利用蛋白质组学技术对线粒体呼吸链酶复合物活性测定，可纵向分析疾病对机体损害的时间次序及严重程度，为探索发病机制及靶向治疗提供更多可能^[30]。

3.3 代谢组学技术

通过定性或定量分析小分子（相对分子质量 <1 500 000）代谢产物，进行靶向/非靶向方式帮助诊断和筛查罕见病发生机制^[31]。据美国医学遗传学和基因组学学会规范新生儿筛查疾病谱，70.4% 的疾病应用串联质谱技术进行检测^[32]。可特异性地评估遗传代谢病酶活性变化程度，鉴定临床意义不明的基因结果，有助于黏多糖贮积症的分型鉴别^[33]。早期新生儿筛查可通过鉴定 α -半乳糖苷酶 A 活性实现法布里病未发病期的诊断，改善患者生存质量。 α -半乳糖苷酶 A 活性检测，简单快捷，可确诊男性患者；女性患者易因 X 染色体随机失活检测呈假阴性，半数以上的活性指数正常，因此，女性患者的诊断，需加入基因分析、底物及衍生物定量测定的判读^[7]。

各功能基因组学技术总结见表 3。

表 3 功能基因组学技术总结

名称	适用范围	诊断定位	疾病示例	优势	局限	文献依据
转录组测序技术	不同 mRNA 表达量，识别剪接位点变异	致病机制涉及 RNA 的罕见病	遗传代谢病、先天性心脏病	准确；减少无义突变干扰	样本难收集；易降解；要求人员专业能力	[26-27]
蛋白质组学技术	蛋白质分离、鉴定；定量细胞、组织全部蛋白质	早期诊断；诊断分型；发掘分子靶点；预后评估；遗传咨询	线粒体疾病如 Leigh 综合征，Kearn-Sayre 综合征；遗传性中性粒细胞减少症	精准；靶向定位	通量有限；步骤复杂	[28-30]
代谢组学技术	定性/定量分析小分子代谢产物	产前诊断；新生儿期筛查；早期诊断；家族筛查；系谱分析；鉴别分型	甲基丙二酸血症、枫糖尿症、苯丙酮尿症、糖原累积病 II 型；法布里病	简单快捷、可确定变异优先级；直接反映疾病表型特征	专业要求高；灵敏度易受技术限制	[7, 31-33]

3.4 生物信息学技术：精准医疗模式

根据“成人慢性疾病胎儿起源”假说，出生缺陷是人类疾病的“起源杀手”，80% 以上的出生缺陷疾病主导因素是遗传特异性。人工智能技术，依托以基因组进展为代表的生物学进行数据的科学融合，完成海量信息的收纳、储存与应用，根据疾病关联性设定优先次序，是实现精准医学、优化诊疗的有效手段。有望在肿瘤、心血管病、罕见病等多个领域取得重大突破，逐步成为健康

医疗事业进步的驱动中坚。

4 常规实验室生化检测：遗传相关儿童罕见病诊断的初步筛查“护卫”

即使大多数罕见病确诊依靠细胞、分子及功能组学技术，但常规生化检测仍能帮助临床医生早期识别部分遗传相关罕见病。肝豆状核变性系常染色体隐性遗传病^[34]，发病初始主要依靠生化

铜水平异常诊断。先天性肾上腺皮质增生症,生化表现是血钠降低、血钾偏高、代谢性酸中毒不易纠正等^[7]。常规检测的非常态化特征有助于初步警惕罕见遗传代谢性疾病,但遗憾的是灵敏度、特异度均不高,需结合其他诊断技术明确诊断。

5 思考未来:遗传相关儿童罕见病诊断技术日趋完善,促进健康生育

儿童领域遗传相关罕见病的实效性诊断是临床医学中亟需改善的部分。随着检测成本的下降及测序方法的优化,遗传相关儿童罕见病的未解之谜会逐渐被揭示,真正实现“罕见并不孤单,罕见即强大”^[35]。针对无有效治疗的高损害性遗传相关罕见病,产前分子诊断预防患儿出生是临床最有效的干预措施。产前诊断技术的普及应用,为优化遗传及健康生育建立夯实的技术支持。

