



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01817445.0

[43] 公开日 2004年1月21日

[11] 公开号 CN 1469932A

[22] 申请日 2001.10.17 [21] 申请号 01817445.0

[30] 优先权

[32] 2000.10.17 [33] US [31] 60/241,417

[32] 2001.6.6 [33] US [31] 09/876,005

[86] 国际申请 PCT/GB01/04629 2001.10.17

[87] 国际公布 WO02/33120 英 2002.4.25

[85] 进入国家阶段日期 2003.4.16

[71] 申请人 香港中文大学

地址 中国香港新界沙田

[72] 发明人 卢煜明 潘烈文

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有
限责任公司

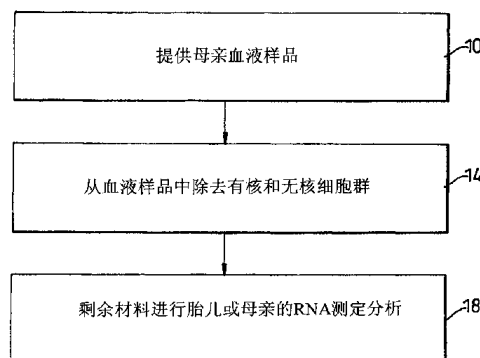
代理人 王达佐 刘玉华

权利要求书3页 说明书6页 附图2页

[54] 发明名称 非侵入的出生前监测

[57] 摘要

本发明的具体实施方式涉及怀孕母体血液样品中胎儿或母体 RNA 的检测，并且涉及将样品进行测试，寻找其中指示胎儿或母亲的状况或特征的胎儿或母亲的分析指标。例如 RNA 分析可以包括通过分析母亲血液样品而对未出生的胎儿的基因表达模式进行评价。首先利用出生前监测技术仅通过分析母亲血液样品就可检测胎儿表达的基因。在特定的实施方案中，出生前监测技术是基于发现了在怀孕妇女血浆中胎儿来源的 RNA 的循环。总之，对怀孕妇女的血清或血浆样品的检测方法包括测定样品中胎儿或母亲来源的 RNA 的存在。



1. 对怀孕个体的血液样品进行胎儿出生前监测或测试的方法，该方法包括：

5 从血液样品中除去所有或基本上所有的有核细胞和无核细胞群，得到剩余的材料，并且

 将剩余的材料进行测试，以显示胎儿或母体的状况或特征的胎儿或母体 RNA 分析指标。

10 2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中从血液样品中除去所有的有核细胞和无核细胞群以得到剩余的材料。

 3. 根据权利要求 1 所述方法，其中剩余的材料包括非细胞物质，并且 RNA 分析是对剩余材料中的非细胞物质进行的。

15 4. 根据权利要求 1 所述方法，其中剩余材料包括细胞物质，并且 RNA 分析是针对剩余材料中的细胞物质而进行的。

 5. 根据权利要求 1 所述方法，剩余材料包括血浆。

20 6. 根据权利要求 1 所述方法，剩余材料包括血清。

 7. 对怀孕母体血清或血浆样品进行检测的方法，该方法包括测定样品中胎儿来源的 RNA 的存在。

25 8. 根据权利要求 7 所述方法，进一步包括了扩增胎儿 RNA，以有助于测定样品中胎儿 RNA 的存在。

 9. 根据权利要求 8 所述方法，其中胎儿 RNA 被反转录酶反转录为 cDNA，然后以聚合酶链式反应进行测定。

30

10. 根据权利要求 8 (8 或 9) 所述方法, 其中至少一个胎儿序列特异性寡聚核苷酸用于扩增胎儿 RNA。

5 11. 根据权利要求 7 (权利要求 7-10 中任一项) 所述方法, 其中用序列特异性的探针检测胎儿 RNA。

12. 根据权利要求 7 (权利要求 7-10 中任一项) 所述方法, 其中测定样品中胎儿来源的 RNA 的存在包括测定从 Y 染色体上转录来的胎儿 RNA 的存在。

