

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-500020

(P2004-500020A)

(43) 公表日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 Q 1/68  
 G O 1 N 33/53  
 G O 1 N 37/00  
 // C 1 2 N 15/09

F I

C 1 2 Q 1/68 A  
 G O 1 N 33/53 M  
 G O 1 N 37/00 1 O 2  
 G O 1 N 37/00 1 O 3  
 C 1 2 N 15/00 Z N A A

テーマコード (参考)

4 B O 2 4  
 4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-608800 (P2000-608800)  
 (86) (22) 出願日 平成12年3月28日 (2000.3.28)  
 (85) 翻訳文提出日 平成12年11月30日 (2000.11.30)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/008617  
 (87) 国際公開番号 W02000/058522  
 (87) 国際公開日 平成12年10月5日 (2000.10.5)  
 (31) 優先権主張番号 60/126,865  
 (32) 優先日 平成11年3月30日 (1999.3.30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 399030381  
 ナノゲン・インコーポレイテッド  
 NANOGEN, INC.  
 アメリカ合衆国92121カリフォルニア  
 州サンディエゴ、パシフィック・センター  
 ・コート10398番  
 (71) 出願人 300008988  
 アメリカ合衆国  
 アメリカ合衆国 メリーランド 2085  
 2-3804, ロックビル, エグゼキュー  
 ティブ プールバード 6011, スイ  
 ト 325, オフィス オブ テクノロジ  
 ー トランスファー, ナショナル インス  
 ティチュアツ オブ ヘルス

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 半導体マイクロチップ上の電子的ドットプロットアッセイによる一塩基多型の識別

## (57) 【要約】

シリコンマイクロチップ上の電子的回路構成を利用する一塩基多型 (SNP) 検出の迅速なアッセイが開示される。該方法は、電子的に補助されたDNAの移動、濃縮、および選択された電極 (テスト部位) への結合により、増幅されたDNAサンプルの正確な識別を提供する。テスト部位は、野生型およびミスマッチ配列を含む二重標識レポーターの内部対照を用いることにより区別されるサンプルの組織化されたアレイを構成し、SNP遺伝子型が確認される。この方法を用いて、マンノース結合蛋白質の複雑な4アレルSNPを識別する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

複数のテスト部位を有する電子的にアドレス可能なマイクロチップを用いて一塩基多型を検出する方法であって、

- i . 少なくとも 1 つの S N P を含む、目的とする少なくとも 1 つの標的核酸を含む少なくとも 1 つのサンプルを提供し；
  - i i . 任意に、前記標的を増幅反応に供して増幅生成物を形成し；
  - i i i . 前記標的または前記増幅生成物を前記マイクロチップ上の特定されたテスト部位に電子的にアドレッシングし；
  - i v . 前記標的または前記増幅生成物を前記テスト部位上に捕獲し；
  - v . S N P 特異的プローブを提供し、前記プローブを前記標的または前記増幅生成物に電子的にハイブリダイズさせてハイブリダイズした複合体を形成し；
  - v i . 前記ハイブリダイズした複合体に電子的ストリンジェンシーを実施して、前記標的または増幅生成物と前記プローブとの間に少なくとも 1 つのミスマッチを含むハイブリダイゼーション複合体を不安定化させ；そして
  - v i i . ( v i ) の電子的ストリンジェンシーの後に安定に残るハイブリダイゼーション複合体を検出する、
- の各工程を含む方法。

10

## 【請求項 2】

前記サンプルが、( 1 ) マンノース結合蛋白質、( 2 ) F c - ガンマレセプター、( 3 ) 主要組織適合遺伝子複合体、( 4 ) インターロイキン 1、( 5 ) リンホトキシン、および( 6 ) 腫瘍壊死因子 をコードする核酸からなる群より選択される、目的とする標的核酸を含む、請求項 1 記載の方法。

20

## 【請求項 3】

一塩基多型の前記検出が、目的とする核酸配列を含む多数の患者サンプルからの S N P のマルチプレックスアッセイによるものである、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 4】

前記患者サンプルが、互いに連続的な関係で提供される、請求項 3 記載の方法。

## 【請求項 5】

一塩基多型の前記検出が、1 つの患者サンプルに由来する異なる遺伝子からの多数の S N P を同時にスクリーニングする能力を含む、請求項 1 記載の方法。

30

## 【請求項 6】

前記電子的アドレッシングおよび/または前記電子的ストリンジェンシーが、種々の段階の電子的ハイブリダイゼーションおよび電子的ストリンジェンシーを実時間でモニターする能力を含み、このことによりアッセイの間に確実な制御を提供することを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 7】

前記 S N P が、目的とする標的核酸の多重アレル遺伝子複合体に由来する、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 8】

各患者サンプルについて複数のテスト部位を有する電子的にアドレス可能なマイクロチップの 1 つの捕獲部位を用いて、少なくとも 1 つの患者サンプル起源からの、目的とする標的核酸中の多数の一塩基多型を検出する方法であって、

40

- i . 目的とする前記標的核酸のそれぞれの中に少なくとも 1 つの S N P を含む少なくとも 1 つのサンプルを提供し；
- i i . 任意に前記標的核酸を増幅反応に供して増幅生成物を形成し；
- i i i . 前記標的核酸または前記増幅生成物を前記マイクロチップ上の特定されたテスト部位に電子的にアドレッシングし；
- i v . 前記標的核酸または前記増幅生成物を少なくとも 1 つのテスト部位上に捕獲し；
- v . S N P 特異的プローブを提供し、前記プローブを前記標的核酸または前記増幅生成物

50

に電子的にハイブリダイズさせてハイブリダイズした複合体を形成し；

v i . 前記ハイブリダイズした複合体上で電子的ストリンジェンシーを実施して，前記標的核酸または増幅生成物と前記プローブとの間に少なくとも1つのミスマッチを含むハイブリダイゼーション複合体を不安定化し；そして

v i i . ( v i ) の電子的ストリンジェンシーの後に安定に残るハイブリダイゼーション複合体を検出する，

の各工程を含む方法。

#### 【請求項9】

それぞれの患者サンプルについて，複数のテスト部位を有する電子的にアドレス可能なマイクロチップの少なくとも1つの捕獲部位で，多数の患者サンプル源の標的核酸中の一塩基多型を検出する方法であって，

i . 目的とする前記標的核酸のそれぞれの中に少なくとも1つのSNPを含む前記サンプルを提供し；

i i . 任意に，前記標的核酸を増幅反応に供して増幅生成物を形成し；

i i i . 前記標的核酸または前記増幅生成物を前記マイクロチップ上の特定されたテスト部位に電子的にアドレッシングし；

i v . 前記標的核酸または前記増幅生成物を少なくとも1つのテスト部位上に捕獲し；

v . SNP特異的プローブを提供し，前記プローブを前記標的核酸または前記増幅生成物に電子的にハイブリダイズさせてハイブリダイズした複合体を形成し；

v i . 前記ハイブリダイズした複合体上で電子的ストリンジェンシーを実施して前記標的核酸または増幅生成物と前記プローブとの間に少なくとも1つのミスマッチを含むハイブリダイゼーション複合体を不安定化し；そして

v i i . ( v i ) の電子的ストリンジェンシーの後に安定に残るハイブリダイゼーション複合体を検出する，

の各工程を含む方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

#### 発明の分野

本発明は，一塩基多型(SNPs)の検出に関する。より詳細には，本発明は，電子的にアドレス可能なマイクロチップを用いてSNPsを検出することに関する。

#### 【0002】

#### 背景

以下の記述は，本発明に関連する情報の概要を提供する。ここに提要される情報のいずれかが本発明に対する先行技術であると認めるものではなく，特定してまたは暗に引用される刊行物のいずれかが本発明に対する先行技術であると認めるものではない。

#### 【0003】

一塩基多型(SNPs)は，最も普通のタイプの遺伝的変種を構成する点突然変異であり，ヒトゲノム中の1000塩基対に0.5 - 10の割合で見いだされる。SNPsは，ヒトの疾患に寄与する因子であることができ，また遺伝子マーカーとして作用することもできる，安定な突然変異である。多数の遺伝子と環境との間の複雑な相互作用のため，疾患の発生および進行におけるSNPsの寄与を解明するためには，大きな集団においてSNPsを追跡することが必要である。現在，高密度アレイ，質量スペクトル，分子ビーコン，ペプチド核酸，および5'ヌクレアーゼアッセイを用いる大規模マッピングのプロジェクトにより，ヒトSNPsを同定する努力が進められている。しかし，これらの技術は，研究および臨床の状況ではまだ広く用いられていない。

#### 【0004】

SNP遺伝子型タイピングの慣用的な方法は，(1)例えばKornman et al . ( J . Clin . Peridontol . V . 24 , pp . 72 - 77 ( 1997 ) ) により記載される，PCR増幅物質のゲルに基づく配列決定，(2)例えばA . J . Jeffreys ( Cell V . 18 , pp . 1 - 10 ( 1979 ) ) により記載される，制限

10

20

30

40

50

断片長多型 (RFLP), (3) 例えば Malmgren et al. (Clin. Genet. V. 50, pp. 202 - 205 (1996)) により記載される, アレル特異的オリゴヌクレオチドプローブ (ASO) を用いるドットプロットハイブリダイゼーション, または (4) Schaffer et al. (Nat. Biotechnol. V 15, pp. 33 - 39 (1995)) により記載される, 一本鎖コンフォメーション多型 (SSCP), のいずれかによって行う。配列決定方法は, 有効ではあるが, 時間を消費し, 二次構造に起因する偽信号が生ずるかもしれない。RFLP は, 一般に, SNP 多型のサブセットのみを包含する。ASO は, 保護された熱変性工程を必要とし, SSCP は, 自動化にはあまり適合性がない。高密度オリゴヌクレオチドアレイに対する受動ハイブリダイゼーションは, SNPs の大規模遺伝子型タイピングを成し遂げた。しかし, 慣用的な DNA アレイの部位を個々に制御することができず, アレイ全体について同じプロセス工程を実施しなければならない。

10

#### 【0005】

本発明者らは, マイクロエレクトロニクスと分子生物学技術とを統合することにより, SNP 検出の技術を前進させる方法を示す。該方法においては, マイクロチップ上での電界の操作により, 指定されたテスト部位における DNA 分子の迅速な濃縮, ハイブリダイゼーション, および検出が可能である。この新規な方法は, さらに, 1塩基対ミスマッチオリゴヌクレオチドを変性するために, テスト部位において極性反転を使用し, ならびに, 多様なテスト部位の配置を使用して, 目的の遺伝子の迅速なスループットのスクリーニングのための設計の融通性を利用する。

20

#### 【0006】

##### 発明の概要

本発明は 1つのアレルまたは多重アレルの遺伝子複合体および他の SNP 含有核酸における一塩基多型 (SNPs) の検出において, バイオエレクトロニック・マイクロチップを核酸ハイブリダイゼーションとともに使用することを含む好ましい態様の, 多くの観点を提供する。これには, 核酸の同じハプロタイプ中の多数の多型部位の存在, マンノース結合蛋白質の複雑な 4 アレル SNP, Fc - ガンマレセプター, 主要組織適合遺伝子複合体, およびインターロイキン 1 の SNP タイピングが含まれるが, これらに制限されない。

#### 【0007】

別の態様においては, 本発明は, 目的とする核酸配列を含む多数の患者サンプルからの SNPs のマルチプレックスアッセイ, 例えば, オンデマンド形式で遺伝子のサブセットについて多数のサンプルの SNP 遺伝子型を迅速にタイピングする能力を含む。

30

#### 【0008】

別の態様においては, 本発明は, 一人の患者のサンプルに由来する異なる遺伝子からの多数の SNPs を同時にスクリーニングする能力を含む。

#### 【0009】

さらに別の態様においては, 本発明は, アレル特異的プローブの使用を含み, ここで, 多型識別は, 多型ヌクレオチドがアレル特異的プローブ中の 5', 中心, または 3' のいずれに存在するかにかかわらず, 同等に良好に得られる。

40

#### 【0010】

別の態様においては, 本発明の方法は, 増幅された標的核酸の 1つの鎖を標識することを含み, ここで, 標識 (ピオチンを含むが, これに限定されない) は, 増幅反応に用いる増幅プライマー中に組み込んで, 前記標的核酸を増幅する。

#### 【0011】

さらに別の態様においては, 本発明の方法は, 標識した標的増幅産物を電子的にアドレス可能なマイクロチップ上の特定のテスト部位に結合させることを含む。

#### 【0012】

さらに別の態様においては, 本発明の方法は, 電子的ハイブリダイゼーションおよび電子的ストリンジェンシーの種々の段階を実時間でモニターする能力を含み, このことにより

50

、アッセイの間に確実な制御を提供することができる。

【0013】

別の態様においては、本発明の方法は、負または正であると評点される任意のシグナルが、それぞれ正または負について観察されるMFIの強度に対して統計学的に明らかに下または上であるように、正および負のサンプルの間のシグナルの差異の程度を比較する基準を含む平均蛍光強度/秒(MFI/s)値に基づく、蛍光ハイブリダイゼーションパターン評点法を用いる。また、個々のサンプルに適用したときに、負および正のレポータープロブの結合に起因するシグナルから得られるMFI/sを比較することにより、可変性の評点基準も実施することができる。この場合、サンプル中の特定の標的にハイブリダイズするように設計された少なくとも2つの異なるレポータープロブを用いてサンプルを試験する。評点から得られる結果はまた、浸透層の性質およびその中の機能性成分の密度(例えばアビジンまたは他の結合成分の濃度)または浸透層の組成(例えばアガロースまたはヒドロゲル)にも依存する。

10

【0014】

さらに、本発明の方法は、アドレス可能なマイクロチップの、受動アレイ技術より優れた利点をさらに含む。利点としては、以下のものが挙げられる：

【0015】

a. テスト部位を個々に制御することができ、このことにより、試験の直前に試験アレイを注文に応じた配置とすることができる；  
b. 核酸分子を数秒間の時間で電子的にアドレッシング(すなわち輸送)、濃縮、およびハイブリダイズすることができる；  
c. 特定されたテスト部位において電子的ストリンジェンシーを制御することができ、このことにより、同じオープンアレイ・マイクロチップ上で無関係な分子を同時に使用することができる；  
d. 開示される方法論を、数百のテスト部位を含むアレイについて自動化装填器の使用に適用することができる；および  
e. 開示される技術を、限定された数の細胞中でのRNAの発現を分析するのに用いることができる。

20

【0016】

発明の詳細な説明

30

定義

本明細書において用いる場合、“平均蛍光強度”(MFI)とは、カメラ積分時間(camera integration time)を1秒として標準化した、目的とする領域全体にわたるピクセル計数値の平均である。値の範囲は、浸透層の構成に従って変化するであろう。

【0017】

本明細書において用いる場合、“蛍光ハイブリダイゼーション評点”とは、ストリンジェンシー後のハイブリダイゼーションパターンの名称であり、ここで評点は、浸透層およびその機能的成分の性質に従って変化するであろう基準に基づく。本発明の1つの態様においては、基準は以下のことを特定する：(1) mismatchプロブは10MFI/秒より低い；(2) 25MFI/sより低いアレルト異的レポーターは、負であると評点する；そして(3) 30MFI/sより高いレポーターは正であると評点する。この評点基準は、電子的ドットプロットアッセイを用いて一塩基多型を同定するために、どのようにシグナルパラメータを用いるかの一例であり、いかなる意味においても本発明を限定することを意図するものではない。正または負の評点の設計におけるMFI/sの大きさは、種々の基準に依存して、検出の異なるレベルについて適切に適切なレベルに定めることができる。

40

【0018】

さらに、1つのサンプルについて、多重レポーターハイブリダイゼーションの使用(または内部重複)を設計して、複製または対照サンプルとの比較によらずに、遺伝子型の決定

50

を行うことができる。

【0019】

#### 詳細な態様

本発明は、種々の観点の1つとして、多重アレル遺伝子複合体および他のSNP含有核酸中の一塩基多型(SNPs)を検出する高スループットアッセイを実施する方法を提供する。これには、電子的にアドレス可能なバイオエレクトロニック・マイクロチップを用いる、同じハプロタイプの核酸中の多数の多型部位の存在、マンノース結合蛋白質の複雑な4アレルSNP、Fc-ガンマレセプター、主要組織適合遺伝子複合体、およびインターロイキン1のSNP-タイピングが含まれるが、これらに限定されない。本明細書において説明するように、マイクロエレクトロニクスと核酸ハイブリダイゼーションとの統合により、SNP配列どうしを迅速かつ正確に識別することができる。実際、本発明の二重蛍光電子的ドットプロットアッセイは、22のブラインドMBP4アレルサンプル、およびDアレルについて増強された13のブラインドサンプルにおけるSNPsの検出に関して、100%の正確性を有することが証明された。この正確性は、新たにミスマッチオリゴヌクレオチドを使用して、電子的マイクロ環境を確認することによって得られ、その結果、ヘテロ接合体配列の正確な識別および個々のサンプル中のSNP配列を確認するcy3およびcy5標識レポーターにより与えられる内部重複が得られる。オンデマンド方式で遺伝子のサブセットについて多数のサンプルを迅速にSNP遺伝子タイピングするこの能力は、現存する方法論よる優れた顕著な利点である。

10

【0020】

さらに、核酸の移動および濃縮に半導体マイクロエレクトロニクスを使用することは、受動アレイ技術より優れたいくつかの利点を与える。利点としては以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：(1)柔軟性、すなわち、オープン・アーキテクチャおよびテスト部位を個々に制御する能力は、試験の直前に各アレイを注文に応じた配置とすることを可能とする；(2)迅速性、すなわち、電子的アドレッシングおよび電子的ハイブリダイゼーションにより、DNA分子を数時間ではなく数秒間で輸送、濃縮およびハイブリダイゼーションすることが可能となる；(3)マルチプレックス化、すなわち、電子的ストリンジェンシーを個々のテスト部位において制御する能力により、無関係な分子を同じマイクロチップ上で同時に使用することが可能となる；(4)有効性、すなわち、電子的ハイブリダイゼーションおよび電子的ストリンジェンシーを種々の段階で実時間でモニターする能力は、アッセイの間により確実な制御を提供する；(5)チップ上実験室技術、すなわち、エレクトロニクスの適用は、細胞をマイクロチップ上で直接濃縮、破壊し、核酸を濃縮/増幅する手段として誘電電気泳動(dielectrophoresis)を用いることにより、自動化して、時間を消費する重要な工程を排除する手段を提供することができる；(6)自動化、すなわち、100パッドおよび400パッド半導体チップ用の自動装填器を用いて、高スループットのパラメータを達成することができる；および(7)遺伝子発現、すなわち、本明細書に記載される技術は、少数の細胞からのRNAの発現の分析に適用することができる。

