



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01811237.4

[43] 公开日 2003 年 8 月 13 日

[11] 公开号 CN 1436247A

[22] 申请日 2001.4.20 [21] 申请号 01811237.4

[30] 优先权

[32] 2000. 4. 20 [33] GB [31] 0009784.0

[86] 国际申请 PCT/GB01/01767 2001.4.20

[87] 国际公布 WO01/81626 英 2001.11.1

[85] 进入国家阶段日期 2002.12.16

[71] 申请人 赛姆格有限公司

地址 英国伯明翰

[72] 发明人 M·A·胡尔藤

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

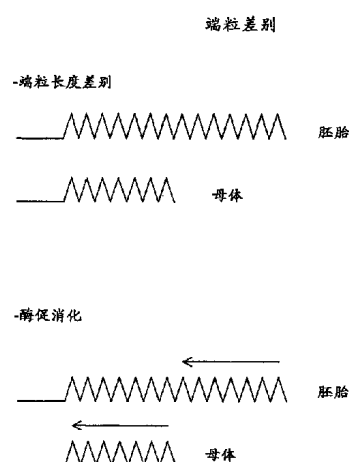
代理人 徐雁漪

权利要求书 3 页 说明书 20 页 附图 2 页

[54] 发明名称 临床诊断方法

[57] 摘要

本发明涉及一种鉴定母体血或阴道样本内包含染色体或 DNA 的胚胎细胞核的方法, 该方法包括 (a) 将该样本中的细胞核的染色体经酶核酸外切消化以除去各染色体的末端区域, 然后 (b) 检测作为所述消化过程结果的保留在胚胎 DNA 中但不存在于母体 DNA 中的 DNA 序列。鉴别后, 可对胚胎 DNA 进行例如检测染色体异常的诊断。



1. 一种鉴定母体血或阴道样本内包含染色体和 DNA 的胚胎细胞核的方法，该方法包括(a)用酶使该样本中的细胞核染色体进行核酸外切消化以除去各染色体的末端区段，然后(b)检测作为所述消化过程的结果而仍然存在于胚胎染色体中但是不存在于母体 DNA 中的 DNA 序列。
2. 根据权利要求 1 的方法，其中将所述酶引入所述细胞中，这样可使细胞核的染色体和所述 DNA 组分在该细胞内原位进行核酸外切消化。
3. 根据权利要求 2 的方法，其中通过给予如溶血卵磷脂、皂苷或 Triton X 100 试剂，可使所述核膜能透过所述酶。
4. 根据权利要求 1 的方法，其中在初始步骤中，通过标准技术如暴露于卡诺依氏液(乙酸:甲醇, 3:1)或甲醛，固定细胞核染色体。
5. 根据任一项前述权利要求的方法，其中胚胎染色体保留的所述 DNA 序列是端粒序列。
6. 根据任一项前述权利要求的方法，其中采用所述序列特异性的初级标记探针，测定所述 DNA 序列。
7. 根据权利要求 6 的方法，其中所述标记物是荧光标记物。
8. 根据任一项前述权利要求的方法，其中通过流式细胞分选方法，将鉴定的胚胎细胞核从母体细胞核中分离出来。
9. 根据权利要求 1-7 中任一项的方法，其中采用荧光原位杂交测定(FISH)鉴定包含染色体和 DNA 的胚胎细胞核。
10. 根据任一项前述权利要求的方法，其中所述酶为 BAL31。
11. 根据权利要求 1-12 中任一项的方法，其中按以下各阶段完成核酸外切消化，其中第一步除去 3'突出端，第二步切除 3'-5' ss 区段，第三步消化 ss 区段。
12. 根据权利要求 11 的方法，其中采用绿豆核酸酶完成所述第一

步骤。

13. 根据权利要求 11 或 12 的方法，其中采用外切核酸酶 III 进行所述第二步骤。

5 14. 根据权利要求 11-13 中任一项的方法，其中采用绿豆核酸酶进行所述第三步骤。

15. 根据任一项前述权利要求的方法，其中将鉴定的包含染色体和 DNA 的胚胎细胞核进行产前诊断。

16. 根据权利要求 15 的方法，其中所述诊断检测染色体异常。

10 17. 根据权利要求 15 或 16 的方法，其中通过将所述样本与一种或多种二级标记探针接触进行所述诊断，所述探针是特定染色体特异性的或者特定染色体节段 DNA 特异性的。

18. 根据权利要求 17 的方法，其中所述二级探针带有荧光标记物。

15 19. 根据权利要求 17 或 18 的方法，其中采用初级荧光标记的探针测定所述胚胎染色体节段和 DNA 序列，所述二级探针带有与所述初级探针不同波长处荧光的荧光标记物，其中通过检测所述初级标记物的荧光，对胚胎染色体节段和 DNA 序列进行检测，鉴定后，将所检测荧光波长变为所述二级探针的波长，并观察两种探针的荧光是否发射于所述同一细胞核，但是鉴定不同染色体节段和 DNA 序列。

20 20. 根据权利要求 17-19 中任一项的方法，其中所述二级探针是染色体 18、21、13、X 或 Y 特异性的。

21. 根据权利要求 17-20 中任一项的方法，其中所述二级探针是一种或多种特定染色体节段特异性的。

25 22. 根据权利要求 1-15 中任一项的方法，所述方法可用于诊断母体病症。

23. 根据权利要求 22 的方法，其中所述病症是先兆子痫、预测早产风险以及自身免疫疾病的后期发展。

24. 根据权利要求 15、22 或 23 的方法，其中测定母体样本中胚

胎细胞的数量和浓度。

25. 一种鉴定母体血或阴道样本内包含染色体和 DNA 的胚胎细胞核的试剂盒，该试剂盒包括能够消化染色体末端节段的外切核酸酶以及用于检测在染色体末端节段中存在的特异性 DNA 序列的标记探针。
5 针。

