

• 先天性红细胞疾病专栏 •

开创我国先天性红细胞疾病分子诊断新局面^{*}

To create a new scenario in the molecular diagnosis of congenital red blood cell disorders in China

李园^{1,2}

【关键词】 先天性;红细胞;贫血;红细胞增多症;分子诊断;二代基因测序技术;基因

Key words congenital; erythrocyte; anemia; erythrocytosis; genetic diagnosis; next generation sequencing; gene
doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2020.11.001

【中图分类号】 R555.1 【文献标志码】 A



专家简介:李园,副主任医师,医学硕士;2003年毕业于河北医科大学临床医学系;2003年8月就职于中国医学科学院血液病医院(血液学研究所);担任天津市抗衰老学会第一届血液病防治专业委员会委员;研究方向:红细胞疾病的诊断和治疗;发表学术论文多篇;参与《内科疑难病例丛书——血液分册》、《红细胞疑难病例荟萃》等专业著作的编写和第8版《威廉姆斯血液学》的翻译;参与国家自然科学基金1项;多次作为讲者参加国内学术会议;于中国医学科学院血液病医院贫血中心一病区工作至今,主要从事红细胞疾病的诊治工作。

先天性红细胞疾病是一组因责任基因突变致病、主要表现为贫血或红细胞增多,伴或不伴有白细胞及血小板异常的先天性疾病。主要包括先天性造血衰竭(如范可尼贫血、Diamond-Blackfan贫血、先天角化不良等)、先天性无效造血(如遗传性铁粒幼细胞贫血、先天性红细胞生成异常性贫血等)、先天性溶血性贫血(如红细胞膜异常、红细胞酶病、血红蛋白病等相关的溶血性贫血)、先天性铁代谢异常(如铁剂难治性缺铁性贫血、先天性转铁蛋白缺乏症等)、先天性红细胞增多症(楚瓦什综合征等)等疾病。

先天性红细胞疾病大多属于单基因病,由于疾病相关责任基因发生了致病性突变,引发相应蛋白表达异常,出现相关临床表现。这类疾病具有如下特征:①罕见性;②单一疾病的临床表型异质性大;③疾病间临床表型相似或重叠;④诊断性的常规检查手段不易建立;⑤诊断性的常规检查易受到某些因素影响,出现检查结果不稳定;⑥致病基因方面

“两多一少”:单一疾病的相关致病基因数量众多^[1],需要鉴别诊断的疾病的相关致病基因的突变位点数量众多,对于传统应用的Sanger测序来说过于庞大、繁琐;某些致病基因的数据少,热点突变区域或位点不明确,也增加了Sanger测序的难度;⑦临床工作者对于先天性红细胞疾病的认知水平差异较大。因而,先天性红细胞疾病的诊断通常较为困难,经常被漏诊或误诊。

1 二代测序技术的介绍

二代基因测序技术(next generation sequencing, NGS)逐渐进入临床,极大地改善了先天性红细胞疾病的诊断困境。

NGS又称高通量测序技术,是使用并行执行多个DNA片段测序,这与传统的一代Sanger测序明显不同^[2]。NGS采用多通道(通常6~8条通道)测序,通道测序读长100~150 bps,测序速度远快于Sanger测序,所产生的DNA序列数据量呈指数级增长,信息量更为丰富。NGS测序速度快,测序数据精准可靠。测序数据确认率可达99.965%^[3]。对于高质量外显子测序区域的差异性结果表明,来自NGS的结果较Sanger测序可能更为准确。由于NGS的技术特点,测序成本明显降低,也更容易开展de novo测序和转录组测序。与生化、溶血、电镜等其他类型的常规实验室检查

^{*}基金项目:科技部国家科技重大专项(No: 2017ZX09304024)

¹中国医学科学院北京协和医学院,血液学研究所血液病医院,贫血诊疗中心(天津,300020)

²中国医学科学院北京协和医学院,血液学研究所血液病医院,实验血液学国家重点实验室

通信作者:李园, E-mail: liyuan@ihcams.ac.cn

相比,NGS 简捷、快速、精准,对标本的要求较低,实验结果受标本状况影响较小。

根据美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG)实验室标准^[4],NGS 分为两个环节:①“实验室操作”环节:包括 DNA 全基因文库的制备、目标基因区域的捕获,在 NGS 平台进行测序等步骤;②“生物信息学分析和数据解读报告”环节:涉及建立生物信息学的分析流程,确认生物信息学分析流程的性能,保存与获取测序数据,数据解读等方面。

