



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105324666 B

(45)授权公告日 2018.07.27

(21)申请号 201480027992.5
 (22)申请日 2014.05.15
 (65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 105324666 A
 (43)申请公布日 2016.02.10
 (30)优先权数据
 61/824,128 2013.05.16 US
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日
 2015.11.13
 (86)PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2014/038250 2014.05.15
 (87)PCT国际申请的公布数据
 W02014/186607 EN 2014.11.20
 (73)专利权人 和卓生物科技(上海)有限公司
 地址 201203 上海市浦东新区郭守敬路199号321室
 (72)发明人 吴涵 陈帆青
 (74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司 11204
 代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.
 G01N 33/53(2006.01)
 C12Q 1/68(2006.01)
 (56)对比文件
 WO 2006/120434 A1,2006.11.16,
 US 5676849 A,1997.10.14,
 US 2010/0323354 A1,2010.12.23,
 CN 1476537 A,2004.02.18,
 CN 102690786 A,2012.09.26,
 Michihiro Kitagawa 等.New technique using galactose-specific lectin for isolation of fetal cells from maternal blood.《PRENATAL DIAGNOSIS》.2002,第22卷
 Marie Brinch 等.Identification of circulating fetal cell markers by microarray analysis.《Prenatal Diagnosis》.2012,第32卷
 审查员 苗君叶

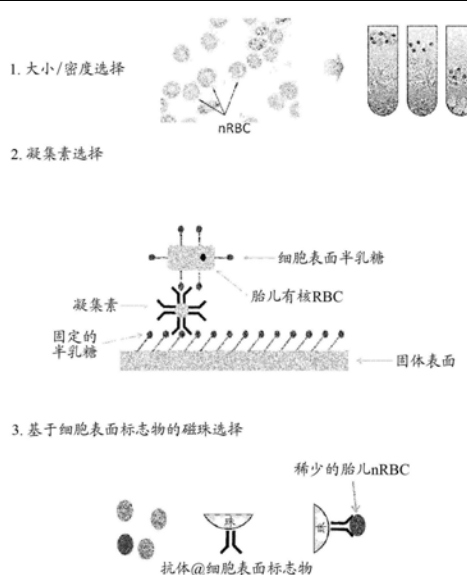
权利要求书5页 说明书17页 附图2页

(54)发明名称

使用来自母体血液的胎儿细胞捕获的胎儿诊断学

(57)摘要

提供非侵入性胎儿诊断方法。具体而言,提供从母体样品获得富集胎儿细胞的样品的方法以及评估母体样品的胎儿核苷酸序列或胎儿基因的表达的方法。



1. 从母体样品获得富集胎儿细胞的样品的方法,其包括:
提供母体样品;
使所述母体样品与对一种或多种糖具有亲和力的第一固定相接触,其中所述第一固定相为柱或颗粒;
将结合第一固定相的母体样品的组分与不结合第一固定相的母体样品的组分分离;
保留结合第一固定相的母体样品的组分;
使所述结合第一固定相的母体样品的组分与对基质金属蛋白酶14具有亲和力的可分离地标记的亲分子相接触;
将结合可分离地标记的亲分子的母体样品的组分与不结合可分离地标记的亲分子的母体样品的组分分离;以及
保留结合可分离地标记的亲分子的母体样品的组分,
从而提供富集胎儿细胞的样品。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述第一固定相为珠。
3. 如权利要求1所述的方法,所述方法还包括在所述母体样品与所述第一固定相和所述第一固定相接触之前实施以下步骤:
根据大小和/或密度,分离所述母体样品的组分;以及
收集所述母体样品分离出的具有有核胎儿红细胞的大小和/或密度的组分。
4. 如权利要求3所述的方法,其中使用梯度离心对所述母体样品的组分进行根据大小和/或密度的分离。
5. 如权利要求1所述的方法,其中所述一种或多种糖为半乳糖。
6. 如权利要求1所述的方法,其中所述第一固定相为凝集素结合的固定相。
7. 如权利要求1所述的方法,其中所述第一固定相包含磁珠。
8. 如权利要求1所述的方法,其中所述可分离地标记的亲分子与磁珠结合。
9. 如权利要求1所述的方法,其中,在保留结合第一固定相的母体样品的组分之后,使所保留的结合第一固定相的母体样品的组分与对基质金属蛋白酶14具有亲和力的可分离地标记的亲分子相接触。
10. 如权利要求1所述的方法,其还包括:
使所述母体样品与对除基质金属蛋白酶14以外的胎儿细胞表面标志物具有亲和力的第二固定相接触;
将结合第二固定相的母体样品的组分与不结合第二固定相的母体样品的组分分离;以及
保留结合第二固定相的母体样品的组分。
11. 如权利要求10所述的方法,其中所述胎儿细胞表面标志物选自转铁蛋白受体(CD71)、血型糖蛋白A(GPA)、HLA-G、EGFR、血小板反应蛋白受体(CD36)、CD 34、HbF、HAE 9、FB3-2、H3-3、促红细胞生成素受体、HBE、AFP、APOC3、SERPINC1、AMBIP、CPB2、ITIH1、APOH、HPX、 β -hCG、AHSB、APOB、J42-4-d、2,3-二磷酸甘油酸(BPG)、碳酸酐酶(CA)和胸苷激酶(TK)。
12. 如权利要求11所述的方法,其中所述胎儿细胞表面标志物为转铁蛋白受体(CD71)。
13. 如权利要求1所述的方法,其中所述母体样品为母体血液样品。
14. 如权利要求1所述的方法,其中所述富集胎儿细胞的样品中至少50%、60%、70%、

80%或90%的细胞为胎儿细胞。

15. 如权利要求1-14中任一项所述的方法,其还包括:

提供所述富集胎儿细胞的样品;以及

分析来自所述富集胎儿细胞的样品的一个或多个细胞中核酸分子的核苷酸序列或基因的表达。

16. 如权利要求15所述的方法,其中所述分析核酸分子的核苷酸序列包括对来自所述富集胎儿细胞的样品的一个或多个细胞的基因组DNA进行测序。

17. 如权利要求16所述的方法,其中对基因组DNA进行测序包括对单个细胞的DNA进行测序,并且其中对来自所述富集胎儿细胞的样品的一个或多个细胞进行单个细胞的DNA的测序。

18. 如权利要求17所述的方法,其中对来自所述富集胎儿细胞的样品的至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个细胞进行单个细胞的DNA的测序。

19. 如权利要求15所述的方法,其中所述基因的表达包括使可检测的抗体与来自所述富集胎儿细胞的样品的一个或多个细胞的表面相杂交。

20. 如权利要求15所述的方法,其中所述分析核酸分子的核苷酸序列包括使可检测的探针与来自所述富集胎儿细胞的样品的一个或多个细胞的基因组DNA相杂交。

21. 如权利要求20所述的方法,其中针对可检测的探针与各个被分析的细胞的基因组DNA的杂交,分析一个或多个个体细胞。

22. 如权利要求21所述的方法,其中针对可检测的探针与各个被分析的细胞的基因组DNA的杂交,分析至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个个体细胞。

23. 评估母体样品的胎儿核苷酸序列或胎儿基因表达的方法,其包括:

提供母体样品;

使所述母体样品与对一种或多种糖具有亲和力的第一固定相接触,其中所述第一固定相为柱或颗粒;

将结合第一固定相的母体样品的组分与不结合第一固定相的母体样品的组分分离;

保留结合第一固定相的母体样品的组分;

使所述结合第一固定相的母体样品的组分与对胎儿细胞表面标志物具有亲和力的可分离地标记的亲分子相接触;

将结合可分离地标记的亲分子的母体样品的组分与不结合可分离地标记的亲分子的母体样品的组分分离;

保留结合可分离地标记的亲分子的母体样品的组分,以提供富集胎儿细胞的样品用于分析,

测定所述富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞中每一个的个体细胞中的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达;以及

评估对所述富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞中每一个的个体细胞所测定的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达,以鉴定胎儿核苷酸序列或基因表达。

24. 如权利要求23所述的方法,其中所述第一固定相为珠。

25. 如权利要求23所述的方法,其中评估对所述富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞中每一个的个体细胞所测定的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达包括:

基于所测定的核苷酸序列或基因表达,将各个细胞分类为属于第一细胞群体或第二细胞群体;以及

鉴定所述第一细胞群体和第二细胞群体为胎儿来源或母体来源的概率。

26. 如权利要求25所述的方法,其中通过将所述第一细胞群体和第二细胞群体中每一个的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达与已知母体细胞的已知核酸分子的核苷酸序列或基因的表达相比较,鉴定所述第一细胞群体和第二细胞群体为胎儿来源或母体来源的概率,其中携带与已知母体细胞较高核苷酸序列或基因表达相似性的细胞群体被鉴定为母体来源。

27. 如权利要求26所述的方法,其中通过评估所述第一细胞群体和第二细胞群体的大小,鉴定所述第一细胞群体和第二细胞群体为胎儿来源或母体来源的概率,其中较大的细胞群体被鉴定为胎儿来源。

28. 评估母体样品的胎儿核苷酸序列或胎儿的基因表达的方法,其包括:

提供富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞中每一个的个体细胞中的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达,其中通过包括以下的方法来制备所述富集胎儿细胞的样品:

提供母体样品;

使所述母体样品与对一种或多种糖具有亲和力的第一固定相接触,其中所述第一固定相为柱或颗粒;

将结合第一固定相的母体样品的组分与不结合第一固定相的母体样品的组分分离;

保留结合第一固定相的所述母体样品的组分;

使所述结合第一固定相的母体样品的组分与对胎儿细胞表面标志物具有亲和力的可分离地标记的亲分子相接触;

将结合可分离地标记的亲分子的母体样品的组分与不结合可分离地标记的亲分子的母体样品的组分分离;以及

保留结合可分离地标记的亲分子的母体样品的组分,以提供富集胎儿细胞的样品用于分析;并且

评估对所述富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞中每一个的个体细胞所测定的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达,以鉴定胎儿的核苷酸序列或基因表达。

29. 如权利要求28所述的方法,其中所述第一固定相为珠。

30. 如权利要求28所述的方法,其中评估对所述富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞中每一个的个体细胞所测定的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达包括:

基于所测定的核苷酸序列或基因表达,将各个细胞分类为属于第一细胞群体或第二细胞群体;以及

鉴定所述第一细胞群体和第二细胞群体为胎儿来源或母体来源的概率,

其中通过将所述第一细胞群体和第二细胞群体中每一个的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达与已知母体细胞的已知核酸分子的核苷酸序列或基因的表达相比较,鉴定所述第一细胞群体和第二细胞群体为胎儿来源或母体来源的概率,其中携带与已知母体细胞较高核苷酸序列或基因表达相似性的细胞群体被鉴定为母体来源。