26. 根据权利要求 25 的试剂盒，其中所述标记探针是荧光标记探针。

27. 根据权利要求 25 或 26 的试剂盒，它还包括二级标记探针，后者能诊断染色体/DNA 病症。

10 28. 根据权利要求 27 的试剂盒，其中所述二级标记探针是荧光标记探针。

29. 一种鉴定母体血或阴道样本内包含染色体和 DNA 的胚胎细胞核的方法，它基本上如本发明上文有关实施例所述。

15 30. 一种鉴定母体血或阴道样本内包含染色体和 DNA 的胚胎细胞核的试剂盒，它基本上如本发明上文所述。

临床诊断方法

5 本发明涉及一种鉴定母体样本(如血或阴道样本)内胚胎细胞核及其遗传物质(如 DNA 或染色体)的方法。然后将此方法中鉴定的胚胎遗传物质用于如产前诊断中。

10 染色体疾病是人类最常见的遗传疾病。结构性染色体疾病占怀孕的前三个月期间与流产有关致死率的 50%以上, 并且约占宫内或围产期死亡的 5%。另外, 0.5%新生儿患有结构性染色体异常。

15 染色体异常可能是数目上的或结构上的。数目异常, 即体细胞组织中 46 个正常二倍体染色体数目发生变化, 包括三体性(多一个染色体)、单体性(丢一个染色体)和多体性(整个多一套染色体)。由染色体断裂、接着异常部位断裂的染色体节端愈合而引起的结构性重排包括所称的易位、翻转和插入。

20 染色体结构性重排可出现平衡形式, 在这种情况下, 所述遗传物质保持与正常状态相同。结构性染色体异常的携带者通常并不呈现出任何症状(除非在断裂点处出现基因损伤)。结构性染色体异常还可出现非平衡形式, 在这种情况下, 某些遗传物质缺失和/或复份。这一般导致发育迟缓, 包括带有身体和心理残障的新生儿。

 以个体存在于人群中的最常见染色体异常是与 Down 氏综合症有关的三体性 21。现普遍接受的是大约有 1/650 新生儿童患有特征为不同程度严重心理运动发育迟缓的 21 三体 Down 氏综合症。世界不同国家中 21 三体 Down 氏综合症的发病率无明显差别。

25 对儿童和成人的 21 三体 Down 氏综合症的诊断一般通过在体外培养血液淋巴细胞, 然后进行染色体分析。该细胞培养过程需要 2-3 日, 以在细胞周期的分裂中期聚集足够的细胞, 而使染色体浓缩至足以通过标准染色体显带法技术进行单个鉴定的程度。

一般 21 三体 Down 氏综合症的儿童的唯一明确确证的临床风险因素与母体的年龄有关。因此，一般认为怀有三体性 21 儿童的风险性随母体年龄的增长增加，在超过 45 岁的最高年龄组中，风险性高出 10%。目前存在鉴别孕妇很可能怀有三体性 21 儿童的筛选程序。5 这些筛选程序包括分析母血样本的生化特征以及对胎儿进行超声波扫描，后者目的在于观察颈部皮肤的厚度，在患有 Down 氏综合症和某些其它染色体疾病的胎儿中，该厚度显著增加。

超过某个年龄(通常为 35 岁)的孕妇以及经筛选被确定为风险性高的妇女一般要进行侵袭性处理(绒毛膜绒毛取样和/或羊膜穿刺术)，10 以对胎儿细胞样本进行染色体分析。这些侵袭方法，除使母体感到不舒适外，还使流产风险性增加。因此需要提供一种更有效地进行产前诊断的方法，而并不依靠这种侵袭取样的方法。

众所周知，在怀孕期间，可在母血中检测出胚胎细胞，其约以百万分之一至千万分之一量存在。这可为产前“非侵袭性”诊断胎儿病症，如最常见的 21 三体 Down 氏综合症，提供可能性，这一点15 也被广泛认知。

Down 氏综合症和某些其它胚胎细胞遗传性疾病以及孕妇并发症，如先兆子痫和早产以及自身免疫疾病的产后发展，特点在于胎儿母体转输增加，从而导致母血中胚胎细胞水平增高(参见 Pertl 和20 Bianchi Semin Perinatol 23, 5, 393-402, 1999; Bianchi Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 92, 1, 103-8, 2000)。

采用特别的免疫学检测系统，然后利用与特定染色体探针原位杂交(FISH)产生的荧光，对染色体数目计数，对鉴定母血中的胚胎细胞进行了许多努力和大量工作(参见 Hahn 等, Mol Hum Repr 4, 6,25 515-521, 1998, 评论)。

利用较少侵袭方法从孕妇母体中得到的样本一般包含一定的母体细胞和相对少量胚胎细胞。目前分离胚胎细胞的方法包括利用抗体、梯度分级分离、母体细胞优选分解以及细胞分选法。但是，母

体细胞依然超出任何分离的胚胎细胞(见 Al-Mufti 等 *Amer J Med Genet* 85, 1, 66-75, 1999)。虽然这种可能技术的任何指标产生的意义非常大,但是利用这些样本进行产前非侵袭性诊断仍然存在着明显困难(见 Hulten, *The Lancet*, 357, 963-4, 2001)。

5 众所周知端粒构成覆盖染色体末端的重复 DNA 序列,其量是变动的,年轻人比年老人具有更高数量的重复序列。认为在端粒复制的终末期不发生 DNA 复制。这就意味着在每个细胞分裂中,该端粒都比以前变得更短。现还认为这种缩短最终导致细胞死亡(参见 De Lange, *Science* 279, 334-335, 1998)。

10 所有人体染色体得端粒都包含相同的 DNA 重复核心。端粒长度随个体年龄的变化是在所有染色体中观测到的普遍现象。根据个体年龄的不同,端粒重复长度的变化估计约为 2-30 Kb 的 DNA。

 可采用特定软件和对端粒探针杂交的染色体进行显微镜像分析来测定染色体特异性端粒长度(Poon 等, *Cytometry* 36, 267-278, 15 1999)。这些研究表明在各染色体端粒含量内的个别细胞核之间可能存在一些变化。尽管如此,如以上所述,端粒长度随主体年龄显著降低。以此为基础,胚胎细胞中各染色体的端粒长度应比新生儿长,也比成人的长(见 De Pauw 等, *Cytometry* 32, 3, 163-1690)。因此,说明胚胎细胞比母体细胞具有更长的端粒,即每个染色体具有更高的
20 的端粒 DNA 重复序列(Friedrich 等, *Pediatr Res* 49, 2, 256-6, 2001)。