10

13. 根据权利要求 12 所述方法, 其中胎儿 RNA 是从 ZFY 基因转录而来。

14. 根据权利要求 12 (权利要求 12 或 13) 所述方法, 进一步包括通过测定样品中胎儿来源的 RNA 来判定胎儿性别。

15

15. 根据权利要求 7 (权利要求 7-11 中任一项) 所述方法, 其中测定样品中胎儿来源的 RNA 的存在包括测定由父亲或母亲遗传来的基因或其他 DNA 序列而来的胎儿 RNA 的存在。

20

16. 根据权利要求 7 (权利要求 7-11 中任一项) 所述方法, 其中 RNA 是用任何一种物理方法、免疫方法、和生化方法进行测定的。

17. 对怀孕母体的血清或血浆样品进行检测的方法, 该方法包括: 测定样品中胎儿或母体来源的 RNA 的存在。

25

18. 根据权利要求 17 所述方法, 进一步包括了扩增胎儿或母体 RNA, 以有利于检测样品中胎儿或母体来源的 RNA 的存在。

19. 根据权利要求 18 所述方法, 其中胎儿或母体 RNA 由反转录酶

30

转变为 cDNA，然后通过 PCR 反应测定。

20. 根据权利要求 18 (权利要求 18 或 19) 所述方法，至少一个胎儿或母体序列特异性寡聚核苷酸可用于扩增胎儿或母体 RNA。

5

21. 根据权利要求 17 (权利要求 17-20 中任一项) 所述方法，用序列特异性探针测定胎儿或母体 RNA。

22. 根据权利要求 17 (权利要求 17-21 中任一项) 所述方法，测定
10 样品中胎儿或母体来源的 RNA 的存在包括测定从染色体 6 上基因转录的 RNA 的存在。

23. 根据权利要求 22 所述方法，RNA 是从 HLA-G 基因转录而来。

15 24. 出生前监测或测试的方法，包括以下步骤：

(i) 提供怀孕母亲血液样品；

(ii) 将样品分离为细胞占优势的组分 (组分 1) 和非细胞占优势的
的组分 (组分 2)；

(iii) 测定组分 2 中胎儿来源的 RNA 的存在；

20 (iv) 基于所测定 RNA 的存在、数量、浓度、序列、和生化成分中至少一种，提供一种诊断结果。

25 25. 根据权利要求 24 所述方法，进一步包括了母体血液样品结块后获得血清，此血清用于步骤 (iii) 和 (iv)。

25

26. 根据权利要求 24 所述方法，其中步骤 (iii) 进一步包括了测定组分 2 中母亲或胎儿来源的 RNA 的存在。

30 27. 对母亲血液样品进行出生前监测或测试的方法，包括获得母亲血液样品的非细胞组分和对此组分表达的基因进行 RNA 分析。

非侵入的出生前监测

5

发明背景

本发明涉及利用非侵入技术的出生前检测方法，尤其是怀孕个体的血液样品中胎儿或母亲的 RNA 的检测，包括通过分析血液样品对未出生胎儿的基因表达模式进行评价。

我们以前描述了对母体血浆和血清中循环胎儿 DNA 的检测，如 Y.M. Dennis Lo 等人在 Lancet 1997, 350: 485-7, 杂志上的文章“母体血浆和血清中存在胎儿 DNA”，我们已经证明了这种技术在非侵入出生前诊断中的用途。Y.M. Dennis Lo 等人 在新英格兰医学杂志 (New England Journal of Medicine 1998, 339: 1734-8) 上的“通过母体血浆的分子分析进行胎儿的 RhD 状态的出生前诊断”一文。胎儿 DNA 在母体血浆中的发现为出生前分子诊断打开了新的视野。自从那时以来，许多研究小组证明可以通过母体血浆中的胎儿 DNA 来测定胎儿遗传性状，如 RhD 状态和遗传疾病。

现有技术的主要限制是：胎儿 DNA 测定只能使人知道母体循环中存在胎儿来源的遗传物质和数量，并不能给出关于婴儿基因表达概况的信息，预期基因表达模式可能受影响母体和婴儿的生理和病理过程的影响，常规的非侵入技术不能做到直接监测胎儿基因表达。

