(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.[6]
C12Q 1/68

(45) 공고일자 2004년12월03일
(11) 등록번호 10-0451267
(24) 등록일자 2004년09월22일

(21) 출원번호 10-1995-0029942
(22) 출원일자 1995년09월14일

(65) 공개번호 10-1996-0010876
(43) 공개일자 1996년04월20일

(30) 우선권주장 08/306870 1994년09월15일 미국(US)

(73) 특허권자 존슨 앤드 존슨 클리니컬 다이어그노스틱, 아이엔씨.
미합중국, 뉴욕 14650-2209, 로체스터, 8 티에치 플로어, 비엘디지. 83, 리서치 랩스

(72) 발명자 존웨슬리백쿠스
미합중국뉴욕14589윌리암슨콩돈로오드4858

토비아스이.에키제
미합중국뉴욕14420부로크포트코렐로오드1585

제로메챨스스와츠
미합중국뉴욕14618로체스터뉴톤드라이브480

리챠드켈빈수톤
미합중국뉴욕14617로체스터트윌라이트드라이브28

이그나지오살바토레폰티셀로
미합중국뉴욕14534피츠포드코퍼우즈21

조안한센커쉬너
미합중국뉴욕14610로체스터클로버스트리트1500

존브루스핀들레이
미합중국뉴욕14580-4024웹스터트레아슈어서클660

(74) 대리인 이병호

심사관 : 한형미

(54) 약염기성중합체를사용한핵산의포획및선택적방출방법및이의증폭방법

요약

핵산은, 용해물을 산성 pH에서 핵산과 침전물을 형성하는 특정한 약염기성 중합체와 접촉시킴으로써 용해후 증폭 또는 기타 처리에 이용할 수 있다. 비침전 물질을 제거한 후, pH를 염기성으로 만들어 중합체로 부터 핵산을 방출시킨다. 표본 샘플의 제조 방법은 간단하고 매우 신속하며, 방출된 핵산은 하이브리드화 검정 또는 증폭 과정에서 더욱 처리할 수 있다. 약염기성 중합체는 수용성이고 산성 pH에서는 양이온이나 염기성 pH에서는 전기적으로 중성이다.

대표도

도 1

명세서

도면의 간단한 설명

제1도는 실시예 3에서 얻은 데이타를 막대 그래프 형태로 도시한다.
제2도는 실시예 4에서 얻은 데이타를 막대 그래프 형태로 도시한다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 검출을 위한 핵산의 포획 및 선택적 방출에 의한 샘플의 제조 방법에 관한 것이다. 특히, 증폭과 같은 후속 처리를 위한 핵산의 포획 및 방출 방법에 관한 것이다. 또한 상기 방법에 사용하기 위한 시험 키트(test kit)에 관한 것이다.
미량의 핵산을 검출하는 기술은 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)과 같은 매우 정교한 증폭 기술의 발달을 포함하여 적어도 지난 20년에 걸쳐 매우 진보하였다. 연구자들은 사람 또는 동물 시험 표본에서 질환 또는 유전적 특징을 나타내는 핵산을 검출하기 위한 기술의 가치를 즉시 인지하였다. 상기 기술에서 프로브 및 프라이머의 사용은 상보성 개념, 즉, 상보적인 뉴클레오타이드(뉴클레오타이드 쌍이라고도 알려져 있음)간의 수소 결합에 의한 이본쇄의 핵산의 결합에 근거를 두고 있다.
PCR은 매우 낮은 농도의 표적 핵산을 검출할 수 있을 정도로 당업계에서 상당히 진보되었다. PCR에 대한 상세한 설명은 비록 급속도로 방대해진 분량의 문헌이 있지만, 예를 들어, US-A-4,683,195(Mullis 등), US-A-4,683,202(Mullis) 및 US-A-4,965,188(Mullis 등)에 기술되어 있다.
표적 핵산을 효과적으로 증폭시키고 검출하기 위해 대개 핵산을 세포 및 다른 표본 조직 파편으로부터 분리할 필요가 있다. 동결, 프로테아제(예: 프로테아제 K)와 같은 분해 효소로의 처리, 비등 및 다양한 세제의 사용[참조: 히구치(Higuchi)에 의해 1988년 4월 6일자로 출원된 U.S.S.N 178,202 및 1991년 5월 22일자로 공개된 EP-A-0 428 197], 용매 침전 및 가열 프로토콜을 포함하는 다양한 용해 방법이 공지되어 있다.
일단 핵산이 세포 또는 바이러스 입자로부터 추출되면, 간단하고 저렴한 방식으로 용해물중의 다른 물질로부터 핵산을 분리할 필요가 있다. 핵산과 복합체를 이루는 것으로 공지된 하나의 물질은 폴리에틸렌이민 및 다양한 화학적 유도체이다. 이는 효소를 분리하기 위한 방법에서 오염물질로서의 핵산을 침전시키기 위해 사용되었고 핵산을 포획하기 위한 친화성 컬럼에 사용되었다.
보다 최근에는, 핵산을 선택적으로 포획하고 분리하기 위해 음이온 포스페이트 에스테르 계면활성제와 배합된 폴리에틸렌이민을 사용했다. 당해 기술이 성공적으로 사용되려면, 다른 단계에서, 조심스럽게 조절된 양으로 2개의 별개의 시약을 사용하는 것이 요구된다. 즉, 사용되는 포스페이트 에스테르 계면활성제의 양은 핵산과 함께 침전물에 존재하는 폴리에틸렌이민의 양에 의존한다. 핵산의 포획 및 분 리를 위해 필요한 단계 및 시약의 수를 감소시키기 위해 개선법이 모색되어 왔다.
상기 언급된 문제점은
(A) 핵산을 함유할 것으로 추정되는 용해물을, 용해물 중에 존재하는 모든 핵산과 수-불용성 침전물을 형성하기에 충분한 양의 수용성인 약염기성 중합체(이는 산성 pH에서 양성자화될 수 있는 아민 그룹을 갖는 하나 이상의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체의 부가 중합에 의해 유도된 반복 단위를 포함한다)와 pH 7 미만에서 접촉시키는 단계,
(B) 용해물로부터 수-불용성 침전물을 분리하는 단계,
(C) 용액의 pH가 7을 초과하도록 상승시키기 위해 침전물을 염기와 접촉시킴으로써 핵산을 상기 약염기성 중합체(이는 산성 pH에서 양성자화될 수 있는 아민 그룹을 갖는 하나 이상의 에틸렌계 불포화된 중합화성 단량체의 부가 중합에 의해 유도된 반복 단위를 포함한다)로부터 방출시키는 단계를 포함하여, 용해물로부터 핵산을 수득하는 방법으로 극복된다.
본 발명은
(1) A) 핵산을 함유하리라고 추정되는 용해물을, 표적 핵산을 포함하는 용해물중 존재하는 모든 핵산과 수-불용성 침전물을 형성하기에 충분한 양의 수용성인 약염기성 중합체(이는 산성 pH에서 양성화될 수 있는 아민 그룹을 갖는 하나 이상의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체의 부가 중합에 의해 유도된 반복 단위를 포함한다)와 pH 7 미만에서 접촉시키는 단계,
B) 용해물로부터 수-불용성 침전물을 분리시키는 단계, 및
C) 용액의 pH가 7을 초과하도록 상승시키기 위해 침전물을 염기외 접촉시킴으로써, 표적 핵산을 포함한 핵산을 상기 약염기성 중합체로부터 방출시키는 단계를 사용하여 표적 핵산을 수득하고,
II) 방출된 핵산중 존재하는 표적 핵산을 증폭시키고, 및

III) 증폭된 표적 핵산을 검출하는 것을 포함하여, 표적 핵산의 증폭 및 검출 방법을 또한 제공한다.
표적 핵산의 증폭을 위한 시험 키트는
a) 하나 이상의 증폭 시약을 포함하는 증폭 반응 혼합물, 및
b) 산성 pH에서 양성자화될 수 있는 아민 그룹을 가진 하나 이상의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위를 포함하는 약염기성 중합체를 별도로 팩키징된 형태로 포함한다.
본 발명은 하이브리드화 검정 또는 증폭 과정과 같은 후속 처리를 위해 핵산을 선택적으로 분리하여 수득하기 위한 신속하고, 간단하고 효과적인 방법을 제공한다. 본 발명은 폴리에틸렌이민의 사용을 포함한, 통상적인 분리 수단에 관련된 상기 언급된 문제점을 극복한다. 더욱이, 계면활성제가 불필요하기 때문에 불소화된 포스페이트 계면 활성제와 배합된 폴리에틸렌이민의 사용으로 나타나는 문제점을 또한 피할 수 있다. 본 발명의 샘플 제조 방법은 지루하지 않고 최소한의 단계만을 요구함으로써 더욱 쉽게 자동화시킬 수 있다. 대개 약 15분 이내(바람직하게는 10분 이내)에 수행할 수 있다.
상기 이점은 폴리에틸렌이민 대신에 산성 pH에서 양이온성이고 수용성이나 중합체의 pKa 보다 상당히 높은 염기성 pH에서 탈양성자화되는 '약염기성' 중합체를 사용함으로써 제공된다 '약염기성'이란 중합체의 pKa가 7 미만, 더욱 바람직하게 6.5 미만을 의미한다. 그러므로, 상기 중합체는 양이온성 중합체와 핵산의 음이온성 포스페이트 골격의 이온 작용 때문에 낮은 pH에서 핵산을 침전시키기 위해 사용될 수 있다.
비복합된 물질을 제거하고 pH를 염기성 조건으로 상향 조정한 후, 핵산은 약염기성 중합체의 침전물로부터 방출되고 (또는 탈복합하되고), 증폭과 같은 후속 처리가 가능하게 된다. 증폭 과정은 염기성 조건하에서 수행할 수 있다.
본 발명은 특히 동물, 사람, 환경 표본 또는 미생물 표본으로부터 수집된 임의의 유형의 샘플에 존재하는 하나 이상의 표적 핵산의 추출 및 검출에 적합하다. 당업계에서 공지된 방법(예: 하이브리드화 기술에 관하여 참고문헌으로 본원에 인용된, US-A-4,994,373)인 통상적인 하이브리드화 검정에 핵산을 적용함으로써 상기 수득한 핵산은 후속 처리될 수 있다.
간략하게, 핵산에 증폭 과정, 특히 PCR을 적용하는 바람직한 실시양태에 관해 논술할 것이다. 그러나, 본 발명의 기술적 영역은 다른 증폭 기술(예: LCR)이 또한 사용될 수 있기 때문에 이로 제한되는 것은 아니다.
폴리머라제 연쇄 반응을 사용하는 핵산의 증폭 및 검출에 관한 일반적인 원리 및 조건은 매우 널리 공지되어 있고, 상세한 것은 US-A-4,683,195(Mullis et al), US-A-4,683,202(Mullis), US-A-4,965,188(Mullis et al) 및 WO-A-91/12342를 포함한 수많은 참고문헌에서 제공된다. 전술된 미국 특허는 여기서 참고문헌으로 인용된다. 당업계에서의 교시 및 본원에서 제공되는 특정 교시로, 당업자는 본 발명의 예비 방법과 폴리머라제 쇄 반응과정 또는 당업계에 공지된 다른 증폭 과정을 조합함으로써 본 발명을 수행하는데 어려움이 없을 것이다.
본 발명의 수행에서 사용될 수 있는 다른 증폭 과정은, 이에 한정되는 것은 아니나, 예를 들어, EP-A-0 320 308(1987년 12월에 공개됨) 및 EP-A-0 439 182(1990년 1월에 공개됨)에서 기술된 바와 같은 리가제 쇄 반응을 포함한다.
시험 표본은 세포성 또는 바이러스 물질, 모발, 체액, 또는 유전자 DNA 또는 RNA를 함유하는 다른 물질, 또는 검출될 수 있는 감염원으로부터의 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 표적 핵산은 임의의 적당한 사람, 동물, 미생물, 바이러스, 또는 식물 공급원으로부터 추출될 수 있다. 또한, 표적 핵산은 암세포로부터 분리될 수 있다.
검출될 수 있는 세균은, 이에 한정되는 것은 아니나, 혈액 중 발견되는 세균, 살모넬라(Salmonella) 종, 스트렙토코커스(Streptococcus) 종, 클라미디아(Chlamydia) 종, 나이세리아(Neisseria) 종, 마이코박테리움(Mycobacterium) 종(예: 마이코박테리움 튜버큘로시스(Mycobacterium tuberculosis) 및 마이코박테리움 아비윰(Mycobacterium avium)의 복합체), 마이코플라즈마(Mycoplasma) 종(예 : 마이코플라즈마 헤모필로스 인플루엔자(Mycoplasma Haemophilus influenzae) 및 마이코플라즈마 뉴모니아(Mycoplasma pneumoniae)), 레지오넬라 뉴모필라(Legionella pneumophila), 보렐리아 부르그도르페레(Borrelia burgdorferei), 뉴모시스티스 카 리니(Pneumocystis carinii), 클로스트리듐 디피실레(Clostridium difficile), 캄필로박터(Campylobacter) 종, 옐시니아(Yersinia) 종, 쉬겔라(Shigella) 종 및 리스테리아(Listeria) 종을 포함한다. 검출가능한 바이러스는, 이에 제한되는 것은 아니나, 단순 포진 바이러스, 엡스타인 바(Epstein Barr) 바이러스, 사이토메갈로 바이러스(Cytomegalovirus), 사람 파필로마(Human papilloma) 바이러스, 인플루엔자(influenza) 바이러스, 호흡기 합포체 바이러스, 간염 바이러스 및 레트로바이러스(예 : HTLV-I, HTLV-II, HIV 1 및 HIV 2)를 포함한다. 원생동물 기생충 및 진균류(효모와 곰팡이를 포함)도 또한 검출가능하다. 다른 검출가능한 종은 당업자에게 쉽게 명확할 것이다. 본 발명은 특히 다양한 세균 또는 바이러스와 연관된 핵산의 존재를 검출하는데 유용하다.
바람직한 양태에서, 본 발명은 HIV 1, HIV 2, HIV 1 프로바이러스, HIV 2 프로바이러스, 사이토메갈로바이러스, 사람 파필로마 바이러스, 마이코박테리움 종, 간염 바이러스 또는 유전적 질환과 연관된 핵산의 분리, 증폭 및 검출에 유용하다.
본원에서 정의된 약염기성 중합체와 접촉되기 전에, 핵산은 임의의 적당한 방식으로 표본으로부터 추출될 수 있다. 문헌[참조: 라우레(Laure) 등의 The Lancet pp 538-540(1988. 9. 3), 마니아티스(Maniatis) 등의 Molecular Cloning : A Laboratory Manual, pp 280-281(1982), 그로스-벨란드 (Gross-Belland) 등의 Eur. J. Biochem., 36, 32 (1973) 및 US-A-4,965,188(상기 언급됨)]에 의해 기술된 과정을 포함하는 다양한 용해 과정이 당업계에 공지되어 있다. 전혈이나 그 성분으로부터 DNA의 추출은 예를 들어, EP-A-0 393 744(1990년 10월 24일자로 공개됨), US-A-5,231,015(Cummin et al) 및 US-A-5,334,499(Burdick et al)에 기술되어 있고, 상기 언급된 특허는 본원에 참고문헌으로 인용된다. 용해 과정은 핵산의 공급원으로 사용되는 표본의 유형에 의존한다.
특정 용해 과정이 본 발명의 수행에 중요하지는 않으나 바람직한 용해 과정은 많은 당업계에 널리 공지된 것, 적합한 비이온성 계면활성제의 존재하에서 표본을 가열하는 것을 포함한다. 또다른 유용한 용해 과정은 U.S.S.N 08/063,169(Ekeze 및 Kerschner에 의해 1993년 5월 18일자로 출원됨)에 기술되어 있고, 이에 따르면 전혈 표본을 완충된 염

