

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00283

应用实时荧光定量 PCR 检测母血浆胎儿 DNA 进行 RhD 基因型产前诊断

张逸^{1,2}, 蒋荔², 袁向亮³, 杨祖菁^{1,2*}

1. 温州医学院临床医学系, 温州 325035
2. 上海交通大学医学院附属新华医院妇产科, 上海 200092
3. 上海交通大学医学院附属新华医院检验科, 上海 200092

[摘要] **目的** 建立实时荧光定量 PCR(real time PCR)技术检测 RhD 阴性孕妇血浆中游离胎儿 DNA 进行无创性产前诊断胎儿 RhD 基因型的方法。**方法** 通过微量 DNA 抽提技术提取母血浆中胎儿游离 DNA, 利用 Real time PCR 检测 22 例妊娠 15~40 周的单胎 RhD 阴性孕妇血浆中胎儿游离 DNA, 进行男性性别决定基因(SRY)和 RhD 基因外显子 7、10 和内含子 4 的特异性扩增, 基因型结果与血清学 RhD 定型结果对比, 评价该技术方法的准确性。**结果** 孕妇血浆中存在游离胎儿 DNA。19 例 RhD 真阳性孕妇血浆中, 14 例均检测到胎儿游离 DNA 的 RhD 基因外显子 7、10 和内含子 4 的特异性扩增, 判断为 RhD 阳性, 基因型结果与血清学表型相符。3 例未检测到胎儿游离 DNA 的 RhD 基因特异性扩增, 结果与胎儿血清学表型相符。因此检测胎儿游离 DNA 的 RhD 基因型准确率达到 89.5%。另外 2 例只检测到 RhD 基因外显子 10 扩增, 通过新生儿脐血血清学吸收放散试验确定为 RhD^d型。3 例 RhD^d型孕妇血浆中检测到 RhD 基因扩增, 不适于胎儿 RhD 基因型的分型。**结论** 实时荧光定量 PCR 方法检测 RhD 阴性孕妇血浆中游离胎儿 DNA 进行无创性诊断胎儿 RhD 基因型, 是一种简便、准确、快速的产前基因诊断的可行性方法, 值得临床推广应用。

[关键词] 实时荧光定量 PCR; 胎儿 DNA; RhD 基因型; 产前诊断

[中图分类号] R 714.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)03-0283-05

Prenatal determination of fetal RhD genotype by real-time PCR examination of fetal DNA in maternal plasma

ZHANG Yi^{1,2}, JIANG Li², YUAN Xiang-liang³, YANG Zu-jing^{1,2*}

1. Department of Clinical Medicine, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, Zhejiang, China
2. Department of Obstetrics and Gynecology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China
3. Department of Laboratory Medicine, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

[Abstract] **Objective** To set up a novel non-invasive prenatal determination technique of fetal RhD genotype by real-time PCR examination of fetal DNA in RhD negative maternal plasma. **Methods** Plasma fetal DNA was extracted by manual DNA micro-extraction method from the plasma of 22 RhD negative women (15-40 gestation week). We amplified the exons 7, 10 and intron 4 of RhD gene and sex-determining region Y gene (SRY) using real-time polymerase chain reaction. The presence of fetal DNA was confirmed by testing SRY. The results of genotyping and serum RhD status of the newborns were compared to evaluate the accuracy of the present method. **Results** Cell-free fetal DNA was detected in the maternal plasma samples. Among the 19 RhD negative specimens, 14 cases had the specifically amplified exons 7, 10 and intron 4 of RhD gene and SRY gene, and the results were confirmed by serological examination of fetal umbilical blood after delivery. Among the 19 specimens, 3 cases were not detected the specifically amplified in exons 7, 10 and intron 4 of RhD gene and SRY gene, and the results were also confirmed by serological examination of fetal umbilical blood. The accuracy of the present method was 89.5%. SRY detection confirmed fetal DNA presence in maternal plasma in all boys. The other 2 cases only had specifically amplified exons 10 of RhD gene, and the results were confirmed as RhD^d phenotype. Real-time PCR easily differentiated pregnant woman whose RBCs had a weak D phenotype ($n=3$) from truly RhD-negative patients. However, in these cases fetal RhD status cannot be determined. **Conclusion** Real time PCR detection of fetal DNA in RhD-negative maternal plasma is simple, quick and specific for noninvasive prenatal diagnosis of fetal RhD blood type, which can help to prevent hemolytic disease of newborns.

