



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년11월18일

(11) 등록번호 10-2468633

(24) 등록일자 2022년11월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/686 (2018.01) C12Q 1/6804 (2018.01)

C12Q 1/6811 (2018.01) C12Q 1/6883 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/686 (2018.05)

C12Q 1/6804 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2019-7007697

(22) 출원일자(국제) 2017년09월15일

심사청구일자 2020년09월09일

(85) 번역문제출일자 2019년03월15일

(65) 공개번호 10-2019-0046880

(43) 공개일자 2019년05월07일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/073293

(87) 국제공개번호 WO 2018/050828

국제공개일자 2018년03월22일

(30) 우선권주장

62/395,325 2016년09월15일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

WO2016101959 A1\*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 21 항

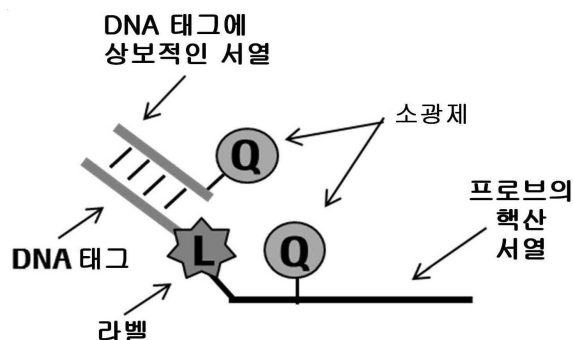
심사관 : 김민정

(54) 발명의 명칭 멀티플렉스 실시간 PCR 수행 방법

## (57) 요약

본 발명은 태그된 가수분해 프로브를 사용하는 표적 핵산의 검출 및 정량화를 위해 더 높은 멀티플렉스 실시간 PCR 을 수행하는 방법을 기술한다.

## 대표도



(52) CPC특허분류

*C12Q 1/6811* (2018.05)  
*C12Q 1/6818* (2018.05)  
*C12Q 1/6823* (2018.05)  
*C12Q 1/6837* (2018.05)  
*C12Q 1/6883* (2022.01)  
*C12Q 2525/161* (2013.01)  
*C12Q 2527/107* (2019.08)  
*C12Q 2531/113* (2013.01)  
*C12Q 2537/143* (2013.01)

(72) 발명자

**사이키 랜델**

미국 94588 캘리포니아주 플레전튼 하시엔다 드라  
 이브 4300 로슈 몰레큘러 시스템스 인코포레이티드  
 씨/오

**찬 엘리슨**

미국 94588 캘리포니아주 플레전튼 하시엔다 드라  
 이브 4300 로슈 몰레큘러 시스템스 인코포레이티드  
 씨/오

(56) 선행기술조사문헌

KR1019980064808 A  
 US04250257 A  
 KR1020100061192 A  
 KR1020110098405 A  
 US20110071038 A1  
 WO2007013915 A1

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(30) 우선권주장

62/435,595 2016년12월16일 미국(US)  
 62/536,871 2017년07월25일 미국(US)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 단계를 포함하는, 샘플 내 표적 핵산의 증폭 및 검출 방법:

(a) 단일 반응 용기에서 상기 표적 핵산을 함유하는 상기 샘플을 하기 (i) 및 (ii) 와 접촉시키는 단계:

(i) 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머, 각각의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 상기 표적 핵산의 서브서열의 반대 가닥에 하이브리드화될 수 있음;

(ii) 어닐링 부분 및 태그 부분을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 프로브, 태그 부분은 표적 핵산 서열에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열 또는 비-뉴클레오타이드 분자를 포함하고, 어닐링 부분은 표적 핵산 서열에 적어도 부분적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고 상기 올리고 뉴클레오타이드 프라이머 쌍에 의해 결합된 상기 표적 핵산의 상기 서브서열의 영역에 하이브리드화됨, 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브는 상기 태그 부분 또는 상기 어닐링 부분 상에 위치하는 리포터 모이어티 및 상기 어닐링 부분 상에 위치하는 제 1 소광제 모이어티를 포함하는 상호작용 이중 라벨을 추가로 포함하고, 상기 리포터 모이어티는 뉴클레아제 민감성 절단 부위에 의해 상기 제 1 소광제 모이어티로부터 분리되고; 상기 태그 부분은 소광 올리고뉴클레오타이드가 상기 태그 부분에 결합될 때 상기 리포터 모이어티를 소광시킬 수 있는 하나 이상의 소광제 모이어티를 포함하거나 또는 이와 연관되는 소광 올리고뉴클레오타이드에 온도-의존적 방식으로 가역적으로 결합됨;

(b) 각각의 폴리머라아제 연쇄 반응 (PCR) 사이클의 연장 단계 동안, 폴리머라아제의 5'- 3' 뉴클레아제 활성이 올리고뉴클레오타이드 프로브의 어닐링 부분 상의 제 1 소광제 모이어티로부터 태그 부분의 절단 및 분리를 허용하도록 5'- 3' 뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제를 사용하는 PCR 에 의해 상기 표적 핵산을 증폭시키는 단계;

(c) 소광 올리고뉴클레오타이드가 태그 부분에 결합되는 제 1 온도에서 리포터 모이어티로부터 억제된 신호를 측정하는 단계;

(d) 온도를 소광 올리고뉴클레오타이드가 태그 부분에 결합되지 않는 제 2 온도로 상승시키는 단계;

(e) 제 2 온도에서 리포터 모이어티로부터의 온도 보정된 신호를 측정하는 단계;

(f) 제 2 온도에서 검출된 온도 보정된 신호로부터 제 1 온도에서 검출된 억제된 신호를 감산함으로써 계산된 신호 값을 얻는 단계;

(g) 복합 PCR 사이클을 통해 단계 (b) 내지 단계 (f) 를 반복하는 단계;

(h) 표적 핵산의 존재를 검출하기 위해 복합 PCR 사이클로부터 계산된 신호 값을 측정하는 단계.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 리포터 모이어티가 올리고뉴클레오타이드 프로브의 태그 부분 상에 존재하는, 샘플 내 표적 핵산의 증폭 및 검출 방법.

#### 청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 태그 부분은 표적 핵산 서열에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 소광 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드 프로브의 태그 부분에 적어도 부분적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고 하이브리드화에 의해 태그 부분에 결합하는, 샘플 내 표적 핵산의 증폭 및 검출 방법.

#### 청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 태그 부분은 핵산 폴리머라아제에 의해 연장될 수 없게 하는 변형을 포함하는, 샘플 내 표적 핵산의 증폭 및 검출 방법.

#### 청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드 프로브의 태그 부분 또는 소광 올리고뉴클레오타이드 또는 태그 부분 및 소광 올리고뉴클레오타이드 모두는 하나 이상의 뉴클레오타이드 변형을 함유하는, 샘플 내 표적 핵산의 증폭 및 검출 방법.

#### 청구항 6

제 5 항에 있어서, 하나 이상의 뉴클레오타이드 변형은 잠긴 핵산 (LNA), 펩티드 핵산 (PNA), 가교 핵산 (BNA), 2'-O 알킬 치환, L-거울상 이성질체 뉴클레오타이드, 또는 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 샘플 내 표적 핵산의 증폭 및 검출 방법.

#### 청구항 7

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 리포터 모이어티는 형광 염료이고, 소광제 모이어티는 형광 염료로부터의 검출 가능한 신호를 소광시키는, 샘플 내 표적 핵산의 증폭 및 검출 방법.

#### 청구항 8

하기 단계를 포함하는, 샘플 내 2 개 이상의 표적 핵산 서열의 검출 방법:

(a) 단일 반응 용기에서 상기 2 개 이상의 표적 핵산 서열을 함유하는 것으로 의심되는 상기 샘플을 하기 (i) ~ (iv) 와 접촉시키는 단계:

(i) 제 1 표적 핵산 서열의 각각의 가닥에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 제 1 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍, 및 제 2 표적 핵산 서열의 각각의 가닥에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 제 2 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍;

(ii) 제 1 표적 핵산 서열과 적어도 부분적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고 제 1 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍에 의해 결합된 제 1 표적 핵산 서열의 영역 내에서 어닐링하는 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브, 상기 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브는 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 형광 모이어티 및 형광 모이어티에 의해 생성된 검출가능한 신호를 소광시킬 수 있는 제 1 소광제 모이어티를 포함하고, 형광 모이어티는 뉴클레아제 민감성 절단 부위에 의해 제 1 소광제 모이어티로부터 분리됨;

(iii) 2 개의 구별되는 부분: 제 2 표적 핵산 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고 제 2 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍에 의해 결합된 제 2 표적 핵산 서열의 영역 내에서 어닐링하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 어닐링 부분 (여기서, 어닐링 부분은 제 2 소광제 모이어티를 포함함); 및 어닐링 부분의 5' 말단 또는 3' 말단에 부착되거나 또는 어닐링 부분의 영역에 링커를 통해 부착되고 2 개 이상의 표적 핵산 서열에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 태그 부분 (여기서, 태그 부분은 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브 상의 형광 모이어티와 동일한 형광 모이어티를 포함하고, 이의 검출가능한 신호는 어닐링 부분 상의 제 2 소광제 모이어티에 의해 소광될 수 있고, 상기 형광 모이어티는 제 2 소광제 모이어티로부터 뉴클레아제 민감성 절단 부위에 의해 분리됨) 을 포함하는 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브;

(iv) 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 태그 부분에 적어도 부분적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 태그 부분에 하이브리드화되어 이중체를 형성하는 소광 올리고뉴클레오타이드, 상기 소광 올리고뉴클레오타이드는 소광 올리고뉴클레오타이드가 태그 부분에 하이브리드화될 때 태그 부분 상의 형광 모이어티에 의해 발생하는 검출가능한 신호를 소광시키는 제 3 소광제 모이어티를 포함함;

(b) 각각의 PCR 사이클의 연장 단계 동안, 핵산 폴리머라아제의 5'-3' 뉴클레아제 활성이 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브 상의 제 1 소광제 모이어티로부터 형광 모이어티의 절단 및 분리, 및 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 어닐링 부분 상의 제 2 소광제 모이어티로부터의 태그 부분 상의 형광 모이어티의 절단 및 분리를 허용하도록 5'-3' 뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제를 사용하는 폴리머라아제 연쇄 반응 (PCR) 에 의해 제 1 및 제 2 표적 핵산 서열을 증폭시키는 단계, 연장 단계에서 소광 올리고뉴클레오타이드는 태그 부분에 하이브리드화되어 남아있음;

(c) 소광 올리고뉴클레오타이드가 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브로부터의 태그 부분에 하이브리드화되는 제 1 온도에서 형광 신호를 측정하는 단계;

(d) 소광 올리고뉴클레오타이드가 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브로부터의 태그 부분에 하이브리드화되지 않는 제 1 온도보다 높은 제 2 온도로 온도를 상승시키는 단계;

- (e) 제 2 온도에서 형광 신호를 측정하는 단계;
- (f) 제 2 온도에서 검출된 형광 신호로부터 제 1 온도에서 검출된 형광 신호를 감산함으로써 계산된 신호 값을 얻는 단계;
- (g) 제 1 및 제 2 표적 핵산 서열로부터 원하는 양의 증폭 산물을 생산하기 위해 복합 PCR 사이클에서 단계 (b) 내지 (f) 를 반복하는 단계;
- (h) 복합 PCR 사이클로부터의 제 1 온도에서 검출된 형광 신호로부터 제 1 표적 핵산 서열의 존재 및 복합 PCR 사이클로부터의 계산된 신호 값으로부터 제 2 표적 핵산 서열의 존재를 결정하는 단계.

#### 청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 태그 부분은 어닐링 부분의 5' 말단에 부착되는, 샘플 내 2 개 이상의 표적 핵산 서열의 검출 방법.

#### 청구항 10

제 8 항 또는 제 9 항에 있어서, 태그 부분은 핵산 폴리머라아제에 의해 연장될 수 없게 하는 변형을 포함하는, 샘플 내 2 개 이상의 표적 핵산 서열의 검출 방법.

#### 청구항 11

제 8 항 또는 제 9 항에 있어서, 소광 올리고뉴클레오타이드는 스템-루프 구조를 통해 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 태그 부분에 연결되는, 샘플 내 2 개 이상의 표적 핵산 서열의 검출 방법.

#### 청구항 12

제 8 항 또는 제 9 항에 있어서, 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 태그 부분 또는 소광 올리고뉴클레오타이드 또는 태그 부분 및 소광 올리고뉴클레오타이드 모두는 하나 이상의 뉴클레오타이드 변형을 함유하는, 샘플 내 2 개 이상의 표적 핵산 서열의 검출 방법.

#### 청구항 13

제 12 항에 있어서, 하나 이상의 뉴클레오타이드 변형은 잠긴 핵산 (LNA), 펩티드 핵산 (PNA), 가교 핵산 (BNA), 2'-O 알킬 치환, L-거울상이성질체 뉴클레오타이드, 또는 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 샘플 내 2 개 이상의 표적 핵산 서열의 검출 방법.

#### 청구항 14

하기 단계를 포함하는, 샘플 내 2 개 이상의 표적 핵산 서열의 검출 방법:

- (a) 단일 반응 용기에서 상기 2 개 이상의 표적 핵산 서열을 함유하는 것으로 의심되는 상기 샘플을 하기 (i) ~ (v) 와 접촉시키는 단계:

(i) 제 1 표적 핵산 서열의 각각의 가닥에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 제 1 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍, 및 제 2 표적 핵산 서열의 각각의 가닥에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 제 2 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍;

(ii) 2 개의 구별되는 부분: 제 1 표적 핵산 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고 제 1 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍에 의해 결합된 제 1 표적 핵산 서열의 영역 내에서 어닐링하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제 1 어닐링 부분 (여기서, 제 1 어닐링 부분은 제 1 소광제 모이어티를 포함하고 핵산 폴리머라아제에 의한 연장을 금지하기 위해 3' 말단에서 차단됨); 및 제 1 어닐링 부분의 5' 말단 또는 3' 말단에 부착되거나 또는 상기 어닐링 부분의 영역에 링커를 통해 부착되고 2 개 이상의 표적 핵산 서열에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제 1 태그 부분 (여기서, 제 1 태그 부분은 검출가능한 신호가 제 1 어닐링 부분 상의 제 1 소광제 모이어티에 의해 소광될 수 있는 형광 모이어티를 포함하고, 상기 형광 모이어티는 제 1 소광제 모이어티로부터 뉴클레아제 민감성 절단 부위에 의해 분리됨) 을 포함하는 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브;

(iii) 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 태그 부분에 적어도 부분적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제 1 태그 부분에 하이브리드화되어 이중체를 형성하는 제 1 소광 올리고뉴클레오타이드, 상기

제 1 소광 올리고뉴클레오타이드는 제 1 소광 올리고뉴클레오타이드가 제 1 태그 부분에 하이브리드화될 때 제 1 태그 부분 상의 형광 모이어티에 의해 발생하는 검출가능한 신호를 소광시키는 제 2 소광제 모이어티를 포함함;

(iv) 2 개의 구별되는 부분: 제 2 표적 핵산 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고 제 2 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍에 의해 결합된 제 2 표적 핵산 서열의 영역 내에서 어닐링하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제 2 어닐링 부분 (여기서, 제 2 어닐링 부분은 제 3 소광제 모이어티를 포함하고 핵산 폴리머라아제에 의한 연장을 금지하기 위해 3' 말단에서 차단됨); 및 제 2 어닐링 부분의 5' 말단 또는 3' 말단에 부착되거나 또는 상기 어닐링 부분의 영역에 링커를 통해 부착되고 2 개 이상의 표적 핵산 서열에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 태그 부분의 뉴클레오타이드 서열과 비교하여 상이한 핵산 서열 또는 상이한 뉴클레오타이드 변형을 갖는 제 2 태그 부분 (여기서, 제 2 태그 부분은 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 태그 부분 상의 형광 모이어티와 동일한 형광 모이어티를 포함하고, 이의 검출가능한 신호는 제 2 어닐링 부분 상의 제 3 소광제 모이어티에 의해 소광될 수 있고, 상기 형광 모이어티는 제 3 소광제 모이어티로부터 뉴클레아제 민감성 절단 부위에 의해 분리됨) 을 포함하는 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브;

(v) 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 태그 부분에 적어도 부분적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제 2 태그 부분에 하이브리드화되어 이중체를 형성하는 제 2 소광 올리고뉴클레오타이드, 상기 제 2 소광 올리고뉴클레오타이드는 제 2 소광 올리고뉴클레오타이드가 제 2 태그 부분에 하이브리드화될 때 제 2 태그 부분 상의 형광 모이어티에 의해 발생하는 검출가능한 신호를 소광시키는 제 4 소광제 모이어티를 포함함;

제 2 소광 올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 태그 부분 사이의 이중체는 제 1 소광 올리고뉴클레오타이드와 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 태그 부분 사이의 이중체보다 높은 용융 온도 (Tm) 값을 가짐;

(b) 각각의 PCR 사이클의 연장 단계 동안, 핵산 폴리머라아제의 5'- 3' 뉴클레아제 활성이 하기 (i) 및 (ii) 를 허용하도록 5'- 3' 뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제를 사용하는 폴리머라아제 연쇄 반응 (PCR) 에 의해 제 1 및 제 2 표적 핵산 서열을 증폭시키는 단계:

(i) 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 어닐링 부분 상의 제 1 소광제 모이어티로부터 제 1 태그 부분 상의 형광 모이어티의 절단 및 분리, 연장 단계에서 제 1 소광 올리고뉴클레오타이드는 제 1 태그 부분에 하이브리드화되어 남아있음, 및

(ii) 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 어닐링 부분 상의 제 3 소광제 모이어티로부터 제 2 태그 부분 상의 형광 모이어티의 절단 및 분리, 연장 단계에서 제 2 소광 올리고뉴클레오타이드는 제 2 태그 부분에 하이브리드화되어 남아있음;

(c) 제 1 소광 올리고뉴클레오타이드가 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브로부터의 제 1 태그 부분에 하이브리드화되지 않고 제 2 소광 올리고뉴클레오타이드가 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브로부터의 제 2 태그 부분에 하이브리드화되어 남아있는 제 1 온도로 온도를 상승시키는 단계;

(d) 제 1 온도에서 형광 신호를 측정하는 단계;

(e) 제 2 소광 올리고뉴클레오타이드가 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브로부터의 제 2 태그 부분에 하이브리드화되지 않는 제 1 온도보다 높은 제 2 온도로 온도를 상승시키는 단계;

(f) 제 2 온도에서 형광 신호를 측정하는 단계;

(g) 제 2 온도에서 검출된 형광 신호로부터 제 1 온도에서 검출된 형광 신호를 감산함으로써 계산된 신호 값을 얻는 단계;

(h) 제 1 및 제 2 표적 핵산 서열로부터 원하는 양의 증폭 산물을 생산하기 위해 복합 PCR 사이클에서 단계 (b) 내지 (g) 를 반복하는 단계;

(i) 복합 PCR 사이클로부터의 제 1 온도에서 검출된 형광 신호로부터 제 1 표적 핵산 서열의 존재 및 복합 PCR 사이클로부터의 계산된 신호 값으로부터 제 2 표적 핵산 서열의 존재를 결정하는 단계.

## 청구항 15

제 14 항에 있어서, 제 1 태그 부분은 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 어닐링 부분의 3' 말단에 부착되고, 제 2 태그 부분은 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 어닐링 부분의 3' 말단에 부착되는, 샘플 내 2

개 이상의 표적 핵산 서열의 검출 방법.

#### 청구항 16

제 14 항 또는 제 15 항에 있어서, 제 1 태그 부분은 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 어닐링 부분의 5' 말단에 부착되고, 제 2 태그 부분은 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 어닐링 부분의 5' 말단에 부착되는, 샘플 내 2 개 이상의 표적 핵산 서열의 검출 방법.