31. 如权利要求30所述的方法,其中通过评估所述第一细胞群体和第二细胞群体的大小,鉴定所述第一细胞群体和第二细胞群体为胎儿来源或母体来源的概率,其中较大的细

胞群体被鉴定为胎儿来源。

32. 根据权利要求23所述的方法,其中所述富集胎儿细胞的样品的制备方法还包括在所述母体样品与所述第一固定相和所述第一固定相接触之前实施以下步骤:

根据大小和/或密度,分离所述母体样品的组分;以及

收集所述母体样品的分离出的具有有核胎儿红细胞的大小和/或密度的组分。

33. 如权利要求32所述的方法,其中使用梯度离心对所述母体样品的组分进行根据大小和/或密度的分离。

34. 如权利要求23所述的方法,其中所述一种或多种糖为半乳糖。

35. 如权利要求23所述的方法,其中所述第一固定相为凝集素结合的固定相。

36. 如权利要求23所述的方法,其中所述第一固定相包含磁珠。

37. 如权利要求23所述的方法,其中所述可分离地标记的亲分子与磁珠结合。

38. 如权利要求23所述的方法,其中,在保留结合第一固定相的母体样品的组分之后,使所保留的结合第一固定相的母体样品的组分与所述可分离地标记的亲分子相接触。

39. 如权利要求23所述的方法,其中所述富集胎儿细胞的样品的制备方法还包括:

使所述母体样品与对胎儿细胞表面标志物具有亲和力的第二固定相接触;

将结合第二固定相的母体样品的组分与不结合第二固定相的母体样品的组分分离;以及

保留结合第二固定相的母体样品的组分。

40. 如权利要求39所述的方法,其中所述胎儿细胞表面标志物选自MMP14(基质金属蛋白酶14)、转铁蛋白受体(CD71)、血型糖蛋白A(GPA)、HLA-G、EGFR、血小板反应蛋白受体(CD36)、CD 34、HbF、HAE 9、FB3-2、H3-3、促红细胞生成素受体、HBE、AFP、APOC3、SERPINC1、AMBP、CPB2、ITIH1、APOH、HPX、 β -hCG、AHSG、APOB、J42-4-d、2,3-二磷酸甘油酸(BPG)、碳酸酐酶(CA)和胸苷激酶(TK)。

41. 如权利要求40所述的方法,其中所述胎儿细胞表面标志物为MMP14(基质金属蛋白酶14)或转铁蛋白受体(CD71)。

42. 如权利要求23所述的方法,其中所述母体样品为母体血液样品。

43. 如权利要求23所述的方法,其中所述富集胎儿细胞的样品中至少50%、60%、70%、80%或90%的细胞为胎儿细胞。

44. 如权利要求23-43中任一项所述的方法,其中所述富集胎儿细胞的样品的制备方法还包括:

提供所述富集胎儿细胞的样品;以及

分析来自所述富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞中的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达。

45. 如权利要求44所述的方法,其中所述分析核酸分子的核苷酸序列包括对来自所述富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞的基因组DNA进行测序。

46. 如权利要求45所述的方法,其中对基因组DNA进行测序包括对单个细胞的DNA进行测序,并且其中对来自所述富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞进行单个细胞的DNA的测序。

47. 如权利要求46所述的方法,其中对来自所述富集胎儿细胞的样品的至少2、3、4、5、

6、7、8、9或10个细胞进行单个细胞的DNA的测序。

48. 如权利要求44所述的方法,其中所述基因的表达包括使可检测的抗体与来自所述富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞的表面相杂交。

49. 如权利要求44所述的方法,其中所述分析核酸分子的核苷酸序列包括使可检测的探针与来自所述富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞的基因组DNA相杂交。

50. 如权利要求49所述的方法,其中针对可检测的探针与各个被分析的细胞的基因组DNA的杂交,分析一个或多个个体细胞。

51. 如权利要求49所述的方法,其中针对可检测的探针与各个被分析的细胞的基因组DNA的杂交,分析至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个个体细胞。

使用来自母体血液的胎儿细胞捕获的胎儿诊断学

[0001] 通过引用任何优先权申请作出的并入

[0002] 本申请依据35U.S.C. §119(e) 要求于2013年5月16日提交的美国临时申请第61/824,128号的优先权,通过引用的方式将其整体明确并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 产前诊断能提供关于胎儿状态的有用信息。通常,使用侵入性技术进行产前诊断,其会对胎儿造成风险。

[0005] 最近,在母体的循环血液内已发现胎儿的遗传物质。这样的胎儿遗传物质来源于胎儿并且穿过胎盘进入母体的循环系统。

[0006] 胎儿DNA的两种主要的非侵入性资源是母体的血浆和循环的胎儿细胞。在怀孕的早期,可在母体血液中检测到胎儿的遗传物质。已通过利用无细胞的胎儿DNA开发了一些非侵入性诊断策略。然而,根据定量分析,在妊娠早期和妊娠晚期,胎儿DNA分别仅占总的血浆DNA的~3.4%和~6.2%。这对精确的分析来说是技术上的挑战,因为胎儿的一半遗传信息来源于父亲,其会被母体的DNA压制。此外,因为胎儿无细胞的DNA没有受到细胞膜的保护,所以与完整的基因组相比,DNA片段短且不完整。至于来自母体血液的胎儿细胞,由于其存在的稀缺性,分离也是困难的,其可低至 $10^6 \sim 10^7$ 个母体细胞中1个胎儿细胞的量级。为了获得足够用于分析的胎儿细胞,使用富集的技术。由于它们的数量少,从母体血液样品富集并纯化胎儿细胞是技术上的挑战。这些挑战最终使胎儿的诊断方法复杂化。

[0007] 发明概述

[0008] 本申请的发明人开发了改进的非侵入性胎儿诊断方法。具体而言,提供从母体样品获得富集胎儿细胞的样品的方法,以及评估母体样品的胎儿核苷酸序列或胎儿基因的表达的方法。

[0009] 在某些实施方案中,本文提供从母体样品获得富集胎儿细胞的样品的方法,其包括:提供母体样品;使母体样品与对一种或多种糖具有亲和力的第一固定相接触;将结合第一固定相的母体样品的组分与不结合第一固定相的母体样品的组分分离;保留结合第一固定相的母体样品的组分;使母体样品与对基质金属蛋白酶14具有亲和力的可分离地(isolatably)标记的亲分子接触;将结合可分离地标记的亲分子的母体样品的组分与不结合可分离地标记的亲分子的母体样品的组分分离;并且保留结合可分离地标记的亲分子的母体样品的组分,从而提供富集胎儿细胞的样品。某些这样的实施方案还包括,在母体样品与所述第一固定相和所述第一固定相接触之前:根据大小和/或密度分离母体样品的组分;并且收集具有有核胎儿红细胞的大小和/或密度的母体样品的分离组分。在某些实施方案中,使用梯度离心,进行根据大小和/或密度进行的母体样品的组分分离。在某些实施方案中,一种或多种糖为半乳糖。在某些实施方案中,第一固定相为凝集素结合的固定相。在某些实施方案中,第一固定相包含磁珠。在某些实施方案中,可分离地标记的亲分子与磁珠结合。在某些实施方案中,在保留结合第一固定相的母体样品的组分之后,使所保留的结合第一固定相的母体样品的组分与对基质金属蛋白酶14具有亲和力的可分离地标记的亲分子接触。某些实施方案还包括使母体样品与对除了基质金属蛋白酶14之外的胎

儿细胞表面标志物具有亲和力的第二固定相接触；将结合第二固定相的母体样品的组分与不结合第二固定相的母体样品的组分分离；并且保留结合第二固定相的母体样品的组分。在某些实施方案中，胎儿细胞表面标志物选自转铁蛋白受体 (CD71)、血型糖蛋白A (GPA)、HLA-G、EGFR、血小板反应蛋白受体 (CD36)、CD 34、HbF、HAE 9、FB3-2、H3-3、促红细胞生成素受体、HBE、AFP、APOC3、SERPINC1、AMBP、CPB2、ITIH1、APOH、HPX、 β -hCG、AHSB、APOB、J42-4-d、2,3-二磷酸甘油酸 (biophosphoglycerate) (BPG)、碳酸酐酶 (CA) 和胸苷激酶 (TK)。在某些实施方案中，胎儿细胞表面标志物为转铁蛋白受体 (CD71)。在某些实施方案中，母体样品为母体血液样品。在某些实施方案中，富集胎儿细胞的样品中至少50%、60%、70%、80%或90%的细胞为胎儿细胞。某些实施方案还包括提供富集胎儿细胞的样品；并且分析来自富集胎儿细胞的样品的一个或多个细胞中的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达。在某些实施方案中，分析核酸分子的核苷酸序列包括对来自富集胎儿细胞的样品的一个或多个细胞的基因组DNA进行测序。在某些实施方案中，对基因组DNA进行测序包括对单个细胞的DNA进行测序，并且其中对来自富集胎儿细胞的样品的一个或多个细胞进行单个细胞的DNA的测序。在某些实施方案中，对来自富集胎儿细胞的样品的至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个细胞进行单个细胞的DNA的测序。在某些实施方案中，基因的表达包括使可检测的抗体与来自富集胎儿细胞的样品的一个或多个细胞的表面杂交。在某些实施方案中，分析核酸分子的核苷酸序列包括使可检测的探针与来自富集胎儿细胞的样品的一个或多个细胞的基因组DNA杂交。在某些实施方案中，针对可检测的探针与各个被分析的细胞的基因组DNA的杂交，分析一个或多个个体细胞。在某些实施方案中，针对可检测的探针与各个被分析的细胞的基因组DNA的杂交，分析至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个个体细胞。

[0010] 本文还提供评估母体样品的胎儿核苷酸序列或胎儿的基因表达的方法，其包括：提供母体样品；使母体样品与对一种或多种糖具有亲和力的第一固定相接触；将结合第一固定相的母体样品的组分与不结合第一固定相的母体样品的组分分离；保留结合第一固定相的母体样品的组分；使母体样品与对胎儿细胞表面标志物具有亲和力的可分离地标记的亲分子接触；将结合可分离地标记的亲分子的母体样品的组分与不结合可分离地标记的亲分子的母体样品的组分分离；保留结合可分离地标记的亲分子的母体样品的组分，以提供富集胎儿细胞的样品用于分析；测定富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞的每个的个体细胞中的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达；并且评估对富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞的每个的个体细胞所测定的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达，以鉴定胎儿的核苷酸序列或基因表达。在某些实施方案中，评估对富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞的每个的个体细胞所测定的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达包括：基于所测定的核苷酸序列或基因表达，将每个细胞分类为属于第一细胞群体或第二细胞群体；并且鉴定第一和第二细胞群体为胎儿或母体来源的概率。在某些实施方案中，通过将第一和第二群体的每一个的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达与已知的母体细胞的已知核酸分子的核苷酸序列或基因的表达相比较，鉴定第一和第二细胞群体为胎儿或母体来源的概率，其中携带与已知的母体细胞较高的核苷酸序列或基因表达相似性的细胞群体被鉴定为母体来源。在某些实施方案中，通过评估第一和第二细胞群体的大小鉴定第一和第二细胞群体为胎儿或母体来源的概率，其中较大的细胞群体被鉴定为胎儿来源。

