

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710087739.0

[43] 公开日 2007年11月21日

[11] 公开号 CN 101074450A

[22] 申请日 2002.9.24

[21] 申请号 200710087739.0

分案原申请号 02823272.0

[30] 优先权

[32] 2001.9.24 [33] US [31] 60/324421

[71] 申请人 一兰姆达公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 K·塞托 J·-H·李

L·布莱尔

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 刘 玥

权利要求书2页 说明书53页 附图5页

[54] 发明名称

诊断探针检测系统

[57] 摘要

本发明涉及一种检测核酸序列是否存在的方法，所用诊断探针包括基本上分别互补于靶标核酸链的第一和第二靶标区的第一和第二探针区，其中第一探针区位于第二探针区的5'端。第一探针区基本上互补于靶标核酸链的第一靶标区，靶标核酸链还具有第二靶标区，其中当靶标核酸链上的所述第一靶标区与第二靶标区连续时，那么在诊断探针上的第一和第二探针区用核酸间隔区隔开。

1. 一种检测在两个或更多样品核酸链上的两个或更多靶标核酸序列存在的方法，其包括步骤：

在杂交条件下，将被怀疑含有所述靶标核酸序列的样品与诊断探针进行接触；

其中第一靶标核酸序列具有第一靶标区和第一互补靶标区带；

其中第二靶标核酸序列具有第二靶标区和第二互补靶标区带；

其中所述诊断探针的核苷酸序列包括(1)第一探针区，基本上互补于所述第一靶标核酸序列的特征性第一靶标区，和(2)第二探针区，基本上互补于所述第二靶标核酸序列的特征性第二靶标区；

由此在所选择的杂交条件下，当第一互补靶标区带基本上互补于第二互补靶标区带、第一探针区基本上互补于第一靶标区及第二探针区基本上互补于第二靶标区时，则第一和第二探针区能够使诊断探针与靶标核酸链稳定杂交，形成可检测的探针：靶标杂交体；

但在所选择的杂交条件下，当第一互补靶标区带不是基本上互补于第二互补靶标区带，或第一探针区不是基本上互补于第一靶标区，或第二探针区不是基本上互补于第二靶标区，则诊断探针不能与靶标核酸链稳定杂交，不能形成在指示稳定杂交的阈值之上的可检测的探针：靶标杂交体；

检测稳定的探针：靶标杂交体的存在或不存在，作为样品中是否存在靶标核酸序列的指标。

2. 权利要求 1 的方法，其中诊断探针上的所述第一探针区和第二探针区由核酸序列间隔区所隔开。

3. 权利要求 1 的方法，其中第一靶标区和第一互补靶标区带由第一非互补区带所隔开，或第二靶标区和第二互补靶标区带由第二非互补区带所隔开。

4. 权利要求 2 的方法，

其中第一靶标区和第一互补靶标区带由第一非互补区带所隔开，或第二靶标区和第二互补靶标区带由第二非互补区带所隔开；

由此所述第一和第二非互补区带之间不是基本上互补的，也不是

基本上互补于间隔区。

5. 权利要求 2 或 4 的方法，其中所述间隔区长度为 1 至 30 个碱基。

6. 权利要求 2 或 4 的方法，其中所述间隔区长度为 3 至 10 个碱基。

7. 权利要求 1 的方法，其中在第一靶标核酸序列上的所述第一靶标区与所述第一互补靶标区带相距 0 至 350 个碱基。

8. 权利要求 1 的方法，其中在第二靶标核酸序列上的所述第二靶标区与所述第二互补靶标区带相距 0 至 350 个碱基。

9. 权利要求 1 的方法，其中第一探针区和第二探针区分别与第一靶标区和第二靶标区完全互补。

10. 权利要求 1 的方法，其中第一和第二互补靶标区带相互之间完全互补。

11. 权利要求 1 的方法，其中靶标核酸序列是一或多个人白细胞抗原(HLA)或 T 细胞受体(TCR)基因序列的特征序列。

12. 权利要求 1 的方法，其中样品核酸链来自于人类。

## 诊断探针检测系统

本申请是申请日为2002年9月24日，申请号为02823272.0，发明名称为“诊断探针检测系统”的发明专利申请的分案申请。

本申请要求于2001年9月24日提交的美国临时申请NO.60/324421的在先权益，该申请在此全部引入作为参考。

### 发明背景

本发明涉及一种检测核酸序列存在或不存在的方法，其中所述核酸序列是病原体等以及基因变体和突变体的特征性序列，所述变体和突变体包括在人类移植中令人关注的人白细胞抗原(HLA)相关的变体或突变体。与T-细胞受体(TCR)基因序列相关的变体和突变体也受人所关注。

在天然状态下，HLA位点(locus)具有高度多态性。在HLA因子的命名体系2000(Hum. Immunol. 2001年4月, 62(4): 419-468)中公开了：124个HLA-A等位基因、258个HLA-B等位基因、74个HLA-C等位基因、221个HLA-DRB1等位基因、19个DRB3等位基因、89个DRB4等位基因、14个DRB5等位基因、19个DQA1等位基因和39个DQB1等位基因，而且还有新的等位基因被陆续报道。作为进展很快的证明，WHO的HLA因子体系的命名委员会([www.anthonynolan.com/HIG/](http://www.anthonynolan.com/HIG/))在2002年7月更新后，表明有：250个HLA-A等位基因、488个HLA-B等位基因、118个HLA-C等位基因、312个HLA-DRB1个等位基因、38个DRB3等位基因、12个HLA-DRB4等位基因、25个HLA-DRB5等位基因、22个DQA1等位基因、53个DQB1等位基因、20个DPA1和99个DPB1等位基因。

所有的HLA-A、-B和-C等位基因具有相似的序列。而在DRB1、DRB3、DRB4和DRB5序列也具有相似性。由于存在相似性，当用一对引物进行序列特异性引物聚合酶链式反应(PCR-SSP)时，经

常出现两个或更多个等位基因被扩增现象，或在诊断性序列特异性寡核苷酸探针检测(SSO)体系中，也经常出现两个或更多个等位基因被杂交的现象。因此，要达到每一个等位基因具有唯一的 PCR-SSP 或 SSO 检测模式，则需要利用多对引物或多个探针。进而，在鉴定 HLA 分型(typing)中使用的诊断杂交 SSO 探针也由于 HLA 等位基因具有高度同源性而受到干扰。因此，现有技术中的许多分型方法，例如 Bugawan 等，Tissue Antigens (1994)44:137-147 中描述的方法，在鉴定 HLA 分型和其它应用中缺乏准确性。

PCR 可以鉴别靶标 DNA 模板上的特征序列。如果出现扩增，则模板 DNA 包含与所引物相同的序列。如果没有出现扩增，则模板 DNA 的序列不同于引物序列。Newton 等的美国专利 No. 5,595,890 公开了一种用于确定基因分型的 PCR 诊断方法，包括利用 PCR-SSP 来鉴定 HLA 的分子分型。根据该方法，根据在多轮 PCR 中的阳性或阴性反应模式来鉴定未知等位基因。如上所述，由于 HLA 具有高度的多态性，Newton 所公开的方法在 HLA 分型时，其效率是有限的。由于用两条分别具有特定序列的引物经常扩增出许多个 HLA 等位基因，因此需要增加 PCR 扩增反应的轮数，才能鉴定一个未知的等位基因。基于类似的理由，在上文中所提到的非-PCR 方法中，为了准确的鉴定 HLA 的分型也需要很多条诊断探针。PCR 要求引物对分别与在 DNA 模板上欲扩增的区域两侧相应。引物与预期序列退火能力依赖于引物的长度，并要在 PCR 热循环程序中设定退火温度。为了获得对 DNA 序列的特异性扩增，引物越长，则退火温度越高。PCR-SSP 利用了引物长度和退火温度之间的平衡来达到引物导向序列扩增的特异性。

在临床使用中，用于 HLA 分型的 PCR-SSP 体系需要利用有限数目的 PCR 反应次数来达到尽可能高的分辨率，这样一对引物所能扩增出的等位基因数目将减少(即引物或探针的特异性需要提高)。共同美国专利 No.6,207,379 中公开的内容对本发明有用，将其引入本申请中作为参考。该专利中教导了诊断 PCR 引物用于鉴定非连续(缺口(gap))序列，以在 HLA 分型中的对相关等位基因的分辨率更高。在可选地另一个实施例中，美国专利 No.6,207,379 教导了利用诊断引物与

在靶标核酸中的非连续序列进行杂交和聚合酶介导引物延伸来扩增靶标。除美国专利 No.6,207,379 的方法在对靶标 HLA 序列进行更高特异性的扩增是成功的之外，利用 PCR 和非-PCR 的对 HLA 序列进行检测的方法仍然需要改进。

在美国专利 No.6,207,379 中描述的 PCR 发明中，提到在本领域中存在着如此需求：即对基于 PCR-SSP 的分子分型方法进行改进，进而提高分型方法的特异性以便减少在每次鉴定中所要进行 PCR 反应的次数。然而，在本领域中也存在用非-PCR 方法对特异序列进行检测的需求。由于基本热动力学的原因，探针和模板，包括完全匹配的情况，总是处在杂交和非杂交之间的平衡状态。探针有时附着于靶标模板上，有时却没有附着在上面。PCR 的延伸过程中，聚合酶对于将引物锁定在相应位置上是非常关键的。在非-PCR 方法中，缺乏关键因素即聚合酶(和接下来的延伸阶段)，因此对于短的探针与靶标形成的杂交复合体不一定总是令人满意的长时间处于的稳定状态。基于此原因，通常认为杂交探针需要比相应的延伸引物更长以确保杂交复合体的稳定性。

在 Gentalen 等, *Nucleic Acids Research* Vol. 27, No.6, pp1485-1491(1999)中所公开的内容对本发明也是有用的，其中公开了一种鉴定 DNA 链上两个位点之间的物理连锁(linkage)的方法，它是通过在寡核苷酸阵列中同一个点(address)有多于一个寡核苷酸探针的高密度寡核苷酸阵列来达到的。根据该方法，协同杂交可区分靶标序列在物理上连锁还是不连锁。

因此，仍然需要对基于杂交的检测体系进行改进，以便能够可靠地检测具有高度多态性情形中的特异性靶标，包括 HLA 分型和 T-细胞受体(TCR)基因序列的鉴定。

### 发明概述

本发明涉及一种检测样品/靶标核酸序列的改进方法，尤其是检测编码人白细胞抗原(HLA)的核酸的方法和检测 T-细胞受体(TCR) 基因序列的方法，由此诊断探针的特异性得以增加，使得至少一个探针能够识别靶标上的两个或更多区域，优选地在增加这种特异性的同时

