



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년11월23일
(11) 등록번호 10-1086611
(24) 등록일자 2011년11월17일

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01) C12P 19/34 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2004-7020741
(22) 출원일자(국제출원일자) 2003년06월19일
심사청구일자 2008년06월17일
(85) 번역문제출일자 2004년12월20일
(65) 공개번호 10-2005-0021997
(43) 공개일자 2005년03월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2003/019518
(87) 국제공개번호 WO 2004/001376
국제공개일자 2003년12월31일

(30) 우선권주장
60/390,269 2002년06월20일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌
US06207031 B1

전체 청구항 수 : 총 24 항

(73) 특허권자
프리메라디엑스, 인크.
미국, 메사추세츠 02048, 맨스필드, 스위트 2000,
포베스 블레바드 171
(72) 발명자
슬렙네브, 블라디미르아이.
미국, 로드아일랜드 02816, 코벤트리, 페어웨이
드라이브 171
(74) 대리인
강명구

심사관 : 김지윤

(54) 폴리뉴클레오티드 감지와 정량을 위한 기구

(57) 요약

생물학적 재료에서 폴리뉴클레오티드 추출, 증폭, 분석을 실행하는 발현 프로파일링 기구. 상기 기구는 폴리뉴클레오티드의 증폭을 가능하게 하는 증폭 장치 및 증폭된 폴리뉴클레오티드 산물의 양을 정량하는 분석 장치를 포함한다. 상기 기구의 증폭 장치는 증폭을 위한 주형을 준비하는 폴리뉴클레오티드 추출, 또는 정량된 폴리뉴클레오티드 산물의 서열 동정 역시 가능하게 한다. 서열을 확인하기에 앞서, 적합한 폴리뉴클레오티드 산물을 수집하는 분획물 수집 장치가 상기 기구에 포함된다. 상기 기구에서 분석 장치 또는 독립된 데이터 발생 장치로 데이터를 발생시킨다. 상기 기구 내에서 이들 장치는 증폭과 분석을 위한 유체와 신호의 전달을 가능하게 하는 연결 수단에 의해 연결된다.

특허청구의 범위

청구항 1

아래의 요소를 포함하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구:

- 반응 혼합물 내에서 폴리뉴클레오티드를 증폭하여 증폭된 폴리뉴클레오티드 산물을 산출하는 증폭 장치;
- 모세관 전기영동 장치와 감지기를 포함하는 분석 장치, 여기서 감지기는 감지기와 모세관 전기영동 장치에 연결된 모세관 전기영동에 이용되는 모세관 내에서 전기영동에 의해 분리된 핵산 종류를 감지하도록 정렬되고;
- 증폭 장치 내에서 반응 혼합물과 분석 장치 사이에 일시적인 물리적, 전기적 접촉을 제공하여 반응 혼합물의 분량(aliquot)이 증폭 반응 동안 증폭 장치로부터 분석 장치로 이동되도록 하는 로봇팔;
- 상기 증폭 장치, 상기 분석 장치 및 상기 로봇팔을 포함하는 하우징,

여기서, 분석 장치는 모세관 튜브 홀더를 포함하고, 증폭 반응 동안 상기 로봇팔은 전기영동 분리 매체를 포함하는 모세관 전기영동에 이용되는 모세관의 단부를 증폭 장치 내에 반응 혼합물에 일시적으로 담가 증폭 장치로부터 분석 장치로 반응 혼합물의 분량이 이동되도록 하고,

여기서, 모세관 전기영동에 이용되는 모세관은 반응 혼합물 내에 모세관 전기영동에 이용되는 모세관의 단부의 담금(immersion) 동안 감지기에 연결되고, 따라서, 분석 장치는 증폭 반응 동안 채취된 증폭 반응 혼합물의 최소 한(one) 분량(aliquot) 내에서 증폭된 핵산 산물을 분리하고 감지할 수 있다.

청구항 2

제 1항에 있어서, 모세관의 단부가 반응 혼합물 내에 담겨질 때 모세관 전기영동에 이용되는 모세관에 전류가 가해지고, 반응 혼합물의 분량이 증폭 장치로부터 모세관 전기영동 장치 내에 모세관 전기영동에 이용되는 모세관으로 이동되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 3

제 1항에 있어서, 증폭 장치는 복수의 증폭 반응 혼합물 내에서 폴리뉴클레오티드를 동시에 증폭하여 증폭된 폴리뉴클레오티드 산물을 산출하도록 구조되고 정렬되며, 모세관 전기영동 기구는 모세관 전기영동에 이용되는 복수의 모세관 내에서 모세관 전기영동을 동시에 수행하도록 구조되고 정렬되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 4

제 3항에 있어서, 증폭 장치와 모세관 전기영동 장치는 증폭 반응 동안 복수의 증폭 반응 혼합물 각각으로부터 적어도 하나의 분량이 제거되도록 연결되고, 이러한 연결은 각각 전기영동 분리 매체를 포함하는 모세관 전기영동 장치 내에서 모세관 전기영동에 이용되는 복수의 모세관 각각의 첫 번째 단부가 증폭 반응 동안 증폭 장치 내에서 복수의 반응 혼합물 각각에서 일시적으로 동시에 담겨지고, 따라서, 증폭 반응 동안 복수의 증폭 반응 혼합물 각각의 적어도 하나의 분량이 모세관 전기영동 장치로 동시에 이동되도록 하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 5

삭제

청구항 6

아래의 요소를 포함하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구:

- 반응 혼합물 내에서 폴리뉴클레오티드를 증폭하여 증폭된 폴리뉴클레오티드 산물을 산출하는 증폭 장치;
- 상기 증폭장치에 의해 산출된 산물을 분석하는 분석 장치, 여기서 분석 장치는 모세관 전기영동 장치, 모세관 전기영동에 이용되는 모세관 및 감지기를 포함하며, 이때 감지기는 모세관 내에서 전기영동에 의해 분리된 핵산 종류를 감지하도록 모세관 전기영동에 이용되는 모세관에 연결된다;

-상기 증폭 장치와 상기 분석 장치를 포함하는 하우징,

여기서, 분석 장치는 모세관 전기영동에 이용되는 모세관의 단부가 증폭 장치 내에 반응 혼합물에 일시적으로 담겨져 반응 혼합물의 분량이 모세관으로 이동되고, 상기 모세관이 반응 혼합물 내에 상기 모세관의 단부의 일시적인 담금(immersion) 동안 감지기에 연결된 상태로 유지되도록 증폭 장치에 연결되고,

여기서, 분석 장치는 증폭 반응 동안 채취된 분량 내에서 증폭된 핵산 종류를 분리하고 감지한다.

청구항 7

제 6항에 있어서, 모세관의 단부가 반응 혼합물 내에 담겨질 때 모세관 전기영동에 이용되는 모세관에 전류가 가해지고, 반응 혼합물의 분량이 증폭 장치로부터 모세관 전기영동에 이용되는 모세관으로 이동되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 8

제 6항에 있어서, 증폭 장치는 복수의 증폭 반응 혼합물 내에서 폴리뉴클레오티드를 동시에 증폭하여 증폭된 폴리뉴클레오티드 산물을 산출하도록 구조되고 정렬되며, 모세관 전기영동 기구는 모세관 전기영동에 이용되는 복수의 모세관 내에서 모세관 전기영동을 동시에 수행하도록 구조되고 정렬되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 9

제 8항에 있어서, 증폭 장치와 모세관 전기영동 장치는 증폭 반응 동안 복수의 증폭 반응 혼합물 각각으로부터 적어도 하나의 분량이 제거되도록 연결되고, 이러한 연결은 각각 모세관 전기영동 장치 내에서 모세관 전기영동에 이용되는 복수의 모세관 각각의 첫 번째 단부가 증폭 반응 동안 증폭 장치 내에서 복수의 반응 혼합물 각각에서 일시적으로 동시에 담겨지고, 따라서, 증폭 반응 동안 복수의 증폭 반응 혼합물 각각의 적어도 하나의 분량이 모세관 전기영동 장치로 동시에 이동되도록 하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 10

제 1항 또는 6항에 있어서, 증폭 반응 동안 증폭 반응 혼합물로부터 복수의 분량이 제거되도록 구조되고 정렬되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 11

제 1항 또는 6항에 있어서, 추출된 폴리뉴클레오티드 시료가 폴리뉴클레오티드 추출 장치로부터 증폭 장치로 이동되도록 하는, 증폭 장치에 연결된 폴리뉴클레오티드 추출 장치를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 12

제 1항 또는 6항에 있어서, 정량된 산물의 수집을 위한, 분석 장치에 연결된 분획물 수집 장치를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 13

제 12항에 있어서, 정량된 산물의 서열을 확인하는 서열 확인 장치를 추가로 포함하고, 여기서 상기 서열 확인 장치는 수집된 산물이 분획물 수집 장치로부터 서열 확인 장치로 이동되도록 분획물 수집 장치에 연결되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 14

제 1항 또는 6항에 있어서, 감지기는 형광 라벨을 감지하도록 구조되고 정렬되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 15

제 1항 또는 6항에 있어서, 증폭 장치는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭 장치인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레

오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 16

제 15항에 있어서, 각 PCR 사이클 동안 또는 각 PCR 사이클 종결 시점에서 반응 혼합물의 분량이 증폭 장치로부터 분석 장치로 이동되도록 구조되고 정렬되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 17

제 1항 또는 6항에 있어서, 증폭 장치는 cDNA를 산출하는 역전사를 위하여 구조되고 정렬되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 18

제 1항 또는 6항에 있어서, 반응 튜브 또는 마이크로역가 평판을 추가로 포함하고, 역전사에 이용되는 하나 이상의 프라이머는 반응 튜브의 내부벽 또는 마이크로역가 평판의 웰에 화학적으로 연결되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 19

제 11항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 추출 장치는 하나 이상의 생물학적 시료로부터 전체 RNA 또는 mRNA를 분리하도록 구조되고 정렬되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 20

제 3항 또는 8항에 있어서, 모세관 전기영동 장치는 96개 모세관에서 전기영동을 수행하도록 정렬되고 구조되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 21

제 1항에 있어서, 로봇팔은 모세관 튜브 홀더에 연결되어, 분량을 이동시키기 위하여 모세관 튜브 홀더 내에 유지되는 모세관 전기영동에 이용되는 모세관의 첫 번째 단부가 반응 혼합물 내에 일시적으로 담겨질 수 있는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 22

제 11 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 추출 장치는 튜브, 채널 또는 로봇팔에 의해 증폭 장치에 연결되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 23

제 12 항에 있어서, 분획물 수집 장치는 튜브, 채널 또는 로봇팔에 의해 분석 장치에 연결되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 24

제 13항에 있어서, 서열 확인 장치는 튜브, 채널 또는 로봇팔에 의해 분획물 수집 장치에 연결되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 25

제 6 항에 있어서, 로봇팔이 추가로 포함되며, 여기서 로봇팔은 모세관 튜브 홀더에 연결되어, 분량을 이동시키기 위하여 모세관 튜브 홀더 내에 유지되는 모세관 전기영동에 이용되는 모세관의 첫 번째 단부가 반응 혼합물 내에 일시적으로 담겨질 수 있는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 탐지 및 정량화 기구.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 폴리뉴클레오티드의 감지와 정량에 사용되는 자동화 장치에 관한다.

배경기술

[0002] 게놈학의 도입은 약물 개발을 가속화시키는 도구가 되어왔다. 게놈 기술은 신규한 약물 표적의 발견에서 가치를 입증하고 있다. 또한, 이 분야에서 지속적인 개발은 가망 약물을 더욱 신속하고 비용 측면에서 효과적으로 개발할 수 있도록 하는 유익한 도구를 제공할 것이다.

[0003] 약물 개발 공정은 질병과 연관된 유망한 생화학 표적의 확인, 활성 화합물의 스크리닝과 심화된 화학적 설계, 전임상 검사 및 최종적으로 임상 시험을 비롯한 여러 단계를 수반한다. 이런 과정의 효율은 아직 완벽하지 못하다: 기술 개발 과정에 사용되는 비용의 약 75%는 실패한 프로젝트에 소모되는 것으로 추산된다. 게다가, 상품 개발 실패가 후기에 발생할수록, 이런 프로젝트와 연관된 손실은 증가한다. 따라서, 전반적인 약물 개발 과정의 비용을 상당한 수준으로 절감하기 위하여 개발 실패의 조기 차단이 요구된다. 따라서, 고유 분자 표적의 특성이 비용-효과적인 약물 개발에 결정적인 요인이 된다.

[0004] 표적 확인과 유효성에 영향을 한 가지 방법은 전사 프로파일링(profiling)이다. 상기 방법은 특정 조건, 예를 들면, 병든 세포와 정상 세포간, 대조 세포와 약물-처리된 세포간, 또는 약물 처리에 반응을 하는 세포와 약물 반응에 저항하는 세포간에 유전자 발현을 비교하는 방법이다. 이런 방법으로 얻은 정보를 이용하여 치료제에 의해 표적되는 특정 유전자를 직접 확인할 수 있고, 중요하게는 질병 및 치료에 관련된 생화학 경로를 확인할 수도 있다. 간단히 말하면, 전사 프로파일링은 생화학적 표적을 제공할 뿐만 아니라 표적의 특성을 평가하는 방법을 제공한다. 또한, 세포-기초한 스크리닝과 병용된 전사 프로파일링은 약물 개발 분야를 급격하게 변화시키고 있다. 역사적으로, 기능성 세포 시스템에서 표식으로 표현형 변화를 이용하여 유망 약물의 스크리닝이 성공적으로 실시되었다. 가령, 배양액에서 종양 세포 성장을 모니터링하여 항암 약물을 확인하였다. 유사하게, 항생제 화합물의 확인을 목적으로 하는 검사에서 세균의 생존력을 이용하였다. 전형적으로, 이런 스크리닝은 표적된 생화학적 경로에 대한 사전 지식없이 실행되었다. 실제로, 확인된 유효 화합물은 이런 생화학 경로를 나타내고 진정한 분자 표적을 지시하여, 차세대 약물의 설계를 가능하게 하였다.

[0005] 전사 프로파일링과 같은 현대적인 도구를 이용하여, 표현형 변화 대신에 유전자 발현을 활용하는 새로운 스크리닝 방법을 설계하고 약물의 효과를 평가할 수 있다. 가령, 이런 방법은 U.S. Patent No. 5,262,311; 5,665,547; 5,599,672; 5,580,726; 6,045,988, 5,994,076 및 Luehrsen et al., 1997, Biotechniques, 22:168-74; Liang and Pardee, 1998, Mol Biotechnol. 10:261-7에서 기술한다. 이런 방법은 치매, 약한 인식 손상, 우울증 등과 같은 중추 신경계(CNS) 질환 분야의 약물 개발에서 가치가 있는데, 그 이유는 이런 질환 분야에서는 표현형 스크리닝이 불가능하고, 원하는 전사 프로파일이 쉽게 확립되고 특정 질환과 연계될 수 있기 때문이다. 확인된 효과 화합물로 기초 분자 공정을 확인한다. 또한, 상기 방법은 동시에 여러 생화학적 표적으로 기능하여 원하는 약리학적 효과를 발생시키는 기존 약물의 개선된 유형의 개발에도 유익한 도구가 될 수 있다. 이런 경우에, 다중 표적에 대한 결합의 최적화에 근거한 선별 방식 보다는 전사 반응에서 변화가 약물 작용에 대한 좀더 우수한 표식이다.