20

30

【0021】

#### 実施例1 MBPアレル検出

ヒトマンノース結合蛋白質(MBPまたはMBL2)は、先天的免疫系の重要な成分であり、病原性微生物にオプソニンを作動させることができる。MBPは、まだ多くの病原体に対する免疫を発達させていない子供においては特に重要である。MBPのいくつかのありふれた変種型のいずれかの遺伝により、免疫抑制の期間の間に増強されうる潜在性免疫的欠陥が生じる。MBP遺伝子の4つの別々のアレルが同定されている。この配列は、MBPが臨床的に意味がある可能性があり、遺伝的に複雑であるため、本発明の方法による分析の適切な標的である。

40

【0022】

本発明の方法は、Nanogen, Inc., (San Diego, CA)により製造された電子的にアドレス可能なマイクロチップを使用する。マイクロチップは、酸化シリ

50

コンウエハー上で標準的加工技術を用いて加工された。高周波スパッタリング方法を用いて、20 nmのチタンおよび100 nmの白金でウエハーを金属被覆した。標準的写真平板技術を用いて金属層をパターン形成しエッチングして電極アレイを形成した。次に、プラズマ増強化学蒸着により、ウエハー全体に酸化シリコン絶縁層を蒸着した。露出する電極直径は80  $\mu\text{m}$ であり、中心間距離は200  $\mu\text{m}$ である。ウエハーをホトレジストで被覆し、1 cm平方のチップに切断した。現在の例では、1 cm平方のチップは、5 x 5のアレイに配置された25個の微小電極を含む(図1)。各電極もしくはテスト部位は、分子をテスト部位へまたはテスト部位から移動させ濃縮するために、個々に正に、負に、または中性に帯電させることができる。

【0023】

ストレプトアビジンを含有するアガロース浸透層を用いて、電極を含有するチップ表面をコーティングし、このことにより、サンプルの生物学的材料を電極近くの苛酷な電気化学的環境から分離することができ、さらに、サンプルのピオチン化核酸を電極の上方のチップ表面に結合させることができる。

【0024】

グリオキサールアガロース(FMC Bioproducts, Rockland ME)をストレプトアビジン(5 mg/ml, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)と組み合わせて2%アガロースおよび1 mg/mlストレプトアビジン混合物とし、これを用いて浸透層コーティングを塗布した。チップをストレプトアビジン-アガロース溶液でスピンコートし、シッフ塩基結合を0.2 Mシアノホウ水素化ナトリウム/0.3 Mホウ酸ナトリウム、pH 9.0で60分間還元する。

【0025】

問題とするMBP遺伝子中の多重SNPは、遺伝子の17塩基対の領域中で生ずる。MBP遺伝子の野生型配列はアレルAと定義され、SNPアレル型は、アレルB, C, およびDと定義される。図3に示されるように、この多型領域を包含する123塩基のフラグメントは、患者のゲノム核酸サンプルから増幅して、本発明の方法において用いることができる。図2は、本発明の方法のアッセイ工程の1つの態様を示す。

【0026】

MBP遺伝子(Genbank HSMBP1A-X15954)を増幅するためのプライマーは、センス鎖プライマーがヌクレオチド配列: 5' - T G A T T G C C T G T A G C T C T C C A G G C A T - 3' (SEQ ID No: 2) からなり、逆プライマーがヌクレオチド配列: ピオチン - 5' - G G T A A A G A A T T G C A G A G A G A C G A A C A G C - 3' (SEQ ID No: 3) (すなわち、逆プライマーの5'末端はピオチン化されている) からなるように設計した。

【0027】

この実施例の方法においては、患者のゲノムDNAサンプルからPCRにより123塩基のフラグメントを増幅し、ここで、反応混合物は、100  $\mu\text{l}$  反応液中、2 - 4  $\mu\text{l}$  のDNA, 1 x PCR緩衝液II (Perkin-Elmer, Branchburg, NJ), 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 20  $\mu\text{M}$  の各プライマー, 2.0 UのAmpli Taq Gold (Perkin-Elmer), および280 nMのTaq Start Antibody (Clontech, Palo Alto, CA) を含有していた。反応混合物は、9700 サーマサイクラー (Perkin-Elmer) 中で、95 °Cで10分間、(1サイクル), 95 °Cで30秒間, 58 °Cで60秒間, および72 °Cで120秒間を35サイクル, 続いて72 °Cで12分間インキュベートするサイクルに供した。各DNAサンプルは、Qiagenカラム (Valencia, CA) により精製し、水中に再懸濁し、DNA質量ラダーコントロール (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) を用いて、ゲル電気泳動により定量した。DNAサンプルは、100 mMヒスチジン (Sigma, St. Louis, MO) 中に濃度2.5 - 10 nMで再懸濁した。

【0028】

10

20

30

40

50

サンプル（容量約40 - 400  $\mu$ l）を95 °Cで2 - 10分間熱変性し，氷上で急冷した。35  $\mu$ lのサンプルをマイクロチップに適用し，正のバイアス直流を用いて，4つの正に荷電したテスト部位のカラムに，400 nA / テスト部位，120秒間で，電子的に移動（アドレス）させた。ヒスチジン緩衝液で洗浄することにより，結合していないDNAを除去した。この工程を，各サンプルについて繰り返した。完全にアドレッシングされたアレイを処理する随意の方法は，0.5 X SSC，pH 11.5で5分間，続いて水およびヒスチジンによる十分な洗浄であり，より高いハイブリダイゼーションシグナルが得られる。アドレッシングされたアンプリコンは，あらかじめ浸透層に埋め込まれたストレプトアビジンとの相互作用により，それぞれのテスト部位に結合したままであった。

**【0029】**

次に，各テスト部位の核酸を，蛍光標識したアレル特異的レポーターオリゴヌクレオチドプローブの混合物に，電子的ハイブリダイゼーションによりハイブリダイズさせた。レポータープローブ（表1を参照）は，5'末端に結合したcy3またはcy5蛍光団（Bio Serve Biotechnologies, Laurel, MD）のいずれかを用いて合成した。電子的ハイブリダイゼーションは，野生型およびSNPのcy3およびcy5レポーター基が，100 mMヒスチジン緩衝液中でそれぞれ75 - 125 nMの範囲で再懸濁されるように，実施した。各アレル群の2つのcy3標識ミスマッチレポーターを37.5 nMで同等に混合し，緩衝液中で合わせて75 nMとした。各レポーター基（20 - 35  $\mu$ l）をマイクロチップに適用し，捕獲されたアンプリコンの列に475 nA / テスト部位で15秒間ハイブリダイズさせた。100 mMヒスチジンで洗浄することにより，過剰のレポーターを除去した。第2，第3および第4のレポーター基を同じ列方式で適用した。ハイブリダイゼーションの後，チップを20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ，20 mM トリス塩基，pH 9.5（20 / 20 緩衝液）で電子的ストリンジェンシーのために洗浄した。

**【0030】**

次に，1塩基対ミスマッチレポータープローブを，個々のテスト部位においてアンペア数を増加させ荷電極性を逆転させることにより，選択的に変性した（電子的ストリンジェンシー）。0.5  $\mu$ A / テスト部位の0.1秒間オン，0.2秒間オフのパルス電流を150サイクル（または0.1秒間オン，0.1秒間オフ，50サイクル）を各テスト部位に印加した。チップを20 / 20 緩衝液中で洗浄して，変性したレポーターを除去し，IP Labソフトウェアで画像化した。アンペア数を完了まで上げて，画像および蛍光を定量した。詳細には，0.6  $\mu$ A / テスト部位，0.7  $\mu$ A / テスト部位，0.8  $\mu$ A / テスト部位，0.9  $\mu$ A / テスト部位，および1.0  $\mu$ A / テスト部位の電流を用いた。TPMTのコードン460多型にまたがるピオチン化アンプリコンを非特異的バックグラウンド対照として用いた。各画像は，MFI / sに対して標準化し，最終的な定量のためには，各MBPテスト部位から非特異的計数を減じた。正のテスト部位は，ミスマッチ対照より高い顕著なシグナルを維持した。

**【0031】**

この実施例に示される本発明の方法は，マイクロマニピレータ6000（Micromaniplator Company, Carson City, NV）上に装着されたエポキシリングプローブカード（Cerprobe, Phoenix, AZ）によりマイクロチップへの電子的接続が形成される器機を用いた。電源（Keithley 236；Keithley Instruments, Cleveland, OH）は，その末端とリレーのアレイとの間に固定電位差または固定電流のいずれかを与えた（National Instruments, Austin, TX）。コンピュータハードウェア（Macintosh Power PC, Apple Computer, Cupertino, CA）およびIP Lab Spectrumバージョン3.1.1ソフトウェア（Signal Analytics Corporation, Vienna, VA）により，個々のアレイ位置におけるグラフィックユーザーメニュー制御が可能となった。レーザー励起は，HeNe 633 nmレーザー（8 m W output；Resea

10

20

30

40

50



rch Electro-Optics, Boulder, CO) および周波数 2 倍化ダイオードポンプ固相レーザー (5 mW 出力; Laser Compact, Moscow) により, 532 nm で行った。蛍光は, 575 nm (cy3 について) または 670 nm (cy5 について) の帯フィルターを備えた 8x 対物レンズ (口径数 0.15) により観察した (Chroma Tech, Brattleboro, VT)。蛍光シグナルをスキャンし, 電荷結合素子カメラにより集めた (Princeton Instruments, Trenton, NJ)。スキャンした画像は, IPLab Spectrum ソフトウェアにより定量した。

【0032】

表 1 に示されるように, 野生型, 特に SNP アレル配列に特異的なまたは野生型および SNP のミスマッチのレポータープローブを合成した。野生型および SNP レポーターは, cy3 (1, 1' - ビス( -カルボキシペンチル) - 3, 3, 3', 3' - テトラメチルインドカルボシアニン - 5, 5' - ジスルホネートカリウム塩ジ - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル) および cy5 (1, 1' - ビス( -カルボキシペンチル) - 3, 3, 3', 3' - テトラメチルインドジカルボシアニン - 5, 5' - ジスルホネートカリウム塩ジ - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル) の両方で標識した。cy3 で標識した野生型プローブは, cy5 で標識した野生型プローブと別に保存した。SNP プローブは同様に処理した。ただし, 野生型および SNP 標識レポーターを組み合わせて 2 種類のプローブ混合物とした。詳細には, これらの混合物もしくは群は, (1) 野生型 - cy3 / SNP - cy5, および (2) 野生型 - cy5 / SNP - cy3 であった。異なるように標識したプローブを混合することにより, 各テスト部位においてこれらを増幅した患者 DNA サンプルに同時にハイブリダイゼーションし, それぞれのハイブリダイゼーション事象を二重に記録することができる。各 SNP アレルについて, 野生型および SNP の両方の異なるミスマッチを取り込んだ 2 つの追加のレポーター・オリゴヌクレオチドプローブを作成した。これらは cy3 でのみ標識した。この実験においては, 実験の都合により任意に Cy3 を選択した。しかし, アレルを区別する目的のために, どのような標識を結合させてもよい。これらのミスマッチプローブも, 組み合わせて, cy5 で標識した真の野生型または SNP プローブのいずれかを有する同じモル濃度の 2 つの群とした ((1) 野生型 - cy5 / ミスマッチ - cy3 および (2) SNP - cy5 / ミスマッチ - cy3)。これらの追加のレポーター対により, 野生型および SNP 配列の両方が同じサンプル中に存在する場合であっても (ヘテロ接合体), マッチしたプローブ配列とミスマッチのプローブ配列との間の相互作用を比較することができる。

【0033】

【表 1】

表1

レポータープロ ーブのタイプ	レポーターの特異性	レポーター 配列
アレルAまたはD 識別	アレルA, cy3または cy5	5'caggcaaagatgggCgtgatg3' (SEQ ID No: 4)
	アレルD, cy3または cy5	5'caggcaaagatgggTgtgatg3' (SEQ ID No: 5)
	ミスマッチA, cy3	5'caggcaaagatgggAgtgatg3' (SEQ ID No: 6)
	ミスマッチD, cy3	5'caggcaaagatgggGgtgatg3' (SEQ ID No: 7)
アレルAまたはB 識別	アレルA, cy3または cy5	5'tgatgGcaccaaggGagaaaag3' (SEQ ID No: 8)
	アレルB, cy3または cy5	5'tgatgAcaccaaggGagaaaag3' (SEQ ID No: 9)
	1073位のミスマッチ AおよびB, cy3	5'tgatgTcaccaaggGagaaaag3' (SEQ ID No: 10)
	1073位のミスマッチ AおよびB, cy3	5'tgatgCcaccaaggGagaaaag3' (SEQ ID No: 11)
アレルAまたはC 識別	アレルA, cy3または cy5	5'tgatgGcaccaaggGagaaaag3' (SEQ ID No: 12)
	アレルC, cy3または cy5	5'tgatgGcaccaaggAagaaaag3' (SEQ ID No: 13)
	1082位のミスマッチ AおよびC, cy3	5'tgatgGcaccaaggTagaaaag3' (SEQ ID No: 14)
	1082位のミスマッチ AおよびC, cy3	5'tgatgGcaccaaggCagaaaag3' (SEQ ID No: 15)

10

20

30

40

50

これらのアッセイ条件を用いて、標準的配列決定技術によりあらかじめ決定された既知のMBP配列のゲノムDNAサンプルについて、ブラインド実験を行った。試験したサンプルのうち、1つの組は、4つの別々のアレルについてホモ接合体またはヘテロ接合体のいずれかであると特定されており、これを対照とした。残りのサンプル(22サンプル)の遺伝子型は未知であった。これらの22のサンプルを本発明の方法においてブラインドで試験した。さらに、第2の組の13のブラインドサンプルをDアレル部位の存在について試験した。

## 【0034】

各ブラインドアンプリコンを4つのテスト部位のカラムに電子的にアドレッシングした。すなわち、25-部位マイクロチップアレイを、4つの異なる患者サンプルおよび非特異的対照アンプリコンに適合させることができる。サンプルの各列を4つのプローブミックスの1つとハイブリダイズさせた(すなわち、(1)Acy3/Bcy5、(2)ミスマッ

チ - c y 3 / A c y 5 , ( 3 ) ミスマッチ - c y 3 / B c y 5 , および ( 4 ) B c y 3 / A c y 5 のレポーター基 ) ) 。各レポーター基は , 一塩基ミスマッチで異なる c y 3 標識および c y 5 標識 S N P アレル特異的オリゴヌクレオチド対からなるものであった。上述した M B P の A または B アレルに特異的な 4 つの c y 3 / c y 5 標識レポーター基とハイブリダイゼーションした後の , 4 つのブラインドサンプル ( N C 4 7 , N C 4 8 , N C 4 9 , および N C 5 0 ) を含有する代表的なマイクロチップの画像が図 4 A - D に示される。ミスマッチ対照 ( ミスマッチ - c y 3 ) がバックグラウンドのレベルまで除去されるまで , 電子的ストリンジェンシーを適用した ( 図 4 C ) 。

#### 【 0 0 3 5 】

3 つの可能な遺伝子型 ( A / A , A / B , および B / B ) を表す明確な蛍光パターンが図 4 A - D に描かれている。サンプル N C 4 7 ( カラム 1 ) の分析は , c y 3 画像 ( 図 4 C ) 中で第 4 のレポーター基 ( 第 4 列 ) で , および c y 5 画像 ( 図 4 D ) 中で第 1 ( 第 1 列 ) および第 3 ( 第 3 列 ) のレポーター基で , 別々のシグナルを示した。全体として , シグナルは , B アレル特異的プローブ ( 真のマッチを表す ) を含有するレポーター基のハイブリダイゼーションと一致した。電子的ストリンジェンシーは , A アレル特異的プローブからのシグナルをバックグラウンドまで減少させた。

10

#### 【 0 0 3 6 】

ブラインドサンプル N C 4 8 ( 図 4 C , カラム 2 ) は , 第 1 のレポーター基で ( 第 1 列 ) c y 3 シグナルを , 第 2 および第 4 のレポーター基で ( 第 2 列および第 4 列 ) c y 5 シグナルを示した ( 図 4 D ) 。各シグナルは , A アレル特異的レポーターのハイブリダイゼーションと相関していた。同様に , サンプル N C 4 9 を含有するカラム ( カラム 4 ) は , c y 3 画像 ( 図 4 C , 第 1 列 ) および c y 5 画像 ( 図 4 D , 第 2 列および第 4 列 ) において , A アレル特異的レポーターでシグナルを示した。図 4 C の第 2 列および第 3 列の各テスト部位から放出される蛍光は , バックグラウンドの強度まで減少していることに注目されたい。これらのテスト部位を , A および B アレル配列に関してミスマッチであることが知られているミスマッチ - c y 3 標識レポーターとハイブリダイズさせた。ミスマッチのシグナルがないことにより , S N P 識別について適当なレベルの電子的ストリンジェンシーが得られたこと , および残存するレポーターシグナルが完全なマッチを構成することが確認された。

20

#### 【 0 0 3 7 】

各パネル ( 図 4 ) におけるブラインドサンプル N C 5 0 ( カラム 5 ) の評価は , c y 3 画像 ( 図 4 C , 列 1 および 4 ) および c y 5 画像 ( 図 4 D , 列 1 - 4 ) において , A および B アレル特異的結合の両方を示した。ミスマッチ c y 3 レポーターとハイブリダイズしたテスト部位にシグナルがないことから ( 図 4 C , 列 2 - 3 ) , 電子的ストリンジェンシーの完了が確認され , N C 5 0 アンプリコン中に A および B アレル配列の両方が存在することが同定された。