[收稿日期] 2009-08-24 **[接受日期]** 2009-12-18

[基金项目] 上海市教委优秀青年教师科研专项基金(jdy06041). Supported by Research Fund for Outstanding Young Teachers of Shanghai Municipal Education Committee(jdy06041).

[作者简介] 张逸, 主治医师. E-mail: xinhuaazhy@hotmail.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-65790000, E-mail: yzujing@sohu.com

[Key words] real time PCR; fetal DNA; RhD genotyping; prenatal diagnosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(3): 283-287]

RhD血型不合所致的新生儿溶血病病情凶险,常引起胎儿水肿缺氧、黄疸、贫血甚至宫内死亡,同时发生早产的概率增加。上海每10 000例分娩中RhD溶血病的发病率为10.6例,胎儿和新生儿的死亡率是20.5%^[1]。因此,胎儿RhD血型的产前诊断对RhD阴性孕妇的孕期监测以及新生儿溶血病的预防和治疗具有重要意义。以往对胎儿RhD血型的产前诊断多为创伤性取材,易引起胎儿流产。非损伤性手段包括超声波和孕妇血液中胎儿细胞,但超声检查无法确定胎儿RhD基因型^[2];而孕妇血中胎儿细胞数量极少,临床应用受限。近年来孕妇血浆中游离胎儿DNA的发现,为无损性产前诊断提供了简捷而准确有效的手段^[3]。针对RhD基因结构遗传特点,应用胎儿游离DNA建立一种准确、方便、快捷、常规的无创性产前诊断胎儿RhD基因型的方法就显得非常必要。本研究拟利用实时定量PCR技术探讨母血浆胎儿DNA的存在,并通过检测RhD多个外显子和内含子的基因扩增综合判断预测胎儿RhD基因型,拟建立成熟的无创性产前诊断RhD溶血病的技术方法。

1 对象和方法

1.1 实验对象 选择2005年8月至2008年12月来自上海交通大学医学院附属新华医院、杨浦区中心医院和杨浦区妇幼保健院进行产前检查的RhD阴性健康孕妇为研究对象,孕15~40周,B超确定为单胎,产后证实为孕男胎。经其知情同意。共收集到35份样本从中选择可检测出Y染色体性别决定区(SRY)基因的孕妇样本22例,其中,初孕妇12例,有流产史者10例。另取2例未婚且无妊娠史的健康女性及2例健康男性外周血各6 ml作为对照。

1.2 RhD阴性常规筛选确认及RhD^d型吸收放散确认试验 常规筛选RhD阴性产检孕妇和分娩后取新生儿脐血2 ml,采用聚凝胺法检测RhD表型(抗D试剂为美国Immuncor公司和Domining生物公司的单克隆和多克隆抗血清)。通过直接抗人球蛋白实验确认,以此作为判断标准。采用间接抗人球蛋白试验方法确认;然后对部分RhD阴性个体重新抽取血样,通过热吸收放散方法筛选其中真实RhD阴性个体。具体操作步骤为首先采用IgM+IgG混合抗D试剂进行盐水法初步筛选RhD阴性,然后采用抗人球蛋白(AHG)试验确认。对RhD阴性个体同时采用IgM+IgG混合试剂测定RhCcEe抗原。Del的检测用吸收放散法:把0.5 ml抗D和