并不增加探针与样品/靶标核酸序列之间的退火温度。增加探针组的特异性减少了被检测等位基因的数量，因而提高了方法的分辨率并降低了成本。

具体地说，本发明提供一种在样品核酸链中检测靶标核酸序列存在的方法，包括如下步骤：在杂交条件下，将诊断探针与被怀疑包含靶标核酸序列的样品进行接触。所述诊断探针的核苷酸序列包含：位于其5'端的第一探针区和位于所述第一探针区3'侧的第二探针区，其中第一探针区基本上互补于所述靶标核酸序列的特征性的第一靶标区。第二探针区基本上互补于所述靶标核酸链的靶标核酸序列的特征性的第二靶标区。当在靶标核酸链上的所述第一靶标区与第二靶标区连续时，那么用核酸间隔区(spacer)隔开诊断探针上的第一和第二探针区。当在诊断探针上的第一和第二探针区连续时，那么在靶标核酸链上的第一和第二靶标区之间存在有间插(intervening)序列。对于特定的杂交条件，第一和第二探针区的长度应使得当第一和第二探针区基本上分别互补于第一和第二靶标区时，诊断探针能够与靶标核酸链稳定杂交而形成可检测的探针：靶标杂交体。然而，在所选择的杂交条件下，当第一或者第二探针区不是基本上分别互补于靶标核酸链的第一或者第二靶标区时，诊断探针不能够与靶标核酸链稳定杂交，不能形成高于指示稳定杂交存在的阈值的探针：靶标杂交体。因而，可根据探针：靶标杂交体的存在与否来判断样品中是否存在靶标核酸序列。

在本发明的实际应用中，靶标核酸和核酸探针可以是DNA、RNA或合成的改变了主链的DNA分子，如用硫酸或肽键替代磷酸键。

由于在缺乏稳定杂交的情况下也可能产生可检测信号，本领域普通技术人员可以想到通过比较阳性和阴性对照所产生的信号来确定稳定杂交存在或不存在。可以确定这样一种阈值，用它来区分稳定杂交与不稳定(包括瞬时)杂交，因而利用该阈值可以作为样品中是否存在靶标核酸序列的指标。其中一个方法，在选择出的预设条件下，阳性对照样品的最低值和阴性对照样品的最高值之间的中间值可选择为确定“阳性”反应的阈值。

根据本发明的一个优选方面，第一探针区和第二探针区分别与第

一和第二靶标区完全互补，但这不是必需的。根据本发明的一个优选方面，样品/一条或多条靶标核酸链源自被检测的人体，但这也不是必需的。

虽然本发明的诊断探针上的第一和第二探针区可以是连续的，但这不是必需的。因此，根据本发明的一个优选实施方式，第一探针区和第二探针区可由间隔区分开，其中间隔区的核酸序列不互补于靶标核酸链的位于第一靶标区和第二靶标区序列之间的序列，即所谓的“间插序列”。具体地，选择间隔区以提供诊断探针的第一探针区和第二探针区核苷酸序列在互补中形成非连续互补，以致于只有在第一探针区和第二探针区分别基本上互补于第一和第二靶标区时才形成稳定的杂交体。根据本发明的方法另一个实施方式，不仅在第一和第二探针区之间存在间隔区，而且在所述靶标核酸上的第一和第二靶标区之间存在有间插序列。

探针上探针区之间的间隔区长度通常多于一个核苷酸而少于 350 个核苷酸，优选 1 到 30，特别优选 3 到 10 个核苷酸。在大部分情况下，间隔区不必超过 10 或 20 个核苷酸碱基的长度。相反，靶标核酸的靶标区之间的间插序列长度可为 1 到 500 或更多个碱基，优选少于 350 个(1-350 碱基)核苷酸。然而，间隔区长度以及靶标核酸链上的靶标区之间的间插序列长度都不应当过长而影响探针区对它们各自相应靶标区的协同结合。此外，探针区和靶标区的长度也不应当长到使任何一个探针区能独立地与其靶标区杂交，这种杂交依靠的是增加长度(并因而增加退火温度)而不要求其它探针区与其靶标区进行事先的瞬时杂交。只有当两个探针区均稳定地与其各自的靶标区杂交时才能产生高于指示靶标核酸存在的阈值信号。

在另一方面，本发明教导了一种检测在两个或更多样品核酸链上的两个或更多个靶标核酸序列的方法，其包括将被怀疑含有所述靶标核酸序列的样品与诊断探针在杂交条件下进行接触。第一靶标核酸序列具有第一靶标区和第一互补靶标区带(zone)。第二靶标核酸序列具有第二靶标区和第二互补靶标区带。所述诊断探针的核苷酸序列包括(1)第一探针区，基本上互补于所述第一靶标核酸序列的特征性第一靶标区，和(2)第二探针区，基本上互补于所述第二靶标核酸序列的



特征性第二靶标区。对于选择杂交条件的要求是，当第一互补靶标区带基本上互补于第二互补靶标区带，第一探针区基本上互补于第一靶标区，第二探针区基本上互补于第二靶标区时，则第一和第二探针区能够使诊断探针与靶标核酸稳定杂交而形成可检测的探针：靶标杂交体。然而，在选择的杂交条件下，当第一互补靶标区带不是基本上互补于第二靶标区带，或第一探针区不是基本上互补于第一靶标区，或第二探针区不是基本上互补于第二靶标区时，则第一和第二探针区不能使诊断探针与靶标核酸稳定杂交，即不能形成高于指示稳定杂交体存在的阈值的探针：靶标杂交体。检测稳定的探针：靶标杂交体的存在与否来指示在样品中是否存在靶标核酸序列。

在一些实施方式中，诊断探针上的第一和第二探针区由核酸序列间隔区分开。在另一些实施方式中，第一靶标区和第一互补靶标区带被第一非互补区带所隔开，或第二靶标区和第二互补靶标区带由第二非互补区带所隔开。

在一些包括互补靶标区带的实施方式中，第一靶标区和第一互补靶标区带可由第一非互补区带所隔开，或第二靶标区和第二互补靶标区带可由第二非互补区带所隔开。在这些实施方式中，第一和第二非互补靶标区带之间，以及它们与间隔区均不是基本上互补的。

在有间隔区的那些实施方式中，其间隔区通常多于一个核苷酸而少于 350 个核苷酸，优选 1 到 30，特别优选 3 到 10 个核苷酸(碱基)。在大部分情况下，间隔区不必超过 10 或 20 个核苷酸碱基的长度。相反，靶标核酸上的靶标区和互补靶标区带(CTZ)之间的非互补区带(NCZ)的长度可为 1 到 500 或更多个碱基，优选少于 350 个(0-350 碱基)核苷酸。然而，间隔区长度以及在靶标核酸链上的靶标区之间非互补区带的长度都不应当过长而影响探针区对它们各自相应靶标区的协同结合。此外，探针区、靶标区和互补靶标区带的长度也不应当长到使任何一个探针区能独立地与其相应靶标区杂交，这种杂交依靠的是增加长度(并因而增加退火温度)而不要求其它探针区与其靶标区进行事先的瞬时杂交，也不应当使互补靶标区之间的形成稳定杂交。只有当两个互补靶标区能够相互稳定杂交和两个探针区稳定地与其各自的靶标区杂交才能产生高于指示靶标核酸存在的阈值信号。

在本发明的实际应用中，靶标核酸和核酸探针可以是 DNA、RNA 或合成的改变了主链的 DNA 分子，如用硫酸或肽键取代磷酸键。

由于在缺乏稳定杂交的情况下也可能产生可检测信号，本领域普通技术人员可以想到通过比较阳性和阴性对照所产生的信号来确定稳定杂交存在或不存在。可以确定这样一种阈值，用它来区分稳定杂交与不稳定(包括瞬时)杂交，因而利用该阈值可以作为样品中是否存在靶标核酸序列的指标。其中一个方法，在选择出的预设条件下，阳性对照样品的最低值和阴性对照样品的最高值之间的中间值可选择为确定“阳性”反应的阈值。

根据本发明的一个优选方面，第一探针区和第二探针区分别与第一和第二靶标区完全互补，但这不是必需的。根据本发明的另一个优选方面，第一 CTZ 和 CTZ 分别与第一和第二靶标区完全互补，但这不是必需的。根据本发明的一个优选方面，样品/一条或多条靶标核酸链来自被测人体，但这也不是必需的。

根据本发明，在同一探针上具有两个(或多个)序列区。在本发明中，缺口探针的两个被隔开的部分应当足够短以致它们本身不能达到充分的结合。最初的探针区可以基于欲检测的等位基因中存在的独特序列来设计。一旦最初设计被考虑后，探针的长度通常是接下来需要考虑的重要因素。在非期望序列与预期的靶标序列之间只有数个碱基对的差别(包括只有一个碱基对的差别)时，探针区的长度尤其关键。两个探针区均能与其靶标序列结合(稳定杂交)是产生阳性信号所必需的。

#### 附图简要说明

图 1A(及 1A')和 1B 描述了本发明第一种实施方式，其中在靶标样品上的第一靶标区是位于第二靶标区的 3' 侧，并由间插序列所隔开。

图 2A(及 2A')和 2B 描述了本发明第二种实施方式，其中在靶标样品上的第一靶标区与第二靶标区是连续的，诊断探针包括第一探针区和第二探针区及其它它们之间的间隔区。

图 3A(及 3A')和 3B 描述了本发明第三种实施方式，其中在靶标

样品上，第一靶标区位于第二靶标区的 3' 侧，并由间插序列所隔开，诊断探针包括第一探针区和第二探针区及其它它们之间的间隔区。

图 4A、4B、4C 和 4D 描述了本发明第四种实施方式，其中在第一靶标核酸链上，第一靶标区位于第一互补靶标区带的 3' 侧，且第二靶标区位于第二互补靶标区带的 5' 侧。

### 发明详述

本发明涉及的核酸探针可以有多种用途，但特别适用于检测特定靶标核苷酸序列的存在与否。不同于利用传统的探针，本发明提供一种诊断探针，其包括在同一探针序列上存在两个(或多个)核酸探针区，优选是非连续的。根据本发明，探针序列的两个部分，即第一和第二探针区，可分别与第一和第二靶标区特异的结合。第二探针区位于第一探针区的 3' 侧。第二探针区优选的位于第一探针区的下游并被隔开，但如果在样品核酸链上的靶标区之间是非连续的，则第一和第二探针区可以是连续的。

在本发明的实际应用中，其中的一个探针区的功能是使探针最初和瞬时地与样品核酸链的预期序列相结合。两个探针区都具备这种功能，即任何一个探针区在开始时都能产生瞬时的结合。当其中一个探针区瞬时结合后，另一个探针区则具有更合适的动力学(依靠局部浓度效应)，以致于更容易识别附近的另一个序列(通常在数百个碱基对范围内)。两个探针区均能增加诊断探针对特定等位基因或其它靶标序列的特异性。

每一个探针区的长度应当短至不能使该探针区本身单独与靶标序列在所确定的杂交条件下形成稳定杂交，以防止产生错误的阳性信号。一个探针区与其相应的靶标区之间的瞬时退火可导致其它探针区在其相应靶标区的局部浓度增加，进而达到使其它探针区对其相应的靶标区之间的退火，最终使探针与样品之间形成稳定杂交。

根据本发明的一个优选方面，设计的第一和第二探针区应当满足：在选定的杂交条件下，当两个探针区基本上互补于各自的靶标区时，则形成可检测反应产物，而在相同杂交条件下，如果任何一个探针区不是与其相应的靶标区基本上互补，则不形成高于指示靶标序列

存在的阈值的可检测反应产物。可以这样理解，在实际操作中，本发明诊断探针的选择性依赖于杂交条件的选择。因而，本领域技术人员都知晓退火温度越高通常要求更长的探针区序列，而退火温度越低则通常需要越短的探针区序列。其它因素如反应物浓度、探针和样品核酸链中的 GC 含量也影响着诊断探针的设计和杂交条件的选择。

