

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-504036

(P2004-504036A)

(43) 公表日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 N 15/09
C 1 2 Q 1/02
C 1 2 Q 1/68
G O 1 N 33/48
G O 1 N 33/483

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q 1/02
C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N 33/48 M
G O 1 N 33/483 C

テーマコード (参考)

2 G O 4 5
4 B O 2 4
4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-512414 (P2002-512414)
(86) (22) 出願日 平成13年7月16日 (2001.7.16)
(85) 翻訳文提出日 平成15年1月14日 (2003.1.14)
(86) 国際出願番号 PCT/EP2001/008202
(87) 国際公開番号 W02002/006524
(87) 国際公開日 平成14年1月24日 (2002.1.24)
(31) 優先権主張番号 00115268.5
(32) 優先日 平成12年7月14日 (2000.7.14)
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

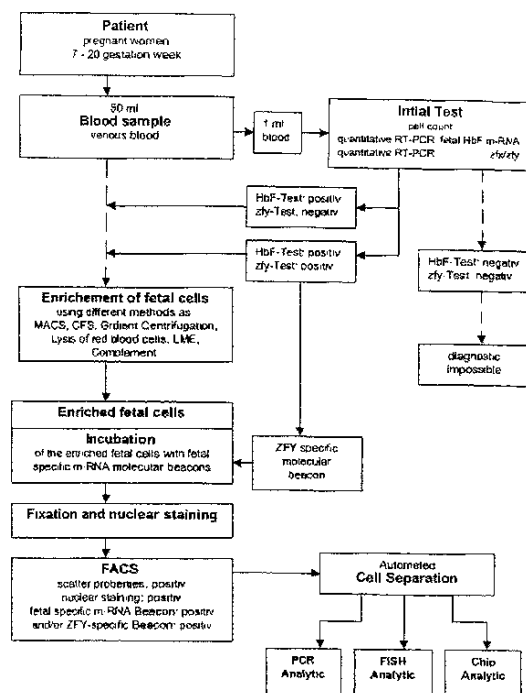
(71) 出願人 503021191
プレナディア ゲゼルシャフト ミット
ベシュレンクテル ハフツング
ドイツ連邦共和国 ミュンスター ハーフ
エンヴェーク 4 6 - 4 8
(74) 代理人 100061815
弁理士 矢野 敏雄
(74) 代理人 100094798
弁理士 山崎 利臣
(74) 代理人 100099483
弁理士 久野 琢也
(74) 代理人 100114890
弁理士 アインゼル・フェリックス＝ライ
ンハルト

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光プローブを使用することによる標的細胞の直接的な遺伝分析のための方法

(57) 【要約】

標識された配列と標的細胞中の標的配列をインサイチュ
ーハイブリダイゼーションさせる工程を含む非標的細胞
からの標的細胞の同定並びにフローサイトメトリーによ
るハイブリダイズした標識された配列の検出による標的
細胞の細胞同定を可能にする方法。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的細胞を同定するにあたり以下の工程：

ー 標的細胞中の標的配列と相補的な標識された配列とのインサイチュールハイブリダイゼーション及び

ー フローサイトメトリーによるハイブリダイズした配列の検出による標的細胞の細胞同定

を含む方法。

【請求項 2】

直接的な遺伝分析にあたり以下の工程：

ー 標的細胞中の標的配列と相補的な標識された配列とのインサイチュールハイブリダイゼーション及び

ー フローサイトメトリーによるハイブリダイズした配列の検出による標的細胞の細胞同定

を含む方法。

【請求項 3】

標識された配列が分子標識である、請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

蛍光活性化セルソーティングを特徴とする、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

標識された配列の少なくとも一部が標的胎児特異的 mRNA に対するものである、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

胎児特異的 mRNA を、胎児ヘモグロビン mRNA、サイトケラチン mRNA、絨毛性ゴナドトロピンの β -サブユニットの mRNA、絨毛性ソマトマンモトロピン mRNA、妊娠特異的糖タンパク質 mRNA、 α -フェトプロテイン mRNA 及びトランスフェリン受容体 mRNA からなる群から選択する、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

標識された配列の少なくとも一部が標的特異的 DNA、ウイルス性核酸又は細菌性核酸又はその一部からなる群から選択される標的配列に相補的である、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

密度勾配遠心分離、低張ショックによる溶解、補体系による分解、リソモトロピック剤による分解、電荷流動分離及び磁気活性化セルソーティングからなる群から選択される方法を適用する、非標的細胞のネガティブセレクトの少なくとも一つの工程を含む、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 9】

電荷流動分離又は磁気活性化セルソーティングからなる群から選択される方法を適用する、標的細胞のポジティブセレクトの少なくとも一つの工程を含む、請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 10】

標的細胞の細胞内染色又は表面マーカーの染色の工程を含む、請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 11】

抗体染色を特徴とする、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

胎児細胞及び母系細胞の識別のための、請求項 1 から 11 までのいずれか 1 項記載の方法の使用。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

出生前診断のための、請求項 1 から 11 までのいずれか 1 項記載の方法の使用。

【請求項 14】

嚢胞性線維症の検出のための、請求項 1 から 11 までのいずれか 1 項記載の方法の使用。

【請求項 15】

染色体異常の検出のための、請求項 1 から 11 までのいずれか 1 項記載の方法の使用。

【請求項 16】

三染色耐性 21 の検出のための、請求項 1 から 11 までのいずれか 1 項記載の方法の使用。

【請求項 17】

母系血液試料内の胎児 mRNA の定量にあたり以下の工程：

10

- ー 胎児細胞特異的 mRNA の増幅、
- ー 前記の増幅された胎児細胞特異的 mRNA に相補的又は部分的に相補的な配列を含む標識された配列の合成、
- ー 前記の標識された配列と前記の増幅された胎児細胞特異的 mRNA とのハイブリダイズ、及び
- ー ハイブリダイズした標識された相補的配列の検出を含む方法。

【請求項 18】

標識された相補的配列の少なくとも一部が分子標識である、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

20

分子標識が第 2 表に列記される配列の少なくとも 1 つを有する、請求項 1 から 18 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 20】

増幅のためのプライマーが第 1 表に列記される配列の 1 つを有する、請求項 17 から 19 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 21】

分子標識を有する少なくとも 1 つの区画を有する試験管を特徴とする、細胞同定及び／又は遺伝分析のためのキット。

【請求項 22】

少なくとも 2 つの区画を有し、それぞれの区画が異なる媒体を有する、請求項 21 記載の 30
キット。

【請求項 23】

膜が区画を互いに分離する、請求項 21 又は 22 記載の試験管。

【請求項 24】

少なくとも 2 つの区画を有する試験管内のプローブを加工するにあたり以下の工程：

- ー 第 1 の区画でのプローブの処理、
- ー 前記のプローブについて第 2 の区画への通路の提供、及び
- ー 前記のプローブの第 2 の区画での処理

を含む方法。

【請求項 25】

40

1 つの処理がプローブと少なくとも分子標識とのハイブリダイズである、請求項 24 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は非標的細胞から標的細胞を、特に母系血液細胞から胎児の細胞を、出生前診断のために分離するための方法に関し、かつ本発明は欧州特許出願第 00115268.5 号の優先権を主張し、該出願はこれにより完全に内容が記載されたものとする。

【0002】

公知又は未知の突然変異又は染色体異常によって引き起こされる性遺伝子疾患及び／又は潜在的な遺伝子疾患に関する胎児遺伝子状態の決定は胎児の細胞から単離される胎児の染 50

染色体の決定を必要とする。染色体決定は一般に細胞遺伝子工学を使用して実施され、これは胎児の生存細胞を採取し、引き続き細胞を数週間培養して、更なる分析のために十分な量を増殖させることが必要である。しかしながら少しの突然変異の検出は少量の細胞試料でポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術をPCR配列決定又は他の後PCR突然変異検出技術と組み合わせて使用して実施できる。生きている胎児の細胞の採取は通常は妊娠の第2の三半期の間に標準化された外科的な方法を使用して特定の外科診療所で行われる。少量の生検は胎盤の絨毛膜絨毛の組織（絨毛膜絨毛採取、CVS）から、又は母体の腹壁に針を挿入することによって羊水から（羊水穿刺）のいずれかで採取される。第3の方法は臍帯の穿刺により妊娠18週後の臍帯血から胎児の細胞を得ることを必要とする。

【0003】

10

残念ながら、この侵襲性法を原因として約0.5～1.5%の頻度で自発的流産が生じる。稀なケースでは、他の重篤な状態が生じて、母体及び胎児の健康を害する。

【0004】

これらの侵襲性採取法の他に、胎児の染色体異常に関する非侵襲性の危険事前評価の方法、例えば母系血液における α -フエトプロテイン、ヒトの絨毛膜のゴナドトロピン及び非結合エストジオールに関する生化学的スクリーニング（“三重試験”として知られている）が一般的である。他の方法は母体の血流からの胎児の有核細胞の回収を含む胎児の細胞の分析を含む。母体の血液から抽出されて、これらの細胞は胎児の発生の遺伝状況についての情報源として提供でき、かつ従って出生前診断のために用いることができる。

【0005】

20

胎児由来の種々の細胞型は妊娠の間に胎盤を通り、母系の末梢血内を循環する（Bianchi, D. W. and Klinger, K. W. in: Genetic Disorder and the fetus: Prevention and Treatment, 3rd edition, Baltimore/London: The John Hopkins University Press 1992; B. Tutweschek, Nichtinvasive Praenataldiagnostik an fetalen Zellen im mütterlichen Blut, Gynäkologie (1995) 28: 289-301）。

【0006】

通常、出生前診断のための標的細胞は栄養膜、胎児の有核赤血球、顆粒球及び／又は白血球、すなわち多核リンパ球の特定細胞型群：好中球、好塩基球及び好酸球である（An investigation of methods for enriching trophoblast from maternal blood, Prenatal Diagnosis, Vol. 15: 921-931 (1999); German patent DE 4222573; international patent application WO96/27420; US-Patent 5,714,325）。

30

【0007】

あまり一般的でない胎児細胞を得るための他の方法は、大腿骨頸部細胞の採集である（Non or minimally invasive prenatal Diagnostic on maternal blood samples or transcervical cells, Prenatal Diagnosis, Vol. 15: 889-896 (1995)）。

40

【0008】

これらの細胞型の一般的な有用性は、母系血液中でのその限られた濃度（ 10^5 循環細胞に1個～ 10^8 循環細胞に1個で推定される）の故に大きく妨げられる。ハマダ他によるより正確な推定（Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age, Human Genet. 1993 June: 91 (5) 427-32）は、1mlの母系血液につき60～600又は典型的な20mlサンプル中に1200～12000の胎児の有核細胞の数を与えている。幾つ

50

かのレポートはこれらの数値を確認しているが、どれも高い回収率でそのような数の胎児の細胞を回収できていない。しかしながら幾つかのグループは異数性状態における胎児-母体細胞交通の高められた速度で報告している。これは胎児の細胞分離が正常状態下よりもかかる異常の存在においてより効果的であることを暗示している。

【0009】

遺伝分析を行うために、少数の胎児の細胞は母系細胞の除去もしくは胎児の細胞の富化を必要とする。ほとんどの胎児の細胞型は形態学だけに基づいて母系細胞から区別できないので、密度勾配遠心分離又は電荷流動分離 (charge flow separation) のような方法 (DE-O S 4 2 2 2 5 7 3 号; WO 9 6 / 2 7 4 2 0 号、WO 9 6 / 1 2 9 4 5 号) が胎児の細胞の富化のために適用されている。電荷流動分離は、更なる分析のために異なる管に直接ソートされた関連の細胞の種々の表面電荷密度を利用する。それにもかかわらず、欠点としてこの技術は誤った陽性の結果はもちろんのこと誤った陰性の結果のリスクを含意する。

10

【0010】

より特定の方法は血液試料を標的細胞特異的な蛍光標識された、蛍光活性化セルソーティング (FACS) による標的細胞の選択を可能にする抗体と一緒にインキュベートすることに基づく。このシステムは、適当な検出システムを通過する各単一の細胞の蛍光を検出することに基づく。蛍光に応じて、細胞を荷電させ、かつ異なる部分に選択する。別の方法は金属ビーズでラベルされた標的細胞特異的な抗体が用いられ、これらの抗体は磁気活性化セルソーティング (magnetic activated cell sorting) (MACS) で同定される。これらの技術は、例えば国際特許出願 WO 9 1 0 7 6 6 0 号又はドイツ国特許出願第 4 2 2 2 5 7 3 号から公知である。

20

【0011】

しかしながら FACS 及び MACS はしばしばモノクローナル抗体の有用性に依存し、かつ相当の専門技術が必要である。抗体フラクションは他の細胞成分に非特異的結合を示すことがあり、これは高い信号対雑音比をもたらす、かつ後の検出に傷害をもたらす。更に胎児の細胞表面抗原、例えば胎児のヘモグロビンの γ -鎖と結合する抗体はしばしば母系細胞にも結合する。このように通常知られるセルソーティングによって得られる試料は汚染母系細胞を含有する。

【0012】

前記の原理の1つ又は幾つかの組合せを使用する方法の例は、例えば胎児の栄養膜の単離のためのマウスモノクローナル抗体の使用に関しては Yeoh et al., Prenatal Diagnosis 11:117-123 (1991); Mueller et al., Lancet 336:197-200 (1990) に記載されている。Price et al., American Journal of Obstetrics and Gynecology 165:1731-37 (1991) は細胞サイズ及び粒状度、トランスフェリン受容体及びグリコホリンA細胞表面分子に基づく胎児の有核赤血球のフローソーティングの概要を示している。PCT出願 WO 9 1 / 0 7 6 6 0 号は胎児の赤血球の細胞表面上に存在する抗原を使用する胎児の有核赤血球の単離のための方法を記載している。PCT出願 WO 9 1 / 1 6 4 5 2 号及び米国特許第 5, 1 5 3, 1 1 7 号は種々の蛍光色素で標識された胎児の細胞に対する種々の抗体の組合せを使用する方法を開示している。

30

40

【0013】

米国特許第 5, 8 5 8, 6 4 9 号は母系の血液から胎児の細胞を富化する方法及びかかる細胞の同定方法を記載している。該方法は母系の血液の採取及び標的特異的、すなわち胎児細胞特異的なリボ核酸の増幅を含む。これらの細胞の後続のインサイチュウハイブリダイゼーションは胎児の細胞の標的リボ核酸に相補的な標識されたりボ核酸プローブを含有するハイブリダイゼーション媒体で行われる。それにもかかわらず、ハイブリダイズされない標識されたりボ核酸プローブは細胞内に残留するので、これらは高い信号/雑音比をもたらす、そうして分析結果の低い信頼性をもたらす。

50

【0014】

前記の方法はハイブリダイゼーションに先立つポジティブセレクション又はネガティブセレクションのいずれかによる胎児細胞の富化の工程、すなわち密度勾配遠心分離又はフローサイトメトリーを暗示している。しかしながら有利には胎児細胞は母系細胞からFACS又はMACS技術によって、胎児細胞表面上で富化されている1つ以上の胎児抗原に対する抗体を用いて分離される。US5,858,649号によって暗示される細胞分離のための技術は前記に概要を示した欠点及び問題を示す。

【0015】

Sokol他(Deborah L. Sokol, Zangh X., Ponzy, L, Gewirtz A. M.; Real time detection of DNA・RNA hybridisation in living cell; Proceedings of National Academy of Science 1998, 95 pp. 11538-11543)は標識された核酸プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを検出するための方法を提供している。標識された配列としてSokol他は、引き続いて分光蛍光計及び／又は共焦点レーザ走査型顕微鏡によって検出されるいわゆる分子標識を用いている。これらの検出システムは時間を消費し、従って高い質の試料を分析する日常の実施のために適当でない。更にこれらのシステムは非標的細胞から標的細胞を分離することを可能にしない。 10

【0016】

従って本発明の第一の対象は細胞の同定及び／又は分離を改善する方法を提供し、かつ遺伝診断、特に生存細胞における直接的な遺伝診断を改善することである。本発明の更なる対象は調査される細胞のより良好な採取及び／又は処理のための装置及び方法を提供することによって診断を改善することである。 20

【0017】

際立った問題は請求項1記載の細胞同定法を提供することによって解決される。

【0018】

本発明の基礎的な観念は標的細胞を同定し、かつ標的細胞内でインビボに標的配列と、相補的又は部分的に相補的な標識された配列とのハイブリダイゼーションによって遺伝的変化を検出し、かつ引き続き細胞内のハイブリダイズした標識された配列をフローサイトメトリーによって検出することである。その後、ハイブリダイズした分子標識の検出によるセルソーティングの工程及び更なる分析を行ってよい。 30

【0019】

本発明の特定の利点は、特に不十分な特異性及び高い信号／雑音比の欠点を克服することによって母系の血液試料中の胎児細胞の同定を改善し、かつ従って母系細胞及び胎児細胞の間の識別を可能にすることである。同定してから細胞分離する前記の方法は殆ど時間を消費せず、かつ通常の実施に比べてあまり専門技術を要さない。

【0020】

更なる利点において、本方法は患者あたりの血液試料内の標的細胞の全てのサンプリング速度を増大させることができる。

【0021】

検出の他に、ハイブリダイズした標識された配列から得られるハイブリダイゼーションシグナルの定量を行ってよく、これは標的配列の発現速度についての情報を与える。従って定量は標的細胞と非標的細胞との間の更なる識別基準を提供することがある。稀な細胞でさえも検出することができる。 40

【0022】

従って有利な態様において、本発明は、野生型細胞では発現されない遺伝子の転写を原因とするか又はそれを特徴とする疾患又は一定の遺伝子もしくはその一部の不在又は変更された発現又は発現速度に特徴付けられる疾患の診断を、転写生成物の発生量のレベルの定量によって可能にする。従って本発明による方法は出生前診断のために提供することができる。 50

【0023】

検出及び／又は定量に引き続いて、標的配列を有する細胞の分離は、例えば胎児由来の細胞を母系の血液試料から単離することが有利な場合がある。細胞分離は、例えば写真法又は視覚法によって行ってよい。有利な態様においてセルソーティングは通常知られた蛍光活性化セルソーティング（FACS；例えば国際特許出願WO9107660号又はドイツ国特許出願第4222573号）で行われる。

【0024】

一般に核酸ハイブリダイゼーション技術は一本鎖の核酸が相補的な核酸鎖と対になる能力に基づくものである。従ってハイブリダイゼーション反応は、標的配列に対する標識された相補的な特異的配列（引き続き標識された配列）又は相補的な特異的配列の組合せの発生を、遺伝子（DNA）の標的配列及び／又はそれらの転写されたポリヌクレオチド配列（RNA）の存在もしくは不在又は配列及び／又は転写された遺伝子産物の特異的な突然変異の存在でさえも同定するために規定している。標的配列は遺伝子的に改変された核酸である野生型であってよい。

【0025】

本発明によれば、それぞれ特異的標的配列（野生型又は突然変異）に対する、それぞれ種々の蛍光色素で標識される少なくとも2つの相補的配列の混合物を使用してよい。これらの蛍光色素は有利には種々の蛍光放出を示す。これは1つのアッセイにおいて種々の標的配列の検出を可能にすることがある。従って種々の標的配列を有する細胞を1つのアッセイで同定及び／又はソートをすることができる（多重アッセイ）。

【0026】

有利な態様において、選択された標識された配列は、例えば性特異的もしくは任意の胎児特異的遺伝子転写物又は標的細胞の他の遺伝的特性に関する、標的細胞の遺伝子マーカーに相補的であってよい。また標識された配列は、標的細胞中に含まれる細菌又はウイルス性の核酸又はその一部に対するものであってよい。ウイルス性標的物のための例はヒトの免疫不全ウイルス（HIV）又はヘルペス又は肝炎ウイルスであってよい。特に関心が持たれており、従って包含される他の検出標的はX染色体又はY染色体又は染色体1、染色体13、染色体16、染色体18及び染色体21のポリヌクレオチド転写物である。

【0027】

有利な態様において、標的ヌクレオチドは相補的な標識された配列とハイブリダイズし、該配列は核酸標的に相補的であり親和性ペア又はアームのメンバーを端部に有し、該親和性ペア又はアームはアッセイ条件下（標的配列の不在下に）互いに相互作用してステム二本鎖を形成する。該配列と標的配列とのハイブリダイズは該配列においてアームを引き離し、かつステム二量体を排除するコンホメーション変化をもたらす。ステム二量体の排除により該配列は検出可能になる。