0.5 ml被检RhD(-)压积红细胞混合,37℃孵育1 h。然后用生理盐水洗涤3次(末次洗涤盐水做阴性对照)。最后压积红细胞加入0.25 ml生理盐水在56℃放散8 min,取出放散液,加入3% D阳性红细胞,离心检测。如阴性,则红细胞上无D抗原;如为阳性,则证明红细胞上有D抗原即D^d,有D抗原的标本进行RhCcEe分型。22例孕妇血浆经确认试验证实19例为RhD真阴性孕妇,3例为RhD^d型孕妇。22例新生儿脐血经确定试验证实2例为RhD^d型。

1.3 抽提血浆DNA 所有研究对象取静脉血6~8 ml,枸橼酸钠抗凝,1 600×g离心10 min后取上层血浆,再次16 000×g离心10 min,吸取上层血浆,-80℃冰箱保存。孕妇血浆DNA抽提按Qiagen公司的QIAamp Blood Kit说明操作。

1.4 实时荧光定量PCR 采用美国ABI公司的ABI Prism 7500实时荧光定量PCR仪。所用引物及探针见表1。

所有扩增基因的引物和探针均由上海基康公司合成。定量PCR扩增体系25 μl,内含TaqMan Universal PCR Master Mixture(美国ABI公司)12.5 μl。每种引物0.5 μmol/L,探针0.3 μmol/L,模板DNA 5 μl。PCR反应条件为:预热50℃,2 min;95℃,10 min;95℃,15 s和60℃,1 min,40个循环。

1.5 统计学处理 应用SPSS 11.5统计软件,对各组数据首先进行正态性检验,正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验比较组间差异,P<0.05为有统计学意义。

2 结果

2.1 实时荧光定量PCR方法检测SRY基因确定母血中胎儿DNA的存在 采用已知浓度的男性基因组DNA稀释后作为标准品制成标准曲线,可从标准曲线上计算出本研究样品的起始拷贝数。孕妇血浆胎儿SRY基因的标准曲线图表明不同稀释度样品C_t值与起始拷贝数的对数存在良好的直线相关关系,相关系数为0.990。所有计算采用每个标准3个复孔所得的平均C_t值,且3个复孔的C_t值之间差异小于1个循环。SRY基因扩增阳性的判断标准为C_t值<38;C_t值≥40为阴性;C_t值介于38和40之间,重复检测1次,如还介于两者之间则判定为阳性。22例孕男胎孕妇血浆中均检测到SRY基因的特异性扩增,证明胎儿DNA均存在。2例健康男性作为阳性对照,均检测到有明显的扩增曲线,而2例

未孕且无妊娠史的健康女性作为阴性对照, 未见任何扩增曲线。

表 1 实时荧光定量 PCR 检测 β -globin, SRY 和 RhD 基因的引物和探针序列

Tab 1 The Sequence of prime and probe for β -globin, SRY and RhD gene by real-time PCR

Gene		Primer and Probe
β -globin	Forward primer	5'- GCA CCT GAC TCC TGA GGA GAA -3'
	Reverse primer	5'- CAC CAA CTT CAT CCA CGT TCA -3'
	Probe	5'- TGC CGT TAC TGC CCT GT -3'
SRY	Forward primer	5'- GCG ACC CAT GAA CGC ATT -3'
	Reverse primer	5'- GCC ATC TTG CGC CTC TGA T -3'
	Probe	5'- ATC GTG TGG TCT CGC -3'
RhD exon7	Forward primer	5'-CTC CAT CAT GGG CTA CAA-3'
	Reverse primer	5'-CCG GCT CCG ACG GTA TC-3'
	Probe	5'-AGC AGC ACA ATG TAG ATG ATC TCT CCA -3'
RhD exon10	Forward primer	5'-CCT CTC ACT GTT GCC TGC ATT-3'
	Reverse primer	5'-AGT GCC TGC GCG AAC ATT-3'
	Probe	5'-TAC GTG AGA AAC GCT CAT GAC AGC AAA GTC T-3'
RhD intron4	Forward primer	5'-GGT TGA AAT CTG CAT ACC CCA-3'
	Reverse primer	5'-ATG AAT CAT TTC TTT GAG TAG TGT TTG C-3'
	Probe	5'-CTC CTG AAC CTG CTC TGT GAA GTG CTT AAT TC-3'

