



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：200930818

(43)公開日：中華民國98(2009)年7月16日

(21)申請案號：097141704

(22)申請日：中華民國97(2008)年10月29日

(51)Int. Cl. : **C12Q1/66 (2006.01)**
G01N33/533 (2006.01)

C12Q1/68 (2006.01)

(30)優先權主張：2007/10/30

美國

60/983,737

(71)申請人：應用生命系統股份有限公司 APPLIED BIOSYSTEMS INC.
美國

(72)發明人：軒尼詩 洛里 HENNESSY, LORI；格林 羅伯特 GREEN, ROBERT

(72)代理人：蔡清福

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：25 項 圖式數：3 共 45 頁

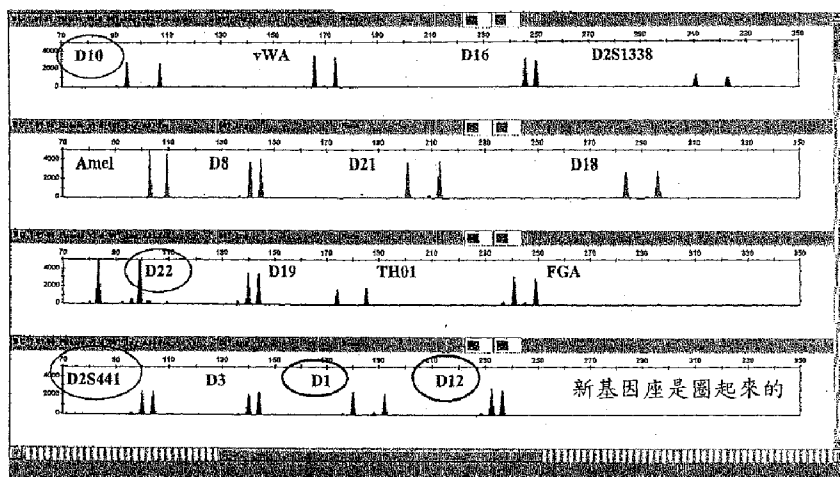
(54)名稱

短串聯重複基因座多工放大方法及套組

METHOD AND KITS FOR MULTIPLEX AMPLIFICATION OF SHORT TANDEM REPEAT LOCI

(57)摘要

揭示一些方法及材料以用於在單一多工反應同時放大基因體DNA的至少11種特定STR基因座，做為用於分析此種反應產物的材料及方法。包含於本發明的是在單一多工反應同時放大16種特定基因座的方法及材料，其包含10 AmpF1STR[®] SGMplus[®] STR基因座、Amelogenin基因座、及5種新的STR基因座，其包含用於分析這些基因座的方法及材料。



Amel：Amelogenin、
性別鑑定基因座

D1：STR基座

D3：STR基座

D8：STR基座

D10：STR基座

D12：STR基座

D16：STR基座

D18：STR基座

D19：STR基座

D21：STR基座

D22：STR基座

D2S441：STR基座

D2S1338：STR基座

FGA：STR基座

STR：短串聯重複序
列

TH01：STR基座

VWA：STR基座



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：200930818

(43)公開日：中華民國98(2009)年7月16日

(21)申請案號：097141704

(22)申請日：中華民國97(2008)年10月29日

(51)Int. Cl. : **C12Q1/66 (2006.01)**
G01N33/533 (2006.01)

C12Q1/68 (2006.01)

(30)優先權主張：2007/10/30

美國

60/983,737

(71)申請人：應用生命系統股份有限公司 APPLIED BIOSYSTEMS INC.
美國

(72)發明人：軒尼詩 洛里 HENNESSY, LORI；格林 羅伯特 GREEN, ROBERT

(72)代理人：蔡清福

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：25 項 圖式數：3 共 45 頁

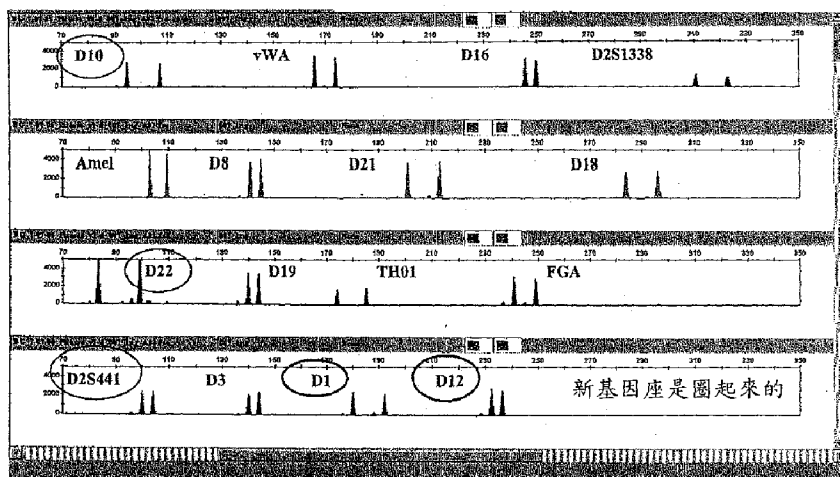
(54)名稱

短串聯重複基因座多工放大方法及套組

METHOD AND KITS FOR MULTIPLEX AMPLIFICATION OF SHORT TANDEM REPEAT LOCI

(57)摘要

揭示一些方法及材料以用於在單一多工反應同時放大基因體DNA的至少11種特定STR基因座，做為用於分析此種反應產物的材料及方法。包含於本發明的是在單一多工反應同時放大16種特定基因座的方法及材料，其包含10 AmpF1STR[®] SGMplus[®] STR基因座、Amelogenin基因座、及5種新的STR基因座，其包含用於分析這些基因座的方法及材料。



Amel：Amelogenin、
性別鑑定基因座

D1：STR基座

D3：STR基座

D8：STR基座

D10：STR基座

D12：STR基座

D16：STR基座

D18：STR基座

D19：STR基座

D21：STR基座

D22：STR基座

D2S441：STR基座

D2S1338：STR基座

FGA：STR基座

STR：短串聯重複序
列

TH01：STR基座

VWA：STR基座

六、發明說明：

【引言】

本發明意旨係大體上關於基因體系統中遺傳標記的偵測，在種種具體實施例，多個不同多態性基因座係同時在一個多工反應放大以決定每一個基座的等位基因。所分析多態性基因座可為短串聯重複序列(STR)基因座，其亦可包含小型-STRs 其產生約 200 個鹼基對或更少的複製子。

【圖式】

熟知該技藝者可了解下文所敘述圖式，係僅用於說明目的，這些圖式不意欲以任何方式限制本發明意旨範圍。

第 1 圖為一種說明由十五個 STR 基因座(十個 SGMplus[®] 基因座加五個基因座)及 Amelogenin 性別鑑定基因座(Amel)的多工放大所產生的複製子(於鹼基對)的相對尺寸範圍的圖，如在實例中所敘述。

第 2 圖為一種得自 SGMplus[®] STR 基座 VWA (vWA)、D16S539 (D16)、D2S1338、D8S1179 (D8)、D21S11 (D21)、D18S51 (D18)、D19S433 (D19)、TH01、FGA、D3S1358 (D3)、性別鑑定基因座 Amelogenin (Amel)、及五種新的 STR 基座(圓圈狀) D10S1248 (D10)、D22S1045 (D22)、D2S441、D1S1656 (D1)及 D12S391 (D12)的同時放大的產物之五色螢光偵測之輸出的圖。基因座係由人類遺傳 DNA 的樣品放大及使用 ABI PRISM[®] 3130 xl 基因分析儀偵測，如在實例中所敘述。四個板，自頂部至底部，係對應於 6-FAM[™]、VIC[®]、NED[™]及 PET[®] 染料標示的尖峰(第五個染料，

LIZ™，係用於標示尺寸標準品，及未示出)。每一個板的x-軸量度鹼基對中放大產品的尺寸。

第3圖為一種當用於實例(6-FAM™、VIC®、NED™、PET®及LIZ™)五種螢光染料，加上可用於一種六個染料多工反應的額外第六個染料(SID)的發射光譜的圖(波長以奈米表示)。

【各種具體實施例敘述】

在此專利說明書中所使用的大多數字眼具熟知該技藝者所使用字眼的意義，在此專利說明書所特別定義的字眼具整體本意旨內文所提供的意義，及係典型上為熟知該技藝者所了解。在字眼或詞語的技藝-所了解定義與在此專利說明書所特定引用字眼或詞語的定義之間存在衝突時，應依循此專利說明書。此處所使用標題僅為方便目的，及不以任何方式建構做為限制。

當用於此處時，"DNA"係表示以其在該技藝中所了解的各種形式的去氧核糖核酸，例如基因體 DNA、cDNA、離體核酸分子、載體 DNA、及染色體 DNA。"核酸"係表示以任何形式的 DNA 或 RNA (核糖核酸)。當用於此處時，名稱"離體核酸分子"係表示一種已自其自然環境移出的核酸分子(DNA 或 RNA)，離體核酸分子的一些實例為包含於載體的重組 DNA 分子，保持在外來宿主細胞的重組 DNA 分子，部份或基本上經純化核酸分子，及合成 DNA 分子。"離體"核酸分子可為無序列的，其在得到核酸的生物體的基因體 DNA 中自然自側邊接於核酸(亦即，位於核酸 5'及 3'

端的序列)。而且，"離體"核酸分子，例如 cDNA 分子，當由重組技術產生時可基本上不含其他細胞物質或是培養介質，或是當化學合成時不含化學前軀體或其他化學物質。

"短串聯重複"或"STR"基因座係表示包含短的、重複序列元素的基因體 DNA 區域，重複的序列元素不限於但是一般為三至七個鹼基對的長度，在 STR 內每一個序列元素重複至少一次及於此處係稱為"重複單元"。名稱 STR 亦包含一種基因體 DNA 的區域，其中超過一個單一重複單元串聯重複或是具插入鹼，只要至少一次序列於串聯中重複至少二次。

"多態性短串聯重複基因座"係表示一種 STR 基因座，其中在基因體 DNA 的特定區域重複序列元素的數目(及序列淨長度)隨等位基因，及隨個體變化。

當用於此處時，"等位基因分型"係表示一種包含來自基因座的經放大等位基因的標準尺寸標記。"等位基因"係表示一種伴隨 DNA 區段的基因變化；亦即佔據相同等位基因的二或更多交替形式的 DNA 區段的其中一個。

"生物化學命名"係表示用於此處的標準生物化學命名，其中核苷酸鹼基係命名為腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)、鳥糞鹼(G)、及胞嘧啶(C)。相對應核苷酸係為，例如，脫氧鳥苷-5'-三磷酸(dGTP)。

"DNA 多態性"係表示 DNA 序列中二或更多不同的核苷酸序列共存於相同遠交群體的情況。

"基因座"或"基因體基因座"係表示一種在染色體上的

特定物理位置，基因座的等位基因係放置於同系物染色體上的相同位置。

"基因座-特定性引子"係表示一種特定地與一部分所敘述基因座或是其互補股，至少基因座的一個等位基因，雜交的引子，及在放大方法所使用條件下不會與其他 DNA 序列有效率地雜交。

"聚合酶連鎖反應"或"PCR"係表示一種技術，其中與引子結合，及使用 DNA 聚合酶酵素延伸的重複變性循環係用於放大標的 DNA 序列的拷貝數目約 10^6 倍或更多。放大核酸的 PCR 方法係涵蓋於美國專利第 4,683,195 號及第 4,683,202 號，其係以其方法敘述併入本文做為方法敘述參考。任何 PCR 的反應條件包含反應的化學成分及其濃度，用於反應循環的溫度，反應循環數目，及反應循環階段時間。

當用於此處時，"放大"係表示酵素地增加特定核苷酸序列的量之方法，此放大不限於但一般是由 PCR 完成。當用於此處時，"變性"係表示兩種互補核苷酸股自結合狀態的分離，變性可由數種因子誘發，例如，緩衝劑的離子強度、溫度、或是中斷鹼配對交互作用的化學物。當用於此處時，"結合"係表示核苷酸股之間的特定交互作用其中這些股基於由 Watson-Crick 鹼配對所決定的股之間的互補性而實質上連接至另一個，互補性不需要為 100% 進行結合。當用於此處時，"延伸"係表示引子寡核苷酸及標的核酸結合之後的放大循環，其中聚合酶酵素作用係使用標的核酸為重複串

聯而延伸引子為適當尺寸的片段。

"引子"係表示一種單股寡核苷酸或 DNA 片段，其與基因座的 DNA 股以一種方式雜交使得引子的 3' 端可做為使用 DNA 聚合酶酵素的聚合及延伸部位。"引子對"係表示包含與在要放大的 DNA 序列的一端的單一股雜交的引子 1，及與在要放大的 DNA 序列的互補股的另一端雜交的引子 2 的兩個引子。"引子部位"係表示引子要雜交的標的 DNA 區域。

"基因標記"一般係為具所欲分析特徵，例如 DNA 分型，的基因體 DNA 的等位基因，其中個體係基於在其 DNA 的變化而區別，大部分 DNA 分型方法係設計以偵測及分析已知以至少兩種不同形式，或等位基因出現於族群的一或更多 DNA 標記區域的長度及/或序列的差異。此種變化係稱為"多態性"，及此種變化發生的任何 DNA 區域係稱為"多態性基因座"。執行 DNA 分型的一個可能方法涉及加入具長度變化多態性分析的 PCR 放大技術(KB Mullis，美國專利第 4,683,202 號)。傳統上 PCR 僅可用於可靠地放大相當小的 DNA 區段；亦即，僅放大長度為 3,000 個鹼基以下的 DNA 區段(M. Ponce 及 L. Micol (1992), NAR 20(3):623; R. Decorte 等(1990), DNA Cell Biol. 9(6):461 469)。短串聯重複序列(STRs)、小衛星序列及可變數目的串聯重複序列(VNTRs)為一些長度變化多樣性的實例。包含小衛星序列或 VNTRs 的 DNA 區段一般為太長而無法由 PCR 可靠地放大。相反地 STRs，其包含約三至七個核苷酸的重複單元，

為足夠短而有用於做為 PCR 應用中的基因標記，因為可設計放大流程以產生較由 DNA 的其他可變長度區域可得到的為小的產品。

常希望在單一放大反應及分離方法中同時放大及偵測多個基因座，同時標的數個基因座以進行分析的此種系統係稱為"多工"系統。已敘述包含多個 STR 基因座的許多此種系統。參考例如，AmpFlSTR[®] SGMplus[™] PCR Amplification Kit User's Manual, Applied Biosystems, pp. i-x 及 1-1 至 1-16 (2001)；AmpFlSTR[®] Identifiler[®] PCR Amplification Kit User's Manual, Applied Biosystems, pp. i-x 及 1-1 至 1-10 (2001)；JW Schumm 等，美國專利第 7,008,771 號。

許多國家的政府維護 DNA 分型資料的資料庫，英國的國家 DNA 資料庫(NDNAD)為最大的此種資料庫，其具約 2.7 百萬人的 DNA 資料，H. Wallace (2006), EMBO reports 7:S26-S30 (*citing* Home Office, 2006)。自從 1999，在 NDNAD 的 DNA 資料已基於由 Applied Biosystems. *Id* 所發展的 SGMplus[®] 系統。在 DNA 資料系統反覆出現的問題為當 DNA 樣品降解時如何辨認個體，在歐洲及美國已在實驗室執行數個研究以比較習知 STRs(範圍在自約 100 至約 450 鹼基對的複製子)與微-STRs(200 鹼基對或更少的複製子)做為分析已降解 DNA 樣品的基因標記，參考例如 LA Dixon 等(2006)，Forensic Sci. Int. 164(1):33-44。結果顯示使用較小尺寸的複製子，例如得自微-STR 基因座，改善了自己降

解 DNA 樣品的分析得到成功結果的機會， *Id.*; MD Coble 及 JM Butler (2005), J. Forensic Sci. 50(1):43-53。The European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI)及 European DNA Profiling (EDNAP)集團同意 DNA 分型的多工 PCR 系統應再造以使得小複製子偵測可進行，及在歐洲內的資料敘述系統的標準化應考慮微-STRs。 P. Gill 等 (2006), Forensic Sci. Int. 156(2-3):242-244。本發明意旨係關於在單一反應中多重長度變化多態性的同時分析，本發明意旨各種具體實施例併入微-STR 基因座於多工放大系統。這些系統對各種應用，包含其於 DNA 分型的使用，為經得起檢驗的。

本發明意旨的方法意欲選擇適當組的基因座、引子、及放大流程以自多個共放大的基因座產生經放大的等位基因(複製子)，可設計此複製子使得在尺寸上不會重疊，及/或可以一種方式標記使得可區別等位基因與在尺寸上重疊的不同基因座。此外，這些方法思考選擇與使用單一放大流程相容的多個 STR 基因座。此處所敘述基因座的特定組合在此應用為獨一的。在本發明意旨各種具體實施例敘述十五個 STR 基因座的共放大，其包含至少八個具最大複製子尺寸為小於約 200 鹼基對的微-STR 基因座。

