مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۶۳/هفته سوم بهمن ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۲۵

اسیدهای نوکلئیک جنینی در خون مادر برای تشخیص غیر تهاجمی پیش از تولد

میثم مصلایی[۱]، دکتر رسول صالحی[۲]

مقاله مروری

چکیده

تکنیک‌های تهاجمی تشخیص پیش از تولد مثل Chorionic villus sampling (CVS) و آمنیوسنتز دارای هزینه‌ی بالا و خطراتی برای جنین و مادر می‌باشند. مطالعات نشان داده است که اسیدهای نوکلئیک آزاد جنینی در گردش خون مادر وجود دارند. بنا بر این، آزمایش‌ها در سرتاسر دنیا به سمت تشخیص غیر تهاجمی پیش از تولد رفته و نشان داده شده است که این روش‌ها، در مقایسه با روش‌های تشخیص تهاجمی، برتری قابل توجهی از نظر اقتصادی و پزشکی دارد. نکته‌ی مهم در استفاده از اسیدهای نوکلئیک جنینی برای تشخیص پیش از تولد کیفیت قطعات DNA و Messenger RNA (mRNA) به همراه حضور اسیدهای نوکلئیک مادری می‌باشد. آنالیزهای معمول اسیدهای نوکلئیک جنینی، با استفاده از نشانگرهای اختصاصی جنینی در mRNA و DNA انجام می‌شود. این نشانگرهای اختصاصی جنینی شامل تفاوت‌های اپی‌ژنتیک موجود در سلول‌های جنین و مادری است که می‌توان از آن به عنوان نشانگر اختصاصی جنینی استفاده نمود. منبع دیگری که می‌توان آن را به عنوان نشانگر زیستی اختصاصی جنین استفاده نمود، mRNA اختصاصی جنینی می‌باشد. در این زمینه می‌توان از تکنیک‌هایی نظیر Bisulfite sequencing، Digital PCR (Digital polymerase chain reaction) و RT-MLPA (Reverse transcriptase-multiplex ligation-dependent probe amplification) استفاده نمود.

واژگان کلیدی: تشخیص غیر تهاجمی، DNA آزاد جنینی، پلاسمای مادری، آنیوپلوئیدی

ارجاع: مصلایی میثم، صالحی رسول. **اسیدهای نوکلئیک جنینی در خون مادر برای تشخیص غیر تهاجمی پیش از تولد.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۳): ۲۲۱۸-۲۲۱۳

مقدمه

تشخیص پیش از تولد به طور کلی به دو دسته‌ی تهاجمی (Invasive) و غیر تهاجمی (Noninvasive) تقسیم می‌شود. از انواع تکنیک‌های تهاجمی می‌توان به آمنیوسنتز، Chorionic villus sampling (CVS) و کوردوسنتز اشاره نمود. زمان طولانی برای دریافت جواب آزمایش تشخیصی (با امکان گذشتن زمان مناسب برای سقط درمانی) (۲-۱)، خطر سقط جنین و هزینه‌ی بالا، از معایب این روش‌ها می‌باشند (۳). روش‌های غیر تهاجمی شامل دو دسته‌ی کلی بررسی سلول‌های جنینی در خون مادر باردار و بررسی اسیدهای نوکلئیک آزاد در خون مادر می‌باشد؛ به کمک این روش‌ها، هم می‌توان تشخیص را در ماه‌های اولیه‌ی بارداری انجام داد و هم خطر سقط جنین را به صفر کاهش داد (۴). این مقاله‌ی مروری، سعی بر ارایه‌ی اطلاعات در زمینه‌ی تاریخچه، جداسازی اسیدهای نوکلئیک در خون مادر و استفاده از آن در زمینه‌های مختلف تشخیص پیش از تولد دارد.

