

(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

(43) 国际公布日
2012 年 6 月 28 日 (28.06.2012)



(10) 国际公布号
WO 2012/083481 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2006.01) *C07H 21/04* (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2010/002090
- (22) 国际申请日: 2010 年 12 月 20 日 (20.12.2010)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (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): **李晓艳 (LI, Xiaoyan)** [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)。 **杨光辉 (YANG, Guanghui)** [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)。 **魏晓明 (WEI, Xiaoming)** [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 (PEK-SUNG 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, RS, 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: GENOTYPING METHOD FOR HPA AND PRIMERS USED

(54) 发明名称: 用于 HPA 基因分型的方法及所用引物

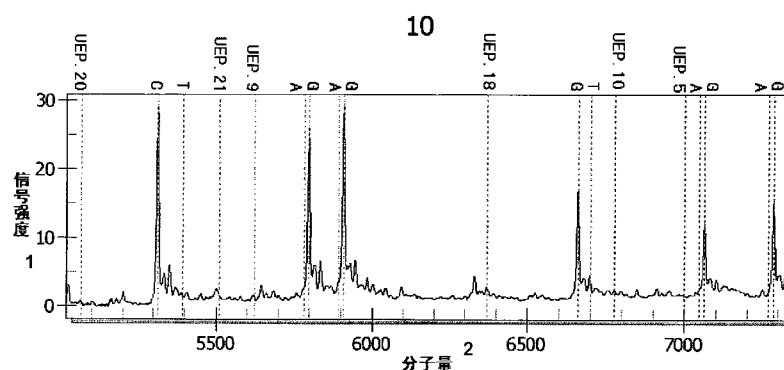


图 1 /Fig.1

1 SIGNAL INTENSITY
2 MOLECULAR WEIGHT

(57) Abstract: The invention discloses a genotyping method for HPA, which comprises: PCR amplifying a sample with specific primers of a HPA genotype, extending the amplification product with an extension primer, and then detecting the extension product by mass spectrometry to determine the HPA genotype of the sample. The invention further discloses primers with certain sequences used in the genotyping method and a kit comprising the primers.

[见续页]

WO 2012/083481 A1

(57) 摘要:

本发明公开了一种用于 HPA 基因分型的方法，其包括以 HPA 基因型别特异性引物对样品进行 PCR 扩增，并利用延伸引物对扩增产物进行延伸，随后通过质谱对获得的延伸产物进行检测，从而确定样品的 HPA 型别。本发明还公开了用于该基因分型方法的特定序列的引物以及包含该引物的试剂盒。

用于HPA基因分型的方法及所用引物

技术领域

本发明涉及一种用于检测 HPA 型别的方法，具体而言，本发明涉及 HPA 基因分型检测的方法。本发明还涉及 HPA 基因型别特异性的扩增引物和延伸引物以及包含这些引物的试剂盒。

背景技术

血小板是哺乳动物血液中的有形成分之一，无细胞核有细胞器。它通过膜表面的糖蛋白(GP)与细胞外介质蛋白相互作用发挥其功能，在止血及维持血管内皮细胞的完整性方面具有重要作用。

自 1959 年第一个人类血小板抗原(human platelet antigen, HPA)被鉴定以来，至 2009 年底已检出的血小板抗原数为 27 个。其中 12 个对偶抗原被归类为 6 个 HPA 系统(HPA-1 ~ HPA-5、HPA-15)；另 15 个抗原由于未发现其对偶抗原，而暂命名为 HPA-6w ~ HPA-14w、HPA-16w ~ HPA-21w。

HPA 抗原命名原则是以 HPA 为字头，然后连接数字表示。在由 2 个对偶抗原组成的遗传系统中，对偶基因分别用英文小写字母 a 和 b 表示。字母 a 代表其中基因频率大于 50 % 的等位基因。字母 b 代表基因频率小于 50 % 的另一等位基因。如果某血小板抗原的对偶抗原尚未被发现，将给予暂时命名，在等位基因数字后加后缀 w 表示，如 HPA-6bw，HPA-7bw 等。只有在 2 个对偶抗原全被检测出来后才能被称为系统。27 种 HPA 中，除 HPA-14 的多态性是编码基因 1909 ~ 1911 位 AAG 三核苷酸缺失外，其它 HPA 抗原的多态性均因编码基因的单核苷酸多态性导致相应糖蛋白中单个氨基酸置换。HPA 在人群中呈多态性分布，不同种族间某些 HPA 的基因频率的差异具统计学意义。

被正式命名的 HPA 等位基因，位于第 5、6、17 和 22 染色体上的 6 个遗传座位。一个 HPA 等位基因，可以编码一个或数个 HPA 抗原表位。

血小板输注在临床中有着重要的作用。HPA 不相合可导致血小板输注无效(PTR)、输血后紫癜(PTP)以及新生儿同种免疫性血小板减少性紫癜(NAITP)等。

建立准确的 HPA 分型技术在血小板减少症的诊断和血小板输注中具有重要作用，但由于特异性同种抗血清的缺乏，利用抗原抗体的免疫学反应进行 HPA 定型很困难。目前常用的方法是进行 HPA 基因分型，如聚合酶链式反应序列特异引物分型技术 (PCR-SSP)、限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)、基于 DNA 扩增和 Sanger 测序法(PCR-SBT)和基因芯片技术 (DNA microarray) 等。PCR-SSP 法，有些受损 DNA 样本会对检测结果产生影响；PCR-RFLP 如果酶解不完全将得错误结果，此外，并非每个 HPA 等位基因都有适当的酶切点；其他的分型方法都有或费用，或技术方面的问题。

发明内容

本发明设计了一套全新的同时检测 18 种 HPA 型别的特异性引物及使用该引物进行检测和定型的方法。

在一个实施方案中，本发明提供了一种用于 HPA 基因分型的方法，包括：

(1) 用一对或多对扩增引物对目的样品进行 PCR 扩增，其中所述扩增引物是根据目标 HPA 基因设计的；

(2) 用一条或多条延伸引物对步骤 (1) 获得的扩增产物进行延伸；所述延伸反应优选是单碱基延伸反应；

(3) 对步骤 (2) 获得的延伸产物进行质谱检测，从而确定样品中的 HPA 基因型别。

优选地，其中所述扩增引物为选自 SEQ ID NO: 1-36 的寡核苷酸序列，更优选地在所述寡核苷酸序列的 5'端添加标签，更优选地所述标签为 acgttgatg；优选地，所述延伸引物为选自 SEQ ID NO: 37-54 的寡核苷酸序列。

