

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4031028号
(P4031028)

(45) 発行日 平成20年1月9日(2008.1.9)

(24) 登録日 平成19年10月26日(2007.10.26)

(51) Int. Cl.		F I		
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68 A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A

請求項の数 32 (全 44 頁)

(21) 出願番号	特願平6-520580	(73) 特許権者	596178419
(86) (22) 出願日	平成6年3月7日(1994.3.7)		エヌ・ブイ・インノジェネティクス・ソシ
(65) 公表番号	特表平8-507690		エテ・アノニム
(43) 公表日	平成8年8月20日(1996.8.20)		N. V. INNOGENETICS S.
(86) 国際出願番号	PCT/EP1994/000654		A.
(87) 国際公開番号	W01994/021818		ベルギー国、ビー-9710 ゲント、ボ
(87) 国際公開日	平成6年9月29日(1994.9.29)		ックス 4、インダストリーパーク・ツウ
審査請求日	平成13年3月7日(2001.3.7)		イナード 7
(31) 優先権主張番号	93400700.6	(74) 代理人	100078662
(32) 優先日	平成5年3月18日(1993.3.18)		弁理士 津国 肇
(33) 優先権主張国	欧州特許庁(EP)	(74) 代理人	100116919
			弁理士 齋藤 房幸
		(74) 復代理人	100147533
			弁理士 岡崎 祐一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特異的プライマー及びプローブセットを使用するHLA-Bタイピングの方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生物学的試料中の1つ以上のHLA-B対立遺伝子をダイピング又はサブダイピングするための方法であって、該HLA-B対立遺伝子はエクソン2の30~33位で5'-GCCA-3'配列を含み、該方法が下記の工程：

(i) (a) 下記の配列：

5'-AGGTATTTCTACACCGCCA-3' (B25P、SEQ ID NO1)、

5'-AGGTATTTCCACACCGCCA-3' (SEQ ID NO2)

または

5'-AGGTATTTTCGACACCGCCA-3' (SEQ ID NO3)

を有する少なくとも1つの5'末端増幅プライマーと

(b) 該HLA-B対立遺伝子に対して適切な少なくとも1つの3'末端増幅プライマーと

によりHLA-B対立遺伝子の核酸

を増幅すること；そして

(ii) 工程(i)において形成された増幅産物を、適切な条件で、HLA-Bエクソン2領域の15~261領域から選択される1つ以上の適切なプローブとハイブリダイズすること、

(iii) 工程(ii)において形成されたハイブリダイズされた産物を適切な洗浄条件

で洗浄すること、

(iv) ハイブリダイズされた産物を検出すること；そして

(v) 観察されるハイブリダイゼーションパターンから対立遺伝子の有無を推定すること、を含む方法。

【請求項2】

H L A - B 対立遺伝子が、B - 5 4 (2 2)、B 5 2 (5)、B 7 8 0 1、B 6 2 (1 5)、B 7 5 (1 5)、B 7 1 (7 0)、B 7 2 (7 0)、B 4 6、B 7 9、B 5 3、B 5 1 0 2、B 5 1 0 3 または B 5 8 (1 7) と命名されている H L A - B 対立遺伝子にある、請求項1記載の方法。

10

【請求項3】

少なくとも1つの3'末端増幅プライマーが、下記の配列：

5' - T C T G G T T G T A G T A G C C G C G C A - 3' (B 2 3 P 1、SEQ ID NO 4)、

5' - T C T G G T T G T A G T A G C G G A G C G - 3' (B 2 3 P 2、SEQ ID NO 5)、または

5' - T C C G C A G G T T C T C T C G G T A - 3' (B 2 3 P 3、SEQ ID NO 6)

を有する、請求項1～2のいずれか1項記載の方法。

【請求項4】

5'および3'増幅プライマーが、検出可能な標識を有する、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

20

【請求項5】

検出可能な標識が、ビオチンである、請求項4記載の方法。

【請求項6】

少なくとも1つの下記のプライマーセットの組合せ：

- B 2 5 P / B 2 3 P 2 と組合せた B 2 5 P / B 2 3 P 1、又は

- B 2 5 P / B 2 3 P 3 と組合せた B 2 5 P / B 2 3 P 1

を増幅のために使用する、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

【請求項7】

選択された2つのプライマーセットとの増幅反応が異なる反応試験管で行われ、増幅産物が別々にハイブリダイズされる、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

30

【請求項8】

選択された2つのプライマーセットとの増幅反応が異なる反応試験管で行われ、増幅後に増幅産物が混合されて、一緒にハイブリダイズされる、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項9】

選択されたプライマーが混合されて、増幅反応が単一の反応試験管で行われ、その後増幅産物が一緒にハイブリダイズされる、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項10】

1つ以上のハイブリダイゼーションプローブが、下記のリスト：

SEQ ID NO 7、SEQ ID NO 8、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 10、SEQ ID NO 11、SEQ ID NO 13、SEQ ID NO 14、SEQ ID NO 18、SEQ ID NO 19、SEQ ID NO 21、SEQ ID NO 22、SEQ ID NO 23、SEQ ID NO 24、SEQ ID NO 26、SEQ ID NO 27、SEQ ID NO 28、SEQ ID NO 29、SEQ ID NO 30、SEQ ID NO 36、SEQ ID NO 39、SEQ ID NO 44、SEQ ID NO 45、SEQ ID NO 46、SEQ ID NO 49、又は SEQ ID NO 52、

或は、任意の上述のオリゴヌクレオチドプローブに対する相補体、或は、デオキシリボヌ

40

50

クレオチドの代わりにリボヌクレオチドよりなる上述のオリゴヌクレオチドプローブ、或は、脂肪族基、NH₂、SH又はカルボキシル基を含有するそれらの誘導体プローブから選択される、請求項1～9のいずれか1項記載の方法。

【請求項11】

1つ以上のハイブリダイゼーションプローブが、標識されている、請求項10記載の方法。

【請求項12】

得られた増幅産物が固体支持体に固定化され、予め標識された請求項10記載の任意のプローブと接触させることを特徴とする、請求項1～10のいずれか1項記載の方法。

【請求項13】

得られた増幅産物を、請求項10記載の少なくとも1つのプローブが予め固定化された固体支持体と接触させることを特徴とする、請求項1～12のいずれか1項記載の方法。

【請求項14】

得られた増幅産物を、膜ストリップに平行線として固定化されたオリゴヌクレオチドプローブにハイブリダイズさせることを特徴とする、請求項1～13のいずれか1項記載の方法。

【請求項15】

H L A - B 対立遺伝子を検出し同定するための方法であって、下記の工程：

- 請求項1～14のいずれか1項記載の方法により、生物学的試料中に存在する核酸が属するH L A - B タイプを決定し、
- 表1に定義されるものに対応するハイブリダイゼーションパターンを生成しない試料を観察した場合は、決定されるべきH L A - B 対立遺伝子の、異常にハイブリダイズするプローブに対応する、H L A - B エクソン2配列の部分を配列決定すること、を含む方法。

【請求項16】

請求項15記載の方法を使用して、B 7 2 (B * 1 5 0 3) と非 B 7 2 H L A - B 対立遺伝子を識別するための方法であって、この非 B 7 2 H L A 対立遺伝子が、B * 1 5 0 3 対立遺伝子にハイブリダイズする、SEQ ID NO 1 9、SEQ ID NO 1 3、SEQ ID NO 1 6、SEQ ID NO 2 4、およびSEQ ID NO 2 5 かなる群から選択される少なくとも1つのプローブとはハイブリッドを形成しないことにより特徴付けられる方法。

【請求項17】

請求項15記載の方法を使用して、B 7 2 (B * 1 5 0 3) と非 B 7 2 H L A - B 対立遺伝子を識別するための方法であって、プローブ2 (SEQ ID NO 8) とはハイブリッドを形成するが、プローブ1 3 (SEQ ID NO 1 9) とはハイブリッドを形成しないことにより特徴付けられる方法。

【請求項18】

下記の配列：

5' - AGGTATTTCTACACCGCCA - 3' (B 2 5 P、SEQ ID NO 1)

5' - AGGTATTTCCACACCGCCA - 3' (SEQ ID NO 2)

または

5' - AGGTATTTTCGACACCGCCA - 3' (SEQ ID NO 3)

を有する、

H L A - B 対立遺伝子を増幅するためのオリゴヌクレオチド増幅プライマー。

【請求項19】

下記のリスト：

10

20

30

40

5' -TCTGGTTGTAGTAGCCGCGCA-3' (B23P1、SEQ ID NO4)、
 5' -TCTGGTTGTAGTAGCGGAGCG-3' (B23P2、SEQ ID NO5)、または
 5' -TCCGCAGGTTCTCTCGGTA-3' (B23P3、SEQ ID NO6)

から選択されるオリゴヌクレオチド増幅プライマーの少なくとも1つと、請求項18記載のプライマーの少なくとも1つとを組合せて含む組成物。

【請求項20】

検出可能な標識を有する、請求項18記載のオリゴヌクレオチド増幅プライマー。

10

【請求項21】

検出可能な標識が、ピオチンである、請求項20記載のオリゴヌクレオチド増幅プライマー。

【請求項22】

下記のリスト:

5' -TCTGGTTGTAGTAGCCGCGCA-3' (B23P1、SEQ ID NO4)、
 5' -TCTGGTTGTAGTAGCGGAGCG-3' (B23P2、SEQ ID NO5)、または
 5' -TCCGCAGGTTCTCTCGGTA-3' (B23P3、SEQ ID NO6)

20

から選択される、検出可能な標識を有するオリゴヌクレオチド増幅プライマーの少なくとも1つと、請求項20または21記載のプライマーの少なくとも1つとを組合せて含む組成物。

【請求項23】

下記のリスト:

5' -TCTGGTTGTAGTAGCCGCGCA-3' (B23P1、SEQ ID NO4)、
 5' -TCTGGTTGTAGTAGCGGAGCG-3' (B23P2、SEQ ID NO5)、または
 5' -TCCGCAGGTTCTCTCGGTA-3' (B23P3、SEQ ID NO6)、

30

から選択される、ピオチン標識を有するオリゴヌクレオチド増幅プライマーの少なくとも1つと、請求項20または21記載のプライマーの少なくとも1つとを組合せて含む組成物。

【請求項24】

下記のプローブのリスト:

SEQ ID NO7、SEQ ID NO8、SEQ ID NO9、SEQ ID NO10、SEQ ID NO11、SEQ ID NO13、SEQ ID NO14、SEQ ID NO18、SEQ ID NO19、SEQ ID NO21、SEQ ID NO22、SEQ ID NO23、SEQ ID NO24、SEQ ID NO26、SEQ ID NO27、SEQ ID NO28、SEQ ID NO29、SEQ ID NO30、SEQ ID NO36、SEQ ID NO39、SEQ ID NO44、SEQ ID NO45、SEQ ID NO46、SEQ ID NO49、又は SEQ ID NO52;

40

或は、任意の上述のオリゴヌクレオチドプローブに対する相補体;或は、デオキシリボヌクレオチドの代わりにリボヌクレオチドよりなる任意の上述のオリゴヌクレオチドプローブ

から選択される少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプローブを含む、請求項1~17のいずれか1項記載の方法のための組成物。

50

【請求項 25】

H L A - B 対立遺伝子のタイピング用逆相ハイブリダイゼーション分析に組み込むために固定化された、請求項 24 記載の 1 つ以上のプローブ。

【請求項 26】

請求項 24 記載の 1 つ以上のプローブが表面に結合している固体支持体。

【請求項 27】

生物学的試料から、1 つ以上の H L A - B 対立遺伝子をタイピングまたはサブタイピングするためのキットであって、下記：

- 1 つ以上のプライマーセットの組合せ：B 2 5 P / B 2 3 P 2 (S E Q I D N O 1 / S E Q I D N O 5) と組み合わせた B 2 5 P / B 2 3 P 1 (S E Q I D N O 1 / S E Q I D N O 4)、または
 - B 2 5 P / B 2 3 P 3 (S E Q I D N O 1 / S E Q I D N O 6) と組み合わせた B 2 5 P / B 2 3 P 1 (S E Q I D N O 1 / S E Q I D N O 4)；
 - 請求項 24 記載の 1 つ以上のハイブリダイゼーションプローブ、
 - ハイブリダイゼーションのための適切な緩衝試薬、
- を含むことを特徴とするキット。

【請求項 28】

さらに、自動走査並びに結果を解釈し、そのハイブリダイゼーションパターンから対立遺伝子を推定するための解釈装置を含む、請求項 27 記載のキット。

【請求項 29】

H L A - B 対立遺伝子が、B - 5 4 (2 2)、B 5 2 (5)、B 7 8 0 1、B 6 2 (1 5)、B 7 5 (1 5)、B 7 1 (7 0)、B 7 2 (7 0)、B 4 6、B 7 9、B 5 3、B 5 1 0 2、B 5 1 0 3 または B 5 8 (1 7) と命名されている H L A - B 対立遺伝子にある、請求項 27 また 28 記載のキット。

【請求項 30】

ハイブリダイゼーションプローブが固体支持体に固定されている、請求項 27 ~ 29 のいずれか 1 項記載のキット。

【請求項 31】

固体支持体が、膜ストリップである、請求項 30 記載のキット。

【請求項 32】

さらにハイブリダイゼーションから生じたハイブリッドを検出するための手段を含む、請求項 27 ~ 31 のいずれか 1 項記載のキット。

【発明の詳細な説明】

本発明は、H L A - B 対立遺伝子の D N A タイピングのための方法及び試薬に関する。

本発明の基礎となっている技術的問題は、特に血清学的方法により識別するのが困難である、H L A - B 対立遺伝子の識別を可能にする特異的プライマー及びプローブセットを使用した D N A タイピング方法を提供することである。