【0028】

これらの検出できるように標識された二重コンホメーションオリゴヌクレオチド配列は米国特許第5,925,517号に開示されており、この記載によって全内容が記載されているものとする。

【0029】

本発明の有利な態様において、前記のオリゴヌクレオチド（引き続き分子標識（MB）と呼称される）は5'末端及び3'末端においてドナー色基及びアクセプタ色基に適合する。相補的核酸鎖の不在下に、MBはステムループ、すなわちステム二量体コンホメーションで保持され、その際、蛍光共鳴エネルギー移動はシグナル放出を妨げる。相補配列とのハイブリダイゼーションにおいて、ステムループ構造はドナー部及びアクセプタ部の間の距離を増大して開き、それにより蛍光共鳴エネルギー移動が低減し、かつMBが適当な波長の光によって励起された場合に検出可能な信号が放出される。ハイブリダイズなくしてドナー及びアクセプタは間隔を保持し、かつ前記の消光効果により蛍光信号は検出できない。このようにハイブリダイズされないMBは蛍光を放出しない。

【0030】

前記の効果により、洗浄又はさもなくばハイブリダイズされない標識されたオリゴヌクレオチドの除去を回避できる。ハイブリダイズ媒体の非特異的な結合は関連のバックグラウンド信号をもたらず、引き続いての細胞分離の間に信号対雑音比を減ずる。

【0031】

本発明による方法はモノクローナル抗体の有用性を必要としないことが有利である。それにもかかわらず、標識された抗体と標識されたプローブとを交換して、FACS又はMACSについて通常知られた細胞分離プロトコルを適用できる。

【0032】

本発明の特定の態様において、胎児細胞は母系末梢血液、胎盤組織、絨毛膜絨毛及び胚組織を含む種々の試料献体から分離される。有利な検体は母系の末梢血液試料である。本発明は胎児の有核赤血球細胞を同定及びソートするために使用できるが、核を有し、かつ遺伝子転写活性を有する任意の他の胎児細胞型は更なる困難なく包含されうる。

10

【0033】

胎児細胞を区別するために、質及び／又は量のいずれかにおいて胎児細胞又は胚細胞に対して特異的である少なくとも1つの適当な標的配列が細胞内で選択される。検出するために有利な標的配列は、本発明を制限するものでないメッセンジャーリボ核酸(mRNA)又はリボソームリボ核酸(rRNA)のような胎児遺伝子特異的染色体転写物、例えば胎児のヘモグロビン(HbF)又は胚ヘモグロビンのためのmRNAである。一般に、胎児細胞において特に活性である遺伝子の種々の発現レベルを用いることができる。

【0034】

本発明の1つの態様において、細胞系統マーカー又は細胞型マーカーに相補的な標識された配列は1つのアッセイにおいて遺伝子的に改変された標的配列に相補的な標識された配列と一緒に使用することができる。このように最大の情報が同時に得られる：i) 標的細胞型又は標的細胞系統の存在又は不在並びにii) 遺伝子的に改変された標的配列の不在又は存在。従って細胞同定及び直接的な遺伝的診断は組み合わされたアッセイにおいて実施できる。

20

【0035】

前記の組み合わされたアッセイにおいて、2組の分子標識を使用してよく、例えば1つは標的細胞系統に特異的なRNA、例えば胎児のヘモグロビンmRNAに対するものであってよく、かつ第2の組は関連のDNA配列、単一のヌクレオチド変化を有する配列に対するものである。両者の組は異なって着色された蛍光色素で標識されている。細胞同定及び考えられる引き続いての細胞分離はFACSプロトコルにより行ってよい。一定の遺伝子異常の同定は遺伝子DNAの直接的な遺伝診断及び該遺伝子の発現レベルの同時の分析としてmRNAの定量によって可能である。このように遺伝子異常はFACSプロセスの間に“オンライン”的に検出できる。胎児細胞の場合には、胎児の一定の遺伝状態を、母系細胞からの分離後に遺伝子試験を行わずに直接決定できる。

30

【0036】

本発明の更なる態様において、種々の細胞型を検出して、例えば同じ起源を供給する多種の標的配列を選択してよい。該標的配列は、例えば多種の胎児細胞型を同時に母系血液試料から回収することを可能にし、それによって回収される細胞の全量は、有核赤血球(NBC)のような特定の胎児由来細胞を回収するために最適化された方法と比較して増大する。

40

【0037】

本発明の別の態様において、後続の細胞同定及び遺伝子分析のための血液試料を、少なくとも1つの群の標識された配列、有利には分子標識を含有するハイブリダイゼーション媒体を含有するインキュベーション媒体を有する少なくとも1つの区画を有する試験管中に取る。

【0038】

前記の試験管は採取及びハイブリダイゼーションの間の期間を相当短縮させる利点を提供し、その利点は信頼性及び試験結果の質の増大をもたらすことができる。

50

【0039】

有利には該試験管は、それぞれ種々のインキュベーション溶液又は試験溶液、例えば固定化溶液又は染色溶液及び／又は抗凝集剤を有する2つ以上の区画を有する。第一に該試料を1つの媒体と一緒にインキュベートし、規定の時間後に、第2の区画からの第2の媒体を、例えば区画を分離する膜を開放することによって試料に到達させることができる。

【0040】

細胞同定及び／又は遺伝子分析の前に、定量的予備試験を行って、細胞試料中に期待されるべき標的細胞の大体の濃度を推定することが有利なこともある。胎児分析の場合において、また胎児細胞の性を細胞同定の前に、細胞同定及び遺伝分析の更なる工程のために適当な分子標識を選択するために決定することが有利なこともある。

10

【0041】

有利な態様において、予備試験は胎児のヘモグロビンに関するPCRのCt値を決定する定量的なオンラインPCRの試みとして実施され、その値は更に陽性及び陰性のブラインドサンプルと比較される。胎児の性は有利にはzfyのmRNA配列からのPCRアンプリコンの中央部に相補的な分子標識を使用することによって決定できる。

【0042】

1つの態様において、請求項1記載の方法は、陰性分離の近年の方法、例えば密度勾配遠心分離及び／又は抗体による不所望な細胞の磁気的分離(MACS)のような技術並びに自由バッファ流電気泳動装置を使用することによる細胞表面電荷のような物理的パラメータに基づく陽性分離技術と組み合わせられる。有利には母系細胞の陰性選択の工程は、インサイチューハイブリダイゼーション及び蛍光活性化セルソーティング法(FACS)の前に行われる。

20

【0043】

不所望の細胞の陰性選択の方法は低張ショックの適用を含み、これは特にまず赤血球の溶解がもたらされる。溶解溶液は、例えばPARTEC、DAKO、Caltag又はMEDACから直ちに商業的に入手される。

【0044】

脱核した赤血球細胞を分離するための別の方法は補体系である。補体、抗体標識された細胞を破壊できる血清因子の群は厳密にネガティブセレクションのため、すなわち不所望の細胞の排除のために使用される。

30

【0045】

選択的又は付加的に、特定の細胞、本願では単球をLME処理によって低減させることができる。LME(L-ロイシン-メチルエステル)はリソモトロピック剤(lysotropic agent)であり、かつ単球を破壊する。

【0046】

主集団の細胞群内の稀な細胞の低い絶対数により、FACS又は他のソーティング法の前に稀な細胞を予め富化することが有利なこともある。このポジティブセレクションは、例えば細胞内染色技術(US5,422,277号)又は磁気的セルソーティング(MACS)を使用して実施できる。

【0047】

MACSを使用して、複合細胞混合物、例えば末梢血液、造血組織又は培養された細胞からのセルソーティングが可能である。小さな磁性粒子(20~150nmの直径)は細胞-ビーズ反応のより早いキネティック、より低い程度の特異的細胞-ビーズ相互作用、粒状凝集物における細胞の特異的な捕捉の低い危険性並びに、標識された細胞の生存性及び光学的特性に対して、大きな磁性粒子(0.5~5µmの直径)と比較した場合に殆どない悪影響を示さないもので、これらは有利に適用できる。特に微小の常磁性粒子及び高い勾配の磁界によるMACS技術が有利である。それにもかかわらず、大きな磁性粒子、例えばDynalからの大きな磁性ビーズ及びMiltenyiからのディプリーション(depletion)カラムとを組み合わせる。

40

【0048】

50

更にMACSはネガティブセレクションのために、例えば白血球のディプリーションのために使用できる。CD45抗原は赤血球、血小板及びその前駆細胞の他の造血起源の全ての細胞で発現するので、CD45マイクロビーズは末梢血液からのリンパ球のディプリーションのために使用できる。全てのリンパ球の十分なディプリーションを改善するために、CD45及びCD15マイクロビーズの組合せは顆粒球／単球細胞系統におけるCD45の弱い発現により推奨される。従ってマイクロビーズの組合せは母系血液からの胎児の赤芽球の富化をもたらすことができる。

【0049】

MACSの前に、再懸濁媒体、例えばEDTA、ウシ血清アルブミン(BSA)又は血清と関連するバッファーを供給して、細胞の十分な再懸濁が達成される。更に死細胞を除去10
することが推奨される。

【0050】

FACSの前に細胞の予備選択を達成するために、特に米国特許第4,061,560号(これにより内容が完全に記載されたものとする)に記載されるような連続的なフロー電気泳動における電荷流動分離技術を使用してよい。標的細胞特異的抗体(ASEC)での染色を伴わずに又は伴って使用してよい。後者はハンセン他(Hansen et al., 1982, (Antigen-specific electrophoretic cell separation (ASECS): Isolation of human T and B lymphocyte subpopulation by free-flow electrophoresis after reaction with 20
antibodies. J. Immunol. Methods 51:197-208)によって論評されている。該方法は第1の抗体に対する第2の抗体をいわゆる“サンドウィッチ技術”において使用することによって改善することができる。なおも不十分であれば、第2の抗体に対する第3の抗体を使用してよい。

【0051】

選択的に通常の抗体よりも高い負電荷を有する側基を有する特異抗体を使用してよい。更に非常に小さい磁性粒子と結合された抗体が有利なことがある。

【0052】

最終的な細胞分離のためにフローサイトメトリーの工程が使用される。有利には蛍光活性化セルソーティングを行う。しかしながら、蛍光はたった1つの可能な染色系である。それというのも他の染料系を使用してよく(米国特許第4,933,293号)かつ光散乱測定又は電氣的サイジングのためには染色は必要ないからである。 30

【0053】

フローサイトメトリー装置は、例えばMICROCYTE、Becton Dickinson's FACScan、FACStrak、FACSort、FACSCalibur、FACStar、FACSVantage、Bio-Rad's BRYTE-HS、Coulter's PROFILE及びEPICS、Cytomation's Moflow、Ortho's CYTORON及びPartec's PAS machineから市販されている。PARTEC(ドイツ)からのPASシステムが有利である。

【0054】

分子標識での標的配列の標識の他に抗体で染色されている標的細胞でフローサイトメトリーを実施することが有利である。これは染色前の細胞の固定を含む。抗体は細胞内物質又は表面マーカに対するものである。米国特許第5422277号及び同第6004762号に記載されるような固定液での細胞の処理は抗体又は他の所望の成分を細胞膜を通して細胞中に導入することを可能にする。 40

【0055】

特異的な細胞決定基に対する蛍光色素と結合した抗体での直接的な染色が有利である。免疫蛍光のための標識として適当な多くの種々の色素の有用性は1つの試料における多くの副集合の同時の測定を可能にする。免疫蛍光のための色素についての論評はGlazer 他(Fluorescent tandem phycobiliprotein con 50

jugates. Emission wavelengths shifting by energy transfer. Biophys J. 1983 Sep. . 43 (3) . P383-386)、Recktenwald他(Peridinin chlorophyll complex As fluorescent label. US Patent No. 4876190. October 24, 1989)、Recktenwald他(Biological pigments As fluorescent labels for cytometrie. New Technologies in Cytometrie and Molecular Biology, Gary C. Salzman, Editor, Proc. SPIE 1206 P 106-111, 1990)、Waggoner他(A new fluorescent antibody label for three - Color flow cytometrie with a single laser. Ann N Y Acad Sci 1993 677 P185-193)、Haugland他(Spectra of fluorescent dyes used in flow cytometry. Methods Cell Biol 1994, 42 Pt B P 641-663)及びRoederer他(10-parameter flow cytometry to elucidate complex leukocyte heterogeneity, Cytometrie 1997, 29 (4) P328-339)に見られる。

【0056】

また免疫蛍光をDNA染色、例えばDNAを染色する蛍光色素であるヨウ化プロピジウム及びDAPIと組み合わせることも可能である。またRabinovitch他(Simultaneous cell cycle analysis and two color surface immunofluorescence using 7-amin-actinomycin D and single laser. J Immunol. 1986 Apr. 15 136 (8). P 2769-2775)を参照のこと。

【0057】

細胞内化合物に対する染色抗体を細胞膜に浸透させることを可能にするために、細胞を固定化し、かつ膜を透過性にすべきである。幾つかの適用 固定化及び細胞膜の透過化のために、サポニンはサイトカインの評価を含んで効果的に使用できる(Willingham: An atlas of immunofluorescence in cultured cells. Vol. II Academic pressも参照のこと)。架橋性固定液としてホルムアルデヒドを適用でき、その際、細胞形態の良好な保存を可能にする。選択的に他の界面活性剤、例えばNP40を、ホルムアルデヒドによる固定と組み合わせ又は有機溶剤、例えば70%メタノール又はエタノール/酢酸(95/5)の組合せで使用して細胞を1工程で固定化及び透過化できる。

【0058】

特にRNA及びDNAの染色のために、アルコールでの固定化が有利である。時として種々の固定化/透過化の工程の組合せでさえも有用なことがある、例えばBrdU染色のために70%アルコールに引き続いてホルムアルデヒド/Tween20が有用である。

【0059】

バックグラウンド染色に関する問題を克服するために、肝臓粉末(肝臓のアセトン沈殿物)又は無関係の細胞(2:1、抗体溶液の容量(1mg/ml):充填細胞)におけるポリクローナル抗体の吸着は非特異的な染色を低減する。最適には、特異的な染色はモル過剰の精製抗原との抗体のプレインキュベーションによってブロックすることができる。

【0060】

定義:

核酸という用語は全ての種類のヌクレオチド配列を示し、従ってデスオキシリボヌクレオチドのオリゴマー及びポリマー並びに全ての種類のリボヌクレオチドを含む。類似体を有するヌクレオチド、染色体及びウイルス核酸もしくは細菌核酸又はその一部、プラスミド、組み換えヌクレオチド及び全ての種類の合成配列を含む。

10

20

30

40

50

【0061】

標的細胞という用語はそれぞれ選択又は精製させるべきである関心がもたれた細胞を示す。標的細胞として胎児細胞の場合において、該細胞は特に栄養膜、胎児の有核赤血球、顆粒球及び／又は白血球の副集団、すなわち多形核リンパ球、例えば好中球、好塩基球及び好酸球を含む。

【0062】

標的配列という用語は標識された相補的な配列とハイブリダイズすべきである全ての核酸を示す。この用語は質及び／又は量の点で標的細胞に特異的な配列を含む。野生型の配列並びに全ての種類の遺伝的に改変された核酸を含む。

【0063】

標識された配列という用語は標的配列に相補的又は部分的に相補的な、少なくとも1つのマーカ、例えば後続の検出を可能にする色素、蛍光色素、磁性粒子又はその他で標識された核酸を示している。

10

【0064】

分子標識という用語は米国特許5,925,517号の請求項1の1つによる標識された配列を示す。

【0065】

RNAという用語はmRNA及びrRNA並びにその誘導体及び一部を含む全ての種類のRNAを示す。

【0066】

DNAという用語は自然に生じる又は合成によって得られたDNA並びにその誘導体及び一部の全ての種類を示す。

20

【0067】

ハイブリダイゼーションという用語は一本鎖核酸又はその一部が相補的又は部分的に相補的な一本鎖核酸鎖と対を形成する現象を示している。インサイチュールハイブリダイゼーションは、細胞を実質的にインタクトに維持する条件下にハイブリダイゼーションすることを示す。

【0068】

蛍光という用語は放出される波長と異なる放射線での励起の結果として検出できる放射線の放出を示す。

30

【0069】

例

例1

フローサイトメトリーにおいて分子標識を使用する染色体異常の検出（フローチャートI）

工程2）に記載される予備試験において得られた陽性のzfy結果の場合に、zfy特異的分子標識（FITC）を合成する（ポイント3）を参照）。

【0070】

予備試験における陰性の結果は女性を示し、従ってHbF mRNA（FITC）特異的分子標識が選択される。

40

【0071】

分子標識を、工程6）で記載された富化された胎児細胞に輸送した後に、HbF特異的抗体（PE）及びDAPI（PARTEC ドイツ）での核染色は胎児細胞の決定を改善する（工程7参照）。

【0072】

標的細胞を同定し、ゲートさせ、かつ自動的にPAS-III（PAS-III：Particle Analysing and separation System. Operating Manual；Partec Germany，工程8も参照のこと）に関する作業マニュアルのプロトコールに従って分離する。

【0073】

50

最後に診断を、工程 9) に記載される F I S H 分析によって、三染色体性 21 の検出のために市販の部位特異的ラージインサートクローン (large-insert clone) (V y t h i s, U S A) を使用することによって実施する。

【0074】

例 2

フローサイトメトリーにおける囊胞性線維症遺伝子特異的な分子標識を使用する直接的突然変異分析 (フローチャート I I 参照)

胎児細胞の予備富化を工程 1) に記載のように実施した。

【0075】

フローチャート I I に記載されるように 1 つの分子標識を使用して母系細胞から胎児細胞を識別した。工程 2) において陽性の結果である場合に、z f y 特異的 m R N A 分子標識 (F I T C) を胎児細胞及び母系細胞の間の識別のために使用する。母系細胞から胎児細胞を識別するための第 2 のパラメータとして、H B F 遺伝子のための胎児特異的 m R N A 分子標識及び D A P I 核染色を適用する。

【0076】

野生型配列の決定のための分子標識は E D A N S で標識され、かつ突然変異特異的標識を蛍光 H E X (工程 3 による) で標識する。

【0077】

胎児細胞を F I T C 及び D A P I 蛍光によって識別すべきである。遺伝状態は引き続いての可能な組合せ: 1 D A P I 及び F I T C 陽性 (胎児細胞) 1 a: H E X 陽性、E D A N S 陰性 (胎児細胞野生型同型接合)、1 b: H E X 陽性、E D A N S 陽性 (胎児細胞、野生型及び突然変異)、1 c: H E X 陰性及び E D A N S 陽性 (胎児細胞、突然変異同型接合) によって決定される。

【0078】

例 3

コントロールとして本来の C H O 細胞を使用する、C D 5 9 m R N A 特異的分子標識を使用する F C 2 細胞の同定

C H O 細胞の細胞系統 F C 2 はヒトの染色体 11 を有する。従って F C 2 細胞はその表面上で C D 5 9 を発現する。従って C D 5 9 の発現は抗体反応によって証明できる。

【0079】

C D 5 9 m R N A 特異的分子標識 (D A B C Y L - G G T G A C T C C A T T T C T G G C A G C A G C C T G T C A C C - F A M) を F C 2 細胞に輸送する。引き続き、蛍光シグナルを分析する (図 5)。標識を使用しない F C 2 細胞 (図 6) 及び標識を使用する C H O 細胞 (図 7) をコントロールとして使用する。

【0080】

蛍光の高い増大により、F C 2 細胞は C H O C D 5 9 ネガティブ細胞から明らかに識別できる。

【0081】

図 5: ホルムアルデヒドで固定化され、“Gene Porter” システムによって細胞中に輸送された C D 5 9 特異的分子標識で染色された F C 2

F C S: 相同細胞

S S C: 相同細胞

F L 1: 分子標識プローブでの特異的染色の後の高められた蛍光

F L 3: チャンネル F L 1 グリーンからのノイズ

図 6: 固定化されていない染色されていない F C 2

F C S = 前方散乱 (細胞のサイズ) 1 つの細胞系統である場合にはそれは同型細胞のピークに違いない。

【0082】

S S C = 側方散乱 (細胞の形態) 1 つの細胞系統である場合にはそれは F S C ピークとして相同であるに違いない。

10

20

30

40

50

【0083】

FL1 グリーン：蛍光標識された細胞の強度を示す。

【0084】

FL3 オレンジ／レッド：“フィコエリトリン”染色された細胞のために通常使用される。

【0085】

図7：ホルムアルデヒドで固定化され、“GenePorter” (GenePorter, Transfection Reagent Cat# T201015, 10190 Telesis Court, San Diego) システムで細胞中に輸送されたCD59 特異的分子標識で染色されたCHO細胞。

