

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580020530.1

[43] 公开日 2007 年 6 月 13 日

[11] 公开号 CN 1981052A

[22] 申请日 2005.4.18

[21] 申请号 200580020530.1

[30] 优先权

[32] 2004.5.5 [33] US [31] 10/840,208

[86] 国际申请 PCT/US2005/013070 2005.4.18

[87] 国际公布 WO2005/111237 英 2005.11.24

[85] 进入国家阶段日期 2006.12.21

[71] 申请人 生物概念股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 Z·谢 S·韩 T·瓦达那斯库尔

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 范 征

权利要求书 4 页 说明书 25 页 序列表 10 页

[54] 发明名称

检测染色体病

[57] 摘要

在一次试验中检测非整倍性或某些突变，特别是微小缺失所致的多种染色体病中的任一种的方法和使用该方法的试剂盒。利用多对引物寡核苷酸进行聚合酶链式反应(PCR)来扩增真核基因组 DNA，其中每对的一条引物在其 5 端连有可检测标记。多对引物靶向感兴趣的染色体 DNA 区段，所述区段是潜在染色体病的指标，和一对靶向于对照基因的引物。纯化扩增的 PCR 产物，从中得到具有可检测标记的单链 DNA，使之与微阵列上各含 DNA 寡核苷酸探针的斑点杂交，所述探针的核苷酸序列与各靶区段一条链的核苷酸序列互补。拍摄微阵列各斑点上存在的标记的图像，并通过首先将该图像结果与对照基因特异性斑点的图像作比较，然后与得自正常 DNA 的图像结果作比较来诊断是否存在一个或多个感兴趣的靶 DNA 区段所表明的染色体病。

1. 一种在一次试验中检测多种染色体病中任一种的方法，所述方法包括以下步骤：

a 在容器中混合以下组分来制备聚合酶链式反应(PCR)混合物：

(i) 真核基因组 DNA；

(ii) 多对正向和反向 DNA 引物寡核苷酸，其中所述每对引物的一条与该真核 DNA 第一 DNA 链的靶区段 3 序列互补，另一条引物与该靶区段第二链的 3 序列互补，该真核 DNA 区段长约 50-300 个碱基对，其中每对引物的一条在其 5 末端连接有可检测标记，多对引物各自靶向所选择的感兴趣的染色体区段，该区段是潜在染色体病的指标，并有一对引物靶向对照基因的区段；和

(iii) 进行 PCR 扩增所需的 PCR 缓冲液和酶；

b 进行有约 5-60 轮温度循环的 PCR，产生扩增的 PCR 产物；

c 纯化步骤(b)的所述产物，获得含有可检测标记的单链 DNA；

d 使微阵列与步骤(c)的产物接触，所述微阵列具有多个斑点，各斑点含有的 DNA 寡核苷酸探针的核苷酸序列与所述各靶区段的所述链之一的核苷酸序列互补；

e 使所述 DNA 寡核苷酸探针与所述 PCR-扩增的含标记单链产物杂交；

f 拍摄该微阵列的图像来检测是否存在与该微阵列杂交的 PCR-扩增产物及其相对含量；和

g 将所述微阵列上所选择染色体的所述各靶区段相关斑点的图像与所述对照基因相关斑点的图像作比较，然后与已知正常的基因组 DNA 的类似测定所得结果相比较，来诊断是否存在与一种或多种所述选择的染色体有关的染色体病。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述诊断步骤包括在与相同性别正常基因组 DNA 的所述结果进行最后比较之前将规则算法应用于步骤(f)的检测结果。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,所选择的真核基因组 DNA 的至少两个靶区段与导致选自以下染色体病的染色体 DNA 的潜在微小缺失相关:

威廉斯综合征,
猫叫综合征, 和
迪乔治综合征。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,选择至少两个靶区段来检测选自以下的染色体畸变: 三体性 13、三体性 18、三体性 21 与 X-和 Y-染色体异常。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的方法,其特征在于,所述可检测标记是可检测颜色的标记。

6. 如权利要求 5 所述的方法,其特征在于,所述可检测颜色的标记与反向引物相连,每对引物的正向引物在其 5 末端磷酸化。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述可检测标记是荧光染料。

8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的方法,其特征在于,首先纯化步骤(b)的双链产物,然后用核酸外切酶消化该纯化产物的有义链得到步骤(c)的带标记的单链反义链。

9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述对照基因是 GAPD。

10. 如权利要求 1-9 中任一项所述的方法,其特征在于,所述探针的大小约为 25-60 个核苷酸,所述靶区段长约 100-200 个碱基对。

11. 如权利要求 1-10 中任一项所述的方法,其特征在于,平行使用两个微阵列,比较二者的图像结果作为杂交和成像步骤有效性的初步核查。

12. 一种检测染色体病的试剂盒,所述试剂盒包括:

a 在扩增哺乳动物基因组 DNA 的聚合酶链式反应(PCR)中用作引物的多对 DNA 寡核苷酸,其中每对寡核苷酸的一条引物与哺乳动物基因组 DNA 靶区段第一链的 3 核苷酸序列互补,每对寡核苷酸的另一条引物与该靶 DNA 区段第二链的 3 寡核苷酸序列互补,每对所述引物的一条在其 5 端共价连接有可

检测标记;

b. 所述多对 DNA 引物靶向扩增所选择的感兴趣的不同染色体的区段, 该区段是潜在染色体病的指标, 并有一对所述引物靶向扩增对照基因的区段;

c 进行(i) PCR, (ii) DNA-DNA 杂交和洗涤, 和(iii) 比色法定量测定所需的缓冲液和酶;

d 至少一个具有多个斑点的微阵列, 至少一个所述斑点连接有和各靶基因组 DNA 区段的携带标记的扩增链相互补的 DNA 序列; 和

e 利用 PCR 扩增产物和微阵列上各斑点之间杂交反应产生的图像结果强度来诊断染色体病的装置, 所述装置利用正常基因组 DNA 的类似测试的图像结果。

13. 如权利要求 12 所述的试剂盒, 其特征在于, 提供一对一式两份的微阵列和规则算法作为所述诊断装置的一部分来分析所述微阵列的所述强度扫描结果。

14. 如权利要求 12 或 13 所述的试剂盒, 其特征在于, 至少两对所述引物靶向哺乳动物基因组 DNA 的区段, 其中具有可能导致以下染色体病的染色体 DNA 的微小缺失:

威廉斯综合征,

猫叫综合征, 和

迪乔治综合征。

15. 如权利要求 12 或 13 所述的试剂盒, 其特征在于, 所述引物对靶向选择用于检测以下染色体畸变的至少两个 DNA 区段: 三体性 13、三体性 18、三体性 21 与 X-和 Y-染色体异常。

16. 如权利要求 12-15 中任一项所述的试剂盒, 其特征在于, 每对所述引物的一条具有荧光染料标记, 每对所述引物的另一条其 5 末端磷酸化。

17. 如权利要求 12-16 中任一项所述的试剂盒, 其特征在于, 所述引物的一对靶向作为对照基因的 GAPD。

18. 如权利要求 12-17 中任一项所述的试剂盒, 其特征在于, 探针的大小约为 25-60 个核苷酸, 靶 DNA 区段长约 120-200 个碱基对。

19. 如权利要求 12-18 中任一项所述的试剂盒，其特征在于，所述酶包括用于消化 PCR-扩增产物有义链的核酸外切酶。

20. 一种在一次试验中检测多种染色体病中任一种的方法，该方法包括以下步骤：

a 在容器中混合以下组分来制备聚合酶链式反应(PCR)混合物：

(i) 真核基因组 DNA；

(ii) 多对正向和反向 DNA 引物寡核苷酸，其中所述每对引物的一条与第一真核 DNA 链靶区段的 3 序列互补，另一条引物与该靶区段第二链的 3 序列互补，真核 DNA 区段长约 100-250 个碱基对，其中所述每对引物的一条其 5 端连接有可检测颜色的标记，多对引物靶向所选择的感兴趣的染色体的区段，这些区段是潜在染色体病的指标，并有一对引物靶向对照基因的区段；和