发明概要

本发明的实施方案涉及怀孕个体血液样品中母体或胎儿的 RNA 的检测，也包括将样品进行显示胎儿或母体状况或特性的胎儿或母体分析指标的测试。比如：RNA 分析包括通过分析母体血液样品，评价未出生胎儿的基因表达模式。本发明的用处在于怀孕的第二个三月和第三个三月开始显示，可以广泛的用于疾病的诊断和监测，包括惊阙前期和提前分娩。

本发明实施方案中的新的出生前监测技术第一次实现了仅通过分析母体血液样品测定胎儿基因的表达。本发明将成为非侵入方法进行出生

前测定的新一代平台技术。

出生前监测技术基于在怀孕妇女血浆中发现循环的胎儿 RNA, 此前, 人们并不知道胎儿 RNA 也存在于母体血浆中, 应用两步的逆转录酶聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术, 我们证明胎儿来源的、男性特有的 mRNA 存在于怀男孩的妇女血浆中。正如在此描述的, 胎儿 RNA 可以被 RT-PCR 技术测定, 但原则上, 可以使用任何 RNA 测定方法。

预期该技术可以在所有怀孕的情况中测定胎儿的生理或病理状况。在特定情况下, 在怀孕期间令人满意的或者必要的是进行一次以上的这样的监测, 因此潜在客户数量和多次使用的可能性是巨大的。

按照本发明的一个方面, 出生前监测或测定怀孕的人的血样的方法, 包括从血样中除去所有的或基本上所有的有核和无核的细胞群以获得剩余的材料, 剩余的材料用于测试胎儿或母体的 RNA 分析指标, 以显示母体或胎儿的状况或特征, 剩余的材料包括血浆或血清。

按照本发明的另一个方面, 测定怀孕妇女母体血清或血浆样品的检测方法包括测定样品中存在的胎儿 RNA。扩增胎儿 RNA 以促进检测样品中存在的胎儿来源的 RNA。例如胎儿 RNA 可能被反转录酶转变为 cDNA, 然后通过聚合酶链反应来测定。

在一些具体实施方案中, 用序列特异性的探针来测定胎儿 RNA。RNA 的测定包括测定从 Y 染色体转录来的胎儿的 RNA 的存在, 或者测定从母亲或父亲遗传来的基因或其他 DNA 序列转录而来的胎儿 RNA。可用任何一种物理方法、免疫方法和生化方法测定 RNA。

按照本发明的另一个方面, 测定怀孕妇女血清或血浆样品的检测方法包括检测样品中胎儿或母体来源的 RNA 的存在。RNA 检测可能包括检测从染色体 6 中的基因转录来的 RNA 的存在, 此 RNA 可能从 HLA-G 基因转录而来。

本发明的另一个方面涉及进行出生前监测或测试的方法。该方法包括提供母体血液样品、将样品分离为细胞占优势的组分 (组分 1) 和非细胞占优势的组分 (组分 2)。在组分 2 中可以检测到胎儿来源的 RNA 的存在。该方法进一步包括了基于所测定 RNA 的存在、数量、浓度、序列、和生化成分中至少一种作出诊断。

按照本发明的另一个方面，对母体血液样品进行出生前监测或测试的方法包括获得母体血液样品的非细胞组分和对此组分中人类基因表达的 RNA 分析。

附图简述

5 附图 1 是本发明的实施方案中描述的非侵入出生前监测方法的流程图。

附图 2 按照本发明的实施方案中描述的母体血浆中胎儿来源的 Y 染色体特异性的锌指蛋白 (ZFY) mRNA 的检测，和针对 HLA-G mRNA 的 RT-PCR 测试。

10

特定的实施方案的描述

如附图 1 所示，按照本发明的实施方案，对由怀孕母体获得的血液样品进行出生前监测或测试的方法首先是提供血液样品 (步骤 10)，在步骤 14 中，所有的或基本上所有的有核细胞和无核细胞群被从血液样品中
15 除去，步骤 18 中将剩下的材料用于胎儿或母体 RNA 分析指标的测试，以显示胎儿或母亲的状况或特征。用于 RNA 分析的剩下的材料可能是细胞物质或非细胞物质。在特定的实施方式中，剩余的材料可能包括血浆或血清。血清可能由母体血液样品凝块而获得。