10

【0086】

FSC：同型細胞

SSC：同型細胞

FL1 グリーン：標識染色されたCHO細胞の自己蛍光及びバックグラウンド FL3 オレンジ／レッド：チャンネルFL1 グリーンからの重複ノイズ

プロセス工程の詳細な記載

1. 血液試料

妊娠7～15週後の妊婦から約30mlの血液を、1つ以上の抗凝血剤、例えば酸-クエン酸デキストロース (ACD)、エチレンジアミン四酸 (EDTA)、ヘパリン及び／又はクエン酸-リン酸-デキストロース-アデニン (CPDA-S-Monovette、Sarsted、ドイツ) を含有する真空試験管中に回収する。血液試料を処理し、かつ採取の48時間以内に分析する。

20

【0087】

2. 母系血液における胎児mRNAの定量 (予備試験)

300 μ lの全血試料を、900 μ lのRBC溶解溶液 (Quantum Prep AquaPure RNA Isolation, BioRad) を含有する1.5mlの小型遠心分離管に添加し、かつ該管をひっくり返すことによって室温で10分間混合する。小型遠心分離機において13000～16000 $\times$ gでの20秒間の遠心分離の後に、上清を、可視の白血球ペレット及び約10～20 μ lの残留液を残してピペットで除去する。白血球を、ペレットが見えなくなるまで渦動によって激しく再懸濁する。

30

【0088】

300 μ lのRNA溶解溶液 (Quantum Prep AquaPure RNA Isolation, BioRad) を前記混合物に、3回上下にピペティングすることによって添加する。100 μ lのDNA沈殿溶液 (Quantum Prep AquaPure RNA Isolation, BioRad) を細胞溶解物に添加し、管をひっくり返すことによって混合し、かつ16000 $\times$ gでの遠心の前に5分間氷浴中に置く。沈殿したタンパク質及びDNAは密なペレットを形成する。上清を300 μ lの純粋なイソプロパノールを含有する1.5mlの透明な滅菌小型遠心分離管に入れる。試料を30回ひっくり返すことによって混合し、16000 $\times$ gで3分間遠心分離する。全RNAは少量の半透明のペレットとして確認できる。上清を流し、該管を吸着紙中で乾燥させる。ペレットを70%エタノールで2回洗浄し、30分間空気乾燥させ、使用するまで-80℃で貯蔵する。

40

【0089】

第1鎖相補性DNAを、ランダムヘキサマー (クロンテック) をプライマーとして用いて合成する。空気乾燥され、かつ凍結されたRNA試料を

1 μ lの50マイクロモル/lのランダムヘキサマー

0.2 μ lの0.1モル/lのジチオトレイトール (DTT)

0.05 μ lのRNAアーゼインヒビター (Rnasin、プロメガ) 及び

7.25 μ lのヌクレアーゼ不含の滅菌水

からなる8.5 μ lの溶液中に再懸濁する。

50

【0090】

ヘキサマーは、70℃で5分間インキュベートすることによってアニーリングし、かつ氷上で急冷する。逆転写を

4 μ l の25ミリモル/lのMgCl₂

2 μ l の10×PCRバッファーII (パーキンエルマー)

4 μ l の2ミリモル/lのdNTP (アマシャム ファルマシア)

1 μ l のRNAアーゼインヒビター (プロメガ) 及び

0.5 μ l のモロニーマウス白血病ウイルス (Maloney murine leukemia virus) (MMLV) 逆転写酵素 (ギブコBRL)

を含有する11.5 μ lを添加することによって実施し、かつ37℃で1時間インキュベートする。反応を95℃への5分間の加熱によって停止させる。 10

【0091】

RT-PCRで使用される前に、5 μ lのRNAハイブリダイゼーション溶液 (Quantum Prep AquaPure RNA Isolation, BioRad) を該RNAに添加する。該混合物を引き続き激しく渦動させ、かつ5 μ lを50 μ lのPCR実験に使用する。

【0092】

マルチプレックス化された定量的リアルタイムPCR (multiplexed quantitative real-time PCR) を、 β -アクチン、zfy及びHbFのmRNA配列からPCR増幅された断片の中央に相補的な分子標識を使用して実施する。分子標識のアーム配列の長さはPCRのアニーリング温度 (第1表) でステムを形成できるように選択されるが、ループの長さ及び配列は前記のPCR工程で安定なプローブ標的物ハイブリッドが得られるように選択される。分子標識の設計はループアンチセンスオリゴヌクレオチド及びリアルタイムサーマルサイクラー (BioRad) を使用して熱変性プロファイルによって事前に試験している。所望の熱プロファイルを示す分子標識だけが増幅プライマーに類似の濃度で引き続いてのPCRに含まれる。 20

【0093】

PCRの変性工程の間に、分子標識はランダムコイルコンホメーション及び蛍光を呈する。温度が、一本鎖PCR断片の標的配列に対する分子標識のアニーリングを可能にするほど低下されると、ループ標的物ハイブリッドが形成し、これにより蛍光発光の継続が可能である。しかしながら余分の分子標識は迅速に、蛍光を止める安定な分子内ステムハイブリッドを形成する。温度がプライマー伸長を可能にするほど高まると、分子標識は標的配列から解離し、かつ重合工程と干渉しない。新規の分子標識ハイブリダイゼーション工程はPCRサイクルの間の各アニーリング工程において行われるが、一方で得られた蛍光の増大がモニタリングされ、かつ推定される標的アンプリコンの量が示される。 30

【0094】

多重化されたPCR実験において、少なくとも2つの異なる標的配列を1つの管中で同時に増幅される。少なくとも2つの分子標識を同時に使用し、該標識のそれぞれは放出波長でスペクトルの重複を有さない異なる蛍光色素で標識されている。得られる蛍光をPCRのアニーリング工程の間に分子標識のそれぞれの適当な波長でモニタリングされる。 40

【0095】

HbF及びzfyを多重化して、PCRを内部コントロールPCRとしての β -アクチンPCRと組み合わせる。 β -アクチンは広く使用されており、そのmRNAは殆どのそれぞれの細胞型において至る所で豊富である。従って β -アクチン増幅は効果的なポリメラーゼ連鎖反応を示すだけでなく、PCRで使用される標的細胞の全量に高度に比例している。

【0096】

プライマー及びリアルタイム定量的PCR実験で使用される分子標識は第1表に示されている。1つのq-RT-PCR実験において、zfy遺伝子特異的mRNAの量を定量し、かつその結果を、それぞれ男性又は女性の胎児を有する母親の血液試料からの全mRN 50

Aであるポジティブコントロール試料及びネガティブコントロール試料と比較する。

【0097】

リアルタイム定量的RT-PCRをiCyclerサーマルサイクラー (BioRad) を使用することによって実施する。zfyのmRNA及びHbFのmRNAのためのPCRを別個の反応で実施するが、β-アクチンに関するPCRと多重化する。各50μlの反応は

5μlの関連の鋳型cDNA

1. 0μMの、それぞれzfy又はHbFを増幅するためのプライマー

0. 25μMの、β-アクチンを増幅するためのプライマー

0. 2μMのzfy分子標識又は0. 5μMのHbF分子標識

0. 2μMのβ-アクチン分子標識

0. 25mMの各dNTP

2. 5ユニットのAmpliTaq Gold (パーキンエルマー)

4mMのMgCl₂

50mMのKCl及び10mMのトリスHCl (pH8. 3)

を含んでいた。

【0098】

50μlの容量の反応を適当なPCR管に装入し、かつiCycler (BioRad) に入れる。cDNAを変性し、かつ96℃への10分間の加熱はTaqポリメラーゼを活性化する。更なる50サイクルのPCRにおいて、変性を95℃で30秒間で行い、60~68℃で30秒間プライマー及び分子標識をアニーリングし、かつ72℃で30秒間伸長を行う。蛍光データは反応のアニーリング工程の間に得られ、かつ蛍光のレベルをサイクル数の関数としてモニタリングする。

【0099】

いかなる鋳型も使用しない反応は蛍光にいかなる増大も示さず、基線として機能する。広範な鋳型濃度にわたり、基線を検出的に超過している蛍光シグナルを有するサイクルは鋳型分子の初期数の対数に反比例している。各ウェルにおけるβ-アクチン蛍光のレベルはPCRのために使用される全cDNAの量を示す適当な更なるコントロールパラメータである。

【0100】

各標的アンプリコンの合成から得られる蛍光シグナルを比較するために、各分子標識の蛍光強度 (F) は計算式 $(F - F_{min}) / (F_{max} - F_{min})$ によって標準化される。こうして、値“0”は標的物の増幅の前の蛍光を表し、かつ“1”はPCR後の蛍光の最大レベルを表す。各分子標識のために、蛍光シグナルの強度がバックグラウンドの基線蛍光の標準偏差の10倍を超える場合には閾値サイクルが規定される。標的物の定量のために、規定された閾値サイクルと標準曲線との比較を行う。

【0101】

3. 分子標識の製造

25~30個のヌクレオチドのオリゴデスオキシヌクレオチド (第2表参照) を相補的な5ヌクレオチドのアーム配列 (ステム配列) によってサンドウィッチされた15~20ヌクレオチドの標的配列 (mRNAに対してアンチセンス) からなり、蛍光色素 (フルオレセイン又はEDANS) に5'末端で、かつ消光色素としてのDABCYLに3'末端で共有結合されている25~30ヌクレオチドのオリゴデスオキシヌクレオチド (第2表を参照) を合成する。このプロトコールは以下の一般式: フルオレセイン-5'-GCGAGCG-標的配列-GCTCGC-3'-DABCYLの分子標識をもたらす。

【0102】

前記の分子標識の合成のための初期のオリゴヌクレオチドはスルフヒドリル基をその5'末端に、かつ第一級アミノ基をその3'末端で有する。その合成は標準的なA-、C-、G-、T-ホスホアミデート化学で自動DNAシンセサイザ (パーキンエルマー394) で3'-アミノ修飾剤としての1-ジメトキシトリチロキシ-3-フルオレニルメトキシ

10

20

30

40

50

カルボニルアミノヘキサシラン-2-メチルスクシニル-長鎖アルキルアミノ調整多孔質ガラス (C7-CPG, Perseptive Biosystems) を使用して実施する。トリチル-ヘキシルチオールリンカー ((S-トリチル-6-メルカプトヘキシル)-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)ホスホアミデート Perseptive Biosystems) を最終工程としてヌクレオチドの5'末端に結合させる。

【0103】

引き続き該オリゴヌクレオチドを28%のアンモニウムを使用して55℃で6時間で支持体から解離させる。この処理は5'のスルフヒドリル末端のトリチル部を除いてアミノ基及びホスホネート基で保護部を除去する。解離されたオリゴヌクレオチドを逆相カートリッジカラム (Waters Sep-Pak C18, Millipore) によって精製し、かつ次いで0.05Mのトリエチルアンモニウム酢酸塩 (pH7.0) 中に溶解された5~40%のアセトニトリルの線形勾配でC18カラム上でのHPLCによって1.0ml/分の流速において40℃で30分間作動させて分画し、かつ254nmで検出する。

10

【0104】

約200ナノモルの乾燥オリゴヌクレオチドを0.5mlの0.1Mの重炭酸ナトリウム (pH8.5) 中に溶解させた。引き続き該混合物を0.1mlのN,N-ジメチルホルムアミド中の20mgのDABCYL (4-(4'-ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸) スクシンイミジルエステル (分子プローブ) と一緒に0.01mlのアリコートで20分間隔でインキュベートする。該混合物を暗所において室温で3日間保持した。過剰のDABCYLをこの混合物から、0.1Mのトリエチルアンモニウム酢酸塩 (pH6.5) で平衡化されたセファデックス (Sephadex) G-25カラム (Nap-5, Amersham-Pharmacia) を通して除去する。殆どの溶出液を0.2μmフィルタ (Centrex MF-0.4, Schleicher & Schuell) を通して濾過し、かつC-18逆相HPLCカラム (Waters) 上に、0.1Mのトリエチルアンモニウムアセテート (pH6.5) 中の75%のアセトニトリル中の0.1Mのトリエチルアンモニウムアセテートの20~70%の線形溶出勾配を1ml/分の流速で25分間使用して負荷する。DABCYLによる吸収を分光光度計によってモニタリングする。260及び491nmで吸収するピークを収集する。

20

30

【0105】

5'末端でスルフヒドリル基からトリチル部を除去するために、乾燥させたかつDABCYL結合されたオリゴヌクレオチドを0.25mlの0.1Mのトリエチルアンモニウムアセテート (pH6.5) 中に溶解させ、かつ0.01mlの0.15Mの硝酸銀と一緒に室温で30分間インキュベートする。この溶液に0.015mlの0.15MのDTTを添加する。上清を回転によってペレットから除去し、かつ0.25mlの0.1Mの重炭酸ナトリウム (pH9.0) 中の40mgの5-ヨードアセトアミドフルオレセイン (分子プローブ) からなる溶液に移す。インキュベートは室温で暗所において1日間実施する。

【0106】

過剰のフルオレセインをゲル排除クロマトグラフィー (Nap-5、アマシャムファルマシア) によって除去し、かつオリゴヌクレオチドをHPLCによって精製する。波長260nm及び491nmで吸収するフラクションを回収する。それを沈殿させ、かつ0.1mlのTEバッファー中に再溶解させる。収率は260nmでの吸収を測定することによって推定する。

40

【0107】

4. 密度勾配遠心分離

15mlの母系の末梢血液を15.0mlのHistopaque^(R)-1119 (Sigma Diagnostics) を含有する50mlのコニカル遠心分離管を室温で慎重に積層し、これを500×gで正確に30分間室温で遠心分離する。低温、例えば4

50

℃での遠心分離によって細胞凝集及び乏しい回収がもたらされることがある。

【0108】

遠心分離の後に、単核細胞を有する乳白色の界面の0.5cm以内までの上層を吸引する。有核の赤血球系細胞及びリンパ球を含む白色のバンドは細胞質層の直下であり、広い拡散バンドを有するHistopaque^(R)-119は他の有核の赤血球系細胞及び未成熟の赤血球を白色層より高いが成熟赤血球細胞ペレットよりも低い密度で含有し、これは管の極めて底部の有核細胞及び赤血球ペレットの直下である。

【0109】

これらの細胞を新しい管に移し、0.1%のBSAを有するリン酸緩衝生理食塩溶液を添加して30mlにし、緩慢な吸引によって混合し、引き続き250×gで10分間遠心分離する。上清を廃棄する。 10

【0110】

ペレットを0.1%のBSAを有する10mlのリン酸緩衝生理食塩溶液で再懸濁し、かつ250×gで10分間再び遠心分離する。洗浄工程を繰り返し、かつ上清を廃棄する。細胞ペレットを0.1%のBSAを有する750μlの緩衝生理食塩溶液中に再懸濁する。

【0111】

5. 磁気活性化セルソーティング（ディプリーション、分離）

ディプリーション

リンパ球の効果的なディプリーションを改善するためにCD45及びCD15の組合せを使用する（Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany; Order No. 458-01 and No. 466-01）。 20

【0112】

凝集物の形成を減らすために、再懸濁バッファーにEDTA及びウシ血清アルブミン（BSA）又は血清（2mMのEDTA及び0.5%のBSAを含有するPBS pH7.2）を供給し、かつ死細胞を磁性標識の前に除去する。

【0113】

MACS分離のために、該バッファーを真空の適用によって、有利には室温でバッファーを用いて脱ガスする。 30

【0114】

磁性標識を冷却器中で6℃～12℃の温度で15分間実施する。

【0115】

凝集物を、細胞をナイロンメッシュ（30μm）又はフィルタ（Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany; Order No. 414-07）に通すことによって除去する。

【0116】

前分離のために、フィルタをレザバー中で500μlの再懸濁バッファーを激しくピペッティングすることによって濾過プロセスの前に湿潤させ、かつ溶出液を廃棄する。引き続き10⁸を有する最低の500μlの細胞懸濁液をフィルタに通し、これを500μlバッファーで2～3回洗浄する。 40

【0117】

不所望の白血球細胞のディプリーション

フィルタ分離の後に、細胞を計数し、かつ適当なバッファー中で洗浄する。

【0118】

磁性分離

磁気活性化セルソーティングのために、LD分離カラム（オーダー番号429-01）を含むMidMACSシステムを使用する（Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany; Order No. 423-01）。 50

【0119】

カラムを3mlのバッファーで洗浄した後に、バッファー中で懸濁された磁性標識された細胞(500 μ l バッファー/10⁸ 全細胞)をカラムに通す。溶出液を陽性フラクションとして回収する。この工程を繰り返してよい。該溶出液を収集し、かつ200 $\times$ gで10分間遠心分離する。ペレットを1.5mlのPBS+0.5%のBSA中に更なる工程のために再懸濁する。

【0120】

胎児の赤血球の富化

前記のMideMACSシステムを、グリコフェリンA(Glycopherin A)(GPA; オーダー番号422-01)及びCD(オーダー番号462-01)結合したMicroBeads及びMACSディプリーションで記載されるようなバッファー系(オーダー番号424-01)を使用することによって胎児赤血球の富化のために作動させる。

【0121】

細胞懸濁液をカラムに通過させる。一方で溶出液を廃棄するが、カラム中に残留している細胞をしっかりと濯ぎだし、かつ陽性フラクションとして回収する。

【0122】

6. 標的細胞への分子標識の輸送

富化された胎児細胞をHEPES(145mMのNaCl、5mMのKCl、1mMのMgCl₂、1mMのCaCl₂、10mMのグルコース、10mMのHEPES、pH7.4)で洗浄し、かつ遠心分離によって沈殿させる。2 μ gの蛍光分子標識を2 μ lの水中に溶解させ、かつ400 μ lのヌクレアーゼ不含の水中に懸濁された0.4mgのN,N,N',N'-テトラメチル-N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2,3-ジオレオイルオキシ-1,4-ブタンジアンモニウムヨード及び0.3mgのL-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンからなる9 μ lのリポソーム(Tfx-50 Reagent, Promega)と混合する。該混合物を緩慢に渦動させ、かつ室温で10分間インキュベートする。引き続き細胞をHEPES中で洗浄する。

【0123】

7. HbF-PE(フィコエリトリン)及びDAPI染色-フローサイトメトリープロトコール

染色手順:

試料内の赤血球細胞(RBC)の量を計数した後に、2.5 $\times$ 10⁷細胞を1mlの0.05%の冷グルタルアルデヒドに室温で10分間添加する。この混合物を2mlの冷PBS-0.1%BSA(pH7.4)で3回洗浄する。引き続き細胞を再懸濁し、かつ0.5mlの0.1%のTritonX100中で室温において3~5分間インキュベートし、引き続き2mlのPBS-0.1%BSA中で洗浄する。次いで細胞を0.5mlのPBS-0.1%BSA中に渦動させるか又は緩慢にピペティングすることによって取る。

【0124】

10 μ lの前記の懸濁液を10 μ lの抗体(Caltag Laboratories Burlingame, CA 94010, Product code: MHFH04; Gamma chain antibody)及び70 μ lのPBS-0.1%BSAに添加し、かつ室温において暗中で15分間インキュベートする。それぞれ2mlのPBS-0.1%BSAでの2工程の洗浄工程を次で行う。

【0125】

ペレットを500 μ lのPBS-0.1%BSA中で懸濁し、かつ1mlのDAPI染色溶液(PARTEC、ドイツ)を添加する。インキュベーションを室温で10分間実施する。ペレットを2mlのPBS-0.1%BSAで2回洗浄し、かつ最後に0.5mlの1%ホルムアルデヒド中に渦動させることによって再懸濁させる。細胞を管中で暗中に冷却器において貯蔵する。

【0126】

誤った陽性シグナルを低減させるために、非特異的なフィコエリトリン（P E）ー染色された抗体をサイトメトリー検出の間のネガティブコントロールとして使用する。

【0127】

8. 細胞分離

細胞分離のために、P A S I I システム（P A R T E C、ドイツ）を、488nmのアルゴンレーザ及び紫外線ランプを適用して使用し、細胞内の種々の蛍光色素を識別する。