DNA آزاد جنینی در خون مادر

اولین بار DNA جنینی موجود در خون مادر باردار، توسط Lo و همکاران تشخیص داده شد. در مطالعات آنان، با به کارگیری تکنیک PCR (Polymerase chain reaction) برای تکثیر توالی‌های اختصاصی بر روی کروموزوم Y روی DNA آزاد موجود در خون مادرانی که دارای جنین مذکر بودند، تشخیص ۸۰ درصد وجود DNA پسری در پلاسمای خون مادر و تشخیص ۷۰ درصد آن در سرم مادر انجام شد؛ پس از آن با انجام تکنیک Real time PCR روی این نمونه‌ها، حساسیت تشخیص DNA جنینی در پلاسما و سرم مادر، به ۱۰۰ درصد افزایش یافت (۶-۵). این مطالعات توسط سایر دانشمندان نیز مورد تأیید قرار گرفت (۸-۷).

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر رسول صالحی
Email: r_salehi@med.mui.ac.ir

بیولوژی DNAهای آزاد جنینی

DNAهای آزاد جنینی موجود در خون مادر در اثر آپوپتوز سلول‌های جفت به ویژه تروفوبلاست‌ها ایجاد می‌شوند (۱۰-۹). این DNAها از هفته‌ی ۵ (۱۱) یا ۷ بارداری در خون مادر قابل تشخیص می‌باشند، با افزایش سن بارداری، میزان آن افزایش می‌یابد (۶) و در تمامی زنان باردار، این DNAها وجود دارد. از آن جایی که نیمه‌ی عمر پایین این DNAها در خون مادر که حدود ۱۶ دقیقه می‌باشد و در نهایت حدود ۲ ساعت پس از زایمان به طور کلی از خون مادر حذف می‌شوند، مزاحمتی از بارداری قبلی برای بررسی‌های بارداری فعلی ایجاد نمی‌کنند (۱۲).

DNA آزاد موجود در خون از ۲ منشأ مادری و جنینی می‌باشند که میزان DNAی جنینی نسبت به کل، حدود ۶/۲-۳/۴ درصد می‌باشد (۶). با مطالعات بعدی نشان داده شد که میزان این DNAها پس از فرایندهایی مثل آمنیوسنتز، افزایش چشمگیری دارد (۱۳). طول قطعات DNA آزاد جنینی، به طور معمول کمتر از ۲۰۰ bp می‌باشد (۱۵-۱۴).

RNAهای آزاد جنینی

RNAهای آزاد جنینی موجود در خون مادر، به عنوان سومین منبع ماده‌ی ژنتیک جنینی بعد از سلول‌های جنینی و DNAهای آزاد جنینی به شمار می‌آیند. این RNAها، اولین بار توسط Poon و همکاران تشخیص داده شد. آنان با استفاده از تکنیک RT-PCR و بررسی وجود mRNA (Messenger RNA) ژن ZFY که روی کروموزوم Y قرار دارد، در مادران بارداری که دارای جنین مذکر بودند، به وجود RNA جنینی در خون مادر پی بردند. با توجه به ناپایداری و بیان متفاوت mRNAهای آزاد جنینی، این ماده‌ی ژنتیک تنها در ۲۲ درصد از زنان، در سه ماهه‌ی اول بارداری و تنها در ۶۳ درصد از زنان در سه ماهه‌ی دوم بارداری قابل تشخیص می‌باشد (۱۶).

مقدار RNA جنینی موجود در خون مادر نسبت به DNA جنینی بیشتر است و نسبت به ژن‌های مختلف و افراد مختلف، بیان متفاوت وجود دارد. همچنین، به خاطر ناپایداری و سخت بودن کار با mRNA، مشکلات تکنیکی زیادی در برابر آن وجود دارد. پایداری نسبی mRNAها در خون مادر، به دلیل پوشیده شدن آن‌ها به وسیله‌ی اجسام آپوپتوزی می‌باشد که می‌تواند آن‌ها را به طور نسبی در برابر تخریب شدن محافظت کند (۱۸-۱۷).

