

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12S 3/24

C12Q 1/68



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02822118.4

[43] 公开日 2005 年 2 月 16 日

[11] 公开号 CN 1582341A

[22] 申请日 2002.9.6 [21] 申请号 02822118.4

[30] 优先权

[32] 2001. 9. 6 [33] AU [31] PR7499

[86] 国际申请 PCT/AU2002/001214 2002.9.6

[87] 国际公布 WO2003/020986 英 2003.3.13

[85] 进入国家阶段日期 2004.5.8

[71] 申请人 莫拿什大学

地址 澳大利亚维多利亚

共同申请人 莫拿什 IVF 控股有限公司

[72] 发明人 M·G·凯茨 D·S·克兰姆

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 周承泽

权利要求书 5 页 说明书 20 页 附图 1 页

[54] 发明名称 分离细胞的方法及其使用

[57] 摘要

本发明涉及提取和鉴别细胞，具体是胎儿细胞和滋养层细胞的非侵入性方法。本发明包括使用细胞鉴别染色体异常和突变的方法，具体用于通过进行染色体和单基因疾病的遗传诊断进行产前诊断。本发明还包括证实细胞胎儿起源的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种从子宫颈粘液样品中提取细胞的方法，其特征在于，所述方法包括：
获得子宫颈粘液样品；
5 用胶原酶和蛋白酶处理样品以从子宫颈粘液样品中分离细胞；和
从样品中提取分离的细胞。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述子宫颈粘液样品是经子宫颈的样品。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，所述子宫颈粘液样品从子宫颈
10 区域获得，所述子宫颈区域包括子宫颈内管和较低的子宫极。
4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法，其特征在于，所述子宫颈粘液样品在妊娠头三个月或中三个月获得。
5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的方法，其特征在于，所述子宫颈粘液样品用胶原酶和蛋白酶以及分离酶混合酶的组合处理。
- 15 6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的方法，其特征在于，所述方法进一步包括用粘液溶解剂处理子宫颈粘液样品。
7. 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述子宫颈粘液样品在用胶原酶和蛋白酶处理前用粘液溶解剂处理。
8. 一种用权利要求 1-7 中任一项所述方法制备的分离的细胞。
- 20 9. 一种从子宫颈粘液样品中提取胎儿细胞的方法，其特征在于，所述方法包括：
获得用权利要求 1-7 中任一项所述方法制备的分离细胞的混合物；
用胎儿抗体处理所述细胞；
鉴别与胎儿抗体结合的细胞；和
提取鉴别的细胞。
- 25 10. 一种鉴别胎儿细胞的方法，其特征在于，所述方法包括：
获得用权利要求 1-7 中任一项所述方法制备的分离细胞的混合物；
用胎儿特异性抗体处理所述细胞；和
鉴别与胎儿抗体结合的细胞。
11. 如权利要求 9 或 10 所述的方法，其特征在于，所述胎儿抗体是头三个月的
30 胎儿的特异性抗体。
12. 如权利要求 9-11 中任一项所述的方法，其特征在于，所述抗体单独使用或

与另一种抗体结合使用以鉴别胎儿细胞。

13. 如权利要求 9-12 中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述一种或多种抗体用于鉴别胎儿细胞。

14. 如权利要求 9-13 中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述胎儿细胞通过与母体对照比较微卫星标记进一步鉴别, 其中所述胎儿细胞与母体细胞共用一个微卫星标记。

15. 如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 所述微卫星标记通过正向引物序列鉴别, 所述正向引物序列选自:

-tatgtgagtcaattccccaagtga;

10 -atgatgaatgcatagatggatg;

-ttgcagggaaccacagtt;

-tgaacatacatgtacatgtgtcttg; 或

-cactgcagacggcatgaacttc。

16. 如权利要求 15 所述的方法, 其特征在于, 所述微卫星标记通过反向引物序列鉴别, 所述反向引物序列选自:

-gttgtattagtcaatgttctccag;

-aatgtgtgtccttccaggc;

-tccttggaaataaattcccgg;

-ttctctacatatttactgccaacac; 或

20 -ccagaatcacatgagccaattcc。

17. 一种用权利要求 9 或 11-16 中任一项所述方法制备的胎儿细胞。

18. 一种鉴别胎儿细胞的方法, 其特征在于, 所述方法包括:

获得细胞样品;

用选自本文所描述的 NDOG1、NDOG5 和 FT1. 41. 1 的抗体或其等价物处理细胞样

25 品; 和

鉴别与抗体结合的细胞。

19. 如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于, 所述抗体单独使用或组合使用以鉴别胎儿细胞。

20. 一种用于鉴别胎儿细胞的组合物, 其特征在于, 所述组合物含有抗体 NDOG1、NDOG5 和 FT1. 41. 1。

21. 一种表征胎儿细胞的方法, 其特征在于, 所述方法包括:

从用权利要求 9-16 中任一项所述方法制备的子宫颈粘液样品中获得胎儿细胞；
用选自以下的方法处理胎儿细胞：

- (a) 多重 FL-PCR；
 - (b) WGA、杂交和微阵列分析；或
 - 5 (c) mRNA、cDNA 文库的提取，杂交和基因表达微阵列分析；和
- 分析处理结果以表征所述细胞。

22. 如权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述胎儿细胞的特征为生化、代谢或遗传异常。

23. 一种在胎儿细胞的染色体中鉴别染色体非整倍性的方法，其特征在于，所述方法包括：

从用权利要求 9-16 中任一项所述方法制备的子宫颈粘液样品中获得胎儿细胞；
鉴别染色体上至少三个多态性微卫星标记；和
确定至少三个 (3) 多态性微卫星标记的等位基因分布图。

24. 如权利要求 23 所述的方法，其特征在于，所述等位基因分布图通过 5 个微卫星标记中的一个或多个加以确定。

25. 一种产前诊断的方法，其特征在于，所述方法包括：

从用权利要求 9-16 中任一项所述方法制备的子宫颈粘液样品中获得胎儿细胞；
鉴别染色体上至少三个多态性微卫星标记；

- 确定至少三个 (3) 多态性微卫星标记的等位基因分布图；和
20 使等位基因分布图与产前诊断症状相关联。

26. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述产前诊断包括确定胎儿细胞中遗传突变的存在，其中所述遗传突变选自染色体非整倍性、点突变、易位、三核苷酸重复扩展、插入和缺失。

27. 如权利要求 26 所述的方法，其特征在于，所述遗传突变与疾病相关，所述疾病选自囊性纤维化、 β 地中海贫血、亨廷顿病、脆性 X 综合症、肌强直性营养不良、杜兴氏肌营养不良、镰状细胞贫血、特纳氏综合症 (XO)、克兰费而特综合症 (XXY)、XXX 女性和 XYY 男性、三倍性 (69、XXX 或 XXY 或 XYY)、帕韬氏综合症 (三体性 13) 和爱德华氏综合症 (三体性 18) 或唐氏综合症 (三体性 21)。

28. 如权利要求 27 所述的方法，其特征在于，所述染色体非整倍性发生在选自染色体 21、18、13、X 和 Y 的人类染色体。

29. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，所述等位基因分布图显示染色体

21 的三体性。

30. 如权利要求 28 或 29 所述的方法，其特征在于，所述遗传疾病是唐氏综合症。

31. 如权利要求 23-30 中任一项所述的方法，其特征在于，所述微卫星标记包
5 括正向引物序列，所述正向引物序列选自：

-tatgtgagtcaattccccaagtga;
-atgatgaatgcatagatggatg;
-ttgcagggaaccacagtt;
-tgaacatacatgtacatgtgtcttg; 或
10 -cactgcagacggcatgaacttc。

32. 如权利要求 23-31 中任一项所述的方法，其特征在于，所述微卫星标记包
括反向引物序列，所述反向引物序列选自：

-gttgtattagtcaatgttctccag;
-aatgtgtgtccttccaggc;
15 -tccttggaataaattcccgg;
-ttctctacataatttactgccaacac; 或
-ccagaatcacatgagccaattcc。