화암모늄 용액과 혼합하고 부가적 단계로 염화암모늄과 제2 혼합한다.
용해물을 pH 7 미만(바람직하게는 5 미만)에서, 용해물중 존재하는 모든 핵산과 복합체를 형성하기에 충분한 양으로 약염기성 중합체(하기 정의됨)와 혼합시켜, 수-불용성 침전물을 형성한다. 상기 중합체는 산성 pH에서 수용성이다. 일반적으로, 존재하는 중합체의 양은 적어도 약 0.01중량%, 바람직하게는 약 0.05 내지 약 0.5중량%이다. 물론, 당업자는 핵산의 양에 적합한 중합체의 양을 조정하는 법을 알 것이다. 혼합은 적합한 온도(일반적으로 15 내지 35℃)에서 30분 이하(일반적으로 5분 미만)로 적합한 방식으로 수행할 수 있다.
약염기성 중합체는 수용성 유리 형태로 사용되거나 친화성 컬럼에서와 같이, 수-불용성 지지체에 부착되거나, 중합성의 유리(glass) 또는 다른 무기 입자에 부착될 수 있다. 그러므로, 중합체는 유리, 중합성 또는 자성 입자, 필터 또는 필름을 포함하는 적합한 지지체에 통상적인 수단(예를 들어, 흡착, 공유결합 또는 특이 적 결합 반응)을 사용하여 부착될 수 있다. 약염기성 중합체가 염기성 pH에서도 수-불용성인 경우 그것은 핵산 방출 후, 여과, 원심분리 또는 다른 통상적인 수단을 통해 제거될 수 있다.
그러나, 약염기성 중합체와 결합되어 있는 한 핵산은 유용하지 않다. 그러므로 수-불용성 침전물을 상당한 세포 파편 및 과량의 중합체를 포함하는 샘플 잔여물로부터 분리시킬 필요가 있다. 이러한 분리는 원심분리 또는 여과 후 액체를 버리는 임의의 다양한 통상적인 과정을 사용하여 수행할 수 있다. 원심분리가 본 발명의 수행에 바람직하다.
분리 단계 후, 가열하거나 가열하지 않으면서 침전물을 염기와 접촉시킴으로써 핵산을 약염기성 중합체로부터 탈복합화 또는 방출시킬 수 있다. 강염기는 가열하지 않으며 사용할 수 있고, 그들은, 이에 한정되는 것은 아니나, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화리튬, 탄산나트륨, 중탄산나트륨, 3급 아민(예 : 트리에틸아민, 디이소프로필에틸아민 및 루티딘), 트리신, 비신, 또는 당업자에게 명백한 임의의 다른 유기 염기 또는 무기 염기를 포함한다. 유용한 약염기는 트리스(하이드록시메틸) 아미노메탄(또는 그의 산 부가염), N,N-비스(2-하이드록시에틸)글리신, N-트리스(하이드록시메틸)메틸-글리신 및 당업계에 공지된 다른 것과 같은 염기성 완충액을 포함할 수 있다. 가열은 보다 약한 염기가 사용될 때 필요하다.
상기 가열은 적당한 압력하에서 적어도 약 50℃ 및 바람직하게는 약 95 내지 약 125℃ 온도에서 15분 이하(일반적으로 5분 미만)로 수행될 수 있다. 상기 문단 에서 사용된 '약'은 ±5℃를 의미한다.
바람직한 양태에서, 보다 약한 염기를 가열하면서 사용하여 핵산을 침전물로부터 방출시킨다. 이는 후속 처리없이 증폭가능한 핵산 함유 용액을 제공한다. 이러한 보다 약한 염기는 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 하이드로클로라이드와 같은 완충액일 수 있다.
몇몇 양태에서, 상기 양태에서 사용된 중합체는 염기성 pH에서 조차 수-불용성인 것이다(하기 정의됨). 상기 중합체는 필요하다면 핵산 방출후 증폭 전에 시스템으로부터 제거될 수 있다.
방출된 핵산을 함유하는 생성된 용액은 염기성 pH이다. 몇몇 예에서, 핵산은 추가의 pH 조정없이 후속 처리될 수 있다. 강염기가 사용되는 다른 양태에서, 임의의 적합한 산, 또는 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 하이드로클로라이드, N,N-비스(2-하이드로시에틸)글리신, N-트리스(하이드록시메틸)메틸글리신 및 당업자에게 명백한 완충제를 사용하여 용액의 pH를 약 6 내지 약 9(바람직하게는 약 7.5 내지 약 9)로 조정(일반적으로 하향 조정)할 수 있다. 목적하는 pH를 얻기 위해 필요한 상기 물질의 양은 당업자에게는 명백할 것이다.
염기성 pH에서, 핵산의 포획을 위해 사용되는 중합체는 수용성 또는 수-불용성일 수 있고, 상기 특성을 제공하기 위해 필요한 단량체는 하기 기술된다.
본 발명의 핵산을 포획하고 방출하는 기술된 방법은 전형적으로 약 20분 이내, 및 바람직하게는 약 10분 이내 수행된다.
다른 언급이 없는 한, 본원에서 사용된 바와 같이, 수식어 '약'은 언급된 값 의 ±10% 변동값을 의미한다. pH값에서 사용될 때, '약'은 ±0.5 pH 단위를 의미한다.
본 발명의 바람직한 양태에서, 표적 핵산의 증폭 및 검출 방법은
I) 세포 또는 바이러스 입자를 용해시켜 표적 핵산을 방출하고,
II) 표적 핵산에 대해,
A) pH 7 미만에서, 표적 핵산을 포함하는 용해물내 존재하는 모든 핵산과 수-불용성 침전물을 형성하기에 충분한 양의 수용성인 약염기성 중합체(이는 산성 pH에서 양성자화될 수 있는 아민 그룹을 가진 하나 이상의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위를 포함한다)와 표적 핵산을 접촉시키는 단계,
B) 수불용성 침전물을 용해물로부터 분리시키는 단계, 및
C) 용액의 pH가 7을 초과하도록 올리기 위해 침전물을 염기와 접촉시켜, 표적 핵산을 포함하는 핵산을 약염기성 중합체로부터 방출시키는 단계를 적용시키고,
III) pH의 조정 없이, 방출된 표적 핵산을 증폭하고,
IV) 증폭된 표적 핵산을 검출하는 것을 포함한다.
상기 방법에서, 약염기성 중합체가 염기성 pH에서 수-불용성이고 표적 핵산 방출 후 이의 증폭 전에 수-불용성 중합체를 제거하는 단계를 추가로 포함하는 방법이 더욱 바람직하다.
본 발명의 실시에서 사용되는 약염기성 중합체는 하나 이상의 에틸렌계 불포화된 중합가능한 단량체로부터 제조되고, 이중 적어도 하나가 산성 pH에서 양성자 화될 수 있는 아민 그룹을 갖는다. 그러므로, 산성 pH에서, 중합체는 양성자화되어 아민의 산 부가염을 형성한다. 염기성 pH에서, 상기 중합체는 유리 염기로 존재한다.
본 발명에서 유용한 중합성 단량체의 일부일 수 있는 특정 '약염기성 그룹'은, 이에 제한되지는 않으나, 산성 pH에서 양성자화될 수 있는 사이클릭 아민 그룹 또는 1급, 2급 또는 3급 아미노알킬 그룹을 포함한다. 유용한 사이클릭 아민 그룹은, 이에 제한되지는 않으나, 이미다졸릴, 이속사졸릴, 피리딜, 피페리딜, 피페라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 퀴놀리닐, 및 퀴나졸리닐 그룹을 포함한다. 바람직한 그룹

은 방향족인 사이클릭 그룹이고, 이미다졸 그룹이 가장 바람직하다. 유용한 아미노알킬 또는 사이클릭 아민 그룹은 알킬렌, 아미도 또는 에스테르 그룹을 포함한 간편한 연결 그룹을 사용하여 비닐 그룹의 단량체와 연결되고, 다수의 알킬렌 그룹은 이미노, 옥시, 아미드, 카보닐 또는 에스테르 그룹과 함께 연결될 수 있다.

핵산을 포획하기 위한 일반적으로 유용한 중합체는

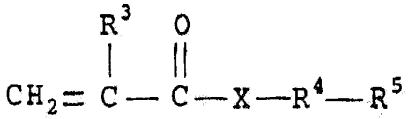
a) 산성 pH에서 양성자화될 수 있고, 아미노알킬, 이미다졸릴, 이속사졸릴, 피리딜, 피페리딜, 피페라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 퀴놀리닐 및 퀴나졸리닐로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 그룹을 가진, 약 15 내지 100중량%의 수용성, 약염기성 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체,

b) 0 내지 약 35중량%의 비이온성, 친수성의, 에틸렌계 불포화된 중합성 단 량체, 및

c) 0 내지 약 85중량%의 비이온성, 소수성의, 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체의 부가중합화에 의해 유도된 반복 단위로 이루어진다.

바람직하게는, 약염기성 중합체는 약 20 내지 약 100중량%의 a), 0 내지 약 25중량%의 b), 및 0 내지 약 80중량%의 c)의 반복 단위로 이루어진다.

상기 a)에서 유용한 더욱 특이한 부류의 단량체는 화학식(I)의 단량체이다:



(I)

상기식에서,

R^3 는 수소 또는 메틸이고,

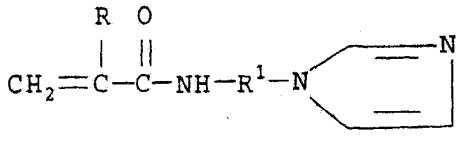
X는 옥시 또는 이미노이다.

또한, R^4 는 쇄중 1 내지 8개의 탄소 및 헤테로 원자를 갖고, 하나 이상의 알킬렌 그룹(예 : 메틸렌, 에틸렌, n-프로필렌, 이소프로필렌, 및 n-펜틸렌)을 포함하는 2가 탄화수소 연결 그룹이고; 단, 하나 이상의 알킬렌 그룹이 있는 경우, R^4 에서 이들은 하나 이상의 카보닐, 옥시, 이미노, 에스테르 또는 아미도 그룹과 임의의 작용가능한 조합으로 함께 연결된다. '작용가능한 조합(operable combination)'은 상기 그룹들이 임의의 화학적으로 가능한 배위로 알킬렌 그룹과 조합될 수 있고, 화학적으로 가능한 방법으로 조합(서로 연결됨)되어 사용될 수 있음을 의미한 다(예: 옥시카보닐, 카본아미도 및 당업자에게 분명한 다른 것). R^4 는 카보닐, 옥시, 이미노, 에스테르 또는 아미도 그룹으로 종결(또는 R^5 와 연결)될 수 있다.

R^5 는 산성 pH에서 양성자화될 수 있는, 상기 언급한 바와 같은, 사이클릭 아민 또는 1급, 2급 또는 3급 아미노알킬 그룹이다.

유용한 a)형 단량체의 예는, 이에 제한되지는 않으나, 1-비닐이미다졸, 2-메틸-1-비닐이미다졸, 2-비닐피리딘, 1-하이드록시-6-비닐-1H-벤조트리아졸, 2-아미노에틸 메타크릴레이트 하이드로클로라이드, 2-아미노에틸 아크릴레이트 하이드로클로라이드, N-(3-아미노프로필)메타크릴아미드, 2-비닐퀴놀린, N-(3-이미다졸릴프로필)메타크릴아미드, N-(2-이미다졸릴에틸)메타크릴아미드, N-(3-이미다졸릴프로필)아크릴아미드, N-(1,1-디메틸-3-N-이미다졸릴프로필)아크릴아미드, N-(이미다졸릴메틸)아크릴아미드, 1-비닐피롤리디논, 3-(N,N-디메틸아미노)프로필 메타크릴레이트 및 언급된 유리 염기의 산 부가염을 포함한다.

본 발명의 a)형의 신규한 단량체 부류는 단독 중합체 또는 공중합체를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 상기 단량체는 하기 화학식(II)로 정의된다:



(II)

상기식에서,

R은 수소 또는 메틸이다. 바람직하게는, R은 메틸이다. 또 R^1 은 1 내지 3개 탄소원자의 측쇄 또는 직쇄 알킬렌(예: 메틸렌, 에틸렌, 트리메틸렌 또는 프로필렌)이다. 바람직하게, R^1 은 2 또는 3개 탄소원자의 알킬렌이다. 더욱 바람직하게, R^1 은 트리메틸렌이다.

화학식(II)의 구조를 갖는 특히 유용한 단량체는, 이로 제한되지는 않으나, N-(3-이미다졸릴프로필)메타크릴아미드, N-(2-이미다졸릴에틸)메타크릴아미드, N-(3-이미다졸릴프로필)아크릴아미드, N-(1,1-디메틸-3-N-이미다졸릴프로필)아크릴아미드, N-(이미다졸릴메틸)아크릴아미드 및 이들의 산부가염을 포함한다. 여기서 기술된 신규한 단량체 중 첫 번째 화합물이 가장 바람직하다.

바람직한 a)형 단량체는 1-비닐이미다졸 및 N-2-메틸-1-비닐이미다졸을 포함한다.

만일 a)형 단량체가 용해성이 없거나 낮다면, 그들은 또한 산 부가염(예: 염화수소 또는 브롬화수소) 형태로 중합될 수 있다.

b)형 단량체로 분류되는 단량체는 본원에서 '친수성'으로 정의된 것으로, 단독중합화되는 경우, pH 7 이상에서 수용성인 단독중합체를 제공하는 단량체를 의미한다. 일반적으로, 상기 단량체는 하이드록시, 아민(1급, 2급, 3급 및 사이클릭), 아미드, 설폰아미드 및 폴리에틸렌옥시 그룹과 같은 친수성 그룹을 가지나, 만일 상기 단독 중합체가 수용성 파라미터를 충족하는 경우, 상기 그룹을 포함할 필요가 없다.