在一个优选的实施方案中，在进行步骤 (2) 之前对步骤 (1) 的扩增产物进行纯化，并且/或者在进行步骤 (3) 之前对步骤 (2) 的延伸产物进行纯化，优选地使用树脂进行纯化；

在一个优选的实施方案中，所述质谱检测使用基质辅助激光解吸附/电离飞行时间质谱系统进行。

在一个优选的实施方案中，所述质谱检测后确定样品中 HPA 基因型别的方法为将获得的谱峰与延伸引物分子量及对应延伸产物分子量信息比对。优选通过 TYPER4.0 分析软件 (SEQUENNOM 公司) 进行分析比对。

在另一个实施方案中，本发明的 HPA 基因分型方法，还包括：

在进行步骤 (2) 之前，对扩增产物进行处理以除去所述扩增产物中含有的 dNTP，优选地使用虾碱式磷酸酶 (SAP 酶) 进行处理；优选地，在进行步骤 (2) 时，在其 3' 端包含一个型别特异性多态性位点标记，更优选地使用 ddNTP 进行单碱基延伸反应。

在另一个优选的实施方案中，前述方法步骤 (2) 所得到的延伸产物和所述的延伸引物之间分子量差异不小于 9D，且各个型别的延伸产物间的分子量差异不小于 30D。

在一个优选实施方案中，所述目的样品选自血样，优选的来自哺乳动物，尤其是人。

在一个实施方案中，所述 HPA 基因型别选自 HPA-1、HPA-2、HPA-4、HPA-5、HPA-6w、HPA-7w、HPA-8w、HPA-9w、HPA-10w、HPA-11w、HPA-13w、HPA-14w、HPA-15、HPA-16w、HPA-17w、HPA-18w、HPA-20w 和 HPA-21w。

在一个实施方案中，本发明提供了 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 54 任一项所示序列的寡核苷酸，优选地所述 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 36 任一项所示序列的寡核苷酸的 5' 端含有标签序列，更优选地所述标签为 acgttgatg。

在一个实施方案中，本发明提供了具有 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 36 任一项所示序列的寡核苷酸用于扩增反应的用途，优选地所述具有 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 36 任一项寡核苷酸的 5' 端含有标签序列，更优选地所述标签为 acgttgatg。

在一个实施方案中，本发明提供了具有 SEQ ID NO: 37 至 SEQ ID NO: 54 任一项所示序列的寡核苷酸用于延伸反应的用途。

在一个实施方案中，本发明提供了一对或多对选自 SEQ ID NO: 1-36 的扩增引物和一条或多条选自 SEQ ID NO: 37-54 的延伸引物

用于制备试剂盒的用途，优选地所述试剂盒用于 HPA 基因分型检测；
优选地，所述选自 SEQ ID NO: 1-36 的扩增引物的 5'端含有标签序列，
更优选地所述标签为 acgttgatg。

- 5 在一个实施方案中，本发明提供了一种试剂盒，所述试剂盒包括：
一对或多对选自 SEQ ID NO: 1-36 的扩增引物对，一条或多条选自选自 SEQ ID NO: 37-54 的延伸引物，以及 PCR 试剂和扩增反应试剂。

优选地，所述的试剂盒还包括 SAP 酶和 ddNTP。

在另一个实施方案中，本发明涉及所述试剂盒用于检测 HPA 基因分型的用途。

- 10 在另一个实施方案中，本发明涉及一种用于 HPA 基因分型的方法，其特征在于使用质谱检测目的样品的 HPA 基因，以确定样品中待检测的 HPA 基因型别。

在另一个实施方案中，本发明涉及质谱分析用于进行 HPA 基因分型的用途。

- 15 应理解所述标签只是为了增加与 tag 相连的引物序列的分子量，以排除这些引物在后续试验的影响，本领域技术人员可以根据需要以及通常的引物设计原则选择使用不同的 tag，而实现本发明的目的。因此，在一些实施方案中可以使用任何可以达到上述目的，且不会与检测目的物相互作用的 tag 序列。

- 20 本发明提供一套用于检测 HPA 基因型的特异性引物，分为扩增引物和延伸引物，其序列及序列编号见表 1、表 2 和表 3：

表 1 HPA PCR 扩增引物

引物名称	序列 5'→ 3'	引物长度	引物用途	序列编号
HPA-1-F	TTGCTGGACTTCTCTTTGGG	20	HPA1 正向引物	SEQ ID NO: 1
HPA-2-F	AAGGCAATGAGCTGAAGACC	20	HPA2 正向引物	SEQ ID NO: 2
HPA-4-F	ATCTGTGGAGCATCCAGAAC	20	HPA4 正向引物	SEQ ID NO: 3
HPA-5-F	GGAAGAGTCTACCTGTTTAC	20	HPA5 正向引物	SEQ ID NO: 4
HPA-6-F	CTTCCCAGCAGGACGAATG	19	HPA6 正向引物	SEQ ID NO: 5
HPA-7-F	AGGTGAGCTTCAGCATTGAG	20	HPA7 正向引物	SEQ ID NO: 6
HPA-8-F	TGGGTGTGTGCAACTCTAAG	20	HPA8 正向引物	SEQ ID NO: 7
HPA-9-F	TGGGCCTGACCACTCCTTTG	20	HPA9 正向引物	SEQ ID NO: 8
HPA-10-F	AGAATCCATCGAGTTCCCAG	20	HPA10 正向引物	SEQ ID NO: 9
HPA-11-F	CCTTCAGAGAATGTGTGGAG	20	HPA11 正向引物	SEQ ID NO: 10

