



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02812662.9

[45] 授权公告日 2007 年 12 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 100352939C

[22] 申请日 2002.8.30 [21] 申请号 02812662.9

[30] 优先权

[32] 2001.8.31 [33] US [31] 09/944,951

[86] 国际申请 PCT/GB2002/003941 2002.8.30

[87] 国际公布 WO2003/020974 英 2003.3.13

[85] 进入国家阶段日期 2003.12.24

[73] 专利权人 香港中文大学

地址 中国香港新界

[72] 发明人 卢煜明 潘烈文

[56] 参考文献

CN1283235A 2001.2.7

US6251594B1 2001.6.26

WO 0070090 A1 2000.11.23

Quantitative DNA methylation analysis by fluorescent polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism using an automated DNA sequencer. SUZUKI HIROMU ET AL. ELECTROPHORESIS, Vol. 21 No. (5). 2000

审查员 刘红霞

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司

代理人 梁兴龙 王达佐

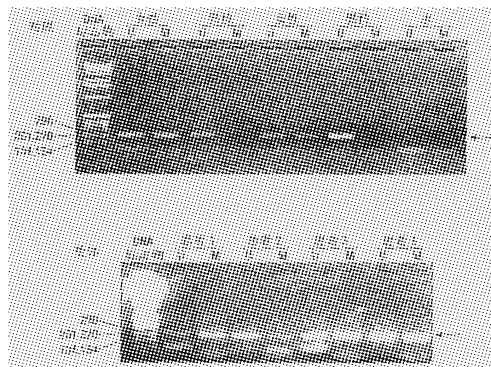
权利要求书 4 页 说明书 23 页 附图 4 页

[54] 发明名称

检测来源于不同个体的 DNA 的方法

[57] 摘要

在第一个方面，本发明涉及区分生物样品中来源于不同个体的 DNA 种类的方法。这些方法可以被用于区分或检测母体样品中胎儿 DNA 或区分器官供体 DNA 和器官受体 DNA。在优选实施方案中，通过观测 DNA 种类中的非遗传差异如 DNA 甲基化的差异，可将 DNA 种类区分开来。在第二个方面，本发明涉及通过检测从母亲获得的生物样品中的胎儿 DNA 来检测胎儿遗传异常的方法。在第三个方面，本发明涉及区分来源于器官供体 DNA 和器官受体 DNA 种类的方法。在第四个方面，本发明涉及用于区分生物样品中来源于不同个体的 DNA 种类的试剂盒。



1. 一种区分生物样品中来源于不同个体的 DNA 种类的方法,包括检测这些 DNA 种类间非遗传差异的步骤,所述的非遗传差异是 DNA 甲基化差异。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的生物样品是血浆或血清。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的生物样品是血液。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的个体之一是怀孕的女性,而其它的个体是未出生的胎儿。
5. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的个体之一是移植受体,而其它的个体是器官供体。
6. 如权利要求 5 所述的方法,其中所述的移植是骨髓移植。
7. 如权利要求 1 所述的方法,还包括测定具有非遗传差异的 DNA 种类浓度的步骤。
8. 如权利要求 1 所述的方法,还包括向所述的生物样品或向所述的 DNA 种类中加入亚硫酸氢钠的步骤,以检测 DNA 甲基化差异。
9. 如权利要求 1 所述的方法,还包括进行甲基化特异性聚合酶链反应的步骤以检测 DNA 甲基化差异。
10. 如权利要求 8 所述的方法,还包括测序 DNA 的步骤,以检测 DNA 甲基化差异。

11. 如权利要求 8 所述的方法，还包括进行引物延伸的步骤，以检测 DNA 甲基化差异。

12. 如权利要求 4 所述的方法，其中所述的生物样品是母体血浆或血清。

13. 如权利要求 12 所述的方法，还包括测定母体血浆或血清中胎儿 DNA 浓度的步骤。

14. 如权利要求 12 所述的方法，其中胎盘中胎儿细胞的非遗传差异被用作母体血浆或血清中的胎儿特异性标志物。

15. 如权利要求 5 所述的方法，还包括测定供体和受体 DNA 浓度的步骤。

16. 如权利要求 1 所述的方法，其中一个个体是男性，而其它的个体是女性。

17. 如权利要求 16 所述的方法，其中所述的非遗传差异存在于所述女性个体的失活 X 染色体。

18. 如权利要求 17 所述的方法，其中在所述的失活 X 染色体上的甲基化 DNA 序列被用于检测来源于女性个体的 DNA。

19. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的非遗传差异是在细胞内被分析的。

20. 如权利要求 19 所述的方法，其中所述的非遗传差异是利用原位甲基化特异性聚合酶链反应进行分析的。

21. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的非遗传差异被用于分拣或分离来自于所述个体的细胞。

22. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的非遗传差异被用于纯化来自于所述个体的 DNA。

23. 确定 DNA 种类甲基化状态的试剂在制备用于区分生物样品中来源于不同个体的 DNA 种类试剂盒中的用途。

24. 如权利要求 23 所述的用途，其中所述的试剂盒中用于确定母体 DNA 甲基化状态的试剂是亚硫酸氢钠。

25. 如权利要求 23 所述的用途，其中所述的试剂盒还包含一种或多种用于检测 DNA 存在的试剂。

26. 如权利要求 23 所述的用途，其中所述的试剂盒还包含一种或多种用于扩增生物样品中存在的 DNA 的量的试剂。

27. 如权利要求 23 所述的用途，其中所述的试剂盒还包含一种或多种用于获取 DNA 样品的装置。

28. 如权利要求 23 所述的用途，其中所述的试剂盒还用于测定怀孕母体血浆或血清中未出生胎儿的 DNA 浓度。

29. 如权利要求 28 所述的用途，其中所述的经测定的胎儿 DNA 浓度被用于预测、监测或者诊断或预示疾病。

30. 如权利要求 28 所述的用途，其中所述 DNA 甲基化状态与胎儿或母体的疾病相关。

-
31. 如权利要求 30 所述的用途，其中所述的疾病是染色体异倍体性。
32. 如权利要求 31 所述的用途，其中所述的染色体异倍体性是 21 号染色体三倍体性。
33. 如权利要求 30 所述的用途，其中所述的疾病是先兆子痫。
34. 如权利要求 30 所述的用途，其中所述的疾病是印迹疾病。
35. 如权利要求 34 所述的用途，其中所述的疾病是 Prader-Willi 综合症。
36. 如权利要求 34 所述的用途，其中所述的疾病是 Angelman 综合症。
37. 如权利要求 23 所述的用途，其中所述的试剂盒还用于测定器官供体和器官受体 DNA 浓度。
38. 如权利要求 37 所述的用途，其中所述的测定被用于预测移植受体的临床进展。

检测来源于不同个体的 DNA 的方法

发明背景

在体液中来源于不同个体的 DNA 的存在在许多临床和生物状况中都是众所周知的生物学现象。例如，在骨髓移植之后，移植受体的造血系统将由变化比例的供体和受体细胞组成。通过检测供体和受体之间的遗传差异，包括性别(Mangioni *et al.*, *Bone Marrow Transplant* 20:969-73 (1997))和 DNA 多态性(Roux *et al.*, *Blood* 79:2775-83 (1992))，已经可以确定供体或受体细胞的数量。此方法的必然结果是，如果在被分析区段供体和受体之间不存在遗传差异，那么用本方法进行分析将是不可能的。

举另一个例子，在怀孕期间，在母体血浆和血清中检测胎儿的 DNA 在先前已经被证明是可行的(Lo *et al.*, *Lancet* 350:9076:485-7(1997))。这一技术表明，从母体血浆和血清分离得到的胎儿 DNA 可被用于非侵入性的产前诊断(Lo *et al.*, *N Eng J Med*, 339(24):1734-8 (1998); Faas *et al.*, *Lancet* 352(9135): 1196 (1998); Amicucci *et al.*, *Clin Chem* 46(2):301 (2000); Chen *et al.*, *Prenat Diagn* 20(4):355-7 (2000); Saito *et al.*, *Lancet* 356:1170(2000))。在母体血浆和血清中这种循环的胎儿 DNA 具有相对较高的绝对和相对浓度(Lo *et al.*, *Am J Hum Genet* 62:768-775(1998))，这有助于这一现象在临床上的应用。应用这种方法，对多种病症进行非侵入性的产前检测已经获得了成功，包括恒河猴 D status 胚胎(Lo *et al.*, *New Eng J Med*, 339:1734-1738(1998))，肌强直性营养不良(Amicucci *et al.*, *Clin Chem* 46:301-302 (2000))，软骨发育不全(Saito *et al.*, *Lancet* 356:1170 (2000))和某些染色体易位(Chen *et al.*, *Prenat Diag* 20:335-357 (2000); Chen *et al.*, *Clin Chem* 47:937-939 (2001))。所有目前这些方法都利用了对从父亲遗传的 DNA 序列的检测，该 DNA 序列能够从遗传学上与从母亲遗传的 DNA 序列区分开来(Bianchi, *Am J Hum Genet* 62(4): 763 (1998))，特别是，对母体血浆或血清中胎儿从母亲遗传的 DNA 的检测被认为是不可能的。对从母体血液的细胞成分分离得到的胎儿有核细胞的检测也受

