



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I576431 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：104114856 (22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 05 月 11 日

(51)Int. Cl. : C12M1/36 (2006.01) C12Q1/68 (2006.01)  
C07H21/04 (2006.01)

(71)申請人：陳明 (中華民國) CHEN, MING (TW)

臺中市西區中興街 359 號 3 樓之 1

(72)發明人：郭守仁 KUO, SHOU JEN (TW)；陳明 CHEN, MING (TW)；馬國欽 MA, GWO CHIN (TW)；張舜評 CHANG, SHUN PING (TW)；蔡鋒博 TSAI, FENG PO (TW)

(74)代理人：陳天賜

(56)參考文獻：

- US 2010/0317916A1 WO 2007/115590A1  
Wang BT et al., Mol Cytogenet. 2014 May 22;7:33.  
[https://web.archive.org/web/20150315051444/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_FAM20B.html](https://web.archive.org/web/20150315051444/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_FAM20B.html).  
[http://web.archive.org/web/20150315162005/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_URB1.html](http://web.archive.org/web/20150315162005/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_URB1.html).  
<http://web.archive.org/web/20150315070135/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/TIAM1ID42557ch21q22.html>.  
[http://web.archive.org/web/20150315022348/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_TRAPPC10.html](http://web.archive.org/web/20150315022348/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_TRAPPC10.html).  
[http://web.archive.org/web/20150315191739/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_PRDM15.html](http://web.archive.org/web/20150315191739/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_PRDM15.html).  
Yamamoto F et al., Electrophoresis. 2007 Jun;28(12):1882-95.  
[https://web.archive.org/web/20150315080552/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_MTMR6.html](https://web.archive.org/web/20150315080552/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_MTMR6.html).  
[https://web.archive.org/web/20150315062327/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_PCDH8.html](https://web.archive.org/web/20150315062327/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_PCDH8.html).  
[https://web.archive.org/web/20150315062714/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_IPO5.html](https://web.archive.org/web/20150315062714/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_IPO5.html).  
[https://web.archive.org/web/20150315122152/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_ZFY.html](https://web.archive.org/web/20150315122152/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_ZFY.html).  
[https://web.archive.org/web/20150315235737/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_KDM5D.html](https://web.archive.org/web/20150315235737/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_KDM5D.html).  
[https://web.archive.org/web/20150125112927/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_ZFX.html](https://web.archive.org/web/20150125112927/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_ZFX.html).  
[https://web.archive.org/web/20150315055324/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_HUWE1.html](https://web.archive.org/web/20150315055324/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_HUWE1.html).  
[https://web.archive.org/web/20150315043823/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_EFNB1.html](https://web.archive.org/web/20150315043823/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_EFNB1.html).

[https://web.archive.org/web/20150315154902/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_XPNPEP2.html](https://web.archive.org/web/20150315154902/http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_XPNPEP2.html).

審查人員：黃教威

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：2 共 22 頁

---

(54)名稱

利用即時定量聚合酶鏈式反應 (qPCR) 檢測人類胚胎的非整倍體之篩檢平台及其套組  
SCREENING PLATFORM FOR CHECKING ANEUPLOIDY IN HUMAN EMBRYOS BY  
QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION (QPCR) AND THE ASSEMBLY THEREOF

(57)摘要

本發明提供一種利用定量聚合酶鏈式反應(qPCR)檢測人類胚胎的非整倍體之篩檢平台及其套組，其主要是採用第 5-6 天胚胎期的胚胎，透過 qPCR 技術選擇性地放大染色體標誌(marker)以檢測非整倍體，並以鎖核酸(LNA, locked nucleic acid)技術修飾探針；藉此，達到提供一種篩檢快速、非整倍體的假陽性率低的篩檢平台，且本發明探針具有檢測至少 5 條染色體之技術功效。

A screening platform for checking aneuploidy in human embryos by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and the assembly thereof, which selectively amplifies chromosome markers of a 5 to 6 day-old embryo via qPCR technology so as to check aneuploidy, and modifies a probe via locked nucleic acid technology, thus providing the screening platform with rapid screening function and low false positive rate. Moreover, the probe can check at least five chromosomes.

指定代表圖：

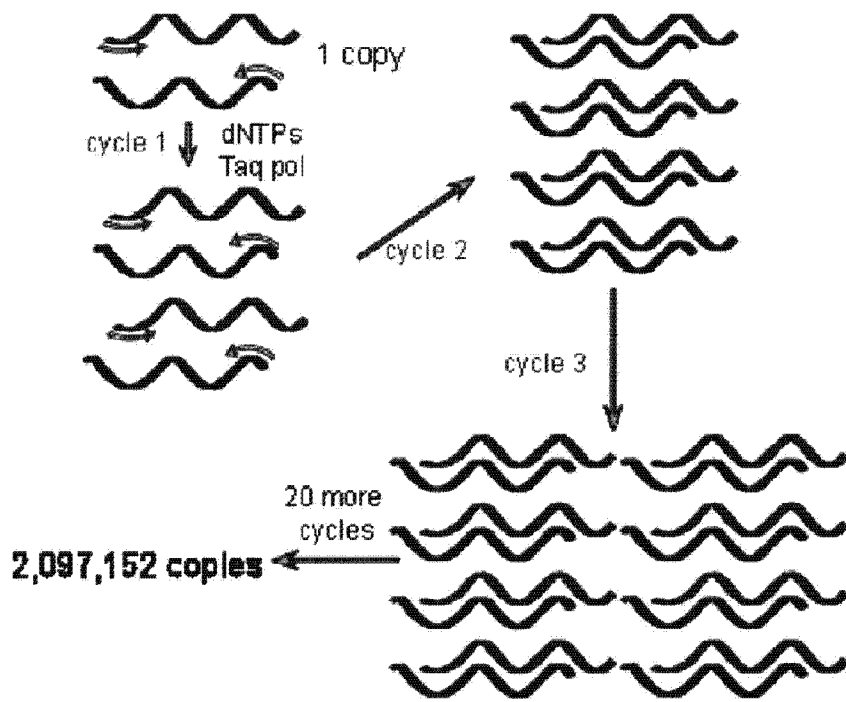
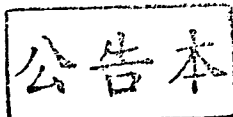


圖1A



申請日： 104. 5. 11  
IPC 分類：  
C12M 1/36 (2006.01)  
C12Q 1/68 (2006.01)  
C07H 21/04 (2006.01)

