

(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2004-520812

(P2004-520812A)

(43) 公表日 平成16年7月15日(2004.7.15)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

C 1 2 Q 1/68

G O 1 N 33/53

G O 1 N 33/566

F I

C 1 2 N 15/00

C 1 2 Q 1/68

G O 1 N 33/53

G O 1 N 33/566

Z N A A

A

M

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 有 (全 69 頁)

(21) 出願番号 特願2002-522564 (P2002-522564)
 (86) (22) 出願日 平成13年8月30日 (2001.8.30)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年2月27日 (2003.2.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/041956
 (87) 国際公開番号 W02002/018659
 (87) 国際公開日 平成14年3月7日 (2002.3.7)
 (31) 優先権主張番号 60/228,994
 (32) 優先日 平成12年8月30日 (2000.8.30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503079033
 ハプロゲン・エルエルシー
 アメリカ合衆国、ウイスコンシン・532
 23、ブラウン・ディア、ノース・ディア
 ブルック・トレイル・9099
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100105131
 弁理士 井上 満
 (74) 代理人 100113332
 弁理士 一入 章夫
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100103920
 弁理士 大崎 勝真

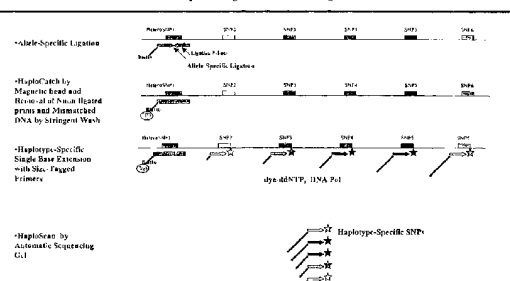
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 対立遺伝子を決定するための方法

(57) 【要約】

本発明は、ゲノムDNA試料中の対立遺伝子を分離して同定し、それによってハプロタイプを分離し、同定するための方法及びキットを提供する。かかる方法は一般に、対立遺伝子内の多型部位に特異的なプライマーをDNA試料にハイブリダイズし、1個又はそれ以上の核酸によってプライマーを伸長し、伸長したプライマーを分離して、伸長したプライマーを利用して対立遺伝子を同定することを含む。かかる方法はまた、2個のプライマーのライゲーション、それらの分離及びその後の標的対立遺伝子を同定する際の使用を可能にする。かかる方法はさらに、多型部位を含むDNAの長さが増幅され、同定されるように、もう1つのプライマーが第一プライマーの伸長の遮断部位として使用できることを提供する。プライマーが容易に分離及び/又は同定できるように、伸長していない又は伸長したプライマーを標識することができる。

- Allele-Specific Ligation/PrimerSizeTag -Based



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

特異的対立遺伝子を持つ核酸分子を分離するための方法であって、

(a) ヘテロ配列部位を含む核酸を、ヘテロ配列部位に特異的な少なくとも 1 個の核酸プライマーとハイブリダイズして、ハイブリダイズ核酸配列を形成し、但し、かかる少なくとも 1 個の特異的核酸プライマーはヘテロ配列にハイブリダイズしたときにのみ伸長を受けることができ、

(b) ハイブリダイズ核酸を、少なくとも 1 個の核酸プライマーの伸長を可能にする条件に供し、そして

(c) 核酸配列から伸長を受けたハイブリダイズ核酸配列を、ハイブリダイズしていない核酸配列及び伸長を受けなかった核酸プライマーから分離することを含む方法。 10

【請求項 2】

少なくとも 1 個の核酸プライマーの 3' 末端がヘテロ配列部位内の多型塩基の位置に対応し、少なくとも 1 個の核酸プライマーの 3' 末端がヘテロ部位内の多型塩基に相補的であって、それにハイブリダイズするときのみ核酸プライマーが伸長を受ける、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

プライマーの 1 個又は伸長したプライマーの 1 個が検出分子で標識されており、そして (d) 検出分子を利用して伸長を受けたハイブリダイズ核酸配列を分離することをさらに含む、請求項 2 に記載の方法。 20

【請求項 4】

(d) 少なくとも 1 個の核酸プライマーとのハイブリダイゼーションに先立ってヘテロ配列部位を含む核酸分子を増幅し、そして

(e) ヘテロ配列部位を同定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

ヘテロ配列部位が一塩基多型を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

請求項 1 の方法を実施するための指示を含む、特異的対立遺伝子を持つ核酸分子を分離するためのキット。 30

【請求項 7】

特異的対立遺伝子を持つ核酸分子を分離するための方法であって、

(a) 1 又はそれ以上のヘテロ配列部位を含む核酸を、ヘテロ配列部位に特異的な少なくとも 1 個の核酸プライマー及びライゲーションプライマーとハイブリダイズして、ハイブリダイズ核酸配列を形成し、但し、かかる少なくとも 1 個の核酸プライマーの 3' 末端はヘテロ配列部位内の多型塩基の位置に対応し、またライゲーションプライマーの 5' 末端は少なくとも 1 個の核酸プライマーの 3' 末端に隣接しており、

(b) 少なくとも 1 個の核酸プライマーとライゲーションプライマーを、少なくとも 1 個の核酸プライマーとライゲーションプライマーのライゲーションを可能にする条件に供して、 40

(c) プライマーがライゲーションを受けたハイブリダイズ核酸分子を分離することを含む方法。

【請求項 8】

少なくとも 1 個の核酸プライマー及びライゲーションプライマーのいずれかが検出分子で標識されており、そして (c) 検出分子を利用して伸長を受けたハイブリダイズ核酸配列を分離することをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

少なくとも 1 個の核酸プライマーが異なる配列を持つ複数のプライマーを含み、各々の配列が、2つの配列が同じ検出分子に結合することがないように個々の特定検出分子と結合 50

している、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

請求項 7 の方法を実施するための指示を含む、特異的対立遺伝子を持つ核酸分子を分離するためのキット。

【請求項 11】

特異的対立遺伝子を持つ核酸分子を分離するための方法であって、

(a) 1 又はそれ以上のヘテロ配列部位を含む核酸を、ヘテロ配列部位に特異的な少なくとも 1 個の核酸プライマーとハイブリダイズして、ハイブリダイズ核酸複合体を形成し、そして

(b) 完全な相補的ハイブリダイゼーションを有するハイブリダイズ核酸複合体を、完全な相補的ハイブリダイゼーションを持たないハイブリダイズ核酸複合体から分離することを含む方法。 10

【請求項 12】

1 又はそれ以上のヘテロ配列部位を含む核酸の配列を決定することをさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

段階 (b) が、完全な相補的ハイブリダイゼーションを持たない核酸複合体が解離し、完全な相補的ハイブリダイゼーションを有する核酸複合体は解離しない温度までハイブリダイズ核酸複合体を加熱することを含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

少なくとも 1 個の核酸プライマーを検出分子で標識する、請求項 11 に記載の方法。 20

【請求項 15】

請求項 11 の方法を実施するための指示を含む、特異的対立遺伝子を持つ核酸分子を分離するためのキット。

【請求項 16】

特異的対立遺伝子を持つ核酸分子を分離するための方法であって、

(a) 少なくとも 5' ヘテロ配列部位と 3' ヘテロ配列部位を含む核酸を、3' ヘテロ配列部位に特異的なヘテロプライマー及びホモプライマーとハイブリダイズして、ハイブリダイズ核酸配列を形成し、但し、ヘテロプライマーの 3' 末端は 3' ヘテロ配列部位内の多型塩基の位置に対応し、ホモプライマーは 5' ヘテロ配列部位の 5' の位置で核酸にハイブリダイズすることができ、そしてヘテロプライマーは、ヘテロプライマーの 3' 末端が 3' ヘテロ部位内の多型塩基に相補的であって、それにハイブリダイズするときのみ伸長を受けることができ、 30

(b) ヘテロプライマーとホモプライマーの間に核酸配列が生成され、5' ヘテロ配列部位を含むようにハイブリダイズヘテロプライマーを伸長し、そして

(c) 5' ヘテロ配列部位の同一性を決定する

ことを含む方法。

【請求項 17】

(d) 5' ヘテロ配列部位の同一性を利用してもう 1 つのヘテロプライマーともう 1 つのホモプライマーを生成し、但し、もう 1 つのヘテロプライマーの 3' 末端は 5' ヘテロ配列部位内の多型塩基の位置に対応し、5' ヘテロ配列部位がもう 1 つの 5' ヘテロ配列の 3' 側に位置し、ホモプライマーはもう 1 つの 5' ヘテロ配列部位の 5' の位置で核酸にハイブリダイズすることができ、そしてヘテロプライマーは、ヘテロプライマーの 3' 末端が 5' ヘテロ部位内の多型塩基に相補的であって、それにハイブリダイズするときのみ伸長を受けることができ、 40

(e) 核酸配列をもう 1 つのヘテロプライマー及びもう 1 つのホモプライマーとハイブリダイズし、そして

(f) (a) から (e) までの段階を 1 回又はそれ以上反復することを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

核酸分子のハプロタイプを決定することをさらに含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

請求項 16 の方法を実施するための指示を含む、特異的対立遺伝子を持つ核酸分子を分離するためのキット。

【請求項 20】

核酸分子内の対立遺伝子を同定するための方法であって、

(a) 複数のヘテロ配列部位を含む核酸を少なくとも 1 個のプライマーとハイブリダイズして、ハイブリダイズ核酸を生成し、但し、かかる少なくとも 1 個のプライマーはビーズに結合しており、

(b) ハイブリダイズプライマーを伸長して、伸長プライマーを生成し、

10

(c) 伸長したプライマーから核酸を解離し、

(d) 伸長したプライマーをビーズに結合した第二のプライマーとハイブリダイズし、

(e) 第二プライマーを伸長して、第二伸長プライマーを生成し、そして

(f) 伸長プライマー、第二伸長プライマー又は両方を利用して核酸のヘテロ配列部位を同定する

ことを含む方法。

【請求項 21】

請求項 20 の方法を実施するための指示を含む、核酸分子内の対立遺伝子を同定するための方法。

【発明の詳細な説明】

20

【0001】

(発明の分野)

本発明は、遺伝子内の 1 又はそれ以上のヘテロ配列部位を同定することにより、対立遺伝子を分離し、その同一性を決定するための方法に関する。より特定すると、本発明は、対立遺伝子を分離し、その同一性を決定するために 1 個又はそれ以上のプライマーを利用する方法に関する。

【0002】

(発明の背景)

個体間の配列変異の最も頻繁な形態は、一般に SNPs (スニップス) として知られる一塩基多型である。ヒトゲノムプロジェクトの完了により、SNPs は 1000 ヌクレオチド当たり平均 1 個の割合で起こると推定されているが、一部の DNA 領域ではより頻繁に起こりうる。現在、疾患あるいは薬剤応答に関連する標的遺伝子を同定するための SNPs の使用が研究の焦点となっている。しかし、相関関係が弱いと、多くの科学者や研究者達は、個々の SNP に基づいて薬剤と疾患を個別化するという計画に挑んでおり、そのためハプロタイプ分析の重要性が SNPs の医学的有用性にとって必須のツールとして明らかになりつつある。

30

【0003】

ハプロタイプは一般に、個々の SNPs が所与の長さの DNA に沿って構成される様式として知られる。ハプロタイプの古典的な定義は、1 本の染色体上に存在し、所与の個体群において 1 つの世代から次の世代へと共に遺伝される傾向がある、密接に連鎖した遺伝子座の対立遺伝子の組合せである。分子ハプロタイピングのもう 1 つの局面は、現在病因遺伝子のポジショナルクローニングにおける重要なツールとして認識されている連鎖不平衡地図の作製であり、複雑な表現型が遺伝学的に詳細に解析されると共に数多くの適用が明らかになるであろう。

40

【0004】

1989 年以来、科学者達は、対立遺伝子を物理的に分離するためのゲノム DNA の一分子希釈 (SMD) 又はヘテロ接合鑄型から半接合 DNA セグメントを選択的に増幅するための対立遺伝子特異的プライマーによる対立遺伝子識別のいずれかを用いて、分子ハプロタイピングのための様々な方法を検討してきた。しかし、これらの方法は短いセグメント (約 500 bp) についてしか開発されていなかったが、最近になって、10 - 20 倍離

50

れたマーカーについてのロングレンジPCRに分子ハプロタイピングが適用され、このアッセイの開発のための基本系としてCD4遺伝子座が使用された。DNA配列のハプロタイプを決定するために他の方法も試みられてきたが、これらの方法は大部分が成功していないか、信頼性が低い又は費用がかかるものであった。それ故、高生産量に対応できる、信頼しうる経済的な分子ハプロタイピングの必要性が依然として存在する。

【0005】

(発明の概要)

本発明は、遺伝子内の1又はそれ以上のヘテロ配列部位を同定することにより、対立遺伝子を決定するための方法を対象とする。かかる方法は、特定遺伝子のハプロタイプを決定するために使用でき、ヒト白血球抗原(HLA)タイピングを含めて多くの領域における適用を持つ。本発明はまた、そのようなタイピングのためのキットを対象とする。

【0006】

本発明は、対立遺伝子特異的核酸分子を分離する方法を含む。1又はそれ以上のヘテロ配列部位特異的核酸プライマーを、1又はそれ以上のヘテロ配列部位を含む一本鎖核酸分子に加えてハイブリダイズさせる。1つの実施形態では、各々のプライマーの3'末端は標的とするヘテロ配列部位の多型部位に対応する。そのような実施形態では、3'末端を、一塩基伸長、ヘテロ配列部位特異的プライマーの3'末端に隣接する5'末端を持つ第二プライマーへのライゲーションに供するか、又はいくつかの塩基を伸長させることができる。次に伸長した又はライゲートしたヘテロ配列部位特異的ハイブリダイズプライマーと核酸分子を分離し、任意に、さらなる遺伝子型分類のために回収する。代替的实施形態では、各々のプライマーは、100%未満の相補性の塩基とハイブリダイズするプライマーを選択的に除去することができ、100%相補的な塩基とハイブリダイズしたプライマーは影響を受けないようにプライマー内に位置する1個又はそれ以上の多型塩基を含む。

【0007】

本発明はまた、核酸分子内に含まれる複対立遺伝子を同定するための方法に関する。複数のヘテロ配列部位を含む一本鎖核酸分子を選択する。この核酸分子に2個のプライマー、ヘテロプライマーとホモプライマーを加える。ヘテロプライマーは、同じ核酸分子上の5'ヘテロ配列部位の3'に位置する3'ヘテロ配列部位にハイブリダイズすることができる。ヘテロプライマーの3'塩基はヘテロ配列部位の多型塩基に対応するので、ヘテロプライマーの3'末端が一本鎖核酸にハイブリダイズするときのみ伸長が起こる。ホモプライマーは、5'ヘテロ配列部位の5'の位置で同じ核酸分子にハイブリダイズすることができる。プライマーを核酸分子にハイブリダイズさせ、プライマーの間に位置する核酸分子の5'ヘテロ配列部位が複製される、すなわちホモプライマーが、ホモプライマーに達したとき伸長ヘテロプライマーの伸長を停止させる働きをするようにヘテロプライマーを伸長させる。核酸分子と伸長したヘテロプライマーを変性し、ヘテロプライマーを分離して分析し、5'ヘテロ配列部位を決定する。この情報を使用して、もう1つのヘテロプライマーともう1つのホモプライマーを含む新しいセットの核酸プライマーを同定する。新しいセットのヘテロプライマーは、5'ヘテロ配列部位(ヘテロプライマーの3'塩基は多型塩基に対応する)にハイブリダイズすることができ、5'ヘテロ配列部位は同じ核酸分子上のさらなるヘテロ配列部位の3'側に位置し、新しいセットのホモプライマーはさらなるヘテロ配列部位の5'の位置で同じ核酸分子にハイブリダイズすることができる。対立遺伝子を同定するのに十分な核酸分子上のヘテロ配列部位が同定されるまで、先の段階を反復し、各々の新しいセットのプライマーをその後のラウンドのハイブリダイゼーション/伸長に使用する。このようにして核酸分子のハプロタイプを決定することができる。

