

鉴定双胞胎类型的方法和系统

优先权信息

无

5

技术领域

本发明涉及生物学医学领域。具体的，本发明涉及鉴定双胞胎类型的方法和系统。更具体的，本发明涉及鉴定双胞胎是否为异卵双胞胎的方法和系统。

背景技术

10

通常情况下，正常女性一次只排出一个卵子，正常受精后发育成为一个胚胎，但有

时候单一受精卵会因为一些不明原因分离成两个并独立发育成为两个胚胎，即双胞胎。

这种由单个受精卵发育而来的双胞胎携带有同样的遗传背景，其性别、相貌等完全相同，

若其中一个胎儿患有某种遗传疾病，另一个胎儿也必然是同样的情况。一般情况下，单

15

卵双胞胎根据分离的时间不同，其胎盘可以是单绒毛膜单羊膜类、单绒毛膜双羊膜类及

双绒毛膜双羊膜类。在某些情况下，女性会一次排出不只一个卵子，若同时排出的两个

卵子都能正常受精并发育成胚胎，即为异卵双胞胎。异卵双胞胎的胎儿会按照孟德尔遗传规

律随机遗传父母的基因组，携带的基因类型并不完全相同，因此可能具有不同性别及相

20

貌，对于遗传疾病的携带情况也可能不同。全世界双胞胎儿平均出生率为 1:89，对于

已经出生的双胞胎，可以凭性别和相貌对是否同卵进行初步判定，但结果并不完全可靠，

仍需借助血型等其他遗传因素进行判定。但由于异卵双胞胎同样可能是双绒毛膜双羊膜类

或单绒毛膜双羊膜类，因此，单凭 B 超结果显示双绒毛膜双羊膜不能确定是否为异卵

双胞胎。即使是可以凭羊水穿刺的结果分别对两个胎儿进行产前诊断，但这种取样方式

25

会造成一定概率的流产，且对两个胎儿分别进行羊水穿刺难度较大，容易失败。

目前，在产前确定异卵双胞胎的方法仍有待改进。

发明内容

本发明旨在至少解决现有技术中存在的问题之一。

为此，本发明提出了一种用于鉴定双胞胎是否为异卵双胞胎的手段。

30

在本发明的第一方面，本发明提出了一种鉴定双胞胎是否为异卵双胞胎的方法。根据

本发明的实施例，该方法包括：对双胞胎胎儿的至少一个多态性位点进行分型，以便获得

胎儿多态性型别；将所述胎儿多态性型别与父母的相应多态性位点型别进行比较；以及基于比较结果，确定所述双胞胎是否为异卵双胞胎。利用该方法，能够有效地确定双胞胎是否为异卵双胞胎。以 STR 为例，对照孕妇本身 STR 型别找出血浆中可判定为父源遗传的 STR 型别，若在某位点，父源 STR 为杂合且与母源性位点均不相同，且在血浆中父源两种型别均可被检测到，则可以鉴定为异卵双胞胎。

根据本发明的实施例，上述鉴定双胞胎是否为异卵双胞胎的方法还可以具有下列附加技术特征：

在本发明的一个实施例中，对双胞胎胎儿的至少一个多态性位点进行分型，以便获得胎儿多态性型别进一步包括：从孕妇样品提取胎儿核酸样本；针对所述胎儿核酸样本，构建测序文库；对所述测序文库进行测序，以便得到测序结果；以及基于所述测序结果，确定所述胎儿多态性型别。由此，可以有效地通过从孕妇进行取样，从而获得胎儿多态性型别，进而进一步有效地确定双胞胎胎儿是否为异卵双胞胎。

在本发明的一个实施例中，所述孕妇样品为选自孕妇外周血、孕妇尿液和乳汁的至少一种，优选所述孕妇样品为孕妇外周血。由此，可以无创地从孕妇进行取样，从而获得胎儿多态性型别，进而进一步有效地确定双胞胎胎儿是否为异卵双胞胎，并且不会对胎儿的发育造成不良影响。

在本发明的一个实施例中，在构建测序文库之前，对所述胎儿核酸样本进行扩增，以便得到含有所述多态性位点的扩增产物，并将所得到的扩增产物用于构建测序文库，优选所述扩增产物的长度为 150bp 以下。由此，可以进一步提高确定双胞胎胎儿是否为异卵双胞胎的效率。

在本发明的一个实施例中，所述多态性为选自 STR、VNTR、RFLP、STS、SSCP、CAPS、SNP 的至少一种。在本发明的一个实施例中，所述多态性位点为选自 vWA、TPOX、D3S1358、D16S539、D5S818、CSF1PO、D11S2368、D2S1338、D8S1179、D13S317、D21S1437、D16S3391、Penta E、D12S1064、D12S391、D6S1043、D19S433 至少之一的 STR 多态性位点。由此，可以进一步提高确定双胞胎胎儿是否为异卵双胞胎的效率。

