



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년11월08일  
(11) 등록번호 10-1916989  
(24) 등록일자 2018년11월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/68 (2018.01) C12M 1/10 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2014-7024457  
(22) 출원일자(국제) 2012년02월03일  
심사청구일자 2017년01월25일  
(85) 번역문제출일자 2014년09월01일  
(65) 공개번호 10-2015-0014908  
(43) 공개일자 2015년02월09일  
(86) 국제출원번호 PCT/AU2012/000089  
(87) 국제공개번호 WO 2013/113054  
국제공개일자 2013년08월08일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020080005224 A  
KR1020080009091 A

(73) 특허권자  
파이로베트 피티이 엘티디  
싱가포르, 싱가포르 149555, #02-02, 8 커몬웰스  
(72) 발명자  
콜베트, 존  
오스트레일리아, 뉴사우스 웨일즈 2030, 바우크루스, 37 더 크레센트  
콜베트, 에스엔알 존  
오스트레일리아, 퀸즐랜드 4216, 파라다이스 포인트, 48 나이트브리지 퍼레이드 웨스트  
(74) 대리인  
허용록

전체 청구항 수 : 총 23 항

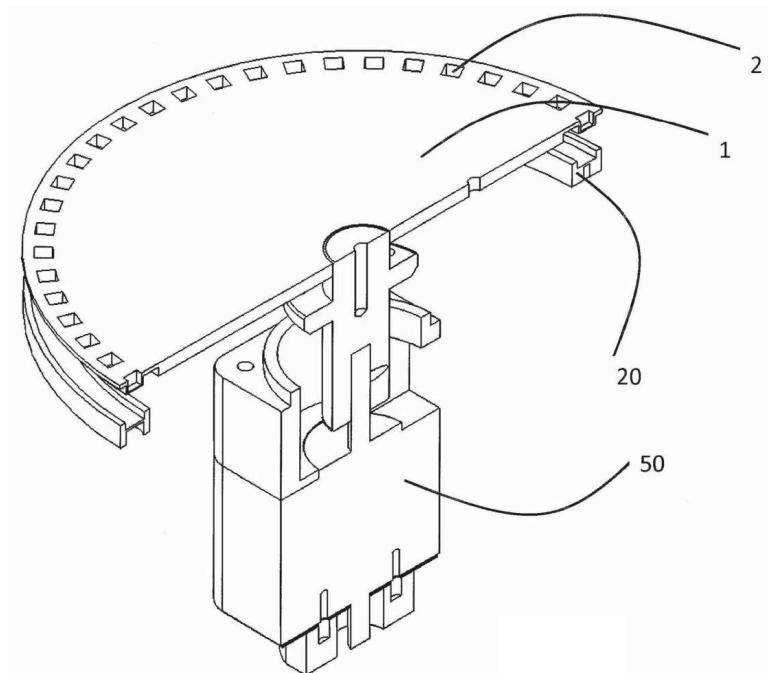
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **핵산 서열분석을 수행하기 위한 회전식 플랫폼**

(57) 요약

본 발명은 핵산 서열분석(sequencing)을 수행하기 위한 방법 및 장치에 관한 것이다. 방법은 적어도 하나의 지지 표면을 포함하기 위한 적어도 하나의 웰을 가지는 플랫폼을 제공하는 단계 및 각 웰 내에 적어도 하나의 지지 표면을 제공하는 단계를 포함하되, 각각의 지지 표면은 제1 결합 파트너를 고정하거나 선택적으로 제2 결합 파트너 (뒷면에 계속)

대표도



를 고정하도록 적응된다. 방법은 제1 또는 제2 결합 파트너를 지지 표면에 결합시키거나 고정시키는 단계 및 시약을 상기 플랫폼의 외부의 지점으로부터 각 웰로 분주하는 단계를 더 포함하되, 분주 단계 이후 플랫폼이 충분히 회전하여 임의의 잔류 또는 미반응 상기 시약을 각 웰 및/또는 각 지지 표면으로부터 실질적으로 원심력으로 제거하고, 회전 중에 각 지지 표면은 각 웰 내에 유지된다. 본 발명은 또한 핵산 서열분석을 수행하기 위한 키트 및 키트의 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 주로 파이로서열분석에 의한 핵산 서열분석용으로 개발되었지만, 본 발명은 이 분야에 제한되지는 않는다.

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

적어도 하나의 지지 표면을 수납하기 위한 적어도 하나의 개방형 웰을 가지는 회전식 플랫폼을 제공하는 단계로서, 상기 회전식 플랫폼은 그 안에 배치된 시약이 상기 플랫폼의 회전에 의해 상기 개방형 웰 및 상기 플랫폼으로부터 원심력으로 제거가능하도록 형상화되거나 치수화된 것인, 단계;

상기 각 개방형 웰에 자성 입자의 형태인 적어도 하나의 상기 지지 표면을 제공하는 단계로서, 상기 지지 표면은 폴리뉴클레오티드 분자를 고정하도록 조정되거나 그 위에 폴리뉴클레오티드 분자를 고정하고 있는 것인, 단계;

폴리뉴클레오티드 분자를 상기 자성 입자 상에 고정하는 단계;

올리고뉴클레오티드 프라이머를 상기 폴리뉴클레오티드 분자의 단일 가닥에 어닐링하는 단계;

상기 플랫폼의 외부 지점으로부터 일련의 파이로서열분석(pyrosequencing) 시약들을 상기 각 개방형 웰에 분주하는 단계로서, 하나 이상의 상기 분주 단계 이후 상기 플랫폼이 회전하여 잔류 또는 미반응 상기 시약을 상기 각 개방형 웰 및 상기 플랫폼으로부터 원심력으로 제거하되, 회전 중에 상기 각 자성 입자는 상기 각 개방형 웰 내에 자기적으로 유지되는 것인, 단계;

상기 각 웰에 파이로인산기가 존재하는지를 검정하는 단계; 및

상기 분주 및 검정 단계를 반복함으로써, 상기 폴리뉴클레오티드 분자를 서열분석(sequencing)하는 단계를 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자를 파이로서열분석하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 플랫폼의 회전 중에 상기 자성 입자(들)를 상기 개방형 웰들 내에 자기적으로 유지시키도록, 자석을 상기 플랫폼에 가깝게 위치시키는 단계를 더 포함하는, 방법.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 자석은 판 또는 고리 형태인, 방법.

#### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 자성 판 또는 고리는 상기 웰(들)을 150℃까지 가열함으로써 상기 자성 입자(들)를 가열하도록 더 적응되는 것인, 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 플랫폼의 회전 중에 상기 자성 입자(들)를 상기 웰 내에 자기적으로 유지하기 위해 전자석을 연결하는 단계를 더 포함하는, 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 플랫폼은 원형이고, 2 내지 500개의 개방형 웰들이 상기 원형 플랫폼의 주변부 주위에 분포된 것인, 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 플랫폼의 직경은 50 내지 500 mm 사이이고, 상기 플랫폼의 두께는 1 내지 6 mm인, 방법.

#### 청구항 8

제6항에 있어서,

상기 개방형 웰들이 0.5 내지 100  $\mu\text{L}$ 의 부피 또는 0.5 내지 5 mm의 웰 깊이를 포함하거나, 상기 개방형 웰들이 1 내지 50개의 자성 입자를 수용하도록 치수화된 것인, 방법.

#### 청구항 9

제1항에 있어서,

상기 플랫폼은 폴리카보네이트, 폴리스티렌, 내충격성 폴리스티렌, 폴리에틸렌 및 폴리프로필렌으로 이루어진 군으로부터 선택된 플라스틱 재료로 형성되거나 유리 또는 석영으로부터 형성된 것인, 방법.

#### 청구항 10

제1항에 있어서,

폴리뉴클레오티드 분자가 상기 각 자성 입자에 화학적으로 흡착되거나, 공유결합 또는 이온 결합 또는 수소 결합하거나, 반 데르 발스 힘이 상기 폴리뉴클레오티드 분자를 상기 각 자성 입자에 고정하는 것인, 방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서,

상기 파이로서열분석 시약들은 효소; 기질; A, T, G 또는 C 뉴클레오티드; 세척 시약 및 세정 시약 중 하나 이상으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 방법.

#### 청구항 12

제1항에 있어서,

회전식 플랫폼을 회전시키는 단계는 400 내지 1000 rpm 사이의 속도로 수행되어 상기 시약을 상기 웰들로부터 원심력으로 제거하고, 회전식 플랫폼을 10 내지 200 rpm의 속도로 회전시키면서 상기 시약을 분주하는 단계를 더 포함하는, 방법.

#### 청구항 13

제1항에 있어서,

플랫폼을 진동시켜서 상기 시약과 상기 자성 입자(들)를 함께 완전히 혼합하는 단계를 더 포함하는, 방법.

#### 청구항 14

제1항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드 분자는 DNA 또는 RNA 또는 이의 변형된 형태인 것인, 방법.

#### 청구항 15

제1항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드 분자는 비오틴화되고, 상기 자성 입자(들)는 비오틴화 폴리뉴클레오티드 분자에 결합하기 위해 아비딘 또는 스트렙트아비딘 또는 유사체를 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 16

제1항에 있어서,

상기 일련의 파이로서열분석 시약들을 분주하는 단계는 다음 중 하나를 포함하는 것인, 방법:

- a) 각각의 뉴클레오티드를 개별적 및 순차적으로 첨가하는 단계, 또는
- b) A+T+G+C 뉴클레오티드 또는 A+T+G+C 뉴클레오티드의 하위세트를 혼합물로서 첨가하는 단계 및 첨가 단계를 1회 이상 반복하는 단계.

#### 청구항 17

제1항에 있어서,

상기 각 개방형 웰 내의 파이로인산기의 존재에 대한 상기 검정 단계는 상기 각 개방형 웰 내의 광신호를 검출하는 단계를 포함하는 것인, 방법

#### 청구항 18

제1항에 있어서,

폴리뉴클레오티드 분자는 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 분자이고, 방법은 어닐링 이전에 이중가닥 폴리뉴클레오티드 분자를 변성시키는 단계를 더 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 19

제18항에 있어서,

상기 변성 단계는 변성을 시행하기 위해 상기 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 분자를 가열하는 단계 또는 상기 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 분자를 상승된 pH에 노출시키는 단계를 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 20

제1항에 있어서,

상기 개방형 웰(들)을 세척 시약으로 세척하는 단계 및 효소 처리 단계를 더 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 21

제20항에 있어서,

상기 세척 단계는 1회 이상의 분주 단계 이후에 일어나는 것인, 방법.

#### 청구항 22

제11항에 있어서,

상기 효소는 DNA 중합효소, ATP 설푸릴라제, 루시페라제, 및 아파라제 중 하나 이상을 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 23

제11항에 있어서,

상기 기질은 아데노신 5' 포스포설페이트(adenosine 5' phosphosulfate, APS) 또는 루시페린을 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 24

삭제

#### 청구항 25

삭제

#### 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

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 검정을 수행하기 위한 방법 및 장치에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 검정, 특히 다단계 검정을 수행하기 위해 사용될 수 있는 회전식 플랫폼에 관한 것이다. 본 발명은 주로 파이로서열분석(pyrosequencing)에 의한 핵산 서열분석(sequencing)에 사용하기 위해 개발되었고, 이하에서 본 명세서에 참조로 기재될 것이지만, 본 발명이 이러한 특정한 사용 분야에 제한되지 않는 것으로 이해될 것이다.

## 배경 기술

[0002] 종래 기술에 대한 다음의 논의는 본 발명을 적절한 기술적 맥락에 두고, 본 발명의 이점을 보다 완전히 이해할 수 있도록 하기 위해 제공된다. 그러나, 본 명세서 전체에 걸쳐 종래 기술에 대한 어떠한 논의도 이러한 종래 기술이 당해 분야의 일반적인 상식의 일부분을 형성하거나 널리 공지되어 있다는 것에 대한 분명하거나 암묵적인 인정으로 여겨져서는 안 되는 것으로 이해되어야 한다.

[0003] DNA 뉴클레오티드 서열을 결정하는 능력은 최근 상당히 중요해지고 있다. 앞서, DNA 서열분석(sequencing)을 위해 가장 흔히 사용되는 2가지 방법은 효소 사슬 종결법 및 화학적 절단 기술로서, 두 가지 모두 더 큰 DNA 세그먼트로부터 생성된 DNA 단편을 그들의 크기에 따라 분리하기 위해 겔 전기영동에 의존하고 있다. 전기영동 단계 및 분리된 DNA 단편의 검출은 번거로운 절차이다. 그러나, 자동화된 전기영동 기기가 상업적으로 이용가능함에도, 전기영동은 높은 처리량을 가지면서 상대적으로 비용 효율적인 기기가 요구되는 대규모 유전자 프로젝트 또는 임상적 서열분석에 잘 맞지 않는다. 따라서, 서열분석을 위한 비전기영동 방법에 대한 필요성이 의미가 있다.

[0004] 중합효소 반응 중에 방출되는 무기 파이로인산(pyrophosphate, PPi)을 검출하는 개념에 기반한 서열분석 방법이 이전에 기술되어 있고(국제 PCT 공개 WO 93/23564 및 WO 89/09283을 참조), 흔히 파이로서열분석(pyrosequencing)으로 지칭된다. 각 뉴클레오티드가 중합 반응 동안 성장하는 핵산 가닥에 첨가되면서, 파이로인산 분자가 방출된다. 이러한 조건 하에서 방출되는 파이로인산은 효소적으로, 예컨대, 루시페라제-루시페린 반응에서의 광생성에 의해 검출될 수 있는 것으로 밝혀져 있다. 이러한 방법은 전기 영동에 대한 필요성 및 해로운 방사성표지의 사용을 피하면서 표적 위치에서 염기를 식별하고 간단하고 빠르게 DNA 서열분석을 할 수 있게 한다.

[0005] 파이로서열분석을 수행하기 위한 초기의 종래 기술의 방법은 0.2 mL 마이크로 원심분리기 튜브(또는 유사체)를 사용하고, 튜브 내에 존재하는 DNA의 서열을 검출하기 위해 순차적으로 튜브에 시약을 첨가하였다. 이러한 방법은 상대적으로 간단하지만, 이 방법은 리드(read) 길이가 짧은 단점을 가지는데, 이는 반응물이 각 뉴클레오티드 시약의 첨가 시마다 희석되고/되거나 반응 부산물이 축적되어, 반응 조건이 반응이 더 이상 진행될 수 없는 지점에 도달하기 때문이다. 예를 들어, 통상적으로는, 단지 약 80개의 염기만이 이러한 방법으로 신뢰할만하게 서열분석된다.

[0006] 파이로서열분석을 활용하는 상업적인 장비도, 또한, 개발되어 왔다. 이러한 시스템은 표적 DNA/RNA 분자의 혼성화를 수행하기 위해 유동 세포를 사용한다. 설명하자면, 단일 가닥 DNA가 유동 세포 내에 위치한 고정 비드에, 통상적으로는 이중 가닥 DNA를 고정시키고 상보적 가닥을 변성시킴으로써 고정된다. 뉴클레오티드(A, G, C, 또는 T)를 포함하는 시약이 비드를 통과하여 유동하고 뉴클레오티드가 삽입된 경우 광이 검출된다. 광신호 강도는 단일 반응 내에서 삽입된 뉴클레오티드의 수에 비례한다. 비드를 상이한 뉴클레오티드들에 노출하는 단계 사이에 세척 단계가 또한 수행되고, 다음 뉴클레오티드의 삽입을 검출하기 위해 과정이 반복된다.

[0007] 합성에 의해 서열분석하는 다른 방법, 예를 들어 형광 표지된 뉴클레오티드를 사용하는 방법들이 또한 알려져 있다. 이러한 방법에서, DNA 시료는 우선 단편화되고, DNA 이중 나선은 단일 가닥으로 용해된다. 단일 DNA 분자가 유동 세포 내 표면에 포획되고, 합성 과정에 의한 서열분석에 대한 주형으로서의 역할을 한다. 형광 표지된 뉴클레오티드들은 한 번에 한 가지씩 첨가되고, DNA 중합효소에 의해 성장하는 상보적인 가닥에 삽입된다. 미사용 뉴클레오티드는 세척되어 제거된다. 레이저로 투광하에서, 삽입된 뉴클레오티드는 검출되는 광을 방출한다. 사이클을 계속하기 위해 다음 뉴클레오티드를 첨가하기 전에 형광 표지가 제거된다. 뉴클레오티드 삽입을 추적하는 것은 각각의 개별 DNA 분자의 정확한 서열을 결정한다.

[0008] 라이게이션에 의한 서열분석도, 또한, 공지되어 있다. 이러한 DNA 서열분석 방법은 DNA 서열 내 주어진 위치에 존재하는 뉴클레오티드를 식별하기 위해 DNA 리가아제 효소를 사용한다. DNA 리가아제 효소의 부정합(mismatch) 민감성이 표적 DNA 분자의 숨겨진 서열을 결정하기 위해 사용된다. 예를 들어, 미국 특허 제5,750,341호 및 제4,883,750호를 참조한다.

[0009] 다양한 화학 및 검출 방법으로 사용할 수 있는 검정 및 분석, 특히 핵산 서열분석에 사용되고 있는 것과 같이



다중 반응 및 세척 단계를 수반하는 검정을 수행하기 위한 장치가 필요하다. 또한, 유동 환경이 요구되는 검정법의 편리한 대체로서 사용할 수 있거나, 핵산 서열분석의 경우에 부산물의 형성이 최대 서열분석 리드 길이를 제한할 수 있는 고정된 반응 용기 검정법을 대체하기 위해 사용할 수 있는 장치가 필요하다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 목적은, 앞서 언급된 종래 기술의 단점 중 적어도 하나를 극복하거나 개선하거나 또는 유용한 대안을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 지지 표면을 수용하기 위한 적어도 하나의 웰을 가지고 각 웰에 적어도 하나의 지지 표면이 적재된 회전식 플랫폼을 사용하는 방법에 관한 것이다. 지지 표면은 제1 및 제2 결합 파트너 쌍의 제1 또는 제2 결합 파트너를 결합시키거나 고정시키도록 적응된다. 제1 및 제2 결합쌍은, 바람직하게는 핵산 서열분석(sequencing), 더욱 바람직하게는 파이로서열분석(pyrosequencing)인 검정의 일부분이다. 검정을 위한 시약들이 웰에 분주되고 플랫폼의 외부 지점으로부터의 지지 표면과 접촉한다. 사용되거나 소비된 시약은 플랫폼의 충분한 회전에 의한 원심력으로 제거될 수 있고, 지지 표면은 원심분리 중에 웰 내에 유지된다. 지지 표면을 보유하기 위한 임의의 방법은 본 발명의 범위 안에 속하며, 단지 예시의 방식으로, 지지 표면은 바람직하게는 자성 비드이고, 원심분리 중에 자성 비드를 웰 내에 보유하기 위해 자석이 사용된다. 파이로서열분석의 맥락에서, 바람직하게는 단일 가닥 DNA(ssDNA)가 원심분리 세척법에 의해 분리된다. 각각의 시약의 새로운 첨가, 또는 다수 회의 첨가 후 시약이 제거될 수 있다. 원심분리 세척 단계는 지지 표면을 건조하여 지지 표면을 후속 시약에 대해 준비시키고, 또한, 검정으로부터 원치 않는 부산물들을 제거한다. 본 발명은, 또한, 플랫폼을 회전시키고 지지 표면을 각각의 웰 내에 유지하기 위한 장치 및 플랫폼 및 지지 표면을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0012] 제1 양태에 의하면, 본 발명은:

[0013] 적어도 하나의 지지 표면을 수용하기 위한 적어도 하나의 웰을 가지는 플랫폼을 제공하는 단계;

[0014] 제1 결합 파트너를 고정시키도록 적응된 적어도 하나의 상기 지지 표면을 상기 각 웰 내에 제공하는 단계;

[0015] 상기 제1 결합 파트너를 상기 지지 표면에 결합시키거나 고정시키는 단계; 및

[0016] 상기 플랫폼의 외부 지점으로부터 상기 각 웰로 시약을 분주하는 단계로서, 상기 분주 단계 이후 상기 플랫폼이 충분히 회전하여 임의의 잔류 또는 미반응 상기 시약을 상기 각 웰 및/또는 상기 각 지지 표면으로부터 실질적으로 원심력으로 제거하되, 회전 중에 상기 각 지지 표면은 상기 각 웰 내에 유지되는 것인, 단계를 포함하는 핵산 서열분석을 수행하기 위한 방법을 제공한다.