غنی‌سازی و بررسی اسیدهای نوکلئیک جنینی موجود در خون مادر

از آن جا که DNAهای موجود در خون مادر ترکیبی از DNA جنینی و DNA مادری می‌باشد (۶) و جنین، نیمی از DNA خود را از مادر به ارث می‌برد، پس تشخیص DNA مادری و جنینی با مشکل روبه‌رو می‌شود. پس از گرفتن نمونه، با گذر زمان به علت آپوپتوز سلول‌های خونی، میزان DNAهای مادری که مزاحم هستند، افزایش می‌یابد. پس در درجه‌ی اول، باید مانع از افزایش DNAهای آزاد مادری شد و هر چه سریع‌تر DNA را از خون مادر جدا نمود. پس از خون‌گیری، برای این که از افزایش DNAهای آزاد مادری جلوگیری شود، می‌توان از فرمالدئید به منظور افزایش استحکام دیواره‌ی سلول‌های خون مادر استفاده نمود تا از آپوپتوز و آزاد شدن DNA مادری جلوگیری گردد (۱۹).

از آن جایی که قطعات DNA جنینی نسبت به DNA مادری اندازه‌ی کوچک‌تری دارد (۱۵)، می‌توان بر اساس تفاوت اندازه‌ی DNA، آن‌ها را از یکدیگر جدا نمود (۲۰، ۱۵-۱۴). هر چند، می‌توان برای جداسازی دقیق‌تر و بهتر، ابتدا DNA جنینی و مادر را با انجام تکنیک تکثیر کلی ژنوم (Whole genome amplification)، افزایش داد و در نهایت، آن‌ها را روی ژل الکتروفورز از هم جدا نمود (۲۱).

هدف قرار دادن توالی‌های ژنتیک اختصاصی جنین

گاهی جنین دارای توالی‌هایی اختصاصی است که در مادر وجود ندارد. به عنوان مثال، وقتی جنین دارای کروموزوم Y باشد، با هدف‌گیری توالی‌های مخصوص آن و استفاده از پرایمرهای مخصوص توالی‌های موجود روی این کروموزوم، می‌توان نسبت به تعیین جنسیت جنین اقدام نمود (۲۲، ۵).

همچنین، زمانی که جنین دارای وضعیت گروه خونی Rh مخالف مادر باشد (جنین دارای RhD مثبت و مادر منفی باشد)، می‌توان با هدف قرار دادن توالی ژن RhD به وضعیت Rh جنین پی برد (۲۴-۲۲). در دنبال کردن مستقیم یک سری جهش‌های خاص که در پدر وجود دارد اما در مادر وجود ندارد نیز می‌توان، با بررسی DNAهای آزاد جنینی پی برد که «آیا جنین این نوع جهش خاص پدری را به ارث برده یا نه؟» (۲۵).

به عنوان مثالی از تشخیص پیش از تولد با ردیابی جهش‌های پدری، می‌توان به تشخیص بیماری دیستروفی میوتونی در جنین اشاره نمود (۲۶). از سوی دیگر، به طور غیر مستقیم با ردیابی کروموزوم‌های حاوی ژن بیماری توسط نشانگرهای کروموزومی که در نزدیکی ژن مورد نظر هستند، می‌توان انتقال کروموزوم حاوی ژن بیماری به جنین را تشخیص داد (۲۹-۲۷).

هدف قرار دادن توالی‌های اپی‌ژنتیک اختصاصی جنین

هدف قرار دادن توالی‌های اپی‌ژنتیک اختصاصی جنین، روشی است که می‌توان از آن برای تشخیص سندرم‌های آنیوپلوئیدی استفاده نمود.

این روش، بر پایه‌ی تفاوت الگوی متیلاسیون جنین و مادر می‌باشد (۱۶). اولین مطالعات در این زمینه، توسط Chim و همکاران بر روی پروموتور ژن maspin که روی کروموزوم ۱۸ قرار دارد، صورت گرفت. در این مطالعه، با مقایسه‌ی الگوی متیلاسیون بافت جنینی و خون مادر با روش تیمار با بیسولفیت و بررسی تفاوت متیلاسیون (با توجه به این که این توالی در جنین، هایپومتیله و در مادر به صورت هایپرمتیله می‌باشد) و نیز با سنجش نرخ آللی توالی‌های هایپومتیله و مقایسه با حالت طبیعی، به وضعیت تریزومی یا دیزمی بودن کروموزوم ۱۸ پی بردند (۳۰). حساسیت این روش ۱۰۰ و موارد مثبت کاذب (False positive) آن ۹/۷ درصد بود (۳۱).

