



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 등록특허공보(B1)

(73) 특허권자
다나-파버 캔서 인스티튜트 임크.
 미국 메사추세츠 02215 보스턴 브룩클린 애비뉴
 450

(72) 발명자
마크리지오고스, 게라씨모스
 미국 매사추세츠주 02155 보스톤 빈니 스트리트
 44

(74) 대리인
양영준, 양영환

(74) 대리인 양영준, 양영환

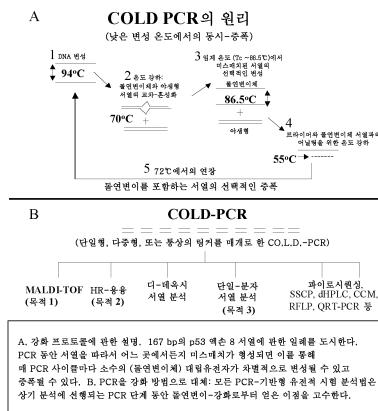
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 표적 서열 강화

(57) 요약

본 발명은 샘플로부터 저빈도 대립유전자를 강화시키기 위한 방법, 조성물, 소프트웨어 및 장치에 관한 것이다. 본 방법은 부분적으로는 임계 변성 온도 또는 "T_c"에서 반응 혼합물을 인큐베이션시키는 단계를 포함하는 변형된 핵산 증폭 프로토콜에 기초한다. 본 발명의 사용으로 모든 PCR-기반형 기술이 갖고 있는 현 검출 한계가 현저히 개선된다.

<div[](https://i.imgur.com/3QD9DfD.png)



특허청구의 범위

청구항 1

- a. 표적 서열 이중체 및 기준 서열 이중체를 갖는 것으로 의심되는 반응 혼합물을 표적 서열 이중체 및 기준 서열 이중체의 융점 (T_m)보다 높은 제1 변성 온도에 대하여 상기 표적 서열 이중체 및 상기 기준 서열 이중체가 변성되게 하되, 여기서, 상기 표적 서열 이중체는 하나 이상의 삽입, 결실 또는 치환을 포함하고, 적어도 하나의 뉴클레오티드에 의해 상기 기준 서열 이중체와 차이를 보이고, 상기 기준 서열 이중체와 동일한 프라이머 쌍에 의해 증폭가능한 것인 단계;
- b. 증폭 반응 혼합물의 온도를 강하시켜 표적 스트랜드(strand)/기준 스트랜드 이중체가 형성되게 하는 단계;
- c. 상기 증폭 반응 혼합물을 상기 기준 서열 이중체의 T_m 보다 낮은 임계 온도 (T_c)에 대하여 상기 단계 (b)의 이중체가 차별적으로 변성되게 함으로써 변성된 표적 및 기준 스트랜드를 형성하는 단계;
- d. 반응 혼합물의 온도를 강하시켜 상기 프라이머 쌍이 상기 표적 및 기준 스트랜드와 어닐링하게 하는 단계; 및
- e. 상기 프라이머 쌍을 연장시켜 상기 기준 서열에 의해 상기 표적 서열을 강화시키는 단계를 포함하는, 반응 혼합물 중 표적 서열을 강화시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 먼저 반응 혼합물에 PCR을 실시하여 상기 표적 및 기준 서열을 증폭시키고, 이어서 반응 혼합물의 적어도 일부를 제1항의 강화 방법에 사용하는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 표적 서열이 하나 이상의 결실, 삽입 또는 변경을 포함하는 돌연변이체 대립유전자인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 및 기준 서열이 25개 이상의 염기를 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 강화된 표적 서열을 갖는 반응 혼합물을 MALDI-TOF, HR-용융, 디-데옥시-서열 분석, 단일-분자 서열 분석, 파이로시퀀싱, SSCP, RFLP, dHPLC, CCM, 디지털 PCR 및 정량적-PCR로 구성된 군으로부터 선택된 방법 중 하나 이상을 이용하여 분석하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 T_c 가 1초 내지 5분 동안 적용되는 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 표적 서열이 기준 서열과 차별적으로 메틸화되는 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제3항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 반응 혼합물이 핵산 검출 염료를 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 표지된 프로브를 사용하는 실시간 반응 조건하에 실행되는 방법.

청구항 10

컴퓨터 프로그램을 기록한 컴퓨터로 읽을 수 있는 매체로서, 상기 컴퓨터 프로그램은 컴퓨터가 제1항의 방법을 수행하도록 하는 것인 매체.

청구항 11

제1항에 있어서, 2개 이상의 상이한 표적 서열을 강화시키는데 사용되며, 상기 상이한 표적 서열에 특이적인 하나 이상의 추가적인 프라이머 쌍을 더 포함하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 프라이머 쌍이 단계 (b)에서 적용된 온도보다 낮은 용점을 갖는 것인 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

제1항에 있어서, 단계 (d)를 실시하기 전에 단계 (b) 및 (c)를 1회 이상 교대로 반복하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 방법이 2 이상의 사이클 동안 반복되는 것인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 표적 서열이 기준 서열과 적어도 70% 상동성인 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 표적 서열이 기준 서열과 적어도 80% 상동성인 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 표적 서열 및 기준 서열이 1 내지 10개의 뉴클레오티드에 의해 차이를 보이는 것인 방법.

청구항 19

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T_c 가 상기 기준 서열 이중체의 T_m 보다 0.3°C 내지 5°C 더 낮은 것인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T_c 가 표적 서열 이중체의 T_m 보다 낮은 것인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 5 내지 40 사이클 동안 반복되는 것인 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 방법이 10 내지 30 사이클 동안 반복되는 것인 방법.

청구항 23

제7항에 있어서, 반응 혼합물에 제1항의 방법을 실시하기 전에 반응 혼합물을 중아황산나트륨으로 처리하는 것인 방법.

청구항 24

제8항에 있어서, 실시간 PCR 장치에서 실행되는 방법.

청구항 25

제12항에 있어서, 상기 프라이머 쌍이 단계 (b)의 온도보다 적어도 5°C 더 낮은 융점을 갖는 것인 방법.

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

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

명세서

기술분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2007년 8월 1일 출원된 미국 가출원 번호 제60/962,838호의 이점을 주장한다. 상기 출원의 전체 교시 내용이 본원에서 참고로 인용된다.

배경기술

[0003] 유전적 분석에 있어 공통적으로 접하게 되는 상황은 충분한 과량의 비-변이체 서열('기준 서열')의 존재하에 낮

은 비율의 변이체 DNA 서열 ('표적 서열')을 동정해야 하는 필요성을 수반한다. 그러한 상황에 대한 예로는 (a) 충분한 과량의 정상 대립유전자의 존재하에서 몇몇 돌연변이화된 대립유전자의 동정 및 서열 분석; (b) 후성유전학적 분석에서 충분한 과량의 비메틸화된 대립유전자의 존재하에서 몇몇 메틸화된 대립유전자의 동정 (또는 그 반대 상황); (c) 충분한 과량의 모체 DNA 서열도 존재하는 모체의 혈액 중에서 순환하는 몇몇 태아 DNA 서열의 동정 및 유전자형 분석; 및 (d) 충분한 과량의 야생형 대립유전자의 존재하에서 암 환자 (또는 암에 걸린 것으로 의심되는 사람)의 혈액 중 종양 순환 DNA의 동정을 포함한다.

[0004] 생식계열 또는 높은 우세도(prevalence)의 체세포 돌연변이에 대하여 스크리닝하는, 신뢰할 수 있는 고효율 스크리닝 방법이 최근 설명된 바 있지만 (문헌 ([Thomas, R.K., et al. (2007) *Nat Genet*, 39, 347-351]; [Chou, L.S., et al. (2005) *Am J Clin Pathol*, 124, 330-338]; [Thomas, R.K., et al. (2006) *Nat Med*, 12, 852-855])), 이질성이고 기질이 오염된 종양에서, 또는 체액에서 우세도가 낮은 체세포 돌연변이를 검출하는 것은 여전히 문제가 되고 있다. 그럼에도, 이러한 돌연변이를 동정하는 것에 관한 임상적 유의성은 수개의 상황하에서는 중요한 것이 된다. 예를 들면: (a) 폐 선암종에서, 통상의 서열 분석법에 의해서는 동정될 수 없는 낮은 수준의 EGFR 돌연변이는 티로신 키나제 저해제에 대한 양성 반응 (문헌 [Paez, J. G., et al. (2004) *Science*, 304, 1497-1500]) 또는 약물 내성 (문헌 [Janne, P.A., et al. (2006) *Clin Cancer Res*, 12, 751-758])을 부여할 수 있고; (b) 조기 검출 (문헌 [Diehl, F., et al. (2005) *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 16368-16373]) 또는 치료에 대한 종양 반응 (문헌 [Kimura, T., et al. (2004) *Ann N Y Acad Sci*, 1022, 55-60])에 대한 바이오마커로서 유용한 혈장 중 돌연변이는 종래 방법을 사용하여 서열 분석될 수 없고; (c) 예로서, 췌장 또는 전립선과 같이 기질이 빈번하게 오염되는 종양 중의 돌연변이는 야생형 대립유전자의 존재로 '차폐'되는 바, 이에 따라 번거로운 현미 해부를 필요로 하거나, 전체적으로 돌연변이를 누락시킬 수 있다.

발명의 내용

- [0005] 본 발명의 요약
- [0006] 본 발명은 샘플로부터 저빈도(low abundance) 대립유전자를 강화시키기 위한 방법, 조성물, 소프트웨어 및 장치에 관한 것이다. 본 방법은 부분적으로는 임계 변성 온도 또는 "T_c"에서 반응 혼합물을 인큐베이션시키는 단계를 포함하는 변형된 핵산 증폭 프로토콜에 기초한다. 본 발명의 사용으로 모든 PCR-기반형 기술이 갖고 있는 현 검출 한계가 현저히 개선된다.
- [0007] "임계 온도" 또는 "T_c"는 기준 서열의 융점 "T_m"보다 낮은 온도를 지칭한다. 몇몇 실시태양에서, T_c는 기준 및 표적 서열 둘 모두의 T_m보다 낮은 온도이다. 임계 온도는 기준/기준 동종이중체보다는 더블 스트랜드(strand) 표적 서열 또는 교차-혼성화된 표적-기준 더블 스트랜드 DNA 이중체를 차별적으로 변성시키기 위하여 더블 스트랜드 표적 서열 또는 교차-혼성화된 표적-기준 더블 스트랜드 DNA 이중체의 보다 낮은 T_m을 이용한다. 표적 서열과 기준 서열이 교차-혼성화하게 되면, 단쇄 (예로서, <200 bp) 더블 스트랜드 DNA 서열을 따라서 어느 곳에 서든지 하나 이상의 단일 뉴클레오티드 미스매치를 이루는 소수의 서열 차이가 상기 서열의 융점 T_m에 작지만 예측 가능한 변화를 가져올 것이다 (문헌 ([Lipsky, R.H., et al. (2001) *Clin Chem*, 47, 635-644]; [Liew, M., et al. (2004) *Clin Chem*, 50, 1156-1164])). 미스매치의 정확한 서열 컨텍스트(context) 및 위치에 따라, 0.1-20°C의 융점 변화가 주시된다.
- [0008] 임계 변성 온도 (T_c)는 기준 핵산 서열에 대한 PCR 효율이 갑자기 떨어지는 온도보다 낮은 온도이다. 예를 들면, 167 bp의 p53 서열은 PCR 변성 온도를 87°C로 설정한 경우에는 잘 증폭되며, 86.5°C에서는 적당히 증폭되며, PCR 변성이 86°C 이하로 설정된 경우에는 어떤 검출가능한 생성물도 수득하지 못한다. 그러므로, 이러한 예에서, T_c는 약 86.5°C이다.
- [0009] 제1 측면에서, 본 발명은 표적 및 기준 서열을 갖는 것으로 의심되는 핵산 샘플 중 표적 서열을 강화시키는 방법에 관한 것이다. 본 방법은 증폭 반응 혼합물을 기준 서열의 융점 "T_m"보다 높은 제1 변성 온도에 가하는 단계를 포함한다. 이어서, 증폭 반응 혼합물의 온도를 강하시켜 싱글-스트랜드 표적 서열 및 기준 서열이 혼성화함으로써 더블-스트랜드 분자를 형성하게 한다. 따라서, 본 반응은 표적-표적 스트랜드, 기준-기준 스트랜드의 동종이중체, 및 표적-기준 스트랜드의 이종이중체의 혼성화를 포함한다. 이종이중체란 불완벽하게 매치되었음에도 불구하고 반응 혼합물 중 이중체 형태를 유지할 수 있을 정도로 스트랜드 사이에 충분한 상동성을 포함하고 있는 이중체로 정의된다. 동종이중체란 완벽하게 매치된 이중체로 정의된다. 이어서, 반응 혼합물의 온도를 T_c로 증가시켜 표적-기준 서열 혼성화 이중체가 차별적으로 변성되게 한다. T_c 또는 임계 온도는 기준 서열

의 T_m 보다 낮은 온도이며, 이는 본원에 기술된 방법에 의해 측정될 수 있다. T_c 에서 표적-기준 서열 이중체 (및 오직 기준 서열보다 낮은 T_m 을 갖는 경우에만 표적-표적 서열 이중체)는 실질적으로 변성되는 반면, 표적-표적 이중체 (기준 서열의 T_m 과 동일하거나, 그보다 큰 T_m 을 갖는 경우) 및 기준-기준 서열 이중체는 실질적으로 비변성된다. "실질적으로"라는 것은 주어진 변성 또는 비변성 형태로 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 더욱 바람직하게는 적어도 80%, 더욱더 바람직하게는 적어도 90% 및 가장 바람직하게는 적어도 98%를 의미한다. 표적-기준 이중체 및 표적-표적 이중체 (기준 서열보다 낮은 T_m 을 갖는 것)의 차별적인 변성 이후에, 강화된 온도를 반응 혼합물에 가하여 프라이머 쌍이 표적 서열과 어닐링하게 한다. 이어서, 어닐링된 프라이머를 연장시켜 기준 서열과 비교하여 샘플 중의 표적 서열을 강화시킨다.

[0010] 또 다른 측면에서, 본 발명은 표적 서열을 강화시키는 추가의 또 다른 방법에 관한 것이다. 본 방법에서, 기준 서열의 T_m 보다 높은 제1 변성 온도를 가하여 표적 서열 및 기준 서열 각각을 함유하는 것으로 의심되는 핵산 샘플을 변성시킨다. 이어서, 표적 및 기준 스트랜드를 서로서로 어닐링시켜 더블 스트랜드 표적-기준 서열 이중체를 형성한다. 표적-기준 서열 이중체가 형성되고, 이는 더블 스트랜드 표적-표적 및 기준-기준 서열 이중체와 함께 반응 혼합물에 존재하게 된다. T_c 를 샘플에 가하여 더블 스트랜드 표적-기준 및 표적-기준 서열 이중체를 차별적으로 변성시킨다. T_c 에서, 표적-기준 서열 이중체 (및 오직 기준 서열보다 낮은 T_m 을 갖는 경우에만 표적-표적 서열 이중체)는 실질적으로 변성되는 반면, 표적-표적 이중체 (기준 서열의 T_m 과 동일하거나, 그보다 큰 T_m 을 갖는 경우) 및 기준-기준 서열 이중체는 실질적으로 비변성된다. "실질적으로"라는 것은 주어진 변성 또는 비변성 형태로 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 더욱 바람직하게는 적어도 80%, 더욱더 바람직하게는 적어도 90% 및 가장 바람직하게는 적어도 98%를 의미한다. 이어서, 프라이머 쌍을 표적 서열과 어닐링시키고 연장시켜 기준 서열과 비교하여 샘플 중의 표적 서열의 농도를 증가시킨다.

[0011] 추가의 또 다른 측면에서, 본 발명은 핵산 증폭 반응 프로토콜을 실시하여 표적 서열을 강화시키는 방법에 관한 것이다. 증폭 반응 프로토콜은 제1 변성 온도 및 제2 변성 온도를 포함한다. 제1 변성 온도는 기준 서열의 T_m 보다 높고, 제2 변성 온도는 기준 서열의 T_m 보다 낮다.

[0012] 또 다른 측면에서, 본 발명은 증폭 반응 혼합물을 T_c 에 가하고, 반응 혼합물의 온도를 강화시키고, 프라이머 쌍을 연장시킴으로써, 상응하는 기준 서열보다 낮은 T_m 을 갖는 표적 서열을 강화시키는 방법에 관한 것이다. 증폭 반응 혼합물은 표적 서열 및 기준 서열 각각을 함유하는 것으로 의심된다. T_c 는 기준 서열의 T_m 보다 낮기 때문에, 이로써 더 낮은 T_m 을 갖는 표적 서열이 차별적으로 변성된다. T_c 에서, 표적-기준 서열 이중체 및 표적-표적 서열 이중체는 실질적으로 변성되는 반면, 기준-기준 서열 이중체는 실질적으로 비변성된다. "실질적으로"라는 것은 주어진 변성 또는 비변성 형태로 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 더욱 바람직하게는 적어도 80%, 더욱더 바람직하게는 적어도 90% 및 가장 바람직하게는 적어도 98%를 의미한다. 반응 혼합물의 온도를 강화시키는 단계를 통해 프라이머 쌍이 표적 서열과 어닐링하게 된다. 이어서, 이러한 어닐링된 프라이머를 폴리머라제에 의해 연장시켜 기준 서열과 비교하여 샘플 중 표적 서열의 양을 증가시킨다.

[0013] 또한 추가의 또 다른 측면에서, 본 발명은 어닐링 조건 및 T_c 하의 다중 사이클에 증폭 반응 혼합물을 적용시킴으로써 표적 서열을 강화시키는 방법에 관한 것이다. 먼저, 표적 및 기준 서열 각각을 갖는 것으로 의심되는 증폭 반응 혼합물을 기준 서열의 T_m 보다 높은 제1 변성 온도에 가한다. 이어서, 온도가 다른 2개의 인큐베이션 단계 사이에서 샘플을 순환시킨다. 제1 인큐베이션 단계에서는 온도를 강화시켜 표적 서열이 기준 서열과 혼성화하여 이중체를 형성하게 한다. 제2 인큐베이션 단계에서는 온도를 기준 서열의 T_m 보다 낮은 T_c 까지 증가시킨다. T_c 에서, 표적-기준 서열 이중체 (및 오직 기준 서열보다 낮은 T_m 을 갖는 경우에만 표적-표적 서열 이중체)는 실질적으로 변성되는 반면, 표적-표적 이중체 (기준 서열의 T_m 과 동일하거나, 그보다 큰 T_m 을 갖는 경우) 및 기준-기준 서열 이중체는 실질적으로 비변성된다. "실질적으로"라는 것은 주어진 변성 또는 비변성 형태로 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 더욱 바람직하게는 적어도 80%, 더욱더 바람직하게는 적어도 90% 및 가장 바람직하게는 적어도 98%를 의미한다. 이어서, 상기 제1 및 제2 단계를 1회 이상 반복한다. 일단 순환형 인큐베이션 단계가 완료되고 나면, 반응 혼합물의 온도를 강화시켜 프라이머 쌍이 표적 서열과 어닐링하게 한다. 이어서, 이러한 프라이머를 폴리머라제에 의해 연장시켜 기준 서열과 비교하여 샘플 중의 표적 서열을 강화시킨다.

도면의 간단한 설명

[0014]

도 1은 제1 변성 온도 및 T_c 를 사용한 본 발명의 표적 서열 강화 방법에 관한 하나의 실시태양을 도시한다. 도 2는 왕복형 어닐링/ T_c 단계를 사용한 본 발명의 표적 서열 강화 방법에 관한 하나의 실시태양을 도시한다. 도 3은 표적 서열 강화 프로토콜을 통해 강화에 대하여 시험된 p53 및 Kras 돌연변이를 도시한다. 도 4는 표적 서열 강화 프로토콜을 사용하여 p53 돌연변이체 대립유전자를 강화시키는 것을 도시한다. 도 5는 표적 서열 강화 프로토콜을 사용하여 Kras 돌연변이체 대립유전자를 강화시키는 것을 도시한다. 도 6은 폐 및 결장 종양으로부터 유래된 임상적 샘플 중 돌연변이체 대립유전자를 강화시키는 것을 도시한다.

도 7은 미스매치-형성 단계를 포함하지 않는 강화 프로토콜의 하나의 실시태양에 의해 돌연변이체 대립유전자를 강화시키는 것을 도시한다.

도 8A-8D는 통상의 실시간 PCR로, 또는 실시간 포맷으로 적용되는 본 발명의 강화 방법을 통한 야생형 및 돌연변이체 p53 엑손 8의 증폭 플롯을 도시한다. (a)는 p53 엑손 8 돌연변이 중에 돌연변이체를 함유하는 일련의 희석 세포주에 대한 통상의 실시간 PCR에서의 증폭 플롯을 나타내고, (b)는 p53 엑손 8 돌연변이 중에 돌연변이체를 함유하는 일련의 희석 세포주에 대한, 실시간 PCR 포맷으로 적용된 본 발명의 강화 방법에서의 증폭 플롯을 나타내고, (c) 4개의 임상적 종양 샘플 (이중 하나는 p53 엑손 8 돌연변이 (CT20)를 함유하는 것으로 알려져 있다)에 대한 통상의 실시간 PCR에서의 증폭 플롯을 나타내고, (d) 4개의 임상적 종양 샘플에 대한, 실시간 PCR 포맷으로 적용된 본 발명의 강화 방법에서의 증폭 플롯을 나타낸다.

도 9A-D는 DNA 검출 염료 (LC그린)을 사용하여 이루어진, 야생형 및 돌연변이체 p53, 엑손 8에 대한 통상의 실시간 PCR 및 강화 실시간 PCR 증폭 플롯을 도시한다. (a)는 돌연변이체 (SW480, TL6, CT20) 및 야생형 (R27, TL8, TL18, TL81, TL82) p53, 엑손 8을 함유하는 샘플의 통상의 실시간 PCR에 대한 증폭 플롯을 나타내고, (b) 돌연변이체 (SW480, TL6, CT20) 및 야생형 (R27, TL8, TL18, TL81, TL82) p53, 엑손 8을 함유하는 샘플에 대한, 실시간 PCR 포맷으로 적용된 본 발명의 강화 방법으로부터 얻은 증폭 플롯을 나타낸다. (c)는 돌연변이체 (SW480, CT7, HCC, CT20) 및 야생형 p53, 엑손 8을 함유하는 샘플의 통상의 실시간 PCR에 대한 증폭 플롯을 나타내고, (d)는 돌연변이체 (SW480, CT7, HCC, CT20) 및 야생형 p53, 엑손 8을 함유하는 샘플에 대한, 실시간 PCR 포맷으로 적용된 본 발명의 강화 방법에 대한 증폭 플롯을 나타낸다.

도 10A-B는 유기 용매 (예로서, 3% DMSO)가 표적 강화에 미치는 효과를 도시한다. (a)는 야생형 및 돌연변이체 p53 엑손 8에 대한 실시간 PCR에서의 증폭 플롯을 나타내고, (b)는 돌연변이체 및 야생형 p53 엑손 8에 대한, 실시간 포맷으로 적용된 본 발명의 강화 방법에서의 증폭 플롯을 나타낸다.

도 11은 AA761 EGFR 돌연변이의 $TaqI$ 분해 이후에 본 발명의 강화 방법을 사용하였을 때 제한효소 단편 길이 다형성 (RFLP) 검출이 개선되었음을 도시한다. (a)는 통상의 PCR 또는 강화 방법 후, 1:10,000 (돌연변이체:개놈)으로 희석되었을 때의 야생형 및 돌연변이체 (AA761) EGFR 검출을 도시한다. (b)는 통상의 PCR에 의해 분석된 야생형 EGFR 검출을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015]

상세한 설명

[0016]

본 발명은 샘플로부터 저빈도 대립유전자 (예로서, 표적 서열)를 강화시키기 위한 방법, 조성물, 소프트웨어 및 장치에 관한 것이다. 본 방법은 부분적으로는 임계 변성 온도를 반응 혼합물에 가하여 표적 서열을 선택적으로 강화시키는 것에 관한 것이다. 임계 변성 온도 또는 T_c 는 기준 서열의 융점 T_m 보다 낮은 온도이다. 임계 온도는 기준/기준 동종이중체보다는 더블 스트랜드 표적 서열 또는 교차-혼성화된 표적-기준 더블 스트랜드 DNA 이중체를 차별적으로 변성시키기 위하여 더블 스트랜드 표적 서열 또는 교차-혼성화된 표적-기준 더블 스트랜드 DNA 이중체의 보다 낮은 T_m 을 이용한다.

