



(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

|                     |           |             |
|---------------------|-----------|-------------|
| (51) 。 Int. Cl.     | (45) 공고일자 | 2007년03월27일 |
| C12Q 1/68 (2006.01) | (11) 등록번호 | 10-0699960  |
|                     | (24) 등록일자 | 2007년03월20일 |

|             |                   |             |                 |
|-------------|-------------------|-------------|-----------------|
| (21) 출원번호   | 10-2003-7016650   | (65) 공개번호   | 10-2004-0019312 |
| (22) 출원일자   | 2003년12월19일       | (43) 공개일자   | 2004년03월05일     |
| 심사청구일자      | 2003년12월19일       |             |                 |
| 번역문 제출일자    | 2003년12월19일       |             |                 |
| (86) 국제출원번호 | PCT/IB2002/001972 | (87) 국제공개번호 | WO 2002/103051  |
| 국제출원일자      | 2002년05월31일       | 국제공개일자      | 2002년12월27일     |

(30) 우선권주장      09/885,731      2001년06월20일      미국(US)

(73) 특허권자      인제네우스 인크.  
벨리즈 벨리즈 시티 센트럴 아메리칸 불리바드 40에이 텔로이테 코포레이트 서비스즈 내

(72) 발명자      에릭슨,글렌,에이취.  
터크스카이코스군도프로비덴시알레스피.오.박스799

다크시스,자스민,아이.  
캐나다엘4씨2엔2온타리오주리치몬드힐카티에크레센트36

칸딕,이바나  
캐나다옴6비1제이7온타리오주토론토아파트먼트906리 텔레애버뉴111

피카르드,피에르  
캐나다케이1쥐4씨5온타리오주오타와픽스레이1868

(74) 대리인      장수길  
김영

심사관 : 신경아

전체 청구항 수 : 총 38 항

## (54) 핵산 삼중체 및 사중체 형성

### (57) 요약

이중중합체성 삼중체 및 사중체와 이들의 제조 방법, 이들을 생성시키기 위한 양이온과 같은 가속화제의 용도, 이들을 검출하기 위한 형광 인터칼레이터 및 형광 프로브 결합된 비인터칼레이터의 용도를 제공한다.

### 대표도

도 1

## 특허청구의 범위

### 청구항 1.

(1) 물, 왓슨-크릭 (Watson-Crick) 이중체, 왓슨-크릭 이중체를 포함하는 다중체를 형성하기 위한 혼합된 단쇄 염기 서열 분자, 및 다중체가 형성되는 속도 또는 양을 증가시키는 가속화제를 포함하는 혼합물을 생성시키는 단계 (여기서, 상기 다중체는 삼중체 또는 사중체이고, 상기 단쇄 분자(들)은 다중체 내에 존재하는 경우 이들이 각각 염기 페어링(pairing) 규칙에 충실하게 다중체의 다른 모든 스트랜드(strand)에 관련되도록 선택되며, 상기 규칙은 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙 또는 상동 결합 염기 페어링 규칙임); 및

(2) 상기 혼합물을 인큐베이션시켜 다중체를 형성시키는 단계 (여기서, 상기 다중체의 각 스트랜드는 염기 페어링 규칙에 충실하게 다중체의 다른 모든 스트랜드에 관련됨)

를 포함하며, 단, 다중체 내에서, 단계 (1)에서 첨가된 왓슨-크릭 이중체가 G-C 함량이 10% 내지 90%인 이중중합체성(heteropolymeric)인, 핵산 다중체의 생성 방법.

### 청구항 2.

제1항에 있어서, 생성된 다중체가 삼중체이고, 단계 (1)에서 단쇄 분자의 수가 1이며, 단계 (2)에서 삼중체가 형성되는 것인, 핵산 다중체의 생성 방법.

### 청구항 3.

제1항에 있어서, 이중체가 그의 이중 나선 구조를 보유하고, 단쇄 분자가 상기 이중 나선 구조의 홈 내에 존재하는 것인, 핵산 다중체의 생성 방법.

### 청구항 4.

제3항에 있어서, 단쇄 분자가 이중체의 하나의 스트랜드에는 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 의해 관련되고, 이중체의 다른 하나의 스트랜드에는 상동 결합 염기 페어링 규칙에 의해 관련되는 것인, 핵산 다중체의 생성 방법.

### 청구항 5.

제4항에 있어서, 이중체가 그의 이중 나선 구조를 보유하고, 단쇄 분자가 상기 이중 나선 구조의 홈 내에 존재하는 것인, 핵산 다중체의 생성 방법.

### 청구항 6.

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 다중체 내에서, 단계 (1)에서 첨가된 왓슨-크릭 이중체가 G-C 함량이 10% 내지 90%인 이중중합체성이고, 또한 그 내부의 퓨린-피리미딘 다이머 및 피리미딘-퓨린 다이머를 합한 빈도수가 25%를 초과하는 것인, 핵산 다중체의 생성 방법.

#### 청구항 7.

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (1) 및 (2)를 세포 외부의 핵산 스트랜드 및 이중체를 사용하여 수행하는 것인, 핵산 다중체의 생성 방법.

#### 청구항 8.

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 혼합물이 단백질을 포함하지 않는 것인, 핵산 다중체의 생성 방법.

#### 청구항 9.

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (1)에서, 물을 부피 기준으로 혼합물의 최종 부피의 50% 이상을 차지하도록 첨가하는 것인, 핵산 다중체의 생성 방법.

#### 청구항 10.

삭제

#### 청구항 11.

삭제

#### 청구항 12.

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (2)를 수용액의 동결 온도를 넘지만 85℃ 이하인 온도에서 수행하는 것인, 핵산 다중체의 생성 방법.

#### 청구항 13.

제12항에 있어서, 단계 (2)를 5℃ 내지 30℃의 온도에서 수행하는 것인, 핵산 다중체의 생성 방법.

#### 청구항 14.

삭제

#### 청구항 15.

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (1)에서, 양이온을 가속화제로서 첨가하는 것인, 핵산 다중체의 생성 방법.

#### 청구항 16.

삭제

#### 청구항 17.

제15항에 있어서, 양이온이 50 mM 내지 125 mM의 농도로 제공되는  $\text{Na}^+$ , 10 mM 내지 45 mM의 농도로 제공되는  $\text{Mn}^{+2}$ , 10 mM 내지 45 mM의 농도로 제공되는  $\text{Mg}^{+2}$  및 20 mM의 농도로 제공되는  $\text{Ni}^{+2}$ 로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인, 핵산 다중체의 생성 방법.

### 청구항 18.

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (1)에서 인터칼레이터(intercalator)를 가속화제로서 첨가하는 것인, 핵산 다중체의 생성 방법.

### 청구항 19.

제18항에 있어서, 인터칼레이터가 형광 인터칼레이터인, 핵산 다중체의 생성 방법.

### 청구항 20.

제19항에 있어서, 형광 인터칼레이터가 시아닌 다이머, 시아닌 모노머, 에티뮴 브로마이드, 에티뮴 호모다이머-1, 에티뮴 호모다이머-2, 에티뮴 유도체, 아크리딘, 아크리딘 오렌지, 아크리딘 유도체, 에티뮴-아크리딘 헤테로다이머, 에티뮴 모노아지드, 프로피뮴 요오다이드 및 7-아미노악티노마이신 D로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인, 핵산 다중체의 생성 방법.

### 청구항 21.

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 가속화제가 비인터칼레이팅(non-intercalating) 형광단인, 핵산 다중체의 생성 방법.

### 청구항 22.

제21항에 있어서, 비인터칼레이팅 형광단이 비오틴, 로다민, Alexa 염료, BODIPY 염료, 비오틴 컨쥬게이트, 티올-반응성 프로브, 및 케이지드 (caged) 프로브, 오레곤 그린(Oregon Green), 로다민 그린(Rhodamine Green) 및 QSY 염료를 포함하는 플루오레세인 및 유도체로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인, 핵산 다중체의 생성 방법.

### 청구항 23.

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (1)에서, 가속화제가 왓슨-크릭 이중체의 마이너(minor) 홈 또는 메이저(major) 홈에 결합하는 인터칼레이터인, 핵산 다중체의 생성 방법.

### 청구항 24.

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (1)에서 가속화제가 25℃에서 액체인, 핵산 다중체의 생성 방법.

### 청구항 25.

제24항에 있어서, 단계 (1)에서 가속화제가 수용성 유기 액체인, 핵산 다중체의 생성 방법.

### 청구항 26.

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (1)에서 왓슨-크릭 이중체에 관하여 축합제(condensation agent)인 가속화제를 첨가하는 것인, 핵산 다중체의 생성 방법.

## 청구항 27.

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (1)에서 왓슨-크릭 이중체에 관하여 탈축합제(decondensation agent)인 가속화제를 첨가하는 것인, 핵산 다중체의 생성 방법.

## 청구항 28.

삭제

## 청구항 29.

제1항, 제3항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 생성된 다중체가 사중체이고, 단계 (1)에서 왓슨-크릭 이중체가 제 1 왓슨-크릭 이중체이며, 단계 (1)에서 단쇄 분자의 수가 2이고, 이들 단쇄 분자가 제2 왓슨-크릭 이중체에 존재하며, 단계 (2)에서 상기 제1 및 제2 이중체로부터 사중체가 형성되는 것인, 핵산 다중체의 생성 방법.

## 청구항 30.

삭제

## 청구항 31.

이중쇄 핵산 표적에 결합된 단쇄 프로브를 포함하는 삼중체로서, 상기 프로브가 이중중합체성 핵산 또는 이중중합체성 핵산 동족체를 포함하며, 상기 삼중체의 모든 염기 트리플렛이 A-T-A, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G 및 C-G-C로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 삼중체.

## 청구항 32.

제31항에 있어서, 이중쇄 핵산 표적이 그의 이중 나선 구조를 보유하고, 이중중합체성 핵산 또는 동족체가 상기 이중 나선 구조의 홈 내에 존재하는 것인 삼중체.

## 청구항 33.

제31항 또는 제32항에 있어서, 이중중합체성 핵산 및 동족체가 각각 G-C 함량이 10% 내지 90%인 삼중체.

## 청구항 34.

삭제

## 청구항 35.

제1 서열의 핵염기를 함유하는 제1 스트랜드;

제2 서열의 핵염기를 함유하며, 왓슨-크릭 결합에 의해 상기 제1 스트랜드와 연합되는 제2 스트랜드;

제3 서열의 핵염기를 함유하는 제3 스트랜드; 및

제4 서열의 핵염기를 함유하며, 왓슨-크릭 결합에 의해 상기 제3 스트랜드와 연합되는 제4 스트랜드를 포함하는 사중체.

### 청구항 36.

제35항에 있어서, 상기 4개의 스트랜드가 각각 G-C 함량이 10% 내지 90%인 이중중합체성인 사중체.

### 청구항 37.

제35항 또는 제36항에 있어서, (1) 제2 및 제4 스트랜드는 평행의 3'에서 5' 방향으로 정렬되고 상기 2개의 스트랜드들 사이의 결합은 상동 염기 페어링 규칙에 따르거나; 또는

(2) 제1 및 제3 스트랜드는 평행의 5'에서 3' 방향으로 정렬되고 상기 2개의 스트랜드들 사이의 결합은 상동 염기 페어링 규칙에 따르거나; 또는

(3) 제2 및 제4 스트랜드는 평행의 3'에서 5' 방향으로 정렬되고 상기 제2 및 제4 스트랜드 사이의 결합은 상동 염기 페어링 규칙에 따르며, 또한 제1 및 제3 스트랜드는 평행의 5'에서 3' 방향으로 정렬되고 상기 제1 및 제3 스트랜드 사이의 결합은 상동 염기 페어링 규칙에 따르는 것인 사중체.

### 청구항 38.

삭제

### 청구항 39.

제35항 또는 제36항에 있어서, (1) 제2 및 제4 스트랜드는 평행의 3'에서 5' 방향으로 정렬되고 상기 2개의 스트랜드들 사이의 결합은 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 따르거나; 또는

(2) 제1 및 제3 스트랜드는 평행의 5'에서 3' 방향으로 정렬되고 상기 2개의 스트랜드들 사이의 결합은 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 따르거나; 또는

(3) 제2 및 제4 스트랜드는 평행의 3'에서 5' 방향으로 정렬되고 상기 제2 및 제4 스트랜드 사이의 결합은 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 따르며, 또한 제1 및 제3 스트랜드는 평행의 5'에서 3' 방향으로 정렬되고 상기 제1 및 제3 스트랜드 사이의 결합은 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 따르는 것인 사중체.

### 청구항 40.

삭제

### 청구항 41.

제35항 또는 제36항에 있어서, (1) 제1 및 제4 스트랜드는 각각 역평행의 5'에서 3' 방향 및 3'에서 5' 방향으로 정렬되고 상기 2개의 스트랜드들 사이의 결합은 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 따르거나; 또는

(2) 제2 및 제3 스트랜드는 각각 역평행의 3'에서 5' 방향 및 5'에서 3' 방향으로 정렬되고 상기 2개의 스트랜드들 사이의 결합은 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 따르거나; 또는

(3) 제1 및 제4 스트랜드는 각각 역평행의 5'에서 3' 방향 및 3'에서 5' 방향으로 정렬되고 상기 제1 및 제4 스트랜드 사이의 결합은 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 따르며, 또한 제2 및 제3 스트랜드는 각각 역평행의 3'에서 5' 방향 및 5'에서 3' 방향으로 정렬되고 상기 제2 및 제3 스트랜드 사이의 결합은 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 따르는 것인 사중체.

#### 청구항 42.

삭제

#### 청구항 43.

제35항 또는 제36항에 있어서, (1) 제1 및 제4 스트랜드는 각각 역평행의 5'에서 3' 방향 및 3'에서 5' 방향으로 정렬되고 상기 2개의 스트랜드들 사이의 결합은 상동 염기 페어링 규칙에 따르거나; 또는

(2) 제2 및 제3 스트랜드는 각각 역평행의 3'에서 5' 방향 및 5'에서 3' 방향으로 정렬되고 상기 2개의 스트랜드들 사이의 결합은 상동 염기 페어링 규칙에 따르거나; 또는

(3) 제1 및 제4 스트랜드는 각각 역평행의 5'에서 3' 방향 및 3'에서 5' 방향으로 정렬되고 상기 제1 및 제4 스트랜드 사이의 결합은 상동 염기 페어링 규칙에 따르며, 또한 제2 및 제3 스트랜드는 각각 역평행의 3'에서 5' 방향 및 5'에서 3' 방향으로 정렬되고 상기 제2 및 제3 스트랜드 사이의 결합은 상동 염기 페어링 규칙에 따르는 것인 사중체.

#### 청구항 44.

삭제

#### 청구항 45.

제35항 또는 제36항에 있어서, 제1 스트랜드의 각각의 상호작용하는 염기가 제3 스트랜드 상의 인접 염기 및 제3 스트랜드 염기가 결합된 제4 스트랜드 상의 염기와 특이적으로 상호작용하는 것인 사중체.

#### 청구항 46.

삭제

#### 청구항 47.

제35항 또는 제36항에 있어서, 제2 스트랜드의 각각의 상호작용하는 염기가 제4 스트랜드 상의 인접 염기 및 제4 스트랜드 염기가 결합된 제3 스트랜드 상의 염기와 특이적으로 상호작용하는 것인 사중체.

#### 청구항 48.

삭제

#### 청구항 49.

삭제

#### 청구항 50.

삭제

#### 청구항 51.

삭제

## 청구항 52.

삭제

## 청구항 53.

적어도 하나의 퓨린 염기와 적어도 하나의 피리미딘 염기를 함유하는 표적 서열을 포함하는 표적 이중쇄 핵산 또는 핵산 동족체를 제공하는 단계;

핵산 서열 또는 핵산 동족체 서열을 포함하는 프로브를 제공하는 단계;

가속화제를 제공하는 단계;

상기 프로브, 표적 서열 및 가속화제를 매질에 첨가하여, 표적 서열에 결합된 프로브를 포함하는 삼중체 복합체를 함유하는 시험 시료를 제공하는 단계 (상기 복합체의 모든 염기 트리플렛은 A-T-A, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G 및 C-G-C로 이루어진 군 중에서 선택됨);

시험 시료에 여기 방사선을 조사하여 시험 시료에서 형광 방사선을 방출시키는 단계;

프로브 및 표적 서열 사이의 결합 친화도와 상관관계가 있는, 상기 형광 방사선의 강도를 검출하는 단계; 및

상기 강도로부터 프로브와 표적 서열의 매칭(matching) 정도를 결정하는 단계

를 포함하고, 이때 상기 매질이 시그날 저하제를 포함하지 않으며, 동질 분석 방법(homogeneous assay)인, 삼중체의 검출 방법.

## 청구항 54.

적어도 하나의 퓨린 염기 및 적어도 하나의 피리미딘 염기를 함유하는 표적 서열을 갖는 표적 핵산 또는 핵산 동족체를 제공하는 단계;

핵산 서열 또는 핵산 동족체 서열을 포함하는 이중쇄 프로브를 제공하는 단계;

혼성화 가속화제를 제공하는 단계;

상기 프로브, 표적 및 혼성화 가속화제를 매질에 첨가하여, 표적 서열에 결합된 프로브를 포함하는 왓슨-크릭 삼중체를 함유하는 시험 시료를 제공하는 단계;

시험 시료에 여기 방사선을 조사하여 시험 시료에서 형광 방사선을 방출시키는 단계;

프로브 및 표적 서열 사이의 결합 친화도와 상관관계가 있는, 상기 형광 방사선의 강도를 검출하는 단계; 및

상기 강도로부터 프로브와 표적 서열 사이의 매칭 정도를 결정하는 단계

를 포함하고, 이때 상기 매질이 시그날 저하제를 포함하지 않으며, 동질 분석 방법인, 삼중체의 검출 방법.

## 청구항 55.

적어도 하나의 퓨린 염기 및 적어도 하나의 피리미딘 염기를 함유하는 표적 서열을 갖는 표적 핵산 또는 핵산 동족체를 제공하는 단계;

핵산 서열 또는 핵산 동족체 서열을 포함하는 이중쇄 프로브를 제공하는 단계;

혼성화 가속화제를 제공하는 단계;

상기 프로브, 표적 및 혼성화 가속화제를 매질에 첨가하여, 표적 서열에 결합된 프로브를 포함하는 왓슨-크릭 사중체를 함유하는 시험 시료를 제공하는 단계;

시험 시료에 여기 방사선을 조사하여 시험 시료에서 형광 방사선을 방출시키는 단계;

프로브 및 표적 서열 사이의 결합 친화도와 상관관계가 있는 상기 형광 방사선의 강도를 검출하는 단계; 및

상기 강도로부터 프로브 및 표적 서열 사이의 매칭 정도를 결정하는 단계

를 포함하고, 이때 상기 매질이 시그날 저하제를 포함하지 않으며, 동질 분석 방법인, 사중체의 검출 방법.

## 명세서

### 기술분야

본 발명은 핵산 다중체, 보다 구체적으로 삼중체 및 사중체로서 이들을 생성하는 방법과 또한 특이적 핵산을 검출하기 위한 분석에서 이들을 사용하는 방법에 관한 것이다.

### 배경기술

상보적 염기 서열의 2개의 단쇄 핵산 분자들의 서로 특이적으로 결합하는 능력은 강력한 연구 및 강력한 진단 도구를 위한 기초를 제공한다. 이중쇄 표적에 결합하는 단쇄 분자의 능력 및 이중쇄 표적에 결합하는 이중쇄 분자의 능력은 상기 "통상의 혼성화"보다 덜 충분히 탐구되었다. 이중쇄 표적에 결합하는 능력은 잠재적으로 통상의 혼성화보다 더 유리하다. 이것은 이중쇄 표적은 변성되지 않아, "보다 온화한" 혼성화 조건을 허용하고 완전 랜덤 코일로 되는 경향이 더 적은 표적을 제공할 것이라는 사실로부터 일부 유래할 수 있다. 또한 염기 페어링 (base-pairing) 메카니즘이 통상의 혼성화에서와는 적어도 부분적으로 상이하여, 보다 유리한 운동역학에 대한 가능성과 혼성화 반응 혼합물에 필요한 프로브 양의 감소를 허용할 것이라는 사실로부터 일부 유래할 수 있다.

다중체를 생성하는데 있어서 선행 기술은

- 1) 박테리아 단백질 RecA 및 다른 유기체에서 유사한 기능의 단백질에 의해 매개되는 상동 재조합 과정의 일부로서 삼중체의 형성;
- 2) 계내 (in situ) 혼성화 동안 삼중쇄 구조체의 생성 (예를 들어, 미국 특허 제5,707,801호 (Bresser 등)); 및
- 3) 후그스틴형 (Hoogsteen-type) 결합에 의존하는 삼중쇄 또는 4중쇄 복합체를 포함한다.

상기 선행 기술은 다중체를 형성하기 위한 가능성을 충분히 연구하지 않았다. RecA-매개 과정은 단백질을 필요로 한다. 계내 혼성화 과정은 이중쇄 세포내 표적이 그의 이중쇄 구조를 국소적으로 개방시켜, 통상의 혼성화 원리에 따라 혼성화할 단쇄 표적을 제공할 것이라는 원리에 기초한다. 후그스틴형 중합체에 의존하는 것으로 보고된 복합체는 순수 이중중합체가 아닌 구조에 한정된다. 오히려 이들은 주어진 스트랜드가 폴리퓨린 또는 폴리피리미딘이거나 이들에 매우 유사할 것을 요구한다. 예를 들어, 문헌[Floris et al., "Effect of cations on purine-purine-pyrimidine triple helix formation in mixed-valence salt solutions," 260 Eur. J. Biochem. 801-809 (1999)]를 참조한다.

삼중체 핵산의 경우에서와 같이, 사중체 핵산에 관한 통상의 지식은 상기 특유한 구조체는 비교적 좁은 종류의 핵산에 대해 비교적 극단적인 조건하에서만 존재한다는 것이었다. 특히, Sen 등 (Nature 334: 364-366 (1988))은 구아닌-풍부 올리고뉴클레오타이드가 시험관 내에서 4중쇄 나선체로 자발적으로 자기회합될 수 있음을 개시하였다. Sen 등 (Biochemistry 31: 65-70 (1992))은 이들 4중쇄 복합체가 8, 12 또는 16 올리고머로 이루어진 초구조체로 더욱 연합될 수 있음을 개시하였다.

Marsh 등 (Biochemistry 33: 10718-10724 (1994), 및 Nucleic Acids Research 23: 696-700 (1995))은 몇몇 구아닌-풍부 올리고뉴클레오티드가 또한 갈라진 (offset) 평행 배열로 회합될 수 있어서, 긴 "G-와이어 (wires)"를 형성하는 것을 개시하였다. 상기 보다 고차 구조체는 평면으로 배열되어 후그스틴 염기 페어링을 통해 함께 유지되는 4개의 구아노신 잔기로 이루어진 G-쿼테트 (quartets)에 의해 안정화된다. Sen 등 (Biochemistry 31: 65-70 (1992))에 따르면, 올리고머 내에 적어도 3개의 인접하는 구아닌이 상기 보다 고차 구조체의 형성에 중요하다.

4중쇄 DNA가 다양한 생물학적 과정, 예를 들어 HIV-1 인테그라제의 억제 (Mazumder et al., Biochemistry 35: 13762-13771 (1996)), 감수분열 동안 시냅시스의 형성 (Sen et al., Nature 334: 364-366 (1988)) 및 텔로미어 (telomere) 유지 (Williamson et al., Cell 59: 871-880 (1989)); Baran et al., Nucleic Acids Research 25: 297-303 (1997))에서 역할을 하는 것으로 제안되었다.

구아닌-풍부 사중체의 생산을 제어하는 것이 상기 생물학적 과정을 제어하기 위한 실마리일 것임이 또한 제안되었다. 예를 들어, 미국 특허 제6,017,709호 (Hardin 등)에서는 텔로머라제 활성이 구아닌 쿼테트의 형성을 억제하는 약물을 통해 제어될 것임을 제안하였다.

미국 특허 제5,888,739호 (Pitner 등)에서는 G-쿼테트계 사중체가 핵산을 검출하기 위한 분석에서 사용될 수 있음을 개시하였다. 상보성 올리고뉴클레오티드에 혼성화시, G-쿼테트 구조체는 펼쳐지거나 선형화되어, G-쿼테트 구조체의 상이한 부분에서 공여체와 수여체 사이의 거리를 증가시켜, 그들의 상호작용을 감소시키고 구조체로부터 방출되는 시그널 (예, 형광)에서 검출가능한 변화를 일으킨다.

미국 특허 제5,912,332호 (Agrawal 등)에서는 합성 올리고뉴클레오티드의 정제 방법을 개시하였으며, 여기서 합성 올리고뉴클레오티드는 목적하는 전장 올리고뉴클레오티드와 특이적으로 혼성화하고 동시에 멀티머 집합체, 예를 들어 사중체 DNA를 형성한다. 이어서 정제시킬 올리고뉴클레오티드를 함유하는 멀티머 집합체를 크기-배제 기술을 이용하여 분리시킨다.

상기한 발전에도 불구하고, 사중체 핵산의 완전한 잠재력은 충분히 이해되거나 충분히 연구되지 않고 있다.

이중쇄 표적을 사용하여 혼성화형 실험을 수행하는 문제에 이들을 검출하는 수단이 관련된다. 수십년 동안 핵산을 검출하고 정량하기 위해 형광 염료가 사용되어 왔다. 가장 기본적인 형태에서, 형광 강도계 분석은 일반적으로 표적을 형광단-함유 프로브와 접촉시키고, 결합된 프로브로부터 임의의 비결합 프로브를 제거하고, 세척된 시료에서 형광을 검출하는 것을 포함한다. 동질 분석은 세척 단계 또는 비액상 지지체의 공급을 필요로 하지 않는다는 점에서 상기 기본 분석을 개선시킨다.

예를 들어, 미국 특허 제5,538,848호 (Livak 등)과 제4,220,450호 (Maggio)에서는 용액 내에서 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하는 뉴클레오티드 서열의 동질 형광계 분석을 개시하였다. 그러나, 상기 특허들은 혼성화된 프로브 및 혼성화되지 않은 프로브에 의해 생성된 시그널을 식별하기 위해 리포팅제 (reporting agent)와 조합하여 저하제 (quenching agent)의 사용을 요구한다. Livak 등은 또한 개시된 방법에서 효소의 사용을 요구한다. 저하제 및 효소는 방법을 복잡하게 하고 비용을 증가시킨다.

미국 특허 제5,332,659호 (Kidwell)에서는 적어도 2개의 형광단 잔기를 포함하는 프로브를 사용하여 용액 중에서 뉴클레오티드 서열을 검출하는 방법을 개시하였다. 형광단은 그들의 스펙트럼의 파장 의존성을 변화시키도록 충분히 근접할 때 서로 전자적으로 상호작용하도록 선택되어야 한다. 혼성화되지 않은 프로브는 표적 서열에 혼성화된 프로브보다 훨씬 더 유연하며, 따라서 프로브가 혼성화될 때보다 프로브가 혼성화되지 않을 때 각 프로브 상의 2개의 형광단 잔기가 서로 보다 더 근접하는 경향이 있다. 따라서, 유리 프로브와 관련된 방출 파장의 변화를 시료 중의 유리 프로브의 양의 표지로서 모니터링할 수 있다.

미국 특허 제5,846,729호 (Wu 등)에서는 또한 핵산을 검출하기 위한 동질 형광계 분석을 개시하였다.

형광 강도를 검출하는 상기 언급한 방법 이외에, 몇몇은 형광 편광 분석의 잇점을 예상하였다. 그러나, 편광계 분석에는 심각한 단점이 있다. 결합의 함수로서 편광의 변화 정도는 예측될 수 없으며, 모순된 데이터를 이론적인 기대값에 일치시키도록 데이터를 해석하는 것은 특히 자동화될 때 분석적 방법에서 바람직한 것보다 더 많은 노력을 요구할 수 있다. 그 운동이 형광 편광 분석으로 평가되는 분자의 분자량이 또한 제한된다.

본 발명은 다양한 중요한 실시태양에서 삼중체 및 사중체를 검출하기 위한 목적에서 형광 분자의 특성을 이용할 것이다.

본원에 인용한 모든 참조문은 그 전문을 참고로 본원에 포함시킨다.

## <발명의 개요>

### 다중체의 생성 방법

하나의 일반적인 측면에서, 본 발명은 핵산 다중체의 생성 방법에 관한 것이며, 상기 방법은

1) 물, 왓슨-크릭 (Watson-Crick) 이중체, 왓슨-크릭 이중체를 포함하는 다중체를 형성하기 위해 충분한 수의 단쇄 혼합된 염기 서열 분자, 및 다중체 형성의 속도 또는 양을 증가시키는 가속화제를 포함하는 혼합물을 생성시키는 단계 {상기 다중체는 삼중체 또는 사중체이고, 상기 단쇄 분자(들)은 다중체 내에 존재하는 경우 이들이 각각 염기 페어링 규칙에 충실하게 다중체의 다른 모든 스트랜드에 관계되도록 선택되며, 상기 규칙은 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙 또는 상동 결합 염기 페어링 규칙임}; 및

2) 상기 혼합물을 인큐베이션시켜 다중체를 형성시키는 단계 (상기 다중체의 각 스트랜드는 염기 페어링 규칙에 충실하게 다중체의 다른 모든 스트랜드에 관련되며; 단, 다중체 내에서, 단계 (1)에서 첨가된 왓슨-크릭 이중체는 G-C 함량이 10% 내지 90%인 이중중합체성이다)를 포함한다.

상기 방법의 하나의 특정 측면에서, 생성된 다중체는 삼중체이고, 단계 (1)에서 단쇄 분자의 충분한 수는 1이며, 단계 (2)에서 삼중체가 형성된다. 상기 방법의 특정 실시태양에서, 삼중체에서 단쇄 분자는 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 의해 이중체의 하나의 스트랜드에 관련되고, 상동 결합 염기 페어링 규칙에 의해 이중체의 제2 스트랜드에 관련된다. 추가의 특정 실시태양에서, 이중체는 실질적으로 그의 이중 나선 구조를 보유하고 단쇄 분자 잔기는 상기 이중 나선 구조의 홈(groove) 내에 존재한다. 상기 모든 삼중체는 또한 본 발명의 측면을 형성한다.

상기 방법의 다른 특정한 측면에서, 생성된 다중체는 사중체이고, 단계 (1)에서 왓슨-크릭 이중체는 제1 왓슨-크릭 이중체이며, 단계 (1)에서 단쇄 분자의 충분한 수는 2이며, 이들 단쇄 분자는 제2 왓슨-크릭 이중체에 존재하며, 단계 (2)에서 상기 제1 및 제2 이중체로부터 사중체가 형성된다. 바람직하게는, 단계 (1)은 제2 왓슨-크릭 이중체 내에 이미 존재하는 2개의 단쇄 분자를 사용하여 수행된다.

### 삼중체의 검출 방법

삼중체의 생성 방법은 삼중체가 검출되는 추가의 단계 (3)을 추가함으로써 삼중체의 검출 방법이 되도록 변형시킬 수 있다.

### 사중체의 검출 방법

사중체의 생성 방법은 사중체가 검출되는 추가의 단계 (3)을 추가함으로써 사중체의 검출 방법이 되도록 변형시킬 수 있다.

### 삼중체

다른 일반적인 측면에서, 본 발명은 이중체 핵산 표적에 결합된 단쇄 프로브를 포함하는 삼중체 (삼중체 복합체)에 관한 것이고, 여기서 상기 프로브는 이중중합체성 핵산 또는 이중중합체성 핵산 동족체를 함유하며, 상기 삼중체의 모든 염기 트리플렛은 A-T-A, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G 및 C-G-C로 이루어진 군 중에서 선택된 것이다.

### 사중체

다른 측면에서, 본 발명은 사중체인 다중체 구조에 관한 것이고, 상기 사중체는

제1 서열의 핵염기를 함유하는 제1 스트랜드;

제2 서열의 핵염기를 함유하는, 왓슨-크릭 결합에 의해 상기 제1 스트랜드와 연합되는 제2 스트랜드;

제3 서열의 핵염기를 함유하는 제3 스트랜드; 및

제4 서열의 핵염기를 함유하는, 왓슨-크릭 결합에 의해 상기 제2 스트랜드 및 제3 스트랜드와 연합되는 제4 스트랜드를 포함한다.

## 실시예

### <발명의 상세한 설명>

#### 용어 및 정의

각각의 뉴클레오타이드의 일부를 형성하는 염기에 대한 1문자 부호는 A: 아데닌; T: 티민; G: 구아닌; C: 시토신; U: 우라실이다. 이들 문자는 또한 각각의 뉴클레오타이드를 나타내도록 사용된다.

이중체의 G-C 함량은 G-C 염기쌍의 수를 G-C 염기쌍의 수와 A-T (또는 A-U) 염기쌍의 수의 합으로 나눈 값에 100을 곱한 값이며, 백분율 (예, 20%)로 표시된다.

가속화제는 본원에서 "상기 삼중체 또는 사중체 형성의 속도 또는 양을 증가시키는" 것으로서 이해된다. 속도는 각각 상이한 시점에서 2회 측정으로 얻을 수 있다. 양은 형성된 삼중체 또는 사중체의 수를 의미한다.

용어 "가속화제"는 프로모터 (promoter)가 구체적으로 유전자 프로모터를 의미하는 경우를 제외하고는 용어 "프로모터" 및 "프로모터 물질"과 상호교환가능하게 사용된다.

용어 핵산, 삼중체, 사중체 등은 왓슨-크릭 이중체 및 본원에서 형성된 삼중체와 사중체와 같은 유사한 구조체를 형성할 수 있는 DNA, RNA 및 이들의 동족체를 포함하는 분자를 의미하는 것으로 의도된다.

"핵염기"는 염기 A, U, G, C, T와 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 따를 수 있는 동족체를 의미한다.

