

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01818367.0

[45] 授权公告日 2007 年 1 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 1293204C

[22] 申请日 2001.8.30 [21] 申请号 01818367.0

[30] 优先权

[32] 2000.8.30 [33] US [31] 60/228,994

[86] 国际申请 PCT/US2001/041956 2001.8.30

[87] 国际公布 WO2002/018659 英 2002.3.7

[85] 进入国家阶段日期 2003.4.30

[73] 专利权人 戴诺生物技术有限公司

地址 挪威奥斯陆

[72] 发明人 刘向军

[56] 参考文献

WO9813527A2 1998.4.2 C12Q1/68

审查员 吴文英

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

代理人 陈文平

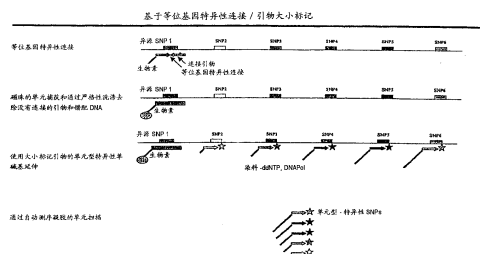
权利要求书 2 页 说明书 25 页 附图 7 页

[54] 发明名称

等位基因的测定方法

[57] 摘要

本发明提供分离和鉴定基因组 DNA 样品中的等位基因，从而分离和鉴定单元型的方法和试剂盒。该方法通常涉及使对等位基因中的多态性位点特异的引物与该 DNA 样品杂交，将引物延伸一个或多个核酸，分离延伸的引物，并且利用延伸的引物鉴定等位基因。该方法还可以进行两个引物的连接，它们的分离以及接着在鉴定目标等位基因中的应用。该方法中还可以使用另一种引物作为延伸第一引物的封闭位点，以便复制和鉴定包含多态性位点的 DNA 片段。可以对延伸或没有延伸的引物进行标记，使得引物容易被分离和/或鉴定。



1. 一种通过杂交检测等位基因的方法, 包括:

将靶寡核苷酸与偶联于不同组小珠上的寡核苷酸杂交, 形成复合体, 其中所述偶联于不同组小珠的寡核苷酸是有和没有间隔区的寡核苷酸; 和

分析所述复合体, 确定不同等位基因的特异性。

2. 权利要求 1 的方法, 进一步包括分离等位基因特异性核酸片段。

3. 权利要求 2 的方法, 其中所述分离等位基因特异性核酸片段包括使用偶联于不同组小珠上的特定多态性的寡核苷酸。

4. 权利要求 1-3 任一项的方法, 进一步包括将特定多态性的寡核苷酸与不同组小珠偶联。

5. 权利要求 1-4 任一项的方法, 进一步包括将有和没有间隔区的寡核苷酸与不同组小珠偶联。

6. 权利要求 1-5 任一项的方法, 进一步包括获得包含多个等位基因的靶核酸样品, 每个等位基因具有一套独特的异源序列位点。

7. 权利要求 1-6 任一项的方法, 进一步包括扩增所述靶核酸样品。

8. 权利要求 1-7 任一项的方法, 进一步包括将所述靶核酸变性为单链核酸。

9. 权利要求 1-8 任一项的方法, 进一步包括通过使所述靶寡核苷酸与第二组小珠杂交并且通过流式细胞仪测定所述靶寡核苷酸的杂交来验证所述靶寡核苷酸的序列, 其中所述第二组小珠与所述靶寡核苷酸互补。

10. 权利要求 1-9 任一项的方法, 其中所述靶寡核苷酸是 HLA 等位基因。

11. 权利要求 1-10 任一项的方法, 其中所述与有和没有间隔区的寡核苷酸偶联的不同组小珠与不同的寡核苷酸缀合, 并且可以通过参入到一组小珠中的一个或多个小珠中的荧光比色鉴定。

12. 一种含有与不同组小珠偶联的寡核苷酸的组合物, 其中所述与

不同组小珠偶联的寡核苷酸是有和没有间隔区的寡核苷酸。

等位基因的测定方法

技术领域

本发明涉及通过鉴定基因中一个或多个异源序列位点而分离和鉴定等位基因的方法。更具体地，本发明涉及使用一个或多个引物分离和鉴定等位基因的方法。

发明背景

个体之间序列差异最常见的形式是单核苷酸多态性，普遍公知为 SNP。随着人体基因组计划的完成，估计 SNP 存在的平均数是每 1000 个核苷酸中有一个，但是在某些 DNA 区存在的频率更高一些。现在努力的焦点在于利用 SNP 来鉴定与疾病或药物反应有关的靶基因。但是，由于关联性不强，很多科学家和研究人员怀疑以个体 SNP 为基础对药物和疾病个性化的观点，从而单元型 (Haplotype) 分析的重要性浮现出来，成为 SNP 医学应用的关键方法。

单元型是个体 SNP 沿着给定 DNA 片段的组织形式，这是普遍公知的。单元型的经典定义是单一染色体中趋向于在给定种群中共同从一代遗传到下一代的紧密连锁基因座的等位基因组合。分子单元型测定的另一方面是连锁不平衡图谱的绘制，其现在被认为是疾病基因的定位克隆中的重要工具，随着复杂表型的遗传学剖析，很多种应用就变得显而易见了。

1989 年以来，科学家们研究了各种分子单元型测定方法，他们利用基因组 DNA 的单分子稀释物 (SMD)，以物理方法分离等位基因，或者通过等位基因特异性引物从杂合模板选择性扩增半合子 DNA 片段进行等位基因辨别。然而，只是针对短片段 (大约 500bp) 开发了这些方法，但是最近分子单元型测定已应用于长范围的 PCR (标记物间隔再扩大 10-20 倍)，并且使用 CD4 基因座作为开发这项分析方法的原型系统。也尝试

过测定 DNA 序列单元型的其它方法，但是这些方法非常不成功、不可靠或者成本高。因此仍存在着对可靠、处理量大的经济型分子单元型测定方法的需要。

发明概述

本发明涉及通过鉴定基因中一个或多个异源序列位点来测定等位基因的方法。该方法可以用来测定具体基因的单元型，并且在很多领域具有应用价值，包括人白细胞抗原 (HLA) 类型的测定。本发明还涉及用于这种类型测定的试剂盒。

本发明包括分离等位基因特异性核酸分子的方法。向包含一个或多个异源序列位点的单链核酸分子中，加入一中或多中异源序列位点特异性核酸引物，并且使其杂交。在一个实施方案中，各引物的 3' 端对应于靶异源序列位点的多态性位点。在这样的实施方案中，可以使该 3' 端进行单碱基延伸，连接于 5' 端与该异源序列位点特异性引物的 3' 端相邻的第二引物，或者可以延伸数个碱基。然后分离延伸的或连接的异源序列位点特异性杂交引物和核酸分子，并根据需要回收，用于进一步的基因型测定。在另一个实施方案中，各引物包含位于引物内的一个或多个多态性碱基，这样能够选择性去除与少于 100% 互补碱基杂交的引物，而 100% 互补碱基杂交的那些引物不受影响。

本发明还涉及鉴定包含该等等位基因的核酸分子中的多个等位基因的方法。选择含有多个异源序列位点的单链核酸分子，向该核酸分子中加入两种引物，一种异源引物、一种同源引物。所述异源引物能够与位于同一核酸分子上 5' 异源序列位点的 3' 端的 3' 端异源序列位点杂交。所述异源引物的 3' 端碱基相应于所述异源序列位点的多态性碱基，这样只有在异源引物的 3' 端与所述单链核酸杂交时才发生延伸。所述同源引物能在位于 5' 异源序列位点的 5' 端位置与同一核酸分子杂交。这些引物与核酸分子杂交，并且延伸异源引物，这样就可复制位于引物之间的、核酸分子的所述 5' 异源序列位点，当延伸的异源引物达到同源引物时，同源引物起到终止异源引物延伸的作用。将核酸分子和延伸的异源

引物变性,并分离和分析异源引物,以确定 5' 异源序列位点。利用这些信息确定新一套含有另一种异源引物和另一种同源引物的核酸引物,该新一套引物的异源引物能与 5' 异源序列位点杂交(该异源引物的 3' 端碱基相应于多态性碱基),该 5' 异源序列位点位于相同核酸分子上另一个异源序列位点的 3' 端,该新一套引物的同源引物能在另一个异源序列位点的 5' 端与同一核酸分子杂交。重复前面的步骤,在每下一轮杂交/延伸中使用新的一套引物,直到在该核酸分子上鉴定出足够的异源序列位点,用来鉴定等位基因。可以用这种方式测定核酸分子的单元型。