除了此處所揭示，成功組合可由，例如藉由引子對序列的選擇，及藉由引子濃度的調整所進行的基因座組合的試誤法產生以辨識分析用所有基因座可被放大的一種平衡。一旦這些意旨的方法及資料被揭示，用於這些意旨的

方法及套組的選擇基因座、引子對、及放大技術的各種方法很可能由熟知該技藝者建議。所有此種方法係包含於所附申請專利範圍的範圍內。

本發明意旨方法的實務可以選擇一組至少十一個 STR 基因座(其包含 D16S539、D18S51、D19S433、D21S11、D2S1338、D3S1358、D8S1179、FGA、TH01、VWA、及至少一個 D10S1248、D12S391、D1S1656、D22S1045、及 D2S441)開始，所有這些基因座可在單一多工放大反應共放大。此外或是除了這些 15 個所列出的基因座的其他基因座可包含於多工放大反應。選擇基因座及寡核苷酸引子以在本發明意旨的多工放大反應放大基因座的可能方法係敘述於此處及說明於下列實例。

數種不同技術的任何一個可用於選擇要根據本發明意旨使用的基因座組，下列實例說明發展用於此分析方法的有用基因座組的一種技術。一旦包含該至少十一個 STR 基因座的多工已發展，其可用做產生包含超過這些十一個基因座，及包含 STR 基因座以外的基因座(例如性別鑑定基因座)的多工之核心。於是可產生超過十一個基因座的新組合，其包含該第一組十一個 STR 基因座。

無論使用何種方法選擇要由本發明意旨方法分析的基因座，在各種具體實施例所選擇用於多工分析的基因座共有一或更多下列特徵：(1)它們產生足夠的放大產品以允許 DNA 的等位基因評估；(2)在多工放大步驟期間因為在有效標的基因座的延伸或是非特定性複製子製造期間因為併入

額外鹼基它們產生較少，若有，加工品；及(3)因為由聚合酶的提前終止放大反應它們產生較少，若有，它們產生較少，若有，加工品。參考，例如，JW Schumm 等(1993), Fourth International Symposium on Human Identification, pp. 177-187, Promega Corp。

當用於此處時特別 STR 基因座的名稱係表示指定至這些基因座的名稱因為它們為該技藝中所已知，基因座係在，例如，各種文獻辨識及藉由在下文清單中的各種登錄號辨識，所有這些參考文獻以其全文併入做為參考。下文參考清單僅意欲為基因座資料來源的示例。關於 DNA 區域的資料(其包含這些基因座及意欲用做標的的放大)係為公開提供及可由參考下列及其他參考及/或登錄號而容易發現。適當時，以歸檔時間的目前登錄號實現，由 GenBank® (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD)所提供。參考，對基因座 D3S1358, H. Li 等. (1993), Hum. Mol. Genet. 2:1327; 對 D12S391, MV Lareu 等(1996), Gene 182:151-153; 對 D18S51, RE Staub 等(1993), Genomics 15:48-56; 對 D21S11, V. Sharma 及 M. Litt (1992), Hum. Mol. Genet. 1:67; 對 FGA (FIBRA), KA Mills 等(1992), Hum. Mol. Genet. 1:779; 對 TH01, A. Edwards (1991), Am. J. Hum. Genet. 49:746-756 及 MH Polymeropoulos 等 (1991), Nucleic Acids Res. 19:3753; 對 VWA (vWF), CP Kimpton 等(1992), Hum. Mol. Genet. 1:287; 對 D10S1248, MD Coble 及 JM Butler (2005), J. Forensic Sci. 50(1):43-53; 對 D16S539, J.

Murray 等(1995)，未公開，Cooperative Human Linkage Center，登錄號 G07925；對 D2S1338，J. Murray 等(1995)，未公開，Cooperative Human Linkage Center，登錄號 G08202 及 Watson 等，於 Progress in Forensic Genetics 7: Proceedings of the 17th Int'l ISFH Congress，Oslo, 2-6 September 1997，B. Olaisen 等，eds., pp. 192-194 (Elsevier, Amsterdam)；對 D8S1179，J. Murray 等(1995)，未公開，Cooperative Human Linkage Center，登錄號 G08710，及 NJ Oldroyd 等(1995)，Electrophoresis 16:334-337；對 D22S1045，J. Murray 等(1995)，未公開，Cooperative Human Linkage Center，登錄號 G08085；對 D19S433，J. Murray 等(1995)，未公開，Cooperative Human Linkage Center，登錄號 G08036，及 MV Lareu 等(1997)，於 Progress in Forensic Genetics 7: Proceedings of the 17th Int'l ISFH Congress, Oslo, 2-6 September 1997, B. Olaisen 等，eds., pp. 192-200，Elsevier，Amsterdam；對 D2S441，J. Murray 等(1995)，未公開，Cooperative Human Linkage Center，登錄號 G08184；對 D1S1656，J. Murray 等(1995)，未公開，Cooperative Human Linkage Center，登錄號 G07820。

微-STRs (小於約 200 個鹼基對的基因座)的放大允許高降解 DNA 的輪廓分析，如在 MD Coble (2005)，J. Forensic Sci. 50(1)：43-53 所說明，其係併入本文做為參考。第 1 圖說明上文所敘述所有十五個基因座，加上 Amelogenin 基因座的基因座尺寸範圍以進行尺寸決定。如在第 1 圖所見，

在先前清單所辨識的基因座中的八個包含此種微-STR 基因座：D10S1248、VWA、D8S1179、D22S1045、D19S433、D2S441、D3S1358 及 D1S1656。

根據這些意旨所選擇用於共-放大及分析的基因座組除了該至少十一個 STR 基因座之外可包含至少一個基因座，該額外基因座可包含一種 STR 或是其他序列多態性，或是任何其他特徵，例如，其辨識特別特徵以在族群中分別一個個體的 DNA 與其他個體的 DNA。該額外基因座亦可為辨識所分析 DNA 樣品來源的性別之基因座。當 DNA 樣品為人類基因體 DNA 時，根據本方法可選擇一種性別-辨識基因座例如 Amelogenin 基因座以進行共-放大及分析。Amelogenin 基因座係由 GenBank 辨識為 HUMAMELY(當用於辨識在 Y 染色體上的基因座當存在於雄性 DNA)或是為 HUMAMELX(當用於辨識在 X 染色體上的基因座當存在於雄性或雌性 DNA)。

一旦在單一多工中反應共放大的基因座組被辨識，我們可決定適合用於共放大該組的每一個基因座的引子，可將寡核甘酸引子加至該反應混合物及用於區分經放大 DNA 片段的 5'及 3'端，一個寡核甘酸引子結合至變性模版 DNA 的同義(+)股，及另一個寡核甘酸引子結合至變性模版 DNA 的反義(-)股。典型言之，寡核甘酸引子可為約 12-25 個核甘酸長度，但其尺寸會依據此種參數，例如，要放大模版序列的鹼組合、放大反應條件等，而顯著變化。引子的特定條件並不必要為這些意旨的運作，寡核甘酸引子可設計以

結合至從側面相接所欲基因座的 DNA 特定部分，以特定地放大引子-互補部位之間的 DNA 部分。

寡核甘酸引子可包含腺嘌呤、胸腺嘧啶、鳥嘌呤核、及胞嘧啶核甘，與尿嘧啶、核甘酸類似物(例如，但不限於，肌甘、鎖核酸(LNA)、非-核甘酸連接物、肽核酸(PNA)及亞磷核甘酸)及包含化學基團或是與之共軛的核甘酸，這些化學基團例如放射性核素(例如， ^{32}P 及 ^{35}S)、螢光分子、小溝結合物(MGBs)，或是在該技藝中為已知的任何其他核甘酸共軛物。

一般而言，可化學地合成寡核甘酸引子，在 PCR 最適化引子設計及選擇為例行步驟，熟知該技藝者可容易地設計特定引子以放大所欲標的基因座，或是自此處所列出參考文獻得到引子組。所有這些引子係在本發明意旨範圍內。

要小心選擇用於該多工反應的引子序列，不適當的引子選擇會產生不欲作用例如放大不足、在所欲標的基因座旁的一個部位或多個部位的放大、引子-二聚體形成、不同基因座的引子之間的不欲交互作用、自一個基因座的等位基因(其與另一個基因座的等位基因重疊(例如，於尺寸)的複製子之製造、或是特別適合用於不同基因座的每一個的放大條件或流程之需求，此條件/流程在單一多工系統為不相容的。藉由，例如，使用熟知該技藝者所熟悉的多工最適化重複方法可選擇及發展引子以用於此意旨的多工系統：選擇引子序列，混合用於所選擇基因座的共-放大的引子，共-放大基因座，接著分離及偵測經放大產品以決定引

子於放大反應的有效性。

做為引子選擇的實例，可選擇在此處所引用參考文獻所辨識或是在其他參考文獻所敘述有用於放大任何上文所列出基因座的個別引子及引子對以根據本發明放大及分析 STR 基因座。做為另一實例，引子可由使用在該技藝中可提供及已知發展放大及/或多工系統的各種軟體程式的任一種而選擇，參考例如，Primer Express[®] 軟體 (Applied Biosystems, Foster City, Calif.)。在使用軟體程式的實例中，可將自所欲基因座區域的序列資料載入至軟體，軟體接著使用各種演算法以選擇最符合使用者規格的引子。

起初，此引子選擇方法會產生上文所敘述放大中的不欲影響中的任一個，或是放大產物的不平衡，且因為在一些引子及其對應標的之間的結合強度較其他引子為大使得一些基因座的產品產率較其他基因座為大，例如造成一些基因座的較偏好結合及放大。或者，引子會產生一些不代表標的基因座等位基因本身的放大產物；亦即，會產生非-特定放大產物。得自較差引子設計的無關產物可能因為，例如，引子與樣品 DNA 的非-標的區域之結合，或是甚至與其他引子的結合，接著為結合之後的放大。

當在引子選擇期間不平衡或是非-特定放大產物存在於多工系統時，個別引子可自總多工組取出及用於自相同或其他基因座使用引子的放大以辨識哪一個引子造成放大不平衡或是加工品，一旦辨識出產生一或更多加工品或不平衡的兩個引子，一或兩個促成因素可單獨成對，或是於多

工系統(或是多工系統的子組)改性及重新測試。可重覆此方法直到產品評估產生不具任何或是具可接受程度的放大加工品於多工系統中的放大等位基因。

引子濃度的最適化可在最終引子序列決定前或後執行，但大多數常在引子選擇之後執行。一般言之，增加任何特定基因座的引子濃度會增加對該基因座所產生的產物量。然而，引子濃度最適化亦為一種重複方法因為，例如，自一個基因座增加產品產率會減少自另一個或是其他基因座的產率。而且，引子會彼此交互作用，其會直接影響自各種基因座的放大產物之產率。簡言之，在特定引子組濃度的線性增加並不必然等於相對應基因座的放大產物產率之線性增加。可參考文獻 MJ Simons，美國專利第 5,192,659 號，以得到基因座-特定引子的更詳細敘述，其意旨係以其全文併入此處做為參考。

多工反應中基因座-至-基因座放大產物平衡亦受數個放大流程參數影響，例如，模版(樣品 DNA)輸入數量、所使用放大循環數目、熱循環流程結合溫度、及在循環方法結束時額外延伸步驟的加入或排除。在所有等位基因及基因座的放大產物產率的絕對均勻平衡，在實務上一般無法達到，雖然理論上為希望的。

決定基因座的方法包含多工系統及該系統反應條件的發展亦可為重複方法，亦即，我們可先發展用於小數目基因座的多工系統，此系統不含或是幾乎不含放大加工品及產品不平衡。此系統的引子可接著與另一個基因座或是分

析所欲的數個額外基因座的引子組合，此擴充引子組合可或可不產生放大加工品或不平衡的產品產率。依次，一些基因座可自該系統移除，及/或可引入新的基因座及評估之。

可重覆一或更多上文所敘述該重複選擇方法直到整組引子皆已辨識，其可用於共-放大上文所敘述選擇用於共-放大的該十一個基因座，其包含 STR 基因座 VWA、D16S539、D2S1338、D8S1179、D21S11、D18S51、D19S433、TH01、FGA、D3S1358，及一或更多的 D10S1248、D22S1045、D2S441、D1S1656、及 D12S391。要瞭解可發展許多不同組的引子以放大特別組的基因座。用於本意旨的引子之合成可使用在該技藝中已知及/或商業可提供寡核苷酸合成的任何標準步驟進行。在本發明各種具體實施例，所有十五種這些 STR 基因座可在一個多工放大系統共-放大：VWA、D16S539、D2S1338、D8S1179、D21S11、D18S51、D19S433、TH01、FGA、D3S1358、D10S1248、D22S1045、D2S441、D1S1656、及 D12S391。在本意旨其他具體實施例，所有十五種這些 STR 基因座可在一個多工放大系統共-放大，及包含 DNA 樣品來源的性別決定的 Amelogenin 基因座。

可使用與後續 DNA 放大相容的任何樣品製備步驟來製備基因體 DNA 的樣品以用於本意旨的方法，許多此種步驟為熟知該技藝者所已知。一些實例為藉由酚萃取純化 DNA(J. Sambrook 等(1989)，於 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 9.14-9.19), 及藉由鹽沉澱(S. Miller 等(1988), Nucl. Acids Res. 16:1215)或是螯合(PS Walsh 等(1991), BioTechniques 10:506-513; CT Comey 等 (1994), J. Forensic Sci. 39:1254)的部份純化及使用未處理血液的未純化物質的釋出(J. Burckhardt (1994), PCR Methods and Applications 3:239-243 ; RBE McCabe (1991), PCR Methods and Applications 1:99-106; BY Nordvag (1992), BioTechniques 12:4 pp. 490-492)。

當要使用本意旨方法分析的該至少一個 DNA 樣品為人類基因體 DNA 時，DNA 可由組織樣品例如，一或更多血液、精液、陰道細胞、頭髮、唾液、尿液、骨、口腔樣品、包含胎盤細胞或是胎兒細胞的羊水、絨毛膜細胞、及/或任何這些或其他組織的混合物製備。

選擇性地，DNA 濃度可在用於本意旨方法之前測量，其係使用熟知該技藝者所已知的任何標準 DNA 定量方法，此種定量方法包含，例如，分光光度測量，如由 J. Sambrook 等(1989)所敘述，*supra*, Appendix E.5；或是使用測量技術的螢光方法例如由 CF Brunk 等(1979), Anal. Biochem. 92: 497-500 所敘述。DNA 濃度可由比較 DNA 標準物的雜交量與人類特定探針而測量例如由 JS Waye 等(1991) J. Forensic Sci. 36:1198-1203 (1991)所敘述。使用過多模版 DNA 於放大反應會產生放大加工品，其不會代表純等位基因。

一旦基因體 DNA 樣品已製備，標的基因座可在本意旨

的多工放大步驟共-放大，可使用數種不同放大方法中的任一個放大基因座，例如，PCR (RK Saiki 等(1985), Science 230: 1350-1354)，基於轉錄的放大(DY Kwoh 及 TJ Kwoh (1990)，American Biotechnology Laboratory, October, 1990)及單股置換放大技術(SDA) (GT Walker 等(1992), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 89: 392-396)。在本發明一些具體實施例，多工放大可經由 PCR 做動，其中 DNA 樣品係使用特定於該多工中每一個基因座的引子對進行放大。

標準 PCR 的化學成分一般包含溶劑、DNA 聚合酶、去氧核糖核三磷酸("dNTPs")、寡核甘酸引子、二價金屬離子、及期望包含 PCR 放大的標的之 DNA 樣品，水可用做 PC 的溶劑 R，其典型上包含緩衝劑及非緩衝鹽類例如 KCl，緩衝劑可為在該技藝中已知的任何緩衝劑，例如，但不限於，三羥甲基氨基甲烷-HCl，及可由日常實驗變化以最適化 PCR 結果，普通知曉該技藝者可容易地決定最適緩衝條件，可依據用於放大的特定酶最適化 PCR 緩衝。

二價金屬離子常有利於使聚合酶有效作用，例如，鎂離子為一種使得某些 DNA 聚合酶有效作用的二價金屬離子。典型上可將 $MgCl_2$ 或 $MgSO_4$ 加至反應緩衝劑以供應最適鎂離子濃度，最適 PCR 放大所需的鎂離子濃度係依據所使用特定引子及模版組而定，於是，添加以達到最適放大的鎂鹽的量常常為實驗決定，及在該技藝中為一種日常工作。一般而言，最適 PCR 的鎂離子濃度可在約 1 及約 10 毫莫耳濃度之間變化，PCR 中鎂離子濃度典型範圍可在