[0017] 바람직하게, 핵산 서열분석은 파이로서열분석이다.

[0018] 바람직하게, 지지 표면은 자성 입자의 형태이고, 상기 플랫폼의 회전 중에 상기 자성 입자(들)를 상기 웰 내에 자기적으로 유지시키도록 상기 플랫폼에 충분히 가깝게 자석을 위치시킴으로써 상기 자성 입자는 상기 웰 내에 자기적으로 유지된다. 바람직하게, 자석은 플랫폼 아래에 놓여진 판 또는 고리 형태이다. 바람직한 구현예에서, 자성 판 또는 고리는 상기 웰(들)을 약 150℃까지 가열함으로써 상기 지지 표면을 가열하도록 더 적응된다. 그러나, 대안적인 구현예에서, 상기 플랫폼의 회전 중에 상기 자성 입자(들)를 상기 웰 내에 자기적으로 유지하기 위해 전자석이 연결된다.

[0019] 바람직한 구현예에서, 플랫폼은 실질적으로 원형이고 상기 웰은 상기 원형 플랫폼의 주변부 주위에 분포된다. 바람직하게는, 약 2 내지 500개의 웰이 상기 플랫폼의 주변부 주위에 분포되고, 상기 플랫폼의 직경은 약 50 내지 500 mm 사이이고, 상기 플랫폼의 두께는 약 1 내지 6 mm이다. 바람직하게, 웰은 약 0.5 내지 100  $\mu$ l의 부피 또는 약 0.5 내지 5 mm의 웰 깊이를 포함한다. 바람직하게, 웰은 약 1 내지 약 50 개의 별개의 지지 표면들을 수용하도록 치수화된다.

[0020] 대안적인 구현예에서, 웰은 상기 플랫폼의 회전 중에 상기 지지 표면을 수용하기 위한 홈을 포함하되, 상기 홈은 상기 플랫폼의 회전 중에 상기 지지 표면은 보유하지만 상기 시약은 통과시키도록 적응된 필터를 포함하여 임의의 잔류 또는 미반응 상기 시약이 상기 각 웰 및/또는 상기 각 지지 표면으로부터 실질적으로 원심력으로 제거되도록 한다.

- [0021] 바람직하게, 플랫폼은 폴리카보네이트, 폴리스티렌, 내충격성 폴리스티렌, 폴리에틸렌 및 폴리프로필렌으로 이루어진 군으로부터 선택된 플라스틱 재료로 형성되거나 유리 또는 석영으로부터 형성된다. 바람직하게, 회전 중에 상기 플랫폼으로부터 탈수되거나 원심분리되어 나가는 폐 유체를 수용하기 위해 상기 플랫폼의 주변부에 홈통(trough)이 배치된다.
- [0022] 바람직하게, 제1 결합 파트너는 상기 지지 표면에 화학적으로 흡착되거나, 공유결합 또는 이온 결합 또는 수소 결합하거나, 반 데르 발스 힘이 상기 제1 결합 파트너를 상기 지지 표면에 고정한다.
- [0023] 바람직하게, 일련의 시약들이 상기 각 웰에 분주되고, 일련의 시약들 중 첫번째는 제1 결합 파트너에 대한 제2 결합 파트너를 포함하고, 후속 시약은 세척 및/또는 세정 시약 및 검출 신호를 현상하기 위한 시약으로부터 선택된다. 바람직하게, 본 발명의 방법은 상기 각 분주 단계 중 및/또는 이후에 핵산 서열분석을 분석하는 단계를 더 포함한다.
- [0024] 바람직하게, 본 발명의 방법은 회전식 플랫폼을 약 10 내지 200 rpm 사이의 속도로 회전시키면서 상기 시약을 분주하는 단계 및 회전식 플랫폼을 400 rpm을 초과하는 속도로 회전시켜서 상기 웰로부터 상기 시약을 실질적으로 원심력으로 제거하는 단계를 더 포함한다. 바람직하게, 플랫폼은 분주 단계 중에 시약이 웰로부터 원심력으로 제거되지 않도록 충분히 낮은 속도로 회전하고, 세척 또는 건조 단계 중에 시약이 웰로부터 원심력으로 제거되도록 충분히 높은 속도로 회전한다. 바람직하게, 충분히 높은 속도는 400 rpm 초과이고, 1000, 2000, 3000, 4000 rpm 이상일 수 있다.
- [0025] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 시약과 상기 지지 표면(들)을 완전히 혼합하기 위해 플랫폼을 충분히 진동시킨다.
- [0026] 제2 양태에 따르면, 본 발명은 하나 이상의 지지 표면을 수용하기 위한 적어도 하나의 웰을 가지는 플랫폼 및 제1 결합 파트너를 고정시키도록 적응된 적어도 하나의 지지 표면을 키트 내에 포함하는 키트가 제공된다. 바람직하게, 지지 표면은 상기 웰 내에 수용되고, 상기 웰 내에 상기 지지 표면을 보유하기 위해 제거가능한 일회용 시트가 상기 플랫폼의 표면에 부착된다. 바람직하게, 키트는 핵산 서열분석, 특히, 파이로서열분석을 수행하기 위한 하나 이상의 시약들을 포함한다.
- [0027] 제3 양태에 따르면, 본 발명은:
- [0028] 회전식 플랫폼을 소정의 제어가능하고 사용자 선택가능한 회전 속도로 회전시키기 위한 장치;
- [0029] 상기 플랫폼의 웰 내에 자성 입자를 보유하기 위해 상기 회전식 플랫폼에 자석을 연결하기 위한 장치;
- [0030] 제1 결합 파트너를 상기 자성 입자에 고정시키기 위해 상기 제1 결합 파트너를 상기 웰에 선택적으로 분주하기 위한 장치;
- [0031] 시약을 상기 웰에 분주하기 위한 장치; 및
- [0032] 세척 시약을 선택적으로 분주하기 위한 장치를 포함하는 핵산 서열분석을 수행하기 위한 장치를 제공한다.
- [0033] 제4 양태에 의하면, 본 발명은:
- [0034] 적어도 하나의 지지 표면을 수용하기 위한 적어도 하나의 웰을 가지는 플랫폼을 제공하는 단계;
- [0035] 제2 결합 파트너를 고정시키도록 적응된 적어도 하나의 상기 지지 표면을 상기 각 웰 내에 제공하는 단계;
- [0036] 상기 제2 결합 파트너를 선택적으로 상기 지지 영역에 결합시키거나 고정시키는 단계; 및
- [0037] 상기 플랫폼의 외부 지점으로부터 상기 각 웰로 시약을 분주하는 단계로서, 상기 분주 단계 이후 상기 플랫폼이 충분히 회전하여 임의의 잔류 또는 미반응 상기 시약을 상기 각 웰 및/또는 상기 각 지지 표면으로부터 실질적으로 원심력으로 제거하되, 회전 중에 상기 각 지지 표면은 상기 각 웰 내에 유지되는 것인, 단계를 포함하는 핵산 서열분석을 수행하기 위한 방법을 제공한다.
- [0038] 바람직하게, 제1 결합 파트너는 이미 상기 지지 표면에 화학적으로 흡착되거나, 공유결합 또는 이온 결합 또는 수소 결합하거나, 반 데르 발스 힘이 제1 결합 파트너를 상기 지지 표면에 고정하고, 상기 제2 결합 파트너는 상기 지지 표면에 이미 결합한 제1 결합 파트너에 결합가능하거나 반응가능하다.
- [0039] 바람직하게, 일련의 시약들이 상기 각 웰에 분주되고, 일련의 시약들 중 첫번째는 제1 결합 파트너에 대한 제2 결합 파트너를 포함하고, 후속 시약은 세척 및/또는 세정 시약들로부터 선택된다.

- [0040] 제5 양태에 따르면, 본 발명은 하나 이상의 지지 표면을 수용하기 위한 적어도 하나의 웰을 가지는 플랫폼 및 제2 결합 파트너를 선택적으로 결합시키거나 고정시키도록 적응된 적어도 하나의 지지 표면을 포함하는 키트가 제공된다.
- [0041] 제6 양태에 따르면, 본 발명은:
- [0042] 회전식 플랫폼을 소정의 제어가능하고 사용자 선택가능한 회전 속도로 회전시키기 위한 장치;
- [0043] 상기 플랫폼의 웰 내에 자성 입자를 보유하기 위해 상기 회전식 플랫폼에 자석을 연결하기 위한 장치;
- [0044] 제2 결합 파트너를 상기 자성 입자에 선택적으로 고정시키기 위해 상기 제2 결합 파트너를 상기 웰에 선택적으로 분주하기 위한 장치;
- [0045] 시약을 상기 웰에 분주하기 위한 장치; 및
- [0046] 세척 시약을 선택적으로 분주하기 위한 장치를 포함하는 핵산 서열분석, 예컨대, 파이로서열분석을 수행하기 위한 장치를 제공한다.
- [0047] 제7 양태에 의하면, 본 발명은:
- [0048] 적어도 하나의 지지 표면을 수용하기 위한 적어도 하나의 웰을 가지는 플랫폼을 제공하는 단계;
- [0049] 핵산 가닥 결합 파트너를 고정시키도록 적응된 적어도 하나의 상기 지지 표면을 상기 각 웰 내에 제공하는 단계;
- [0050] 상기 핵산 가닥 결합 파트너를 상기 지지 표면에 결합시키거나 고정시킨 후 선택적으로 핵산 가닥을 상기 지지 표면에 결합시키거나 고정시키는 단계;
- [0051] 임의의 상보적인 핵산 가닥을 선택적으로 변성시키고 제거하는 단계, 서열분석 프라이머를 상기 지지 표면에 어닐링하는 단계; 및
- [0052] 상기 플랫폼의 외부 지점으로부터 상기 각 웰로 A, T, G 및/또는 C 뉴클레오타이드 또는 적합한 각각의 뉴클레오타이드 유사체를 포함하는 일련의 시약들을 순차적으로 분주하는 단계로서, 각각의 또는 임의의 상기 분주 단계 이후 상기 플랫폼이 충분히 회전하여 실질적으로 임의의 잔류 또는 미반응 상기 시약을 상기 각 웰 및/또는 상기 각 지지 표면으로부터 실질적으로 원심력으로 제거하되, 회전 중에 상기 각 지지 표면은 상기 각 웰 내에 유지되는 것인, 단계를 포함하는 핵산 가닥 서열분석을 수행하기 위한 방법을 제공한다.
- [0053] 바람직하게, 핵산 가닥은 DNA 또는 RNA 또는 이의 변형된 형태이다. 바람직하게, 핵산 가닥의 서열분석은 파이로서열분석이다.
- [0054] 바람직하게, 핵산 가닥은 비오틴화되고, 핵산 가닥 결합 파트너는 비오틴화 핵산 가닥에 결합하기 위해 아비딘 또는 스트렙타아비딘 또는 이의 유사체를 포함한다.
- [0055] 바람직하게, 각 지지 표면은 A, T, G, 및/또는 C 뉴클레오타이드를 포함하는 일련의 시약들과 순차적으로 접촉한다.
- [0056] 바람직하게, 순차적인 접촉/분주 단계는 다음 중 하나를 포함한다:
- [0057] a.) 각각의 뉴클레오타이드 또는 그의 유사체가 임의의 원하는 또는 소정의 순서로 개별적 및 순차적으로 첨가된다,
- [0058] b.) A+T+G+C 뉴클레오타이드 또는 임의의 소정의 또는 원하는 A+T+G+C 뉴클레오타이드의 하위세트가 혼합물로서 첨가되고, 상기 혼합물이 다시 첨가된다.
- [0059] 바람직하게는, 상기 각 분주 단계 중 및/또는 이후에 상기 핵산 가닥을 분석하는 단계를 더 포함한다. 바람직하게, 분석은 광의 산출을 핵산 가닥에 결합하게 된 뉴클레오타이드의 숫자와 상호연관시킴으로써 상기 핵산 가닥 내 다음 염기 쌍을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0060] 바람직하게, 변성 단계는 변성을 시행하기 위해 핵산 가닥을 가열하는 단계 또는 핵산 가닥을 상승된 pH에 노출시키는 단계를 포함한다.
- [0061] 바람직하게, 방법은 상기 핵산 가닥이 변성된 후, 상보적인 가닥을 세정 시약으로 세정 단계에 의해 제거하는 단계를 포함한다.

- [0062] 바람직하게, 상기 각 지지 표면은 상기 지지 표면이 실질적으로 시약으로의 오염이 없도록 임의의 잔류시약을 실질적으로 원심력으로 제거하기 위한 상기 플랫폼의 회전에 의해 상기 지지 표면을 실질적으로 건조함으로써 상기 각 후속 시약에 대해 준비된다.
- [0063] 제8 양태에 따르면, 본 발명은 하나 이상의 지지 표면을 수용하기 위한 적어도 하나의 웰을 가지는 회전식 플랫폼 및 핵산 가닥 결합 파트너를 고정시키도록 적용된 적어도 하나의 지지 표면을 포함하는 핵산 가닥의 서열분석을 수행하기 위한 키트를 제공한다.
- [0064] 제9 양태에 따르면, 본 발명은 핵산 가닥 서열분석을 수행하기 위한 제8 양태에 따른 키트의 용도를 제공한다. 바람직하게, 검정법은 파이로서열분석이다.
- [0065] 제10 양태에 따르면, 본 발명은:
- [0066] 회전식 플랫폼을 소정의 제어가능하고 사용자 선택가능한 회전 속도로 회전시키기 위한 장치;
- [0067] 상기 회전식 플랫폼의 웰 내에 자성 입자를 보유하기 위해 상기 회전식 플랫폼에 자석을 연결하기 위한 장치;
- [0068] 핵산 가닥 결합 파트너를 상기 자성 입자에 고정시키기 위해 상기 핵산 가닥 결합 파트너를 상기 웰에 선택적으로 분주하기 위한 장치;
- [0069] 핵산 가닥을 상기 자성 입자에 선택적으로 고정시키기 위해 상기 핵산 가닥을 상기 웰에 선택적으로 분주하기 위한 장치;
- [0070] 임의의 상보적인 핵산 가닥을 선택적으로 변성시키고 선택적으로 제거하기 위한 장치;
- [0071] A, T, G, 및/또는 C 뉴클레오티드 또는 그들 각각의 유사체 또는 이들의 조합을 상기 웰에 분주하기 위한 장치;
- [0072] 세척 시약을 분주하기 위한 장치; 및
- [0073] 하나 이상의 효소 용액을 선택적으로 분주하기 위한 장치를 포함하는 핵산 가닥을 서열분석하기 위한 장치를 제공한다.
- [0074] 제11 양태에 의하면, 본 발명은:
- [0075] 적어도 하나의 지지 표면을 수용하기 위한 적어도 하나의 웰을 가지는 플랫폼을 제공하는 단계;
- [0076] 핵산 가닥을 선택적으로 고정시키도록 적용된 적어도 하나의 상기 지지 표면을 상기 각 웰 내에 제공하는 단계;
- [0077] 핵산 가닥을 상기 지지 표면에 선택적으로 결합시키거나 고정시키는 단계;
- [0078] 임의의 상보적인 핵산 가닥을 선택적으로 변성시키고 제거하는 단계, 서열분석 프라이머를 상기 지지 표면에 어닐링하는 단계; 및
- [0079] 상기 플랫폼의 외부 지점으로부터 상기 각 웰로 A, T, G 및/또는 C 뉴클레오티드 또는 적합한 각각의 뉴클레오티드 유사체를 포함하는 일련의 시약들을 순차적으로 분주하는 단계로서, 각각의 또는 임의의 상기 분주 단계 이후 상기 플랫폼이 충분히 회전하여 실질적으로 임의의 잔류 또는 미반응 상기 시약을 상기 각 웰 및/또는 상기 각 지지 표면으로부터 실질적으로 원심력으로 제거되, 회전 중에 상기 각 지지 표면은 상기 각 웰 내에 유지되는 것인, 단계를 포함하는 핵산 가닥 서열분석을 수행하기 위한 방법을 제공한다.
- [0080] 바람직하게, 지지 표면은 핵산 가닥 결합 파트너가 이미 고정되어 있고, 상기 핵산 가닥은 선택적으로 상기 핵산 가닥 결합 파트너에 결합한다. 바람직하게, 핵산 가닥은 DNA 또는 RNA 또는 이의 변형된 형태이다. 바람직하게, 핵산 가닥은 비오틴화되고, 제1 결합 파트너는 비오틴화 핵산 가닥에 결합하기 위해 아비딘 또는 스트렙트아비딘 또는 이의 유사체를 포함한다.
- [0081] 제12 양태에 따르면, 본 발명은 하나 이상의 지지 표면을 수용하기 위한 적어도 하나의 웰을 가지는 회전식 플랫폼 및 핵산 가닥을 선택적으로 고정시키도록 적용된 적어도 하나의 지지 표면을 포함하는 키트가 제공된다.
- [0082] 제13 양태에 따르면, 본 발명은 핵산 가닥 서열분석을 수행하기 위한 제12 양태에 따른 키트의 용도를 제공한다.
- [0083] 제14 양태에 따르면, 본 발명은:
- [0084] 회전식 플랫폼을 소정의 제어가능하고 사용자 선택가능한 회전 속도로 회전시키기 위한 장치;

