

DOI: 10.12280/gjszjk.20250564

· 综述 ·

胎儿游离DNA片段富集技术在无创产前检测技术中的研究进展

安清莎, 崔瑞芳, 黄雨霄, 陶逸伦, 李晓泽[△]

【摘要】 胎儿游离DNA (cell-free fetal DNA, cffDNA) 是无创产前检测技术 (noninvasive prenatal test, NIPT) 的核心生物标志物, 其在母体血浆中丰度低且其母源背景干扰强, 严重制约了NIPT的敏感性与适用范围。基于cffDNA相较于母体游离DNA (cell-free DNA, cfDNA) 具有片段长度更短的特点, 多种片段长度富集技术相继发展, 从早期凝胶电泳与磁珠尺寸筛选, 到聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 突变测序、计算机模拟方法及微流控系统, 均显著提升了cffDNA的分离效率与纯度。临床研究表明, 富集胎儿分数 (fetal fraction, FF) 后, 在低FF、高龄、肥胖及妊娠早期等高风险人群中, NIPT对常见三体综合征的敏感度和特异度均显著增强, 同时可降低测序深度需求, 提升成本效益。未来, cffDNA片段富集技术的研究将朝着进一步提高富集效率、降低成本、简化操作流程、扩大临床应用范围、增加多技术联合的方向发展。

【关键词】 游离核酸; 非侵入性产前检测; 聚合酶链反应; 胎儿游离DNA; 胎儿分数

Research Advances in Enrichment Technology of Cell-Free Fetal DNA Fragment for Noninvasive Prenatal Test AN Qing-sha, CUI Rui-fang, HUANG Yu-xiao, TAO Yi-lun, LI Xiao-ze. Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi Province, China (AN Qing-sha, CUI Rui-fang, HUANG Yu-xiao); Changzhi Key Laboratory of Precision Prevention and Control of Birth Defects, Changzhi 046011, Shanxi Province, China (TAO Yi-lun, LI Xiao-ze)

Corresponding author: LI Xiao-ze, E-mail: lixiaoze520@126.com

【Abstract】 Cell-free fetal DNA (cffDNA) serves as the core biomarker for noninvasive prenatal test (NIPT), yet its low abundance in maternal plasma and the substantial maternal background interference significantly limit the sensitivity and applicability of NIPT. Leveraging the characteristic shorter fragment length of cffDNA compared to maternal cell-free DNA (cfDNA), various fragment length-based enrichment techniques have been developed, ranging from early methods such as gel electrophoresis and magnetic bead size selection to polymerase chain reaction (PCR)-based mutation sequencing, computational simulation approaches, and microfluidic systems. The technique development has markedly improved the separation efficiency and purity of cffDNA. Clinical studies demonstrate that after enrichment of the fetal fraction (FF), NIPT exhibits significantly enhanced sensitivity and specificity for common trisomy syndromes in high-risk populations (including those with low FF, advanced maternal age, obesity, and early pregnancy) while also reducing sequencing depth requirements and improving cost-effectiveness. Future research on cffDNA fragment enrichment technology will continue to evolve toward further increasing enrichment efficiency, lowering costs, simplifying operational procedures, expanding clinical applications, and promoting the integration of multiple techniques.

【Keywords】 Cell-free nucleic acids; Noninvasive prenatal testing; Polymerase chain reaction; Cell-free fetal DNA; Fetal fraction

(J Int Reprod Health/Fam Plan, 2026, 45: 139–144)

无创产前检测技术 (noninvasive prenatal test, NIPT) 领域的理论基础建立于1997年, 卢煜明院士团队宣布孕妇外周血中不仅有母亲的游离DNA (cell-free DNA, cfDNA), 还存有少量胎儿游离DNA

(cell-free fetal DNA, cffDNA)^[1]。cffDNA主要来源于胎盘滋养细胞, 胎儿分数 (fetal fraction, FF), 即源自胎盘的cffDNA片段在母体cfDNA中所占的比例, 是决定NIPT准确性的主要影响因素。然而, FF在个体中的差异较为显著, 平均介于4%~30%^[2-3]。由于cffDNA的研究是在大量母体来源的cfDNA背景下进行的, 即使采用敏感度较高的二代测序 (next generation sequencing, NGS) 技术, 要从FF较低的样本中获得足够的准确信息也颇具挑战。根据国内外不同实验室的经验, 单胎孕妇FF的下限一般是

