



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0139582

(43) 공개일자 2015년12월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) C12Q 1/70 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/682 (2013.01)
C12Q 1/6837 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7031699
- (22) 출원일자(국제) 2014년04월04일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2015년11월04일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/033062
- (87) 국제공개번호 WO 2014/165814
국제공개일자 2014년10월09일
- (30) 우선권주장
61/808,447 2013년04월04일 미국(US)

- (71) 출원인
조지아 스테이트 유니버시티 리서치 파운데이션,
인크.
미국 조지아주 30303 아틀란타 코트랜드 스트리트 30
- (72) 발명자
황, 젠
미합중국 30062 조지아 매리에타 킹렛 레인 1560
- (74) 대리인
박창남, 정대섭

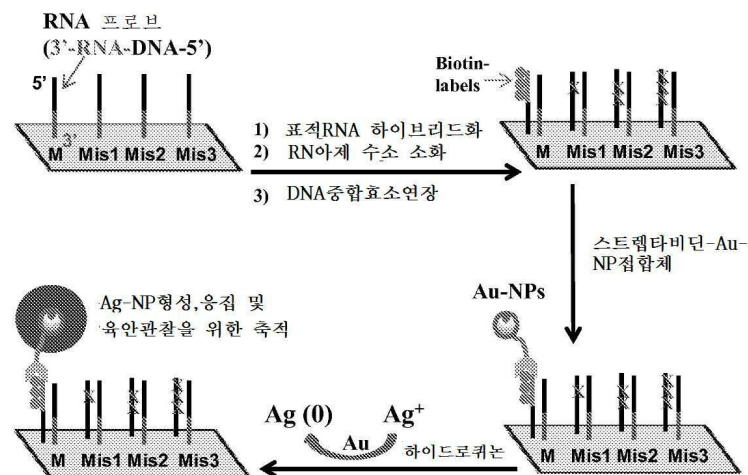
전체 청구항 수 : 총 47 항

(54) 발명의 명칭 나노파티클-지원 신호 증폭을 이용한 RNA 마이크로칩 검출

(57) 요약

본 발명은 샘플 내의 RNA를 검출하기 위한 방법 및 물질이 개시된다. 어떤 형태에서, (a) 샘플과 프로브 어레이를 접촉시키는 단계, (b) 프로브 어레이와 RNA/DNA 하이브리드에 대한 특정 리보뉴클레아제 (RNase H)를 접촉시키는 단계, (c) 프로브 어레이, 표지 뉴클레오타이드, 및 DNA 템플릿을 사용하여 RNA 가닥(strand)을 연장할 수 있고 상기 RNA 가닥의 연장에 표지 뉴클레오타이드를 혼입할 수 있는 핵산 중합효소(클레노우 조각 DNA 중합효소)를 접촉시키는 단계, 및 (d) 연장된 핵산 가닥의 표지 뉴클레오타이드를 검출하는 단계를 포함한다. 상기 키메라 프로브는 DNA 영역과 RNA 영역을 포함하며, 상기 DNA 영역과 RNA 영역은 서로 인접하고, 상기 DNA영역은 RNA 영역의 5'이다. 키메라 프로브는 제2 DNA 영역을 포함 할 수 있다. 제2 DNA 영역 또한 RNA 영역과 인접 할 수 있고, RNA 영역의 3' 일 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 1/689 (2013.01)

C12Q 1/701 (2013.01)

C12Q 2563/131 (2013.01)

C12Q 2563/137 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

샘플 내의 RNA 검출방법이고, 상기 방법은

(a) 샘플과 프로브 어레이를 접촉시키고, 상기 프로브 어레이는 하나 또는 하나 이상의 키메라 프로브를 포함하고, 상기 키메라 프로브는 DNA 영역과 RNA 영역을 포함하며, 상기 DNA 영역과 RNA 영역은 서로 인접하고, 상기 DNA영역은 RNA 영역의 5'이며, 상기 샘플이 적어도 하나의 키메라 프로브의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 RNA 분자를 포함하면, 상기 RNA 분자는 상보적 키메라 프로브와 하이브리드화되며;

(b) 프로브 어레이와 RNA/DNA 하이브리드에 대한 특정 리보뉴클레아제 (RNase H)을 접촉시키며, 상기 키메라 프로브의 DNA영역에 하이브리드화된 RNA 분자의 부분이 분해되며;

(c) 프로브 어레이, 표지 뉴클레오티드, 및 DNA 템플릿을 사용하여 RNA 가닥(strand)을 연장할 수 있고 상기 RNA 가닥의 연장에 표지 뉴클레오티드를 혼입할 수 있는 핵산 중합효소(클레노우 조각 DNA 중합효소)를 접촉시키고, 상기 하이브리드화된 RNA 분자는 연장되어 연장된 핵산 가닥을 형성하며, 적어도 하나의 표지 뉴클레오티드는 상기 연장된 핵산 가닥에 통합되며, 각 표지 뉴클레오티드는 제1표지를 포함하고; 및

(d) 상기 프로브 어레이와 표지 접합체를 접촉시킴으로써 연장된 핵산 가닥의 표지 뉴클레오티드를 검출하고, 상기 표지 접합체는 특정 결합 분자와 제2표지를 포함하고, 상기 특정 결합분자는 제1표지에 결합하며, 상기 연장된 핵산 가닥의 표지 뉴클레오티드는 제2표지를 검출하여 검출되고, 제2표지는 프로브 어레이와 검출 접합체를 접촉시킴으로써 검출되고, 상기 검출 접합체는 응집체를 포함하고, 상기 응집체는 상기 표지 접합체 상에 검출 접합체의 응집을 매개하며,

상기 연장된 핵산 가닥내의 표지 뉴클레오티드의 검출은 샘플내에 RNA 분자의 존재를 나타내는 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

검출 접합체는 제2표지와 연합하거나 제2표지에 결합하는 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 제2표지는 상기 표지 접합체상에 또는 표지 접합체에 검출 접합체의 응집을 매개하거나 허용하는 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 검출 접합체는 신호를 포함하거나 생성하는 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 검출 접합체는 표지의 복수의 카피를 포함하는 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

복수의 검출 접합체는 제2표지와 연합하거나 제2표지에 결합하는 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 검출 접합체는 자가 응집하는 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 제1표지는 바이오틴을 포함하고, 상기 특정 결합분자는 스트렙타비딘을 포함하며, 상기 제2표지는 금을 포함하고, 응집체는 은을 포함하는 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 (a), (b), 및 (c) 단계는 동시에 수행되는 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 표지 접합체는 스트렙타비딘에 접합된 금 나노입자를 포함하는 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 검출 접합체는 은 나노입자를 포함하는 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 리보뉴클레아제는 RN아제 수소이고 상기 핵산 중합효소는 DNA 중합효소의 클레노우(Klenow) 절편인 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 프로브 어레이는 고체 상태 기관을 더 포함하고, 상기 키메라 프로브는 상기 고체상태의 기관상에 고정화되는 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 14

제13항에 있어서,
상기 프로브 어레이는 하나 이상의 키메라 프로브를 포함하고, 각 키메라 프로브는 고체 기관의 다른 위치에 고정화되며, 상기 각 키메라 프로브는 다른 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 상기 각 키메라 프로브는 다른 RNA 분자에 상보적이며, 상기 확장된 핵산 가닥에 표지된 뉴클레오타이드가 검출되는 고체 기관상의 위치는 검출된 RNA 분자의 동일성을 나타내는 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 키메라 프로브는 안정화된 핵산인 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 RNA 영역은 2'-O-메틸 뉴클레오티드로 구성되는 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 또는 하나 이상의 키메라 프로브는 바이러스, 박테리아, 또는 미생물의 뉴클레오티드 서열 특성에 상보적인 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 또는 하나 이상의 키메라 프로브는 제2 DNA영역을 포함하고, 상기 제2 DNA영역은 RNA 영역의 3'인 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 DNA영역과 RNA영역은 연속적인 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 키메라 프로브는 3'-연결기를 더 포함하고, 상기 연결기는 키메라 프로브의 고정화를 매개하는 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 3'-연결기는 아미노기인 것을 특징으로 하는 샘플 내의 RNA 검출방법.

청구항 22

프로브 어레이, 표지 뉴클레오티드, 표지 접합체 및 검출 접합체를 포함하는 키트이고,

상기 프로브 어레이는 상기 키메라 프로브는 DNA 영역과 RNA 영역을 포함하며, 상기 DNA 영역과 RNA 영역은 서로 인접하고, 상기 DNA영역은 RNA 영역의 5'이며, 상기 키메라 프로브의 뉴클레오티드 서열은 관심 RNA 분자의 뉴클레오티드 서열에 상보적이며,

각 표지 뉴클레오티드는 제1표지를 포함하고, 상기 표지 접합체는 특정 결합분자와 제2표지를 포함하며, 상기 특정 결합분자는 제1표지에 결합하고,

상기 검출 접합체는 응집체를 포함하고, 상기 응집체는 상기 표지 접합체 상의 검출 접합체의 응집을 매개하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 23

제22항에 있어서,

상기 검출 접합체는 제2표지와 연합하거나 제2표지에 결합되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서,

상기 제2표지는 상기 표지 접합체상에 그리고 표지 접합체에 검출 접합체의 응집을 매개하거나 허용하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 25

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 검출 집합체는 신호를 포함하거나 신호를 생성할 수 있는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 26

제22항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 검출 집합체는 복수의 표지 카피를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 27

제22항 내지 제26항에 있어서,

상기 복수의 검출 집합체는 제2표지와 연합하거나 제2표지에 결합하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 28

제22항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 검출 집합체는 자가 응집할 수 있는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 29

제22항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 프로브 어레이는 고체 상태의 기판을 더 포함하고, 상기 키메라 프로브는 상기 고체 상태의 기판상에 고정화되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 30

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 프로브 어레이는 하나 이상의 키메라 프로브를 포함하고, 각 키메라 프로브는 고체 상태의 기판의 다른 위치에 고정화되며, 상기 각 키메라 프로브는 다른 뉴클레오타이드 서열을 가지고, 각 키메라 프로브는 다른 RNA 분자에 상보적인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 31

제22항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 키메라 프로브는 안정화된 핵산인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 32

제31항에 있어서,

상기 RNA 영역은 2'-O-메틸 뉴클레오타이드로 구성되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 33

제22항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 또는 하나 이상의 키메라 프로브는 바이러스, 박테리아, 또는 미생물의 뉴클레오타이드 서열 특성에 상보적인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 34

제33항에 있어서,

하나 또는 하나 이상의 키메라 프로브는 제2 DNA 영역을 포함하고, 상기 제2 DNA 영역은 RNA 영역의 3'인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 35

제34항에 있어서,

상기 DNA영역과 RNA영역은 연속적인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 36

제22항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 키메라 프로브는 3'-연결기를 더 포함하고, 상기 연결기는 키메라 프로브의 고정화를 매개하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 37

제26항에 있어서,

상기 3'-연결기는 아미노기인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 38

프로브 어레이이고, 상기 프로브 어레이는 하나 또는 하나 이상의 키메라 프로브를 포함하고, 상기 키메라 프로브는 DNA 영역과 RNA 영역을 포함하며, 상기 DNA 영역과 RNA 영역은 서로 인접하고, 상기 DNA영역은 RNA 영역의 5'이며, 상기 키메라 프로브의 뉴클레오티드 서열은 관심 RNA 분자의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 것을 특징으로 하는 프로브 어레이.

청구항 39

제38항에 있어서,

상기 프로브 어레이는 고체 상태의 기판을 더 포함하고, 상기 키메라 프로브는 상기 고체 상태의 기판상에 고정화되는 것을 특징으로 하는 프로브 어레이.

청구항 40

제38항 또는 제39항에 있어서,

상기 프로브 어레이는 하나 이상의 키메라 프로브를 포함하고, 각 키메라 프로브는 고체 상태의 기판의 다른 위치에 고정화되며, 상기 각 키메라 프로브는 다른 뉴클레오티드 서열을 가지고, 각 키메라 프로브는 다른 RNA 분자에 상보적인 것을 특징으로 하는 프로브 어레이.

청구항 41

제38항 내지 제40항에 있어서,

상기 키메라 프로브는 안정화된 핵산인 것을 특징으로 하는 프로브 어레이.

청구항 42

제41항에 있어서,

상기 RNA 영역은 2'-O-메틸 뉴클레오티드로 구성되는 것을 특징으로 하는 프로브 어레이.

청구항 43

제38항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 또는 하나 이상의 키메라 프로브는 바이러스, 박테리아, 또는 미생물의 뉴클레오티드 서열 특성에 상보적인 것을 특징으로 하는 프로브 어레이.

청구항 44

제43항에 있어서,

하나 또는 하나 이상의 키메라 프로브는 제2 DNA 영역을 포함하고, 상기 제2 DNA영역은 RNA 영역의 3'인 것을

특징으로 하는 프로브 어레이.

청구항 45

제44항에 있어서,

상기 DNA영역과 RNA영역은 연속적인 것을 특징으로 하는 프로브 어레이.

청구항 46

제38항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 키메라 프로브는 3'-연결기를 더 포함하고, 상기 연결기는 키메라 프로브의 고정화를 매개하는 것을 특징으로 하는 프로브 어레이.

청구항 47

제46항에 있어서,

상기 3'-연결기는 아미노기인 것을 특징으로 하는 프로브 어레이.

발명의 설명

기술분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 관련

[0002] 본 출원은 2013. 4. 4.자 출원된 미국 가출원 제61/808,447호의 우선권을 주장한다. 미국 가출원 제61/808,447호는 본 출원에 참조로써 전체적으로 통합되어 있다.

[0003] 서열 목록

[0004] 파일명 "GSURF_2013_17_PCT_Sequence_Listing.txt," 의 텍스트파일로서, 목록이 2014. 4. 4자 제출되고 2014. 4.4자 생성되었으며, 4,889 바이트의 크기를 가진 서열 목록이 미국 특허법 37 C.F.R. 1.52(e)(5)에 따라 본 출원에 추가되어 있다.

[0005] 기술분야

[0006] 본 발명은 일반적으로 핵산 검출 및 분석 분야에 관한 것이고, 특히 RNA 검출 및 분석의 영역에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 천연 전염병 (예를 들어, 웨스트 나일 바이러스 (WNV)와 인플루엔자 전염병) (Pripuzova et al., *PLoS One*, 7, e43246 (2012); Wheeler et al., *Am J Trop Med Hyg*, 87, 559 (2012); Brault et al., *J Med Entomol*, 49, 939 (2012); Kesavaraju et al., *Am J Trop Med Hyg*, 87, 359 (2012))와 식중독 발생 (예 : 대장균 0157 등 : H7)은 인간의 건강과 생명에 치명적인 위협이다. 치료의 시점에서 이러한 인간 병원체의 신속하고 정확한 검출은 적절한 치료와 생명 구제를 위해 필수적이다. 감염성 질환의 신속한 진단을 위한 바이러스성 및 세균성 병원체 검출이 주요한 보건 검사입니다. 예를 들어, 인플루엔자 H1N1, WNV, 탄저균 병원성 대장균은 빠르게 발병의 범위 및 발병 치명적인 영향을 최소화하기 위해 신속하게 검출될 필요가 있다. 문화 기반의 방법은 시간이 많이 소요되고, 결론을 얻기 전에 통상 2~3일이 필요하다(March and Ratnam, *J Clin Microbiol*, 23, 869 (1986)). 항원 - 항체 기반의 면역학적 분석(즉, ELISA)은 신속하고 강력하지만 다른 균주 사이의 미묘한 차이를 효율적으로 구별할 수 없다. 반면, 실시간 중합 효소 연쇄 반응 (PCR)와 cDNA 어레이(Bustin, *J Mol Endocrinol*, 25, 169 (2000); Call, *Crit Rev Microbiol*, 31, 91 (2005); Vora et al., *Molecular and cellular probes*, 22, 294 (2008))와 같은 핵산기반 검출 방법들은 단일 염기 변화를 검출할 수 있고 검출 높은 특이성을 제공할 수 있다. 그러나, 그것들은 RNA를 직접 검출하지 않고, 역전사 (RT)와 여러 단계가 요구된다.

[0008] PCR 증폭은 엄격한 오염 제어의 부족으로 인해 잘못된 긍정적인 결과를 야기할 수 있다. 많은 다른 전략, 예컨대 핵산 서열-기반 증폭(Zhao et al., *J Clin Microbiol*, 47, 2067 (2009)), 질량 분광법(Li et al., *Anal Chem*, 82, 3399 (2010)), 및 롤링 서클 증폭(Murakami et al., *Nucleic Acids Res*, 40, e22 (2012)) 등이 DNA 검출을 위해 개발되어 오고 있다.

[0009] 또한, Northern blot, RNase 보호 분석법, 마이크로 RNA 프로파일링 및 직접 RNA sequencing(Nelson et al., *Nat Methods*, 1, 155 (2004); Sandelin et al., *Nat Rev Genet*, 8, 424 (2007); Ozsolak et al., *Nature*, 461, 814 (2009))과 같은 직접적 RNA 검출을 위한 현재의 방법은 노동 집약적이고, 시간 소모형이며, 비용 및/또는 많은 기기의 사용이 필요하다. 이러한 접근은 신속하고 정확한 RNA 검출, 특히 현장 진료 진단 및 현장 적용에 적합하지 않다. 최근, 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 기초한 복합 RNA 바이오센서(Fang et al., *J Am Chem Soc*, 128, 14044 (2006); Lee et al., *Langmuir*, 22, 5241 (2006)), 잠금 핵산(Locked Nucleic Acid, LNA) 및 금-나노 입자 접합체에 기초한 마이크로 RNA 마이크로 어레이(Castoldi et al., *RNA*, 12, 913 (2006))들이 입증되었다.

[0010] 그러나, RNA 샘플 준비 및 편리한 검출은 여전히 복잡하고 시간 소모적이고, 현장 진료 병원체 및 질병 진단을 위한 직접적 RNA 검출의 주요 과제이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 핵산 증폭의 필요없이 RNA를 신속하고 민감한 검출을 위한 방법 및 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 비싸고 및/또는 작동이 복잡한 장비의 필요없이 RNA를 쉽게 검출하기 위한 방법 및 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 병원균의 검출을 위한 방법 및 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 상기한 목적을 달성하기 위하여, 샘플의 RNA를 검출하기 위한 방법과 물질을 개시한다. 몇몇 형태에서, 본 발명의 방법은, (a) 샘플과 프로브 어레이를 접촉시키는 단계, (b) 프로브 어레이와 RNA/DNA 하이브리드에 대한 특정 리보뉴클레아제 (RNase H)를 접촉시키는 단계, (c) 프로브 어레이, 표지 뉴클레오타이드, 및 DNA 템플릿을 사용하여 RNA 가닥(strand)을 연장할 수 있고 상기 RNA 가닥의 연장에 표지 뉴클레오타이드를 혼입할 수 있는 핵산 중합효소(클레오우 조각 DNA 중합효소)를 접촉시키는 단계, 및 (d) 연장된 핵산 가닥의 표지 뉴클레오타이드를 검출하는 단계를 포함한다.

