



(10) 授权公告号 CN 109312332 B

(45) 授权公告日 2022.07.08

(21) 申请号 201780034953.1

(22) 申请日 2017.04.06

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109312332 A

(43) 申请公布日 2019.02.05

(30) 优先权数据
62/318,982 2016.04.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.12.05

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/026335 2017.04.06

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/176985 EN 2017.10.12

(73) 专利权人 韦恩州立大学

地址 美国密歇根州

(72) 发明人 S·德鲁罗 D·R·阿尔曼特

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

专利代理师 孙占华 吴溪

(51) Int.Cl.

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/6806 (2018.01)

G01N 33/50 (2006.01)

审查员 艾超仁

权利要求书2页 说明书27页 附图7页

(54) 发明名称

自子宫颈内管获取的绒毛外滋养层细胞的
胎儿DNA的分离与分析

(57) 摘要

本发明提供了对正在进行的妊娠的胎儿的DNA进行分离的方法,其包括:从怀孕受试者获得含有母体细胞和胎儿绒毛外滋养层细胞的母体宫颈内样本;从母体宫颈内样本中分离出胎儿绒毛外滋养层细胞,产生被母体DNA污染的分离的胎儿绒毛外滋养层细胞;裂解分离的胎儿绒毛外滋养层细胞;从裂解的胎儿绒毛外滋养层细胞中分离胎儿细胞核,产生分离的胎儿细胞核,从而除去至少一部分污染的母体DNA;以及从分离的胎儿细胞核中纯化基因组DNA,产生纯化的胎儿基因组DNA。可以分析纯化的胎儿基因组DNA以确定纯化的胎儿基因组DNA的基因组DNA序列的特征,从而确定正在进行的妊娠的胎儿的DNA的特征。

1. 一种对正在进行的妊娠的胎儿的DNA进行分离的方法,其包括:
 - 从怀孕受试者中获得含有母体细胞和胎儿绒毛外滋养层细胞的母体宫颈内样本;
 - 从母体宫颈内样本中分离胎儿绒毛外滋养层细胞,产生被母体DNA污染的分离的胎儿绒毛外滋养层细胞;
 - 裂解分离的胎儿绒毛外滋养层细胞;
 - 从裂解的胎儿绒毛外滋养层细胞中分离胎儿细胞核,产生分离的胎儿细胞核,从而除去至少一部分污染的母体DNA;
 - 裂解分离的胎儿细胞核;和
 - 从分离的胎儿细胞核中纯化基因组DNA,产生纯化的胎儿基因组DNA;其还包括用DNA酶处理分离的胎儿细胞核、分离的绒毛外滋养层细胞和/或绒毛外滋养层细胞,从而除去至少一部分污染的母体DNA。
2. 权利要求1的方法,其还包括处理分离的胎儿细胞核以除去至少一部分污染的母体DNA。
3. 权利要求1或2的方法,其中在用DNA酶处理胎儿绒毛外滋养层细胞之前固定胎儿绒毛外滋养层细胞,并将DNA酶附着于支持体上,防止DNA酶进入胎儿绒毛外滋养层细胞。
4. 权利要求1或2的方法,其中在用DNA酶处理胎儿绒毛外滋养层细胞之前,不固定胎儿绒毛外滋养层细胞。
5. 权利要求1或2的方法,其中所述纯化的胎儿基因组DNA的特征在于胎儿分数在10%-100%的范围内。
6. 权利要求1或2的方法,其中所述纯化的胎儿基因组DNA的特征在于胎儿分数在25%-100%的范围内。
7. 一种对正在进行的妊娠的胎儿的DNA进行分析的非诊断方法,其包括:从怀孕受试者中获得含有胎儿绒毛外滋养层细胞的母体宫颈内样本;
 - 从母体宫颈内样本中分离胎儿绒毛外滋养层细胞;
 - 裂解分离的胎儿绒毛外滋养层细胞;
 - 从裂解的胎儿绒毛外滋养层细胞中分离胎儿细胞核;
 - 裂解分离的胎儿细胞核并从分离的胎儿细胞核中纯化基因组DNA;和
 - 分析纯化的胎儿基因组DNA,从而确定纯化的胎儿基因组DNA的基因组DNA序列的特征,从而分析正在进行的妊娠的胎儿的基因组DNA;其还包括用DNA酶处理分离的胎儿细胞核、分离的绒毛外滋养层细胞和/或绒毛外滋养层细胞,从而除去至少一部分污染的母体DNA。
8. 权利要求7的方法,其中分析纯化的胎儿基因组DNA确定纯化的胎儿基因组DNA的基因组DNA序列中至少一个单个核苷酸的特征,从而用单碱基解析来分析正在进行的妊娠的胎儿的DNA。
9. 权利要求7或8的方法,其中所述分析包括选自以下的方法:测序、高分辨率熔解分析、甲基化分析、毛细管电泳法、质谱法、单链构象多态性、单碱基延伸、限制性片段长度多态性。
10. 权利要求7或8的方法,其中所述测序包括选自以下的方法:大规模平行标记测序、单分子实时测序、聚合酶克隆测序、离子半导体、焦磷酸测序、通过合成测序、通过连接测序和链终止测序。

11. 权利要求7或8的方法,其还包括处理分离的胎儿细胞核以除去至少一部分污染的母体DNA。

12. 权利要求7或8的方法,其中在用DNA酶处理胎儿绒毛外滋养层细胞之前固定胎儿绒毛外滋养层细胞,并将DNA酶附着于支持体上,防止DNA酶进入胎儿绒毛外滋养层细胞。

13. 权利要求7或8的方法,其中在用DNA酶处理胎儿绒毛外滋养层细胞之前,不固定胎儿绒毛外滋养层细胞。

14. 权利要求7或8的方法,其中所述纯化的胎儿基因组DNA的特征在于胎儿分数在10%-100%的范围内。

15. 权利要求14的方法,其中所述纯化的胎儿基因组DNA的特征在于胎儿分数在25%-100%的范围内。

自子宫颈内管获取的绒毛外滋养层细胞的胎儿DNA的分离与分析

[0001] 相关申请的引用

[0002] 本申请要求于2016年4月6日提交的美国临时专利申请序列号62/318,982的优先权,所述临时专利申请的全部内容以引用的方式纳入本文。

技术领域

[0003] 总体上,本公开内容涉及用于分析胎儿DNA的方法。根据具体方面,本公开内容涉及从怀孕受试者的胎儿绒毛外滋养层细胞中分离DNA并分析胎儿DNA的方法。

背景技术

[0004] 胎儿基因组的分析可用于检测各种遗传疾病以确定胎儿的风险。目前,围产期诊断使用具有不同程度的风险和精确度的羊膜腔穿刺术、绒毛膜绒毛取样和血液来源的无细胞DNA侵入地进行。

[0005] 分析胎儿DNA的“无细胞”方法受到胎儿DNA降解的限制,使得血样中的大多数胎儿DNA为约143bp (Wong等人,Annu Rev.Med,67:419-432,2016.)。此外,通过“无细胞”方法从血样中分离的DNA的“胎儿分数”限于10-20%。术语“胎儿分数”是指样本中为胎儿DNA的DNA的分数,其中剩余部分是母体DNA。胎儿分数与术语“母体污染”相反关联。因此,例如,当样本中DNA的胎儿分数为10%时,样本的特征在于90%的母体污染。

[0006] 在正在进行的妊娠期间获得的宫颈内样本在含有胎儿细胞的样本中是独特的。胎儿来源的绒毛外滋养层细胞自然流入子宫下部。虽然含有这些胎儿绒毛外滋养层细胞的宫颈内样本似乎是用于分析胎儿基因组的胎儿基因组DNA的有用来源,但尚无法可靠地分析通过从胎儿绒毛外滋养层细胞中的传统DNA提取所获得的胎儿基因组DNA。令人惊讶的是,从高度纯化的胎儿绒毛外滋养层细胞分离的胎儿DNA的测序不能产生可靠的胎儿DNA信号。

[0007] 在正在进行的妊娠期间获得的宫颈内样本含有比胎儿滋养层细胞多得多的母体细胞。出乎意料的是,本发明人已经发现即使在分离出绒毛外胎儿滋养层细胞以便存在很少母体细胞或不存在母体细胞之后,显著量的母体基因组DNA与胎儿绒毛外滋养层细胞相关联。不囿于理论考虑,本发明人认为母体DNA可能在宫颈内样本中被衰老的母体细胞释放,并且该母体DNA(可能被降解)与宫颈内样本中的胎儿绒毛外滋养层细胞的质膜相关。这种先前未知的问题已经引起胎儿基因组分析的显著问题,所述分析使用宫颈内样本的胎儿绒毛外滋养层细胞作为胎儿基因组DNA的来源。因此,一直需要更准确的基因组胎儿DNA分析。

发明内容

[0008] 本发明提供了对正在进行的妊娠的胎儿的DNA进行分离的方法,其包括:从怀孕受试者获得含有母体细胞和胎儿绒毛外滋养层细胞的母体宫颈内样本;从母体宫颈内样本中分离出胎儿绒毛外滋养层细胞,产生被母体DNA污染的分离的胎儿绒毛外滋养层细胞;裂解

分离的胎儿绒毛外滋养层细胞；从裂解的胎儿绒毛外滋养层细胞中分离胎儿细胞核，产生分离的胎儿细胞核，从而除去至少一部分污染的母体DNA；裂解分离的胎儿细胞核；以及从分离的胎儿细胞核中纯化基因组DNA，产生纯化的胎儿基因组DNA。

[0009] 本发明提供了对正在进行的妊娠的胎儿的DNA进行分离的方法，其包括：从怀孕受试者获得含有母体细胞和胎儿绒毛外滋养层细胞的母体宫颈内样本；从母体宫颈内样本中分离出胎儿绒毛外滋养层细胞，产生被母体DNA污染的分选的胎儿绒毛外滋养层细胞；裂解分选的胎儿绒毛外滋养层细胞；从裂解的胎儿绒毛外滋养层细胞中分离胎儿细胞核，产生分离的胎儿细胞核，从而除去至少一部分污染的母体DNA；进一步处理分离的胎儿细胞核以除去至少另一部分污染的母体DNA；裂解分离的胎儿细胞核；以及从分离的胎儿细胞核中纯化基因组DNA，产生纯化的胎儿基因组DNA。

[0010] 本发明提供了对正在进行的妊娠的胎儿的DNA进行分离的方法，其包括：从怀孕受试者获得含有母体细胞和胎儿绒毛外滋养层细胞的母体宫颈内样本；从母体宫颈内样本中分离出胎儿绒毛外滋养层细胞，产生被母体DNA污染的分选的胎儿绒毛外滋养层细胞；裂解分选的胎儿绒毛外滋养层细胞；从裂解的胎儿绒毛外滋养层细胞中分离胎儿细胞核，产生分离的胎儿细胞核，从而除去至少一部分污染的母体DNA；进一步处理分离的胎儿细胞核以除去至少另一部分污染的母体DNA；裂解分离的胎儿细胞核；以及从分离的胎儿细胞核中纯化基因组DNA，产生纯化的胎儿基因组DNA。

[0011] 任选地，在裂解分离的胎儿细胞核之前用DNA酶处理分离的胎儿细胞核，从而除去至少一部分污染的母体DNA。

[0012] 任选地，在从母体宫颈内样本中分离胎儿绒毛外滋养层细胞之前，用DNA酶处理分选的绒毛外滋养层细胞，从而除去至少一部分污染的母体DNA。

[0013] 在另一种选择中，在裂解分离的胎儿绒毛外滋养层细胞之前，用DNA酶处理分选的绒毛外滋养层细胞，从而除去至少一部分污染的母体DNA。

[0014] 在另一种选择中，在用DNA酶处理胎儿绒毛外滋养层细胞之前固定胎儿绒毛外滋养层细胞，并将DNA酶附着于支持体(support)上，防止DNA酶进入胎儿绒毛外滋养层细胞。

[0015] 任选地，在用DNA酶处理胎儿绒毛外滋养层细胞之前，不固定胎儿绒毛外滋养层细胞。

[0016] 根据本发明对正在进行的妊娠的胎儿的DNA进行分离的方法的各方面，纯化的胎儿基因组DNA的特征在于胎儿分数在10%-100%的范围内。

[0017] 根据本发明对正在进行的妊娠的胎儿的DNA进行分离的方法的各方面，纯化的胎儿基因组DNA的特征在于胎儿分数在25%-100%的范围内。

[0018] 本发明提供了对正在进行的妊娠的胎儿的DNA进行分析的方法，其包括：从怀孕受试者获得含有胎儿绒毛外滋养层细胞的母体宫颈内样本；从母体宫颈内样本中分离胎儿绒毛外滋养层细胞；裂解分离的胎儿绒毛外滋养层细胞；从裂解的胎儿绒毛外滋养层细胞中分离胎儿细胞核；裂解分离的胎儿细胞核并从分离的胎儿细胞核中纯化基因组DNA；以及分析纯化的胎儿基因组DNA，从而确定纯化的胎儿基因组DNA的基因组DNA序列的特征，并从而分析正在进行的妊娠的胎儿的基因组DNA。

[0019] 任选地，根据本发明的各方面对纯化的胎儿基因组DNA进行分析确定了纯化的胎儿基因组DNA的基因组DNA序列中的至少一个单个核苷酸的特征，从而用单碱基解析分析正

在进行的妊娠的胎儿的DNA。

[0020] 任选地,根据本发明的各方面对纯化的胎儿基因组DNA进行分析包括进行选自以下的方法:测序、高分辨率熔解分析、甲基化分析、毛细管电泳法、质谱法、单链构象多态性、单碱基延伸、使用纯化的胎儿基因组DNA的限制性片段长度多态性。

[0021] 任选地,根据本发明的各方面对纯化的胎儿基因组DNA进行测序包括进行选自以下的方法:大规模平行标记测序、单分子实时测序、聚合酶克隆测序、离子半导体、焦磷酸测序、通过合成测序、通过连接测序和链终止测序。

[0022] 根据本发明的各方面,本发明提供了对正在进行的妊娠的胎儿的DNA进行分析的方法,其包括:从怀孕受试者获得含有胎儿绒毛外滋养层细胞的母体宫颈内样本;从母体宫颈内样本中分离胎儿绒毛外滋养层细胞;处理分离的胎儿细胞核以除去至少一部分污染的母体DNA;裂解分离的胎儿绒毛外滋养层细胞;从裂解的胎儿绒毛外滋养层细胞中分离胎儿细胞核;裂解分离的胎儿细胞核并从分离的胎儿细胞核中纯化基因组DNA;以及分析纯化的胎儿基因组DNA,从而确定纯化的胎儿基因组DNA的基因组DNA序列的特征,并从而分析正在进行的妊娠的胎儿的基因组DNA。

[0023] 任选地,本发明提供的对正在进行的妊娠的胎儿的DNA进行分析的方法包括在从母体宫颈内样本中分离胎儿绒毛外滋养层细胞之前用DNA酶处理分离的绒毛外滋养层细胞,从而除去至少一部分污染的母体DNA。

[0024] 任选地,本发明提供的对正在进行的妊娠的胎儿的DNA进行分析的方法包括在裂解分离的胎儿绒毛外滋养层细胞之前用DNA酶处理分离的绒毛外滋养层细胞,从而除去至少一部分污染的母体DNA。