[0017]

다수의 공지된 돌연변이 검출 방법들은 표적 서열을 선택적으로 강화시키는 증폭 프로토콜을 이용하는 본 발명으로부터 얻은 이점을 고수한다. 유전적 시험을 위한 초기 단계로서 PCR을 사용하는 것이 대부분의 돌연변이 및 서열 분석 반응에 사용된다. 일반적으로, 제1 단계로서 핵산 서열 (예로서, 개놈 DNA/cDNA)을 증폭시킨 후,

디-데옥시-서열 분석 또는 돌연변이 스크리닝 방법 (예로서 SSCP, dHPLC, MALDI-TOF, 파이로시퀀싱 (pyrosequencing), 고해상도 용융)을 수행한다. 따라서, 스크리닝에 앞서 PCR 단계 동안 돌연변이를 포함하는 서열 (예로서, 표적 서열)을 강화시키는 단계를 실시한다면, 본질적으로 모든 돌연변이 검출 방법이 갖고 있는 한계는 한결같은 이익을 내게 될 것이다.

[0018] 정의

본원에서 사용되는 "표적 서열을 강화시킨다"라는 용어는 상응하는 기준 서열과 비교하여 샘플 중 표적 서열의 양을 증가시키고, 표적 서열의 비율을 증가시키는 것을 지칭한다. 예를 들어, 샘플 중 표적 서열 대 기준 서열의 비가 초기에는 5% 대 95%인 경우, 표적 서열 대 기준 서열의 비가 70% 대 30%이 되도록 하기 위해 증폭 반응에서 표적 서열을 차별적으로 증폭시킬 수 있다. 따라서, 기준 서열과 비교하여 표적 서열이 14배 강화된 것이다. 표적 서열의 강화를 통해 표적 서열은 기준 서열과 비교하여 강화 이전의 2X 내지 200X 만큼 증가하게 된다. 표적 강화는 기준 서열에 비하여 적어도 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 15X, 20X, 25X, 30X, 35X, 40X, 45X, 50X, 60X, 70X, 80X, 90X, 100X, 150X, 200X배 이상 강화되는 것이다. 표적 서열의 강화를 통해 샘플은 기준 서열과 비교하여 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 90%, 95% 이상의 표적 서열을 포함하게 된다 (예로서, 10% 표적 서열:90% 기준 서열 → 95% 표적 서열:5% 기준 서열).

본원에서 사용되는 용어 "표적 서열"은 상응하는 기준 서열보다 핵산 샘플 중에 덜 우세하게 존재하는 핵산을 지칭한다. 표적 서열은 샘플 중 기준 서열 + 표적 서열의 총량의 50% 미만을 구성한다. 바람직하게는, 표적 서열은 RNA 및/또는 DNA 수준으로 기준 서열보다 1:10, 1:15, 1:20, 1:25X, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:150, 1:200X 이하로 표시된다. 하나의 실시태양에서, 표적 서열은 돌연변이체 대립유전자이다. 예를 들면, 샘플 (예로서, 혈액 샘플)은 다수의 정상 세포와 소수의 암성 세포를 함유할 수 있다. 정상 세포는 비-돌연변이체 또는 야생형 대립유전자를 함유하는 반면, 소수의 암성 세포는 체세포 돌연변이를 포함한다. 이러한 경우, 돌연변이체가 표적 서열이 되고, 반면에 야생형 서열은 기준 서열이 된다. 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 모체로부터 수득된 핵산 샘플 중 태아 DNA를 검출하는 것에 관한 것이다. 본 실시태양에서, 표적 서열은 태아 DNA에 존재하는 반면, 더 우세하게 존재하는 모체 DNA가 기준 서열을 함유한다. 본원에서 사용되는, 표적 서열이란 임산부로부터 수득된 태아 DNA를 포함하는 것으로 한다. 본원에서 사용되는, "표적 스트랜드"는 표적 서열의 싱글 핵산 스트랜드를 지칭한다.

[0021] 표적 서열의 길이는 약 17-2000개의 뉴클레오티드이다. 하나의 실시태양에서 표적 서열의 길이는 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900개 이상의 뉴클레오티드이다. 표적 서열은 상응하는 기준 서열과 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 상동성을 공유하지만, 적어도 하나의 뉴클레오티드에 의해 기준 서열과 차이를 보인다. 본 발명에 따른 표적 서열은 기준 서열에 대하여 사용된 것과 동일한 프라이머 쌍을 사용하는 PCR을 통해 증폭될 수 있다.

[0022] 본원에서 사용되는 용어 "기준 서열"은 상응하는 표적 서열 (예로서, 유전자는 동일하지만, 핵산 서열은 상이한 것)보다 핵산 샘플 중에 더 우세하게 존재하는 핵산을 지칭한다. 기준 서열은 샘플 중 기준 서열 + 표적 서열의 총량의 50% 초과를 구성한다. 바람직하게는, 기준 서열은 RNA 및/또는 DNA 수준으로 표적 서열보다 10X, 15X, 20X, 25X, 30X, 35X, 40X, 45X, 50X, 60X, 70X, 80X, 90X, 100X, 150X, 200X 이상으로 표시된다. 하나의 실시태양에서, 기준 서열은 야생형 대립유전자이다. 예를 들면, 샘플 (예로서, 혈액 샘플)은 다수의 정상 세포를 함유하고, 소수의 암성 세포를 함유할 수 있다. 정상 세포는 비-돌연변이체 또는 야생형 대립유전자를 함유할 수 있는 반면, 소수의 암성 세포는 체세포 돌연변이를 포함한다. 이러한 경우, 야생형 서열이 기준 서열이 되고, 반면에 돌연변이체 서열은 표적 서열 (예로서, 돌연변이체 대립유전자)이 된다. 본원에서 사용되는 "기준 스트랜드"란 기준 서열의 싱글 핵산 스트랜드를 지칭한다.

[0023] 기준 서열의 길이는 약 17-2000개의 뉴클레오티드이다. 하나의 실시태양에서 기준 서열의 길이는 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900개 이상의 뉴클레오티드이다. 기준 서열은 상응하는 표적 서열과 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 상동성을 공유하지만, 적어도 하나의 뉴클레오티드에 의해 표적 서열과 차이를 보인다. 본 발명에 따른 기준 서열은 기준 서열에 대하여 사용된 것과 동일한 프라이머 쌍을 사용하는 PCR을 통해 증폭될 수 있다.

[0024] 용어 "대립유전자"는 뉴클레오티드 서열 중 적어도 하나의 차이를 갖는 상동성 염색체 상의 동일한 유전자좌 또

는 위치를 점유하고 있는, 교대 형태의 유전자, 그의 일부분 또는 DNA의 비코딩 부위를 지칭한다. 용어 대립유전자는 세균, 바이러스, 원시생물, 곰팡이, 효모, 식물, 인간, 비인간 동물, 및 고세균을 포함하나, 이에 한정되지 않는 임의의 유기체로부터의 DNA를 기술하는데 사용될 수 있다. 대립유전자는 단일의 세포에서 (예로서, 하나는 부계로부터 유전된 것이고, 하나는 모계로부터 유전된 것인 2개의 대립유전자), 또는 세포 군집 내에서 (예로서, 정상 조직으로부터의 야생형 대립유전자 및 이환 조직으로부터의 체세포 돌연변이체 대립유전자) 발견될 수 있다.

[0025] 대립유전자의 길이는 17-2000개의 뉴클레오티드이다. 하나의 실시태양에서, 대립유전자의 길이는 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900개 이상의 뉴클레오티드이다. 대립유전자는 일반적으로 서로 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 상동성을 공유할 것이다. 본 발명에 따른 대립유전자는 동일한 프라이머 쌍을 사용하는 PCR에 의해 증폭될 수 있다.

[0026] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 다형성을 강화시키는데 사용된다. 임의의 유전자는 대립유전자 형태를 가질 수 없거나, 하나 또는 다수의 대립유전자 형태 (다형성)를 가질 수 있다. 대립유전자가 생기는 보편적인 돌연변이 변화는 천연 또는 인공적인 (예로서, 화학적 발암원) 뉴클레오티드의 결실, 부가, 또는 치환의 결과일 수 있다. 이러한 유형의 변화들은 각각 단독으로 일어날 수 있거나, 주어진 서열에서 1회 이상에 걸쳐 다른 것들과 함께 조합되어 일어날 수 있다.

[0027] 수개의 상이한 유형의 다형성이 보고되었다. 제한효소 단편 길이 다형성 (RFLP)은 제한 단편의 길이를 변경시키는 DNA 서열 상의 변이이다 (문헌 [Botstein et al., *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331 (1980)]). 제한효소 단편 길이 다형성은 제한 부위를 생성 또는 결실시킬 수 있고, 이로써 제한 단편의 길이가 바뀔 수 있게 된다. RFLP는 인간 및 동물의 유전적 분석에서 널리 사용되어 왔다 (WO 90/13668; WO 90/11369; [Donis-Keller, *Cell* 51:319-337 (1987)]; [Lander et al., *Genetics* 121:85-99 (1989)] 참조). 유전가능한 형질이 특정 RFLP와 연관되어 있을 수 있을 때, 개체내 RFLP의 존재는 개체가 또한 상기의 형질을 보일 수 있는지의 가능성을 예측하는데 사용될 수 있다. RFLP는 다형성 검출을 증진시키기 위하여 본원에 기술된 강화 방법과 함께 조합하여 사용될 수 있다. 그러한 방법은 본원 실시예 9에 기술되어 있다.

[0028] 다른 다형성은 연쇄적으로 반복되는 디-, 트리- 및 테트라-뉴클레오티드 모티프를 포함하는 짧은 연쇄 반복 (STR) 형태를 취한다. 이러한 연쇄 반복은 가변수 연쇄 반복 (VNTR: variable number tandem repeat) 다형성으로도 지칭된다. VNTR은 동일성 및 친자 감정 (미국 특허 번호 제5,075,217호; [Armour et al., *FEBS Lett.* 307:113-115 (1992)]; [Horn et al., WO 91/14003; Jeffreys, EP 370,719]), 및 다수의 유전자 지도화 연구에 사용되어 왔다.

[0029] 다른 다형성은 동종 개체들 간에 단일 뉴클레오티드 변이 형태를 취한다. 그러한 다형성은 RFLP, STR (짧은 연쇄 반복) 및 VNTR (가변수 연쇄 반복)보다 훨씬 빈번하게 존재한다. 몇몇 단일 뉴클레오티드 다형성은 단백질 코딩 서열에서 발생하는데, 이러한 경우, 다형성 형태 중 하나는 결손 또는 기타 다른 변이체 단백질의 발현을 일으킬 수 있고, 잠재적으로 유전적 질환을 일으킬 수 있다. 다른 단일 뉴클레오티드 다형성은 비코딩 부위에서 발생한다. 이들 다형성들 중 일부는 또한 (예로서, 결손 스플라이싱의 결과로서) 결손 단백질 발현을 일으킬 수 있다. 다른 단일 뉴클레오티드 다형성은 어떤 표현형 효과도 발휘하지 않는다.

[0030] 추가의 다른 돌연변이로는 체세포 돌연변이가 포함된다. 체세포 돌연변이는 수태 이후에 일어나는 DNA 상의 변경이다. 체세포 돌연변이는 생식 세포 (정자 및 난자)를 제외한 모든 신체 세포에서 일어날 수 있고, 따라서, 자손에게로 전달되지는 않는다. 이러한 변경은 (항상 그러한 것은 아니지만) 암이나 다른 질병을 유발할 수 있다.

[0031] 본원에서 사용되는 용어 "야생형"은 군집내 특정 유전자에 대하여 가장 보편적으로 존재하는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 대립유전자를 지칭한다. 일반적으로, 야생형 대립유전자는 정상 세포로부터 수득될 것이다.

[0032] 본원에서 사용되는 용어 "돌연변이체"는 핵산 서열 중 뉴클레오티드 변화 (즉, 단일 또는 다중 뉴클레오티드 치환, 결실, 또는 삽입)를 지칭한다. 돌연변이를 수반하는 핵산은 상응하는 야생형 폴리뉴클레오티드 서열과는 서열이 다른 핵산 서열 (돌연변이체 대립유전자)을 갖는다. 본 발명의 방법은 특히 1 내지 500개의 뉴클레오티드 서열 변화를 갖는 돌연변이체 대립유전자를 선택적으로 강화시키는데 유용하다. 돌연변이체 대립유전자는 상응하는 야생형 대립유전자와 비교하여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 또는 500개의 뉴클레오티드 서열 변화

를 가질 수 있다. 바람직하게는, 돌연변이체 대립유전자의 돌연변이는 1 내지 10개의 뉴클레오티드 서열 변화를, 더욱 바람직하게는 1 내지 5개의 뉴클레오티드 서열 변화를 포함할 것이다. 돌연변이체 대립유전자는 야생형 대립유전자와 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 상동성을 가질 것이다. 일반적으로, 돌연변이체 대립유전자는 이환 조작 또는 세포로부터 수득될 것이고, 이는 질환 상태와 관련이 있다.

[0033] 본원에서 사용되는 용어 "용점" 또는 "T_m"은 폴리뉴클레오티드가 그의 상보적인 서열로부터 해리되는 온도를 지칭한다. 일반적으로, T_m은 이중체 핵산 분자에서 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍의 반쪽은 파괴되거나 해리되는 반면 (즉, "용용"되는 반면), 왓슨-크릭 염기쌍의 나머지 반쪽은 더블 스트랜드 구조로 온전한 상태로 유지되는 온도로서 정의될 수 있다. 다시 말해, T_m은 2개의 상보적인 서열 중 50%의 뉴클레오티드는 어닐링되고 (더블 스트랜드), 50%의 뉴클레오티드는 변성되는 (싱글 스트랜드) 온도로 정의된다. 따라서, T_m은 더블-스트랜드에서 싱글-스트랜드 핵산 분자로 전이되는 중간점 (또는 역으로, 싱글-스트랜드에서 더블-스트랜드 핵산 분자로 전이되는 중간점)으로서 정의된다.

[0034] T_m은 다수의 방법들에 의해, 예를 들면, 1991년 웨트머(Wetmur) (문헌 [Wetmur, J. G. 1991. DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 26: 227-259] (본원에서 참고로 인용됨))에 따른 최근점 계산법에 의해, 몇 올리고™ 프라이머 디자인(Oligo™ Primer Design)을 비롯한 시판 프로그램 및 인터넷 상에서 이용할 수 있는 프로그램에 의해 예측될 수 있다. 별법으로, T_m은 실제 실험을 통해 측정할 수 있다. 예를 들면, 더블-스트랜드 DNA 결합 또는 삽입성 염료, 예로서, 브롬화에티디움 또는 SYBR-그린 (몰레큘라 프로브스(Molecular Probes))가 핵산의 실제 T_m을 측정하기 위한 용융 곡선 분석법에 사용될 수 있다. 핵산의 T_m을 측정하는 추가의 방법이 당업계에 잘 알려져 있고, 본원에 기술되어 있다.

[0035] 본원에서 사용되는 용어 "임계 온도" 또는 "T_c"는 기준 서열의 T_m보다 낮은 온도를 지칭한다. T_c는 증폭 반응 동안 표적 서열이 선택적으로 강화되게 하기 위해 더블-스트랜드 표적 서열 이중체 또는 표적 서열/기준 서열 더블-스트랜드 이중체를 차별적으로 변성시키는데 적용된다. 임계 변성 온도 (T_c)는 주어진 핵산 서열에 대한 PCR 효율이 갑자기 떨어지는 온도보다 낮은 온도이다. 예를 들면, 167 bp의 p53 서열은 PCR 변성 온도를 87°C로 설정한 경우에는 잘 증폭되며, 86.5°C에서는 적당히 증폭되며, PCR 변성이 86°C 이하로 설정된 경우에는 어떤 검출가능한 생성물도 수득하지 못한다. 그러므로, 이러한 예에서, T_c는 약 86.5°C이다. T_c는 기준 서열의 T_m보다 약 .1-20°C 더 낮은 온도이다. 더욱 바람직하게는, T_c는 기준 서열의 T_m보다 약 .1-10°C, .1-9°C, .1-8°C, .1-7°C, .1-6°C, .2°C-5°C, .3°C-4.5°C, .4-4°C, .5-3.5°C, .5-3°C, .5-2.5°C, .5-2°C, .5-1.5°C, .5-1°C 더 낮은 온도이다. 몇몇 실태양에서, T_c는 기준 서열 및 표적 서열 둘 모두의 T_m보다 낮은 온도이다. 예를 들면, T_c는 표적 서열의 T_m보다 약 .1-10°C, .1-9°C, .1-8°C, .1-7°C, .1-6°C, .2°C-5°C, .3°C-4.5°C, .4-4°C, .5-3.5°C, .5-3°C, .5-2.5°C, .5-2°C, .5-1.5°C, .5-1°C 더 낮은 온도이다.

[0036] 본원에서 사용되는 용어 "선택적인 변성" 또는 "차별적인 변성"은 표적 서열 또는 표적/기준 서열 이중체의 더블-스트랜드 핵산 분자 중 염기쌍 간의 수소 결합을 차별적으로 파괴시켜 싱글-스트랜드 표적 서열을 생성하는 것을 지칭한다. 표적 서열의 선택적인 변성은 표적 서열 및 기준 서열을 포함하는 샘플에 임계 온도를 가함으로써 이루어진다.

[0037] 본원에서 사용되는 "프라이머 쌍"은 PCR 반응 동안 증폭 생성물을 형성하기 위해 표적 서열 및 기준 서열의 맞은편 스크랜드와 어닐링하는 2개의 프라이머를 지칭한다. 프라이머 쌍은 반응물의 T_c보다 낮은 T_m을 갖도록 디자인된다.

[0038] 본원에서 사용되는 용어 "교차-혼성화"는 상보적인 G와 C 염기 사이 및 상보적인 A와 T 또는 A와 U 염기 사이의 수소 결합 형성에 의해 형성된, 하나 이상의 뉴클레오티드가 차이를 보이는 2개의 핵산 서열 사이에 형성된 더블-스트랜드 이중체를 지칭한다. 2개의 상보적인 핵산 서열 수소 결합은 역평행 배열을 이룬다. 바람직한 실태양에서, 2개의 핵산 서열은 표적 서열 및 기준 서열이다. 교차-혼성화된 DNA는 기준 서열과 표적 서열 사이에 차이를 보이는 위치에 미스매치를 포함할 것이다. 미스매치는 다형성, 돌연변이, 삽입, 결실, 및 상기와 같은 차이를 만드는 기타 다른 변화를 포함할 수 있다. 예를 들면, 메틸화가 있다. 예를 들면, 하나 이상의

뉴클레오티드의 루프 및/또는 싱글 스트랜드 부위는 결실/삽입 부위에 존재한다.

[0039] 교차-혼성화는 전형적으로 예를 들면, 가열한 후, 조건 (예로서, 온도 조건)하에서 재생시켜 혼성화 및 이중체 형성이 일어나게 함으로써 표적 서열 및 기준 서열을 변성시키는 것을 포함한다.

[0040] 본원에서 사용되는 "반응 혼합물"은 표적 서열이 변성되게 하는 적합한 완충액을 포함하는, 표적 서열 이중체를 함유하는 것으로 의심되는 혼합물이다.

[0041] 본원에서 사용되는 "동일성" 또는 "상동성"은 두 중합체 분자, 예로서, 두 폴리뉴클레오티드 또는 두 폴리펩티드 사이의 서브유니트 서열 유사성을 지칭한다. 두 분자 모두의 서브유니트가 동일한 단량체 서브유니트로 점유되어 있는 경우, 예로서, 두 웨프티드 각각의 위치가 세린으로 점유되어 있다면, 이때 두 웨프티드는 상기 위치에서 동일한 것이다. 두 서열 간의 동일성은 매칭되거나 동일한 위치의 갯수에 관한 정 함수(direct function)이며, 예로서, 두 웨프티드 또는 화합물 서열의 위치 중 절반 (예로서, 길이가 10개의 서브유니트인 중합체에서 5개의 위치)이 동일하다면, 두 서열은 50% 동일한 것이며; 위치 중 90%, 예로서, 10개 중 9개가 매치된다면, 두 서열은 90%의 서열 동일성을 공유하는 것이다.

[0042] 뉴클레오티드 동일성(%)은 BLAST의 디폴트 파라미터에 의해 측정될 수 있다. 서열 비교를 위해 전형적으로 하나의 서열은 기준 서열로서 작용을 하며, 시험 서열을 기준 서열과 비교하게 되는 것이다. 서열 비교 알고리즘을 사용하는 경우, 시험 및 기준 서열을 컴퓨터에 입력하고, 서브서열 좌표를 지정하고, 필요하다면, 서열 알고리즘 프로그램을 지정한다. 디폴트 프로그램 파라미터를 사용할 수 있거나, 대체 파라미터를 지정할 수 있다. 이어서, 서열 비교 알고리즘은 프로그램 파라미터에 기초하여 시험 서열에 대한 서열 동일성(%)을 서열 기준 서열과 비교하여 계산한다.

[0043] 비교 원도우는 두 서열이 최적으로 정렬된 후 서열이 동일한 수의 인접한 위치에 있는 기준 서열과 비교될 수 있는, 20개 내지 600개, 일반적으로 약 50개 내지 약 200개, 더욱 일반적으로 약 100개 내지 약 150개로 구성된 군으로부터 선택되는 수의 인접한 위치 중 어느 하나의 세그먼트를 언급하는 것을 포함한다. 비교를 위한 서열 정렬 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 비교를 위한 최적의 서열 정렬은 예로서, 문헌 [Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981)]의 국소적인 상동성 알고리즘에 의해, 문헌 [Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리즘에 의해, 문헌 [Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988)]의 유사성 검색법에 의해, 이러한 알고리즘들(GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA (위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575 소재의 제네티克斯 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group)의 위스콘신 제네티克斯 소프트웨어 패키지(Wisconsin Genetics Software Package)))를 컴퓨터로 실행하여, 또는 수동 정렬 및 시각적 검사 (예로서, 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)] 참조)에 의해 수행될 수 있다.

[0044] 서열 동일성(%)과 서열 유사성(%)을 측정하는데 적합한 알고리즘의 일례로서는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이 있는데 이들은 각각 문헌 [Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977)]과 [Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)]에 기재되어 있다. BLAST 분석을 수행하는 소프트웨어는 국립 생명 공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)의 웹 사이트 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)로부터 공개적으로 입수 가능하다. 이 알고리즘은 우선, 의문 서열내 문자 길이 W인 짧은 문자를 동정함으로써, 높은 스코어링 서열 쌍(HSP)을 동정하는데, 여기서, 상기 짧은 문자들은 데이터베이스 서열내 동일한 길이를 가지는 문자와 정렬하였을 때 몇몇 양의 값을 가지는 최소치 스코어 T와 매치되거나 또는 이를 만족시킨다. 상기 T는 이웃하는 문자 스코어 최소치를 의미한다 (문헌 [Altschul et al., 상기 문헌 동일]). 이러한 이웃하는 첫 번째 문자 히트는 그를 함유하는 보다 긴 HSP를 찾기 위한 검색 작업을 개시하는 시드(seed)로서의 역할을 한다. 이후, 상기 문자 히트는 누적 정렬 스코어가 증가할 수 있는 한, 각각의 서열을 따라서 양쪽 방향으로 연장된다. 누적 스코어는, 뉴클레오티드 서열에 있어서는 파라미터 M (한쌍의 매치되는 잔기에 대한 보상 스코어; 항상 >0임)과 N (미스매치되는 잔기에 대한 패널티 스코어; 항상 <0임)을 이용하여 계산된다. 아미노산 서열에 있어서, 스코어링 매트릭스는 누적 스코어를 계산하는데 사용된다. 누적 정렬 스코어가 그것의 최대 수치로부터 X양 만큼 떨어질 때; 하나 이상의 음의 스코어링 잔기 정렬이 누적됨으로 인하여 누적 스코어가 0 이하로 될 때; 또는 양 서열 중 어느 하나의 말단에 도달할 때까지, 각 방향으로 문자 히트를 연장시킨다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T, 및 X가 정렬의 감도와 속도를 결정한다. (뉴클레오티드 서열의 경우) BLASTN 프로그램에서는 디폴트값으로서 문자 길이 (W)=11, 기대치 (E)=10, M=5, N=-4를 사용하고, 두 스트랜드를 비교한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램에서는 디폴트값으로서 문자 길이=3이고, 기대치 (E)=10을 사용하고, BLOSUM62 스코어링 매트릭스 (문헌 [Henikoff & Henikoff, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89: 10915 (1989)] 참조

조)에서는 정렬값 (B)=50, 기대치 (E)=10, M=5, N=-4를 사용하고, 두 스트랜드를 비교한다.

[0045]

BLAST 알고리즘은 또한 두 서열 간의 유사성을 통계학적으로 분석하기도 한다 (예로서, 문헌 [Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:58735787 (1993)] 참조). BLAST 알고리즘에 의해 제공되는 유사성에 관한 한 가지 척도로서는 확률의 최소 합 ($P(N)$)이 있는데, 이는 2개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열이 우연히 매치될 수 있는 확률을 나타내는 것이다. 예를 들어, 기준 서열에 대한 시험 핵산의 비교시 확률의 최소 합이 약 0.2 미만, 더욱 바람직하게는 약 0.01 미만, 그리고 가장 바람직하게는 약 0.001 미만이면, 그 핵산은 기준 서열과 유사한 것으로 간주한다.