【0128】

9. F I S H

染色体又は間期（i n t e r p h a s e）スライドの調製

細胞分離の後に、分子標識を使用してフローサイトメトリーにおいて胎児細胞を同定し、かつ染色体を有する細胞遺伝学的スライド又は核懸濁液を蛍光インサイチュールハイブリダイゼーションのために製造する（S u b c e l l u l a r F r a c t i o n, A p r a c t i c a l a p p r o a c h, E d i t e d b y J. M. G r a h a m a n d D. R i c k w o o d: I R L P r e s s: p a g e 7 9, P r o t o c o l 3. I s o l a t i o n o f m e t a p h a s e c h r o m o s o m e s; p a g e 7 5, P r o t o c o l 1. P u r i f i c a t i o n o f c e l l n u c l e i f r o m s o f t t i s s u e）。

【0129】

スライドを製造するために、一滴の染色体又は細胞核懸濁液を非常にクリーンなスライドガラス上に置く。これらのスライドを2×SSC、pH7.0中で5分間すすぐ。次いで100μg/mlのRNAアーゼAを含有する2×SSC中で37℃において少なくとも30分間インキュベートする。引き続きスライドの洗浄を2×SSC、pH7.0中で3×5分間実施する。RNAアーゼ処理をして、RNA-DNAハイブリッドを形成する相同のプロブDNA配列とハイブリダイズすることがある外因性RNAを除去する。これによりDNA標的物へのハイブリダイゼーションにおける信号対雑音比が改善される。

【0130】

スライドのインキュベーションを0.01NのHCl中の0.05%（w/v）ペプシン粉末中で37℃において10分間ペプシンで行う。スライドを1×PBS、pH7.3中で2×5分間すすぐ、かつ次いで50mMのMgCl₂を含有する1×PBS中で2×5分間すすぐ。スライドの固定化は1%のホルムアルデヒド、1×PBS、50mMのMgCl₂によって室温で10～60分間で達成される。スライドをPBS中で完全に洗浄する。ペプシン及び他のプロテアーゼ（すなわちプロテイナーゼK又はプロナーゼ）は標的DNAをパッケージ化する染色体タンパク質を消化させることによって到達性を増大させる。中期（m e t a p h a s e）及び核は延長されたプロテアーゼ処理の後にスライドから離れるので、スライドのホルムアルデヒドによる再固定化を使用する。

【0131】

エタノール組（70%、85%、100%）におけるスライドの脱水をそれぞれ5分間、空気乾燥で実施する。次いで70%の脱イオン化されたホルムアルデヒド及び2×SSCからなる200μlの変性溶液を各スライドに置き、かつカバーガラスで覆う。該スライドを90℃の炉中に約60分間置く。カバーガラスを引き離し、直ちに氷冷70%エタノール中に入れる。脱水を氷冷エタノール組（70%、85%、100%）中で再び行う。空気乾燥後に、スライドはインサイチュールハイブリダイゼーションの準備ができている。

【0132】

プロブDNAの製造及び標識

DNAテンプレートはスーパーコイル型又は直鎖型であってよい。DNAアーゼIでのDNAのニック付与の後に、DNAポリメラーゼの5'-3'エキソヌクレアーゼ活性はヌクレオチドを除去し、かつDNAポリメラーゼ活性は標識されたヌクレオチドを含む反応混合物からdNTPで切り出されたヌクレオチドを置き換える。ビオチン、ジゴキシゲニン又は蛍光色素の導入のための手順はほぼ同一である。ニックトランスレーションされた

10

20

30

40

50

プローブDNA断片の最終サイズは非常に重要である。標識されたプローブ配列は500bp以下である。それというのも検体の透過が困難であり、ガラス及び細胞材料の両者に非特異的に付着する傾向にあり、信号を不明瞭にする高いバックグラウンドをもたらすからである。100bpより短い配列は通常のスリンジェントな条件下に効率的にハイブリダイズしない。

【0133】

DNAプローブを氷上で混合する、小型遠心分離管中：

DNA（液体形で）	1 μ g	
10×ニクトランスレーションバッファー	5 μ l	
（トリス／HCl 1M、pH8；MgCl ₂ 1M；BSA 10%）		10
0.1Mのメルカプトエタノール	5 μ l	
10×冷dNTP溶液	5 μ l	
（それぞれ0.5mMのdATP、dCTP、dGTP）		
10×1：3標識されたdUTP／冷dTTP溶液	5 μ l	
（0.125mM標識dUTP、すなわちビオチン-16-dUTP又はジゴキシゲニン-11-dUTP及び0.375mMのdTTP）		

ニクトランスレーションされたDNAにおけるそれぞれほぼ20～25番目の位置での1つの変更されたヌクレオチドの標識密度は殆どのFISH実験のために適当である。

【0134】

10×DNAアーゼI	5 μ l	20
（10U／ μ lの活性を有するDNAアーゼストック溶液を二回蒸留したH ₂ Oで1：3000～1：4000に希釈する）。添加された酵素の量に依存するプローブのサイズ分布として、最適なDNAアーゼ濃度を定量によって測定せねばならない。DNAアーゼIの各々の新しいストックを試験して適当な作業濃度を決定すべきである。		

【0135】

DNAポリメラーゼI（5U／ μ l）	1.3 μ l
DdH ₂ Oを必要であれば添加して、50 μ lの最終反応容量に到達させる。	

【0136】

より大量のDNA（5 μ gまで）を標識すべきであれば、反応容量は250 μ lにスケールアップしてよい。	30
---	----

【0137】

反応混合物を15℃で2時間インキュベートする。最適な導入のために、インキュベーション時間は少なくとも2時間であるべきであり、変更されたヌクレオチドの初期導入率は非置換のdNTPのそれより低い。ニクトランスレーションされたDNA断片のサイズを1.5%のアガロースゲル上で、適当なサイズマーカー（0.1～1kb範囲）に沿って確認する。DNA断片がなおも大きすぎる場合には、DNAアーゼ（場合により）の第2のアリコートを追加し、更に15℃で30～60分間インキュベートする。大部分の断片が100塩基対～500塩基対の間のサイズになったら、50 μ lのニクトランスレーション混合物への停止バッファー（1.25 μ lの0.5MのEDTA及び0.5 μ lの10%SDS）を添加することによって反応の停止を行う。管を68℃に10分間加熱する。		40
---	--	----

【0138】

ラージインサートクローンプローブのためには簡単なエタノール沈殿が効果的である。小さな単コピーDNAプローブのためにはセファデックスG50又は市販のカラムを通した遠心分離による精製が、導入されていないハプテン化された又は蛍光のヌクレオチドを除去するために推奨される。

【0139】

間接的な標識法において、ハプテンレポーター分子、すなわちDNAプローブに導入されるビオチン-dUTP又はジゴキシゲニン-dUTPはハイブリダイゼーション反応の後の親和性細胞化学によって検出される。蛍光（ストレプト）アビジン分子は特異的に結合	50
--	----

して、特異的にビオチン標識されたプローブ-標的物ハイブリッドになる。蛍光抗ジゴキシゲニン抗体はジゴキシゲニン化されたプローブの検出のために使用される。間接的に標識されたプローブの蛍光シグナルは直接法によって生じるシグナルより10倍まで強い。更に、小さいハプテン分子、例えばビオチンは殆どの蛍光dNTPよりも効果的にDNA中に導入される。

【0140】

インサイチューハイブリダイゼーション (FISHプロトコール)

散在したりピートがゲノムDNAの毎5 kbに存在し、殆どのラージインサートクローンがかなり多くの数の反復エレメントを有するので、それは、全ゲノムを通して密に関連するリピートとクロスハイブリダイズすることがある。従ってこれらのプローブはその特異的な標的DNA配列にハイブリダイズするだけでなく、全ての染色体にハイブリダイズし、それにより不明瞭なFISHシグナルが得られる。かかる非特異的ハイブリダイゼーションを回避するために、プローブDNA中の反復DNA配列を未標識の全ゲノムDNA又は反復c o t - 1 DNAとのプレハイブリダイゼーションによってブロックする。以下は、単コピーDNA配列の蛍光検出のために最適化されているサプレッションハイブリダイゼーションのための詳細なプロトコールである。

【0141】

ハイブリダイゼーション混合物

ニックトランスレーションされたDNAプローブは約20 ng / μ l (ニックトランスレーションバッファー中)の最終濃度を有する。まず、ヒトの検体にハイブリダイズされるべき多様に標識されたプローブを約50倍過剰のc o t - 1拮抗DNA (GibcoBRL)又は500倍過剰の断片化された(100~500塩基対)の全ゲノムDNA及び50倍過剰の断片化されたキャリアとして使用されるサケ精子DNAと一緒に沈殿させる。ハイブリダイゼーション混合物(全スライドについて30 μ l)中の最適なDNA濃度は主にプローブ型に依存する。ラージインサートクローンのためには、ハイブリダイゼーション混合物中の10~20 ng / μ l (又はスライドあたり300~600 ng)が推奨される。

【0142】

市販の特異的なヒト染色体(21及びY)のためのラージインサートクローン(Vythesis, USA)を使用する。

【0143】

以下に、2つの異なるBAC-DNAプローブを同じスライド上で一緒に三染色体性21によって影響される男性の胎児細胞の同定のためにハイブリダイズさせる。

【0144】

ストック	必要量	
ビオチン化(ニックトランスレーションされた)BAC#21	20 ng / μ l	20 μ l (400 ng)
ジゴキシゲニン化(ニックトランスレーションされた)BAC#Y	100 ng / μ l	2 μ l (200 ng)
C o t - 1 DNA (GibcoBRL)	1 μ g / μ l	30 μ l (30 μ g)
サケ精子DNA	10 μ g / μ l	3 μ l (30 μ g)

DNAを1 / 20容量の3Mの酢酸ナトリウム及び2容量の100%のEtOH(p. a.)で小型遠心分離管中で沈殿させる。試料をよく混合し、かつ-70℃で少なくとも30分間又は-20℃で一晩インキュベートする。沈殿を4℃で15000 rpmでの30分間の遠心分離回転で行う。上清を廃棄し、かつペレットを真空システム中又は選択的に加熱ブロック中で37℃において乾燥させる。

【0145】

DNAプローブを15 μ lの脱イオンされたホルムアミドで再懸濁し、少なくとも15分間37℃で振盪して、プローブDNAを再懸濁させる。次いで等量の2×ハイブリダイゼーション混合物(20%のデキストラン硫酸塩、4×SSC)を添加して、引き続き少な

くとも15分間激しく振盪する。

【0146】

ストリンジェントな条件はハイブリダイゼーション混合物中50%のホルムアミド、10%のデキストラン硫酸塩、2×SSCである。ハイブリダイゼーション混合物（プローブDNAを含有する）の変性を80℃で10分間実施する。プローブを凝縮水をペレット化するために2～5秒間遠心分離する。

【0147】

反復DNAフラクションを再アニーリングさせるために、変性された拮抗物及びプローブDNAを含有する管を37℃で少なくとも15分間インキュベートする。DNAプローブ（30μl）を変性スライド上に置き、かつカバーガラスで覆う。縁部をラバーセメント

10

【0148】

30μlの変性され、かつ前アニーリングされたDNAプローブ混合物を予熱されたスライド（スライド半分について15μl）上にピペティングする。該スライドを気泡が入らないようにカバーガラスで覆い、かつラバーセメントでシールする。ハイブリダイゼーションを湿気チャンバ中で37℃において一晩行う。

【0149】

染色体又は細胞核にハイブリダイズするプローブDNAの免疫細胞化学的検出 スライドの洗浄は50%ホルムアルデヒド、2×SSC中で42℃において3×5分間で行い、かつ次いで0.1×SSC中で60℃において2×5分間で行う。洗浄溶液を異なる水浴で予熱する。スライドを有するコプリンジャー及び予熱された洗浄溶液をプラットホーム攪拌機（Plattform shaker）で攪拌する。

20

【0150】

プローブDNAは標的DNAだけでなく、プローブ配列に部分的なホモロジーを有する配列にも非特異的にハイブリダイズする。かかる非特異的なハイブリッドは完全に一致するDNAハイブリッドよりも安定ではないので、これらを種々の厳密性の後ハイブリダイゼーション洗浄によって解離させることができる。

【0151】

第2のインキュベーション及び洗浄はニックトランスレーションされたハプテン化されたDNAプローブの可視化のために必要である。第2の試薬とのインキュベーションの前に、スライドを、4×SSC、0.1%Tween 20中の5%のウシ血清アルブミンで処理することによってブロックする。新鮮なブロッキング溶液とのコプリンジャー中のスライドのインキュベーションを37℃で少なくとも30分間行う。ブロッキングによって、非特異的抗体結合が回避され、かつバックグラウンドが減少する。

30

【0152】

蛍光（ストレプト）アビジン及び抗ジゴキシゲニン抗体、すなわちFITC-アビジン及びCy3結合された抗ジゴキシゲニンをそれぞれ1%BSA、0.1%Tween 20、4×SSC中で1:800及び1:200で（又は提供元の推奨により）希釈する。スライドを200μlの検出溶液及びカバーガラスで覆う。インキュベーションを湿室において37℃で暗所において30分間実施する。カバーガラスを引き離し、かつスライドをコプリンジャー中で0.1%Tween 20、4×SSCで42℃において3×5分間洗浄する。染色体及び細胞核を可視化するために、2×SSC中の1μg/mlのDAPI（4',6-ジアミジノー-2-フェニルインドール）で1～2分間スライドを後染色する。スライドの洗浄を蒸留水で完全に行い、空気乾燥し、かつ次いで耐フェード封入剤でそれらを封入する。DABCOは蛍光にスライドを晒した後にも蛍光の消滅を阻止する。

40

【0153】

大きいインサートクローンは特異的な蛍光シグナルを発生し、これらは顕微鏡を通して明らかに目視できる。蛍光マウス抗ジゴキシゲニン抗体を結合するジゴキシゲニン化されたDNAプローブを第2層の蛍光ウサギ抗マウス抗体及び、必要であれば第3層の蛍光ヤギ抗ウサギ抗体で増幅する。

50

【0154】

デジタルカメラの高い感度の故に、電子像増強の使用は免疫細胞化学的シグナル増幅に関して議論しうるように有利である。特化されたFISHソフトウェアは染色体のプレーンなDAPI蛍光をG様の横縞模様に変換することを可能にする。ISIS3蛍光写真システム及びHAMAMATSUのデジタルカメラシステム(Metasystems、ドイツ)を使用した。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1はフローサイトメトリーにおいて分子標識を使用する染色体異常の検出についてのフローチャートを示している。

10

【図2】

図2はフローサイトメトリーにおける嚢胞性線維症遺伝子特異的な分子標識を使用する直接的突然変異分析についてのフローチャートを示している。

【図3】

図3はPCRプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドを列記した第1表としての表である。

【図4】

図4は分子標識として使用されるオリゴヌクレオチドを列記した第2表としての表である。

【図5】

図5はホルムアルデヒドで固定化され、“GenePorter”システムによって細胞中に輸送されたCD59特異的な分子標識で染色されたFC2の蛍光シグナル分析を示している。

20

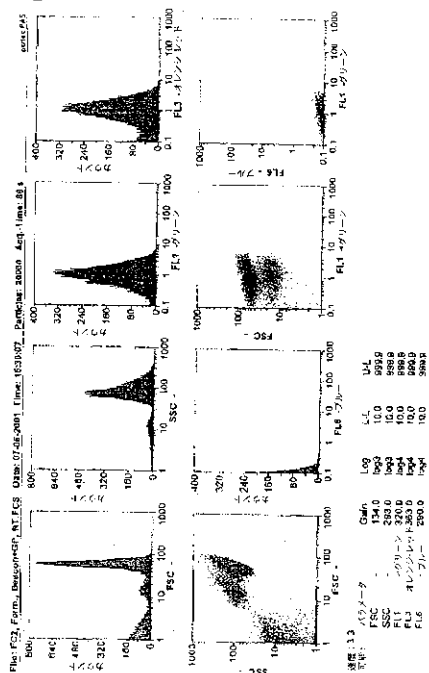
【図6】

図6は固定化されていない染色されていないFC2の蛍光シグナル分析を示している。

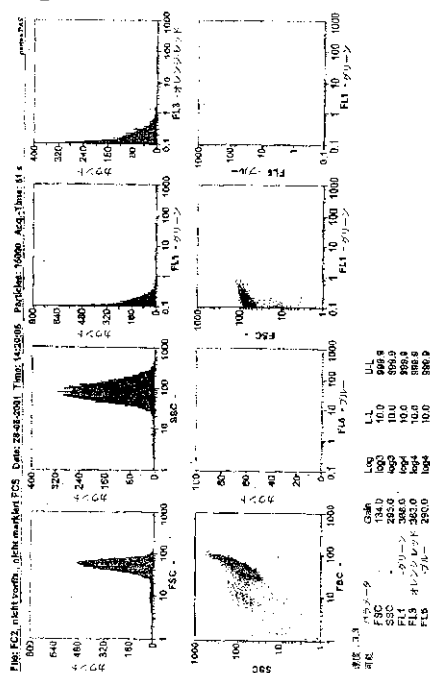
【図7】

図7はホルムアルデヒドで固定化され、“GenePorter”システムで細胞中に輸送されたCD59特異的な分子標識で染色されたCHO細胞の蛍光シグナル分析を示している。

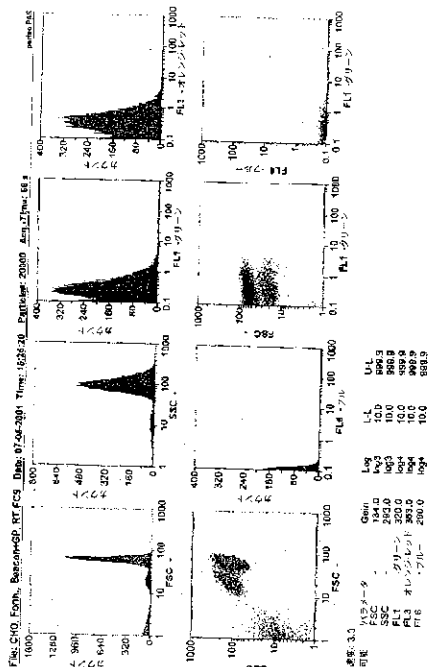
【図 5】



【図 6】



【 図 7 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 January 2002 (24.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/06524 A2

(51) International Patent Classification: C12Q 1/68

(31) International Application Number: PCT/EP01/08202

(22) International Filing Date: 16 July 2001 (16.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

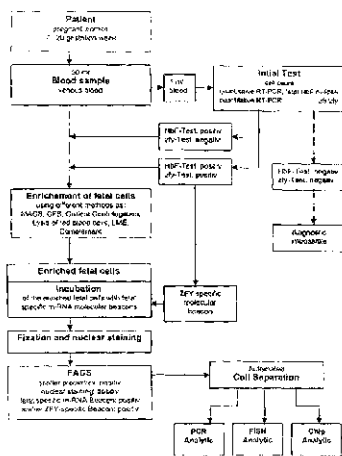
(30) Priority Data:
00115268.5 14 July 2000 (14.07.2000) EP(71) Applicant (for all designated States except US): PRAE-
NADIA GMBH (DE/DE); Hafenweg 46-48, 48155 Mün-
ster (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WIEBUSCH,
Heiko (DE/DE); Gescheweg 23, 48161 Münster (DE).SCIDMITT-JOHN, Thomas (DE/DE); Anna Frank Hof
3, 33813 Steinhagen (DE); WEIDNER, Jürgen (DE/DE);
Wewelinghofgasse 9, 48143 Münster (DE).(74) Agents: KÖNIG, Reinmar et al.; Lohengrinstrasse 11,
40549 Düsseldorf (DE).(81) Designated States (national): AF, AG, AL, AM, AN, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GL, GM, GR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BI, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: A METHOD FOR DIRECT GENETIC ANALYSIS OF TARGET CELLS BY USING FLOURESCENCE PROBES



(57) Abstract: A method enables the identification of target cells from non target cells comprising the step of in situ hybridizing a target sequence in a target cell with a labelled sequence and cell identification of the target cell by the aid of detecting the hybridised labelled sequence by flow cytometry.

WO 02/06524 A2

WO 02/06524 A2

**Published:**

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

"A method for direct genetic analysis of target cells by
using fluorescence probes"

This invention pertains to a method of separating target cells from non-target cells, especially fetal cells from maternal blood cells for prenatal diagnosis and claims priority of the European patent application 00 115 268.5 which is hereby fully incorporated in terms of disclosure.