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 利用即時定量聚合酶鏈式反應 (qPCR) 檢測人類胚胎的非整倍體之篩檢平台及其套組

【英文發明名稱】 SCREENING PLATFORM FOR CHECKING ANEUPLOIDY IN HUMAN EMBRYOS BY QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION (qPCR) AND THE ASSEMBLY THEREOF

### ● 【中文】

本發明提供一種利用定量聚合酶鏈式反應 (qPCR) 檢測人類胚胎的非整倍體之篩檢平台及其套組，其主要是採用第5-6天胚胎期的胚胎，透過qPCR技術選擇性地放大染色體標誌 (marker) 以檢測非整倍體，並以鎖核酸 (LNA, locked nucleic acid) 技術修飾探針；藉此，達到提供一種篩檢快速、非整倍體的假陽性率低的篩檢平台，且本發明探針具有檢測至少5條染色體之技術功效。

### ● 【英文】

A screening platform for checking aneuploidy in human embryos by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and the assembly thereof, which selectively amplifies chromosome markers of a 5 to 6 day-old embryo via qPCR technology so as to check aneuploidy, and modifies a probe via locked nucleic acid technology, thus providing the screening platform with rapid screening function and low false positive rate. Moreover, the probe can check at least five chromosomes.

【指定代表圖】 圖1A

【代表圖之符號簡單說明】 無

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 利用即時定量聚合酶鏈式反應（qPCR）檢測人類胚胎的非整倍體之篩檢平台及其套組

【英文發明名稱】 SCREENING PLATFORM FOR CHECKING ANEUPLOIDY IN HUMAN EMBRYOS BY QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION (qPCR) AND THE ASSEMBLY THEREOF

### ● 【技術領域】

【0001】 本發明係有關於人類胚胎植入前遺傳學篩檢（Preimplantation genetic screening），特別是指利用即時定量聚合酶鏈式反應（qPCR， real-time quantitative polymerase chain reaction）檢測胚胎非整倍體的篩檢平台及套組。

### 【先前技術】

● 【0002】 在第3天卵裂期進行胚胎活檢（Day-3 cleavage stage embryo biopsy）再以螢光原位雜交（FISH， fluorescence in situ hybridization）檢驗，是目前高齡產婦（women with advanced maternal age）接受度很高的一種胚胎植入前遺傳學篩檢（PGS）方案。前述遺傳學篩檢方案的假設是基於高齡產婦易因胚胎染色體呈現非整倍體，而導致胚胎著床失敗或產出染色體異常胎兒的重要因素，因此前述遺傳學篩檢方案能夠改善懷孕成功率及生產正常胎兒的結果（reproductive outcome）。然而，許多隨機對照試驗（RCTs， randomized controlled trials）已經證實，前述遺傳學篩檢方案（FISH）相較於其他尚未被廣泛採用的PGS技術有效性是較低的，不僅未能有效改善懷孕成功率，更有損於高齡產婦的胎兒活產率

(live-birth rate)。是以，其他研究者提出了不同的遺傳學篩檢方案，包括在不同胚胎發育時期進行的活檢以及不同胚胎移植時機等，例如：胚胎發育第5/6天的滋養外胚層活檢 (trophectoderm biopsy) v.s. 胚胎發育第3天的卵裂期卵裂球活檢 (cleavage-stage blastomere biopsy)，以及當周期植入的新鮮胚胎 v.s. 隔周期植入的冷凍胚胎，藉以檢測出染色體套數 (copy number) 異常，並取代只能選擇性地檢測少數染色體的螢光檢測技術 (FISH檢測主要受限於螢光種類的選擇)。

**【0003】** 越來越多的證據顯示，在第3天卵裂期胚胎的卵裂球活檢

(blastomere biopsy) 確實會損害著床潛力 (implantation potential)，反之，對第5/6天胚胎進行的滋養外胚層活檢則不會有胚胎損害問題。此外，使用更先進的遺傳學檢測技術可能篩選出更適合植入的胚胎。相關的技術包括微陣列比較基因組雜合 (aCGH, array-based comparative genomic hybridization)、單核苷酸多態性微陣列 (SNP array, single nucleotide polymorphism array)、qPCR 以及次世代測序 (NGS, next generation sequencing)。這些技術當中，NGS技術雖在生物信息學 (bioinformatics) 領域的資料分析上具有相當的研究價值性，但其成本高，因此降低其臨床應用的普及性；而目前可行性最高的工具為qPCR以及以微陣列為基礎的檢驗技術 (array-based technologies)，包括SNP array和 aCGH。目前已知染色體鑲嵌 (mosaicism) 是早期人類胚胎發育常見現象，故如何篩選具有最佳著床潛力的胚胎成為相當重要的課題。其中，qPCR相較於aCGH，具有較低的假陽性率 (lower false-positive rate)，因此，qPCR係為較佳的PGS方案。

**【0004】** 目前市面上已有可取得之商業化aCGH的PGS平台，由於其易於使用且可行性高 (feasibility of an easy-to-use system)，對於未設有遺傳檢測實驗室的人工生殖中心 (IVF centers)，可接受度高。然而，由於前述qPCR所呈現出來

的PGS結果相當令人信服，因此同領域研究者有必要進一步確認qPCR取代或替換 aCGH平台的可行性。

### 【發明內容】

【0005】 本發明目的在於提供一種利用即時定量聚合酶鏈式反應（qPCR，real-time quantitative polymerase chain reaction）檢測胚胎非整倍體之篩檢平台及其探針，其主要是採用第5/6天胚胎期的胚胎，透過qPCR技術選擇性地放大染色體標誌（markers）以檢測非整倍體，並以鎖核酸（LNA，locked nucleic acid）技術修飾探針；藉此，達到提供一種快速篩檢且假陽性率低的PGS平台，且本發明探針具有檢測至少5條染色體之技術功效。

【0006】 為達前述目的，本發明提供一種利用即時定量聚合酶鏈式反應（qPCR，real-time quantitative polymerase chain reaction）檢測胚胎的非整倍體之篩檢平台，其係採用第5/6天胚胎期的胚胎，並經由一雙色qPCR選擇性地擴增染色體標誌（markers）以檢測非整倍體；其中，該篩檢平台包括至少2個探針（probes）、1組用於擴增1號染色體之對照基因座序列（reference locus）及複數組用於擴增目標染色體之目標基因座序列（targeted loci）的特定外引子對（outside primer sets）與內引子對（inside primer sets），各該探針含有至少三個LNA修飾的核苷酸，且染色體上探針識別區序列皆位於外顯子序列（exon）上，利用識別區序列所具有的保守性（conservation），使探針得以準確識別並結合上染色體探針識別區序列，提升檢測穩定性；此外，任一特定外引子對中之一條引子位於內含子序列（intron）內，以確保所擴增之基因座序列皆以基因體去氧核糖核酸序列（genomic DNA）為模板，可避免訊息核糖核酸序列（precursor mRNA）的干擾，提高檢測之準確性。