“生物信息学分析和数据解读报告”环节主要参照 ACMG 指南^[5],近年来国内也有相关的规范化共识^[6]。遗传病基因检测的生信分析主要包括:原始数据质控和过滤、序列比对、变异检测、变异注释等。参照指南^[5],借助于基因数据库,对变异位点的致病性级别进行判定。致病性级别分为:致病(pathogenic)、可能致病(likely pathogenic)、良性(benign)、可能良性(likely benign),致病性意义未明确(uncertain significance)。致病/可能致病的变异很可能是分子水平的致病原因,致病意义未明确的变异可能是致病原因或潜在的致病原因,待数据库升级后可重新评估。对于受检者的 NGS 结果,有必要进行家系验证以进一步确定其致病性。

2 NGS 应用指征和分类

NGS 诊断遗传性疾病的应用指征需要严格掌握。遇到幼年发病,和(或)有相似临床表型的家庭成员,怀疑诊断遗传性疾病时,才需应用 NGS。

诊治先天性红细胞疾病时,NGS 的应用指征可参照如下标准^[7]:A 标准:慢性红细胞异常:①慢性骨髓衰竭;②无效造血;③溶血性贫血;④红细胞增多症;B 标准:①幼年发病;②躯体畸形或内分泌异常;③相似临床表型的家族史。同时满足 A 标准中的任意一项和 B 标准中的任意一项。

根据基因测序覆盖的不同,NGS 可分为靶向基因集合(targeted gene panel,以下简称 panel)测序、全外显子测序(whole exome sequencing, WES)和全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)^[8-9]。panel 将遗传性疾病的相关已知致病基因集合于芯片上,检测已知致病基因的变异,适用于临床对疑诊的遗传性疾病做出明确诊断;而 WES/WGS 适用于探寻遗传性疾病相关的未知致病基因或变异,科研意义更大。通常,panel 的诊断率高于 WES 或 WGS^[10],当诊断的不确定性大,可能涉及探寻未知致病基因或突变时,WES 或 WGS 可能优于 panel^[11-12],而 WES 和 WGS 的排序上存在争议^[13-14]。

3 NGS 在先天性红细胞疾病诊断中的应用

NGS 用于先天性红细胞疾病的诊断,摆脱了局限于临床诊断的困境,开创了分子诊断的新局

面。在先天性红细胞疾病的明确诊断、疾病的分子生物学分型、跨越许多繁杂的实验室检查和简化诊断流程、基因型与临床型关联、研发或应用潜在靶向治疗/个体化靶向治疗、探索分子发病机制等诸多方面,NGS 都产生了巨大的、积极的、有力的深远影响。

NGS 提高了先天性红细胞疾病的确定诊断率,确诊率大多 37.3%~80.1%,减少了诊断延误。Ghemlas 等^[15]应用包括了 72 个已知 IBMFS 致病基因的 panel,对 158 例临床诊断 IBMFS 的患者进行了检测,共有 59 例患者达到了分子诊断,确诊率约 37.3%。Roy 等^[16]应用包括 33 个基因的 panel 检测了 57 例罕见的先天性贫血,明确了 22 例(38.6%)的分子诊断。Russo 等^[17]检测了 74 例先天性溶血性贫血患者,其中 64.9%的患者明确了分子诊断。李园等^[7]应用靶向 NGS 测序诊断 46 例疑诊先天性贫血患者,其中 28 例(60.9%)明确了分子诊断。全部 46 例患者中,≥14 岁者 27 例(58.7%),中位年龄 24(15~57)岁。Shefer Averbuch 等^[18]应用包含 76 种已知致病基因的 panel 检测 21 例罕见先天性贫血患者,其中 13 例(62%)检测出致病突变,明确了分子诊断。Kedar 等^[19]通过靶向 NGS 检测了 21 例输血依赖的先天性贫血患者,其中 17 例(81.0%)患者的基因诊断得以明确。Agarwal 等^[20]应用包含 28 种相关已知致病基因的 panel 检测 19 例受检者样本(其中 17 例为先天性溶血性贫血患者样本,2 例为对照样本),12 例(70%)患者样本均检出责任基因发生了致病变异,明确了分子诊断。Mansour-Hendili 等^[21]明确了 82.5%(33 例/40 例)的先天性溶血性贫血的分子诊断。Camps 等^[22]应用 NGS 检测 125 例特发性红细胞增多症患者,分子诊断率达 45.6%。