本发明还涉及鉴定核酸分子中多个等位基因的方法,包括向一组小珠加入含有多个等位基因的核酸样品,每一个小珠连接有两个不同的引物,各小珠上至少一个引物是对一种独特等位基因的引物,使一种独特等位基因的至少一种引物与该核酸样品的一部分杂交。将杂交的引物扩增,延伸杂交引物,产生延伸的引物核酸。然后将杂交的核酸样品和引物变性,并从小珠上除去核酸样品。延伸的引物然后与小珠上的第二种引物杂交,并扩增该第二种引物。然后对含有双重扩增引物的小珠进行分析,确定核酸样品中存在的等位基因。

附图简要说明

图 1 是说明应用本发明的等位基因特异性引物延伸方法鉴定等位基因的示意图。

图 2 是说明应用引物大小标记方法的单碱基延伸多等位基因鉴定方法的示意图。

图 2A 是说明应用引物大小标记方法的单碱基延伸多等位基因鉴定方法的示意图。

图 3 是说明应用本发明的等位基因特异性连接和引物大小标记鉴定等位基因的示意图。

图 4 是说明应用本发明的杂交和引物大小标记鉴定等位基因的示意图。

图 5 是说明应用本发明的同源引物和异源引物组的多等位基因鉴定

方法的示意图。

图 6A-6F 是说明应用本发明的包含多种引物的荧光小珠鉴定多个等位基因的方法示意图。

本发明的详细描述

本发明以美国临时专利申请 No. 60/228, 994 为基础（该专利全文在这里引作参考），涉及确定等位基因标记的方法。

本申请自始至终使用下面的术语，并且定义如下：

等位基因：给定基因的变体形式。这样的变体包括单核苷酸多态性、插入、反转、易位和缺失。

抗生物素蛋白：从功能上以其高亲合力、特异性结合生物素的能力定义的蛋白质家族。抗生物素蛋白是相当小的寡聚体蛋白，由四个相同的亚基组成，每一个亚基带有一个单一的生物素结合位点。因此每摩尔抗生物素蛋白能结合 4 摩尔的生物素。抗生物素蛋白包括 (a) 两栖动物、爬行动物和鸟类产生的蛋白质，所述蛋白质存在于它们的蛋中，称为抗生物素蛋白，和 (b) 链霉菌属阿维丁链霉菌 (*Streptomyces avidinii*) 产生的蛋白质，称为链霉抗生物素蛋白。这里使用的"抗生物素蛋白"包括所有的上述蛋白。

生物素：这里使用的"生物素"包括生物素、其中生物素通过加入烷基被修饰的商业生物素产品、和生物素衍生物如活性酯、胺、酰肼和巯基，所述衍生物在聚合物上有额外的反应基团如胺、酰基和烷基离去基团、羰基和烷基卤化物或米歇尔型受体。

检测分子：一般通过外部能源使核酸可检测和/或去除的与核酸共价连接的分子。这样的分子可以包括染料、可变重量分子（包括聚腺苷酸尾和聚胸苷酸尾）、可以与小珠（包括磁小珠）连接的接头、生物素、抗生物素蛋白、地高辛配基、地高辛配基抗体和本领域公知的其它类似材料。

基因型：在基因座上携带的特定等位基因。

单元型：表示若干紧密连锁基因座的集体基因型，为同一染色体上

等位基因的完全序列。

异源引物：在严格条件下与一个独特等位基因杂交的引物。

异源序列位点：在确定的序列位点具有不同序列的两个等位基因被称为具有异源序列位点。

同源引物：与亲代双方的等位基因都杂交的引物。

亲代等位基因：含有一套来自母系一边的染色体和一套来自父系一边的染色体的哺乳动物二倍体细胞的等位基因。

引物：能够与 DNA 模板杂交的寡核苷酸。

这里引述的所有的专利文献和参考文献在这里引作参考。

本发明的方法具有几点重要的优点。本发明的方法可以快速、低成本、精确测定等位基因，包括完整基因型和单元型测定。该方法能够分析的核酸长度是本领域公知的标准扩增方法（例如聚合酶链反应）所不能完全扩增的核酸片段长度。

本发明涉及分离和鉴定等位基因特异性核酸分子的方法。可以使用任何核酸分子，优选脱氧核糖核酸。可以鉴定和分离的等位基因特异性核酸分子包括多列基因 (polyallelic genes) 的等位基因、基因片段和非表达片段。

本发明的方法和试剂盒可以用于所有具有两个或多个异源序列位点、因此具有多种等位基因类型的二倍体遗传物质。可以应用本发明的带有多个等位基因之基因的例子是哺乳动物 MHC 基因如人白细胞抗原 (HLA) I 类和 II 类基因，哺乳动物 T 细胞受体基因，TAP, LMP, ras, 非典型 HLA I 类基因，人补体因子 C4 和 C2 的基因，人 HLA 复合体中的 Bf, 和位于线粒体 DNA、细菌染色体和病毒 DNA 中的基因。

在本发明的一个方法中，获得含有多个等位基因的核酸样品，每个等位基因带有独特的一套异源序列位点。通过本领域公知的任何方法扩增该核酸样品，一个实施方案是通过聚合酶链反应 (PCR)，如 Mullis 的 1988 年 7 月 28 日公开的美国专利 No. 4,683,202 中所述。然后将扩增的核酸样品变性为单链核酸。然后可以对这种单链核酸进行分析，通过本发明的各种方法测定存在的异源序列位点，确定存在的等位基因。

本发明的方法使用一种或多种引物。本发明的引物包含与目的序列杂交的核苷酸序列。在某些情况下，要求引物在能够于扩增期间延伸的条件下杂交。在另外一些情况下，要求杂交时 100% 互补匹配的引物具有比杂交时小于 100% 互补匹配的引物更高的 T_m 。一般情况下，本发明的引物可以是任何有效的长度，但是一般包含大约 12 - 25 个核苷酸或者至少 18 个核苷酸，优选长度是大约 18 - 22 个核苷酸。在本发明的方法中，需要鉴定对于样品中靶 DNA 独特的一个或多个引物序列，以便鉴定目的序列的多态性位点。很多多等位基因的这种多态性鉴定是本领域公知的。例如，HLA-A、HLA-B 和 HLA-C 基因有大约 222 种已知的等位基因，这些等位基因的序列是本领域公知的。参见 Arnett 和 Parham, 组织抗原 (Tissue Antigens) 45: 217-257 页, 1995, 和 Baxter-Lowe 等, 1997 年 12 月 30 日公开的美国专利 No. 5,702,885。

本发明使用的描述核酸分子杂交的短语"在高度严格条件下杂交"指在低离子强度和高洗涤温度条件下杂交。短语"在低严格条件下杂交"指在高离子强度和低温条件下杂交。

影响严格性的变量包括，例如，温度、盐浓度、探针/样品同源性和洗涤条件。随着杂交温度的升高，其它都相同时，严格性提高。严格性提高使得非特异性杂交降低，即背景干扰小。核酸杂交的"高度严格条件"和"中等严格条件"在下面文献中有解释：Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel 等, 1998, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, NY, 其中的教导内容引作参考。当然，技术人员明白，为了包括或排除探针和分析物之间不同的互补程度，为了达到要求的检测范围，杂交条件的严格性可以根据需要而变化。

在本发明中可以使用各种各样的检测分子。这些分子可以与一种或多种引物偶联，或者可以直接与在延伸步骤中插入到核酸中的 ddNTPs 偶联。这些分子可以包含检测所述分子的工具，例如染料、放射性标记等；或者它们可以包含分离所述分子的工具，例如生物素/抗生物素蛋白，磁性和/或荧光珠等；或者含有两者。例如当使用生物素/抗生物素蛋白时，可以用生物素标记一种或多种引物，这样当引物与单链核酸杂

交时，产生的双链 DNA 中一条链带有生物素标记。然后该双链 DNA 可以与包被有抗生物素蛋白的固相载体结合。

本发明中使用的固相载体可以是本领域公知的任何这种载体，例如小珠、亲和色谱柱。优选的载体是磁珠形式。当载体是小珠形式时，通过用磁铁吸引小珠并在使双链核酸解离为单链核酸的条件下洗涤小珠，来分离扩增的核酸的两条链。通常在碱性条件下，一般是 0.1 M 或 0.15 M NaOH，室温下，通过几次反复温育小珠约 5-10 分钟，进行解离作用。然后可以回收各条链并且进一步分析。