A, U, G, C 및 T의 동족체는 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 따를 수 있는 동족체이다.

왓슨-크릭 이중체는 2개의 스트랜드가 5'→3' 방향이 반대인 역평행(antiparallel)으로 존재하는 2쇄 분자 또는 분자 세그먼트이다. 이중체의 전체 구조는 이중 나선의 전체 구조이다. 스트랜드는 수소 결합 및 소수성 상호작용에 의해 함께 유지된다. 염기쌍 상보성이 존재하며, A는 2개의 수소 결합으로 T와 쌍을 이루고 (또는 RNA의 경우, A는 U와 쌍을 이루며), G는 3개의 수소 결합으로 C와 쌍을 이룬다. 결과적으로, 염기 페어링 규칙은 A는 T와 쌍을 이루고, A는 U와 쌍을 이루며, G는 C와 쌍을 이룬다는 것이다.

3쇄 핵산 분자는 반드시 삼중체인 것은 아니며, 3쇄 분자의 임의의 세그먼트가 삼중체일 필요도 없다. 임의의 스트랜드가 그 스트랜드의 어떠한 구역에서도 하나 초과와 다른 스트랜드에 결합되지 않는 것도 가능하다. 간단한 예는 스트랜드 1 및 2가 줄기를 형성하고, 스트랜드 1 및 3이 좌측 상부 가지를 형성하며, 스트랜드 2가 단쇄 우측 상부 가지를 형성하는 Y자형 분자일 것이다.

삼중체의 예는 하나의 스트랜드 (임으로 스트랜드 1로 명명함)가 스트랜드 2 및 스트랜드 3 모두와 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙 (A-T, A-U 및 G-C)에 따르는 삼중체 핵산 분자 또는 분자 세그먼트이다. 스트랜드 1 및 2는 왓슨-크릭 이중체의 또는 그와 근접한 구조를 형성한다. 스트랜드 3은 상기 이중체의 메이저 홈 내에 존재한다. 상기 삼중체의 예는 본원에 참고로 포함시킨 문헌[V.B. Zhurkin et al, J. Mol. Biol., (1994) vol. 239, 181-200 (특히 도 2 참조)]에 상세히 설명된 것이다. 상기 삼중체의 안정화의 일부로서, 스트랜드 3은 염기 페어링 규칙에 의해 다음과 같이 다른 2개의 스트랜드에 결합된다:

스트랜드 3 상의 A는 스트랜드 1 상의 A 및 스트랜드 2 상의 T 모두와 쌍을 이루고;

스트랜드 3 상의 G는 스트랜드 1 상의 G 및 스트랜드 2 상의 C 모두와 쌍을 이루며;

스트랜드 3 상의 C는 스트랜드 1 상의 C 및 스트랜드 2 상의 G 모두와 쌍을 이루며;

스트랜드 3 상의 T는 스트랜드 1 상의 T 및 스트랜드 2 상의 A 모두와 쌍을 이룬다. 이들 염기 페어링 규칙은 쥘리킨 (Zhurkin) 모델의 어떤 변형체 (C 또는 C+ 또는 C', T 또는 T')가 고려되든지 무관하게 만족된다.

용어 "염기 페어링 규칙"은 두 핵산 분자들이 특이성을 가지면서 서로 결합되는 경우 하나의 핵산 분자와 다른 핵산 분자 사이의 특이성을 정의하는 것이다. 그 예로는 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙 (G-C 및 A-T 또는 A-U)과 상동 결합 염기 페어링 규칙 (A-A, T-T, G-G, C-C, U-U)이 있다.

이중체의 "탈축합"은 이중체의 총 나선 반복 길이의 증가로서 정의된다. 예를 들어, 이중체의 B 형태는 10개 염기쌍의 총 나선 반복 길이를 갖고; 106°의 탈축합은 반복 길이를 13개 염기쌍으로 만든다.

PNA는 DNA 및 RNA의 폴리아미드 동족체를 나타낸다 (예를 들어, 미국 특허 제5,539,082호 (Nielsen 등)을 참조한다).

#### 발명의 구체적인 실시태양 및 대체 형식

발명의 개요부에 설명된 본 발명은 관심있는 구체적인 실시태양과 바람직한 실시태양을 포함한다. 상기 실시태양은 본원 전체에서 설명된다. 그러나, 편의상, 많은 실시태양을 본 섹션에 요약한다. 유사하게, 발명의 개요부에 요약된 바와 같은 본 발명은 본 발명의 몇몇 변화를 표현하지만 본질적인 발명에 대해 실질적인 중복을 보유하는 대체적인 양식으로 설명될 수 있다. 상기 본 발명의 대체 형식도 또한 본 섹션에 포함된다.

#### (A) 다중체의 제조 방법

발명의 개요부에 일반적으로 설명된 삼중체 또는 사중체의 형성 방법은 임의로 하나 이상의 하기 조건을 방법 내에 포함시킴으로써 수행될 수 있다:

다중체 내에서, 단계 (1)에서 첨가된 왓슨-크릭 이중체는 G-C 함량이 25% 내지 75%인 이중중합체성이고;

다중체 내에서, 단계 (1)에서 첨가된 왓슨-크릭 이중체는 G-C 함량이 10% 내지 90%인 이중중합체성이며, 또한 그 내부의 퓨린-피리미딘 다이머 및 피리미딘-퓨린 다이머의 합한 빈도는 25%를 초과하며 (다이머는 서열의 5' 말단에서 시작하여 3' 말단에 도달할 때까지 한번에 하나의 염기로 진행하는 것으로 확인된다; 예를 들어, 서열 5'-AAAGGGT는 하나의 퓨린-피리미딘 다이머 (GT)를 갖고 피리미딘-퓨린 다이머를 갖지 않으며 - 이들의 합한 빈도는 1/6이다);

단계 (1) 및(또는) (2)를 세포 내에 존재하지 않는 (또한 바이러스 내에 존재하지 않는) 핵산 스트랜드 및(또는) 이중체를 사용하여 수행하며;

단계 (2)를 단백질 (예를 들어 recA 또는 유사한 기능의 단백질)의 도움 없이 수행하며;

단계 (1)에서, 물을 부피 기준으로 혼합물의 최종 부피의 적어도 50%를 차지하도록 첨가하며 (보다 바람직하게는 최종 부피의 적어도 80%, 가장 바람직하게는 단계 (1)에서 물은 혼합물에 첨가되는 유일한 액체이다);

단계 (1)에서, 임의의 단백질을 첨가하지 않으며;

단계 (2)를 수용액의 동결 온도를 넘지만 85°C 이하인 온도(들) (보다 바람직하게는 5°C 내지 30°C, 가장 바람직하게는 15°C 내지 25°C)에서 수행하며;

단계 (1)에서, 음이온 또는 보다 바람직하게는 양이온을 가속화제 (1가, 2가 또는 다가; 예를 들어, 금속 양이온 또는 양이온성 펩티드)로서 첨가하며; 여기서, 상기 양이온은 알칼리 금속 양이온, 알칼리 토금속 양이온, 전이금속 양이온, Co (NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>3+</sup>, 3가 스페르미딘 및 4가 스페르민으로 이루어진 군 중에서 선택된 적어도 하나의 양이온이고;

상기 양이온은 50 mM 내지 125 mM의 농도로 제공된 Na<sup>+</sup>이며;

상기 양이온은 10 mM 내지 45 mM의 농도로 제공된  $Mn^{+2}$ , 10 mM 내지 45 mM의 농도로 제공된  $Mg^{+2}$  및 20 mM의 농도로 제공된  $Ni^{+2}$ 로 이루어진 군 중에서 선택되며;

단계 (1)에서 인터칼레이터(특히 형광 인터칼레이터; 바람직하게는 비스-인터칼레이터)를 가속화제로서 첨가하며;

단계 (1)에서 상기 가속화제는 시아닌 모노머 및 다이머 (예를 들어, YOYO-1, TOTO-1, YOYO-3, TOTO-3, POPO-1, BOBO-1, POPO-3, BOBO-3, LOLO-1, JOJO-1, YO-PRO-1, TO-PRO-1, YO-PRO-3, TO-PRO-3, TO-PRO-5, PO-PRO-1, BO-PRO-1, PO-PRO-3, BO-PRO-3, LO-PRO-1, JO-PRO-1, SYTO 염료, SYBR Green 1, SYBR 염료, Pico Green 및 SYTOX 염료, 이들 모두는 인비트로진 코퍼레이션(Invitrogen Corp.)의 분자 프로브스 디비전 (Molecular Probes division)으로부터 구입가능함), 에티뮴 브로마이드, 에티뮴 호모다이머-1, 에티뮴 호모다이머-2, 에티뮴 유도체, 아크리딘, 아크리딘 오렌지, 아크리딘 유도체, 에티뮴-아크리딘 헥테로다이머, 에티뮴 모노아지드, 프로피디움 요오다이드 및 7-아미노악티노마이신 D로 이루어진 군 중에서 선택된 인터칼레이팅 형광단이며;

단계 (1)에서 상기 가속화제는 비인터칼레이팅 형광단 (특히 비오틴, 로다민, Alexa 염료, BODIPY 염료, 비오틴 컨쥬게이트, 티올-반응성 프로브, 플루오레세인 및 유도체 ("케이지드 (caged)" 프로브 포함), Oregon Green, Rhodamine Green, QSY 염료로 이루어진 군 중에서 선택된 하나)이며, 상기 강도는 삼중체 또는 사중체의 형성과 역상관관계에 있으며;

단계 (1)에서 상기 가속화제는 상기 제1 스트랜드, 제2 스트랜드, 제3 스트랜드 및 제4 스트랜드 중 적어도 하나에 속박되며;

단계 (1)에서 왓슨-크릭 이중체의 마이너 홈 (또는 2개의 왓슨-크릭 이중체 중 적어도 하나)에 결합하는 인터칼레이터인 가속화제를 첨가하며;

단계 (1)에서 25°C에서 액체인 가속화제 (특히 물에 가용성이 유기 액체, 예를 들어 디메틸 포름아미드, 에탄올 및 글리세롤)를 첨가하며;

단계 (1)에서 하나 이상의 가속화제를 첨가하며;

단계 (1)에서 왓슨-크릭 이중체에 관하여 축합제 또는 탈축합제인 가속화제를 첨가하며;

단계 (1)에서 A, T, U, C 또는 G의 동족체인 가속화제를 첨가하며;

단계 (1)에서 렉틴 및 다당체로 이루어진 군 중에서 선택된 가속화제를 첨가하며;

단계 (1) 및 (2)에서, 혼합물을 약 5 내지 약 9의 pH로 완충시키며;

적어도 하나의 C-G-C 또는 G-C-G 염기 트리플렛 내의 하나의 시토신은 양전하로 대전되며;

각 C-G-C 및 G-C-G 염기 트리플렛 내의 하나의 시토신은 양전하로 대전되며;

단계 (2)에서, 인큐베이션 시간은 약 2시간 이내이며 (보다 바람직하게는 1시간 이내, 또한 두 시간 기준 내에서 바람직하게는 가능한 다중체의 적어도 25%, 보다 바람직하게는 적어도 50%가 형성된다);

상기 적어도 하나의 가속화제는, 비인터칼레이팅 방식으로 결합하고 적어도  $10^3 M^{-1}$ 의 회합 상수로 결합하는 마이너 홈 핵산 결합 분자이며;

여기서 다중체는 전기 회로의 일부이다 (별법으로, 본 발명은 다중체 구조를 포함하는 전기 회로이다).

당업계의 통상의 숙련인에게 상기한 특정 조건이 하기 사중체의 제조 방법에도 또한 적용되는 것이 명백할 것이다.

대안으로 설명된 방식에서, 사중체의 형성 방법은

(1) 제1 스트랜드, 제2 스트랜드, 제3 스트랜드, 제4 스트랜드, 물, 완충액 및 적어도 하나의 가속화제를 포함하는 혼성화 매질을 제공하는 단계; 및

(2) 다중체 구조를 제공하기 위해 제2 스트랜드를 제4 스트랜드에 혼성화시키기에 효과적인 인큐베이션 시간 동안 상기 혼성화 매질을 인큐베이션시키는 단계를 포함하며, 여기서, 상기 다중체 구조는:

제1 서열의 핵염기를 함유하는 제1 스트랜드;

제2 서열의 핵염기를 함유하는, 왓슨-크릭 결합에 의해 제1 스트랜드와 연합되는 제2 스트랜드;

제3 서열의 핵염기를 함유하는 제3 스트랜드; 및

제4 서열의 핵염기를 함유하는, 왓슨-크릭 결합에 의해 제2 스트랜드 및 제3 스트랜드와 연합되는 제4 스트랜드를 포함한다.

사중체의 형성 방법의 특정 실시태양에서, 하기 조건이 단독으로 또는 조합하여 적용된다 (하기 설명에서는 4개의 별개의 스트랜드들을 명시하는 사중체의 제조 방법의 용어를 이용하지만, 이들은 왓슨-크릭 이중체를 하나 또는 2개의 출발 물질로서 명시하는 방법에도 적용가능하다):

상기 제1 스트랜드 및 제2 스트랜드 중 적어도 하나는 제약학적 체제를 추가로 포함하며, 제2 스트랜드의 제4 스트랜드에 대한 혼성화는 상기 제약학적 체제를 제3 스트랜드, 제4 스트랜드 상의 또는 제3 스트랜드와 제4 스트랜드 중 적어도 하나와 연합된 다른 분자 상의 표적으로부터 효과적인 거리에 위치시키며;

상기 제약학적 체제는 임상 관련 유전자의 유전자 프로모터 서열에 결합하도록 설계된 핵산, 임상 관련 유전자에 결합하도록 설계된 핵산 및 병원체의 복제기원 자리에 결합하도록 설계된 핵산으로 이루어진 군 중에서 선택된 것이며;

상기 제3 스트랜드 및 제4 스트랜드는 상기 제1 스트랜드 및 제2 스트랜드보다 먼저 혼성화 매질에 제공되며, 상기 제1 스트랜드 및 제2 스트랜드는 혼성화 매질과 접촉시킴으로써 재수화시키기 전에 탈수 형태로 제공되며;

상기 제1 스트랜드 및 제2 스트랜드 중 적어도 하나는 비인터칼레이팅 형광단으로 공유결합에 의해 표지되고, 상기 강도는 결합 친화도와 역상관관계이며;

적어도 하나의 가속화제는 인터칼레이팅 형광단이며, 다중체 구조를 함유하는 시험 매질의 형광 강도는 제4 스트랜드에 대한 제2 스트랜드의 결합 친화도와 정상관관계이며;

제2 스트랜드의 제4 스트랜드에 대한 혼성화는 형광, 화학발광, 전기화학발광 또는 전기 시그날의 변화로서 검출되며;

상기 시그날의 강도는 제2 스트랜드와 제4 스트랜드 사이의 결합 친화도와 상관관계에 있으며;

제2 스트랜드의 제4 스트랜드에 대한 혼성화는 제3 스트랜드 및 제4 스트랜드 중 적어도 하나와 관련된 활성을 불활성화시킨다.

#### (B) 삼중체의 검출 방법

발명의 개요부에 일반적으로 설명된 삼중체의 검출 방법은 임의로 하나 이상의 하기 조건을 방법 내에 포함시킴으로써 수행할 수 있다:

상기 방법을 단계 (3) 동안 또는 그 이전에, 삼중체의 일부가 아닌 단쇄 분자가 삼중체를 함유하는 것으로부터 분리된 용기 또는 컨테이너에 놓이지 않도록 동질 분석으로서 수행하고;

이중체와 삼중체 내의 단쇄 분자 사이의 완전 염기 페어링 규칙 매치, 1염기 미스매치 (또는 결실) 및 2-염기 미스매치 (또는 결실)를 식별하기 위해 검출 방법을 이용하며 (본 방법은 바람직하게는 공지의 미스매치를 포함하는 분자를 사용하여 방법을 검정하는 것을 포함한다);

인터칼레이터의 결합 정도 (예를 들어, 증가된 형광에 의해 지시되는 바와 같이)를 삼중체 형성의 지표로서 이용하며;

상기 인터칼레이팅 형광단이 형광을 나타내는 파장이 인터칼레이션시 제2 파장으로 이동하며, 상기 파장과 제2 파장 사이의 차이가 상기 프로브와 표적 사이의 복합체가 이중체인지 삼중체인지 및 상기 표적이 DNA인지 RNA인지 나타내며;

프로브는 비인터칼레이팅 형광단으로 공유결합에 의해 표지되고, 상기 강도는 결합 친화도와 역상관계이며 (특히 상기 비인터칼레이팅 형광단은 비오틴, 로다민 및 플루오레세인으로 이루어진 군 중에서 선택된 것이다);

형광단으로 표지된 단쇄 분자를 단쇄 분자로서 사용하며;

방법은 표적 서열 상에 (즉, 이중체 내에) 또는 프로브 (즉, 단쇄 분자) 상에 시그널 저하제를 제공하지 않으면서 및(또는) 표적 서열의 사전 변성 없이 및(또는) 표적 서열의 PCR 증폭 없이 수행되는 동질 분석이며;

상기 방법은 표적 서열 상에 또는 프로브 상에 시그널 저하제를 제공하지 않으면서 수행되는 동질 분석이며;

프로브는 부분적으로 대전된 또는 대전되지 않은 주쇄를 가지며;

프로브는 PNA 서열을 포함하고(하거나) 평행 합성에 의해 제조된 ssPNA이며;

프로브와 표적 서열은 길이가 동일하며;

프로브는 5 내지 30 뉴클레오티드 길이이며;

형광-여기 (exciting) 방사선이 파장 약 200 nm 내지 약 1000 nm에서 아르곤 이온 레이저로부터 방출되며;

시험 시료는 약 10 펨토몰 (femtomoles)의 표적 서열과 약 10 펨토몰의 프로브를 함유하는 약 20  $\mu$ l의 부피를 가지며;

상기 시료 중의 표적 서열의 농도는  $5 \times 10^{-10}$  M 이하이며;

시료 중의 프로브의 농도는  $5 \times 10^{-10}$  M 이하이며;

방법은 바이오칩 (biochip) 상에서 수행되며;

인터칼레이팅 형광단은 프로브와 표적 서열이 없는 형태로 매질 내에 첨가되며;

인터칼레이팅 형광단은 YOYO-1, TOTO-1, 에티뮴 브로마이드, 에티뮴 호모다имер-1, 에티뮴 호모다имер-2 및 아크리딘으로 이루어진 군 중에서 선택된 것이다.

대안으로 설명된 측면에서, 본 발명은:

적어도 하나의 퓨린 염기와 적어도 하나의 피리미딘 염기를 함유하는 표적 서열을 포함하는 표적 이중쇄 핵산 또는 핵산 동족체를 제공하는 단계;

핵산 서열 또는 핵산 동족체 서열을 포함하는 프로브를 제공하는 단계;

가속화제를 제공하는 단계;

상기 프로브, 표적 서열 및 가속화제를 매질에 첨가하여, 표적 서열에 결합된 프로브를 포함하는 삼중체 복합체를 함유하는 시험 시료를 제공하는 단계 (상기 복합체의 모든 염기 트리플렛은 A-T-A, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G 및 C-G-C로 이루어진 군 중에서 선택된 것이다);

시험 시료에 여기 방사선을 조사하여 시험 시료에서 형광 방사선을 방출시키는 단계;

프로브 및 표적 서열 사이의 결합 친화도와 상관관계가 있는, 상기 형광 방사선의 강도를 검출하는 단계; 및

상기 강도로부터 프로브와 표적 서열의 매칭 정도를 결정하는 단계를 포함하는 검출 방법이다.

또다른 대안으로 설명된 관련 측면에서, 방법은:

적어도 하나의 퓨린 염기 및 적어도 하나의 피리미딘 염기를 함유하는 표적 서열을 갖는 표적 핵산 또는 핵산 동족체를 제공하는 단계;

핵산 서열 또는 핵산 동족체 서열을 포함하는 이중쇄 프로브를 제공하는 단계;

혼성화 가속화제를 제공하는 단계;

상기 프로브, 표적 및 혼성화 가속화제를 매질에 첨가하여, 표적 서열에 결합된 프로브를 포함하는 왓슨-크릭 삼중체를 함유하는 시험 시료를 제공하는 단계;

시험 시료에 여기 방사선을 조사하여 시험 시료에서 형광 방사선을 방출시키는 단계;

프로브 및 표적 서열 사이의 결합 친화도와 상관관계가 있는, 상기 형광 방사선의 강도를 검출하는 단계 및

상기 강도로부터 프로브와 표적 서열 사이의 매칭 정도를 결정하는 단계를 포함하며,

여기서 상기 방법은 표적 서열 상에 또는 프로브 상에 시그널 저하제를 제공하지 않으면서 수행되는 동질 분석이다.

#### (C) 사중체의 검출 방법

발명의 개요부에 일반적으로 설명된 사중체의 검출 방법은 임의로 하나 이상의 하기 조건을 방법 내에 포함시킴으로써 수행할 수 있다:

상기 방법을 단계 (3) 동안 또는 그 이전에, 사중체의 일부가 아닌 핵산 분자가 사중체를 함유하는 것으로부터 분리된 용기 또는 컨테이너에 놓이지 않도록 동질 분석으로서 수행하고;

방법은 표적 서열 상에 또는 프로브 (즉, 제2 왓슨-크릭 이중체) 상에 시그널 저하제를 제공하지 않으면서 및(또는) 표적 서열의 사전 변성 없이 및(또는) 표적 서열의 PCR 증폭 없이 수행되는 동질 분석이며;

제1 및 제2 왓슨-크릭 이중체들 사이의 완전 염기 페어링 규칙 매치, 1염기 미스매치 (또는 결실) 및 2염기 미스매치 (또는 결실)를 식별하기 위해 검출 방법을 이용하며 (바람직하게는 공지의 미스매치를 포함하는 분자를 사용하여 방법을 검정함으로써);

인터칼레이터의 결합 정도를 사중체 형성의 지표로서 이용하며 (특히 형광 인터칼레이터를 사용하고 증가된 형광을 지시제로서 사용함으로써);

인터칼레이팅 형광단은 프로브와 표적 서열이 없는 형태로 매질에 첨가되며;

인터칼레이팅 형광단은 YOYO-1, TOTO-1, 에티뮴 브로마이드, 에티뮴 호모다이어-1, 에티뮴 호모다이어-2 및 아크리딘으로 이루어진 군 중에서 선택된 것이며;

인터칼레이팅 형광단이 형광을 나타내는 파장이 인터칼레이션시 제2 파장으로 이동하며, 상기 파장과 제2 파장 사이의 차이가 프로브와 표적 사이의 복합체가 이중체인지 삼중체인지 및 표적이 DNA인지 RNA인지를 지시하며;

#### 삭제

프로브는 비인터칼레이팅 형광단으로 공유결합에 의해 표지되고, 상기 강도는 결합 친화도와 역상관계이며 (특히 상기 비인터칼레이팅 형광단은 비오틴, 로다민 및 플루오레세인으로 이루어진 군 중에서 선택된 것이다);

형광단으로 표지된 단쇄 분자를 제2 왓슨-크릭 이중체의 일부에 사용하며;

방법은 결합 친화도를 정량하는 단계를 추가로 포함하며;

프로브는 부분적으로 대전된 또는 대전되지 않은 주쇄를 갖고;

프로브는 PNA 서열을 포함하고(하거나) 평행 합성에 의해 제조된 ssPNA이며;

프로브 및 표적 서열은 길이가 동일하며;

프로브는 5 내지 30 뉴클레오타이드 (또는 염기쌍) 길이이며;

형광-여기 방사선은 파장 약 200 nm 내지 약 1000 nm에서 아르곤 이온 레이저로부터 방출되며;

시험 시료는 약 10 펩토몰의 표적 서열 및 약 10 펩토몰의 프로브를 함유하는 약 20  $\mu$ l의 부피를 가지며;

시험 중의 표적 서열의 농도는  $5 \times 10^{-10}$  M 이하이며;

시험 중의 프로브의 농도는  $5 \times 10^{-10}$  M 이하이며;

제1 스트랜드와 제2 스트랜드 대 제3 스트랜드와 제4 스트랜드의 비는 약 10:1이며;

제1 스트랜드, 제2 스트랜드, 제3 스트랜드 및 제4 스트랜드의 각각의 농도는  $5 \times 10^{-10}$  M 이하이며;

방법은 바이오칩 상에서 수행한다.

대안으로 설명된 관련 측면에서, 방법은:

적어도 하나의 퓨린 염기 및 적어도 하나의 피리미딘 염기를 함유하는 표적 서열을 갖는 표적 핵산 또는 핵산 동족체를 제공하는 단계;

핵산 서열 또는 핵산 동족체 서열을 포함하는 이중쇄 프로브를 제공하는 단계;

혼성화 가속화제를 제공하는 단계;

상기 프로브, 표적 및 혼성화 가속화제를 매질에 첨가하여, 표적 서열에 결합된 프로브를 포함하는 왓슨-크릭 삼중체를 함유하는 시험 시료를 제공하는 단계;

시험 시료에 여기 방사선을 조사하여 시험 시료에서 형광 방사선을 방출시키는 단계;

프로브 및 표적 서열 사이의 결합 친화도와 상관관계가 있는 상기 형광 방사선의 강도를 검출하는 단계 및

상기 강도로부터 프로브 및 표적 서열 사이의 매칭 정도를 결정하는 단계를 포함하며,

여기서 상기 방법은 표적 서열 상에 또는 프로브 상에 시그널 저하제를 제공하지 않으면서 수행되는 동질 분석이다.

#### (D) 삼중체

발명의 개요부에 일반적으로 설명된 삼중체는 임의로 하나 이상의 하기 특징을 가질 수 있다:

각 스트랜드는 G-C 함량이 25% 내지 75%인 이중중합체성이며;

각 스트랜드는 G-C 함량이 10% 내지 90%인 이중중합체성이며, 또한 그 내부의 퓨린-피리미딘 다이머와 피리미딘-퓨린 다이머의 합한 빈도는 25%를 초과하며;

삼중체는 세포 내에 있지 않으며 (또한 바이러스 내에 있지 않으며);

삼중체는 7.6보다 큰 pH (그러나 pH 9 미만)에서 안정하며;

삼중체는 7.6보다 큰 pH (바람직하게는 9 미만)의 배지 중에 있으며;

단쇄 핵산 또는 핵산 동족체는 5 내지 30 염기 길이이고 이중쇄 핵산 표적은 8 내지  $3.3 \times 10^9$  염기쌍 길이이며;

표적 서열은 이중중합체성이고 25% 내지 75% 퓨린 염기와 75% 내지 25% 피리미딘 염기를 임의의 순서로 함유하며 (바람직하게는 퓨린-피리미딘 다이머의 빈도 + 피리미딘-퓨린 다이머의 빈도는 25%를 초과한다);

프로브 (즉, 단쇄 분자)는 이중쇄 핵산 절단제에 공유 결합되며;

프로브는 화학요법제에 공유 결합되며;

프로브는 라벨 (예를 들어, 다분자 시그널링 복합체, 레독스쌍, 화학발광제, 전기화학발광제 또는 바람직한 실시태양에서, 특히 복합체의 형광 강도가 프로브와 표적 서열 사이의 결합 친화도와 상관관계에 있는 형광단)에 공유 결합되며;

단쇄 핵산 분자에 대한 염기 페어링 규칙은 이중체의 하나의 스트랜드에 관하여 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙 (G-C 및 A-T 또는 A-U)이고 이중체의 다른 스트랜드에 관하여는 A-A 및 T-T 또는 U-U이며;

이중체는 그의 왓슨-크릭 이중 나선 구조를 실질적으로 보유하고, 단쇄 분자는 이중 나선의 홈 내에 존재하며;

가속화제는 이중체의 일부와 단쇄 핵산 분자의 일부 사이에 결합을 형성하며;

가속화제는 단쇄 핵산 분자에 공유 결합되며;

왓슨-크릭 이중체의 두 스트랜드는 모두 DNA이며 (특히 삼중체의 모든 스트랜드가 DNA인 경우);

가속화제는 왓슨-크릭 이중체 내의 염기에 결합하며, 상기 염기는 단쇄 핵산 분자 내의 염기가 결합하는 염기이며;

가속화제는 왓슨-크릭 이중체 내의 염기에 결합하며, 상기 염기는 삼중체 내에 있는 것이 아니며;

가속화제는 왓슨-크릭 이중체의 포스페이트 주쇄에 결합하며;

가속화제는 왓슨-크릭 이중체 상의 하나 초과 부위에 결합하며, 각 부위는 이중체의 염기 상에 또는 포스페이트 주쇄 상에 있으며;

가속화제는 왓슨-크릭 이중체 상의 하나의 부위에 결합하며, 상기 부위는 이중체의 염기 상에 또는 포스페이트 주쇄 상에 있으며;

가속화제는 왓슨-크릭 이중체 내의 염기 및 단쇄 핵산 분자 내의 염기에 결합하며;

가속화제는 단쇄 핵산 분자 내의 염기에 결합한다.

#### (E) 사중체

발명의 개요부에 일반적으로 설명된 사중체는 임의로 하나 이상의 하기 특징을 가질 수 있다:

4개의 스트랜드는 각각 G-C 함량이 10% 내지 90%인 이중중합체성이며;

제2 및 제4 스트랜드는 평행의 3'에서 5' 방향으로 정렬되고 상기 2 스트랜드들 사이의 결합은 상동 염기 페어링 규칙에 따르며;

제1 및 제3 스트랜드는 평행의 5'에서 3' 방향으로 정렬되고 상기 2 스트랜드들 사이의 결합은 상동 염기 페어링 규칙에 따르며;

삭제

제2 및 제4 스트랜드는 평행의 3'에서 5' 방향으로 정렬되고 상기 제2 및 제4 스트랜드 사이의 결합은 상동 염기 페어링 규칙에 따르며, 또한 제1 및 제3 스트랜드는 평행의 5'에서 3' 방향으로 정렬되고 상기 제1 및 제3 스트랜드 사이의 결합은 상동 염기 페어링 규칙에 따르며;

제2 및 제4 스트랜드는 평행의 3'에서 5' 방향으로 정렬되고 상기 2 스트랜드들 사이의 결합은 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 따르며;

제1 및 제3 스트랜드는 평행의 5'에서 3' 방향으로 정렬되고 상기 2 스트랜드들 사이의 결합은 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 따르며;

제2 및 제4 스트랜드는 평행의 3'에서 5' 방향으로 정렬되고 상기 제2 및 제4 스트랜드 사이의 결합은 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 따르며, 또한 제1 및 제3 스트랜드는 평행의 5'에서 3' 방향으로 정렬되고 상기 제1 및 제3 스트랜드 사이의 결합은 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 따르며;

제1 및 제4 스트랜드는 각각 역평행의 5'에서 3' 및 3'에서 5' 방향으로 정렬되고 상기 2 스트랜드들 사이의 결합은 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 따르며;

제2 및 제3 스트랜드는 각각 역평행의 3'에서 5' 및 5'에서 3' 방향으로 정렬되고 상기 2 스트랜드들 사이의 결합은 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 따르며;

제1 및 제4 스트랜드는 각각 역평행의 5'에서 3' 및 3'에서 5' 방향으로 정렬되고 상기 제1 및 제4 스트랜드 사이의 결합은 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 따르며, 또한 제2 및 제3 스트랜드는 각각 역평행의 3'에서 5' 및 5'에서 3' 방향으로 정렬되고 상기 제2 및 제3 스트랜드 사이의 결합은 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 따르며;

제1 및 제4 스트랜드는 각각 역평행의 5'에서 3' 및 3'에서 5' 방향으로 정렬되고 상기 2 스트랜드들 사이의 결합은 상동 염기 페어링 규칙에 따르며;

제2 및 제3 스트랜드는 각각 역평행의 3'에서 5' 및 5'에서 3' 방향으로 정렬되고 상기 2 스트랜드들 사이의 결합은 상동 염기 페어링 규칙에 따르며;

제1 및 제4 스트랜드는 각각 역평행의 5'에서 3' 및 3'에서 5' 방향으로 정렬되고 상기 제1 및 제4 스트랜드 사이의 결합은 상동 염기 페어링 규칙에 따르며, 또한 제2 및 제3 스트랜드는 각각 역평행의 3'에서 5' 및 5'에서 3' 방향으로 정렬되고 상기 제2 및 제3 스트랜드 사이의 결합은 상동 염기 페어링 규칙에 따르며;

제1 스트랜드의 각각의 상호작용 염기는 제3 스트랜드 상의 인접 염기, 및 상기 제3 스트랜드 염기가 결합하는 제4 스트랜드 상의 염기 모두와 특이적으로 상호작용하고;

제2 스트랜드의 각각의 상호작용 염기는 제4 스트랜드 상의 인접 염기, 및 상기 제4 스트랜드 염기가 결합하는 제3 스트랜드 상의 염기 모두와 특이적으로 상호작용하며;

사중체는 단리, 정제, 인공 또는 합성 사중체이며;

각 스트랜드는 G-C 함량이 25% 내지 75%인 이중중합체성이며;

각 스트랜드는 G-C 함량이 10% 내지 90%인 이중중합체성이고, 또한 그 내부의 퓨린-피리미딘 다이머 및 피리미딘-퓨린 다이머의 합한 빈도는 25%를 초과하며;

사중체는 세포 내에 없으며 (또한 바이러스 내에 없으며);

각각의 스트랜드는 독립적으로 이중중합체성 핵산 또는 이중중합체성 핵산 동족체를 포함하며;

각각의 스트랜드는 독립적으로 DNA 또는 RNA를 포함하며;

각각의 스트랜드는 독립적으로 대전되지 않은 또는 부분적으로 대전된 주쇄를 함유하는 이중중합체성 핵산 동족체를 포함하며;

제2 스트랜드 또는 제4 스트랜드 중 하나는 DNA를 포함하고 제2 스트랜드 또는 제4 스트랜드 중 다른 하나는 RNA, mRNA, hnRNA, rRNA, tRNA 또는 cDNA를 포함하며;

제2 스트랜드 및 제4 스트랜드는 서로 평행 상동성이며;

제1 스트랜드 및 제2 스트랜드의 메이저 홈은 제3 스트랜드 및 제4 스트랜드의 마이너 홈 내에 놓이며;

제2 스트랜드 및 제4 스트랜드는 서로 평행 상보성이며;

제1 스트랜드 및 제2 스트랜드의 메이저 홈은 제3 스트랜드 및 제4 스트랜드의 마이너 홈 내에 놓이며 ;

각 핵염기는 2개 이하의 다른 핵염기에 결합하며;

어떤 스트랜드도 다른 스트랜드와 인접하지 않으며;

다중체 구조에는 후그스틴 결합이 실질적으로 없으며;

다중체 구조에는 G-G 쿼테트가 실질적으로 없으며;

제1 스트랜드 및 제2 스트랜드는 5 내지 50 염기쌍 길이이며;

제3 스트랜드 및 제4 스트랜드는 게놈 DNA이며;

제3 스트랜드 및 제4 스트랜드는 게놈 DNA 내의 반수체를 포함하며;

제3 스트랜드 및 제4 스트랜드는 PCR 증폭 산물이며;

여기서 상기 다중체 구조에는 고체 지지체가 없으며;

다중체 구조는 전기 전도성이거나 전기 전도성이 아닌 고체 지지체에 결합되며;

다중체 구조는 제1 스트랜드, 제2 스트랜드, 제3 스트랜드 및 제4 스트랜드 중 적어도 하나에 결합된 치료, 예방 또는 진단제를 추가로 포함하며;

제1 스트랜드와 제2 스트랜드는 각각 5 내지 30 염기 길이이고, 제3 스트랜드와 제4 스트랜드는 각각 8 내지  $3.3 \times 10^9$  염기쌍 길이이며;

제4 서열은 25% 내지 75% 퓨린 염기와 75% 내지 25% 피리미딘 염기를 임의의 순서로 함유하며 (바람직하게는 퓨린-피리미딘 다이머의 빈도 + 피리미딘-퓨린 다이머의 빈도는 25%를 초과한다);

제1 및 제2 왓슨-크릭 이중체 (발명의 개요부의 사중체의 제조 방법 참조)는 각각 G-C 함량이 30 내지 70%이며;

제1 왓슨-크릭 이중체의 두 스트랜드는 모두 DNA이며 (특히 사중체의 모든 스트랜드가 DNA인 경우);

가속화제는 제1 왓슨-크릭 이중체 내의 염기에 결합하며, 상기 염기는 제2 이중체 내의 염기가 결합하는 염기이며;

가속화제는 제1 또는 제2 왓슨-크릭 이중체 내의 염기에 결합하며, 상기 염기는 사중체의 일부가 아닌 염기이며;

가속화제는 제1 또는 제2 왓슨-크릭 이중체의 포스페이트 주쇄에 결합하며;

가속화제는 제1 또는 제2 왓슨-크릭 이중체 중 하나 상의 하나 이상의 부위에 결합하며, 각 부위는 염기 상에 또는 포스페이트 주쇄 상에 있으며;

가속화제는 왓슨-크릭 이중체 상의 하나의 부위에 결합하며, 상기 부위는 염기 상에 또는 포스페이트 주쇄 상에 있으며;

가속화제는 제1 왓슨-크릭 이중체 내의 염기 및 제2 왓슨-크릭 이중체 상의 염기에 결합하며;

가속화제는 제1 및(또는) 제2 왓슨-크릭 이중체의 마이너 홈에 결합하며;

가속화제는 제1 왓슨-크릭 이중체의 일부와 제2 왓슨-크릭 이중체의 일부 사이에 결합을 형성한다.