NGS 不仅可直接明确先天性红细胞疾病的诊断,还可以精准确定疾病的类别和分子生物学分型,简化了鉴别诊断的流程。Roy 等^[16]明确诊断的 22 例先天性贫血患者,分别为 3 例丙酮酸激酶缺乏症(PKD),8 例先天性红细胞生成异常性贫血(CDA) I 型,1 例 CDA-IV 型,1 例先天性铁粒幼细胞贫血(CSA),1 例嘧啶 5'核苷酸酶缺乏症,1 例舒戴综合征(SDS),7 例 DBA。李园等^[7]确诊的 28 例先天性贫血,包括 3 例范可尼贫血 A 型,1 例范可尼贫血 C 型,1 例范可尼贫血 I 型,4 例 ALAS2 基因突变型 CSA,2 例 STEAP3 基因突变型 CSA,3 例 CDA-II 型,4 例遗传性口型红细胞增多症(HX),6 例 PKD,1 例遗传性椭圆型红细胞增多症(HE),1 例家族性噬血细胞性淋巴瘤组织细胞增多症 3 型(FHL-3),1 例 G6PD 缺乏症,1 例腺苷激酶缺乏症。Moreno-Carralero 等^[23]通过靶向 NGS 检测了 53 例疑似先天性红细胞生成异常性贫血

(CDA)患者,明确了 21 例患者的分子诊断,分别是 4 例 CDA-I, 15 例 CDA-II, 1 例 CDA-IV, 1 例 CSA。彭广新等^[24]通过靶向 NGS,确定了 37 例(72%)遗传性球形红细胞增多症患者的分子诊断,并明确了亚型,锚蛋白缺陷型(ANK1 突变)17 例(45.9%)、血影蛋白 B 缺陷型(SPTB 突变)14 例(37.8%)、带 3 蛋白缺陷型(SLC4A1 突变)5 例(13.5%)、复合型(ANK1 突变复合 SPTB 突变)1 例(2.7%)。An 等^[25]经 NGS 确诊了 6 例 CSA 患者,其中 3 例为 SLC25A28 基因突变致病,2 例线粒体基因突变,1 例为 ALAS2 基因突变。Ghemlas 等^[15]的研究中,15 例未分类 IBMFS 患者经靶向 NGS 明确了分类及亚型。

经 NGS 得出的分子诊断,不仅可以确认或纠正原有临床诊断,而且可以提供出新的确定诊断。Roy 等^[16]经 NGS 确诊的 22 例患者中,17 例患者的分子诊断确认了临床疑诊,3 例纠正了临床疑诊,2 例提供了新的确定诊断。李园等^[7]的研究中,26 例患者的基因学结果与临床疑诊相符,一致率达 56.5%,2 例患者基因学结果不支持临床疑诊,依据基因学结果纠正了诊断,包括 1 例 DC(疑诊 FA)和 1 例家族性噬血细胞性淋巴瘤组织细胞增生症(FHL),该 FHL 患者原疑诊不明原因的血细胞减少。

NGS 还可以诊断合并的、表型重叠的疾病,并判断疾病之间是否相关。Li 等^[26]和 Kang 等^[27]分别通过 NGS 分子诊断了遗传性球形红细胞增多症合并遗传性胆红素代谢性疾病,减少了漏诊的发生。对于合并存在的两种类型先天性溶血性贫血^[28],也可以通过 NGS 全部诊出。对于年轻的骨髓增生异常综合征/急性白血病或实体瘤患者,应用 NGS 可以鉴别是否为 IBMFS 相关癌症^[29-32],以采取合理的治疗方式。

NGS 丰富了先天性红细胞疾病的诊断手段。对于某些罕见的红细胞膜疾病,例如遗传性脱水型红细胞增多症,几乎提供了唯一的诊断性途径^[33]。NGS 丰富了产前筛查的手段^[34]。

NGS 为疾病的靶向治疗提供了基础^[35]。

NGS 检出的大量致病基因变异,其中有许多变异为新发(novel)突变。这些变异丰富了基因数据库内容,为日后的疾病分子诊断提供了有益参考;这些变异的生物学意义和致病性多是停留在推测或软件预测阶段,值得进一步试验论证,以深入探讨基因变异对携带者的影响性质和致病机制;大量的变异信息,也将推动对疾病基因型-临床表型的关系的研究^[36-37],继而促进精准诊断、靶向治疗和预后评估等。