[0025] 本发明提供了对正在进行的妊娠的胎儿的DNA进行分析的方法,其包括:从怀孕受试者获得含有胎儿绒毛外滋养层细胞的母体宫颈内样本;从母体宫颈内样本中分离胎儿绒毛外滋养层细胞;裂解分离的胎儿绒毛外滋养层细胞;从裂解的胎儿绒毛外滋养层细胞中分离胎儿细胞核;裂解分离的胎儿细胞核并从分离的胎儿细胞核中纯化基因组DNA;以及分析纯化的胎儿基因组DNA,其中在用DNA酶处理胎儿绒毛外滋养层细胞之前固定胎儿绒毛外滋养层细胞,并将DNA酶附着于支持体上,防止DNA酶进入胎儿绒毛外滋养层细胞,从而确定纯化的胎儿基因组DNA的基因组DNA序列的特征,并从而分析正在进行的妊娠的胎儿的基因组DNA。

[0026] 本发明提供了对正在进行的妊娠的胎儿的DNA进行分析的方法,其包括:从怀孕受试者获得含有胎儿绒毛外滋养层细胞的母体宫颈内样本;从母体宫颈内样本中分离胎儿绒毛外滋养层细胞;裂解分离的胎儿绒毛外滋养层细胞;从裂解的胎儿绒毛外滋养层细胞中分离胎儿细胞核;裂解分离的胎儿细胞核并从分离的胎儿细胞核中纯化基因组DNA;以及分析纯化的胎儿基因组DNA,其中在用DNA酶处理胎儿绒毛外滋养层细胞之前不固定胎儿绒毛外滋养层细胞,从而确定纯化的胎儿基因组DNA的基因组DNA序列的特征,并从而分析正在进行的妊娠的胎儿的基因组DNA。

[0027] 根据本发明对正在进行的妊娠的胎儿的DNA进行分析的方法的各方面,纯化的胎儿基因组DNA的特征在于胎儿分数在10%-100%的范围内。

[0028] 根据本发明对正在进行的妊娠的胎儿的DNA进行分析的方法的各方面,纯化的胎儿基因组DNA的特征在于胎儿分数在25%-100%的范围内。

附图说明

[0029] 图1是凝胶图,其示出了五个独立样本以及阳性和阴性对照中胎儿和母体细胞的扩增DNA;将扩增的DNA描绘为700至900个碱基对长度的涂片(smear),如DNA标准大小标记物(L)所示;

[0030] 图2是凝胶图,其示出了来自五个独立样本以及阳性和阴性对照的胎儿和母体细胞中各种染色体的PCR扩增片段;如DNA标准物(L)所示,片段的长度在100-800个碱基对之间;

[0031] 图3是凝胶图,其示出了五个独立样本中胎儿(F)和母体(M)细胞的成功文库制备的数字电泳分析;DNA标准大小标记物(L)的大小在y轴上标明以供参考;

[0032] 图4是Cercos热图的图像,其指示所有外显子组序列在log₁₀比例(scale)上的靶标区域(~1Mb)的平均覆盖率,指示母体(M)和胎儿(F)样本中的每个染色体(1-22,X,Y);左边的放大区域示出了X和Y染色体的详细覆盖率;

[0033] 图5A是表示用于胎儿和母体细胞的WGA后常染色体、X和Y染色体的相对覆盖率的图;

[0034] 图5B是表示用于新生儿血样(血斑)和作为参考标准使用的母体血样的WGA后常染色体、X和Y染色体的相对覆盖率的图;

[0035] 图6是从来自一名患者的母体细胞(母体)、胎儿滋养层细胞(TRIC)和胎盘组织(胎盘)获得的DNA的图形短串联重复序列(STR)图谱;

[0036] 图7是表示单个患者的相应母体和胎儿(TRIC)样本中94个测序的SNP的等位基因频率的比较的图;

[0037] 图8是表示单个患者的相应胎儿(TRIC)和胎盘样本中94个测序的SNP的等位基因频率的比较的图;和

[0038] 图9是表示单个患者的相应母体和胎盘样本中94个测序的SNP的等位基因频率的比较的图。

具体实施方式

[0039] 本文使用的科学和技术术语意欲具有本领域普通技术人员通常理解的含义。发现在许多标准文献的文中定义和使用这类术语,所述文献示例性地包括J.Sambrook and D.W.Russell,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press;3rd Ed.,2001;F.M.Ausubel,Ed.,Short Protocols in Molecular Biology,Current Protocols;5th Ed.,2002;B.Alberts et al.,Molecular Biology Of the Cell,4th Ed.,Garland,2002;D.L.Nelson and M.M.Cox,Lehninger Principles of Biochemistry,4th Ed.,W.H.Freeman&Company,2004;Engelke,D.R.,RNA Interference (RNAi):Nuts and Bolts of RNAi Technology,DNA Press LLC,Eagleview,PA,2003;Herdewijn,P.(Ed.),Oligonucleotide Synthesis:Methods and Applications,Methods in Molecular Biology,Humana Press,2004;A.Nagy,M.Gertsenstein,K.Vintersten,R.Behringer,Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual,3rd edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press;December 15,2002,ISBN-10:0879695919;Kursad Turksen(Ed.),Embryonic stem cells:methods and protocols in Methods Mol

Biol.2002;185, Humana Press; Current Protocols in Stem Cell Biology, ISBN: 9780470151808.

[0040] 单数术语“一”、“一个”和“所述”不意欲进行限制并且包括复数指代对象,除非另外明确地说明或上下文另外清楚地指明。

[0041] 术语“TRIC”在本文中用于指通过TRIC“自子宫颈的滋养层细胞提取和分离(Trophoblast Retrieval and Isolation form the Cervix)”方法获得的胎儿滋养层细胞。TRIC是在正在进行的妊娠中从宫颈管中安全非侵入性地分离胎儿细胞的方法,参见实施例中的描述。

[0042] 根据本发明的各方面,提供了从正在进行的妊娠的胎儿的细胞中分离基因组DNA以及分析胎儿基因组DNA的方法。胎儿细胞基因组DNA的分析提供了关于胎儿的详细信息,例如胎儿异常或变异的检测,包括单核苷酸多态性、碱基修饰和详细的基因组DNA序列信息。

[0043] 根据本发明各方面的方法包括从分离的胎儿绒毛外滋养层细胞核中纯化基因组DNA,产生纯化的胎儿基因组DNA,其中胎儿分数在10%-100%的范围内。根据本发明各方面的方法包括从分离的胎儿绒毛外滋养层细胞核中纯化基因组DNA,产生纯化的胎儿基因组DNA,其中胎儿分数在25%-100%的范围内。根据本发明各方面的方法包括从分离的胎儿绒毛外滋养层细胞核中纯化基因组DNA,产生纯化的胎儿基因组DNA,其中胎儿分数为50%或更高。根据本发明各方面的方法包括从分离的胎儿绒毛外滋养层细胞核中纯化基因组DNA,产生纯化的胎儿基因组DNA,其中胎儿分数为75%或更高。根据本发明各方面的方法包括从分离的胎儿绒毛外滋养层细胞核中纯化基因组DNA,产生纯化的胎儿基因组DNA,其中胎儿分数为15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、65%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高。如上所述,由于胎儿分数与母体DNA的污染负相关,纯化的胎儿基因组DNA的特征在于具有0%-90%的母体污染。根据本发明各方面的方法包括从分离的胎儿绒毛外滋养层细胞核中纯化基因组DNA,产生纯化的胎儿基因组DNA,其中母体污染为85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少。根据本发明各方面的方法包括从分离的胎儿绒毛外滋养层细胞核中纯化基因组DNA,产生纯化的胎儿基因组DNA,其中母体污染为75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少。

[0044] 尽管宫颈内样本中存在绝对优势的母体细胞群,但本发明的方法允许纯化和分析胎儿基因组DNA。本发明的方法早在正在进行的妊娠孕龄为4至5周时首次提供临床相关的胎儿基因组数据。众所周知,孕龄定义为从未次月经开始之日起测量的时间。本发明的方法不受诸如体重指数或孕龄这些因素的影响,这些因素使无细胞DNA评估方法复杂化。

[0045] 虽然本文描述的组合物和方法特别提及人类女性和人类胎儿,但它们不限于人类,并且可以类似地分离和分析其他物种的胎儿基因组DNA。

[0046] 根据本发明各方面的方法包括从怀孕受试者获得含有胎儿绒毛外滋养层细胞的

母体宫颈内样本;从母体宫颈内样本中分离胎儿绒毛外滋养层细胞;裂解分离的胎儿绒毛外滋养层细胞;从裂解的胎儿绒毛外滋养层细胞中分离胎儿绒毛外滋养层细胞核;以及从分离的胎儿绒毛外滋养层细胞核中纯化基因组DNA,从而从绒毛外滋养层细胞中分离胎儿基因组DNA。

[0047] 从孕妇收集母体宫颈内样本,孕妇从妊娠孕龄约4周至约30周,例如在妊娠的前三个月、第二个三个月和/或第三个三个月。

[0048] 根据本发明的各方面,在受孕后约两周(胎龄4周)直至妊娠约20周(妊娠中期)或之后,从怀孕受试者收集样本。

[0049] 根据本发明的各方面,从母体宫颈内样本中分离胎儿绒毛外滋养层细胞通过使胎儿绒毛外滋养层细胞与胎儿绒毛外滋养层细胞特异性抗体接触(其中所述抗体不与母体宫颈内样本中的母体细胞结合),并捕获附着于所述抗体上的胎儿绒毛外滋养层细胞来完成。

[0050] 根据本发明方法的特定方面,所述抗体对主要组织相容性复合物,I类,G(HLA-G)具有特异性。

[0051] 任选地,对胎儿绒毛外滋养层细胞特异性的抗体附着于任何不溶于水溶液的固体或半固体支持体。通过各种方法中任一种实现抗体对支持体的附着,示例性地包括对支持体的吸附和与支持体的化学键合。

[0052] 胎儿绒毛外滋养层细胞特异性抗体可以直接或间接附着于支持体。术语“直接附着”用于表示支持体与胎儿绒毛外滋养层细胞特异性抗体共价或非共价结合,并且支持体不通过第二抗体与抗体结合。术语“间接附着”用于表示胎儿绒毛外滋养层细胞特异性抗体通过中间体(例如第二抗体或接头)与支持体共价或非共价结合。

[0053] 根据本发明的各方面,胎儿绒毛外滋养层细胞特异性抗体通过抗体与蛋白A或蛋白G分子的结合间接地与支持体结合,其中蛋白A或蛋白G分子与支持体结合。

[0054] 不溶性固体或半固体支持体可以是各种材料中任一种,例如玻璃;塑料,如聚丙烯、聚苯乙烯、尼龙;纸;硅;硝酸纤维素;或者可以附着所需材料而不会显著抑制材料的功能的任何其他材料。支持体可以是各种形式或形状中的任一种,包括平面的,例如硅芯片和玻璃板;和三维的,例如颗粒、微量滴定板、微量滴定孔、针、纤维等。

[0055] 在具体方面,不溶性固体或半固体支持体是颗粒。

[0056] 颗粒可以是任何形状(例如圆柱形、球形等)、尺寸、组成或物理化学特性。可以选择颗粒尺寸或组成,使得颗粒可以与流体分离,例如在具有特定孔径的过滤器上或通过一些其他物理性质进行分离。

[0057] 所用颗粒的直径可小于1毫米,例如,直径为约0.1至约1,000微米,包含其中的各种范围(inclusive),例如直径为约3-25微米,包含其中的各种范围,或直径为约5-10微米,包含其中的各种范围,直径为1纳米(nm)至约100,000nm,包含其中的各种范围,例如,尺寸范围为约10-1,000nm,包含其中的各种范围,或例如,尺寸范围为200-500nm,包含其中的各种范围。在某些实施方案中,使用的颗粒是珠子,特别是微珠和纳米珠子。

[0058] 不溶性固体或半固体支持体可包括用于结合至待与支持体结合的材料官能团。例如,支持体可包括羧基、胺、氨基、羧酸盐、卤化物、酯、醇、脲、醛、氯甲基、硫氧化物、氮氧化物、环氧基和/或甲苯磺酰基官能团。官能团、其修饰和诸如抗体或酶的材料与支持体的结合是本领域已知的。在一个具体实例中,1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸

盐、EDC或EDAC化学可用于将所需材料附着于不溶性固体或半固体支持体上。

[0059] 根据本发明方法的特定方面,对胎儿绒毛外滋养层细胞具有特异性的抗体直接附着于多个磁性颗粒,并且从母体宫颈内样本中除去胎儿绒毛外滋养层细胞包括将磁性颗粒暴露于磁铁。

[0060] 直接偶联到与胎儿抗原特异性结合的抗体的磁性纳米颗粒尺寸通常为10nm-1 μ m,但是可以使用更小或更大的磁性纳米颗粒。

[0061] 根据本发明方法的特定方面,HLA-G抗体附着于磁性纳米颗粒。

[0062] 任选地,通过用固定剂处理来固定母体宫颈内样本的细胞,其中用固定剂处理在从母体宫颈内样本中分离胎儿绒毛外滋养层细胞之前或之后进行。

[0063] 使用的固定剂可以是戊二醛;甲醛;多聚甲醛;或其任何两种或更多种的组合。根据本发明方法的特定方面,醛固定剂是多聚甲醛。根据本发明的其他方面,固定剂是非醛固定剂。

[0064] 非醛固定剂示例性地包括丙酮、乙酸和醇,例如乙醇和甲醇。任选使用两种或更多种非醛固定剂的组合。根据本发明的各方面,甲醇和乙酸的混合物用作非醛固定剂。

[0065] 任选地,首先将母体宫颈内样本固定在非醛固定剂中。然后任选地用醛固定剂固定分离的胎儿绒毛外滋养层细胞。通过用生理液体或缓冲液(例如盐水或与哺乳动物细胞相容的缓冲液)洗涤母体宫颈内样本,任选地除去或部分除去非醛固定剂和/或醛固定剂。

[0066] 在另一种选择中,用蛋白酶和/或糖胺聚糖降解酶(GAGase)处理胎儿绒毛外滋养层细胞,其中用蛋白酶和/或GAGase处理胎儿绒毛外滋养层细胞在从母体宫颈内样本中除去胎儿绒毛外滋养层细胞之前或之后进行,并在用核酸酶处理胎儿绒毛外滋养层细胞之前或之后进行。

[0067] 糖胺聚糖降解酶包括例如透明质酸酶、肝素酶和软骨素酶。

[0068] 根据本发明方法的特定方面,母体宫颈内样本不用粘液溶解剂处理。根据本发明方法的特定方面,在分离胎儿绒毛外滋养层细胞之前,母体宫颈内膜样本不用选自N-乙酰基-L-半胱氨酸、DTT、胰蛋白酶和胰蛋白酶/EDTA的粘液溶解剂处理。根据本发明方法的特定方面,在分离胎儿绒毛外滋养层细胞之前,母体宫颈内样本不用胶原酶、蛋白酶、释放酶混合酶(liberase blendzyme)和粘液溶解剂中的一种或多种进行处理。

[0069] 任选地,在分离胎儿绒毛外滋养层细胞之前,将母体宫颈内样本酸化。任选地将酸化剂加入到样本中,使样本的pH值达到约pH5-6。酸化剂可以是例如任何酸或酸性缓冲剂。