【0007】本發明的篩檢平台，其中，該用於對照基因座序列探針係選自序列5' -CCTGGCCACCG-3' 之探針（序列表：SEQ ID NO：1）；用於目標基因座序列探針係選自序列5' -GGGCAGCAGC-3' 之探針（序列表：SEQ ID NO：2），該兩種鎖核酸（LNA）修飾探針分別以兩種不同螢光進行標識，用以量化目標基因座和對照基因座的擴增數量；而該對照基因座係為第1條染色體上之特定序列，該對照基因座即在特定之序列範圍內定義出複數特定引子對的範圍。

【0008】其中，該對照基因座以FAM20B為例，有兩組引子對（1FAM20B-F/R-out、1FAM20B-F/R-in）的序列範圍，其中，對照基因座外引子對（1FAM20B-F/R-out）之序列範圍係>chr1:179040981+179041348，對照基因座內引子對（1FAM20B-F/R-in）之序列範圍係為>chr1:179041176+179041262。

【0009】本發明之篩檢平台，其中，目標基因座至少可分別為第13、18、21、X、Y條之染色體，亦可為其他體染色體，而該目標基因座即在特定之序列範圍內定義出複數特定引子對的序列範圍。

【0010】本發明的篩檢平台，其中，該鎖核酸（LNA）修飾的螢光標誌包括FAM<sup>TM</sup>及HEX<sup>TM</sup>被分別接於前述二探針的5' -端，前述二探針的3' -端則連結BHQ<sup>TM</sup>作為抑制螢光標誌。

【0011】本發明並提供一種用以檢測人類胚胎非整倍體之套組（kit），其利用前述篩檢平台為基礎，達到提供一種快速、精準的非整倍體檢測套組。

【0012】本發明的技術功效在於，所提出的非整倍體篩檢平台及探針是由本案發明人提出的全新胚胎植入前遺傳學篩檢（PGS）方案。透過前述之篩檢平台與探針可快速準確的檢測出胚胎染色體套數是否為非整倍體，使被檢測之整倍體胚胎植入母體後有較佳之持續妊娠率（ongoing pregnancies），約53.8%，顯示本發明提出的方案具臨床可行性。且前述篩檢及探針是能夠廣泛用於複數染

色體篩檢的PGS，可擴展至24條染色體（指染色體1-22、X、Y）檢測，進行全面性的篩檢。

【0013】本發明之次要目的在於本發明可快速確診，約四小時即可確診出整倍體胚胎，藉以執行新鮮胚胎植入（fresh embryo transplantation）的作業。

【0014】本發明為達成上述目的，所採用之篩檢平台及其探針，茲列舉實施例並配合圖式詳細說明如後，相信本發明之目的、特徵及其他優點，當可由之得一深入而具體之瞭解。

### ● 【圖式簡單說明】

#### 【0015】

圖1A、1B係本發明利用即時定量聚合酶鏈式反應（qPCR）檢測胚胎的非整倍體之第一次擴增流程示意圖。

圖1C係本發明利用即時定量聚合酶鏈式反應（qPCR）檢測胚胎的非整倍體之第一次擴增流程中的溫度與時間曲線圖。

圖2係本發明利用即時定量聚合酶鏈式反應（qPCR）檢測胚胎的非整倍體之探針黏合及第二次擴增流程示意圖。

### 【實施方式】

【0016】以下說明本發明利用即時定量聚合酶鏈式反應（qPCR）檢測胚胎的非整倍體之篩檢及其探針的具體實施方式。

【0017】本發明提供一種關於即時定量聚合酶鏈式反應（qPCR）對所有24條染色體的非整倍體檢測平台，其中，經由本發明人定義出特定之對照基因座與目標基因座之探針，並以鎖核酸技術（LNA，locked nuclear acid technology）修

飾，另以適當之複數引子對進行基因座序列第一次擴增，第一次擴增後之基因座序列，同時可供其他複數引子對與探針黏合，再進行第二次擴增，而使該探針之螢光標誌被釋出並被有效的偵測，形成即時定量聚合酶鏈式反應（qPCR）偵測螢光訊號的檢測平台。

【0018】如圖1A~圖2所示，顯示本發明利用qPCR檢測人類胚胎的非整倍體之篩檢平台的擴增原理流程示意圖及其溫端與時間關係曲線圖。所述流程包括以下步驟：

【0019】第一次擴增：如圖1A、1B所示，其係利用對照基因座與目標基因座之外引子對，針對胚胎細胞進行基因座序列擴增；

【0020】黏合：如圖2所示，其係於前述第一次擴增後之基因座序列上同時黏合該對照基因座與目標基因座之內引子對與探針；

【0021】第二次擴增並釋放螢光：如圖2所示，該對照基因座與目標基因座之內引子對於前述第一次擴增後之基因座序列上進行再次擴增，同時將原黏合於該第一次擴增後基因座序列上之探針予以破壞，並釋放螢光，使該探針之5'端螢光標記HEXTM與FAMTM分別與3'端之抑制螢光標記BHQ分離，螢光標記HEXTM與FAMTM即可發出螢光；

【0022】重複黏合、第二次擴增並釋放螢光等步驟，以作為即時定量聚合酶鏈式反應（qPCR）定量之用。

【0023】本發明人係使用即時定量聚合酶鏈式反應（qPCR）檢測方式進行胚胎植入前遺傳學篩檢（PGS）。本發明在初期僅針對非整倍體之第13條、第18條、第21條、X和Y染色體，並選擇第1條染色體作為控制用之對照組（control set），並以所有染色體，包括：22條體染色體以及X、Y染色體，均可成為被檢測非整倍體的目標組（target set）。