基金项目: 山西省基础研究计划自然科学面上项目 (202403021221345)

作者单位: 046000 长治医学院 (安清莎, 崔瑞芳, 黄雨霄); 长治市出生缺陷精准防控重点实验室 (陶逸伦, 李晓泽)

通信作者: 李晓泽, E-mail: lixiaoze520@126.com

[△]审校者

4.0%, 低于4.0%时则判定试验失败, 而双胞胎孕妇的FF下限会进一步提高到8.0%^[4]。虽然FF会随着孕周的增加而升高, 在孕周较大时采血可获得更高的FF, 但这种升高的幅度对NIPT检测成功率的影响较小, 且延长采血孕周不利于后续的确证试验实施。有研究显示, 妊娠11~13周的平均FF约为10%; 妊娠8~10周时, 每周增加2.6%; 妊娠10~20周时, 每周增加0.2%; 之后每周仅增加0.7%^[3, 5]。为此, 有实验室试图通过增加测序深度来提高分辨率, 但这会导致检测成本上升。因此, 如果可行的话, 提高FF的方法更为可取。现基于cfDNA的片段特性, 对几种从孕妇外周血中富集cffDNA的常见技术在NIPT中的研究进展进行综述。

1 cffDNA富集技术概述

目前, 从cfDNA中识别定量cffDNA主要有两大主流方法——片段组学和表观遗传学。由于cfDNA和cffDNA分别在核小体侧翼的连接区域或核小体结合位点发生了碎片化, 进而产生“片段组学”这一术语来描述cfDNA的片段化特性, 包括游离末端的大小分布和生化性质。在研究孕妇血浆中不同类型DNA片段的分子特征时发现, cfDNA和cffDNA的片段长度分别约为105~798 bp和107~313 bp, 且cffDNA片段平均长度比cfDNA约短20 bp, 其中片段长度<193 bp的cffDNA约占80%^[6-7]。因此, 通过靶向富集孕妇外周血中较短片段的cfDNA, 提升cffDNA与cfDNA的信噪比和分辨率, 提高NIPT的准确率是当前最重要的研究方向^[8]。也有研究在单分子水平上进行遗传-表观遗传组织定位来识别cffDNA。由于cfDNA分子上有丰富的甲基化区域(CpG岛), 而cffDNA则呈现低甲基化表现, 使得单分子甲基化分析可用于推断单个血浆分子的组织来源^[9]。通过先识别含有母体特异性等位基因的cfDNA片段, 再进行甲基化分析, 判断该等位基因是否存在于胎盘来源的cffDNA分子上, 从而确定胎儿的母系遗传情况^[10]。该方法不仅可用于富集cffDNA, 还具有筛查单基因疾病的潜力。但该方法在富集cffDNA方面不如片段组学, 因为其受限于更复杂的数据分析、更高的技术成本以及更多的干扰因素。另外, 有研究通过富集孕妇外周血中的胎儿细胞进一步提取胎儿DNA, 这不仅有利于保留较完整的胎儿基因组信息, 而且可以有效降低嵌合体带来的不确定性, 但该方法获取的胎儿细胞数量非常有限, 且对完整的胎儿DNA进行全基因组扩增容易

出现错误, 既耗时又费力^[11]。根据有关研究, 只有滋养细胞和有核红细胞在母体循环中短暂存在, 是当前妊娠所特有的, 而胎儿淋巴细胞和干/祖细胞在胎儿出生后会在母体循环中持续存在数年, 因此, 淋巴细胞和干/祖细胞在二胎筛查中缺乏研究意义^[12]。从宫颈获取和分离滋养细胞是一种获取胎儿细胞的半侵入性替代方法, 该方法虽有望提高细胞产量, 但缺乏临床验证^[5]。因此, 基于cffDNA的片段特性, 选择性富集cffDNA是目前提高FF最有效的方法。