[0046]

제1 측면에서, 본 발명은 표적 및 기준 서열을 갖는 것으로 의심되는 핵산 샘플 중 표적 서열을 강화시키는 방법에 관한 것이다. 기준 및 표적 서열을 본 방법에 사용하기 이전에 증폭시킬 수 있다. 즉, 관심의 대상이 되는 기준 및 표적 서열은 본 방법에 사용하기 이전에 PCR 반응에서 계놈 주형으로부터 증폭시킬 수 있다. 이어서, 선택적 강화 방법에 사용하기 위해 상기 PCR 반응으로부터 얻은 분취량을 옮긴다. 별법으로, 기준 및 표적 서열을 제1 PCR 반응에 사용할 필요는 없지만, 상기 서열들은 선택적 강화 방법에서는 그의 천연 형태 (예로서, 계놈 DNA)로 사용될 수 있다. 표적 및 기준 서열은 계놈 DNA, cDNA, 바이러스 DNA, 포유동물 DNA, 태아 DNA 또는 세균 DNA를 비롯한, 임의의 핵산 서열로부터 수득할 수 있다. 기준 서열은 일반적으로 야생형 대립유전자인 반면, 표적 서열은 돌연변이체 대립유전자이고, 그 반대의 상황 또한 적용될 수 있다. 돌연변이체 대립유전자는 임의의 하나 이상의 뉴클레오티드 결실, 삽입 또는 변경을 포함할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 돌연변이체 대립유전자는 체세포 돌연변이이다. 다른 실시태양에서, 표적 서열은 메틸화된 DNA인 반면, 기준 서열은 비-메틸화된 DNA이다. 별법으로, 표적 서열은 비-메틸화된 DNA인 반면, 기준 서열은 메틸화된 DNA이다. 본 방법에서 사용되는 프라이머는 일반적으로 크기가 약 17 내지 1000개의 염기, 더욱 바람직하게는 약 25 내지 500개의 염기, 및 가장 바람직하게는 약 50 내지 100개의 염기인 기준 및 표적 서열 증폭 생성물을 제조하도록 디자인된다.

[0047]

본 방법은 증폭 반응 혼합물을 기준 서열의 융점 (T_m)보다 높은 제1 변성 온도에 가하는 것을 포함한다. 핵산의 T_m 은 실험을 통해 측정될 수 있거나, 계산에 의해 예측될 수 있다. 당업자는 핵산의 T_m 을 측정하는 다수의 공지 방법을 잘 알고 있으며, 그러한 방법들 중 일부는 본원에 기술되어 있다. 제1 변성 온도는 PCR에서 사용되는 표준 방법에 따라 설정된다. 따라서, 제1 변성 온도는 표적 및 기준 서열이 완전히 변성되도록 충분히 높아야 한다 (예로서, 96°C). 하나의 실시태양에서, 제1 변성 온도는 기준 서열의 T_m 보다 약 1°C 내지 30°C 더 높고, 더욱 바람직하게는 기준 서열의 T_m 보다 약 5°C 내지 20°C 더 높다.

[0048]

이어서, 증폭 반응 혼합물의 온도를 강하시켜 표적 서열 및 기준 서열을 혼성화한다. 바람직한 실시태양에서, 이러한 혼성화 온도 또는 중간 온도 (제1 변성 온도 및 T_c 보다는 낮지만, 프라이머 어닐링/연장 온도보다는 높은 온도, 예로서, 약 60°C 내지 80°C)는 프라이머 쌍의 T_m 보다는 높고, 따라서 상기 온도는 프라이머 쌍이 표적 및/또는 기준 서열에 결합하는 것은 방해하면서 표적 및 기준 서열이 혼성화되게 한다. 이러한 어닐링 단계를 통해 더블 스트랜드 표적-표적, 기준-기준 및 표적-기준 서열의 혼성화 이중체가 형성된다. 이어서, 반응 혼합물의 온도를 T_c 까지 증가시켜 표적-기준 혼성화 이중체를 차별적으로 변성시킨다. T_c 또는 임계 온도는 기준 서열의 T_m 보다 낮은 온도이고, 이는 본원에 기술된 방법에 의해 측정될 수 있다. 하나의 실시태양에서, T_c 는 기준 서열의 T_m 보다 약 .3°C-5°C 더 낮고, 더욱 바람직하게는 기준 서열의 T_m 보다 약 .5°C 내지 1.5°C 더 낮다. 일반적으로, T_c 는 약 70-90°C가 될 것이다. 표적 서열이 기준 서열과 비교하여 더 낮은 T_m 을 형성하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다면, 표적-표적 혼성화 이중체 또한 차별적으로 변성될 수 있다. T_c 에서, 표적-기준 서열 이중체 (및 오직 기준 서열보다 낮은 T_m 을 갖는 경우에만 표적-표적 서열 이중체)는 실질적으로 변성되는 반면, 표적-표적 이중체 (기준 서열의 T_m 과 동일하거나, 그보다 큰 T_m 을 갖는 경우) 및 기준-기준 서열 이중체는 실질적으로 비변성된다. "실질적으로"라는 것은 주어진 변성 또는 비변성 형태로 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 더욱 바람직하게는 적어도 80%, 더욱더 바람직하게는 적어도 90% 및 가장 바람직하게는 적어도 98%를 의미한다. T_c 는 일반적으로 약 1초 내지 5분, 더욱 바람직하게는 2초 내지 1분, 및 가장 바람직하게는 5초 내지 30초 동안 적용된다.

[0049]

표적-기준 및/또는 표적-표적 서열 혼성화 이중체의 차별적인 변성 이후에, 반응 혼합물의 온도를 강하시켜 프라이머 쌍이 표적 서열과 어닐링하게 한다. 이어서, 어닐링된 프라이머를 핵산 폴리머라제에 의해 연장시켜 기준 서열과 비교하여 샘플 중 표적 서열을 강화시킨다.

[0050]

본 방법의 단계들은 일반적으로 표적 및 기준 서열을 충분히 증폭시키기 위해서 다중 사이를 동안 반복된다. 하나의 실시태양에서, 본 방법의 단계들은 5-40 사이를 및 더욱 바람직하게는 10-30 사이를 반복된다. 최적의 사이를 수는 당업계의 숙련인에 의해 결정될 수 있다. 바람직하게는, 본 방법은 PCR 장치에서, 더욱 바람직하게는, 실시간 검출 PCR 장치, 예로서, 스마트사이클러(SMARTCYCLER) 실시간 PCR 장치 (세페아이드(Cepheid), 캘리포니아주 씨니베일 소재) 및 Mx3005P 실시간 PCR 장치 (스트라테이진(Stratagene), 캘리포니아주 라 졸라 소재)에서 실시간 반응 조건하에 실시된다. 본 실시태양에서, 반응 혼합물을 반응의 증폭 생성물을 정량화 및/또는 모니터링하기 위해 핵산 검출제 (예로서, 핵산 검출 염료, 예로서, SYBR 그린 염료 또는 LC-그린 염료 또는 작동가능하게 형광 염료와 커플링된 프로브)를 포함할 수 있다. 일단 표적 서열의 강화가 완료되고 나면, 샘플을 추가로 프로세싱할 수 있다 (예로서, 본 방법에 의해 강화된 임의의 유전자 변경을 동정하기 위해, 예를 들면, 서열 분석 반응에 사용할 수 있다). 강화된 기준 서열은 MALDI-TOF, HR-용융, 디-데옥시 서열 분석, 단일-분자 서열 분석, 파이로시퀀싱, RFLP, 디지털 PCR 및 정량적-PCR을 비롯한 다양한 방법에 의해 추가로 프로세싱될 수 있다.

[0051]

추가의 또 다른 측면에서, 본 발명은 핵산 증폭 반응 프로토콜을 실시하여 표적 서열을 강화시키는 방법에 관한 것이다. 증폭 반응 프로토콜은 제1 변성 온도 및 제2 변성 온도를 포함한다. 제1 변성 온도는 기준 서열의 T_m 보다 높은 온도이고, 제2 변성 온도는 기준 서열의 T_m 보다 낮은 온도이다. 본 방법은 증폭 반응 혼합물을 기준 서열의 융점 "T"보다 높은 제1 변성 온도에 가하는 단계를 포함한다. 핵산의 T_m 은 실험을 통해 측정될 수 있거나, 계산에 의해 예측될 수 있다. 당업자는 핵산의 T_m 을 측정하는 다수의 공지 방법을 잘 알고 있다. 제1 변성 온도는 PCR 반응의 변성 온도가 일반적으로 선택되는 바와 같이 일반적으로 선택되며, 표적 및 기준 서열이 변성되도록 충분히 높아야 한다. 하나의 실시태양에서, 제1 변성 온도는 기준 서열의 T_m 보다 약 1°C 내지 30°C 더 높고, 더욱 바람직하게는 기준 서열의 T_m 보다 약 5°C 내지 20°C 더 높다.

[0052]

제2 변성 온도는 기준 서열의 T_m 보다 낮고, 이는 본원에 기술된 방법에 의해 측정될 수 있다. 하나의 실시태양에서, T_c 는 기준 서열의 T_m 보다 약 .3°C-5°C 더 낮고, 더욱 바람직하게는 기준 서열의 T_m 보다 약 .5°C 내지 1.5°C 더 낮다. 일반적으로, T_c 는 약 70-90°C가 될 것이다. 제2 변성 온도는 일반적으로 약 1초 내지 5분, 더욱 바람직하게는 2초 내지 1분 및 가장 바람직하게는 5초 내지 30초 동안 적용된다.

[0053]

또 다른 측면에서, 본 발명은 증폭 반응 혼합물을 T_c 에 가하고, 반응 혼합물의 온도를 강화시키고, 프라이머 쌍을 연장시킴으로써, 표적 서열을 강화시키는 방법에 관한 것이다. 증폭 반응 혼합물은 표적 및 기준 서열을 함유하는 것으로 의심된다. 본 측면에서, 표적 서열은 기준 서열의 T_m 보다 낮은 T_m 을 갖는다. T_c 는 기준 서열의 T_m 보다 낮기 때문에, 이로써 그의 뉴클레오티드 조성 (예로서, 결실)의 결과로서 기준 서열보다 낮은 T_m 을 갖는 표적 서열이 차별적으로 변성된다. 본 발명의 다른 측면과 관련하여, 기준 및 표적 서열을 본 방법에 사용하기 이전에 증폭시킬 수 있다. 즉, 관심의 대상이 되는 기준 및 표적 서열은 본 방법에 사용하기 이전에 PCR 반응에서 게놈 주형으로부터 증폭시킬 수 있다. 이어서, 선택적 강화 방법에서 사용하기 위해 상기 PCR 반응으로부터 얻은 분취량을 옮긴다. 별법으로, 기준 및 표적 서열을 제1 PCR 반응에 사용할 필요는 없지만, 상기 서열들은 선택적 강화 방법에서는 그의 천연 형태, 예로서, 게놈 DNA로 사용될 수 있다. 표적 및 기준 서열은 게놈 DNA, cDNA, 바이러스 DNA, 포유동물 DNA, 태아 DNA 또는 세균 DNA를 비롯한, 임의의 핵산 서열로부터 수득할 수 있다. 기준 서열은 일반적으로 야생형 대립유전자인 반면, 표적 서열은 돌연변이체 대립유전자이고, 그 반대의 상황 또한 적용될 수 있다. 돌연변이체 대립유전자는 임의의 하나 이상의 뉴클레오티드 결실, 삽입 또는 변경을 포함할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 돌연변이체 대립유전자는 체세포 돌연변이이다. 본 방법에서 사용되는 프라이머는 일반적으로 크기가 약 15 내지 1000개의 염기, 더욱 바람직하게는 약 25 내지 500개의 염기, 및 가장 바람직하게는 약 50 내지 100개의 염기인 기준 및 표적 서열 증폭 생성물을 제조하도록 디자인된다.

[0054]

반응 혼합물의 온도를 T_c 로 증가시켜 표적-표적 혼성화 이중체가 차별적으로 변성되게 한다. T_c 또는 임계 온도는 기준 서열의 T_m 보다 낮은 온도이며, 이는 본원에 기술된 방법에 의해 측정될 수 있다. 하나의 실시태양에서, T_c 는 기준 서열의 T_m 보다 약 .3°C-5°C 더 낮고, 더욱 바람직하게는 약 .5°C 내지 1.5°C 더 낮다. 일반적으로, T_c 는 약 70-90°C가 될 것이다. T_c 는 일반적으로 약 1초 내지 5분, 더욱 바람직하게는 2초 내지 1분 및 가장 바람직하게는 5초 내지 30초 동안 적용된다. T_c 에서, 표적-기준 서열 이중체 및 표적-표적 서열 이중체는 실질적으로 변성되는 반면, 기준-기준 서열 이중체는 실질적으로 비변성된다. "실질적으로"라는 것은 주어진 변성 또는 비변성 형태로 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 더욱 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 더 바

람직하게는 적어도 90% 및 가장 바람직하게는 적어도 98%를 의미한다.

[0055] 반응 혼합물의 온도를 강하시키는 단계를 통해 프라이머 쌍이 표적 서열과 어닐링하게 된다. 이어서, 이러한 어닐링된 프라이머를 폴리머라제에 의해 연장시켜 샘플 중 표적 서열의 양을 증가시킨다. 본 방법의 단계들은 일반적으로 표적 및 기준 서열을 충분히 증폭시키기 위해서 다중 사이클 동안 반복된다. 하나의 실시태양에서, 본 방법의 단계들은 5-40 사이클 및 더욱 바람직하게는 10-30 사이클 반복된다. 최적의 사이클 수는 당업계의 숙련인에 의해 결정될 수 있다. 바람직하게는, 본 방법은 PCR 장치에서, 더욱 바람직하게는, 실시간 검출 PCR 장치, 예로서, 스마트사이클러 실시간 PCR 장치 (세페이드, 캘리포니아주 써니베일 소재) 및 Mx3005P 실시간 PCR 장치 (스트라테이진, 캘리포니아주 라 졸라 소재)에서 실시간 반응 조건하에 실시된다. 본 실시태양에서, 반응 혼합물은 반응의 증폭 생성물을 정량화 및/또는 모니터링하기 위해 핵산 검출제 (예로서, 핵산 검출 염료, 예로서, SYBR 그린 염료 또는 LC-그린 염료 또는 작동가능하게 형광 염료와 커플링된 프로브)를 포함할 수 있다. 일단 표적 서열의 강화가 완료되고 나면, 예를 들면, 서열 분석 반응에 사용하는 것과 같이, 샘플을 추가로 프로세싱할 수 있다. 강화된 대립유전자는 MALDI-TOF, HR-용융, 디-데옥시 서열 분석, 단일-분자 서열 분석, 파이로시퀀싱, RFLP, 디지털 PCR 및 정량적-PCR을 비롯한 다양한 방법에 의해 추가로 프로세싱될 수 있다.

[0056] 또한 추가의 또다른 측면에서, 본 발명은 증폭 반응 혼합물을, 어닐링 조건의 단계와 T_c 를 가하여 이루어지는 변성 조건의 단계에 교대로 사용하여 표적 서열을 강화시키는 방법에 관한 것이다. 먼저, 표적 및 기준 서열을 갖는 증폭 반응 혼합물을 기준 서열의 T_m 보다 높은 제1 변성 온도에 가한다. 다른 측면에서와 같이, 기준 및 표적 서열을 본 방법에 사용하기 이전에 증폭시킬 수 있다. 즉, 관심의 대상이 되는 기준 및 표적 서열은 본 방법에 사용하기 이전에 PCR 반응에서 계놈 주형으로부터 증폭시킬 수 있다. 이어서, 선택적 강화 방법에서 사용하기 위해 상기 PCR 반응으로부터 얻은 분취량을 읊긴다. 별법으로, 기준 및 표적 서열을 제1 PCR 반응에 사용할 필요는 없지만, 상기 서열들은 선택적 강화 방법에서는 그의 천연 형태, 예로서, 계놈 DNA로 사용될 수 있다. 표적 및 기준 서열은 계놈 DNA, cDNA, 바이러스 DNA, 포유동물 DNA, 태아 DNA 또는 세균 DNA를 비롯한, 임의의 핵산 서열로부터 수득할 수 있다. 기준 서열은 일반적으로 대립유전자인 반면, 표적 서열은 돌연변이체 대립유전자이고, 그 반대의 상황 또한 적용될 수 있다. 돌연변이체 대립유전자는 임의의 하나 이상의 뉴클레오티드 결실, 삽입 또는 변경을 포함할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 돌연변이체 대립유전자는 체세포 돌연변이이다. 다른 실시태양에서, 표적 서열은 메틸화된 DNA인 반면, 기준 서열은 비-메틸화된 DNA이다. 별법으로, 표적 서열은 비-메틸화된 DNA인 반면, 기준 서열은 메틸화된 DNA이다. 본 방법에서 사용되는 프라이머는 일반적으로 크기가 약 15 내지 1000개의 염기, 더욱 바람직하게는 약 25 내지 500개의 염기, 및 가장 바람직하게는 약 50 내지 100개의 염기인 기준 및 표적 서열 증폭 생성물을 제조하도록 디자인된다.

[0057] 핵산의 T_m 은 실험을 통해 측정될 수 있거나, 계산에 의해 예측될 수 있다. 당업자는 핵산의 T_m 을 측정하는 다수의 공지 방법을 잘 알고 있다. 제1 변성 온도는 PCR 반응의 변성 온도가 일반적으로 선택되는 바와 같이 일반적으로 선택되며, 표적 및 기준 서열이 변성되도록 충분히 높아야 한다. 하나의 실시태양에서, 제1 변성 온도는 기준 서열의 T_m 보다 약 1°C 내지 30°C 더 높고, 더욱 바람직하게는 기준 서열의 T_m 보다 약 5°C 내지 20°C 더 높다.

[0058] 이어서, 온도가 다른 2개의 인큐베이션 단계 사이에서 샘플을 순환시킨다. 제1 인큐베이션 단계에서는 온도를 강하시켜 표적 서열이 기준 서열과 혼성화되게 한다. 제2 인큐베이션 단계에서는 온도를 T_c 까지 증가시키며, 상기 T_c 는 기준 서열의 T_m 보다 낮다. 이어서, 이러한 제1 및 제2 단계를 1회 이상, 더욱 바람직하게는 3-20회, 및 가장 바람직하게는 5-10회 반복한다.

[0059] 제1 인큐베이션 단계를 통해 표적-표적, 기준-기준 및 표적-기준 서열의 혼성화 이중체가 형성된다. 바람직한 실시태양에서, 이러한 혼성화 온도 또는 중간 온도 (제1 변성 온도 및 T_c 보다는 낮지만, 프라이머 어닐링/연장 온도보다는 높은 온도, 예로서, 약 60°C 내지 80°C)는 프라이머 쌍의 T_m 보다는 높고, 따라서 상기 온도는 프라이머 쌍이 표적 및/또는 기준 서열에 결합하는 것은 방해하면서 표적 및 기준 서열이 혼성화되게 한다. 이어서, 제2 인큐베이션 단계에서 반응 혼합물의 온도를 T_c 까지 증가시켜 표적-기준 및 표적-표적 (표적이 기준 서열보다 낮은 T_m 을 갖는 한) 혼성화 이중체를 차별적으로 변성시킨다. T_c 또는 임계 온도는 기준 서열의 T_m 보다 낮은 온도이고, 이는 본원에 기술된 방법에 의해 측정될 수 있다. 하나의 실시태양에서, T_c 는 기준 서열의 T_m 보다 약 .3°C-5°C 더 낮고, 더욱 바람직하게는 기준 서열의 T_m 보다 약 .5°C 내지 1.5°C 더 낮다. 일반적으로, T_c 는 약 70-90°C가 될 것이다. 표적 서열이 기준 서열과 비교하여 더 낮은 T_m 을 형성하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다면, 표적-표적 혼성화 이중체 또한 차별적으로 변성된다. T_c 는 일반적으로 약 1초 내지 5분, 더욱 바람

직하게는 2초 내지 1분, 및 가장 바람직하게는 5초 내지 30초 동안 적용된다. 일단 순환형 인큐베이션 단계가 완료되고 나면, 반응 혼합물의 온도를 강하시켜 하나 이상의 프라이머가 표적 서열과 어닐링하게 한다. 이어서, 이러한 프라이머를 폴리머라제에 의해 연장시켜 표적 서열을 강화시킨다.

[0060] 일단 각 단계가 완료되고 나면, 반응은 표적 및 기준 서열을 충분히 증폭시키기 위해서 다중 사이를 동안 반복될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 본 방법의 단계들은 5-40 사이를 및 더욱 바람직하게는 10-30 사이를 반복된다. 최적의 사이를 수는 당업계의 숙련인에 의해 결정될 수 있다. 바람직하게는, 본 방법은 PCR 장치에서, 더욱 바람직하게는, 실시간 검출 PCR 장치, 예로서, 스마트사이클러 실시간 PCR 장치 (세페이드, 캘리포니아주 씨니베일 소재) 및 Mx3005P 실시간 PCR 장치 (스트라테이진, 캘리포니아주 라 졸라 소재)에서 실시간 반응 조건 하에 실시된다. 본 실시태양에서, 반응 혼합물은 반응의 증폭 생성물을 정량화 및/또는 모니터링하기 위해 핵산 검출제 (예로서, 핵산 검출 염료, 예로서, SYBR 그린 염료 또는 LC-그린 염료 또는 작동가능하게 형광 염료와 커플링된 프로브)를 포함할 수 있다. 일단 표적 서열의 강화가 완료되고 나면, 샘플을 추가로 프로세싱할 수 있다. 추가 프로세싱으로는 MALDI-TOF, HR-용융, 디-데옥시 서열 분석, 단일-분자 서열 분석, 파이로시퀀싱, RFLP, 디지털 PCR 및 정량적-PCR을 포함한다.

[0061] 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 방법은 표적 서열 또는 기준 서열에서 메틸화가 일어났는지 여부를 검출하는데 사용될 수 있다. 추가의 실시태양에서, 본 방법은 게놈 DNA를 사용하여 메틸화를 분석한다.

[0062] 메틸화 검출 방법은 DNA를 화학적으로 또는 효소적으로 처리하는 메틸화-감도 처리 접근법을 포함한다. 화학적 처리 방법은 DNA를 중아황산나트륨과 함께 인큐베이션하여 선택적으로 비-메틸화된 시토신이 우라실로 전환되도록 하는 것을 포함한다. 먼저, DNA를 열-변성시킨 후, 5M 중아황산염 (pH 5-7)으로 처리할 수 있다. 중아황산 염으로 처리하기 이전에, 이미 존재하고 있는 우리실을 제거하기 위해서 게놈 DNA를 전처리한다. 이러한 전처리는 5 mM 하이드록실아민 (pH 7) 존재하에 우라실 글리코실라제로 처리하는 것으로 구성된다. 이에 변형된 DNA는 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다.

[0063] 기준 또는 표적 서열의 메틸화된 시토신이 우라실로 전환되고, 따라서 반응 중 교차-혼성화 단계시에는 메틸화되지 않았던 및은편 스트랜드 (표적 또는 기준)와 이중체를 형성하게 될 때 미스매치를 형성하게 될 것이다.

[0064] 추가의 또 다른 측면에서, 본 발명의 방법들 중 임의의 것은 다중 반응에서 다수의 상이한 표적 서열을 강화시키는데 사용된다. 본 실시태양에서, 본 방법은 추가의 표적 서열에 대한 프라이머 쌍의 추가 세트를 포함한다.

[0065] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 방법들 중 임의의 것을 실행하기 위한 프로그램 설명서를 포함하는 컴퓨터 관독가능 매체에 관한 것이다. 추가의 측면에서, 본 발명은 표적 서열을 강화시키기 위한 PCR 시스템에 관한 것이다. 본 시스템은 컴퓨터 관독가능 매체에 관한 프로그램 설명서를 실행하기 위한 메모리를 포함한다.

[0066] 도 1 및 2는 본 발명의 2가지 상이한 측면을 도시한다. 도 1은 본 방법이 제1 변성 온도 및 임계 변성 온도 또는 Tc를 사용한 증폭 반응을 이용하는 본 발명의 한 측면을 도시한다. 도 2 또한 제1 변성 온도 및 Tc를 사용한 증폭 반응을 도시하기는 하나, 이는 추가로 프라이머 어닐링 및 본 반응의 연장 단계 이전에 다회에 걸쳐 어닐링 및 임계 변성 온도를 왕복하는 것을 포함한다.