4 NGS 在我国先天性红细胞疾病诊断中的应用

虽然先天性红细胞疾病多为罕见病,但是我国

人口基数庞大,先天性红细胞疾病患者应不在少数。在我国,NGS 用于检测先天性红细胞疾病患者起自 2013 年^[38],应用 NGS 分子诊断先天性红细胞疾病首次报道于 2015 年^[39]。据不完全统计(以“next generation sequencing and Chinese and anemia”为检索词在 Pubmed 网站检索),迄今我国的相关报道仅有约 64 篇,其中个案报道有 24 篇,个案涉及的病种主要为遗传性球形红细胞增多症。从文章发表的年份和所属单位角度分析,2017 年至今的报道约 51 篇,多来自于省级以上医疗单位。以上表明,在应用 NGS 诊断先天性红细胞疾病方面,我国起步偏晚,普及性不高,诊断数量不多,相关工作成绩较单薄,但推进速度还是较快的,具有较大的提升空间。

5 NGS 的局限

NGS 技术自身的局限,包括:①不充分的靶向测序覆盖(0~1.5%),且某些致病基因未纳入 Panel 中;②调控区及部分内含子区存在的致病性变异无法检出;③为保证数据分析的精确性,根据方法学设定滤除了目标区域内少部分测序质量过低的变异;④虽然靶向 NGS 可以分析到小片段缺失/插入变异,但无法检出大片段缺失、拷贝数变异和短串联重复序列。必要时需采用多重连接探针扩增(MLPA)^[40]、微阵列比较基因组杂交(array CGH)等其他检测技术弥补。

对疾病认知水平的局限。生物信息技术基于对已知致病基因和变异的认识,技术水平也受限于认知水平,目前尚不足以鉴定某罕见变异是否属于致病性变异和(或)对已知致病基因的认识不充分。

6 NGS 的机遇和挑战

临床 NGS 技术发展较快,也面临着机遇和挑战。例如,将基因数据存贮于个人健康档案、基因数据的再次生信分析、建立全国人口的基因变异数据库。Weitzel 等^[41]已开始设计相关研究将基因数据存贮于个人健康档案的研究。用于生信分析的基因数据库内容都是最新的,也是不断更新的,对于以往致病性级别为 uncertain significance 的变异,再次生信分析可能会重新判定级别,确立分子诊断。Ewans 等^[42]认为再次生信分析是一种高性价比的诊断途径。NGS 测序技术的发展使得测序成本逐渐下降,这为增加 WES/WGS 的临床应用提供了机遇,同时,提升对 WES/WGS 所产生的大量变异的生信分析能力是所面临的挑战。

7 NGS 未来的方向

NGS 在先天性红细胞疾病诊断领域已初显诊断价值,深入开发 NGS 的诊断潜力,提升诊断率可能是 NGS 未来的方向。包括:将 NGS 常规应用于临床医疗工作和产前筛查、在临床 NGS 基础上融

入 RNA 试验^[43]、检测结构性变异^[44]、提升 NGS 的临床决策价值、对新发变异的生物学意义和致病性机制进行实验室论证等。NGS 相关的费用、伦理、标准、医疗保险等问题也需要与时俱进,以拓宽 NGS 在日常临床工作中的应用。

总之,NGS 对于诊断先天性红细胞疾病可简化诊断流程,提高诊断效率,并且精准、经济、快速,但整体上看,NGS 在我国的应用尚不普遍。常规应用 NGS 于先天性红细胞疾病的诊断工作,将开创我国先天性红细胞疾病分子诊断的新局面。

(中国医学科学院北京协和医学院,血液学研究所血液病医院的张凤奎教授和赵馨教授在本文的写作方面提出了宝贵的建议,特此感谢。)