#### 발명의 추가의 측면

본 발명은 이중쇄 핵산 표적에 결합된 단쇄 프로브를 포함하는 삼중체 복합체를 제공하며, 여기서 상기 프로브는 이중중합체성 핵산 또는 이중중합체성 핵산 동족체를 포함하고, 복합체의 모든 염기 트리플렛은 A-T-A, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G 및 C-G-C로 이루어진 군 중에서 선택된 것이다.

선행 기술에 개시된 몇몇 후그스틴 삼중체와는 달리, 본 발명의 삼중체는 7.6보다 큰 pH 값에서 안정하다. 더욱이, 본 발명의 삼중체는 몇몇 선행 기술의 삼중체에서와 같이 호모피리미딘 서열 또는 호모퓨린 서열의 존재를 요구하지 않는다. 예를 들어, 표적 서열은 25% 내지 75% 퓨린 염기와 75% 내지 25% 피리미딘 염기를 임의의 순서로 함유할 수 있다.

바람직하게는, 삼중체의 단쇄 핵산 또는 핵산 동족체는 5 내지 30 염기 길이이고, 이중쇄 핵산 표적은 8 내지  $3.3 \times 10^9$  염기쌍 길이이다.

본 발명에 따른 삼중체 형성은 다양한 용도에 적합하다. 예를 들어, 이중쇄 핵산 절단제에 공유 결합된 프로브는 이중쇄 핵산의 표적 서열을 특이적으로 절단하기 위해 사용할 수 있다. 화학요법제에 공유 결합된 프로브는 이중쇄 핵산의 표적 서열을 특이적으로 치료하기 위해 사용할 수 있다.

바람직한 실시태양에서, 본 발명은 이중쇄 표적과 단쇄 프로브 사이의 결합을 분석하기 위한 신속하고 민감하며 환경친화적이고 안전한 방법을 제공하며, 여기서 상기 표적은 핵산 서열 또는 핵산 동족체 서열을 포함하고, 프로브는 핵산 서열 또는 핵산 동족체 서열을 포함한다.

몇몇 선행 기술의 분석과는 달리, 본 발명은 특이적 프로브-표적 결합의 존재를 검출할 뿐만 아니라, 프로브와 표적 사이의 상호작용의 성질에 관한 정성적 및 정량적 정보를 또한 제공한다. 따라서, 본 발명은 당업자가 프로브 내 및 이중쇄 표적의 스트랜드 내 염기 서열 사이에서 일어나는 완전 매치, 하나의 염기쌍 미스매치, 2개의 염기쌍 미스매치, 3개의 염기쌍 미스매치, 하나의 염기쌍 결실, 2개의 염기쌍 결실 및 3개의 염기쌍 결실을 식별할 수 있도록 한다.

본 발명의 실시태양은 제1 프로브-표적 혼합물에 대한 측정된 시그널 (예, 형광 강도)을 동일한 표적과 결합된 다른 프로브에 의해 나타난 동일 유형의 시그널에 대해 검정하는 것을 포함하며, 여기서 각각의 다른 프로브는 적어도 하나의 염기가 제1 프로브와 상이하다.

검정 곡선이 생성될 수 있으며, 여기서 측정된 시그널 (예, 형광 강도)의 크기는 표적과 프로브 사이의 결합 친화도의 함수이다. 표적과 다수의 상이한 프로브들 사이의 결합 친화도는 미스매치된 염기의 수, 미스매치(들)의 성질 (A-G 대 A-C 대 T-G 대 T-C 등), 삼중체 내의 미스매치(들)의 위치 등에 따라 변하므로, 본 발명의 분석은 표적을 시퀀싱하기 위해 사용할 수 있다.

실시태양에서, 측정된 시그널은 시험 시료 내에 포함된 형광단의 형광 강도일 수 있다. 상기 실시태양에서, 프로브와 표적 사이의 결합 친화도는 형광단이 시그널 저하 또는 시그널 증폭을 통해 혼성화 신호를 제시하는지에 따라 강도와 정상관관계 또는 역상관관계일 수 있다. 선택된 조건 하에, 인터칼레이팅제에 의해 생성된 형광 강도는 프로브-표적 결합 친화도와 정상관관계일 수 있는 반면, 프로브에 공유 결합된 비인터칼레이팅 형광단을 사용하는 바람직한 실시태양의 강도는 프로브-표적 결합 친화도와 역상관관계일 수 있다. 바람직하게는 0-2 미스매치 및(또는) 결실 범위에 걸쳐, 보다 바람직하게는 0-3 미스매치 및(또는) 결실의 범위에 걸쳐 프로브와 표적 사이의 매칭 정도가 증가함에 따라 비인터칼레이팅 형광단에 대해 형광 강도는 감소한다.

본 발명은 프로브와 표적 사이의 결합 친화도의 정량을 가능하게 한다. 상기 정보는 최적화된 결합 특성을 갖는 안티센스 약물을 설계하는 것을 포함하여 다양한 용도에 유용할 수 있다.

선행 기술의 방법과는 달리, 본 발명의 분석은 바람직하게는 동질성이다. 분석은 측정된 시그널의 크기를 검출하기에 앞서 유리 프로브 및 표적으로부터 프로브-표적 복합체를 분리시키지 않으면서 수행할 수 있다. 분석은 겔 분리 단계를 요구하지 않으며, 따라서 시험 처리속도를 크게 증가시킨다. 정량적 분석은 단순하며 정확하다. 결과적으로, 결합 분석은 많은 시간과 비용을 절감하고, 쉽게 자동화될 수 있다. 또한, 분석은 결합 변수, 예를 들어 완충액, pH, 이온 농도, 온도, 인큐베이션 시간, 프로브와 표적 서열의 상대적 농도, 인터칼레이터 농도, 표적 서열의 길이, 프로브 서열의 길이 및 가능한 보조인자 요구치가 신속하게 결정될 수 있도록 한다.

분석은 예를 들어 불투과성 표면 상의 또는 바이오칩 상의 웰 내의 용액 중에서 수행할 수 있다.

더욱이, 본 발명의 분석은 바람직하게는 표적 상에 또는 프로브 상에 시그널 저하제를 제공하지 않으면서 수행된다.

본 발명자들은 혼성화에 대한 형광 강도 분석의 이점을 이전에 개시하였지만 (예를 들어 미국 특허 출원 제09/224,505호 (1998년 12월 31일자 출원) 참조), 본 발명에 따른 분석은 프로브 및 이중체 표적의 삼중체를 특이적으로 검출하여, 표적을 변형시켜야 하는 필요를 제거한다. 핵산 (및 핵산 동족체) 프로브는 몇몇 한정된 종류의 표적과 삼중체를 형성하는 것으로 공지되어 있지만 (예를 들어 문헌 [Floris 등 (상동), Dervan 등 (상동), Egholm 등, 365 Nature 566 (1993) 및 Tomac 등, 118 J. Am. Chem. Soc. 5544 (1996)] 참조), 본 발명자들이 단쇄 핵산 (예, ssDNA 및 RNA) 프로브 및 이중체 핵산 (예, dsDNA) 표적 사이에 형성된 삼중체를 특이적으로 분석할 수 있었던 것은 놀라운 것이며, 여기서 프로브와 표적 사이의 상호작용은 예를 들어 Dervan 등의 삼중체 혼성화의 매우 제한된 후그스틴 모델보다는, 왓슨-크릭 염기 페어링에 기초한다 (적어도 A는 T (또는 RNA의 경우 U)에 결합하고 G는 C에 결합한다는 의미에서). 본원에 사용되는 용어 "왓슨-크릭 삼중체"는 단쇄 프로브와 이중체 표적 사이의 염기 페어링의 성질을 A-T-A, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G 및(또는) C-G-C ( $C^+$ -G-C 및(또는) 임의의 다른 염기의 이온화 종 포함)로 한정함으로써 상기 차이를 구체화하도록 의도된다. 이들 3원기들은 이하 왓슨-크릭 염기 트리플렛으로 표시되고, 생성된 구조체는 왓슨-크릭 삼중체로서 표시된다.

본 발명의 분석에 사용하기에 적합한 프로브는 예를 들어, ssDNA, RNA, PNA 및 대전되지 않은 또는 부분적으로 대전된 주쇄를 갖는 다른 핵산 동족체를 포함한다. 8 내지 20 염기의 임의의 길이를 갖는 프로브 서열이 원핵세포 및 진핵세포의 최소 특유(unique) DNA 서열이 발견되는 범위이기 때문에 바람직하다. 12 내지 18 염기의 프로브가 인간 게놈 내의 최소 특유 서열의 길이이므로 특히 바람직하다. 실시태양에서, 5 내지 30 염기의 프로브가 가장 바람직하다. 그러나, 다수의 보다 짧은 프로브들이 뉴클레오타이드 서열을 특이적으로 확인하기 위해 결합되는 다수의 비특유 표적 서열을 내부에 갖는 뉴클레오타이드 서열을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 프로브의 길이는 표적의 길이와 매치되도록 선택될 수 있다.

본 발명자들은 놀랍게도 단쇄 핵산 (예, ssDNA, RNA, ssPNA 및 DNA 또는 RNA의 다른 동족체) 프로브와 이중체 핵산 (예, dsDNA) 표적 사이에 왓슨-크릭 염기-페어 의존 방식으로 형성된 매우 다양한 삼중체를 특이적으로 분석할 수 있다는 것을 발견하였다. 본 발명자들은 삼중체 형성 및(또는) 안정화가 시험 시료 내에 인터칼레이팅제의 존재에 의해 향상됨을 발견하였다.

본 발명자들은 왓슨-크릭 삼중체 형성 및(또는) 안정화가 시험 시료 내에 양이온의 존재에 의해 향상됨을 발견하였다. 적합한 양이온은 예를 들어, 1가 양이온, 예를 들어  $\text{Na}^+$  (바람직하게는 50 mM 내지 125 mM의 농도에서),  $\text{K}^+$  및 다른 알칼리 금속 이온; 2가 양이온, 예를 들어 알칼리 토금속 이온 (예,  $\text{Mg}^{+2}$  및  $\text{Ca}^{+2}$ ) 및 2가 전이금속 이온 (예,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$  및  $\text{Zn}^{+2}$ ); 및 3개 이상의 양전하를 갖는 양이온, 예를 들어  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{+3}$ , 3가 스페르미딘 및 4가 스페르민을 포함한다.  $\text{Mn}^{+2}$ 는 바람직하게는 10 mM 내지 30 mM의 농도에서 제공된다.  $\text{Mg}^{+2}$ 는 바람직하게는 15 mM 내지 20 mM의 농도에서 제공된다.  $\text{Ni}^{+2}$ 는 바람직하게는 약 20 mM의 농도에서 제공된다. 실시태양에서,  $\text{Mg}^{+2}$  및  $\text{Mn}^{+2}$ 는 각각 10 mM, 각각 15 mM 또는 각각 20 mM (즉, 각각 10-20 mM)의 농도에서 조합되어 제공된다.

삼중체가 형성되는 매질 내에 첨가되는 양이온의 양은 양이온의 성질, 프로브의 농도, 표적의 농도, 추가의 양이온의 존재 및 프로브와 표적의 염기 함량을 포함한 많은 요인에 따른다. 바람직한 양이온 농도 및 혼합물은 실험에 의해 일상적으로 발견될 수 있다.

본 발명은 사용하기에 위험하고 지루하며 시간 소모적이며 지속적으로 재생시켜야 할 필요가 있는 방사성 프로브의 사용을 필요로 하지 않는다. 바람직하게는 본 발명의 프로브는 사용하기에 안전하고 수년동안 안정하다. 따라서, 프로브는 대량으로 제조 또는 주문되어 보관될 수 있다.

실시태양에서, 프로브는 다분자 시그널링 복합체 또는 레독스쌍으로, 또는 화학발광 또는 전기화학발광 특성을 유도시키는 라벨로 표지된다.

프로브 또는 표적 (바람직하게는 프로브)은 공유 결합된 형광 라벨을 갖는 것이 바람직하다. 라벨은 바람직하게는 비인터칼레이팅 형광단이다. 상기 실시태양에서, 형광단은 바람직하게는 양 말단에서 프로브에 결합된다. 바람직한 형광 마커는 비오틴, 로다민과 플루오레세인 및 여기 에너지가 조사될 때 형광을 발하는 다른 마커를 포함한다.

여기 파장은 (일상적 실험 및(또는) 통상의 지식에 의해) 사용되는 형광단에 대한 여기 최대치에 상응하도록 선택되며, 바람직하게는 200 내지 1000 nm이다. 형광단은 바람직하게는 200 내지 1000 nm의 발광 파장을 갖도록 선택된다. 바람직한 실시태양에서, 형광단에 400 내지 540 nm 범위의 파장을 갖는 빛을 조사하기 위해 아르곤 이온 레이저가 사용되고, 형광 발광은 500 내지 750 nm 범위에서 검출된다.

본 발명의 분석은 매우 다양한 온도, 예를 들어, 5 내지 85°C에 걸쳐 수행할 수 있다. 몇몇 선행 기술의 분석은 승온을 필요로 하여, 비용이 추가되고 분석을 지연시킨다. 반면, 본 발명은 실온 이하에서 (예를 들어, 25°C 미만의 온도에서) 수행될 수 있다.

본 발명의 신뢰성은 표적 내의 구아닌 및 시토신 함량에 무관하다. G-C 염기쌍은 3개의 수소 결합을 형성하는 한편 A-T 염기쌍은 단지 2개의 수소 결합을 형성하므로, 보다 높은 G 또는 C 함량을 갖는 표적 및 프로브 서열이 보다 안정하고, 보다 높은 융점을 갖는다. 결과적으로, 혼성화된 프로브 및 표적 구역의 GC 함량을 완전히 매칭된 하이브리드 내에 존재하는 것보다 많이 증가시키는 염기쌍 미스매치는 미스매치된 프로브와 관련된 결합 약점을 상쇄할 수 있다. 프로브와 표적 사이의 모든 가능한 염기쌍 미스매치를 함유하는 삼중체는 완전히 매칭된 삼중체보다 더 불안정한 것으로 증명되었으며, 인터칼레이팅 형광단이 사용될 때 완전히 상보적인 하이브리드가 나타내는 것보다 더 낮은 형광 강도를 항상 나타냈다.

본 발명의 분석은 극히 민감하여, 표적의 PCR 증폭을 수행할 필요를 제거한다. 예를 들어, 약 10 펩토몰의 표적과 약 10 펩토몰의 프로브를 함유하는 약 20  $\mu\text{l}$ 의 부피를 갖는 시험 시료를 분석하는 것이 가능하다. 본 발명의 실시태양은  $5 \times 10^{-9}$  M의 농도, 바람직하게는  $5 \times 10^{-10}$  M 이하의 농도에서 표적을 분석하기에 충분히 민감하다. 본 발명의 실시태양은 프로브를  $5 \times 10^{-9}$  M의 농도, 바람직하게는  $5 \times 10^{-10}$  M 이하의 농도로 프로브를 사용하기에 충분히 민감하다. 상기 값은 상기 방법이 보다 고농도를 검출할 수 없음을 제시하고자 한 것이 아님은 말할 필요도 없다.

삼중체가 형성되는 매질은 뉴클레오티드를 보존하기에 적합한 것으로 알려진 임의의 통상의 매질일 수 있다. 예를 들어 문헌[Sambrook 등, "Molecular Cloning: A Lab Manual," Vol. 2 (1989)]을 참조한다. 예를 들어, 액체 매질은 뉴클레오티드, 물, 완충액 및 표준 염 농축액을 포함할 수 있다. 삼중체 형성을 촉진시키기 위해 2가 양이온이 단독으로 사용되는 경우, EDTA 또는 EGTA와 같은 킬레이터가 반응 혼합물 내에 포함되어서는 안된다.

상보성 염기들 사이의 특이적 결합은 온도, 염 농도, 정전기 강도 및 완충 액 조성이 상이한 매우 다양한 조건 하에 일어난다. 이들 조건 및 이를 적용하는 방법의 예는 당업계에 알려져 있다.

약 7.6을 넘는 pH 수준에서 불안정하거나 존재하지 않는 후그스틴형 삼중체와는 달리, 본 발명의 왓슨-크릭 삼중체는 넓은 범위의 pH 수준, 바람직하게는 약 pH 5 내지 약 pH 9에 걸쳐 안정하다.

삼중체는 약 5℃ 내지 약 25℃의 온도에서 약 1시간 이내로 형성되는 것이 바람직하다. 보다 긴 반응 시간은 요구되지 않지만, 대부분의 경우 24시간까지의 인큐베이션은 삼중체에 불리한 영향을 주지 않았다. 본 발명의 왓슨-크릭 삼중체의 신속한 결합 시간은 후그스틴 삼중체계 분석의 훨씬 긴 결합 시간과 대조를 이룬다.

요구되지는 않지만, 양이온에 추가로 몇몇 시약을 사용함으로써 용액 중에서 삼중체 형성을 촉진시키는 것이 가능하다. 이들 시약의 바람직한 예는 단백질 결합 단백질, 예를 들어 Rec A 단백질, T4 유전자 32 단백질, 이. 콜라이 (E. coli) 단백질 결합 단백질, 메이저 또는 마이너 핵산 홈 결합 단백질, 비올로젠 및 인터칼레이팅 기질, 예를 들어 에티뮴 브로마이드, 약 티노마이신 D, 솔라렌 및 안젤리신을 포함한다. 상기 촉진 시약은 극한 조작 조건에서, 예를 들어 비정상적 pH 수준 또는 극고온 하에 유용한 것으로 입증될 수 있다.

본 발명의 분석은 예를 들어, 혼성화 복합체 내의 미스매치된 염기쌍의 수를 결정하고 계놈을 지도화하기 위해 풀딩된 뉴클레오타이드 서열 내의 접근가능한 구역을 확인하기 위해 사용할 수 있다.

본 발명자들은 본원에서 때때로 왓슨-크릭 삼중체가 프로브의 이중체 표적에 대한 혼성화로부터 생성되는 것을 제시할 수 있다. 생산된 프로브에 속박된 형광단은 왓슨-크릭 상보성 염기의 스트랜드를 함유하는 이중체 표적에 노출시 형광 방출을 저하시켰지만 (이는 몇몇 종류의 결합 사건의 발생을 지시한다), 본 발명자들은 왓슨-크릭 삼중체에서 발생하는 것이 왓슨-크릭 이중체 형성과 전통적으로 연관되는 점에서 혼성화로서 가장 잘 설명된다는 것을 확신하지 않는다. 왓슨-크릭 삼중체의 형성은 때때로 본원에서 혼성화 사건으로서 칭해질 수 있지만, 이는 단지 편의상이며 왓슨-크릭 삼중체의 형성이 가장 잘 특성화될 수 있는 방법에 관하여 본 발명의 범위를 제한하려고 의도하지 않는다.

상기 발명의 배경부에서 논의된 사중체와는 달리, 본 발명의 바람직한 다중체 구조는 전통적인 왓슨-크릭 결합 규칙에 따라 함께 결합된 핵산의 적어도 4개의 스트랜드를 함유한다.

본원에서 사용되는 용어 "왓슨-크릭 결합"은 매칭된 마주보는 염기들을 통한 핵산 (및(또는) 핵산 동족체) 스트랜드의 마주보는 쌍들 사이의 특이적 회합을 정의하도록 의도된다. 왓슨-크릭 사중체의 형성은 때때로 본원에서 혼성화 사건으로서 칭해질 수 있지만, 이는 단지 편의상이며 왓슨-크릭 사중체의 형성이 가장 잘 특성화될 수 있는 방법에 관하여 본 발명의 범위를 제한하려고 의도하지 않는다.

본 발명의 다중체 구조는 바람직하게는 사중체이다. 다중체의 각 스트랜드는 독립적으로 핵산 또는 핵산 동족체를 포함한다. 적합한 핵산은 예를 들어 DNA 또는 RNA를 포함한다. 바람직한 핵산 동족체는 대전되지 않은 또는 부분적으로 대전된 주쇄 (즉, 천연 DNA 주쇄와 같은 음이 아닌 전하를 갖는 주쇄)를 함유한다.

몇몇 실시태양에서, 4중체 사중체의 제2 및 제4 스트랜드 중 하나는 DNA를 포함하고, 제2 및 제4 스트랜드 중 다른 하나는 RNA, mRNA, hnRNA, rRNA, tRNA 또는 cDNA를 포함한다.

몇몇 실시태양에서, 제2 스트랜드 및 제4 스트랜드는 서로 평행 상동성이다. 이들 실시태양에서, 제1 및 제2 스트랜드의 메이저 홈은 제3 및 제4 스트랜드 내의 마이너 홈 내에 놓인다.

다른 실시태양에서, 제2 및 제4 스트랜드는 서로 평행 상보성이다. "네스티드(nested) 상보성"을 갖는 이들 실시태양에서, 제1 및 제2 스트랜드의 메이저 홈은 제3 및 제4 스트랜드의 마이너 홈 내에 놓인다.

몇몇 실시태양에서, 각 핵염기는 2개 이하의 다른 핵염기에 결합한다. 이들 실시태양의 일부에서, 제2 스트랜드의 염기는 (왓슨-크릭 규칙을 통해) 제1 스트랜드의 매칭 염기 및 제4 스트랜드의 매칭 염기에 특이적으로 결합하고, 제4 스트랜드의 염기는 (왓슨-크릭 규칙을 통해) 제3 스트랜드의 매칭 염기 및 제2 스트랜드의 매칭 염기에 특이적으로 결합하며, 여기

서 제1 및 제3 스트랜드의 염기들은 각각 1개 이하의 다른 염기에 결합한다. 따라서, 전통적인 왓슨-크릭 염기쌍 이외에, 상기 실시태양은 왓슨-크릭 염기 트리플렛 A-T-A, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G 및(또는) C-G-C ( $C^+$ -G-C 및(또는) 임의의 다른 염기의 이온화 중 포함)를 포함한다.

몇몇 실시태양에서, (a) 제1 및 제2 스트랜드의 마주보는 염기들 사이의 결합; (b) 제3 및 제4 스트랜드의 마주보는 염기들 사이의 결합; 및 (c) 제2 및 제4 스트랜드의 마주보는 염기들 사이의 결합 이외에 추가로 제1 및 제3 스트랜드의 마주보는 염기들도 서로 결합하는 것으로 믿어진다.

본 발명의 다중체 구조의 몇몇 실시태양에서, 어떤 스트랜드도 다른 스트랜드와 인접하지 않는다. 즉, 적어도 4개의 별개의 스트랜드가 존재한다. 폴딩된 형태 등 (예, 헤어핀 턴 (hairpin turn) 등)도 본 발명의 범위 내에 있지만, 단일 스트랜드의 폴딩된 부분은 스트랜드를 4개의 별개의 스트랜드의 최소치가 되도록 1회를 초과하여 계산되도록 하지 않는다.

본 발명의 다중체 구조는 하찮은 양의 후그스틴 결합 및(또는) G-G 쿼테트가 존재할 수 있지만, 바람직하게는 다중체 구조의 유지를 위해 후그스틴 결합 또는 G-G 쿼테트에 의지하지 않는다. 즉, 본 발명의 다중체 구조에는 바람직하게는 후그스틴 결합이 실질적으로 없고 G-G 쿼테트가 실질적으로 없다.

몇몇 실시태양에서, 다중체의 제1 및 제2 스트랜드는 5 내지 50 염기 길이 (보다 바람직하게는 5 내지 30 염기 길이)이고, 제3 및 제4 스트랜드는 8 내지  $3.3 \times 10^9$  염기쌍 길이이다. 예를 들어, 제1 및 제2 스트랜드는 이중쇄 프로브를 구성할 수 있고 제3 및 제4 스트랜드는 이중쇄 표적, 예를 들어 반수체를 함유할 수 있는 게놈 DNA를 구성할 수 있다.

실시태양에서, 제3 스트랜드 및 제4 스트랜드는 PCR 증폭 산물이다.

본 발명의 다중체는 용액 중에, 고체 지지체 상에, 시험관내 또는 생체내에 존재할 수 있다. 고체 지지체는 전기 전도성 (예, 전극)이거나 또는 비전도성일 수 있다.

본 발명에 따른 사중체 형성은 다양한 용도에 적합하다. 예를 들어, 이중쇄 핵산 절단제에 공유 결합된 이중쇄 프로브는 이중쇄 핵산의 표적 서열을 특이적으로 절단하기 위해 사용할 수 있다. 화학요법제에 공유 결합된 이중쇄 프로브는 이중쇄 핵산의 표적 서열을 특이적으로 치료하기 위해 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 제1, 제2, 제3 및 제4 스트랜드 중 적어도 하나에 결합된 치료제, 예방제 또는 진단제를 추가로 포함하는 다중체 구조를 포함한다.

또한, 본 발명의 다중체는 분자 (즉, 나노스케일) 수준 상의 전기 회로를 제공하기 위한 것과 같은 나노엔지니어링에 사용하기에 적합하다. 핵산을 사용하는 나노엔지니어링에 관한 추가의 상세한 내용은 미국 특허 제5,948,897호 (Sen 등)와 여기에 인용된 참조문에서 찾을 수 있다.

본 발명의 다중체 구조는 제1 스트랜드, 제2 스트랜드, 제3 스트랜드, 제4 스트랜드, 물, 완충액 및 프로모터를 포함하는 혼성화 매질을 제공하는 단계; 및 혼성화 매질을 제2 스트랜드를 제4 스트랜드에 혼성화시키기에 효과적인 인큐베이션 시간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 제공될 수 있다.

혼성화 매질은 뉴클레오티드를 보존하기에 적합한 것으로 알려진 임의의 통상의 매질을 포함할 수 있다. 예를 들어 문헌 [Sambrook 등, "Molecular Cloning: A Lab Manual," Vol. 2 (1989)]을 참조한다. 예를 들어, 매질은 뉴클레오티드, 물, 완충액 및 표준 염 농축액을 포함할 수 있다. 사중체 형성을 촉진시키기 위해 2가 양이온이 단독으로 사용되는 경우, EDTA 또는 EGTA와 같은 킬레이터가 반응 혼합물 내에 포함되어서는 안된다.

상보성 염기들 사이의 특이적 결합은 온도, 염 농도, 정전기 강도 및 완충액 조성이 상이한 매우 다양한 조건 하에 일어난다. 이들 조건 및 이를 적용하는 방법의 예는 당업계에 알려져 있다.

약 7.6을 넘는 pH 수준에서 불안정하거나 존재하지 않는 많은 후그스틴형 삼중체와는 달리, 본 발명의 왓슨-크릭 다중체는 넓은 범위의 pH 수준, 바람직하게는 약 pH 5 내지 약 pH 9에 걸쳐 안정하다.

더욱이, 본 발명의 다중체는 몇몇 선행 기술의 사중체에서와 같이 호모피리미딘 서열 또는 호모퓨린 서열의 존재를 필요로 하지 않는다. 예를 들어, 표적 서열은 25% 내지 75% 퓨린 염기와 75% 내지 25% 피리미딘 염기를 임의의 순서로 함유할 수 있다.

다중체는 약 5℃ 내지 약 25℃의 온도에서 약 2시간 이내로 형성되는 것이 바람직하다. 인큐베이션 시간은 바람직하게는 실온에서조차 5분 이내이다. 보다 긴 반응 시간은 요구되지 않지만, 대부분의 경우 24시간까지의 인큐베이션은 사중체에 불리한 영향을 주지 않았다. 본 발명의 왓슨-크릭 사중체의 신속한 결합 시간은 후그스틴 사중체에 대한 훨씬 긴 결합 시간과 대조를 이룬다.

혼성화 매질 중의 프로모터는 바람직하게는 인터칼레이팅제 또는 양이온이다. 인터칼레이팅제는 예를 들어 형광단, 예를 들어 YOYO-1, TOTO-1, 에티뮴 브로마이드, 에티뮴 호모다이어-1, 에티뮴 호모다이어-2 및 아크리딘으로 이루어진 군 중에서 선택된 것일 수 있다.

적합한 양이온은 예를 들어, 1가 양이온, 예를 들어  $\text{Na}^+$  (바람직하게는 50 mM 내지 125 mM의 농도에서),  $\text{K}^+$  및 다른 알칼리 금속 이온; 2가 양이온, 예를 들어 알칼리 토금속 이온 (예,  $\text{Mg}^{+2}$  및  $\text{Ca}^{+2}$ ) 및 2가 전이금속 이온 (예,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$  및  $\text{Zn}^{+2}$ ); 및 3 이상의 양전하를 갖는 양이온, 예를 들어  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{+3}$ , 3가 스페르미딘 및 4가 스페르민을 포함한다.  $\text{Mn}^{+2}$ 는 바람직하게는 10 mM 내지 45 mM의 농도에서 제공된다.  $\text{Mg}^{+2}$ 는 바람직하게는 10 mM 내지 45 mM의 농도에서 제공된다.  $\text{Ni}^{+2}$ 는 바람직하게는 약 20 mM의 농도에서 제공된다. 실시태양에서,  $\text{Mg}^{+2}$  및  $\text{Mn}^{+2}$ 는 각각 10 mM, 각각 15 mM, 각각 20 mM, 각각 25 mM, 각각 30 mM, 각각 35 mM 또는 각각 40 mM (즉, 각각 10-40 mM)의 농도에서 조합되어 제공된다.

다중체가 형성하는 매질 내에 첨가되는 양이온의 양은 양이온의 성질, 프로브의 농도, 표적의 농도, 추가의 양이온의 존재 및 프로브와 표적의 염기 함량을 포함한 많은 요인에 따른다. 바람직한 양이온 농도 및 혼합물은 실험적으로 일상적으로 발견될 수 있다.

요구되지는 않지만, 다른 프로모터는 예를 들어 단쇄 결합 단백질, 예를 들어 Rec A 단백질, T4 유전자 32 단백질, 이. 콜라이 단쇄 결합 단백질, 메이저 또는 마이너 핵산 홈 결합 단백질, 비올로젠 및 추가의 인터칼레이팅 기질, 예를 들어 악티노마이신 D, 솔라렌 및 안젤리신을 포함한다. 상기 촉진 시약은 극한 조작 조건에서, 예를 들어 비정상적 pH 수준 또는 극 고온 하에 유용한 것으로 입증될 수 있다.

