



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03122973.5

[43] 公开日 2004年10月27日

[11] 公开号 CN 1539992A

[22] 申请日 2003.4.23 [21] 申请号 03122973.5

[71] 申请人 林大钦  
地址 中国台湾  
[72] 发明人 林大钦

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司  
代理人 林晓红

权利要求书3页 说明书13页 附图5页

[54] 发明名称 一种使用于产前检查胎儿基因的方法

[57] 摘要

本发明提供一种用于产前检查胎儿基因的方法，其是有关于如何分离怀孕妇女血液中微量的胎儿核酸及提高分离微量胎儿核酸的成功率，藉以避免对母体及胎儿的伤害性及危险性，且该产前检查胎儿基因方法包括利用冷冻法以避免怀孕妇女血液中微量胎儿核酸的破坏，以及避免胎儿核酸于提取过程中流失，并因此增加核酸提取量，而于检查胎儿核酸时可使用基因探针、基因引物及即时聚合酶扩增或定量聚合酶扩增的方法，以提高微量的胎儿核酸检测的准确度及精确度，另外，本发明亦可广泛运用在其它父源性基因疾病的检查，对于产前检查胎儿基因具有其进步性及实用性。

ISSN 1008-4274

1、一种使用于产前检查胎儿基因的方法，其包括抽取怀孕妇女血液且分离出其中微量的胎儿核酸，从而在微量的胎儿核酸中检测父源性的遗传核酸成份。

2、一种使用于产前检查胎儿基因的方法，其包括一种分离怀孕妇女血液中微量的胎儿核酸的方法，此方法包括的步骤有：

步骤（1），抽取怀孕妇女血液；

步骤（2），以离心法分离出血浆、血清；

步骤（3），取用血浆或血清；

步骤（4），以蛋白酶 K 提取法以提取其中的核酸。

3、一种使用于产前检查胎儿基因的方法，其包括一种避免怀孕妇女血液中微量的胎儿核酸的破坏及胎儿核酸提取过程中流失的方法，此方法包括的步骤有：

步骤（1），抽取怀孕妇女血液；

步骤（2），以离心法分离出血浆、血清；

步骤（3），以冷冻法将血浆或血清每分钟定量下降，冷冻至摄氏零度以下成结晶状态；

步骤（4），进行核酸提取时，解冻以进行核酸提取，藉以冷冻及解冻的循环步骤，破坏该分解微量胎儿核酸的酶，以及破坏抑制核酸提取及抑制聚合酶扩增的蛋白质，而于提取时以核酸载体避免胎儿核酸于提取过程中流失，并可因此增加核酸提取量。

