



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01815354.2

[43] 公开日 2003 年 10 月 29 日

[11] 公开号 CN 1452665A

[22] 申请日 2001.7.9 [21] 申请号 01815354.2

[30] 优先权

[32] 2000. 7. 10 [33] GB [31] 0016742.9

[86] 国际申请 PCT/GB01/03092 2001.7.9

[87] 国际公布 WO02/04672 英 2002.1.17

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.7

[71] 申请人 赛姆格有限公司

地址 英国伯明翰

[72] 发明人 M·A·赫尔顿

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 刘 玥

权利要求书 3 页 说明书 19 页 附图 5 页

[54] 发明名称 在母体样品中鉴定胎儿 DNA 的诊断方法

[57] 摘要

一种在含母体 DNA 的样品, 诸如血液或阴道样品中鉴定胎儿 DNA 的方法, 所述方法包括(a)从所述样品分离 DNA, (b)使用一种酶将所述 DNA 进行核酸外切消化以去除每一种 DNA 分子的末端区域, 和(c)检测作为所述消化过程的结果的胎儿 DNA 中保留而母体 DNA 中缺少的一种 DNA 序列的存在。一旦鉴定, 胎儿 DNA 可用于诊断, 例如检测染色体/DNA 异常, 特别是包括诸如胎儿 21 三体的非整倍体。

1. 一种在含母体 DNA 的样品中鉴定胎儿 DNA 的方法，所述方法包括 (a) 从所述样品分离 DNA，(b) 使用酶将所述 DNA 进行核酸外切消化以便去除所述 DNA 的末端区域，和 (c) 检测作为所述消化过程的结果的保留在胎儿 DNA 中但母体 DNA 缺乏的一种 DNA 序列的存在。
5
2. 根据权利要求 1 的方法，其中所述含母体 DNA 的样品是血液或阴道样品。
3. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中在初步步骤中，首先从母体血浆分离细胞，然后按步骤 (a) 从这些细胞中分离 DNA。
- 10 4. 根据前面权利要求任一项的方法，其中在步骤 (b) 之前用限制性酶将来自步骤 (a) 的 DNA 切成片段。
5. 根据权利要求 4 的方法，其中在核酸外切消化之前保护 DNA 片段的切端，使得它们不易被核酸外切酶消化。
6. 根据权利要求 5 的方法，其中用于形成 DNA 片段的限制性酶是进行切割以便为保护性部分提供结合位点的酶，并且通过连接该保护性部分实现保护。
15
7. 根据权利要求 6 的方法，其中保护性部分是连接体。
8. 根据权利要求 7 的方法，其中连接体是 2' - O - 甲基核糖核苷酸 DNA 或含硫代磷酸酯键的互补寡核苷酸。
- 20 9. 根据前面任一项权利要求的方法，其中胎儿 DNA 从母体 DNA 分离。
10. 根据权利要求 9 的方法，其中通过将消化后保留在胎儿 DNA 中的端粒 DNA 序列的特异性生物素化探针杂交到所述 DNA 上并随后固定所述探针至链亲和素覆盖的载体上来分离胎儿 DNA 片段。
- 25 11. 根据权利要求 10 的方法，其中所述链亲和素覆盖的载体包括顺磁颗粒。
12. 根据前面任一项权利要求的方法，其中保留在胎儿 DNA 中的所述 DNA 序列是端粒序列或位于端粒区域近端的染色体标记。
13. 根据权利要求 12 的方法，其中保留在胎儿 DNA 中的所述 DNA
30 序列是端粒序列。
14. 根据权利要求 12 的方法，其中保留在胎儿 DNA 中的所述 DNA 序列是亚端粒多态性染色体特异性标记。

15. 根据前面任一项权利要求的方法，其中所述 DNA 序列用对所述序列特异的标记的探针检测。

16. 根据权利要求 15 的方法，其中所述标记是荧光标记。

17. 根据前面任一项权利要求的方法，其中核酸外切酶是 *Ba131*。

5 18. 根据权利要求 1 至 16 的任一项的方法，其中核酸外切消化按以下步骤实现：第一步，去除 3' 延伸 DNA；第二步，切除 3' - 5' ss 区域和第三步，消化 ss 区域。

19. 根据权利要求 18 的方法，其中第一步使用绿豆核酸酶实现。

10 20. 根据权利要求 18 或 19 的方法，其中第二步使用核酸外切酶 III 实现。

21. 根据权利要求 18 至 20 任一项的方法，其中第三步使用绿豆核酸酶实现。

22. 根据前面任一项权利要求的方法，其中样品中胎儿来源的 DNA 的数量被确定。

15 23. 根据前面任一项权利要求的方法，其中样品中的胎儿 DNA 被扩增。

24. 根据权利要求 23 的方法，其中使用聚合酶链式反应 (PCR) 进行扩增。

20 25. 根据权利要求 24 的方法，其中 PCR 用于定量测定样品中胎儿 DNA 的数量，或扩增样品进行基因分析。

26. 根据前面任一项权利要求的方法，其中对鉴定的胎儿 DNA 进行产前诊断。

27. 根据权利要求 26 的方法，其中该诊断检测染色体畸变。

25 28. 根据前面任一项权利要求的方法，其中在步骤 (c) 之前，根据大小分离 DNA。

29. 根据权利要求 25 至 27 中任一项的方法，其中用对特定染色体或 DNA 诊断区域特异的被标记引物扩增被鉴定为胎儿来源的分离的 DNA。

30 30. 根据权利要求 29 的方法，其中所述第二引物携带一个荧光标记。

31. 根据权利要求 25 或 26 的方法，其中使用荧光标记的引物扩增胎儿 DNA，并且被扩增序列对一种染色体或 DNA 状况有诊断意义。

32. 根据权利要求 31 的方法, 其中所述引物扩增对染色体 18、21、13、X 或 Y 特异的一种序列。

33. 根据权利要求 25 的方法, 它用于诊断母体状况。

5 34. 根据权利要求 33 的方法, 其中该状况是先兆子痫, 预测早产的风险, 和以后发生自身免疫病的危险。

35. 一种在母体血液或阴道样品中鉴定胎儿 DNA 的试剂盒, 所述试剂盒包含从血液或阴道样品中提取 DNA 的工具, 一种能消化 DNA 的核酸外切酶, 和一种适于检测位于 DNA 末端区域的特异性 DNA 序列的被标记引物。

10 36. 根据权利要求 35 的试剂盒, 它进一步包含一种限制性酶, 它切割 DNA 以便在 DNA 上产生连接体的结合位点, 该连接体适于保护 DNA 片段的切端免受酶消化。

37. 根据权利要求 34 或 35 的试剂盒, 它进一步包含适于保护 DNA 片段的切端免受酶消化的连接体。

15 38. 根据权利要求 34 至 37 的任一项的试剂盒, 它进一步包含一个生物素化的端粒探针。

39. 根据权利要求 38 的试剂盒, 它进一步包含链亲和素包被的顺磁颗粒。

20 40. 根据权利要求 34 至 39 的任一项的试剂盒, 它包含诊断一种染色体状况的被标记引物。

41. 一种基本上如前文所描述的在含母体 DNA 的样品中鉴定胎儿 DNA 的方法。

42. 一种基本上如前文所描述的在含母体 DNA 的样品中鉴定胎儿 DNA 的试剂盒。

在母体样品中鉴定胎儿 DNA 的诊断方法

本发明涉及一种在诸如血液或阴道样品的母体样品中鉴定胎儿 DNA 的方法。用这种方法鉴定的胎儿 DNA 然后可以用于，例如产前诊断。

染色体疾病是人类最常见的基因疾病。组成型 (constitutional) 染色体疾病发生率在妊娠第一个三月期占流产相关致死率的 50% 以上，占宫内或围产期死亡率的大约 5%。另外至少 0.5% 的活产儿童有与智力和/或体格障碍相关的组成型染色体异常。

染色体异常可以是数量上的或结构上的。数量异常指体细胞组织中正常二倍体 46 条染色体数目的改变，包括三体 (一条额外的染色体)，单体 (一条染色体缺失) 和多倍体 (整套额外的染色体)。由染色体断裂及随后断裂的染色体末端在异常的位置愈合导致结构重排，包括所谓的易位、倒位和插入。结构染色体重排可以以平衡方式发生，在这种情况下基因物质通常保持如常。

平衡的结构染色体重排的携带者体格和智力是正常的但可能遇到生殖问题，生育力下降的危险提高和染色体不平衡后代的危险提高，导致流产，宫内或围产期死亡和/或体格和/或智力障碍的活产儿童。

在人群中作为一个整体发生的最常见的染色体异常是与唐氏综合征相关的 21 三体。普遍被接受的是大约 1/650 活产儿童有 21 三体唐氏综合征，其特点是或多或少的严重精神运动发育迟缓。在世界范围内不同国家之间 21 三体唐氏综合征的发生率没有本质差别。

儿童和成人中 21 三体唐氏综合征的诊断通常通过血淋巴细胞体外培养之后的染色体分析进行。细胞培养过程需要 2-3 天以便足够的细胞集中在细胞周期的中期阶段，该时期染色体足够浓缩能够用标准染色体显带技术鉴定单个染色体。

唯一清楚证明的产生具有规律的 21 三体唐氏综合征儿童的临床危险因素涉及母亲年龄。因此通常接受的是随母亲年龄增长生产 21 三体儿童的危险增高，其中在 45 岁以上的最高年龄组中可能超过怀孕者的 10%。这种状况导致对妊娠妇女实行加强的筛查方案以鉴定那些最可能具有 21 三体儿童的妇女。这些筛查方案包括分析母体血液样品的生