【0008】

本発明はまた、核酸分子内の複対立遺伝子を同定するための方法であって、複対立遺伝子を含む核酸試料を、各々のピーズに2個の異なるプライマーが結合しており、各ピーズ上の少なくとも1個のプライマーがユニーク対立遺伝子に対するプライマーであるピーズのセットに、ユニーク対立遺伝子に対する少なくとも1個のプライマーが核酸試料の一部に

ハイブリダイズするような条件下で加えることを含む方法に関する。ハイブリダイズしたプライマーを増幅してハイブリダイズプライマーを伸長し、伸長プライマー核酸を生成する。次にハイブリダイズした核酸試料とプライマーを変性して、核酸試料をビーズから除去する。次に伸長したプライマーをビーズ上の第二プライマーにハイブリダイズして、第二プライマーを増幅する。二つの増幅したプライマーを含むビーズを分析して、核酸試料中に存在する対立遺伝子を決定する。

【0009】

(図面の簡単な説明)

図1は、本発明に従った対立遺伝子特異的プライマー伸長法を利用した対立遺伝子同定を例示する概要図である。

10

【0010】

図2は、プライマーサイズタグアプローチによる一塩基伸長を用いて複対立遺伝子を同定する方法を例示した概要図である。

【0011】

図2Aは、プライマーサイズタグアプローチによる一塩基伸長を用いて複対立遺伝子を同定する方法を例示した概要図である。

【0012】

図3は、本発明に従った対立遺伝子特異的ライゲーションとプライマーサイズタグを利用した対立遺伝子同定を例示する概要図である。

【0013】

20

図4は、本発明に従ったハイブリダイゼーションとプライマーサイズタグを利用した対立遺伝子同定を例示する概要図である。

【0014】

図5は、本発明に従ったホモプライマーとヘテロプライマーのセットを用いて複対立遺伝子を同定する方法を例示した概要図である。

【0015】

図6Aから6Fは、本発明に従った複数のプライマーを含む蛍光ビーズを用いて複対立遺伝子を同定する方法を例示する。

【0016】

(発明の詳細な説明)

30

本発明は、その内容全体が参照してここに組み込まれる、米国特許仮出願第60/228,994号に基づく、対立遺伝子の同一性を決定するための方法を対象とする。

【0017】

本明細書全体を通じて下記の用語を使用し、それらは次のように定義される：

対立遺伝子：所与の遺伝子の変異体形態。そのような変異体は、一塩基多型、挿入、逆位、転座及び欠失を含む。

【0018】

アビジン：高い親和性と特異性でビオチンと結合する能力によって機能的に定義されるタンパク質のファミリー。アビジンはかなり小さなオリゴマータンパク質であって、4つの同一サブユニットから構成され、各々がビオチンの単一結合部位を担う。アビジンは、(a)両生類、爬虫類及び鳥類によって産生される、それらの卵中に存在し、アビジンとして知られるタンパク質、及び(b)ストレプトアビジンとして知られる、ストレプトミセス属、*Streptomyces* *abidinii*によって産生されるタンパク質を含む。ここで使用するとき「アビジン」は上記のタンパク質のすべてを含む。

40

【0019】

ビオチン：ここで使用するとき、「ビオチン」は、ビオチン、ビオチンがアルキル基の付加によって修飾された市販のビオチン製品、及びアミン、アシル及びアルキル脱離基、カルボニル基及びハロゲン化アルキルであるポリマー上の相補的反応基又はミカエル型アクセプターとの活性エステル、アミン、ヒドラジド及びチオール基のようなビオチン誘導体

50

を含む。

【0020】

検出分子：典型的には外部ソースによって、核酸の検出及び／又は除去を可能にする、核酸に共有結合した分子。そのような分子は、染料、ポリA及びポリT尾部を含む可変重量分子、磁気ビーズを含めたビーズ、ピオチン、アビジン、ジゴキシゲニン、ジゴキシゲニン抗体及び当該技術において既知の他の同様の物質に連結されうるリンカーを含みうる。

【0021】

遺伝子型：遺伝子座に存在する特定対立遺伝子。

【0022】

ハプロタイプ：多くの密接に連鎖する遺伝子座の集合的遺伝子型を表わし、同じ染色体に沿った対立遺伝子の完全な配列である。 10

【0023】

ヘテロプライマー：ストリンジェント条件下で1個のユニーク対立遺伝子にハイブリダイズするプライマー。

【0024】

ヘテロ配列部位：定義された配列部位に異なる配列を持つ2個の対立遺伝子を、ヘテロ配列部位を持つと称する。

【0025】

ホモプライマー：両方の親対立遺伝子にハイブリダイズするプライマー。

【0026】

親対立遺伝子：母系からの1組の染色体と父系からの1組の染色体を含む哺乳類二倍体細胞からの対立遺伝子。 20

【0027】

プライマー：DNA鋳型にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチド。

【0028】

ここで引用するすべての特許及び参考文献は参照してここに組み込まれる。

【0029】

本発明の方法はいくつかの重要な利点を持つ。本発明の方法は、完全な遺伝子型及びハプロタイプの決定を含めて、対立遺伝子の迅速で費用のかからない正確な決定を可能にする。かかる方法は、ポリメラーゼ連鎖反応のような当該技術において既知の標準的な増幅手段による完全な増幅を妨げるような長さを持つ核酸フラグメントの分析を可能にするであろう。 30

【0030】

本発明は、対立遺伝子特異的な核酸分子を分離し、同定する方法を対象とする。いかなる核酸分子も使用しうるが、デオキシリボ核酸が好ましい。同定し、分離することができる対立遺伝子特異的な核酸分子は、複対立遺伝子、遺伝子のセグメント及び発現されないフラグメントを含む。

【0031】

本発明の方法及びキットは、2又はそれ以上のヘテロ配列部位を持ち、従って複数の型の対立遺伝子を持つすべての二倍体遺伝物質に関して使用しうる。本発明を適用しうる、複対立遺伝子を持つ遺伝子の例は、ヒト白血球抗原(HLA)クラスI及びクラスII遺伝子、哺乳類におけるT細胞受容体遺伝子、TAP、LMP、ras、非古典的HLAクラスI遺伝子、ヒト補体因子C4及びC2についての遺伝子、ヒトHLA複合体におけるBf、及びミトコンドリアDNA、細菌染色体及びウイルスDNA内に存在する遺伝子のような、哺乳類MHC遺伝子である。 40

【0032】

本発明の1つの方法では、各々の対立遺伝子がユニークなセットのヘテロ配列部位を持つ、複対立遺伝子を含む核酸試料を入手する。当該技術において既知の何らかの手段によって、1つの実施形態では1988年7月28日発行の米国特許第4,683,202号においてMullisが述べているようにポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、核酸 50

試料を増幅する。次に増幅した核酸試料を一本鎖核酸に変性する。その後一本鎖核酸を分析して、本発明に従ったいくつかのアプローチによって存在するヘテロ配列部位を決定することにより、存在する対立遺伝子を決定する。

【0033】

本発明に従った方法は1個又はそれ以上のプライマーを利用する。本発明に従ったプライマーは、対象とする配列とハイブリダイズするヌクレオチドの配列を含む。一部の場合には、増幅の際にプライマーが伸長されうるような条件下でプライマーがハイブリダイズすることを必要とする。また別の場合には、ハイブリダイズするとき100%相補的対合であるプライマーが、100%未満の相補的対合でハイブリダイズするプライマーよりも高い T_m を持つことを必要とする。一般に、本発明のプライマーはいかなる有用な長さでもありうるが、一般には約12 - 25ヌクレオチド又は少なくとも18ヌクレオチドを含み、好ましい長さは約18 - 22ヌクレオチドである。本発明の方法においては、対象とする多型部位を同定するために試料中の標的DNAにユニークな1又はそれ以上のプライマー配列を同定する必要がある。多くの複対立遺伝子のそのような多型同定は当該技術において既知である。例えば、HLA-A、HLA-B及びHLA-C遺伝子の約222個の既知の対立遺伝子が存在し、そのような対立遺伝子の配列は当該技術において既知である。ArnettとParham, Tissue Antigens 45: pp. 217 - 257、1995、及びBaxter-Loweら、1997年12月30日発行の米国特許第5,702,885号参照。

10

【0034】

本発明の範囲内に包含される核酸分子のハイブリダイゼーションを説明するための「高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする」との表現は、洗浄のための低いイオン強度と高い温度条件下でハイブリダイズすることを指す。「低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする」との表現は、高いイオン強度とより低い温度を有するハイブリダイゼーションを指す。

20

【0035】

ストリンジェンシーに影響を及ぼす変数は、例えば、温度、塩濃度、プローブ/試料の相溶性及び洗浄条件を含む。その他の条件がすべて等しければ、ハイブリダイゼーションの温度が上昇すると共にストリンジェンシーが高くなる。高いストリンジェンシーは非特異的ハイブリダイゼーションの低下、すなわちより少ないバックグラウンドノイズを提供する。核酸ハイブリダイゼーションに関する「高ストリンジェンシー条件」及び「中ストリンジェンシー条件」は、その教示が参照してここに組み込まれる、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubelら、1998、Green Publishing Associates and Wiley Interscience, NYの中で説明されている。言うまでもなく、当業者は、必要な検出範囲を達成するために、プローブと分析物間の様々な度合の相補性を含む又は排除するように、所望に応じてハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーを変化させうることを認識するであろう。

30

【0036】

様々な検出分子が本発明において使用しうる。これらの分子は、1個又はそれ以上のプライマーに結合するか、又は伸長段階の間に核酸に組み込まれるddNTPに直接結合することができる。これらの分子は、染料、放射性標識、等々のような分子を検出するための手段を含むか、又はビオチン/アビジン、磁気及び/又は蛍光ビーズ、等々のような分子を分離するための手段、又はその両方を含みうる。例えばビオチン/アビジンを使用するときには、プライマーが一本鎖核酸にハイブリダイズするとき1本の鎖がビオチン標識を担う二本鎖DNAが生じるように、プライマーの1個又はそれ以上をビオチンで標識することができる。その後二本鎖DNAをアビジンで被覆した保持体に結合することができる。

40

【0037】

本発明において使用する保持体は、ビーズ、アフィニティークロマトグラフィーカラムの

50

ような当該技術において既知の保持体でよい。好ましい保持体は磁気ビーズの形態である。保持体がビーズの形態であるときには、ビーズを磁石に誘引し、二本鎖核酸が一本鎖の核酸に解離するような条件下でビーズを洗うことによって増幅した核酸の二本の鎖を分離する。解離は、典型的にはアルカリ条件下、典型的には0.1 M又は0.15 M NaOH条件下に室温で約5 - 10分間、数回繰り返してビーズをインキュベートすることによって実施する。その後各々の鎖を収集して、さらに分析することができる。

【0038】

対立遺伝子を決定するべく単離ヘテロ配列部位を同定するために様々な分析手法が使用できる。これらの手法は当該技術において既知であり、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、フローサイトメトリー、高圧液体クロマトグラフィーレーザー走査及び質量分析法を含むが、これらに限定されない。これらの手法は手動で又は自動システムによって実施できる。そのような自動システムは当該技術において既知であり、多色蛍光を走査することができる自動塩基配列決定装置又は毛管電気泳動装置を含む。

10

【0039】

本発明の最初のアプローチは、図1及び2に概要図で示されており、ハイブリダイズしたヘテロ配列部位特異的プライマーの伸長に基づく。このアプローチは、高度に多型の染色体領域において対立遺伝子又はハプロタイプ特異的遺伝子型情報を決定するために特に有用である。図1に示すように、DNA試料を増幅し、変性して、一本鎖DNAフラグメントを作製した後、5'末端に検出分子で標識した1又はそれ以上のヘテロ配列部位特異的プライマーを加える。ヘテロ配列部位特異的プライマーを一本鎖核酸分子に加えてハイブリダイズさせる。好ましい実施形態では、各々のプライマーの3'末端はヘテロ配列部位の多型塩基に相補的である。それ故、3'末端が相補的でないヘテロ配列部位にプライマーがハイブリダイズした場合、伸長のための条件に供したときプライマーは伸長を受けない。好ましくは、単一ヌクレオチドの相違を識別することができる酵素を使用する。図1に示すように、ハイブリダイズしたプライマーをその後伸長に供するが、相補的3'塩基対合でハイブリダイズしたプライマーだけが伸長される。次に、図1ではビオチンとして例示される、検出分子を通してプライマーを除去する。アビジンで被覆した磁気ビーズを使用して、プライマー上のビオチンによってプライマーを除去する。その後ハイブリダイズしたプライマー/DNAフラグメントを、伸長を受けなかったプライマーに結合したDNAフラグメントが除去されるような条件下で洗浄する。次に伸長した二本鎖核酸を変性する。その後ビーズに結合していない鎖を分析してヘテロ配列部位を決定する。

20

30

【0040】

代替的に、本発明において使用するプライマーはそれらの5'末端で検出分子に結合していてもよい。その代わりに、プライマーを上述したようにハイブリダイズさせ、相補的3'末端とハイブリダイズするものを図2に示すような検出分子に結合したddNTPを使用して一塩基伸長に供する。伸長したプライマー上の検出分子を用いてプライマーを分離し、その後プライマーを変性して分析し、存在するヘテロ配列部位を決定することができる。

【0041】

本発明はまた、下記の方法を使用したとき4色の蛍光を走査することができる自動塩基配列決定装置又は毛管電気泳動装置を用いたハイスループット塩基多型タイピングのために有用である。同じ方法を、多塩基多型、挿入、逆位、転座及び欠失を含めた一塩基多型以外の他の遺伝的変異をタイピングするように改変することもできる。

40

【0042】

本発明のもう1つのアプローチは対立遺伝子特異的ライゲーシオンに基づく。このアプローチは図3に例示されている。図3に示すように、1又はそれ以上のヘテロ配列部位を含む一本鎖DNAフラグメントにヘテロ配列部位特異的プライマーを加える。ヘテロ配列特異的プライマーはヘテロ配列部位の多型塩基に相補的な各々のプライマーの3'末端を持ち、それらをDNAフラグメントにハイブリダイズさせる。次にライゲーシオンプライマーを加え、DNAフラグメントにハイブリダイズさせる。各ライゲーシオンプライマーは

50

、ライゲーションプライマーの5'末端が直接ヘテロ配列部位特異的プライマーの3'末端に隣接するように、DNAフラグメントの1つの一部に相補的である配列を持つ。ヘテロ配列部位特異的プライマーがDNAフラグメントにハイブリダイズしなければ、ライゲーションのための条件に供したときライゲーションプライマーはヘテロ配列部位特異的プライマーにライゲートすることができない。可能な場合には、プライマーをライゲートし、その後、ライゲートしていないプライマーを変性させるのに十分であるが、DNAフラグメントにハイブリダイズしているライゲートしたプライマーを変性させるには十分でない温度に供する。典型的には、20塩基のプライマーを使用するとき、そのような温度は約60である。その後ハイブリダイズしたライゲートしたプライマーを当該技術において既知の何らかの手段によって除去することができる。図3に示すように、1組のプライマーは、ピオチンとして例示するような結合検出分子を持ちうる。検出分子はヘテロ配列部位特異的プライマー又はライゲーションプライマーに結合しうる。さらに、図3に示すように上述したような方法を組み合わせることもでき、あるヘテロ配列部位の多型を1つの方法によって検出し、その他の部位をここで述べる他の方法によって決定する。同様に図3に示すように、1個又はそれ以上のプライマーは、2個のプライマーが同じ分子量を持つことがないように、各プライマーの5'末端に結合した可変重量分子を持ちうる。そのような可変重量分子は、ハイブリダイゼーション/増幅段階では非反応性であり、ポリA尾部のようなポリホモ核酸尾部を含む適当な物質でありうる。そのようなポリA尾部は一般に長さが2 - 4塩基分異なるが、ゲル電気泳動のような標準的分離装置でポリA尾部を持つそのようなプライマーを分離するのに十分ないかなる長さであってもよい。