30

#### 【 0 0 3 8 】

上述の画像を各サンプルから放出された蛍光の定量についてさらに識別した。電子的ハイブリダイゼーション後 , M B P レポーターの非特異的アンプリコン ( N S ) への結合は , 全 c y 5 蛍光強度の約 4 % であり , ストリンジェンシーの前の c y 3 標識レポーターの 2 倍から 4 倍高かった。N C 4 9 は , A アレルレポーター間の平均強度で B アレルおよびミスマッチレポーターより 1 0 倍より高い識別を示した ( 図 5 A および 5 B ) 。すなわち , N C 4 9 は , B 部位について , A / A ホモ接合体であると評点された。同様に , サンプル N C 4 8 は , B 部位に関して A / A ホモ接合体であると同定された ( データ示さず ) 。

40

#### 【 0 0 3 9 】

A / B であると評点されたブラインドサンプル N C 5 0 の定量化 ( 図 6 A および 6 B ) は , A および B アレル特異的 c y 3 レポーターおよび c y 5 - 標識レポーターの両方について , 捕獲されたアンプリコンに顕著なシグナルが結合したまま残ることを示した ( 約 7 0 M F I / s ) 。すなわち , N C 5 0 アンプリコンは , B 部位に関して , A / B ヘテロ接合体であると評点された。

50

## 【0040】

NC47サンプル蛍光を定量した(図7Aおよび7B)。これは、ミスマッチおよびAアレルレポーターがバックグラウンド強度まで減少したことを示す。それにもかかわらず、Bアレルレポーターでは、100MFI/sより高いシグナルが維持された。同様に、cy5画像(図7B)の分析から、Aアレルシグナルの減少(すなわち、25MFI/sより低い)およびBアレルシグナルの確かな保持(すなわち、100MFI/sより高い)が明らかとなった。すなわち、NC47は、B/Bホモ接合体であると評点された。

## 【0041】

SNPアレルに関してA/Aであると評点された患者からの異なるブラインドサンプルの分析(サンプル数=18)は、A-cy3レポーターのA/Aサンプルへの結合が、ミスマッチcy3レポーターと比較して100倍高く、BまたはCアレルcy3標識SNPレポーターの結合より26倍高いことを示した(プローブ:平均±平均の標準誤差(SEM); A-cy3:200±36.2MFI/s, SNP-cy3:7.6±1.8MFI/s, ミスマッチ-cy3:1.9±0.3MFI/s)。逆に、ヘテロ接合体と評点された7つの異なるブラインドサンプルの分析は、cy3標識AアレルおよびSNPプローブの両方ともほぼ等しい強度でサンプルに結合し、ミスマッチプローブは20倍低い強度で結合することを示した(プローブ:平均±SEM; A-cy3:188.3±44.4MFI/s, SNP-cy3:150.1±42.3MFI/s, ミスマッチ-cy3:7±2.2MFI/s)。マッチの対とミスマッチの対の同等の比率をcy5標識プローブについて記録した(データ示さず)。

## 【0042】

22のブラインドサンプルの各々を、BおよびCアレル位置で評点した。各位置のヌクレオチド配列およびA, B, およびC遺伝子型を、標準的な配列決定の結果と比較した(表2を参照)。表に示されるように、マイクロチップアッセイは、BおよびC部位における44のSNP評点のうち44で(22のA/B判定および22のA/C判定)配列決定の結果と一致した。これまでのところ、同じハプロタイプ中でBおよびCアレル配列が生じることが記載されていない。B/B遺伝子型については、ストリンジェンシーの後に、完全にマッチしたBおよびCアレルプローブのみが結合したまま残る。したがって、混成のヘテロ接合体を決定する前に、これらをBおよびCレポーターの両方について評点しなければならなかった。多数の可変部位にまたがるプローブは遺伝子型を正確に区別することができるであろうが、同じハプロタイプ中に多重の多型部位が存在することは、このようにして実施される識別を混乱させるであろう。そのような場合、各多型部位について別々のプローブ(10-24ヌクレオチド)の組が有利であろう。本明細書において示されるように、多型ヌクレオチドがアレル特異的プローブ中の5', 中心, または3'のいずれに存在しているかにかかわらず、多型識別は同等に良好に得られた。

## 【0043】

次に、この22のサンプルを、再びブラインド化し、Dアレルの存在について評点した(表2)。本発明の電子的アッセイは、22のサンプル中に存在するDアレルサンプル(NC52-A/D)のみを正確に同定した。Dアレルの出現頻度は低く、SNP識別アッセイの有効性は低頻度のアレルを同定するその能力であるため、第2の組の13のブラインドサンプル(Dアレル系の確認のために重み付けされている、サンプルLM1, LM10, LM11, LM18, LM20, LM27, LM29, LM30, LM31, およびLM32)を、Dアレルレポータープローブを用いる電子的アッセイにより試験した。Dアレルについての両方の群のサンプル(サンプル数=35)の電子的アッセイでの評点は、配列決定の結果と100%一致した。13のブラインドサンプルの10個からのマイクロチップ画像が図8Aおよび8Bに示される。

## 【0044】

## 【表2】

10

20

30

40

表2. 標準的DNA配列決定(NIH)による、ブラインドサンプルの電子的ドットプロット(NGEN)によるSNPタイピングの確認

サンプル	NGEN			遺伝子型 A, B, C, D		一致	不一致
	A/B	A/C	A/D	NGEN	NIH		
1. NC7	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
2. NC11	a/b	a/a	a/a	a/b	A/B	+	
3. NC20	a/a	a/c	a/a	a/c	A/C	+	
4. NC44	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
5. NC45	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
6. NC36	a/a	a/c	a/a	a/c	A/C	+	
7. NC37	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
8. NC38	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
9. NC40	a/b	a/a	a/a	a/b	A/B	+	
10. NC42	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
11. NC43	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
12. NC46	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
13. NC47	b/b	a/a	a/a	b/b	B/B	+	
14. NC48	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
15. NC49	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
16. NC50	a/b	a/a	a/a	a/b	A/B	+	
17. NC51	b/b	c/c	a/a	b/c	B/C	+	
18. NC52	a/a	a/a	a/d	a/d	A/D	+	
19. NC53	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
20. NC54	a/b	a/a	a/a	a/b	A/B	+	
21. NC55	a/b	a/a	a/a	a/b	A/B	+	
22. NC56	a/b	a/a	a/a	a/b	A/B	+	
						100%	0%

10

20

30

#### 実施例2 インターロイキン1 の検出

SNPを検出する本発明の適用可能性を、二アレル性インターロイキン1 (IL-1)多型についてさらに説明する。IL-1配列は、Genbank(X04500)から入手し、これは5888位にCからTへのSNP転移を含む。PCR増幅において用いるプライマー配列は、センス鎖ヌクレオチド配列、5'-AAATTTTGCCACCTCGCCTCACG-3'(SEQ ID No:16)および逆鎖ヌクレオチド配列、ピオチン-5'-AGTCCCGGAGCGTG CAGTTTCAGT-3'(SEQ ID No:17)(すなわち、逆鎖はピオチン化されている)を含有していた。

40

#### 【0045】

この実施例においては、上述したように、野生型(C)およびSNP変種(T)アレルを同定するために、cy3およびcy5標識レポーター基を設計した(合成はBioserve, Laurel, MDによる)(表3を参照)。電子的ストリンジェンシーの増加の後の蛍光の消失は、既知のホモ接合体T/Tピオチン化アンプリコンを含むテスト部位からの非-C/非-Tミスマッチ(mis-cy3)レポーターの変性を示す(図9-10)。同様に、cy3およびcy5Cアレルレポーターは、T/Tアンプリコンに対するス

50

トリンジエントなハイブリダイゼーションの証拠を示さなかった。これに対し、cy3 標識 T アレルレポーター (図 9 A) および cy5 標識レポーター (図 10 A) とのハイブリダイゼーションから 100 MFI/s より大きい、区別しうるシグナルが放出された。すなわち、配列決定技術により T/T ホモ接合体であることが知られているアンプリコンは、電子的フォーマットにより同様に T/T ホモ接合体であると評点された。一般に、cy3 および cy5 レポーターの両方について、電子的ストリンジェンシーの間の全体的シグナル強度の漸次的減少が観察された (データ示さず)。

【0046】

実施例 5 に示されるように、実験は、MBP, IL-1, および TNF のマルチプレックスサンプルから SNP 識別が得られたことを示す。ここでは、マイクロチップを電子的に剥離し、二重鎖中の第 2 の遺伝子の遺伝子型タイピングのために再プローブする。

10

【0047】

【表 3】

表 3

レポーター特異性	レポーター配列
アレル C	5'tcttcttCgacacatgggataacg3' (SEQ ID No: 18)
アレル T	5'tcttcttTgacacatgggataacg3' (SEQ ID No: 19)
ミスマッチ-A	5'tcttcttAgacacatgggataacg3' (SEQ ID No: 20)
ミスマッチ-G	5'tcttcttGgacacatgggataacg3' (SEQ ID No: 21)

20

### 実施例 3 リンホトキシン遺伝子検出

リンホトキシン遺伝子を用いて観察された SNP の検出により、本発明をさらに説明する。リンホトキシン配列は、Genbank (M16441) から入手し、これは 1069 位において A から G への SNP 転移を有していた。PCR 増幅において用いたプライマー配列は、センス鎖ヌクレオチド配列、5'-CTTCTCTGTCTCTGACTCTCCATC-3' (SEQ ID No: 22) および逆鎖ヌクレオチド配列、ピオチン-5'-CAAGGTGAGCAGAGGGAGAC-3' (SEQ ID No: 23) (すなわち逆鎖はピオチン化されている) からなる。

30

【0048】

この実施例においては、リンホトキシン遺伝子中の 1069 位に A または G の一塩基多型を含む遺伝的変異を同定するために、cy3 および cy5 レポーター基を設計した (レポーターオリゴヌクレオチドの合成は Bioserve, Laurel, MD による) (表 4 を参照)。電子的ストリンジェンシーの増加後の蛍光の消失、サンプル NC50 については既知のホモ接合体 A/A ピオチン化アンプリコンを、およびサンプル NC43 については既知のホモ接合体 G/G ピオチン化アンプリコンを含むテスト部位からの、非-A/非-G ミスマッチ (mis-cy3) のレポーターの変性を表す (図 11 A および B)。したがって、配列決定技術によりそれぞれ A/A および G/G ホモ接合体であることが知られているサンプル NC50 および NC43 からのアンプリコンは、電子的フォーマットにより、同様に、それぞれ A/A および G/G ホモ接合体であると評点された。

40

【0049】

【表 4】

表4

レポーター特異性	レポーター配列
アレルA	5'ttctgccatgAttcctctctg3' (SEQ ID No: 24)
アレルG	5'ttctgccatgGttcctctctg3' (SEQ ID No: 25)
ミスマッチーT	5'ttctgccatgTttcctctctg3' (SEQ ID No: 26)
ミスマッチー	5'ttctgccatgCttcctctctg3' (SEQ ID No: 27)

10

## 実施例4 腫瘍壊死因子検出

SNPを検出する本発明の応用を示すさらに別の例は、腫瘍壊死因子遺伝子のプロモーター中で観察された。腫瘍壊死因子ゲノムDNA配列は、Genbank(X02910)から入手し、これは308位においてGからAへのSNP転移を有していた。PCR増幅において用いたプライマー配列は、センス鎖ヌクレオチド配列、5'-GTTAGAAGGAAACAGACCACAGACC-3'(SEQ ID No: 28)および逆鎖ヌクレオチド配列、ビオチン-5'-TCCCTCCCTGCTCCGATTC-3'(SEQ ID No: 29)(すなわち、逆鎖はビオチン化されている)を含有した。

20

## 【0050】

この実施例においては、腫瘍壊死遺伝子のプロモーター中にGまたはAの一塩基多型を含む遺伝的変種を同定するために、cy3およびcy5レポーター基を設計した(レポーターオリゴヌクレオチド合成はBioserve, Laurel, MDによる)(表5を参照)。本発明の改良された形態においては、2つのレポーター基のみを用いてGまたはAのいずれかのアレルを検出する。電子的ストリンジェンシーをサンプルNC39およびNC40ならびに非特異的アンプリコンであるTPMTからのアンプリコンを含むテスト部位に適用した。電子的ストリンジェンシーは、サンプルNC39については、DNA配列決定により決定された既知のA/Gヘテロ接合体がA/Gヘテロ接合体であることを明らかにした。さらに、サンプルNC40については、DNA配列決定により決定された既知のG/Gホモ接合体がG/Gホモ接合体であることが同定された(図12A)。評点の目的で、残りの電子的にハイブリダイズしたレポーターシグナルを最大MFI/secについて標準化し、結果を非特異的対照TPMTについてのものと比較した。この実施例は、SNPの同定における本発明の適用のみならず、特定の接合体の特徴を同定するのに必要なレポーターシグナルの数を減少させるスクリーニング方法論をも示す。

30

## 【0051】

## 【表5】

表4

40

レポーター特異性	レポーター配列
アレルG	5'gcattgGggacgggggttc3' (SEQ ID No: 30)
アレルA	5' gcattgAggacgggggttc 3' (SEQ ID No: 31)

## 実施例5 マルチプレックス分析

実験はまた、TNF $\alpha$ 、MBP、およびIL-1 $\beta$ マルチプレックス化サンプルからのS

50

NP 識別を示す。ここでは、マイクロチップを電子的に剥離し、三重鎖中の次の遺伝子の遺伝子型タイピングのために再プローブした。3つのアンプリコン、すなわち、MBPA/Aホモ接合体(M)、IL-1T/Tホモ接合体(I)、およびTNFG/Gホモ接合体(T)を別々に25パッドの溶液プロセスチップ上の1:1:1三重鎖混合物(T+M+I)として捕獲負荷した(図13A)。TNF 特異的Cy3/Cy5標識レポーター基でチップを二重にハイブリダイズさせた(13B)。アレルト異的多型は、増加する電子的ストリンジェンシーを適用することにより得た(13CおよびD)。マルチプレックス中のTNFの遺伝子型を得た後、高温で(42°C)、0.5xSSC、pH11.5中で2分間洗浄することにより、電子的ストリンジェンシーを適用し、チップを標識レポーターから剥離した。次に、剥離したチップをヒスチジン中でよく洗浄し、ベースライン画像を得た(13E)。次にチップをMBPAアレルト異的Cy3/Cy5レポーターセットと再ハイブリダイズさせ(13F)、電子的ストリンジェンシーの適用により遺伝子型を得た(13GおよびH)。遺伝子型を決定したチップを電子的に剥離し(再び)、ベースライン画像を得て(13I)、IL-1アレルト異的レポーターグループをマルチプレックスにハイブリダイズさせた(13J)。電子的ストリンジェンシーにより遺伝子型が得られた(13KおよびL)。これらの結果は、電子的ドットプロットアッセイのスループットパラメータが、1つの捕獲負荷事象を必要とするパッド上の多数の遺伝子を遺伝子型タイピングする能力により増加するかもしれないことを示す。

10

#### 【0052】

上述するように、サンプルのマルチプレックス化はいくつかの方法により行うことができる。1つのフォーマットにおいては、一人の患者サンプルから得ることができる多重標的を1つのオープンレイマイクロチップ上で試験することができる。さらに、各標的を、マイクロチップ上の別々の位置に、または同じ捕獲パッド上に捕獲することができる。マルチプレックス化はまた、1つのマイクロチップアレイ上の多数の患者サンプルにも適合する。この場合、各患者の個々の標的種を、別々の捕獲部位、または各患者について部位の群または1つの部位のいずれかで、分析のために捕獲することができる。

20

#### 【0053】

上述は、本発明の態様を例示することを意図しており、いかなる意味においても本発明を限定することを意図するものではない。本発明を特定の改変に関して記述してきたが、その詳細は限定であると解釈すべきではない。本発明の精神および範囲を逸脱することなく種々の等価物、変更および改変が可能であることが明らかであろう。そのような等価の態様も本発明に含まれることが理解されるべきである。すべての刊行物および特許出願は、それぞれの個々の刊行物または出願が特異的にかつ個々に本明細書の一部としてここに引用されていることと同じ程度に、本明細書の一部としてここに引用されている。

30

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、1つのマイクロ電子のアレイ設計フォーマットの顕微鏡写真である。

【図2】図2は、電子的ドットプロットアッセイのスキームである。

【図3】図3は、野生型ヒトマンノース結合蛋白質(MBP)のセンス鎖の、ヌクレオチド1001から1158までのDNA配列(SEQ ID No:1)を示し、これはアレルAと表示される。アレルB、C、およびDのSNP塩基および位置が示される。図はまた、正(MBLF)および逆(R-1120)増幅プライマーの位置を示す(矢印)。各レポータープローブは、cy3またはcy5のいずれかで標識して合成した。

40

【図4】図4A、4B、4Cおよび4Dは、マイクロチップ上のSNP検出の結果の顕微鏡写真である。ここでは、4つの捕獲部位の各列に、4つのプラインド増幅MBPサンプル(NC47、NC48、NC49、またはNC50)の1つを負荷した。真中の第5の列には、非特異的(NS)チオプリンS-メチルトランスフェラーゼ(TPMT)アンプリコンを負荷した。図は、電子的ストリンジェンシーの前(図4Aおよび4B)および後(図4Cおよび4D)に、cy3またはcy5のいずれかで標識したアレルト異的レポータープローブのハイブリダイゼーションを示す。図4Aおよび4Cではcy3蛍光を検出したのに対し、図4Bおよび4Dではcy5蛍光を検出した。

50



【図5】図5 Aおよび5 Bは、図4のcy3画像(図5 A)およびcy5画像(図5 B)について、サンプルNC49から放出された蛍光の定量を示すグラフである。サンプルNC49は、A/Aホモ接合体であると同定された。