[0015] 상기 프로브는 하나 또는 하나 이상의 키메라 프로브(chimeric probe)를 포함한다. 상기 키메라 프로브는 DNA 영역과 RNA 영역을 포함하고, DNA 영역과 RNA 영역은 인접하며, DNA 영역은 RNA 영역의 5'이다. 키메라 프로브는 제2 DNA 영역을 포함 할 수 있다. 제2 DNA 영역 또한 RNA 영역과 인접 할 수 있고, RNA 영역의 3'일 수 있다. 상기 샘플이 키메라 프로브들 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 RNA 분자를 포함하는 경우, 그 RNA 분자는 상보적인 키메라 프로브와 혼성화될 것이다. 몇몇 형태에서는, 샘플과 프로브 어레이의 접촉 단계(단계 (a)), 프로브 어레이와 리보뉴클레아제의 접촉(단계 (b)), 및 프로브 어레이, 표지 뉴클레오타이드 및 핵산 분해효소들의 접촉 단계(단계 (c))들이 동시에 수행된다.

[0016] 본 발명의 방법에서, 샘플의 RNA 분자들은 상보적 서열을 가진 키메라 프로브들로 혼성화할 수 있다. 키메라 DNA 프로브의 영역에 하이브리드화된 RNA 분자의 일부는 RNA/DNA 하이브리드에 대한 특정 리보뉴클레아제에 의해 분해된다. 그리고나서 하이브리드된 RNA 분자는 연장된 핵산 가닥을 형성하기 위하여 연장될 수 있고, 상기 키메라 프로브는 템플레이트로 역할을 한다. 표지를 위하여, 적어도 하나의 표지 뉴클레오타이드는 상기 연장된 핵산 가닥에 통합된다. 표지 뉴클레오타이드는 제1 표지를 포함한다. 키메라 프로브와 프로브에 혼성화한 키메라 RNA 분자 사이의 서열 관계 때문에, 연장된 핵산 가닥의 표지 뉴클레오타이드의 검출은 샘플의 RNA 분자의 존재를 나타낸다.

[0017] 본 발명의 방법의 어떤 형태에서는, 라벨링과 검출이 제1라벨의 라벨링에 의해 향상될 수 있다. 이 것은 예를 들면 프로브 어레이와, 표지 접합체(conjugate)를 접촉시킴으로써 달성될 수 있고, 상기 표지 접합체는 특정 결합분자와 제2표지를 포함하고, 특정 결합분자는 제1표지에 결합한다. 상기 연장된 핵산 가닥의 표지 뉴클레오타이드는 제2표지를 검출함으로써 검출된다. 제1표지와 표지 접합체의 유용한 조합의 일례는 바이오틴(biotin)이다. 제1표지로서 바이오틴과 표지 접합체로서 스트렙타비딘(streptavidin)-접합 금나노입자이다. 이 예에서, 상기 스트렙타비딘은 제1표지(바이오틴)에 결합되는 특정 결합분자이고, 금나노입자는 제2표지이다. 제2표지 또는 제2표지의 국위에 응집(aggregate)할 수 있는 다른 접합체를 사용함으로써 그 부위에서 제2표지의 양이 증가되고, 검출 감도를 증가시키고 검출을 더 쉽게 한다. 이 것은 프로브 어레이와 검출 접합체를 접촉함으로써 달성될 수

있고, 상기 검출 집합체는 응집체(aggregator)를 포함하고, 응집체는 표지 집합체 상에 검출 집합체의 응집을 매개한다. 제2표지와 검출 집합체의 유용한 조합의 일례는 제2표지로서 금 나노입자와 검출 집합체로서 은 나노입자이다. 이 예에서 은 나노입자는 응집체이다. 은 나노입자는 금 나노입자와 반응하여 금 나노입자 부위에 은 나노입자를 축적한다. 상기 반응된 은 나노입자들의 응집은 육안으로 충분히 검출할 수 있다.

[0018] 진료시점에서 RNA 바이러스와 같은 병원체의 신속하고 정확한 검출은 적합한 환자 치료 및 생명 구제를 허용할 것이다. 상기 개시된 RNA 마이크로칩은 역전사와 PCR 증폭없이 RNA를 곧바로 검출할 수 있다. 개시된 마이크로칩은 나노입자-지원 신호 증폭을 사용할 수 있다. 상기 개시된 마이크로칩 기술은 간단하고 정확하며 단일-뉴클레오타이드 차이를 구별할 수 있다. 일부 형태에서, RNA는 1시간 이내에 민감하게 검출될 수 있고, 그 신호는 육안으로 검출될 수 있다. 영단 판독 형식과 단순함은 치료와 최소 자원분야에서 상기 개시된 RNA 마이크로칩이 신속하고 정확한 병원체의 검출에 적합하게 한다.

[0019] 또한 상기 개시된 기술은 단일 또는 복수 소스에서 어떠한 RNA나 RNA 조합을 검출할 수 있고 분석하는 데 사용될 수 있다. 예를 들면, 그 기술은 세포와 시료의 RNA 발현 패턴을 검출하는 데 사용될 수 있다. 다른 예로서, 프로브 어레이는 뉴클레오타이드 서열 특성, 예를 들면, 바이러스, 박테리아, 또는 미생물의 서열 특성에 보완적인 하나 또는 하나 이상의 키메라 프로브를 포함할 수 있다. 상기 뉴클레오타이드 서열 특성의 검출은 대응하는 바이러스, 박테리아 또는 미생물의 존재를 나타낸다.

[0020] 개시된 방법은 키메라 프로브가 프로브 어레이로서 고정화되는 고상의 기관을 사용함으로써 도움을 받을 수 있다. 라벨이 검출된 위치에서 키메라 프로브 서열이 알려지므로, 특정 키메라 프로브의 위치는 검출된 RNA 분자의 확인을 제공한다. 프로브 어레이의 복수의 다른 키메라 프로브를 포함함으로써, 복수의 다른 RNA 분자가 검출될 수 있다. 프로브 어레이상의 동일한 위치의 상이한 RNA 분자에 특정된 다른 키메라 프로브들을 그룹화함으로써, 관련 RNA 분자들이 집합적으로 검출될 수 있다. 이것은 예를 들어, 가변 서열을 가진 표적들의 검출을 단순화할 수 있게 한다.

[0021] 어떤 형에서 키메라 프로브들이 안정화될 수 있다. 안정화된 키메라 프로브들과 같은 핵산은 핵산의 품질 저하를 방지하는 개량된 뉴클레오타이드를 사용할 수 있다. 유용한 개량 뉴클레오타이드의 예들은 2'-O-메틸 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 형에서는, 키메라 프로브는 키메라 프로브의 고정을 허용하거나 편리하게 하거나 매개하는 또한 3'-연결기를 포함할 수도 있다. 예를 들면, 상기 3'-연결기는 아미노기일 수 있다.

[0022] 또한 프로브 어레이가 개시된다. 본 발명의 방법에 사용되는 프로브 어레이는 개시된 키메라 어레이를 하나 또는 하나 이상 포함할 수 있다. 또한 키트가 개시된다. 본 발명의 방법에 사용되는 키트(kit)는 하나의 프로브 어레이, 표지 뉴클레오타이드 및 표지 집합체, 여기에 개시된 모든 것을 포함한다. 상기 키트는 RNA/DNA 하이브리드(예, RN아제 수소), DNA 템플레이트를 사용하는 RNA 가닥을 연장할 수 있고 상기 RNA 가닥의 연장부의 표지 뉴클레오타이드를 결합할 수 있고 또는 양자가 가능한 핵산 중합효소(예, 클레노우 절편 DNA 중합효소)에 특정되는 리보핵산 분해효소를, 그리고/또는 대안적으로, 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명에 개시된 방법과 조성물의 추가적인 장점들은 후속하는 발명의 상세한 설명에서 부분적으로 설명되고, 이해될 것이다. 또한 상기 장점들은 본 발명에 개시된 방법과 조성물의 실시예에 의해 이해될 것이다. 본 발명에 개시된 방법과 조성물의 추가적인 장점들은 특허청구범위에 특히 지적된 요소들과 조합들에 의해 이해되고 획득될 것이다. 전술의 일반적인 설명과 후술하는 상세한 설명들은 예시적이고 설명을 위한 것이고 청구된 본 발명의 권리를 제한하는 것은 아니다.

[0024] 후속하는 첨부도면들은 본 발명의 방법과 조성물의 몇가지 실시예들을 설명과 함께 보여주고 본 발명의 방법과 조성물의 기본 원리를 설명하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 나노입자-지원 신호 증폭을 사용하여 본 발명의 RNA 마이크로칩과 RNA 육안 검출의 예들을 보여준다. RNA의 신속하고 직접적인 검출의 플로우차트가 보여준다. RNA 프로브는 표적 RNA와 하이브리드화되고(hybridized), RN아제 수소 분해와 클레노우 연장과 바이오틴-표지의 결합이 뒤따른다. 스트렙타비딘-결합 Au-NPs는 바이오틴에 결합하고 그리고 나서 바이오틴 표지를 Au-NP 표지로 변환한다. Au-NPs는 Au-NP 형성과 응집을 육안 또는 확대경을 이용한 검출을 위하여 결정화한다.

도 2A는 마이크로칩상의 단일-뉴클레오타이드 식별로써 RNA 직접 검출을 보여준다. 위에서 아래의 순서로, 서열은 SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, 서열번호 SEQ ID NO:10, SEQ ID

NO:11, SEQ ID NO:15, and SEQ ID NO:11의 뉴클레오타이드이다. 신호 스팟의 크기는 약 75미크론이고, 이 크기는 육안(또는 확대경)으로 보이는 크기이다. 모든 신호 스팟들은 이 것 그리고 다른 RNA마이크로칩상에서 유사한 크기를 가진다.

도 2B, 2C, 2D, 2E, 2F는 RNA 마이크로칩과 RNA 육안검출을 보여준다. (B)는 바이오티네이트된(biotinated) dNTPs의 부존재에서 RNA 검출. (C)는 RNA의 부존재(네거티브 컨트롤). (D)는 천연 dNTPs의 사용(네거티브 컨트롤). (E) RNA와 바이오티네이트된(biotinated) dNTPs의 부존재에서 RNA 검출. (F) 단일-뉴클레오타이드 식별로써 RNA 검출. 신호 스팟(약 75미크론)은 육안(또는 확대경)으로 보인다. 모든 신호 스팟들은 상기 그리고 다른 RNA 마이크로칩상에서 유사한 크기를 가진다.

도 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F는 개시된 RNA 마이크로칩의 일례와 함께 특이성과 각 mRNA 검출을 보여준다. RNA 마이크로칩은 RNA 프로브로써 고정되었다. BF, AF, *LacZ* 및 BA 프로브들은 조류 독감(BF) RNA, 조류 독감(AF) RNA, *LacZ* RNAs 및 탄저균(*Bacillus anthracis*) (BA) RNA를 각각 검출한다. 표적 RNAs는 바이오티-표지 dNTPs를 표적 RNAs에 특이적으로 결합함으로써 검출되었다. (A) 샘플은 BA RNA를 포함한다. (B) 샘플은 *LacZ* 및 BA RNAs를 포함한다. (C) 샘플은 BF, AF 및 *LacZ* RNAs를 함유한다. (D) 샘플은 상기의 모든 RNAs를 함유한다. (E) 총 RNA에서 개별 RNA (*LacZ* mRNA)의 검출. Chip I: 물(RNA 없음; 네거티브 컨트롤); Chip II: IPTG-유도된 *E.Coli*에서 고립된 총 RNA (*LacZ* 함유); Chip III: 글루코오스-억제 *E.Coli*에서 고립된 총 RNA (*LacZ* 함유). (F) *E.Coli*의 NaOH 직접 처리에 의한 단순 RNA 샘플 제작을 통한 각 RNA(*LacZ* mRNA)의 검출. Chip I: 물(RNA 없음; 네거티브 컨트롤); Chip II 및 Chip III: 각각 NaOH 처리된 IPTG-유도 그리고 글루코오스-억제 *E.Coli*.

도 4는 프로브 고정의 일례로서 글라스 마이크로칩 표면의 활성화를 보여준다. 표면 화학은 아민 수정된 키메라 프로브들의 고정화를 가능하게 한다.

도 5A, 5B, 5C, 5D, 및 5E는 개시된 RNA 마이크로칩의 일례로서 민감하고 신속한 RNA 검출을 보여준다. (A)는 민감한 검출. Chip 1-5는 0, 5, 15 및 50fmol의 *LacZ* mRNA를 각각 함유한다. (B)는 RN아제 수소 및 클레노우 단계의 고려를 통한 RNA 검출. (C)는 하이브리드화, RN아제 수소 및 클레노우 단계(통합된 단계를 위한 15분 인큐베이션)의 고려를 통한 RNA 검출. (D) 신속한 RNA 검출(45분 이내, RNA 샘플 제작 포함). Biotined-oligo-35.2(네거티브 컨트롤); BA 프로브(네거티브 컨트롤)은 *E.Coli* RNAs를 검출하지 않는다. (E) IPTG-유도 세포들이 70% 에탄올로써 0, 30, 45 및 60분 동안 처리된 후, *E.Coli* RNAs(*LacZ* RNA)의 검출. 글루코오스-억제 *E.Coli* 세포(Glu)들은 네거티브 컨트롤로서 사용되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026]

이하, 본 발명의 방법 및 조성물은 실시예들과 예의 상세한 설명과 도면 및 앞의 그리고 후속 설명을 참조하여 더욱 쉽게 이해될 것이다.

[0027]

마이크로 어레이 기술은 세포 군의 특이적 mRNAs의 분석을 위한 강력한 도구를 제공한다. DNA 마이크로 어레이의 유용성은 처리 시간을 증가시키는 RNA의 간접 분석뿐만 아니라, 다수의 편향과 인공산물에 의해 제한된다. RNAs가 쉽게 품질저하되고, RNA 혼합물에서 특정 RNA를 표지하는 것이 어려워 RNA를 직접 검출하는 것은 여전히 도전이다. 직접적이고, 신속하고, 사용하기 쉽고, 특이적이고, 빠르며, 비용적인 면에서 효율적이고, 민감한, 병원균 및 바이러스 RNA 검출용 마이크로칩이 개시된다. 뉴클레아제, 중합효소 및 나노 물질을 이용하여, 특이적 RNA를 역전사없이 검출 할 수 있다. 본 발명에 개시된 기술은 예컨대 감염성 질병의 진단, 식품 안전, 유전자발현 프로파일링 및 암 검출을 포함하는 분야의 광범위한 어레이에서 특정 mRNA를 검출하고 분석하기 위해 사용될 수 있다.

[0028]

어떤 형태에서는, 상기 개시된 mRNA 검출 시스템은 간단하다: RNA 마이크로칩에 대한 표적 RNA 하이브리드화는 RNA 프로브로써 고정된 후(Spencer et al., *ChemBioChem*, 11, 1378 (2010)), 결합된 RNAs는 RN아제 수소로써 분해되고 클레노우(Klenow) DNA 중합효소에 의해 바이오티-지표 dNTPs로써 연장된다. 스트렙타비딘과 나노입자(Ag-NP)의 접합체를 사용하여, 표적 RNAs에 결합된 바이오티 표지들은 Au-NP 표지로 변환된다. 상기 Au-NP는 은 염색(staining)을 통하여 은 나노입자(Au-NP)의 형성을 결정화할 수 있다(Taton et al., *Science*, 289, 1757 (2000); Cao et al., *Biosens Bioelectron*, 22, 393 (2006); Qi et al., *Anal Bioanal Chem*, 398, 2745 (2010); Tang et al., *Diagn Microbiol Infect Dis*, 65, 372 (2009); Zhou et al., *J Am Chem Soc*, 132, 6932 (2010)), 신호 증폭을 100배까지 허용한다. 상기 형성된 Ag-NPs(도 1 및 2)는 RNA 프로브 부위에 검은 스팟으로 응집되고 축적된다. 최종적으로, 이들 검은 스팟의 어레이의 이미지는 직접 육안 관찰을 위하여 형성된다. 또, 우리는 이 RNA 마이크로칩이 단일 뉴클레오타이드 차이를 차별화할 수 있고 낮은 fmole 농도에서 RNA를 검출할 수

있음을 알게 되었다. RNA 검출 시스템은 우리의 RNA 3'-표지화 접근에 기초하고, DNA 중합효소는 표지화된 dNTPs를 DNA 템플레이트 상의 RNA안에 직접 통합한다(Huang and Alsaiddi, *Analytical Biochemistry*, 322, 269 (2003); Alsaiddi et al., *ChemBioChem*, 5, 1136 (2004)). 직접 RNA를 검출하기 위하여, 우리는 기능화된 RNAs를 RNA 프로브로 설계한다. RNA 프로브는 RNA 3'-영역과 DNA 5'-영역(도 1 및 2)으로 구성된다.

[0029]

샘플의 RNA를 검출하기 위한 방법과 물질이 개시된다. 어떤 형태에서, 상기 방법은 다음을 포함한다. (a) 샘플과 프로브 어레이를 접촉시키는 단계, (b) 상기 프로브와 RNA/DNA에 특이적인 리보뉴클리아제를 접촉시키는 단계, (c) 프로브 어레이, 표지 뉴클레오타이드 및 DNA 템플레이트를 사용하여 RNA 가닥을 연장할 수 있고 RNA 가닥에서 연장된 표지 뉴클레오타이드를 통합할 수 있는 핵산 중합효소(클레오우 절편 중합효소)를 접촉시키는 단계, (d) 연장된 핵산 가닥의 표지 뉴클레오타이드를 검출하는 단계. 상기 프로브 어레이는 하나 또는 하나 이상의 키메라 프로브를 포함한다. 상기 키메라 프로브는 DNA 영역과 RNA 영역을 포함하고, DNA 영역과 RNA 영역은 인접하며, DNA 영역은 RNA 영역의 5'이다. 상기 샘플이 키메라 프로브들 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 RNA 분자를 포함하는 경우, 그 RNA 분자는 상보적인 키메라 프로브와 혼성화될 것이다. 키메라 프로브는 키메라 프로브의 고정용 허용하거나 편리하게 하거나 매개하는 또한 3'-연결기를 포함할 수도 있다. 예를 들면, 상기 3'-연결기는 아미노기일 수 있다.

[0030]

본 발명에 개시된 방법 및 조성물은 특정 합성 방법, 특정 분석 기술에 한정되지 않거나 달리 명시되지 않으면 특정 반응제에 한정되지 않고 다양하게 변화될 수 있다. 또한 여기서 사용된 기술은 단지 특정 실시예를 설명하기 위한 목적이고 그 실시예를 한정할 의도는 아니다.