化特征和胎儿超声，目的是特别观察颈部皮下聚积的液体，它在唐氏综合征和其他一些常见的非整倍体胎儿中特征性地增加。

另外超过一定年龄的妊娠妇女，通常 35 岁，常规被提供有创操作（绒毛取样和/或羊膜穿刺术）以允许进行胎儿细胞取样用于染色体分析。目前最常见的染色体病产前诊断方法涉及羊水样品体外培养之后的核型分析。这包括显微镜分析染色体足够浓缩的有丝分裂细胞。细胞培养大约需 1-3 周，诊断的长期拖延被认识到与相当大的父母焦虑相关。

可选择的更迅速的产前染色体诊断技术包括（1）来自未培养的羊水样品的静止（间期）细胞核的荧光原位杂交（FISH），和（2）DNA 诊断，使用分离自羊水样品的 DNA，通过例如聚合酶链式反应（PCR）扩增，并且通过 Q-PCR 技术对染色体特异性引物定量。

用于染色体疾病产前诊断的这两种可选择的技术，使用羊水样品，可能意味着在样品到达实验室的当天或第二天报告就可以迅速完成。到目前为止它们局限于最常见的染色体异常的快速诊断，即那些包括 21、13、18 三体 and 性染色体非整倍体的染色体异常。

无论如何，诸如羊膜腔穿刺术、绒毛膜取样和对于母亲来说不舒适的有创性检查方法，与大约 1-1.5% 的流产率增加有关。因此有必要提供不需要采取这种有创取样方法即可开展产前诊断的更有效的方法。

应用创伤性更小的方法从怀孕母亲获得的样品通常包含很大部分的母体细胞，胎儿细胞数量相对少，数量级为 1/10000 到 1/1 千万。目前胎儿细胞分离的方法包括使用抗体、梯度分离，优选母体细胞溶解，磁激活细胞分类术（MACS），用磁力进行铁磁流体悬浮，单个细胞的显微操作，带电流体分离和荧光激活细胞分类术（FACS）。然而，母体细胞仍比任何回收的胎儿细胞占优势。另外，这些技术中的许多是费时和劳动密集型的。

最近认识到母体血液样品，特别是血浆或血清含相对大量的胎儿 DNA（Lo et al., Lancet 1997, 350, 485-487, W098/39474）。已进一步显示这种胎儿 DNA，在通过诸如 PCR 的技术进行体外扩增之后，可以通过胎儿特异性序列鉴定。这种技术已被应用于一些情况下通过 Y 染色体特异性引物进行胎儿性别诊断，和诸如血红蛋白病的其产前诊断

基于胎儿 DNA 特异性突变的其他情况。

另外已显示使用上文示例的胎儿特异性引物诸如 21 三体的胎儿染色体异常与母体血清/血浆中相比正常情况升高的胎儿 DNA 有关。另外诸如先兆子痫、早产和产后发生自身免疫病的妊娠并发症，可能也以增加的胎儿母体输血、导致母体血液中胎儿细胞水平更高为特征（综述见 Pertl and Bianchi *Semin Perinatol* 23, 5, 393-402, 1999; Bianchi *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 92, 1, 103-82000）。

已有结论，通过胎儿特异性 DNA 引物（例如男胎儿的 Y 染色体特异性引物）确定的胎儿 DNA 数量可以作为检测胎儿染色体非整倍体危险增加的妊娠的筛查方法。然而最重要的是，尚不能通过所述方法诊断胎儿非整倍体本身。因而这些方法来衡量胎儿 DNA 的差别，以确定胎儿是否正常或为非整倍体不够灵敏。这些测试结果种类的例子显示于下文中的图 1。在图 1a 中，胎儿正常，有两个峰相应于母体等位基因。其中一个 (M2) 比另一个 (M1) 大并且有额外量的起源于胎儿 DNA (F) 的 DNA。它的大小与源于父本来源 (F-Pat) 的胎儿等位基因的峰一样。

在图 1b 中，胎儿有 21 三体，在每一个母体等位基因 M1 和 M2 上有一拷贝 F，加上一拷贝父本来源 (F-Pat)。与图 (a) 所示正常情况相比，这会降低等位基因 M1 和 M2 之间的荧光差异。在图 1c 中，胎儿有 21 三体，在母体等位基因 M2 上有两拷贝 F，加上一拷贝父本来源 (F-Pat)。与图 1a 所示正常情况相比，这增加了等位基因 M1 和 M2 之间的荧光差异。最后在图 1d 中，胎儿有 21 三体，含两拷贝父本来源 F-Pat。这不造成母体等位基因 M1 和 M2 之间的荧光差异，但父本等位基因的荧光加倍。这样的结果很难解释，并且就我们所了解的，尚无公开的病例以此种方法，使用母体血液或阴道样品进行 21 三体(或任何其他非整倍体) 的产前诊断。

因此迫切需要新方法以在含母体 DNA 的样品，诸如血液或阴道样品中鉴定胎儿 DNA，包括无创性的产前诊断新方法。

公知组成重复 DNA 序列的位于染色体末端的端粒变化多样，以至年轻人比年纪大的人重复数量更高。DNA 复制被认为不发生在端粒重复的最末端。这意味着每次细胞分裂，端粒变得比以前更短。这种缩短也被认为最终导致细胞死亡。

所有人类染色体的端粒包含同样的 DNA 核心重复 TTAGGG。随个体年龄增加的端粒长度变化是在所有染色体中观察到的普遍现象。根据个体的年龄，估测端粒重复长度的变化数量级在 4 - 200Kb DNA。

可以使用特殊软件和显微图象分析与端粒探针或商业可获得的肽核酸探针 (PNA, DAKO Ltd) 杂交的染色体来测量染色体特异性端粒长度。这些研究指出在每个细胞核之间可能存在个体染色体端粒成分的差异。然而，正如已经提及的，随受试者年龄的增长端粒长度有显著缩短。

在此基础上，胎儿细胞中各个染色体的端粒长度应当比新生儿长，比成人的更长。因此这意味着胎儿细胞比来自母体的细胞具有更长的端粒，即每一染色体具有更高拷贝数量的端粒 DNA 重复 (Butler et al., Cancer Genetics and Cytogenetics 105, 138-144, 1998; Kreji and Koch, Chromosoma 107, 198-203, 1998)。

申请者已发现这一特征可作为鉴别母体和胎儿 DNA 的基础，特别是出现在含母体 DNA 的样品，诸如血液 (包括血浆或血清) 或阴道样品中的 DNA。

因此根据本发明，提供了一种在含母体 DNA 的样品中鉴定胎儿 DNA 的方法，所述方法包含 (a) 从所述样品中分离 DNA，(b) 使用一种酶对所述 DNA 进行核酸外切消化以便去掉所述 DNA 的末端区域，和 (c) 检测作为所述消化过程结果的胎儿 DNA 中保留但母体 DNA 缺少的 DNA 序列的存在。

步骤 (a) 和 (b) 可以按任何顺序进行。例如，首先将 DNA 从细胞中分离，然后按照步骤 (b) 进行酶消化。然而，作为选择，消化可以直接在细胞中进行，并且通过诸如 PCR 扩增的方法分离被消化的 DNA，此后用于步骤 (c) 的分析。

含母体 DNA 的合适样品是血液或阴道样品。优选使用母体血液样品进行此方法。此处所用的“血液样品”的表述包括全血，或由其来源的血清或血浆。

在一种特别的优选实施方案中，首先从母体血浆分离细胞，并按此程序的步骤 (a) 从中提取 DNA，或如果合适的话在步骤 (b) 的过程中或之后进行。这种 DNA 扩增的例子，在只能获得少量材料时有利，对其描述见于例如 Findlay et al Mol Pathol 51(3), 164-

167,1998,Klein et al Proc Natl Acad Sci USA 96(8),4494-4499,1999.

然而可能存在这样的病例，其中本发明被方便地用于其他产前样品类型的分析，例如羊水。通常羊水样品含相对少的母体 DNA，鉴定胎儿 DNA 不困难。然而在某些情况，样品被母体血液污染，并且当例如用 Q-PCR 方法分析时产生复杂的荧光模式。使用本方法作为从这样的样品分离胎儿 DNA 的初步步骤可能有用。

可以使用传统方法从样品分离 DNA。优选采用使长 DNA 片段分离的技术。这种方法的一个例子是使用琼脂糖栓 (agarose plug)，描述于 Heiskanen et al., Biotechniques 17, 5, 928-929; 9320933, 1994.