 本申请人发现,可利用这种特性为基础区分母体组织样本(如血液或血清样本)中存在的母体和胚胎细胞核和/或其中的遗传物质,尤其是染色体和 DNA。

 因此本发明提供一种鉴定母血(包括血清或血浆成分)或阴道样本
25 内胚胎细胞核、染色体和 DNA 的方法,该方法包括(a)将该样本中的细胞核的染色体经酶核酸外切消化以切出各染色体的末端区段,然后(b)检测作为所述消化过程结果保留的胚胎细胞核 DNA 中但不存在于母体细胞核 DNA 中的 DNA 序列。

实际上, 本发明以胚胎和母体 DNA 内端粒重复数目的差别为基础, 对母体组织样本中的胚胎细胞核直接进行鉴别。在步骤(a)中, 从末端区段内部消化细胞核内的染色体 DNA。在这个过程中, 首先将样本中存在的所有的染色体的端粒片段进行消化。然后进行一段
5 时间的外切核酸酶消化, 该时间足以除去至少所有母体端粒 DNA 序列。

如果此刻停止消化, 胚胎染色体将保留某些端粒 DNA。然后采用例如对端粒 DNA 具有特异性的标记探针, 检测该 DNA, 在这种情况下所述探针只对胚胎 DNA 杂交。

10 该方法优选采用母血样本(包括血清和/或血浆成分)进行。本文所用表述“血液样本”包括全血、血清或血浆, 通过标准技术从中分离出具核细胞。

该方法可在细胞原位进行。在这种情况下, 通过核膜, 将外切核酸酶引入到细胞核中。为实现该目的, 例如可通过利用酶, 如溶
15 血卵磷脂、皂苷或 Triton X 100, 将细胞核膜透化处理进行。

在开始步骤中, 通过标准技术, 采用固定方法, 如卡诺依氏液(乙酸:甲醇, 3:1)或甲醛, 将所述细胞中染色体固定, 以用于分析。

当步骤(b)中检测的序列是标记染色体时, 优选它是临近端粒(亚端粒或端粒)的染色体标记, 因此使得将标记物本身用于产前诊断成为可能。在任何情况下, 都可将包含染色体和 DNA 的胚胎细胞核的
20 鉴定作为“非侵袭性”产前诊断的初始步骤。

在特别优选的实施方案中, 将消化后样本中存在的 DNA 用对该 DNA 序列(如端粒序列)具有特异性的初级标记探针杂交。最优选, 用可见标记物(尤其是荧光标记物)将该初级探针标记, 然后检测样本
25 中的荧光。这一步可原位进行, 例如在细胞载玻片上进行, 或者另外可用流式分选方法从母体细胞核中分离出胚胎细胞核(已被荧光标记)。

进行外切核酸消化的适当的酶包括 BAL31。为保证更能控制消

化过程, 优选采用仅消化 DNA 特定区段的酶。更详细地讲, 可以三个阶段方法进行消化, 其中在第一阶段, 除去 DNA 的 3' 突出端, 在第二阶段, 切除 3'-5' ss 区段, 在第三阶段, 消化 ss 区段。完成第一和第三阶段的适当的酶包括绿豆核酸酶, 第二阶段的适当的酶包括外切核酸酶 III。

为提供可靠的消化以区分包含染色体和 DNA 的母体和胚胎细胞核所需的条件, 如酶浓度、缓冲液系统、温度和培养时间需要小心选择, 并且这些条件根据因素(如所用的特定酶)而变。

作为不同染色体末端之间的端粒 DNA 序列重复数目变异的结果, 优选以一种染色体特异性方式, 先将这些酶系统“校准”比较理想。通过分析各种条件下的染色体外切核酸酶端粒消化的结果, 可实现该类型的校准。

另一种校准具体酶系统的方法是获得母体和胚胎组织样本中各个具体染色体的端粒长度上的基线信息。该方法可通过在细胞周期的分裂中期, 对端粒 DNA 序列荧光原位杂交(FISH)进行。采用端粒与亚端粒 DNA 探针结合的 FISH, 可将各染色体末端的具体端粒突出显示。通过显微镜像分析, 采用对比基因组杂交(CGH)软件程序, 可进行端粒序列测定。

还可利用胚胎脐带穿刺术(cordocentesis)的血液样本和送递中的脐血样本, 以获得母体和胚胎组织样本中各个具体染色体臂的端粒 DNA 序列长度正常变异的另外基线信息。一经采用本发明方法鉴定, 即可对胚胎 DNA、染色体或细胞核进行产前诊断, 以确定染色体/DNA 异常(如 Down 氏综合症、Edward 氏综合症和 Klinefelter 氏综合症)的存在或者其它信息(如胎儿的性别)。

另外, 采用本发明方法可获得的信息, 尤其是有关母体样本中胚胎细胞浓度量的信息, 用于产前筛选/诊断以及多种母体症状的诊断。包括妊娠并发症如先兆子痫、预测早产风险以及自身免疫疾病的产后发展。

染色体异常的产前诊断的具体方法，可通过将所述样本与二级标记的探针接触进行，该探针在可与样本中的 DNA 杂交的条件下，对 DNA 的特定染色体或诊断区段具有特异性。因此，对源于胚胎的已识别的核、染色体或 DNA 中该二级探针的检测，将能提供有关胎儿的信息。根据具体诊断目的的不同，如果该二级探针对染色体 18、21 或 13 和/或 X 或 Y 染色体具有特异性，即是有用的。

据推测 X/Y、13、18 和 21 的 FISH 探针组合可检测目前可通过对未选择孕妇中羊水样本的全染色体分析(核型)确定的所有异常中的约 70%。排除高风险的孕妇外(通过如父母是已知的结构染色体异常(如易位)携带者的家族病史确认，或者已通过超声波检测出胎儿结构异常确认)，检测率可增加到 99%以上。还应指出的是可使用对不同类型异常具有特异性的探针。

优选该二级探针带有可见性标记物，如荧光标记物。在本发明方法的特别优选实施方案中，在步骤(b)中，采用初级荧光标记的探针测定所述胚胎 DNA 序列，所述二级探针带有与所述初级探针不同波长处荧光的荧光标记物，其中通过检测该初级标记物中的荧光，检测胚胎 DNA。鉴定后，立即将所检测的荧光波长变为所述二级探针的波长，并观察两种探针中的荧光是否发射于相似的细胞核、染色体或 DNA 中。这可很容易通过改变所用荧光检测器上的滤器实现。