ヒト白血球抗原 (H L A) 系は、第 6 染色体の短腕上の一連の連結遺伝子よりなる。3 つのクラスの遺伝子が定義されている：第 1 5 染色体上にコードされる、2 ミクログロブリンと非共有結合で結合している鎖よりなるクラス I 抗原 (H L A - A、B、C)；鎖及び鎖よりなるクラス II 抗原 (D P、D Q、D R)；補体系の成分に対応するクラス III 産物。クラス I 及びクラス II 抗原は、多型の膜通過型糖タンパクであり、抗原提示における共通の免疫学的役割を共有する。H L A クラス I に制限された外来抗原の提示により、成熟 T リンパ球中に細胞毒性の T 細胞リセプターが現われる。更に、クラス I 及びクラス II 抗原は、移植の免疫学及び自己免疫疾患の罹病性において重要な役割を占める。多くの座に広範囲な多型 (polymorphism) が存在する。これらの抗原の生物学的及び医学的重要性の観点から、H L A タイピングのための高感度で迅速な方法が求められている。これまで異なるプロトコールが使用されてきた。それらは、血清学的方法、細胞学的方法及び D N A に基づく制限断片長多型 (restriction fragment polymorphism) (R F L P) 法及び最近の配列特異的オリゴヌクレオチド (sequence specific oligonucleotide)

10

20

30

40

50

(SSO)ハイブリダイゼーション法である。オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションによるDNAタイピングは、完全な配列分析に次いでHLA多型性の最も優れた直接の定義を与える。しかし、配列分析は費用と時間がかかるため、ルーチンの使用には適さない。

多型性はHLA抗原の機能にとって根本的に重要であり、多くは機能的に重要な細胞外ドメインをコードするエクソンに局在する。

クラスI遺伝子については、多くの多型はアミノ末端 1 と 2 ドメインに局在する。

3 ドメインは、高度に保存されたイムノグロブリン様ドメインである。全部で40個のHLA-A、64個のHLA-B、及び24個のHLA-C対立遺伝子が同定されている (ZemmourとParham, Tissue Antigens, 40: 221-228, 1992)。異なる対立遺伝子間の相違は、1 及び 2 ドメインの特定の領域に発生する。異なる対立遺伝子間に、複数の短い相同部分が存在するパッチワークパターンが発生する。相同組み換えやエクソンシャuffling (exon shuffling) のような遺伝学的機構により、座特異的 (locus specific) 対立遺伝子の多様性が生じる (ParhamらPNAS (USA) 85: 4005-4009, 1988)。

非常に多型性のクラスI及びクラスII座の異なる対立遺伝子を識別するために、異なるタイピング法が開発されてきた。これらの異なるタイピング法の概要を以下に示す：

血清学的方法：ミクロ毒性試験 (microtoxicity test) において、異なるHLAクラスI又はクラスII抗原に対する抗血清を、溶解した精製リンパ球と一緒にインキュベートする。溶解した細胞はエオシン又は他の色素で染色されるが、一方溶解されない細胞は染色されないままである。この方法は、クラスIA、B、C対立遺伝子及びクラスIIDR及びDQ対立遺伝子に使用される。DP対立遺伝子は、発現のレベルが低すぎ抗血清の入手が困難なため、タイピングできない。クラスII対立遺伝子の反応は、精製したBリンパ球上で行われる。超定型的 (supertypic) な群の対立遺伝子の限定された測定は、更なるサブタイピングなしに可能である。HLA-C座の3個の対立遺伝子は、血清学的に未解明のままである。HLA分子上のエピトープが検出されるため、鎖及び鎖間の識別は不可能でありヘテロダイマーが同定される。クラスII分子に対するアロ血清 (allo sera) は、しばしば抗クラスIが混入しており、使用の前に吸収する必要がある。同一又は異なる座上の対立遺伝子間で交差反応が発生し、これにより結果の解析が困難になっている。モノクローナル抗体が使用されるとしても、交差反応の問題は解決されない。本法は非常に迅速な方法 (完全なタイピングに3時間) であるが、不完全で誤った結果が得られることが大きな問題である。

細胞学的方法：放射線照射されたホモ接合体タイピング細胞による刺激に対するT細胞培養の増殖応答に基づいて、混合リンパ球反応 (mixed lymphocyte reaction) (MLR) が開発された。増殖は、 H^3 -チミジンの取り込みにより測定される。本法は、DR及びDQ対立遺伝子のHLAクラスIIタイピングのために使用される。DPは膜発現のレベルが低いため、DPタイピングは不可能である。これらの分析は、血清学的特異性を更に細分するDW特異性を規定した。HLA-DW特異性は、DR及びDQ抗原により決定されるが、これはほとんどいつもDR及びDQ座上のある特定の対立遺伝子と関連している。HLA-DPタイピングについては、2次的MLRを行うことができる。この分析は、インビトロ (試験管内) の2次的又は記憶応答 (in vitro secondary or memory responses) に基づく。放射線照射された刺激細胞にリンパ球が応答した時には、培養の10日後これらは芽細胞の広がりから小リンパ球の産物へ逆戻りする。これらの細胞は、タイピングすべき、そして最初の陽性反応を与えた1次刺激細胞と抗原を共有する照射された刺激細胞に対して、培養においてより強力に加速した応答を与える能力を有する (FestensteinとOllier, 1987)。本分析法は、極めて完全で正確であるが、非常に時間がかかり実施は困難である。抗原の表面発現と関係しないという利点を有する、異なるDNAタイピング法が開発された。これらのDNAタイピング法の概要を示す：

制限断片長多型 (RFLP) 法：高分子量DNAを幾つかの制限酵素で消化し、ゲル電気泳動により大きさに従い分離し、フィルターにプロットし、HLA-DQA、DQB、DPB又はDRBのcDNAプローブにハイブリダイズさせる。異なる対立遺伝子について

10

20

30

40

50

明確なパターンバンドが得られる。異なる制限部位の多型性を見出すため、また使用される異なる酵素を決定するために配列分析が使用された。しかしこの方法は幾つかの欠点を有する：大量の高分子量DNAが必要とされること、さほど多くない対立遺伝子しか識別することができないこと、幾つかの制限酵素の使用、表現型では無関係な特異的アミノ酸の差異の検出。

ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction) (PCR) 法：全てのクラスII対立遺伝子の配列は公知であるため、多型領域を増幅するために座特異的プライマーを設計することができる。増幅後、大量の特異的配列がRFLP分析又はSSOハイブリダイゼーションにより分析される。PCR産物は、異なる制限酵素により消化することができ、断片を電気泳動によりゲル上で分離できる。代替法はハイブリダイゼーション法である。配列特異的オリゴヌクレオチド (SSO) を設計する。ハイブリダイゼーションは、従来法のドットプロット法で行うことができる。PCR産物は、膜に共有結合し、³²P 標識SSOにハイブリダイズする。他の標識方法も可能である。陽性シグナルの検出は、オートラジオグラフィにより行われる。全てのSSOは長さ及びGC含有量が異なるため、従来法のドットプロット法では異なるSSOには異なるハイブリダイゼーション温度が必要であろう。

HLAクラスI抗原に関する従来法の血清学的及び細胞学的タイピング法は、充分確立している。しかし、抗血清の特異性、自己抗体の存在又は薬物療法のため、誤った結果が発生することがある。HLA-Bについては、下記のタイプでタイピングの問題が目立って経験される：

血清学的名称	対応する対立遺伝子
B54 (22)	B* 5401
B52 (5)	B* 5201 / B* 52012
B78	B* 7801
B62 (15)	B* 1501 / B* 1504
B75 (15)	B* 1502
B72 (70)	B* 1503
B71 (70)	未知
B46	B* 4601
B79	B* 7901
B58 (17)	B* 5801
B53	B* 5301
B5102 (B5 / B35)	B* 5102
B5103 (BTA)	B* 5103

DNAに基づくタイピング系は、これらの難しいHLA-Bタイプの同定を大きく改良し加速するであろう。その結果、これは、臓器及び骨髄移植の成功率及びかかる総費用に有益な影響をもたらす。移植の成功率と、提供者と受容者のHLA-B適合性との間には高い相関が存在するという十分な証拠がある。

更により正確なHLA-Bタイピングはまた、疾患罹病性の研究及び法医学的調査を相当に改善又は容易にするであろう。

一般に、簡便、迅速かつ信頼できるDNAタイピング法が使用可能であれば、DNAタイピング法は、血清学的タイピング法よりも好適であることに注意すべきである。これは、サブタイプレベルのある差異 (これはDNA法では通常検出可能である) が、同種移植片拒絶を引き起こすにも拘らず、現在の血清学的タイピング法により検出されないためである (Fleischhauerら, New Eng. J. Med. 323:1818-1822, 1990)。

H L A クラスII 遺伝子の定義に関して分子生物学の応用が成功したのとは対照的に、クラスI 分子タイピングの開発は未だに困難である。これは、この領域の著しい多型性、ヌクレオチド置換の複雑さ及び多くの非古典的クラスI 遺伝子と偽遺伝子の存在による。クラスI 抗原は、血清学的交差反応性群 (C R E G) を規定するほとんど H L A - A 及び - B 抗原内の、異なる対立遺伝子との交差反応性により特徴付けられる。H L A - A 及び B 対立遺伝子は、各々 5 個及び 10 個の古典的 C R E G 群に分類される。現在までのところ、全ての公知の H L A - A 特異性は配列決定されており、このためこれらの交差反応を説明する配列の相同性が規定され、そして最近、配列特異的プライマー (S S P) を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を利用できるようになった。これとは対照的に、H L A - B 対立遺伝子は、より広範囲の多型性、及び高レベルの交差反応性により特徴付けられる。更に、B 対立遺伝子の大部分は、未だ配列決定されていない。交差反応性と D N A 配列の間の相関には、幾つかの矛盾が存在する。

クラスII と比較すると、クラスI 対立遺伝子の P C R と D N A プロブタイピングを扱っている文献の数は限定されている。Yoshida らの論文 (1992, 下記を参照) を除いて、本発明の主題である対立遺伝子はこれらの研究には含まれていない。Summers ら (Hum. Immunol. 32: 176-182, 1991) は、配列決定のためのクラスI 対立遺伝子の P C R の使用を記載している。B 4 4 対立遺伝子 (B^{*}4401、B^{*}4402) の識別のための、P C R と、オリゴヌクレオチドプローブを用いる古典的ドットハイブリダイゼーションの組合せが、Fleischhauer ら (N. Eng. J. Med. 323:1818-1822, 1990) により記載されている。

2 つの研究グループが、H L A - B 2 7 対立遺伝子の D N A タイピングとサブタイピングについて報告している (Hill ら, The Lancet, 337: 640-642, 1991; Dominguez ら, Immunogenetics 36:277-282, 1992)。

Hernandez-Viña

ら (Hum. Immunol. 33:163-173, 1992) は、H L A - A 2 及び H L A - A 2 8 対立遺伝子の P C R 増幅に続くオリゴヌクレオチドタイピングを記載しており；そして増幅不応性増幅系 (amplification refractory amplification system) を使用する、H L A - A 対立遺伝子のより一般的なタイピング法が、最近 Krausa らにより記載されている (The Lancet, 341:121-122, 1993)。

Yoshida ら (Hum. Immunol. 34: 257-266, 1992) も、P C R を古典的ドットプロット法及び / 又は 1 本鎖確定多型分析 (single strand confirmation polymorphism analysis) と組合せた。彼らは、26 個の H L A - B 特異性のタイピングのための P C R - プライマーとプローブの組合せを設計した。彼らのタイピング法は、主に、B w 4 と B w 6 スーブラタイプ (supratypes) を識別するプライマーを用いるディフェレンシャル増幅の使用、及び H L A - B 特異的 5' - 側プライマーの使用に基づいている。記載したプライマーセットとプローブにより、この著者らは下記の対立遺伝子を識別しなかった：B^{*}5401、B^{*}7801 及び B^{*}7901 (これらは従来法でもタイピングが難しい)。対立遺伝子間の配列の差異が、彼らのプライマーで増幅した領域の外側に位置しているため、B^{*}5201 と B^{*}52012 や、B 5 3 と B 5 1 対立遺伝子も彼らは識別できなかった。

従って本発明は、ハイブリダイゼーション法により 1 つ以上の H L A - B 対立遺伝子を D N A タイピング又はサブタイピングするための方法を提供することを目的とする。

更に詳しくは、本発明は、対応する血清学的タイピング法では問題があるか、又は不可能であるこれら H L A - B 対立遺伝子の、D N A タイピング及び / 又はサブタイピングのための方法を目的とする。血清学的タイピング法では問題のある主要な対立遺伝子は、下記のものである：

10

20

30

40

血清学的名称	対応する対立遺伝子
B 5 4 (2 2)	B* 5 4 0 1
B 5 2 (5)	B* 5 2 0 1 / B* 5 2 0 1 2
B 7 8	B* 7 8 0 1
B 6 2 (1 5)	B* 1 5 0 1 / B* 1 5 0 4
B 7 5 (1 5)	B* 1 5 0 2
B 7 2 (7 0)	B* 1 5 0 3
B 7 1 (7 0)	未 知
B 4 6	B* 4 6 0 1
B 7 9	B* 7 9 0 1
B 5 8 (1 7)	B* 5 8 0 1
B 5 3	B* 5 3 0 1
B 5 1 0 2 (B 5 / B 3 5)	B* 5 1 0 2
B 5 1 0 3 (B T A)	B* 5 1 0 3

10

別の実施態様により、本発明は、上記リストから選択されるような血清学的タイピング法では問題のあるHLA-B対立遺伝子のDNAタイピングを可能にする配列特異的オリゴヌクレオチドを提供することを目的とする。

20

更に別の実施態様により、本発明は、上記リストから選択されるような血清学的タイピング法では問題のあるHLA-B対立遺伝子のDNAタイピングを可能にする配列特異的プライマーを提供することを目的とする。