[0006] 본원 발명 이전에 가장 진전된 전사 프로파일링 방법은 DNA 마이크로어레이(microarray)에 기초한다(참조: Greenberg, 2001 Neurology 57:755-61; Wu, 2001, J Pathol. 195:53-65; Dhiman et al., 2001, Vaccine 20:22-30; Bier et al., 2001 Fresenius J Anal Chem, 371:151-6; Mills et al., 2001, Nat Cell Biol. 1E175-8; U.S. Patent No. 5,593,839; 5,837,832; 5,856,101; 6,203,989; 6,271,957; 287,778). DNA 마이크로어레이(microarray)는 검사 어레이의 표면에 부착된 DNA 분자에 mRNA 역전사의 수득된 표지된 폴리뉴클레오티드

시료의 혼성화를 평가함으로써 일정한 시료에서 수천개 유전자의 발현을 동시에 비교하는 방법이다. 이런 선행 기술이 전사 변화에 관한 유용한 정보를 제공하긴 하지만, 완벽하지는 못하다.

- [0007] 첫째, 상기 기술은 마이크로어레이에 제공된 유전자 풀(pool)에만 한정된다. 현재 프린팅 방법으로 단일 칩상에 약 10,000-15,000개 유전자를 배치할 수 있는데, 이 숫자는 특정 세포형에서 발현된 유전자의 숫자이다. 세포형의 다양성으로 인하여, 특정 세포형에 특이적인 어레이의 개발이 요구된다. 이런 작업은 이론적으로는 가능한데, 마이크로어레이 제작에 앞서 이들 세포에서 발현되는 유전자 풀(pool)에 대한 사전 지식이 필요하기 때문에 거의 불가능하다.
- [0008] 또한, 조직 시료에서 전사체의 숫자가 세포 시료에서보다 훨씬 많고, 현재 가용한 마이크로어레이의 기능을 초과한다. 이에 더하여, 유전자 발현에서 일부 변화는 약자택일형 절단접합(splicing)에 기인하는데, 이는 평가해야 할 전사체의 수를 더욱 증가시킨다. 이런 난제(難題)를 극복할 수 있는 유일한 가능성은 선택적으로 절단접합된 유전자를 포함한 전체 게놈을 포괄하는 다중 어레이를 개발하는 것이다. 이런 방식은 1회 실험 비용을 현저하게 증가시키고, 이용가능 범위 이상의 생물학적 시료를 필요로 한다.
- [0009] 둘째, 선행 DNA 마이크로어레이는 정량적으로 정확한 데이터를 제공하지 못하고, 유전자 발현에서 관찰된 변화는 정량적인 중합효소 연쇄 반응(Q-PCR) 방법과 같은 독립된 방법으로 입증해야 한다.
- [0010] 마지막으로, 특히 드물게 나타나는 목적하는 전사체 발현은 선행 감지 기술을 이용한 마이크로어레이에 의해 감지될 수 없다.
- [0011] 모세관(Capillary) 전기영동을 이용하여 유전자 발현을 정량적으로 감지하였다. Rajeve et al., 2001, Pflugers Arch. 442(6 Suppl 1): RI90-2에서는 동시에 다수종양유전자의 발현에서 차이를 감지하기 위한 7쌍의 프라이머를 이용하여 종양유전자(oncogene)의 차등 발현을 감지하는 방법을 보고하였다. 센스 프라이머는 형광 염료로 5'-말단 표지하였다. 다중 형광 RT-PCR 결과는 ABI-PRISM 310 Genetic Analyzer에서 모세관 전기영동으로 분석하였다. Borson et al., 1998, Biotechniques 25:130-7에서는 생성물의 신속한 분리와 감지를 위하여 모세관 전기영동(CE)에 결합된 정량적 경쟁 역전사 PCR(QC-RT-PCR)을 기초한 낮은 존재율(low-존재비율) mRNA 전사체의 신뢰성있는 정량화 전략을 보고하였다. George et al.,(1997, J Chromatogr B Biomed Sci Appl 695:93-102)에서는 모세관 전기영동 시스템(ABI 310)을 형광 차등 디스플레이 EST 패턴의 확인에 이용하였다. Odin et al.,(1999, J Chromatogr B Biomed Sci Appl 734:47-53)은 PCR-증폭된 cDNA의 분리 및 정량을 위한 다색 감지하는 자동화 모세관 겔 전기영동을 보고하였다.
- [0012] PCR 증폭과 CE에 별개의 장치가 가용하다. 가령, PCR 기계는 Applied Biosystems(Foster City, CA), Bio-Rad(Hercules, CA), Eppendorf(Westbury, NY), Roche(Indianapolis, IN)로부터 구입가능하다. CE 기구는 Applied Biosystems(Foster City, CA), Beckman Coulter(Fullerton, CA), Spectrumedix Corporation(State College, PA)로부터 구입가능하다.
- [0013] U. S. 특허 6,126,804에서는 소형 휴대 포장에 통합된 중합효소 연쇄 반응(PCR) 효소 반응 웰, 부착된 모세관 전기영동(CE) 채널, 감지기, 판독기를 보유하는 작은 휴대 장치를 이용한 미생물과 DNA 단편의 현장 확인을 위한 장치를 개시한다. 하지만, 이런 장치는 현장용으로만 설계된다. 어떤 선행 장치에서도 하나이상의 시료에서 유전자 발현 프로파일의 정량적 감지를 위한 간단하고 민감한 기구를 제시하지 않는다.
- [0014] 이들 한계를 극복하기 위하여, 당분야에는 (1) 분석에 앞서 발현된 유전자 풀의 서열에 대한 사전 지식을 요구하지 않고; (2) 발현된 전사체의 수준에서 정량적 변화를 측정하며; (3) 드물게 나타나는 유전자의 발현을 감지하고; (4) 자동화된 전사 프로파일링을 실행하는 선택적 기구의 개발이 필요하다.
- [0015] **본 발명의 요약**
- [0016] 본 발명은 반응 혼합물에서 폴리뉴클레오티드를 증폭하여 증폭 산물을 생성하는 증폭 장치; 반응 혼합물의 분량이 증폭 장치로부터 증폭 산물을 감지하고 정량하는 분석 장치로 이동하도록 하는 제 1 연결 수단에 의해 증폭 장치에 연결된 분석 장치를 포함하는 발현 프로파일링 기구를 제시하는데, 여기서 제 1 연결 수단은 로봇팔이다.
- [0017] 한 구체예에서, 상기 기구는 추출된 폴리뉴클레오티드 시료가 폴리뉴클레오티드 추출 장치로부터 증폭 장치로 이동하도록 하는 제 2 연결 수단에 의해 증폭 장치에 연결된 폴리뉴클레오티드 추출 장치를 추가로 포함한다.
- [0018] 다른 구체예에서, 상기 기구는 분획물 수집 장치를 추가로 포함한다.

- [0019] 바람직한 구체예에서, 분획물 수집 장치는 정량된 산물의 수집을 가능하게 하는 제 4 연결 수단에 의해 분석 장치에 연결된다.
- [0020] 다른 구체예에서, 상기 기구는 정량된 산물의 서열을 확인하는 서열 확인 장치를 추가로 포함하는데, 여기서 서열 확인 장치는 정량된 산물이 분석 장치로부터 서열 확인 장치로 이동하도록 하는 제 5 연결 수단에 의해 분석 장치에 연결된다.
- [0021] 다른 구체예에서, 상기 기구는 정량된 산물의 서열을 확인하는 서열 확인 장치를 추가로 포함하는데, 여기서 서열 확인 장치는 수집된 산물이 분획물 수집 장치로부터 서열 확인 장치로 이동하도록 하는 제 5 연결 수단에 의해 분획물 수집 장치에 연결된다.
- [0022] 또한, 본 발명에서는 반응 혼합물에서 폴리뉴클레오티드를 증폭하여 증폭 산물을 생성하는 증폭 장치; 반응 혼합물의 분량이 증폭 장치로부터 증폭 산물을 감지하고 정량하는 분석 장치로 이동하도록 하는 제 1 연결 수단에 의해 증폭 장치에 연결된 분석 장치; 추출된 폴리뉴클레오티드 시료가 폴리뉴클레오티드 추출 장치로부터 증폭 장치로 이동하도록 하는 제 2 연결 수단에 의해 증폭 장치에 연결된 폴리뉴클레오티드 추출 장치를 포함하는 발현 프로파일링 기구를 제시한다.
- [0023] 한 구체예에서, 상기 기구는 분획물 수집 장치를 추가로 포함한다.
- [0024] 바람직한 구체예에서, 분획물 수집 장치는 정량된 산물의 수집을 가능하게 하는 제 4 연결 수단에 의해 분석 장치에 연결된다.
- [0025] 다른 구체예에서, 상기 기구는 정량된 산물의 서열을 확인하는 서열 확인 장치를 추가로 포함하는데, 여기서 서열 확인 장치는 정량된 산물이 분석 장치로부터 서열 확인 장치로 이동하도록 하는 제 5 연결 수단에 의해 분석 장치에 연결된다.
- [0026] 다른 구체예에서, 상기 기구는 정량된 산물의 서열을 확인하는 서열 확인 장치를 추가로 포함하는데, 여기서 서열 확인 장치는 수집된 산물이 분획물 수집 장치로부터 서열 확인 장치로 이동하도록 하는 제 5 연결 수단에 의해 분획물 수집 장치에 연결된다.
- [0027] 본 발명은 반응 혼합물에서 폴리뉴클레오티드를 증폭하여 증폭 산물을 생성하는 증폭 장치; 반응 혼합물의 분량이 증폭 장치로부터 증폭 산물을 감지하고 정량하는 분석 장치로 이동하도록 하는 제 1 연결 수단에 의해 증폭 장치에 연결된 분석 장치; 신호가 분석 장치로부터 데이터 발생 장치로 이동하도록 하는 제 3 연결 수단에 의해 분석 장치에 연결된 데이터 발생 장치를 포함하는 발현 프로파일링 기구를 제시한다.
- [0028] 한 구체예에서, 상기 기구는 추출된 폴리뉴클레오티드 시료가 폴리뉴클레오티드 추출 장치로부터 증폭 장치로 이동하도록 하는 제 2 연결 수단에 의해 증폭 장치에 연결된 폴리뉴클레오티드 추출 장치를 추가로 포함한다.
- [0029] 다른 구체예에서, 상기 기구는 분획물 수집 장치를 추가로 포함한다.
- [0030] 바람직한 구체예에서, 분획물 수집 장치는 정량된 산물의 수집을 가능하게 하는 제 4 연결 수단에 의해 분석 장치에 연결된다.
- [0031] 다른 구체예에서, 상기 기구는 정량된 산물의 서열을 확인하는 서열 확인 장치를 추가로 포함하는데, 여기서 서열 확인 장치는 정량된 산물이 분석 장치로부터 서열 확인 장치로 이동하도록 하는 제 5 연결 수단에 의해 분석 장치에 연결된다.
- [0032] 다른 구체예에서, 상기 기구는 정량된 산물의 서열을 확인하는 서열 확인 장치를 추가로 포함하는데, 여기서 서열 확인 장치는 수집된 산물이 분획물 수집 장치로부터 서열 확인 장치로 이동하도록 하는 제 5 연결 수단에 의해 분획물 수집 장치에 연결된다.
- [0033] 본 발명은 반응 혼합물에서 폴리뉴클레오티드를 증폭하여 증폭 산물을 생성하는 증폭 장치; 반응 혼합물의 분량이 증폭 장치로부터 증폭 산물을 감지하고 정량하는 분석 장치로 이동하도록 하는 제 1 연결 수단에 의해 증폭 장치에 연결된 분석 장치; 정량된 산물의 수집을 가능하게 하는 분획물 수집 장치를 포함하는 발현 프로파일링 기구를 제시한다.
- [0034] 바람직한 구체예에서, 분획물 수집 장치는 정량된 산물의 수집을 가능하게 하는 제 4 연결 수단에 의해 분석 장치에 연결된다.
- [0035] 한 구체예에서, 상기 기구는 추출된 폴리뉴클레오티드 시료가 폴리뉴클레오티드 추출 장치로부터 증폭 장치로

이동하도록 하는 제 2 연결 수단에 의해 증폭 장치에 연결된 폴리뉴클레오티드 추출 장치를 추가로 포함한다.

- [0036] 다른 구체예에서, 상기 기구는 정량된 산물의 서열을 확인하는 서열 확인 장치를 추가로 포함하는데, 여기서 서열 확인 장치는 수집된 산물이 분획물 수집 장치로부터 서열 확인 장치로 이동하도록 하는 제 5 연결 수단에 의해 분획물 수집 장치에 연결된다.
- [0037] 본 발명은 반응 혼합물에서 폴리뉴클레오티드를 증폭하여 증폭 산물을 생성하는 증폭 장치; 반응 혼합물의 분량이 증폭 장치로부터 증폭 산물을 감지하고 정량하는 분석 장치로 이동하도록 하는 제 1 연결 수단에 의해 증폭 장치에 연결된 분석 장치; 정량된 산물의 서열을 확인하는 서열 확인 장치를 포함하는 발현 프로파일링 기구를 제시하는데, 여기서 서열 확인 장치는 정량된 산물이 분석 장치로부터 서열 확인 장치로 이동하도록 하는 제 5 연결 수단에 의해 분석 장치에 연결된다.
- [0038] 한 구체예에서, 상기 기구는 추출된 폴리뉴클레오티드 시료가 폴리뉴클레오티드 추출 장치로부터 증폭 장치로 이동하도록 하는 제 2 연결 수단에 의해 증폭 장치에 연결된 폴리뉴클레오티드 추출 장치를 추가로 포함한다.
- [0039] 다른 구체예에서, 상기 기구는 분획물 수집 장치를 추가로 포함한다.
- [0040] 바람직한 구체예에서, 분획물 수집 장치는 정량된 산물의 수집을 가능하게 하는 제 4 연결 수단에 의해 분석 장치에 연결되고, 또한 수집된 산물이 분획물 수집 장치로부터 서열 확인 장치로 이동하도록 하는 다른 제 5 연결 수단에 의해 서열 확인 장치에도 연결된다.
- [0041] 한 구체예에서, 증폭 장치와 분석 장치 역시 폴리뉴클레오티드의 서열 동정이 가능하다.
- [0042] 본 발명은 반응 혼합물에서 폴리뉴클레오티드를 증폭하여 증폭 산물을 생성하는 증폭 장치; 증폭 산물을 감지하고 정량하는 모세관 전기영동 장치를 포함하는 발현 프로파일링 기구를 제시하는데, 여기서 모세관 전기영동 장치의 모세관은 반응 혼합물에 담겨지고 반응 혼합물의 분량을 증폭 장치로부터 모세관 전기영동 장치로 이동시킨다.
- [0043] 한 구체예에서, 상기 기구는 추출된 폴리뉴클레오티드 시료가 폴리뉴클레오티드 추출 장치로부터 증폭 장치로 이동하도록 하는 제 2 연결 수단에 의해 증폭 장치에 연결된 폴리뉴클레오티드 추출 장치를 추가로 포함한다.
- [0044] 다른 구체예에서, 상기 기구는 분획물 수집 장치를 추가로 포함한다.
- [0045] 바람직한 구체예에서, 분획물 수집 장치는 정량된 산물의 수집을 가능하게 하는 제 4 연결 수단에 의해 모세관 전기영동 장치에 연결된다.
- [0046] 다른 구체예에서, 상기 기구는 정량된 산물의 서열을 확인하는 서열 확인 장치를 추가로 포함하는데, 여기서 서열 확인 장치는 정량된 산물이 모세관 전기영동 장치로부터 서열 확인 장치로 이동하도록 하는 제 5 연결 수단에 의해 모세관 전기영동 장치에 연결된다.
- [0047] 다른 구체예에서, 상기 기구는 정량된 산물의 서열을 확인하는 서열 확인 장치를 추가로 포함하는데, 여기서 서열 확인 장치는 수집된 산물이 분획물 수집 장치로부터 서열 확인 장치로 이동하도록 하는 제 5 연결 수단에 의해 분획물 수집 장치에 연결된다.
- [0048] 다른 구체예에서, 증폭 장치와 모세관 전기영동 장치는 폴리뉴클레오티드의 서열 동정을 가능하게 한다.
- [0049] 적절하게는, 본 발명의 기구에서 증폭 장치는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭 장치이다.
- [0050] 적절하게는, 제 1 연결 수단은 반응 혼합물의 분량이 각 PCR 사이클의 종결 시점에서 증폭 장치로부터 분석 장치로 이동하도록 한다.
- [0051] 적절하게는, 반응 혼합물은 반응 튜브 또는 마이크로역가 평판의 웰에서 내부벽에 화학적으로 결합된 하나 이상의 PCR 증폭 프라이머를 함유한다.
- [0052] 적절하게는, 본 발명의 기구에서 증폭 장치는 cDNA를 발생시키는 역전사를 가능하게 한다.
- [0053] 적절하게는, 역전사에 이용되는 하나 이상의 프라이머는 반응 튜브 또는 마이크로역가 평판의 웰에서 내부벽에 화학적으로 결합된다.
- [0054] 적절하게는, 상기 기구는 하나 이상의 형광 라벨에 의해 발생된 신호의 감지와 정량을 가능하게 한다.
- [0055] 본 발명의 일부 구체예에서, 제 1, 제 2, 제 4 또는 제 5 연결 수단은 로봇팔이다.