b)형의 대표적인 단량체는, 이에 제한되지는 않으나, 아크릴아미드, 2-하이 드록시에틸 아크릴레이트, 2,3-디하이드록시프로필 아크릴레이트, 2,3-디하이드록시프로필 메타크릴레이트, 폴리(에틸렌옥시)에틸 메타크릴레이트(2 내지 10의 에틸렌옥시 그룹을 가짐) 및 N,N-디메틸아크릴아미드를 포함한다. 바람직한 단량체는 아크릴아미드이다.
c)형 단량체로 분류되는 단량체는 본원에서 '소수성'으로 정의된 것으로, 단독중합화하는 경우, 그들이 가진 부속 그룹형과 무관하게, pH 7 이상에서 수-불용성인 단독중합체를 제공하는 단량체를 의미한다.
c)형의 대표적인 단량체는, 이에 제한되지는 않으나, 메타크릴아미드, 2-하이드록시에틸 메타크릴레이트, N-t-부틸 메타크릴아미드, 에틸 아크릴레이트, 메틸아크릴레이트, 부틸 아크릴레이트, 메틸 메타크릴레이트, 스티렌, 비닐톨루엔 및 다른 비닐 방향족 및 당업자에게 명백한 다른 것을 포함한다. 바람직한 단량체는 2-하이드록시에틸 메타크릴레이트이다.
신규하지 않은 a), b) 및 c)형 단량체는 일반적으로 상업적으로 구입가능하고 통상적인 방법 및 출발 물질을 사용하여 제조된다.
화학식(II) 구조의 신규한 단량체는 일반적으로 당업자에게 명백한 적당한 조건을 사용하여 (메트)아크릴오일 클로라이드와 1-(아미노알킬)이미다졸의 축합으로 제조될 수 있다. 바람직한 단량체의 대표적인 제법은 하기 실시예에 따라 제공된다. 상기 단량체에 관한 더욱 상세한 것은 '약염기성의 중합화성 단량체 및 그로부터 제조된 중합체'란 명칭으로 폰티셀로 등(Ponticello et al)에 의해 동일자로 출원된 후 양도되어 동시계류중인 U.S.S.N.08/306 341으로부터 알 수 있다.
상기 기술된 단독중합체 및 공중합체는 비록 하기 실시예의 제조 방법에서 예시된 특정의 바람직한 조건에도 불구하고, 당업계에 공지된 통상적인 용액 중합화 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 다양한 단량체의 비율을 당업자에게 공지된 바와 같이 조정하여 상기 중합체가 산성 pH에서 수용성인 한, 염기성 pH에서 수용성 또는 수-불용성 어느쪽일 수도 있는 중합체를 제조한다.
용액 중합화는 일반적으로 적당한 용매(물 또는 다양한 수-혼화성 유기 용매를 포함함) 중에 단량체를 용해시키고 적당한 유리 라디칼 개시제의 존재하에서 중합화하는 것을 포함한다. 생성된 중합체는 산성 pH에서 수용성이고, 아세톤과 같은 용매를 사용하여 침전되며 후속 용도를 위해 물에서 정제되고 재용해된다.
본원에서 기술된 특히 유용한 중합체는, 이에 제한되는 것은 아니나, 폴리[N-(3-이미다졸릴프로필)메타크릴아미드 하이드로클로라이드-코-아크릴아미드], 폴리[N-(3-이미다졸릴프로필)메타크릴아미드 하이드로클로라이드-코-2-하이드록시에틸메타크릴레이트], 폴리(1-비닐이미다졸), 폴리(2-아미노에틸메타클릴레이트 하이드로클로라이드-코-2-하이드록시에틸메타크릴레이트), 폴리(1-비닐이미다졸 하이드로클로라이드-코-2-하이드록시에틸 메타크릴레이트), 폴리[N-(1,1-디메틸-3-이미다졸릴프로필)아크릴아미드], 폴리(N-2-메틸-1-비닐이미다졸) 및 유리 염기 중합체의 산 부가염을 포함한다.
바람직한 양태에서, 사용되는 중합체는 염기성 pH에서 수-불용성이다. 상기 중합체는 염기성 pH에서 중합체의 용해를 방지하기 위해 제한된 양의 b)형 단량체(15중량% 미만)와 함께 c)형 단량체 뿐만 아니라 a)형 단량체를 사용하여 제 조된다. 상기 형의 대표적인 중합체는, 이에 제한되지는 않으나, 폴리[N-(3-이미다졸릴프로필)메타크릴아미드 하이드로클로라이드-코-2-하이드록시에틸 메타크릴레이트], 폴리(1-비닐이미다졸), 폴리(2-아미노에틸 메타크릴레이트 하이드로클로라이드-코-2-하이드록시에틸 메타크릴레이트) 및 플리(1-비닐이미다졸하이드로클로라이드-코-2-하이드록시에틸 메타크릴레이트)를 포함한다.
본 발명은 또한 전술한 바와 같이 방출된 하나 이상의 표적 핵산내 존재하는 하나 이상의 특이한 핵산 서열의 증폭 및 검출에 관한 것이다. 더욱이, 다수의 표적 핵산은 상응하는 세트의 프라이머 및 각각의 특이한 핵산에 대한 검출 수단을 사용하여 동시에 증폭 및 검출될 수 있다. 동일 핵산에서 다양한 서열이 또한 증폭 및 검출될 수 있다.
'PCR 시약'은 일반적으로 PCR에서 유용하다고 여겨지는 임의의 시약, 즉 각각의 표적 핵산에 대한 프라이머 세트, DNA 폴리머라제, DNA 폴리머라제 보조 인자 및 2개 이상의 데옥시리보뉴클레오시드-5'-트리포스페이트(dNTP)를 언급한다.
본원에서 프라이머 또는 프로브로 언급하여 사용된 바와 같은, 용어 '올리고 뉴클레오타이드'는 4개 이상의, 바람직하게는 10개 이상의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드로 이루어진 분자를 말한다. 정확한 길이는 중요하지 않으나 올리고뉴클레오타이드의 궁극적인 용도 또는 작용을 포함한 많은 요소에 의존한다. 올리고뉴클레오타이드는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 유도될 수 있다.
용어 '프라이머'는 핵산 쇄(즉, 주형)에 상보적으로 프라이머 연장 생성물의 합성이 유도되는 조건하에서, 합성 개시점으로 작용할 수 있는, 천연적으로 존재하거나 또는 합성적으로 생성된 올리고뉴클레오타이드를 언급한다. 상기 조건은 뉴클레오타이드(4개의 표준 데옥시리보뉴클레오시드-5'-트리포스페이트와 같은), DNA 폴리머라제 및 DNA 폴리머라제 보조 인자의 존재 및 적당한 온도 및 pH를 포함한다. 정상적으로, 상기 조건은 비특이 증폭을 최소화하기 위한 '높은 스트린전시(high stringency)' 조건으로 당업계에 공지되어 있다. 프라이머는 DNA 폴리머라제의 존재하에서 연장 생성물의 합성을 개시하기에 충분히 길어야 한다. 각 프라이머의 정확한 길이는 계획된 용도, 표적 서열의 복잡성, 반응 온도 및 프라이머의 공급원에 의존하여 다양할 것이다. 일반적으로, 본 발명에서 사용된 프라이머는 10 내지 60개의 뉴클레오타이드를 가질 것이다.
본원에서 사용되는 프라이머는 많은 공급원으로부터 수득할 수 있고 또는 공지된 기술 및 예를 들어, ABI DNA 합성기(Applied Biosystems로부터 구입가능함) 또는 Biosearch 8600 시리즈 또는 8800 시리즈 합성기(Milligen-Biosearch, Inc.로부터 구입가능함)를 포함하는 장비 및 그의 사용을 위한 공지된 방법(예: US-A-4,965,188에서 기술된 바와 같음)을 사용하여 제조할 수 있다. 생물학적 공급원으로부터 분리된, 천연적으로 존재하는 프라이머도 또한 유용하다(예: 제한 효소 분해물). 본원에서 사용된 바와 같은, 용어 '프라이머'는 또한 프라이머의 혼합물을 언급한다. 그러므로, 주어진 각 표적 핵산에 대한 프라이머 세트는 각 대응하는 표적 쇄에 대해 2개 이상의 프라이머를 포함할 수

있다.
한쪽 또는 양쪽 프라이머를 증폭된 생산물의 포획 및 검출을 위해 동일하거 나 다른 표지로 표지할 수 있다. 표지를 부착시키는 과정 및 프라이머 제조과정은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 아그라왈(Agrawal) 등에 의한, Nucleic Acid Res., 14, pp, 6227-45 (1986), 비오틴 표지에 관한 US-A-4,914,210(Levenson et al), 효소 표지에 관한 US-A-4,962,029(Levenson et al) 및 본원에 언급된 참조 문헌에서 기술된 바와 같다. 유용한 표지는 또한 방사성동위원소, 전자-조밀 시약, 크로모겐, 플루오로겐, 인광 잔기, 페리틴 및 다른 자성 입자(참조 문헌 : Owen et al의 US-A-4,795,698 및 Poynton et al의 US-A-4,920,061), 화학 발광 잔기(예: 루미놀) 및 다른 특이한 결합종(아비딘, 스트렙트아비딘, 비오틴, 슈거, 또는 렉틴)을 포함한다. 바람직한 표지는 효소, 방사성동위원소 및 특이 결합 종(예: 비오틴)이다. 유용한 효소는 글루코스 옥시다제, 퍼옥시다제, 우리카제, 알칼리 포스파타제 및 당업계에서 공지된 다른 것을 포함하고 공지된 방법을 사용하여 올리고 뉴클레오타이드에 부착될 수 있다. 상기 효소로 비색 또는 화학 발광 시그날을 제공하는 시약은 공지되어 있다.
표지가 퍼옥시다제와 같은 효소일때, 검정의 어느 시점에서, 과산화수소 및 적당한 염색-형성 조성물이 검출가능한 염색을 제공하기 위해 첨가된다. 예를 들어, 유용한 염색-제공 시약은 트리메틸벤지딘 및 그의 유도체, 수-불용성 트리아릴 이미다졸 류코 염료(Bruschi의 US-A-4,089,747에서 기술됨)와 같은 류코 염료 또는 퍼옥시다제 및 과산화수소 존재시 반응하여 염색을 제공하는 다른 화합물을 포함한다. 특히 유용한 염색 제공 조성물은 EP-A-0 308 236(1989년 5월 22일자로 공개됨)에 기술되어 있다. 퍼옥시다제 표지에 반응하는 화학발광 시그날은 또한 적당한 시 약을 사용하여 발생될 수 있다.
만일 하나 또는 두개의 프라이머가 비오틴화된다면, 증폭된 핵산은 검출가능하게 표지된 아비딘 또는 이의 등가물(예: 스트렙트아비딘)을 사용하여 검출할 수 있다. 예를 들어, 아비딘은 효소와 결합될 수 있거나 또는 공지된 기술을 사용하여 방사성동위원소를 가질 수 있다. 아비딘과 증폭된 생성물 복합체상의 비오틴 및 방사성, 비색 또는 화학발광 시그날을 검출하기 위한 적당한 검출 기술이 사용된다.
본원에서 사용된 바와 같은, 포획 '프로브'는 표적 핵산의 하나 이상의 쇄의 핵산 서열에 실질적으로 상보적이고, 증폭된 핵산을 불용화시키기 위해 사용되는 올리고뉴클레오타이드이다. 프로브 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 중합성 비드 또는 유리 비드와 같은 적당한 수-불용성 지지체, 미세역가 플레이트 웰, 중합성 필름 또는 셀룰로오스성 필름, 또는 당업자에게 명백한 다른 물질에 부착된다. 올리고뉴클레오타이드는, 비록 길이가 중요하지는 않으나, 일반적으로 약 12 내지 40개 뉴클레오타이드 길이이다.
DNA 폴리머라제는 프라이머와 주형의 복합체중 프라이머의 3'-하이드록시 말단에 데옥시뉴클레오시드 모노포스페이트 분자를 첨가하는 효소이나, 상기 첨가는 주형에 의존하는 방식이다(즉, 주형중 특정 뉴클레오타이드에 의존함). 많은 유용한 DNA 폴리머라제가 당업계에서 공지되어 있다. 바람직하게는, 폴리머라제는 '열안정적'인데, 이는 열, 특히 DNA 쇄의 변성을 위해 사용되는 고온에 안정한 것을 의미한다. 보다 특히 열안정적 DNA 폴리머라제는 실질적으로 본원에서 기술되는 바와 같은 PCR에서 사용되는 고온에 의해 불활성화되지 않는다.
많은 열안정적 DNA 폴리머라제는 본원에 참조문헌으로 인용된 US-A-4,965,188호(상기 언급됨) 및 US-A-4,889,818(Gelfand et al)에서 상세히 서술된 것을 포함하여, 당업계에 보고되어 있다. 특히 유용한 폴리머라제는 써머스 아쿠아티쿠스(Thermus Aquaticus), 써머스 써모필러스(Thermus thermophilus), 써머스 필리포르미스(Thermus filiformis) 또는 써머스 플라버스(Thermus flavus)와 같은 다양한 써머스 세균 종으로부터 수득한 것이다. 다른 유용한 열안정적 폴리머라제는 써머코커스 리터랄리스(Thermococcus literalis), 피로코커스 푸리오수스(Pyrococcus furiosus), 써모토가 종(Thermotoga sp.) 및 WO-A-89/06691(1989년 7월 27일자로 공개됨)에서 기술된 것을 포함하는 다양한 다른 미생물원으로부터 수득된다. 몇몇 유용한 폴리머라제는 상업적으로 구입가능하다. 상기에서 인용된 기술분야에서 언급된 바와 같이, 유기체로부터 천연적으로 존재하는 폴리머라제를 분리하는 기술 및 재조합 기술을 사용하여 유전적으로 조작된 효소를 생산하기 위한 많은 기술들이 공지되어 있다.
DNA 폴리머라제 보조 인자는 활성에 있어서 효소가 의존하는 비단백질 화합물을 말한다. 많은 상기 물질들이 망간 및 마그네슘 염을 포함하는 보조 인자로 공지되어 있다. 유용한 보조 인자는, 이에 제한되지는 않으나, 망간 및 염화마그네슘, 설페이트, 아세테이트 및 지방산염(예: 부티르산염, 카프로산염, 카프릴산염, 카프르산염 및 라우르산염)을 포함한다. 더 작은 염, 즉 클로라이드, 설페이트 및 아세테이트가 바람직하다.
dATP, dCTP, dGTP, dUTP 및 dTTP와 같은 2 이상의 데옥시리보뉴클레오타이드-5'-트리포스페이트가 PCR을 위해 또한 필요하다. 대개, dATP, dCTP, dGTP, dUTP 및 dTTP가 PCR에서 모두 사용된다. dITP 및 7-데아자-dGTP와 같은 유사체가 또한 유용하다.
항체가 약 50°C 이하 온도에서 효소 활성을 억제하고 더욱 높은 온도에서 항체가 불활성화되는, DNA 폴리머라제에 대해 특이적인 항체가 또한 본 발명의 수행에 유용하다. 상기 특성을 가진 대표적인 모노클로날 항체는 본원에 참조문헌으로 인용된, US-A-5,338,671(Scalice et al에 의해 1992년 10월 7일자로 출원됨)에 기술되어 있다. 항체 단편이 전체 분자와 동등한 성질을 가진다면 그 전체 분자 대신 사용될 수 있다.
본원에 기술된 PCR 시약은 표적 핵산의 증폭을 제공하기 위한 적당한 농도로 PCR에서 사용되고 제공된다. DNA 폴리머라제의 최소량은 일반적으로 적어도 1단위/용액 100㎕, 바람직하게는 약 4 내지 약 25단위/용액 100㎕이다. '단위'란 74°C에서 30분내에 연장되는 핵산쇄 내로 10nmol의 전체 뉴클레오타이드(dNTP)를 삽입하기 위해 필요한 효소 활성의 양으로 여기서 정의된다. 각 프라이머의 농도는 적어도 약 0.075㎛mol이고 바람직하게는 약 0.2 내지 약 1㎛mol이다. 모든 프라이머는 동일양(각각 10% 변동 범위)으로 존재한다. 보조 인자는 약 1 내지 약 15mmol의 양으로 존재하고 각 dNTP는 일반적으로 반응 혼합물중 약 0.1 내지 약 3.5mmol로 존재한다. 상기 문장에서 사용된 바와 같은, 수식어 '약'은 언급된 값의 ±10% 변동치를 의미한다.