4、如权利要求 3 所述的使用于产前检查胎儿基因的方法，其中该载体改以吸附剂实施。

5、如权利要求 2 或 3 所述的使用于产前检查胎儿基因的方法，其中该离心法改以快煮法实施分离。

6、如权利要求 2 所述的使用于产前检查胎儿基因的方法，其中

该蛋白酶 K 提取法改以蛋白酶提取法实施提取。

7、如权利要求 2 所述的使用于产前检查胎儿基因的方法，其中该蛋白酶 K 提取法改以酚/氧仿提取法实施提取。

8、如权利要求 2 所述的使用于产前检查胎儿基因的方法，其中该蛋白酶 K 提取法改以吸附膜提取法实施提取。

9、如权利要求 2 所述的使用于产前检查胎儿基因的方法，其中该蛋白酶 K 提取法改以乙醇核酸提取法实施提取。

10、如权利要求 2 所述的使用于产前检查胎儿基因的方法，其中该蛋白酶 K 提取法改以盐核酸提取法实施提取。

11、一种使用于产前检查胎儿基因的方法，其包括一种以父源性基因序列为胎儿基因检查标的方法，此方法包括的步骤有：

步骤（1），抽取父亲血液；

步骤（2），检验父亲血液中染色体的基因序列；

步骤（3），如果欲检验 Y 性染色体的遗传，略过步骤（1）及步骤（2），直接在 Y 性染色体中选定基因的核酸序列；

步骤（4），选择步骤（2）及步骤（3）中不重复存在于其他的染色体的基因序列；

步骤（5），比对胎儿核酸与父亲体染色体或性染色体是否具相同的基因，或比对具有与 Y 性染色体相同的基因序列。

12、一种使用于产前检查胎儿基因的方法，其包括一种使用探针、引物及即时聚合扩增或定量聚合酶扩增以检查的方法，此方法包括有：

步骤（1），以不重复存在于其他的染色体的基因序列设计引物；

步骤（2），以该引物经一般聚合酶扩增后作电泳分析，以检查是否有要检测的基因；

步骤（3），另设计探针在即时聚合酶扩增中，结合欲测量的基因序列；

步骤（4），以仪器作定性或定量分析探针的表现，而可以分析探

针与欲测量的基因序列结合扩增的情形，即可作一辅助分析。

13、一种使用于产前检查胎儿基因的方法，其包括一种使用定量聚合酶扩增来测量的方法，此方法包括的步骤有：

步骤（1），以定量聚合酶扩增来测量父源性体染色体与 Y 性染色体的比值；

步骤（2），检测比值是否为 1；

步骤（3），比值为 1，胎儿基因套数正常；

步骤（4），当比值大于 1 时，胎儿为父源性体染色体的非整倍染色体（aneuploidy）套数异常；

步骤（5），当比值小于 1 时，胎儿为性染色体的套数异常。

## 一种使用于产前检查胎儿基因的方法

### 技术领域

本发明涉及从怀孕妇女血液中分离出微量的胎儿核酸，而可检测胎儿基因的方法。

### 背景技术

一般传统产前检查胎儿基因的方式，是经由抽取怀孕妇女子宫内羊水后，检查羊水内的胎儿基因，或者藉由抽取或灌洗怀孕中的胎儿组织（如胎盘或绒毛）时，检查灌洗液中或抽取物（如绒毛）中的胎儿基因。不论抽取羊水或绒毛取样，都是一种对母体及胎儿侵犯性的医疗行为，对胎儿或母体都有一定的伤害性及危险性。而目前另一种不侵犯性检查胎儿基因的方式，是以细胞分流仪分离怀孕妇女血液中的胎儿细胞，虽然较上述方法为佳，但手续繁复且消耗时间较长，且仪器成本高昂，实不适合临床使用。

有鉴于此，本发明人为解决此一问题，乃决心凭其从事相关行业的经验及体验，盼能研发出实用的发明，经多次的开发研究后终于精心设计出本发明的用于产前检查胎儿基因的方法，其可完全克服上述已知方法的缺点，实为一安全且极具效率的发明。

### 发明内容

本发明的使用于产前检查胎儿基因的方法所欲解决的技术问题在于，已知检查胎儿基因方法是以抽取羊水或绒毛取样的方式以取得胎儿基因，但该二方式皆对母体及胎儿构成一侵犯性的医疗行为。

本发明的使用于产前检查胎儿基因的方法可藉由分离怀孕妇女血液中微量的胎儿核酸以检测胎儿基因，如此可避免对母体及胎儿的

伤害性及危险性，且可运用在其它父源性基因疾病的检查。另本发明可提高该分离微量胎儿核酸的成功率，以避免怀孕妇女血液中微量胎儿核酸的破坏及胎儿核酸于提取过程中流失，且可以基因探针、基因引物及即时聚合酶扩增或定量聚合酶扩增的方法以提高微量的胎儿核酸检测的准确度及精确度。

其他目的、优点和本发明的新颖特性将从以下详细的描述与相关的附图更加显明。

#### 附图说明

图 1：分离怀孕妇女血液中微量胎儿核酸的方法流程图；

图 2：避免怀孕妇女血液中微量胎儿核酸的破坏及胎儿核酸于提取过程中流失的方法流程图；

图 3：以父源性基因序列为胎儿基因检查标的的方法流程图；

图 4：使用探针及引物检查的方法流程图；

图 5：使用定量聚合酶扩增的测量方法流程图；

表 1：Y 性染色体遗传可选择的基因表；

表 2：Y 性染色体遗传探针的种类；

表 3：Y 性染色体遗传引物探针的组合例；

表 4：载体列表；

表 5：吸附剂列表。

#### 具体实施方式

请参阅图 1~图 5，图中所示者为本发明所选用的一种实施例的结构，此仅供说明之用，在专利申请上并不受此种结构的限制。

本发明主要是提供一种使用于产前检查胎儿基因的方法，其包括有数种方法：

请参阅图 1，一种提供了分离怀孕妇女血液中微量的胎儿核酸的

方法 10，其包括有下列步骤：

步骤 11，抽取怀孕妇女血液；

步骤 12，以离心方式或以快煮法（rapid boiling method）分离出血浆或血清；

步骤 13，取用 10ul 到 10ml 的血浆或血清；

步骤 14，以蛋白酶（proteinase K 或 protease）分解、酚/氯仿方法、吸附膜方法或其他如乙醇（或盐）核酸提取法以提取其中的核酸，其中，从数量较多的血浆或血清中可提取出较大量的胎儿核酸，其检查的准确度也就越高。

请参阅图 2，一种避免怀孕妇女血液中微量的胎儿核酸的破坏、避免胎儿核酸提取过程中流失及增加核酸提取量的方法 20，其包括有下列步骤：

步骤 21，抽取怀孕妇女血液；

步骤 22，以离心方式或以快煮法（rapid boiling method）分离出血浆或血清；

步骤 23，以冷冻法将血浆或血清每分钟定量下降，冷冻至摄氏零度以下成结晶状态（最好维持摄氏零下四度以下）；

步骤 24，当需要进行核酸提取时，即可解冻后而进行核酸提取。

以此冷冻及解冻的循环步骤，即可破坏分解微量的胎儿核酸的酶，以及破坏抑制核酸提取及抑制聚合酶扩增的蛋白质，另外，提取时可以用核酸载体（DNA carrier，表 4）或吸附剂（absorbant material，表 5）避免胎儿核酸于提取过程中流失，并可因此增加核酸提取量。

请参阅图 3，一种以父源性（由父亲遗传而来，不论是正常或突变，或不不论是性染色体或体染色体）基因序列为胎儿基因检查标的方法 30，基因序列的选择以父亲遗传而来的基因为主，而此基因原不存在于女性或原不存在于此怀孕妇女，即可为胎儿基因检查的标的，其包括有下列步骤：

步骤 31, 同步骤 11 至步骤 14;

步骤 32, 抽取父亲血液;

步骤 33, 检验父亲血液中染色体的基因序列;

步骤 34, 如果欲检验 Y 性染色体的遗传, 略过步骤 32 及步骤 33, 直接在 Y 性染色体 (如表 1) 中选定基因的核酸序列;

步骤 35, 选择步骤 33 及步骤 34 中不重复存在于其他的染色体的基因序列;