在一种实施方案中，在步骤 (b) 之前将来自步骤 (a) 的 DNA 用限制性酶切成片段。这样核酸外切消化去掉了 DNA 片段的末端区域(见下文中的图 2)。[然而，并不总需要这样，特别是从血浆分离的细胞自身直接进行核酸外切消化，并且在分析前将产生的 DNA 进行 PCR 扩增。]

在一种特别优选的实施方案中，在核酸外切消化之前，保护 DNA 片段的末端使得它们不易被诸如 Ba131 的核酸外切酶消化。这将意味着来源于 DNA 末端区域的片段的消化将会是单向的，从端粒区向内。近端和来源于 DNA 内部区域的片段会受保护不被消化。结果是消化只会发生在端粒区(见下文中的图 3)。

适当的是，用于形成 DNA 片段的限制性酶是进行切割以便为诸如连接体 (adaptor) 的保护性部分提供结合位点的酶。然后保护可以通过适当的连接体的连接实现。适当的连接体可以是 2' - O-甲基 - 核糖核苷酸 DNA (Mukai et al. Nucleic Acid Research Symposium Series 19, 1998) 或包含硫代磷酸酯键的互补寡核苷酸。

可以在步骤 (c) 中检测到的胎儿 DNA 中保留的适当的 DNA 序列是端粒序列或位于端粒区域近端的染色体标记，并且最优选是亚端粒序列 (subtelomeric sequence)，特别是对特异染色体独特的序列。

步骤 (c) 中的检测可以通过任何已知技术实现。然而在一种优选实施方案中，使用磁分离技术分离和纯化胎儿 DNA。可以通过它实现的一种特别方法包括使用生物素化的引物作为端粒特异性探针。引物杂交将意味着胎儿 DNA 会具有一个能够使用链亲和素包被的顺磁颗粒

(PMPS) 或珠子进行磁力分离的生物素标记 (例如见图 4)。

在本发明方法的内容中, 经常有引物被用作探针的情况。对于本领域技术人员来讲这很清楚。因此本文所用的名词“引物”应被理解为除了指用作扩增反应的传统引物的序列, 还指可能具有探针功能的序列。

一旦按这种方式分离, 可以对 DNA 片段分析。如果需要, 可以首先对它们进行扩增。按这种方式获得的纯的扩增的胎儿 DNA 在无创产前基因分析和诊断方面可以具有广泛应用。可以特别优选开展定量分析, 例如使用荧光 Q-PCR 方法, 例如通过应用生物系统 DNA 测序仪 (Applied Biosystems DNA sequencers) 和 Genescan 软件, 和高温测序 (Pyrosequencing) 和其他这样的包括微阵列 (Microarrays) 的方法。这些方法中的许多现在已经变成全自动化的。

在实行中, 本发明使用胎儿和母体 DNA 端粒重复数量的差异作为在含母体 DNA 的样品中鉴定胎儿 DNA 的基础。在步骤 (b) 过程中, 优选为片段形式, 最优选为长片段的 DNA 被消化, 优选在切端保护之后从片段的端粒末端区域向内单向性地消化。

存在于样品中的所有染色体的端粒区域在此过程中首先被消化。核酸外切消化可以进行足够长时间以去掉至少所有的母体端粒 DNA 序列。

如果消化在此点停止, 一些胎儿 DNA 片段会保留一些端粒 DNA (图 3a)。然后使用例如对引物端粒 DNA 特异性的, 因此只与胎儿 DNA 杂交的被标记引物检测这种 DNA。

然而可以继续消化以便去除母体 DNA 所有片段的亚端粒 DNA 序列 (图 3b)。在这种情况下, 因为更长的胎儿端粒消化费时更长, 一些染色体特异性 DNA 会保留在胎儿 DNA 片段的相应位点, 并且因此是可以检测的, 例如使用该 DNA 的引物并因此用作标记物。在这些情况下, 引物不会与母体 DNA 杂交。

优选地, 检测中使用的引物用诸如荧光标记物的可见标记物标记。

当步骤 (c) 中检测的序列是染色体标记时, 它可能优选是亚端粒多态性染色体标记, 因为这使标记物本身易于在产前诊断中有用的可能性增加。

无论如何，胎儿 DNA 的鉴定可以被用作鉴定的 DNA 的产前诊断的初步步骤。

5 在一个特别的可供选择的实施方案中，用端粒和/或亚端粒序列等所述 DNA 序列的特异性第一标记 (first labelled) 的 DNA 引物对消化后样品中存在的 DNA 进行扩增。最优选第一引物用可视标记特别是荧光标记物标记，并检测来自扩增样品的荧光。

10 进行核酸外切消化的适当的酶包括 Ba131。可以优选使用仅消化 DNA 特定区域的酶，以确保更可控制的消化过程。具体地，消化按三步骤过程进行，其中，第一步，去除 3' 延伸 DNA (extension DNA)；第二步，切除 3' - 5' ss 区域；第三步，消化 ss 区域。实现第一和第三步的适当的酶包括绿豆核酸酶，对于第二步，合适的酶包括核酸外切酶 III。

15 需要诸如酶浓度、缓冲系统、温度和孵育时间的条件以便提供可靠的消化来允许区分母体和胎儿 DNA，需要仔细选择并依赖于诸如正使用的特定的酶等因子。

作为不同 DNA 末端之间端粒 DNA 序列重复数量变异的结果，首先需要“校准”酶系统，优选以染色体特异性方式。可能通过分析在各种条件下分离 DNA 的核酸外切端粒消化的结果实现这种类型的校准。

20 校准特定酶系统的另一种方式是获得母体和胎儿组织样品中每个单独的染色体末端端粒长度的基本信息。这可以通过在细胞周期的中期对端粒 DNA 序列使用荧光原位杂交 (FISH) 完成。在这个阶段使用端粒特异性探针结合亚端粒 DNA 探针进行 FISH，每个染色体末端的各个端粒可以被加亮突出。端粒序列的测量可以通过显微图像分析术进行，例如使用比较性基因组杂交 (Comparative Genomic
25 Hybridisation) (CGH) 软件程序。

也可以使用来自接受脐带穿刺术的胎儿的血液样品和分娩时获得的脐带血样品，目的是获得关于母体和胎儿组织样品中每个染色体臂的端粒 DNA 序列长度的正常变异的其他基本信息。

30 从母体 DNA 去除亚端粒标记需要的酶浓度和暴露时间条件可以用类似方式确定。在这种情况下，可以使用例如聚合酶链式反应 (PCR) 对 DNA 产物的亚端粒标记物进行扩增，以区分组成型母体染色体等位基因和胎儿 DNA 等位基因。此实验将提供在相应的酶消化条件下亚端

粒 DNA 序列去除速率的基本信息。

优选的亚端粒标记包括，例如小串连重复 (STR) 或微卫星。为此目的，它们可以是或可以不是多态性标记，因为它们仅用于测定被核酸外切消化时它们的消失率和鉴别组成型母亲和胎儿 DNA。

5 然而如果该分析接着被用于产前诊断可以优选多态性诊断标记物。21 号染色体特异性多态四核苷酸重复标记物的例子是 D21S11, D21S1412, S21S1411 和 D21S1414。双核苷酸重复 IFNAR 也显示出简单的扩增模式，与大多数其他可能与扫描残迹条带 (stutter band) 相关的更小的重复标记物不同。多态标记物的其他例子包括单
10 核苷酸多态性 (SNPs)，它在人类基因组中发生频率很高，并且目前被确认的数目正在增加。

在这种情况下，胎儿标记物浓度可以随后确定，例如使用诸如 TAQMAN™ 的定量 PCR 方法。只有当某种 DNA 序列在胎儿和母体之间的数量不同时，此信息可以在胎儿状况的产前诊断中 useful。使用母体血液样品进行常见胎儿状况，包括非整倍体，例如 21 三体唐氏综合征的
15 无创产前诊断，需要对染色体独特性胎儿 DNA 数量进行可靠的定量测定。

在一种优选选择中被关注的亚端粒标记物应定位在每一个染色体臂上的染色体独特性 DNA 序列中尽可能远端的地方。分别根据研究人
20 群中位置和多态性程度，预先选定每一个染色体末端的标记物。

适当的是选择的 DNA 标记策略上位于亚端粒染色体位置，包含染色体特异性独特 DNA。因为两个原因优选这些位置。

首先，位于端粒附近但也包含独特的染色体特异性 DNA 的标记物，将促进消化过程，因为与选择性去除母体更近端，中间
25 (interstitial) DNA 所需的相比，它只需要有限的核酸外切消化。当进行上文所述的单方向消化时这会特别有用。

第二，多态亚端粒染色体/DNA 标记物的使用将不仅允许定量测定染色体数量畸变 (例如三体)，也允许定量测定不平衡的染色体结构重排，例如不平衡易位。不平衡易位可以被鉴别为一种亚端粒标记物
30 剂量重复同时另一种亚端粒标记物剂量缺失，这取决于哪种染色体进行了易位。另外，其他相对常见的染色体畸变按这种方式应该可以鉴定。这些包括额外的标记染色体，例如胎儿等臂 12p (iso 12p)，或

等臂 18p (iso 18p), 二者都与严重的胎儿畸形相关, 这可能导致与正常情况相比额外的双倍剂量。

5 可能需要特殊的核酸外切程序用于额外染色体标记物的诊断, 例如 15 逆向重复, 因为这包括两个额外剂量的 15p 端粒 DNA 序列。这样的端粒序列重复自身对于胎儿发育是无害的, 然而也包括 15 号染色体特异性 DNA、位于 q 臂近端部分的标记物与胎儿精神运动发育迟缓相关, 这可以是严重的。

10 通过适当选择用于产前胎儿诊断的亚端粒标记物, 导致胎儿发育障碍的大多数染色体异常可以通过此方法确定。使用此方法, 单独采用亚端粒 DNA 标记物不能检测的仅有的染色体异常是预料不到并且因此确切位置不能被确定的更近端的 (中间) 缺失和重复。此方法也需要特殊修改以诊断因为父母中的每一个都是携带者而预料到的特定缺失和重复。

15 一旦使用本发明的方法鉴定, 胎儿 DNA 可以被用于产前诊断, 例如确定诸如非整倍体、唐氏综合征、Edward 综合症或先天性睾丸发育不全症 (Klinefelter 综合征) 的染色体畸变的存在或其他诸如胎儿性别的信息。