- [0085] 상기 회전식 플랫폼의 웰 내에 자성 입자를 보유하기 위해 상기 회전식 플랫폼에 자석을 연결하기 위한 장치;
- [0086] 핵산 가닥을 상기 지지 표면에 고정시키기 위해 상기 핵산 가닥을 상기 웰에 선택적으로 분주하기 위한 장치;
- [0087] 임의의 상보적인 핵산 가닥을 선택적으로 변성시키고 선택적으로 제거하기 위한 장치;
- [0088] A, T, G, 및/또는 C 뉴클레오티드 또는 그들 각각의 유사체 또는 이들의 조합을 분주하여 상기 지지 표면에 접착시키기 위한 장치;
- [0089] 세척 시약을 분주하기 위한 장치; 및
- [0090] 하나 이상의 효소 용액을 선택적으로 분주하기 위한 장치를 포함하는 핵산 가닥을 서열분석하기 위한 장치를 제공한다.
- [0091] 일부 구현예에서, 회전식 플랫폼은 약 0.5 내지 100  $\mu\text{l}$ 의 부피 또는 약 0.5 내지 3 mm의 웰 깊이를 가지는 상대적으로 얇은 복수의 웰을 포함한다. 다른 구현예에서, 그들 스스로 제1 결합 파트너를 고정시키도록 적응되거나 선택적으로 제2 결합 파트너를 고정시키도록 적응된 자성 비드를 수용하기 위해 웰들은 약 5 내지 8 mm로 상대적으로 깊다. 이러한 실시예에서, 비드들은 별개의 영역들로서 간주되고, 하나 이상의 비드들이 각각의 웰에 수용될 수 있다.
- [0092] 제1 또는 제2 결합 파트너는 바람직하게는 비드(바람직하게는 자성 비드)에 결합가능하다. 만일 자성 비드가 사용된다면 웰은 비드를 수용하기에 충분한 깊이 및 부피여서 비드가 디스크/플랫폼의 회전 중에 원심력으로 이동되지 않는다는 것이 이해될 것이다. 바람직한 구현예에서, 시스템은 자성 환형 디스크를 시료 디스크/플랫폼 아래면으로 상승시키거나 전자석을 활성화시킴으로써 각 웰 내에 자성 비드를 포획하는 능력을 가진다. 이러한 실시예에서, 자성 비드는 웰 내에 수용될 수 있고, 비드를 임의의 주위 시약으로부터 실질적으로 건조하기에 충분한 원심력이 플랫폼의 회전에 의해 가해질 수 있다. 또한, 플랫폼은 복수의 동심으로 위치된 원형 배열의 웰들을 포함할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 일부 구현예에서, 제1 결합 파트너는 비드 또는 입자의 표면에 화학적으로 흡착된다. 다른 구현예에서, 제1 결합 파트너는 비드 또는 입자의 표면에 공유결합 또는 이온결합 또는 수소결합되고, 여전히 다른 구현예에서, 반 데르 발스 힘이 제1 결합 파트너를 비드 또는 입자의 표면에 유지시킨다. 제2 결합 파트너는 비드 또는 입자에 이미 결합한 제1 결합 파트너에 결합가능하거나 반응가능하다는 것이 이해될 것이다.
- [0093] 본 발명은 특히 핵산 서열분석법, 예를 들어 파이로서열분석과 같은 방법 및 검정법에 관한 것이다. 예를 들어, 제1 및 제2 결합 파트너는 (선택적으로는 이 중 하나가 검출가능하게 표지된) 결합 파트너 쌍이고, 바람직하게는 아비딘 또는 스트렙트아비딘 또는 스트렙트액틴 또는 유사체 및 비오틴 또는 유사체로부터 선택된다.
- [0094] 그러나, 그리고 하기에서 더 논의되는 바와 같이, 본 발명의 이점은 상대적으로 빠르고 상대적으로 간단한 세척 단계를 제공하는 것이고 적은 폐기 부피의 세척 용액 및 시약과 관련된다.
- [0095] 지금부터, 본 발명은 파이로서열분석의 맥락에서 설명될 것이지만, 본 발명이 이러한 검정법에 제한되지는 않는 것으로 이해될 것이다.
- [0096] 제1 구현예에서, 웰 내에 유지되는 지지 표면은, 예를 들어, 아비딘 또는 스트렙트아비딘 또는 스트렙트액틴 또는 유사체일 수 있는 제1 결합 파트너를 고정하도록 적응되고, 그런 다음, 아비딘 또는 스트렙트아비딘 또는 스트렙트액틴 또는 유사체는, 후속 공정 단계에서, 말하자면, 비오틴화 DNA와 후속적으로 반응할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 또한, 제2 구현예에서, 지지 표면은 제1 결합 파트너를 이미 포함하고, 표면은 제2 결합 파트너를 선택적으로 고정하도록 적응된다는 것이 이해될 것이다. 따라서, 제1 구현예에 따른 지지 표면은 "기능화되지 않은" 것으로 간주될 수 있고, 제2 구현예에 따른 지지표면은 "기능화" 또는 "전기능화(pre-functionalised)"된 것으로 간주될 수 있는 것으로 이해될 것이다.
- [0097] 바람직하게, 일련의 시약들 중 첫번째는 제1 결합 파트너에 대한 제2 또는 상보적인 결합 파트너를 포함하고, 다음으로, 후속 시약이, 말하자면 하기에서 더 논의되는 바와 같이 세척 또는 세정 시약으로부터 선택된다.
- [0098] 바람직하게, 본 발명의 방법은 상기 각 접촉 또는 분주 단계 중 및/또는 이후에 핵산서열분석 검정을 분석하는 단계를 더 포함한다. 바람직한 구현예에서, 지지 표면을 후속 시약과 접촉시키기 이전에, 상기 각 지지 표면은 세척 시약으로의 세척 또는 세정 단계를 거친다. 세척 시약은 이전의 접촉 단계로부터의 임의의 잔류 용액을 실질적으로 세척할 수 있거나 임의의 잔류 용액 및 상기 용액 내에 존재하는 구성성분의 양을 낮출 수 있는 임의의 시약(활성 물질들, 예컨대, 아파라제 또는 부산물을 분해하거나 그렇지 않으면 부산물의 농도를 낮추는 기타



적합한 효소들)일 수 있다.

- [0099] 세척 시약은 이전의 접착/분주 단계로부터의 임의의 잔류 용액을 실질적으로 세척해 낼 수 있거나 임의의 잔류 용액 및 상기 용액 내에 존재하는 구성성분의 양을 낮출 수 있는 임의의 시약 및 아파라제와 같은 활성 물질일 수 있지만, 다른 구현예에서, 바람직하게, 초과 뉴클레오티드를 제거하기 위한 세척 단계에는 그 전체가 본원에 참조로서 포함된 문헌(Mashayekhi F., and Ronaghi M., Analysis of read-length limiting factors in pyrosequencing chemistry, Anal. Biochem. (2007), 363(2): 275-287)에 상술된 바와 같이 아파라제가 없다. 문헌(Mashayekhi et al)에 상술된 바와 같이, 아파라제가 없는 세척 단계로 세척 단계를 대체하는 것은 파이로서열분석의 리드 길이를 개선하는 것으로 나타났다.
- [0100] 바람직하게는, 표적 자리에 첨가된 시약이 제거되지 않도록 회전식 플랫폼은 낮은 속도, 예를 들어, 약 10 내지 200 rpm 사이의 속도로 회전하면서 상기 시약을 분주하고; 플랫폼은 높은 속도, 예를 들어 약 400 내지 2000 rpm의 속도로 회전하면서 상기 시약을 분주한다. 그러나, 다른 회전 속도도 가능한 것으로 이해될 것이다.
- [0101] 바람직한 구현예에서, 상기 각 지지 표면은, 상기 지지 표면이 실질적으로 앞선 단계의 시약으로의 오염이 실질적으로 감소되고, 바람직하게는 실질적으로 없도록 임의의 잔류시약을 원심력으로 제거하기 위한 상기 플랫폼의 회전에 의해 상기 지지 표면을 실질적으로 '건조'함으로써 상기 각 후속 시약에 대해 준비된다.
- [0102] 다른 양태에 따르면, 본 발명은 검정법을 수행하기 위한 플랫폼 및 지지 표면 조합의 용도를 제공한다. 추가의 양태에 따르면, 본 발명은 본원에서 논의된 바와 같은 플랫폼 및 하나 이상의 지지 표면 및 선택적으로는 상기 검정법을 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0103] 바람직하게, 플랫폼을 회전시키기 위한 장치는 모터이고, 소정의 회전 속도는 사용자 선택가능하며, 약 10 내지 5000 rpm 사이이다. 또한, 바람직하게, 장치에는 회전식 플랫폼으로부터 탈수되는 폐시약을 추출하기 위한 진공 추출 시스템이 구비된다
- [0104] 지금부터, 본 발명은 파이로서열분석의 맥락에서 설명될 것이지만, 본 발명이 이러한 검정법에 제한되지는 않는 것으로 이해될 것이다.
- [0105] **파이로서열분석**
- [0106] 바람직하게, 사용된 핵산 서열분석 방법은 파이로서열분석이다. 그러나, 하기에 더 논의되는 바와 같은 다른 핵산 가닥 서열분석 방법도 활용될 수 있다는 것으로 이해해야 할 것이다.
- [0107] 바람직하게, 상기 핵산 가닥은 DNA 또는 RNA 또는 이의 변형된 형태(들), 예컨대 비설페이트 처리 후속물 또는 자연적으로 발생하는 핵산에서는 존재하는 않은 추가적인 염기 피복물이다. 핵산 가닥의 복제물들이 하나 이상의 별개 영역들 각각에 보유된다는 것으로 이해될 것이다.
- [0108] 바람직하게, 회전식 플랫폼은 실질적으로 원형이고 약 50 내지 500 mm의 직경을 가진다. 바람직하게, 회전식 플랫폼은 약 2 내지 500개의 웰을 포함하고, 웰은 회전식 플랫폼의 중심으로부터 같은 거리만큼 간격을 두고 있다. 직경은 임의의 직경일 수 있고, 직경은, 하나 이상의 다수의 웰들을 수용하도록 선택될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 바람직한 구현예에서, 웰들은 실질적으로 원형인 배열을 형성하기 위해 회전식 플랫폼의 주변부 주위에 실질적으로 고르게 분포하거나 위치한다.
- [0109] 바람직하게, 웰들은 핵산 가닥(예컨대, 서열분석 주형 또는 서열분석 프라이머)을 선택적으로 고정시키거나, 포획하거나 결합시키도록 적응된 비드, 바람직하게는 자성 비드의 형태인 지지 표면을 수용할 수 있다. 예를 들어, 일부 바람직한 구현예에서, 핵산 가닥은 비오틴화되고, 별개의 영역들은 비오틴화 핵산 가닥에 결합하기 위해 아비딘, 바람직하게는 스트렙타아비딘, 또는 유사체를 포함한다. 대안적으로, 지지 표면 또는 비드는 아비딘, 바람직하게는 스트렙타아비딘을 고정시키거나 포획하거나 결합시키도록 적응되고, 후속 단계에서 비오틴화 핵산 가닥은 지지 표면에 결합된 아비딘/스트렙타아비딘에 선택적으로 고정된다. 그러나, 별개 영역에 핵산 가닥을 고정시키기 위해 다른 화학제품들도 사용가능한 것으로 이해될 것이다. 본 발명은 별개 영역들에 핵산 가닥을 고정시키기 위해 사용될 수 있는 화학제품들로 제한되지 않는다. 다른 구현예에서, 주형 결합체들은 리간드 결합 방식, 범용 프라이머/프로브, 또는 항체일 수 있다.
- [0110] 일 구현예에서, 웰들은 약 0.5 내지 100  $\mu$ l의 부피를 포함하는 얇은 웰들이다. 얇은 웰들은 임의의 형상일 수 있고, 웰들이 임의의 부피일 수 있다는 것이 이해될 것이다. 일부 구현예에서, 웰들은 직경이 약 1 내지 5 mm이다. 그러나, 이 때 웰들은 임의의 직경 또는 형상일 수 있다는 것이 이해될 것이다.

- [0111] 바람직하게, 회전식 플랫폼은 편리하게 플라스틱 재료로 형성되지만, 유리 또는 석영과 같은 다른 재료들도 가능하다는 것이 당업자에게 이해될 것이다. 바람직하게, 플라스틱 재료는 폴리카보네이트, 폴리스티렌, 또는 폴리프로필렌으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또한, 회전식 플랫폼은, 또한, 층상 구조일 수도 있다는 것이 고려된다. 회전식 플랫폼을 형성하는 재료가 어떠한 것이든, 하기에 더 논의되는 바와 같이, 플랫폼은 변형없이 회전을 견딜 수 있어야 하고, 잠재적으로 핵산을 변성하기 위한 열효과를 견딜 수 있어야 한다.
- [0112] 일부 바람직한 구현예에서, 실질적으로 원형 디스크인 회전식 플랫폼은 회전 중에 회전식 플랫폼의 표면으로부터 탈수되거나 원심분리되어 나오는 폐 유체를 수용하기 위해 플랫폼의 주변부에 배치된 홈통을 더 포함한다. 긴 리드 길이를 달성하기 위해, 일단 파이로써열분석 반응의 각 단계 또는 다수의 단계가 완료되면, 웰 내의 미사용 또는 폐시약을 제거해야 한다는 것을 이해할 것이다. 회전식 플랫폼의 회전에 의한 원심력의 생성은 폐 유체가 플랫폼으로부터 탈수되는 것을 초래하고, 폐 유체의 처리를 개선하기 위해 홈통이 제공된다. 대안적으로, 폐시약을, 말하자면, 핵산 첨가의 매 20, 30, 40 또는 50 사이클마다 또는 반응을 저해하기에 충분하도록 시약이 희석되기 직전에 플랫폼으로부터 탈수할 수 있다.
- [0113] 이러한 구현예에서, 추가적인 파이로써열분석 시약이 웰에 첨가되면서 회전식 플랫폼의 전체 질량이 증가할 것이고, 그런 다음 각 서열분석 반응이 완료 후 플랫폼이 탈수된다는 것으로 이해될 것이다. 따라서, 대안적인 구현예에서, 회전식 플랫폼 안에 홈통 및 하우징을 포함하지 않는 회전식 플랫폼은 플랫폼의 주변부에 인접하게 배치된 홈통을 가지게 구성되도록 위치되어 회전 중에 회전식 플랫폼의 표면으로부터 탈수되는 폐 유체가 이러한 "고정성" 홈 내에 포착되도록 하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0114] 파이로써열분석을 뒷받침하는 기술 및 화학제품에 친숙한 당업자는 상보적인 핵산 가닥을 제거하기 위해 지지 표면에 고정된 핵산 가닥의 변성이 필요할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 변성은 임의의 방법에 의해 달성될 수 있지만, 바람직한 실시예는 웰 및 지지 표면 또는 심지어 전체 회전식 플랫폼을 변성에 충분한 온도, 예컨대 94 내지 99℃로 가열하는 단계를 포함하거나 지지 표면을 94℃ 초과하여 가열된 용매(예컨대, 완충액)에 노출하는 단계를 포함한다. 대안적으로, 지지 표면은 변성 조성물(예컨대 NaOH를 포함하는 조성물)에 노출될 수 있다. 다른 방법은 적외선 또는 등가물의 조사에 의한 가열을 포함한다. 회전식 플랫폼은 이러한 변성 조건을 견딜 수 있는 재료로 형성되어야 한다는 것이 이해될 것이다.
- [0115] 회전식 플랫폼은, 또한, 가열되거나 냉각될 수 있어서, 포획된 핵산 표적 또는 포획된 서열분석 프라이머에 DNA를 혼성화시키거나 DNA를 용해할 수 있다. 파이로써열분석의 경우, 일단 dsDNA 표적이 포획되고 변성되면, 혼성화하기 위해 ssDNA에 서열분석 프라이머를 첨가하거나 대안적으로 ssDNA가 포획된 서열분석 프라이머에 혼성화된다. 이 경우, ssDNA 내 임의의 3차 구조를 제거하기 위해 회전식 플랫폼을 가열할 수 있고, 그런 다음 서열분석 프라이머를 고정된 표적에 혼성화하기 위해 냉각한다.
- [0116] 챔버를 가열하는 단계는, 디바이스에 약간의 복잡성을 첨가할 수 있는데, 이는 상대적으로 적은 부피의 시약이 사용되는 경우 챔버가 적합한 수단에 의해 밀봉될 수 있기 때문인 것으로 이해될 것이다. 대안적으로, 당업자는 가열 단계 중의 증발을 낮추기 위해 오일 오버레이를 사용할 수 있다. 다른 적합한 수단들이 당업자에게 잘 공지되어 있다. 대안적으로, 변성 시약이 포획된 ssDNA에 첨가될 수 있고, 서열분석 프라이머, 그 다음에는 낮은 pH의 완충액이 첨가되어 pH를 낮추고 서열분석 프라이머를 DNA 표적에 어닐링될 수 있다. 일단 어닐링되면, pH 완충액은 폐기를 위해 탈수된다.
- [0117] 당업자는 다양한 구현예에서 본 발명이 제공할 수 있는 많은 이점들을 이해할 것이다. 예를 들어, 본 발명은 종래 기술 디바이스 및 방법에 비하여 염기 리드 길이를 증가시킬 수 있다. 설명하자면, 종래 기술의 방법은 0.2 mL 마이크로 원심분리기 튜브(또는 유사체)에서 파이로써열분석을 수행하고, 튜브 내에 존재하는 DNA의 서열을 검출하기 위해 순차적으로 튜브에 시약이 첨가된다. 뉴클레오티드를 반응 완충액 내 DNA, 모든 효소들 및 기질(들)을 함유하는 반응물 내에 순차적으로 첨가한다. 반응은 96 또는 24 웰 플레이트 내에서 수행된다. 플레이트를 가열(28℃)하고 반응 동안 진탕한다. 결과적으로, 첨가된 뉴클레오티드의 부피는 증발되는 부피와 거의 동일해서 반응 혼합물의 희석을 초래하지 않으며 부산물의 축적을 초래한다. 종래 기술의 방법은 리드 길이가 상대적으로 짧은 단점을 가지는데, 이는 주로, 예컨대, 아파라제의 활성화에 의해 생성된 분해 산물의 축적에 기인한다. 본 발명은 당해 분야에 알려진 단점들을 제공하지 않는데, 전술된 바와 같이, 이는 고정된 핵산 가닥이 뉴클레오티드와 접촉하여, 잔존하는 뉴클레오티드뿐 아니라, 모든 반응 생성물 및 부산물들이 차후에 실질적으로 웰로부터 제거되고, 지지 표면도 또한 선택적으로 후속 뉴클레오티드 시약과 접촉하기 전에 세척되기 때문이다. 300 또는 400개의 염기를 초과하는 염기 리드 길이가 가능하고, 화학제품의 개선으로 1000개의 염기를 초과하는 것도 가능하다는 것이 고려된다.