在优选方案中，上述亚端粒标记物应位于每个染色体臂内特有的染色体 DNA 序列中尽可能远的位置上。这些标记物被相对于各位置的各染色体末端预先选定。所选择的适宜的 DNA 标记物在战略上位于包含特异性染色体的独特 DNA 的亚端粒染色体位置。这个位置是优选的一个主要原因。

应用亚端粒或端粒染色体/DNA 标记物不仅便于对染色体畸形(如三体性)数目定量，并且还可对某些相对普通的不平衡结构的染色体重排(如不平衡易位)定量。根据染色体所涉及的易位不同，不平衡易位被视为一种特异性染色体亚端粒或端粒标记物的复制与另一种

特异性染色体亚端粒或端粒标记物的缺失的结合。另外，其它相对普通的染色体畸形可按该方法或类似的方法识别。它们包括与胚胎畸形和/或心理运动发育迟缓有关的特别标记染色体，如胚胎 iso 12p、iso 18p 或 isodic 15，以及可产生与正常状况有关的 4 种特别标记。

- 5 通过适当选择产前胚胎诊断所用的荧光 DNA 标记物，可采用这种方法测定大多数导致胚胎发育障碍的染色体异常。这些异常包括以下说明的 Down 氏综合症、Klinefelter 氏综合症和 Edward 氏综合症。

10 在本发明一实施方案中，取得母体组织样本如血液样本(包括血浆或血清成分)，然后通过常规方法，如 Lymphoprep(Sigma)或 Percoll(Amersham Pharmacia)方法，从其中分离出非分裂的具核细胞。

然后采用标准技术，如暴露于化学试剂溶血卵磷脂、皂苷或 Triton X 中，将细胞核膜透化处理。

- 15 在下列步骤中，通过常规技术，如暴露于卡诺依氏液(乙酸:甲醇，3:1)或甲醛，将细胞核染色体固定。

然后将该细胞核涂布于显微镜用载玻片上，与外切核酸酶(如 BAL 31)一起温育一定时间，该时间足以消化母体端粒，但留下某些胚胎端粒 DNA。

- 20 向所述细胞中加入全端粒标记的探针，如荧光标记探针。该探针粘附于胚胎细胞核中的染色体的端粒片段上，但并不与失去其端粒片段的母体细胞核的染色体相互作用。

如果此刻对载玻片进行检测，胚胎细胞核具有荧光，而母体细胞核不具荧光。或者，可用本领域已知的流式细胞计方法，从母体细胞中分离出荧光胚胎细胞。

- 25 在具体的实施方案中，分离后，将二级不同标记的探针引入到所述细胞中。适当的不同标记的探针也可带有可见标记物，如不同的荧光标记物(荧光团)。无论该胚胎细胞的 DNA 是否与所述二级探针结合，都可采用本领域熟知的荧光显微镜检术和分离滤器进行测

定。

一般常用的荧光团包括 DAPI、荧光素、FITC、Cy3、Cy5、罗丹明染料和德克萨斯红。

5 本发明另一方面提供一种鉴定母体血或阴道样本内胚胎细胞核、染色体和 DNA 的试剂盒，该试剂盒包括一种能消化 DNA 末端区段的外切核酸酶以及一种用于检测在染色体末端区段中发现的特定 DNA 序列的标记探针，如荧光标记探针。

10 该试剂盒可包含一或多种实现以上所述方法所需的其它的试剂或物品。更详细地讲，该试剂盒还可包含二级标记探针，如不同的荧光标记探针，该探针对特定的染色体片段的某些 DNA 序列具有特异性，因此能诊断不同的染色体病症。

所述试剂盒还包含核细胞分离剂(如 Percoll 或 Lymphoprep)和/或核膜穿孔剂(如溶血卵磷脂、皂苷或 Triton X100)和/或用于端粒消化的外切核酸酶(如 BAL 31)。

15 应重点指出的是：对胚胎细胞核本身的独立鉴别是进行可靠的非侵袭性产前诊断所必需的(见 Hulten, The Lancet, 357, 963-4, 2001)。本发明提供达到这种要求的方法。

20 另一方面，还应指出的是：对不同 FISH 颜色信号，可使用多种荧光团组合(直接或间接标记)以鉴别端粒序列和染色体特异性序列，这一点在本领域是众所周知的。FISH 本身是目前发展迅速的领域。

25 最后重点指出的是，如其它研究者说明的一样，所述 FISH-FISH 方法本身简单、快速，尤其与其它技术相比来看。所有富集和制备的处理时间，包括原位杂交，一共大约 6 小时。某些步骤可适于自动化操作。应用市场现有的计算机软件，对显微镜分析自动化也同样适用，其中目前本身已存在自动荧光点计数。

现通过实施例并参考附带的图示，详细地说明本发明。

图 1 用示意图说明在母体和胚胎染色体/DNA 中存在的端粒差别以及对其的酶促消化作用；

图 2 用示意图说明采用本发明的母体和胚胎细胞混合群方法，应用(a)端粒特异性 FISH 探针和(b)染色体 Y 特异性 FISH 探针进行分析的结果；

5 图 3 用示意图说明采用本发明的母体和胚胎细胞混合群方法，应用(a)端粒特异性 FISH 探针和(b)染色体 21 特异性 FISH 探针进行分析的结果；

实施例 1

10 从成年女性血样和羊水样本(含胚胎带核细胞)中分离带核细胞。在含有范围为 1/10 和 1/100 至 1/1000 体积百分比的不同比例的胚胎和成人细胞的混悬液中，两种类型的细胞混合在一起。

然后将混悬液暴露于溶血卵磷脂中以诱发细胞/细胞核的膜的透化作用，接着固定、制备显微术载玻片，随后暴露进行核酸外切 DNA 消化。然后将这些细胞先用全端粒探针、再用染色体特异性探针杂
15 交以进行荧光显微镜分析。

1) 细胞制备

将装于 EDTA 管中的 10ml 新鲜血液与 10ml 磷酸盐缓冲液(PBS)混合。然后将 10ml Lymphoprep (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway)
20 置于 50ml 管中，然后慢慢在顶部加上一层 10ml 的所述稀释血液。

