

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2011년 9월 9일 (09.09.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/108854 A2

- (51) 국제특허분류: 미분류
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/001452
- (22) 국제출원일: 2011년 3월 3일 (03.03.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2010-0019539 2010년 3월 4일 (04.03.2010) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **건국대학교 산학협력단 (KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION CORP)** [KR/KR]; 서울 광진구 화양동 1, 143-701 Seoul (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **채치범 (CHAE, Chi-Bom)** [US/KR]; 서울 강남구 삼성 2동 29-19 번지 삼성벨라스빌 501 호, 135-864 Seoul (KR). **김경태 (KIM, Kyung-Tae)** [KR/KR]; 서울 광진구 자양 4동 192-8 번지, 143-846 Seoul (KR). **강종훈 (KANG, Jong Hun)** [KR/KR]; 서울 성동구 응봉동 대림강변아파트 108 동 103 호, 133-769 Seoul (KR).
- (74) 대리인: **특허법인 엠에이피에스 (MAPS INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM)**; 서울 강남구 신사동 587-23 성도빌딩 11 층, 135-747 Seoul (KR).

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): 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, 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) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (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).

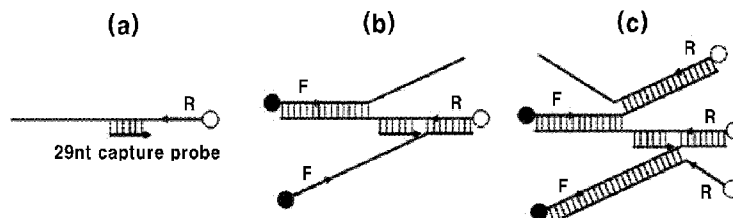
공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR DETECTING NUCLEIC ACIDS BY PROMOTING BRANCHED DNA COMPLEX FORMATION

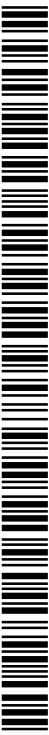
(54) 발명의 명칭: 가지상 DNA 복합체의 형성 촉진을 통한 핵산 검출 방법

[Fig. 2]



(57) Abstract: Disclosed is a method for detecting nucleic acids by promoting branched DNA complex formation. The target nucleic acid detection signal and sensitivity can be dramatically increased by promoting self assembly of branched DNA between a plurality of amplified DNA targets and a single-chain oligonucleotide probe, by means of the integrated implementation of PCR, thermal denaturation and hybridization in a single reaction mixture.

(57) 요약서: 가지상 DNA 복합체의 형성 촉진을 통한 핵산 검출 방법이 개시된다. 동일 반응 혼합물에서의 PCR, 가열 변성 및 혼성화의 통합 수행에 의하여, 단일 사슬 올리고뉴클레오타이드 프로브와 복수의 증폭된 표적 DNA 사이에서의 가지상(branched) DNA 의 자기 조립을 촉진시킴으로써, 표적 핵산의 검출 신호 및 민감도를 극적으로 증가시킬 수 있다.



WO 2011/108854 A2

명세서

발명의 명칭: 가지상 DNA 복합체의 형성 촉진을 통한 핵산 검출 방법

기술분야

- [1] 본원은 가지상(branched) DNA 형성 촉진을 통한 검출 신호 및 민감도가 극적으로 증가된 핵산 검출 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는, 용액 내 또는 고체 지지체 표면에서 동일 반응 혼합물에서의 PCR(Polymerase Chain Reaction) 및 혼성화의 통합 수행에 의하여, 짧은 핵산 프로브와 복수의 증폭된 표적 DNA 사이에서의 가지상 DNA의 자기 조립(self-assembly)을 촉진시킴으로써, 표적 핵산의 검출 신호 및 민감도를 극적으로 증가시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 일반적으로, 단일 사슬의 짧은 핵산 프로브(일반적으로, DNA 또는 PNA)를 이용한 진단방법은 질병 원인 유전자, 돌연변이, 감염원(infectious agents)(예컨대, 바이러스, 미생물 등), 지노타이핑(genotyping), 유전자의 발현 등의 확인 또는 검출과 같은 다양한 목적을 위해 사용된다. 짧은 핵산 프로브는 대체적으로 유리판, 금속판, 비드 등 다양한 고체표면에 고정시켜 사용되고 있다. 예를 들어, 짧은 핵산 프로브를 이용한 DNA 마이크로어레이(또는 DNA 칩)의 주된 장점 중의 하나는 많은 상이한 표적 핵산 서열을 동시에 분석할 수 있다는 점이다. 이러한 기술은 병원이나 클리닉에서의 진단용으로 채용되고 있으며, 또한, 임상 진단에 있어서 편리한 사용 및/또는 신뢰성 있는 결정을 위하여 기타의 다양한 기술들이 통합되고 최적화되고 있다.
- [3] 짧은 핵산 프로브를 이용한 진단 방법은 일반적으로 아래와 같은 긴 프로세스가 요구된다: (a) 생물 시료(예컨대, 조직, 세포, 혈액, 혈청, 체액 등)로부터 핵산(DNA 또는 RNA)을 추출; (b) 표적 핵산의 증폭; 및 (c) 최종적으로, 증폭된 핵산 서열과 고체(예컨대, 유리 슬라이드 혹은 비드) 표면에 고정된 짧은 핵산 프로브의 혼성화. 여기서, RNA 서열을 검출하기 위한 경우에는, 증폭 전에 RNA를 역전사 반응에 의해 DNA로 우선 전환시킨다.
- [4] 상기 표적 핵산의 검출을 위해 요구되는 통상적인 프로세스로부터 알 수 있듯이, 짧은 핵산 프로브를 이용한 분자생물학적 진단 방법은 노동이 많이 투입되고, 번거롭고, 또한 많은 시간이 소비된다. 따라서, 핵산 서열을 편리하고, 경제적이며, 높은 처리량으로 분석하기 위한 간소화된 공정이 요구되고, 이는 병원 및 클리닉에서의 임상 진단을 위해서 특히 중요하다.
- [5] 또 다른 중요한 이슈는 혼성화된 생성물의 검출을 위해 사용되는 방법의 민감도(sensitivity)이다. 검출 민감도는 감염원(예컨대, 바이러스, 미생물 등)의 검출에 있어서 특히 중요하고, 또한, 치료의 예후(prognosis)를 위해 중요하다.

예컨대, 감염원의 치료의 성공 여부가 인간의 체액(예컨대, 혈액) 중에 남아있는 잔류 감염원의 수에 의해 판단될 수 있다. 또 다른 예로서, 암 치료의 성공 여부가 암 원인 유전자의 존재(따라서, 암세포의 존재)에 의해 판단될 수 있다.

[6] 일반적으로, 고체 표면에 고정된 짧은 핵산 프로브를 이용한 표적 핵산 서열의 검출 민감도는 실시간 PCR(real-time PCR)의 민감도보다 수배 더 낮다고 알려져 있다. 따라서, 짧은 핵산 프로브를 이용한 검출 민감도를 향상시킬 수 있는 방법, 이상적으로는 1개 표적분자의 검출이 가능한 수준으로 향상된 민감도를 가지는 검출 방법을 개발하는 것이 필요하다.

[7] 진단 대상 핵산의 증폭을 거치지 않고, 표지가 많이 연결되어 있는 가지상 DNA(branched DNA)를 합성하고 이를 이분절 올리고뉴클레오티드 프로브(bipartite oligonucleotide probe), 즉 가지상 DNA와 혼성화를 통하여 고체상 캡쳐프로브에 결합된 진단대상 핵산과 연결해주는 올리고뉴클레오티드를 통하여 높은 시그널과 민감도를 얻는 진단 방법이 쓰이고 있으나, 이를 위해서는 가지상 DNA를 외부에서 합성하고, 고체상에 고정되는 캡쳐프로브 외에 진단대상을 인식하는 이분절 올리고뉴클레오티드도 합성을 해야한다. 이 기술은 민감도는 높으나 시간이 오래 걸리고 여러 과정을 거쳐야 하는 번거로움이 있는 것이 단점이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본원은 전술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 짧은 핵산 프로브를 이용하여 표적 핵산의 검출하는 방법에 있어서, 짧은 핵산 프로브와 복수의 증폭된 표적 DNA 사이의 가지상 DNA 복합체의 자기 조립 촉진을 통해 검출 신호 및 민감도를 극적으로 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[9] 본원의 일 측면에 따르면, 검출하고자 하는 표적 핵산 분자의 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 포함하는 단일가닥 핵산 프로브의 존재 하에서 상기 표적 핵산 분자의 증폭과 혼성화를 통합하여 수행하여, 상기 핵산 프로브에 복수의 증폭된 핵산 분자들이 혼성화 되어 가지상(branched) 핵산 복합체의 형성을 촉진하는 단계; 및 상기 혼성화된 가지상 핵산 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법이 제공된다.

[10] 일 구현예에 따르면, 상기 증폭은 비대칭 폴리머라제 연쇄 반응(asymmetric PCR)으로 수행하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며 통상의 PCR을 수행하는 경우에도 프라이머 농도를 과량으로 사용하는 경우 가지상 핵산 복합체의 형성의 촉진이 가능하다.

[11] 일 구현예에 따르면, 상기 가지상(branched) 핵산 복합체의 형성을 촉진하는 단계에서, 상기 가지상(branched) 핵산 복합체는 자기조립되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [12] 일 구현예에 따르면, 상기 가지상 핵산 복합체의 형성을 촉진하는 단계는, 써모사이클러(thermocycler)를 이용하여 온도, 온도 사이클 시간 및 온도 사이클 수를 조절함으로써 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [13] 상기 표적 핵산 분자의 증폭과 혼성화의 통합은, 고체 지지체의 표면(예컨대, 마이크로어레이의 표면, 용기 혹은 튜브 내의 표면, 혹은 비드 표면 등)에서 또는 용기 내의 용액 중에서 동일 반응 혼합물 내에서 증폭과 혼성화가 수행됨을 의미하며, 고체 지지체 또는 용기에 써모사이클러를 결합시킴으로써, 상기 고체 지지체 또는 용기의 온도, 온도 사이클 시간 및 수를 조절하여 증폭과 혼성화의 통합 수행이 용이하게 이루어 질 수 있으며, 이러한 조절을 프로그램화 하여 검출 과정을 자동화하는 것이 가능하다. 상기 증폭 및 혼성화의 통합과 관련한 내용은, 본원의 발명자들에 의한 국제출원 PCT/US2006/049395에 보다 상세한 설명이 기재되어 있으며, 상기 특허문헌은 내용 전체가 본 명세서에 통합된다.
- [14] 일 구현예에 따르면, 상기 시료는 전혈, 혈청, 체액, 생체 조직, 세포, 미생물, 바이러스 또는 바이러스 입자를 함유하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 검출하고자 하는 표적 핵산이 포함될 수 있는 것이라면 어떠한 시료라도 무방하다.
- [15] 일 구현예에 따르면, 상기 시료는 핵산 분자의 분리 및 정제 과정을 거치지 않은 시료일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 핵산 분자의 분리 및 정제 과정을 거친 시료 역시 당연히 사용될 수 있다.
- [16] 일 구현예에 따르면, 상기 시료가 핵산 분자의 분리 및 정제 과정을 거치지 않은 시료인 경우, 전술한 증폭 및 혼성화를 통합 수행하기 전에 상기 시료 중의 핵산을 노출시키기 위하여 계면활성제 처리, 효소 처리 또는 가열 처리를 추가로 수행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 핵산 분자의 분리 및 정제 과정을 거치지 않고 증폭 및 혼성화의 통합 수행하는 것과 관련한 내용은, 본원의 발명자들에 의한 국제출원 PCT/US2009/034809에 보다 상세한 설명이 기재되어 있으며, 상기 특허문헌은 내용 전체가 본 명세서에 통합된다.
- [17] 일 구현예에 따르면, 상기 검출하고자 하는 표적 핵산 분자는 세포-무함유 시료 내에 존재하는 것; 바이러스 입자 또는 비진핵 세포 중에 존재하는 것; 병원체의 핵산 분자 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [18] 일 구현예에 따르면, 상기 검출하고자 하는 표적 핵산 분자는 돌연변이된 서열을 포함하는 핵산 분자이고, 상기 프로브는 상기 돌연변이된 서열을 포함하는 표적 핵산 분자에 상보적인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [19] 일 구현예에 따르면, 상기 표적 핵산 분자는 DNA 분자 또는 RNA 분자로부터 역전사된 cDNA 분자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [20] 일 구현예에 따르면, 상기 표적 핵산 분자는 RNA 분자이고, 상기 혼성화된 가지상(branched) 핵산 복합체의 형성을 촉진하는 단계는, 상기 표적 RNA 분자의 역전사, 증폭 및 혼성화를 통합하여 수행하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는

것은 아니다. 여기서, 상기 증폭은 비대칭 폴리머라제 연쇄 반응(asymmetric PCR)으로 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 통상의 PCR을 수행하는 경우에도 프라이머 농도를 과량으로 사용하는 경우 가지상 핵산 복합체의 형성의 촉진이 가능하다.

