



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/48 (2020.05); C12Q 1/6806 (2020.05)

(21)(22) Заявка: 2020108573, 28.02.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.02.2020Дата регистрации:
16.10.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.02.2020

(45) Опубликовано: 16.10.2020 Бюл. № 29

Адрес для переписки:

119234, Москва, ул. Ломоносовский проспект,
27, стр. 1, Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова, Фонд
"Национальное интеллектуальное развитие"

(72) Автор(ы):

Балацкий Александр Владимирович (RU),
Джайн Марк (RU),
Самоходская Лариса Михайловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова" (МГУ)
(RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: Tsui N. B. Y. et al. Detection of
trisomy 21 by quantitative mass spectrometric
analysis of single-nucleotide polymorphisms,
Clinical chemistry, 2005, Т. 51, No. 12. pp. 2358-
2362. US 9719140 В2, 01.08.2017. US 8574842 В2,
12.12.2013. Тимошевский В. А., Лебедев И. Н.
Технологии молекулярного карiotипирования
в практике быстрой пренатальной (см.
прод.)

(54) СПОСОБ НЕИНВАЗИВНОЙ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ТРИСОМИИ И НАБОР ДЛЯ ЕЕ ПРОВЕДЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к клинко-лабораторной диагностике в области пренатальной неинвазивной диагностики, и может быть использовано для выявления трисомии по 21-й хромосоме у плода на раннем сроке беременности (начиная с 8-й акушерской недели гестации). Техническим результатом заявляемого способа является проведение неинвазивной диагностики трисомии по 21-й хромосоме плода, обладающей высокой чувствительностью (возможность количественного анализа при

низких концентрациях ДНК плода, начиная с 6-й недели - не менее 0,7 копий/мкл); отсутствием риска прерывания беременности ввиду отсутствия инвазивного контакта с тканями плода; простотой применения и интерпретации результатов в клинко-диагностических лабораториях ввиду отсутствия необходимости в биоинформатическом анализе; системой самоконтроля как на этапе рестрикции оцДНК, так и на этапе непосредственного сравнения уровней 21-й и референсной хромосом. 2 н. и 3 з.п. ф-лы, 9 ил., 3 табл., 2 пр.

(56) (продолжение):

диагностики клинически значимых анеуплоидий, Медицинская генетика, 2010, Т. 9, номер. 8. стр. 13-23. RU 2583830 С2, 10.05.2016.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/48 (2020.05); C12Q 1/6806 (2020.05)(21)(22) Application: **2020108573, 28.02.2020**(24) Effective date for property rights:
28.02.2020Registration date:
16.10.2020

Priority:

(22) Date of filing: **28.02.2020**(45) Date of publication: **16.10.2020 Bull. № 29**

Mail address:

119234, Moskva, ul. Lomonosovskij prospekt, 27,
str. 1, Moskovskij gosudarstvennyj universitet
imeni M.V. Lomonosova, Fond "Natsionalnoe
intellektualnoe razvitie"

(72) Inventor(s):

**Balatskij Aleksandr Vladimirovich (RU),
Dzhajn Mark (RU),
Samokhodskaya Larisa Mikhajlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Moskovskij gosudarstvennyj
universitet imeni M.V. Lomonosova" (MGU)
(RU)**

(54) **METHOD FOR NON-INVASIVE PRENATAL DIAGNOSTICS OF TRISOMY AND A SET FOR IT**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention refers to biotechnology, particularly to clinical-laboratory diagnostics in the field of prenatal non-invasive diagnostics, and can be used for detection of trisomy on 21st chromosome in the early pregnancy (starting from 8th obstetric week of gestation).

EFFECT: technical result of the proposed method is non-invasive diagnosis of trisomy on 21st chromosome of the fetus, having high sensitivity (possibility of quantitative analysis at low

concentrations of fetal DNA, starting from 6th week – not less than 0.7 copies/mcl); absence of risk of pregnancy termination due to absence of invasive contact with fetal tissues; simple application and interpretation of results in clinical diagnostic laboratories due to the absence of need for bioinformatic analysis; self-monitoring system both at the ssDNA restriction step, and at the stage of direct comparison of levels of 21st and the reference chromosomes.

5 cl, 9 dwg, 3 tbl, 2 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области медицины, в частности к клиническо-лабораторной диагностике в области пренатальной неинвазивной диагностики, и может быть использовано для выявления трисомии по 21-й хромосоме у плода на раннем сроке беременности (начиная с 8-й акушерской недели гестации).

Уровень техники

Синдром Дауна (трисомия по 21-й хромосоме) - это геномная патология, при которой в большинстве случаев кариотип пациента представлен 47 хромосомами, в то время как в норме в ядре клетки присутствует лишь 46 хромосом, увеличение количества хромосом обусловлено появлением лишней (третьей) 21-й хромосомы [Asim A. и др. Down syndrome: an insight of the disease // J. Biomed. Sci. 2015. Т. 22. №1. С. 41]. Также существуют дополнительные формы данного заболевания: транслокация участка 21-й хромосомы на другие хромосомы (чаще на хромосомы 14, 15, 21, 22, Y), мозаичный вариант.

Синдром Дауна является весьма распространенной патологией - в среднем на 700 беременностей приходится 1 трисомия по 21-й хромосоме [Presson A.P. и др. Current estimate of down syndrome population prevalence in the United States // J. Pediatr. 2013. Т. 163. №4. С. 1163-1168]. Однако благодаря развитию пренатальной диагностики рождаемость детей с данной патологией в настоящее время находится на уровне 1:1100, так как при пренатальной постановке диагноза «трисомия по 21-й хромосоме» беременным женщинам предлагается прервать беременность. К факторам, оказывающим влияние на вероятность развития трисомии по 21-й хромосоме, следует относить возраст отца и матери, а также трисомию по 21-й хромосоме при прошлых беременностях. Так, при возрасте матери 20-24 лет вероятность развития трисомии по 21-й хромосоме составляет 1:1562, при возрасте матери 25-29 лет - 1:1000, в то время как при возрасте матери старше 45 лет - 1:19. Также возраст отца старше 42 лет существенно увеличивает риск развития данной патологии.

Циркулирующая в периферической крови матери фетальная ДНК (цфДНК) была обнаружена в 1997 году [Lo Y.M.D. и др. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum // Lancet. 1997. Т. 350. №9076. С. 485-487]. Генетический материал плода попадает в материнские кровеносные сосуды во время физиологического цикла апоптоза в плаценте, необходимого для обновления трофобласта. цфДНК обладает уникальными свойствами, которые отличают ее от циркулирующей материнской ДНК и в некотором смысле затрудняют ее лабораторный анализ: высокая степень фрагментированности и относительно низкое содержание в крови по сравнению с ДНК матери (фракция). Известно, что фрагменты цфДНК по большей части короче, чем фрагменты материнской циркулирующей ДНК [Chan K.C.A. и др. Size Distributions of Maternal and Fetal DNA in Maternal Plasma // Clin. Chem. 2004. Т. 50. №1. С. 88-92]. Также было продемонстрировано, что средняя фракция цфДНК в 1-м триместре беременности составляет всего 9%, а появляться в крови матери цфДНК начинает уже, начиная с 4-й недели беременности [Zhou Y. и др. Effects of Maternal and Fetal Characteristics on Cell-Free Fetal DNA Fraction in Maternal Plasma // Reprod. Sci. 2015. Т. 22. №11. С. 1429-1435]. К особенностям цфДНК также можно отнести отличный от материнского паттерн эпигенетической регуляции, в частности степень метилирования промоторов некоторых генов [Kim S.Y. и др. Quantification of the placental epigenetic signature of the SERPINB5 gene in maternal plasma of pregnancies complicated by small for gestational age // Placenta. 2015. Т. 36. №2. С. 131-137]. Таким образом, цфДНК не только является перспективным диагностическим материалом, не требующим инвазивного исследования ткани зародыша, но и обладает

рядом особенностей, которые могут быть использованы для отделения ее от материнской циркулирующей ДНК.

