

## КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 575.1:577.1

© Коллектив авторов

### НЕИНВАЗИВНАЯ ПРЕНАТАЛЬНАЯ ПЦР ДИАГНОСТИКА ПОЛА

*В.И. Федченко, С.О. Гурьев, Н.В. Семенова*

Государственное учреждение научно-исследовательский институт  
биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, РАМН.  
119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10,  
факс: (095) 245-0857; эл. почта: valerii.fedchenko@ibmc.msk.ru

В последние годы всё большее распространение получают пренатальные методы диагностики генетических заболеваний. В классической акушерской практике при диагностике многих генетических заболеваний применяется метод биопсии ворсинок хориона или пункции околоплодной жидкости с последующим её исследованием. Одним из самых эффективных инструментов неинвазивной пренатальной диагностики оказалась полимеразная цепная реакция (ПЦР). В отличие от УЗИ-обследования ПЦР абсолютно безопасна для эмбриона и гораздо более чувствительна на ранних сроках беременности. ПЦР дала возможность выявлять мужскую ДНК плода в кровотоке матери и определять некоторые сцепленные с полом генетические заболевания. В настоящей работе мы попытались на примере определения Y-хромосомы в материнской периферической крови сравнить эффективность выявления различных маркерных участков Y-хромосомы в зависимости от сроков беременности, типа компонента крови (цельная кровь, плазма или сыворотка) и разновидности ПЦР-метода (одиночная ПЦР или гнездовая (nested)-ПЦР).

На основании сравнительного анализа последовательностей ДНК с использованием интернет-портала NCBI Blast были установлены уникальные области Y-хромосомы (локусы DYS14 и ZFY), оказавшиеся пригодными для ПЦР-идентификации мужской ДНК. Было выяснено, что наиболее предпочтительным компонентом крови для пренатальной ПЦР-идентификации является плазма. Установлен минимальный срок пренатальной идентификации пола плода по крови беременной женщины - 4-6 недельная беременность.

**Ключевые слова:** неинвазивная пренатальная диагностика, определение пола плода, материнская кровь, фетальная ДНК, гнездовая ПЦР, Y-хромосома, DYS14 и ZFY последовательности.

**ВВЕДЕНИЕ.** Выделение фетальных клеток околоплодной жидкости или биопсии ворсинок хориона с использованием ПЦР-метода позволяет быстро и надежно определять пол плода и проводить пренатальную диагностику генетических заболеваний сцепленных с полом. Так Domenes с соавт. [1] по анализу биопсии ворсинок хориона на сроке беременности 10-12 недель протестировали методом ПЦР гены, присутствующие в Y-хромосоме, которые определяли врожденную гиперплазию надпочечников и андроген нечувствительный синдром, которые являются генетическими заболеваниями, сцепленными с полом, и выявляются по цитогенетическому тесту. Авторы показали довольно высокую чувствительность и специфичность ПЦР-метода для выявления соответствующего фрагмента Y-хромосомы (из 200 образцов биопсии только для 5 был неопределенный результат).

Более перспективным представляется неинвазивный метод диагностики, не связанный с проникновением в околоплодное пространство (что может быть

травмоопасным как для плода, так и для женщины). В течение беременности циркуляция фетальных и материнских клеток разделены плацентарной мембраной. Однако плацентарный барьер не является абсолютно непроницаемым и фетальные клетки могут детектироваться в периферической крови матери [2, 3]. Методом Саузерн-гибридизации на ДНК-зонде рY3.4 было установлено, что отношение фетальной и материнской ДНК в цельной крови беременной женщины составляет 1/5000 [4]. Этот факт позволил использовать следовые количества фетальных клеток для неинвазивной молекулярной пренатальной диагностики и осуществлять диагностику пола плода, выделяя ДНК из цельной крови матери [5].

Фетальные клетки на присутствие Y-хромосомы детектируются в соотношении одна на 300 000 материнских клеток. Это было показано Lo YMD с соавт. [6] путем последовательного разведения цельной женской ДНК при детекции методом ПЦР локуса DYS14 Y-хромосомы. Некоторые авторы для более достоверной идентификации области Y-хромосомы используют препараты материнской крови, обогащенные фетальными клетками [7].