33. 如权利要求 23-32 中任一项所述的方法，其特征在于，所述方法包括使用
选自表 2 所列标记的微卫星标记。

20 34. 一种证实个体细胞胎儿起源的方法，所述方法包括：

从用权利要求 9-16 中任一项所述方法制备的子宫颈粘液样品中获得胎儿细胞，
并从同一个体获得母体细胞；

选择表示胎儿或母体细胞特征的至少三个(3)多态性微卫星标记；和

在胎儿细胞和母体细胞上确定至少三个(3)多态性微卫星标记的等位基因分布
25 图。

35. 如权利要求 34 所述的方法，其特征在于，所述证实个体细胞胎儿起源的方
法包括鉴别母体细胞和胎儿细胞染色体的染色体非整倍性。

36. 一种检测单基因疾病的方法，其特征在于，所述方法包括：

从用权利要求 9-16 中任一项所述方法制备的子宫颈粘液样品中获得胎儿细胞；

30 和

检测胎儿细胞的基因突变。

37. 如权利要求 36 所述的方法, 其特征在于, 所述单基因疾病选自囊性纤维化、 β 地中海贫血、亨廷顿病、脆性 X 综合症、肌强直性营养不良、杜兴氏肌营养不良和镰状细胞贫血。

38. 如权利要求 37 所述的方法, 其特征在于, 所述遗传疾病是囊性纤维化。

5 39. 一种如实施例 1 或 2 所描述的提取如权利要求 1 所述细胞的方法。

40. 一种如实施例 1 或 2 所描述的提取如权利要求 9 所述细胞的方法。

分离细胞的方法及其使用

5 本发明涉及一种提取和鉴别细胞——具体是胎儿细胞和滋养层细胞——的非-侵入性的方法。本发明包括使用所述细胞鉴别染色体异常和突变的的方法，特别是通过进行染色体和单基因病的基因诊断用于产前诊断。本发明还包括证实细胞胎儿起源的方法。

10 引言

大约 0.5%的夫妻冒很大的风险怀上患有遗传疾病的胎儿。这种遗传疾病包括囊性纤维化、亨庭顿病、 β 地中海贫血和肌强直性营养不良。例如，在澳大利亚，人群中每 25 人中就有 1 人是囊性纤维化突变的携带者，因此最近已开始进行新生儿囊性纤维化的筛选以监控所有刚出生的孩子。

15 除了单基因病，染色体异常是自然流产和新生儿中最常见的遗传疾病。涉及染色体 21、18、13、X 和 Y 的三体性是具有最常见的染色体 21 三体性或唐氏综合症的最大的类群，大约在每 700 个新生儿中就有一个发生。染色体 13 和 18 的三体性是仅有的其它常染色体三体性，这造成特征异常综合症，导致在出生后的时期里新生儿很快死亡。余下的活产三体性患者具有额外的性染色体，XXY、XYY 或 XXX。

20 进行产前诊断主要是试图检测胎儿中的染色体异常，具体的是唐氏综合症。唐氏综合症是引起人智力迟钝的最重要的遗传因素，还与先天性心脏病和白血病的高风险性有关。

在怀孕过程中进行产前诊断以检测胎儿的单基因病或染色体异常。目前，产前诊断包含侵入性步骤，即以绒毛膜绒毛取样(CVS) (10-12 周)或羊膜腔穿刺(14-16

25 周)的形式鉴定胎儿中潜在的染色体非整倍性。这两种步骤都具有流产的风险(1-2%)。因此，产前检验仅提供给发觉具有较大风险的妇女，包括年长的孕妇(大于 35 岁)，具有母体血清筛选异常的妇女或以前怀有染色体异常的胎儿的妇女。

通常，使用侵入性方法对绒毛膜或羊膜细胞取样进行产前诊断。这些取样方法确保当前胎儿的胎儿细胞也被检验。从其它来源例如血液获得的样品不能保证胎儿

30 细胞这样鉴定，可使用从当前的胎儿或是最近流产的胎儿获得的细胞，因为这种细胞可在循环系统中保留几年。一获得胎儿细胞就使用细胞遗传技术鉴别染色体异

常。这一过程时间很长并需要高水平的专门的技术知识。而且，患者通常要到三周后才能得到结果。

所以一种快速的、非侵入性的诊断技术，并且优选地是一种确保检验当前胎儿的技术将非常有益于具有或高或低的遗传风险性的所有怀孕的妇女。在 24 小时内的作出的诊断将给予她们一种意见和早做决定的机会，即在其怀孕的头三个月进行治疗性的堕胎。

因此，需要一种快速和非-侵入性的诊断试验用于怀孕的妇女，以鉴别基本上完整胚胎的细胞和从她们正在进行的妊娠中诊断例如唐氏综合症的常见的胎儿染色体非整倍性，以及其它遗传和单基因疾病。

因此，本发明的一个方面是克服或至少减少以往技术中的一些问题和改进对怀孕妇女的遗传检验。

发明概述

本发明的第一个方面提供了从子宫颈粘液样品中提取细胞的方法，所述方法包括：

获得子宫颈粘液样品；

用胶原酶和蛋白酶处理样品，以从子宫颈粘液样品中分离细胞；和
从样品中提取分离的细胞。

优选地，本方法提取基本上完整的细胞，该细胞基本上保持其细胞膜的完整性，这使得可以例如通过抗体检验进行可靠的鉴定。

在一个优选的实施例中，子宫颈粘液样品在用胶原酶和蛋白酶处理分离细胞前还用粘液溶解剂进行处理。人们发现通过以这种组合的方式处理，从子宫颈粘液样品中获得了更多的悬浮的单细胞。

该粘液样品进一步用酶混合物处理以分解粘液。理想的是，混合物保持细胞的完整性，以保存细胞膜，便于胎儿或孕妇细胞的鉴别。因此选择以组合方式使用两种酶，它们对细胞基本上没有影响。

申请人发现蛋白酶与胶原酶的组合以及优选地与粘液溶解剂的组合，成功地以允许细胞鉴定和用于随后的诊断目的的形式释放出细胞。本发明的另一个方面提供了一种从子宫颈粘液样品中提取胎儿细胞的方法，所述方法包括：

如上所述获得分离的细胞；

使用胎儿特异性抗体处理细胞；

鉴别与抗体结合的细胞；和
提取已鉴别的胎儿细胞。

本发明的另一个方面提供了鉴别胎儿细胞的方法，所述方法包括：

如上所述从子宫颈粘液样品获得分离的细胞；

5 使用胎儿特异性抗体处理细胞；和
鉴别与抗体结合的细胞。

本发明的另一个方面提供了鉴别胎儿细胞的染色体中染色体非整倍性的方法，
所述方法包括：

获得胎儿细胞；

10 鉴别染色体上至少三个多态微卫星标记；和
确定至少三个(3)多态性微卫星标记的等位基因分布图。

本发明的另一个方面提供了产前诊断的方法，所述方法包括：

如本文所述从子宫颈粘液样品中获得胎儿细胞；

鉴别染色体上至少三个(3)表示胎儿细胞特征的多态微卫星标记；

15 确定至少三个(3)多态性微卫星标记的等位基因分布图；和
把等位基因分布图与产前诊断症状相关联。

优选地，本发明提供了一种诊断唐氏综合症的方法，所述方法包括用以下通过
如下方法鉴别染色体的非整倍性，所述方法包括：

获得胎儿细胞；

20 鉴别染色体上至少三个多态微卫星标记；
确定至少三个(3)多态性微卫星标记的等位基因分布图；和
确定染色体 21 的三体性。

本发明的另一个方面提供了从个体获得的子宫颈粘液样品中证实胎儿细胞起
源的方法，所述方法包括：

25 从同一个体中获得胎儿细胞和母体细胞；
选择表示胎儿或母体细胞特征的至少三个(3)多态性微卫星标记；和
在胎儿细胞和母体细胞上确定至少三个(3)多态性微卫星标记的等位基因分布
图。