(iii) 进行 PCR 扩增所需的 PCR 缓冲液和酶；

b 进行有约 5-60 轮温度循环的 PCR 产生扩增的 PCR 产物；

c 纯化步骤(b)的所述产物，通过消化扩增的双链 PCR-产物的一条链获得具有可检测颜色标记的单链 DNA；

d 使微阵列与步骤(c)的产物接触，所述微阵列具有多个斑点，各斑点含有的 DNA 寡核苷酸探针的核苷酸序列与所述靶区段的所述链之一的核苷酸序列互补；

e 使所述 DNA 寡核苷酸探针与所述 PCR-扩增的含标记单链产物杂交；

f 拍摄该微阵列的比色图像来检测是否存在与该微阵列杂交的 PCR-扩增产物及其相对含量；和

g 首先将所述微阵列上感兴趣的各所述染色体的相关斑点的图像与所述对照基因相关斑点的图像作比较得到 I-比值；然后将各 I 比值与已知正常的基因组 DNA 的类似测试所得结果的 N-比值作比较，来诊断是否存在与一种或多种所述感兴趣的染色体有关的染色体病。

21. 如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述 I-比值经过规则算法，该算法包括首先使所有 I-比值与各自的 N-比值相比较得到各 C-因子，然后得到平均 C-因子，用该平均 C-因子来调整各 I-比值，然后用于最终诊断。

检测染色体病

发明领域

本发明涉及通过定量比较表明未知样品中可能丢失或明显突变的整条染色体和/或染色体中某区段的拷贝数,并将这些结果与正常样品作比较来检测非整倍性和突变,特别是微小缺失。更具体地说,本发明涉及胎儿染色体病,例如非整倍性,包括三体性 21(唐氏综合征)、三体性 13、三体性 18,和男女性染色体异常,和微小缺失综合征,包括猫叫综合征、威廉斯综合征(Williams-Beuren syndrome)和迪乔治综合征与其它类似疾病的产前检测。

发明背景

非整倍性是染色体突变的一种常见形式,其中细胞中各染色体数目比正常细胞中的数目增加或减少。互补的二倍体(diploid complement)中缺少一条染色体称为单体性,而存在额外的一条染色体称为三体性。三体性 21 是存在一条额外的染色体 21,它是非整倍性最常见的形式,导致唐氏综合征,一种潜在的严重智力迟滞的先天性疾病。

当存在适应症时,联用核型与羊水或绒毛膜绒毛样品作产前染色体病诊断已成为全世界高度发达国家的标准方法。核型是能特征鉴定互补染色体状态指征的集合;包括染色体总数、各型染色体的拷贝数和染色体形态。一般通过染色中期(或凝聚的)染色体来测定核型。因为直至近来分裂间期染色体因其分散状态和对染色技术不灵敏而无法目测,所以常用中期染色体。中期染色体可采用多种细胞学技术染色,染色后显示为纵向区段,通常称为条带。各染色体的带型是独特的,从而可明确鉴定含有任何异常的染色体。然而,这种分析需要培养细胞并制备高质量的中期染色体,可能要花 1-3 周。

有人试图不经培养细胞来分析染色体,美国专利号 5,447,841 描述了一种这样的方法。利用与存在于未培养的间期羊水细胞上的染色体特异性 DNA 靶

(序列)的荧光原位杂交(FISH)获得了快速的部分核型分析。在该方法中, 荧光标记的探针与结合在固体支持物上的染色体的互补位点杂交。该方法克服了常规细胞学染色方法因缺乏足够特异性的染色体染色所致的限制; 提供了含有标记核酸片段的异质性混合物的试剂, 该试剂可与特定染色体、染色体的特定亚组或特定染色体的特定亚区的 DNA 杂交。虽然 FISH 方法开创了能快速且高灵敏度地检测中期和间期细胞染色体病的可能性, 但它还是有一些缺点: 1) 许多微小缺失相关的染色体病因缺乏信号灵敏度而仍需要中期染色体和 2) 许多可同时诊断的染色体受限于荧光显微镜滤片分辨率。此外, 进行 FISH 方法需要高度熟练的技术人员和昂贵的仪器与试剂。

通过共同扩增第二种无关模板的 PCR 来定量测定 cDNA 种类的方法已有描述, 参见 Rappolee, D. A.等, *Science*, 241: 708-712, (1988)。该方法极其依赖某些变量, 包括循环次数和各种起始 mRNA 的用量。即使充分控制这些变量, 也不可能精确地使无关对照模板的扩增速率与未知模板相同。两种模板扩增速率中微小的差异在 PCR 期间被放大, 从而非常可能高估或低估所用的最终试验中存在的未知模板的含量。

Amhelm, Norman 等, 在“聚合酶链式反应”, Chemical & Engineering News, 36-47, (1990 年 10 月 1 日)中报导说 PCR 已用于遗传疾病的产前诊断来分析胎儿 DNA 以确定其是否含有可导致该疾病的突变形式的基因。PCR 扩增后, 利用标记探针测试 PCR 样品中是否存在导致疾病的等位基因。其报导说可在一份样品中测定是否存在几种不同的导致(疾病)的基因。该报道还表明在利用斑点印迹方式发现病原的检测方法中, PCR 检测方法已利用了基于酶、化学发光物质和荧光物质的报导物, 将 PCR 扩增产物点样在尼龙膜上, 然后使携带点样斑的该膜与能和感兴趣 PCR 产物特异性退火的单链 DNA 探针接触, 所述探针经放射性标记或用可被荧光物质或化学发光物质检测的分子来标记。该方法的局限是一次(只能)筛检一种分析物。所描述的另一方法是通过 PCR 在不干扰引物与靶(分子)退火或被聚合酶延伸的能力的核苷酸侧链中加入一标记来标记病原特异性产物本身。(该方法)提到了可通过一短的接头臂将引物的 5 端或引物序列内的碱基之一与荧光

染料,例如荧光素或维生素(生物素)连接而监测。然后提出合适的扩增 PCR 产物制备后,可用连接于固体支持物的非标记病原特异性探针“捕获”来检测该产物。由 Cetus Corporation 开发的该备选方法称为反向斑点印迹法。将所有过量的标记引物等洗去后,通过与细菌蛋白质链霉亲和素结合,然后用酶处理来检测是否存在分析物。所提出的另一种捕获(方法)是用荧光染料标记一种引物,用生物素标记另一种引物,然后用链霉亲和素捕获双链产物并检测荧光。(该文献)提到此捕获方法可利用不同的具体病原引物组(其中一种引物被标记)来同时检测不同的诊断性序列。(该文献)提出使总的 PCR 产物与具有不同区域的合适尼龙膜支持物杂交,其中每个区域含有对一种病原的 PCR 产物特异性捕获探针。杂交后用严谨条件洗涤支持物,如果标记物是生物素,可依次加入链霉亲和素-酶复合物与合适的酶底物在该特定区域中产生颜色而表明是否存在一种病原体。(该文献)提出此方法优于包括多步操作的原始斑点印迹法,因为后者需要在不同的杂交实验中用各种标记的病原特异性探针来测试未标记的不同 PCR 产物的等份试样。

授予 Bunn 等的美国专利号 5,213,961 公开了采用竞争性方法的定量 PCR 法,其中讨论了影响 DNA 扩增的参数和区分模板(测试和对照)比值与拷贝数差异的机制。(该文献)提出此方法可用于检测体细胞突变。Bunn 等阐述了主要由 DNA 引物和它们各自的引物结合位点性质所致的各种参数对扩增方法的影响;然而,该系统的局限在于利用了与靶(分子)足够接近的标准品从而使 PCR 以相同速率共同扩增靶(分子)和样品。此外,标准品必须不同于靶(分子)而可在以后通过酶促作用改变其长度,进而通过电泳分离并定量测定标准品和靶(分子)。

PCT 公布的申请 WO 94/03638 公开了利用存在于染色体 DNA 中的短串联重复性 DNA 序列和用于扩增该短串联重复性序列的 PCR 方法来检测非整倍性的其它方法。

授予 Han 的美国专利 5,888,740 在 PCR 反应期间利用经工程改造作为内部标准品的 DNA 模板来定量测定基因组 DNA 的水平。设计的这些对照 DNA 模板具有与测试样品 DNA 模板相同的 PCR 反应引物序列。扩增的目标是以相同

的速率进行,从而可控制扩增速率。然而,该方法每种染色体需要特定的内部对照,因而是复杂。此外,各染色体的 PCR 反应必须在微滴定板的不同孔中或其它容器中进行。

授予 Carey 的美国专利号 6,551,783 说明了一种基于在同时 PCR 试验中定量测定两种靶基因表达的方法,该试验所用的系统中荧光标记或报导探针从被扩增的 DNA 链上取代,其方式是荧光探针离开了邻近的猝灭染料。通过利用两种不同的荧光探针,可同时进行两种基因的多重 PCR。一种靶基因是普遍表达的标记基因,例如 GAPDH 或 DAD-1。所述方法局限在于一次(只能进行)一种未知靶(基因)的测定。