以 2000 rpm 速度，将所述试管离心 30 分钟。然后通过倾斜该试管，采用精密移液管吸出细胞层(3-5ml)，移出血浆下的薄淋巴细胞层。之后，将分离的淋巴细胞用 PBS 稀释使得最终体积达到 20ml。随后以 2000 rpm 速度，将这些细胞离心 15 分钟。弃去上清液，将细
25 胞沉淀溶解于 5ml PBS 中。

以 2000 rpm 速度，将男性三体性 21 妊娠的羊水样本离心 15 分钟。小心弃去上清液，将细胞沉淀再混悬于 5ml PBS 中。

2) 细胞混合液

将各种成年女性细胞和男性胚胎细胞样本的混合物制成终体积为 10ml 的溶液。胚胎与成人细胞的比例在 1/10、1/100 和 1/1000 体积百分比的范围之内。

5 3) 细胞/细胞核的膜的透化作用

将溶血卵磷脂(5 μ g/ml 的乙酸钠溶液)加入到淋巴细胞和羊水样本的混合液中。在 4℃ 下, 将这些细胞温育 2 分钟。加入 2.5ml 多聚甲醛终止该反应。然后以 2000 rpm 速度, 将这些细胞旋转 15 分钟, 用含有 1% 牛血清清蛋白(BSA)的 PBS 洗涤 2 次。

10

4) 载玻片的制备和固定

将 200 μ l 细胞混悬液置于干净的载玻片上, 放置干燥。然后将细胞用加入该载玻片上的 200 μ l 2% 甲醛固定, 放置 10 分钟。随后将所述载玻片在 PBS 中洗涤, 再通过一系列乙醇脱水。

15

5) 核酸外切酶消化

在加热板(40℃-50℃)上, 将载玻片老化 2 小时。在每片载玻片 50 μ l 缓冲液中, 用 1-5 单位的 Bal 31 酶(New England Bio labs)进行酶消化。将载玻片置于 37℃ 加热板上 10 分钟。室温下, 通过在 2xSSC 中洗涤所述载玻片, 终止酶促反应。然后将载玻片通过一系列乙醇脱水, 空气干燥。

20

6) 端粒的 PAN FISH

根据制造商的全端粒 DNA 试剂盒(Dako, Glostrup, Denmark)的使用说明, 将所述载玻片在 Tris-缓冲盐溶液(TBS)、3.7% 甲醛和预处理溶液中洗涤。然后将载玻片通过一系列乙醇脱水, 空气干燥。向各载玻片上加入 10 μ l FITC 标记的探针, 然后盖上一片玻璃盖玻片。在 80℃ 下, 将这些载玻片温育 3 分钟, 然后在室温下暗处温育 30 分钟。将所述载玻片通过漂洗和冲洗溶液, 通过一系列乙醇脱水。将

25

这些载玻片空气干燥，然后用包括 DAPI 的 Vectashield (Vector Laboratories, Peterborough, UK)进行复染色，随后用盖玻片覆盖、密封。

5 7) 采用 Vysis 非整倍性检测试剂盒，与染色体 21、13、18、X 和 Y 特异性的探针杂交

10 通过将所述载玻片浸入丙酮中 2 分钟，从载玻片上移去盖玻片。然后将载玻片脱水，干燥。采用金刚石尖头划痕，在载玻片上标记两个杂交区段。通过浸入 73℃ 下 70%甲酰胺：30% 2xSSC 中 5 分钟，
15 将靶 DNA 变性。向靶区段 1 中加入 10 μl CEP 18/X/Y 探针混合物，向靶区段 2 中加入 10 μl LSI 13/21 探针混合物(Vysis, US)，将盖玻片放在所述探针溶液上。用橡胶胶水将盖玻片密封，将载玻片放入预热的湿化容器中，在 37℃温箱中放置 16 小时或过夜。移去盖玻片，
20 将载玻片在 73℃ 下 0.4xSSC/0.3%NP-40 溶液中洗涤 2 分钟。然后将载玻片置于室温下 2xSSC/0.1%NP-40 溶液中 1 分钟。当完全干燥后，
25 将 10 μl DAPI II 复染剂(Vysis, US)加入到所述靶区段内，在盖玻片下密封。

8) 显微镜检术

20 采用 100 倍物镜的 Zeiss 轴向落射荧光显微镜筛选载玻片。用适当的滤器观测信号，采用带有 SmartCapture 软件(Vysis, US)的 CCD 照相机获得图象。载玻片的扫描从盖玻片的上部左角开始，从顶部到底部移动。

25 采用 FITC 滤器，开始对端粒荧光进行分析。使用 England Finder (Graticules Ltd, Kent, UK)记录阳性和阴性细胞的位置。然后用 Orange 滤器(Vysis, US)，对区段 1 和 2 上的细胞核再检测，以分别对染色体 Y 和 21 进行鉴定和计数。

9) 结果

采用 FITC 滤器的荧光显微镜检术表明在某些细胞核中有端粒信号，而在其它细胞核中没有或几乎没有信号。显示这些端粒信号的细胞核比例对应于所制备和分析的胚胎和成人细胞核的混合物的预期比例。因此，胚胎细胞的浓度越低，非荧光细胞核的比例越高，反之如此。记录适当细胞核群的图象，并记录它们的位置。(图 2A 和 3A)。

接着，采用 Orange 滤器(Vysis, US)，分析所述相同的细胞群，以鉴定胚胎男性三体性 21 核，该核被认为带有一个 Y 染色体和三个染色体 21 信号。对每类细胞混合物(1/10, 1/100, 1/1000 百分体积的胚胎与成人细胞)的总共 1000 个细胞核进行分析，分析该载玻片区域 1 的 Y 信号，载玻片区域 2 的染色体 21 信号。

发现具有端粒荧光性(即被认为是胚胎细胞)的细胞核和 Y 信号的出现具有 97.3%的一致性。Y 荧光性的结果与根据制造商手册对纯胚胎细胞群(95-100)的对应分析结果一致。(图 2B)。

发现具有端粒荧光性(即被认为是胚胎细胞)的细胞核和三种染色体 21 信号的出现具有稍低的一致性。在重复试验中，该值在 83-90%之间。但是这些结果与我们在带有胚胎三体性的羊水样本中常规记录的结果一致，并且在制造商手册记录的范围之内。(图 3B)。

