

· 专家共识 ·

滤纸干血斑用于脊髓性肌萎缩症基因筛查方法的建立*

吴莉萍¹ 高玲亮¹ 杨江涛^{1,2} 付有晴³ 刘彦慧³ 顾茂胜⁴ 何红琴⁵ 杨艳玲^{6,*}

1.深圳爱湾医学检验实验室(广东 深圳 518000)

2.深圳罕见病代谢组学精准医学工程研究中心(广东 深圳 518000)

3.东莞市妇幼保健院产前诊断中心(广东 东莞 523000)

4.徐州市妇幼保健院遗传医学中心(江苏 徐州 221000)

5.运城市妇幼保健院遗传科(山西 运城 044000)

6.北京大学第一医院儿科(北京 100034)

【摘要】目的 建立滤纸干血斑基因组DNA自动化提取方法及流程,并探索其在脊髓性肌萎缩症(SMA)基因筛查中的应用。方法 收集45份干血斑标本,采用打孔钳打孔后提取DNA,使用多重PCR结合荧光探针技术进行SMN1检测,考察最低起始干血斑用量。收集103份4℃不同保存时长的新生儿干血斑和17份EDTA抗凝血制备的干血斑,使用最低起始量提取DNA并检测SMN1,考察运输与保存条件对基因检测结果稳定性的影响。结果 最低1片直径4mm的干血斑所提取的DNA浓度2.54~5.71ng/μL、纯度1.676~1.984,可满足SMN1检测要求。4℃避光保存1~24个月的新生儿干血斑标本,新鲜采集并经冷链运输48~72h的EDTA抗凝血及-80℃超低温冷冻保存1~2年的EDTA抗凝血制备的干血斑标本均可稳定检出SMA基因型。结论 1片直径4mm的干血斑即可满足SMN1检测要求,大大降低了样本采集、保存和运输的难度和复杂程度,有利于开展大规模人群筛查,为现有新生儿筛查体系下增加SMA筛查提供了技术基础。

【关键词】滤纸干血斑; 脊髓性肌萎缩症; DNA提取; SMN1; 新生儿筛查; 最低起始量

【中图分类号】R744

【文献标识码】A

【基金项目】国家重点研发计划(2019YFC1005100); 深圳市工程研究中心(工程实验室)组建项目(F-2020-Z99-502615)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2022.09.001

Establishment of Genetic Screening Method for Spinal Muscular Atrophy Using Dried Blood Spots*

WU Li-ping¹, GAO Ling-liang¹, YANG Jiang-tao^{1,2}, FU You-qing³, LIU Yan-hui³, GU Mao-sheng⁴, HE Hong-qin⁵, YANG Yan-ling^{6,*}

1.Shenzhen Aone Medical Laboratory, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

2.Shenzhen Rare Disease Engineering Research Center of Metabolomics in Precision Medicine, Shenzhen Aone Medical Laboratory Co.,Ltd, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

3.Center of Prenatal Diagnosis, Dongguan Maternal and Child Health Hospital, Dongguan 523000, Guangdong Province, China

4.Center for Genetic Medicine, Xuzhou Maternity and Child Health Care Hospital, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China

5.Genetic Department, Yuncheng Maternal and Child Health Hospital, Yuncheng 044000, Shanxi Province, China

6.Department of Pediatrics, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Abstract: Objective To establish an automatic extraction method of genomic DNA from dried blood spots (DBS), and to explore its application in genetic screening of spinal muscular atrophy (SMA). **Methods** 45 DBS specimens were collected and punched for genomic DNA extraction. Multiplex PCR combined with fluorescent probe technology was used for SMN1 testing to determine the minimum starting amount of dried blood spot. A total of 103 neonatal DBS specimens stored at 4℃ for different months and 17 DBS specimens prepared from EDTA anticoagulants were collected respectively, and the minimum starting amount of these samples were used for genomic DNA extraction and SMN1 testing to investigate the effects of blood transport and storage conditions for SMN1 testing. **Results** One dried blood spot (4mm in diameter) was proved to be the minimum starting amount for SMN1 testing. The genomic DNA concentrations ranged from 2.54~5.71ng/μL, with a purity of 1.676~1.984. DBS can be stored stably at 4℃ for 1~24 months for SMN1 testing. SMA genotype can also be stably detected in DBS specimens prepared from EDTA anticoagulation freshly collected and transported in the cold chain for 48~72 hours or EDTA anticoagulation stored at -80℃ for 1 to 2 years. **Conclusion** The minimum starting amount for SMN1 testing is only one blood spot with a diameter of 4 mm, which greatly reduces the difficulty and complexity of sample collection, storage and transportation. It is very conducive to large-scale population genetic screening of SMA. In particular, it makes it feasible to expand SMA newborn screening under current newborn screening system.