WO 94/23023 所述的另一方法根据对某靶基因、看家基因和它们的含有突变(例如,点突变、插入或缺失)的竞争性模板进行多重 PCR 来定量测定该靶基因。此方法复杂且费事,在最后的分析中还要利用凝胶电泳。

就同时筛检多种疾病而言,上述筛检染色体疾病的方法无一令人完全满意,因此仍要找寻易于使用且能快速提供结果的综合性筛检方法。

发明概述

本发明联用了基因组 DNA 的多重 PCR 与能和 PCR 产物杂交的可定量微阵列平台,通过提供以下优点克服了目前方法的缺点:1) 可同时覆盖非整倍性和突变,特别是微小缺失的综合性筛检;2) 24-48 小时内快速出结果;和 3) 便于使用。采用规则(rule-based)的诊断算法来解释微阵列的图像模式提高了定量测定结果的精确性。本发明提供能快速、精确、简便和廉价地检测染色体病的试剂盒与方法,这些试剂盒与方法可用于同时检测非整倍性(包括三体性 21、三体性 13、三体性 18 和性染色体,例如 X 染色体异常)和微小缺失,包括威廉斯综合征、猫叫综合征、迪乔治综合征、普-韦综合征和安格曼综合征(Angelman syndrome)(二者涉及染色体 15 的部分缺失)、卡尔曼综合征和类固醇硫酸酯酶综合征。

更具体地说,本发明提供利用 PCR、与染色体特异性探针的杂交(反应)和诊断(方法)来产前检测唐氏综合征与其它非整倍性和染色体病的试剂盒与方

法。通过利用规则算法改进了诊断结果。

在一具体方面, 本发明提供在一次试验中检测多种染色体病任一种的方法, 所述方法包括以下步骤: (a) 在容器中混合以下组分来制备聚合酶链式反应(PCR)混合物: (i) 真核基因组 DNA; (ii) 多对正向和反向 DNA 引物寡核苷酸, 其中所述每对的一条引物与该真核 DNA 的第一 DNA 链靶区段的 3 序列互补, 另一条引物与该靶区段第二链的 3 序列互补, 真核该 DNA 区段的长度约为 50 和约 300 个碱基对之间, 所述每对引物的一条在其 5 末端连接有可检测标记, 多对引物各自靶向于所选择的感兴趣不同染色体的某区段, 该区段是潜在染色体病的指标, 和一对靶向于对照基因的区段; 和(iii) 进行 PCR 扩增所需的 PCR 缓冲液和酶; (b) 进行约 5 到约 60 轮温度循环 PCR 以产生扩增的 PCR 产物; (c) 纯化步骤(b)的所述产物, 获得含有可检测标记的单链 DNA; (d) 使微阵列与步骤(c)的产物接触, 所述微阵列具有多个斑点, 各斑点含有 DNA 寡核苷酸探针, 该探针的核苷酸序列与所述各靶区段的所述链之一的核苷酸序列互补; (e) 使所述 DNA 寡核苷酸探针与所述 PCR-扩增的含标记单链产物杂交; (f) 通过拍摄该微阵列图像来检测是否存在能与该微阵列杂交的 PCR-扩增产物及其相对含量; 和(g) 通过将所述微阵列上所选择染色体的所述各靶区段相关斑点的图像与所述对照基因相关斑点的图像作比较, 然后与已知的正常基因组 DNA 的类似测试所得结果作比较, 来诊断是否存在与一种或多种所选择的的不同染色体有关的染色体病。

在另一方面, 本发明提供检测染色体病的试剂盒, 该试剂盒包括检测染色体疾病的试剂盒, 所述试剂盒装有: (a) 在扩增哺乳动物基因组 DNA 的聚合酶链式反应(PCR)中用作引物的多对 DNA 寡核苷酸, 其中每对寡核苷酸的一条引物与哺乳动物基因组 DNA 靶区段第一链的 3 核苷酸序列互补, 每对寡核苷酸的另一条引物与该靶 DNA 区段第二链的 3 寡核苷酸序列互补, 每对所述引物的一条 5 端共价连接有可检测标记; 所述多对 DNA 引物靶向所选的感兴趣的不同染色体的扩增区段, 该区段是潜在染色体病的指标, 和所述一对靶向对照基因扩增区段的引物; (b) 进行: (i) PCR, (ii) DNA-DNA 杂交和洗涤, 和(iii) 比色法定量测定所需的缓冲液和酶; (c) 至少一个具有多个斑点的微阵列, 至少

一个所述斑点连接有与各靶基因组 DNA 区段的携带标记的扩增链相互补的 DNA 序列；和(d) 利用 PCR 扩增产物和微阵列上各斑点之间杂交反应产生的图像强度来诊断染色体病的装置，所述装置利用了正常基因组 DNA 类似检测产生的图像。

在还有一具体方面，本发明提供在一次试验中检测多种染色体病中任一种的方法，该方法包括以下步骤：(a) 在容器中混合以下组分来制备聚合酶链式反应(PCR)混合物：(i) 真核基因组 DNA；(ii) 多对正向和反向 DNA 引物寡核苷酸，所述每对的一条引物与第一真核 DNA 链靶区段 3 序列互补，另一条引物与该靶区段第二链的 3 序列互补，真核 DNA 该区段长约 100 和约 250 个碱基对之间，其中每对引物的一条 5 末端连接有可检测的颜色标记，多对引物靶向于所选的感兴趣的不同染色体的区段，这些区段是潜在染色体病的指标，和一对靶向于对照基因的某区段；和(iii) 进行 PCR 扩增所需的 PCR 缓冲液和酶；(b) 进行约 5 到约 60 轮温度循环 PCR 以产生扩增的 PCR 产物；(c) 纯化步骤(b)的所述产物，通过消化扩增的双链 PCR-产物的一条链获得具有可检测颜色标记的单链 DNA；(d) 使微阵列与步骤(c)的产物接触，所述微阵列具有多个斑点，各斑点含有 DNA 寡核苷酸探针，该探针的核苷酸序列与所述靶区段的所述链之一的核苷酸序列互补；(e) 使所述 DNA 寡核苷酸探针与所述 PCR-扩增的含标记单链产物杂交；(f) 通过拍摄该微阵列比色图像来检测是否存在能与该微阵列杂交的 PCR-扩增产物及其相对含量；和(g) 首先通过将所述微阵列上感兴趣的各所述染色体的相关斑点图像与所述对照基因相关斑点的图像作比较得到 I-比值；然后每种 I 比值与已知的正常基因组 DNA 的类似测试结果所得的 N 比值作比较来诊断是否存在能与一种或多种感兴趣的所述不同染色体有关的染色体病。

优选实施方案详述

总体如上所述，本发明有助于检测染色体非整倍性异常，包括三体性 21、18、13 和性染色体异常，有时称为基因剂量异常或畸变。同时，可通过选择受影响基因区域(即，缺失区)内的靶序列或包含受影响基因区域的靶序列并比较

表明可能发生这种缺失的区域与内部对照和正常 DNA 的基因剂量来检测染色体突变,特别是形成某基因序列一部分缺失,导致称为微小缺失综合征的各种疾病之一的那些突变。这种染色体微小缺失综合征的一些例子和所靶向的缺失区域包括:普-韦综合征和安格曼综合征(Angelman syndrome)(缺失位点 15q11-q13)、威廉斯综合征(缺失位点 7q11.23)、猫叫综合征(缺失位点 5p)、卡尔曼综合征(缺失位点 Xp22.3)、迪乔治综合征(缺失位点 22q 11.2)、杜兴/贝克尔(Becker)综合征(缺失位点 Xp21)和类固醇硫酸酯酶缺陷(缺失位点 Xp22)。最好与同性别对象的正常 DNA 进行某些比较。

提供以下术语和首字母缩写的定义以更好地理解下文详述。

染色体病包括染色体中的或染色体数目的所有异常。例如,这包括检测染色体 21 的三体性、X-和 Y-染色体异常与检测突变,例如各基因中的缺失、插入和/或改变。

本申请使用的杂交指在 DNA 的互补链之间形成双螺旋结构,其中两条链之一优选固定在固体表面或基质上。

本文所用的退火指在杂交条件下使单链或热变性双螺旋核酸分析物与寡核苷酸探针或引物在缓慢降低的温度下或单一温度下培育,使探针或引物与该核酸分析物内的其互补序列结合。

分析物或核酸分析物用于描述 DNA 样品中作为分析对象的化合物。

标记或可检测标记(或“标签”)指可连接于核酸序列,从而能对其进行检测和/或定量测定的取代基团。例子包括放射性同位素标记,例如 ^{32}P 、 ^{33}P 和 ^{35}S ;显色指示剂,如荧光物质、化学发光物质或有色化合物;配体,如生物素;和可用质谱或其它光谱性能区分的化学基团。合适标记的更具体例子包括黄嘌呤染料、罗丹明染料、蔡胺、苯并噁二唑、芪、芪、吡啶、花青 3 和花青 5。虽然也可利用化学反应、酶促反应,或使标记与中间体配体杂交或退火来间接加入,优选将作为引物一部分的标记物直接掺入而引入核酸分析物中。