10

20

【0043】

本発明のもう1つの方法が図4に例示されている。そのような方法に従って、多数のヘテロ配列部位を含むDNAフラグメントに1組のヘテロ配列部位特異的プライマーを加える。各プライマーは、DNAフラグメントへのプライマーのハイブリダイゼーション後、不正塩基対合を含んでハイブリダイズするプライマーは塩基ミスマッチなしでハイブリダイズするプライマーよりも低い T_m を持つように各プライマー内に位置する、少なくとも1個の多型塩基を持つ。この T_m の差を利用して、100%未満の相補性のハイブリダイゼーションを有するプライマーを除去する。そのような塩基ミスマッチは典型的にはプライマー配列の中央付近で起こる。100%未満の相補性のハイブリダイゼーションプライマー/DNAフラグメント複合体を除去した後、残りの複合体を分析して、特異的対立遺伝子を決定するための特異的ヘテロ配列部位を決定する。これは様々な方法で実施しうる。図4に例示するように、すべてのプライマーが結合した可変重量分子を持ちうる。各々の特異的ヘテロ配列部位部位についてのすべてのプライマーが結合した特異的可変重量分子を持ちうる。1又はそれ以上の特異的ヘテロ配列部位における個々の多型についての各々のプライマーが、結合した異なる検出分子を持つ。ハイブリダイズしたプライマーを検出分子によって個々の群に分離し、さらに各々の群のプライマー内にどの可変重量分子が存在するかを判定することにより、対立遺伝子特異性を決定する。

30

【0044】

本発明のもう1つの方法は、PCRのような従来の手段によって完全に増幅するには長すぎると考えられる、核酸の長いセグメント上の複数のヘテロ配列部位の決定を可能にする。図5に示すように、複数のヘテロ配列部位を含む一本鎖核酸分子を選択する。この核酸分子に2個のプライマー、ヘテロプライマーとホモプライマーを加える。ヘテロプライマーは、同じ核酸分子上の5'ヘテロ配列部位の3'に位置する3'ヘテロ配列部位にハイブリダイズすることができる。ヘテロプライマーの3'塩基はヘテロ配列部位の多型塩基に対応するので、ヘテロプライマーの3'末端が一本鎖核酸にハイブリダイズするときのみ伸長が起こる。ホモプライマーは、5'ヘテロ配列部位の5'の位置で同じ核酸分子にハイブリダイズすることができる。プライマーを核酸分子にハイブリダイズさせ、プライマーの間に位置する核酸分子の5'ヘテロ配列部位が複製されるようにヘテロプライマーを伸長させる。核酸分子と伸長したヘテロプライマーを変性し、ヘテロプライマーを分離して分析し、5'ヘテロ配列部位を決定する。この情報を使用して、ヘテロプライマー

40

50

とホモプライマーを含む新しいセットの核酸プライマーを同定する。新しいセットのヘテロプライマーは、5'ヘテロ配列部位(ヘテロプライマーの3'塩基は多型塩基に対応する)にハイブリダイズすることができ、5'ヘテロ配列部位は同じ核酸分子上のさらなるヘテロ配列部位の3'側に位置し、新しいセットのホモプライマーはさらなるヘテロ配列部位の5'の位置で同じ核酸分子にハイブリダイズすることができる。対立遺伝子を同定するのに十分な核酸分子上のヘテロ配列部位が同定されるまで、先の段階を反復し、各々の新しいセットのプライマーをその後のラウンドのハイブリダイゼーション/伸長に使用する。このようにして核酸分子のハプロタイプを決定することができる。

【0045】

図6Aから6Fに示すように、本発明はまた、核酸分子内の複対立遺伝子を同定するための方法に関する。図6Aに示すように、かかる方法は、複対立遺伝子を含む核酸試料をビーズのセットに加えることを含み、各々のビーズには2個の異なるプライマーが結合しており、各ビーズ上の少なくとも1個のプライマーがユニーク対立遺伝子に対するプライマーである。次に、ユニーク対立遺伝子に対する少なくとも1個のプライマーが図6Bに示すような核酸試料の一部にハイブリダイズするような条件下で核酸を反応させる。ハイブリダイズしたプライマーを増幅して、ハイブリダイズしたプライマーを伸長し、図6Cにおけるような伸長プライマー核酸を生成する。図6Dに移って、ハイブリダイズした核酸試料とプライマーを変性し、核酸試料をビーズから除去する。次に伸長したプライマーをビーズ上の第二プライマーにハイブリダイズし(6E)、第二プライマーを増幅する(6F)。二つの増幅したプライマーを含むビーズを分析して、核酸試料中に存在する対立遺伝子を決定する。ビーズからのプライマーの除去を容易にするために、プライマーは開裂部位を持ちうる。

10

20

【0046】

本発明はまた、ここで述べる方法を実施するためのキットを包含する。それらの最も基本的な実施形態では、本発明のキットは上記で述べた方法を実施するための指示を含む。さらに、キットは、1又はそれ以上のセットの遺伝子座特異的増幅プライマー、ポリメラーゼ連鎖反応緩衝液、1個又はそれ以上が任意に標識されているジデオキシヌクレオチド、核酸増幅のための試薬、一本鎖核酸フラグメントの作製のための試薬、任意に少なくとも1個の検出分子に結合している1個又はそれ以上のヘテロ配列部位特異的プライマー、1個又はそれ以上のライゲーションプライマー、隣接するハイブリダイズしたプライマーのライゲーションのための試薬、1個又はそれ以上の検出分子を含むビーズ、そして1又はそれ以上の無菌マイクロチューブのような、本発明において使用される必要試薬の少なくとも1つ又はそれ以上を含む。

30

【0047】

下記の実施例から本発明がよりよく理解されるであろう。しかし、当業者は、ここで述べる特定の方法及び結果は単に本発明の例示にすぎず、本発明の限定を意図しないことを容易に認識するであろう。

【0048】

実施例

本実施例は、HLA遺伝子内の特定多型に関する種々の対立遺伝子の捕獲を確認するための3つの戦略の使用を含んだ：i)ハイブリダイゼーション；ii)一塩基伸長；及びiii)ライゲーション。

40

【0049】

これらの条件の各々を、適切な対立遺伝子、従ってその対立遺伝子に関する特定多型を同定する上で有用なアッセイを開発するための試験として使用した。最後の2つの方法は酵素に基づくアッセイであって、Taq Ligase及びThermus Sequenaseの使用を必要とし、これらの酵素が一本鎖DNA上の特定位置におけるヌクレオチドの相違を識別する能力を利用した。これらの方法は、検討する特定対立遺伝子内の一塩基多型又は突然変異を識別するのに十分な感受性があることが認められた。

【0050】

50

1. A. ハイブリダイゼーション

検出の1つの方法は、特定の捕獲した標的をオリゴ結合ミクロスフェアにハイブリダイズし、複合体をアッセイすることであった。下記に述べるように反応を設定した。捕獲する対立遺伝子を2回のハイブリダイゼーションに供した。最初のラウンドのハイブリダイゼーションは、異なるホモ及びヘテロ接合DNAと特定配列を認識する特異的オリゴ結合ビーズを使用した。2回目のハイブリダイゼーションは、捕獲した対立遺伝子の存在を確認する、標的内の特定配列を認識するもう1組のビーズを使用した。しかし、1回のラウンドのハイブリダイゼーションは、標的内の種々の対立遺伝子に対するオリゴ結合ミクロスフェアの特異性を調べるための対照実験として最初に実施した。

【0051】

H L A - A 遺伝子座の158bpのDNAフラグメントを、U C L A レジストリーから入手した種々のゲノムDNA試料 (U C L A 2 1 0、U C L A 2 3 0 及びU C L A 2 4 3) に関して、センスプライマー5' A 2 0 0 A 及びアンチセンスプライマー3' A 3 2 2 - 1 を用いて増幅した。158bpフラグメントはこの実施例のために標準的な増幅法を用いて生成した。この実施例においてホモ及びヘテロ接合DNAを増幅するために使用したプライマーは次の通りであった：

5' A 2 0 0 A 5' - A C A G C G A C G C C G C G A G C C A - 3'

182 - 200 位、センスプライマー

3' A 3 2 2 - 1 5' - C C T C G C T C T G G T T G T A G T A - 3' 322 - 3

40 位、アンチセンスプライマー

ライゲーション、一塩基伸長又はハイブリダイゼーションにおいて使用するための一本鎖DNA (s s) を非対称PCRによって作製した。非対称PCRのための条件は、センスプライマーをアンチセンスプライマーよりも50倍低い濃度で加えたことを除いて、上記の通りであった。アンチセンスプライマーをビオチニル化して、5' ビオチン標識一本鎖PCRフラグメントを生成した。

【0052】

代替的には、5' - 3' エキソヌクレアーゼであるT7遺伝子6エキソヌクレアーゼを使用してssDNAを作製することができた。この場合には、オリゴヌクレオチド合成の際にPCRプライマーの5'末端に4ホスホチオエート結合を導入することによって対象とする鎖を保護する。T7エキソヌクレアーゼはプライマーの5'末端にホスホチオエート塩基を含まない鎖を分解する。

【0053】

1. B. 一塩基伸長反応 (S B E R)

本実施例の一塩基伸長反応 (S B E R) は、3'末端が多型塩基に隣接してアニーリングするように設計された伸長プライマーを使用した。この実施例の伸長プロトコールは、それぞれサイクリング又は非サイクリング反応に多型塩基を組み込むためにT h e r m o s e q u e n a s e 又はクレノウラージフラグメントポリメラーゼのいずれかを使用した。

【0054】

特定対立遺伝子を捕獲するための試みとして一塩基伸長反応を使用し、プライマー混合物 (P M)、H 0 0 1 及びH 0 0 2 を用いて対立遺伝子特異的PCRを実施した。多型部位に特定塩基を組み込むためにこれらの2つのプライマー混合物を使用した。2つのPMは共通の5'プライマー (a g c g a c g c c g c g a g c c a) を使用したが、対立遺伝子特異的3'プライマーを使用した。ヘテロ接合DNAを使用したときには、それぞれの多型部位にPM H 0 0 1 は「C」 (c c a a g a g c g c a g g t c c t c g) 塩基を特異的に組み込み、PM H 0 0 2 は「A」 (c c a a g a g c g c a g g t c c t c t) に特異的であった。

【0055】

上述したように伸長反応を実施した。伸長反応からの産物を精製し、ストレプトアビジン磁気ビーズに結合した。ビオチンに対するストレプトアビジンの高い結合親和性により、ビオチン標識標的分子を迅速且つ効率的に単離することができた。複合体を数回洗って、

10

20

30

40

50

実験の次の段階に影響を及ぼしうる因子である非結合標識の可能性を排除した。

【0056】

いくつかの異なる試料を、ASPCRによる捕獲対立遺伝子の確認のために試験した。PMH001及びH002を用いたASPCRを5セットにおいて実施した。典型的伸長反応プロトコールの実験対照及び陰性対照は次の通りであった：実験試料は、伸長反応においてピオチニル化A又はCのいずれかを使用した。Sequenaseは特定塩基を正しく組み込み、それ故捕獲された特異的対立遺伝子からの正しいシグナルが使用したプライマー混合物に基づいて検出されると仮定した。2つの陰性対照は、ddNTP A又はCを反応から除外したことを除いて、SEBERにおいて実験試料と同じ成分を含んだ。もう1つの陰性対照は非標識ddNTP A、C、G及びTだけを使用した。下記の反応セ

10

【0057】

サイクリング反応

各々20 µlの反応は、上述したようなゲノムDNAのPCR増幅後に得られたHLA A遺伝子座の一本鎖(ss)DNA100 ngを使用した：伸長プライマー2 µM、非標識ジデオキシターミネーター(ddG、T、A又はC)各々125 nM、及びピオチン標識ddNTP (A又はCのいずれか)500 nM、多型部位に組み込む特定塩基に依存して、10X酵素反応緩衝液(1X最終濃度に希釈する)及びSequenase酵素5単位を反応混合物に加えた。反応を94 で1分間サイクリングし、次いで94 で10秒間及び60 で30秒間の40サイクルを実施した。72 で10分間の最終伸長サイクルと40での保持をこの実施例における伸長プロフィールとして使用した。

20

【0058】

非サイクリング反応

クレノウラージフラグメントポリメラーゼ反応を伸長のために使用したときには、最初の段階は伸長プライマーの一本鎖DNAへのハイブリダイゼーションを必要とした。ssDNA100 ngを伸長プライマー20 µMにアニーリングした。プライマーとDNAを90 で5分間混合し、その後ハイブリッドが形成されるように緩やかに室温まで冷却した。この工程は約1時間を要した。次の段階は、クレノウラージフラグメント5単位と共に、特異的非標識及び標識ピオチンddNTP (1.5 µM)を加えることを含み、37 で30分間インキュベートした。伸長の最後に0.5 M EDTA 1.5 µlを反応混合物に加えた。

30

【0059】

QIAQUICK (登録商標)カラム(Qiagen)を使用して伸長産物(サイクリング又は非サイクリング)を精製し、組み込まれなかったピオチンを除去した。ストレプトアビジン被覆磁気ビーズ10 µl(2X結合緩衝液(10 mM Tris pH 7.5、1 mM EDTA、2.0 mM NaCl)中)を精製した伸長産物20 µlと室温で20分間混合した。ビーズに磁場を適用し、非結合伸長産物を廃棄した。ビーズを同じ結合緩衝液1 mlで少なくとも2回洗い、95 の熱を2分間適用して対象とする鎖をビーズから溶出した。

40

【0060】

次に溶出した鎖を、特異的プライマーを用いた対立遺伝子特異的PCR(ASPCR)に供して、その特異的対立遺伝子の多型を確認した。結果を確認するために適切な対照試験を実施した。

【0061】

1. C. ライゲーション法

この実施例は、一本鎖DNA鋳型にアニーリングする前の、2個のプライマー間でのライゲーション事象の使用を含んだ。この実施例は、完全に対合したときのssDNAと2個のプライマーのライゲーションは強力な二本鎖DNAを形成し、従ってより高い温度(ブ

50

ライマーの T_m 以上)での洗浄に耐えるであろうという理解の下に実施した。ミスマッチ鑄型はプライマーの T_m より高い温度での洗浄に耐えることは困難であり、二本鎖DNAを形成せず、最終的には洗い流されるはずである。

【0062】

そのうち1個のプライマー、すなわち対立遺伝子特異的プライマー又はヘテロ配列プライマーが3'末端に多型部位を持ち、5'末端にビオチン標識を持つ2個のプライマーを、互いに隣接して配置した。第二のプライマーは、ライゲーションを仲介するために5'末端上にリン酸基を持つライゲーションプライマーであった。ssDNA鑄型にハイブリダイズする前に2つのプライマーがライゲートすると仮定したが、本発明はこの仮定に依存しない。20 μ lの反応混合物は、特異的ssDNA 10 μ l (100 ng)、各々のプライマー 1 μ l (1 μ M)、10Xライゲーション緩衝液 2 μ l 及びTaqリガーゼ 10 Uを含んだ。

10

【0063】

混合物をサーモサイ클ラーにおいて90℃で2分間加熱し、次いで37℃で30分間インキュベートして、その時点でEDTAを加えて反応を停止した。QIAQUICK (登録商標)カラムを用いて混合物を精製し、対立遺伝子特異的PCR反応における非特異性の原因となりうる、組み込まれなかったすべてのプライマーとビオチンを排除した。

【0064】

精製した複合体を上述したようにストレプトアビジン被覆磁気ビーズに結合した。複合体を高ストリンジェンシー洗浄条件下で洗った。洗浄のストリンジェンシーを洗浄緩衝液の温度上昇(55 - 95℃)によって制御したので、閾値温度は対立遺伝子特異的DNAフラグメントの分離に達しようとする温度であった。溶出した鑄型を、捕獲した対立遺伝子の多型部位を認識するプライマーを用いた対立遺伝子特異的PCRによってさらに確認した。