Keywords: Dried Blood Spots; Spinal Muscular Atrophy; DNA Extraction; SMN1; Newborn Screening; Minimum Starting Amount

脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)是一种严重的退行性神经肌肉病,由于运动神经元存活基因1(SMN1)的缺失或变异导致脊髓前角α-运动神经元退化变性和丢失,以肌无力和肌萎缩为主要临床特征。SMA为常染色体隐性遗传病,发病率为1/10000~1/6000,一般人群中SMN1的致病变异携带率为1/50~1/40^[1-3]。

已知约95%的SMA患者为SMN1外显子7纯合缺失所致,约5%为SMN1复合杂合变异所致^[2-5]。对于SMA基因筛查,目前已有商业化试剂盒,采用多重PCR结合荧光探针技术,针对SMN1基因外显子7两侧设计特异性的引物序列,扩增SMN1基因片段(以β-actin基因为内参)。针对每个扩增子设计特异的荧光探针,通过收集和分析特定荧光信号的CT值,根据比较Ct法进行SMN1基因外显子7拷贝数的分析,从而实现纯合缺失、杂合缺失以及正

常型三种基因型的自动判读。

现阶段SMA筛查的主要目标为孕前/产前携带者,通过静脉穿刺采集全血样本提取基因组DNA,检测SMN1^[6]。但是,目前孕前/产前携带者筛查率不高,既往由于缺乏基因修正治疗药物,使得国内SMA新生儿筛查落后于美国、德国等发达国家,大量的SMA患儿被延误诊断,未能得到有效治疗,导致瘫痪,儿童期死亡率很高^[7-8]。2022年1月1日,诺西那生钠正式纳入我国医保,SMA新生儿筛查势在必行^[9]。我国台湾和浙江分别于2014年和2018年开始SMA新生儿筛查研究,目前已积累了一定的经验^[10-11]。

能否采用干血斑标本进行基因组DNA提取并应用于SMN1基因检测,是否能顺利开展新生儿SMA基因筛查的必要前提,也是孕前/产前携带者筛查及转诊网络建设的重要环节。使用特殊滤纸采集血样制成干血斑,是一种便捷的临床血液样本采集技术,既保

【第一作者】吴莉萍,女,助理研究员,主要研究方向:遗传病筛查与辅助诊断。E-mail: wuliping@aonebio.com.cn

【通讯作者】杨艳玲,女,教授,主要研究方向:遗传病的诊断、治疗与预防。E-mail: organic.acid@vip.126.com

证了待检测样品的生物稳定性又便于储存和运输,是遗传病基因筛查和诊断的有效工具^[12-13]。干血斑是血液样本稳定的载体,但是需要与相应的提取与检测技术相结合才能够保证其检测准确性。本研究旨在建立一种干血斑基因组DNA自动化提取方法,考察可满足SMA基因筛查的干血斑最低起始用量,并进行检测稳定性测试,以适用于临床大规模人群的SMA基因筛查,尤其是新生儿筛查。

1 资料与方法

1.1 主要仪器与试剂 Whatman 903号滤纸,干血斑基因组DNA提取试剂盒(深圳会众生物科技有限公司),人运动神经元存活基因1(SMN1)检测试剂盒(PCR-荧光探针法)(深圳会众生物科技有限公司)。

全自动核酸提取仪(深圳会众生物科技有限公司),超微量分光光度计(北京凯奥科技发展有限公司),恒温混匀仪(加热型)-TS100(杭州瑞诚仪器有限公司),全自动医用PCR分析系统(上海宏石医疗科技有限公司,中国)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 所有标本的采集均需受检者或其监护人签订知情同意书。(1)新生儿干血斑标本:共40份,来自中国科学院大学深圳医院;(2)不同保存时长的新生儿干血斑标本:共103份,其中102份来自中国科学院大学深圳医院,1份来自运城市妇幼保健院;(3)新鲜采集的EDTA抗凝血:共5份,来自深圳罕见病代谢组学精准医学工程研究中心,使用EDTA抗凝管采集外周静脉血2mL;(4)新鲜采集并经冷链运输48~72h的EDTA抗凝血:共10份,来自深圳罕见病代谢组学精准医学工程研究中心,使用EDTA抗凝管采集外周静脉血2mL,冷链运输48~72h;(5)-80℃超低温冷冻保存1~2年的EDTA抗凝血:共7份,其中5份来自徐州市妇幼保健院,2份来自东莞市妇幼保健院。