[0031]

물질(Materials)

[0032]

사용될 수 있고, 결합에 사용될 수 있으며, 제조에 사용될 수 있는, 물질, 조성물, 및 성분들이 개시되거나, 본 발명의 개시된 방법 및 조성물의 산물이 개시된다. 이들 및 다른 물질은 여기에 개시되고, 이들 물질을 조합, 부분 집합, 상호 작용, 그룹이 개시될 때, 이들 화합물의 각각의 다양한 개별적인 그리고 집단적인 조합과 순열의 특정 기준이 명시적으로 개시될 수 없을 때, 여기에서 각각 구체적으로 고려되고 설명된다. 예컨대, 키메라 프로브가 개시되고 논의되며, 키메라 프로브를 포함하는 많은 분자들로 만들어질 수 있는 많은 수정들이 논의될 때, 특별히 달리 언급하지 않는 한 키메라 프로브와 상기 가능한 수정들의 각각 그리고 모든 조합과 순열이 구체적으로 고려된다. 분자 A, B, 및 C의 클래스 뿐만 아니라 분자 D, E 및 F의 클래스가 개시되고 조합 분자 A-D의 예가 개시되면, 각각의 개별적으로 인용되지 않는 경우에도, 각각은 개별적으로 그리고 집합적으로 논의된다. 그리하여, 이 예는, 조합 A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E 및 C-F의 각각은 구체적으로 논의되고 A, B, 및 C; D, E, 및 F; 및 조합 A-D의 예의 개시로부터 개되는 것을 고려되어야 한다. 또, 위에서 고려되고 개시되는 상기 각 물질, 조성물, 성분 등은 그 물질의 그룹, 서브 그룹, 목록, 세트에 포함되거나 제외될 수 있다. 이러한 개념은 개시된 조성물을 사용하고 만드는 방법의 단계들을 포함하는, 그러나 반드시 이에 한정하지 않는다, 본 특허출원의 모든 형태에 적용된다. 그리하여, 수행될 수 있는 다양한 추가적인 단계들이 있다면, 이들 추가적인 단계들의 각각은 개시된 방법의 어떠한 특정 실시예 또는 실시예들의 조합으로써 수행될 수 있고, 각 조합은 구체적으로 논의되고 개시되는 것을 고려되어야 하는 것이 이해된다.

[0033]

A. 키메라 프로브(Chimeric Probes)

[0034]

키메라 프로브들은 시퀀스-특정 방식으로 RNA 분자에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)이다. 키메라 프로브는 DNA 영역과 RNA 영역을 포함하고, DNA 영역과 RNA 영역은 인접하며, DNA 영역은 RNA 영역의 5'이다. 어떤 형태에서는, 키메라 프로브가 제2DNA영역을 포함할 수도 있다. 어떤 형태에서는, 상기 제2DNA 영역이 RNA 영역과 인접할 수 있고 RNA영역의 3'일 수 있다. 개시된 방법에서 키메라 프로브는 RNA분자에 존재하는 상보적인 서열에 기초하는 RNA 분자들을 포착하기 위하여 사용된다. 상기 키메라 프로브의 DNA 영역(들)은 키메라 프로브와 관심의 RNA 분자 사이에 RNA/DNA 혼성화의 형성을 허용한다. 이는 RNA/DNA 혼성체의 RNA 가닥이 RN아제와 같은 RNA/DNA 혼성-특이적 리보핵산분해효소에 의해 선택적으로 분해되게 한다.

[0035]

개시된 방법에서 키메라 프로브의 기능을 가능하게 하기 위해, 모든 또는 키메라 프로브의 RNA 영역에 인접한 DNA 영역의 전체 또는 일부분과 키메라 프로브의 DNA 영역에 인접한 RNA 영역의 전부 또는 일부분은 관심의 RNA 분자내의 인접한 서열에 상보적이다. 즉, 키메라 프로브의 RNA 영역과 DNA 영역의 연결에 걸처진 키메라 프로브의 뉴클레오타이드 서열은 관심의 RNA 분자내의 서열에 상보적이다. 이는 RNA 분자의 일부분을 키메라 프로브의 RNA 영역에 혼성화 하는 것을 허용하고 다른, RNA 분자의 인접하는 부분을 키메라 프로브의 DNA 영역(들)에 혼성화하는 것을 허용한다. 상기 혼성화된 RNA 분자의 부분은 키메라 프로브의 RNA 영역과 DNA 영역의 연결에 걸처질 것이다.

- [0036] 키메라 프로브는 또한 스페이서, 링커, 키메라 프로브를 기관에 접합하는 연결기 및 추가적인 핵산 영역을 포함한다. 이러한 추가 성분은 적합한 목적을 위해, 예를들면 키메라 프로브의 생산 또는 취급을 도와주고 프로브 어레이를 형성하는 기관상에 키메라 프로브를 고정화하는 데 도와주기 위해서 사용될 수 있다. 어떤 추가적인 성분들은 키메라 프로브들이 만들어지는 방법의 산물일 수 있다. 키메라 프로브의 이러한 추가 성분의 성질은 개시된 방법의 키메라 프로브의 기능에 중요하지 않다. 필요한 모든 것은 키메라 프로브가 관심의 RNA 분자에 혼성화 할 수 있는 것과 본 발명의 방법의 효소들이 상기 하이브리드에 작용할 수 있다는 것이다.
- [0037] 키메라 프로브는, 그리고 바람직하게는, 기관 상에 고정화될 수 있다. 키메라 프로브는 천연 뉴클레오타이드로 구성될 필요는 없다. 변형된 뉴클레오타이드, 비 천연 염기 및 뉴클레오타이드 및 올리고 뉴클레오타이드 유사체가 사용될 수 있다. 필요한 모든 것은 프로브가 본 명세서에 설명된 일반적인 구조를 가지며, 본 발명의 방법에서 요구되는 상호 작용과 반응할 수 있어야 한다는 것이다. 특히, 키메라 프로브는 안정화된 핵산일 수 있다. 여기에서 사용된 안정화된 핵산은 핵산을 덜 분해하고 또는 덜 절단하는 천연 핵산에 대하여 하나 이상의 변형을 포함하는 핵산이다.
- [0038] 키메라 프로브의 고정화를 가능하게 하거나 매개하기 위해, 키메라 프로브는 3'-연결기를 포함할 수 있다. 여기에서 사용된 바와 같이, 3'-연결기는 기관에 부착되게 하거나 기관에의 부착을 매개하는 기 또는 잔기(moiety)이다. 예를 들어, 3'-연결기는 아미노기일 수 있다.
- [0039] 키메라 프로브는 바람직하게는 상보적 부분(프로브 부분이라 한다)과 상기 프로브 부분이 기관에 결합되는 링커 부분을 포함한다. 이들 링커 부분들은 임의의 적합한 구조를 가질 수 있고 일반적으로 키메라 프로브의 고정화 또는 합성의 방법에 기초하여 선택된다. 상기 링커 부분은 뉴클레오타이드로 구성되거나 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 편의를 위하여 그리고 달리 나타나지 않으면, 키메라 프로브의 길이에 대한 기준은 프로브의 프로브 부분의 길이를 말한다. 고정화된 키메라 프로브들은 지지체에 고정된 키메라 프로브들이다.
- [0040] 키메라 프로브는 프로브 서열, 예를 들면, 다양한 표적 RNA 분자를 갖는 다양한 세트에 사용될 수 있다. 예를 들면, 키메라 프로브의 세트는 집합적으로 병원체 세트에 특이적인 RNA 서열에 상보적일 수 있다. 상기 키메라 프로브는 각 프로브가 같은 길이를 갖는 세트에 사용될 수 있다. 상기 키메라 프로브의 상보적 부분의 바람직한 길이는 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, and 30 뉴클레오타이드이다. 키메라 프로브의 RNA 영역의 상보적 부분은 바람직하게는 DNA/RNA 하이브리드에서 RNA 분자의 서열이 분해될 때 안정된 하이브리드와 표적 RNA 분자와 하이브리드를 형성하기에 충분하다. 키메라 프로브의 RNA 영역의 상보적 부분에 대한 바람직한 길이는, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20 뉴클레오타이드이다.
- [0041] 키메라 프로브는 천연 뉴클레오타이드로 구성될 필요는 없다. 변형된 뉴클레오타이드, 비 천연 염기 및 뉴클레오타이드 및 올리고 뉴클레오타이드 유사체가 사용될 수 있다. 필요한 모든 것은 프로브가 본 명세서에 설명된 일반적인 구조를 가지며, 본 발명의 방법에서 요구되는 상호 작용과 반응할 수 있어야 한다는 것이다. 키메라 프로브의 DNA 영역은 디옥시리보핵산으로 구성될 수 있다. 뉴클레오타이드의 변형된 형태는, RNA 영역의 DNA 영역 5'와 RNA 분자 사이의 하이브리드가 DNA/RNA 하이브리드-특이적 리보뉴클리아제용 기관으로서 인식되고 사용되는 한, 뉴클레오타이드 변형된 형태는 사용될 수 있다. 변형된 인 연결은 이 변형 범주에 속할 수 있다.
- [0042] 키메라 프로브의 RNA 영역은 디옥시리보핵산으로 구성될 수 있다. 뉴클레오타이드의 변형된 형태는, RNA 영역이 표적 RNA 서열에 혼성화할 수 있고, RNA 영역과 RNA 분자 사이의 하이브리드가 DNA/RNA 하이브리드-특이적 리보뉴클리아제용 기관으로서 인식되지 않고 사용되는 한, 뉴클레오타이드 변형된 형태는 사용될 수 있다. 유도체화된 2'-하이드록시 및 변형된 인 연결은 이 변형의 범주에 속할 수 있다. 예를 들면, 프로브의 RNA 영역의 하나 또는 하나 이상의 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸리보뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0043] 여기에서 사용되는 리보뉴클레오타이드는 2' 하이드록실 기능을 가진 뉴클레오타이드이다. 유사하게, 2'-데옥시리보뉴클레오타이드는 단지 2' 수소를 가진 뉴클레오타이드이다. 따라서, 여기에서 사용되는 리보뉴클레오타이드와 디옥시리보뉴클레오타이드는 천연적으로 발생하고 아데노신, 구아노신, 시티딘 및 우리딘, 또는 2'-디옥시아데노신, 2'-디옥시구아노신, 2'-디옥시시티딘, 및 티미딘을 각각 화학적 변형없이 가지는 뉴클레오타이드이다.
- [0044] **B. 프로브 어레이(Probe Arrays)**
- [0045] 다른 키메라 프로브들이 셋로서 함께 사용될 수 있다. 그 세트는 상기 프로브, 별도의 반응에서 별도로 사용되는 또는 어레이에 고정화된 프로브의 전부 또는 서브세트의 혼합체로서 사용될 수 있다. 별도로 사용되거나 혼합체로서 사용되는 프로브들은 예컨대, 제1라벨, 분류 태그, 또는 비드(bead)상에 고정화를 통하여 물리적으로 분리될 수 있다. 프로브 어레이(여기서는 어레이라고 함)은 상기 어레이상의 식별화된 또는 소정의 위치에 고정

화된 키메라 프로브와 같은 복수의 프로브를 포함한다. 이와 관련하여, 복수의 프로브들은 각각 다른 서열을 가진 복수의 프로브들을 말한다. 어레이상의 각 소정의 위치는 프로브의 일 형태 (즉, 그 위치의 모든 프로브들은 동일한 서열을 가진다)를 가진다. 각 위치는 프로브의 복수의 카피들을 가진다. 어레이내의 다른 서열의 프로브의 공간적인 분리는 프로브에 하이브리드화하는 RNA 분자의 개별적 검출 및 식별을 가능하게 한다. RNA 분자가 프레브 어레이내의 정해진 위치에서 검출되면, 그것은 핵산 절편내의 절편이 하이브리드화된 그 부위에 인접한 서열이 그 어레이 내의 그 위치에서 고정된 프로브에 상보적임을 나타낸다.

[0046]

프로브 어레이에 사용하기 위한 고상 기관은, 올리고 뉴클레오티드가 직접적으로 또는 간접적으로 결합 될 수 있는 임의의 고체 상태의 재료를 포함 할 수 있다. 이것은, 예컨대 아크릴아미드, 셀룰로오스, 니트로셀룰로오스, 유리, 실리콘, 폴리스틸렌, 폴리에틸렌비닐아세테이트, 폴리프로필렌, 폴리메타크릴레이트, 폴리에틸렌, 폴리에틸렌옥사이드, 유리, 폴리실리케이트, 폴리카보네이트, 테프론, 플루오르카본, 나일론, 실리콘 고무, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 폴리오르토에스테르, 폴리프로필푸머레이트, 콜라겐, 글리코사미노글리칸 및 폴리아미노산 등의 물질을 포함한다. 상기 고상 기관은 박막 또는 멤브레인, 비이드, 병, 접시, 섬유, 직물 모양의 고분자 입자와 미세 입자를 포함한 모든 유용한 형태를 가질 수 있다. 고체상 기관에 바람직한 형태는 실리콘 칩, 유리 슬라이드, 및 마이크로타이터 접시이다. 고체상태 기관에 올리고뉴클레오티드의 고정화하는 방법은 잘 확립되어 있다. 키메라 프로브는 확립된 결합 방법을 사용하여 기관에 결합될 수 있다. 부착방법의 예들은 예를 들면 에폭시 실란 또는 이소시아네이트 코팅된 유리에 부착될 수 있는, 아미노-변형 올리고뉴클레오티드; 예를 들어, 아미노 또는 아미노페닐 유도화된 유리에 부착할 수 있는 숙시닐화된 올리고 뉴클레오티드; 예를 들어, 메르캅토실란화된 유리에 부착할 수 있는 이황화 변형된 올리고뉴클레오티드; 및 예를 들어, 알데히드 또는 에폭사이드에 부착될 수 있는 하이드라진;을 포함한다. 예들의 적합한 부착방법은 통합 DNA 기술, "Strategies for Attaching Oligonucleotides to Solid Supports" (2011); Guo *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 22:5456-5465 (1994); Pease *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(11):5022-5026 (1994); Khrapko *et al.*, *Mol Biol (Mosk) (USSR)* 25:718-730 (1991); Stimpson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6379-6383 (1995); U.S. Patent No. 5,871,928 to Fodor *et al.*; U.S. Patent No. 5,654,413 to Brenner; U.S. Patent No. 5,429,807; 및 U.S. Patent No. 5,599,695 to Pease *et al.*에 설명되어 있다.

[0047]

주어진 프로브 어레이는 단일 유닛 또는 구조인 것이 바람직하지만 반드시 요구되는 것은 아니다. 프로브 세트는 임의의 수의 고체 지지체 위에 제공될 수 있다. 예를 들면, 하나의 극단적인 예에서, 각 프로브는 분리된 반응튜브내 또는 용기 내에서 고정화될 수 있다. 분류 태그는, 이 것은 분류 태그를 가지고 있지 않는 화합물 또는 복합물에서 분류 태그를 가진 화합물 또는 복합체를 분류 또는 분리하는 데 사용될 수 있는 화합물이다, 복수 파트 프로브 어레이의 부분의 분리된 다른 그룹을 분류하고 분리하는 데 사용될 수 있다.

[0048]

어레이 내의 프로브도 유사한 하이브리드 안정성을 가지도록 설계될 수 있다. 이는 보다 효율적으로 프로브 키메라 RNA 분자의 혼성화하고 혼성화 불일치의 발생을 감소시킬 것이다. 프로브의 하이브리드 안정성은 공지 열역학 공식 및 원리를 사용하여 계산 될 수 있다 (Santa Lucia *et al.*, *Biochemistry* 35:3555-3562 (1996); Freier *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9373-9377 (1986); Breslauer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3746-3750 (1986) 참조). 프로브의 하이브리드 안정성은, 예를 들면, 화학적으로 프로브를 변형함으로써 더욱 유사하게 (하이브리드 안정성 평활화로 지칭될 수 있는 공정) 만들어 질 수 있다 (Nguyen *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25(15):3059-3065 (1997); Hohsisel, *Nucleic Acids Res.* 24(3):430-432 (1996)). 하이브리드 안정성은 또한 특별화된 조건하에 혼성화를 수행하여 평활화될 수 있다 (Nguyen *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 27(6):1492-1498 (1999); Wood *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82(6):1585-1588 (1985)).

[0049]

프로브의 하이브리드 안정성을 평활화하는 또 다른 방법은 프로브의 길이를 변화시키는 것이다. 이는 각 프로브의 하이브리드 안정성의 조정을 허용하여 모든 프로브가 유사한 하이브리드 안정성을 가진다(가능한 범위). 프로브에서 단일 뉴클레오티드의 추가 또는 삭제는, 고정된 증분만큼 프로브의 하이브리드 안정성을 변경하기 때문에, 프로브 어레이에서 프로브의 하이브리드 안정성이 동일하지 않는 것으로 이해된다. 이러한 이유로, 본 명세서에서 사용되는 하이브리드 안정성은 프로브의 하이브리드 안정성의 유사성의 증가를 의미한다 (또는 다른 방법으로, 프로브의 하이브리드 안정성에서 차이의 감소). 하이브리드 안정성의 증가된 유사성은 키메라 프로브의 하이브리드화 및 결합도의 효율과 충실도를 개선할 수 있으므로 유용하다.

[0050]

키메라 프로브의 샘플 절편에 대한 하이브리드화 및 결합의 효율은 다른 하이브리드화 조건을 받을 수 있는 프로브 어레이의 섹션 또는 조각에서의 유사한 하이브리드 안정성을 가진 키메라 프로브를 그룹지움으로써 개선될 수 있다.