#### 청구항 17

제 14 항 또는 제 15 항에 있어서, 제 1 소광 올리고뉴클레오타이드가 스템-루프 구조를 통해 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 태그 부분에 연결되는, 샘플 내 2 개 이상의 표적 핵산 서열의 검출 방법.

#### 청구항 18

제 14 항 또는 제 15 항에 있어서, 제 2 소광 올리고뉴클레오타이드가 스템-루프 구조를 통해 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 태그 부분에 연결되는, 샘플 내 2 개 이상의 표적 핵산 서열의 검출 방법.

#### 청구항 19

제 14 항 또는 제 15 항에 있어서, 제 1 태그 부분 및 제 2 태그 부분 모두가 양쪽 태그 부분이 핵산 폴리머라아제에 의해 연장될 수 없게 하는 변형을 포함하는, 샘플 내 2 개 이상의 표적 핵산 서열의 검출 방법.

#### 청구항 20

제 14 항 또는 제 15 항에 있어서, 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 태그 부분 또는 제 1 소광 올리고뉴클레오타이드 또는 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 태그 부분 또는 제 2 소광 올리고뉴클레오타이드 중 임의의 것 또는 이들의 임의의 조합이 하나 이상의 뉴클레오타이드 변형을 함유하는, 샘플 내 2 개 이상의 표적 핵산 서열의 검출 방법.

#### 청구항 21

제 20 항에 있어서, 하나 이상의 뉴클레오타이드 변형이 잠긴 핵산 (LNA), 펩티드 핵산 (PNA), 가교 핵산 (BNA), 2'-O 알킬 치환, L-거울상이성질체 뉴클레오타이드, 또는 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 샘플 내 2 개 이상의 표적 핵산 서열의 검출 방법.

#### 청구항 22

삭제

#### 청구항 23

삭제

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 폴리머라아제 연쇄 반응 (PCR) 방법, 특히 멀티플렉스 실시간 PCR 수행 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 폴리머라아제 연쇄 반응 (PCR) 은 생물학적인 연구, 질환 모니터링 및 진단의 유비쿼터스 도구가 되어 왔다.

PCR 에 의한 핵산 서열의 증폭은 미국 특허 번호 제 4,683,195 호, 제 4,683,202 호, 및 제 4,965,188 호에 기재되어 있다. PCR 은 현재 당업계에 잘 알려져 있고, 학술 문헌에 폭넓게 기재되어 있다. PCR Applications, ((1999) Innis et al., eds., Academic Press, San Diego), PCR Strategies, ((1995) Innis et al., eds., Academic Press, San Diego); PCR Protocols, ((1990) Innis et al., eds., Academic Press, San Diego), 및 PCR Technology, ((1989) Erlich, ed., Stockton Press, New York) 을 참고한다. "실시간" PCR 어세이는 표적 서열의 시작 양의 증폭 및 검출 및 정량화를 동시에 할 수 있다. DNA 폴리머라아제의 5'-to-3' 뉴클레아제 활성을 사용하는 기본 TaqMan 실시간 PCR 어세이는 Holland et al., (1991) Proc. Natl.

Acad. Sci. 88:7276-7280 및 미국 특허 번호 제 5,210,015 호에 기재되어 있다. 뉴클레아제 활성이 없는 실시간 PCR (무-뉴클레아제 어세이) 은 2008 년 12 월 9 일에 출원된 미국 출원 일련 번호 제 12/330,694 호에 기재되어 있다. 실시간 PCR 에서 형광 프로브의 사용은 미국 특허 번호 제 5,538,848 호에 기재되어 있다.

[0003] 형광 프로브를 이용하는 전형적인 실시간 PCR 프로토콜은 각각의 표적 서열에 특이적인, 라벨링된 프로브의 사용을 수반한다. 프로브는 바람직하게는 하나 이상의 형광 모이어티로 라벨링되는데, 이것은 특정 과정에서 빛을 흡수하고 방출한다. 표적 서열 또는 그의 앰플리콘에 대한 하이브리드화될 때, 프로브는 프로브 하이브리드화 또는 가수분해의 결과로서 형광 방출에서의 검출가능한 변화를 나타낸다.

[0004] 그러나 실시간 어세이의 주요한 과제는 단일 튜브에서 수많은 표적을 분석하는 능력으로 남아있다. 의학 및 진단 분야의 사실상 모든 분야에서, 관심 유전자좌의 수는 빠르게 증가한다. 예를 들어, 몇가지를 언급하자면, 범의학적 DNA 프로파일링, 병원성 미생물 검출, 다중-유전자좌 유전 질환 스크리닝 및 다중-유전자좌 발현 연구에서 복합 유전자좌를 분석해야 한다.

[0005] 대부분의 현행 방법으로는, 어세이의 멀티플렉스 능력은 검출 기구에 의해 제한된다. 구체적으로, 동일한 반응에서 복합 프로브의 사용은 별개의 형광 라벨의 사용을 필요로 한다. 복합 프로브를 동시에 검출하기 위해, 기구가 각각의 프로브에서 방출되는 빛 신호를 구별할 수 있어야 한다. 시판되는 대부분의 현행 기술은 동일한 반응 용기에서 4 내지 7 개 이상의 분리된 파장의 탐지를 허용하지 않는다. 그러므로, 표적 당 하나의 고유하게 라벨링된 프로브를 사용하면, 동일한 용기에서 4 내지 7 개 이상의 개별 표적을 탐지할 수 없다. 실제로, 적어도 하나의 표적은 일반적으로 대조 핵산이다. 따라서, 실제로, 동일한 튜브 내에서 3 내지 6 개 이상의 실험 표적을 검출할 수 없다. 형광 염료의 사용은 또한 약 6 개 또는 7 개의 염료 만이 상당한 중첩간섭 없이 가시 스펙트럼 내에 들어갈 수 있는 스펙트럼 폭으로 인해 제한적이다. 따라서 증폭 및 검출 전략에 급진적인 변화가 없는 한, 어세이의 멀티플렉스 능력은 임상적 필요를 따라 가지 못할 것이다.

[0006] 부가적인 실시간 증폭 반응의 멀티플렉스 능력은 포스트-PCR 용융 어세이에 의해 제공된다. 2006 년 6 월 23 일자로 출원된, 미국 특허 출원 일련 번호 제 11/474,071 호를 참고한다. 용융 어세이에서, 증폭된 핵산은 독특한 용융 프로파일에 의해 확인된다. 용융 어세이는 이중-가닥 표적, 또는 라벨링된 프로브와 표적 사이의 이중체의 용융 온도 (용융점) 를 측정하는 것을 포함한다. 미국 특허 번호 제 5,871,908 호에 기재된 바와 같이, 형광 라벨링된 프로브를 사용하여 용융 온도를 결정하기 위해, 표적 핵산과 프로브 사이의 이중체를 제어된 온도 프로그램에서 서서히 가열 (또는 냉각) 한다. 이중체의 해리는 상호작용하는 형광단 사이 또는 형광단과 소광제 사이의 거리를 변화시킨다. 상호작용하는 형광단은 미국 특허 번호 제 6,174,670 호에 기재된 바와 같이, 개별 프로브 분자에 콘쥬게이션될 수 있다. 대안적으로, 미국 특허 번호 제 5,871,908 호에 기재된 바와 같이, 하나의 형광단은 프로브에 콘쥬게이션될 수 있지만, 다른 형광단은 핵산 이중체 내에 끼어들어갈 수 있다. 또 다른 대안으로서, 형광단은 단일 프로브 올리고뉴클레오타이드에 콘쥬게이션될 수 있다. 이중체가 용융될 때, 소광제에 대한 형광단이 이제 단일-가닥 프로브와 함께 모이면서 형광이 소광된다.

[0007] 핵산 이중체의 용융은 형광의 연관된 변화를 측정함으로써 모니터링된다. 형광의 변화는 "용융 프로파일" 이라고 불리는 그래프 상에 나타낼 수 있다. 상이한 프로브-표적 이중체가 상이한 온도에서 용융 (또는 재-어닐링) 되도록 디자인될 수 있기 때문에, 각각의 프로브는 고유한 용융 프로파일을 생성할 것이다. 적절히 디자인된 프로브는 동일한 어세이에서 프로브를 다른 프로브와 명확하게 구별할 수 있는 용융 온도를 가질 것이다. 많은 기존의 소프트웨어 도구를 사용하면 이러한 목표를 염두에 두고 동일-튜브 멀티플렉스 어세이를 위한 프로브를 디자인할 수 있다. 예를 들어, Visual OMP™ 소프트웨어 (DNA Software, Inc., Ann Arbor, Mich.) 는 다양한 반응 조건 하에서 핵산 이중체의 용융 온도를 결정할 수 있게 한다.

[0008] 색상 검출 및 후속 포스트-증폭 용융 어세이를 사용하는 멀티플렉스 PCR 방법은 미국 특허 번호 제 6,472,156 호에 기재되어 있다. 그러한 방법에 의해 검출가능한 표적의 수는 검출가능한 파장의 수와 구별가능한 용융 프로파일의 수의 곱이다. 따라서 색상 검출에 용융 어세이를 추가하는 것은 복합 표적을 탐지하는 능력에서 한 단계 앞선 것이다.

[0009] 포스트-증폭 용융 어세이는 정량 목적, 즉 표적 핵산을 확인하는데 가장 일반적으로 사용되며, 미국 특허 번호 제 6,174,670 호, 제 6,427,156 호 및 제 5,871,908 호를 참조한다. 용융 곡선 함수를 미분하여 용융 피크를 얻는 것이 알려져 있다. Ririe et al. ("Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction" (1997) Anal. Biochem. 245:154-160) 는 분화가 생성물의 혼합물에 의



해 생성된 용융 곡선을 분해하는데 도움이 된다는 것을 관찰했다. 분화 후, 혼합물의 각 성분에 의해 생성된 용융 피크는 쉽게 구별할 수 있게 된다. 또한 포스트-증폭 용융 신호, 즉 용융 피크가 샘플 내의 핵산의 양에 비례하여 더 높다는 것도 이전에 알려졌다. 예를 들어, 미국 특허 번호 제 6,245,514 호는 이중체-개입 염료를 사용하여 유도체 융합 피크를 생성하고, 이후, 독점 소프트웨어를 사용하여 피크를 통합하는 포스트-증폭 용융 어세이를 고시한다. 통합은 증폭 효율 및 증폭된 핵산의 상대량에 대한 정보를 제공한다.

[0010] 실제로, 정성 어세이를 넘어 이동하고 동일한 샘플에서 복합 표적을 정량화할 수 있는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어 Sparano et al. "Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials" J. Clin. Oncol. (2008) 26(5):721-728] 를 참고한다. 표적의 양을 정량화하는 능력은 환자의 혈청에서의 바이러스 부하의 측정, 약물 요법에 대한 반응으로 유전자의 발현 수준 측정 또는 요법에 대한 종양의 반응을 예측하기 위한 종양의 분자적 특징의 결정과 같은 임상 적용에 유용하다.

[0011] 실시간 PCR 어세이에서, 라벨링된 프로브에 의해 생성된 신호는 입력 표적 핵산의 양을 추정하는데 사용될 수 있다. 입력값이 클수록, 더 빨리 형광 신호가 소정의 임계 값 (Ct) 을 넘어설 것이다. 그러므로, 샘플을 서로 또는 핵산의 알려진 양을 가진 대조군 샘플과 비교함으로써 표적 핵산의 상대량 또는 절대량을 결정할 수 있다. 그러나, 기존의 방법은 복합 표적을 동시에 정량화할 수 있는 능력이 제한된다. 복합 표적의 정성적 검출과 마찬가지로, 제한 요소는 스펙트럼으로 분해 가능한 형광단의 이용가능성이다. 상기 설명한 것처럼, 최첨단 형광 라벨 기술은 동일한 튜브에서 6 개 또는 7 개 초과와 개별 형광 라벨링된 프로브로부터 구별되는 신호를 얻을 수 없다. 그러므로 실시간 PCR 동안 수많은 핵산 표적의 증폭 및 검출을 허용하기 위해서는 근본적으로 다른 실험적 접근법이 필요하다.

[0012] 표적 핵산을 검출하는 많은 방법이 알려져 있다. 현재 이용가능한 핵산 검출을 위한 동종 어세이에는 TaqMan®, Amplifluor®, 염료-결합, 대립형질-선택적 동역학 PCR 및 Scorpion® 프라이머 어세이가 포함된다. 이러한 어세이 절차는 검출하고자 하는 각각의 표적 핵산에 대해 상이한 염료에 대한 필요성 때문에 쉽게 멀티플렉스되지 않으며, 따라서 개선 가능성이 제한적이다. 이러한 한계를 극복하기 위해, 몇몇 최근의 연구는 쉽게 분리되고 검출될 수 있는 절단가능한 "태그" 부분을 함유하는 올리고뉴클레오타이드 프로브의 사용을 개시하고 있다 (예를 들어, Chenna et al, 미국 특허 출원 공개 번호 2005/0053939; Van Den Boom, 미국 특허 번호 제 8,133,701 호 참고). 보다 최근에는, 구조 기반 올리고뉴클레오타이드 프로브 절단을 사용하여 핵산 표적 식별을 멀티플렉스 수행하는 개선된 방법이 미국 특허 출원 공개 번호 제 2014/0272955 호, 제 2015/0176075 호 및 제 2015/0376681 호에 기재되어 있다. 소위 PTO 절단 및 신장 어세이에서 "올리고뉴클레오타이드 프로브화 및 태그화" (PTO) 및 "올리고뉴클레오타이드 포획 및 주형화" (CTO) 의 조합을 사용하여 DNA 또는 핵산의 혼합물로부터 표적 핵산 서열을 검출하는 추가 방법은 Chun et al. 미국 특허 번호 제 8,809,239 호에 기재되어 있다. 그러나 표적 핵산의 고효율 멀티플렉스 검출을 수행하는 정확한 방법이 여전히 필요하다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

### 과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 핵산 서열 검출, 특히 실시간 PCR 어세이를 이용한 복합 표적 핵산의 검출을 위한 신규한 방법을 제공한다. 본 방법은 두 개의 고유한 특징, 비-상보적 태그 부분 및 소광 분자를 갖는 신규한 올리고뉴클레오타이드 프로브의 사용에 의해 수행된다.

[0014] 따라서 하나의 양상에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 샘플에서 표적 핵산을 증폭 및 검출하는 방법을 제공한다: (a) 단일 반응 용기에서 표적 핵산을 함유하는 샘플을 하기 (i) 및 (ii) 와 접촉시키는 단계 (i) 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머, 각각의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 표적 핵산의 서브서열의 반대 가닥에 하이브리드화될 수 있음; (ii) 어닐링 부분 및 태그 부분을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 프로브, 태그 부분은 표적 핵산 서열에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열 또는 비-뉴클레오타이드 분자를 포함하고, 어닐링 부분은 표적 핵산 서열에 적어도 부분적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고 올리고 뉴클레오타이드 프라이머 쌍에 의해 결합된 표적 핵산의 서브서열의 영역에 하이브리드화되고, 프로브는 태그 부분 또는 어닐링 부분 상에 위치하는 리포터 모이어티 및 어닐링 부분 상에 위치한 제 1 소광제 모이어티를 포함하는 상호작용 이중 라벨을 추가로 포함하고, 리포터 모이어티는 뉴클레아제 민감성 절단 부위에 의해 제 1 소광제 모이어티로부터 분리되고;

태그 부분은 소광 분자가 태그 부분에 결합될 때 리포터 모이어티를 소광시킬 수 있는 하나 이상의 소광제 모이어티를 포함하거나 또는 이와 연관되는 소광 분자에 온도-의존적 방식으로 가역적으로 결합됨; (b) 각각의 PCR 사이클의 연장 단계 동안, 폴리머라아제의 뉴클레아제 활성이 프로브의 어닐링 부분 상의 제 1 소광 모이어티로부터 리포터 모이어티의 절단 및 분리를 허용하도록 5' to 3' 뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제를 사용하는 PCR 에 의해 표적 핵산을 증폭시키는 단계; (c) 소광 분자가 태그 부분에 결합되는 제 1 온도에서 리포터 모이어티로부터 억제된 신호를 측정하는 단계; (d) 온도를 소광 분자가 태그 부분에 결합되지 않는 제 2 온도로 상승시키는 단계; (e) 제 2 온도에서 리포터 모이어티로부터의 온도 보정된 신호를 측정하는 단계; (f) 제 2 온도에서 검출된 온도 보정된 신호로부터 제 1 온도에서 검출된 억제된 신호를 감산함으로써 계산된 신호 값을 얻는 단계; (g) 복합 PCR 사이클을 통해 단계 (b) 내지 단계 (f) 를 반복하는 단계; (h) 표적 핵산의 존재를 검출하기 위해 복합 PCR 사이클로부터 계산된 신호 값을 측정하는 단계.

[0015] 하나의 구현예에서, 태그 부분은 핵산 폴리머라아제에 의해 연장될 수 없게 하는 변형을 포함한다. 하나의 구현예에서, 리포터 모이어티는 올리고뉴클레오타이드 프로브의 태그 부분 상에 있다. 또다른 구현예에서, 리포터 모이어티는 올리고뉴클레오타이드 프로브의 어닐링 부분 상에 위치하고, 온도-의존적 방식으로 제 2 소광제 모이어티를 포함하는 소광 분자와 상호작용할 수 있다. 하나의 구현예에서, 태그 부분은 표적 핵산 서열에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 소광 분자는 올리고뉴클레오타이드 프로브의 태그 부분에 적어도 부분적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드이며, 하이브리드화에 의해 태그 부분에 결합한다. 또다른 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 프로브의 태그 부분 또는 소광 분자 또는 태그 부분 및 소광 분자 모두는 하나 이상의 뉴클레오타이드 변형을 함유한다. 또다른 구현예에서, 하나 이상의 뉴클레오타이드 변형은 잠긴 핵산 (LNA), 펩티드 핵산 (PNA), 가교 핵산 (BNA), 2'-O 알킬 치환, L-거울상이성질체 뉴클레오타이드, 또는 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 하나의 구현예에서, 리포터 모이어티는 형광 염료이고, 소광제 모이어티는 형광 염료로부터의 검출가능한 신호를 소광시킨다.