20 适当的是, 在分析前分离 DNA, 例如使用磁分离方法。具体地, 使用诸如特异性生物素化引物的标记引物扩增 DNA。如果说在此处使用一种端粒引物, 那么只有含端粒的, 即胎儿 DNA 片段会被测量和标记, 前提是所有相应的母体 DNA 在消化过程中已被去掉。

然后可以使用例如链亲和素包被的顺磁颗粒或珠子捕获所述 DNA 片段。在从上清液中分离磁性颗粒后, 通过洗脱颗粒可以释放靶 DNA (图 4)。

25 一旦分离, 可以在引物扩增样品内 DNA 的条件下用特异于特定染色体或 DNA 诊断区的被标记引物扩增所述 DNA。在被鉴定为胎儿来源的 DNA 中检测这一引物将因此提供有关胎儿的信息。根据特定的诊断目的, 如果第二引物对染色体 18、21 或 13, 或 X 或 Y 染色体特异, 这可能有用。这些染色体的染色体数目异常 (非整倍体) 是最常见的。

30 在本发明一个特别优选的实施方案中, 从母体血液样品, 例如从母体血浆中的细胞分离 DNA, 用限制性酶切成片段, 然后连接到连接体上。将修饰片段用诸如 Ba131 的核酸外切酶孵育足够长的时间以完全

消化母体端粒，但保留一些胎儿端粒 DNA。含端粒（胎儿）的 DNA 片段的进一步纯化可以通过使用生物素化的端粒探针或用作探针的端粒引物和链亲和素顺磁颗粒（PMPS）的磁分离实现（图 4）。

然后将分离的含端粒（胎儿）DNA 片段用诸如 PCR 的方法扩增，使用染色体特异性引物。然后可以使用诸如 Q-PCR 的荧光方法进行分析，例如使用 DNA 测序仪和 Genescan 软件（Applied Biosystems），实时 PCR 或高温测序。

另外，使用本发明的方法可获得的信息，特别是有关母体样品中胎儿 DNA 浓度数量的信息，可能在产前筛查/诊断和一些母体状态的诊断中 10 有用。这包括诸如先兆子痛的妊娠并发症，预测早产和以后以后发生自身免疫病的风险。

根据本发明另一方面，提供在含母体 DNA 的样品中鉴定胎儿 DNA 的试剂盒，所述试剂盒包含从含 DNA 的样品中分离 DNA 的工具，一种能够消化 DNA 末端区域的核酸外切酶，和一种检测位于 DNA 末端区域的 15 特异性 DNA 序列的被标记引物。

试剂盒可以包含一种或更多进一步实现上述方法需要的试剂或商品。特别是，试剂盒可能进一步包含限制性酶，它切割 DNA 以便在 DNA 上产生一个连接体的结合位点，以及适于保护 DNA 片段的末端免受酶消化的连接体。

取决于测定进行的方式，也可以包含生物素化的引物和特别是生物素化的端粒引物和链亲和素顺磁颗粒。

其他可能的试剂盒成分包括一种或更多其他的被标记引物，例如一种不同的荧光标记的引物，它诊断一种染色体状况。

现在通过实施例并参考附录图解具体解释本发明，其中：

25 图 1 显示从母体血液提取的 DNA 的 Genescan 分析的比较性实例，（a）中胎儿是正常的，（b）、（c）和（d）中胎儿有 21 三体，这些用上文方法开展。

图 2 用图解说明诸如 Ba131 对 DNA 片段的核酸外切消化，其中片段两端均被消化：尽管母体序列（M）中端粒序列比胎儿序列（F）中 30 少并因此允许鉴定胎儿 DNA，如果位置如图所示，区别 M 和 F 荧光标记物信号是不可能的。

图 3 用图解说明使用符合本发明优选实施方案的连接体对 DNA 片

段的单向核酸外切消化；以致在最佳时程，酶会去除所有的 M 端粒序列（图 3a）和 M 荧光标记信号（图 3b）。通过选择性保留 F 荧光信号，在进行 DNA 扩增，例如 Q-PCR 之后允许计数关注的 F 染色体，这样的系统将允许 M 和 F 片段的区分；和图 4 用图解说明使用生物素化的端粒探针进行胎儿 DNA 的磁纯化。

实施例 1

步骤 1

DNA 提取

各取 5ml 母体血液，放入两个试管中，其中一个试管含 EDTA。血液样品在 3000g 下离心，分别从含和不含 EDTA 的试管中小心取出血浆和血清放入干净试管。在 3000g 条件下再次将血浆和血清离心并将上清液转移到干净试管。

根据制造商的推荐，采用来自 Qiagen 的 QIAamp 血液试剂盒从血浆和血清样品中提取 DNA。

步骤 2

限制性酶消化以提供连接体附着位点

使用标准的限制性酶消化方案用诸如 Not1 的酶消化提取的 DNA。

步骤 3

连接 DNA 模板和连接体以保护 DNA 片段的近端不受核酸外切酶的消化（例如 Ba1 31）

这一方法涉及使用 Ba1 31 核酸酶造成单向 DNA 缺失（Mukai S., Shibahara S., Morisawa H. Nucleic Acids Research Symposium Series no. 19, 1998）。原理建立在 7bp 的 2'-O-甲基核糖核苷酸-DNA 嵌合连接体形成更大的稳定性这一事实基础上并且也因为位阻阻止核酸酶攻击作用。因此，连接到 DNA 片段上的 Not1 位点将允许仅从一端消化。

DNA 和连接体以及连接酶和缓冲液在 15℃ 孵育过夜。

步骤 4

用诸如 Ba1 31 的核酸外切酶消化连接的 DNA 模板和连接体

30℃ 下 20 分钟时间每微克 DNA 使用 1 单位 Ba1 31 产生单一梯度的缺失（1kb）。通过加入 EDTA 使终浓度达 50mM. 中止反应（图 3）。用乙醇沉淀 DNA，从 Ba1 31 反应物中去除高浓度 NaCl。针对每个染色

体计数优化浓度和/或暴露时间变异。在最佳条件下所有母体端粒序列将被消化，而一些胎儿端粒 DNA 序列会保留（图 3a）。这允许鉴别母体和胎儿 DNA 片段本身。

5 延长的消化将去除对应于染色体特异性引物位点的 DNA 序列（图 3b），这将允许 Q-PCR 之后胎儿 DNA 的阳性鉴定和相应染色体的计数。

步骤 5

使用生物素化端粒探针进行胎儿 DNA 的磁纯化

10 通过在 65℃ 加热 DNA 10 分钟，在溶液中杂交 DNA 片段和生物素化的端粒 DNA 引物，加入生物素化的引物，使溶液在室温下冷却。然后用 0.5x SSC 洗涤链亲和素磁颗粒（SA-PMP）。加入退火的 DNA 片段和生物素化的端粒引物，在室温下孵育 10 分钟。使用磁台（magnetic stand）捕获与生物素化引物结合的 SA-PMPs，小心去掉上清液。用 0.1x SSC 洗涤颗粒 4 次。通过在去离子水中再悬浮最终的 SA-PMP 颗粒洗脱端粒阳性（胎儿）片段。

15 步骤 6

使用染色体特异性多态标记物的 Q-PCR

使用如我们的出版物 Verma et al., The Lancet 352, 9-12, 1998 描述的标准方法进行定量 PCR。

20 实施例 2

下文中的示意图 1 说明了使用本发明的方法进行分析的流程。

步骤 1

在珀可梯度中制备血液样品

25 在珀可（Percoll）梯度中制备血液样品并去除血浆。使用标准方案改进的不连续珀可梯度通过离心回收血浆细胞（见例如 Van Wijke et al. Clinical Chemistry 46, 5, 729-731, 2000）

具体地，在每个试管中制备溶于 PBS 中的各 3ml 40%、45% 和 50% 珀可溶液（Amersham Pharmacia）。3ml EDTA 血液和 3ml PBS 在 15ml 聚苯乙烯试管中混合（Sarstedt, Roher 15ml 试管，目录号 30 62553042）。使用连接到 5ml 注射器的小管（B. Braun, Filter Straw 目录号 415020）注入 3ml 40% 珀可作为底层。将小管尖端穿过血液放置在试管底部并缓慢注入珀可溶液。使用同一小管，分别用 45% 和 50%

%珀可重复铺底层过程两次。在每种情况下，将小管尖端放置在试管底部并且小心注射以免扰乱梯度。

通常按这种方式对每一测试样品准备 3-4 个试管。然后将准备的试管在 18-20℃ 500g 下离心 30 分钟（不使用离心机）。

- 5 之后，取出试管，取出血浆（顶）层，放入干净试管。来自不同试管的同一样品的血浆可以加在一起以确保每管中大约有 6ml 液体。然后在 500g 下再离心 20 分钟，这次使用离心机。将产生的细胞沉淀用 6ml PBS 洗涤几次。

步骤 2

10 提取高分子量 DNA

- 在 PBVS 中再悬浮血浆细胞¹达 2×10^5 细胞/ $50\mu\text{l}^2$ 。将等量的琼脂糖溶液（1.9% NuSieve GTG）加入至细胞悬液—含 1×10^5 细胞。 $50\mu\text{l}$ 分配到模子中并允许调定。然后在 50℃ 下用 0.5M EDTA, PH 8.0, 1% N-Laurylsarcosine, 2mg/ml 蛋白酶 K 处理琼脂糖栓 24-72
- 15 小时（尽管 O/N 孵育可能已经足以进行我们下游的应用）。这一处理消化细胞膜，允许以后步骤中酶穿通。然后在水中洗涤琼脂糖栓，在 50℃ 下用 PMSF（一种蛋白酶抑制剂）孵育以完全灭活任何存留的进行酶处理的蛋白酶 K。然后洗涤琼脂糖栓并储存在 4℃。