步骤 36, 比对胎儿核酸与父亲体染色体或性染色体是否具相同的基因, 或比对具有与 Y 性染色体相同的基因序列。

以检查胎儿是否有接受父亲的 Y 性染色体遗传为例:

因为一般妇女无 Y 染色体基因, 可以检验 PDH11Y 中的 DXS7650、G19304 等, 或可以检验 SRY 中的 X53773、L10102、L08063 等, 经选择其中不重复存在于其它染色体的基因序列, 经聚合酶扩增 (PCR) 就可知道此胎儿是否有接受父亲的 Y 性染色体遗传, 当然也就可知道此胎儿的性别。其可选择基因表列于表 1。

以检查胎儿是否有接受父亲的染色体遗传为例:

不论是父源性体染色体或性染色体, 只要其基因不同于此怀孕妇女, 即可以检验原来不存在于此怀孕妇女的胎儿基因。因为个人不同的基因差异及变异, 使其不论是单核酸或核酸序列的多态性 (polymorphism), 或相对于遗传表型 (phenotype) 的基因型 (genotype) 基因的差异, 经选择其中不重复存在于其它的染色体的基因序列, 经聚合酶扩增 (PCR) 就可知道此胎儿是否有接受父亲的差异处或变异处染色体的遗传, 当然也就可知道此尚未出生胎儿的生父, 也可以知道胎儿是否遗传到父亲的差异处或变异处的基因, 可产前预知胎儿是否接受到父亲遗传性疾病。

例如: 在 RH (RhesusD) 的孕妇体内检验胎儿 RH 是否为阳性, 可以以 RH D 基因序列 (DNA 或 RNA 皆可) 为检验标的。



请参阅图 4，一种使用探针、引物及即时聚合酶扩增（real time PCR）或定量聚合酶扩增以检查的方法 40，可提高微量的胎儿核酸检测准确度及精确度，其包括有下列步骤：

步骤 41，延续步骤 36，以不重复存在于其他的染色体的基因序列设计引物（如表 3）；

步骤 42，以该引物经一般聚合酶扩增（PCR）后作电泳分析以检查是否有要检测的基因；

步骤 43，一般聚合酶扩增（PCR）误差太大，准确度及精确度不够，如要检查的核酸太微量则可另设计探针（如表 2、3）在即时聚合酶扩增中，结合欲测量的基因序列，其结合后探针随探针种类的不同，而可以不同的方式检测；

步骤 44，随着欲测量的基因序列的基因序列因复制而数量变多，且即时探针与欲测量的基因序列结合也越多，被检测到探针表现的也就越多，即可以仪器作定性或定量分析探针的表现，而可以分析探针与欲测量的基因序列结合扩增的情形，即可作一辅助分析，自然其准确度及精确度就较高。

以检查胎儿是否有接受父亲的 Y 性染色体遗传为例：

如上述及表 1 的基因位置中，举检验 SRY 中的 L08063 为例。经选择其中不重复存在于其它染色体的基因序列，可以选 SRY 11f 及 SRY 11r 为引物、配合 Hybridization probes SRY 11FL 及 SRY 11Cy5 为探针或 TaqMan probe SRY 11FT 为探针，经聚合酶扩增（PCR）就可知道此胎儿是否有接受父亲的 Y 性染色体遗传，当然也就可知道此胎儿的性别。其可选择引物及探针的组合列于表 2 及表 3。

请参阅图 5，一种使用定量聚合酶扩增来测量的方法 50，是可测量不同胎儿核酸的量及比值来筛选非整倍染色体（aneuploidy）的胎儿基因疾病，其包括有下列步骤：

步骤 51，非整倍染色体（aneuploidy）中有 20%是父源性的染色

体倍增，故可以定量聚合酶扩增来测量父源性体染色体与 Y 性染色体的比值；

步骤 52，检测比值是否为 1；

步骤 53，比值为 1，胎儿基因套数正常；

步骤 54，当比值大于 1（如 2：1）时，胎儿可能是父源性体染色体的非整倍染色体（aneuploidy）套数异常；

步骤 55，当比值小于 1（如 1：2、1：3、1：4）时，胎儿则可能是性染色体的套数异常，相对的可能是 XYY、XYYY、及 XYYYY 症候群。

所以如果选择第 21 对体染色体的多态核酸序列的检测，则可以检测父源性唐氏症（21 对非整倍染色体）、同理可以选择第 13、18 对体染色体的变异核酸序列来检测父源性非整倍染色体。

就以上所述可以归纳出本发明具有以下优点：

（1）本发明的使用于产前检查胎儿基因的方法，其中包括有一种分离怀孕妇女血液中微量胎儿核酸的方法，其方法是可避免传统检查方式的伤害性及危险性。

（2）本发明的使用于产前检查胎儿基因的方法，其中包括有一种避免怀孕妇女血液中微量胎儿核酸的破坏及胎儿核酸于提取过程中流失的方法，该方法是提高了检查胎儿基因的成功率，以避免一再抽取血液而造成孕妇身体无法负荷。

（3）本发明的使用于产前检查胎儿基因的方法，其中包括有一种以父源性基因序列为胎儿基因检查标的的方法，该方法是经聚合酶扩增后检查其父源性遗传是否有遗传给胎儿，可用以检查胎儿性别、性联遗传或突变基因的遗传。

（4）本发明的使用于产前检查胎儿基因的方法，其中包括有一种使用探针及引物检查的方法，该方法可提高微量胎儿核酸检测的准确度及精确度。

(5) 本发明的使用于产前检查胎儿基因的方法，其中包括有一种使用定量聚合酶扩增的测量方法，该方法是可用来测量不同胎儿核酸量及比值，以筛选非整倍染色体 (aneuploidy) 的胎儿基因疾病，如此，可于胎儿基因检查时即早发现不良基因。