[0067] 도 1은 표적 및 기준 서열을 갖는 핵산 샘플 중 표적 서열을 강화시키는 방법을 나타낸다. 표적 및 기준 서열은 게놈 DNA, cDNA, 바이러스 DNA, 포유동물 DNA, 태아 DNA 또는 세균 DNA를 비롯한, 임의의 핵산 서열로부터 수득할 수 있다. 기준 서열은 일반적으로 대립유전자인 반면, 표적 서열은 돌연변이체 대립유전자는, 그 반대의 상황 또한 적용될 수 있다. 돌연변이체 대립유전자는 임의의 하나 이상의 뉴클레오티드 결실, 삽입 또는 변경을 포함할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 돌연변이체 대립유전자는 체세포 돌연변이이다. 다른 실시태양에서, 표적 서열은 메틸화된 DNA인 반면, 기준 서열은 비-메틸화된 DNA이다. 별법으로, 표적 서열은 비-메틸화된 DNA인 반면, 기준 서열은 메틸화된 DNA이다.

[0068] 본 방법은 증폭 반응 혼합물을 기준 서열의 융점 "T_m"보다 높은 제1 변성 온도에 가하는 것을 포함한다 (도 1A, 단계 1). 핵산의 T_m은 실험을 통해 측정될 수 있거나, 계산에 의해 예측될 수 있다. 당업자는 핵산의 T_m을 측정하는 다수의 공지 방법을 잘 알고 있으며, 그러한 방법들 중 일부는 본원에 기술되어 있다. 제1 변성 온도는 PCR 반응의 변성 온도가 일반적으로 선택되는 바와 같이 일반적으로 선택되며, 표적 및 기준 서열이 완전히 변성되도록 충분히 높아야 한다 (예로서, 94°C). 하나의 실시태양에서, 제1 변성 온도는 기준 서열의 T_m보다 약 1°C 내지 30°C 더 높고, 더욱 바람직하게는 기준 서열의 T_m보다 약 5°C 내지 20°C 더 높다.

[0069] 이어서, 증폭 반응 혼합물의 온도를 강하시켜 표적 서열 및 기준 서열이 혼성화되게 한다 (도 1A, 단계 2). 이

러한 어닐링 단계를 통해 표적-표적, 기준-기준 및 표적-기준 서열의 혼성화 이중체가 형성된다. 어닐링 온도를 결정하는 것은 당업자에게 잘 알려져 있다. 상기 중간 온도에서 PCR 프라이머가 표적 및 기준 서열에 결합하는 것은 방해하는 T_m 을 갖도록 본 방법에서 사용되는 PCR 프라이머를 디자인하여 돌연변이체 (표적) 및 야생형 (기준) 서열의 교차-혼성화를 간섭하지 않도록 한다. 표적 서열 중의 돌연변이로 인하여 대부분의 표적 서열은 결국에는 기준 서열과 미스매치된 구조를 형성하게 되고, 이로써 기준 서열과 이중이중체를 형성하게 될 경우에 완벽하게 매치되는 기준/기준 동종이중체보다 낮은 융점을 갖게 된다.

[0070] 이어서, 반응 혼합물의 온도를 T_c 로 증가시켜 표적-표적 혼성화 이중체가 차별적으로 변성되게 한다 (도 1A, 단계 3). T_c 또는 임계 온도는 기준 서열의 T_m 보다 낮은 온도이며, 이는 본원에 기술된 방법에 의해 측정될 수 있다. 하나의 실시태양에서, T_c 는 기준 서열의 T_m 보다 약 3°C - 5°C 더 낮고, 더욱 바람직하게는 약 0.5°C 내지 1.5°C 더 낮다. 일반적으로, T_c 는 약 70 - 90°C 가 될 것이다. 표적 서열이 기준 서열과 비교하여 더 낮은 T_m 에서 생성된 뉴클레오티드 서열을 갖는다면, 표적-표적 혼성화 이중체 또한 차별적으로 변성된다. T_c 는 일반적으로 약 1초 내지 5분, 더욱 바람직하게는 2초 내지 1분, 및 가장 바람직하게는 5초 내지 30초 동안 적용된다.

[0071] 표적-기준 및/또는 표적-표적 서열 혼성화 이중체의 차별적인 변성 이후에, 반응 혼합물의 온도를 강하시켜 하나 이상의 프라이머가 표적 서열과 어닐링하게 한다 (도 1A, 단계 4). 이어서, 어닐링된 프라이머를 핵산 폴리머라제에 의해 연장시켜 (도 1A, 단계 5) 샘플 중에 포함되어 있는 핵산 군집 중의 표적 서열을 강화시킨다.

[0072] 본 방법의 단계들은 일반적으로 표적 및 기준 서열을 충분히 증폭시키기 위해서 다중 사이를 동안 반복된다. 하나의 실시태양에서, 본 방법의 단계들은 5-40 사이를 및 더욱 바람직하게는 10-30 사이를 반복된다. 최적의 사이를 수는 당업계의 숙련인에 의해 결정될 수 있다. 바람직하게는, 본 방법은 PCR 장치에서, 더욱 바람직하게는, 실시간 검출 PCR 장치, 예로서, 스마트사이클러 실시간 PCR 장치 (세페이드, 캘리포니아주 씨니베일 소재) 및 Mx3005P 실시간 PCR 장치 (스트라테이진, 캘리포니아주 라 졸라 소재)에서 실시간 반응 조건하에 실시된다. 본 실시태양에서, 반응 혼합물은 반응의 증폭 생성물을 정량화 및/또는 모니터링하기 위해 핵산 검출제 (예로서, 핵산 검출 염료, 예로서, SYBR 그린 염료 또는 LC-그린 염료 또는 작동 가능하게 형광 염료와 커플링된 프로브)를 포함할 수 있다. 일단 표적 서열의 강화가 완료되고 나면, 예를 들면, 서열 분석 반응에 사용하는 것과 같이, 샘플을 추가로 프로세싱할 수 있다. 강화된 대립유전자는 MALDI-TOF, HR-용융, 디-데옥시 서열 분석, 단일-분자 서열 분석, 파이로시퀀싱, RFLP, 디지털 PCR 및 정량적-PCR을 비롯한 다양한 방법에 의해 추가로 프로세싱될 수 있다 (도 1B 참조).

[0073] 매 PCR-사이클에서 강화 방법의 실시를 통해 돌연변이체 서열 (표적 서열)의 양은 야생형 서열 (기준 서열)에 비하여 점차적으로 강화된다. 동종접합체 및 이종접합체 돌연변이 둘 모두 상기 방법을 통해 강화된다. 94°C 의 변성 온도에서 통상의 PCR을 실시하는 것에 비해 돌연변이를 포함하는 서열을 10-60배 만큼 강화시키는 것은 일반적인 것이다. 비록 서열 컨택스트와 PCR 앰플리콘의 전체 크기에 따라 효율이 달라질 수 있기는 하지만, 주어진 임계 변성 온도 (T_c)에서의 돌연변이 강화는 모든 서열 위치에서 동시에 일어난다. 임계 변성 온도 T_c 와 임의 위치에서의 예측되는 강화, 이 둘 모두는 적절한 DNA 용융 소프트웨어를 사용함으로써 예측할 수 있고, 이는 실험을 통해 확인될 수 있다. 따라서, 돌연변이 위치에 따라서 다소 상이한 강화가 예측될 수 있지만, 모든 경우에 있어 실질적인 강화가 달성될 수 있고, 이로써, 하류 분석의 검출 한계는 예로서, 서열 분석 반응을 개선시키게 된다.

[0074] 도 2는 증폭 반응 혼합물을, 다회에 걸쳐 어닐링 및 임계 변성 온도 단계에 교대로 사용하여 표적 서열을 강화시키는 방법의 실시태양을 도시한다. 본 실시태양은 임계 온도에서의 차별적인 변성과, 혼성화 온도에서의 차별적인 교차-혼성화, 둘 모두를 이용한다.

[0075] 먼저, 표적 및 기준 서열을 갖는 증폭 반응 혼합물을 기준 서열의 T_m 보다 높은 제1 변성 온도에 가한다 (도 2, 단계 1).

[0076] 이어서, 온도가 다른 2개의 인큐베이션 단계 사이에서 샘플을 순환시킨다. 제1 인큐베이션 단계에서는 온도를 강하시켜 표적 서열이 기준 서열과 차별적으로 혼성화되게 한다 (도 2, 단계 2). 제2 인큐베이션 단계에서는 온도를 T_c 까지 증가시킨다 (도 2, 단계 3). 이어서, 상기 제1 및 제2 단계를 1회 이상, 더욱 바람직하게는 3-20회 및 가장 바람직하게는 5-10회 반복한다 (도 2, 단계 4).

[0077] 주어진 서열에 대한 차별적인 혼성화 온도는 야생형 대립유전자가 돌연변이를 포함하는 대립유전자보다 더욱 빠른 속도로 원래대로 그 자신과 혼성화하게 되는 온도이다. 돌연변이화된 대립유전자의 우세도가 야생형 대립유

전자보다 훨씬 더 낮기 때문에, 야생형 대립유전자와 그들 자신의 교차-혼성화가 돌연변이체 대립유전자와 돌연변이체 대립유전자, 또는 돌연변이체 대립유전자와 야생형 대립유전자 (후자의 것은 미스매치를 형성하게 된다)의 교차-혼성화보다 더욱 빠른 속도로 진행된다. 그 결과, PCR 온도를 교차-혼성화 온도로까지 강하시키면, 돌연변이체 대립유전자는 야생형 대립유전자가 교차-혼성화하는 것과 동일한 정도로 교차-혼성화하지는 못한다. 바람직한 실시태양에서, 이러한 혼성화 온도 또는 중간 온도 (제1 변성 온도 및 T_c 보다는 낮지만, 프라이머 어닐링/연장 온도보다는 높은 온도, 예로서, 약 60°C 내지 80°C)는 프라이머 쌍의 T_m 보다는 높고, 따라서 상기 온도는 프라이머 쌍이 표적 및/또는 기준 서열에 결합하는 것은 방해하면서 표적 및 기준 서열이 혼성화되게 한다.

[0078] 이어서, 반응 온도를 T_c 까지 증가시켜 표적-기준 및 표적-표적 혼성화 이중체를 차별적으로 변성시킨다 (도 2, 단계 3). T_c 또는 임계 온도는 기준 서열의 T_m 보다 낮은 온도이고, 이는 본원에 기술된 방법에 의해 측정될 수 있다. 하나의 실시태양에서, T_c 는 기준 서열의 T_m 보다 약 3°C-5°C 더 낮고, 더욱 바람직하게는 기준 서열의 T_m 보다 약 0.5°C 내지 1.5°C 더 낮다. 일반적으로, T_c 는 약 70-90°C가 될 것이다. 표적 서열이 기준 서열과 비교하여 더 낮은 T_m 에서 생성된 뉴클레오티드 서열을 갖는다면, 표적-표적 혼성화 이중체 또한 차별적으로 변성될 수 있다. T_c 는 일반적으로 약 1초 내지 5분, 더욱 바람직하게는 2초 내지 1분, 및 가장 바람직하게는 5초 내지 30초 동안 적용된다. 본 공정은 어닐링 온도 (도 2, 단계 2)와 임계 온도 (도 2, 단계 3)를 왕복함으로써 수회에 걸쳐 반복되며 (도 2, 단계 4), 매회마다 싱글 스트랜드 형태의 야생형 서열보다 더 많은 싱글-스트랜드 형태의 돌연변이체 서열이 선택적으로 형성된다.

[0079] 일단 순환형 인큐베이션 단계가 완료되고 나면, 반응 혼합물의 온도를 강하시켜 하나 이상의 프라이머가 표적 서열과 어닐링하게 한다 (도 2, 단계 5). 이어서, 이러한 프라이머를 폴리머라제에 의해 연장시켜 (도 2, 단계 6) 표적 서열을 강화시킨다. 본 방법의 단계들은 일반적으로 표적 및 기준 서열을 충분히 증폭시키기 위해서서 다중 사이클 동안 반복된다. 하나의 실시태양에서, 본 방법의 단계들은 5-40 사이클 및 더욱 바람직하게는 10-30 사이클 반복된다. 최적의 사이클 수는 당업계의 숙련인에 의해 결정될 수 있다. 바람직하게는, 본 방법은 PCR 장치에서, 더욱 바람직하게는, 실시간 검출 PCR 장치에서 실시간 반응 조건하에 실시된다.

[0080] 일단 표적 서열의 강화가 완료되고 나면, 샘플을 추가로 프로세싱할 수 있다. 추가 프로세싱으로는 MALDI-TOF, HR-용융, 디-테옥시 서열 분석, 단일-분자 서열 분석, 파이로시퀀싱, RFLP, 디지털 PCR 및 정량적-PCR을 포함한다.

[0081] 디지털 PCR은 강화 방법과 함께 조합되어 초기 수준의 돌연변이를 검출하는데 사용될 수 있다. 디지털 PCR에서, 단일 문자가 되도록 DNA 샘플을 희석시켜 각 PCR 반응에서 출발 물질은 야생형이거나 돌연변이체가 되도록 한다. 동일한 출발 물질로부터 다회에 걸친 PCR 반응을 수행한 후, 돌연변이체 문자를 단리시키고 검출한다. 플루이다임(Fluidigm) (캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 소재)은 본 발명에 사용될 수 있는 각종 디지털 PCR 기반형 시스템을 판매한다. 따라서, 동시에 수천개의 평행 강화 반응에서 단일 문자로부터 실시간 강화를 실시함으로써, 돌연변이체 DNA가 어디서 유래되었는지를 PCR 반응을 통해 동정한다. 그러한 시스템은 암 계놈 중 초기 돌연변이를 검출하는데 특히 유용하다. 디지털 PCR과 강화 방법의 조합은 유사하게 단일 문자 서열 분석 적용에 이로울 수 있다.

핵산 증폭 반응

[0083] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 핵산 샘플은 표적 서열 및 기준 서열을 갖는 게놈 DNA를 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 방법의 핵산 샘플은 핵산 증폭 반응에서 미리 증폭된 표적 서열 및 기준 서열을 포함한다. 당업자는 핵산을 증폭시키는데 이용될 수 있는 방법이 다수 존재한다는 것을 이해할 것이다. 아마도 가장 인기있는 방법은 중합효소 연쇄 반응 (PCR; 예를 들면, 미국 특허 번호 제4,683,195호 및 제4,683,202호, 및 문헌 [Saiki et al., *Science* 230:1350-1354 (1985)] 및 [Gyllensten et al., *PNAS (USA)* 85:7652-7656 (1985)] 참조)일 것이다. PCR 방법의 바람직한 변형 방법은 비대칭 PCR (예를 들면, 문헌 [Mao et al., *Biotechniques* 27(4):674-678 (1999)]; [Lehbein et al., *Electrophoresis* 19(8-9):1381-1384 (1998)]; [Lazaro et al., *Molc. Cell. Probes* 6(5):357-359 (1992)]; 및 미국 특허 번호 제6,197,499호 참조)이다. 기타 다른 증폭 방법으로는 스트랜드 치환 증폭 (SDA) (문헌 [Walker et al., *Nuc. Acids Res.* 20(7):1691-1696 (1992)] 및 미국 특허 번호 제5,744,311호, 제5,648,211호, 및 제5,631,147호 참조), 롤링 서클(rolling circle) 증폭 (RCA) (PCT 공보 WO 97/19193 참조), 핵산 서열-기반형 증폭 (NASBA) (문헌 [Compton, *Nature* 350:91-92 (1991)]; 및 미국 특허 번호 제5,409,818호, 및 제5,554,527호 참조), 전사체 매

개 증폭 (TMA) (문헌 [Kwoh et al., *PNAS (USA)* 86:1173-1177 (1989)]; 및 미국 특허 번호 제5,399,491호 참조), 자립 서열 복제 (3SR) (문헌 [Guatelli et al., *PNAS (USA)* 87:1874-1879 (1990)] 참조) 및 리가제 연쇄 반응 (LCA) (미국 특허 번호 제5,427,930호 및 제5,792,607호 참조)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0084] 본 방법은 변형된 PCR을 사용한다. PCR은 문헌 [Mullis and Faloona, 1987, *Methods Enzymol.*, 155: 335] (본 원에서 참고로 인용됨)에 기재되어 있는 바와 같이 실시된다. 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 기법은 미국 특허 번호 제4,683,202호, 제4,683,195호 및 제4,800,159호에 개시되어 있다. 가장 간단한 형태의 PCR은 맞은편 스트랜드와 혼성화하고, 표적 DNA 중 관심의 대상이 되는 부위 측면에 위치하는 올리고뉴클레오티드 프라이머 2개를 사용하는, 특정 DNA 서열을 효소적으로 합성하는 시험관내 방법이다. 주형 변성, 프라이머 어닐링 및 어닐링된 프라이머의 DNA 폴리머라제에 의한 연장을 포함하는 반복적인 일련의 반응 단계를 거쳐 말단이 프라이머의 5' 말단으로 정의되는 특정 단편이 기하급수적으로 축적되게 된다. PCR은 특정 DNA 서열을 10^9 배 만큼 선택적으로 강화시킬 수 있는 것으로 보고되어 있다. PCR 방법은 또한 문헌 [Saiki et al., 1985, *Science* 230:1350]에 기재되어 있다.

[0085] PCR은 주형 DNA (표적 서열 및 기준 서열) (적어도 1 fg; 더욱 유용하게는, 1-1000 ng) 및 적어도 25 pmol의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 실시된다. 전형적인 반응 혼합물은 2 μ l의 DNA, 25 pmol의 올리고뉴클레오티드 프라이머, 2.5 μ l의 적합한 완충액, 0.4 μ l의 1.25 μ M dNTP, 2.5 유니트의 Taq DNA 폴리머라제 (스트라데이진)와, 총 부피가 25 μ l가 되도록 하는 탈이온수를 포함한다. PCR은 프로그램화될 수 있는 열 사이클러를 사용하여 실시된다.

[0086] PCR 사이클의 각 단계의 길이 및 온도 뿐만 아니라 사이클 수는 사실상 염격도 요건에 따라 조정된다. 어닐링 온도 및 타이밍은 프라이머가 주형과 어닐링하는 효율 및 허용될 미스매치 정도, 이 둘 모두에 의해 결정된다. 프라이머 어닐링 조건의 염격도를 최적화시킬 수 있는 능력은 당업계의 숙련인의 지식 범위내 포함되어 있다. 30°C 내지 72°C 사이의 어닐링 온도가 사용된다. 주형 분자의 초기 변성은 보통 4분 동안 92°C 내지 99°C에서, 그리고 이어서, 변성 (15초 내지 1분 동안 94-99°C), 어닐링 (상기 논의된 바와 같이 결정된 온도; 1-2분), 및 연장 (1분 동안 72°C)으로 구성된 20-40 사이클로 이루어진다. 최종 연장 단계는 일반적으로 4분 동안 72°C에서 수행되고, 이어서 4°C에서의 무한정 (0-24시간) 단계가 이어질 수 있다.

[0087] PCR은 뉴클레오시드 트리포스페이트의 중합화를 촉매화시키는 효소인 핵산 폴리머라제를 이용한다. 일반적으로, 효소는 표적 서열과 어닐링된 프라이머의 3'-말단에서의 합성을 개시하고, 이는 주형을 따라 5'-방향으로 진행될 것이다. 공지된 DNA 폴리머라제로는 예를 들면, *E. coli* DNA 폴리머라제 I, T7 DNA 폴리머라제, 테르무스 씨며필루스(*Thermus thermophilus*) (Tth) DNA 폴리머라제, 바실러스 스테아로씨며필루스 (*Bacillus stearothermophilus*) DNA 폴리머라제, 써모코쿠스 리토랄리스(*Thermococcus litoralis*) DNA 폴리머라제, 테르무스 아쿠아티кус(*Thermus aquaticus*) (Taq) DNA 폴리머라제 및 피로코쿠스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*) (Pfu) DNA 폴리머라제를 포함한다. 용어 "핵산 폴리머라제"는 또한 RNA 폴리머라제를 포함한다. 핵산 주형이 RNA일 경우, "핵산 폴리머라제," 예로서, 역전사효소는 RNA-의존 중합화 활성을 지칭한다.

[0088] 본 발명의 방법에서 PCR 프로토콜은 추가로 임계 변성 단계를 포함한다. 이러한 프로토콜은 본원에 전체가 기술되어 있고, 도 1 및 2에 도시되어 있다.

[0089] 바람직하게는, 강화 방법은 PCR 장치, 더욱 바람직하게는, 실시간 PCR 장치에서 실시간 반응 조건하에 실시된다. 실시간 반응 조건은 추가로 PCR 생성물이 생산될 때 이를 측정/검출하기 위해 핵산 검출제 (예로서, 염료 또는 프로브)를 사용한다.

[0090] 하나의 실시태양에서, 강화 방법은 다중 포맷으로 실행된다. 다중 PCR은 1 초파의 표적 서열을 검출하기 위해 1 초파의 프라이머 쌍을 PCR 반응에 사용하는 경우에 사용된다. 다중 PCR의 목적은 1 초파의 표적 서열을 동시에 증폭시킴으로써 시간을 절약하고, 비용을 최소화시키는 것이다. 이는 1회 실행으로 다수의 표적 서열을 증폭시킬 수 있다. 일반적으로, 모든 증폭된 서열 중 소수의 대립유전자를 동시에 강화시키기 위한 목적으로 본 발명과 함께 다중 PCR을 사용하고, 생성된 PCR-앰플리콘 모두가 거의 동일한 Tc (임계 변성 온도)를 공유하도록 프라이머를 디자인한다.

[0091] T_m 및 T_c 측정

[0092] T_m은 이중체 핵산 분자에서 왓슨-크릭 염기쌍의 반쪽은 파괴되거나 해리되는 반면 (즉, "용융"되는 반면), 왓슨-크릭 염기쌍의 나머지 반쪽은 더블 스트랜드 구조로 온전한 상태로 유지되는 온도로서 정의될 수 있다. "임계

온도," "임계 변성 온도" 또는 "T_c"는 기준 서열의 T_m보다 낮은 온도를 지칭한다. 증폭 반응 동안 표적 서열이 선택적으로 강화되도록 하기 위해 T_c를 적용시켜 핵산 샘플 중 더블-스트랜드 표적 서열 또는 표적 서열/기준 서열 더블-스트랜드 이중체를 선택적으로 변성시킨다.

[0093] 주어진 핵산 스트랜드 쌍의 T_m이 스트랜드 대 스트랜드 결합의 안정성을 나타내는 지표가 되고, 상기 T_m은 스트랜드의 상보성, 서열 길이, GC 함량, 더블 스트랜드 부위 내의 미스매치의 존재 여부, 및 비교적 중요하지 않은 기타 다른 인자들, 예로서, 샘플의 염 농도에 따라 달라진다 (문헌 [Lewin, *Genes V*, Chapter 5, Oxford University Press and Cell Press: New York, (1994) pp. 109-126; SantaLucia, 1998]).

[0094] 융점 온도는 보통, 온도를 연속적으로 증가시키면서 그에 샘플을 가하고 혼성화 이중체가 싱글 스트랜드로 해리되는 것을 연속하여 측정함으로써 실험적으로 측정된다. 해리는 각종의 상이한 방법, 예를 들면, UV 흡광도의 시프트, 더블-스트랜드 DNA 결합 염료의 형광, 표면 플라스몬 공명에 의해, 또는 바람직하게는, 형광에 의해 검출될 수 있다. 후자의 경우, 혼성화 프로브는 보통 형광 엔티티로 표지되고, 아무튼 형광 신호의 발생은 혼성화 이중체의 정보에 따라 달라진다.

[0095] T_m은 실험적으로 측정될 수 있거나, 당업계의 숙련인에게 공지된 잘 정의되어 있는 방법에 기초하여 예측될 수 있다. 핵산 변성 전이를 관찰하고 분석하는 방법은 시차 주사 열량법 (DSC)에 의해 핵산이 변성함에 따라 샘플 내의 엔탈피 변화를 측정하는 것 (문헌 [Kulinski et al., *Nucleic Acids Res.* 19(9):2449-2455 (1991)]; [Paner et al., *Biopolymers* 29:1715-1734 (1990)]; [Volker et al., *Biopolymers* 50:303-318 (1999)]), 공유적으로 부착된 형광단 쌍의 형광을 측정하는 것 (문헌 [Vamosi and Clegg, *Biochemistry* 37:14300-14316 (1998)]), 및 핵산의 흡광증가성 변화를 모니터링하는 것 (문헌 [Haugland, "In Vitro Applications for Nucleic Acid Stains and Probes", in *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 6th ed., Molecular Probes Inc, Eugene OR (1996) pp. 161-174])을 포함한다.