对母体的血清或血浆样品进行测试以检测样品中胎儿或母体来源的
20 RNA 的存在。为了促进样品中的 RNA 检测，可以将 RNA 扩增。在一个例子中，胎儿或母体 RNA 由反转录酶转变为 cDNA，然后经 PCR 扩增后测定。扩增胎儿或母体 RNA 可能包括使用胎儿或母体的至少一个序列特异性寡核苷酸。

用一个序列特异性探针可能测定胎儿或母体的 RNA。在一个实施例中，存在的胎儿 RNA 的测定包括测定从 Y 染色体转录来的胎儿 RNA，
25 更具体地说，胎儿 RNA 可能被从 ZFY 基因转录。样品中的胎儿来源的 RNA 可以测定胎儿的性别。在另一个实施例中，测定样品中胎儿来源的 RNA 的存在包括测定从父亲遗传来的基因或其他 DNA 序列而来的胎儿 RNA。在另一个例子中，测定样品中母亲或胎儿来源的 RNA 的存在包括
30 测定从染色体 6 中的基因转录来的 RNA 的存在，此 RNA 可能从 HLA-G

基因 中 转录 而来。用 一个 或 多个 物理的、免疫 和 生化 的 方法 可以 测定 RNA。

在 另外 的 例子 中，母亲 的 或 胎儿 的 RNA 的 测定 和 分析 用 母亲 的 血液 样品 的 非 细胞 组分 进行。非 细胞 组分 完全 是 非 细胞 或 非 细胞 占 优势 的，
5 通过 分离 血液 样品 中 所有 的 或 占 优势 的 细胞 组分 而 获得。RNA 分析 包括 基于 测定 RNA 的 存在、数量、浓度、序列、生化 组成 中 的 一种 或 多种 给出 的 诊断。在 一个 特定 的 实施例 中，对 在 样品 中 非 细胞 组分 中 表达 的 人类 基因 进行 RNA 分析。

应该 说明 的 是：过滤 血液 样品、除去 所有 细胞 材料、得到 血浆 或 血清（即：血液 中 无 细胞 组分 占 优势），对此 样品 仍能 进行 胎儿 或 母亲 的
10 RNA 测定 和 分析。

如下 的 例子 描述 本 发明 的 各种 特征，并不 以 任何 形式 限制 本 发明 的 范围。

在 该 例子 中，在 知情 同意 的 情况 下，怀孕 妇女 在 产科 和 妇科 医学 系、
15 威尔士 王子 医院、香港 等 参加 出生 前 诊断 试验。临床 研究 伦理 委员会 批准 了 此 项 研究，21 个 怀孕 早期 和 37 个 怀孕 晚期 的 妇女 参加 了 试验，怀孕 早期 的 平均 的 怀孕 时间 为 16 周（范围 从 11-19 周），晚期 的 平均 为 33 周（范围 为 26-40 周）。所有 的 早期 怀孕 样品 都是 在 侵入 过程 之前 获得，另一方面，怀孕 晚期 的 样品 或者 是 从 在 怀孕 早期（n=21）做过 侵入 过程 的
20 妇女 获得 的，或者 是 从 没有 进行 任何 出生 前 侵入 步骤（n=16）的 妇女 获得 的。所有 的 血浆 样品 都是 30 分钟 内 从 EDTA 血液 样品 获得 的，参照 Y.M.Dennis Lo 等人 在 《手术 刀》（1997，350：485-7）中 的 文章“胎儿 DNA 在 母体 血浆 和 血清 中 出现”，按照 生产 者 的 说明，血浆 中 的 所有 的 RNA 用 Trizol LS 试剂（Gibco BRL）分离，一般 来说，1mL 血浆 中 分离
25 得 RNA 被 溶解 在 50uL 不含 RNA 酶 的 水中。