在本发明的一个实施例中，通过 PCR，对所述胎儿核酸样本进行扩增，其中，针对 vWA，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 1 和 2 所示的寡核苷酸作为引物；针对 TPOX，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 3 和 4 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D3S1358，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 5 和 6 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D16S539，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 7 和 8 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D5S818，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 9 和 10 所示的寡核苷酸作为引物；针对 CSF1PO，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 11 和 12 所示的寡核苷酸作为引物；

针对 D11S2368, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 13 和 14 所示的寡核苷酸作为引物; 针对 D2S1338, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 15 和 16 所示的寡核苷酸作为引物; 针对 D8S1179, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 17 和 18 所示的寡核苷酸作为引物; 针对 D13S317, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 19 和 20 所示的寡核苷酸作为引物; 针对 D21S1437, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 21 和 22 所示的寡核苷酸作为引物; 针对 D16S3391, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 23 和 24 所示的寡核苷酸作为引物; 针对 Penta E, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 25 和 26 所示的寡核苷酸作为引物; 针对 D12S1064, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 27 和 28 所示的寡核苷酸作为引物; 针对 D12S391, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 29 和 30 所示的寡核苷酸作为引物; 针对 D6S1043, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 31 和 32 所示的寡核苷酸作为引物; 针对 D19S433, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 33 和 34 所示的寡核苷酸作为引物。由此, 可以进一步提高确定双胞胎胎儿是否为异卵双胞胎的效率。

在本发明的又一个方面, 本发明提出了一种鉴定双胞胎是否为异卵双胞胎的系统。根据本发明的实施例, 该系统包括: 分型装置, 所述分型装置用于对双胞胎胎儿的至少一个多态性位点进行分型, 以便获得胎儿多态性型别; 分析装置, 所述分析装置与所述分型装置相连, 并且适于将所述胎儿多态性型别与父母的相应多态性位点型别进行比较, 以及基于比较结果, 确定所述双胞胎是否为异卵双胞胎。利用该系统, 能够有效地实施前面所述鉴定双胞胎是否为异卵双胞胎的方法。由此, 可以能够有效地确定双胞胎是否为异卵双胞胎。以 STR 为例, 对照孕妇本身 STR 型别找出血浆中可判定为父源遗传的 STR 型别, 若在某位点, 父源 STR 为杂合且与母源性位点均不相同, 且在血浆中父源的两种型别均可被检测到, 则可以鉴定为异卵双胞胎。

根据本发明的实施例, 上述鉴定双胞胎是否为异卵双胞胎的系统还可以具有下列附加技术特征:

在本发明的一个实施例中, 所述分型装置进一步包括: 核酸提取单元, 所述核酸提取单元适于从孕妇样品提取胎儿核酸样本; 文库构建单元, 所述文库构建单元与所述核酸提取单元相连, 并且适于针对所述胎儿核酸样本, 构建测序文库; 测序单元, 所述测序单元与所述文库构建单元相连, 并且适于对所述测序文库进行测序, 以便得到测序结果; 以及型别确定单元, 所述型别确定单元与所述测序单元相连, 并且适于基于所述测序结果, 确定所述胎儿多态性型别。由此, 可以进一步提高确定双胞胎胎儿是否为异卵双胞胎的效率。

在本发明的一个实施例中, 所述分型装置进一步包括: 扩增单元, 所述扩增单元分别与核酸提取单元和文库构建单元相连, 并且适于对所述胎儿核酸样本进行扩增, 以便得到含有所述多态性位点的扩增产物, 并将所得到的扩增产物用于构建测序文库。由此, 可以

进一步提高确定双胞胎胎儿是否为异卵双胞胎的效率。

在本发明的一个实施例中，所述多态性为选自 STR、VNTR、RFLP、STS、SSCP、CAPS、SNP 的至少一种。由此，可以进一步提高确定双胞胎胎儿是否为异卵双胞胎的效率。

在本发明的一个实施例中，所述多态性位点为选自 vWA、TPOX、D3S1358、D16S539、
5 D5S818、CSF1PO、D11S2368、D2S1338、D8S1179、D13S317、D21S1437、D16S3391、
Penta E、D12S1064、D12S391、D6S1043、D19S433 至少之一的 STR 多态性位点。

在本发明的一个实施例中，所述扩增单元中设置有引物，以便通过 PCR，对所述胎儿
核酸样本进行扩增，其中，针对 vWA，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 1 和 2 所示的寡核苷酸
作为引物；针对 TPOX，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 3 和 4 所示的寡核苷酸作为引物；针
10 对 D3S1358，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 5 和 6 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D16S539，
所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 7 和 8 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D5S818，所述 PCR 采
用 SEQ ID NO: 9 和 10 所示的寡核苷酸作为引物；针对 CSF1PO，所述 PCR 采用 SEQ ID NO:
11 和 12 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D11S2368，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 13 和 14
所示的寡核苷酸作为引物；针对 D2S1338，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 15 和 16 所示的寡
15 核苷酸作为引物；针对 D8S1179，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 17 和 18 所示的寡核苷酸作
为引物；针对 D13S317，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 19 和 20 所示的寡核苷酸作为引物；
针对 D21S1437，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 21 和 22 所示的寡核苷酸作为引物；针对
D16S3391，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 23 和 24 所示的寡核苷酸作为引物；针对 Penta E，
所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 25 和 26 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D12S1064，所述 PCR
20 采用 SEQ ID NO: 27 和 28 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D12S391，所述 PCR 采用 SEQ ID
NO: 29 和 30 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D6S1043，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 31
和 32 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D19S433，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 33 和 34 所示
的寡核苷酸作为引物。由此，可以进一步提高确定双胞胎胎儿是否为异卵双胞胎的效率。

