



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104846103 A

(43) 申请公布日 2015.08.19

(21) 申请号 201510274271.0

(22) 申请日 2015.05.26

(71) 申请人 南京杰蒙生物技术有限公司

地址 210014 江苏省南京市秦淮区永丰大道
8号白下高新技术创业园B幢501

(72) 发明人 黄跃进 季红峰 魏艳

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限
公司 31266

代理人 崔佳佳 马莉华

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页

序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

多重数字 PCR 技术在染色体非整倍体筛查中的应用

(57) 摘要

本发明提供了多重数字 PCR 技术在染色体非整倍体 (Aneuploidy) 筛查中的应用。具体地, 本发明公开了一种利用多重数字 PCR (Multiplex digital PCR, MDPCR) 技术对妊娠妇女进行包括唐氏综合症, 爱德华氏综合症, 帕陶氏综合症和其他染色体异常疾病无创产前筛查 (Non-invasive prenatal screening, NIPS) 的方法。该方法具有早期、安全无创、准确、快速、适合大规模检测和临床应用等优点, 能避免妇女妊娠中后期胎儿宫内感染、流产、死亡, 达到优生优育目的。

1. 一种体外非诊断性的检测目标染色体非整倍体 (Aneuploidy) 的方法, 其特征在于, 包括步骤:

(a) 提供含有胎儿游离 DNA 的妊娠对象外周血样本;

(b) 从所述外周血样本分离去除细胞, 并从去除细胞的所述样本中富集 DNA, 得到 DNA 样本;

(c) 将所述 DNA 样本分为对照组和实验组, 其中,

在实验组中, 以所述 DNA 样本为模板, 用扩增目标染色体基因的 n_1 对第一引物对进行多重数字 PCR, 并记录阳性点个数 C_1 与引物对数量 n_1 之比, 记为 a_1 , 其中 $a_1 = C_1/n_1$, 且 $n_1 \geq 2$, 优选地, $n_1 \geq 5$;

在对照组中, 以所述 DNA 样本为模板, 用扩增参照染色体基因的 n_2 对第二引物对进行多重数字 PCR, 并记录阳性点个数 C_2 与引物对数量 n_2 之比, 记为 a_2 , 其中 $a_2 = C_2/n_2$, 且 $n_2 \geq 5$, 优选地, $n_2 \geq 5$;

(d) 将所述 a_1 值与 a_2 值进行比较, 从而确定目标染色体的倍数。

2. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述各对第一引物的扩增产物的长度为 50-150bp, 较佳地 60-120bp。

3. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述的 n_1 对第一引物中的每对引物是特异性扩增 21 号染色体的引物。

4. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述目标染色体基因包括 21 号染色体的 Usp25 (NCBI#NM_001283041)、C21orf37 (NCBI#LN608865)、C21orf58 (NCBI#NM_058180)、Setd4 (NCBI#NM_017438)、或 C21orf62 (NCBI#AF231922) 基因; 和 / 或

13 号染色体的 Sacs (NCBI#NM_014363)、Cenpj (NCBI#NM_018451)、Foxo1 (NCBI#NM_002015)、Smad9 (NCBI#NM_001127217)、或 Fgf14 (NCBI#NM_004115); 和 / 或

18 号染色体的 Setbp1 (NCBI#NM_015559)、Potec (NCBI#NM_001137671)、Malt1 (NCBI#AB026118)、Dsc3 (NCBI#NM_001941)、Cdh19 (NCBI#NM_021153)。

5. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述的参照染色体为一个或多个。

6. 一种引物集合, 其特征在于, 所述的引物集合包括以下引物对:

(i) 权利要求 1 中用于扩增目标染色体基因的所述 n_1 对引物对; 和

(ii) 权利要求 1 中用于扩增参照染色体基因的所述 n_2 对引物对;

其中, n_1 、 n_2 分别 ≥ 2 。

7. 如权利要求 6 所述的引物集合, 其特征在于, 所述的引物集合中的引物上还含有引物荧光标记。

8. 如权利要求 6 所述的引物集合, 其特征在于, 所述用于扩增目标染色体基因的引物对序列如 SEQ ID NO. :1-2 所示; 和 / 或

所述用于扩增参照染色体基因的引物对序列如 SEQ ID NO. :4-5 所示;

其中所述目标染色体为 21 号染色体的 Usp25 基因; 所述参照染色体为 18 号染色体的 Setbp1 基因。

9. 权利要求 6 所述引物集合的用途, 其特征在于, 用于制备检测染色体非整倍体和 / 或筛查染色体数量异常疾病的试剂或试剂盒。

10. 一种检测目标染色体的试剂盒, 其特征在于, 所述的试剂盒中含有权利要求 6 所述

的引物集合,和说明书。

多重数字 PCR 技术在染色体非整倍体筛查中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医疗技术领域,具体地涉及利用早期、安全无创、准确、快速、适合大规模检测和临床应用的多重数字 PCR(Multiplex digital PCR, MDPCR) 技术对正常妊娠妇女进行无创产前筛查(Non-invasive prenatal screening, NIPS) 包括唐氏综合征,爱德华氏综合征,帕陶氏综合征和其他多倍染色体疾病筛查的方法。

背景技术

[0002] 中国是人口大国,巨大的人口压力会制约社会发展,所以做好优生优育既能提高人口素质,也能制约人口发展,对未来整个民族的生存与发展有重要作用。预防性优生优育主要研究如何降低人群中不利表现型的基因频率,减少以至消除有严重遗传病和先天性遗传病的个体出生,主要包括遗传咨询、产前筛查、宫内治疗等。