- [0118] 추가의 이점들이 당업자에게 명백할 것이다; 그러나, 명확성을 위해 본 발명은 종래 기술의 유동 세포보다 상대적으로 단순한 장치를 제공한다. 추가의 이점들은 종래 기술 방법 및 디바이스보다 잠재적으로 상대적으로 빠른 서열분석 및 종래 기술에 비해 잠재적으로 적은 부피의 시약이 요구되는 서열분석에 관한 것이다. 일부 종래 기술 방법, 특히 파이로서열분석을 수행하는 방법의 추가의 제한은 하나의 반응 사이클, 즉 뉴클레오티드의 첨가에 매우 긴 시간이 필요하다는 것이다. 일부 경우에서, 하나의 반응 사이클에 필요한 시간은 보통 약 60초 또는 심지어 그 이상인데, 이는 이전의 반응 사이클의 잔존하는 뉴클레오티드 모두를 분해하는데 필요한 시간에 기반한 것이다. 이전 반응 사이클의 잔존하는 모든 뉴클레오티드가 실질적으로 완전히 분해된 이후에만, 다음 뉴클레오티드가 첨가된다. 본원에 기술된 장치는 잔존하는 뉴클레오티드를 훨씬 더 빠른 속도로 (즉, 원심분리 단계, 세척 단계를 통해서) 제거할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 이는 하나의 베이스가 삽입되는 데 훨씬 더 짧은 사이클 시간을 초래한다. 본 발명을 제한하는 것을 바라지 않으면서, 사이클 시간이 대략 15초까지 감소됨으로써 대략 적어도 4배의 작업 시간 감소를 생성할 수 있다. 그러나, 사이클 시간은 더욱 감소될 수 있다는 것을 고려한다.
- [0119] 본 발명은, 또한, 일부 종래 기술 디바이스에 비해 유체 처리를 개선할 수 있다. 또한, 본 발명은 고속 광전배 증관을 CCD 어레이 대신에 사용할 수 있음을 고려할 때 종래 기술 디바이스에 비해 증가된 민감도를 제공할 수 있는 것이 가능하다.
- [0120] 파이로서열분석은 '합성에 의한 서열분석' 원리에 기반한 DNA 서열분석 방법으로 디데옥시뉴클레오티드로의 사슬 종결 보다는 뉴클레오티드 삽입시 파이로인산 방출의 검출에 의존한다. '합성에 의한 서열분석'은 서열분석되는 단일 가닥의 DNA를 취한 다음 단일 가닥의 DNA의 상보적인 가닥을 효소적으로 합성하는 단계를 수반한다. '합성에 의한 서열분석' 방법은 DNA 중합효소(DNA 합성 효소)의 뉴클레오티드 첨가 반응( $(\text{DNA} + \text{dNTP} \rightarrow \text{DNA}_{n+1} + \text{PPi})$  또는  $\text{X}$ 에 따른 상이한 부산물.  $\text{X}$ 는 또한 ATP가 될 수도 있음)의 반응 부산물의 검출함으로써 DNA 중합효소의 활성을 검출하는 것에 기반한다. 파이로서열분석 반응에서, PPi는 광을 생성하는 효소 연쇄반응을 사용하여 정량화된다.
- [0121] 1. 설푸릴라제:  $\text{APS} + \text{PPi} \rightarrow \text{ATP} + \text{SO}_4$
- [0122] 2. 루시페라제: 루시페린 + ATP  $\rightarrow$  옥소루시페린(Oxoluciferin) + PPi + 광
- [0123] 3. 아파라제: 잔존하는 dNTP 및 ATP의 분해
- [0124] 또한, 부산물을 정량하기 위해 사용될 수 있는 몇몇 반응들, 예컨대,  $\text{PPi} + \text{PEP} + \text{AMP} \rightarrow \text{피루베이트} + \text{ATP} + \text{Pi}$ 로 변환하는 포스포에놀 피루베이트 디키나아제(phosphoenol pyruvate dikinase, PPDK)의 사용이 당해 분야에 공지되어 있다. 또한, 부산물은, 예컨대, pH의 변화 또는 다른 검출가능한 파라미터의 변화에 의해 검출될 수 있다. '합성에 의한 서열분석' 방법은, 대안적으로, DNA 리가아제의 프라이머 첨가 반응의 반응 부산물을 검출하는 DNA 리가아제의 활성을 검출하는 것에 기반할 수 있다. 적합한 방법들이 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0125] 본질적으로, 방법은 DNA의 단일 가닥을 따라 상보적인 가닥을 한번에 한 개의 염기 쌍씩 합성하고 각 단계에서 어떤 염기가 실제로 첨가되었는지를 검출함으로써, DNA의 단일 가닥을 서열분석할 수 있다. 순차적으로, 주형 DNA 또는 서열분석 프라이머를 고정하고, A, C, G, 및/또는 T 뉴클레오티드의 용액을 첨가하고 반응 후에 제거한다. 첨가된 뉴클레오티드가 주형의 제1 짝이 없는 염기 또는 염기들에 상보적일 때에만 광이 생성된다. 검출 가능한 신호, 예컨대, 화학발광 신호를 생성하는 첨가된 뉴클레오티드의 서열이 주형의 서열을 결정할 수 있게 한다. ssDNA 주형은 서열분석 프라이머에 혼성화되거나, 또는 그 반대이고, 효소인 DNA 중합효소 및 선택적으로 ATP 설푸릴라제, 루시페라제 및/또는 아파라제, 그리고, 예시의 방식으로, 기질인 아데노신 5' 포스포설페이트(APS) 및 루시페린과 함께 항온배양된다. 검출 가능한 신호를 제공하는 다른 반응 연쇄들이 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0126] 광범위한 개요에서, 파이로서열분석은 다음과 같은 일반적인 단계를 따른다:
- [0127] 1. 4종의 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트(dNTP) 또는 이의 적합한 유도체 중 임의의 하나를 핵산 가닥 주형에 첨가. DNA 중합효소는 정확하고 상보적인 dNTP 또는 그의 유도체를 주형상에 삽입하고, 이는 화학양론적으로 파이로인산(PPi)을 방출한다.
- [0128] 2. ATP 설푸릴라제는 PPi를 정량적으로 ATP로 전환한다. 이러한 ATP는 루시페라제 매개 루시페린의 옥시루시페린으로의 전환을 유발하고, 루시페린의 옥시루시페린으로의 전환은 ATP의 양에 비례하는 양의 가시적인 광을 생성한다. 루시페라제로 촉진된 반응에서 생성되는 광을 검출하고 분석한다.



- [0129] 3. 미삽입 뉴클레오티드 및 ATP는 이어서 아파라제 또는 다른 적합한 효소들에 의해 분해된다.
- [0130] 고전적인 파이로서열분석 프로토콜에 대한 몇몇 변형들이 당해 분야에 잘 알려져 있고, 본 발명에 따른 장치에서 수행하기에 아주 적합하다. 단일 뉴클레오티드 삽입 단계마다 생성된 광이 삽입된 뉴클레오티드의 양에 비례하기 때문에, 적합한 소프트웨어는 생성된 광정보를 특정한 뉴클레오티드 서열 패턴으로 변환할 수 있다. 고전적인 파이로서열분석에서, 광패턴은 '파이로그래姆'으로 일컬어진다. 또한, 상기 소프트웨어는 바람직하게는 특정 위치에서 혼합된 군집의 삽입 비를 정량할 수 있게 한다.
- [0131] 본 발명은 서열분석될 핵산 주형 또는 표적 또는 서열분석 프라이머를 고정하는 단계 및 단계적 뉴클레오티드 첨가 사이클을 포함하는 서열분석 방법에 관한 것이다. 본 발명은 파이로서열분석에 관하여 예시되었지만, 본 발명은 또한 다른 핵산 서열분석 화학제품, 특히, 유동 환경 및 고체상에서 유리한 이러한 화학제품에도 유용할 수 있다. 본 발명은 또한 앞서 언급된 단계 중 일정단계를 피하거나 적어도 그들을 더욱 편리하게 한다. 파이로서열분석에서는 ssDNA 주형이 존재하는 것이 요구된다. 선택적으로, 지지 표면은, 또한, dsDNA를 포획하고 상기 dsDNA를 변형시켜 예를 들어 파이로서열분석용으로 준비된 어닐링된 서열분석 프라이머와 함께, ssDNA를 이탈하는 역할을 함으로써, 별도의 분리단계에 대한 필요성을 제거한다.
- [0132] 구체적으로, 당업자는 "유동 DNA 서열분석"이라는 용어가, 예를 들어 핵산 주형 또는 서열분석 프라이머를 고정하고, 프라이머를 주형에 혼성화하거나, 그 반대인 방법을 포함하고, 뉴클레오티드의 존재 하에 단계적 방식으로 프라이머 매개 합성을 수행한다는 것을 이해할 것이며, 여기서 뉴클레오티드는, 예를 들어 선택적으로 가닥 연장 종결 모이어티, 예컨대, 디데옥시 모이어티와 함께, 선택적으로 검출가능한 표지를 포함한다(예컨대, 생거(Sanger) 서열분석). 추가의 핵산 서열분석 방법 구현에는 다음의 단계를 포함한다: 표지된 뉴클레오티드를 연장하는 프라이머 가닥에 삽입하는 단계; 삽입된 뉴클레오티드를 식별하는 단계; 및 가닥 연장 종결 모이어티 및 표지를 제거하여 연장하는 가닥이 이어지는 뉴클레오티드의 삽입을 준비하기 위한 단계.
- [0133] 또한, 당업자는 "유동 DNA 서열분석"이라는 용어가, 예를 들어, 라이게이션에 의한 핵산 서열분석을 포함한다는 것을 이해할 수 있을 것이다. "라이게이션에 의한 핵산 서열분석"이라는 용어는 핵산 주형 또는 서열분석 프라이머를 고정하는 단계, 프라이머를 주형에 혼성화시키는 단계 또는 그 반대 단계, 이어지는 회차의, 예를 들어, 표지된 뉴클레오티드 또는 짧은 표지된 프로브의 DNA 라이게이션 단계를 포함한다는 것이 명확할 것이다.
- [0134] 또한, 당업자에게, 본 발명이 핵산 고정 단계 및 단계적인 뉴클레오티드 첨가 및 검출 단계를 포함하는 임의의 DNA 서열분석 방법을 고려한다는 것이 명확할 것이다.
- [0135] 본 발명의 방법은 또한 선택적인 세척 단계를 포함할 수 있거나, 효소 처리가 잔류 또는 미반응 시약을 제거하는 단계를 개선할 수 있다.
- [0136] 일 구현예에서, 순차적인 접촉 또는 분주 단계는 다음 중 하나를 포함한다:
- [0137] a.) A 다음으로 T 다음으로 G 다음으로 C 뉴클레오티드, 다시 A, 등이 뒤이어진다; 또는
- [0138] b.) A+T+G+C 뉴클레오티드가 혼합물로서 첨가되고, 혼합물이 다시 첨가된다.
- [0139] 다른 구현예에서, 각 지지 표면 영역은 A, T, G, 및/또는 C 뉴클레오티드를 포함하는 일련의 시약들과 순차적으로 접촉한다. 순차적인 접촉 단계는 다음 중 하나를 포함할 수 있다:
- [0140] a.) 각각의 뉴클레오티드 또는 그의 유사체가 임의의 원하는 또는 소정의 순서로 개별적 및 순차적으로 첨가된다,
- [0141] b.) A+T+G+C 뉴클레오티드 또는 임의의 소정의 또는 원하는 A+T+G+C 뉴클레오티드의 하위세트가 혼합물로서 첨가되고, 상기 혼합물이 다시 첨가된다.
- [0142] 순차적인 접촉 단계 a)는 특히 파이로서열분석 방법론에 유용하고, 순차적인 접촉 단계 b)는 표지된 뉴클레오티드, 예를 들면, 형광으로 표지된 뉴클레오티드(각각이 상이한 염료로 표지됨)가 활용되는 경우 특히 유용하다.
- [0143] 방법 전체는 뉴클레오티드의 서열이 임의의 미리정의된 순서 및/또는 임의의 미리정의된 조합으로 첨가될 수 있고 서열이 핵산 주형 서열분석에 요구되는 만큼 충분한 횟수로 반복된다는 점에서 반복적인 것으로 이해될 것이다. 예를 들어, A, T, G, 및 C를 단지 공지된 돌연변이 자리에만 첨가할 수 있다. 이러한 구현예의 이점은, 더 적은 염기 첨가가 요구되기 때문에 이러한 절차는 공지된 돌연변이 검출의 속도를 높인다는 것이다.
- [0144] 바람직하게, 본 발명의 방법은 상기 각 접촉 단계 중 및/또는 이후에 핵산 가닥을 분석하는 단계를 더

포함한다. 이러한 분석은 임의의 분석이 될 수 있지만, 파이로서열분석의 맥락에서, 분석 단계는 상기 분석의 각 단계에서 광의 산출을 핵산 가닥에 삽입된 뉴클레오타이드의 숫자와 상호연관시킴으로써 핵산 가닥 내 다음 염기 쌍을 식별하는 단계를 포함하는 것으로 이해될 것이다. 당업자는 뉴클레오타이드의 삽입을 검출하기 위한 적절한 하고 적합한 기술적인 모든 측정법들을 취할 수 있다. 예를 들어, 반응에 의해 생성된 광을 검출하기에 적합한 검출기는 광전배증관(PMT)이다. 회전식 플랫폼이 회전하면서 시료들이 검출기를 통과하고, 바람직하게는 모든 시료들이 검출기를 통과하는 것으로 이해될 것이다.

[0145] 바람직한 구현예에서, 별개 영역을 후속 시약과 접촉시키기 이전에, 상기 각 지지 표면은 세척 시약으로의 세척 또는 세정 단계를 거친다. 세척 시약은 이전 접촉 단계로부터의 잔류용액을 세척하기에, 바람직하게는 이전 접촉 단계로부터의 모든 잔류 용액을 실질적으로 세척하기에 적합한 임의의 시약일 수 있다. 그러나, 바람직한 구현예에서, 세척 시약은 그 안에서 다음 반응단계가 수행되는 완충액이다. 세척 시약은 또한, 예시의 방식으로, 아파라제, 포스파타제, 등과 같은 세척 증진제를 함유할 수 있다. 적합한 세척 시약은 당업자에게 잘 공지되어 있다.

[0146] 위에서 논의된 바와 같이, 변성 단계는 변성을 시행하기 위해 핵산 가닥을 가열하는 단계 또는 핵산 가닥을 상승된 pH에 노출시키는 단계 또는 핵산 가닥을 적합한 효소 또는 효소 혼합물에 노출시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0147] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 방법은 핵산 가닥이 변성된 후, 상보적인 가닥을 세정 시약으로 세정 단계에 의해 제거하는 단계를 포함한다.

[0148] 상기 핵산 가닥을 분주하고, A, T, G 및/또는 C 뉴클레오타이드를 분주하고, 세척 시약을 분주하기 위한 장치는 임의의 장치일 수 있지만, 바람직하게 장치는 피에조 작동되거나 공기필스에 의해 구동되는 잉크 젯 기술과 유사하다. 또한, 바람직하게, 장치에는 회전식 플랫폼으로부터 탈수되는 폐시약을 추출하기 위한 진공 추출 시스템이 구비된다. 또한, 장치에는 파이로서열분석 반응에 의해 생성된 광을 검출하기 위한 적합한 검출 수단이 구비된다. 적합한 검출기들, 예를 들어, 회전식 플랫폼 위에 장착될 수 있는 광전배증관이 당업자에게 알려질 것이다.

[0149] 임의의 상보적인 핵산 가닥을 변성 및 선택적으로 제거하는 장치는 플랫폼을 약 94℃로 가열하기 위한 장치, 또는 가열된 시약 또는 다른 변성화 화합물을 분주하는 추가적인 주사기 또는 플라스틱 분주기를 포함할 수 있다.

[0150] 대안적인 하나의 검출 방법론에서, 하나 이상의 고체상 pH 측정기가 플랫폼의 각 웰 아래에 장착된다. 따라서, 서열 검출을 위해 결합된 DNA를 지지하기 위해 자성 비드를 사용할 수 있고, 전술된 바와 같이 각 서열분석 사이클 사이에서 웰을 세척할 수 있기 때문에 플랫폼은 재사용가능하다. 일단 서열분석이 완료되면, 플랫폼의 아래에서 자석을 제거함으로써 비드를 방출할 수 있고, 플랫폼을 완전히 세척하고 분석을 위한 새로운 시료를 적재할 수 있다. 본 출원은, 또한, 사용 후 ISFET 감지 플랫폼의 폐기를 실행할 수 있게 만들기 위해 플랫폼에 맞춤형 설계된 경우, ISFET(51)의 비용이 충분히 낮기 때문에 (즉, 반도체 칩처럼) 플랫폼이 일회용일 수 있는 것을 고려한다.

[0151] 당업자는 중합효소를 뉴클레오타이드에 첨가하면, H<sup>+</sup> 이온이 방출됨으로써 국소 pH를 변화시키고, 이는 예를 들어 고체 상태 pH 측정기에 의해 검출될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예시의 방식으로, 우리는 트랜지스터의 표면에서 또는 트랜지스터의 표면에 인접한 이온 전하의 국소화된 변동에 반응하여 전기 출력 신호를 생성하도록 배열된 이온 선택성 전계 효과 트랜지스터(Ion Sensitive Field Effect Transistor, ISFET)를 포함하는 감지 장치를 개시하며 본원에 참조로서 포함된 US 2010/0151479(DNA Electronics Ltd)를 언급한다. 이 실시예에서, 절대값보다는 이온 전하의 변동이 측정된다. 이러한 접근법은 자연적인 뉴클레오타이드가 순차적으로 첨가될 수 있는 화학제품을 단순화하고, pH 변화가 검출될 때, 비드를 포획하고 웰을 세척하고 새로운 회차의 뉴클레오타이드를 첨가한다.

[0152] 바람직하게, 재사용가능한 플랫폼 상의 ISFET 검출 시스템을 사용하는 경우, 자성 비드가 ssDNA를 포획하기 위해 사용될 것이다. 일회용 ISFET 검출 플랫폼에서, ssDNA를 포획하기 위해 ISFET 게이트의 표면을 코팅할 수 있거나, 자성 비드를 또한 사용할 수 있다.

[0153] 추가의 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 회전식 플랫폼을 구비한 ISFET 검출기의 용도 및 각 웰에 별도의 제거가능한 지지 표면을 채용하는 것을 제공한다. 바람직하게, ISFET 검출 요소는 각 웰의 하부를 형성한다.