唯上所述者，仅为本发明的较佳实施例而已，不能以之限定本发明实施的范围，即大凡依本发明权利要求书所作的均等变化与修饰，皆应仍属本发明专利涵盖的范围之内。

表1: Y性染色体遗传可选择基因

LOC256370·LOC170334·SRY·LOC170335·RPS4Y·LOC140073·ZFY·LOC140075·TGIF2LY·  
 LOC170337·LOC170339·PCDH11Y·LOC140079·LOC140080·LOC220904·LOC159148·  
 TTTY8·LOC140086·AMELY·TBL1Y·LOC140087·LOC140088·PRKY·LOC140092·  
 LOC140095·TTY12·LOC140096·LOC140097·LOC140098·LOC140100·LOC170343·  
 LOC170344·TTY11·LOC140101·LOC140103·LOC140104·LOC159156·LOC140044·  
 LOC140045·LOC257439·LOC257424·LOC140046·LOC257452·LOC140048·TSPY·  
 LOC159133·LOC140050·LOC140051·LOC140053·LOC140054·LOC257440·LOC140057·  
 LOC170330·LOC140059·TTY2·LOC170331·LOC140064·LOC140065·LOC140066·  
 LOC140067·LOC170332·LOC140068·LOC140070·LOC253293·ASSP6·RPS24P1·ARSEP·  
 ARSDP·LOC170312·LOC207097·LOC139976·LOC170314·USP9Y·DBY·LOC256944·  
 UTY·TMSB4Y·LOC170315·KALP·LOC256951·LOC170316·VCY·KIAA0951·LOC170318·  
 LOC139990·STSP·LOC139993·LOC139998·LOC140004·LOC159110·LOC140005·  
 LOC254255·LOC159111·LOC140006·LOC203611·LOC140008·LOC140009·CDY2·  
 LOC140010·LOC159114·XKRY·ACTGP2·LOC140012·LOC159116·LOC140013·LOC140015·  
 LOC254257·LOC140016·HSFY·TTY9·LOC140017·LOC140018·LOC140019·LOC140020·  
 LOC159119·LOC140023·LOC254261·LOC140024·Cyorf14·LOC159121·LOC170324·TTY14·  
 LOC140028·LOC170325·Cyorf15B·LOC159123·SMCY·LOC140031·LOC203613·EIF1AY·  
 RPS4Y2·LOC140033·LOC17027·LOC140036·LOC159125·LOC207098·LOC140037·  
 LOC140038·RBM1A1·TTY13·LOC140042·LOC140043·LOC159128·LOC140107·  
 LOC170346·LOC140111·LOC159160·LOC170353·LOC170349·LOC253125·LOC140112·  
 LOC253126·TTY7·MGC26641·LOC140116·LOC159163·TTY6·LOC170351·LOC170347·  
 PRY·LOC140118·LOC170354·LOC10121·LOC253169·LOC159165·DAZ·DAZ2·LOC170356·  
 LOC140123·LOC140125·LOC140126·LOC207103·LOC140127·LOC140129·LOC170358·  
 LOC253175·LOC140131·LOC170359·LOC256886·LOC253182·LOC159178·GOLGA2LY·  
 LOC140134·LOC140134·LOC140135·LOC140136·LOC253240·DAZ3·LOC140139·VCY2·  
 LOC140141·LOC159176·LOC257431·LOC159170·LOC84664·LOC140145·LOC170361·  
 LOC140146·CDY1·LOC170362·LOC140149·LOC140151·LOC140155·LOC140157·  
 LOC256956·LOC159184·LOC170365·LOC170366·LOC253479·LOC253480·LOC253481·

表2: Y性染色体遗传探针的种类

**Hybridization probes** 杂交探针 : 供给荧光的荧光素探针 (fluorescein probe) 及接受荧光的荧光探针 (acceptor probe) 与要检验的核酸序列结合后, 因荧光能量转移而产生要检测的荧光。

**Molecular Beacons** 分子信号探针 : 探针核酸序列与要检验的核酸序列结合后荧光出现或改变的探针。一般有双标示探针 (Dual-labeled probes), 猝灭探针 (quenched probes) (Dark Quencher (Dabcyl)) …等等之类的探针。

**Double-Dye Oligonucleotide** 双染料寡核苷酸探针: TaqMan 水解探针 (TaqMan hydrolysis probe), FAM/TAMRA TaqMan 探针 (羧基荧光素 / 羧基四甲基罗丹明), TAMRA猝灭探针 (Quencher TAMRA probe)。

**Scorpion** 蝎型引探针: 引物及荧光探针共构的一种核酸序列。

可用的荧光染料 (**dyes**) : FAM, Fluorescein, Texas Red, HEX, TET, CY3, CY5, CY5.5, JOE, 6-ROX, Rhodamine, Rhodamine 6G, Rhodamine Green, Rhodamine Red, 6-TAMRA, 5-TAMRA, TEXAS, BO-TMR, Yakima Yellow, LC640, LC705, Redmond Red, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, DABCYL, BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3, QSY-7, DABCYL dT, BHQ-1, BHQ-2 or QSY-7... 等等。