应用各种各样的分析技术鉴定分离的异源序列位点来确定等位基因。这些技术是本领域公知的，包括但不限于，电泳如聚丙烯酰胺凝胶电泳、流式细胞术、高压液相色谱、激光扫描和质谱法。这些技术可以手工操作或者通过自动系统操作。这样的自动系统是本领域公知的并且包括能扫描多种颜色荧光的自动测序仪或者毛细管电泳仪。

本发明的第一种方法已在图 1 和 2 中图示说明，该方法依赖于杂交的异源序列位点特异性引物的延伸。该方法特别适用于测定高度多态性染色体区中的等位基因或单元型特异性基因型信息。如图 1 所示，DNA 样品扩增和变性之后产生单链 DNA 片段，加入在 5' 端用检测分子标记的一种或多种异源序列位点特异性引物。将异源序列位点特异性引物加入单链核酸分子中并且使其杂交。在优选的实施方案中，各引物的 3' 端与异源序列位点的多态性碱基互补。因此，如果引物与其中 3' 端碱基不互补的异源序列位点杂交的话，当使之处于延伸条件下时引物不会延伸。优选地，使用能区别单个核苷酸差异的酶。如图 1 所示，然后使杂交的引物延伸，只有与互补 3' 端碱基匹配杂交的引物才能延伸。然后通过检测分子去除引物，图 1 中以生物素为例说明。使用包被抗生物素蛋白的磁珠通过引物上的生物素去除引物。然后在与那些未经延伸的引物结合的 DNA 片段被去除的条件下洗涤杂交的引物/DNA 片段。然后使延伸的双链核酸变性。分析不再与小珠结合的链，确定异源序列位点。

或者，本发明中使用的引物可以不在 5' 端与检测分子偶联，而是如前所述使引物杂交，使用与检测分子偶联的 ddNTPs 使那些与互补 3' 端

杂交的引物进行单碱基延伸，如图 2 所示。利用延伸引物上的检测分子分离引物，然后使引物变性并进行分析，确定存在的异源序列位点。

使用以下的方法时，本发明还适用于使用能扫描四种颜色荧光的自动测序仪或者毛细管电泳仪的高通量单核苷酸多态性测定。也可以将同样的方法加以修改来测定单核苷酸多态性之外的其它遗传变异类型，包括多碱基多态性、插入、反转、易位和缺失。

本发明的另一种方法依赖于等位基因特异性连接。图 3 说明了这种方法。如图 3 所示，将异源序列位点特异性引物加入含有一个或多个异源序列位点的单链 DNA 片段中。所述异源序列特异性引物的各引物的 3' 端与一个异源序列位点的多态性碱基互补，并且使其与所述 DNA 片段杂交。然后加入连接引物，并使其与所述 DNA 片段杂交。各连接引物具有与所述 DNA 片段之一的一部分互补的序列，使得连接引物的 5' 端直接邻接异源序列位点特异性引物的 3' 端。如果该异源序列位点特异性引物不与所述 DNA 片段杂交，则当处于连接条件下时，连接引物不能与异源序列位点特异性引物连接。如果可能，则引物被连接起来，然后使之处于足以使没有连接的引物变性但是不足以使与 DNA 片段杂交的连接引物变性的温度条件下。一般情况下，当使用 20 个核苷酸的引物时，这样的温度是大约 60℃。然后通过本领域公知的任何方法去除杂交的连接引物。如图 3 所示，一套引物可以连接有检测分子，如生物素。检测分子可以连接在异源序列特异性引物上或连接在连接引物上。此外，可以将所描述的不同方法组合，如图 3 所示，通过一种方法检测一个异源序列位点处的多态性，通过这里描述的其它方法测定其它位点处的多态性。也如图 3 所示，一种或多种引物可以有可变重量的分子与各引物的 5' 端偶联，这样，没有两个引物具有相同的分子量。这种可变重量的分子可以是在杂交/扩增步骤中不反应的任何合适的材料，包括多聚同型核酸尾，例如聚腺苷酸尾 (poly A)。这样的聚腺苷酸尾的长度差是 2-4 个碱基，但是可以是在标准分离仪器例如凝胶电泳上足以分离具 poly A 尾引物的任何不同长度。

图 4 说明本发明的另一种方法。根据这样的方法，将一套异源序列

特异性引物加入包含多个异源序列位点的 DNA 片段中。各引物具有至少一个多态性碱基，其位于各引物之内，这样，在引物与 DNA 片段杂交之后，杂交中有错配碱基的那些引物的 T_m 比没有错配碱基的那些引物的 T_m 低。然后利用 T_m 的这种差异来去除少于 100% 互补杂交的那些引物。这样的碱基错配一般发生于引物序列中心附近。去除少于 100% 互补杂交的引物/DNA 片段缀合物之后，分析留下的缀合物，测定特异性异源序列位点，确定具体的等位基因。这可以用各种各样的方法进行。根据图 4 所示，所有的引物都可以连接可变重量的分子。各特异性异源序列位点的所有引物可以连接特定的可变重量的分子。在一个或多个特异性异源序列位点的各多态性的各引物连接不同的检测分子。按照检测分子将杂交的引物分成各个组，并通过进一步测定各组引物中存在哪一种可变重量分子，来确定等位基因特异身份。

本发明的另一种方法能够测定核酸长片段上的多个异源序列位点，所述核酸长片段可能太长，用常规方法例如 PCR 不能完全扩增。如图 5 所示，选择含有多个异源序列位点的单链核酸分子。向该核酸分子中加入两种引物，一种异源引物和一种同源引物。异源引物能与位于相同核酸分子上的 5' 异源序列位点的 3' 端的 3' 异源序列位点杂交。所述异源引物的 3' 端碱基相应于所述异源序列位点的多态性碱基，这样只有在异源引物的 3' 端与所述单链核酸杂交时才发生延伸。所述同源引物能与同一核酸分子在 5' 异源序列位点的 5' 端位置杂交。引物与核酸分子杂交，并延伸异源引物，以便复制位于引物之间的核酸分子的 5' 异源序列位点。将核酸分子和延伸的异源引物变性，并分离和分析异源引物，确定 5' 异源序列位点。利用这种信息鉴定新的一套含有异源引物和同源引物的核酸引物，该新的一套引物的异源引物能与 5' 异源序列位点杂交（该异源引物的 3' 端碱基相应于多态性碱基），所述 5' 异源序列位点位于同一核酸分子上另一个异源序列位点的 3' 端，该新的一套引物的同源引物能与位同一核酸分子于另一个异源序列位点的 5' 端的位置杂交。重复前面的步骤，以下每一轮杂交/延伸中使用一套新的引物，直到鉴定出足够量的用来鉴定等位基因的核酸分子上的异源序列位点。可以用这

种方式测定核酸分子的单元型。

如图 6A-6F 所示,本发明还涉及鉴定核酸分子中多个等位基因的方法。如图 6A 所示,该方法包括,向一组小珠加入含有多个等位基因的核酸样品,每个小珠连接有两个不同的引物,各小珠上的至少一个引物是对一种独特等位基因的引物。然后如图 6B 所示,使该核酸反应,以便使独特等位基因的至少一种引物与该核酸样品的一部分杂交。使杂交的引物扩增,以延伸杂交的引物,产生延伸的引物核酸,如图 6C 所示。参见图 6D,然后将杂交的核酸样品和引物变性,从小珠上除去核酸样品。延伸的引物然后与小珠上的第二种引物杂交(6E),并扩增该第二种引物(6F)。然后对含有双重扩增引物的小珠进行分析,确定核酸样品中存在的等位基因。为了容易从小珠上去除引物,引物可以具有裂解位点。

本发明还涉及用于实施本发明所述方法的试剂盒。在大多数基础实施方案中,本发明的试剂盒包含关于实施上述方法的说明。另外,试剂盒可以含有至少一种或几种本发明方法中使用的必要的试剂,例如一套或几套位点特异性扩增引物、聚合酶链反应缓冲剂、双脱氧核苷酸(其中一种或多种是根据需要被标记的)、核酸扩增试剂、产生单链核酸片段所用试剂、一种或多种异源序列位点特异性引物(根据需要与至少一种检测分子偶联)、一种或多种连接引物、用于连接邻近杂交引物的试剂、包含一种或多种检测分子的小珠和一个或多个无菌微管。

从下面的实施例会更好理解本发明。但是,本领域技术人员容易理解,所讨论的具体方法和结果只是为了详细说明本发明而不是要限制本发明。

实施例

本实施例涉及应用三种策略来验证不同等位基因的捕获,所述不同的等位基因与 HLA 基因中特定的多态性有关: i) 杂交; ii) 单碱基延伸; 和 iii) 连接。