表 1 用於本發明之非整倍體檢測的染色體基因座匯整			
對照組探針序列 (Control set probe sequence) :			
HEX-5'-CCTGGCCACCG-3'-BHQ			
染色體	基因	正向/逆向引子 (forward/ reverse primer)	序列範圍
1	FAM20B	1FAM20B-F/R-out	>chr1:179040981+179041348
		1FAM20B-F/R-in	>chr1:179041176+179041262
目標組探針序列 (Target set probe sequence) :			
FAM-5'-GGGCAGCAGC-3'-BHQ			
染色體	基因	正向/逆向引子 (forward/ reverse primer)	序列範圍
21	URB1	21URB1-F/R-out	>chr21:33706393-33706556
		21URB1-F/R-in	>chr21:33706443-33706522
	TIAM1	21TIAM1-F/R-out	>chr21:32582430-32582602
		21TIAM1-F/R-in	>chr21:32582484-32582588
	TRAPPC10	21TRAPPC10-F/R-out	>chr21:45457611+45457826
		21TRAPPC10-F/R-in	>chr21:45457699+45457783
PRDM15	21PRDM15-F/R-out	>chr21:43279112-43279292	
	21PRDM15-F/R-in	>chr21:43279123-43279253	
18	MBD1	18MBD1-F/R-out	>chr18:47800159-47800294
		18MBD1-F/R-in	>chr18:47800188-47800275
	ZNF236	18ZNF236-F/R-out	>chr18:74592149+74592311
		18ZNF236-F/R-in	>chr18:74592157+74592265
	CTDP1	18CTDP1-F/R-out	>chr18:77513629+77513793
		18CTDP1-F/R-in	>chr18:77513666+77513758
13	MTMR6	13MTMR6-F/R-out	>chr13:25823301-25823552
		13MTMR6-F/R-in	>chr13:25823445-25823508
	PCDH8	13PCDH8-F/R-out	>chr13:53419845-53420030
		13PCDH8-F/R-in	>chr13:53419866-53419995
		13PCDH8-F/R-in	>chr13:53419922-53419995
	IPO5	13IPO5-F/R-out	>chr13:98655080+98655268
13IPO5-F/R-in		>chr13:98655149+98655224	
Y	ZFY	YZFY-F/R-out	>chrY:2844794+2844938
		YZFY-F/R-in	>chrY:2844826+2844897
	KDM5D	YKDM5D-F/R-out	>chrY:21871539-21871720
		YKDM5D-F/R-in	>chrY:21871564-21871641

X	ZFX	XZFX-F/R -out	>chrX:24226376+24226585
		XZFX-F/R -in	>chrX:24226424+24226508
	HUWE1	XHUWE1-F/R -out	>chrX:53573627-53573781
		XHUWE1-F/R -in	>chrX:53573688-53573767
	EFNB1	XEFNB1-F/R -out	>chrX:68060064+68060217
		XEFNB1-F/R -in	>chrX:68060099+68060172
	XPNPEP2	XXPNPEP2-F/R -out	>chrX:128873141+128873289
		XXPNPEP2-F/R -in	>chrX:128873173+128873264

【0024】如上表1所示，本發明係為一雙色即時定量聚合酶鏈式反應（qPCR），該篩選系統包括，針對人體中最少出現三體性的第1條染色體為對照染色體，而針對該對照染色體所設計的對照基因座序列探針係選自序列 5' -CCTGGCCACCG-3'（序列表SEQ ID NO：1）之探針；而其他染色體則為目標染色體，而針對該目標染色體所設計的目標基因座序列探針係選自序列 5' -GGGCAGCAGC-3'（序列表SEQ ID NO：2）之探針，該兩探針分別以兩種不同的螢光標誌進行鎖核酸（LNA）修飾。

【0025】前述之引子對（primer sets）中，係可分為外引子對（outside primer sets）與內引子對（inside primer sets），其中，如表1所示，該對照組染色體的對照基因座之引子對，以FAM20B為例，有1FAM20B-F/R-out及1FAM20B-F/R -in共二對與前述對照基因座序列探針（SEQ ID NO：1）結合的引子對，其中，對照基因座外引子對（1FAM20B-F/R-out）之序列範圍係>chr1:179040981+179041348，對照基因座內引子對（1FAM20B-F/R-in）之序列範圍係為 >chr1:179041176+179041262。

【0026】如表1所示，該目標組染色體以第21條染色體為例，其目標基因座為URB1、TIAM1、TRAPPC10以及PRDM15時，有21URB1-F/R -out、21URB1-F/R -in、21TIAM1-F/R -out、21TIAM1-F/R -in、21TRAPPC10-F/R -out、21TRAPPC10-F/R

-in、21PRDM15-F/R -out、21PRDM15-F/R -in共八對與前述目標基因座序列探針 (SEQ ID NO: 2) 結合的引子對，其中，目標基因座為URB1之外引子對 (21URB1-F/R-out) 的序列範圍係>chr21:33706393-33706556，目標基因座為URB1之內引子對 (21URB1-F/R-in) 的序列範圍係為>chr21:33706443-33706522；目標基因座為TIAM1之外引子對 (21 TIAM1-F/R-out) 的序列範圍係>chr21:32582430-32582602，目標基因座為TIAM1之內引子對 (21 TIAM1-F/R-in) 的序列範圍係為>chr21:32582484-32582588；目標基因座為TRAPPC10之外引子對 (21 TRAPPC10-F/R-out) 的序列範圍係>chr21:45457611+45457826，目標基因座為TRAPPC10之內引子對 (21 TRAPPC10-F/R-in) 的序列範圍係為>chr21:45457699+45457783；目標基因座為PRDM15之外引子對 (21 PRDM15-F/R-out) 的序列範圍係>chr21:43279112-43279292，目標基因座為PRDM15之內引子對 (21 PRDM15-F/R-in) 的序列範圍係為>chr21:43279123-43279253。

【0027】如表1所示，該目標組染色體以染色體第18條為例，其目標基因座為MBD1、ZNF236以及CTDP1時，有18MBD1-F/R -out、18MBD1-F/R -in、18ZNF236-F/R -out、18ZNF236-F/R -in、18CTDP1-F/R -out、18CTDP1-F/R -in共六對與前述目標基因座序列探針 (SEQ ID NO: 2) 結合的引子對，其中，目標基因座為MBD1之外引子對 (18MBD1-F/R-out) 的序列範圍係>chr18:47800159-47800294，目標基因座為MBD1之內引子對 (18MBD1-F/R-in) 的序列範圍係為>chr18:47800188-47800275；目標基因座為ZNF236之外引子對 (18ZNF236-F/R-out) 的序列範圍係>chr18:74592149+74592311，目標基因座為ZNF236之內引子對 (18 ZNF236-F/R-in) 的序列範圍係為>chr18:74592157+74592265；目標基因座為CTDP1之外引子對 (18 CTDP1-F/R-out) 的序列範圍係>chr18:77513629+77513793，目標基因座為CTDP1之內引子對 (18 CTDP1-F/R-in) 的序列範圍係為>chr18:77513666+77513758。