25

本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得
明显，或通过本发明的实践了解到。

附图说明

30 本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明
显和容易理解，其中：

图 1 是根据本发明一个实施例的鉴定双胞胎是否为异卵双胞胎的方法的流程示意图；

图 2 是根据本发明又一个实施例的鉴定双胞胎是否为异卵双胞胎的方法的流程示意图；

5 图 3 是根据本发明一个实施例的鉴定双胞胎是否为异卵双胞胎的系统的结构示意图；

图 4 是根据本发明又一个实施例的鉴定双胞胎是否为异卵双胞胎的系统的结构示意图；

图 5 是根据本发明一个实施例的分型结果凝胶电泳图；以及

10 图 6 是根据本发明一个实施例的分型结果凝胶电泳图。

发明详细描述

下面详细描述本发明的实施例，所述实施例的示例在附图中示出，其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的，仅用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

需要说明的是，术语“第一”、“第二”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此，限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。进一步地，在本发明的描述中，除非另有说明，“多个”的含义是两个或两个以上。

20 鉴定双胞胎是否为异卵双胞胎的方法

本发明提出了一种鉴定双胞胎是否为异卵双胞胎的方法。参考图 1，该方法包括下列步骤：

对双胞胎胎儿的至少一个多态性位点进行分型，以便获得胎儿多态性型别(S100 分型步骤)。

25 根据本发明的实施例，获得胎儿多态性型别的方法，并不受特别限制。根据本发明的一些实施例，可以通过从孕妇分离孕妇样品，并进一步从孕妇样品中提取胎儿核酸样本，从而可以通过对胎儿核酸样本进行测序以便确定胎儿的多态性型别。这里需要说明的是“胎儿核酸样本”应做广义理解，其是包含所关心胎儿多态性位点的任何核酸样本，既可以是胎儿的全基因组核酸样本，也可以是包含胎儿核酸片段的核酸样本，既可以完全由胎儿遗传物质构成，也可以是包含胎儿遗传物质和孕妇遗传物质的混合物。

由此，参考图 2，根据本发明的一些实施例，获得胎儿多态性型别的步骤可以进一步包

括:

从孕妇样品提取胎儿核酸样本 (S101)。由此,可以有效地通过从孕妇进行取样,从而获得胎儿多态性型别,进而进一步有效地确定双胞胎胎儿是否为异卵双胞胎。根据本发明的实施例,可以用于提取胎儿核酸样本的孕妇样品的类型并不受特别限制。根据本发明的一些实施例,可以采用的孕妇样品为选自孕妇外周血、孕妇尿液和乳汁的至少一种,优选所述孕妇样品为孕妇外周血。由此,可以无创地从孕妇进行取样,从而获得胎儿多态性型别,进而进一步有效地确定双胞胎胎儿是否为异卵双胞胎,并且不会对胎儿的发育造成不良影响。根据本发明的实施例,从孕妇样本提取核酸样本的方法和设备,也不受特别限制,可以采用商品化的核酸提取试剂盒进行。

10 在得到胎儿核酸样本之后,可以针对所得到的胎儿核酸样本,构建测序文库 (S102)。关于针对核酸样本,构建测序文库的方法和流程,本领域技术人员可以根据不同的测序技术进行适当选择,关于流程的细节,可以参见测序仪器的厂商例如 Illumina 公司所提供的规程,例如参见 Illumina 公司 Multiplexing Sample Preparation Guide (Part#1005361; Feb 2010) 或 Paired-End SamplePrep Guide (Part#1005063; Feb 2010),通过参照将其并入本文。在本发明的一个实施例中,在构建测序文库之前,对所述胎儿核酸样本进行扩增,以便得到含有所述多态性位点的扩增产物,并将所得到的扩增产物用于构建测序文库,优选所述扩增产物的长度为 150bp 以下。由此,可以进一步提高确定双胞胎胎儿是否为异卵双胞胎的效率。

在本发明的一个实施例中,所述多态性为选自 STR、VNTR、RFLP、STS、SSCP、CAPS、20 SNP 的至少一种。在本发明的一个实施例中,所述多态性位点为选自 vWA、TPOX、D3S1358、D16S539、D5S818、CSF1PO、D11S2368、D2S1338、D8S1179、D13S317、D21S1437、D16S3391、Penta E、D12S1064、D12S391、D6S1043、D19S433 至少之一的 STR 多态性位点。由此,可以进一步提高确定双胞胎胎儿是否为异卵双胞胎的效率。