本発明はまた、少なくとも1つの上述の配列特異的オリゴヌクレオチド及び/又は特異的プライマーよりなる組成物又は固体支持物を提供することを目的とする。

更に詳しくは、本発明の方法は、特異的なプライマー(SP)により、血清学的タイピング法では問題のある対立遺伝子に対応する、HLA-B対立遺伝子の特異的サブセットのエクソン2を増幅すること、及び続いて増幅産物を、HLA-Bのエクソン2の増幅領域を含む配列特異的オリゴヌクレオチド(SSO)の適切なセットにハイブリダイズさせることを目的とする。

30

本発明はまた、上記リストから選択されるような血清学的タイピング法では問題のあるHLA-B対立遺伝子のDNAタイピングのためのキットを提供することを目的とする。

本発明は、新規な方法と試薬を提供することにより、上述の目的を満たしている。更に詳しくは、特異的プライマー(SP)と配列特異的オリゴヌクレオチド(SSO)の特異的なセット、及びこれと一緒にHLA-B遺伝子の対立遺伝子をタイピングするための迅速、簡便かつ正確な系を提供する方法を実行するためのキットを提供することにより、本発明は、上述のニーズを満たしている。

本発明による新規な方法と試薬により、以前には未知のHLA-B対立遺伝子が発見され、またこれらの対立遺伝子を本法によりタイピング及び同定することができる。B76、B77、B61、B67及びB59のような、幾つかの他のタイプ(上記の表にはリストされていない)もまた、血清学によるタイピングは困難である。核酸配列は未知であるが、これらの特異性が本発明の方法を使用してタイピングできるかどうかを予測することが時々可能なことがある。これは、本明細書ではB71について例示される。

40

「タイピング又はサブタイピング」という表現は、生物学的試料に存在するタイプ又はサブタイプを決定及び/又は識別することとして理解されるべきである。タイプ又はサブタイプにより、そのタイピング方法により識別される全ての変異体が理解される。1つの対立遺伝子のタイプを識別する場合には、タイピング方法は、その特異的対立遺伝子の存在を決定する。

50

公式に認められた血清学的タイプ（HLA特異性とも呼ばれる）及びこれらの対応する対立遺伝子（配列が公知であれば）は、毎年更新される参照リストに集められる（Bodnerら、Tissue Antigens, 39: 161-173, 1992）。

本発明の方法は、増幅プライマーの特定のセット（SPとも呼ばれる）を用いる、恐らく試料中に存在するHLA-B対立遺伝子のサブセットのエクソン2の増幅に基づく。続いて増幅産物を、DNAプローブの適切なセット（SSOとも呼ばれる）とハイブリダイズさせ、その後形成されたハイブリッドを検出し、生成したハイブリダイゼーションパターンからHLA-Bタイプを導き出す。本法では、特に、血清学的方法により区別するのが困難であるか、又は全然区別できないタイプの同定を目的としており、5'末端増幅プライマーが、HLA-B対立遺伝子のエクソン2の30~33領域（ZemmourとParham, 1992により与えられた番号付けによる）を特異的に標的とすることが特に有利である。これらの著者により与えられた配列データにより、本発明により決定することができる全ての公知の対立遺伝子は、エクソン2の30~33位に下記の配列を有している：5'-GCCCA-3'。このため、この配列で終わる増幅プライマーは、必要な全ての対立遺伝子を増幅し、同時に他の多くのHLA-B対立遺伝子（エクソン2の30~33位の対応する5'-TCCG-3'配列により特徴付けられる）のエクソン2の増幅を除外して、これによりDNAタイピング法を相当に単純化する。DNA配列が公知（ZemmourとParham, 1992）であり、30~30位の5'-GCCCA-3'配列により特徴づけられるHLA-Bエクソン2対立遺伝子を第1表にリストする。

このように本発明は、HLA-B対立遺伝子のエクソン2の30~33位（番号付けは、ZemmourとParham, 1992による）の5'-GCCCA-3'配列により特徴づけられる試料中の1つ以上のHLA-B対立遺伝子をタイピング又はサブタイピングするための方法に関し、更に詳しくは、例えばB54(22)、B52(5)、B7801、B62(15)、B75(15)、B71(70)、B72(70)、B46、B79、B53、B5102、B5103及びB58(17)のような、血清学的には識別が困難であるHLA-Bタイプを識別する方法に関し、この方法は少なくとも下記の工程よりなる：

(i) 場合により試料中の核酸を抽出し、

(ii) HLA-B対立遺伝子のエクソン2の30~33位の5'-GCCCA-3'配列により特徴づけられるHLA-B対立遺伝子の核酸を、下記のリスト：

5'-AGGTATTTCTACACCGCCA-3' (B25P、SEQ ID NO1)

又は次のようなこれらの配列変異体、

5'-AGGTATTTCCACACCGCCA-3' (SEQ ID NO2)

5'-AGGTATTTTCGACACCGCCA-3' (SEQ ID NO3)

又は他の配列変異体（これらの配列変異体は、1つ以上のヌクレオチドの欠失、及び/又は挿入、及び/又は置換を含むが、3'末端GCCA配列が保存されており、かつこれらの配列変異体上記のB25Pプライマー又はその変異体と同一のHLA-B対立遺伝子を特異的に増幅させることができる）から選択される少なくとも1つの5'末端増幅プライマーと一緒に、上記で定義された5'末端プライマーと同一の対立遺伝子から選択される適切な3'末端プライマー（5'及び3'末端プライマーは、場合により標識されている）と組合せて増幅し；そして

(iii) 場合により増幅中又は増幅後に標識された増幅産物を、適切な条件で、HLA-Bエクソン2領域の15~261領域（番号付けは、ZemmourとParham, 1992による）から選択される1つ以上の適切なプローブとハイブリダイズさせて、

(iv) 適切な洗浄条件で洗浄し、

(v) 形成されたハイブリッドを検出し；そして

(vi) 観察されるハイブリダイゼーションパターンから存在する対立遺伝子を推定する。上記に示した本発明の方法を実行するために、当該分野で公知の任意の方法により試料核酸の抽出を行うことが必要になることがある。RNAの抽出の場合には、cDNAの作成

10

20

30

40

50

が必要であり；そうでなければ、cDNA又はゲノムDNAを抽出する。

「プライマー」という用語は、1本鎖DNAオリゴヌクレオチド配列、即ち、複製される核酸鎖に相補的なプライマー伸長産物の合成のための開始点として作用することができる特異的プライマー（SP）のことをいう。プライマーの長さや配列は、伸長産物の合成を開始させることができるものでなければならない。好適には、プライマーは約5～50個のヌクレオチドであり、更に好適には約10～21個のヌクレオチドである。プライマーの具体的な長さや配列は、必要なDNA又はRNA標的の複雑さ、並びに温度やイオン強度のようなプライマー使用の条件に依存する。

プライマーの3'末端の最後の3つのヌクレオチドが正確に一致していれば、増幅プライマーが、適正な増幅を保証するために、対応する鋳型配列と正確に一致する必要はないという事実は、文献上詳細に報告されている（Kwokら、Nucleic Acids Research 18:999-1005, 1990; SommerとTautz, Nucleic Acids Research 17,6749,1989）。

10

「プローブ」という用語は、検出すべき対立遺伝子の標的配列に、正確に相補的な配列を有する、1本鎖の配列特異的オリゴヌクレオチド（SSO）のことをいう。

好適には、これらのプローブは、約5～50個のヌクレオチドの長さ、更に好適には約10～18個のヌクレオチドである。

「適切な」ハイブリダイゼーション及び洗浄条件という表現は、ほとんどの場合にそのプローブが、正確に相補的な配列にだけハイブリダイズする事実をいう。このような条件は、実施例の項に例示される。例えばプローブ17については、好適なハイブリダイゼーション及び洗浄温度は、ハイブリダイゼーション及び洗浄溶液として3MのTMACが使用されるならば、各々54及び58である。一般に、ハイブリダイゼーション条件は、当該分野で公知のとおり厳重にすべきである（例えば、Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982）。

20

しかし、ハイブリダイゼーション溶液（SSC、SSPEなど）により、これらのプローブは、十分な特異性を得るためにこれらの適切な温度でハイブリダイズさせるべきである（ほとんどの場合に、1つの点変異のレベルで差異が識別されるはずである）。

上述の5'末端プライマーは、B25Pプライマーと呼ばれる。「試料」という用語は、任意の起源の生物学的物質であり、例えば血液のしみ、毛髪、上皮細胞又は末梢血液細胞のことをいう。典型的な試料は、末梢血単核細胞（PBMC）、リンパ芽球様細胞株（lymphoblastoid cell line）（LCL）、毛髪細胞などを含む。好適な単離された核酸は、ゲノムDNAである。しかし、細胞質性、細胞性及びポリ（A）+RNAも使用できる。

30

「観察されるハイブリダイゼーションパターンから存在する対立遺伝子を推定する」という表現は、オリゴヌクレオチドプローブのパネルの結合のパターンを解析することによる、試料中に存在するHLA-B対立遺伝子を同定（決定又は識別ともいう）することよりなる、本発明のHLA-Bタイピング法の中心的特徴のことをいう。単一のプローブも有用な情報を提供するかもしれないが、種々のHLA-B対立遺伝子が天然に分散しており、任意の1つのプローブが独特に特異的な変異体を同定することができることは稀である。むしろ、実施例に示されるように、対立遺伝子の同一性は、オリゴヌクレオチドプローブのパネルの結合のパターンから推定され、このパターンは、異なるHLA-B対立遺伝子の異なるセグメントに特異的である。これらのオリゴヌクレオチドプローブの選択に依存して、公知の各対立遺伝子は、プローブの特異的組合せの使用による特異的なハイブリダイゼーションパターンに対応する。各対立遺伝子はまた、オリゴヌクレオチドプローブの選択に依存して、同一プライマーで増幅された他の任意の対立遺伝子から識別することができる。例えば、1つ以上の未知のHLA-B対立遺伝子を含有する試料についての陽性にハイブリダイズするプローブの生成したパターンを、第1表に示す予測されるハイブリダイゼーションパターンのスキームと比較することにより、その試料に存在するHLA-B対立遺伝子を明確に推定することが可能になる。

40

標的の対立遺伝子はエクソン2の3'末端の配列が多少異なるため（ZemmourとParham, 1992）、目的の全ての対立遺伝子の特異的な増幅を達成するために、異なる3'末端プラ

50

イマーを5'末端プライマー(B25P又はその変異体)に組合せるべきである。
このように、本発明は上記で定義された方法に関し、更に、少なくとも1つの下記の3'
末端増幅プライマー(B23)：

5'-TCTGGTTGTAGTAGCCGCGCA-3' (B23P1、SEQ ID

NO4)

又は次のようなこれらの配列変異体、

5'-TCTGGTTGTAGTAGCGGAGCG-3' (B23P2、SEQ ID

NO5)

5'-TCCGCAGGTTCTCTCGGTA-3' (B23P3、SEQ ID NO

6)

又は他の配列変異体(これらの配列変異体は、1つ以上のヌクレオチドの欠失、及び/又は挿入、及び/又は置換を含むが、これらの配列変異体は、上記のB23P1プライマー又はその変異体であるB23P2若しくはB23P3と同一のHLA-B対立遺伝子を特異的に増幅させることができ、またそのプライマーは、場合によりピオチンのような検出可能な標識を与えられている)を使用することを特徴とする方法に関する。

示されるように、これらのプライマーは更に、各々B23P1、B23P2及びB23P3と呼ばれる。B23P1及びB23P2プライマーは、HLA-Bエクソン2の241~261領域を標的とし；B23P3プライマーは、219~237領域を標的とする(ZemmourとParham, 1992による番号付け)。DNA配列が上述のプライマーの3'末端と完全に一致する対立遺伝子が、表1に同定される。

これらのデータから、目的の全てのHLA-B対立遺伝子を増幅するためには、プライマーセット

B25P/B23P1

による増幅を、下記のセット：

B25P/B23P2、又は

B25P/B23P3

の1つと少なくとも組合せるべきであることが結論される。

表1に与えられたデータから、幾つかの対立遺伝子は、1つのプライマーセットでのみ増幅され、他の組合せのセットでは増幅されないことも結論される。例えば、特にB*4601又はB*7801は、B25P/B23P1プライマーセットでのみ増幅される。これに対して、例えばB*1503又はB*5801対立遺伝子は、各々B25P/B23P1とB25P/B23P3、及びB25P/B23P2とB25P/B23P3で増幅される。

また、この利用可能な配列データ(ZemmourとParham, 1992)から、5'末端プライマーのB25P又はその変異体と組合せられるならば、HLA-Bエクソン2対立遺伝子の特定の部分の増幅が達成される、他の3'末端増幅プライマーが選択できることも言及されるべきである。

本発明の1つの実施態様においては、選択した2つのプライマーセットによる増幅を異なる反応試験管で行い、増幅産物を図1のタイピングスキームに示されるように別々にハイブリダイズさせる。

本発明の別の実施態様においては、選択した2つのプライマーセットによる増幅を異なる反応試験管で行い、増幅産物を増幅後混合して一緒にハイブリダイズさせる。

本発明の好適な実施態様においては、関係する異なるプライマー(B25P、B23P1とB23P2、又はB25P、B23P1とB23P3のいずれか)を混合して、増幅を単一の反応試験管で行い、その後増幅産物を一緒にハイブリダイズさせる。