- 5 The determination of the fetus genetic condition with respect to sex and/or potential genetic diseases caused by known or unknown small mutations or chromosomal abnormalities requires the examination of the fetal chromosomes isolated from fetal cells. Chromosomal examination is generally performed using cytogenetic technologies, which require the sampling of living
10 cells of the fetus followed by cell culturing for some weeks in order to grow a sufficient amount of cells for further analysis. The detection of small mutations however can be performed with a small quantity of cell sample using polymerase-chain-reaction (PCR) technologies combined with PCR-sequencing or other post-PCR mutational detection techniques. The sampling
15 of living fetal cells is usually performed during the second trimesters of pregnancy using standardised surgical procedures in specialised outpatient clinics. A small biopsy is taken either from tissue of the placental chorionic villi (chorionic villi sampling, CVS) or from the amniotic fluid (amniocentesis) by
20 inserting a needle through the mothers abdominal wall. A third method in-

CONFIRMATION COPY

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 2 -

volves the puncture of the umbilical to obtain fetal cells from the cord blood after the 18 th week of gestation.

- 5 Unfortunately, spontaneous miscarriages result with a frequency of about 0.5 to 1.5% as a matter of this invasive procedure. In rare cases other serious conditions have occurred harming the mother's and the fetus' health.

- 10 Besides these invasive sampling procedures non-invasive procedures of risk assessment for fetal chromosomal abnormalities are common, e.g. the biochemical screening for alpha-fetoprotein, human chorionic gonadotropin and unconjugated estriol in the maternal blood, known as the "triple-test". Other methods include the analysis of fetal cells including the recovery of nucleated fetal cells from mothers blood stream. Extracted from the mother's blood these cells can serve as a source of information about the genetic status of the developing fetus and therefore can serve for prenatal diagnosis.

- 20 A variety of cell types of fetal origin cross the placenta during pregnancy and circulate within the maternal peripheral blood (Bianchi, D. W. and Klinger, K.W. in: Genetic Disorder and the fetus: Prevention and Treatment, 3rd edition, Baltimore/ London: The John Hopkins University Press 1992; B. Tutweschek, Nichtinvasive Pränataldiagnostik an fetalen Zellen im mütterlichen Blut, Gynäkologie (1995) 28: 289-301).

- 25 Usually, the target cells for prenatal diagnostics are trophoblasts, nucleated fetal red blood cells, granulocytes and/or a subpopulation of white blood cells, i.e. polymorphonuclear leukocytes: neutrophils, basophiles and eosinophiles (An investigation of methods for enriching trophoblast from maternal blood, Prenatal Diagnosis, Vol. 15: 921-931 (1995); German patent DE 4222573; international patent application WO 96/27420; US-Patent 5,714,325).

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 3 -

Another, but less common method to obtain fetal cells, is the collection of transcervical cells (Non or minimally invasive prenatal Diagnostic on maternal blood samples or transcervical cells, Prenatal Diagnosis, Vol. 15: 889-896 (1995)).

5

The general usability of these cell types is greatly hindered due to their limited concentration in maternal blood, which is estimated at between 1 in 10^5 and 1 in 10^8 circulating cells. A more precise estimation by Hamada et al. (Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. Human Genet. 1993 June; 91(5) 427-32) gives a number of nucleated fetal cells at 60-800 per ml of maternal blood or 1200-12000 in a typical 20 ml sample. Several reports could confirm these figures but never have been able to collect such a number of fetal cells with high recovery rates. Several groups however reported on an increased rate of fetal-maternal cell traffic in aneuploidy conditions. This suggests fetal cell separation to be more successful in the presence of such abnormalities than under normal conditions.

In order to conduct a genetic analysis, low fetal cell numbers necessitate removal of maternal cells respectively enrichment of fetal cells. Since most of the fetal cell types cannot be distinguished from maternal cells on the basis of morphology alone, methods such as density gradient centrifugation or charge flow separation (DE-OS 4222573; WO 96/27420, WO 96/12945) have been applied in order to enrich fetal cells. The charge flow separation exploits differing surface charge densities of interesting cells which are sorted directly into distinct tubes for further analysis. Nevertheless, as a draw back this technique implies the risk of as well as false positive as false negative results.

More specific methods are based on incubating the blood sample with a target cell specific, fluorescent labelled antibody, which enables the selection of the target cell by a fluorescent activated cell sorting (FACS). This system

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 4 -

is based on the detection of fluorescence of each single cell passing an adequate detection system. According to the fluorescence the cells are electrically charged and selected into different portions. Another method utilises metallic beads labelled, target cell specific antibodies, which are identified with magnetic activated cell sorting (MACS). These techniques are known e.g. from the International patent application WO 91/07660 or German patent application 42 225 73.

However, FACS and MACS frequently dependent on the availability of monoclonal antibodies and require considerable expertise. The antibody fraction can exhibit a non-specific binding to other cellular components which leads to a high signal and noise ratio and impairs the later detection. Furthermore, antibodies binding with fetal cell surface antigen, e.g. γ -chain of fetal haemoglobin, often also bind to maternal cells. Thus, samples obtained by commonly known cell sorting contain contaminating maternal cells.

Examples of methods using one or a combination of several above mentioned principals are described, e.g. in Yeoh et al., *Prenatal Diagnosis* 11:117-123 (1991); Mueller et al., *Lancet* 336:197-200 (1990) for the use of murine monoclonal antibodies for the isolation of fetal trophoblasts. Price et al., *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 165:1731-37 (1991) outline flow sorting of fetal nucleated erythrocytes on the basis of cell size and granularity, and transferrin receptor and glycophorin A cell surface molecules. PCT publication WO 91/07660 describes a method for isolating fetal nucleated erythrocytes using an antigen present on the cell surface of fetal erythrocytes. The PCT publication WO 91/16452 and US-patent 5,153,117 disclose a method using a combination of different antibodies to fetal cells which were labelled with different fluorochromes.

The US-patent 5,858,649 describes a method of enriching fetal cells from maternal blood and identifying such cells. It comprises the sampling of ma-

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 5 -

ternal blood and the amplification of a target specific, i.e. fetal cell specific, ribonucleic acid. Later in-situ hybridisation of the cells take place with a hybridisation medium containing labelled ribonucleic acid probes complementary to the target ribonucleic acid of fetal cells. Nevertheless, since non-hybridised labelled ribonucleic acid probes remain within the cell they lead to a high signal/noise ration and thus to a low reliability of analysis results.

This method suggests a step of enrichment of fetal cells either by positive or by negative selection preceding the hybridisation i.e. density gradient centrifugation or flow cytometry. However, preferably, fetal cells are separated from maternal cells by FACS or MACS technology using antibodies against fetal antigen or antigens, being enriched on fetal cell surface. The techniques for cell separation suggested by US 5,858,649 exhibit the drawbacks and problems outlined above.

Sokol et al. (Deborah L. Sokol, Zangh X., Ponzy, L., Gewirtz A.M.; Real time detection of DNA-RNA hybridisation in living cell; Proceedings of National Academy of Science 1998, 95 pp. 11538-11543) provide a method to detect hybridisation of a labelled nucleic probes with target nucleic acid. As labelled sequences they utilise so called molecular beacons which are subsequently detected by spectrofluorimeter and or confocal laser scanning microscopy. These detection systems are time consuming and thus are not suitable for the routine practice of analysing high quantities of samples. Furthermore, they do not allow for a separation of target cell from non target cell.

Therefore, a primary objective of the present invention is to provide a method which improves the identification and/or separation of cells and to improve genetic diagnosis, especially direct genetic diagnosis in living cells. A further objective of the invention is to improve the diagnosis by providing a device and a method for a better sampling and/or processing of the investigated cells.

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 6 -

The underlying problem is solved by providing a method for cell identification according to claim one.

- 5 The basic idea of the invention is to identify target cells and to detect genetic alterations within target cells in vivo by hybridising target sequences with complementary or partly complementary labelled sequences and subsequently detect the hybridised labelled sequence within the cell by flow cytometry. A step of cell sorting according to the detection of the hybridised molecular beacon and further analysis may follow.
- 10 It is a special advantage of the invention to improve the identification of fetal cells within a maternal blood sample and therefore to enable the distinction between maternal and fetal cells, especially by overcoming the drawbacks of insufficient specificity and high signal/noise ratio. This method identification with subsequent cell separation is less time consuming and requires less expertise than common practices.
- 15 In a further advantage the presented method enables to increase the overall sampling rate of target cell within a blood sample per patient.
- 20 Another advantage is the simultaneous detection of different cell types or lines in a fast multiplex assay which can be combined with the detection of various genetic differences within these cells at once.
- 25 Further to the detection a quantification of the hybridisation signal derived from hybridised labelled sequences can be performed, giving information about the expression rates of target sequences. Therefore, the quantification can also provide further discrimination criterion between target and non target cells. Even rare sequences can be detected.
- 30 Thus, in a preferred embodiment the invention allows for the diagnosis of diseases which are due to or characterised in the transcription of genes

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 7 -

which are not expressed in the wild type cell, or diseases characterised in the absence or altered expression or expression rates of certain genes or parts by quantifying the level of abundance of the transcript products. Therefore, the method according to the invention can provide for prenatal
5 diagnosis.

Subsequently to the detection and or quantification the separation of the target sequence carrying cell may be advantageous, e.g. to isolate fetus derived cells out of a maternal blood sample. The cell separation can be conducted e.g. by photographic or visual methods. In a preferred embodiment
10 the cell sorting is performed with commonly known fluorescence activated cell sorting (FACS; e.g. international patent application WO 9 107 660 or German patent application 42 22 573).

15 Generally, nucleic acid hybridisation techniques are based on the ability of single-stranded nucleic acid to pair with a complementary nucleic acid strand. Therefore, a hybridisation reaction prescribes the development of labelled complementary specific sequences (subsequently also labelled sequence) directed against a target sequence or combination of complementary specific sequences in order to identify the presence or absence of target
20 sequences of genes (DNA) and/or their transcribed polynucleotide sequences (RNA) or even the presence of a specific mutation within a sequence and/or a transcribed gene product. The target sequence can be a wild type or genetically altered nucleic acid.

25 According to the invention a mixture of at least two complementary sequences directed each against a specific target sequence (wild type or mutation) can be used which are labelled each with a different fluorochrome. These fluorochromes advantageously exhibit a different fluorescent emission. This can allow for the detection of different target sequences in one
30 assay. Therefore, also the different target sequences carrying cells can be identified and/or sorted in one assay (multiplex assay).

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 8 -

In a preferred embodiment a selected labelled sequence can be complementary to a genetic marker of the target cell, for example for the gender or any fetal specific gene transcript or for other genetic characteristics of the target cell. Also labelled sequences can be directed against bacterial or viral nucleic acids being included in the target cell or part thereof. Examples for viral targets can be the human immunodeficiency virus (HIV), or the herpes or hepatitis virus. Other detection targets of particular interest and therefore included are polynucleotide transcripts of the X- or Y-chromosome or the chromosome 1, 13, 16, 18 and 21.

In a preferred embodiment the target nucleotides are hybridised with a complementary labelled sequence that has a nucleic acid target complement sequence flanked by members of an affinity pair or arms, that under assay conditions - in the absence of the target sequence - interact with one another to form a stem duplex. Hybridising of the sequence with the target sequence produces a conformational change in the sequence forcing the arms apart and eliminating the stem duplex. Due to the elimination of the stem duplex the sequence becomes detectable.

These detectably labelled dual conformation oligonucleotide sequences are disclosed in US patent 5,925,517, which is hereby fully incorporated in the text in terms of disclosure.

In a preferred embodiment of the invention the above mentioned oligonucleotide (which subsequently will be referred to as molecular beacon (MB)) matches a donor and acceptor chromophores on their 5' and 3' ends. In the absence of a complementary nucleic acid strand, the MB remains in a stem-loop, i.e. stem-duplex, conformation where fluorescence resonance energy transfer prevents signal emission. On hybridisation with a complementary sequence, the stem-loop structures opens increasing the distance between the donor and the acceptor moieties thereby reducing fluorescence reso-

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 9 -

nance energy transfer and allowing detectable signal to be emitted when the MB is excited by light of appropriate wavelength. Without hybridisation the donor and acceptor remain in distance and due to the above described effect of quenching no fluorescence signal is detectable. Thus, non-hybridised MB do not emit fluorescent light.

Due to this effect a washing or otherwise removing of non-hybridised labelled oligonucleotides can be avoided. Even a non specific binding of hybridising medium does not result in a relevant background signal otherwise impairing the signal to noise ratio during subsequent cell separation.

It is an advantage that the method according to the invention does not require the availability of monoclonal antibodies. Nevertheless, substituting labelled antibodies with labelled probes the cell separation protocols commonly known for FACS or MACS can be applied.

In a special embodiment of the invention fetal cells are separated from a variety of sample specimens including maternal peripheral blood, placental tissue, chorionic villi, amniotic fluid and embryonic tissue. A preferred specimen is a maternal peripheral blood sample. The invention can be used to identify and sort fetal nucleated red blood cells, but any other fetal cell type carrying a nucleus and having gene transcription activity can be included with no further difficulties.

In order to distinguish a fetal cell at least a suitable target sequence can be chosen within the cell, which is either specific in quality and/or quantity to fetal or embryonic cells. The preferred target sequences to detect are fetal-gene-specific chromosomal transcripts like messenger ribonucleic acids (mRNAs) or ribosomal ribonucleic acids (rRNAs), without limiting the invention to them, e.g. the mRNA for fetal hemoglobin (HbF) or embryonic hemoglobin. In general, different expression levels of genes can be utilised which are specifically active in the fetal cell.

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 10 -

In one embodiment of the invention labelled sequences complementary to cell line or cell type marker can be used in one assay together with labelled sequence complementary to genetically altered target sequences. Thus, a maximum information can be obtained at once: i.) The presence or absence of a target cell type or line and ii) The absence or presence of a genetically altered target sequence. Therefore, a cell identification and a direct genetic diagnosis can be performed in a combined assay.

10 In this combined assay two sets of molecular beacons can be used, e.g. one set can be directed against target cell lines specific RNA, e.g. against fetal hemoglobin mRNA, and a second set is directed against a DNA sequence of interest, e.g. a sequence with single nucleotide alteration. Both sets are labelled with differently coloured fluorophores. The cell identification and possible subsequent cell separation can be performed according to a FACS protocol. It allows the identification of certain genetic abnormalities as a direct genetic diagnosis of the gene DNA and the analysis of the expression level of the genes by quantifying the mRNA simultaneously. Thus, genetic abnormalities can be detected in an 'online' fashion during the FACS procedure. In case of fetal cells it allows to directly determine a certain genetic condition of the fetus without a genetic testing procedure following the separation from maternal cells.

25 In a further embodiment of the invention multiple target sequences can be selected detecting different cell types, which for example share the same origin. This for example allows for multiple fetal cell types to be collected at once out of a maternal blood sample, thereby maximising the total amount of cells being collected compared to a technique that is optimised for collecting specific fetal derived cells like nucleated red blood cells (NRBCs).

30 In another embodiment of the invention, the blood samples for later cell identification and genetic analysis are taken in a test tube comprising at

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 11 -

least one compartment with incubation media containing hybridisation media including at least one group of labelled sequences, preferably molecular beacons.

- 5 This test tube provides the advantage of shortening the period between sampling and hybridisation considerably, which can result in an increase in reliability and quality of the test results.

- 10 Advantageously, the test tube comprises two or more compartments each with different incubation- or test-solutions, e.g. fixation, or staining solution and/or anticoagulants. While primarily, the sample is incubated with one media, after a defined period of time, a second media from a second compartment can have access to the sample e.g. by opening a membrane separating the compartments.

- 15 Prior to cell identification and/or genetic analysis it can be advantageous to conduct a quantitative pre-test to estimate the proximate concentration of target cells to be expected in the cell sample. In case of fetal analysis it can be also advantageous to determine the sex of the fetal cells prior cell identification in order to select suitable molecular beacons for further steps of cell identification and genetic analysis.

- 20 In a preferred embodiment this pre-test is conducted as a quantitative online-PCR approach determining the Ct value of the PCR for fetal hemoglobin which is further on compared to a positive and negative blind sample. The sex of the fetus can be preferably determined by using molecular beacons complementary to the middle of PCR amplicons from mRNA sequences of zfy.

- 25 In one embodiment the method according to claim one the invention is combined with current methods of negative separation such as density gradient centrifugation and/or techniques like antibody derived magnetic separation

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 12 -

(MACS) of unwanted cells and with positive separation techniques on the basis of physical parameters like the cell surface charge by using a free buffer-flow electrophoresis device. Advantageously the step of negative selection of maternal cells is conducted before the in situ hybridising and prior to fluorescence activated cell-sorting procedure (FACS).

Methods of negative selection of unwanted cells include the application of a hypotonic shock, which leads specifically to the lysis of erythrocytes first. Lysis solutions are readily commercially available e.g. from PARTEC, DAKO, Caltag or MEDAC.

Another method to remove enucleated red blood cells is the complement system. Complement, a group of serum factors that can destroy antibody marked cells, is used strictly for negative selection, i.e. elimination of unwanted cells.

Alternatively or additionally specific cells, here monocytes can be reduced by the LME Treatment. LME (L-Leucin-methyl-ester) is a lysomotropic agent and destroys monocytes.

Due to the low absolute number of rare cells within a group of cells of the main population it can be of advantage to pre-enrich the rare cells prior FACS or other sorting procedures. This positive selection can be performed using for example intracellular staining techniques (US 5,422,277) or magnetic cell sorting (MACS).

With MACS, cell sorting from complex cell mixtures, such as peripheral blood, hematopoietic tissue or cultured cells is possible. Since small magnetic particles (20 – 150 nm in diameter) exhibit faster kinetics of the cell-bead reaction, a lower degree of non specific cell bead interactions, a lower risk of non specific entrapping of cells in particle aggregates, and less adverse effects of particles on viability and optical properties of labelled cells

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 13 -

when compared with large magnetic particles (0.5 – 5 μ m in diameter), they can be applied advantageously. Especially a MACS technology with small super-paramagnetic particles and high gradient magnetic fields is advantageous. Nevertheless, it can be combined with large magnetic particles as well for example large magnetic beads from Dynal and depletion columns from Miltenyi.

Furthermore, MACS can be used for negative selection, i.e. for example for the depletion of white blood cells. Since CD45 antigen is expressed on all cells of hematopoietic origin except erythrocytes, platelets and their precursor cells, CD45 Micro Beads can be used for the depletion of leukocytes from peripheral blood. To improve the efficient depletion of all leukocytes a combination of CD45 and CD15 Micro Beads is recommended due to the weak expression of CD45 in the granulocyte / monocyte lineage. Therefore, the combination of MicroBeads can result in an enrichment of fetal erythroblasts from maternal blood.

Prior to MACS it is advantageous to supply the relevant buffer with a resuspending medium, such as EDTA, bovine serum albumin (BSA) or serum, to achieve a sufficient resuspension of the cells. Furthermore it is recommended to remove dead cells.

In order to achieve a pre-selection of the cells prior to FACS, also charge flow separation technique, especially in the continuous free-flow electrophoresis method as disclosed US patent 4,061,560, (fully incorporated into the text hereby) can be used. It can be either used without or including staining with target cell specific antibodies (ASEC). The latter is reviewed by Hansen et al., 1982, (Antigen-specific electrophoretic cell separation (ASECS): Isolation of human T and B lymphocyte subpopulation by free-flow electrophoresis after reaction with antibodies. J. Immunol. Methods 51 : 197 - 208). The method can be improved by using a second antibody directed against the

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 14 -

first in a so called "sandwich technique". If this is still not sufficient, a third antibody can be used, directed against the second.

- 5 Alternatively specific antibodies with side groups containing a higher negative charge than a normal antibody can be used. Furthermore, antibodies coupled with very small magnetic particles can be advantageous.

- 10 For the final separation step of cells flow cytometry is used. Preferably, fluorescence activated cell sorting is performed. However, fluorescence is just one possible staining system since other dye systems may also be employed (US-patent 4,933,293) and no staining is necessary for light-scatter measurements or electrical sizing.

- 15 Flow cytometry apparatus are commercially available e.g. from MICROCYTE, Becton Dickinson's FACScan, FACStrak, FACSsort, FACSCalibur, FACStar, FACS Vantage, Bio-Rad's BRYTE-HS, Coulter's PROFILE and EPICS, Cytomation's MoFlow, Ortho's CYTORON and Partec's PAS machines. The PAS- System from PARTEC (Germany) is preferred.