[0003] 据中国出生缺陷干预救助基金会的数据,中国每年新增出生缺陷约 90-120 万例,约占每年出生人口总数的 4-6%。现有 8000 多万残疾人中,约 3000 万人是出生缺陷所致。出生缺陷目前已成为儿童致病、致残,甚至死亡的重要原因,其中染色体异常疾病为主要疾病。孕前和孕早期保健以及产前筛查,是避免与降低新生儿缺陷和实行优生优育的最重要关卡。以往,那些具有染色体异常疾病患病高风险的夫妇,对于孕育健康的后代,往往处于无从选择的被动地位。直到 1966 年,研究发现了孕妇高龄与唐氏综合症的相关性,此后,产前筛查得到迅速发展。产前筛查是指在出生前对胚胎或胎儿的发育状态、是否患有疾病等方面进行检测诊断。从而掌握时机,对可治疗疾病,选择及时进行宫内治疗;对于不可治疗性疾病,如染色体异常疾病等,能够做到知情选择和预防。

[0004] 染色体异常疾病,是指染色体的数目异常和 / 或形态结构变化,可发生于每一条染色体上,但多发于如 21 三体(唐氏综合征),18 三体(爱德华氏综合征),13 三体(帕陶氏综合征)和性染色体异常等,在自发性流产、死胎、早产中占 50% 以上,新生儿中发病率约 1%,是先天性心脏病、智能发育不全、性发育异常及男女不孕不育等的重要原因。随着染色体分带技术,PCR 技术,DNA 检测技术等快速发展,对染色体畸变与疾病关系的认识日益加深,染色体异常疾病检测日趋增多。约 15% 的妊娠发生流产,而其中一半为染色体异常所致,即约为 5% -8% 的胚胎有染色体异常。不过在出生前,90% 以上已有自然流产或死产。流产愈早,有染色体异常的频率愈高。染色体异常疾病,迄今尚无有效的治疗方法,只能通过产前筛查 / 诊断等手段进行一定程度的预防。但目前传统的产前诊断多采用羊膜穿刺等侵入性取样方法,胎儿宫内感染或流产等的风险增加。

[0005] 上述传统侵入性产前诊断的缺点,导致染色体异常疾病无创产前筛查 / 诊断方法的出现。目前通用的方法包括以细胞为主体的和脱细胞方法,尤以后者居多。胎儿游离 DNA 在妊娠母体血液中的存在,和新一代 DNA 检测技术的不断改进,使得无创产前筛查 / 诊断更加容易开展。仅需采取孕妇静脉血,利用新一代 DNA 检测技术对母体外周血浆中的游离 DNA 片段(包含胎儿游离 DNA) 进行检测分析从而检测胎儿是否患染色体异常疾病。但妊娠早期,主要来自胎盘细胞的胎儿游离 DNA 只占母体血液 DNA 的 10-20%。而目前常用的新一代

DNA 测序技术,检测耗时较长,需用复杂的仪器和生物信息学软件分析大量的 DNA 序列,1-2 周获检测结果,且耗费许多试剂和耗材,价格昂贵。数字 PCR(digital PCR) 是近年来快速发展起来的一种新型定量分析技术,通过将单个样本分成超过数万,甚至数百万、数千万份分布于不同的反应单元,每个单元包含无或一个或多个拷贝的 DNA 模板,分别对这些 DNA 模板进行 PCR 扩增,然后对各个反应单元的荧光信号进行分析。dPCR 可不需要对照标准样品和曲线实现绝对定量分析。尤其需要指出的是,将多重 PCR 技术与 dPCR 技术有机结合(MDPCR),便可大幅提高 dPCR 多重性达 20-50 以上。

[0006] 因此本领域迫切需要开发一种早期、安全无创、准确、快速、适合大规模检测和临床应用的新方法。

发明内容

[0007] 本发明提供了一种对染色体疾病进行早期筛查的方法。

[0008] 本发明第一方面,提供了一种体外非诊断性的检测目标染色体非整倍体(Aneuploidy)的方法,包括步骤:

[0009] (a) 提供含有胎儿游离 DNA 的妊娠对象外周血样本;

[0010] (b) 从所述外周血样本分离去除细胞,并从去除细胞的所述样本中富集 DNA,得到 DNA 样本;

[0011] (c) 将所述 DNA 样本分为对照组和实验组,其中,

[0012] 在实验组中,以所述 DNA 样本为模板,用扩增目标染色体基因的 n_1 对第一引物对进行多重数字 PCR,并记录阳性点个数 C_1 与引物对数量 n_1 之比,记为 a_1 ,其中 $a_1 = C_1/n_1$,且 $n_1 \geq 2$,优选地, $n_1 \geq 5$;

[0013] 在对照组中,以所述 DNA 样本为模板,用扩增参照染色体基因的 n_2 对第二引物对进行多重数字 PCR,并记录阳性点个数 C_2 与引物对数量 n_2 之比,记为 a_2 ,其中 $a_2 = C_2/n_2$,且 $n_2 \geq 5$,优选地, $n_2 \geq 5$;

[0014] (d) 将所述 a_1 值与 a_2 值进行比较,从而确定目标染色体的倍数。

[0015] 在另一优选例中,所述的参照染色体为二倍体。

[0016] 在另一优选例中,所述的胎儿和所述的妊娠对象包括小鼠、大鼠、或人,优选地,为人。

[0017] 在另一优选例中,所述的第一引物对和/或第二引物对所扩增的 PCR 产物中,有至少一个引物或探针经荧光标记。

[0018] 在另一优选例中,所述步骤 (b) 还包括步骤 (b1):将所述的 DNA 样本进行片段化处理,从而获得片段化的 DNA 样本。

[0019] 在另一优选例中,所述的片段化处理包括物理和生化处理,如碎化、超声处理和酶切。

[0020] 在另一优选例中,所述的片段化的 DNA 样本大小 $\leq 3000\text{bp}$ 。

[0021] 在另一优选例中,计算 a_1/a_2 值记为 R ,

[0022] 当 R 等于或约等于 0.5 (即接近于 0.5) 时,则表明所述的样本中所述目标染色体为单倍体;