使用这些条件的每一种作为建立一项有助于鉴定合适的等位基因、从而鉴定与该等位基因有关的特定多态性的测试方法的试验。后两种方

法是以酶为基础的测试，要求使用 Taq 连接酶和 Thermus 测序酶，利用这些酶区别单链 DNA 上特定位点单个核苷酸差异的能力。已观察到，这些方法对分辨所研究的特定等位基因中的单核苷酸多态性或突变足够灵敏。

1. A. 杂交

一种检测方法是捕获的特异靶物与寡核苷酸偶联的微球杂交，并且分析该复合体。如下所述进行反应。对要捕获的等位基因进行两轮杂交。第一轮杂交使用不同的纯合 DNA 和杂合 DNA 以及识别特定序列的特异寡核苷酸偶联小珠。第二轮杂交使用另一套识别靶物中特异序列的小珠，证实捕获的等位基因的存在。但是，开始先进行单轮杂交作为测定寡核苷酸偶联微球对靶物中不同等位基因的特异性的对照实验。

使用从 UCLA 登记处获得的各种基因组 DNA 样品 (UCLA 210, UCLA 230 和 UCLA 243)，使用有义引物 5' A200A 和反义引物 3' A322-1 扩增 HLA-A 基因座的 158 bp DNA 片段。对于该实施例，应用标准扩增方法制备该 158 bp 片段。在该实施例中用来扩增纯合 DNA 和杂合 DNA 的引物是：

5' A200A 5'-ACA GCG ACG CCG CGA GCC A-3'，位置 182-200，有义引物

3' A322-1 5'-CCTCGCTCTGTTGTAGTA-3'，位置 322-340，反义引物

通过不对称 PCR 制备用于连接、单碱基延伸或杂交的单链 DNA (ss)。除了加入的有义引物浓度比反义引物低 50 倍之外，不对称 PCR 的条件如上所述。反义引物是生物素化的，产生 5' 端生物素标记的单链 PCR 片段。

或者，使用 5'-3' 外切酶、T7 基因 6 外切酶制备 ssDNA。在这种情况下，在寡核苷酸合成期间通过在 PCR 引物的 5' 端引入 4 硫代磷酸酯键来保护目的链。T7 外切酶将引物的 5' 端不包含硫代磷酸酯碱基的链降解

1. B. 单碱基延伸反应 (SBER)

该实施例中单碱基延伸反应 (SBER) 使用延伸引物，设计该引物使其 3' 端在邻近多态性碱基处退火。该实施例的延伸方法使用 Thermo 测序

酶或者 Klenow 大片段聚合酶，分别在循环或非循环反应中引入多态性碱基。

使用单碱基延伸反应试图捕获特异等位基因；使用引物混合物 (PM) H001 和 H002 进行等位基因特异性 PCR (ASPCR)。使用这两个引物混合物在多态性位点引入特定碱基。两个 PM 使用共同的 5' 引物 (agcgacgccgcgagcca)，但是使用等位基因特异性 3' 引物。使用杂合 DNA 时，PM H001 在相应的多态性位点处特异性引入 "C" (ccaagagcgcaggtcctcg) 碱基，而 PM H002 特异性地引入 "A" (ccaagagcgcaggtcctct)。

如上所述进行延伸反应。来自延伸反应的产物被纯化并且与链霉抗生物素蛋白磁珠结合。链霉抗生物素蛋白对生物素的高结合亲和性使得生物素标记的靶物分子的分离快速而有效。将复合体洗涤数次，以减小任何非结合标记的可能性，该非结合标记是可能影响实验的下一步反应的因素。

对多种不同的样品进行试验，以通过 ASPCR 验证捕获的等位基因。使用 PMH001 和 H002 进行 5 次 ASPCR。典型的延伸反应方法的实验条件和阴性对照如下：延伸反应中使用的实验样品是生物素化的 A 或 C。假设测序酶会正确地引入特定碱基，因此来自捕获的特异等位基因的正确信号将会在使用引物混合物的基础上被检测。两个阴性对照和 SBER 中实验样品具有相同的成分，只是从反应中取消了 ddNTPs A 或 C。另一个阴性对照只使用没有标记的 ddNTPs A、C、G 和 T。使用引物混合物 H001 和 H002，通过 ASPCR 验证下面各组反应的上清液。测试的上清液分如下 5 组：延伸之后、延伸产物与磁珠结合之后、洗涤数次之后、和高温下从磁珠洗脱产物之后。

循环反应

每 20 μ l 反应使用 100 ng HLA A 基因座的单链 (ss) DNA，如上所述对基因组 DNA PCR 扩增后获得该单链 DNA；向反应混合物加入 2 μ M 延伸引物、125 nM 各没有标记的双脱氧终止子 (ddG、T、A 或 C)、和 500 nM 的生物素-标记的 ddNTP (A 或者 C，取决于要在多态性位点引入的特异

碱基)、10X 酶反应缓冲剂(稀释至 1X 的终浓度)和 5 单位的测序酶。反应在 94℃ 下进行 1 分钟,接着进行 40 个循环的 94℃ 10 秒和 60℃ 30 秒。在 72℃ 10 分钟进行最终的延伸循环,并在 4℃ 下保持,此为实施例中的延伸反应。

非循环反应

当使用 Klenow 大片段聚合酶反应进行延伸时,第一步要求延伸引物与单链 DNA 杂交。100 ng 的 ssDNA 与 20 μ M 的延伸引物退火。引物和 DNA 在 90℃ 下混合 5 分钟,然后缓慢冷却到室温,这样生成杂交物。该过程持续大约 1 小时。下一步包括加入特异性没有标记的和标记的生物素 ddNTPs (1.5 μ M)和 5U Klenow 大片段,并在 37℃ 下温育 30 分钟。延伸结束后,向反应混合物中加入 1.5 μ l 的 0.5 M EDTA。

使用 QIAQUICK® 柱 (Qiagen)纯化延伸产物(循环或非循环的),去除没有被掺入的生物素。将 10 μ l 链霉抗生物素蛋白包被的磁珠(于 2X 结合缓冲液 10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 2.0 mM NaCl 中)与 20 μ l 纯化的延伸产物在室温下混合 20 分钟。对磁珠施加磁场,弃除没有结合的延伸产物。用 1 ml 相同的结合缓冲液将磁珠洗涤至少两次,通过在 95℃ 下加热 2 分钟将目的链从磁珠上洗脱下来。

然后使用特异引物对洗脱的链进行等位基因特异性 PCR (ASPCR)来证实特异性等位基因的多态性。同时进行合适的对照实验以验证该结果。

1. C. 连接方法

该实施例涉及利用在与单链 DNA 模板退火之前两种引物之间的连接。本实施例的实施是基于这样的理解:与 ssDNA 完全匹配的两种引物的连接会生成强的双螺旋,因此可耐受较高温度洗涤(高于各引物的 T_m)。而错配模板将难以耐受高于引物 T_m 的温度洗涤,因此其本身会从双螺旋游离出来并且最终被洗掉。

使两种引物彼此邻近,其中一种引物是等位基因特异性或异源序列引物,其在 3' 端有一个多态性位点,在 5' 端有一个生物素标记。第二种引物是连接引物,其在 5' 端有一个介导连接的磷酸基团。假设两种引

物在与 ssDNA 模板杂交之前被连接在一起,但是本发明方法不依赖于该假设。20 μ l 反应混合物含有 10 μ l (100 ng) 特异 ssDNA、1 μ l 各种引物 (1 μ M)、2 μ l 10X 连接缓冲液和 10U Taq 连接酶。

混合物在热循环仪中在 90 $^{\circ}$ C 下加热 2 分钟,接着在 37 $^{\circ}$ C 下温育 30 分钟,此时通过加入 EDTA 终止反应。使用 QIAQUICK[®] 柱纯化混合物,去除所有的没有结合的引物和生物素,它们是等位基因特异性 PCR 反应中的非特异性因素。

如上所述,纯化的复合体与链霉抗生物素蛋白包被的磁珠结合。在高严格洗涤条件下洗涤复合体。通过提高洗涤缓冲液的温度 (55-95 $^{\circ}$ C) 控制洗涤的严格性,以便达到分离等位基因特异性 DNA 片段的阈值温度。利用识别所捕获等位基因的多态性位点的引物,通过等位基因特异性 PCR,进一步验证洗脱的模板。

