

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02124705.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006年1月4日

[11] 授权公告号 CN 1235046C

[22] 申请日 2002.6.21 [21] 申请号 02124705.6

[71] 专利权人 晶碁生化科技股份有限公司

地址 台湾省台北县

[72] 发明人 魏文进 陈志宏 黄献龙 赵守宇

审查员 李 珊

[74] 专利代理机构 北京安博达知识产权代理有限公司

代理人 徐国文

权利要求书2页 说明书8页 附图2页

[54] 发明名称

人类白血球抗原分型晶片及其制造方法与利用前述晶片检测人类白血球抗原的方法

[57] 摘要

本发明提供一种人类白血球抗原分型晶片及其制造方法与利用前述晶片以检测人类白血球抗原的方法，本发明的晶片可进行针对单一区或同时进行多区的人类白血球抗原侦测。前述晶片的探针为多段专一性结合的探针，藉由特殊的探针及引物，可提供一种快速、高分辨率、高通量操作及成本低廉的人类白血球抗原的检测方法。

1. 一种人类白血球抗原分型晶片，至少包含：
 - 尼龙基材；及
 - 复数个探针，其是为针对特定人类白血球抗原基因区内的基因片段的多段专一性结合探针，
- 5 前述探针是固着于前述尼龙基材上，其针对多区的人类白血球抗原基因进行侦测。
2. 如权利要求 1 所述的人类白血球抗原分型晶片，其中前述基因区是选自 HLA-A、B、C、DR、DQ 或 DP。
3. 如权利要求 1 的人类白血球抗原分型晶片的制造方法，至少包含下列程序：设计探针程序、合成探针程序及固着探针于尼龙基材上的程序，前述
- 10 设计探针程序的探针为多段专一性结合探针。
4. 如权利要求 3 所述的人类白血球抗原分型晶片的制造方法，其中前述固着探针于尼龙基材上的程序为原位合成或异位合成。
5. 如权利要求 1 的人类白血球抗原分型晶片在体外检测人类白血球抗原的方法，至少包含以下程序：萃取检体 DNA 程序、放大并标示检体 DNA 程
- 15 序、检体 DNA 与权利要求 1 的人类白血球抗原分型晶片上的探针的杂交反应程序、讯号侦测程序及结果分析程序。
6. 如权利要求 5 所述的检测人类白血球抗原的方法，其中前述放大检体 DNA 程序利用一般 PCR 或多重引物 PCR 的方式进行。
- 20 7. 如权利要求 6 所述的检测人类白血球抗原的方法，其中前述 PCR 利用的引物为共通引物。
8. 如权利要求 5 所述的检测人类白血球抗原的方法，其中前述标示检体 DNA 程序可利用荧光或显色基团方式，其中显示基团可使用洋地黄毒甙配基 (DIG) 或生物素。

9. 如权利要求 5 所述的检测人类白血球抗原的方法，其中前述讯号侦测程序可使用高通量扫描装置，及前述结果分析程序可利用计算机程序分析软件进行。

人类白血球抗原分型晶片及其制造方法 与利用前述晶片检测人类白血球抗原的方法

5

技术领域

本发明关于一种人类白血球抗原分型晶片及其制造方法与利用前述人类白血球抗原分型晶片以检测人类白血球抗原的方法。

10 背景技术

人类白血球抗原 (Human leukocyte antigen, HLA) 是一种位于细胞表面的重要蛋白质分子, 其主要功能在于免疫系统中的自我辨识 (self recognition) 及抗原呈现 (antigen presentation)。免疫细胞藉由HLA分子结合抗原片段, 再呈现给T细胞而引发一连串的免疫反应, 以完成各种免疫防御机制, 故此HLA分子具备重要的免疫功能意义。人类白血球抗原基因 (HLA gene) 位于人体第六对染色体短臂上 (6p21.3), 依据分子结构大小和基因所在位置不同, 分为HLA-A、HLA-B、HLA-C及HLA-D等基因座 (gene locus), 其中HLA-A、HLA-B及HLA-C基因座属第 I 类(class I); 而HLA-D基因座则属第 II 类(class II), 并可大略细分为HLA-DR、HLA-DQ及HLA-DP三组。