10) 说明

这些结果表明采用端粒和染色体特异性探针的双重 FISH 分析，以及随之在一时间过程内的端粒酶促消化，可能在胚胎和成人细胞之间进行区分。

实施例 2

用母血对胚胎 47、XY+21 Down 氏综合症的产前诊断

1. 妊娠和血样

5 在获准 Ethical Approval from the Local Ethical Committee 的同意
通知书后, 通过静脉穿刺从妊娠期 16 周的怀孕妇女取血 12ml, 加入
到 2 个乙二胺四乙酸(EDTA)管中。

[应注意: 在本实施例以及以下实施例中, 均使用相对少量的血。
大量母血样本应可收集到大量胚胎细胞, 因此是更可取的。]

2. 胚胎细胞的富集

10 根据(Ganshirt 等, Diagnostic Cytogenetics, Springer Lab Manual,
1999 R. -D. Wagner, Fetal Cells In Maternal Blood, pp401-415)中说明的
稍加改变的方法, 采用三密度梯度进行母血血浆内胚胎带核细胞的
富集。

15 将 12ml 该 EDTA 血液加入到 12ml 磷酸盐缓冲液(PBS)中, 倒转
试管混合。用移液管将 6ml 该血液/PBS 混合物加入到 4 个 15ml 聚苯
乙烯管中。采用连有注射器的长细插管, 放入三层 Percoll^R (Amersham
Pharmacia)。开始放入下层 3ml 40% 的 Percoll, 接着 3ml 45% 的
Percoll, 然后 3ml 50% 的 Percoll。然后以 500g 速度, 将该混悬液离
20 心 30 分钟。移出血浆层, 转移至清洁的试管中, 再在 500g 速度下
离心 10 分钟。将该细胞沉淀在 PBS 中洗涤, 然后根据细胞遗传学制
备常规使用的标准技术, 用 3:1 甲醇:乙酸固定。

3. 载玻片的制备和固定

25 将固定细胞混悬液置于硅烷化的显微镜检术载玻片上, 放置干
燥。然后在玻片染色缸中, 再将该细胞混悬液甲醛固定 10 分钟(50ml
PBS, 0.5g MgCl₂, 1.3ml 甲醛), 通过一系列乙醇(70%, 95%, 100%)脱
水, 空气干燥。

4. 核酸外切酶消化

按实施例 1(第 5 段)中说明的方案, 用 3 单位的 Bal 31 酶进行酶消化。

5. 采用全端粒、Y 和 21 探针组合进行 FISH

将 0.5 μ l 全端粒毛地黄毒苷元标记的探针(Appligene Oncor)、1 μ l LSI 染色体 21 光谱橙探针(Vysis Ltd.)和 1 μ l CEP(III)光谱水探针(Vysis Ltd.)与 7.5 μ l 的 Hybrisol VI(Oncor Appligene)一起混合, 作为每个载玻片的用量。将 10 μ l 该探针混合物置于含有所述靶细胞的显微载玻片上。然后在 75°C 下的加热板上, 将该载玻片变性 5 分钟, 用橡胶溶液密封, 在 37°C 湿化箱中杂交过夜。

次日进行杂交后清洗。将载玻片在 43°C 下 50%甲酰胺中洗涤 15 分钟, 在 37°C 下 2xSSC 中洗涤 8 分钟, 然后置于室温下的 1xPBT 中。在该载玻片上加上 30 μ l 标记荧光素的抗毛地黄毒苷元抗体, 在 37°C 下保持 5 分钟。最后, 将该载玻片在 1xPBT 中洗涤 3 次, 每次 2 分钟, 空气干燥, 用 DAPI 复染。

6. 显微镜检术分析

采用 40 倍物镜的 Zeiss 轴向落射荧光显微镜筛选载玻片。用适当的滤器观测信号, 采用带有 SmartCapture 图象获得系统和分析系统(Vysis/Applied Imaging)的 CCD 照相机获得图象并储存相关图象。

对共计 1000 个细胞核进行测定。大多数, 如 995/1000(99.5%), 不包含端粒(绿)信号, 它们被认为是源于母体的核。用 FITC、光谱橙和光谱水滤器, 对其余 5 个细胞核捕获图象。这些 5/1000 细胞核可同时包含绿色端粒信号和水 Y 信号, 因此被认定为是源于男性胚胎的细胞核。但是, 当这 5 个细胞核还包含三个红信号时, 即表明该胚胎可能具有 Down 氏综合症的核型 47、XY+21。

概述和结论

在通过 Percoll 梯度富集血浆部分胚胎细胞后，通过采用探针混合物 Tel/Y/21 对存在的端粒序列识别并对 Y 和染色体 21 信号计数，进行 FISH 研究。

- 5 该实施例表明：根据所用的探针混合物，以及体外酶促消耗后通过其保留的端粒荧光诊断 Y/21 源于胚胎细胞核，可鉴定该染色体的组成。这种组合能够确定该胚胎是否是男性以及是否具有 21 三体 Down 氏综合症。

10 实施例 3

用母血对胚胎 47、XX、+21 Down 氏综合症的产前诊断

1. 妊娠和血样

- 15 在获准 Ethical Approval from the Local Ethical Committee 的同意通知书后，通过静脉穿刺从妊娠期 16 周的怀孕妇女中取血 12ml，加入到 2 个乙二胺四乙酸(EDTA)管中。

2. 胚胎细胞的富集

- 20 根据(Ganshirt 等，Diagnostic Cytogenetics, Springer Lab Manual, 1999 R. -D. Wagner, Fetal Cells In Maternal Blood, pp401-415)中说明的稍加改变的方法，采用三密度梯度进行母血血浆内胚胎带核细胞的富集。

- 25 将 12ml 该 EDTA 血液加入到 12ml 磷酸盐缓冲液(PBS)中，倒转试管混合。用移液管将 6ml 该血液/PBS 混合物加入到 4 个 15ml 聚苯乙烯管中。采用连有注射器的长细插管，放入三层 Percoll^R (Amersham Pharmacia)。开始放入下层 3ml 40%的 Percoll，接着 3ml 45%的 Percoll，然后 3ml 50%的 Percoll。然后以 500g 速度，将该混悬液离心 30 分钟。移出血浆层，转移至清洁的试管中，再在 500g 速度下离心 10 分钟。将该细胞沉淀在 PBS 中洗涤，然后根据细胞遗传学制