1.2.2 干血斑标本的制备与保存 用移液枪取45μL左右的血液标本自然滴落于滤纸片采样圈中,每个血斑直径不小于8mm,确保滤纸正反两面均匀、充分渗透,室温干燥4小时后即制备成滤纸干血片标本。每单张干血片置于自封袋中,独立密闭保存。

1.2.3 干血斑最低起始用量测试 新生儿干血斑标本40份和新鲜采集的EDTA抗凝血所制备的干血斑标本5份,用于SMN1基因检测干血斑最低起始用量测试。第一步,随机选取新生儿干血斑标本20份[其中1份为阳性样本(SMN1基因外显子7杂合缺失型)]和新鲜采集的EDTA抗凝血所制备的干血斑标本5份,每份标本使用打孔钳从干血斑标本采样圈中打取直径为3mm的干血斑各1片、2片和3片,分别提取基因组DNA,测试SMN1基因检测稳定性。第二步,使用剩余新生儿干血斑标本20[其中1份为阳性样本(SMN1基因外显子7杂合缺失型)],根据第一步测试结果调整干血斑使用面积,考察最低起始干血斑用量。

基因组DNA提取,使用打孔钳从干血斑标本采样圈中打取不同面积的血片,收集在1.5mL离心管中。每份标本打孔后,均使用75%酒精对打孔钳头部进行擦拭消毒,避免交叉污染。

提取步骤:基因组DNA提取采用会众生物干血斑基因组DNA提取试剂盒,提取操作严格按照试剂盒说明书进行。每个样本依次加入200μL裂解液和20μL蛋白酶K,用恒温混匀仪56℃ 1800rpm恒温振荡孵育30min后,99℃ 500rpm恒温振荡孵育10min,取出离心管瞬时离心,将液体全部转移到V-F型板A列,将V-F型板放置在会众生物全自动核酸提取仪的提取槽上,套好磁棒套,运行干血斑标本提取程序,仪器自动完成提取,洗脱的DNA在V-F型板的H列。

DNA浓度与纯度测定,完成所有干血斑标本的基因组DNA提取后,使用超微量分光光度计进行吸光值检测,计算DNA浓度和纯度。

SMN1基因检测,采用会众生物人运动神经元存活基因1(SMN1)检测试剂盒(PCR-荧光探针法),通过多重PCR结合荧光探针技术,对SMN1外显子7拷贝数进行检测分析。操作流程严格按照试剂盒说明书进行。

当SMN1基因存在0个拷贝(即SMA纯合缺失型)其RQ值参考区间<0.25或无RQ值,当SMN1基因存在1个拷贝(即SMA杂合缺失型)其RQ值参考区间为0.25~0.75,当SMN1基因存在2个拷贝(即正常型)其RQ值参考区间为0.75~1.25。

1.2.4 新生儿干血斑标本保存稳定性测试 选取4℃避光保存1个月、3个月、6个月、12个月和24个月的新生儿干血斑标本各20份,其中保存时长为1个月的组别中增加2份阳性标本(SMN1基因外显子7杂合缺失型),保存时长为6个月的组别中增加1份阳性标本(SMN1基因外显子7杂合缺失型)。每份标本分别使用打孔钳打取最低起始用量的干血斑,提取基因组DNA,检测SMN1,评价用于SMA基因检测时新生儿干血斑标本冷藏保存的稳定性。

1.2.5 EDTA抗凝血运输与保存条件测试 选取10份新鲜采集并经冷链运输48~72h的EDTA抗凝血(其中阳性样本5份,包括3份SMN1基因外显子7杂合缺失型和2份纯合缺失型标本)及7份-80℃超低温冷冻保存1~2年的EDTA抗凝血所制备的干血斑标本(其中阳性样本2份,为SMN1基因外显子7纯合缺失型)。每份标本分别使用打孔钳打取最低起始用量的干血斑,提取基因组DNA,检测SMN1,评价用于制备干血斑标本并进行SMA基因检测时EDTA抗凝血的运输与保存条件。