【図6】図6 Aおよび6 Bは、図4のcy3画像(図6 A)およびcy5画像(図6 B)について、サンプルNC50から放出された蛍光の定量を示すグラフである。サンプルNC50は、A/Bヘテロ接合体であると同定された。

【図7】図7 Aおよび7 Bは、図4のcy3画像(図7 A)およびcy5画像(図7 B)について、サンプルNC47から放出された蛍光の定量を示すグラフである。サンプルNC47は、B/Bホモ接合体であると同定された。

【図8】図8 Aおよび8 Bは、AおよびDMBPアレルを含有するサンプルについての、マイクロチップ上でのcy5検出結果を示す顕微鏡写真である。サンプルLM18はD/Dホモ接合体である。サンプルLM27はA/Dヘテロ接合体である。示される残りのサンプルはA/Aホモ接合体である。

10

【図9】図9 Aは、電子的ストリンジェンシーのアンペア数の増加に対する、アレルC、アレルT、およびミスマッチレポーター基とハイブリダイズしたIL-1 T/Tアンプリコンの、cy3標識の検出による定量を示すグラフである。図9 Bは、図9 Aに示される最後のストリンジェンシーについての検出結果を示す顕微鏡写真である。

【図10】図10 Aは、電子的ストリンジェンシーのアンペア数の増加に対する、アレルCおよびアレルT基とハイブリダイズしたIL-1 T/Tアンプリコンのcy5標識の検出による定量を示すグラフである。図10 Bは、図10 Aに示される最後のストリンジェンシーについての検出結果を示す顕微鏡写真である。

20

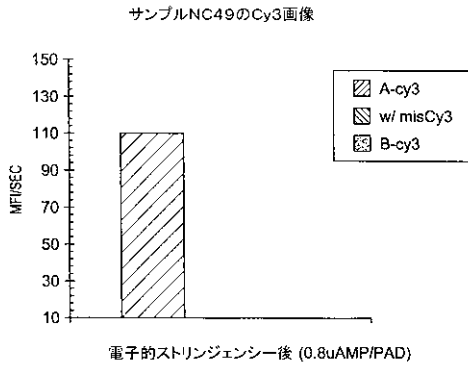
【図11】図11 AおよびBは、それぞれリンホトキシン遺伝子のA/AおよびG/Gホモ接合体を有するプローブの正および負のシグナルを示す棒グラフである。

【図12】図12 AおよびBは、腫瘍壊死因子 遺伝子中の標的を有するプローブの正、負および対照シグナルを示す棒グラフである

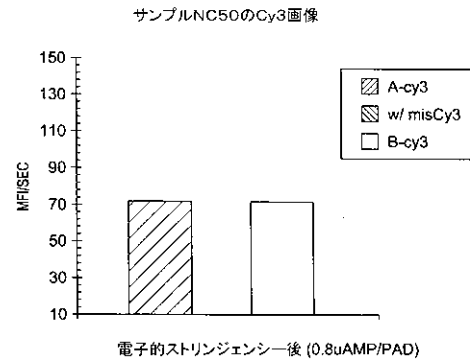
【図13】図13 A-Lは、マルチプレックス分析に関する本発明を説明するマイクロアレイの一連の写真を示す。