[0016] 또다른 양상에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 샘플에서 2 개 이상의 표적 핵산 서열을 검출하는 방법을 제공한다: (a) 단일 이상의 반응 용기에서 2 개 이상의 표적 핵산 서열을 함유하는 것으로 의심되는 샘플을 하기 (i) ~ (iv) 와 접촉시키는 단계 (i) 제 1 표적 핵산 서열의 각각의 가닥에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 제 1 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍, 및 제 2 표적 핵산 서열의 각각의 가닥에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 제 2 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍; (ii) 제 1 표적 핵산 서열과 적어도 부분적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고 제 1 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍에 의해 결합된 제 1 표적 핵산 서열 내에서 어닐링하는 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브, 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브는 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 형광 모이어티 및 형광 모이어티에 의해 생성된 검출가능한 신호를 소광시킬 수 있는 제 1 소광제 모이어티를 포함하고, 형광 모이어티는 뉴클레아제 민감성 절단 부위에 의해 제 1 소광 모이어티에서 분리됨; (iii) 2 개의 구별되는 부분: 제 2 표적 핵산 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고 제 2 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍에 의해 결합된 제 2 표적 핵산 서열 내에서 어닐링하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 어닐링 부분 (어닐링 부분은 제 2 소광제 모이어티를 포함함); 및 어닐링 부분의 5' 말단 또는 3' 말단에 부착되거나 또는 어닐링 부분의 영역에 링커를 통해 부착되고 2 개 이상의 표적 핵산 서열에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 태그 부분 (태그 부분은 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브 상의 형광 모이어티와 동일한 형광 모이어티를 포함하고, 이의 검출가능한 신호는 어닐링 부분 상의 제 2 소광제 모이어티에 의해 소광될 수 있고, 형광 모이어티는 제 2 소광 모이어티로부터 뉴클레아제 민감성 절단 부위에 의해 분리됨) 을 포함하는 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브; (iv) 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 태그 부분에 적어도 부분적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 태그 부분에 하이브리드화되어 이중체를 형성하는 소광 올리고뉴클레오타이드, 소광 올리고뉴클레오타이드는 소광 올리고뉴클레오타이드가 태그 부분에 하이브리드화될 때 태그 부분 상의 형광 모이어티에 의해 발생되는 검출가능한 신호를 소광시키는 제 3 소광제 모이어티를 포함함; (b) 각각의 PCR 사이클의 연장 단계 동안, 핵산 폴리머라아제의 5' to 3' 뉴클레아제 활성이 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브 상의 제 1 소광 모이어티로부터 형광 모이어티의 절단 및 분리, 및 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 어닐링 부분 상의 제 2 소광 모이어티로부터의 태그 부분 상의 형광 모이어티의 절단 및 분리를 허용하도록 5' to 3' 뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제를 사용하는 폴리머라아제 연쇄 반응 (PCR) 에 의해 제 1 및 제 2 표적 핵산 서열을 증폭시키는 단계, 연장 단계에서 소광 올리고뉴클레오타이드는 태그 부분에 하이브리드화되어 남아있음; (c) 소광 올리고뉴클레오타이드가 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브로부터의 태그 부분에 하이브리드화되는 제 1 온도에서 형광 신호를 측정하는 단계; (d) 소광 올리고뉴클레오타이드가 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브로부터의 태그 부분에 하이브리드화되지 않는 제 1 온도보다 높은 제 2 온도로 온도를 상승시키는 단계; (e) 제 2 온도에서 형광 신호를 측정하는 단계; (f) 제 2 온도에서 검출된 형광 신호로부터 제 1 온도에서 검출된 형광 신호를 감산함으로써 계산된

신호 값을 얻는 단계; (g) 제 1 및 제 2 표적 핵산 서열로부터 원하는 양의 증폭 산물을 생산하기 위해 복합 PCR 사이클에서 단계 (b) 내지 (f) 를 반복하는 단계; (h) 복합 PCR 사이클로부터의 제 1 온도에서 검출된 형광 신호로부터 제 1 표적 핵산 서열의 존재 및 복합 PCR 사이클로부터의 계산된 신호 값으로부터 제 2 표적 핵산 서열의 존재를 결정하는 단계.

[0017] 하나의 구현예에서, 태그 부분은 핵산 폴리머라아제에 의해 연장될 수 없게 하는 변형을 포함한다. 또다른 구현예에서, 태그 부분은 어닐링 부분의 5' 말단에 부착된다. 또다른 구현예에서, 태그 부분은 어닐링 부분의 3' 말단에 부착된다. 또다른 구현예에서, 태그 부분은 링커를 통해 어닐링 부분의 영역에 부착된다. 또다른 구현예에서, 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 태그 부분 또는 소광 올리고뉴클레오타이드 또는 태그 부분과 소광 올리고뉴클레오타이드 둘 모두는 하나 이상의 뉴클레오타이드 변형을 함유한다. 또다른 구현예에서, 하나 이상의 뉴클레오타이드 변형은 잠긴 핵산 (LNA), 펩티드 핵산 (PNA), 가교 핵산 (BNA), 2'-O 알킬 치환, L-거울상이성질체 뉴클레오타이드, 또는 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0018] 또다른 양상에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 샘플에서 2 개 이상의 표적 핵산 서열을 검출하는 방법을 제공한다: (a) 단일 반응 용기에서 2 개 이상의 표적 핵산 서열을 함유하는 것으로 의심되는 샘플을 하기 (i) ~ (v) 와 접촉시키는 단계 (i) 제 1 표적 핵산 서열의 각각의 가닥에 상보적인 서열을 갖는 제 1 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍, 및 제 2 표적 핵산 서열의 각각의 가닥에 상보적인 서열을 갖는 제 2 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍; (ii) 2 개의 구별되는 부분: 제 1 표적 핵산 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고 제 1 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍에 의해 결합된 제 1 표적 핵산 서열 내에서 어닐링하는 서열을 포함하는 제 1 어닐링 부분 (제 1 어닐링 부분은 제 1 소광제 모이어티를 포함함); 및 제 1 어닐링 부분의 5' 말단 또는 3' 말단에 부착되거나 또는 제 1 어닐링 부분의 영역에 링커를 통해 부착되고 2 개 이상의 표적 핵산에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제 1 태그 부분 (제 1 태그 부분은 검출가능한 신호가 제 1 어닐링 부분 상의 제 1 소광제 모이어티에 의해 소광될 수 있는 형광 모이어티를 포함하고, 형광 모이어티는 제 1 소광 모이어티로부터 뉴클레아제 민감성 절단 부위에 의해 분리됨) 을 포함하는 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브; (iii) 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 태그 부분에 적어도 부분적으로 상보적인 서열을 포함하고, 제 1 태그 부분에 하이브리드되어 이중체를 형성하는 제 1 소광 올리고뉴클레오타이드, 제 1 소광 올리고뉴클레오타이드는 제 1 소광 올리고뉴클레오타이드가 제 1 태그 부분에 하이브리드화될 때 제 1 태그 부분 상의 형광 모이어티에 의해 발생하는 검출가능한 신호를 소광시키는 제 2 소광제 모이어티를 포함함; (iv) 2 개의 구별되는 부분: 제 2 표적 핵산 서열에 적어도 부분적으로 상보적이고 제 2 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍에 의해 결합된 제 2 표적 핵산 서열 내에서 어닐링하는 서열을 포함하는 제 2 어닐링 부분 (제 2 어닐링 부분은 제 3 소광제 모이어티를 포함함); 및 제 2 어닐링 부분의 5' 말단 또는 3' 말단에 부착되거나 또는 제 2 어닐링 부분의 영역에 링커를 통해 부착되고 2 개 이상의 표적 핵산에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 태그 부분의 뉴클레오타이드 서열과 비교하여 상이한 핵산 서열 또는 상이한 뉴클레오타이드 변형을 갖는 제 2 태그 부분 (제 2 태그 부분은 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브 상의 형광 모이어티와 동일한 형광 모이어티를 포함하고, 이의 검출가능한 신호는 제 2 어닐링 부분 상의 제 3 소광제 모이어티에 의해 소광될 수 있고, 형광 모이어티는 제 3 소광 모이어티로부터 뉴클레아제 민감성 절단 부위에 의해 분리됨) 을 포함하는 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브; (v) 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 태그 부분에 적어도 부분적으로 상보적인 서열을 포함하고 제 2 태그 부분에 하이브리드화하여 이중체를 형성하는 제 2 소광 올리고 뉴클레오타이드, 제 2 소광 올리고뉴클레오타이드는 제 2 소광 올리고뉴클레오타이드가 제 2 태그 부분에 하이브리드화될 때 제 2 태그 부분 상의 형광 모이어티에 의해 생성된 검출가능한 신호를 소광시키는 제 4 소광 모이어티를 포함하고; 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 소광 올리고뉴클레오타이드와 제 2 태그 부분 사이의 이중체는 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 소광 올리고뉴클레오타이드와 제 1 태그 부분 사이의 이중체보다 높은 용융 온도 ( $T_m$ ) 값을 가짐; (b) 각각의 PCR 사이클의 연장 단계 동안, 핵산 폴리머라아제의 5' to 3' 뉴클레아제 활성이 하기 (i) 및 (ii) 를 가능하게 하도록 5' to 3' 뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제를 사용하는 폴리머라아제 연쇄 반응 (PCR) 에 의해 제 1 및 제 2 표적 핵산 서열을 증폭시키는 단계; (i) 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 어닐링 부분 상의 제 1 소광 모이어티로부터 제 1 태그 부분 상의 형광 모이어티의 절단 및 분리 단계, 연장 단계에서 제 1 소광 올리고뉴클레오타이드는 제 1 태그 부분에 하이브리드화되어 남아있음, 및 (ii) 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 어닐링 부분 상의 제 3 소광 모이어티로부터 제 2 태그 부분 상의 형광 모이어티의 절단 및 분리 단계, 연장 단계에서 제 2 소광 올리고뉴클레오타이드는 제 2 태그 부분에 하이브리드화되어 남아있음; (c) 제 1 소광 올리고뉴클레오타이드가 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브로부터 제 1 태그 부분에 하이브리드화되지 않고 제 2 소광 올리고뉴클레오타이드가 제 2 올리고 뉴클레오타이드 프로브로부터 제 2 태그 부분에 하이브리드화되어 남아있는 제 1 온도로 온도를 상승시키는 단계; (d) 제 1 온도에서 형광 신호를 측정하는 단계; (e)



제 2 소광 올리고뉴클레오타이드가 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브로부터의 제 2 태그 부분에 하이브리드화되지 않는 제 2 온도로 온도를 상승시키는 단계; (f) 제 2 온도에서 형광 신호를 측정하는 단계; (g) 제 2 온도에서 검출된 형광 신호로부터 제 1 온도에서 검출된 형광 신호를 감산함으로써 계산된 신호 값을 얻는 단계; (h) 제 1 및 제 2 표적 핵산 서열로부터 원하는 양의 증폭 산물을 생산하기 위해 다중 PCR 사이클에서 단계 (b) 내지 (g) 를 반복하는 단계; (I) 복합 PCR 사이클로부터의 제 1 온도에서 검출된 형광 신호로부터 제 1 표적 핵산 서열의 존재 및 복합 PCR 사이클로부터의 계산된 신호 값으로부터 제 2 표적 핵산 서열의 존재를 결정하는 단계.

[0019] 하나의 구현예에서, 제 1 태그 부분 및 제 2 태그 부분 모두는 양쪽 태그 부분이 핵산 폴리머라아제에 의해 연장될 수 없게 하는 변형을 포함한다.

[0020] 하나의 구현예에서, 제 1 태그 부분은 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 어닐링 부분의 3' 말단에 부착되고, 제 2 태그 부분은 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 어닐링 부분의 3' 말단에 부착된다. 또다른 구현예에서, 제 1 태그 부분은 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 어닐링 부분의 3' 말단에 부착되고, 제 2 태그 부분은 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 어닐링 부분의 5' 말단에 부착된다. 또다른 구현예에서, 제 1 태그 부분은 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 어닐링 부분의 3' 말단에 부착되고, 제 2 태그 부분은 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 어닐링 부분의 영역에 링커를 통해 부착된다.

[0021] 하나의 구현예에서, 제 1 태그 부분은 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 어닐링 부분의 5' 말단에 부착되고, 제 2 태그 부분은 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 어닐링 부분의 5' 말단에 부착된다. 또다른 구현예에서, 제 1 태그 부분은 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 어닐링 부분의 5' 말단에 부착되고, 제 2 태그 부분은 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 어닐링 부분의 3' 말단에 부착된다. 또다른 구현예에서, 제 1 태그 부분은 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 어닐링 부분의 5' 말단에 부착되고, 제 2 태그 부분은 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 어닐링 부분의 영역에 링커를 통해 부착된다.

[0022] 하나의 구현예에서, 제 1 태그 부분은 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 어닐링 부분의 영역에 링커를 통해 부착되고, 제 2 태그 부분은 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 어닐링 부분의 5' 말단에 부착된다. 또다른 구현예에서, 제 1 태그 부분은 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 어닐링 부분의 영역에 링커를 통해 부착되고, 제 2 태그 부분은 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 어닐링 부분의 3' 말단에 부착된다. 또다른 구현예에서, 제 1 태그 부분은 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 1 어닐링 부분의 영역에 링커를 통해 부착되고, 제 2 태그 부분은 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 어닐링 부분의 영역에 링커를 통해 부착된다.

[0023] 하나의 구현예에서, 제 1 올리고뉴클레오타이드 프로브 또는 제 1 소광 올리고뉴클레오타이드의 제 1 태그 부분 또는 제 2 올리고뉴클레오타이드 프로브 또는 제 2 소광 올리고뉴클레오타이드의 제 2 태그 부분 중 임의의 것 또는 이들의 임의의 조합은 하나 이상의 뉴클레오타이드 변형을 함유한다. 하나의 구현예에서, 하나 이상의 뉴클레오타이드 변형은 잠긴 핵산 (LNA), 펩티드 핵산 (PNA), 가교 핵산 (BNA), 2'-O 알킬 치환, L-거울상이성질체 뉴클레오타이드, 또는 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 또다른 양상에서, 본 발명은 하기를 포함하는, 샘플에서 2 개 이상의 표적 핵산 서열을 검출하는 키트를 제공한다: (a) 2 개 이상의 표적 핵산 서열의 각각의 가닥에 상보적인 서열을 갖는 2 개 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍; (b) 2 개의 구별되는 부분: 1 개 초과 표적 핵산 서열 중 하나에 적어도 부분적으로 상보적이고 1 개 초과 표적 핵산 서열 중 하나 내에서 어닐링하는 서열을 포함하는 어닐링 부분 (어닐링 부분은 제 1 소광제 모이어티를 포함함); 및 제 1 어닐링 부분의 5' 말단 또는 3' 말단에 부착되거나 또는 어닐링 부분의 영역에 링커를 통해 부착되고 1 개 초과 표적 핵산 서열에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 태그 부분 (태그 부분은 검출가능한 신호가 어닐링 부분 상의 제 1 소광제 모이어티에 의해 소광될 수 있는 형광 모이어티를 포함하고, 상기 형광 모이어티는 제 1 소광 모이어티로부터 뉴클레아제 민감성 절단 부위에 의해 분리됨) 을 포함하는 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프로브; (c) 올리고뉴클레오타이드 프로브의 태그 부분에 적어도 부분적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 태그 부분에 하이브리드화되어 이중체를 형성하는 적어도 하나의 소광 올리고뉴클레오타이드, 소광 올리고뉴클레오타이드는 소광 올리고뉴클레오타이드가 태그 부분에 하이브리드화될 때 태그 부분 상의 형광 모이어티에 의해 발생하는 검출가능한 신호를 소광시키는 제 3 소광제 모이어티를 포함함. 하나의 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 프로브의 태그 부분 또는 소광 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 소광 올리고뉴클레오타이드의 태그 부분 모두는 하나 이상의 뉴클레오타이드 변형을 함유하고, 하나 이상의 뉴클레오타이드 변형은 잠긴 핵산 (LNA), 펩티드 핵산 (PNA), 가교 핵산 (BNA), 2'-O 알킬 치환, L-거울상이성질체 뉴클레오타이드 또는 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

## 도면의 간단한 설명

[0024]

도 1 은 본 발명의 방법을 수행하는데 사용된 올리고뉴클레오타이드 프로브의 하나의 구현예의 그래프이다.

도 2 는 소광 올리고뉴클레오타이드의 태그 부분의 분리 및 후속 해리를 나타내는 본 발명의 방법의 그래프이다.

도 3 은 본 발명의 방법의 하나의 구현예의 설명이다.

도 4 는 본 발명의 방법의 또다른 구현예를 사용하는 신호 검출 온도를 나타낸다.

도 5 는 본 발명의 방법을 실시하기 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드 프로브의 상이한 구현예를 나타낸다.

도 6 은 실시예 1 에서 기술된 바와 같이 소광 올리고뉴클레오타이드와 형광 라벨링된 상보적 올리고뉴클레오타이드 사이의 2 가지 온도에서 하이브리드화 및 해리의 결과를 나타낸다.

도 7 은 표준 TaqMan® 프로브 G0 를 사용하는 0, 100, 1,000 또는 10,000 cp/rxn 에서의 내부 대조군 주형 (GIC) 및 58°C 에서의 HIV-1 Group M 주형 (HIM) 의 부재 하에 (도 7A) 또는 10 cp/rxn (도 7B), 100 cp/rxn (도 7C) 및 1,000 cp/rxn 로의 HIM 의 존재 하에 (도 7D) FAM 형광 판독값으로부터 생성된 PCR 성장 곡선을 나타낸다.

도 8 은 상보적 소광 올리고뉴클레오타이드 (Q9) 와 태그된 프로브 (L24) 를 사용하는 0, 10, 100 또는 1,000 cp/rxn 로의 HIM 및 80°C 에서의 GIC 의 부재 하에 (도 8A) 또는 100 cp/rxn (도 8B), 1,000 cp/rxn (도 8C) 및 10,000 cp/rxn 로의 GIC 의 존재 하에 (도 8D) FAM 형광 판독값으로부터 생성된 PCR 성장 곡선을 나타낸다.

도 9 는 GIC 의 부재 하에 (도 9A) 또는 100 cp/rxn (도 9B), 1,000 cp/rxn (도 9C) 및 10,000 cp/rxn 로의 GIC 의 존재 하에 (도 9D) 80°C 형광 신호로부터 감산된 58°C 형광 신호의 84% 를 가짐으로써 생성된 0, 10, 100 또는 1,000 cp/rxn 로의 HIM 으로부터 유도된 성장 곡선을 나타낸다.

도 10A 및 10B 는 내부 대조군 주형 (GIC) 또는 HIV 주형 (HIV), 또는 표준 TaqMan® GIC 프로브 (G0) 및 태그된 HIV 프로브 (L24) 를 상보적 소광 올리고뉴클레오타이드 (Q9) 와 함께 사용하는 GIC 및 HIV 주형 (G+H) 둘 다로부터 생성된 PCR 성장 곡선을 나타낸다 (이때 두 프로브는 FAM (도 10A, 윗줄), HEX (도 10A, 아랫줄), JA270 염료 (도 10B, 윗줄) 또는 Cy5.5 (도 10B, 아랫줄) 로 라벨링됨).

도 11A, 11B 및 11C 는 L24 태그된 프로브가 D-DNA 대신 L-DNA 를 함유하는 실시예 4 에서 기재된 바와 같은 실험의 PCR 성장 곡선을 나타내며, 58°C 에서의 FAM 형광 판독값 (도 11A), 80°C 에서의 FAM 형광 판독값 (도 11B) 및 80°C 형광 신호로부터 감산된 58°C 형광 신호의 84% (도 11C) 이다.