引物名称	序列 5'→3'	引物长度	引物用途	序列编号
HPA-13-F	ACCCTTTATTGTCAGCAACC	20	HPA13 正向引物	SEQ ID NO: 11
HPA-14-F	CTCTCTCCAGACTCCACAC	19	HPA14 正向引物	SEQ ID NO: 12
HPA-15-F	GAATCAGGTACAGTTACTTC	20	HPA15 正向引物	SEQ ID NO: 13
HPA-16-F	TGAAGGATGATCTGTGGAGC	20	HPA16 正向引物	SEQ ID NO: 14
HPA-17-F	GTATGAAGACCACCTGCTTG	20	HPA17 正向引物	SEQ ID NO: 15
HPA-18-F	AATCAAGCACAGAGTTGCCC	20	HPA18 正向引物	SEQ ID NO: 16
HPA-20-F	CCTGGCTTCACTCCTCTTTC	20	HPA20 正向引物	SEQ ID NO: 17
HPA-21-F	CCTTCAGAGAATGTGTGGAG	20	HPA21 正向引物	SEQ ID NO: 18
HPA-1-R	CAGATTCTCCTTCAGGTCAC	20	HPA1 反向引物	SEQ ID NO: 19
HPA-2-R	TGTTAGCCAGACTGAGCTTC	20	HPA2 反向引物	SEQ ID NO: 20
HPA-4-R	GAAGCCAATCCGCAGGTTAC	20	HPA4 反向引物	SEQ ID NO: 21
HPA-5-R	CCAAATGCAAGTTAAATTACC	21	HPA5 反向引物	SEQ ID NO: 22
HPA-6-R	AGACACATTGACCACAGAGG	20	HPA6 反向引物	SEQ ID NO: 23
HPA-7-R	CACGGGCTTTATGGTAAAGG	20	HPA7 反向引物	SEQ ID NO: 24
HPA-8-R	GACGAAAATACCTGCAACCG	20	HPA8 反向引物	SEQ ID NO: 25
HPA-9-R	TGCGATCCCGCTTGTGATG	19	HPA9 反向引物	SEQ ID NO: 26
HPA-10-R	TGACTTGAGTGACCTGGGAG	20	HPA10 反向引物	SEQ ID NO: 27
HPA-11-R	CACTGACTCAATCTCGTCAC	20	HPA11 反向引物	SEQ ID NO: 28
HPA-13-R	AGTGTTGTATGCACTTTCCC	20	HPA13 反向引物	SEQ ID NO: 29
HPA-14-R	GGACACCTGTGAGAAGTGC	19	HPA14 反向引物	SEQ ID NO: 30
HPA-15-R	CAAAATGTATCAGTTCTTGG	20	HPA15 反向引物	SEQ ID NO: 31
HPA-16-R	CAGGTTACTGGTGAGCTTTC	20	HPA16 反向引物	SEQ ID NO: 32
HPA-17-R	TCACTTCCTCATTGAAGCGG	20	HPA17 反向引物	SEQ ID NO: 33
HPA-18-R	ACCACTCTCTCGTCTTTAGG	20	HPA18 反向引物	SEQ ID NO: 34
HPA-20-R	TGCAGCTCCAGGACATTATC	20	HPA20 反向引物	SEQ ID NO: 35
HPA-21-R	AATCTCGTCACGGCAGTAAC	20	HPA21 反向引物	SEQ ID NO: 36

其中扩增引物对 HPA-1-F 和 HPA-1-R 用于扩增 HPA-1，扩增引物对 HPA-2-F 和 HPA-2-R 用于扩增 HPA-2，以此类推。

表 2 质谱延伸引物

引物名称	序列 5' → 3'	引物长度	引物用途	序列编号
HPA-1-U	CTGTCTTACAGGCCCTGCCTC	21	HPA-1	SEQ ID NO:37
HPA-2-U	CTGCCCCCAGGGCTCCTGA	19	HPA-2	SEQ ID NO:38
HPA-4-U	GCTGGCCACCCAGATGC	17	HPA-4	SEQ ID NO:39
HPA-5-U	GAGTCTACCTGTTTACTATCAA	23	HPA-5	SEQ ID NO:40
HPA-6-U	CAGGACGAATGCAGCCCCC	19	HPA-6w	SEQ ID NO:41
HPA-7-U	CCAAGGTGCGAGGCTGT	17	HPA-7w	SEQ ID NO:42
HPA-8-U	TTCCTGACTCAATCTCGTCA	22	HPA-8w	SEQ ID NO:43
HPA-9-U	CACTCCTTTGCCCCCCCAG	19	HPA-9w	SEQ ID NO:44
HPA-10-U	GAGTTCCCAGTGAGTGAGGCC	22	HPA-10w	SEQ ID NO:45
HPA-11-U	CTACATGACGAAAATACCTGCA	25	HPA-11w	SEQ ID NO:46
HPA-13-U	CAAAAGGTTAACATTTTCAGTAA	23	HPA-13w	SEQ ID NO:47
HPA-14-U	AGACTCCACACTCACTT	17	HPA-14w	SEQ ID NO:48
HPA-15-U	TCAAATTCTTGGTAAATCCTG	21	HPA-15	SEQ ID NO:49
HPA-16-U	GGGTACCAAGCTGGCCAC	18	HPA-16w	SEQ ID NO:50
HPA-17-U	TGGCTACAAACACGTGCTGA	20	HPA-17w	SEQ ID NO:51
HPA-18-U	CGAGCACATCATTTATATACA	21	HPA-18w	SEQ ID NO:52
HPA-20-U	CCTCTTTCCCCACAGGA	17	HPA-20w	SEQ ID NO:53
HPA-21-U	CGGGGAGCCCTACATGAC	18	HPA-21w	SEQ ID NO:54

其中延伸引物 HPA-1-U 用于延伸 HPA-1，延伸引物 HPA-2-U 用于延伸 HPA-2，以此类推。

5

4、有益效果

与现有技术相比，上述技术方案采用基质辅助激光解吸附/电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 系统进行检测，较以前 HPA DNA 测序方法而言，能够准确检测出 18 种 HPA 基因型 (HPA 型别为 HPA-1、HPA-2、HPA-4、HPA-5、HPA-6w、HPA-7w、HPA-8w、HPA-9w、HPA-10w、HPA-11w、HPA-13w、HPA-14w、HPA-15、HPA-16w、HPA-17w、HPA-18w、HPA-20w、HPA-21w 中的一种或