在本发明的一个实施例中,通过 PCR,对所述胎儿核酸样本进行扩增,其中,针对 vWA,25 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 1 和 2 所示的寡核苷酸作为引物;针对 TPOX,所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 3 和 4 所示的寡核苷酸作为引物;针对 D3S1358,所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 5 和 6 所示的寡核苷酸作为引物;针对 D16S539,所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 7 和 8 所示的寡核苷酸作为引物;针对 D5S818,所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 9 和 10 所示的寡核苷酸作为引物;针对 CSF1PO,所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 11 和 12 所示的寡核苷酸作为引物;30 针对 D11S2368,所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 13 和 14 所示的寡核苷酸作为引物;针对 D2S1338,所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 15 和 16 所示的寡核苷酸作为引物;针对 D8S1179,

所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 17 和 18 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D13S317，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 19 和 20 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D21S1437，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 21 和 22 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D16S3391，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 23 和 24 所示的寡核苷酸作为引物；针对 Penta E，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 25 和 26 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D12S1064，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 27 和 28 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D12S391，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 29 和 30 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D6S1043，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 31 和 32 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D19S433，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 33 和 34 所示的寡核苷酸作为引物。由此，可以进一步提高确定双胞胎胎儿是否为异卵双胞胎的效率。所采用的引物如下表所示：

10 表 1

引物名称*	引物序列	SEQ ID NO:
vWA-F	AATAATCAGTATGTGACTTGGATTGA	1
vWA-R	ATAGGATGGATGGATAGATGGA	2
TPOX-F	CTTAGGGAACCCCTCACTGAATG	3
TPOX-R	GTCCTTGTCAGCGTTTATTTGC	4
D3S1358-F	CAGAGCAAGACCCTGTCTCAT	5
D3S1358-R	TCAACAGAGGCTTGCATGTAT	6
D16S539-F	ATACAGACAGACAGACAGGTG	7
D16S539-R	GCATGTATCTATCATCCATCTCT	8
D5S818-F	GGGTGATTTTCCTCTTTGGT	9
D5S818-R	AACATTTGTATCTTTATCTGTATCCTTATTTAT	10
CSF1PO-F	ACAGTAACTGCCTTCATAGATAG	11
CSF1PO-R	GTGTCAGACCCTGTTCTAAGTA	12
D11S2368-F	ACAATGAGGTGCAAGAATGT	13
D11S2368-R	GTTAGATGGGTGGATGGATA	14
D2S1338-F	TGGAAACAGAAATGGCTTGG	15
D2S1338-R	GATTGCAGGAGGGAAGGAAG	16
D8S1179-F	TTTGTATTTTCATGTGTACATTCGTATC	17
D8S1179-R	ACCTATCCTGTAGATTATTTTCACTGTG	18
D13S317-F	TCTGACCCATCTAACGCCTA	19

D13S317-R	CAGACAGAAAGATAGATAGATGATTGA	20
D21S1437-F	ATGTACATGTGTCTGGGAAGG	21
D21S1437-R	TACTGCCAACACTTGTCC	22
D16S3391-F	TCGCTCGCTCTATCTATCTATC	23
D16S3391-R	ACAGAACCAATAAGATGAG	24
Penta E-F	AGACTCAGTCTCAAAGAAA	25
Penta E-R	ATTGAGAAAACCTCCTTAC	26
D12S1064-F	ACTACTCCAAGGTTCCAGCC	27
D12S1064-R	TGTGGTAGATAGATGATA	28
D12S391-F	GGATGCATAGGTAGATAGATAGA	29
D12S391-R	TAATAAATCCCCTCTCATCT	30
D6S1043-F	CAAGGATGGGTGGATCAATA	31
D6S1043-R	TTGTATGAGCCACTTCCCAT	32
D19S433-F	GCCTGGGCAACAGAATAAGA	33
D19S433-R	ATCTTCTCTCTTTCTTCCT	34

*引物名称采用的是位点名称+引物类型的标注方式,以 D19S433-F 和 D6S1043-R 为例, D19S433-F 表示的是 D19S433 的正向引物, D6S1043-R 表示的是 D6S1043 的反向引物。

在构建测序文库之后,可以对所构建的测序文库进行测序,以便得到测序结果 (S103)。在获得测序文库之后,将测序文库应用于测序仪器,对测序文库进行测序,并获得相应的

5 测序结果,该测序结果是由多个测序数据构成的。根据本发明的实施例,可以用于进行测序的方法和设备并不受特别限制,包括但不限于双脱氧链终止法;优选高通量的测序方法,由此,能够利用这些测序装置的高通量、深度测序的特点,进一步提高了确定有核红细胞染色体非整倍性的效率。从而,提高后续对测序数据进行分析,尤其是统计检验分析时的精确性和准确度。高通量的测序方法包括但不限于第二代测序技术或者是单分子测序技术。

10 第二代测序平台 (Metzker ML. Sequencing technologies-the next generation. Nat Rev Genet. 2010 Jan;11(1):31-46) 包括但不限于 Illumina-Solexa (GATM, HiSeq2000TM 等)、ABI-Solid 和 Roche-454 (焦磷酸测序) 测序平台;单分子测序平台 (技术) 包括但不限于 Helicos 公司的真实单分子测序技术 (True Single Molecule DNA sequencing), Pacific Biosciences 公司单分子实时测序 (single molecule real-time (SMRTTM)), 以及 Oxford Nanopore Technologies 公

15 司的纳米孔测序技术等 (Rusk, Nicole (2009-04-01). Cheap Third-Generation Sequencing.