2 基于片段组学的cffDNA富集技术

2.1 磁珠富集法

磁珠分离技术是游离核酸提取过程最常用的方法。常用的磁性颗粒包括二氧化硅包覆、氨基包覆、羟基包覆和羧基包覆的 Fe_3O_4 或 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 磁性颗粒。在一定浓度的醇或盐的作用下核酸呈现负电荷, 与带有正电荷的磁珠形成静电吸附, 从而实现游离核酸的分离纯化^[13]。随着研究的不断深入, 磁珠法从对不同片段长度的cfDNA无偏好转而实现在特定的pH值和盐离子浓度下, 可以对较短片段cffDNA的靶向富集^[14]。得益于该理论的存在, 基于磁珠富集法的NIPT的应用和研究成为现实。

Zhang等^[15]建立了一种磁性纳米平台(MiniEnrich)并成功应用于产前筛查, 该研究使用了两种磁性纳米颗粒, 一种能够高分辨率地过滤长片段DNA, 另一种则能以高于95%的回收率回收低于目标片段长度阈值的剩余DNA片段, 使cffDNA的平均FF从13%提升至20%。Liu等^[16]提出一种用于液体活检且精度更高的纳米磁珠选择性cfDNA提取平台, 该方法可在cfDNA提取过程中有效去除基因组DNA污染, 与传统的微米级磁珠相比, 纳米磁珠可提供更大的表面积和更强的动力学特性, 通过调整沉淀剂的比例直接利用原始血浆样本分离不同片段长度的DNA, 此平台的cfDNA回收率超过90%, 且将FF从10.10%提高到29.94%。曾雯等^[17]在传统磁珠富集技术基础上又增加了两次磁珠筛选, 这种改良磁珠富集技术使筛选富集的cfDNA片段长度集中在140~150 bp, 提高了FF, 相比于传统磁珠富集技术, 改良磁珠富集技术使NIPT中的cffDNA浓度由9.08%提升为21.86%, 重复检测率由2.02%降低至0.74%, 检测失败率由0.057%降至0.006%。Hu等^[18]通过优化磁珠浓度富集cffDNA时发现, 该方法虽可使平均FF增加1.5~4倍, 但会导致cfDNA文库的复杂性从323.69±

77.42降低到 84.09 ± 61.37 ,并造成部分原始胎儿DNA信息丢失,影响检测结果的准确性(如单基因疾病检测),尽管如此,该研究依然认为磁珠富集程序可为NIPT提供足量的DNA。Hapsianto等^[19]使用氮芥包被的DNA捕获微珠(nitrogen-mustard-coated DNA capture beads, NMD微珠)共价捕获DNA,并允许在不洗脱的情况下直接从NMD微珠进行后续聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增,无需复杂的DNA提取和纯化过程,该方法不仅耗时短、操作简单,还存在自动化可能。

2.2 E-Gel凝胶电泳回收法 基于E-Gel电泳的NIPT原理是对孕妇外周血中的cfDNA进行建库之后,通过E-Gel电泳对指定片段长度的DNA进行回收纯化后再进行测序。该方法回收到的DNA片段富集度高,成本较低,目前在国内外多个研究团队中都已经得到了成功应用。

Liang等^[20]用E-Gel回收法富集125~135 bp cfDNA片段后,cfDNA片段丰度平均增加2.5倍,母体背景干扰平均降低23.1%,同时,对22例传统NIPT检测失败的样本进行复检后,有20例得到了正确结果。Xue等^[21]基于E-Gel技术对孕妇外周血中的cfDNA富集后,NIPT假阴性病例的成功检测率可达62.5%,尤其是能够降低局限性胎盘嵌合体病例和双胎妊娠病例的假阴性率。Zhou等^[22]的研究认为,当胎儿发生染色体非整倍体异常时,非整倍体异常的含量大致等于胎儿DNA数量;当出现局限性胎盘嵌合时,非整倍体异常的含量与胎儿DNA数量之比等于嵌合比例,该比例也可视为胎儿染色体异常的比例,故称这一比例为模拟局限性胎盘嵌合比例(simulated confined placental mosaicism proportion, SCPMP),该研究通过E-Gel回收法成功富集了110~130 bp的cfDNA片段[FF从 $(11.0 \pm 3.2)\%$ 提高到 $(26.9 \pm 8.4)\%$],不仅提高了SCPMP的准确性,还降低了NIPT的假阴性率。Qiao等^[23]使用E-Gel系统对208例妊娠6~13周的孕妇进行cfDNA片段(<140 bp)选择,富集后FF从6.1%提高到15.7%,且妊娠6周时检测成功率为81.8%,而妊娠7周时使用富集技术后的检测成功率达到了100%。内切酶CEL-I是S1核酸酶家族中的一种单链特异性核酸内切酶,能够高特异度、高敏感度地识别并切割异源双链DNA中的错配位点,是一种有效的错配切割工具酶。基于此特性,有研究将CEL-I酶切技术与毛细管电泳相结合,用于分离胎儿与母体DNA:首先利用CEL-I酶特异性切割错配的异源双链,随后以荧光染料标记