图 1 描述了本发明的一种实施方式，用于检测样品核酸链上是否存在靶标核酸序列的诊断探针，所包括的第一和第二探针区之间没有间隔区所隔开。具体地，图 1A 表示的是第一探针区与第一靶标区之间形成的瞬时杂交，其中样品核酸上第一靶标区位于第二靶标区的 3' 侧，并由间插序列所隔开。图 1A' 表示第二探针区与第二靶标区之间形成的瞬时杂交，其中样品核酸上第二靶标区位于第一靶标区的 5' 侧，并由间插序列所隔开。

一个探针区与其相应靶标区的瞬时杂交造成局部浓度效应，以致于在选定的杂交条件下，诊断探针上的其它探针区将能与其相应的靶标区形成稳定杂交。进一步考虑靶标和诊断探针的同一性来选择杂交条件，以便在第一探针区不是与第一靶标区基本上互补或者第二探针区不是与第二靶标区基本上互补的情况下，诊断探针不与靶标核酸链稳定杂交，即不形成可检测探针：靶标杂交体。图 1B 表示诊断探针上的两个探针区与在样品核酸上的各自靶标区分别杂交，因而在与诊断探针杂交的样品核酸链上形成了由样品核酸链上的靶标区之间的间插序列所构成的环。在图 1B 中，表示所形成的探针：靶标稳定杂交体。

图 2 描述了本发明第二种实施方式，其中用于检测在靶标核酸链是否存在的诊断探针，所包括的第一探针区和第二探针区由位于中间的间隔区所隔开。在这种情况下，在靶标样品上的第一靶标区与第二靶标区是连续的。具体地，图 2A 表示第一探针区与第一靶标区之间形成的瞬时杂交，其中在靶标核酸上的第一靶标区位于第二靶标区的 3' 端。图 2A' 表示第二探针区与第二靶标区之间形成的瞬时杂交，其中靶标核酸的第二靶标区位于第一靶标区的 5' 端。

图 2B 表示诊断探针上的第一和第二探针区与在样品核酸上的第一和第二靶标区分别杂交，因而在诊断探针上形成了由探针区之间的

间隔区所构成的环，这是由于间隔区不能与样品/靶标核酸链上的序列杂交所致。在图 2B 中，表示所形成的探针：靶标稳定杂交体。

图 3 描述了本发明第三种实施方式，其中用于检测在靶标核酸链是否存在的诊断探针包括了由间隔区隔开的第一探针区和第二探针区。在这个实施方式中，在靶标样品上的第一靶标区与第二靶标区之间由间插序列所隔开。相应地，图 3 表示了将图 1 和图 2 中所示实施方式的特征结合起来的一个实施方式。具体地，图 3A 表示第一探针区与第一靶标区之间形成的瞬时杂交，其中在靶标核酸上的第一靶标区位于第二靶标区的 3' 侧。图 3A' 表示第二探针区与第二靶标区之间形成的瞬时杂交，其中靶标核酸上第二靶标区位于第一靶标区的 5' 侧。

图 3B 表示诊断探针上的第一和第二探针区与在样品核酸链上的第一和第二靶标区分别杂交，由于这两个环之间的序列不是基本上互补，因而在诊断探针上形成了由探针区之间的间插区所构成的环，同时在样品核酸链上形成了靶标区之间的间插序列所构成的环。在图 3B 中，表示所形成的探针：靶标稳定杂交体。

虽然图 1、2 和 3 中显示，在靶标核苷酸链上的第一靶标区位于第二靶标区的 3' 端，这只是为了说明性目的。在其它实施方式中，第一靶标区可以位于第二靶标区的 5' 端。也可以实施包含两个以上靶标区和两个以上探针区的实施方式。

在本发明另外的实施方式中，探针区可以与靶标区杂交，其中靶标区位于不同的靶标核酸链上，且在其中一个靶标核酸链上存在至少一个区带，该区带基本上与存在于其它靶标核酸链上的一个区带互补。

其中，第一靶标核酸链包含至少两个感兴趣的序列。第一靶标核酸链上的第一个序列作为第一靶标区，基本上互补于第一探针区。第一靶标核酸链上的第二个序列作为第一互补靶标区带(CTZ)，基本上互补于在第二核酸链上的第二互补靶标区带(CTZ)。第一 CTZ 与第一靶标区之间可以由第一非互补区带(NCZ)所隔开，该 NCZ 的长度优选少于 350 个核苷酸碱基(0-350 个碱基)，但也可长达 500 个核苷酸碱基或更长。

在第二靶标核酸链上包含至少两个感兴趣的序列。第二靶标核酸链第一个序列作为第二靶标区，基本上互补于第二探针区。第二靶标核酸链的第二个序列是第二互补靶标区带(CTZ)，它基本上互补于第一靶标核酸链上的第一互补靶标区带(CTZ)。第二 CTZ 与第二靶标区之间可为第二非互补区带(NCZ)所隔开，该 NCZ 的长度优选少于 350 个核苷酸碱基(0-350 个碱基)，但也可长达 500 个核苷酸碱基或更长。

在本发明前面的实施方式和各个方面中所涉及的原则，至少在杂交特性方面也同样适用于该实施方式和其它涉及 CTZ 的实施方式。具体地，对于稳定杂交而言，要求第一探针区和第一靶标区之间、第二探针区和第二靶标区之间基本上互补。此外，在这些涉及 CTZ 的实施方式中，为了第一探针区和第一靶标区之间、第二探针区和第二靶标区之间形成稳定杂交，则第一 CTZ 必须基本上互补于第二 CTZ。然而，与前面的实施方式不同，在这些涉及 CTZ 的实施方式中，第一探针区不需要位于第二探针区的 5'端。

图 4 是本发明第四种实施方式，其中用于检测在两个靶标核酸链是否存在的诊断探针包括了由间隔区隔开的第一探针区和第二探针区，其中第一探针区位于第二探针区的 5'端。在这个实施方式中，第一靶标区和第一 CTZ 存在于第一靶标核酸链，而第二靶标区和第二 CTZ 位于第二靶标核酸链上。具体地，图 4A 显示在杂交之前的第一和第二靶标核酸链、诊断探针。图 4B 显示在第一和第二 CTZ 之间形成稳定的杂交。图 4C 显示第一探区与第一靶标区形成的瞬时杂交，其中在第一靶标核酸上的第一靶标区位于第一 CTZ 的 3'端。在图 4D 中，表示所形成的探针：靶标稳定杂交体。

虽然图 4 显示，第一 CTZ 位于第一靶标区的 5'端，第二 CTZ 位于第二靶标区的 3'端，但在其它的实施方式中，CTZ 不一定是这种位置关系。即，在同一核酸链上，CTZ 可以相对于靶标区位于不同的位置。例如，第一 CTZ 可在第一探针区的 3'端，而不是 5'端。另外的实施方式中，第二 CTZ 可位于第二靶标区的 5'端，而不是 3'端。还可采用这样实施方式，即第一 CTZ 位于第一探针区的 3'端，而第二 CTZ 位于第二靶标区的 5'端。此外，虽然在图 4 中显示的是第一探针区位于第二探针区的 5'端，但并不是非得如此。例如，在别的

实施方式中，第一探针区可以位于第二探针区的 3'端。而且，在涉及 CTZ 的实施方式中，诊断探针可以含有也可以不含间隔区，或在两个靶标核酸链中的一个或两个不包括 NCZ。

在涉及 CTZ 的实施方式中，CTZ 可以多于一对，也就是说，在两个(或更多个)靶标核酸链之间可以有多个互补区带。在有些实施方式中，可以通过聚合酶链式反应(PCR) 将一个或多个 CTZ 整合到一个靶标核酸链中。具体地，当 PCR 反应用于产生靶标核酸链时，利用一个或多个 PCR 引物可以掺入一个核酸区域，该区域与另一个靶标核酸链上的区域互补。在这些有多对 CTZ 的实施方式中，在所述核苷酸链中的两个 CTZ 之间为一个 NCZ 所隔开。

图 1-4 中显示，诊断探针的 5'端附着于固体支持物上。然而，这只是说明性的。根据本发明的诊断探针也可以在 3'端或其它位置进行附着。

根据本发明的靶标核酸链可以源自任何天然材料或人工材料，包括人。

使用本发明方法的诊断探针，可以增加杂交分析的选择性，因为它利用了两个以上独特序列来作为检测的选择性标准。根据本发明，选择合适的诊断探针使得可以分辨在杂合情况中出现的模棱两可，这种导致检测结果不明确的原因是只利用常规设计的探针时，对两个不同等位基因构成的等位基因对的检测结果完全同于对另外的等位基因对的检测结果。

利用本发明方法的诊断探针，通过应用多于一个的与感兴趣核酸序列同源的序列区，可以达到在对特定等位基因或等位基因对(set)的识别中具有更高的特异性。增加核酸序列同源性的特异性识别提高了许多基于 DNA 的检测方法的检测能力。这些检测方法包括基于核酸序列的存在与否而进行的 HLA 组织分型(tissue typing)、遗传性疾病的检测、在组织中感染性生物体的检测或其它各种标记或条件的检测(如检测基因治疗技术的有效性)。

术语“核苷酸”在此处是指在 DNA 或 RNA 中的核苷酸，因而包括了腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶为碱基，以脱氧核糖或核糖为糖元。然而，在本发明所使用的诊断探针中也可采用其它

与常规碱基即腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶中的某一个配对的修饰碱基。这种修饰碱基包括，如8-氮鸟嘌呤和次黄嘌呤。

在此处所述的与核苷酸相关术语“互补于”是指一个核苷酸可与另一个特定的核苷酸形成碱基对。例如，腺苷三磷酸与尿苷三磷酸或胸苷三磷酸互补、鸟苷三磷酸与胞苷三磷酸互补。但在合适条件下，胸苷三磷酸与鸟苷三磷酸可以形成碱基对，这在本说明书中不被认为是互补。同样，胞苷三磷酸与腺苷三磷酸之间在特定条件下也能形成碱基对，在本发明中也不被认为是互补。这也适合于胞苷三磷酸和尿苷三磷酸之间的情况。

术语“顺式(cis)”是指两个(或更多个)靶标区位于同一DNA链上的情形，即它们是同一等位基因的一部分。相反，术语“反式(trans)”是指两个(或更多个)靶标区位于不同的DNA链上的情形，即它们是不同的等位基因的一部分。

术语“连续”是指位于同一核酸链上的两个序列、区、区带、段等的核酸相互之间相邻且无任何间隔。即在两个序列之间不存在间隔区、间插序列或非互补区带。

在此处的诊断探针被选择为“基本上”互补于另外的链上被检测的每一个特定序列。这意指诊断探针必须与它们各自的链足够互补以形成杂交。因此，诊断探针序列不必与样品/靶标核酸序列完全一致。从而，探针序列(包括诊断探针上的第一和第二探针区)不必完全互补于靶标序列。因而，不是所有探针都产生与负等位基因的阴性对照相似的完全的负信号。根据错配碱基的数目和错配碱基的类型(G-T错配有时也产生与G-C配对大致相同的信号)，1个碱基对错配的等位基因产生荧光信号基本上高于负对照。然而，只要真正阳性等位基因的信号明显高于那些潜在的交叉反应的等位基因，通常可以大于10-20%作为阈值或分离点来区分阳性和阴性反应。