20

【0065】

2. ハプロタイピングのためのハイブリダイゼーションアッセイ

HLA A遺伝子座の特定多型に関する種々のオリゴヌクレオチドを、ハイブリダイゼーションアッセイにおいて使用する種々のビーズセット(Luminex)に結合させた。完全な配列相同性を与えるためにオリゴ結合ビーズにハイブリダイズした鑄型を選択した。特定オリゴへのビーズの結合は製造者(Luminex Corp.)の指示に従って実施した。Luminexビーズ-プローブ複合体を上記で作製したPCRフラグメントとハイブリダイズした。対立遺伝子特異的PCRフラグメントの分離のために使用したプローブの配列は次の通りであった：

30

L 5' A 107 A 1 A G G T A T T T C T A C A C C T C C G T G

L 5' A 107 C 1 A G G T A T T T C T C C A C A T C C G T G

ハイブリダイズしなかったPCR鑄型を洗い流し、5' A 107 A又は5' A 107 Cに特異的にハイブリダイズしたPCRフラグメントをLuminexビーズから溶出した。スパーサーを含む及び含まない(すなわちオリゴ配列の中央に付加的な20個のランダム塩基を含む)種々のサイズのオリゴを様々なビーズセットに結合し、種々の対立遺伝子の特異性について検定するために種々の鑄型にハイブリダイズさせた。プライマーの同定における数字はビーズに結合した種々のオリゴヌクレオチドに相関し、特異的対立遺伝子についての多型部位を示唆する。例えば107 A又はCは塩基107の多型部位を意味し、各々の対立遺伝子は107位にA又はCのいずれかを持つ。

40

【0066】

ハイブリダイゼーションについての反応プロトコールは次の通りであった：ssDNA 17 μ lを95℃で5分間変性し、次いで鑄型に相補的な特異的オリゴ結合ビーズ(5000ビーズ/オリゴ)33 μ lを加えて、55℃で30分間インキュベートした。スパーサーを持つオリゴを使用するときには、特異性を確保するためにハイブリダイゼーション温度を65℃に上げた。ビーズ混合物を十分に渦動攪拌し、音波破碎して、必要なハイブリダイゼーション温度まで上げた後、ssDNAを加えた。ハイブリダイゼーション後、混

50

合物を2000×gで遠心分離し、1.5×TMAC(3MTMAC、0.1%SDS、50mMTris-Cl、pH8.0、4mMEDTA pH8.0)各々1mlで2回洗って、上清を廃棄した。

【0067】

H₂O 20μlを複合体に加え、オリゴ結合ビーズに結合した捕獲鋳型を95℃で5分間溶出した。溶出した鋳型1μlを非対称PCRに供して、2回目のラウンドのハイブリダイゼーションのためにより豊富な溶出鋳型を得た。

【0068】

鋳型の正確さを確認するための試験として、捕獲した鋳型に相補的な第二のビーズセットに関して第二ラウンドのハイブリダイゼーションを実施した。各々のチューブにストレプトアビジン-フィコエリトリン(SA-PE)120ngを加えた後、Luminex 100フローサイトメトリー装置で試料を測定し、さらに5分間ハイブリダイゼーション温度でインキュベートした。得られた蛍光シグナルの量はビオチンとSA-PEの相互作用の真正な表示であった。このアッセイは定量的であり、陽性シグナルの量は所与の反応について得られた最も高い数として表わした。

【0069】

2回目のラウンドのハイブリダイゼーションは、次のような他の対立遺伝子特異的Luminexビーズ-プローブを使用した：

対立遺伝子特異的分離を確認するために使用したLuminexビーズ-プローブ

L5'A107A 1AGGTATTTCTACACCTCCGTG

L5'A107C 1AGGTATTTCTCCACATCCGTG

L5'A153A 1CTTTCATCGCAGTGGGCTAC

L5'A153C 1CTTTCATCGCCGTGGGCTAC

L5'A249T 1GCAGGAGGGTCCGGAGTAT

L5'A249G 1GCAGGAGGGGCGGAGTAT

L5'A291C 1GAAGGCCCACTCACAGACT

L5'A291G 1GAAGGCCCACTCACAGACT

【0070】

【表1】

表1. ハイブリダイゼーション後に予測される対立遺伝子特異的反応パターン

| 鋳型 DNAの名称 | Luminex ビーズ-プローブ反応パターン | | | | | | |
|----------------------|------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | HLA-A 対立遺伝子 | L5'A107A | L5'A107C | L5'A249G | L5'A249T | L5'A291C | L5'A291G |
| UCLA 210 (ホモ接合体) | A*0206, - | + | - | - | + | + | - |
| UCLA 230 (ヘテロ接合体) | A*2402101 | - | + | + | - | + | - |
| | A*3401 | + | - | + | - | - | + |
| UCLA 243 (ホモ接合体) | A*2402101, - | - | + | + | - | + | - |

【0071】

【表2】

表 2. ハイブリダイゼーション後に認められた対立遺伝子特異的反応パターン

| 鋳型 DNAの名称 | プローブ | L5'A107A | L5'A107C | L5'A249G | L5'A249T | L5'A291C | L5'A291G |
|----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| UCLA 210 (ホモ接合体) | L5'A107A | (+) 166 | (-) 50 | (-) 124 | (+) 279 | (+) 234 | (-) 21 |
| | L5'A107C | (-) 152 | (-) 60 | (-) 137 | (-) 330 | (-) 223 | (-) 29 |
| UCLA 230 (ヘテロ接合体) | L5'A107A | (+) 63 | (+) 111 | (+) 90 | (-) 56 | (+) 94 | (-) 27 |
| | L5'A107C | (-) 52 | (+) 87 | (+) 70 | (-) 55 | (+) 57 | (-) 13 |
| UCLA 243 (ホモ接合体) | L5'A107A | (-) 13 | (-) 57 | (-) 37 | (-) 23 | (+) 96 | (-) 14 |
| | L5'A107C | (-) 15 | (+) 83 | (+) 60 | (-) 36 | (+) 124 | (-) 13 |
| 陰性対照 | | 7 | 9 | 14 | 19 | 6 | 9 |

10

【 0 0 7 2 】

【 表 3 】

表 3. 陰性対照を用いたハイブリダイゼーション後に認められた対立遺伝子特異的反応パターン

20

| 鋳型 DNAの名称 | プローブなし (対照) | L5'A107A | L5'A107C | L5'A249G | L5'A249T | L5'A291C | L5'A291G |
|----------------------|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| UCLA 210 (ホモ接合体) | | (+) 65 | (-) 29 | (-) 65 | (+) 124 | (+) 97 | (-) 19 |
| UCLA 230 (ヘテロ接合体) | | (+) 63 | (+) 111 | (+) 90 | (-) 56 | (+) 30 | (-) 68 |
| UCLA 243 (ホモ接合体) | | (-) 12 | (-) 216 | (-) 100 | (-) 23 | (+) 213 | (-) 10 |
| 陰性対照 | | 7 | 9 | 14 | 19 | 6 | 9 |

30

【 0 0 7 3 】

上記の表の結果は、対立遺伝子特異的な数が非対立遺伝子特異的反応よりも高いことから、対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションの成功を明らかにしている。

【 0 0 7 4 】

当業者には理解されるように、あらゆる目的のために、特に文書での説明を提供することに関して、ここで開示するすべてのレンジはあらゆる可能なサブレンジ及びそれらのサブレンジの組合せも包含する。リストしたレンジは、同じレンジが少なくとも等しい2分の1、3分の1、4分の1、5分の1、10分の1、等々に分類されることを十分に説明し、それを可能にするものとして容易に認識されうる。非制限的な例として、ここで論じる各々のレンジは下3分の1、真中の3分の1及び上3分の1、等々に容易に分類できる。同様に当業者には理解されるように、「まで」、「少なくとも」、「以上」、「未満」等のようなすべての言語は、その後上記で述べたようなサブレンジに分類することができるレンジを指す。

40

【 0 0 7 5 】

本発明のいくつかの好ましい実施形態だけを説明したが、当業者は、本発明の中心的精神と範囲から逸脱することなく実施形態を修正し、変更しうることを認識するであろう。それ故、上記で述べた好ましい実施形態は、すべての点において例示であり、非制限的とみなされるべきであり、本発明の範囲は上記の説明によってではなく添付の特許請求の範囲

50

によって指示され、特許請求の範囲の等価物の意味と範囲内に含まれるすべての変更を包含することが意図されている。

下記の参考文献は、その全体が参照して本特許出願に組み込まれる：

【 0 0 7 6 】

【 表 4 】

参考文献

Jorde, L.B.: Am. J. Hum. Genet. **56**, pp. 11-14, 1995;

Thomson, G.: Am. J. Hum. Genet. **57**, pp. 474-486, 1995;

10

Ruano, G., Kidd, K.K. and Stephens, J.C.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, pp. 6296-6300, 1990;

Ruano, G. and Kidd, K.K.: Nucleic Acids Res. **19**, pp. 6877-6882, 1991;

Beloin, S.M., Tishkoff, S.A., Bentley, K.L., Kidd, K.K. and Ruano, G.: Nucleic Acids Res. **24**, pp. 4841-4843, 1996;

20

Gilles, P.N., Wu, D.J., Foster, C.B., Dillon, P.J. and Chanock, S.J.: *Single nucleotide polymorphic discrimination by an electronic dot blot assay on semiconductor microchips.* Nature Biotechnol. **17**, pp. 365-370, 1999;

Little, D.P., Braun, A., O'Donnell, M.J. and Koster, H.: *Mass spectrometry from miniaturized arrays for full comparative DNA analysis.* Nature Med. **3**, pp. 357-362, 1997;

30

Marshall, R.D., Koonts, J. and Sklar, J.: *Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvases.* Nature Genet. **9**, pp. 177-183, 1995;

Nauck, M.S., Gierens, H., Nauck, M.A., Marz, W. and Wieland, H.: *Rapid genotyping of human platelet antigen 1 (HPA-1) with fluorophore-labelled hybridization probes on the Lightcycler.* Brit. J. Haematol. **105**, pp. 803-810, 1999;

40

Pease, A.C., Solas, D., Sullivan, E.J., Cronin, M.T., Holmes, C.P. and Fodor, S.P.A.: *Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994;

Southern, E.M.: *DNA chips: Analysis sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale*. Trends Genet. 12, pp. 110-115, 1996;

Syvanen, A.C., Aalto-Setälä, K., Harju, L., Kontula, K. and Soderlund, H.: *A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E*. Genomics 8, pp. 684-692, 1990;

Tyagi, S. and Kramer, F.R.: *Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization*. Nature Biotechnol. 14, pp. 303-308, 1996.

10

【図面の簡単な説明】

20

【図 1】

本発明に従った対立遺伝子特異的プライマー伸長法を利用した対立遺伝子同定を例示する概要図である。

【図 2】

プライマーサイズタグアプローチによる一塩基伸長を用いて複対立遺伝子を同定する方法を例示した概要図である。

【図 2 A】

プライマーサイズタグアプローチによる一塩基伸長を用いて複対立遺伝子を同定する方法を例示した概要図である。

【図 3】

本発明に従った対立遺伝子特異的ライゲーションとプライマーサイズタグを利用した対立遺伝子同定を例示する概要図である。

30

【図 4】

本発明に従ったハイブリダイゼーションとプライマーサイズタグを利用した対立遺伝子同定を例示する概要図である。

【図 5】

本発明に従ったホモプライマーとヘテロプライマーのセットを用いて複対立遺伝子を同定する方法を例示した概要図である。

【図 6 A】

本発明に従った複数のプライマーを含む蛍光ビーズを用いて複対立遺伝子を同定する方法を例示する。

40

【図 6 B】

本発明に従った複数のプライマーを含む蛍光ビーズを用いて複対立遺伝子を同定する方法を例示する。

【図 6 C】

本発明に従った複数のプライマーを含む蛍光ビーズを用いて複対立遺伝子を同定する方法を例示する。

【図 6 D】

本発明に従った複数のプライマーを含む蛍光ビーズを用いて複対立遺伝子を同定する方法を例示する。

50

【図 6 A】

**A**

FIG. 6A

【図 6 B】

**B**

FIG. 6B

【図 6 C】

**C**

FIG. 6C

【図 6 D】

**D**

FIG. 6D

【図 6 E】

**E**

FIG. 6E

【図 6 F】

**F**

FIG. 6F

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 March 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/18659 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/US01/41956
- (22) International Filing Date: 30 August 2001 (30.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/228,994 30 August 2000 (30.08.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): HAPLOGEN, LLC [US/US]; 9099 North Deerbrook Trail, Brown Deer, WI 53223 (US).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): LIU, Xiangjun [CN/US]; N64 W 13828 Cobblestone Drive, Menomonee Falls, WI 53051 (US).
- (74) Agent: KASSEL, Mark; Foley & Lardner, 150 East Gilman Street, P.O. Box 1497, Madison, WI 53701-1497 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, 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, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, 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, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/18659 A2

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING ALLELES

(57) Abstract: The present invention provides methods and kits for separating and identifying alleles, and thereby the haplotype, in genomic DNA samples. The method generally involves hybridizing primers specific to polymorphic sites within the alleles to the DNA sample, elongating the primers by one or more nucleic acids, separating the elongated primers and identifying the alleles utilizing the elongated primer. The method also allows for a ligation of two primers, their separation and subsequent use in identifying the targeted allele. The method further provides that another primer can be used as a blocking site for elongation of the first primer such that a stretch of DNA that includes a polymorphic site is replicated and identified. The unextended or extended primers can be labeled so that the primer can be easily separated and/or identified.

WO 02/18659

PCT/US01/41956

METHOD FOR DETERMINING ALLELES

TECHNICAL FIELD

The present invention relates to methods for separating and
5 determining the identity of an allele by identifying one or more heterosequence sites
in a gene. More particularly, the present invention relates to methods which utilize
one or more primers for separating and determining the identity of an allele.

BACKGROUND

The most frequent form of sequence variations among individuals are
10 single nucleotide polymorphisms, popularly known as SNPs. With the completion
of the Human Genome Project, SNPs are estimated to occur on an average of 1 out
of every 1000 nucleotides but can occur more frequently in certain DNA regions.
Efforts are now being focused on the use of SNPs to identify target genes associated
with disease or drug response. However, due to weak correlations, many scientists
15 and researchers challenge the idea of personalizing drugs and diseases based on an
individual SNP, and so the importance of Haplotype analysis emerges as a critical
tool to the medical utility of SNPs.

A haplotype is commonly known as the manner in which individual
SNPs are organized along a given stretch of DNA. The classical definition of a
20 haplotype is a combination of alleles of closely linked loci that are found in a single
chromosome and tend to be inherited together from one generation to the next in a
given population. Another aspect of molecular haplotyping is linkage disequilibrium
mapping which is now recognized as an important tool in the positional cloning of

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-2-

disease genes, and numerous applications will become apparent as complex phenotypes are dissected genetically.

Since 1989 scientists have investigated various methodologies for molecular haplotyping using either single molecule dilution (SMD) of genomic DNA to separate alleles physically or allele discrimination by allele-specific primers to amplify selectively hemizygous DNA segments from a heterozygous template. However, these methods were developed for short segments only (approx. 500bp), but more recently molecular haplotyping has been applied on long range PCR for markers 10-20 times farther apart and used the CD4 locus as a prototype system for the development of this assay. Other methods have been attempted to determine the haplotype of DNA sequences, however these methods have been largely unsuccessful, unreliable or expensive. Thus there remains a need for economic molecular haplotyping that is amenable to high throughput volumes that is reliable.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is drawn to methodologies for determining alleles by identifying one or more heterosequence sites in a gene. The methodologies can be used to determine the haplotype of a specific gene, and has application in a number of areas, including human leukocyte antigen (HLA) typing. The present invention is also drawn to kits for such typing.