到类似的限制(Lo *et al.*, *Ann N Y Acad Sci*, 731:204 (1994))。

其他人已经从癌症患者中检测到异常甲基化的 DNA, 据报道这一现象出现在患有不同癌症的患者中, 包括肺癌(Estaller, *et al.*, *Cancer Res* 59(1):67 (1999))和肝癌(Wong *et al.*, *Cancer Res* 59(1):71 (1999))。

最近, 人们的很多兴趣集中在非遗传现象的生物学上, 即改变了表现型但并没有伴随 DNA 序列的变化的过程(Wolffe, *Science* 286:481-486 (1999))。最典型的非遗传过程之一是 DNA 甲基化(Wolffe *et al.*, *Curr Biol.* 10:R463-R465 (1999))。利用 DNA 种类之间的非遗传差异而不是遗传差异对生物体液中来源于不同个体的 DNA 种类加以辨别的方法将会是非常有价值的。例如, 对母体样品中胎儿 DNA 的非遗传检测将预示着一个重大的进展, 使另外的筛选和诊断方法成为可能。

发明概述

在第一个方面, 本发明涉及区分生物样品中来源于不同个体的 DNA 种类的方法。在优选实施方案中, 本发明的方法被用于区分或检测母体样品中胎儿 DNA 或区分器官供体 DNA 和器官受体 DNA。

本领域所属技术人员应当理解, 从个体获取的生物样品可以从任何液体或细胞样品中采取, 然而在优选实施方案中体液为血浆或血清。在优选实施方案中, 通过观测 DNA 种类中的非遗传差异如 DNA 甲基化的差异, 可将 DNA 种类区分开来。例如, 在一个 DNA 种类来自于男性, 而一个 DNA 种类来自于女性的情况中, 非遗传标志物可能是女性个体失活的 X 染色体。在此实施方案中, 在失活的 X 染色体上的甲基化 DNA 序列可以被用于检测来源于女性个体的 DNA。在某些实施方案中, 非遗传差异可以在细胞内部分析。此外, 在某些实施方案中, 非遗传差异可以用原位甲基化特异性聚合酶链反应进行分析。此外, 非遗传差异可以被用于分拣或分离来自于各个个体的细胞或者纯化来自于各个个体的 DNA。本发明的方法可以在测定或不测定 DNA 种类浓度的情况下进行, 然而在优选实施方案中, 测定了具有各个非遗传差异的 DNA 种类的浓度, 这种浓度的测定包括在 DNA 甲基化差异是非遗传标志物的实施方案中测定各 DNA 的甲基化差异。在特别优选的实施方案中, 亚硫酸氢钠被直接

加入到生物样品中或 DNA 种类中以检测 DNA 甲基化差异。然而，在其它的实施方案中，本领域所属技术人员公知的甲基化特异性聚合酶链反应可以被用于检测 DNA 甲基化差异。在另外的实施方案中，DNA 测序或引物延伸可以被用于检测甲基化差异。

在第二个方面，本发明涉及通过检测从母亲获得的生物样品中的胎儿 DNA 来检测胎儿异常的方法。本发明的方法通过根据非遗传标志物如 DNA 甲基化的差异将胎儿 DNA 与母体 DNA 区分开来而从母体样品中检测胎儿 DNA。采用这种方法可以鉴别出可预测遗传异常或遗传性疾病的胎儿 DNA，因而提供了产前诊断方法。这些方法可被应用于与怀孕有关的任何和所有的状况，其中与疾病状态有关的甲基化变化可被鉴别出来。可以被诊断的典型病症包括，例如先兆子痫、染色体异倍体性，其包括但不限于 21 号染色体三倍体性、Prader-Willi 综合症及 Angelman 综合症。

与本发明第一方面更广泛的区分方法一样，从母亲获得的生物样品优选为血浆或血清。母体和胎儿 DNA 之间的区分可以在对母体血浆或血清中的胎儿 DNA 浓度进行定量或不进行定量的情况下进行。在胎儿 DNA 被定量的实施方案中，测定的浓度可以被用于预测、监测或者诊断或预示与怀孕有关的异常。在优选实施方案中，特定的源自于胎儿的非遗传标记与胎儿异常有关，而且在某些实施方案中，胎盘中胎儿细胞的非遗传特性被用作母体血浆或血清中的胎儿特异性标志物。

在第三个方面，本发明涉及区分来源于器官供体 DNA 和器官受体 DNA 的方法。与本发明第一方面更广泛的区分方法一样，取得的生物样品优选为血浆或血清。来自于器官供体和器官受体之间或潜在的器官供体和潜在的器官受体之间的 DNA 区分可以在对生物样品中 DNA 浓度进行定量或不进行定量的情况下进行。该实施方案在移植是骨髓移植的情况下特别有用。这种检测可以被用于预测移植受体的临床进展，特别是在器官排斥方面。

在第四个方面，本发明涉及一种用于区分生物样本中来源于不同个体的 DNA 种类的试剂盒。这种试剂盒可用于，例如区分或检测母体生物样品中胎儿 DNA 的存在，或区分来自于器官供体或潜在的器官供体 DNA

与来自于器官受体或潜在的器官受体 DNA。本发明的试剂盒包含一种或多种用于确定母体 DNA 甲基化状态的试剂，如亚硫酸氢钠，及一种或多种用于检测 DNA 存在的试剂，如凝胶。另外，这种试剂盒可以包含一种或多种用于扩增样品中存在的 DNA 的量的试剂，如一种或多种用于进行聚合酶链反应扩增的试剂。这些试剂对本领域所属技术人员是公知的。此外，此试剂盒可以包括一种或多种用于获取母体 DNA 样品的装置，这些装置以本领域所属技术人员是公知的。特别地，本发明的试剂盒可以被用于诊断全部或部分地由在胎儿中出现的遗传异常如突变所导致的疾病、全部或部分地由在胎儿中出现的 DNA 序列的替代或缺失所导致的疾病。可以被诊断的典型病症包括，例如先兆子痫、染色体异倍体性，其包括但不限于 21 号染色体三倍体性、Prader-Willi 综合症及 Angelman 综合症。

附图简要说明

图 1 显示了检测雄激素受体基因的甲基化和非甲基化 DNA 序列的分析结果。总共有 6 名男性和 11 名女性健康受试者进入本研究。在所有的男性对照受试者中，正如所预料的在这些样品中只检测到了非甲基化的雄激素受体基因(图 1A)。与此相反，在女性对照受试者中，观察到了非甲基化的和甲基化的雄激素受体基因 DNA 序列(图 1A)。在这些女性受试者中甲基化的和非甲基化的雄激素受体基因的检测率分别为 100%和 82%。而当从分析中省略 DNA 样品时，未观察到阳性信号(图 1A)。有趣的是，在所有接受女性供体的男性骨髓移植受体中，都观察到了甲基化的和非甲基化的 DNA 序列的阳性信号，表明来自于女性供体的细胞存在于男性受体的血液循环中。

图 2 为人 *IGF2-H19* 区域的甲基化差异区域(DMR)的示意图，其中显示了两个 450 碱基对的重复单元(A1 和 A2)及七个 400 碱基对的重复单元(B1-B7)。所研究区域的上链 DNA 上的潜在甲基化位点用空心的圆表示，所研究的单核苷酸多态性(SNP)位点(A/G)用空心的方块表示，空心的箭头分别表示特异性的甲基化(M)和非甲基化(U)等位基因的 PCR 反应中的正向(for)引物和反向(rev)引物的位置，这些 MSP 引物的序列如图中所示。

经亚硫酸氢盐处理的 DNA 和未经处理的 DNA 之间的序列差异以粗斜体突出表示, 而甲基化的(从父亲遗传的)和非甲基化的(从母亲遗传的)DNA 之间的序列差异为加下划线的粗体。

图 3 显示了在第三个三月期(a)和第二个三月期(b)的母体血浆中的甲基化(从父亲遗传的)的胎儿 DNA 的检测。在母体血沉棕黄层血沉棕黄层(1 号板)、胎儿血沉棕黄层血沉棕黄层或羊水(2 号板)、产前的母体血浆(3 号板)和产后的母体血浆(4 号板)样品中的甲基化等位基因的 DNA 序列如图中所示。在产前母体血浆样品中出现的甲基化胎儿 DNA 以*表示, 多态性(SNP)位点以红色字母表示。