- [21] 일 구현예에 따르면, 상기 핵산 프로브는 단일 가닥 DNA 또는 PNA 서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [22] 일 구현예에 따르면, 상기 핵산 프로브는 용액 내에 존재하거나 또는 고체 지지체 상에 존재하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 핵산 프로브가 용액 내에 존재하는 경우, 표적 핵산 분자의 증폭과 혼성화가 단일 용기 내에서 통합 수행될 수 있다. 또한, 상기 핵산 프로브가 고체 지지체 상에 존재하는 경우, 고체 지지체 상에서 표적 핵산 분자의 증폭과 혼성화가 통합 수행될 수 있다.
- [23] 상기 고체 지지체로는 다양한 고체 표면이 이용될 수 있으며, 예컨대, 플라스틱 튜브, 플라스틱 용기(well), 유리용기, 비드(bead), 유리 슬라이드, 금속 표면 등이 이용될 수 있다. 또한, 상기 고체 지지체는 다수의 핵산 프로브가 부착된 마이크로어레이일 수 있다.
- [24] 일 구현예에 따르면, 상기 고체 지지체 상에 존재하는 핵산 프로브는 3' 또는 5' 말단이 링커 분자를 통하여 상기 고체 지지체 상에 고정된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 여기서, 상기 링커 분자는 핵산 프로브를 고체 지지체 상에 연결할 수 있는 다양한 물질이 사용될 수 있다. 예컨대, 유리 슬라이드 등의 고체 지지체 표면을 다양한 화합물질로 코팅하여 핵산 프로브를 표면에 부착될 수 있도록 할 수 있다. 상기 화합물질은 프로브(DNA 또는 PNA)를 고체 지지체 표면에 부착시켜야 할 뿐만 아니라, 비-특이적 결합 및 노이즈를 최소화하여야 하며, 예컨대, DNA의 부착을 위한 아민, 에폭시, 또는 알데히드 그룹의 공급원으로서 실란, 실릴 또는 폴리-L-리신 등을 함유할 수 있다. 바이오칩에 사용하기 위한 수상돌기(dendron 또는 dendrimer)가 개발된 바 있고, 링커 분자로서 수상돌기를 사용함으로써 캡처 프로브 사이의 공간을 조절할 수 있고, 이로써 입체 방해가 줄어들고 동시에 민감도가 증가될 수 있다. 또한, 이러한 효과는 다른 방법으로도 가능하며, 예를 들어 스트렙타비딘(streptavidin)으로 코팅된 유리슬라이드 표면에 비오틴(biotin)-핵산 프로브를 부착함으로써 이러한 현상을 재현 할 수 있을 것이다.
- [25] 일 구현예에 따르면, 상기 검출은 이중 가닥 DNA와 결합하는 검출 가능한 표지와 상기 혼성화된 가지상 핵산 복합체를 접촉시켜 표지된 복합체를 형성시켜 검출하는 것일 수 있으며, 또는 상기 증폭시 표지된 뉴클레오티드 또는 표지된 PCR 프라이머를 사용하여 증폭된 표적 DNA에 혼입된 표지를 통하여 검출하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 당해 기술분야에 공지된 다양한 검출 수단을 통하여 증폭된 표적 분자의 검출이 가능하다.
- [26] 예컨대, 증폭 반응을 위한 반응 혼합물 중에 형광 표지된 dNTP를

포함시킴으로써 증폭된 핵산 물질을 표지하는 것이 가능하며, 다른 예로서 방사성 동위원소를 표지로 사용하는 것도 가능하다. 또한, 전기화학적 검출 및 이중가닥 핵산 결합체의 사용, 예컨대 결합된 물질을 칩 또는 슬라이드 표면으로부터 제거하는 세척 또는 세정 단계 이후에 유리하게 사용되는 SYBR green의 사용 등이 이용될 수 있다. 또한, 표적 핵산의 증폭시에 비오틴 표지된 PCR 프라이머를 사용함으로써, 발색효소가 결합된 스트렙타비딘(streptavidin)을 이용하여 검출이 수행될 수 있다. 또한, 당업자에게 공지된 다른 검출 수단을 사용할 수 있으며, 형광 이외의 예로서 방사활성 또는 화학발광 잔기를 갖는 표지화나, 화학적, 효소적, 물리화학적 또는 항원-항체 결합 과정에 기초한 다른 수단을 들 수 있다. 예컨대, 알칼리 포스파타제, 호스레디쉬 퍼옥시다제, β -갈락토시다제, 우레아제, 루시퍼라제, 로다민, 플로레스세인, 피토에리스린, 루미놀, 이소루미놀, 아그리디늄 에스테르 또는 형광성 마이크로스피어 등이 검출가능한 잔기로서 사용될 수 있다.

- [27] 한편, 고체 지지체 상의 증폭된 물질의 분석은 당업자에게 공지된 임의의 적합한 수단에 의해 수행할 수 있다. 예컨대, 혼성화 이후의 DNA 분석에서 수행될 수 있는 일반적인 예로서, 이미지 획득을 위한 시판되는 공초점 레이저 스캐너 및 형광 강도 분석을 위한 정량적인 마이크로어레이 분석 소프트웨어 등을 사용할 수 있다.
- [28] 본원의 다른 측면에 따르면, 검출하고자 하는 표적 핵산 분자를 비대칭 폴리머라제 연쇄 반응(asymmetric PCR)을 수행하여 증폭하는 단계; 상기 증폭된 표적 핵산 분자를 포함하는 반응 혼합물 전체를 상기 표적 핵산 분자의 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 포함하는 단일가닥 핵산 프로브가 존재하는 용액 또는 고체 지지체 표면으로 전달하는 단계; 상기 용액 중에서 또는 상기 고체 지지체 상에서 혼성화를 수행하여, 상기 핵산 프로브와 복수의 증폭된 핵산 분자들이 혼성화되어 가지상(branched) 핵산 복합체의 형성을 촉진하는 단계; 및 상기 혼성화된 가지상 핵산 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법이 제공된다.
- [29] 여기서, 고체 지지체에 고정된 핵산프로브를 사용하는 것은 핵산프로브와 형성된 가지상 핵산 복합체를 쉽게 분석하기 위한 방법이다. 예시적 구현에 따르면 용액 상태에서도 비대칭 PCR과 짧은 핵산 프로브와의 혼성화를 거쳐 가지상 DNA가 형성됨을 측정할 수 있다.
- [30] 일 구현에 따르면, 상기 비대칭 PCR 반응이 상기 고체 지지체 표면으로부터 분리된 용기 또는 컨테이너 내에서 수행되고, 반응 혼합물 전체를 핵산 프로브가 고정된 고체 지지체 표면으로 전달하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [31] 연쇄비대칭 PCR을 분리 수행하는 경우에 있어서도 그 반응 혼합물 전체를 핵산 프로브가 고정된 지지체 표면으로 전달함으로써 가지상 핵산 복합체의 형성이 촉진될 수 있다. 여기서, 비대칭 PCR을 분리 수행하는 것을 제외한다

나머지 구성은 전술한 통합 수행의 경우와 동일하게 수행될 수 있다.

발명의 효과

- [32] 본원의 일 실시예에 따르면, DNA 칩 기술의 사용을 통해 기초 연구분야뿐만 아니라 분자 진단에서의 표적 핵산 분자의 검출에 있어서, 높은 신호를 가지는 표적 핵산 분자 1개 수준의 검출 민감도(따라서 높은 수준의 신뢰도)를 가지는 표적 DNA 또는 RNA의 검출이 가능하다. DNA 마이크로어레이에 의한 높은 신뢰도(높은 신호)로 표적 DNA 1개 분자의 검출은 전례가 없는 것이고, 이러한 민감도는 최신의 정량 PCR의 성능에 상응하거나 훨씬 더 좋은 것이다.
- [33] 본원의 일 실시예에 따르면, 핵산 프로브를 비드에 부착하여 비대칭 PCR과 혼성화를 수행한 후 비드를 회수하여 가지상 DNA 형성을 측정할 수 있고, 핵산 프로브를 플라스틱 혹은 유리 용기나 튜브 표면에 부착하여 비대칭 PCR과 혼성화를 수행한 후 가지상 DNA 형성을 측정할 수 있다. 이러한 예들은 본원의 기술이 다양한 진단방법에 활용될 수 있다는 것을 보여 준다. 위의 예들은 진단을 자동화하는데도 활용할 수 있다.
- [34] 본원의 일 실시예에 따른, 통합된 비대칭 PCR 및 혼성화에 의하여 얻어진 신호는 시판 중인 DNA 칩 진단 키트에 의해 추천되는 통상적인 프로토콜보다 적어도 25 내지 30배 더 높기 때문에, 통합된 프로세스의 높은 민감도는 감염원, 예컨대 바이러스 및 미생물의 검출 및 동정뿐만 아니라, 신체 내의 감염원의 존부의 결정 등의 많은 활용가능성을 가지며, 또한 이러한 통합된 프로세스는 많은 보통의 세포 중에서 암세포의 검출을 위해 사용될 수 있다.
- [35] 본원에서 명시하는 통합과정을 통한 가지상 DNA 복합체의 자기 조립은 유전자 진단의 자동화에도 활용 가능하다. 즉, PCR 과정에 필요한 장비와 혼성화에 필요한 장비를 통합할 수 있을 뿐만 아니라 이에 필요한 프로세스 즉 샘플의 피펫팅(pipetting) 및 이동 등을 단순화할 수 있는 효과도 있다.
- [36] 기존에 표지분자가 결합된 가지상 DNA를 합성하고 이를 고체에 결합된 캡처프로브와 혼성화된 진단대상 핵산과 상보적인 서열과 가지상 DNA와 상보적인 서열 부위를 가진 이분절 올리고뉴클레오티드(bipartite oligonucleotide)를 통하여 연결시켜 시그널과 민감도를 올리는 기술이 발표 되었으나, 이는 본원에서 명시되는 자기 조립 (self-assembly)을 통한 가지상 DNA 복합체 조립과는 성격상 아주 다른 기술이며, PCR을 통한 진단대상 유전자를 증폭하고 가지상 DNA 복합체 형성을 통한 시그널과 민감도를 더욱 더 높이는 기술이다. 또한 통합과정(PCR, 가열변성, 혼성화)이 동일한 PCR 반응 혼합물에서 진행되어 과정이 간편화되는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [37] 도 1은 HPV DNA의 지노타이핑을 위해 사용된 HPV DNA의 L1 영역을 도식적으로 나타낸 도면으로서, 포워드(F) PCR 프라이머, 리버스(R) PCR 프라이머 및 HPV16 캡처 프로브로 사용한 29 뉴클레오티드(nt)를 도시한

도면이다.

- [38] 도 2는 혼성화 과정을 도시한 것이다.(a)는 1차적으로 29 nt 캡처 프로브와 R 프라이머에 의해 생성된 리버스사슬과 결합된 구조이며, (b)에서는 (a)에서 형성된 결합체에 두 개의 F 프라이머에 의해 생성된 포워드 사슬이 2개 결합되고 이로 인해 2개의 리버스 사슬이 결합할 수 있는 부위가 노출된 것을 나타내며, (c)는 (b)에서 형성된 결합체에 2개의 리버스 사슬이 결합되어 2개의 포워드 사슬이 결합할 수 있는 부위가 노출된 것을 나타낸다. ●과 ○은 표지분자를 의미한다.
- [39] 도 3은 캡처 프로브와 비대칭 PCR 생성물 사이의 응집물 (또는 가지상 DNA)의 조립을 증명하는 전기영동 결과 이미지이다. (a)는 대칭(Symmetric) PCR과 비대칭 (asymmetric) PCR을 HPV16 L1 부위와 완전히 상보적인 서열을 가진 프라이머 세트 A로 수행한 결과이고, (b)는 지노타이핑용 프라이머 세트 B로 실험한 결과이다. (a) 및 (b)의 각 레인은 다음과 같다: 레인 1: 대칭 PCR + 혼성화; 레인 2: 대칭 PCR + 캡처프로브 + 혼성화; 레인 3: 비대칭 PCR + 혼성화; 레인 4: 비대칭 PCR + 캡처프로브+ 혼성화.
- [40] 도 4는 가지상 DNA 복합체가 정상적인 두사슬 DNA가 아니고 단일사슬 부위와 갭(gap)을 포함하고 있음을 나타내는 전기영동 결과 이미지이다. (a): EtBr로 염색한 이미지; (b): Cy5 이미지. 비대칭 PCR + 혼성화: 레인 1: Cy5-GP4F 프라이머, 레인 2: Cy5-GP4R 프라이머 비대칭 PCR + 캡처프로브+ 혼성화: 레인 3: Cy5-GP4F 프라이머, 레인 4: Cy5-GP4R 프라이머. 레인 3, 4 DNA를 S1 누클레아제로 처리한 경우: 레인 5: Cy5-GP4F 프라이머, 레인 6: Cy5-GP4R 프라이머.
- [41] 도 5는 가지상 DNA 내에 존재하는 캡처 프로브 당 결합된 포워드와 리버스 사슬의 숫자를 결정하는 실험결과를 나타낸 전기영동 결과 이미지이다. (a): EtBr로 염색한 이미지; (b): Cy5 이미지. 캡처 프로브 없이 통합과정을 진행한 경우: 레인 1: Cy5-GP4R, 레인 2: Cy5-GP4F. 캡처 프로브 포함한 통합과정: 레인 3: Cy5-캡처 프로브, 레인 4: Cy5-GP4R, 레인 5: Cy5-GP4F.
- [42] 도 6은 가지상 DNA가 형성되는 조건에 관한 실험 결과이다. (a): 캡처 프로브 존재하에 비대칭 PCR을 진행하고 정지된 상태 (레인 1), 비대칭 PCR 후 변성 과정이 없이 혼성화를 진행한 경우 (레인 2), 비대칭 PCR 후, 95°C에서 변성시키고, 50°C에서 혼성화를 진행한 경우 (레인 3). (b): 비대칭 PCR을 진행하고, 변성, 그리고 혼성화를 하되 캡처 프로브를 첨가하지 않은 경우 (레인 1), 비대칭 PCR, 가열변성(heat denaturation) 후 캡처 프로브를 첨가하고 혼성화를 한 경우 (레인 2), PCR, 가열변성 후 캡처프로브와 EDTA를 같이 첨가하고 혼성화를 한 경우 (레인 3).
- [43] 도 7은 유리 슬라이드 상에 고정화된 HPV16 프로브와 혼성화에 기인한, PCR 생성물과 단일사슬 PCR 생성물의 양의 증가에 의해 얻어지는 신호를 나타낸 그래프이다.

- [44] 도 8은 비대칭 PCR과 이에 이어지는 혼성화가 DNA 마이크로어레이 슬라이드의 표면에서 수행되었을 때, 신호가 수배 증가함을 증명하는 그래프이다.
- [45] 도 9는 DNA 마이크로어레이 슬라이드의 표면에서의 통합된 비대칭 PCR, 가열변성 및 혼성화 (-●-)에 의하여, 슬라이드 상에 적용된 1개 분자의 표적 DNA를 높은 신호로 검출함을 증명하는 그래프이다.
- [46] 도 10은 다양한 프로세스에 의하여 얻어진 신호를 비교한 그래프이다.
- [47] 도 11은 역전사, 증폭 및 유리 표면에 고정화된 캡처 프로브(A2-P)와의 혼성화에 의한, 만성 골수성 백혈병 세포(chronic myeloid leukemia cell)에서의 키메라(chimeric) BCR B3-ABL A2 RNA 검출을 도식적으로 나타낸 도면이다.
- [48] 도 12는 DNA 마이크로어레이 슬라이드의 표면에서의 통합된 역전사, 비대칭 PCR, 가열변성 및 혼성화에 의한 RNA 검출 신호 및 민감도의 극적인 증가를 증명하는 그래프이다(①: 슬라이드 표면에서 역전사, 비대칭 PCR, 가열변성, 혼성화를 통합한 프로세스; ②: 3xSSC 중에서 고정화된 프로브와 역전사/비대칭 PCR 생성물의 혼성화; ③: 3xSSC 중에서 고정화된 프로브와 역전사/대칭 PCR 생성물의 혼성화).
- [49] 도 13은 대칭 PCR에서 프라이머 농도를 증가시킨 경우 신호의 큰 증가를 보여주는 그래프이다.
- [50] 도 14는 마이크로어레이 슬라이드 상의 통합된 역전사, 비대칭 PCR 및 혼성화에 가열된 만성 골수성 백혈병 세포 추출물(chronic myeloid leukemia cell-extract)의 직접적인 첨가에 의한 키메라(chimeric) BCR-ABL RNA의 검출을 보여주는 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [51] 정의
- [52] 본원에서 사용되는 대부분의 용어는 당업자가 인지할 수 있을 것이지만, 그럼에도 불구하고 다음의 정의는 본원의 이해를 돕기 위해 제시된다. 그러나, 명시적으로 정의되지 않은 경우, 용어는 당업자에 의해 당시에 받아들여지는 의미를 택함으로써 해석되어야 한다.
- [53] "비대칭 폴리머라제 연쇄 반응(asymmetric PCR)"은 증폭된 단일 사슬 DNA를 생성할 수 있는 PCR 방법으로서, 두 가지 프라이머 중 한가지를 과량으로 사용하여 과잉의 프라이머를 통해 단일 사슬 DNA를 증폭시킬 수 있는 방법을 말한다.
- [54] "가지상(branched) DNA"는 3개 이상의 단일 사슬 DNA가 서로 부분적으로 혼성화 되어 측쇄를 가진 응집된(aggregated) 형태의 DNA를 의미한다.
- [55] "혼성화(hybridization)"은 단일 사슬(single strand) DNA의 두 사슬 사이의 이중나선(duplex)의 형성 또는 염기 상보성에 의한 DNA 사슬과 RNA 사슬 사이의 이중나선의 형성을 의미한다.