Использование трансцервикальных клеток (ТСС) для выделения фетальной ДНК и определения пола зародыша более надежно. В этом случае авторам удавалось достоверно предсказать не только пол зародыша, но и выявить некоторые генетические заболевания, сцепленные с полом (атрофию спинной мускулатуры, врожденную миотонию, трисомию хромосом) у всех обследованных женщин [8].

Позднее [9] было установлено, что в плазме периферической материнской крови присутствует и свободная от клеток фетальная ДНК. Некоторые авторы с помощью ПЦР-анализа материнской плазмы выявляли последовательности Y-хромосомы у 100% женщин находящихся на ранних сроках беременности [10].

Обнаружение специфических последовательностей ДНК Y-хромосомы [10-13] в плазме беременной женщины дает потенциальную возможность проводить пренатальную диагностику и профилактику заболеваний сцепленных с родительскими аллелями. Некоторые исследователи уделяют большое внимание анализу ДНК и материнской плазмы для пренатальной диагностики наследственного микросателлитного полиморфизма ДНК. Например, описан метод определения микросателлитного полиморфизма хромосом 13, 18 и 21 [14]. Более того, в работе [15] был продемонстрирован микросателлитный полиморфизм Y-хромосомы плода на основании анализа плазмы крови матери. Эти данные иллюстрируют потенциальную возможность пренатальной диагностики различных генетических заболеваний посредством анализа ДНК из плазмы материнской крови.

Особый интерес представляет факт обнаружения в плазме крови ДНК, происходящей из клеток различных опухолей. Это позволяет проводить детекцию онкомаркеров в крови больных [16-18].

На основании анализа процитированных выше работ можно сделать вывод, что у пренатальной диагностики с применением ПЦР большие возможности. Открываются перспективы разработки доступного и безопасного метода определения пола плода. Появляется возможность пренатального выявления генетических отклонений у плода и проведения своевременной профилактики многих наследственных заболеваний. Кроме того, открываются пути для ранней диагностики и профилактики онкологических заболеваний. Однако для достоверного тестирования необходим подбор генетических маркеров, которые позволяли бы делать надежные выводы.

В данной работе по результатам сравнения последовательностей нескольких локусов Y-хромосомы были подобраны специфические области ДНК, которые были наиболее перспективны для пренатальной диагностики пола плода. Использование таких локусов позволило установить пол плода на основании анализа периферической крови женщин на разных сроках беременности. Было проведено сравнение компонентов крови (цельная кровь, плазма или сыворотка) с

точки зрения наибольшей предпочтительности для диагностики пола и молекулярно-генетического анализа различных заболеваний.

### МЕТОДИКА.

*Выделение ДНК из крови.* Тотальную ДНК из периферической крови женщин (со сроками беременности от 4 до 12 недель или небеременных для отрицательного контроля) выделяли тремя методами. Из цельной крови ДНК выделяли фенольным методом [19] и с использованием ДНК-сорбента (Chellex 100) [20]. Из плазмы и/или сыворотки крови ДНК выделяли с использованием гуанидинтиоцианата (сильно хаотропный агент) [21, 22] и сорбентом ДНК (Celatom, Aldrich Chemical Company, Inc.). Выделение и очистку ДНК из агарозного геля проводили по методу [19].

В качестве контрольной ДНК использовали тотальную ДНК, выделенную из лимфоцитов мужской крови, с разведением до 6,6 пико г/мкл, что соответствует одной копии Y-хромосомы.

