

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



PCT



(10) 国际公布号

WO 2011/035550 A1

(43) 国际公布日
2011 年 3 月 31 日 (31.03.2011)

- (51) 国际专利分类号:
C12P 19/34 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2010/001480
- (22) 国际申请日: 2010 年 9 月 25 日 (25.09.2010)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
200910174203.1 2009 年 9 月 23 日 (23.09.2009) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 深圳华大基因科技有限公司 (BGI SHENZHEN CO., LIMITED) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区 11 栋 8 楼, Guangdong 518083 (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 李剑 (LI, Jian) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区 11 栋 8 楼, Guangdong 518083 (CN)。 瞿京辉 (QU, Jinghui) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区 11 栋 8 楼, Guangdong 518083 (CN)。 王莉萍 (WANG, Liping) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区 11 栋 8 楼, Guangdong 518083 (CN)。
- (74) 代理人: 北京北翔知识产权代理有限公司 (PEKSUNG INTELLECTUAL PROPERTY LTD.);

中国北京市海淀区学院路 35 号世宁大厦 908 室, Beijing 100191 (CN)。

- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: METHOD FOR GENE AMPLIFICATION AND GENOTYPING OF HLA AND CORRESPONDING PRIMERS THEREOF

(54) 发明名称: HLA 基因扩增和基因分型方法及其相关引物

(57) Abstract: The present invention provides a method for the amplification of HLA gene and specific primer pairs used in said method. The present invention also provides a method for the genotyping of HLA, and amplification primers and sequencing primers used in said method.

(57) 摘要:

本发明提供了用于扩增 HLA 基因的方法以及所述方法中使用的特异性引物对。本发明还提供了 HLA 基因分型的方法以及所述方法中使用的扩增引物对和测序引物。

WO 2011/035550 A1

HLA 基因扩增和基因分型方法及其相关引物

技术领域

5 本发明涉及分子生物学领域，具体而言，本发明涉及用于 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C 基因的扩增和分型方法，以及所述方法中使用的特异性引物。

背景技术

10

人类白细胞抗原，即 HLA (human leukocyte antigen)，是调控人体特异性免疫应答和决定疾病易感性个体差异的主要基因系统，与同种异体器官移植的排斥反应密切相关。

15 HLA 系统在抗原识别、抗原递呈、免疫应答与调控、破坏外来抗原靶细胞等方面发挥重要的作用，是引起免疫排斥反应的主要物质基础。移植细胞表面 I 类和 II 类抗原都是强移植抗原，体液免疫和细胞免疫都参与了对移植物的排斥反应，无论是异基因器官、组织或细胞的移植，供受体间 HLA 相配是成功的关键。

20 目前国际标准的 HLA 分型技术为 PCR-SSP(序列特异引物聚合酶链式反应)，PCR-SSO(聚合酶链式反应寡核苷酸探针杂交)和 PCR-SBT(聚合酶链式反应产物直接测序分型)。

25 SSP 的原理是设计出一整套等位基因组特异性引物，借助 PCR 技术获得 HLA 型别特异的扩增产物，通过电泳分析决定 HLA 型别。其缺点是不易自动化；不能检测新的等位基因；试剂盒需不断升级；检测信号是模拟信号。

SSO 的原理是设计 HLA 型别特异的寡核苷酸序列作为探针，对 PCR 产物进行标记，以 PCR 产物(待检测基因 DNA)与探针杂交。通过检测信号判断 HLA 基因型别。缺点是不能检测新的等位基因，分辨率不够高；检测信号是模拟信号。

30 SBT 是一种通过对扩增后的 DNA 进行核酸序列测定，从而判断 HLA 型别的方法。对于基因结构的分析，SBT 是最直观、最准确的方法。用 PCR-SSP 或 PCR-SSO 方法鉴别出新的等位基因，必须通过测序加以证实。

但是目前现有的 SBT 法尚存在一些技术问题, 例如其 PCR 引物大多是对 HLA-A, B, C 位点的外显子 2、3、4 进行扩增, 当某几个等位基因核苷酸区别在扩增区域之外时, 就无法进行区分; PCR 反应过多, 成本较高, 时间过长等。

- 5 综上所述, 本领域仍需要改进的 HLA 基因扩增和分型方法, 以便对 HLA 基因进行全长基因扩增, 实现更准确、分辨率更高的分型。

发明内容

- 10 为解决上述现有技术中的问题, 本发明提供了一种新的 HLA 基因扩增方法, 其特征在于使用本发明的扩增引物对进行 PCR 扩增, 所述扩增引物对的序列以及序列编号 (SEQ ID NO:) 示于下表 1:

表 1: PCR 扩增引物对

引物名称	序列 5' → 3'	长度	SEQ ID NO:
A-F	TCTCAGGGTCTCAGGCCCCGAA	22	1
A-R	GCAGAAACAAAGTCAGGGTTCTTCA	25	2
B-F	GGCTCTCAGGGTCTCAGGCT	20	3
B-R	CTCTAAACAGCCCACCACACACG	23	4
C-F	GGTTCTAGAGAAGCCAATCAGCGTCT	26	5
C-R	AGGCAGCTGTCTCAGGCTACAGAAC	25	6