[0096] 더블 스트랜드 핵산의 T_m 값은 또한 핵산과 조합된 더블-스트랜드 DNA-특이 염료의 형광을 모니터링함으로써 관찰될 수 있다 (문헌 [Wittwer et al., 1996]). 더블 스트랜드-특이 염료는 핵산-결합 형광단이다. 전형적으로, 이를 염료의 형광은 이중체로 형성된 핵산에 결합하였을 때에 증가한다 (문헌 [Wittwer et al., *BioTechniques* 22:176-181 (1997)]). 리리에(Ririe) 등 (1997)은 더블 스트랜드 핵산 결합 염료 SYBR® 그린 I를 사용하여 용융 곡선 분석에 의해 PCR 후 생성물을 식별할 수 있다는 것을 입증하였다. SYBR® 그린 I는 차별적으로 더블 스트랜드 핵산에 결합한다 (문헌 [Haugland, 1996]). 더블 스트랜드 핵산의 T_m을 측정하기 위한 기타 다른 적합한 염료로는 SYBR® 골드, 브롬화에티디움, 아크리딘 오렌지, 브롬화프로피디움, 피코그린®, 퀘스트 (Hoechst) 33258, 퀘스트 33342, 퀘스트 34580, YO-PRO®-1 및 YOYO®-1을 포함한다. 이들 염료들 각각 상업적으로 이용가능하다. 예를 들면, 문헌 [Chapter 8 of the Molecular Probes (Eugene, Oreg.) catalog *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, Eighth Edition] (2001년 5월호 CD-ROM; 본원에서 참고로 인용됨)에는 본 발명에서 사용될 수 있는 여러 염료가 열거되어 있다.

[0097] 당업자가 이해하는 바와 같이, 임의의 더블 스트랜드 핵산 구조물의 용융은 일반적으로 제한된 온도 범위에 걸쳐 상당한 비율의 유사 핵산 군집에서 일어나고, 이는 전형적으로 상기 핵산에 대해 대략적으로 T_m에서 용융 피크 (가장 빠른 전이)를 갖게 될 것이다. 그러므로, 형광 발광에서의 상기와 같은 변화 피크를 사용하여 더블 스트랜드 핵산에 대한 T_m을 계산할 수 있다.

[0098] T에 대해 -dF/dT를 플로팅함으로써 융점 프로파일을 그래프로 나타낼 수 있다 (여기서, dF는 형광 발광 측정치의 변화량이고, dT는 핵산 온도의 변화량이며, T는 핵산의 온도이다). 그러한 그래프 표현은 형광이 가장 빠르게 변한 온도에서 피크를 나타낼 것이며, 이것이 융점을 나타내는 것이다.

[0099] 더블 스트랜드 핵산의 T_m을 측정하는 기타 다른 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 이는 미국 특허 번호 제7,226,736호; 및 제6,030,115호 (이들 각각의 전문이 본원에서 참고로 인용됨)에 기재되어 있는 것을 포함한다.

[0100] T_m은 실험식으로부터 예측할 수 있다. T_m은 상보적인 염기쌍을 형성하는 핵산 서열의 길이 (n), 서열 중 G 및 C 함량, 염 농도 (μ), 및 샘플 용액 중의 변성제 (% FA)에 따라 달라진다고 알려져 있으며, 일반적으로는 실험식 $T_m = 81.5 + 16.6 \log (\mu) + 0.41 (\% \text{GC}) - 500/n - 0.61 (\% \text{FA})$ 을 따른다. T_m은 다수의 방법들에 의해, 예를 들면, 1991년 웨트머 (문헌 [Wetmur, J. G. 1991. DNA probes: applications of the principles of nucleic

acid hybridization. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 26: 227-259] (본원에서 참고로 인용됨))에 따른 최근접 계산법에 의해, 및 올리고™ 프라이머 디자인을 비롯한 시판 프로그램 및 인터넷 상에서 이용할 수 있는 프로그램에 의해 예측될 수 있다.

[0101] "임계 온도" 또는 "T_c"는 기준 서열의 T_m보다 낮은 온도를 지칭한다. T_c는 증폭 반응 동안 표적 서열이 선택적으로 강화되게 하기 위해 기준/기준 서열 이중체보다는 더블-스트랜드 표적 서열 이중체 또는 표적 서열/기준 서열 더블-스트랜드 이중체를 차별적으로 변성시키는데 적용된다. 임계 온도는 더블 스트랜드 표적 서열 또는 교차-혼성화된 표적-기준 더블 스트랜드 DNA 이중체의 보다 낮은 T_m을 이용한다. 표적 서열과 기준 서열이 교차-혼성화하게 되면, 단쇄 (예로서, <200 bp) 더블 스트랜드 DNA 서열을 따라서 어느 곳에서든지 하나 이상의 단일 뉴클레오티드 미스매치를 이루는 소수의 서열 차이가 상기 서열의 융점 T_m에 작지만, 예측가능한 변화를 가져올 것이다 (문헌 ([Lipsky, R.H., et al. (2001) *Clin Chem*, 47, 635-644]; [Liew, M., et al. (2004) *Clin Chem*, 50, 1156-1164])). 미스매치의 정확한 서열 컨텍스트 및 위치에 따라, 200 bp 이하의 서열에 대해서는 공통적으로 0.5-1.5°C의 융점 변화가 일어난다. 따라서, 미스매치로 인해 표적-기준 서열의 어닐링은 본질적으로는 공지된 대립유전자 (예로서, 기준 서열)보다 낮은 T_m을 갖게 될 것이다. 적어도 부분적으로 본 발명은 완벽하게 매치되는 서열과 미스매치되는 서열 사이의 작은 T_m 차이를 이용한다. 임계 변성을 때 PCR 사이클마다 실시되기 때문에, 돌연변이를 포함하는 대립유전자의 차별적인 강화는 기하급수적으로 복식화되고, 결과적으로는 사이클링 종료시에 돌연변이체와 야생형 대립유전자 간의 전반적인 증폭 효율은 큰 차이를 보이게 된다. T_c는 기준 서열의 T_m보다 약 .1-20°C 더 낮다. 더욱 바람직하게는 T_c는 기준 서열의 T_m보다 약 .1-15°C, .1-10°C, .1-9°C, .1-8°C, .1-7°C, .1-6°C, .2°C-5°C, .3°C-4.5°C, .4-4°C, .5-3.5°C, .5-3°C, .5-2.5°C, .5-2°C, .5-1.5°C, .5-1°C 더 낮다.

[0102] 몇몇 실시태양에서, T_c는 기준 서열 및 표적 서열 둘 모두의 T_m보다 낮은 온도일 수 있다. 예를 들면, 일례로 야생형 서열의 T_m은 84°C였고, 돌연변이화된 서열의 T_m은 83.8°C였다. 고속 버전의 강화 방법이 사용될 때, 최적의 T_c는 83.5°C였다.

[0103] 몇몇 바람직한 실시태양에서, T_c는 기준 서열과, 가능한 모든 표적 서열 둘 모두의 T_m보다 낮은 온도가 되도록 선택된다. 예를 들면, 일례로 야생형 서열의 T_m은 84°C이고, 다른 위치에서 돌연변이화된 서열들 (단일 점 돌연변이)의 T_m은 83.8°C, 83.7°C, 83.9°C, 83.6°C, 83.75°C였다. 고속 버전의 강화 방법을 사용하였을 때, 최적의 T_c는 83.5°C였다.

[0104] 임계 변성 온도 (T_c)는 주어진 핵산 서열에 대한 PCR 효율이 갑자기 떨어지는 온도보다 낮은 온도이다. 예를 들면, 167 bp의 p53 서열은 PCR 변성 온도를 87°C로 설정한 경우에는 잘 증폭되며, 86.5°C에서는 적당히 증폭되며, PCR 변성이 86°C 이하로 설정된 경우에는 어떤 검출가능한 생성물도 수득하지 못한다.

[0105] T_m과 같이, 주어진 서열에 대한 T_c는 실험적으로, 또는 계산에 의해 확인할 수 있다. 주어진 PCR 생성물에 대한 T_c를 실험적으로 확인하기 위해 삽입성 염료 (LC-그린 또는 SYBR-그린)의 존재하에 실시간 용융 곡선을 실시하여 서열의 평균 융점을 획득한다 (상기 T_m 측정에 관한 내용 참조). T_m보다 약 0.5-1.5°C 더 낮은 온도가 보통은 표적 서열을 강화시키는데 적절한 임계 변성 온도 T_c이다.

[0106] 또한, 교차-혼성화된 표적-기준 이중체 중에 존재하는 바, 염기쌍 미스매치에 기인한 DNA 서열의 ΔT_m 을 측정하여 T_c를 예측할 수 있다. 완벽한 기준/기준 서열 매치와 비교하여 이러한 차이는 약 .1°C 내지 약 12.5°C이다. 따라서, 하나의 실시태양에서, T_c는 식 $T_c = T_m - \Delta T_m$ 으로 나타낼 수 있다 (여기서, T_m은 기준/기준 서열 이중체의 융점이고, ΔT_m 은 표적/기준 서열의 교차-혼성화 동안 형성될 수 있는 하나 이상의 염기쌍 미스매치의 결과로서 기준 서열의 T_m의 변화량이다). ΔT_m 은 표적/기준 서열 이중체의 길이에 따라, 구아닌-시토신 함량 (%GC)에 따라, 그리고 추가로 이중체 중 점 돌연변이 또는 염기쌍 미스매치의 위치에 따라 달라질 수 있다는 것이 밝혀졌다. 예를 들면, 미스매치가 이중체 중 어느 한쪽에 존재한다면, ΔT_m 은 전형적으로는 약 .1°C 내지 약 8°C 범위로 보통 더 낮을 것이다. 미스매치가 이중체 중심쪽에 존재한다면, ΔT_m 은 전형적으로는 약 .2°C 내지 약 11°C 범위로 상대적으로 더 높을 것이다. ΔT_m 은 일반적으로 교차-혼성화된 표적-기준 이중체 중 염기 미스매치 (%)당 약 .5°C 내지 약 1.5°C와 같다. ΔT_m 은 이중체의 길이 및 돌연변이 위치에 따라 달라질 뿐만 아니라,

서열의 특정 정렬에 따라서도 달라질 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 결과적으로, 상기와 같은 모든 변수가 본 개시내용의 범주내 포함된다.

[0107] 본 발명의 핵산

[0108] 본 발명에 유용한 핵산 서열

[0109] 본 발명은 핵산 샘플 중 표적 서열을 강화시키는 방법을 제공하며, 이는 또한 주형 핵산 서열을 증폭시키기 위해 프라이머를 사용한다.

[0110] 본원에서 사용되는 용어 "핵산," "폴리뉴클레오티드" 및 "올리고뉴클레오티드"는 검출될 프라이머, 프로브, 및 올리고머 단편을 지칭하며, 이는 폴리데옥시리보뉴클레오티드 (2-데옥시-D-리보스 포함), 폴리리보뉴클레오티드 (D-리보스 포함), 및 퓨린 또는 피리미딘 염기, 또는 변형된 퓨린 또는 피리미딘 염기 (염기가 제거된 부위 포함)의 N-글리코시드인 임의의 다른 유형의 폴리뉴클레오티드를 총칭하는 것이어야 한다. 용어 "핵산," "폴리뉴클레오티드" 및 "올리고뉴클레오티드" 간에는 길이에 따라 달리하고자 하는 의도된 차이는 없고, 이를 용어는 상호교환적으로 사용될 것이다. 이를 용어는 오직 1차 구조의 문자만을 지칭한다. 따라서, 이를 용어는 더블- 및 싱글-스트랜드 DNA 뿐만 아니라, 더블- 및 싱글-스트랜드 RNA도 포함한다.

[0111] 올리고뉴클레오티드가 반드시 임의의 기준 또는 천연 서열로부터 물리적으로 유도될 필요는 없지만, 화학적 합성, DNA 복제, 역전사 또는 그의 조합을 비롯한, 임의의 방식으로 생성될 수는 있다. 용어 "올리고뉴클레오티드" 또는 "핵산"은, 그의 합성 기원 또는 조작에 의해 (1) 자연 상태에서 그와 결합하고 있는 폴리뉴클레오드 전부 또는 그 일부와 결합하고 있지 않은 것; 및/또는 (2) 자연 상태에서 그에 연결되어 있는 것 이외의 폴리뉴클레오티드에 연결되어 있는 것인, 게놈 DNA 또는 RNA, cDNA, 반합성, 또는 합성 기원의 폴리뉴클레오티드를 의도한다.

[0112] 하나의 실시태양에서, 본 방법에서 사용되는 핵산은 기준/기준 서열 동종이중체와 표적/기준 서열 이종이중체 사이의 변성 온도차를 증가시키기 위해 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 그러한 변형이 표적 서열의 강화를 증진시킬 것이다. 변형된 또는 비-천연 뉴클레오티드를 강화 방법 이전에 또는 강화 방법 동안에 혼입시킬 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 것으로서 주시되는 변형된 뉴클레오티드로는 디아미노-퓨린 유사체 (예로서 2'-0-메틸-2,6-디아미노퓨린), 우라실, 펩티드 핵산 유사체, 상기의 비오텐-변형된 유사체, 상기의 형광단-변형된 유사체, 이노신, 7-데아자구아닌, 2'-데옥시-2'-플루오로- β -D-아라비노핵산 (2'F-ANA) 뉴클레오티드, 잠금(locked)-핵산 (LNA), ENA: 2'-0,4'-C-에틸렌-브릿지 핵산 및 기타 다른 것을 포함한다. 변형된 뉴클레오티드는 주형, 프라이머 및 프로브 핵산을 비롯한, 본 발명의 핵산들 중 임의의 것으로 혼입될 수 있다.

[0113] 이러한 변형은 매치된 염기와 미스매치된 염기 사이의 T_m 차이를 증가시킬 수 있고, 이로써, 본 발명을 통한 강화를 증가시킬 수 있게 된다. 예를 들면, 잠금 핵산은 예를 들면, WO 99/14226 (참고로 인용됨)에 기재되어 있는, 구조적으로 제한된 뉴클레오티드 유사체의 한 부류를 나타내는 것으로서, 이는 핵산의 융점을 증가시킨다. 잠금 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드는 문헌 ([Koshkin, A. A., et al., *Tetrahedron* (1998), 54: 3607-3630] 및 [Obika, S. et al., *Tetrahedron Lett.* (1998), 39: 5401-5404] (상기 2개의 문헌들 모두 참고로 인용됨))에 기재되어 있다. 잠금 뉴클레오티드를 올리고뉴클레오티드로 도입하면 상보적인 서열에 대한 친화성은 증가하게 되고, 융점은 몇도 증가하게 된다 (문헌 [Braasch, D.A. and D.R. Corey, *Chem. Biol.* (2001), 8:1-7]). 본 발명은 예를 들면, WO 99/14226 및 문헌 [Latorra D, et al., 2003. *Hum. Mutat.* 22: 79-85] (상기 2개의 문헌들 모두 참고로 인용됨)에 개시되어 있는 것과 같이, 당업계에 공지된 LNA 중 임의의 것을 사용함으로써 수행될 수 있다.

[0114] 완벽하게 상보적일 필요는 없고; 안정한 이중체는 미스매치된 염기쌍 또는 비매치된 염기를 포함할 수 있다. 핵산 기술의 당업자는 예를 들면, 올리고뉴클레오티드 길이, 올리고뉴클레오티드의 염기 조성 및 서열, 이온 강도, 및 미스매치된 염기쌍 우세도를 비롯한 다수의 변수를 고려하여 실험적으로 이중체 안정성을 측정할 수 있다. 핵산 이중체의 안정성은 융점, 또는 " T_m "에 의해 측정된다.

[0115] 본 발명은 주형 핵산 서열을 증폭시키기 위한 올리고뉴클레오티드 프라이머를 제공한다.

[0116] 용어 "프라이머"는 천연적으로 발생된 것이든, 정제된 제한 분해물이든, 또는 합성적으로 생산된 것이든 간에, 핵산 스트랜드에 상보적인 프라이머 연장 생성물의 합성이 촉매화되는 조건하에 배치될 때에 상보적인 스트랜드를 따른 합성의 개시점으로서 작용할 수 있는, 1 초과의 프라이머를 지칭할 수도 있고, 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 그러한 조건은 적합한 온도하에 적합한 완충액 ("완충액"은 보조인자이거나, 또는 pH, 이온 강도 등

에 영향을 주는 치환체를 포함한다) 중 4개의 상이한 데옥시리보뉴클레오시드 트리포스페이트 및 중합화-유도체, 예로서, DNA 폴리머라제 또는 역전사 효소가 존재하는 것을 포함한다. 최대 증폭 효율을 위해 프라이머는 싱글-스트랜드인 것이 바람직하다.

[0117] 본 발명에 따라 유용한 올리고뉴클레오티드 프라이머는 주형 핵산 서열과 혼성화할 수 있고, 핵산 스트랜드의 효소적 합성을 개시하는 싱글-스트랜드 DNA 또는 RNA 분자이다. 프라이머는 핵산 분자 풀에 존재하는 표적 분자 중 일부와 상보적이다. 본 발명에 따른 올리고뉴클레오티드 프라이머가 화학적이거나 효소적인 합성 방법에 의해 제조된다는 것이 주시된다. 별법으로, 그러한 분자 또는 그의 단편은 천연적으로 발생되고, 이는 그의 천연 공급원으로부터 단리되거나, 상업적 공급업체로부터 구입된다. 올리고뉴클레오티드 프라이머 길이는 5 내지 100개의 뉴클레오티드이며, 다른 길이의 프라이머가 사용되기도 하지만, 17 내지 40개의 뉴클레오티드가 이상적이다. 증폭용 프라이머는 약 17-25개의 뉴클레오티드인 것이 바람직하다. 본 발명에 따라 유용한 프라이머는 또한 용점 예측 방법에 의해서 특정 용점 (T_m)을 갖도록 디자인된다. 올리고□, 프라이머 디자인 및 인터넷 상에서 이용할 수 있는 프로그램 (프라이머3(Primer3) 및 올리고 컬클레이터(Oligo Calculator) 포함)을 비롯한 시판용 프로그램을 사용하여 본 발명에 따라 유용한 핵산 서열의 T_m 을 계산할 수 있다. 바람직하게는, 예를 들면, 올리고 컬클레이터에 의해 계산된 바와 같은, 본 발명에 따라 유용한 증폭 프라이머의 T_m 은 바람직하게는 약 45 내지 65°C, 및 더욱 바람직하게는, 약 50 내지 60°C이다.

[0118] 전형적으로, 선택적인 혼성화는, 2개의 핵산 서열이 실질적으로 상보적일 때 (적어도 14 내지 25개의 뉴클레오티드로 이루어진 스트레치에 대해 적어도 약 65% 상보적일 때, 바람직하게는, 적어도 약 75%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 90% 상보적일 때)에 일어난다. 문헌 [Kanehisa, M., 1984, *Nucleic Acids Res.* 12: 203] (본원에서 참고로 인용됨)을 참조한다. 그 결과, 개시 부위에서 어느 정도의 미스매치는 허용될 것으로 기대된다. 그러한 미스매치는 예로서, 모노-, 디-, 또는 트리-뉴클레오티드 정도로 작을 수 있다. 별법으로, 미스매치 부위는, 4개 이상의 연속된 일련의 뉴클레오티드에 미스매치가 존재하는 부위로서 정의되는 루프를 포함할 수 있다.

[0119] 하나의 실시태양에서, 강화 방법은 돌연변이 강화의 감도를 증가시키기 위해서 웹터드 핵산 (PNA) 프라이머와 함께 조합되어 사용될 수 있다. PNA는 오직 야생형 (기준) 서열의 증폭만을 억제시키는데 사용된다. 본 실시태양에서, 프라이머는 표적 (돌연변이체) 서열과 기준 서열 간의 식별을 위해 합성될 수 있다. PNA 기반형 프라이머는 돌연변이화된 서열에 결합하는 프라이머보다 더 높은 열적 안정성을 가지고 특이적으로 상보적인 야생형 서열을 인식하고 그에 결합한다. 이는 PNA 프라이머-기준 핵산과 통상의 프라이머-표적 핵산 사이의 T_m 차 이를 증가시킬 뿐만 아니라, PNA 기반형 프라이머가 DNA 폴리머라제에 의해 연장되지 못하도록 함으로써 표적 서열을 추가적으로 강화시키게 되는 것이다. 그러한 분석법은 당업계에 알려져 있고, 문헌 [Orum et al., *Nucleic Acids Research*, 21(23): 5332-5336 (1993)]에 기재되어 있다.

[0120] 올리고뉴클레오티드 프라이머는 이러한 고려사항을 염두해 두고 디자인될 수 있고, 하기 방법에 따라 합성될 수 있다.

올리고뉴클레오티드 프라이머 디자인 전략법

[0122] 서열 분석 또는 PCR용의 특정 올리고뉴클레오티드 프라이머를 디자인하는 것은 표적 서열을 인식할 수는 있지만, 예측되는 최소 2차 구조를 갖는 서열을 선택하는 것을 포함한다. 올리고뉴클레오티드 서열은 표적 핵산 중의 단일 부위에만 결합할 수 있거나, 또는 결합하지 않을 수 있다. 추가로, 올리고뉴클레오티드의 T_m 은 올리고뉴클레오티드의 길이 및 GC 함량 분석을 통해 최적화된다. 추가로, 계놈 DNA를 증폭시키는데 유용한 PCR 프라이머를 디자인할 때, 선택된 프라이머 서열은 진뱅크(GenBank) 데이터베이스 (또는 기타 다른 이용가능한 데이터베이스) 중의 서열과 유의적인 매치를 이루는 것으로서 입증되지는 못했다.

[0123] 본 발명에 따라 유용한 프라이머를 디자인하는 것은 상기 기술된 수개의 파라미터의 평가 및 프라이머 서열의 최적화를 보조하도록 개발된, 쉽게 이용할 수 있는 컴퓨터 프로그램의 사용에 의해 원활히 수행된다. 그러한 프로그램의 예로는 DNASTar™ 소프트웨어 패키지의 "프라이머셀렉트(PrimerSelect)" (디엔에이스타, 인크.(DNASTar, Inc.; 미국 위스콘신주 매디슨 소재)), 올리고 4.0 (내셔널 바이오사이언시스 인크.(National Biosciences, Inc.)), 프라이머(PRIMER), 올리고뉴클레오티드 셀렉션 프로그램(Oligonucleotide Selection Program), PGEN 및 앰플리파이(Amplify) (문헌 [Ausubel et al., 1995, *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd Edition, John Wiley & Sons]에 기재)가 있다.

[0124] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 프라이머는 표적/기준 서열 교차-흔성화 단계 T_m 보다 낮은 온도를 갖도록 디자인된다. 따라서, 본 실시태양에서 프라이머는 흔성화 단계 동안 표적 또는 기준 서열과 어닐링하지 않는다 (도 1 참조). 하나의 실시태양에서, 프라이머의 T_m 은 교차-흔성화 어닐링 단계 온도보다 5-10°C 더 낮다.

[0125] 합성

[0126] 프라이머 그 자체는 당업계에도 잘 알려져 있는 기법을 사용하여 합성한다. 특정 서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 그러한 방법은 예를 들면, 적절한 서열의 클로닝 및 제한분해 분석, 및 직접적인 화학적 합성을 포함한다. 일단 디자인되고 나면, 올리고뉴클레오티드는 예를 들면, 포스포트리에스테르 방법 (문헌 [Narang et al., 1979, Methods in Enzymology, 68:90]에 기재), 포스포디에스테르 방법 (문헌 [Brown et al., 1979, Methods in Enzymology, 68:109]에 개시), 디에틸포스포르아미데이트 방법 (문헌 [Beaucage et al., 1981, Tetrahedron Letters, 22:1859]에 개시), 및 고체 지지체 방법 (미국 특허 번호 제4,458,066호에 개시)을 비롯한 적합한 화학적 합성 방법에 의해, 또는 시판용 자동 올리고뉴클레오티드 합성기 (이는 상업적으로 이용가능함) 또는 VLSIPS™ 기술을 사용하는 기타 다른 화학적 방법에 의해 제조된다. 프라이머는 또한 당업계에 잘 알려져 있는 방법에 의해 변형된 핵산을 사용하여 합성될 수 있다.

[0127] 샘플

[0128] 본원에서 사용되는 "샘플"은 관심의 대상이 되는 핵산 (표적 및 기준 서열)을 함유하고 있거나, 또는 함유하는 것으로 추정되는 임의의 물질, 또는 그 자체가 관심의 대상이 되는 표적 핵산을 함유하고 있거나, 또는 함유하는 것으로 추정되는 핵산인 것인 임의의 물질을 지칭한다. 따라서, 용어 "샘플"은 핵산 (게놈 DNA, cDNA, RNA), 세포, 유기체, 조직, 체액, 또는 예를 들면, 혈장, 혈청, 척수액, 림프액, 윤활액, 뇨, 눈물, 대변, 피부, 기도, 창자 및 비뇨생식관의 외분비물, 타액, 혈액 세포, 종양, 기관, 조직, 시험관내 세포 배양물 구성 요소의 샘플, 천연 단리물 (예로서, 식수, 해수, 고체 물질), 미생물 표본, 및 핵산 추적자 분자로 "차폐된" 사물 또는 표본을 포함하나, 이에 한정되지 않는 물질의 샘플을 포함한다.

[0129] 본 발명의 핵산 서열은 게놈 DNA로부터 증폭될 수 있다. 게놈 DNA는 하기 방법에 따라 조직 또는 세포로부터 단리될 수 있다. 별법으로, 본 발명의 핵산 서열은 당업계에 잘 알려져 있는 방법에 의해 혈액으로부터 단리될 수 있다.