图 4 显示了母体血浆中非甲基化(从母亲遗传的)的胎儿 DNA 的检测。(a) 应用直接的测序方法对在母体血沉棕黄层血沉棕黄层(1 号板)和第三个三月期母体样品(2 号板)中的非甲基化 DNA 序列进行检测。在母体血浆中出现的非甲基化胎儿 DNA 以*表示。(b) 应用引物延伸分析对两个第三个三月期母体血浆样品中的非甲基化胎儿 DNA(箭头)进行检测。(c) 应用引物延伸分析对第二个三月期母体血浆样品中的非甲基化胎儿 DNA(箭头)进行检测。从只包含引物的对照反应获得的产物, 非甲基化的 G 等位基因或非甲基化的 A 等位基因如图中所示, 反应产物的大小(nt)显示在底部。●, 未使用的引物; □, 检测的等位基因。

具体实施方案说明

在第一个方面, 本发明涉及区分生物样品中来源于不同个体的 DNA 种类的方法。在优选实施方案中, 本发明的方法被用于区分或检测母体样品中胎儿 DNA 或区分器官供体 DNA 和器官受体 DNA。

本领域所属技术人员应该理解, 从个体获得的生物样品可以从任何液体或细胞样品中采取, 然而在优选实施方案中体液为血浆或血清。在优选实施方案中, 通过观测 DNA 种类中的非遗传差异如 DNA 甲基化的差异, 可将 DNA 种类区分开来。例如, 在一个 DNA 种类来自于男性, 而一个 DNA 种类来自于女性的情况下, 非遗传标志物可能是女性个体失活的 X 染色体。在此实施方案中, 在失活的 X 染色体上的甲基化 DNA 序列可以被用于检测来源于女性个体的 DNA。在某些实施方案中, 非遗

传差异可以在细胞内部分析。此外，在某些实施方案中，非遗传差异可以用原位甲基化特异性聚合酶链反应进行分析。此外，非遗传差异可以被用于分拣或分离来自于各个个体的细胞或者纯化来自于各个个体的DNA。本发明的方法可以在测定或不测定DNA种类浓度的情况下进行，然而在优选实施方案中，测定了具有各个非遗传差异的DNA种类的浓度，这种浓度的测定包括在DNA甲基化差异是非遗传标志物的实施方案中测定各DNA的甲基化差异。在特别优选的实施方案中，亚硫酸氢钠被直接加入到生物样品中或DNA种类中以检测DNA甲基化差异。然而，在其它的实施方案中，本领域所属技术人员公知的甲基化特异性聚合酶链反应可以被用于检测DNA甲基化差异。在另外的实施方案中，DNA测序或引物延伸可以被用于检测甲基化差异。

本文所用的术语“生物样品”意图包括从活体获得的任何液体或细胞样品或其混合物，具体地讲，该术语包括活组织检查、血清、血浆或羊水样品。

本文所用的术语“非遗传差异”意图包括除了初级核苷酸序列之外的任何分子或结构差异，例如其可以包括甲基化的差异。

本文所用的术语“DNA”意图包括任何超过一个核苷酸的序列，如多核苷酸、基因片段和完整的基因序列。

本文所用的术语“甲基化特异性的PCR”是用于描述一种以亚硫酸氢钠处理DNA然后进行PCR扩增的方法，该技术是基于以亚硫酸氢盐处理DNA可导致非甲基化的胞嘧啶残基转化成尿嘧啶的原理。另一方面甲基化的胞嘧啶残基则保持不变。因此，亚硫酸氢盐转化之后甲基化和非甲基化的基因组区域的DNA序列是不同的，并且能够通过序列特异性的PCR引物加以区分。

本发明使用基因组印迹现象以克服现有技术的局限性。在基因组印迹中，DNA序列在不改变DNA序列的情况下进行生化修饰。如果该过程导致胎儿和母体DNA有不同的修饰，那么该差异可以被用于在母体血浆和血清中将胎儿DNA与母体DNA区分开来。这一现象也可以被用于在母体血液的细胞成分中将胎儿细胞与母体细胞区分开来。另外，这一原理也可以被用于检测已进入胎儿/幼儿身体内的母体细胞或DNA(Lo, *et*

al., *Blood* 88(11): 4390-5 (1996); Lo, *et al.*, *Clin Chem*, 46(9): 1301-9 (2000); Maloney *et al.*, *J Clin Invest* 104(1): 41-7 (1999)。这一现象也可以在许多其它临床情况中使用, 其中细胞或 DNA 序列被发现存在于个体的身体内部, 如骨髓移植之后(Lo *et al.*, *Br J Haematol* 89(3): 645-9 (1995))或实体器官移植之后(Starzal *et al.*, *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6(3): 292-8 (1997); Lo *et al.*, *Lancet* 351(9112): 1329-30 (1998); Zhang, *Clin Chem* 45(10): 1741-6 (1999))。

本发明允许发展用于母体血浆/血清中胎儿 DNA 中的不依赖于性别和不依赖于多态性的标志物。为发展不依赖于性别和不依赖于多态性的胎儿标志物, 可以使用滋养层中被优先和特异性地甲基化的 DNA 序列(Ohgane *et al.*, *Dev Genet*, 22(2): 132-40 (1998))。这克服了当前技术的局限性, 即只能方便地在母亲的血浆/血清中检测到男性胎儿的 DNA 的存在(通过使用 Y-染色体作为目标)(Lo, *et al.*, *Am J Hum Genet*, 62(4): 768 (1998))。它提供了与依靠胎儿和母体 DNA 的序列差异来进行这种区分的不同的检测方法(Tang *et al.*, *Clin Chem* 45(11): 2033-5 (1999); Pertl *et al.*, *Hum Genet* 106: 45-49 (2000))。分子检测方法如 PCR 的发展已经为骨髓移植(BMT)之后嵌合现象的监测提供了许多有力的工具。应用最广的 PCR 基试验方法之一可用于检测性别失配病例中的 BMT 后的嵌合现象, 其是一种 Y 染色体测序的 PCR(Lo *et al.*, *Br J Haematol* 89: 645-9 (1995))。这一方法的局限在于它只能用在供体是男性而受体是女性的情况中。本发明提供了一种能被应用在供体是女性而受体是男性的情况下的系统。Lyonization 现象只发生在女性中的事实可以被用来发展女性特异性的标志物。在此现象中, 女性个体的两个 X 染色体中的任意一个失活, 同时在失活的基因上发生甲基化。因此, 这允许进行检测超过男性 DNA 的女性 DNA 的分析, 且可被用于女性供体和男性受体的 BMT 中。

在第二个方面中, 本发明涉及通过检测从母亲获得的生物样品中的胎儿 DNA 来检测胎儿异常的方法。本发明的方法通过根据非遗传标志物如 DNA 甲基化的差异将胎儿 DNA 与母体 DNA 区分开来而从母体样品中检测胎儿 DNA。采用这种方法, 可以鉴别出可预测异常或疾病的胎儿 DNA, 因而提供产前诊断方法。这些方法可被应用于与怀孕有关的任何

和所有的情况，其中与疾病状态有关的甲基化变化可被鉴别出来。可以被诊断的典型疾病包括，例如先兆子痫、染色体异倍体性，其包括但不限于 21 号染色体三倍体性、Prader-Willi 综合症及 Angelman 综合症。

与本发明第一方面更广泛的区分方法一样，从母亲获得的生物样品优选为血浆或血清。母体和胎儿 DNA 之间的区分可以在对母体血浆或血清中的胎儿 DNA 浓度进行定量或不进行定量的情况下执行。在胎儿 DNA 被定量的实施方案中，测定的浓度可以被用于预测、监测或诊断与怀孕有关的异常。在优选实施方案中，特定的源于胎儿的非遗传标记与胎儿异常有关，而且在某些实施例中，胎盘中胎儿细胞的非遗传特性被用作母体血浆或血清中的胎儿特异性标志物。

本发明利用甲基化有差异的胎儿 DNA 序列作为非侵入性产前诊断的标志物，而不需要将 DNA 序列与母体 DNA 区别开来。这种新方法可以将常规方法中不能提供信息的胎儿-母亲对转化成能提供用于产前诊断信息的胎儿-母亲对。因此，本发明提供了可以在其上建立新一代的非侵入性产前检验的平台。

本发明的方法是基于对来自于怀孕妇女的血浆或血清的甲基化有差异的胎儿 DNA 的检测。甲基化有差异的 DNA 序列可能包括单核苷酸多态性，优选通过甲基化特异性聚合酶链反应(PCR)对其进行检测，但总的来说任何检测甲基化有差异的 DNA 的方法都可以使用。这种方法允许在产前诊断中使用常规不提供信息的胎儿 DNA 标志物。

本发明允许检测或预测任何与 DNA 序列的甲基化状态有关的胎儿或母亲的异常的存在，其例子包括印迹疾病，如 Prader-Willi 综合症(Kubota *et al.*, *Nat Genet* 16(1):16-7 (1997))。本发明对被认为是印迹疾病的先兆子痫提供了一种新型检验方法(Graves, *Reprod Fertil Dev* 10(1):23-9 (1998))，本发明还对可能与甲基化改变有关的染色体异倍体性，包括 Down 综合症(21 号染色体三倍体性)提供了一种新型检验方法(Yu *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13):6862-7 (1997))。