این روش، اگر چه مستقل از جنسیت و مستقل از نشانگرهای پلی‌مورفیسمی است، اما چون تیمار با بیسولفیت سبب تخریب مقدار زیادی از DNAهای جنینی هایپومتیله می‌شود، نیاز به مقدار زیادی از DNA جنینی می‌باشد (۳۲)؛ برای حل این مشکل، می‌توان از نشانگرهای اپی‌ژنتیک استفاده نمود که در جنین، هایپرمتیله و در مادر، هایپومتیله می‌باشد. تعدادی از این نشانگرهای اپی‌ژنتیک، روی سایر کروموزوم‌ها به ویژه کروموزوم‌های ۲۱، ۱۸ و Y شناسایی شدند و از آن‌ها برای بررسی وجود سندرم‌های کروموزومی استفاده شده است (۳۳-۳۷).

از روش‌های جدیدی که می‌توان با استفاده از تفاوت الگوی متیلاسیون در جنین و مادر، در تشخیص سندرم‌های آنیوپلوئیدی از آن استفاده کرد، روش Real time PCR به همراه MeDip on chip (Methylated DNA Immunoprecipitation) می‌باشد. به این صورت که ابتدا با روش MeDip on chip، نواحی که در آن‌ها DNA جنینی هایپرمتیله و مادر هایپومتیله است، شناسایی می‌شوند. آن گاه با استفاده از روش MeDip به همراه Real time PCR، تفاوت توالی این مناطق از نظر الگوی متیلاسیون، بررسی و با حالت طبیعی آن‌ها مقایسه می‌شود و با گذاشتن یک حد آستانه‌ای (Threshold) برای آن، می‌توان به وضعیت تعدادی کروموزوم‌ها پی برد (۳۸).

هدف قرار دادن mRNAهای اختصاصی جنین

روش دیگری که می‌توان از آن برای تشخیص سندرم‌های آنیوپلوئیدی استفاده کرد، بررسی mRNAهایی است که به طور اختصاصی در جنین بیان می‌شوند؛ به طوری که با مشخص نمودن منشأ این mRNAها به کمک ردیابی آن‌ها با استفاده از نشانگرهایی مثل SNP (Single nucleotide polymorphisms) که در سطح آن‌ها وجود دارد، و مقایسه‌ی مقداری این mRNAها در حالت طبیعی و آزمایش، می‌توان به وضعیت تعدادی کروموزومی که از آن منشأ گرفته‌اند، پی برد (۳۹-۴۲). نخستین mRNAی که به این طریق مورد بررسی قرار گرفت، mRNA ژن Plac4 روی کروموزوم ۲۱ بود که توسط Lo و همکاران مورد بررسی قرار گرفت (۴۳).

سنجش نرخ mRNA بر پایه‌ی SNP، مستقل از جنسیت، اما وابسته به پلی‌مورفیسم است؛ از این رو، نیاز به SNPهایی دارد که در مادر و جنین متفاوت باشد (۱۷). از روش‌های جدیدی که با استفاده از SNPهای موجود بر روی این mRNAها، نرخ آللی آن‌ها را تشخیص می‌دهد و در تعیین وضعیت آنیوپلوئیدی استفاده دارد، می‌توان به RT-MLPA (Reverse transcriptase-multiplex ligation-dependent probe amplification) و Digital PCR اشاره کرد.