- 15 在本发明方法中, 引物对 A-F 与 A-R 用于扩增 HLA-A 区段, 引物对 B-F 与 B-R 用于扩增 HLA-B 区段, 引物对 C-F 与 C-R 用于扩增 HLA-C 区段。使用本发明的扩增引物对, 可以通过 PCR 反应扩增出 HLA-A、HLA-B 或 HLA-C 的全长基因。

- 20 由于能够通过 PCR 反应扩增出 HLA-A、HLA-B 或 HLA-C 的全长基因, 因此, 本发明的方法特别有利地可用于进行 HLA 基因分型。与现有的 PCR-SBT 方法相比, 由于使用本发明的方法和扩增引物对能够扩增全长基因, 因此在进一步进行分型时, 能够避免当某几个等位基因核苷酸位于扩增区域之外时无法进行有效分型的问题。

另外, 本发明提供了一种改进的 HLA 基因分型方法, 所述方法包括:

- 25 (1) 使用本发明的 PCR 扩增引物对扩增待测的 HLA-A、HLA-B 和/或 HLA-C 全长基因,

(2) 使用本发明的测序引物对 PCR 产物进行扩增, 分别扩增 HLA-A、HLA-B 和/或 HLA-C 的各外显子, 然后对扩增出的各外显子进行测序, 并将测序结果与数据库中的标准序列进行比较, 从而确定基因分型结果。

其中所述各测序引物的序列以及序列编号 (SEQ ID NO:) 示于下表 2。

表 2: 测序引物

引物名称	序列 5' → 3'	长度	SEQ ID NO:
A1F	CACCGGGA CT CAGATTCT	18	7
A2F	CTCTGCGGGGAGAAGC	16	8
A3F	GGTTTCATTTTCAGTTTA	18	9
A4F	ACAGATGCAAAATGCCT	17	10
A5F	CAGGGTCAGGGCCCCTCA	18	11
A6F	GGTTCCTCTAGGACCTTA	18	12
B1F	GTCCCAGTTCTAAAGTC	17	13
B2F	AGCCGCGCCGGGAGGA	16	14
B3F	ACCCGGTTTCATTTTCAGT	19	15
B4F	GGTCACATGGGTGGTCC	17	16
B5F	GTAAGGAGGGGGATGAG	17	17
B6F	TCTCATGGCCCTGCTTC	17	18
C1F	ATCAGCGTCTCCGCAGT	17	19
C2F	GGTCGGGCGGGTCTCA	16	20
C3F	GTTTAGGCCAAAATCC	16	21
C4F	GGCTGGCGTCTGGGTTCT	18	22
C5F	AAGTCCTGGAGCCCTTCA	18	23
C6F	TCCAAGACTAGGAGGTTC	18	24

另一方面, 本发明提供了如上表 1 和表 2 所示的用于 HLA 基因扩增和/或分型的新的扩增引物对和测序引物, 它们具有 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 24 任一项所示的多核苷酸序列。

另一方面, 本发明还提供了一种用于进行 HLA 基因分型的试剂盒, 所述试剂盒中包括本发明的 PCR 扩增引物对和测序引物。

应用本发明提供的扩增引物对和测序引物以及基因分型方法, 能够

在扩增全长基因的基础上进行基因分型。因此相对于现有技术而言，分型的准确率和分辨率更高，同时还节省了时间和成本。

附图说明

5

图 1 为 HLA-A 扩增产物电泳图。

图 2 为 HLA-B 扩增产物电泳图。

图 3 为 HLA-C 扩增产物电泳图。

图 4 为 HLA-A 外显子 2、3、4 的示例性测序图谱。

10

图 5 为检测到的新基因型的测序图谱。

具体实施方式

15 本发明人通过对 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C 基因序列进行生物信息学分析，在 5' 和 3' 非翻译区寻找各基因位点保守序列，设计出了若干能够扩增 HLA 全长基因的特异性 PCR 引物。使用本发明的扩增引物对，可以通过 PCR 反应扩增出 HLA-A、HLA-B 或 HLA-C 的全长基因。

在本发明的一个实施方案中，使用 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 的扩增引物对扩增 HLA-A 的全长基因。在本发明的另一个实施方案中，20 使用 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 的扩增引物对扩增 HLA-B 的全长基因。在本发明的另一个实施方案中，使用 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 的扩增引物对扩增 HLA-A 的全长基因。

由于能够通过 PCR 反应扩增出 HLA-A、HLA-B 或 HLA-C 的全长基因，因此，本发明的方法特别有利地可用于进行 HLA 基因分型。与现有的 25 PCR-SBT 方法相比，由于使用本发明的方法和扩增引物对能够扩增全长基因，因此在进一步进行分型时，能够避免当某几个等位基因核苷酸位于扩增区域之外时无法进行有效分型的问题。

因此根据本发明的另一方面，提供了一种改进的 HLA 基因分型方法，所述方法包括：

30 (1) 使用本发明的 PCR 扩增引物对扩增待测的 HLA-A、HLA-B 和/或 HLA-C 全长基因，

(2) 使用本发明的测序引物对 PCR 产物进行扩增，分别扩增 HLA-A、

HLA-B 和/或 HLA-C 的各外显子, 然后对扩增出的各外显子进行测序, 并将测序结果与数据库中的标准序列进行比较, 从而确定基因分型结果,

其中所述各测序引物的序列以及序列编号 (SEQ ID NO:) 示于上表 2。

在本发明的一个实施方案中, 其中使用 SEQ ID NO: 7 至 SEQ ID NO: 12 的测序引物扩增 HLA-A 的第 1-7 外显子; 使用 SEQ ID NO: 13 至 SEQ ID NO: 18 的测序引物扩增 HLA-B 的第 1-7 外显子; 使用 SEQ ID NO: 19 至 SEQ ID NO: 24 的测序引物扩增 HLA-C 的第 1-7 外显子。

