



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0023556

(51)⁷ C12Q 1/68

(13) B

(21) 1-2011-01954

(22) 22/12/2009

(86) PCT/US2009/069317 22/12/2009

(87) WO2010/075459 01/07/2010

(30) 61/140,063 22/12/2008 US; 61/166,188 02/04/2009 US; 61/231,232
04/08/2009 US

(45) 27/04/2020 385

(43) 27/02/2012 287A

(73) NeoSeq Ltd. (US)

11011 Torreyana Road, Suite 251, San Diego CA, 92121, U.S.A

(72) OLIPHANT, Arnold, R. (US); KRUMMEL, Kurt, A. (US); ZHANG, Haichuan (US);
KATZ, Andrew, S. (US)

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyền (INVENCO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN YẾU TỐ NHẬN DẠNG THAI NHI TRÊN CƠ SỞ
TẾ BÀO

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện yếu tố nhận dạng thai nhi trên cơ sở tế
bào và bảng định kiểu gen để phát hiện alen, hệ gen và hệ phiên mã trong hỗn hợp của hai
cá thể.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực phương pháp và bảng định kiểu gen để phát hiện alen, hệ gen và hệ phiên mã trong hỗn hợp của hai cá thể.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các phương pháp chẩn đoán trước khi sinh chủ yếu nhằm thu được các thông tin di truyền của thai hoặc phôi thai. Các phương pháp chẩn đoán di truyền trước khi sinh được sử dụng trong thực tiễn lâm sàng chủ yếu bao gồm các kỹ thuật xâm nhập như chọc ối, lấy lông nhung màng đệm và lấy máu thai hoặc sinh thiết mô. Các kỹ thuật này bao gồm việc thu mẫu trực tiếp từ thai hoặc gián tiếp từ các cấu trúc sinh dục nữ. Do tính chất xâm nhập cao của các phương pháp này nên dễ gây biến chứng cho người mẹ hoặc thai nhi. Ví dụ về các biến chứng có thể viện dẫn trong trường hợp chọc ối là nguy cơ nhiễm trùng, xuất huyết thai nhi-mẹ với khả năng gây miễn dịch khác loại, mất dịch ối và đau bụng. Các nghiên cứu khác đã ước tính nguy cơ sảy thai sau chọc ối cao hơn nhóm đối chứng từ 0,06% đến 2,1% (Eddleman, Obstet Gynecol 2006 108(5): 1067-1072). Do đó, việc chọc ối chỉ được đề xuất đối với những phụ nữ có nguy cơ có thai bị biến dị di truyền đáng kể về mặt lâm sàng vượt quá nguy cơ sảy thai do điều trị, và nhiều bác sỹ muốn chỉ ra nguy cơ theo kinh nghiệm của họ (thường là từ 1 trong 300 ca đến 1 trong 500 ca).

Để hạn chế việc sử dụng các kỹ thuật xâm nhập chẩn đoán trước khi sinh có nguy cơ gây ra các biến chứng nêu trên và thường gây khó chịu và/hoặc căng thẳng cho người mẹ, việc phát triển các phương pháp không xâm nhập vẫn là mục đích chính của sản khoa hiện đại.

Cụ thể, các tế bào thai nhi tuần hoàn trong máu người mẹ tạo nên nguồn vật chất di truyền có khả năng được sử dụng để chẩn đoán di truyền trước khi sinh (Bianchi, Br J Haematol 1999 105: 574-583; Fisk, Curr Opin Obstet Gynecol 1998 10: 81-83). Trong suốt quá trình thai nghén, các loại tế bào khác nhau có nguồn gốc từ thai nhi sẽ đi qua nhau thai và tuần hoàn trong máu người mẹ (Bianchi, Br J Haematol 1999 105: 574-583). Các loại tế bào này bao gồm tế bào lympho và tế bào hồng cầu, tiền tủy bào và nguyên bào biểu mô dinh dưỡng (lớp Langhans và hợp bào).

Các phương pháp phân tích hệ gen của tế bào thai nhi tuần hoàn trong máu người mẹ với mục đích chẩn đoán trước khi sinh đã được mô tả, song chúng vẫn rất hạn

chế về độ nhạy và tính đặc hiệu chẩn đoán (Di Naro et al., *Mol Hum Reprod* 2000 6: 571-574; Watanabe et al., *Hum Genet* 1998 102: 611-615; Takabayashi et al., *Prenat Diagn* 1995 15: 74-77; Sekizawa et al., *Hum Genet* 1998 102: 393-396). Ưu điểm của việc phát triển phương pháp chẩn đoán trước khi sinh, không xâm nhập là khả năng sử dụng phương pháp này để làm giảm số lượng phương pháp chẩn đoán xâm nhập được thực hiện ở các phụ nữ mang thai cho kết quả cuối cùng âm tính. Ví dụ, trong trường hợp thể ba nhiễm sắc thể 21, chiếm tỷ lệ một trong 700 phụ nữ, việc chẩn đoán trước khi sinh hiện được đề xuất ở Pháp chỉ khi người mẹ này ở tuổi 38, trong khi xét nghiệm phân tích sinh hóa có khả năng phát hiện 60% trong số các ca mắc hội chứng thể ba nhiễm sắc thể 21 đối với 5% giá trị chọn lọc lại được đề xuất đối với các phụ nữ trẻ. Tuy nhiên, 40% trong số các ca mắc hội chứng thể ba nhiễm sắc thể 21 không phát hiện được bằng các xét nghiệm hiện có. Việc phát hiện thể ba nhiễm sắc thể 21 trước khi sinh ở tế bào thai nhi phân lập được từ huyết tương người mẹ bằng kỹ thuật FISH đã được mô tả. Phương pháp này rất thú vị, song do tế bào thai nhi rất hiếm trong huyết tương (từ 1 trong 500 trường hợp đến 1 trong 2000 trường hợp) và thường bao gồm tế bào chết theo chương trình, việc chẩn đoán thích hợp cần phải tiến hành với số lượng tế bào rất lớn, khiến nó không khả thi. Ngoài ra, các tế bào thai nhi thể bội chỉnh không thể xác nhận được bằng phương pháp này.

Một hạn chế của các phương pháp này xuất phát từ thực tế rằng tế bào thai nhi tuần hoàn trong máu có mặt với nồng độ rất thấp. Các nghiên cứu trên cơ sở phát hiện bằng PCR nhiễm sắc thể Y trong các mẫu máu mà không chọn trước đã cho phép xác định được số lượng tế bào thai nhi trung bình là khoảng một tế bào lympho thai nhi/ml máu (Bianchi, *J Perinat Med* 1998 26: 175-85). Mới đây, số lượng tế bào thai nhi trung bình đã được sửa lại tăng lên do các kỹ thuật làm giàu cải thiện thu được nhiều tế bào hơn. Một nghiên cứu mới đây phát hiện được giá trị trung bình là 37 tế bào lympho thai nhi/ml máu (Huang, *Prenatal Diagnosis* 2008 28: 892-899).

Công bố đơn quốc tế số WO2005/023091 mô tả phương pháp phát hiện axit nucleic trong mẫu sinh học bằng cách kết hợp phản ứng kéo dài bazơ và phân tích đo phổ khối.

Công bố đơn quốc tế số WO2007/147079 mô tả hệ thống, thiết bị và phương pháp phát hiện sự có mặt của các tế bào thai nhi được kết hợp với một quần thể tế bào mẹ mà bao gồm đánh dấu các vùng của ADN hệ gen trong mỗi tế bào trong mẫu kết hợp bằng các chất đánh dấu khác nhau trong đó mỗi chất đánh dấu là đặc hiệu với mỗi tế bào và xác định các vùng đánh dấu của ADN hệ gen từ mỗi tế bào trong mẫu hỗn

hợp. Một nhược điểm của phương pháp này là không thu được toàn bộ hệ gen bào thai không bị biến đổi đã được khuếch đại.

Do đó, cần có các phương pháp và công cụ cải thiện để phát hiện alen thai nhi và các biến dị di truyền thai nhi.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện yếu tố nhận dạng thai nhi trên cơ sở tế bào, bao gồm các bước: chia mẫu máu người mẹ chứa hỗn hợp tế bào thai nhi và người mẹ thành các mẫu nhỏ; tiến hành khuếch đại toàn bộ hệ gen trên ít nhất một mẫu nhỏ chứa một tế bào để tạo ra sản phẩm khuếch đại, trong đó số bản sao nhiễm sắc thể từ mẫu được bảo toàn trong mẫu nhỏ sau khi khuếch đại toàn bộ hệ gen để sản phẩm khuếch đại thu được là hệ gen hoặc hệ phiên mã của tế bào người mẹ hoặc tế bào thai nhi, chia sản phẩm khuếch đại thành các phần mẫu, sàng lọc hoặc định kiểu gen phần mẫu về sự có mặt của yếu tố nhận dạng thai nhi, trong đó bước sàng lọc hoặc định kiểu gen này bao gồm: tạo bảng SNP để xác định sự có mặt của alen không phải của người mẹ trong mẫu hỗn hợp, trong đó bảng SNP bao gồm ít nhất một bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể đối chứng chứa các SNP nằm trên nhiễm sắc thể mà không dễ bị thể bội không chỉnh và bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể trên nhiễm sắc thể mà dễ bị thể bội không chỉnh, xác định vật chất di truyền của tế bào người mẹ là đồng hợp tử hay dị hợp tử ở nhóm locut đích trong bảng SNP này để xác định kiểu gen người mẹ, chọn lọc locut thử nghiệm từ locut đích, trong đó bước chọn lọc locut thử nghiệm này bao gồm sàng lọc mẫu chứa hỗn hợp axit nucleic người mẹ và thai nhi đối với kiểu gen khác kiểu gen người mẹ ở locut đích và chọn lọc locut đích có kiểu gen không phải của người mẹ trong mẫu chứa hỗn hợp axit nucleic người mẹ và thai nhi làm locut thử nghiệm, sàng lọc hoặc định kiểu gen phần mẫu đối với kiểu gen khác kiểu gen người mẹ ở locut thử nghiệm, trong đó sự có mặt của kiểu gen này khác kiểu gen người mẹ chứng tỏ sự có mặt của alen người bố mang thông tin trong sản phẩm khuếch đại và xác định sự có mặt của ít nhất một yếu tố nhận dạng thai nhi từ tế bào thai nhi trong phần mẫu từ ít nhất một mẫu nhỏ, trong đó bước xác định sự có mặt của ít nhất một yếu tố nhận dạng thai nhi bao gồm xác định alen người bố mang thông tin trong ít nhất một phần mẫu hoặc mẫu nhỏ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp và bảng định kiểu gen để phát hiện alen thai nhi (tức là alen không phải của người mẹ/alen người bố mang thông tin) và biến dị di truyền thai nhi.

Phương pháp theo sáng chế cho phép phát hiện alen thai nhi và các biến dị di truyền thai nhi bất kể giới tính của thai nhi và không cần trình tự axit nucleic người bố để làm mẫu so sánh. Bằng cách phân biệt tế bào thai nhi với tế bào người mẹ, tốt hơn là trên cơ sở từng tế bào, phương pháp theo sáng chế khắc phục được các hạn chế tài nguyên do lượng dư thừa thấp của tế bào thai nhi trong máu người mẹ và đảm bảo tính toàn vẹn của hệ gen hoặc hệ phiên mã của thai nhi cho việc phân tích ở phạm vi rộng hơn so với các phương pháp hiện có. Ngoài ra, bằng cách phân biệt tế bào thai nhi trên cơ sở từng tế bào, sáng chế cho phép phát hiện hiện tượng khảm và trẻ sinh đôi hai hợp tử.

Theo phương án được ưu tiên, mẫu người mẹ được định kiểu gen để xác định các locut đích đồng hợp tử, tiếp theo chúng được định kiểu gen để phát hiện sự có mặt của các locut dị hợp tử của thai nhi trong mẫu chứa tế bào thai nhi. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rằng mẫu người mẹ cũng có thể được định kiểu gen để xác định các locut đích dị hợp tử, tiếp theo chúng được định kiểu gen để phát hiện sự có mặt của các locut đồng hợp tử của thai nhi trong mẫu chứa tế bào thai nhi. Hỗn hợp tế bào người mẹ và tế bào thai nhi được thu và làm giàu để tạo ra mẫu giàu tế bào thai nhi hơn so với tế bào người mẹ. Tiếp theo, chia mẫu đã làm giàu thành các mẫu nhỏ sao cho tốt hơn là mỗi mẫu nhỏ chỉ chứa một tế bào. Tiếp theo, khuếch đại mỗi mẫu nhỏ này để tạo ra sản phẩm khuếch đại tương ứng với mỗi mẫu nhỏ, tạo điều kiện tiếp cận các hệ gen tương ứng với các tế bào. Tiếp theo, chia sản phẩm khuếch đại thành các phần mẫu. Sau đó, sàng lọc riêng rẽ các phần mẫu này về alen không phải của người mẹ ở ít nhất một locut xác định được trước đó là dị hợp tử ở mẫu người mẹ, với việc lần lượt phát hiện kiểu gen dị hợp tử hoặc đồng hợp tử, chỉ ra sự có mặt của alen không phải của người mẹ trong phần mẫu, và do đó hệ gen hoặc hệ phiên mã của thai nhi. Việc phát hiện kiểu gen dị hợp tử có thể đạt được bằng cách sàng lọc alen không phải của người mẹ chỉ ở locut được chọn. Tiếp theo, phân tích thêm đối với các phần mẫu không sàng lọc tương ứng để phát hiện biến dị di truyền thai nhi, với ít nhất một phần mẫu chứa hệ gen hoặc hệ phiên mã hoàn toàn của thai nhi.

Ngoài ra, mẫu người mẹ được định kiểu gen, hỗn hợp tế bào người mẹ và tế bào thai nhi được thu, và mẫu này được làm giàu tế bào thai nhi và chia thành các mẫu nhỏ

như được mô tả trên đây. Bảng gồm ít nhất một locut đích mà ở đó mẫu người mẹ là đồng hợp tử sẽ được chọn để sàng lọc và định kiểu gen các mẫu nhỏ. Mỗi mẫu nhỏ được sàng lọc hoặc định kiểu gen một cách riêng rẽ ở ít nhất một trong số các locut này, với việc phát hiện lại kiểu gen dị hợp tử chỉ ra sự có mặt của alen không phải của người mẹ trong mẫu nhỏ. Tiếp theo, tiến hành phân tích tỷ lệ alen ở các mẫu nhỏ dị hợp tử để phát hiện biến dị số bản sao của thai nhi.

Như được sử dụng ở đây, axit nucleic có nghĩa là axit deoxyribonucleic (ví dụ, ADN, ADN ty thể, ADN hệ gen hoặc ADN bổ trợ), axit ribonucleic (ví dụ, ARN hoặc ARN thông tin), hoặc biến thể khác của các axit nucleic đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Như được sử dụng ở đây, locut đích có nghĩa là locut hệ gen hoặc locut hệ phiên mã mà ở đó mẫu chứa vật chất di truyền người mẹ có kiểu gen phát hiện được. Khi có nhiều hơn một locut đích, locut đích bao gồm tất cả các locut đồng hợp tử, tất cả các locut dị hợp tử hoặc hỗn hợp các locut đồng hợp tử và dị hợp tử. Bảng locut đích cũng có thể bao gồm tất cả các locut đồng hợp tử, tất cả các locut dị hợp tử hoặc hỗn hợp các locut đồng hợp tử và dị hợp tử.

Như được sử dụng ở đây, locut thử nghiệm có nghĩa là locut đích được chọn để tiếp tục định kiểu gen trong mẫu chứa vật chất di truyền thai nhi.