本发明特征在于使用母亲和胎儿之间的 DNA 甲基化差异，因而克服了现有技术之母体血浆中的胎儿 DNA 的检测上的局限性。

在第三个方面，本发明涉及区分来源于器官供体 DNA 和器官受体 DNA 的方法。与本发明第一方面更广泛的区分方法一样，取得的生物样品优选为血浆或血清。来自于器官供体和器官受体之间或潜在的器官供体和潜在的器官受体之间的 DNA 区分可以在对生物样品中 DNA 浓度进行定量或不进行定量的情况下进行。此实施方案在移植是骨髓移植的情况下特别有用。这种检测可以被用于预测移植受体的临床进展，特别是在器官排斥方面。

在第四个方面，本发明涉及用于区分来源于生物样品中不同个体的 DNA 种类的试剂盒。这种试剂盒可用于，例如区分或检测母体生物样品中胎儿 DNA 的存在，或区分来自于器官供体或潜在的器官供体 DNA 与来自于器官受体或潜在的器官受体 DNA。本发明的试剂盒包含一种或多种用于确定母体 DNA 甲基化状态的试剂，如亚硫酸氢钠，及一种或多种用于检测 DNA 存在的试剂，如凝胶。另外，这种试剂盒可以包含一种或多种用于扩增样品中存在的 DNA 量的试剂，如一种或多种用于进行聚合酶链反应扩增的试剂。这些试剂对本领域所属技术人员是公知的。此外，此试剂盒可以包括一种或多种用于获取母体 DNA 样品的装置，这些装置以本领域所属技术人员是公知的。特别地，本发明的试剂盒可以被用于诊断全部或部分地由在胎儿中出现的遗传异常如突变所导致的疾病、全部或部分地由在胎儿中出现的 DNA 序列的替代或缺失或复制所导致的疾病。可以被诊断的典型病症包括，例如先兆子痫、染色体异倍体性，其包括但不仅限于 21 号染色体三倍体性、Prader-Willi 综合症及 Angelman 综合症。

实施例 1

骨髓移植后嵌合现象的检测

非遗传方法

材料与方法

受试者与样品

四个从女性供体接受骨髓的男性骨髓移植受体和 17 个正常的健康受试者进入本研究。如(Lo *et al.*, *Am J Hum Genet* 62:768-75 (1998))所述的收取所有的 EDTA-血液样品的血沉棕黄层血沉棕黄层(BC)并在-20℃储存。

DNA 的分离

按照生产商的推荐使用 Nucleon DNA 提取试剂盒(Scotlabs)从 BC 中提取 DNA。

亚硫酸氢盐转化

按照生产商的指示使用 CpGenome DNA 修饰试剂盒(Intergen)进行 DNA 样品的亚硫酸氢盐修饰。通过亚硫酸氢盐转化,非甲基化的胞嘧啶残基被转化为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶残基保持不变(Herman *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9821-6 (1996))。在亚硫酸氢盐转化之后,再使用不同的 PCR 引物将甲基化和非甲基化 DNA 之间的序列差异区分开来。在亚硫酸氢盐转化反应中使用 1μg 的 BC DNA。

甲基化特异性 PCR(MSP)

按 Herman *et al.*, *supra* 所描述的方法对 MSP 分析进行了改良。引物 M-for (5'-GCGAGCGTAGTATTTTTTCGGC-3') 和 M-rev (5'-AACCAAATAACCTATAAAACCTCTACG-3')被设计用于甲基化的序列,而引物 U-for (5'-GTTGTGAGTGTAGTATTTTTTGGT-3')和 U-rev (5'-CAAATAACCTATAAAACCTCTACA-3')被设计用于非甲基化的序列。5μl 的亚硫酸氢盐处理的 DNA 加入到包含 5μl 的 10X TaqMan 缓冲液 A(PE Applied Biosystems)、2mM MgCl₂、10pmol dNTPs、20pmol 各个相应的 MSP 引物、1.25U AmpliTaq Gold DNA 聚合酶(PE Applied Biosystems)的 50μl PCR 反应物中。将反应混合物进行 45 次热循环(甲基化等位基因: 95℃ 45 秒、58℃ 30 秒、72℃ 20 秒;非甲基化等位基因: 95℃ 45 秒、50℃ 30 秒、72℃ 20 秒),其中在 95℃ 进行 8 分钟的初始变性步骤。然后通过琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行分析。

结果

本试验提供 MSP 分析方法以检测雄激素受体基因的甲基化和非甲基化的 DNA 序列。总共有 6 名男性和 11 名女性健康受试者进入本研究。在所有的男性对照受试者中,正如所预料的,在这些样品中只检测到了

非甲基化的雄激素受体基因(图 1A)。与此相反,在女性对照受试者中,观察到了非甲基化的和甲基化的雄激素受体基因 DNA 序列(图 1A)。在这些女性受试者中甲基化的和非甲基化的雄激素受体基因的检测率分别为 100%和 82%。而当从 MSP 分析中省略 DNA 样品时,未观察到阳性信号(图 1A)。有趣的是,在所有性别失配的男性骨髓移植受体中(100%),都观察到了甲基化和非甲基化的 DNA 序列的阳性信号,表明来自于女性供体的细胞存在于男性受体的血液循环中。

这些结果第一次表明从女性个体来的失活 X 染色体上的甲基化基因 在嵌合现象的研究中可用作女性特异性的标志物,这一分析方法也可用于其它类型的移植后嵌合现象的研究中,包括男性和女性细胞或 DNA 的混合物。其例子包括实体器官移植之后的细胞嵌合现象(Starzl *et al.*, *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6:292-8 (1997))、移植后的血浆 DNA 嵌合现象(Lo *et al.*, *Lancet* 351:1329-30 (1998))和尿液 DNA 嵌合现象(Zhang *et al.*, *Clin Chem* 45: 1741-6 (1995))。另外,近来对怀孕期间细胞和 DNA 从母亲进入胎儿的移动产生了兴趣(Lo *et al.*, *Blood* 88:4390-5. (1996); Maloney *et al.*, *J Clin Invest* 104: 41-7 (1999); Lo *et al.*, *Clin Chem* 46:1301-9 (2000))。发展的非遗传标志物也应该用于源自于男性后代的母体嵌合现象中。

应用例如实时 PCR 技术可将当前的分析方法发展成定量的形式(Lo *et al.*, *Cancer Res* 59:3899-903 (1999)),这种发展将允许我们监测特定个人中的嵌合现象水平。在临床上这种分析可能在 BMT 移植接受的监测中发挥作用。在尿液或血浆 DNA 嵌合现象的情况中,这种分析也可用于监测移植排斥。

实施例 2

胎儿和母亲之间的 DNA 甲基化差异用作检测母体血浆中胎儿 DNA 的方法

本试验表明,通过使用人 *IGF2-H19* 位点中的甲基化差异区域作为母体血浆中的非遗传标志物,对胎儿从母亲遗传的等位基因的检测是可能的。这些结果极大地扩展了对在母体血浆中的胎儿 DNA 的产前诊断的可能性,从而允许发展在母体血浆中不依赖于性别和不依赖于多态性的胎

儿特异性标志物，及发展产前诊断印迹疾病和某些染色体异倍体性的新方法。

材料与方法

受试者与样品

取得同意后从怀孕妇女处收集样品，总共有 21 名和 18 名分别处于第二个三月期(17-21 周)和第三个三月期(37-42 周)的怀孕妇女进入本研究。进入研究的受试者在当前怀孕期中无一例具有先兆子痫或早产阵痛。EDTA 母体血液和胎儿羊水样品按如前所述的(Lo *et al.*, *Am J Hum Genet* 62:768-775 (1998))从第二个三月期的受试者中收集。对于第三个三月期的受试者，在正常阴道分娩前 2-3 小时收集 EDTA 母体血液样品。如所述的(Lo *et al.*, *Clin Chem* 46:1903-1906 (2000))在分娩后立即收集胎儿脐带血液样品。除了 16,000g 的血浆样品被再次离心外，如所述的(Lo *et al.*, *Am J Hum Genet* 62:768-775 (1998))从所有受试者血液样品中获得的血浆和血沉棕黄层血沉棕黄层被收集起来并在 -20℃ 储存，。羊水样品在 4℃ 储存。

DNA 分离

使用 QIAamp Blood 试剂盒(Qiagen)从血浆和羊水样品中提取 DNA，通常 800μl 的血浆或羊水被用于每柱的 DNA 提取。使用 50-100μl 体积的洗脱液。按照生产商的推荐使用 Nucleon DNA 提取试剂盒(Scotlabs)从血沉棕黄层血沉棕黄层中提取 DNA。