人体 HLA 系统非常复杂及多型 (polymorphism), 正常人第六对之两条染色体上各自带有来自父母的一组 HLA 基因, 每一组 HLA 基因含有许多基因座, 在每个基因座中有许多数目不等的对偶基因 (alleles), 而不同的对偶基因将表现不相同的蛋白质序列。当带着不同 HLA 分子的不同组织相遇时, 就会发生兼容性的问题, 并引发相关临床症状, 因此, HLA 在移植医学上扮演相当重要的角色。比较各

种对偶基因的 DNA 序列差异，以 Class I 的 HLA 分子为例，在长约 1100bp 的基因序列中，约有 10-30 个碱基对分散在序列之中，有些差异较小的对偶基因甚至只有数个碱基对的差异而已。因此，如何快速又有效率地分型 HLA，以便分析前述基因的差异，为当前重要且热门的课题。

以侦测标的分类，可将现行 HLA 分型技术分成蛋白质与去氧核糖核酸 (DNA) 两大类。蛋白质类主要是利用抗原抗体结合反应，以专一抗体来侦测细胞表面上 HLA 分子的氨基酸序列或构形上的差异，藉此了解检体中 HLA 分子的分型。虽然此法系直接侦测，但是由于抗体辨识能力较弱，即有些抗原虽存在着些许差异却无法藉由抗体辨识出来，因此产生分辨率较弱的缺点。DNA 类产品则是利用 DNA 放大、杂交或定序等操作技术，侦测 HLA 在基因序列上的差异，分别有下列几种方法：PCR (聚合酶链反应) 电泳法、基因序列定序法及探针杂交侦测法，其中 PCR 电泳法是利用多组特定的引物 (primer) 增幅放大特定 HLA 基因区内的基因片段，再藉由跑电泳分析以区分出放大片段为何，此法最大缺点是引物的专一放大并不稳定，而且每个检体需作数十个或数百个 PCR 再行电泳分析，非常耗工；基因序列定序法是将 HLA 基因区内的基因片段进行译码定序，是准确性很高的方法，但必须先取得低分辨率的初步分型才能进行序列译码，且需有 DNA 定序仪支持，其操作繁复，操作成本较高，且检验时间长，无法普及于一般检验实验室；而探针杂交侦测法主要是利用特定的引物将 HLA 基因区内的特定基因片段增幅放大，再藉由专一性探针杂交结合反应来作为分型结果的办法识别，其最大的问题也是引物的专一放大不稳定，此外目前这类办法识别分型乃是针对各基因区个别进行，不具有多区同时侦测的能力。

发明内容

有鉴于习知 HLA 分型技术的缺失，本发明提供一种人类白血球抗原分型晶片及其制造方法与利用前述晶片检测人类白血球抗原的方法，可有效解决习知技术的缺失。

- 5 本发明提供一种人类白血球抗原分型晶片，至少包含：一固态基材；及复数个探针，其为针对特定人类白血球抗原基因区内的基因片段的多段专一性结合探针，前述探针是固着于前述固态基材上，可针对单区或多区的人类白血球抗原基因进行侦测。

前述人类白血球抗原分型晶片的制造方法，至少包含以下程序：

- 10 设计探针程序、合成探针程序及固着探针于固态基材上程序。

前述设计探针程序是针对特定 HLA 基因区内的基因片段，设计多段专一性结合探针。前述合成探针程序可以核酸合成仪或其它方式合成。前述固着于固态基材上的探针可依侦测上的需要设计为仅针对单一区的探针或针对多区的探针，制成各种各样的分型晶片。前述固着
15 探针于固态基材上的程序可为原位 (in situ) 合成或异位 (ex situ) 合成。