Như được sử dụng ở đây, yếu tố nhận dạng thai nhi chỉ yếu tố chỉ thị bất kỳ chỉ ra mẫu hoặc phần mẫu có nguồn gốc thai nhi. Yếu tố nhận dạng thai nhi có thể bao gồm biến dị di truyền bất kỳ hoặc thông tin khác. Một ví dụ về yếu tố nhận dạng thai nhi là alen thai nhi. Như được sử dụng ở đây, alen thai nhi chỉ alen người bố có khả năng nhận dạng nguồn di truyền là thai nhi. Alen người bố là alen bất kỳ có mặt trong mẫu bố. Tuy nhiên, như được sử dụng ở đây, alen người bố mang thông tin là alen bất kỳ tương đương với alen không phải của người mẹ (như được sử dụng ở đây) hoặc alen thai nhi (như được sử dụng ở đây).

Như được sử dụng ở đây, biến dị di truyền có nghĩa là biến dị bất kỳ về trình tự axit nucleic. Các biến dị di truyền có thể nằm trong khoảng từ biến dị cặp bazơ duy nhất đến biến dị nhiễm sắc thể, hoặc biến dị khác bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Biến dị di truyền có thể là đoạn lặp trình tự đơn, đoạn lặp nối tiếp ngắn, hiện tượng đa hình nucleotit đơn, hoán vị, đảo đoạn, mất đoạn, nhân đôi, hoặc các biến dị số bản sao khác bất kỳ. Biến dị nhiễm sắc thể là tính bất thường ở nhiễm sắc thể. Ví dụ, biến dị nhiễm sắc thể có thể là thể bội không chỉnh, đảo đoạn, hoán vị, mất đoạn hoặc nhân đôi. Biến dị di truyền cũng có thể là dạng khảm. Ví dụ, biến dị di truyền có thể liên

quan đến các trạng thái di truyền hoặc yếu tố nguy cơ đối với trạng thái di truyền (ví dụ, chứng xơ nang, bệnh Tay-Sachs, bệnh Huntington, bệnh Alzheimer và các bệnh ung thư khác nhau). Biến dị di truyền cũng có thể bao gồm đột biến bất kỳ, tính bất thường ở nhiễm sắc thể, hoặc biến dị khác được mô tả trong các tài liệu ưu tiên (ví dụ, thể bội không chỉnh, vi mất đoạn hoặc vi nhân đôi) được nêu trên đây. Biến dị di truyền có thể có tác dụng dương tính, âm tính hoặc trung tính đối với kiểu hình. Ví dụ, biến dị nhiễm sắc thể có thể bao gồm các biến dị có lợi, có hại hoặc trung tính. Biến dị di truyền là yếu tố nguy cơ đối với bệnh hoặc rối loạn. Biến dị di truyền có thể mã hóa tính trạng kiểu hình mong muốn.

Thu mẫu (ví dụ, bao gồm hỗn hợp tế bào người mẹ và tế bào thai nhi)

Mẫu người mẹ, mẫu hỗn hợp tế bào người mẹ và tế bào thai nhi và mẫu hỗn hợp các axit nucleic vô bào của người mẹ và thai nhi có thể được thu từ máu. Khoảng 20 - 40mL máu được lấy từ người mẹ mang thai. Có thể lấy máu ở thời điểm bất kỳ ở giai đoạn mang thai. Ví dụ, có thể lấy máu ở ba tháng đầu. Theo các phương án khác, có thể lấy máu ở ba tháng thứ hai. Theo phương án được ưu tiên, có thể lấy máu ở 10-18 tuần tuổi thai. Tuy nhiên, có thể lấy máu sớm ở giai đoạn mang thai hoặc sau 18 tuần tuổi thai. Thời gian lấy máu có thể thay đổi tùy theo thông tin có được hoặc các tiêu chuẩn chăm sóc trước sinh. Cũng có thể lấy mẫu máu ở thời điểm bất kỳ trong ngày. Theo một số phương án, máu được lấy vào buổi sáng. Theo các phương án khác, máu được lấy vào buổi chiều.

Có thể lấy máu từ vùng thích hợp bất kỳ của cơ thể, kể cả tay, chân, hoặc qua ống thông tĩnh mạch trung tâm. Theo một số phương án, máu được lấy sau khi điều trị hoặc hoạt động. Ví dụ, có thể lấy máu sau khi thăm khám khung chậu. Thời gian lấy máu cũng có thể được kết hợp để gia tăng số tế bào thai nhi có mặt trong mẫu. Ví dụ, có thể lấy máu sau khi tập luyện hoặc điều trị để kích thích giãn mạch.

Có thể kết hợp máu với các thành phần khác sau khi lấy máu để bảo quản hoặc điều chế mẫu dùng cho các kỹ thuật tiếp theo. Máu được xử lý bằng chất chống ngưng kết, cố định tế bào, hoặc bảo quản ADN hoặc ARN sau khi lấy máu. Theo phương án được ưu tiên, máu được lấy bằng cách tiêm tĩnh mạch bằng cách sử dụng ống lấy máu chân không chứa chất chống ngưng kết như EDTA hoặc heparin. Máu cũng có thể được lấy bằng ống tiêm đã phủ heparin và kim tiêm dưới da. Cũng có thể kết hợp máu với các thành phần hữu ích cho việc nuôi cấy tế bào. Ví dụ, kết hợp máu với môi trường nuôi cấy tế bào hoặc môi trường nuôi cấy tế bào bổ sung (ví dụ, các xytokin).

Mẫu người mẹ cũng có thể thu được từ các nguồn khác đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm huyết thanh, huyết tương, nước tiểu, gạc thấm mẫu cổ tử cung, nước mắt, nước bọt, gạc thấm mẫu trong khoang miệng, da, hoặc các mô khác. Mẫu chứa hỗn hợp tế bào người mẹ và tế bào thai nhi và mẫu chứa hỗn hợp các axit nucleic vô bào của người mẹ và thai nhi cũng có thể thu được từ các nguồn khác đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm huyết thanh, huyết tương, nước tiểu, gạc thấm mẫu cổ tử cung, nước rửa cổ tử cung, nước rửa tử cung, dịch chọc hút túi cùng, hạch bạch huyết, hoặc tủy xương. Ví dụ, nguồn mẫu chứa hỗn hợp các axit nucleic vô bào của người mẹ và thai nhi là gạc thấm mẫu cổ tử cung. Theo phương án được ưu tiên, các axit nucleic vô bào của thai nhi bao gồm ADN. Theo phương án khác, các axit nucleic vô bào của thai nhi bao gồm ARN hoặc ADN bổ trợ.

Làm giàu tế bào thai nhi

Để giải quyết vấn đề lượng dư thấp của tế bào thai nhi trong mẫu chứa hỗn hợp tế bào người mẹ và tế bào thai nhi, có thể làm giàu tế bào thai nhi trong mẫu này. Do hồng cầu bị khuyết nhân khi trưởng thành, song lại có nhân khi chưa trưởng thành, các đặc tính này có thể được sử dụng để biệt hóa hồng cầu người mẹ và hồng cầu thai nhi trong mẫu. Có thể làm giàu tế bào thai nhi trong mẫu thông qua việc chọn lọc dương tính, chọn lọc âm tính hoặc kết hợp chọn lọc dương tính và âm tính. Theo một số phương án, tế bào thai nhi được gom lại trực tiếp. Theo các phương án khác, tế bào người mẹ được gom lại và thu tế bào thai nhi từ mẫu còn lại.

Có thể làm giàu tế bào thai nhi trong mẫu trên cơ sở các khác biệt về đặc tính vật lý của tế bào. Ví dụ, có thể làm giàu tế bào thai nhi trong mẫu trên cơ sở tỷ trọng, cấu trúc màng tế bào hoặc hình thái học. Theo một số phương án trên cơ sở tỷ trọng, gradien tỷ trọng như FICOLL™ (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ), PERCOLL™ (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ), iodixanol (Axis Shield, Oslo, Norway), NYCODENZđ (Axis Shield, Oslo, Norway), hoặc sucroza được sử dụng. Theo một số phương án trên cơ sở cấu trúc màng tế bào, chất phản ứng tan bào được sử dụng (ví dụ, amoni clorua). Theo một số phương án trên cơ sở hình thái học, sử dụng kỹ thuật phân tích tế bào dòng chảy hoặc bộ lọc. Có thể làm giàu tế bào thai nhi trong mẫu trên cơ sở các đặc tính vật lý khác đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, có thể làm giàu tế bào thai nhi trong mẫu trên cơ sở các đặc tính điện môi hoặc từ tính. Có thể làm giàu tế bào thai nhi trong mẫu bằng cách thu tủy xương.

Có thể làm giàu tế bào thai nhi trong mẫu trên cơ sở các khác biệt về đặc tính sinh hóa của tế bào. Ví dụ, có thể làm giàu tế bào thai nhi trong mẫu trên cơ sở các

khác biệt về kháng nguyên, axit nucleic, chuyển hóa, biểu hiện gen hoặc biểu sinh. Theo một số phương án trên cơ sở khác biệt kháng nguyên, sử dụng hạt từ tính hoặc thuận từ liên hợp với kháng thể trong gradien từ trường hoặc kháng thể đánh dấu huỳnh quang với phép đo kỹ thuật phân tích tế bào dòng chảy. Theo một số phương án trên cơ sở khác biệt axit nucleic, sử dụng kỹ thuật phân tích tế bào dòng chảy. Theo một số phương án trên cơ sở khác biệt chuyển hóa, sử dụng sự hấp thụ/thải loại thuốc nhuộm đo được bằng kỹ thuật phân tích tế bào dòng chảy hoặc kỹ thuật phân loại khác. Theo một số phương án trên cơ sở biểu hiện gen, sử dụng nuôi cấy tế bào với xytokin. Theo một số phương án trên cơ sở khác biệt biểu sinh, sử dụng nuôi cấy tế bào. Cũng có thể làm giàu tế bào thai nhi trong mẫu trên cơ sở các đặc tính sinh hóa khác đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, có thể làm giàu tế bào thai nhi trong mẫu trên cơ sở độ pH hoặc tính di động. Ngoài ra, theo một số phương án, sử dụng nhiều hơn một phương pháp để làm giàu tế bào thai nhi.

Theo một số phương án, làm giàu tế bào thai nhi trong mẫu bằng cách loại bỏ hồng cầu thông qua việc sử dụng chất phản ứng tan bào như amoni clorua hoặc bằng cách tách bằng gradien tỷ trọng FICOLL™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), PERCOLL™ (GE Healthcare Life Sciences Piscataway, NJ), hoặc sucroza. Cũng có thể sử dụng gradien tỷ trọng để làm giảm phân đoạn bạch cầu. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell ("PBMC")) cũng có thể được làm giàu tế bào thai nhi bằng kỹ thuật tách hạt từ tính từ các hãng sản xuất như Miltenyi Biotec (Gladbach, Germany), Stemcell Technologies (Vancouver, BC, Canada) và Dynal Biotech/Invitrogen (Carlsbad, CA). Có thể sử dụng phép làm giàu dương tính hoặc phép làm suy kiệt âm tính hoặc kết hợp hai phương pháp này để làm giàu phân đoạn thai nhi ở PBMC.

Mặc dù hiện chưa biết được các chất đánh dấu bề mặt đặc hiệu thai nhi, song có một số chất đánh dấu đã được chứng minh là làm giàu dương tính tế bào thai nhi tới 1 tế bào thai nhi trong 1000 đến 100000 tế bào người mẹ. Theo một số phương án, các chất đánh dấu bề mặt tế bào CD71, CD34, CD45 hoặc CD235a được sử dụng để làm giàu tế bào thai nhi. Theo một số phương án, các chất đánh dấu bề mặt tế bào không được tìm thấy trên quần thể tế bào thai nhi sẽ được sử dụng để làm giàu âm tính tế bào thai nhi bằng cách làm suy kiệt quần thể tế bào trưởng thành. Theo một số phương án, hỗn hợp CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123 và CD61 được sử dụng để làm suy kiệt tế bào trưởng thành. Cũng có thể sử dụng phép phân loại bằng kỹ thuật phân tích tế bào dòng chảy để tiếp tục làm giàu tế bào thai nhi bằng cách sử

dùng các chất đánh dấu bề mặt tế bào hoặc chất đánh dấu nội bào liên hợp với chất đánh dấu huỳnh quang. Chất đánh dấu nội bào có thể bao gồm thuốc nhuộm nhân hoặc kháng thể kháng protein nội bào được ưu tiên biểu hiện ở tế bào thai nhi (ví dụ, hemoglobin thai nhi).

Việc oxy hóa hemoglobin đã được xác nhận là một cách để làm giàu ưu tiên hồng cầu có nhân (nucleated red blood cell: NRBC) bằng cách sử dụng gradien từ trường (Zborowski, Biophys J 2003 84(4): 2638 - 2645). Ngoài ra, các thiết bị vi lỏng đã được phát triển để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tách hồng cầu ra khỏi bạch cầu hoặc làm giàu tế bào thai nhi từ PBMC (Huang, Prenatal Diagnosis 2008 28: 892-899).

Theo một số phương án, mẫu được làm giàu tế bào thai nhi bằng cách cho tế bào thai nhi sinh sản biệt hóa vượt quá tế bào người mẹ trong môi trường nuôi cấy. Việc sinh sản biệt hóa có thể thực hiện được bằng một số phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm phương pháp ủ tế bào từ mẫu máu người mẹ chứa tế bào CD34+ có nguồn gốc cả người mẹ lẫn thai nhi với sự có mặt của yếu tố tế bào gốc (Stem Cell Factor: SCF) trong môi trường không chứa huyết thanh như được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 2008/048931.

Theo một số phương án, tế bào thai nhi trong hỗn hợp tế bào người mẹ và tế bào thai nhi được làm giàu tới tỷ lệ 1 trong 2, 1 trong 5, 1 trong 10, 1 trong 100, 1 trong 1000, 1 trong 10000, hoặc 1 trong 100000 tế bào thai nhi:người mẹ, hoặc khoảng được xác định bằng hai trị số bất kỳ trong số các trị số đứng trước.

Chia thành mẫu nhỏ

Trước khi khuếch đại mẫu nhỏ (tốt hơn là bằng cách sử dụng phép khuếch đại toàn hệ gen (whole genome amplification: WGA) hoặc khuếch đại toàn hệ phiên mã (whole transcriptome amplification: WTA)), việc sàng lọc hoặc định kiểu gen đối với các locut đồng hợp tử hoặc dị hợp tử, có thể chia mẫu thành các mẫu nhỏ với số tế bào đủ ít để số bản sao nhiễm sắc thể từ các mẫu được bảo tồn trong các mẫu nhỏ ngay cả sau khi khuếch đại mẫu nhỏ (ví dụ, WGA hoặc WTA). Có thể chia mẫu thành các mẫu nhỏ theo phân phối Poisson hoặc phân phối Non-Poisson. Theo một số phương án, các mẫu được chia liên tiếp. Ví dụ, có thể chia mẫu theo loạt. Theo các phương án khác, chia mẫu theo dãy.

Theo một số phương án, chia mẫu thành các mẫu nhỏ có thể tích, nhỏ hơn, hoặc nhỏ hơn khoảng, 100uL, 50uL, 10uL, 1000nL, 500nL, 400nL, 300nL, 200nL, 100nL, 50nL, 30nL, 10nL, 3nL, hoặc 1nL, hoặc khoảng được xác định bằng hai trị số bất kỳ trong số các trị số đứng trước. Tốt hơn, nếu mỗi mẫu nhỏ có thể tích nhỏ hơn hoặc

bằng 100nL. Theo một số phương án, mỗi mẫu nhỏ chứa nhỏ hơn hoặc bằng 500, 400, 300, 200 hoặc 100 tế bào, hoặc khoảng được xác định bằng hai trị số bất kỳ trong số các trị số đứng trước. Tốt hơn, nếu mỗi mẫu nhỏ chứa nhỏ hơn hoặc bằng 50, 40, 30, 20 hoặc 10 tế bào, hoặc khoảng được xác định bằng hai trị số bất kỳ trong số các trị số đứng trước. Tốt hơn, nếu mỗi mẫu nhỏ chứa nhỏ hơn hoặc bằng 5, 4, 3 hoặc 2 tế bào. Theo một số phương án, mỗi mẫu nhỏ chứa không quá 1 tế bào.