[0011] 还提供评估母体样品的胎儿核苷酸序列或胎儿的基因表达的方法，其包括：提供

富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞的每个的个体细胞中的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达,其中通过包括以下步骤的方法制备富集胎儿细胞的样品:提供母体样品;使母体样品与对一种或多种糖具有亲和力的第一固定相接触;将结合第一固定相的母体样品的组分与不结合第一固定相的母体样品的组分分离;保留结合第一固定相的母体样品的组分;使母体样品与对胎儿细胞表面标志物具有亲和力的可分离地标记的亲分子接触;将结合可分离地标记的亲分子的母体样品的组分与不结合可分离地标记的亲分子的母体样品的组分分离;并且保留结合可分离地标记的亲分子的母体样品的组分以提供富集胎儿细胞的样品用于分析;并且评估对富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞的每个的个体细胞所测定的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达,以鉴定胎儿的核苷酸序列或基因表达。在某些实施方案中,通过将第一和第二群体的每一个的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达与已知的母体细胞的已知核酸分子的核苷酸序列或基因的表达相比较,鉴定第一和第二细胞群体为胎儿或母体来源的概率,其中携带与已知的母体细胞较高的核苷酸序列或基因表达相似性的细胞群体被鉴定为母体来源。在某些实施方案中,通过评估第一和第二细胞群体的大小,鉴定第一和第二细胞群体为胎儿或母体来源的概率,其中较大的细胞群体被鉴定为胎儿来源。在某些实施方案中,富集胎儿细胞的样品的制备方法还包括,在母体样品与所述第一固定相和所述第一固定相接触之前:根据大小和/或密度,分离母体样品的组分;并且收集具有有核胎儿红细胞的大小和/或密度的母体样品的分离组分。

[0012] 在本文所提供的方法的某些实施方案中,使用梯度离心,进行根据大小和/或密度进行的母体样品的组分分离。在某些实施方案中,一种或多种糖为半乳糖。在某些实施方案中,第一固定相为凝集素结合的固定相。在某些实施方案中,第一固定相包含磁珠。在某些实施方案中,可分离地标记的亲分子与磁珠结合。在某些实施方案中,在保留结合第一固定相的母体样品的组分之后,使所保留的结合第一固定相的母体样品的组分与可分离地标记的亲分子接触。在某些实施方案中,富集胎儿细胞的样品的制备方法还包括:使母体样品与对胎儿细胞表面标志物具有亲和力的第二固定相接触;将结合第二固定相的母体样品的组分与不结合第二固定相的母体样品的组分分离;并且保留结合第二固定相的母体样品的组分。在某些实施方案中,胎儿细胞表面标志物选择MMP14(基质金属蛋白酶14)、转铁蛋白受体(CD71)、血型糖蛋白A(GPA)、HLA-G、EGFR、血小板反应蛋白受体(CD36)、CD 34、HbF、HAE 9、FB3-2、H3-3、促红细胞生成素受体、HBE、AFP、APOC3、SERPINC1、AMBIP、CPB2、ITIH1、APOH、HPX、 β -hCG、AHSG、APOB、J42-4-d、2,3-二磷酸甘油酸(BPG)、碳酸酐酶(CA)和胸苷激酶(TK)。在某些实施方案中,胎儿细胞表面标志物为MMP14(基质金属蛋白酶14)或转铁蛋白受体(CD71)。在某些实施方案中,母体样品为母体血液样品。在某些实施方案中,富集胎儿细胞的样品中至少50%、60%、70%、80%或90%的细胞为胎儿细胞。在某些实施方案中,富集胎儿细胞的样品的制备方法还包括:提供富集胎儿细胞的样品;并且分析来自富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞中的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达。在某些实施方案中,分析核酸分子的核苷酸序列包括对来自富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞的基因组DNA进行测序。在某些实施方案中,对基因组DNA进行测序包括对单个细胞的DNA进行测序,并且其中对来自富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞进行单个细胞的DNA的测序。在某些实施方案中,对来自富集胎儿细胞的样品的至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个细胞进行单个细胞的DNA的测序。在某些实施方案中,基因的表达包括使可检测的抗体与来自富集胎

儿细胞的样品的两个或更多个细胞的表面杂交。在某些实施方案中,分析核酸分子的核苷酸序列包括使可检测的探针与来自富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞的基因组DNA杂交。在某些实施方案中,针对可检测的探针与各个被分析的细胞的基因组DNA的杂交,分析一个或多个个体细胞。在某些实施方案中,针对可检测的探针与各个被分析的细胞的基因组DNA的杂交,分析至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个个体细胞。

[0013] 附图简述

[0014] 图1描述用于从母体的血液样品获得富集的有核胎儿红细胞的方案的实例。

[0015] 图2描述用于评估富集有核胎儿红细胞的样品的两个或更多个细胞的每个的个体细胞所测定的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达的方案的实例。

[0016] 发明详述

[0017] 本申请的发明人开发了改进的非侵入性胎儿诊断方法。具体而言,提供从母体样品获得富集胎儿细胞的样品的方法,以及评估母体样品的胎儿核苷酸序列或胎儿基因的表达的方法。

[0018] 胎儿物质为关于发育中的胎儿的性别和遗传组成的信息的来源。在怀孕的早期,可在母体血液中检测到胎儿的遗传物质。本文所提供的方法包括用于从母体血液分离具有高纯度的胎儿细胞的有效方案。某些实施方案包括初始的富集步骤,其通过例如密度梯度离心促进多种母体的无核细胞的去除。随后的胎儿细胞的纯化或富集可包括基于亲和力的分离。作为实例,有核胎儿红细胞的前体细胞在细胞表面表达大量的半乳糖分子,其可被凝集素捕获。因此,使用已知的方法,如Kitagawa等,2002Prenat.Diagn 22:17-21所提供的方法,凝集素(如大豆凝集素(SBA))可被用来富集有核胎儿细胞。作为另一实例,有核胎儿细胞具有多种可被用于进一步富集的细胞表面标志物。在一个这样的实施方案中,基质金属蛋白酶14(MMP14或MMP-X1)前体和/或转铁蛋白受体(CD71)可被用来以高特异性和高回收率富集胎儿细胞。可被使用的另外的标志物包括但不限于,血型糖蛋白A(GPA)、血小板反应蛋白受体(CD36)、CD34、HbF、HAE9、FB3-2、H3-3和促红细胞生成素受体。作为另外的、任选的步骤,可包括使用例如CD47、CD45、CD35、CD12、CD14、CD32的阴性选择,其可被用来特异性地结合并且从而去除母体红细胞。

[0019] 图1中提供用于从母体的血液样品获得富集的有核胎儿红细胞的方案的实例,其包括(1)使用密度梯度离心的大小/密度的选择,(2)使用大豆凝集素的凝集素选择,以及(3)使用例如抗MMP14抗体的基于细胞表面标志物的磁珠选择。

[0020] 图2中提供用于评估对富集有核胎儿红细胞的样品的两个或更多个细胞的每个的个体细胞所测定的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达的方案的实例,其包括(1)提供来自富集有核胎儿红细胞的样品的~10-100个细胞,(2)将细胞分入96孔板(图中的绿色孔指示容纳有细胞的孔),使得每个孔含有1或0个细胞,以及(3)对于每一个孔,对分离的细胞进行分析,测定核酸分子的核苷酸序列或基因的表达。

[0021] 母体样品

[0022] 从将进行诊断或预后的任何动物或孕有将进行诊断或预后的胎儿的动物,可获得含有一个或多个有核胎儿细胞的母体样品。在一个实施方案中,样品可获自疑似怀孕、正怀孕或已怀孕的雌性动物。当动物是人类时,可在早期妊娠(约怀孕的前三个月)、中期妊娠(约怀孕的4-6个月)或晚期妊娠(约怀孕的7-9个月)期间采集样品。本发明的动物可为人或

家畜动物,如牛、猪、马、兔、狗、猫、绵羊或山羊。通常,所获的样品为血液样品。其他样品可包括阴道分泌物、宫颈拭子和尿。因此,例如母体样品(如母体的血液样品)可获自怀孕的女人或非人的哺乳动物,并且可被用来研究怀孕的女人或非人的哺乳动物内的胎儿的状态。

[0023] 当从动物获得母体样品(例如血液样品)时,样品的量可依据动物大小、其怀孕期以及被筛选的条件变化。在一个实施方案中,获得多至200、175、150、125、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10或5mL样品。在一个实施方案中,获得5-200、10-100或30-50mL样品。在一个实施方案中,获得多于1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或150mL样品。在一个实施方案中,从怀孕的雌性获得约10-100ml或30-50ml的外周血液样品。在某些实施方案中,从怀孕36、24、22、20、18、16、14、12、10、8、6或4周内或甚至怀孕结束后的怀孕的人或非人动物获得血液样品。

[0024] 样品的富集/纯化

[0025] 对样品实施一个或多个步骤,所述步骤相对于样品的总组分富集有核胎儿细胞和/或相对于样品中的总细胞富集有核胎儿细胞。

[0026] 图1中提供用于从母体的血液样品获得富集有核胎儿红细胞的方案的实例,其包括(1)使用密度梯度离心进行的大小/密度的选择,(2)使用大豆凝集素的凝集素选择,以及(3)使用例如抗MMP14抗体的基于细胞表面标志物的磁珠选择。可根据本文所提供的教导改变该实例方法。

[0027] 密度梯度离心

[0028] 密度梯度离心是基于混合物中细胞类型的不同密度分离细胞的方法。该方法被用来将细胞分离进隔室,隔室含有比所使用的梯度材料的比重更轻或更重的细胞。可基于一系列不同密度梯度、通过重复步骤实施密度梯度离心,或将其与诸如亲和分离、细胞盘选、细胞分选等的其他分离方法联合。在某些实施方案中,可使用多层的不同梯度密度进行密度梯度离心。该方法允许在离心后不同密度的细胞在其相应的密度处形成区域或条带。可通过在适当的位置放置吸液管收集一个或多个不同区域中的细胞。美国专利第5,840,502号中描述了通过密度梯度离心富集具体细胞类型的方法,通过引用将其整体并入本文。