参考文献

- [1] Schneider M, Chandler K, Tischkowitz M, et al. Fanconi anaemia: genetics, molecular biology, and cancer implications for clinical management in children and adults[J]. Clin Genet, 2015, 88: 13–24.
- [2] Levy SE, Myers RM. Advancements in Next-Generation Sequencing[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2016, 17: 95–115.
- [3] Beck TF, Mullikin JC, NISC Comparative Sequencing Program, et al. Systematic Evaluation of Sanger Validation of Next-Generation Sequencing Variants[J]. Clin Chem, 2016, 62: 647–654.
- [4] Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing[J]. Genet Med, 2013, 15: 733–747.
- [5] Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology[J]. Genet Med, 2015, 17: 405–424.
- [6] 孙隽, 黄颐, 王小冬, 等. 遗传病二代测序临床检测全流程规范化共识探讨(3)——数据分析流程[J]. 中华医学遗传学杂志, 2020, 37(3): 345–351.
- [7] 李园, 彭广新, 高清妍, 等. 应用靶向二代测序诊断疑似先天性贫血 46 例[J]. 中华血液学杂志, 2018, 39(5): 414–419.
- [8] ACMG Board of Directors. Points to consider in the clinical application of genomic sequencing[J]. Genet Med, 2012, 14: 759–761.
- [9] Adams DR, Eng CM. Next-Generation Sequencing to Diagnose Suspected Genetic Disorders[J]. N Engl J Med, 2019, 380: 201.
- [10] Consugar MB, Navarro-Gomez D, Place EM, et al. Panel-based genetic diagnostic testing for inherited eye diseases is highly accurate and reproducible, and more sensitive for variant detection, than exome sequencing[J]. Genet Med, 2015, 17: 253–261.
- [11] Dillon OJ, Lunke S, Stark Z, et al. Exome sequencing has higher diagnostic yield compared to simulated disease-specific panels in children with suspected monogenic disorders[J]. Eur J Hum Genet, 2018, 26: 644–651.
- [12] Lionel AC, Costain G, Monfared N, et al. Improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels suggests a role for whole-genome sequencing as a first-tier genetic test[J]. Genet Med, 2018, 20: 435–443.
- [13] Sun Y, Ruivenkamp CA, Hoffer MJ, et al. Next-generation diagnostics: gene panel, exome, or whole genome? [J]. Hum Mutat, 2015, 36: 648–655.
- [14] Alfares A, Aloraini T, Subaie LA, et al. Whole-genome sequencing offers additional but limited clinical utility compared with reanalysis of whole-exome sequencing[J]. Genet Med, 2018, 20: 1328–1333.
- [15] Ghemlas I, Li H, Zlateska B, et al. Improving diagnostic precision, care and syndrome definitions using comprehensive next-generation sequencing for the inherited bone marrow failure syndromes [J]. J Med Genet, 2015, 52: 575–584.
- [16] Roy NB, Wilson EA, Henderson S, et al. A novel 33-Gene targeted resequencing panel provides accurate, clinical-grade diagnosis and improves patient management for rare inherited anaemias[J]. Br J Haematol, 2016, 175: 318–330.
- [17] Russo R, Andolfo I, Iolascon A. Next generation research and therapy in red blood cell diseases [J]. Haematologica, 2016, 101: 515–517.
- [18] Shefer Averbuch N, Steinberg-Shemer O, Dgany O, et al. Targeted next generation sequencing for the diagnosis of patients with rare congenital anemias[J]. Eur J Haematol, 2018, 101: 297–304.
- [19] Kedar PS, Harigae H, Ito E, et al. Study of pathophysiology and molecular characterization of congenital anemia in India using targeted next-generation sequencing approach[J]. Int J Hematol, 2019, 110: 618–626.
- [20] Agarwal AM, Nussenzveig RH, Reading NS, et al. Clinical utility of next-generation sequencing in the diagnosis of hereditary haemolytic anaemias[J]. Br J Haematol, 2016, 174: 806–814.
- [21] Mansour-Hendili L, Aissat A, Badaoui B, et al. Exome sequencing for diagnosis of congenital hemolytic anemia[J]. Orphanet J Rare Dis, 2020, 15: 180.
- [22] Camps C, Petousi N, Bento C, et al. Gene panel sequencing improves the diagnostic work-up of patients with idiopathic erythrocytosis and identifies new mutations[J]. Haematologica, 2016, 101: 1306–1318.
- [23] Moreno-Carralero MI, Horta-Herrera S, Morado-Arias M, et al. Clinical and genetic features of congenital dyserythropoietic anemia (CDA) [J]. Eur J Haematol, 2018, 101: 368–378.
- [24] 彭广新, 杨文睿, 赵馨, 等. 37 例遗传性球形细胞增多症基因突变特征分析[J]. 中华血液学杂志, 2018, 39