DMR 多态性区域的基因型

人 *IGF2-H19* 位点中的 DMR 包含两个 450 碱基对的重复单元和七个 400 碱基对的重复单元(Nakagawa *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:591-596 (2001))(图 2)。在我们的研究中选择 DMR 内的 A/G SNP (Nakagawa *et al.*, *supra*)为标志物(图 2)。聚合酶链反应(PCR)被用于扩增在母体和胎儿 DNA 样品中的 SNP。使用人类 *H19* 基因的序列(基因库登录号 AF125183)设计引物。通常 2-5μl 经洗脱并从母体血沉棕黄层血沉棕黄层、脐带血沉棕黄层血沉棕黄层或羊水中纯化的 DNA 被加入到包含 2.5μl 的 10X TaqMan 缓冲液 A(PE Applied Biosystems)、3mM MgCl₂、6.26pmol dNTPs、5pmol 的引物(正向: 5'-ggACGGAATTGGTTGTAGTT-3';

反向: 5'-AGGCAATTGTCAGTTCAGTAA-3')、0.625U AmpliTaq Gold DNA 聚合酶(PE Applied Biosystems)的 25 μ l PCR 反应物中(95 $^{\circ}$ C 8 分钟, 随后 35 次循环, 95 $^{\circ}$ C 1 分钟、56 $^{\circ}$ C 20 秒、72 $^{\circ}$ C 20 秒)。对于正向引物, 以大写字母表示的核苷酸相应于 *H19* 序列(基因库登录号 AF125183)的 7927-7944 位置。对于反向引物, 核苷酸与 *H19* 序列的 8309-8329 位置互补。然后通过琼脂糖凝胶电泳和 DNA 测序对 PCR 产物进行分析。

亚硫酸氢盐转化

按照生产商的指示使用 CpGenome DNA 修饰试剂盒(Intergen)进行 DNA 样品的亚硫酸氢盐修饰。通过亚硫酸氢盐转化, 非甲基化的胞嘧啶残基被转化为尿嘧啶, 而甲基化的胞嘧啶残基将保持不变(Herman *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9821-9826 (1996))。在亚硫酸氢盐转化之后, 再使用不同的 PCR 引物将甲基化和非甲基化 DNA 之间的序列差异区分开来。通常在亚硫酸氢盐转化反应中使用 1 μ g 来自于母体或脐带血的血沉棕黄层 DNA, 或 93 μ l 从母体血浆或羊水纯化的经洗脱的 DNA。然后经亚硫酸氢盐处理的 DNA 在 25-50 μ l 1 μ Tris-EDTA 中洗脱。

甲基化特异性 PCR(MSP)

按 Herman *et al.*, *supra* 所描述的方法对 MSP 分析进行了改良。5 μ l 的亚硫酸氢盐处理的 DNA 加入到包含 5 μ l 的 10X TaqMan 缓冲液 A(PE Applied Biosystems)、2.5mM MgCl₂、10pmol dNTPs、20pmol 各个相应的 MSP 引物(图 2)、1.25U AmpliTaq Gold DNA 聚合酶(PE Applied Biosystems)的 50 μ l PCR 反应物中。引物 M-for 和 M-rev(图 2)被设计用于甲基化的序列, 而引物 U-for 和 U-rev(图 2)被设计用于非甲基化的序列。将反应混合物进行 50 次(血沉棕黄层和羊水 DNA)或 56 次(血浆 DNA)热循环(甲基化等位基因: 95 $^{\circ}$ C 45 秒、55 $^{\circ}$ C 20 秒、72 $^{\circ}$ C 20 秒; 非甲基化等位基因: 95 $^{\circ}$ C 45 秒、49 $^{\circ}$ C 20 秒、72 $^{\circ}$ C 20 秒), 其中在 95 $^{\circ}$ C 进行 8 分钟的初始变性步骤。然后通过琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行分析。使用 Microspin S-300 HR 柱(Amersham Pharmacia)纯化反应产物以进行 DNA 测序或引物延伸分析。

DNA 测序

使用 ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction 试剂盒(PE Applied Biosystems)和 PCR 产物的相应正向引物对纯化的 PCR 产物进行测序。用 ABI Prism 310 基因分析仪(PE Applied Biosystems)对测序产物进行分析。

引物延伸分析

2 μ l 纯化的 MSP 产物被加入到包含 50 μ M ddATP (2',3'-二脱氧三磷酸腺苷)、50 μ M dGTP、50 μ M dTTP、0.2pmol Cys-5 标记的引物 (5'-GGGTTATTTGGGAATAGGATATTTA-3')、4U Thermo Sequenase (Amersham Pharmacia)、1.43 μ l 浓缩缓冲液的 25 μ l 反应物中。将反应物进行 40 次热循环(95 $^{\circ}$ C 30 秒、51 $^{\circ}$ C 20 秒、72 $^{\circ}$ C 20 秒)。Cys-5 标记的引物长度为 25 个核苷酸(nt), 且多态性位点与引物的 3'-端相距 2nt。对于 A 等位基因, 在该多态性位点上引入 ddATP 将产生链终止, 因此得到 27nt 的延伸产物(即 25+2nt)。对于 G 等位基因, 链延伸将继续直到与引物的 3'-端相距 5nt 的下一个 A 残基为止, 因此得到 30nt 的延伸产物(即 25+5nt)。使用 14% 的变性聚丙烯酰胺凝胶对反应产物进行电泳, 并使用 ALF Express Sequencer (Amersham Pharmacia) 进行分析。数据用 AlleleLinks 程序(Amersham Pharmacia)进行分析。

结果

DMR 的基因型

39 名怀孕妇女进入本研究, 通过直接测序从血沉棕黄层 DNA 获得的 PCR 产物来确定在 DMR 内的 SNP 的母体基因型(图 2)。具有每个可能的基因型的怀孕妇女的数目为 17(GG, 43.6%)、16(AG, 41.0%)和 6(AA, 15.4%)。

二等位基因多态性杂合的妇女血浆中胎儿 DNA 的检测

选择 16 名 SNP 杂合(即 AG)妇女以进行进一步检验。由于这是二等位基因多态性, 按照以前的标准这些妇女将不会被认为可对母体血浆中胎儿 DNA 的检测在该多态性位点处能够提供信息(Lo *et al.*, *Ann NY Acad Sci* 731:204-213 (1994); Bianchi *Am J Hum Genet* 62:763-764 (1998))。为证实在此基因组区域的甲基化差异将允许我们克服这一限制, 用亚硫酸氢盐处理母体 DNA 并使用如图 2 中所示的引物通过 MSP 进行扩增。与此

相似,从羊水(第二个三月期样品)或脐带血(第三个三月期样品)的血沉棕黄层中分离的胎儿 DNA 经过 PCR 和 MSP 以确定胎儿等位基因的印迹状态。

在 16 个选择的受试者中,从四个第三个三月期和七个第二个三月期胎儿样品得到的甲基化的(即从父亲遗传的)等位基因与各自的母亲的甲基化的等位基因不同(图 3a、图 3b, 比较 1 号板和 2 号板)。为检验是否在胎儿和母亲之间的甲基化差异将允许从母体血浆中检测出胎儿等位基因,来自于这些受试者的母体血浆 DNA 经过亚硫酸氢盐转化,再进行 MSP。有趣的是,从父亲遗传的甲基化的胎儿等位基因可以在两个第三个三月期和四个第二个三月期母体血浆样品中检测到(图 3a、图 3b, 3 号板)。为排除这些观察值仅是由于母体血浆中异常甲基化的母体 DNA 存在而引起的可能性,我们从这些阳性受试者中的一个受试者中收集了产后母体血浆样品(约分娩后 3.5 年)。在此产后样品中我们没有观察到其它的甲基化等位基因(图 3a, 4 号板),表明在怀孕期间母体样品中其它的甲基化等位基因是来自于胎儿。另外,在没有提供信息的受试者(n=4, 数据未显示)的血浆中没有观察到阳性信号,因此进一步表明该 MSP 分析的特异性。总而言之,这些数据表明,即使在按照现有标准不被认为能提供信息的情况下,利用母亲和胎儿之间的甲基化差异也允许检测母体血浆中的胎儿 DNA。

从母体血浆中检测来源于胎儿的从母亲遗传的 DNA

然后我们检验是否使用母亲和胎儿之间的甲基化差异可以允许我们检测胎儿从母亲遗传的等位基因。这种类型的分析以前被认为是不可能的(Lo *et al.*, *Ann NY Acad Sci* 731:204-213 (1994); Bianchi, *Am J Hum Genet* 62:763-764 (1998))。由于从母亲遗传的等位基因是非甲基化的,所以引物 U-for 和 U-rev(图 2)在亚硫酸氢盐转化后被用于扩增非甲基化的等位基因。在 16 个被分析的受试者中,三个第三个三月期和五个第二个三月期母体样品可以提供信息。在这些受试者中,胎儿拥有不同于母亲的非甲基化等位基因的非甲基化等位基因。这些结果意味着,在这些受试者中,母亲具有最初从她的父亲遗传的胎儿等位基因,然后传递到她的