[0029] 使用密度梯度离心鉴定样本中胎儿细胞的方法利用密度梯度介质。密度梯度介质可为包被有胶状聚乙烯吡咯烷酮的硅土(例如PercolD、Nycodenz),单独或具有泛影钠的非离子性聚蔗糖(Ficoll)或以上的混合物。选择所采用的试剂的密度以将感兴趣的有核胎儿细胞与其他血液组分(如非细胞组分和非有核红细胞)分离。

[0030] 基于大小的富集

[0031] 在某些实施方案中,使用一种或多种基于大小的分离方法,发生稀少细胞的富集。基于大小的分离模块的实例包括滤膜、分子筛以及基质。本发明所考虑的基于大小的分离模块的实例包括国际公布第W0 2004/113877号中所公开的模块,通过引用将其整体并入本文。国际公布第W0 2004/0144651号以及美国专利申请公布第US20080138809A1号和第US20080220422A1号中公开其他基于大小的分离方法,通过引用将其整体并入本文。

[0032] 基于亲和力的富集

[0033] 在某些实施方案中,有核胎儿细胞可基于其对结合部分或亲和分子的亲和力进行富集。在这样的实施方案中,对结合部分进行可分离地标记,以便于有核胎儿细胞与母体样品的不希望的组分分离。例如,对有核胎儿细胞具有亲和力的结合部分可结合有核胎儿细

胞,并且可被用来通过与固体支持物(如磁珠或层析材料的固定相)结合来分离有核胎儿细胞,或者对结合部分进行可检测地标记,使得可通过检测辅助的有核胎儿细胞的富集,使有核胎儿细胞与其他样品组分区分开。

[0034] 在某些实施方案中,亲和方法包括使用对胎儿细胞表面标志物具有亲和力的可分离地标记的结合部分或亲和分子。例如,结合部分或亲和分子可附接于固定相、荧光团、放射性核素或其他可检测部分,并且在允许胎儿有核细胞与结合部分或亲和分子特异性地结合、而样品的其他组分不与结合部分或亲和分子特异性地结合的条件下,使所述样品与可分离地标记的结合部分或亲和分子接触。然后,例如可使用光镊子、磁力架、密度离心机、流式细胞术以及基于尺寸的液相色谱法处理被接触的可分离地标记的结合部分或亲和分子,将结合可分离地标记的结合部分或亲和分子的母体样品的组分与不结合可分离地标记的结合部分或亲和分子的母体样品的组分分离。任选地,可冲洗母体样品的结合组分以去除非特异性结合组分。然后可保留或收集结合可分离地标记的结合部分或亲和分子的样品的组分(其包含胎儿有核细胞)用于进一步的富集或用于分析。

[0035] 结合部分可包括例如特异性地结合有核胎儿细胞的蛋白、核酸和碳水化合物。在一个实施方案中,结合部分对一种或多种碳水化合物(如半乳糖)具有亲和力。例如,结合部分可为凝集素。在其他实施方案中,结合部分为抗体。这样的结合部分抗体的实例包括:抗基质金属蛋白酶14(抗MMP14)、抗转铁蛋白受体(抗CD71)、抗血型糖蛋白A(抗GPA)、抗血小板反应蛋白受体(抗CD36)、抗CD34、抗HbF、抗HAE9、抗FB3-2、抗H3-3、抗促红细胞生成素受体、抗CD235a、抗碳水化合物、抗选择素、抗CD45、抗GPA、抗抗原-i、抗EpCAM、抗E-钙粘蛋白、抗Muc-1、抗hPL、抗CHS2、抗KISS1、抗GDF15、抗CRH、抗TFP12、抗CGB、抗LOC90625、抗FN1、抗COL1A2、抗PSG9、抗PSG1、抗HBE、抗AFP、抗APOC3、抗SERPINC1、抗AMBP、抗CPB2、抗ITIH1、抗APOH、抗HPX、抗 β -hCG、抗AHSG、抗APOB、抗J42-4-d、抗2、3-双磷酸甘油酸(biphosphoglycerate)(抗BPG)、抗碳酸酐酶(抗CA)或抗胸苷激酶(抗TK)。

[0036] 在一个实施方案中,使用抗MMP14、抗CD71和/或抗GPA选择来富集有核胎儿细胞。在另一个实施方案中,使用抗HLA-G或抗EGFR的选择富集滋养层细胞。在另一个实施方案中,使用可结合表达自以下基因的蛋白的一种或多种抗体或抗体片段富集有核胎儿细胞:MMP14、CD71、GPA、HLA-G、EGFR、CD36、CD34、HbF、HAE 9、FB3-2、H3-3、促红细胞生成素受体、HBE、AFP、APOC3、SERPINC1、AMBP、CPB2、ITIH1、APOH、HPX、 β -hCG、AHSG、APOB、J42-4-d、BPG、CA或TK。

[0037] 基于固定相的富集

[0038] 在某些实施方案中,可使用亲和层析的方法。例如,可将结合部分或亲和分子附于固定相,如珠、柱或颗粒,并且在允许胎儿有核细胞与结合部分或亲和分子特异性的结合、而样品的其他组分不与结合部分或亲和分子特异性结合的条件下,使样品与附有亲和分子的固定相接触。然后,例如可使用流动相处理被接触的固定相,将结合附有亲和分子的固定相的母体样品的组分与不结合附有亲和分子的固定相的母体样品的组分分离。然后,可保留或收集结合附有亲和分子的固定相的样品的组分(其包含胎儿有核细胞)用于进一步的富集或用于分析。

[0039] 在一个实施方案中,磁性颗粒被用来富集有核胎儿细胞。在一个实施方案中,结合部分(如抗体)可与磁性颗粒(例如磁珠)相联。在一个实施方案中,珠与抗体或抗体的片段

相联,所述抗体或抗体的片段为抗MMP14、抗CD71、抗GPA、抗CD36、抗CD34、抗HbF、抗HAE9、抗FB3-2、抗H3-3、抗促红细胞生成素受体、抗CD235a、抗碳水化合物、抗选择素、抗CD45、抗GPA、抗抗原-i、抗EpCAM、抗E-钙粘蛋白、抗Muc-1、抗hPL、抗CHS2、抗KISS1、抗GDF15、抗CRH、抗TFP12、抗CGB、抗LOC90625、抗FN1、抗COL1A2、抗PSG9、抗PSG1、抗HBE、抗AFP、抗APOC3、抗SERPINC1、抗AMBP、抗CPB2、抗ITIH1、抗APOH、抗HPX、抗 β -hCG、抗AHSG、抗APOB、抗J42-4-d、抗BPG、抗CA或抗TK抗体或者上述抗体的片段。

[0040] 富集效率

[0041] 在某些实施方案中,即使富集后的产物也能被不感兴趣的细胞(例如,有核母体红细胞)主导(>50%)。在一些情况下,富集的样品的有核胎儿细胞占富集样品中所有细胞的至少2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90或95%。例如,使用本文所描述的方法和系统,来自孕妇的20mL的母体血液样品可被富集一个或多个有核胎儿细胞(如有核红细胞),使得富集的样品具有总共约500个细胞,其中的2%为有核胎儿细胞,并且其余细胞为母体的。在某些实施方案中,所进行的富集步骤从样品中去除所有不需要的分析物(例如,母体的细胞、母体的红细胞、有核母体的红细胞、无核的细胞)的至少50、60、70、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.6、99.7、99.8或99.9%。

[0042] 胎儿生物标志物

[0043] 在某些实施方案中,胎儿生物标志物可被用来检测和/或分离一个或多个胎儿细胞。例如,这可通过基于胎儿发育期间差异性表达的基因(例如DYS1、DYZ、CD-71、MMP14)的相对表达辨别胎儿和母体的成核细胞进行。在本发明所提供的实施方案中,包括以下的一个或多个基因的转录或蛋白表达的检测可被用来富集、纯化、计数、鉴定、检测或辨别胎儿细胞:MMP14、CD71、GPA、HLA-G、EGFR、CD36、CD34、HbF、HAE9、FB3-2、H3-3、促红细胞生成素受体、HBE、AFP、APOC3、SERPINC1、AMBP、CPB2、ITIH1、APOH、HPX、 β -hCG、AHSG、APOB、J42-4-d、2,3-二磷酸甘油酸(biophosphoglycerate)(BPG)、碳酸酐酶(CA)或胸苷激酶(TK)。表达可包括表达自这些基因的转录物或蛋白。在本发明所提供的实施方案中,包括以下的一个或多个基因的表达可被用来鉴定、纯化、富集或计数有核胎儿细胞,如有核胎儿红细胞:MMP14、CD71、GPA、HLA-G、EGFR、CD36、CD34、HbF、HAE 9、FB3-2、H3-3、促红细胞生成素受体、HBE、AFP、AHSG、J42-4-d、BPG、CA或TK。

[0044] β -hCG(也被称为b-hCG、HCG、CGB、CGB3和hCGB)为糖蛋白激素 β 链家族的成员,并且编码绒毛膜促性腺激素(CG)的 β 3亚基。糖蛋白激素是由共有的 α 亚基和赋予生物学特异性的独特的 β 亚基组成的异二聚体。CG由胚盘的滋养层的细胞产生,并且刺激卵巢合成对维持怀孕必需的一类固醇。CG的 β 亚基由6个基因编码,这些基因在染色体19q13.3上串联排列且倒转成对,并且与促黄体激素 β 亚基基因毗邻。

[0045] APOB(也被称为载脂蛋白B(其包括Ag(x)抗原)和FLDB)是乳糜微粒以及低密度脂蛋白的主要载脂蛋白。其以两个主要的同种型apoB-48和apoB-100的形式在血浆中存在:前者在仅在肠中合成,而后者在肝脏中合成。肠形式和肝形式的apoB由来自单条、非常长的mRNA的单一基因编码。两个同种型共有共同的N-端序列。apoB-100的转录物在残基2180处的RNA编辑(CAA \rightarrow UAA)后(其导致终止密码子的形成以及早期翻译终止)产生较短的apoB-48蛋白。该基因或其调节区的突变引起由于配体缺陷的apoB的低 β 脂蛋白血症、甘油三酯水平正常的低 β 脂蛋白血症和高胆固醇血症,影响血浆胆固醇和apoB水平的疾病。

[0046] AHS_G (也被称为 α -2-HS-糖蛋白; AHS; A2HS; HSGA和FETUA) 为存在于血清中的糖蛋白, 并且可由肝细胞合成。AHS_G分子由两条多肽链组成, 其均切割自单一mRNA所编码的原蛋白。AHS_G参与多种功能, 如胞吞作用、大脑发育和骨组织的形成。该蛋白通常存在于未成熟的大脑皮层的皮层板和骨髓造血基质中, 并且因此假定其参与组织的发育。