- [0051] 이러한 방식으로, 하이브리드화 조건은 프로브의 특정 계층을 위하여 최적화될 수 있다.
- [0052] **C. 샘플**
- [0053] 본 발명의 방법은 어떠한 소스를 형성하는 어떠한 RNA 분자를 검출하고 분석하는 데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명을 위한 RNA 분자와 RNA 분자를 포함하는 샘플의 소스는 광범위하다. 보 sqkfaud에서 일반적으로 사용되는 샘플은 RNA 분자를 포함하고 있거나 포함할 수도 있는 임의의 샘플일 수 있다.
- [0054] 어떤 소스에서의 모든 샘플은 본 발명의 방법으로 사용될 수 있다. 적합한 표적 샘플의 예로는 세포 샘플, 조직 표본, 세포 추출물, 요소 또는 시료로부터 정제된 다른 분획, 환경 시료, 배양 샘플, 조직 샘플, 체액 및 조직 검사 샘플을 포함한다. 샘플들의 다수의 다른 소스는 공지되어 있거나 개발 될 수 있고, 임의의 개시된 방법으로 사용될 수 있다. 개시된 방법에 사용하기에 바람직한 샘플은 세포 및 조직의 샘플이다.
- [0055] **R. 표지 뉴클레오티드(Labeled Nucleotides)**
- [0056] 개시된 방법은 연장된 핵산 가닥에 통합된 라벨("제1표지")을 사용한다. 본 발명의 방법에서, 이 결합은 상기 가닥의 연장 동안에 표지 뉴클레오티드의 통합에 의해 달성된다. 중합된 핵산에 통합을 위한 표지 뉴클레오티드는 공지되어 있고 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 어떠한 표지와 어떠한 표지 뉴클레오티드(핵산 중합효소에 의해 통합될 수 있는)도 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명의 방법은 일반적으로 표지 쌍의 멤버인 제1표지를 사용한다. 표지 상은 서로 결합되거나 상호작용하는 화합물의 쌍이다. 바이오틴과 스트렙타비딘과 항체 및 그의 합프텐(hapten)들이 표지쌍의 예들이다. 제1표지들은 바람직하게는 하나의 표지 쌍(표지 쌍의 다른 멤버는 표지 접합체안의 특이적 결합분자로서 사용되어야 한다)의 하나의 멤버이다. 표지 쌍들과 제1표지들은 제1표지로서 표지되고 유도화된 뉴클레오티드가 핵산 중합효소에 의해 합성된 핵산 가닥에 통합될 수 있도록 선택될 수 있다. 유용한 표지 뉴클레오티드는 바이오틴화된 핵산, 다이옥시제닌 함유 뉴클레오티드, 디니트로페놀-함유 뉴클레오티드, 브로모다이옥시우리딘(bromodeoxyuridine), 형광 뉴클레오티드(형광물질 함유 뉴클레오티드)를 포함한다.
- [0057] 제1표지는 본 발명의 방법에서 연장된 핵산 가닥안에 통합되고 특이적 결합 분자들이 연합할 수 있는 분자 또는 모이에티(moieties)이다. 제1 표지들은 특정 결합분자 연합을 위한 표적으로 역할을 할 수 있는 분자 또는 모이에티의 어떠한 타입일 수 있다.
- [0058] **E. 표지 접합체(Lable Conjugates)**
- [0059] 표지 접합체는 제2표지를 연장된 핵산 가닥에 통합된 표지 뉴클레오티드에 연합하기 위하여 사용된다. 표지 접합체는 RNA 분자 간의 브릿지로서 역할을 하고, 검출하고 검출 접합체가 검출을 위한 신호를 증가시키기 위해 사용 된 그들은 서브. 표지 접합체가 특이 적 결합 분자와 제 표지 접합체이다. 표지 접합체의 특이 적 결합 분자와 연합 또는 첫 번째 표지에 바인딩 선택된다. 표지 접합체의 제2표지와 연합 또는 검출 복합체에 결합하기 위해 선택된다. 표지 접합체는 임의의 구조 및 개시된 방법에 표지 접합체의 기능과 일치하는 임의의 추가 구성요소를 가질 수 있다.
- [0060] 본원에서 사용되는, 특이 적 결합은 분자의 특정 분자 또는 잔기와 특이 적 상호 작용하는 분자이다. 특이적인 결합 분자와 특이 적 상호 작용하는 분자 또는 잔기를 표적 분자로 지칭된다. 일반적으로, 표지는 제 개시된 방법의 맥락에서 표적 분자이다. 이 용어는 표적 분자는 모두 별개의 분자와 같은 특이 적 결합 분자와 특이 적 상호 작용 단백질의 에피토프와 같은 분자의 일부를 의미하는 것이 이해되어야 한다. 항체, 수용체/리간드 쌍의 부제, 및 특이 적 결합 친화력을 가진 다른 분자들 중 하나는 리포터 분자의 결합 친화 부로서 유용한 특이 적 결합 분자의 예이다.
- [0061] 임의의 특이적인 결합 분자는 개시 표지 접합체에 사용될 수 있다. 그러나, 본 방법은 일반적으로는 특정 표지 쌍의 구성원 인 분자 결합을 이용한다. 특이적인 결합 분자는 바람직하게는 표지 쌍 (표지 쌍 중 다른 부제가 제1표지로 표기)의 한 구성원이다. 표지 및 특이 적 결합 쌍 분자가 대응하는 제1표지로 표지 또는 유도체 화 뉴클레오티드 핵산 중합 효소에 의해 합성되는 핵산 가닥에 통합 될 수 있도록 선택 될 수 있다. 특정 결합 분자는 표지 접합체의 일부 첫 번째 표지에 연결할 수 있는 분자 또는 부분이다. 선택하는 특정 결합 분자는 스트렙타비딘, 디그 옥시 제닌, 특이 항체, 니트로 페놀-특이 항체, 브로 모데 옥시 우리 딘 특정 항체 및 형광 특정 항체를 포함한다.
- [0062] 특정 표적 분자에 특이 적으로 상호 작용하는 특이적인 결합 분자가 해당 표적 분자에 특이적인 것으로 알려져 있다. 특이적인 결합 분자는 특정 항원에 결합하는 항체 인 예를 들면, 특이적인 결합 분자는 그 항원에 특이적

인 것으로 알려져 있다. 항원은 대상 분자이다. 특이적인 결합 분자를 포함하는 표지 접합체는 또한 특정 제1표지로서 특정 표적 분자에 특이적인 것으로 언급 될 수 있다. 특이적인 결합 분자는 바람직하게는 항체, 리간드 결합 단백질, 수용체 단백질, 합텐, 압 타머, 탄수화물, 합성 폴리 아미드, 또는 올리고 뉴클레오티드이다.

[0063] 유용한 항체, 예를 들어, 특이적 결합 분자, 제1표지 및 표지 제2표지는 시판 또는 잘 확립된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. Johnstone and Thorpe, *Immunochemistry In Practice* (Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, 1987)는 클론 및 단클론 모두 항체를 생산하는 데 유용 일반적인 방법을 설명한다. 일반적으로 책은 분석 시스템에서 항체의 사용을 위해 많은 일반적인 기법과 원칙에 대해 설명한다.

[0064] 어떤 표지도 제2표지로서 사용할 수 있다. 제2표지는 표지 접합체의 일부가되는 검출 접합체가 연결할 수 있는 분자 또는 부분이다. 제2표지는 검출 공액 연합의 대상으로 될 수 있는 분자 또는 잔기의 임의의 타입일 수 있다. 바람직하게는, 제2표지는 중재 또는/및 표지 접합체에서 검출 접합체의 집계를 할 수 있다. 선호하는 제2표지 금, 금 나노 입자 및 기타 금 접합체를 포함한다.

[0065] F. 검출 접합체

[0066] 검출 접합체 혼성화하고 연장 RNA 분자에 검출 신호를 연결하기 개시된 방법에 사용된다. 검출 복합체와 연관 또는 표지 접합체에서 두 번째 표지에 결합한다. 검출 접합체 포함하거나 임의의 신호를 생성 할 수 있다. 바람직하게는, 검출 접합체는 다중 검출 접합체 검출하기가 더 쉽다 효과에 두 번째 표지를 중심으로 집계. 검출 접합체 표지의 여러 사본도 포함 할 수 있도록 한 검출 복합 동료 표지 복합체 많은 표지 협회.

[0067] 집계는 임의의 적절한 방식으로 달성 될 수 있다. 예를 들어, 제 2 표지는 여러 검출 접합체와 연관 또는 제 표지에 결합 할 수 있도록 선택 될 수 있다. 검출 접합체 협회, 결합, 공유 결합, 또는 화학 반응, 예를 통해 할 수 있다. 대안으로, 또는 부가 적으로, 검출 접합체 자기 집계체이다. 검출 접합체의 집계는 응집체를 통해 할 수 있다. 응집체는 하나의 표지 접합체로 또는 연관 결합 할 수 있는 화합물 여러 개이다.

[0068] 유용한 검출 접합체 은나노 입자이다. 두 번째 표지로 금 나노 입자와 함께 사용하면, 은 나노 입자는 금 나노 입자에 집계과 반응. 예를 들어, 은은 감소 은은 금 표면에 축적되게 금의 존재가 감소 할 수 있다.

[0069] G. 표지

[0070] 표지는 검출 된 신호를 생성하는데 사용될 수 있다. 표지는 직접 또는 간접적으로, 직접 또는 간접적으로 포함 되거나 확장 핵산 가닥, 표지 접합체 또는 검출 접합체에 혼입 될 수 있는 임의의 분자이며, 측정, 검출 신호가 발생한다. 이 성분에 공유적 또는 비공유적 중, 결합되거나 결합 될 때 표지 부품과 관련된다. 이 공유 구성 요소에 결합 될 때 표지 부품에 결합된다. 핵산과로 통합에 커플 링, 또는 협회에 대한 많은 적절한 표지가 알려져 있다. 개시된 방법에 사용하기에 적합한 표지의 예는 방사성 동위 원소, 형광 분자, 인광 분자, 생물 발광 분자, 효소, 항체 및 리간드이다

[0071] 적합한 형광 표지의 예는 -4, 형광물질 (FITC), 5,6- 디 카르복시 형광물질, 텍사스 레드, 니트로벤젠-2- 옥사 -1,3- 다이아졸-4- 일 (NBD), 쿠마린, 단실 클로라이드, 로다 민을 포함 6-디아미디노-2-페닐이노돌(DAPI) 및 시아닌 염료 인 Cy3, Cy3.5, Cy5에, Cy5.5 및 Cy7. 바람직한 형광 표지 (5-카복시 -N-히드 록시 에스테르) 및 로다 민 (5,6-테트라 메틸 로다 민)을 형광된다. 동시 검출을위한 바람직한 형광 표지는 FITC와 시아닌 염료 인 Cy3, Cy3.5, Cy5에, Cy5.5 및 Cy7가 있다. 흡수와 방출 최대, 각각이 루어 위한 것이다: FITC (490 내지 520 nm), Cy3에 (554 나노 미터, 568 nm), Cy3.5 (581 나노 미터, 588 nm), Cy5에 (652 나노 미터 : 672 nm) , Cy5.5 (682 내지 703 nm) 및 Cy7 (755 내지 778 나노 미터)에 따라서 그들의 동시 검출을 허용한다. 형광 표지는 분자 프로브, 유진, 또는/및 리서치 오가닉, 오하이오 주 클리블랜드 포함한 상업 다양한 소스로부터 획득 될 수 있다.

[0072] 이들은 직접 합성 중에 핵산 내로 혼입 될 수 있기 때문에 표지 표지 된 뉴클레오티드의 형태가 바람직하다. DNA 또는 RNA에 통합될 수 있는 표지의 예들은 뉴클레오티드 유사체, 예를 들면 as BrdUrd (Hoy and Schimke, *Mutation Research* 290:217-230 (1993)), BrUTP (Wansick *et al.*, *J. Cell Biology* 122:283-293 (1993)) 및 바이오티드로(Langer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6633 (1981)) 또는 디고시제네과 같은 적합한 헵 텐으로써(Kerkhof, *Anal. Biochem.* 205:359-364 (1992)) 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 적합한 형광물질-표지 뉴클레오티드는 형광물질-이소시아네이트-dUTP, 시아닌-3-dUTP 및 시아닌-5-dUTP이다(Yu *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 22:3226-3232 (1994)). DNA에 대한 바람직한 뉴클레오티드 유사체 검출 표지는 BrdUrd (BUDR triphosphate, Sigma), 및 RNA를위한 바람직한 뉴클레오티드 유사체 검출 표지는 비오티 16 우리 딘 -5'- 트리 포스페이트 (비오티 16 dUTP를, Boehringer 만하임)이다. 플루오 레세 인, 인 Cy3, Cy5에과는 직접 표지 된

dUTP를 위해 연결될 수 있다. Cy3.5 및 Cy7는 바이오틴 또는 제닌 표지 프로브의 차 검출을 위한 아비딘 또는 항-디그 옥시 제닌 접합체로 사용할 수 있다.

[0073] 바이오틴 등의 핵산에 포함되는 표지, 이어서 당 업계에 공지된 방법을 이용하여 민감한 검출 할 수 있다. 디 나 트륨, 3- (4- 메톡시시피로- : 예를 들면, 바이오틴, 바이오틴에 결합하고 이어서 예를 들어 적절한 기재 (화학 발 광 기질 CSPD의 화학 발광에 의해 검출 된 스트렙타비딘-알칼리성 포스파타제 결합체 (트로픽스 사)를 사용하여 검출 될 수 있다 [1,2??디옥세탄 3-2 '- (5'- 클로로) 트리 시클로 [3.3.1.1^{3,7}] 데칸] -4- 일) 페닐 포스페이 트; 트로픽스 사).

[0074] 다른 표지 분자 또는 금속 바코드 질량 표지를 포함하고, 핵 자기 공명, 전자 스핀 공명, 표면 강화 라만 산란, 표면 플라스몬 공명, 형광, 인광, 화학 발광, 공명 라만, 마이크로파, 또는 이들의 조합에 의해 검출 표지. 질 량 표지, 또는 표지 구성 요소, 질량 분석에 특유의 질량 서명을주는 화합물 또는 부분이다. 질량 분광법은 검 출을 위해 사용되는 경우 질량 표지 유용하다. 바람직한 대량 표지 펩타이드 핵산 및 탄수화물이다. 표지의 조 합도 유용할 수 있다. 예를 들어, 예를 들어, 색을 갖는 인코딩 된 마이크로 비드는, 표지 (265)의 독특한 조합 은, 다수의 구성 요소를 구별하는데 유용하다. 예를 들어, 256 개의 상이한 키 메릭 프로브는 고유 표지 및 개 시된 방법 멀티플렉싱 및 자동화를 가능하게 검출 할 수 있다.

[0075] 유용한 표지에 설명되어 드 하스 외., "시간-분해 현미경 인광 표지로 플래티넘 포르피린," *J. Histochem. Cytochem.* 45(9):1279-92 (1997); Karger 및 Gesteland "전하 결합 소자 카메라를 사용하여 DNA 시퀀싱 말의 디지털 화학 발광 이미징". *Nucleic Acids Res.* 20(24):6657-65 (1992); Keyes et al.; "DNA의 전체 내부 역 학은 다섯 원자 닿는 스핀 표지에 의해 모니터링으로". *Biophys. J.* 72(1):282-90 (1997); Kirschstein et al., "Detection of the DeltaF508 mutation in the CFTR gene by means of time- resolved fluorescence methods," *Bioelectrochem. Bioenerg.* 48(2):415-21 (1999); Kricka, "Selected strategies for improving sensitivity and reliability of immunoassays," *Clin. Chem.* 40(3):347-57 (1994); Kricka, "Chemiluminescent and bioluminescent techniques," *Clin. Chem.* 37(9):1472-81 (1991); Kumke et al., "Temperature and quenching studies of fluorescence polarization detection of DNA hybridization," *Anal. Chem.* 69(3):500-6 (1997); McCreery, "Digoxigenin labeling," *Mol. Biotechnol.* 7(2):121-4 (1997); Mansfield, et al., "Nucleic acid detection using non-radioactive labeling methods," *Mol. Cell Probes* 9(3):145-56 (1995); Nurmi, et al., "A new label technology for the detection of specific polymerase chain reaction products in a closed tube," *Nucleic Acids Res.* 28(8):28 (2000); Oetting et al. "Multiplexed short tandem repeat polymorphisms of the Weber 8A set of markers using tailed primers and infrared fluorescence detection," *Electrophoresis* 19(18):3079-83(1998); Roda et al., "Chemiluminescent imaging of enzyme-labeled probes using an optical microscope-videocamera luminograph," *Anal. Biochem.* 257(1):53-62 (1998); Siddiqi et al., "Evaluation of electrochemiluminescence- and bioluminescence- based assays for quantitating specific DNA," *J. Clin. Lab. Anal.* 10(6):423-31 (1996); Stevenson et al., "Synchronous luminescence: a new detection technique for multiple fluorescent probes used for DNA sequencing," *Biotechniques* 16(6):1104-11 (1994); Vo-Dinh et al., "Surface-enhanced Raman gene probes," *Anal. Chem.* 66(20):3379-83 (1994); Volkers et al., "Microwave label detection technique for DNA in situ hybridization," *Eur. J. Morphol.* 29(1):59-62 (1991).

[0076] 금속 바코드, 분자 바코드의 형태, 400-4000 nm의 다층 멀티 금속 봉에 의해 30 ~ 300 나노 미터의 직경이다. 이 막대는 알루미늄이나 금형에 전착으로 구성되어, 다음 알루미늄나 뒤에이 작은 다층 개체를 떠나 제거된다. 이 시 스템은 최대 12 개의 영역이 금속은 다른 반사율이 때문에 금속에 따라 광학 현미경에 밝거나 어둡게 보일 최대 7 개의 다른 금속에, 인코딩 할 수 있다; 이것은 사실상 무제한의 식별 코드로 이끈다. 금속 바아는 유리 또는 다른 재료, 및 당 업계에 공지된 방법을 이용하여 유리에 부착 된 프로브로 코팅 될 수 있다; 분석 판독 대상 에서 형광에 의해, 그리고 프로브의 ID는 바코드의 광의 명암 패턴에서이다.

[0077] 검출 표지에 의해 생성 된 신호들을 측정하는 방법은 공지되어 있다. 예를 들어, 방사성 동위 원소는 섬광 계수 또는 직접적인 시각화에 의해 검출 될 수 있다; 형광 분자는 형광 분광 광도계로 검출 할 수 있다; 인광 분자는 분광 광도계로 검출 또는 직접 카메라에 시각화 될 수 있다; 효소는 검출 또는 효소에 의해 촉매 반응의 생성물 의 시각화에 의해 검출 될 수 있다; 항체는 항체에 결합 된 이차 검출 표지를 검출함으로써 검출될 수 있다. 이 러한 방법은 증폭 및 검출 방법에 개시된 직접 사용될 수 있다. 본 출원에 사용 된 바와 같이, 검출 분자 증폭 핵산 어느 하나 이상의 검출 표지가 연결되어 상호 작용하는 분자이다. 검출의 또 다른 형태에서, 표지는 상이 한 형광, 인광, 화학 발광이나 발광 수명을 통해 시간적으로 구별 될 수 있다. 다중화 경시- 검출은 Squire et

al., J. Microscopy 197(2):136-149 (2000), 및 WO 00/08443에 설명되어 있다.

[0078] 표지의 양 또는 세기의 정량적 측정을 사용할 수 있다. 예를 들어, 정량은 주어진 표지, 이렇게 표지 된 성분은, 임계 레벨 또는 양에 존재 하는지를 결정하는데 사용될 수 있다. 문턱 레벨 또는 양을 어느 원하는 레벨 또는 신호의 양이고, 수행되는 방법의 특정 형태의 필요에 따라 선택 될 수 있다.

[0079] 금속 바코드, 분자 바코드의 형태, 400-4000 nm의 다층 멀티 금속 봉에 의해 30 ~ 300 나노 미터의 직경이다. 이 막대는 알루미늄이나 금형에 전착으로 구성되어, 다음 알루미늄이나 뒤에이 작은 다층 개체를 떠나 제거된다. 이 시스템은 최대 12 개의 영역이 금속은 다른 반사율이 때문에 금속에 따라 광학 현미경에 밝거나 어둡게 보일 최대 7 개의 다른 금속에, 인코딩 할 수 있다; 이것은 사실상 무제한의 식별 코드로 이끈다. 금속 바아는 유리 또는 다른 재료, 및 당 업계에 공지 된 방법을 이용하여 유리에 부착 된 프로브로 코팅 될 수 있다; 분석 판독 대상에서 형광에 의해, 그리고 탐침의 ID는 바코드의 광의 명암 패턴에서이다.

[0080] 검출 표지에 의해 생성 된 신호들을 측정하는 방법은 공지되어 있다. 예를 들어, 방사성 동위 원소는 섬광 계수 또는 직접적인 시각화에 의해 검출 될 수 있다; 형광 분자는 형광 분광 광도계로 검출 할 수 있다; 인광 분자는 분광 광도계로 검출 또는 직접 카메라에 시각화 될 수 있다; 효소는 검출 또는 효소에 의해 촉매 반응의 생성물의 시각화에 의해 검출 될 수 있다; 항체는 항체에 결합 된 이차 검출 표지를 검출함으로써 검출 될 수 있다. 이러한 방법은 증폭 및 검출 방법에 개시된 직접 사용될 수 있다. 본원에 사용 된 바와 같이, 검출 분자 증폭 핵산 어느 하나 이상의 검출 표지가 연결되어 상호 작용하는 분자이다. 검출의 또 다른 형태에서, 표지는 상이한 형광, 인광, 화학 발광이나 발광 수명을 통해 시간적으로 구별 될 수 있다. 다중화 경시- 검출은 Squire et al., J. Microscopy 197(2):136-149 (2000), 및 WO 00/08443에 설명되어 있다.