[0070] 进一步处理分离的胎儿绒毛外滋养层细胞以从胎儿绒毛外滋养层细胞中分离细胞核。

[0071] 裂解分离的胎儿绒毛外滋养层细胞以打破细胞并通过各种方法中的任一种来释放完整的细胞核,所述方法包括但不限于打开细胞并释放完整的细胞核的物理、化学、微流体或混合模式方法。

[0072] 物理的细胞裂解方法包括但不限于均质化、超声处理、涡旋和经珠搅打(beadbeating)。用于裂解细胞并释放完整细胞核的均质化方法通过Dounce均质化来举例说明。

[0073] 用于裂解细胞并释放完整细胞核的细胞的细胞裂解方法包括但不限于用低渗缓冲液和/或非离子型去污剂处理。用于裂解细胞并释放完整细胞核的非离子型去污剂包括

但不限于壬基苯氧基聚乙氧基乙醇 (NP-40) (通常在0.1-1%的范围内)、辛基苯氧基聚乙氧基乙醇和衍生物如支化的辛基苯氧基聚(乙烯氧基)乙醇 (IGEPAL CA-630) (通常在0.1-1%的范围内) 和叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇 (Triton X-100) (通常在0.1-5%的范围内)。任选地,非离子型去污剂存在于低渗缓冲液中。用于裂解分离的胎儿绒毛外滋养层细胞并释放完整细胞核的实例细胞裂解缓冲液是10mM Hepes pH 7.5、2mM MgCl₂、25mM KCl、0.5%NP-40或1%Triton X-100。

[0074] 化学细胞裂解方法包括蛋白酶处理,例如用包括但不限于蛋白酶K、链霉菌蛋白酶、胰蛋白酶和/或胃蛋白酶的蛋白酶的处理。蛋白酶的活性取决于蛋白酶的浓度、pH、温育时间和温度,所有这些都可以通过技术人员调整以达到所需的蛋白水解程度。为了控制蛋白水解以裂解细胞并释放完整的细胞核,优选使用具有有限蛋白质切割位点的酶如胃蛋白酶 (Phe1Val、Gln4His、Glu13Ala、Ala14Leu、Leu15Tyr、Tyr16Leu、Gly23Phe、Phe24) 或胰蛋白酶来逐渐消化细胞膜而不影响细胞核,使细胞核DNA保持完整。

[0075] 任选地,将细胞在具有非离子型去污剂的低渗缓冲液中进行均质化以裂解细胞并释放完整的细胞核。

[0076] 微流体方法可用于裂解细胞并释放完整的细胞核,例如如美国专利号8304185; Nan等人,Lab Chip,14:1060-1073,2014; 和Cui等人,Ann.Rev.Biomed.Engin.,17:267-286,2015中所述。

[0077] 进一步处理含有完整细胞核的细胞裂解物以分离完整的细胞核。例如,将完整细胞核与细胞裂解物中存在的其他组分通过剥离、洗涤、差速离心、过滤或微流体分离来完成胎儿绒毛外滋养层细胞核的分离。

[0078] 胎儿绒毛外滋养层细胞核的分离任选地包括离心以沉淀细胞核并除去含有胎儿绒毛外滋养层细胞细胞质的上清液。细胞核可以洗涤并重复离心一次或多次。

[0079] 微流体技术可用于将胎儿绒毛外滋养层细胞核与细胞裂解物中存在的其他组分分离,例如如美国专利号8304185; Nan等人,Lab Chip,14:1060-1073,2014; 和Cui等人,Ann.Rev.Biomed.Engin.,17:267-286,2015中所述。

[0080] 在另一个实例中,将胎儿绒毛外滋养层细胞固定在不溶性固体或半固体支持体上,裂解细胞并洗去细胞质,将细胞核留在支持体上。可以使用任何支持体,例如本文中提到的那些。

[0081] 载玻片是可以使用的支持体的具体实例。通过离心与含有细胞的样本接触的载玻片,细胞容易附着在载玻片上。

[0082] 或者,可将一滴含有细胞的液体置于载玻片上。细胞附着在载玻片上而无需进一步处理。

[0083] 任选用粘附促进剂处理固体或半固体支持体以促进细胞粘附。粘附促进剂的例子有聚阳离子材料,如聚-L-赖氨酸和聚-L-肌苷; 和/或细胞外基质材料,例如胶原蛋白、纤连蛋白和层粘连蛋白。

[0084] 在另一个实例中,将抗体与细胞核结合以分离细胞核,所述抗体对不裂解细胞核即可接近抗体的完整细胞核的核蛋白具有特异性。抗体可以与支持体结合,例如本文中所述的那些支持体,使得与抗体结合的细胞核间接结合到支持体上,然后可以洗掉其他材料。抗体可以附着于磁性支持体,例如磁性颗粒,允许与附着于磁性支持体的抗体结合的细胞

核通过暴露于磁体而与其他组分分离。对不裂解细胞核即可接近抗体的完整细胞核的核蛋白具有特异性的抗体包括但不限于对位于外核膜表面的nesprin蛋白具有特异性的抗体。

[0085] 在又一个实例中,通过尺寸排阻方法(例如过滤)从胎儿绒毛外滋养层细胞裂解物中分离细胞核,所述方法允许基于尺寸的差异保留细胞核并除去其他的裂解物组分。

[0086] 分离的胎儿绒毛外滋养层细胞核通过各种方法中的任一种进行裂解,所述方法包括但不限于破坏细胞核并释放基因组DNA的物理、化学、微流体或混合模式方法。

[0087] 用于裂解细胞核的物理方法包括但不限于均质化、超声处理、涡旋和经珠搅打。用于裂解细胞核并释放基因组DNA的均质化方法通过Dounce均质化来举例说明。

[0088] 用于裂解细胞核并释放基因组DNA的细胞的细胞裂解方法包括但不限于用一种或多种去污剂和/或离液剂处理细胞。

[0089] 分离的细胞核的裂解任选地包括用低渗、高渗缓冲液和/或离子去污剂(例如SDS,通常在0.1-1%的范围内)处理。任选地,离子去污剂存在于低渗缓冲液中。用于裂解分离的细胞核的裂解缓冲液的实例是400mM NaCl、10mM Tris、2mM EDTA、pH 8.2、0.66% SDS和50 μ g/ml蛋白酶K。分离的细胞核可以在具有离子去污剂的低渗缓冲液中进行均质化以裂解细胞核。

[0090] 化学的细胞核裂解方法包括蛋白酶处理,例如用包括但不限于蛋白酶K、链霉菌蛋白酶、胰蛋白酶和/或胃蛋白酶的蛋白酶的处理。蛋白酶的活性取决于蛋白酶的浓度、pH、温育时间和温度,所有这些都可以通过技术人员调整以达到所需的蛋白水解程度。

[0091] 在另一个实例中,将细胞核固定在不溶性固体或半固体支持体上,细胞核裂解并洗去细胞核内容物,将基因组DNA留在支持体上。可以使用任何支持体,例如本文中提到的那些。载玻片是可以使用的支持体的具体实例。

[0092] 胎儿基因组DNA通过DNA分离方法从细胞核的裂解物中分离,所述DNA分离方法例如通过沉淀、离心和洗涤;电泳分离,如凝胶电泳;尺寸排阻色谱;梯度离心,如分步梯度离心或连续梯度离心。

[0093] 任选地处理母体宫颈内样本、分离的胎儿绒毛外滋养层细胞和/或分离的胎儿绒毛外滋养层细胞核,以除去样本中存在但不包含在母体细胞中的至少一部分母体DNA。去除母体DNA的处理包括但不限于用DNA酶处理以消化母体DNA。然后可以洗去消化的母体DNA,从而除去至少一部分母体DNA。任选地,使母体DNA与DNA吸收材料接触以吸收母体DNA。然后除去具有吸收的母体DNA的吸收材料,从而除去至少一部分母体DNA。DNA吸收材料的例子是任选地附着于支持体的抗DNA抗体。

[0094] 任选地用DNA酶和/或蛋白酶处理包括母体细胞和胎儿绒毛外滋养层细胞的母体宫颈内样本,产生DNA酶处理的样本和/或蛋白酶处理的样本。如果在DNA酶和/或蛋白酶处理之前将细胞固定,则至少将DNA酶和任选的蛋白酶附着到不能进入固定的细胞的支持体上。在用DNA酶和/或蛋白酶处理母体宫颈内样本后,从DNA酶处理的样本和/或蛋白酶处理的样本中除去活性DNA酶和/或蛋白酶,例如通过过滤、洗涤和/或DNA酶和/或蛋白酶的热灭活。

[0095] 在裂解之前,任选地用DNA酶和/或蛋白酶处理分离的胎儿绒毛外滋养层细胞。如果在DNA酶和/或蛋白酶处理之前将细胞固定,则至少将DNA酶和任选的蛋白酶附着到不能进入固定的细胞的支持体上。在用DNA酶和/或蛋白酶处理胎儿绒毛外滋养层细胞后,从DNA

酶处理的细胞和/或蛋白酶处理的细胞中除去活性DNA酶和/或蛋白酶,例如通过过滤、洗涤和/或DNA酶和/或蛋白酶的热灭活。

[0096] 裂解胎儿绒毛外滋养层细胞后,任选地用DNA酶和/或蛋白酶处理从细胞释放的完整胎儿绒毛外滋养层细胞核。如果在DNA酶和/或蛋白酶处理之前将细胞核固定,则至少将DNA酶和任选的蛋白酶附着到不能进入固定的细胞核的支持体上。在用DNA酶和/或蛋白酶处理胎儿绒毛外滋养层细胞核后,从DNA酶处理的细胞核和/或蛋白酶处理的细胞核中除去活性DNA酶和/或蛋白酶,例如通过过滤、洗涤和/或DNA酶和/或蛋白酶的热灭活。

[0097] 在用DNA酶处理细胞和/或细胞核后,在去除与细胞和/或细胞核接触的DNA酶的过程中,任选地将一种或多种DNA酶抑制剂包括在洗涤缓冲液中以保护细胞核和DNA。包括的DNA酶抑制剂的例子有2-巯基乙醇、2-硝基-5-硫氰基苯甲酸、肌动蛋白、 α B2a、G2、G2a和M1(非竞争性); Ca^{2+} 、EGTA、EDTA、十二烷基硫酸钠(SDS)、小牛脾抑制蛋白、碳二亚胺、胆固醇硫酸盐、碘乙酸盐及其任意两种或更多种的组合。

[0098] 在根据本发明各方面的方法中使用的DNA酶任选地附着(例如通过共价连接)到一种或多种支持体,例如本文所述的支持体,使得DNA酶不能穿透固定的细胞或固定的细胞核。根据本发明的特定方面,DNA酶附着于颗粒(例如珠子),其大小可以防止进入固定的细胞中。这种颗粒通常具有大于10nm的粒径。

[0099] 根据特定方面,完整的胎儿绒毛外滋养层细胞在从母体宫颈内样本分离之前或之后,未用DNA酶处理。

[0100] 根据特定方面,分离的胎儿绒毛外滋养层细胞核在从胎儿绒毛外滋养层细胞分离之前或之后,未用DNA酶处理。

[0101] 分析胎儿绒毛外滋养层细胞基因组DNA以确定胎儿绒毛外滋养层细胞DNA的一种或多种特征,并任选地与标准物进行比较。分析胎儿绒毛外滋养层细胞基因组DNA包括任何适用的基因组DNA分析。

[0102] 基因组DNA分析包括但不限于测序、高分辨率熔解分析、甲基化分析、毛细管电泳法、质谱法、单链构象多态性、单碱基延伸和限制性片段长度多态性。基因组DNA分析包括检测单核苷酸多态性的测定和具有单碱基解析的DNA碱基修饰的测定,例如检测基因组DNA序列中一个或多个单碱基处的甲基化。

[0103] 测序方法包括,例如大规模平行测序、单分子实时测序、聚合酶克隆测序、离子半导体(Ion Torrent测序)、焦磷酸测序(454)、通过合成测序(Illumina)、通过连接测序(SOLiD测序)和链终止测序(Sanger测序)。

[0104] 基因组DNA分析包括但不限于斑点印迹;Southern印迹;和DNA酶保护。这些分析的细节描述于,例如J.Sambrook和D.W.Russell,Molecular Cloning:A Laboratory Manual.Cold Spring Harbor Laboratory Press;第三版,2001;和F.M.Ausubel编著,Short Protocols in Molecular Biology,Current Protocols;第五版,2002。

[0105] 在进行基因组DNA分析之前,任选通过扩增方法扩增胎儿基因组DNA。扩增方法包括由核酸聚合酶介导的模板指导的引物延伸和位于待扩增的靶核酸侧翼的一对引物,包括但不限于聚合酶链式反应(PCR)、连接介导的PCR(LM-PCR)、 ϕ -29PCR、实时定量PCR(qPCR)、全基因组扩增和其他核酸扩增方法,例如,如C.W.Dieffenbach等人,PCR Primer:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2003;MDemidov等人,DNA

Amplification:Current Technologies and Applications,Taylor&Francis,2004;和 Kroneis,T.(编著),Whole Genome Amplification:Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology),2015,Humana Press ISBN-10:1493929895中所述。

[0106] 根据本发明各方面的方法包括确定纯化的胎儿基因组DNA的基因组DNA序列中的至少一个单个核苷酸的特征,从而分析正在进行的妊娠的胎儿的DNA。

[0107] 标准物

[0108] 根据本发明的各方面,分析从胎儿细胞分离的基因组DNA,以鉴定胎儿细胞中与标准物相比的基因组DNA变体。

[0109] 适用于基因组DNA分析的标准物是本领域公知的,所用的标准物可以是任何合适的标准物。

[0110] 标准物可以是参考基因组,其在单个对照受试者的样本中或在对照受试者群体的样本中同时分析或预先测定,并存储在出版物或电子介质中用于调出并与分析结果进行比较。

[0111] 在以下实施例中说明了本发明组合物和方法的实施方案。提供这些实施例是为了说明的目的,并不认为是对本发明组合物和方法范围的限制。

[0112] 实施例

[0113] 实施例1

[0114] 样本收集和滋养层细胞分离

[0115] 在妊娠的第5、7、14、15和15周,从五个宫颈样本中获得母体和胎儿细胞。来自相同患者的母体血液和胎儿血斑DNA用作可获得的参考材料。分离来自五个胎儿/母体对的基因组DNA并进行外显子组测序。

[0116] 用ThinPrep获得宫颈内细胞,并在PAP涂片步骤期间立即固定,保留蛋白质和核酸。处理收集的样本以分离粘液和细胞。然后将细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤、离心并重悬于1.5mL PBS中,与抗HLA-G抗体包被的磁性纳米颗粒组合,并在4°C下混合孵育过夜。在磁力固定并在PBS中洗涤三次后收集HLA-G阴性未结合细胞。收集HLA-G阳性结合细胞并染色EVT标记物。分离的HLA-G阳性绒毛外滋养层(EVT)细胞在本文中可互换地称为分离的胎儿细胞、分离的胎儿绒毛外滋养层细胞或分离的EVT,以及HLA-G阴性宫颈细胞在本文中可互换地称为母体细胞。

[0117] 荧光免疫杂交

[0118] 将分离的胎儿绒毛外滋养层细胞(HLA-G阳性)旋涂到载玻片上,并通过FISH技术染色X和Y染色体。选择Y染色体阳性的样本用于以下实验。使用的样本列于表I中。