約 1.0 及約 4.0 毫莫耳濃度之間，在約 2.5 毫莫耳濃度的中值變化，或者是，可使用二價錳，例如以二氧化錳(MnO_2)的形式，滴定至適合於最適聚合酶活性的濃度，此濃度可由熟知該技藝者使用標準實驗室步驟而容易地決定。

dNTPs，其為用於放大核酸分子的建構組件，可典型地以例如每一個濃度為約 40-200 微莫耳濃度的去氧腺苷三磷酸酯("dATP")、脫氧鳥苷三磷酸酯("dGTP")、去氧胞苷三磷酸酯("dCTP")及去氧胸苷三磷酸酯("dTTP")供應於標準 PCR，亦可使用其他 dNTPs，例如去氧尿苷三磷酸酯("dUTP")、dNTP 類似物(例如，肌苷)，及共軛 dNTPs，及這些係包含於此處所使用的名稱"dNTPs"。當使用每一個在濃度約 40-200 微莫耳濃度的 dNTPs 時，其相符於本意旨方法，每一個高於約 200 μM 微莫耳濃度的 dNTPs 濃度可為有利的，於是在本意旨方法的一些具體實施例，每一個 dNTP 的濃度一般至少為約 500 微莫耳濃度及可高至約 2 毫莫耳濃度，在一些進一步具體實施例，每一個 dNTP 的濃度可範圍自約 0.5 毫莫耳濃度至約 1 毫莫耳濃度。用於任何多工放大的特定 dNTP 濃度可依據多工條件而變化，及可由熟知該技藝者使用標準實驗室步驟而實驗地決定。

在 PCR 中聚合核苷酸三磷酸酯為放大產物的酶可為任何 DNA 聚合酶，該 DNA 聚合酶可為，例如，在該技藝中為已知的任何耐熱聚合酶，一些可用於此意旨的聚合酶實例為得自生物的 DNA 聚合酶例如水生棲熱菌、極端嗜熱菌、嗜熱水生菌、脂肪嗜熱芽孢桿菌、海棲熱袍菌及嗜熱

sp.。酶可由許多可能方法中的任一個得到；例如，自細菌源隔離，由重組 DNA 技術產生或是購自商業來源。一些此種商業可提供 DNA 聚合酶的實例包含 AmpliTaq Gold[®] DNA 聚合酶；AmpliTaq[®] DNA 聚合酶；AmpliTaq[®] DNA 聚合酶 Stoffel Fragment；rTth DNA 聚合酶；及 rTth DNA 聚合酶，XL (所有皆由 Applied Biosystems, Foster City, Calif. 所製造)。合適聚合酶的其他實例包含 Tne、自脂肪嗜熱芽孢桿菌的 Bst DNA 聚合酶大片段、Vent and Vent Exo- 得自嗜熱水生菌、得自脂肪嗜熱芽孢桿菌的 Tma，得自嗜熱 *sp.* 的 Deep Vent 及 Deep Vent Exo- 及 Pfu，及前文的突變體、變異體及衍生物。

PCR 的其他已知成分可在本發明意旨範圍內使用，此種成分的一些實例包含山梨糖醇、表面活性劑(例如，Triton X-100、Nonidet P-40 (NP-40)、吐溫-20)及分裂核苷酸對的不相配之試劑，例如，二甲亞砜(DMSO)、及氯化四甲銨 (TMAC)、及尿嘧啶 N-糖基化酶或是作用以在 PCR 培養或製備期間，PCR 步驟開始之前防止 PCR 的複製子污染及/或產品的不欲生成之其他試劑。

可改變 PCR 循環溫度、循環數目及其期間以最適化特定反應，作為日常實驗，普通知曉該技藝者可認知下列為決定 PCR 各種參數的指引，及亦認知一或更多條件的變化係在本發明意旨範圍內。決定 PCR 中三個階段：變性、結合及延伸的溫度及循環時間，一輪的變性、結合及延伸係稱為一個“循環”，變性一般可在足夠高以允許 DNA 股分

離，但不足以高至破壞聚合酶活性的溫度進行。一般而言，耐熱型聚合酶可用於該反應，耐熱型聚合酶在高溫不會變性而是保有某一程度的活性，然而，若在每一次 PCR 變性步驟之後重新更新，則可使用熱不穩定聚合酶，典型而言，變性可在高於約 90° C 及低於約 100° C 執行。在一些具體實施例，變性可在約 94-95° C 的溫度執行，DNA 的變性一般進行至少約 1 至約 30 秒。在一些具體實施例，變性可進行約 1 至約 15 秒。在其他具體實施例，變性可進行多至約 1 分鐘或更多。除了 DNA 變性之外，對一些聚合酶，例如 AmpliTaq Gold[®]，在變性溫度的培養亦用於活化酶，所以，當使用這些聚合酶時使得 PCR 的第一變性步驟較後續變性步驟為長是有利的。

在結合階段期間，寡核苷酸引子在其互補區域結合至標的 DNA 及實質上由聚合酶延伸，一旦聚合酶結合至引子-模版雙工。在習知 PCR，結合溫度可典型上在或低於最不穩定引子-模版雙工的熔點(T_m)，於此 T_m 可由熟知該技藝者所熟知的許多理論方法中的任一個估計。例如， T_m 可由式子決定：

$$T_m = (4^{\circ}\text{C} \times \text{G 及 C 鹼基的數目}) + (2^{\circ}\text{C} \times \text{A 及 T 鹼基的數目})。$$

典型而言，在標準 PCR，結合溫度可為約 5-10°C 低於所估計最不穩定引子-模版雙工的熔點 T_m 。結合時間可在約 30 秒及約 2 分鐘之間，結合階段典型上係在延伸階段之後，延伸可進行足夠量的時間以允許聚合酶完成成為適當尺寸

的放大產品的引子延伸。

於 PCR 的循環數目(一個循環包含變性、結合及延伸)決定放大程度及後續放大產品量。PCR 產生 DNA 分子的指數式放大，於是，理論上，在每一個 PCR 循環之後存在出現在先前循環的兩倍量的產物，直到 PCR 試劑耗盡及達到平頂(於此沒有進一步放大產品產生)。典型上，會執行約 20-30 個 PCR 循環以達到此平頂，更典型而言，會執行約 25-30 個循環，雖然並未特別限制循環數目。

對一些具體實施例，在 PCR 的最後循環的最後階段之後於某一溫度培養反應為有利的。在一些具體實施例，可選擇加長的延伸階段。在其他具體實施例，可選擇於低溫(例如，約 4°C)培養。

可使用各種方法以評估由多工反應所得到的放大產品混合物中經放大等位基因的產品，例如，螢光標示產品的偵測，放射性同位素標示產品的偵測，放大產品的銀染色或是使用 DNA 嵌入劑染料例如溴化乙錠(EtBr)及 SYBR 綠色菁染料以顯現雙-股放大產品。適合用於接附至引子以用於本發明的螢光標示為數目繁多的，商業可提供的，及該技藝中所熟知。使用螢光分析，至少一種經螢光標示引子可用於每一個基因座的放大。螢光偵測在標示及產品偵測的放射性方法為所欲的，例如，因為螢光偵測不需要使用放射性物質，及於是避免伴隨放射性物質的使用之法規及安全問題。使用經標示引子的螢光偵測亦可選擇用於其他偵測的非放射性方法，例如銀染色及 DNA 嵌入劑，因為偵

測的螢光方法一般較銀染色及 DNA 嵌入劑顯現出較少的放大人工品。此一部分是因為僅具標示接附於其上的 DNA 放大股在螢光偵測被偵測出的事實，於是每一個放大產品的兩個股皆使用銀染色及嵌入劑偵測方法染色及偵測，其產生許多非特定放大人工品的視覺建立，此外，存在伴隨使用 EtBr 及 SYBR 的潛在健康風險，已知 EtBr 為一種致突變原；SYBR，雖然具較 EtBr 為少的致突變原，係一般懸浮於 DMSO，其可快速地通過皮膚。

當引子的螢光標示用於多工反應時，一般可使用至少三種不同標示以標示不同引子，當使用尺寸標誌評估多工反應產品時，用於製備尺寸標誌的引子可使用得自放大該反應中所欲基因座的引子的不同標誌標示，隨著自動化螢光成像及分析，可得到多工放大反應產品的較快速偵測及分析。

在本意旨的一些具體實施例，螢光可用於，例如藉由共價鍵結至引子，來標示多工放大的至少一種引子，由此產生經螢光標示的引子。在一些具體實施例，多工中不同標的基因座的引子可使用不同螢光體標示，依據螢光體放射波長而定，每一個螢光體產生不同顏色的產品。這些各種標示的引子可用於相同多工反應，及它們的各自放大產品接著一起分析。可標示放大特定基因座的前置或反置引子對，雖然前置引子較常被標示。

下列為一些在該技藝中熟知及適合用於本意旨的可能螢光體實例，該清單意欲為實例及不欲為排外性的。一些

可能螢光體包含：螢光素(FL)，其最大在 492 奈米吸收及最大在 520 奈米發射；N,N,N',N'-四甲基-6-羧基若丹明(TAMRA™)，其最大在 555 奈米吸收及最大在 580 奈米發射；5-羧基螢光素(5-FAM™)，其最大在 495 奈米吸收及最大在 525 奈米發射；2',7'-二甲氧基-4',5'-二氯-6-羧基螢光素(JOE™)，其最大在 525 奈米吸收及最大在 555 奈米發射)；6-羧基-X-若丹明(ROX™)，其最大在 585 奈米吸收及最大在 605 奈米發射；CY3™，其最大在 552 奈米吸收及最大在 570 奈米發射；CY5™，其最大在 643 奈米吸收及最大在 667 奈米發射；四氯-螢光素(TET™)，其最大在 521 奈米吸收及最大在 536 奈米發射；及六氯-螢光素(HEX™)，其最大在 535 奈米吸收及最大在 556 奈米發射；NED™，其最大在 546 奈米吸收及最大在 575 奈米發射；6-FAM™，其最大在約 520 奈米發射；VIC®其最大在約 550 奈米發射；PET®其最大在約 590 奈米發射；及 LIZ™，其最大在約 650 奈米發射。參考 SR Coticone 等，美國專利第 6,780,588 號；AmpFlSTR® Identifiler™ PCR Amplification Kit User's Manual, pp. 1-3, Applied Biosystems (2001)。注意上文所列出發射及/或吸收波長為典型的及僅可用於一般指引目的；對不同應用及在不同條件下實際尖峰波長會變化。

本意旨各種具體實施例可包括含有至少四種不同染料的單一多工系統，這些至少四種染料可包含上文所列出染料的任何四種，或是該技藝中已知的任何其他四種染料，或是 6-FAM™、VIC®、NED™及 PET®。本意旨其他具體

實施例可包括含有至少五種不同染料的單一多工系統，這些至少五種染料可包含上文所列出染料的任何五種，或是該技藝中已知的任何其他五種染料，或是 6-FAMTM、VIC[®]、NEDTM、PET[®] 及 LIZTM。參考第 2 圖 DNA 數據之實例，其係由使用五種染料 6-FAMTM、VIC[®]、NEDTM、PET[®] 及 LIZTM 的十六個基因座的多工放大所得到，如在實例所敘述 (LIZTM 的放大尖峰未示出，因為 LIZTM 係用於標示尺寸標準物)。本意旨其他具體實施例可包括含有至少六種不同染料的單一多工系統，這些至少六種染料可包含上文所列出染料的任何六種，或是該技藝中已知的任何其他六種染料，或是 6-FAMTM、VIC[®]、NEDTM、PET[®]、LIZTM 及具在約 620 奈米的最大發射之第六種染料(SID)。參考第 3 圖。

PCR 產品可於篩分或無篩分介質分析。在這些意旨一些具體實施例，例如，PCR 產品可由電泳分析；例如，毛细管電泳，如在 H. Wenz 等(1998)，Genome Res. 8:69-80 (亦參考 E. Buel 等(1998), J. Forensic Sci. 43:(1), pp. 164-170))所敘述，或是平板凝膠電泳，如在 M. Christensen 等(1999), Scand. J. Clin. Lab. Invest. 59(3): 167-177 所敘述，或是變性聚丙烯醯胺凝膠電泳(參考，例如 J. Sambrook 等(1989)，於 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 13.45-13.57)。電泳中 DNA 片段的分離係主要基於不同片段大小，放大產品亦可由層析法分析；例如，藉由尺寸排除色譜(SEC)。

一旦該經放大等位基因被分離，在例如，凝膠或毛細管的這些等位基因及任何其他 DNA(例如，DNA 尺寸標誌或是等位基因分型)可接著視覺化及分析，DNA 的視覺化可使用在該技藝中已知的數種技術的任何一種完成，例如，銀染色或是藉由使用報告基因例如放射性同位素及螢光染料，如此處所敘述，或是化學發光劑及酶與可偵測基質。常常，偵測多工基因座的方法可藉由螢光，參考，例如，JW Schumm 等. in Proceedings from the Eighth International Symposium on Human Identification, pub. 1998 by Promega Corporation, pp. 78-84; E. Buel 等(1998), *supra*。當使用螢光-標示引子偵測在多工反應的每一個引子，放大後可使用螢光偵測劑偵測經標示產品，參考螢光染料敘述，*supra*。

存在於 DNA 樣品中的每一個基因座的等位基因尺寸可由比較在電泳的尺寸標準品，例如已知尺寸的 DNA 標誌而決定，評估包含二或更多多態性 STR 基因座的多工放大之標誌亦包含基因座-特異性等位基因分型或是所評估每一個基因座的等位基因分型之組合，參考例如，C. Puers 等(1993), Am. J. Hum. Genet. 53:953-958; C. Puers 等(1994), Genomics 23:260-264。亦參考，美國專利第 5,599,666; 5,674,686; 及 5,783,406 號的適合用於 STR 基因座偵測的一些等位基因分型之敘述，及所揭示一些分型結構的方法。個別基因座的等位基因分型結構之後，分型可與放大產品同時電泳，每一個等位基因分型與等位基因自相對應基因座共遷移。

本意旨多工反應的產品亦可使用內泳道標準物評估；亦即使用，構型為要在例如，與放大產品相同的毛細管電泳的特定形式的尺寸標誌。該內泳道標準物包含一系列已知長度的片段，該內泳道標準物亦可使用螢光染料標示，其可與在放大反應的其他染料區別。該泳道標準物可與經放大樣品或尺寸標準物/等位基因分型混合及與彼此電泳，以比較在凝膠電泳的不同泳道或是毛細管電泳的不同毛細管的遷移。在該內泳道標準物遷移的差異可用於顯示於分離介質性能的差異，此差異的定量及與等位基因分型相關性可提供用於在不同泳道或是毛細管電泳的放大產品之校正，及於未知樣品中等位基因的尺寸決定之關連。

當使用螢光染料標示放大產品時，經電泳及分離產品可使用螢光偵測裝置分析，例如，ABI PRISM[®] 310 或 3130xl 基因分析儀，或是 ABI PRISM[®] 377 DNA 序列儀(Applied Biosystems, Foster City, Calif.)；或是 Hitachi FMBIO[™] II 螢光掃描器(Hitachi Software Engineering America, Ltd., South San Francisco, Calif.)。在本意旨各種具體實施例，PCR 產品可由毛細管凝膠電泳流程與此種電泳儀錶裝置如 ABI PRISM[®] 3130xl 基因分析儀(Applied Biosystems)分析，及經電泳放大產品的等位基因分析可使用例如 Applied Biosystems 的 GeneMapper[®] ID Software v3.2 執行。在其他具體實施例，放大產品可由在，例如，約 4.5%，29:1 丙烯醯胺：雙丙烯醯胺，8 莫耳濃度凝膠電泳(如為 ABI PRISM[®] 377 自動化螢光 DNA 序列儀所製備)中電泳而分離。

本意旨亦相關於使用上文所敘述方法的試劑盒。在一些具體實施例，基本試劑盒可包含具一或更多基因座-特定引子的容器。試劑盒亦可選擇性地包含使用指南，試劑盒亦可包含其他選擇性試劑盒組件，例如，與每一個該特定基因座相關的一或更多等位基因分型，足夠量的放大用酶，促進放大的放大緩衝液，促進酶活性的二價陽離子溶液，在放大期間用於股延伸的 dNTPs，製備電泳用放大產品的負荷溶液，基因體 DNA 做為模版控制組，尺寸標誌以確保物質於分離介質中如所預期遷移，及流程與手冊以教育使用者及限制於使用時的錯誤。在試劑盒中各種試劑量亦可依據數種因素而變化，例如最適方法敏感性。提供測試試劑盒以在手動應用使用或是試劑盒以隨自動偵測器或分析儀使用亦在本意旨範圍內。

個人辨識測試，或是 DNA 分型，可在包含核酸，例如骨、頭髮、血液、組織及其類似物的任何樣品上執行，DNA 可自該樣品及一組所使用引子萃取以放大多工中 DNA 的所欲 STR 基因座組以產生一組放大產品，如此處所敘述。在親子鑑定，特定樣品的放大模式，或是 DNA 數據，可與得自推定受害者(推定匹配源)的已知樣品比較，或是可與得自推定受害者的家族成員(例如，母親及/或父親)的經放大基因座的模式比較，其中相同組的 STR 基因座被放大。STR 基因座放大的模式可用於確認或排除受害者的辨識。在親子鑑定，測試樣品一般可為得自小孩及可進行與來自推定父親的 STR 基因座模式之比較，及/或可與得自小孩母親的