根据本发明的另一方面, 还提供了用于 HLA 基因扩增和/或分型的各个引物, 它们具有 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 24 任一项所示的多核苷酸序列。

根据本发明的另一方面, 还提供了一种用于进行 HLA 基因分型的试剂盒, 所述试剂盒中包括本发明的 PCR 扩增引物对和测序引物。任选地, 所述试剂盒中还包括使用说明书。

15 实施例

提出以下实施例, 以便使本领域普通技术人员更好地理解本发明, 所述实施例仅出于示例性目的, 并非意在限制本公开的范围。已经努力确保有关数字 (如数量、温度等) 的准确性, 但应该考虑到会存在一些误差和偏差。除非另有说明, 否则份数为重量份数, 温度以℃为单位或者为环境温度, 压力接近或等于大气压。

实施例 1. 使用本发明的 HLA 分型系统对已知基因型的样本进行分型检测。

在本实施例中, 采用本发明的 PCR 扩增引物对和测序引物, 对 20 例已知 HLA 基因型的人血样进行 HLA-A, B, C 位点的高分辨率基因分型。试验的具体步骤如下:

1. 利用盐析法提取基因组 DNA。

试验步骤如下:

(1) 在生物安全柜中进行操作, 吸取 200 μ l 混匀全血到 2ml EP 管中, 操作结束按流程关闭生物安全柜。

(2) 在所述 EP 管中加入 700 μ l 红细胞裂解液, 振荡 15 秒, 14,000rpm 离心 1 min。

(3) 弃去上清液, 将所述 EP 管开口向下放吸水纸上, 尽量排出剩余液体。

(4) 在所述 EP 管中加入 10 μ l (10mg/ml) 蛋白酶 K 和 300 μ l 核裂解液, 振荡 15 秒, 再加入 20 μ l SDS (20%), 振荡 15 秒。

5 (5) 将 EP 管在 56 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 然后以 14,000 rpm 离心 3 min。

(6) 在所述 EP 管中加 1ml 无水乙醇 (-20 $^{\circ}$ C 预冷), 颠倒 Ep 管 15 至 20 次, 直到线性 DNA 形成。

(7) 以 14,000 rpm 离心 2 min, 弃去上清。

10 (8) 在所述 EP 管中加 1ml 70%乙醇, 反复颠倒 Ep 管, 然后以 14,000 rpm 离心 2 min, 弃去上清。

(9) 打开所述 Ep 管, 室温放置 10 至 15 min, 待管壁的乙醇挥发干燥后, 加入 100 μ l 左右蒸馏水。

2. PCR 扩增

15 分别使用不同的引物对扩增步骤 1 中提取的基因组 DNA。使用 A-F (SEQ ID NO: 1) 和 A-R (SEQ ID NO: 2) 引物对进行 HLA-A 分型的扩增; 使用 B-F (SEQ ID NO: 3) 和 B-R (SEQ ID NO: 4) 引物对进行 HLA-B 分型的扩增; 使用 C-F (SEQ ID NO: 5) 和 C-R (SEQ ID NO: 6) 引物对进行 HLA-C 分型的扩增。使用不同的引物对进行扩增时的扩增过程和反应体系均是相似的。
20 的。

所述 PCR 扩增过程为:

96 $^{\circ}$ C 2min

95 $^{\circ}$ C 30s $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C 30s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 3min ($\times$ 35 个循环)

15 $^{\circ}$ C ∞

25

所述 PCR 反应体系为 25 μ l, 其组成如下表所列, 其中 2 $\times$ GC Buffer I (Mg²⁺ plus) 和 LA Taq 酶均购自宝生物工程(大连)有限公司 (Takara):

Takara 2 $\times$ GC buffer I (Mg ²⁺ plus)	12.5 μ l
dNTP 混合物 (各 2.5mM)	4.0 μ l
扩增引物对 (F 引物和 R 引物各 10pmol/l)	1.0 μ l
Takara LA Taq 酶 (5U/ μ l)	0.3 μ l
DNA 模板	3.0 μ l

ddH₂O4.2 μ l

扩增产物的电泳图示于图 1 至图 3。图 1、2、3 分别为 HLA-A、B、C 的扩增产物电泳图，图最左边的白色条痕为 Marker 标记。从上到下依次为 2000bp、1000bp、500bp、200bp、100bp 和 50bp。图中从右至左的各个泳道分别对应各受试者的样本。

从图 1-3 可以看出，应用本发明的引物，所扩增的片段长度均在 3200bp 左右。若仅扩增 HLA-A、B、C 的外显子 2、3 和 4，则片段大小约为 1.3KB。因此可以证明，使用本发明的方法和引物能够扩增 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C 基因的全长。

3. 利用 millipore 纯化板进行 PCR 产物纯化。

用记号笔在 96 孔 PCR 产物纯化板上标记需要使用的孔，并向需要使用的孔中加入 50 μ l 超纯水，剩余孔粘贴封口膜，室温静置 15 分钟或连接到抽滤系统上，以 -10Pa 抽滤 5 分钟，每次从抽滤系统上取下纯化板时都要在吸水纸上吸干残留在纯化板底部排液口的液体。