注: FAM : 6-羧基荧光素

JOE : 2, 7-二甲氧基-4, 5-二氯-6-羧基荧光素

Rhodamine 6G : 也称为Rhodamine 590 chloride

6-TAMRA : 6-羧基四甲基罗丹明

表3: Y性染色体遗传引物及探针之组合例(杂交探针或TaqMan 探针)

引物及探针之组合一例1		
基因核酸序列名称:	功能:	核酸序列:
SRY 11f	引物	TggCgATTAAGTCAAATTCgC
SRY 11r	引物	CCCCCTAgTACCCTgACAATgTATT
SRY 11FL	杂交探针	TgCCCTgCTgATCTgCCTCCC X
SRY 11Cy5	杂交探针	Cy5-gACTgCTCTACTgCTgTCCTgAAAAATgC p
SRY 11LC640	杂交探针	LC Red640-gACTgCTCTACTgCTgTCCTgAAAAATgC p
SRY 11LC705	杂交探针	LC Red705-gACTgCTCTACTgCTgTCCTgAAAAATgC p
SRY-11FT	TaqMan 探针	(FAM)AgC AgT AgA gCA gTC Agg gAg gCA gA(TAMRA)
引物及探针之组合一例2		
基因核酸序列名称:	功能:	核酸序列:
SRY-21f	引物	gAACTCCTTTACTggggTgATg
SRY-21r	引物	ATACgTgATggTgACTgAACAg
SRY 21FL	杂交探针	CCACAgggTgCTCCACAgggT X
SRY 21LC640	杂交探针	LC Red640-AAgCCCCATgCCCTACAgggTgAAg p
SRY 21LC705	杂交探针	LC Red705-AAgCCCCATgCCCTACAgggTgAAg p
SRY 21Cy5	杂交探针	Cy5-AAgCCCCATgCCCTACAgggTgAAg p
引物及探针之组合一例3		
基因核酸序列名称:	功能:	核酸序列:
SRY 31f	引物	ggCAACgTCCAggATAgAgTgA
SRY 31r	引物	TgCTgATCTCTgAgTTTCgCATT

SRY 31FLs	杂交探针	CATgAACgCATTTCATCgTgTggTCTC X
SRY 31FL	杂交探针	CCATgAACgCATTTCATCgTgTggTCTC X
SRY 31LC640	杂交探针	LC Red640-CgATCAgAggCgCAAATggCTCT p
SRY 31LC705	杂交探针	LC Red705-CgATCAgAggCgCAAATggCTCT p
SRY 31Cy5	杂交探针	Cy5-CgATCAgAggCgCAAATggCTCT p

注： p：磷酸化，3'末端可用P04，NH<sub>2</sub>或阻断碱基阻断

x：具有荧光素的3'末端

表4:

载体 (DNA carriers)

1. 聚丙烯
2. 丙烯酰胺
3. 糖原



表5:

吸附剂(adsorbant materials)

1. 二乙氨基乙醇类树脂(diethylaminoethanol grouped resin)
2. 阻离子交换树脂
3. 聚偏1,1-二氟乙烯(polyvinylidene fluoride)
4. 二氧化硅珠