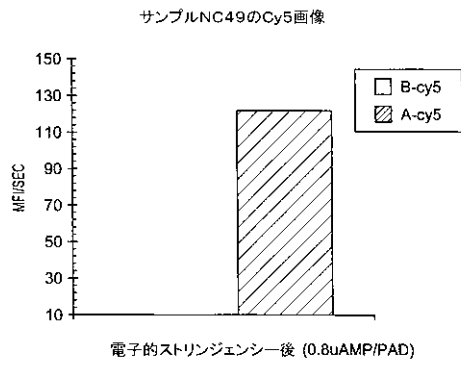
【 図 5 A 】



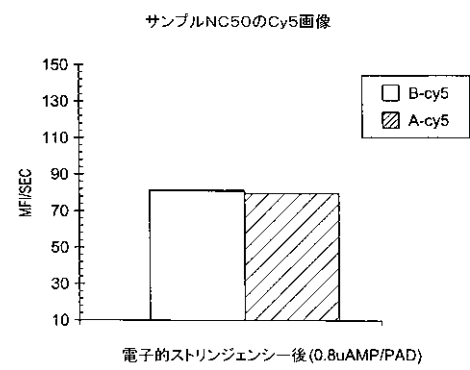
【 図 6 A 】



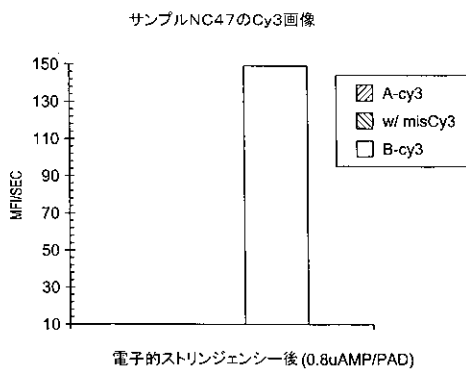
【 図 5 B 】



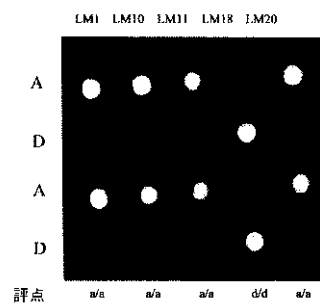
【 図 6 B 】



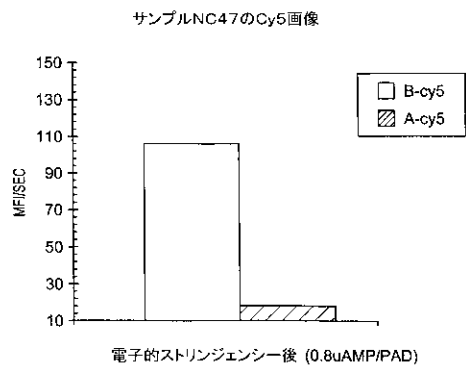
【 図 7 A 】



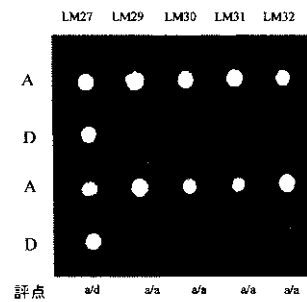
【 図 8 A 】



【 図 7 B 】

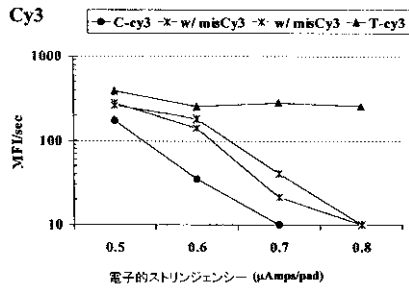


【 図 8 B 】

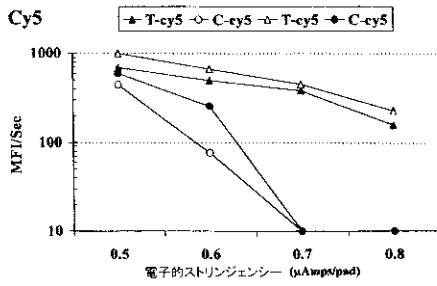


【 図 9 A 】

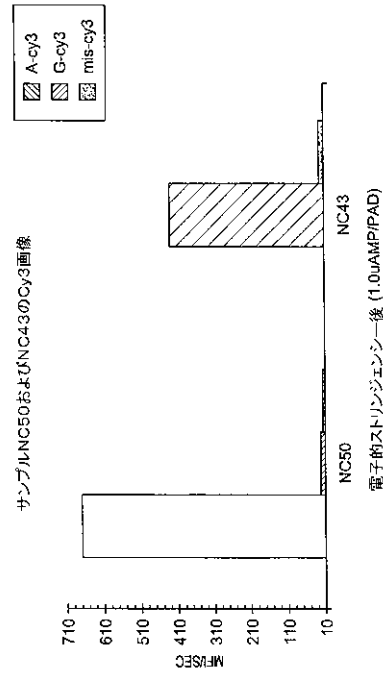
IL-1 $\beta$  T/T 同定



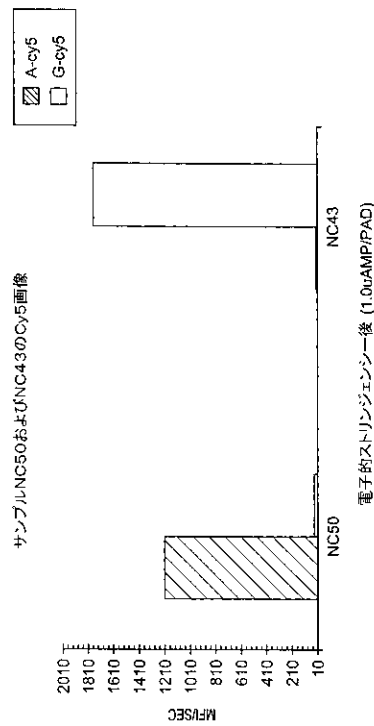
【 図 10 A 】



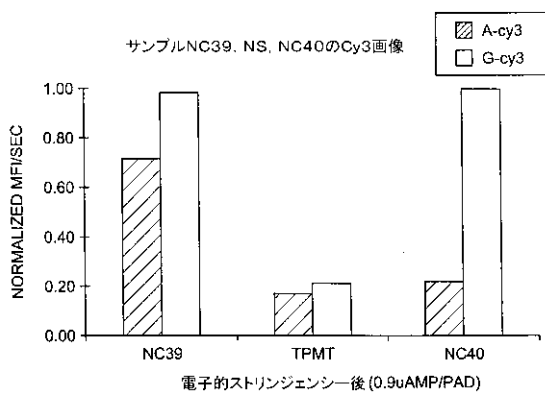
【 図 11 A 】



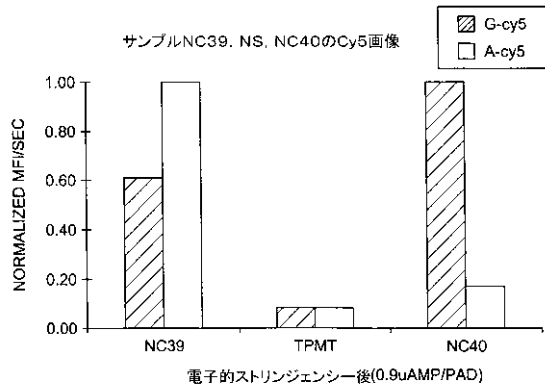
【 図 11 B 】



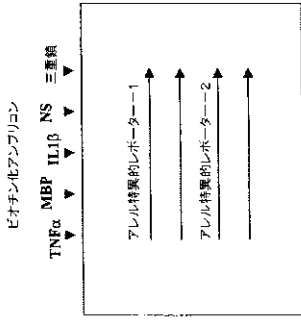
【 図 12 A 】



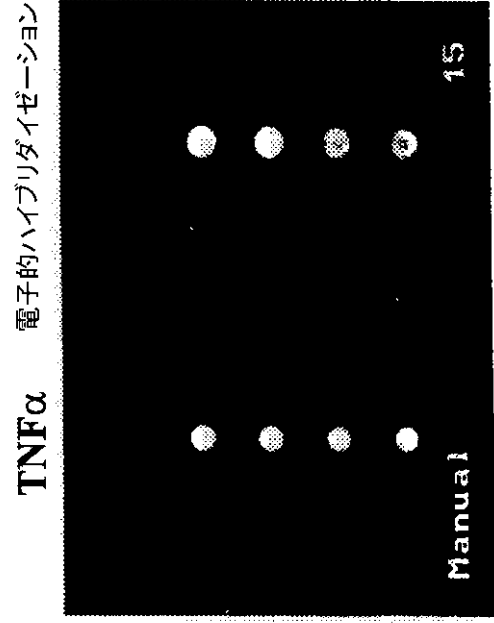
【 図 12 B 】



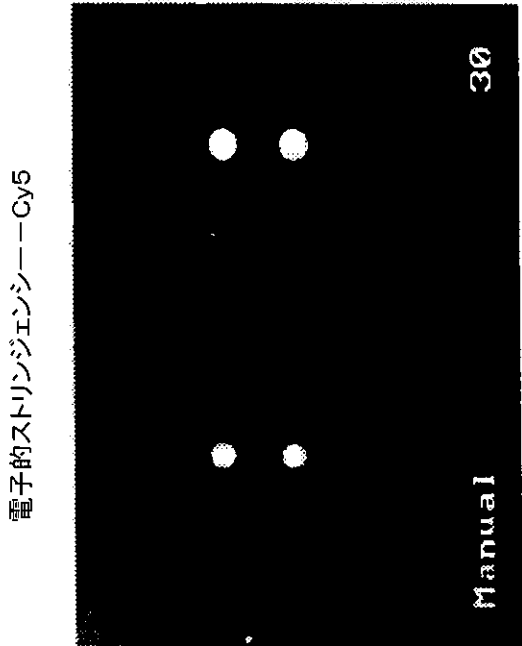
【 図 1 3 A 】



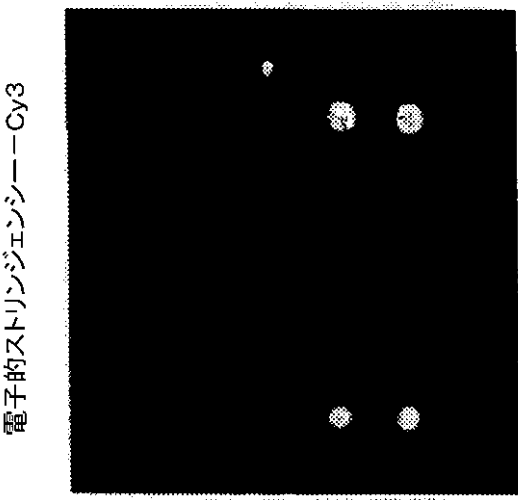
【 図 1 3 B 】



【 図 1 3 C 】

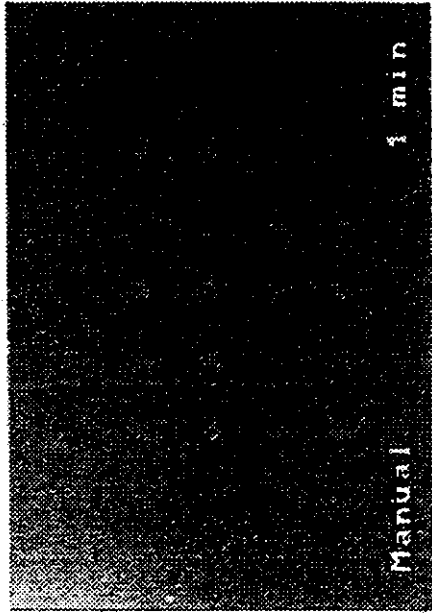


【 図 1 3 D 】



【 図 1 3 E 】

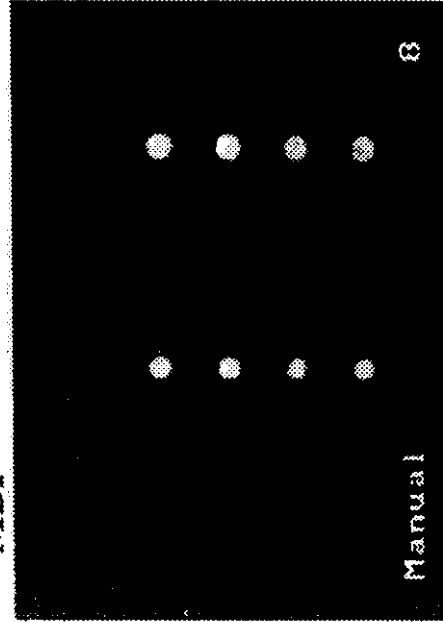
電子の剥離



【 図 1 3 F 】

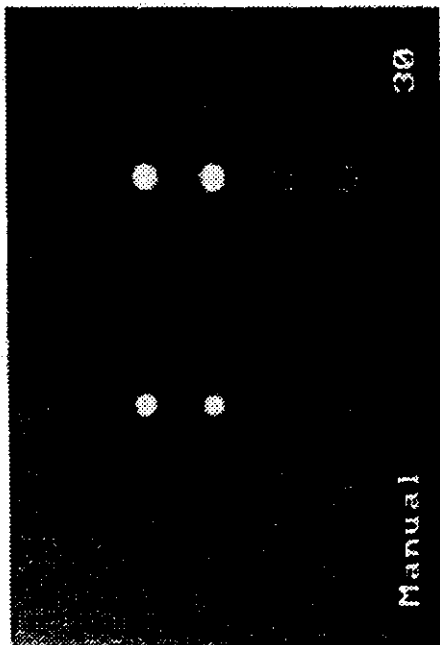
電子のハイブリダイゼーション

MBP



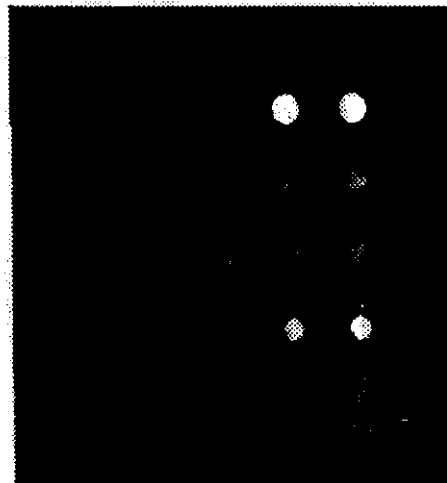
【 図 1 3 G 】

電子のストリンジェンシー-Cy5



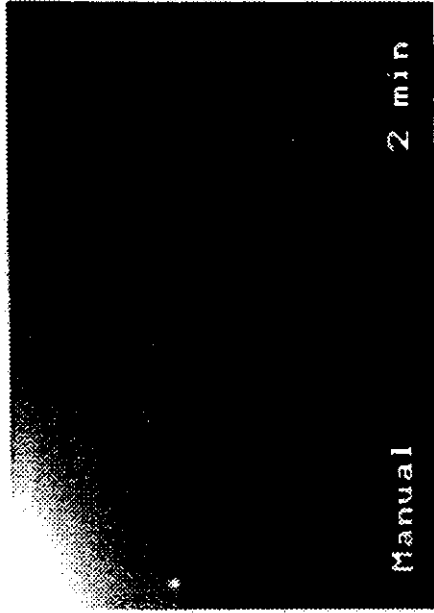
【 図 1 3 H 】

電子のストリンジェンシー-Cy5



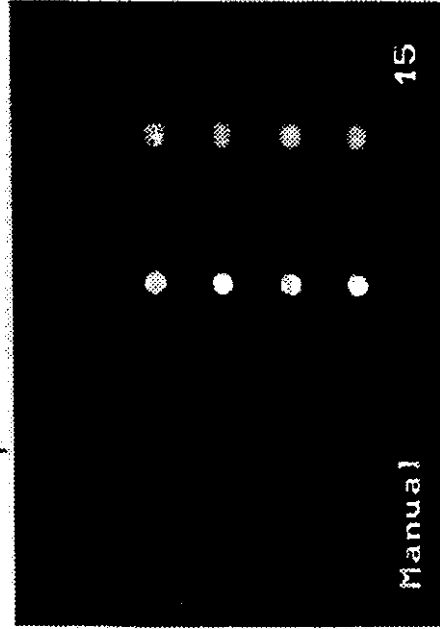
【図 1 3 I】

電子的剥離



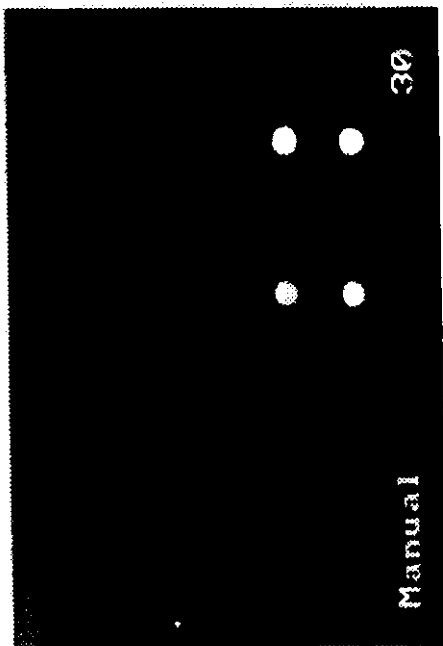
【図 1 3 J】

IL-1 $\beta$  電子的ハイブリダイゼーション



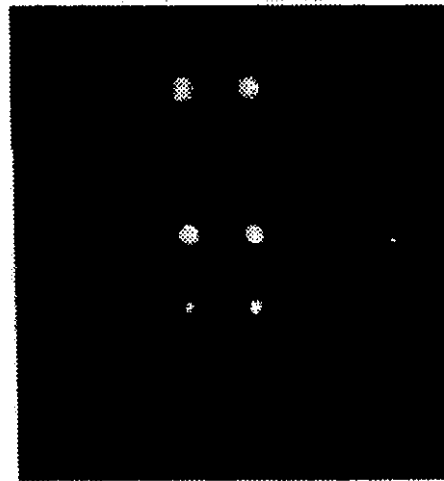
【図 1 3 K】

電子的ストリンジェンシー-Cy5



【図 1 3 L】

電子的ストリンジェンシー-Cy5



【国際公開パンフレット】

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 7 : C12Q 1/68, C07H 21/04		AI	(11) International Publication Number: <b>WO 00/58522</b>
			(43) International Publication Date: 5 October 2000 (05.10.00)
(21) International Application Number: PCT/US00/08617	(81) Designated States: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).		
(22) International Filing Date: 28 March 2000 (28.03.00)	(72) Inventors; and (73) Inventors/Applicants (for US only): GILES, Patrick, N. [US/US]; 1720 Ceramium Street, Carlsbad, CA 92009 (US); DILLON, Patrick, J. [US/US]; 1065 Snipe Court, Carlsbad, CA 92009 (US); WU, David, J. [US/US]; 2041 Paseo Dorado #7, La Jolla, CA 92037 (US); FOSTER, Charles, B. [US/US]; Nanogen, Inc., 10398 Pacific Center Court, San Diego, CA 92121 (US); CHANOCK, Stephen, J. [US/US]; Nanogen, Inc., 10398 Pacific Center Court, San Diego, CA 92121 (US).  (74) Agents: MURDOCK, Douglas, C. et al.; Brobeck, Phleger & Harrison, 12390 El Camino Real, San Diego, CA 92130 (US).		
(30) Priority Data: 60126865 30 March 1999 (30.03.99) US			
(54) Title: SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHIC DISCRIMINATION BY ELECTRONIC DOT BLOT ASSAY ON SEMICONDUCTOR MICROCHIPS			
(57) Abstract			
A rapid assay for single nucleotide polymorphism (SNP) detection that utilizes electronic circuitry on silicon microchips is disclosed. The method provides accurate discrimination of amplified DNA samples following electronic assisted transport, concentration, and attachment of DNA to selected electrodes (test sites). The test sites make up organized arrays of samples that are distinguished by using internal controls of dual labeled reporters comprising wild-type and mismatched sequences to validate the SNP genotype. This method has been used to discriminate the complex quadra-allelic SNP of mannose binding protein.			



*FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY*

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	ID	Indonesia	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BW	Botswana	IS	Iceland	NZ	New Zealand	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	MX	Mexico	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NO	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Cote d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea				
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea				
CN	China	KZ	Kazakhstan				
CU	Cuba	LC	Saint Lucia				
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein				
DK	Denmark	LK	Sri Lanka				
EE	Estonia	LR	Liberia				

WO 00/58522

PCT/US00/08617

SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHIC DISCRIMINATION BY ELECTRONIC  
DOT BLOT ASSAY ON SEMICONDUCTOR MICROCHIPS

## FIELD OF THE INVENTION

5 This invention relates to the detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs). More specifically, this invention relates to detecting SNPs using electronically addressable microchips.

## BACKGROUND

10 The following description provides a summary of information relevant to the present invention. It is not an admission that any of the information provided herein is prior art to the presently claimed invention, nor that any of the publications specifically or implicitly referenced are prior art to that invention.

15 Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are point mutations that constitute the most common type of genetic variation and are found at a rate of 0.5-10 per every 1000 base pairs within the human genome. SNPs are stable mutations that can be contributory factors for human disease and can also serve as genetic markers. The complex interaction between multiple genes and the environment necessitates the tracking of SNPs in large populations in order to elucidate their contribution to  
20 disease development and progression. Current efforts are underway in identifying human SNPs through large-scale mapping projects with high density arrays, mass spectrometry, molecular beacons, peptide nucleic acids, and the 5' nuclease assay. However, technologies such as these are not yet widely used in research and clinical settings.

25 Conventional methods for SNP genotyping have depended on either (1) gel-based sequencing of PCR amplified material such as that described by Kornman et al. (*J. Clin. Periodontol.* V.24, pp.72-77 (1997)), (2) restriction fragment length polymorphisms (RFLP) such as that described by A.J. Jeffreys (*Cell* V.18, pp.1-10 (1979)), (3) dot blot hybridization with allele-specific oligonucleotide probes (ASO) such as that described by Malmgren et al. (*Clin. Genet.* V.50, pp.202-205 (1996)), or  
30 (4) single-strand conformational polymorphism (SSCP) as described by Schafer et al. (*Nat. Biotechnol.* V15, pp.33-39 (1995)). Sequencing procedures, although effective, can be time consuming, and artifacts caused by secondary structures may be encountered. RFLPs generally encompass only a subset of SNP polymorphisms.

ASO may require protracted heat denaturation steps, and SSCP is less amenable to automation. Passive hybridization to high density oligonucleotide arrays has accomplished large-scale genotyping of SNPs. However, the sites on conventional DNA arrays cannot be individually controlled and the same process steps must be performed over the entire array.

We present a method which advances the art of SNP detection by integrating microelectronics with the molecular biological arts wherein the manipulation of an electric field on a microchip permits the rapid concentration, hybridization, and detection of DNA molecules at designated test sites. This new method further uses polarity reversal at the test sites for denaturing single base pair mismatched oligonucleotides as well as a variety of test site configurations to take advantage of flexibility of design for rapid throughput screening of genes of interest.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The current invention provides numerous aspects of which a preferred embodiment comprises the use of a bioelectronic microchip with nucleic acid hybridization in the detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in single or multi-allelic gene complexes and other SNP containing nucleic acids including, but not limited to, the presence of multiple polymorphic sites within the same haplotype of a nucleic acid, the complex quadra-allelic SNP of mannose binding protein, the Fe-gamma receptors, the major histocompatibility complex, and the SNP-typing of Interleukin 1 $\beta$ .

In another embodiment, the invention comprises the multiplex assaying of SNPs from a multiplicity of patient samples containing nucleic acid sequences of interest, such as the ability to rapidly SNP genotype a large number of samples for a subset of genes in an on-demand basis.

In another embodiment, the invention comprises the ability to simultaneously screen multiple SNPs from different genes from a single patient sample.

In a further embodiment, the invention comprises the use of allele-specific probes wherein polymorphic discrimination is attained equally well regardless of whether the polymorphic nucleotide is located 5', centrally, or 3' within the allele-specific probe.

WO 00/58522

3

PCT/US00/08617

In another embodiment, the method uses labeling of one strand of an amplified target nucleic acid wherein the label (including, but not limited to, a label comprising biotin) is incorporated on the amplification primer used in the amplification reaction to amplify said target nucleic acid.

5 In yet another embodiment, the method includes the binding of a labeled target amplification product to a specified test site on an electronically addressable microchip.

10 In still another embodiment, the method includes the capacity to monitor various stages of electronic hybridization and electronic stringency in real time thereby providing validated control during assaying.

In another embodiment, the method uses a fluorescence hybridization pattern scoring method based on Mean Fluorescent Intensity per second (MFI/s) values comprising criteria that compares the magnitude of signal differences between positive and negative samples such that any signal scored as negative or positive is statistically clearly below or above, respectively, the intensity of the MFI observed for the positive or negative, respectively. Variable scoring criteria may also be carried out by comparison of the MFI/s obtained from signals resulting from binding of negative vs. positive reporter probes when applied to individual samples. In this case, the samples are tested using at least two different reporter probes that are designed to hybridize to specific targets in the sample. Results obtained from scoring also depend upon the nature of the permeation layer and the densities of functional components therein such as concentration of avidin, or other binding moieties, or composition of the permeation layer such as agarose, or hydro gel.

25 Additionally, the method of the invention further comprises advantages of addressable microchips over passive array technologies, including:

- a. the capacity to individually control test sites thereby allowing custom configuration of test arrays immediately prior to testing;
- b. the capacity to electronically address (*i.e.*, transport), concentrate, and hybridize nucleic acid molecules in a time period of seconds;
- 30 c. the capacity to control electronic stringency at specified test sites thereby permitting the simultaneous use of unrelated molecules on the same open array microchip;

- d. the capacity of the disclosed methodology to be applied toward use in automated loaders for arrays comprising hundreds of test sites; and
- e. the capacity of the disclosed technology to be used in analyzing RNA expression in a limited number of cells.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a photomicrograph of one microelectronic array format design.

Figure 2 is a schematic of an electronic dot blot assay.

Figure 3 represents a DNA sequence (SEQ ID No: 1) of the sense strand of wild-type human mannose binding protein (MBP) from nucleotides 1001 to 1158 denoted allele A. The SNP bases and positions for allele B, C, and D are noted. The figure further shows positions of forward (MBL F) and reverse (R-1120) amplification primers (arrows). Each reporter probe is synthesized with either a cy3 or cy5 label.

Figures 4A, 4B, 4C, and 4D are photomicrographs of SNP detection results on a microchip wherein each row of four capture sites were loaded with one of four blinded amplified MBP samples (NC47, NC48, NC49, or NC50). A central fifth row was loaded with a non-specific (NS) thiopurine s-methyltransferase (TPMT) amplicon. The figures show hybridization of allele-specific reporter probes labeled with either cy3 or cy5 before (Figs. 4A and 4B) and after (Figs. 4C and 4D) electronic stringency. Figs. 4A and 4C detect cy3 fluorescence while Figs. 4B and 4D detect cy5 fluorescence.

Figures 5A and 5B are charts showing quantification of the emitted fluorescence from sample NC49 for the cy3 image (Fig. 5A) and cy5 image (Fig. 5B) of Fig. 4. Sample NC49 is identified as an A/A homozygote.

Figures 6A and 6B are charts showing quantification of the emitted fluorescence from sample NC50 for the cy3 image (Fig. 6A) and cy5 image (Fig. 6B) of Fig. 4. Sample NC50 is identified as an A/B heterozygote.

Figures 7A and 7B are charts showing quantification of the emitted fluorescence from sample NC47 for the cy3 image (Fig. 7A) and cy5 image (Fig. 7B) of Fig. 4. Sample NC47 is identified as an B/B homozygote.

WO 00/58522

5

PCT/US00/08617

Figures 8A and 8B are photomicrographs showing cy5 detection results on a microchip for samples containing A and D MBP alleles. Sample LM18 is a D/D homozygote. Sample LM27 is an A/D heterozygote. The remaining samples shown are A/A homozygotes.

5 Figure 9A is a graph showing quantification by detection of cy3 label of the IL-1 $\beta$  T/T amplicon hybridized with allele C, allele T, and mismatched reporter groups versus increasing amperage of electronic stringency.

Figure 9B is a photomicrograph showing detection results for the final stringency shown in Fig. 9A.

10 Figure 10A is a graph showing quantification by detection of cy5 label of the IL-1 $\beta$  T/T amplicon hybridized with allele C and allele T groups versus increasing amperage of electronic stringency.

Figure 10B is a photomicrograph showing detection results for the final stringency shown in Fig. 10A.

15 Figures 11A and B are bar graphs showing the positive and negative signals of probe with A/A and G/G homozygotes of the lymphotoxin gene respectively.

Figure 12A and B are bar graphs showing the positive, negative and control signals of probe with targets in the Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  gene.

20 Figures 13A to L show a series of photographs of microarrays wherein the invention with respect to multiplex analysis is demonstrated.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

##### Definitions

25 As used herein, "mean fluorescent intensity" (MFI) is the average of the pixel count values over a region of interest upon normalizing the camera integration time to one second. The value ranges will vary according to the makeup of the permeation layer.

30 As used herein, "fluorescence hybridization scoring" refers to the designation of hybridization patterns post stringency wherein scoring is based on criteria that may vary according to the nature of the permeation layer and its functional components. In one embodiment of the invention, the criteria specify that (1) the mismatched probes be less than 10 MFI/second; (2) any allele-specific reporter less than 25 MFI/s be scored as a negative; and (3) any reporter greater than 30 MFI/s be scored as

positive. This scoring criteria represents an example of how signal parameters would be used to identify single nucleotide polymorphisms using the electronic dot blot assay and are not intended to limit the invention in any way. The magnitude of the MP/Is in designating a positive or negative score could be set at an appropriate level  
5 suitable to a different level of detection depending upon the variable criteria.

Additionally, the used of multiple reporter hybridizations (or internal redundancy) per sample was designed for genotypic determination independent of comparison with a replicate or control sample.

#### 10 Detailed Embodiments

The current invention, among other aspects, provides a method of carrying out a high throughput assay for detecting single nucleotide polymorphisms (SNPs) in multi-allelic gene complexes and other SNP containing nucleic acids including, but not limited to the presence of multiple polymorphic sites within the same haplotype of  
15 a nucleic acid, the complex quadra-allelic SNP of mannose binding protein, the Fe-gamma receptors, the major histocompatibility complex, and the SNP-typing of Interleukin 1 $\beta$ , using an electronically addressable bioelectronic microchip. As explained herein, the integration of microelectronics with nucleic acid hybridization can rapidly and accurately discriminate between SNP sequences. In fact, the dual  
20 fluorescent electronic dot blot assay of the invention has proven 100% accuracy with respect to the detection of SNPs in 22 blinded MBP quadra-allelic samples and 13 blinded samples that were enhanced for the D allele. This accuracy is derived by the novel use of mismatched oligonucleotides to validate the electronic microenvironment resulting in accurate discrimination of heterozygous sequences, and the internal  
25 redundancy imparted by cy3 and cy5 labeled reporters that confirmed the SNP sequence in individual samples. This ability to rapidly SNP genotype a large number of samples for a subset of genes in an on-demand basis is a significant advantage over existing methodologies.

30 Additionally, the use of semiconductor microelectronics for the transport and concentration of nucleic acids imparts several advantages over passive array technologies, including, but not limited to, (1) *flexibility*, wherein the open architecture and capacity to individually control test sites allows custom configuration of each array immediately prior to testing; (2) *speed*, wherein electronic addressing

WO 00/58522

7

PCT/US00/08617

and electronic hybridization enable the transport, concentration, and hybridization of DNA molecules in seconds rather than hours; (3) *multiplexing*, wherein the ability to control electronic stringency at individual test sites permits the simultaneous use of unrelated molecules on the same microchip; (4) *efficiency*, wherein the ability to  
5 monitor various stages of electronic hybridization and electronic stringency in real time provides a more validated control during the assay; (5) *laboratory-on-a-chip technology*, wherein the application of electronics provides a means for automation and elimination of time-consuming, up-front processes by employing dielectrophoresis as a means of cell concentration, disruption, and nucleic acid  
10 concentration/amplification directly on the microchip; (6) *automation*, wherein automated loaders for 100-pad and 400-pad semiconductor chips may be used to achieve high throughput parameters; and (7) *gene expression*, wherein the technology described here may be applied to analysis of RNA expression from a small number of cells.

15

#### EXAMPLE 1 - MBP allele detection

The human mannose binding protein (MBP or MBL2) is an important component of the innate immune system and is capable of opsonizing pathogenic microorganisms. MBP is particularly important in children who have not yet  
20 developed immunity to many pathogens. Inheritance of any of several common variant forms of MBP gives rise to a subtle immunologic defect that can be enhanced during a period of immunosuppression. Four distinct alleles of the MBP gene have been identified. The potential clinical relevance of MBP and its genetic complexity made this sequence a relevant target for analysis by the method of the invention.