The present invention includes a method of separating allele specific nucleic acid molecules. One or more heterosequence site specific nucleic acid primers are added to single stranded nucleic acid molecules containing one or more heterosequence sites and allowed to hybridize. In one embodiment, the 3' end of each primer corresponds to a polymorphic site of the targeted heterosequence site. In such embodiment, the 3' end may be subjected to single base extension, ligation to a second primer having a 5' end adjacent to the 3' end of the heterosequence site specific primer or may be elongated for a number of bases. The elongated or

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-3-

ligated heterosequence site specific hybridized primer and nucleic acid molecules are then separated, and optionally recovered for further genotyping. In an alternative embodiment, each primer contains one or more polymorphic bases located within the primer such that primers which hybridize with less than 100% complementary bases can be selectively removed, and those primers which have hybridized with 100% complementary bases be unaffected.

The invention also relates to a method for identifying multiple alleles in a nucleic acid molecule containing such alleles. A single stranded nucleic acid molecule containing multiple heterosequence sites is selected. To this nucleic acid molecule two primers are added, a hetero primer and a homo primer. The hetero primer is capable of hybridizing to a 3' heterosequence site that is located 3' of a 5' heterosequence site on the same nucleic acid molecule. The 3' base of the hetero primer corresponds to a polymorphic base of the heterosequence site, such that elongation will only occur when the 3' end of the hetero primer is hybridized to the single stranded nucleic acid. The homo primer is capable of hybridization to the same nucleic acid molecule at a position located 5' of the 5' heterosequence site. The primers are hybridized to the nucleic acid molecule, and the hetero primer is elongated such the 5' heterosequence site of the nucleic acid molecule located between the primers is replicated, that is the homo primer acts to stop elongation of the elongated hetero primer when it reaches the homo primer. The nucleic acid molecule and elongated hetero primer are denatured, and the hetero primer separated and analyzed to determine the 5' heterosequence site. This information is used to identify a new set of nucleic acid primers containing another hetero primer and another homo primer, the hetero primer of the new set capable of hybridizing to the 5' heterosequence site (with the 3' base of the hetero primer corresponding to a polymorphic base), the 5' heterosequence site located 3' to a further heterosequence site on the same nucleic acid molecule, and the homo primer of the new set capable of hybridization to the same nucleic acid molecule at a position located 5' of the further heterosequence site. The previous steps are repeated, with each new set of primers used in the subsequent round of hybridization/elongation

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-4-

until sufficient heterosequence sites on the nucleic acid molecule have been identified to identify the allele. The haplotype of the nucleic acid molecule may be determined in this manner.

5 The present invention also relates to a method for identifying multiple alleles in a nucleic acid molecule that comprises adding a nucleic acid sample containing multiple alleles to a set of beads, each bead having two distinct primers attached, at least one primer on each bead being a primer to a unique allele, under conditions such that at least the one primer to a unique allele hybridizes to a portion of the nucleic acid sample. The hybridized primer is amplified to extend the
10 hybridized primer to produce an extended primer nucleic acid. The hybridized nucleic acid sample and primer are then denatured, and the nucleic acid sample removed from the beads. The extended primer is then hybridized to the second primer on the bead and the second primer is amplified. The beads containing the dual amplified primers are then analyzed to determine the alleles present in the
15 nucleic acid sample.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 is a diagram which illustrates allele identification utilizing an allele specific primer extension methodology according to the present invention.

20 FIG. 2 is a diagram which illustrates a method of identifying multiple alleles using a single base extension with a primer size tag approach.

FIG. 2A is a diagram which illustrates a method of identifying multiple alleles using a single base extension with a primer size tag approach.

FIG. 3 is a diagram which illustrates allele identification utilizing allele specific ligation and primer size tags according to the present invention.

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-5-

FIG. 4 is a diagram which illustrates allele identification utilizing hybridization and primer size tags according to the present invention.

FIG. 5 is a diagram which illustrates a method of identifying multiple alleles using sets of homo primers and hetero primers according to the present
5 invention.

FIGS. 6A – 6F illustrate a method of identifying multiple alleles using fluorescent beads comprising multiple primers according to the present invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

10 The present invention is directed to a method for determining the identity of alleles, based on United States Provisional Patent Application No. 60/228,994, the entire content of which is hereby incorporated by reference.

The following terms are used throughout the application, and are defined as follows:

15 **Allele:** A variant form of a given gene. Such variants include single nucleotide polymorphisms, insertions, inversions, translocations and deletions.

Avidin: A family of proteins functionally defined by their ability to bind biotin with high affinity and specificity. Avidins are fairly small oligomeric proteins, made up of four identical subunits, each bearing a single binding site for
20 biotin. Avidins can therefore bind up to four moles of biotin per mole of avidin. Avidins include proteins (a) produced by amphibians, reptiles and avians, which is present in their eggs and known as avidin, and (b) produced by a streptomyces, *Streptomyces avidinii*, and known as streptavidin. As used herein "avidin" includes all of the above proteins.

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-6-

Biotin: As used herein, "biotin" includes biotin, commercial biotin products in which the biotin has been modified by the addition of alkyl groups, and biotin derivatives such as active esters, amines, hydrazides and thiol groups with the complimentary reactive groups on polymers being amines, acyl and alkyl leaving
5 groups, carbonyl groups and alkyl halides or Michael-type acceptors.

Detection Molecule: A molecule covalently attached to a nucleic acid that allows for detection and/or removal of the nucleic acid, typically by an external source. Such molecules may comprise dyes, variable weight molecules including poly A and poly T tails, linkers which may be connected to beads
10 including magnetic beads, biotin, avidin, digoxigenin, digoxigenin antibodies and other similar materials well known in the art.

Genotype: The particular alleles carried at a genetic locus.

Haplotype: Denotes the collective genotype of a number of closely linked loci and is the complete sequence of alleles along the same chromosome.

Hetero primer: A primer which will hybridize under stringent
15 conditions to one unique allele.

Heterosequence site: Two alleles that have different sequences at a defined sequence site are said to have a heterosequence site.

Homo primer: A primer that will hybridize to both parental alleles.

Parental Alleles: Alleles from mammalian diploid cells which
20 contain one set of chromosomes from the maternal side and one set of chromosomes from the paternal side.

Primer: An oligonucleotide which can be hybridized to a DNA template.

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-7-

All patents and references cited herein are hereby incorporated by reference.

The methods of the present invention have several important advantages. The methods of the present invention allow for quick, inexpensive, accurate determination of alleles, including complete genotype and haplotype determinations. The methods will allow for analysis of nucleic acid fragments having lengths that prevent complete amplification by standard amplification means known in the art, such as the polymerase chain reaction

The present invention is directed to methods of separating and identifying allele specific nucleic acid molecules. Any nucleic acid molecules may be used, with deoxyribonucleic acids being preferred. The allele specific nucleic acid molecules that may be identified and separated include alleles of polyallelic genes, segments of genes and non-expressed fragments.

The methods and kits of the present invention may be used with all diploid genetic material which has two or more heterosequence sites, thus having multiple types of alleles. Examples of genes with multiple alleles to which the invention may be applied are the mammalian MHC genes such as human leukocyte antigen (HLA) class I and class II genes, the T cell receptor genes in mammals, TAP, LMP, ras, non-classical HLA class I genes, the genes for human complement factors C4 and C2, Bf in the human HLA complex, and genes located in mitochondrial DNA, bacterial chromosomes and viral DNA.

In one method of the present invention, a nucleic acid sample containing multiple alleles is obtained, each allele having a unique set of heterosequence sites. The nucleic acid sample is amplified by any means well known in the art, in one embodiment by the polymerase chain reaction (PCR), as described in Mullis, U.S. Patent No. 4,683,202, issued, July 28, 1988. The amplified nucleic acid sample is then denatured into single stranded nucleic acid. This single stranded nucleic acid may then be analyzed to determine the alleles

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-8-

present by determining the heterosequence sites present by a number of approaches according to the present invention.

The methods according to the present invention utilize one or more primers. Primers according to the invention comprise a sequence of nucleotides that will hybridize with the sequence of interest. In some cases, it is required that the primers hybridize under conditions so that the primer will be capable of being elongated during amplification. In other cases, it is required that primers that are a 100% complementary match when hybridized have a higher T_m than primers that hybridize with less than a 100% complementary match. In general, the primers of the present invention can be any useful length, but will generally contain from about 12 to 25 nucleotides or at least 18 nucleotides, with a preferred length of about 18 to 22 nucleotides. In the methods of the present invention, it is necessary to identify one or more primer sequences unique for the target DNA within the sample so as to identify the polymorphic sites of interest. Such polymorphic identification of many multiple allele genes are known in the art. For example, there are about 222 known alleles of the HLA-A, HLA-B and HLA-C genes and the sequences of such alleles are well known in the art. See Arnett and Parham, *Tissue Antigens* 45: pp. 217-257, 1995, and Baxter-Lowe *et al.*, U.S. Patent No. 5,702,885, issued Dec. 30, 1997.

The expression "hybridize under highly stringent conditions" to describe the hybridization of nucleic acid molecules encompassed within the scope of this invention refers to hybridizing under conditions of low ionic strength and high temperature for washing. The expression "hybridize under low stringency" refers to hybridization conditions having high ionic strength and lower temperature.

Variables affecting stringency include, for example, temperature, salt concentration, probe/sample homology and wash conditions. Stringency is increased with a rise in hybridization temperature, all else being equal. Increased stringency provides reduced non-specific hybridization. i.e., less background noise.

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-9-

"High stringency conditions" and "moderate stringency conditions" for nucleic acid hybridizations are explained in *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, 1998, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, NY, the teachings of which are hereby incorporated by reference. Of course, the artisan will

5 appreciate that the stringency of the hybridization conditions can be varied as desired, in order to include or exclude varying degrees of complementation between probe and analyte, in order to achieve the required scope of detection.

Various detection molecules may be used in the present invention. These molecules may be coupled to one or more primers, or may be coupled

10 directly to ddNTPs that are incorporated into nucleic acids during elongation steps. These molecules may comprise a means for detecting the molecule, such as dyes, radiolabels, etc., or they may comprise a means for separating the molecules, such as biotin/avidin, magnetic and/or fluorescent beads, etc., or both. For example

15 when biotin/avidin are used, one or more of the primers may be labeled with biotin, so that when the primers are hybridized to single stranded nucleic acids, the resultant double stranded DNA is produced in which one strand carries a biotin label. The double stranded DNA may then be bound to a solid support coated with avidin.

The solid support used in the invention may be any such support well

20 known in the art such as a bead, an affinity chromatography column. A preferred support is in the form of a magnetic bead. When the support is in the form of a bead, the two strands of the amplified nucleic acid are separated by attracting the beads to a magnet and washing the beads under conditions such that the double stranded nucleic acid dissociates into single strands of nucleic acid. The dissociation

25 is typically performed by incubating the beads in several repetitions under alkaline conditions, typically 0.1 M or 0.15 M NaOH, at room temperature for about 5 to 10 minutes. Either strand can then be collected and further analyzed.

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-10-

Various analysis techniques can be used to identify the isolated heterosequence sites to determine the alleles. These techniques are well known in the art and include, but are not limited to, electrophoresis such as polyacrylamide gel electrophoresis, flow cytometry, high pressure liquid chromatography laser scanning and mass spectroscopy. These techniques can be done manually or by an automated system. Such automated systems are well known in the art and include an automated sequencing machine or capillary electrophoresis machine which are able to scan multiple-color fluorescence.

The first approach of the present is diagrammed in FIGS. 1 and 2 and relies on elongation of hybridized heterosequence site specific primers. This approach is particularly useful to determine allele or haplotype-specific genotype information in a highly polymorphic chromosome region. As shown in FIG. 1, following amplification and denaturing of a DNA sample to produce single stranded DNA fragments, one or more heterosequence site specific primer(s) which is labeled with a detection molecule at the 5' end is added. The heterosequence site specific primer is added to the single stranded nucleic acid molecule and allowed to hybridize. In a preferred embodiment, the 3' end of each primer is complementary to a polymorphic base of a heterosequence site. Therefore, if the primer hybridizes to a heterosequence site wherein the 3' base is not complementary, the primer will not undergo elongation when subjected to conditions for elongation. Preferably an enzyme that is capable of distinguishing single nucleotide differences is utilized. As shown in FIG. 1, the hybridized primers are then subjected to elongation, with only the primers which have hybridized with complementary 3' base matches being elongated. The primers are then removed via the detection molecule, exemplified as biotin in FIG. 1. Magnetic beads coated with avidin are used to remove the primers via the biotin on the primers. The hybridized primer/DNA fragments are then washed under conditions such that the DNA fragments bound to those primers that have not undergone elongation are removed. The elongated double stranded nucleic acids are then denatured. The strands not bound to the bead may then be analyzed to determine the heterosequence site(s).

Alternatively, the primers used in the invention may not be coupled to a detection molecule at their 5' ends. Rather, the primers will be allowed to hybridize as previously described, and those that hybridize with complementary 3' ends will be subjected to single base extension using ddNTPs that are coupled to detection molecules as shown in FIG 2. The detection molecules on the extended primers will be used to separate the primers, and the primers can then be denatured and analyzed to determine the heterosequence site(s) present.

The present invention is also useful for high-throughput single nucleotide polymorphism typing using an automated sequencing machine or capillary electrophoresis machine which are able to scan four-color fluorescence when using the following method. The same method can also be modified to typing other genetic variations other than single nucleotide polymorphisms, including multibase polymorphisms, insertions, inversions, translocations and deletions.

Another approach of the present invention relies on allele specific ligation. This approach is illustrated in FIG. 3. As shown in FIG. 3, heterosequence site specific primers are added to single stranded DNA fragments containing one or more heterosequence sites. The heterosequence specific primers have the 3' end of each primer complementary to a polymorphic base of a heterosequence site and are allowed to hybridize to the DNA fragments. Ligation primers are then added, and allowed to hybridize to the DNA fragments. Each ligation primer has a sequence that is complementary to a portion of one of the DNA fragments, such that the 5' end of the ligation primer is directly adjacent to the 3' end of the heterosequence site specific primer. If the heterosequence site specific primer does not hybridize to the DNA fragment, the ligation primer will be unable to ligate to the heterosequence site specific primer when subjected to conditions for ligation. The primers are ligated, if possible, and then subjected to temperature conditions sufficient to denature the primers that have not ligated, but insufficient to denature ligated primers that have hybridized to the DNA fragments. Typically, such temperature will be approximately 60°C when 20 mer primers are

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-12-

used. The ligated primers that have hybridized may then be removed by any means known in the art. As shown in FIG. 3, one set of the primers may have a detection molecule attached, illustrated as biotin. The detection molecule may be attached to the heterosequence specific primers or the ligation primers. Moreover, the methodologies as described may be combined, as shown in FIG. 3, and polymorphism at one heterosequence site detected by one method, and the other sites determined by other methodologies described herein. Also as shown in FIG. 3, one or more of the primers may have a variable weight molecule coupled to the 5' end of each primer, such that no two primers have the same molecular weight. Such variable weight molecules can be any appropriate materials that are unreactive in the hybridization/amplification steps, and include poly homonucleic acid tails, such as poly A tails. Such poly A tails generally differ in length from 2 to 4 bases, but may be of any different length that is sufficient to separate such primers with poly A tails on standard separating equipment, such as gel electrophoresis.

Another method of the present invention is illustrated in FIG. 4. According to such methodology, a set of heterosequence specific primers are added to DNA fragments containing multiple heterosequence sites. Each primer has at least one polymorphic base, located within each primer such that following hybridization of the primers to the DNA fragments, those primers that hybridize with base mismatches will have a lower T_m than those primers that hybridize without base mismatches. This difference in T_m is then used to a to remove those primers which have less than 100% complementary hybridization. Such base mismatches typically occur near the center of the primer sequence. After removal of the less than 100% complementary hybridization primer/DNA fragment conjugates, the remaining conjugates are analyzed to determine the specific heterosequence sites to determine the specific allele. This may be done in a variety of ways. As illustrated in FIG. 4, all primers may have a variable weight molecule attached. All primers for each specific heterosequence site may have a specific variable weight molecule attached. Each primer for each individual polymorphism at one or more specific

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-13-

heterosequence site will have a different detection molecule attached. By separating the hybridized primers into individual groups by the detection molecules, and by further determining which variable weight molecules are present in each group of primers, the allele specificity is determined.