前述固态基材则可为玻璃 (glass)、硅晶片 (silica)、尼龙 (nylon)、高分子聚合物 (polymer)、金属或合金组成的群组等材质，其中较佳者为尼龙材质。

- 20 前述利用本发明的晶片检测人类白血球抗原的方法，至少包含以下程序：萃取检体 DNA 程序、放大并标示 (labeling) 检体 DNA 程序、检体 DNA 与晶片上的探针的杂交反应程序、讯号侦测程序及结果分析程序。

前述放大检体 DNA 程序是利用 PCR 的方式进行，前述 PCR 利用的
25 引物为共通引物 (universal primer)，可对不同检体中特定 HLA 基因区进行增幅放大。前述 PCR 亦可以多重引物 PCR (multiplex PCR)

的方式进行，其可于同一条件（例如：温度、时间）下将不同 HLA 基因区的引物进行增幅放大。

前述标示检体 DNA 程序可利用萤光或显色基因（例如：洋地黄毒贰配基（Digoxigenin (DIG)）或生物素（Biotin））等方式标示，以利
5 后续的侦测。

前述杂交反应程序可利用自动杂交反应仪进行。前述讯号侦测程序是根据不同的标示方式（例如：萤光强度、呈色解析）进行不同方式的侦测，例如：可使用高通量扫描装置进行快速且高通量的检测反应。

10 前述结果分析程序则可利用计算机程序分析软件来达成检体中 HLA 的分型。

附图说明

图 1 是本发明的人类白血球抗原分型晶片的制造方法流程图。

15 图 2 是利用本发明的人类白血球抗原分型晶片检测人类白血球抗原的方法流程图。

图 3 是本发明实施例的 HLA-DRB 单区的人类白血球抗原分型晶片。

图 4 (A) - 图 4 (C) 是使用本发明的人类白血球抗原分型晶片检测人类白血球抗原的实施例结果图。

20

主要组件符号对照说明

- 1---HLA-DRB 分型晶片
- 2---探针
- 10... 设计探针程序
- 25 20... 合成探针程序
- 30... 固着探针于固态基材上程序

- 40... 萃取检体 DNA 程序
- 50... 放大并标示检体 DNA 程序
- 60... 杂交反应程序
- 70... 讯号侦测程序
- 5 80... 结果分析程序

发明详述

本发明的人类白血球抗原分型晶片，至少包含：一固态基材；及复数个探针，其为针对特定人类白血球抗原基因区内的基因片段的多段专一性结合探针，前述探针是固着于前述固态基材上，可针对单区或多区的人类白血球抗原基因进行侦测。

如图 1 所示，本发明的人类白血球抗原分型晶片的制造方法，至少包含：设计探针程序 10、合成探针程序 20 及固着探针于固态基材上程序 30，其程序如下：首先进行设计探针程序 10，该程序是针对特定 HLA 基因区内的基因片段来设计多段专一性结合探针；接着进行合成探针程序 20，该程序是利用核酸合成仪或其它方法对前述完成设计的探针进行合成；最后进行固着探针于固态基材上程序 30，该程序是将前述完成合成探针程序 20 的探针固着于固态基材上以完成晶片的制备。

前述固着方法可以为原位 (in situ) 合成或异位 (ex situ) 合成。将设计好的探针固着于固态基材上时，可固着仅针对 HLA-A、B、C、DR、DQ 或 DP 中任何一区的特定探针以完成侦测单一区的晶片，或在同一条件下同时固着针对多区的特定探针以完成可以侦测多区的晶片。前述固态基材可为玻璃 (glass)、硅晶片 (silica)、尼龙 (nylon)、高分子聚合物 (polymer)、金属或合金组成的群组。其中较佳为尼龙材质。