- [0056] 본 발명의 다른 구체예에서, 제 1, 제 2, 제 4 또는 제 5 연결 수단은 튜브 또는 채널이다.
- [0057] 본 발명의 일부 구체예에서, 제 1, 제 2, 제 4 또는 제 5 연결 수단은 단일 연결 수단, 예를 들면, 시료를 한 장치로부터 다른 장치로 이동시키는 로봇팔이다.
- [0058] 한 구체예에서, 전류를 제 1, 제 2, 제 4 또는 제 5 연결 수단에 적용하여 이동을 가능하게 한다.
- [0059] 적절하게는, 본 발명의 기구에서 분석 장치는 모세관 전기영동 장치이다.
- [0060] 적절하게는, 본 발명의 기구에서 폴리뉴클레오티드 추출 장치는 한가지이상의 생물학적 재료로부터 전체 RNA 또는 mRNA의 분리를 가능하게 한다.
- [0061] 본 발명은 생물학과 생물의학 연구; 치료제와 진단 마커의 확인; 유전자 조작된 세포와 생물체의 특성화; 미지 질환의 확인; DNA의 특성화와 생물 시료의 확인과 같은 다양한 분야에 활용된다. 이런 활용의 무제한적 예는 정량적 PCR, 실시간 PCR, DNA 서열분석, 전사 프로파일링, 유전자형 확인이다.

발명의 상세한 설명

- [0077] 본 명세서에는 아래의 용어 및 정의가 이용된다.
- [0078] 본 명세서에서 "시료"는 자연 환경에서 분리되고 폴리뉴클레오티드를 함유하는 생물학적 물질을 의미한다. 본 발명에 따른 "시료"는 정제되거나 분리된 폴리뉴클레오티드로 구성되거나, 조직 시료, 생물학적 유체 시료 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포 시료와 같은 생물학적 시료로 구성된다. 생물학적 유체에는 혈액, 혈장, 가래, 뇨, 뇌 척수액, 위 세척액, leukophoresis 시료가 포함된다. 본 발명의 시료는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 임의의 식물, 동물, 세균 또는 바이러스 물질이다.
- [0079] 본 명세서에서 "제조된 시료"는 폴리뉴클레오티드, 다시 말하면, DNA(예, 게놈 DNA 또는 cDNA) 또는 RNA(예, 전체 RNA 또는 mRNA)를 분리하거나 합성하기 위한 목적으로 시료로부터 유래된 제조물을 의미한다.
- [0080] 본 명세서에서 "분량"은 전체 제조된 시료 또는 반응 혼합물로부터 채취된 시료 부피를 의미한다. 분량은 시료 또는 반응 혼합물의 전체 부피보다 적고, 바람직하게는 1 μ l 내지 5 μ l이다. 본 발명의 한 구체예에서, 제거되는 각 분량에 대하여 반응에 필요한 반응물(예, 완충액, 염, 뉴클레오티드, 중합효소)을 함유하는 동등 부피의 반응 완충액이 도입된다.
- [0081] 본 명세서에서 "연결 수단"은 2개의 장치를 연결하고 유체 및/또는 신호가 한 장치에서 다른 장치로 이동하도록 하는 수단을 의미한다.
- [0082] 본 명세서에서 "로봇팔"은 시료, 튜브, 또는 시료를 보유하는 평판을 한 위치에서 다른 위치로 물리적으로 이동시키는 장치, 바람직하게는 마이크로프로세서에 의해 조절되는 장치를 의미한다. 각 위치는 본 발명의 유용한 모듈 기구에서 단위일 수 있다. 본 발명에 유용한 로봇팔의 예는 Mitsubishi RV-E2 로봇팔이다. 로봇팔의 조절 소프트웨어는 일반적으로, 제조업체로부터 제공된다.
- [0083] 본 명세서에서 "반응 챔버"는 반응(예, 증폭 반응 또는 추출 과정)이 진행되거나 진행되려고 하는 반응물을 위치시키기 위한 유체 챔버를 의미한다. "반응 챔버"는 임의의 적절한 재료, 다시 말하면, 유리, 플라스틱, 나일론, 세라믹 또는 이들의 조합을 비롯한 최소의 비-특이적 흡수도를 보이거나 최소의 비-특이적 흡수도를 보이도록 처리된 재료로 구성된다. "반응 챔버"는 재료를 반응 챔버의 내외로 이동시키는 적어도 하나의 연결 수단에 연결된다.
- [0084] 본 명세서에서 "발현"은 세포 또는 세포-없는 조직에서 단백질 또는 뉴클레오티드 서열의 생산을 의미하고, RNA 산물로의 전사, 전사후 변형, 산물을 인코딩하는 DNA로부터 단백질 산물 또는 폴리펩티드로의 번역, 선택적으로 번역후 변형을 수반한다.
- [0085] 본 명세서에 "발현 프로파일링"은 복수의 시료간 발현 프로파일에서 차이의 감지를 의미한다.
- [0086] 본 명세서에서 "발현 프로파일에서 차이"는 유전자의 발현에서 정량적(즉, 존재비율) 차이와 정성적 차이를 의미한다. 유전자 발현이 공지된 폴리뉴클레오티드 감지 방법(예, 전기영동)에 의해 한 시료에서 감지되지만 다른 시료에서 감지되지 않는 경우에, "발현 프로파일에서 차이"가 존재한다. 대안으로, 두 시료간 유전자 발현의 정량적 차이가 대략 20%, 대략 30%, 대략 50%, 대략 70%, 대략 90% 내지 대략 100%(대략 2배) 이상, 최대 1.2배, 2.5배, 5배, 10배, 20배, 50배 또는 그 이상인 경우에, "발현 프로파일에서 차이"가 존재한다. 두 시료간 발현 프

로필에서 차이를 보이는 유전자는 이들 두 시료에서 차별적으로 발현되는 유전자이다.

- [0087] 본 명세서에서 "복수"는 2개 이상을 의미한다. 본 발명에 따른 복수는 3개 이상, 100개 이상, 또는 1000개 이상, 예를 들면, 시료에서 전체 mRNA에 상응하는 cDNA의 총수일 수 있다.
- [0088] 본 명세서에서 "증폭 사물"은 특정 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보적 서열의 일부 사본이 되는 폴리뉴클레오타이드를 의미하는데, 이는 뉴클레오타이드 서열에서 주형 폴리뉴클레오타이드 서열 및 이의 상보적인 서열에 상응한다. 본 발명에 따른 "증폭 사물"은 DNA 또는 RNA이고, 이중 가닥 또는 단일 가닥이다.
- [0089] 본 명세서에서 "합성" 또는 "증폭"은 서로 상호 교환적으로 이용되고, 특정 폴리뉴클레오타이드 서열의 사본을 만들거나 특정 폴리뉴클레오타이드 서열의 양이나 사본 수를 증가시키는 반응을 의미한다. 이는 제한없이 시험관내 방법, 예를 들면, 중합효소 연쇄 반응(PCR), 리가제 연쇄 반응(LCR), 폴리뉴클레오타이드-특이적인 증폭(NSBA), 또는 다른 당분야에 공지된 방법을 이용하여 달성할 수 있다. 가령, 폴리뉴클레오타이드 증폭은 임의의 특정 폴리뉴클레오타이드 서열, 다시 말하면, 표적 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 표적 폴리뉴클레오타이드를 초기에 존재한 양보다 많이 생산하기 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍 및 중합효소를 이용한 과정이다.
- [0090] 본 명세서에서 "분획물 수집 장치"는 천천히 유동하는 공급원으로부터 기원하는 액체 시료를 수집하는 장치, 예를 들면, 크로마토그래피 칼럼 또는 전기영동 장치를 의미하는데, 여기서 액체의 조성은 시간의 추이에서 변한다. 일반적으로, 분획물 수집 장치는 복수의 독립된 수집 튜브를 유지할 수 있는 서포트 표면 및 액체 시료를 개별 수집 튜브에 선택적으로 지향시킬 수 있는 분배 헤드(dispensing head)를 보유한다. 이런 방식으로, 시료의 개별 액체 분획물은 추후 분석이나 사용을 위하여 독립된 튜브에 수집된다. 모세관 전기영동에서, 분획물 수집은 모세관의 단부 및 전극을 액체 보유 수집 튜브에 담그고, 전류를 가하여 폴리뉴클레오타이드가 수집 튜브로 용리되도록 하여 실시한다.
- [0091] 본 명세서에서 "서열 확인 장치"는 폴리뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 실체를 확인할 수 있는 장치, 다시 말하면, DNA 서열 확인 장치를 의미한다.
- [0092] 본 명세서에서 "라벨"또는 "감지가능한 라벨"은 감지가능한(정량적으로) 신호를 제공하고, 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결될 수 있는 임의의 원자 또는 분자를 의미한다. 라벨은 형광, 방사능, 발색, 무게, X-선 회절이나 흡수, 자성, 효소 활성, 질량 스펙트럼, 결합 친화성, 혼성화 무선헤수, 나노결정 등에 의해 감지가능한 신호를 제공한다. 본 발명의 프라이머에 표지하여 감지가능한 라벨을 "감지"함으로써, 증폭 반응 산물을 감지할 수 있다. "정량적"또는 "정성적"감지는 라벨에 의해 발생된 신호의 크기(강도)에 기초한 시각적 또는 자동화 평가를 의미한다.
- [0093] 폴리뉴클레오타이드와 관련하여 본 명세서에서 "분리된" 또는 "정제된"은 자연 발생 서열이 정상적인 세포(염색체) 환경으로부터 제거되었거나 비-자연 환경(가령, 인공 합성)에서 합성됨을 의미한다. 따라서, "분리된"또는 "정제된" 서열은 세포-없는 용액에 존재하거나 상이한 세포 환경에 위치된다. "정제된"은 서열에 뉴클레오타이드만 존재한다는 것이 아니라 이와 자연적으로 연관된 비-뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 재료가 본질적으로 존재하지 않고(약 90-05%, 최대 99-100% 순수), 따라서 분리된 염색체와 구별된다는 것을 의미한다.
- [0094] 본 명세서에서 "cDNA"는 RNA-의존성 DNA 중합효소(가령, 역전사효소)의 작용에 의해 RNA 주형으로부터 만들어진 상보적 또는 사본 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. "cDNA 클론"은 클로닝 벡터에 운반되는 목적하는 RNA 분자에 상보적인 이중 DNA 서열을 의미한다.
- [0095] 본 명세서에서 "게놈 DNA"는 RNA 전사체로부터 복사된 상보적인 DNA와는 반대되는 염색체 DNA를 의미한다. "게놈 DNA"는 단일 세포에 존재하는 전체 DNA, 또는 단일 세포에 있는 DNA 일부분이다.
- [0096] 본 발명은 유전자 발현 프로파일링을 위한 자동화 기구에 관한다. 상기 기구는 단일 시료 및 복수 시료에서 대용량 발현 분석을 제공할 수 있다. 따라서, 단일 자동화 장치는 전문가용 피펫(pipettor), 배양기, 폴리뉴클레오타이드 증폭 장치, 분석 장치(예, 겔 전기영동 시스템), 데이터 획득 시스템에 의해 전통적으로 실행되는 기능을 단일 시스템에 보유한다. 본 발명의 기구는 증폭 산물의 감지, 분석, 정량화 및/또는 시각화를 가능하게 한다.
- [0097] 본 발명의 실행에는 다른 언급이 없으면, 통상의 분자생물학, 미생물학, 재조합 DNA 기술이 이용되는데, 이런 기술은 당업자에게 공지되고 기존 문헌에서 기술되어 있다(Sambrook, Fritsch amp; Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Polymicleteotide Hybridization(B.D. Haines amp; S.J. Higgins, eds., 1984); A Practical Guide to

Molecular ClgWM (B. Perbal, 1984); and a series, Methods in EnzMology (Academic Press, Inc.); Short Protocols In Molecular Biology, (Ausubel et al., ed., 1995). 또한, 본 발명의 실행은 U.S. Patent No. 5,965,409; 5,665,547; 5,262,311; 5,599,672; 5,580,726; 6,045,998; 5,994,076; 5,962,211; 6,217,731; 6,001,230; 5,963,456; 5,246,577; 5,126,025; 5,364,521; 4,985,129에 개시된 기술 및 조성물을 수반한다. 본 명세서에 언급된 모든 특허, 특허 출원 및 간행물은 참고문헌으로 한다.

[0098] 본 발명의 유전자 발현 프로파일링은 도 1에 10으로 표시한다. 기구(10)는 증폭 장치(64) 및 제 1 연결 수단(66)에 의해 증폭 장치(64)에 연결된 분석 장치(68)로 구성된다. 관심 시료로부터 추출된 폴리뉴클레오티드는 증폭 장치(64)에서 증폭된다. 이후, 증폭된 폴리뉴클레오티드 산물의 분량은 제 1 연결 수단(66)에 의해 분석 장치(68)로 전달된다. 분석 장치(68)는 증폭 산물의 감지와 정량을 실행한다.