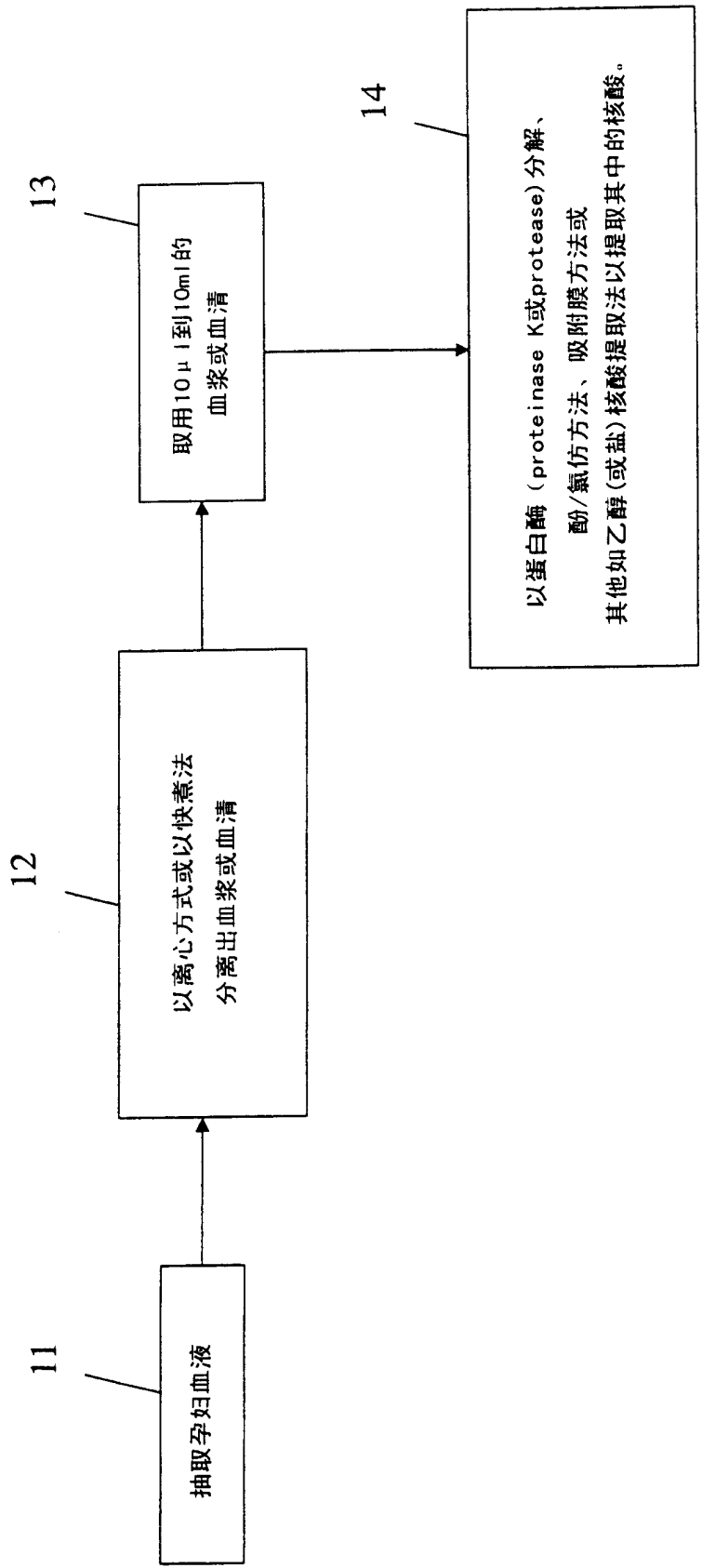


图1

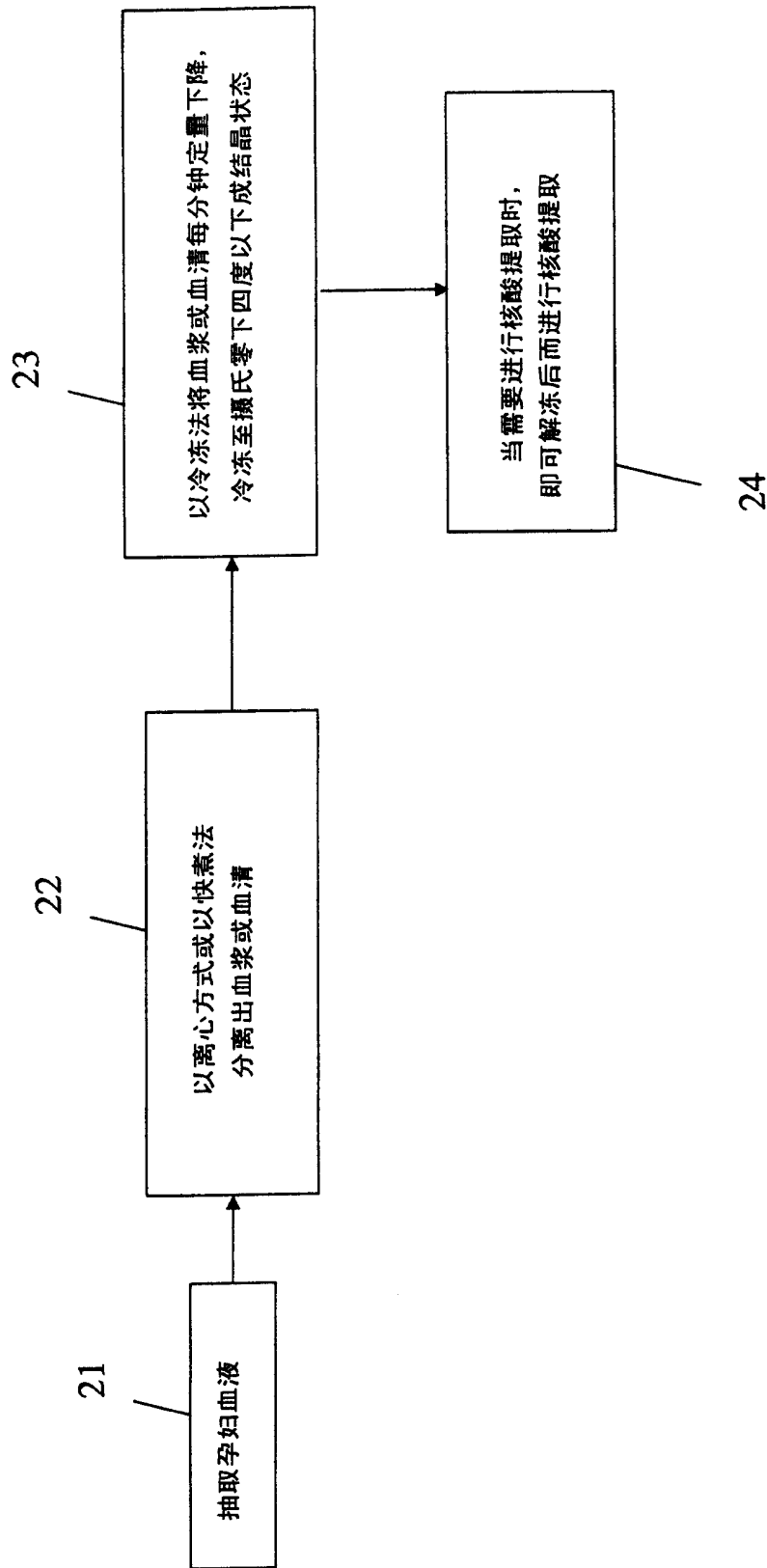