*Проведение полимеразной цепной реакции.* Для детекции специфических последовательностей Y-хромосомы методом ПЦР были использованы локусы DYS14 и ZFY. Эти локусы наиболее часто упоминаются в публикациях по пренатальной диагностике, так как обладают рядом преимуществ по сравнению с другими областями Y-хромосомы [6, 23]. Для этих локусов были выбраны внутренние и внешние праймеры:

Для локуса DYS14: внешний прямой праймер: 5'-CCAAAGGCCACGCAGC-CCGCGTGTGCC (P1f) и внешний обратный 5'-AAACACTGAGAAGGATACAA-CATTGGC (P1r). Внутренний прямой праймер 5'-GGTGGAGAGTGAGCAGGC (P2f) и внутренний обратный праймер 5'-CCGCTGCCGAGAAAAGGC (P2r).

Для локуса ZFY: внешний прямой праймер 5'-CCATGCCCCACAATTC-CAAAGGCC (P1f) и внешний обратный праймер 5'-GGTCTAG-GTGGGGCTTGCGCCTC (P1r). Внутренний прямой праймер 5'-GGAGTCGGC-CTGGGTGC (P2f) и внутренний обратный 5'-GGTCATGGGCCCAGGGC (P2r).

Гнездовую (nested) ПЦР проводили следующим способом. Первый этап ПЦР проводили в 20 мкл смеси следующего состава: ПЦР-буфер (67 мМ Трис-HCl (pH 8.8) 16,6 мМ сульфата аммония, 0,02% твин-20), 20 мкМ dNTP, 25 мкМ MgCl<sub>2</sub>, 20 пМ (P1f) и 20 пМ (P1r) праймеров, 2 ед. Taq-полимеразы и 2 мкл ДНК анализируемой пробы. Амплификация включала 1 цикл - 3 мин при 94°C, с последующими 30 циклами - 10 сек при 94°C, 15 сек при 60°C и 10 сек. при 72°C, 10 сек, затем 1 цикл 3 мин при 72°C. На втором этапе ПЦР смесь содержала те же компоненты, что и на первом, за исключением праймеров: (P2f) и (P2r) в аналогичных концентрациях и ДНК матрицы, в качестве которой брали 1 мкл амплификационной смеси после первого этапа ПЦР. Условия амплификации те же, что и на первом этапе, за исключением количества циклов, которые уменьшались до 22-24.

*Анализ продуктов амплификации.* Продукт амплификации анализировали в 2% агарозном геле в Трис-боратном-ЭДТА (ТБЕ)-буфере [19]. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 10-15 в/см в течение 20-30 мин. Гель окрашивали 1% раствором бромистого этидия и визуализировали в УФ. Ампликоны, соответствующие специфическому фрагменту Y-хромосомы, имели подвижность после первого этапа амплификации – для локуса DYS14 650 п.о. и для локуса ZFY 520 п.о.; после второго этапа амплификации – для локуса DYS14 250 п.о. и для локуса ZFY 210 п.о.

В качестве внутреннего контроля амплификации был использован фрагмент ДНК размером 173 п.о. из мульткопийного локуса, локализованного в клоне X55926 Alu элемента C3N4 (согласно базе данных NCBI). Прямой праймер имел последовательность - 5'-GGCCGAGGCGGGCGGATCAC обратный - 5'-CTCCGC-STCCCGGGTTTC.