通常在探针序列的中部可以容忍少数的错配而仍然可以杂交。一般而言，容忍错配碱基的程度依赖于探针的长度，反过来也影响变性和退火温度的选择。如果探针的变性温接近或高于退火温度(较低的严谨条件)，那么虽然有少数(通常1或2个，最多3个)的错配碱基，其探针仍然能与靶标序列结合。一个探针区可能在其序列的中部



会容忍更多的错配碱基，但这种容忍程度同样决定于探针区的变性温度和所选择的杂交和检测条件中的退火温度。类似的参数也适用于互补靶标区带序列。优选第一和第二探针区，以及第一和第二互补靶标区带与它们各自的靶标区或区带完全互补。然而，这些区或区带之间的完全互补并不是必需的。

诊断序列-特异性寡核苷酸探针检测(SSO)系统是一种利用诊断探针分析特定靶标核酸序列是否存在的系统或设计。在这种系统或设计中，可用接头将诊断探针附着于支持物上，接头是本领域熟知的如聚碳(poly-carbon)和聚核苷酸接头。可选地，靶标序列可固定在固体支持物上，例如硝酸纤维素膜而诊断探针溶解在溶液中。在SSO中的诊断探针包括至少一个探针区。术语“探针区”指基本上互补于靶标核苷酸序列一部分的存在于诊断探针上的核苷酸序列。该靶标核苷酸链上与探针区基本上互补的部分被称作“靶标区”。在那些涉及多个靶标核苷酸链的实施方式中，可以在每一个靶标核苷酸链上具有一个特定核苷酸序列即“互补靶标区带”(CTZ)，而且一个靶标链上的CTZ基本上互补另一个靶标链上CTZ。将靶标区与在特定靶标核苷酸链上的CTZ分隔开的序列被称为非互补区带(NCZ)，且一个靶标链的NCZ不是基本上互补于另一个靶标链的NCZ。然而，NCZ不是必需的。

缺口探针(gap probe)是指特定类型的探针，即包含一个以上的探针区。缺口探针中的探针区之间可以有间隔区，也可以没有。“间隔区”是指在两个探针区之间的核苷酸序列，如果在靶标核苷酸序列上的相应靶标区之间存在间插序列，则间隔区与间插序列之间不是基本上互补的。如果在靶标核苷酸序列上的靶标区与CTZ之间存在非互补区带，则“间隔区”也不是基本上互补于非互补区带。探针：靶标杂交体是包括诊断探针与靶标核苷酸序列稳定杂交的复合体。

可对探针或靶标序列进行标记。直接的荧光化合物、生物素、FITC或地高辛(Dig)可用作标记(tag)。对于非直接检测，可用荧光或酶联抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白(Avidine/Streptavidine)(用于检测生物素)、抗-FITC抗体(用于检测FITC)、抗-Dig抗体(用于检测Dig)来作检测之用。根据一个实施方式，用羧基基团进行修饰的乳胶珠(latex

bead)可用于固定探针。在珠上的羧基首先用 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺氢氯化物(EDC)进行活化,然后 EDC-活化羧基基团与寡聚探针 5'端的氨基基团进行反应。另外一个实施方式是用氨基与氨基、硫酸基与氨基进行连接,及使用其它化学物质。

通过下面描述性的实施例可以进一步理解本发明的其它方面和优点。

### 实施例 1

在该实施例中,根据本发明单个的缺口探针包括第一探针区和第二探针区,用于将 HLA DRB1\*0308 和 HLA DRB1\*1107 等位基因与其它等位基因区别开来。而常规探针, OLR4040(5'-GCCTGATGAGGAGTACTG-3')(SEQ ID NO:5)是设计用于检测 DRB1 第 58 位氨基酸密码子的 GAG。探针 OLR4093-2(5'-AAGCGGGGCCGGGTG-3')(SEQ ID NO:6)可以识别 AAG CGG GGC(SEQ ID NO:8)的互补序列,该序列位于 DRB1 的第 71-72 位氨基酸处。然而,HLA DRB1\*0308 和 HLA DRB1\*1107 等位基因均包含了这两个探针的序列而均能发生杂交。因而,这些等位基因使得在分析 DRB1 杂合性反应时产生许多不明确的结果。表 1 列出了这些 DRB1 等位基因和缺口探针及用于检测它们的常规探针序列之间的关系。

表 1 显示等位区域和探针序列的序列特征。在该实施例中的等位基因包含两个序列区即分别称为“区域 1”和“区域 2”。并显示了对于每一个区域的氨基酸位置。表中序列是从左到右的顺序,当达到一行的末端或双斜线“//”时(以先终止的为准)则就是序列末端。而且序列是连续的。例如,参照(等位基因)包含 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2。SEQ ID NO:1 是连续的序列,相应于区域 1,开始于“CGG”而末端为“TGG”,并终止于“//”。SEQ ID NO:2 作为连续序列,相应于区域 2,开始于“GAG”而末端为“GTG”。

对于除参照序列之外的其它序列类型,当出现“-”时,则表示该特定序列包含的这个核苷酸碱基与参照(等位基因)相应的位置相同。当出现核苷酸字母而不是“-”时,则表示该特定序列包含的是

字母所示核苷酸碱基而不是对照(等位基因)相应位置的碱基。当既不是“-”也没有出现字母时,则该特定序列不包括相应位置的核苷酸碱基。表中序列直接按顺阅读直到“//”或该行的末端,不管哪一个先出现均形成连续序列。(在有些表中,某一行可能延续到下一页。)。对于探针而言,由于不存在“//”,故其序列直接按顺序排列而成为一个连续的序列,而不同于等位基因中被分隔开的两个各别的连续序列。

探针 OLR-4431-3 包括一个中间区(inter-region)。中间区与等位基因序列不相应,而是人工序列。人工序列的例子包括诊断探针上的“间隔区”,如探针 OLR - 4431 - 3 的“TTTT”。多于一个的等位基因可能共同拥有一个特定的序列编号(ID number),因为等位基因在特定区域具有共同的序列。例如,表 1 中的对照等位基因 DRB1\*0101 和 DRB1\*03011 的等位基因系列均在区域 1 具有共同的序列,即相应于 SEQ ID NO:1。然而,这两个等位基因在区域 2 相应部分的序列有差别。

上述关于表 1 中的结构说明同样适用于表 3、5、7、9 和 11。

序列类型	序列名称和相应的有关序列ID编号	区域 1(第一行中的数字是指下面一行中核苷酸的相关氨基酸位置)								中间区	区域 2(第一行中的数字是指下面一行中核苷酸的相关氨基酸位置)					
		55	56	57	58	59	60	61	69		70	71	72	73	74	75
参照等位基因	DRB1*0101 (SEQ ID NOS: 1 和 2)	CGG	CCT	GAT	GCC	GAG	TAC	TGG	//	GAG	CAG	AGG	CGG	GCC	GCG	GTG
等位基因	DRB1*0415, DRB1*1101/01 2/041/042/05/0 6/081/082/09/1 0/121/122/13/ 15/18/19/22/24/ 26-30/34/37/39 (SEQ ID NOS: 3 和 2)	---	---	---	-AG	---	---	---	//	---	---	---	---	---	---	---
等位基因	DRB1*0308, DRB1*1107 (SEQ ID NOS: 3 和 4)	---	---	---	-AG	---	---	---	//	---	---	-A-	---	-G-	CG-	---
等位基因	DRB1*03011/01 2/021/022/03- 07/09/14-16/18, DRB1*0422, DRB3*0204 (SEQ ID NOS: 1 和 4)	---	---	---	---	---	---	---	//	---	---	-A-	---	-G-	CG-	---
探针	OLR-4040 (SEQ ID NO:5)	-	---	---	-AG	---	---	---		---	---					

序列类型	序列名称和相应的有关序列 ID 编号	区域 1(第一行中的数字是指下面一行中核苷酸的相关氨基酸位置)										中间区					区域 2(第一行中的数字是指下面一行中核苷酸的相关氨基酸位置)				
		55	56	57	58	59	60	61						69	70	71	72	73	74	75	
参照等位基因	DRBI*0101 (SEQ ID NOS: 1 和 2)	CGG	CCT	GAT	GCC	GAG	TAC	TGG						//	GAG	CAG	AGG	CGG	GCC	GCG	GTG
探针	OLR-4043-2 (SEQ ID NO: 6)																				
探针	OLR-4431-3 (SEQ ID NO: 7)		--	---	-AG	---	---						TTTT	--	---	-A-	---	-G-	CG-		

由 DRB1\*0308 和 DRB1\*1107 等位基因所造成的混淆(即检测结果无法分辨), 传统的解决办法是进行第二轮 PCR, 要么只扩增 DRB1\*03xx, 要么只扩增 DRB1\*11xx, 然后重复探针杂交过程。因此, 将 DRB1\*0308 和 DRB1\*1107 与其它相似的那些等位基因在第一轮 PCR 和探针杂交中区别开来, 以避免进一步的 PCR 和杂交, 这是非常有好处的。

具体地说, HLA 基因的扩增和与固定于微球体上的探针之间的 DNA 杂交反应可按如下方法进行。用包含大约 1ng/微升的基因组 DNA 和 10 微摩尔相应的序列特异性生物素化的引物, 按照事先确定的热循环程序来进行标准基因扩增反应。5 微升的反应混合物中包含了扩增的 HLA - DRB1 外显子 2 区域, 进行变性、中和后, 与存在于 1M NaCl 和 70mM 磷酸钠缓冲液的固定有探针的微球体进行混合(每次实验中每个探针用 1000 微球体)。于 60°C 温育 15 分钟以进行杂交反应。向混合物中加入 2 倍体积的 50nM NaCl 溶液(预热到 60°C), 并离心 5 分钟。在不破坏沉淀的微球体的情况下, 去除上清液。重复洗涤步骤 2 次。

用 3 倍体积 5 微克每微升的藻红蛋白 - 链霉素抗生素共轭体对杂交后的 DNA 进行标记。标记的混合物在 60°C 温育 5 分钟后, 按上述方法进行洗涤。洗涤后的微球体重悬于 80 微升 50nM NaCl 中。用 Luminex 100 Flow Analyzer 在 580nm 下对注入的微球体进行激发、检测和计数荧光信号, 而获得杂交信号。在每次实验中用大约 100 - 200 微球体进行分析以计算出每个探针的中值荧光强度(MFI)。获得每个探针的 MFI 后即可利用合适的阳性对照探针的 MFI 计算出相对杂交信号。

阳性对照探针可以识别在所有等位基因上的非多态性区域, 该区域可通过特异性引物进行扩增。本发明中所述的靶标核酸链包括经聚合酶链式反应 PCR 扩增出的等位区域。阳性对照探针用于提供参照信号, 以便估计扩增的 DNA(扩增子, amplicon)在量上的差异。阳性对照信号用于计算所有诊断探针的相对信号, 即诊断探针信号相对于阳性对照信号的百分率。对于 DRB1 的外显子 2, 所用的阳性对照探