[0047] HPX (也被称为血色素结合蛋白) 可结合血红素。HPX通过清除由血红素蛋白质(如血红蛋白的更新) 所释放或损失的血红素, 可保护机体免受由自由血红素引起的氧化性损伤。为了保存机体的铁, 当血色素结合蛋白与位于肝细胞表面的特异性受体相互作用时, 其能释放其结合配体用于内化。

[0048] CPB2 (也被称为羧肽酶B2(血浆); CPU; PCPB和TAFI) 为能使C-端肽键水解的酶。羧肽酶家族包括金属羧肽酶、丝氨酸羧肽酶和半胱氨酸羧肽酶。根据它们的底物特异性, 这些酶被称为羧肽酶A(其切割脂肪族残基) 或羧肽酶B(其切割碱性氨基残基)。该基因所编码的蛋白由胰蛋白酶激活, 并且作用于羧肽酶B的底物。凝血酶激活后, 成熟的蛋白质下调纤维蛋白溶解。已描述了该基因及其启动子区的多态性。可用的序列数据分析指示编码不同同种型的剪接变体。

[0049] ITIH1 (也被称为间- α (球蛋白) 抑制剂H1; H1P; ITIH; LATIH和MGC126415) 为丝氨酸蛋白酶抑制剂家族成员。其装配自两个前体蛋白: 轻链和一条或两条重链。ITIH1能增加体外的细胞附着。

[0050] APOH (也被称为载脂蛋白H(β -2-糖蛋白I); BG和B2G1) 参与多种生理途径, 包括脂蛋白代谢、凝血以及抗磷脂自身抗体的产生。APOH可为在患有狼疮和原发性抗磷脂综合征的许多患者的血清中发现的抗磷脂自身抗体结合阴离子磷脂的必需的辅因子。

[0051] AMBP (也被称为 α -1-微球蛋白/双库尼茨抑制剂前体; HCP; ITI; UTI; EDC1; HI30; ITIL; IATIL和ITILC) 编码血浆中所分泌的复合糖蛋白。前体被以蛋白水解的方式加工为不同的功能蛋白: α -1-微球蛋白和双库尼茨抑制剂, α -1-微球蛋白属于脂质运载(lipocalin) 转运蛋白的超家族并且可在炎症过程的调节中发挥作用, 双库尼茨抑制剂为属于库尼型蛋白酶抑制剂超家族的尿胰蛋白酶抑制剂并且在许多生理和病理过程中发挥重要作用。该基因位于染色体9上、脂质运载基因簇中。

[0052] J42-4-d也被称为类t-复合体11(小鼠) 2; MGC40368和TCP11L2。

[0053] 评估富集的细胞

[0054] 然后可评估来自富集胎儿细胞的样品的细胞的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达。

[0055] 图2中提供用于评估对富集有核胎儿红细胞的样品的两个或更多个细胞的每个的个体细胞所测定的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达的方案实例, 其包括(1) 提供来自富集有核胎儿红细胞的样品的~10-100个细胞, (2) 将细胞分入96孔板(图中的绿色孔指示含有细胞的孔), 使得每个孔含有1或0个细胞, 以及(3) 对于每一个孔, 对分离的细胞进行分析, 测定核酸分子的核苷酸序列或基因的表达。可根据本文所提供的教导改变该实例方法。

[0056] 细胞分析

[0057] 可通过鉴定有核胎儿细胞的一个或多个核苷酸序列或有核胎儿细胞的一个或多个基因的表达的一个或多个细胞测定来分析富集的有核胎儿细胞。

[0058] 在某些实施方案中,对于来自富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞,评估有核胎儿细胞的一个或多个基因的表达。在某些实施方案中,有核胎儿细胞的一个或多个基因的表达包括单个细胞的基因表达。在某些实施方案中,对于来自富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞,评估单个细胞的一个或多个基因的表达。在某些实施方案中,对于来自富集胎儿细胞的样品的至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个细胞,评估单个细胞的一个或多个基因的表达。

[0059] 在某些实施方案中,评估核酸分子的核苷酸序列包括对来自富集胎儿细胞的样品的细胞的基因组DNA进行测序。在某些实施方案中,分析核酸分子的核苷酸序列包括使可检测的探针与感兴趣的序列杂交。在某些实施方案中,对于来自富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞,评估有核胎儿细胞的核苷酸序列。在某些实施方案中,基因组DNA测序包括单个细胞的DNA测序。在某些实施方案中,对来自富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞,进行单个细胞的DNA测序。在某些实施方案中,对来自富集胎儿细胞的样品的至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个细胞,进行单个细胞的DNA测序。在某些实施方案中,分析核酸分子的核苷酸序列包括使可检测的探针与来自富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞的基因组DNA杂交。在某些实施方案中,针对可检测的探针与各个被分析的细胞的基因组DNA的杂交,分析一个或多个个体细胞。在某些实施方案中,针对可检测的探针与各个被分析的细胞的基因组DNA的杂交,分析至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个个体细胞。

[0060] 在某些实施方案中,通过检测来自富集胎儿细胞的样品的细胞中的基因的RNA表达评估基因表达。在某些实施方案中,通过检测来自富集胎儿细胞的样品的细胞中基因的蛋白表达评估基因表达。在某些实施方案中,基因的表达包括使可检测的抗体与来自富集胎儿细胞的样品的细胞的表面杂交。

[0061] 核苷酸测序方法包括靶核苷酸测序方法和基因组核苷酸测序方法。靶测序方法包括一个或多个具体基因或其他靶基因的测序,使用例如基于引物的PCR以扩增靶核苷酸区,随后通过本领域已知的常规的核苷酸测序方法。基因组核苷酸测序方法包括用于基因组DNA的扩增和核苷酸测序的方法。基因组核苷酸测序方法包括但不限于以下文献中所教导的单个细胞中的多重置换扩增:Zhang等(2006)“Sequencing genomes from single cells by polymerase cloning”*Nature Biotechnology* 24(6):680-6;和Spits等(2006)“Whole-genome multiple displacement amplification from single cells”*Nature protocols* 1(4):1965-70。其他基因组核苷酸测序方法包括但不限于以下文献所教导的多次退火且基于成环的扩增循环(MALBAC)所教导的单个细胞中的多重置换扩增:Zong等(2012)“Genome-Wide detection of Single-Nucleotide and Copy-Number Variations of a Single Human cell”*Science* 338:1622-6。在某些实施方案中,全基因组扩增后,在用使用者设计的寡核苷酸进行基于杂交的选择后,可对感兴趣的部分基因组序列进行测序(如全外显子测序)。

[0062] 可通过例如检测表达自基因的转录物或蛋白测定基因的表达。可通过例如RNA显色原位杂交(CISH)、RNA FISH、使用分子信标探针的RNA-FISH、Q-PCR、RT-PCR、Taqman RT-PCR、Northern印迹、核糖核酸酶保护试验、使用微阵列的RNA表达谱分析或全转录组测序检测来自基因的转录物的表达。

[0063] 可通过例如免疫组织化学、免疫细胞化学、Western印迹、质谱分析法、ELISA、凝胶

电泳随后考马斯亮蓝染色或银染、流式细胞术、FACS或微流体荧光细胞分选检测蛋白表达。表达的蛋白可为细胞表面或内部的表达蛋白。可通过结合部分(例如基于抗体的部分)识别细胞表面蛋白。检测中所使用的结合部分可为抗体、Fab片段、Fc片段、scFv片段、肽模拟物或类肽。

[0064] 在一个实施方案中,通过测定核RNA转录物(包括初期的或未加工的转录物)测定表达水平。在另一个实施方案中,通过测量mRNA(包括核糖体RNA)测定表达水平。本领域已知许多方法用于成像(例如测量)核酸或RNA,包括但不限于使用来自Affymetrix, Inc.的表达阵列或来自Illumina, Inc.和Life Technologies, Inc.的测序技术。

[0065] 可通过靶向基因特异区、选择扩增子大小以及调整引物退火温度设计RT-PCR引物以实现均等的PCR扩增效率。因此可针对各个扩增子设计具有良好分离荧光染料, Alexa Fluor-355、Alexa Fluor-488和Alexa Fluor-555的TaqMan探针。可以以双重形式中首先验证所选择的引物以证实它们的特异性、检测限以及使用靶cDNA模板的扩增效率。可以针对扩增效率、检测动态范围以及检测限,在三重形式中进一步测试引物的最佳组合。

[0066] 多种可商购的试剂可用于RT-PCR,如一步法RT-PCR试剂,其包括Qiagen一步法RT-PCR试剂盒和Applied Biosystems TaqMan一步法RT-PCR预混液试剂盒。可针对各个靶标记正向引物。可通过细胞离心法(cytospinning)将富集的细胞沉积在载玻片上。此外,可在原位RT-PCR后对富集的细胞进行细胞离心法。此后,可通过荧光显微法显示荧光标记的扩增子的存在。可优化反转录的时间和PCR循环以使扩增子信号:背景的比值最大化,以获得胎儿信号超过母体信号的最大分离。在某些实施方案中,信号:背景的比值大于5、10、50或100,并且过程期间的总细胞损失低于50、10或5%。

[0067] 可用于本文所提供的核酸、抗体或基于抗体片段的探针的多种荧光分子或染料的任一种包括但不限于Alexa Fluor 350、AMCA、Alexa Fluor 488、异硫氰酸荧光素(FITC)、GFP、RFP、YFP、BFP、CFSE、CFDA-SE、DyLight 288、SpectrumGreen、Alexa Fluor 532、罗丹明、罗丹明6G、Alexa Fluor 546、Cy3染料、四甲基罗丹明(TRITC)、SpectrumOrange、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、丽丝胺罗丹明B染料、Alexa Fluor 594、德克萨斯红染料、SpectrumRed、Alexa Fluor 647、Cy5染料、Alexa Fluor 660、Cy5.5染料、Alexa Fluor 680、藻红蛋白(PE)、碘化丙啶(PI)、多甲藻黄素叶绿素蛋白(PerCP)、PE-Alexa Fluor700、PE-Cy5 (TRI-COLOR)、PE-Alexa Fluor 750、PE-Cy7、APC、APC-Cy7、Draq-5、Pacific Orange、Amine Aqua、Pacific Blue、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 514、Alexa Fluor-555、Alexa fluor-568、Alexa Fluor-610、Alexa Fluor-633、DyLight405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 594、DyLight 633、DyLight649、DyLight 680、DyLight 750或DyLight 800。