探针指用作经杂交反应而与核酸分析物中其互补序列相结合的试剂的核酸序列。本文所用捕获探针指一端结合到固体表面(即,被束缚的)而能在杂交

反应中将含互补序列的核酸或寡核苷酸捕获在该固体表面的探针。

序列指在含有 DNA 的 A、G、C、T 残基的核酸内，以特定顺序和链长连接在一起的碱基串。

互补或互补序列指能在严谨条件下形成双链(双螺旋)结构的两条序列。

靶、靶序列、靶链或靶核酸本文用于指存在的检测目标(例如通过与特异性 DNA 探针杂交)的核酸序列。有时术语“靶向”以广义使用，指选择某染色体的特定核酸区段。

“被束缚的”或“表面束缚的”在本文用于指通过表面官能团和 DNA 探针一端的官能团之间形成的共价键或其它强键而在一端结合于某表面的寡核苷酸 DNA 探针。

“固相杂交”指参与形成双螺旋结构的两条“反应链”中的一条被束缚于或者固定在固体支持物上的杂交反应。

“侧翼”或“边界”用于指接近、毗连和/或包括某染色体的 DNA 靶区段二末端的核酸区段。

“寡核苷酸”指可化学合成的短 DNA 链，其长度一般最多约 100 个核苷酸。

“基因”指一个遗传功能单位，包括编码蛋白质的序列、间插在基因中的内含(非编码)序列和调节基因功能的其它序列。

“微阵列”或“DNA 芯片”指能同时分析杂交反应的多重性，在某表面上或固定在某表面的微点上形成的表面束缚的 DNA 探针的两维或三维(3D)阵列，一般采取小型化形式，所含的各 DNA 探针阵列的中心间隔小于 1 毫米。

“引物”指具有游离 3'-OH 末端的寡核苷酸，其与“模板链”碱基配对，从而可用聚合酶延伸。例如在 PCR 反应中，与 DNA 模板退火的寡核苷酸引物可用作 DNA 聚合酶的底物(连同脱氧核苷 5'-三磷酸)，从而导致“引物延伸”。

“引物对”指能与核酸靶区段的相反链相结合的两条引物。

“PCR 片段”指聚合酶链式反应形成的长度确定(受模板上引发位点之间的间距所限定)的 DNA 片段。

“变性”或“变性的”指双螺旋核酸分子的两条链在该双螺旋不稳定的条

件(最常见的是升温(“热变性”))下分离(解离)。

“5'-端/末端”指核酸链的末端,该末端含有的核苷酸在其脱氧核糖上为非酯化碳-5。

“3'-端/末端”指核酸链的末端,该末端含有的核苷酸在其脱氧核糖上具有非酯化碳-3。

PCR- 聚合酶链式反应。

SSC- 柠檬酸钠盐水,含有 150 mM 氯化钠和 15 mM 柠檬酸钠的溶液。

申请人的诊断方法利用 PCR 先扩增相对于总 DNA 而言以低丰度存在的特异性 DNA 序列。当特异性 DNA 序列存在于起始 DNA 中时,采用 PCR 可将其扩增 10 万倍以上从而有助于检测。

美国专利号 4,683,202; 4,683,195; 4,800,159 和 4,965,188 提供了现已熟知的本发明所用 PCR 方法的细节,其内容纳入本文作为参考。通过利用与感兴趣特定区域侧翼序列互补的寡核苷酸引物以相反和重叠方向进行引物指导的 DNA 合成,PCR 可以在数小时内将 DNA 序列扩增几个数量级。利用对这种侧翼序列的了解可设计出用作引物的两条合成的单链寡核苷酸,其长度一般约 20 个核苷酸。选择的二引物各自的序列应与所选择的各侧翼序列碱基对互补。PCR 首先使双链靶 DNA 变性,然后使引物(每条链一条引物)与靶分析物侧翼的序列退火。每条引物与一条侧翼序列形成双螺旋从而使引物的 3 羟基末端面向靶分析物序列。加入 DNA 聚合酶和脱氧核糖核苷三磷酸导致形成始于引物并沿靶序列延伸的新 DNA 链,从而制备了该靶(序列)的一份拷贝。这些步骤,即 DNA 变性、引物退火和 DNA 聚合酶延伸代表了一轮 PCR; 每一步骤都在合适的温度下进行。延伸产物一般延伸和并包含了与位于该靶序列另一端引物互补的序列。因此,每条新的延伸产物在变性后可用作下一轮的模板。

通过采用重复多轮的高温模板变性、寡核苷酸引物再退火和聚合酶介导的延伸,可忠实地将 DNA 序列扩增几十万倍。PCR 一般需要了解模板或待扩增区段的 5 和 3 二末端的序列,从而为各模板设计两条不同的引物,一条有义链的正向引物和一条反义链的反向引物。

本发明的 PCR 方法利用多对包含不同寡核苷酸的引物, 这些寡核苷酸的作用是作为感兴趣的所需 DNA 区段的 DNA 合成起始点。各引物与待扩增双螺旋区段的两个 3' 边缘之一互补; 它们常称为正向和反向引物。正向引物的方向为基因的 5' 区域到 3' 区域(即, 它们与非编码链或反义链互补), 反向引物的方向为基因的 3' 区域到 5' 区域(即, 它们与编码或有义链互补)。引物在诱导引物延伸的条件下与其它 PCR 试剂, 即四种不同的脱氧核糖核苷三磷酸(或其类似物)、合适的合成酶与合适的缓冲液(“缓冲液”包含实现所需 pH 和离子强度的物质等)联用, 并维持于合适的温度。在聚合酶是 Taq 聚合酶或等效酶的 PCR 方法中, 缓冲液可含有 1.5-2 mM 镁盐, 优选 $MgCl_2$, 15-200 mM 各种核苷三磷酸, 1 mM 各引物, 和(例如)50 mM KCl, 10 mM Tris 缓冲液, pH 8.4 和 100 Cg/ml 明胶。进行 PCR 扩增的这种试剂盒可从许多供应商处购得。

利用引物序列设计和优化专业目前可得到的序列信息和已知的标准技术不难设计出用于检测人染色体病的合适寡核苷酸引物。可通过本领域已知的标准方法合成寡核苷酸, 例如通过利用自动化 DNA 合成仪, 如购自 Biosearch (Novato, Calif.); Applied Biosystems (Foster City, Calif.)和其它公司。本文所用引物应足够长从而可与一条链上毗邻于某染色体 DNA 区段的所选择侧翼位点特异性杂交, 所述区段是特别感兴趣的疾病的指标。这种 DNA 区段的长度最少可包含 14、15、16、17、18 或 19 个碱基对; 然而, 它们通常包含 20、30、40、50、60、70、80、90 或 100 个以上的核苷酸。待扩增的 DNA 区段往往长 100 和 250 个核苷酸碱基对 (bp)之间; 然而, 也可能需要扩增 50 和 300 bp 之间的区段, 例如当分析非整倍性时。探针和引物的长度可短至 14、15、16、17、18 或 19 个核苷酸, 但它们通常至少含有 20、30、40 或 50 个以上的核苷酸。

各引物应足够长从而在有合适的聚合酶和其它试剂, 例如上述试剂存在时能启动或引发延伸 DNA 产物的合成。合适的引物长度如熟知的那样取决于许多因素; 一般在实施本发明方法时, 所用的引物通常含有约 15-40 个核苷酸残基。较短的引物分子通常需要较低的反应温度来形成并维持支持链延伸反应的引物-模板复合物。

所用的引物需要与含有所选序列的待扩增核酸基本上互补,即引物必须能与含有所选序列(或其互补序列)的核酸结合,即杂交。虽然引物序列无需全部与模板精确互补;例如,非互补核苷酸片段或其它部分可与引物的5端相连。然而,引物序列的剩余部分优选与所选核酸序列互补,这是通常使用的。

总体上,通过PCR方法可扩增任何特定的核酸序列,只要足够详细地知道该序列两端足够多的碱基从而可制备能与所需序列(位于该核酸序列的所需相对位置)的不同链杂交的两条寡核苷酸引物。结果,将从一条引物合成的延伸产物与其模板(互补的)分离后,它可用作模板在下一轮中将另一引物延伸为长度确定的核酸。