Из уровня техники известно, что стандартным в Российской Федерации методом исследования на наличие трисомии по 21-й хромосоме у беременной женщины являются скрининги I и II триместров (11-14 и 16-21 недель соответственно). В рамках скрининга I триместра проводится определение количества, ассоциированного с беременностью плазменного протеина А, свободной β -субъединицы хорионического гонадотропина человека, а также ультразвуковое исследование. В то время как в рамках скрининга II триместра проводят определение уровней α -фетопротеина, свободной β -субъединицы хорионического гонадотропина человека, свободного эстриола, а также ультразвуковое исследование. При помощи данного подхода удается диагностировать трисомию по 21-й хромосоме с вероятностью, достигающей лишь 70% с частотой ложноположительных результатов 5% [Mujezinovic F., Alfirovic Z. Procedure-Related Complications of Amniocentesis and Chorionic Villous Sampling // *Obstet. Gynecol.* 2007. Т. 110. №3. С. 687-694]. Поэтому диагноз необходимо верифицировать при помощи одного из инвазивных видов исследования, сопровождающихся забором ткани плода: аспирация ворсин хориона (8-14 недель), амниоцентез (14-18 недель), кордоцентез (с 18-й недели) [Tongsong T. и др. Second-trimester cordocentesis and the risk of small for gestational age and preterm birth // *Obstet. Gynecol.* 2014. Т. 124. №5. С. 919-925]. Несмотря на то, что инвазивные процедуры обладают сравнительно высокой точностью (более 90%), их проведение сопряжено с довольно высоким риском прерывания беременности (2%).

Из уровня техники известен пример подхода к вышеобозначенной инвазивной диагностике, описанный в патенте CN108070639. В соответствии с данным способом биологическим субстратом для диагностики трисомии по 21-й хромосоме является амниотическая жидкость. При помощи цифровой полимеразной цепной реакции (ПЦР) и набора олигонуклеотидных праймеров и зондов, специфичных к 21-й и референсной хромосоме, в ДНК, выделенной из амниотической жидкости, проводится определение уровней вышеназванных хромосом с целью определить их соотношение. Данный способ обладает недостатками, характерными для инвазивных методов, описанными выше: амниотическую жидкость, как правило, получают на 14-18-й неделе беременности, в результате чего диагностика трисомии по 21-й хромосоме происходит сравнительно поздно, и в случае прерывания беременности увеличиваются риски нежелательных последствий для пациента, также выполнение амниоцентеза, необходимого для получения данного биоматериала сопряжено с риском прерывания беременности, равным 2%.

Таким образом, к недостаткам вышеописанного подхода к пренатальной диагностике трисомии по 21-й хромосоме можно отнести поздний срок конечной постановки диагноза, что увеличивает возможные риски в случае решения о прерывании беременности, низкую точность неинвазивного этапа определения, высокий риск прерывания беременности во время проведения инвазивного этапа.

Из уровня техники известны подходы к неинвазивной пренатальной диагностике трисомии по 21-й хромосоме, основанные на методах секвенирования нового поколения. В частности, известен способ неинвазивной пренатальной диагностики анеуплоидий плода, заключающийся в том, что у беременной женщины на раннем сроке (от 8-й недели гестации) проводится забор периферической крови, из которой выделяется общая циркулирующая ДНК (оцДНК), которая затем подвергается анализу при помощи технологий секвенирования нового поколения (RU2627673). Данные подходы обладают высокой точностью, однако для работы на секвенаторах нового поколения и анализа

данных необходимы высококвалифицированные специалисты с биоинформатическим образованием, а также обслуживание таких приборов требует куда больших затрат, чем обслуживание оборудования для различных видов ПЦР, для анализа результатов которой также нет необходимости в специалисте-биоинформатике. Вышеперечисленные факторы делают недоступным данный вид пренатальной неинвазивной диагностики для широких слоев населения ввиду высокой стоимости.

Из уровня техники известны методы неинвазивной пренатальной диагностики, основанные на ПЦР в реальном времени после проведения рестрикции, чувствительной к метилированию, например, способ получения ДНК-праймеров и зондов для малоинвазивной пренатальной ПЦР-диагностики трисомии 21-й хромосомы у плода по крови беременной женщины и диагностический набор для ее осуществления (RU2602366). Данный подход подразумевает после выделения циркулирующей ДНК из крови матери проведение рестрикции, чувствительной к метилированию, а затем ПЦР в реальном времени по дифференциально метилированным сайтам ДНК плода на 21-й и референсной хромосомах. Главным недостатком такого вида исследования является необходимость проведения параллельных количественных ПЦР в реальном времени, в результате чего на соотношение 21-й и референсной хромосом оказывает влияние не только погрешность пипетирования в рамках отдельных пробирок для параллельных ПЦР в реальном времени, но и ограниченная воспроизводимость ПЦР в реальном времени. Необходимо отметить, что при количественной ПЦР в реальном времени происходит определение уровня ДНК относительно стандарта, низкое качество которого способно существенно исказить результат, также точность ПЦР в реальном времени существенно падает при работе с низкими концентрациями ДНК, которые и имеют место быть в случае с цфДНК, и данный вид ПЦР малоустойчив к ингибиторам ПЦР при сравнении с более современными вариациями ПЦР - цифровой ПЦР [Quan P.L., Sauzade M., Brouzes E. DPCR: A technology review // Sensors (Switzerland). 2018. Т. 18. №4]. К еще одному недостатку вышеописанного подхода к неинвазивной пренатальной диагностике трисомии можно отнести отсутствие системы проверки полноты рестрикции, чувствительной к метилированию. В случае ее неполного протекания в растворе ДНК останутся копии генетического материала матери, как 21-й хромосомы, так и референсной, что существенно исказит соотношение этих хромосом при наличии трисомии по 21-й хромосоме плода. Все вышеописанные недостатки такого подхода не позволили ему получить широкое распространение в пренатальной диагностике.

Таким образом, в настоящее время существует необходимость в создании способа неинвазивной пренатальной диагностики трисомии по 21-й хромосоме, лишенного всех вышеперечисленных недостатков.

Раскрытие изобретения

Техническая проблема, решаемая посредством заявляемого изобретения, заключается в устранении недостатков, таких как влияние ограниченной воспроизводимости методов количественного анализа ДНК и погрешности пипетирования на точность определения соотношения 21-й и референсной хромосом, а также фракции цфДНК, низкая точность количественного определения уровня ДНК при малых концентрациях генетического материала плода, наблюдаемых на ранних сроках беременности (6-12 недель), необходимость биоинформатического анализа результатов, отсутствие системы проверки полноты рестрикции, чувствительной к метилированию. Техническая проблема реализуется за счет создания набора реагентов и способа неинвазивной пренатальной диагностики трисомии по 21-й хромосоме при помощи определения соотношения 21-й и референсной хромосомы в сумме циркулирующей в крови матери ДНК с последующим

подтверждением результатов за счет определения фракции цфДНК, обеспечивающих высокий уровень статистической достоверности.

Техническим результатом заявляемого способа является проведение неинвазивной диагностики трисомии по 21-й хромосоме плода, обладающей высокой чувствительностью (возможность количественного анализа при низких концентрациях ДНК плода, начиная с 6-й недели - не менее 0,7 копий/мкл); отсутствием риска прерывания беременности ввиду отсутствия инвазивного контакта с тканями плода; простотой применения и интерпретации результатов в клиничко-диагностических лабораториях ввиду отсутствия необходимости в биоинформатическом анализе; системой самоконтроля как на этапе рестрикции оцДНК, так и на этапе непосредственного сравнения уровней 21-й и референсной хромосом.

Техническая проблема решается способом неинвазивного пренатального определения трисомии по 21-й хромосоме, включающим проведение забора крови беременной женщины, отделение плазмы, выделение из нее циркулирующей внеклеточной ДНК с последующим определением соотношения 21-й хромосомы и референсной и подтверждением результатов при помощи определения фракции цфДНК и ее соответствия увеличению вышеобозначенного соотношения; при повышенном соотношении 21-й хромосомы и референсной, подтвержденном фракцией цфДНК, делают заключение о наличии трисомии по 21-й хромосоме у плода.