表 I: 基于 FISH 鉴定为雄性的样本 ID 及其孕龄

样本 ID	孕龄	胎儿性别
0624-4 A (S1)	14 周	雄性
1007-3A (S2)	15 周 3 天	雄性
1028-3B (S3)	15 周 5 天	雄性
0325-4A (S4)	7 周	雄性
0318-4A (S5)	5 周 2 天	雄性

[0119]

[0120] 分离的EVT和母体细胞的DNA提取和验证

[0121] 对于每个样本,从用于FISH的载玻片提取胎儿细胞DNA,从HLA-G阴性细胞级分提取母体细胞DNA。

[0122] 如下处理先前未用于FISH分析的载玻片上的分离的胎儿绒毛外滋养层细胞,以除去可能被母体DNA污染的细胞膜和细胞质,仅留下分离的胎儿绒毛外滋养层细胞核。

[0123] 将载玻片上分离的胎儿绒毛外滋养层细胞在新鲜制备的蛋白酶溶液(在100mL 0.01N HCl中的0.011mg胃蛋白酶)中于37°C下孵育11min以裂解细胞,同时胎儿细胞核保持完整。在裂解后通过在1X磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH 7.5)中洗涤除去细胞片段,将完整的胎儿细胞核留在载玻片上。

[0124] 然后通过与PCR相容的裂解缓冲液、5mM Tris/HCL、pH 8.8(包括蛋白酶K)在42°C下孵育过夜,然后在65°C下持续30min并在80°C下持续15min使酶失活来裂解分离的胎儿细胞核(细胞与缓冲液的比率保持在1 μ L缓冲液:2个细胞)。然后使用拷贝号探针(Applied Biosystems)进行标准TaqMan实时PCR(qPCR)分析,以验证DNA提取步骤和SRV探针(Applied Biosystems),来确认分离的EVT(胎儿样本)的雄性性别。

[0125] 使用基于标准二氧化硅柱的DNA纯化方案提取来自HLA-G阴性母体细胞(10,000个细胞)的DNA,所述方案市售为DNeasy血液&组织试剂盒(Qiagen)。使用荧光DNA嵌入染料分析法Pico Green测定(Invitrogen)对提取的DNA定量。

[0126] 自母体和胎儿血样的DNA提取和纯化

[0127] 将从患者收集的2ml血液分层到5ml聚蔗糖-泛影葡胺(Ficol hypaque)溶液上,并在200g下离心10min。然后将白细胞层(血沉棕黄层)吸入新管中。获得作为血球/血斑的胎儿血液。按照制造商的方案,分别使用EZ1 DNA Blood 350 μ l试剂盒(Qiagen)和EZ1 DNA Investigator试剂盒(Qiagen)从血沉棕黄层和血斑中提取DNA。然后按照制造商的方案使用MiniElute PCR纯化试剂盒(Qiagen)进行DNA纯化。

[0128] 全基因组扩增(WGA)

[0129] 从分离的EVT和母体细胞中提取DNA后,将一部分分离的DNA进行基于PCR的WGA,Ampli 1TM全基因组扩增试剂盒(Silicon Biosystems),其按照制造商的方案提供细胞的全

基因组的平衡和完整的扩增。图1示出了来自五个独立样本,加上阳性(+)和阴性(-)对照的胎儿和母体细胞的扩增DNA。扩增的DNA被描绘为长度为700至900个碱基对的涂片,如DNA标准大小标记物(L)所示。为了图1中琼脂糖凝胶上的全基因组扩增的可视化,将6 μ L全基因组扩增的样本与2 μ L上样缓冲液混合,上样到1%琼脂糖凝胶上并进行电泳。L:梯度;F:胎儿样本,M:母体样本。对照,-:扩增步骤的水对照,+ :人类雄性基因组DNA。图1示出了代表性图像。

[0130] 然后使用基于标准市售的固相反向固定化珠子(Agencourt Ampure XP顺磁珠子)的纯化系统进行3X珠子纯化。DNA由于其电荷结合至珠子上的官能团。蛋白质对珠子的亲和力较小,并使用制造商的方案冲洗掉。

[0131] 为了评估WGA步骤的质量,使用扩增所选区域的基于PCR的分析,Amplifi 1™ QC试剂盒(Silicon Biosystems)。通过比较获得的扩增子长度(碱基对,bp)与预期的扩增子长度,使用凝胶电泳评估质量控制(QC)分析的结果,参见表II。

表 II: PCR 预期的产物长度		
靶标	染色体	扩增子长度 (bp)
A	12q	91
B	5q	108-166
C	17q	299
D	6q	614

[0134] 此外,通过在1%琼脂糖凝胶上运行6 μ L等份的扩增样本来目测验证WGA。图2示出了来自五个独立样本,加上阳性(+)和阴性(-)对照的胎儿和母体细胞的各种染色体的PCR扩增片段。片段的长度在100-800个碱基对之间,如DNA标准大小标记物(L)所示。为了在琼脂糖凝胶上对全基因组扩增的QC分析进行可视化,合并复制物,将24 μ L样本与6 μ L上样缓冲液混合,上样到1%琼脂糖凝胶上并进行电泳。L:梯度;F:胎儿样本,M:母体样本。对照,-:扩增程序的水对照,+ :扩增的对照人类雄性基因组DNA。图2示出了代表性图像。

[0135] 文库制备

[0136] 按照制造商的方案,使用Nextera快速捕获外显子试剂盒(Illumina),使用50ng DNA起始原料,制备DNA文库。用于文库制备的样本和它们各自的级分(fraction)列于表III中。

表 III: 用于文库制备的样本 ID 及其代表性级分。			
样本 ID		全基因组扩增的级分	未扩增的级分
0624-4A (S1)	胎儿	从 FISH 载玻片分离的 DNA	血斑
	母体	HLA-G 阴性宫颈细胞	HLA-G 阴性宫颈细胞 (10,000 个细胞)
1007-3A (S2)	胎儿	从 FISH 载玻片分离的 DNA	血斑
	母体	HLA-G 阴性宫颈细胞	血沉棕黄层
1028-3B (S3)	胎儿	从 FISH 载玻片分离的 DNA	血斑
	母体	HLA-G 阴性宫颈细胞	血沉棕黄层
0325-4A (S4)	胎儿	从 FISH 载玻片分离的 DNA	血斑
	母体	HLA-G 阴性宫颈细胞	血沉棕黄层
0318-4A (S5)	胎儿	从 FISH 载玻片分离的 DNA	血斑
	母体	HLA-G 阴性宫颈细胞	HLA-G 阴性宫颈细胞 (10,000 个细胞)

[0137]

[0138] 将从分离的 EVT 和母体细胞分离的 DNA 一式三份分别扩增, 并将 50ng 合并的复制物用于文库制备。使用荧光 DNA 嵌入染料测定法 (Pico Green 测定 (Invitrogen)) 定量全基因组扩增的 DNA 样本和来自血沉棕黄层和血斑的未扩增的 DNA。将独特的条形码接头连接到样本上, 然后进行 PCR 扩增和文库纯化。通过使用荧光 DNA 嵌入染料测定法 (Pico Green 测定 (Invitrogen)) 定量最终文库池, 并使用生物分析仪上的高灵敏度 DNA 芯片 (Agilent Technologies) 评估其质量。图 3 示出了在五个独立样本中从胎儿 (F) 和母体 (M) 细胞成功制备文库的数字电泳分析。DNA 标准大小标记物 (L) 的大小在 y 轴上标明以供参考。

[0139] 使用商购可得的 KAPA 文库定量试剂盒 (KAPA Biosystems-Illumina) 通过 RT-PCR 定量单个文库样本。试剂盒中提供的 DNA 标准物代表 10 倍稀释系列 (20pM 至 0.0002pM)。在确定单个浓度时, 将所得 cDNA 以 2nM 的浓度合并到各个文库中, 然后进行测序 (多重) 以消除任何测序泳道效应。

[0140] 实施例 2

[0141] 用于未染色载玻片的方法

[0142] 将分离的胎儿绒毛外滋养层细胞 (HLA-G 阳性) 旋涂到载玻片上。在明视野显微镜下观察载玻片以勾画出具有细胞的区域。将载玻片浸入新鲜制备的蛋白酶溶液 (在 100mL 0.01N HCl 中的 0.011mg 胃蛋白酶) 中, 在 37°C 下持续 11min 以裂解细胞并释放完整的胎儿绒毛外滋养层细胞核。然后将载玻片在室温下用 1X 磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH7.5) 洗涤 5min。然后通过使载玻片通过乙醇 90%、80% 和 70% 的乙醇梯度各 1min 对其进行脱水。然后使载玻片干燥并再次在显微镜下观察以确保没有细胞损失。

[0143] 为了裂解载玻片上分离的胎儿绒毛外滋养层细胞核, 将 5-10 μ l 加热至 65°C 的 5mM Tris/HCL pH8.8/蛋白酶 K 细胞核裂解缓冲液 (在 Arcturus PicoPure DNA 提取试剂盒中商购获得, Thermo Fischer) 与载玻片上的细胞核接触, 将载玻片置于设定在 65°C 的热循环仪

上1-2分钟。使用的缓冲液量是变化的,并且基于载玻片上的细胞数量。加入另外的5 μ l细胞核裂解缓冲液,从载玻片中除去总量并置于0.2ml管中。调节管中的细胞核裂解缓冲液的最最终量以保持2个细胞/1 μ L缓冲液的比例。然后再次观察载玻片以确保已提取所有细胞。然后将管在65 $^{\circ}$ C下孵育过夜,接着在95 $^{\circ}$ C下灭活30min。通过使用拷贝号探针(Applied Biosystems)和SRY探针(Applied Biosystems)的TaqMan实时PCR(qPCR)分析确认DNA分离的成功以确认性别。

[0144] 用于分离的EVT和母体细胞的DNA提取和验证

[0145] 针对全基因组扩增:

[0146] 对于每个样本,在细胞裂解后从载玻片上分离的细胞核中提取胎儿绒毛外滋养层细胞DNA。使用5-10 μ l的5mM Tris/HCL pH8.8/蛋白酶K细胞裂解缓冲液在42 $^{\circ}$ C下过夜,然后在65 $^{\circ}$ C下灭活30min并在80 $^{\circ}$ C下灭活15min,从HLA-G阴性细胞级分中分离母体细胞DNA。将细胞与缓冲液的比例维持在1 μ L缓冲液:2个细胞。每个样本裂解的细胞数量示于表IV中。

[0147] 然后使用拷贝号探针(Applied Biosystems)进行TaqMan实时PCR(qPCR)分析以验证DNA提取程序,并且使用SRY探针(Applied Biosystems)进行TaqMan实时PCR(qPCR)分析以确认分离的EVT(胎儿样本)的雄性性别。

[0148] 针对靶向测序:

[0149] 计数来自样本的载玻片上的细胞数,并标记具有细胞的区域。通过将FISH处理的细胞上的盖玻片浸入1X SSC缓冲液(75 $^{\circ}$ C)中3min直至盖玻片抬起来分离所述盖玻片。然后在显微镜下观察载玻片和盖玻片,以确定是否存在任何细胞损失。

[0150] 还在明视野显微镜下观察未染色的载玻片以标记具有细胞的区域。然后将载玻片浸入新鲜制备的蛋白酶溶液(在0.01N HCl中的0.011mg胃蛋白酶)中,在37 $^{\circ}$ C下保持11min。然后将载玻片在室温下用1X PBS(磷酸盐缓冲盐水,pH7.5)洗涤5min。然后通过使载玻片通过乙醇90%、80%和70%的乙醇梯度各1min对其进行脱水并使其干燥。再次在显微镜下观察载玻片以再次确保没有细胞损失。

[0151] 通过加入5 μ l加热至65 $^{\circ}$ C的裂解缓冲液(Arcturus PicoPure DNA提取试剂盒,ThermoFischer)裂解细胞,并将载玻片置于设定在65 $^{\circ}$ C的热循环仪上保持1-2min。加入另外的5 μ l裂解缓冲液,从载玻片除去总量并置于0.2ml管中。调节管中裂解缓冲液的最最终量以保持2个细胞/1 μ L缓冲液的比例。观察载玻片以确保从载玻片上提取所有细胞。然后将管在65 $^{\circ}$ C下孵育过夜,接着在95 $^{\circ}$ C下灭活30min。通过使用拷贝号探针(Applied Biosystems)和SRY探针(Applied Biosystems)的TaqMan实时PCR(qPCR)分析确认DNA分离的成功以确认性别。

表 IV:样本和相应的裂解的细胞数的列表	
样本编号	细胞编号
0318-4A-(S5-F)	27
0318-4A-(S5-M)	20
1007-3A-(S2-F)	25
1007-3A -(S2-M)	20
1028-3B-(S3-F)	25
1028-3B -(S3-M)	20
0325-4A-(S4-F)	13
0325-4A-(S4-M)	20
0624-4A-(S1-F)	27
0624-4A-(S1-M)	20

[0152]

[0153] 实施例3

[0154] 从胎儿绒毛外滋养层细胞中分离基因组DNA

[0155] 使用细胞刷收集母体宫颈内样本,并将细胞刷在冰冷的培养基或PBS (137mM NaCl, 10mM磷酸盐缓冲液) 中漂洗。

[0156] 将细胞离心并重悬于10ml PBS加2.7mM CaCl₂、1mM MgCl₂中,然后温热至室温。

[0157] 用于去除胎儿细胞的磁分离步骤通过在重悬于1ml PBS中之后向洗涤的细胞中添加20μl与抗HLA-G抗体缀合的250nm磁性纳米颗粒开始并在4℃下振荡孵育1至24小时。

[0158] 使用DynaMag™ Spin磁体 (Life Technologies) 将母体细胞 (HLA-G阴性) 与磁化的 (HLA-G阳性) 胎儿绒毛外滋养层细胞分离。

[0159] 然后使用磁铁将胎儿绒毛外滋养层细胞洗涤3次以除去残留的母体细胞。

[0160] 将分离的胎儿绒毛外滋养层细胞重悬于50-100微升PBS/10mM EDTA的溶液中。取出15微升的等分试样用于细胞计数和胎儿细胞的质量控制。任选地,如果需要的话,将分离的母体细胞重悬于50-100微升PBS/10mM EDTA的溶液中,取出15微升的等分试样用于细胞计数和质量控制。

[0161] 分离的胎儿绒毛外滋养层细胞通过加入50mM Tris-HCl, pH 8.5, 150mM NaCl, 1% NP-40裂解,然后以约1000×g的低速离心,以沉淀完整的胎儿绒毛外滋养层细胞核。除去上清液,用PBS/10mM EDTA洗涤细胞核两次或三次。

[0162] 通过向50微升分离的胎儿绒毛外滋养层细胞核中添加25微升3X浓缩DNA提取缓冲液(90mM TRIS,90mM EDTA,1.5%EDTA,pH 8.0,3mg/ml蛋白酶K),从胎儿绒毛外滋养层细胞核中提取基因组DNA。然后将细胞核在65℃下孵育3小时,然后在95℃下孵育10min。

[0163] 将提取的基因组DNA冷冻用于随后的分析,或者可以通过在微量离心机中高速离心5分钟进一步纯化。任选地,仍将DNA进一步纯化,例如使用市售的DNA纯化和浓缩试剂盒,例如Zymresearch DNA 10浓缩试剂盒。