待纯化 PCR 产物离心，4000 rpm $\times$ 1 分钟。在每个 PCR 反应体系中加入 100 μ l 超纯水。然后把加入待纯化 PCR 产物的纯化板连接到抽滤系统上，调节真空度至气压表显示 -10 $\pm$ 1Pa，抽滤至纯化板底部的微孔再生纤维膜上无残留液体为止，并在光照下观察为无完整液面反射光泽，通常 10 至 15 分钟。

向含有待纯化 PCR 产物的孔中加 20-50 μ l 超纯水或 TE 至微孔再生纤维膜上；在室温下，使用微量振荡器的中档速度振荡纯化板 5 分钟，转移相应孔内全部液体至一块新的 96 孔 PCR 板的对应孔中。

根据需要用超纯水或 TE 回收已纯化的 PCR 产物，需进行测序反应的产物只能用超纯水回收，回收的体积根据纯化前 PCR 产物电泳鉴定情况决定，通常为 20-50 μ l。

4. 使用测序引物进行产物的扩增。

分别使用不同的引物对步骤 3 中纯化的 PCR 产物进行测序扩增。使用 A1F (SEQ ID NO: 7)、A2F (SEQ ID NO: 8)、A3F (SEQ ID NO: 9)、A4F (SEQ ID NO: 10)、A5F (SEQ ID NO: 11) 和 A6F (SEQ ID NO: 12) 分别扩增 HLA-A

的 1、2、3、4、5 和 6、7 号外显子 (其中使用 A6F 可以同时扩增出第 6 和第 7 外显子); 使用 B1F (SEQ ID NO: 13)、B2F (SEQ ID NO: 14)、B3F (SEQ ID NO: 15)、B4F (SEQ ID NO: 16)、B5F (SEQ ID NO: 17) 和 B6F (SEQ ID NO: 18) 分别扩增 HLA-B 的 1、2、3、4、5 和 6、7 号外显子 (其中使用 B6F 可以同时扩增第 6 和第 7 外显子); 使用 C1F (SEQ ID NO: 19)、C2F (SEQ ID NO: 20)、C3F (SEQ ID NO: 21)、C4F (SEQ ID NO: 22)、C5F (SEQ ID NO: 23) 和 C6F (SEQ ID NO: 24) 分别扩增 HLA-C 的 1、2、3、4、5 和 6、7 号外显子 (其中使用 C6F 可以同时扩增第 6 和第 7 外显子); 各测序扩增反应的条件和反应体系都是相同的。

所述测序扩增反应的条件是:

96℃ 2min

96℃ 10s → 55℃ 5s → 60℃ 2min (25 个循环)

15℃ ∞

反应的体系为 5 μl, 其组成如下表所列, 其中 2.5 × Bigdye 和 5 × Buffer 均购自美国应用生物系统公司 (Applied Biosystems, ABI):

PCR 产物	1 μl
引物 (3.2 pmol/l)	1 μl
ABI 2.5 × Bigdye	0.3 μl
ABI 5 × Buffer	0.85 μl
ddH ₂ O	1.85 μl

5. EDTA/无水乙醇纯化测序扩增的产物。

基本步骤是: 取下测序反应板配平, 离心 3000g × 1 分钟。在 96 孔反应板的每 5 μl 反应体系加 0.125 mol/L EDTA-Na₂ 溶液 2 μl, 85% 乙醇 33 μl, 盖上硅胶垫, 充分振荡 3 分钟, 在 4℃ 离心 3000g × 30 分钟。离心结束后取出反应板, 打开硅胶垫, 将反应板倒置吸水纸上进行倒离心, 在离心力达到 185g 时立即停止离心。在 96 孔板的每孔中加入 70% 乙醇 50 μl, 盖上硅胶垫, 振荡 1.5min, 在 4℃ 离心 3000g × 15 分钟。将反应板置于避光通风处 30 分钟, 风干至无乙醇气味。在 96 孔板的每孔中加 10 μl (384 孔板每孔加 8 μl) HI-DI 甲酰胺, 盖封口膜, 振荡 5 秒后以 1000 ± 100rpm 离心。

6. 在 ABI 3730XL 上进行外显子测序。

使用 ABI 3720solexa 测序仪对经过纯化的测序扩增产物进行测序。
一个示例性的测序结果示于图 4。

然后将测序所得结果与国际组织 IMGT 数据库 (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/>) 中公布的 HLA 分型中的标准序列进行比对; 通过比对得出样品序列与标准序列的匹配率; 根据匹配率高低得出样品序列的分型结论。检测结果与样本原来的分型结果的对比见下表 3 (关于 HLA 分型命名的查询可见于 <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/align.html>)。