在 本 研究 中，我们 选择 测定 母亲 血浆 中 的 胎儿 来源 的、Y 染色体 特异性 的 锌 指 蛋白 mRNA，参照 D.C. page 等人“人类 Y 染色体 上 性别 决定 区 编码 锌 指 蛋白”（《细胞》杂志 1987，51：1091-104），M.S.Palmer 等人“人类 ZFY 和 ZFX 转录 物 的 比较”（美国 科学院 年报 1990，87：1681-5），
30 如图 2，只有 当 怀 男孩 的 妇女 胎盘 总 RNA 用于 RT-PCR 测定 时，可以

观察到对应于 ZFY mRNA 的 RT-PCR 产物 (图 2, 1 泳道)。相反, 当反
转录 (RT) 被省略, 没有出现阳性信号 (图 2, 2 泳道), 当女性的胎盘
总 RNA 用于 RT-PCR 检测时, 也没有阳性信号 (图 2, 3 泳道)。在怀
孕晚期的怀男孩的 20 个妇女中, 13 个妇女的血浆样品中检测到了 ZFY
5 阳性信号 (图 2, 中间泳道, 6-10 泳道)。在怀孕早期的怀男孩的妇女
中, 9 个当中的 2 个检测到了阳性信号。阳性反应中的 ZFY mRNA 特异
性的 RT-PCR 产物在 DNA 测序中也得到了证实 (数据没有示出)。通过
比较, 20 个怀女孩的妇女, 无论是 12 个怀孕早期的, 还是 8 个怀孕晚期
的, 除一个之外, 所有测试都是阴性反应 (图 2, 中间泳道, 11-14 泳道)
10 唯一一个假阳性的反应推测是由于 RNA 加工过程的污染, 作为提取的
RNA 质量的对照, 我们将所有样品进行 RT-PCR 测定以检测 HLA-G
mRNA, 参照 T.V.F.Hviid 等人, “人类前三个月胚胎滋养层 HLA-G 基因
共显性表达和各种剪切形式的 HLA-G mRNA” (Hum. Immunol, 1998,
59:87-98)。HLA-G 基因在胎儿 (比如滋养层, 参照 id.) 和母体组织中 (比
15 如淋巴细胞, 参照 M.Kirszenbaum 等人) 都有表达。“人类滋养层的作为选
择的 HLA-G mRNA 的剪切形式和 HLA-G 转录物在成人淋巴细胞中存在的
证据” (美国科学院年报, 1994, 91:4209-13)。如图 2 底下的泳道,
HLA-G mRNA 的 RT-PCR 产物在所有的血浆样品中都检测到了, 表明这
些样品中存在可扩增 RNA 的。

20 最近证明, 一定比例的母体血浆中的胎儿 DNA 以完整的胎儿细胞的
形式在血液中循环, 参照 I. J. van Wijk 等人的“怀孕妇女血浆中的编程
性死亡的胎儿细胞的测定[技术简介]” (Clin.Chem.2000, 46:729-31)。所以
我们测定到的胎儿 RNA 是从血浆中的细胞而来的, 这在理论上很可能。
为了最终验证是否胎儿 RNA 以无细胞的形式参与母体的循环, 母体血浆
25 样品通过 0.2um 的膜 (Nalgene) 过滤, 从过滤血浆中的提取的 RNA 用
于 ZFY RT-PCR 测定。在 9 个怀孕晚期的怀男孩的妇女的过滤过的血浆
样品中, 6 个样品中检测到了阳性的 ZFY mRNA 信号 (数据没有示出),
这个结果显示, 至少一部分胎儿 RNA 在母体血浆中是非细胞形式出现的。