PCR 시약은 개별적으로, 또는 임의의 적합한 완충액을 사용하는 pH 범위가 약 7 내지 약 9인 완충 용액중에 제공될 수 있다.
증폭시켜 검출할 표적 핵산은 일반적으로 이본쇄형이므로, 이 이본쇄는 프라이밍이 일어날 수 있기 전에 분리(즉, 변성)되어야만 한다. 이것은 추출 공정 동안, 그러나 바람직하게는, 이후의 분리 단계 동안 일어날 수 있다. 적합한 온도(본원에서는 '제1 온도' 또는 T_1 이라고 정의함)까지 가열하는 것이 변성을 위해 바람직한 수단이다. 일반적으로, 상기 제1 온도는 약 85 내지 약 100℃의 온도 범위이고 적합한 시간은 예를 들면, 1 내지 약 240초(바람직하게는 1 내지 약 40초)이다. 상기의 초기 변성 단계는 또한 제1 증폭 주기에 포함될 수 있다. 그러한 경우에, 변성은 제1 주기에서 더욱 길 수 있으나(예: 240초 이하) 후반 주기에서 변성 단계는 보다 훨씬 짧을 수 있다(예: 30초 이하).
다음 변성된 쇄는 반응 혼합물을 일반적으로 약 55 내지 약 70℃ 범위내 온도인 제2 온도(T_2)로 냉각시킴으로써 적절한 프라이머 셋트로 프라이밍시킬 수 있다. 냉각은 가능한 신속하게 수행하는 것이 바람직하지만, 현재의 공지되어 있는 장비를 사용하는 경우, 일반적으로 약 5 내지 약 40초, 및 더욱 바람직하게는 약 5 내지 약 20초의 시간이 경과된다.
변성된 쇄가 냉각되는 경우, PCR 시약을 함유하는 반응 혼합물을 제3 온도(T_3)에서, 일반적으로 1 내지 약 120초, 및 바람직하게는 1 내지 약 80초간 항온처리하여 프라이머 연장 생성물을 형성시킨다. 일반적으로, 제3 온도는 약 55 내지 약 74℃ 범위이며, 바람직하게는 약 62 내지 약 70℃의 범위이다.
가장 바람직한 양태에서, 제2 및 제3 온도는 동일하며 약 62 내지 약 70℃ 범위의 온도이다. 즉, 프라이밍 및 프라이머 연장 단계는 바람직하게는 동일한 단계에서 수행된다.
따라서, 증폭 주기는 상술한 변성 단계, 프라이밍(또는 어닐링) 단계 및 프라이머 연장 단계를 포함한다. 일반적으로, 본 발명을 실시하는데 있어서는 특정 사용자의 판단아래 최대의 수의 주기로 상기와 같은 증폭 주기가 15회 이상 수행된다. 대부분의 예에서는, 방법중 15 내지 50회의 증폭 주기가 사용되며 15 내지 40 주기가 바람직하다. 각각의 증폭 주기는 일반적으로 약 20초 내지 360초가 소요되며, 주기 시간은 약 30 내지 약 120초가 바람직하고 약 30 내지 약 90초가 더욱 바람직하다. 그러나, 필요하다면 더욱 길거나 짧은 주기 시간이 사용될 수 있다.
증폭 공정에서 주어진 단계에서의 시간에 관해 용어 '약'은 상기 제한 시간의 ±10%을 언급한다. 또한 온도에 관해, 용어 '약'은 ±5℃를 언급한다.
본 발명의 증폭 방법은 바람직하게는 연속식, 자동화 방식으로 수행되므로 반응 혼합물의 온도는 목적하는 횟수에 대해 주기적인 방식으로 조절된다. 당업자가 인지하고 있는 바와 같이, 다수의 장비는 이러한 목적을 위해 개발되어 왔다. 바람직하게는, 장비는 또한 제1 및 제2 증폭 주기 모두에 대해 프로그램화될 수 있을 것이다.
이러한 목적용의 장비는 US-A-4,965,188 및 EP-A-0,236,069에 어느 정도 상세히 기술되어 있다. 일반적으로, 이러한 장비는 반응 혼합물을 포함하는 반응 튜브의 수를 유지시키기 위한 가열 수행 용기, 가열, 냉각 및 온도유지용 수단, 및 증폭 서열, 온도 및 시간에 있어서의 변화를 제어하는 시그날을 발생시키는 컴퓨터 화된 수단을 포함한다. EP-A-0 402 994는 본원에서 참조로 인용한 US-A-5,089,233(Devaney, Jr. et al)에 기술된 장비를 사용하여 프로세싱될 수 있는 유용한 화학 시험 팩의 세부 사항을 기술하고 있다. 또한, 상기 문헌에는 본 발명의 방법을 수행하기에 적절한 반복된 간격(즉, 주기)을 통해 시험 팩을 가열하고 냉각시키기 위한 수단이 기술되어 있다. 유용한 PCR 프로세싱 장치에 관한 세부 사항은 당해 분야의 여러 문헌에서 입수할 수 있으며, 당업자에게 용이하게 인지될 것이다.
상술한 화학 시험 팩외에, 상기 방법은 모두 본원에서 참조로 인용되어 있는, US-A-4,902,624(Columbus et al), US-A-5,173,260(Zander et al) 및 US-A-5,229,297(Schnipelsky et al)에 상세히 기술된 바와 같은 다른 용기, 및 당업자에게 친숙한 또 다른 적합한 용기내에서 수행할 수 있다. 상기 시험 팩은 또한 본 발명의 방법중에 사용되는 다양한 시약에 대해 분리된 구획이 있는 자가-함유 시험 장치(self-contained test device)로서 공지되어 있다. 구획들은 적절하게 연결되어 있으므로 시약 및 검정 용액은 장치를 개봉하지 않고서도 적절한 시간에 포획 시약과 접촉시킬 수 있다.
증폭된 생성물의 검출은 서던 블롯 기술(참조: US-A-4,965,188, 상기 인용)을 포함하는 공지된 어떠한 방법을 사용하거나, 당해 분야에 공지되어 있는 표지된 프로브나 프라이머의 사용을 통해 달성할 수 있다.
상술한 양태와는 달리, 증폭된 생성물을 프라이머 연장 생성물중 하나와 상 보적인 표지된 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 검출할 수 있다.
본 발명의 이종 검출 시스템에 있어서, 증폭된 생성물은 몇몇 종류의 수-불용성 지지체상에 포획되며, 반응 혼합물중 다른 물질은 여과, 원심분리, 세척 또는 기타 분리 기술에 의해 적합한 방식으로 제거된다.
포획 프로브는 흡수 및 공유 결합 반응을 포함하는 공지된 부착 기술을 사용하여 수-불용성 지지체에 부착시킬 수 있다. 이와 같은 기술중 하나가 EP-A-0 439 222(1991년 9월 18일자로 공개됨)에 기술되어 있다. 다른 기술은 예를 들어, US-A-4,713,326(Dattagupta et al), US-A-4,914,210(Levenson et al) 및 EP-B-070 687(1983년 1월 26일 공개됨)에 기술되어 있다. 유용한 분리 수단은 폴 코포레이션(Pall Corporation)에서 시판하는 폴리아미드 미세공극 막과 같은 막을 통한 여과를 포함한다.
그러나, 임의의 유용한 고체 지지체도 포획 프로브 및 궁극적인 하이브리드화 생성물 부착을 위해 사용될 수 있고 미세역가 플레이트, 시험 튜브, 비이커, 자성 입자 또는 중합체성 입자, 금속, 세라믹 및 일부 명명된 유리솜을 포함하여 사용될 수 있다. 특히, 포획 프로브를 공유결합으로 부착시키는데 유용한 반응성 그룹을 지닌 자성 입자 또는 중합체성 입자가 유용한 물질이다. 상기 입자의 크기는 일반적으로 약 0.001 내지 약 10㎛이다. 상기 물질의 예에 대한 추가의 세부 사항은 본원에서 모두 참조로 인용되는 US-A-4,997,772(Sutton et al), US-A-5,147,777(Sutton et al), US-A-5,155,166(Danielson et al) 및 US-A-4,795,698(Owen et al)에 제공되어 있다.
포획 프로브는 중합체성 필름, 막, 여과지 또는 수지-피복되거나 피복되지 않은 종이와 같은 편평한 지지체에 고정시킬 수 있다. 중합체성 입자에 고정된 포획 프로브는 또한 예를 들면, 건조된 침착과 같은 적합한 방식으로 상기의 편평

한 지지체상에 고정화시키거나 열 융합 또는 접착제로 접착시킬 수 있다. 포획 프로브는 예를 들면, 본 발명의 자가-함유 시험 장치내 편평한 지지체에 고정시킬 수 있다. 상기 물질의 기타 세부 사항은 EF-A-0 408 738(1991년 1월 23일자로 공개됨), WO92/16659(1992년 10월 1일자로 공개됨) 및 US-A-5,173,260(Sutton et al)에 제공되어 있다.

포획 프로브는 적합한 지지체상에 특정 배위, 예를 들면 원형 침착물 또는 스트립(strip)의 열로 배열시킬 수 있다.

본 발명은 또한 표적 핵산이 포획 시약 없이 검출되는 '균질의' 증폭 과정으로 공지된 방법에 사용될 수 있다. 이와 같은 검정의 세부 사항은 EP-A-0 487 218(1992년 5월 27일자로 공개됨) 및 EP-A-0 512 334(1992년 11월 11일자로 공개됨)에서와 같이, 당해 분야에 공지되어 있다.

증폭 반응 조성물은 다양한 증폭 검정에 유용한 시험 키트의 개별적으로 팩키징된 성분의 하나로서 포함될 수 있다. 이 키트는 다른 시약, 용액, 장치 및 본 발명의 방법에 유용한 지침을 포함할 수 있고, 수-불용성 지지체상에 고정화된 포획 시약, 세척 용액, 용균 용액, 검출 시약 및 당업자에게 친숙한 다른 물질을 포함할 수 있다. 이외에, 시험 키트는 상술한 바와 같이 분리 팩키징된 약염기성 중 합체, 완충액, 강염기 또는 약염기 및 증폭 반응 및 표본 샘플 제조 각각 또는 모 두에 요구되는 다른 시약을 포함할 수 있다. 시험 키트는 또한 하나 이상의 다른 키트 부품을 포함하는 시험 장치를 포함할 수 있다. 이 시험 장치는 바람직하게는 당해 분야에서 이해되는 용어로서 '자가-함유'이다. 다른 키트는 본원에 기술된 약염기성 중합체 및 하이브리드화 검정에 사용되는 하나 이상의 시약(검출 또는 포획 프로브)을 포함할 수 있다.

하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위함이며, 어떠한 방식으로도 본 발명을 한정하는 것은 아니다, 모든 %는 달리 언급되지 않는한 중량 단위이다.

실시예에 있어서 재료 및 방법:

N-(3-이미다졸릴프로필)-메타크릴아미드의 제조 :

본 공정은 상기 정의한 화학식(I)의 신규한 단량체의 제조를 나타내지만, 이 제조 방법은 본 발명의 영역내 다른 단량체를 용이하게 제조할 수 있는 대표적인 방법이다.

수산화나트륨(12.8g, 0.32mole)을 함유하는 물(100ml)과 1-(3-아미노프로필)이미다졸(37.5g, 0.3mole)을 함유하는 디클로로메탄(200ml)을 혼합시켜 용매 혼합물을 제조하고, 이를 빙욕중에서 냉각시켰다. 상기 냉각된 혼합물에 디클로로메탄(I00ml)중 메타크릴로일 클로라이드(34.8g, 0.3mole)을 질소 대기하에 격렬히 교반하면서 한번에 모두 가했다. 혼합물의 온도가 약 60℃로 상승하도록 가열하고, 이 혼합물을 다시 10분간 격렬히 교반한 후, 유기층이 분리되도록 했다. 수층을 디클로로메탄(매회 100ml)으로 2회 추출했다. 합한 유기 용액(유기 용매층 및 추출물)을 포화된 염화나트륨(100ml)으로 세척하고, 무수 황산나트륨으로 건조 시키고 여과하고, 용매를 제거했다. 잔사를 클로로포름(50ml)중에 용해한 다음, 혼탁 지점에 이를때까지 에틸 에테르(50ml)를 가했다.

생성된 반응 생성물은 약 0℃에서 결정화되었으며, 여과하여 백색 고체((융점: 45 내지 46℃)를 수득했다. 수율은 70%이었다.

분석 데이타: m/e (M-193),

1H NMR(DMSO d6) 1.8(m,2H,C-CH_2-C,CH_3), 3.02(m,2H, N-CH_2),

3.95(t,2H,im-CH_2), 5.25 및 5.6(AB,2H,비닐-CH_2), 6.82 및 7.15(AB,2H,4,5-H of

im), 7.6(s,1H,2-H of im), 7.95(m,1H,NH).

단독중합체의 제조 :

본원에 기술된 신규한 단량체로부터 제조한 바람직한 단독 중합체는 2,2'-아조비스(2-메틸프로피오니트릴)(300mg)을 질소 대기하에 유지시킨, 물(90ml) 및 이소프로판올(10ml)중 N-(3-이미다졸릴프로필)메타크릴아미드(12.5g, 0.065mole)의 용액에 가하여 제조했다. 생성된 용액을 교반하면서 수욕중에서 65 내지 70℃로 3시간 가열했다. 약 1.5시간 후, 진한 HCl(3ml)을 가하고, 질소하에 잔류 시간 동안 계속 교반했다. 다음 용액을 회전 증발기상에서 약 25ml로 농축시키고, 생성된 중합체 생성물을 아세톤(4ℓ이상) 중에 침전시키고, 여과하고 탈이온수(80ml)중에 용해시켰다. 이 용액은 12%의 고체를 함유했다.

제1 공중합체의 제조 :

탈이온수(120ml) 및 이소프로판올(15ml)중의 N-(3-이미다졸릴프로필)-메타크 릴레이트(18g, 0.09mol) 및 아크릴아미드(2g, 0.028mole)의 용액에 2,2'-아조비스(2-메틸프로피오니트릴)(400mg)을 가하여 폴리[N-(3-이미다졸릴프로필)메타크릴아미드 하이드로클로라이드-코-아크릴아미드](90:10 중량비)를 제조하여 질소 대기하에 유지시켰다. 이 용액을 4시간 동안 교반하면서 65 내지 70℃로 가열한 후, 묽은 HCl을 가하여 pH를 약 2로 저하시켰다. 다시 1시간 동안 계속 교반 및 가열한후, 용액이 밤새 실온에 이르도록 방치했다.

용액을 회전 증발기로 약 75ml까지 농축시키고, 생성된 중합체를 아세톤(약 4ℓ)중에 침전시키고, 여과하여 탈이온수(150ml)중에 용해시켰다. 추가로 약 125ml까지 농축시켜 잔류 아세톤을 제거했다. 상기 중합체는 15.5%의 고체로 존재했다.

제2 공중합체의 제조 :

탈이온수(180ml) 및 에탄올(20ml)중 2-아미노에틸메타크릴레이트 하이드로클로라이드(4g, 0.02mole) 및 2-하이드록시에틸 메타크릴레이트(16g, 0.12mole)의 용액에 2,2'-아조비스(2-메틸프로피오니트릴)을 가하여 폴리[2-아미노에틸 메타크릴레이트 하이드로클로라이드-코-2-하이드록시에틸메타크릴레이트](20:80 중량비)를 제조하여, 질소

대기하에 유지시켰다. 이 용액을 4시간 동안 교반하면서 65 내지 70℃로 가열했다. 추가로 1시간 동안 계속 교반 및 가열하고, 용액이 실온에 이르도록 밤새 방치했다.
생성된 중합체를 아세톤(약 4ℓ)중에 침전시키고, 여과하고 탈이온수(150ml)중에 용해했다. 추가로 약 125ml까지 농축시켜 잔류 아세톤을 제거한다. 상기 중합체는 5.6%의 고체로 존재했다.
제3 공중합체의 제조 :
N,N-디메틸포름아미드(160ml)중 1-비닐이미다졸(10g, 0.1mole) 및 2-하이드록시에틸 메타크릴레이트(10g, 0.077mole)의 용액에 2,2'-아조비스(2-메틸프로피오니트릴)(350mg)을 가하여 폴리[1-비닐이미다졸-코-2-하이드록시에틸메타크릴레이트](50:50 중량비)를 제조한 다음, 질소 대기하에 유지시켰다. 이 용액을 7시간 동안 교반하면서 65 내지 70℃로 가열했다.
실온에서 밤새 교반한 후, 중합체를 아세톤(약 4ℓ)중에 침전시키고, 여과하고 진한 HCl(8.5ml)을 함유하는 탈이온수(200ml) 중에 용해했다. 추가로 농축시켜 잔류 아세톤을 제거했다. 상기 중합체는 12.4%의 고체로 존재했다.
제4 공중합체의 제조 :
'제3 공중합체'에서와 유사한 방식으로 폴리(1-비닐이미다졸-코-2-하이드록시에틸 메타크릴레이트)(25:75 중량비)를 제조했다. 생성된 용액은 13.7%의 고체를 포함했다.
통상적인 방법으로 써머스 아쿠아티쿠스로부터 재조합 DNA 폴리머라제를 제조하였으며, 이의 활성은 약 250,000단위/단백질(mg)이었다.
하기의 프라이머 및 프로브를 공지된 출발 물질 및 Applied Biosystems Model 380B DNA 합성기 및 표준 포스포르아미디트 화학 및 ABI 1μmole 규모, 신속한 주기 프로토콜을 사용하는 방법으로써 제조했다. 뉴클레오시드-3'-포스포르아미디트 및 유리 지지체 공극에 조절된 유도화시킨 뉴클레오시드는 Applied Biosystem에서 입수했다.
사람 사이토메갈로바이러스 DNA의 주요 캡시드 단백질 영역과 상보적인 프라이머 및 프로브는 하기와 같다:
서열 1 :
5'-X-CATTCCCACT GACTTTCTGA CGCACGT-3'
서열 2 :
5'-X-TGAGGTCGTG GAACTTGATG GCGT-3'
서열 3 :
5'-GGTCATCGCC GTAGTAGATG CGTAAGGCCT-Y-3'
마이코박테리움 튜버큘로시스(Mycobacterium tuberculosis) DNA의 65KD 항원 영역에 상보적인 프라이머 및 프로브는 하기와 같다:
서열 4 :
5'-X-GAGATCGAGC TGGAGGATCC GTACG-3'
서열 5 :
5'-X-AGCTGCAGCC CAAAGGTGTT GGACT-3'
서열 6 :
5'-CGAAATCGCT GCGGTGGCCG CAATCTGCTC-Y-3'
HIV 1 프로바이러스 DNA의 gag 영역에 상보적인 프라이머 및 프로브는 하기와 같다:
서열 7 :
5'-X-TTTGGTCCTT GTCTTATGTC CAGAATGC-3'
서열 8 :
5'-X-ATAATCCACC TATCCCAGTA GGAGAAAT-3'
서열 9 :
5'-ATCCTGGAAT TAAATAAAAT AGTAAGAATG TATAGCCCTA C-Y-3'
프라이머 서열에서, X는 본원에서 참조로 인용한 US-A-4,914,210(Levenson et al)의 교시를 사용하여 2개의 테트라에틸렌 글리콜 스페이서 단위를 통해 서열에 부착된 비오틴 포스포르아미디트 잔기(DuPont 제조원)를 나타낸다. 모든 정제는 핵산 정제 컬럼의 사용에 이은 역상 HPLC 기술을 사용하여 수행했다.
포획 프로브 서열에서, Y는 포스페이트 결합에 의해 연결된 2개의 테트라에틸렌글리콜 스페이서, 및 상기한 Levenson 등의 특허의 방법으로 제조된 3-아미노-1,2-프로판디올 잔기를 포함한다.
카피(copy)수가 적은 HIV 1 표적 프로바이러스 DNA는 통상적인 방법을 사용하여 8E5/LAV 세포주(HIV-1 게놈의 단일 통합된 카피물 함유)로부터 추출했다. 세포 용해 및 단백질 분해에 이어, 핵산을 페놀/클로로포름 추출로 정제하고, 트리스-포화된 페놀(750μℓ)을 세포 현탁액에 가한 후, 페놀/용해물 용액을 혼합하여 원심분리로 분리한다. 이후 수성 상을 새로운 2ml짜리 튜브에 이전시켰다. 이 공정을 클로로포름 이소아밀 알콜로 반복했다. 수성 층을 나트륨 아세테이트로 0.3 몰이 되게 했다. 95% 냉 에탄올을 가하여 핵산을 침전시키고, -70℃에서 1시간 동안 저장했다. 다음 HIV 1 프로바이러스 DNA의 농도를 A260에서 측정하고 실험중에 사용하기 위해 'TE' 완충액 [트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(1mmole) 및 (에틸렌디니트릴로) 테트라아세트산(0.1mmole)] 중에 카피수를 변화시킨 일련의 희석물을 제조했다. 샘플(5 내지 10μℓ)을 포획용 DNA 용액에 가했다.
특징적인 세포 변성 효과가 단일층의 90% 이상에서 명백해질 때까지 대조군 hCMV 바이러스 AD 169(ATCC VR 538)을 MRC-5(ATCC CCL 171) 세포내에서 증식시켰다. 세포 배양액을 수거하고, 최종 용량이 20%인 태아 소 혈청을 가하여, 세포를 펠렛화했다. 유리된 바이러스를 포함하는 상층액을 -80℃에서 동결시켰다. 대조군 DNA를 증폭시키기 위해, 상기 스톡 제제의 1:10의 일련의 희석물을 완충액[트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(10mmole, pH 8) 및