- (11):898—903.
- [25] An W, Zhang J, Chang L, et al. Mutation analysis of Chinese sporadic congenital sideroblastic anemia by targeted capture sequencing [J]. *J Hematol Oncol*, 2015, 8:55.
- [26] Li Y, Li Y, Yang Y, et al. Next generation sequencing reveals co-existence of hereditary spherocytosis and Dubin-Johnson syndrome in a Chinese girl: A case report [J]. *World J Clin Cases*, 2019, 7:3303—3309.
- [27] Kang LL, Liu ZL, Zhang HD. Gilbert's syndrome co-existing with hereditary spherocytosis might not be rare: Six case reports [J]. *World J Clin Cases*, 2020, 8:2001—2008.
- [28] Fermo E, Vercellati C, Marcello AP, et al. Hereditary Xerocytosis due to Mutations in PIEZO1 Gene Associated with Heterozygous Pyruvate Kinase Deficiency and Beta-Thalassemia Trait in Two Unrelated Families [J]. *Case Rep Hematol*, 2017, 2017:2769570.
- [29] Chao MM, Thomay K, Goehring G, et al. Mutational Spectrum of Fanconi Anemia Associated Myeloid Neoplasms [J]. *Klin Padiatr*, 2017, 229:329—334.
- [30] DiNardo CD, Bannan SA, Routbort M, et al. Evaluation of Patients and Families With Concern for Predispositions to Hematologic Malignancies Within the Hereditary Hematologic Malignancy Clinic (HHMC) [J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2016, 16:417—428. e2.
- [31] Przychodzen B, Makishima H, Sekeres MA, et al. Fanconi Anemia germline variants as susceptibility factors in aplastic anemia, MDS and AML [J]. *Oncotarget*, 2018, 9:2050—2057.
- [32] 安文彬, 刘超, 万扬, 等. 伴髓系恶性转化的 Shwachman-Diamond 综合征患儿的临床特征及基因突变分析 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2020, 22(5):460—465.
- [33] Andolfo I, Russo R, Gambale A, et al. Hereditary Stomatocytosis: An underdiagnosed condition [J]. *Am J Hematol*, 2018, 93:107—121.
- [34] 王珂, 党瑜慧, 李芝兰, 等. 高通量测序技术筛检地中海贫血的临床意义 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2019, 27(4):1220—1226.
- [35] Rivera A, Vidorpe DH, Shmukler BE, et al. Erythrocyte ion content and dehydration modulate maximal Gardos channel activity in KCNN4 V282M/+ hereditary xerocytosis red cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 317:C287—C302.
- [36] Andolfo I, Alper SL, De Franceschi L, et al. Multiple clinical forms of dehydrated hereditary stomatocytosis arise from mutations in PIEZO1 [J]. *Blood*, 2013, 121:3925—3935, S1—S12.
- [37] Andolfo I, Russo R, Rosato BE, et al. Genotype-phenotype correlation and risk stratification in a cohort of 123 hereditary stomatocytosis patients [J]. *Am J Hematol*, 2018, 93:1509—1517.
- [38] Qiu QW, Wu DD, Yu LH, et al. Evidence of recent natural selection on the Southeast Asian deletion (SEA) causing alpha-thalassemia in South China [J]. *BMC Evol Biol*, 2013, 13:63.
- [39] 龚珠文, 余永国, 张其刚, 等. 应用第二代测序对一个范可尼贫血家系进行基因突变检测和产前诊断 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2015, 32(2):204—207.
- [40] Wu-Chou YH, Hung TC, Lin YT, et al. Genetic diagnosis of neurofibromatosis type 1: targeted next-generation sequencing with Multiple Ligation-Dependent Probe Amplification analysis [J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25:72.
- [41] Weitzel KW, Alexander M, Bernhardt BA, et al. The IGNITE network: a model for genomic medicine implementation and research [J]. *BMC Med Genomics*, 2016, 9:1.
- [42] Ewans LJ, Schofield D, Shrestha R, et al. Whole-exome sequencing reanalysis at 12 months boosts diagnosis and is cost-effective when applied early in Mendelian disorders [J]. *Genet Med*, 2018, 20:1564—1574.
- [43] Volk AE, Kubisch C. The rapid evolution of molecular genetic diagnostics in neuromuscular diseases [J]. *Curr Opin Neurol*, 2017, 30:523—528.
- [44] Barseghyan H, Tang W, Wang RT, et al. Next-generation mapping: a novel approach for detection of pathogenic structural variants with a potential utility in clinical diagnosis [J]. *Genome Med*, 2017, 9:90.

(收稿日期:2020-09-25)