[0081] 표지의 양 또는 세기의 정량적 측정을 사용할 수 있다. 예를 들어, 정량은 주어진 표지, 이렇게 표지 된 성분은, 임계 레벨 또는 양에 존재 하는지를 결정하는데 사용될 수 있다. 문턱 레벨 또는 양을 어느 원하는 레벨 또는 신호의 양이고, 수행되는 방법의 특정 형태의 필요에 따라 선택 될 수 있다.

[0082] H. 리보뉴클레아제

[0083] 개시된 방법은 키메라 DNA 프로브의 영역 (들)에 혼성화되는 RNA 분자의 부분을 저하/DNA 하이브리드 RNA 특정 리보핵산분해효소를 사용한다. RNA/DNA 하이브리드에 따라 임의의 리보핵산분해효소는 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 선호하는 리보핵산분해효소는 잘 특성화 된 RN아제 수소(EC 3.1.26.4)이다. 의 RN아제 수소 활성이 최적으로 7.5과 9.1 사이에서 이루어지는 pH에서 달성된다 (Berkower et al., J Biol Chem 248:5914-5921 (1973))를 감소시키는 시약의 존재의 RN아제 수소 활성이 N-에틸 말레이 미드 (SH 기와 반응 화학)의 존재 하에서 억제되고, 현저하게 높은 이온 강도 (50 % 활성은 0.3 M의 NaCl의 RN아제 수소의 존재하에 유지된다 영향을 받지는 Mg²⁺ + 이온을 필요,의 Mn²⁺ + 이온에 의해 부분적으로 대체 될 수 있다.

[0084] I. 핵산 중합 효소

[0085] 개시된 방법 우리 핵산 폴리머 라 아제는 프라이머에 혼성화 키메라 RNA 분자의 말단을 연장. 임의의 적합한 핵산 중합 효소가 DNA 템플릿을 사용하여 RNA 가닥을 연장 할 수 있고, RNA 가닥으로부터 연장에 표지 뉴클레오티드를 혼입 할 수 있는 것을 사용할 수 있다. 대부분의 DNA 중합 효소는 이러한 요구 사항을 만족시킨다. 바람직한 DNA 중합 효소 5 '내지 3'엑소 뉴 클레아 제 활성이 부족하다. 유용한 핵산 중합 효소로서는 클레 나우 단편 (DNA 폴리머 라제 I의 대형 단편)를 포함한다 (Jacobsen et al., Eur. J. Biochem. 45:623-627 (1974)), T4 DNA polymerase (Kaboord and Benkovic, Curr. Biol. 5:149-157 (1995)), and modified T7 DNA polymerase (Tabor and Richardson, J. Biol. Chem. 262:15330-15333 (1987); Tabor and Richardson, J. Biol. Chem. 264:6447-6458 (1989); SequenaseTM (U.S. Biochemicals)). Other useful nucleic acid polymerases include bacteriophage 29 DNA polymerase (U.S. Patent Nos. 5,198,543 and 5,001,050 to Blanco et al.), phage M2 DNA polymerase (Matsumoto et al., Gene 84:247 (1989)), phage 2PRD1 DNA polymerase (Jung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8287 (1987)), VENT[®] DNA polymerase (Kong et al., J. Biol. Chem. 268:1965-1975 (1993)), T5 DNA polymerase (Chatterjee et al., Gene 97:13-19 (1991)), PRD1 DNA polymerase (Zhu and Ito, Biochim. Biophys. Acta. 1219:267-276 (1994)), T7 DNA polymerase (Studier et al., Methods Enzymol. 185:60-89 (1990)), DEEP VENT[®] DNA polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA), Thermus flavus DNA polymerase (MBR, Milwaukee, WI), 및 the Stoffel fragment of Taq DNA polymerase (Lawyer et al., PCR Methods Appl. 2(4):275-287 (1993), King et al., J. Biol. Chem. 269(18):13061-13064 (1994)).

[0086]

J. 안정화된 핵산

[0087]

개질된 올리고 리보 뉴클레오타이드는 효과적인 프로브, 프로브 키메라를 작동 할 수 있고, 프로브 어레이는보다 안정적 일 수 있으며, 더 긴 유효 기간을 갖고 있지만 프로브 핵산 변형을 사용하여 안정화 된 경우. 화학적 변형은 크게 키메라 프로브 클레아 제 내성을 강화하는 제조 될 수 있다. 일반적으로, 이러한 변형은 키메라 프로브 뉴클레오타이드의 2 '위치에 만들고, 키메라 프로브 뉴클레오타이드 간 포스페이트 결합 될 수 있다. 예를 들어, 하나 또는 키메라 프로브의 염기 이상의 가능한 핵산의 합성 방법을 사용하여 2 '메 톡시 리보 뉴클레오타이드, 포스 포로 티오 에이트 데 옥시 리보 뉴클레오타이드 또는 리보 뉴클레오타이드 포스 포로 티오 에이트 일 수 있다. 변형 된 뉴클레오타이드 및 올리고 뉴클레오타이드, 및 그들의 합성 방법은 공지되어 있다. **이들 중 일부는** Offensperger *et al.*, *EMBO J.*, 12:1257-1262 (1993); WO 93/01286 by Rosenberg *et al.*; Agrawal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:7079-7083 (1988); Sarin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:7448-7794 (1989); Shaw *et al.*, *Nucleic Acids Res*, 19:747-750 (1991); Orson *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19:3435-3441 (1991); Paolella *et al.*, *EMBO J.*, 11:1913-1919 (1992); Pieken, *et al.*, *Science*, 253:314-317 (1991); Heidenreich and Eckstein, *J. Biol. Chem*, 267:1904-1909 (1992); WO 91/17093 by Hybridon, Inc.; EP 0339842 by Ajinomoto Co., Inc.; WO 95/23225 by Ribozyne Pharmaceuticals, Inc.; WO 94/15619 by Johns Hopkins University; and U.S. Patent 5,334,711 to Sproat *et al.*에 설명된다.

[0088]

뉴클레오타이드, 올리고 뉴클레오타이드, 키메라 및 프로브, 알킬 또는 알킬 그룹을 수정하는 데 사용 치환체를 설명함에 있어서의 직쇄, 분지 쇠 및시 클릭 알킬기를 포함하여 포화 지방족 탄화수소를 의미한다. 이러한 사용을 위해 그러한 알킬기는 1 내지 12 개의 탄소를 갖는 것이 바람직하다. 그것은 더 이러한 알킬기는 1 내지 6 개의 탄소를 갖는 것이 바람직하다. 그것은 더욱 이러한 알킬기 1 내지 2 개의 탄소를 갖는 것이 바람직하다. 그것은 대부분의 알킬 기는 탄소수 1을 갖는 것이 바람직하다. 이들 알킬기는 하나 이상의 하이드 톡실 그룹, 하나 이상의 아미노기 또는 둘 모두를 포함 할 수 있다. 이러한 하이드 톡실 및 아미노 그룹은 알킬 그룹에있는 탄소 원자에 결합 될 수 있다. 본원에서 사용 된 용어 하이드 톡실 알킬은 하나 이상의 히드록시기를 포함한 알킬기를 지칭하는데 사용되는 용어 아미노 알킬은 하나 이상의 아미노 그룹을 포함하는 알킬기를 지칭하는데 사용되며, 하이드 톡실 아미노 알킬을 지칭하는데 사용된다 하나 이상의 하이드 톡실 그룹 및 하나 이상의 아미노 그룹을 포함하는 알킬 기이다. 본원에 사용 된 바와 같이, 아릴 또는 알릴 그룹은 직쇄, 분지 쇠, 및 사이 클릭 알릴기를 포함한 불포화 지방족 탄화수소를 의미한다. 이 사용이이를 알릴 기는 1 내지 12 개의 탄소를 갖는 것이 바람직하다. 그것은 더 알릴 기는 1 내지 6 개의 탄소를 갖는 것이 바람직하다. 그것은 더욱 알릴 기는 2-3 개의 탄소를 갖는 것이 바람직하다. 그것은 가장 알릴 기는 3 개의 탄소를 갖는 것이 바람직하다. 다른 치환체는 또한 뉴클레오타이드, 올리고 뉴클레오타이드 및 아릴 벤질기를 의미 아릴, 알카 릴 및 아릴 알킬, 본원에 기재된 키메라 프로브를 수정하는데 사용될 수 있다, 알카 릴은 아릴기로 치환 된 알킬기를 의미하며, 아릴은 말한 다 알킬기로 치환 된 아릴 기이다.

[0089]

뉴클레오타이드, 올리고 뉴클레오타이드 및 키메라 프로브를 참조하여 용어 수정 본원에 사용은 기존의 뉴클레오타이드 및 올리고 뉴클레오타이드에 뉴클레오타이드 또는 올리고 뉴클레오타이드 상대의 화학적 차이를 의미한다. 용어 변형의 사용은 본원에서 변형 된 뉴클레오타이드, 올리고 뉴클레오타이드, 키메라 및 프로브를 제조하는 방법을 제한하지 않는다. 유사하게, 뉴클레오타이드, 올리고 뉴클레오타이드, 또는 키메라 프로브에 화학기를 대체 참조는 통상의 뉴클레오타이드 및 올리고 뉴클레오타이드 뉴클레오타이드 또는 올리고 뉴클레오타이드 상대의 화학적 차이를 의미한다, 그리고 방법을 제한하지 않는 뉴클레오타이드, 올리고 뉴클레오타이드 내의 키메라 또는 프로브 생산된다.

[0090]

3 '5'에서 수정이 종료 : 그것은 잘 올리고 뉴클레오타이드 유사체의 저하는 3'- 엑소 뉴 클레아 제에 주로 기인하는 것으로 설명되어 있다. 몇몇 연구는 다양한 3'-수정이 크게 이러한 유사의 클레아 제 민감성을 감소시킬 수 있음을 증명하고 있다. ... 3435-3441 : 따라서, 다른 방법은 3 감수성을 줄이기 위해 키메라 프로브의 말단 히드 록 그룹 '의 엑소 뉴 클레아 제하면 3 무료 아민의 소개'(예, 올슨 등, *Nucl 산 해상도*, 19, 참조 (1991)). 또 다른 유용한 3 (3 ')에 결합'말단 변형은 결합하도록 3 키메라 프로브의 티민 염기 끝 '. 이러한 구조는 3'-3'- 티민 염기 또는 T (3'-3 '이라고 칭함).

[0091]

바람직한 3 키메라 프로브의 수산기 등 -H, -O-R1, -NH2, -NH-R1, -N-R12, F 등과 같은 화학기로 치환 '변형이 3 곳들이다'-3 ' -nucleotide, 각각의 R1은 독립적으로, 하이드 톡실 알킬, 아미노 알킬, 하이드 톡실 알킬, 알릴, 각 R2는 독립적으로 O, S, F, 알킬, 하이드 톡시, PR2 (O) -R2, 또는 PR2 (S)를 -R2, 알킬 곳 알킬, 아미노 알킬, 하이드 톡실 알킬, 알릴, O-R3, 또는 S-R3, 및 R3은 각각 독립적으로, 하이드 톡시 알킬, 아미노 알킬, 하이드 톡실 아미노 알킬, 알킬 또는 알릴된다. 본원에 사용 된 바와 같이, 3 키메라 프로브의 3 '말단 뉴클레오타이드의 리보스 잔기의 탄소'키메라 프로브 히드 정상적으로 3에 존재할 것이다 수산기를 의미한다. '

본원에 사용 된 바와 같이, 3 키메라 프로브의 3 '말단 뉴클레오타이드의 리보스 잔기의 탄소'키메라 프로브의 탄소를 의미 3 '.

[0092] 이 5 것이 바람직하지만 '키메라 프로브의 단부가 수산기 또는 포스페이트기를 가지고, 5'말단은 클레아에 키메라 프로브의 저항을 증가시키기 위해 변경 될 수 있다. 바람직한 5 키메라 프로브의 수산기 등 -H, -O-R4, -NH₂, -NH-R4, -N-R4₂, 및 F, 각각의 R4와 같은 화학기로 치환 '변형들이다 5 곳'은 독립적으로, 하이드 록시 알킬, 아미노 알킬, 하이드 록실 아미노 알킬, 알릴 알킬되고, -PR₅ (O) -R₅ 또는 각 R₅는 독립적으로 PR₅ (S) -R₅, O, S, F, 알킬, 하이드 록시 알킬, 아미노 알킬, 하이드 록실 아미노 알킬, 알릴, O-R₆, 또는 S-R₆, 및 여기서 R₆ 각각은 독립적으로 알킬, 히드 록시 알킬, 아미노 알킬, 하이드 록실 알킬, 또는 알릴. 본원에 사용 된 바와 같이, 5 인산기가 정상적으로 장착 될되는 키메라 프로브의 5 '말단 뉴클레오타이드의 리보스 잔기의 탄소'키메라 프로브 히드 정상적으로 5에 존재할 것이다 히드 지칭 '. 본원에 사용 된 바와 같이, 5 키메라 프로브의 5 '말단 뉴클레오타이드의 리보스 잔기의 탄소'키메라 프로브의 탄소를 의미 5 '. 또 다른 유용한 변형은, 예를 들면, ((펜타 메틸렌 브릿지를 사용) 참조 5 '말단 포스페이트, 예컨대 아 크리 딘 유도체 등 인터 제의 공유 결합이며, 마 헤르 등, 사이언스 245 :. 7백25부터 7백30까지 (1989); Grigoriev 등, J. BIOL 화학, 267 :. 3,389부터 3,395까지 (1992))...

[0093] 다양한 세포 내와 세포 외 클레아 제의 활성화에 중요한 것으로 밝혀졌다 염기의 리보오스 부분의 OH 그룹 : 2 ' 화학 수정의 또 다른 유용한 클래스는 2의 변형이다 뉴클레오타이드의 위치'에 수정. 및 2'- 플루오과 2'- 아미노 올리고 뉴클레오타이드 (Pieken, ET : 전형적인 2 '변형 (. 1913년에서 1919년까지 (1992) Paolella 등, EMBO J., 11) 2'-O- 메틸 올리고 뉴클레오타이드의 합성 아르 등, 과학, 253 : 314-317 (1991) Heidenreich 및 Eckstain, J. BIOL 화학, 267 :.. 1,904에서 1,909 사이 (1992)). 키메라 프로브는 (DNA 영역 (들)) 데 옥시 리보 뉴클레오타이드를 포함한다. 그러나, 사용되는 리보핵산분해효소는 (2)에 비치 환 수소 필요로하는 범위 "RNA/DNA 하이브리드를 인식하는 위치에, 2 '변형 RNA 영역의 5'인 해당 키메라의 프로브 DNA 영역의 뉴클레오타이드에 사용되어서는 안된다 .

[0094] 바람직한 2 염기의 수산기 등 -H, -O-R₇, -NH₂, -NH-R₇, -N-R₇₂, F 등과 같은 화학기로 치환 '변형이 2 곳들이 다'-2 '를 각 R₇은 독립적으로 알킬 뉴클레오타이드, 히드 록시 알킬, 아미노 알킬, 하이드 록실 알킬, R₈은 각각 독립적으로 알릴, PR₈ (O) -R₈, 또는 PR₈ (S) R₈, O, S, F, 알킬, 하이드 록시 알킬, 아미노 알킬, 하이드 록 실 알킬, 알릴, R₉-O, 또는 S-R₉, 및 여기서 각 R₉는 독립적으로 알킬, 히드 록시 알킬, 아미노 알킬, 하이드 록실 알킬, 또는 알릴. 더 바람직한 2 염기의 수산기 등 -H, O-CH₃, -NH₂, -NH-CH₃, -N- (CH₃)₂, F, OCH₂- 같 은 화학기로 치환 '변형이 2 곳들이다'는 CH = CH₂, OPO (O) -CH₃, 및 OPO (S) -CH₃. 염기의 수산기 -O-CH₃로 대체 가장 바람직한 2 '2 곳 수정은'가.

[0095] 인산염 결합 수정 : 키메라 뉴클레오타이드 프로브에 연결 인산기로 변형도 클레아에 키메라 프로브의 저항을 향 상시키기 위해 사용될 수 있다. 이러한 목적을위한 전형적인 변형은 하나 이상의 자유 산소 원자 또는 황 할로 겐의 양을 대체 포함한다. 자유 산소 원자, 또는 황 원자는 존재한다면, 또한 알킬, 하이드 록시 알킬, 아미노 알킬, 하이드 록실 알킬, 또는 알릴 기 등의 화학 물질에 연결될 수 있다. 이러한 (3)의 사용 '및/또는 5'dihalophosphonate 뉴클레오타이드 치환 (예를 들어, 3 '및/또는 5'-CF₂-포스 치환 뉴클레오타이드) 등의 치환, 예를 들면, WO 23,225분의 95에 기재되어 있다. 키메라 프로브에 사용하기 위한 연결기 바람직한 변성 인산 OPR₁₀ 포함 (O) O-, -OPR₁₀ (S) O-, 및 -OPO R₁₀은 알킬, 하이드 록시 알킬, 아미노 알킬, 하이드 록실 아미노 알킬 (S) O-, 알릴 , -O-R₁₁, NH₂, -NH-R₁₁, -N-R₁₁₂, 또는 F, 각 R₁₁는 독립적으로, 하이드 록시 알킬, 아미 노 알킬, 하이드 록실 아미노 알킬, 알킬 또는 알릴된다. 더 키메라 프로브에 사용하기 위한 연결기 변성 포스 페이트 OPR₁₂ 포함 바람직 (O) O-, OPR₁₂ (S) O-, 및 R₁₂는 -CH₃, -O-CH₃, OCH₂-CH₃이고 -OPO (S) O-, = CH₂, NH₂, -NH-CH₃, N- (CH₃)₂, 또는 키메라 F. 프로브에 사용하기에 가장 바람직한 변성 포스페이트 연결기 일반적 포스라고 OPO (S) O-이다.

[0096] 또 다른 유용한 수정은 순서에 존재할 수 있는 시토신 염기의 메틸화이다. 키메라 프로브/RNA 분자 하이브리드 의 안정성은 RNA 분자에 강한 염기 쌍으로 올리고 결과 변형 된 뉴클레오타이드를 사용하여 증가 될 수 있다. 예 를 들어, C-5 프로피 닐 피리 미드 뉴클레오타이드는 핵산 간의 수소 결합을 증가 (Froehler 등, 사면체 문자 33 :. 5,307에서 5,310까지 (1992)).