30 **附图**

图 1 显示从一个患有唐氏综合症的男性获得的单个人口腔细胞的 DNA 指纹。

微卫星标记 D21S1413、D21S11 和 D21S1442 显示三等位基因模式，而 D21S1437、D21S11 和 D21S1411 显示具有预期的 1:2 等位比的二等位基因加倍剂量模式。

图 2 显示从一个二倍体患者获得的单个人口腔细胞的 DNA 指纹。在这个八重 (octaplex) DNA 指纹分析系统中，对如下每一个染色体具有两个微卫星标记，X、13、18 和 21 都显示二倍体等位比。

图 3 显示从一个二倍体患者获得的单个人口腔细胞的 DNA 指纹，该患者是常见的囊性纤维化 $\delta F508$ 突变的携带者。在这个 DNA 指纹中对于染色体 21 有四个微卫星标记，以及对囊性纤维化 $\delta F508$ 的突变检测。

10

发明详述

本发明的第一个方面提供了从子宫颈粘液样品提取细胞的方法，所述方法包括：

获得子宫颈粘液样品；

用胶原酶和蛋白酶处理样品，以从子宫颈粘液样品中分离细胞；和

15

从样品中提取分离的细胞。

本发明提供了从子宫颈粘液样品中释出母体和胎儿细胞的方法。这些细胞可能束缚于复合粘液结构中，并且以前曾尝试将这些细胞释出。然而，以前没有成功地释出这些细胞，即使被释出，它们保持为块状或其细胞膜完整性遭到破坏，因此降低了其随后用于例如产前诊断或有效的鉴定的有效性。

20

因此，优选的是本方法提取基本上完整的细胞，该细胞基本上保持其细胞膜的完整性，这使得可以例如通过抗体检验进行可靠的鉴定。

为了正确地诊断胎儿的遗传疾病，理想地是使用胎儿细胞。然而，获得用于这种用途的可靠分离和鉴定的胎儿细胞始终存在问题。子宫颈粘液提供了这些细胞的来源，但是问题依然存在，即从主要包含母体细胞的粘液中有效地分离胎儿细胞，然后保持其完整性用于鉴定和诊断。

25

检验胎儿的非侵入性方法将降低流产和胎儿死亡的发生率。胎儿细胞流入较低的子宫极 (uterine pole)，母亲的子宫颈粘液提供了胎儿细胞的潜在来源。然而，与这一来源有关的是分离胎儿细胞用于进一步鉴定和诊断的问题。直到现在也难以从周围的粘液栓中分离这些稀少的细胞。甚至当细胞从粘液中释出后，从母体细胞中分离和鉴别这些稀有的胎儿细胞仍然存在问题。因此，在可以进行随后的用于任何遗传疾病的单细胞分子诊断前，需要从大多数的母体细胞中正确鉴定这些稀有的

30

细胞。以前的研究表明起源于当前胎儿的这些细胞仅仅在妊娠的 7-13 周的这一段短短的时间内出现。

在妊娠的头三个月和中三个月中，在母亲的血液循环中发现了胎儿起源的有核红血细胞，虽然出现的频率为约百万分之一。一些研究小组使用不同形式的细胞分
5 选方法试图分离这些稀有的胎儿有核红血细胞；但是进展有限。此外，研究显示分娩后胎儿细胞仍保留在母体血液循环中，因此能够混淆当前胎儿的诊断。到目前为止，在胎儿红血细胞和其它胎儿细胞的表面使用胎儿特异性抗原，结合显微操作技术，最有希望鉴别胎儿细胞。

术语“完整的”细胞是指保持细胞膜完整性的细胞。理想地，该细胞没有损失
10 胞内物质，以便通过使用包括 DNA、RNA 和 mRNA 的核酸进行进一步的鉴定。

本方法提供了从子宫颈粘液获得细胞，优选的是完整细胞的手段，这提供了非侵入性检验胎儿的基础。一旦从粘液栓中释出细胞，它们可被进一步鉴定为胎儿的或母体的，这样提供了用于遗传检验的胎儿细胞的来源。

样品中的细胞包括来自子宫颈内导管的细胞，该细胞从胎儿流出并迁移到子宫
15 颈。在妊娠头三个月(大约 7-13 周)，在子宫颈内导管中发现了这些细胞。该细胞可能起源于胎儿或者母体。

假定这些细胞从正在退化的绒毛膜绒毛流入较低的子宫极和子宫颈粘液。胎儿细胞可连同母体细胞一起以非侵入的方法提取，与 pap 涂片相似，优选地通过从子宫颈内导管和较低的子宫极抽吸粘液。以前的研究显示这些胎儿细胞发生于 50-
20 90%的经子宫颈的样品；发生频率的变化是由于取样技术、操作者的技术水平以及不能准确无误地区别胎儿细胞和母体细胞。据文献报道经子宫颈的细胞的收集是安全而有效的。在 CVS 前对怀孕的妇女进行初步的研究表明这一过程不会增加感染或自然流产的风险。迄今为止报道的研究涉及 200 多名妇女，在正在进行的妊娠过程中抽吸子宫样品，并且这些步骤对于母亲和胎儿健康没有不良影响。只有在某些
25 样品中通过在大量经子宫颈的细胞进行 PCR 后，来自父亲的遗传微卫星标记的存在证实胎儿的起始。母体细胞污染将干扰产前诊断。

可以在怀孕的任何阶段获得子宫颈粘液样品。优选地，妊娠的头三个月和中三个月获得样品。理想地，在能够对胎儿的良好状况做出决定的阶段获得样品，和
30 优选地在有机会对治疗性流产做出早期决定的期间内获得样品。优选地直到妊娠的 14 周获得样品。更佳地，在妊娠的头三个月获得样品。

在一个优选的实施例中，子宫颈粘液样品用胶原酶和蛋白酶处理以分离细胞前

还用粘液溶解剂进行处理。人们发现以这种结合的方式进行处理，从子宫颈粘液样品中获得了更多的细胞。

适合的粘液溶解剂选自 N-乙酰-L-半胱氨酸、DTT、胰蛋白酶和胰蛋白酶/EDTA。优选地，粘液溶解剂是 N-乙酰-L-半胱氨酸。

- 5 样品在用酶处理之前优选用粘液溶解剂处理。然而，这一步也可以与用胶原酶和蛋白酶进行的酶处理组合进行。组合处理的结果导致粘液分解的协同作用，因此促进细胞的释出。粘液溶解剂和酶(胶原酶和蛋白酶)的组合作用比仅用粘液溶解剂和仅用酶处理的分离的和总和的效果更有效。

10 优选地，样品用 2-20mg/ml 的 N-乙酰-L-半胱氨酸处理。更佳地，使用的最终浓度为 10mg/ml。

样品处理一段时间，使之足以分解粘液并通常通过分解粘液栓成为小珠降低粘液的粘性。更佳地，样品在大约 37℃ 处理 30-60 分钟。最优选地，缓缓搅动样品并处理 45 分钟。

- 15 进一步用酶混合物处理粘液样品以分解粘液。理想地，混合物保持细胞的完整性以保存细胞膜，从而便于胎儿或母体细胞的鉴定。所以挑选并组合使用酶，这些酶对细胞基本上没有影响。

通常避免使用酶如蛋白酶，特别是如果细胞膜的完整性得到保持。然而，申请人发现蛋白酶和胶原酶组合，并且优选地与粘液溶解剂组合，成功地释出细胞，细胞的形式使之可以被鉴定和用于随后的诊断目的。