针序列是 5'-ggAACAgCCAgAAggAC-3'(SEQ ID NO:9)。

根据本发明，称为 OLR4431-3 的缺口探针具有的序列为：5'-CTGATGAGGAGTACTTTTAGCAGAAGCGGGG-3'(SEQ ID NO:7)，其包括了两个探针区以对靶标核酸序列进行杂交(包括 DRB1\*0308 和 DRB1\*1109)。第一个探针区即 CTGATGAGGAGTAC (SEQ ID NO:10) 可以与第一靶标区杂交，第二探针区即 AGCAGAAGCGGGG(SEQ ID NO:11) 可以与第二靶标区杂交。两个探针区之间由 4 个 T 所隔开，这 4 个 T 序列不与靶标序列杂交。对于在第 58 位密码子只含有 GAG 而没有第 71-73 位密码子的 AAG CGG GGC(SEQ ID NO: 8)序列的 DRB1，利用该缺口探针所得到的荧光信号<1%，因而有效排除了这种 DRB1 所产生的假阳性信号。该探针与第 71-73 位有 AAG CGG GGC(SEQ ID NO: 8)而第 58 位不含有 GAG 的 DRB1 等位基因也可产生<20%荧光信号。在下面的表 2 中所显示的数据中，所述缺口探针与包含 DRB1\*0308 的样品可产生几乎 90% 的阳性对照探针信号强度。相应地，可容易的建立确定阳性反应的转折点(通常是阳性对照最低值和阴性对照最高值之间的中间值)。考虑到在骨髓捐赠人登记时，检测所需要的样品数量，根据上述提供的方法可以区分 DRB1\*0308 和 DRB1\*1107 是否存在，那么可明显节约时间和成本。

表 2. 探针的荧光信号强度，与对照探针比较

细胞 ID 号	DRB1 等位基因	% (被测探针信号/对照探针信号)		
		OLR-4040 (常规)	OLR-4093-2 (常规)	OLR-4431-3 (常规)
GN0090	0308,0405	37.4	16.2	88.3
TER227	03021,03021	0.0	31.7	16.4
TER118	0301,1202	0.0	22.9	14.3
TER087	0301,0803	0.0	20.4	11.9
TER156	1104,1404	35.1	0.1	0.7
TER119	1101,0101	26.3	0.0	0.5
TER083	1102,0404	26.1	0.0	0.4

## 实施例 2

在用 SSO 方法来进行检测中, 在 HLA - A 位点的血清学水平 DNA 类型中有如下两个最常导致检测结果不明确的原因。第一个是, A\*03011 和 A\*2501 杂合体与 A\*3204 和 A\*6601 杂合体具有很高频率的相同反应模式。第二个是, A\*3201 和 A\*6601 杂合体与 A\*2502 和 A\*7401 杂合体具有很高频率的相同反应模式。用可以识别只存在于 A\*2501 和 A\*2502 中的两个靶标区的特异性探针将极大的减少在对上述杂合体进行检测中的第二轮检测。

在这个实施例中, 单个的缺口诊断探针即 A166 - 2, 由一个短的间隔区所隔开的两个探针区组成, 可将 A\*2501 - 2504 的一些基因型与相当多的其它 HLA - A 基因型区分开来。下面的表 3 列出了这些 HLA - A 等位基因序列和用于检测它们的缺口探针和常规探针序列之间的关系。利用其中的两个常规探针可确定基因组中是否存在两个靶标区, 但不能确定这些靶标区是否位于等位基因对中的同一条(cis)或不同条的(trans)等位基因上。探针 A104 - 11, 具有一个识别序列, 可确定约第 62 位密码子到约第 68 位密码子所显示的靶标核酸序列(表 3)是否存在。探针 A150 - 19, 也只具有一个识别序列, 可确定约第 77 位密码子到约第 85 位密码子所显示的靶标核酸序列(表 3)是否存在。



序列类型	序列名称和相应的有关序列ID编号	区域1(第一行中的数字是指下面一行中核苷酸的相关氨基酸位置)												
		61	62	63	64	65	66	67	68	69				
参照等位基因	A*0101 (SEQ ID NOS: 12 和 13)	GAC	CAG	GAG	ACA	CGG	AAT	ATG	AAG	GCC				
等位基因	A*2424,A*2501-04 (SEQ ID NOS: 14 和 16)	---	-G-	A-C	---	---	---	G--	---	---				//
等位基因	A*6601 (SEQ ID NOS: 14 和 13)	---	-G-	A-C	---	---	---	G--	---	---				//
等位基因	A*3201 (SEQ ID NOS: 15 和 16)	---	---	---	---	---	---	G--	---	---				//
等位基因	A*0301 (SEQ ID NOS: 15 和 13)	---	---	---	---	---	---	G--	---	---				//
等位基因	A*68012 (SEQ ID NOS: 14 和 13)	---	-G-	A-C	---	---	---	G--	---	---				//
探针	A166-2 (SEQ ID NO: 17)		-G-	A-C	---	---	-							TTTT
探针	A104-11 (SEQ ID NO: 18)		G-	A-C	---	---	---	G--	---					
探针	A150-19 (SEQ ID NO: 19)													

表3 HLA-A等位基因靶标序列和探针的序列的对比(续)

序列类型	序列名称和相应的有关序列ID编号	区域2(第一行中的数字是指与下面行的核苷酸相关的氨基酸位置)													
		77	78	79	80	81	82	83	84	85					
参照等位基因	A*0101 (SEQ ID NOS: 12 和 13)	C	CTG	GGG	ACC	CTG	CGC	GGC	TAC	TAC					
等位基因	A*2424,A*2501-04 (SEQ ID NOS: 14 和 16)	-	---	C--	-T-	GC-	-T-	C--	---	---					
等位基因	A*6601 (SEQ ID NOS: 14 和 13)	-	---	---	---	---	---	---	---	---					
等位基因	A*3201 (SEQ ID NOS: 15 和 16)	-	---	C--	-T-	GC-	-T-	C--	---	---					
等位基因	A*0301 (SEQ ID NOS: 15 和 13)	-	---	---	---	---	---	---	---	---					
等位基因	A*68012 (SEQ ID NOS: 14 和 13)	-	---	---	---	---	---	---	---	---					
探针	A166-2 (SEQ ID NO: 17)			--	-T-	GC-	-T-	C-							
探针	A104-11 (SEQ ID NO: 18)														
探针	A150-19 (SEQ ID NO: 19)	-	---	C--	-T-	GC-	-T-	C--	---	---					

表 4. HLA-A 探针的荧光信号强度, 与对照探针比较

细胞 ID 号	HLA-A 等位基因	%(被测探针信号/对照探针信号)		
		A166-2	A104-11	A150-19
9008	2501	61.9%	87.3%	38.9%
TER250	2501,68012	46.8%	90.5%	29.2%
9057	6601	0.0%	72.5%	0.0%
9035	3201	0.0%	0.001%	56.7%
TER259	3201,6802	0.0%	91.4%	32.8%

缺口探针与两个靶标区的结合表明存在着两个靶标区以顺式存在的等位基因, 其中。该结果可将其与两个靶标区虽然都存在但为反式的等位基因区别开来。对于反式存在的两个靶标区, 常规探针可以与它们各自的靶标区结合, 但缺口探针则不会结合, 因为对两个靶标区中的一个所具有的亲和力不足以在这些杂交条件下形成稳定的结合。因而, 例如, 可以区分基因型 A\*2501/A\*03011 的等位基因对与基因型 A\*3204/A\*6601 的等位基因对。A166-2 只结合至少含有一个 A\*25 等位基因的产品, 而 A104-11 和 A150-19 都能结合两种等位基因对的 DNA。

探针 A104-11 可以与任何包含相应 HLA-A 靶标序列(在该实验中的等位基因 A\*2501、A\*68011、A\*6601 和 A\*6802)的 DNA(9008、Ter250、9057 和 Ter259)进行很好的结合。A150-19 可以与任何包含相应靶标序列(在该实验中的等位基因 A\*2501 和 A\*3201)的 DNA(9008、Ter250、9035 和 Ter259)进行很好的结合。单独用这两个常规探针 A104-11 和 A150-19 不能区分下述 DNA: 即不能确定是以反式包含这两种靶标序列的杂合 DNA, 例如 Ter259(A\*2501/A\*6802), 还是以顺式包含这两靶标序列的 DNA(纯合 A\*2501)或 Ter250(杂合 A\*2501)。然而, A166-2 只对包含顺式构型 DNA 9008 (61.9%)和 Ter(46.8%)的 A\*2501 有很好的结合。对于 A 位点的外显子 2, 所用的阳性对照序列为 5'-gCTACTACAACCAgAgCgAg-3'(SEQ ID NO:20)。

### 实施例 3

在本实施例中，缺口探针即 B204 被用于确定识别序列是否以顺式存在。下面的表 5 列出了这种等位基因和其它 HLA-B 等位基因及用于检测它们的缺口探针和常规探针之间的序列关系。DNA#1067 包含等位基因 B\*1521，包含了探针 B106 的靶标区，但没有 B153 的靶标区。反向(conversely)DNA 的 #1064 和 Ter244 纯合的包含了探针 B153 的靶标区的等位基因。DNA#124 包含探针 B106 和 B153 在 HLA-B 中的靶标区。然而，探针 B204 的信号对于这些 DNA 而言呈阴性，因为每个靶标区都位于不同的等位基因上，即以反式构型存在。探针 B204 的信号对于 Ter250 DNA(等位基因 B\*1523)和 9035(B\*3801)而言呈阳性，因为它们包含的靶标区在同一个等位基因上，即以顺式构型存在。

针对第 64-68 位氨基酸密码子序列的探针 B106 可以识别至少 73 个 HLA-B 位点的等位基因。然而，如果针对第 79-83 位氨基酸密码子序列的探针 B153 作为缺口探针的一部分则大约只有 5 个 HLA-B 等位基因可被 B204 缺口探针所识别，从而利用缺口探针提高了 SSO 系统的分辨率。

序列类型	序列名称和相应的有关序列 ID 编号	区域 1(第一行中的数字是指下面一行中核苷酸的相关氨基酸位置)										区域 2(第一行中的数字是指下面一行中核苷酸的相关氨基酸位置)									
		64	65	66	67	68	69	70	中间区	77	78	79	80	81	82	83					
参照等位基因	A*0101 (SEQ ID NOS: 21 和 22)	ACA	CGG	AAT	ATG	AAG	GCC	CAC	//	AAC	CTG	GGG	ACC	CTG	CGC	GCC					
等位基因	B*1523, B*3801 (SEQ ID NOS: 23 和 24)	---	-A-	-TC	TGC	---	A-	A-	//	---	---	C-	-T-	GC-	-T-	C-					
等位基因	B*1401, B*1521, B*3901 (SEQ ID NOS: 23 和 25)	---	-A-	-TC	TGC	---	A-	A-	//	-G-	---	C-	-A-	---	---	---					
等位基因	B*51011, B*5301 (SEQ ID NOS: 26 和 24)	---	-A-	-TC	T-C	---	A-	A-	//	---	---	C-	-T-	GC-	-T-	C-					
等位基因	B*5501 (SEQ ID NOS: 27 和 25)	---	-A-	-TC	TAC	---	---	--G	//	-G-	---	C-	-A-	---	---	---					
等位基因	B*4601 (SEQ ID NOS: 28 和 25)	---	-A-	--G	TAC	---	CG-	--G	//	-G-	---	C-	-A-	---	---	---					
探针	B204 (SEQ ID NO: 29)	---	-A-	-TC	TGC	---	---	---	TIT	---	---	--	-T-	GC-	-T-	C-					
探针	B153 (SEQ ID NO: 30)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C-	-T-	GC-	-T-	C					
探针	B106 (SEQ ID NO: 31)	---	-A-	-TC	TGC	---	A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---					