25

The method of the invention uses an electronically addressable microchip manufactured by Nanogen, Inc., (San Diego, CA). The microchips were fabricated on oxidized silicon wafers using standard process technology. The wafer was metalized with 20nm of titanium and 100nm of platinum using a radio frequency sputter  
30 process. Using standard photolithographic techniques, the metal layer was patterned and etched to form the electrode array. A silicon oxide insulating layer was then deposited by plasma-enhanced chemical vapor deposition over the entire wafer. The exposed electrode diameter is 80  $\mu\text{m}$  and the center-to-center spacing is 200 $\mu\text{m}$ . The wafers were coated with photoresist and diced into 1 cm square chips. In the current



example, the 1 cm square chips comprised 25 microelectrodes arranged in a five-by-five array (Fig. 1). Each electrode or test site may be individually charged positive, negative, or neutral for the movement and concentration of molecules to and from the test site.

5 An agarose permeation layer containing streptavidin is used to coat the electrode containing chip surface thereby separating the biological material of samples from the harsh electrochemical environment near the electrode and further allowing binding of biotinylated nucleic acid of the sample to the chip surface above the electrode. The permeation layer coating is applied by employing glyoxal agarose (FMC Bioproducts, Rockland ME) combined with streptavidin (5 mg/ml, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) to yield a 2% agarose and 1mg/ml streptavidin mixture. 10 The chips are spin coated with the streptavidin-agarose solution and schiff base linkages are reduced with 0.2 M sodium cyanoborohydride/0.3 M sodium borate, pH 9.0 for 60 min.

15 The multiple SNPs of the MBP gene in question occur within a 17 base pair region of the gene. The wild-type sequence of the MBP gene is defined as allele A while SNP allele types are designated as alleles B, C, and D. As shown in Fig. 3, a 123 base fragment encompassing this polymorphic region may be amplified from patient genomic nucleic acid samples and used in the method of the invention. Fig. 2 20 shows one embodiment of the method assay steps.

Primers for amplifying the MBP gene (Genbank HSMBP1A-X15954) were designed such that the sense strand primer comprised the nucleotide sequence 5'-TGATTGCCTGTAGCTCTCCAGGCAT-3' (SEQ ID No: 2) while the reverse primer 25 comprised the nucleotide sequence. biotin-5'-GGTAAAGAATTGCAGAGACGAACAGC-3' (SEQ ID No: 3) (*i.e.*, the 5' end of the reverse primer is biotinylated).

The 123 base fragment in the method of this example was amplified from patient genomic DNA samples by PCR wherein the reaction mixture comprised 2-4 µl of DNA, 1x PCR buffer II (Perkin-Elmer, Branchburg, NJ), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM 30 dNTPs, 200 µM of each primer, 2.0 U of AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer), and 280 nM of Taq Start Antibody (Clontech, Palo Alto, CA), in a 100µl reaction. The reaction mixes were cycled at 95°C for 10 min. (one cycle), 35 cycles at 95°C for 30

WO 00/58522

9

PCT/US00/08617

seconds, 58°C for 60 seconds, and 72°C for 120 seconds, followed by incubation at 72°C for 12 minutes in a 9700 Thermocycler (Perkin-Elmer). Each DNA sample was purified by Qiagen column (Valencia, CA), resuspended in water and quantified by gel electrophoresis using a DNA mass ladder control (Gibco BRL, Gaithersburg, MD).

- 5 The DNA samples were resuspended at a concentration of 2.5-10 nM in 100 mM histidine (Sigma, St. Louis, MO).

The samples (approximately 40 to 400 µl in volume) were heat denatured for 2-10 minutes at 95°C and quick cooled on ice. 35 µl of sample were applied to the microchip and electronically transported (addressed) using positive bias direct current  
10 to a column of four positively charged test sites at 400 nA/test site for 120 seconds. The unattached DNA was removed by washing with histidine buffer. This step was repeated for each sample. An optional procedure of treating the completely addressed array for 5 minutes with 0.5XSSC, pH 11.5 followed by extensive washing with water and histidine yielded greater hybridization signals. The addressed amplicons  
15 remained attached to their respective test sites through interaction with the streptavidin previously embedded in the permeation layer.

The nucleic acid at each test site was then hybridized to mixtures of fluorescently labeled allele-specific reporter oligonucleotide probes by electronic hybridization. The reporter probes (see Table 1) were synthesized with either a cy3 or  
20 cy5 fluorophore linked at the 5' end (BioServe Biotechnologies, Laurel, MD). Electronic hybridization was carried out such that wild-type and SNP cy3 and cy5 reporter groups were resuspended in a range of between 75 to 125 nM each in 100 mM histidine buffer. The two cy3 labeled mismatched reporters of each allele group were mixed equally at 37.5 nM to yield a combined 75 nM in buffer. Each reporter  
25 group (20-35 µl) was applied to the microchip and hybridized to a row of captured amplicons at 475 nA/test site for 15 seconds. Excess reporter was removed by washing with 100 mM histidine. The second, third, and fourth reporter groups were applied in the same row-wise manner. After hybridization, the chip was washed in 20 mM dibasic NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM Trisbase, pH 9.5, (20/20 buffer) for electronic  
30 stringency.

Single base pair mismatched reporter probes were then preferentially denatured by reversing the charge polarity at individual test sites with increasing

amperage (electronic stringency). A pulsed current of 0.5  $\mu\text{A}/\text{test site}$  0.1 second on, 0.2 seconds off, for 150 cycles (or 0.1 second on, 0.1 second off, 50 cycles), was applied to each test site. The chip was washed in 20/20 buffer to remove the denatured reporter and imaged with IPLab software. Imaging and fluorescence were  
5 quantified as the amperage was ramped to completion. Specifically, currents of 0.6  $\mu\text{A}/\text{test site}$ , 0.7  $\mu\text{A}/\text{test site}$ , 0.8  $\mu\text{A}/\text{test site}$ , 0.9  $\mu\text{A}/\text{test site}$ , and 1.0  $\mu\text{A}/\text{test site}$  were used. A biotinylated amplicon that spans the TPMT codon 460 polymorphism was used as a nonspecific background control. Each image was normalized to MFIs and the nonspecific counts were subtracted from each MBP test site for final  
10 quantification. Positive test sites retained significant signal above the mismatched controls.

The invention method of this example used instrumentation wherein electronic connections to the microchip were made by an epoxy ring probe card (Cerprobe, Phoenix, AZ) mounted on a micromanipulator 6000 (Micromanipulator Company, Carson City, NV). The power supply (Keithley 236; Keithley Instruments, Cleveland, OH) sourced either fixed potential difference or a fixed current between its terminals through an array of relays (National Instruments, Austin, TX). Computer hardware (Macintosh Power PC, Apple Computer, Cupertino, CA) and IPLab Spectrum version  
15 3.1.1 software (Signal Analytics Corporation, Vienna, VA) allowed graphical user menu control of the individual array locations. Laser excitation was by a HeNe 633 nm laser (8mW output; Research Electro-Optics, Boulder, CO) and a frequency-doubled diode pumped solid state laser (5 mW output; Laser Compact, Moscow) 532 nm. Fluorescence was observed through a 8x objective (numerical aperture 0.15) with the banded filters at 575 nm (for cy3) or 670 nm (for cy5) (Chroma Tech, Brattleboro, VT). The fluorescent signal was scanned and collected by a charged  
20 couple device camera (Princeton Instruments, Trenton, NJ). The scanned image was quantified by IPLab Spectrum software.

As shown in Table 1, reporter probes specific for wild-type, a particular SNP allele sequence or a mismatch of wild-type and SNP were synthesized. The wild-type  
25 and SNP reporters were labeled with both cy3 (1,1'-bis(*ε*-carboxypentyl)-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine-5,5'-disulfonate potassium salt di-N-hydroxysuccinimide ester) and cy5 (1,1'-bis(*ε*-carboxypentyl)-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine-5,5'-disulfonate potassium salt di-N-hydroxysuccinimide ester). The wild-type probes

WO 00/58522

11

PCT/US00/08617

- labeled with cy3 were kept separate from wild-type probes labeled with cy5. The SNP probes were treated the same. However, the wild-type and SNP labeled reporters were combined into two types of probe mixtures. Specifically, these mixtures or groups were (1) wild-type-cy3/SNP-cy5, and (2) wild-type-cy5/SNP-cy3.
- 5 Mixing of the differentially labeled probes allowed their simultaneous hybridization to the amplified patient DNA samples at each test site with each hybridization event recorded in duplicate. For each SNP allele, two additional reporter oligonucleotide probes were created that incorporated a distinct mismatch of both wild-type and SNP. These were labeled only with cy3. Cy3 in this experiment was chosen arbitrarily for experimental convenience. However, any label could be attached for the purpose of distinguishing the alleles. These mismatched probes were combined also into two groups at equivalent molar concentration with either the bonafide wild-type or SNP probes labeled with cy5 ((1) wild-type-cy5/mismatch-cy3 and (2) SNP-cy5/mismatch-cy3). These additional reporter pairs permitted comparison of the interaction with
- 10 matched and mismatched probe sequences even if both the wild-type and SNP sequences were present in the same sample (heterozygote).

TABLE I

Type reporter probe	specificity of reporter	reporter sequence
allele A or D discrimination	allele A, cy3 or cy5	5'caggcaaagatgggCgtgatg3' (SEQ ID No: 4)
	allele D, cy3 or cy5	5'caggcaaagatgggTgtgatg3' (SEQ ID No: 5)
	mismatch A, cy3	5'caggcaaagatgggAgtgatg3' (SEQ ID No: 6)
	mismatch D, cy3	5'caggcaaagatgggGgtgatg3' (SEQ ID No: 7)
allele A or B discrimination	allele A, cy3 or cy5	5'tgatgGcaccaaggGagaaaag3' (SEQ ID No: 8)
	allele B, cy3 or cy5	5'tgatgAcaccaaggGagaaaag3' (SEQ ID No: 9)
	mismatch A and B at position 1073, cy3	5'tgatgTcaccaaggGagaaaag3' (SEQ ID No: 10)
	mismatch A and B at position 1073, cy3	5'tgatgCcaccaaggGagaaaag3' (SEQ ID No: 11)
allele A or C discrimination	allele A, cy3 or cy5	5'tgatgGcaccaaggGagaaaag3' (SEQ ID No: 12)
	allele C, cy3 or cy5	5'tgatgGcaccaaggAagaaaag3' (SEQ ID No: 13)
	mismatch A and C at position 1082, cy3	5'tgatgGcaccaaggT agaaaag3' (SEQ ID No: 14)
	mismatch A and C at position 1082, cy3	5'tgatgGcaccaaggC agaaaag3' (SEQ ID No: 15)

Using these assay conditions, a blinded study was conducted on genomic DNA samples of known MBP sequence previously determined by standard sequencing techniques. Of the samples tested, one set had been identified as either homozygous or heterozygous for the four separate alleles and served as controls.

5 The genotypes of the remaining samples (22 samples) were unknown. These 22 samples were tested blind in the method of the current invention. Additionally, a second set of 13 blinded samples were tested for the presence of the D allele site.

Each blinded amplicon was electronically addressed to a column of four test sites. Thus, a 25-site microchip array can accommodate four different patient samples and a nonspecific control amplicon. Each row of samples was hybridized with one of the four probe mixes (*i.e.* reporter groups (1) Acy3/Bcy5, (2) mismatch-cy3/Acy5, (3) mismatch-cy3/Bcy5, and (4) Bcy3/Acy5). Each reporter group consisted of a cy3-labeled and a cy5-labeled SNP allele-specific oligonucleotide pair that differed by a single nucleotide mismatch. Images of a representative microchip containing four 10 blinded samples (NC47, NC48, NC49, and NC50) after hybridization with the four cy3/cy5-labeled reporter groups specific for the A or B allele of MBP mentioned above are shown in Figs. 4A-D. Electronic stringency was applied until the 15 mismatched controls (mismatch-cy3) had been removed to background levels (Fig. 4C).

20 The distinct fluorescent patterns representative of the three possible genotypes (A/A, A/B, and B/B) are illustrated in Fig. 4A-D. Analysis of sample NC47 (column 1) showed a discrete signal with the fourth reporter group (row 4) in the cy3 image (Fig. 4C) and signals with the first (row 1) and third (row 3) reporter groups in the cy5 image (Fig. 4D). Collectively, the signals were consistent with hybridization of 25 reporter groups containing B allele-specific probes (representing a true match). Electronic stringency had reduced the signal from A allele-specific probes to background.

Blinded sample NC48 (Fig. 4C, column 2) displayed a cy3 signal with the first reporter group (row 1) and cy5 signal (Fig. 4D) with the second and fourth reporter groups (rows 2 and 4). Each signal correlated with hybridization of the A allele-specific reporters. Similarly, the column containing sample NC49 (column 4) showed a signal with the A allele-specific reporter in the cy3 image (Fig. 4C, row 1) and in the cy5 image (Fig. 4D, rows 2 and 4). Note that the fluorescence emitted from each

WO 00/58522

13

PCT/US00/08617

test site in rows 2 and 3 of Fig. 4C was reduced to background intensity. These test sites had been hybridized with the mismatch-cy3 labeled reporters, known to be mismatched with respect to both the A and B allele sequences. The elimination of the mismatched signal confirmed that the appropriate level of electronic stringency had been attained for SNP discrimination and that any remaining reporter signal constituted a perfect match.

Evaluation of blinded sample NC50 (column5) in each panel (Fig. 4) revealed both A and B allele-specific binding in the cy3 image (Fig. 4C, rows 1 and 4) and the cy5 image (Fig. 4D, rows 1-4). The absence of signal in test sites hybridized with the mismatched cy3 reporters (Fig. 4C, rows 2-3) confirmed the completion of electronic stringency and identified the presence of both the A and B allele sequences within the NC50 amplicon.

The above images were further discriminated for quantification of the emitted fluorescence from each sample. The binding of the MBP reporters to the nonspecific amplicon (NS) was approximately 4% of the total cy5 fluorescent intensity post-electronic hybridization and was twofold to fourfold higher with the cy3-labeled reporters prior to stringency. NC49 showed a greater than 10-fold discrimination in mean intensity between the A allele reporter with that of the B allele and mismatched reporters (Figs. 5A and 5B). Thus, NC49 was scored as an A/A homozygote with respect to the B site. Similarly, sample NC48 was identified as an A/A homozygote with respect to the B site (data not shown).

Quantification of blinded sample NC50, scored as A/B (Figs. 6A and 6B) demonstrated that significant signal remained bound to the captured amplicon (approximately 70 MFI/s) with both A and B allele-specific cy3 reporters and cy5-labeled reporters. Thus, the NC50 amplicon was scored as an A/B heterozygote with respect to the B site.

The NC47 sample fluorescence was quantified (Figs. 7A and 7B) showing that the mismatched and A allele reporters are reduced to background intensity. Nevertheless, a signal of greater than 100 MFI/s was retained with the B allele reporter. Similarly, analysis of the cy5 image (Fig. 7B) revealed a reduction of the A allele signal (*i.e.*, less than 25 MFI/s) with robust retention of B allele signal (*i.e.*, greater than 100 MFI/s). Thus, NC47 was scored as a B/B homozygote.

Analysis of different blinded samples from patients scored as A/A with respect to the SNP alleles (sample population =18) demonstrated 100-fold higher binding of the A-cy3 reporter to the A/A samples compared with that of the mismatched cy3 reporters, and 26-fold greater binding than that of the B or C allele cy3-labeled SNP reporters (probe: mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM); A-cy3: 200  $\pm$ 36.2 MFI/s, SNP-cy3: 7.6  $\pm$ 1.8 MFI/s, mismatch-cy3: 1.9  $\pm$ 0.3 MFI/s). Conversely, analysis of seven different blinded samples scored as heterozygotes demonstrated that both the cy3-labeled A allele and SNP probes bound with near equal intensity to the samples as compared with the mismatched probes, which bound with 20-fold less intensity (probe: mean  $\pm$ SEM; A-cy3: 188.3  $\pm$ 44.4 MFI/s, SNP-cy3: 150.1  $\pm$ 42.3 MFI/s, mismatched-cy3: 7  $\pm$ 2.2 MFI/s). equivalent ratios of matched to mismatched pairs were recorded with the cy5 labeled probes (data not shown).

Each of the 22 blinded samples was scored at the B and C allele positions. The nucleotide sequence at each location and A, B, and C genotypes were compared with the standard sequencing results (see Table 2). As shown, the microchip assay was in agreement with sequencing results on 44 of 44 SNP scores (22A/B calls and 22A/C calls) at the B and C sites. Thus, far, occurrence of the B and C allele sequences within the same haplotype has not been described. For the B/B genotype, only the perfectly matched B and C allele probes remained bound after stringency. Consequently, they had to be scored against both the B and C reporters before the compound heterozygote determination could be made. Although probes that span multiple variant sites may accurately discriminate between genotypes, the presence of multiple polymorphic sites within the same haplotype may confound discrimination performed in this way. In such cases, separate probe (10-24 nucleotide) sets for each polymorphic site would be advantageous. As demonstrated herein, polymorphic discrimination was attained equally well, regardless of whether the polymorphic nucleotide was located 5', centrally, or 3' within the allele-specific probe.

The 22 samples were subsequently reblinded and scored for the presence of the D allele (Table 2). The electronic assay of the invention correctly identified the only D allele sample (NC52-A/D) present among the 22 samples. As the frequency of occurrence of the D allele is low and the effectiveness of any SNP discrimination assay is its capacity to identify alleles of low frequency, a second set of 13 blinded samples (weighted toward validation of the D allele system, samples LM1, LM10,

WO 00/58522

15

PCT/US00/08617

LM11, LM18, LM20, LM27, LM29, LM30, LM31, and LM32) was tested by the electronic assay with the D allele reporter probes. The scoring of both groups of samples for the D allele (sample population =35) with the electronic assay was in 100% agreement with the sequencing results. Microchip images from 10 of the 5 blinded samples are shown in Figs. 8A and 8B.