- [56] "DNA 변성(denaturation)"은, 상보적인 DNA 사슬이 혼성화를 통하여 두 가닥의 이중나선을 가진 DNA를 형성하기 위해서는 단일 사슬의 DNA를 형성할 필요가 있는데 통상적으로 90°C 이상의 온도에서 두 가닥의 DNA 사슬이 분리가 된다. pH 13-14에서도 두 가닥의 DNA 사슬이 분리된다. 본 특허에서 명시한 94°C 혹은 95°C 에서는 기본적으로 같은 결과, 즉 두 가닥의 DNA가 단일 가닥으로 분리가 된다.
- [57] "고체 지지체(solid support)"는 본원에서 사용되는 경우 표적 핵산을 검출하기 위한 캡처 프로브가 부착될 수 있는 기재(substrate)를 의미한다. 바람직하게는 다수의 캡처 프로브의 어레이를 결합시킬 수 있는 유리 슬라이드, 금속, 플라스틱 같은 평면의 기판일 수 있으나, 유리, 플라스틱, 혹은 고분자 비드(bead) 등의 구형의 기재도 가능하며, 유리나 플라스틱 용기, 즉 튜브(tube)와 같은 다양한 재질의 기재가 사용될 수 있다.
- [58] "증폭"은 특정 핵산의 카피 수를 증대시키는 것을 의미한다.
- [59] "검출하다"라는 용어 또는 그 변형은 정량적 및 정성적 검출 방법 두 가지 모두를 포함하는 의미이다.
- [60] "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이며, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [61] 이하, 본원에 따른 핵산 검출 방법을 실시하기 위한 구체적인 내용을 도면을 참조하여 설명한다.
- [62] 본원은 액체 내, 혹은 고체 표면에서 통합된 DNA 사슬의 비대칭 증폭, 가열변성(heat denaturation)과 혼성화에 의해 고정화된 캡처 핵산 프로브와 증폭된 표적 DNA 사이에 가지상(branched) DNA의 형성을 촉진하는 방법을 포함한다. DNA 칩 기술의 사용을 통해, 기초 연구뿐만 아니라 분자 진단에서의 표적 핵산 분자의 검출에 있어서, 높은 신호를 가지는 표적 핵산 분자 1개 수준의 검출 민감도(따라서 높은 수준의 신뢰도)의 극적인 증가를 가져올 수 있다. 상기 기술은 용액 내에서도 고체 지지체 표면에서의 역전사, 비대칭 증폭 및 혼성화의 통합에 의하여 높은 민감도와 신호를 가지는 RNA 분자의 검출에도 또한 적용될 수 있다.
- [63] 도 1에 도시된 바 같이, DNA 칩에 의한 DNA의 진단 도중에, 표적 DNA를 포함하는 작은 부분(small section)의 DNA가 증폭된다(또한 증폭 중에 표지화될 수 있음).
- [64] 도 2는 혼성화 과정을 나타낸 것으로, (a)는 혼성화 과정 중에 1차적으로 29 nt 캡처 프로브와 R 프라이머에 의해 생성된 리버스 사슬과 결합된 구조를 표시하며, 리버스 사슬에 포워드사슬이 결합할 수 있는 두 개의 부위가 노출되어 있다. (b)는 (a)에서 형성된 결합체에 두 개의 F 프라이머에 의해 생성된

포워드사슬이 2개 결합되고 이로 인해 2개의 리버스 사슬이 결합할 수 있는 부위가 노출된다. (c)는 (b)에서 형성된 결합체에 2개의 리버스 사슬이 결합되어 2개의 포워드사슬이 결합할 수 있는 부위가 노출된다. 이러한 과정이 계속되면 1개의 올리고뉴클레오티드 프로브에 여러 개의 PCR 사슬이 결합된 아주 거대한 복합체 즉 가지상 DNA가 형성된다. 표지가 된 PCR 산물을 사용할 경우 시그널이 대폭 증가될 수 있다. PCR 프라이머끝에 연결된 ●과 ○은 표지분자를 의미한다. 도 2에 도시된 바 같이, 상기 증폭된 DNA는 증폭된 DNA의 작은 부분에 대응되는 짧은 캡처 핵산 프로브와 혼성화된다. 이론적으로, 증폭된 DNA의 상보적인 사슬(도 1에서의 리버스 프라이머 (R)에 의해 연장된 사슬)이 캡처 프로브와 이중나선 구조를 형성한 후, 결합된 증폭된 DNA 사슬의 상당 부분이 다른 증폭된 사슬(도 1에서의 포워드 프라이머 (F)에 의해 연장된 사슬)과 이중나선 구조를 형성하기 위해 열려있게 된다 [도 2 (a)]. 리버스 사슬에 포워드 사슬이 결합한 후에 [도 2 (b)], 포워드 사슬에 열린 2개의 영역은 2개의 리버스 사슬의 결합에 이용될 수 있고, 그에 따라 가지상 DNA(또는 응집된 DNA) 구조를 형성한다(도 2 (c)의 제안된 모델 참조). 이론적으로, 이러한 형태의 결합은 수회 반복될 것이다. 각 PCR 사슬이 표지화된 경우, 이는 검출 신호 및 민감도에 큰 증가를 가져올 수 있다.

[65]

[66] 캡처 프로브와 비대칭 PCR 생성물 사이의 큰 가지상 DNA 복합체의 형성

[67] 증폭된 DNA 및 캡처 프로브 사이의 가지상 DNA의 조립을 증명하기 위하여, 두 가지 프라이머 세트를 사용하였다. HPV16 DNA 중 L1 유전자와 완전히 상보적인 프라이머 세트 A와 40여개의 HPV 바이러스 종(genotyping)의 L1 부위를 증폭할 수 있도록 프라이머 세트 A에 몇 개의 서열 변화를 도입한 프라이머 세트 B를 사용하였다. 이 이유는 HPV 감염 여부 및 HPV type을 진단을 위해서도 가지상 DNA 복합체 기술을 활용할 수 있는 근거를 제시하기 위함이다. 이들 프라이머 서열들은 하기 실시예 1에 기재하였다. 도 3의 (a)에 나타낸 바와 같이, 프라이머 세트 A를 이용한 비대칭 PCR 생성물을 95°C에서 변성시키고 캡처 프로브와 혼성화한 후 전기영동을 하면, 320 bp PCR 생성물보다 8배나 커 보이는 2500 bp DNA 밴드를 볼 수 있다. 전기영동상 DNA의 이동성은 DNA 3차원적 구조에 민감하므로 정확한 크기는 짐작하기 어려우나 2500 bp 위치에 있는 DNA는 캡처프로브와 비대칭 PCR 산물간에 형성된 DNA 복합체임에는 틀림이 없다. 대칭 PCR 산물의 경우 2500 bp 위치에 있는 DNA 양은 아주 미미하다 (도3의 (a), 라인 2). 지노타이핑용 프라이머 세트를 사용했을 때에도 2500 bp 위치에 있는 DNA 복합체가 조립된다 (도 3의 (b)). 포워드 사슬과 리버스 사슬을 각각 Cy5로 표지한 경우 2500 bp 위치의 DNA는 캡처 프로브와 포워드 사슬과 리버스 사슬을 다 포함하고 있으며 (도 4 라인 3과 4) 이 구조는 정상적인 두 사슬의 DNA가 아니고 도 2에서 보여주듯이 단일 사슬의 DNA 부위와 gap을 포함하고 있어서 S1 뉴클레아제로 처리할 경우 분해가 된다 (도 4, 라인 5와 6).

또한 비대칭 PCR을 수행할 경우 600 bp 위치에 있는 DNA가 생성되는데 (도 3과 4), 이는 Cy5 리버스 프라이머에 의해서만 표지되고, S1 뉴클레아제(nuclease)에 의해 분해된 것으로 보아 비대칭 PCR에 의해 생성된 단일 사슬 DNA인 것으로 보인다. 단일사슬 DNA는 전기영동상 두 사슬 DNA와 다른 이동성을 가지는 것은 잘 알려진 사실이다.

[68] 가지상 DNA 복합체 내의 캡처프로브당 포워드 사슬 및 리버스사슬 숫자

[69] 비대칭 PCR을 이용한 통합과정 (프로브가 존재하는 상태에서 PCR, 가열변성, 혼성화 진행)을 수행하되 PCR 프라이머 2개와 캡처 프로브 중 한 개만 Cy5로 표지되도록 하여 얻은 산물을 전기영동하고, 2500 bp 위치에 있는 가지상 DNA의 Cy5 강도를 측정하여 비교하였다 (도 5의 (b) 참조). 이렇게 얻은 결과를 보면 캡처 프로브당 리버스사슬 3개와 포워드사슬 2개가 결합되어 있는 것으로 보인다. 즉, 도 2 (c)의 구조와 유사해 보인다. 따라서 각 사슬이 표지가 된 경우 캡처 프로브당 5개의 시그널을 얻을 수 있다는 결론을 얻을 수 있다.

[70] 가지상 DNA 복합체 조립을 촉진 시키는 조건

[71] 가지상 DNA 복합체는 비대칭 PCR 과정 중에 캡처 프로브를 포함해도 자기조립이 되는데 비대칭 PCR 후에 열처리에 의한 변성 과정을 거친 후 혼성화를 할 경우 가지상 DNA 조립이 약 5배 촉진된다 (도 6의 (a), 레인 3). 혼성화 과정 중에 EDTA를 첨가하여 DNA 생성을 억제할 경우 가지상 DNA 조립이 현저히 줄어든다 (도 6의 (b)). 이 결과들은 혼성화 과정 중에 PCR 반응 혼합물 내에 존재하는 PCR 프라이머, dNTP, DNA 폴리머라아제에 의한 DNA 생성과정에 의하여 가지상 DNA 조립이 촉진된다는 것을 의미한다. 비대칭 PCR 후 열처리를 통한 변성 과정을 거치지 않으면 혼성화 과정 중에 자기조립이 촉진되지 않는다 (도 6의 (a), 레인 2). 따라서 가지상 DNA 복합체 조립의 촉진을 위해서는 PCR 후 열처리를 통한 변성이 꼭 필요하다. 이는 두 가닥의 PCR 산물이 열처리에 의하여 단일사슬이 형성되고 PCR 프라이머가 결합되어야 혼성화 과정 중에 새로운 DNA가 생성이 될 수 있음을 의미하기도 한다.

[72] 고체표면에서 가지상 DNA 복합체 조립의 증거

[73] 가지상 DNA의 조립에 대한 추가적인 증거가, 단일사슬 DNA, 비대칭 PCR 생성물 및 대칭 PCR 생성물과, 유리 슬라이드 상에 고정화된 캡처 핵산 프로브의 혼성화에 의하여 얻어진 신호의 비교에 의하여 얻어졌다. 도 7에 나타낸 바와 같이, 단일사슬 DNA 양의 포화에 의하여 얻어진 신호는 약 10,000 유닛(unit)이었고, 이는 고정화된 캡처 프로브 및 상보적인 단일사슬 DNA(약 20 pmol/30 μ l) 사이에 형성된 100% 이중나선에 의해 얻어지는 최대 신호를 의미한다. 더 많은 양의 이중나선 DNA가 첨가되었을 때(예컨대, 150 pmol) 얻어지는 검출 가능한 신호는 없었다. 반면, 비대칭 PCR 생성물은 단일사슬 DNA에 의하여 얻어진 신호보다 수배 더 큰 신호를 생성하였다. 이는 1개 분자 이상의 비대칭 PCR 생성물이, 도 2에 나타낸 가지 형태의 DNA의 형성에 의하여, 각각의 고정화된 캡처 프로브에 결합될 것이라는 점을 강하게 제안한다. 이

실험에서는 비대칭 PCR 경우 신호가 너무 높게 나와, 실험결과들을 적절한 한도 내에서 비교할 수 있도록 형광으로 표지된 프라이머를 비형광 프라이머로 10배 희석하였다.

[74] 슬라이드 상의 혼성화 도중 1회(one round)의 DNA 복제의 중요성

[75] 표지화된 비대칭 PCR 생성물을 정제하고, 슬라이드 상에 고정된 캡처 프로브와 혼성화시켰을 때, 완전한 비대칭 PCR 반응 혼합물의 존재 하에서 신호가 수배 증가하였다(도 8의 오른쪽 2번째 막대). 증가의 정도는 고정화된 캡처 프로브의 표면에서의 통합된 비대칭 PCR, 가열 변성 및 혼성화에 의하여 얻어진 신호와 매우 유사하다(도 8의 가장 오른쪽 막대). 이는 혼성화 단계(통상적으로 50 내지 60°C) 동안의 1회(one round)의 DNA 복제가 신호의 증가에 중요하다는 것을 제시한다. 이를 증명하는 또 한 가지의 예는 다음과 같다. 혼성화 과정 중에 증가하는 시그널은 혼성화 과정 중에 첨가한 표지된 PCR 프라이머에 의한다는 것이다 (도 8의 왼쪽부터 3번째와 5번째 막대 비교). 상기 결과는, 신호의 극적인 증가가 튜브에서의 비대칭 PCR를 수행하고, 전체 함유물을 마이크로어레이 슬라이드 상의 챔버로 전달하고 열처리 후 혼성화를 수행하는 것에 의하여, 또는 DNA 마이크로어레이의 표면에서의 통합된 비대칭 PCR 및 혼성화에 의하여 얻어질 수 있다는 것도 증명한다.

[76] 마이크로어레이 슬라이드 상의 통합된 비대칭 PCR 및 혼성화의 높은 민감도

[77] 전술한 바와 같이, DNA 마이크로어레이에 의한 표적 DNA의 검출 민감도는 실시간 PCR 보다 수 차수 배(several orders of magnitude)로 더 낮다고 알려져 있다. 마이크로어레이 슬라이드 상의 통합된 비대칭 PCR 및 혼성화의 민감도를 측정하기 위하여, 계단 희석된 HPV16 DNA를 비대칭 PCR 혼합물에 첨가하고, 통합된 PCR, 가열변성 및 혼성화를 고정화된 HPV16 캡처 프로브의 표면에서 수행하였다. 도 9에 나타낸 바와 같이, 1개 분자의 HPV16 DNA가 높은 신호로 검출되었고, HPV16 DNA의 1 내지 10000개 분자 사이에 선형적인 비례 관계가 있었다. 도 9에서 보여준 바와 같이 다양한 방식으로 제조된 표지된 DNA와의 적절한 비교를 위하여, 표지된 PCR 프라이머를 5배의 비표지 프라이머로 희석하였다. 실제로, 얻어진 신호는 레이저 스캐너에 의한 검출 상한을 초과하였다. DNA 마이크로어레이에 의한 높은 신뢰도(높은 신호)로 표적 DNA 1개 분자의 검출은 전례가 없는 것이고, 이러한 민감도는 최신의 정량(quantitative) PCR의 성능에 상응하거나 오히려 더 좋은 것이다.