TWEEN ™ 20 비이온성 계면활성제(0.5%)]으로 제조했다. 다음 일련의 희석물을 5분간 비등시켜 바이러스 입자를 용해하고 이 샘플 분취량을 PCR 반응 혼합물에 가했다.
배양된 마이코박테리움 튜버큘로시스, 비독성 균주 H37Ra(ATCC 25177)을 MacFarland #1 표준물과 동일한 혼탁도가 되도록 희석시켜 엠. 튜버큘로시스를 수득했다. 이것은 대략 3x10 ^{8} 콜로니-형성 단위/ml(cfu)에 상응한다. DNA를 증폭시키기 위해, 본 스톡 제제의 1:10 일련의 희석물을 상기 정의한 완충액으로 제조했다. 이후 일련의 희석물을 30분간 비등시켜 세균을 용해했다. 표적 핵산 농도가 1.8x10 ^{4} cfu에 상응하는 것을 각각 300㎕의 반응 혼합물 중에서 사용했다.
실시예 3에 대한 임상 샘플을 그레고리 제이. 부폰 박사[참조: Dr. Gregory J. Buffone at Bayler College of Medicine, Texas Children's Hospital(Houston, Texas)]로부터 입수했다. 이 샘플을 hCMV DNA '항온처리 양성' 또는 '항온처리 음성' 여부에 대해 미리 측정했다. 또한 항온처리 양성 샘플을 가시적으로 관측되는 항온처리 양성 결과에 대해 필요한 시간의 길이로 기록했다(초기에 가시적으로 양성인 샘플은 일반적으로 더욱 항온처리가능한 바이러스를 포함하는 것으로 추정된다).
데옥시 리보뉴클레오타이드(dNTP), 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 완충액 및 동결건조시킨 소 흉선 DNA를 Sigma Chemical Co.로부터 입수했다.
ZONYL ™ FSP 음이온성 불소화된 포스페이트 에스테르 계면활성제를 DuPont사로부터 입수했다.
TWEEN ™ 20 비이온성 계면활성제는 ICI Americas, Inc.로부터 입수했다.
주지된 DNA 폴리머라제에 대해 특이적인 모노클로날 항체는 US-A-5,338,671(상기 참조)에 기술된 바와 같이 제조했다.
스트렙트아비딘-퍼옥시다제 접합 용액은 시판되는(Zymed Lahoratories, Inc.) 포스페이트 완충 염용액(25mmol 인산나트륨 및 75mmole 염화나트륨)중의 스트렙트아비딘 및 서양 고추냉이 퍼옥시다제(131ng/ml)의 접합물, 카제인(0.5%), 4'-하이드록시아세트아닐리드(10mmol) 및 머티올레이트(0.5%)를 함유했다. 최종 접합물 농도는 312ng/ml이었다.
세척 용액(pH 7.4)은 인산나트륨, 일염기성 1-수화물(25mmole), 염화나트륨(373mmole), (에틸렌디니트릴로)테트라아세트산 이나트륨염(2.5mmole), 에틸머큐리티오 살리실산 나트륨염(25㎛mole), 및 데실 나트륨 설페이트(38mmole)을 함유했다.
염료-제공 조성물(pH 6.8)은 4,5-비스(4-디메틸아미노페닐)-2-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)이미다졸 류코 염료(250㎛mole), 폴리(비닐 피롤리돈)(112mmole), 과산화수소(0.03%), 디에틸렌 트리아민펜타아세트산(100㎛mole), 3'-클로로-4'-하이드록시 아세트아닐리드(5mmole) 및 인산나트륨, 일염기성, 1-수화물(10mmole)을 함유했다.
염료 시그날 정지 수용액은 나트륨 아지드(0.1%)를 함유했다.
포획 시약은 상기 나타낸 서열 3, 서열 6 또는 서열 9의 올리고뉴클레오타이드를 하기 방식으로 폴리[스티렌-코-3-(p-비닐벤질티오)프로피온산](95:5 중량비, 1㎛의 평균 직경)의 입자에 부착시켜 제조했다. 상기 입자의 수중 현탁액을 2-(N-모르폴리노)에탄설폰산 완충액(0.1mole, pH 6)으로 2회 세척하고 대략 10% 고체가 되도록 현탁했다. 완충액(0.1mole)중에 3.33% 고체로 희석시킨, 세척된 입자 샘플(3.3ml)을 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드 하이드로클로라이드(84mg/ml의 물중 2.1ml) 및 적절한 프로브(초순수 ml당 44,440D 22㎕)와 혼합했다. 생성된 현탁액을 50°C의 수욕중에서 약 2시간 동안 간헐적으로 혼합시키면서 가열하고 원심분리했다. 입자를 (에틸렌디니트릴로) 테트라아세트산 이나트륨 염(0.001mole)을 함유하는 트리스(하이드록시메틸) 아미노메탄 완충액(0..1mole, pH 8)으로 3회 세척하고 재현탁하여 4%의 고체가 되게 했다.
PCR 반응 혼합물(100ml)은 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 하이드로클로라이드 완충액(10mmole, pH 8), 염화칼륨(50mmole), 염화마그네슘(10mmole), 젤라틴(0.01%), dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP(실시예 2와 3에서는 각각 1.5mmole 및 실시예 4에서는 각각 1.0mmole), 글리세롤(9.5%), 프라이머(달리 제시하지 않는 한 각각 0.4㎛mole), 상기 정의한 DNA 폴리머라제(16단위/100㎕), 및 상기 정의한 DNA 폴리머라제에 대해 특이적인 모노클로날 항체(실시예 2 및 4에서만 DNA 폴리머라제에 대해 50:1의 몰 비)를 함유했다.
PCR에 의한 증폭을 1회용 화학 시험 팩 또는 개개의 시약 및 용액용 챔버가 장착된 장치를 사용하여 하기 실시예 2에서 수행했다. 이 챔버 및 장치는 폴리에스테르의 시이트(0.01cm 두께)로부터 형성되었으며 폴리에틸렌(SCOTCHPAK ™ : 3M Co. 제조원)으로 피복되어 있고, 겹쳐져서 직경이 약 1.3cm인 원형의 챔버를 제공했다. 입구를 개봉하여 진공에 의해 챔버내로 도입되는 PCR 시약 혼합물을 첨가했다. 다음 입구를 가열 밀봉했다. 증폭시킨 후, 챔버의 한 구석을 절단시킨 후, 생성물을 함유하는 반응 혼합물을 생성물이 검출될 때까지 4°C에서 저장용 마이크로퓨지 튜브(microfuge tube; 0.5ml)에 이전시켰다. 본원에서 참조로 인용한 US-A-5,089,233에 상세히 기술된 통상적인 자동화 PCR 프로세서를 사용하여 PCR 프로토콜을 수행했다.
실시예 3 및 4에서의 증폭은 통상적인 Perkin Elmer ENEAMP ™ PCR System 9600 열순환기를 사용하는 0.2ml 짜리 ICROAMP ™ 반응 튜브내에서 수행했다.
PCR 증폭 프로토콜은 하기 각각의 실시예에서 기술한다.
SURECELL ™ 시험 장치를 사용하여 증폭 생성물을 검출했다. 이 장치는 Eastman Kodak Company(Clinical Diagnostics Division)에서 시판되며, 각각 LOPRODYNE ™ 미세 공극막(Pall Corp. 제조원, 5㎛의 평균 공극 크기)이 탑재된 3개의 시험 웰을 포함한다. 0.25%로 희석시킨 후, 포획 시약 각각 (1.2㎕)을 분배하고 시험 장치의 시험 웰 내 막의 한정된 영역내에서 건조시킨다. 이 시험 장치는 본원에서 참조로 인용한 US-A-4,948,561(Hinckley et al)에 상세히 기술되어 있다.
검출은 하기 방식으로 수행했다. 최종 증폭 반응 혼합물 일부(5㎕)를 완충 용액인 [트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(10mmole, pH 8), 염화칼륨(50mmole), 염화마그네슘(10mmole) 및 젤라틴(0.01%)](95㎕)와 혼합하고 95°C에서

5분간 항온처리하여 핵산을 변성시켰다. 다음 생성되는 용액을 SURECELL ™ 시험 장치에 이전시킴으로써 증폭된 표적 핵산이 50°C에서 포획 프로브에 하이브리드화될 수 있게 했다.
다음 시험 장치의 시험 웰을 55°C에서 완충 용액[인산이수소나트륨(10mmole), 염화나트륨(150mmole), 나트륨 도데실 설페이트(1%) 및 에틸렌디아민테트라아세트산(1mmole)](250μℓ, pH 7.4)으로 세척했다. 스트렙트아비딘-퍼옥시다제 접합 용액(50μℓ)을 각각의 시험 웰에 가하고 실온 에서 막을 통과하여 유동하도록 했다. 2분후, 시험 웰을 2회 세척했다.
이후 염료-제공 조성물(100μℓ)을 각각의 시험 웰에 가한 후 실온에서 2분간 항온처리했다. 염색 정지 용액(100μℓ)을 각각의 시험 웰에 가하여 염색의 진행을 중지시킨 다음, 수득된 염료 시그날을 0 내지 10(최대 밀도)의 밀도 규모로써 가시적으로 등급화했다. 기본 판독은 포획 시약이 침착되지 않은 막의 영역으로부터 수득했다.
에티디움 브로마이드(0.4mg/ml의 최종 농도)로 미리 염색시킨 아가로즈 겔(2.5%)에 증폭 생성물의 혼합물(6.75μℓ)을 가하여 겔 전기영동을 수행했다. 겔을 약 8V/cm에서 약 1시간 동안 에티디움 브로마이드(0.4mg/ml의 최종 농도)를 함유하는 전기영동 완충액(600ml)을 사용하여 전기영동했다. 완충액은 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄, 보레이트 및 에틸렌디아민테트라 아세트산의 혼합물이었다. 수득된 밴드를 통상적인 분자량의 마커와 비교하고, 생성물 밴드 강도를 0 내지 5 규모로 기록했는데(HIV 1의 경우 115-머, 엠. 투베르클로시스의 경우 383-머) 여기시 0은 검출 시그날이 없는 경우이고 5는 최대의 시그날 강도가 있는 경우이다.
다른 시약 및 물질을 업자로부터 입수하거나 시판되는 출발 물질과 통상적인 방법을 사용하여 제조했다.
실시예 1 :
약염기성 단독중합체를 사용한 DNA의 포획 및 방출
본 실시예는 폴리(1-비닐이미다졸)을 사용하여 핵산을 포획하고 방출시키는 본 발명의 실시를 예시한다.
다양한 용적의 폴리(1-비닐이미다졸)[2.4% 스톡 용액(pH 2.3)의 1:10 희석액]을 소 흉선 DNA(100μℓ, 0.5μg/μℓ)과 혼합하고, 와동시켜서 핵산 및 중합체의 침전물을 형성시켰다. 그 후, 1분 동안 원심분리했다. 추가량의 중합체(2.4% 스톡 용액중의 10μℓ)를 각각의 상층액에 가하고, 생성된 혼합물을 와동시킨 다음, 원심분리하여 제1 침전이 정량적인가를 측정했다. 표 I은 사용된 중합체의 양 및 각각의 샘플에서 관찰된 침전물의 형태를 나타낸 것이다.

표 I

중합체 용적(㎕)	제1 침전 펠릿	제2 침전 펠릿
5	거의 보이지 않음	대형
10	소형 내지 중간형	소형
25	대형	보이지 않음
50	초대형	보이지 않음

산성 조건(pH 2.3)하에서 침전이 일어나며, 중합체 스톡 용액의 1:10 희석액 50μℓ을 사용하여 거의 정량적으로 소 흉선 DNA 용액 100μℓ(0.5μg/μℓ)를 침전시킬 수 있음이 관찰되었다. 이 관찰은 또한 통상적인 겔 전기 영동 방법을 사용하여 확인되었다.
실험을 수행하여 침전물이 어떻게 가용화되고 그럼으로써 후반 사용을 위한 핵산이 어떻게 방출되는지를 조사했다. 하기 표 II는 시험된 각종 펠릿의 가용화 조건 및 생성된 펠릿의 크기를 나타낸 것이다. 가장 유용한 기술은 염기성 pH와 함께 가열하는 것(펠릿 없음)이었다. 통상적인 겔 전기영동은 염기성 pH에서, 중합체 및 핵산이 유리 물질로서 존재한다는 것을 명백히 나타냈다. 따라서, 핵산은 후속 사용, 예를 들면 PCR에 유용했다.

표 II

가용화 조건	펠릿의 크기
50㎕ NaCl(4mol)	없음
50㎕ NaOH(50mmol), 5분 동안 55℃에서 가열	소형
50㎕ NaOH(100mmol), 5분 동안 55℃에서 가열	없음
50㎕ NaOH(50mmol), 10분 동안 100℃에서 가열	없음
50㎕ NaOH(25mmol), 10분 동안 100℃에서 가열	없음
50㎕ "TE" 완충액*, 10분 동안 100℃에서 가열	대형
50㎕ 물, 10분 동안 100℃에서 가열	대형
50㎕ Zonyl™ FSP 비이온성 계면활성제(1.25%), 10분 동안 100℃에서 가열	대형
50㎕ "TW" 완충액**, 10분 동안 100℃에서 가열	대형

* 'TE' 완충액은 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 하이드로클로라이드 완충액(10mmol, pH 8)중의 에틸렌디아민테트라아세트산(1mmol)을 포함한다.
** 'TW' 완충액은 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 하이드로클로라이드 완충액(10mmol, pH 8)중의 TWEEN ™ 20 비이온성 계면활성제(0.5%)를 포함한다.
하기 표 III은 중합체(스톡 용액의 1:10 희석액 50㎕)와 소 흉선 DNA(0.5㎍/ml, 용액 중의 100㎕) 사이의 침전물 형성에 대한 pH의 효과를 나타낸 것이다. 산성 pH가 침전물(펠릿)의 형성에 의한 핵산의 효과적인 포획에 요구됨이 명백했다.