Digital PCR

این روش، بر پایه‌ی رقیق کردن نمونه‌ای است که دارای مقدار کمی از آلل مورد نظر می‌باشد. mRNA ژن Plac4 تبدیل شده به cDNA (complementary DNA)، مثالی از نمونه‌ی مورد استفاده در این روش است که رقیق‌سازی می‌شود. آن گاه، آن را در حجم‌های بسیار کم درون چاهک‌های با اندازه‌ای در حد میکرون قرار می‌دهند که در این چاهک‌ها پرایمر برای SNPهای مورد نظر و پروب‌های مخصوص برای گزارش انجام واکنش PCR وجود دارد. از آن جایی که مقدار نمونه، کم و ضریب رقیق‌سازی بالا می‌باشد، در نتیجه تعداد کمی از نسخه‌های آلل نادر مورد نظر وارد چاهک می‌شود (به طور معمول ۱ نسخه) که با شمارش چاهک‌هایی که در آن واکنش PCR صورت گرفته نسبت به کل چاهک‌ها و مقایسه‌ی آن با حالت طبیعی، می‌توان به وجود سندرم‌های آنیوپلوئیدی پی برد. مزیت Digital PCR این است که دقت و صحت نتایج آن نسبت به روش Real time PCR بالاتر است و نیاز به یک ژن شاهد داخلی برای طبیعی‌سازی اطلاعات ندارد (۴۴، ۳۹).

RT-MLPA

این روش، در واقع ترکیبی از روش‌های RT-PCR و MLPA می‌باشد. در این سیستم، ابتدا mRNA به روش RT-PCR به cDNA تبدیل می‌شود. سپس، به منظور بررسی SNPهای مختلف، از پروب‌های متفاوت استفاده می‌گردد و میزان این پروب‌ها، در صورت تکثیر شدن با حالت طبیعی مقایسه می‌شود؛ به این ترتیب، از آن برای تشخیص سندرم‌های آنیوپلوئیدی می‌توان استفاده کرد (۴۵).

نتیجه‌گیری

استفاده از اسیدهای نوکلئیک آزاد جنینی موجود در خون مادر باردار، به عنوان یک روش تشخیص غیر تهاجمی پیش از تولد است. این

روش‌ها، با توجه به نداشتن هیچ گونه خطر برای جنین و مـادر، قابلیـت استفاده از روش‌های نوینی همچون Next generation sequencing و نیز افزایش حساسیت و اختصاصیت روش‌هـای تشخیصـی تـا بـالاترین حد ممکن (۴۷-۴۶)، در آینده‌ای نه چندان دور می‌تواند بـه طـور کامـل جایگزین روش‌های تهاجمی شود و به عنوان یکی از روش‌هـای قطعـی تشخیص پیش از تولد مورد استفاده قرار گیرد.