1.3 统计学处理 采用R包对检测结果进行数据处理和统计学分析。

2 结果

2.1 不同面积干血斑SMN1基因检测结果 新生儿干血斑标本20份(其中1份为阳性样本为SMN1外显子7杂合缺失型)和新鲜采集的EDTA抗凝血所制备的干血斑标本5份,使用2~3片直径为3mm的干血斑均可稳定检出SMN1基因型,见图1、表1。与2片直径为3mm的干血斑相比,仅使用1片直径为4mm的干血斑也可稳定检出SMN1基因型,见图2。

2.2 不同面积干血斑所提取的基因组DNA浓度与纯度分析

2.2.1 DNA浓度 新生儿干血斑标本20份、新鲜采集的EDTA抗凝血所制备的干血斑标本5份,使用2~3片直径3mm的干血斑所提取的基因组DNA浓度为3.11~13.71ng/μL(图3,表2),满足SMN1检测要求(2~180ng/μL,下文同)。

与2片直径3mm的干血斑相比,仅使用1片直径4mm的干血斑所提取的基因组DNA浓度为2.54~5.71ng/μL(图4),也可满足SMN1检测要求。

2.2.2 DNA纯度 新生儿干血斑标本20份、新鲜采集的EDTA抗凝血所制备的干血斑标本5份,使用2~3片直径3mm的干血斑所提取的基因组DNA纯度(A260/A280)为1.617~1.968(图3,表2),满足SMN1基因检测要求(A260/A280介于1.6~2.0,下文同)。

与2片直径3mm的干血斑相比,仅使用1片直径4mm的干血斑所提取的基因组DNA纯度(A260/A280)为1.676~1.984(图4),也可满足SMN1检测要求。

表1 新鲜采集EDTA抗凝血所制1~3片直径为3mm的干血斑标本SMN1检测结果

样本序号	1片		2片		3片	
	RQ值	SMN1	RQ值	SMN1	RQ值	SMN1
1	1.17	正常型	1.13	正常型	1.10	正常型
2	1.25	正常型	1.21	正常型	1.19	正常型
3	1.18	正常型	1.15	正常型	1.19	正常型
4	1.10	正常型	1.09	正常型	1.12	正常型
5	1.03	正常型	0.99	正常型	1.06	正常型

表2 新鲜采集EDTA抗凝血所制1~3片直径3mm的干血斑基因组DNA浓度与纯度

样本序号	DNA浓度(ng/μL)			DNA纯度(A260/A280)		
	1片	2片	3片	1片	2片	3片
1	5.45	6.95	7.44	1.938	1.862	1.944
2	7.25	6.99	6.77	1.885	1.856	1.862
3	2.88	3.71	6.79	1.604	1.829	1.641
4	3.37	4.98	5.71	1.849	1.847	1.875
5	3.08	4.79	5.52	1.682	1.678	1.629

2.3 新生儿干血斑标本保存稳定性测试 新生儿干血斑标本在4℃避光保存1个月、3个月、6个月、12个月和24个月，打取1片直径4 mm的干血斑，所提取的基因组DNA浓度与纯度均满足SMN1检测要求，可稳定检出SMA基因型，见图5~图6。

2.4 EDTA抗凝血运输与保存条件测试 新鲜采集并经冷链运输48~72h的EDTA抗凝血及-80℃超低温冷冻保存1~2年的EDTA抗凝血所制备的干血斑标本，打取1片直径4mm的干血斑所提取的基因组DNA浓度与纯度均满足SMN1检测要求，可稳定检出SMA基因型，见图7~图8。