DNA片段,并通过激光诱导荧光进行检测。与常规毛细管电泳相比,该方法对DNA片段的分离效率提升了6~7倍,并成功分离检测出209 bp、219 bp和338 bp的突变标准DNA片段,证明其对低、中、高不同范围的DNA片段均具有高分离敏感度^[24]。吴小娟等^[25]利用E-Gel从孕妇血浆中富集cfDNA,68例假阳性样本经短片段cfDNA富集后FF由10.3%提高到28.7%,虽然该法提高了富集效率,但由于回收效率低($<60\%$)、易污染、精密度低等问题,单纯地通过琼脂糖E-Gel对cfDNA进行富集并不是首选方法。

2.3 基于PCR的突变富集法 最初,学者们开发了基于电泳、质谱和DNA微阵列的单核苷酸多态性基因分型方法,用于分析目标区域的已知突变,但這些方法不适合分析未知突变或低丰度突变。因为NGS技术在所有技术平台都存在固有错误率,且低丰度突变的变异检测算法问题使得其对低丰度突变的检测变得复杂。虽然基于唯一分子标识符的SAFE测序或Cypher测序可以克服这些困难,且这些方法能够区分PCR扩增产物中的人为假象、变异检测错误和真正的突变,但提高敏感度的前提是需要做大量测序来发现突变。基于定量PCR(quantitative PCR, qPCR)或液滴数字PCR(droplet digital PCR, ddPCR)的检测方法敏感度提高,能够在临床样本中检测到较低丰度的特定突变。然而,低丰度突变的信号有时接近检测限,导致结果存疑,且无法获得基于PCR测序的突变鉴定信息^[26]。因此,开发基于PCR的敏感方法用于富集低水平甚至极低水平的突变至关重要。

目前主要有2种富集方法:①基于突变特异性扩增引物,如经典的扩增受阻突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)、差异解链扩增子竞争性扩增技术及德国希尔德斯市凯杰公司(Qiagen)的商业化TheraScreen®突变检测试剂盒等,这些方法需要预先知晓存在的突变情况或者进行多次检测以筛查多种突变,却因为突变碱基被包含在扩增引物之中,无法对突变等位基因进行基于序列的验证;②低温变性共扩增PCR(co-amplification at lower denaturation temperature PCR, COLD-PCR),该方法用于不了解突变确切位置和性质的情况下富集低丰度突变,包括全COLD-PCR、快速COLD-PCR和耐高温COLD-PCR等多种形式。该方法利用父系和母系等位基因之间的解链温度(melting temperature, T_m)差异,通过形成异源双链PCR片段实现检测。

在 COLD-PCR 中,设定低于同源双链 T_m 的临界 T_m ,选择性扩增父系等位基因。因此,虽然其具有成本效益高、检测速度快等优点,但它们都仅适用于父母携带不同突变的情况,当父母携带相同突变时则不再适用^[26-27]。