Проблема также решается способом определения трисомии по 21-й хромосоме по фетальной ДНК в крови матери, включающим:

- выделение ДНК из плазмы крови беременной женщины с получением двух аликвот;
- проведение цифровой ПЦР аликвоты №1 с количественным определением уровней 21-й и референсной хромосом по генам PRDM15 и EIF2C1 соответственно с расчетом их соотношения;
- при соотношении уровней 21-й и референсной хромосом менее или равном 1 делается вывод об отсутствии трисомии по 21-й хромосоме плода;
- при получении соотношения уровней 21-й и референсной хромосом более 1 делается вывод о возможном наличии трисомии по 21-й хромосоме плода и рассчитывается фракция фетальной ДНК по 21-й хромосоме.

При этом аликвота №2 используются для верификации полученных результатов, для этого:

- аликвоту №2 обрабатывают эндонуклеазой рестрикции, чувствительной к метилированию;
- подтверждают полноту рестрикции при помощи ПЦР в реальном времени по гену АСТВ, содержащему сайт рестрикции и лишенному гиперметилирования,
- при наличии сигнала от гена АСТВ повторяют процедуру рестрикции, чувствительной к метилированию,
- при отсутствии сигнала от гена АСТВ считают рестрикцию, чувствительную к метилированию, прошедшей в полной мере,
- проводят цифровую ПЦР аликвоты №2 с параллельным определением числа копий гиперметилированного у плода гена RASSF1A и гена EIF2C1, лишенного сайта рестрикции и представляющего сумму ДНК матери и плода, в одной реакционной смеси,
- определяют фракцию фетальной ДНК по соотношению чисел копий гена RASSF1A и гена EIF2C1.
- если расхождение между значениями фракции фетальной ДНК, вычисленными по результатам измерений аликвот №1 и №2 не превышает 10% от большего значения, результаты измерений считаются достоверными.

Проблема решается также созданием набора реагентов, предназначенного для реализации заявляемого способа, включающего праймеры и зонды, специфичные к генам PRDM15, EIF2C1, ACTB, RASSF1A.

Краткое описание чертежей

5 На фиг. 1 представлены результаты ПЦР в реальном времени по гену ACTB для подтверждения полноты рестрикции (пример 1).

На фиг. 2 представлены результаты цифровой ПЦР чипа №1.1 по генам PRDM15 (хромосома 21) и EIF2C1 (хромосома 1) (пример 1).

10 На фиг. 3 представлены результаты цифровой ПЦР чипа №2.1 по гиперметилированному у плода гену RASSF1A (хромосома 3) и гену EIF2C1, лишенному сайта рестрикции и отражающему сумму ДНК матери и плода (хромосома 1) (пример 1).

На фиг. 4 представлены результаты ПЦР в реальном времени по гену ACTB для подтверждения полноты рестрикции (пример 2).

15 На фиг. 5 представлены результаты цифровой ПЦР чипа №1.1 по генам PRDM15 (хромосома 21) и EIF2C1 (хромосома 1) (пример 2).

На фиг. 6 представлены результаты цифровой ПЦР чипа №2.1 по гиперметилированному у плода гену RASSF1A (хромосома 3) и гену EIF2C1, лишенному сайта рестрикции и отражающему сумму ДНК матери и плода (хромосома 1) (пример 2).

На фиг. 7 представлены результаты ПЦР в реальном времени по гену ACTB для подтверждения полноты рестрикции (пример 3).

На фиг. 8 представлены результаты цифровой ПЦР чипа №1.1 по генам PRDM15 (хромосома 21) и EIF2C1 (хромосома 1) (пример 3).

25 На фиг. 9 представлены результаты цифровой ПЦР чипа №2.1 по гиперметилированному у плода гену RASSF1A (хромосома 3) и гену EIF2C1, лишенному сайта рестрикции и отражающему сумму ДНК матери и плода (хромосома 1) (пример 3).

Осуществление изобретения

30 Проведенный анализ биоматериала от 23 женщин на ранних сроках беременности (12-16 недель) с высоким риском развития трисомии по 21-й хромосоме у плода по результатам скрининга I триместра с использованием заявляемого способа показал, что у 11 пациенток имеет место быть трисомия по 21-й хромосоме.

35 Пациенткам, участвовавшим в исследовании, была проведена процедура инвазивной пренатальной диагностики трисомии по 21-й хромосоме при помощи аспирации ворсин хориона и последующего кариотипирования. У 11 пациенток был подтвержден диагноз, что на 100% совпало с результатами определения по заявляемому способу.

40 Таким образом, была подтверждена пригодность заявляемого способа для пренатальной неинвазивной диагностики трисомии по 21-й хромосоме по фетальной ДНК, циркулирующей в крови матери.

Заявляемый способ неинвазивного пренатального определения трисомии по 21-й хромосоме включает:

- получение образца периферической крови беременной женщины;
- выделения плазмы крови из образца путем центрифугирования образца крови;
- 45 - выделение ДНК из плазмы крови с получением раствора с выделенной ДНК;
- отбор двух аликвот из полученного раствора;
- обработка аликвоты №2 эндонуклеазой рестрикции, чувствительной к метилированию;

- проверка полноты рестрикции путем проведения ПЦР в реальном времени по гену АСТВ;

- при наличии сигнала от гена АСТВ повторяют процедуру рестрикции, чувствительной к метилированию,

5 - при отсутствии сигнала от гена АСТВ считают рестрикцию, чувствительную к метилированию, прошедшей в полной мере,

- проведение цифровой ПЦР:

1) аликвоты №1 из исходного раствора с выделенной ДНК по гену 21-й хромосомы PRDM15 и референсной - EIF2C1;

10 2) аликвоты №2, обработанной эндонуклеазой рестрикции, по гиперметилированному у плода гену RASSF1A и гену EIF2C1, лишенному сайта рестрикции и представляющему сумму ДНК матери и плода;

15 - подсчет фракции фетальной ДНК по результатам цифровой ПЦР аликвоты №2 путем деления концентрации ДНК по гиперметилированному у плода гену RASSF1A на концентрацию ДНК по гену EIF2C1, лишенному сайта рестрикции и представляющему сумму ДНК матери и плода, по формуле:

$$F_R = C_R / C_E,$$

где F_R - фракция фетальной ДНК, определенная по гиперметилированному у плода 20 гену RASSF1A; C_R - концентрация ДНК по гену RASSF1A в аликвоте №2; C_E - концентрация ДНК по гену EIF2C1 в аликвоте №2;

- анализ данных цифровой ПЦР аликвоты №1:

1) в случае, если при анализе соотношение уровней 21-й (ген PRDM15) и референсной 25 хромосом (ген EIF2C1) менее или равно 1, то делается вывод об отсутствии трисомии по 21-й хромосоме плода;

2) в случае, если соотношение уровней 21-й (ген PRDM15) и референсной (ген EIF2C1) хромосом более 1, то делается вывод о возможном наличии трисомии по 21-й хромосоме плода и рассчитывается фракция фетальной ДНК по 21-й хромосоме, для этого необходимо воспользоваться формулой:

30 $F_P = (C_P - C_{E1}) * 2 / C_{E1},$

где F_P - фракция фетальной ДНК, определенная по гену PRDM15; C_P - концентрация ДНК по гену 21-й хромосомы PRDM15 в аликвоте №1; C_{E1} - концентрация ДНК по гену EIF2C1 в аликвоте №1;

35 - при схождении значений F_P и F_R (разница между результатами не превышает 10% от большего значения; 10% является инструментальной погрешностью при проведении цифровой ПЦР на чипах) считают, что плод имеет трисомию по 21-й хромосоме.

40 Процесс центрифугирования проводят в условиях достаточных для осаждения форменных элементов крови и получения плазмы. Предпочтительно проводить центрифугирование в течение 10 минут при 3000 g со средней скоростью разгона и низкой скоростью торможения; не рекомендуется отбирать нижний слой плазмы (10% от общего объема плазмы у дна пробирки).

45 Выделение ДНК из плазмы крови осуществляют с использованием набора реагентов, обеспечивающих полное выделение генетического материала из образца и предназначенным для выделения внеклеточной ДНК из плазмы.

Предпочтительно для проведения рестрикции использовать эндонуклеазу BstFN I, продолжительность рестрикции необходимо рассчитать, исходя из предполагаемой концентрации ДНК в растворе и активности фермента, указанной производителем.