注：

- 20 1. 3ml 血液含约 2×10^3 血浆细胞
2. 1×10^5 细胞 = $1\mu\text{l}$ DNA

用酚：氯仿（1:1）提取血浆 DNA，乙醇沉淀，用 70%乙醇洗涤两次并小心地再悬浮在水中。

步骤 3

25 连接抗核酸酶的连接体

- 如果连接体的连接不必要，此过程可省略，因为这是受存在于琼脂糖栓中的 DNA 影响的唯一步骤。Ba131 消化和 PCR 反应都不会受琼脂糖栓影响。方案允许琼脂糖被消化成醇可溶性寡糖，这使 DNA 在不被损害或剪切的情况下更易处理。融化琼脂糖栓，加入等体积 50x 缓冲液和 1U β -琼脂糖酶，在 45℃ 下孵育 60 分钟。剩下的寡糖和 β -琼脂糖酶不影响随后的酶反应。
- 30

为了连接体的连接必须用一种少见的切割物 (cutter) 切割 DNA, 例如在人类基因组内分别每隔 670kb 和 310kb 切割的 Asc I 或 Not I。这将产生适合连接体连接的末端, 必须检查端粒和标记物之间的限制性位点以确保这些酶不在此区域内切割。

5 在 100 μ l 1x 限制性缓冲液中用 10U 酶平衡琼脂糖栓, 孵育 2 小时, 然后用水漂洗。

含硫代磷酸酯键的互补的寡核苷酸将被退火产生抗核酸酶消化的连接体。它们也将包含与用于切割 DNA 样品的限制性内切酶互补的粘性末端。通过加入 1x 连接缓冲液, 5U 连接酶并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时来连接连接体。

步骤 4

Ba131 核酸酶消化端粒末端

包含高分子量 DNA 的琼脂糖栓在 1ml 1x Ba131 缓冲液中平衡 30 分钟, 50U 酶 (NEBL) 放置在冰上 30 分钟。通过放置反应物于 30 $^{\circ}$ C 开始反应, 在 0, 30, 60, 90 和 120 分钟的每个时间点取出琼脂糖栓并加入 1ml 冰冷的 TE。通过在冰上用水漂洗栓 30 分钟去掉 Ba131。Ba131 在 PCR 热变性步骤应完全灭活。首先采集时间点确定去除需要长度的 DNA 需要的消化时间以允许区分有更长的端粒的胎儿 DNA。

步骤 5

20 通过 QF-PCR 扩增多态标记物

使用标准技术通过 QF-PCR 扩增多态标记物 (参见例如, Verma et al., Lancet, 352, 9-12, 1998 ; Pertl et al., Amer. J. Obstet. Gynecol. 177, 4, 899-906)。

25 X22 标记物 (离端粒起约 300kb) 是可以用这种方式扩增的特别的标记物, 但可以依靠诊断的特别目的选择其他端粒多态性标记物。例如, 14 号染色体上的两个高度多态性标记物 D14S1419 和 D14S1420 位于距端粒约 210kb 和 95kb 处。

30 实施例 3: 使用本发明的方法进行胎儿 21 三体唐氏综合征的无创性产前诊断

实施例 3A

1. 妊娠和血液样品

在书面知情同意并收到当地伦理委员会的伦理批准后，通过静脉穿刺从一孕 12 周的怀孕妇女抽取 12ml 血液收集到 2 个依地酸 (EDTA) 试管中。

5 2. 从核区室 (nuclear compartment) 和血浆分离细胞

使用 3 倍密度梯度 (Triple Density Gradient) 从母体血液分离来自核区室和来自血浆的有核细胞，按照 (Ganshirt et al., Diagnostic Cytogenetics, Springer Lab Manual, 1999 R.-D. Wagner, Fetal Cells in Maternal blood, pp 401-415) 所述方案的
10 细微修改。

将 12ml EDTA 血液加入 12ml 磷酸盐缓冲液 (PBS)，通过倒置试管进行混合。将 6ml 血液/PBS 混合物移液至四个 15ml 的聚苯乙烯试管。使用与注射器连接的又长又细的小管将三层 Percoll[®] (Amersham Pharmacia) 铺在底层。首先铺 3ml 40% 珀可，随后是 3ml 45% 和 3ml 50
15 % 珀可。然后将悬浮液在 500g 下离心 30 分钟。取出血浆层和淋巴细胞层并转移到干净试管中并再次在 500g 下离心 10 分钟。用 PBS 洗涤细胞沉淀并转移到含 5 μ l 蛋白酶 K 溶液的微量管中 (400mg/l 蛋白酶 K, 20mmol/l 二硫苏糖醇, 1.7 μ mol/l 十二烷基硫酸钠, 10mmol/l Tris 缓冲液, 50mmol/l 氯化钾)。

20 3. 提取高分子量 DNA

血浆细胞以 2×10^5 细胞/50 μ l 重新悬浮在 PBVS 中。将等量琼脂糖溶液 (1.9% NuSieve GTG) 加入细胞悬浮液—含 1×10^5 细胞。50 μ l 分配给模子并允许设定。然后在 50 $^{\circ}$ C 下用 0.5M EDTA, PH 8.0, 1% N-Laurylsarcosine, 2mg/ml 蛋白酶 K 处理琼脂糖栓 24-72 小时。然后
25 用水洗涤琼脂糖栓，50 $^{\circ}$ C 下在 PMSF (一种蛋白酶抑制剂) 中孵育以完全灭活任何遗留的进行酶处理的蛋白酶 K。

4. 连接耐核酸酶的连接体

融化琼脂糖栓，加入等量的 50x 缓冲液和 1U β -琼脂糖，并在 45 $^{\circ}$ C 下孵育 60 分钟。琼脂糖栓在 100 μ l 1x 限制缓冲液中和 10U 酶一起平衡，孵育 2 小时，然后用水漂洗。
30

然后通过加入 1x 连接酶缓冲液，5U 连接酶，并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时连接连接体。

5. Ba131 核酸酶消化端粒末端

含高分子量 DNA 的琼脂糖栓在 1ml 1 x Ba131 缓冲液中平衡 30 分钟，5U 酶 (NEBL) 放置冰上 30 分钟。通过放置反应物在 30℃ 下开始反应，在 0, 30, 60, 90 和 120 分钟的每个时间点取出栓并放入 1ml 冰冷的 TE。通过在冰上用水漂洗栓 30 分钟去掉 Ba131。

6. 通过 QF-PCR 扩增多态标记物

通过常规技术使用 D21S1411 和 D21S1446 的引物进行一种多重荧光 PCR 测定 (参见例如 Pertl et al 1997 Am. J. Obstet. Gynecol. 177, 899-906)。每一个前向引物用荧光燃料标记 (5' 末端) 以便能看见和分析 PCR 产物。在最初变性之后，进行 24 个循环的 95℃ 48 秒，60℃ 48 秒和 72℃ 1 分钟，随后 72℃ 下延伸 15 分钟。

7. 分析

将等位基因片段溶解在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶中，并运行 Genescan 672 软件在应用生物系统 (Applied Biosystems) (Warrington) 373 DNA 测序仪上分析。测定扩增产物尺寸，根据在电泳图谱上看到的峰面积计算它们的荧光强度。分析 (a) 直接来自母体血液样品中淋巴细胞的 DNA，(b) 酶消化后来自同一类型细胞的 DNA，和 (c) 酶消化后来自母体样品血浆成分中细胞的 DNA (预期含富集的胎儿细胞)。

8. 结果

(a) 来自母体血液样品淋巴细胞 DNA 的 PCR 产物的电泳图显示相应两个引物 D21S1411 和 D21S1446 中的每一个有两个大小相等的峰。对于正常女性中这一结果是预期的。

(b) 来自母体血液样品淋巴细胞 DNA 的 PCR 产物的电泳图，在用 2U Ba131 核酸外切酶消化 20 分钟后，显示最远端标记物 D21S1446 的信号缺失，然而在近端标记物 D21S1411 的位置见到两个大小相等的信号。

这提示这些酶切条件对于我们鉴别母体和胎儿 DNA 的目的是最佳的。

(c) 来自母体血浆中细胞的 DNA 的电泳图，在与 (b) 一样的条件下进行酶消化后显示近端标记物 D21S1411 不清晰的信号，但远端标记物 D21S1446 有 3 条清晰信号。

这些结果提示首先端粒 DNA 序列已完全被消除（同时从母体和胎儿 DNA）。第二，近端标记物 D21S1411 DNA 序列不清晰的信号被解释为母体和胎儿 DNA 的混合引起。第三，我们推断远端标记物 D21S1446 的三个清晰信号（其中一个位于某位置，该位置与在来自母体血液样品淋巴细胞 DNA 的电泳图中见到的母体位置不同）是胎儿的，并且显示胎儿有 21 三体。

9. 总结

本实施例说明通过酶消化端粒和亚端粒 DNA 序列之后进行母体血液样品的 DNA 分析，有可能常规计数 21 号染色体的数目并因此鉴定胎儿 21 三体唐氏综合征。过程迅速，结果可在血液样品到达实验室的同一天内获得。另外，基本自动化是可能的。