在已知突变的情况下,有研究首先针对致病基因突变位点设计了相应的野生型肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)序列,当 PNA 与模板 DNA 杂交后可以提高该区域的 T_m ,达到排除大量母源 cfDNA 干扰的目的;然后设计相应位点的突变基因引物,在有适当浓度 PNA 的反应体系中,选择性扩增富集突变序列^[25]。与该方法类似, Song 等^[28]开发了一种 NaME-PrO(nuclease-assisted minor-allele enrichment with probe-overlap)法,用双链 DNA 特异性核酸酶和重叠的寡核苷酸探针检测野生型 DNA 靶标,并引导核酸酶对这些位点进行水解,而含有突变的 DNA 会造成探针与 DNA 的不匹配,从而抑制水解,然后通过随后的 PCR 扩增把突变的 DNA 序列选择性富集起来。对于胎儿和母体有相同突变的情况,上述方法并不适用。Lun 等^[29]开发了核酸片段筛选(nucleic acid size selection, NASS)方法,其利用两对引物,第一对引物用于扩增血浆中的片段 DNA,之后再用第二对引物对野生型序列和突变型序列进行特异性检测,通过比较相应的拷贝数判断样本的基因型,在此过程中,含有 cfDNA 的短片段会得到富集。NASS 检测虽然通量高,且能够排除母源 DNA 的干扰,但是需要昂贵的超高通量荧光定量系统,虽然技术先进,但是短时间内难以成为临床常规技术^[24]。对于无法明确突变位置和性质的情况, Byrou 等^[30]建立了一种快速温度梯度 COLD-PCR 法用于富集并检测孕妇血浆中胎儿父系遗传 β -珠蛋白基因簇的等位基因,结果 17 份样本均完成了正确测定。ARMS-PCR 技术操作简单、准确、成本效益高,且能够直接从母体血浆的 cfDNA 中检测出父系来源的单基因遗传病^[31-32]。然而,步骤多、过程繁琐和耗时长是该技术的缺点,因为需要经过多个纯化步骤,所以增加了 cfDNA 丢失的风险。

2.4 基于计算机模拟富集法 基于 cfDNA 平均长度约为 143 bp,对应单个核小体包裹的 DNA 长度,而母体来源 cfDNA 则多呈 166 bp 左右的双核小体模式的特征,有研究者利用高通量测序数据构建了基于片段长度密度分布的胎儿 DNA 识别算法,即在 NIPT 建库过程中无需再打断 cfDNA,而是保留了母体外周血中 cfDNA 的原始片段长度信息^[33]。在测序完成

后,通过进一步的数据过滤分析、比对,不仅可以对所有的 DNA 片段长度及分布进行统计分析,而且可以通过生物信息技术将长片段的 cfDNA 过滤后再进行 NIPT,从而实现了基于计算机富集法的 NIPT。

Minarik 等^[34]用 130 例样本检测了计算机模拟富集法在 Ion Torrent PGM 和 MiSeq 两个测序平台上的应用效果,结果显示两个平台的特异度和敏感度均达到 100%。Kucharik 等^[35]通过计算机模拟研究发现,当 FF 为 10% 且测序读数为 2 000 万时,检测敏感度为 79.3%;若仅检测片段长度 > 3 Mb 的缺失,敏感度可进一步提高到 98.4%,同时该研究还验证了基于计算机的 NIPT 在染色体微缺失微重复的可应用性。近期研究显示, Fragile 模型通过多阶段机器学习直接从原始 cfDNA 片段长度分布中量化 FF,敏感度提升 30% 以上,该模型若进一步结合核小体定位信息可增强识别精确度^[33, 36]。计算机模拟富集以与性别无关的方式仅基于浅层全基因组测序数据就能准确预测 FF,不仅成本效益和自动化高,而且消除了传统实验室手工操作过程中的污染和无菌问题。

2.5 基于微流控富集法 微流控技术通过精确控制流体动力学实现高效的 cfDNA 片段长度分选。Wei 等^[37]建立了一种新聚合物微系统 DNA 提取法,通过聚丙烯酰胺、植酸、聚多巴胺水凝胶在正电场驱动下吸附 DNA,而在负电场中则解吸 DNA,可从不同介质中快速高效地富集 DNA,这些介质包括缓冲溶液中的单链 DNA(single-stranded DNA, ssDNA)以及血浆中的 cfDNA,即使长度为 78 个核苷酸的 ssDNA 经过富集后,也能实现低至 0.1 pmol/L 的检测限,同时保持 75% 以上的回收率。Alleva 等^[38]报道了一种基于聚合物微系统的 DNA 浓缩分离方法,该方法首先对大量母体血浆样本进行批量 DNA 提取,然后将提取物注入聚合物微系统,在该系统中, DNA 被特异性捕获并实现预浓缩,随后通过瞬态等速电泳使样品在相邻通道内堆积,再采用均一缓冲体系按片段长度分离,最终目标 DNA 从通道末端出口回收,经此流程, cfDNA 片段可被浓缩至原预浓缩样品浓度的 4~8 倍。黄琴等^[39]用注射式微流控核酸分析系统在 30 min 内完成从全血到纯化 cfDNA 的全过程,并直接衔接下游 PCR,对目标序列的检测限低至 0.1% 的 FF。微流控富集法不仅具备高效率、低污染风险、高自动化程度、低成本和高度集成化等技术优势,其微型化特征也使其尤其适用于产前筛查对样本需求量低、检测周期短以及床旁化操作的需求。