我们的数据显示: 胎儿 RNA 可以在母体血浆中测定到, 在早期和晚
30 期怀孕的妇女的血浆中测定到胎儿 RNA 的比率分别为 22% 和 63%。在怀

孕早期妇女的血浆中检测到 RNA 的比率比怀孕晚期的要低,说明血浆中胎儿 RNA 的浓度在怀孕早期比较低。这一发现和我们以前的发现相似,即母体血浆中的胎儿 DNA 浓度随着怀孕时间增加而增加。参照 Y.M.Dennis Lo 等人“母体血浆和血清中胎儿 DNA 的分析:非侵入的出生前诊断”(Am.J.Hum.Genet1998,62:768-75)。我们意识到,血浆中所测定到的胎儿 RNA 的比率低于 DNA 的比率,很可能是胎儿 RNA 在母体血液中更容易降解,所以血浆中的胎儿 RNA 的数量要少于 DNA 的数量。在怀男孩的妇女血浆样品中测定到了 Y 染色体的 DNA (数据没有示出),这一点也可以支持上述观点。高灵敏度的实时数量 RT-PCR 测定可以用于改进母体血浆胎儿 RNA 的测定的灵敏度。

总之,我们的试验第一次表明:母体血浆中可以测定到胎儿 RNA,我们的数据为非侵入出生前诊断提供了新的方法。血浆胎儿 DNA 分析为在母体循环中存在的胎儿遗传物质的和浓度提供了数据。此外,血浆中的胎儿 RNA 分析可以为胎儿组织的基因表达模式提供有价值的信息。不正常的怀孕,比如惊阙前期就和胎儿组织中不正常的基因表达模式相关。B.K.Rinehart 等人“胎盘细胞因子肿瘤坏死因子 α ,白介素 1 β 和白介素 10 在惊阙前期表达量增加”(Am.J.Obstet.Gynecol 1999,181:915-20)。所以随着进一步的 RNA 标记的研制,母体血浆 RNA 分析使得在许多生理和病理状况下的非侵入的胎儿基因表达实现。很明白的是,在这里用的术语“血浆胎儿 RNA 分析”包括母体血浆或血清中胎儿 RNA 分析。

以上描述的仪器和方法的安排仅仅描述了本发明原理的应用,正像权利要求所述的,在不改变本发明的主旨和范围的情况下,可以有许多其他具体实施方案和改变。比如当我们展示了概念的可行性,进一步的研究可能阐明本技术应用的条件范围。此外,可以对此技术进一步的改善,比如在遵循本发明范围的情况下提高本方法的可靠性。本发明的范围不应按照以上描述确定,而应该按照附带的权利要求和等同物的全部的范围来确定。