도 12 는 형광 신호 검출을 표준 TaqMan® GIC 프로브 (IC-QF), 2'-OMe 치환으로 변형된 A 및 G 뉴클레오타이드를 갖는 소광 올리고뉴클레오타이드 (Q9-OMe A/G) 가 있는 태그된 HIV 프로브 (L24), 소광 올리고뉴클레오타이드 (Q9-OMe A/G) 로 2'-OMe 치환으로 변형된 (L24-OMe) 모든 뉴클레오타이드를 갖는 태그된 HIV 프로브, 및 2'-OMe 치환으로 변형된 모든 뉴클레오타이드를 갖는 소광 올리고뉴클레오타이드 (Q9-OMe) 가 있는 태그된 HIV 프로브 (L24-OMe) 의 존재 하에 58°C, 75°C, 88°C 또는 97°C 에서 측정된 실시예 5 에 기재된 실험의 PCR 성장 곡선을 나타낸다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025]

정의

[0026]

본 명세서에서 사용되는 용어 "샘플" 은 핵산을 포함하는 표본 또는 배양물 (예를 들어, 미생물 배양물) 을 포함한다. "샘플" 이라는 용어는 또한 생물학적 및 환경적 샘플 모두를 포함하는 것을 의미한다. 샘플에는 합성 기원의 표본이 포함될 수 있다. 생물학적 샘플은 전혈, 혈청, 혈장, 제대혈, 용모막, 양수, 뇌척수액, 척수액, 세척액 (예를 들어, 기관지폐포, 위, 복강, 관, 귀, 관절경), 생검 샘플, 소변, 대변, 객담, 타액, 코점액, 전립선액, 정액, 림프액, 담즙, 눈물, 땀, 모유, 유방액, 배아 세포 및 태아 세포를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 생물학적 샘플은 혈액이고, 보다 바람직하게는 혈장이다. 본원에서 사용된 용어 "혈액" 은 통상적으로 정의된 바와 같이 전혈 또는 혈청 및 혈장과 같은 혈액의 임의의 분획을 포함한다. 혈장이란 항응고제로 처리된 혈액의 원심분리로 산출된 전혈의 분획을 말한다. 혈청이란 혈액 샘플이 응고된 후 남아 있는 유체의 물과 같은 부분을 말한다. 환경적 샘플에는 표면 물질, 토양, 물 및 산업 샘플과 같은 환경적 물질뿐만 아니라 식품 및 유제품 가공 기기, 기구, 장비, 식기류, 일회용 및 비-일회용 품목으로부터 수득된 샘플

플이 포함된다. 이들 예는 본 발명에 적용가능한 샘플 유형을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

- [0027] 본원에 사용된 용어 "표적" 또는 "표적 핵산"은 그의 존재가 검출되거나 측정되어야 하거나 그의 기능, 상호작용 또는 성질이 연구되어야 하는 임의의 분자를 의미하는 것으로 의도된다. 따라서, 표적은 검출가능한 프로브 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드 프로브) 또는 어레이가 존재하는 본질적으로 임의의 분자를 포함하거나, 또는 당업자에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 표적은 검출가능한 프로브 (예를 들어, 항체)와 결합하거나 다르게는 접촉할 수 있는 핵산 분자, 폴리펩티드, 지질 또는 탄수화물과 같은 생물분자일 수 있으며, 검출가능한 프로브는 또한 본 발명의 방법에 의해 검출될 수 있는 핵산을 포함한다. 본원에 사용된, "검출가능한 프로브"는 관심의 표적 생물분자에 하이브리드화 또는 어닐링 할 수 있는 임의의 분자 또는 작용제를 지칭하고, 본원에서 기술된 바와 같은 표적 생물분자의 특이적 검출을 가능하게 한다. 본 발명의 하나의 양상에서, 표적은 핵산이고, 검출가능한 프로브는 올리고뉴클레오타이드이다. 용어 "핵산" 및 "핵산 분자"는 본 개시 내용 전체에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. 용어는 올리고뉴클레오타이드, 올리고, 폴리뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드 (DNA), 게놈 DNA, 미토콘드리아 DNA (mtDNA), 상보적 DNA (cDNA), 박테리아 DNA, 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, RNA, 메세지 RNA (mRNA), 전송 RNA (tRNA), 리보솜 RNA (rRNA), siRNA, 촉매성 RNA, 클론, 플라스미드, M13, P1, 코스미드, 박테리아 인공 염색체 (BAC), 효모 인공 염색체 (YAC), 증폭 핵산, 앰플리콘, PCR 생성물 및 다른 유형의 증폭된 핵산, RNA/DNA 하이브리드 및 폴리아미드 핵산 (PNA)을 말하며, 이들 모두는 단일- 또는 이중-가닥 형태일 수 있으며, 달리 제한되지 않는 한, 자연 발생 뉴클레오타이드 및 이들의 조합물 및/또는 혼합물로서 유사한 방식으로 기능할 수 있는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 포함할 것이다. 따라서, 용어 "뉴클레오타이드"는 폴리핵산 또는 올리고뉴클레오타이드 내에 존재하는 모노포스페이트 단량체 뿐만 아니라 뉴클레오시드 트리, 디 및 모노포스페이트를 포함하는, 자연-발생 및 변형된/비자연-발생 뉴클레오타이드 모두를 말한다. 뉴클레오타이드는 또한 리보; 2'-데옥시; 2',3'-데옥시 뿐만 아니라 당 업계에 널리 공지되어 있는 광대한 배열의 다른 뉴클레오타이드 모방체일 수 있다. 모방체는 3'-O-메틸, 할로겐화 염기 또는 당 치환과 같은 사슬-종결 뉴클레오타이드; 비-당, 알킬 고리 구조를 포함하는 대안적인 당 구조; 이노신을 포함하는 대안적인 염기; 데아자-변형됨; 카이 (chi) 및 프사이 (psi), 링커-변형됨; 질량 라벨-변형됨; 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트, 보라포스포에이트, 아마이드, 에스테르, 에테르를 포함하는 포스포디에스테르 변형 또는 대체; 및 광절단가능 니트로페닐 모이어티와 같은 절단 연결을 포함하는 기본 또는 완전 인터뉴클레오타이드 대체를 포함한다.
- [0028] 표적의 존재 또는 부재는 정량적으로 또는 정성적으로 측정될 수 있다. 표적은 예를 들어 단순 또는 복합 혼합물, 또는 실질적으로 정제된 형태를 비롯한 다양한 상이한 형태로 나타날 수 있다. 예를 들어, 표적은 다른 구성요소를 함유하거나 샘플의 유일한 또는 주요한 구성요소일 수 있는 샘플의 일부일 수 있다. 따라서, 표적은 전체 세포 또는 조직, 세포 또는 조직 추출물, 그의 분획화된 용해물 또는 실질적으로 정제된 분자의 구성성분일 수 있다. 또한 표적은 공지된 또는 미공지된 서열 또는 구조를 가질 수 있다.
- [0029] 용어 "증폭 반응"은 핵산의 표적 서열의 카피를 증식시키는 임의의 시험관 내 수단을 말한다.
- [0030] "증폭"은 증폭을 허용하기에 충분한 조건에 용액을 적용하는 단계를 말한다. 증폭 반응의 구성성분은 예를 들어, 프라이머, 폴리뉴클레오타이드 주형, 폴리머라아제, 뉴클레오타이드, dNTP 등을 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 용어 "증폭"은 전형적으로 표적 핵산 중의 "지수적" 증가를 말한다. 그러나, 본원에서 사용되는 "증폭"은 또한 핵산의 선택 표적 서열의 수의 선형 증가를 말할 수도 있지만, 일회성, 단일 프라이머 연장 단계와는 상이하다.
- [0031] "폴리머라아제 연쇄 반응" 또는 "PCR"은 표적 이중-사슬 DNA의 특정 분절 또는 서브서열이 기하학적 진행으로 증폭되는 방법을 말한다. PCR은 당업자에게 잘 알려져 있다; 예를 들어, 미국 특허 번호 제 4,683,195 호 및 제 4,683,202 호; 및 PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., eds, 1990.
- [0032] 본원에서 사용된 "올리고뉴클레오타이드"는 포스포디에스테르 결합 또는 이의 유사체에 의해 연결된 천연 또는 변형된 뉴클레오시드 단량체의 선형 올리고머를 말한다. 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산에 특이적으로 결합할 수 있는 데옥시리보뉴클레오시드, 리보뉴클레오시드, 그의 아노머 형태, 펩티드 핵산 (PNA) 등을 포함한다. 보통 단량체는 포스포디에스테르 결합 또는 그의 유사체에 의해 연결되어, 몇 개의 단량체 단위, 예를 들어, 3-4 개부터 수십 개의 단량체 단위, 예를 들어, 40-60 개의 크기 범위의 올리고뉴클레오타이드를 형성한다. 올리고뉴클레오타이드가 "ATGCCTG"와 같은 문자 서열에 의해 표시될 때마다, 달리 명시되지 않는 한, 뉴클레오타이드는 왼쪽에서 오른쪽으로 5'-3' 순서이고, "A"는 데옥시아데노신을 의미하고, "C"는 데옥시시티딘을 의미하고, "G"는 데옥시구아노신, "T"는 데옥시티미딘, "U"는 리보뉴클레오시드, 우라실을 나타내는 것으

로 이해될 것이다. 보통 올리고뉴클레오타이드는 4 개의 천연 데옥시뉴클레오타이드를 포함한다; 그러나, 이들은 또한 리보뉴클레오타이드 또는 비-천연 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다. 효소가 활성을 위한 특정 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 기질 요구 조건, 예를 들어, 단일 가닥 DNA, RNA/DNA 이중체 등을 갖는 경우, 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 기질에 대한 적절한 조성의 선택은 당업자의 지식 범위 내에 있다.

[0033] 본 명세서에서 사용된 "올리고뉴클레오타이드 프라이머", 또는 단순히 "프라이머" 는 표적 핵산 주형 상의 서열에 하이브리드화되고 올리고뉴클레오타이드 프로브의 검출을 용이하게 하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 말한다. 본 발명의 증폭 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 핵산 합성의 개시 지점으로서 작용한다. 비-증폭 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 절단제에 의해 절단될 수 있는 구조를 생성하는데 사용될 수 있다. 프라이머는 다양한 길이일 수 있으며 종종 길이가 50 개 뉴클레오타이드 미만, 예를 들어 12-25 개 뉴클레오타이드 길이이다. PCR 에서 사용하기 위한 프라이머의 길이 및 서열은 당업자에게 공지된 원리에 기초하여 디자인될 수 있다.

[0034] 본원에서 사용된 용어 "올리고뉴클레오타이드 프로브" 는 관심의 표적 핵산에 하이브리드화 또는 어닐링 할 수 있고 표적 핵산의 특이적 검출을 가능하게 하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 말한다.

[0035] "리포터 모이어티" 또는 "리포터 분자" 는 검출가능한 신호를 부여하는 분자이다. 검출가능한 표현형은 예를 들어 비색계, 형광성 또는 발광성일 수 있다. "소광제 모이어티" 또는 "소광제 분자" 는 리포터 모이어티로부터 검출가능한 신호를 소광시킬 수 있는 분자이다.

[0036] "미스매치된 뉴클레오타이드" 또는 "미스매치" 는 그 위치(들) 에서 표적 서열과 상보적이지 않은 뉴클레오타이드를 말한다. 올리고뉴클레오타이드 프로브는 적어도 하나의 미스매치를 가질 수 있지만, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 개 이상의 미스매치된 뉴클레오타이드를 또한 가질 수 있다.

[0037] 본원에서 사용된 용어 "다형성" 은 대립형질 변이체를 말한다. 다형성은 단일 뉴클레오타이드 다형성 (SNP's) 및 간단한 서열 길이 다형성을 포함할 수 있다. 다형성은 또다른 대립 유전자와 비교하여 하나의 대립 유전자에서 하나 이상의 뉴클레오타이드 치환에 기인할 수 있거나 또는 당업계에 공지된 삽입 또는 결실, 복제, 역전 및 기타 변경에 기인할 수 있다.

[0038] 본원에서 사용된 용어 "변형" 은 분자 수준 (예를 들어, 염기 모이어티, 당 모이어티 또는 포스페이트 백본) 에서 올리고뉴클레오타이드 프로브의 변경을 말한다. 뉴클레오타이드 변형은 절단 차단제 또는 절단 유도제의 도입, 마이너 그루브 결합체의 도입, 동위원소 농축, 동위원소 고갈, 중수소 도입 및 할로젠 변형을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 뉴클레오타이드 변형은 올리고뉴클레오타이드 프로브의 용융 온도를 증가시키거나 하이브리드화의 엄격성을 증가시키는 모이어티를 포함할 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 분자는 2' 및 4' 탄소를 연결하는 여분의 다리로 변형되어 뉴클레아제에 의한 절단에 저항적인 잠긴 핵산 (LNA) 뉴클레오타이드를 생성할 수 있다 (Imanishi et al., 미국 특허 번호 제 6,268,490 호 및 Wengel et al., 미국 특허 번호 제 6,794,499 호에 기재됨). 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 소광 올리고뉴클레오타이드 분자의 태그 부분의 조성은 안정한 이중체를 형성하는 그들의 능력에 의해서만 제한된다. 따라서, 이들 올리고뉴클레오타이드는 DNA, L-DNA, RNA, L-RNA, LNA, L-LNA, PNA (Nielsen et al., 미국 특허 번호 제 5,539,082 호에 기재된 바와 같은 펩티드 핵산), BNA (가교 핵산, 예를 들어, Rahman et al., J. Am. Chem. Soc. 2008;130(14):4886-96 에 기재된 바와 같은 2',4'-BNA(NC) [2'-O,4'-C-아미노메틸렌 가교 핵산]), L-BNA 등 (여기서, "L-XXX" 는 핵산의 당 단위의 L-거울상이성질체를 말함) 또는 뉴클레오타이드 염기, 당, 또는 포스포디에스테르 백본 상의 임의의 공지된 변이 및 변형을 포함할 수 있다.

[0039] 뉴클레오타이드 변형의 다른 예는 올리고뉴클레오타이드의 당 모이어티에 도입된 할로, 알콕시 및 알릴옥시 기와 같은 다양한 2' 치환을 포함한다. 2'-치환된-2'-데옥시아데노신 폴리뉴클레오타이드는 DNA 보다는 이중-가닥 RNA 와 유사하다는 증거가 제시되었다. Ikehara et al. (Nucleic Acids Res., 1978, 5, 3315) 은 폴리 A, 폴리 I 또는 폴리 C 의 이의 보체에 이중체를 형성한 2'-플루오로 치환기가 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드 폴리 이중체보다 표준 용융 어세이에 의해 결정된 바와 같이 상당히 더욱 안정하다는 것을 보여준다. Inoue et al. (Nucleic Acids Res., 1987, 15, 6131) 은 모든 핵산 뉴클레오타이드 상의 2'-OMe (O-메틸) 치환기를 함유하는 혼합 올리고뉴클레오타이드 서열의 합성을 기술하였다. 혼합된 2'-OMe-치환된 올리고뉴클레오타이드는 동일한 서열 RNA-DNA 헤테로이중체보다 상당히 강한 RNA-RNA 이중체만큼 강하게 RNA 보체와 하이브리드화되었다. 따라서, 당의 2' 위치에서 치환의 예는 F, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, OMe, OCN, O-알킬, S-알킬,



SMe, SO<sub>2</sub>Me, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, NH-알킬, OCH<sub>3</sub>=CH<sub>2</sub> 및 OCCH 를 포함한다.

- [0040] 표적 폴리뉴클레오티드에 대한 프로브와 같은 또다른 분자에 대한 하나의 분자의 결합과 관련하여 용어 "특이적" 또는 "특이성" 은 분자의 다른 분자와의 인식, 접촉, 또는 복합체 형성은 실질적으로 적으면서, 두 분자 사이의 안정한 복합체의 인식, 접촉 및 형성을 말한다. 본원에서 사용된 용어 "어닐링" 은 두 분자 사이의 안정한 복합체의 형성을 말한다.
- [0041] 프로브의 적어도 하나의 영역이 핵산 서열의 상보물의 적어도 하나의 영역과 실질적인 서열 동일성을 공유하는 경우, 프로브는 핵산 서열에 "어닐링할 수 있다". "실질적인 서열 동일성" 은 적어도 약 80%, 바람직하게는 적어도 약 85%, 보다 바람직하게는 적어도 약 90%, 95% 또는 99%, 가장 바람직하게는 100% 의 서열 동일성이다. DNA 서열과 RNA 서열의 서열 동일성을 결정하려는 목적으로, U 와 T 는 종종 동일한 뉴클레오티드로 간주된다. 예를 들어, 서열 ATCAGC 를 포함하는 프로브는 서열 GCUGAU 를 포함하는 표적 RNA 서열에 하이브리드화할 수 있다.
- [0042] 본원에 사용된 용어 "절단제" 는 효소를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 올리고뉴클레오티드 프로브를 절단하여 단편을 생성할 수 있는 임의의 수단을 말한다. 증폭이 일어나지 않는 방법에 대해, 절단제는 올리고뉴클레오티드 프로브의 제 2 부분 또는 그의 단편을 절단, 분해 또는 다르게는 분리시키는 역할을 할 수 있다. 절단제는 효소일 수 있다. 절단제는 천연, 합성, 비변형 또는 변형될 수 있다.
- [0043] 증폭이 일어나는 방법의 경우, 절단제는 바람직하게는 합성 (또는 중합) 활성 및 뉴클레아제 활성을 갖는 효소이다. 그러한 효소는 종종 핵산 증폭 효소이다. 핵산 증폭 효소의 예는 테르무스 아쿠아티쿠스 (*Thermus aquaticus* (Taq)) DNA 폴리머라아제 (TaqMan®) 또는 E. 콜라이 (*E. coli*) DNA 폴리머라아제 I 과 같은 핵산 폴리머라아제 효소이다. 효소는 자연 발생, 비변형 또는 변형될 수 있다.
- [0044] "핵산 폴리머라아제" 는 뉴클레오티드를 핵산으로 혼입시키는 것을 촉매하는 효소를 말한다. 예시적인 핵산 폴리머라아제는 DNA 폴리머라아제, RNA 폴리머라아제, 말단 트랜스퍼라아제, 역전사효소, 텔로머라아제 등을 포함한다.
- [0045] "열안정성 DNA 폴리머라아제" 는 선택된 기간 동안 고온에 노출될 때 안정적이며 (즉, 분해 또는 변성에 저항하는) 충분한 촉매 활성을 유지하는 DNA 폴리머라아제를 말한다. 예를 들어, 열안정성 DNA 폴리머라아제는 이중-가닥 핵산을 변성시키는데 필요한 시간 동안 상승된 온도에 적용할 때, 후속 프라이머 연장 반응을 수행하기에 충분한 활성을 보유한다. 핵산 변성에 필요한 가열 조건은 당 업계에 잘 알려져 있으며, 미국 특허 번호 제 4,683,202 호 및 제 4,683,195 호에 예시된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 열안정성 폴리머라아제는 폴리머라아제 연쇄 반응 ("PCR") 과 같은 온도 사이클링 반응에서의 사용에 전형적으로 적합하다. 열안정성 핵산 폴리머라아제의 예는 테르무스 아쿠아티쿠스 (*Thermus aquaticus*) Taq DNA 폴리머라아제, 테르무스 (*Thermus*) sp. Z05 폴리머라아제, 테르무스 플라부스 (*Thermus flavus*) 폴리머라아제, 테르모토가 마리티마 (*Thermotoga maritima*) 폴리머라아제, 예컨대 TMA-25 및 TMA-30 폴리머라아제, Tth DNA 폴리머라아제 등을 포함한다.
- [0046] "변형된" 폴리머라아제는 적어도 하나의 단량체가 기준 서열과 상이한, 예를 들어 천연 또는 야생형 형태의 폴리머라아제 또는 또다른 변형된 형태의 폴리머라아제를 말한다. 예시적인 변형은 단량체 삽입, 결실 및 치환을 포함한다. 변형된 폴리머라아제는 또한 2 개 이상의 부도로부터 유래된 확인가능한 성분 서열 (예를 들어, 구조적 또는 기능적 도메인 등) 을 갖는 키메라 폴리머라아제를 포함한다. 또한, 변형된 폴리머라아제의 정의 내에는 기준 서열의 화학적 변형을 포함하는 것들이 포함된다. 변형된 폴리머라아제의 예는 G46E E678G CS5 DNA 폴리머라아제, G46E L329A E678G CS5 DNA 폴리머라아제, G46E L329A D640G S671F CS5 DNA 폴리머라아제, G46E L329A D640G S671F E678G CS5 DNA 폴리머라아제, G46E E678G CS6 DNA 폴리머라아제, Z05 DNA 폴리머라아제, ΔZ05 폴리머라아제, ΔZ05-Go1d 폴리머라아제, ΔZ05R 폴리머라아제, E615G Taq DNA 폴리머라아제, E678G TMA-25 폴리머라아제, E678G TMA-30 폴리머라아제 등을 포함한다.
- [0047] 용어 "5' to 3' 뉴클레아제 활성" 또는 "5'-3' 뉴클레아제 활성" 은 전형적으로 핵산 가닥 합성과 연관된, 핵산 폴리머라아제의 활성을 지칭하며, 이로써 뉴클레오티드는 핵산 가닥의 5' 말단으로부터 제거되고, 예를 들어 E. 콜라이 DNA 폴리머라아제 I 에는 이 활성이 있지만, Klenow 단편에는 없다. 5' to 3' 뉴클레아제 활성을 갖는 일부 효소는 5' to 3' 엑소뉴클레아제이다. 이러한 5' to 3' 엑소뉴클레아제의 예는 다음을 포함한다: *B. 서브틸리스* (*B. subtilis*) 의 엑소뉴클레아제, 비장 유래의 포스포디에스테라아제, 람다 엑소뉴클레아제, 효모 유래의 엑소뉴클레아제 II, 효모 유래의 엑소뉴클레아제 V 및 뉴로스포라 크라사 (*Neurospora crassa*) 유래



의 엑소뉴클레아제.