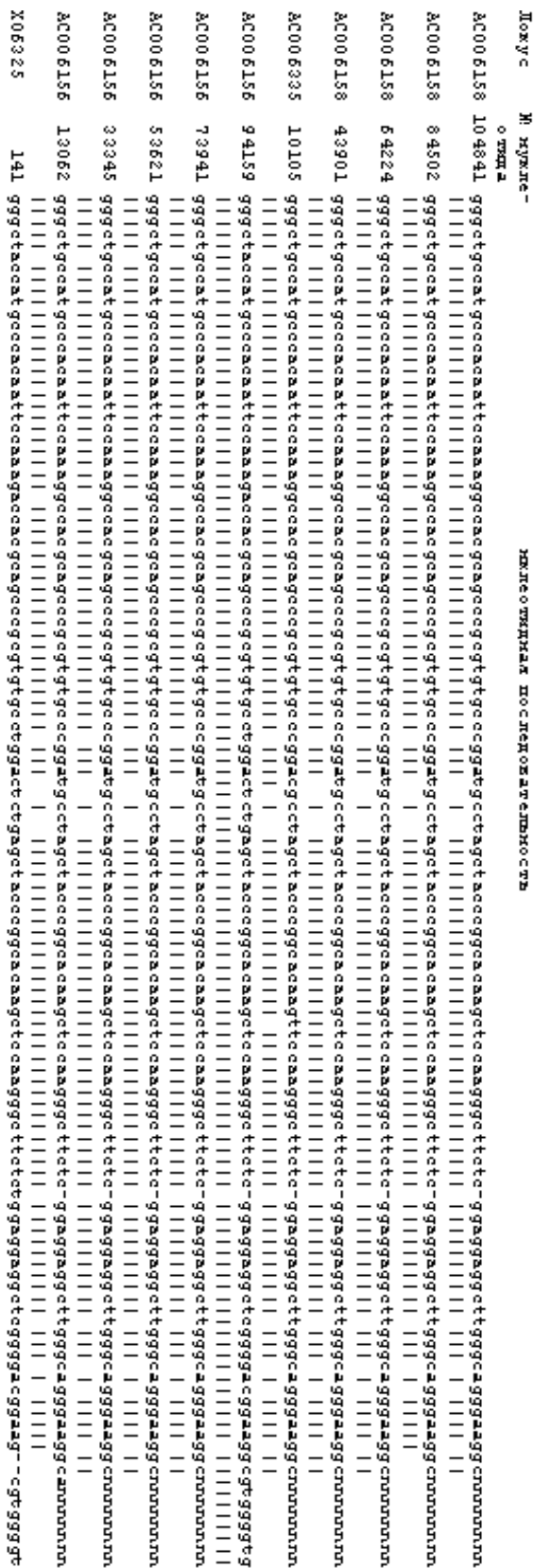
В качестве маркера молекулярного веса (ММВ) использовали псевдоаллельный ММВ для локуса VNTR D17S5, применяемый в геномной дактилоскопии и синтезированный нами ранее [24].

*Секвенирование ДНК.* Секвенирование выделенных фрагментов ДНК проводили дидезокси методом с использованием Taq-полимеразы на автоматическом секвенаторе модели ABI310A (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) производства Applied Biosystems

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** При амплификации локуса DYS14 было обнаружено, что ампликоны данного локуса для разных образцов ДНК имели инвариантные размеры. Ампликон, имевший наиболее сильный и часто встречающийся сигнал для различных образцов ДНК, был изолирован из агарозного геля и подвергнут секвенированию. После определения его первичной структуры и сравнительного компьютерного анализа с вариабельными повторяющимися последовательностями (ПП) клонов X06325, AC006156, AC006335 и AC006158 выяснилось, что выбранный первоначально участок локуса DYS14 имеет высокую степень гомологии с другими (около 20 копий) ПП Y-хромосомы, что и объясняло наблюдаемую вырожденность размеров продуктов амплификации (см. рис. 1 на стр. 531).

На основании компьютерного анализа, в мультикопийных участках локуса DYS14 размером около 900 п.о., были выявлены наиболее специфические последовательности ДНК, для которых были подобраны внешние и внутренние праймеры (P1-2f и P1-2r). Амплификация, с подобранными таким образом праймерами локуса DYS14 на различных образцах ДНК, выделенной из цельной крови и плазмы беременных женщин, давала удовлетворительный результат (см. рис.2 дорожки 6-8). На рисунке 2 также видно, что интенсивность полос ампликонов как для локуса ZFY, так и для DYS14 полученных на матрице ДНК, выделенной из плазмы и/или сыворотки крови женщины беременной мальчиком (дорожки 4 и 6), значительно выше интенсивности полос ампликонов полученной на матрице ДНК, выделенной из цельной крови этой же женщины (дорожки 3, 7 и 8). Интенсивности ампликонов от контрольной ДНК (дорожка 1 и 9) соответствует интенсивности ампликонов от ДНК полученной из плазмы и/или сыворотки крови женщины беременной мальчиком (дорожки 4 и 6). Это свидетельствует о том, что количество фетальной ДНК, по отношению к материнской ДНК, в плазме и/или сыворотки крови значительно выше, чем в цельной крови. Следует отметить, что концентрация фетальной ДНК в материнской плазме крови увеличивается в течении беременности и достигает максимума во время родов [10]. На рисунке 2 также заметно, что интенсивность ампликонов для локуса DYS14 (дорожка 6) превышает интенсивность ампликонов локуса ZFY (дорожка 4) и интенсивности ампликонов контрольной ДНК матрицы (дорожки 1 и 9), что свидетельствует о большей копийности локуса DYS14 по отношению к локусу ZFY.