- 20 胶原酶和蛋白酶可以单独使用或组合使用。然而，两种酶同时使用处理粘液细胞是优选的。还需要制备用于粘液样品处理的酶的混合物，这样可完成粘液样品的同时处理。

优选地，酶的浓度足以充分地分解粘液。该浓度最好足够高，使之无论如何在一次或两次处理后分解粘液。

- 25 用胶原酶和蛋白酶处理子宫颈粘液样品。可使用熟练的技术人员所熟悉的任何胶原酶类型或蛋白酶类型。

- 商业购得的酶混合物，如分离酶混合酶(liberase blendzyme)，可用来补足胶原酶和蛋白酶处理。分离酶混合酶是胶原酶同工型 I 和 II 以及嗜热菌蛋白酶的组
合，可从 Roche 购得。酶混合物的适当的浓度大约为分离酶混合酶(0.5-10WU/ml)
30 胶原酶和分散酶(0.1-1.5mg/ml)。

然而，本发明并不限于这些特定的浓度。浓度和培养时间的操作在某些粘液样

品中可提供更多细胞的释放。

分离的细胞将包含母体和胎儿的细胞，就是来自这种细胞混合物的胎儿细胞可进一步鉴定和分离，用于产前诊断测试或需要分离的细胞或胎儿细胞的其它用途。

可使用熟练的技术人员可利用的任何方法从样品中提取分离的细胞，这些方法
5 包括用适当的缓冲液和盐溶液洗涤后离心。提取或除去细胞包括从上清液中分离细胞。一旦提取，可使用该细胞用于进一步鉴定为母体和胎儿的细胞。

本发明的另一个方面提供了从子宫颈粘液样品提取胎儿细胞的方法，所述方法包括：

如上所述获得分离的细胞；
10 用胎儿特异性抗体处理细胞；
鉴别与抗体结合的细胞；和
提取鉴别的胎儿细胞。

如上所述制备了分离细胞的样品后，可从子宫颈粘液样品提取胎儿细胞。从子宫颈粘液样品获得的分离的细胞是胎儿和母体细胞的混合物。然后对该细胞混合物
15 进行鉴别，鉴定出胎儿起源的细胞。

本发明的胎儿细胞可使用本领域熟知的技术鉴别和分离。这些技术包括，但不限于，包含使用抗体标记细胞的免疫组织化学，并因此鉴定该它为胎儿起源的细胞。这些技术还包括使用初次抗体和二次抗体鉴别细胞为妊娠头三个月的胎儿起源的细胞。优选地，抗体与胎儿特异性抗原结合，并可以是 IgG、IgM 和单克隆的。
20 优选地，胎儿特异性抗原位于胎儿细胞的表面。一旦结合，胎儿细胞被加工，“标记的”细胞与那些缺乏标记的细胞分离。细胞的标记可包括进一步使用与初次抗体结合的二次抗体。二次抗体的例子包括将与小鼠衍生的初次抗体结合的兔抗-小鼠荧光素异硫氰酸盐异构体 I (FITC)。然而初次抗体可能适合于在二次抗体缺乏的情况下鉴别和分离细胞。适当的二次抗体可通过熟练的技术人员考虑初次抗体和二次
25 抗体对初次抗体作出的反应而确定。

使用胎儿特异性抗体鉴定胎儿细胞。一旦细胞从子宫颈样品的粘液中分离，就可使用目前可购得的胎儿特异性抗体。优选地，胎儿特异性抗体对妊娠的头三个月具有特异性。更佳地，该抗体包括对合胞滋养层、绒毛细胞滋养层和细胞滋养层细胞柱具有特异性的抗体。

30 其它适当的胎儿特异性抗体描述于 Sunderland, C. A 等, (1981) “人合胞滋养层的单克隆抗体” (Monoclonal Antibodies to human syncytiotrophoblast)

Immunology 43(3):541-6 和 Griffith-Jones, M. D. 等, (1992) “通过基因扩增从妊娠的头三个月获得的经子宫颈的棉拭中的胎儿 DNA 的检测:一种产前诊断的新途径?” (Detection of fetal DNA in trans-cervical swabs from first trimester pregnancies by gene amplification: A new route to prenatal diagnosis?),
5 British Journal of Obstetrics and Gynecology, 99 (6):508-11。特别地, 这些抗体是 NDOG1、NDOG5 和 FT1.41.1。NDOG1 染色合体滋养层, NDOG5 染色合体滋养层和细胞滋养层细胞柱, FT1.41.1 染色合体滋养层和妊娠头三个月的绒毛细胞滋养层。这些抗体不与母体的子宫内膜或子宫颈组织发生反应。

10 这些抗体可以单独使用或组合使用。如果允许细胞与抗体反应和与抗体结合, 那么这些抗体可以分别或同时给予细胞。优选地, 将它们用做抗体混合物来鉴定胎儿细胞。申请人发现这些抗体特异性地结合胎儿细胞的细胞膜。

胎儿特异性抗体对所有的胎儿细胞类型都具有特异性是优选的。由于在子宫颈粘液样品中胎儿细胞的异质性增加, 需要使用胎儿特异性抗体的混合物检测所有类型的胎儿细胞。当使用一个抗体时, 其它胎儿细胞类型可能被遗漏。可通过了解妊娠的阶段选择抗体, 并因此可预测具体的细胞类型。相应地, 对该预测的细胞类型
15 具有特异性的抗体可优先单独使用或组合使用。

抗体可包含一个标记以便于鉴别。本文使用的术语“标记”是指直接或间接地与例如核酸探针或抗体的试剂结合或融合, 并促进与其结合或融合的试剂的检测的化合物或组合物。标记本身可以被检测(例如放射性同位素标记或荧光标记), 或在
20 酶标记的情况下可催化可被检测的基质化合物或组合物的化学改变。

使用本领域熟知的技术鉴别和/或分离用抗体标记的胎儿细胞, 这些技术包括荧光激活细胞分类(FACS)、磁珠分离术、显微操作术、激光捕获和用于母体细胞的负选择或胎儿细胞的正选择的荧光免疫组织化学。优选地, 使用荧光免疫组织化学鉴别和/或分离胎儿细胞, 用于母体细胞的负选择或胎儿细胞的正选择。例如, 使
25 用荧光免疫组织化学标记的胎儿细胞可在荧光显微镜下从形态上得以鉴定, 且细胞使用显微操纵术进行分离, 该显微操纵术例如使用拉伸的玻璃移液管或显微操纵器。

一旦细胞得以鉴定, 那么可通过熟练的技术人员可以得到的方法进行分离或提取。例如, 如果细胞是荧光标记的, 它们可使用激光捕获进行分离或通过 FACS 分析进行分选。然而, 可使用其它方法, 这取决于通过抗体识别的细胞的鉴定方法。
30

本发明的另一个方面提供了通过本文描述的方法提取的胎儿细胞。

本发明的另一个方面提供了鉴别胎儿细胞的方法，所述方法包括：

如上所述从子宫颈粘液样品中获得分离的细胞；

用胎儿特异性抗体处理细胞；和

鉴别与抗体结合的细胞。

- 5 通过从子宫颈粘液样品中获得细胞悬浮液成功地从子宫颈粘液样品中鉴别了胎儿细胞。优选地该细胞是完整的，使抗体可以与基本上完整的细胞膜发生反应。

本发明的另一个方面提供了鉴别胎儿细胞的方法。所述方法包括：

获得细胞样品；

用抗体处理细胞样品，所述抗体选自本文所述的 NDOG1、NDOG5 和 FT1. 41. 1 或

- 10 它们的等价物；和

鉴别与抗体结合的细胞。

如上文所述，可使用仅与胎儿细胞反应的特异性的抗体混合物鉴别胎儿细胞。这些抗体也就是对胎儿细胞具有特异性的 NDOG1、NDOG5 和 FT1. 41. 1。它们可以被单独使用或组合使用并且它们可以被分别或同时加入。

- 15 术语“它们的等价物”，它涉及抗体 NDOG1、NDOG3 和 FT1. 41. 1，并且如本文所使用的是指等价抗体，该抗体以相似的方式进行反应并且对任何一个所列出的抗体具有相似的特异性。例如，可通过确定 NDOG1、NDOG5 和 FT1. 41. 1 的靶位点并使用熟练的技术人员所熟悉的方法，例如产生单克隆和多克隆抗体的方法生产其它抗体。