- [0048] 용어 "프로판디올" 또는 "프로판디올 스페이서" 는 1,3-프로판디올을 말하며 프로판-1,3-디올, 1,3-디히드록시프로판, 및 트리메틸렌 글리콜과 동의어이다. 용어 "HEG" 또는 "HEG 스페이서" 는 3,6,9,12,15-펜타옥사헵타데칸-1,17-디올과 동의어인, 헥사에틸렌 글리콜을 말한다.
- [0049] 본 발명의 다양한 양상은 핵산 폴리머라아제의 특별한 특성에 기반한다. 핵산 폴리머라아제는 여러 활성, 그 중에서도, 핵산 폴리머라아제가 그의 보다 큰, 상보적인 폴리뉴클레오티드에 어닐링된 올리고뉴클레오티드로부터 모노뉴클레오티드 또는 작은 올리고뉴클레오티드를 절단할 수 있는 5' to 3' 뉴클레아제 활성을 가질 수 있다. 절단이 효율적으로 일어나기 위해서, 업스트림 올리고뉴클레오티드도 동일한 큰 폴리뉴클레오티드에 어닐링되어야 한다.
- [0050] 5' to 3' 뉴클레아제 활성을 이용하는 표적 핵산의 검출은 미국 특허 번호 제 5,210,015 호; 제 5,487,972 호; 및 제 5,804,375 호; 및 Holland et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280 에 기재된 "TaqMan®" 또는 "5'-뉴클레아제 어세이"에 의해 수행될 수 있다. TaqMan® 어세이에서, 증폭된 영역 내에서 하이브리드화되는 라벨링된 검출 프로브는 증폭 반응 동안 존재한다. 프로브는 DNA 합성을 위한 프라이머로서 작용하지 않도록 변형된다. 증폭은 5' to 3' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 폴리머라아제를 사용하여 수행된다. 증폭의 각 합성 단계 동안, 연장되는 프라이머로부터 다운스트림 표적 핵산에 하이브리드화되는 임의의 프로브는 DNA 폴리머라아제의 5' to 3' 엑소뉴클레아제 활성에 의해 분해된다. 따라서, 새로운 표적 가닥의 합성은 또한 프로브의 분해를 초래하고, 분해 산물의 축적은 표적 서열의 합성의 측정값을 제공한다.
- [0051] 분해 산물을 검출하기 위해 적합한 임의의 방법이 5' 뉴클레아제 어세이에서 사용될 수 있다. 종종, 검출 프로브는 2 개의 형광 염료로 라벨링되며, 그 중 하나는 다른 염료의 형광을 소광시킬 수 있다. 염료는 전형적으로 5' 말단에 부착된 리포터 또는 검출기 염료 및 내부 사이트에 부착된 소광 염료와 함께 프로브에 부착되어, 프로브가 하이브리드화되지 않은 상태에 있을 때 소광이 발생하고 DNA 폴리머라아제의 5' to 3' 엑소뉴클레아제 활성에 의한 프로브의 절단이 두 염료 사이에서 일어난다. 증폭은 소광의 제거와 초기에 소광된 염료로부터 관찰할 수 있는 형광의 증가와 함께 염료들 사이의 프로브의 절단을 초래한다. 분해 산물의 축적은 반응 형광의 증가를 측정함으로써 모니터링된다. 미국 특허 번호 제 5,491,063 호 및 제 5,571,673 호에는 증폭과 동시에 발생하는 프로브 분해를 검출하기 위한 대안적인 방법이 기재되어 있다.
- [0052] 표적 핵산의 검출을 위한 5' 뉴클레아제 어세이는 5' to 3' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 임의의 폴리머라아제를 이용할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 5'-뉴클레아제 활성을 갖는 폴리머라아제는 열안정성 및 열활성 핵산 폴리머라아제이다. 이러한 열안정성 폴리머라아제에는, 제한 없이, 진정세균 속 테르무스 (*Thermus*), 테르마토가 (*Thermatoga*) 및 테르모시포 (*Thermosiphon*) 의 다양한 종으로부터의 천연 및 재조합 형태의 폴리머라아제뿐만 아니라, 이들의 키메라 형태가 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 테르무스 (*Thermus*) 종 폴리머라아제에는 테르무스 아쿠아티쿠스 (*Thermus aquaticus* (*Taq*)) DNA 폴리머라아제, 테르무스 테르모필루스 (*Thermus thermophilus* (*Tth*)) DNA 폴리머라아제, 테르무스 (*Thermus*) 종 Z05 (Z05) DNA 폴리머라아제, 테르무스 (*Thermus*) 종 sps17 (sps17) 및 테르무스 (*Thermus*) 종 Z05 (예를 들어, 미국 특허 번호 제 5,405,774 호, 제 5,352,600 호, 제 5,079,352 호, 제 4,889,818 호, 제 5,466,591 호, 제 5,618,711 호, 제 5,674,738 호 및 제 5,795,762 호에 기재됨) 가 포함된다. 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 테르마토가 (*Thermatoga*) 폴리머라아제는 예를 들어, 테르마토가 마리티마 (*Thermatoga maritima*) DNA 폴리머라아제 및 테르마토가 네아폴리타나 (*Thermatoga neapolitana*) DNA 폴리머라아제를 포함하는 반면, 사용될 수 있는 테르모시포 (*Thermosiphon*) 폴리머라아제의 예는 테르모시포 아프리카누스 (*Thermosiphon africanus*) DNA 폴리머라아제이다. 테르마토가 마리티마 (*Thermatoga maritima*) 및 테르모시포 아프리카누스 (*Thermosiphon africanus*) DNA 폴리머라아제의 서열은 국제 특허 출원 번호 PCT/US91/07035 (공개 번호 WO 92/06200) 에 공개되어 있다. 테르마토가 네아폴리타나 (*Thermatoga neapolitana*) 의 서열은 국제 특허 공개 번호 WO 97/09451 에서 찾을 수 있다.
- [0053] 5' 뉴클레아제 어세이에서, 증폭 검출은 전형적으로 증폭과 동시에 일어난다 (즉, "실시간"). 일부 구현예에서, 증폭 검출은 정량적이며, 증폭 검출은 실시간이다. 일부 구현예에서, 증폭 검출은 정성적이다 (예를 들어, 표적 핵산의 존재 또는 부재의 종점 검출). 일부 구현예에서, 증폭 검출은 증폭에 후속한다. 일부 구현예에서, 증폭 검출은 정성적이며, 증폭 검출은 증폭에 후속한다.
- [0054] 본 발명에서, 단일 반응 용기 (예를 들어, 튜브, 웰) 에서 2 개 이상의 표적 핵산의 실시간 PCR 증폭 및 검출은 제 1 표적의 존재를 검출하기 위한 표준 TaqMan® 올리고뉴클레오티드 프로브 및 동일한 형광 라벨을 포함하는

모든 프로브로, 제 2, 제 3 또는 그 이상의 표적의 존재를 검출하기 위한 하나 이상의 신규한 TaqMan® 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여 수행될 수 있다. 대안적으로, 신규한 TaqMan® 올리고뉴클레오타이드 프로브는 모든 표적 핵산의 존재를 검출하기 위해 사용될 수 있다. 신규한 프로브에는 두 가지 구별되는 특징이 있다.

[0055] 신규한 프로브의 첫 번째 특징은 그것이 두 개의 구별되는 부분을 포함한다는 것이다. 제 1 부분은 어닐링 부분으로 지칭되며, 표적 핵산 서열과 적어도 부분적으로 상보적인 서열을 포함하여 표적 서열과 하이브리드화될 수 있다. 어닐링 부분은 또한 소광제 모이어티를 함유한다. 하나의 구현예에서, 어닐링 부분은 소광제 모이어티를 소광시킬 수 있고 소광제 모이어티로부터 뉴클레아제 민감성 절단 부위에 의해 분리되는 형광 염료와 같은 리포터 모이어티를 함유한다. 올리고뉴클레오타이드 프로브의 제 2 부분은 태그 부분으로 언급된다. 하나의 구현예에서, 태그 부분은 어닐링 부분의 5' 말단에 부착된다. 또다른 구현예에서, 태그 부분은 어닐링 부분의 3' 말단에 부착된다. 또다른 구현예에서, 태그 부분은 링커를 통해 어닐링 부분의 5' 말단과 3' 말단 사이의 임의의 위치에 부착된다. 태그 부분은 표적 핵산 서열에 상보적이지 아니며 표적 핵산에 결합할 수 없는 "플랩" 영역을 형성하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다 (5' 플랩 프로브의 그래프 도식을 위한 도 1 참고). 태그 부분은 또한 이것이 어닐링 부분에 부착될 수 있고 소광 분자와 상호작용할 수 있는 한, 임의의 유기 모이어티 또는 반복 단위 (예를 들어  $(CH_2-CH_2-O)_n$  등) 와 같은 비-뉴클레오타이드로 구성될 수 있다 (다음 절에서 설명). 하나의 구현예에서, 태그 부분은 어닐링 부분 상의 소광제 모이어티에 의해 소광될 수 있는 형광 염료와 같은 리포터 모이어티를 함유한다. 올리고뉴클레오타이드 프로브의 어닐링 및 태그 부분은 임의로 비-뉴클레오타이드 "링커" 에 의해 분리될 수 있다. 이 링커는 탄소, 탄소 및 산소, 탄소 및 질소, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있고, 임의의 길이일 수 있다. 게다가, 링커는 선형 모이어티 또는 고리형 모이어티로 구성될 수 있다. 링커는 단일 유닛으로부터 또는 포스페이트 연결로 분리된 복합적인 동일 또는 상이한 유닛으로부터 유도될 수 있다. 링커의 목적은 올리고뉴클레오타이드 프로브의 어닐링 및 태그 부분의 접합부에 영역을 생성하는 것이다. 태그 부분이 어닐링 부분으로부터 분리될 때, 링커는 또한 태그 부분이 핵산 폴리머라아제에 의해 연장되는 것을 방지할 수 있다. 대안적으로, 분리된 태그 부분에 대한 또다른 변형은 핵산 폴리머라아제에 의해 확장되지 않도록 한다.

[0056] 신규한 프로브의 두 번째 특징은 태그 부분이 소광 분자에 결합한다는 것이다. 태그 부분이 뉴클레오타이드 서열인 경우, 소광 분자는 태그 부분의 뉴클레오타이드 서열에 완전히 또는 부분적으로 상보적이고 태그 부분에 하이브리드화되는 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 소광 분자는 또한 소광제 모이어티, 즉 태그 부분 상의 리포터 모이어티 (예를 들어, 형광 염료) 로부터의 신호를 소광시킬 수 있는 제 2 소광제 모이어티를 함유하거나 이와 연관되어 있다. 소광 분자 (제 2 소광제 모이어티) 상의 또는 이와 연관된 소광제 모이어티는 어닐링 부분 (제 1 소광제 모이어티) 상의 소광제 모이어티와 동일하거나 상이할 수 있다. 따라서, PCR 증폭을 수행하기 전에, 태그 부분 상의 리포터 모이어티는 프로브의 어닐링 부분 상의 소광제 모이어티와 소광 분자 상의 또는 이와 연관된 소광 모이어티에 의해 (예를 들어, 도 1 에 제시된 소광 올리고뉴클레오타이드에 의해) 소광된다.

[0057] 5' 뉴클레아제 어세이에서 표적 핵산의 실시간 PCR 증폭 및 검출을 수행하기 위해 신규한 프로브를 사용하는 일반적인 원리는 하기에 기재되어 있다. 우선, 표적 핵산을 함유하는 것으로 의심되는 샘플을 제공한다. 그 다음 단일 반응 용기 (예를 들어, 다중-웰 마이크로플레이트 내의 단일 시험관 또는 단일 웰) 내에서 샘플을 표적 핵산의 앰플리콘을 생성할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 신규한 올리고뉴클레오타이드 프로브 둘 모두를 함유하는 PCR 시약과 접촉시킨다. PCR 증폭은 5' 내지 3' 뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제를 사용함으로써 시작되며, 각각의 PCR 사이클의 연장 단계 동안, 폴리머라아제의 뉴클레아제 활성은 프로브의 어닐링 부분 상의 소광 모이어티로부터 태그 부분의 절단 및 분리를 허용한다. 분리된 태그 부분은 임의로 핵산 폴리머라아제에 의해 연장될 수 없도록 변형 (예컨대, 비-뉴클레오타이드 링커) 을 함유할 수 있다.

[0058] 다음으로, 분리된 태그 부분 상의 리포터 모이어티로부터의 신호는 소광 분자가 여전히 태그 부분에 결합되는 제 1 온도, 통상적으로 어닐링 및/또는 신장 온도에서 측정된다. 소광 분자 상에 또는 이와 연관된 소광제 모이어티의 존재로 인해, 태그 부분 상의 리포터 모이어티 (예를 들어, 형광 염료) 로부터의 신호는 여전히 소광된다. 그 다음, PCR 사이클의 정상 단계로서, 온도는 변성 온도까지 점차적으로 상승된다. 온도가 연장 온도에서 변성 온도까지 증가함에 따라, 소광 분자가 더 이상 태그 부분에 결합되지 않는 온도 지점에 도달한다. 소광 분자가 태그 부분의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드인 경우, 이해되는 소광 올리고뉴클레오타이드 분자와 태그 부분 사이의 이중체 형성의 용융 온도 ( $T_m$ ) 에서 발생한다.

소광 올리고뉴클레오타이드 상의 또는 이와 연관된 소광제 모이어티에 의해 더 이상 소광되지 않는 리포터 모이어티로부터 신호가 그 다음 이중체의  $T_m$  온도에서 또는 그보다 높은 제 2 온도에서 측정된다. 실제로, 태그 부분의 거의 100%가 단일-가닥 형태가 되도록 제 2 온도는  $T_m$  온도를 초과하는 것이 더 좋을 수 있다. 그러나, 또한  $T_m$  온도 미만의 온도에서 신호를 측정하는 것도 가능하다. 그러면, 소광 분자가 태그 부분에 결합되어 있지 않을 때의 제 2 온도에서 검출된 신호로부터 소광 분자가 여전히 태그 부분에 결합되어 있을 때의 제 1 온도에서 검출된 신호를 감산함으로써 계산된 신호 값이 결정된다 (도 2 및 도 3 참조). 계산된 신호 값은 임의로 온도에 의해 영향을 받을 수 있는 신호의 보정을 위해 정규화될 수 있다. 예를 들어, 형광 신호는 고온에서 감소하는 것으로 알려져 있으므로, 표준을 사용하여 상이한 온도에서 얻은 신호 값을 표준화할 수 있다.

[0059] 이러한 신호 측정 및 계산은 복합 PCR 사이클에서 수행되며 결정된 누적 신호 값을 사용하여 PCR 사이클 횟수에 대해 작성된 계산된 신호 값으로부터 생성된 PCR 성장 곡선으로부터 임계 값 ( $C_t$  값)을 결정함으로써 표적 핵산의 존재 또는 부재 뿐만 아니라 양을 결정할 수 있다. 하나의 구현예에서, 신호 측정 및 계산은 각각의 PCR 사이클에서 수행된다.

[0060] 하나의 리포터 모이어티 (예를 들어, 하나의 형광 염료)를 사용하는 멀티플렉스 PCR 어세이는 다양한  $T_m$  온도에서 이들의 각각의 소광 올리고뉴클레오타이드 분자와 하이브리드화된 태그 부분을 갖는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 디자인함으로써 가능하다. 예를 들어, 한 반응에서 3 개의 표적 핵산의 증폭 및 검출은 모두 동일한 형광단으로 라벨링된 3 개의 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써 달성될 수 있다. 표준 TaqMan® 올리고뉴클레오타이드 프로브는 제 1 온도 (일반적으로 PCR 사이클의 어닐링 온도)에서 형광 신호를 측정하여 제 1 표적을 검출하는데 사용할 수 있다. 낮은  $T_m$  태그-소광 올리고뉴클레오타이드 이중체를 갖는 제 1 "태그" 프로브는 그의  $T_m$  온도에서 또는 초과인 그리고 제 1 온도보다 높은 제 2 온도에서 계산된 형광 값을 측정하여 제 2 표적을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 높은  $T_m$  태그-소광 올리고뉴클레오타이드 이중체를 갖는 제 2 "태그" 프로브는 그의  $T_m$  온도에서 또는 초과인 그리고 제 2 온도보다 높은 제 3 온도에서 계산된 형광 값을 측정하여 제 3 표적을 검출하기 위해 사용될 수 있다. (도 4 참조) 이론적으로, 하나의 TaqMan® 프로브와 4 내지 7 개의 상이한 리포터 모이어티 (예를 들어, 형광 염료)를 가진 2 개의 상이한 태그된 프로브를 사용하여 하나의 반응에서 12 내지 21 개의 상이한 표적 핵산을 검출할 수 있고, 또는 하나의 TaqMan® 프로브 및 3 개의 상이한 태그된 프로브를 사용하여 하나의 반응에서 16 내지 28 개의 상이한 표적 핵산을 검출할 수 있다.

[0061] 부가적으로, 본 발명의 신규한 프로브는 태그 부분이 뉴클레오타이드 서열이고 소광 올리고뉴클레오타이드에 연결되어 헤어핀 (즉, 스템-루프 구조)을 형성하도록 디자인될 수 있다. 이러한 구조에서, "스스템" 부분은 태그 부분과 소광 올리고뉴클레오타이드 사이의 상보적 영역으로 구성되는 반면, "루프" 부분은 비-상보적 뉴클레오타이드 또는 비-뉴클레오타이드, 예컨대 이전에 기재된 바와 같은 링커로 구성될 수 있다.

[0062] 본 발명의 신규한 프로브는 프로브의 태그 부분 상에 위치한 리포터 모이어티를 갖는 것으로 기술되었지만, 리포터 모이어티가 소광 분자 상의 제 2 소광제 모이어티와 가역적으로 상호작용할 수 있는 한, 어닐링 부분 상에 리포터 모이어티를 위치시키고 태그 부분 상에 제 1 소광제 모이어티를 위치시킬 수 있다. 일반적인 의미에서, 리포터 모이어티는 5' 뉴클레아제 (TaqMan®) 어세이 동안 어닐링 부분 상의 제 1 소광 모이어티로부터 분리되고 추가로 소광 분자 상의 제 2 소광 모이어티와 가역적으로 상호작용하도록 디자인된 방식으로 프로브 올리고뉴클레오타이드에서 설계되고 위치된다. 신규한 프로브의 이러한 다양한 대안적인 구현예 중 일부는 도 5에서 볼 수 있다.

[0063] 본 발명의 방법을 실시하기 위해, 프로브 올리고뉴클레오타이드 및 소광 분자의 태그 부분의 디자인에 일정한 특징이 필요하다. 하나의 구현예에서, 태그 부분 및 소광 분자 모두는 뉴클레오타이드 서열로 구성된다. 이러한 상황에서, 태그 부분과 소광 올리고뉴클레오타이드 모두는 표적 핵산 서열에 특이적으로 하이브리드화되어서는 안되지만, 이들은 원하는 온도에서 하이브리드화를 가능하게 하기 위해 서로 완전히 또는 부분적으로 상보적이어야 한다. 둘 모두는 PCR 증폭 동안 핵산 폴리머라아제에 의해 연장되지 않도록 그들의 3' 말단에 변형을 포함할 수 있다. 태그 부분 상의 리포터 모이어티 (예를 들어, 형광 염료) 및 소광 올리고뉴클레오타이드 상의 소광 모이어티 모두는 5' 말단, 3' 말단 또는 5'와 3' 말단 사이의 임의의 위치에 위치할 수 있지만, 이들은 태그 부분이 소광 올리고뉴클레오타이드에 하이브리드화되어 소광 모이어티가 리포터 모이어티로부터의 검출 가능한 신호를 소광시킬 수 있도록 하는 경우 서로 근접하여 위치해야만 한다.