Проведение цифровой ПЦР рекомендуется производить в соответствии с рекомендациями производителя оборудования для проведения цифровой ПЦР и с использованием реагентов, подходящих для данного оборудования, используемого для проведения цифровой ПЦР, например, из набора QuantStudio™ 3D Digital PCR 20K Chip Kit v2 (Thermo Fisher Scientific, США) с применением специфичных гидролизуемых зондов.

Ниже приведены последовательности праймеров и зондов:

RASSF1A_F: 5'-AGCCTGAGCTCATTGAGCT-3' (SEQ ID NO: 1)

RASSF1A_R: 5'-ACCAGCTGCCGTGTG-3' (SEQ ID NO: 2)

RASSF1A_pr: 5'-6-FAM-CCAACGCGCTGCGCA-BHQ-1-3' (SEQ ID NO: 3)

EIF2C1_F: 5'-GTTCGGCTTTCACCAGTCT-3' (SEQ ID NO: 4)

EIF2C1_F: 5'-CTCCATAGCTCTCCCCACTC-3' (SEQ ID NO: 5)

EIF2C1_pr: 5'-HEX-CGCCCTGCCATGTGGAAGAT-BHQ-1-3' (SEQ ID NO: 6)

PRDM15_F: 5'-GCACACTCCAGAATGACC-3' (SEQ ID NO: 7)

PRDM15_R: 5'-GGAGGCTGGATTGAGTTG-3' (SEQ ID NO: 8)

PRDM15_pr: 5'-6-FAM-TGGGCAGTGGAGACGCATTGGCA-BHQ-1-3' (SEQ ID NO: 9)

ACTB_F: 5'-GCGCCGTTCCGAAAGT-3' (SEQ ID NO: 10)

ACTB_R: 5'-CGGCGGATCGGCAA-3' (SEQ ID NO: 11)

ACTB_pr: 5'-HEX-ACCGCCGAGACCGCGT-BHQ-1-3' (SEQ ID NO: 12)

Тест-система, предназначенная для неинвазивного пренатального определения трисомии по 21-й хромосоме, включает праймеры и зонды, специфичные к генам PRDM15, EIF2C1, RASSF1A на хромосомах 21, 1 и 3 соответственно. Указанные праймеры и зонды могут быть добавлены в реакционную смесь для проведения цифровой ПЦР.

Ниже представлено более детальное описание заявляемого способа, которое не ограничивает объем притязаний заявляемого изобретения, а демонстрирует возможность осуществления изобретения с достижением заявляемого технического результата.

1) Забор 10 мл крови у пациента в пробирку, содержащую ЭДТА для предотвращения коагуляции, соотношение кровь:ЭДТА 9:1.

2) Пробирку с кровью необходимо хранить при температуре 4°C не более чем 4 часа до осуществления дальнейших операций для предотвращения потерь генетического материала вследствие действия нуклеаз плазмы.

3) Пробирку с кровью необходимо центрифугировать в течение 10 минут при 3000g со средней скоростью разгона и низкой скоростью торможения.

4) По завершении центрифугирования отобрать 5 мл плазмы в отдельную пробирку, при этом нужно избегать забора из нижнего слоя плазмы.

5) Выделение внеклеточной ДНК из плазмы при помощи набора QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen®, Германия) в соответствии с инструкцией.

В пробирку на 50 мл вносили пипеткой 500 мкл QIAGEN® Протеиназы К, затем в эту же пробирку вносили 5 мл плазмы из исследуемого образца. Отдельно готовили carrier РНК в ACL буфере. Для этого в отдельную пробирку вносили 4,4 мл буфера ACL и 5,6 мкл carrier РНК, предварительно растворенную в AVE буфере в соответствии с указаниями на упаковке и перемешивали на вортексе в течение 30 с. В исходную

пробирку на 50 мл, содержащую исследуемую плазму и QIAGEN® Протеиназу К, вносили 4 мл carrier РНК в ACL буфере. Пробирку с полученной смесью закрывали крышкой и перемешивали вортексированием 30 с. Затем пробирку инкубировали 30 мин при температуре 60°C на термостате (Eppendorf™ ThermoStat Plus, США) для

лизирования всех белковых компонентов плазмы. После инкубирования добавляли 9 мл буфера ACB к лизату, закрывали пробирку крышкой и перемешивали содержимое вортексированием в течение 30 с. Далее пробирку инкубировали 5 мин на льду. Далее к вакуумному насосу присоединяли колонку QIAmp Mini column, к которой затем
5 присоединяли расширитель на 20 мл. После инкубирования на льду содержимое пробирки аккуратно переливали в расширитель колонки. Затем включали вакуумный насос. Когда жидкость полностью проходила через колонку, вакуумный насос отключали и доводили давление до 0 мбар. После этого удаляли расширитель колонки. Крышку колонки оставляли открытой. Далее в колонку пипеткой добавляли 600 мкл
10 буфера ACW1, включали вакуумный насос. Когда жидкость полностью проходила через колонку, вакуумный насос отключали и доводили давление до 0 мбар. Затем в колонку вносили пипеткой 750 мкл буфера ACW2, включали вакуумный насос. Когда жидкость полностью проходила через колонку, вакуумный насос отключали и доводили давление до 0 мбар. После этого в пробирку вносили пипеткой 750 мкл этанола (96-
15 100%) и включали вакуумный насос. Когда жидкость полностью проходила через колонку, вакуумный насос отключали и доводили давление до 0 мбар. Далее колонку закрывали крышкой, отсоединяли от вакуумного насоса, помещали в пустую пробирку на 2 мл и центрифугировали при скорости 14.000 об./мин в течение 3 мин. Колонку помещали в новую пустую пробирку на 2 мл (прошлую пробирку выбрасывали),
20 открывали крышку и инкубировали при температуре 56°C в течение 10 мин на термостате (Eppendorf™ ThermoStat Plus, США), чтобы высушить мембрану колонки. Далее колонку помещали в чистую пробирку на 1,5 мл (прошлую пробирку выбрасывали) и аккуратно пипеткой вносили 60 мкл буфера AVE в центр мембраны колонки, затем инкубировали при комнатной температуре 3 мин. Затем колонку в
25 пробирке центрифугировали при скорости 14.000 об./мин в течение 1 мин, чтобы элюировать нуклеиновые кислоты. В случае, если к проведению дальнейшего анализа приступают не сразу, то выделенную ДНК хранят при температуре -80°C.

б) Из раствора с выделенной ДНК отбирали 2 аликвоты.

Аликвота №1 - 15,7 мкл; аликвота №2 - 15,2 мкл. В свободное от манипуляций время
30 все аликвоты хранили при температуре 4°C.

7) В аликвоте №2 проводили рестрикцию в соответствии со следующей методикой.

К аликвоте №1 добавляли 1 мкл эндонуклеазы BstFN I (СибЭнзим, Россия) и 1,8 мкл буфера (Buffer Y 10X concentrate, СибЭнзим, Россия). Смесь перемешивали вортексированием 30 с, а затем центрифугировали при скорости 6000 об./мин в течение
35 10 с. Пробирку помещали в амплификатор (Eppendorf™ Mastercycler gradient), на котором устанавливали программу: 60°C 40 мин (для проведения рестрикции) - 80°C 20 мин (для инактивации фермента).

8) Для проверки полноты рестрикции проводили ПЦР в реальном времени по гену АСТВ.