[78] 통합된 비대칭 PCR 및 혼성화에 의하여 얻어진 신호는 시판 중인 DNA 칩 진단 키트에 의해 추천되는 통상적인 프로토콜보다 적어도 25 내지 30배 더 높다(도 10). 통상적인 프로세스는 마이크로어레이 슬라이드 상에서 정제된 PCR 생성물을 buffer용액 (예를 들어, 3xSSC 혹은 6xSSC) 상에서의 혼성화를 추천한다. 통합된 DNA 마이크로어레이의 표면에서의 비대칭 PCR, 가열변성 및 혼성화에 의하여 얻어진 신호(칼럼 4)는 통상의 프로세스, 즉 정제된 대칭 PCR 생성물(칼럼 1)에 의하여 얻어진 신호에 비해 30배 더 크고, 통합된 대칭 PCR 및

혼성화에 의하여 얻어진 신호(칼럼 2) 또는 정제된 비대칭 PCR 생성물의 혼성화에 의한 신호(칼럼 3)에 비하여 5배 더 크다.

- [79] 통합된 프로세스의 높은 민감도는 감염원, 예컨대 바이러스 및 미생물의 검출 및 동정뿐만 아니라, 신체 내의 감염원의 존재의 결정 등의 많은 활용가능성을 가진다. 또한, 통합된 프로세스는 많은 보통의 세포 중에서 암세포의 검출을 위해 사용될 수 있다.

[80] 통합된 프로세스에 의한 높은 민감도의 RNA의 검출

- [81] RNA 계층을 함유하는 바이러스를 포함하는 많은 감염원 및 진단은 RNA의 검출과 연관된다. 때때로 감염성 바이러스의 존재 결정은 RNA 시료의 정제와 농축 후 정량 PCR에 의해 측정된다. 본원에서는 RNA로부터 혼성화까지의 통합된 프로세스가 마이크로어레이 표면 상에서 수행될 수 있다는 것을 발견하였다. 통합된 프로세스 중에 비대칭 PCR을 포함시킴으로써 검출 신호 및 민감도를 크게 증가시킬 수 있다. 도 12에 나타낸 바와 같이, DNA 마이크로어레이 표면 상에서의 통합된 역전사, 비대칭 PCR 및 혼성화는 1 내지 10개 분자의 RNA를 용이하게 검출할 수 있다(도 12의 ①). 도 12에서 첨가한 연구대상 RNA가 만개인 경우를 비교하였을 때 비대칭 PCR 및 혼성화에 의해 얻어진 시그널이 비대칭 PCR만 수행했을 때 보다(도 12의 ②) 5배 더 높다.

- [82] 또한, 도 13의 라인 ㉔ 및 ㉕에 나타낸 바와 같이, 포워드 및 리버스 프라이머를 양쪽 모두 10배 증가시킨 통합된 대칭 PCR 및 혼성화에 의해서도 신호의 큰 증가가 얻어질 수 있다. 그러나, 민감도의 증가 정도는 비대칭 PCR에 의하여 얻어지는 수준에 미치지 못한다(도 13의 라인 ㉖와 ㉔ 비교).

[83] 통합된 프로세스와 단순 핵산 추출 과정의 결합

- [84] 통상적인 방법은 연구 혹은 진단대상 검체로부터 핵산을 분리 정제하고, 정제된 핵산을 대상 유전자 증폭 및 혼성화에 이용한다. 그러나 검체와 진단 목적에 따라 검체(특히, 혈액, 혈청, 세포 등)를 간단히 처리한 후 진단대상 유전자를 증폭할 수 있다. 따라서 이러한 과정은 유전자 진단을 자동화하는데 유익하게 활용될 수 있다.

- [85] 도 14에서 보여주듯이 만성 골수성 백혈병 세포를 열처리를 할 경우, 이때 방출되는 핵산을 통합과정 즉 직접 역전사, PCR 및 혼성화 과정과 연계하여 사용할 수 있다. 시그널과 민감도가 정제된 RNA와 비슷한 양상을 보인다. 따라서 이러한 과정은 유전자 진단을 간소화하며 또한 자동화에 유용하게 활용될 수 있다.

[86] 비대칭 PCR 산물에 의한 가지상 DNA 조립에 관한 의견

- [87] 대칭 PCR 산물은 비대칭 PCR 산물이나 단일사슬에 비해 캡처 프로브에 결합하는 속도나 효율성이 아주 낮다. 이는 대칭 PCR 산물이 변성 후 복원(renaturation)(두 사슬이 이중 나선으로 되돌아가는 과정)이 캡처 프로브와 결합하는 속도나 효율성보다 더 높기 때문이라 본다. 특히 고체표면에 고정된 캡처 프로브와 혼성화하는 속도는 더 낮다. 반면 단일 사슬 DNA는 캡처

프로브와 충돌하는 확률이 더 높기 때문에 혼성화 속도나 효율이 높다. 이는 실험적으로 증명된 사실이다. 비대칭 PCR 경우 단일 사슬 DNA가 추가로 생성되므로 이 단일 사슬이 캡처 프로브와 결합할 수 있는 속도나 효율이 대칭 PCR 산물보다 높다. 이에 관한 보고는 이미 있다. 도 2 (a)에서 보듯이 가지상 DNA가 형성되기 위해서는 일단 캡처 프로브와 상보성이 있는 단일 사슬이 우선 결합을 해야 한다. 이러한 점에서 비대칭 PCR 산물이 대칭 PCR 산물보다 가지상 DNA 형성에 있어서 더 유리하다. 그리고 가지상 DNA 조립이 PCR 반응 혼합물 내에서 혼성화 과정 중에 촉진되는 이유는 one round DNA 생성에 의한 것이라는 외에는 더 자세한 메카니즘이 아직 밝혀지지 않은 상태이다.

발명의 실시를 위한 형태

[88] [실시예 1]

[89] **HPV DNA의 검출을 위한 PCR 및 혼성화 조건**

[90] HPV 16 DNA의 검출을 위해 사용된 캡처 프로브 및 PCR 프라이머를 도 1에 나타내었고, 그 구체적 서열은 아래와 같다.

[91] PCR 프라이머 세트 A:

[92] HPV16 L1 부위와 모든 서열이 상보적인 프라이머

[93] 포워드 프라이머 (F): 5'-GATGGTAGTATGGTTCATACTGGCTTTGG-3'

(서열번호 1)

[94] 리버스 프라이머 (R): 5'-GCATCAGAGGTAACCATAGAACCACTAGG-3'

(서열번호 2)

[95] PCR 프라이머 세트 B:

[96] 40여종의 HPV의 지노타이핑을 위하여 사용되는 공통적인 프라이머들은 약간의 서열 차이를 가진 모든 종의 HPV L1 부위를 인식하도록 제조되었다.

[97] 포워드 프라이머 (GP4F): 5'-GATGGTGATATGGTAGATACAGGATTTGG-3'

(서열번호 3)

[98] 리버스 프라이머 (GP4R): 5'-GCGTCAGAGGTTACCATAGAGCCACTAGG-3'

(서열번호 4)

[99] 캡처 프로브:

[100] HPV16 캡처 프로브: 5'-CTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTT-3'

(서열번호 5)

[101] HPV18 캡처 프로브: 5'-CACAGGTATGCCTGCTTCACCTG-3' (서열번호 6)

[102] PCR 프라이머는 Cy3 또는 Cy5 중의 하나를 연결하여 5' 말단을 표지화시켰다. 캡처 프로브는 통상적으로 5' 말단에 말단 아민기를 가지고, 그 사이에 카분 링커를 가진다.

[103] 프라이머 및 캡처 프로브는 (GenBank accession number K02718 및

한국공개특허 제10-2006-0019042호에 기재된 바와 같이) HPV의 L1

영역으로부터 유래된 것이며, 본문에서 사용한 캡처 프로브들의 특이성은 이미

증명된 바 있다 (한국공개특허 제10-2006-0019042호; Kim KT, Na CH, Yun YM, Hwang TS, Kim SN, Chae CB Analytical Biochemistry 2010 396:139-145).

[104] 대칭 PCR 반응 혼합물의 제조:

[105] PCR 반응 혼합물(30 μ l)은 다음을 함유한다: 30 mM Tris-HCl (pH 9.3), 30 mM KCl, 30 mM NH₄Cl, 2 mM MgCl₂, 0.4 mM 각각의 dNTP, Taq DNA 중합효소, 5 pmol의 Cy3 표지된 포워드 프라이머, 5 pmol의 Cy3 표지된 리버스 프라이머, DNA 주형.

[106] 비대칭 PCR 반응 혼합물의 제조:

[107] 다음을 제외하고 상기 대칭 PCR 반응 혼합물과 동일하다: 5 pmol의 Cy3 표지된 포워드 프라이머 및 50 pmol의 Cy3 표지된 리버스 프라이머.

[108] PCR 사이클:

[109] PCR은 다음과 같이 수행하였다: 94°C에서 5 분 동안 가열한 후; 94°C 1분, 50°C 1분, 72°C 1분의 30회 사이클, 그리고 마지막으로 72°C 5분.

[110] PCR 생성물의 정제:

[111] Qiagen이 제공한 프로토콜에 따라, PCR 생성물을 글라스 멤브레인에 결합시켜 유리(free) 프라이머로부터 정제하였다.

[112] PCR 생성물의 2개 사슬의 분리:

[113] PCR 생성물의 2개 사슬의 분리를 위하여, 프라이머 중의 하나는 5' 말단을 비오틴으로 표지화하고, 나머지 프라이머는 Cy3로 5' 말단을 표지화하였다. PCR 후에, PCR 생성물을 전술한 방법으로 정제하였다. 정제된 생성물을 자성 비드에 결합된 스트렙타비딘에 결합시키고, 95°C로 가열하여 Cy3 표지화된 사슬을 방출시켰다(Release). 방출된 사슬을 회수하고 정량하였다.

[114] [실시예 2]

[115] 비대칭 PCR 생성물 및 캡처 프로브 사이에서 가지상 DNA 복합체 (응집된 DNA)의 형성

[116] 캡처프로브와 PCR 생성물을 혼성화할 경우 PCR 생성물보다 더 큰 DNA 복합체가 형성이 되는 것을 증명하기 위하여 HPV16 플라스미드를 대칭 및 비대칭 PCR을 통하여 증폭하고, 5분간 95°C에서 열처리하고, HPV16 캡처 프로브와 50°C에서 한 시간 혼성화를 수행하였다. 그리고 DNA를 폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 분석하고 결과를 도 3에 나타냈다.

[117] 도 3은 캡처 프로브와 비대칭 PCR 생성물 사이의 응집물 (또는 가지상 DNA)의 조립을 증명하는 전기영동 결과 이미지이다. (a). 대칭 (Symmetric) PCR과 비대칭 (asymmetric) PCR을 HPV16 L1 부위와 완전히 상보적인 서열을 가진 프라이머 세트 A로 수행한 후, 반응혼합물에 29nt HPV16 캡처 프로브를 첨가하고, 95°C에서 DNA를 변성시키고, 50°C에서 혼성화를 진행하였다. 이 모든 과정은 같은 PCR 반응 혼합물 내에서 진행되었다. DNA를 폴리아크릴아미드 전기영동으로 분리한 후 EtBr(ethidium bromide)로 염색한 결과를 보여 준다. 대칭 PCR 경우 F 프라이머와 R 프라이머가 1:1로 존재하고, 비대칭 PCR 경우

본원에서는 R 프라이머와 F 프라이머가 10:1로 존재하였다. 레인 1: 대칭 PCR + 혼성화; 레인 2: 대칭 PCR + 캡처프로브 + 혼성화; 레인 3: 비대칭 PCR + 혼성화; 레인 4: 비대칭 PCR + 캡처프로브+ 혼성화. 레인 3, 4에서 600 bp 위치에 있는 DNA는 비대칭 PCR에 의해서 생성된 단일사슬 (single-strand) DNA (320 nucleotide)이고, 전기영동상 두사슬 (double-strand) PCR 산물 (320 bp)보다 이동성(mobility)이 느리다. 레인 4에서 2500 bp 위치에 있는 DNA는 가지상 DNA 복합체였다. 가지상 DNA도 두사슬 DNA보다 이동성이 느리다. (b).

지노타이핑용 프라이머 세트 B로 실험한 결과이다. 레인 설명은 도 3의 A와 같다. 지노타이핑용 프라이머로 대칭 PCR을 수행한 경우 비 특이적인 DNA가 생성되거나 캡처 프로브 존재 하에 가지상 DNA가 조립되지 않았다.

- [118] 도 3의 A에서 볼 수 있듯이 PCR 프라이머 세트 A를 이용한 비대칭 PCR 생성물은 캡처 프로브와 PCR 생성물 (320 bp)보다 더 큰 2500 bp 위치에 있는 DNA 복합체를 형성하였다. 반면 대칭 PCR 산물의 경우 캡처 프로브 존재 하에 2500 bp 위치에 있는 DNA 복합체가 아주 미미한 양이 형성되었다. 지노타이핑을 위한 프라이머 세트 B를 이용하여 증폭된 DNA 경우에도 (도 3의 (a)) 비대칭 PCR 산물이 캡처프로브 존재하에 2500bp 위치에 있는 DNA 복합체를 형성하였고 대칭 PCR 산물은 캡처 프로브와 복합체를 조립하지 못하였다. DNA는 전기영동상 이동성이 3차구조에 민감하므로 정확한 크기나 구조는 알 수 없었다. 대칭 PCR을 지노타이핑용 PCR 프라이머를 사용할 경우 비 특이적인 산물 (600 bp 위치)이 보였다. 그러나 이들은 도 3의 (b)에서 보듯이 DNA 복합체 생성에 관여하지 않는다.

[119] [실시예 3]

- [120] 복합체의 구조에 관한 정보를 얻기 위하여, 비대칭 PCR을 지노타이핑 용 프라이머 Cy5-GP4F 혹은 Cy5-GP4R 프라이머 존재하에 진행하고, 95°C에서 변성시키고, 캡처 프로브와 혼성화를 하고 DNA를 정제하였다. 정제한 DNA를 단일 가닥에 특이한 S1 뉴클레아제로 처리하고 전기영동을 한 후 Cy5 이미지를 LAS4000 이미지 분석기로 스캔하고 그 결과를 도 4에 나타냈다.

- [121] 도 4는 가지상 DNA 복합체가 정상적인 두사슬 DNA가 아니고 단일사슬 부위와 gap을 포함하고 있음을 예시한다. 지노타이핑용 프라이머 세트 B를 이용한 비대칭 PCR로서, Cy5로 표지된 포워드 프라이머 혹은 Cy5로 표지된 리버스 프라이머 존재하에 PCR을 진행한 후, 캡처프로브를 첨가하고, 95°C에서 변성시키고 50°C에서 혼성화를 하였다. DNA를 정제한 후 단일사슬 특이 (specific) S1 뉴클레아제로 처리하고 DNA를 전기영동으로 분석하였다. (a): EtBr로 염색한 이미지; (b): Cy5 이미지. 비대칭 PCR + 혼성화: 레인 1: Cy5-GP4F 프라이머, 레인 2: Cy5-GP4R 프라이머 비대칭 PCR + 캡처프로브+ 혼성화: 레인 3: Cy5-GP4F 프라이머, 레인 4: Cy5-GP4R 프라이머. 레인 3, 4 DNA를 S1 뉴클레아제로 처리한 경우: 레인 5: Cy5-GP4F 프라이머, 레인 6: Cy5-GP4R 프라이머.