[0023] 当 R 等于或约等于 1 (即接近于 1) 时,则表明所述的样本中所述目标染色体与参

照染色体的倍数相同；

[0024] 当 R 等于或约等于 1.025 时,则表明所述的样本中只有 5% 胎儿游离 DNA 样本的目标染色体为三倍体,而其余 95% 妊娠母体 DNA 样本的目标染色体仍为二倍体；

[0025] 当 R 等于或约等于 1.05 时,则表明所述的样本中只有 10% 胎儿游离 DNA 样本的目标染色体为三倍体,而其余 90% 妊娠母体 DNA 样本的目标染色体仍为二倍体；

[0026] 当 R 等于或约等于 1.5 (即接近于 1.5) 时,则表明所述的样本中所述目标染色体为 3 倍体；

[0027] 当 R 等于或约等于 2 (即接近于 2) 时,则表明所述的样本中所述目标染色体为 4 倍体。

[0028] 在另一优选例中,当 R 与 1 离散时,则表明所述的样本中含有多倍染色体。

[0029] 在另一优选例中,所述各对第一引物的扩增产物的长度为 50-150bp,较佳地 60-120bp。

[0030] 在另一优选例中,所述的 n1 对第一引物中的每对引物是特异性扩增 21 号染色体的引物。

[0031] 在另一优选例中,所述的目标染色体为可发生染色体数量变异疾病的染色体,优选地包括 21 号染色体、13 号染色体、18 号染色体、性染色体。

[0032] 在另一优选例中,所述的参照染色体为正常染色体。

[0033] 在另一优选例中,所述的参照染色体包括 21 号染色体、13 号染色体、18 号染色体。

[0034] 在另一优选例中,所述目标染色体基因包括 21 号染色体的 Usp25 (NCBI#NM_001283041)、C21orf37 (NCBI#LN608865)、C21orf58 (NCBI#NM_058180)、Setd4 (NCBI#NM_017438)、或 C21orf62 (NCBI#AF231922) 基因;和 / 或

[0035] 13 号染色体的 Sacs (NCBI#NM_014363)、Cenpj (NCBI#NM_018451)、Foxo1 (NCBI#NM_002015)、Smad9 (NCBI#NM_001127217)、或 Fgf14 (NCBI#NM_004115);和 / 或

[0036] 18 号染色体的 Setbp1 (NCBI#NM_015559)、Potec (NCBI#NM_001137671)、Malt1 (NCBI#AB026118)、Dsc3 (NCBI#NM_001941)、Cdh19 (NCBI#NM_021153)。

[0037] 在另一优选例中,所述的目标染色体基因还包括非编码基因。

[0038] 在另一优选例中,所述的参照染色体为一个或多个。

[0039] 本发明第二方面,提供了了一种引物集合,所述的引物集合包括以下引物对:

[0040] (i) 本发明第一方面中用于扩增目标染色体基因的所述 n1 对引物对;和

[0041] (ii) 本发明第一方面中用于扩增参照染色体基因的所述 n2 对引物对;

[0042] 其中,n1、n2 分别 ≥ 2 。

[0043] 在另一优选例中,所述 n1、n2 分别至少为 3、4、5、6、7、8、9、10 对,优选至少 5 对。

[0044] 在另一优选例中,所述的目标染色体为可发生染色体数量变异疾病的染色体,优选地包括 21 号染色体、13 号染色体、18 号染色体、性染色体。

[0045] 在另一优选例中,所述的参照染色体为正常染色体。

[0046] 在另一优选例中,所述的引物集合中每对引物所扩增的模板长度为 50-150bp,较佳地,为 100-120bp。

[0047] 在另一优选例中,所述的目标染色体基因选自包括 21 号染色体的 Usp25 (NCBI#NM_001283041)、C21orf37 (NCBI#LN608865)、C21orf58 (NCBI#NM_058180)、

Setd4(NCBI#NM_017438)、C21orf62(NCBI#AF231922) 基因及其他基因位点和非基因位点；13号染色体的Sacs(NCBI#NM_014363)、Cenpj(NCBI#NM_018451)、Foxo1(NCBI#NM_002015)、Smad9(NCBI#NM_001127217)、Fgf14(NCBI#NM_004115) 基因及其他基因位点和非基因位点；或18号染色体的Setbp1(NCBI#NM_015559)、Potec(NCBI#NM_001137671)、Malt1(NCBI#AB026118)、Dsc3(NCBI#NM_001941)、Cdh19(NCBI#NM_021153) 基因及其他基因位点和非基因位点。

[0048] 本发明第一方面所述的引物集合中的引物上还含有引物荧光标记。

[0049] 在另一优选例中,所述的引物荧光标记为荧光标记探针。

[0050] 本发明第一方面所述用于扩增目标染色体基因的引物对序列如 SEQ ID NO. :1-2 所示 ;和 / 或所述用于扩增参照染色体基因的引物对序列如 SEQ ID NO. :4-5 所示 ;其中所述目标染色体为 21 号染色体的 Usp25 基因 ;所述参照染色体为 18 号染色体的 Setbp1 基因。

[0051] 在另一优选例中,含有荧光标记探针的引物中,探针序列如 SEQ ID NO. :3、或 6 所示。

[0052] 本发明第三方面,提供了本发明第二方面所述引物集合的用途,用于制备检测染色体非整倍体和 / 或筛查染色体数量异常疾病的试剂或试剂盒。

[0053] 在另一优选例中,所述的染色体数量异常疾病包括单倍体疾病或多倍体疾病。

[0054] 在另一优选例中,所述的单倍体疾病包括 5q- 综合征。

[0055] 在另一优选例中,所述的多倍体疾病包括 21 三体综合征、13 三体综合征、18 三体综合征。

[0056] 在另一优选例中,所述的试剂盒包括本发明第二方面所述的引物集合,和说明书。

[0057] 在另一优选例中,所述的说明书上记载着如下使用方法,包括步骤:

[0058] (a) 提供含有胎儿游离 DNA 的妊娠对象外周血样本;

[0059] (b) 从所述外周血样本分离去除细胞,并从去除细胞的所述样本中富集 DNA,得到 DNA 样本;

[0060] (c) 将所述 DNA 样本分为对照组和实验组,其中,

[0061] 在实验组中,以所述 DNA 样本为模板,用扩增目标染色体基因的 n1 对第一引物进行多重数字 PCR,并记录阳性点个数 C1 与引物对数量 n1 之比,记为 a1,其中 $a1 = C1/n1$, 且 $n1 \geq 5$;

[0062] 在对照组中,以所述 DNA 样本为模板,用扩增参照染色体基因的 n2 对第二引物进行多重数字 PCR,并记录阳性点个数 C2 与引物对数量 n2 之比,记为 a2,其中 $a2 = C2/n2$, 且 $n2 \geq 5$;

[0063] (d) 将所述 a1 值与 a2 值进行比较,从而确定目标染色体的倍数。

[0064] 在另一优选例中,所述的参照染色体为二倍体。

[0065] 在另一优选例中,计算 a1/a2 值记为 R,

[0066] 当 R 等于或约等于 0.5 (即接近于 0.5) 时,则表明所述的样本中所述目标染色体为单倍体;

[0067] 当 R 等于或约等于 1 (即接近于 1) 时,则表明所述的样本中所述目标染色体与参照染色体的倍数相同;

[0068] 当 R 等于或约等于 1.025 时,则表明所述的样本中只有 5% 胎儿游离 DNA 样本的目标染色体为三倍体,而其余 95% 妊娠母体 DNA 样本的目标染色体仍为二倍体;

[0069] 当 R 等于或约等于 1.05 时,则表明所述的样本中只有 10% 胎儿游离 DNA 样本的目标染色体为三倍体,而其余 90% 妊娠母体 DNA 样本的目标染色体仍为二倍体;

[0070] 当 R 等于或约等于 1.5 (即接近于 1.5) 时,则表明所述的样本中所述目标染色体为 3 倍体;

[0071] 当 R 等于或约等于 2 (即接近于 2) 时,则表明所述的样本中所述目标染色体为 4 倍体。

[0072] 在另一优选例中,所述含有胎儿游离 DNA 的外周血样本经胎儿游离 DNA 富集获得。

[0073] 本发明第四方面,提供了一种检测目标染色体的试剂盒,所述的试剂盒中含有本发明第二方面所述的引物集合,和说明书。

[0074] 本发明第五方面,提供了一种检测目标染色体的非整倍体和 / 或对染色体异常疾病进行无创产前筛查的方法,包括步骤:

[0075] (a) 提供含有胎儿游离 DNA 的妊娠对象外周血样本;

[0076] (b) 从所述外周血样本分离去除细胞,并从去除细胞的所述样本中富集 DNA,得到 DNA 样本;

[0077] (c) 将所述 DNA 样本分为对照组和实验组,其中,

[0078] 在实验组中,以所述 DNA 样本为模板,用扩增目标染色体基因的 n_1 对第一引物进行多重数字 PCR,并记录阳性点个数 C_1 与引物对数量 n_1 之比,记为 a_1 ,其中 $a_1 = C_1/n_1$,且 $n_1 \geq 5$;

[0079] 在对照组中,以所述 DNA 样本为模板,用扩增参照染色体基因的 n_2 对第二引物进行多重数字 PCR,并记录阳性点个数 C_2 与引物对数量 n_2 之比,记为 a_2 ,其中 $a_2 = C_2/n_2$,且 $n_2 \geq 5$;

[0080] (d) 将所述 a_1 值与 a_2 值进行比较,从而确定目标染色体的倍数。

[0081] 在另一优选例中,计算 a_1/a_2 值记为 R,

[0082] 当 R 等于或约等于 0.5 (即接近于 0.5) 时,则表明所述的样本中所述目标染色体为单倍体;

[0083] 当 R 等于或约等于 1 (即接近于 1) 时,则表明所述的样本中所述目标染色体与参照染色体的倍数相同;

[0084] 当 R 等于或约等于 1.025 时,则表明所述的样本中只有 5% 胎儿游离 DNA 样本的目标染色体为三倍体,而其余 95% 妊娠母体 DNA 样本的目标染色体仍为二倍体;

[0085] 当 R 等于或约等于 1.05 时,则表明所述的样本中只有 10% 胎儿游离 DNA 样本的目标染色体为三倍体,而其余 90% 妊娠母体 DNA 样本的目标染色体仍为二倍体;

[0086] 当 R 等于或约等于 1.5 (即接近于 1.5) 时,则表明所述的样本中所述目标染色体为 3 倍体;

[0087] 当 R 等于或约等于 2 (即接近于 2) 时,则表明所述的样本中所述目标染色体为 4 倍体。

[0088] 在另一优选例中,当 R 与 1 离散时,则表明所述的样本中含有多倍染色体。

[0089] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文 (如实施例) 中具

体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0090] 图 1. 多重数字 PCR 基本流程。其流程包括样品 DNA 分离和稀释→ dPCR 样品混合→ dPCR 样品上样→ dPCR 扩增→ dPCR 结果分析。

[0091] 图 2. 多重数字 PCR 扩增芯片分析结果截图。

[0092] 图 3. 高分辨率染色体拷贝数分析示意图。多重数字 PCR 扩增芯片染色体绝对定量软件分析结果转移至 Excel,经计算显示正常母体 DNA 与不同比例 21-三体 DNA 混合染色体拷贝数实际测量值与其理论值相似。