본 발명은 또한 제2 스트랜드의 제4 스트랜드에 대한 혼성화가 제3 스트랜드 및 제4 스트랜드 중 적어도 하나와 연관된 활성을 불활성화시키는 방법을 가능하게 한다. 따라서, 제1 스트랜드 및 제2 스트랜드 중 적어도 하나는 제약학적 제제를 추가로 포함하며, 여기서 제2 스트랜드의 제4 스트랜드에 대한 혼성화는 제약학적 제제를 제3 스트랜드, 제4 스트랜드, 또는 제3 스트랜드 및 제4 스트랜드 중 적어도 하나에 연관된 다른 분자 상의 표적으로부터 유효한 거리에 놓는다. 제약학적 제제는 바람직하게는 임상 관련 유전자의 프로모터 서열에 결합하도록 설계된 핵산, 임상 관련 유전자에 결합하도록 설계된 핵산 또는 병원체의 복제 기원 부위에 결합하도록 설계된 핵산으로 이루어진 군 중에서 선택된 것이다.

바람직한 실시태양에서, 본 발명은 단쇄 또는 이중쇄 표적과 이중쇄 프로브 사이의 결합을 분석하기 위한 신속하고 민감하며 환경친화적이고 안전한 방법을 제공하며, 여기서 상기 표적은 핵산 서열 또는 핵산 동족체 서열을 포함하고, 프로브는 핵산 서열 또는 핵산 동족체 서열을 포함한다.

본 발명의 분석은 예를 들어, 혼성화 복합체 내의 미스매치된 염기쌍의 수를 결정하고 계수를 지도화하기 위해 풀딩된 뉴클레오타이드 서열 내의 접근가능한 구역을 확인하기 위해 사용할 수 있다.

본 발명은 특이적 프로브-표적 결합의 존재를 검출할 뿐만 아니라, 프로브와 표적 사이의 상호작용의 성질에 관한 정성적 및 정량적 정보를 또한 제공한다. 따라서, 본 발명은 당업자가 이중쇄 프로브 내의 서열 및 이중쇄 표적 내의 서열 사이에서 일어나는 완전 매치, 하나의 염기쌍 미스매치, 2개의 염기쌍 미스매치, 3개의 염기쌍 미스매치, 하나의 염기쌍 결실, 2개의 염기쌍 결실 및 3개의 염기쌍 결실을 식별할 수 있도록 한다.

본 발명의 실시태양은 제1 프로브-표적 혼합물에 대한 측정된 시그널 (예, 형광, 화학발광, 전기화학발광 또는 전기적 성질)을 동일한 표적과 결합된 다른 프로브에 의해 나타난 동일 유형의 시그널에 대해 검정하는 것을 포함하며, 여기서 각각의 다른 프로브는 적어도 하나의 염기가 제1 프로브와 상이하다.

검정 곡선이 생성될 수 있으며, 여기서 측정된 시그널 (예, 형광 강도)의 크기는 표적과 프로브 사이의 결합 친화도의 함수이다. 표적과 다수의 상이한 프로브들 사이의 결합 친화도는 미스매치된 염기의 수, 미스매치(들)의 성질 (A-G 대 A-C 대 T-G 대 T-C 등), 사중체 내의 미스매치(들)의 위치 등에 따라 변하므로, 본 발명의 분석은 표적을 시퀀싱하기 위해 사용할 수 있다.

실시태양에서, 측정된 시그널은 시험 시료 내에 포함된 형광단의 형광 방출 강도일 수 있다. 상기 실시태양에서, 프로브와 표적 사이의 결합 친화도는 형광단이 시그널 저하 또는 시그널 증폭을 통해 혼성화를 신호하는지에 따라 방출 강도와 정상관관계 또는 역상관관계일 수 있다. 선택된 조건 하에, 인터칼레이팅제에 의해 생성된 형광 방출 강도는 프로브-표적 결합 친화도와 정상관관계일 수 있는 반면, 프로브에 공유 결합된 비인터칼레이팅 형광단을 사용하는 바람직한 실시태양의 방출 강도는 프로브-표적 결합 친화도와 역상관관계일 수 있다. 바람직하게는 0-2 미스매치 및(또는) 결실 범위에 걸쳐, 보다 바람직하게는 0-3 미스매치 및(또는) 결실의 범위에 걸쳐 프로브와 표적 사이의 매칭 정도가 증가함에 따라 비인터칼레이팅 형광단에 대한 형광 방출 강도는 감소한다.

본 발명은 프로브와 표적 사이의 결합 친화도를 정량할 수 있게 한다. 상기 정보는 최적화된 결합 특성을 갖는 안티센스 약물을 설계하는 것을 포함하여 다양한 용도에 유용할 수 있다.

본 발명의 분석은 바람직하게는 동질성이다. 분석은 측정된 시그널의 크기를 검출하기에 앞서 유리 프로브 및 유리 표적으로부터 프로브-표적 복합체를 분리시키지 않으면서 수행할 수 있다. 분석은 겔 분리 단계를 요구하지 않으며, 따라서 시험 처리속도를 크게 증가시킨다. 정량적 분석은 단순하며 정확하다. 결과적으로, 결합 분석은 많은 시간과 비용을 절감하고, 쉽게 자동화될 수 있다. 또한, 분석은 결합 변수, 예를 들어 완충액, pH, 이온 농도, 온도, 인큐베이션 시간, 프로브와 표적 서열의 상대적 농도, 인터칼레이터 농도, 표적 서열의 길이, 프로브 서열의 길이 및 가능한 보조인자 (즉, 프로모터) 요구치가 신속하게 결정될 수 있도록 한다.

분석은 예를 들어 불투과성 표면 상의 또는 바이오칩 상의 웰 또는 마이크로채널 내의 용액 중에서 수행할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 제3 및 제4 스트랜드는 제1 및 제2 스트랜드보다 먼저 혼성화 매질에 제공되고, 제1 및 제2 스트랜드는 혼성화 매질과의 접촉에 의해 재수화되기에 앞서 탈수 형태로 제공된다.

더욱이, 본 발명의 분석은 바람직하게는 표적 상에 또는 프로브 상에 시그널 저하제를 제공하지 않으면서 수행된다.

본 발명자들은 혼성화에 대한 형광 강도 분석의 이점을 이전에 개시하였지만 (예를 들어 미국 특허 출원 제09/224,505호 (1998년 12월 31일자 출원) 참조), 본 발명의 분석의 몇몇 실시태양은 프로브 및 이중쇄 표적의 사중체를 특이적으로 검출하여, 표적을 변형시켜야 하는 필요를 제거한다. 본 발명자들이 이중쇄 프로브 및 이중쇄 표적 사이에 형성된 사중체를 특이적으로 분석할 수 있었던 것은 놀라운 것이며, 여기서 프로브와 표적 사이의 상호작용은 예를 들어 Pitner 등 (상기 문헌)의 사중체 혼성화의 매우 제한된 후그스틴 모델보다는, 왓슨-크릭 염기 페어링에 기초한다 (적어도 A는 T (또는 RNA의 경우 U)에 결합하고 G는 C에 결합한다는 의미에서).

본 발명의 분석에 사용하기에 적합한 프로브는 예를 들어, dsDNA, dsRNA, DNA:RNA 하이브리드, dsPNA, PNA:DNA 하이브리드 및 대전되지 않은 또는 부분적으로 대전된 주쇄를 갖는 다른 이중쇄 핵산 동족체를 포함한다. 8 내지 20 염기의 임의의 길이를 갖는 프로브 서열이 원핵세포 및 진핵세포의 최소의 특유 DNA 서열이 발견되는 범위이기 때문에 바람직하다. 12 내지 18 염기의 프로브가 인간 게놈 내의 최소 특유 서열의 길이이므로 특히 바람직하다. 실시태양에서, 5 내지 30 염기의 프로브가 가장 바람직하다. 그러나, 다수의 보다 짧은 프로브들이 뉴클레오티드 서열을 특이적으로 확인하기 위해 결합되는 다수의 비특유 표적 서열을 내부에 갖는 뉴클레오티드 서열을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 프로브의 길이는 표적의 길이와 매치되도록 선택될 수 있다.

본 발명은 사용하기에 위험하고 지루하며 시간 소모적이며 지속적으로 재생시켜야 할 필요가 있는 방사성 프로브의 사용을 필요로 하지 않는다. 바람직하게는 본 발명의 프로브는 사용하기에 안전하고 수년동안 안정하다. 따라서, 프로브는 대량으로 제조 또는 주문되어 보관될 수 있다.

실시태양에서, 프로브는 다분자 시그널링 복합체 또는 레독스쌍으로, 또는 화학발광 또는 전기화학발광 특성을 유도시키는 라벨로 표지된다.

형광 인터칼레이터가 혼성화 매질 내에 존재하지 않는 경우, 프로브 또는 표적 (바람직하게는 프로브)은 공유 결합된 형광 라벨을 갖는 것이 바람직하다. 라벨은 바람직하게는 비인터칼레이팅 형광단 또는 인터칼레이팅 형광단이다. 상기 실시태양에서, 형광단은 바람직하게는 양 말단에서 프로브에 결합된다. 바람직한 형광 마커는 비오틴, 로다민, 아크리딘 및 플루오레세인과 여기 에너지가 조사될 때 형광을 발하는 다른 마커를 포함한다.

여기 파장은 (일상적 실험 및(또는) 통상의 지식에 의해) 사용되는 형광단에 대한 여기 최대치에 상응하도록 선택되며, 바람직하게는 200 내지 1000 nm이다. 형광단은 바람직하게는 200 내지 1000 nm의 발광 파장을 갖도록 선택된다. 바람직한 실시태양에서, 형광단에 400 내지 540 nm 범위의 파장을 갖는 빛을 조사하기 위해 아르곤 이온 레이저가 사용되고, 형광 발광은 500 내지 750 nm 범위에서 검출된다.

본 발명의 분석은 매우 다양한 온도, 예를 들어, 5 내지 85°C에 걸쳐 수행할 수 있다. 몇몇 선행 기술의 분석은 승온을 필요로 하여, 비용이 추가되고 분석을 지연시킨다. 반면, 본 발명은 실온 이하에서 (예를 들어, 25°C 미만의 온도에서) 수행될 수 있다.

본 발명의 신뢰성은 표적 내의 구아닌 및 시토신 함량에 무관하다. G-C 염기쌍은 3개의 수소 결합을 형성하는 한편 A-T 염기쌍은 단지 2개의 수소 결합을 형성하므로, 보다 높은 G 또는 C 함량을 갖는 표적 및 프로브 서열이 보다 안정하고, 보다 높은 용점을 갖는다. 결과적으로, 혼성화된 프로브 및 표적 구역의 GC 함량을 완전히 매칭된 하이브리드 내에 존재하는 것보다 많이 증가시키는 염기쌍 미스매치는 미스매치된 프로브와 관련된 결합 약점을 상쇄할 수 있다.

본 발명의 분석은 극히 민감하여, 표적의 PCR 증폭을 수행할 필요를 제거한다. 예를 들어, 약 10 펩토몰의 표적과 약 10 펩토몰의 프로브를 함유하는 약 20  $\mu$ l의 부피를 갖는 시험 시료를 분석하는 것이 가능하다. 본 발명의 실시태양은  $5 \times 10^{-9}$  M의 농도, 바람직하게는  $5 \times 10^{-10}$  M 이하의 농도에서 표적을 분석하기에 충분히 민감하다. 본 발명의 실시태양은  $5 \times 10^{-9}$  M의 농도, 바람직하게는  $5 \times 10^{-10}$  M 이하의 농도로 프로브를 사용하기에 충분히 민감하다. 상기 값은 상기 방법이 보다 고농도를 검출할 수 없음을 제시하고자 한 것이 아님은 말할 필요도 없다.

프로브 (예, 제1 및 제2 스트랜드) 대 표적 (예, 제3 및 제4 스트랜드)의 비는 30:1 내지 1:1, 바람직하게는 약 10:1이다.

실시예에서는 이중체 DNA의 공지된 마이너 홈 존재 인터칼레이터인 YOYO-1이 DNA 올리고의 이중체 표적과의 삼중체 회합 또는 결합 (이는 올리고 상의 염기와 이중체 표적 내의 상보성 서열의 염기 사이의 왓슨-크릭 염기쌍 인식을 기초로 확인된 상보성 정도의 지표임)을 촉진시키고 시그널을 제시할 수 있음을 보여줄 것이다.

관찰된 삼중체 결합은 복합체가 강산 조건을 필요로 하기 때문에 문헌에 잘 특성화되어 있는 호모피리미딘 삼중체 모티브의 버전일 수 없다. 유사하게, 본 발명자들의 전형적인 야생형 33% GC 함량 15-mer 올리고를 호모퓨린 삼중체 모티브에 대한 요건인 이중체 표적 내의 "퓨린 풍부 스트랜드"에 대한 결합 상대로서 평가하면, 본 발명자들의 올리고는 올리고 서열 또는 표적 이중체의 퓨린 풍부 스트랜드 상의 추정 결합 부위에서 9 염기가 미스매치될 것이다.

YOYO-1 인터칼레이터는 문헌[Johansen and Jacobsen (1998)]에 NMR 분광학 연구를 기초로 이중체 DNA의 마이너 홈에 존재하는 것으로 보고되었다. YOYO-1은 이중체 DNA의 B 형태를 106°로 국소적으로 탈축합시켜 B 형태 나선 반복부에서 보통 발견되는 10 염기쌍보다는 13 염기쌍의 총 나선 반복부를 생성시키는 작용을 하는 것이 또한 보고되었다.

형광단으로서, YOYO-1의 발광은 상보성 올리고를 이중체 표적을 갖는 매질에 첨가함으로써 크게 향상되었다. 올리고와 이중체의 상호작용과 관련된 발광 개선은 YOYO-1이 이중체 마이너 홈 내에 존재하여 올리고와 이중체의 접촉시 보다 활기차게 발광하거나 또는 각각의 염기가 서로 접촉할 때 올리고와 이중체 내의 상보성 스트랜드에 의해 생성된 홈 내에 스스로를 배치시키기 위해 YOYO-1이 제2의 쾌적한 위치를 찾기 때문일 수 있다. 두가지 사건이 모두 일어나는 것도 또한 가능하다. X-선 결정학 및 NMR 분광학과 같은 추가의 연구는 YOYO-1과 천연 삼중체의 가능한 위치 및 상호작용을 확립시킬 것이다.

문헌[Johansen and Jacobsen (1998)]에서는 이중체 DNA의 106° 탈축합은 YOYO-1 발색단의 2회-인터칼레이션에 의해 유발되는 한편, 폴리프로필렌 아민 링커 사슬은 이중체의 마이너 홈 내에 유지되는 것으로 결론지었다. 이는 표적이 106°로 탈축합되는 메카니즘의 일부일 수 있으며, 그 이완은 양 방향에서 YOYO-1 상호작용 부위로부터 나타날 것이다. 이중체의 주쇄 사이의 마이너 홈에 위치하는 YOYO-1의 +4 양이온성이 YOYO-1 결합 부위의 바로 부근의 포스페이트 음이온성 전하 사이의 반발을 이완시켜, 주쇄 스트랜드가 YOYO-1의 부근에서 서로 보다 가까이 이동하도록 하는 것도 또

한 가능할 수 있다. 마이너 홈 내에서 서로 접촉할 때 올리고 및 상보성 스트랜드에 의해 생성된 홈에 존재함으로써 이중체 마이너 홈 내에 존재하는 YOYO-1 근처에 제2 YOYO-1이 위치하면, YOYO-1은 또한 올리고 주쇄 및 주쇄의 상보성 서열의 구역 사이의 음이온성 반발을 감소시키는 작용을 할 것이다.

본 발명자들은 또한 이중체 DNA를 축합시키는 시약이 삼중체 형성을 촉진시키는 능력을 갖는 것을 관찰하였다. 이중체 DNA를 축합시키는 1가, 2가 및 다가 양이온의 잘 알려진 능력 이외에, 상기 결과는 양이온이 올리고 내의 염기와 이중체의 상보성 스트랜드 내의 염기 사이의 가능한 결합을 만드는 가교를 형성한다는 것을 제시한다. 본 발명자들은 먼저 양이온에 의해 촉진된 삼중체를 형성한 다음 가교 구조를 파괴함으로써 이를 밝혀내었다. 양이온 및 삼중체가 존재한 매질의 지속적인 레이저 조사 결과는 모든 삼중체 구조의 급속한 소멸이었다.

YOYO-1에 의해 촉진된 삼중체를 사용하는 본 발명자들의 실험은 삼중체가 실온에서 용이하게 형성되어 형성될 때 수시간 동안 유지된다는 것이다. 시간이 경과하면서 미스매치된 올리고머는 동일하게 낮은 수준의 형광단 방출을 계속하고, 이것은 동일한 수준의 삼중체 형성을 의미한다. 한편, 양이온은 삼중체 또는 사중체 형성에 도움이 되는 일시적인 조건을 발생시키는 것으로 보인다. 양이온은 인터칼레이터, 예를 들어 YOYO-1, 금속 중심 양이온, 예를 들어  $MgCl_2$  또는 양이온성 펩티드, 예를 들어 스페르미딘을 포함하고, 이들은 음이온 전하와 상호작용함으로써 이중체 DNA 표적의 형태에 작용하여 상기 표적의 형태를 변경시킨다. 그 결과는 양이온 중, 농도 또는 상이한 농도의 여러 종의 존재에 따라 상이하였다.

본 발명자들은 유기 용매의 적절한 농도가 표적 이중체 DNA를 변경시켜 삼중체의 생성을 가능하게 함을 밝혀내었다.

많은 삼중체 및 사중체 형성의 일시적인 특성은 이중체 DNA로부터 서열 정보의 입수와 관련된 많은 과정이 용이하게 가역적일 것, 즉 활성화되고 종료될 것을 요구하는 개체의 필요성과 협력한다. 그럼에도 불구하고, 상기 형성은 그 형성을 기초로 한 진단 및 다른 분석이 가능할 정도로 충분히 안정적이다.

따라서, 본 발명자들은 올리고상의 적어도 하나의 염기와 이중체 표적의 상보성 스트랜드의 염기의 접촉을 달성하기에 충분한 올리고와 상보성 서열의 인식이 가능하도록 만드는 수단이 이중체 DNA의 축합 또는 탈축합임을 밝혀내었다. 나선 반복부의 크기가 축합 또는 탈축합에 의해 변형될 때 서열 내의 인접 염기쌍의 일반적인 위치로 많은 이탈이 발생할 가능성이 있다. 변형 나선체에서 스택된 염기쌍의 상기 재배열은 비변형 이중 나선의 염기 스택 내에 존재하는 것과 상이한 전자 궤도의 충분한 변화를 가능하게 하여 제3 스트랜드가 상보성 스트랜드에 대한 결합이 시작되도록 만들 가능성이 크다.

축합 또는 탈축합에 의한 이중체 변형은 dsDNA 및 인접 서열의 음이온 전하가 일반적으로 동시에 영향받으면서 동질 방식으로 발생할 수 있거나, 상기 변형은 국소화될 수 있다. 국소화되는 경우, 일련의 크게 상이한 변형은 변형 로커스로부터 점진적으로 멀어지는 DNA 염기쌍 및 주쇄에서 발생할 것이다. 어느 경우에도 올리고 상의 염기와 이중체의 상보성 스트랜드 내의 염기 사이의 결합이 가능하여 삼중체 페어링을 생성시키는 조건이 발생할 수 있다. 상기 결합이 일단 개시되면, 올리고 상의 염기의 두개의 인접 서열이 이중체의 상보성 스트랜드의 인접 서열 내의 염기와 결합하는 위치로 어떻게 이동하는지 이해할 수 있다.

본 발명자들의 실험이 YOYO-1에 의해 촉진되는 삼중체의 큰 안정성을 보여주지만, 많은 다른 시약은 이중체 DNA의 형태에 영향을 주어 천연 삼중체를 일시적으로 형성시킨다. 상기 삼중 나선 구조체는 삼중체 유지에 덜 유리한 형태로 계속 진행되어 삼중체 구조를 상실시킨다.

표적 dsDNA의 형태를 변형시키는 작용을 할 수 있는 임의의 물질은 선택된 온도, pH 등의 조건에 적합한 농도 및 인큐베이션 시간 확립을 위해 시간에 따른 효과를 모니터링하여야 한다. 본원은 본원에서 개시한 내용을 실시하기 위해서 당업자가 사용하거나 변형할 수 있는 상기 시약을 평가하는 많은 방법을 교시한다.

본 발명을 하기 실시예를 참고로 하여 보다 상세하게 예시하지만, 본 발명이 이들로 제한되지 않음을 이해하여야 한다.

## 실시예

본 발명을 하기 실시예를 통해 보다 상세하게 설명하지만, 본 발명이 이들 실시예에 의해 한정되지 않음을 이해하여야 한다.

## 실시예 1

실시에 1은 본 발명의 분석법이 양이온 DNA 인터칼레이터인 YOYO-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)이 존재할 경우 1 bp, 2 bp 및 3 bp 미스매치 또는 결실을 포함하는 완전히 상보성인 dsDNA:ssDNA 복합체 및 dsDNA:ssDNA 복합체를 식별할 수 있음을 입증한다. YOYO-1과 dsDNA 사이의 상호작용 메커니즘의 NMR 분광분석은 YOYO-1의 인터칼레이션에 의해 dsDNA 나선체의 106°의 국소적인 탈축합이 야기되어 비축합 B 형태 dsDNA에서의 정상적인 10 염기쌍 나선 반복부와는 달리 13 염기쌍의 총 나선 반복부를 생성시킴을 보여준다 [J. Biomolec. Struct. and Dynamics 16, 205-222 (1998)].

인간 낭포성 섬유증 유전자의 엑손 10[Nature 380, 207 (1996)]으로부터 유래하는 상보성 센스 및 안티센스 50-mer ssDNA 표적 서열을 DNA 합성기 (Expedite 8909, PerSeptive Biosystems)로 합성하여 HPLC로 정제하였다. 등몰량의 상보성 올리고뉴클레오타이드를 95℃에서 10분 동안 가열하고, 1.5 시간에 걸쳐서 온도를 21℃로 냉각시키면서 점진적으로 어닐링시켰다. dsDNA 올리고뉴클레오타이드를 1 pmole/ $\mu$ l의 농도로 ddH<sub>2</sub>O에 용해시켰다.

야생형 표적 DNA (서열 1)의 센스 스트랜드의 서열은 5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT CAT CTT TGG TGT TTC CTA TGA TGA ATA TA-3'이었다.

야생형 표적 DNA (서열 1)의 안티센스 스트랜드 서열은 5'-TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CAA AGA TGA TAT TTT CTT TAA TGG TGC CA-3'이었다.

서열 2는 야생형 센스 스트랜드 서열 CAT가 CGT로 변경되는 아미노산 위치 507에서 하나의 염기쌍 돌연변이 (밑줄친 부분)를 제외하고는 야생형 표적 DNA (서열 1)와 동일한 50-mer 변이체 dsDNA 표적 서열이었다.

서열 2의 센스 스트랜드 서열은 5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT CGT CTT TGG TGT TTC CTA TGA TGA ATA TA-3'이었다.

서열 2의 안티센스 스트랜드 서열은 5'-TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CAA AGA CGA TAT TTT CTT TAA TGG TGC CA-3'이었다.

서열 3은 야생형 센스 스트랜드 서열 CAT가 ACT로 변경되는 아미노산 위치 506 및 507에서 연속적인 두개의 염기쌍 돌연변이 (밑줄친 부분)를 제외하고는 야생형 표적 DNA (서열 1)와 동일한 50-mer 변이체 dsDNA 표적 서열이었다.

서열 3의 센스 스트랜드 서열은 5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT ACT CTT TGG TGT TTC CTA TGA TGA ATA TA-3'이었다.

서열 3의 안티센스 스트랜드 서열은 5'-TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CAA AGA GTA TAT TTT CTT TAA TGG TGC CA-3'이었다.

서열 4는 야생형 센스 스트랜드 서열 CAT가 ACG로 변경되는 아미노산 위치 506 및 507에서 연속적인 세개의 염기쌍 돌연변이 (밑줄친 부분)를 제외하고는 야생형 표적 DNA (서열 1)와 동일한 50-mer 변이체 dsDNA 표적 서열이었다.

서열 4의 센스 스트랜드 서열은 5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT ACG CTT TGG TGT TTC CTA TGA TGA ATA TA-3'이었다.

서열 4의 안티센스 스트랜드 서열은 5'-TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CAA AGC GTA TAT TTT CTT TAA TGG TGCCA-3'이었다.

서열 5는 야생형 센스 스트랜드 서열 CTT가 결실되는 아미노산 위치 507 및 508에서 연속적인 세개의 염기쌍 결실 (3개의 점으로 표시)을 제외하고는 야생형 표적 DNA (서열 1)와 동일한 47-mer 변이체 dsDNA 표적 서열이었다.

서열 5의 센스 스트랜드 서열은 5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT CAT...TGG TGT TTC CTA TGA TGA ATA TA-3'이었다.

서열 5의 안티센스 스트랜드 서열은 5'-TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CA...A TGA TAT TTT CTT TAA TGG TGC CA-3'이었다.

프로브 No. 1은 아미노산 위치 505 내지 510에서 중첩되는 50-mer 야생형 표적 DNA (서열 1)의 센스 스트랜드의 15 뉴클레오타이드 세그먼트에 완전히 상보성하도록 디자인된 15-mer ssDNA 프로브이었다 [Nature 380, 207(1996)]. 프로브의 키랄성은 표적 센스 스트랜드의 키랄성과 반대이거나 역평행이었다. 프로브 No.1은 DNA 합성기로 합성하여 HPLC로 정제하고, 1 pmole/ $\mu$ l의 농도로 ddH<sub>2</sub>O에 용해시켰다.

프로브 No.1의 서열은 5'-CAC CAA AGA TGA TAT-3'이었다.

혼성화 반응 혼합물(120  $\mu$ l)은 6 pmole의 표적 dsDNA, 6 pmole의 ssDNA 프로브, 0.5 x TBE 및 500 nM의 DNA 인터칼레이터 YOYO-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 포함하였다. 반응 혼합물을 실온 (21°C)에서 5분 동안 인큐베이션하고, 수정 큐벳에 위치시켜 파장이 488 nm인 아르곤 이온 레이저 빔을 조사하고, 가열 챔버에서 온도를 경시적으로 상승시키면서 형광 방출을 반복적으로 모니터링하였다. 시료의 동시 온도 측정은 각 시료에 직접 설치한 소프트웨어 조절 온도 프로브로 실시하였다. 최대 형광 강도는 각 분석 시료에 대한 온도의 함수로서 플로팅하였다.

도 1은 야생형 50-mer 비변성 dsDNA 표적 서열 (서열 1)을 30°C 내지 85°C에서 15-mer ssDNA 프로브 No. 1과 반응시켰을 때 가장 높은 형광 강도를 얻을 수 있음을 보여준다. 50-mer 야생형 dsDNA의 T<sub>m</sub>인 65°C 미만의 온도에서, dsDNA:ssDNA 복합체가 형성되었고, DNA 인터칼레이터 YOYO-1에 의해 증가되었다. 온도가 65°C를 초과하여 증가할 때, dsDNA:ssDNA 복합체는 ssDNA:ssDNA 복합체로 전환되었다. 분명한 것은 YOYO-1이 두 종류의 복합체에서 효과적으로 인터칼레이션되어 형광을 발생시킬 수 있다는 것이다.

이와 대조적으로, 1 bp 미스매치 (서열 2 + 프로브 No. 1), 연속적인 2 bp 미스매치 (서열 3 + 프로브 No. 1), 연속적인 3 bp 미스매치 (서열 4 + 프로브 No. 1) 및 3 bp 결실 (서열 5 + 프로브 No. 1)를 생성시키는 불완전하게 상보성인 프로브와 표적 조합물은 형광 강도를 완전하게 매치된 서열에서 관찰된 것보다 각각 30°C에서 57%, 94%, 97% 및 98%, 65°C에서 47%, 79%, 92% 및 91% 더 낮게 만들었다 (도 1). 50-mer dsDNA 표적 및 500 nM YOYO-1을 포함하는 대조 시료는 30°C에서 3 bp 미스매치된 복합체에서 관찰된 형광 수준 이하의 형광 수준을 보였다 (테이타 미제시). ssDNA 프로브 No. 1 + 500 nM YOYO-1 시료에 의해 방출된 형광 수준은 YOYO-1 단독에 의해 방출된 것과 동일하였다 (테이타 비제시). 온도가 65°C 이상으로 상승하면서, 완전한 매치와 염기쌍 미스매치 사이의 식별도가 증가하였고, 이것은 dsDNA:ssDNA 구조의 점진적인 붕괴를 의미하였다. 85°C까지는, 1 bp 미스매치, 2 bp 미스매치, 3 bp 미스매치 및 3 bp 결실에 의해 달성된 형광 강도는 완전한 매치에 의해 달성되는 강도보다 40%, 63%, 92% 및 83% 더 낮았다 (도 1). 임의의 소정 온도에서, 각각의 복합체에 의해 방출된 특징적인 형광 수준을 경시적으로 모니터링하였고, 5분 내지 24시간 사이에서 안정하였다.

DNA 탈축합제인 YOYO-1의 존재에 의해 dsDNA 표적의 사전 변성을 필요로 하지 않으면서 ssDNA 프로브를 완전히 상보성인 dsDNA:ssDNA 복합체와 1 bp, 2 bp 또는 3 bp 미스매치 또는 결실을 포함하는 것을 식별하는데 사용할 수 있었다.

## 실시예 2

DNA 탈축합제, ssDNA 프로브 및 비변성 dsDNA 표적을 사용한 형광 강도 분석이 GC 함량 비율 (및 잠재적으로 상이한 어닐링 온도)이 크게 상이한 프로브 및 표적 DNA 프로세싱에 적용되는지를 확인하기 위해서 새로운 15-mer ssDNA 프로브 및 50-mer dsDNA 표적 서열을 상기한 바와 같이 합성하여 정제하고 어닐링시켰다. ssDNA 프로브와 dsDNA 표적을 모두 1 pmole/ $\mu$ l의 농도로 ddH<sub>2</sub>O에 용해시켰다.

서열 6은 GC 함량 비율이 30%에서 52%로 변경된, 서열 1로부터 변형된 50-mer dsDNA 표적 서열이었다.

야생형 표적 DNA (서열 6)의 센스 스트랜드 서열은 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CTC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG-3'이었다.

야생형 표적 DNA (서열 6)의 안티센스 스트랜드 서열은 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'이었다.

서열 7은 센스 스트랜드 CTC가 CTT로 변경된 한 염기쌍 돌연변이 (밑줄친 부분)를 제외하고는 야생형 표적 DNA (서열 6)와 동일한 50-mer 변이체 dsDNA 표적 서열이었다.

변이체 서열 7의 센스 스트랜드 서열은 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CTT TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG-3'이었다.

변이체 서열 7의 안티센스 스트랜드 서열은 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAA AGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'이었다.

서열 8은 센스 스트랜드 CAT가 CGT로 변경된 한 염기쌍 돌연변이 (밑줄친 부분)를 제외하고는 서열 6과 동일한 50-mer 변이체 dsDNA 표적 서열이었다.

변이체 서열 8의 센스 스트랜드 서열은 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CGT CTC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG-3'이었다.

변이체 서열 8의 안티센스 스트랜드 서열은 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA CGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'이었다.

서열 9는 센스 스트랜드 CAT가 CTT로 변경된 한 염기쌍 돌연변이 (밑줄친 부분)를 제외하고는 서열 6과 동일한 50-mer 변이체 dsDNA 표적 서열이었다.

변이체 서열 9의 센스 스트랜드 서열은 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CTT CTC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG-3'이었다.

변이체 서열 9의 안티센스 스트랜드 서열은 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA AGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'이었다.

서열 10은 센스 스트랜드 CTC가 CCC로 변경된 한 염기쌍 돌연변이 (밑줄친 부분)를 제외하고는 서열 6과 동일한 50-mer 변이체 dsDNA 표적 서열이었다.

변이체 서열 10의 센스 스트랜드 서열은 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CCC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG-3'이었다.

변이체 서열 10의 안티센스 스트랜드 서열은 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG GGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'이었다.

서열 11은 센스 스트랜드 CTC가 CGC로 변경된 한 염기쌍 돌연변이 (밑줄친 부분)를 제외하고는 서열 6과 동일한 50-mer 변이체 dsDNA 표적 서열이었다.

변이체 서열 11의 센스 스트랜드 서열은 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CGC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG-3'이었다.

변이체 서열 11의 안티센스 스트랜드 서열은 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG CGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'이었다.

서열 12는 센스 스트랜드 CAT가 ACT로 변경된 연속적인 두개의 염기쌍 돌연변이 (밑줄친 부분)를 제외하고는 서열 6과 동일한 50-mer 변이체 dsDNA 표적 서열이었다.

변이체 서열 12의 센스 스트랜드 서열은 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT ACT CTC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG-3'이었다.

변이체 서열 12의 안티센스 스트랜드 서열은 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA GTA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'이었다.

서열 13은 GC 함량 비율이 30%에서 72%로 변경된, 서열 1로부터 변형된 50-mer dsDNA 표적 서열이었다.

야생형 표적 DNA (서열 13)의 센스 스트랜드 서열은 5'-GAG CAC CCT CCC AGG CAC GGT CGT CCC TGG TGC GAC CTC CGA CGA GCG TG-3'이었다.

야생형 표적 DNA (서열 13)의 안티센스 스트랜드 서열은 5'-CAC GCT CGT CGG AGG TCG CAC CAG GGA CGA CCG TGC CTG GGA GGG TGC TC-3'이었다.

서열 14는 센스 스트랜드 CGT가 CAT로 변경된 한 염기쌍 돌연변이 (밑줄친 부분)를 제외하고는 서열 13과 동일한 50-mer 변이체 dsDNA 표적 서열이었다.