STR 基因座模式匹配。STR 基因座放大的模式可用於確認或排除父親的辨識，特定基因座的放大及比較亦可用於育種的親子鑑定；例如，牛、狗、馬及其他哺乳動物。CR Primmer 等(1995), Mol. Ecol. 4:493-498。

在臨床處理，可使用此種 STR 標誌，例如，以監控骨髓移植中供體植入的程度，在醫院中，這些標誌亦有用於樣品匹配及追蹤。這些標誌亦已進入其他科學領域，例如於人類種族及族群差異的種群生物研究(DB Goldstein 等(1995), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:6723-6727)，進化及物種差異性，及於動物與植物的變化(MW Bruford 等(1993)，Curr. Biol. 3:939-943)。

參考文獻、專利、專利申請案、科學文獻及其他出版品，與此處所參考 GenBank 資料庫序列的登錄號，係皆以其全文併入做為參考。

【實例】

本意旨方面可參考下列實例而進一步了解，此實例在任何方面不應建構為限制本意旨範圍。

在某些具體實施例，將要分析的 DNA 樣品與 STR- 及 Amelogenin-特定引子組合併於 PCR 混合物中以放大基因座 D16S539、D18S51、D19S433、D21S11、D2S1338、D3S1358、D8S1179、FGA、TH01、VWA、Amelogenin，及五種新的 STR 基因座 D10S1248、D12S391、D1S1656、D22S1045、及 D2S441。這些基因座的引子組係根據此處所提供方法設計，放大 D10S1248、VWA、D16S539 及 D2S1338

的每一個引子組的一個引子係以 6-FAM™ 螢光標誌標示，放大 Amelogenin、D8S1179、D21S11 及 D18S51 的每一個引子組的一個引子係以 VIC® 螢光標誌標示，放大 D22S1045、D19S433、TH01 及 FGA 的每一個引子組的一個引子係以 NED™ 螢光標誌標示，放大 D2S441、D3S1358、D1S1656 及 D12S391 的每一個引子組的一個引子係以 PET® 螢光標誌標示，第五種螢光標誌，LIZ™，係用於標示尺寸標準物。

反應混合物接著進行聚合酶連鎖反應，放大產品係由 STR 及 Amelogenin 基因座產生，且經標示引子併入放大產品。放大產品於是以 6-FAM™、VIC®、NED™ 或 PET® 螢光標誌標示，所有或部分反應混合物於單一毛細管通道在放大反應後進行毛細管電泳。亦電泳該 LIZ™-標示尺寸標準物。自螢光標誌的放射在單一輸出偵測及顯示。第 2 圖為使用五種染料放大 16 個基因座的 DNA 資料(LIZ™-標示尺寸標準物未示出)，STR 及 Amelogenin 基因座遷移通過該通道的速率係為其尺寸的函數，STR 及 Amelogenin 放大產品的尺寸及其標誌的顏色辨識每一個基因座的等位基因。

如熟知該技藝者所了解，可對各種本意旨各種具體實施例進行數種變化及修改而不偏離本意旨精神，意欲包含所有此種變化於本意旨範圍內。

【主要元件符號說明】

D10、D22、D2S441、D1、STR 基座

D12、VWA、D16、D2S1338、

D8、D21、D18、D19、TH01、

FGA、D3、D10S1248、

D16S539、D2S1338、

D8S1179、D21S11、D18S51、

D22S1045、FGA、D3S1358、

D1S1656、D12S391

STR

短串聯重複序列

Amel

Amelogenin、性別鑑定基

因座

6-FAM、VIC、NED、PET、染料

LIZ、SID

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：097141704

※ 申請日期：97 年 10 月 29 日

※IPC 分類：

C12Q 1/66 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

短串聯重複基因座多工放大方法及套組/Method and Kits for
Multiplex Amplification of Short Tandem Repeat Loci

二、中文發明摘要：

揭示一些方法及材料以用於在單一多工反應同時放大基因體 DNA 的至少 11 種特定 STR 基因座，做為用於分析此種反應產物的材料及方法。包含於本發明的是在單一多工反應同時放大 16 種特定基因座的方法及材料，其包含 10 AmpFlSTR® SGMplus® STR 基因座、Amelogenin 基因座、及 5 種新的 STR 基因座，其包含用於分析這些基因座的方法及材料。

三、英文發明摘要：

Methods and materials are disclosed for use in simultaneously amplifying at least 11 specific STR loci of genomic DNA in a single multiplex reaction, as are methods and materials for use in the analysis of the products of such reactions. Included in the present invention are materials and methods for the simultaneous amplification of 16 specific loci in a single multiplex reaction, comprising the 10 AmpF1STR[®] SGMplus[®] STR loci, the Amelogenin locus, and 5 new STR loci, including methods and materials for the analysis of these loci.

七、申請專利範圍：

1. 一種方法，其包含：
 - (a) 於多工之放大的反應中共放大要分析的至少一 DNA 樣品的一組基因座，其中該反應的產物係為該組中來自共放大基因座的經放大等位基因的一混合物，其中該組基因座係包含 10 個 STR 基因座 D16S539、D18S51、D19S433、D21S11、D2S1338、D3S1358、D8S1179、FGA、TH01、VWA；及由 STR 基因座 D10S1248、D12S391、D1S1656、D22S1045、及 D2S441 所組成的族群的其中之一或更多；
 - (b) 評估該混合物的該經放大等位基因，以決定在該至少一個 DNA 樣品內的該組基因座中存在於所分析的每一個基因座的等位基因。
2. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中在步驟(a)的該組基因座係進一步包含可用於辨識該至少一個 DNA 樣品的來源之性別的一基因座。
3. 如申請專利範圍第 2 項的方法，其中該 DNA 樣品的該來源係為人類，及用於辨識人類性別的該基因座係為一 Amelogenin 基因座。
4. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其進一步包含在該評估的步驟之前分離該經放大等位基因之步驟。
5. 如申請專利範圍第 4 項的方法，其中該經放大等位基因係由毛細管凝膠電泳分離。
6. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該共放大的步驟

係包含使用一對寡核甘酸引子於該組基因座的每一個基因座，在該多工的反應中該對的引子的每一個位於該組基因座的一個基因座兩側。

7. 如申請專利範圍第 6 項的方法，其中每一對寡核甘酸引子的至少一個引子係為一經標示引子。
8. 如申請專利範圍第 7 項的方法，其中該經標示引子的標籤係為一螢光標誌。
9. 如申請專利範圍第 8 項的方法，其中該共放大的步驟係包含使用至少五螢光標示的寡核甘酸引子，其中該至少五標示引子由至少五不同螢光標示分別共價接附。
10. 如申請專利範圍第 8 項的方法，其中該共放大的步驟係包含使用至少六螢光標示的寡核甘酸引子，其中該至少六標示引子由至少六不同螢光標示分別共價接附。
11. 如申請專利範圍第 10 項的方法，其中該至少六種不同螢光標示係包含
於 520 奈米發射自己的最大螢光之一第一螢光標示、
於 550 奈米發射自己的最大螢光之一第二螢光標示、
於 575 奈米發射自己的最大螢光之一第三螢光標示、
於 590 奈米發射自己的最大螢光之一第四螢光標示、
於 650 奈米發射自己的最大螢光之一第五螢光標示、
及於 620 奈米發射自己的最大螢光之一第六螢光標示。
12. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中在所選擇該組基

因座的每一個基因座係使用一聚合酶連鎖反應而被共放大。

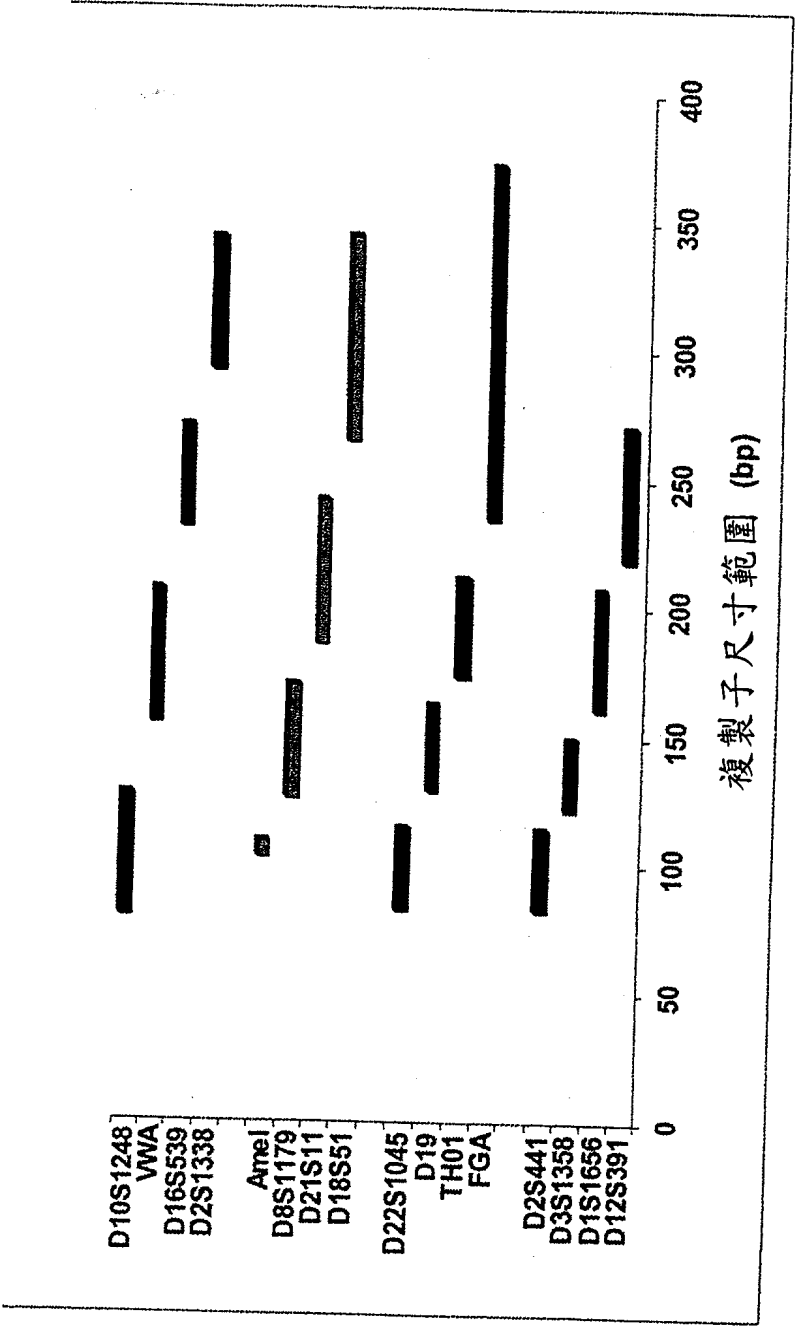
13. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中要分析的該至少一個 DNA 樣品係由人類組織製備。
14. 如申請專利範圍第 13 項的方法，其中該人類組織係由血液、精液、陰道細胞、頭髮、唾液、尿液、骨、口腔樣品、包含胎盤細胞的羊水，及包含胎兒細胞的羊水所組成族群的其中之一或更多選出。
15. 一種試劑盒，其包含用於共放大要分析的至少一個要分析 DNA 樣品的一組基因座的寡核甘酸引子；其中該組基因座可被共放大；其中該引子係在一或更多容器中；及其中該組基因座係包含 Amelogenin 基因座，該 10 個 STR 基因座 D16S539、D18S51、D19S433、D21S11、D2S1338、D3S1358、D8S1179、FGA、TH01、VWA、及由 STR 基因座 D10S1248、D12S391、D1S1656、D22S1045、及 D2S441 所組成的族群的其中之一或更多。
16. 如申請專利範圍第 15 項的試劑盒，其中在該試劑盒的所有寡核甘酸引子係在一容器中。
17. 如申請專利範圍第 15 項的試劑盒，其進一步包含用於至少一多工放大反應的試劑。
18. 如申請專利範圍第 15 項的試劑盒，其進一步包含具至少一尺寸標準物的一容器。
19. 如申請專利範圍第 18 項的試劑盒，其中該尺寸標準物

係為一 DNA 標誌。

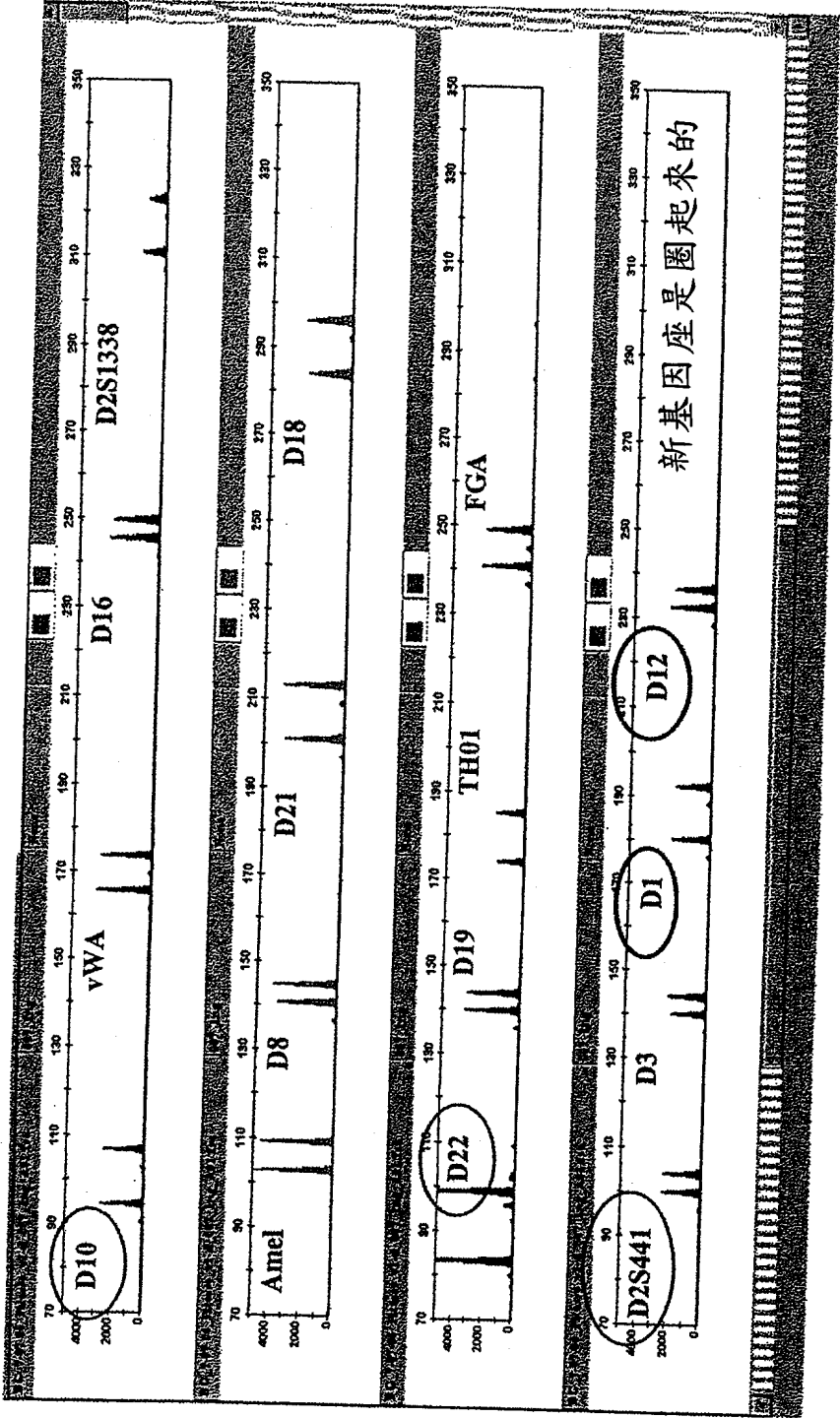
20. 如申請專利範圍第 18 項的試劑盒，其中該尺寸標準物係為一基因座-特定等位基因分型。
21. 如申請專利範圍第 20 項的試劑盒，其中每一該基因座-特定等位基因分型及在該組基因座的每一基因座的至少一寡核苷酸引子係由一螢光標誌共價地接附，及該寡核苷酸引子的至少兩個係由一與該容器中其他引子不同的螢光標誌所共價地接附。
22. 如申請專利範圍第 21 項的試劑盒，其中該經標示引子中的至少五個係由至少五不同螢光標誌分別共價地接附。
23. 如申請專利範圍第 22 項的試劑盒，其中該至少五不同螢光標誌係包含
於 520 奈米發射自己的最大螢光之一第一螢光標示、
於 550 奈米發射自己的最大螢光之一第二螢光標示、
於 575 奈米發射自己的最大螢光之一第三螢光標示、
於 590 奈米發射自己的最大螢光之一第四螢光標示、
及於 650 奈米發射自己的最大螢光之一第五螢光標示。
24. 如申請專利範圍第 21 項的試劑盒，其中該經標示引子中的至少六個係由至少六不同螢光標誌分別共價地接附。
25. 如申請專利範圍第 24 項的試劑盒，其中該至少六不同螢光標誌係包含
於 520 奈米發射自己的最大螢光之一第一螢光標示、