具体实施方式

[0093] 本发明人经过广泛而深入的研究,首次提出应用 MDPCR 技术在孕妇外周血液中进行染色体异常疾病无创产前筛查,从而开发出一种早期、安全无创、准确、快速、适合大规模检测和临床应用的新方法。该方法利用多重技术富集胎儿游离 DNA,同时利用不同浓度荧光标记探针组合,荧光信号会集聚于不同区域,及不同的 PCR 循环数量,从而增加 MDPCR 多重性达 20-50 次以上。在此基础上完成了本发明。

[0094] 定义

[0095] “无创产前筛查”是指仅需采取妊娠对象外周血液,利用新一代 DNA 检测技术对母体外周血浆中的胎儿游离 DNA 片段进行检测分析,从而检测胎儿是否患染色体异常疾病—唐氏综合症(21 三体)、爱德华氏综合症(18 三体)、帕陶氏综合症(13 三体)和其他染色体非整倍体异常疾病。

[0096] “染色体异常疾病”或“染色体非整倍体异常疾病”是指染色体的数目异常和/或形态结构变化,可发生于每一条染色体上。通常,所述的染色体数量异常疾病包括单倍体疾病或多倍体疾病。例如,所述的单倍体疾病包括 5q- 综合征。所述的多倍体疾病包括 21 三体(唐氏综合症),18 三体(爱德华氏综合症),13 三体(帕陶氏综合症)和性染色体异常等。

[0097] 多重数字 PCR

[0098] 数字 PCR(digital PCR) 是近年来快速发展起来的一种新型定量分析技术,通过将单个样本分成超过数万,甚至数百万、数千万份分布于不同的反应单元,每个单元包含无或一个或多个拷贝的 DNA 模板,分别对这些 DNA 模板进行 PCR 扩增,然后对各个反应单元的荧光信号进行分析。dPCR 可不需要对照标准样品和曲线实现绝对定量分析。数字 PCR(digital PCR) 技术概念虽然在九十年代就提出(Sykes PJ et al. *Biotechniques* 1992, 13:444-449),但只是近年来随着技术发展而快速兴起的一种新型定量分析技术,通过将单个样本稀释、分成超过数万,甚至数百万、数千万份分布于不同的反应单元,每个单元包含无或一个拷贝的 DNA 模板,分别对这些 DNA 模板进行 PCR 扩增,然后对各个反应单元的荧光信号进行分析。dPCR 可不需要对照标准样品和曲线实现绝对定量分析。

[0099] 多重 PCR(multiplex PCR) 是在同一 PCR 反应体系里加上二对或更多对引物,同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应。一般 PCR 仅应用一对引物,通过 PCR 扩增产生一个核酸

片段。而多重 PCR(multiplex PCR) 是在同一 PCR 反应体系里加上二对或更多对引物,同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应。

[0100] 本发明所用的多重数字 PCR(multiplex digital PCR, MDPCR) 是在同一数字 PCR 反应体系里加上二对或更多对引物,同时扩增出多个核酸片段的数字 PCR 反应。尤其需要指出的是,将多重 PCR 技术与 dPCR 技术有机结合而形成的多重数字 PCR(MDPCR),根据 DNA 探针不同荧光度,DNA 扩增不同循环数及多种标记荧光同时使用,便可大幅提高数字 PCR 多重性达 20-50 以上,即同时在一个 PCR 反应单元内进行 20-50 个以上数字 PCR 反应。

[0101] 可用于本发明的多重数字 PCR 的特点有:(1) 高效性。在同一 PCR 反应管内同时检出多种核酸片段,或对有多个型别的目的基因进行分型。(2) 系统性。多重数字 PCR 很适宜于成组核酸片段的检测。(3) 经济简便性。多种核酸片段在同一反应管内同时检出,节省时间、试剂耗材和经费,为临床提供更多更准确的检测信息。

[0102] 检测染色体非整倍体的方法

[0103] 本发明提供了一种用于体外非诊断性检测染色体非整倍体的或用于对染色体异常疾病进行无创产前筛查的方法。

[0104] 本发明的方法包括步骤:

[0105] (a) 提供含有胎儿游离 DNA 的妊娠对象外周血样本;

[0106] (b) 从所述外周血样本分离去除细胞,并从去除细胞的所述样本中富集 DNA,得到 DNA 样本;

[0107] (c) 将所述 DNA 样本分为对照组和实验组,其中,

[0108] 在实验组中,以所述 DNA 样本为模板,用扩增目标染色体基因的 n_1 对第一引物对进行多重数字 PCR,并记录阳性点个数 C_1 与引物对数量 n_1 之比,记为 a_1 ,其中 $a_1 = C_1/n_1$,且 $n_1 \geq 2$,优选地, $n_1 \geq 5$;

[0109] 在对照组中,以所述 DNA 样本为模板,用扩增参照染色体基因的 n_2 对第二引物对进行多重数字 PCR,并记录阳性点个数 C_2 与引物对数量 n_2 之比,记为 a_2 ,其中 $a_2 = C_2/n_2$,且 $n_2 \geq 5$,优选地, $n_2 \geq 5$;

[0110] (d) 将所述 a_1 值与 a_2 值进行比较,从而确定目标染色体的倍数。

[0111] 其中,优选地,步骤 (b) 中所述的细胞为血液样本中的完整或破碎的血细胞,主要包括红细胞、白细胞、血小板等,此外还可以包括血浆蛋白等。去除方法可以通过本领域常规技术进行。经去除细胞的 DNA 样本为富集的 DNA 样本。

[0112] 此外,更优选地,步骤 (b) 中的 DNA 样本是经过片段化处理后的样本。可用于片段化处理的方法没有特别限制,为本领域技术人员熟知的方法,例如物理或生化处理,如碎化、超声处理、酶切等等。经过片段化处理后的片段化的 DNA 样本,通常其大小不超过 3000bp。