[0097] 상기 변형은 변형 된 키메라 프로브 키메라 결과 및/또는 이들의 조합에서 키메라 프로브의 제한된 영역에서 사 용될 수 있다. 키메라 프로브의 특정 영역 인한 핵산 중합 효소에 의한 리보핵산분해효소 및 DNA 영역에 의해 RNA/DNA 하이브리드 영역의 인식을위한 요건에 다른 것보다 더 많은 변형 의무가있다. 예를 들면, 2'-O- 메틸

뉴클레오타이드가 개시된 방법에 영향을주지 않고 프로브 키메라 RNA의 영역에 도입 될 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[0098] **K. 올리고 뉴클레오타이드 합성**

[0099] 키메라 프로브 및 다른 올리고 뉴클레오타이드는 확립 된 올리고 뉴클레오타이드 합성법으로 합성 할 수 있다. 방법은 올리고 뉴클레오타이드 또는 생산은 당 업계에 잘 알려져있다 합성한다. 이러한 방법은 염기 조각 분리 한 다음 표준 효소 소화에 이르기까지 다양 할 수 있다 (예를 들어, 참조, 샘 블록 등, 분자 클로닝 : 실험실 설명서, 제 2 판 (콜드 스프링 하버 연구소 출판부, 콜드 스프링 하버, 뉴욕, 1989) 5 장, 6) 예를 들어 Milligen 또는 베크 시스템 IPlus DNA 합성기를 사용하여 시아 노 에틸 포스의 방법으로, 예를 들어 순수하게 합성 방법, (예, Milligen-Bioscience, 벨링턴, MA 또는 ABI 모델 380B)의 모델 8700 자동 합성기. 올리고 뉴클레오타이드를 만들기위한 유용한 합성 방법은 이쿠타 등의 알에 의해 설명되어 있다. 앤. 목사 BIOCHEM. 53 : 3백23에서 3백56까지 (1984), (포스 포트리 에스테르 및 포스 파이트 트리 에스테르 방법), 그리고 나랑 등, 방법 Enzymol 65 : 6백10에서 6백20까지 (1980), (포스 포트리 에스테르 방법). 단백질 핵산 분자는 그러한 닐슨 외., Bioconjug 의해 기술 된 것과 같은 공지 된 방법을 이용하여 제조 될 수 있다. 화학. 5 : 3-7 (1994).

[0100] 본원에 기재된 올리고 뉴클레오타이드의 대부분은 다른 올리고 뉴클레오타이드 또는 안정한 하이브리드가 그들 사이에 형성 될 수 있는 핵산의 특정 부분을 보완 할 수 있도록 설계된다. 이러한 하이브리드의 안정성과 같은 Lesnick Freier, 생화학 34에 기재된 것과 같은 공지 된 방법을 사용하여 계산 될 수 있다 : 10,807에서 10,815 사이 (1995), 맥그로 등, Biotechniques 8 : 6백74부터 6백78까지 (1990), 및 Rychlik 외. 핵산 해상도. 18 : 6409-6412 (1990).

[0101] **L. 키트(Kits)**

[0102] 상기 물질뿐만 아니라, 다른 물질, 또는, 본 발명의 방법의 성능을 수행하기 위한 보조 유용한 키트로서 임의의 적절한 조합에 함께 패키징 될 수 있다. 주어진 키트 키트 구성 요소 설계 및 본 발명의 방법에서 함께 사용하기에 적합 할 경우 유용하다. 개시된 예를 들어 RNA 분자, 프로브 어레이를 포함하는 키트, 표지 뉴클레오타이드와 표지 복합체를 검출하기 위한 키트이다. 키트는 또한 검출 복합체를 포함 할 수 있다. 개시 키트는 리보핵산 분해효소, 핵산 중합 효소 또는 둘 모두를 포함 할 수 있다.

[0103] **M. 혼합물**

[0104] 수행하거나 개시된 방법을 수행하도록 제조함으로써 형성된 혼합물이 개시되어 있다. 예를 들어, 탐침 어레이와 샘플을 포함하는 혼합물을 개시된다; 프로브 어레이 및 RNA 분자; 프로브 어레이 및 리보핵산분해효소; 탐침 어레이와 표지 뉴클레오타이드; 탐침 어레이와 핵산 중합 효소; 탐침 어레이와 표지 접합체; 탐침 어레이와 검출 복합체; 프로브 어레이, RNA 분자, 및 리보핵산분해효소; 프로브 어레이, RNA 분자와 핵산 중합 효소; 프로브 어레이, RNA 분자 표지 된 뉴클레오타이드와 핵산 중합 효소; 프로브 어레이, RNA 분자, 리보핵산분해효소 및 핵산 중합 효소; 및 프로브 어레이, RNA 분자, 리보핵산분해효소, 표지 뉴클레오타이드와 핵산 중합 효소.

[0105] 상기 방법은 접촉 또는 혼합 조성물 또는 성분 또는 시약으로 데리고 참여 시키면, 상기 방법을 수행하는 다른 혼합물의 개수를 생성한다. 예를 들어, 방법은 단계가 별도로 수행되는 경우 고유 한 혼합물이 형성되고, 이들 각 단계 혼합 한 후 3 단계를 포함하는 경우. 또한, 혼합물에 관계없이 단계들이 수행 된 방법의 모든 단계의 완료에 형성된다. 본 발명은 본원에 개시된 방법의 개시 성능뿐만 아니라, 예를 들면 어떤 개시된 시약, 조성물 또는 성분을 함유하는 혼합물에 의해 얻어진 이들의 혼합물을 고려한다.

[0106] **N. 시스템**

[0107] 시스템이 개시 수행하는 데 유용하거나, 개시된 방법의 성능을 돕는. 시스템은 일반적으로 이러한 구조, 기계, 장치 등이 있으며, 조성물, 화합물, 물질 등과 같은 제조품의 조합을 포함한다. 개시되거나 이러한 조합이 고려된다 개시 내용으로부터 명백하다. 예를 들어, 개시 및 프로브 어레이와 반응 제어기 (예를 들어, PCR 기계, 자동 피펫팅 장치 및 반응 인큐베이터)를 포함하는 시스템이 고려된다.

[0108] **O. 데이터 구조 및 컴퓨터 제어**

[0109] 본 발명에 사용되는 데이터 구조에 의해 생성 된 또는 개시된 방법으로부터 생성이 개시된다. 데이터 구조는 일반적으로, 조직 수집 저장된 데이터, 정보, 및/또는 물체의 임의의 형태이고, 및/또는 조성물 또는 매체에서 구현. 이러한 RAM 또는 기억 디스크 등의 전자 형태로 저장 RNA 검출 결과는, 데이터 구조 타입이다.

- [0110] 본 발명의 방법, 또는 부분은 그에 대한 이의 또는 준비, 제어, 관리하거나 컴퓨터 제어에 의해 도움을받을 수 있다. 이러한 컴퓨터 제어는 사용 및/또는 데이터 구조를 생성하고, 컴퓨터 프로그램을 사용할 수 있다, 컴퓨터 제어 프로세스 또는 방법에 의해 달성 될 수 있다. 이러한 컴퓨터 제어 프로세스 컴퓨터 제어, 데이터 구조 및 컴퓨터 프로그램이 고려되고, 본원에 개시되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0111] **용도**
- [0112] 개시된 방법 및 조성물은 여러 분야에 적용이 포함되지만 RNA 검출 및 분석에 한정되지 않는다. 특히, 개시된 방법 및 조성물은 병원균의 특정 RNA 분자, 세포 질병 및 질환과 같은 관심있는 특정 RNA 분자를 검출하는데 사용될 수 있다. 다른 용도는 다른 사용 방법이 개시 내용으로부터 명백하게 개시되는 등 세포 샘플에 대한 발현 카탈로그를 생성하는 것을 포함하고/또는 당업자에 의해 이해 될 것이다.
- [0113] **A. 식별에 기초한 작용**
- [0114] 개시된 방법은, 측정, 탐지, 비교에 기초하여 피사체 등, 질환, 조건 ("식별"라 통칭 할 수 있다) 결정, 식별 표시, 상관, 진단, 예후 등 상태를 포함 예를 들어, 분석 등, 상영, 분석 대상, 위치 또는 환경이 검출 RNA 분자를 기반으로 특정 미생물을 갖는 것으로 확인 될 수 있다. 이러한 식별은 여러 가지 이유로 유용하다. 예를 들어, 특히, 이러한 식별은 특정 행동에 기초하여 촬영 한 만든 특정 식별에 관련 할 수 있다. 예를 들어, 특정 주제 (그 질병 또는 다른 과목 상태의 진단의 부족)의 특정 질환이나 상태의 진단에 기반 등 치료, 행동, 행동, 혜택을 누릴 것이다 식별 주제의 매우 유용한 효과가 있다 진단. 예를 들어, 확인 대상의 특정 질환이나 상태에 대한 치료는 식별 (또는 식별에 관계없이)없이 모든 과목의 치료는 상당히 다르다. 주제는 필요로 하거나 그것을 필요하지 않거나 그것을 받을 수 없고 치료의 혜택을 하지 않을 대상을 받게 된다 치료 혜택을 누릴 수 있다.
- [0115] 다음의 개시 및 식별에 기초하여 특정 동작을 포함하는 촬영 방법을 따라서, 또한 본 명세서에 개시되어 있다. 예를 들어, (예를 들어, 종이, 전자, 또는 다른 형태로 물리 등의) 식별의 레코드를 생성하는 단계를 더 포함하는 방법이 개시되어 있다. 따라서, 예를 들어, 개시된 방법에 기초하여 식별하는 레코드를 생성하는 것은 단순히 측정, 검출, 비교, 분석, 분석, 스크린을 수행 육체적 명백하게 상이 등 이러한 기록은 특히 상당한 그것이 허용에서 중요 식별은 (등, 부탁, 후속, 모니터에 기초하여 식별 될 수 있는 사람을 치료하는 것과 같은) 기타로 통신, 예를 들면, 수 유형 형태로 고정되도록; 나중에 사용 또는 검토를 위해 유지; 주체 등, 치료 효능, 다른 측정치, 탐지, 비교에 기초하여 식별 정밀도 분석, 검정, 검진의 세트를 평가하기 위한 데이터로서 이용하???고 있다. 예를 들어, 식별의 레코드와 같은 용도가 다른 개인이나 기관보다, 또는 동일한 개인 또는 엔티티의 조합이 아닌 다른 개인 또는 엔티티에 의해, 동일한 개인 또는 엔티티에 의해, 예를 들어, 제조 될 수 있다, 식별 레코드를 만든 개인이나 기관. 레코드를 만드는 방법이 개시 식별 개시된 방법 중 하나 이상의 단계로, 본원에 개시된 임의의 하나 이상의 다른 방법으로, 특히 결합 될 수 있다.
- [0116] 개시된 또 다른 예로서, 하나 또는 그 이상의 다른 식별에 기초하여 하나 이상의 추가의 식별을 포함하는 방법이다. 예를 들어, 특정 치료는 모니터링은 등 속행, 통보는 다른 식별에 기초하여 식별 될 수 있다. 예를 들어, 특정 구성 요소 또는 특징의 높은 수준을 갖는 질환 또는 증상을 갖는 것으로 피사체의 식별은 상기 또는 상위 레벨 구성 요소 또는 특징을 기반으로 하는 치료법으로 치료하거나 이동해야 수 있는 대상으로 식별 될 수 있다. (예를 들어, 전술 한 바와 같이) 임의의 적절한 방식으로 사용될 수 있다 상기 식별의 레코드가 생성 될 수 있다. 이러한 식별은 더 기초 할 수 있다, 예를 들면, 직접 다른 식별, 기타 동정의 기록 또는 조합. 이러한 상기 식별은 개인 또는 다른 엔티티보다, 또는 동일한 개인 또는 엔티티의 조합이 아닌 다른 개인 또는 엔티티 만든 개인이나 기관에 의해, 동일한 개인 또는 엔티티에 의해, 예를 들어, 제조 될 수 있다 다른 식별. 상기 식별 제조 개시된 방법은 식별 개시된 방법 중 하나 이상의 단계로, 본원에 개시된 임의의 하나 이상의 다른 방법으로, 특히 결합 될 수 있다.
- [0117] 다른 예로서, 상담과 치료, 모니터링, 다음 촬영을 포함하는 방법 등이 개시된 임의의 방법으로 식별 될 개시된다. 또한 등에 개시된 방법 중 하나로부터 식별 레코드가 이루어진 것으로, 해당하는 피사체 상담과 치료, 모니터링, 다음 촬영을 포함하는 방법은 개시된다. 예를 들어, 특정 치료는 모니터링은 등 속행, 어드바이스는 에 기초하여 식별 및/또는 레코드의 식별에 기초하여 사용될 수 있다. 예를 들면, 피사체의 특정 구성 요소 또는 특징 (및/또는 레코드는 식별 이루어진 것으로, 해당하는 피사체)의 높은 수준을 갖는 질환 또는 증상을 갖는 것으로 식별에 기초한 요법으로 치료 또는 지향 될 수 있다 하이 레벨 구성 요소 또는 특징에 관한 것이다. 이러한 치료 등, 모니터링, 속행, 어드바이스가 기초 할 수 있다, 예를 들면, 직접 동정에 같은 식별들의 기록들, 또는 이들의 조합. 이러한 치료, 모니터링, 속행, 조언 등 다른 개인이나 보다 실체, 또는 같은 개인의 조합이

나 단체 및 다른 개인과 동일한 개인 또는 단체에 의해, 예를 들어, 수행 할 수 있다 또는 식별 및/또는 식별의 기록을 만든 개인이나 기업보다 기업. 등의 상담과 치료, 모니터링, 다음 업의 개시 방법은 본 명세서에 개시된 임의의 하나 이상의 다른 방법과 조합 될 수 있다.

[0118]

방법

[0119]

샘플의 RNA를 검출하기 위한 방법과 물질을 개시한다. 몇몇 형태에서, 본 발명의 방법은, (a) 샘플과 프로브 어레이를 접촉시키는 단계, (b) 프로브 어레이와 RNA/DNA 하이브리드에 대한 특정 리보뉴클레아제 (RN아제 수소)을 접촉시키는 단계, (c) 프로브 어레이, 표지 뉴클레오타이드, 및 DNA 템플릿을 사용하여 RNA 가닥(strand)을 연장할 수 있고 상기 RNA 가닥의 연장에 표지 뉴클레오타이드를 혼입할 수 있는 핵산 중합효소(클레노우 조각 DNA 중합효소)를 접촉시키는 단계, 및 (d) 연장된 핵산 가닥의 표지 뉴클레오타이드를 검출하는 단계를 포함한다.

[0120]

상기 프로브 어레이는 하나 또는 하나 이상의 키메라 프로브를 포함한다. 상기 키메라 프로브는 DNA 영역과 RNA 영역을 포함하고, DNA 영역과 RNA 영역은 인접하며, DNA 영역은 RNA 영역의 5'이다. 상기 샘플이 키메라 프로브들 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 RNA 분자를 포함하는 경우, 그 RNA 분자는 상보적인 키메라 프로브와 혼성화될 것이다. 키메라 프로브는 키메라 프로브의 고정을 허용하거나 편리하게 하거나 매개하는 또한 3'-연결기를 포함할 수도 있다. 예를 들면, 상기 3'-연결기는 아미노기일 수 있다.

[0121]

샘플 키메라 프로브들 중 적어도 하나의 염기 서열을 RNA 분자는 상보 포함하는 경우, RNA 분자는 상보적인 프로브와 혼성화 키메라 것이다. 일부 프로브 어레이를 접촉하게 시료와 접촉 프로브 어레이 및 리보핵산분해효소를 데리고 프로브 어레이를 데리고와 접촉하게 가져 형태, 표지 뉴클레오타이드와 핵산 중합 효소 (단계 (a), (b)에있어서, 및 (c))를 동시에 수행된다.

[0122]

방법 표지링 및 검출의 일부 형태 제 표지 표지링에 의해 향상 될 수 있다. 이것은 접촉 표지 접합체가 특이 적 결합 분자와 제 표지 및 여기서 특이적인 결합 분자는 제 표지에 결합을 포함하는 프로브 어레이와 표지 접합체를 가져옴으로써, 예를 들어, 수행 될 수 있다. 확장 된 핵산 가닥에 표지 뉴클레오타이드이어서 제2표지를 검출 함으로써 검출된다. 제 표지 및 표지 접합체의 유용한 조합의 예는 제 표지 및 표지 접합체로서 스트렙타비딘-접합 된 금 나노 입자로 비오틴된다. 이 예에서, 첫 번째는 스트렙 표지 (비오틴) 및 금 나노 입자에 결합하는 특이 적 결합 분자 번째 표지다.

[0123]

또는 제2표지사이트 응집 할 수 있는 또 다른 복합체를 사용함으로써, 현장에서 제2표지의 양을 검출의 감도를 증가시키고, 검출을 쉽게 증가한다. 이것은 접촉 검출 복합체 수집기를 포함하는 프로브 어레이와 검출 복합체를 가져옴으로써, 예를 들어, 수행 될 수 있으며, 수집기는 표지 접합체에 검출 접합체의 응집을 매개한다. 둘째 표지 및 검출 접합체의 유용한 조합의 예는 제 표지 검출 접합체로서 은의 나노 입자로서 금 나노 입자이다. 이 예에서, 은 나노 입자 수집기이다. 은나노 입자는 금 나노 입자의 사이트에 은 나노 입자를 축적하는 금 나노 입자와 반응한다. 반응은 나노 입자의 축적은 육안으로 검출하기에 충분할 수 있다.

[0124]

이러한 치료의 시점에서 RNA 바이러스 등 병원체의 신속하고 정확한 검출, 적절한 환자 치료를 허용하고 생명을 구할 것이다. 공개 RNA 마이크로 칩은 직접 역전사 및 PCR 증폭없이 RNA를 검출 할 수 있다. 공개 RNA 마이크로 칩은 나노 입자를 이용한 신호 증폭을 사용할 수 있다. 공개 RNA 마이크로 칩 기술은 간단하고 정확하며 단일 염기 차이를 구별 할 수 있다. 일부 형태에서, RNA 민감 1시간 내에서 검출 될 수 있고 신호는 육안으로 검출 될 수 있다. 영상 판독 형식과 단순 병원체에서 최소 자원 분야에서 병원체의 신속하고 정확한 검출을위한 공개 RNA 마이크로 칩 기술이 적합하다.

[0125]

개시된 기술은 또한 검출하고 하나 또는 여러 소스로부터의 임의의 RNA 또는 RNA의 결합을 분석 할 수 있다. 예를 들어, 이 기술은 세포 시료에서 RNA 발현 패턴을 검출 할 수 있다. 다른 예로서, 프로브 어레이는 하나 이상의 염기 서열에 상보적인 특성이다 키메라 프로브, 예를 들어, 바이러스, 박테리아, 또는 미생물을 포함 할 수 있다. 특성 뉴클레오타이드 서열의 검출은 대응 바이러스, 박테리아, 또는 미생물의 존재를 나타낸다.

[0126]

A. 샘플 준비

[0127]

시료는 임의의 적합한 기술을 사용하여 제조 할 수 있다. 일반적으로, 요구되는 모든 것은 RNA 분자의 파괴 또는 제거 (예 : 뉴 클레아 제와 같은) 샘플의 성분을 간섭의 감소, (있는 경우) 및 예방이다. 그것은 언급하지만, RNA의 정화가 필요하지 않다. 간단한 제조 기술은 개시된 방법에 사용하기에 충분하다. RNA 분자의 작은 조각이 충분 개시된 방법에 사용하기에 바람직하기 때문에, 시료에서 RNA의 일부 열화가 바람직하다. 세포 시료에서 RNA의 바람직한 제제는 RNA 분리없이 NaOH로 처리한다. RNA 샘플을 혼성화하고 신속한 검출을위한 짧은 조각으로 생물의 RNA를 가수 분해하여 고온에서 몇 분 동안 NaOH로 생물학적 시료를 처리하여 제조 할 수 있

다. 중화 및 원심 분리 후, RNA 샘플 (상청액)은 RNA의 직접 검출을위한 준비가 되어 있다.