[0130] 특정 조직으로부터 유래된 유전자의 변이체 형태를 원활히 검출하기 위해서 조직을 단리시킨다. 포유동물 조직으로부터 게놈 DNA를 단리시키기 위해 조직을 민싱(mince)하고, 액체 질소에서 냉동시킨다. 예냉된 유발과 유봉을 사용하여 냉동된 조직을 미세 분말로 분쇄하고, 조직 100 mg당 1.2 ml의 분해 완충액으로 분해 완충액 (100 mM NaCl, 10 mM 트리스-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% (w/v) SDS, 0.1 mg/ml 프로테이나제 K) 중에 혼탁시킨다. 포유동물 조직 배양물 세포로부터 게놈 DNA를 단리시키기 위해 500 x g로 5분 동안 원심 분리하여 세포를 펠릿화하고, 1-10 ml 빙냉 PBS 중에 재현탁시키고, 500 x g로 5분 동안 재펠릿화하고, 1부피의 분해 완충액 중에 재현탁시킨다.

[0131] 분해 완충액 중의 샘플을 50°C에서 12-18시간 동안 (진탕시키면서) 인큐베이션시킨 후, 동량의 폐놀/클로로포름/이소아밀 알코올을 사용하여 추출한다. 원심분리 단계 (1700 x g로 10분 동안) 이후 상이 분해되지 않았다면, 추가 용량의 분해 완충액 (프로테이나제 K 포함하지 않음)을 첨가하고, 원심분리 단계를 반복한다. 2개의 상 사이의 경계면에 두꺼운 백색 물질이 뚜렷이 관찰되면, 유기 추출 단계를 반복한다. 추출한 후에, 수성 상층을 새 투브로 옮기고, 상기 투브에 1/2 부피의 7.5 M 아세트산암모늄 및 2 부피의 100% 에탄올을 첨가하게 된다. 1700 x g로 2분 동안 원심분리하여 핵산을 펠릿화하고, 70% 에탄올로 세척하고, 대기 건조시키고, 1 mg/ml로 TE 완충액 (10 mM 트리스-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)) 중에 재현탁시킨다. 0.1% SDS 및 1 µg/ml DNase 무함유 RNase의 존재하에 37°C에서 1시간 동안 샘플을 인큐베이션시키고, 추출 및 에탄올 침전 단계를 반복하여 잔류 RNA를 제거한다. 본 방법에 따라, 게놈 DNA의 수율은 대략 2 mg DNA/1 g 세포 또는 조직인 것으로 예측된다 (문헌 [Ausubel et al., 상기 문헌 동일]). 본 방법에 따라 단리된 게놈 DNA는 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

[0132] 표적 DNA는 또한 전혈로부터 추출될 수 있다. 예를 들면, 혈청 제조를 위한 경우, 항응고제를 함유하지 않거나, 또는 혈장 제조를 위한 경우, EDTA, 시트르산나트륨, 혜파린 또는 유사한 항응고제, 가장 바람직하게는 EDTA를 함유하는, 바람직하게는, 실리콘으로 처리된 유리를 포함한 채혈관으로 혈액을 표준 방법에 의해 채혈할 수 있다. 절대적으로 필요한 것은 아니지만, 바람직한 방법에서는 혈장 또는 혈청이 전혈로부터 분획화될 필요가 있다. 혈장 또는 혈청은 원심분리에 의해, 바람직하게는, 300 내지 800 Xg로 5 내지 10분 동안의 온화한 원

심분리에 의해 전혈로부터 분획화될 수 있거나, 기타 다른 표준 방법에 의해 분획화될 수 있다. 혜파린이 PCR을 방해할 수 있기 때문에, 혜파린으로 처리된 혈액을 사용하는 것은 혜파리나제로 전처리할 필요가 있을 수 있다. 따라서, 혈액 표본에 대해서는 EDTA가 바람직한 항응고제이다. 새로 채혈된 혈액 혈장 또는 혈청, 또는 냉동된 (보관된) 이후 해동된 혈장 또는 혈청을 본 발명의 방법에 사용할 수 있다. 보관된 혈장 또는 혈청은 -20°C 내지 -70°C에서 유지시켜야 하고, 새로 채혈된 혈장 또는 혈청은 사용시까지 냉동된 상태로 유지시키거나 얼음 상에서 유지시켜야 한다. 이어서, 당업계에 잘 알려져 있고, 본원에 기술되어 있는 방법에 의해 DNA를 추출할 수 있다.

[0133] 진단 분석법

본 방법은 동물 또는 인간에서 질병, 특히, 신생물병 또는 증식성 질환을 진단, 검출, 모니터링, 평가 또는 치료하기 위해 환자 샘플로부터 표적 서열을 강화시키는 방법을 제공한다. 바람직한 실시태양에서, 핵산은 온코진을 코딩하는 핵산, 또는 기타 다른 종양 관련 DNA로부터 유래된다.

표적 서열의 차별적인 강화를 통해 DNA를 추가로 분석할 수 있거나, 조작할 수 있다. 예를 들면, 강화된 대립 유전자는 DNA의 기원이 되는 세포의 특징을 정의하기 위해 분석될 수 있다. 원하는 정보에 따라, 핵산 서열 분석, RFLP, 디지털 PCR, 분광법 (양성자 NMR 분광법 포함), 생화학적 분석법 및 면역학적 분석법을 비롯한 여러 방법들 중 임의의 것이 사용될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 증폭된 DNA는 아가로스 젤로부터 돌연변이체 DNA 밴드를 잘라 단리시키고, 재증폭시키고, 플라스미드 벡터, 예를 들면, pGEM-T 벡터 플라스미드 (프로메가)로 클로닝하고, 시판용 키트, 예로서, 시퀴나제 2.0 (Sequenase 2.0) (USB)을 사용하여 서열 분석을 한다. 표적 DNA, 및 이에 따라, 예를 들면, 종양의 특징을 정의하는 분석법은 매우 다양한 임상적 유용성을 제공하는데, 예를 들면, 예로서, 기원이 된 조직에 의해서, 유형 (예로서, 전암성 또는 암성), 표현형, 및 유전자형에 의해서, 종양 행태, 생리학적 성질 및 생화학적 성질에 관한 설명 또는 특징 규명에 의해서, 종양 침윤, 전이 성향, 및 현재 진행 중에 있거나, 계획된 요법에 대한 반응을 예측하게 하는 요법, 및 추가로 예후 평가를 하게 하는 요법과 같은 다양한 요법들에 대한 감수성 또는 내성에 관해 이해하기 위해서 알려진 것이든지 또는 잠재적인 것이든지 상관없이 세포 (예로서, 종양)를 설명, 특징 규명, 또는 분류하는 것을 포함한다. 표적 DNA의 특징을 이전의 생검 또는 외과적 표본과 비교함으로써 상기 표본과 비교해 볼 때 종양 이종성 또는 유사성을 추가로 평가할 수 있고, 이로써 종양의 재발을 평가할 수 있다.

[0136] 또한, 표적 서열의 선택적인 강화를 수행한 후, 상보적 리보핵산 (RNA)은 DNA로부터 전사될 수 있거나, 제조될 수 있다. 바람직한 실시태양에서, RNA의 전사는 증폭 반응에서 관심의 대상이 되는 DNA에 대한 표준 프라이머 서열에 연결된 RNA 폴리머라제 프로모터 부위와 함께 프라이머를 사용함으로써 실시된다 (3 단계). 이어서, DNA에 상보적인 RNA를 부착된 프로모터 부위로부터 전사시킨다. 대체 방법에서는 증폭된 대립유전자 DNA를 발현 벡터로 클로닝하고, DNA에 상보적인 RNA를 전사시킨다. 추가로, 임의의 바람직한 실시태양으로서, 시험관내 번역 반응에 상보적 RNA를 사용하여 종양-관련 또는 종양-특이 단백질을 제조한다.

[0137] 대립유전자의 특징 규명, 종양-유래 또는 종양-관련 DNA의 증폭, 및 상보적 RNA의 특징 규명, 전사, 및 종양-관련 또는 종양-특이 단백질로의 번역은 요법 배정 및 종양-특이 요법 개발, 이 둘 모두에 있어 상당한 유용성을 제공한다. 세포의 DNA의 서열 분석 또는 상보적인 RNA의 전사를 통해서는 예를 들면, 발현 플라스미드를 제작하여, 예로서, 아오키(Aoki) 등의 방법 (문헌 [Aoki et al. (1995, Cancer Res. 55: 3810 3816)])을 적합화하여 합성 올리고뉴클레오티드 및 세포의 DNA에 적절하게 특이적인 기타 다른 앤티센스 작제물을 비롯한 앤티센스 화합물을 배정하거나 개발할 수 있다. 유사하게, 종양 특징을 정의함으로써 증폭된 DNA에 적절하게 특이적인 백신 요법 또는 특이적인 모노클로날 항체를 배정할 수 있다. 상응하는 면역원성 단백질을 생산하는 것은 종양-특이 모노클로날 항체 개발에 사용될 수 있다. 유사하게, 번역된 단백질은 종양-특이 백신 개발에 사용될 수 있다.

[0138] 심지어 오직 전암성 종양, 조기 암, 또는 잠재 암만이 존재하는 경우에도 본 발명을 통해 이들 종양-특이 요법 또는 진단법을 개발 및 적용시킬 수 있다는 점에서 이는 특히 가치가 크다. 따라서, 종양 적하 중량(tumor burden)이 낮고, 면역원성 기능이 상대적으로 온전한 상태이며, 환자는 면역 반응 등을 제대로 발휘하는 경우, 본 발명은 상기 모두 치유될 가능성을 증가시키면서 치료학적 개입을 허용한다.

[0139] 강화된 서열의 추가적인 프로세싱

[0140] 본 방법과 MALDI-TOF, 고해상도 용융 또는 단일 분자 서열 분석과의 조합은 돌연변이 검출에 있어서의 3가지 상이한 요구 사항을 처리할 것이다: 임상적 결과와 상관관계에 있는 것으로 알려져 있거나, 그러한 것으로 의심되

는 체세포 돌연변이의 신속한 검출 (MALDI-TOF); 미지의 체세포 돌연변이에 대한 개개 환자 샘플의 신속한 스캐닝 (HR-용융)에 이은 소수의 엑손에 관한 선택적인 서열 분석; 및 '처리하기 어려운 샘플,' 즉, 임상적으로 관련이 있는 돌연변이가 0.5-5% 수준으로 존재할 수 있는 체액 또는 이질성이고 기질이 오염된 종양으로부터 유래된 샘플 중 다수의 유전자에 관해 대량으로 동시에 이루어지는 서열 분석 (단일 분자 서열 분석, SMS).

[0141] 질량 분광분석법

하나의 실시태양에서, 강화된 표적 서열을 MALDI-TOF에 의해 서열 분석한다. 질량 분광분석법 (MS)은 DNA 서열 분석에 있어 강력한 도구로서 부상하였다. 질량 분광분석계를 통해 직접 질량을 측정하게 됨으로써 초 또는 분단위로 펩토몰 내지 피코몰 범위의 값을 획득할 수 있다. 신속한 DNA 서열 분석과 효율적인 DNA 분자 크기 측정을 위해서는 매트릭스-지원 레이저 탈착/이온화(MALDI: matrix-assisted laser desorption/ionization) 비행시간형(TOF: time-of-flight) MS가 성공적으로 사용되어 왔다. MALDI-TOF MS의 출현으로 온전한 거대 DNA 분자의 이온화와 그의 질량 대 전하비 측정이 보다 용이해졌다. 길이가 500개의 뉴클레오티드 (nt)인 싱글-스트랜드 및 더블-스트랜드 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 생성물이 MALDI-TOF MS에 의해 검출되었다. DNA 단편화를 감소시키는 최적화된 매트릭스-레이저 조합법을 사용한 합성 DNA, 플라스미드 DNA의 제한 효소 단편, 및 크기가 2180 nt 이하인 RNA 전사체의 적외선 MALDI 질량 스펙트럼이 보고되었고, 그의 정확도는 $\pm 0.5\text{-}1\%$ 였다. 비록 거대 올리고머가 MALDI-TOF MS에 의해 검출되기는 하였지만, 일반적으로 현재는 100-mer 이하의 것이 통상적인 것으로 받아들여지고 있다.

몇몇 유전자의 경우, 임상적으로 중요한 돌연변이는 게놈에서 무작위적으로 일어나지 않는다 (예를 들면, 기능 획득 점 돌연변이는 대부분의 공지된 온코진에서 일어난다). 대신, 상대적으로 적은 수의 코돈에 영향을 미치는 변화가 대개는 대다수의 체세포 돌연변이를 차지한다. 이어서, 원칙적으로는 제한된 수의 신중히 디자인된 유전적 분석법이 대다수의 임상적으로 관련이 있는 돌연변이를 효과적으로 조사하여야 한다. 예를 들면, 가려웨이(Garraway)와 그의 동료들 (문헌 [Thomas, R.K., et al. (2007) *Nat Genet*, 39, 347-351])은 *RAS*, *EGFR* 및 *BRAF*에서 각 유전자에 대한 16-44 MALDI-TOF 분석법이 인간 암성 종양에서 *RAS*, *EGFR* 및 *BRAF*에 대해 지금까지 관찰되었던 90%-99%의 돌연변이 우세도를 포착하였음을 나타내었다. 그러므로, 고효율 유전자형 분석법이 임상적 표본 중에서 대량으로 임계 및/또는 '표적가능한' 암 돌연변이를 검출할 수 있는 효과적인 수단을 제공할 것이라는 제안이 나왔다. MALDI-TOF는 비이질성 종양 샘플 중에서 앞서 동정된 돌연변이를 검출하는데 이상적으로 적합하다. 그러나, 생식계열 돌연변이에 대한 MALDI-TOF 또는 SNP-동정에 대한 신뢰성에는 의심의 여지가 없지만, 체세포 돌연변이 검출에서의 경력은 상대적으로 최근에서부터 이루어진 것이다. 따라서, 10% 미만의 돌연변이화된 세포를 포함하는 이질성 샘플 (예로서 혀장, 폐 또는 전립선 암)이 사용되는 경우, 또는 체액으로부터 유래된 DNA가 스크리닝될 경우에는 실질적으로 MALDI-TOF의 신뢰성은 감소하게 된다. 감도를 개선시킴으로써 본 강화 방법을 통해 MALDI-TOF는 낮은 수준의 체세포 돌연변이를 검출할 수 있고, 또한 주류를 이루는 외과적 종양 샘플 스크리닝에는 필수적인 필요한 신뢰성을 제공받게 될 것이다.

[0144] 고해상도 용융

또다른 실시태양에서, 강화된 표적 서열을 고해상도 용융에 사용한다. 엑손을 따라 다수의 위치에 임상적으로 관련이 있는 돌연변이를 포함하는 유전자, 예로서, p53는 개별적으로 돌연변이 유전자형을 분석하는 것보다는 돌연변이 스캐닝을 통해 스크리닝하는 것이 더 쉽다. HR-용융은 지난 몇년에 걸쳐 도입된 고효율 돌연변이 스캐닝 기술로서, SNP 또는 생식계열 돌연변이를 밝혀내는 능력은 탁월하다 (문헌 ([Chou, L.S., et al. (2005); *Am J Clin Pathol*, 124, 330-338]; [Wittwer, C.T., et al. (2003); *Clin Chem*, 49, 853-860]; [Reed, G.H. and Wittwer, C.T. (2004); *Clin Chem*, 50, 1748-1754])).

삽입성 형광 염료 (LC 그린 또는 SYBR-그린)의 존재하에 관심의 대상이 되는 게놈 부위의 PCR 증폭 이후에 바로 세심한 용융 곡선 분석에 의해서 실시간으로 돌연변이의 존재 여부를 동정하고, 증폭 후에 어떤 처리도 하지 않은 야생형과 비교한다. 추가로, 고해상도 용융 분석법은 밀폐형 튜브 환경을 유지하면서, 전통적인 방법 사용시 필요한 소요 시간의 분수적 개념의 짧은 시간 안에 유전자 스캐닝과 돌연변이 유전자형 분석 (즉, SNP 동정)을 동시에 완수하게 된다. PCR에는 <30분 (모세관) 또는 1.5 시간 (96- 또는 384-웰 플레이트)이 필요하고, 용융 획득에는 모세관당 1-2분, 또는 플레이트당 5분이 소요된다.

그러나, MALDI-TOF와 같이, 돌연변이체 대 야생형의 비가 대략 약 20%인 체세포 돌연변이에 대해서는 HR-용융을 사용하였을 때 얻게 되는 이점을 이용할 수는 없고, 따라서 HR-용융을 통해서는 여러 부류의 임상적 샘플을 신뢰할 수 있을 정도로 스크리닝할 수는 없다. 검출 한계를 증가시킴으로써 본 발명을 통해 편리하고 효율적인 HR-용융은 주류를 이루는 외과적 종양 샘플 스크리닝에 적용될 수 있고, 또한 기질이 오염된 '처리하기 어려운'

임상적 샘플 또는 체액으로부터 유래된 DNA 중의 낮은 수준 체세포 돌연변이를 검출할 수도 있다.

[0148] 단일 분자 서열 분석

또다른 실시태양에서, 강화된 표적 서열은 단일 분자 서열 분석에 사용된다 (문헌 [Thomas, R.K., et al. (2006); *Nat Med.*, 12, 852-855]). 단일 분자 서열 분석의 능력은 또한 본 발명에 도입함으로써 그로부터 이익을 얻게 될 것이다. 예를 들면, 환자 샘플에서 돌연변이를 스크리닝하는 경우, 제2 세대 서열을 개시하기 이전에 게놈 DNA로부터 선택된 엑손을 통상의 PCR 기기에서 PCR하는 것이 여전히 요구시 되고 있다. 추가로, 임상적 샘플 중 돌연변이체 대 야생형의 비 수준이 1-5%인 돌연변이를 검출하는 것은 통계적으로 수용되도록 하기 위해 '개별 이벤트'를 다회에 걸쳐 반복적으로 서열 분석하여야 한다. 이는 결국 처리 능력을 감소시키고, 돌연변이가 우세할 경우에는 약 4,000개의 서열이 동시에 스크리닝될 수 있는 것과는 대조적으로, 수준이 1%인 돌연변이에 대해서는 단지 10-20개의 서열만이 동시에 스크리닝될 수 있다 (454 라이프 사이언스(454 Life Sciences), 테크니컬 서비스(Technical Service)에 의해). 단일 분자 서열 분석 이전에 본 발명을 실시함으로써 돌연변이의 우세도는 전체 갯수 또는 대립유전자의 분수적 개념으로서 10배 내지 100배(1-2 orders of magnitude) 만큼 증가하게 될 것이며, 따라서 단일 분자 서열 분석의 처리량은 등가한 정도로 증가될 것이다.

[0150] 하나의 실시태양에서, 선택적인 강화 방법은 단일 분자 서열 분석 반응 중, 에멀젼 중의 단계 동안 적용된다. 본 실시태양에서, 이어서, 강화된 표적 서열은 파이로시퀀싱에 사용된다.

[0151] 프라이머 연장

또다른 실시태양에서, 강화된 표적 서열을 프라이머 연장 서열 분석 반응에 사용한다. 프라이머 연장에서는 올리고뉴클레오티드를 사용함으로써 서열이 알려져 있는 핵산과 비교하여 서열 중 그의 사전결정된 위치에서의 변이를 평가한다. 샘플 올리고뉴클레오티드를 싱글 스트랜드 분자로서 제공하고, 상기 싱글 스트랜드 분자를 유도체, 표지된 뉴클레오티드, 및 사전결정된 위치의 측면에 위치하는 부위와 동일한 서열을 갖는 프라이머와 함께 혼합하여 혼합물을 형성하는데, 여기서, 혼합물에는 표지된 뉴클레오티드를 구성하는 염기 이외의 염기로 구성된 뉴클레오티드가 본질적으로 존재하지 않는다. 이어서, 혼합물을 프라이머가 싱글-스트랜드 분자와 어닐링 할 수 있고 표지된 뉴클레오티드를 혼입한 프라이머 연장 생성물이 형성되는데 도움이 되는 조건에 가하고, 혼합물을 표지된 뉴클레오티드를 함유하는 프라이머 연장 생성물의 존재에 대하여 분석한다 (미국 특허 번호 제 5,846,710호).

[0153] 완충액

[0154] 본 발명의 증폭 방법에서 미스매치된 이중체와 매치된 이중체 간의 T_m 차이를 증가시키기 위해서 유기 용매를 포함하는 것이 주시된다. 특정 유기 용매를 포함하면 표적 서열의 강화는 개선될 수 있다. 예를 들면, 유기 용매를 포함하면 기준 및 표적 DNA 서열 간의 변성 온도 차이는 증가할 수 있고, 따라서, 이는 표적 서열의 차별적인 증폭에 도움이 될 수 있다. 유기 용매, 예로서, DMSO, 포름아미드, 베타인 또는 글리세롤 (문헌 [Pomp, D. and Medrano, J.F. *Biotechniques*, 10, 58-59 (1991)])은 매치된 (기준/기준) 서열과 미스매치된 (표적/기준) 서열 간의 T_m 차이를 증가시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 중간 혼성화 단계 (교차-혼성화)는 미스매치를 포함하는 표적-기준 서열을 형성할 수 있기 때문에, 유기 용매가 폴리머라제의 작용을 저해하지 않는 정도로 유기 용매를 포함하는 것이 이롭다. 그러므로, 몇몇 실시태양에서, 반응 혼합물을 1-10%의 부피 대 부피, 또는 바람직하게는 3-8%의 부피 대 부피, 또는 가장 바람직하게는 5-6%의 부피 대 부피 수준으로 DMSO, 포름아미드, 베타인, 글리세롤, 또는 그의 조합물로 보충한다. 실시예 8이 강화 방법에서 DMSO의 용도를 설명한다.

[0155] 유기 용매 사용이 갖는 또다른 실제 이점은 반응에서 유기 용매를 사용하였을 때 T_c 가 주어진 서열 변화에 대하여 적절하다는 점이다. 따라서, DMSO 부재하에서 서열에 대한 T_c 는 83.5°C인 반면, 3% DMSO의 존재하에서는 T_c 가 80.5°C이다. 결과적으로, 다른 서열에 DMSO 또는 기타 다른 용매를 다른 용량으로 첨가함으로써 T_c 는 모든 서열에 대하여 동일하다는 것을 확인할 수 있다. 또한, 변성 온도는 모두에 대하여 동일하기 때문에 작동 중인 단일의 PCR 기기 상에서 각종 서열에 대한 다수의 강화 반응을 수행하는데 유용하다.

[0156] 실시예

[0157] 실시예 1. 표적 서열을 강화시키기 위한 물질 및 방법

[0158] COLD-PCR 확인을 위해 사용된 서열: 본 발명을 확인하기 위해 p53 엑손 8 및 Kras 엑손 2 (코돈 12-13)의 다른 위치에 돌연변이를 포함하는 세포주와 일련의 게놈 DNA를 사용하였다 (도 3). p53 엑손 8 돌연변이는 폐 암에

서의 불량한 예후와 상관관계에 있고, 암 환자의 혈장 중 우세도가 낮은 돌연변이이다. 유사하게, Kras 돌연변이는 폐 선암종에서 예후적 유의성을 갖는다.

[0159] 강화 프로토콜 및 프라이머: 0.1 x LC-그린 삽입성 염료의 존재하에서 PCR을 실시하였고, 이는 세페이드 기기에서 실시간으로 진행하였다. PCR의 실시간-추적 검사가 필수적인 것은 아니지만, 이는 편리하기 때문에 모든 실험에 채택되었다.

[0160] 167 bp p53 서열의 경우, 먼저 강화 프로토콜에서 사용하기 위한 생성물을 충분히 생성하기 위해 일반 PCR을 10 사이클 동안 실시하였다. 세페이드 기기를 하기와 같은 사이클링 파라미터로 프로그램화하였다:

[0161] 95°C, 120초; (95°C, 15초/55°C 형광 판독기 작동(ON), 30초/72°C, 1분 연장) x 10 사이클.

[0162] 이어서, 생성된 PCR 생성물을 1:1000으로 희석시키고, 하기 강화 프로토콜 (이는 도 1에도 도시되어 있다)에 사용하였다:

[0163] (95°C, 15초; 120초 동안 70°C; 3초 동안 $T_c=86.5^{\circ}\text{C}$ 에서 변성; 30초 동안 55°C 형광 판독기 작동; 이어서, 72°C, 1분 연장) x 30 사이클.