於 550 奈米發射自己的最大螢光之一第二螢光標示、
於 575 奈米發射自己的最大螢光之一第三螢光標示、
於 590 奈米發射自己的最大螢光之一第四螢光標示、
於 650 奈米發射自己的最大螢光之一第五螢光標示、
及於 620 奈米發射自己的最大螢光之一第六螢光標示。

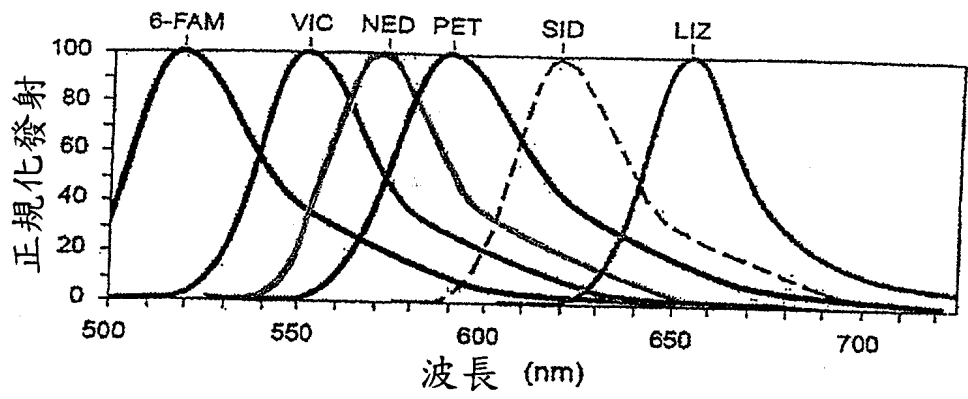
八、圖式：



第 1 圖



第 2 圖



第 3 圖

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (2) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

D10、D22、D2S441、D1、STR 基座

D12、VWA、D16、D2S1338、

D8、D21、D18、D19、TH01、

FGA、D3

STR

短串聯重複序列

Amel

Amelogenin、性別鑑定基

因座

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：097141704

※申請日期：97年10月29日

※IPC 分類：

C12Q 1/66 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

短串聯重複基因座多工放大方法及套組/Method and Kits
for Multiplex Amplification of Short Tandem Repeat Loci

二、中文發明摘要：

揭示一些方法及材料以用於在單一多工反應同時放大基因體 DNA 的至少 11 種特定 STR 基因座，做為用於分析此種反應產物的材料及方法。包含於本發明的是在單一多工反應同時放大 16 種特定基因座的方法及材料，其包含 10 AmpFlSTR[®] SGMplus[®] STR 基因座、Amelogenin 基因座、及 5 種新的 STR 基因座，其包含用於分析這些基因座的方法及材料。

六、發明說明：

【引言】

本發明意旨係大體上關於基因體系統中遺傳標記的偵測，在種種具體實施例，多個不同多態性基因座係同時在一個多工反應放大以決定每一個基座的等位基因。所分析多態性基因座可為短串聯重複序列(STR)基因座，其亦可包含小型-STRs 其產生約 200 個鹼基對或更少的複製子。

【圖式】

熟知該技藝者可了解下文所敘述圖式，係僅用於說明目的，這些圖式不意欲以任何方式限制本發明意旨範圍。

第 1 圖為一種說明由十五個 STR 基因座(十個 SGMplus[®] 基因座加五個基因座)及 Amelogenin 性別鑑定基因座(Amel)的多工放大所產生的複製子(於鹼基對)的相對尺寸範圍的圖，如在實例中所敘述。

第 2 圖為一種得自 SGMplus[®] STR 基座 VWA (vWA)、D16S539 (D16)、D2S1338、D8S1179 (D8)、D21S11 (D21)、D18S51 (D18)、D19S433 (D19)、TH01、FGA、D3S1358 (D3)、性別鑑定基因座 Amelogenin (Amel)、及五種新的 STR 基座(圓圈狀) D10S1248 (D10)、D22S1045 (D22)、D2S441、D1S1656 (D1)及 D12S391 (D12)的同時放大的產物之五色螢光偵測之輸出的圖。基因座係由人類遺傳 DNA 的樣品放大及使用 ABI PRISM[®] 3130 xl 基因分析儀偵測，如在實例中所敘述。四個板，自頂部至底部，係對應於 6-FAM[™]、VIC[®]、NED[™]及 PET[®] 染料標示的尖峰(第五個染料，

LIZ™，係用於標示尺寸標準品，及未示出)。每一個板的 x-軸量度鹼基對中放大產品的尺寸。

第 3 圖為一種當用於實例(6-FAM™、VIC®、NED™、PET®及 LIZ™)五種螢光染料，加上可用於一種六個染料多工反應的額外第六個染料(SID)的發射光譜的圖(波長以奈米表示)。

【各種具體實施例敘述】

在此專利說明書中所使用的大多數字眼具熟知該技藝者所使用字眼的意義，在此專利說明書所特別定義的字眼具整體本意旨內文所提供的意義，及係典型上為熟知該技藝者所了解。在字眼或詞語的技藝-所了解定義與在此專利說明書所特定引用字眼或詞語的定義之間存在衝突時，應依循此專利說明書。此處所使用標題僅為方便目的，及不以任何方式建構做為限制。

當用於此處時，"DNA"係表示以其在該技藝中所了解的各種形式的去氧核糖核酸，例如基因體 DNA、cDNA、離體核酸分子、載體 DNA、及染色體 DNA。"核酸"係表示以任何形式的 DNA 或 RNA (核糖核酸)。當用於此處時，名稱"離體核酸分子"係表示一種已自其自然環境移出的核酸分子(DNA 或 RNA)，離體核酸分子的一些實例為包含於載體的重組 DNA 分子，保持在外來宿主細胞的重組 DNA 分子，部份或基本上經純化核酸分子，及合成 DNA 分子。"離體"核酸分子可為無序列的，其在得到核酸的生物體的基因體 DNA 中自然自側邊接於核酸(亦即，位於核酸 5'及 3'

端的序列)。而且，"離體"核酸分子，例如 cDNA 分子，當由重組技術產生時可基本上不含其他細胞物質或是培養介質，或是當化學合成時不含化學前軀體或其他化學物質。

"短串聯重複"或"STR"基因座係表示包含短的、重複序列元素的基因體 DNA 區域，重複的序列元素不限於但是一般為三至七個鹼基對的長度，在 STR 內每一個序列元素重複至少一次及於此處係稱為"重複單元"。名稱 STR 亦包含一種基因體 DNA 的區域，其中超過一個單一重複單元串聯重複或是具插入鹼，只要至少一次序列於串聯中重複至少二次。

"多態性短串聯重複基因座"係表示一種 STR 基因座，其中在基因體 DNA 的特定區域重複序列元素的數目(及序列淨長度)隨等位基因，及隨個體變化。

當用於此處時，"等位基因分型"係表示一種包含來自基因座的經放大等位基因的標準尺寸標記。"等位基因"係表示一種伴隨 DNA 區段的基因變化；亦即佔據相同等位基因的二或更多交替形式的 DNA 區段的其中一個。

"生物化學命名"係表示用於此處的標準生物化學命名，其中核苷酸鹼基係命名為腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)、鳥糞鹼(G)、及胞嘧啶(C)。相對應核苷酸係為，例如，脫氧鳥苷-5'-三磷酸(dGTP)。

"DNA 多態性"係表示 DNA 序列中二或更多不同的核苷酸序列共存於相同遠交群體的情況。

"基因座"或"基因體基因座"係表示一種在染色體上的

特定物理位置，基因座的等位基因係放置於同系物染色體上的相同位置。

"基因座-特定性引子"係表示一種特定地與一部分所敘述基因座或是其互補股，至少基因座的一個等位基因，雜交的引子，及在放大方法所使用條件下不會與其他 DNA 序列有效率地雜交。

"聚合酶連鎖反應"或"PCR"係表示一種技術，其中與引子結合，及使用 DNA 聚合酶酵素延伸的重複變性循環係用於放大標的 DNA 序列的拷貝數目約 10^6 倍或更多。放大核酸的 PCR 方法係涵蓋於美國專利第 4,683,195 號及第 4,683,202 號，其係以其方法敘述併入本文做為方法敘述參考。任何 PCR 的反應條件包含反應的化學成分及其濃度，用於反應循環的溫度，反應循環數目，及反應循環階段時間。

當用於此處時，"放大"係表示酵素地增加特定核苷酸序列的量之方法，此放大不限於但一般是由 PCR 完成。當用於此處時，"變性"係表示兩種互補核苷酸股自結合狀態的分離，變性可由數種因子誘發，例如，緩衝劑的離子強度、溫度、或是中斷鹼配對交互作用的化學物。當用於此處時，"結合"係表示核苷酸股之間的特定交互作用其中這些股基於由 Watson-Crick 鹼配對所決定的股之間的互補性而實質上連接至另一個，互補性不需要為 100% 進行結合。當用於此處時，"延伸"係表示引子寡核苷酸及標的核酸結合之後的放大循環，其中聚合酶酵素作用係使用標的核酸為重複串

聯而延伸引子為適當尺寸的片段。

"引子"係表示一種單股寡核苷酸或 DNA 片段，其與基因座的 DNA 股以一種方式雜交使得引子的 3' 端可做為使用 DNA 聚合酶酵素的聚合及延伸部位。"引子對"係表示包含與在要放大的 DNA 序列的一端的單一股雜交的引子 1，及與在要放大的 DNA 序列的互補股的另一端雜交的引子 2 的兩個引子。"引子部位"係表示引子要雜交的標的 DNA 區域。

"基因標記"一般係為具所欲分析特徵，例如 DNA 分型，的基因體 DNA 的等位基因，其中個體係基於在其 DNA 的變化而區別，大部分 DNA 分型方法係設計以偵測及分析已知以至少兩種不同形式，或等位基因出現於族群的一或更多 DNA 標記區域的長度及/或序列的差異。此種變化係稱為"多態性"，及此種變化發生的任何 DNA 區域係稱為"多態性基因座"。執行 DNA 分型的一個可能方法涉及加入具長度變化多態性分析的 PCR 放大技術(KB Mullis，美國專利第 4,683,202 號)。傳統上 PCR 僅可用於可靠地放大相當小的 DNA 區段；亦即，僅放大長度為 3,000 個鹼基以下的 DNA 區段(M. Ponce 及 L. Micol (1992), NAR 20(3):623; R. Decorte 等(1990), DNA Cell Biol. 9(6):461 469)。短串聯重複序列(STRs)、小衛星序列及可變數目的串聯重複序列(VNTRs)為一些長度變化多樣性的實例。包含小衛星序列或 VNTRs 的 DNA 區段一般為太長而無法由 PCR 可靠地放大。相反地 STRs，其包含約三至七個核苷酸的重複單元，

為足夠短而有用於做為 PCR 應用中的基因標記，因為可設計放大流程以產生較由 DNA 的其他可變長度區域可得到的為小的產品。

常希望在單一放大反應及分離方法中同時放大及偵測多個基因座，同時標的數個基因座以進行分析的此種系統係稱為"多工"系統。已敘述包含多個 STR 基因座的許多此種系統。參考例如，AmpFlSTR[®] SGMplus[™] PCR Amplification Kit User's Manual, Applied Biosystems, pp. i-x 及 1-1 至 1-16 (2001)；AmpFlSTR[®] Identifiler[®] PCR Amplification Kit User's Manual, Applied Biosystems, pp. i-x 及 1-1 至 1-10 (2001)；JW Schumm 等，美國專利第 7,008,771 號。

許多國家的政府維護 DNA 分型資料的資料庫，英國的國家 DNA 資料庫(NDNAD)為最大的此種資料庫，其具約 2.7 百萬人的 DNA 資料，H. Wallace (2006), EMBO reports 7:S26-S30 (*citing* Home Office, 2006)。自從 1999，在 NDNAD 的 DNA 資料已基於由 Applied Biosystems. *Id* 所發展的 SGMplus[®] 系統。在 DNA 資料系統反覆出現的問題為當 DNA 樣品降解時如何辨認個體，在歐洲及美國已在實驗室執行數個研究以比較習知 STRs(範圍在自約 100 至約 450 鹼基對的複製子)與微-STRs(200 鹼基對或更少的複製子)做為分析已降解 DNA 樣品的基因標記，參考例如 LA Dixon 等(2006)，Forensic Sci. Int. 164(1):33-44。結果顯示使用較小尺寸的複製子，例如得自微-STR 基因座，改善了自己降

解 DNA 樣品的分析得到成功結果的機會， *Id.*; MD Coble 及 JM Butler (2005), J. Forensic Sci. 50(1):43-53。The European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI)及 European DNA Profiling (EDNAP)集團同意 DNA 分型的多工 PCR 系統應再造以使得小複製子偵測可進行，及在歐洲內的資料敘述系統的標準化應考慮微-STRs。 P. Gill 等 (2006), Forensic Sci. Int. 156(2-3):242-244。本發明意旨係關於在單一反應中多重長度變化多態性的同時分析，本發明意旨各種具體實施例併入微-STR 基因座於多工放大系統。這些系統對各種應用，包含其於 DNA 分型的使用，為經得起檢驗的。

本發明意旨的方法意欲選擇適當組的基因座、引子、及放大流程以自多個共放大的基因座產生經放大的等位基因(複製子)，可設計此複製子使得在尺寸上不會重疊，及/或可以一種方式標記使得可區別等位基因與在尺寸上重疊的不同基因座。此外，這些方法思考選擇與使用單一放大流程相容的多個 STR 基因座。此處所敘述基因座的特定組合在此應用為獨一的。在本發明意旨各種具體實施例敘述十五個 STR 基因座的共放大，其包含至少八個具最大複製子尺寸為小於約 200 鹼基對的微-STR 基因座。

除了此處所揭示，成功組合可由，例如藉由引子對序列的選擇，及藉由引子濃度的調整所進行的基因座組合的試誤法產生以辨識分析用所有基因座可被放大的一種平衡。一旦這些意旨的方法及資料被揭示，用於這些意旨的

方法及套組的選擇基因座、引子對、及放大技術的各種方法很可能由熟知該技藝者建議。所有此種方法係包含於所附申請專利範圍的範圍內。

本發明意旨方法的實務可以選擇一組至少十一個 STR 基因座(其包含 D16S539、D18S51、D19S433、D21S11、D2S1338、D3S1358、D8S1179、FGA、TH01、VWA、及至少一個 D10S1248、D12S391、D1S1656、D22S1045、及 D2S441)開始，所有這些基因座可在單一多工放大反應共放大。此外或是除了這些 15 個所列出的基因座的其他基因座可包含於多工放大反應。選擇基因座及寡核苷酸引子以在本發明意旨的多工放大反應放大基因座的可能方法係敘述於此處及說明於下列實例。

數種不同技術的任何一個可用於選擇要根據本發明意旨使用的基因座組，下列實例說明發展用於此分析方法的有用基因座組的一種技術。一旦包含該至少十一個 STR 基因座的多工已發展，其可用做產生包含超過這些十一個基因座，及包含 STR 基因座以外的基因座(例如性別鑑定基因座)的多工之核心。於是可產生超過十一個基因座的新組合，其包含該第一組十一個 STR 基因座。

無論使用何種方法選擇要由本發明意旨方法分析的基因座，在各種具體實施例所選擇用於多工分析的基因座共有一或更多下列特徵：(1)它們產生足夠的放大產品以允許 DNA 的等位基因評估；(2)在多工放大步驟期間因為在有效標的基因座的延伸或是非特定性複製子製造期間因為併入

額外鹼基它們產生較少，若有，加工品；及(3)因為由聚合酶的提前終止放大反應它們產生較少，若有，它們產生較少，若有，加工品。參考，例如，JW Schumm 等(1993), Fourth International Symposium on Human Identification, pp. 177-187, Promega Corp。

當用於此處時特別 STR 基因座的名稱係表示指定至這些基因座的名稱因為它們為該技藝中所已知，基因座係在，例如，各種文獻辨識及藉由在下文清單中的各種登錄號辨識，所有這些參考文獻以其全文併入做為參考。下文參考清單僅意欲為基因座資料來源的示例。關於 DNA 區域的資料(其包含這些基因座及意欲用做標的放大)係為公開提供及可由參考下列及其他參考及/或登錄號而容易發現。適當時，以歸檔時間的目前登錄號實現，由 GenBank[®] (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD)所提供。參考，對基因座 D3S1358, H. Li 等. (1993), Hum. Mol. Genet. 2:1327; 對 D12S391, MV Lareu 等(1996), Gene 182:151-153; 對 D18S51, RE Staub 等(1993), Genomics 15:48-56; 對 D21S11, V. Sharma 及 M. Litt (1992), Hum. Mol. Genet. 1:67; 對 FGA (FIBRA), KA Mills 等(1992), Hum. Mol. Genet. 1:779; 對 TH01, A. Edwards (1991), Am. J. Hum. Genet. 49:746-756 及 MH Polymeropoulos 等 (1991), Nucleic Acids Res. 19:3753; 對 VWA (vWF), CP Kimpton 等(1992), Hum. Mol. Genet. 1:287; 對 D10S1248, MD Coble 及 JM Butler (2005), J. Forensic Sci. 50(1):43-53; 對 D16S539, J.