10

多种)并对其分型。反应可在微量体系中进行,减少样品和各种消耗品的使用;试剂耗材相对简单且稳定;自动化高通量检测,成本低,适合大规模检测。质谱可以在一块板的384个孔中同时操作,简单方便,所以通量大,速度快,两天就可以出结果,简单快速。

5

附图说明

下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员应理解,下列附图和实施例仅用于说明本发明,而不是对本发明的范围进行限定。本领域技术人员参考如下对附图和优选实施方案的详细描述,显然可以明了本发明的各种目的和各个有利方面。

图1为样本HPA-5、9w、10w、18w、20w、21w共计6种HPA抗原的质谱检测峰图。

图1中,横坐标表示各型延伸引物和产物的分子量大小,其中左边的虚线表示延伸引物分子量所在位置(由于完全消耗,所以无峰型),右边虚线表示延伸产物分子量所在位置(由于有延伸,所以有峰型);纵坐标表示引物的信号强度。例如HPA-20W,左边无虚线表示延伸引物完全消耗,右边峰处有一条虚线C,表示在突变位点基因为C。HPA-21W,左边无虚线表示延伸引物完全消耗,右边峰处有一条虚线G,表示在突变位点基因为G。HPA-9W,右边峰处有一条虚线G,表示在突变位点基因为G。HPA-18W,右边峰处有一条虚线G,表示在突变位点基因为G。HPA-10W,右边峰处有一条虚线G,表示在突变位点基因为G。HPA-5W,右边峰处有一条虚线G,表示在突变位点基因为G。

图2为样本HPA-1、2、4、8w、16w、17w共计6种HPA抗原的质谱检测峰图。

图3为样本HPA-4、6w、7w、11w、13w、15共计6种HPA抗原的质谱检测峰图。该样本峰图置信度高,延伸产物的峰型清晰,分型结果明确。

图4为样本的HPA-18w质谱检测峰图,其显示,在质量6660.4处的峰(对应于产物峰)很高,而在质量6373.2处的峰(对应于引物峰)不存在,在质量7700.3处的峰(对应于另一产物峰)不存在。这表明样

品中 HPA-18w 在突变位点基因为 G，因此基因型为 aa。

图 5 为样品的 HPA-5 质谱检测峰图，其显示，在质量 7284.8 处的峰（对应于产物峰）很高，而在质量 6997.5 处的峰（对应于引物峰）不存在，在质量 7268.8 处的峰（对应于另一产物峰）不存在。

5 这表明样品中 HPA-5 在突变位点基因为 G，因此基因型为 aa，图中质量 7064 处的峰为 HPA-10 的产物峰。

具体实施方式

10 在本发明的实施例中，采用本发明的特异性引物及质谱检测方法，对从血液从提取的 DNA 样本进行检测，获得样本中 HPA 型别结果。

实施例 1:

(1) 特异性引物的设计

15 每一个系统的 HPA 基因型是由一个位置的碱基突变决定的，引物设计的区域就是根据所在碱基的 DNA 序列设计的，具有特异性。根据所选择的待检测 HPA 型别的基因中包含突变位点的保守区域，设计出针对每型的扩增引物，扩增引物均带了 10 个碱基 acgttgatg 的标签序列；设计延伸引物，延伸引物的长度为 17-25 个碱基；延伸
20 引物与延伸产物之间，各个型别的延伸产物的分子量差异不小于 9 道尔顿。按照引物间，引物与扩增产物/延伸产物间不形成二聚体，引物自身不形成发夹结构，以及引物与模板间不发生错配的原则设计引物。

25 用于质谱检测的延伸引物按照下列原则设计：每条延伸引物的分子量相互间的差别要大于 30 道尔顿，各延伸引物与各延伸产物之间的分子量差异不小于 9 道尔顿，延伸引物与延伸产物的分子量要在 4500—8500Da 之间。

30 一种 HPA 型别设计一条质谱延伸引物，一个质谱反应中加入多条质谱延伸引物。将多个检测型别的扩增引物与扩增引物混合，延伸引物与延伸引物混合。这样可以同时检测多个 HPA 型别，提高了效率，节省了成本。本发明中，在 18 个 HPA 系统中，除 HPA-14w 是

由缺失 3 个核苷酸引起外，其余 HPA 均为相关基因的 SNP 所致。HPA-1、2、4、8w、16w、17w 属于一个质谱反应；HPA-4、6w、7w、11w、13w、15 属于一个质谱反应；HPA-5、9w、10w、18w、20w、21w 属于一个质谱反应；同时进行三个质谱反应可以检测 18 个 HPA 基因型别。

本实施例中使用的扩增引物为一对或多对在 5'端添加了标签后的表 1 所述扩增引物，延伸引物为一条或多条表 2 所述延伸引物。

(2) PCR 扩增

在本方法的步骤(2)中，对待检测血液样本进行 PCR 扩增，扩增反应的条件为本领域技术人员所熟知，在本发明的实施例中也详细描述了示例性的反应条件。并且根据所使用的本发明引物的具体序列，对扩增反应的条件进行一定的变化或优化也在本领域技术人员能力范围之内。

在本发明的扩增步骤中，使用的扩增引物对选自具有 SEQ ID NO:37 至 SEQIDNO: 72 所示序列的多核苷酸。

示例性 PCR 扩增过程为：

反应条件为 94°C，15min；94°C 变性 20s，56°C 退火 30s，72°C 延伸 1min，共扩增 45 循环；最终 72°C 延伸 3min。

PCR 反应在 Bio-Rad 公司的 PTC-200PCR 仪上运行。PCR 扩增反应试剂的配置见表 3(缓冲液、dNTP 混合物和 taq 酶购自 sequenom 公司)。

表 3 PCR 体系

试剂	浓度/5ul	体积/反应
H ₂ O		1.9ul
10xPCR缓冲液	1x	0.5ul
MgCl ₂	2mM	0.4ul
dNTP混合物	500uM	0.1ul
扩增引物混合物	100nM	1.0ul
热启动Taq酶	0.5U	0.1ul
模板DNA		1.0ul
体积		5.0ul