- 20 it may be advantageous to perform the flow cytometry with target cells being stained with antibodies additionally to the labelling of target sequences with molecular beacons. This might include fixation of cells prior staining. The antibodies can be directed against intracellular substances or surface markers. Treatments of cells with a fixative as described in US Patent NR. 25 5422277 and 6004762 allow antibodies or other desired components to enter the cell through the cellular membrane.

- 30 Direct staining with flouochrome -conjugated antibodies against specific cellular determinants is preferable. The availability of many different dyes suitable as labels for immunofluorescence enables the simultaneous measurement of many subpopulations in one sample. Reviews about dyes for im-

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 15 -

munofluorescence can be found in Glazer et al. (Fluorescent tandem phyco-
bilibiprotein conjugates. Emission wavelengths shifting by energy transfer.
Biophys J. 1983 Sep.; 43 (3). P 383-386), Recktenwald et al. (Peridinin chlo-
rophyll complex As fluorescent label. US Patent No. 4876190. October
5 24,1989), Recktenwald et al. (Biological pigments As fluorescent labels for
cytometrie. New Technologies in Cytometrie and Molecular Biology, Gary C.
Satzman, Editor , Proc. SPIE 1206 P 106-111, 1990), Waggoner et al. (A
new fluorescent antibody label for three - Color flow cytometrie with a single
laser. Ann N Y Acad Sci 1993 677 P185-193), Haugland et al. (Spectra of
10 fluorescent dyes used in flow cytometrie. Methods Cell Biol 1994. 42 Pt B P
641- 663) and Roederer et al. (10-parameter flow cytometrie to elucidate
complex leukocyte heterogeneity. Cytometrie 1997. 29 (4) P 328-339.)

It is also possible to combine immunofluorescence with DNA staining such
15 as Propidiumjodid and DAPI are fluorescence dyes who stain DNA. See
also Rabinovitch et al. (Simultaneous cell cycle analysis and two color sur-
face immunofluorescence using 7-amino-actinomycin D and single laser.J
Immunol. 1986 Apr. 15 136 (8). P 2769-2775).

20 In order to allow staining antibodies against intracellular compounds to
penetrate the cell membrane cells have to be fixed and the membranes
have to be permeabilized. For several application fixation and permeabilisa-
tion of cell membranes saponin can be used successfully, including
assessment of cytokines (see also Willingham: An atlas of immunofluores-
25 cence in cultured cells. Vol. II Academic press). As a cross linking fixative
formaldehyde can be applied with allows for good preservation of cell mor-
phology. Alternatively other detergents, like NP40 in combination with fixa-
tion by formaldehyde, or of organic solvents, like 70 % methanol or etha-
nol/acetic acid (95/5), which fix and permeabilise cells in one step can be
30 used.

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 16 -

Especially for staining RNA and DNA, fixation with alcohol is preferable. Sometimes even a combination of different fixation/permeabilisation steps might be useful, e.g. 70 % alcohol followed by formaldehyde / Tween 20 for BrdU-staining.

- 5 In order to overcome problems with background staining absorption of polyclonal antibodies on liver powder (acetone precipitate of liver) or on irrelevant cells (2:1, volume of antibody solution (1mg/ml) : packed cells) can reduce unspecific staining. Optimally specific staining can be blocked by
10 preincubation of the antibodies with molar excess of purified antigen.

Definitions:

- 15 The term nucleic acid refers to sequences of nucleotides of all kind and thus comprises oligomers and polymers of desoxyribonucleotides, as well as all kinds of ribonucleotides. Also nucleotides with analogs, chromosomes and viral or bacterial nucleic acids or parts thereof, plasmids, recombinant nucleotides and all kinds of synthetic sequences are included.
- 20 The term target cells refers to cells of interest, which are to be selected or purified respectively. In case of fetal cells as target cells they include especially trophoblasts, nucleated fetal red blood cells, granulocytes and/or a subpopulation of white blood cells, i.e. polymorphonuclear leukocytes such as neutrophils, basophiles and eosinophiles.
- 25 The term target sequence refers to all nucleic acids, which are to be hybridised with the labelled complementary sequence. This term comprises sequences specific for the target cells in terms of quality and/or quantity. It comprises wild type sequences as well as genetically altered nucleic acids
30 of all kind.

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 17 -

The term labelled sequence refers to nucleic acids complementary or partially complementary to target sequences, which are labelled with at least one marker such as chromophores, fluorophore, magnetic particle or others allowing the later detection.

5

The term molecular beacon refers to a labelled sequences according to one of the claims of US patent 5,925,517.

8

The term RNA refers to all kinds of RNA, including mRNA and rRNA as well as derivatives and parts thereof.

10

The term DNA refers to all kinds of naturally occurring or synthetically derived DANN as well as derivatives and parts thereof.

15

The term hybridisation refers to the phenomenon that single strand nucleic acids or parts thereof are forming pairs with complementary or partly complementary single nucleic acid strands. In situ hybridisation refers to hybridisation under conditions maintaining the cell substantially intact.

20

The term fluorescence refer to emission of detectable radiation as a result of excitement with radiation of a different wavelength than the emitted.

Examples

25

Example 1.

Detection of chromosomal aberration using molecular beacons in flow cytometry (flow chart I).

30

In case of positive zfy results obtained in the pre-test described under step 2) a zfy specific molecular beacon (FITC) is synthesized (see under point 3)).

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 18 -

A negative result in the pre-test indicates a female and therefore, a HbF mRNA (FITC) specific molecular beacon is chosen.

- 5 After the delivery of molecular beacons into the enriched fetal cells, described under step 6) a HbF specific antibody (PE) and a nuclear staining with DAPI (PARTEC Germany) improves the determination of the fetal cells (see under step 7).

- 10 The target cells are identified, gated and automatically separated according to the protocol of the operating manual for the PAS-III, (PAS-III: Particle Analysing and separation System, Operating Manual; Partec Germany, see also under step 8).

- 15 Finally a diagnosis is conducted by FISH analysis, described under step 9) by using commercially available region-specific large-insert clones (Vythesis, USA) for the detection of trisomy 21.

Example 2

- 20 Direct mutation analyses using cystic fibrose gene specific molecular beacons in flow cytometrie (see flow chart II)

Pre-enrichment of the fetal cells was performed as described under step 1.)

- 25 As described in flow chart II one molecular beacon is used to distinguish fetal from maternal cells. In case of a positive result in step 2.) a zfy specific mRNA molecular beacon (FITC) is used to differentiate between fetal and maternal cells. As a second parameter for distinguishing fetal cells from maternal cells a fetal specific mRNA - molecular beacon for the HbF-gene and a DAPI nuclear staining is applied.
- 30

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 19 -

The molecular beacon for the determination of the wild type sequence is labelled with EDANS and a mutation specific beacon is labelled with the fluorescens HEX (according to step 3).

- 5 A fetal cell is to be distinguished by FITC and DAPI fluorescence. The genetic status is determined by the subsequent possible combinations: 1 DAPI and FITC positiv (fetal cell) 1a: HEX positiv, EDANS negativ (fetal cell wildtyp homozygous). 1b: HEX positiv, EDANS positiv (fetal cell, wildtyp and mutation) 1c: HEX negativ and EDANS positiv (fetal cell, mutation homozygous).

Example 3

- 15 Identification of FC2 cells using CD59 mRNA specific molecular beacons using original CHO cells as control.

The cell line FC2 of CHO cells carries the human chromosome 11. Thus, FC2 cells express CD 59 on their surfaces. Hence, the expression of CD 59 can be proven by antibody reaction.

- 20 CD 59 mRNA specific molecular beacons (DABCYL-GGTGACTCCATTCTGGCAGCAGCCTGTCACC-FAM) are delivered into the FC2 cells. Subsequently, fluorescence signals are analysed (Fig. 5). FC2 cells without beacons (Fig. 6) and CHO cells with beacons (Fig. 7) were used as controls.

Due to the high increase of fluorescence FC2 cells can clearly be distinguished from CHO CD 59 negative cells.

- 30 Fig. 5: FC 2, fixed with formaldehyde, stained with a CD 59 specific molecular beacon which was transferred into cells by the "GenePorter" System
FSC: homogenous cells

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 20 -

SSC: homogenous cells

FL1 : Increased fluorescence after specific staining with a molecular beacon probe

FL3 : noise from channel FL1 green

5

Fig. 6: FC2, not fixed, not stained

FSC = forward scatter (size of the cells) If you have only one cell line it must be a homogeneous cell peak.

10

SSC = side scatter (morphology of the cell) If you have only one cell line it must be homogenous as the FSC peak.

FL1 green: Shows the intensity of the fluorescent labelled cells.

FL 3 orange/red: Normally used for "Phycoerthrin" stained cells.

15

Fig. 7: CHO cells , fixed with formaldehyde, stained with a CD 59 specific molecular beacon which was transferred into the cells by the "GenePorter" (GenePorter, Transfection Reagent Cat # T201015, 10190 Telesis Court, San Diego) System

FSC: homogenous cells

SSC: homogenous cells

20

FL1 green: auto-fluorescence and background of the beacon stained CHO cells

FL3 orange/red: overlapping noise from channel FL1 green

Detailed description of procedural steps

25

1. Blood sample

Approximately 30 ml blood from a pregnant woman after 7 to 15 week of gestation is collected in a vacuum - test - tube containing one or more anti-coagulants e.g. acid-citrate-dextrose (ACD), ethylenediamine-tetracid (EDTA), heparin and/or citrate-phosphate-dextrose-adenine (CPDA-S -

30

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 21 -

Monovette, Sarsted, Germany). The blood probe is processed and analysed within 48 hours of sampling.

2. Quantifying fetal mRNA in maternal blood (pre-test)

5 300 µl of the whole blood sample is added to a 1.5 ml microfuge tube containing 900 µl RBC Lysis solution (Quantum Prep ApuaPure RNA Isolation, BioRad) and mixed by inverting the tube for 10 min at room temperature. After centrifugation at 13,000-16,000 x g in a microcentrifuge for 20 sec the
10 supernatant is removed with a pipet leaving behind the visible white cell pellet and about 10-20 µl of residual liquid. The white cells are re-suspended by vortexing vigorously until the pellet has disappeared.

300 µl RNA lysis solution (Quantum Prep ApuaPure RNA Isolation, BioRad)
15 is added to this mixture by pipeting up and down for 3 times. 100 µl of DNA-precipitation solution (Quantum Prep ApuaPure RNA Isolation, BioRad) is added to the cell lysate, mixed by inverting the tube and placed into an ice bath for 5 min before centrifugation at 16,000 x g. The precipitated protein and DNA form a tight pellet. The supernatant is placed into a clean sterile
20 1.5 ml microcentrifuge tube containing 300 µl pure isopropanol. The sample is mixed by inverting 30 times and centrifuged for 3 min at 16,000 x g. Total RNA is visible as a small translucent pellet. The supernatant is poured and the tube is dried in an absorbent paper. The pellet is washed twice with 70% ethanol, air dried for 30 min and stored at -80°C until used.

25 First strand complementary DNA is synthesized by priming with random hexamers (Clontech). The air dried and frozen RNA sample is resuspended in an 8.5 µl solution consisting of :

30 1 µl 50 µmol/l random hexamers
0.2 µl 0.1 mol/l dithiothreitol (DTT)
0.05 µl Rnase inhibitor (Rnasin, Promega) and

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 22 -

7.25 µl sterile nuclease free water.

The hexamers are annealed by incubating the sample at 70°C for 5 min and quenched on ice. Reverse transcription is performed by addition of 11.5 µl containing

4 µl 25 mmol/l MgCl₂,
2 µl 10x PCR buffer II (Perkin Elmer),
4 µl 2 mmol/l dNTPs (Amersham Pharmacia),
1 µl RNase inhibitor (Promega) and
0.5 µl Maloney murine leukaemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Gibco BRL).

and incubated at 37°C for one hour. The reaction is stopped by heating to 95°C for 5 min.

Prior to be used in a RT-PCR, 5 µl RNA Hydration Solution (Quantum Prep ApuaPure RNA Isolation, BioRad) is added to the RNA. The mixture is subsequently vortexed heavily and 5 µl are used in a 50 µl PCR experiment.

A multiplexed quantitative real-time PCR is performed utilizing molecular beacons that are complementary to the middle of PCR amplified fragments from mRNA sequences of beta-actin, zfy and HbF. The length of the arm sequences of the molecular beacons is chosen in order to allow a stem being formed at the annealing temperature of the PCR (table 1) whereas the length and sequence of the loop is chosen to provide a probe-target hybrid being stable at this step of PCR. The design of molecular beacons has been tested before by thermal denaturation profiles using loop-antisense oligonucleotides and a real-time thermal cycler (BioRad). Only molecular beacons showing desired thermal profiles are included in the subsequent PCR at concentrations similar to the amplification primers

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 23 -

During the denaturation step of the PCR, the molecular beacons assume a random coil conformation and fluoresce. As the temperature is lowered to allow annealing of the molecular beacon to the target sequence at the single stranded PCR fragments, loop-target hybrids are formed which are able to continue to fluorescing. Superfluous molecular beacon however rapidly form stable intra-molecular stem-hybrids that prevents them from fluoresce. As the temperature raises to allow primer prolongation, the molecular beacons dissociate from the target sequences and do not interfere with the polymerization step. A new molecular beacon hybridization step takes place in every annealing step during PCR cycling while the increase of the resulting fluorescence is monitored and indicated the amount of the accumulated target amplicon.

in a multiplexing PCR experiment, at least two different target sequences are simultaneously amplified in one tube. At least two different molecular beacons are used simultaneously, each of them labelled with a different fluorescent dye with no spectral overlap at emission wavelength. The resulting fluorescence is monitored at the appropriate wavelength of each of the molecular beacons during the annealing step of the PCR.

Multiplexing of HbF and zfy PCR is combined with a beta-actin PCR as an internal control PCR. Beta-actin is widely used its mRNA is ubiquitously abundant in almost every cell type. Beta-actin amplification therefore not only indicates a successful polymerase chain reaction but is highly proportional to the total amount of target cells used in the PCR.

The primers and molecular beacons used in the real-time quantitative PCR experiment are shown in table 1. in one q-RT-PCR experiment the amount of zfy-gen-specific mRNA is quantified and the result is compared to a positive and a negative control sample, which is the total mRNA from a blood sample of a mother carrying a male or a female fetus respectively.

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 24 -

Real-time quantitative RT-PCR is performed by using the iCycler Thermal Cycler (BioRad). The PCR for zfy mRNA and HbF mRNA is conducted in separate reactions but multiplexed with a PCR for beta-actin. Each 50 μ l reaction contained

- 5 5 μ l of the relevant template cDNA,
 1.0 μ M of primers for amplifying either zfy or HbF,
 0.25 μ M of the primers for amplifying beta-actin,
10 0.2 μ M of either the zfy-molecular beacon or 0.5 μ M of the HbF-molecular beacon,
 0.2 μ M of the beta-actin molecular beacon,
 0.25 mM of each dNTPs,
 2.5 units of AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer),
 4 mM $MgCl_2$
15 50 mM KCl and 10 mM Tris-HCl at pH 8.3.

- The 50 μ l volume reaction is loaded into the appropriate PCR-tubes and placed into the iCycler (BioRad). The cDNA is denatured and heating to 96°C for 10 min activates the Taq Polymerase. In a further 50 cycle PCR,
- 20 denaturation is performed at 95°C for 30 sec, annealing of the primers and molecular beacons at 60-68°C for 30 sec and extension at 72°C for 30 sec. Fluorescence data is acquired during the annealing steps of the reaction and the level of fluorescence is monitored as a function of cycle number.
 - 25 The reaction without any template does not exhibit any increase in fluorescence and functions as a baseline. Over a wide range of template concentrations the cycle with a fluorescence signal exceeding detectably over the baseline is inversely proportional to the logarithm of the initial number of template molecules. The level of beta-actin fluorescence in each well is a
 - 30 suitable further control parameter indicating the amount of total cDNA target used for the PCR.

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 25 -

In order to compare the fluorescent signals resulting from the synthesis of each target amplicon, the fluorescence intensity (F) of each molecular beacon is normalized by calculating $(F - F_{min}) / (F_{max} - F_{min})$. Thus, the value „0“ represents fluorescence before target amplification, and „1“ represents the maximum level of fluorescence after PCR. For each molecular beacon the threshold cycle is determined when the intensity of the fluorescent signal exceeds 10 times the standard deviation of the background baseline fluorescence. For quantification of the target a comparison of the determined threshold cycles with a standard curve is performed.

3. Preparation of molecular beacons

25- to 30-nucleotide-oligodesoxynucleotides (see table 2) are synthesized consisting of a 15- to 20-nucleotide-target sequence (antisense to mRNA) sandwiched by a complementary 5-nucleotide-arm sequence (stem sequence), being covalently linked to a fluorescent dye (fluorescein or EDANS) at the 5'-end and to a DABCYL as a quencher dye at the 3'-end. This protocol results in a molecular beacon of the following general formula: fluorescein-5'-GCGAGC-target-sequence-GCTCGC-3'-DABCYL.

The initial oligonucleotide for this synthesis of the molecular beacon is conducted contains a sulfhydryl group at its 5'-end and a primary amino group at its 3'-end. Its synthesis is conducted with a standard A-, C-, G-, T-phosphoramidate chemistry on an automatic DNA synthesizer (Perkin Elmer 394) using 1-dimethoxytrityloxy-3-fluorenylmethoxycarbonylamino-hexane-2-methylsuccinyl-long chain alkylamino-controlled pore glass (C7-CPG, PerSeptive Biosystems) as the 3'-aminomodifier. A trityl-hexylthiol linker ((S-trityl-6-mercaptohexyl)-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidate, PerSeptive Biosystems) is coupled as a final step to the nucleotide's 5'-end.

Subsequently, the oligonucleotide is detached from the support using 28% ammonium at 55°C for 6 h. This treatment also removes the protective mole-

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 26 -

ties at the amino and phosphate groups except for the trityl moiety at the 5'-sulfhydryl end. The detached oligonucleotides are purified by reverse phase cartridge column (Waters Sep-Pak C18, Millipore) and then fractionated by HPLC on a C18 column with a linear gradient of 5-40% acetonitrile dissolved in 0.05 M triethylammonium acetate (pH 7.0) running for 30 min at a flow rate of 1.0 ml/min at 40°C and detected at 254 nm.

About 200 nmoles of the dried oligonucleotide was dissolved in 0.5 ml of 0.1 M sodium bicarbonate, pH 8.5. Subsequently the mixture is incubated with 20 mg of DABCYL (4-(4'-dimethylaminophenylazo)benzoic acid) succinimidyl ester, (**Molecular Probes**) in 0.1 ml N,N-dimethylformamide in 0.01 ml aliquots at 20 min intervals. The mixture was kept for 3 days at room temperature in the dark. Excess DABCYL is removed from this mixture by passing through a Sephadex G-25 column (Nap-5, Amersham-Pharmacia), equilibrated with 0.1 M triethylammonium acetate (pH 6.5). The eluate of approximately is filtered through a 0.2 µm filter (Centrex MF-0.4, Schleicher & Schüll) and loaded on a C-18 reverse phase HPLC column (Waters), utilizing a linear elution gradient of 20% to 70% 0.1M triethylammonium acetate in 75% acetonitrile (pH 6.5) in 0.1 M triethylammonium acetate (pH 6.5) for 25 min at a flow rate of 1 ml/min. The absorption by DABCYL is monitored by spectrophotometry. The peak absorbing at 260 and 491 nm is collected.

In order to remove the trityl moiety from the sulfhydryl group at the 5'-end, the dried and DABCYL-coupled oligonucleotides are dissolved in 0.25 ml 0.1 M triethylammonium acetate (pH 6.5) and incubated with 0.01 ml of 0.15 M silver nitrate for 30 min at room temperature. To this solution 0.015 ml of 0.15 M DTT is added. The supernatant is removed from the pellet by spinning and transferred into a solution consisting of 40 mg 5-iodoacetamidofluorescein (**Molecular Probes**) in 0.25 ml of 0.1 M sodium bicarbonate (pH 9.0). Incubation is performed at room temperature for one day in the dark.