변이체 서열 14의 센스 스트랜드 서열은 5'-GAG CAC CCT CCC AGG CAC GGT CAT CCC TGG TGC GAC CTC CGA CGA GCG TG-3'이었다.

변이체 서열 14의 안티센스 스트랜드 서열은 5'-CAC GCT CGT CGG AGG TCG CAC CAG GGA TGA CCG TGC CTG GGA GGG TGC TC-3'이었다.

서열 15는 센스 스트랜드 CGT가 ATT로 변경된 연속적인 두개의 염기쌍 돌연변이 (밑줄친 부분)를 제외하고는 서열 13과 동일한 50-mer 변이체 dsDNA 표적 서열이었다.

변이체 서열 15의 센스 스트랜드 서열은 5'-GAG CAC CCT CCC AGG CAC GGT ATT CCC TGG TGC GAC CTC CGA CGA GCG TG-3'이었다.

변이체 서열 15의 안티센스 스트랜드 서열은 5'-CAC GCT CGT CGG AGG TCG CAC CAG GGA ATA CCG TGC CTG GGA GGG TGC TC-3'이었다.

프로브 No. 2는 50-mer 야생형 표적 DNA (서열 6)의 센스 스트랜드의 15 뉴클레오타이드 세그먼트에 완전히 상보성이라도 디자인된 15-mer ssDNA 프로브이었다. 프로브의 키랄성은 표적 센스 스트랜드의 키랄성과 반대이거나 역평행이었다.

프로브 No. 2의 서열은 5'-CAC CAG AGA TGA CAG-3'이었다.

프로브 No. 3은 50-mer 야생형 표적 DNA (서열 13)의 센스 스트랜드의 15 뉴클레오타이드 세그먼트에 완전히 상보성이라도 디자인된 15-mer ssDNA 프로브이었다. 프로브의 키랄성은 표적 센스 스트랜드의 키랄성과 반대이거나 역평행이었다.

프로브 No. 3의 서열은 5'-CAC CAG GGA CGA CCG-3'이었다.

혼성화 분석 조건은 실시예 1과 동일하였다.

ssDNA 프로브 No. 2 (53%의 GC 함량)를 50-mer 야생형 dsDNA 표적 (서열 6) 및 변이체 dsDNA 표적 (서열 8 및 서열 12)과 반응시킬 때, dsDNA:ssDNA 복합체가 비변성 조건 하에서 낮은 온도에서 형성되었다 (도 2A). 완전히 매치된 DNA 복합체가 가장 높은 형광 강도를 달성하였지만, 1 bp 미스매치 (서열 8 + 프로브 No. 2) 및 연속적인 2 bp 미스매치 (서열 12 + 프로브 No. 2)를 갖는 불완전하게 상보성인 복합체는 30°C에서 완전하게 매치된 서열에서 관찰된 것보다 각각 63% 및 95% 더 낮은 형광 강도를 생성시켰다 (도 2A). 온도가 상승하면서 dsDNA:ssDNA 복합체가 점진적으로 붕괴되어 형광 강도의 감소 및 완전한 매치와 염기쌍 미스매치 사이의 식별력 저하를 야기하였다. 85°C까지는 완전하게 매치된 서열과 염기쌍 미스매치를 포함하는 서열 사이에 형광의 차이가 거의 목격되지 않았다 (도 2A).

이와 유사하게, YOYO-1의 존재 하에 ssDNA 프로브 No. 3 (73%의 GC 함량)를 대응하는 50-mer 야생형 dsDNA 표적 (서열 13) 및 변이체 dsDNA 표적 (서열 14 및 서열 15)과 반응시켰을 때 dsDNA:ssDNA 복합체가 형성되었다. 1 bp 미스매치된 DNA 복합체 (서열 14 + 프로브 No. 3) 및 연속적인 2 bp 미스매치된 DNA 복합체 (서열 15 + 프로브 No. 3)의

형광 강도는 30℃에서 완전하게 매치된 서열에 의해 얻은 것보다 각각 48% 및 64% 더 작았다 (도 2B). 온도가 30℃에서 85℃로 상승하면서 모든 시료의 형광은 감소하였고, 이것은 YOYO-1 결합의 감소 및 dsDNA:ssDNA 복합체 붕괴를 의미한다.

ssDNA 프로브 및 dsDNA 표적의 GC 함량 비율에 무관하게, YOYO-1는 비변성 조건 하에서 dsDNA:ssDNA 복합체 형성을 촉진시켜 완전히 상보성인 서열과 1 또는 2 bp 돌연변이를 포함하는 서열을 정확하게 식별할 수 있도록 만든다.

### 실시예 3

다음 실시예는 비변성 dsDNA 표적 및 ssDNA-F 프로브를 사용한 복합체 형성을 촉진하고 안정화시키는 상이한 DNA 축합제를 이용한 분석법의 특이성을 입증할 것이다.

프로브 No. 4는 5' 위치에 플루오레세인 잔기가 부착된 것을 제외하고는 프로브 No. 1과 동일한 15-mer 역평행 ssDNA 프로브이다. 프로브 No. 4는 DNA 합성기로 합성하고, HPLC로 정제하여 1 pmole/ $\mu$ l의 농도로 ddH<sub>2</sub>O에 용해시켰다.

프로브 No. 4의 서열은 5'-Flu-CAC CAA AGA TGA TAT-3'이었다.

혼성화 반응 혼합물 (40  $\mu$ l)은 0.4 pmole의 표적 dsDNA, 4 pmole의 5'- 플루오레세인 표지된 ssDNA 프로브 No. 4, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 및 10 mM 내지 125 mM NaCl을 포함하였다. dsDNA 표적을 사전 변성 처리하지 않은 상태로 반응 혼합물을 실온 (21℃)에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 시료를 수정 큐벳에 위치시켜 파장이 488 nm인 아르곤 이온 레이저 빔을 조사하고, 형광 방출을 모니터링하였다. 최대 형광 강도는 플루오레세인의 방출 파장인 525 nm의 파장에서 발생하였다. 형광 방출 강도를 각 분석 시료에 대한 파장의 함수로서 플로팅하였다.

NaCl의 부재 하에 또는 10 mM 또는 25 mM NaCl의 존재 하에, dsDNA 표적과 역평행 ssDNA-F 프로브 사이에 어떠한 결합도 검출되지 않았다 (데이터 비제시).

50 mM NaCl의 존재 하에 1시간 동안 인큐베이션한 후에, 완전히 상보성인 서열 (서열 1 + 프로브 No. 4)로 이루어진 dsDNA:ssDNA-F 복합체가 용이하게 형성되었고, 대조 프로브 No. 4 (표지된 ssDNA-F)에 의해 방출되는 것에 비해 형광 방출 강도의 49% 저하를 보였다 (도 3). 이와 대조적으로, 1 bp G-T 미스매치 (서열 2 + 프로브 No. 4)를 포함하는 불완전하게 상보성인 dsDNA:ssDNA-F 복합체는 프로브 No. 4 대조 시료에서 관찰되는 것에 비해 형광 방출 강도의 11% 저하를 보였다.

또한, 반응 혼합물 내에 75 mM, 100 mM 및 125 mM NaCl의 존재도 완전하게 매치된 서열 1 표적과 역평행 프로브 No. 4 사이의 상당량의 복합체 형성과 일치되도록 형광 방출 저하를 야기하고, 1 bp G-T 미스매치된 서열 2 표적 및 프로브 No. 4가 존재할 경우 형광 방출을 보다 적게 저하시켜 50 mM NaCl의 존재 하에 관찰된 것과 유사한 형광 강도를 생성시켰다 (데이터 미제시).

공지된 DNA 축합제인 1가 양이온을 사용하면 비변성 dsDNA 표적과 형광 표지된 역평행 ssDNA 프로브 사이의 DNA 복합체 형성을 촉진시켜 완전하게 상보성인 DNA 서열과 하나의 1 bp 미스매치를 포함하는 서열 사이의 신뢰할 수 있는 식별이 가능하게 되었다. 반응은 10 대 1의 프로브 대 표적 비율에서 인큐베이션한 지 1시간 내에 실온에서 발생하였다. 상기 실시예에 사용된 dsDNA 표적 및 ssDNA 프로브는 33% GC 함량을 보였고, DNA의 호모퓨린 또는 호모피리미딘 스트레치를 포함하지 않았다. 15 뉴클레오타이드 ssDNA 프로브 내에 산재하는 6개의 피리미딘 염기의 존재에도 불구하고 dsDNA:ssDNA 복합체가 서열 특이적인 방식으로 용이하게 형성되었다.

### 실시예 4

DNA 축합제, 예를 들어 양이온의 존재 하에 5'-플루오레세인 표지된 ssDNA 프로브 및 비변성 dsDNA 표적을 사용하는 형광 강도 분석을 GC 함량 (및 잠재적으로 상이한 어닐링 선호도)이 크게 상이한 프로브 및 표적 DNA에 적용할 수 있는지를 확인하기 위해 15-mer ssDNA-F 프로브 및 50-mer dsDNA 표적 서열을 (GC 함량 비율을 변경시키면서) 상기한 바와 같이 합성하고, 정제하여 어닐링시켰다. ssDNA-F 프로브 및 dsDNA 표적을 1 pmole/ $\mu$ l의 농도로 ddH<sub>2</sub>O에 용해시켰다.

프로브 No. 5는 5' 위치에 플루오레세인 잔기가 부착된 것을 제외하고는 프로브 No. 2와 동일한 15-mer 역평행 ssDNA 프로브이었다.

프로브 No. 5의 서열은 5'-Flu-CAC CAG AGA TGA CAG-3'이었다.

프로브 No. 6은 5' 위치에 플루오레세인 잔기가 부착된 것을 제외하고는 프로브 No. 3과 동일한 15-mer 역평행 ssDNA 프로브이었다.

프로브 No. 6의 서열은 5'-Flu-CAC CAG GGA CGA CCG-3'이었다.

실시에 3에서 수행한 분석은 반응 혼합물에 1가 양이온을 첨가함으로써 용이하게 실시하였다. 분석 특이성은 추가로 GC 함량 비율이 상이한 dsDNA 표적 및 ssDNA-F 프로브를 사용하여 복합체 형성을 촉진시키기 위해 2가 양이온 (1가 양이온 대신에)을 사용하여 조사하였다.

혼성화 반응 혼합물 (40  $\mu$ l)은 0.4 pmole의 표적 dsDNA, 4 pmole의 5' 플루오레세인 표지된 ssDNA 프로브, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 및 5 mM 내지 30 mM  $MnCl_2$  또는 5 mM 내지 30 mM  $MgCl_2$  또는 5 mM 내지 30 mM  $NiCl_2$ 를 포함하였다. dsDNA 표적을 사전 변성 처리하지 않은 상태로 반응 혼합물을 실온 (21°C)에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 시료를 수정 큐벳에 위치시켜 파장이 488 nm인 아르곤 이온 레이저 빔을 조사하고, 형광 방출을 모니터링하였다. 최대 형광 강도는 플루오레세인의 방출 파장인 525 nm의 파장에서 발생하였다. 형광 방출 강도를 각 분석 시료에 대한 파장의 함수로서 플로팅하였다.

10 mM  $MnCl_2$ 의 존재 하에 ssDNA-F 프로브 No. 5 (53% GC 함량)를 50-mer 야생형 dsDNA 표적 (서열 6) 및 변이체 dsDNA 표적 (서열 7 내지 서열 12)와 함께 인큐베이션할 때, dsDNA:ssDNA-F 복합체가 비변성 조건 하에서 실온에서 형성되었다. 완전하게 매치된 DNA 복합체는 형광 강도의 최대 저하 (1시간 인큐베이션 후에 43% 감소)를 보였지만, 1 bp T-G 미스매치 (서열 7 + 프로브 No. 5)를 포함하는 덜 안정한 dsDNA:ssDNA-F 복합체는 1시간 인큐베이션 후에 프로브 No. 5만을 사용시에 관찰되는 것보다 20% 더 작았다 (도 4). 1 bp G-T 미스매치 (서열 8 + 프로브 No. 5), 1 bp T-T 미스매치 (서열 9 + 프로브 No. 5), 1 bp C-A 미스매치 (서열 10 + 프로브 No. 5) 및 연속적인 2 bp A-G 및 C-T 미스매치 (서열 12 + 프로브 No. 5)를 생성시키는 dsDNA:ssDNA-F 복합체는 프로브 No. 5만에 대해 관찰된 것과 완전히 매치된 DNA 복합체에 대해 관찰된 것 사이의 형광 강도를 보이는 완전히 매치된 dsDNA:ssDNA-F 복합체 (서열 6 + 프로브 No. 5)보다 덜 안정하였다 (데이터 미제시). 가장 불안정한 1 bp T-T 미스매치된 dsDNA:ssDNA-F 복합체 (1시간 후에 단지 5%의 형광 강도 감소만을 야기함)를 제외하고, 다른 모든 미스매치된 DNA 복합체는 매우 유사한 형광 강도를 생성시켰다. 1 bp G-A 미스매치 (서열 11 + 프로브 No. 5)를 포함하는 dsDNA:ssDNA-F 복합체만이 완전히 매치된 dsDNA:ssDNA-F 복합체에 의해 생성된 것보다 작은 형광 강도를 생성시켰다 (데이터 미제시).

또한, ssDNA-F 프로브 No. 6 (73% GC 함량)은 대응하는 50-mer 야생형 dsDNA 표적 (서열 13) 및 변이체 dsDNA 표적 (서열 14)과 1시간 동안 반응시킬 때 20 mM  $MgCl_2$  또는 20 mM  $MnCl_2$  또는 20 mM  $NiCl_2$ 를 포함시키면

dsDNA:ssDNA-F 복합체 형성을 촉진시켰다 (데이터 미제시). 예상한 바와 같이, 완전히 매치된 dsDNA:ssDNA-F 복합체는 형광 강도의 최대 감소를 생성시켰고, 덜 안정한 1 bp A-C 미스매치된 dsDNA:ssDNA-F 복합체 (서열 14 + 프로브 No. 6)는 중간 수준의 형광을 생성시켰다 (데이터 미제시).

완전하게 매치된 dsDNA:ssDNA-F 복합체 (33% GC 함량) (서열 1 + 프로브 No. 4)는 10 mM  $MnCl_2$ 의 존재 하에 1시간 내에 용이하게 형성되었고, 프로브 No. 4 단독시에 방출되는 것에 비해 형광 강도의 57% 감소를 야기하였다 (데이터 미제시). 상기 반응 조건은 1 bp G-T 미스매치 (서열 2 + 프로브 No. 4)를 포함하는 dsDNA:ssDNA-F 복합체에 매우 불리하였고, 프로브 No. 4 단독시에 관찰되는 것에 비해 형광을 증가시켰다 (데이터 미제시).

ssDNA 프로브 및 dsDNA 표적의 GC 함량 비율에 무관하게,  $Mn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  또는  $Ni^{+2}$ 과 같은 2가 양이온의 첨가는 비변성 조건 하에서 dsDNA:ssDNA 복합체 형성을 촉진시켜 완전히 상보적인 서열과 1 bp 돌연변이를 포함하는 서열을 정확하게 식별할 수 있도록 만든다.

실시에 5

실시에 3 및 4의 dsDNA:ssDNA 복합체 형성 분석을 1종류의 1가 또는 2가 양이온의 존재 하에 수행하였다. 다음 실시예는 2가 양이온의 조합물을 복합체 형성 촉진제로서 사용할 경우 dsDNA:ssDNA 복합체 내의 완전한 매치와 1 bp 미스매치를 식별하는 본 발명의 분석법의 신뢰성을 입증할 것이다.

혼성화 반응 혼합물 (40  $\mu$ l)은 0.4 pmole의 표적 dsDNA, 4 pmole의 5' 플루오레세인 표지된 ssDNA 프로브, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 및 각각 5 mM 내지 20 mM의  $MgCl_2$  및  $MnCl_2$ 를 포함하였다. dsDNA 표적을 사전 변성 처리하지 않은 상태로 반응 혼합물을 실온 (21°C)에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 시료를 수정 큐벳에 위치시켜 파장이 488 nm인 아르곤 이온 레이저 빔을 조사하고, 형광 방출을 모니터링하였다. 형광 방출 강도를 각 분석 시료에 대한 파장의 함수로서 플로팅하였다.

역평행 ssDNA-F 프로브 No. 6 (73% GC 함량)을 20 mM  $MgCl_2$  및 20 mM  $MnCl_2$ 의 존재 하에 1시간 동안 50-mer 야생형 dsDNA 표적 (서열 13)과 함께 인큐베이션할 경우, 완전히 상보성인 dsDNA:ssDNA-F 복합체가 효과적으로 형성되었고, 프로브 No. 6 단독에 의해 방출되는 것에 비해 46%의 형광 감소를 야기하였다 (도 5A). 상기 반응 조건은 1 bp A-C 미스매치 (서열 14 + 프로브 No. 6)를 포함하는 dsDNA:ssDNA-F 복합체에 매우 불리하였고, 프로브 No. 6 단독시에 관찰되는 것에 비해 형광을 3% 감소시켰다 (도 5A). 동일한 시료를 10 mM  $MgCl_2$  및 10 mM  $MnCl_2$ , 또는 15 mM  $MgCl_2$  및 15 mM  $MnCl_2$ 의 존재 하에 1시간 동안 인큐베이션했을 때 매우 유사한 결과를 얻었다 (데이터 미제시). 5 mM  $MgCl_2$  및 5 mM  $MnCl_2$ 의 첨가만으로는 1시간 인큐베이션 후에 시험된 역평행 ssDNA-F 프로브 No. 6과 모든 dsDNA 표적 사이에 복합체를 형성시키기에는 불충분하였다 (데이터 미제시).

역평행 ssDNA-F 프로브 No. 4 (33% GC 함량)를 10 mM  $MgCl_2$  및 10 mM  $MnCl_2$ 의 존재 하에 야생형 dsDNA 표적 (서열 1) 또는 변이체 dsDNA 표적 (서열 2 및 서열 3)과 함께 인큐베이션할 때, 최소 DNA 복합체 형성이 관찰되었다 (데이터 미제시). 그러나, 15 mM  $MgCl_2$  및 15 mM  $MnCl_2$ 의 존재 하에 1시간 동안 인큐베이션하면 프로브 No. 4에 의해 얻어지는 것에 비해 목격되는 형광 강도의 49% 감소에 의해 입증되는 바와 같이 완전히 매치된 dsDNA:ssDNA-F (서열 1 + 프로브 No. 4) 복합체 형성이 촉진되었다 (도 5B). 1 bp G-T 미스매치 (서열 2 + 프로브 No. 4) 또는 3 bp 결실 (서열 3 + 프로브 No. 4)을 야기하는 dsDNA:ssDNA-F 복합체는 15 mM  $MgCl_2$  및 15 mM  $MnCl_2$ 의 존재 하에 매우 불안정하여 프로브 No. 4 단독에 의해 방출되는 것에 비해 각각 2%의 형광 감소 및 5%의 형광 증가를 야기하였다 (도 5B). 20 mM  $MgCl_2$  및 20 mM  $MnCl_2$ 로 1시간 처리하면 프로브 No. 4 단독의 경우 관찰된 것에 비해 완전하게 매치된 dsDNA:ssDNA-F 복합체 및 1 bp G-T 미스매치 또는 3 bp 결실을 포함하는 dsDNA:ssDNA-F 복합체에 대해 각각 68%, 48% 및 6%의 형광이 감소하였다 (데이터 미제시).

도 5C에 도시한 바와 같이, 10 mM  $MgCl_2$  및 10 mM  $MnCl_2$ 의 존재 하에 완전하게 상보성인 서열 (서열 6 + 프로브 No. 5) 또는 1 bp T-G 미스매치 (서열 7 + 프로브 No. 5)를 포함하는, GC 함량이 53%인 dsDNA:ssDNA-F 복합체는 1시간 인큐베이션 후에 역평행 프로브 No. 5 단독에 의해 방출되는 것보다 각각 68% 및 20% 더 낮은 형광 강도를 생성시켰다.

15 mM  $MgCl_2$  및 15 mM  $MnCl_2$ 의 존재 하에 역평행 ssDNA-F 프로브 No. 5 (53% GC 함량)를 50-mer 야생형 dsDNA 표적 (서열 6)와 함께 1시간 동안 인큐베이션할 경우, 완전하게 상보성인 dsDNA:ssDNA-F 복합체가 매우 효율적으로 생성되었고, 프로브 No. 5 단독에 의해 달성되는 것에 비해 형광이 74% 감소되었다 (도 5D). 이와 대조적으로, 1 bp T-G 미스매치 (서열 7 + 프로브 No. 5)를 포함하는 dsDNA:ssDNA-F 복합체는 15 mM  $MgCl_2$  및 15 mM  $MnCl_2$ 의 존재 하에 훨씬 덜 안정하여 형광이 1시간 인큐베이션 후에 프로브 No. 5 단독에 의해 방출되는 것에 비해 15% 감소하였다 (도 5D). 이와 유사하게, 1 bp G-T 미스매치 (서열 8 + 프로브 No. 5), 1 bp C-A 미스매치 (서열 10 + 프로브 No. 5), 1 bp G-A 미스매치 (서열 11 + 프로브 No. 5) 및 연속적인 2 bp A-G 및 C-T 미스매치 (서열 12 + 프로브 No. 5)를 야기하는 dsDNA:ssDNA-F 복합체는 완전하게 매치된 DNA 복합체보다 훨씬 덜 안정하였다 (데이터 미제시). 프로브 No. 5 (53% GC 함량)를 dsDNA 표적 서열 3 (33% GC 함량)과 반응시킬 때, 프로브 No. 5 단독에 의해 얻어지는 것에 비해 형광의 3% 증가가 관찰되었고 (도 5D), 이것은 어떠한 DNA 복합체도 형성되지 않았음을 의미한다. 상기 결과는 상기 프로브 및 표적 조합물이 5 bp 미스매치를 생성시키는 것을 고려할 때 예상된 것이었다.

실시에 3, 4 및 5는 1가 양이온 또는 2가 양이온 (그 자체로 또는 서로 조합하여)과 같은 촉합제를 첨가하면 GC 함량이 크게 상이한 dsDNA 표적과 형광 표지된 ssDNA 프로브 사이의 DNA 복합체 형성이 촉진되고, 완전히 상보성인 서열과 다양한 1 bp 돌연변이를 포함하는 서열을 정확하고 신뢰할 수 있을 정도로 식별할 수 있게 된다는 것을 입증하였다.

## 실시예 6

YOYO-1에 의해 촉진된 dsDNA:ssDNA 복합체는 인큐베이션 5분 이내에 실온에서 용이하게 형성되었고, 수시간 동안 동일한 수준의 형광을 방출하였다. 염기쌍 미스매치를 포함하는 복합체는 지속되는 형광 시그널을 유사하게 방출하고, 이것은 복합체 형성이 시간이 경과하여도 동일한 수준임을 나타낸다. 양이온과 같은 축합제의 존재 하에 형성된 dsDNA:ssDNA 복합체의 형성 속도, 안정성 및 해리 속도를 조사하기 위해 시간 경로 실험을 수행하였다.

혼성화 반응 혼합물(40  $\mu$ l)은 0.4 pmole의 비변성 표적 dsDNA, 4 pmole의 5'-플루오레세인 표지된 ssDNA 프로브, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 및 10 mM MgCl<sub>2</sub> 및 10 mM MnCl<sub>2</sub>을 포함하였다. 반응 혼합물을 1분 내지 2시간의 상이한 기간 동안 실온 (21°C)에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 시료를 수정 큐벳에 위치시켜 파장이 488 nm인 아르곤 이온 레이저 빔을 1회 조사하고, 형광 방출을 모니터링하였다. 나타낸 시간에서 후속 다수회 레이저 조사 후에 동일한 샘플에 대한 형광을 추가로 측정하였다 (도 6). 형광 강도는 각 분석 시료에 대한 시간의 함수로서 플로팅하였다.

표적 dsDNA의 부재 하에 4 pmole의 프로브 No. 5 + 10 mM MgCl<sub>2</sub> 및 10 mM MnCl<sub>2</sub>을 포함하는 대조 시료에 의해 방출된 형광은 단지 5분의 인큐베이션 시간 내에 3배 감소하였고 (테이타 미제시), 이어서 수시간 내에 훨씬 더 느린 속도로 계속 감소하였다 (도 6A). 이러한 효과를 본원에서 "양이온성 저하 (Cationic Quench)"라고 언급한다. 특정 양이온과 함께 ssDNA-F 프로브의 인큐베이션 기간 증가와 관련된 상기 형광 억제체는 통상 2가 양이온의 존재 하에 발생하지만, 1가 양이온의 존재 하에서는 발생하지 않는다 (테이타 미제시). 이러한 관찰은 시험 시료가 반응하는 조건과 정확히 동일한 조건 하에서 대조 시료를 인큐베이션해야 할 중요성을 제시한다. 상이한 인큐베이션 기간 후에 각각의 ssDNA-F 대조 시료의 다수회의 레이저 조사는 형광단의 저하를 추가로 억제하고, 이후에 일정한 수준의 형광을 생성시켰다 (도 6A). 상기 결과는 전혀 예상치 못한 것이었다.

10 mM MgCl<sub>2</sub> 및 10 mM MnCl<sub>2</sub>의 존재 하에 역평행 ssDNA-F 프로브 No. 5를 50-mer 야생형 dsDNA 표적 (서열 6)와 인큐베이션했을 때 dsDNA:ssDNA-F 복합체 형성은 인큐베이션 15분 후에 나타났고, 대조 프로브 No. 5의 점진적인 양이온성 저하보다 6% 더 큰, 형광의 감소를 야기하였다 (도 6B). 복합체 형성은 10 mM MgCl<sub>2</sub> 및 10 mM MnCl<sub>2</sub>의 존재 하에 서열 6을 프로브 No. 5와 함께 30분 및 60분의 인큐베이션을 실시한 후에 크게 나타났고, 양이온성 저하된 프로브 No. 5 단독에 의해 달성되는 것에 비해 각각 76% 및 61%의 형광 저하를 보였다 (도 6B). 10 mM MgCl<sub>2</sub> 및 10 mM MnCl<sub>2</sub>의 존재 하에 90분 및 120분 인큐베이션한 후에 복합체 형성의 시그널이 전혀 발생하지 않았다 (도 6B). 90분 및 120분에 관찰된 형광 방출 수준은 양이온성 저하 효과에 전적으로 기인하였다 (도 6A와 6B 비교).

이와 대조적으로, 10 mM MgCl<sub>2</sub> 및 10 mM MnCl<sub>2</sub>의 존재하에 1 bp T-G 미스매치 (서열 7 + 프로브 No. 5)를 포함하는 dsDNA:ssDNA-F 복합체는 보다 느린 속도로 형성되고, 훨씬 덜 안정하였다. 1 bp T-G 미스매치된 복합체는 먼저 30분 인큐베이션 후에 관찰되었고, 인큐베이션 60분 후에 제거되는 것으로 나타났다 (도 6C). 다시, 상기 프로브는 이중체의 상보성 스트랜드에 역평행이었다 (도 6C).

10 mM MgCl<sub>2</sub> 및 10 mM MnCl<sub>2</sub>의 존재하에 30분 및 60분 인큐베이션 후에 형성된 완전히 상보성인 dsDNA:ssDNA-F 복합체 (서열 6 + 프로브 No. 5)에 레이저를 다수회 조사하면 상기 복합체의 파괴에 일치하는 형광이 역평행 ssDNA 프로브를 포함하는 DNA 복합체에 특이적인 속도로 방출되었다 (도 6B). 30분에 완전히 상보성인 복합체에 레이저를 조사한 지 45분 후에 측정시에 방출 강도 수준은 1869이었고, 이것은 복합체가 신속히 파괴됨을 입증한다 (테이타 미제시). 다수회 레이저 조사 후의 형광 방출 수준은 비복합체화된 프로브 No. 5 단독 대조군에 의해 관찰된 양이온 저하 수치로 복귀하였다 (도 6A와 6B 비교). 유일한 예외는 15분 인큐베이션 후에 형성되어 그 후 반복하여 조사한 완전히 매치된 복합체이었다 (도 6B). 이 경우에, 형광 방출은 복합체의 파괴와 일치하지 않지만 (도 6B), 15분 인큐베이션 후에 다수회 조사할 때 프로브 No. 5의 양이온성 저하가 완전히 억제되었다 (도 6A). 이와 유사하게, 1 bp T-G 미스매치 (서열 7 + 프로브 No. 5)를 포함하는 dsDNA:ssDNA-F 복합체는 다수회 레이저 조사에 의해 분명하게 파괴되었다 (도 6C).

복합체에 대한 다수회 레이저 조사의 효과를 결정하기 위한 실험을 수행하였다. 새로운 양이온을 2회 레이저 조사된 반응 혼합물에 첨가했을 때 ssDNA-F 프로브에 의해 방출되는 형광의 양이온성 저하의 억제가 역전될 수 없고 추가로 양이온성 저하가 추가의 인큐베이션시에 발생하지 않음이 밝혀졌고, 이것은 ssDNA-F 프로브가 아직 밝혀지지 않은 메커니즘에 의해 다수회 조사에 의해 불활성화되었다는 것을 강하게 시사한다 (테이타 미제시). 이와 유사하게, 새로운 ssDNA-F 프

로브를 2회 레이저 조사된 반응 혼합물에 첨가했을 때 새로운 프로브의 증가된 형광 방출을 표준화한 후에 반응 혼합물의 추가 인큐베이션시에 어떠한 점진적인 후속 양이온성 저하도 관찰되지 않았고, 이것은 레이저 조사된 양이온이 다소 기능을 상실하였음을 강하게 시사한다 (데이터 미제시).

#### 실시예 7

실시예 1-6은 dsDNA 표적과 ssDNA 프로브 사이의 서열 특이적 방식의 dsDNA:ssDNA 복합체 형성이 DNA 탈축합제, 예를 들어 YOYO-1 또는 DNA 축합제, 예를 들어 1가 또는 2가 양이온에 의해 촉진된다는 것을 입증하였다. 다음 실시예는 상이한 양이온의 존재 하에 형성된 dsDNA:ssDNA 복합체의 형성 속도, 안정성 및 해리 속도를 조사한다. 이들 실시예는 양이온의 종류, 각 양이온의 농도 및 상이한 농도의 상이한 양이온의 조합물이 형성된 dsDNA:ssDNA 복합체의 형성 속도, 안정성 및 해리 속도에 어떻게 영향을 미치는지를 보여줄 것이다.

상보성 센스 및 안티센스 15-mer ssDNA 프로브 서열을 DNA 합성기로 합성하여 HPLC로 정제하였다. 등몰량의 상보성 올리고뉴클레오타이드를 95°C에서 10분 동안 가열하고, 1.5 시간에 걸쳐서 온도를 21°C로 냉각시키면서 점진적으로 어닐링시켰다. dsDNA 올리고뉴클레오타이드를 1 pmole/ $\mu$ l의 농도로 ddH<sub>2</sub>O에 용해시켰다.

프로브 No. 7는 50-mer 야생형 표적 DNA (서열 6)의 15 세그먼트에 완전히 상보성이도록 디자인된, 각각의 5' 위치에 플루오레세인 잔기가 부착된 15 bp dsDNA 프로브이었다. 프로브 No. 7의 안티센스 스트랜드는 프로브 No. 5와 동일하였다.

프로브 No. 7의 센스 스트랜드 서열은 5'-Flu-CTG TCA TCT CTG GTG-3'이었다.

프로브 No. 7의 안티센스 스트랜드 서열은 5'-Flu-CAC CAG AGA TGA CAG-3'이었다.

혼성화 반응 혼합물 (40  $\mu$ l)은 0.4 pmole의 비변성 표적 dsDNA, 4 pmole의 5'-플루오레세인 표지된 dsDNA 프로브, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 70 mM 내지 90 mM KCl 및 0 mM 내지 20 mM NaCl을 포함하였다. 반응 혼합물을 1분 내지 2 시간의 상이한 기간 동안 실온 (21°C)에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 시료를 수정 큐벳에 위치시켜 파장이 488 nm인 아르곤 이온 레이저 빔을 1회 조사하고, 형광 방출을 모니터링하였다. 형광 강도는 각 분석 시료에 대한 시간의 함수로서 플로팅하였다.

표적 dsDNA의 부재 하에 4 pmole의 프로브 No. 7 + 90 mM KCl을 포함하는 대조군 시료에 의해 방출된 형광은 120분 인큐베이션 내내 비교적 일정하게 유지되었고, 이것은 dsDNA-F 프로브의 양이온성 저하가 1가 KCl의 존재 하에 전혀 발생하지 않았음을 나타낸다 (도 7A). dsDNA-F 프로브 No. 7을 90 mM KCl의 존재 하에 50-mer 야생형 dsDNA 표적 (서열 6) 및 변이체 dsDNA 표적 (서열 7)과 함께 인큐베이션할 때, dsDNA:ssDNA-F 복합체가 비변성 조건 하에 실온에서 단지 인큐베이션한지 15분 내에 형성되었고, 적어도 120분 동안 유지되었다 (도 7A). 완전하게 매치된 dsDNA:ssDNA-F 복합체와 1 bp 미스매치된 dsDNA:ssDNA-F 복합체 사이의 최대 식별은 90 mM KCl의 존재 하에 30 및 45분의 인큐베이션 후에 관찰되었고, 형광 강도가 프로브 No. 7 단독에 의해 방출된 것보다 30분 후에는 각각 27% 및 3% 더 작았고, 45분 후에는 각각 34% 및 15% 더 작았다 (도 7A).