표 III

pH	펠릿의 크기
2.3	대형
3	대형
4	대형
7	투명한, 두꺼운 매스
12	거의 보이지 않음

실시예 2 :
HIV 1 프로바이러스 DNA의 포획 및 방출 및 HIV 1 DNA 및 게놈성 마이코박테리움 튜버큘로시스 DNA의 증폭
본 실시예는 비-표적 핵산의 존재하에서 표적 핵산의 포획 및 방출에 이어, 분리된 표적 핵산을 증폭시키는 본 발명의 실시를 예시한다.
소 흉선 DNA(비-표적 DNA, 250㎕, 0.5㎍/㎕)를 HIV 1 프로바이러스 DNA의 100개의 카피물의 존재 또는 부재하에서의 폴리(1-비닐이미다졸)(2.4% 용액 중의 1:10 희석액 125㎕)과 혼합하고, 와동시켜 침전물을 형성시킨 다음 1분 동안 원심 분리하여, 침전물을 분리함으로써 실험 샘플을 제조했다.
침전물은 물(25㎕)중의 수산화나트륨 용액(187.5㎕, 50mmol) 또는 수성 수산화나트륨 및 ZONYL ™ FSP 음이온성 불소화 인산염 에스테르 계면활성제(25㎕)에 재현탁시키고, 10분 동안 100°C에서 가열했다. 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄하 이드로클로라이드 완충액(37.5㎕, 0.5mol)을 각각의 용액에 가해 최종 DNA 농도가 0.5㎍/㎕이 되게 했다. 음이온성 계면활성제를 약간의 침전물에 가해 DNA의 방출 및 증폭에 대한 이의 효과를 측정했다.
각각의 생성된 혼합물(60㎕ 또는 150㎕)에 위에서 확인한 PCR 증폭 반응 혼합물(240㎕ 또는 150㎕)을 가해 최종 반응 혼합물 300㎕을 수득하고, 하기 프로토콜을 사용하여 40회의 주기 동안 증폭을 수행했다:
1) 15초 동안 95°C에서 변성(제1 주기 동안 80초), 및
2) 표적 HIV 1 프로바이러스 DNA에 대해 62°C에서 30초 동안 프라이머 어닐링 및 프라이머 연장.
엠. 튜버큘로시스 DNA(100개의 카피물)을 PCR 반응 혼합물에 직접 가하는 것만 제외하고는 유사하게 증폭시켰다[단계 2)에서 64°C에서 프라이머 연장]. 이를 약염기성 중합체로 처리하지 않았다. 이는 중합체가 비-포획된 표적 핵산의 증폭에 역효과를 미치지 않음을 입증하기 위한 것이다.
증폭 후, 2개의 방법을 사용하여 증폭된 표적 DNA의 존재를 탐지했다 :
(a) 겔 전기영동 : 각각의 증폭된 생성물 용액의 분획(12㎕)을 통상의 샘플 트랙킹 염료 4㎕에 가했다. 생성된 혼합물을 에티듐 브로마이드(0.4mg/ml 최종 농도)로 미리 염색시킨 2.5% 아가로즈 겔상에 가했다. 전기영동을 120볼트에

서 1.5시간 동안 수행했다. 겔 밴드를 자외선하에서 가시화하여 위에서 기술한 바와 같이 스코어링했다.
(b)SURECELL ™ 시험 장치를 사용한 염색 시그날을 위에서 기술한 바와 같이 수득했다.
하기 표 IV는 여러 조건하에서 몇몇 샘플에 대한 겔 전기영동 및 염색 스코어(dye color score; 염색 지수) 결과를 나타낸 것이다. 결과는 HIV 1 프로바이러스 DNA 표적 핵산이 약염기성 중합체를 사용하여 포획 및 방출시킨 후 성공적으로 증폭되었다는 것을 나타낸다. 또한, 엠. 튜버큘로시스 DNA도 증폭되었는데, 이는 반응 혼합물중의 중합체가 외래성 핵산의 증폭을 억제하지 못했다는 것을 나타낸다.
30μg 및 75μg 표적 수준에서의 염색 시그날 및 겔 전기영동 결과는 비등 또는 비등하지 않은 소 흉선 DNA(샘플 17 내지 20) 또는 비등하지 않은 사람의 태반 DNA(샘플 21 내지 23)의 동량을 사용하여 수득한 결과와 일치했다. ZONYL ™ FSP 음이온성 계면활성제의 모든 수준에서, 증폭은 심하게 억제되었고, 어떠한 검출 기술을 사용하여도 시그날은 관찰되지 않았다. 샘플 1 및 2는 HIV 1 프로바이러스 DNA(300μℓ 반응 혼합물 당 각각 24개 및 60개의 카피물)에 대한 가장 효과적인 증 폭을 입증했다.

표 IV

샘플	용적(ml)	Zonyla FSP의 최종 비율(%)	증폭된 표적 DNA	염색 시그날 스코어	겔 시그날
1	60	0	HIV1	9.0	1.5
2	150	0	HIV1	9.5	2.5
3	60	0.5	HIV1	0	0
4	150	0.5	HIV1	0	0
5	60	0.25	HIV1	0	0
6	150	0.25	HIV1	0	0
7	60	0.0125	HIV1	0	0
8	150	0.0125	HIV1	0	0
9	60	0	Mtb*	8.5	2.5
10	150	0	Mtb*	8.5	1.5
11	60	0.5	Mtb*	0	0
12	150	0.5	Mtb*	0	0
13	60	0.25	Mtb*	0	0
14	150	0.25	Mtb*	0	0
15	60	0.0125	Mtb*	0	0
16	150	0.0125	Mtb*	0	0
17	60ml 비등되지 않은 소 흉선 DNA	0	Mtb*	8.5	2.5
18	150ml 비등되지 않은 소 흉선 DNA	0	Mtb*	8.0	2.0
19	60ml 비등된 소 흉선 DNA	0	Mtb*	8.5	2.5
20	150ml 비등된 소 흉선 DNA	0	Mtb*	8.5	2.0
21	19.8ml 사람의 태반 DNA	0	Mtb*	8.5	2.5
22	60ml 사람의 태반 DNA	0	Mtb*	8.5	2.0
23	150ml 사람의 태반 DNA	0	Mtb*	8.5	2.0

* "Mtb" =마이코박테리움 튜버큘로시스

실시예 3 :
사람 사이토메갈로바이러스 DNA의 샘플 제조 및 증폭
본 실시예는 의약 센터로부터 입수한 9개의 hCMV '항온처리 양성' 및 3개의 '항온처리 음성' 소변 표본을 사용하여 본 발명의 실시를 예시한다. 또한, 본 발명 을 비이온성 계면활성제의 존재하에서 10분 동안 100°C에서 샘플을 가열하는 통상적으로 사용되는 샘플 제조 방법과 비교한다.
각각의 소변 표본의 2개의 분획(각각 150μℓ)을 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 하이드로클로라이드 완충액(10mmol, pH 8)중의 TWEEN ™ 20 비이온성 계면활성제(0.5%) 및 소 흉선 DNA(10μg)을 함유하는 완충액 용액(150μℓ)과 혼합했다.
혼합물은 각각 10분 동안 100°C에서 가열했다. 한 세트의 표본에, 약염기성 중합체인 폴리(1-비닐이미다졸)(2.4%중의 1:10 희석액, 125μℓ)을 가하여 중합체 및 핵산의 침전물을 형성시켰다. 생성된 현탁액은 14,000rpm에서 5분 동안 원심분리했다. 상층액을 버리고, 펠릿을 수산화나트륨(83μℓ,50mmol)에 재현탁시킨 다음, 100°C에서 10분 동안 가열하여, 핵산을 방출시켰다. 그 후, 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 하이드로클로라이드(7μℓ, 0.5mol pH 7)를 가하여 용액을 중화시켰다.
두번째 세트의 표본은 추가로 처리하지 않았다.
(양 세트의 처리된 표본에 대한) 각각의 용액의 분획(20μℓ)을 주지된 hCMV 프라이머를 함유하는 위에서 기술한 PC

R 시약 혼합물(80㎕)에 가하고, 다음의 프로토콜을 사용하여 40회 주기의 PCR을 수행했다 :
1) 94℃에서 30초 동안 변성, 및
2) 64℃에서 30초 동안 프라이머 어닐링 및 프라이머 연장.
실시예 2에서 기술한 포획 프로브로 염색 시그날 생성을 사용하여 증폭시킨 생성물의 검출을 수행하고, 항온처리(임상 표본 단독)에 의해 측정한 결과와 비교 했다.
제1도 및 표 V는 항온처리 결과와 비교한 양 시험의 결과를 나타낸 것이다. 본 실시예에서, 항온처리 결과와 비교한 경우, 본 발명은 89%의 감도(9개의 항온처리 양성 표본 중의 8개) 및 100%의 특이성(3개의 항온처리 음성 표본 중의 3개)을 명백히 나타냈다. 대조군 샘플 제조 방법(비이온성 계면활성제의 존재하에서의 가열)은 항온처리 결과와 비교한 경우 33%의 감도(9개의 항온처리 양성 표본 중의 3개) 및 100%의 특이성(3개의 항온처리 음성 표본 중의 3개)을 나타냈다.
본 실시예는 임상 표본에 존재할 수 있는 억제제로부터 표적 핵산을 제거하는 이점을 입증한다. 당해 기술 분야에서 사용되는 또 다른 방법은 동일한 결과를 제공하지만, 보다 지루하고 시간이 많이 걸리며 환경적으로 불안전한 방법이다.

표 V

표본	항온처리 결과(일)	염색 시그날 스코어	
		본 발명	대조군
U5	+ 14	5	0
U6	-	0	0
U15	-	0	0
U17	-	0	0
U19	+ 10	8	6
U29	+ 7	5	0
U44	+ 17	6	0
U60	+ 7	7	0
U67	+ 7	6	3
U73	+ 4	8	6
U90	+ 10	7	0
U100	+ 14	0	0
대조군-1:10,000 희석액	수득 못함	7	0
대조군-1:10^5 희석액	수득 못함	5	0
대조군-1:10^6 희석액	수득 못함	2	0
음성 대조군(물 단독)	수득 못함	0	0

실시예 4 :
표적 hCMV DNA의 포획 및 방출 및 몇몇 중합체를 사용한 증폭
본 실시예는 본 발명의 범주 내의 몇몇 약염기성 중합체를 사용하여 실시예 3과 유사하게 수행되었다.
여러 hCMV DNA 희석액(10㎕)을 1.5ml들이 미세 원심분리 튜브 중에서 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 하이드로클로라이드 완충액(10mmol, pH 8) 및 TWEEN ™ 20 비이온성 계면활성제(0.5%)를 함유하는 완충액(70㎕) 및 소 흉선 DNA(20㎕, 0.5㎍/㎕)과 와동시키면서 혼합했다. 희석시킨 중합체(100㎕, 약 0.24% 고체)를 각각의 튜브에 가하고, 생성된 혼합물을 와동시켰다.
중합체 1은 폴리[N-(3-이미다졸릴프로필)메타크릴아미드 하이드로클로라이드](12% 고체)이고, 중합체 2는 폴리[N-비닐이미다졸-코-2-하이드록시에틸 메타크릴레이트](50:50 중량비, 5.3% 고체)이고, 중합체 3은 폴리[N-(3-이미다졸릴프로필)메타크릴아미드 하이드로클로라이드-코-아크릴아미드](90:10중량%, 15.5% 고체)이었다. 표적 핵산을 함유하지 않는 음성 대조군을 유사하게 제조하고 가공처리했다. 다른 대조군은 표적 핵산을 함유하지만 증류수(100㎕)를 중합체 대신 표본과 혼합했다.
생성된 혼합물을 30초 동안 14,000rpm으로 원심분리하여 침전물을 상등액으로부터 분리하고 상등액은 제거했다. 생성된 펠릿에 완충액(100㎕, TWEEN ™ 20 비이온성 계면활성제를 함유, pH 10)을 가하고, 와동시킨 다음 5분 동안 160℃에서 가열했다.
표적 hCMV DNA 스톡 용액의 희석 수준은 다음과 같다 :

수준 1 : 1:500
수준 2 : 1:5,000
수준 3 : 1:50,000
수준 4 : 1:500,000
포획되고 방출된 표적 hCMV DNA의 증폭 및 검출은 40회의 실험 주기를 사용하여 실시예 3에서 기술한 바와 유사하게 수행했다:
1) 95℃에서 30초 동안 변성(제1 주기에서 180초), 및
2) 68℃에서 30초 동안 프라이머 어닐링 및 프라이머 연장.
결과는 제2도 및 표 VI에 나타내었다. 제2도에서, 첫번째 3개의 세트의 바는 각각의 3개의 약염기성 중합체에 대해 포획되고 이어서 증폭된 각각의 hCMV DNA 수준으로부터 본 발명에 의해 수득한 염색 스코어(dye color score; 염색지수)를 나타낸다. 마지막 세트의 바는 중합체를 사용하지 않고 핵산을 분리한 경우의 결과를 나타낸 것이다. 표 VI의 염색 스코어는 실시예 3에서 기술한 바와 같이 측정했다.
이러한 결과는 3개의 약염기성 중합체가 가장 낮은 표적 핵산 수준을 제외하 고는 증폭용 표적 핵산을 효과적으로 포획하고 방출시켰음을 나타낸다.

표 VI

샘플	중합체	희석 수준	염색 시그날 스코어
1	1	1	8
2	1	2	6
3	1	3	3
4	1	4	0
5	1	*	0
6	2	1	8
7	2	2	6
8	2	3	4
9	2	4	0
10	2	*	0
11	3	1	8
12	3	2	5
13	3	3	3
14	3	4	0
15	3	*	0
16	없음	1	0
17	없음	2	0
18	없음	3	0
19	없음	4	0
20	없음	*	0

* 대조군 = 표적 DNA 함유하지 않음
본 발명은 특히 이의 바람직한 양태와 관련하여 상세하게 기술되었으나, 본 발명의 취지 및 범위내에서 변형 및 변화가 이루어질 수 있는 것으로 이해된다.

발명의 구성 및 작용

서열 목록

(1) 일반 정보

(i) 출원인 : 존 더블유. 백쿠스

토비아스 이. 에키제

제로메 씨. 스왈츠

리차드 씨. 수톤

이그나지오 에스. 폰티셀로

존안 에이치. 커쉬너

존 비. 핀들레이

(ii) 발명의 명칭 : 약염기성 중합체를 사용한 핵산의 포획 및 선택적 방출 방법 및 이의 증폭 방법

(iii) 서열 수 : 9개

(iv) 서신 주소 :

(A) 주소 . 이스트맨 코닥 캄파니, 페이턴트 디파트먼트

(B) 가 : 343 스테이트 스트리트

(C) 시 . 로체스터

(D) 주 · 뉴욕

(E) 국 : 미국

(F) 우편 번호 . 14650-2201

(v) 컴퓨터 판독형 .

(A) 매체형 : 디스켓, 3.5inch, 1.44 MB 저장(IBM)

(B) 컴퓨터 : IBM PS/2

(C) 운영 시스템 · MS-DOS 버젼 3.3

(D) 소프트웨어 . PC-8(윈도우용 워드)

(vi) 현 출원 정보 :

(A) 출원 번호 : 지정 예정

(B) 출원일 : 지정 예정

(C) 분류 : 지정 예정

(vii) 선출원일 : 없음

(viii) 대리인 정보 ·

(A) 성명 : 턱커 제이. 라니

(B) 등록 번호 · 27,678

(C) 참조 도켓 번호 · 69627

(ix) 통신 정보 .

(A) 전화번호 : (716) 722-9332

(B) 팩시밀리 번호 : (716) 477-4646

(2) 서열 1에 대한 정보

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 27개의 뉴클레오타이드

(B) 유형 : 핵산

(C) 본쇄형 : 일본쇄

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 형태 : hCMV DNA에 대한 프라이머

(iii) 가설 : 없음

(iv) 안티-센스 : 없음

(vi) 최초 공급원 : 합성 제조

(vii) 직접적인 공급원 : 합성 제조

(x) 간행 정보 : 공지되지 않음

(xi) 서열 기술 : 서열 1

CATTCCCACT GACTTTCTGA CGCACGT 27

(3) 서열 2에 대한 정보

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 24개의 뉴클레오타이드

(B) 유형 : 핵산

(C) 본쇄형 : 일본쇄

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 형태 : hCMV DNA에 대한 프라이머

(iii) 가설 : 없음

(iv) 안티-센스 : 없음

(vi) 최초 공급원 : 합싱 제조

(vii) 직접적인 공급원 : 합성 제조

(x) 간행 정보 : 공지되지 않음

(xi) 서열 기술 : 서열 2

TGAGGTCGTG GAACTTGATG GCGT 24

(4) 서열 3에 대한 정보

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 30개의 뉴클레오타이드

(B) 유형 : 핵산

(C) 본쇄형 . 일본쇄

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 형태 : hCMV DNA에 대한 포획 프로브

(iii) 가설 · 없음

(iv) 안티-센스 : 없음

(vi) 최초 공급원 : 합성 제조

(vii) 직접적인 공급원 : 합성 제조

(x) 간행 정보 . 공지되지 않음

(xi) 서열 기술 . 서열 3

GGTCATCGCC GTAGTAGATG CGTAAGGCCT 30

(5) 서열 4에 대한 정보

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 25개의 뉴클레오타이드

(B) 유형 . 핵산

(C) 본쇄형 : 일본쇄

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 형태 : 마이코박테리움 튜버큘로시스 DNA에 대한 프라이머

(iii) 가설 : 없음

(iv) 안티-센스 : 없음

(vi) 최초 공급원 : 합성 제조

(vii) 직접적인 공급원 : 합성 제조

(x) 간행 정보 : 공지되지 않음

(xi) 서열 기술 : 서열 4

GAGATCGAGC TGGAGGATCC GTACG 25

(6) 서열 5에 대한 정보

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 25개의 뉴클레오타이드

(B) 유형 : 핵산

(C) 본쇄형 : 일본쇄

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 형태 : 마이코박테리움 튜버큘로시스 DNA에 대한 프라이머