10 表 3 本次分析结果与样本已知的分型结果对比

样本编号	原 HLA 基因型别			本次检测结果			是否相符
	A	B	C	A	B	C	
01	1101/2402	3901/4001	0102/0302	1101/2402	3901/4001	0102/0302	是
02	1101/2402	3901/4001	0401/702	1101/2402	3901/4001	0401/702	是
03	2402/2402	4001/4001	1402/1602	2402/2402	4001/4001	1402/1602	是
04	1101/2402	3901/2704	0304/0602	1101/2402	3901/2704	0304/0602	是
05	1101/3303	1502/5801	0302/0304	1101/3303	1502/5801	0302/0304	是
06	0201/1101	1502/5101	0302/0801	0201/1101	1502/5101	0302/0801	是
07	1101/3303	4001/5801	0302/0702	1101/3303	4001/5801	0302/0702	是
08	1101/3303	1502/5801	0102/0401	1101/3303	1502/5801	0102/0401	是
09	1101/3303	1502/5801	0302/0304	1101/3303	1502/5801	0302/0304	是
10	1101/3101	1502/5102	0304/0702	1101/3101	1502/5102	0304/0702	是
11	1101/3101	1502/5102	0302/1202	1101/3101	1502/5102	0302/1202	是
12	0203/1101	1502/3815	1402/0702	0203/1101	1502/3815	1402/0702	是
13	0201/2601	1302/5201	0102/1502	0201/2601	1302/5201	0102/1502	是
14	0201/0203	1302/5501	0801/1502	0201/0203	1302/5501	0801/1502	是
15	0207/2402	5401/5502	0102/0302	0207/2402	5401/5502	0102/0302	是
16	0207/2402	4001/5502	0102/0302	0207/2402	4001/5502	0102/0302	是
17	0207/2402	5401/5502	0102/072	0207/2402	5401/5502	0102/072	是
18	2402/3303	4001/5801	1202/0702	2402/3303	4001/5801	1202/0702	是
19	2402/3303	5401/5801	0801/0702	2402/3303	5401/5801	0801/0702	是
20	0207/2402	4001/5502	0102/0702	0207/2402	4001/5502	0102/0702	是

从上表 3 可以看出, 使用本发明方法进行 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C 的基因分型结果与样本原来的分型结果完全相符, 从而证明了本发明的可靠性。

实施例 2. 利用本发明的系统发现新的等位基因。

在本实施例中，使用本发明的引物对多个未知基因型的人血样本进行分型，所使用的方法如实施例 1 所述。经过测序发现其中一个样本的基因型与数据库中记载的已有基因型均不相同（测序结果见图 5），如图中圆圈所示，该样本的 HLA-C 基因的第 4 外显子第 695 位置处的核苷酸为 G，而数据库 5 中该位置的核苷酸为 T，因此说明该样本是一个 HLA-C 新等位基因。由此证明，利用本发明的方法可以发现新的等位基因型。

对于本领域技术人员显而易见的是，在不背离本发明的范围和精神的前提下可对本发明进行各种修改和变动。通过考虑本发明在此所公开的说明书和实例，本发明的其他实施方案对本领域技术人员来说是显而易见的。10 本说明书和实施例应仅看作示例性用途，本发明真正的范围和精神在所附的权利要求书中说明。

15 参考文献

- [1]. Tiercy J M. Molecular basis of HLA polymorphism: implications in clinical transplantation. [J]. Transpl Immunol, 2002, 9: 173-180.
- [2]. Gonzalez-Roces, SM.V, Alvarez, S. Gonzalez, et al. HLA-B27 polymorphism and worldwide susceptibility to ankylosing spondylitis. [J]. Tissue Antigens, 1997, 49: 116. 20
- [3]. Pera C, Deffins L, Marabito A, et al. HLA-A typing: Comparison between serology, the amplification refractory mutation system with polymerase chain reaction and sequencing. [J]. Tissue Antigens, 1997, 50: 372-379.
- [4] Lillo R, Balas A, Vicario JL, et al. Two new HLA class allele, DPB1*02014, by sequence-based typing. [J]. Tissue Antigens, 2002, 59: 47-48. 25
- [5]. Dunn PP, Carter V, Dunn A, et al. Identification of an HLA-B7 serological variant and its characterization by sequencing based typing. [J]. Tissue Antigens, 2000, 55: 71-73.
- [6]. Al-Hussein K A, Rama N R, Butt A I, et al. HLA class II sequence based typing in normal Saudi individuals. [J]. Tissue Antigens, 2002, 60: 259- 261. 30
- [7]. D. C. Sayer, D. M. Goodridge. Pilot study: assessment of interlaboratory

variability of sequencing-based typing DNA sequence data quality. [J] Tissue Antigens, 2007, 69 Suppl. 1 (66 68)

[8]. K. Kotsch, J. Wehling, R. Blasczyk. Sequencing of HLA class II genes based on the conserved diversity of the non-coding regions: sequencing based typing of HLA-DRB genes. [J]. Tissue Antigens, 1999: 53: 486 497.

[9]. K. R. Miao, Q. Q. Pan, R. C. Tang, et al. The polymorphism and haplotype analysis of HLA-A, -B and -DRB1 genes of population in Jiangsu province of China. [J]. International Journal of Immunogenetics, 2007, 34: 419 424.