利益冲突声明:所有作者均声明不存在利益冲突。

【参 考 文 献】

- [1] The Ryan Foundation. Facts about rare diseases[EB/OL]. (2017-09-05)[2022-01-06]. <https://ryanfoundation.org/home>.
- [2] Wright CF, FitzPatrick DR, Firth HV. Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children[J]. Nat Rev Genet, 2018, 19(5): 253-268. PMID: 29398702. DOI: 10.1038/nrg.2017.116.
- [3] 张抒扬,赵玉沛,黄尚志,等.罕见病学[M].北京:人民卫生出版社,2020:2-6.
- [4] Blin O, Lefebvre MN, Rascol O, et al. Orphan drug clinical development[J]. Therapie, 2020, 75(2): 141-147. PMID: 32247678. DOI: 10.1016/j.therap.2020.02.004.
- [5] 何山,高仕奇,何欣悦,等.中国罕见病领域新进展(2020—2021)[J].协和医学杂志,2022,13(1):39-45. DOI: 10.12290/xhyxzz.2021-0248.
- [6] 国家卫生健康委官网.国家卫健委:完成我国首部罕见病诊疗指南发布[J].中华医学信息导报,2019,34(5):7.
- [7] 彭镜.儿童神经遗传罕见病进入疾病修正治疗时代[J].中华儿科杂志,2022,60(11):1097-1099. PMID: 36319139. DOI: 10.3760/cma.j.cn112140-20220919-00815.
- [8] Abrams ZB, Zhang L, Abruzzo LV, et al. CytoGPS: a web-enabled karyotype analysis tool for cytogenetics[J]. Bioinformatics, 2019, 35(24): 5365-5366. PMID: 31263896. PMCID: PMC6954647. DOI: 10.1093/bioinformatics/btz520.
- [9] 荧光原位杂交技术在产前诊断中的应用协作组.荧光原位杂交技术在产前诊断中应用的专家共识[J].中华妇产科杂志,2016,51(4):241-244. PMID: 27116980. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2016.04.001.
- [10] 染色体微阵列分析技术在产前诊断中的应用协作组.染色体微阵列分析技术在产前诊断中的应用专家共识[J].中华妇产科杂志,2014,49(8):570-572. PMID: 25354854. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2014.08.002.
- [11] Zhang C, Cerveira E, Romanovitch M, et al. Array-based comparative genomic hybridization (aCGH) [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1541: 167-179. PMID: 27910023. DOI: 10.1007/978-1-4939-6703-2_15.
- [12] Seo JS, Rhie A, Kim J, et al. De novo assembly and phasing of a Korean human genome[J]. Nature, 2016, 538(7624): 243-247. PMID: 27706134. DOI: 10.1038/nature20098.
- [13] Telias M. Molecular mechanisms of synaptic dysregulation in fragile X syndrome and autism spectrum disorders[J]. Front Mol Neurosci, 2019, 12: 51. PMID: 30899214. PMCID: PMC6417395. DOI: 10.3389/fnmol.2019.00051.
- [14] Ghosh R, Tabrizi SJ. Clinical features of Huntington's disease[J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1049: 1-28. PMID: 29427096. DOI: 10.1007/978-3-319-71779-1_1.
- [15] Middleton PG, Mall MA, Dřevínek P, et al. Elexacaftor-tezacaftor-ivacaftor for cystic fibrosis with a single Phe508del allele[J]. N Engl J Med, 2019, 381(19): 1809-1819. PMID: 31697873. PMCID: PMC7282384. DOI: 10.1056/NEJMoa1908639.
- [16] 中华医学会医学遗传学分会临床遗传学组,中国医师协会医学遗传医师分会遗传病产前诊断专业委员会,中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会遗传病防控学组.低深度全基因组测序技术在产前诊断中的应用专家共识[J].中华医学遗传学杂志,2019,36(4):293-296. PMID: 30950010. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2019.04.001.
- [17] Miao H, Zhou J, Yang Q, et al. Long-read sequencing identified a causal structural variant in an exome-negative case and enabled preimplantation genetic diagnosis[J]. Hereditas, 2018, 155: 32. PMID: 30279644. PMCID: PMC6162922. DOI: 10.1186/s41065-018-0069-1.
- [18] 柳延虎,王璐,于黎.单分子实时测序技术的原理与应用[J].遗传,2015,37(3):259-268. PMID: 25787000. DOI: 10.16288/j.yczs.14-323.
- [19] Kamilaris CDC, Faucez FR, Voutetakis A, et al. Carney complex[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2019, 127(2-03): 156-164. PMID: 30428497. DOI: 10.1055/a-0753-4943.
- [20] Suzuki Y, Wang Y, Au KF, et al. A statistical method for observing personal diploid methylomes and transcriptomes with single-molecule real-time sequencing[J]. Genes (Basel), 2018, 9(9): 460. PMID: 30235838. PMCID: PMC6162384. DOI: 10.3390/genes9090460.
- [21] Nowak A, Murik O, Mann T, et al. Detection of single nucleotide and copy number variants in the Fabry disease-associated GLA gene using nanopore sequencing[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 22372. PMID: 34785703. PMCID: PMC8595663. DOI: 10.1038/s41598-021-01749-7.
- [22] Schouten J, van Vught P, Galjaard RJ. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for prenatal diagnosis of common aneuploidies[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1885: 161-