Чтобы оценить минимальный срок беременности, начиная с которого можно надежно определить пол плода, нами были собраны 140 образцов крови беременных женщин со сроком беременности от 4 до 12 недель. Из них 57 образцов от женщин со сроком беременности от 4 до 6 недель, 44 - от 7 до 9 недель и 39 - от 10 до 12 недель. В отобранных образцах крови была выделена ДНК из цельной крови. Все образцы ДНК были проанализированы двухстадийным ПЦР-методом (nested) по двум локусам DYS14 и ZFY на присутствие Y-положительного сигнала (см. табл. 1). Наличие этого сигнала выявляли электрофоретически в 2% агарозном геле по присутствию ампликонов размером 250 и 210 п.о. Из таблицы видно, что положительный результат по выявлению Y положительного сигнала увеличивается в зависимости от срока беременности женщины и на сроке беременности от 10 до 12 недель составляет 100% как для локуса DYS14, так и ZFY. Менее чувствительный результат получается при сроке беременности от 4 до 6 недель и составляет 87–80%, соответственно для локусов DYS14 и ZFY. При сроке беременности от 7 до 9 недель чувствительность метода увеличивается и достигает 96–92%, соответственно для локусов DYS14 и ZFY. Следовательно, определение пола плода с использованием матрицы ДНК полученной из цельной крови можно проводить с определенной долей вероятности на сроках

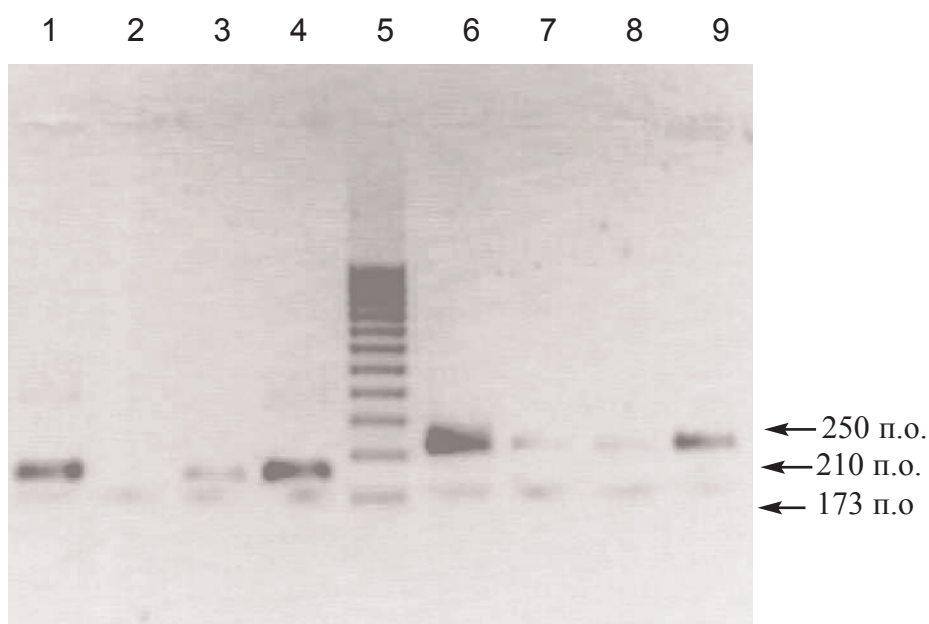


### Рисунок 1.

Сравнительный анализ вариабельной области повторяющихся последовательностей локуса DYS14 в клонах X06325, AC006156, AC006335 и AC006158 полученной при использовании интернет-портала NCBI Blast. Чёрточками отмечены идентичные основания.