【0028】如表1所示，該目標組染色體以染色體第13條為例，該目標基因座為MTMR6、PCDH8以及IPO5時，有13MTMR6-F/R -out、13MTMR6-F/R -in、13PCDH8-F/R -out、13PCDH8-F/R -in-1、13PCDH8-F/R -in-2、13IPO5-F/R -out、13IPO5-F/R -in共七對與前述目標基因座序列探針（SEQ ID NO：2）結合的引子對，其中，目標基因座為MTMR6之外引子對（13 MTMR6-F/R-out）的序列範圍係>chr13:25823301-25823552，目標基因座為MTMR6之內引子對（13 MTMR6-F/R-in）的序列範圍係為>chr13:25823445-25823508；目標基因座為PCDH8之外引子對（13 PCDH8-F/R-out）的序列範圍係>chr13:53419845-53420030，目標基因座為PCDH8之內引子對（13 PCDH8-F/R-in-1、13PCDH8-F/R -in-2）的序列範圍依序係為>chr13:53419866-53419995以及>chr13:53419922-53419995；目標基因座為IPO5之外引子對（13 IPO5-F/R-out）的序列範圍係>chr13:98655080+98655268，目標基因座為IPO5之內引子對（13 IPO5-F/R-in）的序列範圍係為>chr13:98655149+98655224。

【0029】如表1所示，該目標組染色體以染色體Y為例，該目標基因座為ZFY以及KDM5D時，有YZFY-F/R -out、YZFY-F/R -in、YKDM5D-F/R -out、YKDM5D-F/R -in共四對與前述目標基因座序列探針（SEQ ID NO：2）結合的引子對，其中，目標基因座為ZFY之外引子對（YZFY-F/R-out）的序列範圍係>chrY:2844794+2844938，目標基因座為ZFY之內引子對（YZFY-F/R-in）的序列範圍係為>chrY:2844826+2844897；目標基因座為KDM5D之外引子對（YKDM5D-F/R-out）的序列範圍係>chrY:21871539-21871720，目標基因座為KDM5D之內引子對（YKDM5D-F/R-in）的序列範圍係為>chrY:21871564-21871641。

【0030】如表1所示，該目標組染色體以染色體X為例，其目標基因座為ZFX、HUWE1、EFNB1以及XPNPEP2時，有XZFX-F/R -out、XZFX-F/R -in、XHUWE1-F/R -out、XHUWE1-F/R -in、XEFNB1-F/R -out、XEFNB1-F/R -in、

XXPNPEP2-F/R -out、XXPNPEP2-F/R -in共八對與前述目標基因座序列探針（SEQ ID NO：2）結合的引子對，其中，目標基因座為ZFX之外引子對（X ZFX-F/R-out）之序列範圍係>chrX:24226376+24226585，目標基因座為ZFX之內引子對（X ZFX-F/R-in）的序列範圍係為>chrX:24226424+24226508；目標基因座為HUWE1之外引子對（X HUWE1-F/R-out）的序列範圍係>chrX:53573627-53573781，目標基因座為HUWE1之內引子對（X HUWE1-F/R-in）的序列範圍係為>chrX:53573688-53573767；目標基因座為EFNB1之外引子對（X EFNB1-F/R-out）的序列範圍係>chrX:68060064+68060217，目標基因座為EFNB1之內引子對（X EFNB1-F/R-in）的序列範圍係為>chrX:68060099+68060172；目標基因座為XPENPEP2之外引子對（X XPENPEP2-F/R-out）的序列範圍係>chrX:128873141+128873289，目標基因座為XPENPEP2之內引子對（X XPENPEP2-F/R-in）的序列範圍係為>chrX:128873173+128873264。

【0031】而本發明之目標基因座序列探針除了可針對前述染色體進行粘著與檢測外，另可針對其他的染色體進行相同的檢測作業。

【0032】本發明之對照基因座序列探針及目標基因座序列探針含有LNA修飾核苷酸；其中，該對照基因座序列探針的5'端標記有HEXTM螢光標記，該目標基因座序列探針的5'端則標記有FAMTM螢光標記（IDT，Integrated DNA Technologies, Iowa, USA／美國，定制核酸供應商），且對照基因座序列探針及目標基因座序列探針的3'端皆接上抑制螢光標記BHQ。

#### 【符號說明】

【0033】無



【序列表】

<110>陳明

<120> 利用即時定量聚合酶鏈式反應（qPCR）檢測人類胚胎的非整倍體之篩檢平台及其套組

<160> 2

<210> 1

<211> 11

<212>DNA

<213> 人工序列

<400> 1

cctggccacc g

<210> 2

<211> 10

<212>DNA

<213> 人工序列

<400> 2

gggcagcagc

公告本

105年12月16日修正本

105年12月16日修正替換頁

## 【發明申請專利範圍】

【第1項】一種利用即時定量聚合酶鏈式反應（qPCR）檢測胚胎的非整倍體之篩檢平台，經由一雙色 qPCR 選擇性地放大染色體基因座以檢測非整倍體；其中，該篩檢平台包括一對照基因座序列探針、一目標基因座序列探針、複數用於對照基因座與目標基因座的特定引子對，該對照基因座係為第1條染色體內部的基因序列，該第1條染色體所設計的對照基因座序列探針係序列5'-CCTGGCCACCG-3' 的SEQ ID NO：1之探針；該目標基因座係選自24條染色體內部的基因序列，選自該24染色體所設計的目標基因座序列探針係選自序列5'-GGGCAGCAGC-3' 的SEQ ID NO：2之探針，該對照基因座序列探針及該目標基因座序列探針含有LNA修飾核苷酸。

【第2項】如申請專利範圍第1項所述之篩檢平台，其中，該對照基因座為FAM20B，該對照基因座外引子對的序列範圍係>chr1:179040981+179041348，該對照基因座內引子對的序列範圍係為>chr1:179041176+179041262。

【第3項】如申請專利範圍第1項所述之篩檢平台，該目標基因座為第21條染色體內部的基因序列，其目標基因座係選自URB1、TIAM1、TRAPPC10以及PRDM15，其中，目標基因座為URB1之外引子對的序列範圍係>chr21:33706393-33706556，目標基因座為URB1之內引子對的序列範圍係為>chr21:33706443-33706522；目標基因座為TIAM1之外引子對的序列範圍係>chr21:32582430-32582602，目標基因座為TIAM1之內引子對的序列範圍係為>chr21:32582484-32582588；目標基因座為TRAPPC10之外引子對的序列範圍係>chr21:45457611+45457826，目標基因座為TRAPPC10之內引子對的序列範圍係為>chr21:45457699+45457783；目標基因座為PRDM15之外引子對的序列範圍係