40 Подготавливали 3 пробирки с оптически прозрачными крышками объемом 0,1 мл. В каждую из них вносили по 12,5 мкл TaqMan Maxima Probe qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, США), 0,75 мкл зондов на АСТВ при их концентрации 10 мкмоль/л, по 1 мкл праймеров на АСТВ при их концентрации 10 мкмоль/л, 8,75 мкл дистиллированной стерильной воды. В 1-ю из 3 пробирок вносили 1 мкл раствора из аликвоты №2,
45 подвергшейся рестрикции. Во 2-ю пробирку вносили 1 мкл дистиллированной стерильной воды (отрицательный контроль). В 3-ю пробирку вносили 1 мкл раствора любой геномной ДНК, не подвергавшейся рестрикции. Пробирки с растворами центрифугировали при скорости 6000 об./мин в течение 1 мин. Затем их вносили в

амплификатор для ПЦР в реальном времени Applied Biosystems® 7500 FAST Real-Time PCR System, на котором выставляли программу: денатурация (95°C, 10 мин) - 1 цикл, денатурация (95°C, 15 с), отжиг (60°C, 1 мин) и элонгация (70°C, 1 мин) - 60 циклов, конечная элонгация (70°C, 5 мин) - 1 цикл. По прошествии амплификации убеждались, что в пробирке с исследуемым образцом не обнаружено следов гена АСТВ, то есть считали, что рестрикция прошла успешно. При обнаружении следов гена АСТВ повторяли процедуру рестрикции, после чего вновь повторяли процедуру ПЦР в реальном времени.

9) Готовили смеси для цифровой ПЦР.

Для этого брали 2 пробирки на 1,5 мл. В каждую пробирку вносили по 17,4 мкл QuantStudio™ 3D Digital PCR Master Mix v2. В пробирку №1 вносили по 1,74 мкл заранее подготовленной смеси, содержащей праймеры и зонды на гены PRDM15 и EIF2C1 (концентрации праймеров 18 мкмоль/л, зондов - 5 мкмоль/л). В пробирку №2 вносили 1,74 мкл заранее подготовленной смеси, содержащей праймеры и зонды на гены RASSF1A и EIF2C1 (концентрации праймеров 18 мкмоль/л, зондов - 5 мкмоль/л). Последовательности праймеров и зондов указаны выше. Затем в пробирку №1 вносили 15,7 мкл ДНК из аликвоты №1, содержащей интактную сумму циркулирующей ДНК матери и плода; в пробирку №2 - 15,7 мкл ДНК из аликвоты №2, подвергшейся рестрикции. Пробирки с растворами центрифугировали при скорости 6000 об./мин в течение 10 с.

10) Подготавливали 4 чипа для цифровой ПЦР (QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip v2).

При помощи QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader на чипы №1.1 и №1.2 вносили раствор из пробирки №1; на чипы №2.1 и №2.2 - раствор из пробирки №2. Для этого вносили по 14,5 мкл смеси на каждый чип из соответствующей пробирки в съемный пластиковый дозатор QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader механической пипеткой, избегая образования пузырьков воздуха, а затем запускали дозирование нажатием на центральную кнопку QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader. Сразу же после дозирования матрицу чипа покрывали иммерсионной жидкостью из шприца, чтобы предотвратить испарение. Затем опускали и удерживали 15 с механическую ручку QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader с заранее вставленной крышкой от чипа (QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Lid v2). После этого в отверстие на крышке чипа аккуратно вводили иммерсионную жидкость из шприца, пока все содержимое шприца не заполнялось иммерсионной жидкостью и не оставалось лишь пузырька воздуха размером с отверстие на крышке чипа. Далее с неприклеившейся части крышки снимали защитную пленку и надавливали на 15 с, пока чип не будет плотно закрыт. Затем чип откладывали в сторону, накрывали его поверхность металлической пластиной из комплекта поставки. Только после этого переходили к дозированию и подготовке следующего чипа.

11) Проводили амплификацию 4 подготовленных чипов.

Для этого чипы переносили в амплификатор (ProFlex™ 2x Flat PCR System), установленный под углом 11° и накрывали мягкими накладками из комплекта поставки для лучшего соприкосновения с нагревательными элементами. В программе амплификатора устанавливали следующие параметры: денатурация (96°C, 10 мин) - 1 цикл, денатурация (98°C, 30 с), отжиг (63°C, 1 мин) и элонгация (70°C, 1 мин) - 60 циклов, удерживание при 10°C не дольше 24 ч. Затем запускали процесс амплификации.

12) Считывали результаты цифровой ПЦР на QuantStudio™ 3D Digital PCR Instrument. Для этого чипы после амплификации последовательно устанавливали в считывающее

гнездо QuantStudio™ 3D Digital PCR Instrument. Результаты цифровой ПЦР считывали и обрабатывали в автоматическом режиме программным обеспечением системы.

13) Проводили анализ результатов цифровой ПЦР чипов №2.1, №2.2.

На облачном сервисе (QuantStudio™ 3D AnalysisSuite) в личном кабинете оператора записывали концентрации ДНК, копий/мкл (предварительно отмечали в системе, что зонды на RASSF1A дают сигнал в канале FAM, а на EIF2C1 - в канале VIC). Чипам №2.1 и №2.2 в системе давали одинаковое название для более точного определения концентрации ДНК в образце. Для определения фракции фетальной ДНК по гену RASSF1A полученные концентрации подставляли в выражение:

$$F_R = C_R / C_E,$$

где F_R - фракция фетальной ДНК, определенная по гиперметилированному у плода гену RASSF1A; C_R - концентрация ДНК по гену RASSF1A в аликвоте №2; C_E - концентрация ДНК по гену EIF2C1 в аликвоте №2.

14) Проводили анализ результатов цифровой ПЦР чипов №1.1 и №1.2.

На облачном сервисе (QuantStudio™ 3D AnalysisSuite) в личном кабинете оператора записывали концентрации ДНК, копий/мкл (предварительно отмечали в системе, что зонды на ген PRDM15 дают сигнал в канале FAM, а на EIF2C1 - в канале VIC). Чипам №1.1 и 1.2 в системе давали одинаковое название для более точного определения концентрации ДНК в образце.

15) В случае, если при анализе соотношение концентрации PRDM15 и EIF2C1 меньше или равно 1, то считали, что у плода нет трисомии по 21-й хромосоме;

16) В случае, если при анализе соотношение концентрации PRDM15 и EIF2C1 больше 1, то считали, что у плода возможна трисомия по 21-й хромосоме и полученные концентрации подставляли в выражение:

$$F_P = (C_P - C_{E1}) * 2 / C_{E1},$$

где F_P - фракция фетальной ДНК, определенная по гену PRDM15; C_P - концентрация ДНК по гену 21-й хромосомы PRDM15 в аликвоте №1; C_{E1} - концентрация ДНК по гену EIF2C1 в аликвоте №1;

При схождении значений F_P и F_R (разница между результатами не превышает 10% от большего значения; 10% является инструментальной погрешностью при проведении цифровой ПЦР на чипах) считали, что плод имеет трисомию по 21-й хромосоме.

Пример 1.

Пациентка Ф., 41 год. Срок беременности составляет 13 недель. У пациентки был проведен забор 10 мл периферической крови в пробирку с ЭДТА. Были проведены выделение внеклеточной ДНК крови, отбор аликвот и рестрикция с последующим подтверждением ее полноты в соответствии с методикой, описанной в настоящем документе. На фиг. 1 представлены результаты ПЦР в реальном времени для подтверждения полноты рестрикции.

После подтверждения полноты рестрикции был проведен анализ методом цифровой ПЦР в соответствии с методикой, описанной в настоящем документе. На фиг. 2 и 3 графически представлены результаты цифровой ПЦР чипов №1.1 и №2.1 соответственно.

По информации, представленной на фиг. 2, можно сделать вывод, что в исследуемом образце соотношение 21-й и референсной хромосом больше 1, что соответствует генотипу при трисомии плода по 21-й хромосоме. Таким образом, для подтверждения результатов необходимо применить формулу $F_P = (C_P - C_{E2}) * 2 / C_{E2}$.

По информации, представленной на фиг. 3, можно сделать вывод о наличии фетальной

ДНК в образце. Для определения фракции фетальной ДНК необходимо применить формулу $F_R = C_R / C_E$ и сравнить полученные фракции.

Концентрации ДНК, полученные в ходе анализа методом цифровой ПЦР аликвот №1 и №2, а также результаты определения фракции фетальной ДНК как по гену RASSF1A, так и по гену PRDM15 (21-я хромосома) представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты измерения концентраций ДНК и определения фракции фетальной ДНК. Пациентка Ф.