(3) SAP 酶处理

通过 SAP 消化酶处理, 可以将未反应的 dNTP 去磷酸化, 阻止其参与后续反应中, 以确保延伸反应时只延伸一个碱基。SAP 消化酶反应体系见表 4。

表 4 SAP 消化酶反应体

试剂	体积/反应
H ₂ O (HPLC级)	1.53ul
SAP酶缓冲液	0.17ul
SAP酶	0.30ul
DNA体积	5.0ul
总体积	7.0ul

反应条件为 37℃ 孵育 40 分钟, 去除反应中剩余的 dNTP; 85℃ 5 分钟使 SAP 酶失活。

(4) 延伸反应

在本发明方法的步骤(4)中, 对经过 SAP 处理的扩增产物进行延伸反应, 在延伸反应中使用本发明的延伸引物, 所得到的延伸产物与延伸引物的区别仅在于其 3'端多了一个碱基(ddNTP)。延伸反应所使用的原料是经过质量修饰的 ddNTP, 它既保证了延伸反应只连接一个碱基, 又能使整个系统的分辨率提高。

在本发明的方法中使用经过质量修饰的 ddNTP, 进行质量修饰的主要目的是为了使得各延伸产物之间的分子量差距加大, 从而提高后续的质谱分析的分辨率。对 ddNTP 进行质量修饰的方法是已知的。

作为本发明的一个优选实施方式, 四种 ddNTP 为购自 sequenom 公司的市售产品, 其分子量分别是: ddATP 271.2, ddTTP 327.1, ddCTP 247.2, 和 ddGTP 287.2。

在本发明的方法中, 所使用的延伸引物包括具有 SEQIDNO: 73 至 SEQIDNO: 90 任一项所示序列的多核苷酸的一种或多种。

在本发明的具体实施方案中, 在 9 微升的反应体系中进行延伸反应, 可以根据待检测的位点而使用一种延伸引物或多种的延伸引物的

组合。延伸反应体系如下表 5 所示。

表 5 延伸反应体系

试剂	浓度/9ul 反应体系	体积/反应
H ₂ O		0.619ul
iPLEX缓冲液	0.222	0.200ul
iPLEX ddNTP混合物	1x	0.200ul
表3中的延伸引物混合物	*	0.940ul
iPLEX酶	1x	0.041ul
体积		2.00ul
总体积		9.00ul

*其中延伸反应 mix 按照各型引物的分子量大小进行线性关系调整。

反应条件为 94°C, 30s; 94°C 变性 5s, 52°C 退火 5s, 80°C 延伸 5s, 共扩增 40 循环, 在每个循环中退火和延伸进行 5 个小循环; 最终 72°C 延伸 3min。

(5) 树脂纯化

采用树脂纯化延伸反应产物。在延伸反应的产物中加入 6mg 树脂 (购自 sequenom 公司), 加入 18.00ul 水, 垂直摇匀一小时。经过本步反应, 树脂将充分与反应体系中的阳离子结合, 从而使反应体系脱盐。反应完成后的纯化产物可在 4°C 保存数天, 也可在 -20°C 保存数周, 也可 4000rpm 离心 5min 后取上清直接用于质谱检测。

(6) 质谱分析

在本发明方法的步骤(6)中, 对经过纯化的延伸产物进行质谱分析, 从而确定各延伸产物的分子量。

在本发明的优选实施方式中, 质谱仪选择基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)。在所述方法中, 将纯化产物与芯片基质共结晶, 将该晶体放入质谱仪的真空管, 然后用瞬时纳秒强激光激发, 由于基质分子经辐射吸收能量, 导致能量蓄积并迅速产热, 从而使基质晶体升华, 核酸分子就会解吸附并转变为亚稳态离子, 产生

的离子多为单电荷离子，这些单电荷离子在加速电场中获得相同的动能，进而在一非电场漂移区内按照其质荷比率加以分离，在真空小管中飞行到达检测器。这样，采用质谱仪检测待检测突变位点不仅方便，而且灵敏度高、准确性高。

- 5 获得质谱峰图后，通过 sequenom 公司自带的分析软件，获得检测的 HPA 型别。

每一种抗原得到一个峰图，包括引物峰和产物峰，野生型和突变型产物由于分子量不同，产物峰的位置不同。当引物峰峰值为 0，野生型产物峰峰高时，说明这种 HPA 抗原的型别是野生型 aa；当引物峰峰值为 0，突变型产物峰峰高时，说明这种 HPA 抗原的型别是突变型 bb；当引物峰峰值为 0，野生型产物峰和突变型产物峰同时峰高时，说明这种 HPA 抗原的型别是 ab。图 4 和 5 分别示出了对其中两种 HPA 质谱图的分析。

15 实施例 2 HPA 基因型别的分型检测

本发明的方法中，多种 HPA 型别是同时检测的，将不同的引物同时放入一个管里面进行检测，如果存在 18 种 HPA 基因型别：HPA-1、HPA-2、HPA-4、HPA-5、HPA-6w、HPA-7w、HPA-8w、HPA-9w、HPA-10w、HPA-11w、HPA-13w、HPA-14w、HPA-15、HPA-16w、HPA-17w、HPA-18w、HPA-20w 和 HPA-21w 中的一个就能检测出来。

本发明所述的 HPA 型别检测分三个孔进行，每个孔用于检测 6 种 HPA 基因型别，每个孔中所含引物（即反应过程中使用所有的扩增产物和延伸产物）及反应步骤和条件相同，按实施例 1 中所述将 PCR 体系加入 384 孔板孔中，混匀，加入 DNA 样品，进行 PCR 扩增，纯化，延伸，再次纯化，然后进行质谱检测（参见前述实施例 1 中所述的反应步骤和条件），检测完成后分别对每个管进行质谱检测和分析。

其中所有的引物峰和产物峰之间分子量差异不小于 9Da。峰图报告结果分为 4 种：A：结果可靠 B：中度可靠 C：一般可靠 D：低度可靠。前三种视为该延伸反应有效，第四种由于质谱峰图基线不平而致，视为该延伸反应无效。质谱检测峰图结果如图 1-3 中所示。

图 1 为样本 HPA-5、9w、10w、18w、20w、21w 共计 6 种 HPA 抗原的质谱检测峰图。

图 2 为样本 HPA-1、2、4、8w、16w、17w 共计 6 种 HPA 抗原的质谱检测峰图。

- 5 图 3 为样本 HPA-4、6w、7w、11w、13w、15 共计 6 种 HPA 抗原的质谱检测峰图。该样本峰图置信度高，延伸产物的峰型清晰，分型结果明确。