Nature Methods 6 (4): 244-245)。随着测序技术的不断进化,本领域技术人员能够理解的是还可以采用其他的测序方法和装置进行全基因组测序。根据本发明的具体示例,可以利用选自 Illumina-Solexa、ABI-SOLiD、Roche-454 和单分子测序装置的至少一种对所述全基因组测序文库进行测序。

5 在得到测序结果之后,基于所得到的测序结果,确定所述胎儿多态性型别(S104)。可以通过常规信息分析方法,对测序结果进行分析,以便确定胎儿多态性位点的型别。例如,可以采用比对软件,将测序结果与参照序列进行比对,从而确定在多态性位点,胎儿的多态性型别。例如,可以采用 SOAP 软件进行比对。根据本发明的实施例,可以采用的参照序列为人类基因组序列。根据本发明的实施例,所用位点数目可根据需要进行选择;分型
10 方式灵活,既可根据序列长度进行分型,也可根据碱基序列进行分型。根据本发明的实施例,直接根据遗传信息对胎儿是否同卵进行推断,判定结果准确可靠。根据本发明的实施例,分型的方式还可以用 PCR、序列捕获后根据片段长度进行电泳检测。对于结果的判定不仅决定于具体分型结果,还可决定于各种型别在总体型别中所占的比例。

在确定胎儿多态性位点的型别后,可以将所得到的胎儿多态性型别与父母的相应多态
15 性位点型别进行比较(S200,比较步骤)。例如可以平行地或者预先对父母的全基因组样本进行测序,从而确定父母的多态性位点型别进行分析。在基于比较结果,确定所述双胞胎是否为异卵双胞胎(S300,确定步骤)。在获得胎儿多态性位点型别之后,如果在某位点,父源型别为杂合且与母源性位点均不相同,且在孕妇样本,例如血浆中父源的两种植别均可被检测到,则说明为异卵双胞胎。例如,以 STR 为例,对父母基因组 DNA 和孕妇血浆
20 DNA 分别进行多态性位点分型,对照孕妇本身 STR 型别找出血浆中可判定为父源遗传的 STR 型别,若在某位点,父源 STR 为杂合且与母源性位点均不相同,且在血浆中父源的两种植别均可被检测到,则说明为异卵双胞胎。

鉴定双胞胎是否为异卵双胞胎的系统

25 在本发明的又一个方面,本发明提出了一种鉴定双胞胎是否为异卵双胞胎的系统 1000。参考图 3,根据本发明的实施例,该系统包括:分型装置 100 和分析装置 200。根据本发明的实施例,分型装置用于对双胞胎胎儿的至少一个多态性位点进行分型,以便获得胎儿多态性型别。根据本发明的实施例,分析装置与分型装置相连,并且适于将所述胎儿多态性型别与父母的相应多态性位点型别进行比较,以及基于比较结果,确定所述双胞胎是否为
30 异卵双胞胎。在本文中所 的术语“相连”应作广义理解,既可以是直接相连,也可以是间接相连,只要能够实现上述功能上的衔接即可。利用该系统,能够有效地实施前面所述鉴

定双胞胎是否为异卵双胞胎的方法。由此，可以能够有效地确定双胞胎是否为异卵双胞胎。以 STR 为例，对照孕妇本身 STR 型别找出血浆中可判定为父源遗传的 STR 型别，若在某位点，父源 STR 为杂合且与母源性位点均不相同，且在血浆中父源的两种型别均可被检测到，则可以鉴定为异卵双胞胎。

- 5 参考图 4，在本发明的一个实施例中，分型装置 100 可以进一步包括：核酸提取单元 101、文库构建单元 102、测序单元 103 和型别确定单元 104。根据本发明的实施例，核酸提取单元 101 适于从孕妇样品提取胎儿核酸样本。文库构建单元 102 与核酸提取单元 101 相连，并且适于针对胎儿核酸样本，构建测序文库。测序单元 103 与文库构建单元 102 相连，并且适于对测序文库进行测序，以便得到测序结果；以及型别确定单元 104，型别确定单元 104 与测序单元 103 相连，并且适于基于测序结果，确定所述胎儿多态性型别。

关于针对核酸样本，构建测序文库的方法和流程，本领域技术人员可以根据不同的测序技术进行适当选择，关于流程的细节，可以参见测序仪器的厂商例如 Illumina 公司所提供的规程，例如参见 Illumina 公司 Multiplexing Sample Preparation Guide (Part#1005361; Feb 2010) 或 Paired-End SamplePrep Guide (Part#1005063; Feb 2010)，通过参照将其并入本文。