实施例 3B

1. 妊娠和血液样品

在书面知情同意并收到当地伦理委员会的伦理批准后，通过静脉穿刺从一孕 12 周的怀孕妇女抽取 12ml 血液收集到 2 个依地酸 (EDTA) 试管中。

2. 从核区室 (nuclear compartment) 和血浆分离细胞

使用 3 倍密度梯度 (Triple Density Gradient) 从母体血液分离来自核区室和来自血浆的有核细胞，按照 (Ganshirt et al., Diagnostic Cytogenetics, Springer Lab Manual, 1999 R.-D. Wagner, Fetal Cells in Maternal blood, pp 401-415) 所述方案的细微修改。

将 12ml EDTA 血液加入 12ml 磷酸盐缓冲液 (PBS)，通过倒置试管进行混合。将 6ml 血液/PBS 混合物移液至四个 15ml 的聚苯乙烯试管。使用与注射器连接的又长又细的小管将三层 Percoll[†] (Amersham Pharmacia) 铺在底层。首先铺 3ml 40% 珀可，随后 3ml 45% 和 3ml 50% 珀可。然后将悬浮液在 500g 下离心 30 分钟。取出血浆层和淋巴细胞层并转移到干净试管中并再次在 500g 下离心 10 分钟。用 PBS 洗涤细胞沉淀并转移到含 5 μ l 蛋白酶 K 溶液的微量管中 (400mg/l 蛋白酶 K, 20mmol/l 二硫苏糖醇, 1.7 μ mol/l 十二烷基硫酸钠, 10mmol/l Tris 缓冲液, 50mmol/l 氯化钾)。

3. 核酸外切酶消化

在 30℃ 下经过 20 分钟时间每微克 DNA 使用 1 单位 Ba131 以产生单一梯度的缺失 (>1kb)。通过加入 EDTA 达终浓度 50mM 以终止反应。

首先对淋巴细胞的 DNA 进行酶消化以校准最佳去除 DNA 序列以鉴别胎儿和母体 DNA 所需的浓度和时间。这种情况选择的引物是位于 21q22.3 的 D21S1446 和 D21S1411 (D21S1411 位于 D21S1446 近端) 以及端粒 DNA 序列 TTAGGG 的引物。

设定区分母体和胎儿信号的最佳条件以去除端粒加母体血液样品淋巴细胞 (首先是母体细胞) DNA 的标记物 D21S1446。按步骤 4 和 5 描述的进行评价。然后在这些证实的最佳条件下用 Ba131 对从母体血浆分离的细胞 (母体细胞和富集的胎儿细胞的混合物) 进行酶消化。

4. 多重 PCR

通过常规技术 (参见例如 Pertl et al., 1997 Am. J. Obstet. Gynecol. 177, 899-906) 使用 D21S1411 和 D21S1446 的引物进行多重荧光 PCR 测定。每一个前向引物用荧光染料标记 (5' 端) 以便能看见和分析 PCR 产物。最初变性之后, 进行 24 个循环的 95℃ 48 秒, 60℃ 48 秒和 72℃ 1 分钟, 随后 72℃ 下延伸 15 分钟。

5. 分析

将等位基因片段溶解在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶中, 并运行 Genescan 672 软件在应用生物系统 (Applied Biosystems) (Warrington) 373 DNA 测序仪上分析。测定扩增产物尺寸, 根据在电泳图谱上看到的峰面积计算它们的荧光强度。进行分析 (a) 直接来自母体血液样品中淋巴细胞的 DNA, (b) 酶消化后来自同一类型细胞的 DNA, 和 (c) 酶消化后来自母体样品血浆成分中细胞的 DNA (预期富含富集的胎儿细胞)。

6. 结果

(a) 来自母体血液样品淋巴细胞 DNA 的 PCR 产物的电泳图显示相应两个引物 D21S1411 和 D21S1446 中的每一个有两个大小相等的峰。对于正常女性中这一结果是预期的。

(b) 来自母体血液样品淋巴细胞 DNA 的 PCR 产物的电泳图, 在用 2U Ba131 核酸外切酶消化 20 分钟后, 显示最远端标记物 D21S1446 的信号缺失, 然而在近端标记物 D21S1411 的位置见到两个信号。

这提示这些酶切条件对于我们鉴别母体和胎儿 DNA 的目的是最佳的。

(c) 来自母体血浆中细胞的 DNA 的电泳图, 在与 (b) 一样的条件下进行酶消化后显示近端标记物 D21S1411 不清晰的信号, 但远端标记物 D21S1446 有 3 条清晰信号。

这些结果提示首先端粒 DNA 序列已完全被消除 (同时从母体和胎儿 DNA)。第二, 近端标记物 D21S1411 DNA 序列不清晰的信号被解释为母体和胎儿 DNA 的混合引起。第三, 我们推断远端标记物 D21S1446 的三个清晰信号 (其中一个位于某位置, 该位置与在来自母体血液样品淋巴细胞 DNA 的电泳图中见到的母体位置不同) 是胎儿的, 并且显示胎儿有 21 三体。

总结

本实施例说明通过酶消化端粒和亚端粒 DNA 序列之后进行母体血液样品的 DNA 分析, 有可能常规计数 21 号染色体的数目并因此鉴定胎儿 21 三体唐氏综合征。在此实施例中, DNA 降解程度低, 并且因此有可能不需使用连接体就能进行诊断分析。象实施例 3A 一样, 分析迅速, 结果可在血液样品到达实验室的同一天内获得; 并且基本自动化是可能的。

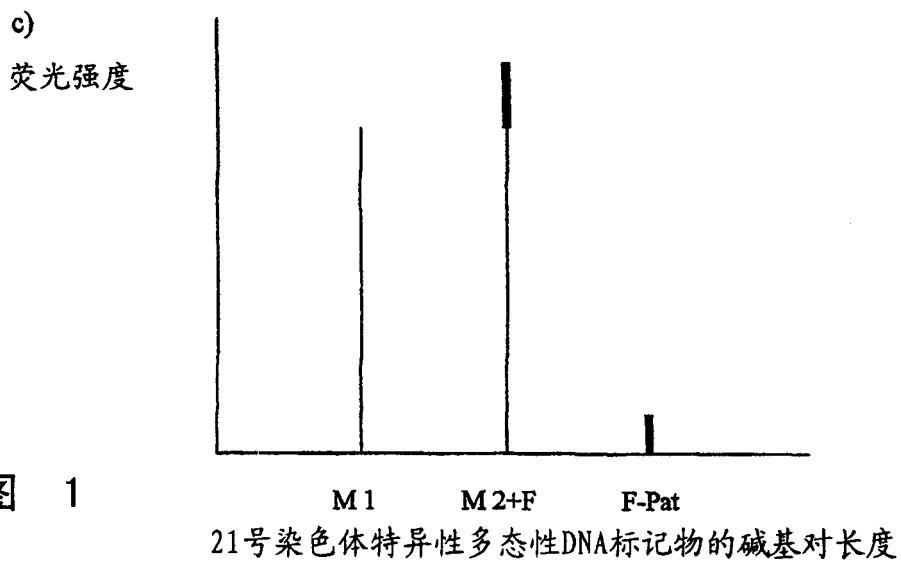
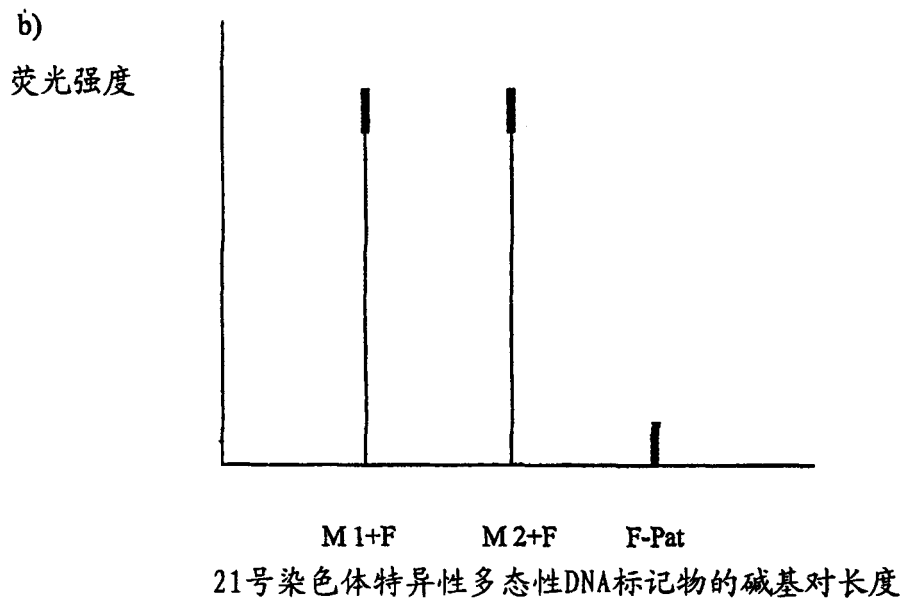
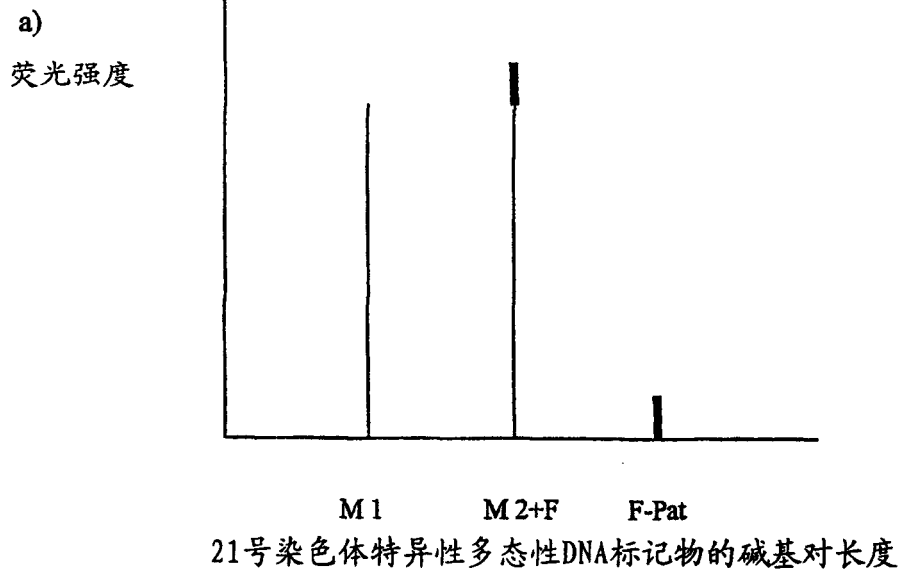