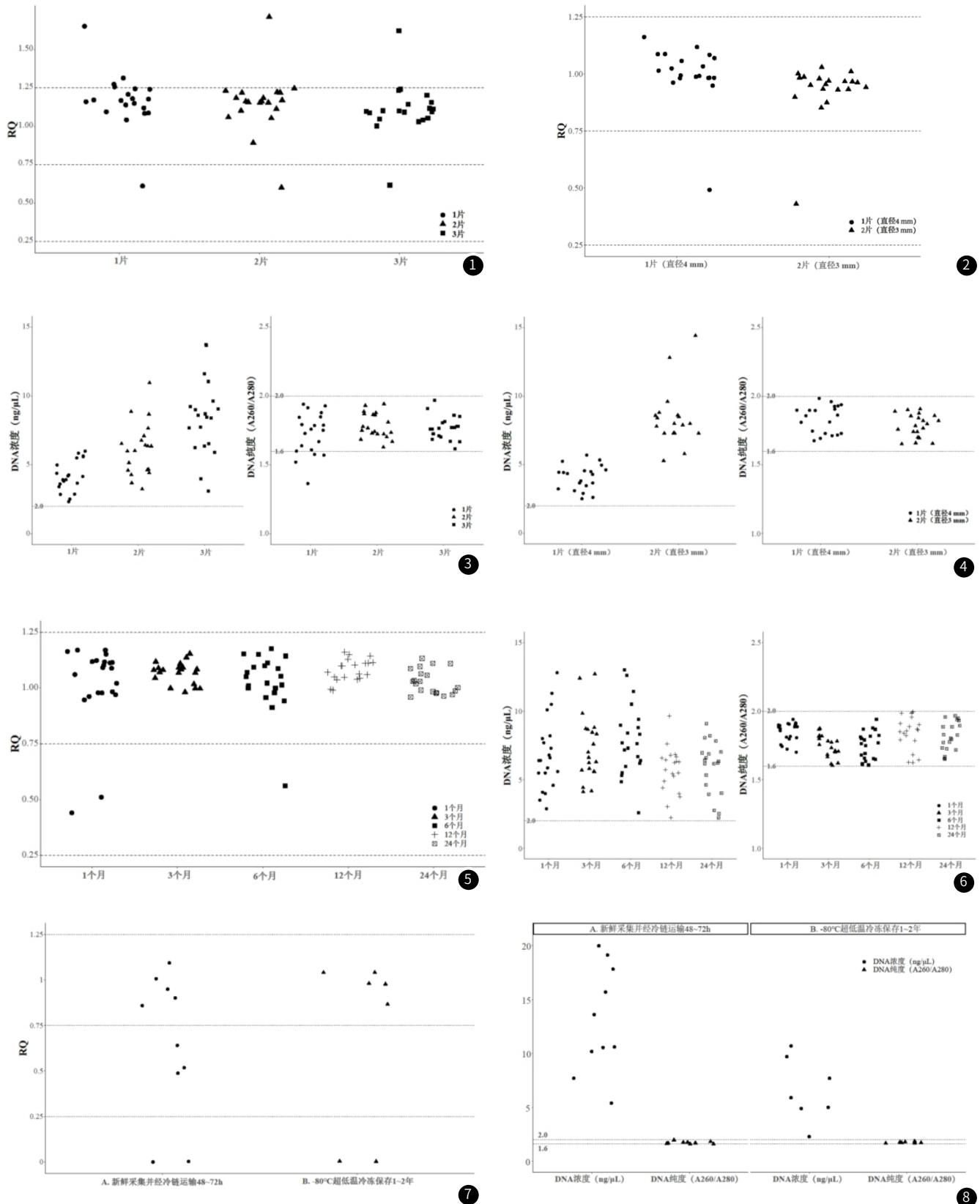


图1 1~3片直径为3mm的新生儿DBS标本SMN1基因检测结果。图2 干血斑SMN1检测结果(1片直径4mm vs 2片直径3mm)。图3 1~3片直径3mm的新生儿干血斑所提取的基因组DNA浓度与纯度。图4 干血斑基因组DNA浓度与纯度(1片直径4mm vs 2片直径3mm)。图5 新生儿干血斑标本4℃不同保存时长下的SMN1检测结果。图6 新生儿干血斑标本4℃保存不同时长下的基因组DNA浓度与纯度。图7 不同运输或保存条件下EDTA抗凝血所制干血斑标本SMN1检测结果。图8 不同运输或保存条件下EDTA抗凝血所制干血斑标本基因组DNA浓度与纯度。

3 讨论

SMA是导致婴幼儿残障的主要遗传病之一，发病年龄早，进展快，死亡率高。随着诺西那生钠被正式纳入医保，大大推动了我国SMA新生儿筛查的开展^[9]。根据中国新生儿筛查专家共识《高通量测序在单基因病筛查中的应用》，SMA完全符合新生儿单基因病筛查的病种和基因选择原则^[14]。为了减轻患者及其家庭的经济负担和生理心理创伤，提升我国出生人口素质，在大力推广孕前/产前携带者筛查的同时，我国也亟待开展大规模新生儿人群SMA筛查。