求。然而,目前微流控技术并未实现临床转化。

2.6 其他 Vong等^[40]基于cffDNA比母体cfDNA更短、更碎片化、具有更多损伤的特点,提出DNA修复可提高FF的假设,他们通过20例样本验证显示,修复后的长cffDNA的富集程度(82.3%)高于母体cfDNA(66.7%),且所有21三体样本在NIPT中的Z值(Z-score)均得到改善。

3 结语与展望

上述几种常见的cffDNA富集技术均展现出独特的优势与局限。磁珠富集法通过优化磁珠特性及筛选条件能有效提高cffDNA比例,但可能会导致cffDNA复杂性降低,丢失部分关键信息。E-Gel回收法可有效富集特定片段cffDNA,在降低NIPT假阴性率方面效果显著,然而其回收效率较低、易污染的问题限制了应用。基于PCR的突变富集法在检测低丰度突变时具有一定优势,针对已知和未知突变均有相应策略,但操作过程较为繁琐,存在cffDNA丢失的风险。计算机模拟富集法凭借生物信息分析技术,成本效益高且自动化程度高,但依赖于测序数据质量和分析算法。微流控系统浓缩分离法和DNA损伤修复法虽尚未广泛应用于产前筛查,但也为cffDNA富集提供了新的思路和潜在方向。目前,虽然这些技术在提高NIPT准确性上取得了一定进展,但仍面临挑战。未来,cffDNA富集技术的研究应朝着进一步提高富集效率、降低成本、简化操作流程以及扩大临床应用范围的方向发展。同时,加强不同技术之间的联合应用,有望发挥各自优势,克服局限性,为无创产前筛查提供更精准、可靠的检测方法。