图2

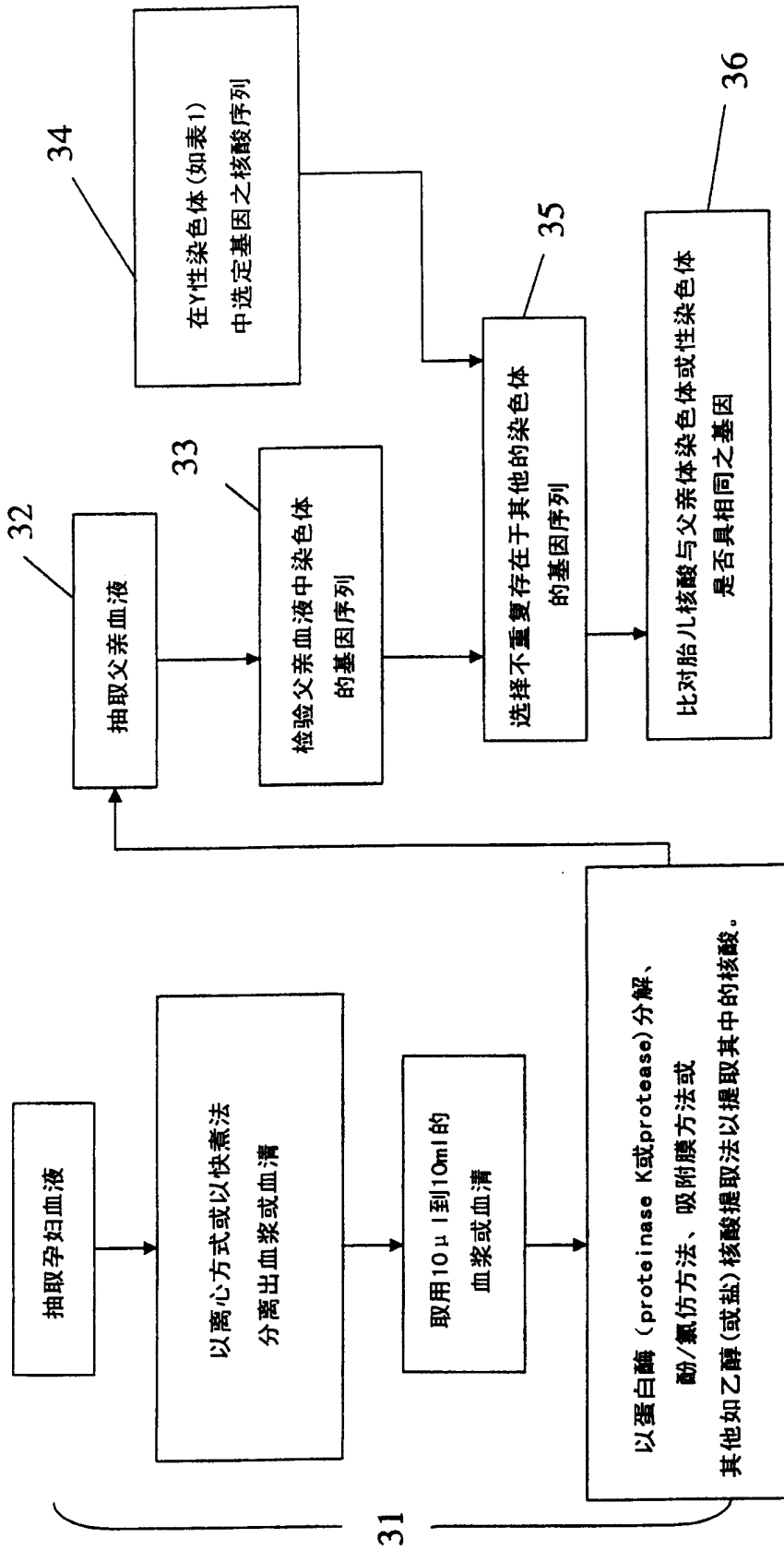


图3