[0154] 당업자는 본 발명이 본원에 개시된 구현예들 및 특징들뿐 아니라 개시된 구현예들 및 특징들의 모든 조합에들

및/또는 보급예들을 포함한다는 것을 이해할 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0155]

지금부터, 본 발명의 바람직한 구현예를, 단지 예시의 방식으로, 첨부한 도면을 참조하여 기술할 것이다:

도 1a는 본 발명의 회전식 플랫폼의 평면도이다;

도 1b는 도 1a에 나타난 회전식 플랫폼의 측면도이다;

도 1c는 도 1b의 선 1C-1C에 대해 취해진 단면도이다;

도 2a는 도 1에 나타난 회전식 플랫폼의 일 구현예의 사시도이고, 도 2b는 절단된 사시도이다;

도 3은 도 1a에 나타난 회전식 플랫폼이 그 안에 설치된 장치의 단면도이다;

도 4는 반응을 모니터링하기 위해 초점 광학장치를 활용하는 광학 검출 장치를 나타낸 것이다;

도 5는 반응을 모니터링하기 위해 직접적인 영상화를 활용하는 광학 검출 장치를 나타낸 것이다;

도 6a 내지 c는 a) 스트렙트아비딘 Mag 세파로오스; b) MyOne 스트렙트아비딘 C1; 및 c) Sera-Mag 자성 SpeedBeads 뉴트라비딘에 대한 파이로서열분석(pyrosequencing) 피크 높이를 나타낸 것이다;

도 7은 고주파 혼합을 사용하여 스트렙트아비딘 Mag 세파로오스 비드에 대해 취득한 파이로서열분석 피크를 나타낸 것이다;

도 8은 1500 rpm의 원심분리 속도로 세척된 Sera-Mag 자성 SpeedBeads 뉴트라비딘에 고정된 PCR 암플리콘(amplicon)에 효소 및 기질의 혼합물을 첨가한 후의 높은 피크를 나타낸 것이다;

도 9는 Dynabeads MyOne 스트렙트아비딘 C1 비드에 고정된 DNA 표적을 사용한 파이로서열분석 동안의 위상 전이 및 넓어진 피크 신호를 나타낸 것이다;

도 10은 자성 비드가 웰 1 내지 3에 적재된 것을 보여주는 실제 생산 플랫폼의 사진이다;

도 11 및 12는 플랫폼을 회전시키기 위한 모터(50)에 연결된 본 발명에 따른 플랫폼의 사시도이고, 플랫폼에 가해지는 자력이 거의 없거나 전혀 없는 제1 위치 내 환상의 주변부 자성 고리(20)를 보여준다;

도 13 및 14는 각각 제1 위치 및 제2 위치 내 자성 고리(20)를 보여주는 측면 단면도이다;

도 15는 본 발명의 다른 구현예로서, 회전 하에, 비드가 공동 내로 회전하여 들어오고 폐 유체는 원심력에 의해 프리트(firt) 또는 유사 필터(60)를 통과해가도록 배열되고 구성된 웰을 가지는 플랫폼을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0156]

정의

[0157]

본 발명을 설명하고 청구하는 데 있어서, 다음과 같은 용어들이 하기에 기재된 정의에 따라 사용될 것이다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 본 발명의 특정 구현예를 설명하기 위한 목적이며 제한하고자 하는 의도가 아닌 것으로 이해된다. 다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 기술적이고 과학적인 모든 용어들은 본 발명이 속한 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 같은 의미를 가진다.

[0158]

문맥에서 명확하게 다르게 요구되지 않는 경우, 상세한 설명 및 청구범위전체에서 "포함하다(comprise)", "포함하는(comprising)" 등의 단어들은 배타적(exclusive)이거나 완전한(exhaustive) 의미와는 반대로 포괄적인 의미, 즉, "포함하지만 이에 제한되지는 않는"의 의미인 것으로 이해되어야 한다.

[0159]

이하에서, 아니면 지시된 부분에서, "%"는 "중량 %", "비"는 "중량비" 그리고 "부"는 "중량부"를 의미할 것이다.

[0160]

본 발명의 넓은 범주를 기재하는 수치 범위들 및 파라미터들은 근사치이지만, 특정 실시예들에 기재된 수치값들은 가능한 한 정확하게 기록된다. 그러나, 임의의 수치값은 본질적으로 그들 각각의 시험 측정들에서 관찰되는 표준 편차로부터 불가피하게 기인한 일정한 오차를 포함한다.

[0161]

더욱 간결한 설명을 제공하기 위해, 본원에 주어진 정량적인 표현들 중 일부는 "약"이라는 용어로 제한되지 않는다. "약"이라는 용어가 명확하게 사용되든 아니든, 본원에 주어진 모든 양은 실제 주어진 값을 지칭하는 것을

의미하고, 또한, 이러한 주어진 값에 대한 실험 및/또는 측정 조건에 기인한 근사치들을 포함한 당해 분야의 일반적인 기술에 기반하여 합리적으로 추론할 수 있는 주어진 값에 대한 근사치를 지칭하는 것도 의미하는 것으로 이해된다.

- [0162] 본원에 사용된 "우세하게" 및 "실질적으로"라는 용어는, 다르게 지시되지 않는 한, 50 중량%를 초과하여 포함하는 것을 의미할 것이다.
- [0163] 종료점을 사용한 수치 범위의 인용은 그 범위 내에 포함되는 모든 숫자들을 포함한다(예컨대, 1 내지 5는 1, 1.5, 2, 2.75, 3, 3.80, 4, 5 등을 포함한다).
- [0164] "바람직한" 및 "바람직하게"라는 용어는 일정한 환경 하에서 일정한 혜택을 제공할 수 있는 본 발명의 구현예들을 지칭한다. 그러나, 동일하거나 다른 환경 하에서 다른 구현예들도 또한 바람직할 수 있다. 또한, 하나 이상의 바람직한 구현예들의 인용은 다른 구현예들이 유용하지 않다는 것을 시사하지 않으며 본 발명의 범주로부터 다른 구현예들을 배제하려는 의도가 아니다.
- [0165] 열거된 항목들의 목록은 임의의 또는 모든 항목들이 상호배타적이라는 것을 시사하는 것이 아니다. 열거된 항목들의 목록은, 명백하게 다르게 명시되지 않는 한, 임의의 또는 전체 항목들이 임의의 것의 전체를 망라하는 것을 시사하는 것이 아니다. 열거된 항목들의 목록은 항목들이 그들이 나열된 순서에 따라 임의의 방식으로 정렬된다는 것을 시사하는 것이 아니다.
- [0166] 본원에서 사용된 "결합 파트너"라는 용어는 임의의 리간드/수용체 쌍일 수 있는 결합 파트너 쌍 중 하나를 의미하는 것으로 이해된다. 결합 파트너 쌍 중 하나는 "제1 결합 파트너"로 지칭되고, 결합 파트너 쌍의 나머지 하나는 "제2 결합 파트너"로 지칭된다. 예를 들어, 결합 파트너 쌍은 스트렙트아비딘/아비딘 및 비오틴이 될 수 있다. 결합 파트너 쌍은, 예를 들어, 스트렙트아비딘 및 비오틴화 핵산을 포함할 수 있다.
- [0167] 본원에서 사용된 "회전식"이라는 용어는 회전하도록 적응된다는 것을 의미한다. 또한, "비드", "입자", "고체 지지체"라는 용어는, "플랫폼" 및 "디스크"와 마찬가지로, 상호교환적으로 사용되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0168] 본 발명의 바람직한 구현예
- [0169] 많은 구현예들이 본 특허 출원에 기술되고, 단지 예시적인 목적으로만 제시된다. 기술된 구현예들은 어떠한 의미로도 제한하고자 하는 의도가 아니다. 본 발명은 본원의 개시로부터 쉽게 분명해진 바와 같이, 다양한 구현예들에 폭넓게 적용가능하다. 이러한 구현예들은 당업자가 본 발명을 실행할 수 있도록 충분히 상세하게 기술되고, 본 발명의 범주로부터 벗어나지 않으면서 다른 변형들이 만들어질 수 있고, 다른 구현예들이 사용될 수 있다는 것이 이해된다. 따라서, 당업자는 본 발명이 다양한 변형들 및 변경들을 가지고 실행될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 전체에 걸쳐 유사한 참조 번호들이 유사한 부품들을 지칭하는 도면이 참조될 것이다.
- [0170] 파이로서열분석(pyrosequencing)과 관련하여 본 발명의 바람직한 구현예가 지금부터 기술될 것이다. 파이로서열 분석에 관한 바람직한 구현예의 기술은 본 발명을 파이로서열분석 검정법으로 제한하는 것으로 간주되지 않아야 한다.
- [0171] 도 1을 참고하면, 핵산의 서열분석(sequencing)을 수행하기 위해 선택적으로 핵산 가닥을 보유하는 비드 형태인 적어도 하나의 지지 표면을 수납하도록 적응된 2개 이상의 웰(2)들을 포함하는 폴리카보네이트 디스크 형태인 회전식 플랫폼(또는 디스크)(1)이 제공된다. 웰(2)들은 바람직하게는 직경이 약 2 내지 3 mm이고, 디스크(1)의 원주 주위에 동일하게 이격된 간격으로 위치한다. 예를 들어, 120 mm의 직경을 가지는 디스크(1)는 377 mm의 원주를 가지고, 디스크(1)의 중심으로부터 반경 55 mm로 (별개의 영역들/표적 자리(2)들의 중심들 사이에서) 6 mm 만큼 이격된 3 mm 직경의 별개의 영역(2)들을 형성함으로써 디스크(1)의 주변부 주위에 대략 57개의 웰들이 생긴다. 그러나 웰들의 수는 더 큰 디스크(1) 또는 더 작은 별개의 영역들, 예컨대, 말하자면, 1 mm의 간격을 가지는 0.5 mm의 직경, 또는 이들의 임의의 조합을 사용함으로써 더 작거나 더 큰 숫자가 될 수 있다. 바람직하게, 웰(2)들은 약 0.5 내지 100  $\mu$ l의 부피를 포함하는 얇은 웰들이다.
- [0172] 다른 구현예는 도 2에서 볼 수 있으며, 유사한 특징부에는 유사한 참조 번호가 주어져 있다. 이러한 예에서, 회전식 플랫폼은 주변부 주위에 동일한 간격을 둔 50개의 웰들을 가지며 직경은 120 mm이다. 웰들은 직경이 약 3 mm이고, 폴리카보네이트, 투명 폴리스티렌 및 백색 내충격 폴리스티렌(HIPS)를 포함하는 재료로부터 제조될 수 있다. 플랫폼 두께는 통상적으로 1 mm 내지 5 mm이고, 웰 깊이는 약 4 mm이다.
- [0173] 바람직하게 사용되는 서열분석 방법은 파이로서열분석이다. 그러나, 앞에서 논의된 바와 같이 핵산 가닥을 서열 분석하는 다른 방법도 활용될 수 있다는 것으로 이해될 것이다. 바람직하게, 웰(2)들은 핵산 가닥을 선택적으로



고정시키도록 적응된 지지 표면들을 수용한다. 예를 들어, 핵산 가닥은 비오틴화될 수 있고, 지지 표면들은 비오틴화 핵산 가닥을 지지표면들에 결합시키기 위해 스트렙타비딘을 포함한다. 그러나, 지지 표면들에 핵산 가닥을 고정시키기 위해 다른 화학제품들도 사용가능한 것으로 이해될 것이다.

[0174] 핵산 가닥의 서열분석을 수행하기 위한 본 발명의 방법에 따르면, 회전식 플랫폼(1)이 제공되고, 핵산 가닥은 웰(2)들 내에 수용된 지지 표면들에 고정된다. 그런 다음, 예를 들어, 플랫폼(1)을 가열하여 지지 표면들을 약/대략 94℃로 가열함으로써 임의의 상보적인 핵산 가닥을 변성시키고 제거한다. 다음으로, 지지 표면들을 적합한 시약을 웰(2)에 분주함으로써 A, T, G 및 C 뉴클레오티드와 순차적으로 접촉시키되, 각 접촉 단계 사이에 플랫폼(1)을 회전시켜서 임의의 잔류 또는 미반응 뉴클레오티드가 실질적으로 웰(2)로부터 원심력으로 제거되도록 한다.

[0175] 본 발명의 방법은 상기 각 접촉 단계 중 및/또는 이후에 핵산 가닥을 분석하는 단계를 더 포함한다. 분석 단계는 뉴클레오티드의 삽입으로부터 기인한 광의 산출을 핵산 가닥에 결합하게 된 뉴클레오티드의 숫자와 상호연관 시킴으로써 핵산 가닥 내 다음 염기쌍을 검출하는 단계를 포함한다. 반응에 의해 생성된 광을 검출하기에 적합한 검출기는 광전배증관이다. 회전식 플랫폼(1)이 회전하면서 모든 시료들이 검출기를 통하는 것으로 이해될 것이다. 만일 삽입된 뉴클레오티드가 없다면, 광신호가 없고, 반응 혼합물은 원심력을 이용하여 탈수되고(모든 사이클마다 또는 10 내지 50번째 사이클(말하자면) 그러나 80번째 미만의 사이클마다), 다음 뉴클레오티드를 사용하여 다른 회차가 시행된다.

[0176] 바람직한 구현예에서, 웰(2)을 후속 뉴클레오티드와 접촉시키기 이전에, 각 지지 표면(2)은 세척 시약을 사용하는 세척 또는 세정 단계를 거친다. 세척 시약은 이전의 접촉 단계로부터의 임의의 잔류 용액을 실질적으로 세척해 낼 수 있는 임의의 시약일 수 있고, 바람직하게는 PCR 완충액이다.

[0177] 바람직하게는, 회전식 플랫폼(1)이 낮은 속도, 예를 들어, 약 10 내지 200 rpm으로 회전하면서 뉴클레오티드 시약들 및 효소를 분주하고, 플랫폼(1)은 높은 속도, 예를 들면 약 400 내지 4000 rpm으로 회전하면서 세척 시약을 분주한다.

[0178] 도 3을 참조하면, 본 발명은 또한 핵산 가닥 서열분석을 위한 회전식 플랫폼(1)과 함께 사용하기 위한 장치를 제공한다. 장치는 플랫폼(1)을 소정의 제어가능하고 사용자 선택가능한 회전 속도로 회전시키기 위한 모터(50), 예를 들면, 약 10 내지 4000 rpm의 회전 속도를 전달할 수 있는 모터를 포함한다. 또한 핵산 가닥을 웰(2)들에 분주하여 핵산 가닥을 지지 표면들에 고정시키기 위한 장치가 제공된다. 이러한 장치는 잉크젯 형 기술 또는 주사기 펌프와 같은 적합한 분주기(7)의 형태를 취할 수 있다. 또한 A, T, G 및 C 뉴클레오티드를 지지 표면과 접촉시키기 위해 분주하고, 세척 시약을 분주하기 위한 장치를 제공한다. 다시, 이러한 장치는 잉크젯 형 기술의 형태를 취할 수 있다. 또한, 임의의 상보적인 핵산 가닥을 변성시키고 제거하기 위한 장치를 제공하고, 이러한 장치는 하우징(4) 내에 배치된 가열 코일(본 도면에 미도시)의 형태를 취할 수 있다.

[0179] 파이로서열분석 반응에 의해 생성된 광을 검출하기에 적합한 검출기(8)가 또한 제공된다. 적합한 검출기들은 당업자에게 잘 알려져 있는데, 예를 들어, 회전식 플랫폼(1) 위에 장착될 수 있는 광전배증관이다. 특히, 본 발명에 사용하기 위한 광전배증관 검출기들의 다양한 구현예들을 보여주는, 도 4 및 5를 참조한다. 하나의 광학적 구성은 초점 광학장치(도 4)를 사용하며, 두번째는 직접적인 영상화(도 5)를 사용한다. 도 4는 초점 렌즈(10), 구멍(11), 광감작 표면(12), 광전배증관(13) 및 검출 전자기기(14)를 상세히 나타낸다. 도 5는 구멍(15), 광감작 표면(16), 광전배증관 검출기(17) 및 검출 전자기기(18)를 상세히 나타낸다.

[0180] 회전식 플랫폼(1)은 낮은 속도(즉, 200 rpm 이하)로 회전하여 효소 및 뉴클레오티드(들) 혼합물을 분주하며, 여기서 원심력은 혼합물을 웰(2)들로부터 이동시키지 않도록 충분히 낮아서, 반응이 진행되고 광학 검출이 완료될 수 있게 한다. 세척 시약들을 높은 회전자 속도(즉, 400+ rpm)로 첨가하여서, 세척이 웰(2)들로부터 모든 시약들을 제거하고 웰(2)들 사이를 실질적으로 오염되지 않게 한다.