[0164] 实施例4

[0165] 从胎儿绒毛外滋养层细胞中分离基因组DNA

[0166] 使用细胞刷通过将其插入子宫颈内管约2cm并在取出时旋转2或3次来收集母体宫颈内样本。存在于管中的粘液也被收集在刷子中。细胞刷在固定剂中冲洗,例如,使用ThinPrep试剂盒。将样本冷藏或在环境温度下储存并运送到实验室进行进一步处理。它可以在4℃下储存至少一周而不会损失RNA或HLA-G蛋白。

[0167] 为了分离胎儿绒毛外滋养层细胞基因组DNA,通过向含有细胞的20ml体积的ThinPrep中加入0.6ml乙酸,达到3%乙酸的最终浓度,在母体宫颈内样本酸化后用PBS洗涤所有细胞两次。

[0168] 将细胞通过250微米过滤器离心,并在4℃下重悬于10ml PBS中。然后将细胞在10ml PBS中再洗涤2次,最后的沉淀在PBS中达到1ml的体积。

[0169] 用于除去胎儿细胞的磁分离步骤通过在重悬于1ml PBS中之后向洗涤的细胞中添加20μl与抗HLA-G抗体缀合的250nm磁性纳米颗粒开始,并在4℃下振荡孵育1至24小时。

[0170] 使用DynaMag™ Spin磁体(Life Technologies)将母体细胞(HLA-G阴性)与磁化的(HLA-G阳性)胎儿绒毛外滋养层细胞分离。

[0171] 然后使用磁铁将胎儿绒毛外滋养层细胞洗涤3次以除去残留的母体细胞。

[0172] 将分离的胎儿绒毛外滋养层细胞重悬于50-100微升PBS/10mM EDTA的溶液中。取出15微升的等分试样用于细胞计数和胎儿细胞的质量控制。任选地,如果需要的话,将分离的母体细胞重悬于50-100微升PBS/10mM EDTA的溶液中,取出15微升的等分试样用于细胞计数和质量控制。

[0173] DNA酶I通过将1mg DNA酶I粉末(Worthington Cat#2138,>2000Kunitz单位/mg)溶解在10ml PBS加0.9mM MgCl₂中来制备。

[0174] 为了保护细胞核DNA不被进入固定的、可渗透的分离的胎儿绒毛外滋养层细胞的核酸酶降解,将DNA酶附着(例如通过共价连接)到一个或多个支持体(例如不能穿透固定细胞的珠子或颗粒)上。在该实施例中,将与非磁珠共价结合的DNA酶加入到分离的胎儿绒毛外滋养层细胞、5微升F7(MoBiTec,德国)中,并在室温下孵育10min。

[0175] 将DNA酶处理的分离的胎儿绒毛外滋养层细胞通过250微米过滤器离心,并在4℃下重悬于10ml PBS中。然后将细胞在10ml PBS中再洗涤2次,最后的沉淀在PBS中达到1ml的体积。在胎儿DNA提取之前,将使用诸如凝胶过滤、网状过滤、微流体通道中的层流或其他适当方法的尺寸排阻方法除去固定在珠子上的DNA酶。

[0176] DNA酶处理的分离的胎儿绒毛外滋养层细胞通过加入50mM Tris-HCl,pH 8.5,150mM NaCl,1%NP-40来裂解,然后低速离心以沉淀完整的胎儿绒毛外滋养层细胞核。除去上清液,用PBS/10mM EDTA洗涤细胞核两次或三次。

[0177] 通过向50微升的分离的胎儿绒毛外滋养层细胞核中添加25微升3X浓缩DNA提取缓冲液(90mM TRIS,90mM EDTA,1.5%EDTA,pH 8.0,3mg/ml蛋白酶K)从胎儿绒毛外滋养层细胞核中提取基因组DNA。然后将细胞核在65℃下孵育3小时,然后在95℃下孵育10min。

[0178] 将提取的基因组DNA冷冻用于随后的分析,或者可以通过在微量离心机中高速离心5分钟来进一步纯化。任选地,DNA仍然进一步纯化,例如使用市售的DNA纯化和浓缩试剂盒,例如Zymresearch DNA 10浓缩试剂盒。

[0179] 实施例5

[0180] 样本

[0181] 从在5至19周(9.1±4.0周)的孕龄获得的宫颈内样本(n=22)中分离母体和胎儿细胞,并在每个胎儿分娩后获得相应的新生儿血斑。在妊娠前三个月终止妊娠的第二组妇女中,获得宫颈内样本和匹配的胎盘组织。

[0182] 宫颈内胎儿滋养层细胞的分离

[0183] 使用ThinPrep试剂盒(Hologic,Marlborough,MA)立即固定宫颈内样本。离心宫颈内样本,重悬于10mL磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,然后用PBS洗涤三次。在1.5mL PBS中最终重悬后,加入抗HLA-G包被的磁性纳米颗粒,并在4℃下混合孵育过夜。在磁性固定并分离HLA-G阳性(胎儿)细胞后,收集未结合的(母体)细胞。然后将两种类型的分离细胞在PBS中洗涤三次。计数滋养层细胞(110-1515,来自每个样本平均数为373个)和母体细胞,并将约50个细胞的组固定在玻璃显微镜载玻片上。通过免疫荧光显微镜评估细胞的β-hCG的表达,并测定标记的细胞的百分比。滋养层特异性蛋白β-hCG的表达以89.8±5.2%的分离的胎儿细胞的平均值存在于分离的胎儿细胞中,而分离的母体细胞中不存在β-hCG。表V示出了评估的三个样本的实例。

样本 ID	S1		S2		S3	
孕龄	5.2 周		7 周		14 周	
细胞分离物 (F/M) *	F	M	F	M	F	M
滋养层纯度 (%β-hCG)	98	0	86	0	89	0
FISH ¹ (具有 Y 染色体的# 细胞/总数)	雄性		雄性		雄性	
	(27/27)		(13/13)		(25/25)	
qPCR	SRV		SRV		SRV	
Ct 值	36.9		39.0		37.1	
	RNaseH		RNaseH		RNaseH	
	35.1	34.0	36.5	34.7	28.8	26.6
外显子组测序结果						
比对的读数 (%)	99.5	99.3	85.5	99.4	99.3	98.8
中间测序深度	157	133	205	269	167	141
变体分析						
F&M 之间的比较	#总的共有变体	589		124	398	
	#信息性变体(%)	160 (27.2)		46 (37.1)	65 (16.3)	

[0186] 荧光原位杂交 (FISH)

[0187] 将分离的胎儿绒毛外滋养层细胞固定在载玻片上,并使用Y染色体上的DYZ1随体

III,以及X染色体上的DXZ1a随体作为荧光标记的探针(Abbott Molecular)通过FISH用探针探查X和Y染色体。用DAPI对细胞核进行复染,并对每个染色体进行评分以对为XX或XY的细胞定量。用于X和Y染色体的荧光原位杂交(FISH)和用于SRY基因的定量PCR(qPCR)鉴定了来自雄性胎儿的滋养层分离物。

[0188] 从分离的细胞核中提取和分离DNA

[0189] 在从细胞核中提取胎儿DNA之前,通过分离胎儿绒毛外滋养层细胞核获得胎儿DNA。将分离的胎儿绒毛外滋养层细胞固定在载玻片上、裂解,并从保持附着在载玻片上的细胞核中提取胎儿细胞DNA。

[0190] 细胞通过在新鲜制备的蛋白酶溶液(在100mL 0.01N HCl中的0.011mg胃蛋白酶)中在37℃下孵育11min裂解以释放完整的细胞核,以裂解细胞并释放完整的胎儿绒毛外滋养层细胞核。

[0191] 通过在5-10 μ l的5mM Tris/HCL pH 8.8/蛋白酶K细胞裂解缓冲液中于42℃下孵育过夜来裂解细胞核,并将细胞与缓冲液的比例维持在1 μ L缓冲液:2个细胞。在65℃下灭活30min并在80℃下灭活15min后,将1 μ L用于RNaseH和SRY基因的qPCR,以确认从细胞核中的DNA提取和胎儿细胞的雄性性别。

[0192] 从相应的宫颈内样本的母体细胞的20-细胞等分试样中提取相应的母体细胞DNA,所述宫颈内样本通过免疫磁性分离耗尽胎儿细胞,所述宫颈内样本已经冷冻储存在PCR管中。

[0193] 在DNA酶消化后从分离的细胞核中提取和分离DNA

[0194] 对从用DNA酶处理的细胞中分离的DNA进行靶向测序。将从宫颈内样本中分离的胎儿和母体细胞滴在单独的载玻片上并使其干燥,将它们粘附到载玻片上。

[0195] 将具有粘附的胎儿细胞的载玻片在新鲜制备的蛋白酶溶液(在100mL 0.01N HCl中的0.011mg胃蛋白酶)中于37℃下浸渍11min,以裂解细胞并释放完整的胎儿绒毛外滋养层细胞核,然后用PBS洗涤5min以除去细胞质膜和潜在的母体DNA片段,产生分离的胎儿绒毛外滋养层细胞核。通过将10 μ L洗涤的、固定化的DNA酶(DNA酶I,固定在基质F7M上,MoBiTec,Goettingen,德国)添加到胃蛋白酶处理过的载玻片上,并在室温下温育3-5min,从玻璃结合的分离的胎儿绒毛外滋养层细胞核中进一步消除外源DNA(即非胎儿DNA)。用PBS洗涤载玻片以通过除去含有DNA酶的珠子来终止DNA酶活性。

[0196] 然后通过65℃下用0.5 μ L/细胞5mM Tris/HCL pH 8.8/蛋白酶K细胞核裂解缓冲液(在42℃下过夜)孵育过夜来裂解分离的胎儿绒毛外滋养层细胞核,并将细胞与缓冲液的比例保持在1 μ L缓冲液:2个细胞。然后通过95℃下孵育30min使蛋白酶失活。

[0197] 然后通过65℃下用0.5 μ L/细胞5mM Tris/HCL pH 8.8/蛋白酶K细胞核裂解缓冲液(在42℃下过夜)孵育过夜来裂解粘附于载玻片的母体细胞,并将细胞与缓冲液的比例保持在1 μ L缓冲液:2个细胞。然后通过95℃下孵育30min使蛋白酶失活。对于母体细胞,在DNA提取之前未分离细胞核,并且未对细胞进行DNA酶处理。

[0198] 解剖胎盘绒毛(20-25mg)并悬浮于100 μ L PBS中。加入10 μ L固定化的DNA酶并在室温下振荡10min以确保有效的DNA消化。通过在PBS中洗涤除去DNA酶珠子。使用标准DNA分离方法从组织中提取DNA。

[0199] 使用Qiagen MinElute PCR纯化试剂盒纯化所有DNA,以20 μ L的终体积进行洗脱,

并使用荧光DNA测定法定量。

[0200] 从血液和组织中提取和分离参考DNA

[0201] 将2mL母体血液涂层在5mL聚蔗糖-泛影葡胺溶液 (GE Healthcare) 上并以200xg离心10min,然后收集白细胞层(血沉棕黄层)。从收集卡上的血斑中获得1/4英寸穿孔的新生儿血斑。根据制造商的方案,分别使用EZ1 DNA血液试剂盒 (Qiagen) 和EZ1 DNA Investigator试剂盒 (Qiagen) 从母体血沉棕黄层和新生儿血斑中提取DNA。按照制造商的方案,使用MiniElute PCR纯化试剂盒 (Qiagen) 纯化DNA。作为母体血液的替代物,使用基于标准二氧化硅柱的DNA纯化方案提取分离自宫颈内样本的10,000个母体细胞的DNA,所述方案作为DNeasy血液&组织试剂盒 (Qiagen) 市售购得。使用荧光DNA嵌入染料测定 (Pico Green测定 (Invitrogen)) 定量所有分离的DNA。

[0202] 定量PCR (qPCR)

[0203] 使用具有自动数据分析的BioRad CFX 364实时荧光热循环仪,通过使用RNaseH和雄性SRY基因的TaqMan探针和引物 (Life Technology) 的多重、实时qPCR确定每个胎儿的性别。将样本在95°C下孵育10min,然后在92°C下进行50个循环持续15秒并在60°C下持续1min。

[0204] 全基因组扩增 (WGA)

[0205] 从10-50个细胞核中分离胎儿基因组DNA,参见表V,并且将胎儿或母体DNA的等分试样(约4个基因组当量)用于全基因组扩增 (WGA)。通过PCR扩增4个常染色体片段证实WGA,参见图1和2。从胎儿和母体细胞中分离的一部分DNA(约4个拷贝)进行基于PCR的WGA,AmplifiTM全基因组扩增试剂盒 (Silicon Biosystems)——其按照制造商的方案提供细胞全基因组的平衡和完全扩增。然后使用标准市售的基于固相反向固定化珠子纯化系统、Agencourt Ampure XP顺磁珠子进行3X珠子纯化。DNA由于其电荷而与珠子上的官能团结合。蛋白质对珠子的亲和力较小,并使用制造商的方案将其冲洗掉。

[0206] 为了评估WGA程序的质量,通过1%琼脂糖凝胶电泳评估每个扩增样本的6 μ L等分试样,参见图1,并使用扩增所选区域的基于PCR的测定法,Amplifi 1TM QC试剂盒 (Silicon Biosystems)。使用凝胶电泳评估结果,以比较QC测定扩增子的bp长度与试剂盒预期的那些扩增子的bp长度,参见图2。每个样本一式三份扩增,并评估各个复制物的质量。合并复制物用于DNA文库制备。

[0207] 用于外显子组测序的文库制备

[0208] 测序WGA扩增的DNA(来自从宫颈内样本中分离的胎儿滋养层细胞的细胞核,从宫颈内样本中分离的母体宫颈内细胞)和未扩增的DNA(来自新生儿血斑和母体细胞或血液)。按照制造商的方案,使用具有50ng DNA原料的Nextera快速捕获外显子组试剂盒 (Illumina) 制备DNA文库。将独特的条形码接头连接到样本上,然后进行PCR扩增和文库纯化。对最终的文库池进行定量,并使用高灵敏度DNA芯片 (Agilent Technologies) 评估其质量,参见图3。

[0209] 使用KAPA文库定量试剂盒 (KAPA Biosystems-Illumina),通过RT-PCR定量每个文库。试剂盒中提供的DNA标准物代表0.0002至20pM的10倍稀释系列。将2nM的每个单独文库合并用于多重测序,这消除了测序泳道效应。在Illumina HiSeq 2500上的快速流动池中对文库进行测序。

[0210] 外显子组测序数据分析

[0211] 使用BWA富集管道版本2.1.0.0 (Illumina BaseSpace Workflow) 与智人 (Homo Sapiens) 参考基因组 (UCSC hg19)、Nextera快速捕获外显子组v1.2的靶向区域进行外显子组测序读取的比对和变体调用,包括接头的修剪和PCR复制物的标记。随后将VCF文件加载到Illumina Variant Studio 2.2中,以过滤通过BWA富集质量控制的调用,确保最小读取深度为100,并除去插入和缺失变体。

[0212] 鉴定每个母体和胎儿对之间共有的变体,然后过滤掉共有的纯合子和共有的杂合子,使用>85的变体等位基因百分比被认为是纯合子,并且<85的变体等位基因百分比被认为是杂合子。其次,母体和胎儿变体等位基因百分比之间的最小差异设定为25。其余变体被认为是信息性的,即母体纯合子/胎儿杂合子,或母体杂合子/胎儿纯合子。