参 考 文 献

- [1] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. *Lancet*, 1997, 350(9076): 485-487. doi: 10.1016/S0140-6736(97)02174-0.
- [2] Xu C, Li J, Chen S, et al. Genetic deconvolution of fetal and maternal cell-free DNA in maternal plasma enables next-generation non-invasive prenatal screening[J]. *Cell Discov*, 2022, 8(1): 109. doi: 10.1038/s41421-022-00457-4.
- [3] Welker NC, Lee AK, Kjolby R, et al. High-throughput fetal fraction amplification increases analytical performance of noninvasive prenatal screening[J]. *Genet Med*, 2021, 23(3): 443-450. doi: 10.1038/s41436-020-01009-5.
- [4] Deng C, Liu S. Factors Affecting the Fetal Fraction in Noninvasive Prenatal Screening: A Review[J]. *Front Pediatr*, 2022, 10: 812781. doi: 10.3389/fped.2022.812781.
- [5] Hanson B, Scotchman E, Chitty LS, et al. Non-invasive prenatal diagnosis (NIPD): how analysis of cell-free DNA in maternal plasma has changed prenatal diagnosis for monogenic disorders[J]. *Clin Sci(Lond)*, 2022, 136(22): 1615-1629. doi: 10.1042/CS20210380.
- [6] Lo Y, Han D, Jiang P, et al. Epigenetics, fragmentomics, and topology of cell-free DNA in liquid biopsies[J]. *Science*, 2021, 372(6538): eaaw3616. doi: 10.1126/science.aaw3616.
- [7] Zhang M, Li K, Qu S, et al. Integrative analyses of maternal plasma cell-free DNA nucleosome footprint differences reveal chromosomal aneuploidy fetuses gene expression profile[J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 536. doi: 10.1186/s12967-022-03735-7.
- [8] Ding SC, Lo Y. Cell-Free DNA Fragmentomics in Liquid Biopsy[J]. *Diagnostics(Basel)*, 2022, 12(4): 978. doi: 10.3390/diagnostics12040978.
- [9] Zhou Q, Kang G, Jiang P, et al. Epigenetic analysis of cell-free DNA by fragmentomic profiling[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(44): e2209852119. doi: 10.1073/pnas.2209852119.
- [10] Akbariomi M, Heidari R, Gargari SS, et al. Evaluation and statistical optimization of a method for methylated cell-free fetal DNA extraction from maternal plasma[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2019, 36(5): 1029-1038. doi: 10.1007/s10815-019-01425-w.
- [11] Toft C, Ingerslev HJ, Kesmodel US, et al. Cell-based non-invasive prenatal testing for monogenic disorders: confirmation of unaffected fetuses following preimplantation genetic testing[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2021, 38(8): 1959-1970. doi: 10.1007/s10815-021-02104-5.
- [12] van de Looij A, Singh R, Hatt L, et al. Do fetal extravillous trophoblasts circulate in maternal blood postpartum? [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2020, 99(6): 751-756. doi: 10.1111/aogs.13880.
- [13] Chen Y, Liu Y, Shi Y, et al. Magnetic particles for integrated nucleic acid purification, amplification and detection without pipetting[J]. *Trends Analyt Chem*, 2020, 127: 115912. doi: 10.1016/j.trac.2020.115912.
- [14] He G, Wang W, Zhou Y, et al. Ampholytic ion-exchange magnetic beads: a promising tool for selecting short fragments in circulating cell-free DNA analysis[J]. *Front Oncol*, 2024, 14: 1397680. doi: 10.3389/fonc.2024.1397680.
- [15] Zhang B, Zhao S, Wan H, et al. High-resolution DNA size enrichment using a magnetic nano-platform and application in non-invasive prenatal testing[J]. *Analyst*, 2020, 145(17): 5733-5739. doi: 10.1039/d0an00813c.
- [16] Liu Y, Cheng L, Wang G, et al. A nano-magnetic size selective cfDNA extraction platform for liquid biopsy with enhanced precision[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2022, 1199: 123236. doi: 10.1016/j.jchromb.2022.123236.
- [17] 曾雯, 祝建疆, 戚红, 等. 超顺磁性纯化磁珠筛选胎儿游离DNA技术在无创产前筛查中的应用比较[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2024, 41(7): 797-802. doi: 10.3760/cma.j.cn511374-20230508-00268.
- [18] Hu P, Liang D, Chen Y, et al. An enrichment method to increase