Theo một số phương án, mỗi mẫu nhỏ chứa trung bình hoặc khoảng 500, 400, 300, 200 hoặc 100 tế bào, hoặc khoảng được xác định bằng hai trị số bất kỳ trong số các trị số đứng trước. Tốt hơn, nếu mỗi mẫu nhỏ chứa trung bình khoảng 50, 40, 30, 20 hoặc 10 tế bào, hoặc khoảng được xác định bằng hai trị số bất kỳ trong số các trị số đứng trước. Tốt hơn, nếu mỗi mẫu nhỏ chứa trung bình hoặc khoảng 5, 4, 3 hoặc 2 tế bào, hoặc khoảng được xác định bằng hai trị số bất kỳ trong số các trị số đứng trước. Theo một số phương án, mỗi mẫu nhỏ chứa trung bình nhỏ hơn 1 tế bào, khoảng 1 tế bào, hoặc từ 1 đến 2 tế bào, hoặc khoảng được xác định bằng hai trị số bất kỳ trong số các trị số đứng trước.

Việc chia mẫu được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm việc sử dụng nút đầu để tách đầu của các tế bào riêng rẽ trong thiết bị vi lỏng, lắng đọng trong các lỗ, hoặc các giọt nằm tự do được neo với chất nền phẳng nhờ sức căng bề mặt. Ngoài ra, mẫu nhỏ có thể được tạo huyền phù trong dung dịch đệm, mà sẽ thích hợp cho các phản ứng tiếp theo. Ví dụ, mẫu nhỏ có thể được tạo huyền phù trong dung dịch bao gồm dung dịch đệm làm tan và dung dịch đệm PCR, các dung dịch này cho phép làm tan tế bào một bước, sau đó khuếch đại mà không cần thao tác thêm đối với các mẫu nhỏ.

Khuếch đại mẫu nhỏ

Để bù lại lượng vật chất di truyền có hạn trong tế bào duy nhất hoặc mẫu nhỏ, việc khuếch đại mẫu nhỏ có thể được tùy ý thực hiện. Ví dụ, việc sao chép axit nucleic hoặc việc phân bào có thể được thực hiện. Chia mẫu thành các mẫu nhỏ với số tế bào đủ ít để số bản sao nhiễm sắc thể từ các mẫu được bảo tồn trong các mẫu nhỏ sau khi khuếch đại mẫu nhỏ. Theo phương án được ưu tiên, việc khuếch đại mẫu nhỏ được thực hiện đối với mẫu nhỏ chứa tế bào duy nhất, để sản phẩm khuếch đại thu được là hệ gen hoặc hệ phiên mã của tế bào người mẹ hoặc tế bào thai nhi. Ví dụ, việc khuếch đại mẫu nhỏ có thể được thực hiện đối với tế bào riêng rẽ nằm trong vi lỗ hoặc trong các giọt được tách bởi nút đầu như được mô tả ở đây.

Việc sao chép axit nucleic có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ để tạo ra các bản sao axit nucleic bổ sung, các tín hiệu bổ sung biểu thị cho axit nucleic, hoặc các tín hiệu khác cho axit nucleic (ví dụ, biểu hiện protein) đã biết trong lĩnh vực này. Theo một số phương án, việc sao chép axit nucleic được thực hiện bằng cách sử dụng WGA, WTA hoặc các kỹ thuật khuếch đại axit nucleic đích. Theo các phương án khác, việc sao chép axit nucleic được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp tạo ra tín hiệu biểu thị trình tự axit nucleic, như INVADER® (Hologic, Inc., Bedford, MA). Theo một số phương án, chỉ có phần trình tự được khuếch đại mới bổ trợ cho khuôn mẫu axit nucleic. Ví dụ, theo một số phương án, sản phẩm khuếch đại liên tục chứa một phần của khuôn mẫu axit nucleic và một phần của trình tự tín hiệu. Kỹ thuật chung để sao chép axit nucleic có thể bao gồm sao chép đẳng nhiệt hoặc theo chu kỳ nhiệt. Theo một số phương án, việc sao chép axit nucleic được thực hiện trước khi định kiểu gen SNP. Tuy nhiên, việc sao chép axit nucleic cũng có thể được thực hiện sau khi định kiểu gen SNP.

Việc sao chép tế bào cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Theo một số phương án, tế bào được nuôi cấy trong môi trường và các thành phần bổ sung để tạo ra các bản sao axit nucleic bổ sung để sử dụng trong các phương pháp được mô tả ở đây. Theo các phương án khác, tế bào được nuôi cấy và một hoặc nhiều tế bào được giữ nguyên để sử dụng cho bước phân tích tiếp theo. Theo một số phương án, việc sao chép tế bào được thực hiện trước khi chia thành mẫu nhỏ. Tốt hơn, nếu việc sao chép tế bào được thực hiện sau khi chia thành mẫu nhỏ.

Chia thành các phần mẫu

Sau khi khuếch đại mẫu nhỏ, sản phẩm khuếch đại có thể được chia thành các phần mẫu. Các phần mẫu này có thể được sử dụng cho nhiều thử nghiệm. Ví dụ, theo một phương án, một hoặc nhiều phần mẫu từ sản phẩm khuếch đại được sử dụng để phát hiện sự có mặt của alen thai nhi, trong khi một hoặc nhiều phần mẫu còn lại được sử dụng để phát hiện biến dị di truyền thai nhi trong sản phẩm khuếch đại chứa hệ gen hoặc hệ phiên mã của thai nhi. Theo một số phương án, phần mẫu được nhận dạng là chứa hệ gen hoặc hệ phiên mã của thai nhi sẽ được thử nghiệm theo dãy về các biến dị di truyền. Ví dụ, phần mẫu có thể được thử nghiệm về các biến dị di truyền liên quan đến các tình trạng bệnh di truyền (ví dụ, hội chứng Williams, hội chứng Wolf-Hirschhorn, hội chứng Miller-Dieker, hội chứng Smith Magenis, hội chứng Angelman, hội chứng Di George, hội chứng Prader-Willi, hội chứng Jacobsen, hội chứng Cri du

chat, bệnh Charcot-Marie-Tooth, hội chứng vi lặp 22q11.2, chứng xơ nang, bệnh Tay-Sachs, bệnh Huntington, bệnh Alzheimer, và nhiều bệnh ung thư).

Có thể chọn các phần đồng nhất hoặc không đồng nhất của sản phẩm khuếch đại để chia thành các phần mẫu. Theo một số phương án, các phần đồng nhất của sản phẩm khuếch đại được chia liên tiếp (ví dụ, theo loạt). Theo các phương án khác, các phần đồng nhất của sản phẩm khuếch đại được chia theo dãy. Theo cách khác, các phần không đồng nhất của sản phẩm khuếch đại có thể được chọn để chia thành các phần mẫu bằng cách sử dụng phép chọn dương tính, phép chọn âm tính hoặc kết hợp phép chọn dương tính và phép chọn âm tính. Ví dụ, theo một số phương án, các oligo bẫy liên kết với hạt được sử dụng để nhằm vào các phần mong muốn của sản phẩm khuếch đại dùng để chia thành các phần mẫu. Theo các phương án khác, các oligo liên kết với bề mặt được sử dụng để loại bỏ các phần không mong muốn của sản phẩm khuếch đại. Các phần không đồng nhất của sản phẩm khuếch đại có thể được chọn trên cơ sở đặc tính vật lý hoặc sinh hóa bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các phần được mô tả ở đây. Ví dụ, các phần của sản phẩm khuếch đại có điện tích, kích thước hoặc tính đồng nhất nhiễm sắc thể cụ thể có thể được chọn để chia thành các phần mẫu.

Theo một số phương án trong đó bước tùy ý khuếch đại mẫu nhỏ không được thực hiện, một phần hoặc phần mẫu của mẫu nhỏ có thể được lấy để dùng cho bước phân tích tiếp theo.

Theo một số phương án, các phần mẫu được gom lại thành các nhóm gồm hai hoặc nhiều phần mẫu. Điều này cho phép làm giảm số phản ứng trên cơ sở SNP hoặc các phản ứng khác được mô tả ở đây nhiều đến mức bằng hệ số N , trong đó N là số phần mẫu ở mỗi hỗn hợp. Tiếp theo, các phần mẫu từ các hỗn hợp dương tính (tức là các hỗn hợp chứa ít nhất một kiểu gen khác với kiểu gen người mẹ) có thể được thử nghiệm lại từng phần mẫu một để nhận dạng phần mẫu chứa alen thai nhi. Theo một số phương án, mỗi hỗn hợp được thử nghiệm về alen không phải của người mẹ ở locut thử nghiệm. Theo một số phương án, mỗi hỗn hợp được thử nghiệm về alen không phải của người mẹ ở hai hoặc nhiều locut thử nghiệm.

Theo một số phương án, các phần mẫu được gom lại bằng cách sử dụng hệ đo chỉ số cho phép nhận dạng nguồn phần mẫu dương tính trong hỗn hợp dương tính. Ví dụ, hai hoặc nhiều phần mẫu có thể được lấy từ mỗi sản phẩm khuếch đại để tạo ra các hỗn hợp chỉ số của $N \times M$ phần mẫu khuếch đại. Các lỗ chứa ít nhất một alen thai nhi có thể được nhận dạng bằng cách định vị điểm giao giữa các hỗn hợp N và M dương

tính trong hệ tọa độ vuông góc. Theo một số phương án, N (tức là số cột trong chỉ số N x M) và M (tức là số hàng trong chỉ số N x M) độc lập nằm trong khoảng từ 2 đến 1000. Tốt hơn, nếu N và M độc lập nằm trong khoảng từ 8 đến 100. Theo một số phương án, N là, là khoảng, là ít nhất, là ít nhất khoảng, là nhỏ hơn hoặc bằng, là nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 30, 32, 36, 40, 48, 50, 56, 60, 64, 70, 72, 80, 84, 88, 90, 96, 100, 192, 288, 384, 480, 576, 672, 768, 864, 960, 1000, hoặc khoảng được xác định bằng hai trị số bất kỳ trong số các trị số đứng trước. Theo một số phương án, M là, là khoảng, là ít nhất, là ít nhất khoảng, là nhỏ hơn hoặc bằng, là nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 30, 32, 36, 40, 48, 50, 56, 60, 64, 70, 72, 80, 84, 88, 90, 96, 100, 192, 288, 384, 480, 576, 672, 768, 864, 960, 1000, hoặc khoảng được xác định bằng hai trị số bất kỳ trong số các trị số đứng trước. Theo các phương án được ưu tiên, các phần đồng nhất hoặc không đồng nhất của sản phẩm khuếch đại được đo chỉ số để nhận dạng nguồn phân mẫu dương tính.

Thu hoặc phỏng đoán kiểu gen bố mẹ

Kiểu gen bố mẹ có thể được thu hoặc phỏng đoán để nhận dạng alen không phải của người mẹ. Tiếp theo, thông tin liên quan đến alen không phải của người mẹ có thể được sử dụng để sàng lọc hoặc định kiểu gen các phân mẫu hoặc mẫu nhỏ, hoặc phân tích trực tiếp hệ gen thai nhi về các biến dị di truyền. Ví dụ, kiểu gen người bố hoặc người mẹ có thể được thu bằng cách định kiểu gen trực tiếp các mẫu người bố hoặc người mẹ hoặc phỏng đoán bằng cách định kiểu gen các mẫu từ các thành viên trong gia đình có quan hệ về mặt di truyền. Tuy nhiên, theo phương án được ưu tiên, không cần thu hoặc phỏng đoán kiểu gen người bố. Ví dụ, theo phương án được ưu tiên, chỉ thu kiểu gen người mẹ.

Theo một số phương án, kiểu gen người bố hoặc người mẹ được thu bằng cách định kiểu gen vật chất di truyền từ máu, huyết tương, huyết thanh, nước tiểu, gạc thấm mẫu trong khoang miệng, nước bọt, nước mắt, da hoặc nguồn axit nucleic người bố khác bất kỳ (bao gồm các axit nucleic người bố được mô tả ở đây). Theo một số phương án, kiểu gen người bố hoặc người mẹ được thu bằng cách sử dụng axit nucleic vô bào hoặc axit nucleic chiết được từ các tế bào có nguồn gốc từ một trong số các nguồn này. Tốt hơn, việc định kiểu gen người bố hoặc người mẹ còn được thực hiện đối với ADN, song cũng có thể được thực hiện đối với ARN, ADN bổ trợ, hoặc axit nucleic khác bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Theo một số phương án, khuôn mẫu của mẫu người bố hoặc người mẹ được khuếch đại và phát hiện (ví dụ, bằng cách sử dụng

các phương pháp trên cơ sở PCR). Tuy nhiên, theo một số phương án, khuôn mẫu của mẫu người bố hoặc người mẹ không được khuếch đại (ví dụ, bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả ở đây).

Kiểu gen người bố và người mẹ cũng có thể được thu bằng cách truy cập thông tin tạo ra được trong quá trình trước thử nghiệm di truyền, như thông tin trong cơ sở dữ liệu, trong báo cáo thử nghiệm, hoặc từ lần mang thai trước đó mà phương pháp được mô tả ở đây được thực hiện. Kiểu gen người bố hoặc người mẹ cũng có thể được phỏng đoán bằng cách sử dụng các kiểu gen cùng huyết thống. Ví dụ, có thể sử dụng các kiểu gen của bố mẹ, anh chị em ruột, ông bà, cô dì, chú bác hoặc con có quan hệ về mặt di truyền để phỏng đoán kiểu gen người bố hoặc người mẹ.

Hiện tượng đa hình bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để định kiểu gen mẫu bố mẹ. Ví dụ, SNP, haplotyp, đoạn lặp nối tiếp ngắn (short tandem repeat: STR) hoặc các biến dị trình tự khác có thể được định kiểu gen. Các chất đánh dấu di truyền hoặc biểu sinh khác cũng có thể được sử dụng để định kiểu gen mẫu bố mẹ. Ví dụ, biến dị số bản sao (copy number variation: CNV) hoặc mô hình metyl hóa có thể được đánh giá.

Tùy ý nhận dạng ít nhất một alen không phải của người mẹ trong hỗn hợp các axit nucleic người mẹ và thai nhi

Theo các phương án trong đó locut đích đồng hợp tử đã được nhận dạng trong mẫu người mẹ, hỗn hợp các axit nucleic người mẹ và thai nhi có thể tùy ý được sử dụng để nhận dạng kiểu gen dị hợp tử ở cùng locut, nó chỉ ra sự có mặt của thai nhi (tức là alen không phải của người mẹ/alen người bố mang thông tin). Tốt hơn, nếu bước tùy ý này được thực hiện trước khi sàng lọc hoặc định kiểu gen các phân mẫu hoặc mẫu nhỏ riêng rẽ. Bằng cách sàng lọc alen không phải của người mẹ, và do đó nhận dạng locut dị hợp tử (và do đó alen thai nhi) trong mẫu chứa hỗn hợp các axit nucleic người mẹ và thai nhi, các phân mẫu và mẫu nhỏ có thể được sàng lọc hữu hiệu hơn về các SNP được biết là mang thông tin. Theo phương án được ưu tiên, ADN vô bào của thai nhi được sàng lọc alen không phải của người mẹ và nhận dạng locut dị hợp tử. Theo phương án khác, ARN hoặc ADN bổ trợ vô bào của thai nhi được sử dụng để nhận dạng locut dị hợp tử.

Các axit nucleic vô bào có thể được thu từ nguồn bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm máu, huyết thanh, huyết tương, nước tiểu, gạc thấm mẫu cổ tử cung, nước rửa cổ tử cung, nước rửa tử cung hoặc dịch chọc hút túi cùng từ phụ nữ mang thai. Axit nucleic cũng có thể được chiết từ mẫu hỗn hợp của tế bào người mẹ và thai nhi để

xác định locut dị hợp tử. Tốt hơn, nếu ADN được chiết từ mẫu chứa hỗn hợp tế bào người mẹ và tế bào thai nhi. Tuy nhiên, ARN hoặc ADN bổ trợ có thể được chiết từ mẫu chứa hỗn hợp tế bào người mẹ và tế bào thai nhi. Các axit nucleic có thể được chiết từ tế bào thu được từ nguồn bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm máu, gạc thấm mẫu cổ tử cung, nước rửa cổ tử cung, nước rửa tử cung, dịch chọc hút túi cùng, hạch bạch huyết, hoặc tủy xương. Theo các phương án khác, máu toàn phần được sử dụng để nhận dạng kiểu gen dị hợp tử mà không (hoặc trước khi) chia máu toàn phần này thành phân đoạn tế bào, huyết tương hoặc huyết thanh.