- 20 优选地，如上文所述的方式标记抗体。荧光标记是最优选的。

一旦优选地从非侵入性来源，例如子宫颈粘液栓中鉴别并提取了胎儿细胞，该细胞可以任何方式使用，所述方式包括：

(a) 用于胎儿鉴别、染色体非整倍性和单基因诊断的多重 FL-PCR；

(b) WGA、杂交和微阵列分析，包括用于胎儿鉴别的 SNP's 和用于单基因疾病和

- 25 染色体非整倍性的探针；或

(c) mRNA、cDNA 文库的提取，杂交和基因表达微阵列的分析。

这些技术可用于表征胎儿细胞以鉴别胎儿细胞的任何生化的、

代谢的或遗传的疾病。这些分离的胎儿细胞可用于鉴别所有类型的异常，包括可在任何细胞类型中得到确定的异常。一旦胎儿细胞从子宫颈粘液样品中得以分离

30 和鉴别，就可在该细胞上进行任何细胞分析。

微阵列也可用于证实细胞起源、单基因疾病的诊断和染色体异常。在一个单一

的微阵列上，使用单核苷酸多态性(SNP's)鉴定胎儿细胞是可能的，单基因疾病和染色体异常也是同样。使用这种方法，分离的和鉴别的单一的胎儿细胞可通过引物延伸预扩增 PCR(PEP-PCR)、降解寡核苷酸引物 PCR(DOP-PCR)、连接体-适配器-PCR 或者 MSD(多股链的置换)WGA 进行全基因组扩增(WGA)。来自 WGA 的荧光标记的产物
5 可与微阵列平台杂交，并且结合荧光的激光扫描可证实胎儿起源和所有 23 对人类染色体的染色体非整倍性的诊断以及鉴定任何特异性单基因缺陷。

本发明的另一个方面提供了一种组合物，当用于鉴定胎儿细胞时，所述组合物包括抗体 NDOG1、NDOG5 和 FT1.41.1。

10 本发明的另一个方面提供了一种在胎儿细胞的染色体中鉴别染色体非整倍性的方法，所述方法包括：

获得胎儿细胞；

鉴别染色体上至少三个多态性微卫星标记；和

确定至少三个(3)多态性微卫星标记的等位基因分布图。

15 本发明的这一方面涉及在胎儿细胞的染色体中鉴别染色体非整倍性的方法。本文使用的“染色体中的染色体非整倍性”包括当与受试者的正常的天然染色体组型相比较时，染色体丢失或具有一个额外的拷贝或染色体部分，并包括缺失、添加和移位，这在具体的位点引起单体性或三体性。优选地，非整倍性选自常染色体的三体性和单体性，性染色体的单体性、二体性和三体性。

20 优选地，如上所述从子宫颈粘液样品中获得胎儿细胞。优选地，样品取自怀孕的妇女。然而，本发明不排除从流产的妇女获得胎儿细胞。

获得胎儿细胞的侵入性方法，例如绒毛膜绒毛取样(CVS)或羊膜穿刺产生绒毛膜绒毛样品、羊水细胞(aminocyte)、胎儿组织和脐血，可提供胎儿细胞。然而，从子宫颈粘液样品中获得胎儿细胞的非侵入性方法是优选的。可使用任何阶段的任何类型的胎儿细胞。

25 本发明包括对核酸具有特异性的多态微卫星标记的使用。本发明的核酸可以是 DNA，优选染色体 DNA。优选地，多态微卫星标记位于相同的染色体。

30 优选地，选择多态微卫星标记基于高度的杂合性、等位基因的广分散性、产生三等位基因模式的高概率和对指示染色体的特异性。例如用于唐氏综合症诊断的染色体 21 的四核苷酸微卫星标记列于表 2 中，用于其它综合症的诊断的其它四核苷酸微卫星标记列于表 3 中。

选择的多态标记将用于鉴定各种模式的非整倍性，它包括常染色体的三体性和

单体性, 和性染色体的单体性、二体性和三体性。等位基因大小的广泛分布对于成功的遗传分析是优选的, 因为这种等位基因大小的范围提供了非整倍性的等位基因模式的诊断, 具体是三体性、二体性或单体性。还选择了标记, 这样各个标记在DNA 指纹中具有一个独特的等位基因分布图并且不与其它的标记重叠。

- 5 三体性是最常见的染色体异常, 常见于流产和死产, 染色体 21、18 和 13 的三体性和 X 和 Y 的二体性为最大的群体。染色体 21 的三体性和唐氏综合症是妊娠期间最常见的常染色体异常。

本发明在染色体上需要至少三个多态性的微卫星标记, 使之可以进行染色体非整倍性的鉴别。

- 10 少于三个多态性的标记的扩增由于一些原因给出了虚假的结果。与通过在有限的模板上进行多重荧光聚合酶链反应 (FL-PCR) 得到的 DNA 指纹有关的问题包括整个扩增的失败、亲本纯合性的可能性 (每个亲本具有相同等位基因的两个拷贝)、等位基因丢失 (ADO) (一个等位基因在 PCR 的前几轮中整个扩增失败, 以致于只有一个等位基因可检测) 和优先扩增 (PA) (一个等位基因的不足表现导致预期的 1:1 二对
15 等位基因的比的改变)。因此, 每个染色体需要最少三个高度多态的微卫星标记用于非整倍性细胞的诊断。

- 为了提高精确度, 微卫星标记的数量可以增加。本方法需要至少三个 (3) 标记。然而, 五个 (5) 微卫星标记是优选的。具有至少三个 (3) 微卫星标记, 等位基因的丢失 (ADO) 和优先扩增就不会很大程度上干扰到结果, 因为如果一个基因座标记被影
20 响, 其它的保留用于最后的诊断。优选地, 五个多态性标记被扩增。

贯穿本说明书的描述和权利要求, 词语“包含”以及该词时态的变化, 并不是要排除其它的添加剂、成分、整体或步骤。

- 等位基因分布图提供了鉴定非整倍性和胎儿起源的手段。通过多态性微卫星标记鉴别的各种等位基因的比提供了可鉴别为各种类型的非整倍性中的任何一种的
25 等位基因模式, 该非整倍性包括, 但不限于三体性、二体性和单体性。

通过多态性微卫星标记可使用各种方法检测等位基因。其它的方法包括限制性片段多态性 (RFLP's)、单核苷酸多态性 (SNP's) 和微阵列。

- 在一个优选的实施例, 通过多态性标记的扩增确定等位基因分布图而产生等位基因分布图。等位基因分布图可提供具体的非整倍性的指示, 该非整倍性包括但
30 不限于单体性、二体性或三体性。例如, 因为评估在 FL-PCR 扩增中产生的 DNA 的量与最初的靶序列的量成比例, 任何具体的基因座位的等位基因的比可从最终的荧

光产量计算得出(从第一个等位基因得到的 PCR 产物的量被第二个等位基因的产物的量分开)。因此,二体性可通过预期的 1:1 的二等位基因比确定,而三体性可确定为三等位基因模式和预期的 1:1:1 的比。单体性的诊断可能需要所有 5 个微卫星标记以显示单一的等位基因,同时三体性可通过一个标记的至少一个三等位基因模式得到最终的诊断。

本文使用的术语“扩增”包括本领域熟练的技术人员已知的,提高核酸或其部分的拷贝数量的任何方法。核酸扩增可通过本领域已知的任何核酸扩增方法完成,包括聚合酶链反应(PCR)。各种形式的 PCR 包含于本发明的范围中,包括多重 FL-PCR。本领域已知各种扩增方法并描述于“聚合酶链反应”(The polymerase chain reaction) Baumforth 等, Journal of Clinical Pathology:Molecular Pathology 1999, (52):1-10。