>chr21:43279112-43279292，目標基因座為PRDM15之內引子對的序列範圍係為  
>chr21:43279123-43279253。

【第4項】如申請專利範圍第1項所述之篩檢平台，該目標基因座為第18條染色體內部的基因序列，其目標基因座係選自MBD1、ZNF236以及CTDP1，其中，目標基因座為MBD1之外引子對的序列範圍係>chr18:47800159-47800294，目標基因座為MBD1之內引子對的序列範圍係為>chr18:47800188-47800275；目標基因座為ZNF236之外引子對的序列範圍係>chr18:74592149+74592311，目標基因座為ZNF236之內引子對的序列範圍係為>chr18:74592157+74592265；目標基因座為CTDP1之外引子對的序列範圍係>chr18:77513629+77513793，目標基因座為CTDP1之內引子對的序列範圍係為>chr18:77513666+77513758。

【第5項】如申請專利範圍第1項所述之篩檢平台，該目標基因座為第13條染色體內部的基因序列，其目標基因座係選自MTMR6、PCDH8以及IPO5，其中，目標基因座為MTMR6之外引子對的序列範圍係>chr13:25823301-25823552，目標基因座為MTMR6之內引子對的序列範圍係為>chr13:25823445-25823508；目標基因座為PCDH8之外引子對的序列範圍係>chr13:53419845-53420030，目標基因座為PCDH8之內引子對的序列範圍依序係為>chr13:53419866-53419995以及>chr13:53419922-53419995；目標基因座為IPO5之外引子對的序列範圍係>chr13:98655080+98655268，目標基因座為IPO5之內引子對的序列範圍係為>chr13:98655149+98655224。

【第6項】如申請專利範圍第1項所述之篩檢平台，該目標基因座為第Y條染色體內部的基因序列，其目標基因座係選自ZFY以及KDM5D，其中，目標基因座為ZFY之外引子對的序列範圍係>chrY:2844794+2844938，目標基因座為

ZFY之內引子對的序列範圍係為>chrY:2844826+2844897；目標基因座為KDM5D之外引子對的序列範圍係>chrY:21871539-21871720，目標基因座為KDM5D之內引子對的序列範圍係為>chrY:21871564-21871641。

【第7項】如申請專利範圍第1項所述之篩檢平台，該目標基因座為第X條染色體內部的基因序列，其目標基因座係選自ZFX、HUWE1、EFNB1以及XPNPEP2，其中，目標基因座為ZFX之外引子對之序列範圍係>chrX:24226376+24226585，目標基因座為ZFX之內引子對的序列範圍係>chrX:24226424+24226508；目標基因座為HUWE1之外引子對的序列範圍係>chrX:53573627-53573781，目標基因座為HUWE1之內引子對的序列範圍係>chrX:53573688-53573767；目標基因座為EFNB1之外引子對的序列範圍係>chrX:68060064+68060217，目標基因座為EFNB1之內引子對的序列範圍係>chrX:68060099+68060172；目標基因座為XPNPEP2之外引子對的序列範圍係>chrX:128873141+128873289，目標基因座為XPNPEP2之內引子對的序列範圍係為>chrX:128873173+128873264。

【第8項】如申請專利範圍第1項所述之篩檢平台，其中，該LNA修飾核苷酸包括FAM和HEX之螢光標記，並分別接設於該該對照基因座序列探針及該目標基因座序列探針的5'端。

【第9項】如申請專利範圍第8項所述之篩檢平台，其中，該對照基因座序列探針的5'端標記HEX，且其3'端接有抑制螢光標記BHQ，該目標基因座序列探針的5'端標記FAM，且其3'端接有抑制螢光標記BHQ。

【第10項】一種用以檢測人類胚胎非整倍體之套組，包括如申請專利範圍第1至9項之任一項所述之篩檢平台。

【第11項】一種如申請專利範圍第 1 項所述之篩檢平台用以檢測人類胚胎非整倍體之方法，係包括：

第一次擴增：利用對照基因座與目標基因座之外引子對，針對胚胎細胞進行基因座序列擴增；

黏合：於前述第一次擴增後之基因座序列上同時黏合該對照基因座與目標基因座之內引子對與探針，其中，序列5' -CCTGGCCACCG-3' 之SEQ ID NO：1係為對照基因座之探針，而序列5' -GGGCAGCAGC-3' 之SEQ ID NO：2係為目標基因座之探針；

第二次擴增並釋放螢光：該對照基因座與目標基因座之內引子對於前述第一次擴增後之基因座序列上進行再次擴增，同時將原黏合於該第一次擴增後基因座序列上之探針予以破壞，並釋放螢光，使該探針之5'端螢光標記HEX與FAM分別與3'端之抑制螢光標記BHQ分離，螢光標記HEX與FAM即可發出螢光；