2. 单元型测定的杂交方法

HLA A 基因座特异性多态性的不同寡核苷酸与用于杂交方法的不同组的小珠 (Luminex) 偶联。选择与寡核苷酸偶联小珠杂交的模板,以提供完全的序列同源性。根据厂商说明 (Luminex Corp.) 进行小珠与特异性寡核苷酸的偶联。Luminex 小珠-探针偶联物与上面制备的 PCR 片段杂交。用于分离等位基因特异性 PCR 片段的探针序列是:

L5' A107A 1AGGTATTTCTACACCTCCGTG

L5' A107C 1AGGTATTTCTCCACATCCGTG

洗掉没有杂交的 PCR 模板,并从 Luminex 小珠上洗脱与 5' A107A 或 5' A107C 特异性杂交的 PCR 片段。有和没有间隔区 (即寡核苷酸序列中间含有另外 20 个随机碱基) 的不同大小的寡核苷酸,与不同的小珠组偶联,并与不同的模板杂交,测定不同等位基因的特异性。引物标识中的数字与小珠上偶联的不同寡核苷酸相关联,并且表明特异性等位基因的多态性位点。例如,107 A 或 C 表示多态性位点在 107 位碱基处,其中每个等位基因在 107 位有一个 A 或者 C。

杂交反应程序如下: 17 μ l 的 ssDNA 在 95 $^{\circ}$ C 下变性 5 分钟,接着加入 33 μ l 特异性寡核苷酸偶联的小珠 (5000 小珠/每种寡核苷酸) (与模板

互补), 并在 55℃ 下温育 30 分钟。当使用有间隔区的寡核苷酸时, 杂交温度提高至 65℃, 以保证特异性。将小珠混合物充分涡流混合并超声处理, 在加入 ssDNA 之前升至要求的杂交温度。杂交之后, 将混合物在 2000 x g 下离心; 用 1.5X TMAC (3M TMAC, 0.1 % SDS, 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 4 mM EDTA pH 8.0) 洗涤两次, 每次用 1ml, 弃除上清液。

向复合体加入 20μl 的 H₂O, 在 95℃ 下洗脱与寡核苷酸偶联磁珠结合的捕获模板 5 分钟。对 1μl 洗脱的模板进行不对称 PCR, 获得更大丰度的洗脱模板, 用于第二轮杂交。

用与捕获模板互补的第二套小珠进行第二轮杂交, 作为验证模板准确性的试验。向各试管加入 120 ng 链霉抗生物素蛋白-藻红蛋白 (SA-PE) 并在杂交温度下再温育 5 分钟之后, 在 Luminex 100 流式细胞仪上测定样品。获得的荧光信号量是生物素与 SA-PE 相互反应的真实表现。该方法是一种定量测试方法, 阳性信号的量以对于给定反应获得的最大数目表示。

第二轮杂交使用的其它等位基因-特异性 Luminex 小珠-探针如下:

用于证实等位基因特异性分离的 Luminex 小珠-探针:

L5' A107A	1AGGTATTTCTACACCTCCGTG
L5' A107C	1AGGTATTTCTCCACATCCGTG
L5' A153A	1CTTCATCGCAGTGGGCTAC
L5' A153C	1CTTCATCGCCGTGGGCTAC
L5' A249T	1GCAGGAGGGTCCGGAGTAT
L5' A249G	1GCAGGAGGGGCCGGAGTAT
L5' A291C	1GAAGGCCCACTCACAGACT
L5' A291G	1GAAGGCCCA <u>G</u> TCACAGACT

表 1. 预期的杂交之后等位基因特异性反应模式

模板 DNA 名称	Luminex 小珠-探针反应模式						
	HLA-A 等位基因	L5'A107A	L5'A107C	L5'A249G	L5'A249T	L5'A291C	L5'A291G
UCLA 210 (纯合子)	A*0206,-	+	-	-	+	+	-
UCLA 230 (杂合子)	A*2402101	-	+	+	-	+	-
	A*3401	+	-	+	-	-	+
UCLA 243 (纯合子)	A*2402101, -	-	+	+	-	+	-

表 2. 观察到的杂交之后等位基因特异性反应模式

模板 DNA 名称	探针	L5'A107A	L5'A107C	L5'A249G	L5'A249T	L5'A291C	L5'A291G
UCLA 210 (纯合子)	L5'A107A	(+) 166	(-) 50	(-) 124	(+) 279	(+) 234	(-) 21
	L5'A107C	(-) 152	(-) 60	(-) 137	(-) 330	(-) 223	(-) 29
UCLA 230 (杂合子)	L5'A107A	(+) 63	(+) 111	(+) 90	(-) 56	(+) 94	(-) 27
	L5'A107C	(-) 52	(+) 87	(+) 70	(-) 55	(+) 57	(-) 13
UCLA 243 (纯合子)	L5'A107A	(-) 13	(-) 57	(-) 37	(-) 23	(+) 96	(-) 14
	L5'A107C	(-) 15	(+) 83	(+) 60	(-) 36	(+) 124	(-) 13
阴性对照		7	9	14	19	6	9

表 3. 使用阴性对照观察到的杂交之后等位基因特异性反应模式

模板 DNA 名称	没有探针 (对照)	L5'A107A	L5'A107C	L5'A249G	L5'A249T	L5'A291C	L5'A291G
UCLA 210 (纯合子)		(+) 65	(-) 29	(-) 65	(+) 124	(+) 97	(-) 19
UCLA 230 (杂合子)		(+) 63	(+) 111	(+) 90	(-) 56	(+) 30	(-) 68
UCLA 243 (纯合子)		(-) 12	(-) 216	(-) 100	(-) 23	(+) 213	(-) 10
阴性对照		7	9	14	19	6	9

上面表中的结果证明了成功的等位基因特异性杂交，因为等位基因特异性数目比非等位基因特异性反应的大。

正如本领域技术人员明理解的，对于任何和所有的目的，特别是就提供书面描述来说，这里公开的所有的范围包括任何和所有可能的次级范围及其组合。容易理解，所有列出的范围是对相同范围分为至少相等的一半、三分之一、四分之一、五分之一、十分之一等的充分公开和描述。作为非限制性例子，这里讨论的各范围容易分为下三分之一、中间的三分之一和上三分之一等。本领域技术人员还明白，所有例如"至多"、"至少"、"大于"、"小于"等描述是指可以如上所述接着分成次级范围的范围。

尽管只是描述了几个优选的实施方案，本领域普通技术人员明白可以修饰和改变该实施方案而不脱离本发明中心精神和范围。因此，上面描述的优选的实施方案在所有的方面均为举例说明而不是限制本发明的范围，本发明的范围由权利要求书指明，而不是由前面的说明书限定，而且落在权利要求含义之内和等同范围之内内的所有变化都包含在本发明范围内。

下面的参考文献在本专利申请中全文引作参考：

Jorde, L. B.: 美国人类遗传学杂志 (Am. J. Hum. Genet.) 56, pp. 11-14, 1995;

Thomson, G.: 美国人类遗传学杂志 (Am. J. Hum. Genet.) 57, pp. 474-486, 1995;

Ruano, G., Kidd, K. K. 和 Stephens, J. C.: 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 87, pp. 6296-6300, 1990;

Ruano, G. 和 Kidd, K. K.: 核酸研究 (Nucleic Acids Res.) 19, pp. 6877-6882, 1991;

Beloin, S. M., Tishkoff, S. A., Bentley, K. L., Kidd, K. K. 和 Ruano, G.: 核酸研究 (Nucleic Acids Res.) 24, pp. 4841-4843, 1996;

Gilles, P. N., Wu, D. J., Foster, C. B., Dillon, P. J. 和 Chanock, S. J.: 通过对半导体芯片的电子点印迹分析的单核苷酸多态性辨别 (Single nucleotide polymorphic discrimination by an electronic dot blot assay on semiconductor microchips), 自然生物技术 (Nature Biotechnol.) 17, pp. 365-370, 1999;

Little, D. P., Braun, A., O'Donnell, M. J. 和 Koster, H.: 全比较 DNA 分析的微型化阵列质谱 (Mass spectrometry from miniaturized arrays for full comparative DNA analysis), 天然药物 (Nature Med.) 3, pp. 357-362, 1997;

Marshall, R. D., Koonts, J. 和 Sklar, J.: 用噬菌体解离酶裂解 DNA 异源双螺旋对突变的检测 (Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvases), 自然遗传学 (Nature Genet.) 9, pp. 177-183, 1995;