可以使用本领域熟练的技术人员熟知的方法分析扩增的核酸,并产生分布图,所述方法包括聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),优选地使用变性凝胶。可使用自动化的或手动方法进行分析,例如自动化分析可包括使用 ABI Prism 377 DNA 测序仪并结合 Genescan 672 软件(Biosystems 澳大利亚提供)。其它自动化分析包括 ABI Prism 3100 遗传分析仪(Genetic Analyzer)和变性高效液相色谱(DHPLC)。

本文使用的术语“引物”包括短的核酸,优选 DNA 寡核苷酸 15 核苷酸或更长,它可退火成为,例如,通过核酸杂交形成互补靶 DNA 链,以在引物和靶 DNA 链之间形成杂合体,然后通过聚合酶沿着靶 DNA 链延伸,优选地使用热稳定 DNA 聚合酶。可使用引物对扩增核酸,例如通过 PCR 或通过本领域熟知的其它核酸扩增方法。PCR-引物对可从核酸序列获得,并根据如下标准设计,大约 50%的 GC 含量,长度为 18-24 个碱基对,形成最小的引物-二聚体和自我退火,在引物的 3'末端有 2 个 G 或 C 碱基,正向和反向引物具有相同的长度(+/- 1 个核苷酸),一列中不超过三个重复的碱基,且 PCR 产物的大小长度在 100-400 个核苷酸之间。

文献中描述了制备和使用引物的方法,例如 Sambrook 等,“分子克隆实验室手册”(Molecular Cloning:A Laboratory manual),第二版,1-3 卷;Sambrook 等, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1989;“分子生物学现状”(Current Protocols in Molecular Biology), Asubel 等, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, USA 1987。

最优选地,本方法包括通过 DNA 指纹确定多态性微卫星标记的等位基因分布图。本发明的另一个方面提供了产前诊断的方法,所述方法包括:

如本文所述从子宫颈粘液样品获得胎儿细胞；
在染色体上鉴别至少三个(3)表示胎儿特征的多态性微卫星标记；
确定至少三个(3)多态性微卫星标记的等位基因分布图；和
将等位基因分布图与产前诊断症状联系起来。

5 本文使用的术语“产前诊断”包括确定遗传突变的存在或胎儿细胞中的任何生化或代谢鉴定。产前诊断旨在鉴别所有类型的胎儿异常。遗传突变包括，但不仅限于染色体非整倍性、点突变、易位、三核苷酸重复扩展、倒位、多态性、插入和缺失。遗传突变可引起基因疾病，例如囊性纤维化、 β 地中海贫血、亨廷顿病、脆性X综合症、肌强直性营养不良、杜兴氏肌营养不良或镰状细胞贫血。

10 产前诊断可包括遗传疾病，其发生是由于染色体异常。染色体异常包括最频繁的染色体 21、18、13、X 和 Y，并发现于活产的婴儿中。其它非整倍性通常在着床前或早在怀孕的头三个月遗漏，然而用早期非侵入性方法诊断所有 23 对染色体的非整倍性可指用多重 FL-PCR 或微阵列完成。遗传疾病包括，但不仅限于特纳氏综合症(XO)、克兰费而特综合症(XXY)、XXX 女性和 XYY 男性、三倍性(69、XXX 或 XYY 或 XYY)、帕韬氏综合症(三体性 13)和爱德华氏综合症(三体性 18)。唐氏综合症(三体性 21)也可通过本方法检测。优选地，产前诊断可检测非整倍性形式的染色体异常。产前诊断也可包括由特异性基因突变引起的单基因疾病。最常见的疾病是囊性纤维化。可在 2500 个婴儿中发现一例囊性纤维化，并且 25 人中有 1 人是这种常染色体隐性条件的携带者。

20 本发明优选的一个方面提供了诊断唐氏综合症的方法，所述方法包括通过如下方法鉴定染色体非整倍性，所述方法包括：

获得胎儿细胞；
鉴定染色体上至少三个多态性微卫星标记；
确定至少三个(3)多态性微卫星标记的等位基因分布图；

25 确定染色体 21 的三体性。

目前，向小于 35 岁的孕妇提供了一系列的非诊断性的血清筛选测试用于唐氏综合症胎儿的检测。这些测试包括测定已鉴定与唐氏综合症胎儿有关的变量的范围，所述变量包括在 12 周的超声检查中测定胎儿颈后液体累积的量(颈的厚度)、在怀孕头三个月的母体血液中游离- β hCG 和与妊娠有关的血浆蛋白-A(PAPP-A)的
30 浓度以及在怀孕中三个月的母体血液中游离- β hCG 和 α -胎儿球蛋白(AFP)的浓度。从结合的试验结果可计算出具有 80-90%的检测效率和 5-10%的假阳性比率的患者

的特异性风险。然而，这些筛选试验是非诊断性的，并且一个否定的结果并不表示胎儿没患有唐氏综合症。目前，近 80%的患有唐氏综合症的活产婴儿是由 35 岁以下的母亲生产的。

可从上面描述的任何来源获得胎儿细胞。优选该细胞是从怀孕妇女的经子宫颈的棉拭或颈管的抽吸物获得的胎儿细胞。这对于非侵入性的诊断方法是理想的。

在本方法中，染色体 21 的三体性是唐氏综合症的指示物。

使用至少三个(3)多态性微卫星标记进行本方法。然而，使用至少五个(5)标记是优选的。染色体 21 上的四核苷酸微卫星标记是高度杂合的，并且它具有广泛分布的等位基因大小，这特别适用于本发明。

对于唐氏综合症，选择产生独特的等位基因分布图或不具有任何荧光或大小重叠的模式的标记物是优选的。关于唐氏综合症的优选的诊断见表 2。

虽然本方法需要至少三个(3)微卫星标记，优选地选自表 2，最佳的是使用五个(5)标记诊断唐氏综合症。

在本系统中包含五个(5)微卫星标记，等位基因的丢失和优先的扩增不干扰结果，这是因为如果一个基因座位的标记受影响，还有余下的四个用于最终的诊断。

确定等位基因分布图的方法可使用产生可表示由多态性微卫星标记代表的等位基因的模式的方法。优选地，等位基因分布图通过标记的 DNA 扩增确定，优选地使用 PCR，更佳地使用 FL-PCR。

本文描述了分析 PCR 产物的方法。

一旦建立了等位基因分布图，如上所述，对于总的 DNA 可鉴别其非整倍性，以此确定的用于唐氏综合症的它们各自的等位基因比和大小见图 2，图 3 是染色体 13、18、21 和 X 的非整倍性。

本发明的另一个方面提供了用于诊断唐氏综合症的方法的微卫星标记，所述标记具有一个正向引物序列，所述正向引物序列选自：

-tatgtgagtcaattccccaagtga;
-atgatgaatgcatagatggatg;
-ttgcagggaaaccacagtt;
-tgaacatacatgtacatgtgtcttg; 或
-cactgcagacggcatgaacttc.

本发明的另一个方面提供了用于诊断唐氏综合症的方法的微卫星标记，所述标记具有一个反向引物序列，所述反向引物序列选自：

-gttgatttagtcaatgttctccag;
-aatgtgtgtccttccaggc;
-tccttggaataaattcccgg;
-ttctctacatatatttactgccaacac; 或
5 -ccagaatcacatgagccaattcc.