重複黏合、第二次擴增並釋放螢光等步驟，以作為即時定量聚合酶鏈式反應（qPCR）定量之用。

【發明圖式】

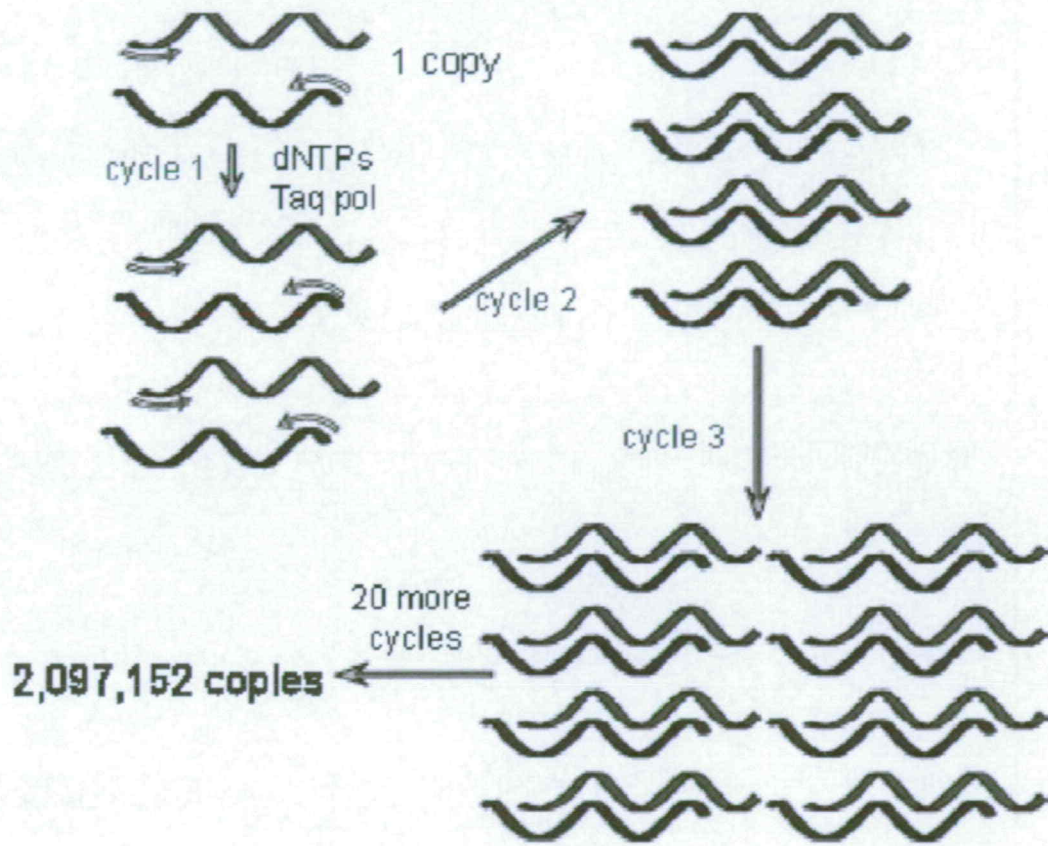


圖1A

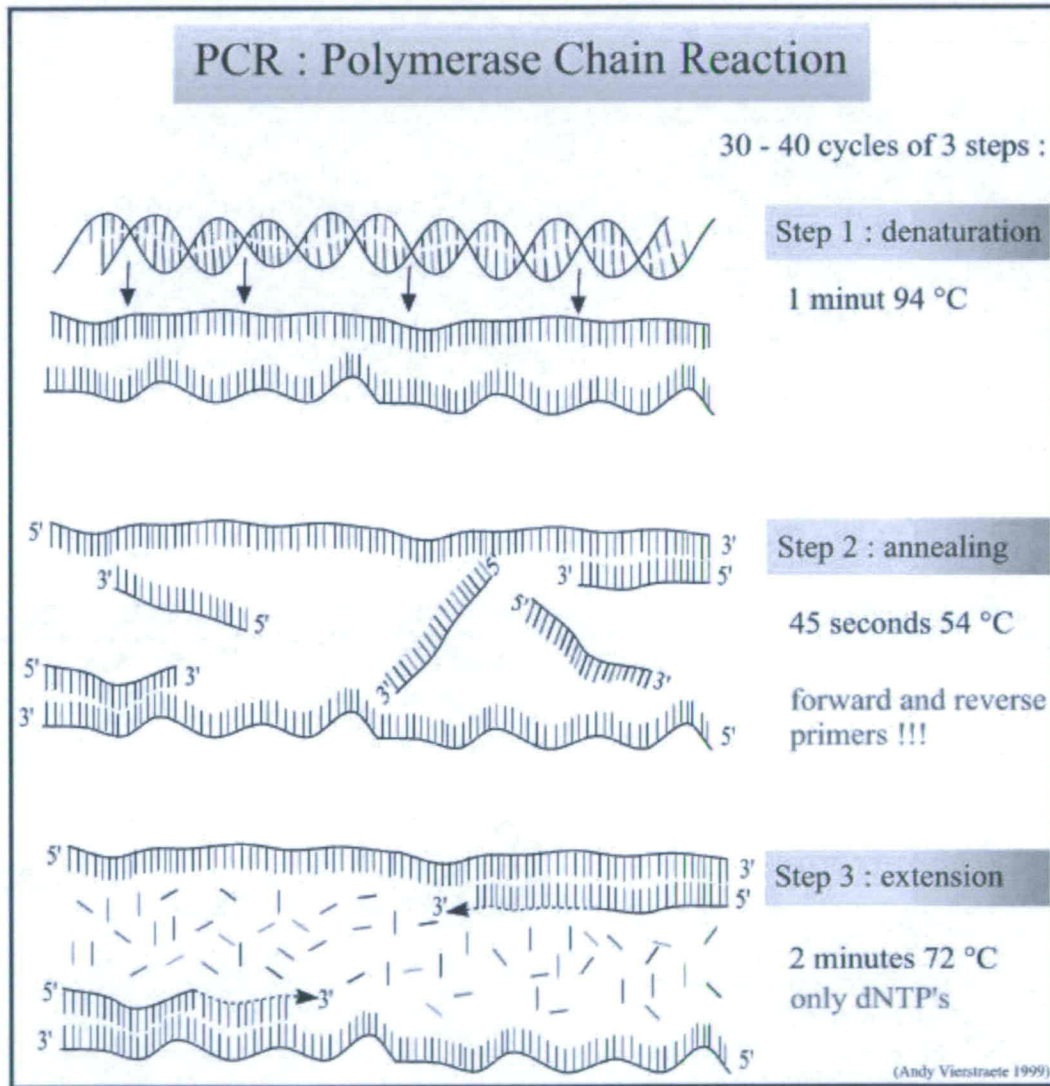