- 15 在本发明的一个实施例中，分型装置进一步包括：扩增单元（图中未示出），所述扩增单元分别与核酸提取单元和文库构建单元相连，并且适于对所述胎儿核酸样本进行扩增，以便得到含有所述多态性位点的扩增产物，并将所得到的扩增产物用于构建测序文库。由此，可以进一步提高确定双胞胎胎儿是否为异卵双胞胎的效率。由此，在本发明的一个实施例中，在构建测序文库之前，对所述胎儿核酸样本进行扩增，以便得到含有所述多态性位点的扩增产物，并将所得到的扩增产物用于构建测序文库，优选所述扩增产物的长度为 150bp 以下。由此，可以进一步提高确定双胞胎胎儿是否为异卵双胞胎的效率。在本发明的一个实施例中，所述多态性为选自 STR、VNTR、RFLP、STS、SSCP、CAPS、SNP 的至少一种。由此，可以进一步提高确定双胞胎胎儿是否为异卵双胞胎的效率。在本发明的一个实施例中，所述多态性位点为选自 vWA、TPOX、D3S1358、D16S539、D5S818、CSF1PO、
25 D11S2368、D2S1338、D8S1179、D13S317、D21S1437、D16S3391、Penta E、D12S1064、D12S391、D6S1043、D19S433 至少之一的 STR 多态性位点。在本发明的一个实施例中，所述扩增单元中设置有引物，以便通过 PCR，对所述胎儿核酸样本进行扩增，其中，针对 vWA，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 1 和 2 所示的寡核苷酸作为引物；针对 TPOX，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 3 和 4 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D3S1358，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 5 和 6 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D16S539，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 7 和 8 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D5S818，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 9 和 10 所示的寡核苷酸
- 30

作为引物；针对 CSF1PO，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 11 和 12 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D11S2368，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 13 和 14 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D2S1338，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 15 和 16 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D8S1179，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 17 和 18 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D13S317，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 19 和 20 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D21S1437，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 21 和 22 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D16S3391，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 23 和 24 所示的寡核苷酸作为引物；针对 Penta E，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 25 和 26 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D12S1064，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 27 和 28 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D12S391，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 29 和 30 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D6S1043，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 31 和 32 所示的寡核苷酸作为引物；针对 D19S433，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 33 和 34 所示的寡核苷酸作为引物。由此，可以进一步提高确定双胞胎胎儿是否为异卵双胞胎的效率。

相比其他已有的异卵双胞胎鉴定方法，根据本发明实施例的技术方案有以下技术优势，主要体现在无创取样、准确性和可获得的遗传信息量上：

1) 根据本发明实施例的技术方案采用抽取孕妇外周血或尿液等尽可能无创或微创的取样方式，避免了传统羊水或绒毛膜取样带来的不便和流产风险。

2) 根据本发明实施例的技术方案通过一种或几种多态性位点分型结果对是否异卵进行判定，所用位点数目可根据需要进行选择；分型方式灵活，既可根据序列长度进行分型，也可根据碱基序列进行分型；直接根据遗传信息对胎儿是否同卵进行推断，判定结果准确可靠。

3) 根据本发明实施例的技术方案可更加有效地指导临床疾病的诊断，因为异卵双胞胎携带的遗传物质并不完全相同，在判定某种疾病的时候需要对每个胎儿单独进行判定，若鉴定为同卵，则可能会有误诊的可能；进而更好地进行胎儿遗传发育相关研究、更好地对孕妇外周血中游离胎儿 DNA 的产生机制及存在状态进行研究、更好地指导无创产前疾病诊断。

下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件（例如参考 J. 萨姆布鲁克等著，黄培堂等译的《分子克隆实验指南》，第三版，科学出版社）或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品，例如可以采购自 Illumina 公司。

实施例：

一般方法

本发明鉴定双胞胎是否为异卵双胞胎的方法包括:

1、无创采取含有胎儿遗传物质的孕妇样品,提取其中含有的遗传物质。

2、胎儿父母基因组 DNA 提取和纯化。

3、分别对父母基因型与孕妇和胎儿基因组混合物进行多态性位点分型。

5 4、将孕妇和胎儿基因组混合物中出现的新的多态性位点型别与父亲基因组分型结果进行对比,对胎儿型别进行判定。通过对比胎儿基因型的型别,若胎儿携带不同的父源基因型,则胎儿是异卵双胞胎。

实施例 1

10 收集怀有双胞胎的孕妇血浆一份,同时收集该孕妇夫妇的基因组 DNA,该双胞胎为植入的试管婴儿且已经临床诊断为异卵双胞胎。选取 17 对常用于亲子鉴定的 STR 位点(vWA、TPOX、D3S1358、D16S539、D5S818、CSF1PO、D11S2368、D2S1338、D8S1179、D13S317、D21S1437、D16S3391、Penta E、D12S1064、D12S391、D6S1043、D19S433),设计引物如表 1 所示,要求扩增产物片段小于 150bp。首先对父母基因组 DNA 进行 STR 分型,以父母基因组 DNA 为模板,分别用 Phusion®高保真 DNA 聚合酶对 14 对引物进行 PCR 扩增,扩
15 增体系如下:

	2 × Phusion PCR Master Mix	25μl
	正向引物	5μl
	反向引物	5μl
	DNA 模板	15μl
20	总体积	50μl

将 PCR 产物进行 12%PAGE 电泳分型,180 伏,2 小时,分型结果如图 5 所示,除 D6S1043、D19S433 及 D12S391 三个位点非特异性扩增较严重外,其余位点均分型成功。其中父亲为杂合位点且与母亲两种拷贝数均不相同的位点有 4 对: D8S1179、vWA、D16S539、D11S2368。

25 TIANamp Micro DNA Kit (TIANGEN) 提取血浆样品 DNA 后进行常规建库,具体流程如下:

末端修复:

	10 × T4 多核苷酸激酶缓冲液	10 μl
	dNTPs(10mM)	2 μl
	T4 DNA 聚合酶	1 μl
30	Klenow 片段	0.1 μl
	T4 多核苷酸激酶	1 μl

DNA 85 μ l

ddH₂O 补至 100 μ l

20℃反应 30 分钟后, 使用 PCR Purification Kit(QIAGEN)回收末端修复产物。将回收的样品最后溶于 34 μ l 的 EB 缓冲液中。

5 末端添加碱基 A 的反应体系:

10 × Klenow 缓冲液 5 μ l

dATP(1mM) 10 μ l

Klenow (3'-5' exo⁻) 1 μ l

DNA 34 μ l

10 37℃温育 30 分钟后, 经 MinElute[®] PCR Purification Kit(QIAGEN)纯化并溶于 45 μ l 的 EB 中, 得到末端添加碱基 A 的 DNA 样品。

接头连接:

2x Rapid DNA 连接缓冲液 50 μ l

PEI Adapter oligomix(20uM) 1 μ l

15 T4 DNA 连接酶 4 μ l

末端添加碱基 A 的 DNA 样品 45 μ l

20℃反应 15 分钟后, 使用 PCR Purification Kit(QIAGEN)回收连接产物。样品最后溶于 15 μ l 的 EB 缓冲液中, 得到连接产物。

PCR 反应体系:

20 连接产物 15 μ l

Phusion DNA Polymerase Mix 25 μ l

PCR 引物 (10 pmol/ μ l) 2.5 μ l

标签 N(10 pmol/ μ l) 2.5 μ l

UltraPureTM Water 5 μ l

25 反应程序如下:

98℃	30 s	
98℃	10 s	} 17 个循环
65℃	30 s	
72℃	30 s	
72℃	5 min	
4℃	Hold	

30

使用 PCR Purification Kit(QIAGEN)回收 PCR 产物。样品最后溶于 20 μ l 的 EB 缓冲液中。

以建好的血浆文库为模板，对选出的 4 种候选 STR 位点进行分型，分型方法和前面一致。结果如图 6 所示，在血浆样品成功扩增的 vWA 位点，父亲基因组为杂合且两种拷贝数与母亲基因型均不相同，在血浆分型结果中可以看到父亲的两条等位基因，认为是两个胎儿分别遗传了父亲不同的等位基因，为异卵双胞胎。

工业实用性

根据本发明实施例的技术方案，能够有效地确定双胞胎是否为异卵双胞胎。

10 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示意性实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何的一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

权利要求书

- 1、一种鉴定双胞胎是否为异卵双胞胎的方法，其特征在于，包括：
对双胞胎胎儿的至少一个多态性位点进行分型，以便获得胎儿多态性型别；
5 将所述胎儿多态性型别与父母的相应多态性位点型别进行比较；以及
基于比较结果，确定所述双胞胎是否为异卵双胞胎。
- 2、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，对双胞胎胎儿的至少一个多态性位点进行分型，以便获得胎儿多态性型别进一步包括：
从孕妇样品提取胎儿核酸样本；
10 针对所述胎儿核酸样本，构建测序文库；
对所述测序文库进行测序，以便得到测序结果；以及
基于所述测序结果，确定所述胎儿多态性型别。
- 3、根据权利要求2所述的方法，其特征在于，所述孕妇样品为选自孕妇外周血、孕妇尿液和乳汁的至少一种。
- 15 4、根据权利要求3所述的方法，其特征在于，所述孕妇样品为孕妇外周血。
- 5、根据权利要求2所述的方法，其特征在于，在构建测序文库之前，对所述胎儿核酸样本进行扩增，以便得到含有所述多态性位点的扩增产物，并将所得到的扩增产物用于构建测序文库。
- 6、根据权利要求5所述的方法，其特征在于，所述扩增产物的长度为150bp以下。
- 20 7、根据权利要求2所述的方法，其特征在于，所述多态性为选自STR、VNTR、RFLP、STS、SSCP、CAPS、SNP的至少一种。
- 8、根据权利要求7所述的方法，其特征在于，所述多态性位点为选自vWA、TPOX、D3S1358、D16S539、D5S818、CSF1PO、D11S2368、D2S1338、D8S1179、D13S317、D21S1437、D16S3391、Penta E、D12S1064、D12S391、D6S1043、D19S433至少之一的STR多态性位
25 点。
- 9、根据权利要求8所述的方法，其特征在于，通过PCR，对所述胎儿核酸样本进行扩增，
其中，
针对vWA，所述PCR采用SEQ ID NO: 1和2所示的寡核苷酸作为引物；
30 针对TPOX，所述PCR采用SEQ ID NO: 3和4所示的寡核苷酸作为引物；
针对D3S1358，所述PCR采用SEQ ID NO: 5和6所示的寡核苷酸作为引物；