本研究建立了一种干血斑基因组DNA自动化提取方法，并根据临床基因检测项目的实际情况，模拟设计了各种检测条件，包括干血斑最低起始用量、新生儿干血斑标本不同保存时长、EDTA抗凝血的不同运输与保存条件等，提取各类干血斑样本基因组DNA，并验证SMN1检测的准确性与稳定性。结果显示，无论采用新生儿足跟血干血斑或是EDTA抗凝血制备的干血斑，最少使用1片直径为4mm的干血斑即可进行基因组DNA自动化提取和SMN1检测；4℃避光保存长达24个月的新生儿干血斑标本，经冷链运输48~72h或-80℃超低温冷冻保存1~2年的EDTA抗凝血所制备的干血斑标本，均能够稳定进行SMN1检测，证明干血斑可作为SMA筛查的首选样本类型之一。

本研究把SMN1检测所需干血斑面积降至最低，以最大程度地减少所需新生儿的血量；另外，干血斑便于运输与保存，可为SMA孕前/产前基因筛查及转诊网络建设发挥重要作用。

3.1 干血斑标本在遗传检测中的优势 目前临床基因检测最常使用的样本为外周静脉血，需要专业医护人员进行静脉穿刺，且采集好的血液需要通过冷链运输至实验室待检。另外，血液样本在检验前后均需保存在-80℃超低温冰箱，以最大程度地避免基因组DNA降解。

相较于静脉血，干血斑样本的采集、运输及保存都更为简便、快捷和安全。新生儿可采取少量足跟血，滴于专用滤纸上，自然晾干，制成干血斑样本，采样过程疼痛感低，病原体感染的风险也较静脉采血低。相比于静脉血样的冷链运输，干血斑样本的寄送仅需普通快递即可。另外，干血斑样本的储存条件也相对较低，可在4℃环境下稳定保存，占用空间也小得多^[15]。血斑干燥后，生物危害性也降低。因此，干血斑标本的采集、运输和保存具有简便、安全且低成本的优势。

3.2 改良的基因组DNA自动化提取方法 SMN1检测对DNA浓度要求较低，但对纯度要求较高。由于制备干血斑的滤纸片中含有大量纤维素，干血斑在裂解、洗脱过程中会有大量的滤纸纤维脱落在洗脱液中，影响后续磁珠吸附DNA的过程，严重时会影响基因检测结果的准确性和稳定性。本研究尝试采用了不同提取试剂盒，所提取的DNA纯度差别较大。经严格挑选，本研究中所使用的干血斑基因组DNA提取试剂盒，能够很好的去除杂质干扰，提高DNA提取效率和质量。而且提取过程操作简便，通量大，可同时提取96个样本，尤其适用于大样本批量提取和检测。

3.3 用于SMN1检测的干血斑最低起始用量 通过不同面积干血斑测试，结果提示直径为3mm的干血斑2片或3片均可满足SMN1检测要求。如果使用2~3片直径为3mm的干血斑，打孔操作复杂，干血斑使用面积较大，为了提高操作简便性，减少样本使用量，通过计算血斑面积，得出1片直径为4mm的干血斑面积(12.56mm²)基本接近2片3mm的干血斑面积之和(14.13mm²)。因此，本研究选取1片直径为4mm的新生儿干血斑和新鲜采集的EDTA抗凝血所制备的干血斑，分别提取基因组DNA，测试SMN1检测稳定性。结果显示，1片直径为4mm的干血斑即可满足SMN1检测要求。

无论对于受检者或是临床医生，仅使用1片直径为4mm的干血斑都具有明显的优势，样本使用量少，采血量少，打孔操作简便，大大提升了大规模人群SMA筛查的可行性和便利性。尤其在现有新生儿筛查体系下，仅使用少量干血斑标本，无需额外采样即可满足SMN1检测需求，使得在常规新生儿筛查病种的基础上增加SMA筛查具备了可操作性。

3.4 干血斑长时间冷藏保存后的稳定性 本研究对4℃避光条件下不同保存时长的新生儿干血斑标本分别进行了基因组DNA提取和SMN1检测，结果显示4℃避光保存了1个月、3个月、6个月、12个月和24个月的干血斑标本，所提取的DNA质量良好，与新鲜制备的干血斑标本无显著差异，且可以稳定进行SMN1检测。这可能与干血斑标本中的血斑已经完全干燥，且独立密闭保存，受外界环境因素影响小有关。采用干血斑标本克服了静脉血样储存和运输条件相对较高的问题，为大规模人群筛查提供了良好的技术基础，也为仅进行了常规新生儿筛查的婴幼儿提供了延迟检测SMA基因型的机会。另外，由于遗传检测本身存在不可避免的技术局限性和一定的适用范围，可能会出现筛查范围外变异类型所致的SMA，可通过长期保存的干血斑标本复检验证，提高诊断率。