利用前述人类白血球抗原分型晶片制造方法所制备的晶片，可检测人类白血球抗原，检测方法如图 2 所示，至少包含：萃取检体 DNA 程序 40、放大并标示检体 DNA 程序 50、杂交反应程序 60、讯号侦测程序 70 及结果分析程序 80，其程序如下：首先进行萃取检体去氧核糖核酸 (DNA) 程序 40；接着利用特定的引物经聚合酶链反应 (PCR) 进行放大并标示检体 DNA 程序 50；接着将检体 DNA 与依前述人类白血球抗原分型晶片制造方法所制备的晶片进行杂交反应程序 60；最后进行讯号侦测程序 70 及结果分析程序 80，以判别检体的白血球抗原分型。

10 前述萃取检体 DNA 程序是利用一般萃取生物体 DNA 的技术。本发明是针对特定 HLA 基因区内的基因片段设计特定的共通引物 (universal primer)，并可利用核酸合成仪合成引物，利用此共通引物可以进行 PCR 将检体 DNA 增幅放大。本发明使用的 PCR 亦可以多重引物 PCR (multiplex PCR) 的方式进行，即将多组不同的引物于同一条件下进行 PCR 放大的动作，如此可同时针对不同区的 DNA 进行放大的动作，与一般传统的 PCR 需针对不同的引物需有不同的温度、时间等条件相比，可达到缩短反应时间的目的。进行 PCR 步骤时，并同时以萤光或显色基团，例如：DIG 或生物素 (Biotin) 等不同方式对增幅放大的基因片段作标示，以利后续晶片反应后的侦测程序。

20 将已增幅放大且标示完成的 DNA 片段与前述带有特定探针的晶片作用，使得增幅放大的 DNA 片段与特定探针在特定控制的条件下进行杂交反应 (可利用自动杂交仪器) 后，即针对不同的标示物质进行如：萤光强度或呈色解析的不同方式的侦测。由于本发明的晶片可同时操作多个检体并可搭配高通量扫描装置的使用，故具有高通量检测的潜力。因为只有和检体 DNA 互补的探针才能进行专一性结合，因此通过
25 前述多段专一性探针的杂交反应结果，最后可利用计算机程序分析软

件对于探针杂交反应的各种杂交图谱 (pattern) 来分析并定义 HLA 的分型。以下为通过一实施例做更进一步的说明。

具体实施方式

实施例：HLA-DRB 单区的人类白血球抗原分型晶片

HLA 分型晶片的准备：

- 5 图 3 为本实施例的人类白血球抗原分型晶片 1，使用 HLA-DRB 单区检测的探针 2，晶片 1 基材使用尼龙膜；晶片 1 上的每一探针点 2 为 0.15ul 的 HLA-DRB 的基因片段；并使用 UV 作交互连结，使探针固着于尼龙膜基材上。

待测 DNA 检体的制备：

- 10 本实施例使用三种待测 DNA 检体进行检测 (A、B、C)：取 5ul PCR 产物加入 20ul 的杂交反应缓冲液于 PCR 试管中；于 95℃ 下变性 (denature) 15 分钟；之后置于冰上 15 分钟。

HLA 分型晶片的反应：

- 15 将前述制备好的待测 DNA 检体置于前述 HLA-DRB 单区的分型晶片 1 上，并置于自动杂交仪中，于 50℃ 下反应 1 至 2 小时；用清洗的缓冲液 (wash buffer) 清洗晶片上未杂交的 DNA；在加入其它缓冲液；之后加入 α DIG-AP (1:12500) 于缓冲液中；加入呈色液 (NBT/BCIP: 侦测缓冲液: 1:50)；最后，于室温下静置直到晶片上出现呈色结果，即可利用高通量扫描装置进行分析。