[0113] 本发明方法中,所述的目标染色体通常为现有发现的染色体数量变异并导致染色体异常疾病的染色体,优选地包括 21 号染色体、13 号染色体、18 号染色体、性染色体。而所述的参照染色体则为已知正常数目的染色体。例如,当目标染色体为 21 号染色体是,可以采用其它任意一条染色体(如 13 号、18 号)等为参照染色体。此外,可用于本发明的参照染色体为一个或多个。

[0114] 在本发明方法中,根据多重 PCR 的原理并根据本发明方法设计的步骤,本领域技

术人员可以获得以下 PCR 产物和染色体倍数结果的对应内容：

[0115] 计算 a_1/a_2 值记为 R，

[0116] 当 R 等于或约等于 0.5 (即接近于 0.5) 时，则表明所述的样本中所述目标染色体为单倍体；

[0117] 当 R 等于或约等于 1 (即接近于 1) 时，则表明所述的样本中所述目标染色体与参照染色体的倍数相同；

[0118] 当 R 等于或约等于 1.5 (即接近于 1.5) 时，则表明所述的样本中所述目标染色体为 3 倍体；

[0119] 当 R 等于或约等于 2 (即接近于 2) 时，则表明所述的样本中所述目标染色体为 4 倍体。

[0120] 在另一优选例中，当 R 与 1 离散时，则表明所述的样本中含有多倍染色体。

[0121] 当进行产前筛查时，还可以进一步获得：

[0122] R 等于或约等于 1.025 时，则表明所述的样本中只有 5% 胎儿游离 DNA 样本的目标染色体为三倍体，而其余 95% 妊娠母体 DNA 样本的目标染色体仍为二倍体。

[0123] 当 R 等于或约等于 1.05 时，则表明所述的样本中只有 10% 胎儿游离 DNA 样本的目标染色体为三倍体，而其余 90% 妊娠母体 DNA 样本的目标染色体仍为二倍体。

[0124] 引物集合

[0125] 本发明还提供了一种引物集合，采用本发明引物集合可以用于完成本发明体外非诊断性检测染色体非整倍体的或用于对染色体异常疾病进行无创产前筛查的方法。

[0126] 本发明的引物集合中，包含了扩增目标染色体的引物对，以及扩增参照染色体的引物对，二者引物对的数量分别为 n_1 对和 n_2 对。其中， n_1 和 n_2 分别为 ≥ 2 的正整数。优选地，可用于本发明引物集合的引物对的对数 n_1 和 n_2 分别为 3、4、5、6、7、8、9、10 对，优选至少 5 对。

[0127] 可用于扩增本发明目标染色体和参照染色体基因的引物通常没有特别限制。为任何现有技术中可以根据目标染色体基因和参照染色体基因模板而设计的引物对。可用于本发明的目标染色体和参照染色体没有特别限制，具体可如上文所定义。可用于本发明的目标染色体基因没有特别限制，可以为目标染色体上任意的基因。本领域技术人员可以根据本发明提供的方法来判断确定目标染色体和参照染色体。当确定了目标和 / 或参照染色体后，可以选取所述染色体上相应的基因作为模板，然后通过常规方法设计用于扩增所述模板的相应引物。

[0128] 通常，当目标染色体为 21 号染色体时，可选用的基因包括 Usp25 (NCBI#NM_001283041)、C21orf37 (NCBI#LN608865)、C21orf58 (NCBI#NM_058180)、Setd4 (NCBI#NM_017438)、C21orf62 (NCBI#AF231922) 等及其他基因位点和非基因位点；当目标染色体为 18 号染色体时，可选用的基因包括 Setbp1 (NCBI#NM_015559)、Potec (NCBI#NM_001137671)、Malt1 (NCBI#AB026118)、Dsc3 (NCBI#NM_001941)、Cdh19 (NCBI#NM_021153) 等及其他基因位点和非基因位点；当目标染色体为 13 号染色体时，可选用的基因包括 Sacs (NCBI#NM_014363)、Cenpj (NCBI#NM_018451)、Foxo1 (NCBI#NM_002015)、Smad9 (NCBI#NM_001127217)、Fgf14 (NCBI#NM_004115) 等及其他基因位点和非基因位点。而参照染色体则只需选择与目标染色体不同的染色体，并进一步

选择参照染色体上相应的基因及其他基因位点和非基因位点。

[0129] 优选地,引物集合中每对引物所扩增的基因模板长度为 50-150bp,较佳地,为 100-120bp。优选地,当目标染色体为 21 号染色体时,用于扩增目标染色体基因的引物对序列如 SEQ ID NO. :1-2 所示,所针对的基因为 *Usp25*;和 / 或当参照染色体为 18 号染色体时,所述用于扩增参照染色体基因的引物对序列如 SEQ ID NO. :4-5 所示,所针对的基因为 *Setbp1*。

[0130] 此外,用于多重数字 PCR 检测的引物对中,通常会采用标记物的形式来测定所扩增产物的绝对值并用于和对照进行比对。可用的标记物没有特别限制,可用是优选地,用于参照染色体和目标染色体的各引物对中至少一条连接有荧光标记,例如采用荧光标记探针进行引物扩增结果的显示,优选地,含有荧光标记探针的引物中,探针序列如 SEQ ID NO. :3(目标染色体)或 6(参照染色体)所示。