[0213] 对于同一个体的WGA扩增的和未扩增的样本之间共有的变体,当未扩增的DNA显示杂合性而扩增的DNA显示纯合性时,鉴定出等位基因丢失。在杂合的WGA扩增的DNA中鉴定出其他等位基因,而未扩增的样本是纯合的。

[0214] 通过计算每个靶标区域的每个染色体的平均覆盖值来确定染色体覆盖率,作为二倍体染色体覆盖的比率。

[0215] 表VI和VII中示出的测序数据揭示了所有染色体的覆盖率。

表 VI. 三个样本的 WGA (胎儿和母体) 产物的外显子组测序						
样本 ID	S1		S2		S3	
[0216]	WGA		WGA		WGA	
	母体	胎儿	母体	胎儿	母体	胎儿
一般性分析信息						

[0217]

总读数 (通过 Illumina 滤光器)	3.840E+07	2.073E+07	1.545E+07	2.106E+08	4.598E+07	1.183E+07	
质量得分 Q30 (%)	90.7	92.0	86.8	84.0	90.8	91.6	
读数富集 (%)	70.1	67.9	69.7	62.0	66.8	55.5	
填充读数富集 (%) (填充尺寸(padding size)150bp)	72.5	70.1	72.1	67.3	70.8	59.1	
成对的复制物读数 (%)	10.0	5.9	41.2	43.9	9.6	6.1	
片段长度中值+ SD	123±64	121±62	130±67	171±84	144±82	144±83	
<u>变体分析</u>							
应用滤光器后的总 #变体	5,577	1,466	661	8,850	6,928	988	
范围测序深度 (100-...)	1,681	839	4,385	9,886	2,934	1,150	
与未扩增的样品的比较	# 共有变体	174	5267	843	37	107	2507
	# 等位基因丢失 (%)	16 (9.2)	93 (1.8)	166 (19.7)	14 (37.8)	6 (5.6)	494 (19.7)
	# <i>De Novo</i> 等位基因 (%)	11 (6.3)	10 (0.2)	70 (8.3)	1 (2.7)	6 (5.6)	286 (11.4)

[0218]

表 VII. 三个样本的未扩增的 (母体血液和新生儿血斑) DNA 的外显子组测序						
样本 ID	<u>S1</u>		<u>S2</u>		<u>S3</u>	
	未扩增的		未扩增的		未扩增的	
	母体	胎儿	母体	胎儿	母体	胎儿
<u>一般性分析信息</u>						
总读数 (通过	1.618E+	2.172E+	3.169E+	4.523E+	1.142E+	3.029E+

[0219]

Illumina 滤光器)	08	07	07	07	08	07
质量得分 Q30 (%)	88.8	90.5	90.3	90.4	89.6	91.1
比对的读数 (%)	99.3	99.8	99.8	99.8	99.5	99.8
读数富集 (%)	70.3	67.8	66.0	63.7	72.1	68.6
填充读数富集 (%) (填充尺寸 150bp)	73.0	72.0	71.0	68.2	73.7	70.9
成对的复制物读数 (%)	19.0	4.5	5.7	4.9	19.3	5.1
片段长度中值 + SD	117±60	143±80	156±85	143±78	100±48	113±57
变体分析						
应用滤光器后的总 # 变体	24,797	1,089	2,174	3,848	14,837	1,246
中值测序深度	181	131	130	127	156	123
范围测序深度 (100-...)	2,134	1,432	1,741	1,629	2,488	1,027

[0220] 所有染色体的覆盖率也通过图4中示出的结果显示。图4是Cercos热图，其指示 \log_{10} 比例上所有外显子组序列的靶标区域的平均覆盖率，表明母体 (M) 和胎儿 (F) 样本中的每个染色体 (1-22, X, Y)。较深的灰色表示较高的覆盖率。最外面的圆圈代表染色体模式图，其顺时针方向为pter-qter取向，黑色为着丝粒。放大区域 (左) 示出了X和Y染色体的详细覆盖率。图5A示出了胎儿和母体细胞WGA后的常染色体、X和Y染色体的相对覆盖率，图5B示出了新生儿血样 (血斑) 和母体血样WGA后的常染色体、X和Y染色体的相对覆盖率，其用作参考标准。图5A和5B中的点代表各个数据点；方框：25至75百分位数；方框内的水平线：中位数；须状物 (whisker)：1.5x中间四分位数范围 (第三四分位数 - 第一四分位数)。与其各自的雌性和雄性性别一致，获得了母体DNA中常染色体:X:Y染色体的预期比例 (2:2:0) (1.96 ± 0.03 比 2.29 ± 0.46 比 0.05 ± 0.08)，而在来自分离的胎儿细胞核的滋养层DNA中获得雄性胎儿的预期比例 (2:1:1) (1.67 ± 0.11 比 1.16 ± 0.24 比 2.46 ± 1.02)，参见图5A。滋养层细胞中Y染色体的比例升高很可能是由于不正确的比对，因为Y染色体的大部分与X染色体共有。WGA扩增的DNA，参见图5A，表现出了比未扩增的DNA更大的染色体覆盖率变化，参见图5B，这是由于在WGA期间优先扩增非富含GC的区域。

[0221] 实施例6

[0222] 靶向测序

[0223] 从宫颈内样本中分离的胎儿滋养层细胞的细胞核中、从宫颈内样本中分离的母体宫颈内细胞的细胞核中和从相应胎盘的组织的细胞核中获得DNA,如上文针对外显子组测序所述。使用具有男性和女性胎儿的妊娠进行靶向测序 (N=20)。

[0224] 用于ForenSeq靶向测序的文库制备

[0225] 对来自宫颈内样本的胎儿滋养层细胞或从宫颈内样本中分离的母体宫颈内细胞的分离的细胞核的胎儿DNA (范围为5至19周孕龄的20个宫颈内样本中的约282个细胞,表VIII) 进行测序,并与从匹配的胎盘样本中分离的测序的参考胎儿DNA进行比较。

[0226]

表 VIII. 靶向测序的样本和结果概述

样本 ID	孕龄 (周)	滋养层细胞纯度 (%β-hCG)	胎儿性别	TRIC 中的常染色体 STR 等位基因		% 胎儿分数 (%母体分数)	阈值后的胎儿滋养层细胞中的 SNV 数	
				中值	范围		称为 <u>正确</u> (%SNV 总数)	称为 <u>不正确</u>
<u>S_A</u>	5	86	雄性	94.8	85.6-100	97.6(2.4)	93(98.9)	0
<u>S_B</u>	5	89	雌性	85.5	75.1-100	92.2(7.8)	77(81.9)	0
<u>S_C</u>	5	91	雌性	89.1	73.5-100	87.2(12.8)	82(87.2)	0
<u>S_D</u>	6	85	雌性	91.9	80.8-98.7	95.2(4.8)	89(94.7)	0
<u>S_E</u>	6	92	雄性	86.4	85.7-96.9	85.6(14.4)	62(66.0)	0

[0227]

<u>S_F</u>	6	93	雄性	88.1	73.2-99.4	75.6(24.4)	55(58.5)	0
<u>S_G</u>	6	89	雄性	93.3	84.9-100	93.9(6.1)	91(96.8)	0
<u>S_H</u>	6	86	雌性	92.7	77.8-98.5	98.6(1.4)	89(94.7)	0
<u>S_I</u>	6	89	雄性	95	88.9-100	100(0.0)	90(95.7)	0
<u>S_J</u>	7	92	雌性	89	77.7-96.6	82.1(17.9)	68(72.3)	0
<u>S_K</u>	8	80	雌性	89	72.3-100	82.4(17.6)	74(78.7)	0
<u>S_L</u>	8	96	雌性	92	79.6-99.4	97.2(2.8)	87(92.6)	0
<u>S_M</u>	8	96	雌性	90.2	78.3-100	90.8(9.2)	91(96.8)	0
<u>S_N</u>	8.4	92	雌性	93.3	76.5-99.2	92.8(7.2)	90(95.7)	0
<u>S_O</u>	9	85	雄性	93.6	79.8-100	92.9(7.1)	90(95.7)	0
<u>S_P</u>	9	94	雄性	91.9	81.9-100	100(0.0)	92(97.9)	0
<u>S_Q</u>	11	85	雌性	91.9	73.8-97.6	95.9(4.1)	89(94.7)	0
<u>S_R</u>	13	91	雄性	87.4	77.7-100	91.9(8.1)	77(81.9)	0
<u>S_S</u>	14	90	雄性	91.7	81.8-100	92.6(7.4)	93(98.9)	0
<u>S_T</u>	19	80	雌性	93.2	85.3-99.5	98.7(1.3)	92(97.9)	0

[0228] 在宫颈内取样后5-7天完成序列分析。使用用于靶向PCR和DNA文库制备的

ForenSeq DNA Signature Prep试剂盒 (Illumina) 对每种类型的约 1.9 ± 0.9 ng DNA进行测序,然后在MiSeq FGx系统上进行分析。用ForenSeq DNA Signature Prep试剂盒 (Illumina),使用“引物混合物A”制备DNA文库,所述“引物混合物A”允许按照制造商的指示分析94个SNP基因座和59个STR基因座(常染色体和性染色体特异性的)。通过Qubit对个体样本进行定量,并在文库标准化之前使用Agilent高灵敏度DNA芯片进行分析。基于文库迹线(trace)计算200-1000bp之间的文库的百分比,并相应地在核心设施上混合。选择200-1kb的池大小,并将选择大小的阴性对照混入池中。样本在包括阳性和阴性对照的MiSeq FGX系统 (Illumina) 上进行测序。

[0229] ForenSeq靶向测序数据分析

[0230] ForenSeq靶向测序数据是从ForenSeq Universal Analysis软件中提取的,所述软件提供运行质量报告和详细的基因型。从该报告中,使用每个短串联重复序列 (STR) 或单核苷酸多态性 (SNP) 的读取深度提取数据并确定等位基因百分比。对于STR数据,将具有最高相对峰的两个显性等位基因用于进一步分析。

[0231] 为了确定从分离自宫颈内样本的胎儿滋养层细胞的分离的胎儿细胞核获得的胎儿DNA的纯度,从SNP和STR数据计算母体DNA的污染水平。对于每组三个样本(胎儿、母体、胎盘),确定每个SNP的纯合性或杂合性,首先在胎盘中,然后与胎儿比较,并计算胎儿DNA的百分比偏差。还在母体DNA的SNP谱(profile)中计算与纯合性或杂合性的偏差,以确定技术变化和/或生物学变异的阈值。然后比较母体和胎盘SNP谱,并滤出非信息性SNP(即,相同的母体和胎盘等位基因)。对于信息性SNP,从胎儿样本中减去从母体样本中获得的偏差并乘以2(以考虑对胎儿样本有贡献的两个母体等位基因),产生母体污染的百分比。

[0232] 为了研究仅STR基因型是否可以确定胎儿DNA纯度,使用每个常染色体STR。将具有最高相对峰的显性等位基因相加,以建立中值和范围,其区分纯的样本(<15%污染)与不纯的样本。纯的样本的中值STR等位基因>85%,而不纯的样本的中值STR等位基因<80%。为建立用于区分纯的样本和不纯的样本的临界值(cutoff),选择82.5%。

[0233] 所有153个基因座都被成功测序。差异性SNP分析显示,从分离的胎儿滋养层细胞核获得的胎儿DNA中,平均胎儿DNA纯度为 $89.2 \pm 5.0\%$,参见表VIII。与以前尝试分析从胎盘脱落的细胞中分离的胎儿DNA而不在DNA分离之前分离胎儿细胞核相比,分析来自分离的滋养层细胞核中的胎儿DNA产生了高分辨率STR谱,详细描述了多个共有和差异性等位基因。图6示出了由一个样本的母体细胞(母体)、胎儿滋养层细胞(TRIC)和胎盘组织(胎盘)组成的DNA三联体的图形STR图谱。对于每个DNA样本,确定每个STR具有最高相对峰(或当纯合时的单峰)的两个显性等位基因,并在三联体中进行比较。相邻的小图示出了共有STR(上部小图)和差异性STR(中部和下部小图)的分布,其中读数的百分比以数字形式以及由每个显性等位基因的阴影强度表示。

[0234] 这些数据表明通过TRIC获得的胎儿滋养层细胞的分离的细胞核获得的胎儿DNA和参考胎盘DNA(两者均与母体DNA不同)的等位基因分布之间的一致性,并且在所有样本中提供100%正确的胎儿性别鉴定,参见表VIII。

[0235] 通过比较母体基因型与参考胎盘基因型(其与胎儿基因型一致),鉴定信息性SNP(母体或胎儿DNA中的纯合子,其他DNA中的杂合子)。图7、8和9示出了对于单个患者的相应的母体、胎儿(TRIC)和胎盘样本的实例中的94个序列SNP的等位基因频率的比较。

[0236] 信息性SNP平均为总SNP的 $48.7 \pm 5.5\%$ 。所有母体和胎儿基因型对在任何等位基因处缺乏禁用组合(AA/BB),图7,与作为亲本和后代相关的独特个体一致。胎儿(TRIC)DNA与从相应胎盘获得的DNA的比较证明了遗传同一性,参见图8,而来自母体和胎盘DNA的SNP的比较(如图9所示)显示出与图7中所示相似的差异。

[0237] 项目

[0238] 项目1.一种分离正在进行的妊娠的胎儿的DNA的方法,其包括:从怀孕受试者中获得含有母体细胞和胎儿绒毛外滋养层细胞的母体宫颈内样本;从母体宫颈内样本中分离胎儿绒毛外滋养层细胞,产生被母体DNA污染的分选的胎儿绒毛外滋养层细胞;裂解分选的胎儿绒毛外滋养层细胞;从裂解的胎儿绒毛外滋养层细胞中分离胎儿细胞核,产生分选的胎儿细胞核,从而除去至少一部分污染的母体DNA;裂解分选的胎儿细胞核;和从分选的胎儿细胞核中纯化基因组DNA,产生纯化的胎儿基因组DNA。

[0239] 项目2.项目1的方法,其还包括处理分选的胎儿细胞核以除去至少一部分污染的母体DNA。

[0240] 项目3.项目1或2的方法,其还包括在裂解分选的胎儿细胞核之前用DNA酶处理分选的胎儿细胞核,从而除去至少一部分污染的母体DNA。

[0241] 项目4.项目1-3中任一项的方法,其还包括在从母体宫颈内样本中分离胎儿绒毛外滋养层细胞之前用DNA酶处理分选的绒毛外滋养层细胞,从而除去至少一部分污染的母体DNA。

[0242] 项目5.项目1-4中任一项的方法,其还包括在裂解分选的胎儿绒毛外滋养层细胞之前用DNA酶处理分选的绒毛外滋养层细胞,从而除去至少一部分污染的母体DNA。

[0243] 项目6.项目1-5中任一项的方法,其中在用DNA酶处理胎儿绒毛外滋养层细胞之前固定胎儿绒毛外滋养层细胞,并将DNA酶附着于支持体上,防止DNA酶进入胎儿绒毛外滋养层细胞。