- 5 Another method of the present invention allows for the determination of multiple heterosequence sites on long segments of nucleic acid that may be too long to be fully amplified by traditional means such as PCR. As shown in FIG. 5, a single stranded nucleic acid molecule containing multiple heterosequence sites is selected. To this nucleic acid molecule two primers are added, a hetero primer and
- 10 a homo primer. The hetero primer is capable of hybridizing to a 3' heterosequence site that is located 3' of a 5' heterosequence site on the same nucleic acid molecule. The 3' base of the hetero primer corresponds to a polymorphic base of the heterosequence site, such that elongation will only occur when the 3' end of the hetero primer is hybridized to the single stranded nucleic acid. The homo primer is
- 15 capable of hybridization to the same nucleic acid molecule at a position located 5' of the 5' heterosequence site. The primers are hybridized to the nucleic acid molecule, and hetero primer is elongated such that the 5' heterosequence site of the nucleic acid molecule located between the primers is replicated. The nucleic acid molecule and elongated hetero primer are denatured, and the hetero primer separated and
- 20 analyzed to determine the 5' heterosequence site. This information is used to identify a new set of nucleic acid primers containing a hetero primer and a homo primer, the hetero primer of the new set capable of hybridizing to the 5' heterosequence site (with the 3' base of the hetero primer corresponding to a polymorphic base), the 5' heterosequence site located 3' to a further
- 25 heterosequence site on the same nucleic acid molecule, and the homo primer of the new set capable of hybridization to the same nucleic acid molecule at a position located 5' of the further heterosequence site. The previous steps are repeated, with each new set of primers used in for the subsequent round of hybridization/elongation until sufficient heterosequence sites on the nucleic acid molecule have been

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-14-

identified to identify the allele. The haplotype of the nucleic acid molecule may be determined in this manner.

As shown in FIGS. 6A-6F, the present invention also relates to a method for identifying multiple alleles in a nucleic acid molecule. As shown in 6A, the method comprises adding a nucleic acid sample containing multiple alleles to a set of beads, each bead having two distinct primers attached, at least one primer on each bead being a primer to a unique allele. The nucleic acid is then reacted under conditions such that the at least one primer to a unique allele hybridizes to a portion of the nucleic acid sample as shown in 6B. The hybridized primer is amplified to extend the hybridized primer to produce an extended primer nucleic acid as in 6C. Moving to 6D, the hybridized nucleic acid sample and primer are then denatured, and the nucleic acid sample removed from the beads. The extended primer is then hybridized to the second primer on the bead (6E) and the second primer is amplified (6F). The beads containing the dual amplified primers are then analyzed to determine the alleles present in the nucleic acid sample. For easy removal of the primers from the beads the primers can have a cleavage site.

The present invention also embodies kits for carrying out the methods described herein. In their most basic embodiment the kits of the present invention comprise instructions for carrying out the methods discussed above. Additionally, the kits can contain at least one or more of the required reagents utilized in the present methods, such as one or more sets of locus specific amplification primers, polymerase chain reaction buffer, dideoxynucleotides, wherein one or more is optionally labeled, reagents for nucleic acid amplification, reagents for generation of single stranded nucleic acid fragments, one or more heterosequence site specific primers, optionally conjugated to at least one detection molecule, one or more ligation primers, reagents for ligation of adjacent hybridized primers, beads containing one or more detection molecules, and one or more sterile microtubes.

This invention will be better understood from the Examples which follow. However, one skilled in the art will readily appreciate that the specific methods and results discussed are merely illustrative of the invention and no limitation of the invention is implied.

5

EXAMPLES

The present examples involved the use of three strategies to verify the capture of different alleles pertaining to a specific polymorphism in the HLA Gene: i) Hybridization; ii) Single Base Extension; and iii) Ligation

Each of these conditions were used as a test to develop an assay that would be helpful in identifying the appropriate allele and hence the specific polymorphism pertaining to that allele. The last two methods were enzyme based assays and required the use of a Taq Ligase, and a Thermus Sequenase that exploits the ability of these enzymes to distinguish single nucleotide differences at specific positions on a single stranded DNA. These methods have been noted to be sensitive enough to distinguish single nucleotide polymorphisms or mutations within specific alleles under investigation.

1.A. Hybridization

One method of detection was hybridization of a specific captured target to oligo coupled microspheres and assaying the complex. The reactions were set up as described below. Any allele to be captured was subject to 2 rounds of Hybridization. The first round of Hybridization used different homo and heterozygous DNA and specific oligo coupled bead that recognized a particular sequence. The second round of Hybridization used another set of beads that recognized a specific sequence within that target which confirmed the presence of the captured allele. However, a single round of hybridization was initially done as a

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-16-

control experiment to test the specificity of the oligo coupled microspheres to different alleles within a target.

5 A 158 bp DNA fragment of HLA-A locus was amplified using sense primer 5' A200A and antisense primer 3' A322-1 with various genomic DNA samples obtained from UCLA registries (UCLA 210, UCLA 230 and UCLA 243). The 158 bp fragment was produced for this example using standard amplification methods. Primers used to amplify both Homo and Heterozygous DNAs in this example were:

| | |
|-----------|--|
| 5' A200A | 5' -ACA GCG ACG CCG CGA GCC A- 3' position 182 - 200, sense primer |
| 3' A322-1 | 5' -CCTCGCTCTGGTTGTAGTA- 3' position 322 - 340, antisense primer |

10 Single stranded DNA (ss) for use in ligation, single base extension or hybridization was generated by Asymmetric PCR. The conditions for the asymmetric PCR were as above, except the sense primer was added at 50 times lower concentration than the antisense primer. The antisense primer was biotinylated to generate a 5' biotin-labeled single stranded PCR fragment.

15 Alternatively, the use of a 5'-3' exonuclease, T7 gene 6 exonuclease, could be used to produce ssDNA. In this case, the strand of interest is protected through the introduction of 4 phosphothioate bonds at the 5' end of the PCR primer during oligonucleotide synthesis. T7 exonuclease degrades the strand that does not contain the phosphothioate bases at the 5' end of the primer.

1.B. Single Base Extension Reaction (SBER)

20 The Single Base Extension Reaction (SBER) of the present example utilized an extension primer which was designed so that the 3' end annealed adjacent to the polymorphic base. The extension protocol of this example used either Thermosequenase, or the Klenow large Fragment polymerase to incorporate the polymorphic base in a cycling or a non-cycling reaction, respectively.

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-17-

Using the single base extension reaction in an attempt to capture a specific allele; Allele Specific PCR was performed using Primer Mixes (PM), H001 and H002. These two primer mixes were used for the incorporation of specific bases at the site of the polymorphism. Both PM used a common 5'

5 primer(aggagcgcgcgagcca), but used an allele specific 3' primer. PM H001 specifically incorporated the "C" (ccaagagcgcaggtcctcg) base whereas PM H002 was specific for "A" (ccaagagcgcaggtcctct) at the respective sites of polymorphism, when a heterozygous DNA was used.

10 The extension reaction was done as described above. The product from the extension reaction was purified and bound to streptavidin magnetic beads. The high binding affinity of streptavidin for biotin allowed for the rapid and efficient isolation of biotin-labeled target molecules. The complex was washed a number of times to eliminate the possibility of any unbound label that could be a factor which might influence the next step of experimentation.

15 A number of different samples were tested for verification of the captured allele by ASPCR. ASPCR using PMH001 and H002 were done in sets of 5. Experimental and negative controls of a typical extension reaction protocol were as follows: The experimental sample used either biotinylated A or C in the extension reaction. It was assumed that Sequenase would correctly incorporate the
20 specific base and hence a correct signal from the specific allele caught, would be detected based on the primer mix used. The two negative controls had the same components in the SBER as the experimental samples except the ddNTPs A or C was eliminated from the reaction. Another negative control used only unlabeled ddNTPs A, C, G and T. The supernatants of the following sets of reactions were
25 verified by ASPCR using primer mixes H001, and H002. The supernatants tested were in sets of 5 and were as follows: After extension, after binding of the extension product to the magnetic beads, after a number of washes, and after the product was eluted from the magnetic beads at high temperature.

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-18-

Cycling Reaction

Each 20 μ l reaction used 100 ng of a single stranded (ss) DNA of the HLA A locus which was obtained after PCR amplification of Genomic DNA as described above; 2 μ M of an extension primer, 125 nM each of the unlabeled dideoxy terminators (ddG, T, A or C), and 500 nM of a biotin-labeled ddNTP (either A or C), depending on the specific base to be incorporated at the site of the polymorphism, 10X Enzyme reaction buffer (diluted to 1X final concentration) and 5 units of the Sequenase enzyme were added to the reaction mixture. The reaction was cycled at 94°C for 1 min, followed by 40 cycles of 94°C for 10 sec; and 60°C for 30 sec. A final extension cycle at 72°C for 10 min with a hold at 4°C was used as the extension profile in this example.

Non-Cycling Reaction

When the Klenow Large fragment polymerase reaction was used for extension, the first step required hybridization of the extension primer to the single stranded DNA. 100 ng of ssDNA was annealed to 20 μ M of an extension primer. The primer and DNA were mixed together at 90°C for 5 min and then cooled to room temperature slowly, so that a hybrid formed. This process took about 1 hour. The next step involved the addition of specific unlabeled and labeled biotin ddNTPs (1.5 μ M), with 5U of the Klenow Large Fragment, and incubated at 37°C for 30 min. 1.5 μ l of 0.5 M EDTA was added to the reaction mixture at the end of extension.

The extension product (cycling or non-cycling), was purified using a QIAQUICK® column (Qiagen), to remove the unincorporated biotin. 10 μ l of Streptavidin coated Magnetic beads (in a 2X binding buffer 10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 2.0 mM NaCl) was mixed for 20 min at room temp with 20 μ l of the purified extension product. A magnetic field was applied to the beads and the unbound extension product was discarded. The beads were washed at least twice

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-19-

with 1 ml of the same binding buffer, and the strand of interest was eluted from the beads by applying heat at 95°C for 2 min.

The eluted strand was then subjected to Allelic specific PCR (ASPCR) using specific primers to confirm the polymorphism of that specific allele.

5 Appropriate controls were implemented to confirm the result.

1.C. Ligation Method

This example involved the use of a ligation event between two primers before annealing to a single stranded DNA template. This example was performed with the understanding that ligation of the two primers with the ssDNA
10 when perfectly matched would form a strong duplex and thus sustain a higher temperature washing (greater than the T_m of the primers). The mismatched template would find it difficult to withstand washing at temperatures higher than the T_m of the primers and would free itself from the duplex and ultimately wash off.

Two primers were placed adjacent to each other in which one primer,
15 an allele specific or heterosequence primer, had a polymorphic site at the 3' end and a biotin label at the 5' end. The second primer was a ligation primer that had a phosphate group on the 5' end to mediate ligation. It was assumed that both primers would ligate together before hybridizing to the ssDNA template although the present method does not depend on this assumption. The 20 µl reaction mixture contained
20 10 µl (100 ng) of a specific ssDNA, 1 µl of each of the primers (1 µM), 2 µl of a 10X Ligation Buffer and 10U of Taq Ligase.

The mixture was heated in a thermocycler at 90°C for 2 min, followed by a 30 min incubation at 37°C at which time the reaction was stopped by the addition of EDTA. The mixture was purified using a QIAQUICK® column to
25 eliminate all unincorporated primer and biotin that can account for the non-specificity in an allele specific PCR reaction.

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-20-

The purified complex was bound to streptavidin coated magnetic beads as described above. The complex was washed under high stringency washing conditions. Stringency of the wash was controlled by elevated temperatures of the wash buffer (55-95°C), so a threshold temperature was reached for the separation of the allele-specific DNA fragment. The eluted template was further verified by Allele specific PCR using primers that recognized the site of polymorphism of the captured allele.

2. Hybridization Assay for Haplotyping

Different oligonucleotides for specific polymorphisms of the HLA A Locus were coupled to different bead sets (Luminex) to be used in the hybridization assay. The template that hybridized to the oligo coupled beads was selected to provide perfect sequence homology. Coupling beads to specific oligos was performed according to the manufacturer's instructions (Luminex Corp.). The Luminex bead-probe conjugate were hybridized with PCR fragments produced above. The sequence of the probes used for separation of allele specific PCR fragments was:

| | |
|----------|-----------------------|
| L5'A107A | 1AGGTATTCTACACCTCCGTG |
| L5'A107C | 1AGGTATTCTCCACATCCGTG |

The non-hybridized PCR templates were washed away and the PCR fragment specific hybridized to 5'A107A or 5'A107C were eluted from the Luminex beads. Oligos of different sizes, with and without a spacer (i.e. which contained an additional 20 random bases in the middle of an oligo sequence), were coupled to various bead sets and hybridized to different templates to assay for specificity of different alleles. The numbers in the primer identification correlate to different oligonucleotides coupled to beads and indicate the site of the polymorphism for a specific allele. For example, 107 A or C signifies the site of polymorphism at base 107 where each allele either has an A or a C at position 107.

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-21-

The reaction protocol for hybridization was as follows: 17 μ l of ssDNA was denatured at 95°C for 5 min, followed by the addition of 33 μ l of a specific oligo coupled bead (5000 beads/oligo), complementary to the template and incubated at 55°C for 30 min. When the oligo with the spacer was used the hybridization temperature was increased to 65°C to ensure specificity. The bead mixture was thoroughly vortexed and sonicated and brought up to the required hybridization temperature, before addition of the ssDNA. Following hybridization the mixture was centrifuged at 2000 x g; washed twice with 1 ml each of 1.5X TMAC (3M TMAC, 0.1% SDS, 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 4 mM EDTA pH 8.0) and the supernatant was discarded.

20 μ l of H₂O was added to the complex and the captured template which was bound to the oligo coupled bead was eluted at 95°C for 5 min. 1 μ l of the eluted template was subjected to asymmetric PCR to obtain a greater abundance of the eluted template for a second round of hybridization.

15 A second round of Hybridization was performed with a second bead set that was complementary to the captured template as a test to confirm the accuracy of the template. The samples were measured on a Luminex 100 flow cytometry instrument after the addition of 120 ng of Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) to each tube and incubated at the hybridization temperature for another 5 minutes. The amount of fluorescent signal obtained was a true representation of the interaction of the biotin with the SA-PE. This assay was a quantitative one and the amount of positive signal was expressed as the highest number obtained for a given reaction.