- 20 晶片反应结果：

- 经由前述步骤的晶片反应结果如图 4 (A) 至图 4 (C) 所示，是显示三种不同的 DNA 检体 (A、B、C)，经由本发明的 HLA-DRB 分型晶片检测后显示，检体 (A) 于 DRB4*01 的基因片段有呈色反应；检体 (B) 于 DRB3*02 的基因片段有呈色反应；检体 (C) 于 DRB1*01/DRB1*04 25 的基因片段有呈色反应。依据晶片不同的呈色反应结果，即可精确分析出检体 DNA 中的 HLA 分型。

前述实施例是针对 HLA 单一区进行侦测，但本发明的 HLA 分型晶片可依据前述的制造方法制成单一区（例如：HLA-A、HLA-B、HLA-DRB）或同时可侦测多区（例如：结合 HLA-A、HLA-B 及 HLA-DRB 三区）的 HLA 分型晶片。

- 5 藉由本发明的晶片的特殊探针设计及快速有效的杂交步骤，可以达到一快速、高分辨率、高通量操作、微小化及低成本的人类白血球抗原分型方法，并且可以同时进行多区侦测的动作，其与习知 HLA 分型技术的分别如表一所示，可以明显看出其优异性。由于 HLA 分型技术应用用于器官移植的兼容性评估、与疾病的关联性分析、学术研究（包括人类学、生物学）以及法医学的应用（亲子鉴定、检体化验）等方面，且不断创新的诊断及治疗方法，例如：干细胞的应用、器官或组织的移植等，都将会严谨地评估病患的 HLA 兼容性问题，因此本发明对于临床医学上的应用有极大帮助。
- 10

15

表一

方法	高通量操作	分辨率	体积微小化	多区侦测	使用成本
抗原抗体法	可	低	小	否	低
PCR 电泳法	否	中	大	否	高
基因序列 定序法	否	高	大	否	高
探针杂 交侦测法	可	中	大	否	高
分型晶片	可	高	小	可	低