针对 D16S539, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 7 和 8 所示的寡核苷酸作为引物;
针对 D5S818, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 9 和 10 所示的寡核苷酸作为引物;
针对 CSF1PO, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 11 和 12 所示的寡核苷酸作为引物;
针对 D11S2368, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 13 和 14 所示的寡核苷酸作为引物;
5 针对 D2S1338, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 15 和 16 所示的寡核苷酸作为引物;
针对 D8S1179, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 17 和 18 所示的寡核苷酸作为引物;
针对 D13S317, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 19 和 20 所示的寡核苷酸作为引物;
针对 D21S1437, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 21 和 22 所示的寡核苷酸作为引物;
针对 D16S3391, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 23 和 24 所示的寡核苷酸作为引物;
10 针对 Penta E, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 25 和 26 所示的寡核苷酸作为引物;
针对 D12S1064, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 27 和 28 所示的寡核苷酸作为引物;
针对 D12S391, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 29 和 30 所示的寡核苷酸作为引物;
针对 D6S1043, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 31 和 32 所示的寡核苷酸作为引物;
针对 D19S433, 所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 33 和 34 所示的寡核苷酸作为引物。

15 10、一种鉴定双胞胎是否为异卵双胞胎的系统, 其特征在于, 包括:

分型装置, 所述分型装置用于对双胞胎胎儿的至少一个多态性位点进行分型, 以便获得胎儿多态性型别;

分析装置, 所述分析装置与所述分型装置相连, 并且适于将所述胎儿多态性型别与父母的相应多态性位点型别进行比较, 以及基于比较结果, 确定所述双胞胎是否为异卵双胞胎。
20

11、根据权利要求 10 所述的系统, 其特征在于, 所述分型装置进一步包括:

核酸提取单元, 所述核酸提取单元适于从孕妇样品提取胎儿核酸样本;

文库构建单元, 所述文库构建单元与所述核酸提取单元相连, 并且适于针对所述胎儿核酸样本, 构建测序文库;

25 测序单元, 所述测序单元与所述文库构建单元相连, 并且适于对所述测序文库进行测序, 以便得到测序结果; 以及

型别确定单元, 所述型别确定单元与所述测序单元相连, 并且适于基于所述测序结果, 确定所述胎儿多态性型别。

12、根据权利要求 10 所述的系统, 其特征在于, 所述分型装置进一步包括:

30 扩增单元, 所述扩增单元分别与核酸提取单元和文库构建单元相连, 并且适于对所述胎儿核酸样本进行扩增, 以便得到含有所述多态性位点的扩增产物, 并将所得到的扩增产

物用于构建测序文库。

13、根据权利要求 12 所述的系统，其特征在于，所述多态性为选自 STR、VNTR、RFLP、STS、SSCP、CAPS、SNP 的至少一种。

14、根据权利要求 13 所述的系统，其特征在于，所述多态性位点为选自 vWA、TPOX、
5 D3S1358、D16S539、D5S818、CSF1PO、D11S2368、D2S1338、D8S1179、D13S317、D21S1437、
D16S3391、Penta E、D12S1064、D12S391、D6S1043、D19S433 至少之一的 STR 多态性位点。

15、根据权利要求 14 所述的系统，其特征在于，所述扩增单元中设置有引物，以便通过 PCR，对所述胎儿核酸样本进行扩增，

10 其中，

针对 vWA，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 1 和 2 所示的寡核苷酸作为引物；

针对 TPOX，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 3 和 4 所示的寡核苷酸作为引物；

针对 D3S1358，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 5 和 6 所示的寡核苷酸作为引物；

针对 D16S539，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 7 和 8 所示的寡核苷酸作为引物；

15 针对 D5S818，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 9 和 10 所示的寡核苷酸作为引物；

针对 CSF1PO，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 11 和 12 所示的寡核苷酸作为引物；

针对 D11S2368，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 13 和 14 所示的寡核苷酸作为引物；

针对 D2S1338，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 15 和 16 所示的寡核苷酸作为引物；

针对 D8S1179，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 17 和 18 所示的寡核苷酸作为引物；

20 针对 D13S317，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 19 和 20 所示的寡核苷酸作为引物；

针对 D21S1437，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 21 和 22 所示的寡核苷酸作为引物；

针对 D16S3391，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 23 和 24 所示的寡核苷酸作为引物；

针对 Penta E，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 25 和 26 所示的寡核苷酸作为引物；

针对 D12S1064，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 27 和 28 所示的寡核苷酸作为引物；

25 针对 D12S391，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 29 和 30 所示的寡核苷酸作为引物；

针对 D6S1043，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 31 和 32 所示的寡核苷酸作为引物；

针对 D19S433，所述 PCR 采用 SEQ ID NO: 33 和 34 所示的寡核苷酸作为引物。