[0099] 한 구체예에서, 상기 기구는 폴리뉴클레오티드의 중합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭을 가능하게 하고, 증폭 산물은 전기영동으로 분석한다. 적절하게는, 모세관 전기영동을 이용하여 증폭 산물을 분석한다.

[0100] 도 2에 도시된 바와 같이, 본 발명의 발현 프로파일링 기구는 증폭 반응을 위한 DNA 주형의 제조를 가능하게 한다. 기구(10)는 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20), 증폭 장치(64), 분석 장치(68)를 보유한다. 제 1 연결 수단(66)은 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)를 연결하고, 제 2 연결 수단(40)은 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20)와 증폭 장치(64)를 연결한다. 생물 시료는 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20)에 도입되고, 폴리뉴클레오티드는 이들 생물학적 재료로부터 추출된다. 이후, 추출된 폴리뉴클레오티드는 제 2 연결 수단(40)을 통하여 증폭 장치(64)로 전달되고 이들 폴리뉴클레오티드를 증폭 장치(64)에서 증폭된다. 이후, 증폭된 폴리뉴클레오티드 산물의 분량은 제 1 연결 수단(66)으로 분석 장치(68)에 전달된다. 분석 장치(68)는 증폭 산물의 감지와 정량을 실행한다.

[0101] 바람직한 구체예에서, 폴리뉴클레오티드 추출 장치는 생물학적 재료로부터 RNA를 추출한다. 좀더 바람직한 구체예에서, mRNA는 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20)에서 생물학적 재료로부터 추출한다.

[0102] 상기 기구의 분석 장치(68)는 도 5에 도시된 바와 같이, 원하는 발현 프로파일링 데이터를 산출할 수 있다. 기구(10)는 증폭 장치(64) 및 제 1 연결 수단(66)에 의해 증폭 장치(64)에 연결된 분석 장치(68)로 구성된다. 관심 시료로부터 추출된 폴리뉴클레오티드는 증폭 장치(64)에서 증폭한다. 이후, 증폭된 폴리뉴클레오티드 산물의 분량은 제 1 연결 수단(66)에 의해 분석 장치(68)로 전달된다. 분석 장치(68)는 증폭 산물의 감지와 정량을 실행하고 발현 프로파일링 데이터를 산출한다.

[0103] 대안으로, 본 발명의 발현 프로파일링 기구는 도 3에 도시된 바와 같이, 독립된 데이터 발생 장치를 추가로 포함한다. 기구(10)는 증폭 장치(64), 분석 장치(68), 데이터 발생 장치(120)로 구성된다. 제 1 연결 수단(66)은 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)를 연결하고, 제 3 연결 수단(80)은 분석 장치(68)와 데이터 발생 장치(20)를 연결한다.

[0104] 도 4에 도시된 바와 같이, 발현 프로파일링 기구의 증폭 장치는 역전사에 의한 cDNA의 발생을 가능하게 한다. 기구(10)는 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)로 구성된다. 제 1 연결 수단(66)은 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)를 연결한다. 추출된 RNA(예, 전체 RNA 또는 mRNA)는 증폭 장치(64)로 도입되고, cDNA는 증폭 장치(64) 내에서 RNA로부터 합성된다. 이후, 합성된 cDNA는 증폭 장치(64)에서 증폭한다. 이후, 증폭된 폴리뉴클레오티드 산물의 분량은 제 1 연결 수단(66)으로 분석 장치(68)에 전달된다. 분석 장치(68)는 증폭 산물의 감지와 정량을 실행한다.

[0105] 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20)

[0106] 도 2와 도 7에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20)는 생물학적 시료(예, 세포 시료 또는 조직 시료)로부터 폴리뉴클레오티드 (즉, DNA 또는 RNA)의 직접 추출을 가능하게 한다. 적절하게는, 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20)는 증폭 장치(64)에서 역전사 반응 및/또는 PCR 증폭 반응을 위한 주형으로 이용될 수 있는 추출된 폴리뉴클레오티드를 제공하도록 설계된다. 한 구체예에서, 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20)는 제조된 폴리뉴클레오티드를 폴리뉴클레오티드의 증폭을 위한 기존 또는 향후 시스템의 요구 조건에 상응하는 양과 부피로 제공한다. 상업적으로 입수가능한 증폭 시스템에는 GeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems, Foster City, CA); iCycler Thermal Cycler(Hercules, CA; Eppendorf Mastercycler Gradient(Eppendorf); Smart Cycler TD System(Cepheid, Sunnyvale, CA); LightCycler(Roche, Indianapolis, IN); AMPLICORTM 자동화 PCR 시스템(Roche, Indianapolis, IN); 이런 장치의 후세대가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 추출 장치는 추출된 폴리뉴클레오티드를 함유하는 유체를 임의의 적절한 산출 부피, 예를 들면 대

략 100 ml 내지 750 μ l, 바람직하게는 대략 500 ml 내지 500 μ l, 더욱 바람직하게는 대략 1 μ l 내지 250 μ l, 가장 바람직하게는 대략 1 μ l 내지 100 μ l를 제공하도록 설계될 수 있다.

[0107] 한 구체예에서, 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20)는 생물학적 재료로부터 mRNA의 분리를 가능하게 한다. 다른 구체예에서, 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20)는 복수의 생물학적 재료로부터 mRNA의 분리를 가능하게 한다.

[0108] 폴리뉴클레오티드를 추출하기 위한 기술과 반응물은 당분야에 공지되어 있다(Basic Methods in Molecular Biology, 1986, Davis et al., Elsevier, NY); Current Protocols in Molecular Biology, 1997, Ausubel et al., John Wiley & Sons, Inc.).

[0109] 상기한 폴리뉴클레오티드 추출 기술을 이용한 다양한 폴리뉴클레오티드 추출 기구가 본 발명과 병용될 수 있다. 가령, Japanese Patent Publication No. 125972/1991에서는 바이러스 감염을 예방하고 추출 효율을 개선하도록 설계된 폴리뉴클레오티드 추출 기구를 기술하는데, 상기 기구는 다중분절된 산업 로봇 및 DNA 추출과 정제에 필요한 주변 장치를 포함한다. Japanese Patent Publication No. 131076/1992에서는 폴리뉴클레오티드 추출 용기로부터 원심분리기로 이동을 위한 압축 정렬된 수단을 통하여 소량의 혈액 또는 다른 생물학적 재료로부터 폴리뉴클레오티드의 추출 효율을 개선하도록 설계된 추출 기구를 기술한다. Japanese Patent Publication No. 47278/1997에서는 원심분리기 이외에 진공 펌프가 구비된 필터 시스템을 이용한 추출 기구를 기술한다. 완전한 자동화 추출 장치를 구현하기 위하여, 원심분리기 또는 진공 펌프 및 연관된 소프트웨어를 장치에 내장할 수도 있다.

[0110] 한 구체예에서, 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20)는 폴리뉴클레오티드 추출 기구이다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 추출 기구는 (1) 생물학적 재료, 반응물 용액, 자성 담체가 혼합되고 반응되는 반응 튜브, 원치않는 성분 용액을 모으는 배출 컵, 폴리뉴클레오티드 회수 튜브(이들 모두 서포트에 고정됨)를 각각 보유하는 일군의 추출 용기; (2) 용액을 각 추출 용기로 도입하는 분배 수단; (3) 반응 튜브에서 용액과 자성 담체를 혼합하는 교반 수단; (4) 용기 내에서 자성 담체를 정지 상태로 유지하는 유지 수단; (5) 자성 담체를 정지 상태로 유지시키면서 반응 튜브로부터 용액을 방출하는 방출 수단; (6) 반응 튜브에서 용액과 자성 담체를 가열하는 가열 수단; (7) 용기를 정해진 위치로 연속으로 전달하는 전달 수단을 포함할 수 있다. 이런 장치는 U. S. Patent No. 6,281,008에서 기술한다.

[0111] 다른 구체예에서, 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20)는 자동화 폴리뉴클레오티드 분리 장치이다. 상기 장치는 이동가능 카세트를 포함하고, 상기 카세트는 독립된 시료 전달/저장 스트립을 보유한다. 카세트는 밀봉되거나 개방되는데, 적절하게는 밀봉된다. 바람직한 카세트는 이동가능 입력 전달 바(bar)를 또한 보유하고, 깡통에 넣어진다. 상기 장치는 상측, 외부, 내부, 카세트의 배치를 위한 적어도 하나의 슬롯, 시료 컨테이너의 배치를 위한 적어도 하나의 웰을 보유하는 속이 빈 몸체 (hollow body)를 추가로 포함한다. 부가적으로, 카세트는 카세트를 깡통 내외로 이동시키는 수단 및 입력 전달 시료 바(bar)를 활성화시키는 수단을 보유한다. 바람직한 장치는 가압된 공기에 접근하거나, 이를 저장하거나 또는 이를 발생시키는 수단과 소통하는 공기 노즐 및 카세트의 시료 입력 채널을 밀봉하는 수단을 또한 포함한다. 게다가, 상기 장치는 카세트에서 밸브를 열고 닫기 위하여 내부에 위치한 밸브 액츄에이터(actuator) 및 카세트에서 유체 챔버 내외로 유체를 이동시키기 위한 하나이상의 펌프 액츄에이터를 포함한다. 적절하게는, 상기 장치는 자석, 파워 공급 장치, 사용자 인터페이스, 바-코드 판독 수단을 또한 포함한다. 적절하게는, 상기 장치는 카세트 또는 시료 컨테이너가 개별적으로 삽입될 때 슬롯이나 웰이 점유되었음을 신호하는 슬롯이나 웰에서 센서 수단을 또한 포함한다. 이런 장치는 U. S. Patent No. 6,281,008에서 기술한다.

[0112] 다른 구체예에서, 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20)는 기억 수단을 추가로 포함한다. 다른 구체예에서, 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20)는 카세트의 나머지 부분으로부터 스트립을 분리하는 분리 수단을 추가로 포함한다. 적절하게는, 분리 수단은 소통되는 가열 수단을 보유하는 나이프(knife)인데, 이는 스트립 및 카세트의 나머지 부분을 동시에 밀봉한다. 바람직한 장치는 하나이상의 웰을 보유한다; 더욱 바람직한 장치는 대략 24개, 48개, 96개, 196개 또는 384개의 웰을 보유한다. 적절하게는, 상기 장치는 (1) 장치에서 동일한 수의 웰과 연속하여 개별적으로 소통하는 입력 전달 시료 바에 위치한 하나이상의 시료 입력 포트, 여기서 포트는 카세트의 입력 시료 저장소와도 소통한다; (2) 유체 교환 채널을 통하여 동일한 수의 시료 입력 저장소와 연속하여 개별적으로 소통하는 하나이상의 반응 유동-통로; (3) 유동 교환 채널과 소통하는 유체 챔버, 여기서 유체 챔버는 반응물의 공급 챔버, 시료 저장소, 또는 반응 챔버이다; (4) 유체 교환 채널에서 유체의 유동을 조절하는 밸브; (5) 반응 유동-통로와 소통하는 하나이상의 유체 챔버를 보유하는 시료 전달/저장 스트립을 추가로 포함하는 카세트를 보유한다.

- [0113] 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20)는 임의의 생물학적 시료로부터 폴리뉴클레오티드의 제조에 적합하도록 설계된다. 본 발명에 이용되는 생물학적 시료는 폴리뉴클레오티드, 다시 말하면, RNA 또는 DNA를 함유하는 임의의 재료이다. 이런 시료는 예로써 박테리아 또는 효모의 분석에서처럼 곤충과 전체 생물체, 또는 다수의 생물체일 수 있다; 또는 시료는 조직, 체액 또는 분비물과 같은 생물체의 일부분일 수 있다. 폴리뉴클레오티드 조성물을 수득하는데 적합한 조직은 피부, 뼈, 간, 뇌, 잎, 뿌리 등, 다시 말하면, 살아있거나 죽은 생물체의 임의 조직에서 수득할 수 있다. 조직은 공급 생물체의 다른 조직으로 실질적으로 오염되지 않거나 오염될 수 있고, 심지어 상이한 생물체로부터 유래된 조직으로 오염될 수도 있다. 적절하게는, 특정 생물학적 시료가 채취되는 생물체의 공급원은 본 발명의 방법을 적용하기에 앞서 정보가 공개되어 있다; 하지만, 법의학 시료에서처럼 이런 정보가 항상 가용한 것은 아니다.
- [0114] 생물학적 시료는 임상 시료 또는 견본일 수도 있다. 가령, 외인성 원인으로 유발된 질환이나 이상의 증거는 예로써 특정 병원균에 포함된 특징적인 폴리뉴클레오티드 서열의 제조에서 동정으로 입증되는 특정 병원균의 존재를 특정 임상 견본, 예를 들면 소변, 분변, 척수액, 타액, 혈액이나 혈액 성분, 또는 임의의 다른 적합한 견본의 시료로부터 채취된 폴리뉴클레오티드를 검사하여 확인할 수 있다. 개체서 특정한 내생적 유전 질환이나 이상에 대한 존재 또는 성향 역시 검사할 수 있다. 이런 유전 질환에는 헌팅턴병(Huntington's disease), 테이삭스병(Tay Sach's disease) 및 다른 질환이 포함되지만 이들에 국한되지 않고, 이들 질환은 적절한 임상 시료, 예를 들면, 검사 개체의 임의 세포 물질로부터 분리된 폴리뉴클레오티드에 존재하는 이런 유전 질환이나 성향의 특징적인 폴리뉴클레오티드 서열을 검사함으로써 확인되는데, 생식세포계 줄기 세포, 예를 들면 적혈구와 항체-형성 세포에 관하여 재검열되거나 낮은 빈도로 감지되는 DNA를 보유하는 세포 단독으로는 이런 검사에 충분하지 않다.
- [0115] 폴리뉴클레오티드 추출 장치에 의해 추출된, 다시 말하면, 분리된 폴리뉴클레오티드는 임의의 폴리뉴클레오티드인데, 여기서 적합성은 원하는 유형의 검사에 의해 결정된다. 가령, 개체에서 특정 병원균의 존재를 검사하는 경우에, 병원균과 숙주의 공지된 생물학이 감염된 검사 개체에서 병원균이 발견될 것임을 암시하는 임상 시료로부터 채취된 DNA 조성물에서 발견되는 폴리뉴클레오티드 서열을 검사한다. 대안으로, 특정 유전자가 개체에서 발현되는 지를 검사하는 경우에, 기초 생물학/병리학이 검사되는 이상이나 질환에 고유한 발현이 발견되거나 발견되지 않음을 시사하는 조직으로부터 채취된 RNA 조성물에서 폴리뉴클레오티드 서열의 증거를 조사함으로써 이런 발현을 검사할 수 있다. 발현이 모니터링되는 유전자에 따라, RNA 조성물은 당분야에 공지된 방법을 이용하여 현저하게 폴리아데닐화되거나 폴리아데닐화되지 않은 RNA 종류를 함유하도록 더욱 정제할 수 있다. 대안으로, 또는 부가적으로, RNA 종류의 크기 부류 역시 본 발명에서 선별될 수 있다.
- [0116] 생물학적 시료는 개체로부터 새로이 채취되거나 자연으로부터 분리되거나, 또는 얼음과 같은 적절한 조건하에 보관될 수 있다. 가령, 혈액 시료는 표준 수단, 예를 들면, 개체의 정맥에 배치되고 예로써 개체로부터 튜브로 채혈하기 위한 표준 배출 튜브에 연결된 피하 주사를 이용하여 개체로부터 수집될 수 있다. 혈액은 가급적 항응고제, 예를 들면, 헤파린, 구연산염 또는 EDTA의 존재하에 직접 사용하거나 얼음에 보관될 수 있다. 장기간 보관을 위하여, 시료는 가급적 동결하거나 동결-건조하거나, 또는 예로써 DNA의 보관을 위하여 적절한 기질에 적용하고 여기에서 건조시킨다. 이런 적합한 기질에는 임의의 흡수 페이퍼, 예를 들면, Whatman 필터 페이퍼, 또는 방출에 의해 DNA에 결합하는 처리된 막 재료가 포함된다. 바람직한 막은 IsoCode.TM이라고 하는 제품에 포함된다. Stix(Schleicher & Schuell, Inc., Keene, N. H.)는 DNA에 가역적으로 결합할 뿐만 아니라, 헤모글로빈에 비가역적으로 결합한다(특정 폴리뉴클레오티드 증폭 방법의 저해물질). 이후, 기질-결합된 폴리뉴클레오티드는 본 발명에 따라 기질로부터 추출하고 새로운 시료에서와 동일한 방식으로 정제할 수 있다.
- [0117] 적절하게는, 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20)는 하나 이상의 생물학적 시료로부터 핵산 추출을 가능하게 한다. 한 구체예에서, 이는 슬롯에 이동가능 카세트가 삽입된 장치에 의해 달성된다. 적절하게는, 상기 장치는 동시에, 순차적으로, 또는 서로 엇갈리는 방식으로 작동될 수 있는 서로 다른 4가지 카세트(예, 한 시료에 각각의 카세트)에 대한 슬롯을 보유한다.
- [0118] 시료 제조 장치는 증폭 반응 혼합물의 저장소로도 기능할 수 있는데, 증폭 산물의 분석 장치로의 전달이후 분량에 상당하는 양이 새로 보충된다.
- [0119] 증폭 장치(64)
- [0120] 도 1에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 증폭 장치(64)는 가급적 폴리뉴클레오티드 연쇄 반응(PCR)을 통하여 폴리뉴클레오티드를 증폭할 수 있는 임의의 장치이다. PCR 반응은 서열 증폭기(thermal cycler)로 실행한다. 유용한 서열 증폭기에는 GeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems, Foster City, CA); iCycler Thermal