在本发明一优选的实施方案中,引物成对使用。引物之一,即正向引物与靶DNA区段反义链3端的序列互补;该序列接近、毗邻和/或包含该靶区段的反义链3端。另一引物,即反向引物与靶DNA区段的有义或编码链3端的序列互补;该序列包含、毗邻和/或接近该靶区段的有义链3端。

引物的长度优选在约15和约40个核苷酸之间,更优选在约18和约35个核苷酸之间。连接于或固定在微阵列斑点上的探针的长度优选在约25和约60个核苷酸之间,更优选在约35和约50核苷酸之间。捕获标记产物的探针序列应含有足够的核苷酸,从而可在中等严谨杂交条件下杂交。如上所述,虽然探针可以2D阵列连接在平面基板的表面,但优选3D阵列。

可利用许多供应商的商品化DNA纯化试剂盒来适当地纯化人DNA,例如胎儿DNA,往往是得自羊水或可能得自母亲血液的产前DNA。可用荧光计和PicoGreen染料作为染色试剂来评估真核基因组DNA的浓度。或者,可通过标准DNA提取技术从胎儿细胞提取DNA,这些细胞可通过合适的方法,例如羊膜穿刺获得。适当稀释后,将纯化的胎儿DNA一等份加入PCR反应试管。在本发明优选的实施方案中,所加入的反应组分包括浓度合适的酶与含有维持所需pH和离子强度的物质的缓冲液,与其它反应条件加上合适量的脱氧核糖核苷三磷酸。

所选择的一套引物应对能表明感兴趣疾病的特定染色体的部分或区段具有特异性。例如,可能需要定量比较存在的所有染色体的拷贝数。或者,可能

需要与正常染色体相比较来确定某染色体是否有小部分丢失。为实现此目的，适当选择的引物应侧接作为所分析疾病指标的靶区域。此外，整套引物可包括设计用于扩增对照基因的一对(引物)。对照基因是存在于人真核 DNA 中，优选是普遍表达的并存在于用于诊断某疾病的靶区段的染色体以外的染色体中的基因。一种优选的基因是在染色体 12 上发现的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPD)。

对照基因的合适正向和反向引物与探针以及可用于诊断 5 种示例性的非整倍性染色体病的引物对的例子见下文。

就 GAPD 而言，引物可以是以下寡核苷酸序列：SEQ ID NO: 1 和 2。相应的探针序列包括 SEQ. ID NO: 19 的序列。

就女性中与 X 染色体数量异常相关的特纳(Turner)或三 X(Triple X)疾病而言或就男性具有一条以上 X 染色体的克兰费尔特综合征而言，可利用正向和反向引物对来制备包含 Xp22 区域的 158 bp PCR 片段。这些引物可具有 SEQ ID NO: 3 和 4 的序列。相应的探针可包含 SEQ. ID NO: 20 的序列。

为区分男性和女性并诊断克兰费尔特综合征的一些罕见病例，利用如 SEQ ID NO: 5 和 6 所示的引物对来制备与 Y-染色体上 SRY 基因相关的 148 bp PCR 片段。相应的探针可包含 SEQ. ID NO: 21 的序列。

为诊断三体 13 综合征，即三体性 13，设计了如 SEQ ID NO: 7 和 8 所示的引物对来制备与 ATP7B 基因相关的 127 bp PCR 片段。相应的探针可包含 SEQ ID NO: 22 序列。

为诊断爱德华综合征，即三体性 18，设计了如 SEQ ID NO: 9 和 10 所示的引物对来制备与 WDR7 基因相关的 154 bp PCR 片段。相应的探针可包含 SEQ ID NO: 23 序列。

为诊断唐氏综合征或三体性 21，设计了如 SEQ ID NO: 11 和 12 所示的引物对来制备与 SOD 1 基因相关的 124 bp PCR 片段。相应的探针可包含 SEQ ID NO: 24 序列。

下文是设计用于分析人染色体中微小缺失的某些引物对的例子。

就猫叫综合征而言，可采用合适引物对，如 SEQ ID NO: 13 和 14 所示

来制备靶向可能出现染色体 5 上潜在缺失位点的 TAS2R1 基因某区域的 167 bp PCR 片段。相应的探针可包含 SEQ. ID NO: 25 序列。

就威廉斯综合征而言，可采用合适引物对，如 SEQ ID NO: 15 和 16 所示来制备靶向可能出现染色体 7 上潜在缺失位点的 ELN 基因某区域的 138 bp PCR 片段。相应的探针可包含 SEQ. ID NO: 26 序列。

就迪乔治综合征而言，可利用合适引物对，如 SEQ ID NO: 17 和 18 所示来制备靶向可能出现染色体 22 上潜在缺失位点的 DGCR2 基因某区域的 145 bp PCR 片段。相应的探针可包含 SEQ. ID NO: 27 序列。

虽然认为上述几套正向和反向引物或相应的探针用于体现本发明各种特征的试验令人满意，但自从最初进行的工作以来，已开发了目前优选的三套引物和相应的探针来诊断这些异常中的三种疾病，并利用不同的标记开发了一套(引物和探针)来检测三体 13 综合征(三体性 13)，即 FGF9 基因。当只有少量 DNA 可由于试验时，优选该组引物和探针。这四套引物和探针示于下文并用于检测以下四种基因的异常：SRY、FGF9、WDR7 和 SOD1。目前优选这四套引物和探针来诊断相应的疾病。

就 SRY 而言：引物为 SEQ ID NO: 28 和 29；探针为 SEQ ID NO: 36。这些引物产生了 175 bp PCR 片段。

就 FGF9 而言：引物为 SEQ ID NO: 30 和 31；探针为 SEQ ID NO: 37。这些引物产生了 139 bp PCR 片段。

就 WDR7 而言：引物为 SEQ ID NO: 32 和 33；探针为 SEQ ID NO: 38。这些引物产生了 172 bp 碱基 PCR 片段。

就 SOD1 而言：引物为 SEQ ID NO: 34 和 35；探针为 SEQ ID NO: 39。这些引物产生了 129 bp PCR 片段。

已开发了另一套引物和探针来取代靶向染色体 13 上 ATP7B 基因而非靶向 FGF9 基因的引物和探针。当有至少约 10 ng DNA 可用于试验时，优选该套(引物和探针)，其中引物为 SEQ ID NO: 40 和 41，探针为 SEQ ID NO: 42 所示。

为便于该试验，提供了装有全部所需工具的试剂盒。例如，检测多种染色体病的试剂盒应包含：

(a) 在扩增哺乳动物基因组 DNA 的聚合酶链式反应中可用作正向和反向引物的多对 DNA 寡核苷酸, 设计这些引物来扩增感兴趣的哺乳动物染色体的靶 DNA 区段, 此区段是潜在染色体病的指标, 和一对靶向扩增对照基因的引物; 每对引物中的一条具有与其 5' 末端共价相连的可检测标记;

(b) 进行(i) PCR, (ii) DNA cDNA 杂交和洗涤, 和(iii) 比色法定量测定的缓冲液和酶;

(c) 至少一个含有多个斑点的微阵列(优选一式两份微阵列), 其中至少一个斑点连接有和带标记的各自靶基因组 DNA 区段的扩增链相互补的 DNA 探针序列; 和

(d) 利用 PCR 扩增产物和微阵列上各斑点之间杂交反应产生的图像强度诊断染色体病的装置, 该装置可利用正常基因组 DNA 相似测试产生的图像。

此微阵列具有多个其上连接有 DNA 探针的微斑点; 这些探针各自与扩增 DNA 的一条标记链互补。虽然可利用大量已开发的标记了靶 DNA 的阵列, 包括靶 DNA 的探针直接连接于平面基板或微滴定板孔中的两维试验阵列, 但优选三维生物芯片, 例如美国专利号 6,174,683 和名为“三维形式生物芯片”(Three Dimensional Format Biochips)的已公布国际申请 WO 02/059372 中所述的芯片。在这种三维试验中, 探针不连接于板孔的固体表面或载玻片或其它平板, 而是通过与聚合的水凝胶的微斑点相连而存在于三维阵列中。此排列(方式)将探针与固体表面分开, 从而为呈递探针和最终捕获标记的分子提供了更大的表面积。就试验中所用的各种不同的靶子而言, 每块载玻片上或微孔板的每个孔中优选具有多个这种 3D 微斑点。