3.5 EDTA抗凝血制备的干血斑标本同样满足SMN1检测要求 孕前/产前携带者筛查可使用EDTA抗凝血样本，但血液样本不易存储和运输，将其制备成干血斑标本后，可大大提高检测便利性。本研究将新鲜采集的EDTA抗凝血、新鲜采集并经冷链运输48~72h的EDTA抗凝血及-80℃超低温冷冻保存1~2年的EDTA抗凝血分别制成干血斑，提取基因组DNA，检测SMA基因，对照结果，均能稳定检出SMA基因型。这对于地域偏远、医疗条件相对落后的区域提供了转诊可能性，有利于扩大SMA筛查覆盖面。

综上所述，干血斑标本由于其样本采集、制备、运输和保存方便，是SMA大规模人群筛查最为有利的采样方式，尤其适用于新生儿筛查。建立干血斑基因组DNA自动化提取和基因检测方法和流程，有利于推广大范围SMA防控工作。

参考文献

- [1] 张抒扬. 罕见病诊疗指南(2019版) [M] // 彭晓音, 宋昉. 脊髓性肌萎缩症. 北京: 人民卫生出版社, 2019: 699-704.
- [2] 北京医学会医学遗传学分会, 北京罕见病诊疗与保障学会. 脊髓性肌萎缩症遗传学诊断专家共识[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(40): 3130-3140.
- [3] 北京医学会罕见病分会, 北京医学会医学遗传学分会, 北京医学会神经病学分会神经肌肉病学组, 等. 脊髓性肌萎缩症多学科管理专家共识[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(19): 1460-1467.
- [4] 都娟, 瞿宇晋, 熊晖, 等. 脊髓性肌萎缩症三例及其家系的基因突变分析[J]. 中华儿科杂志, 2011, 49(6): 5.
- [5] 瞿宇晋, 都娟, 李尔珍, 等. 脊髓性肌萎缩症的SMN1基因点突变分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2011, 28(2): 6.
- [6] 国家卫健委临床检验中心新生儿疾病筛查室间质量评价委员会. 新生儿疾病筛查滤纸血片采集和递送及保存专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(10): 836-840.
- [7] Dangoulouff T, Vrščaj E, Servais L, et al. Newborn screening programs for spinal muscular atrophy worldwide: Where we stand and where to go. [J] Neuromuscul Disord, 2021, 31(6): 574-582.
- [8] Zhang J, Wang Y, Ma D, et al. Carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy in 13,069 Chinese pregnant women [J]. J Mol Diagn, 2020, 22(6): 817-822.
- [9] 戴毅, 崔丽英. 脊髓性肌萎缩症的昨天、今天与明天[J]. 罕见病研究, 2022, 1(1): 28-33.
- [10] Chien Y H, Chiang S C, Weng W C, et al. Presymptomatic diagnosis of spinal muscular atrophy through newborn screening [J]. J Pediatr. 2017 Nov; 190: 124-129.
- [11] Lin Y, Lin CH, Yin X, et al. Newborn screening for spinal muscular atrophy in China using DNA mass spectrometry [J]. Front Genet, 2019, Dec, 17, 10: 1255.
- [12] 唐东江, 马雯琴, 宋诚燕, 等. 干血纸片法用于广东人G6PD基因点突变筛查研究[J]. 中华血液学杂志, 1998, 19(004): 189-191.
- [13] 黄烁丹, 占伟, 邹婕, 等. 滤纸干血斑DNA自动化提取及其在地中海贫血基因诊断中的应用[J]. 新医学, 2015(8): 4.
- [14] Tong F, Wang J, Xiao R, et al. Application of next generation sequencing in the screening of monogenic diseases in China, 2021: A consensus among Chinese newborn screening experts [J]. World J Pediatr, 2022, 18(4): 235-242.
- [15] 国家卫生健康委临床检验中心新生儿遗传代谢病筛查室间质量评价委员会. 新生儿疾病筛查生物样本管理专家共识[J]. 临床检验杂志, 2020, 38(7): 488-490.

(收稿日期: 2022-07-08)