- [122] 2500 bp 위치에 있는 가지상 DNA는 캡쳐프로브, 포워드사슬, 그리고 리버스사슬을 포함하고 있음을 알 수 있었고, S1 뉴클레아제에 의해 분해가 되는 것으로 보아 (도 4) 도 2에서 보여준 구조와 같이 단일 사슬 부위와 gap을 가지고 있을 가능성이 높다. 비대칭 PCR 경우 600bp 위치에 Cy5-GP4R 프라이머로 생성된 리버스 가닥이 생성되나 Cy5-GP4F 프라이머를 사용할 경우 같은 위치에 DNA가 없다 (도 4의 (b)). 따라서 600 bp 위치에 있는 DNA는 비대칭 PCR에 의해서 생성된 리버스 단일사슬 DNA이다. 이 DNA는 S1 뉴클레아제에 의해 분해가 된다 (도 4). 단일사슬 DNA도 이중나선 DNA와 전기 영동상 이동성이 다른 것은 잘 알려진 사실이다.
- [123] [실시예 4]
- [124] 가지상 DNA 복합체내의 캡쳐프로브당 리버스사슬 및 포워드사슬의 숫자
- [125] 캡쳐 프로브를 포함하는 통합과정 (비대칭 PCR, 변성, 혼성화)를 진행하되 2개의 지노타이핑용 PCR 프라이머와 캡쳐프로브 중 한 개를 Cy5로 표지하였다. 전기영동 후 Cy5 이미지를 LAS4000 image analyzer를 이용하여 분석하고 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [126] 도 5는 가지상 DNA 내에 존재하는 캡쳐프로브 당 결합된 포워드와 리버스 사슬의 숫자를 결정하는 실험결과를 보여 준다. 지노타이핑용 용 프라이머와 HPV16 캡쳐 프로브가 있는 상태에서 비대칭 PCR을 수행하고, 95°C에서 변성시키고, 50°C에서 혼성화를 진행하였다. 이 과정은 2개의 프라이머와 캡쳐 프로브 중 한 개는 Cy5로 표지된 것을 사용하였고, 전기영동 후 LAS4000 imager로 스캔하고 2500 bp 위치의 가지상 DNA의 강도(intensity)를 비교하였다. (a): EtBr로 염색한 이미지; (b): Cy5 이미지. 캡쳐 프로브 없이 통합과정을 진행한 경우: 레인 1: Cy5-GP4R, 레인 2: Cy5-GP4F. 캡쳐프로브 포함한 통합과정: 레인 3: Cy5-캡쳐 프로브, 레인 4: Cy5-GP4R, 레인 5: Cy5-GP4F.
- [127] 2500 bp 위치에 있는 가지상 DNA 복합체내에 있는 3개의 DNA, 즉, 캡쳐 프로브, 리버스 사슬, 포워드 사슬의 시그널 강도를 비교하였다. 그 결과 프로브당 3개의 리버스 사슬과 2개의 포워드 사슬이 포함되어 있음을 알 수 있었다.
- [128] [실시예 5]
- [129] 단일사슬 DNA, 대칭 PCR 생성물 및 비대칭 PCR 생성물의 혼성화 패턴
- [130] 지노타이핑용 프라이머를 이용하여 다양한 양의 ssDNA, 대칭 PCR 생성물 및 비대칭 PCR 생성물을 30 μ l 6xSSC에 용해시키고, 94°C로 5분 동안 가열한 후, 재빨리 빙수(ice-water)에 냉각시켰다. 가열된 혼합물을 HPV16 캡쳐 프로브가 고정된 마이크로어레이의 상부에 결합된 챔버에 첨가하고, 50°C에서 1시간 동안 인큐베이션(혼성화)시켰다. 인큐베이션 후, 챔버를 열고(pilled off), 유리 슬라이드를 다음 용액에 각각 5분 동안 담갔다: 1xSSC-0.1% SDS, 0.1xSSC-0.1% SDS 및 1x SSC. 마지막으로 슬라이드를 탈이온수로 행균 후 건조시켰다.
- [131] 건조된 유리 슬라이드를 레이저 스캐너(Scan Array Express, Perkin Elmer, Co)로

- 스캔하고, 그 형광 이미지를 스캔하여, 형광 스팟(spot)의 강도를 정량하였다.
- [132] 이 실험에서는, 다른 DNA 제조법에 의하여 얻어진 결과와의 적절한 비교를 위하여, 비표지화된 프라이머로 10 배 희석된 Cy3-표지화 프라이머의 존재 하에서 PCR을 수행하고 결과를 도 7에 나타냈다.
- [133] 도 7은 유리 슬라이드 상에 고정화된 HPV16 프로브와 혼성화에 기인한, PCR 생성물과 단일사슬 PCR 생성물의 양의 증가에 의해 얻어지는 신호를 나타낸 그래프이다. 단일사슬 DNA(ssDNA) (-▲-)는 Cy3 표지된 리버스 프라이머에 의해 연장된 것으로 PCR 생성물로부터 정제된 것이며, 그 신호는 고정화된 캡처 프로브를 포화시킨 ssDNA의 양(즉, 고정화된 프로브와 형성된 100% 이중나선 DNA에 상응하는 양)에 의하여 얻어진 것이다. 비대칭 PCR 생성물 (-●-)로 얻어진 신호는 ssDNA로 얻어진 포화 신호를 훨씬 초과한다. 다른 DNA로 얻어진 결과와 적절히 비교하기 위하여 Cy3-표지화 프라이머는 비표지화 프라이머로 10배 희석되었다. 대칭 PCR의 생성물 (-■-)은 본 실험조건에서 거의 시그날의 증가를 보이지 않는다.
- [134] 도 7에 나타낸 바와 같이, 고정화된 HPV16 올리고뉴클레오티드는 약 25 pmol에서 ssDNA로 포화되었고, 약 10,000 유닛의 신호가 얻어졌다. 이 수치는 HPV16 캡처 프로브와 ssDNA 사이에 형성된 100% 이중나선에 의하여 얻어진 신호에 상응하는 값이다. 대칭 PCR 생성물은 150 pmol에서도 유의미한 수준의 이중나선을 형성하지 않았다. 반면, 비대칭 PCR 생성물은 ssDNA의 포화량에 의해 얻어진 것보다 큰 배수로 더 높은 신호가 생성되었다. 이는 고정화된 HPV16 올리고뉴클레오티드 프로브 단일 분자에 한 개 분자 이상의 비대칭 PCR 생성물이 부착됨을 의미한다. 대칭 PCR 생성물에 의할 때 고정된 프로브와의 이중나선 형성이 미미한 이유는 대칭 PCR 생성물의 2개의 상보적인 사슬 사이의 이중나선의 압도적인 자기 조립과 고정화된 올리고뉴클레오티드와의 매우 미미한 상호작용에 기인할 것이다.
- [135] [실시예 6]
- [136] 용액 내에서 혼성화 과정 중의 DNA생성이 가지상 DNA조립을 촉진
- [137] HPV16 캡처 프로브 존재 하에 실시예 1에서와 같이 비대칭 PCR을 수행하고, 95°C에서 가열한 후 (denaturation), 50°C에서 1시간 혼성화를 진행할 때도 가지상 DNA가 조립되었다 (도 6의 (a)). 이에 비해 비대칭 PCR만 수행한 경우나, 비대칭 PCR 후 열을 가하지 않고 혼성화를 수행할 경우 가지상 DNA 조립이 미비하였다 (도 6의 (a)). 이 결과는 변성 후 혼성화 과정 중에 가지상 DNA 조립이 촉진된다는 것을 의미한다. 혼성화 과정 중에 DNA 생성에 필요한 모든 요소가 존재하므로 1회 DNA 합성(one-round DNA synthesis)이 중요하다는 것도 의미한다. 혼성화 과정 중에 EDTA를 첨가하면 DNA 합성이 정지되는데 이러한 경우 가지상 DNA 조립이 현저하게 감소하였다 (도 6의 (b)). 프라이머 세트 A나 B를 이용하여 비대칭 PCR을 수행하여도 같은 결과를 얻었다.
- [138] 도 6은 가지상 DNA가 형성되는 조건에 관한 실험 결과이다. (a). 캡처프로브

존재하에 비대칭 PCR을 진행하고 정지된 상태 (레인 1), 비대칭 PCR 후 변성 과정이 없이 혼성화를 진행한 경우 (레인 2), 비대칭 PCR 후, 95°C에서 변성시키고, 50°C에서 혼성화를 진행한 경우 (레인 3). (b). 비대칭 PCR을 진행하고, 변성, 그리고 혼성화를 하되 캡처 프로브를 첨가하지 않은 경우 (레인 1), 비대칭 PCR, 가열변성(heat denaturation) 후 캡처프로브를 첨가하고 혼성화를 한 경우 (레인 2), PCR, 가열변성 후 캡처프로브와 EDTA를 같이 첨가하고 혼성화를 한 경우 (레인 3). 모든 실험은 PCR 반응 혼합물 내에서 이루어진 것이다.

[139] [실시예 7]

[140] DNA 칩 표면에서 혼성화 과정 중 DNA 생성이 가지상 DNA조립을 촉진

[141] 비표지된 프라이머로 5배 희석한 것을 제외하고는, 실시예 1에서와 같은 표지된 프라이머를 이용하여, 10⁵ 카피의 HPV16 플라스미드로 비대칭 PCR(30 μ l)을 수행하였다(도 8). 대량으로 수득하기 위하여 비대칭 PCR을 다수의 튜브에서 수행하였다. PCR 후, 생성물을 글라스 멤브레인에 결합시켜 정제하였다. 정제된 PCR 생성물을 다음과 같은 다양한 버퍼에서 인큐베이션시켰다: 1x PCR 버퍼, 추가로 다음을 포함하는 1x PCR 버퍼(각각 및 조합으로, 도 8 참조): 4 dNTP, Taq 중합효소, 비표지 프라이머, 표지된 프라이머(비표지 프라이머로 5배 희석됨). 혼합물을 마이크로어레이(HPV16 및 HPV18 캡처 프로브가 고정됨)의 표면에 결합된 챔버로 전달하였다. 슬라이드를 95°C에서 5분간 열처리 후 50°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 세척 후, 슬라이드를 형광 이미지 및 정량을 위해 스캔하였다. 도 8에서 보여 주는 바와 같이 PCR에 필요한 모든 요소가 포함된 용액에서 혼성화를 진행할 경우 시그널이 대폭 증가한다. 이는 DNA 칩 위에서 비대칭 PCR, 가열변성, 혼성화를 같은 PCR 반응 혼합물 내에서 통합해서 진행할 때 얻은 시그널과 유사하다 (도 8). 이 결과는 또한 혼성화 과정 중에 DNA 생성과정이 가지상 DNA조립을 촉진한다는 것도 의미한다.

[142] 도 8은 비대칭 PCR과 이에 이어지는 혼성화가 DNA 마이크로어레이 슬라이드의 표면에서 수행되었을 때, 신호가 수배 증가함을 증명하는 그래프이다. 여기서, Cy3-표지화 비대칭 PCR 생성물을 정제한 후 다양한 조건하에서 혼성화시켰고, 그 결과를 DNA 마이크로어레이 슬라이드 표면에서의 동일한 PCR 반응 혼합물 중에서 수행된 통합된 비대칭 PCR 및 연속적인 혼성화(가장 오른쪽 칼럼)와 비교하였다. 결과는 혼성화 과정 중에 일어나는 DNA 복제가 (오른쪽에서 두번째 칼럼) 신호 상승효과에 중요함을 보여준다.

[143] [실시예 8]

[144] 통합된 비대칭 PCR 및 혼성화에 의한 검출의 민감도

[145] 계단희석된(serially diluted) HPV16 플라스미드를 고정된 HPV16 및 HPV18 캡처 프로브를 포함하는 슬라이드 상에서 PCR로 증폭시켰다. PCR의 마지막에,

슬라이드를 세척 및 스캔하거나, 또는 PCR 혼합물을 95°C로 가열하고 50°C에서 1시간 동안 인큐베이션하여 동일한 반응 혼합물에서 혼성화를 지속시켰다. 다양한 PCR 생성물로부터 얻어진 결과와 적절한 비교를 위하여, Cy3 표지된 PCR 프라이머를 5배 비표지 프라이머로 희석하였다.

[146] 도 9에 나타낸 바와 같이, 계단 희석된 HPV DNA를 비대칭 PCR로 증폭시켰을 때, 1개 분자의 HPV DNA를 높은 신호로 검출할 수 있었다. 또한, 신호와 슬라이드 상의 적용된 HPV DNA의 수(적용된 DNA의 1 내지 10,000 카피) 사이에 선형적인 관계가 있었다.

[147] 반대로, 다른 형태의 PCR의 신호 및 민감도는 슬라이드 상의 통합된 비대칭 PCR 및 혼성화에 비하여 훨씬 더 낮았다.

[148] [실시예 9]

[149] 다양한 과정에 의하여 얻어진 신호의 비교

[150] 이미 보고된 바와 같이, 슬라이드 상의 통합된 대칭 PCR 및 혼성화는 정제된 PCR 생성물을 슬라이드 상에서 혼성화하는 경우에 비해 5배의 신호 증가를 가져온다. 정제된 비대칭 PCR 생성물은 통상의 공정(즉, 슬라이드 상에서 정제된 대칭 PCR의 혼성화)에 비하여 약 5배 내지 6배의 신호 증가를 가져온다. 그러나, 비대칭 PCR 및 혼성화를 슬라이드 상에서 수행한 경우, 추가적인 5배의 신호 증가가 있었다(도 9의 막대 4 참조). 따라서 결과적으로 대칭 PCR 생성물을 정제한 후 혼성화 하는 통상적인 방법(도 9의 막대 1) 보다 약 30배의 높은 신호를 보인다. 이러한 신호(그에 따른 민감도)의 극적인 증가는 상당히 예측하기 어려운 발견이다.

[151] [실시예 10]

[152] RNA의 검출을 위한 통합된 역전사, 비대칭 PCR 및 혼성화에 의한 신호 및 민감도의 극적인 증가

[153] 만성 골수성 백혈병 세포주 K562(chronic myeloid leukemic cell line K562)를 배양액에서 성장시켜 RNA를 추출하였다. 키메라(chimeric) BCR-ABL (type B3-A2) RNA의 함량을 실시간 정량 PCR로 측정하였다. 단일단계(one-step) 역전사 및 PCR 반응 혼합물(총 30 μ l)을 다음과 같이 준비하였다: 4 dNTP, 버퍼, 역전사효소 및 DNA 중합효소를 함유하는 12 μ l 프리믹스(premixed) 반응 혼합물(Intron Co.); 표지된 리버스 (A2-R) 및 포워드 (B2-F) 프라이머 (비표지된 프라이머로 2배 희석됨); RNA.

[154] 비대칭 PCR을 위해 통상적으로 5 pmol의 Cy3-포워드 프라이머 및 50 pmol의 Cy5-리버스 프라이머를 첨가하였다. 대칭 PCR을 위해서, 각각 5 pmol의 표지된 포워드 및 리버스 프라이머를 첨가하였다.