使用される増幅方法は、PCR法(Saikiら, Science 239:487-491, 1988)、核酸配列に

10

20

30

40

50

基づく増幅法 (N A S B A 法, Guateli, PNAS (USA) ; 87: 1874-1878, 1990; Compton, Nature; 350: 91-92, 1991)、転写に基づく増幅系法 (T A S 法, Kwohら, Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 86: 1173-1177, 1989)、鎖置換増幅法 (S D A 法, Duckら, Biotechniques 9: 142-147, 1990; Walkerら, Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 89: 392-396, 1992)、Q レプリカーゼによる増幅法 (Lizardiら, Bio/Technology 6:1197-1202, 1988; Lomeliら, Clin.Chem. 35: 1826-1831, 1989) 又はプライマー伸長を使用して核酸分子を増幅するような任意の他の適した方法であってよい。増幅中、増幅産物は、標識プライマーを使用するか、又は標識ヌクレオチドを取り込んで標識することが便利である。標識物は、アイソトープ (^{32}P 、 ^{35}S など) であっても、又は非アイソトープ (ピオチン、ジゴキシゲニンなど) であってもよい。

10

増幅した対立遺伝子を相互に区別するために、選択した増幅プライマー領域間に位置する H L A - B エクソン 2 領域を標的とする配列特異的 D N A プローブ (S S O とも呼ばれる) のセットに、増幅産物をハイブリダイズさせる。従来法のドットプロット形式、サンドイッチハイブリダイゼーション又は逆ハイブリダイゼーション (例えば、逆ドットプロット形式) のような、異なるハイブリダイゼーション形式を使用することができる。目的の対立遺伝子を相互に、及び記載した他の対立遺伝子 (これらの対立遺伝子がホモ接合状態で存在しているにせよ、又はヘテロ接合状態で存在しているにせよ) から区別することができる、D N A プローブの特定のセットが選択された。

この目的のために、実施例の項に説明されるように、T M A C (塩化テトラメチルアンモニウム) のハイブリダイゼーション及び洗浄条件で、機能するように設計されている 2 0 個の基本の D N A プローブ配列を同定した。これらのプローブの大部分は、H L A - B エクソン 2 の最可変領域を標的とし、2 つ以上の H L A - B 対立遺伝子にハイブリダイズせうる。幾つかのプローブは、対立遺伝子特異的であるために選択された ; これらのプローブは、プローブ 8 (S E Q I D N O 1 4)、1 2 (S E Q I D N O 1 8)、及び 1 6 (S E Q I D N O 2 2) であり、これらは各々 B * 5 4 0 1、B * 4 6 0 1、及び B * 7 9 0 1 にのみハイブリダイズする。異なるプローブに標的にされる領域は、図 2 にスキームとして表される。表 2 には、プローブの配列が示される。説明を表 1 に示す。更に、実施例 5 と表 2 - 2 で再検討されるように、S S P E に特異的なハイブリダイゼーション及び洗浄条件で、同じ 2 0 個の基本のプローブ又はその変異体を試験した。表 2 - 2 に示されるように、使用した特異的 S S P E 緩衝液条件の下では、元の T M A C 試験プロ 30
プローブの中の 9 個と新規変異体プローブの幾つかは、他のものに比べて特に好適である。従って本発明は、1 つ以上のハイブリダイゼーションプローブが、表 2 (S E Q I D N O 7 ~ 2 6)、又はその変異体 [この配列変異体は、主にその末端 (3 ' 又は 5 ' のいずれか) に 1 つ以上のヌクレオチドの欠失、及び / 又は挿入、又は幾つかの本質的でないヌクレオチド (即ち、対立遺伝子間を識別するために必須ではないヌクレオチド) の他のもの (イノシンのような修飾ヌクレオチドを含む) による置換を含むか ; 或はこの変異体は、任意の上述のオリゴヌクレオチドプローブに対する相補鎖よりなるか ; 或はこの変異体は、デオキシリボヌクレオチドの代わりにリボヌクレオチドよりなるが、この変異体のプローブは、これらが誘導されたオリゴヌクレオチドプローブと同じ特異性でハイブリダイズせうる] から選択される上記で定義された方法に関する。

20

30

40

上記は、異なるが厳重なハイブリダイゼーション及び洗浄条件 (異なる溶液、異なる濃度の緩衝液、異なる濃度のプローブ、異なる温度) 下で、これらが誘導されたプローブと同じ特異性でハイブリダイズするプローブとして、本発明のこの面で意図される変異体を定義しうることを意味する。このような変異体は、例えば、S E Q I D N O 2 7 ~ 5 2 (表 2 - 2) に与えられた配列に含まれる。

ハイブリダイゼーション溶液 (S S C、S S P E、T M A C など) に従って、十分な特異性を達成するために、これらのプローブを、その適切な温度で厳重にハイブリダイズさせるべきである (ほとんどの場合に、1 つの点変異のレベルで差異が識別されるはずである)。しかし、その末端 (3 ' 又は 5 ' のいずれか) で少数のヌクレオチドを添加又は削除するか、或は幾つかの本質的でないヌクレオチド (即ち、対立遺伝子間を識別するために

50

必須でないヌクレオチド)を他のもの(イノシンのような修飾ヌクレオチドを含む)により置換することにより、表2にリストされたDNAプローブをわずかに修飾することにより、これらのプローブ又はその変異体を、同一のハイブリダイゼーション条件(即ち、同一の温度及び同一のハイブリダイゼーション溶液)で特異的にハイブリダイズさせる。使用されるプローブの量(濃度)を相互に関連させて変化させることも、より特異的なハイブリダイゼーション結果を得るために有益であろう。これに関連して、SSPEに基づく緩衝液とは反対に、そのGC含量に関係なく同じ長さのプローブは、TMA溶液中でほぼ同じ温度で特異的にハイブリダイズすることに注意すべきである(Jacobsら, *Nucleic Acids Research* 16: 4637-4650, 1988)。

異なるハイブリダイゼーション及び洗浄緩衝液条件を利用する好適な基本の及び変異体のプローブは、本発明の実施例の項で説明する。これらの好適なプローブの幾つかは、SEQ ID NO 7 ~ 52に含まれる。 10

本発明の主題である対立遺伝子の中で、B*1501とB*1504は、これらの配列が第2エクソンにおいて全く同一であるため、相互に識別することができない。両方の対立遺伝子間の差異は、エクソン3の5'末端に見い出される(ZemmourとParham, 1992)。同じ理由で、B*5101 ~ B*5104は、区別しえない。これらの対立遺伝子についても、識別はエクソン3で行いうる(ZemmourとParham, 1992)。従って、より完全なタイピング系は、エクソン3のタイプを識別するためのプライマー及びプローブの組合せを含むであろう。

プライマー対B25P/B23P2が使用され、ハイブリダイゼーションがSSOの7(SEQ ID NO 13)と9(SEQ ID NO 15)で観察される上述のDNAタイピング法は、好適には更に別々にプライマー対B25PとB23P1及び/又はB23P3プライマーで行われる。この後者の適用のために、B25Pプライマーの代わりに下記の配列: 20

5'-GACGACACG/CCT/AGTTCGTGA-3' B25PX1 (SEQ ID

NO 53)

を使用することができる。

実施例の項に詳細に説明されるように、追加の増幅工程は、HLA-AR偽遺伝子(B23P2プライマーが使用される時)の同時増幅(co-amplification)が発生する可能性を除外し、そしてより正確なHLA-Bタイピング法を可能にする。 30

オリゴヌクレオチドプローブと試料中の核酸配列間に形成されるハイブリッドを検出するための、本発明の目的に適切な分析法は、当該分野で公知の任意の分析法よりなる。例えば、この検出は、ドットプロット形式を使用して、非標識増幅試料を膜に結合させ、適切なハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で、この膜に少なくとも1つの標識プローブを取り込み、そして結合したプローブの存在をモニターすることにより行うことができる。プローブは放射性アイソトープで標識してもよいし、発色性又は化学発光性検出を可能にする標識物で標識してもよい(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合プローブ)。

代替法として、増幅配列が標識を含む「逆」ドットプロット形式がある。この形式では、非標識オリゴヌクレオチドプローブを固体支持体に結合させて、適切で厳重なハイブリダイゼーション及び続いての洗浄条件下で標識試料に暴露する。試料中の核酸と本発明によるオリゴヌクレオチドプローブ間のハイブリッドの形成に依存する任意の他の分析法も使用しうることは理解されるべきである。 40

1つの有利な実施態様では、生物学的試料に含まれるHLA-B対立遺伝子のタイピング法は、遺伝物質から誘導された増幅コピーを、上記で定義されたプローブが前もって固定化された固体支持体と接触させる工程よりなる。

「固体支持体」という用語は、オリゴヌクレオチドプローブがハイブリダイゼーション特性を保持し、かつハイブリダイゼーションのバックグラウンドレベルが低く保持される限り、このようなプローブが結合することができる任意の基質のことをいう。通常固体支持体は、マイクロタイタープレート、膜(例えば、ナイロン又はニトロセルロース)又は微 50

小球（ビーズ）である。

膜への適用又は固定の前に、固定を容易にするために、又はハイブリダイゼーション効率を改善するために、核酸プローブを修飾するのが便利であろう。このような修飾は、ホモポリマーテリング（homopolymer tailing）、脂肪族基、NH₂基、SH基、カルボキシル基のような異なる反応性基との結合、又はビオチン又はハプテンとの結合を包含する。別の有利な実施態様では、生物学的試料中に含有されるHLA-B対立遺伝子のタイピング法は、遺伝物質から誘導された増幅コピーを、固体支持体に平行線として固定化されたオリゴヌクレオチドプローブと接触させる工程よりなる。

本発明のこの好適な実施態様では、上記で定義された方法によるHLA-B対立遺伝子のタイピングのために、固定化及び逆相ハイブリダイゼーション分析への組み込み（好適には膜ストリップのような固体支持体上に平行線として固定化）のために、1つ以上の上記で定義されたプローブが使用される。

この有利な方法により、プローブは、ラインプローブアッセイ（Line Probe Assay）（LiPA）形式で固定化される。これは、便利にはその上に20個以上のオリゴヌクレオチドプローブ（陰性又は陽性対照のオリゴヌクレオチドを含む）が平行線として適用される膜ストリップを使用する逆ハイブリダイゼーション形式（Saiki, PNAS (USA); 86: 6230-6234, 1989）である。LiPAストリップは、Stuyverら（J.Gen.Virol. 74: 1093-1102, 1993）により記載されたように調製される。

従って本発明はまた、上記で定義された1つ以上のプローブが、平行線の形で支持体の表面に結合している固体支持体（好適には膜ストリップ）に関する。

LiPAは、非常に迅速で使いやすいハイブリダイゼーション試験である。結果は、増幅の開始後4時間で読むことができる。通常非アイソトープ標識が増幅産物に組み込まれている増幅、及びアルカリ性変性の後、増幅産物を膜上のプローブに接触させ、ハイブリダイゼーションを約1～1.5時間行う。簡単に洗浄（10～30分）後、検出操作を開始する。これら全ての工程は、同一のハイブリダイゼーション容器中で行われ、このため手作業の時間を少なくすることができる。生成したハイブリダイゼーションパターンから、存在するHLA-B対立遺伝子を、視覚的にしかし好適には専用のソフトウェアを使用して推定することができる。LiPA形式は、市販されている走査装置に何の問題もなく適合し、従って結果の自動解釈は非常に信頼性の高いものとなる。これら全ての利点により、LiPA形式はルーチン設定でのHLAタイピングの使用に適している。LiPA形式は、ルーチンの血清学的方法にタイピングが困難な対立遺伝子をタイピングするために特に有利であろう。

本発明はまた、公知のHLA-B対立遺伝子とは異なる、新規HLA-B対立遺伝子を検出し同定するための方法に関し、この方法は下記の工程よりなる：

- 上記で定義した方法により、生物学的試料中に存在するHLA-B対立遺伝子を決定し、
- 表1に定義されるものに対応するハイブリダイゼーションパターンを生成しない試料を観察した場合は、決定されるべき新規HLA-B対立遺伝子の異常にハイブリダイズするプローブに対応する、HLA-Bエクソン2配列の部分を配列決定する。

本発明のプローブセットにより、配列が公知である対立遺伝子を識別しうるのみでなく、実施例3で例証されるように未知の配列を有する対立遺伝子を検出することもできる。この実施例では、プローブ13を使用してB71がB72（B*1503）から区別できることが示される。これは、血清学に基づくB71とB72の識別に問題があるため、特に有利である。

従って本発明は、上記で定義される方法を使用して、B72（B*1503）とB70群（B70、B71、即ち、B*1503とは異なる対立遺伝子）の非B72HLA-B対立遺伝子を識別する方法に関し、ここで、非B72HLA-B対立遺伝子は、B*1503対立遺伝子[例えば、プローブ13（SEQ ID NO19）、プローブ7（SEQ ID NO13）、プローブ10（SEQ ID NO16）、プローブ18（SEQ ID NO24）、及びプローブ19（SEQ ID NO25）]にハイブリダイズす

10

20

30

40

50

る少なくとも1つのプローブとはハイブリッドを形成しない。

これらの新規な対立遺伝子が一旦使用可能になると、これら新規対立遺伝子の特異的検出を可能にする新規プローブを推定することができる。表1にリストされる20個の基本のプローブのセットにこれらのプローブを追加することにより、本タイピング法の識別力と信頼性のレベルが改善される。

本発明はまた、更に上記で定義された方法により決定される、核酸配列レベルで未決定の B70HLA-Bタイプに対応する新規HLA-B対立遺伝子に関し、ここで、この対立遺伝子は、プローブ2 (SEQ ID NO8、表2を参照のこと)とはハイブリッドを形成するが、プローブ13 (SEQ ID NO19、表2参照)とはハイブリッドを形成せず、かつこの対立遺伝子は、ヌクレオチド192~209 (番号付けは、ZemmourとParham, 1992による)の範囲の領域の少なくとも1個のヌクレオチドの位置でHLA-BのB70対立遺伝子であるB*1503とは異なっている。

本発明はまた、下記のリスト：

5'-AGGTATTTCTACACCGCCA-3' (B25P、SEQ ID NO1)