权 利 要 求

1. 一种 HLA 基因扩增方法, 其特征在于使用选自 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4, 和/或 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 的扩增引物对进行 PCR 扩增, 扩增 HLA-A、HLA-B 和/或 HLA-C 基因。
5
2. 权利要求 1 的方法, 其中使用 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 的扩增引物对扩增 HLA-A 基因。
3. 权利要求 1 的方法, 其中使用 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 的扩增引物对扩增 HLA-B 基因。
- 10 4. 权利要求 1 的方法, 其中使用 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 的扩增引物对扩增 HLA-C 基因。
5. 一种 HLA 基因分型方法, 所述方法包括:
 - (1) 使用选自 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4, 和/或 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 的扩增引物对进行 PCR 扩增, 扩增待测样本的 HLA-A、HLA-B 和/或 HLA-C 的全长基因,
15
 - (2) 使用一种或多种选自 SEQ ID NO: 7 至 SEQ ID NO: 24 的测序引物对 PCR 产物进行扩增, 分别扩增 HLA-A、HLA-B 和/或 HLA-C 的各外显子, 然后对扩增出的各外显子进行测序, 并将测序结果与数据库中的标准序列进行比较, 从而确定基因分型结果。
20
6. 权利要求 5 的方法, 其中使用 SEQ ID NO: 7 至 SEQ ID NO: 12 的测序引物扩增 HLA-A 的各外显子; 使用 SEQ ID NO: 13 至 SEQ ID NO: 18 的测序引物扩增 HLA-B 的各外显子; 使用 SEQ ID NO: 19 至 SEQ ID NO: 24 的测序引物扩增 HLA-C 的各外显子。
- 25 7. 权利要求 5 的方法, 其中分别使用 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4, 以及 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 的扩增引物对进行 PCR 扩增, 扩增出 HLA-A、HLA-B 以及 HLA-C 的全长基因。
8. 具有 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 24 任一项所示序列的多核苷酸。
- 30 9. 一种用于进行 HLA 基因分型的试剂盒, 所述试剂盒中包括一对或多

对选自 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4, 或 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 的 PCR 扩增引物对, 以及一种或多种选自 SEQ ID NO: 7 至 SEQ ID NO: 24 的测序引物。