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 27 -

Excess fluorescein is removed by gel exclusion chromatography (Nap-5, Amersham Pharmacia) and the oligonucleotide are purified by HPLC. The fraction absorbing at wavelength 260 nm and 491 nm is collected. It is precipitated and re-dissolved in 0.1 ml TE buffer. The yield is estimated by determining the absorbance at 260 nm.

4. Density Gradient Centrifugation

15 ml of peripheral maternal blood is layered carefully in a 50 ml conical centrifuge tube containing 15.0 ml Histopaque® - 1119 (Sigma Diagnostics) at room temperature which is centrifuged at 500 x g for exactly 30 minutes at room temperature. Centrifugation at lower temperatures, such as 4° , may result in cell clumping and poor recovery.

15 After centrifugation the upper layer to within 0,5 cm of the opaque interface containing mononuclear cells is aspirated. The white band, including nucleated erythroid cells and lymphocytes, is directly below the plasma layer. Histopaque®- 1119 containing a broad diffuse band containing other nucleated erythroid cells and immature red cells with densities heavier than the white layer but lighter than the mature erythrocyte pellet, which is immediately below the nucleated cells and the erythrocyte pellet at the very bottom of the tube.

25 The cells are transferred in a new tube add 30 ml Phosphate Buffered Saline solution with 0,1 % BSA is added, mixed by gentle aspiration and subsequently centrifuged at 250 x g for 10 minutes. The supernatant is discarded.

30 The pellet is resuspended with 10 ml Phosphate Buffered Saline solution with 0,1 % BSA and centrifuged at 250 x g for 10 minutes again. The step of washing is repeated and the supernatant is discarded. The cell pellet is resuspended in 750 µl Buffered Saline solution with 0,1 % BSA.

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 28 -

5. Magnetic activated cell sorting (Depletion, Separation)

Depletion

- 5 In order to improve the efficient depletion of all leucocytes a combination of CD 45 and CD15 is used (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany; Order No. 458-01 and No. 486-01).
- 10 To reduce the forming of aggregates a resuspension buffer is supplemented with EDTA and bovine serum albumin (BSA) or serum (PBS pH 7,2 with 2mM EDTA and 0,5% BSA) and dead cells are removed prior magnetic labelling.
- 15 For MACS separation, the buffer is degassed by applying vacuum, preferentially with buffer at room temperature.
- The magnetic labelling is performed in the refrigerator at a temperature between 6° and 12° C for 15 minutes.
- 20 Clumps are removed by passing the cells through a nylon mesh (30 µm) or filter (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany; Order No. 414-07).
- 25 For the pre-separation a filter is wetted by vigorously pipetting 500 µl of resuspension buffer in the reservoir prior the filter process and the effluent is discarded. Subsequently a minimum of 500 µl cell suspension with 10^6 runs through the filter, which is washed 2 to 3 times with 500 µl buffer.
- 30 Depletion of unwanted white blood cells.

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 29 -

After the filter separation the cells are counted and washed in an appropriate buffer.

Magnetic separation

5

For the magnetic activated cell sorting the MidiMACS system is used (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany; Order No. 423-01) including the LD-Separation column order No. 429-01.

- 10 After washing the column with 3 ml of buffer the magnetic labelled cells suspended in buffer (500 μ l buffer/ 10^8 total cells) is passed through the column. The effluent is collected as the positive fraction. This step can be repeated. The effluents are compiled and centrifuged with 200 x g for 10 minutes. The pellet is resuspended in 1,5 ml PBS + 0,5 % BSA for further procedures.

15

Enrichment of fetal erythrocytes

The aforementioned MidiMACS system is operated for the enrichment of fetal erythrocytes by using Glycopherin A (GPA; order No. 422-01) and CD (order No. 462-01) conjugated MicroBeads and the buffer system as described under MACS depletion (order No. 424-01).

20

The cell suspension is allowing to pass the column. Whereas the effluent is discarded the cells having remained within the column are firmly flushed out and collected as the positive fraction.

25

6. Delivery of molecular beacons into the target cells

- 30 Enriched fetal cells are washed with HEPES (145 mM NaCl, 5mM KCl, 1mM $MgCl_2$, 1mM $CaCl_2$, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4), and precipitated by centrifugation. 2 μ g of the fluorescent molecular beacons are dissolved in 2 μ l of water and mixed with 9 μ l of liposomes comprising 0.4 mg

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 30 -

- of *N,N,N',N'*-tetramethyl-*N,N'*-bis(2-hydroxyethyl)-2,3-dioleoyloxy-1,4-butanediammonium iodide and 0.3 mg of L-dioleoyl phosphatidylethanolamine suspended in 400 μ l of nuclease free water (Tfx-50 Reagent, Promega). The mixture is vortexed gently and incubated for 10 min at room temperature.
- 5 Subsequently the cells are washed in HEPES.

7. HbF-PE (phycoerythrin) and DAPI staining - Flow cytometric Protocol

Stain Procedure:

- 10 After counting the amount of red blood cells (RBC) within the sample 2.5×10^7 cells are added to 1 ml of cold 0.05 % Glutaraldehyde for 10 min at room temperature. This mixture is washed three times with 2 ml cold PBS- 0.1 % BSA (pH 7.4). Subsequently, the cells are resuspended and incubated in
- 15 0.5 ml 0.1 % Triton X 100 for 3-5 minutes at room temperature and subsequently washed in 2 ml of PBS-0.1 % BSA. Afterwards the cells are taken in 0.5 ml PBS- 0.1 % BSA by vortexing or gentle pipetting.
- 20 10 μ l of this suspension are added to 10 μ l antibody (Caltag Laboratories Burlingame, CA 94010, Product code: MHFh04; Gamma chain antibody) and 70 μ l of PBS-0.1 % BSA and incubated at room temperature in the dark for 15 minutes. Two washing steps with 2 ml PBS-0.1 % BSA each are following.
- 25 The pellet is suspended in 500 μ l PBS-0.1 % BSA and 1ml DAPI staining solution (PARTEC, Germany) is added. The incubation takes place for 10 minutes at room temperature. The pellet is washed twice with 2 ml PBS-0.1 % BSA and finally resuspended by vortex in 0.5 ml 1 % formaldehyde. The cells are stored in tubes in the dark in the refrigerator.

30

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 31 -

In order to minimise false positive signals an unspecific Phycoerythrin (PE)-stained antibody is used as a negative control during the cytometric detection.

5 8. Cell separation

For cell separation the PASIII – system (PARTEC Germany), is used applying a 488 nm argon laser and an ultraviolet lamp to distinguish different fluorescent dyes within the cells.

10

9. FISH

Preparation of chromosome or interphase slides

- 15 After the cell separation molecular beacon are used to identify fetal cells in flow cytometry and cytogenetic slides with chromosome or nuclear suspension are prepared for fluorescens in situ hybridisation.
(Subcellular Fraction, A practical approach, Edited by J.M.Graham and D. Rickwood; IRL Press; page 79, Protocol 3. Isolation of metaphase chromosomes; page 75, Protocol 1. Purification of cell nuclei from soft tissue).
- 20

- In order to prepare slides one drop of chromosome or cell nuclear suspension is placed on a very clean glass slide. Slides are rinsed in 2 x SSC, pH 7.0 for 5 min. An incubation for at least 30 min at 37°C in 2 x SSC containing 100 µg/ml RNase A follows. Subsequently the washing of slides is performed for 3 x 5 min in 2 x SSC, pH 7.0. RNase treatment serves to remove endogenous RNA which may hybridize with homologous probe DNA sequences, forming RNA-DNA hybrids. This improves the signal to noise ratio in hybridization to DNA targets.
- 25

30

The incubation of slides is conducted with pepsin for 10 min at 37°C in 0.05% (w/v) pepsin powder in 0.01 N HCl. Slides are rinsed for 2 x 5 min in

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 32 -

- 1 x PBS pH 7,3 and then 2 x 5 min in 1 x PBS containing 50 mM MgCl₂. Fixation of slides is achieved with 1% formaldehyde, 1 x PBS, 50 mM MgCl₂ for 10-60 min at room temperature. Slides are thoroughly washed in PBS. Pepsin and other proteases (i.e., proteinase K or pronase) increase accessibility by digesting chromosomal protein that package the target DNA.
- 5 Since metaphases and nuclei have the tendency to come off the slides after prolonged protease treatment, refixation of the slides with formaldehyde is used.
- 10 Dehydration of slides in an ethanol series (70%, 85%, 100%) is performed for 5 min each and air-dry. Then 200 µl of denaturation solution, consisting of 70% deionized formamide and 2 x SSC, is placed on each slide and cover with a coverslip. The slide is placed in 90°C oven for approximately 60 sec. The coverslip is shacked off and immediately put in ice-cold 70%
- 15 ethanol. Dehydration is performed again in an ice-cold ethanol series (70%, 85%, 100%). After air-drying, the slides are ready for in situ hybridization.

Preparation and labelling of probe DNA

- 20 The DNA template can be supercoiled or linear. After nicking the DNA with DNase I, the 5'-3' exonuclease activity of DNA polymerase removes nucleotides and the DNA polymerase activity replaces the excised nucleotides with dNTPs from the reaction mixture including the labeled nucleotide. The procedures for incorporating biotin, digoxigenin or fluorochromes are nearly
- 25 identical. The final size of the nick-translated probe DNA fragments is very important. Labeled probe sequences should not be larger than 500 bp because of difficulty penetrating the specimen and a tendency to stick non-specifically to both the glass and the cellular material, resulting in high background which obscures the signal. Sequences shorter than 100 bp do not
- 30 hybridize efficiently under routine conditions of stringency.

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 33 -

DNA probes are mixed on ice, in a microcentrifuge tube:

- | | | |
|----|--|------|
| | DNA (in liquid format) | 1 µg |
| | 10 x nick-translation buffer | 5 µl |
| | (Tris/HCl 1M, pH 8; MgCl ₂ 1M; BSA 10%) | |
| 5 | 0.1 M-mercaptoethanol | 5 µl |
| | 10 x cold dNTP solution | 5 µl |
| | (0.5 mM each of dATP, dCTP, dGTP) | |
| | 10 x 1:3 labeled dUTP/cold dTTP solution | 5 µl |
| 10 | (0.125 mM labeled dUTP, i.e. biotin-16-dUTP or digoxigenin-11-dUTP, and 0.375 mM dTTP) | |

A labeling density of one modified nucleotide at approximately every 20-25th position in the nick-translated DNA is optimal for most FISH experiments.

- | | | |
|----|---|------|
| 15 | 10 x DNase I | 5 µl |
| | (DNase stock solution with an activity of 10 U/µl is diluted 1:3000-1:4000 with double-distilled H ₂ O) Optimal DNase concentration must be determined by titration, as the size distribution of the probe depends on the amount of enzyme added. Each new stock of DNase I should be tested to determine the appropriate working concentration. | |
| 20 | | |

	DNA polymerase I (5 U/µl)	1.3 µl
	DdH ₂ O is added as needed to achieve final reaction volume of 50 µl	

- | | | |
|----|---|--|
| 25 | If larger amounts of DNA (up to 5 µg) need to be labelled, the reaction volumes can be scaled up to 250 µl. | |
|----|---|--|

- | | | |
|----|--|--|
| 30 | The reaction mixture is incubated for 2 h at 15°C. For optimal incorporation the time of incubation should at least be 2 h, as the initial incorporation rate of modified nucleotides is less than that of unsubstituted dNTP. The size of the nick-translated DNA fragments is checked on a 1.5% agarose gel, along with suitable size markers (0.1-1 kb range). If the DNA fragments are still too | |
|----|--|--|

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 34 -

large, a second aliquot of DNase (optional) is added and incubated for another 30-60 min at 15°C. When the majority of the fragments are between 100 bp and 500 bp in size, termination of the reaction follows by adding stop buffer (1.25 µl 0.5 M EDTA and 0.5 µl 10% SDS) to the 50 µl of nick-translation mixture. The tube is heated to 68°C for 10 min.

For large-insert clones probes, simple ethanol precipitation is sufficient. For small single-copy DNA probes, purification by centrifugation through Sephadex G-50 or commercially available columns is recommended to remove unincorporated haptenized or fluorescent nucleotides.

In the indirect labelling method hapten reporter molecules, i.e. biotin- or digoxigenin-dUTP, being introduced into the DNA probe, are detected by affinity cytochemistry after the hybridization reaction. Fluorescent (strept)avidin molecules bind specifically to biotin-labeled probe-target hybrids. Fluorescent anti-digoxigenin antibodies are used to detect digoxigenated probes. The fluorescence signals of indirectly labeled probes may be up to tenfold brighter than those produced by direct methods. In addition, small hapten molecules such as biotin are efficiently incorporated into DNA than most fluorescent dNTPs.

In situ hybridisation (FISH PROTOCOL)

Since interspersed repeats are present in every 5 kb of genomic DNA and most large-insert clones contain a significant number of repetitive elements that can cross-hybridize with closely related repeats throughout the entire genome. Consequently, these probes will not only hybridize to their specific target DNA sequences but to all chromosomes, yielding ambiguous FISH signals. To prevent such unspecific hybridization, repetitive DNA sequences in the probe DNA are blocked by prehybridization with unlabelled total

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 35 -

genomic DNA or repetitive cot-1 DNA. The following is a detailed protocol for suppression hybridization that has been optimized for the fluorescent detection of single-copy DNA sequences.

5 Hybridization Mixture

- Nick-translated DNA probes have a final concentration of approximately 20 ng/ μ l (in nick-translation buffer). First, differentially labeled probes which are to be hybridized on human specimen are precipitated together with an approximately 50-fold excess of cot-1 competitor DNA (Gibco BRL) or a 500-fold excess of fragmented (100-500 bp) total genomic DNA, and a 50-fold excess of fragmented salmon sperm DNA which is used as a carrier. The optimal DNA concentrations in the hybridization mixture (30 μ l for a whole slide) depend mainly on the probe types. For large-insert clones, 10-20 ng/ μ l in the hybridization mixture (or 300-600 ng per slide) are recommended.

Commercially available large insert clones (Vythys, USA) for specific human chromosomes (21 and Y) are used.

- 20 In the following, two different BAC-DNA probes are hybridized together on the same slide for identification of male foetal cells that are affected by trisomie 21.

	Stock	Amount required	
25 Biotinylated (nick-translated) BAC # 21	20 ng/ μ l	20 μ l	(400 ng)
Digoxigenated (nick-translated) BAC# Y	100 ng/ μ l	2 μ l	(200 ng)
Cot-1 DNA (Gibco BRL)	1 μ g/ μ l	30 μ l	(30 μ g)
Salmon sperm DNA	10 μ g/ μ l	3 μ l	(30 μ g)

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 36 -

5 The DNA is precipitated with 1/20 volume 3 M Naacetate and 2 volumes 100% EtOH (p.a.) in a microcentrifuge tube. The sample is mixed well and incubated at least 30 min at -70°C or overnight at -20°C. The precipitation is done in a centrifuge spinning for 30 min at 15,000 rpm at 4°C. The supernatant is discarded and the pellet are dried in a vacuum system or alternatively at 37°C in a heating block.

10 The DNA probe is resuspended with 15 µl of deionized formamide and shaken at 37°C for at least 15 min to resuspend the probe DNA. Then an equal volume of 2 x hybridization mixture (20% dextran sulfate, 4 x SSC) is added followed by vigorously shaking for at least 15 min.

15 Conditions of stringency are 50% formamide, 10% dextran sulfate, 2 x SSC in the hybridization mixture. Denaturation of hybridization mixture (containing the probe DNA) is performed at 80°C for 10 min. Probes are centrifuged for 2-5 sec in order to pellet the condensed water.

20 To allow reannealing of repetitive DNA fractions, the tube with the denatured competitor and probe DNA is incubated at 37°C for at least 15 min. DNA probes (30 µl) are placed on the denatured slide and cover with a coverslip. The edges are sealed with rubber-cement and incubated overnight (or longer) at 37°C in a moist chamber.

25 30 µl of denatured and pre-annealed DNA probe mixture is pipetted on the prewarmed slide (15 µl for half a slide). The slide is covered with a coverslip without air bubbles and sealed with rubber cement. Hybridisation is done overnight in a moist chamber at 37°C.

30 Immunocytochemical detection of probe DNA hybridised on chromosome or cell nuclei

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 37 -

5 Washing of slides follows for 3 x 5 min at 42°C in 50% formamide, 2 x SSC and then 2 x 5 min at 60°C in 0.1 x SSC. The washing solutions are pre-warmed in different water baths. The Coplin jar with slides and pre-warmed washing solution are agitated on a platform shaker.

10 The probe DNA hybridizes not only to the target DNA but also non-specifically to sequences which bear partial homology to the probe sequence. Since such non-specific hybrids are less stable than perfectly matched DNA hybrids, they can be dissociated by post-hybridization washes of various stringencies.

15 Secondary incubations and washes are required for the visualization of nick-translated haptenized DNA probes. Prior to incubation with secondary reagents, slides are blocked by treating with 5% bovine serum albumin in 4 x SSC, 0.1% Tween 20. Incubation of slides in a Coplin jar with fresh blocking solution for at least 30 min at 37°C follows. Blocking prevents unspecific antibody binding and reduces background.

20 Fluorescent (strept)avidin and anti-digoxigenin antibodies, i.e. FITC-avidin and Cy3-conjugated anti-digoxigenin, are diluted 1:800 and 1:200, respectively (or according to recommendations of the supplier) in 1% BSA, 0.1% Tween 20, 4 x SSC. Cover slides with 200 µl of detection solution and a coverslip. Incubation is performed in a moist chamber in the dark at 37°C for 30 min. Coverslips are shaken off the and washing slides 3 x 5 min in a Coplin jar with 0.1% Tween 20, 4 x SSC at 42°C. To visualize chromosomes and cell nuclei, counterstain slides for 1-2 min with 1 µg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) in 2 x SSC. Washing of the slides is performed thoroughly with distilled water, air-dry and then mount them with antifade mounting medium. DABCO retards fading of the fluorescence after exposure of the slides to fluorescence light.

25

30

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 38 -

Large-insert clones produce specific fluorescence signals, which are clearly visible by eye through the microscope. Digoxigenated DNA probes binding fluorescent mouse anti-digoxigenin antibody are amplified with a second
5 layer of fluorescent rabbit anti-mouse antibodies and, if necessary, with a third layer of fluorescent goat anti-rabbit antibodies.

Because of the high sensitivity of digital cameras, use of electronic image enhancement is arguably preferred over immunocytochemical signal amplification. Specialized FISH software allows the conversion of the plain DAPI
10 fluorescence of a chromosome into a G-like banding pattern. We used ISIS 3 Fluorescens picture system and a HAMAMATSU Digital camera system (Metasystems Germany).

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 39 -

Claims:

1. Method for identifying a target cell comprising the following steps:
 - in situ hybridising of a target sequence in a target cell with a complementary labelled sequence and
 - cell identification of the target cell by the aid of detecting hybridised sequence by flow cytometry.
2. Method for direct genetic analysis comprising the following steps:
 - in situ hybridising of a target sequence in a target cell with a complementary labelled sequence and
 - cell identification of the target cell by the aid of detecting hybridised sequence by flow cytometry.
3. Method according to claim 1 or 2 **characterised in** the labelled sequences being molecular beacons.
4. Method according to one of the above claims **characterised in** fluorescence activated cell sorting.
5. Method according to one of the above claims **characterised in** at least one part of the labelled sequences being directed against a target fetal specific mRNA.
6. Method according to claim 5 whereas the fetal specific-mRNA is selected from the group consisting of fetal hemoglobin mRNA, cytokeratin mRNA, β -subunit of chorionic gonadotropin mRNA, chorionic somatomammotropin mRNA, pregnancy-specific glycoprotein mRNA, α -feto-protein mRNA and transferrin receptor mRNA.
7. Method according to claim 1 to 4 whereas at least one part of the labelled sequence is complementary to a target sequence selected from

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 40 -

the group consisting of target specific DNA, viral nucleic acids or bacterial nucleic acids, or parts thereof.