Cycler(Bio-Rad, Hercules, CA); Eppendorf Mastercycler Gradient(Eppendorf); Smart Cycler TD System(Cepheid, Sunnyvale, CA); LightCycler(Roche, Indianapolis, IN); AMPLICOR 자동화 PCR 시스템(Roche, Indianapolis, IN)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 발명에 유용한 PCR 장치에는 U. S. Patent No. 5,475,610; 5,602,756; 5,720,923; 5,779,977; 5,827,480; 6,033,880; 6,326,147; 6,1716,785에 기술된 장치가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0121] 중합효소 연쇄 반응의 목적은 초기에 공급된 소량의 "주형" DNA와 동일한 대량의 DNA를 제조하는 것이다. 반응은 DNA 가닥을 복사하고, 이후 후속 사이클에서 이들 사본을 이용하여 다른 사본을 발생시키는 단계를 수반한다. 이상적인 조건하에, 각 사이클은 존재하는 DNA의 양을 2배로 늘리고, 따라서 반응 혼합물에 존재하는 "표적"또는 "주형" DNA 가닥의 사본 부피를 기하학적으로 증가시킨다.

[0122] 가령, 전형적인 PCR 온도 사이클은 반응 혼합물이 규정된 시간동안 각 배양 온도에서 정확하게 유지되고 동일한 사이클 또는 유사한 사이클이 수회 반복될 것을 요한다. 전형적인 PCR 프로그램은 반응 혼합물을 변성하기 위하여 대략 30초동안 유지되는 대략 94℃의 시료 온도에서 시작된다. 이후, 반응 혼합물의 온도는 대략 30℃ 내지 60℃로 낮아지고 1분동안 유지시켜 프라이머 혼성화를 유도한다. 그 다음, 반응 혼합물의 온도는 대략 50℃ 내지 70℃ 범위의 온도로 상승시키고 대략 2분동안 유지시켜 신장 산물의 합성을 촉진한다. 이는 1회 사이클을 완결한다. 이후, 선행 사이클에서 형성된 신장 산물의 가닥 분리(변성)를 위하여 반응 혼합물의 온도는 대략 94℃로 다시 상승시켜 차기 PCR 사이클을 시작한다. 전형적으로, 사이클은 25회 내지 30회 반복된다. 당업자가 인지하는 바와 같이, PCR 사이클의 온도 및 PCR 반응에서 사이클의 횟수는 반응의 목적과 주형의 특성에 따라 변한다. 기본 PCR 프로토콜과 전략은 당분야에 공지되어 있다(Basic Methods in Molecular Biology, 1986, Davis et al., Elsevier, NY); Current Protocols in Molecular Biology, 1997, Ausubel et al., John Wiley & Sons, Inc.).

[0123] 한 구체예에서, 반응 혼합물은 캡으로 닫힌 휴대가능 플라스틱 튜브에 보관한다. 이런 튜브의 전형적인 시료 부피는 대략 50-100 μ l이다. 전형적으로, 이런 장치는 금속 블록에서 시료 웰이라고 하는 구멍에 삽입된 시료 DNA와 반응 혼합물로 채워진 다수의 튜브를 이용한다. PCR 과정을 실시하기 위하여, 금속 블록의 온도는 PCR 프로토콜 파일에서 사용자에게 의해 명시된 규정 온도와 시간에 따라 조절한다. 이후, 컴퓨터 및 연관된 전자장치는 시간, 온도, 사이클 횟수를 정의하는 PCR 프로토콜 파일에서 사용자 공급된 데이터에 따라 금속 블록의 온도를 조절한다. 금속 블록이 온도를 변화시킴에 따라, 다양한 튜브에서 시료는 온도에서 유사한 변화를 따른다.

[0124] 일반적으로, 금속 블록 내에서 온도의 균일성을 유도하는 것이 바람직한데, 그 이유는 블록의 금속 내에 존재하는 온도 변화가 사이클의 특정 시점에서 일부 시료가 다른 시료와 상이한 온도를 갖도록 유발하기 때문이다. 또한, 시료 블록에서부터 시료로 열 전달의 지연을 최소화시키는 것이 바람직한데, 그 이유는 이런 지연이 모든 시료에서 동일하지 않기 때문이다. 이들 인자는 본 발명의 PCR 장치를 설계하는 동안 고려된다.

[0125] 한 구체예에서, PCR 장치는 산업 표준 마이크로역가 평판의 양식으로 정렬된 시료 튜브(96)를 수용할 만큼 큰 금속 블록을 보유한다. 마이크로역가 평판은 생화학과 생물기술 분야에서 다수의 소형 시료를 취급하고 가공하고 분석하는데 폭넓게 이용되는 수단이다. 유용한 마이크로역가 평판은 24개, 48개, 96개, 196개 또는 384개의 웰을 보유한다. 전형적으로, 마이크로역가 평판은 3 5/8 인치 너비와 5 인치 길이이고, 9 ml 중심에 8웰 x 12웰 직사각형 어레이에 96개의 동일한 시료 웰을 보유한다. 마이크로역가 평판은 서로 다른 사용 목적에 적합한 다양한 재료, 형상, 부피의 시료 웰로 가용하다. 적절하게는, 적절하게는, 마이크로역가 평판은 상기 총괄 외부 치수 및 9 ml 중심에 동일한 8 x 12웰 어레이를 보유한다. 이런 표준 마이크로역가 평판 양식에서 시료의 취급, 가공, 분석을 자동화하는데 다양한 장비가 이용가능하다. 마이크로역가 평판은 예로써 MWG biotech Inc.(High Point, NC)로부터 상업적으로 구입가능하다. 마이크로평판은 당분야에 공지된 방법으로 제조될 수도 있다(참조: U.S. Patent No. 5,602,756).

[0126] 적절하게는, 마이크로역가 평판에 사용되는 튜브는 시료 블록의 시료 온도에서 변화 및 반응 혼합물의 온도에서 상응하는 변화간 지연을 감소시키기 위한 얇은 외벽 시료 튜브이다. 이용된 열교환기와 접촉하는 시료 튜브 구획의 벽 두께는 PCR 사이클링의 열 스트레스 및 정상적인 사용의 스트레스를 견뎌낼 수 있을 만큼 충분히 강하다면 가능한 얇게 한다. 전형적으로, 시료 튜브는 0.009 내지 0.012 $\times$ 0.001 인치 범위로 원뿔 구획의 벽 두께를 보유하는 가압밀균 폴리프로필렌, 예를 들면, Himont PD701로 구성된다.

[0127] 다른 구체예에서, PCR 장치는 시료 블록을 가열하고 냉각하는 단계를 수반하는데, 이는 급속한 열 사이클링 속도, 통제되지 않는 가변적인 실온 및 다른 작동 조건, 예를 들면, 전력선 전압과 냉각제 온도에서 변화에도 불구하고 시료-시료 균일성을 달성한다. 가열된 덮개를 이용하여 후술한 바와 같은 응축 및 시료 부피 손실을 예

방할 수 있다.

- [0128] 다른 구체예에서, PCR 장치는 시료가 끓는점 근처의 온도에서 시료가 배양될 때 반응 혼합물로부터 용매의 손실을 예방한다. 가열된 열판은 시료 튜브의 상부를 덮고 각 시료 튜브에 기밀(氣密) 밀봉을 제공하는 개별 캡과 접촉한다. 열판으로부터 열은 각 시료 튜브의 상부와 캡을 응축점(condensation point) 초과 온도도 가열하여 임의의 시료 튜브 내에서 응축과 환류가 나타나지 않도록 한다. 수증기가 응축할 때 기화열에 상당하는 열량이 발생하기 때문에, 응축은 상대적으로 큰 열전도를 나타낸다. 응축이 균일하게 진행되지 않으면, 이는 각 시료에서 상당한 온도 변이를 초래할 수 있다. 가열된 열판은 임의의 시료 튜브에서 응축이 발생하는 것을 예방하고, 따라서 이런 잠재적 온도 오차를 최소화시킨다. 가열된 열판의 이용은 반응물 소비 역시 감소시킨다.
- [0129] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 증폭 장치(64)는 cDNA를 합성하기 위한 역전사의 실행을 가능하게 한다. 역전사 반응은 RNA 주형에 상보적인 DNA 가닥의 주형-의존성 중합화가 진행되는 시험관내 효소 반응을 의미한다. 역전사는 RNA 주형에 어닐링된 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 신장으로 실행되고, 대부분의 경우에 바이러스 역전사효소, 예를 들면, AMV(조류 골수아세포종 바이러스) 역전사효소 또는 MMLV(Moloney 뮤린 백혈병 바이러스) 역전사효소가 사용된다. 역전사를 위한 조건과 방법은 당분야에 공지되어 있다. 역전사를 위한 전형적인 조건은 아래와 같다: AMV 역전사효소-반응의 경우에 - 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.8 mM dNTP, 50 단위의 역전사효소, 1-5 μ g 주형 RNA를 함유하는 완충액에서 대략 37°C에서 반응; MMLV 역전사효소의 경우에 - 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 30 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.8 mM dNTP, 50 단위의 역전사효소, 1-5 μ g 주형 RNA를 함유하는 완충액에서 대략 37°C에서 반응.
- [0130] 다른 바람직한 구체예에서, 역전사는 96웰 평판으로 실행하는데, 여기서 cDNA는 평판 웰의 내부벽에 화학적으로 결합된 하나이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 이용하여 합성된다. 이런 화학적으로 결합된 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 기술은 McGall et al., International application No. PCT/US93/03767; Pease et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 5022-5026; Southern and Maskos, International application PCT/GB89/01114; Maskos and Southern (Supra); Southern et al., (1992) Genomics, 13: 1008-1017; Maskos and Southern, (1993) Polynucleotides Research, 21: 4663-4669에서 개시한다.
- [0131] 일부 구체예에서, 역전사는 마이크로역가 평판의 웰에서 내부벽에 화학적으로 부착된 하나이상의 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 실행한다. 다른 구체예에서, 증폭 반응은 마이크로역가 평판의 웰 또는 반응 튜브에서 내부벽에 화학적으로 결합된 하나이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 이용하여 실행한다. 결과적으로, 합성된 cDNA 또는 증폭된 폴리뉴클레오타이드 산물은 간편한 분리와 정제를 위하여 마이크로역가 평판의 내부벽에 부착된다.
- [0132] 또한, 올리고뉴클레오타이드는 단일(또는 수개의) 고체상 서포트, 예를 들면, 마이크로역가 평판의 웰 또는 반응 튜브에서 내부벽에 합성되어, 합성된 올리고뉴클레오타이드로 균일하게 피복된 영역 어레이를 형성할 수 있다. 이런 어레이를 합성하는 기술은 McGall et al., International application No. PCT/US93/03767; Pease et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 5022-5026; Southern and Maskos, International application PCT/GB89/01114; Maskos and Southern (Supra); Southern et al., (1992) Genomics, 13: 1008-1017; Maskos and Southern, (1993) Polynucleotides Research, 21: 4663-4669에서 개시한다.
- [0133] 한 구체예에서, 증폭 장치는 표지된 증폭 산물을 산출한다. 가령, 증폭 산물은 표지된 프라이머를 이용하여 산출된다. 본 발명의 방법에 따른 표지된 폴리뉴클레오타이드(예, 올리고뉴클레오타이드 프라이머)는 5' 말단, 3' 말단, 양 말단, 또는 내부에 표지된다. 라벨은 "직접", 예를 들면, 염료, 방사성 라벨일 수 있다. 라벨은 또한, "간접", 예를 들면, 항체 에피토프, 비오틴, 디곡신, 알칼리성 포스파타제(AP), 양고추냉이 과산화효소(HRP)일 수도 있다. "간접 라벨"의 감지를 위하여, 추가적인 성분, 예를 들면, 표지된 항체, 또는 포획되고 방출되고 표지된 폴리뉴클레오타이드 단편을 가시화시키는 효소 기질을 필요로 한다. 바람직한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 형광 라벨로 표지된다. 적절한 형광 라벨에는 로다민과 이의 유도체(Texas Red), 플루레신과 이의 유도체(5-브로모메틸 플루레신), Lucifer Yellow, IAEDANS, 7-Me₂N-코우라민-4-아세테이트, 7-OH-4-CH₃-코우라민-3-아세테이트, 7-NH₂-4-CH₃-코우라민-3-아세테이트(AMCA), 모노브로모비만, 파이렌 트리설포네이트(Cascade Blue), 모노브로모메틸-암모니오비만과 같은 형광단이 포함된다(DeLuca, Immunofluorescence Analysis, in Antibody As a Tool, Marchalonis, et al., eds., John Wiley & Sons, Ltd., (1982)).
- [0134] 분석 장치(68) - 모세관 전기영동 장치