25 The second round of hybridization used other allele-specific Luminex bead-probes as follows:

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-22-

Luminex bead-probes used to confirm allele specific separation

L5'A107A 1AGGTATTCTACACCTCCGTG
 L5'A107C 1AGGTATTCTCCACATCCGTG

 L5'A153A 1CTTCATCGCAGTGGGCTAC
 L5'A153C 1CTTCATCGCGTGGGCTAC

 L5'A249T 1GCAGGAGGGTCCGGAGTAT
 L5'A249G 1GCAGGAGGGGCCGGAGTAT

 L5'A291C 1GAAGGCCCACTACAGACT
 L5'A291G 1GAAGGCCCA~~G~~TCACAGACT

Table 1. Expected allele-specific reaction pattern after hybridization

| Template DNA Name | Luminex bead-probe reaction pattern | | | | | | |
|-------------------------|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | HLA-A Allele | L5'A107A | L5'A107C | L5'A249G | L5'A249T | L5'A291C | L5'A291G |
| UCLA 210 (homozygote) | A*0206, - | + | - | - | + | + | - |
| UCLA 230 (heterozygote) | A*2402101 | - | + | + | - | + | - |
| | A*3401 | + | - | + | - | - | + |
| UCLA 243 (homozygotes) | A*2402101, - | - | + | + | - | + | - |

Table 2. Observed allele-specific reaction pattern hybridization.

| Template DNA Name | Probe | L5'A107A | L5'A107C | L5'A249G | L5'A249T | L5'A291C | L5'A291G |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| UCLA 210 (homozygote) | L5'A107A | (+) 166 | (-) 50 | (-) 124 | (+) 279 | (+) 234 | (-) 21 |
| | L5'A107C | (-) 152 | (-) 60 | (-) 137 | (-) 330 | (-) 223 | (-) 29 |
| UCLA 230 (heterozygote) | L5'A107A | (+) 63 | (+) 111 | (+) 90 | (-) 56 | (+) 94 | (-) 27 |
| | L5'A107C | (-) 52 | (+) 87 | (+) 70 | (-) 55 | (+) 57 | (-) 13 |
| UCLA 243 (homozygotes) | L5'A107A | (-) 13 | (-) 57 | (-) 37 | (-) 23 | (+) 96 | (-) 14 |
| | L5'A107C | (-) 15 | (+) 83 | (+) 60 | (-) 36 | (+) 124 | (-) 13 |
| Negative Control | | 7 | 9 | 14 | 19 | 6 | 9 |

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-23-

Table 3. Observed allele-specific reaction pattern after hybridization using negative control.

| Template DNA Name | No Probe (Control) | L5'A107A | L5'A107C | L5'A249G | L5'A249T | L5'A291C | L5'A291G |
|-------------------------|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| UCLA 210 (homozygote) | | (+) 65 | (-) 29 | (-) 65 | (+) 124 | (+) 97 | (-) 19 |
| UCLA 230 (heterozygote) | | (+) 63 | (+) 111 | (+) 90 | (-) 56 | (+) 30 | (-) 68 |
| UCLA 243 (homozygotes) | | (-) 12 | (-) 216 | (-) 100 | (-) 23 | (+) 213 | (-) 10 |
| Negative Control | | 7 | 9 | 14 | 19 | 6 | 9 |

The results in the tables above demonstrate successful allele-specific hybridization as the allele-specific numbers are higher than the non-allelic specific reactions.

As will be understood by one skilled in the art, for any and all purposes, particularly in terms of providing a written description, all ranges disclosed herein also encompass any and all possible subranges and combinations of subranges thereof. Any listed range can be easily recognized as sufficiently describing and enabling the same range being broken down into at least equal halves, thirds, quarters, fifths, tenths, etc. As a non-limiting example, each range discussed herein can be readily broken down into a lower third, middle third and upper third, etc. As will also be understood by one skilled in the art all language such as "up to," "at least," "greater than," "less than," and the like refer to ranges which can be subsequently broken down into subranges as discussed above.

While only a few, preferred embodiments of the invention have been described, those of ordinary skill in the art will recognize that the embodiment may be modified and altered without departing from the central spirit and scope of the invention. Thus, the preferred embodiments described above are to be considered in all respects as illustrative and not restrictive, the scope of the invention being indicated by the following claims, rather than by the foregoing description, and all

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-24-

changes which come within the meaning and range of equivalents of the claims are intended to be embraced.

The following references are hereby incorporated into the patent application in their entirety:

- 5 Jorde, L.B.: Am. J. Hum. Genet. **56**, pp. 11-14, 1995;
- Thomson, G.: Am. J. Hum. Genet. **57**, pp. 474-486, 1995;
- Ruano, G., Kidd, K.K. and Stephens, J.C.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, pp. 6296-6300, 1990;
- 10 Ruano, G. and Kidd, K.K.: Nucleic Acids Res. **19**, pp. 6877-6882, 1991;
- Beloin, S.M., Tishkoff, S.A., Bentley, K.L., Kidd, K.K. and Ruano, G.: Nucleic Acids Res. **24**, pp. 4841-4843, 1996;
- Gilles, P.N., Wu, D.J., Foster, C.B., Dillon, P.J. and Chanock, S.J.: *Single nucleotide polymorphic discrimination by an electronic dot blot assay on*
- 15 *semiconductor microchips.* Nature Biotechnol. **17**, pp. 365-370, 1999;
- Little, D.P., Braun, A., O'Donnell, M.J. and Koster, H.: *Mass spectrometry from miniaturized arrays for full comparative DNA analysis.* Nature Med. **3**, pp. 357-362, 1997;
- 20 Marshal, R.D., Koonts, J. and Sklar, J.: *Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvases.* Nature Genet. **9**, pp. 177-183, 1995;
- Nauck, M.S., Gierens, H., Nauck, M.A., Marz, W. and Wieland, H.: *Rapid genotyping of human platelet antigen 1 (HPA-1) with fluorophore-labelled hybridization probes on the Lightcycler.* Brit. J. Haematol.
- 25 **105**, pp. 803-810, 1999;

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-25-

Pease, A.C., Solas, D., Sullivan, E.J., Cronin, M.T., Holmes, C.P. and Fodor, S.P.A.: *Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994;

Southern, E.M.: *DNA chips: Analysis sequence by hybridization to*
5 *oligonucleotides on a large scale*. Trends Genet. 12, pp. 110-115, 1996;

Syvanen, A.C., Aalto-Setälä, K., Harju, L., Kontula, K. and Soderlund, H.: *A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E*. Genomics 8, pp. 684-692, 1990;

Tyagi, S. and Kramer, F.R.: *Molecular beacons: Probes that*
10 *fluoresce upon hybridization*. Nature Biotechnol. 14, pp. 303-308, 1996.

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-26-

CLAIMS

What is claimed is:

- 1 1. A method for separating nucleic acid molecules which have
2 specific alleles, comprising:
3 (a) hybridizing a nucleic acid comprising a heterosequence site
4 with at least one nucleic acid primer specific to the heterosequence site to form a
5 hybridized nucleic acid sequence, wherein the at least one specific nucleic acid
6 primer is capable of undergoing elongation only when hybridized to the
7 heterosequence site;
8 (b) subjecting the hybridized nucleic acid sequence to conditions
9 which permit elongation of the at least one nucleic acid primer; and
10 (c) separating the hybridized nucleic acid sequences which have
11 undergone elongation from the nucleic acid sequences from unhybridized nucleic
12 acid sequences and the nucleic acid primers which have not undergone elongation.
- 1 2. The method of claim 1, wherein the 3' end of the at least one
2 nucleic acid primer corresponds in position to a polymorphic base within the
3 heterosequence site and the nucleic acid primer is capable of undergoing elongation
4 only when the 3' end of the at least one nucleic acid primer is complementary to and
5 hybridized to the polymorphic base within the heterosequence site.
- 1 3. The method of claim 2, wherein one of the primer or one of
2 the elongated primer is labeled with a detection molecule and (d) further comprises
3 separating the hybridized nucleic acid sequences which have undergone elongation
4 utilizing the detection molecule.

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-27-

- 1 4. The method of claim 1, further comprising:
2 (d) amplifying the nucleic acid molecule comprising the
3 heterosequence site prior to hybridization with the at least one nucleic acid
4 primer; and
5 (e) identifying the heterosequence site.
- 1 5. The method of claim 1 wherein the heterosequence site
2 comprises a single nucleotide polymorphism.
- 1 6. A kit for separating nucleic acid molecules which have
2 specific alleles comprising instructions for carrying out the method of claim 1.
- 1 7. A method for separating a nucleic acid molecule which has a
2 specific allele, comprising:
3 (a) hybridizing a nucleic acid comprising one or more
4 heterosequence sites with at least one nucleic acid primer specific to the
5 heterosequence site and a ligation primer to form a hybridized nucleic acid
6 sequence, wherein the 3' end of the at least one nucleic acid primer corresponds in
7 position to a polymorphic base within the heterosequence site and the 5' end of the
8 ligation primer is adjacent to the 3' end of the at least one nucleic acid primer;
9 (b) subjecting the at least one nucleic acid primer and the ligation
10 primer to conditions which permit ligation of the at least one nucleic acid primer
11 and the ligation primer; and
12 (c) separating the hybridized nucleic acid molecule in which the
13 primers have undergone ligation.
- 1 8. The method of claim 7 wherein one of the at least one nucleic
2 acid primer and the ligation primer is labeled with a detection molecule and (c)
3 further comprises separating the hybridized nucleic acid sequences which have
4 undergone elongation utilizing the detection molecule.

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-28-

1 9. The method of claim 8 wherein the at least one nucleic acid
2 primer comprises a plurality of primers having different sequences and each
3 sequence is associated with a particular detection molecule such that no two
4 sequences are associated with the same detection molecule.

1 10. A kit for separating a nucleic acid molecule which has a
2 specific allele comprising instructions for carrying out the method of claim 7.

1 11. A method for separating a nucleic acid molecule which has a
2 specific allele, comprising:

3 (a) hybridizing a nucleic acid comprising one or more
4 heterosequence sites with at least one nucleic acid primer specific to the
5 heterosequence site to form hybridized nucleic acid complexes; and

6 (b) separating the hybridized nucleic acid complexes which have
7 complete complementary hybridization from the hybridized nucleic acid complexes
8 which do not have complete complementary hybridization.

1 12. The method of claim 11 further comprising determining the
2 sequence of the nucleic acid comprising the one or more heterosequence sites.

1 13. The method of claim 11 wherein step (b) comprises heating
2 the hybridized nucleic acid complexes to a temperature at which the nucleic acid
3 complexes which do not have complete complementary hybridization dissociate and
4 which the nucleic acid complexes which have complete complementary
5 hybridization do not dissociate.

1 14. The method of claim 11 wherein the at least one nucleic acid
2 primer is labeled with a detection molecule.

1 15. A kit for separating a nucleic acid molecule which has a
2 specific allele comprising instructions for carrying out the method of claim 11.

WO 02/18659

PCT/US01/41956

-29-

1 16. A method for separating a nucleic acid molecule which has a
2 specific allele, comprising:

- 3 (a) hybridizing a nucleic acid comprising at least a 5'
4 heterosequence site and a 3' heterosequence site with a hetero primer specific to the
5 3' heterosequence site and a homo primer to form a hybridized nucleic acid
6 sequence, wherein the 3' end of the hetero primer corresponds in position to a
7 polymorphic base within the 3' heterosequence site, the homo primer is capable of
8 hybridizing to the nucleic acid at a position located 5' of the 5' heterosequence site
9 and the hetero primer is capable of undergoing elongation only when the 3' end of
10 the hetero primer is complementary to and hybridized to the polymorphic base
11 within the 3' heterosequence site;
12 (b) elongating the hybridized hetero primer such that the nucleic
13 acid sequence between the hetero primer and the homo primer is produced and
14 includes the 5' heterosequence site; and
15 (c) determining the identity of the 5' heterosequence site.

1 17. The method of claim 16 further comprising:

- 2 (d) utilizing the identity of the 5' heterosequence site to produce
3 another hetero primer and another homo primer, wherein the 3' end of the another
4 hetero primer corresponds in position to a polymorphic base within the 5'
5 heterosequence site, the 5' heterosequence is located 3' to another 5'
6 heterosequence, the homo primer is capable of hybridizing to the nucleic acid at a
7 position located 5' of the another 5' heterosequence site and the hetero primer is
8 capable of undergoing elongation only when the 3' end of the hetero primer is
9 complementary to and hybridized to the polymorphic base within the 5'
10 heterosequence site;
11 (e) hybridizing nucleic acid sequence with the another hetero
12 primer and the another homo primer; and
13 (f) repeating steps (a) through (e) one or more times.

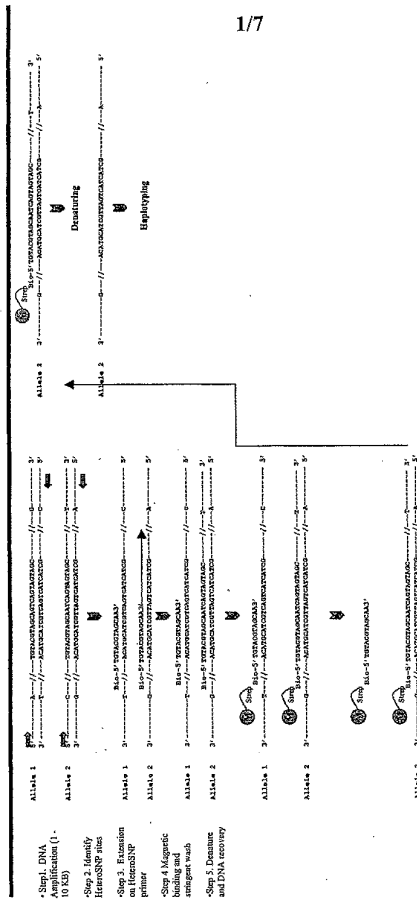
WO 02/18659

PCT/US01/41956

-30-

- 1 18. The method of 16 further comprising determining the
2 haplotype of the nucleic acid molecule.
- 1 19. A kit for separating a nucleic acid molecule which has a
2 specific allele comprising instructions for carrying out the method of claim 16.
- 1 20. A method for identifying an allele in a nucleic acid molecule,
2 comprising:
3 (a) hybridizing a nucleic acid comprising a plurality of
4 heterosequence sites with at least one primer to a produce a hybridized nucleic acid,
5 wherein the at least one primer is attached to a bead;
6 (b) elongating the hybridized primer to produce an extended
7 primer;
8 (c) dissociating the nucleic acid from the extended primer;
9 (d) hybridizing the extended primer with a second primer attached
10 to the bead;
11 (e) elongating the second primer to produce a second extended
12 primer; and
13 (f) identifying any heterosequence sites of the nucleic acid
14 utilizing the extended primer, the second extended primer or both.
- 1 21. A method for identifying an allele in a nucleic acid molecule
2 comprising instructions for carrying out the method of claim 20.