беременности от 7 до 9 недель. Следует отметить, что чувствительность метода для локуса DYS14 несколько выше по отношению к локусу ZFY. Пренатальной диагностике пола плода в зависимости от срока беременности женщины на примере тестирования гена ZFY посвящены ряд работ [26-28]. В одной из них [26] было изучено 66 образцов венозной крови от беременных женщин. Пол плода был определен в 56 случаях, 33 мужской пол и 23 женский пол, в 7 случаях пол не был определен. Как и в нашем случае, этот метод для определения пола плода имеет “предсказательный” характер, т.е. может быть использован с некоторой долей вероятности.



**Рисунок 2.**

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации локусов ZFY и DYS14 в 2% агарозном геле.

1-4 – ампликоны полученные после второго тура амплификации (праймеры P2f и P2r) локуса ZFY.  
6-9 – ампликоны полученные после второго тура амплификации (праймеры P2f и P2r) локуса DYS14.

2 – анализ ДНК выделенной из плазмы крови женщины беременной девочкой (отсутствие фрагмента ДНК в 210 п.о.).

3, 7 и 8 – анализ ДНК выделенной из цельной крови женщины беременной мальчиком (фрагменты ДНК в 210 и 250 п.о.).

4 и 6 – анализ ДНК выделенной из плазмы крови женщины беременной мальчиком (фрагменты ДНК 210 и 250 п.о.).

1 и 9 – контрольная ДНК с концентрацией 6,6 пико/мкл полученная из лимфоцитов мужской крови.

5 – ММВ размерами 170, 240, 310, 380, 450, 520, 590, 660, 730, 800, 870 и 940 п.о..

173 п.о. – внутренний контроль амплификации.

Вторая серия опытов была проведена с образцами ДНК выделенной из плазмы крови беременных женщин. В этом случае были изучены 80 образцов крови беременных женщин со сроком беременности от 4 до 12 недель. Среди которых 47 образцов от женщин со сроком беременности от 4 до 6 недель, 19 - от 7 до 9 недель и 14 - от 10 до 12 недель. Результаты анализа, представленные в таблице 2, показывают, что положительный результат по выявлению Y-положительного сигнала является стабильным и не зависит от срока беременности женщины и составляет 100% как для локуса DYS14, так и локуса ZFY. Эти результаты свидетельствуют, что отсутствует зависимость различий между выбранными нами локусами (DYS14 и ZFY) в определении Y-хромосомо-специфичной ДНК в плазме и/или сыворотке беременной женщины от срока беременности.

## ПРЕНАТАЛЬНАЯ ПЦР ДИАГНОСТИКА ПОЛА

*Таблица 1.* Результаты двухстадийного (nested) ПЦР анализа 140 образцов ДНК из цельной крови по локусам DYS14 и ZFY в сравнении с фактическим полом ребенка после рождения ребенка и/или по результату УЗИ-диагностики.

	Анализ образцов ДНК по локусам: DYS14 - ZFY			Пол после рождения ребенка и/или по УЗИ диагностике		
Образцы ДНК от 80 беременных женщин с различным сроком беременности	47 образцов 4 - 6 недель	19 образцов 7 - 9 недель	14 образцов 10 - 12 недель	47 образцов 4 - 6 недель	19 образцов 7 - 9 недель	14 образцов 10 - 12 недель
Женский пол (n = 32)	20 - 20	7 - 7	5 - 5	20	7	5
Мужской пол (n = 48)	27 - 27	12 - 12	9 - 9	27	12	9

*Таблица 2.* Результаты двухстадийного (nested) ПЦР анализа 80 образцов ДНК выделенной из плазмы крови по локусам DYS14 и ZFY в сравнении с фактическим полом ребенка после рождения и/или по результату УЗИ-диагностики.