(iii) 가설 : 없음

(iv) 안티-센스 : 없음

(vi) 최초 공급원 : 합성 제조

(vii) 직접적인 공급원 : 합성 제조

(x) 간행 정보 : 공지되지 않음

(xi) 서열 기술 : 서열 5

AGCTGCAGCC CAAAGGTGTT GGACT 25

(7) 서열 6에 대한 정보

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 30개의 뉴클레오타이드

(B) 유형 : 핵산

(C) 본쇄형 : 일본쇄

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 형태 : 마이코박테리움 튜버큘로시스 DNA에 대한 포획

프로브

(iii) 가설 : 없음

(iv) 안티-센스 : 없음

(vi) 최초 공급원 : 합성 제조

(vii) 직접적인 공급원 : 합성 제조

(x) 간행 정보 : 공지되지 않음

(xi) 서열 기술 : 서열 6

CGAAATCGCT GCGGTGGCCG CAATCTGCTC 30

(8) 서열 7에 대한 정보

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 28개의 뉴클레오타이드

(B) 유형 : 핵산

(C) 본쇄형 : 일본쇄

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 형태 : HIVI 프로바이러스 DNA 프라이머

(iii) 가설 : 없음

(iv) 안티-센스 : 없음

(vi) 최초 공급원 : 합성 제조

(vii) 직접적인 공급원 : 합성 제조

(x) 간행 정보 : 공지되지 않음

(xi) 서열 기술 : 서열 7

TTTGGTCCTT GTCTTATGTC CAGAATGC 28

(9) 서열 8에 대한 정보

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 28개의 뉴클레오타이드

(B) 유형 : 핵산

(C) 본쇄형 : 일본쇄

(D) 형태 : 선형

(ii) 분자 형태 : HIV 1 프로바이러스 DNA 프라이머

(iii) 가설 : 없음

(iv) 안티-센스 : 없음

(vi) 최초 공급원 : 합성 제조

(vii) 직접적인 공급원 : 합성 제조

(x) 간행 정보 . 공지되지 않음

(xi) 서열 기술 . 서열 8

ATAATCCACC TATCCCAGTA GGAGAAAT 28

(10) 서열 9에 대한 정보

(i) 서열 특징 :

(A) 길이 : 41개의 뉴클레오타이드

(B) 유형 : 핵산

(C) 본쇄형 : 일본쇄

(D) 형태 · 선형

(ii) 분자 형태 : HIV 1 프로바이러스 DNA 프로브

(iii) 가설 : 없음

(iv) 안티-센스 . 없음

(vi) 최초 공급원 . 합성 제조

(vii) 직접적인 공급원 : 합성 제조

(x) 간행 정보 : 공지되지 않음

(xi) 서열 기술 : 시열 9

ATCCTGGAAT TAAATAAAAT AGTAAGAATG TATAGCCCTA C 41

(57) 청구의 범위

청구항 1.

A) pH 7 미만에서, 핵산을 함유할 것으로 추정되는 용해물을 a)산성 pH에서 양성자화될 수 있고 아미노알킬, 이미다졸릴, 이속사졸릴, 피리딜, 피페리딜, 피페라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 퀴놀리닐 및 퀴나졸리닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 그룹을 갖는 수용성인 약염기성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위로 이루어지는 수용성인 약염기성 중합체(여기서, 약염기성 중합체는 산성 pH에서 양성자화될 수 있는 아민 그룹을 가진 하나 이상의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위를 포함한다)와 접촉시켜 상기 용해물에 존재하는 모든 핵산과 상기 약염기성 중합체의 수-불용성 침전물을 형성시키는 단계,
B) 상기 용해물로부터 수-불용성 침전물을 분리시키는 단계, 및
C) 단계 B)에서 분리된 침전물을 염기와 접촉시켜 용액의 pH가 7을 초과하도록 상승시킴으로써 핵산을 약염기성 중합체로부터 방출시키는 단계를 포함하는, 용해물로부터 핵산을 수득하는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 방출된 핵산을 함유하는 용액의 pH를 6 내지 9로 조정하는 단계 D)를 추가로 포함하는 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 염기가 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화리튬, 탄산나트륨, 중탄산 나트륨, 3급 아민 또는 트리스(하이드록시메틸)-아미노메탄인 방법.

청구항 4.

제1항에 있어서, 약염기성 중합체가 단계 A)에서 0.01 내지 0.5 중량%의 양으로 사용되는 방법.

청구항 5.

제1항에 있어서, 단계 C)에서 약염기를 사용하고, 이때 50 내지 125℃에서 수-불용성 침전물을 가열시킴을 수반하는 방법.

청구항 6.

제1항에 있어서, 단계 C)에서 수-불용성 침전물의 가열없이 강염기를 사용하는 방법.

청구항 7.

I) A) pH 7 미만에서, 표적 핵산을 포함할 것으로 추정되는 용해물을 a) 산성 pH에서 양성자화될 수 있고 아미노알킬, 이미다졸릴, 이속사졸릴, 피리딜, 피페리딜, 피페라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 퀴놀리닐 및 퀴나졸리닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 그룹을 갖는 수용성인 약염기성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위로 이루어지는 수용성인 약염기성 중합체(여기서, 약염기성 중합체는 산성 pH에서 양성자화될 수 있는 아민 그룹을 가진 하나 이상의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위를 포함한다)와 접촉시켜 상기 표적 핵산을 포함하여 상기 용해물에 존재하는 모든 핵산과 상기 약염기성 중합체의 수-불용성 침전물을 형성시키는 단계,

B) 상기 용해물로부터 수-불용성 침전물을 분리시키는 단계, 및

C) 단계 B)에서 분리된 침전물을 염기와 접촉시켜 용액의 pH가 7을 초과하도록 상승시킴으로써 표적 핵산을 포함한 핵산을 약염기성 중합체로부터 방출시키는 단계를 사용하여 표적 핵산을 수득하고,

II) 단계 I)에서 방출된 핵산중에 존재하는 표적 핵산을 증폭시키며,

III) 단계 II)에서 증폭된 표적 핵산을 검출함을 포함하는, 표적 핵산을 증폭 및 검출하는 방법.

청구항 8.

제7항에 있어서, 단계 C) 이후에, 방출된 핵산을 함유하는 용액의 pH를 6 내지 9로 조정하는 단계 D)를 추가로 포함하는 방법.

청구항 9.

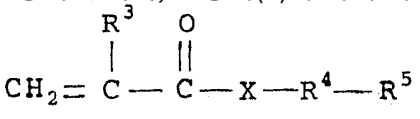
제7항에 있어서, 증폭이 열안정성 DNA 폴리머라제 및 하나 이상의 표지된 프라이머를 사용하는 폴리머라제 연쇄 반응에 의해 이루어지는 방법.

청구항 10.

제7항에 있어서, 표적 핵산 쇄에 특이적이고 이와 하이브리드화가 가능한 프라이머를 사용하여 HIV 1, HIV 2, 프로바이러스 HIV 1, 프로바이러스 HIV 2, 사이토메갈로바이러스, 마이코박테리움 종(Mycobacterium spp.), 사람 파필로마 바이러 스, 간염 바이러스, 또는 유전자 질환과 연관된 표적 핵산을 증폭 및 검출하는 방법.

청구항 11.

제7항에 있어서, 단량체(a)가 하기 화학식(I)의 화합물인 방법.



(I)

상기식에서,

R^3 는 수소 또는 메틸이고,

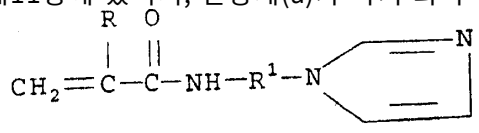
X는 옥시 또는 이미노이며,

R^4 는 쇄중 1 내지 8개의 탄소 또는 헤테로 원자를 갖고 하나 이상의 알킬렌 그룹을 포함하는 2가 탄화수소 연결 그룹이고, 단 하나 이상의 알킬렌 그룹이 존재하는 경우 이들은 하나 이상의 카보닐, 옥시, 이미노, 에스테르 또는 아미도 그룹과 작용 가능한 조합으로 R^4 에서 함께 연결되며, R4는 카보닐, 옥시, 이미노, 에스테르 또는 아미도 그룹으로 말단화될 수 있고,

R^5 는 산성 pH에서 양성자화될 수 있는 사이클릭 아민 또는 1급, 2급 또는 3급 아미노알킬 그룹이다.

청구항 12.

제11항에 있어서, 단량체(a)가 하기 화학식(II)의 화합물인 방법.



(II)

상기식에서,

R은 수소 또는 메틸이고,

R^1 은 탄소수 1 내지 3의 알킬렌이다.

청구항 13.

제7항에 있어서, 단량체(a)가 N-(3-이미다졸릴프로필)메타크릴아미드, 1-비닐이미다졸, 2-메틸-1-비닐이미다졸, 2-비닐피리딘, 1-하이드록시-6-비닐-1H-벤조트리아졸, 2-아미노에틸 메타크릴레이트 하이드로클로라이드, 2-아미노에틸아크릴레이트 하이드로클로라이드, 1-비닐피롤리디논, 3-(N,N-디메틸아미노)프로필 메타크릴레이트, 2-아미노에틸메타크릴레이트, N-(3-아미노프로필)메타크릴아미드 하이드로클로라이드, 2-비닐퀴놀린, N-(2-이미다졸릴에틸)메타크릴아미드, N-(3-이미다졸릴프로필)아크릴아미드, N-(이미다졸릴매틸)아크릴아미드, N-(1,1-디메틸-3-이미다졸릴프로필)아크릴아미드 및 이의 산 부가염으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 14.

제7항에 있어서, 약염기성 중합체가 폴리(1-비닐이미다졸), 폴리[N-(1,1-디메틸-3-이미다졸릴프로필)아크릴아미드] 또는 폴리(N-2-메틸-1-비닐이미다졸)인 방 법.

청구항 15.

i) 하나 이상의 증폭 시약을 포함하는 증폭 반응 혼합물, 및

ii) a) 산성 pH에서 양성자화될 수 있고 아미노알킬, 이미다졸릴, 이속사졸릴, 피리딜, 피페리딜, 피페라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 퀴놀리닐 및 퀴나졸리닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 그룹을 갖는 수용성인 약염기성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위로 이루어지는 약염기성 중합체를 별도의 팩키징으로 포함하는 표적 핵산의 증폭용 시험 키트.

청구항 16.

제15항에 있어서, 증폭 반응 혼합물이 하나 이상의 프라이머가 표지된 한 세트의 프라이머, 다수의 dNTP 및 열안정성 DNA 폴리머라제를 포함하는 시험 키트.

청구항 17.

제15항에 있어서, 하나 이상의 키트 성분을 포함하는 시험 장치를 포함하는 시험 키트.

청구항 18.

제15항에 있어서, 약염기성 중합체가 고체 지지체에 부착되어 있는 시험 키트.

청구항 19.

I) 세포 또는 바이러스 입자를 용해시켜 표적 핵산을 방출시키고,

II) 상기 표적 핵산에 대해,

A) pH 7 미만에서, 표적 핵산을 a) 산성 pH에서 양성자화될 수 있고 아미노 알킬, 이미다졸릴, 이속사졸릴, 피리딜, 피페리딜, 피페라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 퀴놀리닐 및 퀴나졸리닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 그룹을 갖는 수용성인 약염기성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위로 이루어지는 수용성인 약염기성 중합체(여기서, 약염기성 중합체는 산성 pH에서 양성자화될 수 있는 아민 그룹을 가진 하나 이상의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위를 포함한다)와 접촉시켜 상기 표적 핵산을 포함하여 상기 용해물에 존재하는 모든 핵산과 약염기성 중합체의 수-불용성 침전물을 형성시키는 단계,

B) 상기 용해물로부터 수-불용성 침전물을 분리시키는 단계, 및

C) 단계 B)에서 분리된 침전물을 염기와 접촉시켜 용액의 pH가 7을 초과하도록 상승시킴으로써 표적 핵산을 포함한 핵산을 약염기성 중합체로부터 방출시키는 단계를 적용시키고,

III) 추가의 pH 조정없이, 단계 II)에서 방출된 표적 핵산을 증폭시키고,

IV) 단계 III)에서 증폭된 표적 핵산을 검출함을 포함하는, 표적 핵산을 증폭 및 검출하는 방법.

청구항 20.

제19항에 있어서, 약염기성 중합체가 염기성 pH에서 수-불용성이고, 상기 방 법이 수-불용성 중합체로부터 표적 핵산의 방출 후 및 표적 핵산의 증폭 전에 수-불용성 중합체를 제거하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 21.

제1항에 있어서, 약염기성 중합체가 a) 산성 pH에서 양성자화될 수 있고 아미노알킬, 이미다졸릴, 이속사졸릴, 피리딜, 피페리딜, 피페라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 퀴놀리닐 및 퀴나졸리닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 그룹을 갖는 수용성인 약염기성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 65 중량% 내지 100 중량% 미만, 및 b) 비이온성인 친수성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 35 중량% 이하의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위로 이루어지는 방법.

청구항 22.

제1항에 있어서, 약염기성 중합체가 a) 산성 pH에서 양성자화될 수 있고 아미노알킬, 이미다졸릴, 이속사졸릴, 피리딜, 피페리딜, 피페라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 퀴놀리닐 및 퀴나졸리닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 그룹을 갖는 수용성인 약염기성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 15 중량% 내지 100 중량% 미만, 및 c) 비이온성인 소수성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 85 중량% 이하의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위로 이루어지는 방법.

청구항 23.

제1항에 있어서, 약염기성 중합체가 a) 산성 pH에서 양성자화될 수 있고 아 미노알킬, 이미다졸릴, 이속사졸릴, 피리딜, 피페리딜, 피페라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 퀴놀리닐 및 퀴나졸리닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 그룹을 갖는 수용성인 약염기성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 15 중량%, 내지 100 중량%, 미만, b) 비이온성인 친수성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체

35 중량% 이하, 및 c) 비이온성인 소수성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 85 중량% 이하의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위로 이루어지는 방법.

청구항 24.

제21항 내지 제23항 중의 어느 한 항에 있어서, 방출된 핵산을 함유하는 용액의 pH를 6 내지 9로 조정하는 단계 D)를 추가로 포함하는 방법.

청구항 25.

제21항 내지 제23항 중의 어느 한 항에 있어서, 염기가 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화리튬, 탄산나트륨, 중탄산 나트륨, 3급 아민 또는 트리스(하이드록시메틸)-아미노메탄인 방법.

청구항 26.

제21항 내지 제23항 중의 어느 한 항에 있어서, 약염기성 중합체가 단계 A)에서 0.01 내지 0.5 중량%의 양으로 사용되는 방법.

청구항 27.

제21항 내지 제23항 중의 어느 한 항에 있어서, 단계 C)에서 약염기를 사용하고, 이때 50 내지 125℃에서 수-불용성 침전물을 가열시킴을 수반하는 방법.

청구항 28.

제21항 내지 제23항 중의 어느 한 항에 있어서, 단계 C)에서 수-불용성 침전물의 가열없이 강염기를 사용하는 방법.

청구항 29.

제7항에 있어서, 약염기성 중합체가 a) 산성 pH에서 양성자화될 수 있고 아미노알킬, 이미다졸릴, 이속사졸릴, 피리딜, 피페리딜, 피페라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 퀴놀리닐 및 퀴나졸리닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 그룹을 갖는 수용성인 약염기성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 65 중량% 내지 100 중량% 미만, 및 b) 비이온성인 친수성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 35 중량% 이하의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위로 이루어지는 방법.

청구항 30.

제7항에 있어서, 약염기성 중합체가 a) 산성 pH에서 양성자화될 수 있고 아미노알킬, 이미다졸릴, 이속사졸릴, 피리딜, 피페리딜, 피페라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 퀴놀리닐 및 퀴나졸리닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 그룹을 갖는 수용성인 약염기성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 15 중량%, 내지 100 중량% 미만, 및 c) 비이온성인 소수성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 85 중량% 이하의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위로 이루어지는 방법.

청구항 31.

제7항에 있어서, 약염기성 중합체가 a) 산성 pH에서 양성자화될 수 있고 아미노알킬, 이미다졸릴, 이속사졸릴, 피리딜, 피페리딜, 피페라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 퀴놀리닐 및 퀴나졸리닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 그룹을 갖는 수용성인 약염기성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 15 중량% 내지 100 중량% 미만, b) 비이온성인 친수성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 35 중량% 이하, 및 c) 비이온성인 소수성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 85 중량% 이하의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위로 이루어지는 방법.

청구항 32.

제29항 내지 제31항 중의 어느 한 항에 있어서, 방출된 핵산을 함유하는 용액의 pH를 6 내지 9로 조정하는 단계 D)를 추가로 포함하는 방법.

청구항 33.

제29항 내지 제31항 중의 어느 한 항에 있어서, 증폭이 열안정성 DNA 폴리머라제 및 하나 이상의 표지된 프라이머를 사용하는 폴리머라제 연쇄 반응에 의해 이루어지는 방법.