[0131] 采用本发明提出的精确定量的多重数字 PCR 方法,能同时检测同一条染色体上至少 5-10 个不同的基因位点,或短串联重复序列包括至少 4-6 个 STR 基座,并将胎儿和母体的 DNA 分子在超过数万,甚至数百万、数千万个不同的 PCR 单元进行单独分析,无交叉干扰,从而在低浓度胎儿游离 DNA 中检测出染色体拷贝数变化,基因点突变及单核苷酸多态性 (SNP)。例如,正常整倍体妊娠母体血浆样品每 100 微升含 10 个基因组当量 (genome-equivalents, GE) (其中 1 个当量来自于胎儿游离 DNA),即每 100 微升含 21 染色体拷贝数为 20 (18 母体拷贝数 +2 胎儿拷贝数),而 21 三体妊娠每毫升含 21 染色体拷贝数为 21 (18 母体拷贝数 +3 胎儿拷贝数),常规定量 PCR 尚不能这样精细分析 20 拷贝与 21 拷贝之间的细微区别。但采用 MDPCR 方法,能精确分析 20 拷贝与 21 拷贝之间的细微区别。

[0132] 试剂盒

[0133] 本发明还提供了检测染色体非整倍体和 / 或筛查染色体数量异常疾病的试剂盒。其中,所述的试剂盒中含有本发明的引物集合以及说明书。

[0134] 本发明试剂盒中含有的说明书记录了本发明检测目标染色体非整倍体的方法和 / 或对染色体异常疾病进行无创产前筛查的方法。

[0135] 本发明具有以下主要优点:

[0136] (1) 早期检测。正常妊娠情况下,胎儿细胞经过胎盘渗透至母体血液,细胞被母体免疫系统破坏,胎儿 DNA 游离于母血中。据报道,胎儿游离 DNA 最早在母血中能测到的时间为妊娠 5 周,而含量只有母血 DNA 的 5-10%,随着孕周增加而增多,妊娠中期时可达 25%,但存在个体差异。游离 DNA 半衰期短,分娩后短时间内消失。再加上其 DNA 片段较小,平均 166bp,常规 PCR 方法通常很难检测,而多重数字 PCR 方法由于具高灵敏性,能进行早期检测。

[0137] (2) 安全无创。只需抽取 5-10ml 母体外周血进行检测,同时避免胎儿宫内感染和孕妇流产。

[0138] (3) 准确。采用最新的多重数字 PCR 技术,由于检测的是染色体疾病发生的根本原因 (DNA 变化),而不是其结果 (生化指标筛查),检出率可达 99% 以上,假阳性率不超过 1%。据测算,如胎儿游离 DNA 占母体外周血 DNA 的 10%,只需 10000 个 PCR 单元分析,便可实现检出率达 99% 以上,假阳性率不超过 1% (Evans MI et al. *Fetal Diagn Ther* 2012, 31:244-247)。

[0139] (4) 快速。检测结果通常 12 小时内获得,价格只是新一代 DNA 测序技术的二分之一。

[0140] (5) 适合大规模检测和临床应用。多重数字 PCR 所具的多重性,高通量及高灵敏性,能将多种 DNA 片段在同一反应单元内同时检出,节省时间、试剂耗材和经费。其适应症包括所有妊娠妇女,尤其是试管婴儿治疗和多次流产的孕妇,35 岁以下错过染色体疾病筛查机会的孕妇,35 岁以上超过染色体疾病筛查适应年龄的孕妇,拒绝羊水穿刺或脐血穿刺的孕妇及有穿刺禁忌症的孕妇等。

[0141] 除了以上所述主要优点外,该方法的主要创新之处在于可利用至少四重技术从母体外周血 DNA 中富集胎儿游离 DNA,有利于早期检测胎儿游离 DNA;利用不同浓度荧光标记探针组合,优化不同 PCR 反应的循环数量从而增加 MDPCR 多重性达 20-50 次以上,使得多种核酸片段在同一反应管内同时检出,节省时间、试剂耗材和经费,为临床提供更多更准确的检测信息。

[0142] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如 Sambrook 等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0143] 实验材料:化学试剂购自 Sigma-Aldrich 公司;所用内切酶和其他分子生物学试剂购自 NEB 和 Promega 公司;Amicon® Ultra 10K 装置购自 Millipour 公司;引物购自 Invitrogen 公司,探针购自 Roche 公司;PCR 试剂和耗材购自 Life Technologies 公司。

[0144] 实施例 1. 应用 MDPCR 技术进行 21 三体检测

[0145] (1) 取 5ml 孕妇外周血液样本;

[0146] (2) 从所述外周血样本分离去除细胞,并从去除细胞的所述样本中消化血清或血浆蛋白,富集 DNA,得到 DNA 样本;

[0147] (3) 经 TaqI 酶切,使 DNA 片断化;

[0148] (4) 将酶切过的 DNA 样本分为对照组和实验组,应用多重数字 PCR(QuantStudio 3D dPCR) 技术在 Pro-Flex PCR 系统进行 21 三体检测(PCR 反应条件:95°C 10 分钟;60°C 2 分钟,98°C 30 秒,重复 44 次;60°C 2 分钟)。

[0149] (5) 将正常基因组 DNA 分别按 10%和 5%比例与 21 三体细胞系基因组 DNA 或 18 三体细胞系基因组 DNA 混合,先进行 Taq 酶切,使这些基因组 DNA 混合物片段化,片段大小约 200bp。以含 18 三体 DNA 混合样品作为对照,用这些模拟孕妇含 21 三体 DNA 混合样品进行多重数字 PCR,平行样品达 8 次。

[0150] 其中,21 染色体所选取的基因为 Usp25(NCBI#NM_001283041)、C21orf37(NCBI#LN608865)、C21orf58(NCBI#NM_058180)、Setd4(NCBI#NM_017438)、C21orf62(NCBI#AF231922) 等及其他基因位点和非基因位点,Usp25 基因引物如 SEQ ID NO.:1-2 所示,探针为 SEQ ID NO.:3 所示;18 染色体所选取的基因为 Setbp1(NCBI#NM_015559)、Potec(NCBI#NM_001137671)、Malt1(NCBI#AB026118)、Dsc3(NCBI#NM_001941)、Cdh19(NCBI#NM_021153) 等及其他基因位点和非基因位点,Setbp1