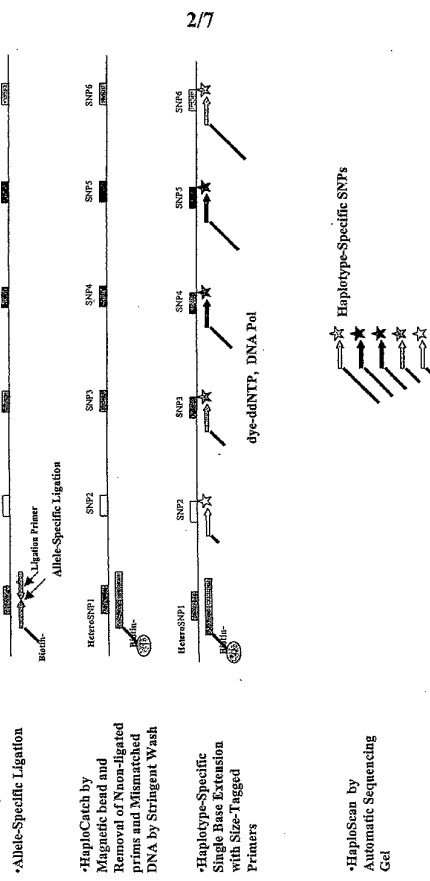
- Allele-Specific Primer Extension (ASPE)-Based



WO 02/18659

PCT/US01/41956

- Allele-Specific Ligation/PrimerSizeTag -Based



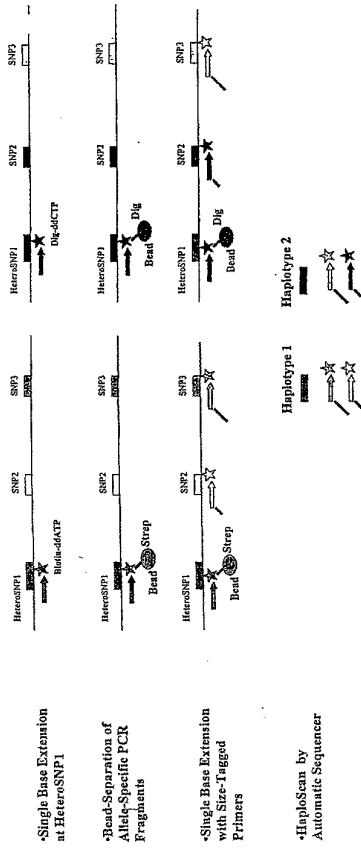
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18659

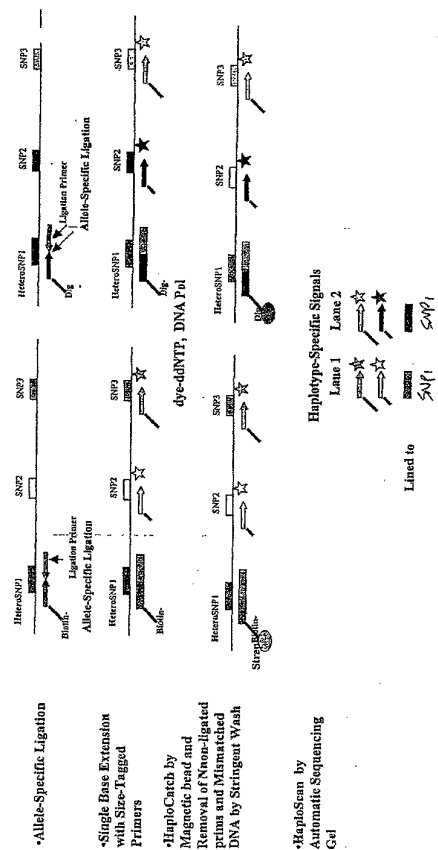
PCT/US01/41956

3/7

- Single-Base Extension/PrimerSize-Tag -Based

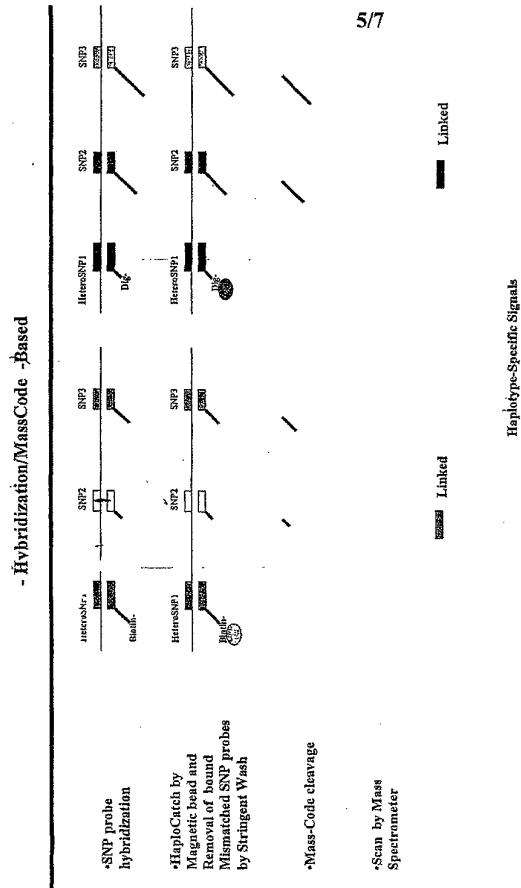


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



WO 02/18659

PCT/US01/41956



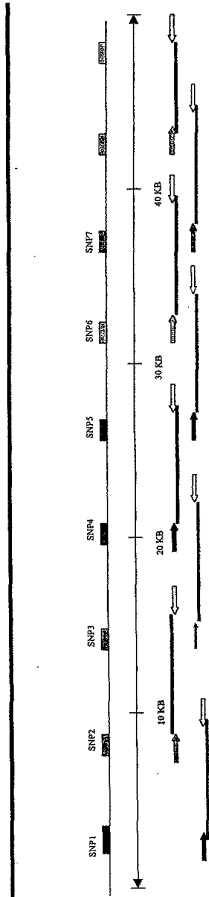
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18659

PCT/US01/41956

6/7

- Allele-Specific Ligation/PrimerSizeTag -Based



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/18659

PCT/US01/41956

7/7



A



B



C



D



E



F

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 March 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/018659 A3(51) International Patent Classification⁷: C12Q 1/68

(21) International Application Number: PCT/US01/41956

(22) International Filing Date: 30 August 2001 (30.08.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/228,994 30 August 2000 (30.08.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): HAPLOGEN, LLC [US/US]; 9099 North Deerbrook Trail, Brown Deer, WI 53223 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): LIU, Xiangjun [CN/US]; N64 W 13828 Cobblestone Drive, Menomonee Falls, WI 53051 (US).

(74) Agent: KASSEL, Mark; Foley & Lardner, 150 East Gilman Street, P.O. Box 1497, Madison, WI 53701-1497 (US).

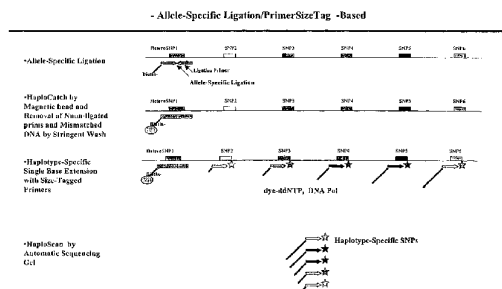
(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, 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, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report(88) Date of publication of the international search report:
31 July 2003

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING ALLELES



(57) Abstract: The present invention provides methods and kits for separating and identifying alleles, and thereby the haplotype, in genomic DNA samples. The method generally involves hybridizing primers specific to polymorphic sites within the alleles to the DNA sample, elongating the primers by one or more nucleic acids, separating the elongated primers and identifying the alleles utilizing the elongated primer. The method also allows for a ligation of two primers, their separation and subsequent use in identifying the targeted allele. The method further provides that another primer can be used as a blocking site for elongation of the first primer such that a stretch of DNA that includes a polymorphic site is replicated and identified. The unextended or extended primers can be labeled so that the primer can be easily separated and/or identified.

WO 02/018659 A3

WO 02/018659 A3

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | Internal Application No PC1/US 01/41956 |
|--|--|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q | | |
| 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 practical, search terms used) WPI Data, PAJ, CAB Data, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EPO-Internal, EMBASE | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | NEWTON C R ET AL: "ANALYSIS OF ANY POINT MUTATION IN DNA. THE AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM (ARMS)" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 17, no. 7, 11 April 1989 (1989-04-11), pages 2503-2516, XP000141596 ISSN: 0305-1048 | 1,2,5,6 |
| Y | the whole document --- | 3,4 |
| X | WO 96 26291 A (UNIV NOTTINGHAM ;BARDSEY RONALD GEORGE (GB); LOCKLEY ANDREW KEITH) 29 August 1996 (1996-08-29) | 1,2,5,6 |
| Y | the whole document --- | 3,4 |
| | --- /-- | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" 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 "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 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "S" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 22 January 2003 | | Date of mailing of the international search report 07 MAY 2003 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patenlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3018 | | Authorized officer HORNIG H. |

Form PC1/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No. PC1,US 01/41956 |
|--|---|--|
| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | WO 90 09455 A (GENECO PTY LTD) 23 August 1990 (1990-08-23) claims 1-44 --- | 3,4 |
| Y | WO 93 25563 A (HOPE CITY ;WALLACE ROBERT BRUCE (US)) 23 December 1993 (1993-12-23) the whole document --- | 3,4 |
| Y | PREZANT T R ET AL: "TRAPPED-OLIGONUCLEOTIDE NUCLEOTIDE INCORPORATION (TONI) ASSAY, A SIMPLE METHOD FOR SCREENING POINT MUTATIONS" HUMAN MUTATION, WILEY-LISS, NEW YORK, NY, US, vol. 1, no. 2, 1992, pages 159-164, XP000571693 ISSN: 1059-7794 the whole document --- | 3,4 |
| Y | PASTINEN TOMI ET AL: "A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays." GENOME RESEARCH, vol. 10, no. 7, July 2000 (2000-07), pages 1031-1042, XP002228091 ISSN: 1088-9051 the whole document --- | 3,4 |
| A | NICKERSON D A ET AL: "AUTOMATED DNA DIAGNOSTICS USING AN ELISA-BASED OLIGONUCLEOTIDE LIGATION ASSAY" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 87, no. 22, 1 November 1990 (1990-11-01), pages 8923-8927, XP000209335 ISSN: 0027-8424 the whole document --- | 1-6 |
| A | TOBE V O ET AL: "SINGLE-WELL GENOTYPING OF DIALLELIC SEQUENCE VARIATIONS BY A TWO-COLOR ELISA-BASED OLIGONUCLEOTIDE LIGATION ASSAY" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 24, no. 19, 1996, pages 3728-3732, XP000978683 ISSN: 0305-1048 the whole document --- -/-- | 1-6 |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No. PC1/US 01/41956 |
|--|--|--|
| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | WO 97 31256 A (BLOK HERMAN ;BARANY GEORGE (US); KEMPE MARIA (US); ZIRVI MONIB (US) 28 August 1997 (1997-08-28) the whole document --- | 1-6 |
| A | KAWAI S ET AL: "A SIMPLE METHOD OF HLA-DRB TYPING USING ENZYMATICALLY AMPLIFIED DNA AND IMMOBILIZED PROBES ON MICROTITER PLATE" HUMAN IMMUNOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 41, no. 2, 1994, pages 121-126, XP000890112 ISSN: 0198-8859 the whole document --- | 1-6 |
| A | US 5 468 611 A (BAXTER-LOWE LEE A ET AL) 21 November 1995 (1995-11-21) the whole document ----- | 1-6 |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US 01/41956 |
|--|-------------------------------------|---|
| Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet) | | |
| This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: | | |
| 1. | <input type="checkbox"/> | Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: |
| 2. | <input type="checkbox"/> | Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: |
| 3. | <input type="checkbox"/> | Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). |
| Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet) | | |
| This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: | | |
| see additional sheet | | |
| 1. | <input type="checkbox"/> | As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims. |
| 2. | <input type="checkbox"/> | As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. |
| 3. | <input type="checkbox"/> | As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: |
| 4. | <input checked="" type="checkbox"/> | No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: |
| 1-6 | | |
| Remark on Protest | | |
| <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. | | |
| <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees. | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01/41956

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-6

A method for separating nucleic acid molecules which have specific alleles, comprising: (a) hybridizing a nucleic acid comprising a heterosequence site with at least one nucleic acid primer specific to the heterosequence site to form a hybridized nucleic acid sequence, wherein the at least one specific nucleic acid primer is capable of undergoing elongation only when hybridized to the heterosequence site; (b) subjecting the hybridized nucleic acid sequence to conditions which permit elongation of the at least one nucleic acid primer; and (c) separating the hybridized nucleic acid sequences which have undergone elongation from the nucleic acid sequences from unhybridized nucleic acid sequences and the nucleic acid primers which have not undergone elongation.

2. Claims: 7-10

A method for separating a nucleic acid molecule which has a specific allele, comprising: (a) hybridizing a nucleic acid comprising one or more heterosequence sites with at least one nucleic acid primer specific to the heterosequence site and a ligation primer to form a hybridized nucleic acid sequence, wherein the 3'end of the at least one nucleic acid primer corresponds in position to a polymorphic base within the heterosequence site and the 5'end of the ligation primer is adjacent to the 3'end of the at least one nucleic acid primer; (b) subjecting the at least one nucleic acid primer and the ligation primer to conditions which permit ligation of the at least one nucleic acid primer and the ligation primer; and (c) separating the hybridized nucleic acid molecule in which the primers have undergone ligation.

3. Claims: 11-15

A method for separating a nucleic acid molecule which has a specific allele, comprising: (a) hybridizing a nucleic acid comprising one or more heterosequence sites with at least one nucleic acid primer specific to the heterosequence site to form hybridized nucleic acid complexes; and (b) separating the hybridized nucleic acid complexes which have complete complementary hybridization from the hybridized nucleic acid complexes which do not have complete complementary hybridization.

4. Claims: 16-19

A method for separating a nucleic acid molecule which has a

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01/41956

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

specific allele, comprising: (a) hybridizing a nucleic acid comprising at least a 5' heterosequence site and a 3' heterosequence site with a hetero primer specific to the 3' heterosequence site and a homo primer to form a hybridized nucleic acid sequence, wherein the 3' end of the hetero primer corresponds in position to a polymorphic base within the 3' heterosequence site, the homo primer is capable of hybridizing to the nucleic acid at a position located 5' of the 5' heterosequence site and the hetero primer is capable of undergoing elongation only when the 3' end of the hetero primer is complementary to and hybridized to the polymorphic base within the 3' heterosequence site; (b) elongating the hybridized hetero primer such that the nucleic acid sequence between the hetero primer and the homo primer is produced and includes the 5' heterosequence site; and (c) determining the identity of the 5' heterosequence site.

5. Claims: 20-21

A method for identifying an allele in a nucleic acid molecule, comprising : (a) hybridizing a nucleic acid comprising a plurality of heterosequence sites with at least one primer to produce a hybridized nucleic acid, wherein the at least one primer is attached to a bead; (b) elongating the hybridized primer to produce an extended primer; (c) dissociating the nucleic acid from the extended primer; (d) hybridizing the extended primer with a second primer attached to the bead; (e) elongating the second primer to produce a second extended primer; and (f) identifying any heterosequence sites of the nucleic acid utilizing the extended primer, the second extended primer or both.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/US 01/41956

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9626291 | A | 29-08-1996 | WO 9626291 A1 | 29-08-1996 |
| WO 9009455 | A | 23-08-1990 | AT 181576 T | 15-07-1999 |
| | | | AU 656514 B2 | 09-02-1995 |
| | | | AU 5106990 A | 05-09-1990 |
| | | | WO 9009455 A1 | 23-08-1990 |
| | | | CA 2044591 A1 | 14-08-1990 |
| | | | DK 457824 T3 | 24-01-2000 |
| | | | EP 0457824 A1 | 27-11-1991 |
| | | | ES 2136059 T3 | 16-11-1999 |
| | | | IE 66572 B1 | 24-01-1996 |
| | | | JP 3021036 B2 | 15-03-2000 |
| | | | JP 4503158 T | 11-06-1992 |
| | | | SG 50434 A1 | 20-07-1998 |
| | | | US 5856092 A | 05-01-1999 |
| WO 9325563 | A | 23-12-1993 | CA 2115342 A1 | 23-12-1993 |
| | | | WO 9325563 A1 | 23-12-1993 |
| | | | AU 674127 B2 | 12-12-1996 |
| | | | AU 2251192 A | 04-01-1994 |
| | | | DE 69232846 D1 | 19-12-2002 |
| | | | EP 1302547 A2 | 16-04-2003 |
| | | | EP 0607151 A1 | 27-07-1994 |
| | | | JP 6509946 T | 10-11-1994 |
| | | | US 5981176 A | 09-11-1999 |
| | | | US 2003027775 A1 | 06-02-2003 |
| WO 9731256 | A | 28-08-1997 | AU 735440 B2 | 05-07-2001 |
| | | | AU 2799797 A | 10-09-1997 |
| | | | CA 2244891 A1 | 28-08-1997 |
| | | | EP 0920440 A2 | 09-06-1999 |
| | | | JP 2001519648 T | 23-10-2001 |
| | | | WO 9731256 A2 | 28-08-1997 |
| | | | US 2003022182 A1 | 30-01-2003 |
| | | | US 2002150921 A1 | 17-10-2002 |
| US 5468611 | A | 21-11-1995 | US 6194147 B1 | 27-02-2001 |
| | | | US 5545526 A | 13-08-1996 |
| | | | US 5702885 A | 30-12-1997 |
| | | | US 6503707 B1 | 07-01-2003 |

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,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,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 リユウ, シアンユン

アメリカ合衆国、ウイスコンシン・ 5 3 0 5 1、メノモニー・ホールズ、コブルストン・ドライブ
・ウエスト・ 1 3 8 2 8 ・エヌ・ 6 4

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA09 CA11 CA20 HA08 HA11 HA13 HA14
HA20
4B063 QA13 QA17 QQ02 QQ04 QQ07 QQ08 QQ09 QQ42 QQ52 QR08
QR14 QR20 QR32 QR35 QR40 QR56 QR62 QR83 QS25 QS34
QS36 QX02