Theo một số phương án, khuôn mẫu axit nucleic của phần mẫu từ mẫu chứa hỗn hợp các axit nucleic người mẹ và thai nhi được khuếch đại và phát hiện để nhận dạng locut dị hợp tử (ví dụ, bằng cách sử dụng các phương pháp trên cơ sở PCR). Tuy nhiên, theo một số phương án, khuôn mẫu axit nucleic của phần mẫu từ mẫu hỗn hợp không được khuếch đại để nhận dạng locut dị hợp tử. Ví dụ, các phương pháp trong đó chỉ khuếch đại tín hiệu liên kết với khuôn mẫu (ví dụ, phương pháp ABSCRIPTION™ như được mô tả trong patent Mỹ số 7,226,798, 7,473,775 và 7,468,261 (Ribomed Biotechnologies, Inc., Carlsbad, CA) hoặc các phương pháp liên quan đến hóa học INVADER® (Hologic, Inc.)) có thể được sử dụng. Các phương pháp trong đó phát hiện khuôn mẫu axit nucleic mà không khuếch đại tín hiệu hoặc khuôn mẫu (ví dụ, phương pháp bao gồm bước phát hiện hóa học về sự liên kết với ADN như được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 2005/01122 (Adnavance Technologies, Inc., San Diego, CA)) cũng có thể được sử dụng. Ngoài ra, các phương pháp trong đó khuôn mẫu axit nucleic được giải trình tự mà không khuếch đại (ví dụ, phương pháp giải trình tự như được mô tả trong Eid et al, Science 2009 323(5910): 133-38) có thể được sử dụng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rằng nguồn khuôn mẫu dùng để nhận dạng alen không phải của người mẹ có thể bao gồm huyết thanh, huyết tương, nước tiểu, gạc thấm mẫu cổ tử cung hoặc nguồn axit nucleic khác bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này.

Sàng lọc hoặc định kiểu gen ít nhất một phần mẫu hoặc mẫu nhỏ về sự có mặt của ít nhất một alen người bố mang thông tin

Các bước tiếp theo là sàng lọc hoặc định kiểu gen mẫu nhỏ hoặc phần mẫu để nhận dạng alen không phải của người mẹ. Khi đã tạo ra được bảng SNP (như được mô tả chi tiết ở đây) và nhóm locut đích có mẫu di truyền người mẹ là đồng hợp tử (hoặc, theo cách khác, dị hợp tử) đã được nhận dạng, có thể chọn được locut thử nghiệm để sàng lọc hoặc định kiểu gen mẫu nhỏ hoặc phần mẫu về sự có mặt của alen thai nhi. Để

phát hiện sự có mặt của alen thai nhi, locut thử nghiệm được sàng lọc hoặc định kiểu gen về sự có mặt của alen không phải của người mẹ (tức là nhận dạng kiểu gen dị hợp tử, hoặc theo cách khác kiểu gen đồng hợp tử, ở locut thử nghiệm). Theo một số phương án, các phân mẫu sản phẩm khuếch đại được sàng lọc hoặc định kiểu gen từng phân mẫu để phát hiện locut dị hợp tử (hoặc, theo cách khác, đồng hợp tử). Theo một số phương án, phân mẫu chứa chất khuếch đại từ tế bào duy nhất.

Mẫu nhỏ hoặc phân mẫu có thể được định kiểu gen ở locut xác nhận được trước đó là đồng hợp tử trong mẫu người mẹ. Theo một số phương án, kiểu gen ở locut xác nhận được trước đó là đồng hợp tử trong mẫu người mẹ được xác định bằng cách sàng lọc về sự có mặt của alen không phải của người mẹ. Tùy ý, như được mô tả ở đây, trước khi sàng lọc các phân mẫu hoặc mẫu nhỏ về alen không phải của người mẹ, mẫu chứa hỗn hợp các axit nucleic người mẹ và thai nhi (tốt hơn là vô bào) được sử dụng để nhận dạng sự có mặt của alen không phải của người mẹ trong hỗn hợp axit nucleic này, chỉ ra sự có mặt của kiểu gen dị hợp tử ở cùng locut trong mẫu thai nhi.

Theo các phương án khác, mẫu nhỏ hoặc phân mẫu định kiểu gen ở locut xác nhận được trước đó là dị hợp tử trong mẫu người mẹ. Việc nhận dạng kiểu gen đồng hợp tử trong phân mẫu hoặc mẫu nhỏ đối với cùng locut chỉ ra sự có mặt của alen không phải của người mẹ, tức là alen thai nhi.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rằng các phương pháp sàng lọc hoặc định kiểu gen theo phương án bất kỳ được mô tả ở đây có thể thực hiện được bằng cách sử dụng phân mẫu hoặc mẫu nhỏ. Các phân mẫu và mẫu nhỏ có thể được sàng lọc hoặc định kiểu gen về alen thai nhi bằng cách sử dụng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các phương pháp được nêu ở đây. Ví dụ, các phân mẫu có thể được sàng lọc hoặc định kiểu gen bằng cách sử dụng các tín hiệu phân tử hoặc các phương pháp phát hiện SNP trên cơ sở axit nucleic khác. Theo một số phương án, khuôn mẫu axit nucleic trong phân mẫu được khuếch đại và phát hiện (ví dụ, bằng cách sử dụng các phương pháp trên cơ sở PCR). Tuy nhiên, theo một số phương án, khuôn mẫu axit nucleic không được khuếch đại (ví dụ, bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả ở đây). Ngoài ra, chất đánh dấu bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để sàng lọc hoặc định kiểu gen các phân mẫu và mẫu nhỏ. Theo các phương án được ưu tiên, SNP, haplotyp, STR, hoặc biến dị trình tự khác, CNV hoặc chất đánh dấu biểu sinh được định kiểu gen trong mẫu người mẹ được sử dụng.

Do theo một số phương án các mẫu nhỏ chứa nhỏ hơn hoặc bằng 1 tế bào nên việc sàng lọc hoặc định kiểu gen của mẫu nhỏ hoặc phần mẫu có thể là từng tế bào. Các mẫu nhỏ hoặc phần mẫu cũng có thể được sàng lọc hoặc định kiểu gen bằng cách sử dụng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các phương pháp được nêu trên đây. Tốt hơn, nếu các mẫu nhỏ được sàng lọc về các alen dị hợp tử bằng cách sử dụng PCR định lượng (quantitative PCR: qPCR) với hệ TAQMAN® (Foster City, CA). Số lượng định trước của mẫu nhỏ hoặc tế bào có thể được sàng lọc để phát hiện alen dị hợp tử. Ví dụ, như được thể hiện trong bảng 1, để thử nghiệm 7 locut trong mẫu đã được làm giàu tới tỷ lệ 1:10000 tế bào thai nhi:tế bào người mẹ, trong đó mong đợi có khoảng 5 tế bào thai nhi cho mỗi locut, số lượng định trước của mẫu hoặc tế bào là 350000. Theo một số phương án, số tế bào thai nhi cho mỗi locut là, là khoảng, là ít nhất, là ít nhất khoảng, nhỏ hơn hoặc bằng, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 hoặc 300, hoặc khoảng được xác định bằng hai trị số bất kỳ trong số các trị số đứng trước.

Bảng 1

		Tổng số tế bào được làm giàu (tính bằng nghìn)							
		50	100	150	200	250	300	350	400
		Số locut có thể có với 5 tế bào thai nhi cho mỗi locut							
Tần số thai nhi	1:100	100	200	300	400	500	600	700	800
	1:1000	10	20	30	40	50	60	70	80
	1:10000	1	2	3	4	5	6	7	8

Nhận dạng ít nhất một alen người bố mang thông tin ở ít nhất một phần mẫu hoặc mẫu nhỏ

Như được mô tả ở đây, sau khi các SNP đồng hợp tử (hoặc, theo cách khác, dị hợp tử) được nhận dạng trong vật chất di truyền người mẹ, các SNP này có thể được sàng lọc hoặc định kiểu gen trong các mẫu nhỏ hoặc phần mẫu để phát hiện sự có mặt của alen không phải của người mẹ. Nếu SNP đồng hợp tử/dị hợp tử thứ nhất của người mẹ không tạo ra kiểu gen dị hợp tử/đồng hợp tử trong các phần mẫu hoặc các mẫu nhỏ thì SNP đồng hợp tử/dị hợp tử thứ hai của người mẹ có thể được chọn và định kiểu gen. Có thể lặp lại quy trình này cho đến khi alen không phải của người mẹ được phát hiện hoặc cho đến khi lượng định trước của SNP và/hoặc tế bào, các mẫu nhỏ hoặc phần

mẫu được sàng lọc. Quy trình này cũng có thể bao gồm việc định kiểu gen nhiều phần mẫu hoặc mẫu nhỏ, SNP đa thành phần hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Các locut thử nghiệm được sàng lọc hoặc định kiểu gen sao cho ít nhất một alen thai nhi được phát hiện nếu có mặt trong mẫu. Theo một số phương án, các locut thử nghiệm được sàng lọc hoặc định kiểu gen cho đến khi ít nhất một alen không phải của người mẹ được phát hiện. Theo một số phương án, locut thử nghiệm thứ nhất được sàng lọc hoặc định kiểu gen trong các phần mẫu hoặc mẫu nhỏ cho đến khi đủ tế bào được định kiểu gen vượt quá xác suất được chỉ định để phát hiện alen không phải của người mẹ. Nếu không phát hiện được alen không phải của người mẹ thì locut thử nghiệm thứ hai được sàng lọc hoặc định kiểu gen trong các phần mẫu hoặc mẫu nhỏ cho đến khi đủ tế bào được định kiểu gen vượt quá xác suất được chỉ định để phát hiện alen không phải của người mẹ. Nếu không phát hiện được alen không phải của người mẹ thì các locut thử nghiệm bổ sung được sàng lọc hoặc định kiểu gen cho đến khi số locut thử nghiệm vượt quá xác suất tích lũy được chỉ định để phát hiện alen không phải của người mẹ (và do đó alen thai nhi) từ mẫu hỗn hợp.

Các locut thử nghiệm cũng có thể được sàng lọc hoặc định kiểu gen cho đến khi phát hiện được nhiều hơn một alen thai nhi. Nếu nhiều hơn một locut thử nghiệm được sàng lọc hoặc định kiểu gen thì mỗi locut bổ sung cho thử nghiệm dương tính với alen thai nhi (tức là có kiểu gen khác với kiểu gen người mẹ) làm tăng độ tin cậy của việc phát hiện hệ gen thai nhi trong mẫu nhỏ hoặc phần mẫu. Ngoài ra, lượng định trước của các locut thử nghiệm có thể được chỉ định để lý giải thực tế rằng vật chất di truyền thai nhi có thể không có mặt. Theo một số phương án, lượng định trước của các locut thử nghiệm được xác định bằng cách tính xác suất tích lũy phát hiện alen thai nhi đối với nhóm biến thích hợp. Ví dụ, như được thể hiện trong bảng 3, xác suất phát hiện sự có mặt của alen thai nhi dị hợp tử bằng cách sử dụng 7 SNP có tần số alen thấp khoảng 0,5 là $1 - (0,5)(0,5)(0,5)(0,5)(0,5)(0,5)(0,5) = 99,22\%$. Như được thể hiện trong bảng 1, đối với 350000 phần mẫu hoặc mẫu nhỏ từ mẫu được làm giàu tới tỷ lệ 1:10.000 (tế bào thai nhi:tế bào người mẹ), lượng định trước của các locut thử nghiệm do đó có thể là khoảng 7 locut thử nghiệm.

Các locut thử nghiệm có thể được sàng lọc hoặc định kiểu gen một cách riêng rẽ hoặc đồng thời. Theo một số phương án, một locut thử nghiệm được sàng lọc hoặc định kiểu gen trong một phần mẫu hoặc mẫu nhỏ. Một locut thử nghiệm cũng có thể được sàng lọc hoặc định kiểu gen ở nhiều phần mẫu hoặc mẫu nhỏ. Ngoài ra, các phần mẫu hoặc mẫu nhỏ có thể được sàng lọc hoặc định kiểu gen một cách riêng rẽ hoặc đồng

thời. Theo một số phương án, nhiều hơn một locut thử nghiệm được sàng lọc hoặc định kiểu gen trong một phần mẫu hoặc mẫu nhỏ. Ngoài ra, nhiều hơn một locut thử nghiệm cũng có thể được sàng lọc hoặc định kiểu gen trong nhiều phần mẫu hoặc mẫu nhỏ. Theo một số phương án, số locut thử nghiệm trong bảng là, là khoảng, là ít nhất, là ít nhất khoảng, nhỏ hơn hoặc bằng, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 locut thử nghiệm được kết hợp để sàng lọc hoặc định kiểu gen alen thai nhi, hoặc khoảng được xác định bằng hai trị số bất kỳ trong số các trị số đứng trước.

Theo một số phương án, locut được xác định là chứa kiểu gen dị hợp tử (và do đó kiểu gen không phải của người mẹ) trong hỗn hợp các axit nucleic người mẹ và thai nhi (tốt hơn là vô bào) được sàng lọc từng mẫu nhỏ với các mẫu nhỏ có nguồn gốc từ hỗn hợp tế bào người mẹ và tế bào thai nhi. Tiếp theo, các phần mẫu và mẫu nhỏ bảo toàn có thể được sử dụng để thực hiện các bước phân tích di truyền bổ sung. Tuy nhiên, mặc dù các axit nucleic vô bào của người mẹ và thai nhi thuận lợi để phát hiện sự có mặt của alen thai nhi, các mẫu này không thích hợp cho các phân tích cần bảo tồn tính toàn vẹn của hệ gen hoặc hệ phiên mã thai nhi, hoặc bất giữ mẫu. Điều này làm nổi bật một trong số các lợi ích của việc sử dụng các phương pháp trên cơ sở tế bào được mô tả ở đây.

Lấy phần mẫu hoặc mẫu nhỏ

Các phần mẫu hoặc mẫu nhỏ được xác định là chứa alen thai nhi có thể được lấy cho các phân tích tiếp theo. (Các) phần mẫu lấy để phân tích tiếp có thể là cùng (các) phần mẫu được sử dụng để sàng lọc alen thai nhi, hoặc phần mẫu khác từ cùng mẫu nhỏ có thể được sử dụng để tạo ra phần mẫu chưa dùng cho phản ứng bất kỳ được sử dụng để sàng lọc alen thai nhi. Theo một số phương án, các phần mẫu hoặc mẫu nhỏ được chọn để lấy mẫu trên cơ sở chất lượng, số lượng hoặc sự có mặt của các axit nucleic mong muốn. Ví dụ, các phần mẫu hoặc mẫu nhỏ có thể được chọn để lấy mẫu bằng cách sử dụng tương quan tín hiệu, cường độ tín hiệu, tỷ lệ cường độ tín hiệu, tín hiệu so với số đo cơ sở, động học thử nghiệm theo thời gian, động học thử nghiệm theo nhiệt độ hoặc các số đo tính năng khác đã biết trong lĩnh vực này. Theo một số phương án, chất đánh dấu hoặc vùng dùng để phân biệt alen người bố với alen người mẹ được lấy mẫu. Tuy nhiên, theo các phương án khác, chất đánh dấu hoặc vùng không liên kết được lấy mẫu để phân tích tiếp.

Theo một số phương án, chỉ có phần mong muốn của phần mẫu hoặc mẫu nhỏ được lấy mẫu để phân tích tiếp. Ví dụ, theo một số phương án, đoạn dò lai được sử dụng để lấy duy nhất các trình tự axit nucleic từ nhiễm sắc thể hoặc vùng quan tâm.