除引物组和微阵列以外, 作为试剂盒分类目录一部分提供的物品是熟知物品, 它们商业可购得且通常作为任何 PCR 试剂盒的一部分而装入。提供了目前熟知的 PCR 方法细节的上述四份美国参考文献详述了这些物品。如上所述, 该试剂盒也装有适当的化学物质以协助杂交反应。将杂交溶液与载玻片或板孔培育后, 进行洗涤以除去未结合的标记的靶材料, 从而可以任何方法观察得到的载玻片, 例如当利用荧光染料时可用荧光检测器观察, 或根据该试剂盒选用的具体标记物的性质来使用其它合适的检测器。该试剂盒中提供了合适的算

法,可用之解释微阵列比色扫描的结果;开发的这种算法依据早先从对照样品得到的数据。

作为可用于检测非整倍性或微小缺失所致多种染色体病的具有本发明各种特征的试验方法的例子,首先要得到少量真核基因组 DNA。所述 DNA 可得自胎儿来源等;该试验常用于分析得自羊水的基因组 DNA。至少约 0.1 纳克的基因组 DNA 可认为足够;然而,可用多达 10 ng(当这种用量可得时)。可利用纯化试剂盒,例如商业可得的来常规纯化 DNA。纯化后,可适当评估某浓度和纯度,得到纯度和浓度的肯定值后,进行多重 PCR 反应。

可在体积约 50 微升的反应室中加入商业可购得的 PCR 系统的诸成分与根据不同染色体侧翼靶区域设计的一套数对引物,所述靶区域是需要检测的潜在疾病的指标。这些引物对当然应与连接在微阵列的斑点上的探针相一致,所述微阵列作为检测试剂盒的一部分提供。例如当检测微小缺失时,可将这些探针设计为优先与发生潜在缺失的区域中的正常反义链区段相结合,从而当在该探针处检测到强度很低时表明发生了这种微小缺失。这种引物对的数目可包括,例如甚至 100 对以上。然而,作为一个试剂盒的一部分,更常装有不同的 5-25 对(引物)。除了作为感兴趣染色体病的指标而选择多对引物外,试剂盒也可装有一对所选对照基因的特异性引物。所选择的每对引物最好能与染色体上可导致 DNA 序列扩增的位置结合,所述 DNA 序列为约 50-300 碱基对,更优选约 100 bp-250 bp,最优选约 120 bp-200 bp。提供了约 1 cM 的各正向和反向引物。当然,商品化 PCR 系统试剂盒中装有合适量的脱氧核糖核苷底物,合适的酶,例如 Taq 酶,优选能热启动的聚合酶,和缓冲液。

标记每对引物的一条,用 5-磷酸衍生另一条。在优选的实施方案中,正向引物 5 磷酸化,反向引物与可检测标记共价相连。虽然如上文定义所述有各种可包含的可检测标记,但优选比色标记,更优选利用荧光标记,例如花青。

PCR 复制方法一般进行约 5 到 60 轮温度循环;通常约 20-30 轮即足以产生有利于进行检测的所需量的各种扩增核酸序列。PCR 扩增完成后,采用标准方法,例如柱纯化(如,设计能保留大小为 100 个碱基对以上的分子)来纯化双链产物。可利用商品化试剂盒来帮助这种纯化。

纯化后,利用适合该目的核酸外切酶来消化纯化产物的有义链;结果,此步骤得到了 PCR 扩增的单链产物。消化后,用杂交缓冲液适当稀释消化的混合物。将得到的溶液加热至约 95℃的温度 5-10 分钟以使核酸外切酶灭活并使单链产物变性。将得到的标记反义链溶解于杂交溶液中,此溶液优选分为两等分从而可平行用于一式两份的一对微阵列。将各微阵列于合适的温度,例如 45℃在含有合适缓冲液的此溶液中杂交约 10-20 小时,优选约 14-16 小时。杂交后,用含有合适缓冲液的溶液洗涤各微阵列多次,然后利用激光扫描仪或一些相当的仪器进行荧光成像。当然,如果使用不同类型的比色标记,或者如果使用放射性或其它类型的已知标记物,可使用其它合适的扫描仪/检测器。

由于优选的试验方法消化扩增双链 PCR 产物的有义链,所提供的各微阵列具有探针,所述探针是从待检测核酸各延伸段有义链选出的区段和所选择的对照基因有义链的合适区段。下文给出了与所述引物对联用的相应探针的例子。探针的长度一般为约 25-约 60 个核苷酸。平行进行一式两份的微试验(microassay)后,记录各微阵列上探针的荧光强度,然后用规则算法将这些图像用于诊断。

首先将记录值除以内部标准品的信号强度,例如位于具有探针的斑点处的信号强度,将各探针的信号强度标准化,所述探针可以是染色体 12 上 GAPD 基因有义链的某区段。此初步计算得到了以各探针与所选择内部标准品比值形式的数值,称为其 I-比值。

然后比较一式两份载玻片各块上相同探针所得到的 I-比值。就 X 和 Y 染色体而言,如果一式两份载玻片之间某特定探针的这些比值的差异大于 30%,则感到那些数值可能不可靠,因此不作进一步计算。类似地,如果对一些其它染色体上靶区段的某特定探针的 I-比值差异大于 20%,此特定探针同样不作进一步计算和分析。(计算)经过这种排除后保留下的那些(比值)的两个 I 因子的平均值,然后使用此数值。

为提供分析这种未知样品所得结果的基础,首先分析几组已知正常的 DNA,然后用这些结果来测定各所选 DNA 序列的正常比值。例如,运行 12 份正常的男性样品,然后计算每份样品的各探针与对内部标准品(本文选择

GAPD 基因)的比值。然后计算这 12 个比值的平均值得到从正常男性 DNA 样品预计的“正常比值”(N-比值)。进行类似的方法分析 12 位正常女性的 DNA。类似地计算出这些数值的平均值,利用这些数值得到从正常女性 DNA 预计的 N-比值。

在下一分析步骤中,将待分析的未知 DNA 与内部标准品得到的初始比值(I-比值)分别除以相同性别人的各种 N-比值,得到的因子称为转换因子(C-因子)。采用该方法计算各探针的 C-因子。感到各 C-因子应该在约 1.25 和 0.75 之间,超出此范围的任何 C-因子判定为异常并不作随后的分析。计算微阵列上各探针的 C-因子后,计算除代表内部对照基因的探针以外的所有这些 C-因子的平均值得到平均 C-因子(当然是在 0.75-1.25 之间)。一旦建立了一式两份的一套微阵列的平均 C-因子后,将先前得到的各初始平均 I-比值除以该平均 C-因子从而得到各(探针的)校准比值(A-比值)。就微阵列的任何具体操作性运行而言,发现这一特别步骤可有效降低因内部标准品差异可能导致的总体变异;以此方式可将差异的总系数明显降低约 2-4%。

用平均 C-因子来校准 N-比值得到 A-比值后,采用另一规则诊断各探针,所述规则将偏离正常比值 25%医师的任何比值视作基因组 DNA 样品在该特定靶区段异常的指标。例如,如果表示男性样品染色体 21 的探针的信号与一式两份微阵列上所用内部标准品的 I-比值是 1.01,计算出此特定测试方法的平均 C-因子为 1.10,则该染色体 21 探针比值的再校准计算为: $1.01/1.10$ 等于 0.92(A-比值)。然后将 A-比值(即, 0.92)与先前发现约为 0.68 的正常男性样品的染色体 21 探针信号的 N-比值相比较。可看出该值比正常比值约高 35%;因此,该样品诊断为三体性 21。感兴趣的是,通常可接受的三体性 21 的理论值约为 1.02,该值合理地接近此分析所得的 0.92 再校准比值。

就所选择的各潜在疾病而言,可以相同方式分析各探针所得的数值,结果可在一次试验过程中诊断是否存在染色体病。例如,当检测到三体性疾病时,各探针的强度基本上较高,当在其它突变(处)发现微小缺失时,各探针的强度基本上较低。为证实利用微阵列的此测试方法,利用上述八种具体染色体病的各自 DNA 进行了测试,24 份已知正常的 DNA 样品和 48 份已知含有特定异常

的不同 DNA 样品得到的测试结果显示了 100%的灵敏度和 100%的特异性。虽然目前只检测了八种潜在的染色体病,但是明显不难在一个微阵列上进行这种测试可包括非整倍性和/或微小缺失的其它疾病,并完全可预计能得到类似的检测和诊断(结果)。

给出以下实施例提供目前已知的本发明最佳实施方式,所述方式利用针对多达 9 种不同染色体的探针和多套引物,其中 8 种引物针对潜在疾病。然而,应该理解给出这些实施例只是为说明目的,不能认为以任何方式限制本发明的范围,本发明的范围当然只受本文末尾的权利要求书所限定。