70 mM KCl 및 20 mM NaCl의 존재 하에, 완전하게 매치된 서열 (서열 6 + 프로브 No. 7) 또는 1 bp 미스매치 (서열 7 + 프로브 No. 7)를 포함하는 dsDNA:ssDNA-F 복합체는 프로브 No. 7 단독에 의해 방출된 것보다 30분 후에는 각각 47% 및 19% 더 작고, 45분 후에는 각각 35% 및 14% 더 작은 형광 강도를 발생시켰다 (도 7B). dsDNA-F 프로브 No. 7 대조군 시료의 소량의 양이온성 저하가 70 mM KCl 및 20 mM NaCl의 존재 하에 120분 동안의 인큐베이션에 걸쳐 관찰되었다 (도 7B). 이러한 최소 양이온성 저하는 단독으로 존재시에 프로브 No. 7의 유사한 점진적인 형광 저하를 야기하는 NaCl의 첨가에 의해 야기된 것이다 (데이터 미제시).

80 mM KCl 및 10 mM NaCl의 존재는 야생형 dsDNA 표적 (서열 6)과 dsDNA-F 프로브 No. 7 사이의 완전하게 매치된 dsDNA:ssDNA-F 복합체의 형성을 우선적으로 촉진시켰고, 대조군 프로브 No. 7 시료에 의해 방출된 형광에 비해 30분, 45분 및 60분 후에 각각 18%, 48% 및 34%의 형광 방출 저하를 야기하였다 (도 7C). 이와 대조적으로, 1 bp 미스매치된 dsDNA:ssDNA-F 복합체 (서열 7 + 프로브 No. 7)의 형성은 프로브 No. 7에 의해 보이는 것에 비해 상기 미스매치된 복합체에서 관찰되는 형광의 1% 내지 5% 저하에서 입증되는 바와 같이 80 mM KCl 및 10 mM NaCl의 존재하에서 120분 동안의 인큐베이션 내내 매우 비효율적이었다 (도 7C).

따라서, 생리학적 농도에 가까운 1가 양이온, 예를 들어 KCl 및 NaCl의 첨가는 비변성 dsDNA 표적과 형광 표지된 dsDNA 프로브 사이의 DNA 복합체 형성을 촉진하였다. 복합체 형성은 상동 염기쌍 인식에 기초하여 발생하고, 충분히 매치된 상동 이중체 스트랜드 사이의 측정 가능한 상당히 많은 양의 복합체가 형성되었다. 반응은 실온에서 15분 내지 60분의 비교적 짧은 인큐베이션 기간 내에 10 내지 1의 프로브 대 표적 비율에서 발생하였다. 상기 실시예에 사용된 dsDNA 표적 및 dsDNA 프로브는 상동성이고, 53%의 GC 함량을 보였고, 임의의 DNA 스트랜드에 호모퓨린 또는 호모피리미딘 스트레치를 포함하지 않았다. 본 발명의 분석법은 dsDNA 프로브를 사용하여 완전하게 매치된 dsDNA 서열 및 미스매치된 염기쌍을 포함하는 서열을 확인할 수 있었다.

#### 실시예 8

실시예 7에서 수행한 분석법은 반응 혼합물에 1가 양이온을 첨가함으로써 촉진되었다. 다음 실시예는 2가 양이온의 존재 하에 형성된 dsDNA:dsDNA 복합체의 형성 속도, 안정성 및 해리 속도를 조사한다. 반응 조건은 KCl 및 NaCl이 각각 30 mM 내지 40 mM의 MgCl<sub>2</sub> 및 MnCl<sub>2</sub>로 대체된 것을 제외하고는 실시예 7에 기재된 것과 동일하였다.

대조군 dsDNA-F 프로브 No. 7 시료는 30 mM MgCl<sub>2</sub> 및 30 mM MnCl<sub>2</sub> (도 8A) 또는 40 mM MgCl<sub>2</sub> 및 40 mM MnCl<sub>2</sub> (도 8B)의 존재 하에 인큐베이션 시간이 증가하면서 형광의 점진적인 저하를 보였다. 이러한 양이온성 저하는 10 mM MgCl<sub>2</sub> 및 10 mM MnCl<sub>2</sub>의 존재 하에 ssDNA-F 프로브 No. 5를 사용하여 관찰된 것과 유사하였다 (도 6A).

dsDNA-F 프로브 No. 7을 30 mM MgCl<sub>2</sub> 및 30 mM MnCl<sub>2</sub>의 존재 하에 50-mer 야생형 dsDNA 표적 (서열 6)과 인큐베이션할 때, 인큐베이션 60분 후에 dsDNA:dsDNA-F 복합체의 형성이 나타났고, 형광 감소를 야기하였고, 이것은 대조군 프로브 No. 7의 점진적인 양이온성 저하보다 13% 더 컸다 (도 8A). 복합체 형성은 30 mM MgCl<sub>2</sub> 및 30 mM MnCl<sub>2</sub>의 존재 하에 서열 6을 프로브 No. 7과 함께 75분 인큐베이션한 후에 크게 나타났고, 양이온성 저하된 프로브 No. 7 단독에 의해 달성되는 것에 비해 형광의 81% 감소를 야기하였다 (도 8A). 또한, 1 bp 미스매치 (서열 7 + 프로브 No. 7)를 포함하는 dsDNA:dsDNA-F 복합체가 30 mM MgCl<sub>2</sub> 및 30 mM MnCl<sub>2</sub>의 존재 하에 60분 및 75분 인큐베이션한 후에 형성되었고, 양이온성 저하된 프로브 No. 7 단독에 의해 달성된 것에 비해 각각 16% 및 30%의 형광 저하를 야기하였다 (도 8A). 30 mM MgCl<sub>2</sub> 및 30 mM MnCl<sub>2</sub>의 존재 하에 90분 및 120분 인큐베이션한 후에 어떠한 복합체 형성 시그널이 발생하지 않았다 (도 8A). 90분 후에, 관찰된 형광 수준은 전적으로 양이온성 저하 효과에 기인한 것이었다 (도 8A).

40 mM MgCl<sub>2</sub> 및 40 mM MnCl<sub>2</sub>의 존재 하에 완전하게 매치된 서열 (서열 6 + 프로브 No. 7) 또는 1 bp 미스매치 (서열 7 + 프로브 No. 7)를 포함하는 dsDNA:dsDNA-F 복합체는 양이온성 저하된 프로브 No. 7 단독에 의해 방출된 것보다 60분 후에 각각 17% 더 작고 4% 더 큰, 75분 후에 각각 36% 및 22% 더 작은, 90분 후에 각각 57% 더 작고 0.2% 더 큰 형광 강도를 생성시켰다 (도 8B). 40 mM MgCl<sub>2</sub> 및 40 mM MnCl<sub>2</sub>의 존재 하에 120분 동안 인큐베이션한 후에 어떠한 복합체 형성 시그널이 발생하지 않았다 (도 8B).

MgCl<sub>2</sub> 및 MnCl<sub>2</sub>과 같은 2가 양이온의 첨가는 비변성 dsDNA 표적과 형광 표지된 dsDNA 프로브 사이의 DNA 복합체 형성을 촉진하고, 완전하게 매치된 상동 서열과 1 bp 돌연변이를 포함하는 서열의 정확한 식별을 가능하게 하였다. dsDNA:ssDNA 복합체 형성에 필요한 농도에 비해 약 2배 농도의 MgCl<sub>2</sub> 및 MnCl<sub>2</sub>가 dsDNA:dsDNA 복합체 형성에 필요하였다. dsDNA:dsDNA 복합체의 형성 속도는 1가 양이온의 존재하에서보다 2가 양이온의 존재 하에서 더 느렸다. 일단 형성된 후에, 2가 양이온 유도 dsDNA:dsDNA 복합체는 보다 짧은 시간에 걸쳐 안정한 것으로 보였다.

#### 실시예 9

1가 및 2가 양이온의 존재 하에 형성된 dsDNA:dsDNA 복합체의 형성 속도, 안정성 및 해리 속도를 조사하였다. 혼성화 반응 혼합물(40  $\mu$ l)은 0.4 pmole의 비변성 표적 dsDNA, 4 pmole의 5'-플루오레세인 표지된 dsDNA 프로브, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 60 mM 내지 80 mM KCl, 10 mM 내지 20 mM NaCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub> 및 30 mM MnCl<sub>2</sub>를 포함하였다. 반응 혼합물을 1분 내지 150분의 상이한 기간 동안 실온 (21°C)에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 시료를 수정 큐벳에 위치시켜 파장이 488 nm인 아르곤 이온 레이저 빔을 1회 조사하고, 형광 방출을 모니터링하였다. 형광 강도는 각 분석 시료에 대한 시간의 함수로서 플로팅하였다.

30 mM  $MgCl_2$  및 30 mM  $MnCl_2$ 과 함께 상이한 농도의 KCl 및 NaCl의 존재는 대조군 dsDNA-F 프로브 No. 7의 형광의 양이온성 저하를 야기하였고 (도 9), 이것은 2가 양이온만 존재 하에 관찰된 것과 매우 유사하였다 (도 8). 1가 양이온의 첨가는 2가 양이온에 의한 dsDNA-F 프로브의 양이온성 저하에 영향을 주지 않은 것으로 보인다.

dsDNA-F 프로브 No. 7을 60 mM KCl, 20 mM NaCl, 30 mM  $MgCl_2$  및 30 mM  $MnCl_2$ 의 존재 하에 50-mer 야생형 dsDNA 표적 (서열 6) 및 변이체 dsDNA 표적 (서열 7)과 함께 인큐베이션할 때, 인큐베이션한지 단지 15분 내에 비변성 조건 하에 실온에서 dsDNA:dsDNA-F 복합체가 형성되었고, 적어도 150분 동안 유지되었다 (도 9A). 완전하게 매치된 dsDNA:dsDNA-F 복합체와 1 bp 미스매치된 dsDNA:dsDNA-F 복합체 사이의 최대 식별은 인큐베이션한지 30, 45 및 150분 후에 관찰되었고, 양이온 저하된 프로브 No. 7 단독에 의해 방출된 것보다 30분 후에 각각 43% 및 16% 더 작은, 45분 후에 각각 38% 및 16% 더 작은, 150분 후에 65% 및 1% 더 작은 형광 강도를 생성시켰다 (도 9A).

70 mM KCl, 20 mM NaCl, 30 mM  $MgCl_2$  및 30 mM  $MnCl_2$ 의 존재 하에 완전하게 매치된 서열 (서열 6 + 프로브 No. 7) 또는 1 bp 미스매치 (서열 7 + 프로브 No. 7)를 포함하는 dsDNA:dsDNA-F 복합체는 양이온 저하된 프로브 No. 7 단독에 의해 달성되는 것보다 60분 후에 각각 17% 및 1% 더 작은, 75분 후에 각각 48% 및 11% 더 작은, 90분 후에 각각 22% 및 3% 더 작은, 120분 후에 각각 34% 및 2% 더 작은 형광 강도를 생성시켰다 (도 9B).

80 mM KCl, 10 mM NaCl, 30 mM  $MgCl_2$  및 30 mM  $MnCl_2$ 의 존재는 인큐베이션 30분 내지 120분 후에 야생형 dsDNA 표적 (서열 6)과 dsDNA-F 프로브 No. 7 사이의 완전하게 매치된 dsDNA:dsDNA-F 복합체 형성을 우선적으로 촉진하였다. 완전하게 매치된 dsDNA:dsDNA-F 복합체는 양이온성 저하된 프로브 No. 7 시료에 의해 방출된 것에 비해 60분, 75분, 90분 및 120분 인큐베이션 후에 각각 27%, 43%, 29% 및 52%의 형광 방출 저하를 야기하였다 (도 9C). 이와 대조적으로 1 bp 미스매치된 dsDNA:dsDNA-F 복합체 (서열 7 + 프로브 No. 7)의 형성은 80 mM KCl, 10 mM NaCl, 30 mM  $MgCl_2$  및 30 mM  $MnCl_2$ 의 존재 하에서 45분 내지 90분 인큐베이션 후에 매우 비효과적이었고, 이것은 양이온성 저하된 프로브 No. 7에 의해 나타난 것에 비해 상기 미스매치된 복합체에서 관찰된 형광의 낮은 2% 내지 3% 저하에 의해 입증되었다 (도 9C). 최소 1 bp 미스매치된 dsDNA:dsDNA-F 복합체 형성은 120분 인큐베이션 후에 발생하였고, 양이온성 저하된 프로브 No. 7에 의해 방출된 것에 비해 형광의 14% 저하를 야기하였다.

1가 및 2가 양이온이 모두 존재하면 2가 양이온 단독의 경우보다 빠른 속도로 dsDNA:dsDNA 복합체의 형성이 촉진되었다. 일단 형성된 후에, 두 종류의 양이온에 의해 촉진된 복합체는 1가 양이온 또는 2가 양이온이 각각 개별적으로 복합체를 촉진하는 것보다 보다 긴 시간 동안 유지되었다. 완전하게 매치된 dsDNA:dsDNA-F 복합체와 1 bp 미스매치된 dsDNA:dsDNA-F 복합체 사이의 최대 식별은 1가 및 2가 양이온 모두의 존재 하에 보다 긴 시간 간격 동안 관찰되었다. 따라서, 생리학적 농도의 KCl, NaCl 및  $MgCl_2$ 은 상동 염기쌍 인식을 기초로 하여 충분히 매치된 상동성 이중체 스트랜드 사이의 복합체 형성을 우선적으로 촉진하였다.

## 실시예 10

실시예 3-6은 1가 또는 2가 양이온과 같은 DNA 축합제에 의해 촉진된, dsDNA 표적과 ssDNA 프로브 사이의 서열 특이적 방식의 dsDNA:ssDNA 복합체 형성을 입증하였다. 다음 실시예는 DNA 축합 기능도 갖는 다가 양이온인 스페르미딘 (+ 3의 전하 보유)의 존재 하에 형성된 dsDNA:ssDNA 복합체의 형성 속도, 안정성 및 해리 속도를 조사하였다.

혼성화 반응 혼합물 (40  $\mu$ l)은 0.2 pmole의 비변성 표적 dsDNA, 2 pmole의 5'-플루오레세인 표지된 ssDNA 프로브, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 및 1 mM 스페르미딘을 포함하였다. 반응 혼합물을 1분 내지 2시간의 상이한 기간 동안 실온 (21°C)에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 시료를 수정 큐벳에 위치시켜 파장이 488 nm인 아르곤 이온 레이저 빔을 1회 조사하고, 형광 방출을 모니터링하였다. 형광 강도는 각 분석 시료에 대한 시간의 함수로서 플로팅하였다.

대조군 ssDNA-F 프로브 No. 5는 1 mM 스페르미딘의 존재 하에 인큐베이션 시간 증가에 따라 형광의 점진적인 저하를 보였다 (도 10). 이러한 양이온성 저하는 특히 인큐베이션한지 처음 5분 내에 동일한 프로브를 10 mM  $MgCl_2$  및 10 mM  $MnCl_2$ 의 존재하에 인큐베이션한 경우에 관찰된 것만큼 현저하지 않았다 (도 6A).

dsDNA 표적 (서열 6)과 ssDNA-F 프로브 No. 5 사이의 완전하게 상보성인 dsDNA:ssDNA-F 복합체 형성은 1 mM 스페르미딘의 존재 하에 단지 15분 및 30분 인큐베이션한 후에 나타났고, 양이온성 저하된 프로브 No. 5 단독에 의해 달성되는 것에 비해 각각 11% 및 20%의 형광 저하를 발생시켰다 (도 10). 1 mM 스페르미딘의 존재 하에 45분 인큐베이션 후에 최소 복합체 형성 시그날이 발생하였다 (도 10).

1 mM 스페르미딘의 첨가는 1 bp T-G 미스매치 (서열 7 + 프로브 No. 5)를 포함하는 dsDNA:ssDNA-F 복합체 형성에 매우 불리하였고, 이것은 15분 및 30분 인큐베이션 후에 양이온성 저하된 프로브 No. 5에 의해 관찰되는 것에 비해 각각 11% 및 7%의 형광 증가에 의해 입증되었다 (도 10). 불완전하게 상보성인 서열을 포함하는 최소 복합체 형성은 1 mM 스페르미딘의 존재 하에 75분 인큐베이션한 후에만 나타났고, 120분 후에 사라졌다.

DNA 축합제인 스페르미딘의 첨가는 비변성 조건 하에 완전하게 매치된 서열 사이의 신속한 dsDNA:ssDNA 복합체 형성을 촉진하였고, 완전하게 상보성인 서열과 1 bp 돌연변이를 포함하는 서열의 식별을 가능하게 하였다.

#### 실시에 11

양이온 이외의 많은 상이한 물질이 dsDNA를 축합할 수 있다. 실시에 11은 또다른 종류의 DNA 축합제인 에탄올의 존재 하에 형성된 dsDNA:ssDNA 복합체의 형성 속도, 안정성 및 해리 속도를 조사하였다.

혼성화 반응 혼합물 (40  $\mu$ l)은 0.2 pmole의 비변성 표적 dsDNA, 2 pmole의 5'-플루오레세인 표지된 ssDNA 프로브, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 및 10% 에탄올을 포함하였다. 반응 혼합물을 1분 내지 90분의 상이한 기간 동안 실온 (21°C)에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 시료를 수정 큐벳에 위치시켜 파장이 488 nm인 아르곤 이온 레이저 빔을 1회 조사하고, 형광 방출을 모니터링하였다. 형광 강도는 각 분석 시료에 대한 시간의 함수로서 플로팅하였다.

2가 또는 다가 양이온과는 달리, 10% 에탄올의 첨가는 대조군 ssDNA-F 프로브 No. 5에 의해 방출된 형광의 저하를 야기하지 않았지만, 시간이 경과하면서 상기 프로브의 형광의 경미한 증가를 실제로 야기하였다 (도 11).

10% 에탄올의 첨가는 15분 내지 60분 인큐베이션 후에 야생형 dsDNA 표적 (서열 6)과 ssDNA-F 프로브 No. 5 사이의 완전하게 상보성인 dsDNA:ssDNA-F 복합체 형성을 우선적으로 촉진하였다 (도 11). 이와 달리, 1 bp T-G 미스매치된 dsDNA:ssDNA-F 복합체 (서열 7 + 프로브 No. 5)의 형성은 10% 에탄올의 존재 하에 인큐베이션 시간 동안 매우 비효과적이었다. 완전하게 매치된 복합체 및 1 bp 미스매치된 복합체에 의해 생성된 형광 강도는 프로브 No. 5 대조군에 의해 방출된 것보다 15분 후에 각각 11% 및 2% 더 작은, 30분 후에 각각 12% 및 1% 더 작은, 45분 후에 각각 25% 및 2% 더 작은, 60분 후에 각각 13% 및 7% 더 작았다 (도 11). 어떠한 유의한 dsDNA:ssDNA-F 복합체 형성도 10% 에탄올 존재 하에 75분 인큐베이션 후에 관찰되지 않았다.

저농도의 에탄올 첨가는 비변성 dsDNA 표적과 형광 표지된 ssDNA 프로브 사이의 DNA 복합체 형성을 촉진시켰고, 완전하게 상보성인 서열과 1 bp 돌연변이를 포함하는 서열 사이의 식별을 가능하게 하였다.

#### 실시에 12

실시에 12는 본 발명의 분석법이 양이온 DNA 인터칼레이터 YOYO-1이 존재할 때 완전하게 상보성인 dsDNA:ssDNA 복합체와 가능한 모든 종류의 1 bp 미스매치를 포함하는 dsDNA:ssDNA 복합체를 식별할 수 있음을 입증한다.

상보성 센스 및 안티센스 15-mer ssDNA 프로브를 DNA 합성기로 합성하여 HPLC로 정제하고, 1 pmole/ $\mu$ l의 농도로 ddH<sub>2</sub>O에 용해시켰다. 프로브 No. 1은 아미노산 위치 505 내지 510에서 중첩되는 50-mer 야생형 표적 DNA (서열 1)의 센스 스트랜드의 15 뉴클레오타이드 세그먼트에 완전히 상보성이도록 디자인된 15-mer ssDNA 프로브이었다 [Nature 380, 207 (1996)]. 프로브의 키랄성은 표적 센스 스트랜드의 키랄성과 반대이거나 역평행이었다. 변이체 프로브 (프로브 No. 8 내지 프로브 No. 16)는 1 염기 돌연변이 (밑줄친 부분)을 제외하고는 프로브 No. 1의 서열과 동일하였다.

프로브 No. 1의 서열은 5'-CAC CAA AGA TGA TAT-3'이었다.

프로브 No. 8의 서열은 5'-CAC CAA AGA AGA TAT-3'이었다.

프로브 No. 9의 서열은 5'-CAC GAA AGA TGA TAT-3'이었다.

프로브 No. 10의 서열은 5'-CAC CAA ACA TGA TAT-3'이었다.

프로브 No. 11의 서열은 5'-CAC CAT T AGA TGA TAT-3'이었다.

프로브 No. 12의 서열은 5'-CAC CAG G AGA TGA TAT-3'이었다.

프로브 No. 13의 서열은 5'-CAC CAC C AGA TGA TAT-3'이었다.

프로브 No. 14의 서열은 5'-CAC CAA AGA CGA TAT-3'이었다.

프로브 No. 15의 서열은 5'-CAC CAA AAA TGA TAT-3'이었다.

프로브 No. 16의 서열은 5'-CAC AAA AGA TGA TAT-3'이었다.

프로브 No. 17은 아미노산 위치 505 내지 510에서 중첩되는 50-mer 야생형 표적 DNA (서열 1)의 안티센스 스트랜드의 15 뉴클레오타이드 세그먼트에 완전히 상보성하도록 디자인된 15-mer ssDNA 프로브이었다 [Nature 380, 207 (1996)]. 프로브의 키랄성은 표적 안티센스 스트랜드의 키랄성과 반대이거나 역평행이었다. 변이체 프로브 (프로브 No. 18 내지 프로브 No. 26)는 1 염기 돌연변이 (밑줄친 부분)을 제외하고는 프로브 No. 17의 서열과 동일하였다.

프로브 No. 17의 서열은 5'-ATA TCA TCT TTG GTG-3'이었다.

프로브 No. 18의 서열은 5'-ATA TCT T TCT TTG GTG-3'이었다.

프로브 No. 19의 서열은 5'-ATA TCA TCT TTC G GTG-3'이었다.

프로브 No. 20의 서열은 5'-ATA TCA TGT TTG GTG-3'이었다.

프로브 No. 21의 서열은 5'-ATA TCA TCT ATG GTG-3'이었다.

프로브 No. 22의 서열은 5'-ATA TCA TCT CTG GTG-3'이었다.

프로브 No. 23의 서열은 5'-ATA TCA TCT GTG GTG-3'이었다.

프로브 No. 24의 서열은 5'-ATA TCG G TCT TTG GTG-3'이었다.

프로브 No. 25의 서열은 5'-ATA TCA TTT TTG GTG-3'이었다.

프로브 No. 26의 서열은 5'-ATA TCA TCT TTT T GTG-3'이었다.

혼성화 반응 혼합물(40  $\mu$ l)은 2 pmole의 표적 dsDNA, 2 pmole의 ssDNA 프로브, 0.5 x TBE 및 500 nM의 DNA 인터칼레이터 YOYO-1을 포함하였다. dsDNA 표적의 사전 변성없이 반응 혼합물을 5분 동안 실온 (21°C)에서 인큐베이션하였다. 시료를 수정 큐벳에 위치시켜 파장이 488 nm인 아르곤 이온 레이저 빔을 조사하고, 형광 방출을 모니터링하였다. 형광 방출 강도는 각 분석 시료에 대한 파장의 함수로서 플로팅하였다.

50-mer 야생형 비변성 dsDNA 표적 (서열 1)을 15-mer 야생형 안티센스 ssDNA 프로브 No. 1 및 가능한 모든 종류의 1 bp 미스매치를 생성시키는 상이한 15-mer 1 염기 돌연변이된 안티센스 ssDNA 프로브 (프로브 No. 8 내지 프로브 No. 16)와 반응시켰다. 예상한 바와 같이, 가장 높은 형광 강도는 완전하게 상보성인 서열 (서열 1 + 프로브 No. 1) (도 12A 및 12B)로 이루어진 dsDNA:ssDNA 복합체에 의해 생성되었다. 1 bp A-A 미스매치 (서열 1 + 프로브 No. 8), 1 bp G-G 미스매치 (서열 1 + 프로브 No. 9), 1 bp C-C 미스매치 (서열 1 + 프로브 No. 10), 1 bp T-T 미스매치 (서열 1 + 프로브 No. 11), 1 bp T-G 미스매치 (서열 1 + 프로브 No. 12), 1 bp T-C 미스매치 (서열 1 + 프로브 No. 13), 1 bp A-C 미

스매치 (서열 1 + 프로브 No. 14), 1 bp C-A 미스매치 (서열 1 + 프로브 No. 15), 및 1 bp G-A 미스매치 (서열 1 + 프로브 No. 16)를 야기하는 dsDNA:ssDNA 복합체는 완전하게 매치된 dsDNA:ssDNA 복합체에 의해 방출되는 것보다 각각 63%, 66%, 50%, 47%, 49%, 79%, 57%, 51% 및 71% 더 낮은 형광 방출 강도를 생성시켰다 (도 12A 및 12B).

또한, 50-mer 야생형 비변성 dsDNA 표적 (서열 1)을 15-mer 야생형 센스 ssDNA 프로브 No. 17 및 가능한 모든 종류의 1 bp 미스매치를 생성시키는 상이한 15-mer 1 염기 돌연변이된 센스 ssDNA 프로브 (프로브 No. 18 내지 프로브 No. 26)와 반응시켜 삼중 스트랜드 분석법을 평가하였다. 센스 스트랜드 프로브를 포함하는 완전하게 상보성인 dsDNA:ssDNA 삼중 스트랜드 복합체 (서열 1 + 프로브 No. 17) (도 12C 및 12D)는 안티센스 스트랜드 프로브를 포함하는 완전하게 상보성인 삼중 스트랜드 복합체 (서열 1 + 프로브 No. 1) (도 12A 및 12B)와 유사한 효율로 형성되었다. 1 bp T-T 미스매치 (서열 1 + 프로브 No. 18), 1 bp C-C 미스매치 (서열 1 + 프로브 No. 19), 1 bp G-G 미스매치 (서열 1 + 프로브 No. 20), 1 bp A-A 미스매치 (서열 1 + 프로브 No. 21), 1 bp C-A 미스매치 (서열 1 + 프로브 No. 22), 1 bp G-A 미스매치 (서열 1 + 프로브 No. 23), 1 bp G-T 미스매치 (서열 1 + 프로브 No. 24), 1 bp T-G 미스매치 (서열 1 + 프로브 No. 25), 및 1 bp T-C 미스매치 (서열 1 + 프로브 No. 26)를 야기하는 dsDNA:ssDNA 복합체는 완전하게 매치된 dsDNA:ssDNA 복합체에 의해 방출되는 것보다 각각 63%, 67%, 76%, 59%, 54%, 57%, 59%, 56% 및 82% 더 낮은 형광 방출 강도를 생성시켰다 (도 12C 및 12D).

상이한 1 bp 미스매치 사이에 관찰된 형광 방출 강도의 변화는 변이체 삼중 스트랜드 서열의 GC 함량 비율의 변화보다 특정 염기쌍 미스매치에 보다 크게 의존한다 (도 12). 도 12의 결과는 안티센스 또는 센스 ssDNA 프로브를 DNA 축합제 YOYO-1의 존재하에 비변성 dsDNA 표적과 반응시킬 때 가능한 모든 1 bp 미스매치를 매우 정확하게 확인할 수 있는 삼중 스트랜드 분석법의 신뢰성을 입증하였다.

본 발명을 구체적인 실시예를 참고하여 상세하게 설명하였지만, 당업계의 숙련자는 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않으면서 본 발명의 다양한 변경 및 변형이 가능함을 분명하게 이해할 것이다.

## 도면의 간단한 설명

삭제

본 발명은 첨부 도면에 관련하여 설명될 것이며, 도면에서 유사한 참조 번호는 유사한 구성요소를 나타낸다. 도 1, 2A 및 2B는 온도, GC 함량 및 염기쌍 매칭 (matching) 정도의 함수로서 형광 강도를 보여주는 그래프이다.

도 3, 4, 5A, 5B, 5C 및 5D는 파장, 염기쌍 매칭 정도 및 양이온의 함수로서 형광 강도를 보여주는 그래프이다.

도 6A, 6B 및 6C는 레이저 조사 (lasing) 프로토콜 및 양이온의 함수로서 형광 강도를 보여주는 그래프이다.

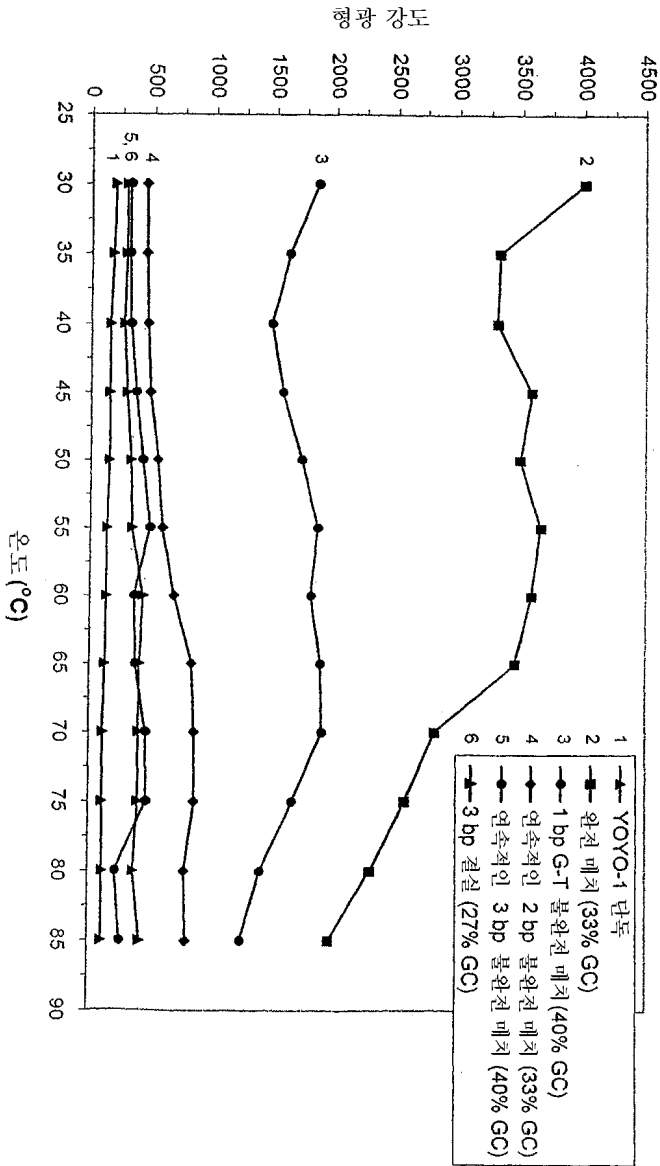
도 7A, 7B, 7C, 8A, 8B, 9A, 9B, 9C 및 10은 사중체에 관하여, 염기쌍 매칭 정도 및 양이온의 함수로서 형광 강도를 보여주는 그래프이다.

도 11은 에탄올을 함유하는 용액 중에서 염기쌍 매칭 정도의 함수로서 형광 강도를 보여주는 그래프이다.

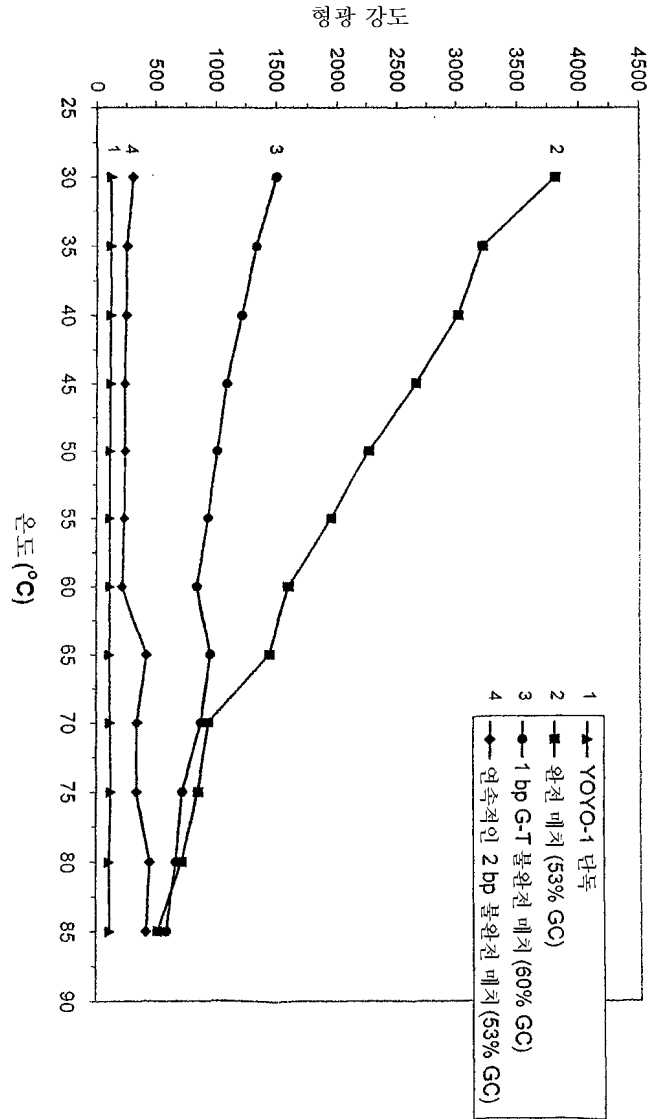
도 12A, 12B, 12C 및 12D는 양이온 DNA 인터칼레이터 (intercalator) YOYO-1이 존재할 때 dsDNA:ssDNA 복합체 내의 완전 및 불완전 염기쌍 매치에 대한 파장의 함수로서 형광 강도를 보여주는 그래프이다.