References

1. Dey M, Sharma S, Aggarwal S. Prenatal screening methods for aneuploidies. N Am J Med Sci 2013; 5(3): 182-90.
2. Kuliev AM, Modell B, Jackson L, Simpson JL, Brambati B, Rhoads G, et al. Risk evaluation of CVS. Prenat Diagn 1993; 13(3): 197-209.
3. Bianchi DW. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review. Placenta 2004; 25(Suppl A): S93-S101.
4. Purwosunu Y, Sekizawa A, Koide K, Okazaki S, Farina A, Okai T. Clinical potential for noninvasive prenatal diagnosis through detection of fetal cells in maternal blood. Taiwan J Obstet Gynecol 2006; 45(1): 10-20.
5. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet 1997; 350(9076): 485-7.
6. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. Am J Hum Genet 1998; 62(4): 768-75.
7. Smid M, Lagona F, de Benassuti L, Ferrari A, Ferrari M, Cremonesi L. Evaluation of different approaches for fetal DNA analysis from maternal plasma and nucleated blood cells. Clin Chem 1999; 45(9): 1570-2.
8. Houfflin-Debarge V, O'Donnell H, Overton T, Bennett PR, Fisk NM. High sensitivity of fetal DNA in plasma compared to serum and nucleated cells using unnested PCR in maternal blood. Fetal Diagn Ther 2000; 15(2): 102-7.
9. Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel HM, Abdel-Fattah S, Avent N, et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. Prenat Diagn 2007; 27(5): 415-8.
10. Wataganara T, Metzenbauer M, Peter I, Johnson KL, Bianchi DW. Placental volume, as measured by 3-dimensional sonography and levels of maternal plasma cell-free fetal DNA. Am J Obstet Gynecol 2005; 193(2): 496-500.
11. Birch L, English CA, O'Donoghue K, Barigye O, Fisk NM, Keer JT. Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. Clin Chem 2005; 51(2): 312-20.
12. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. Am J Hum Genet 1999; 64(1): 218-24.
13. Samura O, Miharu N, Hyodo M, Honda H, Ohashi Y, Honda N, et al. Cell-free fetal DNA in maternal circulation after amniocentesis. Clin Chem 2003; 49(7): 1193-5.
14. Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. Clin Chem 2004; 50(1): 88-92.
15. Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. Sci Transl Med 2010; 2(61): 61ra91.
16. Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Presence of fetal RNA in maternal plasma. Clin Chem 2000; 46(11): 1832-4.
17. Go AT, van Vugt JM, Oudejans CB. Non-invasive aneuploidy detection using free fetal DNA and RNA in maternal plasma: recent progress and future possibilities. Hum Reprod Update 2011; 17(3): 372-82.
18. Bianchi DW, Maron JL, Johnson KL. Insights into fetal and neonatal development through analysis of cell-free RNA in body fluids. Early Hum Dev 2010; 86(11): 747-52.
19. Dhallan R, Au WC, Mattagajasingh S, Emche S, Bayliss P, Damewood M, et al. Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation. JAMA 2004; 291(9): 1114-9.
20. Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. Clin Chem 2004; 50(6): 1002-11.
21. Jorgez CJ, Bischoff FZ. Improving enrichment of circulating fetal DNA for genetic testing: size fractionation followed by whole gene amplification. Fetal Diagn Ther 2009; 25(3): 314-9.
22. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. BJOG 2000; 107(6): 766-9.
23. Lo YM. Noninvasive prenatal detection of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis: a review of the current state of the art. BJOG 2009; 116(2): 152-7.
24. Colin Y, Cherif-Zahar B, Le Van KC, Raynal V, van Huffel V, Cartron JP. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. Blood 1991; 78(10): 2747-52.
25. Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. Hum Reprod Update 2009; 15(1): 139-51.
26. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. Clin Chem 2000; 46(2): 301-2.