[0181] 실시예

# [0182] 자성 비드를 사용한 파이로서열분석

[0183] DNA 표적의 뉴클레오티드 서열을 결정하기 위한 파이로서열분석(pyrosequencing)의 사용은 고체 지지체에 DNA 표적을 고정하는 것을 요구한다. 파이로서열분석 프로토콜의 간단한 설명은 다음과 같다:

[0184] 1) 고체 지지체에 비오틴화 이중가닥 DNA를 고정;

- [0185] 2) 화학적 변성을 통해 비오틴화되지 않은 가닥을 분리;
- [0186] 3) 세척을 통한 비오틴화되지 않은 가닥의 제거;
- [0187] 4) 서열분석 과정의 시작을 촉진하기 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 어닐링;
- [0188] 5) 파이로서열분석을 가능하게 하는 효소 및 기질 혼합물의 첨가;
- [0189] 6) DNA 중합효소에 의해 표적 DNA에 삽입(두 뉴클레오타이드가 상보적이라는 것을 보장함)되는 제1 데옥시리보뉴클레오타이드(dNTP)의 분주;
- [0190] 7) 상보적 염기의 삽입에서, 효소 연쇄 반응을 통해 광신호로 전환되는 파이로인산의 분자가 방출된다. 줄 내에서 하나 이상의 뉴클레오타이드가 존재하는지를 결정하기 위해 신호의 강도를 사용한다.
- [0191] 8) 삽입되지 않은 초과 dNTP는 그들이 서열분석 반응의 다음 부분 동안에 삽입되지 않는 것을 확실하게 하기 위해 분해된다. 이것은 서열이 모든 표적 주형들과 동기화되어 유지되는 것을 보장한다.
- [0192] 9) 다음 상보적인 염기를 첨가함으로써 서열분석 반응을 계속한다.
- [0193] 파이로서열분석 반응에서 사용되는 비오틴화 DNA의 고정에는 스트렙타비딘 또는 뉴트라비딘으로 코팅된 자성 비드 입자 55를 사용함으로써 달성될 수 있다. 자성 입자 55는 넓은 표면적을 제공하고 반응 용액 내에서의 이동을 가능하게 하여 결합능 및 비오틴화 DNA 표적이 위치될 가능성을 높인다.
- [0194] 본 실시예에서, DNA 주형의 고정은 자성 비드 입자 55를 비오틴화 DNA 표적과 결합 완충액과 함께 설정된 시간(예컨대, 10 분) 동안 플랫폼/디스크(1) 내의 웰(2) 내로 혼합함으로써 달성되었다. 고정 기간 후, 미결합 주형 및 파이로서열분석 반응에서 원치 않는 다양한 다른 시약들을 함유하는 상충액을 원심분리로 제거하였다. 원심분리에 앞서, 자성 고리(20)를 상승시켜 플랫폼과 접촉시키고 자성 입자를 웰의 저부에 고정시켰다. 자성 고리는 플랫폼 표면 아래 1 mm 미만으로 떨어져서, 자성 비드 입자를 웰 내에 보유하기에 충분한 자기장을 제공하면서 플랫폼이 2000 rpm 보다 큰 속도로 회전하고 상충액을 원심분리해서 버릴 수 있게 한다. 세척을 함유하는 완충액을 사용하는 세척 단계는 상충액의 충분한 제거를 보장하기 위해 적용된다. 동일한 원심분리 단계가 세척 완충액을 제거하기 위해 사용되었다.
- [0195] 비오틴화되지 않은 DNA 가닥의 변성은 변성제인 수산화 나트륨을 사용하여 달성되었고, 수산화 나트륨은 20초 이하로 적용되었다. 변성제는 원심분리를 사용하여 제거되었고, 세척 완충액이 제거를 최대화하기 위해 적용되었다. 다시, 웰들 내에 자성 비드 입자들을 유지하면서 상충액을 원심분리할 수 있게 하기 위해 자성 고리가 적용되었다.
- [0196] 파이로서열분석 반응을 촉진하기 위해, 서열분석 프라이머를 첨가하였고, 시료를 80℃ 초과로 가열하고 30℃ 미만의 온도로 냉각하는 어닐링 과정을 통해 DNA 표적에 혼성화되었다.
- [0197] 어닐링 과정의 완료시, 파이로서열분석 효소 혼합물을 APS 및 루시페린을 함유하는 기질 혼합물과 함께 웰들 내로 분주하였다. 반응이 무작위적으로 일어나는 것을 보장하기 위해 자성 비드 입자를 반응 용액 내에서 진동시켰다. 설명하자면, 플랫폼을 충분히 진동시켜서, 비드가 교반되게함으로써 용액 및 비드 입자가 서로 완전히 혼합되었다.
- [0198] 마지막으로, 소량의 dNTP를 반응 혼합물에 분주하고 서열 내의 그 위치에 상보적인 염기가 존재한다면 광신호를 측정함으로써 서열을 결정하였다. 1분의 기간은 초과 dNTP가 아파라제에 의해 분해되는 것을 보장할 수 있다. 서열은 dNTP 중 임의의 하나를 분주함으로써 결정되었다. 반응 중에 플랫폼은 회전하면서 또한 진동하여 자성 비드의 지속적인 움직임이 유지되고 추가적으로 그들이 함께 응집되거나 응고되는 것을 예방하는 것을 보장한다.
- [0199] **자성 비드 입자**
- [0200] 다양한 유형의 자성 비드 입자의 성능을 평가하였다.
- [0201] • Dynabeads MyOne 스트렙타비딘 C1(Invitrogen): 친수성 비드 표면에 공유결합으로 스트렙타비딘이 코팅된 단층을 가지는 1  $\mu$ m 직경의 초상자성 비드;
- [0202] • Sera-Mag Magnetic SpeedBeads(Thermo Scientific): 1  $\mu$ m 자성 카복실레이트-변형 염기 입자, 코어 쉘 공정에 의해 제조되고, 공유결합으로 뉴트라비딘이 코팅됨;

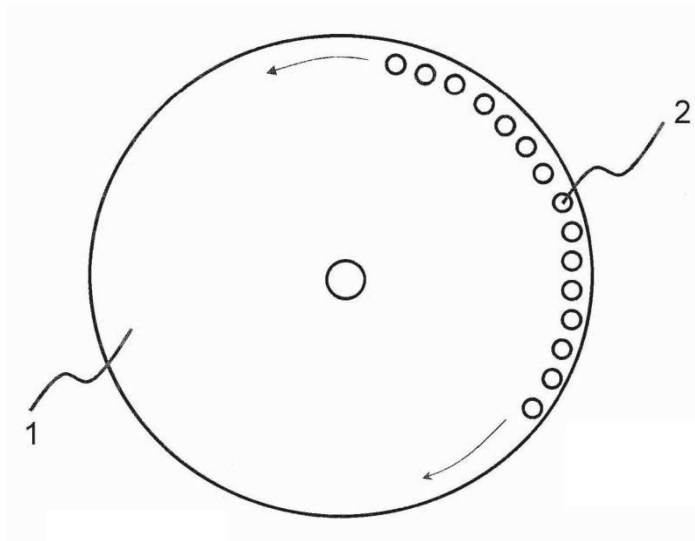
- [0203] · 스트랩트아비딘 Mag 세파로오스(GE Life Sciences): 자철석 함유 세파로오스 비드에 결합된 스트랩트아비딘.
- [0204] 자성 비드 입자들을 다음에 대하여 평가하였다;
- [0205] 1) 비오틴화 DNA 표적 고정능
- [0206] 2) 원심분리 과정 동안 웰 내에 유지됨
- [0207] 3) 파이로서열분석 반응 중 단백질의 비특이적 결합의 회피
- [0208] **결과**
- [0209] 고정화
- [0210] 3가지 유형의 비드 모두 비오틴화 DNA를 고정할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 가장 높은 파이로서열분석 피크 신호 높이는 Sera-Mag Magnetic SpeedBeads 뉴트라비딘에서 관찰되었고, Dynabeads MyOne 스트랩트아비딘 C1이 뒤따르고, 그 다음은 스트랩트아비딘 Mag 세파로오스였다(도 6a 내지 c 참고). 스트랩트아비딘 Mag 세파로오스 비드에 대한 신호는 다른 2가지 유형의 비드와 비교하여 현저하게 낮았다. 2가지 이유가 밝혀졌는데, 첫번째는, 비드의 크기 및 중량으로 인해, 비드가 표준 진동 조건 하에서처럼 잘 혼합되지 않았고; 두번째는, 비드의 진한 색상이 흡광을 통한 광신호를 약화시켰다. 첫번째 문제점에 대한 해결책은 더 큰 주파수로 진동시키는 것이다. 즉, 더 높은 진동 주파수는 더 나은 혼합 및 이에 따른 더 나은 신호 피크 높이를 가능하게 한다(도 7 참조).
- [0211] 원심분리
- [0212] 고정된 DNA로부터 원치 않는 반응 분자의 최적의 제거를 달성하기 위해서는, 2000 rpm을 초과하는 원심분리를 위한 회전 속도가 필요한 것으로 결정되었다. 1500 rpm의 세척 원심분리로 중합효소 연쇄 반응으로부터 분리된 DNA를 사용한 결과는 효소 및 기질 혼합물의 첨가시 높은 피크를 나타내었다(도 8 참조). 얻어진 서열분석 피크는 현저하게 약화되었다. 효소 및 기질의 첨가 후의 높은 피크의 원인은 자성 비드 입자에 대한 DNA의 고정 후 세척 단계 동안의 PCR 구성요소의 불량한 제거에 의한 것으로 설명될 수 있다. PCR로부터의 잔류 dNTP는 효소 및 기질 혼합물의 첨가 시 모두 삽입되어, 서열을 순간적으로 완성함으로써 하나의 높은 피크를 전달하고, 잔존하는 비삽입 주형이 거의 없기 때문에 남아 있는 서열분석 반응이 순차적으로 약화된다. 테이더는 2000 rpm을 초과하는 회전 속도가 상층액의 완전한 제거를 달성하기 위해 필요하다는 것을 나타낸다.
- [0213] 2000 rpm을 초과하는 원심분리속도를 적용하는 것은 스트랩트아비딘 Mag 세파로오스 비드를 제외한 모두가 웰들로부터 옮겨지는 것을 초래하였다. 더 큰 크기로 인해, 이러한 비드들은 2000 rpm을 초과하는 속도에서 웰들 내에 유지되었다.
- [0214] 비특이적 결합
- [0215] 일부 비드의 외부 웰의 조성으로 인한 파이로서열분석 반응에 사용되는 효소의 비특이적인 결합은 얻어진 피크 및 서열에 부정적인 영향을 가질 수 있다. 이러한 현상의 한가지 특징은 피크의 넓어짐이다. 이는 초과 미결합 뉴클레오타이드를 분해하는 효소인 아파라제의 감소에 기인한다. 감소된 양의 아파라제는 또한 서열이 위상 밖으로 전이되도록 하는 비동기화적인 초과 뉴클레오타이드 삽입을 초래한다. 따라서, 어떠한 신호를 가질 것으로 예상되지 않는 뉴클레오타이드 주입에 대한 피크가 관찰되기 때문에 얻어진 서열을 이해하기 어려워진다.
- [0216] 이러한 문제점은 Dynabeads MyOne 스트랩트아비딘 C1 비드에 대하여 관찰되었다(도 9 참조). 즉, 다른 두 비드에 비하여 피크 폭 및 비특이적 피크 높이가 가장 컸다. 가장 적게 영향을 받은 비드는 스트랩트아비딘 Mag 세파로오스 비드 입자였다. 이론에 얽매이는 것을 바라지 않으면서, 세파로오스 웰은 비활성이고 따라서 비특이적 결합을 피하는 것으로 여겨진다. 반대로, Dynabeads MyOne 스트랩트아비딘 C1 비드 입자에 대한 비드 표면은 반대로 하전된 아파라제를 유인하는 전하를 가짐으로써 아파라제를 비드에 결합시킨다. 결합된 아파라제는 더 이상 초과 뉴클레오타이드를 분해하는 데에 사용될 수가 없고, 서열에서 위상 전이를 초래한다.
- [0217] 결론
- [0218] 상이한 비드 유형에 대한 관찰에 기반하여, 사용하기에 최적인 비드는 스트랩트아비딘 Mag 세파로오스 비드인 것으로 판단되었지만, 다른 비드들도 여전히 본 발명의 방법에 대해 실행가능한 것으로 이해되어야 한다. 자성 입자는 DNA 표적을 고정시킬 수 있었고, 서열분석을 위한 깨끗한 주형을 보장하기 위해 일정한 속도로 수행되는 세척 원심분리를 사용하였다. 비활성 외부 웰은 또한 파이로서열분석 효소의 비특이적 결합이 dNTP의 비동기화적 삽입을 통한 서열분석 성능에 영향을 미치는 문제점이 되지 않는 것을 의미한다.

- [0219] 도 6a 내지 c는 a) 스트렙타아비딘 Mag 세파로오스; b) MyOne 스트렙타아비딘 C1; 및 c) Sera-Mag Magnetic SpeedBeads 뉴트라비딘에 대한 파이로서열분석 피크 높이를 나타낸 것이다. 1 피코몰의 DNA 주형을 10  $\mu$ l 결합 완충액 용액에 첨가하고 10분간 항온배양하였다. NaOH로의 변성 이전 및 이후에 고정된 비드를 완충 용액에서 세척하였다. 400 nM 농도로 서열분석 프라이머를 첨가하였고 60초간 80℃로 가열한 다음 30℃로 냉각함으로써 어닐링하였다. 효소 및 기질을 첨가하였고 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP의 15 사이클을 사용하여 드 노보 파이로서열분석 반응을 수행하였다. Sera-Mag Magnetic SpeedBeads 뉴트라비딘에서 가장 높은 피크가 관찰되었다.
- [0220] 도 7은 고주파 혼합을 사용하여 스트렙타아비딘 Mag 세파로오스 비드에 대해 취득한 파이로서열분석 피크를 나타낸 것이다. 신호 피크는 5의 평균 신호 피크 높이로부터 40 유닛 초과까지 증가되었다. 그러나, 자성 비드 입자의 진한 색에 의한 신호의 약화로 인해, 피크 높이는 다른 2종의 비드에 대해 관찰된 피크 높이를 초과하지는 않았다.
- [0221] 도 8은 1500 rpm의 원심분리 속도로 세척된 Sera-Mag Magnetic SpeedBeads 뉴트라비딘에 고정된 PCR 암플리콘 (amplicon)에 효소 및 기질의 혼합물을 첨가한 후의 높은 피크를 나타낸 것이다. 효소 및 기질 혼합물의 첨가 후 후속 서열분석 반응 피크는 현저하게 약화되었다. 동일한 비드는 2000 rpm을 초과하는 원심분리 후 웰 내에 유지되지 않았다.
- [0222] 도 9는 Dynabeads MyOne 스트렙타아비딘 C1 비드에 고정된 DNA 표적을 사용한 파이로서열분석 동안의 위상 전이 및 넓어진 피크 신호를 나타낸 것이다. 도 25는 자성 비드가 웰 1 내지 3에 적재된 것을 보여주는 실제 생산 플랫폼의 사진이다. 도 26 및 27은 플랫폼을 회전시키기 위한 모터가 연결된 본 발명에 따른 플랫폼의 사시도이고, 플랫폼에 가해지는 자력이 거의 없거나 전혀 없는 제1 위치 내 환상의 주변부 자성 고리를 보여준다. 도 28 및 29는 각각 제1 위치 및 제2 위치 내 자성 고리를 보여주는 측면 단면도이다. 제2 위치에서, 고리는 플랫폼에 충분히 가깝게 위치하여 자력이 웰 내에 수용된 임의의 자성 비드에 가해지도록 한다.
- [0223] 도 15는 본 발명의 다른 구현예로서, 회전 하에, 비드가 공동 내로 회전하여 들어오고 폐 유체는 원심력에 의해 프리트(firt) 또는 유사 필터를 통과해가도록 구성되고 배열된 웰을 가지는 플랫폼을 나타낸다.
- [0224] 위에서 논의된 바와 같이, DNA 서열의 결정은 파이로서열분석 적용(Agah A., Aghajan M., Mashayekhi F., Amini S., Davis R., Plummer J.D., Ronaghi M., Griffin P.B., A multi-enzyme model for pyrosequencing, Nucleic Acids Res., 2004; 32: e166 참조)의 사용을 통해 달성될 수 있다. 서열분석은 상보적인 3' 데옥시리보뉴클레오타이드 5' 트리포스페이트(dNTP)의 단일 가닥 주형으로의 DNA 중합효소에 의한 삽입 후 파이로인산의 방출을 검출함으로써 달성될 수 있다. 초기에, 파이로인산은 설파릴라제 효소에 의해 아테노신 트리포스페이트(ATP)로 전환되어야 한다. 뉴클레오타이드 삽입 및 이에 따른 주형 가닥의 서열을 가리키는 광신호를 생성하는 것은 루시페라제 효소를 통한 ATP와 루시페린의 반응이다. 앞서 첨가된 뉴클레오타이드로부터 방해 받지 않고 다음 뉴클레오타이드를 삽입하고 검출할 수 있도록, 아파라제 효소가 사용된다. 아파라제는 다음 뉴클레오타이드의 첨가 이전에 초과된 뉴클레오타이드를 분해할 것이다.
- [0225] 파이로서열분석의 과정 중, 설페이트 및 이인산화 뉴클레오타이드와 같은 부산물들이 축적된다. 이러한 부산물들은 효소를 저해하여 긴 서열 작업 중 신호 품질의 저하를 초래한다. 예를 들어, 아파라제의 저해는 염기의 비동기화 삽입 및 이에 따른 불량한 신호 검출을 야기하는 미삽입 뉴클레오타이드의 제거의 저하를 초래한다. 따라서, 파이로서열분석 적용을 사용한 서열분석의 길이는 현재 60 뉴클레오타이드 이하로 제한된다(Mashayekhi F., Ronaghi M., Analysis of read-length limiting factors in pyrosequencing chemistry, Anal. Biochem., 2007; 363: 275-287 참조).
- [0226] 따라서, 부산물 저해효과를 낮추고 리드(read) 길이를 증가시키기 위해, 본 발명은 다수의 뉴클레오타이드 노출 후 반응 구성요소를 세척할 수 있어서, 주형이 지지체에 결합된 채로 유지되는 것을 보장하면서 서열의 다음 단계를 지속하기 위해 신선한 시약이 첨가될 수 있다.
- [0227] 본 발명은 최선의 형태들 또는 이러한 발명의 실제 시행 시 실시되는 형태들로서 현재 고려된 구현예들을 참조하여 예시하고 설명하였지만, 본 명세서에 개시되고 다음의 청구범위에 의해 파악되는 광범위한 발명의 개념으로부터 벗어나지 않으면서 본 발명을 상이한 구현예들에 적응시키는 다양한 변형들이 이루어질 수 있다는 것을 이해해야 한다.