- 5 8. Method according to one of the above claims comprising at least one step of negative selection of non-target cells applying a method selected of the group consisting of density gradient centrifugation, lysis by hypotonic shock, destruction by complement system, destruction by lysomotropic agent, charge flow separation and magnetic activated cell sorting.
- 10 9. Method according to one of the above claims comprising at least one step of positive selection of target cells applying a method selected of the group consisting of charge flow separation or magnetic activated cell sorting.
- 15 10. Method according to one of the above claims including the step of intracellular staining or staining of surface markers of the target cells.
11. Method according to claim 10 characterised in antibody staining.
- 20 12. Use of a method according to one of the above claims for the distinction of fetal and maternal cells.
13. Use of a method according to one of the above claims for prenatal diagnosis.
- 25 14. Use of a method according to one of the above claims for the detection of cystic fibrose.
15. Use of a method according to one of the above claims for the detection of chromosomal aberration.
- 30

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 41 -

16. Use of a method according to one of the above claims for the detection of trisomy 21.
17. Method for quantifying fetal mRNA within a maternal blood sample comprising the following steps:
- amplifying fetal cell specific mRNA;
 - synthesising labelled sequences comprising a sequence being complementary or partly complementary to said amplified fetal cell specific mRNA;
 - hybridising said labelled sequence with said amplified fetal cell specific mRNA and
 - detecting the hybridised labelled complementary sequence.
18. Method according to claim 17 **characterised in** at least one part of the labelled complementary sequences being molecular beacons.
19. Method according to one of the above claims **characterised in** the molecular beacon comprising at least one of the sequences enlisted in table 2.
20. Method according to one of the claims 17 to 19 whereas a primer for the amplification comprises one of the sequences enlisted in table 1.
21. Kit for cell identification and / or genetic analysis comprising a test tube with at least one compartment containing molecular beacons.
22. Kit according to claim 21 with at least two compartments whereas each of the compartments comprises a different media.
23. Test tube according to claim 21 or 22 **characterised in** a membrane separating the compartments one from the other.

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

- 42 -

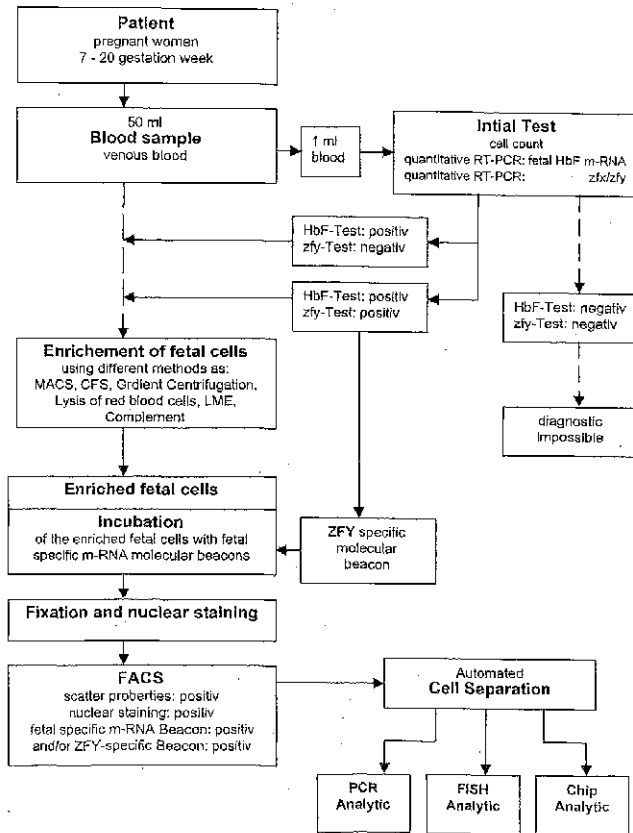
24. Method for processing probes within a test tube with at least two compartments comprising the following steps:
- 5 - treatment of the probe in the first compartment;
 - providing access for said probe to the second compartment and
 - treatment of said probe in the second compartment.
25. Method according to claim 24 **characterised in** one of the treatments
- 10 being the hybridising of the probe with molecular beacons.

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

Fig. 1

1/6

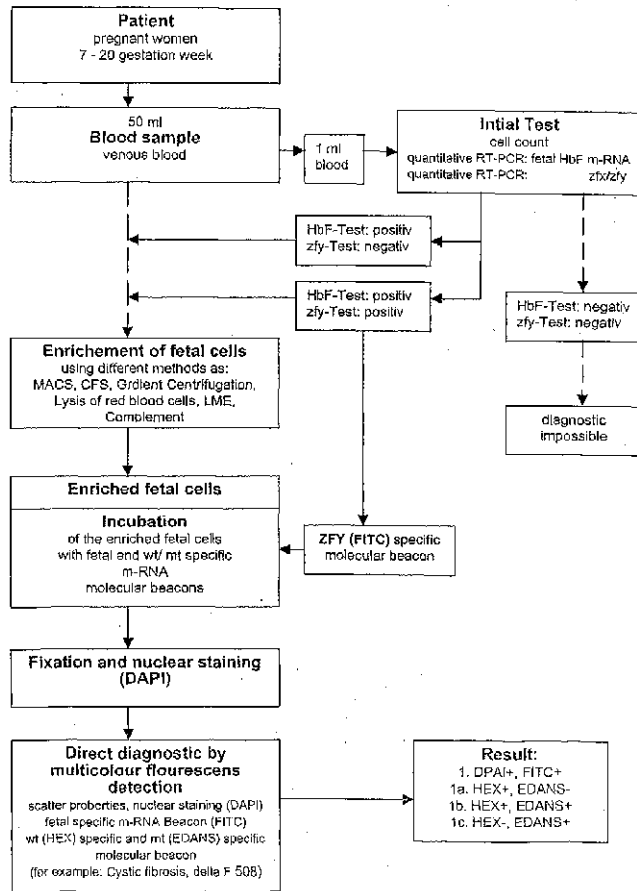


WO 02/06524

PCT/EP01/08202

Fig. 2

2/6



WO 02/06524

PCT/EP01/08202

3/6

Fig. 3

table 1
Oligonucleotides used as PCR-primers

Probe Feature	Probe Designation	Fluorescent Label	Sequences 5'-3'	Comments
PCR	beta-actin	none	gtggcgacaggctcttc	downstream
PCR	beta-actin	none	ggcaacggcgccttc	upstream
PCR	HBG1	none	aagacagcacctcttgcctgtcc	downstream
PCR	HBG1	none	ttcacagaggagacaaggctac	upstream

Fig. 4

table 2
Oligonucleotides used as Molecular Beacons

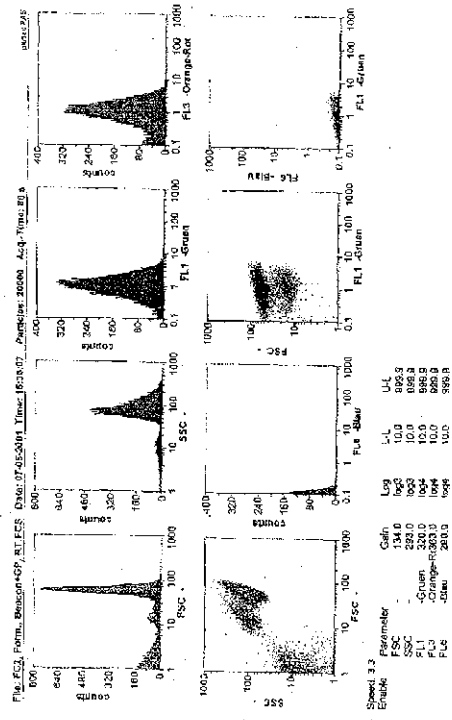
Probe Feature	Probe Designation	Fluorescent Label	Sequences 5'-3'	Comments
MB	beta-actin	HEX	gcctgcctcgtccaggaaggaagagc	Stem sequence undefined
MB	Zfy 3'-UTR	fluorescein	gcctagtagtcacattttattcttcgc	Stem sequence undefined
MB	HBG1	EDANS	gcgagaccagaggtttgtacacgtttgcbgc	Stem sequence undefined
MB	CFTrexon10	EDANS	gcgagaaagaaataatactttgtgtttctctgc	deltaF508wt
MB	CFTrexon10	fluorescein	gcgagaaagaaataatactttgtgtttctctgc	deltaF508mut

WO 02/06524

PCT/EP01/08202

4/6

Fig. 5

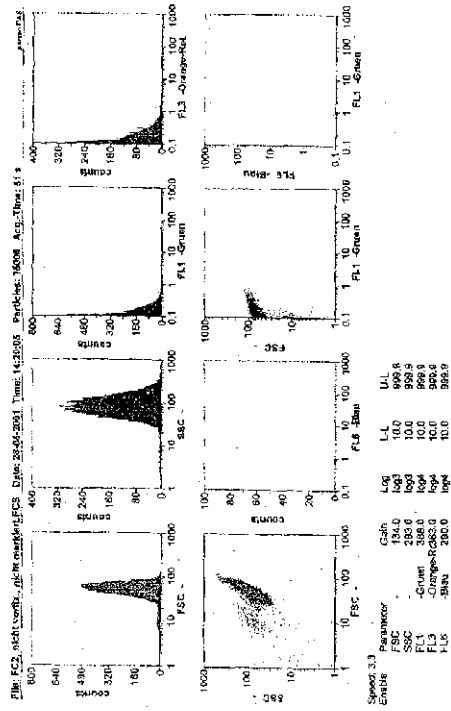


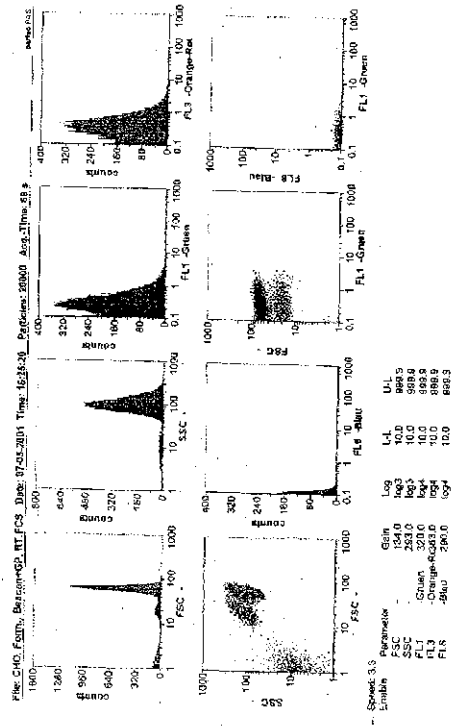
WO 02/06524

PCT/EP01/08202

5/6

Fig. 6





【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 January 2002 (24.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/06524 A3(51) International Patent Classification: C12Q 1/68,
B01L 3/14

(21) International Application Number: PCT/EP01/08202

(22) International Filing Date: 16 July 2001 (16.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 00115268.5 14 July 2000 (14.07.2000) EP

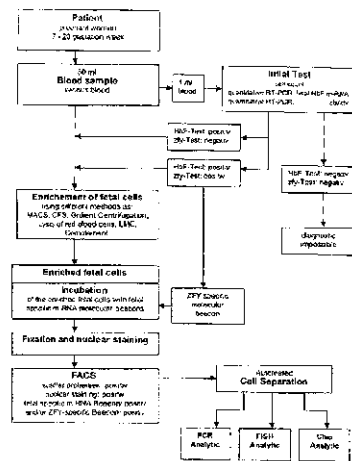
(71) Applicant (for all designated States except US): PRAE-
NADIA GMBH (DE/DE), Hafenweg 46-48, 48155 Münster
(DE).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WIEBISCH,
Heiko (DE/DE); Geschenweg 23, 48161 Münster (DE)SCHMITT-JOHN, Thomas (DE/DE); Anna-Frank-Hof
3, 48803 Steinhagen (DE); WEIDNER, Jürgen (DE/DE);
Wevelinghofergasse 9, 48143 Münster (DE).(74) Agents: KÖNIG, Reimar et al.; Lohengrinstrasse 11,
40549 Düsseldorf (DE).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NI, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TN), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: A METHOD FOR DIRECT GENETIC ANALYSIS OF TARGET CELLS BY USING FLOURESCENCE PROBES

(57) Abstract: A method enables the identification of
target cells from non-target cells comprising the step of
in situ hybridising a target sequence in a target cell with
a labelled sequence and cell identification of the target
cell by the aid of detecting the hybridised labelled se-
quence by flow cytometry.

WO 02/06524 A3

WO 02/06524 A3

**Published:**

-- with international search report

For two letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(88) Date of publication of the international search report:
27 June 2002

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/08202
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 B01L3/14 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q B01L Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 506 098 A (ZARLING DAVID A ET AL) 9 April 1996 (1996-04-09) column 3, line 15 - line 63; claim 5; figure 11 column 11, line 33 - column 12, line 5 ---	1,2
X	US 5 858 649 A (CUBBAGE MICHAEL LEE ET AL) 12 January 1999 (1999-01-12) column 3, line 5 - column 7, line 20; claims ---	1,2
X	WO 95 03431 A (APROGENEX INC) 2 February 1995 (1995-02-02) claims ---	1,2
-/-		
☒ Further documents are cited in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date on priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
15 January 2002		08.04.02
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5081 Palmstein 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Telex 311501 epo nl, Fax: (+31-70) 340-2019		Authorized officer Luzzatto, E

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/08202

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WALLNER G ET AL: "OPTIMIZING FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION WITH RNA-TARGETED OLIGONUCLEOTIDE PROBES FOR FLOW CYTOMETRIC IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS" CYTOMETRY, ALAN LISS, NEW YORK, US, vol. 14, no. 2, 1993, pages 136-143, XP000916755 ISSN: 0196-4763 the whole document	1,7
X	BORZI R M ET AL: "A fluorescent in situ hybridization method in flow cytometry to detect HIV-1 specific RNA" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, vol. 193, no. 2, 21 June 1996 (1996-06-21), pages 167-176, XP004020810 ISSN: 0022-1759 the whole document	1,7
X	EP 0 745 690 A (NEW YORK HEALTH RES INST) 4 December 1996 (1996-12-04) claims 1,6,7	21
A	WO 98 59083 A (CRAWFORD ERIN L; JACKSON CLARA M (US); WEAVER DAVID A (US); WILLEY) 23 December 1998 (1998-12-23) page 4, line 10 - line 23; claims	1,2,14
A	US 5 641 628 A (BIANCHI DIANA W) 24 June 1997 (1997-06-24) claims	1,2,14

Form PCT/ISA 210 (continuation of synopsis sheet) July 1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/EP 01/08202
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. ☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. ☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:	
3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
see additional sheet	
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-16, 19-21 (all partially)	
Remark on Protest	☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 01/08202

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-16, 19-21 (all partially)

Methods for identifying a target cell or for genetic analysis comprising in situ hybridisation and cell identification by flow cytometry (insofar as not comprising the use of probes Zfy, HBG1 and CTF as defined in table 2) and optionally comprising the use of the actin primers and probe as defined in tables 1 and 2 and a kit therefor.

2. Claims: 17-20 (all partially)

Method for quantifying fetal mRNA comprising amplification, hybridisation and detection (insofar as not comprising the use of the HBG1 primers and probe of tables 1 and 2 or of the probes Zfy HBG1 and CTF of table 2) and optionally the use of the actin primers and probe defined in tables 1 and 2 respectively.

3. Claims: 1-16, 19-21 (all partially)

Methods as in invention 1 using the probe and the primers HBG1 as defined in table 2 and 1 respectively.

4. Claims: 1-16, 19, 21 (all partially)

Method as in invention 1 based on the use of the probes CFTR listed in table 1

5. Claims: 1-16, 19, 21 (partially)

Methods as in invention 1 using the probe ZFY of table 2.

6. Claims: 17-20 (all partially)

A method as in invention 2 comprising the use of the HBG1 primers and probes of tables 1 and 2 respectively

7. Claims: 17-18, 20 (all partially)

A method as in invention 2 comprising the use of the probes CFTR of table 2

International Application No. PCT/EP 01/08202

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

8. Claims: 17,18,20 (all partially)

A method as in invention 2 comprising the use of the probe
Zfy of table 2

9. Claims: 22-25

A test tube comprising at least two compartments, kits
comprising it and methods based thereon

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

in relation to patent family members

International Application No.

PCT/EP 01/08202

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5506098	A	09-04-1996	AT 145674 T	15-12-1996
			AU 564045 B2	02-11-1995
			AU 2500792 A	05-04-1993
			DE 69215533 D1	09-01-1997
			DE 69215533 T2	29-03-1997
			DK 614492 T3	02-06-1997
			EP 0614492 A1	14-09-1994
			ES 2094928 T3	01-02-1997
			FI 941015 A	03-05-1994
			WO 9305177 A1	18-03-1993
			JP 2819838 B2	05-11-1998
			JP 6510290 T	17-11-1994
			KR 245283 B1	02-03-2000
			NO 940746 A	03-03-1994
			US 5719023 A	17-02-1998
US 5858649	A	12-01-1999	US 5629147 A	13-05-1997
			US 5766843 A	16-06-1998
			US 5861253 A	19-01-1999
			AU 7474394 A	20-02-1995
			WO 9503431 A1	02-02-1995
			AU 4685593 A	14-02-1994
			BR 9306867 A	08-12-1998
			CA 2140278 A1	03-02-1994
			EP 0662152 A1	12-07-1995
			JP 7569136 T	12-10-1995
WO 9402646 A1	03-02-1994			
WO 9503431	A	02-02-1995	AU 7474394 A	20-02-1995
			WO 9503431 A1	02-02-1995
			US 5629147 A	13-05-1997
			US 5766843 A	16-06-1998
			US 5861253 A	19-01-1999
			US 5858649 A	12-01-1999
EP 0745690	A	04-12-1996	US 5925517 A	20-07-1999
			AU 702598 B2	25-02-1999
			AU 5232496 A	21-11-1996
			CA 2176266 A1	13-11-1996
			EP 0745690 A2	04-12-1996
			JP 9107996 A	28-04-1997
			US 6103476 A	15-08-2000
WO 9858083	A	23-12-1998	US 5876978 A	02-03-1999
			AU 8072898 A	04-01-1999
			CN 1265155 T	30-08-2000
			EP 0998581 A2	10-05-2000
			JP 2001519672 T	23-10-2001
			WO 9858083 A2	23-12-1998
US 5641628	A	24-06-1997	US 2002006621 A1	17-01-2002
			AT 162631 T	15-02-1998
			AU 2467095 A	07-12-1995
			AU 658132 B2	06-04-1995
			AU 6750590 A	13-06-1991
			AU 6802698 A	16-07-1998
			CA 2068660 A1	14-05-1991
			DE 69031984 D1	26-02-1998

From PCT/ISA(210) (class. (a) and (b)) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/Er 01/08282

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5641628	A	DE 69031984 T2	10-09-1998
		EP 0500727 A1	02-09-1992
		EP 0791659 A2	27-08-1997
		JP 5601612 T	25-03-1993
		WO 9107660 A1	30-05-1991

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) July 2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	M
G O 1 N 33/566	G O 1 N 33/566	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,S G,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 230100044

弁護士 ラインハルト・アインゼル

(72)発明者 ハイコ ヴィーブッシュ

ドイツ連邦共和国 ミュンスター ゲシエルヴェーク 2 3

(72)発明者 トーマス シュミットーヨン

ドイツ連邦共和国 シュタインハーゲン アンネーフランクーホーフ 3

(72)発明者 ユルゲン ヴァイトナー

ドイツ連邦共和国 ミュンスター ヴェフェリンクホーフアーガッセ 9

Fターム(参考) 2G045 AA01 AA24 AA25 CA25 CB01 DA36 DA44 DA51 DA78 FA11

FA37

4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 HA12

4B063 QA01 QA18 QQ05 QQ53 QR08 QR42 QR56 QR62 QS25 QS36

QS39 QX02

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004504036A5	公开(公告)日	2005-02-24
申请号	JP2002512414	申请日	2001-07-16
[标]申请(专利权)人(译)	预纳迪亚GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tsongu		
申请(专利权)人(译)	预纳迪亚GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	ハイコヴィーブッシュ トーマスシュミットヨーン ユルゲンヴァイトナー		
发明人	ハイコ ヴィーブッシュ トーマス シュミット-ヨーン ユルゲン ヴァイトナー		
IPC分类号	G01N33/48 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6841 G01N33/483 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6841 C12Q2565/626		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/48.M G01N33/483.C G01N33/53.M G01N33/566		
F-TERM分类号	2G045/AA01 2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/DA44 2G045/DA51 2G045/DA78 2G045/FA11 2G045/FA37 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	矢野俊夫		
优先权	2000115268 2000-07-14 EP		
其他公开文献	JP2004504036A		

摘要(译)

通过流式细胞术检测杂交的标记序列，从非靶细胞中鉴定靶细胞，包括靶细胞中标记序列和靶序列的原位杂交和靶细胞的细胞鉴定怎么样