Nauck, M. S., Gierens, H., Nauck, M. A., Marz, W. 和 Wieland, H.: 在光循环器上用荧光团标记的杂交探针对人血小板抗原 1 (HPA-1) 的快速基因型测定 (Rapid genotyping of human platelet antigen 1 (HPA-1) with fluorophore-labelled hybridization probes on the Lightcycler), Brit. J. Haematol. 105, pp. 803-810, 1999;

Pease, A. C., Solas, D., Sullivan, E. J., Cronin, M. T., Holmes, C. P. 和 Fodor, S. P. A.: 用于快速 DNA 测序分析的产生光的寡核苷酸阵列 (Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis), 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 1994;

Southern, E. M.: DNA 芯片: 大规模与寡核苷酸杂交进行序列分析 (DNA chips : Analysis sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale), 遗传学动态 (Trends Genet.) 12, pp. 110-115, 1996;

Syvanen, A. C., Aalto-Setälä, K., Harju, L., Kontula, K. 和 Soderlund, H.: 在载脂蛋白 E 基因型测定中的引物导向核苷酸插入试验 (A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E), 基因组 (Genomics) 8, pp. 684-692, 1990;

Tyagi, S. 和 Kramer, F. R.: 分子指标: 杂交时发荧光的探针 (Molecular beacons : Probes that fluoresce upon hybridization), 自然生物技术 (Nature Biotechnol), 14, pp. 303-308, 1996。

序列表

<110> 刘向军

<120> 等位基因的测定方法

<130> 034928/0112

<140> US 09/943,416

<141> 2001-08-30

<150> US 60/228,994

<151> 2000-08-30

<160> 18

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<223> 引物

<400> 1

acagcgacgc cgcgagcca

19

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<223> 引物

<400> 2

cctcgctctg gttgtagta

19

<210>	3	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	未知	
<220>		
<223>	引物	
<400>	3	
	agcgacgccg cgagcca	17
<210>	4	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	未知	
<220>		
<223>	引物	
<400>	4	
	ccaagagcgc aggtcctcg	19
<210>	5	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	未知	
<220>		
<223>	引物	
<400>	5	
	ccaagagcgc aggtcctct	19
<210>	6	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	未知	
<220>		
<223>	探针	

<400> 6
aggtatttct acacctccgt g 21

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> 探针

<400> 7
aggtatttct ccacatccgt g 21

<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> 探针

<400> 8
cttcacgcga gtgggctac 19

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> 探针

<400> 9
cttcacgcc gtgggctac 19

<210> 10
<211> 19
<212> DNA

<213>	未知	
<220>		
<223>	探针	
<400>	10	
gcaggagggt	ccggagtat	19
<210>	11	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	未知	
<220>		
<223>	探针	
<400>	11	
gcaggagggg	ccggagtat	19
<210>	12	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	未知	
<220>		
<223>	探针	
<400>	12	
gaaggccac	tcacagact	19
<210>	13	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	未知	
<220>		
<223>	探针	
<400>	13	
gaaggcccag	tcacagact	19

<210>	14	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	未知	
<220>		
<223>	探针	
<400>	14	
	tgtacgtagc agtcagtagt agc	23
<210>	15	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	未知	
<220>		
<223>	引物	
<400>	15	
	gctactactg actgctacgt aca	23
<210>	16	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	未知	
<220>		
<223>	引物	
<400>	16	
	tgtacgtagc aatcagtagt agc	23
<210>	17	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	未知	
<220>		
<223>	引物	

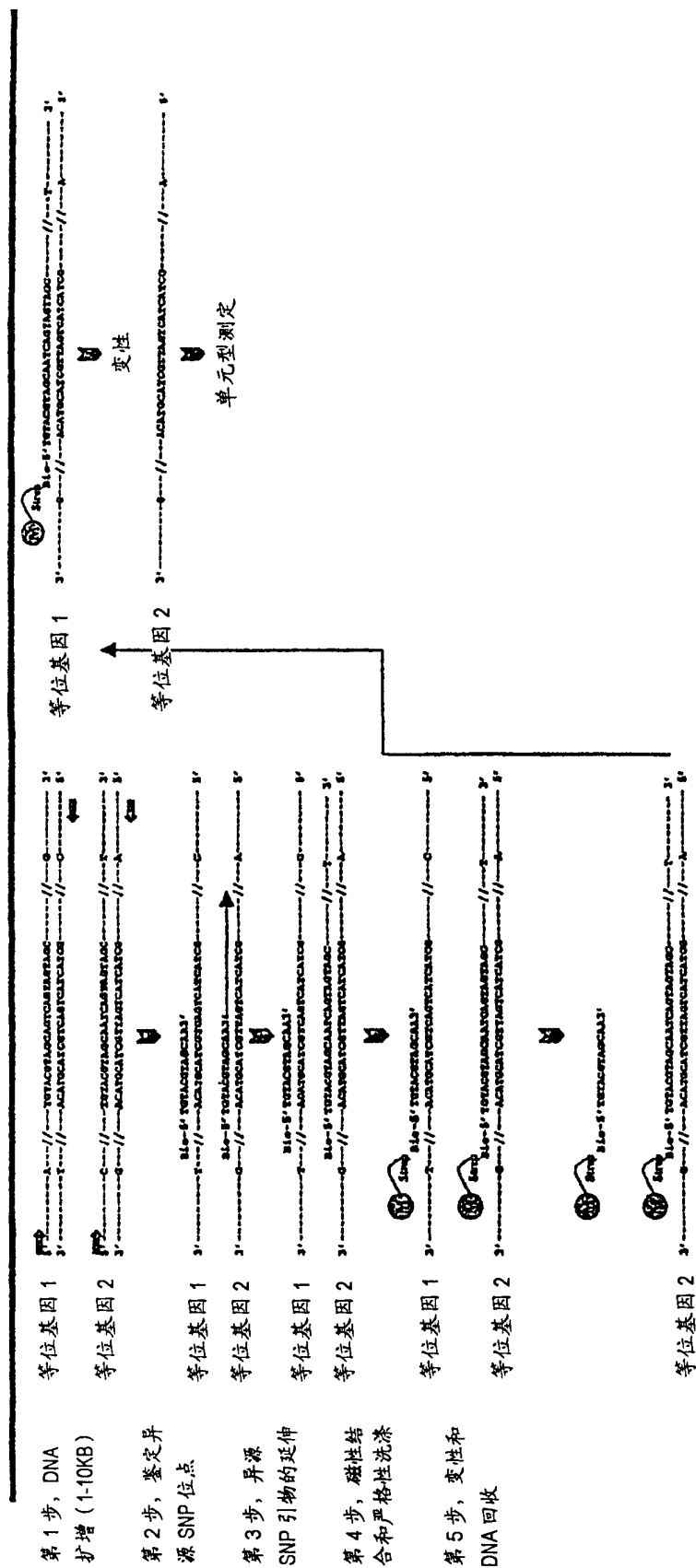
<400> 17
gctactactg attgctacgt aca 23

<210> 18
<211> 12
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> 引物

<400> 18
tgtacgtagc aa 12

基于等位基因特异性引物延伸 (ASPE)