胎儿。在这 8 个提供信息的受试者中，通过直接测序只在一个第三个三月期样品中观察到微弱的阳性信号(图 4a，比较 1 号板和 2 号板)。

我们推测，在该单独的阳性受试者中的微弱信号和来自于母体血浆中的非甲基化胎儿等位基因的低检测率可能是由于直接测序方法低灵敏度的原因。为增强检测的灵敏度，我们采用了更为灵敏的引物延伸分析方法以检测来自于 MSP 反应产物的未甲基化胎儿等位基因。由于 SNP 是 A/G 多态性，所以 ddATP 在引物延伸分析被用作反应底物。从 A 和 G 等位基因延伸的反应产物分别为 27 和 30nt 长。在相应的母体血沉棕黄层样品中没有出现胎儿特异性的反应产物(图 4b、图 4c；母体 BC)。让人注意的是，在二个第三个三月期(图 4b，箭头)和一个第二个三月期(图 4c，箭头)的母体血浆样品中观察到了胎儿特异性的延伸产物，表明非甲基化的胎儿 DNA 出现在母体血浆中。至于对照组，在此分析中检验的不提供信息的受试者中没有一个是阳性的(n=5，数据未显示)。这些结果第一次表明有可能使用非遗传标志物从母体血浆中检测来自于胎儿的从母亲遗传的 DNA 序列。

讨论

这些结果表明使用非遗传标志物克服了常规检测在母体血浆中的胎儿 DNA 的局限性。通过使用母亲和胎儿之间的非遗传差异，从母亲的血浆中检测在遗传上与母体等位基因不可区分的从父亲遗传的等位基因是可能的。同样地，从母体血浆中检测从母亲遗传的胎儿等位基因是可能的。因此这种新的非遗传方法将扩展可以使用在母体血浆中的胎儿 DNA 的疾病种类。

即使使用了相对不灵敏的方法如直接测序和引物延伸，本结果也表明从母体血浆中检测甲基化有差异的胎儿 DNA 序列是可能的。与类似的甲基化等位基因分析相比(图 3)，在母体血浆中检测非甲基化胎儿 DNA 的灵敏度较低(图 4)。使用更为灵敏的检测系统，如等位基因特异性的 PCR(Newton *et al*, *Nucleic Acids Res* 17:2503-2516 (1989))和实时甲基化特异性 PCR(Lo *et al.*, *Cancer Res* 59:3899-3903 (1999); Eads *et al.*, *Nucleic Acids Res* 28:E32 (2000))可以增强血浆基非遗传分析的灵敏度。实时甲基化特异性 PCR 的发展特别使人感兴趣，因为它开启了在母体血浆中定量

胎儿特异性甲基化的可能性，正如早已实现的在血液循环中对肿瘤 DNA 的检测那样(Kawakami *et al*, *J Natl Cancer Inst* 92:1805-1811 (2000))。

在母体血浆中胎儿 DNA 的可能引入作为常规的产前诊断工具已经引起一些关于在循环的胎儿 DNA 中需要非遗传标志物的问题(Lo *et al.*, *Am J Hum Genet* 62:768-775 (1998); Avent *et al.*, *Vox Sang* 78:155-162 (2000))。因此对于这种标志物大多数的方案更集中于母亲和胎儿之间的基因多态性的使用上(Tang *et al.*, *Clin Chem* 45:2033-2035 (1999); Pertl *et al.*, *Hum Genet* 106:45-49 (2000))。当前对于非遗传标志物用于母体血浆中胎儿 DNA 检测可能性的证实开启了发展母体血浆中不依赖于性别和不依赖于多态性的胎儿标志物的新方法。可以达到这一目的的一种途径是利用组织特异性甲基化现象(Grunau *et al.*, *Hum Mol Genet* 9:2651-2663 (2000))。由于滋养层被认为是用于将胎儿 DNA 释放进入母体血浆中的占优势细胞群体，对滋养层特异性的甲基化模式的说明允许发展母体血浆中一般的非遗传胎儿标志物。在生物学上，组织特异性甲基化标志物的应用也可以允许直接解决关于胎儿细胞类型应负责向母体血浆中释放胎儿 DNA 类的问题。

母体血浆的非遗传分析在与基因组印迹有关的疾病，如 Prader-Willi 综合症(Pfeifer, *Lancet* 356:1819-1820 (2000))中具有显而易见的应用，这种方法也具有诊断疾病如先兆子痫的可能性，其中印迹基因被推测发挥了作用(Graves, *Reprod Fertil Dev* 10:23-29 (1998))。

母体血浆中胎儿 DNA 在产前检测胎儿染色体异倍体性中的可能应用是由于对这一现象的发现而热烈讨论的结果(Lo *et al.*, *Lancet* 350:485-487 (1997); Bianchi, *Am J Hum Genet* 62:763-764 (1998))。与整倍体性怀孕相比(Lo *et al.*, *Clin Chem* 45:1747-1751 (1999); Zhong *et al.*, *Prenat Diagn* 20:795-798 (2000))，在异倍体性中循环的胎儿 DNA 水平之间的定量差异可提供一种从母体血浆预计胎儿染色体异倍体性的可能性的方法。最近在母体血浆中发现凋亡胎儿细胞(“来源于血浆的细胞”)(Van Wijk *et al.*, *Clin Chem* 46:729-731 (2000))还提供了另外一种从母体血浆检测异倍体性的方法(Poon *et al.*, *Lancet* 356:1819-1820 (2000))。有趣的是，当前的数据还开启了另外一种检测胎儿异倍体性的可能方法。这是基于对异常

DNA 甲基化模式可能与染色体异倍体性有关的观察(Kuromitsu *et al.*, *Mol Cell Biol* 17:707-712 (1997); Yu *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6862-6867 (1997))。因此,发展用于从母体血浆中检测这种甲基化异常的胎儿 DNA 序列的非遗传标志物是可能的。这种标志物与母体血浆中胎儿 DNA 的简单定量相比提供了特异性(Lo *et al.*, *Clin Chem* 45:1747-1751 (1999); Zhong *et al.*, *Prenat Diagn* 20:795-798 (2000))和与基于“来源于血浆的细胞”相比对于大规模应用提供了更好的适应性(Poon *et al.*, *Lancet* 356:1819-1820 (2000))。

胎儿非遗传标志物也可以用在从母体血液的细胞成分中分离的胎儿细胞的分析中。这里利用了最近的数据,表明甲基化分析可以以原位方式进行(Nuovo *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12754-12759 (1999))。

随着我们最近认识到胎儿母体运输是一个双向的过程(Lo *et al.*, *Blood* 88:4390-4395 (1996); Maloney *et al.*, *J Clin Invest* 104:41-47 (1999)),非遗传标志物也可以被用于研究细胞和 DNA 从母亲到胎儿的转移。这种方法也可以在其它类型的嵌合现象研究中应用,如移植后的血液嵌合现象(Starzl *et al.*, *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6:292-298 (1997))和尿液 DNA 嵌合现象(Zhang *et al.*, *Clin Chem* 45:1741-1746 (1999))。

随着我们对人类基因组的理解的增加及高通量阵列基的甲基化分析技术的发展(Yan *et al.*, *Clin Cancer Res* 6:1432-1438 (2000)),我们期望在未来几年中可以使用的胎儿非遗传标志物的数目迅速增加。这样的发展将为胎儿非遗传标志物提供与临床相关的平台,其能够与母体血浆中的常规遗传标志物以相互协同的方式使用。

序列表

<110> 卢煜明

潘烈文

香港中文大学

<120> 检测来源于不同个体的 DNA 的方法

<130> 016285-002500US

<140> US 09/944,951

<141> 2001-08-31

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 雄激素受体基因的甲基化序列
甲基化特异性 PCR (MSP)引物 M-for

<400> 1

gcgagcgtag tatttttcgg c 21

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 雄激素受体基因的甲基化序列
甲基化特异性 PCR (MSP)引物 M-rev

<400> 2

aaccaaataa cctataaaac ctctacg 27

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 雄激素受体基因的非甲基化序列
甲基化特异性 PCR (MSP)引物 U-for

<400> 3

gttgtgagtg tagtattttt tgggt 24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 雄激素受体基因的非甲基化序列
甲基化特异性 PCR (MSP)引物 U-rev

<400> 4

caaataacct ataaaacctc taca 24

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人 IGF2-H19 区域的甲基化差异区域(DMR)中的单核苷酸多态性(SNP)
扩增 PCR 正向引物

<400> 5

ggacggaatt ggttgtagtt 20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人 IGF2-H19 区域的甲基化差异区域(DMR)中的单核苷酸多态性(SNP)
扩增 PCR 反向引物

<400> 6

aggcaattgt cagttcagta a 21

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人 IGF2-H19 区域的甲基化差异区域中的单核苷酸多态性(SNP)位点
甲基化等位基因的甲基化特异性 PCR (MSP)正向引物 M-for

<400> 7

ttaattgggg ttcgttcg 18

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人 IGF2-H19 区域的甲基化差异区域中的单核苷酸多态性(SNP)位点

甲基化等位基因的甲基化特异性 PCR (MSP)反向引物 M-rev

<400> 8

cccgacctaa aaatctaata cga 23

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人 IGF2-H19 区域的甲基化差异区域中的单核苷酸多态性(SNP)位点