[0068] 在一个实施方案中,可使用一个或多个引物/探针组检测胎儿细胞中一个或多个基因的存在或转录物表达。例如,至少1、2、3、4、5、6或更多个引物/探针组可被用来检测胎儿细胞(例如有核胎儿红细胞)中的一个或多个基因的表达。在一个实施方案中,引物/探针组包含两个引物和一个探针以及任选的淬灭剂。在一个实施方案中,多重的引物/探针组合包含一个或多个引物/探针组。在一个实施方案中,引物/探针组或多重的引物/探针组合与样品结合用于q-PCR。在一个实施方案中,引物/探针组或多重的引物/探针组合与样品结合用于实时-PCR。在一个实施方案中,如果靶序列存在于样品,可设计多重的引物/探针组合

以便平衡用于每组的引物和探针的量,使得每个引物/探针组产生可检测的信号。在一个实施方案中,可设计最佳的退火温度和热循环特性,以便多重引物/探针的组合可在相同的反应室起作用,以检测样品中靶序列的存在。在一个实施方案中,用不同的荧光染料标记探针。可优化染料标记的探针,以便在多重反应中的来自具体的引物/探针组的每个探针标记有不同的染料,其在足以不同于其他染料标记的探针的峰值波长处发荧光,以便允许鉴定来自每组探针的荧光。在一个实施方案中,多重的引物/探针组合包含与以下的基因组DNA退火的一个或多个引物/探针组:MMP14、CD71、GPA、HLA-G、EGFR、CD36、CD34、HbF、HAE 9、FB3-2、H3-3、促红细胞生成素受体、HBE、AFP、APOC3、SERPINC1、AMBP、CPB2、ITIH1、APOH、HPX、 β -hCG、AHSG、APOB、J42-4-d、BPG、CA或TK基因。在另一个实施方案中,多重的引物/探针组合包含与以下基因所表达的RNA或以下基因所表达的RNA的cDNA退火的一个或多个引物/探针组:MMP14、CD71、GPA、HLA-G、EGFR、CD36、CD34、HbF、HAE 9、FB3-2、H3-3、促红细胞生成素受体、HBE、AFP、APOC3、SERPINC1、AMBP、CPB2、ITIH1、APOH、HPX、 β -hCG、AHSG、APOB、J42-4-d、BPG、CA或TK基因。在一个实施方案中,使用多重的引物/探针组合富集、计数、纯化、检测或鉴定有核胎儿细胞,所述多重的引物/探针组合包含与以下基因的基因组DNA、与以下基因所表达的RNA或以下基因所表达的RNA的cDNA退火的一个或多个引物/探针组:MMP14、CD71、GPA、HLA-G、EGFR、CD36、CD34、HbF、HAE9、FB3-2、H3-3、促红细胞生成素受体、HBE、AFP、APOC3、SERPINC1、AMBP、CPB2、ITIH1、APOH、HPX、 β -hCG、AHSG、APOB、J42-4-d、BPG、CA或TK基因。在另一个实施方案中,多重的引物/探针组合包含至少三个引物/探针组,它们与以下基因的基因组DNA,以下基因所表达的RNA或以下基因所表达的RNA的cDNA退火:FN1、 β -hCG或AHSG基因。

[0069] 在另一个实施方案中,至少1、2、3、4、5、6或更多个引物组可被用来检测有核胎儿细胞中一个或多个基因的存在或转录物表达。在一个实施方案中,引物组包含两条引物。在一个实施方案中,在与包含靶序列的样品进行多重反应中包括两个或更多个引物组。在一个实施方案中,如果靶序列存在于样品,可设计多重引物组合以便平衡用于每组的引物的量,使得每个引物组产生可检测的扩增产物。在一个实施方案中,可设计最佳的退火温度和热循环特性,以便多重引物组在相同的反应室中可联合起作用以扩增样品中存在的靶序列。在一个实施方案中,引物组与以下基因的基因组DNA退火:MMP14、CD71、GPA、HLA-G、EGFR、CD36、CD34、HbF、HAE 9、FB3-2、H3-3、促红细胞生成素受体、HBE、AFP、APOC3、SERPINC1、AMBP、CPB2、ITIH1、APOH、HPX、 β -hCG、AHSG、APOB、J42-4-d、BPG、CA或TK基因。在另一个实施方案中,引物组与以下基因所表达的RNA或以下基因所表达的RNA的cDNA退火:MMP14、CD71、GPA、HLA-G、EGFR、CD36、CD34、HbF、HAE 9、FB3-2、H3-3、促红细胞生成素受体、HBE、AFP、APOC3、SERPINC1、AMBP、CPB2、ITIH1、APOH、HPX、 β -hCG、AHSG、APOB、J42-4-d、BPG、CA或TK基因。在一个实施方案中,使用与以下基因的基因组DNA、以下基因所表达的RNA或以下基因所表达的RNA的cDNA退火的引物组富集、计数、纯化、检测或鉴定有核胎儿细胞:MMP14、CD71、GPA、HLA-G、EGFR、CD36、CD34、HbF、HAE 9、FB3-2、H3-3、促红细胞生成素受体、HBE、AFP、APOC3、SERPINC1、AMBP、CPB2、ITIH1、APOH、HPX、 β -hCG、AHSG、APOB、J42-4-d、BPG、CA或TK基因。

[0070] 在另一个实施方案中,至少1、2、3、4、5、6或更多个探针可被用来检测有核胎儿细胞的一个或多个基因的转录物表达。在一个实施方案中,两个或更多个探针被可检测地标

记,并且可与RNA序列结合。在一个实施方案中,两个或更多个探针可被用来检测由胎儿细胞所表达的多个RNA序列。在一个实施方案中,两个或更多个探针被用于荧光原位杂交的方法。在一个实施方案中,荧光原位杂交的方法为RNA-FISH。在一个实施方案中,探针为核酸探针。在另一个实施方案中,探针为肽核酸(PNA)。在另一个实施方案中,探针包含一个或多个修饰的核酸,如酰胺基修饰的核酸、磷酸胺修饰的核酸、硼烷磷酸酯修饰的核酸、甲基磷酸酯修饰的核酸、脱氧核糖核酸胍(DNG)修饰的核酸或吗啉代修饰的核酸。

[0071] 在一个实施方案中,用可检测的标签(如生物素或链霉亲和素)标记两个或更多个探针,可检测的标签可结合标记偶联物。在另一个实施方案中,用可将底物(如固红)转变为可检测标记的酶(如碱性磷酸酶)标记探针。在一个实施方案中,酶为碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶或葡糖氧化酶。

[0072] 在一个实施方案中,用荧光染料标记偶联物。在另一个实施方案中,通过荧光标记可检测地标记两个或更多个探针。在一个实施方案中,用相同的荧光标记标记两个或更多个探针。在一个实施方案中,用不同的荧光标记标记两个或更多个探针。可优化荧光标记的探针,以便每个探针标记有不同的标记,使其在足以不同于其他荧光标记的探针的峰值波长处发光,以便允许鉴定来自每个探针的荧光。

[0073] 在一个实施方案中,一个或多个可检测地标记的探针与以下基因所表达的RNA序列退火或与由以下基因所表达的多肽特异性地结合:MMP14、CD71、GPA、HLA-G、EGFR、CD36、CD34、HbF、HAE 9、FB3-2、H3-3、促红细胞生成素受体、HBE、AFP、APOC3、SERPINC1、AMBP、CPB2、ITIH1、APOH、HPX、 β -hCG、AHSG、APOB、J42-4-d、BPG、CA或TK基因。在一个实施方案中,使用与一个或多个以下基因所表达的RNA序列退火或与一个或多个以下基因所表达的多肽特异性地结合的一个或多个可检测地标记探针富集、计数、纯化、检测或鉴定有核胎儿细胞:MMP14、CD71、GPA、HLA-G、EGFR、CD36、CD34、HbF、HAE 9、FB3-2、H3-3、促红细胞生成素受体、HBE、AFP、APOC3、SERPINC1、AMBP、CPB2、ITIH1、APOH、HPX、 β -hCG、AHSG、APOB、J42-4-d、BPG、CA或TK基因。

[0074] 在另一个实施方案中,至少1、2、3、4、5、6或更多个抗体或基于抗体的片段可被用来检测胎儿细胞(例如fnRBC或滋养层细胞)中一个或多个蛋白的表达。

[0075] 在一个实施方案中,用可检测的标签(如生物素或链霉亲和素)标记抗体或基于抗体的片段,可检测的标签结合标记偶联物。在另一个实施方案中,用可将底物(如固红)转变为可检测标记物的酶(如碱性磷酸酶)标记抗体或基于抗体的片段。在一个实施方案中,酶为碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶或葡糖氧化酶。

[0076] 在一个实施方案中,抗体或抗体片段与胎儿细胞标志物蛋白结合。在一个实施方案中,用荧光染料标记抗体或抗体片段。在另一个实施方案中,抗体或抗体片段与标记有荧光染料的抗体或抗体片段结合。在一个实施方案中,用相同的荧光染料标记多个抗体或抗体片段。在一个实施方案中,用不同的荧光染料标记每个抗体或抗体片段。可优化染料标记的抗体或基于抗体的片段,以便每个抗体或基于抗体的片段标记有不同的染料,其在足以不同于另外的染料标记的抗体或基于抗体的片段的峰值波长处发荧光,以便允许鉴定来自每个抗体或基于抗体的片段的荧光。

[0077] 在一个实施方案中,至少1、2、3、4、5、6或更多个抗MMP14、抗CD71、抗GPA、抗CD36、抗CD34、抗HbF、抗HAE9、抗FB3-2、抗H3-3、抗促红细胞生成素受体、抗CD235a、抗碳水化合物

物、抗选择素、抗CD45、抗GPA、抗抗原-i、抗EpCAM、抗E-钙粘蛋白、抗Muc-1、抗hPL、抗CHS2、抗KISS1、抗GDF15、抗CRH、抗TFP12、抗CGB、抗LOC90625、抗FN1、抗COL1A2、抗PSG9、抗PSG1、抗HBE、抗AFP、抗APOC3、抗SERPINC1、抗AMBP、抗CPB2、抗ITIH1、抗APOH、抗HPX、抗 β -hCG、抗AHSg、抗APOB、抗J42-4-d、抗BPG、抗CA或者抗TK抗体或者基于抗体的片段被用来检测胎儿细胞的一个或多个蛋白的表达。在一个实施方案中,抗体或基于抗体的片段与胎儿细胞内的蛋白结合。在另一个实施方案中,抗体或基于抗体的片段与胎儿细胞的表面所表达的蛋白结合。

[0078] 检测特异性的基因的蛋白或转录物表达可被用来区分胎儿细胞和参照细胞(例如母体的细胞)、区分胎儿的细胞类型、鉴定胎儿细胞、纯化或富集一个或多个胎儿细胞、或者用于一个或多个胎儿细胞的计数。