- [0135] 모세관 전기영동은 본 발명의 증폭 산물을 분석하는데 바람직한 방법이다. 도 1에 도시된 바와 같이, 본 발명은 증폭 장치(64) 및 분석 장치(68), 예를 들면, 모세관 전기영동 장치 모두를 포함하는 단일 기구를 제시한다. 모세관 전기영동 장치는 당분야에 공지되어 있다. 본 발명에 유용한 모세관 전기영동 장치에는 ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer, ABI PRISM[®] 3700 DNA Analyzer, ABI PRISM[®] 377 DNA Sequencer, ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA); MegaBACE 1000 Capillary Array Electrophoresis System(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ); CEQ[™] 8000 Genetic Analytic System(Beckman Coulter, Fullerton, CA); Agilent 2100 Bioanalyzer(Caliper Technologies, Mountain View, CA); iCE280 System(Convergent Bioscience Ltd., Toronto, Canada). 유용한 모세관 전기영동 반복 장치는 U.S. Patent No. 6,217,731; 6,001,230; 5,963,456; 5,246,577; 5,126,025; 5,364,521; 4,985,129; 5,202,010; 5,045,172; 5,560,711; 6,027,624; 5,228,969; 6,048,444; 5,616,228; 6,093,300; 6,120,667; 6,103,083; 6,132,582; 6,027,627; 5,938,908; 5,916,428에서 개시한다.
- [0136] 모세관 전기영동에서, 배경 전해질 용액을 보유하는 2개의 저장소는 동일한 용액을 보유하는 모세관 튜브에 의해 서로 연결된다. 분석 시료는 짧은 존으로써 모세관의 한 단부로 도입된다. 시료의 도입을 위하여, 모세관의 상기 단부는 일반적으로 한 저장소로 이동되고, 원하는 양의 시료 용액이 모세관에 주입되며, 이후 상기 모세관 단부는 배경 용액으로 환원된다. 저장소에서 전극의 수단으로, 일반적으로 200 내지 1000 V/cm 범위의 전기장이 모세관에 가해지는데, 하전된 입자는 이의 영향으로 모세관으로 이동하기 시작한다. 상이한 입자는 전기장에서 서로 다른 속도를 갖기 때문에 서로 분리된다. 입자 존은 서로 다른 시점에 모세관의 다른 말단에서 감지기를 통과하고, 이들의 신호가 측정된다.
- [0137] 한 구체예에서, 모세관 전기영동 장치는 복수의 모세관, 전극/모세관 어레이, 다중내강 튜빙(tubing), 튜빙 홀더, 광학 감지 영역, 모세관 번들, 고압 T-핏팅(T-fitting)을 제공한다. 모세관은 전극/모세관 어레이에 배치된 시료 단부 및 고압 T-핏팅에 의해 수용되는 제 2 단부를 포함한다.
- [0138] 적절하게는, 전극/모세관 어레이는 전극 및 모세관 전기영동 장치의 바닥면으로부터 돌출되는 모세관의 시료 단부를 포함한다. 전극 및 모세관의 시료 단부는 96-웰 또는 384-웰 마이크로역가 트레이에서 상응하는 시료 웰에 담겨지도록 정렬된다; 이는 마이크로역가 트레이에서 모든 웰을 완전히 활용하기 위하여 96개 또는 384개의 모세관을 필요로 한다.
- [0139] 적절하게는, 모세관은 튜빙 홀더에 의해 단단하게 고정된 상응하는 다중내강 튜브의 내부에서 움직인다. 이후, 나란히 배열되고 다중내강 튜브의 보호를 받지 못한 노출된 모세관 부분은 카메라 어셈블리를 보유하는 광학적 감지 영역을 통과한다. 카메라 어셈블리는 노출된 모세관 내부에서 이동하는 시료의 영상을 포착한다. 이후, 모세관의 노출된 2차 단부는 서로 묶고 고압 T-핏팅으로 적합된다.
- [0140] 한 구체예에서, 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)는 도 6에 도시된 바와 같이 동일 하우징(60)에 배치된다. 하우징(60) 내에서 제 1 연결 수단(66)은 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)를 연결한다.
- [0141] 데이터 발생 장치(120)
- [0142] 도 5에 도시된 바와 같이, 본 발명의 분석 장치(68)는 데이터 발생을 가능하게 한다. 대안으로, 데이터는 도 3에 도시된 바와 같이 데이터 발생 장치(120)에 의해 발생될 수도 있다.
- [0143] 데이터 발생은 당분야에 공지된 방법으로 달성할 수 있다(참조: U.S. Patent No. 6,217,731; 6,001,230; 5,963,456; 5,246,577; 5,126,025; 5,364,521; 4,985,129; 5,202,010; 5,045,172; 5,560,711; 6,027,624; 5,228,969; 6,048,444; 5,616,228; 6,093,300; 6,120,667; 6,103,083; 6,132,582; 6,027,627; 5,938,908; 5,900,934; 6,184,990; 5,916, 428).
- [0144] 한 구체예에서, 데이터 발생 장치는 신호 감지기, 디스플레이 모니터 및 조절 회로와 디스플레이 모니터에 연결된 컴퓨터 프로세서를 포함한다. 컴퓨터 프로세서는 조절 회로와 소통하도록 구성된 입력/출력(I/O) 인터페이스 및 디스플레이 모니터에 그래픽 사용자 인터페이스를 전시하는 디스플레이 프로그램을 저장하는 제 1 컴퓨터 메모리를 포함한다.
- [0145] 적절하게는, 데이터 발생 장치는 형광단에 의해 발생된 형광 신호의 감지와 정량을 가능하게 한다. 형광단에는 로다민과 이의 유도체(Texas Red), 플루레신과 이의 유도체(5-브로모메틸 플루레신), Lucifer Yellow, IAEDANS, 7-Me₂N-코우라민-4-아세테이트, 7-OH-4-CH₃-코우마린-3-아세테이트, 7-NH₂-4-CH₃-코우마린-3-아세테이트(AMCA), 모노브로모비만, 파이렌 트리설포네이트(Cascade Blue), 모노브로모메틸-암모니오비만이 포함되지만

이들에 국한되지 않는다.

[0146] 한 구체예에서, 상기 장치는 제 1 고도 개구수(N.A.) 수집 장치로써 모세관 유동 셀의 한 측면에 위치한 오목 반사기, 제 2 고도 N.A. 수집 장치로써 유동 셀의 반대 측면에 위치한 렌즈 수집 장치, 유동 셀에 포함된 시료가 방사광을 발산하도록 유도하는 여기광의 전달을 위하여 유동 셀에 근접 위치한 광학 섬유를 제공한다. 반사기는 방사광을 반사하기 위한 오목 표면을 보유하고, 수집 장치는 방사광을 수집하는 기부 볼록 표면 및 방사광을 조준하는 원부 볼록 표면을 보유한다. 이런 정렬은 유동 셀의 양 측면으로부터 좀더 큰 입체 수집 각도를 달성한다. 2개 이상의 광학 섬유를 이용하여 서로 다른 출처로부터 여기광(excitation light)을 전달할 수 있다. 이들 광학 섬유는 반사기와 수집 장치의 광학축에 직각인 평면에 정렬시켜 산란된 배경광(background light)으로부터 간섭을 감소시키고 신호 대 잡음 비율을 개선한다. 조준된 방사광은 예로써 광-배출기 튜브 감지기로 감지할 수 있다.

[0147] 분획물 수집 장치(160)

[0148] 본 발명에서, 상기 기구는 분석 장치로부터 원하는 폴리뉴클레오티드 시료를 수집하기 위하여 분석 장치에 연결된 분획물 수집 장치를 포함한다. 도 8에 도시된 바와 같이, 분획물 수집 장치(160)는 제 4 연결 수단(140)을 통하여 분석 장치(68)에 연결될 수 있다. 분획물 수집 장치(160)는 제 5 연결 수단(180)에 의해 서열 확인 장치(200)에 연결될 수도 있다.

[0149] 전통적으로, 분획물 수집 장치는 2가지 군으로 분류할 수 있다. 제 1 군에서, 수집 튜브는 전체적으로 직사각형 어레이로 정렬되고, 분배 헤드는 개별 수집 튜브에 선택적으로 공급하도록 조작된다. 제 2 군에서, 수집 튜브는 나선 패턴으로 정렬되고 전체적으로 원형 회전반에 적재된다. 나선 패턴을 추종하고 개별 수집 튜브를 추적하기 위하여 회전반은 회전하고 분배 헤드는 방사상으로 이동한다. 이들 분획물 수집 장치는 본 발명에 이용될 수 있다. 이런 분획물 수집 장치의 예에는 U.S. Patent No. 4,862,932; 3,004,567; 3,945,412; 4,495,975; 4,171,715에 개시된 것들이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0150] 분획물 수집 장치는 대용량 분석 시스템의 필요성을 수용하기 위하여 개발되었는데, 이들 수집 장치 역시 본 발명의 기구에 통합될 수 있다. 가령, U.S. Patent No. 6,309,541에서는 고정된 위치에 마이크로역가 평판을 유지시키고 시료 일부를 마이크로역가 평판에서 선택된 웰로 분배하는 자동화 분획물 수집 어셈블리를 개시한다. 상기 분획물 수집 어셈블리는 시료 일부를 휴대가능 확장 챔버, 이후 마이크로역가 평판으로 분배하는 분배 주사를 보유한다. 분배 주사는 시료 일부가 응축되고, 이후 마이크로역가 평판으로 분배되는 휴대가능 확장 챔버로 확장되도록 적합한 분배 헤드에 적재된다.

[0151] 본 발명에 유용한 다른 유형의 분획물 수집 장치는 전기영동에 의한 분획물 수집 장치이다(참조: U.S. Patent No. 5,541,420; 5,635,045; 5,439,573; 4,964,961; 4,608,147; 4,049,534; 4,040,940; 3,989,612). 한 구체예에서, 본 발명에 따른 분획물 수집 장치는 전기영동으로 시료를 분리하기 위한 정해진 간격의 하나 이상의 전기영동 트랙을 포함하고, 이후 분리된 성분은 전기영동 트랙으로부터 용리된다. 단부가 정해진 간격의 전기영동 트랙의 단부에 인접하여 위치하는 하나 이상의 모세관 시료 전달 튜브는 각 전기영동 트랙으로부터 용리된 분리된 성분을 전달한다. 선택적으로, 연결 수단을 이용하여 간격에 완충액을 공급하고 완충액의 시어스유동(sheathflow)에 의해 시료 전달 튜브에 분리된 성분을 운반한다.

[0152] 다른 유용한 분획물 수집 장치에는 U.S. Patent No. 6,106,710; 6,004,443; 5,205,154; 6,355,164에 기술된 것들이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0153] 서열 확인 장치(200)

[0154] 본 발명의 기구는 원하는 폴리뉴클레오티드, 예를 들면, 분석 장치에 의해 확인된 관심 폴리뉴클레오티드의 서열을 제공하는 서열 확인 장치를 추가로 포함한다. 도 10에 도시된 바와 같이, 서열 확인 장치(200)는 분획물 수집 장치(160)와 연결시켜 수집된 각 분획물에서 폴리뉴클레오티드의 서열을 확인할 수 있다. 도 9와 12에 도시된 바와 같은 다른 구체예에서, 서열 확인 장치(200)는 제 5 연결 수단(180)에 의해 분석 장치에 연결된다. 도 11에 도시된 바와 같은 다른 구체예에서, 분석 장치(68) 자체가 서열 확인 장치로 기능할 수 있다. 적절하게는, 관심 폴리뉴클레오티드를 함유하는 시료는 서열 동정을 위하여 분석 장치에 다시 적하한다. DNA 서열 동정은 Sanger et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74: 5463, 1977) 방법으로 실행하는데, 단일 가닥 DNA 주형과 프라이머로부터 DNA 단일 가닥의 효소적 합성을 수반한다. 단일 가닥 주형은 이런 주형에 혼성화되는 프라이머와 함께 제공된다. 프라이머는 DNA 중합효소를 이용하여 신장하고, 각 반응은 적절한 사슬 종결제, 예를 들면, 디데옥시뉴클레오티드의 합입을 통하여 특정 염기(구아닌, G, 아데닌, A, 티민, T, 또는 사이토신, C)에서 종결한

다. 이후, 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 실체는 폴리뉴클레오티드의 각 위치에 함입된 사슬 종결제에 따라 결정된다. 하지만, 다른 DNA 서열 확인 장치와 방법 역시 개발되었고, 본 발명의 서열 확인 장치로써 이용될 수 있다.