Чипы №1.1 и №1.2	Чипы №2.1 и №2.2	Фракция фетальной ДНК, определенная по гену PRDM15	Фракция фетальной ДНК, определенная по гену RASSF1A
$C_P = 18,32$ копий/мкл	$C_R = 1,34$ копий/мкл	$F_P = (18,34 - 17,59) * 2 / 17,59$ $= 0,085$	$F_R = 1,34 / 16,55 = 0,081$
$C_{E1} = 17,59$ копий/мкл	$C_E = 16,55$ копий/мкл		

По данным, представленным в таблице 1, вынесли заключение о наличии трисомии по 21-й хромосоме у плода, так как наблюдается схождение значений F_P и F_R .

Основываясь на результатах скрининга I триместра беременности, пациентка Ф. была направлена на инвазивную диагностику трисомии по 21-й хромосоме при помощи аспирации ворсин хориона с последующим кариотипированием. По результатам инвазивной диагностики у пациентки Ф. была выявлена трисомия по 21-й хромосоме плода, что соответствует результатам неинвазивного определения трисомии по 21-й хромосоме с использованием заявляемых набора реагентов и технологии.

Пример 2.

Пациентка Л., 39 лет. Срок беременности составляет 13 недель. У пациентки был проведен забор 10 мл периферической крови в пробирку с ЭДТА. Были проведены выделение внеклеточной ДНК крови, отбор аликвот и рестрикция с последующим подтверждением ее полноты в соответствии с методикой, описанной в настоящем документе. На фиг. 4 представлены результаты ПЦР в реальном времени для подтверждения полноты рестрикции.

После подтверждения полноты рестрикции был проведен анализ методом цифровой ПЦР в соответствии с методикой, описанной в настоящем документе. На фиг. 5 и 6 графически представлены результаты цифровой ПЦР чипов №1.1 и №2.1 соответственно.

По информации, представленной на фиг. 5, можно сделать вывод, что в исследуемом образце соотношение 21-й и референсной хромосом менее 1, что не соответствует генотипу при трисомии плода по 21-й хромосоме.

По информации, представленной на фиг. 6, можно сделать вывод о наличии фетальной ДНК в образце. Для определения фракции фетальной ДНК необходимо применить формулу $F_R = C_R / C_E$.

Концентрации ДНК, полученные в ходе анализа методом цифровой ПЦР аликвот №1 и №2, а также результаты определения фракции фетальной ДНК по гену RASSF1A представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты измерения концентраций ДНК и определения фракции фетальной ДНК. Пациентка Л.

Чипы №1.1 и №1.2	Чипы №2.1 и №2.2	Фракция фетальной ДНК, определенная по гену PRDM15	Фракция фетальной ДНК, определенная по гену RASSF1A
$C_P=16,07$ копий/мкл	$C_R=1,57$ копий/мкл	-	$F_R=1,57 / 15,93 = 0,099$
$C_{E1}=16,48$ копий/мкл	$C_E=15,93$ копий/мкл		

По данным, представленным в таблице 2, вынесли заключение об отсутствии трисомии по 21-й хромосоме у плода, так как значение соотношения уровней 21-й и референсной хромосом меньше 1.

Основываясь на результатах скрининга I триместра беременности, пациентка Ф. была направлена на инвазивную диагностику трисомии по 21-й хромосоме при помощи аспирации ворсин хориона с последующим кариотипированием. По результатам инвазивной диагностики у пациентки Ф. не была выявлена трисомия по 21-й хромосоме плода, что соответствует результатам неинвазивного определения трисомии по 21-й хромосоме с использованием заявляемых набора реагентов и технологии.

Пример 3.

Пациентка В., 36 лет. Срок беременности составляет 14 недель. У пациентки был проведен забор 10 мл периферической крови в пробирку с ЭДТА. Были проведены выделение внеклеточной ДНК крови, отбор алиquot и рестрикция с последующим подтверждением ее полноты в соответствии с методикой, описанной в настоящем документе. На фиг. 7 представлены результаты ПЦР в реальном времени для подтверждения полноты рестрикции.

После подтверждения полноты рестрикции был проведен анализ методом цифровой ПЦР в соответствии с методикой, описанной в настоящем документе. На фиг. 8 и 9 графически представлены результаты цифровой ПЦР чипов №1.1 и №2.1 соответственно.

По информации, представленной на фиг. 8, можно сделать вывод, что в исследуемом образце соотношение 21-й и референсной хромосом более 1, что соответствует генотипу при трисомии плода по 21-й хромосоме.

По информации, представленной на фиг. 9, можно сделать вывод о наличии фетальной ДНК в образце. Для определения фракции фетальной ДНК необходимо применить формулу $F_R=C_R/C_E$.

Концентрации ДНК, полученные в ходе анализа методом цифровой ПЦР алиquot №1 и №2, а также результаты определения фракции фетальной ДНК по гену RASSF1A представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты измерения концентраций ДНК и определения фракции фетальной ДНК. Пациентка В.

Чипы №1.1 и №1.2	Чипы №2.1 и №2.2	Фракция фетальной ДНК, определенная по гену PRDM15	Фракция фетальной ДНК, определенная по гену RASSF1A
$C_P=29,44$ копий/мкл $C_{E1}=27,56$ копий/мкл	$C_R=4,86$ копий/мкл $C_E=36,09$ копий/мкл	$F_P = (29,44-27,56)*2 / 27,56$ = 0,136	$F_R=4,86 / 36,09 = 0,135$

По данным, представленным в таблице 3, вынесли заключение о наличии трисомии по 21-й хромосоме у плода, так как наблюдается схождение значений F_P и F_R .

Однако по результатам скрининга I триместра беременности у пациентки В. не было обнаружено признаков наличия трисомии по 21-й хромосоме, и она не была направлена на инвазивную диагностику. Наблюдалось расхождение в результатах между определением трисомии по 21-й хромосоме методикой, представленной в настоящем документе, и скринингом I триместра беременности.

С согласия пациентки В. был установлен контроль за исходом беременности. У новорожденного были признаки развития трисомии по 21-й хромосоме, на основании чего лечащим врачом было принято решение о проведении постнатального кариотипирования ребенку. По результатам кариотипирования новорожденному был поставлен диагноз синдром Дауна (трисомия по 21-й хромосоме), что соответствует пренатально определенному с помощью методики, заявляемой в настоящем документе, генотипу плода.

Таким образом, заявляемый способ неинвазивной пренатальной диагностики позволяет с высокой точностью определять наличие трисомии по 21-й хромосоме по фетальной ДНК на ранних сроках беременности. Преимущество заявляемого способа состоит в том, что определения фракций фетальной ДНК происходят в одной реакционной смеси, благодаря чему соотношение не подвержено влиянию погрешности пипетирования и ограниченной воспроизводимости количественного определения уровня ДНК, а также представлена система для подтверждения полноты рестрикции. В клинической практике это позволит сделать неинвазивное пренатальное определение трисомии по 21-й хромосоме более точным и надежным.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профес

<120> СПОСОБ НЕИНВАЗИВНОЙ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ТРИСОМИИ И НАБОР ДЛЯ ЕЕ ПРОВЕДЕНИЯ

<160> SEQ ID NO:1

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<223> Human ras association domain-containing protein 1, RASSF1A_F

<400> 1

1 AGCCTGAGCTCATTTGAGCT

<160> SEQ ID NO:2

<210> 2
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence
5 <223> Human ras association domain-containing protein 1, RASSF1A_R
<400> 2
1 ACCAGCTGCCGTGTG
<160> SEQ ID NO:3
<210> 3
10 <211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<223> Human ras association domain-containing protein 1, RASSF1A_pr
<400> 3
15 1 6-FAM-CCAACGCGCTGCGCA-BHQ-1
<160> SEQ ID NO:4
<210> 4
<211> 19
<212> DNA
20 <213> Artificial sequence
<223> Human protein argonaute-1, EIF2C1_F
<400> 4
1 GTTCGGCTTTCACCAGTCT
<160> SEQ ID NO:5
25 <210>5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<223> Human protein argonaute-1, EIF2C1_R
30 <400>5
1 CTCCATAGCTCTCCCCACTC
<160> SEQ ID NO:6
<210> 6
<211> 20
35 <212> DNA
<213> Artificial sequence
<223> Human protein argonaute-1, EIF2C1_pr
<400> 6
1 HEX-CGCCCTGCCATGTGGAAGAT-BHQ-1
40 <160> SEQ ID NO:7
<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial sequence
45 <223> Human PR/SET domain 15 protein, PRDM15_F
<400> 7
1 GCACACTCCAGAATGACC
<160> SEQ ID NO:8