TABLE 2. Validation of SNP-typing of blinded samples by electronic dot blot (NGEN) with standard DNA sequencing (NIH).

Samples	NGEN			Genotype A, B, C, D			
	A/B	A/C	A/D	NGEN	NIH	Agree	Disagree
1. NC7	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
2. NC11	a/b	a/a	a/a	a/b	A/B	+	
3. NC20	a/a	a/c	a/a	a/c	A/C	+	
4. NC44	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
5. NC45	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
6. NC36	a/a	a/c	a/a	a/c	A/C	+	
7. NC37	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
8. NC38	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
9. NC40	a/b	a/a	a/a	a/b	A/B	+	
10. NC42	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
11. NC43	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
12. NC46	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
13. NC47	b/b	a/a	a/a	b/b	B/B	+	
14. NC48	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
15. NC49	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
16. NC50	a/b	a/a	a/a	a/b	A/B	+	
17. NC51	b/b	c/c	a/a	b/c	B/C	+	
18. NC52	a/a	a/a	a/d	a/d	A/D	+	
19. NC53	a/a	a/a	a/a	a/a	A/A	+	
20. NC54	a/b	a/a	a/a	a/b	A/B	+	
21. NC55	a/b	a/a	a/a	a/b	A/B	+	
22. NC56	a/b	a/a	a/a	a/b	A/B	+	
						100%	0%

10



EXAMPLE 2 Interleukin 1 $\beta$  detection

Applicability of the current invention to detect SNPs was further demonstrated for the biallelic Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) polymorphism. The IL-1 $\beta$  sequence was retrieved from Genbank (XO4500) and contained a C to T SNP transition at position 5888. Primer sequences for use in PCR amplification comprised the sense strands nucleotide sequence, 5'-AAATTTGGCCACCTCGCCTCAG-3' (SEQ ID No: 16) and the reverse strand nucleotide sequence, biotin-5'-AGTCCCGGAGCGTGCAGTTCAGT-3' (SEQ ID No: 17) (i.e., the reverse strand was biotinylated).

In this example, as described above, cy3 and cy5 labeled reporter groups were designed to identify the wild-type (C) and SNP variant (T) alleles (synthesis by Bioserve, Laurel, MD). (see Table 3) Loss of fluorescence following increased electronic stringency illustrated the denaturation of the non-C/non-T mismatched (mis-cy3) reporters from test sites containing the known homozygous T/T biotinylated amplicon (Figs. 9-10). Similarly, the cy3 and cy5 C allele reporters showed no evidence of stringent hybridization to the T/T amplicon. In contrast, a distinct signal of greater than 100 MFI/s was emitted from hybridization with the cy3 labeled T allele reporter (Fig. 9A) and cy5 labeled reporters (Fig. 10A). Thus, the amplicon known to be a T/T homozygote by sequencing technology was similarly scored as a T/T homozygote by the electronic format. In general, gradual decreases in overall signal intensity during electronic stringency was observed for both cy3 and cy5 reporters (data not shown).

Experiments, as shown in Example 5, demonstrate that SNP discrimination was obtained from an MBP, IL-1 $\beta$ , and TNF  $\alpha$  multiplexed sample, in which the microchip was electronically stripped and reprobed for the genotyping of the second gene in the duplex.

TABLE 3

reporter specificity	reporter sequence
allele C	5'tcttcttCgacacatgggataacg3' (SEQ ID No: 18)
allele T	5'tcttcttTgacacatgggataacg3' (SEQ ID No: 19)
mismatch - A	5'tcttcttAgacacatgggataacg3' (SEQ ID No: 20)
mismatch - G	5'tcttcttGgacacatgggataacg3' (SEQ ID No: 21)

EXAMPLE 3 Lymphotoxin gene detection

Another demonstration of the current invention to detect SNPs was observed using the Lymphotoxin gene. The Lymphotoxin sequence was retrieved from Genbank (M16441) and contained an A to G SNP transition at position 1069. Primer sequences for use in PCR amplification comprised the sense strand nucleotide sequence, 5'-CTTCTGTCTCTGACTCTCCATC-3' (SEQ ID No: 22) and the reverse strand nucleotide sequence, biotin-5'-CAAGGTGAGCAGAGGGAGAC-3' (SEQ ID No: 23) (*i.e.*, the reverse strand was biotinylated).

In this example, the cy3 and cy5 reporter groups were designed to identify genetic variants containing a single nucleotide polymorphism of an A or a G at position 1069 in the Lymphotoxin gene (reporter oligo synthesis by Bioserve, Laurel, MD). (*see* Table 4). Loss of fluorescence following increased electronic stringency illustrated the denaturation of the non-A/non-G mismatched (mis-cy3) reporters from test sites containing the known homozygous A/A biotinylated amplicon for sample NC50 and the known homozygous G/G biotinylated amplicon for sample NC43 (Fig. 11A and B). Consequently, the amplicons from samples NC50 and NC43 known to be A/A and G/G homozygotes, respectively, by sequencing technology were similarly scored as A/A and G/G homozygotes, respectively, by the electronic format.

TABLE 4

reporter specificity	reporter sequence
allele A	5'ttctgccaatgAttctctctctg3' (SEQ ID No: 24)
allele G	5'ttctgccaatgGttctctctctg3' (SEQ ID No: 25)
mismatch - T	5'ttctgccaatgTttctctctctg3' (SEQ ID No: 26)
mismatch - C	5'ttctgccaatgCttctctctctg3' (SEQ ID No: 27)

EXAMPLE 4 Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  detection

Yet, another example demonstrating the application of the invention to detect SNPs was observed in the promoter for the Tumor Necrosis Factor gene. The Tumor Necrosis genomic DNA sequence was retrieved from Genbank (X02910) and contained a G to A SNP transition at position 308. Primer sequences for use in PCR amplification comprised the sense strand nucleotide sequence, 5'-GTTAGAAGGAACAGACCACAGACC-3' (SEQ ID No: 28) and the reverse strand

nucleotide sequence, biotin-5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCC-3' (SEQ ID No: 29)(*i.e.*, the reverse strand was biotinylated).

In this example, the cy3 and cy5 reporter groups were designed to identify genetic variants containing a single nucleotide polymorphism of a G or an A in the promoter for the Tumor Factor Necrosis gene (reporter oligo synthesis by Bioserve, Laurel, MD). (see Table 5). In a modified version of the invention, only two reporter groups were used to detect either the G or A allele. Electronic stringency was applied to test sites containing amplicons from samples NC39 and NC40 as well as the non-specific amplicon, TPMT. The electronic stringency revealed that the known A/G heterozygote as determined by DNA sequencing was an A/G heterozygote for sample NC39. Moreover, the known G/G homozygote as determined by DNA sequencing was identified as a G/G homozygote for sample NC40 (Fig. 12A). For scoring purposes, the remaining electronically hybridized reporter signals were normalized to the greatest MFI/sec and the results were compared to that for the non-specific control TPMT. This example demonstrates not only the application of the invention in identifying SNPs, but also screening methodology which reduces the number of reporter signals necessary to identify specific zygosity.

TABLE 4

reporter specificity	reporter sequence
allele G	3'gcatgGggacggggttc3' (SEQ ID No: 30)
allele A	5' gcatg/Aggacggggttc 3' (SEQ ID No: 31)

#### EXAMPLE 5. Multiplex analysis

Experiments have also shown SNP discrimination from a TNF $\alpha$ , MBP, and IL-1 $\beta$  multiplexed sample in which the microchip was electronically stripped and reprobed for the genotyping of the subsequent genes in the triplex. Three amplicons, the MBP A/A homozygote (M), the IL-1 $\beta$  T/T homozygote (I), and the TNF $\alpha$  G/G homozygote (T), were capture loaded individually and as a 1:1:1 triplex mixture (T+M+I) on a 25 pad solution process chip (Figure 13A). The chip was hybridized in duplicate with TNF $\alpha$  specific Cy3/Cy5 labeled reporter groups (13B). The allele specific polymorphism was obtained by electronic stringency applied in increased increments (13C and D). After the genotype of TNF $\alpha$  in the multiplex was obtained,

WO 00/58522

19

PCT/US00/08617

the chip was stripped of labeled reporter by the application of electronic stringency at an elevated temperature (42°C) followed by a 2 minute wash in 0.5x SSC, pH 11.5. The stripped chip was then extensively washed in histidine and a baseline imaged obtained (13 E). The chip was then re-hybridized with MBP allele specific Cy3/Cy5 reporter sets (13 F) and the genotype was obtained by application of electronic stringency (13 G and H). The genotyped chip was electronically stripped (again), a baseline image was obtained (13 I) and IL-1 $\beta$  allele specific reporter groups were hybridized to the multiplex (13 J). The genotype was obtained by electronic stringency (13 K and L). These results demonstrate that the throughput parameters of the electronic dot blot assay may be increased by the capacity to genotype multiple genes on pads which require a single capture loading event.

As shown above multiplexing of samples can be accomplished in several ways. In one format, multiple targets obtainable from a single patient sample can be tested on a single open array microchip. Further, each target may be captured on either separate locations on the microchip or on the same capture pad. Multiplexing may also accommodate multiples of patient samples on a single microchip array. In this situation, the individual target species of each patient may be captured for analysis on either separate capture sites or on groups or single sites for each patient.

The foregoing is intended to be illustrative of the embodiments of the present invention, and are not intended to limit the invention in any way. Although the invention has been described with respect to specific modifications, the details thereof are not to be construed as limitations, for it will be apparent that various equivalents, changes and modifications may be resorted to without departing from the spirit and scope thereof and it is understood that such equivalent embodiments are to be included herein. All publications and patent applications are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

WO 00/58522

20

PCT/US00/08617

We claim:

1. A method for detection of single nucleotide polymorphisms using an electronically addressable microchip having a plurality of test sites comprising:
- 5 i. providing at least one sample containing at least one target nucleic acid of interest that contains at least one SNP;
  - ii. optionally subjecting said target to an amplification reaction to form amplification products;
  - iii. electronically addressing said target or said amplification products to specified test sites on said microchip;
  - 10 iv. capturing said target or said amplification products onto said test sites;
  - v. providing SNP-specific probes and electronically hybridizing said probes to said target or said amplification products to form hybridized complexes;
  - 15 vi. performing electronic stringency on said hybridized complexes to destabilize hybridization complexes comprising at least one mismatch between said target or amplification products and said probes; and
  - 20 vii. detecting hybridization complexes that remain stable following electronic stringency of (vi).
2. A method according to claim 1 wherein said sample comprises target nucleic acids of interest selected from the group consisting of nucleic acids encoding
- 25 (1) mannose binding protein, (2) Fe-gamma receptors, (3) the major histocompatibility complex, (4) Interleukin 1 $\beta$ , (5) lymphotoxin, and (6) tumor necrosis factor  $\alpha$ .
3. A method according to claim 1 wherein said detection of single nucleotide
- 30 polymorphisms is by a multiplex assaying of SNPs from a multiplicity of patient samples containing nucleic acid sequences of interest.

WO 00/58522

21

PCT/US00/08617

4. A method according to claim 3 wherein said patient samples are provided in serial relation to one another.

5. A method according to claim 1 wherein said detection of single nucleotide polymorphisms includes the ability to simultaneously screen multiple SNPs from different genes from a single patient sample.

6. A method according to claim 1 wherein said electronic addressing and/or said electronic stringency includes a capacity to monitor various stages of electronic hybridization and electronic stringency in real time thereby providing validated control during assaying.

7. A method according to claim 1 wherein said SNPs are derived from multi-allelic gene complexes of a target nucleic acid of interest.

15

8. A method for detection of multiples of single nucleotide polymorphisms in target nucleic acids of interest from at least one patient sample source using for each patient sample a single capture site of an electronically addressable microchip having a plurality of test sites comprising:

- 20
- i. providing at least one sample containing at least one SNP in each of said target nucleic acids of interest;
  - ii. optionally subjecting said target nucleic acids to an amplification reaction to form amplification products;
  - iii. electronically addressing said target nucleic acids or said amplification products to specified test sites on said microchip;
  - 25
  - iv. capturing said target nucleic acids or said amplification products onto at least one test sites;
  - v. providing SNP-specific probes and electronically hybridizing said probes to said target nucleic acids or said amplification products to form hybridized complexes;
  - 30
  - vi. performing electronic stringency on said hybridized complexes to destabilize hybridization complexes comprising at least one

WO 00/58522

22

PCT/US00/08617

- mismatch between said target nucleic acids or amplification products and said probes; and
- vii. detecting hybridization complexes that remain stable following electronic stringency of (vi).

5

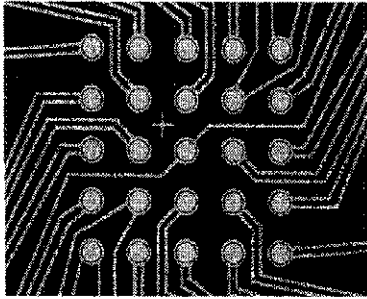
9. A method for detection of single nucleotide polymorphisms in target nucleic acids of multiple patient sample sources using for each patient sample at least one capture site of an electronically addressable microchip having a plurality of test sites comprising:

- 10 i. providing said samples containing at least one SNP in each of said target nucleic acids of interest;
- ii. optionally subjecting said target nucleic acids to an amplification reaction to form amplification products;
- 15 iii. electronically addressing said target nucleic acids or said amplification products to specified test sites on said microchip;
- iv. capturing said target nucleic acids or said amplification products onto at least one test sites;
- v. providing SNP-specific probes and electronically hybridizing said probes to said target nucleic acids or said amplification products to form hybridized complexes;
- 20 vi. performing electronic stringency on said hybridized complexes to destabilize hybridization complexes comprising at least one mismatch between said target nucleic acids or amplification products and said probes; and
- 25 vii. detecting hybridization complexes that remain stable following electronic stringency of (vi).

WO 00/58522

PCT/US00/08617

1/20

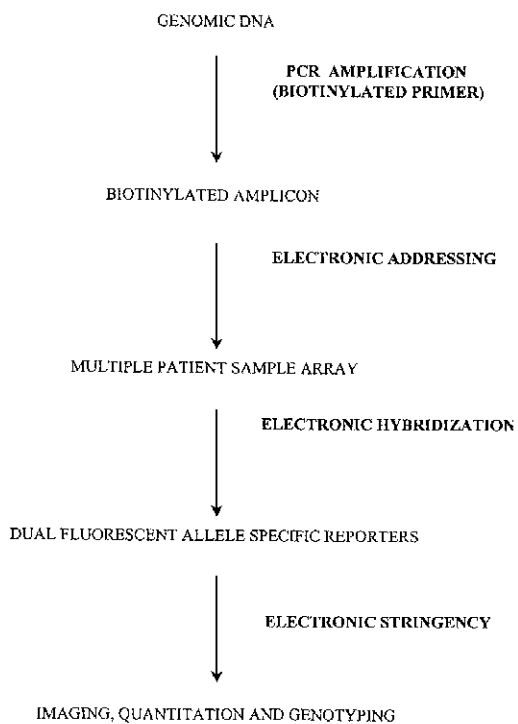


*FIG. 1*

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



**ASSAY OVERVIEW**



**FIG. 2**

3/20

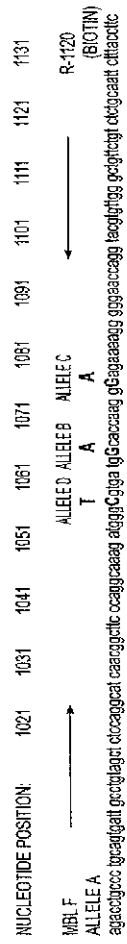
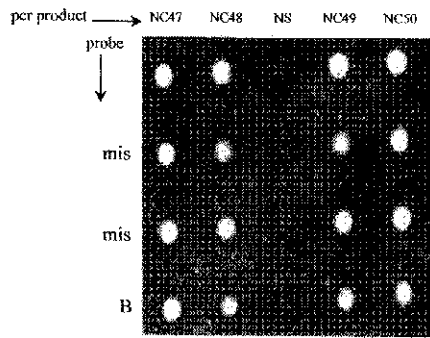
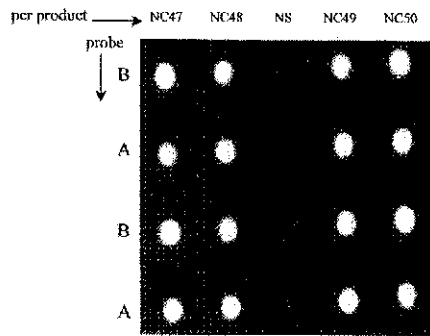