	Анализ образцов ДНК по локусам: DYS14 - ZFY			Пол после рождения ребенка и/или по УЗИ-диагностике		
Образцы ДНК от 140 беременных женщин с различным сроком беременности	57 образцов 4 - 6 недель	44 образцов 7 - 9 недель	39 образцов 10 - 12 недель	57 образцов 4 - 6 недель	44 образцов 7 - 9 недель	39 образцов 10 - 12 недель
Женский пол (n = 64)	30 - 32	19 - 20	15 - 15	26	18	15
Мужской пол (n = 76)	27 - 25	25 - 24	24 - 24	31	26	24

В работе Yatama MK с соавторами [28] также определяли наличие Y-хромосома-специфичной ДНК, содержащейся в плазме беременной женщины. В результате анализа 80 образцов от женщин со сроком беременности от 7 до 40 недель методом nested ПЦР было обнаружено, что 55 женщин были беременны мальчиком, а 25 – девочкой.

Следовательно, наличие высокой концентрации свободной (не связанной с клетками) фетальной ДНК в плазме и/или сыворотке беременной женщины, как было показано Lo Y.M. с соавторами [3], может быть использовано с высокой степенью достоверности при определении пола плода, а так же для других генетических заболеваний сцепленных с полом. Например, использование количественного метода амплификации ДНК (Real-time PCR) позволяет выявлять кариотип плода (трисомию) [14, 15], делеции и вставки в гене и другие генетические заболевания плода [10, 12, 13].

Коллектив авторов выражает глубокую признательность профессору, зав. лаб. биохимии аминов и циклических нуклеотидов ГУ НИИ БМХ РАМН Медведеву А.Е. за ценные советы и критические замечания в процессе работы и написания статьи. Также авторы выражают благодарность Калошину А.А. за предоставления образцов крови беременных женщин.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Domenice S., Billerbeck A.E., Rocha R.O., Nishi M.Y., Medeiros M.A., Bachega T.A., Budunki V., Mendonca B.B.* (1998) *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao. Paulo*, **53**, (2), 80-82.
2. *Walknowska J., Conte F.A., Grumbach M.M.* (1969) *Lancet*, **1**, 119-122.
3. *Lo Y.M.D., Patel P., Wainscoat J.S., Sampietro M., Gillmer M.D.G., Fleming K.A.* (1989) *Lancet*, **2**, 1363-1365.
4. *Ganshirt-Ahlert D., Pohlschmidt M., Gal A., Miny P., Horst J., Holzgreve W.* (1990). *Clin. Genet.* **38**, 38-43.
5. *Bianchi D.W.* (1999) *Br. J. Haematol.*, **105**, 574-583
6. *Lo Y.M.D., Patel P., Baigent C.N., Gillmer M.D., Chamberlain P., Travi M., Sampietro M., Wainscoat J.S.* (1993) *Hum. Genet.*, **90**(5), 483-488.
7. *Rodriguez De Alba M., Palomino P., Jurado A., Sanz R., Ibanez M.A., Fernandez-Moya J.M.* (1999) *Prenat. Diagn.*, **19**(10), 934-940
8. *Massari A., Novelli G., Colosimo A., Sangiuolo F., Palka G., Calabrese G., Camurri L., Ghirardini G., Milani G., Giorlandino C., Gazzanelli G., Malatesta M., Romanini C., Dallapiccola B.* (1996) *Hum. Genet.*, **97**(2), 150-155
9. *Lo Y.M., Corbetta N., Chamberlain P.F., Rai V., Sargent I.L., Redman C.W., et. al.* (1997) *Lancet*, **350**, 485-4877
10. *Lo Y.M.D., Tein M.S.C., Lau T.K., Haines C.J., Leung T.N., Poon P.M.K., et. al.* (1998) *Am. J. Hum. Genet.*, **62**, 768-775
11. *Smid M., Lagona F., de Benassuti L., Ferrari A., Ferrari M., Cremonesi L.* (1999) *Clin. Chem.*, **45**, 1570-1572.
12. *Houfflin-Debarge V., O'Donnell H., Overton T., Bennett P.R., Fisk N.M.* (2000) *Fetal. Diagn. Ther.*, **15**, 102-107.
13. *Zhong X.Y., Holzgreve W., Hahn S.* (2000) *B.J.O.G.*, **107**, 766-769.
14. *Pertl B., Sikizawa A., Samura O., Orescovic I., Rahaim P.T., Bianchi D.W.* (2000) *Hum. Genet.*, **106**, 45-49
15. *Tang N.L.S., Leung T.N., Zhang J., Lau T.K., Lo Y.M.D.* (1999) *Clin. Chem.*, **45**, 2033-2035.
16. *Wong I.H.N., Lo Y.M.D., Zhang J., Liew C.T., Ng M.H.L., Wong N., et. al.* (1999) *Cancer Res.* **59**, 71-73.
17. *Anker P., Lefort F., Vasioukhin V., Lyautey J., Lederrey C., Chen X.Q., et. al.* (1997) *Gastroenterology*, **112**, 1114-1120.
18. *Strickland S., Richards W.G.* (1992) *Cell*, **71**, 355-357.
19. *Maniatis T., Fritach E.F. and Sambrook* (1993) *J. Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
20. *Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R.* (1991) *BioTechniques* **10**, 506-513.
21. *Cox R.A.* (1968) *Methods. Enzymol.*, **12B**, 120
22. *Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J.* (1990) *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 495-503.
23. *Lau Y.F., Chan K.M.* (1989) *An. J. Hum. Genet.*, **45**(6), 942-952
24. *Федченко В.И., Гурьев С.О., Калошин А.А.* (2004) *Биомедицинская химия*, **50** (2) 211-216.
25. *Zhao X.X., Suzumori N., Ozaki Y., Sato T., Suzumori K.* (2004) *Gynecol. Obstet Invest.* **58**(1), 57-60.
26. *Ayuso C., Diaz-Recasens J., Lahoz C., Ramos C.* (1999) *Prenat. Diagn.*, **19** (10), 934-940
27. *Kao S.M., Tang G.C., Hsieh T.T., Young K.C., Wang H.C., Pao C.C.* (1992) *Am. J. Obstet Gynecol.*, **166** (3), 1013-1019.
28. *Yatama M.K., Mustafa A.S., Ali S., Abraham S., Khan Z., Khaja N.* (2001) *Prenat Diagn.*, **21**(5), 399-402.