2.2 孕妇血浆胎儿 DNA 的 RhD 基因特异性扩增 图1 为一例孕妇血浆胎儿 SRY 以及 RhD 基因外显子 7、10 和内含子 4 的实时定量 PCR 扩增曲线图。在图 1 所示的病例中, SYR 基因的 C_t 值为

24.8, 证明在该孕妇血浆中检测到游离胎儿 DNA。同时也检测到 RhD 基因外显子 7、10 和内含子 4 的特异性扩增, C_t 值分别为 28.0、28.5 和 25.1, 证明该孕妇所孕胎儿 RhD 基因阳性。

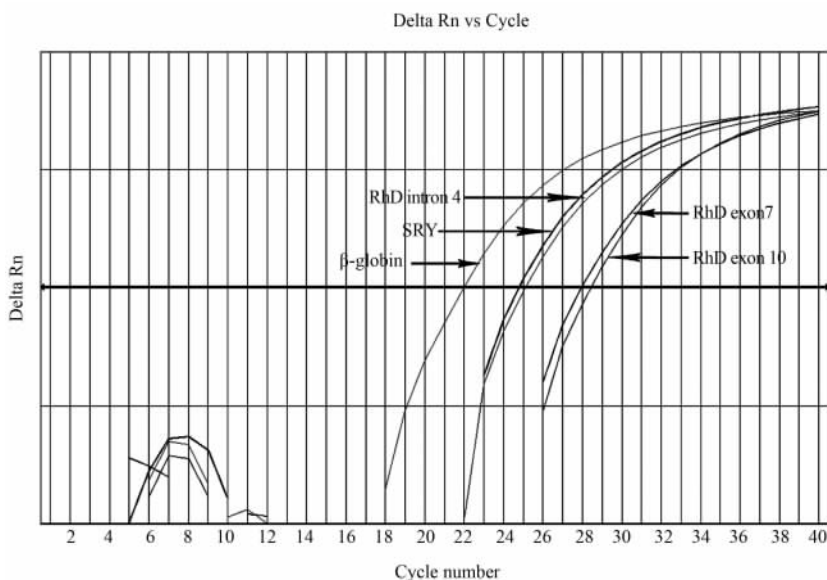


图 1 母血浆中胎儿 SRY 以及 RhD 基因外显子 7、10 和内含子 4 的实时定量 PCR 扩增曲线图

Fig 1 Real-time quantitative PCR amplification plots showing the determination of fetal SRY gene, RhD exon 7, 10 and intron 4 amplicons by analysis of DNA extracted from maternal plasma

2.3 孕妇血浆胎儿 DNA 的 RhD 基因型检测 通过实时定量 PCR 检测孕妇血浆胎儿 SRY 以及 RhD 基因外显子 7、10 和内含子 4 的扩增曲线图, 结果显示 19 例 RhD 真阴性孕妇血浆中, 14 例均检测到胎儿游离 DNA 的 RhD 基因外显子 7、10 和内含子 4 的特异性扩增, 判断为 RhD 阳性, 其基因定型结果

与血清学表型相符。3 例 RhD 阴性孕妇血浆中均未检测到胎儿游离 DNA 的 RhD 基因外显子 7、10 和内含子 4 的特异性扩增, 其基因定型结果与胎儿血清学表型均相符。因此检测胎儿游离 DNA 的 RhD 基因型准确率达到 89.5%。