<210> 8
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 5 <223> Human PR/SET domain 15 protein, PRDM15_R
 <400> 8
 1 GGAGGCTGGATTGAGTTG
 <160> SEQ ID NO:9
 <210> 9
 10 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <223> Human PR/SET domain 15 protein, PRDM15_pr
 <400>9
 15 1 6-FAM-TGGGCAGTGGAGACGCATTGGCA-BHQ-1
 <160>SEQIDNO:10
 <210> 10
 <211> 16
 <212> DNA
 20 <213> Artificial sequence
 <223> Human beta-actin protein, ACTB_F
 <400> 10
 1 GCGCCGTTCCGAAAGT
 <160> SEQ ID NO:11
 25 <210> 11
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <223> Human beta-actin protein, ACTB_R
 30 <400> 11
 1 CGGCGGATCGGCAA
 <160> SEQ ID NO:12
 <210> 12
 <211> 16
 35 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <223> Human beta-actin protein, ACTB_pr
 <400>12
 1 HEX-ACCGCCGAGACCGCGT-BHQ-1

40

(57) Формула изобретения

1. Способ неинвазивной пренатальной диагностики трисомии по 21-й хромосоме
 плода по фетальной ДНК, характеризующийся тем, что проводят забор плазмы крови
 беременной женщины, выделяют из нее циркулирующую внеклеточную ДНК, с
 45 последующим определением соотношения уровней 21-й хромосомы и референсной с
 подтверждением результата по фракции фетальной ДНК, определенной при помощи
 чувствительной к метилированию рестрикции, и тем, что при подтвержденном
 повышенном соотношении 21-й хромосомы и референсной делают вывод о наличии

трисомии по 21-й хромосоме у плода.

2. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что для определения трисомии по 21-й хромосоме плода по фетальной ДНК в крови беременной женщины:

- выделяют ДНК из плазмы крови беременной женщины с получением двух аликвот;

5 - проводят цифровую ПЦР аликвоты №1 с количественным определением уровней 21-й и референсной хромосом по генам PRDM15 и EIF2C1 соответственно и расчетом их соотношения;

- при получении соотношения 21-й и референсной хромосом, равного или менее 1, делается вывод об отсутствии трисомии по 21-й хромосоме плода;

10 - при получении соотношения 21-й и референсной хромосом более 1 делается вывод о наличии трисомии по 21-й хромосоме плода;

- вычисляется фракция фетальной ДНК по уровню избыточной 21-й хромосомы;

- аликвота №2 используется для верификации полученных результатов.

3. Способ по п. 2, характеризующийся тем, что для верификации результатов:

15 - аликвота №2 обрабатывается эндонуклеазой рестрикции, чувствительной к метилированию;

- полноту рестрикции проверяют при помощи ПЦР в реальном времени по гену АСТВ, лишенному метилирования у плода и у матери;

20 - проводят цифровую ПЦР аликвоты №2 после рестрикции с определением числа копий гиперметилированного у плода гена RASSF1A и лишенного сайта рестрикции гена EIF2C1, представляющего сумму ДНК матери и плода;

- определяют фракцию фетальной ДНК по соотношению чисел копий гена RASSF1A и EIF2C1, полученных в результате измерений в аликвоте №2;

25 - если расхождение между значениями фракции фетальной ДНК, вычисленными по результатам измерений аликвот №1 и №2, не превышает 10% от большего значения, результаты измерений по п. 2 считаются достоверными.

4. Набор реагентов, предназначенный для реализации способа по п. 1, включающий, по крайней мере, олигонуклеотидные праймеры - прямые и обратные, и зонды, специфичные к генам PRDM15, EIF2C1, RASSF1A и АСТВ, представленные в
30 лиофилизированном виде или водном растворе.

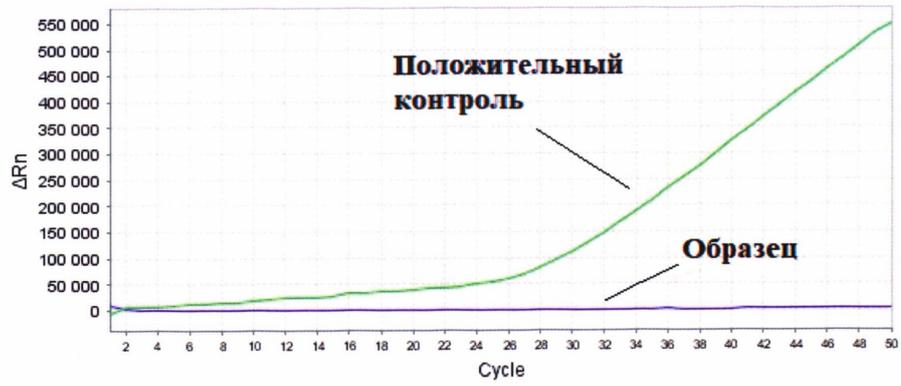
5. Набор по п. 4, характеризующийся тем, что используют олигонуклеотидные праймеры и зонды с последовательностями SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 12.