- [0155] 바람직한 구체예에서, 상기 기구에서 독립된 서열 확인 장치는 존재하지 않는다. 증폭 장치와 분석 장치(예, 모세관 전기영동 장치)는 서열 동정 기능을 수행한다. 서열화 반응 혼합물을 증폭 반응에 첨가하여 서열화 반응을 수행하고, 이후 서열 동정을 위하여 서열화 반응물의 분량을 분석 장치(예, 모세관 전기영동 장치)에 전달한다. 서열화 반응과 서열 동정을 위한 방법과 반응물은 당분야에 널리 공지되어 있다(Short Protocols In Molecular Biology, Ausubel et al., ed. , 1995, supra).
- [0156] 본 발명의 유용한 서열 확인 장치는 U. S. Patent No. 6,270,961; 6,025,136; 5,955,030; 5,846,727; 5,821,058; 5,608,063; 5,643,798; 5,556,790; 5,453,247; 5,332,666; 5,306,618; 5,288,644; 5,242,796; 5,221,518; 5,122,345에 개시된 것들이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0157] 관심 폴리뉴클레오티드의 확인된 서열을 이용하여 다양한 데이터베이스, 예를 들면, Genbank에서 가용한 서열과 비교할 수 있다.
- [0158] 연결 수단(40, 66, 80, 140 또는 180)
- [0159] 본 발명의 연결 수단(40, 66, 80, 140 또는 180)은 도 1-12에 도시된 바와 같이 두 장치간 유체 및/또는 신호 소통을 가능하게 한다. 적절하게는, 본 발명의 연결 수단은 수평과 수직으로 이동하여 유체의 전달을 가능하게 한다. 연결 수단은 튜브 또는 채널, 또는 로봇팔이다. 연결 수단은 2개 이상의 튜브를 포함한다. 2개 이상의 튜브는 서로 결합된다. 연결 수단이 부착되는 구획, 예를 들면, 증폭 장치의 반응 챔버는 연결 수단의 존재를 제외하고 밀봉되거나, 본 발명의 목적과 일치하는 사용가능한 부피를 여전히 정의하면서 하나이상의 개방면을 보유한다. 시료는 연결 수단을 통하여, 예를 들면, 접지를 비롯한 선택가능 전압 수준을 적용할 수 있는 전압 조절 장치를 이용함으로써 동전기학적으로 전달될 수 있다. 이런 전압 조절 장치는 다중 전압 분할기와 다중 계전기로 실행시켜 선택가능 전압 수준을 달성할 수 있다. 동전기학적 수술의 이용은 펌핑(pumping) 기전으로써 시료 조작에 실용적인 접근 방식이다. 또한, 본 발명은 조절된 재현 방식으로 다양한 유체를 혼합하기 위하여 전기삼투압적 유동의 이용을 수반한다. 적절한 유체가 상응하는 적절한 재료로 구성된 튜브에 배치되면, 튜브의 표면에서 기능기는 이온화될 수 있다. 전기삼투압은 프로그램가능 펌핑 기전으로써 이용될 수 있다.
- [0160] 펌핑 작용은 예로써, 롤러가 유체 챔버의 유연성 필름을 압박하여 챔버의 부피를 줄이는 정량송액 펌프, 유체 챔버의 유연성 필름에 가압하여 부피를 줄이는 플런저 및 당분야에 공지된 다른 펌핑 설계를 이용하여 달성할 수도 있다. 이런 기계에는 Shoji et al., "Fabrication of a Pump for Integrated Chemical Analyzing Systems," Electronics and Communications in Japan, Part 2, 70, 52-59 (1989) 또는 Esashi et al., "Normally closed microvalve and pump fabricated on a Silicon Wafer," Sensors and Actuators, 20, 163-169 (1989)에 보고된 바와 같은 마이크로-전기기 장치가 포함된다.
- [0161] 본 발명에 유용한 연결 수단(40, 66, 140 또는 180)은 로봇팔이다. 로봇팔은 시료, 튜브, 또는 시료를 보유하는 평판을 한 위치에서 다른 위치로 물리적으로 이전한다. 자동화 시료채취 과정은 프로그램된 루틴(routine)으로써 용이하게 실행될 수 있고, 시료채취에서 인간의 오류(즉, 시료 크기 및 시료 실체의 추적에서 오류) 및 인간 시료채취로부터 오염의 가능성을 차단한다. 서열 증폭기로부터 분량을 채취할 수 있는 로봇팔은 당분야에 가용하다. 가령, Mitsubishi RV-E2 로봇팔은 SciCloneTM Liquid Handler 또는 Robbins Scientific Hydra 96 피펫과 병용될 수 있다. 적절하게는, 본 발명의 로봇팔은 시료를 전달하는 목적으로 수평과 수직 운동을 가능하게 하는 전동 스테이지(motorized stage)를 또한 보유한다.
- [0162] 한 구체예에서, 제 1 연결 수단(66)은 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)를 연결하여, 유체를 수송하고 특정 분석을 실시한다. 바람직한 구체예에서, 제 1 연결 수단(66)은 분석 장치(68) 내에서 유체 시료의 적하 웰로의 자동화 적하를 가능하게 한다. 이후, 적하 웰 내에 배치된 시료의 부피 또는 "충전물"은 분석 채널로 이동되고, 여기서 원하는 분석이 실시된다. 바람직한 구체예에서, 분석 장치(68)는 모세관 전기영동 장치이다. 따라서, 이런 작업을 위하여, 주요 또는 분석 채널은 일반적으로 시료의 구성 요소의 전기영동 분석을 최적화하는 체 매트릭스(sieving matrix), 완충액 또는 매체를 보유한다. 하지만, 본 발명에서 분석 장치(68)는 다양한 비-CE 장치일 수도 있고, 시료에서 상이한 분석 반응을 실행하는데 이용될 수 있다.
- [0163] 적절하게는, 시료를 전달하기 위한 연결 수단(66)은 증폭 단계동안 증폭 반응으로부터 분량의 채취를 가능하게 한다. 연결 수단(66)은 단일 시료가 채취된 이후에 폐기되거나 각 시료가 채취된 이후에 1회 이상 세척되는 피

셋 침단 또는 바늘을 포함한다. 대안으로, 연결 수단은 분량을 모세관에 적하하기 위하여, 모세관 전기영동에 이용되는 모세관을 증폭 반응물과 직접 접촉시킬 수 있다.

[0164] 한 구체예에서, 제 1 연결 수단(66)은 각 PCR의 종결 시점에서 PCR 증폭 반응 혼합물의 분량을 증폭 장치에서 분석 장치로 전달한다.

[0165] 다른 구체예에서, 제 2 연결 수단(40)은 폴리뉴클레오티드 추출 장치와 증폭 장치를 연결한다. 다른 구체예에서, 제 2 연결 수단은 증폭 반응 혼합물을 출발 반응 혼합물과 동일 농도로 dNTP, 프라이머, 필요 반응물, DNA 중합효소를 함유하는 혼합물로 다시 보충시키는 역할을 또한 수행한다. 또 다른 구체예, 증폭 반응 혼합물을 다시 보충하는데 상이한 연결 수단이 이용된다. 이런 연결 수단은 유체의 전달이 가능하도록 본원에 기술된 바와 동일한 방식으로 제조될 수 있다.

[0166] 적절하게는, 본 발명의 제 1 연결 수단은 증폭 반응 혼합물의 분량이 분석 장치, 예를 들면, 모세관 전기영동 장치로 공급되도록 한다. 이런 공급 기능은 당분야에 공지된 아래의 방법으로 달성될 수 있다(참조: U.S. Patent No. 6,280,589; 6,192,768; 6,190,521; 6,132,582; 6,033,546).

[0167] 한 구체예에서, 시료는 전해질 완충액을 위한 적어도 하나의 채널 및 시료를 위한 공급과 배출 채널을 포함하는 연결 수단에 시료 충전물로써 주입된다. 공급과 배출 채널은 전해질 채널에서 분석 장치(68)의 개별 공급과 배출 포트에 배분한다. 공급 포트와 배출 포트간 거리는 시료 부피를 기하학적으로 정의한다. 전해질 채널에 시료 충전물의 주입은 가장 낮은 전기영동 이동도(electrophoretic mobility)를 갖는 시료 성분이 기하학적으로 정의된 부피 내에 내포될 만큼 충분히 긴 시간동안 공급과 배출 채널에 전기장을 가함으로써 동전기적으로 달성된다. 각 공급과 배출 채널은 전해질 채널로 경사진다. 시료를 시료 볼륨(volume)으로 동전기적으로 주입하는 수단이 제공된다. 전해질 완충액에 관하여 공급과 배출 채널의 유동에 대한 저항성은 전해질 채널의 유동에 대한 개별 저항성보다 적어도 5% 낮다.

[0168] 다른 구체예에서, 시료는 당분야에 공지된 유체역학적 방법을 이용하여 제 1 연결 수단에 의해 도입된다. 시료는 압력 차이에 의해 모세관에 주입된다. 압력 차이는 모세관 단부를 정수압(hydrostatic pressure) 차이가 발생하는 상이한 수준으로 위치시키거나, 또는 가스에 의해 과압(overpressure)이 발생하고 이런 과압이 시료 용액을 모세관으로 주입시키는 밀봉가능 시료 저장소에 위치시켜 발생시킨다. 모세관을 통과하는 시료의 양은 압력 차이 및 이의 유효 시간(effective time)의 선택에 의해 조절된다.

[0169] 다른 구체예에서, 시료는 시료 용액이 입력 단부를 완전히 둘러싸고 시료가 전기영동 전류에 의해 분리 모세관으로 전달되도록 하는 방식으로 또는 다른 방식으로 시료-주입 모세관을 모세관 존 전기영동 기구의 모세관 입력 단부의 인근에 위치시키고, 미리 결정된 시간이후에, 시료 용액이 배경 용액으로 대체된 입력 단부의 인근에서 용액을 채취함으로써 고정되거나 이동가능 시료 주입 모세관에 의해 주입된다.

[0170] 하지만, 상이한 구체예에서, 제 1 연결 수단은 증폭 장치와 모세관 전기영동 분석 장치를 연결하는데 이용되지 않는다. 대신에, 증폭된 폴리뉴클레오티드 시료의 분획물은 전기영동 장치의 모세관과 전극을 PCR 반응물에 직접 담금으로써 전기영동 장치에 적하된다. 적절하게는, 전류를 제한된 시간동안 전극에 가하여 폴리뉴클레오티드 시료가 상기한 바와 같이 동전기력에 의해 모세관으로 이동하도록 한다. 전류를 가하는 시간, 예를 들면, 대략 0.001초, 0.01초, 0.1초, 1초, 10초 또는 그 이상은 모세관 전기영동에 의한 분석을 위하여 모세관에 의해 채취되는 시료 필요량에 좌우된다. 하기 구체예는 분석 장치에 시료 적하를 위한 좀더 간편한 공정을 제시한다.

[0171] 제 3 연결 수단(80)은 분석 장치(68) 및 분석 장치의 외부에 위치한 데이터 발생 장치(120)를 연결한다.

[0172] 제 4 연결 수단(140)은 분석 장치(68)와 분획물 수집 장치(160)를 연결하는 한 구체예에 이용된다. 하지만, 본 발명의 다른 구체예에서, 분석 장치와 분획물 수집 장치간에 연결 수단이 이용되지 않는다. 일부 구체예에서, 서열 확인 장치(200)와 분석 장치(68) 또는 분획물 수집 장치(160)를 연결하는데 제 5 연결 수단(180)을 이용하여 관심 폴리뉴클레오티드의 서열 실체를 수득한다.

[0173] 일부 구체예에서, 제 1, 제 2, 제 4, 제 5 연결 수단은 단일 연결 수단, 예를 들면, 유체를 한 장치에서 다른 장치로 이동시키는 로봇팔이다. 단일 로봇팔은 유체를 한 장치에서 두 번째 장치로 이동시키고, 이후 유체를 한 장치에서 세 번째 장치로 이동시키기에 앞서 자체 세척한다.

[0174] 본 발명의 연결 수단을 만드는데 적합한 기질은 임의의 다양한 재료, 또는 재료의 조합으로부터 제조될 수 있다. 빈번하게, 연결 수단은 당분야에 공지된 고형 기질, 예를 들면, 유리, 석영, 실리콘 또는 폴리실리콘과 같은 실리카-기초한 기질 및 다른 공지된 기질, 다시 말하면, 갈륨 비소(gallium arsenide)를 이용하여 제조된

다. 대안으로, 중합성 기질 재료, 예를 들면, 폴리디메틸실록산(PDMS), 폴리메틸메트아크릴레이트(PMMA), 폴리우레탄, 폴리비닐클로라이드(PVC), 폴리스티렌, 폴리설폰, 폴리카보네이트, 폴리메틸펜텐, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리비닐리덴 플루라이드, ABS(아크릴로니트릴-부타디엔-스티렌 공중합체) 및 유사 물질을 이용하여 본 발명의 연결 수단을 제조할 수 있다.

[0175] 본 발명은 전사 프로파일링에 이용되는 자동화 기구를 가능하게 한다. 상기 기구는 표적 폴리뉴클레오티드의 증폭 및 표적 폴리뉴클레오티드로부터 증폭 산물의 정량적 분석이 가능하다. 또한, 상기 기구는 폴리뉴클레오티드 추출과 연전사가 가능하다. 이에 더하여, 상기 기구는 관심 폴리뉴클레오티드(예, 2개 이상의 시료에서 차별적으로 발현되는 유전자)의 동정 및 관심 폴리뉴클레오티드의 서열화가 가능하다.

[0176] 도 13에서는 본 발명의 기구를 이용한 발현 프로파일링 공정의 개요도를 도시한다. 가령, 상기 공정은 도 10에 도시된 기구를 이용하여 실행된다. 바람직한 구체예에서, 도 10에서 모든 장치는 단일 하우징 내에 배치된다. RNA는 별도로 추출되거나, 또는 도 2에 도시된 바와 같이 증폭 장치에 연결된 폴리뉴클레오티드 추출 장치에 의해 추출될 수 있다(1 단계). 증폭 장치(64)는 cDNA 합성과 증폭(예, PCR)을 실행한다(2 단계). 각 PCR 사이클의 종결 시점에서, 증폭 산물의 분량은 분석 장치(68)(예, 모세관 전기영동 장치)에 이동시켜 분석한다(3 단계). 차별적으로 발현된 폴리뉴클레오티드는 분획물 수집 장치(160)로 수집하고(4 단계), 하나이상의 차별적으로 발현된 폴리뉴클레오티드의 서열은 서열 확인 장치(200)로 확인한다(5 단계). 5 단계에서, 서열화 반응물 마스터 혼합물을 첨가하고 당분야에 공지된 방법에 따라 서열화 반응 혼합물을 배양할 수 있다. 한 구체예에서, 서열화 반응 혼합물은 서열 동정을 위하여 분석 장치(68)(예, 모세관 전기영동 장치)에 적하된다. 다른 구체예에서, 분획물 수집 장치(160)에 의해 수집된 분획물의 분량은 서열 반응을 실행하기 위하여 증폭 장치(64)에 반환된다. 이후, 반응 산물은 서열 동정을 위하여 분석 장치(68)에 적용된다.

[0177] 한 구체예에서, 본 발명의 기구는 게놈 DA 시료를 분석하는데 이용된다(예, 유전자의 게놈 사본의 정량화). 이런 기술은 전체 게놈 기준에서, 프로브 기초한 분석 또는 핵형분석(karyotyping)보다 비용이 저렴하고 분석력이 높다. 게놈 DNA 분석 공정은 게놈 DNA가 사용되기 때문에 역전사 효소와 cDNA 합성이 필요하지 않다는 점을 제외하고, 상기한 RNA 분석 공정에서와 유사하게 실행된다. 게놈 DNA 분석 공정은 비교되는 2개 이상의 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계로 시작된다. 시료는 다중 분량(예, 5개, 10개, 20개, 30개 또는 그 이상의 분량)으로 분할한다. 각 분량은 서로 다른 프라이머 세트(예, 분석되는 모든 분량에 대하여 5개, 10개, 20개, 30개 또는 그 이상의 프라이머 세트)에 의해 증폭된다. 각 프라이머 세트에서, 하나의 프라이머는 공통 경쟁 서열과 상보적이거나 임의 서열이고 시료-특이적인 서열 태그를 보유한다. 다른 프라이머는 임의 프라이머이다. 한 구체예에서, 2개 이상의 시료가 동일한 조건하에 동일한 프라이머로 증폭되고, 이후 전체 게놈에서 무작위로 분포된 좌위로부터 유래되는 PCR 산물 사다리가 형성된다. 이후, 각 PCR 산물의 양을 측정하고 시료간에 비교한다. 따라서, 서로 다른 좌위에서 사본 수의 전체-게놈 차이를 확인할 수 있다. 이들 차이는 국부 중복 또는 증폭; 삼염색체증(trisomy); 이형접합성(heterozygosity)의 상실을 지시한다.

[0178] 대안으로, 특정 좌위에서 2개 이상의 시료간 사본 수 변화를 결정하기 위하여, 좌위 특이적 프라이머 세트(즉, 표적 좌위에서 특이적인 서열을 인식하는 프라이머)를 PCR 증폭에 이용할 수 있다.

[0179] 전술한 구체예는 본 발명을 완성하고 실행하는 과정에서 본 발명자에 의해 수행된 실험 및 고려된 기술을 예시한다. 이들 구체예는 본 발명의 실시를 당분야에 통고하고 이의 유용성을 입증한다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 본원에 개시된 기술 및 구체예는 바람직한 구체예이며, 이에 균등한 방법과 기술을 이용하여 동일한 결과를 달성할 수 있다.

[0180] 본 명세서에 언급된 모든 참고문헌은 순전히 참조로 한다.

도면의 간단한 설명

[0062] 본 발명은 첨부된 도면을 인용하여 더욱 구체적으로 설명하는데, 유사 구조는 전체 도면에서 유사 수사로 표시된다. 도시된 도면은 일정 비율로 작성할 필요가 없으며, 본 발명의 원리를 설명하는 부분은 강조한다.