- cell-free fetal DNA fraction and significantly reduce false negatives and test failures for non-invasive prenatal screening: a feasibility study[J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 124. doi: 10.1186/s12967-019-1871-x.
- [19] Hapsianto BN, Kojima N, Kurita R, et al. Direct Capture and Amplification of Small Fragmented DNAs Using Nitrogen-Mustard-Coated Microbeads[J]. *Anal Chem*, 2022, 94(21): 7594-7600. doi: 10.1021/acs.analchem.2c00531.
- [20] Liang B, Li H, He Q, et al. Enrichment of the fetal fraction in non-invasive prenatal screening reduces maternal background interference[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 17675. doi: 10.1038/s41598-018-35738-0.
- [21] Xue Y, Zhao G, Qiao L, et al. Sequencing Shorter cfDNA Fragments Decreases the False Negative Rate of Non-invasive Prenatal Testing[J]. *Front Genet*, 2020, 11: 280. doi: 10.3389/fgene.2020.00280.
- [22] Zhou J, Ouyang G, Wu L, et al. Simulated confined placental mosaicism proportion (SCPMP) based on cell-free fetal DNA fraction enrichment can reduce false-positive results in non-invasive prenatal testing[J]. *Prenat Diagn*, 2022, 42(8): 1008-1014. doi: 10.1002/pd.6150.
- [23] Qiao L, Zhang B, Wu X, et al. A fetal fraction enrichment method reduces false negatives and increases test success rate of fetal chromosome aneuploidy detection in early pregnancy loss[J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 345. doi: 10.1186/s12967-022-03555-9.
- [24] 农琛. 基于PNA的核酸选择性扩增技术富集孕妇血浆cfDNA的基础研究[D]. 百色: 右江民族医学院, 2023.
- [25] 吴小娟, 贺权泽, 张春花, 等. 短片段胎儿DNA富集技术可提高无创产前筛查的准确性[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2024, 32(4): 828-832.
- [26] Mauger F, How-Kit A, Tost J. COLD-PCR Technologies in the Area of Personalized Medicine: Methodology and Applications[J]. *Mol Diagn Ther*, 2017, 21(3): 269-283. doi: 10.1007/s40291-016-0254-8.
- [27] Mahdi Mortazavipour M, Mahdian R, Shahbazi S. The current applications of cell-free fetal DNA in prenatal diagnosis of single-gene diseases: A review[J]. *Int J Reprod Biomed*, 2022, 20(8): 613-626. doi: 10.18502/ijrm.v20i8.11751.
- [28] Song C, Liu Y, Fontana R, et al. Elimination of unaltered DNA in mixed clinical samples via nuclease-assisted minor-allele enrichment[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(19): e146. doi: 10.1093/nar/gkw650.
- [29] Lun FM, Tsui NB, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(50): 19920-19925. doi: 10.1073/pnas.0810373105.
- [30] Byrou S, Makrigiorgos GM, Christofides A, et al. Fast Temperature-Gradient COLD PCR for the enrichment of the paternally inherited SNPs in cell free fetal DNA; an application to non-invasive prenatal diagnosis of β -thalassaemia[J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0200348. doi: 10.1371/journal.pone.0200348.
- [31] Suwannakhon N, Pangeson T, Seeratanachot T, et al. Noninvasive prenatal screening test for compound heterozygous beta thalassemia using an amplification refractory mutation system real-time polymerase chain reaction technique[J]. *Hematol Rep*, 2019, 11(3): 8124. doi: 10.4081/hr.2019.8124.
- [32] Tan Y, Jian H, Zhang R, et al. Applying amplification refractory mutation system technique to detecting cell-free fetal DNA for single-gene disorders purpose[J]. *Front Genet*, 2023, 14: 1071406. doi: 10.3389/fgene.2023.1071406.
- [33] Skanderup A, Zhu G, Rahman CR. 1175P Universal circulating tumor DNA quantification using deep learning[J]. *Ann Oncol*, 2024, 35(Suppl 2): S763. doi: 10.1016/j.annonc.2024.08.1235.
- [34] Minarik G, Repiska G, Hyblova M, et al. Utilization of Benchtop Next Generation Sequencing Platforms Ion Torrent PGM and MiSeq in Noninvasive Prenatal Testing for Chromosome 21 Trisomy and Testing of Impact of In Silico and Physical Size Selection on Its Analytical Performance[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144811. doi: 10.1371/journal.pone.0144811.
- [35] Kucharik M, Gnip A, Hyblova M, et al. Non-invasive prenatal testing (NIPT) by low coverage genomic sequencing: Detection limits of screened chromosomal microdeletions[J]. *PLoS One*, 2020, 15(8): e0238245. doi: 10.1371/journal.pone.0238245.
- [36] Guo W, Hu Y, Wang W, et al. Assessment of plasma cell-free DNA fragmentation for multi-cancer early detection: An independent clinical validation study[J]. *J Clin Oncol*, 2024, 42(16): e15037. doi: 10.1200/jco.2024.42.16_suppl.e15037.
- [37] Wei J, Zhao Z, Gao J, et al. Polyacrylamide/Phytic Acid/Polydopamine Hydrogel as an Efficient Substrate for Electrochemical Enrichment of Circulating Cell-Free DNA from Blood Plasma[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(10): 5365-5371. doi: 10.1021/acsomega.9b04397.
- [38] Alleva N, Eigen K, Ng D, et al. A Versatile and Efficient Method to Isolate DNA-Polymer Conjugates[J]. *ACS Macro Lett*, 2023, 12(9): 1257-1263. doi: 10.1021/acsmacrolett.3c00371.
- [39] 黄琴, 黄乐阳, 靳翔宇, 等. 注射式微流控芯片全集成核酸分析系统与精准医疗应用[J]. *中国激光*, 2024, 51(9): 190-199. doi: 10.3788/CJL231461.
- [40] Vong J, Jiang P, Cheng SH, et al. Enrichment of fetal and maternal long cell-free DNA fragments from maternal plasma following DNA repair[J]. *Prenat Diagn*, 2019, 39(2): 88-99. doi: 10.1002/pd.5406.

(收稿日期: 2025-11-11)

[本文编辑 王琳]