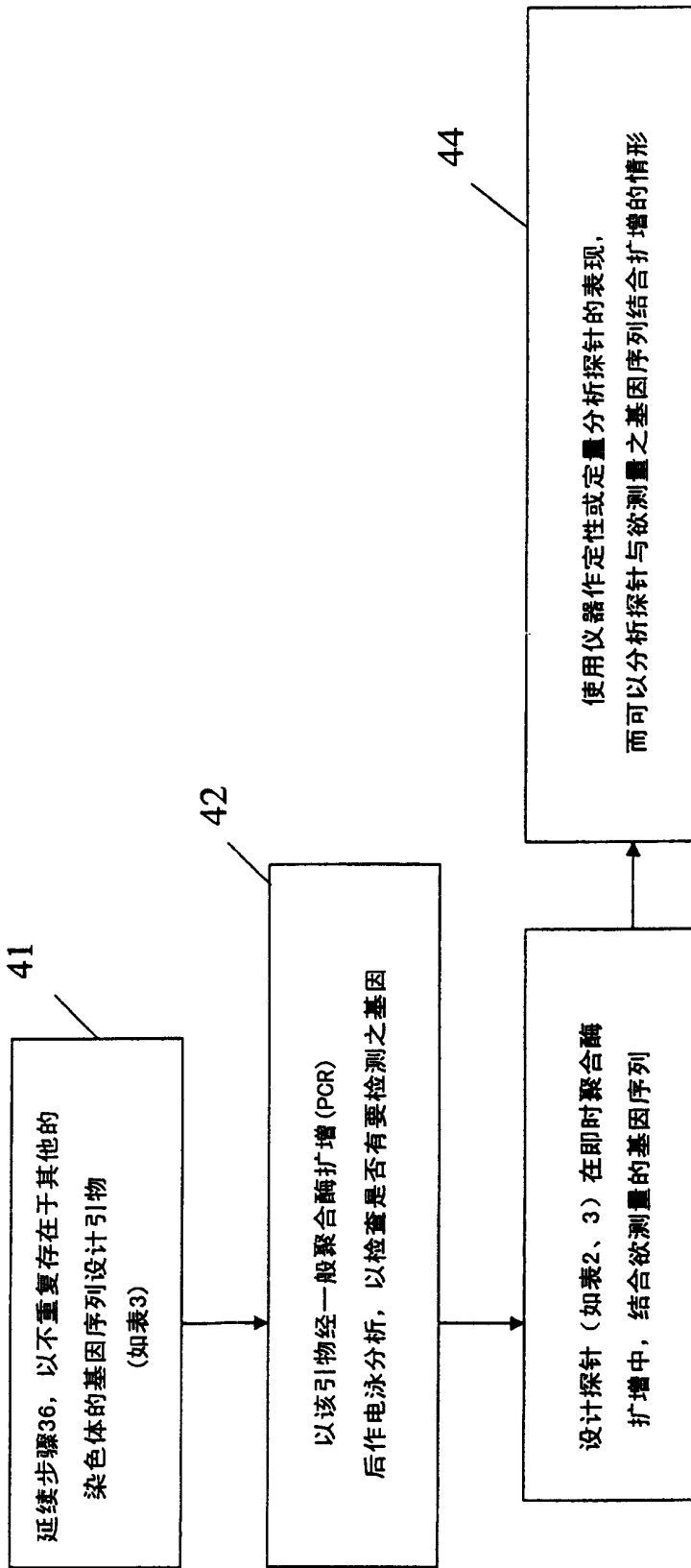


图4

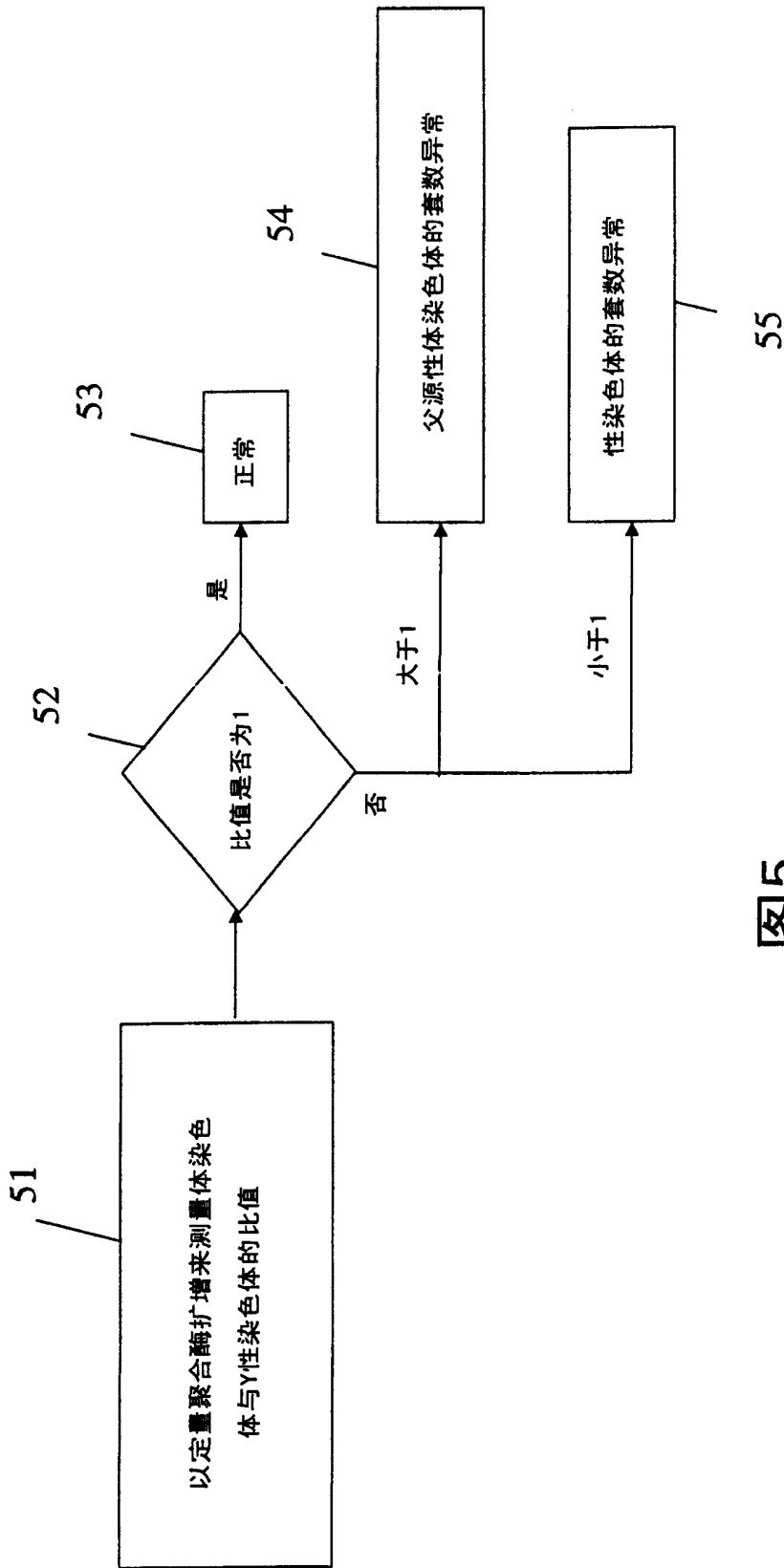


图5