[0064] 다양한  $T_m$  온도에서 각각의 소광 올리고뉴클레오타이드 분자에 하이브리드화되는 상이한 태그 부분과 관련해서, 태그 부분 상의, 소광 올리고뉴클레오타이드 상의 또는 태그 부분과 소광 올리고뉴클레오타이드 모두 상의 모든 또

는 일부 위치에 도입될 수 있어 올리고뉴클레오타이드 길이가 단축될 수 있다. 용융 온도를 증가시키는 뉴클레오타이드 변형의 예는 LNA, PNA, G-클램프 (9-(아미노에톡시)-페녹사진-2'-데옥시시티딘), 프로피닐 데옥시우리딘 (pdU), 프로피닐 데옥시시티딘 (pdC), 및 당 그룹에서의 다양한 2' 변형, 예컨대 2'-O-메틸 변형을 포함한다. 핵산 폴리머라아제의 태그 부분 또는 소광 올리고뉴클레오타이드에 대한 원치않는 결합을 방지할 수 있는 또다른 유형의 변형은 뉴클레오타이드의 거울상이성질체 L-형태, 예컨대 L-DNA, L-RNA 또는 L-LNA 를 사용하는 것을 포함할 것이다.

[0065] 또다른 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드 프로브의 태그 부분 및 소광 분자는 온도-의존적 방식으로 서로 가역적으로 상호작용하는 비-뉴클레오타이드 분자로 구성된다. 그러한 비-뉴클레오타이드 상호작용의 예로는 단백질-단백질 상호 작용, 단백질-펩티드 상호작용 (예를 들어, 펩티드 앵타머), 단백질-소분자 상호작용, 펩티드-소분자 상호작용, 소분자-소분자 상호작용이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 하나의 예에서, 비오틴과 아비딘 (또는 스트렙타비딘) 사이의 잘 공지된 상호작용은 비오틴 모이어티 (예를 들어, 테스티오비오틴) 또는 아비딘 모이어티를 변형시킴으로써 (Nordlund et al., J. Biol. Chem., 2003, 278 (4) 2479-2483) 또는 상호작용을 가역적으로 하고 온도 의존적으로 만들기 위해 이용될 수 있다.

[0066] 또다른 구현예에서, 태그 부분과 소광 분자 사이의 상호작용은 서열 특이적 방식으로 뉴클레오타이드 서열 (또는 뉴클레오타이드 서열들) 과 비-뉴클레오타이드 분자 사이의 상호작용을 포함할 수 있다. 이러한 유형의 상호작용의 예로는 핵산 앵타머, DNA 결합 단백질 또는 펩티드 및 DNA 마이너 그루브 결합체가 포함되나 이에 제한되지 않는다. 서열-특이적 DNA-결합 분자의 디자인 및 합성은 여러 논문에 기술되어 있고 (예를 들어, Dervan, Science, 1986, 232, 464-471; White et al., Nature, 1998, 391, 468-471 참조), 이들 방법은 온도-의존적인 태그 부분과 소광 분자 사이의 상호작용을 생성하는데 사용될 수 있다. 유사하게, 이중 가닥 뉴클레오타이드와 가용성 소광제 사이의 상호작용은 또한 소광 모이어티가 소광 분자 자체 내에 함유될 필요는 없지만, 태그 부분이 소광 분자에 결합된 경우에만 리포터 모이어티와 상호작용하고 이를 소광시킬 가용성 형태일 수 있다. 본 발명의 구현예는 하기 실시예에 추가로 기재될 것이며, 이는 청구 범위에 기재된 본 발명의 범주를 제한하지 않는다.

## [0067] 실시예

### [0068] 실시예 1 소광 올리고뉴클레오타이드에 의한 소광의 검증

[0069] 소광제 모이어티를 함유하는 소광 올리고뉴클레오타이드가 올리고뉴클레오타이드 프로브의 형광 라벨링된 태그 부분과 하이브리드화되고 이중체의 용융 온도 미만의 온도에서 그러나 이중체가 해리되는 용융 온도 초과 온도에서 형광 신호를 소광할 수 있는지를 확인하기 위해 실험을 수행하였다. 표 1 은 태그 부분 및 소광 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 소광 올리고뉴클레오타이드 Q0 는 소광제를 함유하지 않는 반면, 소광 올리고뉴클레오타이드 Q1 은 그의 5' 말단에 BHQ-2 소광제를 함유한다.

[0070] 표 1

명칭	서열	변형	SEQ ID NO:
9FAM9TAG	CGTCGCCAGTCAGCTCCGG <b>9F9T</b>	9= C9 스페이서, F = FAM	1
Q0	CCGGAGCTGACTGGCGAC <b>Gp</b>	p = 포스페이트	2
Q1	<b>Q</b> CCGGAGCTGACTGGCGAC <b>Gp</b>	p = 포스페이트, Q = BHQ-2	3

[0071]

[0072] 9FAM9 TAG 올리고뉴클레오타이드를 소광 올리고뉴클레오타이드 없이 (QX) 또는 Q0 또는 Q1 소광 올리고뉴클레오타이드와 1:5 몰비로 인큐베이션하였다. 그 다음 혼합물을 60 mM 트리신, 120 mM 포타슘 아세테이트, 5.4% DMSO, 0.027% 소듐 아지드, 3% 글리세롤, 0.02% Tween 20, 43.9  $\mu$ M EDTA, 0.2 U/ $\mu$ L UNG, 0.1  $\mu$ M 19TAGC9FAMC9, 0.5  $\mu$ M Q0 또는 Q1, 400  $\mu$ M dATP, 400  $\mu$ M dCTP, 400  $\mu$ M dGTP, 800  $\mu$ M dUTP 및 3.3 mM 망간 아세테이트로 이루어진 50  $\mu$ L 반응물 중에서 사이클링하였다. 전형적인 PCR 증폭 반응과 유사한 사이클 조건이 표 2 에 제시된다.



[0073] 표 2

단계	설명	사이클 #	온도(°C)	시간	데이터 취득
1	멸균/RT	1	50	2 분	없음
			94	5 초	없음
			55	2 분	없음
			60	6 분	없음
			65	4 분	없음
2	다크 사이클 (데이터 취득 없음)	5	95	5 초	없음
			55	30 초	없음
3	TaqMan 사이클	55	91	5 초	없음
			58	25 초	형광 판독
			80	5 초	형광 판독

[0074]

[0075] 실험 결과를 도 6 에 제시한다. FAM 염료로부터의 신호를 58℃ 에서 측정하였을 때, 형광을 소광 올리고뉴클레오티드 없이 (QX) 또는 소광 모이어티가 없는 소광 올리고뉴클레오티드 (Q0) 로 검출하였으나, Q1 소광 올리고뉴클레오티드의 존재 하에 어느 사이클에서도 신호가 검출되지 않았다. 반대로, 형광을 80℃ 에서 측정하였을 때, 심지어 Q1 소광 올리고뉴클레오티드의 존재 하에서도 모든 사이클에서 신호가 검출될 수 있었고, 이것은 더 높은 온도에서, Q1 소광 올리고뉴클레오티드가 TAG 에 더이상 하이브리드화되지 않았고, 소광이 관찰되지 않았다는 것을 입증한다.

[0076] 실시예 2 태그된 프로브 및 소광 올리고뉴클레오티드로의 실시간 PCR

[0077] 실시간 PCR 연구를 다양한 농도의 HIV-1 그룹 M (HIM) 으로부터의 주형 서열과 혼합된 다양한 농도의 내부 대조군 주형 (GIC) 을 함유한 샘플을 사용하여 수행하였다. GIC 서열에 하이브리드화하는 표준 TaqMan® 가수분해 프로브 (G0) 및 상보적 소광 올리고뉴클레오티드 (Q9) 및 HIM 서열에 하이브리드화하는 어닐링 부분을 가진 태그된 프로브 (L24) 를 사용하여 상기 2 개 주형으로부터 생성된 증폭 산물을 검출하였다. 두 프로브를 FAM 로 라벨링하였고 표 3 은 이들의 서열 및 소광 올리고뉴클레오티드의 서열을 보여준다.

[0078] 표 3

명칭	서열	변형	SEQ ID NO:
G0	FTGCGCGTCCCGQTTTTGATACTTCGTAAC GGTGc <sub>p</sub>	F = FAM, Q= BHQ-2, p= 포스페이트	4
L24	QTCTCTAGCAGTGGCGCCGAACAGGGAC FCACACATTGGCACCGCCGTCT <sub>p</sub>	F= FAM, Q= BHQ-2, p = 포스페이트, <u>태그</u> <u>밀줄쳐짐</u>	5
Q9	AGACGGCGGTGCCAATGTGTGQ <sub>p</sub>	Q = BHQ-2, p= 포스페이트	6

[0079]

[0080] 4 가지 농도의 GIC: 0 카피/반응 (cp/rxn), 100 cp/rxn, 1,000 cp/rxn, 및 10,000 cp/rxn 를 4 가지 농도의 HIM: 0 cp/rxn, 10 cp/rxn, 100 cp/rxn, 및 1,000 cp/rxn 와 혼합하여 16 가지 상이한 농도 조합을 형성하였다. PCR 시약 및 사이클 조건은 실시예 1 및 표 2 에 기재된 바와 같았고, 단, 100 nM 의 G0 및 L24 프로브 및 200 nM 의 Q9 소광 올리고뉴클레오티드를 반응에 사용하였다. FAM 라벨로부터의 형광 판독값을 사이클 #6 에서 시작하는 각각의 사이클에 대해 58℃ 및 80℃ 에서 취득하였다 (표 2 참고).

[0081] 이들 실험 결과를 도 7-9 에 제시한다. 58℃ 에서의 형광 판독값을 도 7 에서 성장 곡선으로서 제시한다. 도 7A 는 HIM 가 없는 것 및 0, 100, 1,000 또는 10,000 cp/rxn GIC 가 있는 것으로 생성된 성장 곡선을 제시한다. 흥미롭게도, 10 cp/rxn (도 7B), 100 cp/rxn (도 7C) 및 1,000 cp/rxn (도 7D) 로의 HIM 의 존재 하에 58℃ 에서의 성장 곡선 판독값에는 형광 강도 및 사이클 역치 (Ct) 값의 차이가 본질적으로 없었는데, 이것은 표준 TaqMan® G0 프로브로부터 FAM 신호 만이 상기 온도에서 검출된다는 것을 나타낸다. 이것은 L24

태그된 프로브 상의 FAM 라벨이 Q9 소광 올리고뉴클레오타이드 상의 소광제에 의해 매우 효과적으로 소광되고 GIC 표적의 검출을 간섭하지 않기 때문이다.

[0082] 80℃에서의 형광 판독값은 도 8에서 성장 곡선으로서 제시된다. 도 8A는 GIC가 없는 것 및 0, 10, 100 또는 1,000 cp/rxn HIM가 있는 것으로 생성된 성장 곡선을 제시한다. 형광은 이제 L24 프로브 상의 FAM 라벨로부터 검출될 수 있는데 이것은 프로브의 "어닐링 부분" 상의 소광제 (뉴클레아제에 의한 가수분해로 인한) 및 상기 고온에서의 가닥 해리로 인한 소광 올리고뉴클레오타이드 (Q9) 상의 소광제 둘다에 의해 더이상 소광되지 않기 때문이다. L24 프로브로부터의 형광 강도가 G0 프로브의 것보다 상당히 더 낮음에도 불구하고, 이것은 HIM의 출발 농도에 상응하는 Ct 값을 계산하기에는 충분하다. 그러나, HIM 및 GIC가 둘다 존재하는 경우, 80℃에서의 형광 판독값은 G0 프로브로부터 검출되는 더 강한 형광으로 인해 복합 곡선을 생성한다. (도 8B, 8C, 8D 참고). 따라서, L24 태그된 프로브로부터 형광 신호를 "벗겨내기" 위해, G0 프로브로부터의 형광 신호를 감산하는 것이 필요할 것이며, 이것은 80℃ 형광 판독값으로부터 58℃ 형광 판독값 (이것은 오직 G0 프로브에 의해서만 기여됨)을 감산하는 것을 포함하고 도 8A에서 관찰된 것을 닮은 성장 곡선을 유도할 것이다.

[0083] 58℃ 형광 판독값의 100%를 80℃ 형광 판독값으로부터 감산하는 경우, 유도된 성장 곡선은 감산의 과잉보상이 있다는 것을 나타내는 음의 값을 제시하였다. 상기 관찰에 대한 이유는 58℃에서의 강도와 비교하여 80℃에서의 FAM 라벨의 감소된 형광 강도로 인한 것이었다. 따라서, "정규화" 계수는 필수적인 것으로 여겨지고 그러면 80℃ 신호로부터 감산된 58℃ 신호의 84%가 최고 결과를 생성하였다는 것이 경험적으로 측정되었다. 유도된 성장 곡선은 도 9A, 9B, 9C 및 9D에 제시되고 모두 사실상 도 8A의 0 GIC 성장 곡선과 동일하다. 이들 결과는 GIC의 존재를 나타내는 형광 신호가 HIM의 존재의 존재를 나타내는 형광 신호로부터 분리될 수 있다는 것을 보여주며, 본 발명의 멀티플렉스 유용성을 입증한다.

[0084] 실시예 3: 상이한 형광 염료를 갖는 프로브로의 실시간 PCR

[0085] 일련의 실험을 실시예 2에 기재된 바와 같이 수행하였는데, 단, G0 및 L24 프로브를 제 1 세트에서 FAM 염료로 라벨링하였고, 제 2 세트에서 HEX 염료로 라벨링하였고, 제 3 세트에서 JA270 염료로 라벨링하였고, 제 4 세트에서 Cy5.5 염료로 라벨링하였다. 각각의 실험 세트에서, PCR 증폭을 100 cp/rxn 로의 GIC 주형 만의 존재 하에, 1000 cp/rxn 로의 HIV 주형 만의 존재 하에 또는 GIC (100 cp/rxn) 및 HIV (1000 cp/rxn) 주형 둘다의 존재 하에 수행하였다. 실험 결과를 도 10에 제시한다. 58℃에서의 형광 판독값에서 (도 10, 제 1 열), 예상되는 바와 같이, GIC 주형에 대해 G0 프로브에 의해 생성되는 신호만 관찰되었고, L24 프로브가 여전히 Q9 소광 올리고뉴클레오타이드에 하이브리드화되기 때문이다. 80℃에서의 형광 판독값에서 (도 10, 제 2 열), G0 프로브 (GIC의 경우) 그리고 HIV의 경우 "비소광된" L24 프로브 둘다에 의해 생성된 신호가 관찰되었다. 각각의 형광 염료에 대한 정규화 계수를 사용한 후, 80℃ 신호로부터 감산된 58℃ 신호는 HIV 주형 만으로부터 유도된 성장 곡선을 생성하였다 (도 10, 제 3 열). HEX 및 JA270 으로부터 생성된 신호는 FAM 으로부터의 신호와 유사하거나 높았던 반면, Cy5.5 로부터의 신호가 FAM 신호보다 상당히 낮았으나 그럼에도 불구하고 검출가능하였다.

[0086] 실시예 4: L-DNA 태그된 프로브 및 소광 올리고뉴클레오타이드로의 실시간 PCR

[0087] 실시예 2에 기재된 실험과 동일한 실험을 수행하였는데, 단, HIV-1 그룹 M (HIM) 주형을 검출하기 위한 L24 태그된 프로브는 "천연" D-데옥시리보오스 뉴클레오타이드 대신 L-데옥시리보오스 뉴클레오타이드를 전적으로 포함하였다. 실험 결과를 도 11에 제시하고, L24 태그된 프로브의 L-거울상이성질체 형태를 사용함으로써 발생된 형광 신호가 L24 태그된 프로브의 D-거울상이성질체 형태를 사용함으로써 발생된 신호보다 4-5 배 높았다는 것이 관찰되었다.

[0088] 실시예 5: 2'-O 메틸 변형을 가진 태그된 프로브 및 소광 올리고뉴클레오타이드로의 실시간 PCR

[0089] 실시예 2에 기재된 것과 유사한 실험을 수행하였는데, 단, 뉴클레오타이드 변형을 가진 태그된 프로브 및 소광 올리고뉴클레오타이드를 사용하였다. HIM 주형의 존재를 검출하기 위해 사용된 "표준" L24 프로브 외에, 프로브의 태그 부분 중의 모든 뉴클레오타이드 (표 3에서 L24의 밑줄친 부분으로 제시됨)가 리보오스 모이어티의 2' 위치 상에 O-메틸 치환기를 가짐으로써 (2'-OMe) 변형되는, 태그된 프로브, L24-OMe를 생성하였다. L24의 태그 부분에 하이브리드화하기 위한 2가지 변형된 Q9 소광 올리고뉴클레오타이드를 또한 생성하였다. Q9-OMe는 2'-OMe 치환기에 의해 모든 뉴클레오타이드가 변형되었고, Q9-OMe (A/G)는 2'-OMe 치환기에 의해 A 및 G 뉴클레오타이드만 변형되었다. HIM 주형의 검출을 태그 부분 및 소광 올리고뉴클레오타이드의 3가지 상이한 조

합: L24 와 Q9-OME (A/G), L24-OME 와 Q9-OME (A/G) 및 L24-OME 와 Q9-OME 을 사용하여 수행하였다. 상기 실험 결과를 표 12 에 제시한다.

[0090] 예상되는 바와 같이, 58℃ 에서, 오직 GO TaqMan® 프로브로부터의 형광 신호만 검출될 수 있었다. 75℃ 에서, 형광 신호는 GO 및 L24/Q9-OME (A/G) 으로부터 검출되었으나, 2 가지 다른 태그-소광 올리고뉴클레오타이드 조합으로부터는 검출되지 않았다. 88℃ 에서, 형광 신호는 또한 L24-OME/Q9-OME (A/G) 로부터 검출될 수 있었고 97℃ 에서, 신호는 L24-OME/Q9-OME 조합을 포함하는, 모든 조합으로부터 검출되었다. 이들 결과는 3 가지 개별 온도로부터의 형광 판독값이 태그된 프로브 및 소광 분자를 사용하여 달성될 수 있을 뿐 아니라, 뉴클레오타이드 변형, 예컨대 2'-OMe 가 이들의 서열 또는 이들의 길이를 변화시킬 필요 없이 태그-소광 올리고뉴클레오타이드 이중체의 용융 온도를 변경하기 위해, 태그 부분의 뉴클레오타이드 서열 또는 소광 올리고뉴클레오타이드 또는 둘에 선택적으로 도입될 수 있다는 것을 제시한다.

[0091] 전술한 발명이 명료함과 이해의 목적으로 어느 정도 상세히 설명되었지만, 본 개시물을 읽음으로써 당업자라면 형태 및 세부 사항의 다양한 변경이 본 발명의 진정한 범주를 벗어나지 않고 이루어질 수 있음을 알 것이다. 예를 들어, 상술한 방법은 다양한 조합으로 사용될 수 있다.