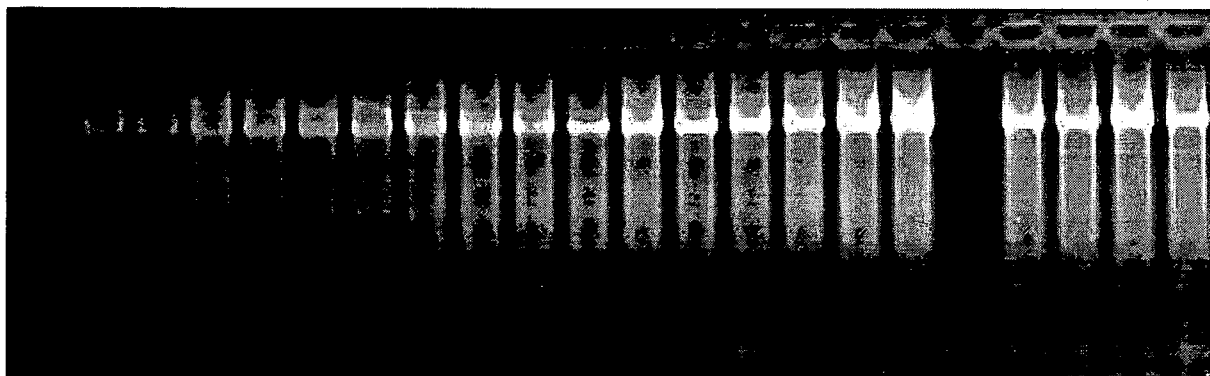


图 1

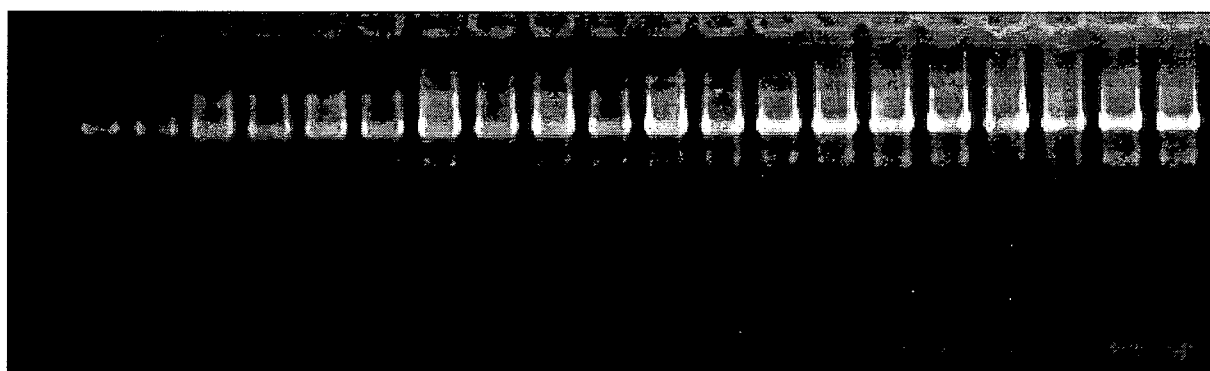


图 2

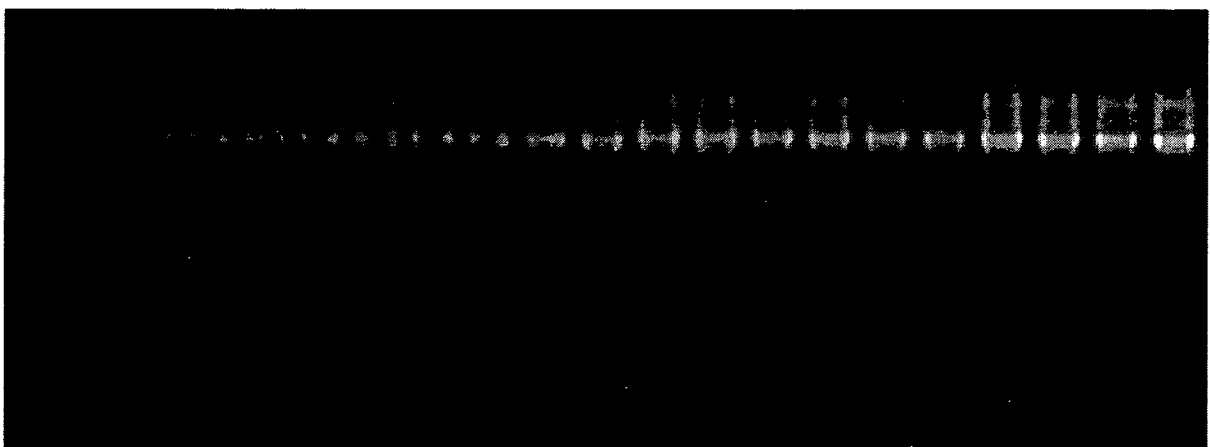


图 3

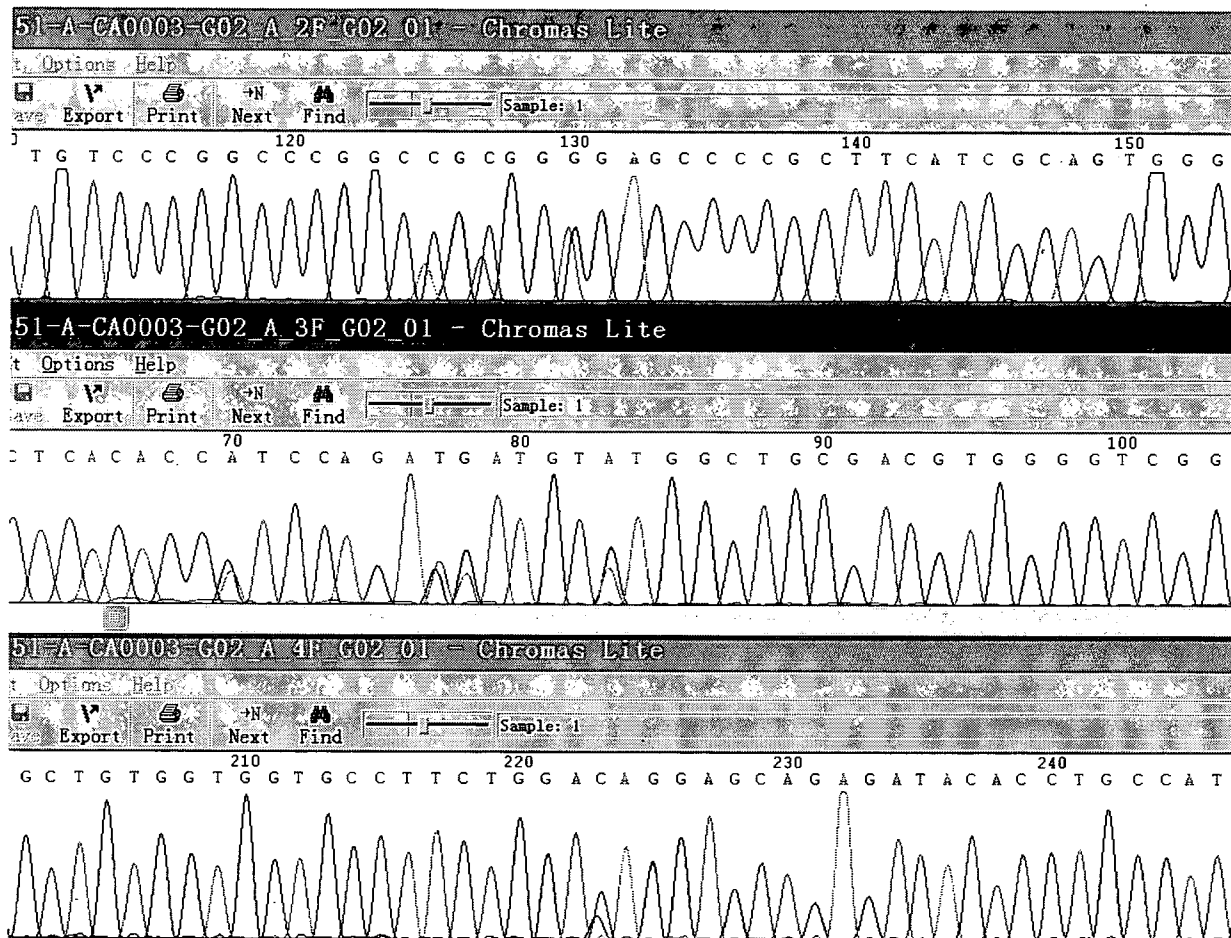


图 4

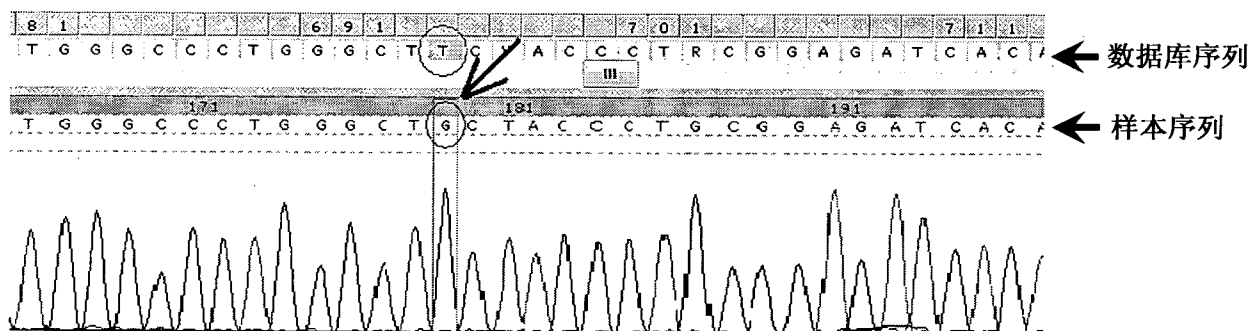


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/001480

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

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: C12P; C12Q; C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRS; CNKI; WPI; EPODOC; MEDLINE and keywords: HLA, MHC, typing, genotype, sequencing, amplify, primer, full length, etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DUNN, P.P.J. et al. Sequencing protocols for detection of HLA class I polymorphism. <i>Methods in Molecular Biology: MHC Protocols</i> . Totowa: Humana Press Inc., 2002, pages 191-222 page 192, lines 20-27, page 200, section 3.1, page 201, section 3.2 (3.), page 203, section 3.2.2, page 203, section 3.3, tables 1 and 4	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 22 Dec. 2010 (22.12.2010)	Date of mailing of the international search report 06 Jan. 2011 (06.01.2011)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer YANG, Zhenyu Telephone No. (86-10)62411111

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/001480

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	COX, S.T. et al. Cloning and sequencing full-length HLA-B and -C genes. Tissue Antigens. January 2003, vol. 61, No. 1, pages 20-48 abstract, table 3	1-9
X	CURRAN, M.D. et al. Long-range PCR amplification as an alternative strategy for characterizing novel HLA-B alleles. European Journal of Immunogenetics. August 1996, vol. 23, No. 4, pages 297-309 abstract, table 1	1, 3, 5-9
A	US 2006078930 A1 (BOEING CO) 13 Apr. 2006 (13.04.2006) abstract, table 1	1-9
P, X	CN 101654691 A (SHENZHEN BGI TECHNOLOGY CO LTD) 24 Feb. 2010 (24.02.2010) claims 1-9	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2010/001480

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 2006078930 A1	13.04.2006	US 2005102814 A1	19.05.2005
		WO 2005049304 A1	02.06.2005