[0164] 생어(Sanger) 디데옥시-서열 분석을 위한 PCR 생성물을 제조하기 위해, 생성물을 엑소뉴클레아제 I 및 쉬럽프 알칼리성 포스파타제(Shrimp Alkaline Phosphatase)로 처리하였다. 본 서열 분석 방법에 하기 프라이머를 사용하였다:

[0165] 167 bp 단편: 5'-GCT TCT CTT TTC CTA TCC TG-3' 정방향;

[0166] 5'-CTT ACC TCG CTT AGT GCT-3' 역방향

[0167] 87 bp 및 210 bp p53 단편, 및 135 bp Kras 단편의 경우, 강화 프로토콜은 상기 기술된 바와 같았지만, 단, 임계 변성 온도는 각각 $T_c=83.5$, 87.5, 및 80°C로 설정하였다. 본 서열 분석 반응에 사용된 프라이머는 하기와 같았다:

[0168] 5'-TGG TAA TCT ACT GGG ACG-3' 정방향;

[0169] 5' CGG AGA TTC TCT TCC TCT-3' 역방향 (87 bp p53 엑손 8 단편)

[0170] 5'-GCT TCT CTT TTC CTA TCC TG-3' 정방향;

[0171] 5'-TAA CTG CAC CCT TGG TC-3' 역방향 (210 bp p53 엑손 8 단편)

[0172] 5'-AACTTGTGGTAGTTGGACCT-3' 정방향;

[0173] 5'-CTCTATTGTTGGATCATATT-3' 역방향 (Kras 엑손 2 단편).

[0174] 3-6개의 독립 실험에서 강화 프로토콜 모두의 재현성을 시험하였다.

결과

[0175] **p53 엑손 8 돌연변이**: 임계 변성 온도 $T_c=86.5^{\circ}\text{C}$ 를 사용한 강화 프로토콜을 167 bp 엑손 8 단편에 적용하였을 때에는 시험된 돌연변이 모두에서 강화가 일어난 것이 명백히 관찰되었다. 도 4는 대표적인 결과를 도시한다. 예를 들면, 돌연변이체 대 야생형의 비를 5%까지 낮추기 위해 초기에 야생형 세포 중에 희석시킨 HCC 세포로부터의 DNA는, 서열 분석 크로마토그램을 관찰하여 예측해 본 바, 강화 프로그램 이후에 돌연변이체 대 야생형의 비가 약 70%가 되었다 (즉, 약 14배 강화됨). 유사하게, 야생형에 10배로 희석된 SW480 세포 (코돈 273에서 동종접합체 G>A 돌연변이)로부터의 DNA는 강화 방법 이후에 약 7배 강화된다. CT7 샘플 (이종접합체 C>A 돌연변이)의 경우에는 약 12배 강화되고, MDA-MB231 샘플 (이종접합체 C>T 돌연변이)의 경우에는 6배 강화된 것 또한 관찰되었다. 강화 방법을 통해 증폭된 야생형 p53 샘플에서는 어떤 돌연변이도 나타나지 않았다 (도 4). 도 3에 열거된 바와 같이, 167 bp 단편에 대해서 연구가 이루어진 모든 p53 돌연변이에 있어서 강화는 5-14배로 다양하였다. 따라서, 강화 방법은 돌연변이가 존재하는 위치와는 상관없이 돌연변이를 포함하는 서열 모두의 우세도를 증가시켰다.

[0176] **Kras 코돈 12/13 돌연변이**: 도 5는 Kras로부터의 135 bp 단편에 대한 결과를 도시한다. 상기 결과를 94°C의 변성 온도에서 실시된 통상의 네스티드(nested) PCR과 비교하고, 생어 서열 분석을 실시하였다. 도 5는 생어 서열 분석을 사용하여 돌연변이체 대 야생형의 비가 33%까지 낮아진 돌연변이를 명확하게 검출할 수 있다는 것을 도시한다.

[0178] 실시예 2: 임상적 샘플의 생어 서열 분석

임상적 샘플의 분석을 위해 본 발명을 적용하기 위해서 통상의 PCR에 따라 앞서 서열 분석된 20개의 임상적 결장 종양 및 폐 선암종 샘플을 실시예 1에 기술된 바와 같이 강화 프로토콜 및 생어 서열 분석에 사용하였다. 통상의 PCR-생어 서열 분석을 통해 동정된 돌연변이 모두가 강화 방법에 이어진 서열 분석을 통해서도 동정되었다는 결과를 얻었다. 그러나, 강화 방법은 또한 통상의 서열 분석에 의해 누락된 돌연변이를 동정하였다. 도 6은 우세도가 낮은 G>A 돌연변이인 2개의 임상적 샘플, TL64와 CT20이 p53 엑손 8, 코돈 273의 강화 프로토콜-생어 서열 분석을 통해서는 검출되었으나, 통상의 PCR 이후 서열 분석에 의해서는 검출되지 못했다는 것을 도시한다. RFLP-기반형 서열 분석을 사용하여 돌연변이 존재 여부를 독립적으로 확인하였다.

추가로, 5명의 결장 암 환자로부터 유래된 혈장-순환 DNA 중 p53 엑손 8 (G>A) 돌연변이는 강화 방법-생어 서열 분석을 통해서는 검출되었으나, 통상의 PCR-생어 서열 분석을 통해서는 검출되지 못했다. 이어서, 통상의 서열 분석에 의해서는 누락되었던 p53 (C>T) 돌연변이 또한 비소세포 폐 암 환자 (NSCLC)로부터 수득한 포르말린-고정 (FFPE) 표본으로부터 입수한 DNA를 사용하여 밝혀냈다 (도 6). 도 6의 하단에 있는 크로마토그래프는 NSCLC 환자로부터 수득한 또 다른 FFPE 샘플 중에서 Kras 코돈 12 돌연변이가 검출되었다는 것을 입증한다. 이어서, 강화 방법을 통해 동정된 돌연변이를 독립적으로 RFLP 방법을 통해 계놈 DNA로부터 확인하였다. 따라서, 통상의 PCR-서열 분석에 의해 누락되었던 관련 돌연변이는 COLD-PCR-서열 분석의 사용으로 쉽게 검출할 수 있다.

[0181] 실시예 3- T_m 을 강하시키는 돌연변이는 미스매치 어닐링 단계 없이도 강화될 수 있다

변성 온도가 임계 온도 (T_c)로 설정된 경우에는 PCR이 뉴클레오티드 서열에 의존하는 것이 명백하기 때문에, 심지어 PCR 동안 미스매치를 형성하지 않고서도 T_m 을 강하시키는 돌연변이가 강화될 수 있다. 따라서, G 및 A 대립유전자가 존재하는 경우, A-대립유전자는 대립유전자의 T_m 을 강하시킴에 따라 COLD-PCR 동안에 강화될 것이다. 이러한 핵심 내용을 입증하기 위해, 그리고 조사되는 서열의 크기에 따른 강화 의존도도 조사하기 위해, p53 엑손 8로부터의 167 bp 단편과 동일한 돌연변이를 포함하는 87 bp 단편 및 210 bp 단편을 조사하였다 (도 3). 167 bp 단편의 경우와 같이, 네스티드 PCR에 이어진 강화 프로토콜을 통해 초기 p53 엑손 8 앰플리콘으로부터 상기 2개의 단편을 증폭시켰다. 그러나, 이 경우에는 실시예 1의 증폭 프로토콜의 절단형 버전을 사용하였지만, 70°C에서의 미스매치-형성 단계 뿐만 아니라, 94°C에서의 단계도 2가지 모두 생략되었다 (87 bp 단편의 경우, 임계 변성 온도 $T_c=83.5^\circ\text{C}$, 및 210 bp 단편의 경우, $T_c=87.5^\circ\text{C}$). 그러므로, 이러한 버전의 강화 프로토콜에서는 PCR이 오직 임계 변성 온도 (T_c), 프라이머 결합 단계 (예로서 55°C) 및 프라이머 합성 단계 (예로서 72°C) 사이만을 순환시킨다.

도 7A는 87 bp 단편에 대한 서열 분석 크로마토그램을 입증한다 (돌연변이가 87 bp 서열 상의 어느 위치에 존재하는지에 따라 정방향 또는 역방향 서열 분석을 실시하였다). 데이터는, 이러한 버전의 변형된 강화 프로토콜을 사용한 결과, 87 bp 단편이 20-50배 강화되었다는 것을 나타낸다. 예를 들면, SW480 DNA의 돌연변이체 대 야생형 DNA가 1%인 초기 희석액은 강화 이후 50% 돌연변이체 대 야생형이 되었고, 즉, 약 50배 강화되었다. 이어진 생어 서열 분석을 통해 '이중접합' 서열이 밝혀졌다. 단축형 강화 프로토콜을 통해 이루어진 크기가 강화에 미치는 효과는 도 7B에 도시되어 있다. 단편 <100 bp인 경우에 가장 큰 강화가 이루어졌지만, 210 bp 이하의 단편인 경우에도 강화는 명백히 이루어졌다 (약 8-10배)는 것을 상기 데이터를 통해 도시한다.

[0184] 실시예 4- T_m 을 증가 또는 강하시키는 돌연변이는 완전한 강화 방법을 통해 강화될 수 있다

비록 다양한 암 샘플 중에서 접하게 되는 대부분 (약 70%)의 돌연변이가 T_m 을 강하시키기는 하지만, 약 15%의 돌연변이는 T_m 을 증가시키는 반면 (예로서, A>G), 약 15%는 T_m 을 유지한다 (예로서, G>C). G>A 및 A>G 돌연변이 둘 모두와 결실을 비롯한, 가능한 돌연변이들 모두를 강화시킬 수 있도록 하기 위해서는 완전한 강화 프로그램이 바람직하다 (도 1). T_m 을 증가 또는 강하시키는 돌연변이를 포함하는 표적 서열을 강화시킬 수 있는 능력을 입증하기 위해서, C 또는 T 뉴클레오티드 (야생형 대 HCC 세포주)를 포함하는 167 bp p53 엑손 8 단편을 도 1의 강화 프로토콜을 통해 증폭시켰다.

2개의 혼합물을 형성하였는데, 하나는 C 대립유전자가 소수로 존재하고 (C:T 1:10), 또 다른 하나는 T 대립유전자가 소수로 존재하는 것이다 (T:C 1:10). 강화 방법 또는 별법으로 통상의 PCR을 수행한 후, 생성물을 서열 분석하였다. 2가지 경우 모두 소수의 대립유전자가 강화되었으며, 즉, 증폭 이전에 어떤 것이 더 희박하게 존재하였는지에 따라 C 또는 T가 강화되었다. 가정컨대, 미스매치된 서열은 C 또는 T 대립유전자보다 낮은 용접

을 갖는 바, 도 1의 프로토콜 실시로 미스매치된 서열은 항상 차별적으로 변성된다. 그러므로, 강화 프로토콜을 수행하는 동안 중간 온도 (약 70°C)에서 미스매치를 형성함으로써, 비록 특이적인 뉴클레오티드 변화가 국소 T_m 을 증가시키는 경향이 있기는 하지만, 소수의 대립유전자의 강화는 항상 이루어진다.

[0187] **실시예 5-MALDI-TOF 서열 분석**

[0188] 본 발명은 또한 체세포 돌연변이 검출을 위한 MALDI-TOF를 비롯한, 대부분의 다른 PCR-기반형 기술을 개선시킬 것으로 기대된다. 이러한 핵심 내용을 입증하기 위해, 돌연변이를 포함하는 세포주를 야생형 샘플 내로 희석시킨 일련의 희석액을 사용하여 특이적인 p53 엑손 8 돌연변이를 동정하는 생어 서열 분석을 위한, 실시예 1에서 적용되었던 것과 동일한 모델을 사용하여 강화 프로토콜 대 통상의 PCR에 이어진 MALDI-TOF를 비교하였다.

[0189] 강화 프로토콜 또는 통상의 PCR을 수행한 후, 20분 동안 37°C에서 0.3 U 쉬림프 알칼리성 포스파타제 (USB)와 함께 인큐베이션시켜 과량의 dNTP를 제거한 후, 5분 동안 85°C에서 인큐베이션시켜 상기 효소를 불활성화시켰다. 각각의 연장 프라이머 600 nM, d/ddNTP 50 uM 및 써모시퀴나제(Thermosequenase) (솔리스 바이오다인(Solis Biodyne)) 0.126 U의 최종 농도로 SNP 또는 삽입/결실에의 싱글 프라이머 연장을 실시하고, 2분 동안 94°C에서 인큐베이션시킨 후, 5초 동안 94°C, 5초 동안 52°C, 및 5초 동안 72°C에서의 45 사이클을 수행하였다. 사용된 연장 프라이머는 MALDI-TOF 하버드 핵심연구 시설(Harvard Core Facility)에 의해서 매스어레이어 세이 디자인(MassArray Assay Design) 소프트웨어 버전 3.1.2.2를 사용하여 연구되는 각 p53 돌연변이에 대하여 디자인되었다. 각 돌연변이에 대해 사용된 프라이머는 하기와 같았다:

[0190] p53_sw480: CAGGACAGGCACAAACA;

[0191] p53_CT7: AGGACAGGCACAAACAC;

[0192] p53_DU145: ACAGCTTGAGGTGCGT;

[0193] KRAS_SW480: TGTGGTAGTTGGACCTG;

[0194] KRAS_A549: ACTCTTGCCTACGCCAC.

[0195] 이어서, 양이온 교환 수지를 첨가하여 반응물을 탈염시킨 후, 혼합하고 원심분리하여튜브 안의 내용물을 침전시켰다. 연장 생성물은 MALDI-TOF 질량 분광분석계 (시퀴놈(Sequenom)) 상에 전개시키기 전에 384 웰 스펙트로칩(spectroCHIP) 상에 스팟팅하였다.

[0196] 결과를 표 1에 나타낸다. 돌연변이 강화 배수는 표 1의 세번째 칸에 열거되어 있다. 강화 값은 통상의 PCR MALDI-TOF를 적용하였을 때 획득한 값과 비교하여 계산한다. 연구된 대다수의 돌연변이의 경우, 10-60의 강화 배수를 얻었다. 돌연변이체 대 야생형의 비가 감소함에 따라 강화는 증가하는데, 이는 강화 배수가 초기 돌연변이 농도에 대하여 비선형 의존성을 갖는다는 것을 시사한다.

표 1

p53 돌연변이		다양한 p53 엑손 8 돌연변이에 대한 돌연변이 체(%) 또는 야생형 대립유전자(%)를 나타낸다.		
		MALDI-TOF 결과		
p53 엑손 8 돌연변이	= 14484G>A			강화-PCR
스크리닝된 세포주 회색액		돌연변이 체 A(%)	야생형 G(%)	강화
SV480 -야생형의 비	1:5 통상의 PCR	15	85	
SV480 -야생형의 비	1:10 통상의 PCR	5(절량 분광분석 한계)	95	
SV480 -야생형의 비	1:33 통상의 PCR	0	100	
SV480 -야생형의 비	1:10 CO.L.D-PCR	45	55	-9
SV480 -야생형의 비	1:100 CO.L.D-PCR	33	67	>10
SV480 -야생형의 비	1:300 CO.L.D-PCR	31	69	>30
오직 야생형만, CO.L.D-PCR		0	100	강화되지 않음

p53 엑손 8 돌연변이 = 14483C>T		MALDI-TOF 결과		
		돌연변이 체 T(%)	야생형 C(%)	CO.L.D-PCR
스크리닝된 세포주 회색액				강화
CT7 -야생형의 비	1:5 통상의 PCR	28	72	미적용
CT7 -야생형의 비	1:10 통상의 PCR	18	82	미적용
CT7 -야생형의 비	1:33 통상의 PCR	5(절량 분광분석 한계)	95	미적용
CT7 -야생형의 비	1:100 CO.L.D-PCR	45	54	-18
CT7 -야생형의 비	1:200 CO.L.D-PCR	28	72	-40
CT7 -야생형의 비	1:300 CO.L.D-PCR	27	73	-60
오직 야생형만, CO.L.D-PCR		0	100	강화되지 않음

p53 엑손 8 돌연변이 = 14486G>T		MALDI-TOF 결과		
		돌연변이 체 G(%)	야생형 T(%)	CO.L.D-PCR
스크리닝된 세포주 회색액				강화
DU145 -야생형의 비	1:5 통상의 PCR	28	72	미적용
DU145 -야생형의 비	1:10 통상의 PCR	18	82	미적용
DU145 -야생형의 비	1:33 통상의 PCR	0	100	미적용
DU145 -야생형의 비	1:33 CO.L.D-PCR	27	73	-7
DU145 -야생형의 비	1:100 CO.L.D-PCR	12	88	>10
DU145 -야생형의 비	1:300 CO.L.D-PCR	0	100	검출불가
오직 야생형만, CO.L.D-PCR		0	100	강화되지 않음

Kras 코돈 12 돌연변이				
Kras 코돈 12 돌연변이에 대한 돌연변이 체(%) 또는 야생형 대립유전자(%)를 나타낸다.				
MALDI-TOF 결과				
Kras 코돈 12 돌연변이 =GGT>AGT				
스크리닝된 세포주 회색액				
A549 -야생형의 비	1:10 통상의 PCR	25	75	미적용
A549 -야생형의 비	1:33 CO.L.D-PCR	40	60	-5.5
A549 -야생형의 비	1:100 CO.L.D-PCR	25	75	-10
A549 -야생형의 비	1:200 CO.L.D-PCR	12	88	-10
Kras 코돈 12 돌연변이 =GGT>GTT				
스크리닝된 세포주 회색액				
SV480 -야생형의 비	1:10 통상의 PCR	15	85	미적용
SV480 -야생형의 비	1:33 CO.L.D-PCR	15	85	-3
SV480 -야생형의 비	1:100 CO.L.D-PCR	7	93	-5
SV480 -야생형의 비	1:200 CO.L.D-PCR	5	95	-7
오직 야생형만, CO.L.D-PCR		0	100	강화되지 않음

강화-PCR-MALDI-TOF와 통상의-PCR-MALDI-TOF 비교.
획득한 돌연변이 강화는 마지막 칸에 기재되어 있다.

[0197]

실시예 6-택맨(TAQMAN) 기반형 통상의 실시간 PCR과 강화 기반형 실시간 PCR의 비교

[0199]

통상의 실시간 PCR 중의 택맨 프로브 분석법과 강화 기반형 실시간 PCR을 비교하기 위해 핵산 증폭 반응을 실시하였다. 2개의 실시간 검출 방법을 비교하기 위하여, p53 엑손 8 중 G>A 돌연변이를 포함하는 임상적 종양 샘플과 게놈 DNA 둘 모두를 야생형 서열 중에 회석된 다양한 회석율로 분석하였다. 야생형 DNA에 회석된, SW480로부터 유래된 게놈 DNA의 일련의 회석액 (1:3, 1:10, 1:30, 1:100 및 1:300)을 제공하였다. 구체적으로, SW480로부터 유래된 DNA 상의 p53 돌연변이를 포함하는 서열과 완벽하게 매치되는 0.2 μ M 택맨 프로브 5'-6-Fam-TTT GAG GTG CAT GTT TGT GCC-BHQ_1-3'의 존재하에서 20 ng 게놈 DNA로부터 직접 실시간 PCR 반응을 실시하였다. 다른 시약의 최종 농도는 하기와 같았다: 1X GoTaq Flexi 완충액 (프로메가), 1X GoTaq 폴리머라제 (프로메가) 0.2 mM 각각의 dNTP, 0.2 μ M 정방향 프라이머, 5'- TGG TAA TCT ACT GGG ACG-3', 0.2 μ M 역방향 프라이머, 5'-CGG AGA TTC TCT TCC TCT-3', MgCl₂ 3 mM, 플러스 DNA. PCR 앰플리콘의 크기는 87 bp이고, Tc=83.5°C였다. 고속 COLD-PCR 사이클링은 다음과 같았다: 95°C, 120초; (95°C, 15초; 58°C 형광 판독기 작동, 60초) x 25 사이클; (83.5°C 15초; 58°C 형광 판독기 작동, 60초) x 25 사이클. 통상의 PCR 사이클링의 경우, 동일한 프로그램을 사용하였지만, PCR 처음부터 끝까지 변성 온도는 95°C였다. 독립 실험으로 실험은 적어도 5회 반복하였다.

- [0200] 결장 암 세포주 SW480로부터 유래된 계놈 DNA에 적용된 바에 따른, 통상의 실시간 PCR 및 강화 실시간 PCR의 감도를 도시하는 증폭 플롯을 도 8A 및 8B에 도시한다. 도 8B는 돌연변이체 대 야생형 대립유전자의 비가 1:300 일 때 강화 실시간 PCR이 돌연변이의 존재를 검출할 수 있다는 것을 입증한다. 대조적으로, Tc 단계를 제외하고 동일한 조건하에서 수행된 통상의 실시간 PCR은 최대 희석율이 1:10일 때에만 오직 돌연변이체를 검출할 수 있다 (도 8A). 그러므로, 본 분석법의 감도는 강화 방법을 사용할 때가 30배 더 우수하다.
- [0201] p53 엑손 8 돌연변이를 포함하는 임상적 종양 샘플 (이중 하나는 p53 엑손 8 중 낮은 수준 (5% 돌연변이체 대 야생형)으로 돌연변이를 포함하는 것으로 알려져 있다, CT20)에서의 통상의 실시간 PCR 및 강화 실시간 PCR의 감도를 비교하는 증폭 플롯은 도 8C 및 8D에 도시되어 있다. 강화 실시간 PCR은 돌연변이를 쉽게 검출할 수 있는 반면 (도 8D), 통상의 PCR은 검출하지 못했다 (도 8C). 야생형 샘플로서 공지되어 있는 나머지 샘플들 (TL6, TL8 및 TL18)은 동일한 조건하에서 증폭되지 못했다 (도 8C).
- [0202] 실시예 7-강화 실시간 PCR을 통한 돌연변이 스캐닝
- [0203] DNA 검출 엔도를 사용한, 통상의 실시간 PCR 및 강화 실시간 PCR의, p53의 엑손 8을 따라서 어느 곳에서든지 돌연변이를 포함하는 샘플을 검출할 수 있는 능력을 비교하기 위해 핵산 증폭 반응 혼합물을 제조하였다. 본 방법은 미지의 돌연변이 또는 이종접합체 SNP를 동정할 수 있는 빠르고 편리한 방법을 제공한다. 따라서, 본 방법은 각종의 상이한 적용을 위해 생식계열 또는 체세포 돌연변이에 대한 다수의 유전자를 스캐닝하기 위하여 당업계의 숙련인에 의해 채택될 수 있다 (예로서, 유방암/난소암이 발병될 위험이 높은 군집에서 BRCA1/2 돌연변이에 대한 스캐닝, 돌연변이를 동정하기 위한 전체적인 유전적 경로에 대한 스캐닝 등).
- [0204] 도 9A 및 9B는 p53의 엑손 8 중 돌연변이를 포함하는 것으로 알려져 있는 각종 세포주 및 임상적 샘플 중에서 LC-그린 엔도를 사용하여 통상의 실시간 PCR 및 강화 실시간 PCR 둘 모두를 비교한 증폭 플롯을 도시한다. 데이터는, 통상의 실시간 PCR (도 9A)은 돌연변이체 (SW480 및 TL6)과 야생형 (R27, TL8, TL18, TL81 및 TL82) 샘플 간의 차이를 식별할 수 없는 반면, 강화 실시간 PCR (도 9B)은 식별이 가능하다는 것을 나타낸다. 강화 방법은 야생형 샘플보다는 돌연변이를 포함하는 샘플에 대해서 더 빠르게 역치를 검출한다.
- [0205] 도 9C 및 9D는 도 9A 및 9B에 설명된 것과 동일하나, 단, 여기서의 샘플은 모두 폐 종양인 조건하에서 제조된 증폭 반응물로부터 얻은 결과를 도시한다. 데이터는, 통상의 실시간 PCR (도 9C)은 돌연변이체와 야생형 샘플 간의 차이를 식별할 수 없는 반면, 강화 실시간 PCR (도 9D)은 식별이 가능하다는 것을 나타낸다. 강화 방법은 야생형 샘플보다는 돌연변이를 포함하는 샘플에 대해서 더 빠르게 역치를 검출한다.
- [0206] 추가로, 강화 검출 방법은 샘플 TL6 중의 종래 미지의 C>T 돌연변이를 동정할 수 있다.
- [0207] 실시예 8-유기 용매는 통상의 실시간 PCR 및 강화 실시간 PCR 동안 돌연변이 강화를 증가시킨다
- [0208] 유기 용매가 통상의 실시간 PCR 및 강화 실시간 PCR에 미치는 효과를 평가하기 위하여 핵산 증폭 반응 혼합물을 제조하였다. 유기 용매 (3% DMSO)의 존재하에 또는 부재하에 반응을 실시하였다. 사용된 방법은 3% DMSO를 첨가한 것을 제외하고는 실시예 7에 기술한 것 및 도 9C 및 9D에 도시한 것과 동일하였다.
- [0209] 유기 용매가 존재하는 경우에는 돌연변이화된 서열을 포함하는 샘플의 증폭 플롯과 야생형 서열을 포함하는 샘플의 증폭 플롯 간의 식별력은 증진되었다 (도 10). 예를 들면, 야생형 샘플과 돌연변이체 샘플 간의 역치 차이는 약 5 사이클 (DMSO 미포함의 실시간 강화, 도 9A 참조)로부터 10 초과의 사이클 (DMSO 포함의 실시간 강화, 도 10A 참조)로 증가하였다.
- [0210] 실시예 9-강화 PCR과 함께 조합된 RFLP를 사용하여 이루어진 초저 수준 돌연변이 검출
- [0211] 초저-수준 돌연변이의 동정을 개선시키기 위해, 예로서, 초조기(very early) 단계에서의, 즉, 처리 이전의 암 계놈 중 무작위 돌연변이 또는 암 샘플 중 내성 돌연변이를 동정하기 위해 RFLP-PCR과 함께 조합된 강화 PCR을 사용하였다.
- [0212] 예를 들면, 야생형 EGFR 엑손 19를 포함하는 샘플을 TaqI 효소를 사용하여 선택적으로 분해하였다. 이어서, 1:10,000 이하의 돌연변이체 대 계놈 DNA 희석액을 강화 포맷 ($T_c = 81.5$ 또는 81°C) 또는 통상의 PCR 포맷 (95°C)의 PCR에 가하였다. TaqI 분해한 후, dHPLC하여 돌연변이 강화를 정량하였다 (도 11). 체류 시간 약 7분째의 분리된 돌연변이 피크의 존재에 의해서 돌연변이 존재량을 정량하였다. 강화 방법 이후에 돌연변이 피크는 통상의 PCR 이후보다 더욱더 명확하다. 결론적으로, 강화 방법은 실질적으로 RFLP-PCR을 통해 동정된 초저 수준의 돌연변이 검출을 개선시켰다.