权 利 要 求 书

1. 一种用于 HPA 基因分型的方法，包括：

5 (1) 用一对或多对扩增引物对目的样品进行 PCR 扩增，其中所述扩增引物是根据目标 HPA 基因设计的；

(2) 用一条或多条延伸引物对步骤 (1) 获得的扩增产物进行延伸；

(3) 对步骤 (2) 获得的延伸产物进行质谱检测，从而确定样品中的 HPA 基因型别；

10 优选地，其中所述延伸引物为选自 SEQ ID NO: 37-54 的寡核苷酸序列；

优选地，其中所述扩增引物为选自 SEQ ID NO: 1-36 的寡核苷酸序列，优选地在所述寡核苷酸序列的 5' 端添加标签，更优选地所述标签为 acgttgatg。

15 2. 权利要求 1 所述的方法，其中在进行步骤 (2) 之前对步骤 (1) 的扩增产物进行纯化，并且/或者在进行步骤 (3) 之前对步骤 (2) 的延伸产物进行纯化，优选地使用树脂进行纯化；优选地，其中所述质谱检测使用基质辅助激光解吸附/电离飞行时间质谱系统；优选地，在进行步骤 (2) 之前，对扩增产物进行处理以除去所述扩增产物中含有的 dNTP，优选地使用 SAP 酶进行处理；优选地，在进行步骤 (2) 时，使用 ddNTP 进行延伸反应；优选地，步骤 (2) 所得到的延伸产物和所述的延伸引物之间分子量差异不小于 9D，且各个型别的延伸产物间的分子量差异不小于 30D。

25 3. 前述权利要求任一项所述的方法，其中所述 HPA 基因型别选自 HPA-1、HPA-2、HPA-4、HPA-5、HPA-6w、HPA-7w、HPA-8w、HPA-9w、HPA-10w、HPA-11w、HPA-13w、HPA-14w、HPA-15、HPA-16w、HPA-17w、HPA-18w、HPA-20w 和 HPA-21w。

30 4. 具有 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 54 任一项所示序列的寡核苷酸，优选地其中具有 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 36 任一项寡核苷酸的 5' 端含有标签序列，更优选地所述标签为 acgttgatg；优选地，其中具有 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 36 任一项所示序列的寡核苷酸成对使用。

5. SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 36 任一项所示序列的寡核苷酸用于扩增反应的用途, 优选地所述 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 36 任一项所示序列的寡核苷酸的 5'端含有标签序列, 更优选地所述标签为 acgttgatg。

5 6. 具有 SEQ ID NO: 37 至 SEQ ID NO: 54 任一项所示序列的寡核苷酸用于延伸反应的用途。

7. 一对或多对选自 SEQ ID NO: 1-36 的扩增引物和一条或多条选自选自 SEQ ID NO: 37-54 的延伸引物用于制备试剂盒的用途, 优选地所述试剂盒用于 HPA 基因分型检测, 优选地, 所述选自 SEQ ID NO: 1-36 的扩增引物的 5'端含有标签序列, 更优选地所述标签为 acgttgatg。

8. 一种试剂盒, 所述试剂盒包括: 一对或多对选自 SEQ ID NO: 1-36 的扩增引物对, 一条或多条选自选自 SEQ ID NO: 37-54 的延伸引物, 以及 PCR 试剂和扩增反应试剂, 优选地还包括 SAP 酶和 ddNTP; 15 优选地所述试剂盒用于检测目的样品的 HPA 基因分型; 更优选地所述目的样品选自血样, 优选的来自哺乳动物, 尤其是人。