[155] 서모사이클링은 다음과 같다: 45°C 30분, 95°C 5분, (94°C 15초, 55°C 15초, 72°C 15초)의 45회 사이클.

[156] CML 퓨전 전사물(transcripts)의 검출을 위하여 사용된 캡처 프로브 및 유전자 특이적(gene-specific) RT-PCR 프라이머를 도 11에 나타내었고, 그 서열은 다음과

같다:

- [157] 포워드 프라이머(B2-F): 5'-GGGAGCAGCAGAAGAAGTG-3' (서열번호 7)
- [158] 리버스 프라이머(A2-R): 5'-CCTAAGACCCGGAGCTTTTCACCTT-3' (서열번호 8)
- [159] ABL A2 캡처 프로브(A2-P): 5'-GTGAAGCCGCTCGTTGGA ACTCC-3' (서열번호 9)
- [160] 통합된 역전사, PCR 및 혼성화를 위해서, 조합된 반응 혼합물을 DNA 마이크로어레이의 상부면에 결합된 챔버로 전달하고, 그 슬라이드를 PCR 장치(Thermo, USA)의 히팅 블록 상에 위치시켰다. 전술한 바와 같이 서모사이클링을 수행하였다. PCR 사이클의 마지막에서, 상기 글라스를 95°C로 5분 동안 가열하고, 소정기간 동안 55°C에서 인큐베이션 (혼성화)하였다.
- [161] 도 12는 DNA 검출의 경우와 마찬가지로, 역전사, 비대칭 PCR 및 혼성화의 통합된 공정을 통해 통상의 공정에 비해 신호 및 민감도의 극적인 증가를 가져온다는 것을 보여준다(도 12, 라인 1 및 3의 비교). 1 내지 10개 분자의 RNA가 높은 신뢰도(높은 신호)로 검출될 수 있다. 이는 통상의 공정(즉, 튜브에서의 RT-PCR과 마이크로어레이 슬라이드 상의 혼성화; 도 12 라인3)에 비해서 민감도가 100배 내지 1000배 증가된 것이다.
- [162] 또한, DNA 검출의 경우와 마찬가지로, 역전사, 비대칭 PCR 및 혼성화의 통합은 슬라이드 상에서의 RT-PCR 단독 수행의 경우에 비하여 큰 증가를 보였다(도 13의 라인 a 및 b의 비교). 포워드 및 리버스 프라이머를 모두 더 높은 농도로 첨가하여 통합된 프로세스를 통한 대칭 PCR에서도, 아마도 가지상 DNA의 형성 촉진에 의해서 신호가 크게 증가하였다(도 13의 라인 c 및 d 참조). 그러나, 검출의 민감도는 비대칭 PCR을 포함하는 통합된 프로세스만큼 높지 않았다(도 13의 라인 a 및 c 비교).
- [163] [실시예 11]
- [164] 마이크로어레이 슬라이드 상의 통합된 역전사, 비대칭 PCR 및 혼성화 시스템에 가열된 세포 추출물의 직접 첨가에 의한 키메라 BCR-ABL RNA의 검출
- [165] 계단희석된 만성 골수성 백혈병 세포(K562)를 펠렛화(pelleted)하고, 50 μ l Chelex-resin (BioRad)에 현탁하였다. 95°C에서 5분간 가열 및 원심분리 후, 5 μ l의 상층액을 실시예 7에 기재된 반응 혼합물에 첨가하였다. 전체 혼합물을 마이크로어레이 슬라이드의 상부에 결합된 챔버로 전달하여, 실시예 7에 기재된 바와 같이 통합된 역전사, 비대칭 PCR 및 혼성화를 수행하였다. 세척된 슬라이드를 레이저 스캐너로 스캔하였다. 그 결과를 도 14에 나타내었다. 세포 추출물 및 정제된 RNA 양쪽 모두에서 키메라 BCR/ABL RNA의 유사한 검출 신호 및 민감도를 보여주었다. 이는 RNA를 세포로부터 분리 정제하지 않아도 세포를 간단한 열처리를 하면 정제된 RNA와 유사한 진단결과를 얻을 수 있다는 것을 증명한다.

- [166] 상기에서는 본원의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 하기의 특허 청구의 범위에 기재된 본원의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본원을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

산업상 이용가능성

- [167] 이상 설명한 바와 같이, 가지상 DNA 복합체의 형성 촉진을 통한 핵산 검출 방법에 관한 것으로, 동일 반응 혼합물에서의 PCR, 가열변성 및 혼성화의 통합 수행에 의하여, 단일 사슬 올리고뉴클레오티드 프로브와 복수의 증폭된 표적 DNA 사이에서의 가지상(branched) DNA의 자기 조립을 촉진시킴으로써, 표적 핵산의 검출 신호 및 민감도를 극적으로 증가시킬 수 있어 다양한 진단 및 검출에 활용될 수 있으며 진단방법의 자동화에도 기여함으로써 혁신적인 질병 진단 및 치료기술을 제시할 수 있다.

서열목록 Free Text

- [168] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

- [청구항 1] 검출하고자 하는 표적 핵산 분자의 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 포함하는 핵산 프로브의 존재 하에서 상기 표적 핵산 분자의 증폭, 가열변성과 혼성화를 동일한 반응 혼합물 (reaction mixture) 내에서 통합 수행하여, 상기 핵산 프로브에 복수의 증폭된 핵산 분자들이 혼성화되어 가지상(branched) 핵산 복합체의 형성을 촉진하는 단계; 및
상기 혼성화된 가지상 핵산 복합체를 검출하는 단계:
를 포함하는, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 증폭은 비대칭 폴리머라제 연쇄 반응(asymmetric PCR)으로 수행하는 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 가지상(branched) 핵산 복합체의 형성을 촉진하는 단계에서, 상기 가지상(branched) 핵산 복합체는 자기조립되는 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 가지상 핵산 복합체의 형성을 촉진하는 단계는,
써모사이클러(thermocycler)를 이용하여 온도, 온도 사이클 시간 및 온도 사이클 수를 조절함으로써 수행되는 것인, 시료 중의 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서,
상기 시료는 전혈, 혈청, 체액, 생체 조직, 세포, 미생물, 바이러스 또는 바이러스 입자를 함유하는 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 6] 제 5 항에 있어서,
상기 시료는 핵산 분자의 분리 및 정제 과정을 거치지 않은 시료인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서,
상기 증폭과 혼성화를 수행하기 전에, 상기 시료 중의 핵산을 노출시키기 위하여 계면활성제 처리, 효소 처리 또는 가열 처리를 수행하는 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 8] 제 1 항에 있어서,
상기 검출하고자 하는 표적 핵산 분자는 세포-무함유 시료 내에 존재하는 것; 바이러스 입자 또는 비진핵 세포 중에 존재하는 것; 및 병원체의 핵산 분자로 이루어지는 군에서 선택되는 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.

- [청구항 9] 제 1 항에 있어서,
상기 검출하고자 하는 표적 핵산 분자는 돌연변이된 서열을 포함하고, 상기 프로브는 상기 돌연변이된 서열을 포함하는 표적 핵산 분자에 상보적인 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서,
상기 표적 핵산 분자는 DNA 분자 또는 RNA 분자로부터 역전사된 cDNA 분자인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 11] 제 1 항에 있어서,
상기 표적 핵산 분자는 RNA 분자를 포함하고,
상기 혼성화된 가지상(branched) 핵산 복합체의 형성을 촉진하는 단계는, 상기 표적 RNA 분자의 역전사, 증폭, 가열변성 및 혼성화를 동일한 반응혼합물 내에서 통합하여 수행하는 것을 포함하는 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 12] 제 11 항에 있어서,
상기 증폭은 비대칭 폴리머라제 연쇄 반응(asymmetric PCR)으로 수행하는 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 13] 제 1 항에 있어서,
상기 핵산 프로브는 단일 가닥 DNA 또는 PNA 서열을 포함하는 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 14] 제 1 항에 있어서,
상기 핵산 프로브는 용액 내에 존재하거나 또는 고체 지지체 상에 존재하여, 단일 용기 내에서 또는 고체 지지체 상에서 상기 가지상(branched) 핵산 복합체의 형성을 촉진하는 단계가 수행되는 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 15] 제 14 항에 있어서,
상기 고체 지지체 상에 존재하는 핵산 프로브는, 3' 또는 5' 말단이 링커 분자를 통하여 상기 고체 지지체 상에 고정된 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 16] 제 1 항에 있어서,
상기 검출은 이중 가닥 DNA와 결합하는 검출 가능한 표지와 상기 혼성화된 가지상 핵산 복합체를 접촉시켜 표지된 복합체를 형성시켜 검출하는 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 17] 제 1 항에 있어서,
상기 검출은 상기 증폭시 표지된 뉴클레오티드 또는 표지된 PCR 프라이머를 사용하여 증폭된 표적 DNA에 혼입된 표지를 통하여 검출하는 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 18] 제 16 항 또는 제 17 항에 있어서,

상기 표지는 형광성 표지인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.

[청구항 19]

제 1 항에 있어서,
상기 검출은, 상기 증폭시 비오틴 표지된 PCR 프라이머를 사용하여, 발색효소가 결합된 스트렙타비딘(streptavidin)을 이용하여 검출하는 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.

[청구항 20]

검출하고자 하는 표적 핵산 분자를 비대칭 폴리머라제 연쇄 반응(asymmetric PCR)을 수행하여 증폭하는 단계;
상기 증폭된 표적 핵산 분자를 포함하는 반응 혼합물 전체를 상기 표적 핵산 분자의 전체 또는 일부와 상보적인 서열을 포함하는 핵산 프로브가 존재하는 용액 또는 고체 지지체 표면으로 전달하는 단계;
상기 용액 중에서 또는 상기 고체 지지체 상에서 혼성화를 수행하여, 상기 핵산 프로브와 복수의 증폭된 핵산 분자들이 혼성화 되어 가지상(branched) 핵산 복합체의 형성을 촉진하는 단계; 및
상기 혼성화된 가지상 핵산 복합체를 검출하는 단계:
를 포함하며,
상기 반응혼합물에 대한 가열변성은, 상기 반응혼합물을 상기 용액 또는 고체 지지체 표면으로 전달하는 단계 전에 또는 후에 수행되는 것인,
시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.

[청구항 21]

제 20 항에 있어서,
상기 시료는 전혈, 혈청, 체액, 생체 조직, 세포, 미생물, 바이러스 또는 바이러스 입자를 함유하는 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.

[청구항 22]

제 20 항에 있어서,
상기 검출하고자 하는 표적 핵산 분자는 세포-무함유 시료 내에 존재하는 것; 바이러스 입자 또는 비진핵 세포 중에 존재하는 것; 및 병원체의 핵산 분자로 이루어지는 군에서 선택되는 것을 포함하는 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.

[청구항 23]

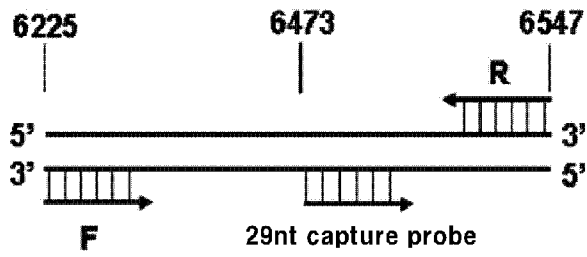
제 20 항에 있어서,
상기 검출하고자 하는 표적 핵산 분자는 돌연변이된 서열을 포함하고, 상기 프로브는 상기 돌연변이된 서열을 포함하는 표적 핵산 분자에 상보적인 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.

[청구항 24]

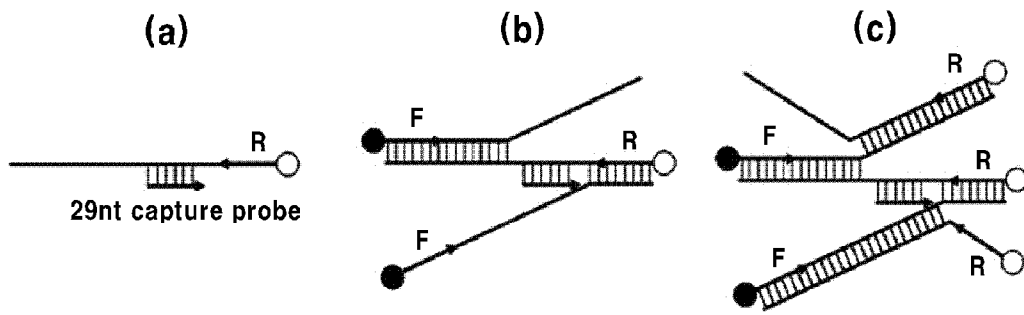
제 20 항에 있어서,
상기 표적 핵산 분자는 DNA 분자 또는 RNA 분자로부터 역전사된

- cDNA 분자를 포함하는 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 25] 제 20 항에 있어서,
상기 표적 핵산 분자가 RNA 분자를 포함하고, 상기 증폭 단계에서 역전사와 비대칭 폴리머라제 연쇄 반응이 통합되어 수행되는 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 26] 제 20 항에 있어서,
상기 핵산 프로브는 단일 가닥 DNA 또는 PNA 서열인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 27] 제 20 항에 있어서,
상기 고체 지지체 상에 존재하는 핵산 프로브는, 3' 또는 5' 말단이 링커 분자를 통하여 상기 고체 지지체 상에 고정된 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 28] 제 20 항에 있어서,
상기 검출은 이중 가닥 DNA와 결합하는 검출 가능한 표지와 상기 혼성화된 가지상 핵산 복합체를 접촉시켜 표지된 복합체를 형성시켜 검출하는 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 29] 제 20 항에 있어서,
상기 검출은 상기 증폭 과정 중에 표지된 뉴클레오티드 또는 표지된 PCR 프라이머를 사용하여 증폭된 표적 DNA에 혼입된 표지를 통하여 검출하는 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 30] 제 28 항 또는 제 29항에 있어서,
상기 표지는 형광성 표지인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 31] 제 20 항에 있어서,
상기 검출은, 상기 증폭시 비오틴 표지된 PCR 프라이머를 사용하여, 발색효소가 결합된 스트렙타비딘(streptavidin)을 이용하여 검출하는 것인, 시료 중의 표적 핵산 분자의 검출 방법.