[0063] 도 1은 본 발명의 한 구체예에 따른 발현 프로파일링 기구의 개요도이다. 기구(10)는 증폭 장치(64) 및 제 1 연결 수단(66)에 의해 증폭 장치(64)에 연결된 분석 장치(68)로 구성된다.

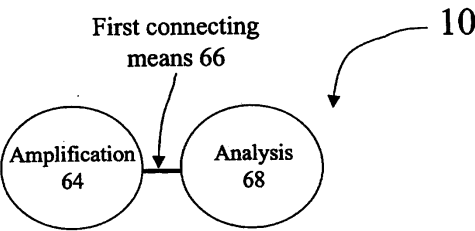
[0064] 도 2는 본 발명의 한 구체예에 따른 발현 프로파일링 기구의 개요도이다. 기구(10)은 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20), 증폭 장치(64), 분석 장치(68)로 구성된다. 제 1 연결 수단(66)은 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)를 연

결하고, 제 2 연결 수단(40)은 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20)와 증폭 장치(64)를 연결한다.

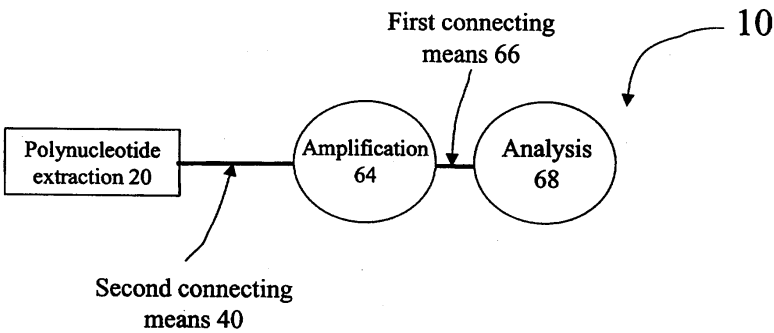
- [0065] 도 3은 본 발명의 한 구체예에 따른 발현 프로파일링 기구의 개요도이다. 기구(10)는 증폭 장치(64), 분석 장치(68), 데이터 발생 장치(120)로 구성된다. 제 1 연결 수단(66)은 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)를 연결하고, 제 2 연결 수단(40)은 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20)와 증폭 장치(64)를 연결하고, 제 3 연결 수단(80)은 분석 장치(68)와 데이터 발생 장치(120)를 연결한다.
- [0066] 도 4는 본 발명의 한 구체예에 따른 발현 프로파일링 기구의 개요도이다. 기구(10)는 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)로 구성된다. 증폭 장치(64)는 증폭 반응에 앞서 폴리뉴클레오티드의 역전사를 가능하게 한다. 제 1 연결 수단(66)은 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)를 연결한다.
- [0067] 도 5는 본 발명의 한 구체예에 따른 발현 프로파일링 기구의 개요도이다. 기구(10)는 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)로 구성된다. 분석 장치(68)는 데이터 발생을 가능하게 한다. 제 1 연결 수단(66)은 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)를 연결한다.
- [0068] 도 6은 본 발명의 한 구체예에 따른 발현 프로파일링 기구의 개요도이다. 기구(10)는 증폭 장치(64) 및 동일 하우징(60)에 배치된 분석 장치(68)로 구성된다. 하우징(60) 내에서 제 1 연결 수단(66)은 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)를 연결한다.
- [0069] 도 7은 본 발명의 한 구체예에 따른 발현 프로파일링 기구의 개요도이다. 기구(10)는 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20), 증폭 장치(64), 분석 장치(68), 데이터 발생 장치(120)로 구성된다. 제 1 연결 수단(66)은 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)를 연결하고, 제 2 연결 수단(40)은 폴리뉴클레오티드 추출 장치(20)와 증폭 장치(64)를 연결하고, 제 3 연결 수단(80)은 분석 장치(68)와 데이터 발생 장치(120)를 연결한다.
- [0070] 도 8은 본 발명의 한 구체예에 따른 발현 프로파일링 기구의 개요도이다. 기구(10)는 증폭 장치(64), 분석 장치(68), 분획물 수집 장치(160)로 구성된다. 제 1 연결 수단(66)은 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)를 연결하고, 제 4 연결 수단(140)은 분석 장치(68)와 분획물 수집 장치(160)를 연결한다.
- [0071] 도 9는 본 발명의 한 구체예에 따른 발현 프로파일링 기구의 개요도이다. 기구(10)는 증폭 장치(64), 분석 장치(68), 서열 확인 장치(200)로 구성된다. 제 1 연결 수단(66)은 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)를 연결하고, 제 5 연결 수단(180)은 증폭 장치(64)와 서열 확인 장치(200)를 연결한다.
- [0072] 도 10은 본 발명의 한 구체예에 따른 발현 프로파일링 기구의 개요도이다. 기구(10)는 증폭 장치(64), 분석 장치(68), 분획물 감지 장치, 서열 확인 장치(200)로 구성된다. 제 1 연결 수단(66)은 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)를 연결하고, 제 4 연결 수단(140)은 분석 장치(68)와 분획물 수집 장치(160)를 연결하고, 제 5 연결 수단(180)은 분획물 수집 장치(160)를 서열 확인 장치(200)와 연결한다.
- [0073] 도 11은 본 발명의 한 구체예에 따른 발현 프로파일링 기구의 개요도이다. 기구(10)는 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)로 구성되고, 여기서 분석 장치(68)는 서열 확인 장치(200)로써 또한 기능한다. 제 1 연결 수단(66)은 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)를 연결한다.
- [0074] 도 12는 본 발명의 한 구체예에 따른 발현 프로파일링 기구의 개요도이다. 기구(10)는 증폭 장치(64), 분석 장치(68), 서열 확인 장치(200), 데이터 발생 장치(120)로 구성된다. 제 1 연결 수단(66)은 증폭 장치(64)와 분석 장치(68)를 연결하고, 제 5 연결 수단(180)은 증폭 장치(64)와 서열 확인 장치(200)를 연결하고, 제 3 연결 수단(80)은 서열 확인 장치(200)를 데이터 발생 장치를 연결한다.
- [0075] 도 13은 본 발명의 일부 구체예에 따른 기구를 이용한 발현 프로파일링 공정의 개요도이다.
- [0076] 상기한 도면이 본 발명의 바람직한 구체예를 제시하긴 하지만, 본 발명의 다른 구체예 역시 고려된다. 본원에서는 본 발명의 무제한의 전형적인 구체예를 제공한다. 수많은 다른 개변이 당업자에 의해 고안될 수 있는데, 이들은 본 발명의 원리 범주에 속한다.

도면

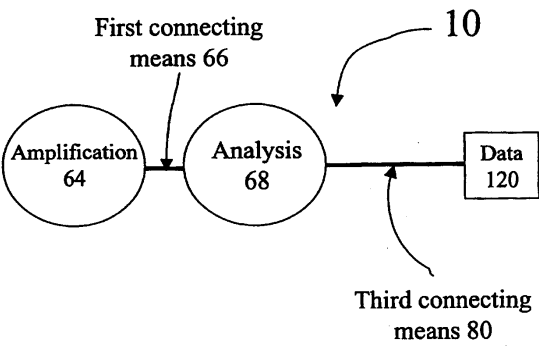
도면1



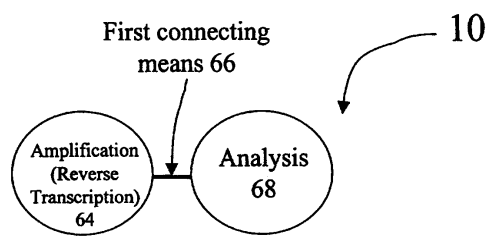
도면2



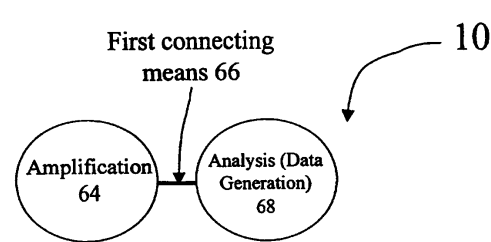
도면3



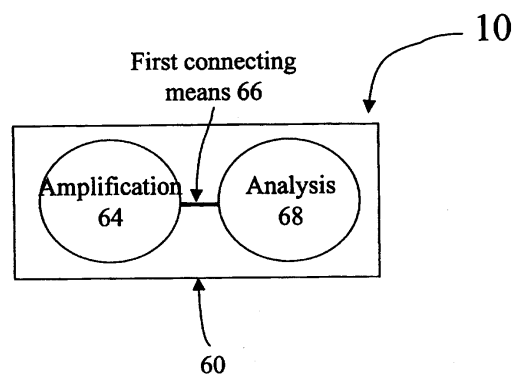
도면4



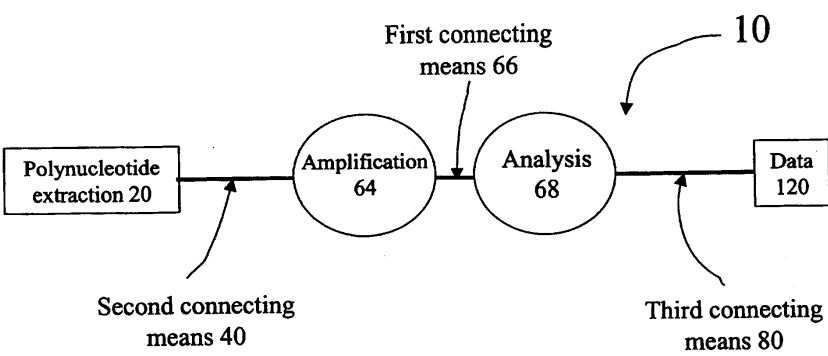
도면5



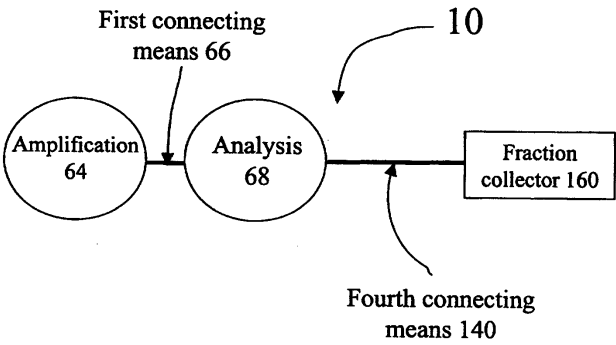
도면6



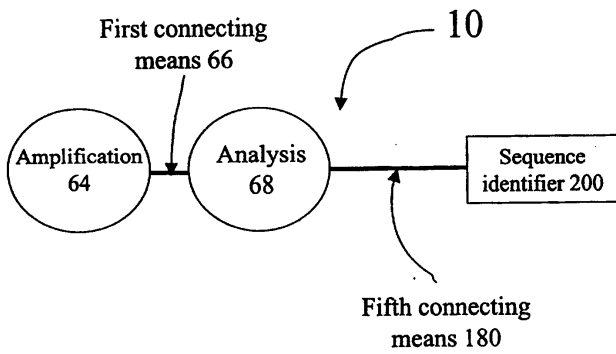
도면7



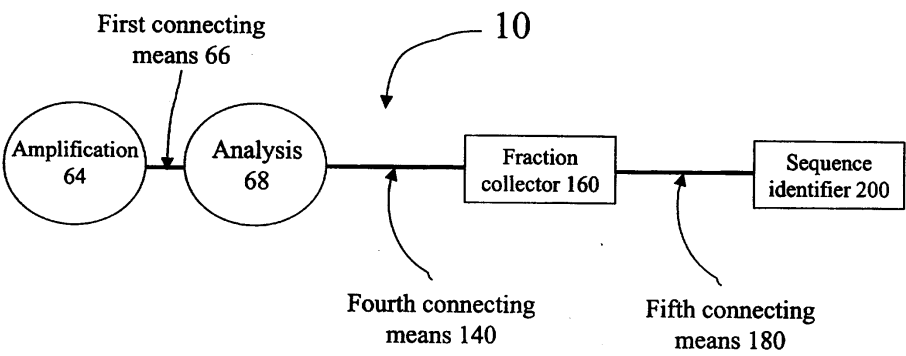
도면8



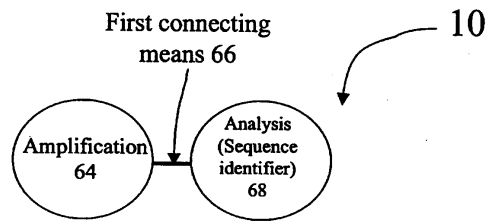
도면9



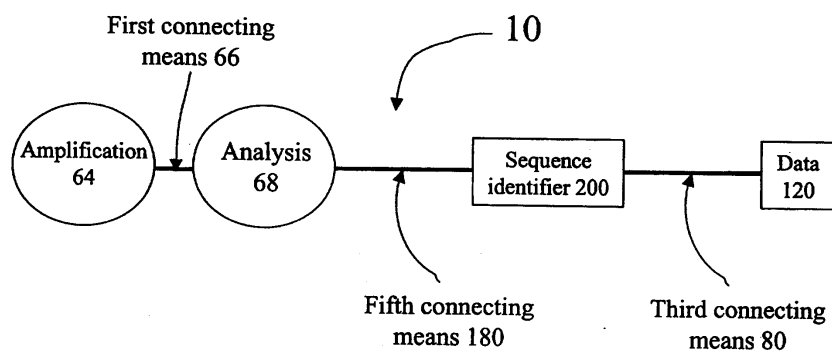
도면10



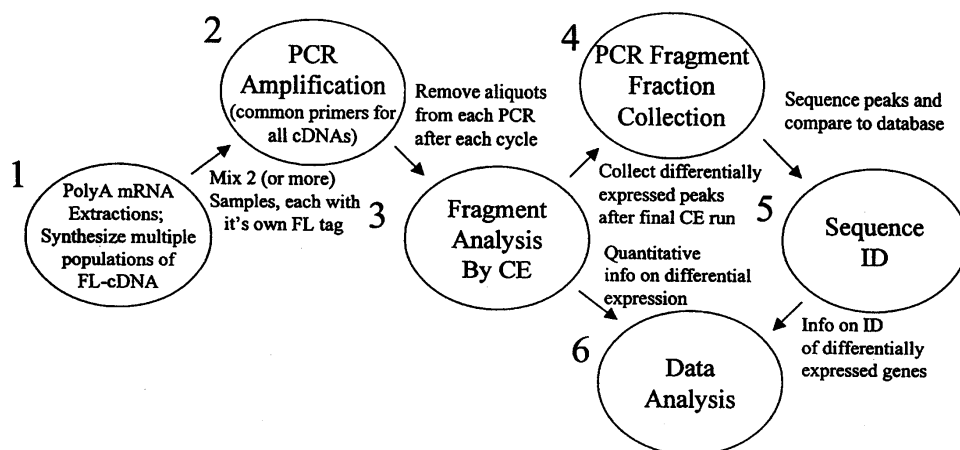
도면11



도면12



도면13



* 1 단계와 2 단계에서 cDNA 합성은 동일한 장치(예, 서열 증폭기)에서 실행된다.

** 3 단계와 5 단계 역시 동일한 장치(예, CE 장치 - 작동 조건은 상이)에서 실행된다.