Theo các phương án khác, toàn bộ phần mẫu, mẫu nhỏ hoặc phần đồng nhất của chúng được lấy mẫu.

Phân tích ít nhất một hệ gen thai nhi về biến dị di truyền

Các phần mẫu hoặc mẫu nhỏ nhận dạng được là có alen không phải của người mẹ, được tùy ý lấy mẫu như được mô tả ở đây, có thể được phân tích tiếp, ví dụ, để thử nghiệm về sự có mặt của biến dị nhiễm sắc thể hoặc biến dị di truyền. Phần mẫu dùng cho phân tích có thể là cùng phần mẫu dùng để sàng lọc hoặc định kiểu gen về alen thai nhi. Hoặc phần mẫu dùng cho phân tích có thể là phần mẫu khác từ cùng mẫu nhỏ, song là phần mẫu không dùng để sàng lọc hoặc định kiểu gen bất kỳ về alen thai nhi. Toàn bộ hệ gen thai nhi hoặc các phần của nó có thể được chọn để phân tích tiếp. Theo một số phương án, hiện tượng đa hình được định kiểu gen bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, SNP, haplotyp hoặc STR có thể được định kiểu gen bằng cách sử dụng PCR và, nếu thích hợp, các phương pháp phát hiện tiếp theo như điện di mao dẫn. Các hiện tượng đa hình cũng có thể được định kiểu gen bằng cách sử dụng các phương pháp giải trình tự. Tốt hơn, nếu việc định kiểu gen được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông lượng. Ví dụ, theo một số phương án, vi dây được sử dụng để tạo ra số liệu về SNP và/hoặc haplotyp. Biến dị số bản sao cũng có thể được đánh giá để phân tích tiếp. Ví dụ, phép lai hệ gen ngang bằng dây (array comparative genomic hybridization: aCGH) có thể được sử dụng để phát hiện biến dị số bản sao. Sự tái sắp xếp nhiễm sắc thể cũng có thể được đánh giá. Ví dụ, đảo đoạn hoặc hoán vị có thể phát hiện được bằng cách sử dụng các phương pháp như giải trình tự, FISH hoặc PCR.

Theo một số phương án, tỷ lệ alen di truyền từ người mẹ và người bố được xác định để phân tích sự có mặt của biến dị di truyền. Tùy ý, cùng locut được sử dụng để xác định sự có mặt của alen thai nhi và sự có mặt của biến dị di truyền. Ví dụ, cường độ alen ở locut thử nghiệm dị hợp tử có thể được đo, với tỷ lệ cường độ 2:1 hoặc 1:2 chỉ ra biến dị số bản sao. Tuy nhiên, theo một số phương án, locut dùng để xác định sự có mặt của alen thai nhi là không cùng locut dùng để xác định biến dị di truyền. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rằng theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả ở đây, các tỷ lệ cường độ khác (ví dụ, 3:1, 1:3, 3:2, 2:3, 4:1 và 1:4) có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của biến dị số bản sao.

Theo một số phương án, sự biểu hiện quá mức hoặc dưới mức của các trình tự nhiễm sắc thể được xác định để phân tích sự có mặt của biến dị số bản sao. Ví dụ, số trình tự độc nhất được đối với nhiễm sắc thể cụ thể có thể đo được và so sánh với

nhiễm sắc thể người mẹ và/hoặc nhiễm sắc thể so sánh khác, với tỷ lệ nhỏ hơn hoặc lớn hơn 1:1 chỉ ra biến dị số bản sao. Việc phát hiện các kết quả đọc trình tự độc nhất này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp quy mô nhỏ (ví dụ, giải trình tự bằng các cặp môi được thiết kế cho các locut đặc hiệu) hoặc quy mô lớn (ví dụ, giải trình tự của toàn hệ gen). Số trình tự độc nhất đọc được đối với vùng nhiễm sắc thể cụ thể có thể đo được và so sánh với vùng nhiễm sắc thể người mẹ và/hoặc vùng nhiễm sắc thể so sánh khác, với tỷ lệ nhỏ hơn hoặc lớn hơn 1:1 chỉ ra sự có mặt của biến dị số bản sao.

Các phân mẫu hoặc mẫu nhỏ có thể được phân tích một cách riêng rẽ hoặc trong mẫu hỗn hợp chứa ít nhất hai phân mẫu hoặc mẫu nhỏ. Theo một số phương án, các phân mẫu hoặc mẫu nhỏ được phân loại trên cơ sở các phép đo tín hiệu như được mô tả ở đây và nhóm được ưu tiên được chọn để phân tích hoặc thu gom và sau đó phân tích. Theo một số phương án, các phân mẫu hoặc mẫu nhỏ hoặc hỗn hợp được phân lập được thử nghiệm về sự có mặt của biến dị di truyền hoặc biến dị nhiễm sắc thể bằng cách sử dụng phép lai hệ gen ngang bằng dây (array comparative genomic hybridization-aCGH), PCR huỳnh quang định lượng (quantitative fluorescence PCR: QF-PCR), kỹ thuật tạo đoạn lặp nối tiếp ngắn (STR) hoặc giải trình tự. Tuy nhiên, kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các kỹ thuật được mô tả ở đây, có thể được sử dụng để thử nghiệm về sự có mặt của biến dị di truyền hoặc biến dị nhiễm sắc thể.

Việc sàng lọc hoặc định kiểu gen các phân mẫu hoặc mẫu nhỏ trên cơ sở từng tế bào cho phép phát hiện dạng khảm (tức là trạng thái trong đó các tế bào từ cùng cá thể có các profin di truyền khác nhau). Ví dụ, các mẫu nhỏ có thể được sàng lọc hoặc định kiểu gen để phát hiện biến dị nhiễm sắc thể khảm. Theo một số phương án, số mẫu nhỏ được sàng lọc hoặc định kiểu gen về dạng khảm nằm trong khoảng từ 2 đến 100 mẫu nhỏ. Theo một số phương án, số mẫu nhỏ được sàng lọc hoặc định kiểu gen là, là khoảng, là ít nhất, là ít nhất khoảng, nhỏ hơn hoặc bằng, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hoặc 100, hoặc khoảng được xác định bằng hai trị số bất kỳ trong số các trị số đứng trước. Theo phương án được ưu tiên, số mẫu nhỏ được sàng lọc hoặc định kiểu gen nằm trong khoảng từ 5 đến 10 mẫu nhỏ. Tùy ý, cùng locut được sử dụng để xác định sự có mặt của alen thai nhi và sự có mặt của dạng khảm. Ví dụ, cường độ của các alen ở locut thử nghiệm dị hợp tử có thể được đo, với tỷ lệ cường độ 1:1 ở ít nhất một mẫu nhỏ và tỷ lệ cường độ 2:1 hoặc 1:2 ở ít nhất một mẫu nhỏ khác chỉ ra sự có mặt của biến dị di truyền khảm. Tuy nhiên, các locut khác nhau cũng có thể được sử dụng để xác định sự có mặt của alen thai nhi

và sự có mặt của dạng khảm. Ví dụ, locut thử nghiệm đồng hợp tử có thể được sử dụng để nhận dạng alen thai nhi. Tiếp theo, locut dị hợp tử có thể được phát hiện và cường độ của các alen ở locut dị hợp tử này có thể được đo, với tỷ lệ cường độ 1:1 ở ít nhất một mẫu nhỏ và tỷ lệ cường độ 2:1 hoặc 1:2 ở ít nhất một mẫu nhỏ khác chỉ ra sự có mặt của biến dị di truyền khảm.

Theo một số phương án, dạng khảm được phát hiện bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể đặc hiệu giới tính. Ví dụ, các alen ở locut thử nghiệm nhiễm sắc thể X dị hợp tử có thể được phát hiện, với sự có mặt của một alen ở ít nhất một mẫu nhỏ và sự có mặt của cả hai alen ở ít nhất một mẫu nhỏ khác chỉ ra sự có mặt của thể bội không chỉnh khảm (ví dụ, hội chứng Turner khảm). Theo một phương án khác, sự có mặt của các alen ở locut thử nghiệm nhiễm sắc thể X đồng hợp tử có thể được phát hiện, với tỷ lệ cường độ nhiễm sắc thể X:Y là 1:1 ở ít nhất một mẫu nhỏ và tỷ lệ cường độ nhiễm sắc thể X:Y là 2:1 ở ít nhất một mẫu nhỏ khác chỉ ra sự có mặt của thể bội khảm không chỉnh (ví dụ, hội chứng Klinefelter khảm).

Việc sàng lọc hoặc định kiểu gen các phần mẫu hoặc mẫu nhỏ trên cơ sở từng tế bào cũng cho phép phát hiện trẻ sinh đôi hai hợp tử (tức là trẻ sinh đôi không giống nhau). Ví dụ, việc định kiểu gen SNP có thể được thực hiện đối với các mẫu nhỏ chứa alen thai nhi, với sự có mặt của ít nhất hai mẫu nhỏ có kiểu gen SNP khác nhau chỉ ra sự có mặt của trẻ sinh đôi hai hợp tử. Theo một số phương án, số SNP được sàng lọc hoặc định kiểu gen để phát hiện trẻ sinh đôi hai hợp tử nằm trong khoảng từ 1 đến 20 SNP. Theo một số phương án, số SNP được sàng lọc hoặc định kiểu gen là, là khoảng, là ít nhất, là ít nhất khoảng, nhỏ hơn hoặc bằng, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20 SNP, hoặc khoảng được xác định bằng hai trị số bất kỳ trong số các trị số đứng trước. Theo phương án được ưu tiên, số SNP được sàng lọc hoặc định kiểu gen nằm trong khoảng từ 3 đến 4 SNP. Xác suất phát hiện sự có mặt của trẻ sinh đôi hai hợp tử bằng cách sử dụng 3 SNP là $1 - (0,5)(0,5)(0,5) = 87,5\%$, trong khi xác suất phát hiện sự có mặt của trẻ sinh đôi hai hợp tử bằng cách sử dụng 4 SNP là $1 - (0,5)(0,5)(0,5)(0,5) = 93,75\%$.

Theo một số phương án, các phần mẫu chứa alen thai nhi từ trẻ sinh đôi hai hợp tử có thể được kết hợp. Ví dụ, các phần mẫu chứa tế bào từ trẻ sinh đôi thứ nhất có thể độc lập được kết hợp với các phần mẫu chứa tế bào từ trẻ sinh đôi thứ hai. Theo một số phương án, các phần mẫu kết hợp từ trẻ sinh đôi thứ nhất và thứ hai có thể độc lập được đặt lên một hoặc nhiều dây và đánh giá về biến dị di truyền hoặc biến dị nhiễm sắc thể như được mô tả ở đây.

Các kỹ thuật

Ngay cả khi ADN hoặc ARN thai nhi có mặt trong phần nhỏ của mẫu chứa vật chất di truyền người mẹ và thai nhi, vẫn có thể để phát hiện được các alen SNP thai nhi bằng cách sử dụng các phương pháp phát hiện SNP chuẩn, như TAQMAN® PCR. Tuy nhiên, để phát hiện các alen nhỏ, có thể cần tối ưu hóa việc phát hiện bằng huỳnh quang để ngăn ngừa sự chồng chéo tín hiệu người mẹ làm khuất tín hiệu đặc hiệu thai nhi. Theo một số phương án, thuốc nhuộm huỳnh quang tối ưu dùng để đánh dấu đoạn dò được chọn để giảm thiểu sự chồng chéo. Ví dụ, thuốc nhuộm tách biệt ở phổ huỳnh quang chuẩn (400-700 nm) có mức chồng chéo nhỏ hơn 10% giữa các bức xạ sẽ được chọn. Theo cách này, ngay cả tín hiệu nhỏ (cường độ tín hiệu nhỏ hơn 10%) từ alen thai nhi không bị khuất bởi tín hiệu người mẹ (cường độ tín hiệu 90%). Theo một số phương án, bộ lọc huỳnh quang tối ưu được chọn để giảm thiểu sự chồng chéo trong quá trình phát hiện bằng bức xạ và phần cứng và phần mềm phát hiện huỳnh quang tiêu thụ được chọn để giảm thiểu sự nhiễu tín hiệu. Theo một số phương án, PCR số được sử dụng để tối ưu hóa tỷ lệ tín hiệu thu được so với tín hiệu cơ sở.

Các công cụ tiềm năng khác để đo cường độ alen bao gồm làm khớp đường cong S và các phép phân tích thống kê khác đã biết trong lĩnh vực này. Theo một số phương án, dịch chuyển Ct được đo để phát hiện biến dị di truyền hoặc biến dị nhiễm sắc thể. Ví dụ, việc bao nang các tế bào đơn để phát hiện SNP thai nhi bằng hóa học TAQMAN® có thể cho phép phát hiện đồng thời số bản sao bất thường đối với SNP phát hiện được và, do đó cả số lượng bản sao của nhiễm sắc thể tương ứng. Nếu SNP nằm trên nhiễm sắc thể 21 thì mức độ dư SNP tương quan với trị số Ct và, do đó, tương quan với cả số bản sao nhiễm sắc thể 21. Nếu phản ứng chứa một tế bào thì số bản sao nhiễm sắc thể trong tế bào đó có thể được phát hiện bằng dịch chuyển Ct. Trong ví dụ này, việc sử dụng dư trị số Ct của tế bào người mẹ bình thường sẽ thiết lập Ct cho số bản sao bình thường của hai nhiễm sắc thể cho mỗi tế bào và dịch chuyển Ct tới chu kỳ sớm có thể chỉ ra sự có mặt của biến dị số bản sao.

Như được mô tả ở đây, các phương pháp giải trình tự có thể được sử dụng để sàng lọc alen thai nhi và/hoặc xác định sự có mặt của biến dị di truyền hoặc biến dị nhiễm sắc thể. Theo một số phương án, việc giải trình tự nhanh có thể được sử dụng dưới dạng phương pháp khác đối với dãy CGH để phát hiện biến dị số bản sao (ví dụ, thu được từ biến dị di truyền) như được mô tả, ví dụ, trong ấn phẩm: Xie and Tammi, BMC Bioinformatics 2009, 10(80). Theo một số phương án, việc giải trình tự toàn hệ gen có thể được thực hiện.

Việc định kiểu gen SNP cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các phương pháp qPCR và TAQMAN®. Nhiều phương pháp hóa học SNP và thiết bị có thể sử dụng từ các hãng sản xuất như Life Technologies (TAQMANđ) (Carlsbad, CA), Illumina (GOLDENGATE®) (San Diego, CA), Millipore (AMPLIFLUOR®) (Billerica, MA), và DxS Ltd. (SCORPIONSTM) (Manchester UK). Các dạng thiết bị thu nhỏ cũng có thể sử dụng từ BioTrove (OPENARRA YTM) (Woburn, MA) và Fluidigm (BIOMARKTM) (South San Francisco, CA).

Bảng SNP

Bảng SNP có thể được sử dụng để nhận dạng các locut đích trong mẫu di truyền người mẹ. Khi đã nhận dạng được các locut đích này, chúng được sử dụng để xác định sự có mặt của alen không phải của người mẹ trong mẫu hỗn hợp. Do việc định kiểu gen mẫu di truyền người mẹ để nhận dạng locut đích là tốn kém và tốn thời gian, bảng SNP được thiết kế để chứa các SNP càng ít càng tốt. Tuy nhiên, bảng này vẫn phải chứa đủ SNP để nhận dạng nhóm locut đích đủ lớn để cho phép phát hiện alen thai nhi trong mẫu hỗn hợp, với các SNP là đủ thông tin để bảo toàn lượng tế bào xác định trong hỗn hợp tế bào thai nhi và tế bào người mẹ.

Kích thước bảng SNP tỷ lệ nghịch với tần số alen nhỏ của các SNP trong bảng. Theo một số phương án, mục đích theo sáng chế là nhận dạng từ 1 đến 5 tế bào thai nhi từ mẫu hỗn hợp chứa tế bào người mẹ và tế bào thai nhi. Số SNP phải được đánh giá để đạt mục đích này phụ thuộc vào tần số alen nhỏ của SNP được đánh giá và số tế bào được định kiểu gen. Số tế bào phải được đánh giá lại phụ thuộc vào mức độ làm giàu mẫu hỗn hợp đối với tế bào thai nhi.