备常规使用的标准技术，用 3:1 甲醇:乙酸固定。

3. 载玻片的制备和固定

5 将固定细胞混悬液置于硅烷化的显微镜检术载玻片上，放置干燥。然后在玻片染色缸中，再将该细胞混悬液甲醛固定 10 分钟(50ml PBS, 0.5g $MgCl_2$, 1.3ml 甲醛),通过一系列乙醇(70%, 95%, 100%)脱水，空气干燥。

4. 核酸外切酶消化

10 按实施例 1(第 5 段)中说明的方案，用 3 单位的 Bal 31 酶进行酶消化。

5. 采用全端粒、X/Y、13、18 和 21 探针组合进行 FISH

15 将 0.5 μ l 全端粒毛地黄毒苷元标记的探针(Appligene Oncor)与 0.5 μ l 生物素标记的 StarFISH 人染色体全端粒探针(Cambio)混合。然后将该端粒混合物加入到 10 μ l MultiVysion™ PGT(Vysis Ltd.)中。将该探针混合物置于含有所述靶细胞的显微载玻片上。然后在 75℃下的加热板上，将该载玻片变性 5 分钟，用橡胶溶液密封，在 37℃湿化箱中杂交过夜。

20 次日进行杂交后清洗。将载玻片在 43℃下 50%甲酰胺中洗涤 15 分钟，在 37℃下 2xSSC 中洗涤 8 分钟，然后置于室温下的 1xPBT 中。将 30 μ l 预混合的双重颜色检测试剂(Oncor Appligene)加到该载玻片上，在 37℃下保持 5 分钟。最后，将该载玻片在 1xPBT 中洗涤 3 次，每次 2 分钟，空气干燥，用 DAPI 复染。

25

6. 显微镜检术分析

采用 40 倍物镜的 Zeiss 轴向落射荧光显微镜筛选载玻片。用适当的滤器观测信号，采用带有 SmartCapture 图象获得系统和分析系统(Vysis/Applied Imaging)的 CCD 照相机获得图象并储存相关图象。

对共计 1000 个细胞核进行测定。大多数, 如 995/1000(99.5%), 不包含端粒(黄)信号, 它们被初步认为是源于母体的核。用 FITC、光谱橙、光谱水和光谱金滤器, 对其余 5 个细胞核捕获图象。这些 5/1000 细胞核包含黄端粒信号, 因此被认定为是源于胚胎的细胞核。

- 5 这些细胞核可以例如还含有染色体 13 的两个红信号、染色体 21 的两个绿信号、染色体 X 的两个水信号以及对应于染色体 18 的三个蓝信号, 但没有 Y 染色体的金信号。这种图谱表明该胚胎具有核型 47、XY+18, 表明为 Edward 氏综合症。

10 概述和结论

在通过 Percoll 梯度富集血浆部分胚胎细胞后, 通过采用探针混合物 Tel/13/18/X/Y/21 对存在的端粒序列识别并对 13、18、X、Y 和染色体 21 信号计数, 进行 FISH 研究。

- 15 该实施例表明: 通过体外酶促消耗后其余端粒荧光, 而诊断为源于胚胎本身的细胞核, 可鉴定该细胞核染色体的组成(对应于探针混合物 13/18/X/Y/21)。这组合能够确定该胚胎是否是女性以及是否具有 Edward 氏综合症。

实施例 4

20 用母血对胚胎 47、XXY Klinefelter 氏综合症的产前诊断

1. 妊娠和血样

在获准 Ethical Approval from the Local Ethical Committee 的同意通知书后, 通过静脉穿刺从妊娠期 16 周的怀孕妇女中取血 12ml, 加入到 2 个乙二胺四乙酸(EDTA)管中。

25

2. 胚胎细胞的富集

根据(Ganshirt 等, Diagnostic Cytogenetics, Springer Lab Manual, 1999 R. -D. Wagner, Fetal Cells In Maternal Blood, pp401-415)中说明的稍加改变的方法, 采用三密度梯度进行母血血浆内胚胎带核细胞的

富集。

将 12ml 该 EDTA 血液加入到 12ml 磷酸盐缓冲液(PBS)中，倒转试管混合。用移液管将 6ml 该血液/PBS 混合物加入到 4 个 15ml 聚苯乙烯管中。采用连有注射器的长细插管，放入三层 Percoll[®] (Amersham Pharmacia)。开始放入下层 3ml 40% 的 Percoll，接着 3ml 45% 的 Percoll，然后 3ml 50% 的 Percoll。然后以 500g 速度，将该混悬液离心 30 分钟。移出血浆层，转移至清洁的试管中，再在 500g 速度下离心 10 分钟。将该细胞沉淀在 PBS 中洗涤，然后根据细胞遗传学制备常规使用的标准技术，用 3:1 甲醇:乙酸固定。

3. 载玻片的制备和后固定

将固定细胞混悬液置于硅烷化的显微镜检术载玻片上，放置干燥。然后在玻片染色缸中，再将该细胞混悬液甲醛固定 10 分钟(50ml PBS, 0.5g MgCl₂, 1.3ml 甲醛),通过一系列乙醇(70%, 95%, 100%)脱水，空气干燥。

4. 核酸外切酶消化

按实施例 1(第 5 段)中说明的方案，用 3 单位的 Bal 31 酶进行酶消化。

5. 采用全端粒和 18/X/Y 探针组合进行 FISH

将 9.5 μ l Aneuvysion CEP 18/X/Y (Vysis Ltd.)和 0.5 μ l 全端粒毛地黄毒苷元标记的探针(Oncor)加在载玻片上，盖上盖玻片。然后在 75 $^{\circ}$ C 下的加热板上，将该载玻片变性 5 分钟，用橡胶溶液密封，在 37 $^{\circ}$ C 湿化箱中杂交过夜。

次日进行杂交后清洗。将载玻片在 43 $^{\circ}$ C 下 50%甲酰胺中洗涤 15 分钟，在 37 $^{\circ}$ C 下 2xSSC 中洗涤 8 分钟，然后置于室温下的 1xPBT 中。在该载玻片上加上 30 μ l 标记荧光素的抗毛地黄毒苷元抗体，在 37 $^{\circ}$ C 下保持 5 分钟。最后，将该载玻片在 1xPBT 中洗涤 3 次，每次 2

分钟，空气干燥，用一滴 4',6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI, Vectashield Ltd.)复染。