又は次のようなこれらの配列変異体、

5'-AGGTATTTCCACACCGCCA-3' (SEQ ID NO2)

5'-AGGTATTTTCGACACCGCCA-3' (SEQ ID NO3)

又は他の配列変異体 (これらの配列変異体は、1つ以上のヌクレオチドの欠失、及び/又は挿入、及び/又は置換を含むが、3'末端GCCA配列が保存されており、かつこれらの配列変異体が上記のB25Pプライマー又はその変異体と同一のHLA-B対立遺伝子の特異的に増幅させることができる)、

5'-TCTGGTTGTAGTAGCCGCGCA-3' (B23P1、SEQ ID

NO4)

又は次のような、これらの配列変異体、

5'-TCTGGTTGTAGTAGCGGAGCG-3' (B23P2、SEQ ID

NO5)

5'-TCCGCAGGTTCTCTCGGTA-3' (B23P3、SEQ ID NO6)

又は他の配列変異体 (これらの配列変異体は、1つ以上のヌクレオチドの欠失、及び/又は挿入、及び/又は置換を含むが、これらの配列変異体は、上記のB23P1プライマー又はその変異体であるB23P2若しくはB23P3と同一のHLA-B対立遺伝子の特異的に増幅させることができ、また、そのプライマーは、場合によりビオチンのような検出可能な標識物を与えられており、かつそのプライマーは場合により固体支持体に固定されている)から選択される少なくとも1つのオリゴヌクレオチド増幅プライマーを含む組成物に関する。

好適にはこのような組成物は、上記のリストから選択される少なくとも2つ以上の増幅プライマーを含む。更に好適には、増幅プライマーセットB25P/B23P1が、少なくとも1つの下記のセット：

B25P/B23P2、又はB25P/B23P3

と組み合わせられる。

上述の成分に追加して、この組成物はまた、少なくとも1つの下記のプライマー：

5'-GACGACACG/CCT/AGTTCGTGA-3' B25PX1 (SEQ ID

NO53)

よりなってもよい。

本発明はまた、下記のプローブのリスト：

10

20

30

40

50

SEQ ID NO7、SEQ ID NO8、SEQ ID NO9、SEQ ID NO10、SEQ ID NO11、SEQ ID NO12、SEQ ID NO13、SEQ ID NO14、SEQ ID NO15、SEQ ID NO16、SEQ ID NO17、SEQ ID NO18、SEQ ID NO19、SEQ ID NO20、SEQ ID NO21、SEQ ID NO22、SEQ ID NO23、SEQ ID NO24、SEQ ID NO25、又はSEQ ID NO26（表2に与えられる）、

又はその配列変異体〔この配列変異体は、主にその末端（3'又は5'のいずれか）に1つ以上のヌクレオチドの欠失、及びノ又は挿入、又は幾つかの本質的でないヌクレオチド（即ち、対立遺伝子間を識別するために必須ではないヌクレオチド）の他のもの（イノシンのような修飾ヌクレオチドを含む）による置換を含むか；或はこの変異体は、任意の上述のオリゴヌクレオチドプローブに対する相補鎖よりなるか；或はこの変異体は、デオキシリボヌクレオチドの代わりにリボヌクレオチドよりなるが、この変異体のプローブは、これらが誘導されたオリゴヌクレオチドプローブと同じ特異性でハイブリダイズさせうる〕から選択される少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプローブを含む組成物に関する。このような変異体は、例えば、下記のプローブのリスト：

SEQ ID NO27、SEQ ID NO28、SEQ ID NO29、SEQ ID NO30、SEQ ID NO31、SEQ ID NO32、SEQ ID NO33、SEQ ID NO34、SEQ ID NO35、SEQ ID NO36、SEQ ID NO37、SEQ ID NO38、SEQ ID NO39、SEQ ID NO40、SEQ ID NO41、SEQ ID NO42、SEQ ID NO43、SEQ ID NO44、SEQ ID NO45、SEQ ID NO46、SEQ ID NO47、SEQ ID NO48、SEQ ID NO49、SEQ ID NO50、SEQ ID NO51、又はSEQ ID NO52（表2-2に与えられる）

から選択されてよい。

好適にはこのような組成物は、少なくとも2つ、3つ又はそれ以上のこれらのプローブを含有する。

本発明はまた、HLA-B対立遺伝子を含むかもしれない生物学的試料から、少なくとも1つのHLA-B対立遺伝子をタイピングするためのキットに関し、このキットは、下記の成分：

- 適宜、上記で定義される任意のプライマーから選択される少なくとも1つの増幅プライマー、
- 少なくとも1つのプローブ（このプローブは、好適には固体基質上に、更に好適には1つの同一の膜ストリップ上に固定されており、かつこのプローブは、上記で定義される任意のプローブから選択される）、
- 緩衝液、又はこれらのプローブと増幅産物間のハイブリダイゼーション反応を可能にする緩衝液を調製するために必要な成分、
- 適宜、前記ハイブリダイゼーションから生じるハイブリッドを検出するための手段、を含む。

本発明はまた、HLA-B対立遺伝子を含むかもしれない生物学的試料から、少なくとも1つのHLA-B対立遺伝子をタイピングするためのキットに関し、更に詳しくは、血清学的には識別するのが困難なHLA-Bタイプを含むかもしれない試料から、この試料中に存在するHLA-B対立遺伝子をコードするヌクレオチドの増幅に続いて、上記で定義される方法による1つ以上のプライマーセットの組合せを使用する、下記：

- 少なくとも1つのプローブ（このプローブは、好適には固体基質上に、更に好適には1つの同一の膜ストリップ上に固定されており、かつこのプローブは、上記で定義される任意のプローブから選択される）、
- 緩衝液、又はこれらのプローブと増幅産物間のハイブリダイゼーション反応を可能にする緩衝液を調製するために必要な成分、

10

20

30

40

50

- 前記ハイブリダイゼーションから生じるハイブリッドを検出するための手段、
- 場合により結果を解釈し、観察されるハイブリダイゼーションパターンから存在する対立遺伝子を推定するための、自動走査及び解釈装置も含む、キットに関する。

図と表の凡例

図 1 : 本発明によるタイピング法のスキームによる表示。

図 2 : H L A - B 遺伝子のエクソン 2 を表す軸上への本発明のプライマーとプローブの局在。番号付けは、Zemmour と Parham, 1992 による。

図 3 : 13 の患者試料と 7 つの対照から得られた増幅 (上のパネル) 及びドットプロットハイブリダイゼーション (下のパネル) 結果。実施例 1 及び 2 に記載されるように、試料をプライマーセット B 2 5 P / B 2 3 P 1 を使用して増幅し、ドットプロットし、そして

10

プローブ 6 (S E Q I D N O 1 2) 及び 1 7 (S E Q I D N O 2 3) とハイブリダイズさせた。

図 4 : B 7 0 変異体対立遺伝子及び B 4 6 対立遺伝子を含む、15 の試料 (n ° 1 ~ 1 5) について得られたドットプロットハイブリダイゼーションの結果。増幅した物質をナイロン膜に適用した。続いてこれらの膜を、示されるように S S O - プ

ローブ 1 3 (S E Q I D N O 1 9)、1 2 (S E Q I D N O 1 8)、1 5 (S E Q I D N O 2 1)、6 (S E Q I D N O 1 2)、及び 2 (S E Q I D N O 8) とハイブリダイズさせた。結果を、実施例 S S O 3 及び 4 で検討し、表 3 に要約した。

20

表 1 : 本発明のプライマーセットで増幅した H L A - B 対立遺伝子 (エクソン 2)。対立

遺伝子中の 3 ' 末端プライマー配列の存在、及び 1 9 S S O - プローブのセットとのハイブリダイゼーションパターンも示される。

表 2 : H L A - B 対立遺伝子のタイピング用 S S O - プローブのパネル。

表 2 - 2 : 逆ハイブリダイゼーション (ラインプローブアッセイ、L i P A) 形式で使用するために、試験される H L A - B 対立遺伝子のタイピング用 S S O - プローブのパネル。これら全てのプローブは、表 2 に与えられた基本セットの 2 0 個の S S O から誘導される。好適なプローブは、「+」として示される。

表 3 : 実施例 3 及び 4 で記載される 5 個の S S O - プローブとハイブリダイズさせた 1 5 の増幅試料から得られたハイブリダイゼーション結果の要約。図 4 も参照。

表 4 : 2 0 個のオリゴヌクレオチドプローブを固定した L i P A ストリップで得られたハイブリダイゼーション結果。各々増幅 1 及び 2 (実施例 6 参照) 後に得られた試料とのハイ

30

ブリダイゼーション後の陽性ハイブリダイゼーションシグナルは、「+」として示される。

略語

T M A C : 塩化テトラメチルアンモニウム

S S O : 配列特異的オリゴヌクレオチド

D I G 1 1 - d d U T P : ジゴキシゲニン - 1 1 - 2 ' , 3 ' - ジデオキシ - ウリジン - 5 ' - 三リン酸

D I G : ジゴキシゲニン

A M P P D : 3 - (2 ' - スピロアダマンタン) - 4 - メトキシ - 4 - (3 " - ホスホリルオキシ) - フェニル - 1 ' , 2 - ジオキセタン

40

A P : アルカリ性ホスファターゼ

実施例

実施例 1 . プライマーセット B 2 5 P / B 2 3 P 1 によるある H L A - B 対立遺伝子の特異的増幅

実施例により、1 つのプライマーセットでの増幅特異性を説明する。図 3 に示したように、1 2 の試料と 7 つの対照をプライマーセット B 2 5 P / B 2 3 P 1 (S E Q I D N O 1 及び 4) で増幅した。細胞物質から出発して、標準的プロトコールによりゲノム D N A を調製した。ゲノム D N A 約 0 . 5 μ g を、各プライマー 1 2 . 5 pmoles ; 2 0 0 mM の各 d N T P (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) ; 1 0 mM のトリス H C l (p H 8 . 5) ; 5 0 mM の K C l ; 1 mM の M g C l 2 ; 0 . 0 1 % のゼラチン ; 0 . 0 2

50

5%のNP-40及びTaq (Thermusaquaticus) DNAポリメラーゼ (Boehringer, Mannheim GmbH, FRG) 1単位を含有する、2倍の蒸留水で最終容量50 µlに調整したPCR緩衝液と混合した。試料を95 °Cで10分間加熱して、各94 °Cで1分間、55 °Cで30秒間、72 °Cで1分間、そしてDNAサーマルサイクラー (DNA Thermal Cycler) (Techne and Perkin-Elmer Cetus Corp., Norwalk, CT) 中で、72 °Cで10分間の最終延長でPCRのサイクルを35回行った。増幅産物を1.5%ゲル電気泳動により性状解析した。

結果を図3に示した。増幅可能な対立遺伝子が存在する全ての試料中に、入手できる配列データにより予測されるように、臭化エチジウム染色後に約246塩基対の明瞭なバンドを観察した。

試料1、4、5、6、8、9、10、11、及び12は、B^{*}7801対立遺伝子を含んでいた (図1にBSNA、BX1又はBTe76として示した)。試料2と3及び対照15では、B8対立遺伝子 (B^{*}0801) を見出した。試料16~19は、各々B35、B55、B56及びB54のホモ接合体の対照であった。陰性対照 (13及び14は、各々B^{*}3701及びB^{*}1801対立遺伝子を含んでいた) では、バンドを観察できなかった。これらの対立遺伝子には、エクソン2の30~33位に5'-GCCA-3'の代わりに5'-TCCG-3'配列があった (ZemmourとParham, 1992)。

実施例2. B78対立遺伝子の検出のためのドットプロットタイピング測定

本実施例では、プローブ6及び17 (SEQ ID NO12及び23) を使用した、B^{*}7801対立遺伝子の特異的タイピングを説明する。B^{*}7801は、両方のプローブ (6及び17) とハイブリダイズする唯一の対立遺伝子であるため、プライマーセットB25P/B23P1で増幅した他の対立遺伝子からB^{*}7801を識別することができる。配列特異的オリゴヌクレオチドプローブ (SSO) を化学合成し、ジゴキシゲニン-11-2', 3'-ジデオキシ-ウリジン-5'-三リン酸 (DIG-11-ddUTP) とDNAデオキシヌクレオチジルエキソトランスフェラーゼを用いてその3'末端を標識した。13の試料と7つの対照を、実施例1で記載したようにプライマーセットB25P/B23P1で増幅した。

次にPCR産物2 µlを、ナイロン膜 (Hybond N Plus, Amersham, Buckinghamshire, UK) 上にドットプロットし、フィルターを0.4NのNaOH中で5分間浸漬することにより変性させ、そして10×SSPE (生理食塩水リン酸ナトリウムEDTA) 10 ml中で15分間中和した。プロット後、50 mMのトリス-HCl (pH 8.0)、0.1%のSDS、2 mMのEDTA、3 MのTMAC (塩化テトラメチルアンモニウム、Janssen Chimica, Geel, Belgium) を含有するハイブリダイゼーション溶液10 ml中で、54 °Cで30分間、膜を予備的にハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションのために、SSO-6 (SEQ ID NO12) (52) を除いて、54 °Cで1時間、この予備的ハイブリダイゼーション溶液に3 pmol/mlのDIG標識SSOを添加した。過剰のプローブを除去するために、(2×SSPE、0.1% SDS) 中で2回、室温で10分間、次いでハイブリダイゼーション溶液中で15分間厳密に58 °Cで、フィルターを洗浄した (54 °Cで洗浄したSSO-6を除く)。