Do đó, theo một số phương án, bảng SNP được thiết kế để giảm thiểu số thử nghiệm cần để nhận dạng các locut đồng hợp tử (hoặc, theo cách khác, dị hợp tử) trong mẫu người mẹ và dị hợp tử (hoặc, theo cách khác, đồng hợp tử) trong mẫu hỗn hợp chứa vật chất di truyền người mẹ và thai nhi. Theo một số phương án, bảng SNP được thiết kế để nhận dạng từ 1 đến 20 SNP người mẹ đồng hợp tử cho mỗi bảng SNP đặc hiệu nhiễm sắc thể. Theo một số phương án, bảng SNP được thiết kế để phát hiện số SNP người mẹ đồng hợp tử cho mỗi bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể là, là khoảng, là ít nhất, là ít nhất khoảng, nhỏ hơn hoặc bằng, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20 SNP, hoặc khoảng được xác định bằng hai trị số bất kỳ trong số các trị số đứng trước. Theo phương án được ưu tiên,

bảng SNP được thiết kế để nhận dạng từ 5 đến 10 SNP người mẹ đồng hợp tử cho mỗi bảng SNP đặc hiệu nhiễm sắc thể. Tốt hơn, nếu bảng SNP được thiết kế để nhận dạng 7 SNP người mẹ đồng hợp tử cho mỗi bảng SNP đặc hiệu nhiễm sắc thể. Ví dụ, như được thể hiện trong bảng 2, đối với SNP trong HWE khi $p^2 = 0,25$, cần bảng chứa 20 SNP để nhận dạng 10 SNP mà mẫu người mẹ là đồng hợp tử.

Một số bảng SNP đặc hiệu nhiễm sắc thể, tốt hơn là bao gồm ít nhất một bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể đối chứng, có thể được kết hợp để tạo ra bảng SNP để định kiểu gen vật chất di truyền người mẹ. Mỗi bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể được thiết kế để tạo ra nhóm locut đích đối với nhiễm sắc thể đó. Tốt hơn, nếu bảng SNP đặc hiệu nhiễm sắc thể chứa từ 5 đến 100 SNP độc nhất. Tốt hơn, nếu tổng số SNP trong bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể nằm trong khoảng từ 5 đến 30 SNP độc nhất. Tốt hơn, nếu tổng số SNP trong bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể là 20 SNP. Theo một số phương án, tổng số SNP trong bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể là, là khoảng, là ít nhất, là ít nhất khoảng, nhỏ hơn hoặc bằng, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 hoặc 100 SNP, hoặc khoảng được xác định bằng hai trị số bất kỳ trong số các trị số đứng trước.

Các bảng SNP có thể chứa một hoặc nhiều bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể. Bảng SNP đặc hiệu nhiễm sắc thể có thể chứa các SNP nằm trên nhiễm sắc thể sinh dưỡng, tốt hơn là SNP nằm trên các nhiễm sắc thể dễ bị thể bội không chỉnh trong các hội chứng liên quan lâm sàng. Tốt hơn, nếu bảng SNP đặc hiệu nhiễm sắc thể chứa SNP nằm trên nhiễm sắc thể 13, 18, 21, X, và Y. Bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể cũng có thể là bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể đối chứng. Tốt hơn, nếu bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể đối chứng chứa SNP nằm trên nhiễm sắc thể không dễ bị thể bội không chỉnh hoặc vị trí mà thể bội không chỉnh không tương thích với khả năng sống, thường là các nhiễm sắc thể lớn hơn được ký hiệu bằng các chỉ số thấp hơn (ví dụ, nhiễm sắc thể 1, 2 hoặc 3). Tốt hơn, nếu bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể đối chứng chứa SNP nằm trên nhiễm sắc thể 1, 2 hoặc 3. Ngoài ra, bảng SNP đặc hiệu nhiễm sắc thể cũng có thể chứa SNP nằm trên nhiễm sắc thể đặc hiệu giới tính. Theo một số phương án, bảng không đặc hiệu với nhiễm sắc thể cụ thể. Theo một số phương án, bảng đối chứng không phải là bảng SNP đặc hiệu nhiễm sắc thể. Ví dụ, các đoạn môi có thể được sử dụng để khuếch đại vùng đặc hiệu nhiễm sắc thể sẽ dùng làm đối chứng.

Theo một số phương án, bảng SNP chứa nhiều hơn một bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể, trong đó bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể này dùng cho các SNP trên nhiễm sắc thể 1,

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X hoặc Y. Theo một số phương án, bảng SNP chứa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 hoặc 23 bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể, hoặc khoảng được xác định bằng hai trị số bất kỳ trong số các trị số đứng trước. Theo một số phương án, tổng số SNP trong bảng là $N \times$ số SNP trên bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể, trong đó N là số bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể trong bảng SNP.

Một số yếu tố có thể được xem xét để chọn các locut cho bảng định kiểu gen. Ví dụ, cân bằng Hardy-Weinberg ("HWE") có thể được sử dụng để tính xác suất tần số alen của SNP. Theo một số phương án, xác suất alen trong SNP được chọn được tính theo phương trình sau: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Ví dụ, SNP có mức dị hợp tử bằng 0,5 có thể được chọn. HWE được ưu tiên, do các SNP không có trong HWE là các SNP không di truyền, hạn chế tiện ích của chúng, hoặc có thể là do hóa học định kiểu gen sai lệch.

Các SNP có một alen ưu thế về tính đồng hợp tử so với phần lớn các haplotyp đã biết cũng có thể được sử dụng. Theo một số phương án, SNP có kiểu gen người mẹ đồng hợp tử (pp hoặc qq) ở tần số nhỏ hơn 0,25 và kiểu gen đồng hợp tử đối diện ở tần số lớn hơn 0,25 được chọn.

Theo một số phương án, SNP có tần số nằm trong khoảng từ 30% đến 50% đối với alen nhỏ khi đo tất cả các nhóm quần thể chính. Theo phương án được ưu tiên, SNP có tần số nằm trong khoảng từ 49% đến 50% đối với alen nhỏ. Theo một số phương án, SNP có tần số là, là khoảng, là ít nhất, là ít nhất khoảng, nhỏ hơn hoặc bằng, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49% hoặc 50% đối với alen nhỏ, hoặc khoảng được xác định bằng hai trị số bất kỳ trong số các trị số đứng trước.

Các phương án của sáng chế

Một phương án của sáng chế là phương pháp phát hiện alen thai nhi, bao gồm: thu mẫu chứa hỗn hợp tế bào người mẹ và tế bào thai nhi; làm giàu tế bào thai nhi trong mẫu; chia mẫu đã làm giàu thành các mẫu nhỏ; thực hiện khuếch đại toàn hệ gen đối với mẫu nhỏ để tạo ra sản phẩm hệ gen đã khuếch đại; chia sản phẩm hệ gen đã khuếch đại thành các phân mẫu; nhận dạng các locut đích ở đó vật chất di truyền của tế bào người mẹ là đồng hợp tử đối với alen nhỏ; chọn locut thử nghiệm từ các locut đích này; sàng lọc phân mẫu về alen không phải của người mẹ (kiểu gen dị hợp tử) ở locut thử nghiệm, trong đó sự có mặt của alen không phải của người mẹ (kiểu gen dị hợp tử) chỉ ra sự có mặt của alen thai nhi trong sản phẩm hệ gen đã khuếch đại; và nhận dạng ít nhất một alen thai nhi.

Phương án khác của sáng chế là phương pháp phát hiện biến dị di truyền thai nhi, bao gồm: phương pháp nhận dạng alen thai nhi trong mẫu hỗn hợp tế bào người mẹ và tế bào thai nhi, bao gồm: thu mẫu chứa hỗn hợp tế bào người mẹ và tế bào thai nhi; làm giàu tế bào thai nhi trong mẫu; chia mẫu đã làm giàu thành các mẫu nhỏ, mỗi mẫu nhỏ chứa không quá một tế bào; nhận dạng bảng chứa ít nhất một locut ở đó vật chất di truyền của tế bào người mẹ là đồng hợp tử đối với alen nhỏ; chọn locut thử nghiệm từ các locut đích này; sàng lọc mẫu nhỏ về alen không phải của người mẹ (kiểu gen dị hợp tử) ở locut thử nghiệm chọn được từ bảng, trong đó sự có mặt của alen không phải của người mẹ (kiểu gen dị hợp tử) chỉ ra sự có mặt của alen thai nhi trong mẫu nhỏ; và nhận dạng ít nhất một alen thai nhi; và xác định tỷ lệ các alen di truyền của người bố và người mẹ trong mẫu nhỏ chứa alen thai nhi, trong đó tỷ lệ này được phân tích để xác định sự có mặt của biến dị di truyền.

Phương án khác của sáng chế là phương pháp phát hiện alen thai nhi, bao gồm: thu mẫu chứa hỗn hợp tế bào người mẹ và tế bào thai nhi; chia mẫu thành các mẫu nhỏ; thực hiện khuếch đại sơ bộ đối với mẫu nhỏ để tạo ra sản phẩm khuếch đại; chia sản phẩm khuếch đại thành các phân mẫu; chọn các locut đích và xác định vật chất di truyền của tế bào người mẹ là đồng hợp tử hay dị hợp tử ở nhóm các locut đích để định kiểu gen người mẹ; chọn locut thử nghiệm từ các locut đích này; sàng lọc phân mẫu về kiểu gen khác với kiểu gen người mẹ ở locut thử nghiệm, trong đó sự có mặt của kiểu gen khác với kiểu gen người mẹ chỉ ra sự có mặt của alen thai nhi trong sản phẩm khuếch đại; và nhận dạng ít nhất một alen thai nhi.

Phương án khác của sáng chế là phương pháp phát hiện alen thai nhi, bao gồm: thu mẫu chứa hỗn hợp tế bào người mẹ và tế bào thai nhi; chia mẫu thành các mẫu nhỏ; nhận dạng bảng chứa ít nhất một locut đích và xác định vật chất di truyền của tế bào người mẹ là đồng hợp tử hay dị hợp tử đối với ít nhất một locut đích để định kiểu gen người mẹ; chọn locut thử nghiệm từ ít nhất một locut đích; sàng lọc mẫu nhỏ về kiểu gen khác với kiểu gen người mẹ ở locut thử nghiệm chọn được từ bảng, trong đó sự có mặt của kiểu gen khác với kiểu gen người mẹ chỉ ra sự có mặt của alen thai nhi trong mẫu nhỏ; và nhận dạng ít nhất một alen thai nhi.

Các phương án của sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều phương án sau: phương pháp còn bao gồm bước làm giàu tế bào thai nhi trong mẫu; phương pháp trong đó bước làm giàu bao gồm việc sinh sản biệt hóa tế bào thai nhi vượt quá tế bào người mẹ; phương pháp còn bao gồm bước phân tích sản phẩm khuếch đại được xác định là chứa alen thai nhi để phát hiện biến dị di truyền thai nhi; phương pháp trong đó biến dị

di truyền thai nhi được chọn từ nhóm bao gồm thể bội không chỉnh, vi mất đoạn, vi nhân đôi, và đột biến hoặc biến dị di truyền khác; phương pháp còn bao gồm bước phân tích sản phẩm khuếch đại được xác định là chứa alen thai nhi để phát hiện sự có mặt của dạng khảm; phương pháp còn bao gồm bước phân tích sản phẩm khuếch đại được xác định là chứa alen thai nhi để phát hiện sự có mặt của trẻ sinh đôi hai hợp tử; phương pháp trong đó bước khuếch đại sơ bộ bao gồm khuếch đại toàn hệ gen hoặc khuếch đại toàn hệ phiên mã; phương pháp trong đó các locut đích là đồng hợp tử về kiểu gen người mẹ; phương pháp trong đó các locut đích là dị hợp tử về kiểu gen người mẹ; phương pháp trong đó các locut đích bao gồm hỗn hợp các locut đồng hợp tử và dị hợp tử về kiểu gen người mẹ; phương pháp trong đó sản phẩm khuếch đại bao gồm ADN hệ gen; phương pháp trong đó sản phẩm khuếch đại bao gồm ADN bổ trợ; phương pháp trong đó bước định kiểu gen người mẹ bao gồm việc sử dụng bảng SNP để định kiểu gen mẫu vật chất di truyền người mẹ từ cùng cá thể là nguồn tế bào người mẹ; phương pháp trong đó nguồn vật chất di truyền người mẹ được chọn từ nhóm bao gồm máu, huyết thanh, huyết tương, nước tiểu, gạc thấm mẫu cổ tử cung hoặc gạc thấm mẫu trong khoang miệng; phương pháp trong đó nguồn vật chất di truyền người mẹ được chọn từ nhóm bao gồm máu hoặc gạc thấm mẫu trong khoang miệng; phương pháp trong đó bước chọn locut thử nghiệm bao gồm việc sàng lọc hoặc định kiểu gen mẫu chứa các axit nucleic vô bào của người mẹ và thai nhi về kiểu gen khác với kiểu gen người mẹ ở locut đích, và chọn locut đích có kiểu gen không phải của người mẹ trong mẫu axit nucleic vô bào làm locut thử nghiệm; phương pháp trong đó kiểu gen không phải của người mẹ là đồng hợp tử; phương pháp trong đó kiểu gen không phải của người mẹ là dị hợp tử; phương pháp trong đó nguồn mẫu chứa các axit nucleic vô bào của người mẹ và thai nhi là máu, huyết thanh, huyết tương, nước tiểu hoặc gạc thấm mẫu cổ tử cung từ phụ nữ mang thai; phương pháp bao gồm chọn và sàng lọc nhiều hơn một locut thử nghiệm trong một phần mẫu; phương pháp bao gồm chọn và sàng lọc nhiều hơn một locut thử nghiệm ở nhiều hơn một phần mẫu; phương pháp bao gồm chọn và sàng lọc một locut thử nghiệm trong một phần mẫu; phương pháp bao gồm chọn và sàng lọc một locut thử nghiệm trong nhiều hơn một phần mẫu; phương pháp trong đó mỗi mẫu nhỏ chứa không quá một tế bào; phương pháp còn bao gồm kết hợp các nhóm chứa hai hoặc nhiều phần mẫu trước khi sàng lọc; phương pháp trong đó bước kết hợp bao gồm việc sử dụng hệ chỉ số hóa gồm các hàng và cột của các lỗ chứa các phần mẫu; phương pháp trong đó số hàng và cột độc lập nằm trong khoảng từ 2 đến 1000; phương pháp trong đó số hàng và cột độc lập nằm trong khoảng từ 8 đến 100;

phương pháp trong đó số hàng và cột độc lập nằm trong khoảng từ 16 đến 24; phương pháp trong đó ít nhất một locut đích là đồng hợp tử về kiểu gen người mẹ; phương pháp trong đó ít nhất một locut đích là dị hợp tử về kiểu gen người mẹ; phương pháp trong đó bảng bao gồm hỗn hợp các locut đích đồng hợp tử và dị hợp tử; phương pháp còn bao gồm bước xác định cường độ tín hiệu trong mẫu nhỏ chứa alen thai nhi, trong đó cường độ tín hiệu được phân tích để xác định sự có mặt của biến dị di truyền; phương pháp còn bao gồm bước xác định sự biểu hiện quá mức hoặc dưới mức các trình tự nhiễm sắc thể trong mẫu nhỏ chứa alen thai nhi so với mẫu nhỏ chứa alen người mẹ, trong đó sự biểu hiện quá mức hoặc dưới mức được sử dụng để xác định sự có mặt của thể bội không chỉnh, vi mất đoạn hoặc vi nhân đôi của nhiễm sắc thể; phương pháp còn bao gồm bước xác định cường độ tín hiệu trong mẫu nhỏ bao gồm alen thai nhi, trong đó cường độ tín hiệu được phân tích để xác định sự có mặt của dạng khảm; phương pháp còn bao gồm bước xác định số bản sao alen trong mẫu nhỏ chứa alen thai nhi, trong đó số bản sao alen được phân tích để xác định sự có mặt của dạng khảm; phương pháp còn bao gồm bước xác định số bản sao alen trong mẫu nhỏ bao gồm alen thai nhi, trong đó số bản sao alen được phân tích để xác định sự có mặt của biến dị di truyền; phương pháp trong đó bước định kiểu gen người mẹ bao gồm việc sử dụng bảng SNP để định kiểu gen mẫu vật chất di truyền người mẹ từ cùng cá thể là nguồn tế bào người mẹ; phương pháp trong đó locut đích là đồng hợp tử và locut thử nghiệm là dị hợp tử; phương pháp trong đó locut đích là dị hợp tử và locut thử nghiệm là đồng hợp tử; phương pháp trong đó bảng bao gồm hỗn hợp các locut đích đồng hợp tử và dị hợp tử; phương pháp trong đó bảng SNP là bảng SNP như được mô tả ở đây; và phương pháp trong đó bảng này là bảng chứa ít nhất 5 locut.