#### [0092] 비형식적인 서열 목록

[0093] SEQ ID NO 1: 9FAM9TAG 올리고뉴클레오타이드 서열

[0094] CGTCGCCAGTCAGCTCCGGT

[0095] SEQ ID NO 2: Q0 소광 올리고뉴클레오타이드 서열 (소광제 없음)

[0096] CCGGAGCTGACTGGCGACG

[0097] SEQ ID NO 3: Q1 소광 올리고뉴클레오타이드 서열 (5' 말단 상에 BHQ-1 소광제)

[0098] CCGGAGCTGACTGGCGACG

[0099] SEQ ID NO 4: GO TaqMan 프로브 올리고뉴클레오타이드 서열 (FAM/BHQ/포스페이트)

[0100] tgcgcgtcccggttttgatacttcgtaacgggtgc

[0101] SEQ ID NO 5: L24 태그된 프로브 올리고뉴클레오타이드 서열 (BHQ/FAM/포스페이트)

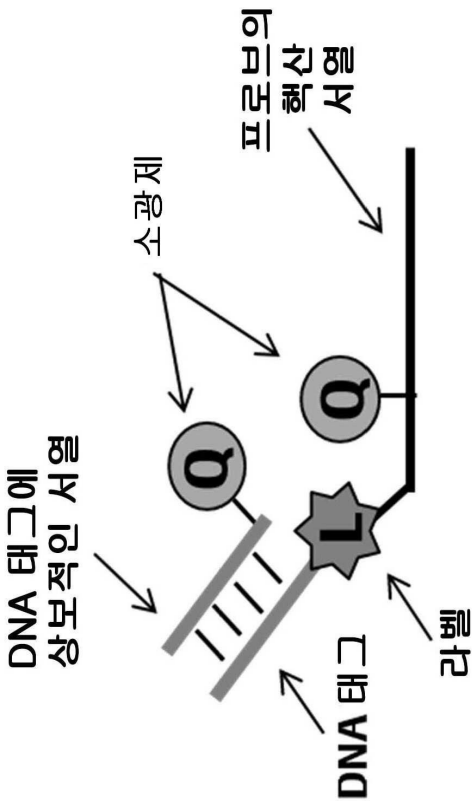
[0102] TCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACCACACATTGGCACCGCGTCT

[0103] SEQ ID NO 6: Q9 소광 올리고뉴클레오타이드 서열 (3' 말단 상에 소광제)