细胞 ID 号	HLA-B 等位基因	%(被测探针信号/对照探针信号)		
		B204	B153	B106
9035	3801/3801	108.6%	117.0%	122.5%
TER250	1523/5501	85.7%	90.6%	191.1%
#124	1401/51011	1.8%	71.3%	57.6%
#1064	5301/5301	1.6%	115.3%	0.0%
TER244	51011/51011	1.7%	125.1%	0.0%
#1067	1521/4601	0.74%	0.25%	65.9%

在表 6 中, 探针 B153 的信号很强表明它可以识别存在于 DNA 9035、Ter250、#124、#1064 和 Ter244 中的 HLA-B 靶标序列, 这些 DNA 分别相应于等位基因 B\*3801、B\*1523、B\*51011、B\*5301 和 B\*51011。相似地, B106 可识别存在于 DNA 9035、#124、#1067 中靶标序列, 这些 DNA 分别相应于等位基因 B\*3801、B\*1523、B\*1401 和 B\*1521。用这两个常规探针不能分辨靶标序列是以反式构型存在如 DNA #124(B\*1401/B51011), 还是以顺式构型存在如 DNA9035(B\*3801)或 Ter250(B\*1523)。探针 B204 只针对 9035(B\*3801)和 Ter250(B\*1523)具有强的信号, 这表明两个分隔开的靶标序列以顺式构型存在。对于 B 位点的外显子 2, 所用的阳性对照序列是 5'-gCTACTACAACCAgAgCgA-3'(SEQ ID NO:32)。

#### 实施例 4

在该实施例中涉及 HLA class II 的 DQB1 位点。探针 DQ25-8 可识别靶标序列即 DQB1\*05031 和 DQB1 \*06011 的特征序列, 而 DQ33 可识别分隔开的 DQB1\*05031 和 DQB1 06011 的特征序列。然而, 利用探针 DQ54G-3 只可识别以顺式存在的上述两个探针区, 可确定 DQB105031 是否是上述两个等位基因中的一个。下面的表 7 列出了这些 HLA-DQB1 等位基因及用于检测它们的缺口探针和常规探针之间的序列关系。

表 7 HLA-DQB1 等位基因靶标序列和探针序列的比较

序列类型	序列名称和相应的有关序列 ID 编号	区域 1(第一行中的数字是指下面一行中核苷酸的相关氨基酸位置)													中间区	区域 2(第一行中的数字是指下面一行中核苷酸的相关氨基酸位置)						
		52	53	54	55	56	57	58	59	68	69	70	71	72		73	74					
参照等位基因	DQB1*05011 (SEQ ID NOS: 33 和 34)	CCG	CAG	GGG	CGG	CCT	GTT	GCC	GAG						CTG	GAG	GGG	GCC	CCG	GCG	TCG	
等位基因	DQB1*05031 (SEQ ID NOS: 35 和 34)	---	---	---	---	-AC	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
等位基因	DQB1*06011 (SEQ ID NOS: 35 和 36)	---	---	---	---	-AC	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A--	A--	A--	--A	---	---	GA-
等位基因	DQB1*05011 (SEQ ID NOS: 33 和 34)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
探针	DQ54G-3 (SEQ ID NO: 37)																					
探针	DQ25-8 (SEQ ID NO: 38)																					
探针	DQ33 (SEQ ID NO: 39)																					

表 8. HLA-DQB1 探针的荧光信号强度, 与对照探针比较				
细胞 ID 号	HLA-B 等位基因	% (被测探针信号/对照探针信号)		
		DQ54G - 3	DQ25 - 8	DQ33
TER145	05031/05031	34.9%	34.1%	39.5%
TER68	0201/05031	29.5%	25.2%	26.9%
TER74	0502/0601	0.0%	28.4%	27.1%
TER87	0201/0601	0.0%	39.1%	0.0%
TER123	0201/0501	0.0%	0.0%	28.9%

表 8 中一些数据是 HLA class II 的 DQB1 位点中的一个例子。同样, 常规探针 DQ25 - 8 对几个 DNA - Ter145、Ter68、Ter74 和 Ter87 的结合具有相对强的信号, 其中这些 DNA 分别相应于等位基因 DQB1\*05031(纯合)、DQB1\*05031(杂合)、DQB1\*0601 中存在的靶标序列。另外, DQ33 对 DNA - Ter145、Ter68、Ter74 和 Ter123 的结合具有相对强的信号, 其中这些 DNA 分别相应于等位基因 DQB1\*05031(纯合)、DQB1\*05031(杂合)、DQB1\*0502 和 DQB1\*0501 中存在的靶标序列。如前面的实施例中, 利用这两个常规探针不能分辨识别位点是以反式还是以顺式构型存在, 即不能将 Ter74(DQB1 0502/DQB10601)(反式构型)与 Ter145 或 Ter68 区分开, 而这两种等位基因均含有 DQB1\*05031。缺口探针 DQ54G - 3 只识别以顺式构型存在的两个靶标序列, 而只对包含 DQB1\*05031 等位基因产生相对强的信号。对于 DQB1 位点的外显子 2, 所用的阳性对照序列是 5'-gTCCCgTTggTgAAgTAgCAC-3'(SEQ ID NO:40)和 5'-gTCCCATTTggTgAAgTAgCAC-3'(SEQ ID NO:41)。

#### 实施例 5

与实施例 1 相似, 该实施例也涉及 DRB1\*0308, 利用的是“半探针(half-probes)”, 即探针具有比缺口探针 OLR - 04431 - 3 更短的序列, 即只含有两个探针区中的一个探针区。这些“半探针”(列于表 9)与 OLR - 04431 - 3 比较了对 DRB1\*0308、其它 DRB1\*03 等位



基因或 DRB1\*11 等位基因作为样品的结合特性。下面的表 9 列出了这些 DRB1 等位基因及在该实验中使用的用于检测它们的缺口探针和半探针之间的序列关系。以 DRB1\*0308、其它 DRB1\*03 等位基因或检测样品的 DRB1\*11 等位基因，半探针不产生或几乎不产生信号(均 <1%)。OLR - 04431 - 3 也只对 DRB1\*0308 DNA 产生强的信号(表 10)。该实施例表明，在本实验中，短的单识别位点序列本身是不能与任何 DRB1\*等位基因进行稳定的结合，而将它们装配起来成为单条序列时即能与 DRB1\*0308 结合。在本实验中，单个的半探针对被测等位基因中识别序列的结合能力低于阈值。将“半探针”序列组合起来形成的探针，只对那些均包含了本实验中设计的两个半探针或探针区的靶标区的等位基因的结合能力可高于阈值。

表 9 DRB1 等位基因靶标序列和探针序列的比较

序列类型	序列名称和相应的有关序列 ID 编号	区域 1(第一行中的数字是指下面一行中核苷酸的相关氨基酸位置)										中间区					区域 2(第一行中的数字是指下面一行中核苷酸的相关氨基酸位置)				
		55	56	57	58	59	60	61	69	70	71	72	73	74	75						
参照等位基因	DRB1*0101 (SEQ ID NOS: 1 和 2)	CGG	CCT	GAT	GCC	GAG	TAC	TGG	//	GAG	CAG	AGG	CGG	GCC	GCG	GTG					
等位基因	DRB1*0308, DRB1*1107 (SEQ ID NOS: 3 和 4)	---	---	---	-AG	---	---	---	//	---	---	-A-	---	-G-	CG-	---					
探针	OLR4431-3 (SEQ ID NO: 7)		--	---	-AG	---	---	---	TTTT	--	---	-A-	---	-G							
探针	OLR-4611 (SEQ ID NO: 42)		--	---	-AG	---	---	---	TTTT												
探针	OLR-4612 (SEQ ID NO: 43)		--	---	-AG	---	---	---													
探针	OLR-4613 (SEQ ID NO: 44)									--	---	-A-	---	-G							
探针	OLR-4614 (SEQ ID NO: 45)									--	---	-A-	---	.							

表 10 探针的荧光信号强度, 与对照探针比较

Cell ID	DRB1 Alleles	% (被测探针信号/对照探针信号)					
		OLR-4431-3	OLR4611	OLR4612	OLR4613	OLR4614	
GN090	0308, 0405	64.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.3%	
TER227	03021, 03021	0.5%	0.0%	0.0%	0.6%	0.4%	
TER87	0301, 0803	0.2%	0.0%	0.0%	0.3%	0.2%	
TER118	0301, 1202	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
TER119	0101, 1101	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.3%	
TER156	1104, 1404	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%	

表 10 显示缺口探针 OLR4431-3 只对来自 GN090 的 DNA 产生相对强的信号, 该 DNA 包含 DRB1\*0308。OLR4611、OLR4612、OLR4613 和 OLR4616 只含有 OLR4431-3 中两个缺口区中的一个区域。这些探针均不能对上述样品 DNA 产生任何识别信号。该实施例表明, 两个探针区的协同结合是对预期靶标序列产生阳性信号所必需的。对于 DQB1 外显子 2, 所用的阳性对照探针序列是 5'-ggAACAgCCAgAAggAC-3'(SEQ ID NO:46)。

### 实施例 6

在该实施例中, 缺口探针 OLR4029-6 可识别两个短的靶标区, 即外显子 2 的近 5'末端的 15 个碱基区(第 12-16 位密码子)和外显子 2 的近 3'末端的 12 个碱基区(第 68-71 位密码子), 其中所述外显子 2 来自 DRB1\*16 等位基因(表 11)。这两个识别(靶标)区相距 150 个碱基。DRB1\*16 等位基因在外显子 2 的 5'端与 DRB1\*15 等位基因是相同的(表 11)。(这两群等位基因实际上是“断裂基因”或者可认为是最初的 DR2 等位基因群的亚群。)为了鉴定基因型, 利用单个探针而将 DRB1\*16 群中的等位基因与 DRB1\*15 群中的等位基因区分开来是非常有好处的。下面的表 11 列出了这些 DRB1 等位基因及用于检测它们的缺口探针之间的序列关系。

序列类型	序列名称和相应的有关序列 ID 编号	区域 1 (第一行中的数字是指下面一行中核苷酸的相关氨基酸位置)														
		8	9	10	11	12	13	14	15	16						
参照等位基因	DRB1*0101 (SEQ ID NOS: 47 和 48)	TTG	TGG	CAG	CTT	AAG	TTT	GAA	TGT	CAT						
等位基因	DRB1*1501 (SEQ ID NOS: 49 和 50)	C--	---	---	-C-	---	AGG	--G	---	---						
等位基因	DRB1*1502 (SEQ ID NOS: 49 和 50)	C--	---	---	-C-	---	AGG	--G	---	---						
等位基因	DRB1*16011 (SEQ ID NOS: 49 和 51)	C--	---	---	-C-	---	AGG	--G	---	---						
等位基因	DRB1*16021 (SEQ ID NOS: 49 和 52)	C--	---	---	-C-	---	AGG	--G	---	---						
探针	OLR-4029-6 (SEQ ID NO: 53)				-C-	---	AGG	--G	---	---						