[0244] 项目7.项目1-5中任一项的方法,其中在用DNA酶处理胎儿绒毛外滋养层细胞之前,不固定胎儿绒毛外滋养层细胞。

[0245] 项目8.项目1-7中任一项的方法,其中所述纯化的胎儿基因组DNA的特征在于胎儿分数在10%-100%的范围内。

[0246] 项目9.项目1-8中任一项的方法,其中所述纯化的胎儿基因组DNA的特征在于胎儿分数在25%-100%的范围内。

[0247] 项目10.一种分析正在进行的妊娠的胎儿的DNA的方法,其包括:从怀孕受试者中获得含有胎儿绒毛外滋养层细胞的母体宫颈内样本;从母体宫颈内样本中分离胎儿绒毛外滋养层细胞;裂解分选的胎儿绒毛外滋养层细胞;从裂解的胎儿绒毛外滋养层细胞中分离胎儿细胞核;裂解分选的胎儿细胞核并从分选的胎儿细胞核中纯化基因组DNA;和分析纯化的胎儿基因组DNA,从而确定纯化的胎儿基因组DNA的基因组DNA序列的特征,从而分析正在进行的妊娠的胎儿的基因组DNA。

[0248] 项目11.项目10的方法,其中分析纯化的胎儿基因组DNA确定纯化的胎儿基因组DNA的基因组DNA序列中至少一个单个核苷酸的特征,从而用单碱基解析来分析正在进行的妊娠的胎儿的DNA。

[0249] 项目12.项目10或11的方法,其中所述分析包括选自以下的方法:测序、高分辨率

熔解分析、甲基化分析、毛细管电泳法、质谱法、单链构象多态性、单碱基延伸、限制性片段长度多态性。

[0250] 项目13.项目10-12中任一项的方法,其中所述测序包括选自以下的方法:大规模平行标记测序、单分子实时测序、聚合酶克隆测序、离子半导体、焦磷酸测序、通过合成测序、通过连接测序和链终止测序。

[0251] 项目14.项目10-13中任一项的方法,其还包括处理分离的胎儿细胞核以除去至少一部分污染的母体DNA。

[0252] 项目15.项目10-14中任一项的方法,其还包括在裂解分离的胎儿细胞核之前用DNA酶处理分离的胎儿细胞核,从而除去至少一部分污染的母体DNA。

[0253] 项目16.项目10-15中任一项的方法,其还包括在从母体宫颈内样本中分离胎儿绒毛外滋养层细胞之前用DNA酶处理分离的绒毛外滋养层细胞,从而除去至少一部分污染的母体DNA。

[0254] 项目17.项目10-16中任一项的方法,其还包括在裂解分离的胎儿绒毛外滋养层细胞之前用DNA酶处理分离的绒毛外滋养层细胞,从而除去至少一部分污染的母体DNA。

[0255] 项目18.项目10-17中任一项的方法,其中在用DNA酶处理胎儿绒毛外滋养层细胞之前固定胎儿绒毛外滋养层细胞,并将DNA酶附着于支持体上,防止DNA酶进入胎儿绒毛外滋养层细胞。

[0256] 项目19.项目10-17中任一项的方法,其中在用DNA酶处理胎儿绒毛外滋养层细胞之前,不固定胎儿绒毛外滋养层细胞。

[0257] 项目20.项目10-19中任一项的方法,其中所述纯化的胎儿基因组DNA的特征在于胎儿分数在10%-100%的范围内。

[0258] 项目21.项目10-20中任一项的方法,其中所述纯化的胎儿基因组DNA的特征在于胎儿分数在25%-100%的范围内。

[0259] 项目22.一种分离正在进行的妊娠的胎儿的DNA的方法,其基本上如本文所述。

[0260] 项目23.一种用单碱基解析来分析正在进行的妊娠的胎儿的DNA的方法,其基本上如本文所述。

[0261] 本说明书中提及的任何专利或出版物通过引用纳入本文,其程度如同每个单独的出版物被具体和单独地指出通过引用纳入。

[0262] 本文所述的组合物和方法目前是优选实施方案的代表,是示例性的,并非旨在限制本发明的范围。本领域技术人员将想到其中的变化和其他用途。在不脱离权利要求所述的本发明的范围的情况下,可以进行这些改变和其他用途。