在本发明的一个优选的实施例中, 提供了用于诊断唐氏综合症的方法的微卫星标记, 其中所述标记是选自表2中所述的任何一个标记。这些标记中的任何一个可与至少两个(2)其它适当的标记组合使用, 用于根据本发明描述的方法诊断三体性21。另外, 可设计引物序列与多重FL-PCR中的其它引物序列互补。

10 本发明的另一个方面提供了用于产前诊断的试剂盒, 所述试剂盒包括至少三个(3)多态性微卫星标记, 用于在胎儿细胞的染色体中鉴别染色体非整倍性的方法, 所述方法包括:

获得胎儿细胞;

鉴别染色体上至少多态性微卫星标记; 和

15 确定至少三个(3)多态性微卫星标记的等位基因分布图。

优选地, 如本文所述从子宫颈粘液样品中获得胎儿细胞。

在一个优选的方面中, 所述试剂盒进一步含有在胎儿细胞的特异性染色体上鉴别多态性微卫星标记的手段, 这样获得等位基因分布图。

在另一个方面中, 所述试剂盒包括扩增多态性微卫星标记的方法, 优选地使用20 PCR, 更佳地使用FL-PCR。本文描述了扩增标记的方法。

在一个优选的方面中, 提供了用于诊断唐氏综合症的试剂盒, 其中标记选自上述用于唐氏综合症的任何标记。

本发明的另一个方面提供了证实胎儿细胞的起源的方法, 所述细胞取自个体的子宫颈粘液样品, 所述方法包括:

25 从同一个体获得胎儿细胞和母体细胞;

选择胎儿或母体细胞的至少三个(3)多态性微卫星标记特征; 和

在胎儿细胞和母体细胞上确定至少三个(3)多态性微卫星标记的等位基因分布图。

30 优选地, 从一个个体证实胎儿细胞起源的方法包括鉴定母体细胞和胎儿细胞的染色体中染色体的非整倍性。

另外, 由于胎儿细胞从子宫颈分离, 这一非侵入性方法还可检测引起单基因疾

病的突变, 例如囊性纤维化。

结合单基因疾病的突变检测和 DNA 指纹分析系统, 并提供给孕妇染色体非整倍性和指示性的单基因疾病的诊断也是可能的(参见图 3)。

包含于本说明书中的文献、事实、材料、设备、论文等的讨论仅仅是为了提供本发明的范围。并不表示或代表由于在本申请的各项权利要求的优先权日前它已存在于澳大利亚, 任何或全部这些内容形成了现有技术基础的部分, 或在与本发明相关的领域中是常见的一般知识。

现在本发明将参照如下的实施例进行更全面的描述。但是, 应当理解下文的描述仅仅是举例说明, 不应以任何方式限制本发明上文描述的普遍性。

10

实施例

实施例 1: 唐氏综合症的诊断

(a) 经子宫颈的细胞的收集和制备

在头三个月或中三个月中, 从孕妇体内收集经子宫颈的的细胞与 pap 涂片的过程相似, 并包括使用一个细的导管(catheter) (Aspiracath, Cook IVF) 从子宫颈内管和较低的子宫极直接吸取子宫颈粘液。切下含有母体粘液和经子宫颈的细胞的导管顶端, 放入含有 0.5ml RPMI 培养基的微量离心管中, 并放置于 37°C。轻轻地将内容物从导管的内部顶端取出并于 37°C 悬浮于培养基中。

(b) 从经子宫颈的样品中鉴别和分离胎儿细胞。

收集后, 用 0.5ml、20mg/ml 的 N-乙酰-L-半胱氨酸处理样品,

并在 37°C 轻微摇动, 进一步培养 45 分钟。然后, 在用 0.5ml 的酶混合物(胶原酶和蛋白酶)在 37°C 培养 1 小时前, 整个样品在 PBS 中洗涤两次。在培养过程中, 除去分离的细胞, 用新鲜的酶处理原来样品中余下的部分。全部分离后, 细胞悬浮物用 PBS 洗涤两次, 之后用免疫荧光标记。

在 37°C, 用荧光标记的三种胎儿特异性抗体的混合物(NDOG1、NDOG5 和 FT1. 41. 1) 加入细胞悬浮液, 并使之仅与胎儿细胞的细胞膜特异性地结合。NDOG1 使怀孕头三个月的合胞滋养层着色, NDOG5 使合胞滋养层和细胞滋养层细胞柱着色, FT1. 41. 1 使合胞滋养层和绒毛细胞滋养层着色。这些抗体都不与母体的子宫内膜或子宫颈组织发生反应。在倒置显微镜下, 使用延长的玻璃吸管进行显微操作和显微解剖技术, 鉴别和分离单个和小块状的荧光标记的胎儿细胞, 并在 PBS 缓冲液中洗涤三次, 之后转移到 0.2ml 的 PCR 管中进行分析。作为一个负控制, 还分离了母体的鳞状上皮

细胞并将其在 PBS 缓冲液中洗涤三次，之后转移到 0.2ml 的 PCR 管中进行分析。

(c) 胎儿起源的证实和染色体 21 三体性的诊断

多重 FL-PCR 反应与发现于染色体 21 上的五个微卫星标记结合。从所述多重 FL-PCR 产生的等位基因分布图证实母体或胎儿的起源，以及染色体 21 是否存在。

- 5 FL-PCR 反应包括：2.5 μ l 的 10 $\times$ PCR 缓冲液(500mM KCL, 100mM Tris-HCl, pH 9.0 和 15mM MgCl₂)，0.5 μ l 的 10mM dNTPs(200 μ M)，0.3 μ l 的 Taq 聚合酶(5 单位/ μ l)，11.20 μ l MQ-H₂O 和 10.5 μ l 的引物混合液，使最终体积为 25 μ l。在各个 PCR 反应中，引物对包括 D21S1411、D21S11、D21S1413、D21S1442 和 D21S1437。所有经历手工“Hot Start”和多重 FL-PCR 的反应混合物使用 9700 Thermocycler PCR 仪器(购自 Biosystems, 澳大利亚)进行。进行 35 次热循环反应，包括在 94 $^{\circ}$ C 变性 45 秒，在 60 $^{\circ}$ C 退火 45 秒，在 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟。当进行各个单个细胞的多重 FL-PCR 时，还包括正、负控制，以确保混合的 PCR 反应是可操作的，且没有一种反应物被污染。

- 其它实施例包括唐氏综合症和常见的囊性纤维化 δ F508 突变的同时诊断。如上所述的 FL-PCR 进行如下改变：引物混合物含有四种信息染色体 21 微卫星标记以及用于 δ F508 突变检测的引物对。

(d) 胎儿起源的读出和染色体 21 三体性的诊断

- 使用 ABI Prism 3100 DNA 测序仪和附带的 Genescan 672 软件(购自 Biosystems, 澳大利亚)分析所有的 FL-PCR 产物。各个 PCR 产物(0.5-1.0 μ l)与 9.75 μ l 的甲酰胺和 0.25 μ l 的内标物混合。样品在 95 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟，放置于冰上且将其 10 μ l 装入 96 孔平板。使样品经受动电注射和通过 Genescan 软件进行自动测量的电泳。由于染色的峰值取决于使用的荧光染料，产生的基因扫描分布图或“指纹”显示了 PCR 产物(见图 1-一个唐氏综合症患者的单个细胞的等位基因分布图)。

- 微阵列也可用于证实胎儿的起源、单基因疾病和染色体异常的诊断。在一个单一的微阵列上，可以使用单核苷酸多态性(SNP's)、单基因疾病和染色体异常鉴别胎儿细胞。使用这一方法分离和鉴别的单个胎儿细胞将首先通过 PEP-PCR、DOP-PCR、连接体-适配器-PCR 或 MSDWGA 进行整个基因组的扩增(WGA)。从 WGA 获得的荧光标记产物可与微阵列平台杂交，且结合的荧光性的激光扫描将证实胎儿的起源和所有 23 对人类染色体的染色体非整倍性的诊断以及鉴定任何特异性的单基因缺陷。

30

实施例 2: 唐氏综合症 II 的诊断

(a)如实施例 1 所描述的进行经子宫颈的细胞的收集和制备。

(b)胎儿细胞的鉴别和分离

收集后,样品铺于载玻片上并用 100%的乙醇固定。使用前三个月的胎儿特异性抗体进行免疫组织化学分析以鉴别胎儿细胞。然后使载玻片脱水。使用激光捕获显微解剖术从载玻片上除去阳性染色的细胞并放置于膜上,它可直接转移到 PCR 管中。