9. 一种用于 HPA 基因分型的方法, 包括对目的样品进行质谱检测, 以确定样品中待检测的 HPA 基因型别。

10. 质谱分析用于进行 HPA 基因分型的用途。

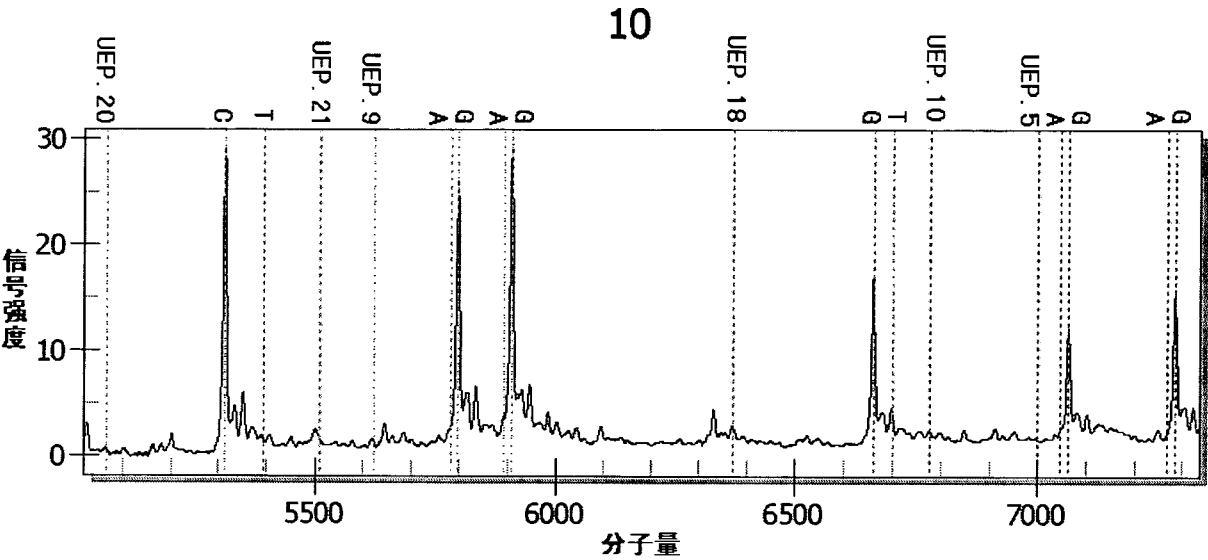


图 1

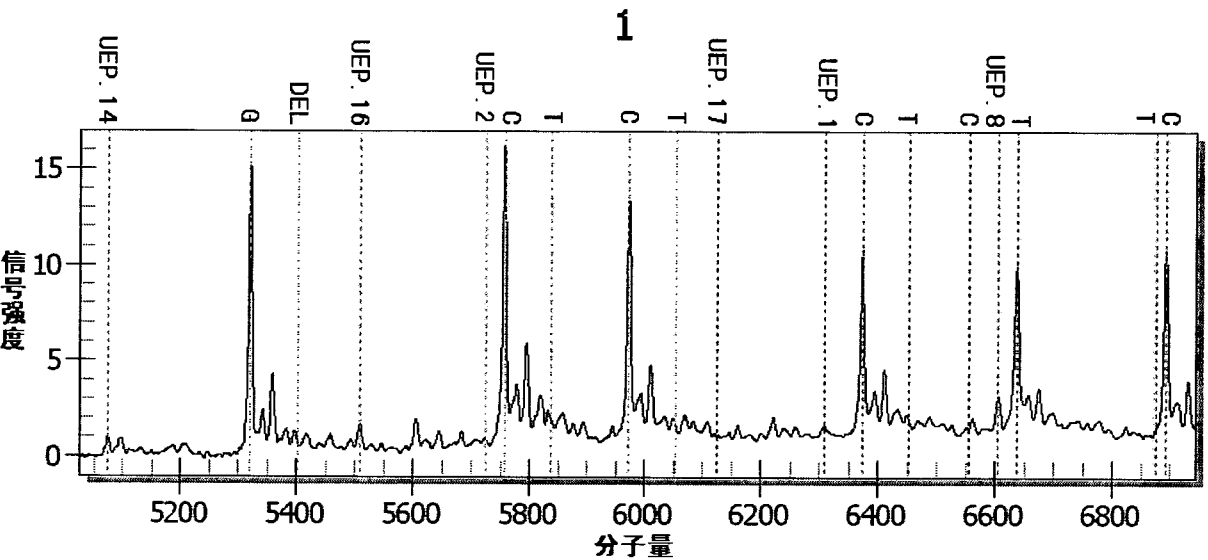


图 2

5

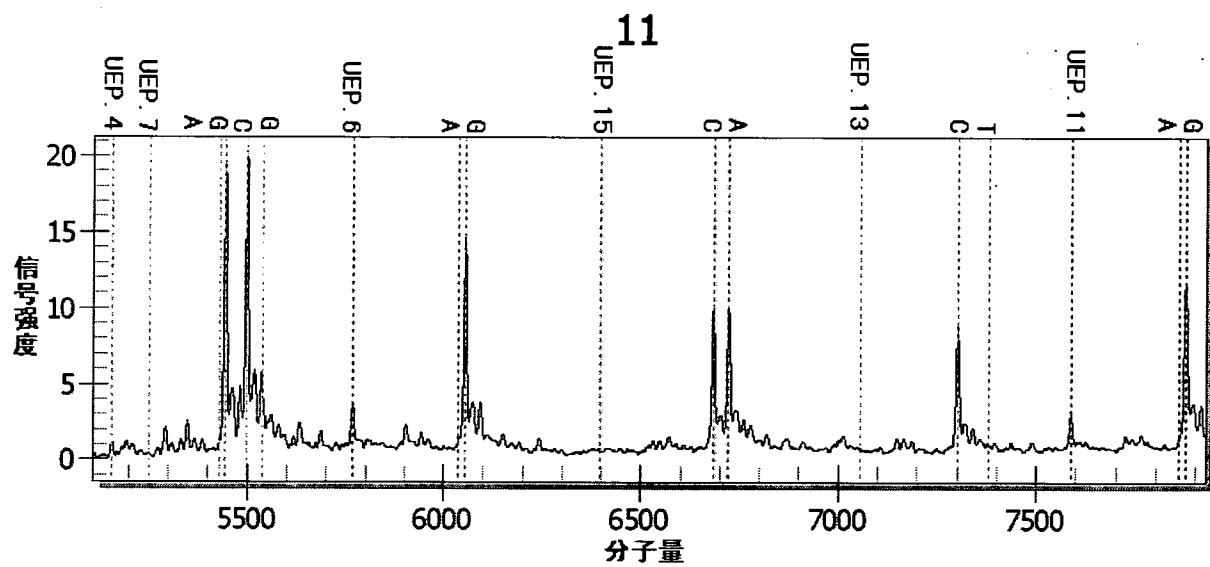


图 3

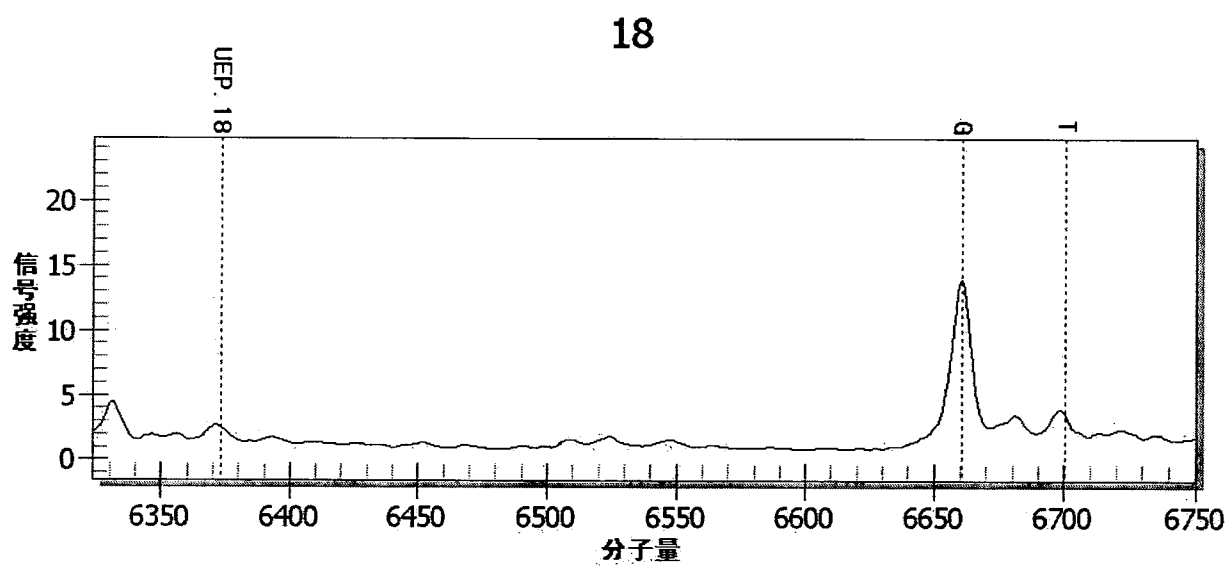


图 4

5

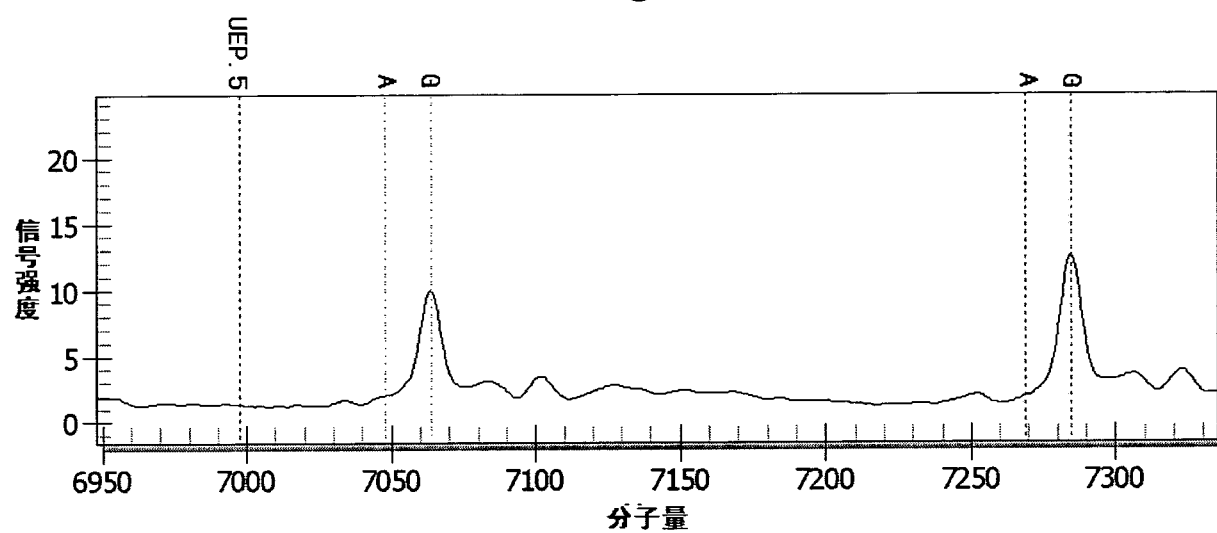


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/002090

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: C12Q, G01N, C07H

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)

DWPI, CNABS, CNTXT, CNKI, ISI Web of Knowledge, NCBI, EBI: human platelet antigen, HPA, genotyping, typing, grouping, amplification, extension, mass spectrometry, MALDI, primer; sequence search on SEQ ID NOs: 1-54.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Garritsen HS et al., Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for genotyping of human platelet-specific antigens, Transfusion, Feb. 2009, Vol. 49, pages 252 - 258.	1-10
A	CN101027408A (SANQUIN BLOOD SUPPLY FOUN) 29 Aug. 2007 (29.08.2007) See whole document.	1-10
A	CN101845520A (SHANGHAI BLOOD CENT) 29 Sep. 2010 (29.09.2010) See whole document.	1-10

☐ 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 14 Sep. 2011 (14.09.2011)	Date of mailing of the international search report 29 Sep. 2011 (29.09.2011)
--	--

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 TIAN, Tian Telephone No. (86-10)62411042
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/002090

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of:

a. a sequence listing filed or furnished

☐ on paper

☒ in electronic form

b. time of filing or furnishing

☐ contained in the application as filed

☒ filed together with the application in electronic form

☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2010/002090

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101027408 A	29.08.2007	WO 2005095650 A1	13.10.2005
		EP 1591534 A1	02.11.2005
		EP 1730311 A1	13.12.2006