27. Tang NL, Leung TN, Zhang J, Lau TK, Lo YM. Detection of fetal-derived paternally inherited X-chromosome polymorphisms in maternal plasma. Clin Chem 1999; 45(11): 2033-5.
28. Pertl B, Sekizawa A, Samura O, Orescovic I, Rahaim PT, Bianchi DW. Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. Hum Genet 2000; 106(1): 45-9.
29. Chen CP, Chern SR, Wang W. Fetal DNA in maternal plasma: the prenatal detection of a paternally inherited fetal aneuploidy. Prenat Diagn 2000; 20(4): 355-7.
30. Chim SS, Tong YK, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LY, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(41): 14753-8.
31. Tong YK, Ding C, Chiu RW, Gerovassili A, Chim SS, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: Theoretical and empirical considerations. Clin Chem 2006; 52(12): 2194-202.
32. Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. Nucleic Acids Res 2001; 29(13): E65.
33. Chim SS, Jin S, Lee TY, Lun FM, Lee WS, Chan LY, et al. Systematic search for placental DNA-methylation markers on chromosome 21: toward a maternal plasma-based epigenetic test for fetal trisomy 21. Clin Chem 2008; 54(3): 500-11.
34. Old RW, Crea F, Puszyk W, Hulten MA. Candidate epigenetic biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome. Reprod Biomed Online 2007; 15(2): 227-35.
35. Tong YK, Jin S, Chiu RW, Ding C, Chan KC, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach. Clin Chem 2010; 56(1): 90-8.
36. Brown L, Brown G, Vacek P, Brown S. Aneuploidy detection in mixed DNA samples by methylation-sensitive amplification and microarray analysis. Clin Chem 2010; 56(5): 805-13.
37. Papageorgiou EA, Karagrigoriou A, Tsaliki E, Velissariou V, Carter NP, Patsalis PC. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. Nat Med 2011; 17(4): 510-3.
38. Patsalis PC, Tsaliki E, Koumbaris G, Karagrigoriou A, Velissariou V, Papageorgiou EA. A new non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome through epigenetic markers and real-time qPCR. Expert Opin Biol Ther 2012; 12(Suppl 1): S155-S161.
39. Lo YM, Lun FM, Chan KC, Tsui NB, Chong KC, Lau TK, et al. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104(32): 13116-21.
40. Tsui NB, Wong BC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM. Non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by RNA-SNP allelic ratio analysis using maternal plasma SERPINB2 mRNA: a feasibility study. Prenat Diagn 2009; 29(11): 1031-7.
41. Go AT, Visser A, Mulders MA, Twisk JW, Blankenstein MA, van Vugt JM, et al. C21ORF105, A chromosome 21-encoded mRNA, is not a discriminative marker gene for prediction of Down syndrome in maternal plasma. Prenat Diagn 2007; 27(2): 146-9.
42. Go AT, Visser A, Mulders MA, Blankenstein MA, van Vugt JM, Oudejans CB. 44 single-nucleotide polymorphisms expressed by placental RNA: assessment for use in noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. Clin Chem 2007; 53(12): 2223-4.
43. Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Heung MM, et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. Nat Med 2007; 13(2): 218-23.
44. Chiu RW, Cantor CR, Lo YM. Non-invasive prenatal diagnosis by single molecule counting technologies. Trends Genet 2009; 25(7): 324-31.
45. Li PQ, Zhang J, Fan JH, Zhang YZ, Hou HY. Development of noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21 by RT-MLPA with a new set of SNP markers. Arch Gynecol Obstet 2014; 289(1): 67-73.
46. Xu L, Shi R. Noninvasive prenatal diagnosis using next-generation sequencing. Gynecol Obstet Invest 2014; 77(2): 73-7.
47. Papasavva T, van Ijcken WF, Kockx CE, van den Hout MC, Kountouris P, Kythreotis L, et al. Next generation sequencing of SNPs for non-invasive prenatal diagnosis: challenges and feasibility as illustrated by an application to beta-thalassaemia. Eur J Hum Genet 2013; 21(12): 1403-10.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 22.10.2015
Vol. 33, No. 363, 3rd Week, February 2016
Accepted: 15.01.2016

Fetal Nucleic Acids in Maternal Circulation for Noninvasive Prenatal Diagnosis

Meysam Mosallayi[1], Rasoul Salehi PhD[2]

Review Article

Abstract

Invasive techniques of prenatal diagnosis such as amniocentesis and chorionic villus sampling (CVS) are expensive and associated with risks to the mother and the fetus. Studies show that cell-free nucleic acids circulate freely in maternal blood. Therefore, the experiments performed worldwide towards noninvasive prenatal diagnosis (NIPD) have demonstrated great economical and medical benefits compared to the currently used invasive prenatal diagnostic techniques. The important point of using cell-free nucleic acids in maternal plasma for prenatal diagnosis is quality of the recovered DNA and messenger RNA (mRNA) fragments in conjunction with presence of maternal nucleic acids. The current analysis of fetal nucleic acids in maternal plasma is done via using fetal specific DNA and mRNA markers. Using the fetal-specific markers includes epigenetic differences between the placenta and maternal blood cells that could be used as a fetal-specific marker and also fetal-specific mRNA in maternal plasma that provides another source of fetal specific biomarkers. Techniques such as bisulfite sequencing, digital polymerase chain reaction (Digital PCR) and reverse transcriptase-multiplex ligation-dependent probe amplification (RT-MLPA) are used in these cases, too.

Keywords: Noninvasive diagnosis, Cell-free fetal DNA, Maternal plasma, Aneuploidy

Citation: Mosallayi M, Salehi R. **Fetal Nucleic Acids in Maternal Circulation for Noninvasive Prenatal Diagnosis.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(363): 2213-8

1- MSc Student, Pediatric Inherited Diseases Research Center AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Pediatric Inherited Diseases Research Center AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Rasoul Salehi PhD, Email: r_salehi@med.mui.ac.ir