[0079] 在一个实施方案中,通过RT-PCR方法,细胞类型特异性的胎儿细胞标志物可被用来鉴定胎儿的细胞类型。

[0080] 在一个实施方案中,可通过RNA FISH标记胎儿细胞。在一个实施方案中,可用分子信标标记胎儿细胞。在一个实施方案中,可通过FACS或微流体的荧光细胞分选鉴定、纯化、富集或计数标记有分子信标的胎儿细胞。

[0081] 在一个实施方案中,通过结合RT-PCR和数字PCR,可鉴定胎儿的细胞类型并且计数胎儿细胞的数量。

[0082] 在一个实施方案中,可通过与胎儿细胞标志物基因所表达的蛋白结合的抗体或基于抗体的片段标记胎儿细胞。在一个实施方案中,可通过FACS或微流体荧光细胞分选鉴定、纯化、富集或计数标记有抗体或基于抗体的片段的胎儿细胞。

[0083] 可使用本领域已知的或本文所提供的一个或多个细胞遗传学方法进行染色体分析,包括但不限于G带染色体的常规分析、其他细胞遗传学显带技术以及分子细胞遗传学,如荧光原位杂交(FISH)和比较基因组杂交(CGH)。

[0084] 在一个实施方案中,样品分析包括对来自富集胎儿细胞的样品的核酸进行一种或多种遗传分析或检测步骤。可通过本文的方法分析来自富集细胞或富集胞核的核酸包括:双链DNA、单链DNA、单链DNA发夹、DNA/RNA杂交体、RNA(例如mRNA)和RNA发夹。可对富集的细胞或核酸进行的遗传分析的实例包括,例如SNP检测、STR检测和RNA表达分析。

[0085] 在一个实施方案中,分析包括检测来自富集胎儿细胞的样品的一个或多个细胞的DNA或RNA转录物中的一个或多个突变或SNP。可使用例如DNA微阵列或RNA转录物表达阵列进行这样的检测。DNA微阵列的实例包括以下文献所展示的根据本领域已知的方法来自Affymetrix, Inc. (Santa Clara, Calif.)的可商购的DNA微阵列: Kennedy, G.C.等, *Nature Biotechnology* 21, 1233-1237, 2003; Liu, W.M., *Bioinformatics* 19, 2397-2403, 2003; Matsuzaki, H., *Genome Research* 3, 414-25, 2004和Matsuzaki, H., *Nature Methods*, 1, 109-111, 2004以及美国专利第5,445,934号; 5,744,305号; 6,261,776号; 6,291,183号; 5,799,637号; 5,945,334号; 6,346,413号; 6,399,365号和6,610,482号,以及欧洲专利第619321号; 373203号,通过引用将它们整体并入本文。在一个实施方案中,微阵列可被用来检测样品中至少5、10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000或500,000个不同的靶核酸。

[0086] 包含具有计算机可执行逻辑的计算机可读介质的计算机程序可被用来自动化基

因分型簇和召集。

[0087] 在本文的任何实施方案中,可通过测序完成来自富集稀少细胞的或富集稀少细胞核的遗传物质的基因型分型(例如SNP检测)和/或表达分析(例如RNA转录物的定量)。可通过本领域公知的经典的Sanger测序法完成测序。也可使用高通量系统完成测序,其中有些高通量系统允许在测序的核苷酸并入生长链后或当其并入生长链时立即检测测序的核苷酸,即,实时或基本上实时检测序列。在一个实施方案中,高通量测序每小时生成至少10,000、至少50,000、至少100,000、至少200,000、至少300,000、至少400,000、至少500,000、至少1,000,000或至少5,000,000个序列读取;每个读取为每个读取至少50、至少60、至少70、至少80、至少90、至少100、至少120或至少150个碱基。可使用基因组DNA或来源于RNA转录物的cDNA作为模板进行测序。在一个实施方案中,可使用高通量测序,其包括来自富集胎儿细胞的样品的单个细胞的高通量测序。在一个实施方案中,分析逆转录自胎儿或母体的细胞获得的mRNA的cDNA。cDNA的类型和丰度可被用来确定细胞是否为胎儿细胞(如通过Y染色体特异性转录物的存在)或胎儿细胞是否具有遗传畸形(如非整倍体、可选的转录物的丰度或类型或者具有DNA甲基化或印记的问题)。

[0088] 分析一个或多个细胞以确定病况或疾病的存在也可包括检测富集稀少细胞的样品中的线粒体DNA、端粒酶或核基质蛋白;检测富集样品的细胞中的核周室的存在或不存在;或进行富集样品的基因表达分析、测定核酸拷贝数、细胞内PCR或荧光原位杂交。

[0089] 在本文的任何实施方案中,靶核酸可获自单个细胞。

[0090] 在一个或多个富集细胞的分析之前,可将富集胎儿细胞的样品“分配(binned)”。分配是导致富集细胞输出的复杂性和/或总细胞数降低的任何过程。可通过本领域已知的或本文所描述的任何方法进行分配。分配富集细胞的一个方法是通过连续稀释。可使用任何适当的平台(例如PCR孔、微量滴定板)实施这样的稀释。其他方法包括将样品分离为小滴的纳米流控系统(例如BioTrove、Raindance、Fluidigm)。这样的分配可导致孔或纳米滴中存在单个细胞。当分配富集胎儿细胞的样品时,优选每个位置包括0或1个细胞。

[0091] 富集胎儿细胞方法在分配(bin)之前进行,其包括但不限于亲和结合(例如,使用凝集素,抗MMP14和/或抗CD71抗体)。例如,富集的母体血液可经过梯度离心、基于凝集素的亲和分离以及基于MMP-14的亲和分离。然后将含有大约100个细胞的该样品小份分入100个分配器(bin)(PCR孔或其他可接受的分配平台),预期每个分配器含有大约一个细胞。本领域技术人员会意识到,可根据实验设计和/或分配所使用的平台增加分配器的数量。降低分配细胞群体的复杂性可便于靶细胞的进一步遗传和细胞分析。

[0092] 在某些实施方案中,对个体分配器进行分析以证实个体分配器中的有核胎儿细胞的存在或不存在。可根据本文的教导、使用本领域已知的任何方法进行这样的分析,包括但不限于FISH、PCR、STR检测、SNP分析、生物标志物检测和序列分析。

[0093] 可基于本文的方法和系统确定的胎儿的病况包括胎儿的存在和/或胎儿的病况的存在,诸如胎儿非整倍体(例如13三体综合征,18三体综合征,21三体综合征(唐氏综合征)),克兰费尔特综合征(XXY)以及性染色体或常染色体的其他不规则数目,包括一条或多条染色体的单体性(X染色体单体性,也被称为特纳氏综合症),一条或多条染色体的三体综合征(13、18、21和X),一条或多条染色体的四体性和五体性(在人类中,其在性染色体上最常观察到,例如XXXX、XXYY、XXXY、XYYY、XXXXX、XXXXY、XXXYY、XYYYY和XXYYY),一倍性,三倍

性(每条染色体有三份,例如在人类中有69条染色体),四倍性(每条染色体有四份,例如在人类中有92条染色体),五倍性和多倍性。可使用本文的方法检测的其他胎儿病况包括部分非整倍体,如1p36复制、dup(17)(p11.2p11.2)综合征、唐氏综合征、子痫前期、早产、子宫内膜异位症、佩利措伊斯-梅茨巴赫病、dup(22)(q11.2q11.2)综合征、猫眼综合征。在一个实施方案中,希望检测出的胎儿畸形起因于性染色体或常染色体中的一个或多个缺失,包括猫叫综合征, Wolf-Hirschhorn综合征, Williams-Beuren综合征, 腓骨肌萎缩征, 易于压迫性麻痹的遗传性神经病, 史密斯-马吉林综合征, 多发性神经纤维瘤, 阿拉吉欧综合征, 软腭-心-面综合征, 迪乔治综合征, 类固醇硫酸酯酶缺乏症, 卡尔曼综合征, 线性皮肤缺损的小眼畸形, 肾上腺发育不全, 甘油激酶缺乏症, 佩利措伊斯-梅茨巴赫病, Y染色体上的睾丸决定因素, 精子缺乏(因素a)、精子缺乏(因素b)、精子缺乏(因素c)以及1p36缺失。在一个实施方案中, 胎儿畸形为染色体数目的异常降低, 如XO综合征。上述所列仅作为可使用本文所提供的方法评估的可能遗传疾病的实例。然而, 这些方法可延伸至具有已知的遗传成因的任何疾病, 其包括但不限于公共数据库中的疾病, 如OMIM。

[0094] 胎儿细胞序列或表达的鉴定

[0095] 在某些实施方案中, 本文所提供的方法还包括分析对个体细胞所测定的核酸分子的核苷酸序列数据或基因表达数据, 并且确定所述数据是指示母体的序列或基因表达还是指示胎儿的序列或基因表达。在某些这样的实施方案中, 测定所述数据指示母体或胎儿信息的概率。本申请考虑了, 甚至在进行富集方法之后, 母体的细胞很可能依然存在于富集胎儿细胞的样品中。因此, 可实施方法用于鉴定细胞为胎儿或母体来源, 或用于鉴定细胞为胎儿或母体来源的概率。本文所提供的方法允许提高鉴定细胞为胎儿来源或鉴定细胞为胎儿来源的可能性的能力, 因为以逐个单个细胞的方式进行富集胎儿细胞的样品的细胞的分析。因此, 根据本文所提供的实施方案测定序列或基因表达不是基于细胞的整体或来自多个细胞的平均信号, 而是基于多个单细胞的序列或基因表达的测量。

[0096] 在某些实施方案中, 所述方法包括分析对富集胎儿细胞的样品的两个或更多个细胞的每个的个体细胞所测定的核酸分子的核苷酸序列数据或基因表达数据。这样的方法可包括基于所测定的核苷酸序列或基因表达将每个细胞分类为属于第一细胞群体或第二细胞群体, 并且鉴定第一和第二细胞群体为胎儿或母体来源的概率。在某些这样的实施方案中, 通过将第一和第二群体的每个的核酸分子的核苷酸序列或基因的表达与已知的母体细胞的已知核酸分子的核苷酸序列或基因的表达相比较, 鉴定第一和第二细胞群体为胎儿或母体来源的概率, 其中携带与已知的母体细胞较高的核苷酸序列或基因表达相似性的细胞群体被鉴定为母体来源。

[0097] 在某些实施方案中, 通过评估第一和第二细胞群体的大小鉴定第一和第二细胞群体为胎儿或母体来源的概率, 其中较大的细胞群体被鉴定为胎儿来源。本文考虑到, 本文所提供的方法的某些实施方案产生含有胎儿细胞多于母体细胞的富集胎儿细胞的样品。因此, 在这些实施方案中, 尽管母体的细胞很可能存在于富集胎儿细胞的样品中, 但在富集胎儿细胞的样品的整体细胞群体上更共有的序列或基因表达更可能是胎儿细胞而不是母体细胞的序列或基因表达。因此, 本文所提供的方法, 虽然其可应用于单个细胞的测量, 但当其应用于多个细胞的测量时也具有增加的精确度概率。例如, 可分析至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个个体细胞的核苷酸序列信息或基因表达信息,