청구항 34.

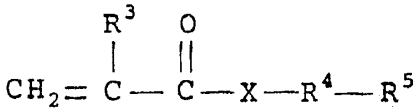
제29항 내지 제31항 중의 어느 한 항에 있어서, 표적 핵산 쇄에 특이적이고 이와 하이브리드화가 가능한 프라이머를 사용하여 HIV 1, HIV 2, 프로바이러스 HIV 1, 프로바이러스 HIV 2, 사이토메갈로바이러스, 마이코박테리움 종(Mycobacterium spp.), 사람 파필로마 바이러스, 간염 바이러스, 또는 유전자 질환과 연관된 표적 핵산을 증폭 및 검출하는 방법.

청구항 35.

제31항에 있어서, 약염기성 중합체가 20 중량% 내지 100 중량% 미만의 단량체(a), 25 중량% 이하의 단량체(b), 및 80 중량% 이하의 단량체(c)의 반복 단위로 이루어지는 방법.

청구항 36.

제29항 내지 제31항 중의 어느 한 항에 있어서, 단량체(3)가 하기 화학식(I)의 화합물인 방법.



(I)

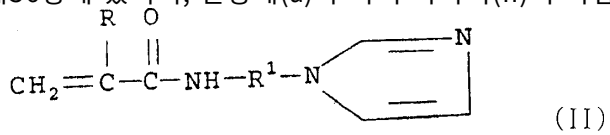
상기식에서,

R^3 는 수소 또는 메틸이고,

X는 옥시 또는 이미노이며,
R^4는 쇄중 1 내지 8개의 탄소 또는 헤테로 원자를 갖고 하나 이상의 알킬렌 그룹을 포함하는 2가 탄화수소 연결 그룹이고, 단 하나 이상의 알킬렌 그룹이 존재하는 경우 이들은 하나 이상의 카보닐, 옥시, 이미노, 에스테르 또는 아미도 그룹과 작용 가능한 조합으로 R^4에서 함께 연결되며, R^4는 카보닐, 옥시, 이미노, 에스테르 또는 아미도 그룹으로 말단화될 수 있고,
R^5는 산성 pH에서 양성자화될 수 있는 사이클릭 아민 또는 1급, 2급 또는 3급 아미노알킬 그룹이다.

청구항 37.

제36항에 있어서, 단량체(a)가 하기 화학식(II)의 화합물인 방법.



(II)

상기식에서,
R은 수소 또는 메틸이고,
R^1은 탄소수 1 내지 3의 알킬렌이다.

청구항 38.

제29항 내지 제31항 중의 어느 한 항에 있어서, 단량체(a)가 N-(3-이미다졸릴프로필)메타크릴아미드, 1-비닐이미다졸, 2-메틸-1-비닐이미다졸, 2-비닐피리딘, 1-하이드록시-6-비닐-1H-벤조트리아졸, 2-아미노에틸 메타크릴레이트 하이드로클로라이드, 2-아미노에틸아크릴레이트 하이드로클로라이드, 1-비닐피롤리디논, 3-(N,N-디메틸아미노)프로필 메타크릴레이트, 2-아미노에틸메타크릴레이트, N-(3-아미노프로필)메타크릴아미드 하이드로클로라이드, 2-비닐퀴놀린, N-(2-이미다졸릴에틸)메타크릴아미드, N-(3-이미다졸릴프로필)아크릴아미드, N-(이미다졸릴메틸)아크릴아미드, N-(1,1-디메틸-3-이미다졸릴프로필)아크릴아미드 및 이의 산부가염으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 39.

제29항 또는 제31항에 있어서, 단량체(b)가 아크릴아미드, 2-하이드록시에틸 아크릴레이트, 2,3-디하이드록시프로필 아크릴레이트, 2,3-디하이드록시프로필 메타크릴레이트, 폴리(에틸렌옥시)에틸 메타크릴레이트(2 내지 10개의 에틸렌옥시 그룹을 가짐) 및 N,N-디메틸아크릴아미드로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 40.

제30항 또는 제31항에 있어서, 단량체(c)가 메타크릴아미드, 2-하이드록시에틸 메타크릴레이트, N-t-부틸메타크릴아미드, 에틸 아크릴레이트, 메틸 메타크릴레이트, 스티렌, 비닐톨루엔, 메틸 아크릴레이트 및 부틸 아크릴레이트로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 41.

제29항에 있어서, 약염기성 중합체가 폴리[N-(3-이미다졸릴프로필)메타크릴아미드 하이드로클로라이드-코-아크릴아미드]인 방법.

청구항 42.

제30항에 있어서, 약염기성 중합체가 폴리[N-(3-이미다졸릴프로필)메타크릴아미드 하이드로클로라이드-코-2-하이드록시에틸 메타크릴레이트], 폴리(2-아미노에틸 메타크릴레이트 하이드로클로라이드-코-2-하이드록시에틸 매타크릴레이트), 또는 폴리(1-비닐이미다졸-코-2-하이드록시에틸 메타크릴레이트)인 방법.

청구항 43.

제15항에 있어서, 약염기성 중합체가 a) 산성 pH에서 양성자화될 수 있고 아 미노알킬, 이미다졸릴, 이속사졸릴, 피리딜, 피페리딜, 피페라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 퀴놀리닐 및 퀴나졸리닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 그룹을 갖는 수용성인 약염기성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 65 중량% 내지 100 중량% 미만, 및 b) 비이온성인 친수성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 35 중량% 이하의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위로 이루어지는 시험 키트.

청구항 44.

제15항에 있어서, 약염기성 중합체가 a) 산성 pH에서 양성자화될 수 있고 아미노알킬, 이미다졸릴, 이속사졸릴, 피리딜, 피페리딜, 피페라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 퀴놀리닐 및 퀴나졸리닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 그룹을 갖는 수용성인 약염기성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 15 중량% 내지 100 중량% 미만, 및 c) 비이온성인 소수성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 85 중량%, 이하의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위로 이루어지는 시험 키트.

청구항 45.

제15항에 있어서, 약염기성 중합체가 a) 산성 pH에서 양성자화될 수 있고 아미노알킬, 이미다졸릴, 이속사졸릴, 피리딜, 피페리딜, 피페라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 퀴놀리닐 및 퀴나졸리닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 그룹을 갖는 수용성인 약염기성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 15 중량% 내지 100 중량% 미만, b) 비이온성인 친수성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 35 중량% 이하, 및 c) 비이온성인 소수성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 85 중량% 이하의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위로 이루어지는 시험 키트.

청구항 46.

제43항 내지 제45항 중의 어느 한 항에 있어서, 증폭 반응 혼합물이 하나 이상의 프라이머가 표지된 한 세트의 프라이머, 다수의 dNTP 및 열안정성 DNA 폴리머라제를 포함하는 시험 키트.

청구항 47.

제43항 내지 제45항 중의 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 키트 성분을 포함하는 시험 장치를 포함하는 시험 키트.

청구항 48.

제43항 내지 제45항 중의 어느 한 항에 있어서, 약염기성 중합체가 고체 지지체에 부착되어 있는 시험 키트.

청구항 49.

제19항에 있어서, 약염기성 중합체가 a) 산성 pH에서 양성자화될 수 있고 아미노알킬, 이미다졸릴, 이속사졸릴, 피리딜, 피페리딜, 피페라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 퀴놀리닐 및 퀴나졸리닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 그룹을 갖는 수용성인 약염기성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 65 중량% 내지 100 중량% 미만, 및 b) 비이온성인 친수성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 35 중량% 이하의 부 가 중합화에 의해 유도된 반복 단위로 이루어지는 방법.

청구항 50.

제19항에 있어서, 약염기성 중합체가 a) 산성 pH에서 양성자화될 수 있고 아미노알킬, 이미다졸릴, 이속사졸릴, 피리딜, 피페리딜, 피페라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 퀴놀리닐 및 퀴나졸리닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 그룹을 갖는 수용성인 약염기성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 15 중량% 내지 100 중량% 미만, 및 c) 비이온성인 소수성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 85 중량% 이하의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위로 이루어지는 방법.

청구항 51.

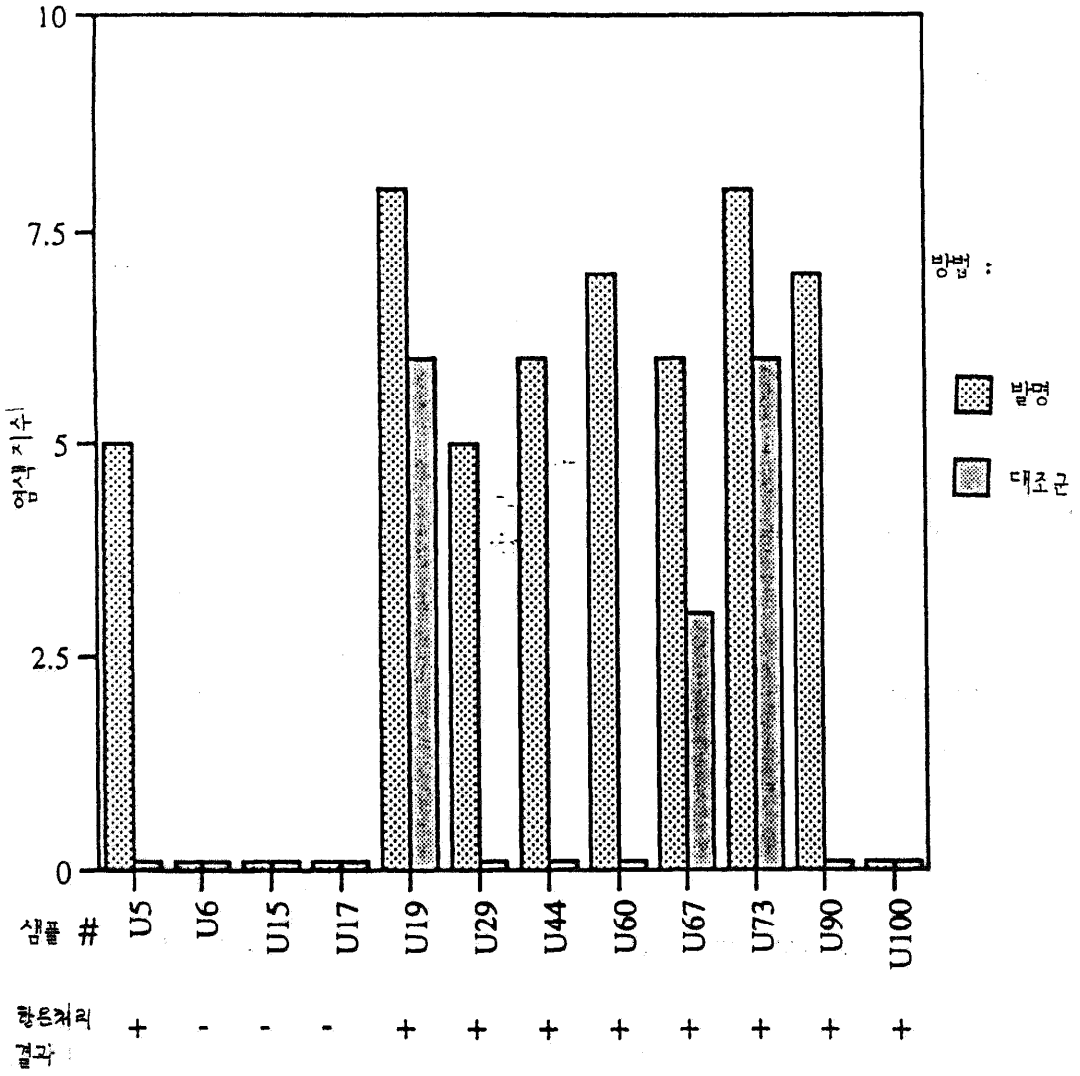
제19항에 있어서, 약염기성 중합체가 a) 산성 pH에서 양성자화될 수 있고 아미노알킬, 이미다졸릴, 이속사졸릴, 피리딜, 피페리딜, 피페라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리다지닐, 피리미딜, 피라지닐, 퀴놀리닐 및 퀴나졸리닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 그룹을 갖는 수용성인 약염기성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 15 중량% 내지 100 중량% 미만, b) 비이온성인 친수성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 35 중량% 이하, 및 c) 비이온성인 소수성의 에틸렌계 불포화된 중합성 단량체 85 중량% 이하의 부가 중합화에 의해 유도된 반복 단위로 이루어지는 방법.

청구항 52.

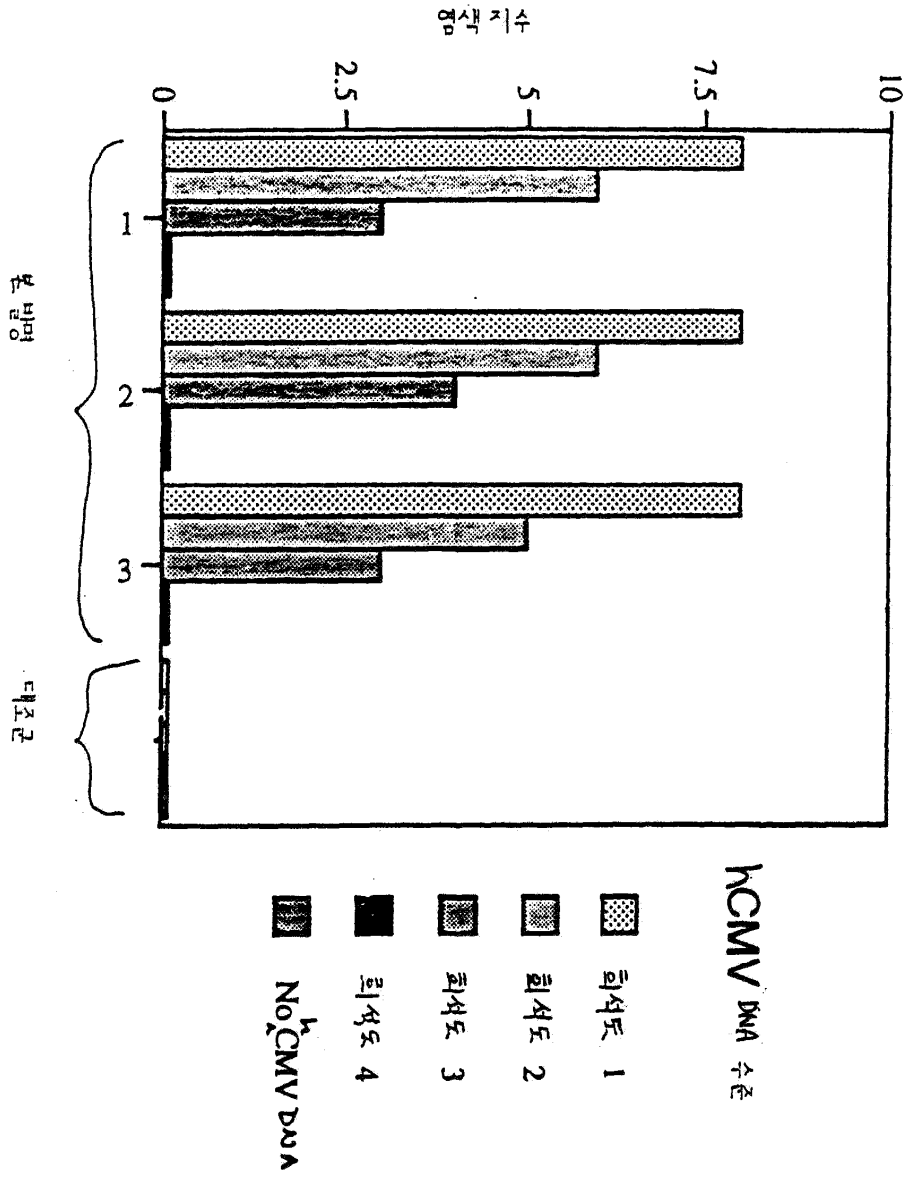
제49항 내지 제51항 중의 어느 한 항에 있어서, 약염기성 중합체가 염기성 pH에서 수-불용성이고, 상기 방법이 수-불용성 중합체로부터 표적 핵산의 방출 후 및 표적 핵산의 증폭 전에 수-불용성 중합체를 제거하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

도면

도면1


10
7.5
5
2.5
0
염색지수
범례 :
발명
대조군
샘플 #
U5
U6
U15
U17
U19
U29
U44
U60
U67
U73
U90
U100
항돈처리 결과
+
-
-
-
+
+
+
+
+
+
+
+

도면2


흡광지수
0
2.5
5
7.5
10
1
2
3
본 발명
대조군
hCMV DNA 수준
희석도 1
희석도 2
희석도 3
희석도 4
No hCMV DNA