表 11 DRB1 等位基因靶标序列和探针的序列的对比 (续)											
序列类型	序列名称和相应的有关序列 ID 编号	中间区	67	68	69	70	71	72	73	区域 2 (第一行中的数字是指下面一行中核苷酸的相关氨基酸位置)	
参照等位基因	DRB1*0101 (SEQ ID NOS: 47 和 48)	//	CTC	CTG	GAG	CAG	AGG	CGG	GCC		
等位基因	DRB1*1501 (SEQ ID NOS: 49 和 50)	//	A--	---	---	---	GC-	---	---		
等位基因	DRB1*1502 (SEQ ID NOS: 49 和 50)	//	A--	---	---	---	GC-	---	---		
等位基因	DRB1*16011 (SEQ ID NOS: 49 和 51)	//	T--	---	--A	G-C	---	--C	---		
等位基因	DRB1*16021 (SEQ ID NOS: 49 和 52)	//	---	---	--A	G-C	---	--C	---		
探针	OLR-4029-6 (SEQ ID NO: 53)			---	--A	G-C	---				

细胞 ID 号	DRB1*基因类型	4029-6 信号
TER69	09012/1502	7.8%
E18994	07011/1501	8.9%
E10351	1303/16011	29.4%
TER262	1413/16021	22.8%
TER85	0801/1401	0.0%
Hicks	0804/1101	0.1%
TER160	0415/1301	0.0%
AP630	03021/1201	0.0%

探针 OLR4029-6 确实显示了明显的信号而将 DRB1\*16 与 DRB1\*15 等位基因区分开来。在本实验中, 对 DRB1\*16 等位基因的信号是 DRB1\*15 等位基因的 2.5 倍, 虽然在两个靶标区之间有 150 个碱基所隔开(表 12)。在 5'端的 DR2 特异性序列可鉴别 DRB1\*15 或 DRB1\*16, 但不能产生足够强的信号(表 12)。DRB1\*16 特异性序列与 5'的 DR2 特异性信号协同而显著增强了对 DRB1\*16 等位基因的信号(表 12)。3'探针区本身不足以对 DRB1\*0801、DRB1\*0804、DRB1\*1101、DRB1\*0415 和 DRB1\*1201 产生高于背景的信号。对于 DQB1 外显子 2, 所用的阳性对照探针序列是 5'-ggAACAgCCAgAAggAC-3'(SEQ ID NO:9)。

## 序列表

<110> ONE LAMBDA

<120> 诊断探针检测系统

<130> 27978/37504A

<140> To be assigned

<141> Herewith

<150> US 60/324,421

<151> 2001-09-24

<160> 53

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 等位基因 DRB\*0101

<400> 1

cggcctgatg cggagtactg g

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 等位基因 DRB\*0101

<400> 2

gagcagaggc gggccgcggt g

21



<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 等位基因 DRB1\*0415, 等位基因 s DRB1\*11011/01 2/041/042/05/0 6/081/082  
/09/1 0/121/122/13/ 15/18/19/22/24/  
26-30/34/37/39

<400> 3

cgccctgatg aggagtactg g

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 等位基因 DRB1\*0308, DRB1\*1107

<400> 4

gagcagaagc ggggccgggt g

21

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 常规探针, OLR4040

<400> 5

gcctgatgag gagtactg

18

<210> 6  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 常规探针, OLR4040

<400> 6  
 aagcggggcc ggtg

15

<210> 7  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Gap 探针, OLR4431-3

<400> 7  
 ctgatgagga gtacttttag cagaagcggg g

31

<210> 8  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 8  
 aagcggggc

9

<210> 9  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 阳性对照探针

<400> 9  
 ggaacagcca gaaggac

17

<210> 10  
 <211> 14  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 探针区

<400> 10  
 ctgatgagga gtac

14

<210> 11  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 探针区

<400> 11  
 agcagaagcg ggg

13

<210> 12  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人

<220>  
 <221> misc\_特征  
 <223> 等位基因 A\*0101

<400> 12  
 gaccaggaga cacggaatat gaaggcc

27

<210> 13  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 等位基因 A\*0101

<400> 13

cctggggacc ctgcgcggt actac

25

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 等位基因 A\*2424, A\*2501-2504

<400> 14

gaccggaaca cacggaatgt gaaggcc

27

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 等位基因 A\*0301

<400> 15

gaccaggaga cacggaatgt gaaggcc

27

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 等位基因 A\*2424, A82501~04

<400> 16

cctgcggtac gcgctccgct actac

25

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Gap 探针, A\*68012

<400> 17

cggaacacac ggattttgga tcgctccg

30

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 探针, A104-11

<400> 18

ggaacacacg gaatgtgaag

20

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 探针, A150-19

<400> 19

cctgcggtac gcgctccgct actac

25

<210> 20  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 阳性对照探针

<400> 20

gctactacaa ccagagcgag

20

<210> 21  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人

<220>  
 <221> misc\_特征  
 <223> 等位基因 A\*0101

<400> 21

acacggaata tgaaggcca c

21

<210> 22  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人

<220>  
 <221> misc\_特征  
 <223> 等位基因 A\*0101

<400> 22

aacctgggga ccctgcgcg c

21

<210> 23  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 等位基因 B\*1523, B\*3801

<400> 23

acacagatct gcaagaccaa c

21

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 等位基因 B\*1523, B\*3801

<400> 24

aacctgcgga tcgcgctccg c

21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 等位基因 B\*1401, B\*1521, B\*3901

<400> 25

agcctgcgga acctgcgcgg c

21

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征  
<223> 等位基因 B\*5501

<400> 26  
acacagatct tcaagaccaa c 21

<210> 27  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人

<220>  
<221> misc\_特征  
<223> 等位基因 B\*5501

<400> 27  
acacagatct acaaggccca g 21

<210> 28  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人

<220>  
<221> misc\_特征  
<223> 等位基因 B\*4601

<400> 28  
acacagaagt acaagcgcca g 21

<210> 29  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Gap 探针, B204



<400> 29  
 acacagatct gcaagtttgg atcgcgctcc g 31

<210> 30  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 探针, B153

<400> 30  
 acctgaggat cgcgctcc 18

<210> 31  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 探针 B106

<400> 31  
 acacagatct gcaagacc 18

<210> 32  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 阳性对照探针

<400> 32  
 gctactacaa ccagagcga 19

<210> 33  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 等位基因 DQB1\*05011

<400> 33

ccgcaggggc gccctgttgc cgag

24

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 等位基因 DQB1\*05011

<400> 34

ctggaggggg cccgggcgtc g

21

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 等位基因 DQB1\*06011

<400> 35

ccgcaggggc gccctgacgc cgag

24

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征  
 <223> 等位基因 DQB1\*06011

<400> 36  
 ctggagagga cccgagcgga g 21

<210> 37  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Gap 探针, DQ54G-3

<400> 37  
 ggccctgacgc cgattttctg gagggggcc 29

<210> 38  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 探针, DQ25-8

<400> 38  
 gcagggggcgg cctgaacg 18

<210> 39  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 探针, DQ33

<400> 39  
 tggagggggc ccgggcgt 18

<210> 40  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 阳性对照探针

<400> 40  
 gtcccgttgg tgaagtagca c

21

<210> 41  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 阳性对照探针

<400> 41  
 gtccattgg tgaagtagca c

21

<210> 42  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人

<220>  
 <221> misc\_特征  
 <223> 等位基因 OLR-4611

<400> 42  
 ctgatgagga gtactttt

18

<210> 43  
 <211> 14  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 探针, OLR-4612

<400> 43

ctgatgagga gtac

14

<210> 44

<211> 13

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 探针, OLR-4613

<400> 44

agcagaagcg ggg

13

<210> 45

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 探针, OLR-4614

<400> 45

agcagaagcg gg

12

<210> 46

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 阳性对照探针

<400> 46

ggaacagcca gaaggac

17

<210> 47

<211> 27

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 参照序列

<400> 47

ttgtggcagc ttaagtttga atgtcat

27

<210> 48

<211> 21

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 参照序列

<400> 48

ctcctggagc agaggcgggc c

21

<210> 49

<211> 27

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 等位基因 s DRB1\*1501 和 DRB1\*1502

<400> 49

ctgtggcagc ctaagaggga gtgtcat

27

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 等位基因 s DRB1\*1501 和 DRB1\*1502

<400> 50

atcctggagc aggcgcgggc c

21

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 等位基因 DRB1\*16011

<400> 51

ttcctggaag acaggcgcgc c

21

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc\_特征

<223> 等位基因 DRB1\*16021

<400> 52

ctcctggaag acaggcgcgc c

21

<210> 53

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Gap 探针, OLR-4029-6

<400> 53

cctaagaggg agtgtctgga agacagg

27



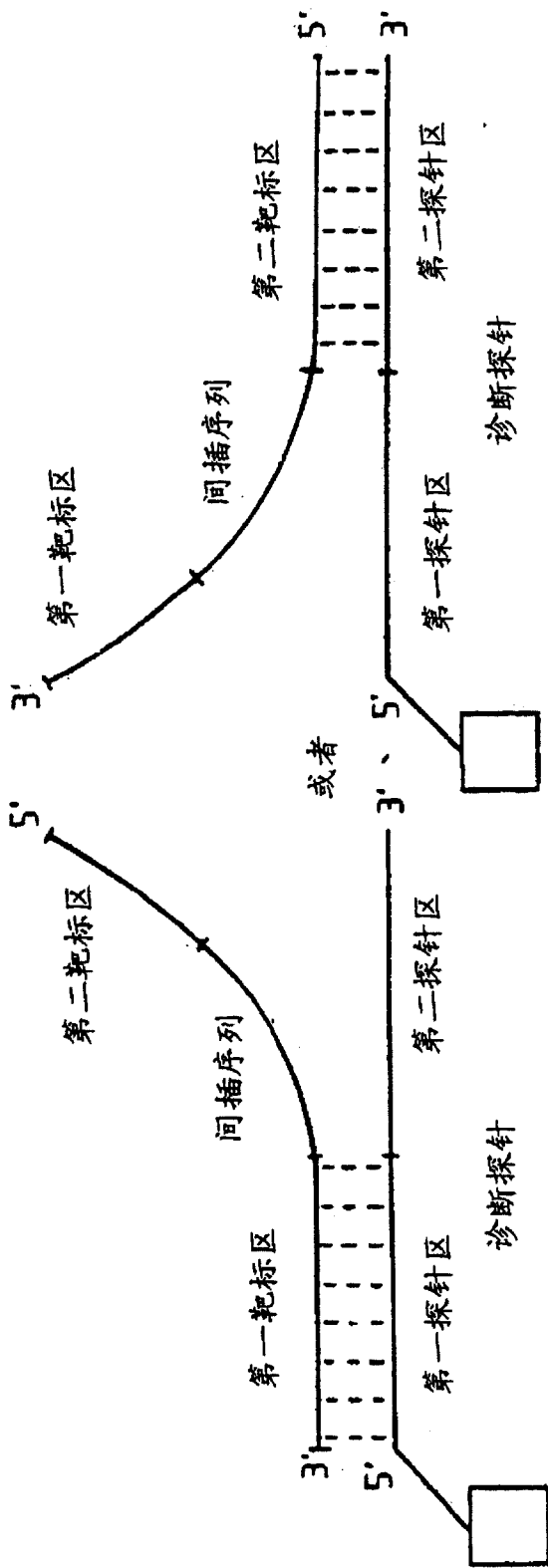


图 1A'