一
圖

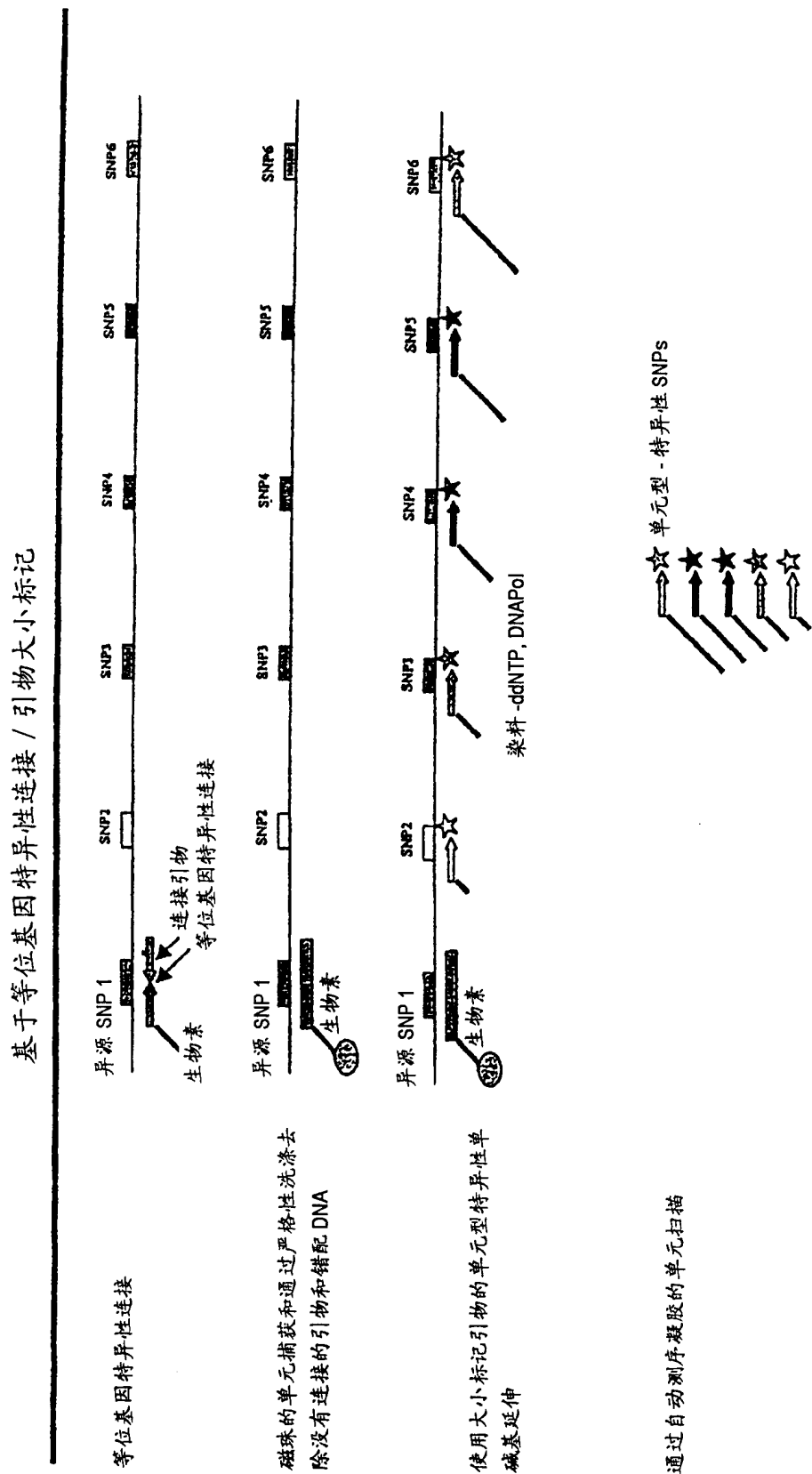


图 2

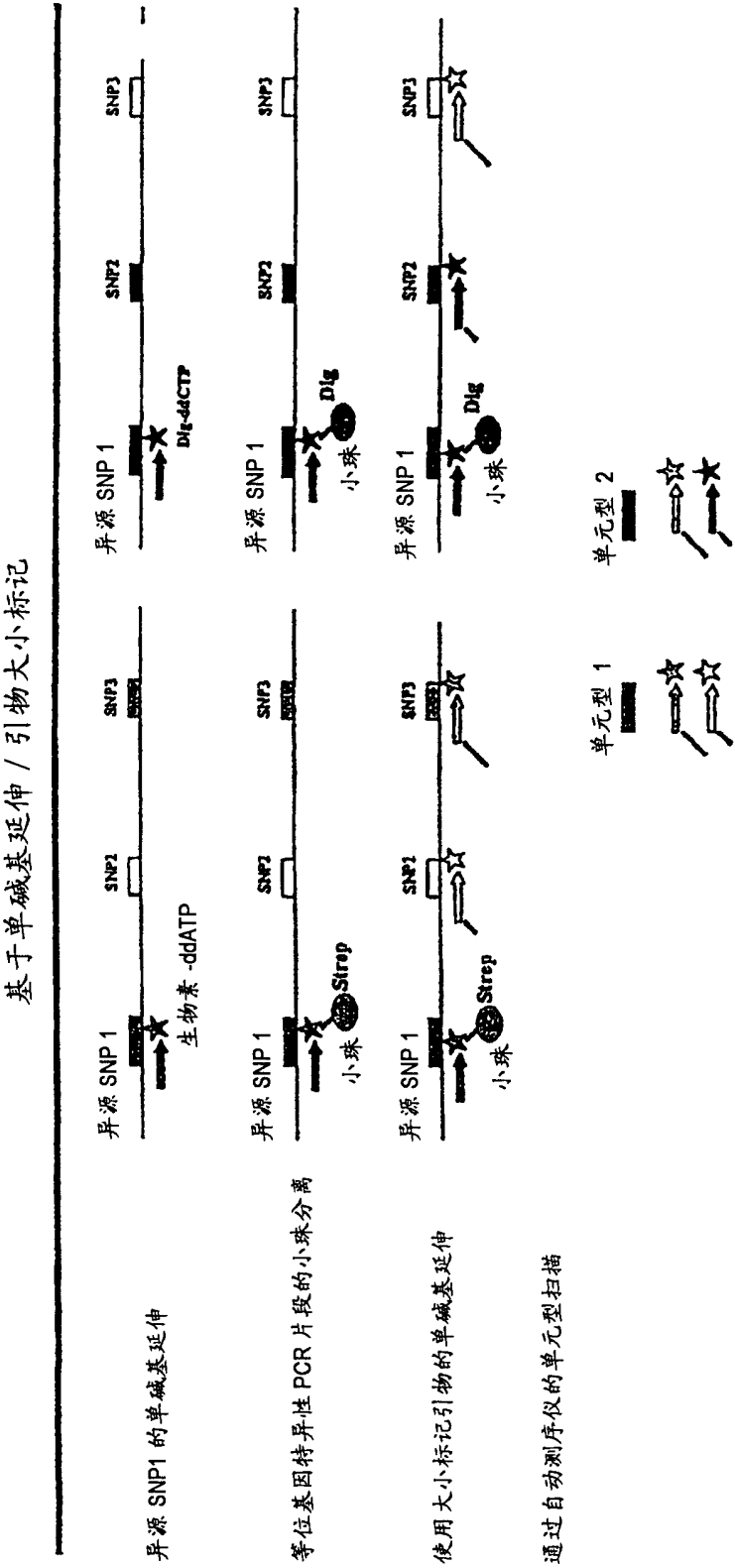


图 2A

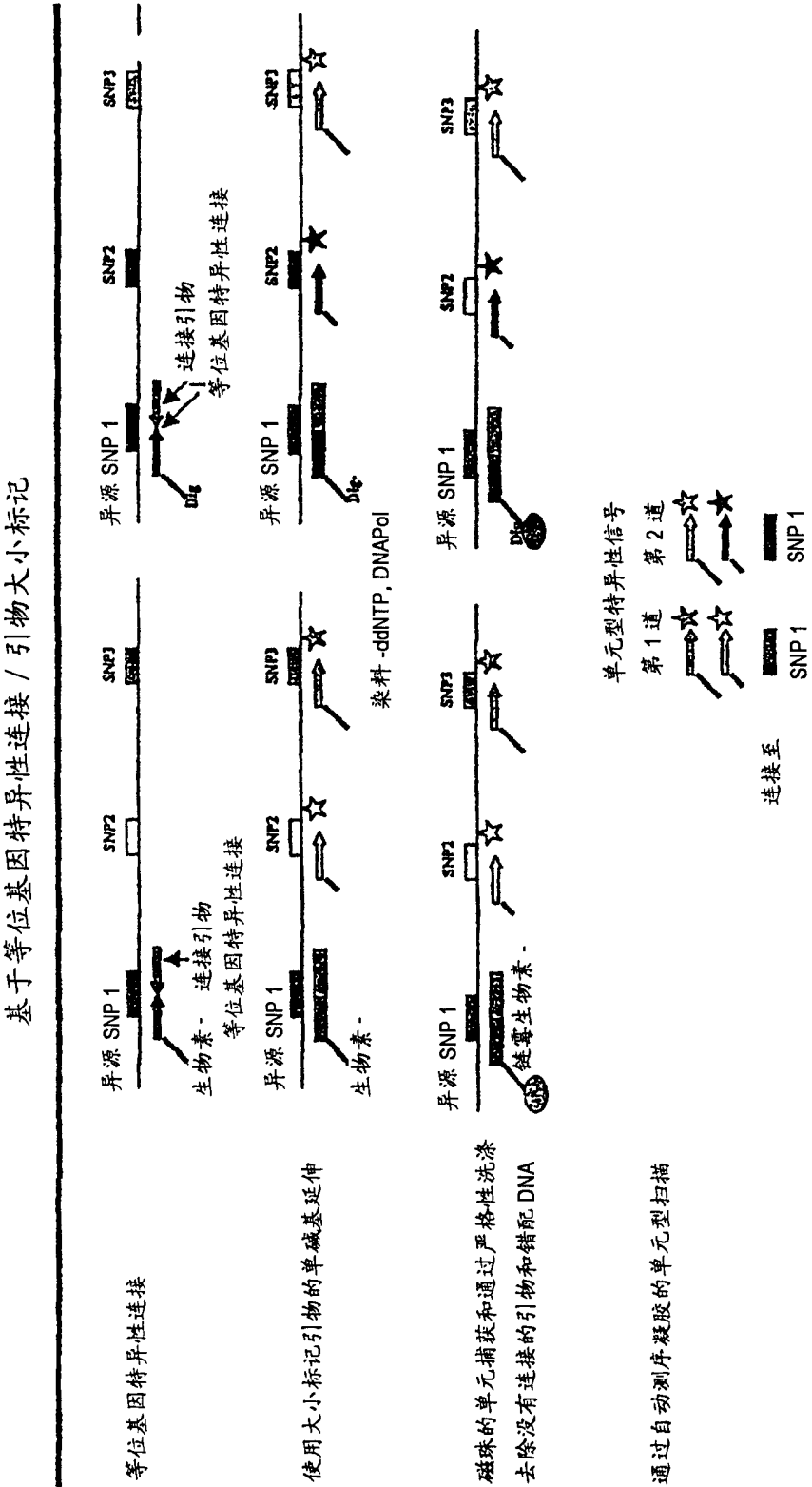


图 3