非甲基化等位基因的甲基化特异性 PCR (MSP)正向引物 U-for

<400> 9

ggtttgtttg tggaaatggtt tt 22

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人 IGF2-H19 区域的甲基化差异区域中的单核苷酸多态性(SNP)位点

非甲基化等位基因的甲基化特异性 PCR (MSP)反向引物 U-rev

<400> 10 cccaacctaa aaatctaata caa 23

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 引物延伸分析 Cys-5-标记的引物

<400> 11

gggttatttg ggaataggat attta 25

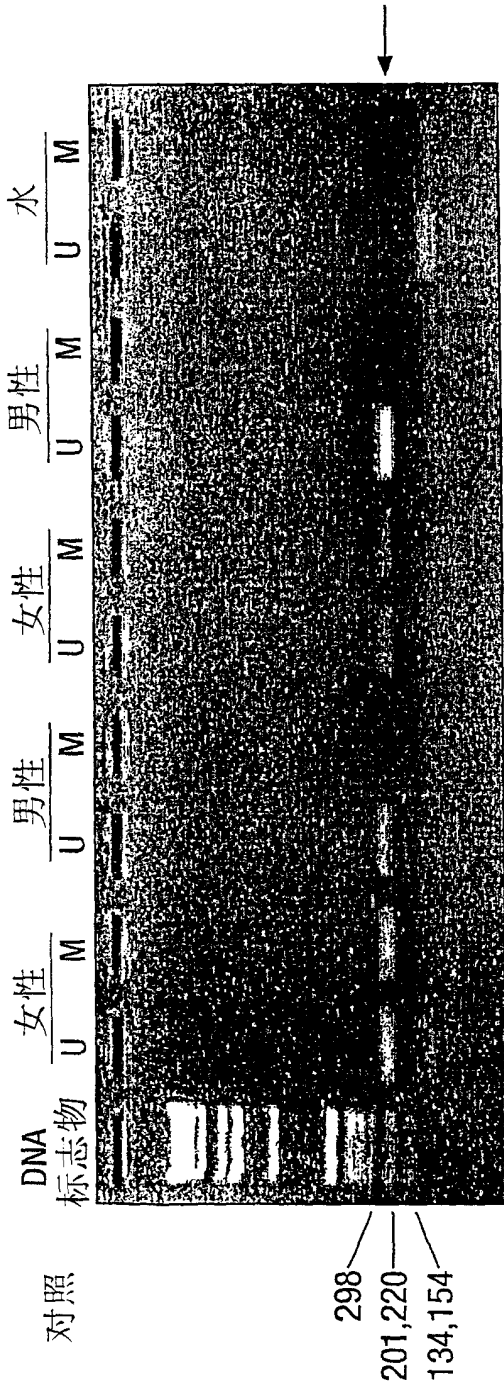


图 1A

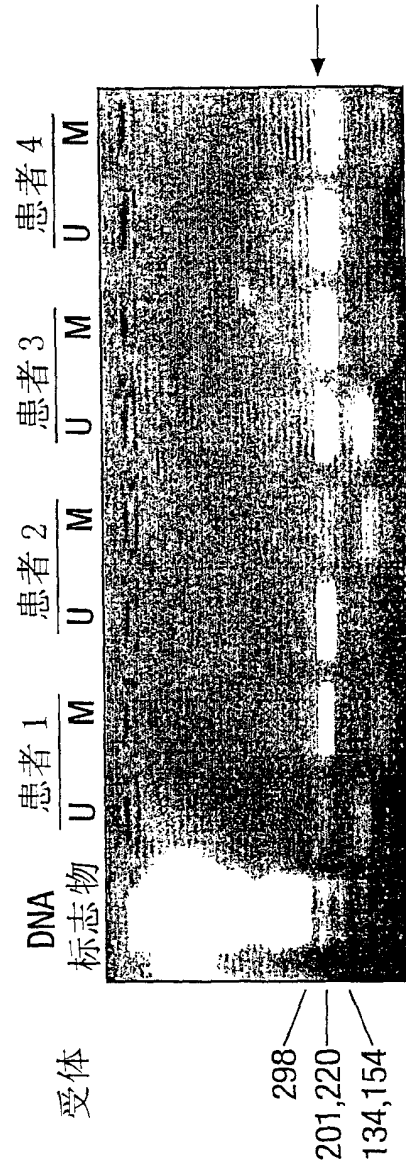
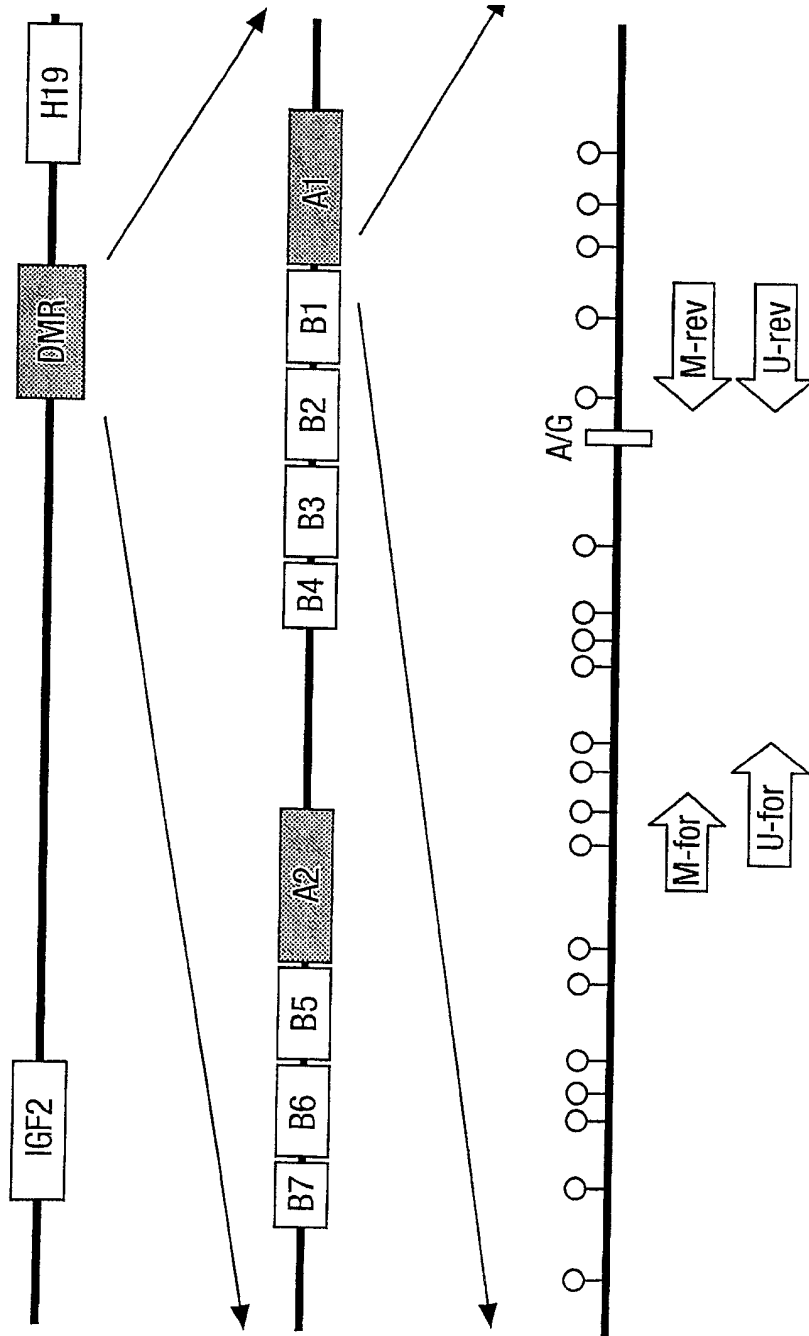


图 1B



M-for: 5'-TTAATTGGGGTTCG7TCG-3'
 M-rev: 5'-CCCGACCTAAAAATCTAATACGA-3'
 U-for: 5'-CGTTJG7TIGTGGAAA7GT7T-3'
 U-rev: 5'-CCCAACCTAAAAATCTAATACAA-3'