[0104] AGACGGCGGTGCCAATGTGTG

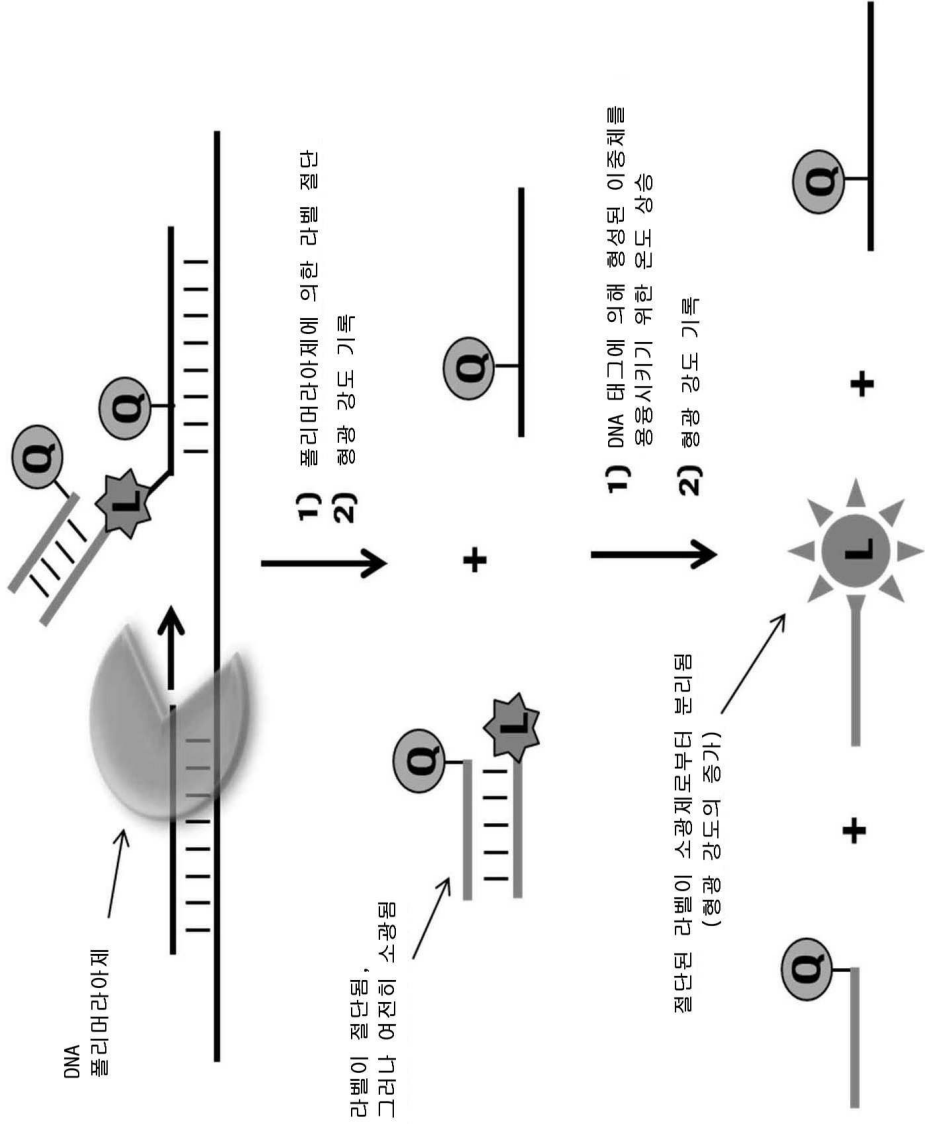
도면

도면1

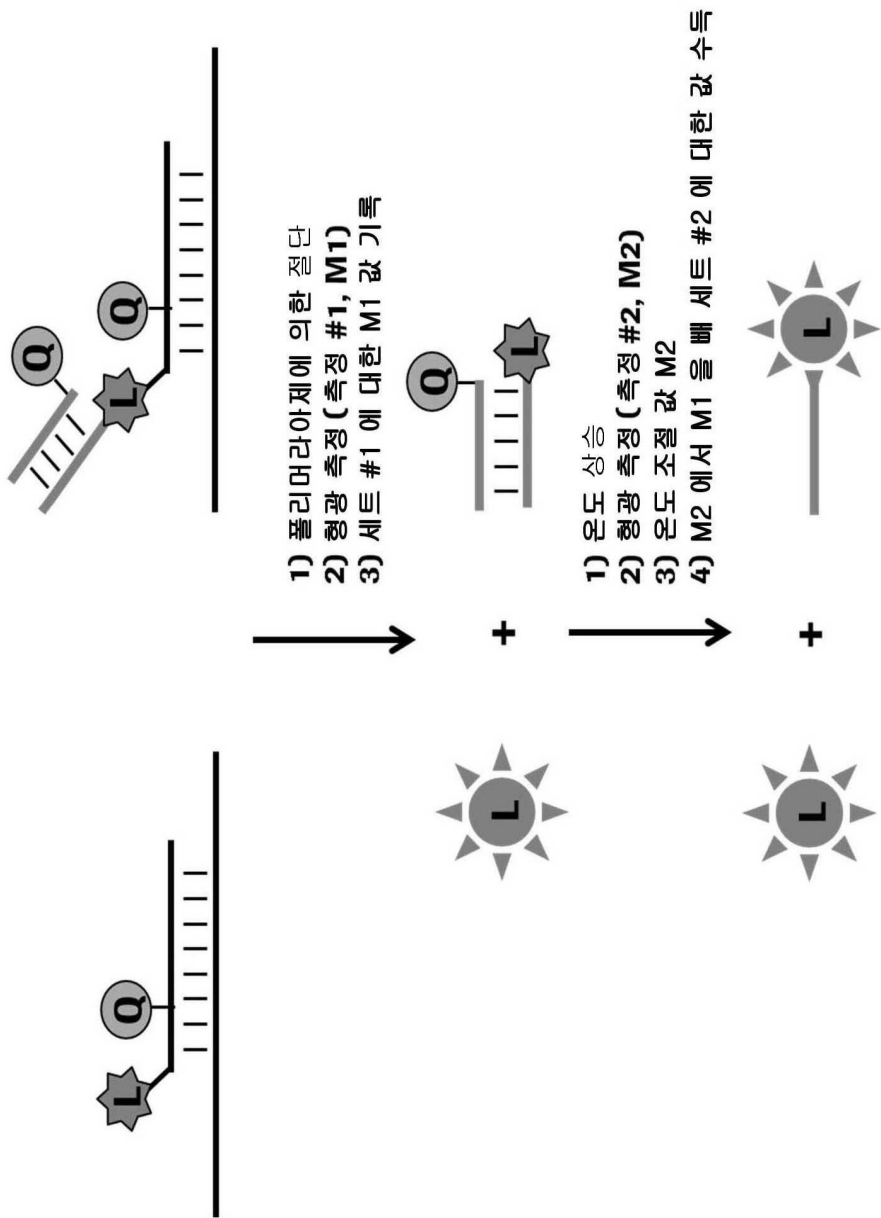




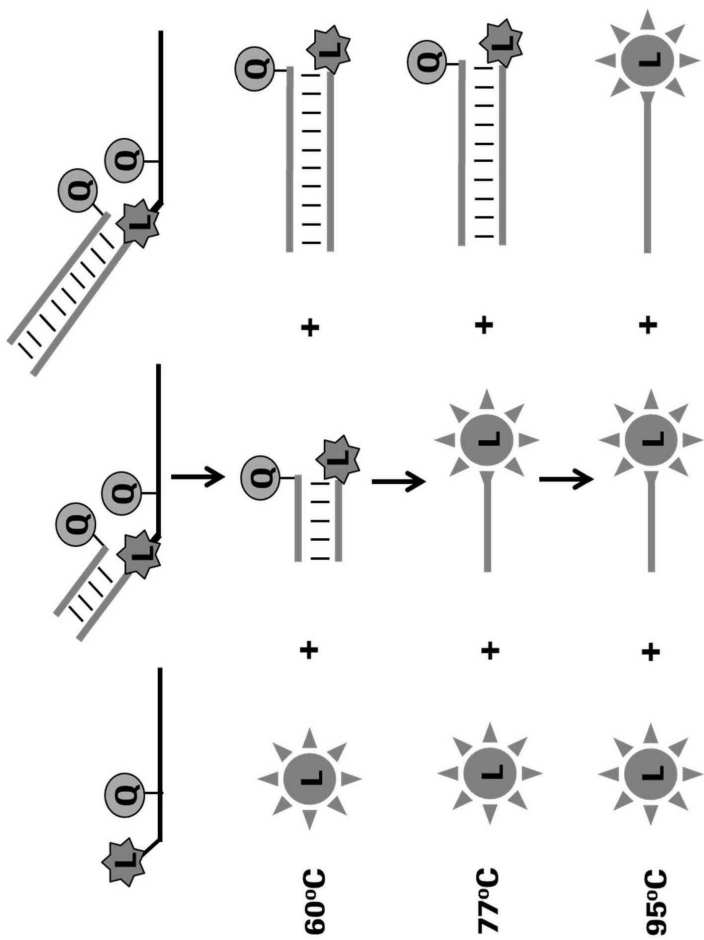
도면2



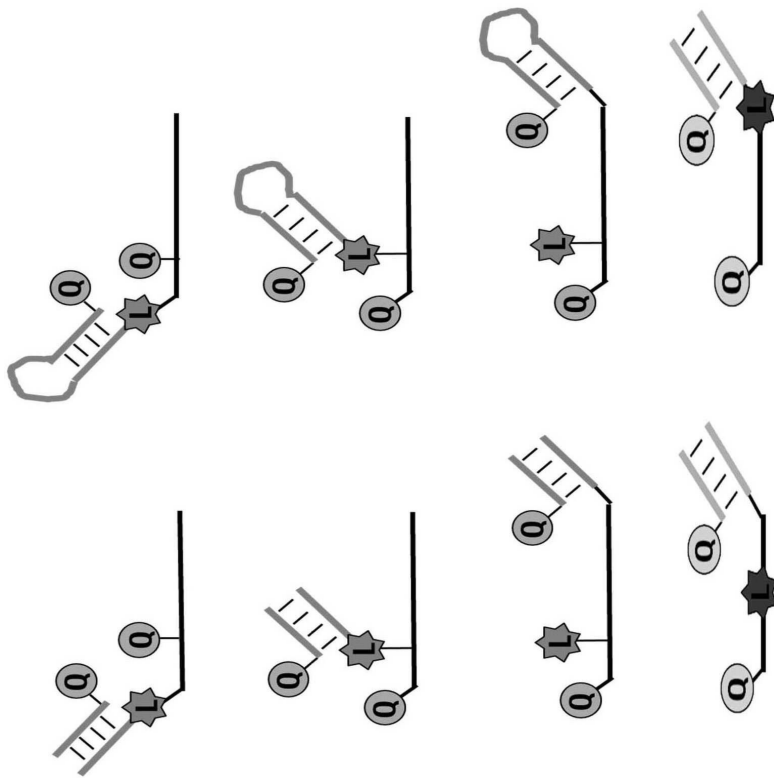
도면3



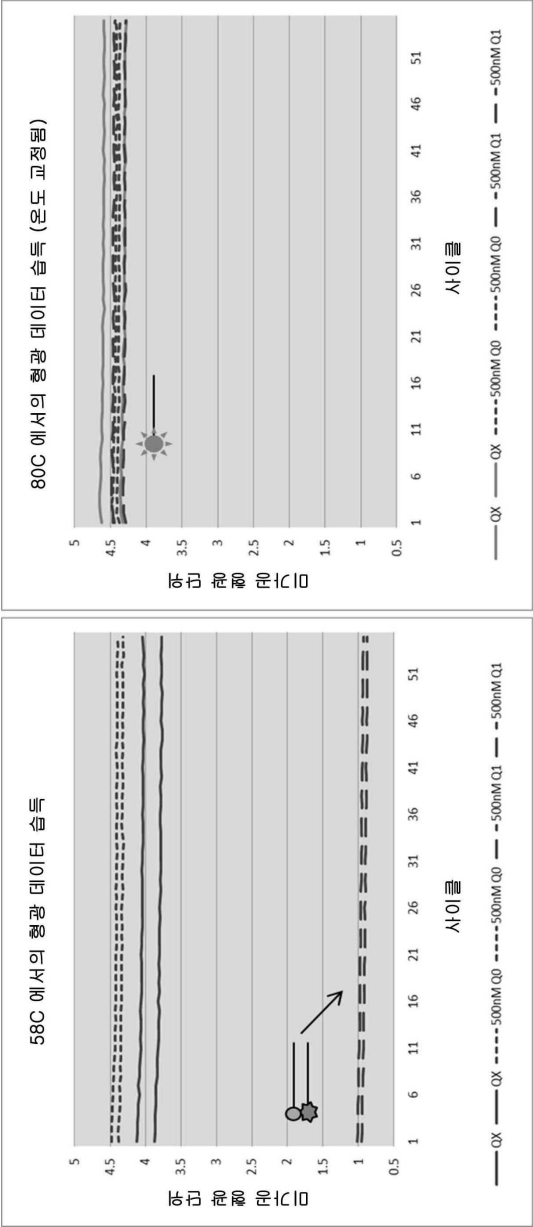
도면4



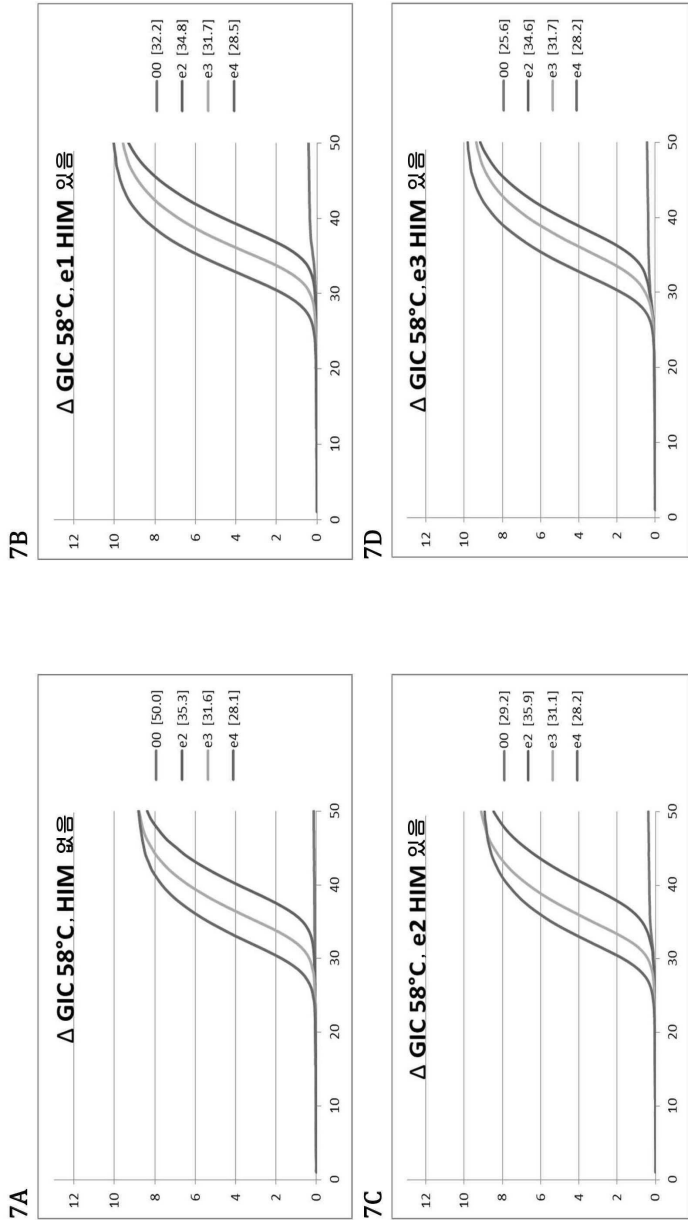
도면5



도면6

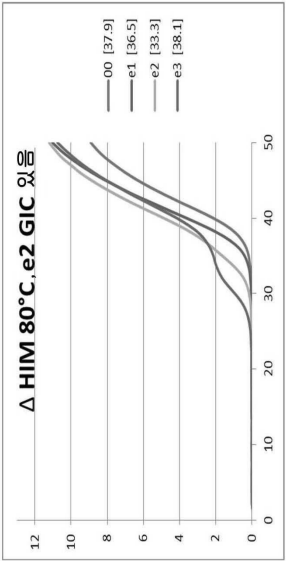


도면7

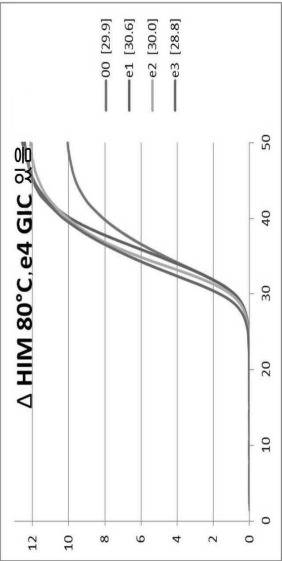


도면8

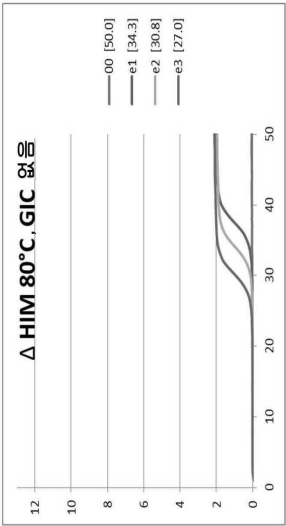
8B



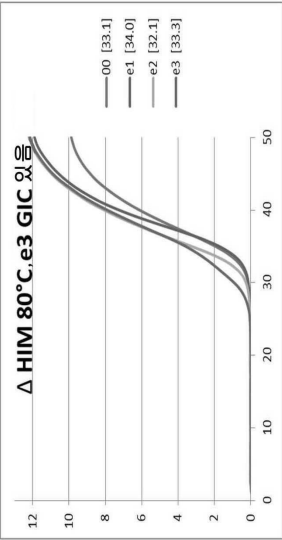
8D



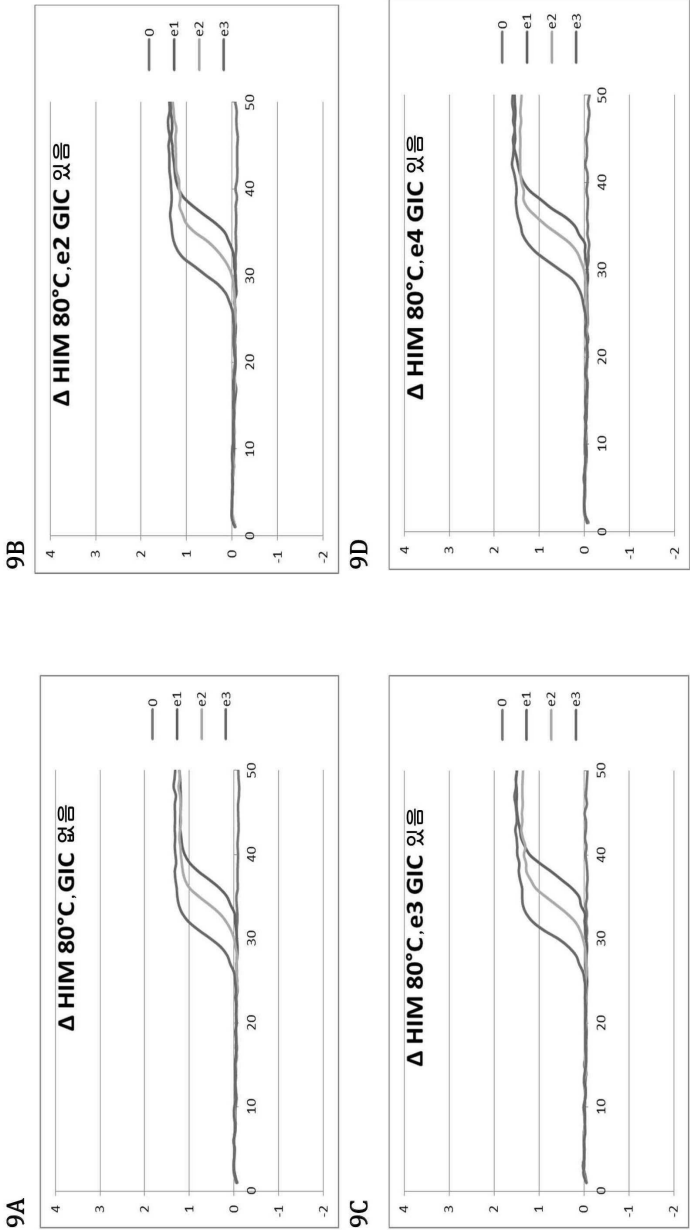
8A



8C

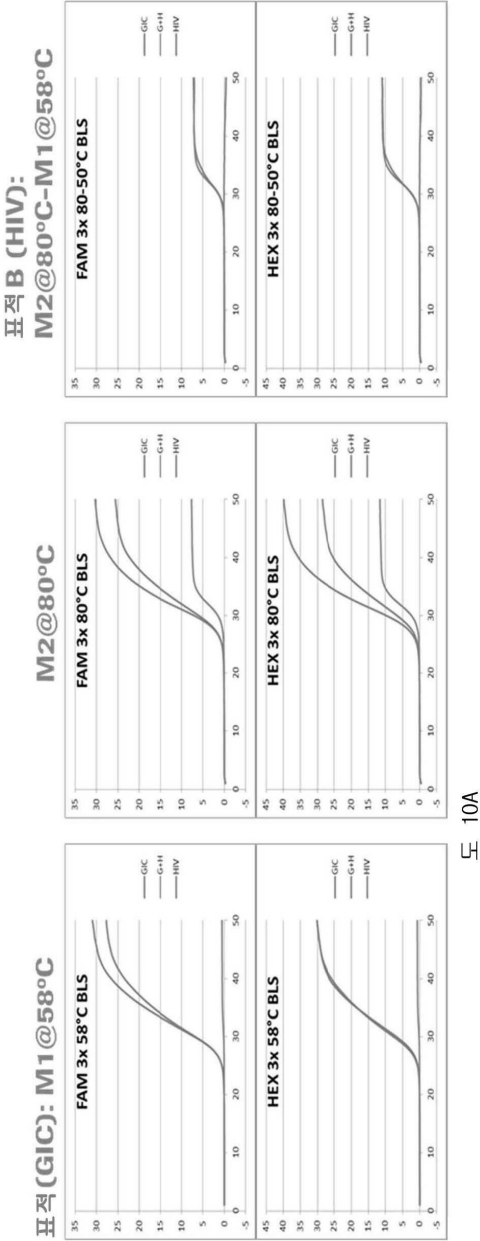


도면9

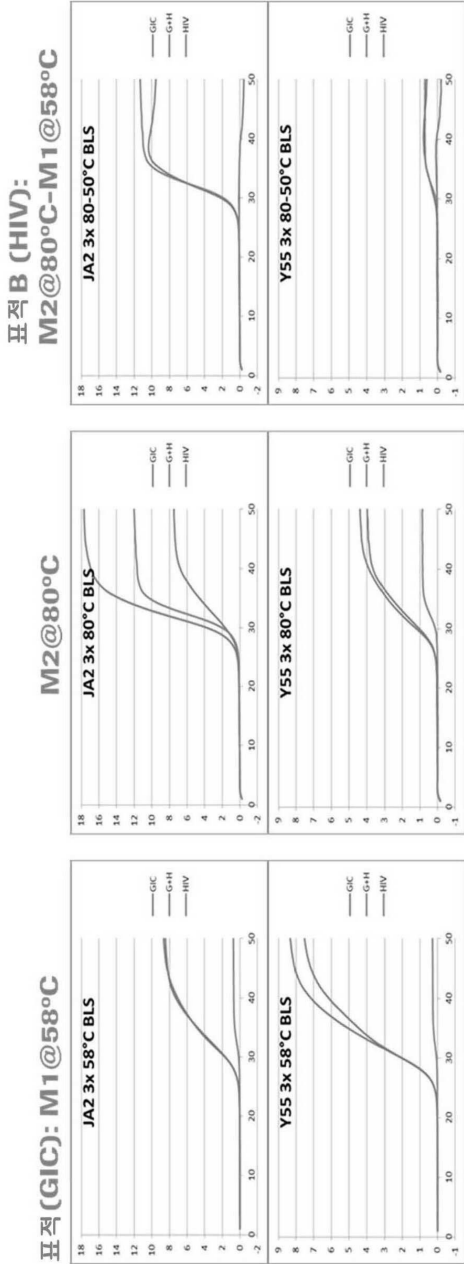




도면10a

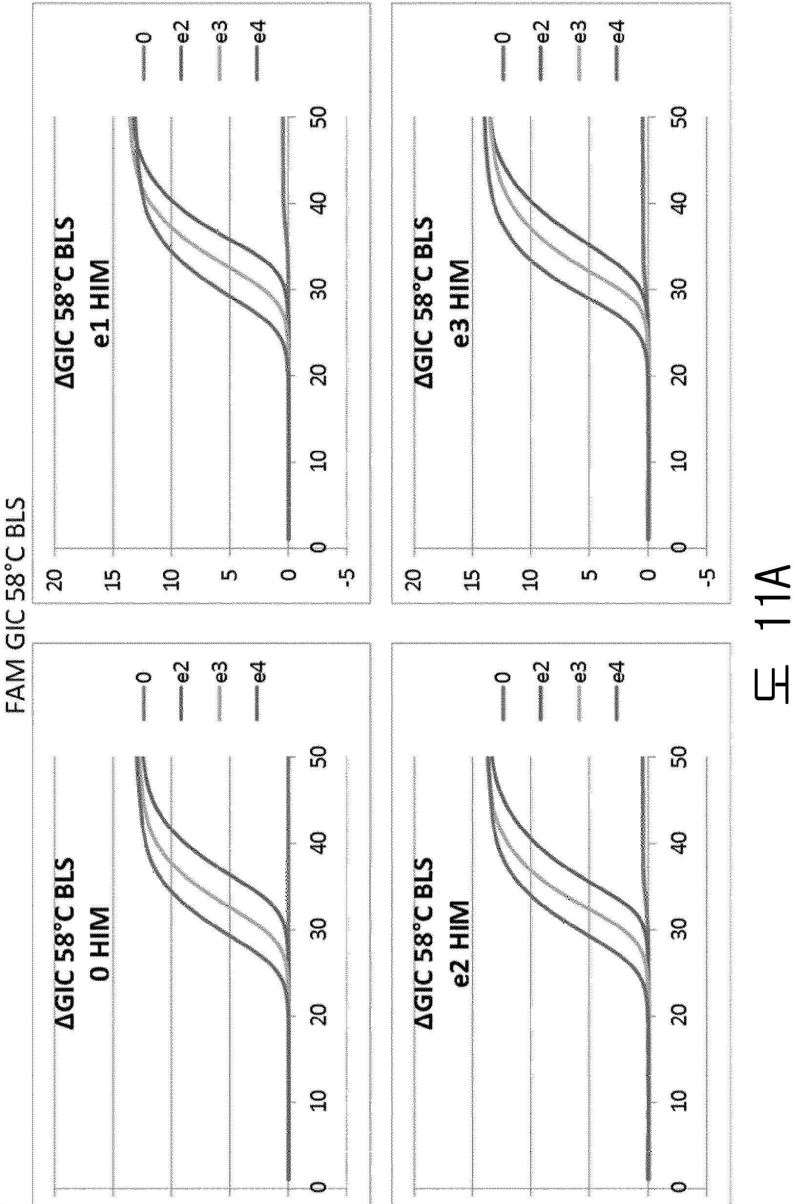


도면10b

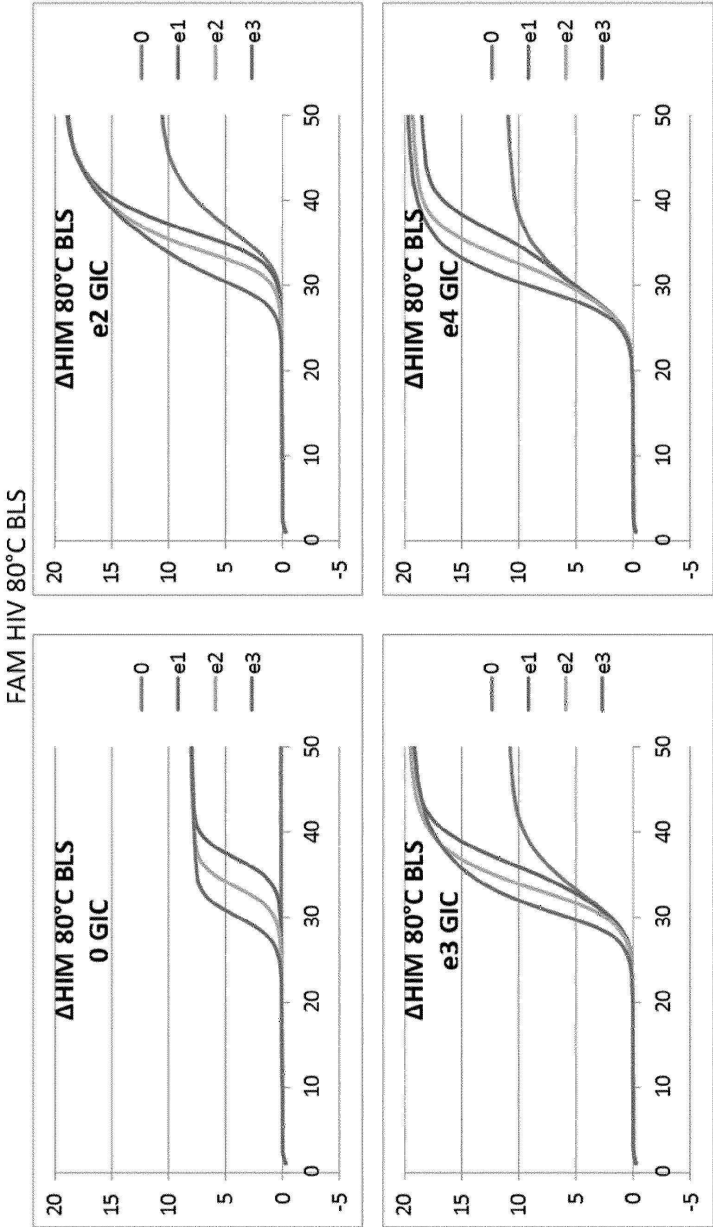


도 10B

도면11a

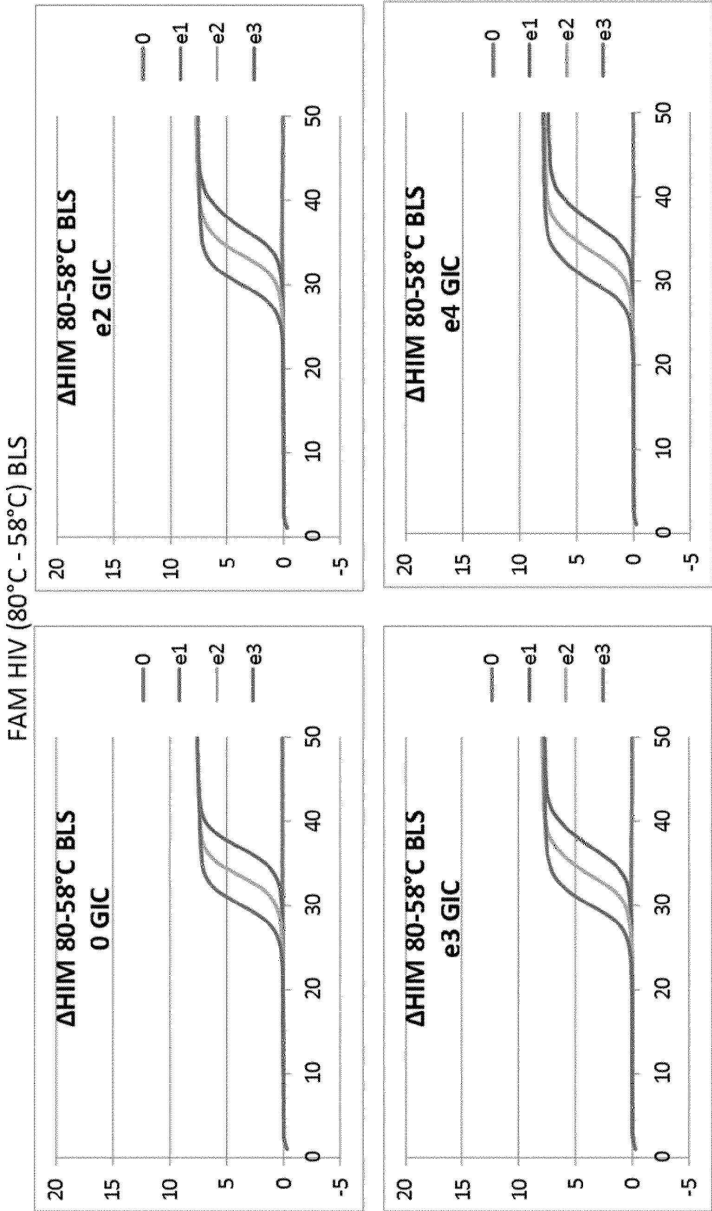


도면11b



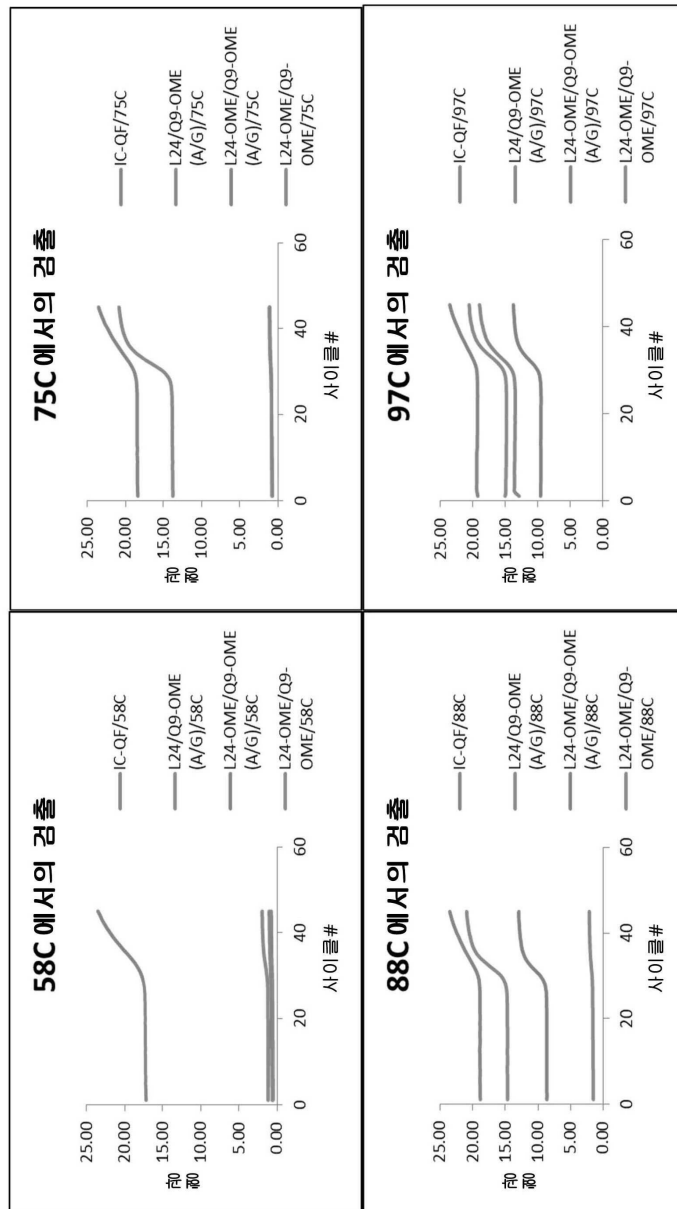
도 11B

도면11c



도 11C

도면12



## 서열 목록

- <110> Roche Diagnostics GmbH  
F. Hoffmann-La Roche AG  
Roche Molecular Systems, Inc.
- <120> Methods for Performing Multiplexed Real-Time PCR
- <130> P33677-WO-KOE
- <150> 62/395,325
- <151> 2016-09-15
- <150> 62/435,595
- <151> 2016-12-16

<150> 62/536,871  
 <151> 2017-07-25  
 <160> 6  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 9FAM9TAG oligonucleotide sequence  
 <400> 1  
 cgtcgccagt cagctccgt 20  
  
 <210> 2  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Q0 quenching oligonucleotide  
 <400> 2  
 ccggagctga ctggcgacg 19  
 <210> 3  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Q1 quenching oligonucleotide (BHQ-1 on 5` terminus)  
 <400> 3  
 ccggagctga ctggcgacg 19  
 <210> 4  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220><223> G0 TaqMan probe oligonucleotide  
 <400> 4  
 tgcgcgtccc gttttgatac ttcgtaacgg tgc 33  
 <210> 5

<211> 49  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> L24 Tagged probe oligonucleotide  
 <400> 5  
 tctctagcag tggcgcccgga acagggacca cacattggca cgcgcgtct 49  
 <210> 6  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Q9 quenching oligonucleotide  
 <400> 6  
 agacggcggt gccaatgtgt g 21