圖1B



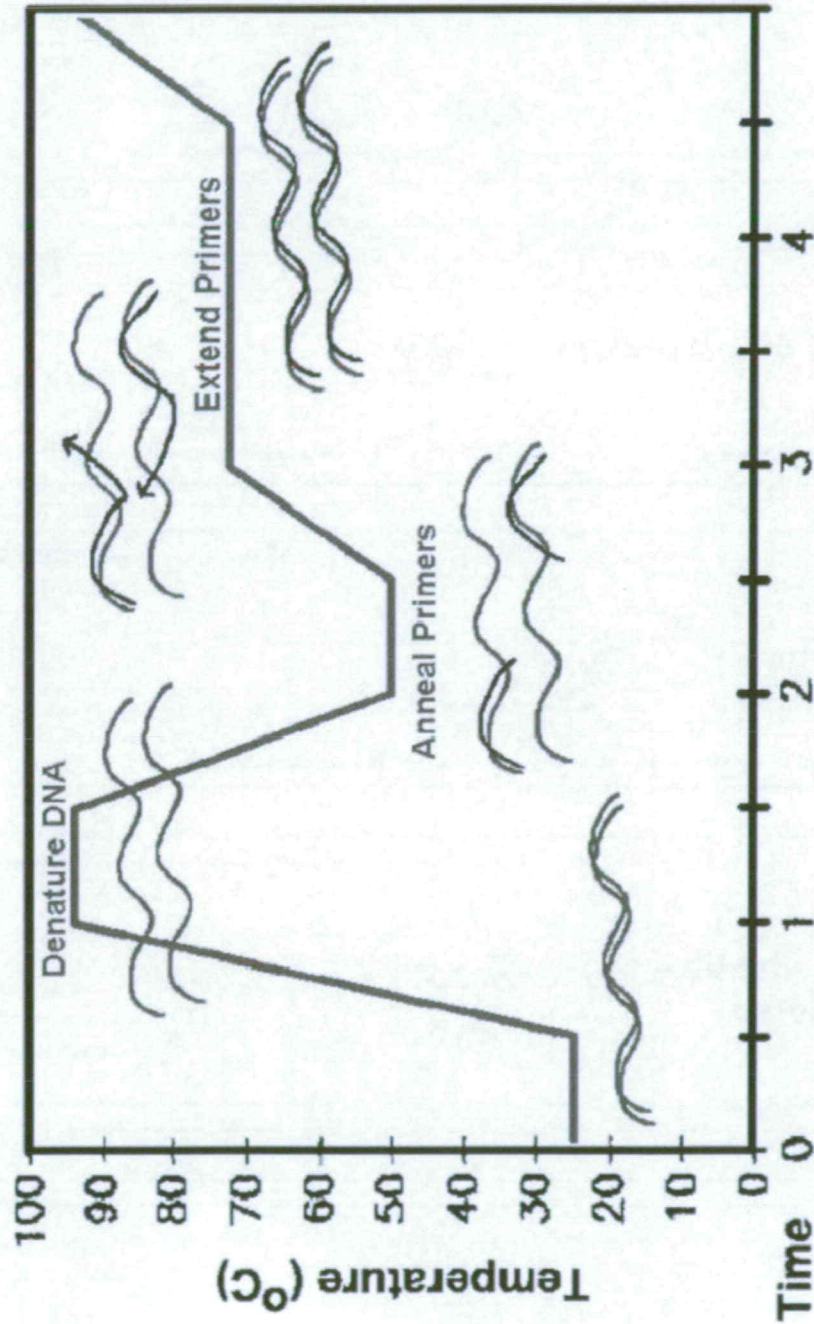


圖1C



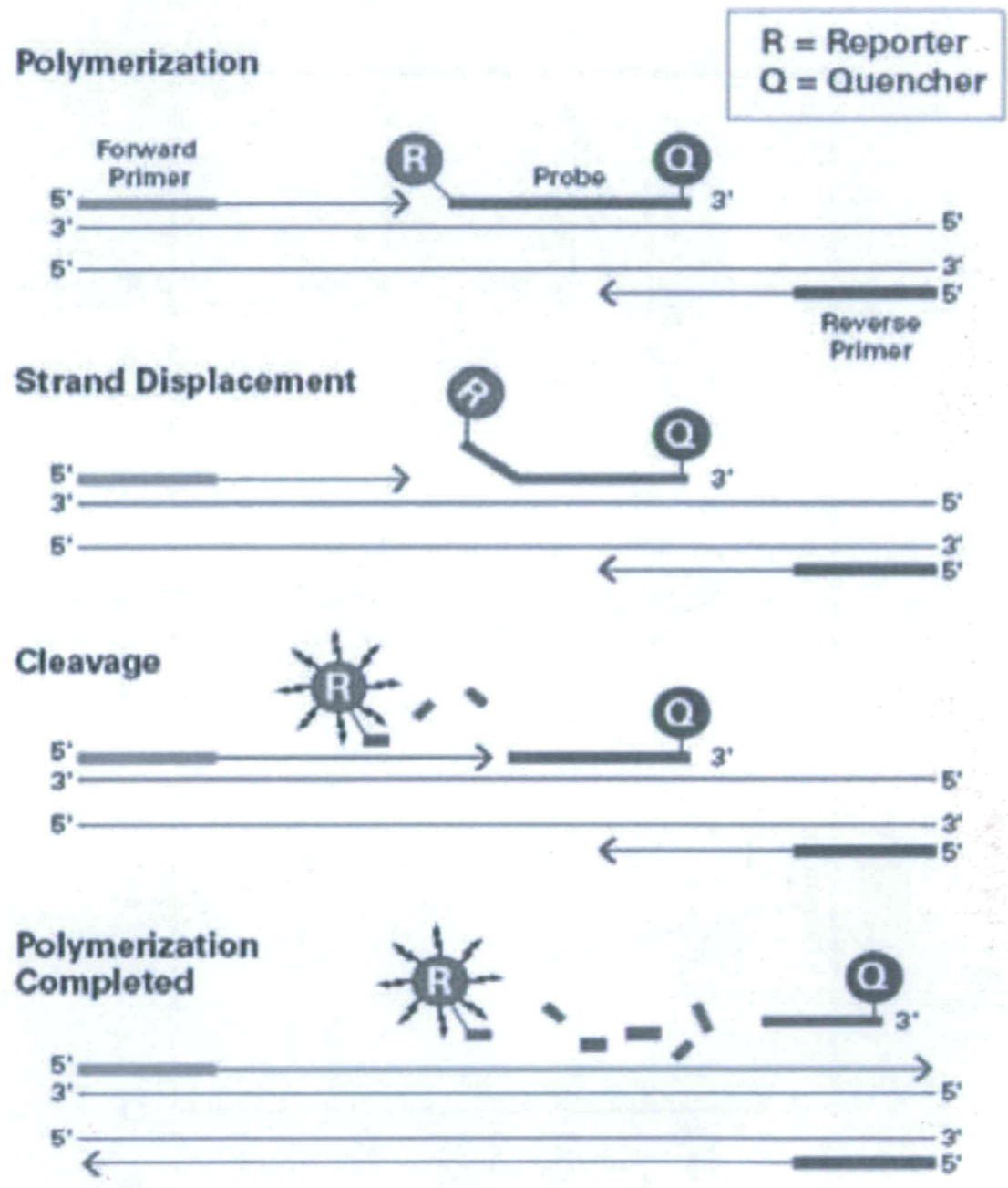


圖2