抗DIGアルカリ性ホスファターゼ、Fab断片 (抗-DIG-AP) を使用して非アイソトープ検出を行い、化学発光性基質AMPPD [3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3"-ホスホリルオキシ)-フェニル-1,2-ジオキセタン] により可視化した。水気を切った膜を、カセット中で15~30分間X線フィルム (X-omat AR5, Kodak) に暴露した。このオリゴタイピング法で使用した全ての試薬は、Boehringer, Mannheim GmbH, FRGから購入した。結果を図3に示した。B78タイプの対立遺伝子が存在する (BSNA、BX1又はBTe76) 全ての試料が、プローブ6及び17 (SEQ ID NO12及び23) と明白にハイブリダイズした。他の試料 (n° 2、3、7、15、16、17、18、及び19) は、プローブ17 (SEQ ID NO23) 又はプローブ6 (SEQ ID NO12) のいずれかとハイブリダイズするが、両方とはハイブリダイズしなかった。試料13及び14は、使用したプライマーセットでは増幅

10

20

30

40

50

しなかったため、プローブ6 (SEQ ID NO 12) とプローブ17 (SEQ ID NO 23) のいずれでもハイブリダイゼーションシグナルは観察されなかった。

実施例3 . B70 変異体のタイピング及びサブタイピング

本実施例では、B70 変異体を含んでいる7つの試料を使用して、B70 変異体のタイピング及びサブタイピングを説明する。ブランクと7つの非B70 試料も対照として用いた (表3を参照のこと)。B71とB72は、ブロードな抗原HLA-B70のサブタイプの対立遺伝子である。B72 対立遺伝子 (B*1503) の配列は文献上公知 (ZemmourとParham, 1992) であり ; B71 配列は最近まで公知でなかった。単独特異的なB71及びB72 試薬は記載されてなく、他の抗原 (主にB35とB62) の存在によりB70 変異体の正確な血清学的指定が確立していない。B70 変異体の識別は等電点フォーカシング (isoelectric focusing) により可能であるが、これはルーチン設定の好ましい方法ではない。

10

プライマーセットB25P/B23P1 (SEQ ID NO 1及び4) 及び本発明の幾つかのプローブの組合せを使用することにより、B72 変異体を他のB70 変異体から区別することができた。ここで強調したいことは、B71 及びB72 以外の他の変異体は未だ同定されていないが存在するかもしれないということである。

B70 変異体対立遺伝子を含んでいることが公知 (表3の、試料1~6及び8) の一連の試料からDNAを抽出して、実施例1で記載したように増幅した。増幅産物を5つのナイロン膜に適用し、これを更に実施例2で記載したように処理した。これらの膜を各々下記のプローブのセット : 2、6、12、13及び15 (SEQ ID NO 8、12、18、19及び21) とハイブリダイズさせた。これらのプローブで得られた結果を図4に示した。これらの結果を表3に要約した。全ての場合に、7つのB70 試料の内4つに存在するB72 変異体 (B*1503) を、B71 又は他の可能性のある変異体から区別することができた。B*1503 (B72) は、プローブ2及び13 (SEQ ID NO 8及び19) とハイブリダイズすることにより特徴づけられるが、一方他のB70 変異体はプローブ13 (SEQ ID NO 19) と非反応性であった。従って本実施例は、配列情報がない時にも、対立遺伝子を識別できる可能性を明白に示している。

20

実施例4 . B46 変異体のタイピング

実施例3で記載したのと同じ方法、プライマーセット、及びプローブの組合せを使用して、2つのB46 含有試料をタイピングした。図4と表3にタイピング結果を示した。プローブパネル中のプローブ12 (SEQ ID NO 18) の存在によって、B*4601を容易に追跡でき、他の対立遺伝子から明確に区別できた。プライマーセットB25P/B23P1 (SEQ ID NO 1/4) により増幅した全ての対立遺伝子の中で、B*4601はプローブ12 (SEQ ID NO 18) とハイブリダイズした唯一の対立遺伝子であった。

30

実施例5 . HLA-B 対立遺伝子のタイピングのためのラインプローブアッセイ (LiPA) 及びSSO

ラインプローブアッセイ (LiPA) のために好適なハイブリダイゼーション及び洗浄媒体は、SSPEに基づく緩衝液である。基本的にはStuyverら (J.Gen.Virol. 74: 1093-1102, 1993) により記載されたようにLiPA ストリップを調製した。LiPA 形式では全てのプローブが同一のハイブリダイゼーション及び洗浄条件 (同一塩濃度及び温度) 下で特異的に反応するため、またSSPE中のDNA:DNAハイブリッドの融点がGC含量とプローブの長さに依存するため、TMACに基づく緩衝系からSSPEに基づく緩衝系に変更するために表2のリストに示したプローブの修飾が幾つかのプローブについて必要になる。

40

LiPA 形式に使用するための最も適したプローブを選択するために、多数のプローブ (表2-2にリストされる) を合成し、TTPと末端トランスフェラーゼを使用して3' 末端につなぎ、固体支持体 (ニトロセルロース膜) に固定した。

下記のハイブリダイゼーション及び洗浄条件を使用して、これらのプローブを標的物質にハイブリダイズさせた。

50

- ハイブリダイゼーション :
- 5 × S S P E / 0 . 5 % S D S
- 5 5
- 洗 浄 :
- 2 × S S P E / 0 . 1 % S D S
- 5 5

(1 × S S P E は、 0 . 1 8 M の N a C l 、 0 . 0 1 M の N a H ₂ P O ₄ 、 1 m M の E D T A (p H 7 . 2) である)

上述の条件下で特異性と感度に関して最良の試験結果を示したプローブを、更に L i P A ストリップ上での使用のために選択した。これらのプローブを表 2 - 2 に陽性 (+) とし

10

て評点した。T M A C 緩衝系で使用された 2 0 プローブの内 9 つだけ (S E Q I D N O 7 b 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 8 、 1 9 、 2 1 、 2 3 及び 2 4) が、S S P E に基づく系で修飾なしに使用することができた。

これらの結果により、使用されるプローブの配列のわずかな修飾が重要であり、信頼できる L i P A 試験の開発のためには細心のプローブ設計が必須であることが明白に証明された。

実施例 6 . L i P A ストリップを使用するより代表的なホモ接合性細胞株のタイピングプローブ 7 (S E Q I D N O 1 3) 及び 9 (S E Q I D N O 1 5) の配列に対応する配列がその H L A - A R 偽遺伝子に存在するため、H L A - A R 偽遺伝子の同時増幅 (プライマー B 2 3 P 2 が使用される時) により、プローブ 7 (S E Q I D N O 1 3) 及び 9 (S E Q I D N O 1 5) によるハイブリダイゼーション結果はあいまいなものになっている。

20

陽性のハイブリダイゼーションシグナルのもとを最終的に突きとめるために、少なくとも 1 つの B 2 3 プライマーと下記の配列 :

5'-GACGACACG/CCT/AGTTCGTGA-3' B 2 5 P X 1 (S E Q I D

N O 5 3)

を有するプライマーを使用する追加の増幅を行った。

次に、得られた増幅産物を、少なくともプローブ 7 と 9 が固定化されるストリップとハイブリダイズさせた。

30

本測定におけるプローブ 7 及び 9 についての陽性ハイブリダイゼーションシグナルは、プローブ 7 及び / 又は 9 配列が、分析された試料の H L A - B 対立遺伝子に存在していることを示しており、従ってプローブ 7 及び / 又は 9 は陽性とすべきである。陰性の結果は、それらの最初の陽性ハイブリダイゼーションシグナルは偽遺伝子に由来し、H L A - B 遺伝子自体に由来しないため、1 回目の増幅後の結果の解釈において、これらのプローブは無視すべきであることを意味する。

プライマー B 2 5 P と B 2 3 P 1 / B 2 3 P 2 (増幅 1) 、 及びプライマー B 2 5 X 1 と B 2 3 P 1 / B 2 3 P 2 (増幅 2) による別々の増幅後の、幾つかの選択した試料 (ホモ接合性細胞株 A ~ G) で得られたハイブリダイゼーション結果を、表 4 に要約した。

これらの結果により、試料 A について、プローブ 7 及び 9 の陽性ハイブリダイゼーションシグナルは、H L A - B 対立遺伝子に由来することが示された。試料 E 及び F の、プローブ 9 で得られた陽性シグナルについても同じことがいえた。

40

増幅工程 1 及び 2 後の結果を組合せると、表 1 の助けにより下記の H L A - B 対立遺伝子を推定することができた :

試料	対立遺伝子
A	B* 0 8 0 1
B	B* 1 5 0 1
C	B* 4 0 0 1
D	B* 4 6 0 1
E	B* 5 1 0 1

50

表 1 (つづき)

	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	7b
4001/4501/5001		+			+					+	+	+
4901		+			+					+	+	+
4101		+			+					+	+	+
4701		+			+					+	+	+
1301/1302		+			+					+	+	+
4401~4403		+			+					+	+	+
0801	+					+			+			
5401	+						+					
5501/5502/5601/5602	+						+					
3501~3506	+					+						
5301	+					+						
5101~5104	+					+						
5201		+			+							
52012		+			+							
7801	+					+			+			
1501/1504		+			+					+	+	+
1502		+			+					+	+	+
1503		+			+					+	+	+
4601		+			+					+	+	+
7901	+											
5701/5702			+									
5801			+									

10

20

30

40

表 2 : オリゴヌクレオチドプローブ DNA 配列

1	5'-GCTTCATCACCGTGGGCT-3' (SEQ ID NO 7)	
2	5'-CGCTTCATCTCAGTGGGC-3' (SEQ ID NO 8)	
3	5'-CGCTTCATTGCAGTGGGC-3' (SEQ ID NO 9)	
4	5'-CGCTTCATCGCAGTGGGC-3' (SEQ ID NO 10)	
5	5'-CCGAGGATGGCGCCCCGG-3' (SEQ ID NO 11)	
6	5'-TCCGAGGACGGAGCCCCG-3' (SEQ ID NO 12)	
7	5'-AGTCCGAGAGAGGAGCCG-3' (SEQ ID NO 13)	
7b	5'-GTCCGAGGAAGGAGCCGC-3' (SEQ ID NO 26)	
8	5'-GCGCCGTGGGTGGAGCAG-3' (SEQ ID NO 14)	10
9	5'-GGACCGGAACACACAGA-3' (SEQ ID NO 15)	
10	5'-GGACCGGGAGACACAGAT-3' (SEQ ID NO 16)	
11	5'-GGACGGGGAGACACGGAA-3' (SEQ ID NO 17)	
12	5'-ACACAGAAGTACAAGCGC-3' (SEQ ID NO 18)	
13	5'-CAGATCTCCAAGACCAAC-3' (SEQ ID NO 19)	
14	5'-ACAGATCTTCAAGACCAA-3' (SEQ ID NO 20)	
15	5'-CAGATCTACAAGGCCAG-3' (SEQ ID NO 21)	
16	5'-ACAGATCTGCAAGACCAA-3' (SEQ ID NO 22)	
17	5'-ACAGACTGACCGAGAGAG-3' (SEQ ID NO 23)	
18	5'-CACAGACTTACCGAGAGA-3' (SEQ ID NO 24)	20
19	5'-ACCGAGAGAGCCTGCGGA-3' (SEQ ID NO 25),	

表 2 の 2

S01	+	5'-CTTCATCACCGTGGGCT-3'	(SEQ ID NO 27)	
S02	+	5'-GCTTCATCTCAGTGGGC-3'	(SEQ ID NO 28)	
S03	+	5'-GCTTCATTGCAGTGGGC-3'	(SEQ ID NO 29)	
S04	+	5'-CTTCATCGCAGTGGGC-3'	(SEQ ID NO 30)	
S05		5'-GATGGCGCCCCGG-3'	(SEQ ID NO 31)	
S05(2)		5'-GAGGATGGCGCCCCGG-3'	(SEQ ID NO 32)	
S05(3)	+	5'-CCGAGGATGGCGCCCCGG-3'	(SEQ ID NO 11)	10
S06		5'-GGACGGAGCCCCG-3'	(SEQ ID NO 33)	
S06(2)		5'-CGAGGACGGAGCCCCG-3'	(SEQ ID NO 34)	
S06(3)		5'-CCGAGGACGGAGCCCCG-3'	(SEQ ID NO 35)	
S06(4)		5'-TCCGAGGACGGAGCCCCG-3'	(SEQ ID NO 12)	
S06(5)	+	5'-TCCGAGGACGGAGCCCCGG-3'	(SEQ ID NO 36)	
S07		5'-TCCGAGAGAGGAGCC-3'	(SEQ ID NO 37)	
S07(2)		5'-AGTCCGAGAGAGGAGCC-3'	(SEQ ID NO 38)	
S07(3)	+	5'-AGTCCGAGAGAGGAGCCG-3'	(SEQ ID NO 13)	
S07b	+	5'-GTCCGAGGAAGGAGCCGC-3'	(SEQ ID NO 26)	
S08	+	5'-CCGTGGGTGGAGCAG-3'	(SEQ ID NO 39)	
S08(2)		5'-CGCCGTGGGTGGAGCAG-3'	(SEQ ID NO 40)	20
S09		5'-GGACCGGAACACACAGA-3'	(SEQ ID NO 41)	
S09(2)		5'-GACCGGAACACACAGA-3'	(SEQ ID NO 42)	
S09(3)		5'-GACCGGAACACACAG-3'	(SEQ ID NO 43)	
S09(4)	+	5'-GGACCGGAACACACAG-3'	(SEQ ID NO 44)	
S10	+	5'-GACCGGGAGACACAGAT-3'	(SEQ ID NO 45)	
S11	+	5'-ACGGGGAGACACGGAA-3'	(SEQ ID NO 46)	
S12	+	5'-ACACAGAAGTACAAGCGC-3'	(SEQ ID NO 18)	
S13	+	5'-CAGATCTCCAAGACCAAC-3'	(SEQ ID NO 19)	
S14		5'-CACAGATCTTCAAGACCAAC-3'	(SEQ ID NO 47)	
S14(2)		5'-ACAGATCTTCAAGACCAAC-3'	(SEQ ID NO 48)	
S14(3)	+	5'-CAGATCTTCAAGACCAA-3'	(SEQ ID NO 49)	30
S15	+	5'-CAGATCTACAAGGCCAG-3'	(SEQ ID NO 21)	
S16	+	5'-CACAGATCTGCAAGACCAA-3'	(SEQ ID NO 50)	
S17	+	5'-ACAGACTGACCGAGAGAG-3'	(SEQ ID NO 23)	
S18	+	5'-CACAGACTTACCGAGAGA-3'	(SEQ ID NO 24)	
S19		5'-CGAGAGAGCCTGCGG-3'	(SEQ ID NO 51)	
S19(2)	+	5'-CGAGAGAGCCTGCGGA-3'	(SEQ ID NO 52)	