Murray 等(1995)，未公開，Cooperative Human Linkage Center，登錄號 G07925；對 D2S1338，J. Murray 等(1995)，未公開，Cooperative Human Linkage Center，登錄號 G08202 及 Watson 等，於 Progress in Forensic Genetics 7: Proceedings of the 17th Int'l ISFH Congress，Oslo, 2-6 September 1997，B. Olaisen 等，eds., pp. 192-194 (Elsevier, Amsterdam)；對 D8S1179，J. Murray 等(1995)，未公開，Cooperative Human Linkage Center，登錄號 G08710，及 NJ Oldroyd 等(1995)，Electrophoresis 16:334-337；對 D22S1045，J. Murray 等(1995)，未公開，Cooperative Human Linkage Center，登錄號 G08085；對 D19S433，J. Murray 等(1995)，未公開，Cooperative Human Linkage Center，登錄號 G08036，及 MV Lareu 等(1997)，於 Progress in Forensic Genetics 7: Proceedings of the 17th Int'l ISFH Congress, Oslo, 2-6 September 1997, B. Olaisen 等，eds., pp. 192-200，Elsevier，Amsterdam；對 D2S441，J. Murray 等(1995)，未公開，Cooperative Human Linkage Center，登錄號 G08184；對 D1S1656，J. Murray 等(1995)，未公開，Cooperative Human Linkage Center，登錄號 G07820。

微-STRs (小於約 200 個鹼基對的基因座)的放大允許高降解 DNA 的輪廓分析，如在 MD Coble (2005)，J. Forensic Sci. 50(1)：43-53 所說明，其係併入本文做為參考。第 1 圖說明上文所敘述所有十五個基因座，加上 Amelogenin 基因座的基因座尺寸範圍以進行尺寸決定。如在第 1 圖所見，

在先前清單所辨識的基因座中的八個包含此種微-STR 基因座：D10S1248、VWA、D8S1179、D22S1045、D19S433、D2S441、D3S1358 及 D1S1656。

根據這些意旨所選擇用於共-放大及分析的基因座組除了該至少十一個 STR 基因座之外可包含至少一個基因座，該額外基因座可包含一種 STR 或是其他序列多態性，或是任何其他特徵，例如，其辨識特別特徵以在族群中分別一個個體的 DNA 與其他個體的 DNA。該額外基因座亦可為辨識所分析 DNA 樣品來源的性別之基因座。當 DNA 樣品為人類基因體 DNA 時，根據本方法可選擇一種性別-辨識基因座例如 Amelogenin 基因座以進行共-放大及分析。Amelogenin 基因座係由 GenBank 辨識為 HUMAMELY(當用於辨識在 Y 染色體上的基因座當存在於雄性 DNA)或是為 HUMAMELX(當用於辨識在 X 染色體上的基因座當存在於雄性或雌性 DNA)。

一旦在單一多工中反應共放大的基因座組被辨識，我們可決定適合用於共放大該組的每一個基因座的引子，可將寡核甘酸引子加至該反應混合物及用於區分經放大 DNA 片段的 5'及 3'端，一個寡核甘酸引子結合至變性模版 DNA 的同義(+)股，及另一個寡核甘酸引子結合至變性模版 DNA 的反義(-)股。典型言之，寡核甘酸引子可為約 12-25 個核甘酸長度，但其尺寸會依據此種參數，例如，要放大模版序列的鹼組合、放大反應條件等，而顯著變化。引子的特定條件並不必要為這些意旨的運作，寡核甘酸引子可設計以

結合至從側面相接所欲基因座的 DNA 特定部分，以特定地放大引子-互補部位之間的 DNA 部分。

寡核苷酸引子可包含腺嘌呤、胸腺嘧啶、鳥嘌呤核、及胞嘧啶核苷，與尿嘧啶、核苷酸類似物(例如，但不限於，肌苷、鎖核酸(LNA)、非-核苷酸連接物、肽核酸(PNA)及亞磷核苷酸)及包含化學基團或是與之共軛的核苷酸，這些化學基團例如放射性核素(例如， ^{32}P 及 ^{35}S)、螢光分子、小溝結合物(MGBs)，或是在該技藝中為已知的任何其他核苷酸共軛物。

一般而言，可化學地合成寡核苷酸引子，在 PCR 最適化引子設計及選擇為例行步驟，熟知該技藝者可容易地設計特定引子以放大所欲標的基因座，或是自此處所列出參考文獻得到引子組。所有這些引子係在本發明意旨範圍內。

要小心選擇用於該多工反應的引子序列，不適當的引子選擇會產生不欲作用例如放大不足、在所欲標的基因座旁的一個部位或多個部位的放大、引子-二聚體形成、不同基因座的引子之間的不欲交互作用、自一個基因座的等位基因(其與另一個基因座的等位基因重疊(例如，於尺寸)的複製子之製造、或是特別適合用於不同基因座的每一個的放大條件或流程之需求，此條件/流程在單一多工系統為不相容的。藉由，例如，使用熟知該技藝者所熟悉的多工最適化重複方法可選擇及發展引子以用於此意旨的多工系統：選擇引子序列，混合用於所選擇基因座的共-放大的引子，共-放大基因座，接著分離及偵測經放大產品以決定引

子於放大反應的有效性。

做為引子選擇的實例，可選擇在此處所引用參考文獻所辨識或是在其他參考文獻所敘述有用於放大任何上文所列出基因座的個別引子及引子對以根據本發明放大及分析 STR 基因座。做為另一實例，引子可由使用在該技藝中可提供及已知發展放大及/或多工系統的各種軟體程式的任一種而選擇，參考例如，Primer Express[®] 軟體 (Applied Biosystems, Foster City, Calif.)。在使用軟體程式的實例中，可將自所欲基因座區域的序列資料載入至軟體，軟體接著使用各種演算法以選擇最符合使用者規格的引子。

起初，此引子選擇方法會產生上文所敘述放大中的不欲影響中的任一個，或是放大產物的不平衡，且因為在一些引子及其對應標的之間的結合強度較其他引子為大使得一些基因座的產品產率較其他基因座為大，例如造成一些基因座的較偏好結合及放大。或者，引子會產生一些不代表標的基因座等位基因本身的放大產物；亦即，會產生非-特定放大產物。得自較差引子設計的無關產物可能因為，例如，引子與樣品 DNA 的非-標的區域之結合，或是甚至與其他引子的結合，接著為結合之後的放大。

當在引子選擇期間不平衡或是非-特定放大產物存在於多工系統時，個別引子可自總多工組取出及用於自相同或其他基因座使用引子的放大以辨識哪一個引子造成放大不平衡或是加工品，一旦辨識出產生一或更多加工品或不平衡的兩個引子，一或兩個促成因素可單獨成對，或是於多

工系統(或是多工系統的子組)改性及重新測試。可重覆此方法直到產品評估產生不具任何或是具可接受程度的放大加工品於多工系統中的放大等位基因。

引子濃度的最適化可在最終引子序列決定前或後執行，但大多數常在引子選擇之後執行。一般言之，增加任何特定基因座的引子濃度會增加對該基因座所產生的產物量。然而，引子濃度最適化亦為一種重複方法因為，例如，自一個基因座增加產品產率會減少自另一個或是其他基因座的產率。而且，引子會彼此交互作用，其會直接影響自各種基因座的放大產物之產率。簡言之，在特定引子組濃度的線性增加並不必然等於相對應基因座的放大產物產率之線性增加。可參考文獻 MJ Simons，美國專利第 5,192,659 號，以得到基因座-特定引子的更詳細敘述，其意旨係以其全文併入此處做為參考。

多工反應中基因座-至-基因座放大產物平衡亦受數個放大流程參數影響，例如，模版(樣品 DNA)輸入數量、所使用放大循環數目、熱循環流程結合溫度、及在循環方法結束時額外延伸步驟的加入或排除。在所有等位基因及基因座的放大產物產率的絕對均勻平衡，在實務上一般無法達到，雖然理論上為希望的。

決定基因座的方法包含多工系統及該系統反應條件的發展亦可為重複方法，亦即，我們可先發展用於小數目基因座的多工系統，此系統不含或是幾乎不含放大加工品及產品不平衡。此系統的引子可接著與另一個基因座或是分

析所欲的數個額外基因座的引子組合，此擴充引子組合可或可不產生放大加工品或不平衡的產品產率。依次，一些基因座可自該系統移除，及/或可引入新的基因座及評估之。

可重覆一或更多上文所敘述該重複選擇方法直到整組引子皆已辨識，其可用於共-放大上文所敘述選擇用於共-放大的該十一個基因座，其包含 STR 基因座 VWA、D16S539、D2S1338、D8S1179、D21S11、D18S51、D19S433、TH01、FGA、D3S1358，及一或更多的 D10S1248、D22S1045、D2S441、D1S1656、及 D12S391。要瞭解可發展許多不同組的引子以放大特別組的基因座。用於本意旨的引子之合成可使用在該技藝中已知及/或商業可提供寡核苷酸合成的任何標準步驟進行。在本發明各種具體實施例，所有十五種這些 STR 基因座可在一個多工放大系統共-放大：VWA、D16S539、D2S1338、D8S1179、D21S11、D18S51、D19S433、TH01、FGA、D3S1358、D10S1248、D22S1045、D2S441、D1S1656、及 D12S391。在本意旨其他具體實施例，所有十五種這些 STR 基因座可在一個多工放大系統共-放大，及包含 DNA 樣品來源的性別決定的 Amelogenin 基因座。

可使用與後續 DNA 放大相容的任何樣品製備步驟來製備基因體 DNA 的樣品以用於本意旨的方法，許多此種步驟為熟知該技藝者所已知。一些實例為藉由酚萃取純化 DNA(J. Sambrook 等(1989)，於 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 9.14-9.19), 及藉由鹽沉澱(S. Miller 等(1988), Nucl. Acids Res. 16:1215)或是螯合(PS Walsh 等(1991), BioTechniques 10:506-513; CT Comey 等 (1994), J. Forensic Sci. 39:1254)的部份純化及使用未處理血液的未純化物質的釋出(J. Burckhardt (1994), PCR Methods and Applications 3:239-243; RBE McCabe (1991), PCR Methods and Applications 1:99-106; BY Nordvag (1992), BioTechniques 12:4 pp. 490-492)。

當要使用本意旨方法分析的該至少一個 DNA 樣品為人類基因體 DNA 時，DNA 可由組織樣品例如，一或更多血液、精液、陰道細胞、頭髮、唾液、尿液、骨、口腔樣品、包含胎盤細胞或是胎兒細胞的羊水、絨毛膜細胞、及/或任何這些或其他組織的混合物製備。

選擇性地，DNA 濃度可在用於本意旨方法之前測量，其係使用熟知該技藝者所已知的任何標準 DNA 定量方法，此種定量方法包含，例如，分光光度測量，如由 J. Sambrook 等(1989)所敘述，*supra*, Appendix E.5；或是使用測量技術的螢光方法例如由 CF Brunk 等(1979), Anal. Biochem. 92: 497-500 所敘述。DNA 濃度可由比較 DNA 標準物的雜交量與人類特定探針而測量例如由 JS Waye 等(1991) J. Forensic Sci. 36:1198-1203 (1991)所敘述。使用過多模版 DNA 於放大反應會產生放大加工品，其不會代表純等位基因。

一旦基因體 DNA 樣品已製備，標的基因座可在本意旨

的多工放大步驟共-放大，可使用數種不同放大方法中的任一個放大基因座，例如，PCR (RK Saiki 等(1985), Science 230: 1350-1354)，基於轉錄的放大(DY Kwoh 及 TJ Kwoh (1990)，American Biotechnology Laboratory, October, 1990) 及單股置換放大技術(SDA) (GT Walker 等(1992), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 89: 392-396)。在本發明一些具體實施例，多工放大可經由 PCR 做動，其中 DNA 樣品係使用特定於該多工中每一個基因座的引子對進行放大。

標準 PCR 的化學成分一般包含溶劑、DNA 聚合酶、去氧核糖核三磷酸("dNTPs")、寡核甘酸引子、二價金屬離子、及期望包含 PCR 放大的標的之 DNA 樣品，水可用做 PC 的溶劑 R，其典型上包含緩衝劑及非緩衝鹽類例如 KCl，緩衝劑可為在該技藝中已知的任何緩衝劑，例如，但不限於，三羥甲基氨基甲烷-HCl，及可由日常實驗變化以最適化 PCR 結果，普通知曉該技藝者可容易地決定最適緩衝條件，可依據用於放大的特定酶最適化 PCR 緩衝。

二價金屬離子常有利於使聚合酶有效作用，例如，鎂離子為一種使得某些 DNA 聚合酶有效作用的二價金屬離子。典型上可將 $MgCl_2$ 或 $MgSO_4$ 加至反應緩衝劑以供應最適鎂離子濃度，最適 PCR 放大所需的鎂離子濃度係依據所使用特定引子及模版組而定，於是，添加以達到最適放大的鎂鹽的量常常為實驗決定，及在該技藝中為一種日常工作。一般而言，最適 PCR 的鎂離子濃度可在約 1 及約 10 毫莫耳濃度之間變化，PCR 中鎂離子濃度典型範圍可在

約 1.0 及約 4.0 毫莫耳濃度之間，在約 2.5 毫莫耳濃度的中值變化，或者是，可使用二價錳，例如以二氧化錳(MnO_2)的形式，滴定至適合於最適聚合酶活性的濃度，此濃度可由熟知該技藝者使用標準實驗室步驟而容易地決定。

dNTPs，其為用於放大核酸分子的建構組件，可典型地以例如每一個濃度為約 40-200 微莫耳濃度的去氧腺苷三磷酸酯("dATP")、脫氧鳥苷三磷酸酯("dGTP")、去氧胞苷三磷酸酯("dCTP")及去氧胸苷三磷酸酯("dTTP")供應於標準 PCR，亦可使用其他 dNTPs，例如去氧尿苷三磷酸酯("dUTP")、dNTP 類似物(例如，肌苷)，及共軛 dNTPs，及這些係包含於此處所使用的名稱"dNTPs"。當使用每一個在濃度約 40-200 微莫耳濃度的 dNTPs 時，其相符於本意旨方法，每一個高於約 200 μM 微莫耳濃度的 dNTPs 濃度可為有利的，於是在本意旨方法的一些具體實施例，每一個 dNTP 的濃度一般至少為約 500 微莫耳濃度及可高至約 2 毫莫耳濃度，在一些進一步具體實施例，每一個 dNTP 的濃度可範圍自約 0.5 毫莫耳濃度至約 1 毫莫耳濃度。用於任何多工放大的特定 dNTP 濃度可依據多工條件而變化，及可由熟知該技藝者使用標準實驗室步驟而實驗地決定。

在 PCR 中聚合核苷酸三磷酸酯為放大產物的酶可為任何 DNA 聚合酶，該 DNA 聚合酶可為，例如，在該技藝中為已知的任何耐熱聚合酶，一些可用於此意旨的聚合酶實例為得自生物的 DNA 聚合酶例如水生棲熱菌、極端嗜熱菌、嗜熱水生菌、脂肪嗜熱芽孢桿菌、海棲熱袍菌及嗜熱

sp.。酶可由許多可能方法中的任一個得到；例如，自細菌源隔離，由重組 DNA 技術產生或是購自商業來源。一些此種商業可提供 DNA 聚合酶的實例包含 AmpliTaq Gold[®] DNA 聚合酶；AmpliTaq[®] DNA 聚合酶；AmpliTaq[®] DNA 聚合酶 Stoffel Fragment；rTth DNA 聚合酶；及 rTth DNA 聚合酶，XL (所有皆由 Applied Biosystems, Foster City, Calif. 所製造)。合適聚合酶的其他實例包含 Tne、自脂肪嗜熱芽孢桿菌的 Bst DNA 聚合酶大片段、Vent and Vent Exo- 得自嗜熱水生菌、得自脂肪嗜熱芽孢桿菌的 Tma，得自嗜熱 *sp.* 的 Deep Vent 及 Deep Vent Exo- 及 Pfu，及前文的突變體、變異體及衍生物。

PCR 的其他已知成分可在本發明意旨範圍內使用，此種成分的一些實例包含山梨糖醇、表面活性劑(例如，Triton X-100、Nonidet P-40 (NP-40)、吐溫-20)及分裂核苷酸對的不相配之試劑，例如，二甲亞砜(DMSO)、及氯化四甲銨 (TMAC)、及尿嘧啶 N-糖基化酶或是作用以在 PCR 培養或製備期間，PCR 步驟開始之前防止 PCR 的複製子污染及/或產品的不欲生成之其他試劑。