并且该分析的结果可提供胎儿核苷酸序列或基因表达的鉴定和/或具体的核苷酸序列或基因表达为胎儿来源的概率。

[0098] 在某些实施方案中,通过将来自这样的遗传分析的结果与来自参照样品的(例如母体的细胞)的相似分析的结果相比较作出诊断。例如,可分析富集胎儿细胞的样品,通过将来自富集胎儿细胞的样品的细胞中的序列或基因表达与已知的母体细胞(例如母体的真皮或上皮细胞)中的序列或基因表达相比较,确定一个或多个胎儿细胞的存在和/或这样的细胞中的序列或基因表达。

[0099] 在一个实施方案中,胎儿细胞中的基因的转录物或蛋白表达可被用作标志物,以富集、计数、纯化、检测或鉴定胎儿细胞,如果胎儿细胞中基因的表达高于或低于参照样品的(例如母体的细胞)。在一个实施方案中,基因可为胎儿细胞标志物,如果其表达(转录物或蛋白质的形式)的水平比参照样品的(例如母体的细胞)中基因的表达(转录物或蛋白质的形式)的水平高或低至少约10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、750%、1000%、2000%、3000%、4000%、5000%或10,000%。在一个实施方案中,与参照样品的(例如母体的细胞)相比,基因具有较高的蛋白或转录物表达的水平。在另一个实施方案中,基因可为胎儿细胞的标志物,如果胎儿细胞中基因的蛋白或转录物的表达与参照样品的(例如母体的细胞)中基因的表达相比较的比值为至少约11:10、6:5、13:10、7:5、3:2、8:5、17:10、9:5、2:1、3:1、4:1、5:1或10:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1、55:1、60:1、65:1、70:1、75:1、80:1、85:1、90:1、100:1、150:1、200:1、250:1、300:1、350:1、400:1、450:1、500:1、550:1、600:1、650:1、700:1、750:1、800:1、850:1、900:1、950:1或1000:1。在另一个实施方案中,基因可为胎儿细胞的标志物,如果胎儿细胞中基因的蛋白或转录物的表达比参照样品的(例如母体的细胞)中的转录物的表达高或低至少约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100倍。可将转录物或蛋白表达的水平对于其他转录物或蛋白的表达水平进行标准化。

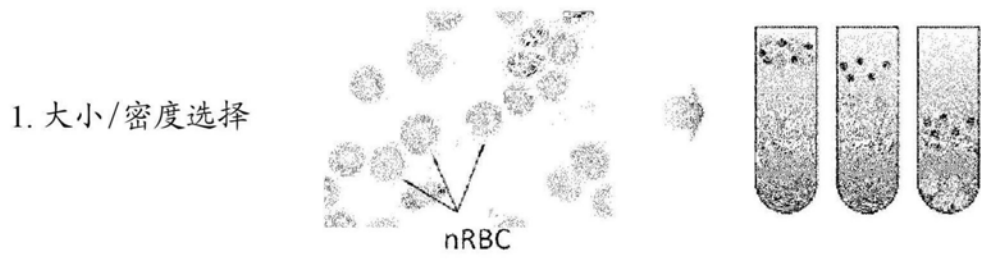
实施例

[0100] 样品获自100名孕妇,在她们怀孕的早期、中期和/或晚期获得。收集后三小时内处理血液样品。用磷酸盐缓冲溶液(PBS)以1:1稀释各个血液样品至适当的体积。将稀释的血液样品在调整至~1.09g/ml密度的密度介质上分层。室温下、以1500rpm进行密度离心30min。用冷的PBS冲洗3次后,通过在室温下再次离心10min收集单核细胞。用PBS重悬沉积物,并且如Kitagawa等,2002Prenat.Diagn 22:17-21中所描述,使用大豆凝集素(SBA)进行凝集素选择。

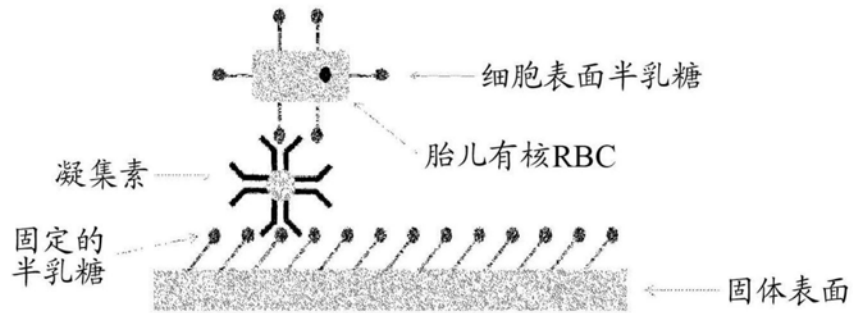
[0101] 用PBS加吐温-20重悬10mg的蛋白A/G磁珠混合物(Life Technologies Corporation),并冲洗两次。将50 μ g候选抗体(CD71和MMP14;EMD Millipore Corporation)加入至400 μ l在PBS加吐温-20中稀释的珠混合物中,在室温下孵育并旋转30min。用磁力架分离偶联有抗体的珠并且在PBS加吐温-20中冲洗3次。将凝集素选择后所分离的粗分单核细胞加入至400 μ l在PBS加吐温-20中稀释的偶联有抗体的蛋白A/G珠中,并且在室温下孵育1小时。冲洗后,将富集细胞稀释为20 μ l用于下游分析。

[0102] 为了估计富集后细胞的质量和纯度,对富集的细胞样品的一半进行上文所述的细胞遗传分析和胎儿细胞表面标志物的免疫染色。对于另一半样品,将细胞分至96-孔板的各个孔以确保每孔至多1个细胞。

[0103] 会进行3-5个单个细胞的细胞遗传学分析、转录组/基因组和DNA/RNA组成的其他分析。作为对照,从唾液样品收集母体的细胞。将单个细胞的DNA序列数据与来自母体细胞的DNA序列数据相比较,以区分胎儿的单个细胞和母体的单个细胞,以及胎儿细胞特异性遗传变异。在各个单细胞之间计算差异的RNA和蛋白表达,其将被用于鉴定新的标志物。



2. 凝集素选择



3. 基于细胞表面标志物的磁珠选择

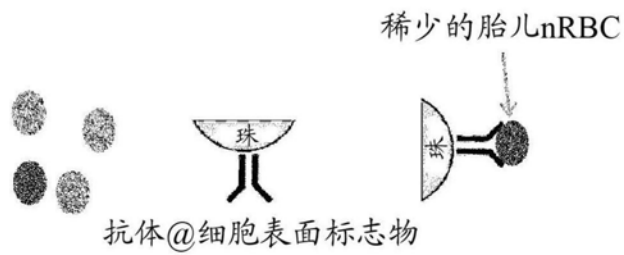


图1

细胞分析

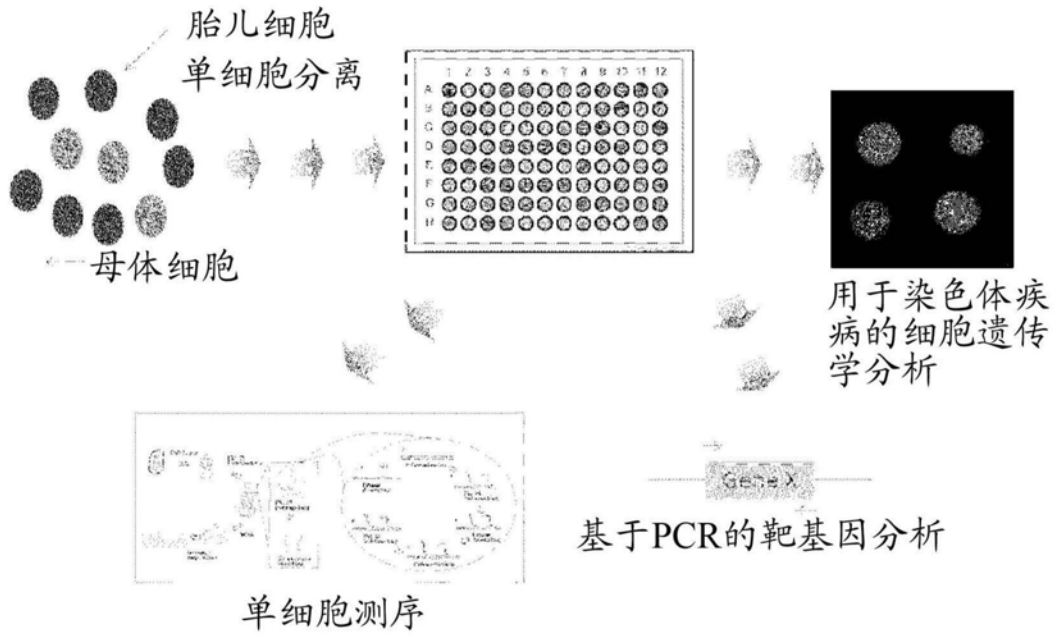


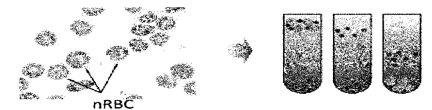
图2

专利名称(译)	使用来自母体血液的胎儿细胞捕获的胎儿诊断学		
公开(公告)号	CN105324666B	公开(公告)日	2018-07-27
申请号	CN201480027992.5	申请日	2014-05-15
[标]申请(专利权)人(译)	百世嘉(上海)医疗技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	百世嘉(上海)医疗技术有限公司		
[标]发明人	吴涵 陈帆青		
发明人	吴涵 陈帆青		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68		
CPC分类号	C12Q1/6881 G01N33/56966 G01N33/573 G01N2333/70582 G01N2333/96494		
代理人(译)	洪欣		
优先权	61/824128 2013-05-16 US		
其他公开文献	CN105324666A		
外部链接	SIPO		

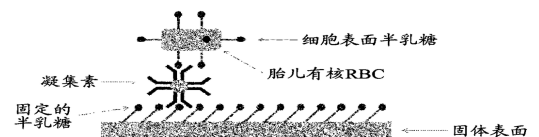
摘要(译)

提供非侵入性胎儿诊断方法。具体而言，提供从母体样品获得富集胎儿细胞的样品的方法以及评估母体样品的胎儿核苷酸序列或胎儿基因的表达的方法。

1. 大小/密度选择



2. 凝集素选择



3. 基于细胞表面标志物的磁珠选择