表 3

試料
 2 12 15 6 13
 同定された B70 又は
 B46 対立遺伝子

試料	2	12	15	6	13
1 B70/B78	+			+	
2 B51/B70	+				
3 B49/B71	+				
4 B07/B72	+				
5 B49/B72	+				
6 B07/B72	+				
7 B07/B49					
8 ?/B70	+				
9 ブラック					
10 B75/B46		+			+
11 B46/B46		+			
12 B51/B35				+	
13 B08/B35	+				
14 B08/B44				+	
15 B44/B44					

表 4

試料	ブローフ																						
	増幅 1														増幅 2								
	1	2	3	4	5	6	7	7b	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	7	9	
A		+					+			+					+			+			+		+
B				+	+		+			+									+	+			
C	+							+		+				+					+	+			
D				+	+					+			+										
E			+			+	+			+					+				+	+			+
F				+		+	+			+					+				+	+			+
G				+	+					+			+										

配列表

(1) 一般情報 :

(i) 出願人 :

10

20

30

40

50

- (A) 名称 : Innogenetics N.V.
- (B) 町 : Industriepark Zwijnaarde 7 Bus 4
- (C) 市 : Gent
- (E) 国 : ベルギー
- (F) 郵便コード (ZIP) : 9 0 5 2
- (G) 電話 : 0 0 - 3 2 - 0 9 . 2 4 1 . 0 7 . 1 1
- (H) ファックス : 0 0 - 3 2 - 0 9 . 2 4 1 . 0 7 . 9 9

(ii) 発明の名称 :

特異的プライマー及びプローブセットを使用するHLA - Bタイピングの方法

(iii) 配列の数 : 5 3

10

(iv) コンピューター可読形式 :

- (A) メジウムタイプ : フロッピーディスク
- (B) コンピューター : IBM PC互換機
- (C) オペレーションシステム : PC - DOS / MS - DOS
- (D) ソフトウェア : パテントインリリース # 1 . 0、バージョン # 1 . 2 5 (E P O)

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 1 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 1 9 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

20

(ii) 配列の種類 : genomic DNA

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

(ix) 配列の特徴 :

- (A) 名称 / キー : オリゴヌクレオチドプライマー B 2 5 P
- (B) 位置 : 例えば H L A - B * 3 5 0 1 のエクソン 2 のヌクレオチド 1 5 ~ 3 3 にアニールする

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 1 :

AGGTATTTCT ACACCGCCA

30

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 2 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 1 9 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic DNA

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

(ix) 配列の特徴 :

40

(A) 名称 / キー : オリゴヌクレオチドプライマー B 2 5 P 変異種

(B) 位置 : 例えば H L A - B * 4 0 0 1 のエクソン 2 のヌクレオチド 1 5 ~ 3 3 にアニールする

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 2 :

AGGTATTTCC ACACCGCCA

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 3 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 1 9 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖

50

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：genomic DNA

(iii) ハイポセティカル配列：NO

(iii) アンチセンス配列：NO

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称/キイ：オリゴヌクレオチドプライマー B 2 5 P 変異種

(B) 位置：例えば H L A - B * 0 8 0 1 のエクソン 2 のヌクレオチド 1 5 ~ 3 3 にアニールする

(xi) 配列の記述：SEQ ID No. 3 :

AGGTATTTTCG ACACCGCCA

10

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 4 の情報 :

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：2 1 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：genomic DNA

(iii) ハイポセティカル配列：NO

(iii) アンチセンス配列：YES

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称/キイ：オリゴヌクレオチドプライマー B 2 3 P 1

(B) 位置：例えば H L A - B * 4 0 0 1 のエクソン 2 のヌクレオチド 2 4 1 ~ 2 6 1 にアニールする

(xi) 配列の記述：SEQ ID No. 4 :

TCTGGTTGTA GTAGCCGCGC A

20

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 5 の情報 :

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：2 1 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：genomic DNA

(iii) ハイポセティカル配列：NO

(iii) アンチセンス配列：YES

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称/キイ：オリゴヌクレオチドプライマー B 2 3 P 2

(B) 位置：例えば H L A - B * 1 3 0 1 のエクソン 2 のヌクレオチド 2 4 1 ~ 2 6 1 にアニールする

(xi) 配列の記述：SEQ ID No. 5 :

TCTGGTTGTA GTAGCGGAGC G

30

40

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 6 の情報 :

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：1 9 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：genomic DNA

(iii) ハイポセティカル配列：NO

(iii) アンチセンス配列：YES

(ix) 配列の特徴：

50

(A) 名称 / キー : オリゴヌクレオチドプライマー B 2 3 P 3

(B) 位置 : 例えば H L A - B * 5 1 0 1 のエクソン 2 のヌクレオチド 2 1 9 ~ 2 3 7 にアニールする

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 6 :

TCCGCAGGTT CTCTCGGTA

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 7 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1 8 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジ : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic D N A

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / キー : オリゴヌクレオチドプローブ 1

(B) 位置 : 例えば H L A - B * 4 0 0 1 のエクソン 2 のヌクレオチド 6 1 ~ 7 8 にアニールする

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 7 :

GCTTCATCAC CGTGGGCT

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 8 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1 8 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジ : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic D N A

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / キー : オリゴヌクレオチドプローブ 2

(B) 位置 : 例えば H L A - B * 0 8 0 1 のエクソン 2 のヌクレオチド 6 0 ~ 7 7 にアニールする

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 8 :

CGCTTCATCT CAGTGGGC

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 9 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1 8 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジ : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic D N A

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / キー : オリゴヌクレオチドプローブ 3

(B) 位置 : 例えば H L A - B * 5 1 0 1 のエクソン 2 のヌクレオチド 6 0 ~ 7 7 にアニールする

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 9 :

CGCTTCATTG CAGTGGGC

10

20

30

40

50

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 1 0 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1 8 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic DNA

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / キー : オリゴヌクレオチドプロープ 4

(B) 位置 : 例えば H L A - B * 3 5 0 1 のエクソン 2 のヌクレオチド 6 0 ~ 7 7 にアニールする

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 1 0 :

CGCTTCATCG CAGTGGGC

10

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 1 1 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1 8 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic DNA

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / キー : オリゴヌクレオチドプロープ 5

(B) 位置 : 例えば H L A - B * 1 5 0 1 のエクソン 2 のヌクレオチド 1 2 6 ~ 1 4 3 にアニールする

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 1 1 :

CCGAGGATGG CGCCCCGG

20

30

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 1 2 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1 8 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic DNA

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / キー : オリゴヌクレオチドプロープ 6

(B) 位置 : 例えば H L A - B * 3 5 0 1 のエクソン 2 のヌクレオチド 1 2 5 ~ 1 4 2 にアニールする

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 1 2 :

TCCGAGGACG GAGCCCCG

40

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 1 3 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1 8 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

50

(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：genomic DNA
(iii) ハイボセティカル配列：NO
(iii) アンチセンス配列：NO
(ix) 配列の特徴：
(A) 名称/キイ：オリゴヌクレオチドプローブ7
(B) 位置：例えばHLA - B*0801のエクソン2のヌクレオチド123～140にア
ニールする
(xi) 配列の記述：SEQ ID No. 13：
AGTCCGAGAG AGGAGCCG

10

(2) 配列番号 (SEQ ID No.)：14の情報：

(i) 配列の特徴：
(A) 長さ：18塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：genomic DNA
(iii) ハイボセティカル配列：NO
(iii) アンチセンス配列：NO
(ix) 配列の特徴：
(A) 名称/キイ：オリゴヌクレオチドプローブ8
(B) 位置：例えばHLA - B*5401のエクソン2のヌクレオチド143～161にア
ニールする
(xi) 配列の記述：SEQ ID No. 14：
GCGCCGTGGG TGGAGCAG

20

(2) 配列番号 (SEQ ID No.)：15の情報：

(i) 配列の特徴：
(A) 長さ：18塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：genomic DNA
(iii) ハイボセティカル配列：NO
(iii) アンチセンス配列：NO
(ix) 配列の特徴：
(A) 名称/キイ：オリゴヌクレオチドプローブ9
(B) 位置：例えばHLA - B*0801のエクソン2のヌクレオチド178～195にア
ニールする
(xi) 配列の記述：SEQ ID No. 15：
GGGACCGGAA CACACAGA

30

40

(2) 配列番号 (SEQ ID No.)：16の情報：

(i) 配列の特徴：
(A) 長さ：18塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：genomic DNA
(iii) ハイボセティカル配列：NO
(iii) アンチセンス配列：NO
(ix) 配列の特徴：

50

(A) 名称 / キー : オリゴヌクレオチドプローブ 1 0

(B) 位置 : 例えば H L A - B * 4 0 0 1 のエクソン 2 のヌクレオチド 1 7 9 ~ 1 9 6 にア
ニールする

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 1 6 :

GGACCGGGAG ACACAGAT

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 1 7 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1 8 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジ : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic D N A

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / キー : オリゴヌクレオチドプローブ 1 1

(B) 位置 : 例えば H L A - B * 5 7 0 1 のエクソン 2 のヌクレオチド 1 7 9 ~ 1 9 6 にア
ニールする

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 1 7 :

GGACGGGGAG ACACGGAA

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 1 8 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1 8 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジ : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic D N A

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / キー : オリゴヌクレオチドプローブ 1 2

(B) 位置 : 例えば H L A - B * 4 6 0 1 のエクソン 2 のヌクレオチド 1 8 9 ~ 2 0 6 にア
ニールする

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 1 8 :

ACACAGAAGT ACAAGCGC

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 1 9 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1 8 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジ : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic D N A

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / キー : オリゴヌクレオチドプローブ 1 3

(B) 位置 : 例えば H L A - B * 4 0 0 1 のエクソン 2 のヌクレオチド 1 9 2 ~ 2 0 9 にア
ニールする

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 1 9 :

CAGATCTCCA AGACCAAC

10

20

30

40

50

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 20 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 18 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic DNA

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / キー : オリゴヌクレオチドプローブ 14

(B) 位置 : 例えば H L A - B * 0 8 0 1 のエクソン 2 のヌクレオチド 1 9 1 ~ 2 0 8 にア
ニールする

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 20 :

ACAGATCTTC AAGACCAA

10

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 21 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 18 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic DNA

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / キー : オリゴヌクレオチドプローブ 15

(B) 位置 : 例えば H L A - B * 5 4 0 1 のエクソン 2 のヌクレオチド 1 9 2 ~ 2 0 9 にア
ニールする

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 21 :

CAGATCTACA AGGCCAG

20

30

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 22 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 18 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic DNA

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / キー : オリゴヌクレオチドプローブ 16

(B) 位置 : 例えば H L A - B * 7 9 0 1 のエクソン 2 のヌクレオチド 1 9 1 ~ 2 0 8 にア
ニールする

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 22 :

ACAGATCTGC AAGACCAA

40

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 23 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 18 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

50

(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：genomic DNA
(iii) ハイボセティカル配列：NO
(iii) アンチセンス配列：NO
(ix) 配列の特徴：
(A) 名称/キイ：オリゴヌクレオチドプローブ17
(B) 位置：例えばHLA - B*7801のエクソン2のヌクレオチド212～229にア
ニールする
(xi) 配列の記述：SEQ ID No.23：
ACGACTGAC CGAGAGAG

10

(2) 配列番号 (SEQ ID No.)：24の情報：

(i) 配列の特徴：
(A) 長さ：18塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：genomic DNA
(iii) ハイボセティカル配列：NO
(iii) アンチセンス配列：NO
(ix) 配列の特徴：
(A) 名称/キイ：オリゴヌクレオチドプローブ18
(B) 位置：例えばHLA - B*4001のエクソン2のヌクレオチド211～228にア
ニールする
(xi) 配列の記述：SEQ ID No.24：
CACAGACTTA CCGAGAGA

20

(2) 配列番号 (SEQ ID No.)：25の情報：

(i) 配列の特徴：
(A) 長さ：18塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：genomic DNA
(iii) ハイボセティカル配列：NO
(iii) アンチセンス配列：NO
(ix) 配列の特徴：
(A) 名称/キイ：オリゴヌクレオチドプローブ19
(B) 位置：例えばHLA - B*4001のエクソン2のヌクレオチド220～237にア
ニールする
(xi) 配列の記述：SEQ ID No.25：
ACCGAGAGAG CCTGCGGA

30

40

(2) 配列番号 (SEQ ID No.)：26の情報：

(i) 配列の特徴：
(A) 長さ：18塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：genomic DNA
(iii) ハイボセティカル配列：NO
(iii) アンチセンス配列：NO
(xi) 配列の記述：SEQ ID No.26：

50

GTCCGAGGAA GGAGCCGC

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 27 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 17 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic DNA

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

10

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 27 :
CTTCATCACC GTGGGCT

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 28 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 17 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic DNA

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

20

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 28 :
GCTTCATCTC AGTGGGC

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 29 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 17 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic DNA

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

30

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 29 :
GCTTCATTGC AGTGGGC

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 30 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 16 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic DNA