170. PMID: 30506197. DOI: 10.1007/978-1-4939-8889-1_11.
- [23] Duan D, Goemans N, Takeda S, et al. Duchenne muscular dystrophy[J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7(1): 13. PMID: 33602943. DOI: 10.1038/s41572-021-00248-3.
- [24] Markati T, Duis J, Servais L. Therapies in preclinical and clinical development for Angelman syndrome[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2021, 30(7): 709-720. PMID: 34112038. DOI: 10.1080/13543784.2021.1939674.
- [25] Moelans CB, Atanesyan L, Savola SP, et al. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA) [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1708: 537-549. PMID: 29224162. DOI: 10.1007/978-1-4939-7481-8_27.
- [26] 蒋敏, 李慧莉, 庞盼盼, 等. 高通量单细胞转录组测序发展与展望[J]. 生命科学, 2020, 32(12): 1280-1287. DOI: 10.13376/j.cbbs/2020152.
- [27] DeLaughter DM, Bick AG, Wakimoto H, et al. Single-cell resolution of temporal gene expression during heart development[J]. Dev Cell, 2016, 39(4): 480-490. PMID: 27840107. PMCID: PMC5198784. DOI: 10.1016/j.devcel.2016.10.001.
- [28] 宋正阳, 蒋春明. 多组学技术在单基因遗传病临床诊断中的应用展望[J]. 浙江医学, 2022, 44(4): 427-431. DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2022.44.4.2021-3286.
- [29] 中华医学会血液学分会红细胞学组. 重组人促红细胞生成素治疗骨髓衰竭性疾病贫血专家共识[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(42): 3396-3400. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2018.42.004.
- [30] 陆相朋, 张婧韬, 梁瑞星, 等. 丙酮酸脱氢酶复合物缺陷 Leigh 综合征 2 例临床及 *PDHAI* 基因分析[J]. 临床儿科杂志, 2019, 37(3): 218-222. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3606.2019.03.015.
- [31] Bujak R, Struck-Lewicka W, Markuszewski MJ, et al. Metabolomics for laboratory diagnostics[J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 113: 108-120. PMID: 25577715. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.12.017.
- [32] Almannai M, Alfadhel M, El-Hattab AW. Carnitine inborn errors of metabolism[J]. Molecules, 2019, 24(18): 3251. PMID: 31500110. PMCID: PMC6766900. DOI: 10.3390/molecules24183251.
- [33] 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组, 中华医学会医学遗传学分会, 中华医学会儿科学分会罕见病学组, 等. 儿童糖原累积病 II 型诊断及治疗中国专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2021, 59(6): 439-445. PMID: 34102815. DOI: 10.3760/cma.j.cn112140-20201210-01094.
- [34] 中华医学会肝病学分会遗传代谢性肝病协作组. 肝豆状核变性诊疗指南(2022 年版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2022, 30(1): 9-20. PMID: 35152665. DOI: 10.3760/cma.j.cn501113-20211217-00603.
- [35] 刘薇, 张碧丽, 黄金月. 儿童罕见病管理现状、进展与前景[J]. 罕见病研究, 2022, 1(1): 20-27. DOI: 10.12376/j.issn.2097-0501.2022.01.004.

(本文编辑: 王颖)