Phương án khác của sáng chế là phương pháp phát hiện alen người bố mang thông tin, bao gồm: thu mẫu chứa hỗn hợp tế bào người mẹ và tế bào thai nhi; tùy ý làm giàu tế bào thai nhi trong mẫu; chia mẫu hoặc mẫu đã làm giàu thành các mẫu nhỏ; tùy ý chia sản phẩm khuếch đại thành các phần mẫu; tùy ý chọn nhóm các locut đích; xác định vật chất di truyền của tế bào người mẹ là đồng hợp tử hay dị hợp tử ở nhóm các locut đích để định kiểu gen người mẹ; tùy ý chọn locut thử nghiệm từ nhóm các locut đích, trong đó bước chọn tùy ý bao gồm việc sàng lọc mẫu chứa hỗn hợp các axit nucleic người mẹ và thai nhi về kiểu gen khác với kiểu gen người mẹ ở locut đích, và chọn locut đích có kiểu gen không phải của người mẹ trong mẫu chứa hỗn hợp axit nucleic người mẹ và thai nhi làm locut thử nghiệm; việc sàng lọc hoặc định kiểu gen phần mẫu hoặc mẫu nhỏ về sự có mặt của alen người bố mang thông tin, trong đó bước

sàng lọc tùy ý bao gồm việc sàng lọc phần mẫu về kiểu gen khác với kiểu gen người mẹ ở ít nhất một locut đích hoặc locut thử nghiệm, và trong đó sự có mặt của kiểu gen khác với kiểu gen người mẹ chỉ ra sự có mặt của alen người bố mang thông tin trong phần mẫu; và nhận dạng sự có mặt của ít nhất một alen người bố mang thông tin ở ít nhất một phần mẫu. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm: tùy ý lấy một phần của phần mẫu được xác định là chứa alen người bố mang thông tin; và phân tích phần mẫu hoặc phần đã lấy của sản phẩm khuếch đại được xác định là chứa alen người bố mang thông tin để phát hiện biến dị di truyền.

Một số phương án của sáng chế bao gồm: bảng SNP trong đó bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể được định hướng tới nhiễm sắc thể bị thể bội không chính được chọn từ nhóm bao gồm nhiễm sắc thể 13, 18, 21, X và Y; và bảng SNP còn bao gồm bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể đối chứng được định hướng tới nhiễm sắc thể đối chứng được chọn từ nhóm bao gồm nhiễm sắc thể 1, 2 và 3.

Thuật ngữ sàng lọc như được sử dụng trong ít nhất một trong số các tài liệu ưu tiên nêu trên bao gồm các phương pháp sàng lọc và định kiểu gen được mô tả ở đây. Ngoài ra, các thuật ngữ alen đồng hợp tử hoặc dị hợp tử như được sử dụng trong ít nhất một trong số các tài liệu ưu tiên trên đây đôi khi được đề cập trong bản mô tả này là locut hoặc các locut đồng hợp tử hoặc dị hợp tử, hoặc kiểu gen đồng hợp tử hoặc dị hợp tử. Ngoài ra, thuật ngữ khuếch đại sơ bộ như được sử dụng trong ít nhất một trong số các tài liệu ưu tiên nêu trên được dùng ở đây để chỉ khuếch đại mẫu nhỏ.

Các ví dụ dưới đây được mô tả chỉ nhằm mục đích minh họa.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Ví dụ sau bao gồm việc phát hiện mẫu thai nhi trên cơ sở PCR, tiếp theo bằng WGA. Tế bào, tùy ý hỗn hợp làm giàu chứa tế bào người mẹ và tế bào thai nhi, được tạo huyền phù trong dung dịch đệm như PBS và cho vào dung dịch đệm thứ hai với hóa chất thích hợp làm tan tế bào và PCR. Tiếp theo, tế bào trong dung dịch đệm tương thích PCR được phân chia thành các hỗn hợp phản ứng riêng rẽ, ví dụ bằng cách sử dụng nắp dầu để tách dầu các tế bào riêng rẽ trong dung dịch đệm làm tan và dung dịch đệm PCR. Tốt hơn, nếu phương pháp này sử dụng hóa chất làm tan tế bào một bước, và khuếch đại các axit nucleic đích mà không cần bổ sung chất phản ứng sau khi bao nang. Tốt hơn, nếu phương pháp này cũng không sử dụng bước tinh chế ADN trước khi khuếch đại ADN. Tiếp theo, mỗi phản ứng tế bào đơn bình thường được thực hiện chu kỳ nhiệt gia nhiệt và làm lạnh với việc phát hiện mẫu dò huỳnh quang đặc

hiệu thai nhi trong suốt chu kỳ nhiệt hoặc vào cuối chu kỳ cuối và phát hiện tất cả các ô chứa tế bào thai nhi (tức là một hoặc nhiều). Trong trường hợp ưu tiên, một tế bào cho mỗi phản ứng được thu, song các phản ứng bao gồm một tế bào thai nhi và một vài đến nhiều tế bào người mẹ sẽ vẫn nhận dạng một cách chính xác sự có mặt hoặc không có mặt của tế bào thai nhi. Miễn là phép phân tích hệ gen tiếp theo cho phép mức lẫn tạp tương đương (tức là một tế bào thai nhi và hai tế bào người mẹ tương đương với 33% ADN thai nhi tinh khiết) thì nhiều hơn một tế bào thai nhi cho mỗi phản ứng là chấp nhận được. Mỗi ô dương tính tùy ý được gom vào bình chung duy nhất. Hỗn hợp phản ứng đặc hiệu thai nhi đã gom này được thực hiện các quy trình tinh chế ADN, như loại bỏ ARN và protein. Sau bước tinh chế tùy ý này, axit nucleic được chạy WGA bằng hóa chất tương thích bất kỳ. Các phương pháp dùng cho WGA bao gồm: phản ứng chuỗi polymeraza sử dụng mỗi oligonucleotit biến tính (Degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction ("DOP-PCR")), PCR nối (Ligation mediated PCR ("LM-PCR")), khuếch đại thay thế sợi (Strand Displacement amplification ("SDA")) với polymeraza Φ -29 hoặc các quy trình kết hợp khác (Rubicon Genomics hoặc NuGen). Sau WGA, ADN hệ gen đã khuếch đại thu được được sử dụng cho phân tích di truyền, ví dụ, lai hệ gen tương đối (comparative genomic hybridization ("CGH")) hoặc giải trình tự hệ gen đầy đủ. Có nhiều phương pháp được sử dụng cho CGH, bao gồm dây BAC hoặc dây oligo. Cũng có nhiều phương pháp giải trình tự bao gồm giải trình tự Sanger trên cơ sở mao dẫn chuẩn và các phương pháp giải trình tự công suất cao "thế hệ kế tiếp" bao gồm các phương pháp Solexa/Illumina (San Diego, CA), Complete Genomics (Mountain View, CA), Roche/454 (Branford, CT), và Life Technologies (SOLiD™) (Carlsbad, CA).

Ví dụ 2

Ví dụ sau phát hiện ADN thai nhi từ tế bào bao gồm tách tế bào vào các buồng phản ứng riêng biệt, sau đó thực hiện WGA, tiếp theo chia mỗi hỗn hợp phản ứng thành nhiều phần mẫu để phát hiện alen thai nhi bằng PCR, và tiếp theo tùy ý thu gom các phần mẫu kết hợp có phản ứng dương tính thai nhi để phân tích di truyền, ví dụ, CGH hoặc giải trình tự. Các tế bào, tùy ý hỗn hợp làm giàu chứa tế bào thai nhi và tế bào người mẹ, được cho vào các buồng phản ứng riêng biệt chứa các dung dịch đệm và chất phản ứng thích hợp cho việc làm tan tế bào và WGA. Hỗn hợp này có thể ở trong các pha nước và dầu xen kẽ trong các mao dẫn hoặc trong đĩa để cho phép bổ sung chất phản ứng nhiều bước. Ở dạng đĩa, trước hết tế bào được tái huyền phù ở tỷ lệ 100,000

tế bào trong 200µl, và đặt vào lỗ của đĩa có 96 lỗ. Tiếp theo, bằng cách sử dụng các kỹ thuật pipet vi lượng chuẩn, như kỹ thuật TECAN (Männedorf, Switzerland), LabCyte (Sunnyvale, CA) hoặc các kỹ thuật khác, 10nL huyền phù tế bào chứa trung bình 1, 2, 3, 4 hoặc 5 tế bào được chuyển sang đĩa mật độ cao chứa, ví dụ, 1536 hoặc 3456 lỗ. Sử dụng các hóa chất WGA chuẩn. Ví dụ, bổ sung 90nL chất phản ứng dùng cho WGA vào mỗi 10nL thể tích tế bào, bịt kín đĩa bằng dầu để ngăn bay hơi, và hóa học WGA được thực hiện. Sau WGA, lên đến 25nL, chứa nhiều bản sao ADN hệ gen đã khuếch đại từ tất cả các tế bào trong hỗn hợp phản ứng này, được chuyển sang đĩa mật độ cao thứ hai. Tiếp theo, phần mẫu lên đến 100nL chất phản ứng PCR chứa các đoạn môi và đoạn dò để nhận dạng các hỗn hợp phản ứng chứa ADN thai nhi được sàng lọc bằng cách sử dụng locut đích từ bảng SNP như được mô tả ở đây. Các hỗn hợp phản ứng dương tính với ADN thai nhi được sử dụng, tùy ý sau khi thu gom, để phân tích hệ gen xuôi dòng, bao gồm CGH hoặc giải trình tự. Các hỗn hợp phản ứng được tinh chế trước khi lai CGH hoặc giải trình tự.

Ví dụ 3

Trong ví dụ này, SNP nằm trên nhiễm sắc thể 21 được chọn để lập bảng. Cân bằng Hardy-Weinberg ("HWE") được sử dụng để tính xác suất tần số alen. Một alen có ưu thế về tính đồng hợp tử so với phần lớn các haplotyp đã biết. Kiểu gen người mẹ là đồng hợp tử (pp hoặc qq) ở tần số nhỏ hơn 0,25 và kiểu gen đồng hợp tử đối diện có tần số lớn hơn 0,25, và xác suất alen được tính bằng phương trình sau: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. SNP này được di truyền theo định luật Mendel.

Ví dụ 4

Trong ví dụ này, bảng đề xuất bao gồm chọn SNP ở HWE, trong đó tỷ lệ p^2 và q^2 là 0,25, và tính dị hợp tử là 0,5. Với các tỷ lệ này, việc tìm các SNP người mẹ đồng hợp tử chỉ cần thống kê 20 SNP để tìm 10 SNP trong đó mẫu người mẹ là đồng hợp tử ($20 \times (0,25 + 0,25)$). Đối với SNP đồng hợp tử cho trước bất kỳ, quần thể bao gồm thai nhi có thể có xác suất dị hợp tử là 0,5. Đối với SNP người mẹ đồng hợp tử thứ nhất, xác suất thai nhi dị hợp tử là 0,5, đối với tổng xác suất 0,5. Đối với SNP người mẹ đồng hợp tử thứ nhất và thứ hai, xác suất kết hợp là $1 - (0,5 \times 0,5) = 0,75$. Xác suất kết hợp của 7 SNP là 0,992.

Ví dụ 5

Trong ví dụ này, phụ nữ mang thai ở tuần 14. Để phát hiện thai có bộ ba nhiễm sắc thể 21, bác sĩ lấy 30mL mẫu máu và tế bào biểu mô từ phụ nữ mang thai này lần lượt bằng cách tiêm tĩnh mạch và lấy gạc thấm mẫu trong khoang miệng.

Bảng SNP được thiết kế. Hai mươi SNP với mỗi SNP từ nhiễm sắc thể 1 và 21 (tức là 40 locut đích) được chọn để lập bảng, với mỗi SNP có tần số alen nhỏ 49% ở tất cả các quần thể chính. ADN người mẹ được chiết từ gạc thấm mẫu trong khoang miệng và định kiểu gen bằng cách sử dụng bảng SNP. Hai mươi SNP từ bảng này tạo ra kiểu gen đồng hợp tử (tức là các locut đích) và được chọn để tiếp tục định kiểu gen trong hỗn hợp tế bào người mẹ và tế bào thai nhi từ mẫu máu.

Mẫu máu được làm giàu tới tỷ lệ 1:10000 (tế bào thai nhi:tế bào người mẹ) bằng cách cho mẫu qua FICOLL™ ([location]), tiếp theo hạt từ tính Miltenyi (Gladbach, Germany). Mẫu máu đã làm giàu được tạo huyền phù trong dung dịch chứa chất đệm làm tan và chất phản ứng PCR. Tiếp theo, mẫu được kết hợp với nắp dầu và đưa vào thiết bị vi lỏng sao cho mẫu được chia thành các mẫu nhỏ mà mỗi mẫu nhỏ chứa không quá một tế bào. Khi đã ở trong thiết bị vi lỏng, các mẫu nhỏ trải qua quá trình tan tế bào một bước, tiếp theo khuếch đại PCR như được mô tả dưới đây.

Việc tính toán được thực hiện để xác định rằng với nồng độ 1:10000 (tế bào thai nhi:tế bào người mẹ), thì cần 50000 tế bào được sàng lọc để phát hiện 5 locut dị hợp tử đối với SNP có tần số alen nhỏ bằng 49%.

Nhóm thứ nhất gồm 50000 mẫu nhỏ (và do đó 50000 tế bào) được sàng lọc từng mẫu nhỏ (và do đó từng tế bào) đối với SNP thứ nhất trên mỗi nhiễm sắc thể 1 và 21 (tức là tổng hai locut) bằng cách sử dụng qPCR đa thành phần với hệ TAQMAN®. Không có kiểu gen dị hợp tử được nhận dạng đối với SNP trên nhiễm sắc thể 1 hoặc 21. Tiếp theo, nhóm thứ hai gồm 50000 mẫu nhỏ được sàng lọc từng mẫu nhỏ đối với SNP thứ hai trên mỗi nhiễm sắc thể 1 và 21. SNP trên nhiễm sắc thể 1 là dị hợp tử (chỉ ra sự có mặt của alen thai nhi), trong khi SNP trên nhiễm sắc thể 21 là đồng hợp tử. Tiếp theo, nhóm thứ ba gồm 50000 mẫu nhỏ được sàng lọc từng mẫu nhỏ đối với SNP thứ ba trên mỗi nhiễm sắc thể 1 và 21. Lúc này, SNP trên nhiễm sắc thể 21 là dị hợp tử và không còn định kiểu gen được nữa.

Tỷ lệ alen từ SNP thứ ba trên nhiễm sắc thể 21 được phân tích để phát hiện sự có mặt của thể bội không chính. Do cường độ alen của alen có nguồn gốc người mẹ (C) so với alen có nguồn gốc người bố (G) là 2:1 (tức là CCG), bộ ba nhiễm sắc thể 21 được phát hiện.