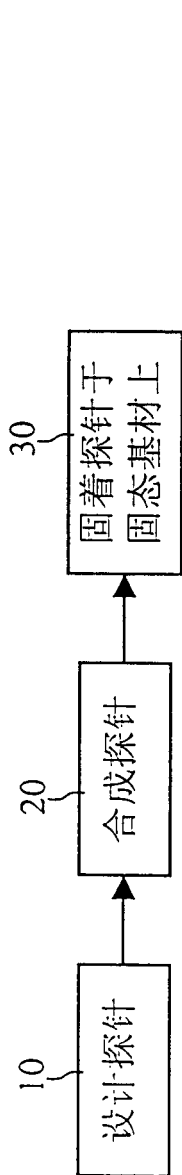


图 1

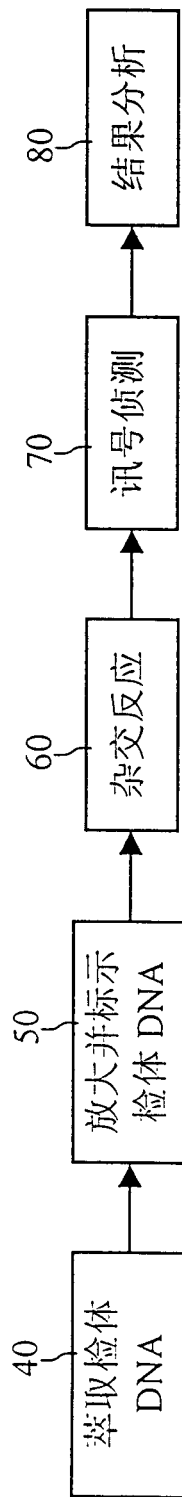


图 2

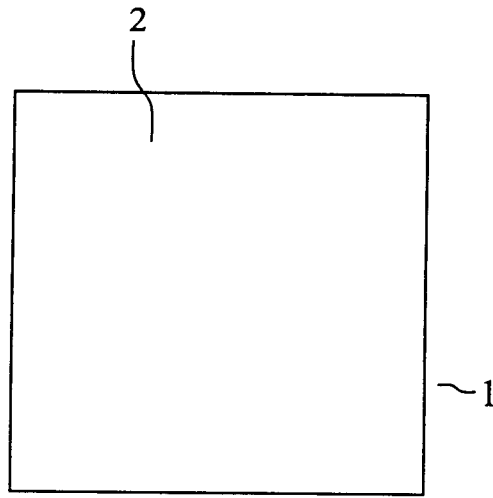


图 3

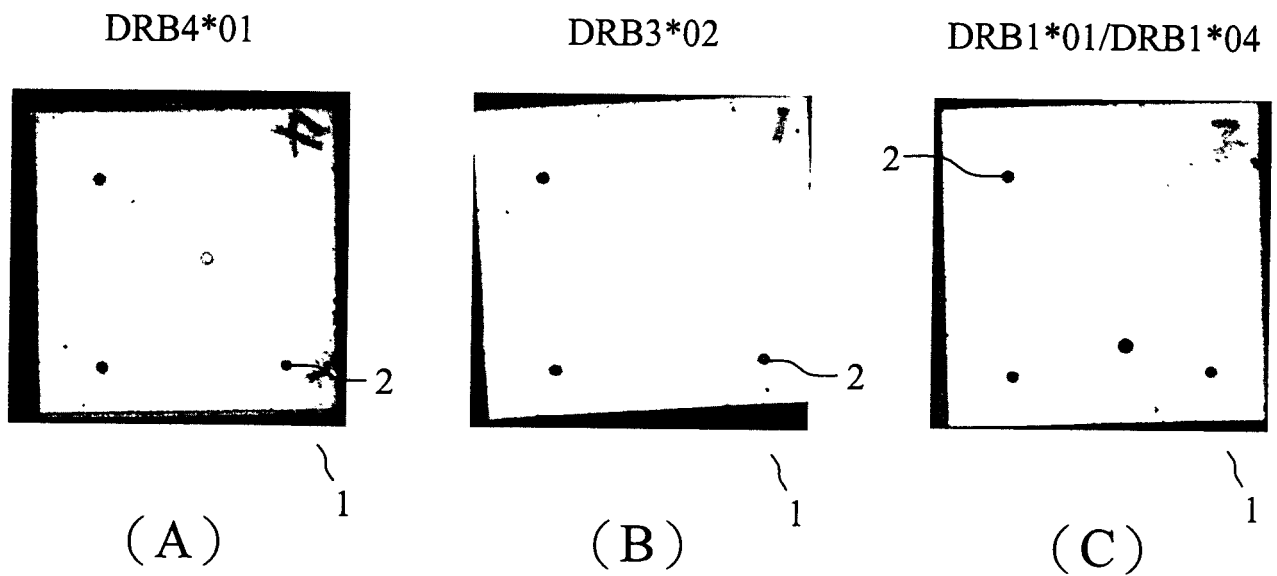


图 4

专利名称(译)	人类白血球抗原分型晶片及其制造方法与利用前述晶片检测人类白血球抗原的方法		
公开(公告)号	CN1235046C	公开(公告)日	2006-01-04
申请号	CN02124705.6	申请日	2002-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	晶暮生化科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	晶暮生化科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	晶暮生化科技股份有限公司		
[标]发明人	魏文进 陈志宏 黄献龙 赵守宇		
发明人	魏文进 陈志宏 黄献龙 赵守宇		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/68 C12Q1/68		
代理人(译)	徐国文		
其他公开文献	CN1464306A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种人类白血球抗原分型晶片及其制造方法与利用前述晶片以检测人类白血球抗原的方法，本发明的晶片可进行针对单一区或同时进行多区的人类白血球抗原侦测。前述晶片的探针为多段专一性结合的探针，藉由特殊的探针及引物，可提供一种快速、高分辨率、高通量操作及成本低廉的人类白血球抗原的检测方法。