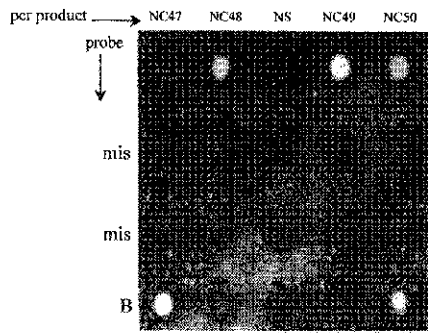
FIG. 3



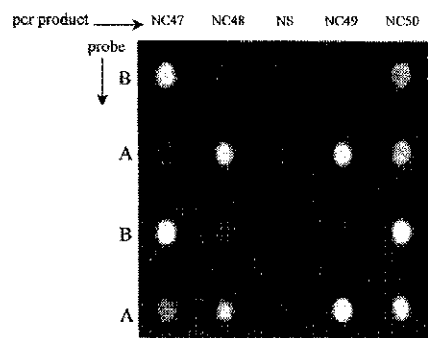
**FIG. 4A**



**FIG. 4B**



**FIG. 4C**



**FIG. 4D**

WO 00/58522

PCT/US00/08617

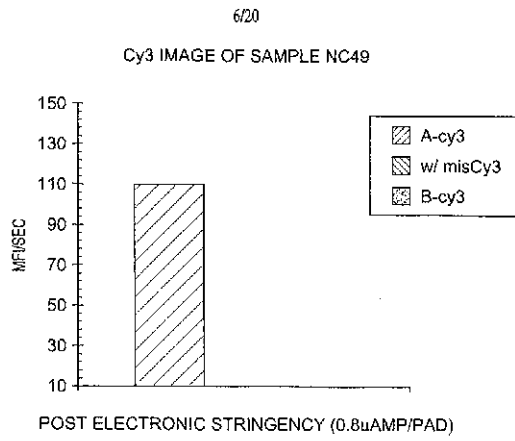


FIG. 5A

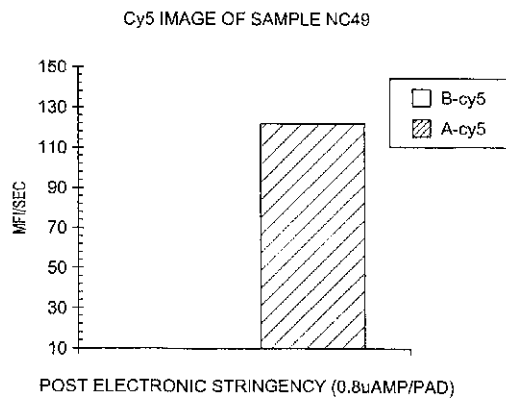


FIG. 5B

WO 00/58522

PCT/US00/08617

7/20

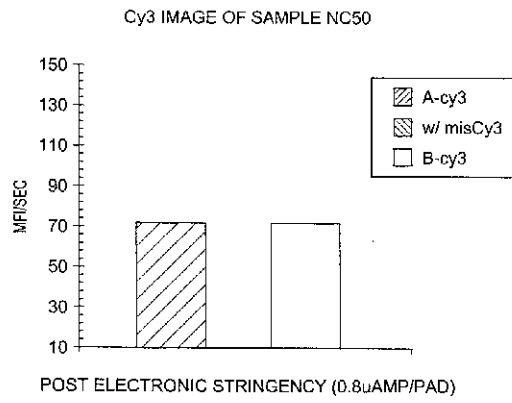


FIG. 6A

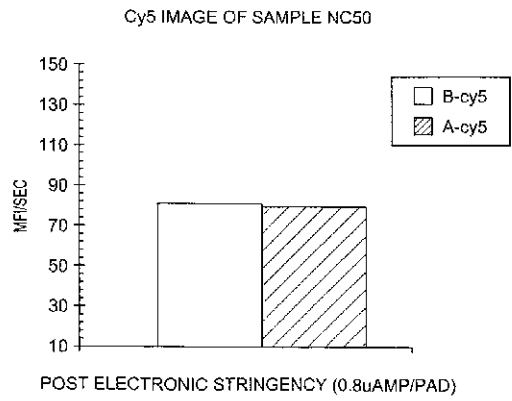


FIG. 6B

WO 00/58522

PCT/US00/08617

8/20

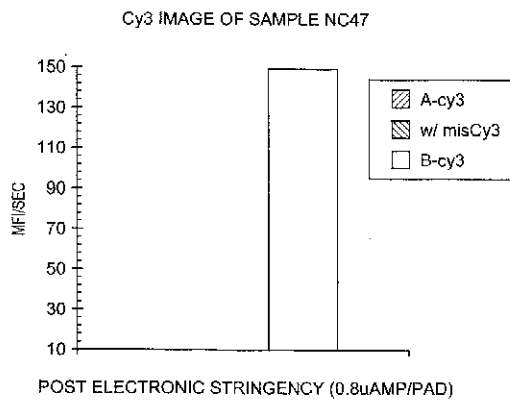


FIG. 7A

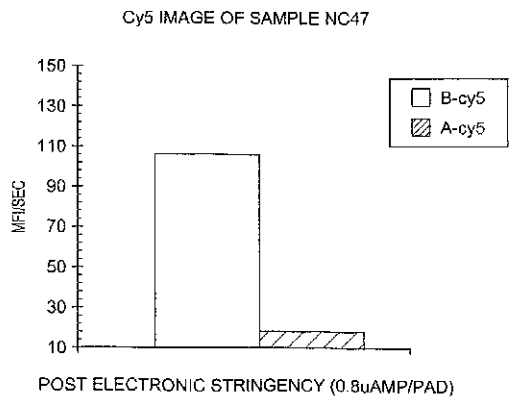
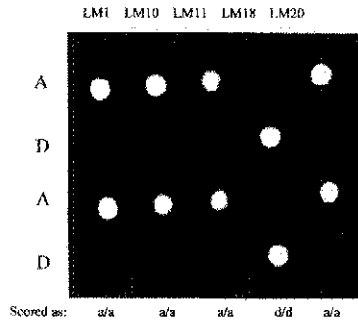
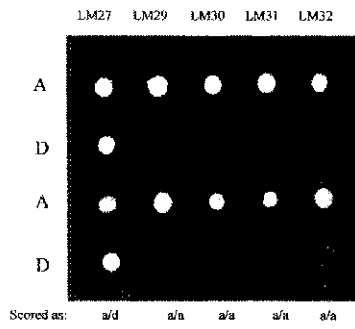


FIG. 7B



**FIG. 8A**



**FIG. 8B**

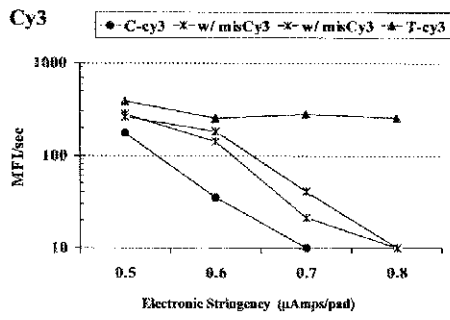


WO 00/58522

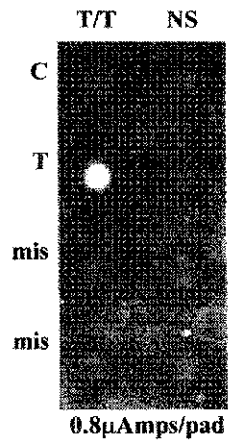
10/20

PCT/US00/08617

**IL-1 $\beta$  T/T identification**



**FIG. 9A**



**FIG. 9B**

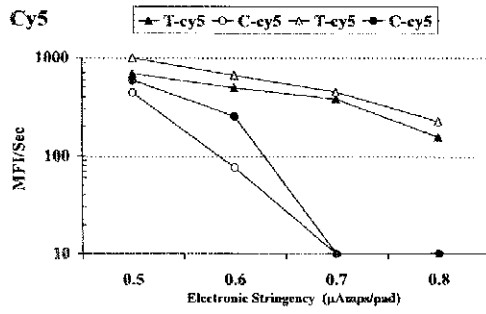
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/58522

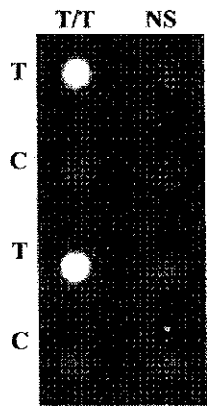
11/20

PCT/US00/08617

**IL-1 $\beta$  T/T identification**



**FIG. 10A**



**0.8 $\mu$ Amps/pad**

**FIG. 10B**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

12/20

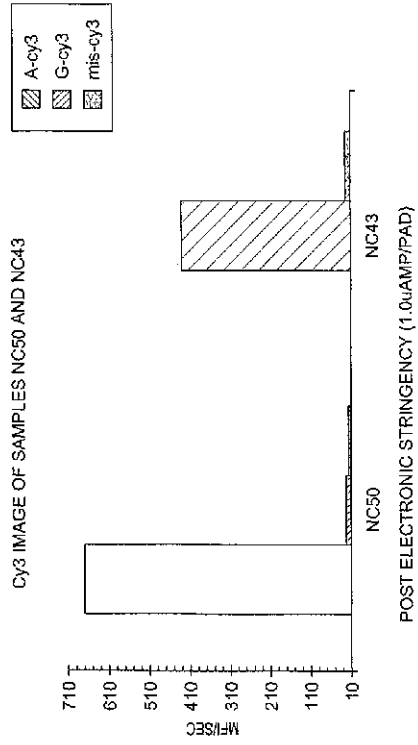


FIG. 11A

WO 00/58522

PCT/US00/08617

13/20

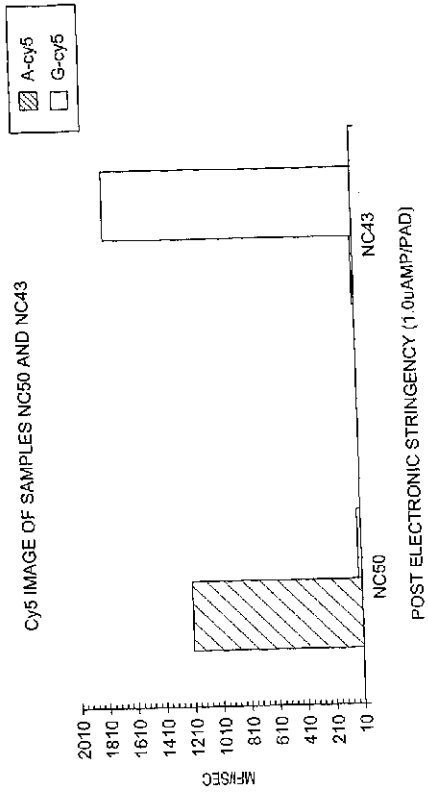


FIG. 11B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/58522

PCT/US00/08617

14/20

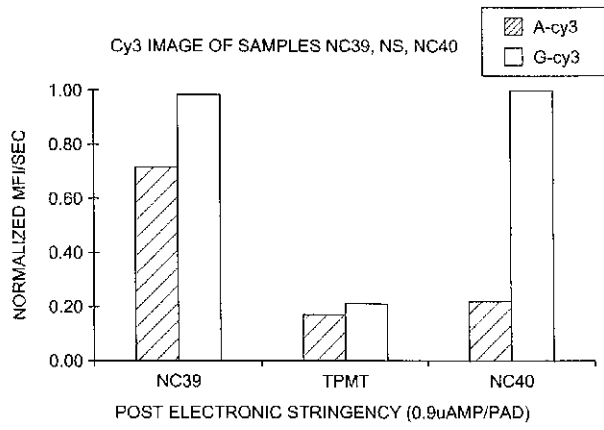


FIG. 12A

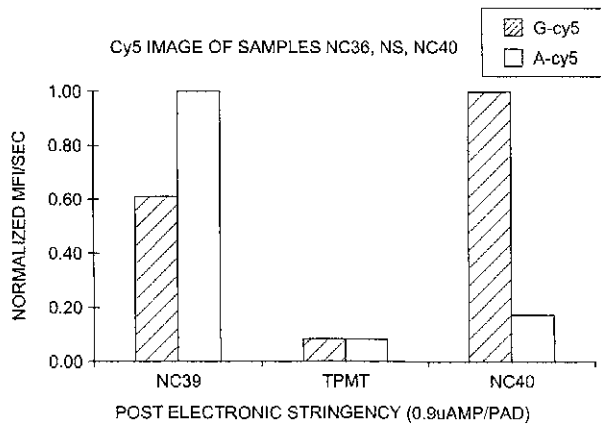


FIG. 12B

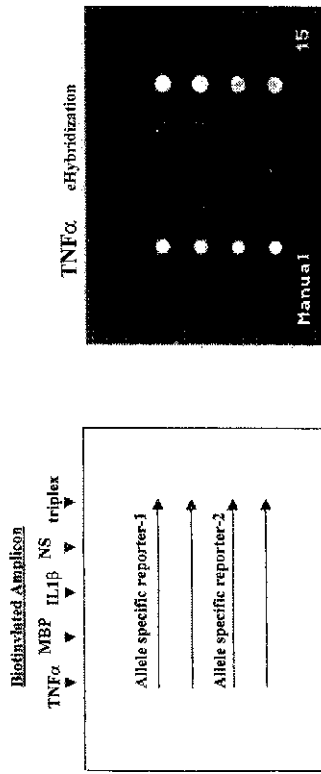


FIG. 13B

FIG. 13A

WO 00/58522

PCT/US00/08637

16/20

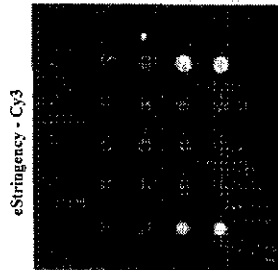


FIG. 13D

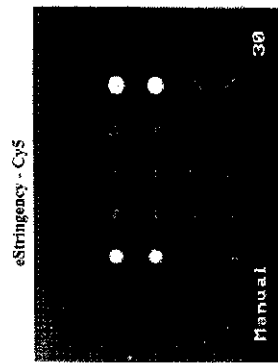


FIG. 13C

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

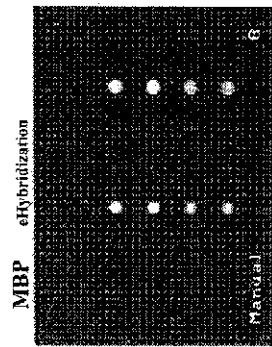


FIG. 13F

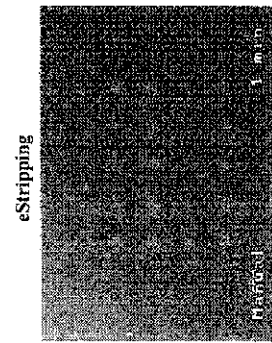


FIG. 13E



WO 00/58822

PCT/AUS00/08617

18/20

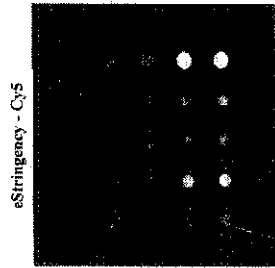


FIG. 13H

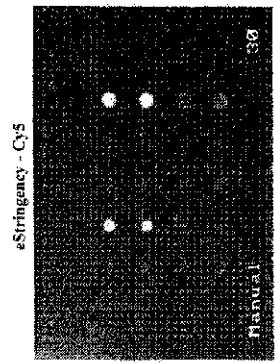


FIG. 13G

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/58522

PC17US0008617

19/20

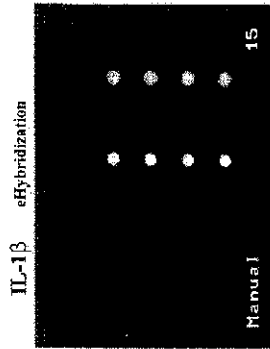


FIG. 13J

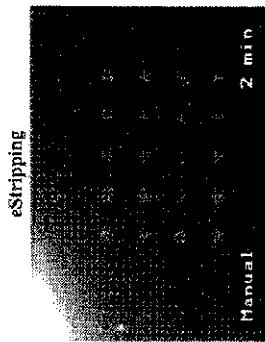


FIG. 13I

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

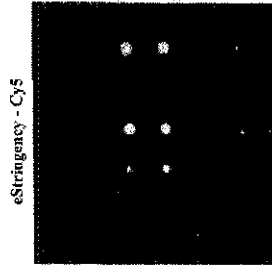


FIG. 13L

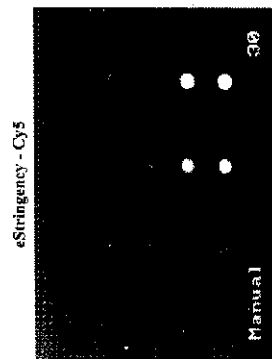
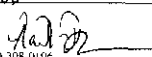


FIG. 13K

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/08617
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C12Q 1/68, C07H 21/04 US Cl. : 435/6 ; 536/24.3 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6 ; 536/24.3 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	GILLES et al. Single nucleotide polymorphic discrimination by an electronic dot blot assay on semiconductor microchips. Nature Biotechnology, April 1999, Vol. 17, No. 4, pages 365-370, see entire document.	1-9
X	SOSNOWSKI et al. Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, February 1997, Vol. 94, No. 4, pages 1119-1123, see entire document.	1-9
Y	WO 9712030 A1 (KANOGEN, INC.) 03 April 1997 (03.04.1997), entire document.	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family sources.		
Special categories of cited documents:		
"A"	documents defining the general state of the art which is generally considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"I"	document which may throw doubts on priority claimed or which is cited to establish the publication date of another earlier or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to a oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
22 May 2000 (22.05.2000)	03 JUL 2000	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Telex No. (703) 305-3220	Authorized Officer Young J. Kim  Telephone No. (703) 308-0196	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US00/08617

Continuation of B. **FIELDS SEARCHED** Item 3: West 2.0 (USPT, EPAB, JPAB, DWPI, TDBD)  
STN Commercial Database (Biois, Medline, Embase, Finbio, SciSearch, BiosisCDS, CAPlus)  
Search Terms: SNP, Single nucleotide polymorphism, polymorphism, electronically addressable, array, microarray, chip

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> F I テーマコード(参考)  
C 1 2 N 15/00 A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(74) 上記1名の代理人 100062144

弁理士 青山 稜

(74) 代理人 100106231

弁理士 矢野 正樹

(72) 発明者 ギレス, パトリック・エヌ

アメリカ合衆国 9 2 0 0 9, カリフォルニア州カールスバッド, ジェラニウム・ストリート 1 7 2 0

(72) 発明者 ディロン, パトリック・ジェイ

アメリカ合衆国 9 2 0 0 9, カリフォルニア州カールスバッド, スナイプ・コート 1 0 5 5

(72) 発明者 ウー, デイヴィッド・ジェイ

アメリカ合衆国 9 2 3 0 7, カリフォルニア州ラホヤ, パセオ・ドラド# 7 2 0 4 1

(72) 発明者 フォスター, チャールズ・ビー

アメリカ合衆国 9 2 1 2 1, カリフォルニア州サンディエゴ, パシフィック・センター・コート 1 0 3 9 8, ナノゲン・インコーポレイテッド

(72) 発明者 チャノック, ステファン・ジェイ

アメリカ合衆国 9 2 1 2 1, カリフォルニア州サンディエゴ, パシフィック・センター・コート 1 0 3 9 8, ナノゲン・インコーポレイテッド

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA03 CA09 HA14

4B063 QA01 QA12 QA18 QA19 QQ42 QR56 QR62 QR82 QS25 QS34

QS39 QX02