Ví dụ 6

Trong ví dụ này, tế bào thai nhi và tế bào trưởng thành được nuôi cấy với sự có mặt của các yếu tố khác nhau để đánh giá tác dụng của chúng đối với việc sinh sản biệt hóa của tế bào thai nhi. Các yếu tố này là yếu tố tế bào gốc ở 50ng/mL, IL-3 ở 5ng/nL,

IL-6 ở 5ng/mL, EPO ở 1,5 LVmL, TPO ở 100ng/mL, và Flt-3 ở 50ng/mL. Tế bào sử dụng là tế bào CD34+ dương tính tinh chế được từ máu ngoại vi của người cho di động trưởng thành và tế bào CD34+ dương tính tinh chế được từ mô gan thai mua được từ Cambrex (Walkersville, MD). Tế bào được cấy ở mật độ 10000 tế bào/mL vào đĩa nuôi cấy mô loại 24 lỗ. Tế bào được ủ trong môi trường HPGM chứa 50 đơn vị/mL penixilin, 50µg/mL streptomycin sulfat, và hỗn hợp xytokin trong 6 ngày ở 37°C và 5% CO₂ trong buồng giữ ẩm. Sau 6 ngày, phần mẫu tế bào được đếm thủ công bằng hồng cầu kế và tổng số tế bào được tính bằng cách sử dụng công thức chuẩn. Phần mẫu bổ sung được sử dụng để thử nghiệm tổng mức ATP (tương quan tuyến tính với tổng số tế bào) bằng cách sử dụng kit thử nghiệm VIALIGHT® (Cambrex, Walkersville, MD).

Trong mọi trường hợp đo, tế bào thai nhi sinh sản nhiều hơn tế bào trưởng thành (ví dụ, so sánh cột 4 với cột 7 ở bảng 4). Cột cuối của bảng 4 cho thấy tỷ lệ tế bào thai nhi với tế bào trưởng thành trong các điều kiện sinh trưởng xác định. Trong mọi trường hợp đo tỷ lệ này, tế bào thai nhi có số lượng nhiều hơn sau khi sinh sản.

Ví dụ 7

Ví dụ này mô tả việc phát hiện ADN thai nhi từ tế bào bao gồm việc phân lập tế bào vào các buồng phản ứng riêng biệt, tiếp theo WGA, và phát hiện trực tiếp biến dị di truyền. Tế bào, tùy ý hỗn hợp đã làm giàu chứa tế bào thai nhi và tế bào người mẹ, được cho vào các buồng phản ứng riêng biệt chứa chất đệm và chất phản ứng thích hợp cho việc làm tan tế bào và WGA. Ở dạng đĩa, trước hết tế bào được tái huyền phù ở 100.000 tế bào trong 200µl, và đặt vào lỗ của tấm loại 96 lỗ. Tiếp theo, bằng cách sử dụng các kỹ thuật pipet vi lượng, như kỹ thuật TECAN (Männedorf, Switzerland), LabCyte (Sunnyvale, CA) hoặc kỹ thuật khác, 10nL huyền phù tế bào chứa trung bình 1, 2, 3, 4 hoặc 5 tế bào được chuyển sang đĩa mật độ cao chứa, ví dụ, 1536 hoặc 3456 lỗ. Sử dụng hóa chất WGA chuẩn. Ví dụ, bổ sung 90nL chất phản ứng dùng cho WGA vào mỗi 10nL thể tích tế bào, bịt kín đĩa bằng dầu để ngăn bay hơi, và hóa học WGA được thực hiện. Sau WGA, chất phản ứng PCR chứa đoạn môi và đoạn dò để nhận dạng các hỗn hợp phản ứng chứa ADN thai nhi được bổ sung vào để khuếch đại locut đích từ bảng SNP như được mô tả ở đây. Các hỗn hợp phản ứng dương tính với ADN thai nhi được phát hiện trực tiếp bằng cách sử dụng đoạn dò bẫy trong buồng phản ứng. Sau khi lai đích, các lỗ được rửa để loại bỏ ADN không đích và chất phản ứng không phản ứng. Tiếp theo, các sản phẩm lai đặc hiệu được phát hiện bằng cách sử dụng các

phương pháp hóa học chuẩn, như đèn hiệu phân tử. Tỷ lệ trình tự thai nhi và người mẹ có thể được sử dụng để xác định biến dị di truyền.

Ví dụ 8

Trong ví dụ này, 40ml máu được lấy từ phụ nữ mang thai và kết hợp với chất chống ngưng kết chuẩn (ví dụ, EDTA), tiếp theo chuyển tới vị trí xử lý. 12ml huyết tương được lấy từ máu và chiết ADN vô bào. Phần mẫu của máu toàn phần hoặc PBMC được lấy để định kiểu gen người mẹ.

Việc làm giàu theo gradien được thực hiện để loại bỏ hồng cầu, bao gồm làm tan hồng cầu. Phép phân loại tế bào được hoạt hóa từ tính (Magnetic activated cell sorting: MACS) được sử dụng để làm tan tế bào người mẹ để thu được dưới 500000 tổng số tế bào. Việc phân loại tế bào được sử dụng để làm giàu phân đoạn thai nhi tới tổng số 10000 tế bào. Các tế bào này được chia cho $\lambda = 1$ tế bào/hỗn hợp phản ứng với thể tích thích hợp. Tế bào được làm tan trực tiếp và dung dịch tương thích PCR được tạo ra, có thể bổ sung dung dịch trung hòa. Chất phản ứng WGA được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng để có tổng thể tích là 100nL. WGA được thực hiện đối với tổng cộng từ 10 đến 10000 tổng đương lượng ADN hệ gen (trong đó hỗn hợp phản ứng ban đầu chứa một đương lượng hệ gen). Phản ứng WGA được dập tắt và tất cả các hỗn hợp phản ứng được chia thành ít nhất một phần mẫu có ghi vị trí. PCR được thực hiện đối với tất cả các phần mẫu để phát hiện alen không phải của người mẹ (ví dụ, bằng cách so sánh với kiểu gen thu được bằng cách sử dụng phần mẫu của máu toàn phần hoặc PBMC). Vị trí ban đầu của chất WGA chứa alen không phải của người mẹ được nhận dạng, và thể tích ở các vị trí này được thu hồi. Tiếp theo, các thể tích này được thu gom cho WGA cuối để tạo ra lượng ADN thích hợp cho CGH (ví dụ, khoảng 0,5-1 μ g). Tiếp theo, CGH được thực hiện để phát hiện CNV.

Bảng 2

Số SNP	p^2	$2pq$	q^2	Số SNP người mẹ đồng hợp tử có thể có bằng phép thử tích lũy
2	0,25	0,5	0,25	1
4	0,25	0,5	0,25	2
6	0,25	0,5	0,25	3
8	0,25	0,5	0,25	4
10	0,25	0,5	0,25	5
12	0,25	0,5	0,25	6

14	0,25	0,5	0,25	7
16	0,25	0,5	0,25	8
18	0,25	0,5	0,25	9
20	0,25	0,5	0,25	10

Bảng 3

	p^2	$2pq$	q^2	Xác suất tích lũy của phát hiện ít nhất một alen thai nhi dị hợp tử, nếu SNP người mẹ được chọn là loại p^2
SNP1	0,25	0,5	0,25	50,00%
SNP2	0,25	0,5	0,25	75,00%
SNP3	0,25	0,5	0,25	87,50%
SNP4	0,25	0,5	0,25	93,75%
SNP5	0,25	0,5	0,25	96,88%
SNP6	0,25	0,5	0,25	98,44%
SNP7	0,25	0,5	0,25	99,22%
SNP8	0,25	0,5	0,25	99,61%
SNP9	0,25	0,5	0,25	99,80%
SNP10	0,25	0,5	0,25	99,90%
SNP11	0,25	0,5	0,25	99,95%
SNP12	0,25	0,5	0,25	99,98%
SNP13	0,25	0,5	0,25	99,99%
SNP14	0,25	0,5	0,25	99,99%
SNP15	0,25	0,5	0,25	100,00%
SNP16	0,25	0,5	0,25	100,00%
SNP17	0,25	0,5	0,25	100,00%
SNP18	0,25	0,5	0,25	100,00%
SNP19	0,25	0,5	0,25	100,00%
SNP20	0,25	0,5	0,25	100,00%

Bảng 4

Hỗn hợp	Tổng	Tế bào thai	Mức sinh sản
---------	------	-------------	--------------

xytokin	ATP/lỗ (AU)	nhi/lỗ	(thai nhi)
O	77,2	18850	18,85
OA	272,8	577500	57,75
OB	167,9	410400	41,04
OC	657,9	1410000	141
OD	267,0	652500	65,25
OE	213,5	663300	66,33
OAB	280,2		
OAC	668,3		
AOD	457,9		
OAE	517,1		
OBC	741,4		
OB	335,9	850500	85,05
OBE	341,2		
OCD	706,0		
OCE	638,6		
ODE	480,5		
OABC	691,0		
OABD	389,8		
OABE	281,3		
OACD	689,6		
OACE	609,6		
OADE	508,0		
OBCD	694,0		
OBCE	543,4		
OBDE	299,0		
OCDE	670,0		
OABCD	568,6		
OABCE	602,1		
OABDE	317,4		
OACDE	472,0		
OBCDE	441,0	1449000	144,9

OABCDE	571,3	1577000	157,7
OC		1000000	100
OCD		1200000	120
O		450000	45
OA		75000	7,5
OB		550000	55
OAB		625000	62,5
OE		900000	90
ODE		1250000	125

Bảng 4 (tiếp tục)

Hỗn hợp xytokin	Tổng ATP/lỗ (AU)	Tế bào người trưởng thành/lỗ	Mức sinh sản (người trưởng thành)	ATP biệt hóa thai nhi/người trưởng thành	Lượng biệt hóa thai nhi/người trưởng thành
O	0,8	7500	0,75	93,6	25,1
OA	46,2	91200	9,12	5,9	6,3
OB	8,9	23400	2,34	18,8	17,5
OC	100,7	127500	12,75	6,5	11,1
OD	18,3	37000	3,7	14,6	17,6
OE	70,9	150000	15	3,0	4,4
OAB	57,5			4,9	
OAC	282,6			2,4	
OAD	95,0			4,8	
OAE	186,0			2,8	
OBC	225,8			3,3	
OBD	38,7	12320	12,32	8,7	6,9
OBE	138,6			2,5	
OCD	260,2			2,7	
OCE	338,1			1,9	
ODE	157,6			3,0	
OABC	323,9			2,1	
OABD	92,8			4,2	
OABE	126,5			2,2	

OACD	326,3			2,1	
OACE	347,3			1,8	
OADE	181,6			2,8	
OBCD	268,7			2,6	
OBCE	228,4			2,4	
OBDE	122,2			2,4	
OCDE	283,4			2,4	
OABCD	259,4			2,2	
OABCE	289,0			2,1	
OABDE	137,4			2,3	
OACDE	165,0			2,9	
OBCDE	215,1	292000	29,2	2,1	5,0
OABCDE	259,8	440800	44,08	2,2	3,6
OC		220000	22		4,5
OCD		350000	35		3,4
O		30000	3		15,0
OA		50000	5		1,5
OB		30000	3		18,3
OAB		100000	10		6,3
OE		130000	13		6,9
ODE		160000	16		7,8

O: yếu tố tế bào gốc (50ng/mL); A: IL-3 (5ng/mL); B: IL-6 (5ng/mL); C: EPO (1,5U/mL); D: TPO (100ng/mL); E: Flt-3 (50ng/mL)

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phát hiện yếu tố nhận dạng thai nhi trên cơ sở tế bào, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

chia mẫu máu của người mẹ chứa hỗn hợp của tế bào người mẹ và tế bào thai nhi thành các mẫu nhỏ;

tiến hành khuếch đại toàn bộ hệ gen trên ít nhất một mẫu nhỏ chứa tế bào để thu được sản phẩm khuếch đại, trong đó số bản sao nhiễm sắc thể từ mẫu này được bảo quản trong mẫu nhỏ sau khi khuếch đại toàn bộ hệ gen sao cho sản phẩm khuếch đại thu được là hệ gen hoặc hệ phiên mã của tế bào người mẹ hoặc tế bào thai nhi;

chia sản phẩm đã khuếch đại này thành các phần mẫu;

sàng lọc hoặc định kiểu gen phần mẫu để xác định sự có mặt của yếu tố nhận dạng thai nhi, trong đó bước sàng lọc hoặc định kiểu gen này bao gồm:

tạo ra bảng SNP để xác định sự có mặt của alen không phải của người mẹ trong mẫu hỗn hợp này, trong đó bảng SNP bao gồm ít nhất một bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể đối chứng chứa SNP nằm trên nhiễm sắc thể mà không nhảy với thể bội không chẵn và bảng đặc hiệu nhiễm sắc thể trên nhiễm sắc thể mà nhảy với thể bội không chẵn;

xác định liệu nguyên liệu di truyền của các tế bào người mẹ là đồng hợp tử hay dị hợp tử ở bộ locut đích trong bảng SNP này để định kiểu gen của người mẹ;

chọn lọc locut thử nghiệm từ locut đích này, trong đó việc chọn lọc locut thử nghiệm này bao gồm sàng lọc mẫu chứa axit nucleic của người mẹ và thai nhi để định kiểu gen khác kiểu gen của người mẹ ở locut đích và chọn lọc locut đích làm locut thử nghiệm với kiểu gen không phải của người mẹ trong mẫu chứa axit nucleic của người mẹ và thai nhi hỗn hợp;

sàng lọc hoặc định kiểu gen trong phần mẫu này đối với kiểu gen khác với kiểu gen của người mẹ ở locut thử nghiệm, trong đó sự có mặt của kiểu gen khác kiểu gen của người mẹ này chứng tỏ sự có mặt của alen của người bố mang thông tin trong sản phẩm khuếch đại; và

xác định sự có mặt của ít nhất một yếu tố nhận dạng thai nhi từ tế bào thai nhi trong phần mẫu thu được từ ít nhất một mẫu nhỏ, trong đó việc xác định sự có mặt của ít nhất một yếu tố nhận dạng thai nhi này bao gồm xác định alen của người bố mang thông tin trong ít nhất một phần mẫu hoặc mẫu nhỏ.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước phân tích phần mẫu được xác định là chứa yếu tố nhận dạng thai nhi này để phát hiện biến dị di truyền.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước:

thu gom một phần của phần mẫu được xác định là chứa yếu tố nhận dạng thai nhi, trong đó việc phân tích phần mẫu được xác định là chứa yếu tố nhận dạng thai nhi để phát hiện biến dị di truyền bao gồm phân tích phần thu được từ phần mẫu này.

4. Phương pháp theo điểm 2, trong đó phương pháp này còn bao gồm thu gom phần mẫu được xác định là chứa yếu tố nhận dạng thai nhi từ ít nhất hai mẫu nhỏ và kết hợp các phần mẫu này trước khi phân tích sản phẩm khuếch đại.

5. Phương pháp theo điểm 2, trong đó phân tích này bao gồm xác định tỷ lệ các alen di truyền của người mẹ và người bố trong phần mẫu chứa yếu tố nhận dạng thai nhi, trong đó tỷ lệ này được phân tích để xác định sự có mặt của biến dị di truyền.

6. Phương pháp theo điểm 2, trong đó phân tích này bao gồm xác định số bản sao alen trong phần mẫu chứa yếu tố nhận dạng thai nhi, trong đó số bản sao alen được phân tích để xác định sự có mặt của biến dị di truyền.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 6, trong đó phần mẫu phân tích không phải là phần mẫu được sàng lọc hoặc được định kiểu gen để xác định sự có mặt của yếu tố nhận dạng thai nhi, mà là từ cùng một mẫu nhỏ như phần mẫu được sàng lọc hoặc được định kiểu gen để xác định sự có mặt của yếu tố nhận dạng thai nhi.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó mỗi mẫu nhỏ này chứa không quá một tế bào.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó phương pháp này còn bao gồm kết hợp các phần mẫu từ hai hoặc nhiều mẫu nhỏ trước khi sàng lọc hoặc định kiểu gen.

10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó phương pháp này còn bao gồm làm giàu các tế bào thai nhi trong mẫu này trước khi chia thành các mẫu nhỏ.