[0128] 예로서, 시료를 승온에서 5 분간 NaOH로 (박테리아 또는 절연 세균 총 RNA 같은) 샘플 (예를 들면 200 mm)를 처리하여 이하에서 10 분에 제조 할 수 중화하고 원심 분리 하였다. NaOH로 처리 단편 생물 RNA(예 : mRNA의 길이가 보통 수천 개 뉴클레오티드 등) 프로브 어레이에 RNA 분자의 혼성화를 용이하게 짧은 부분 (예컨대 15 ~ 25 개 뉴클레오티드)에, array (Spencer et al., *ChemBioChem*, 11, 1378 (2010)). 샘플은 또한 임의의 적합한 분리 또는 RNA 제제 기술을 사용하여 제조 할 수 있다.

[0129] **나. 하이브리드**

[0130] 이 방법에서, 샘플에서의 RNA 분자는 상보적인 서열을 갖는 키메라 프로브에 혼성화 할 수 있다. 혼성화는 다양한 조건 하에서 달성 될 수 있다. 일반적으로, 온도는 분자 및 RNA 키메라 RNA 프로브의 영역 사이의 하이브리드의 용융 온도 이상이어야 한다. pH와 염 조건은 다를 수 있지만, 중성 pH와 적당한 소금 조건이 바람직하다. 리보핵산분해효소 및 핵산 중합 효소와 호환되는 온도는 가장 바람직한 pH를, 염이 있으며, 이러한 조건은 공기 또는 판정 핵산 반응의 분야에서 이들의 지식 내에 있다.

[0131] **C. RNA 분해**

[0132] 키메라 DNA 프로브의 영역에 하이브리드 화하는 RNA 분자의 일부는 RNA/DNA 하이브리드에 대한 특정 리보핵산분해효소에 의해 분해된다. 이 열화는 임의의 적당한 조건 하에서 수행 될 수 있다. 일반적으로, 온도는 분자 및 RNA 키메라 RNA 프로브의 영역 사이의 하이브리드의 용융 온도 이상이어야 한다. pH와 염 조건은 다를 수 있지만, 중성 pH와 적당한 조건이 바람직하다. 리보핵산분해효소 및 핵산 중합 효소와 호환되는 온도는 가장 바람직한 pH 염이 있다.

[0133] **D. RNA 분자의 확장**

[0134] 혼성화 된 RNA 분자는 다음 RNA 영역의 5 '인 키메라 프로브의 DNA 영역이 템플릿 역할 확장 핵산 가닥을 형성 하도록 확장 할 수 있다. 표지 용, 적어도 하나의 표지 된 뉴클레오티드는 연장 된 핵산 가닥에 포함된다. 표지 뉴클레오티드는 첫 번째 표지를 포함한다. 때문에 키메라 프로브와 프로브에 혼성화 키메라 RNA 분자 사이의 서열 관계, 확장 된 핵산 가닥에 표지 된 뉴클레오티드의 검출은 샘플의 RNA 분자의 존재를 나타낸다.

[0135] 이 확장은 임의의 적합한 조건 하에서 수행 될 수 있다. 일반적으로, 온도는 분자 및 RNA 키메라 RNA 프로브의 영역 사이의 하이브리드의 용융 온도 이상이어야 한다. pH와 염 조건은 다를 수 있지만, 중성 pH와 적당한 소금 조건이 바람직하다. 리보핵산분해효소 및 핵산 중합 효소와 호환되는 온도는 가장 바람직한 pH를 염이 있으며.

[0136] RNA 분자의 혼성화 조건은, RNA/DNA 하이브리드에서 RNA의 분해 및 RNA 분자의 확장을 위해 호환 될 수 있으므로, 이러한 작업을 하고 반응을 동시에 행할 수 있다.

[0137] **E. 이차 표지**

[0138] 방법 표지링 및 검출의 일부 형태 제 표지 표지링에 의해 향상 될 수 있다. 이것은 접촉 표지 접합체가 특이 적 결합 분자와 제 표지 및 여기서 특이적인 결합 분자는 제 표지에 결합을 포함하는 프로브 어레이와 표지 접합체를 가져옴으로써, 예를 들어, 수행 될 수 있다. 확장 된 핵산 가닥에 표지 뉴클레오티드이어서 제2표지를 검출 함으로써 검출된다. 제 표지 및 표지 접합체의 유용한 조합의 예는 제 표지 및 표지 접합체로서 스트렙타비딘-접합 된 금 나노 입자로 비오틴된다. 이 예에서, 첫 번째는 스트렙 표지 (비오틴) 및 금 나노 입자에 결합하는 특이 적 결합 분자 번째 표지이다.

[0139] **F. 응집 (3차 표지화)**

[0140] 제2표지사이트 응집 할 수 있는 또 다른 복합체를 사용함으로써, 현장에서 제2표지의 양을 검출의 감도를 증가 시키고, 검출을 쉽게 증가한다. 이것은 접촉 검출 복합체 수집기를 포함하는 프로브 어레이와 검출 복합체를 가져옴으로써, 예를 들어, 수행 될 수 있으며, 수집기는 표지 접합체에 검출 접합체의 응집을 매개한다. 둘째 표지 및 검출 접합체의 유용한 조합의 예는 제 표지 검출 접합체로서 은의 나노 입자로서 금 나노 입자이다. 이 예에서, 은 나노 입자 수집기이다. 은나노 입자는 금 나노 입자의 사이트에 은 나노 입자를 축적하는 금 나노 입자와 반응한다. 형성된 나노 입자의 축적은 응집 및 육안으로 검출하기에 충분한 (또는 돋보기의 도움으로) 일 수 있다.

[0141] **G. 검출**

[0142] 개시된 방법은 RNA 분자가 프로브 어레이에 혼성화 한 표지 된 성분을 첨가하여 RNA 분자의 민감한 검출을 허용한다. 개시된 방법의 다양한 형태로, RNA 분자는, 예를 들면, (A) RNA 분자의 연장 가닥에 혼입 (제 표지를 통해) 표지 뉴클레오티드를 검출, (b)와 연관된 표지 접합체의 두 번째 표지를 검출함으로써 검출 될 수 있다 RNA 분자, 또는 이들의 조합과 연관되거나 응집 검출 접합체 검출 RNA 분자, (c). 예 RNA 분자와 연관된 표지 접합체 통해 RNA 분자와 연관되거나 응집 검출 복합체를 검출하는 것이 바람직 RNA 분자에 의해 검출 될 수 있다.

[0143] 검출되는 구성 요소는 다른 구성 요소 및 재료로부터 검출 될 식별 및 컴포넌트의 식별을 가능하게 하는 모든 방법 또는 수단을 이용하여 검출 할 수 있다. 일반적으로, 구성 요소 및 검출 될 수 있는 표지는 적절한 검출 기술에 일치 될 수 있다. 예를 들어, 형광 신호를 생성 요소와 표지는, 예를 들면, 또는 분광계 그래피에 의해 검출 할 수 있다. 가시광 신호를 생성 요소와 표지는, 예를 들면, 시각적으로, 분광 광도계, 또는 그래피에 의해 검출 될 수 있다. 방사능을 생성 요소와 표지는 섬광 계수 또는자가 방사선, 예를 들어, 검출 될 수 있다. 시각적 검출은 바람직하다.

[0144] 개시된 표지 및 성분은 또한 설립 효소 결합 검출 시스템으로 검출 할 수 있다. 예를 들어, 다음과 같이 증폭된 핵산의 혼입에 의해 표지 된 비오틴 16 UTP (Boehringer 만하임)를 검출 할 수 있다. 핵산은 증폭된 핵산에 존재하는 상보의 DNA 표적 서열에 상보적인 올리고 뉴클레오티드 (어드레스 프로브) (또는 그것의 보체)와 혼성화하여 고체 유리 표면에 고정된다. 혼성화 후, 유리 슬라이드를 세척하고, 알칼라인 포스포타제 컨주 게이트된 스트렙타비딘 (트로픽스 사, 베드포드, MA)와 접촉. 이 효소-스트렙타비딘 복합체는 증폭된 핵산에 비오틴 잔기에 결합한다. 슬라이드를 다시 초과 효소 접합체 및 CSPD 화학 발광 기질 (트로픽스 사)를 첨가하고, 유리 커버 슬립으로 피복을 제거하는 세척한다. 슬라이드이어서 바이오 라드에 이미징 될 수 있다.

[0145] H. 밀접하게 관련 RNA 분자 사이의 식별

[0146] 키메라 프로브는 이러한 대립 유전자와 같은 밀접하게 관련된 표적 서열을 구별하도록 설계 될 수 있다. 실시예에 도시된 바와 같이, 개시된 방법은 정확히 하나의 뉴클레오티드에 의해 상이한 RNA 분자로부터 RNA 분자를 식별 할 수 있다. 이것은 가장 RNA 영역의 5 '인 키메라 DNA 프로브의 영역에서 미분 뉴클레오티드 (들)를 포함함으로써 달성된다. 혼성화 된 RNA제 수소 분해 및 DNA 중합 효소의 연장 때문에 염기쌍에 의존하고, RNA 영역의 5 '인 키메라 프로브의 DNA 영역 염기쌍 이러한 단계를 모두 포함하기 때문에, 분화 향상된다. 차별이 세 가지 층은 높은 검출 특이성을 달성 노골적 도움이 될 수 있다. 이러한 차별적 힘의 조합은 쉽게 단일 염기 차별을 제공한다.

[0147] I. RNA 분자 그룹의 검출

[0148] 멀티 플렉스 RNA 검출은 다수의 서로 다른 돌연변이가 특정 질병 또는 어디에 여러 유전자에 돌연변이가 관여와 관련된 유전자에 돌연변이를 검출하기에 특히 유용하다. 헌팅턴 무도병을 담당하는 유전자가 확인되어 있지만, 예를 들면, 유전자의 다른 부분에서의 돌연변이의 영향을받는 다양한 개인들 사이에 발생한다. 결과는 단일 테스트 개인이 많은 헌팅 돌연변이 중 하나 이상이 있는지 여부를 검출하도록 고안되어 있지 않은 점이다. 단일 RNA 검출 분석은 RNA 분자의 임의의 수의 그룹의 하나 이상의 멤버들의 존재를 검출하는데 사용될 수 있다. 이는 그룹 내의 각각의 RNA 분자에 대한 키메라 프로브를 설계함으로써, 예를 들어, 수행 될 수 있다. 키메라 모든 프로브는 프로브 어레이의 스폿 또는 같은 위치에 배치된다. RNA 분자의 임의의 샘플에서 존재하는 경우, 그 존재는 프로브 어레이에 대응하는 위치에서 탐지된다. 제 표지, 표지 접합체 및 검출 접합체는 모든 프로브 및 RNA 분자 모두에 대해 동일 할 수 있기 때문에, 신호는 임의의 존재 또는 그룹의 RNA 분자의 임의의 조합으로 제조 될 수 있다. 검출은 RNA 분자 그룹의 적어도 하나의 부재는, 샘플에 존재하는 것을 나타낸다.

[0149] J. 치료

[0150] 특정 병원체를 갖는 환자 및 대상이어서 감소 또는 병원체를 제거하기 위해 치료될 수 있다. 다수의 조성물 및 방법은 일반적으로 특정 병원균 모두 같은 치료 알려져 있다. 이러한 치료는 개시된 방법에 기초하여 다음과 함께 사용하거나 할 수 있다.

[0151] 본원에서 사용되는 "대상"은 포함하지만, 동물, 식물, 박테리아, 바이러스, 기생충 및 다른 유기체 또는 기관에 한정되지 않는다. 피사체가 척추 동물, 더 구체적으로 포유 동물 일 수 있다 (예를 들면, 인간, 말, 돼지, 토끼, 개, 양, 염소, 인간이 아닌 영장류, 소, 고양이, 기니피그 또는 설치류), 물고기, 새 또는 파충류 나 양서류. 주제는 무척추 동물, 보다 구체적으로는 절지 동물 (예를 들면, 곤충 및 갑각류)이 될 수 있다. 이 용어는 특정 연령 또는 성별을 나타내지 않는다. 따라서, 성인 및 새로 태어난 대상자뿐만 아니라 태아는, 남성 또

는 여성의 여부, 포함되는 것으로 의도된다. 환자는 질환이나 장애로 고통받는 주체를 의미한다. 용어 "환자는" 인간과 동물 과목을 포함한다.

[0152] "치료"와 "치료"에 의해 질병을 치료 개선, 고정 시키거나 방지하기 위해 의도, 병적 상태, 또는 장애를 가진 환자의 의료 관리를 의미한다. 이 용어 즉, 관련 질환의 원인, 병리학 적 증상의 제거 향하는 치료하거나, 질병, 병적 상태 또는 장애의 개선을 향해 구체적 관한 활성 치료, 치료를 포함하고, 또한 인과 치료를 포함 장애. 또한, 이 용어는, 오히려 질병, 병적 상태 또는 장애의 경화보다 증상 완화를 위해 설계 치료 완화 처리를 포함한다; 예방 적 치료, 즉, 치료는 최소화 또는 부분적으로 또는 완전히 관련 질병, 병적 상태 또는 장애의 발달을 억제에 관한 것이다; 지지 및 치료, 즉 치료 연관된 질병, 병적 상태 또는 장애의 개선을 향한 또 다른 특정한 치료를 보충하는데 사용. 실제로 치료, 안정화 또는 예방 될 필요가 없다, 치료 개선, 안정화, 또는 질병, 병적 상태, 또는 장애를 미연에 방지하기 위한 동안은, 그 치료를 이해된다. 치료 효과 측정 또는 평가 본원에 기재된 바와 같이 당 업계에 공지 된 바와 같이 관련된 질병, 병적 상태 또는 장애로 적합 할 수 있다. 이러한 측정 및 평가는 정 성적 및/또는 정량적 측면에서 이루어질 수 있다. 따라서, 예를 들면, 특성 또는 질병의 특성, 병리학 적 증상 또는 질환 및/또는 질병, 병적 상태 또는 장애의 증상이 어떤 효과 또는 임의의 양을 저장 할 수 있다.

[0153] 본원에서 사용 된 용어 "감시"는 활성을 측정 할 수 있는 기술 분야의 임의의 방법을 지칭한다.

[0154] 본원에서 사용되는 "제공"이라는 용어는 당 업계에 공지 된 원가 화합물 또는 분자를 첨가하는 임의의 수단을 말한다. 제공은 예는 등 피펫, 주사기, 바늘, 튜브, 총기의 사용이 수동 또는 자동이 될 수를 포함 할 수 있다. 그것은 어떤 평균이나 식기류, 세포, 조직, 무 세포 시스템으로 핵산을 제공하고, 시험 관내 또는 생체 내에서 될 수 있는 임의의 다른 수단에 의해 형질 전환을 포함 할 수 있다.

[0155] 본원에서 사용 된 "예방"이란 용어는 질환 또는 상태와 관련된 수차의 물리적 표현을 방지하도록 질병 또는 증상의 임상 적 증상의 발병 전에 화합물을 투여 함을 지칭한다.

[0156] 세포는 시험관 내에서 할 수 있다. 대안 적으로, 세포는 생체 내에서 할 수 있고, 피사체에서 찾을 수 있다. "셀"이란 생물체의 세포를 포함하지만 이에 한정되지 세균 일 수 있다.

[0157] 예

[0158] A. 나노입자-지원 신호 증폭을 이용한 RNA 마이크로칩 검출

[0159] 이 예는 직접 직접 시각화 및 나노 입자를 이용한 신호 증폭을 통해 RNA를 검출하는데 사용 개시 RNA 마이크로 칩의 일례를 설명한다. 이 기술은 단순하고 정확하고 효율적으로 단일 염기의 차이를 구별 할 수 있다. RNA 샘플 제조는 간단하고 5 분에서 달성 될 수 있다. 개시된 급속 RNA 검출 (샘플 준비 시간 포함)을 45 분 내에 완료하고 fmole 낮은 수준에서 검출 감도를 가질 수 있다. 또한, 검출 신호는 육안 또는 확대경으로 관찰 할 수 있다. 이러한 접근법은 PCR없이 수행하기 쉽고 경제적이다. 또한, 상기 전략은 정교한 설비를 필요로하지 않고 모니터 소독 치료를 돕기 위해 사용될 수 있다. 시각적 감지 형식과 단순 최소한의 장비와 원격 지역, 병원, 및 필드에서 병원체의 신속하고 정확한 검출이 RNA의 마이크로 칩 기술이 적합하다. 공개 단순, 신속하고 정확한 기술은 크게 특히 전염성 질병 발생시, 현장 진료 응용 프로그램을 도움이된다.

[0160] 이 예는 나노 입자의 형성 및 시각화를 통해 신속하고 직접적인 RNA 검출을위한 개시 간단한 RNA 마이크로 칩 (도 1)의 일례를 설명한다. (같은 크기에서 40 μm 의 작은 볼 오브젝트) 또는 간단한 도구의 도움으로, 육안에 의한 나노 입자 어시스트 신호 증폭 및 검출 시각 (예 돋보기 등). RNA 검출 시스템이 간단하다 : (. 스펜서 등의 문헌 (2010) ChemBioChem, 11, 1378) RNA 마이크로 칩에 표적 RNA 혼성화 RNA 프로브 고정화 후, 결합 된 RNA를 RNase H로 소화에 의해 바이오틴 - 표지 된 dNTP로 확장된다 클레 나우 DNA 폴리머 라제. 스트랩 타 비 딘과 금 나노 입자 (Au-NP)의 컨쥬 게이트를 사용하여, RNA를 대상으로 혼입 바이오틴 라벨이어서 Au-NP 라벨로 변환된다. . AU-순이익은 염색 (Taton 등, 과학, 289, 1757 (2000)를 통해는 나노 입자의 형성은 (Ag-NP)을 촉진 할 수 있다 카오 등, Biosens Bioelectron, 22, 393 (2006). : . 치 등, 애널 Bioanal 화학, 398, 2745 (2010), 탕 등, Diagn 미생물학을 감염 지, 65, 372 (2009);.. 저우 등, J 암 화학 SOC, 132, 6932 (2010)) 상기 신호 증폭을 허용한다. AG-NP에 형성된 (도 1 및 2) RNA 프로브 사이트 다크 스팟 등의 골재와 예 금. 사람 눈으로 이들 다크 스팟의 배열의 이미지, 직접 육안 관찰 (그림 2)에 대한 형성 할 것이다. 또한, 이 RNA의 마이크로 칩은 단일 염기 차이를 구별하고 낮은 fmolar 수준에서 RNA를 검출 할 수 있음을 입증했다.

[0161] 생물학적 방법은 RNA를위한 간단한 시료 준비 프로토콜에 의해 도움을 받는다. RNA 샘플 준비 편리 : 불과 3 분 NaOH로 직접 (세균 등) 생물학적 시료를 처리. 다른 기술과 달리, RNA들의 분리 및 정제는 필요하지 않다. 개시

된 RNA 마이크로 칩 방식으로, 간단하고 신속한 RNA 검출을 45 분 이내에 달성 될 수 있다.