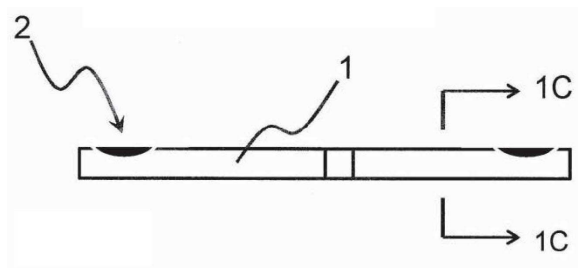


도면

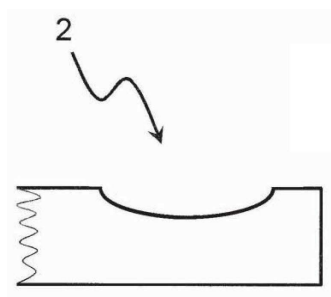
도면1a



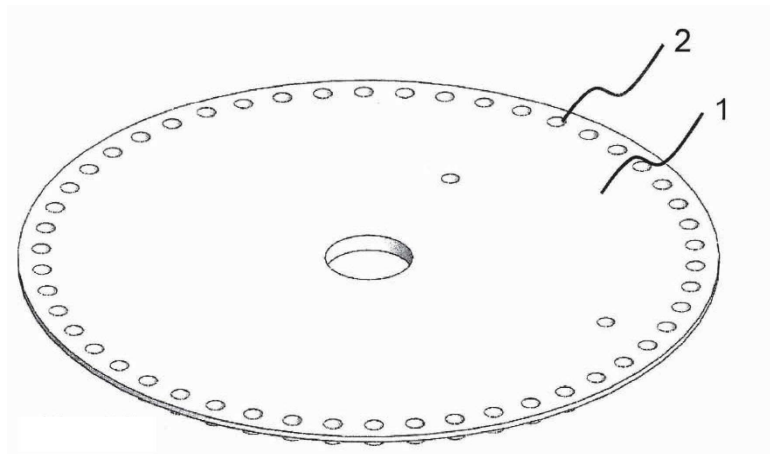
도면1b



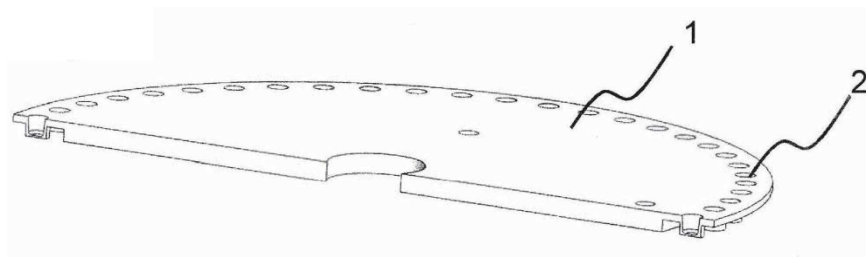
도면1c



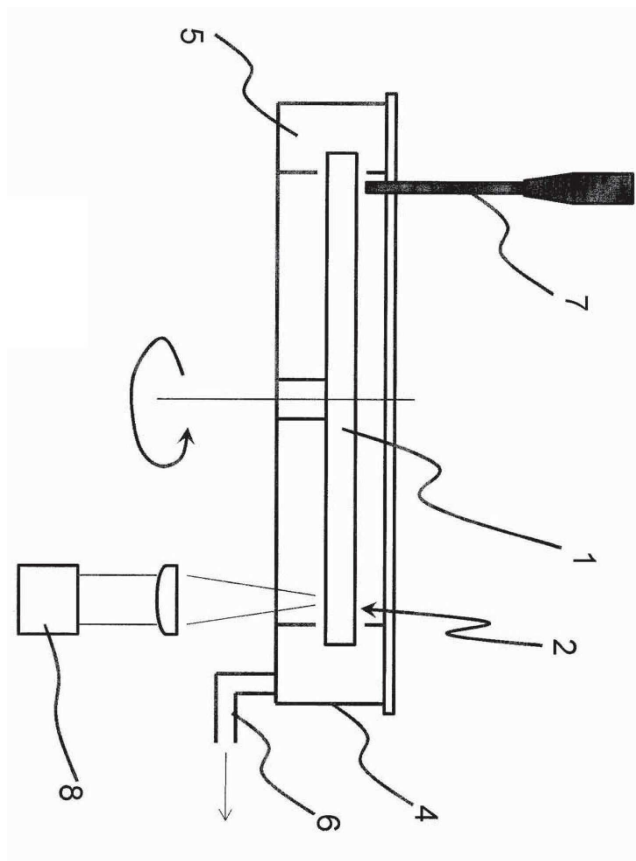
도면2a



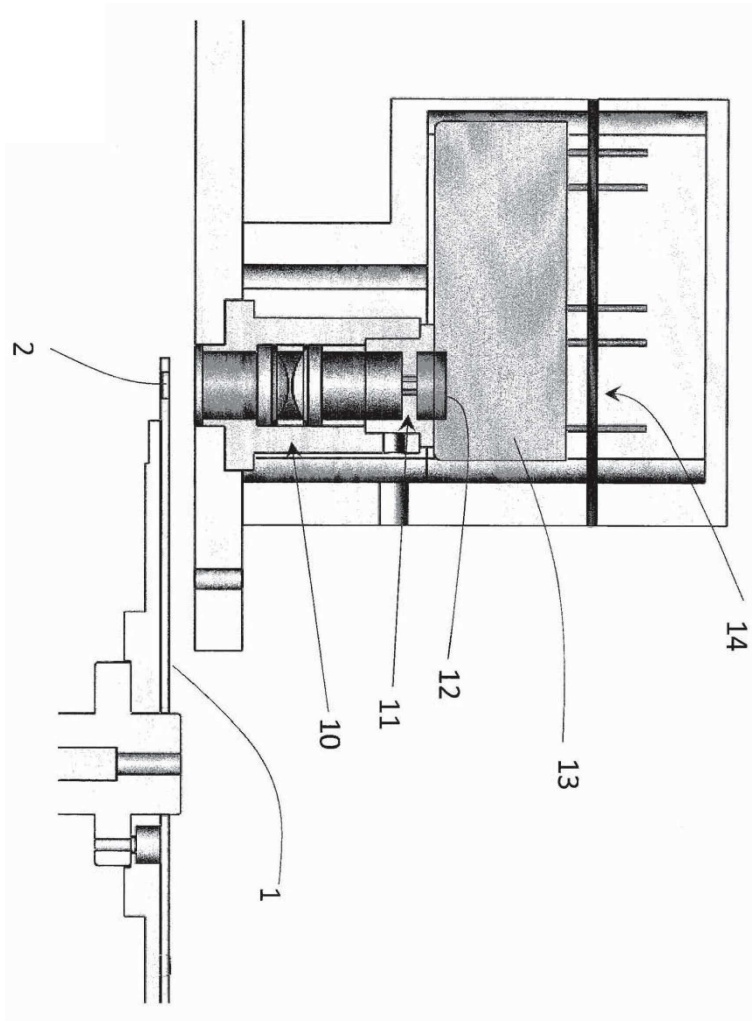
도면2b



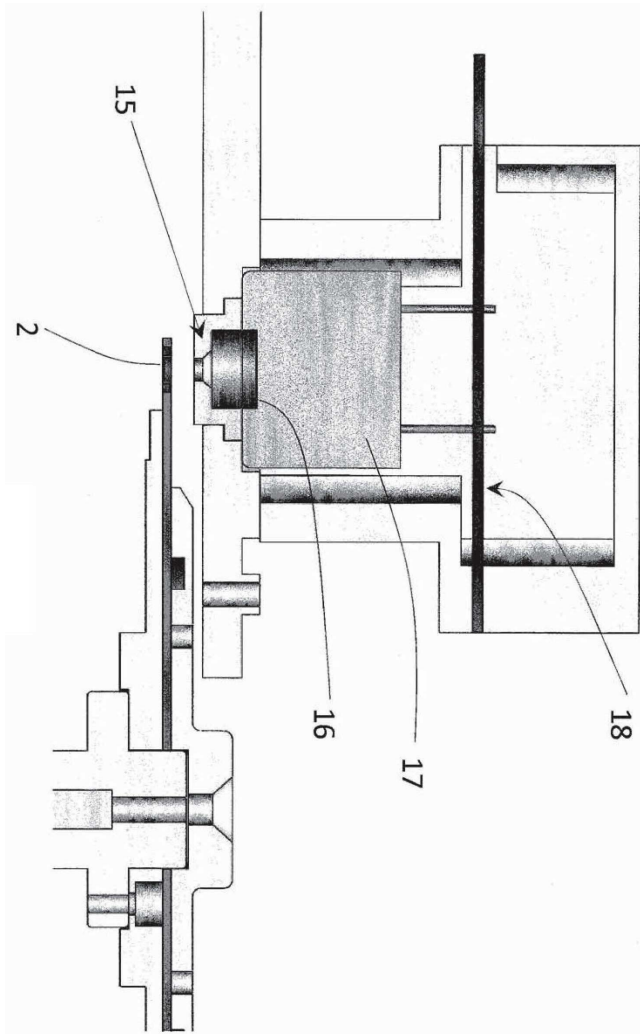
도면3



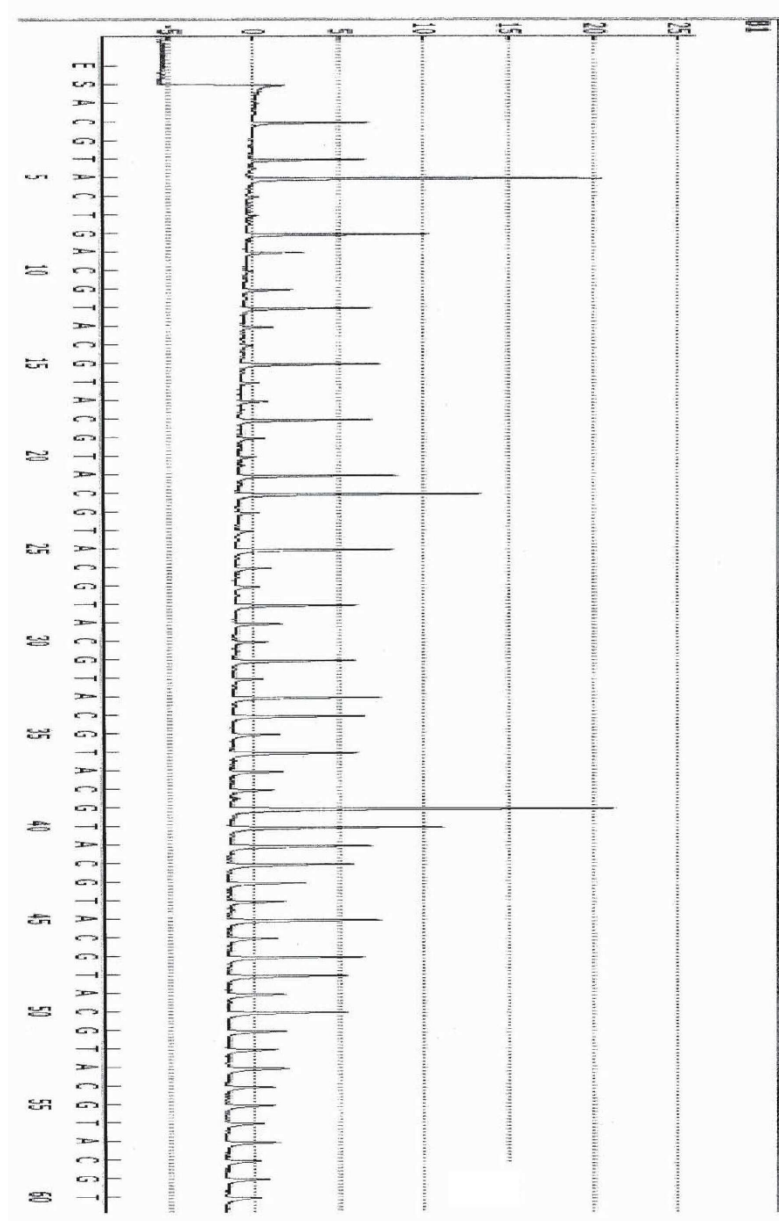
도면4



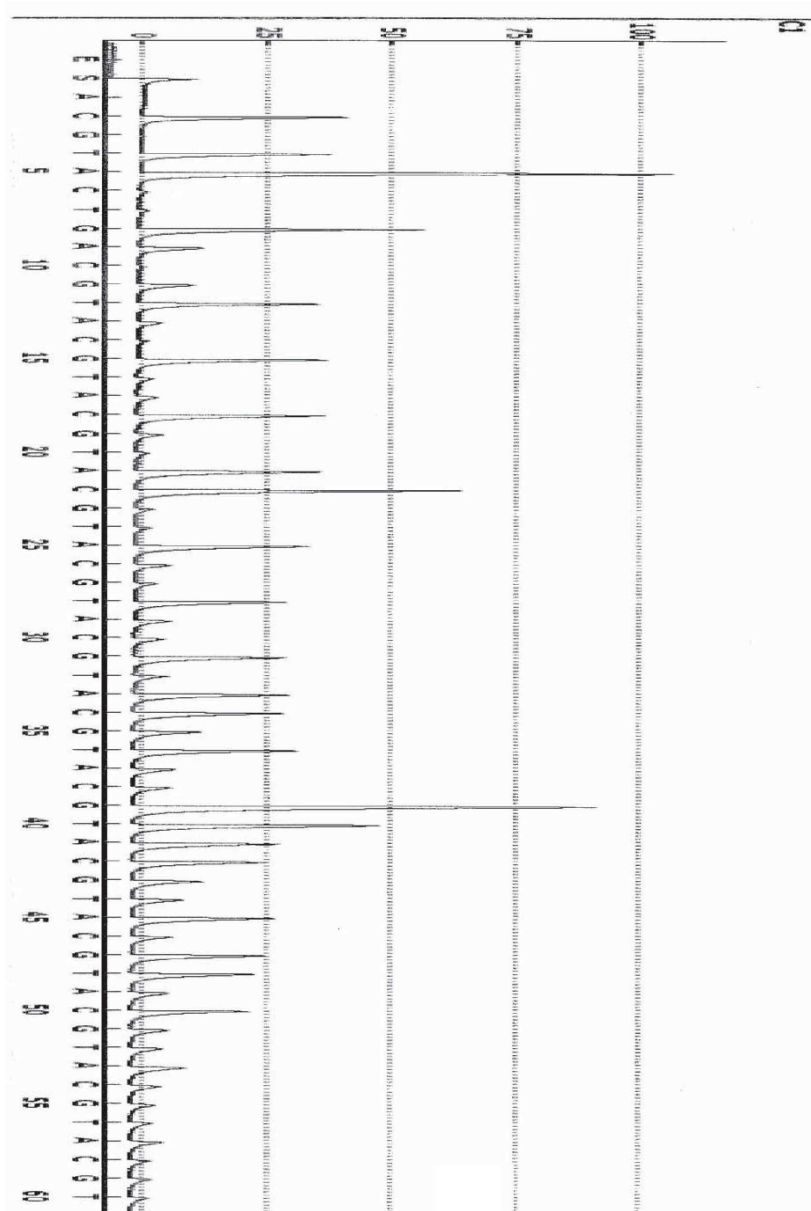
도면5