		AU 2005228297 A1	13.10.2005
		JP 2007530073 T	01.11.2007
		US 2008050727 A1	28.02.2008
		EP 1730311 B1	15.09.2010
		DE 602005023588 E	28.10.2010
CN101845520A	29.09.2010	None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/002090

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68 (2006.01) i

G01N30/72 (2006.01)i

C07H21/04 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2010/002090

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: C12Q, G01N, C07H

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))

DWPI, CNABS, CNTXT, CNKI, ISI Web of Knowledge, NCBI, EBI: 人血小板抗原、分型、扩增、延伸、质谱、引物、human platelet antigen、HPA、genotyping、typing、grouping、amplification、extension、mass spectrometry、MALDI、primer; 基于 SEQ ID NOs:1-54 的序列检索。

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	Garritsen HS等, Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for genotyping of human platelet-specific antigens, Transfusion, 2月 2009, 第49卷, 第252 - 258页。	1-10
A	CN101027408A (桑昆血液供给基金会) 29. 8 月 2007 (29.08.2007) 参见全文	1-10
A	CN101845520A (上海市血液中心) 29. 9 月 2010 (29.09.2010) 参见全文	1-10

☐ 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

14.9 月 2011 (14.09.2011)

国际检索报告邮寄日期

29.9 月 2011 (29.09.2011)

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

田甜

电话号码: (86-10) 62411042

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1、关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是在下列基础上进行的:

a. 序列表的提交或提供

☐ 纸件形式

☒ 电子形式

b. 提交或提供时间

☐ 包含在申请提交时的国际申请中

☒ 以电子形式与国际申请一起提交

☐ 为检索之用随后提交本单位

2、☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/002090

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 101027408 A	29.08.2007	WO 2005095650 A1	13.10.2005
		EP 1591534 A1	02.11.2005
		EP 1730311 A1	13.12.2006
		AU 2005228297 A1	13.10.2005
		JP 2007530073 T	01.11.2007
		US 2008050727 A1	28.02.2008
		EP 1730311 B1	15.09.2010
		DE 602005023588 E	28.10.2010
CN101845520A	29.09.2010	无	

A. 主题的分类

C12Q1/68 (2006.01) i

G01N30/72 (2006.01) i

C07H21/04 (2006.01) i