图 1

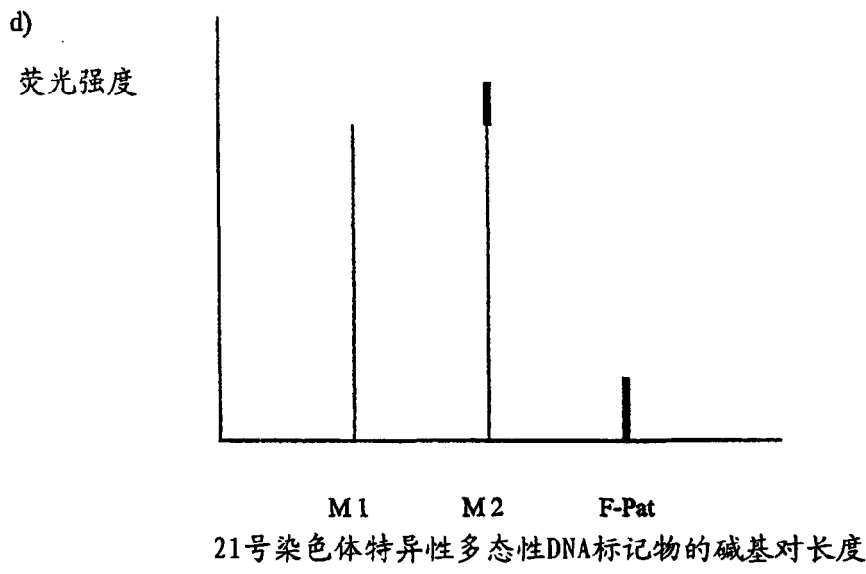


图 1(续)