图 1A

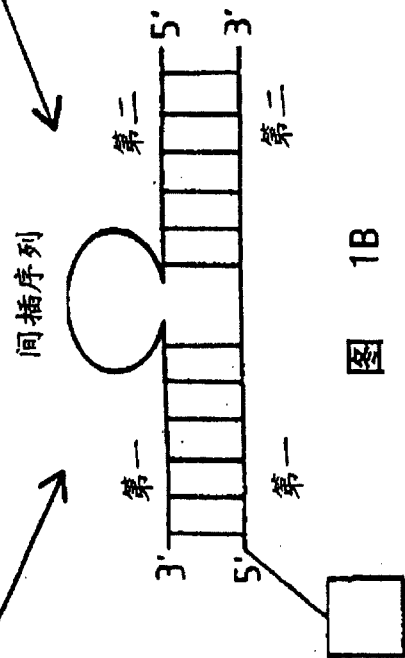


图 1B

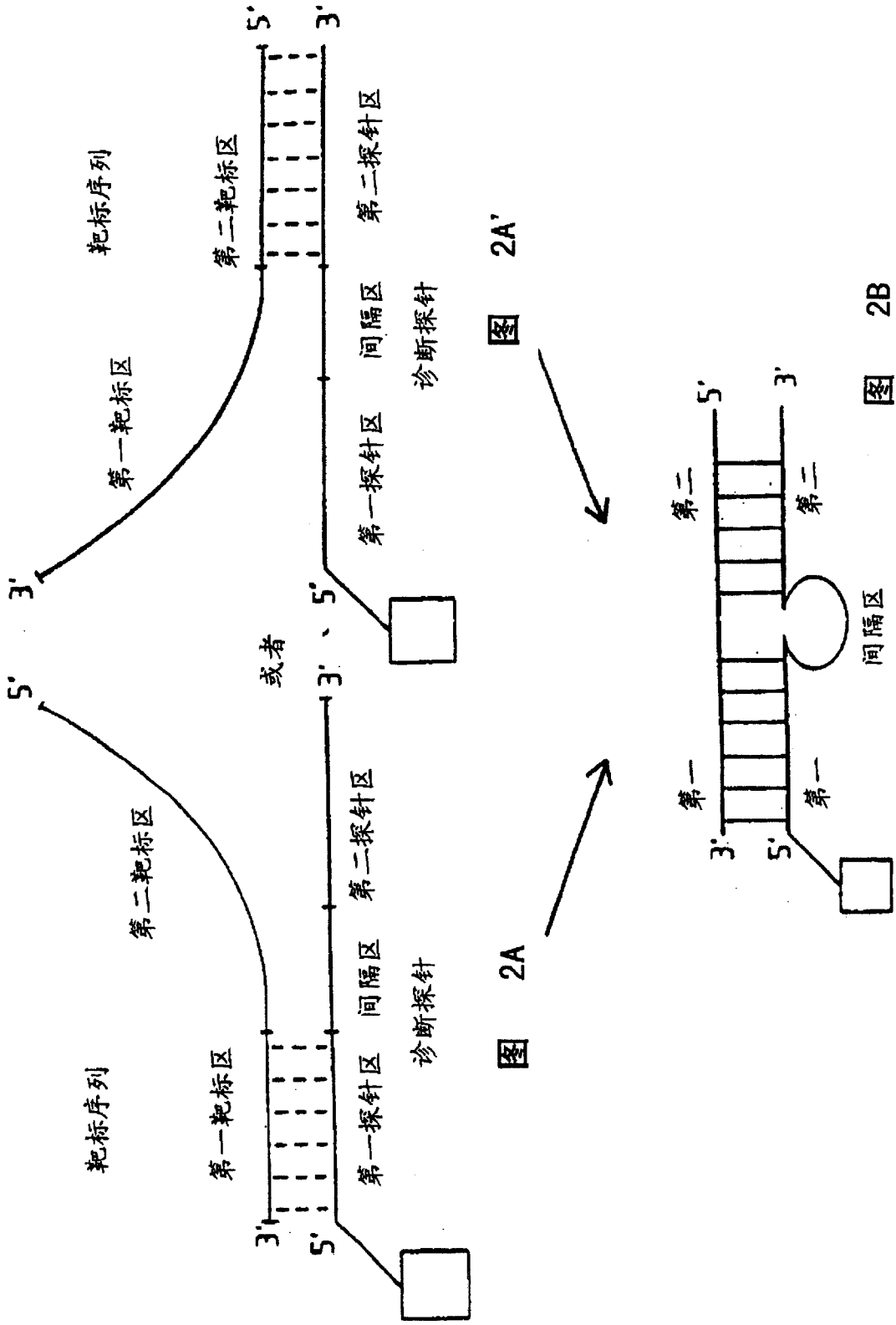


图 2A'

图 2A

图 2B

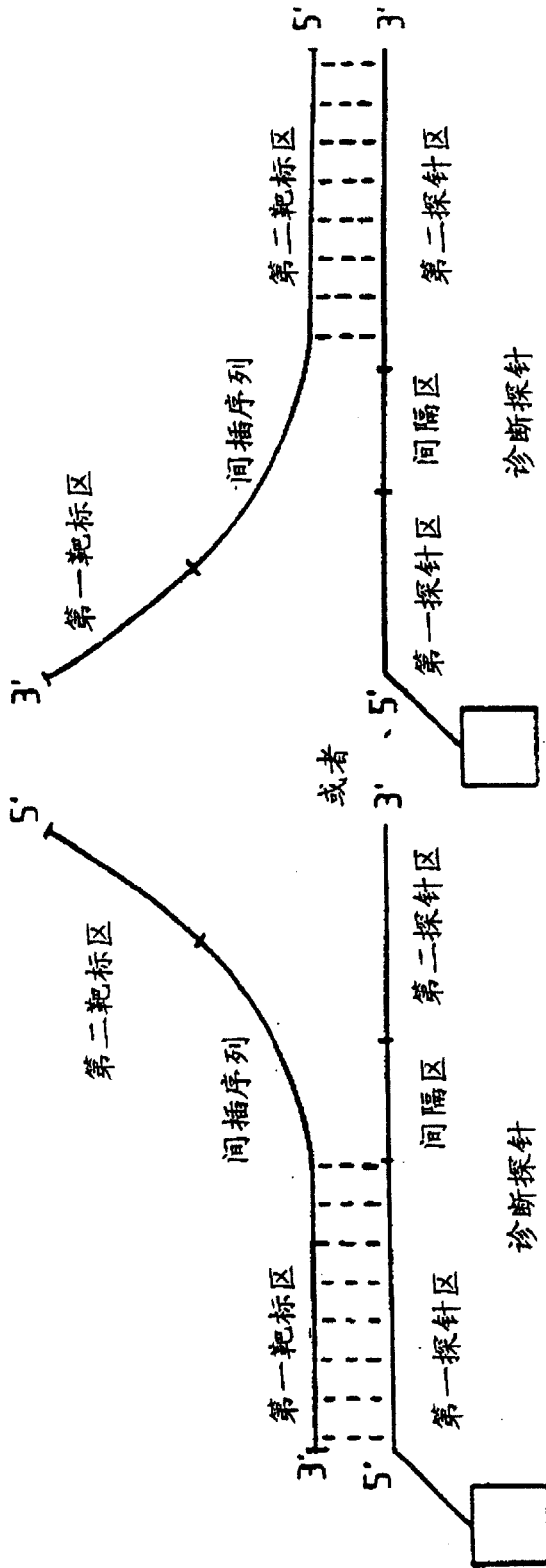


图 3A

图 3A

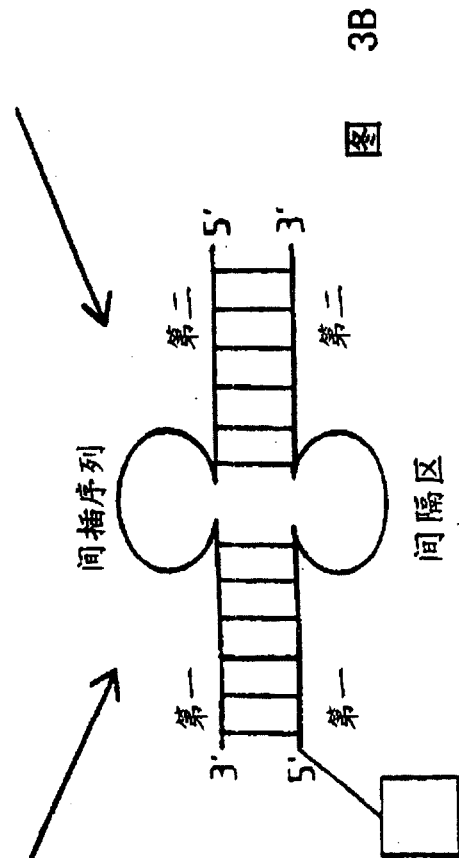


图 3B

图 4A

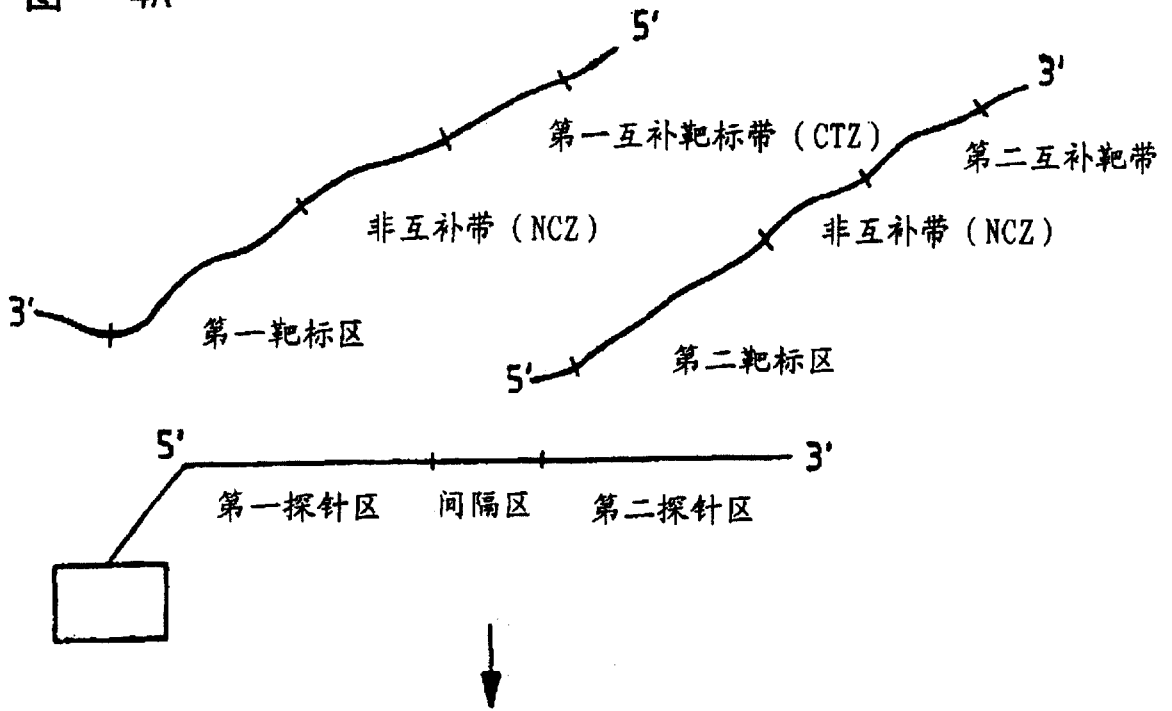


图 4B