实施例 1

作为用于检测与八种不同染色体有关的非整倍性或微小缺失所致染色体病的试验方法的例子,得到并常规纯化了 10 ng 真核基因组 DNA。纯化后,利用表 1 所示配方进行多重 PCR 反应:

表 1. PCR 诸组分的体积

组分	用量(cL)
AmpliTaq Gold PCR Master Mix	25
纯化的基因组 DNA (UMB 1839-M, 2 ng/cL)	5
引物混合物	5
DEPC 水	15
总量	50

利用体积约 50 微升的反应室。将引物混合物中的各对引物(即, SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO: 18)设计为侧接在所选择用于检测各种染色体的靶区域。

引物混合物的浓度 (10×)范围是 1.25 cM 到 2.5 cM。市售 PCR Master Mix 含有合适量的脱氧核糖核苷底物、合适的酶(例如 Taq)和缓冲液。正向引物 5-磷酸化,反向引物与荧光标记物,即花青(Cy-3)共价相连。利用 ABI 9700 热循环仪扩增混合物的所有成分。PCR 循环时间和温度如下所示:

95℃、11', 96℃、1', 94℃、30", 55℃、30"和 70℃、30", 10 轮; 94

℃、30", 55℃、30"和 70℃、30", 13 轮; 60℃、10'。

PCR 扩增完成后, 利用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen)纯化所扩
增的双链物质。在 37℃用λ核酸外切酶(1.5 cL, 5 单位/cL, New England
BioLabs)消化所纯化物质的有义链 30 分钟。

将得到的标记的单链物质溶解于含有 3 × SSC 和 0.1 % Triton X-100
的杂交溶液中并分为两等份。使每份样品与在不连续位置结合了 9 种不同
探针(即 SEQ ID NO: 19 到 SEQ ID NO: 27)的 3D 微阵列杂交, 45℃温育 14
小时。在 37℃用含有 1×SSC 和 0.1%Triton X-100 的洗涤液洗涤 15 分钟除
去未结合的靶(分子)。然后室温用 10 mM MgCl₂ 和 5 mM Tris-HCl 缓冲液(pH
8.0)再洗涤 15 秒。干燥后, 用激光扫描仪(ScanArray Lite, Perkin Elmer)获
得各杂交的 3D 微阵列(A 和 B)的荧光图像。

如下所示, 采用规则算法分析图像:

表 2. 两个 3D 微阵列的荧光信号强度
60 的激光能量
85 的 PMT 获得(值)

基因	A	B
GAPD	31,177	32,908
Xp22	6,642	7,177
SRY	5,286	5,334
SOD1	31,223	33,624
ATP7B	21,703	23,202
WDR7	9,119	9,325
ELN	10,201	10,498
TAS2R1	9,650	9,825
DGCR2	11,579	13,181

首先计算各基因的信号与 GAPD 的信号的值。结果见表 3。

表 3. 各信号与内部标准品 GAPD 信号的初始比值(I-比值)

基因	A	B
Xp22	0.21	0.22
SRY	0.17	0.16
SOD1	1.00	1.02
ATP7B	0.70	0.71
WDR7	0.29	0.28
ELN	0.33	0.32

TAS2R1	0.31	0.30
DGCR2	0.37	0.40

然后计算各基因(比值)值的平均比值和差异百分比。

表 4. 两个 3D 微阵列之间的平均比值和差异百分比

基因	平均比值	两个 3D 微阵列之间的差异百分比
Xp22	0.22	2
SRY	0.17	5
SOD1	1.01	2
ATP7B	0.70	1
WDR7	0.29	3
ELN	0.33	3
TAS2R1	0.30	4
DGCR2	0.39	8

在该样品中, 差异百分比没有一个显示高变异。

表 5. 计算的转换因子和利用平均 C-因子校准的比值

基因	平均比值	N-比值	C-因子	A-比值
Xp22	0.22	0.19	1.14	0.20
SRY	0.17	0.17	1.02	0.15
SOD1	1.01	0.68		0.92
ATP7B	0.70	0.59	1.20	0.63
WDR7	0.29	0.26	1.13	0.26
ELN	0.33	0.35	0.96	0.30
TAS2R1	0.30	0.25	1.18	0.27
DGCR2	0.39	0.35	1.10	0.35
平均 C-因子			1.10	

在此样品中, 除 SOD1 以外所有基因的 A-比值在 N-比值的约 15% 以内, 这说明该样品中不存在这些基因所代表的疾病。SOD 的 A-比值是 0.92, 比 N-比值的 0.68 高 35%。该差异百分比的数量级表示样品来自受三体性 21 影响的对象; 此外, 三体性 21 的理论值是 0.93。由于所测试的 DNA 随后显示对象的 DNA 确实受到三体性 21 影响, 因此认为该测试证实了使用此试剂盒的诊断方法。

实施例 2

作为另一实施例, 实施了类似于实施例 1 所述的试验方法, 其中利用了靶向八种不同染色体的引物和探针。得到 10 ng 真核基因组 DNA 并常规纯化。

纯化后，利用与实施例 1 相同的配方进行多重 PCR 反应。

利用体积约 50 微升的反应室。使用与实施例 1 所用相同引物混合物和设计为侧接在待检测 9 种染色体靶区域的引物对。

引物混合物的浓度范围是 1.25 cM 到 2.5 cM。市售 PCR Master Mix 含有合适量的脱氧核糖核苷底物、合适的酶(例如 Taq)和缓冲液。正向引物 5-磷酸化，反向引物与荧光标记物，即花青(Cy-3)共价相连。

如实施例 1 所述进行 PCR 扩增、纯化(扩增产物)和消化纯化物质的有义链。

将得到的标记的单链物质溶解于含有 3 × SSC 和 0.1 % Triton X-100 的杂交溶液中并分为两等份。每份样品通过与实施例 1 所述相同的在不连续位置结合了 9 种不同探针的 3D 微阵列杂交，45cC 温育 14 小时。在 37cC 用含有 1×SSC 和 0.1%Triton X-100 的洗涤液洗涤 15 分钟除去未结合的靶(分子)。干燥后，用激光扫描仪(ScanArray Lite, Perkin Elmer)获得各杂交的 3D 微阵列(A 和 B)的荧光图像。

如下所示，采用规则算法分析图像：

表 6. 两个 3D 微阵列的荧光信号强度

70 处的激光能量

85 处的 PMT 获得(值)

基因	A	B
GAPD	45,888	45,918
XP22	15,407	16,675
SRY	背景	背景
SOD1	30,392	32,665
ATP7B	26,406	25,668
WDR7	10,193	10,014
ELN	17,115	15,766
TAS2R1	9,938	10,210
DGCR2	9,248	10,244

首先计算各基因的信号与 GAPD 的信号的值。结果见表 7。

表 7. 各信号与内部标准品 GAPD 信号的初始比值(I-比值)

基因	A	B
XP22	0.34	0.36

SRY	-	-
SOD1	0.66	0.71
ATP7B	0.58	0.56
WDR7	0.22	0.22
ELN	0.37	0.34
TAS2R1	0.22	0.22
DGCR2	0.20	0.22

然后计算各基因(比值)值的平均比值和差异百分比。

表 8. 两个 3D 微阵列之间的平均比值和差异百分比

基因	平均比值	两个 3D HydroArray(阵列) 之间的差异百分比
XP22	0.35	8
SRY	-	-
SOD1	0.69	7
ATP7B	0.57	3
WDR7	0.22	2
ELN	0.36	9
TAS2R1	0.22	3
DGCR2	0.21	11

在该样品中，无差异百分比显示高度可变性。

表 9. 所计算的转化因子和利用平均 C-因子调整的比值

基因	平均比值	N-比值	C-因子	A-比值
XP22	0.35	0.35	1.00	0.35
SRY	-	-	-	-
SOD1	0.69	0.65	1.06	0.70
ATP7B	0.57	0.56	1.02	0.57
WDR7	0.22	0.25	0.89	0.22
ELN	0.36	0.33	1.07	0.36
TAS2R1	0.22	0.25	0.88	0.22
DGCR2	0.21	0.32		0.22
平均 C-因子			0.99	

在此样品中，不存在 SRY 基因显示该对象是女性(因为缺乏 Y-染色体)；除 DGCR2 以外的所有其余基因的 A-比值在 N-比值的约 12%以内，这说明样品中不存在这些基因所代表的疾病。DGCR2 的 A-比值是 0.22，比 N-比值 0.32 低 31%。差异百分比的数量级表示样品是来自受迪乔治综合征影响的对象。