도면

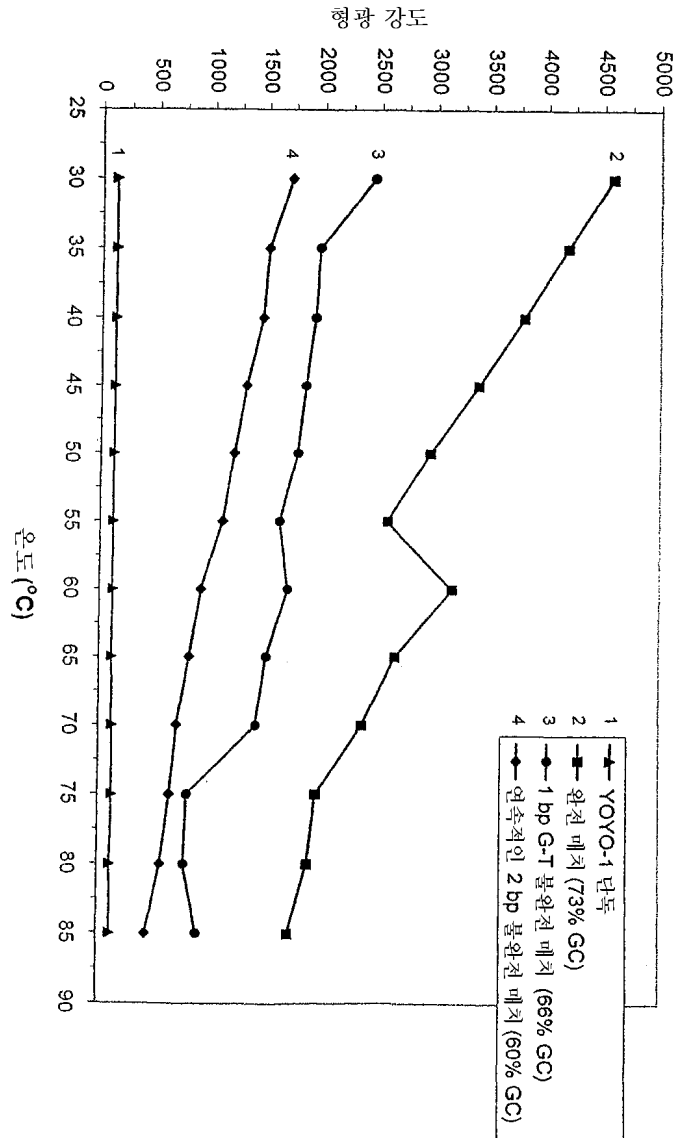
도면1



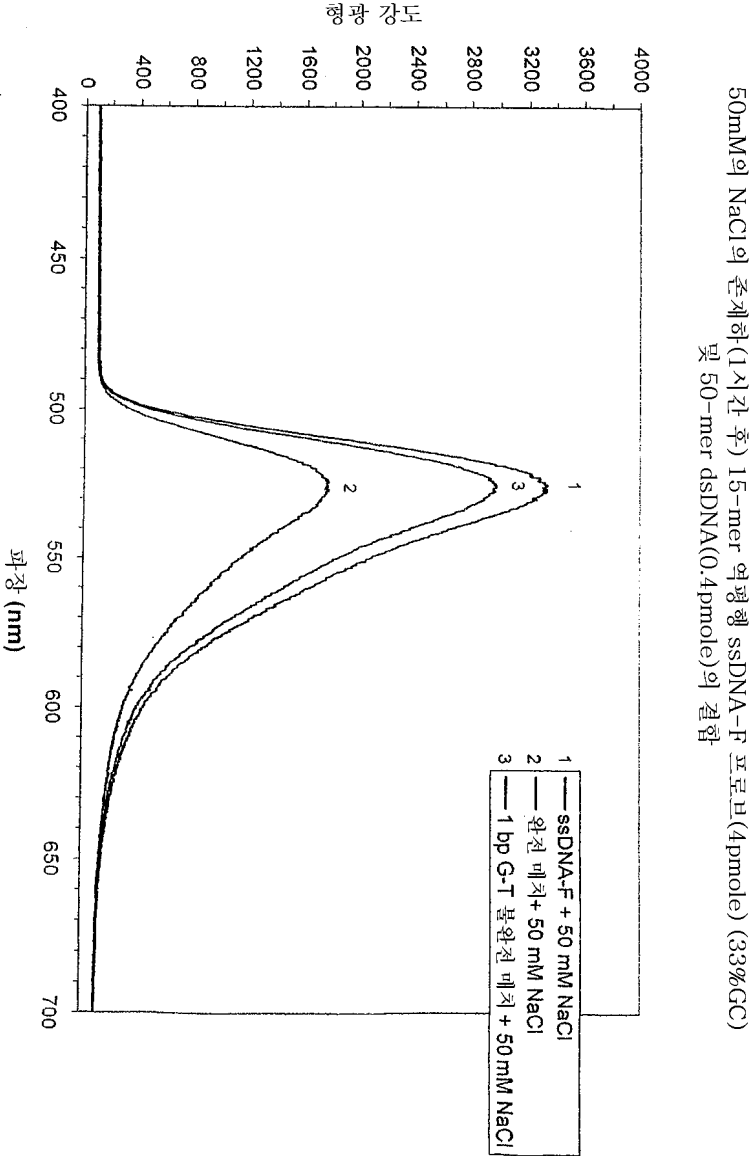
도면2A



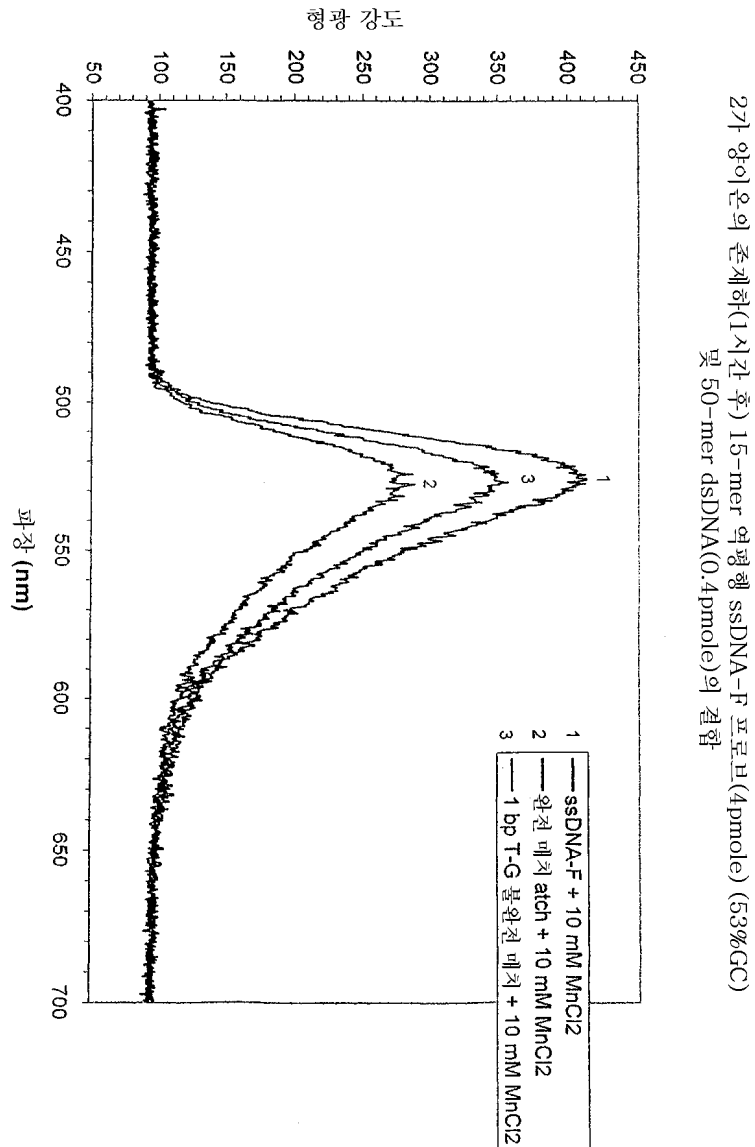
도면2B



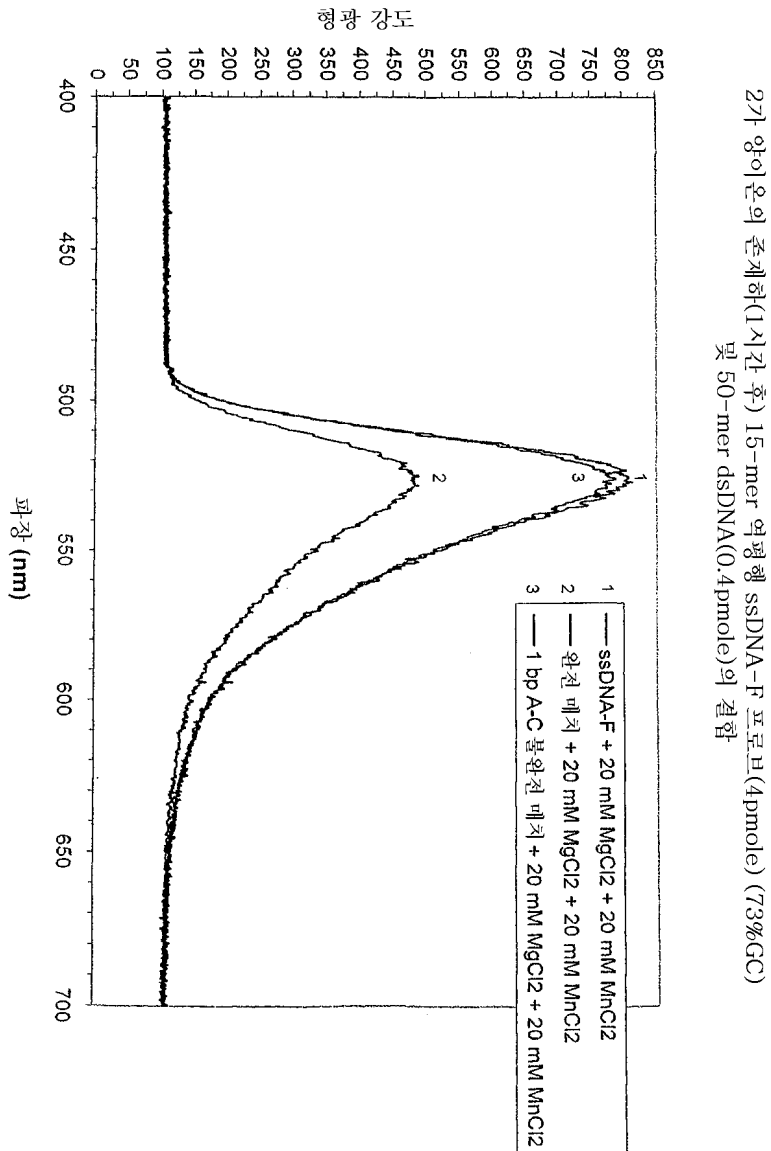
도면3



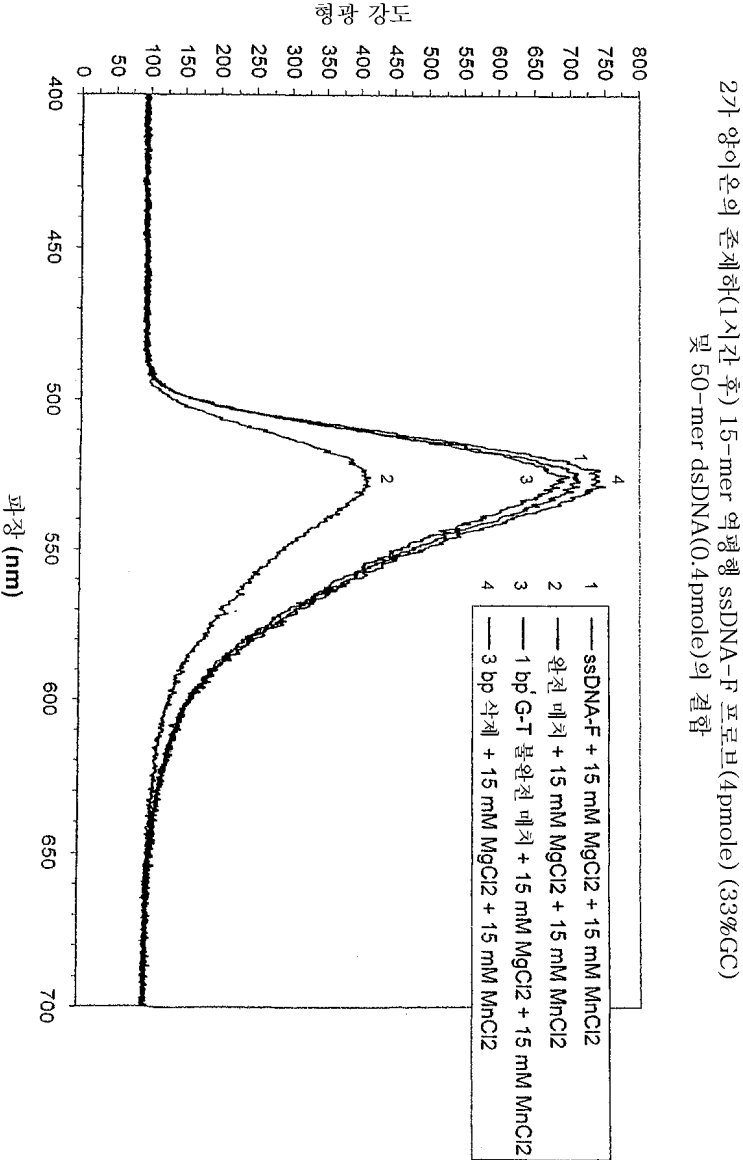
도면4



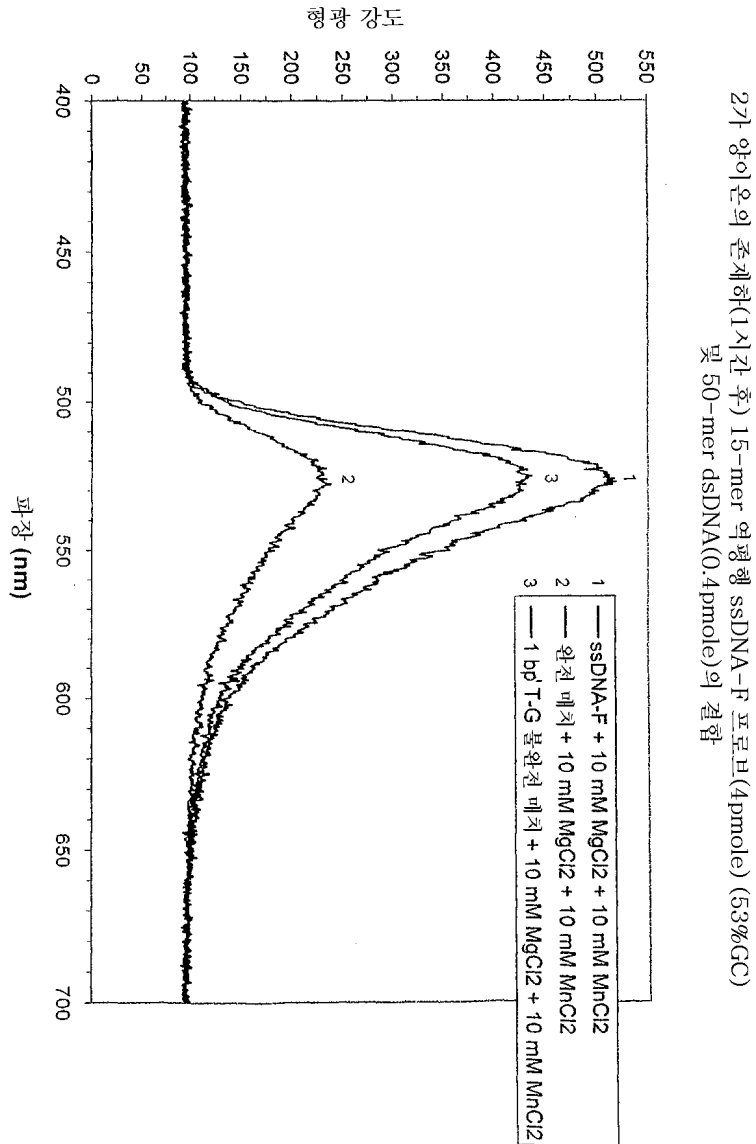
도면5A



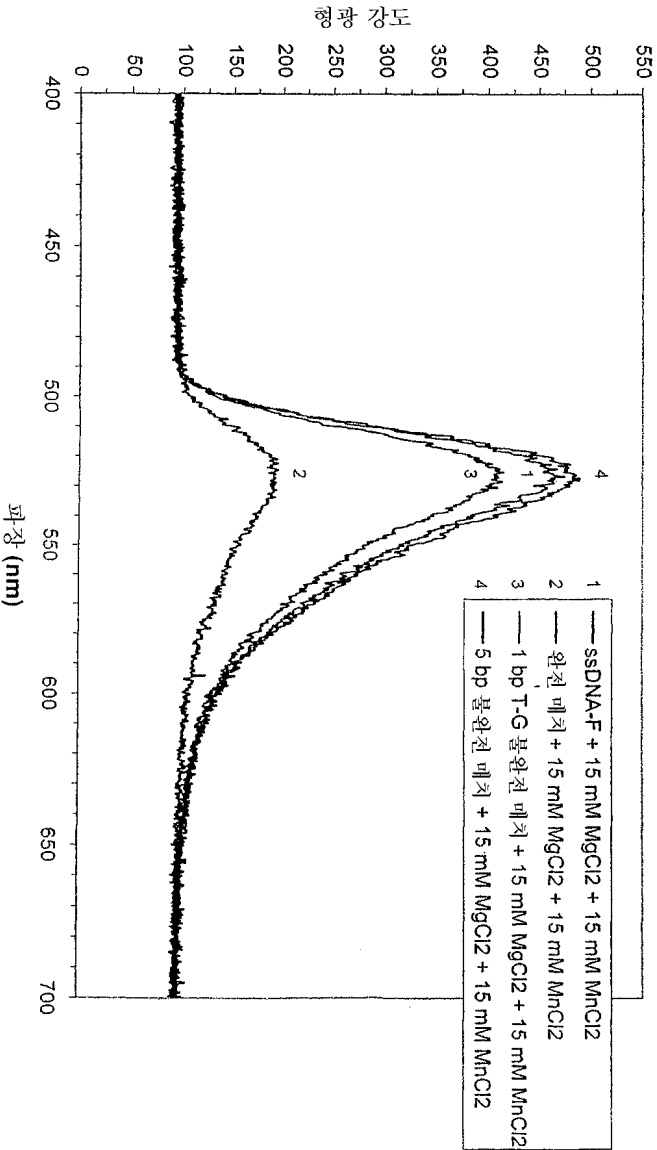
도면5B



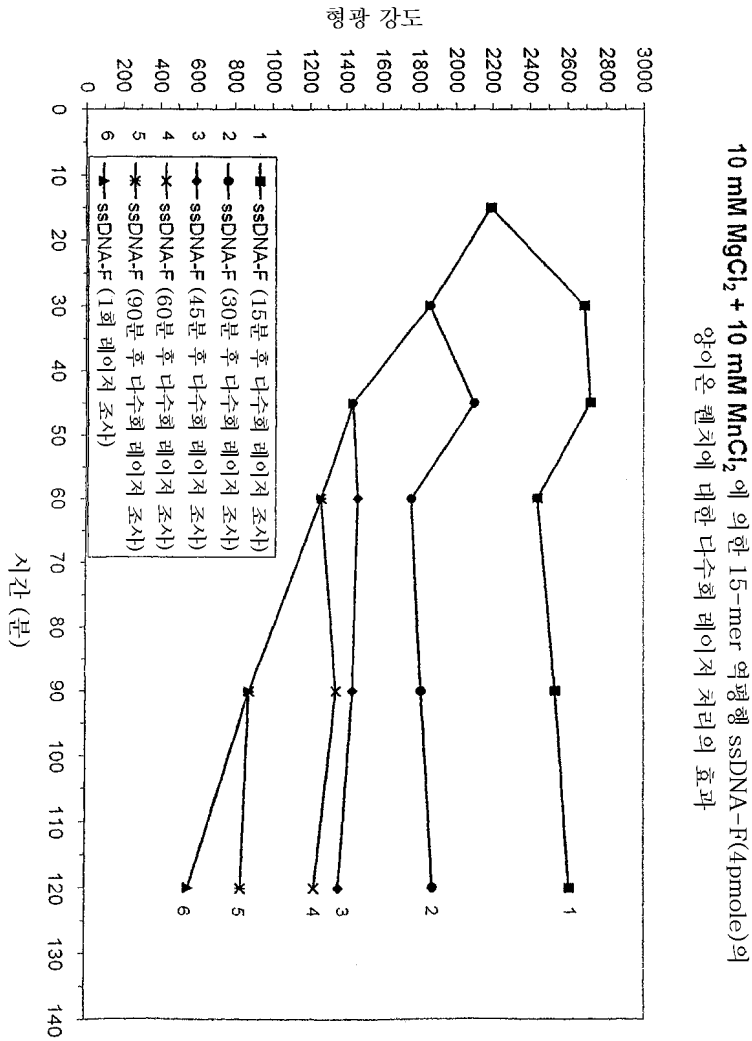
도면5C



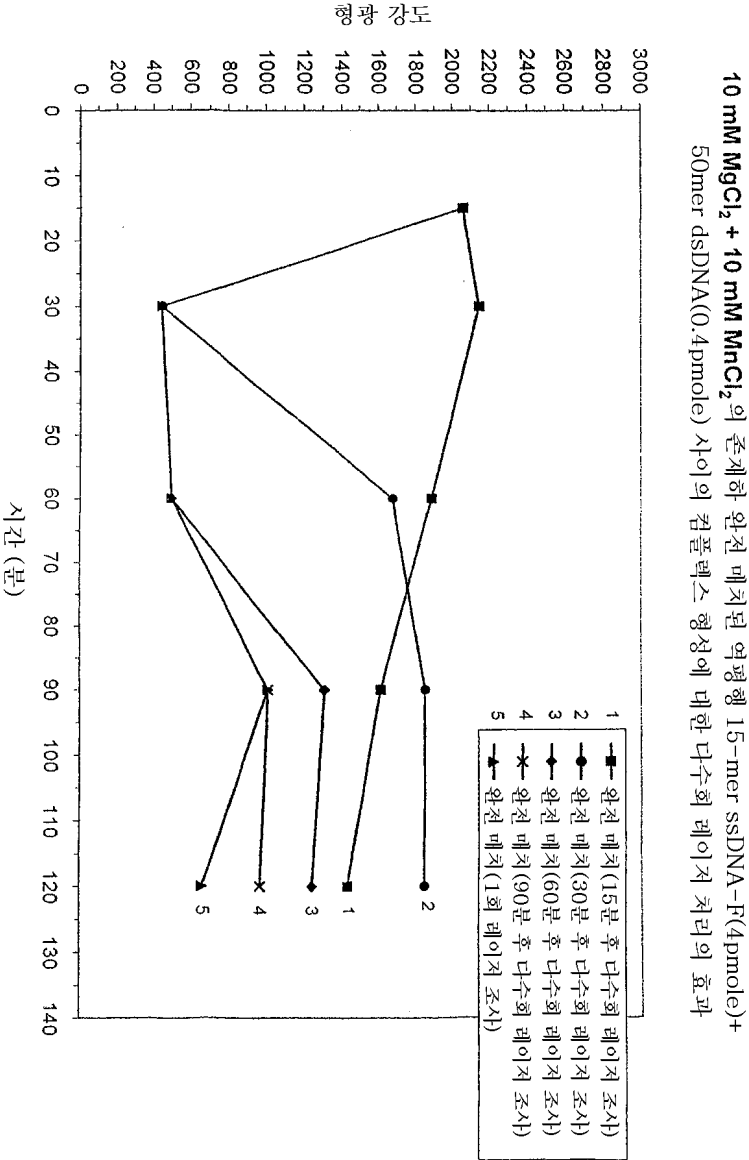
2가 양이온의 존재하(1시간 후) 15-mer 역평형 ssDNA-F 프로브(4pmole) (53%GC) 및 50-mer dsDNA(0.4pmole)의 결합