(c, d 和 e)随后如实施例 1 所述进行用于染色体 21 的三体性的 FL-PCR DNA 指纹分析和 FL-PCR 产物的分析以及非整倍性的诊断。

10 实施例 3:唐氏综合症和囊性纤维化 $\delta F508$ 突变的同时诊断

(a&b)如实施例 1 中所述收集和制备经子宫颈的细胞,并随后鉴别和分离胎儿细胞。

(c)染色体 21 的三体性 FL-PCR DNA 指纹分析和囊性纤维化 $\delta F508$ 突变的诊断。

上述的 FL-PCR 反应进行如下改变:引物混合液含有四种信息染色体 21 微卫星标记以及用于 $\delta F508$ 突变检测的引物对。概括于表 2 和 3 中的微卫星标记是双亲基因组 DNA 的基因型,以鉴别杂合的基因座位,用于结合入 DNA 指纹分析系统。最终优化的引物对浓度是反应和引物特有的。

(d&e)如上所述进行 FL-PCR 产物的分析非整倍性的诊断(见图 3)。

最后,应当理解可以进行各种其它的修饰和/或改变,而不背离本文中概括的本发明的精神。

自然流产中的染色体异常		新生儿中的染色体异常	
异常	发病率(%)	异常	每 10,000 个新生儿中的发病率
三体性 13	2	三体性 13	2
三体性 16	15	三体性 18	3
三体性 18	3	三体性 21	15
三体性 21	5	45, X	1
其它三体性	25	47, XXX	10
单体性 X	20	47, XXX	10
三倍性	15	47, XXX	10
四倍性	5	不平衡基因重排	10
其它	10	平衡的基因重排	30

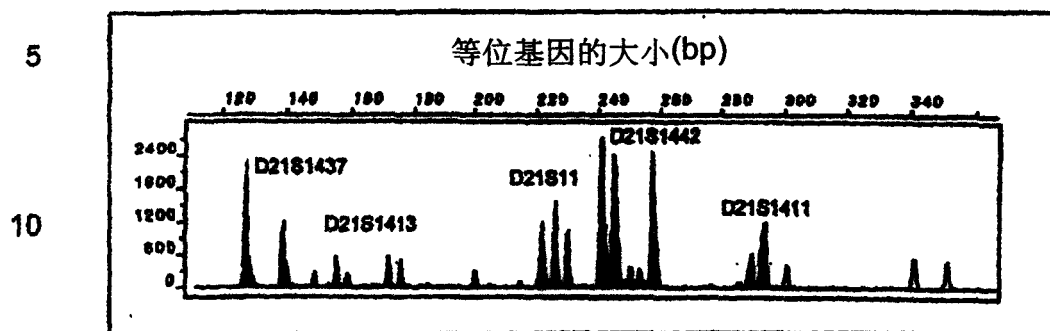
表 1:-非整倍性妊娠的详细情况

表 2:-四核苷酸微卫星标记的详细情况

微卫星 标记	引物序列	荧光 染料	等位基因 大小范围	杂合性	三等位基因模 式的概率(%)
D21S11	F-tatgtgagtcaattcccccaagtga R-gttgtattagtagtcaatgttctccag	6-FAM	172-264bp	0.93	72.5
D21S141	F-atgatgaatgcatagatggatg R-aatgtgtgtccttccaggc	HEX	>239bp	0.93	65.5
D21S1413	F-ttgcagggaaccacagtt R-tccttggaataaatcccg	TET	<240bp	0.88	62.5
D21S1437	F-tgaacatacatgtacatgtgtctgg R-ttctctacataatttactgcccaacac	6-FAM	107-143bp	0.93	65.6
D21S1442	F-cactgcagacggcatgaacttcc R-ccagaatcacatgagccaattcc	TET	237-261bp	0.80	67.5

表 3: 鉴别的四核苷酸微卫星标记用于 DNA 指纹分析和染色体 13、18、21、X 和 Y 的非整倍性诊断

染色体	微卫星标记
染色体 21	D21S1412
	D21S1414
	D21S1435
	D21S1808
	D21S1270
染色体 13	D13S631
	D13S258
	D13S634
	D13S317
	D13S800
X 染色体	DXS8377
	HUMARC
	HPRT
	DXS1283E
	SBMA
	X22
Y 染色体	DYS391
	DYS393
	DYS390
染色体 18	D18S535
	D18S51
	MBP
	D18S978
	D18S1002
	D18S974
	D18S849
	D18S865
	D18S877
	D18S386



15

图 1

20

25

30

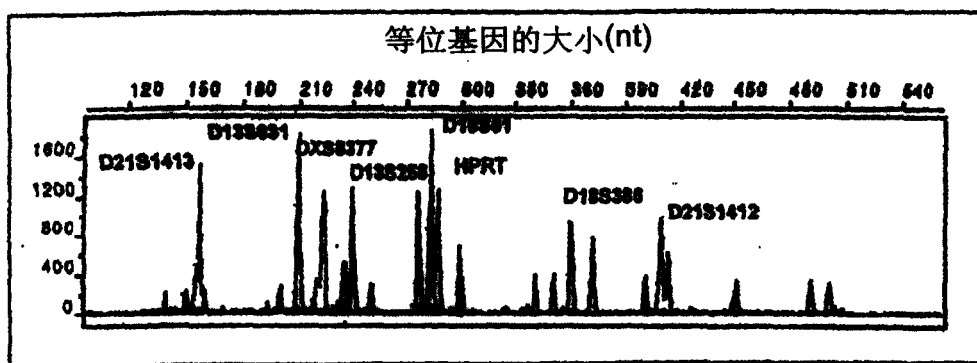


图 2

35

40

45

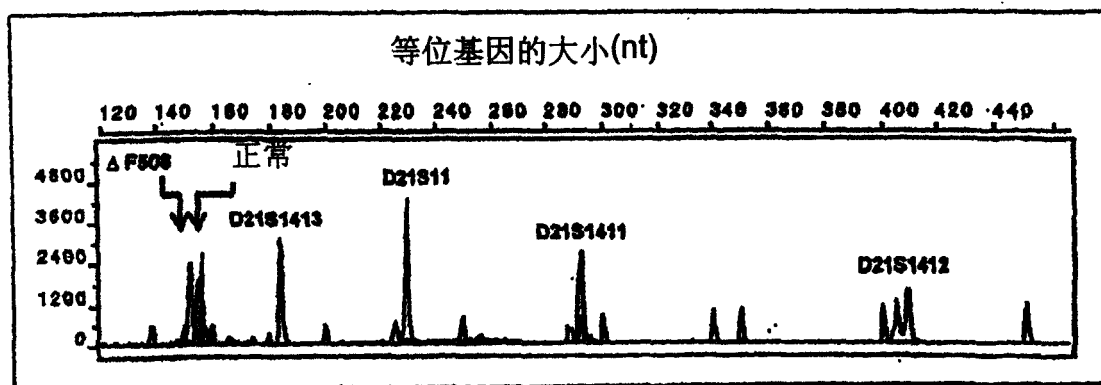


图 3

专利名称(译)	分离细胞的方法及其使用		
公开(公告)号	CN1582341A	公开(公告)日	2005-02-16
申请号	CN02822118.4	申请日	2002-09-06
申请(专利权)人(译)	莫拿什大学		
当前申请(专利权)人(译)	莫拿什大学		
[标]发明人	MG凯茨 DS克兰姆		
发明人	M·G·凯茨 D·S·克兰姆		
IPC分类号	G01N33/53 C12N5/06 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6881 C12Q1/6883 C12S3/24 G01N33/50 G01N33/569		
CPC分类号	C12Q2600/156 C12Q1/6883 C12Q2600/16 G01N33/56966 C12Q1/6881 C12Q2600/158		
代理人(译)	周承泽		
优先权	2001PR7499 2001-09-06 AU		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及提取和鉴别细胞，具体是胎儿细胞和滋养层细胞的非侵入性方法。本发明包括使用细胞鉴别染色体异常和突变的方法，具体用于通过进行染色体和单基因疾病的遗传诊断进行产前诊断。本发明还包括证实细胞胎儿起源的方法。