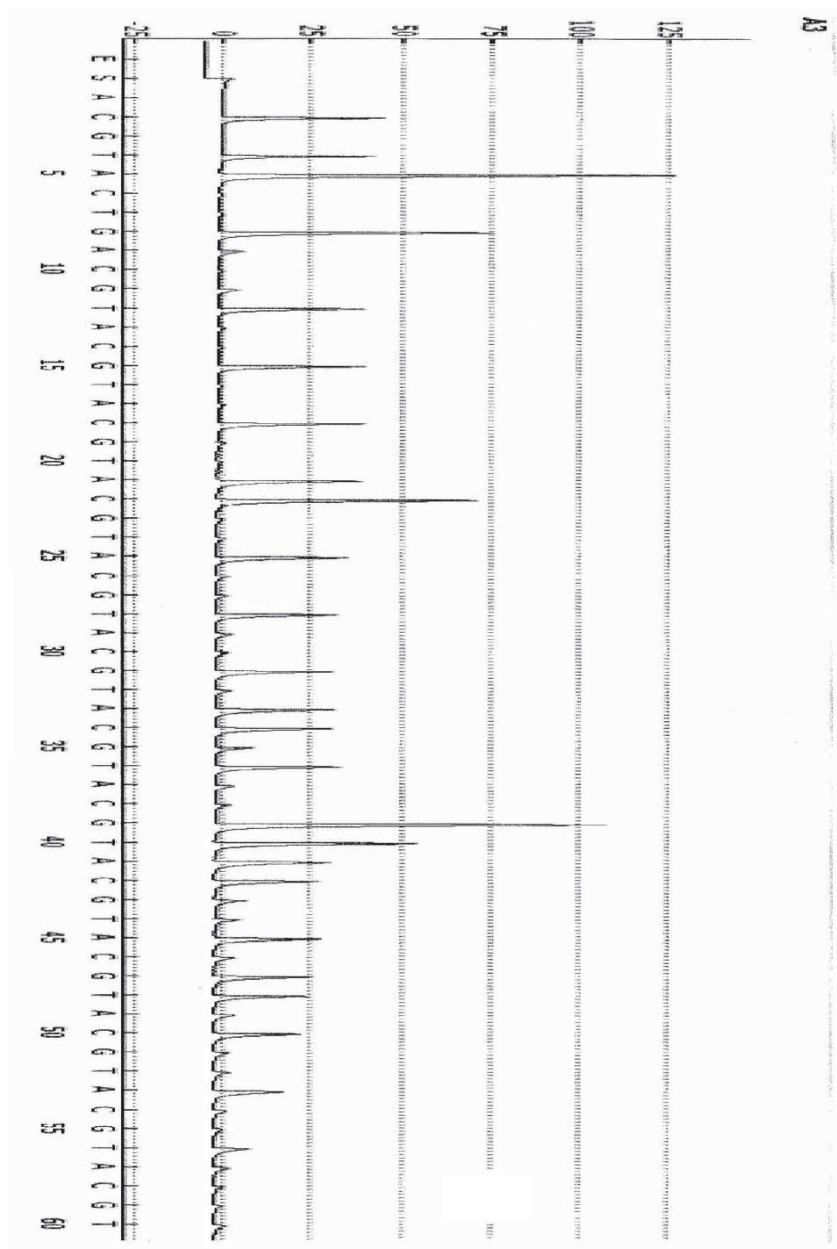
도면6a



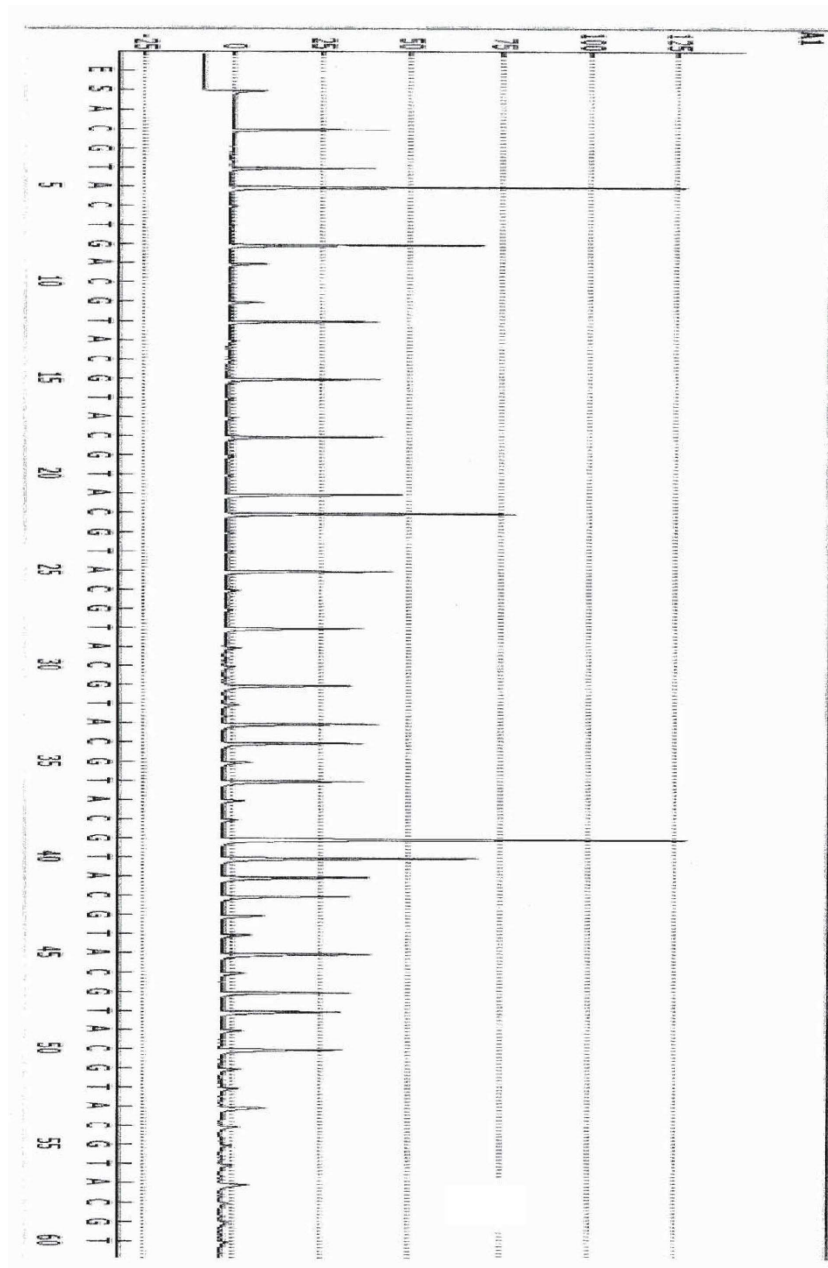
도면6b



도면6c

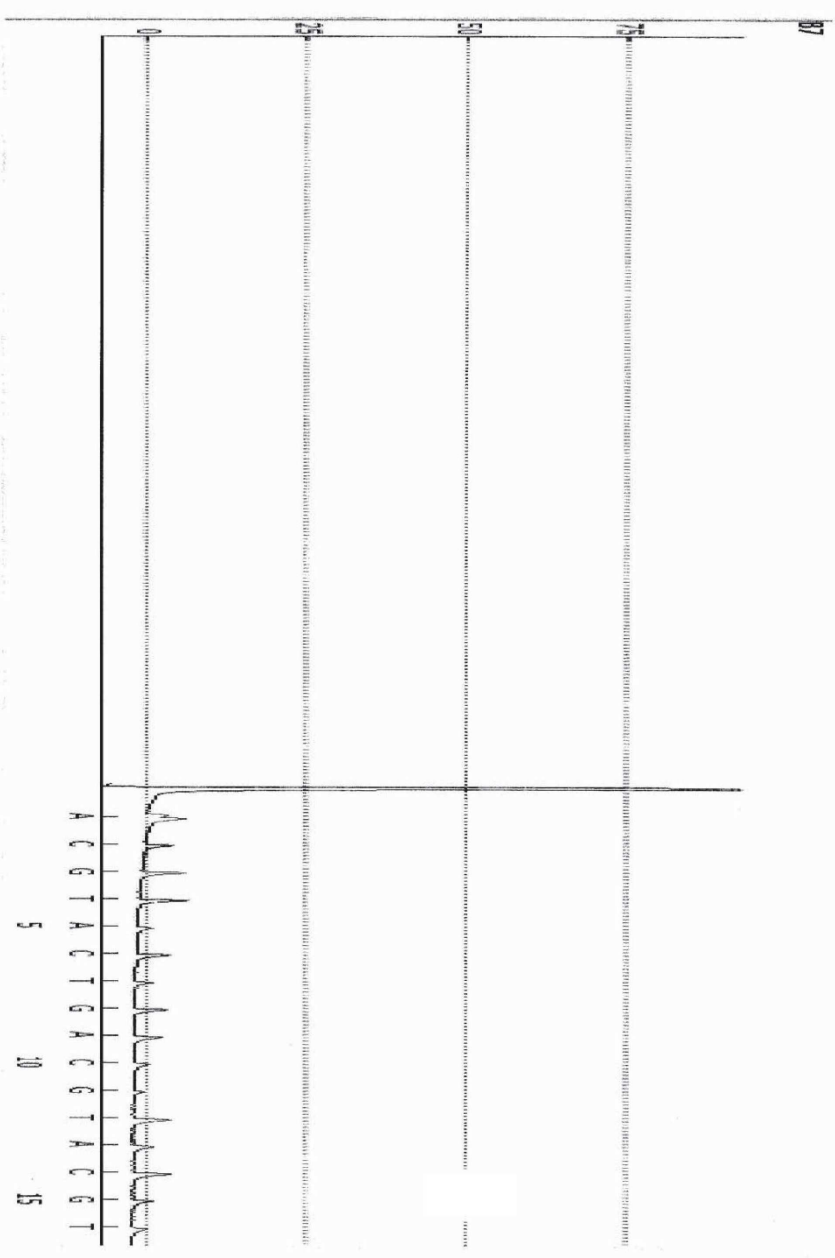


도면7

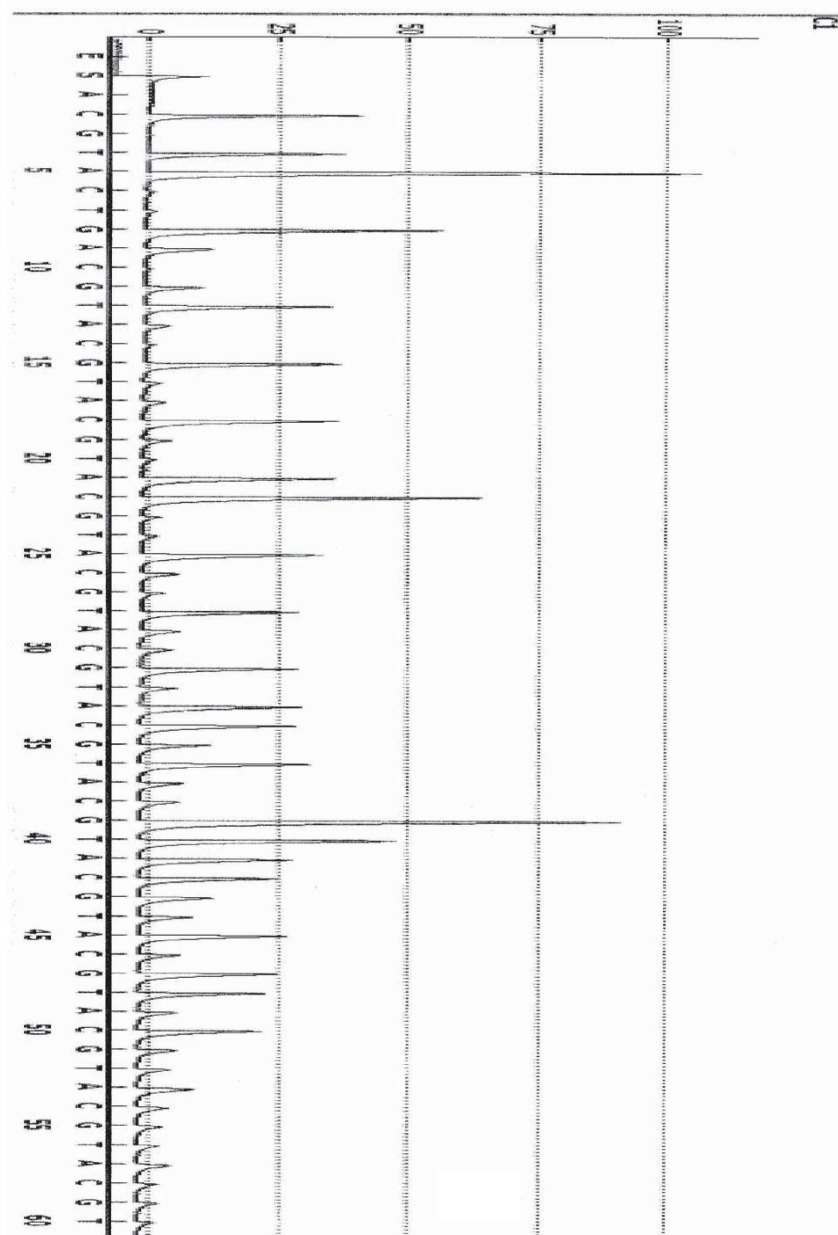




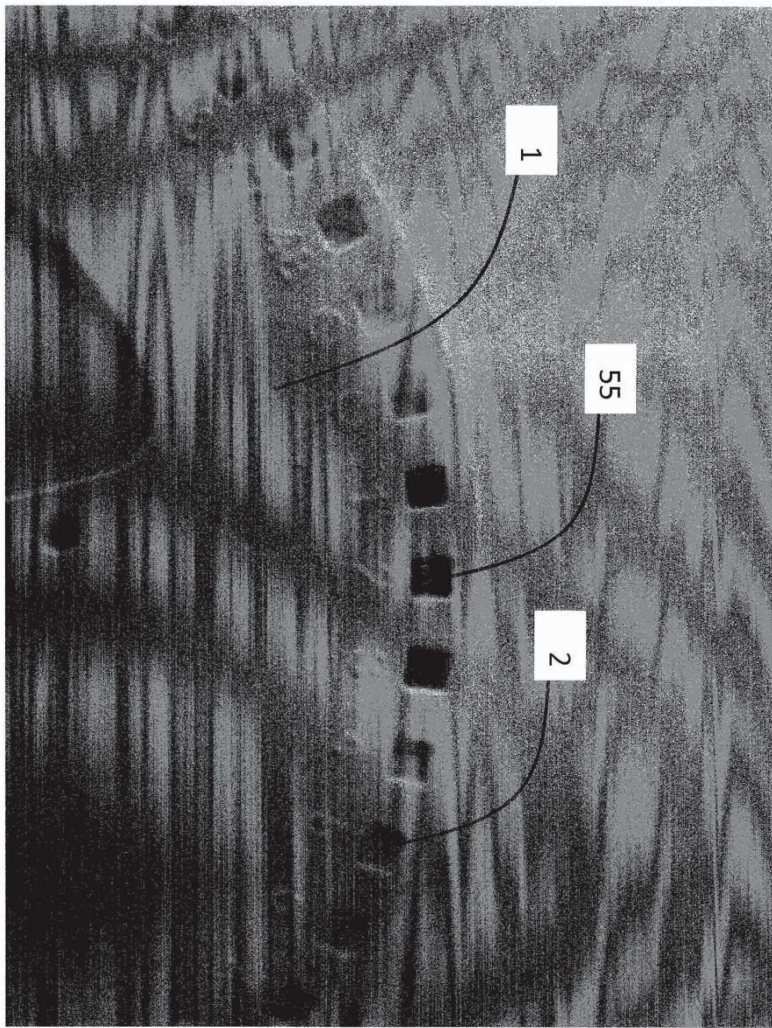
도면8



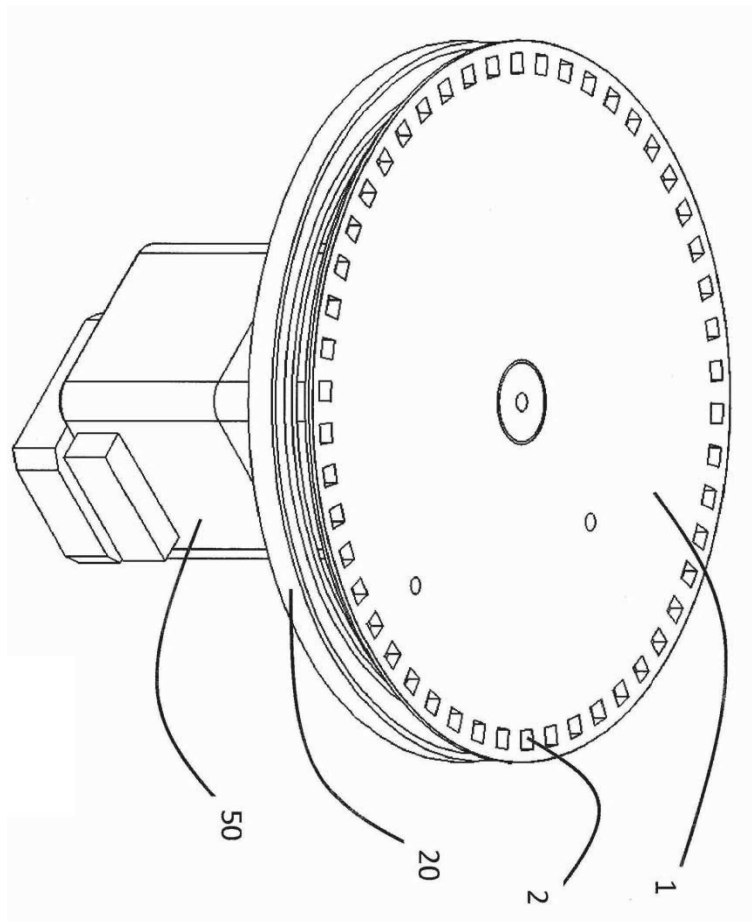
도면9



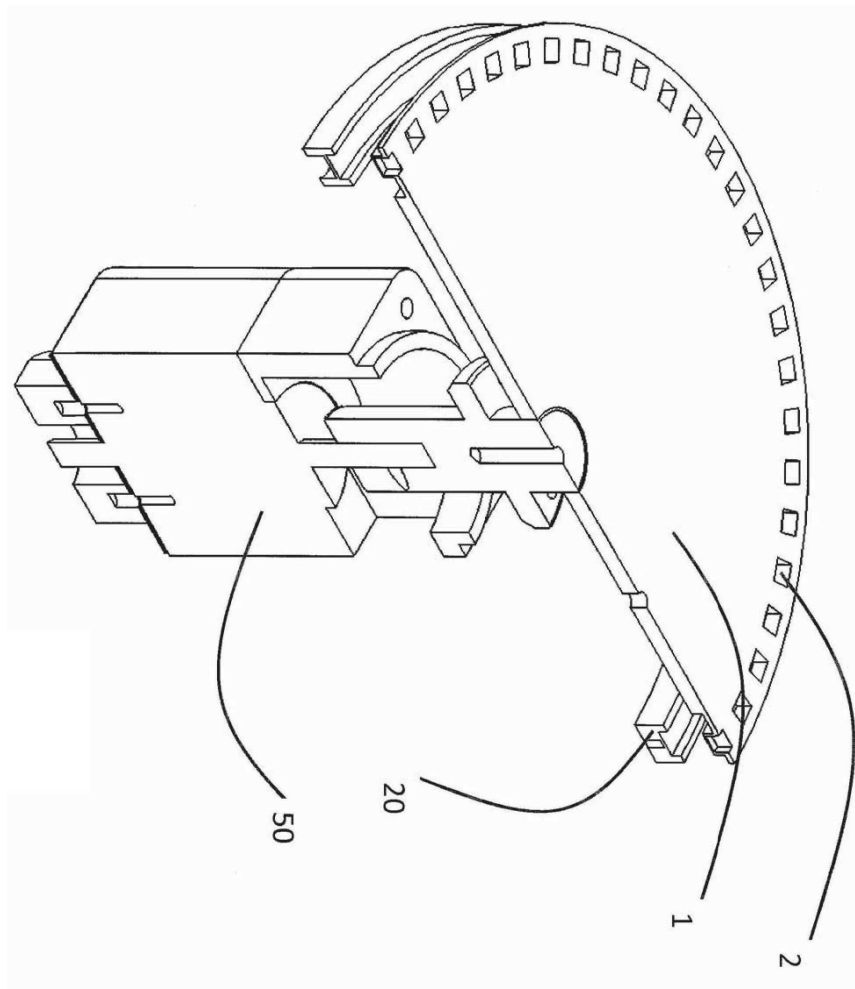
도면10



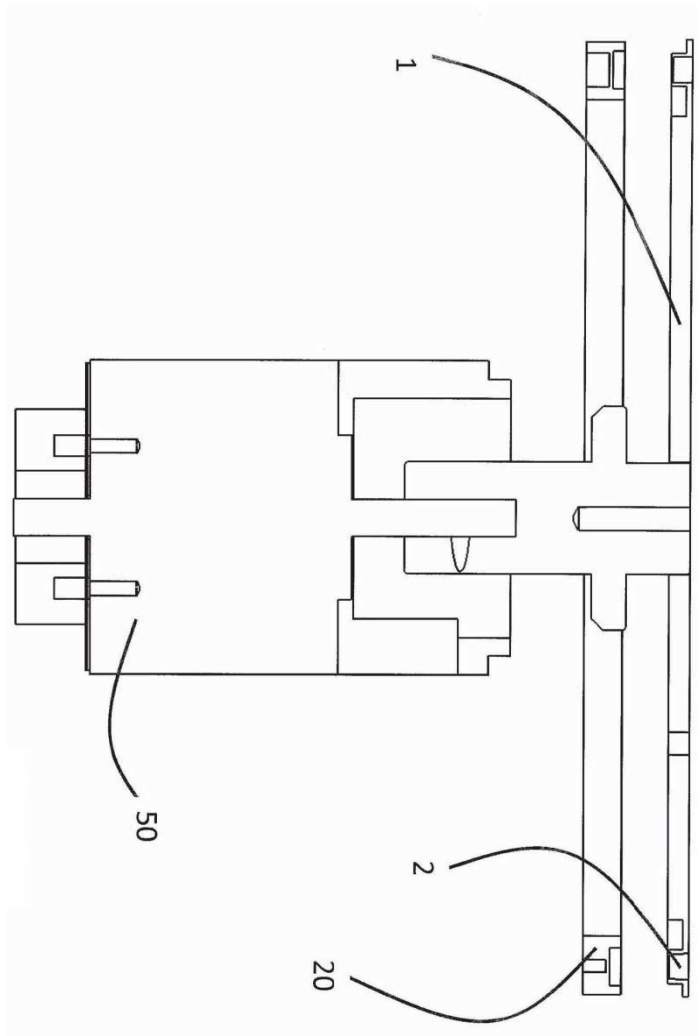
도면11



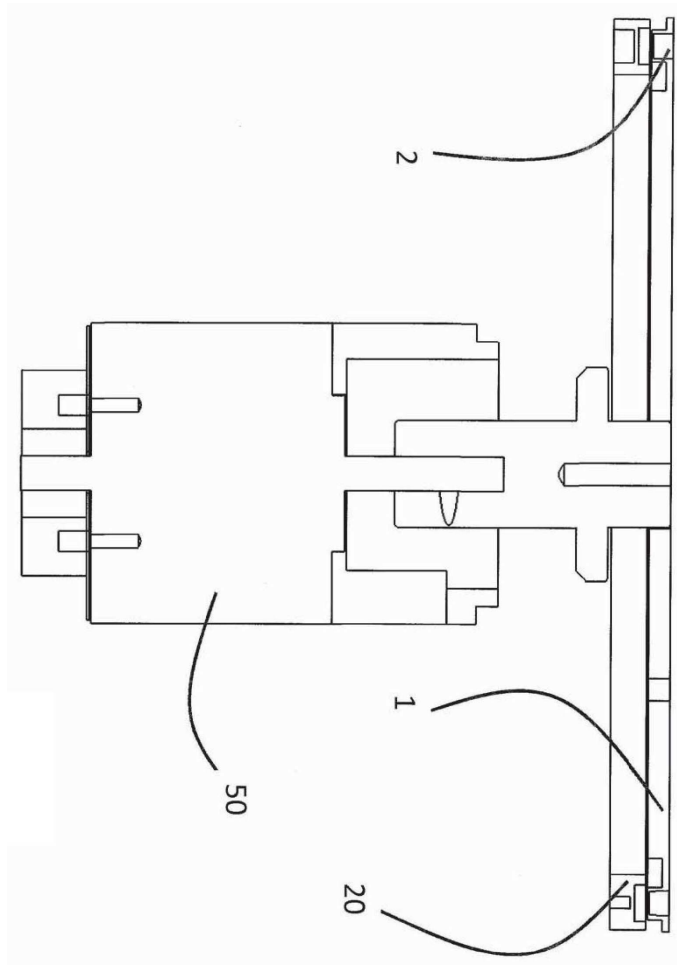
도면12



도면13



도면14



도면15