另外 2 例 RhD 阴性孕妇血浆中游离胎儿 DNA

只检测到 RhD 基因外显子 10 的特异性扩增,通过这两例新生儿脐血血清学吸收放散试验均确定为 RhD^{el}型。可见,对于 RhD^{el}型,该方法不能很好地确定其基因型。

2.4 RhD^{el}孕妇血浆胎儿 DNA 的 RhD 基因型检测

通常 RhD 抗原的确认方法为抗人球蛋白试验,但现已证实经抗人球蛋白试验鉴定的 RhD 阴性个体中存在 RhD 弱表现型:RhD^{el}型,RhD^{el}型基本保留 RhD 基因。如果孕妇的红细胞弱表达 D 抗原常常会被误认为 D 阴性。对于 3 例 RhD^{el}型,利用孕妇

血浆游离 DNA 分离技术和实时定量 PCR 方法可较容易的区分真正 RhD 阴性患者和弱 D 型孕妇。因为真正 RhD 阴性孕妇如果其胎儿 RhD 为阳性,游离 DNA 的 RhD 外显子 10 或 7 扩增的 C_t值较高,远高于管家基因珠蛋白基因扩增的 C_t值,而弱 D 型孕妇外显子 10 或 7 扩增的 C_t值低,接近珠蛋白基因的 C_t值(表 2),两组差异具有统计学意义(P<0.05)。然而在这些弱 D 型孕妇血浆中 DNA 的 RhD 基因出现扩增,但无法确定是母体 DNA 还是胎儿 DNA,所以胎儿 RhD 基因型尚不能检测确定。

表 2 比较 RhD 阴性和 RhD^{el}孕妇血浆中游离 DNA RhD 基因型 ΔC_t 值

Tab 2 Comparison of the ΔC_t value in real-time PCR performed from RhD⁻ and RhD^{el} maternal plasma

Group	n	Gestational week	ΔC _t value(target gene C _t —housekeeping gene C _t)		
			RhD exon 10	RhD exon 7	RhD intron 4
RhD ⁻	19	26±2.5	5.43±0.67	5.27±1.14	3.23±0.75
RhD ^{el}	3	27±1.0	1.27±1.10	1.30±0.72	0.77±0.55
t value			6.00	5.71	3.55
P value			<0.01	<0.01	<0.05

3 讨论

利用孕妇血浆中存在的胎儿游离 DNA 进行无创性产前诊断是近年来该领域研究的一个新方向。目前,胎儿游离 DNA 已经广泛用于胎儿性别检测、胎儿 RhD 血型检测以及一些常见单基因遗传病的产前诊断研究中,因其无创、简便及快速有效的特点使其在临床上得以推广应用。胎儿 RhD 血型的产前诊断对 RhD 阴性孕妇的孕期监测新生儿溶血病的预防具有重要意义。

母血浆中检测胎儿 RhD 基因型是以 RhD 阴性孕妇缺失 RhD 基因这一理论为基础,通过检测 RhD 阴性孕妇血浆中游离胎儿 DNA RhD 基因确定胎儿 RhD 基因型^[4]。国外学者利用胎儿游离 DNA 进行胎儿 RhD 血型检测开展较早。Finning 等^[5]和 Brojer 等^[6]采用实时 PCR 扩增 RhD 基因预测胎儿 Rh 血型。Finning 等^[5]检测了 RhD 基因外显子 4、5 和 10,结果显示,233 份预测为 D(+),114 份预测为 D(-),12 份未能作出预测;359 份中已有 247 份通过羊水 DNA 检测或通过产后血清学检查进行了验证。Brojer 等^[6]检测了 RhD 基因外显子 7、10 和内含子 4 230 份样本的结果预测符合率几乎是 100%。国内也有学者进行了母血浆游离胎儿 DNA 进行 RhD 血型等方面的研究报道,如邬晋芳等^[7]利用普通 PCR 技术检测 27 例母血浆中游离胎儿 DNA 进行 RhD 基因第 10 外显子的特异性扩增,其中 17 例 RhD 阳性孕妇均扩增出特异性片段,而 10 例 RhD