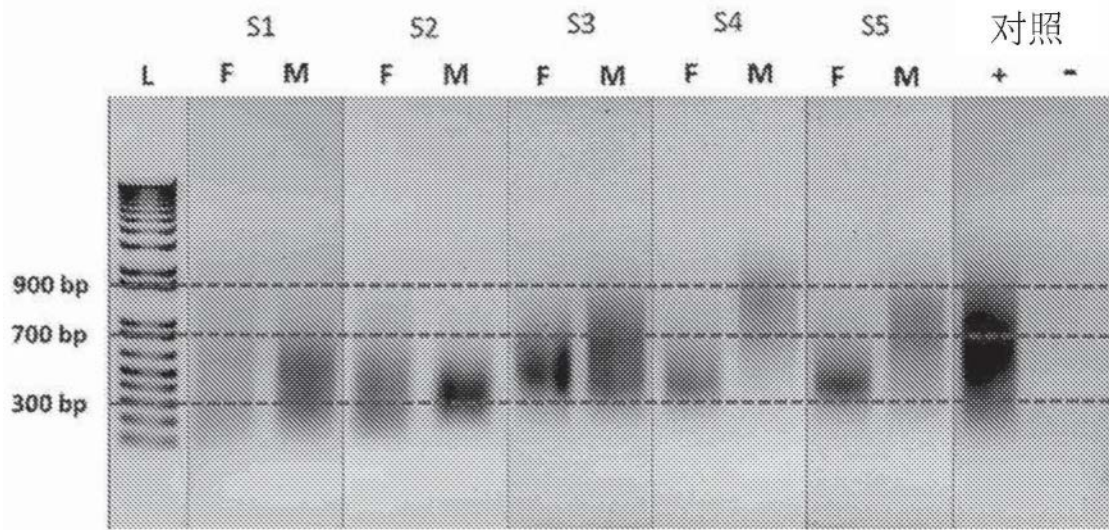


图1

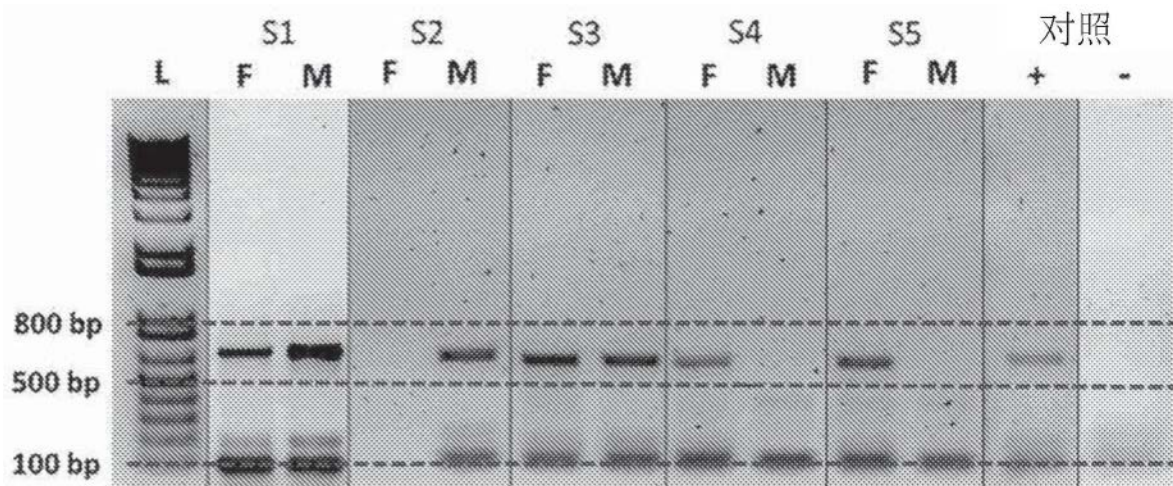


图2

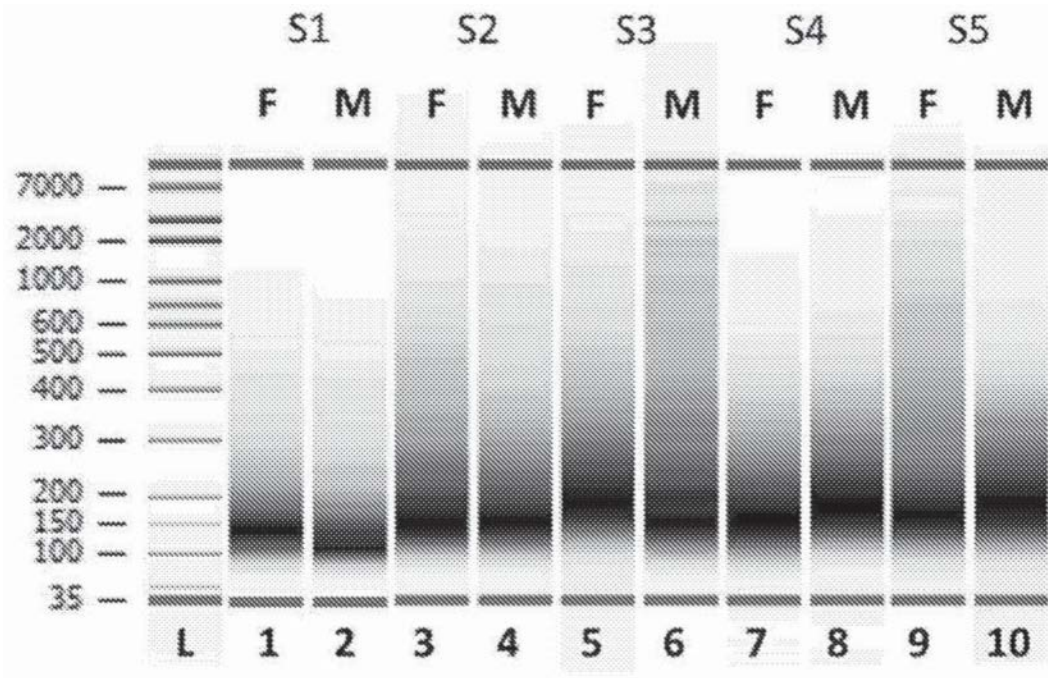


图3

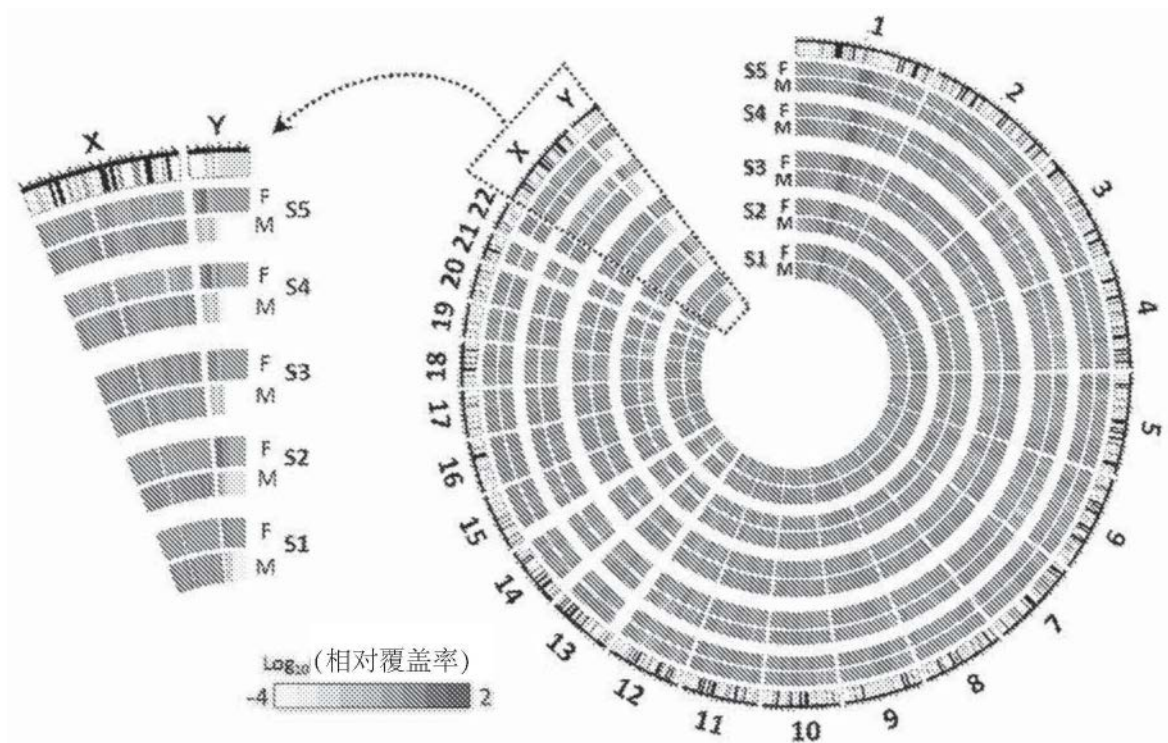


图4

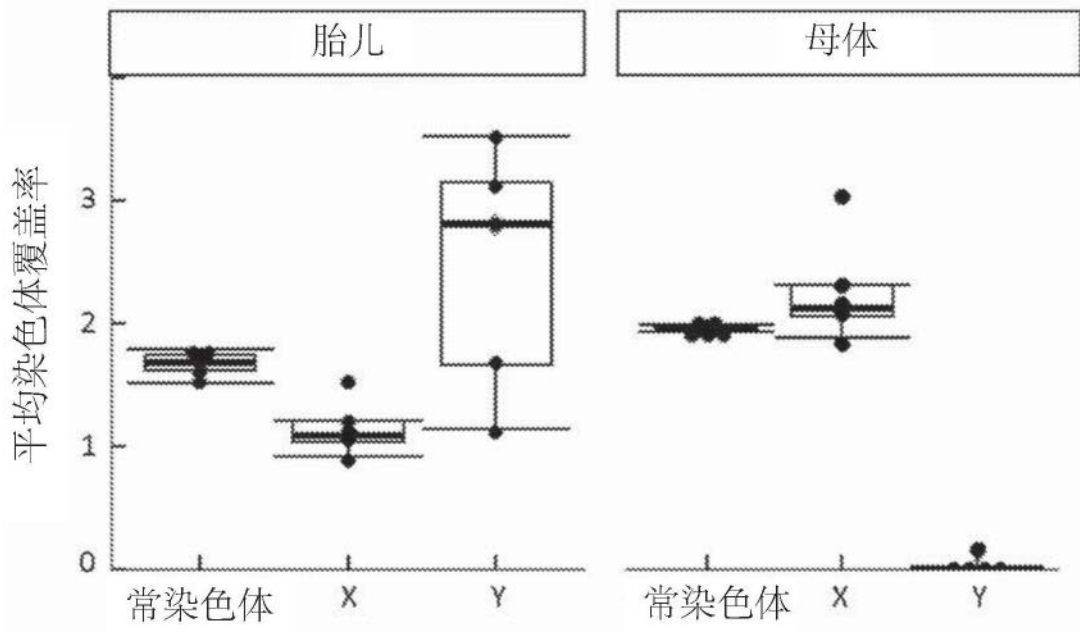


图5A

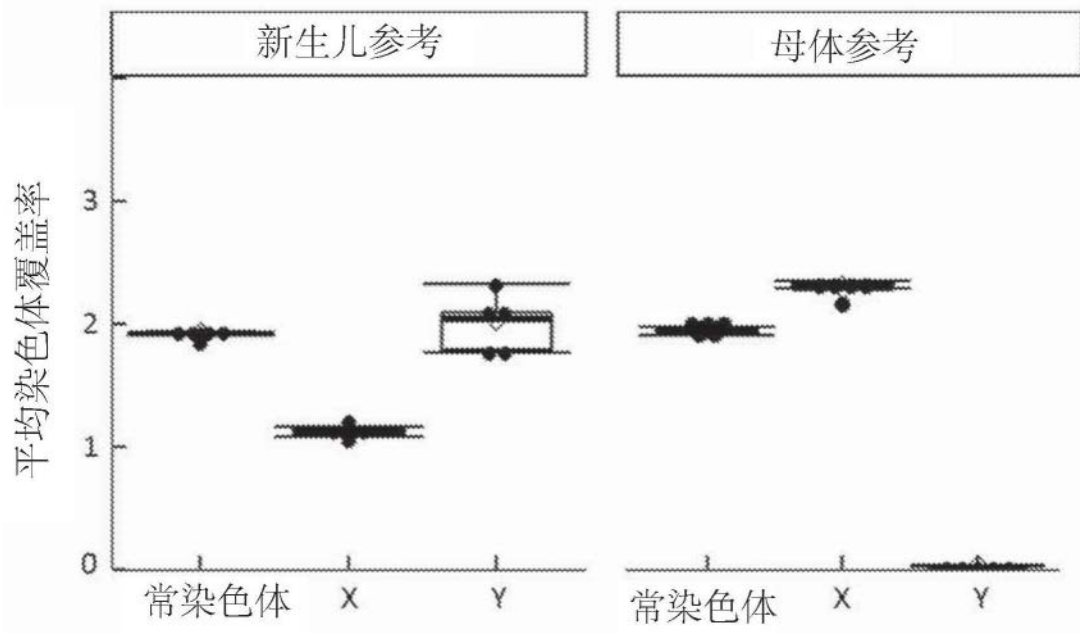


图5B

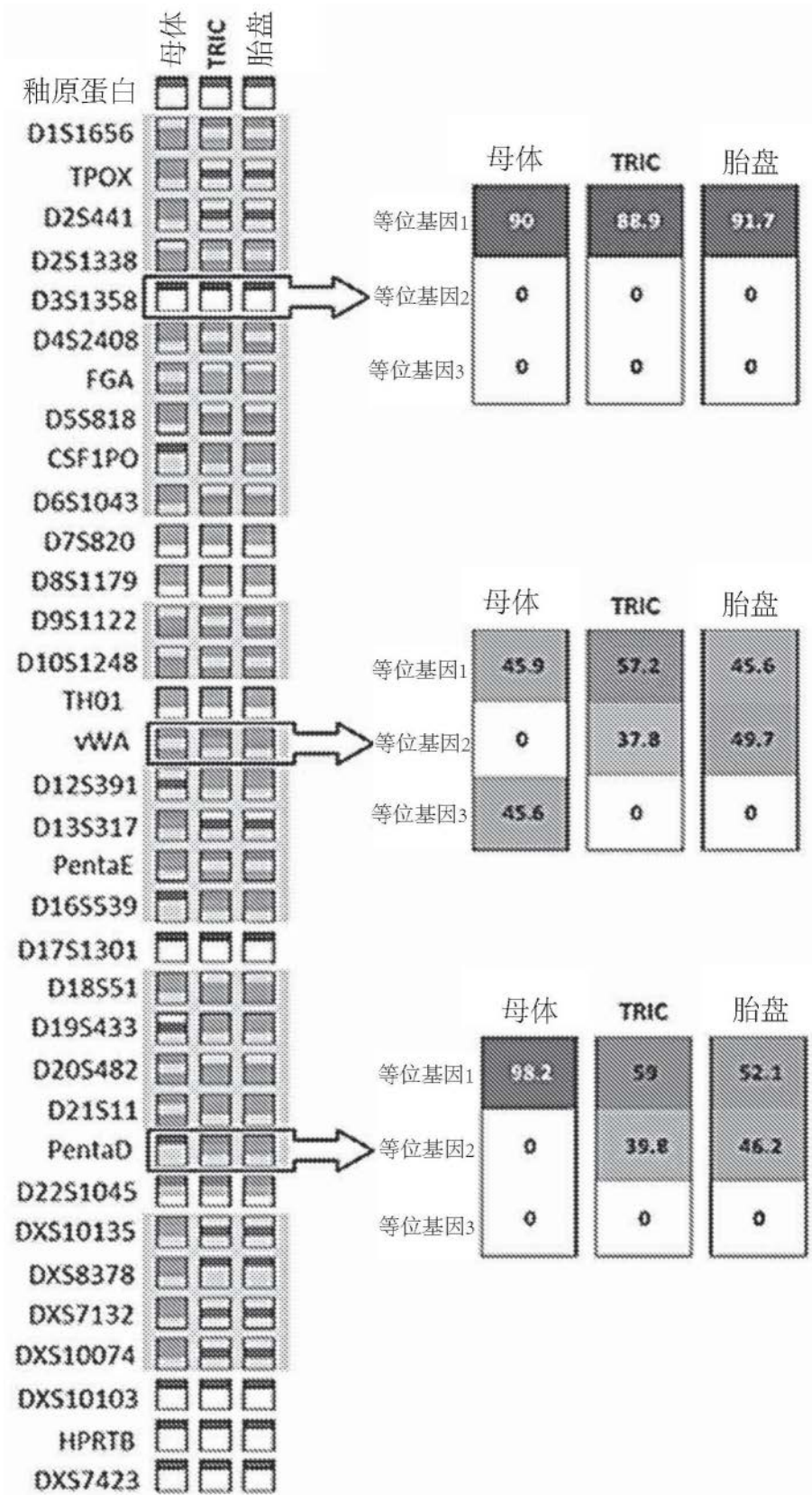


图6

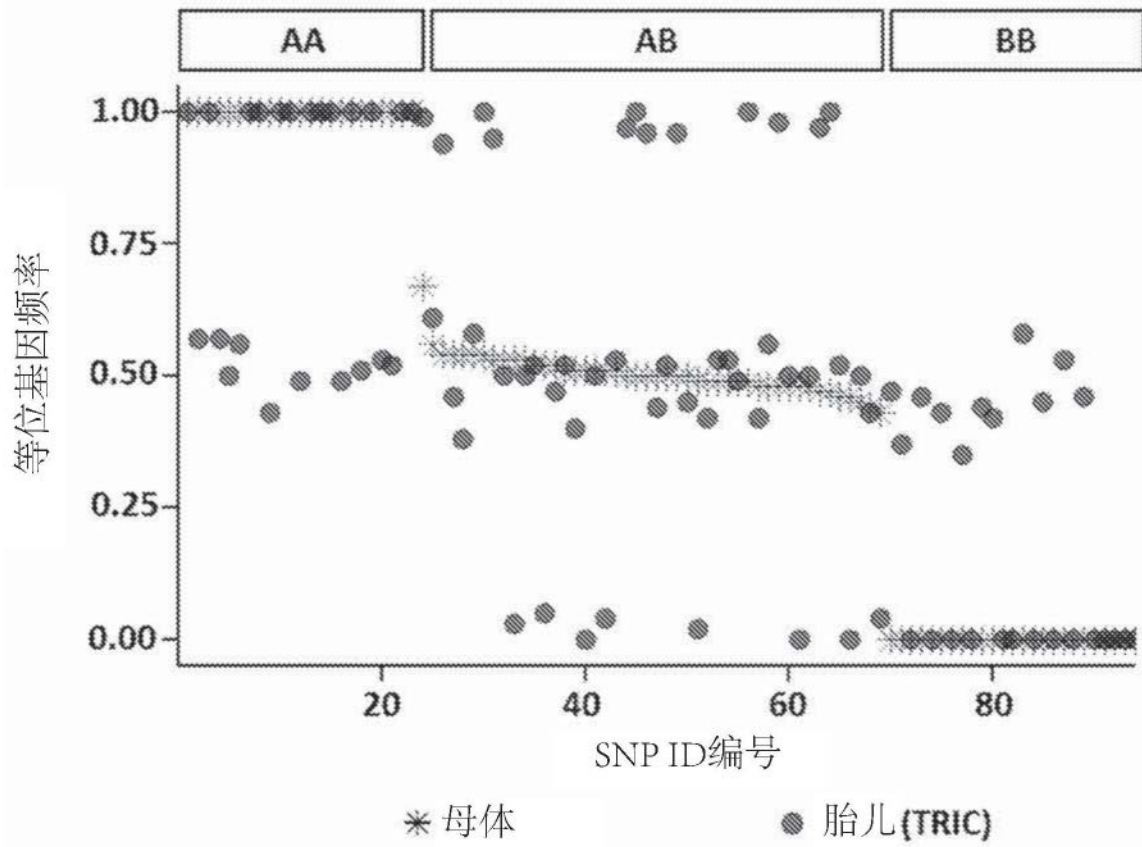


图7

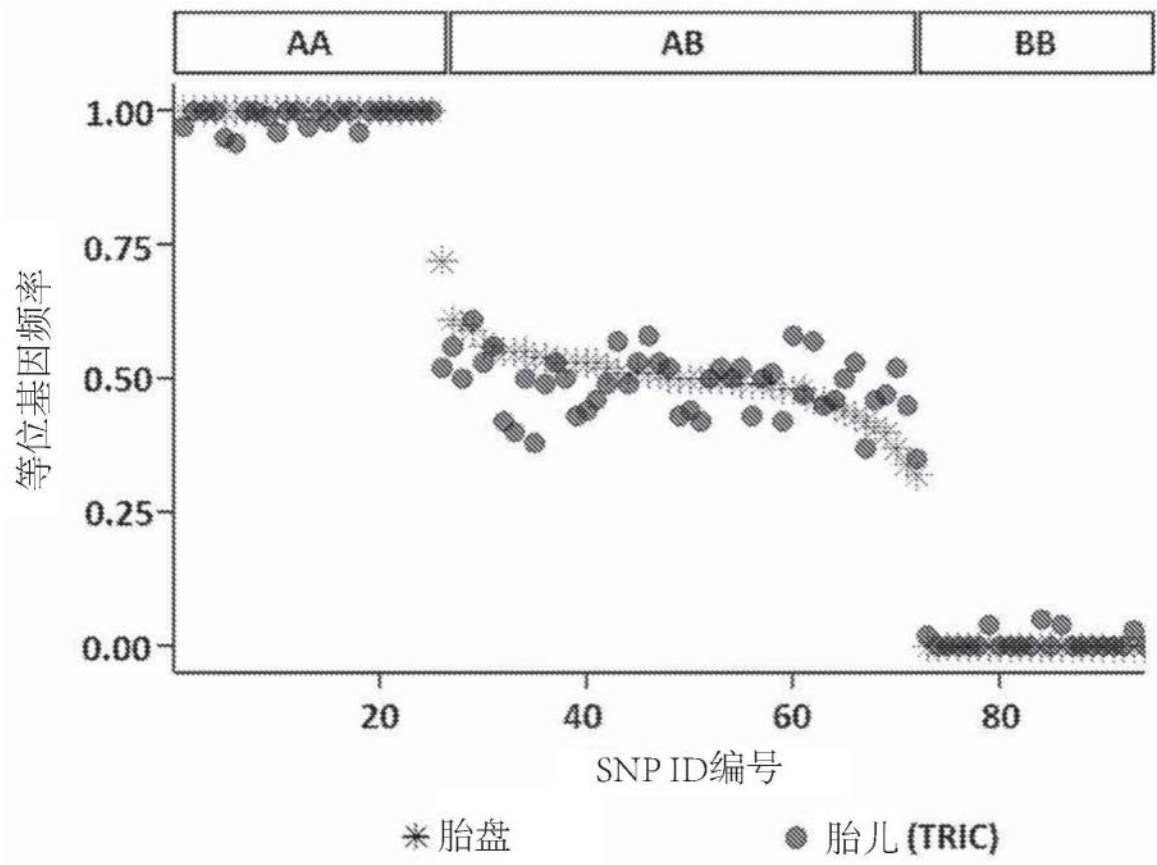


图8

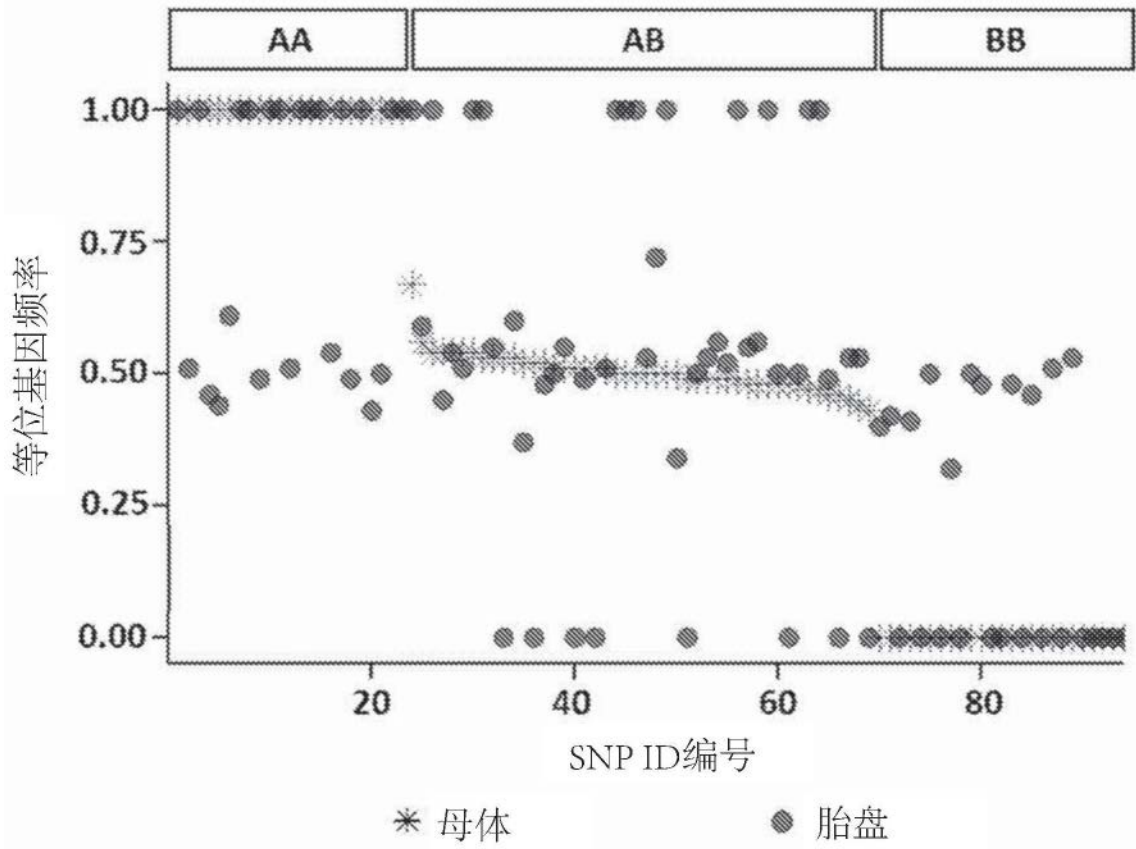


图9