35

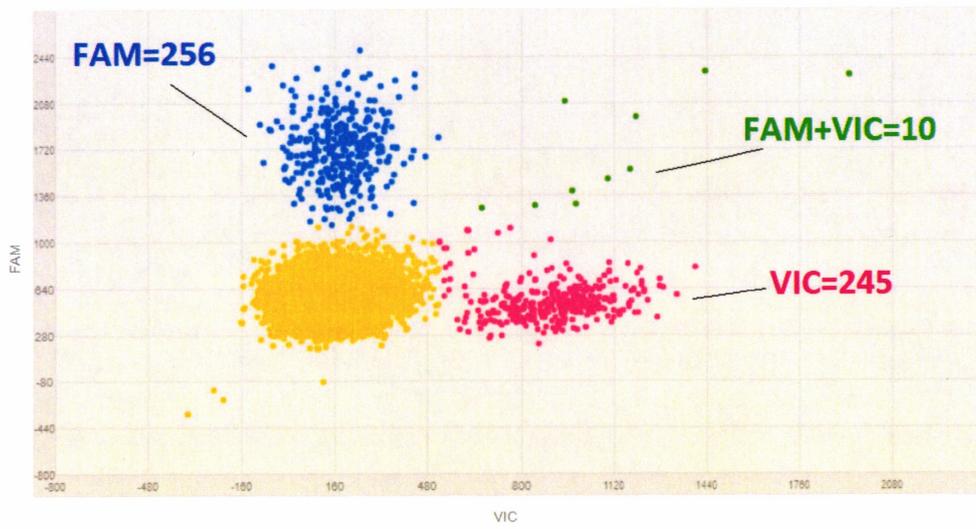
40

45

1

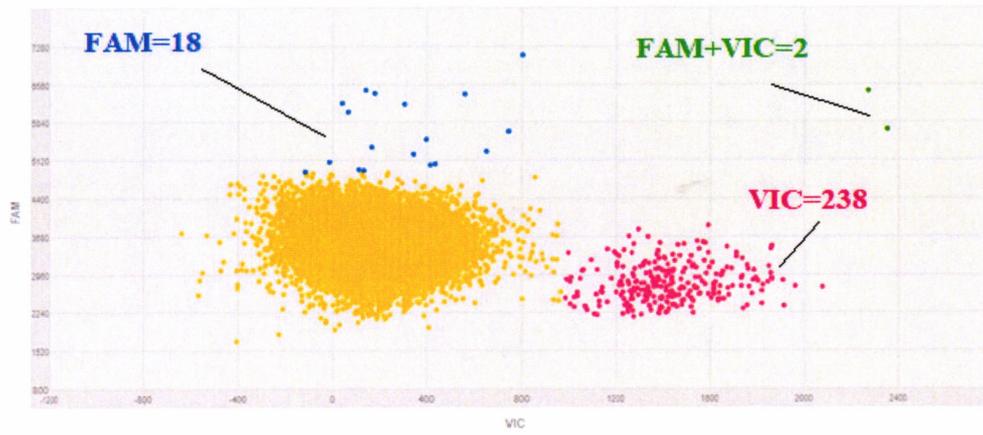


Фиг. 1

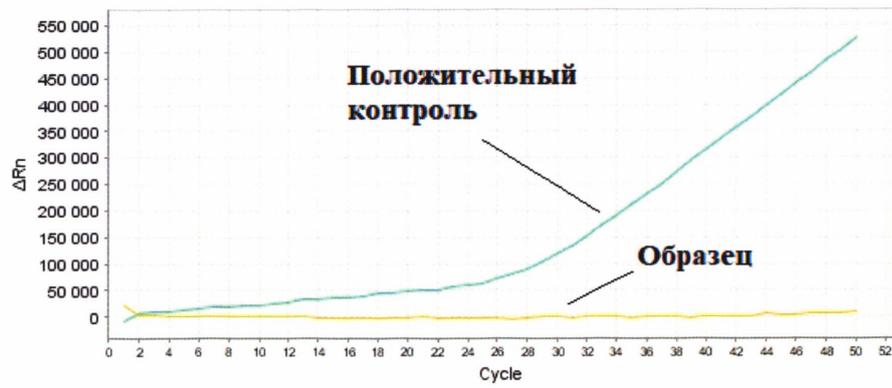


Фиг. 2

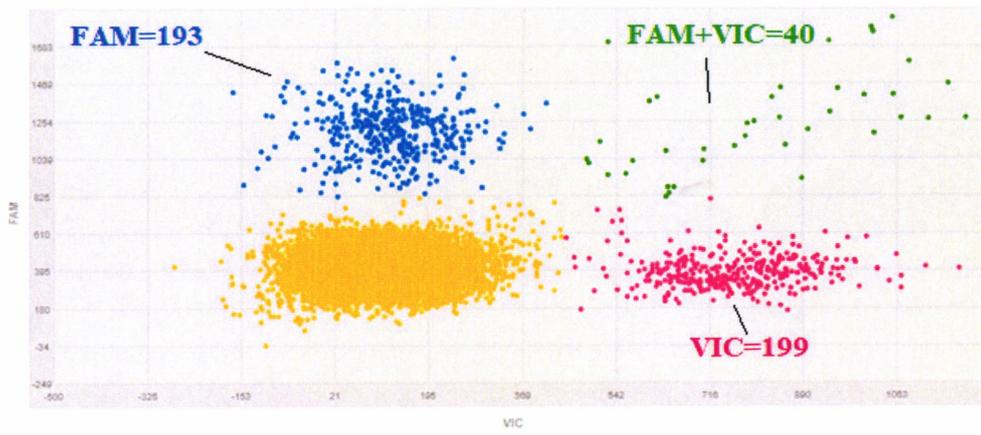
2



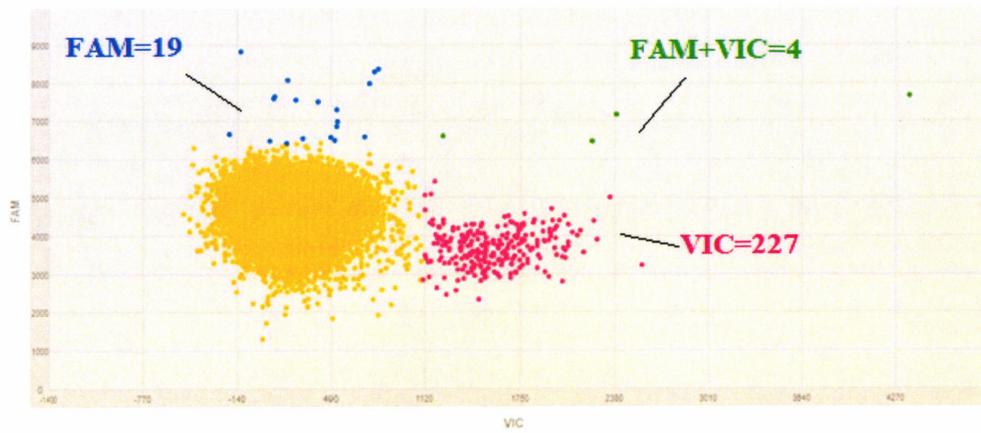
Фиг. 3



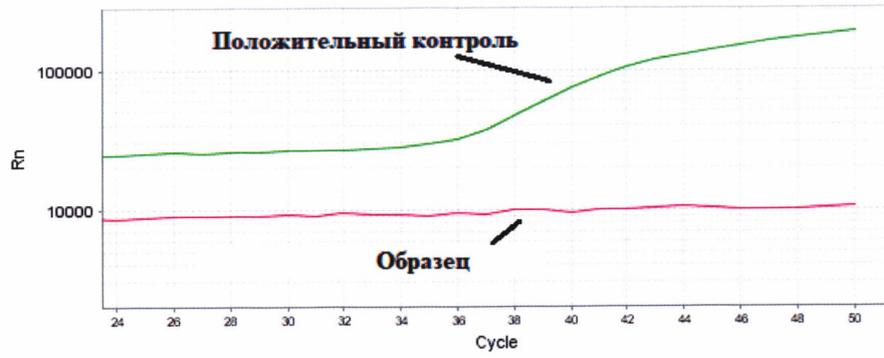
Фиг. 4



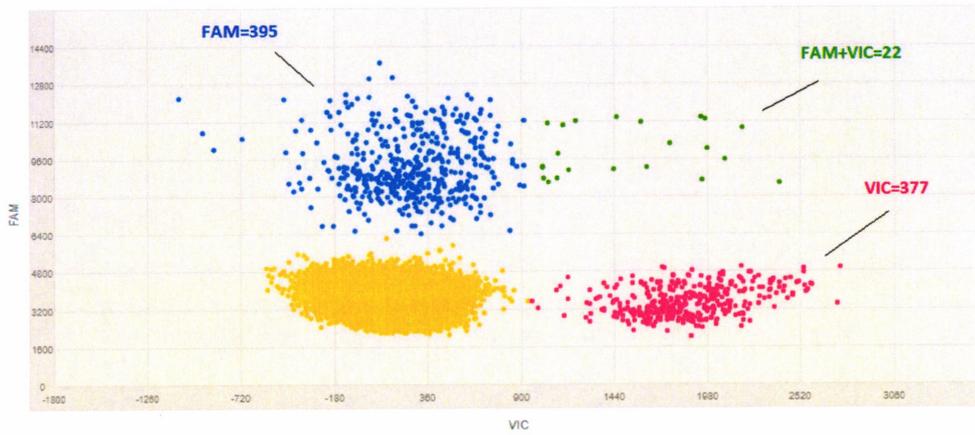
Фиг. 5



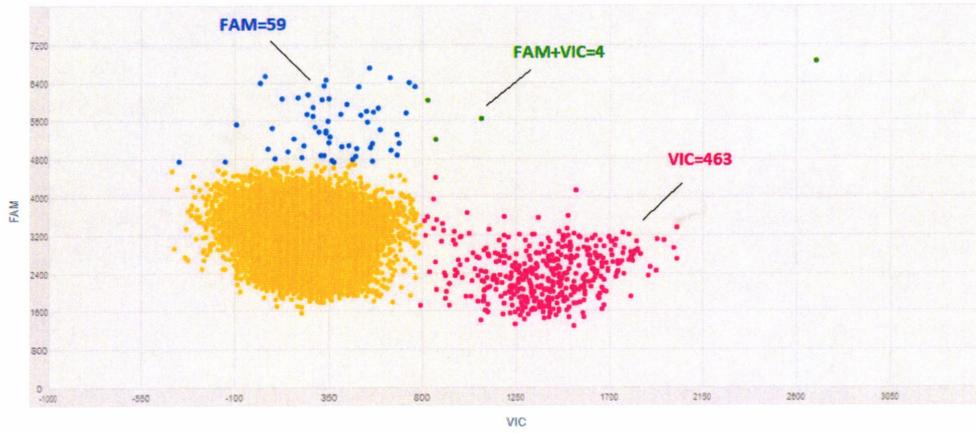
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9