阴性孕妇中 4 例出现特异性扩增。可能由于 RhD 阴性基因型具有多态性,且存在种族差异,可导致假阳性结果的现象^[8]。由于 RhD 基因多态性的特点,通常单一位点的检测容易造成假阴性结果,因此需要针对不同位点设计多对引物,增加特异性。王学东等^[9]采用 PCR-SSP 技术对 32 例妊娠 11~40 周的单胎 RhD 阴性孕妇血浆中胎儿游离 DNA 进行 RhD 基因外显子 5、7、10 和内含子 4 的特异性扩增,32 例样本中,28 例基因定型结果与血清学表型相符。

国内外学者针对不同位点进行多引物设计与 Rh 血型基因(RH)的特点密切相关。RH 主要由紧密连锁的 RhD 基因和 RHCE 基因串联排列组成,利用 RhD 和 RHCE 两基因间序列差异设计序列特异性引物,进行 PCR 扩增,能扩增出 RhD 基因为 RhD 阳性。RhD 基因和 RHCE 基因序列同源性高达 96%以上,其中 RhD 基因第 1、2、8 外显子的编码区与 RHCE 基因的相对对应序列相同,不是 RhD 基因的特异性序列,不能作为引物序列区。而 RhD 基因的 3、4、5、6、7、9、10 外显子的核苷酸序列与 RHCE 基因有区别。有研究报道检测 RhD 基因外显子 7 的敏感性最高,而且第 7 孕周就可在母血中检测到^[10]。而单独检测外显子 7 可引起假阴性,增加检测外显子 10 可减少假阴性。如果外显子 7 和 10 特异性扩增结果出现差异时,检测另一 RhD 基因的特异性片段——内含子 4 可帮助做出正确判断。有研究报道检测 RhD 基因的内含子 4,基因型与

表型的一致性高^[11]。而且内含子4片段距离外显子7和10较远,同时可检测某些RhD基因变异体。因此目前国内外学者针对不同位点如RhD基因外显子7、10和内含子4设计多对引物,增加特异性^[12]。

但国内相关研究大多采用普通PCR扩增的方法,虽然孕妇母血浆中胎儿DNA的存在确实为无创性产前诊断提供了很好的技术,但要发展为临床常规的技术,需要应用更加精确的测定方法。近年来实时荧光定量PCR技术作为一种实时检测技术,检测过程中无需打开扩增管,无需对终产物进行处理因此造成污染的可能性较小,并以其特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确等优点已代替普通PCR成为临床检测中的常规技术,因此开展实时PCR的胎儿游离DNA检测RhD基因型技术方法显得尤为必要。根据RhD基因结构特点并参考国内外有关RhD基因定型方法^[13-15],本研究采用实时荧光定量PCR技术检测RhD基因外显子7、10和内含子4的特异性扩增,来评价其作为孕妇血浆检测胎儿RhD基因型进行无创性产前诊断方法的可行性。我们检测的22例妊娠15~40周的单胎RhD阴性孕妇血浆中胎儿游离DNA样本中,19例为RhD真阴性孕妇,其中14例检测到RhD基因特异性扩增,3例未检测到RhD基因扩增,结果均与血清学表型相符。因此检测胎儿游离DNA的RhD基因型准确率高。另外2例只检测到RhD基因外显子10的特异性扩增,确定为RhD^{el}型。王学东等^[9]采用PCR-SSP技术对2例基因定型结果与血清学表型不相符的病例,利用特异性引物序列进行RhD1227A等位基因扩增,2例扩增结果为阳性,并通过新生儿脐血血清学吸收放散试验确定为RhD^{el}型。结合我们的结果说明RhD^{el}型可引起RhD基因定型的假阳性,这应当引起重视。同样对于RhD^{el}型孕妇,利用该方法可有效区分真正RhD阴性患者和弱D型孕妇。然而在这些弱D型孕妇中胎儿RhD基因型尚不能检测确定。因此对于RhD^{el}型孕妇以及本研究没有涉及的孕女胎孕妇检测胎儿DNA确定胎儿RhD基因型可能需要采用基因多态性检测,以确保该游离DNA是源于胎儿DNA而非母亲DNA。