Поступила: 27. 04. 2005



## NONINVASIVE PRENATAL GENDER DETERMINATION BY MEANS OF PCR

*V.I. Fedchenko, S.O. Guriev, N.V. Semenova*

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul, 10, Moscow, 119121 Russia; fax: (095) 245-08-57, e-mail: Valerii.Fedchenko@ibmc.msk.ru

Prenatal diagnostics of genetic diseases becomes more and more popular. Classic obstetric approach for diagnostics of numerous genetic diseases employs biopsy or amniotic liquid analyses. Good evidence now exists that polymerase chain reaction (PCR) is one of the most powerful tools of prenatal diagnostics. In contrast to ultrasound investigation PCR is absolutely safe for an embryo and is much more sensitive at early stage of gestation. PCR analysis can recognize male fetal DNA in mother blood and detect some gender-related genetic diseases. Using detection of Y-chromosome in peripheral blood we have analyzed a diagnostic value of some markers sites of Y-chromosome during gestation, type of blood sample (whole blood, plasma or serum) and variations of the PCR-method (single-step PCR or nested PCR). Comparative analysis of DNA sequences using NCBI Blast we have found Y-chromosome sites (loci DYS14 and ZFY) suitable for PCR identification of male DNA. Blood plasma is the most optimal blood sample for PCR prenatal gender determination. Prenatal gender determination by PCR can be diagnosed at 4-6 weeks gestation.

**Key words:** non-invasive prenatal diagnostics, fetal DNA, nested PCR, Y-chromosome, DYS14 and ZFY sequences.