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

40

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 30 :
CTTCATCGCA GTGGGC

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 31 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 13 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

50

- (D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：genomic DNA
(iii) ハイボセティカル配列：NO
(iii) アンチセンス配列：NO
(xi) 配列の記述：SEQ ID No. 3 1 :
GATGGCGCCC CGG
- (2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 3 2 の情報 :
(i) 配列の特徴 :
(A) 長さ：1 3 塩基対
(B) 型：核酸 10
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：genomic DNA
(iii) ハイボセティカル配列：NO
(iii) アンチセンス配列：NO
(xi) 配列の記述：SEQ ID No. 3 2 :
GGACGGAGCC CCG
- (2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 3 3 の情報 :
(i) 配列の特徴 :
(A) 長さ：1 6 塩基対 20
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：genomic DNA
(iii) ハイボセティカル配列：NO
(iii) アンチセンス配列：NO
(xi) 配列の記述：SEQ ID No. 3 3 :
GAGGATGGCG CCCCCG
- (2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 3 4 の情報 :
(i) 配列の特徴 : 30
(A) 長さ：1 6 塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：genomic DNA
(iii) ハイボセティカル配列：NO
(iii) アンチセンス配列：NO
(xi) 配列の記述；SEQ ID No. 3 4 :
CGAGGACGGA GCCCCG
- (2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 3 5 の情報 : 40
(i) 配列の特徴 :
(A) 長さ：1 7 塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：genomic DNA
(iii) ハイボセティカル配列：NO
(iii) アンチセンス配列：NO
(xi) 配列の記述：SEQ ID No. 3 5 :
CCGAGGACGG AGCCCCG 50

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 3 6 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1 9 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic D N A

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 3 6 :

TCCGAGGACG GAGCCCCG

10

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 3 7 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1 5 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic D N A

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 3 7 :

TCCGAGAGAG GAGCC

20

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 3 8 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1 7 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic D N A

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 3 8 :

AGTCCGAGAG AGGAGCC

30

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 3 9 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1 5 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : genomic D N A

(iii) ハイボセティカル配列 : NO

(iii) アンチセンス配列 : NO

(xi) 配列の記述 : SEQ ID No. 3 9 :

CCGTGGGTGG AGCAG

40

(2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 4 0 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1 7 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

50

- (ii) 配列の種類：genomic DNA
 (iii) ハイボセティカル配列：NO
 (iii) アンチセンス配列：NO
 (xi) 配列の記述：SEQ ID No. 4 0 :
CGCCGTGGGT GGAGCAG
- (2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 4 1 の情報 :
 (i) 配列の特徴 :
 (A) 長さ : 1 7 塩基対
 (B) 型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 一本鎖 10
 (D) トポロジー : 直鎖状
 (ii) 配列の種類：genomic DNA
 (iii) ハイボセティカル配列：NO
 (iii) アンチセンス配列：NO
 (xi) 配列の記述：SEQ ID No. 4 1 :
GGACCGGAAC ACACAGA
- (2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 4 2 の情報 :
 (i) 配列の特徴 :
 (A) 長さ : 1 6 塩基対
 (B) 型 : 核酸 20
 (C) 鎖の数 : 一本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖状
 (ii) 配列の種類：genomic DNA
 (iii) ハイボセティカル配列：NO
 (iii) アンチセンス配列：NO
 (xi) 配列の記述：SEQ ID No. 4 2 :
GACCGGAACA CACAGA
- (2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 4 3 の情報 :
 (i) 配列の特徴 :
 (A) 長さ : 1 5 塩基対 30
 (B) 型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 一本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖状
 (ii) 配列の種類：genomic DNA
 (iii) ハイボセティカル配列：NO
 (iii) アンチセンス配列：NO
 (xi) 配列の記述：SEQ ID No. 4 3 :
GACCGGAACA CACAG
- (2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 4 4 の情報 :
 (i) 配列の特徴 : 40
 (A) 長さ : 1 6 塩基対
 (B) 型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 一本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖状
 (ii) 配列の種類：genomic DNA
 (iii) ハイボセティカル配列：NO
 (iii) アンチセンス配列：NO
 (xi) 配列の記述 ; SEQ ID No. 4 4 :
GGACCGGAAC ACACAG
- (2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 4 5 の情報 : 50

- (i) 配列の特徴：
 (A) 長さ：17塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：genomic DNA
 (iii) ハイポセティカル配列：NO
 (iii) アンチセンス配列：NO
 (xi) 配列の記述：SEQ ID No. 45：
GACCGGAGA CACAGAT 10
- (2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 46 の情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 長さ：16塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：genomic DNA
 (iii) ハイポセティカル配列：NO
 (iii) アンチセンス配列：NO
 (xi) 配列の記述：SEQ ID No. 46：
ACGGGGAGAC ACGGAA 20
- (2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 47 の情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 長さ：20塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：genomic DNA
 (iii) ハイポセティカル配列：NO
 (iii) アンチセンス配列：NO 30
 (xi) 配列の記述：SEQ ID No. 47：
CACAGATCTT CAAGACCAAC
- (2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 48 の情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 長さ：19塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：genomic DNA
 (iii) ハイポセティカル配列：NO 40
 (iii) アンチセンス配列：NO
 (xi) 配列の記述：SEQ ID No. 48：
ACAGATCTTC AAGACCAAC
- (2) 配列番号 (SEQ ID No.) : 49 の情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 長さ：17塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：genomic DNA 50

(iii) ハイボセティカル配列：NO

(iii) アンチセンス配列：NO

(xi) 配列の記述：SEQ ID No. 49：

CAGATCTTCA AGACCAA

(2) 配列番号 (SEQ ID No.)：50 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：19 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

10

(ii) 配列の種類：genomic DNA

(iii) ハイボセティカル配列：NO

(iii) アンチセンス配列：NO

(xi) 配列の記述：SEQ ID No. 50：

CACAGATCTG CAAGACCAA

(2) 配列番号 (SEQ ID No.)：51 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：15 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

20

(ii) 配列の種類：genomic DNA

(iii) ハイボセティカル配列：NO

(iii) アンチセンス配列：NO

(xi) 配列の記述：SEQ ID No. 51：

CGAGAGAGCC TGCGG

(2) 配列番号 (SEQ ID No.)：52 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：16 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

30

(ii) 配列の種類：genomic DNA

(iii) ハイボセティカル配列：NO

(iii) アンチセンス配列：NO

(xi) 配列の記述：SEQ ID No. 52：

CGAGAGAGCC TGCGGA

(2) 配列番号 (SEQ ID No.)：53 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

40

(ii) 配列の種類：genomic DNA

(iii) ハイボセティカル配列：NO

(iii) アンチセンス配列：NO

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称 / キー：他の特徴

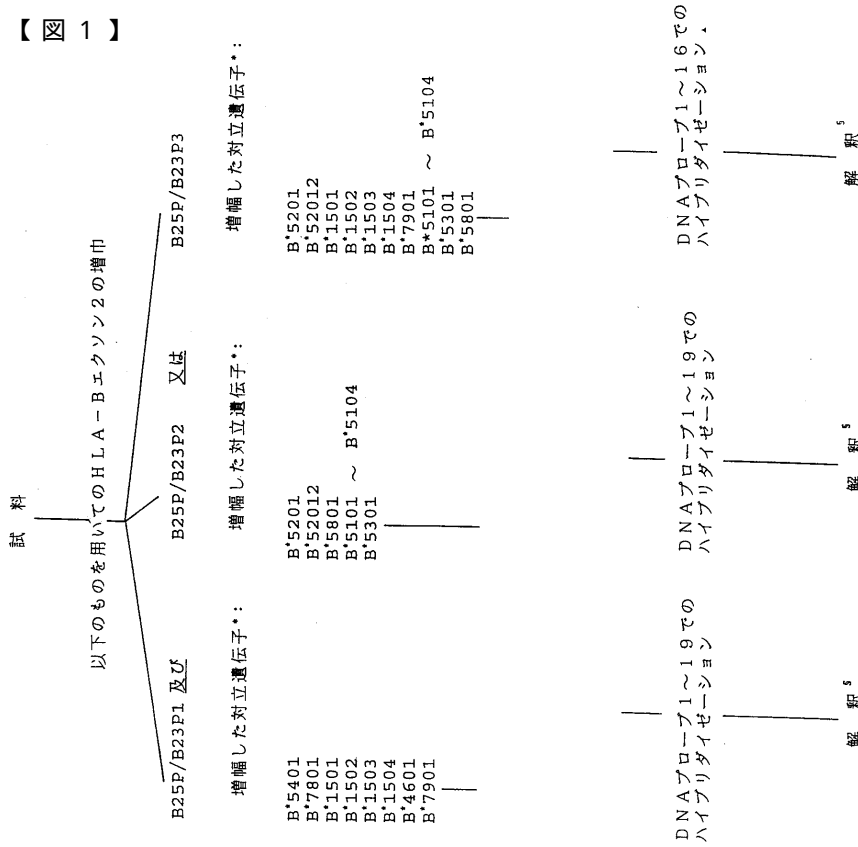
(B) 位置：9

(D) 他の情報： / 標準名 = G 又は C

50

- (ix) 配列の特徴：
- (A) 名称 / キー：他の特徴
- (B) 位置：1 2
- (D) 他の情報： / 標準名 = T 又は A
- (xi) 配列の記述：SEQ ID No. 5 3：
GACGACACSC CWGTTTCGTGA

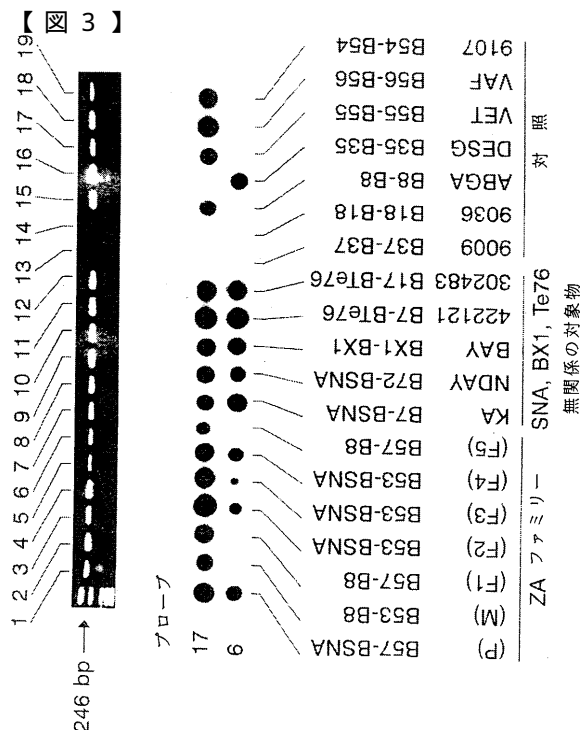
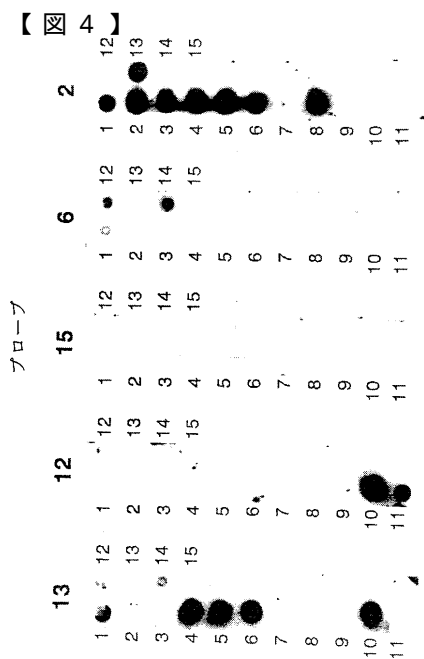
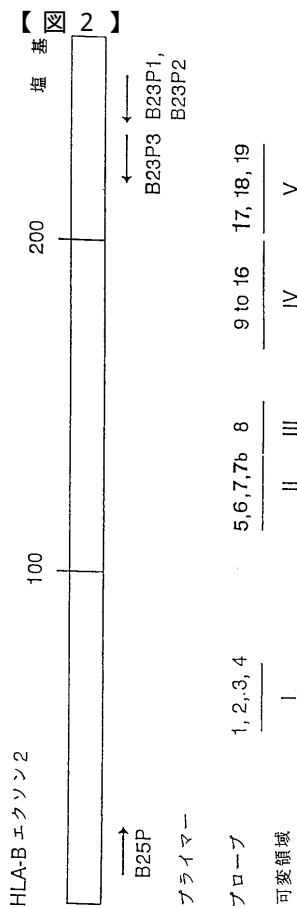
【 図 1 】



* 本発明の対象であるもののみを示してある

* プローブ17、18及び19でのハイブリダイゼーションは、これらがB23P3プライマーの3'末端の端部に位置しているため、不適切である。

⁵ 表1参照



フロントページの続き

- (72)発明者 アンドリアン, マルク
ベルギー国、ベー 1060 ブリュッセル、リュ・ドウ・ラ・リニエール 25
- (72)発明者 デュボン, エティエンヌ
ベルギー国、ベー 1060 ブリュッセル、アブニュ・デュ・オ・ポン 9
- (72)発明者 ロッソ, リュディ
ベルギー国、ベー 2180 エケーレン、ウィルヘフーフエストラート 45
- (72)発明者 ドゥ・カンク, イルゼ
ベルギー国、ベー 2020 アントウェルペン、ブス 105、クライスホーフストラート 146

審査官 富永 みどり

- (56)参考文献 特開平08-066197(JP, A)
Immunogenetics, Vol.36, No.5(1992)p.277-282
Lancet, Vol.337, No.8742(1991)p.640-642
Human Immunology 1992, Vol.34, p.257-266
Tissue Antigen 1992, Vol.40, p.221-228

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

CA(STN)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
PubMed
REGISTRY(STN)