[0213]

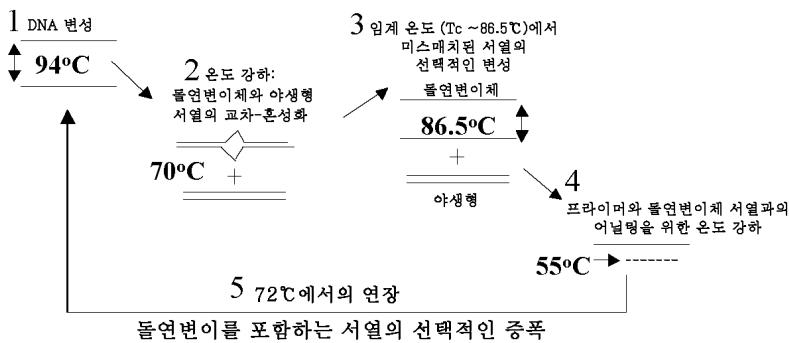
본원에서 인용된 모든 특허, 특허 출원, 및 공개 문헌은 그의 전문이 본원에서 참고로 인용된다. 본 발명은 특히 그의 바람직한 실시태양을 참고로 하여 나타내고 기술하였지만, 첨부된 특허청구범위에 포함되는 본 발명의 범주로부터 벗어나지 않으면서 그 범위 안에서 형태적으로 그리고 세부적으로 다양한 변형이 이루어질 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

도면

도면1

A COLD PCR의 원리

(낮은 변성 온도에서의 동시-증폭)



B COLD-PCR

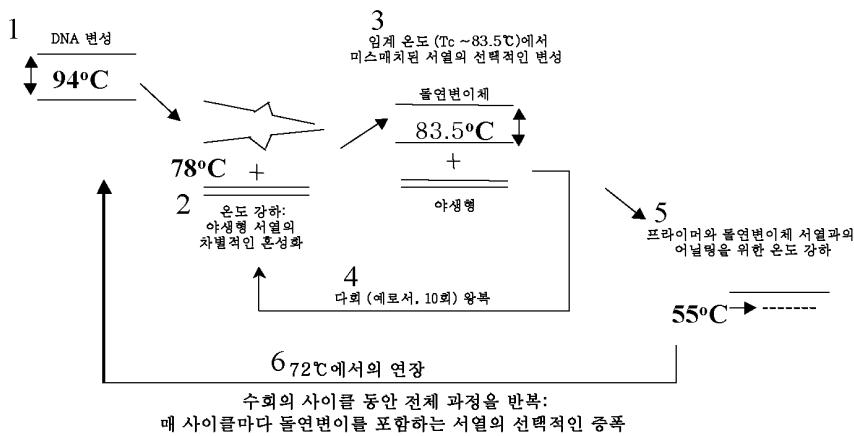
(단일형, 다중형, 또는 통상의 링커를 매개로 한 CO.L.D.-PCR)

MALDI-TOF (목적 1) HR-용융 (목적 2) 디-테온시 서열 분석 단일-분자 서열 분석 (목적 3) 파이로시퀀싱, SSCP, dHPLC, CCM, RFLP, QRT-PCR 등

A. 강화 프로토콜에 관한 설명. 167 bp의 p53 엑손 8 서열에 관한 일례를 도시한다.
PCR 동안 서열을 따라서 어느 곳에서든지 미스매치가 형성되면 이를 통해
매 PCR 사이클마다 소수의 (돌연변이체) 대립유전자가 차별적으로 변성될 수 있고
증폭될 수 있다. B. PCR을 강화 방법으로 대체: 모든 PCR-기반형 유전적 시험 분석법은
상기 분석에 수행되는 PCR 단계 동안 돌연변이-강화로부터 얻은 이점을 고수한다.

도면2

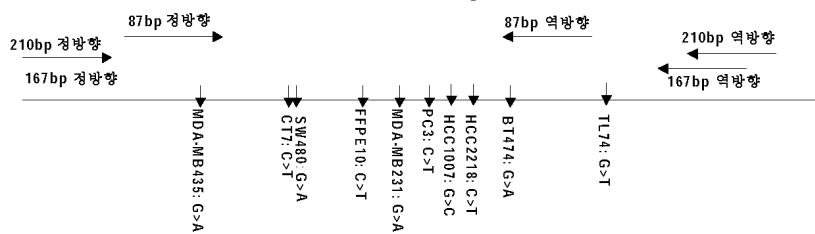
왕복형 COLD PCR의 원리

(87 bp의 p53 엑손 8 서열에 관한 일례 ($T_c=83.5^{\circ}\text{C}$)를 나타낸다.)

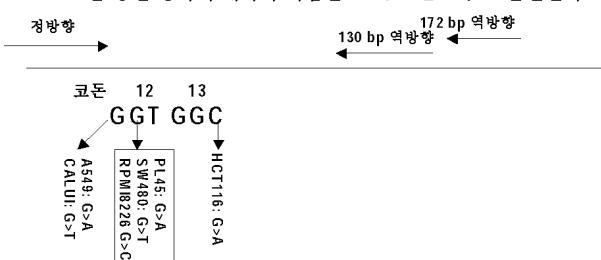
왕복형 강화 프로토콜의 원리

도면3

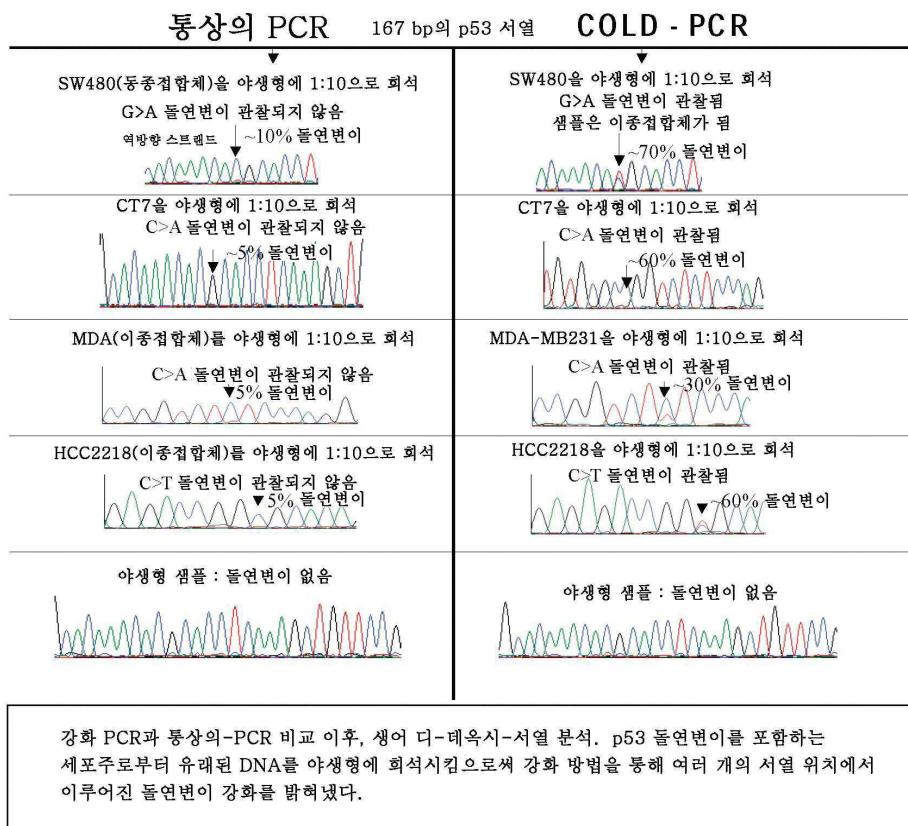
CO.L.D. PCR을 통한 강화에 대하여 시험된 p53 엑손 8 복연변이



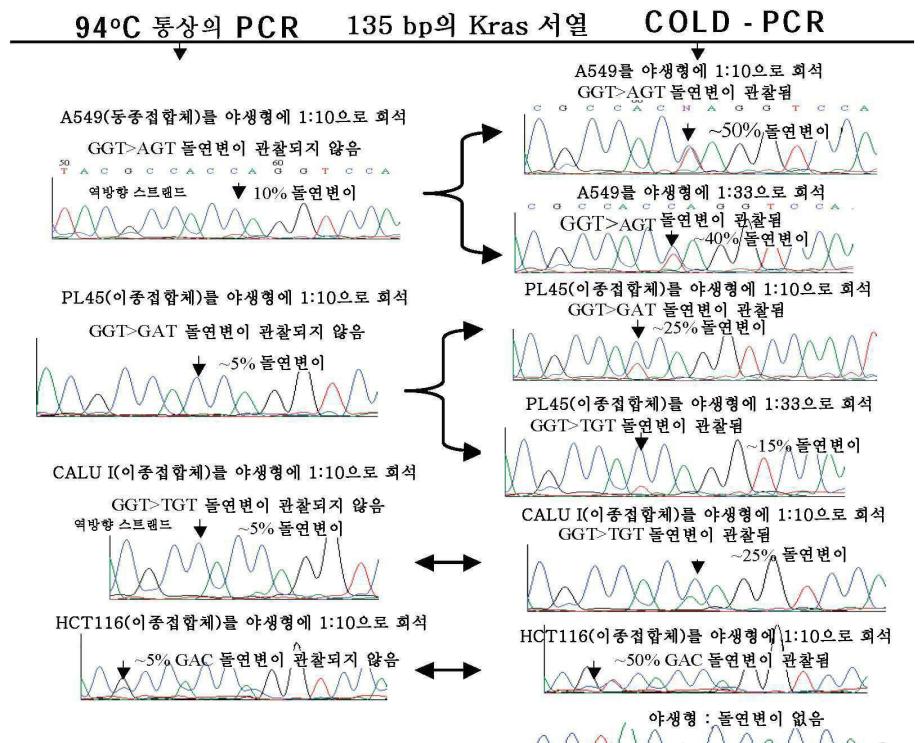
CO.L.D.-PCR을 통한 강화에 대하여 시험된 Kras 코돈 12/13 복연변이



도면4



도면5

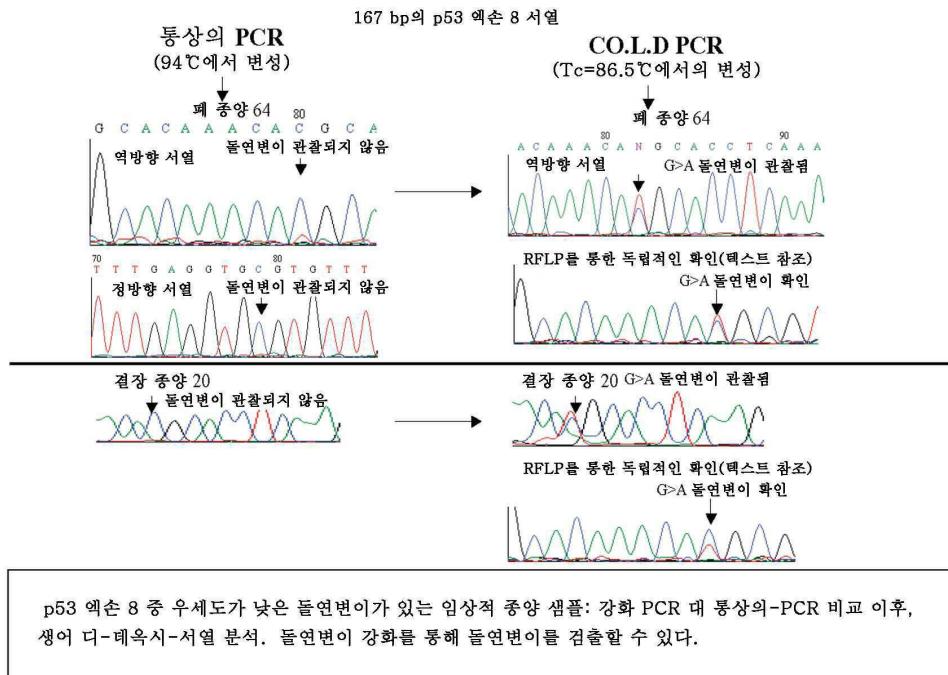


강화 PCR과 통상의-PCR 비교 이후, 생어 디-데옥시-서열 분석. Kras 돌연변이를 포함하는 세포주로부터 유래된 DNA를 야생형에 희석시킴으로써 COLD-PCR을 통해 여러 개의 서열 위치에서 이루어진 돌연변이 강화를 밝혀냈다.

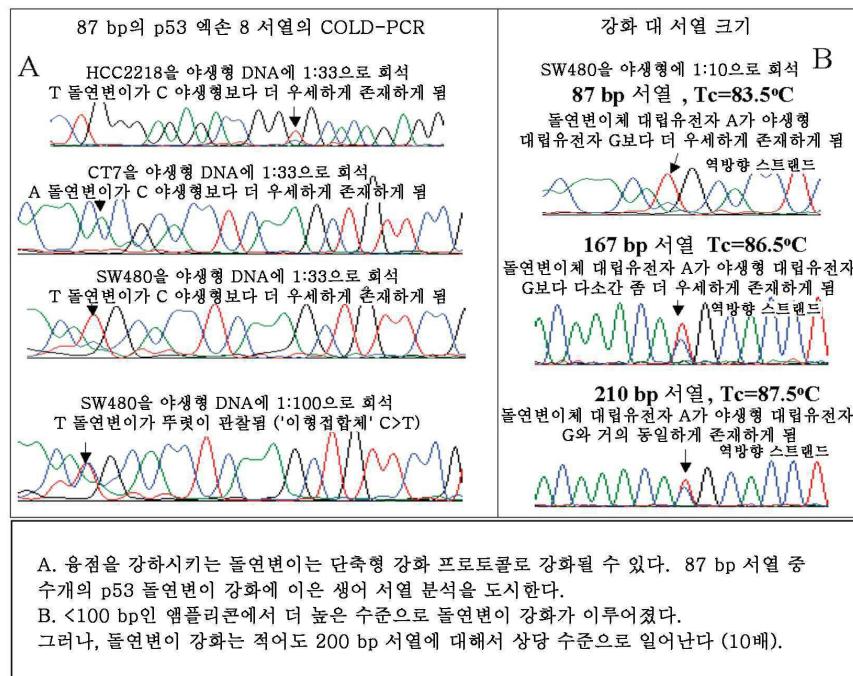
도면6

앞서 생어 디-데옥시-서열 분석에 의해서는 '관찰되지 않았지만,' 현 COLD PCR을 통해서는 검출 가능한, 임상적 고령 종양 샘플 중 낮은 수준의 돌연변이에 관한 일례

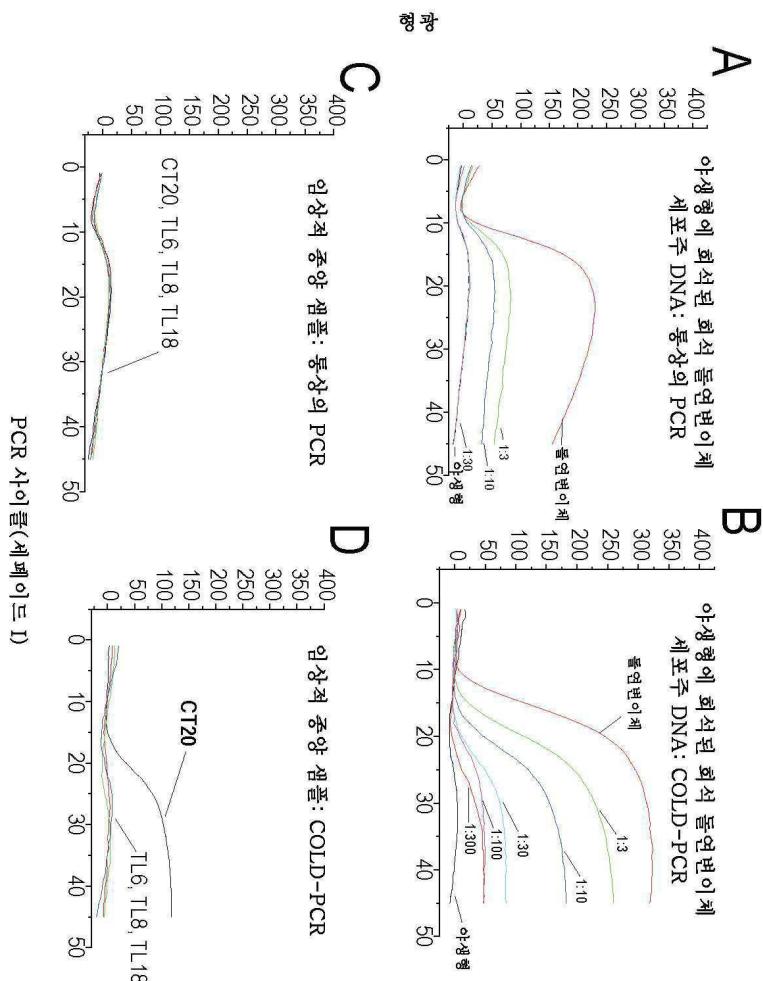
p53 엑손 8 돌연변이에 대한 임상적 종양 샘플의 생어 디-데옥시-서열 분석



도면7

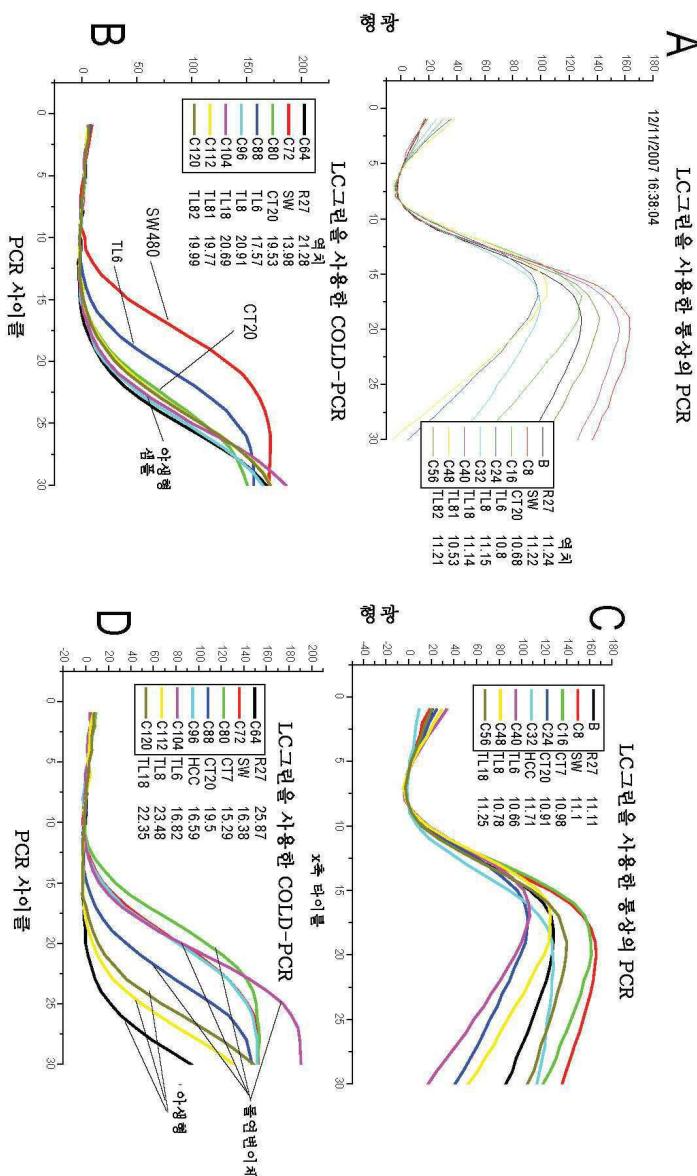


도면8

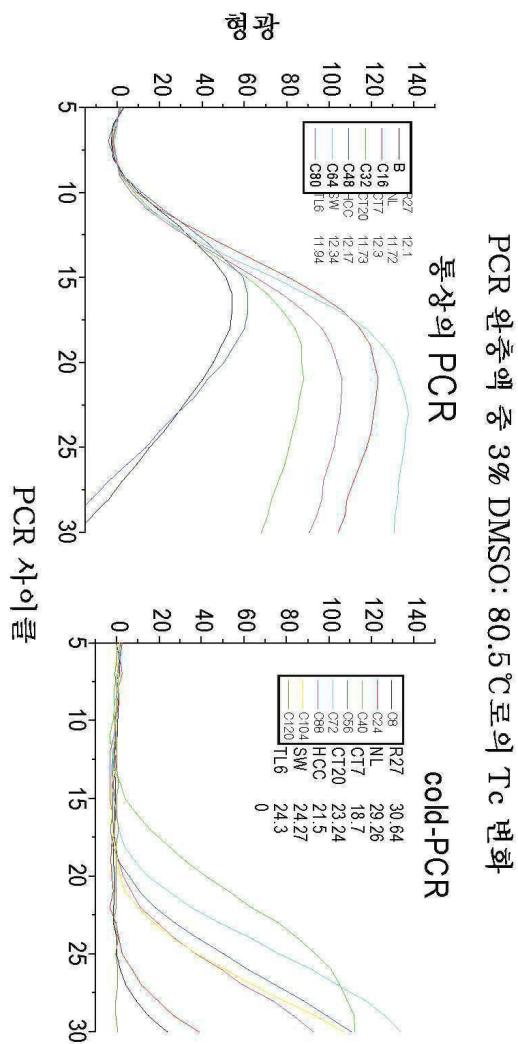


p53 액손 8 돌연변이 검출: 통상의 실시간-PCR 대 실시간-COLD-PCR 비교

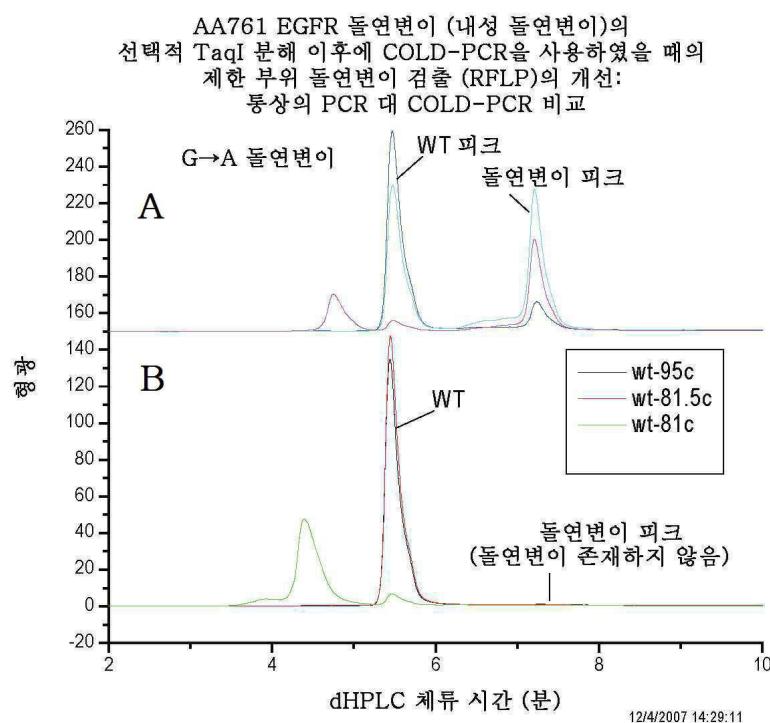
도면9



도면10



도면11



서 열 목 록

[서열목록 전자파일 첨부](#)