图 2

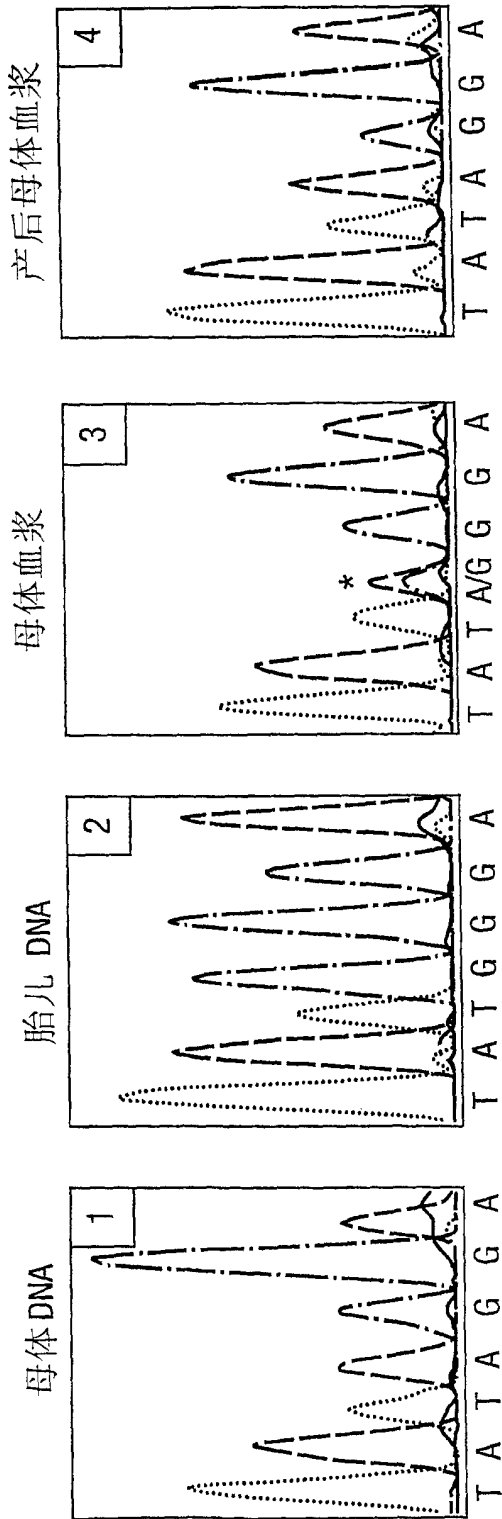


图 3A

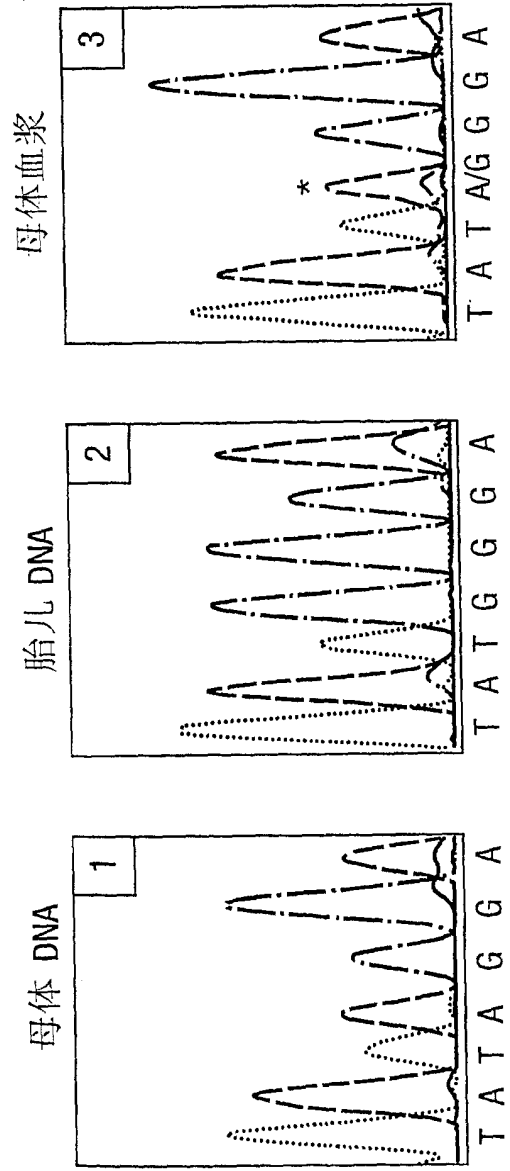


图 3B

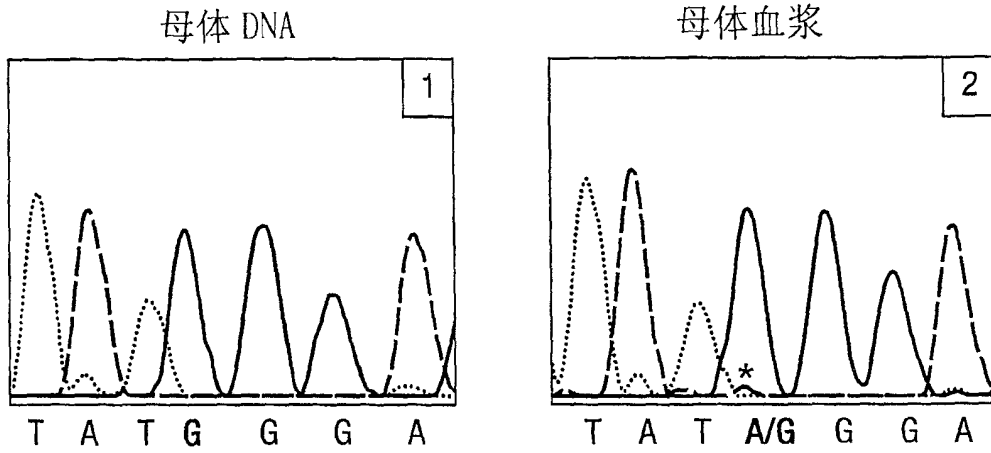


图 4A

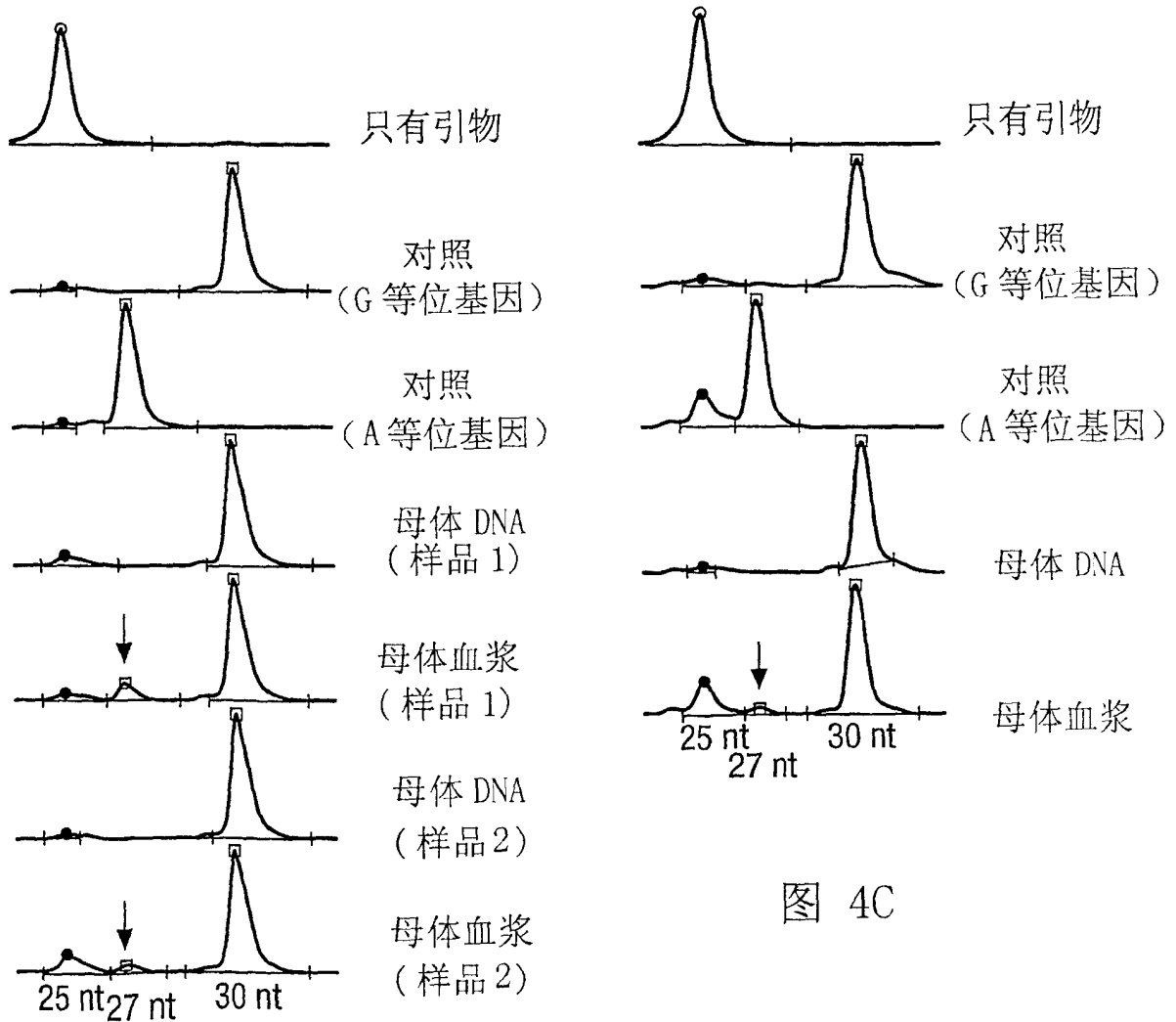


图 4B

图 4C