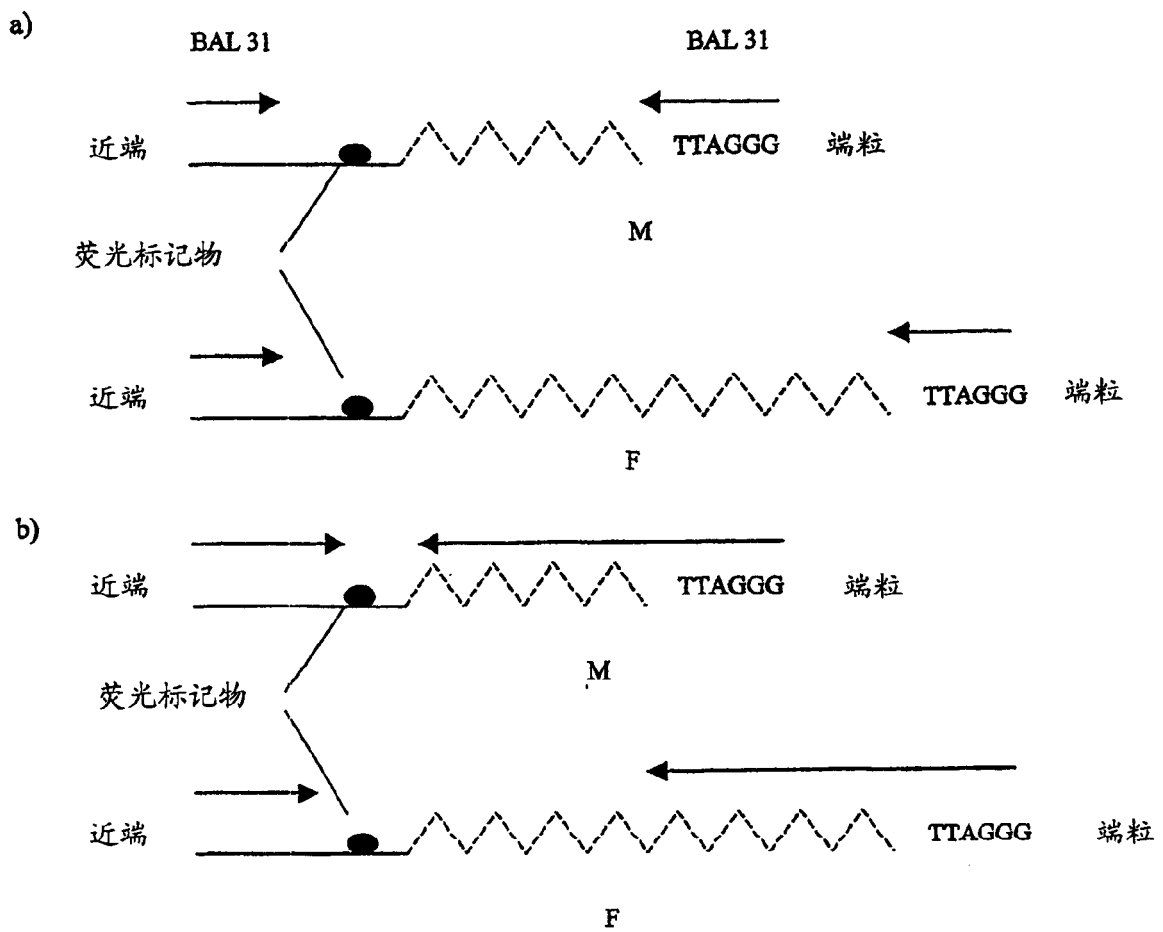


图 2

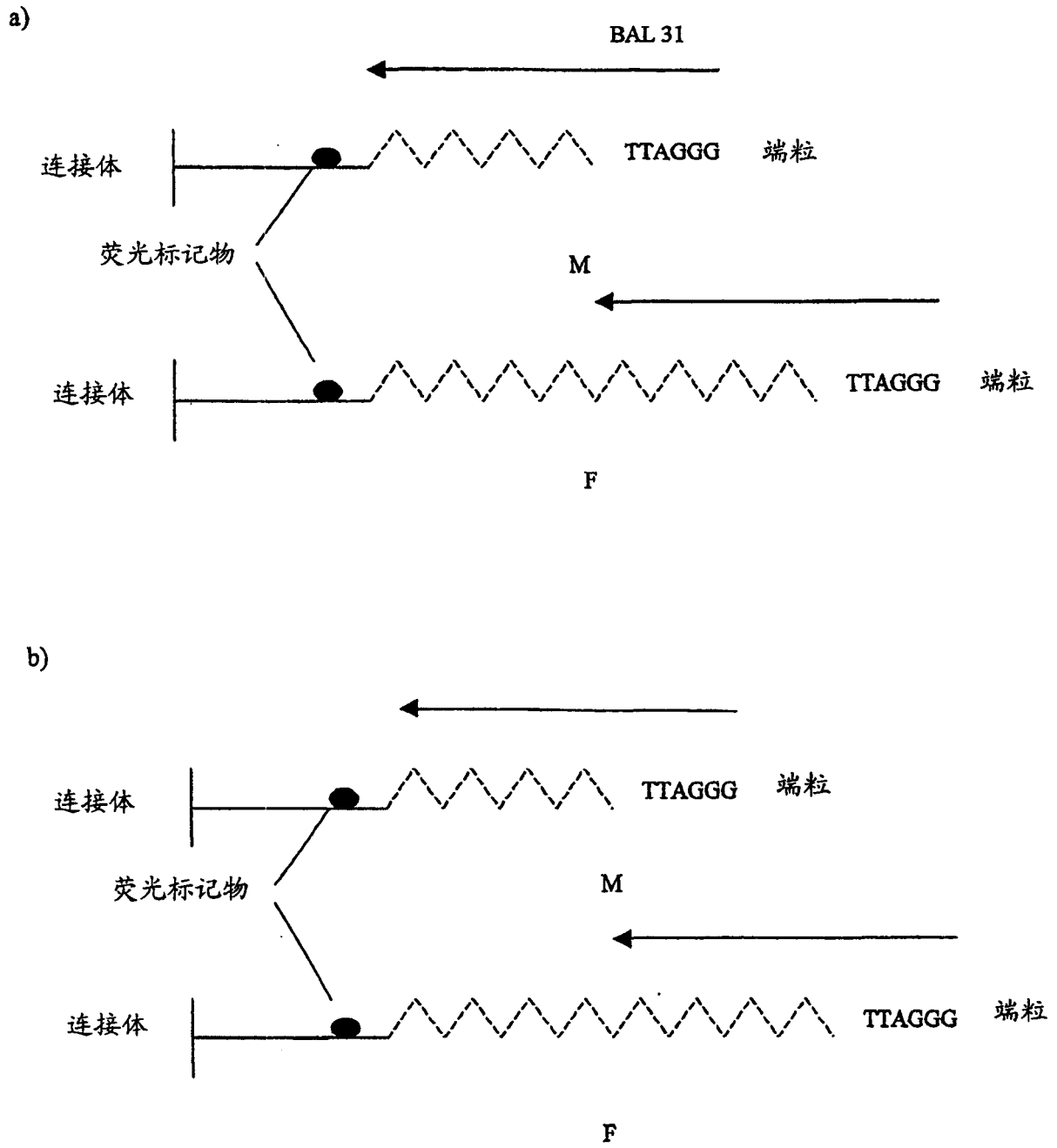


图 3

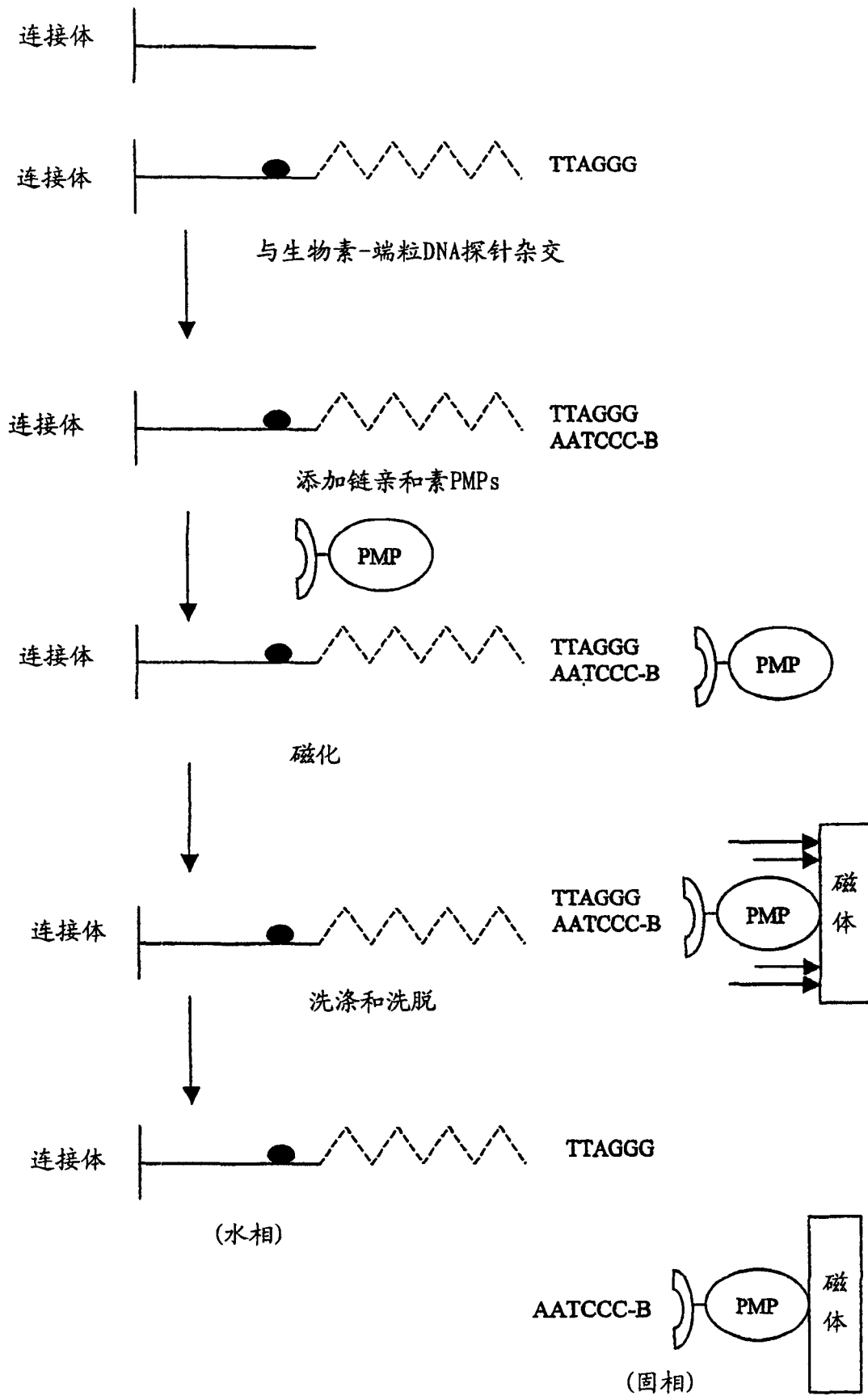


图 4

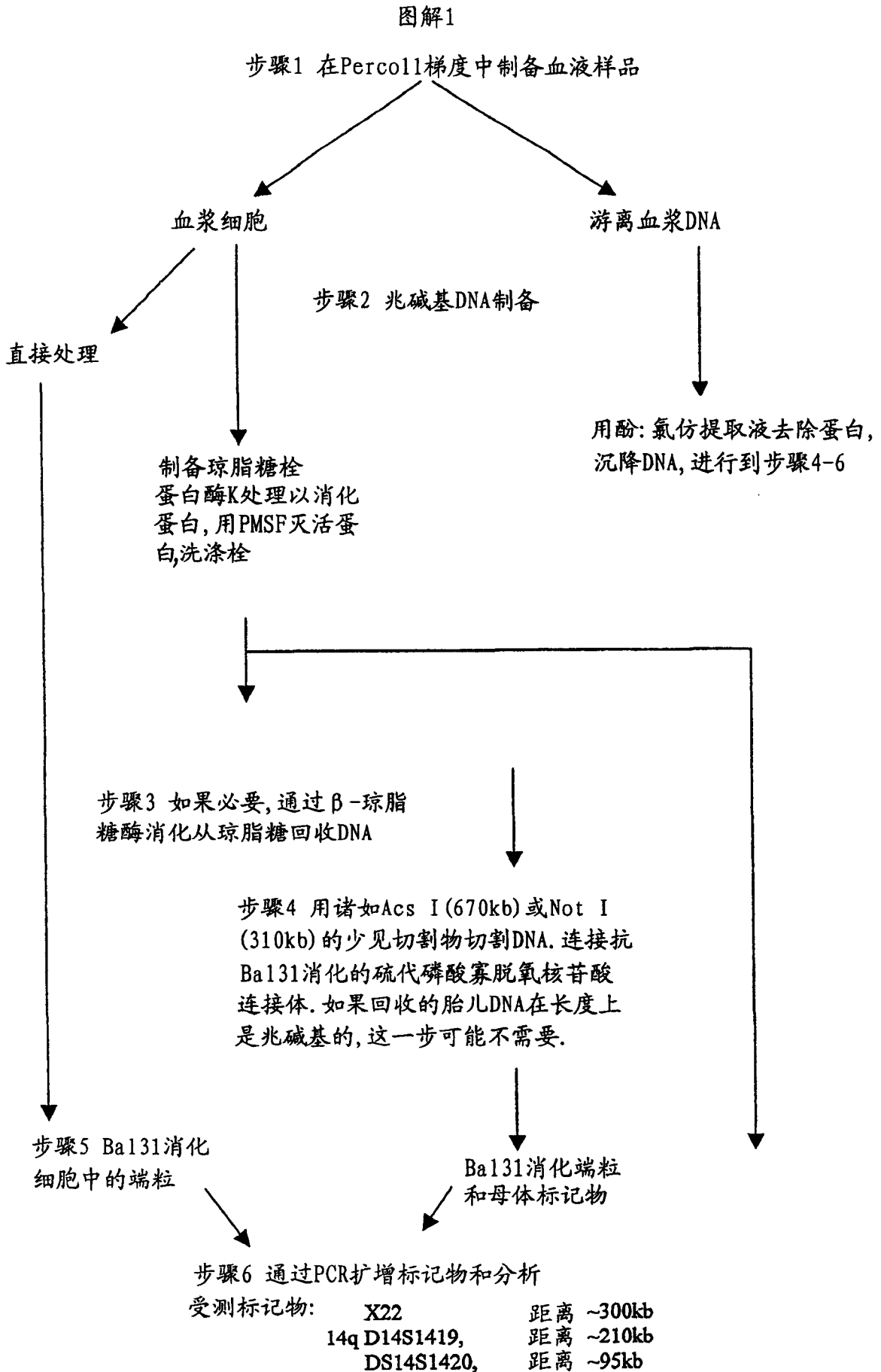


图 5

专利名称(译)	在母体样品中鉴定胎儿DNA的诊断方法		
公开(公告)号	CN1452665A	公开(公告)日	2003-10-29
申请号	CN01815354.2	申请日	2001-07-09
[标]申请(专利权)人(译)	赛姆格有限公司		
申请(专利权)人(译)	赛姆格有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	英国技术集团国际有限公司		
[标]发明人	MA赫尔顿		
发明人	M·A·赫尔顿		
IPC分类号	G01N33/50 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6881 G01N33/53 G01N33/553 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6881 C12Q2600/156		
代理人(译)	刘玥		
优先权	2000016742 2000-07-10 GB		
其他公开文献	CN100558908C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种在含母体DNA的样品，诸如血液或阴道样品中鉴定胎儿DNA的方法，所述方法包括(a)从所述样品分离DNA，(b)使用一种酶将所述DNA进行核酸外切消化以去除每一种DNA分子的末端区域，和(c)检测作为所述消化过程的结果的胎儿DNA中保留而母体DNA中缺少的一种DNA序列的存在。一旦鉴定，胎儿DNA可用于诊断，例如检测染色体/DNA异常，特别是包括诸如胎儿21三体的非整倍体。