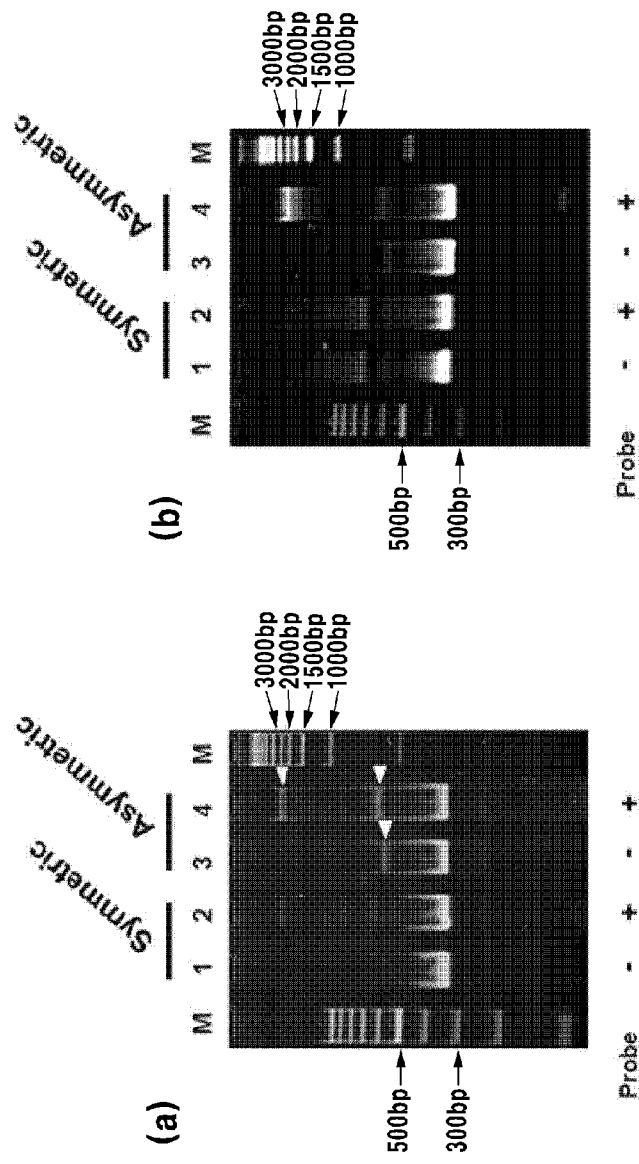
[Fig. 1]



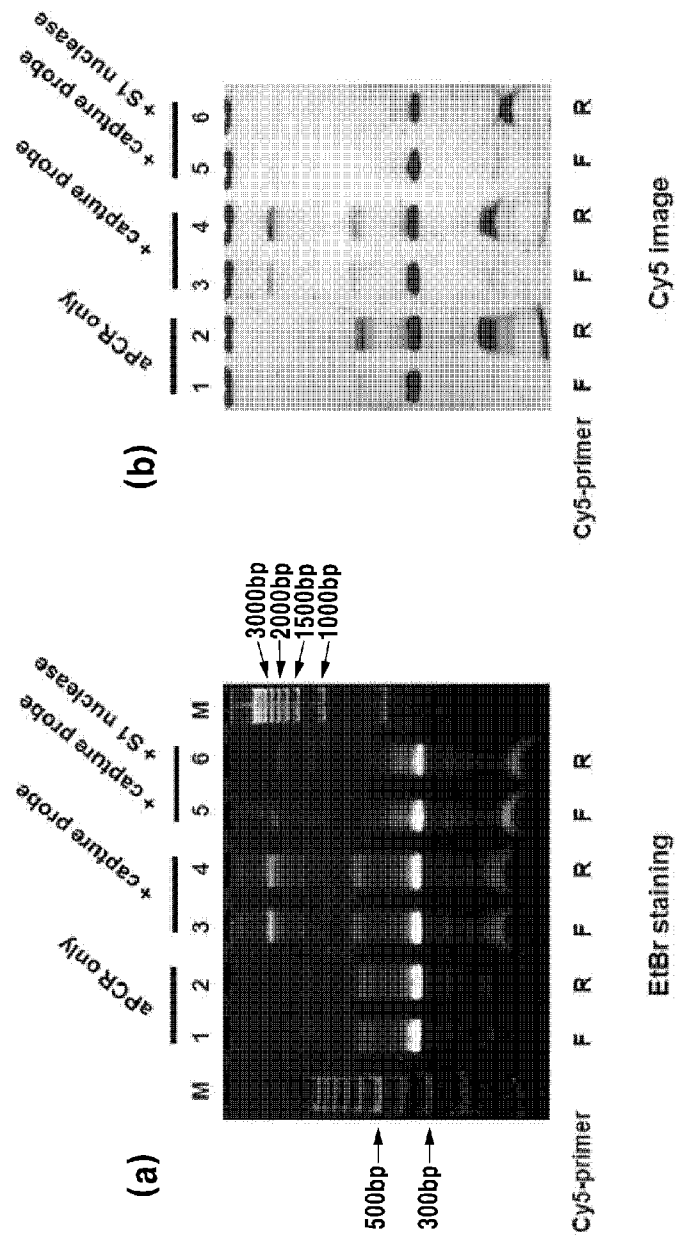
[Fig. 2]



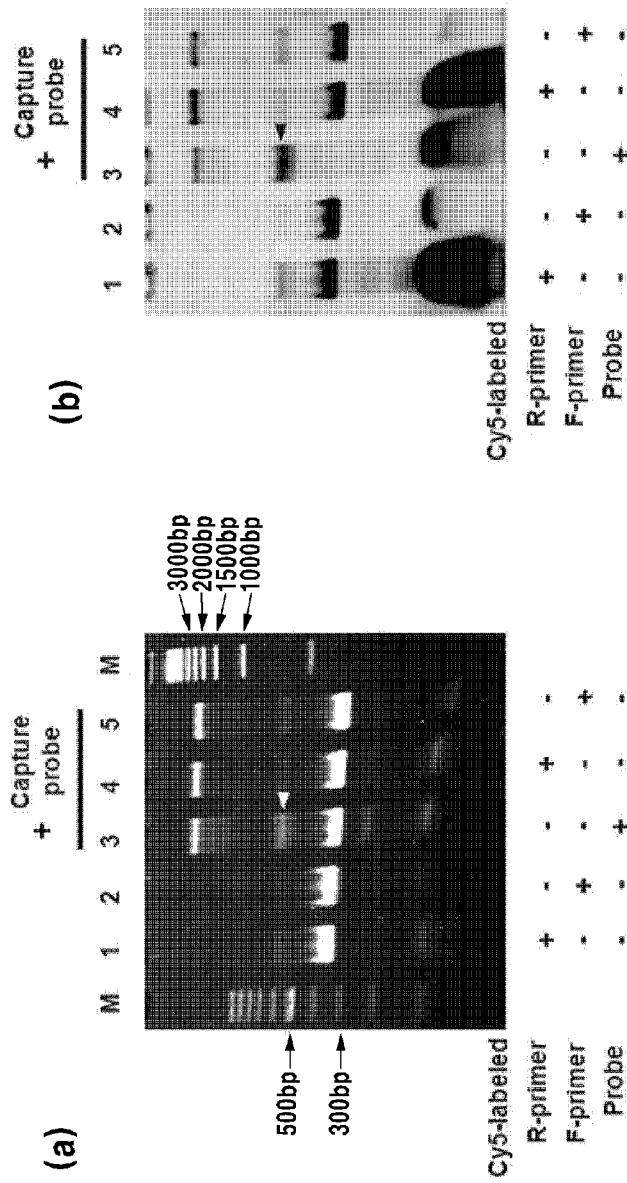
[Fig. 3]



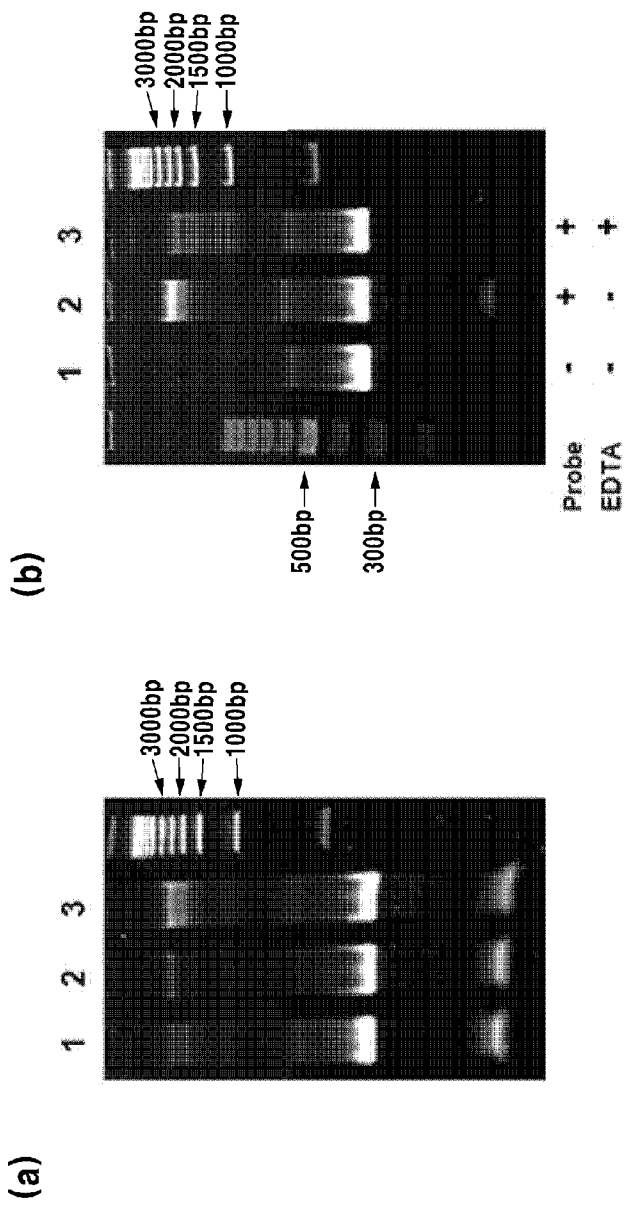
[Fig. 4]



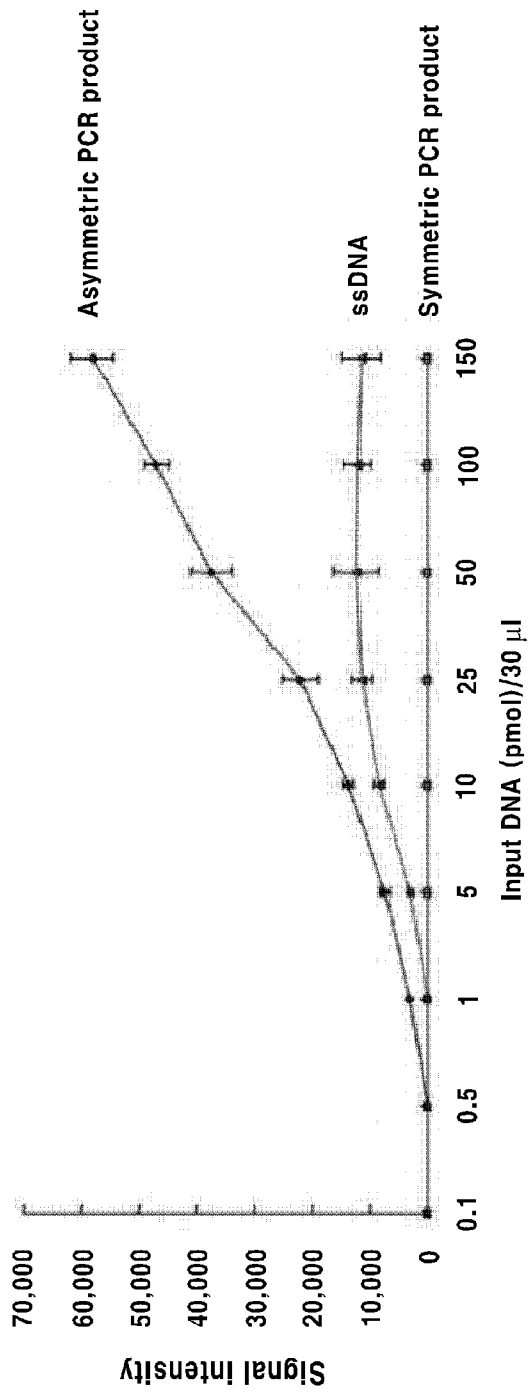
[Fig. 5]



[Fig. 6]

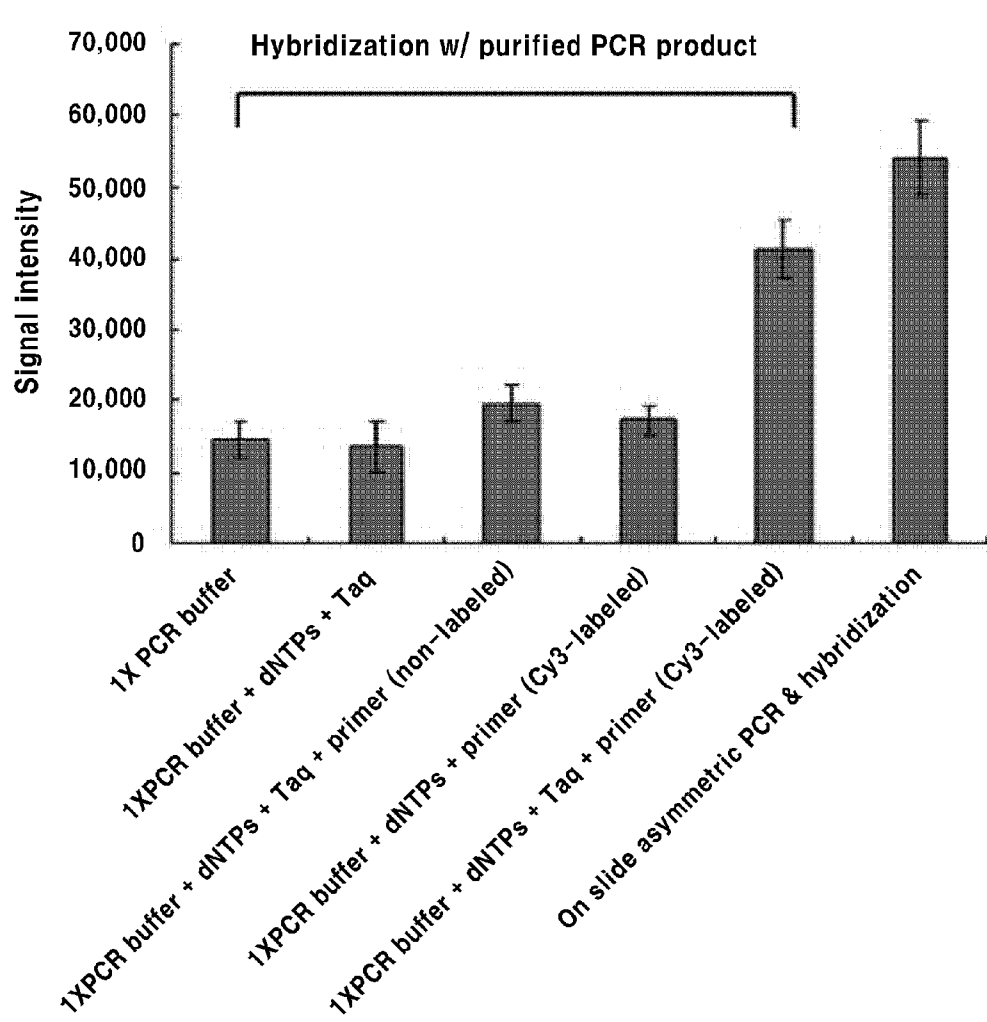


[Fig. 7]