可改變 PCR 循環溫度、循環數目及其期間以最適化特定反應，作為日常實驗，普通知曉該技藝者可認知下列為決定 PCR 各種參數的指引，及亦認知一或更多條件的變化係在本發明意旨範圍內。決定 PCR 中三個階段：變性、結合及延伸的溫度及循環時間，一輪的變性、結合及延伸係稱為一個”循環”，變性一般可在足夠高以允許 DNA 股分

離，但不足以高至破壞聚合酶活性的溫度進行。一般而言，耐熱型聚合酶可用於該反應，耐熱型聚合酶在高溫不會變性而是保有某一程度的活性，然而，若在每一次 PCR 變性步驟之後重新更新，則可使用熱不穩定聚合酶，典型而言，變性可在高於約 90° C 及低於約 100° C 執行。在一些具體實施例，變性可在約 94-95° C 的溫度執行，DNA 的變性一般進行至少約 1 至約 30 秒。在一些具體實施例，變性可進行約 1 至約 15 秒。在其他具體實施例，變性可進行多至約 1 分鐘或更多。除了 DNA 變性之外，對一些聚合酶，例如 AmpliTaq Gold[®]，在變性溫度的培養亦用於活化酶，所以，當使用這些聚合酶時使得 PCR 的第一變性步驟較後續變性步驟為長是有利的。

在結合階段期間，寡核甘酸引子在其互補區域結合至標的 DNA 及實質上由聚合酶延伸，一旦聚合酶結合至引子-模版雙工。在習知 PCR，結合溫度可典型上在或低於最不穩定引子-模版雙工的熔點(T_m)，於此 T_m 可由熟知該技藝者所熟知的許多理論方法中的任一個估計。例如， T_m 可由式子決定：

$$T_m = (4^{\circ}\text{C} \times \text{G 及 C 鹼基的數目}) + (2^{\circ}\text{C} \times \text{A 及 T 鹼基的數目})。$$

典型而言，在標準 PCR，結合溫度可為約 5-10°C 低於所估計最不穩定引子-模版雙工的熔點 T_m 。結合時間可在約 30 秒及約 2 分鐘之間，結合階段典型上係在延伸階段之後，延伸可進行足夠量的時間以允許聚合酶完成成為適當尺寸

的放大產品的引子延伸。

於 PCR 的循環數目(一個循環包含變性、結合及延伸)決定放大程度及後續放大產品量。PCR 產生 DNA 分子的指數式放大，於是，理論上，在每一個 PCR 循環之後存在出現在先前循環的兩倍量的產物，直到 PCR 試劑耗盡及達到平頂(於此沒有進一步放大產品產生)。典型上，會執行約 20-30 個 PCR 循環以達到此平頂，更典型而言，會執行約 25-30 個循環，雖然並未特別限制循環數目。

對一些具體實施例，在 PCR 的最後循環的最後階段之後於某一溫度培養反應為有利的。在一些具體實施例，可選擇加長的延伸階段。在其他具體實施例，可選擇於低溫(例如，約 4°C)培養。

可使用各種方法以評估由多工反應所得到的放大產品混合物中經放大等位基因的產品，例如，螢光標示產品的偵測，放射性同位素標示產品的偵測，放大產品的銀染色或是使用 DNA 嵌入劑染料例如溴化乙錠(EtBr)及 SYBR 綠色菁染料以顯現雙-股放大產品。適合用於接附至引子以用於本發明的螢光標示為數目繁多的，商業可提供的，及該技藝中所熟知。使用螢光分析，至少一種經螢光標示引子可用於每一個基因座的放大。螢光偵測在標示及產品偵測的放射性方法為所欲的，例如，因為螢光偵測不需要使用放射性物質，及於是避免伴隨放射性物質的使用之法規及安全問題。使用經標示引子的螢光偵測亦可選擇用於其他偵測的非放射性方法，例如銀染色及 DNA 嵌入劑，因為偵

測的螢光方法一般較銀染色及 DNA 嵌入劑顯現出較少的放大大人工品。此一部分是因為僅具標示接附於其上的 DNA 放大股在螢光偵測被偵測出的事實，於是每一個放大產品的兩個股皆使用銀染色及嵌入劑偵測方法染色及偵測，其產生許多非特定放大大人工品的視覺建立，此外，存在伴隨使用 EtBr 及 SYBR 的潛在健康風險，已知 EtBr 為一種致突變原；SYBR，雖然具較 EtBr 為少的致突變原，係一般懸浮於 DMSO，其可快速地通過皮膚。

當引子的螢光標示用於多工反應時，一般可使用至少三種不同標示以標示不同引子，當使用尺寸標誌評估多工反應產品時，用於製備尺寸標誌的引子可使用得自放大該反應中所欲基因座的引子的不同標誌標示，隨著自動化螢光成像及分析，可得到多工放大反應產品的較快速偵測及分析。

在本意旨的一些具體實施例，螢光可用於，例如藉由共價鍵結至引子，來標示多工放大的至少一種引子，由此產生經螢光標示的引子。在一些具體實施例，多工中不同標的基因座的引子可使用不同螢光體標示，依據螢光體放射波長而定，每一個螢光體產生不同顏色的產品。這些各種標示的引子可用於相同多工反應，及它們的各自放大產品接著一起分析。可標示放大特定基因座的前置或反置引子對，雖然前置引子較常被標示。

下列為一些在該技藝中熟知及適合用於本意旨的可能螢光體實例，該清單意欲為實例及不欲為排外性的。一些

可能螢光體包含：螢光素(FL)，其最大在 492 奈米吸收及最大在 520 奈米發射；N,N,N',N'-四甲基-6-羧基若丹明(TAMRA™)，其最大在 555 奈米吸收及最大在 580 奈米發射；5-羧基螢光素(5-FAM™)，其最大在 495 奈米吸收及最大在 525 奈米發射；2',7'-二甲氧基-4',5'-二氯-6-羧基螢光素(JOE™)，其最大在 525 奈米吸收及最大在 555 奈米發射)；6-羧基-X-若丹明(ROX™)，其最大在 585 奈米吸收及最大在 605 奈米發射；CY3™，其最大在 552 奈米吸收及最大在 570 奈米發射；CY5™，其最大在 643 奈米吸收及最大在 667 奈米發射；四氯-螢光素(TET™)，其最大在 521 奈米吸收及最大在 536 奈米發射；及六氯-螢光素(HEX™)，其最大在 535 奈米吸收及最大在 556 奈米發射；NED™，其最大在 546 奈米吸收及最大在 575 奈米發射；6-FAM™，其最大在約 520 奈米發射；VIC®其最大在約 550 奈米發射；PET®其最大在約 590 奈米發射；及 LIZ™，其最大在約 650 奈米發射。參考 SR Coticone 等，美國專利第 6,780,588 號；AmpFlSTR® Identifiler™ PCR Amplification Kit User's Manual, pp. 1-3, Applied Biosystems (2001)。注意上文所列出發射及/或吸收波長為典型的及僅可用於一般指引目的；對不同應用及在不同條件下實際尖峰波長會變化。

本意旨各種具體實施例可包括含有至少四種不同染料的單一多工系統，這些至少四種染料可包含上文所列出染料的任何四種，或是該技藝中已知的任何其他四種染料，或是 6-FAM™、VIC®、NED™及 PET®。本意旨其他具體

實施例可包括含有至少五種不同染料的單一多工系統，這些至少五種染料可包含上文所列出染料的任何五種，或是該技藝中已知的任何其他五種染料，或是 6-FAMTM、VIC[®]、NEDTM、PET[®] 及 LIZTM。參考第 2 圖 DNA 數據之實例，其係由使用五種染料 6-FAMTM、VIC[®]、NEDTM、PET[®] 及 LIZTM 的十六個基因座的多工放大所得到，如在實例所敘述 (LIZTM 的放大尖峰未示出，因為 LIZTM 係用於標示尺寸標準物)。本意旨其他具體實施例可包括含有至少六種不同染料的單一多工系統，這些至少六種染料可包含上文所列出染料的任何六種，或是該技藝中已知的任何其他六種染料，或是 6-FAMTM、VIC[®]、NEDTM、PET[®]、LIZTM 及具在約 620 奈米的最大發射之第六種染料(SID)。參考第 3 圖。

PCR 產品可於篩分或無篩分介質分析。在這些意旨一些具體實施例，例如，PCR 產品可由電泳分析；例如，毛细管電泳，如在 H. Wenz 等(1998)，Genome Res. 8:69-80 (亦參考 E. Buel 等(1998), J. Forensic Sci. 43:(1), pp. 164-170))所敘述，或是平板凝膠電泳，如在 M. Christensen 等(1999), Scand. J. Clin. Lab. Invest. 59(3): 167-177 所敘述，或是變性聚丙烯醯胺凝膠電泳(參考，例如 J. Sambrook 等(1989)，於 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 13.45-13.57)。電泳中 DNA 片段的分離係主要基於不同片段大小，放大產品亦可由層析法分析；例如，藉由尺寸排除色譜(SEC)。

一旦該經放大等位基因被分離，在例如，凝膠或毛細管的這些等位基因及任何其他 DNA(例如，DNA 尺寸標誌或是等位基因分型)可接著視覺化及分析，DNA 的視覺化可使用在該技藝中已知的數種技術的任何一種完成，例如，銀染色或是藉由使用報告基因例如放射性同位素及螢光染料，如此處所敘述，或是化學發光劑及酶與可偵測基質。常常，偵測多工基因座的方法可藉由螢光，參考，例如，JW Schumm 等. in Proceedings from the Eighth International Symposium on Human Identification, pub. 1998 by Promega Corporation, pp. 78-84; E. Buel 等(1998), *supra*。當使用螢光-標示引子偵測在多工反應的每一個引子，放大後可使用螢光偵測劑偵測經標示產品，參考螢光染料敘述，*supra*。

存在於 DNA 樣品中的每一個基因座的等位基因尺寸可由比較在電泳的尺寸標準品，例如已知尺寸的 DNA 標誌而決定，評估包含二或更多多態性 STR 基因座的多工放大之標誌亦包含基因座-特異性等位基因分型或是所評估每一個基因座的等位基因分型之組合，參考例如，C. Puers 等(1993), Am. J. Hum. Genet. 53:953-958；C. Puers 等(1994), Genomics 23:260-264。亦參考，美國專利第 5,599,666；5,674,686；及 5,783,406 號的適合用於 STR 基因座偵測的一些等位基因分型之敘述，及所揭示一些分型結構的方法。個別基因座的等位基因分型結構之後，分型可與放大產品同時電泳，每一個等位基因分型與等位基因自相對應基因座共遷移。

本意旨多工反應的產品亦可使用內泳道標準物評估；亦即使用，構型為要在例如，與放大產品相同的毛細管電泳的特定形式的尺寸標誌。該內泳道標準物包含一系列已知長度的片段，該內泳道標準物亦可使用螢光染料標示，其可與在放大反應的其他染料區別。該泳道標準物可與經放大樣品或尺寸標準物/等位基因分型混合及與彼此電泳，以比較在凝膠電泳的不同泳道或是毛細管電泳的不同毛細管的遷移。在該內泳道標準物遷移的差異可用於顯示於分離介質性能的差異，此差異的定量及與等位基因分型相關性可提供用於在不同泳道或是毛細管電泳的放大產品之校正，及於未知樣品中等位基因的尺寸決定之關連。

當使用螢光染料標示放大產品時，經電泳及分離產品可使用螢光偵測裝置分析，例如，ABI PRISM[®] 310 或 3130xl 基因分析儀，或是 ABI PRISM[®] 377 DNA 序列儀(Applied Biosystems, Foster City, Calif.)；或是 Hitachi FMBIO[™] II 螢光掃描器(Hitachi Software Engineering America, Ltd., South San Francisco, Calif.)。在本意旨各種具體實施例，PCR 產品可由毛細管凝膠電泳流程與此種電泳儀錶裝置如 ABI PRISM[®] 3130xl 基因分析儀(Applied Biosystems)分析，及經電泳放大產品的等位基因分析可使用例如 Applied Biosystems 的 GeneMapper[®] ID Software v3.2 執行。在其他具體實施例，放大產品可由在，例如，約 4.5%，29:1 丙烯醯胺：雙丙烯醯胺，8 莫耳濃度凝膠電泳(如為 ABI PRISM[®] 377 自動化螢光 DNA 序列儀所製備)中電泳而分離。

本意旨亦相關於使用上文所敘述方法的試劑盒。在一些具體實施例，基本試劑盒可包含具一或更多基因座-特定引子的容器。試劑盒亦可選擇性地包含使用指南，試劑盒亦可包含其他選擇性試劑盒組件，例如，與每一個該特定基因座相關的一或更多等位基因分型，足夠量的放大用酶，促進放大的放大緩衝液，促進酶活性的二價陽離子溶液，在放大期間用於股延伸的 dNTPs，製備電泳用放大產品的負荷溶液，基因體 DNA 做為模版控制組，尺寸標誌以確保物質於分離介質中如所預期遷移，及流程與手冊以教育使用者及限制於使用時的錯誤。在試劑盒中各種試劑量亦可依據數種因素而變化，例如最適方法敏感性。提供測試試劑盒以在手動應用使用或是試劑盒以隨自動偵測器或分析儀使用亦在本意旨範圍內。

個人辨識測試，或是 DNA 分型，可在包含核酸，例如骨、頭髮、血液、組織及其類似物的任何樣品上執行，DNA 可自該樣品及一組所使用引子萃取以放大多工中 DNA 的所欲 STR 基因座組以產生一組放大產品，如此處所敘述。在親子鑑定，特定樣品的放大模式，或是 DNA 數據，可與得自推定受害者(推定匹配源)的已知樣品比較，或是可與得自推定受害者的家族成員(例如，母親及/或父親)的經放大基因座的模式比較，其中相同組的 STR 基因座被放大。STR 基因座放大的模式可用於確認或排除受害者的辨識。在親子鑑定，測試樣品一般可為得自小孩及可進行與來自推定父親的 STR 基因座模式之比較，及/或可與得自小孩母親的

STR 基因座模式匹配。STR 基因座放大的模式可用於確認或排除父親的辨識，特定基因座的放大及比較亦可用於育種的親子鑑定；例如，牛、狗、馬及其他哺乳動物。CR Primmer 等(1995), Mol. Ecol. 4:493-498。

在臨床處理，可使用此種 STR 標誌，例如，以監控骨髓移植中供體植入的程度，在醫院中，這些標誌亦有用於樣品匹配及追蹤。這些標誌亦已進入其他科學領域，例如於人類種族及族群差異的種群生物研究(DB Goldstein 等(1995), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:6723-6727)，進化及物種差異性，及於動物與植物的變化(MW Bruford 等(1993), Curr. Biol. 3:939-943)。

參考文獻、專利、專利申請案、科學文獻及其他出版品，與此處所參考 GenBank 資料庫序列的登錄號，係皆以其全文併入做為參考。

【實例】

本意旨方面可參考下列實例而進一步了解，此實例在任何方面不應建構為限制本意旨範圍。

在某些具體實施例，將要分析的 DNA 樣品與 STR- 及 Amelogenin-特定引子組合併於 PCR 混合物中以放大基因座 D16S539、D18S51、D19S433、D21S11、D2S1338、D3S1358、D8S1179、FGA、TH01、VWA、Amelogenin，及五種新的 STR 基因座 D10S1248、D12S391、D1S1656、D22S1045、及 D2S441。這些基因座的引子組係根據此處所提供方法設計，放大 D10S1248、VWA、D16S539 及 D2S1338

的每一個引子組的一個引子係以 6-FAMTM 螢光標誌標示，放大 Amelogenin、D8S1179、D21S11 及 D18S51 的每一個引子組的一個引子係以 VIC[®] 螢光標誌標示，放大 D22S1045、D19S433、TH01 及 FGA 的每一個引子組的一個引子係以 NEDTM 螢光標誌標示，放大 D2S441、D3S1358、D1S1656 及 D12S391 的每一個引子組的一個引子係以 PET[®] 螢光標誌標示，第五種螢光標誌，LIZTM，係用於標示尺寸標準物。

反應混合物接著進行聚合酶連鎖反應，放大產品係由 STR 及 Amelogenin 基因座產生，且經標示引子併入放大產品。放大產品於是以 6-FAMTM、VIC[®]、NEDTM 或 PET[®] 螢光標誌標示，所有或部分反應混合物於單一毛細管通道在放大反應後進行毛細管電泳。亦電泳該 LIZTM-標示尺寸標準物。自螢光標誌的放射在單一輸出偵測及顯示。第 2 圖為使用五種染料放大 16 個基因座的 DNA 資料(LIZTM-標示尺寸標準物未示出)，STR 及 Amelogenin 基因座遷移通過該通道的速率係為其尺寸的函數，STR 及 Amelogenin 放大產品的尺寸及其標誌的顏色辨識每一個基因座的等位基因。

如熟知該技藝者所了解，可對各種本意旨各種具體實施例進行數種變化及修改而不偏離本意旨精神，意欲包含所有此種變化於本意旨範圍內。

【圖式簡單說明】

第 1 圖為一種說明由十五個 STR 基因座(十個 SGMplus[®] 基因座加五個基因座)及 Amelogenin 性別鑑定基因座(Amel)的多工放大所產生的複製子(於鹼基對)的相對尺寸範圍的圖。

第 2 圖為一種得自 SGMplus[®] STR 基座 VWA (vWA)、D16S539 (D16)、D2S1338、D8S1179 (D8)、D21S11 (D21)、D18S51 (D18)、D19S433 (D19)、TH01、FGA、D3S1358 (D3)、性別鑑定基因座 Amelogenin (Amel)、及五種新的 STR 基座(圓圈狀) D10S1248 (D10)、D22S1045 (D22)、D2S441、D1S1656 (D1)及 D12S391 (D12)的同時放大的產物之五色螢光偵測之輸出的圖。

第 3 圖為一種當用於實例(6-FAM[™]、VIC[®]、NED[™]、PET[®]及 LIZ[™])五種螢光染料，加上可用於一種六個染料多工反應的額外第六個染料(SID)的發射光譜的圖(波長以奈米表示)。

【主要元件符號說明】

D10、D22、D2S441、D1、STR 基座

D12、VWA、D16、D2S1338、

D8、D21、D18、D19、TH01、

FGA、D3、D10S1248、

D16S539、D2S1338、

D8S1179、D21S11、D18S51、

D22S1045、FGA、D3S1358、

D1S1656、D12S391

STR

短串聯重複序列

Amel

Amelogenin、性別鑑定基

因座

6-FAM、VIC、NED、PET、染料

LIZ、SID

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：097141704

※申請日期：97年10月29日

※IPC 分類：

C12Q 1/66 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

短串聯重複基因座多工放大方法及套組/Method and Kits
for Multiplex Amplification of Short Tandem Repeat Loci

二、中文發明摘要：

揭示一些方法及材料以用於在單一多工反應同時放大基因體 DNA 的至少 11 種特定 STR 基因座，做為用於分析此種反應產物的材料及方法。包含於本發明的是在單一多工反應同時放大 16 種特定基因座的方法及材料，其包含 10 AmpFlSTR[®] SGMplus[®] STR 基因座、Amelogenin 基因座、及 5 種新的 STR 基因座，其包含用於分析這些基因座的方法及材料。

三、英文發明摘要：

Methods and materials are disclosed for use in simultaneously amplifying at least 11 specific STR loci of genomic DNA in a single multiplex reaction, as are methods and materials for use in the analysis of the products of such reactions. Included in the present invention are materials and methods for the simultaneous amplification of 16 specific loci in a single multiplex reaction, comprising the 10 AmpFlSTR[®] SGMplus[®] STR loci, the Amelogenin locus, and 5 new STR loci, including methods and materials for the analysis of these loci.