随后鉴定到所测试的 DNA 确实来自受迪乔治综合征影响的女性对象

的组织；因此认为该测试证实了使用此试剂盒的诊断方法。

实施例 3

为进行如以上实施例 1 所述的杂交，得到、纯化、扩增、消化和制备 0.3 ng 与实施例 1 所用相同的 DNA 样品。然而，在此试验中，只对基因 GAPD、XP22、SRY、FG9、WDR7 和 SOD1 进行试验。引物混合物所包含的多套引物是 SEQ ID NO: 1 和 2；SEQ ID NO: 3 和 4；SEQ ID NO: 28 和 29；SEQ ID NO: 30 和 31；SEQ ID NO: 32 和 33；SEQ ID NO: 34 和 35。

将得到的含有合适缓冲液的杂交溶液再分为两等份。每份样品与在不连续位置结合了 6 种不同探针的 3D 微阵列杂交；所用的探针是 SEQ ID NO: 19 和 20 与 SEQ ID NO: 36-39。如上所述进行培育，以相同方式洗涤除去未结合的靶(分子)。干燥后，用实施例 1 中所用的激光扫描仪扫描各微阵列获得其荧光图像。

采用规则算法以实施例 1 所述相同的方式分析结果。结果还是四种基因的 A-比值在 N-比值的 15%以内；例外的是 SOD1 的 A-比值。结果，使用 0.3 ng 的基因组 DNA 样品测定再次诊断为一位对象受三体性 21(唐氏综合征)影响。

虽然利用一些优选的实施方案描述了本发明，这些方案构成了本发明人目前已知的实施其发明的最佳方式，但是应该理解本领域的普通技术人员明显可作出各种改变或改进而不脱离如本文附加的权利要求书所述的本发明范围。例如，虽然优选使用至少含有本文所述全部序列的探针，但如果需要也可使用(含有)所述序列的主要部分的探针。所提及的所有美国专利和申请与文章的内容专门纳入本文作为参考。

序列表简述

SEQ ID NO 1 和 SEQ ID NO 2 是用于扩增人 GAPD 基因的 139 个碱基对区段的引物。

SEQ ID NO 3 和 SEQ ID NO 4 是用于扩增 X-染色体的 158 个碱基对区

段的引物。

SEQ ID NO 5 和 SEQ ID NO 6 是用于扩增人 SRY 基因的 171 个碱基对区段的引物。

SEQ ID NO 7 和 SEQ ID NO 8 是用于扩增 ATP7B 基因的 127 个碱基对区段的引物。

SEQ ID NO 9 和 SEQ ID NO 10 是用于扩增人 WDR7 基因的 151 个碱基对区段的引物。

SEQ ID NO 11 和 SEQ ID NO 12 是用于扩增 SOD1 基因的 124 个碱基对区段的引物。

SEQ ID NO 13 和 SEQ ID NO 14 是用于扩增人 TAS2R1 基因的 167 个碱基对区段的引物。

SEQ ID NO 15 和 SEQ ID NO 16 是用于扩增 ELN 基因的 138 个碱基对区段的引物。

SEQ ID NO 17 和 SEQ ID NO 18 是用于扩增 DGCR2 基因的 145 个碱基对区段的引物。

SEQ ID NO 19 到 SEQ ID NO 27 是 5 末端设计为与微阵列板上的斑点相连, 3 区域设计为能与一条消化后的各扩增 PCR 产物杂交的探针寡聚物。

SEQ ID NO 28 和 SEQ ID NO 29 是用于扩增人 SRY 基因的 175 个碱基对区段的引物。

SEQ ID NO 30 和 SEQ ID NO 31 是用于扩增 FGF9 基因的 139 个碱基对区段的引物。

SEQ ID NO 32 和 SEQ ID NO 33 是用于扩增人 WDR7 基因的 172 个碱基对区段的引物。

SEQ ID NO 34 和 SEQ ID NO 35 是用于扩增 SOD 基因的 129 个碱基对区段的引物。

SEQ ID NO 36 到 SEQ ID NO 39 是 5 末端设计为与微阵列板上的斑点相连, 3 区域设计为能与一条消化后的各扩增 PCR 产物杂交的探针寡聚物。

SEQ ID NO 40 和 SEQ ID NO 41 是用于扩增 FGF9 基因某区段的引物。

SEQ ID NO 42 是 5 末端设计为与微阵列板上的斑点相连，3 区域设计为能与一条消化后的 FGF9 基因的 PCR 扩增区段杂交的探针寡聚物。

<110>	生物概念股份有限公司(Biocept, Inc.)	
<120>	检测染色体病	
<130>	81665/6776	
<140>	10/840, 208	
<141>	2004-05-05	
<160>	42	
<170>	PatentIn version 3.2	
<210>	1	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	1	
	tggatgaagca ggcgtcgga	19
<210>	2	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	2	
	aagtggatcgt tgaggcaat gc	22
<210>	3	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	3	
	caggaggcg ttctcaagg at	22
<210>	4	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工	

<220>

<223> 引物

<400> 4

tccaagagga aatccccacc ct

22

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400> 5

cgcatcctc ggtggtctc gc

22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400> 6

ctgtgcctcc tggaagaatg gc

22

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400> 7

acatgggtccc tgaggtcttc gg

22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400> 8

gtccattga aggcaagtc cg

22

<210> 9	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 9	
ccgccacgaa ggttgagaac aa	22
<210> 10	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 10	
tcaaacatcg tccaccccag gg	22
<210> 11	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 11	
agcagatgac ttgggcaaag gt	22
<210> 12	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 12	
ggcctcagac tacatccaag gg	22
<210> 13	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	

<223> 引物

<400> 13
tgttgctgag ttctcagtgc catt 24

<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探针

<400> 14
tcaggaagga caggatagac agca 24

<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 15
cgttggtgct actgcttggt gg 22

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 16
cgctccctc ttgtttcctt gc 22

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 17
cccgtgaagt tccatgtgcc a 21

<210> 18

<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	18	
	agattaagcg ggttctgtgc ga	22
<210>	19	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	探针	
<400>	19	
	ctacactgag caccaggtgg tctcctctga ctccaacagc gacac	45
<210>	20	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	探针	
<400>	20	
	ctcaaggata agagcgacac ggcctgacag tcactagtat tcatt	45
<210>	21	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	探针	
<400>	21	
	tctagagaat cccagaatgc gaaactcaga gatcagcaag cagct	45
<210>	22	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	探针	

<400> 22
ctgataagtg atgacggcct ctiggttgct gaggagact ttgac 45

<210> 23
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探针

<400> 23
acgtattccg tctgcacagg caaccaaggc cagtagaaag ctatg 45

<210> 24
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探针

<400> 24
caaaggtgga aatgaagaaa gtacaaagac aggaaacgt ggaag 45

<210> 25
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探针

<400> 25
gctcttgatt ttctctctgg ggaggcacac ccggcaaatg agaa 44

<210> 26
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探针

<400> 26
gaatgtaaac cctttgtaac cccatcccat gccctccga ctcc 44

<210> 27
<211> 46
<212> DNA

<213>	人工	
<220>		
<223>	探针	
<400>	27	
cagagacaca aacatacaaa ggaaagatcc agacattcaa cgtaga		46
<210>	28	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	28	
tggctttcgt acagtcattcc ct		22
<210>	29	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	29	
cacagaaatt acaggccatg caca		24
<210>	30	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	30	
ctcatcaaac ctatataagc acgtggacac tgga		34
<210>	31	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	31	
gggtccactg gtctaggtaa aaaatgtgtg aattt		35

<210> 32	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 32	
tgcctcagtt tctagtcagc caat	24
<210> 33	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 33	
aggtctttac cccaggcatt caca	24
<210> 34	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 引物	
<400> 34	
tttgggtatt gttgggagga ggtagtgatt actt	34
<210> 35	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 35	
tctgtcttt gtactttctt catttcacc ttg	35
<210> 36	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 探针	

<400> 36	
tcttcgccctt ccgacgaggt cgatacttat aattcgggta ttctct	45
<210> 37	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 探针	
<400> 37	
gatactatgt tgcattaaat aaagatggga ccccgagaga aggga	45
<210> 38	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 探针	
<400> 38	
cagcccaaag ttatcttctt aaatttttta caggtccatg aaaaa	45
<210> 39	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 探针	
<400> 39	
cagcccaaag ttatcttctt aaatttttta caggtccatg aaaaa	45
<210> 40	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 40	
gattctcatg ggttgccag gata	24
<210> 41	
<211> 24	
<212> DNA	

<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	41	
actccagagc	tcaaagtaac ccac	24
<210>	42	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	探针	
<400>	42	
acatcttctg	tctattgaaa ggcaacttac ggctgggcgt ggtg	44