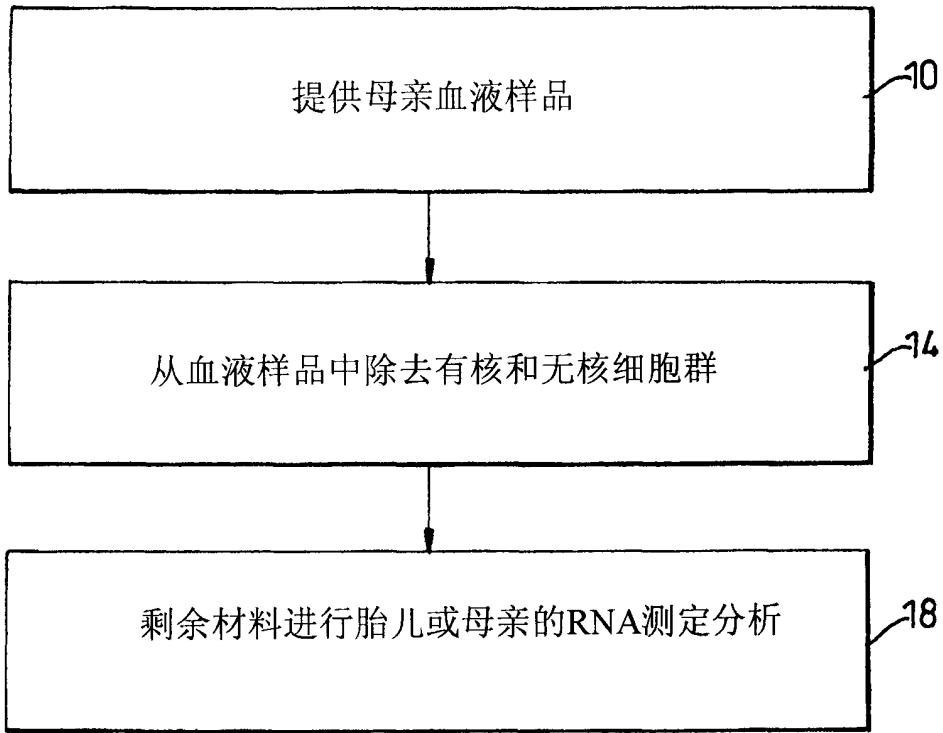


图 1

对照

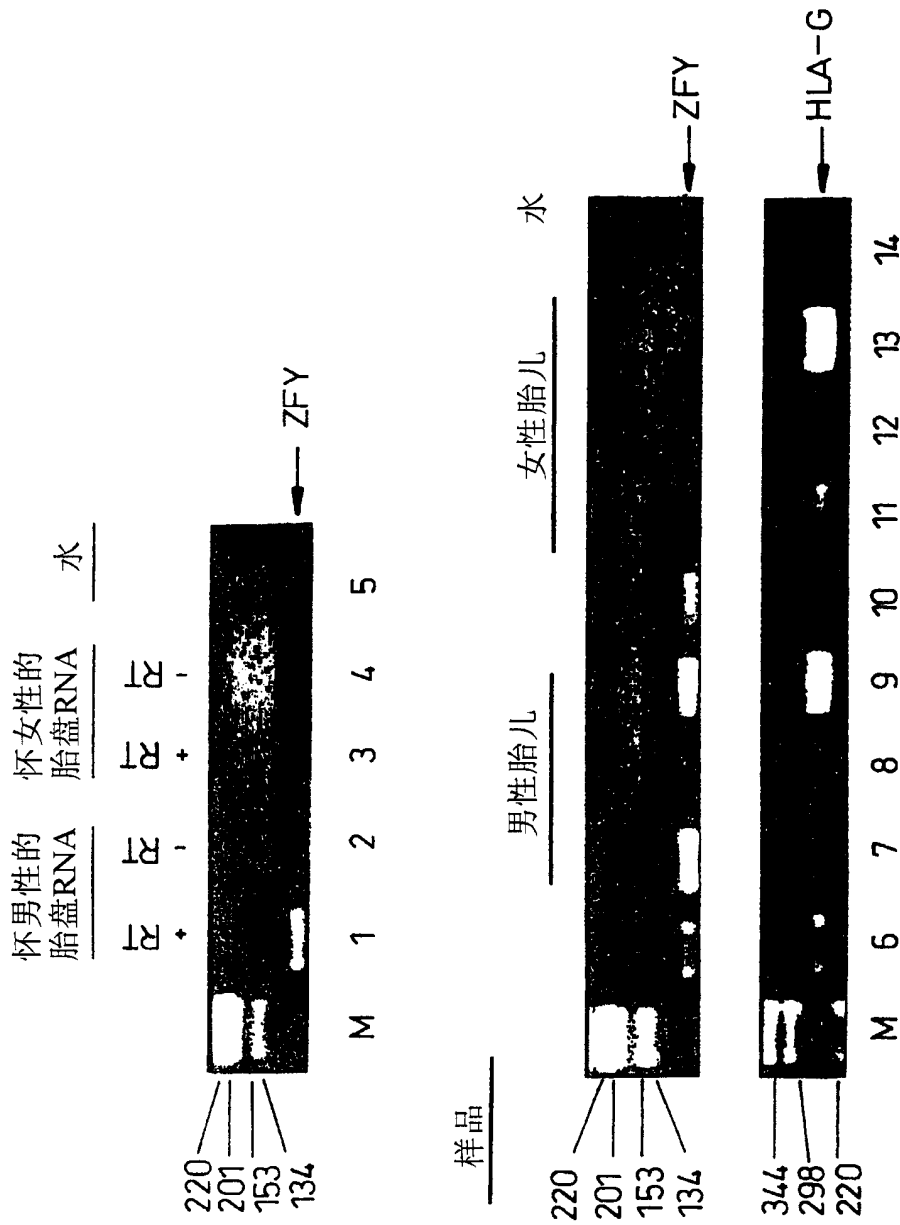


图 2