七、申請專利範圍：

1. 一種方法，其包含：
 - (a) 於多工之放大的反應中共放大要分析的至少一 DNA 樣品的一組基因座，其中該反應的產物係為該組中來自共放大基因座的經放大等位基因的一混合物，其中該組基因座係包含 10 個 STR 基因座 D16S539、D18S51、D19S433、D21S11、D2S1338、D3S1358、D8S1179、FGA、TH01、VWA；及由 STR 基因座 D10S1248、D12S391、D1S1656、D22S1045、及 D2S441 所組成的族群的其中之一或更多；
 - (b) 評估該混合物的該經放大等位基因，以決定在該至少一個 DNA 樣品內的該組基因座中存在於所分析的每一個基因座的等位基因。
2. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中在步驟(a)的該組基因座係進一步包含可用於辨識該至少一個 DNA 樣品的來源之性別的一基因座。
3. 如申請專利範圍第 2 項的方法，其中該 DNA 樣品的該來源係為人類，及用於辨識人類性別的該基因座係為一 Amelogenin 基因座。
4. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其進一步包含在該評估的步驟之前分離該經放大等位基因之步驟。
5. 如申請專利範圍第 4 項的方法，其中該經放大等位基因係由毛細管凝膠電泳分離。
6. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該共放大的步驟

係包含使用一對寡核甘酸引子於該組基因座的每一個基因座，在該多工的反應中該對的引子的每一個位於該組基因座的一個基因座兩側。

7. 如申請專利範圍第 6 項的方法，其中每一對寡核甘酸引子的至少一個引子係為一經標示引子。
8. 如申請專利範圍第 7 項的方法，其中該經標示引子的標籤係為一螢光標誌。
9. 如申請專利範圍第 8 項的方法，其中該共放大的步驟係包含使用至少五螢光標示的寡核甘酸引子，其中該至少五標示引子由至少五不同螢光標示分別共價接附。
10. 如申請專利範圍第 8 項的方法，其中該共放大的步驟係包含使用至少六螢光標示的寡核甘酸引子，其中該至少六標示引子由至少六不同螢光標示分別共價接附。
11. 如申請專利範圍第 10 項的方法，其中該至少六種不同螢光標示係包含
 於 520 奈米發射自己的最大螢光之一第一螢光標示、
 於 550 奈米發射自己的最大螢光之一第二螢光標示、
 於 575 奈米發射自己的最大螢光之一第三螢光標示、
 於 590 奈米發射自己的最大螢光之一第四螢光標示、
 於 650 奈米發射自己的最大螢光之一第五螢光標示、
 及於 620 奈米發射自己的最大螢光之一第六螢光標示。
12. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中在所選擇該組基

因座的每一個基因座係使用一聚合酶連鎖反應而被共放大。

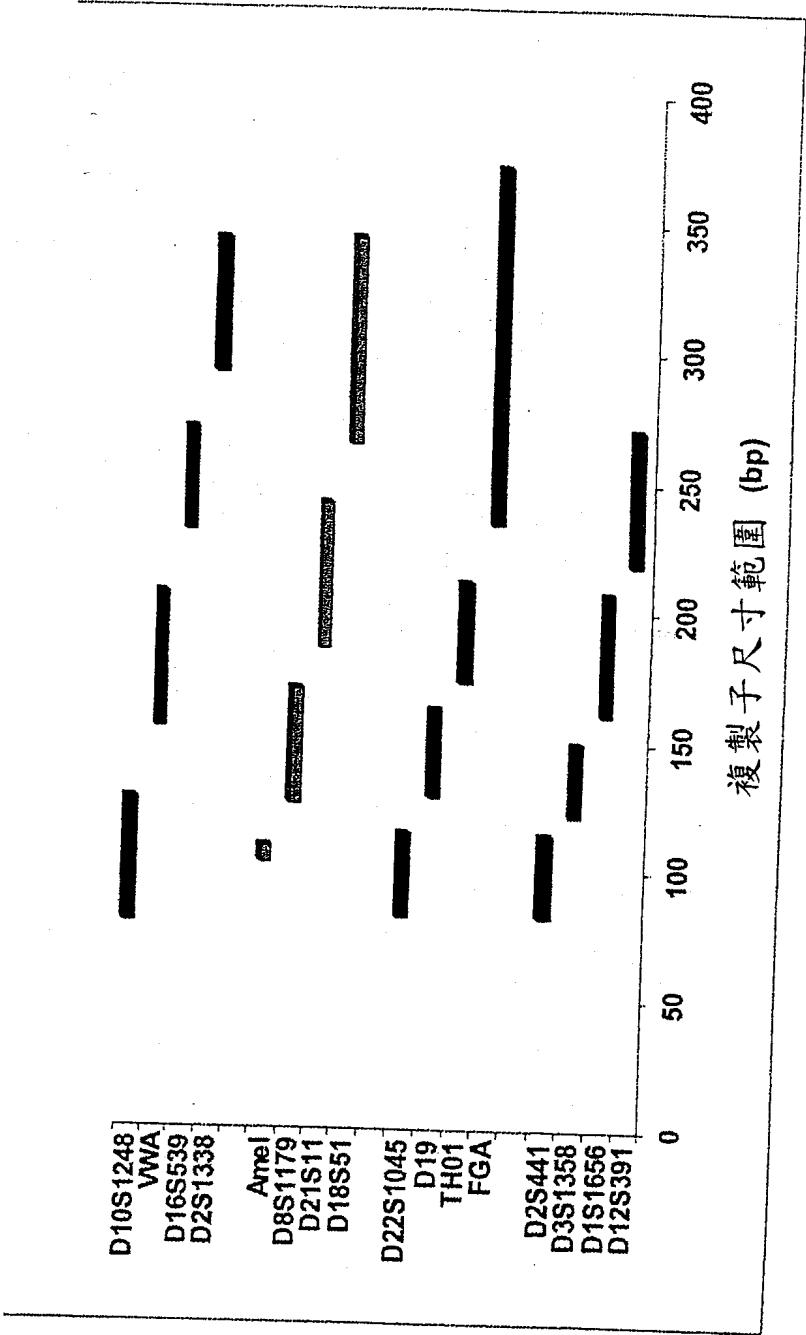
13. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中要分析的該至少一個 DNA 樣品係由人類組織製備。
14. 如申請專利範圍第 13 項的方法，其中該人類組織係由血液、精液、陰道細胞、頭髮、唾液、尿液、骨、口腔樣品、包含胎盤細胞的羊水，及包含胎兒細胞的羊水所組成族群的其中之一或更多選出。
15. 一種試劑盒，其包含用於共放大要分析的至少一個要分析 DNA 樣品的一組基因座的寡核甘酸引子；其中該組基因座可被共放大；其中該引子係在一或更多容器中；及其中該組基因座係包含 Amelogenin 基因座，該 10 個 STR 基因座 D16S539、D18S51、D19S433、D21S11、D2S1338、D3S1358、D8S1179、FGA、TH01、VWA、及由 STR 基因座 D10S1248、D12S391、D1S1656、D22S1045、及 D2S441 所組成的族群的其中之一或更多。
16. 如申請專利範圍第 15 項的試劑盒，其中在該試劑盒的所有寡核甘酸引子係在一容器中。
17. 如申請專利範圍第 15 項的試劑盒，其進一步包含用於至少一多工放大反應的試劑。
18. 如申請專利範圍第 15 項的試劑盒，其進一步包含具至少一尺寸標準物的一容器。
19. 如申請專利範圍第 18 項的試劑盒，其中該尺寸標準物

係為一 DNA 標誌。

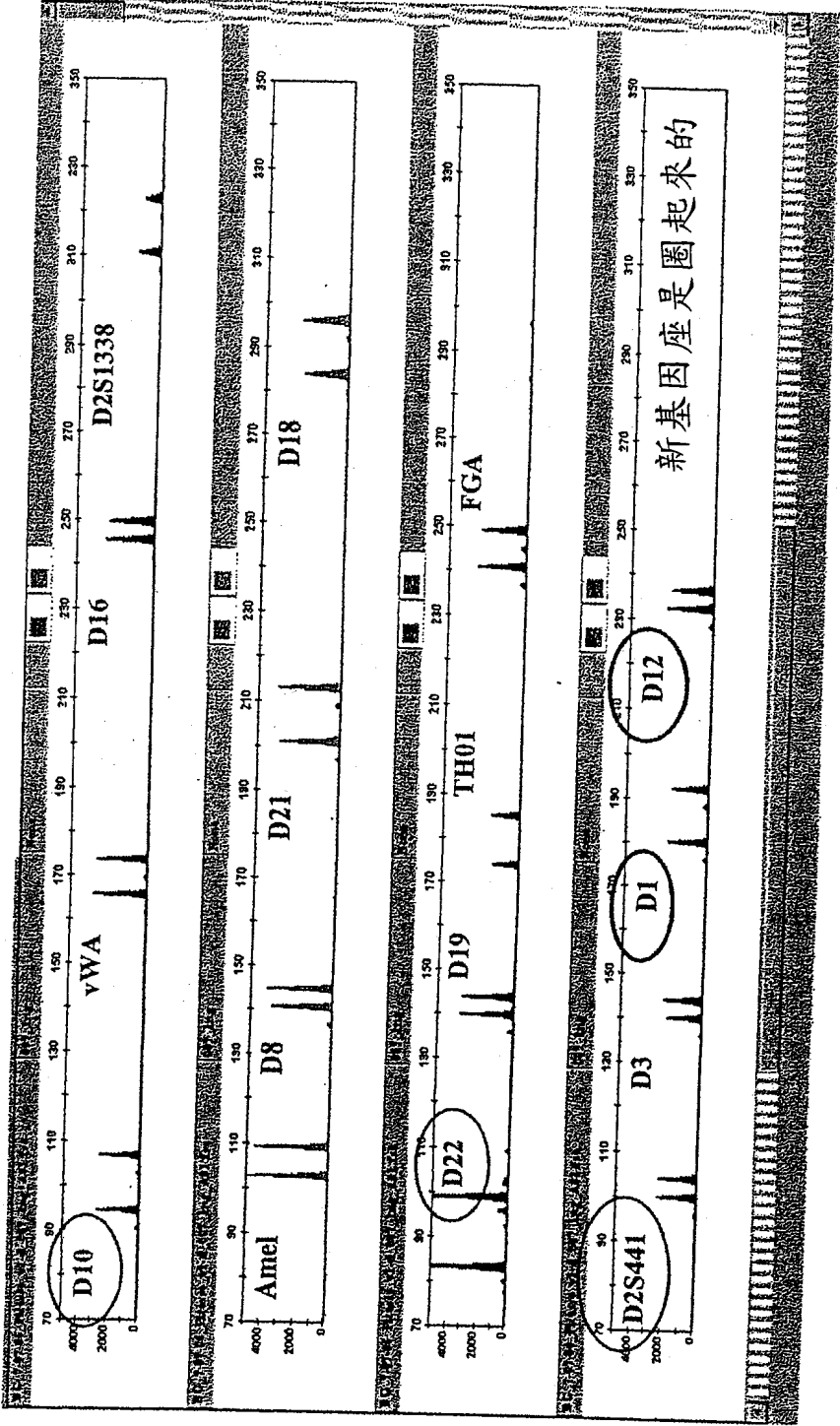
20. 如申請專利範圍第 18 項的試劑盒，其中該尺寸標準物係為一基因座-特定等位基因分型。
21. 如申請專利範圍第 20 項的試劑盒，其中每一該基因座-特定等位基因分型及在該組基因座的每一基因座的至少一寡核甘酸引子係由一螢光標誌共價地接附，及該寡核甘酸引子的至少兩個係由一與該容器中其他引子不同的螢光標誌所共價地接附。
22. 如申請專利範圍第 21 項的試劑盒，其中該經標示引子中的至少五個係由至少五不同螢光標誌分別共價地接附。
23. 如申請專利範圍第 22 項的試劑盒，其中該至少五不同螢光標誌係包含
於 520 奈米發射自己的最大螢光之一第一螢光標示、
於 550 奈米發射自己的最大螢光之一第二螢光標示、
於 575 奈米發射自己的最大螢光之一第三螢光標示、
於 590 奈米發射自己的最大螢光之一第四螢光標示、
及於 650 奈米發射自己的最大螢光之一第五螢光標示。
24. 如申請專利範圍第 21 項的試劑盒，其中該經標示引子中的至少六個係由至少六不同螢光標誌分別共價地接附。
25. 如申請專利範圍第 24 項的試劑盒，其中該至少六不同螢光標誌係包含
於 520 奈米發射自己的最大螢光之一第一螢光標示、

於 550 奈米發射自己的最大螢光之一第二螢光標示、
於 575 奈米發射自己的最大螢光之一第三螢光標示、
於 590 奈米發射自己的最大螢光之一第四螢光標示、
於 650 奈米發射自己的最大螢光之一第五螢光標示、
及於 620 奈米發射自己的最大螢光之一第六螢光標示。

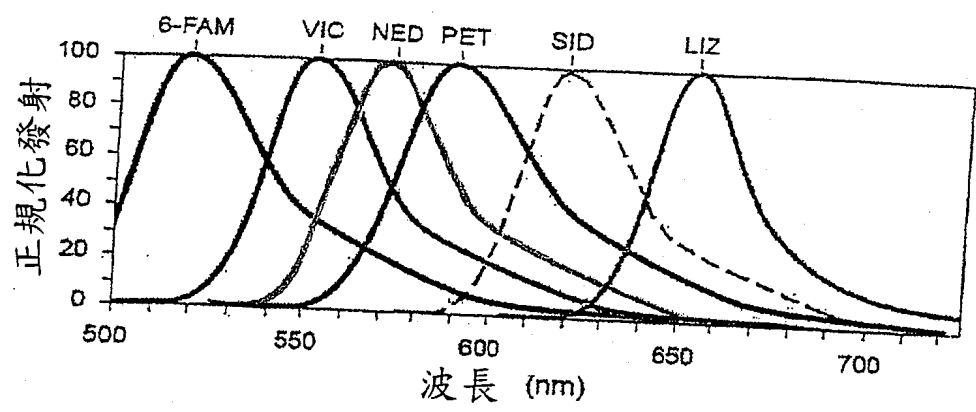
八、圖式：



第 1 圖



第 2 圖



第 3 圖

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (2) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

D10、D22、D2S441、D1、STR 基座

D12、VWA、D16、D2S1338、

D8、D21、D18、D19、TH01、

FGA、D3

STR

短串聯重複序列

Amel

Amelogenin、性別鑑定基

因座

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：