基因引物如 SEQ ID NO. :4-5 所示,探针为 SEQ ID NO. :6 所示。

[0151] 结果显示:当混合 DNA 浓度 = 5.7ng 时, Quantstudio 3D 数字 PCR 系统能从孕妇血浆中能准确检测小于 5% 和 10% 的 21 三体胎儿 DNA (图 2 和图 3)。这些结果被 300 例临床标本所证实。

[0152] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0001]

序列表

<110> 南京杰蒙生物技术有限公司
 <120> 多重数字PCR技术在染色体非整倍体筛查中的应用
 <130> P2014-0034
 <160> 6
 <170> PatentIn version 3.5

 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 寡核苷酸
 <400> 1
 gccaa gcaga tacaa atgtg 20

 <210> 2
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 寡核苷酸
 <400> 2
 ttccag tctc cctga atgc 19

 <210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 寡核苷酸
 <400> 3
 ctactgg ag atgataa aga tgat 24

 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 寡核苷酸
 <400> 4
 ccactt tea acacag ttag g 21

 <210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 寡核苷酸
 <400> 5
 ggctgg agat ttggc atag 19

 <210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 寡核苷酸
 <400> 6
 ggcaac ctga gccct gccag cac 23

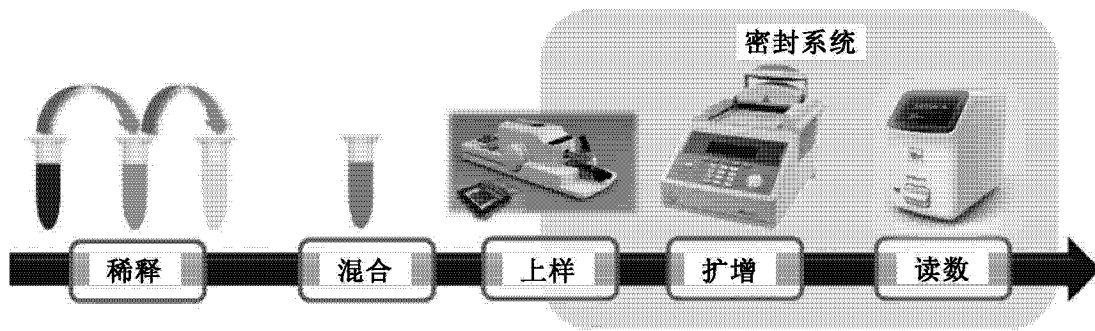


图 1

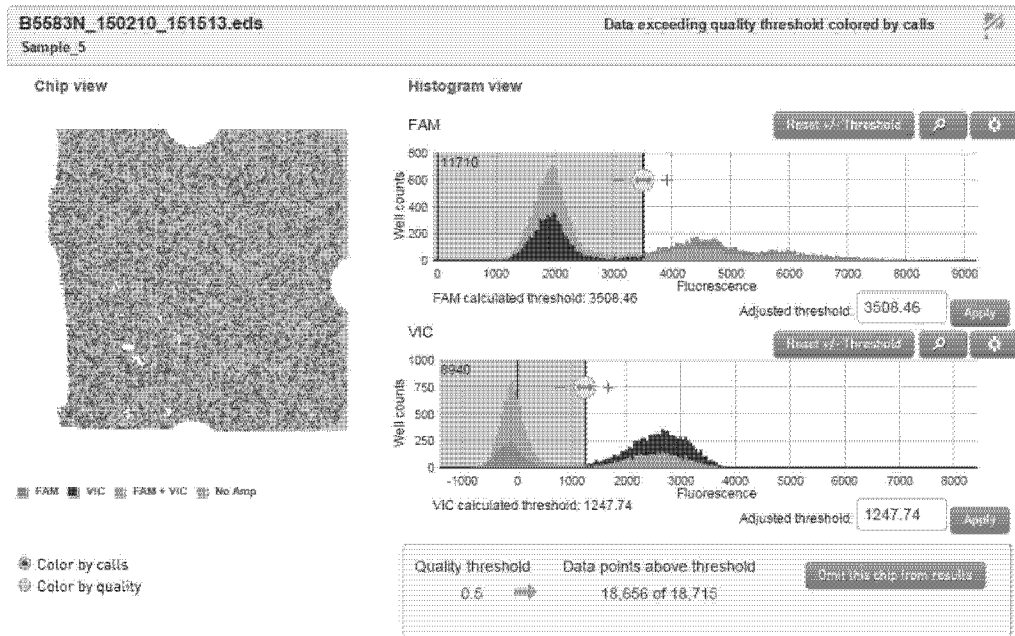


图 2

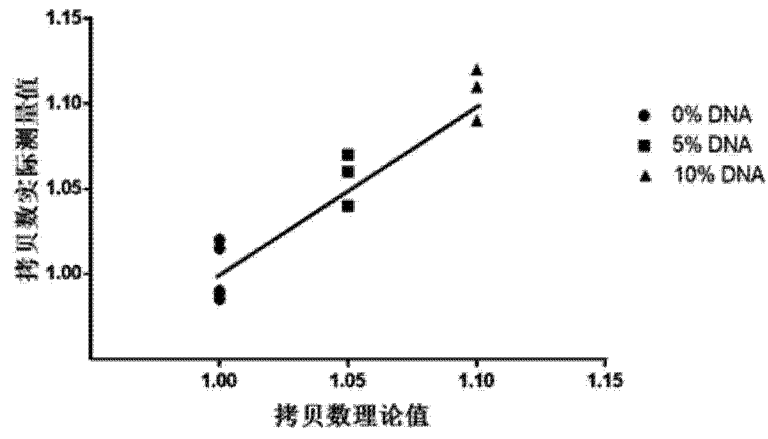


图 3