实时荧光定量PCR方法能简单、快速、方便的检测孕妇血浆胎儿游离DNA,其敏感性、特异性好,无污染,为无创性产前诊断提供了很好的技术方法^[4]。相对于毛细血管电泳等技术方法^[15],利用实时荧光定量PCR技术对RhD阴性孕妇血浆中游离胎儿DNA,通过检测RhD基因外显子7、10和内含

子4的特异性扩增,进行胎儿RhD基因型诊断,方便可行,可用于新生儿RhD溶血病的预防和诊断,值得临床推广应用。

[参考文献]

- [1] 籍孝诚. 母婴血型不合溶血病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999:13.
- [2] Geifman-Holtzman O, Wojtowycz M, Kosmas E, Artal R. Female alloimmunization with antibodies known to cause hemolytic disease[J]. *Obstet Gynecol*, 1997, 89:272-275.
- [3] Lo Y M, Corbetta N, Chamberlain P F, Rai V, Sargent I L, Redman C N, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. *Lancet*, 1997, 350:485-487.
- [4] Finning K, Martin P, Daniels G. The use of maternal plasma for prenatal rhd blood group genotyping[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 496:143-157.
- [5] Finning K, Martin P, Daniels G. A clinical service in the UK to predict fetal Rh (Rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1022:119-123.
- [6] Brojer E, Zupanska B, Guz K, Orzinska A, Kalinska A. Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma[J]. *Transfusion*, 2005, 45:1473-1480.
- [7] 邹晋芳, 杨华, 韩梅宁, 张卫华. 胎儿RhD基因型的诊断研究[J]. *中国儿童保健杂志*, 2004, 12:26-28.
- [8] Peng C T, Shih M C, Liu T C, Lin I L, Jaung S J, Chang J G. Molecular basis for the RhD negative phenotype in Chinese[J]. *Int J Mol Med*, 2003, 11:515-521.
- [9] 王学东, 王保龙, 王兰芳, 廖艳秋, 沈建军, 叶书来. 应用Rh阴性孕妇外周血胎儿游离DNA进行RhD血型产前基因诊断[J]. *中华围产医学杂志*, 2007, 10:370-373.
- [10] Rouillac-Le Sciellour C, Puillandre P, Gillot R, Baulard C, Metra S, Le Van Kim C, et al. Large scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhD-negative pregnant women[J]. *Mol Diagn*, 2004, 8:23-31.
- [11] Aubin J T, Le Van Kim C, Mouro I, Colin Y, Bignozzi C, Brosard Y, et al. Specificity and sensitivity of RHD genotyping methods by PCR-based DNA amplification[J]. *Br J Haematol*, 1997, 98:356-364.
- [12] Hyland C A, Gardener G J, Davies H, Ahvenacnen M, Flower R L, Irwin D, et al. Evaluation of non-invasive prenatal RHD genotyping of the fetus[J]. *Med J Aust*, 2009, 191:21-25.
- [13] Purwosunu Y, Sekizawa A, Okai T. Detection and quantification of fetal DNA in maternal plasma by using lightcycler technology[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 444:231-238.
- [14] Grootkerk-Tax M G H M, Soussan A A, de Haas M, Wijk P A M, van der Schoot C E. Evaluation of prenatal RHD typing strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma[J]. *Transfusion*, 2006, 46:2142-2148.
- [15] Kimura M, Sato C, Hara M, Ishihara O, Ikebuchi K. Noninvasive fetal RHD genotyping by maternal plasma with capillary electrophoresis[J]. *Transfusion*, 2008, 48:1156-1163.