6. 显微镜检术分析

5 采用 40 倍物镜的 Zeiss 轴向落射荧光显微镜筛选载玻片。用适当的滤器观测信号，采用带有 SmartCapture 图象获得系统和分析系统(Vysis/Applied Imaging)的 CCD 照相机获得图象并储存相关图象。

10 对共计 1000 个细胞核进行测定。大多数，如 995/1000(99.5%)，不包含端粒(绿)信号，它们被认为是源于母体的核。另一方面，5 个核包含端粒信号以及 Y 信号，被认定为是源于胚胎的细胞核。

 这 5 个核中的 4 个可能有两个 X 信号，这种组合信号与胚胎核型 47、XXY，即 Klinefelter 氏综合症一致。余下的一个细胞具有一个 X 和一个 Y 信号，被认为是正常的 46、XY 男性细胞核。这 5 个细胞都具有两个染色体 18 信号。

15 在这种情况下，可得出结论：该胚胎具有与 Klinefelter 氏综合症一致的核型 47、XXY。但是应注意：把带有代表 X 杂交失败的工艺人工产物(假的阴性胚胎细胞)的 XY 染色体成分的单细胞核或者另一种胚胎实际是一种核型 47、XY[1]/47、XXY[4]的 Klinefelter 嵌合体的存在可能性区分开来，是不可能的。

20

概述和结论

 在通过 Percoll 梯度富集血浆部分胚胎细胞后，通过采用探针混合物 X/Y/18(Vysis Ltd)对 X、Y 和染色体 18 计数，并应用全端粒毛地黄毒苷元标记的探针(Appligene Oncor)进行端粒序列识别，从而进行 FISH 研究。

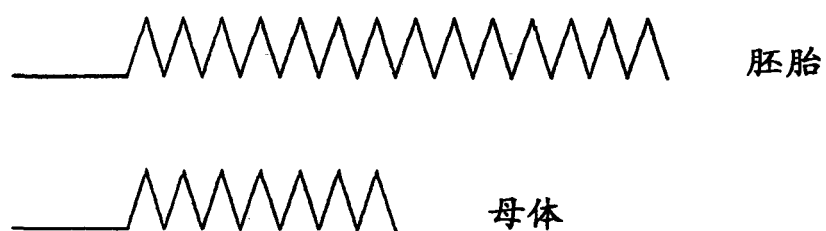
25

 该实施例表明：根据所用的探针混合物，采用全端粒探针，以及体外酶促消耗后通过其余端粒荧光诊断为源于胚胎的细胞核中的 X/Y/18，可鉴定胚胎细胞核染色体的组成。基于带有 XXY 和 XY 细

胞核与端粒荧光的一致性，我们可以确定该胚胎具有非嵌合型或嵌合型 Klinefelter 氏综合症。

端粒差别

-端粒长度差别



-酶促消化

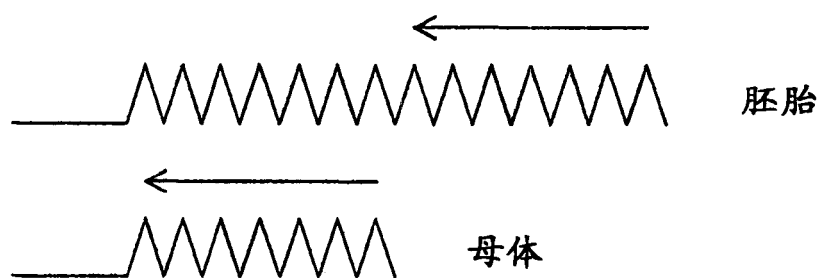
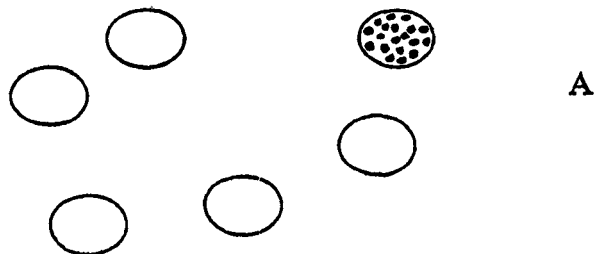


图 1

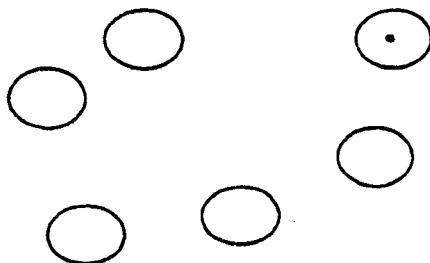
双重 FISH

-端粒 FISH



A

-染色体 Y FISH

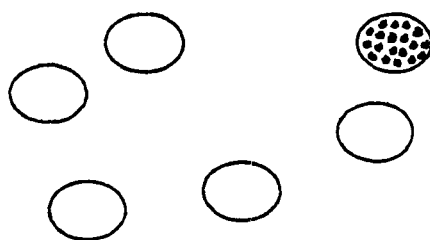


B

图 2

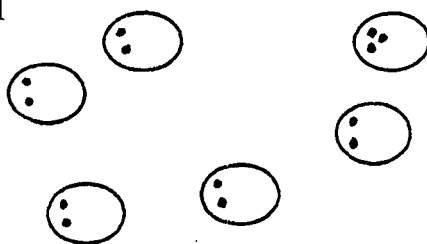
双重 FISH

-端粒 FISH



A

-染色体 21 FISH



B

图 3

专利名称(译)	临床诊断方法		
公开(公告)号	CN1436247A	公开(公告)日	2003-08-13
申请号	CN01811237.4	申请日	2001-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	赛姆格有限公司		
申请(专利权)人(译)	赛姆格有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	赛姆格有限公司		
[标]发明人	MA胡尔藤		
发明人	M· A· 胡尔藤		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/34 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/566 G01N33/58		
CPC分类号	C12Q2600/156 C12Q1/6883		
优先权	2000009784 2000-04-20 GB		
其他公开文献	CN1250742C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种鉴定母体血或阴道样本内包含染色体或DNA的胚胎细胞核的方法，该方法包括(a)将该样本中的细胞核的染色体经酶核酸外切消化以除去各染色体的末端区域，然后(b)检测作为所述消化过程结果的保留在胚胎DNA中但不存在于母体DNA中的DNA序列。鉴别后，可对胚胎DNA进行例如检测染色体异常的诊断。