		EP 1691969 A1	23.08.3006
		JP 2007511404 T	10.05.2007
		US 7228611 B2	12.06.2007
CN 101654691 A	24.02.2010	NONE	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/001480

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 19/34 (2006.01) i

C12Q 1/68 (2006.01) i

C12N 15/11 (2006.01) i

A. 主题的分类

见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12P; C12Q; C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CPRS; CNKI 和关键词: HLA、人白细胞抗原、HMC、主要组织相容性复合体、分型、基因型、测序、扩增、引物, 全长, 等

WPI; EPODOC; MEDLINE 和关键词: HLA, MHC, typing, genotype, sequencing, amplify, primer, full length, 等

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	DUNN, P.P.J.等, Sequencing protocols for detection of HLA class I polymorphism. <i>Methods in Molecular Biology: MHC Protocols</i> . Totowa: Humana Press Inc., 2002 年, 第 191-222 页 第 192 页第 20-27 行, 第 200 页第 3.1 节, 第 201 页第 3.2 节 3., 第 203 页第 3.2.2 节, 第 203 页第 3.3 节, 表 1, 表 4	1-9

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

22.12 月 2010 (22.12.2010)

国际检索报告邮寄日期

06.1 月 2011 (06.01.2011)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

授权官员

杨振宇

电话号码: (86-10) 62411111

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	COX, S.T.等, Cloning and sequencing full-length HLA-B and -C genes. Tissue Antigens. 1 月 2003 年, 第 61 卷, 第 1 期, 第 20-48 页 摘要, 表 3	1-9
X	CURRAN, M.D.等, Long-range PCR amplification as an alternative strategy for characterizing novel HLA-B alleles. European Journal of Immunogenetics. 8 月 1996 年, 第 23 卷, 第 4 期, 第 297-309 页 摘要, 表 1	1, 3, 5-9
A	US 2006078930 A1 (BOEING CO) 13.4 月 2006 (13.04.2006) 摘要, 表 1	1-9
P, X	CN 101654691 A (深圳华大基因科技有限公司) 24.2 月 2010 (24.02.2010) 权利要求 1-9	1-9

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/001480

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
US 2006078930 A1	13.04.2006	US 2005102814 A1	19.05.2005
		WO 2005049304 A1	02.06.2005
		EP 1691969 A1	23.08.3006
		JP 2007511404 T	10.05.2007
		US 7228611 B2	12.06.2007
CN 101654691 A	24.02.2010	无	

A. 主题的分类

C12P 19/34 (2006.01) i

C12Q 1/68 (2006.01) i

C12N 15/11 (2006.01) i