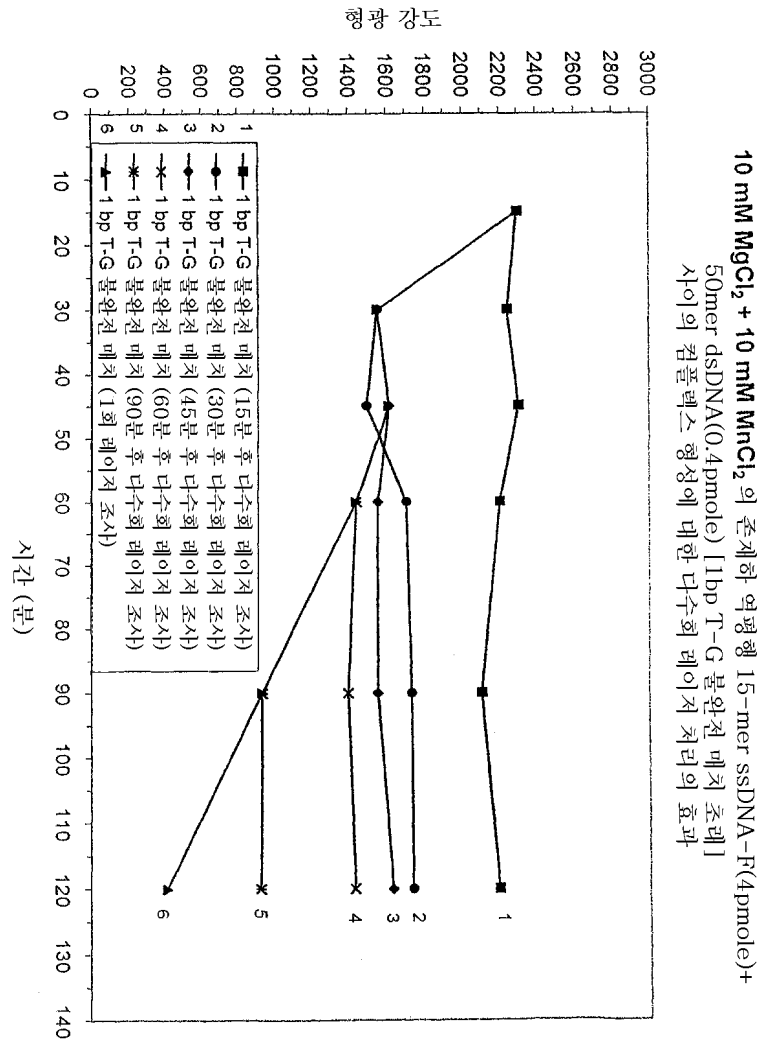
도면6A



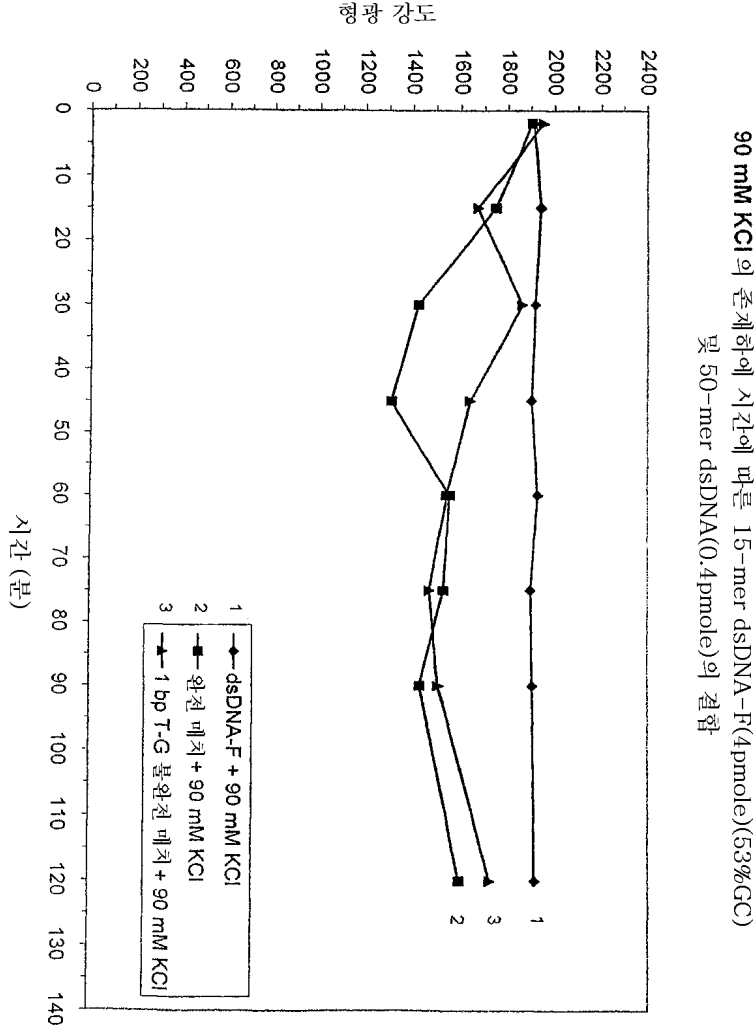
도면6B



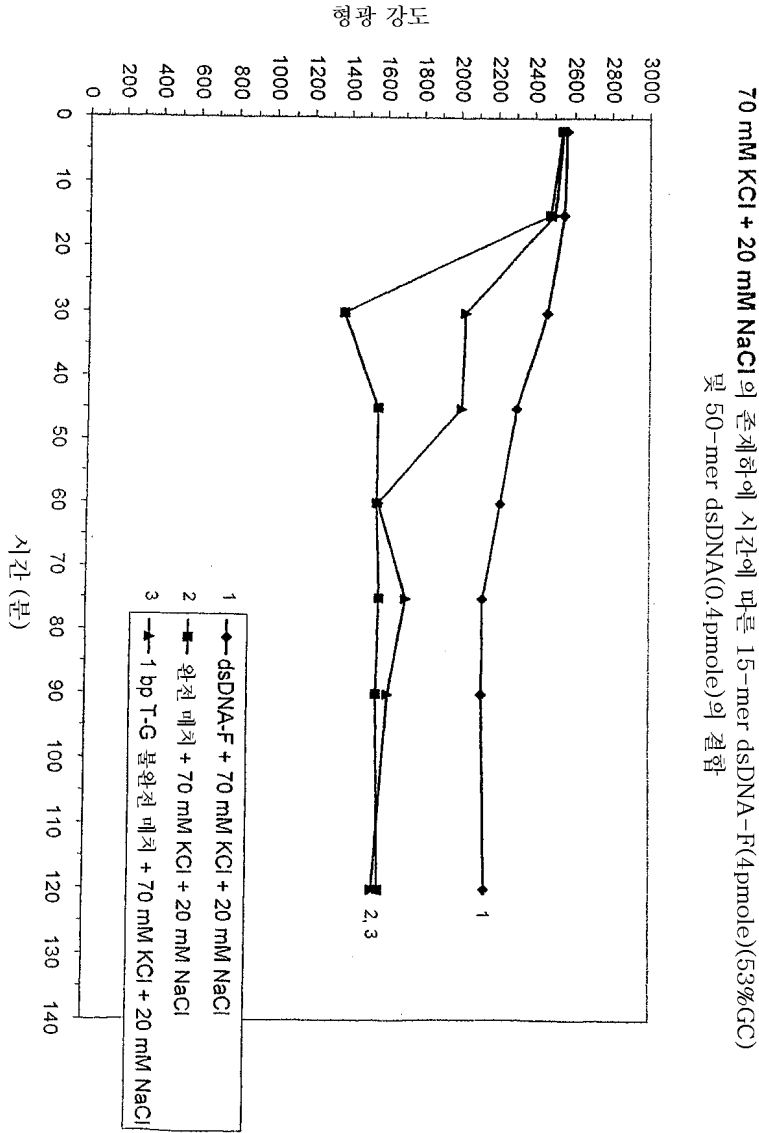
도면6C



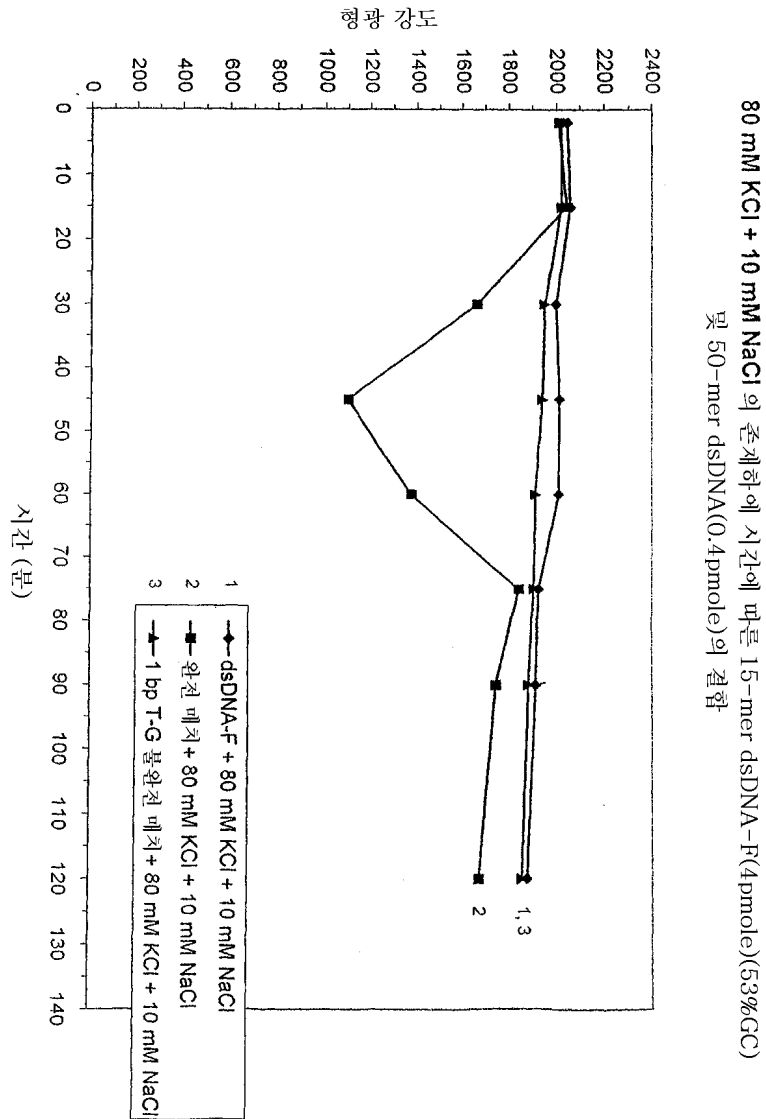
도면7A



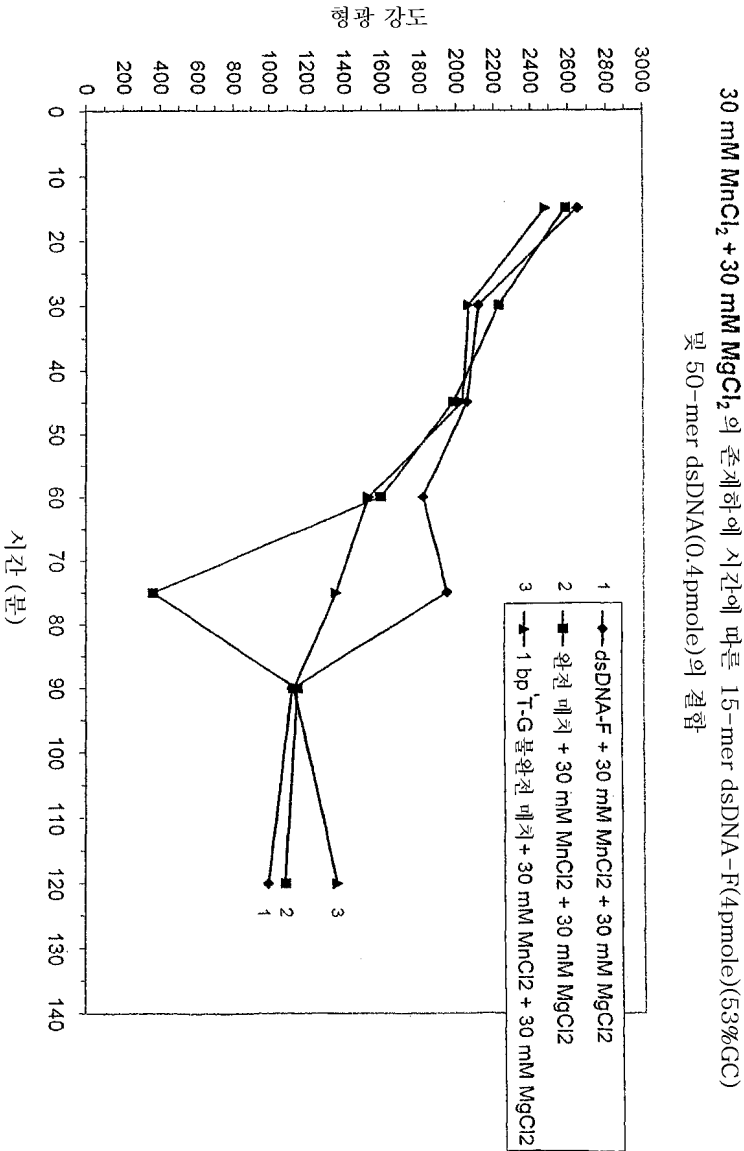
도면7B



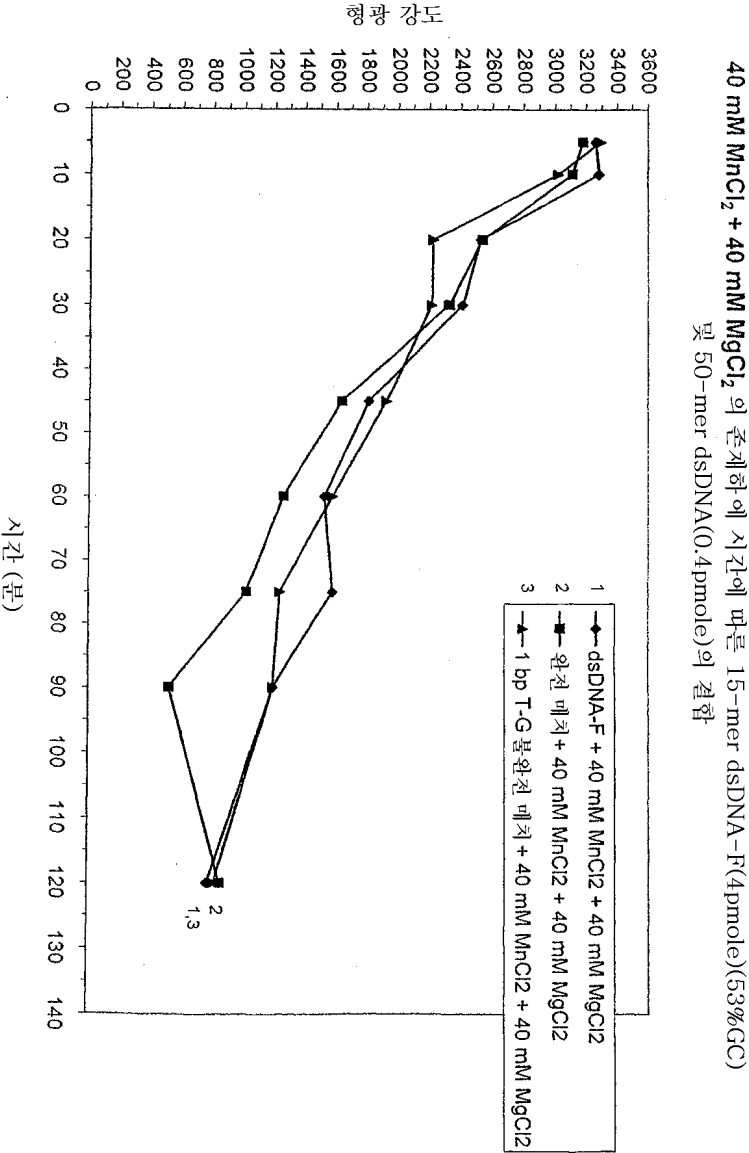
도면7C



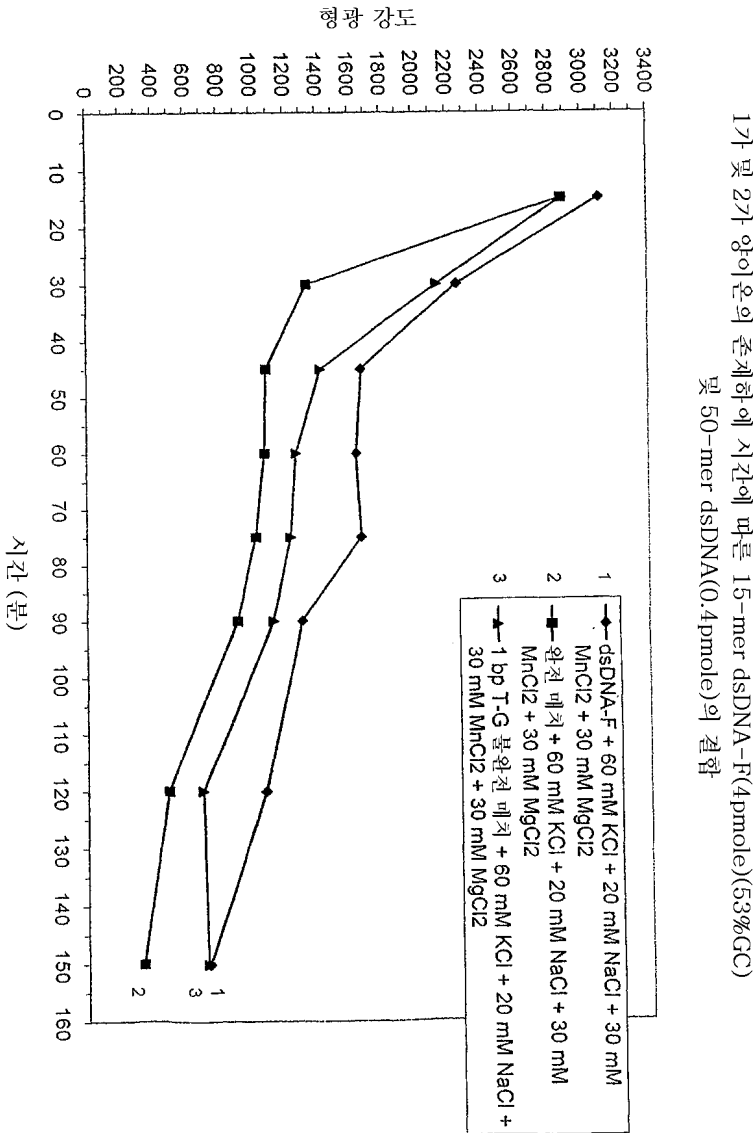
도면8A



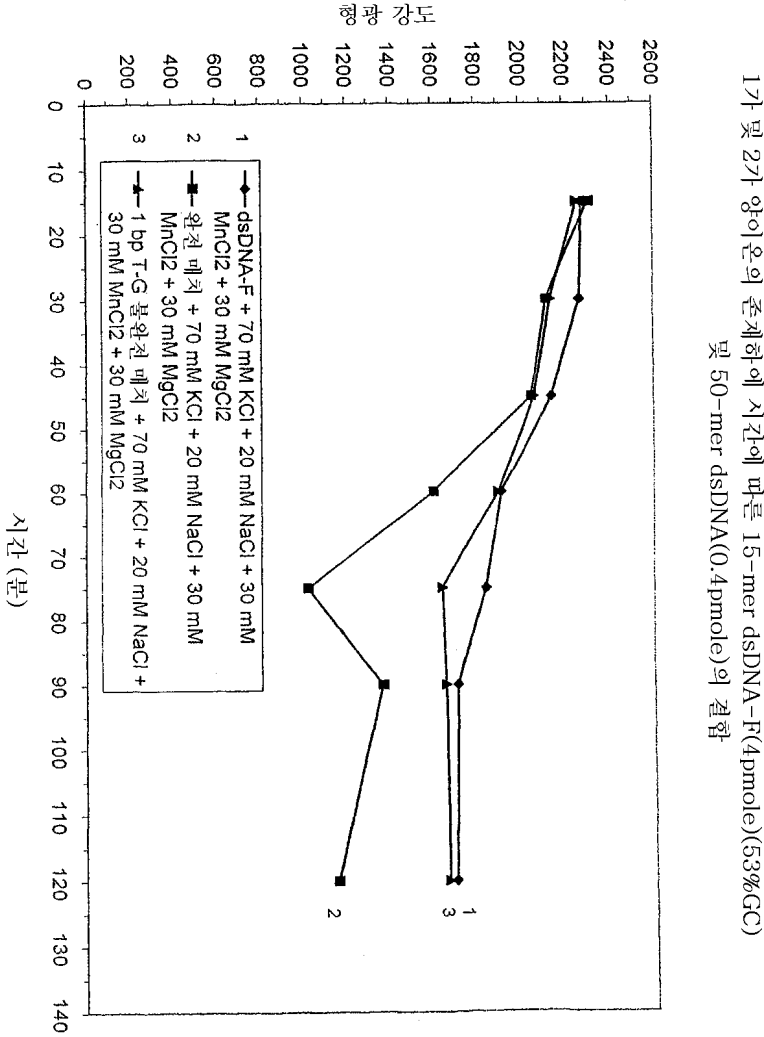
도면8B



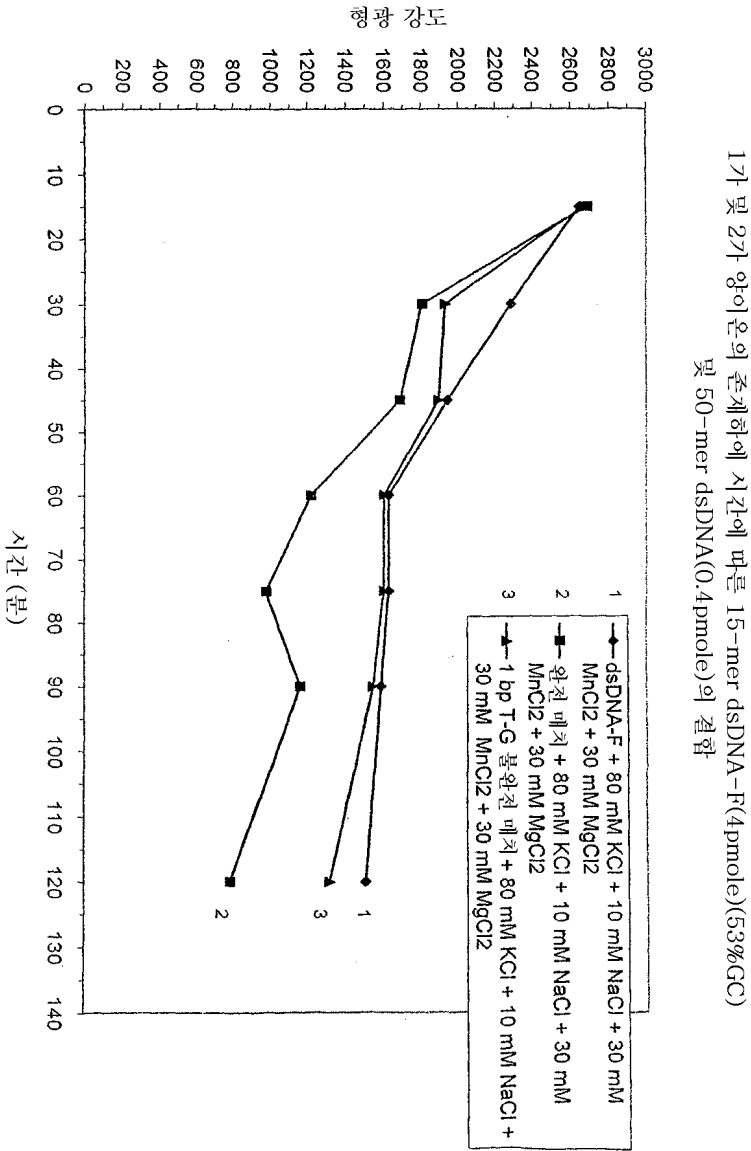
도면9A



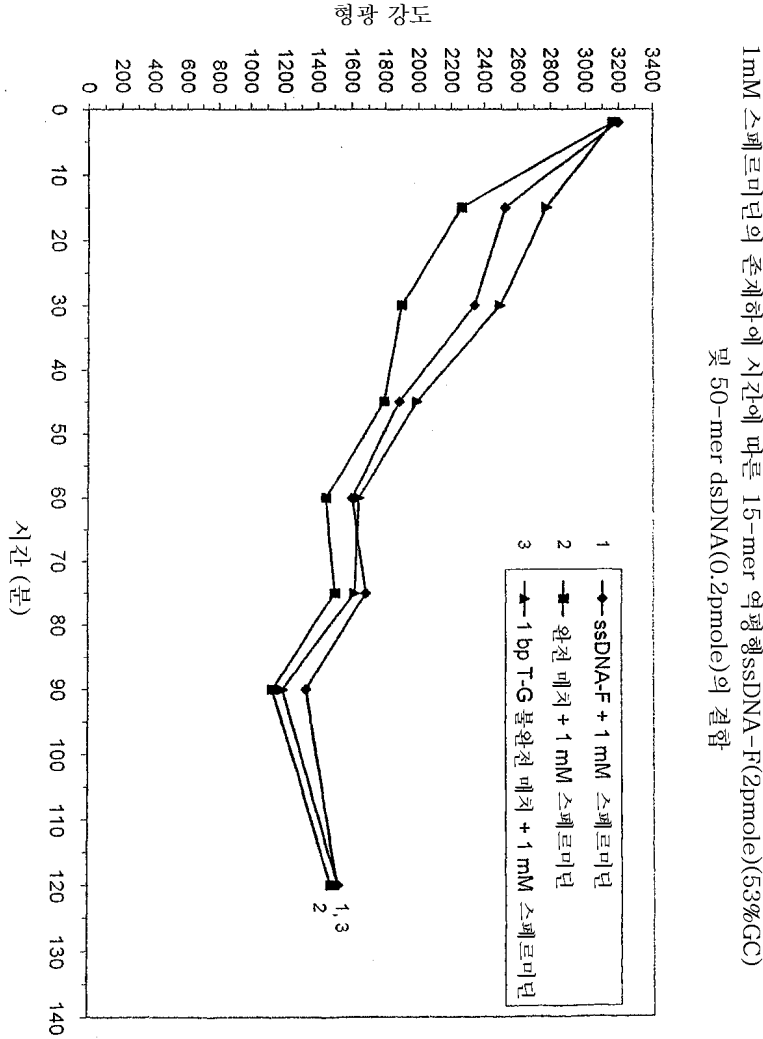
도면9B



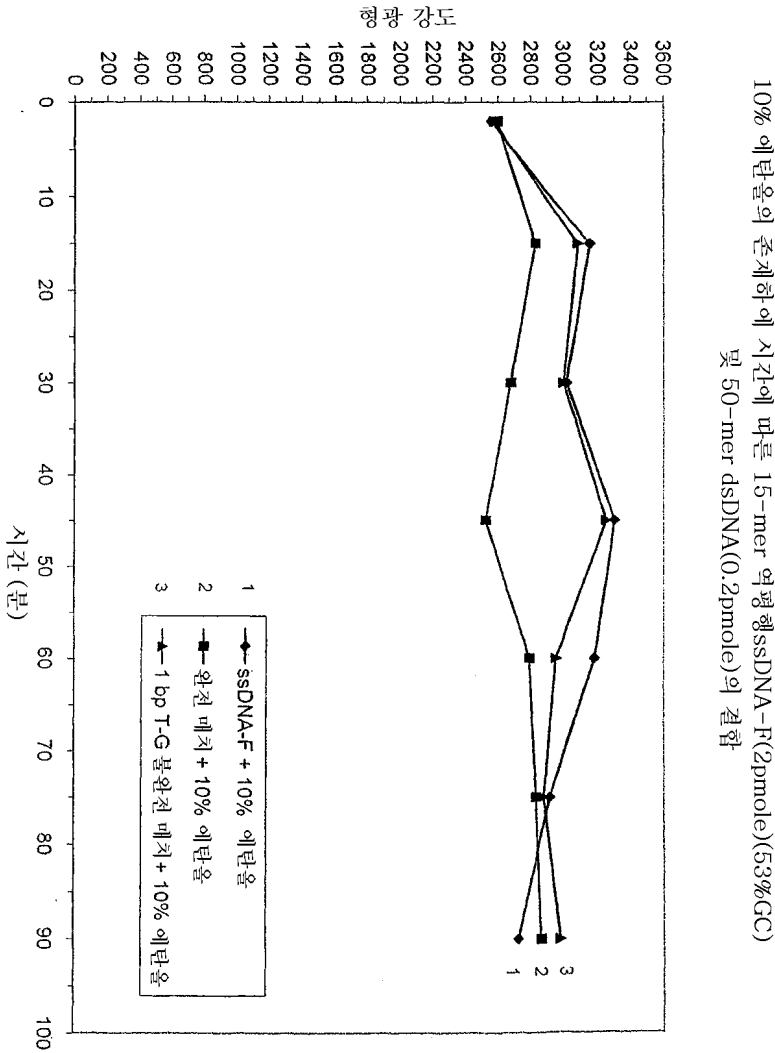
도면9C



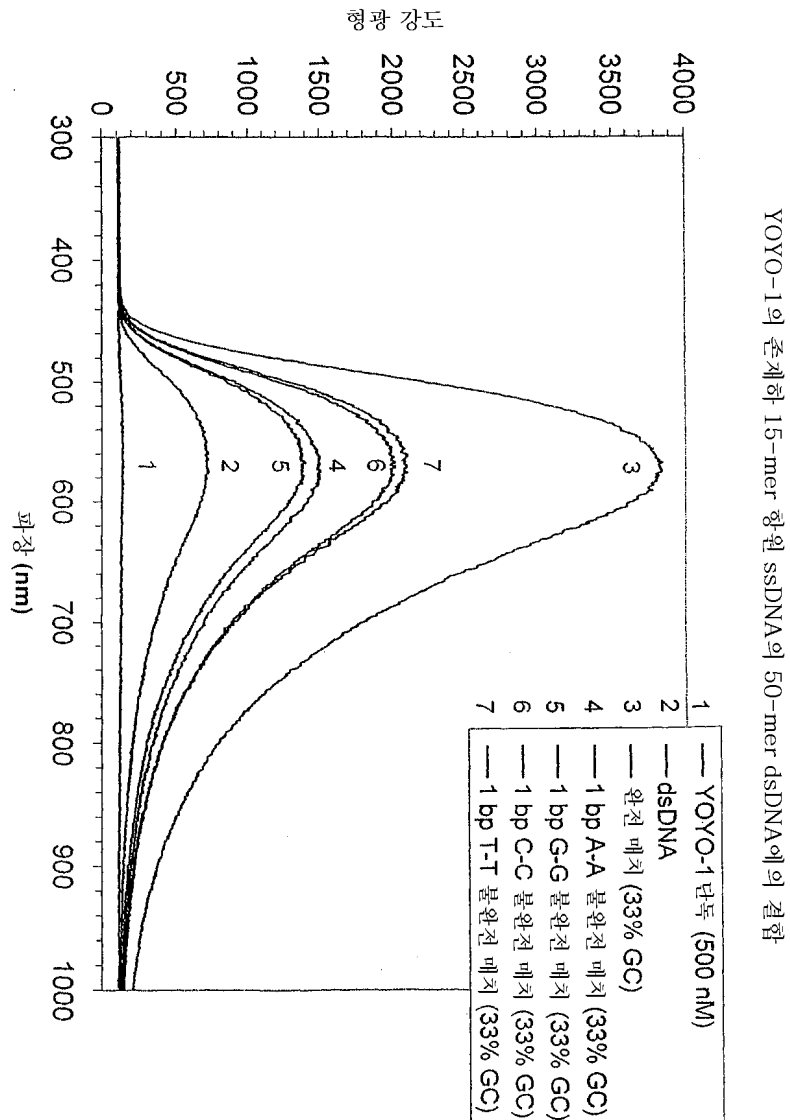
도면10



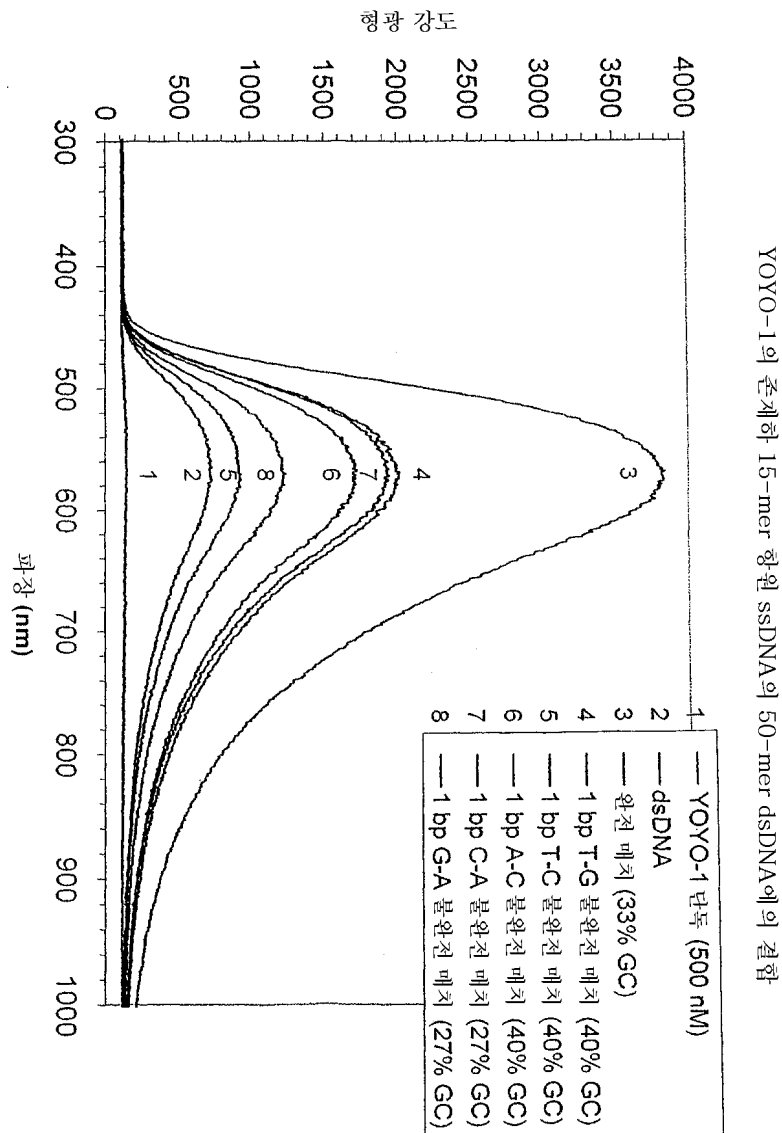
도면11



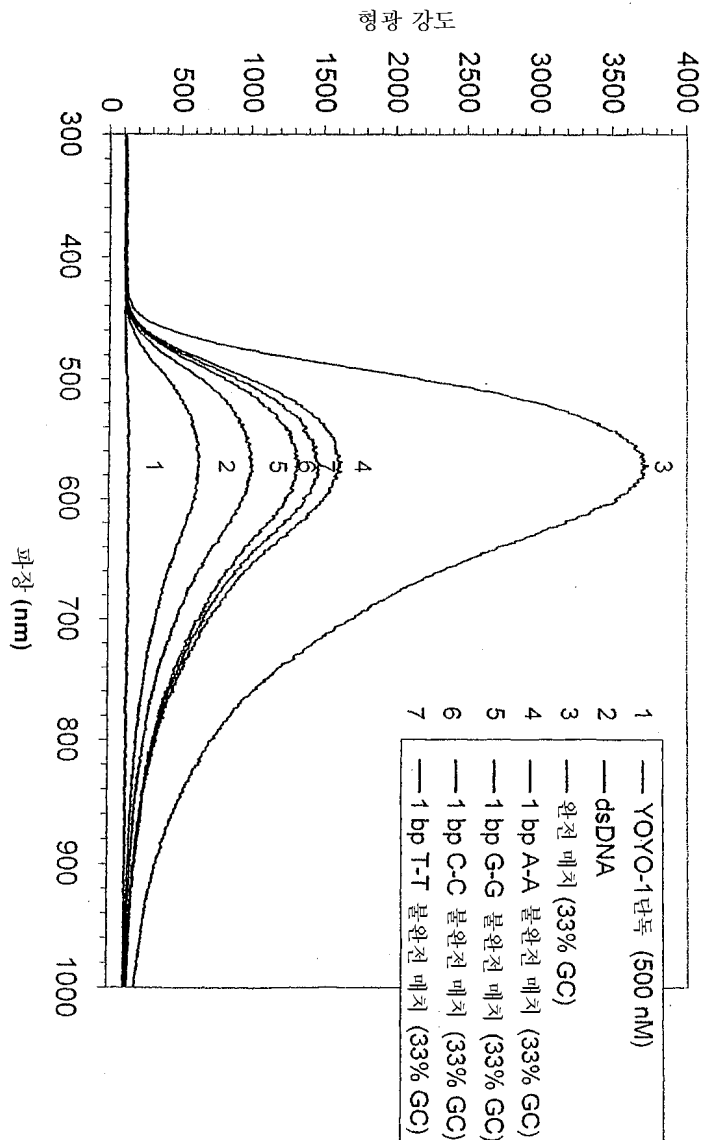
도면12A



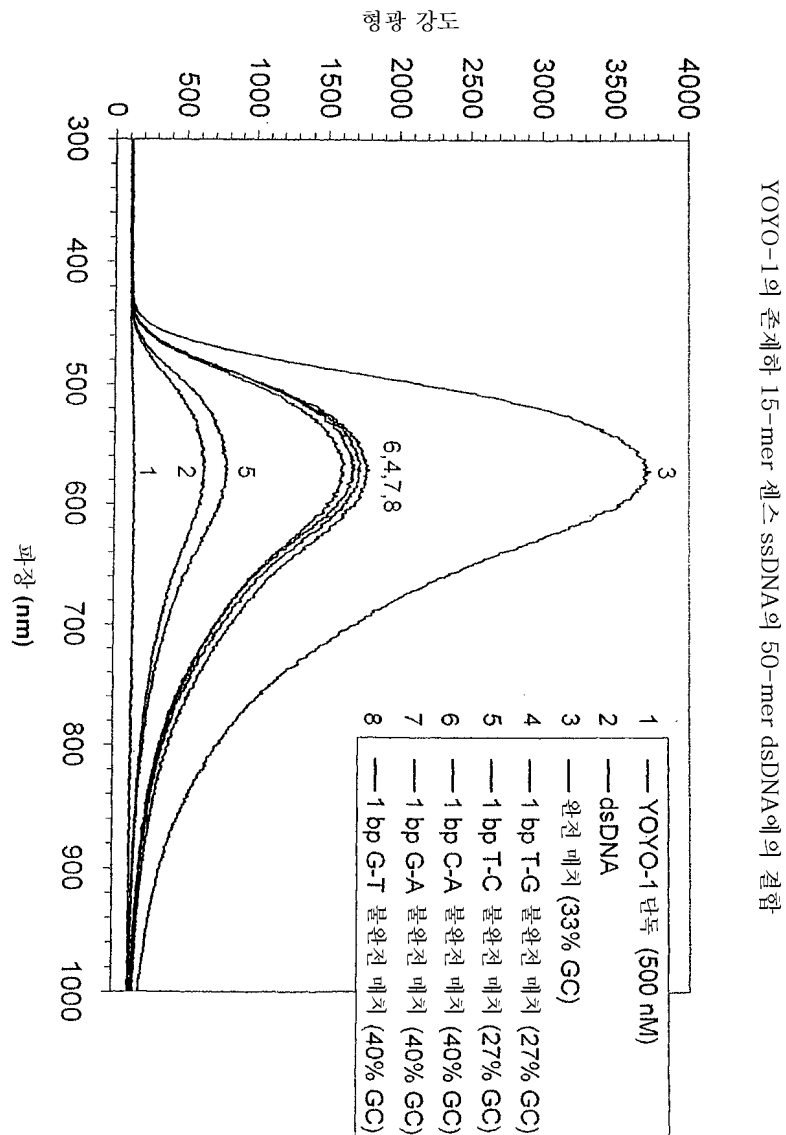
도면12B



도면12C



도면12D



## 서열목록

### SEQUENCE LISTING

<110> Erikson, Glen  
Daksis, Jasmine  
Kandic, Ivana  
Picard, Pierre

<120> NUCLEIC ACID MULTIPLEX FORMATION

<130> E1047/20056

<140> 09/885,731

<141> 2001-06-20

<150> 09/664,827

<151> 2000-09-19

<150> 09/613,263

<151> 2000-07-10

<150> 09/468,679

<151> 1999-12-21  
 <160> 15  
 <170> PatentIn version 3.0  
 <210> 1  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene  
 <400> 1  
 tggcaccatt aaagaaaata tcatctttgg tgtttcctat gatgaatata 50  
 <210> 2  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: variant of sequence derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene  
 <400> 2  
 tggcaccatt aaagaaaata tcgtctttgg tgtttcctat gatgaatata 50  
 <210> 3  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: variant of sequence derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene  
 <400> 3  
 tggcaccatt aaagaaaata tactctttgg tgtttcctat gatgaatata 50  
 <210> 4  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: variant of sequence derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene  
 <400> 4  
 tggcaccatt aaagaaaata tacgctttgg tgtttcctat gatgaatata 50  
 <210> 5  
 <211> 47  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: variant of sequence derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene  
 <400> 5  
 tggcaccatt aaagaaaata tcattggtgt ttctatgat gaatata 47  
 <210> 6  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: variant of sequence derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene  
 <400> 6  
 gagcaccatg acagacactg tcattctctgg tgtgtcctac gatgactctg 50  
 <210> 7  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: variant of sequence derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene  
 <400> 7  
 gagcaccatg acagacactg tcattcttgg tgtgtcctac gatgactctg 50  
 <210> 8  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: variant of sequence derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene  
 <400> 8  
 gagcaccatg acagacactg tcgtctctgg tgtgtcctac gatgactctg 50  
 <210> 9  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: variant of sequence derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene  
 <400> 9  
 gagcaccatg acagacactg tcttctctgg tgtgtcctac gatgactctg 50  
 <210> 10  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: variant of sequence derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene  
 <400> 10  
 gagcaccatg acagacactg tcattccctgg tgtgtcctac gatgactctg 50  
 <210> 11  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: variant of sequence derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene  
 <400> 11  
 gagcaccatg acagacactg tcattcgctgg tgtgtcctac gatgactctg 50  
 <210> 12  
 <211> 50

```

<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: variant of sequence derived f
        rom exon 10 of the human cystic fibrosis gene
<400> 12
gagcaccatg acagacactg tactctctgg tgtgtcctac gatgactctg          50
<210> 13
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: variant of sequence derived f
        rom exon 10 of the human cystic fibrosis gene
<400> 13
gagcaccctc ccaggcacgg tcgtccctgg tgcgacctcc gacgagcgtg          50
<210> 14
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: variant of sequence derived f
        rom exon 10 of the human cystic fibrosis gene
<400> 14
gagcaccctc ccaggcacgg tcatccctgg tgcgacctcc gacgagcgtg          50
<210> 15
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: variant of sequence derived f
        rom exon 10 of the human cystic fibrosis gene
<400> 15
gagcaccctc ccaggcacgg tattccctgg tgcgacctcc gacgagcgtg          50

```