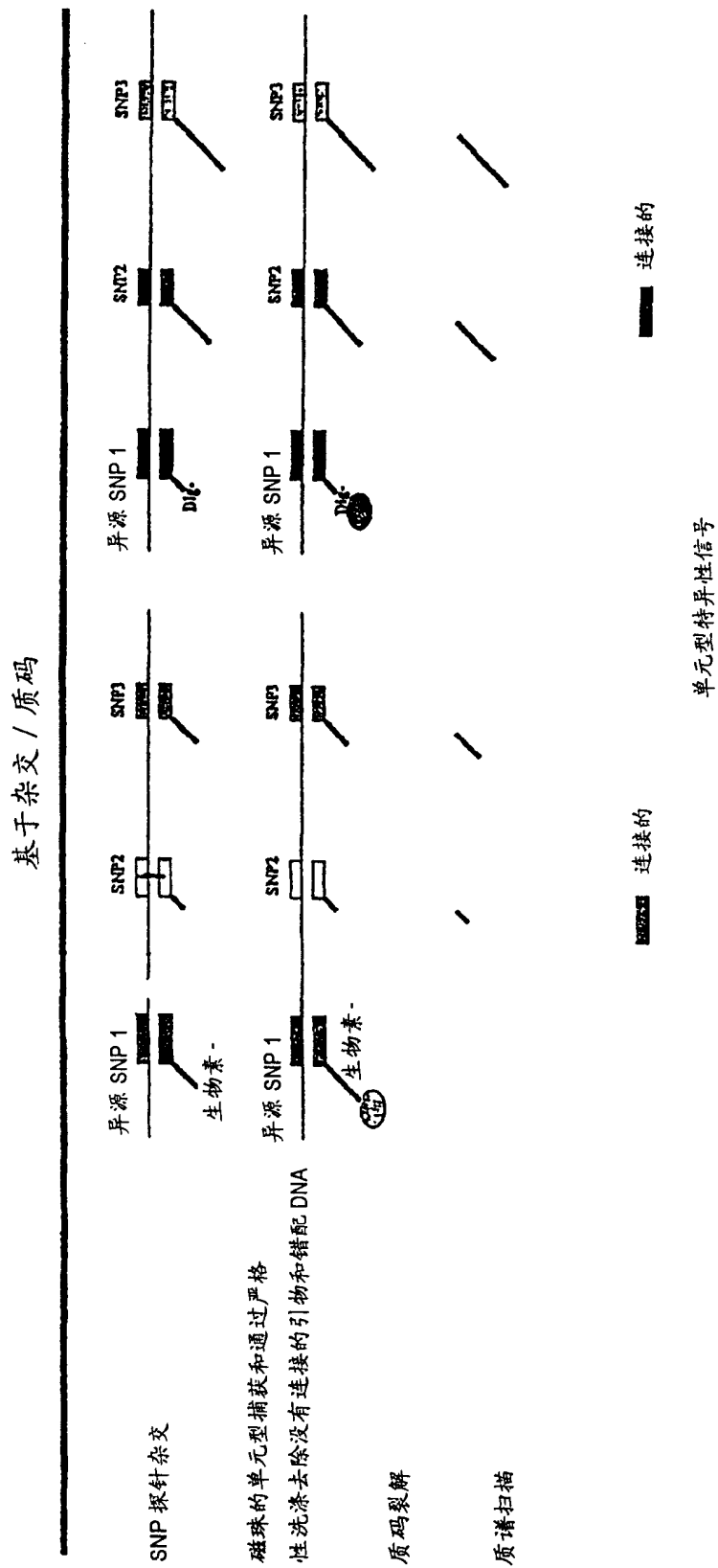


图 4

基于等位基因特异性连接 / 引物大小标记

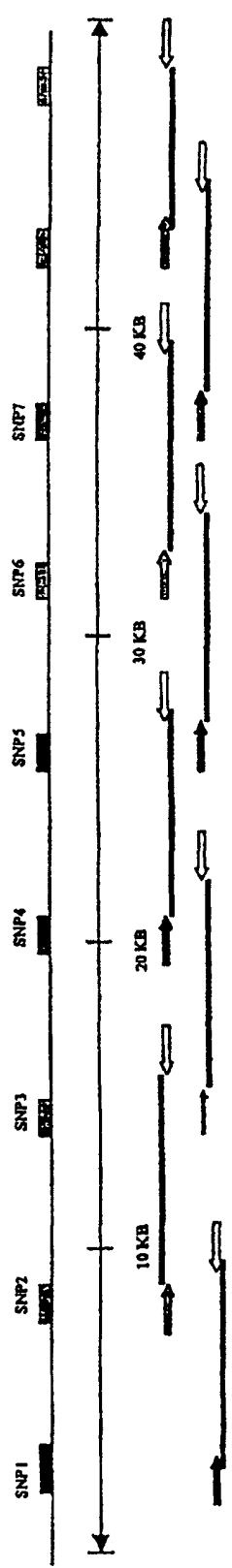


图 5

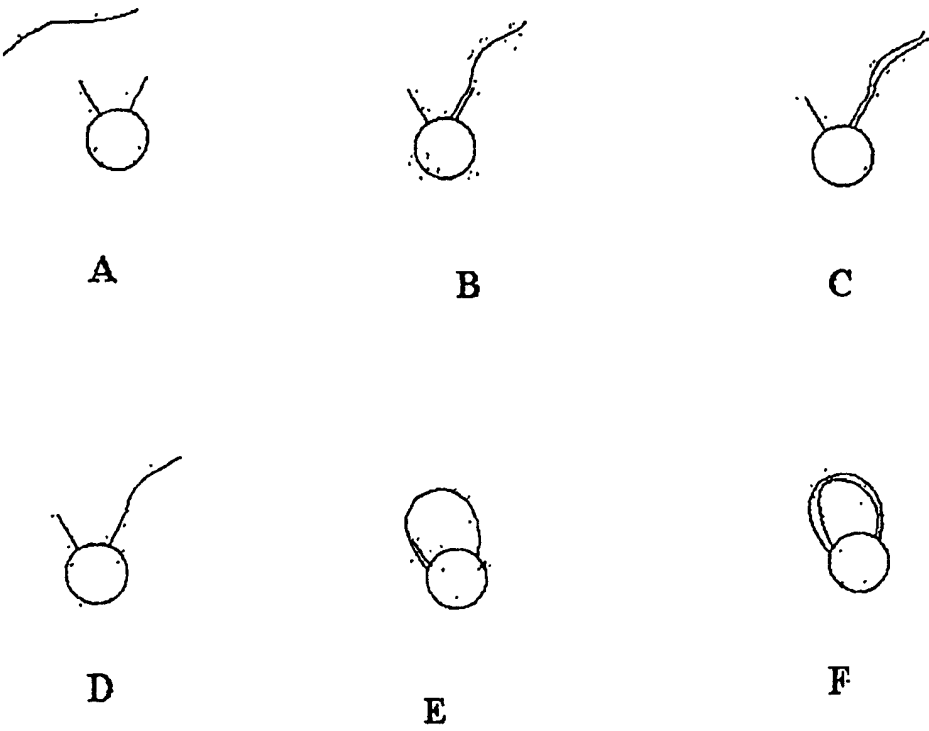


图 6