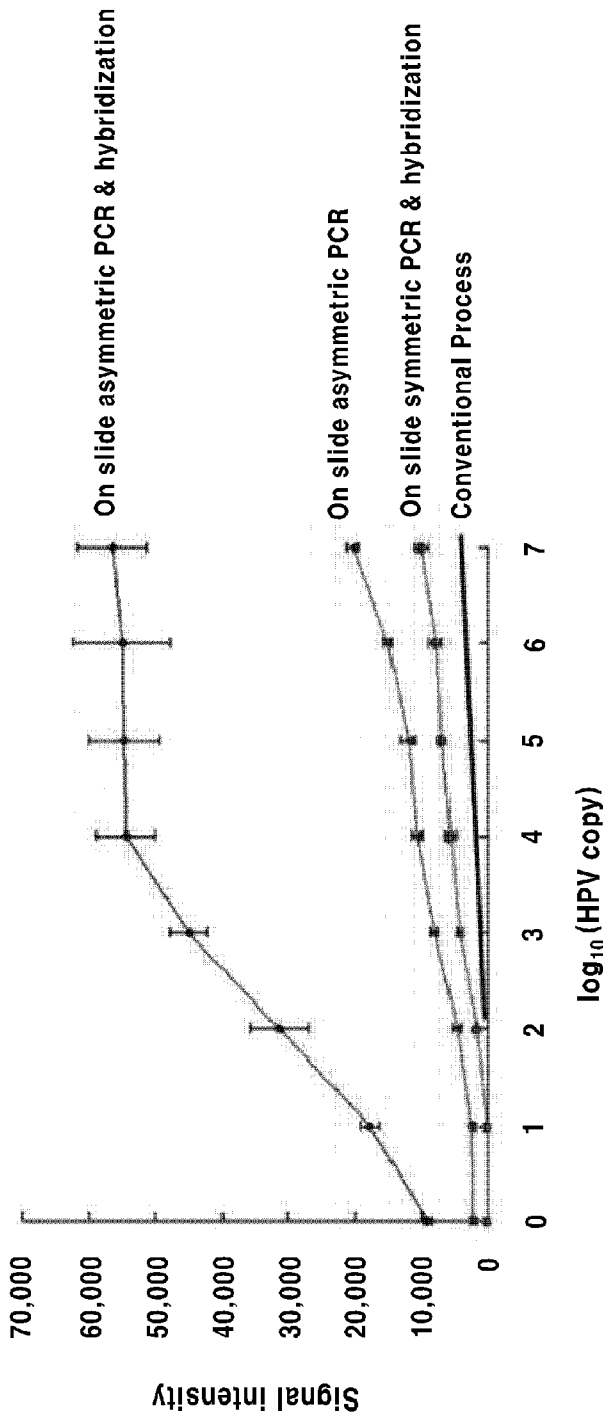


- Labeled PCR primers were diluted 10 folds with non-labeled primers
- PCR product was purified
- Hybridized in 6XSSC

[Fig. 8]

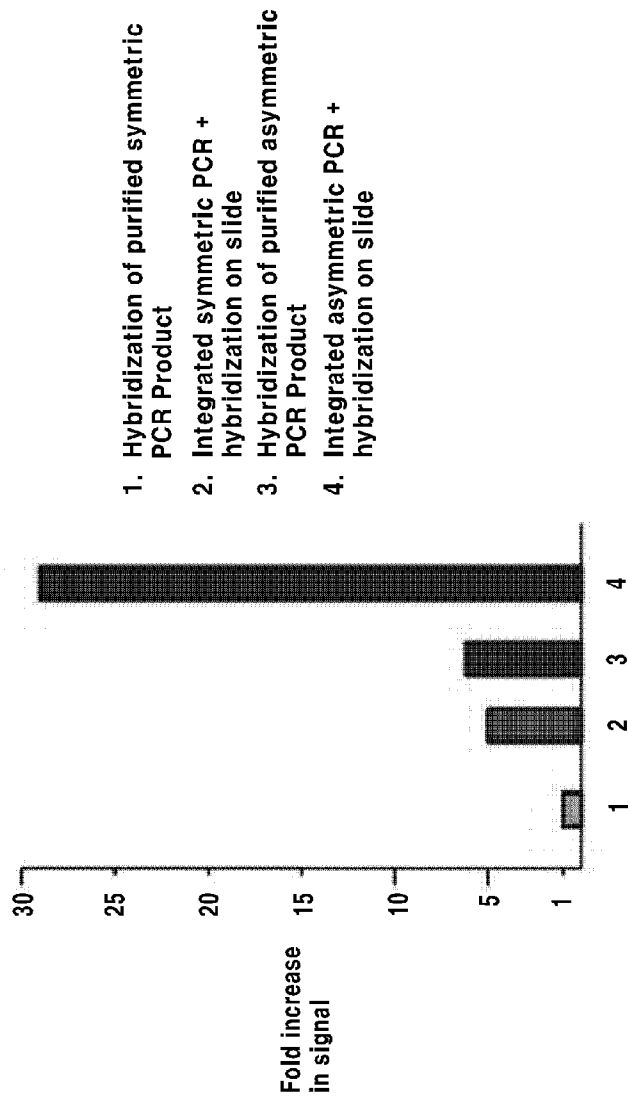


[Fig. 9]

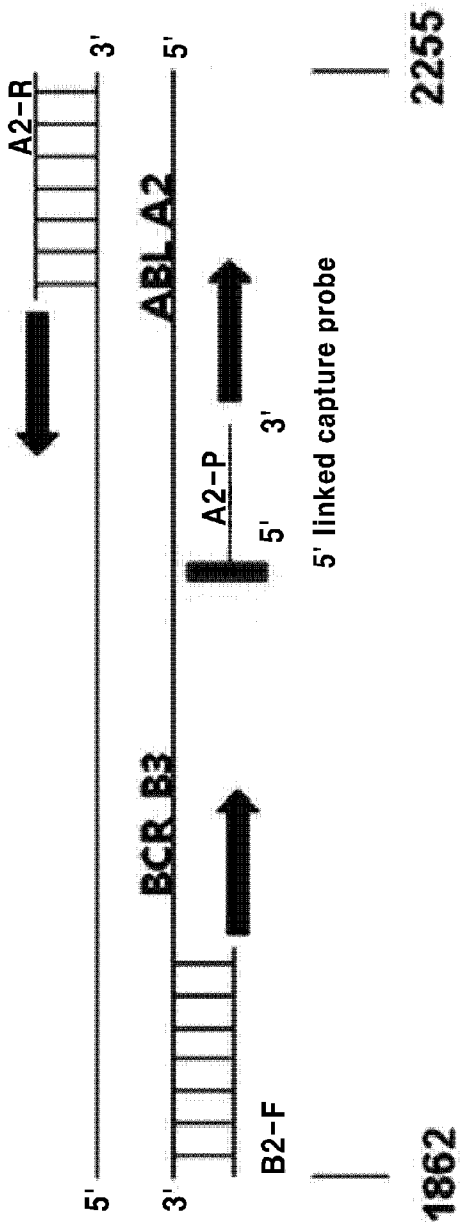


Cy3 labeled PCR primers were diluted 5X with non-labeled primers

[Fig. 10]



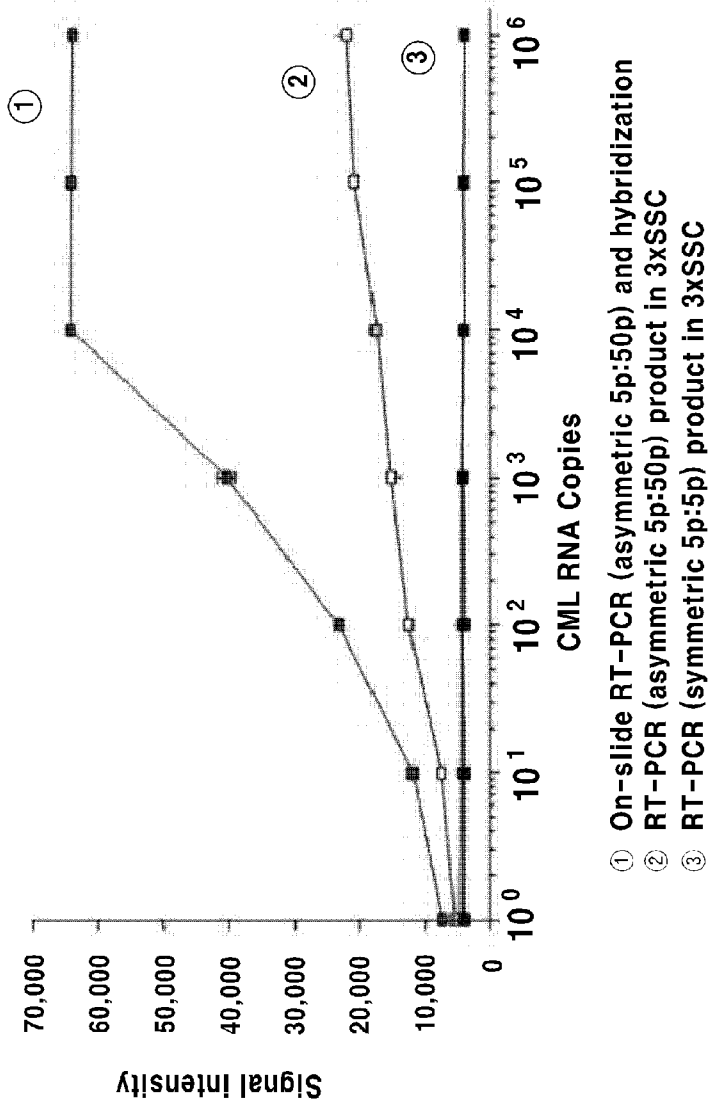
[Fig. 11]



Positions according to accession number EU 216071 (BCR-ABL)

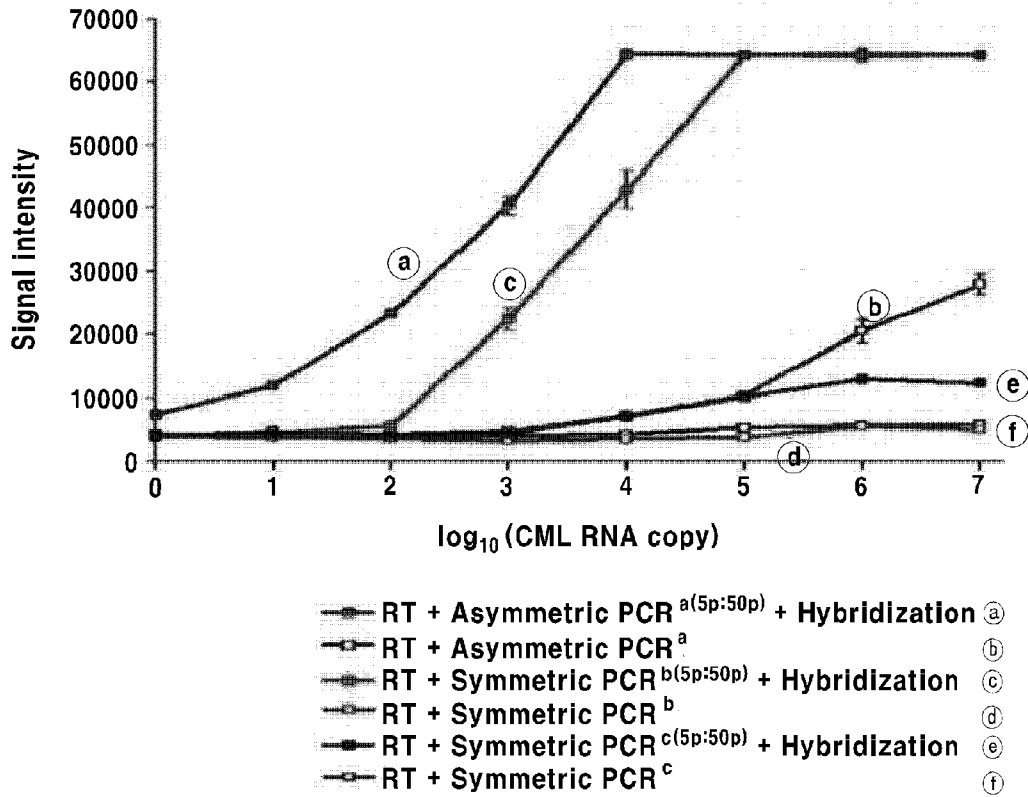
- B2-F BCR, (1862-1880) 5'-Cy3-GGGAGCAGCAGAGAAGTG-3'
- A2-R ABL, (2255-2231) 5'-Cy3-CCTAAGACCCGGAGCTTTTCACCTT-3'
- A2-P ABL, (2108-2130) 5'-NH₂-GTGAAGCCGCTCGTTGGAAGTCC-3'

[Fig. 12]

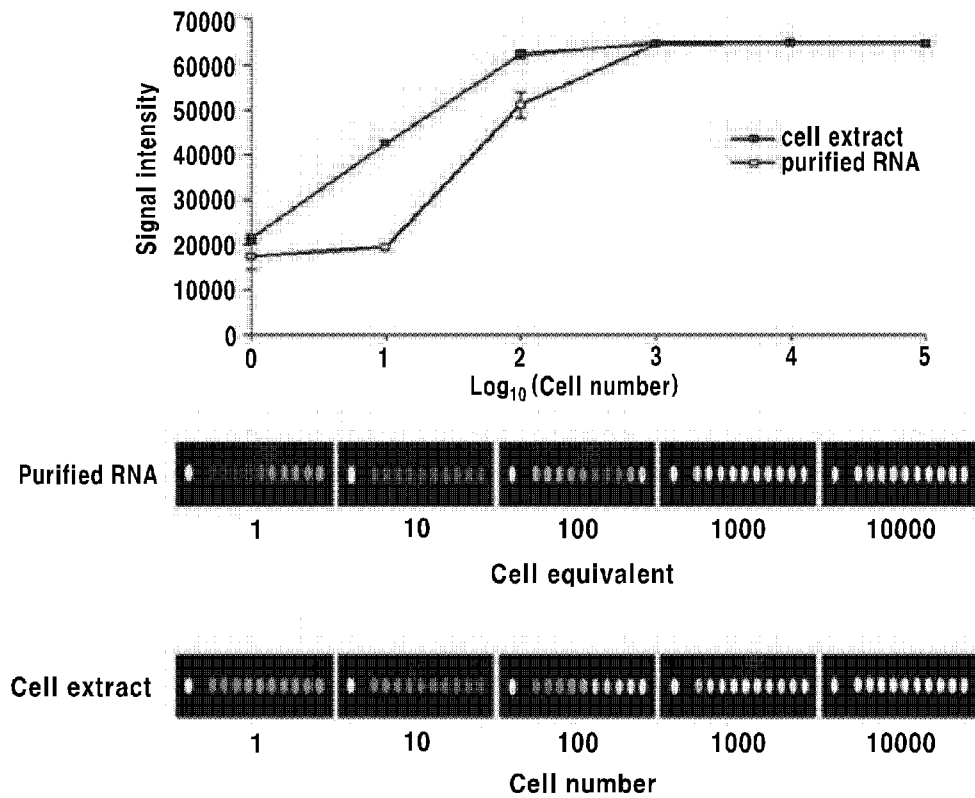


- ① On-slide RT-PCR (asymmetric 5p:50p) and hybridization
- ② RT-PCR (asymmetric 5p:50p) product in 3xSSC
- ③ RT-PCR (symmetric 5p:5p) product in 3xSSC

[Fig. 13]



[Fig. 14]



• Probe sequence is partial complementary with BCR B3 sequence