- [0162] RNA 검출 시스템은 DNA 증합 효소를 직접 DNA 템플릿 RNA로 표지 된 dNTP를 포함 RNA 3'-라벨링 방식에 기반 (황 및 Alsaiddi, 분석 생화학, 322, 269 (2003)). Alsaiddi 등, ChemBioChem 5, 1136 (2004)). 직접적 RNA를 검출하기 위하여, 작용 RNA 프로브 설계 하였다. RNA 프로브 RNA 3'-영역과 5'-DNA 영역 (도 1)로 구성된다. RNA 영역 (2'-메틸화 변형 표적 RNA 및 캡처를위한 혼성화 결합제이다 Novopashina 등, 뉴 클레오 시드, 뉴클레오티드와 핵산, 24, 527 (2005)). Majlessi 외 핵산 해상도, 26, (1998)) 2224은 RNases에 대한 RNA 프로브의 안정성을 증가시킨다. DNA 영역의 RNase H의 소화와 DNA 증합 효소 확장을위한 템플릿 역할을 한다. 따라서, 작용 화 된 RNA 프로브는 (3'-NH₂-RNA-DNA-5')에 자신의 칩을 통해 고정화 RNA 마이크로 칩 (또는 마이크로 어레이)을 구성하도록 설계되어 있다. 프로브 3'-NH₂ 기는 표면에 자신을 고정 가능하게한다. 예를 들어, 프로브는 1, 4- 페닐 렌 diisothiocyanate (PDITC) N 히드 록시 숙신이 미드 (NHS)의 변위를 통해 기능화 표면 (도 4) (Benters 등, ChemBioChem, 2, 686 (2001)에 고정 될 수 있으며, 비트 만 및 Alegret, 칩 DNA의 척추 고정, 스프링거 출판사 (2005)).
- [0163] 과 일치하지 않는 프로브 (MIS) RNA 시퀀스에 대한 설계되었다 :: RNA 마이크로 칩, 완벽하게 일치하는 프로브 (11 서열 번호도 2a에서 M)를 보여주기 위해. 이 네 개의 RNA 프로브는 칩 (그림 2)에 고정되었다. 프로브는 약 75 μm의 스폿 크기를 생성하는 마이크로 어를 사용하여 표면 상에 발견되었다.
- [0164] 칩을 제조 한 후, 여러 제어 실험을 수행하였다. 이는 표적 RNA의 부재 (도 2B)가 어떤 신호를 산출하지 않았음이 관찰되었다. 또한 dNTPs를 포함한다 (그림 2C) 또는 클레 나우 확장 단계에서 비오틴 표지의 dNTPs의 부재 (그림 2D)은 어떤 신호를 생성하지 않았다. 예만 RNA 프로브 고정화 마이크로 칩에 모두 RNA를 바이오틴과의 dNTPs의 존재하에 원하는 신호 (도 2e) 관찰 하였다. 혼성화, 소화, 및 확장자 : 혼성화 된 RNase H 분해 및 DNA 폴리머 라제 연장 프로세스 염기쌍에 의존하기 때문에, 전체의 검출 특이도는 다음의 세 단계에 기인한다. 그것은 차별이 세 가지 층 (또는 단계) 높은 검출 특이성을 달성 할 수 있다는 것을 발견했다. 놀랍게도, RNA 마이크로 칩 안심 높은 특이성을 제공한다. 여러 RNA 프로브 (아래 탭기 열 올리고 뉴클레오티드 라이브러리 프로브의 목록 참조) 탭기열 바이러스 RNA (DV RNA)를 검출하기 위해 설계되었다. 도 2F에서 설명한 바와 같이 단일 염기 미스 매치와 다른 프로브 (MIS-1, -2 및 -3)하지 않았지만, 단지 완벽 매치 프로브 (M)는, DV RNA를 검출 할 수 있었다. 이 실험은 RNA의 마이크로 칩과 단일 핵산 염기의 차별화를 나타냅니다. 엄격 혼성화 조건을 조정하지 않고 세 차별의 조합은 용이하게 단일 염기 구별을 제공 할 것으로 보인다.
- [0165] 그림 3은 여러 대상 RNA를 동시 탐지를 보여줍니다. RNA를 타겟은 마이크로 칩에 고정화 해당 프로브 혼성화. BA의 RNase A가 샘플에 포함되었을 때, 예를 들면, AG-NP은 BA의 RNase A의 존재를 나타내는, BA 프로브 위치 (도 3a)에서 증착. BA 및 lacZ의 RNA를 모두 시료에 포함 된 경우, AG-NP는 BA 및 RNA를 lacZ의 존재를 나타내는 프로브들은 위치 (도 3b) 모두에서 증착. 이상의 타겟의 RNA가 샘플에 포함 된 경우,보다 대응 프로브 사이트 (도 3B-D)는 다크 스팟의 배열을 형성하고, 대응의 RNA의 존재를 나타내는, AG-NP에 기탁 하였다. RNA 검출 신호들의 이러한 배열은 육안 또는 확대경의 도움으로 검출 하였다. 이러한 실험 개시 RNA 마이크로 칩 기술은 동시에 여러 표적 RNA를 검출하는데 사용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0166] 총 RNA의 개개의 mRNA의 검출은 또한 입증되었다. 대장균은 IPTG로 유도하는 경우 (이소 프로필 β-D-1- 티오 갈 락토 피 라노 시드) LacZ를 mRNA를 (> 2,300 NT.) 및 베타 - 갈 락토시다 제, LacZ를 RNA 프로브 고정화 RNA 마이크로 칩을 표현하는 구체적 표현 LacZ를 검출하는 데 사용 된 총 RNA (그림 3E과 3 층 모두에서 칩 I I)에서의 mRNA. LacZ를 mRNA를 검출의 특이성을 확인하기 위해, 포도당 LacZ를 mRNA의 발현을 억제하기 위해 사용 하였다. 599-624 (: 다른 RNA를 수천 Rhodius 등, 아누 계 미생물학 56 (대장균에 존재하지만 나도 LacZ를 mRNA도 아닌 특정 RNA들은 (그림 3E과 3 층 모두에서 칩 I I I) 칩에 표시되지 않았다 2002)). 이러한 실험 결과가 우리 RNA 마이크로 칩 구체적인 선택적으로 생물학적 시료에서 RNA 개인을 검출 할 수 있음을 증명하고 있다. 또한, RNA 샘플을 준비하기위한 간단하고 신속한 전략이 입증되었다. RNA 샘플을 직접 95°C에서 3 분 동안 수산화 나트륨 (400 mM)으로 (대장균 등) 생물학적 시료를 처리하여 (5 분 단위)을 제조 할 수 있다. 중화 및 원심 분리 후, RNA 샘플 (상층 액) 칩 하이브리드에 대한 준비가 되어 있다. 수산화 나트륨 처리는 주로 마이크로 칩의 대상 RNA 하이브리드 및 검출을 용이하게 (NT를 15-25로 짧게.) 짧은 조각으로, (스펜서, L. (예 : mRNA를, 길이가 일반적으로 수천 개의 뉴클레오티드 등) 생물의 RNA를 단편화한다 린, CF 치앙마이, Z를 켈, P. Hesketh, 제이 살롱, Z를 황, ChemBioChem 11 : 1378-1382 (2010)). 이 빠른 샘플 준비 전략, LacZ를 mRNA를 선택적으로 (도 3f)를 검출 할 수 있다.
- [0167] 검출 감도도 증명되었다. 도 5a에 도시 된 바와 같이, 표적 RNA의 양은 다양한 마이크로 칩으로 조사 하였다.

이 RNA의 마이크로 칩이 낮은 fmole 수준 (10 ~ 15)까지의 RNA를 검출 할 수 있음을 입증했다. 현저하게, 그것 입증되었다 즉 상기 검출 계를 단순화 처음 세 단계 (RNA 혼성화 된 RNase H 소화와 DNA 증합 효소 확장) 하나의 단계로 통합 될 수 있다 (도 5B 및 5C). 전체 검출 수단의 검출 단부에 시료 준비의 시작으로부터 45 분 (도 3F, 5D 및 5E)에서 달성 될 수 있다. 또한, 세균 RNA의 감소는 박테리아를 70 % 에탄올로 대장균을 처리 한 후 RNA 마이크로 칩 (도 5E)으로 관찰 하였다. 이 RNA 합성 종료 및 효소 가수 분해로 인해 죽은 미생물의 RNA 분해성과 일치한다. 따라서, 본 발명의 방법은 소독 처리 및 전염성 질병 발생시 생명이나 박테리아의 죽음을 모니터링에 유용할 수 있다.

표 1은 신속한 검출의 최적화 예를 나타낸다. 신속한 RNA 마이크로 칩을 개발하는 단계적으로 최적화 된 여러 단계가 있다. 실버 염색 5-20분으로 수행하고 사진 CCD 카메라를 사용하여 0.6의에서 촬영했다.

표 1

RNA 하이브리드화 (분)	RNase H (분)	클레노우 통합 (분)	효소 표지 (분)	금나노입자	합계(분)
15	15	30	45	60	165
10	10	10	45	60	135
10	10	10	45	40	115
10	10	10	45	30	105
10	10	10	45	20	95
5	5	5	45	40	100
5	5	5	45	20	80
5	5	5	45	15	75
5	5	5	45	10	70
5	5	5	45	5	65
5	5	5	20	20	55
5	5	5	15	20	50
5	5	5	15	15	45
5	5	5	15	10	40
5	5	5	15	5	35

1. 재료 및 방법

i. 올리고 뉴클레오티드의 설계 및 합성

고유의 RNA는 통합의 DNA 기술 (IDT)에서 구입 하였다. 혼성 프로브를 설계하고 (3400) DNA / RNA 합성기 (어플라이드 바이오 시스템즈)에서 고상 포스 화학을 사용하여 합성 및 폴리 아크릴 아마이드 겔 전기 영동에 의해 정제 하였다. RNA 프로브 RNA 영역과 5'-DNA 영역 (및 일부 프로브 3'-DNA 영역)로 구성된다. 2 '메틸화가 표적 RNA를 캡처하기위한 혼성화와 바인더 인 RNA 영역은 수정된다. 3'-DNA 영역의 RNase H 소화를위한 템플릿 역할을 한다.5'-DNA 영역의 RNase H의 소화와 DNA 증합 효소 확장을 위한 템플릿 역할을합니다. 3'-NH-그룹은 마이크로 칩 고정화 링커 역할을 한다. 따라서, 작용 화 된 RNA 프로브 (3'-NH₂-RNA-DNA-5 '또는 3'-NH₂-DNA-RNA-DNA-5')는 마이크로 칩 상에 자신의 고정화를 통해 RNA 마이크로 칩 (또는 마이크로 어레이)을 구성하도록 설계 됨.

ii. 병원성 올리고뉴클레오티드

LacZ RNA: E. coli LacZ mRNA (724-748 nt):

5'-AUGUGGAUUGGCGAUAAAAACAA-3' (SEQ ID NO:1)

LacZ probe:

5'-d(GTTGTTTTT)-2'-O-Me-RNA(AUCGCCAAUCCACAU)-d(CTGTGAAAGA)-NH₂-3' (SEQ ID NO:2)

BA RNA: Bacillus anthracis RNA (lethal factor mRNA, 855-892 nt):

5'-AUCUUUAGAAGCAUUAUCUGAAGAUAGAAAAA-3' (SEQ ID NO:3)

BA probe:

- [0181] 5'-d(GATTTTTT)-2'-O-Me-RNA(CUUAUCUUCAGAUAA)-d(TGCTTCTAAAGAT)-NH₂-3' (SEQ ID NO:4)
- [0182] BF RNA: Bird flu or Avian Influenza (H5N1) RNA [matrix protein 1 (M1) mRNA (692-729 nt)]:
- [0183] 5'-AAUCUUCUGAAAAUUUGCAGACCUACCAAAACGA-3' (SEQ ID NO:5)
- [0184] BF probe:
- [0185] 5'-d(TCGTTTTT)-2'-O-Me-(GGUAGGUCUGCAAAAUUU)-d(CAAGAAGATT)-NH₂-3' (SEQ ID NO:6)
- [0186] AF RNA: Avian flu (H5N1) RNA [matrix protein (M2) mRNA (838-872 nt)]:
- [0187] 5'-CAU UUAUCGUCGC CUUAAAUACG GUUUG AAAAGAG-3' (SEQ ID NO:7)
- [0188] AF Probe:
- [0189] 5'-d(CTCTTTT)-2'-O-Me-(CAAACCGUAUUUAAG)-d(GCGACGATAAATG)-NH₂-3' (SEQ ID NO:8)
- [0190] Biotin-labeled DNA (LacZ DNA):
- [0191] 3'-NH₂-AGAAAGTGTCTACACCTAACCGCTATTTTTTGTG-biotin-Cy3-5' (SEQ ID NO:9)
- [0192] **iii. 헝기열 RNA 게놈에서 얻어지는 특이성 연구를 위한 헝기열 올리고뉴클레오타이드 라이브러리**
- [0193] DENV-1 RNA (Accession no.: U88536.1; 10484-10504 nt):
- [0194] 5'-GGAAGCUGUACGC-AUGGGGUA-3' (SEQ ID NO:10)
- [0195] DENV-1 Probe: (Accession no.: U88536.1; 10484-10504 nt):
- [0196] 5'-TACCCCAT-[2'-O-Me-r(GCGUACAGCUUCC)]-NH₂-3' (SEQ ID NO:11)
- [0197] DENV-2 Probe: (Accession no.: U87411.1; 10470-10490 nt):
- [0198] 5'-TACGCCAT-[2'-O-Me-r(GCGUACAGCUUCC)]-NH₂-3' (SEQ ID NO:12)
- [0199] DENV-3 Probe: (Accession no.: AY099336.1; 10457-10477 nt):
- [0200] 5'-TACACCGT-[2'-O-Me-r(GCGUACAGCUUCC)]-NH₂-3' (SEQ ID NO:13)
- [0201] DENV-4 Probe: (Accession no.: AF326825.1; 10393-10413 nt):
- [0202] 5'-TATGCCAC-[2'-O-Me-r(GCGUACAGCUUCC)]-NH₂-3' (SEQ ID NO:14)

[0203] **iv. 사진/이미징 시스템**

[0204] RNA 마이크로 칩의 배열은 육안으로 (또는 확대 유리의 도움으로) 볼 수 있었고, 우리는 배열 사진을 문서에 사진/이미징 시스템을 사용했다. 사진/이미징 시스템은 냉각 전하 결합 소자 카메라 (CCD, VersArray 시스템; 프린스턴 기구, 프린스턴, NJ)를 구비 한 현미경 (니콘 이클립스 80i)로 구성하고, 이를 이미지 프로 플러스 6.1 컴퓨터 소프트웨어에 의해 제어되었다 이미지 수집, 처리 및 분석 (미디어 사이버네틱스, 주식, 실버 스프링, MD).검출은 0.6 S, 2 X 렌즈의 평균에 대한 2 2 비닝의 이미지를 사용하여 수행 하였다.

[0205] **v. 마이크로칩 활성화**

[0206] 먼저 유리 칩 (0.5 X 0.5 cm)은 30분 동안 CH₂Cl₂중에서 부드럽게 흔들어 탈지하고, (시그마 알드리치, 세인트 루이스, MO)에서 탈지하고, 칩이어서 진한 황산으로 세정 하였다(시그마 알드리치, 세인트루이스, MO) 흔들어 45 분. 마지막 세척은 pH가 7.0에 도달하고 자연적으로 건조될 때까지 칩은 탈 이온화된 물로 여러 번 세척하였다(Sigma Aldrich, St. Louis, MO), 수성 에탄올(95% 에탄올 및 5%물)에 실릴 3 % 3-아미노프로필트리에메톡시 실린의 용액 중에서 진탕하면서 45 분 동안 열 침입큐베이션에 의해 수행되었다. 에탄올, 물, 에탄올 : 실릴화 종료 후, 칩은 3회 세척 하였다. 2 시간 동안 CH₂Cl₂ 중의 1% 피리딘 (Fluka 사) 칩 1, 4- 페닐렌 디이소티오시 아네이트(diisothiocyanate) (PDITC; 10 mM; Sigma Aldrich, St. Louis, MO)의 용액에서 인큐베이션 한 후, 자연 건조시켰다. 칩은 그 다음, CH₂Cl₂로 세 번 세척하고 자연 건조시키고, 실온에서 테시 케이 터에 보관 하였

다. 활성화 프로세스의 단계적인 표현은도 4 도시하면 된다.

[0207] **vi. RNA 프로브 고정화**

[0208] 하이브리드 RNA 프로브 스텔스 핀 Omnigrid 미세 배열 (직교 테크놀로지스, 얼바인 CA)을 (사용 활성화 마이크로 칩에이를 인쇄한 다음 인산 나트륨 완충액 (100-300 μ M) (100 mm의 pH를 8.5)에 용해되고 SMP3 핀)이 예금 0.7 거리 nL / 지점. 접박이 칩을 30 분 동안 37 $^{\circ}$ C 수욕에서 배양한다.

[0209] **VII. 제어 실험**

[0210] LacZ를, 나 탄저균과 조류 독감 설계 다른 프로브는 제어 실험에 대한 네 가지 칩에 고정되었다. 네 개의 칩은 StartingBlock 20 분간 차단 완충액으로 배양 하였다. 모든 칩, 상이한의 RNA가 결합되지 않은 RNA를 두 번 세척하고, 칩 A. 제외하고 15 분 동안 37 C에서 5 X SSC 완충액 (20 μ L, 0.75 M의 NaCl, 75 mM의 시트르산 나트륨, pH를 7.0)에 도포하고, 배양시켰다 1 X PBS 완충액 (137 mM의 염화나트륨, 2.7 밀리미터의 KCl, 4.3 밀리미터의 Na₂HPO₄, pH를 7.4)와 함께). 칩은 그 다음 15 분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션 된 RNase H 버퍼의 RNase H (0.5 μ L, 5000 U ML⁻¹) (20 μ L, 1 X 뉴 잉글랜드 바이오 랩스, 입스, MA)과 함께 배양 하였다. 소화 RNA를 이어서 클레 나우 큰 단편 (0.5 μ L, 5000 U ML⁻¹) 클레 노우 완충액 (20 μ L, 1 X 뉴 잉글랜드 바이오 랩스, 입스, MA)와 비오틴 표지 된 dATP를 함께 인큐베이션 (이어서 1X PBS 완충액으로 두번 세척하고, 칩 A, D에 1 μ L, 0.4 밀리미터, 인비 트 로젠, 칼스 바드, CA)이 칩 C의 dNTPs는 그것에인가가 있었을 때. 칩은 1 X PBS 완충액으로 세척 한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 30 분간 배양 하였다. 금은 1 X PBS 버퍼로 세척 한 다음 1 시간 동안 금 복합 희석 버퍼 (100 μ L, KPL, Inc의, 게이 더스 버그, 메릴랜드)에 스트랩 타비 딘 (4 μ L를) 표시와 함께 칩 배양 하였다. 다크 스팟이 관찰 될 때까지 계속해서, 100 μ L 실버 강화 용액을 도포 하였다. 이 칩은 건조 더 실버 증착 및 공기를 중지하는 많은 양의 물로 세척 하였다. 사진은 CCD 카메라를 사용하여 촬영 하였다.

[0211] **viii. 선택도 복수 병원체의 선택적 및 동시적인 검출**

[0212] LacZ를에서 디자인 된 다양한 프로브, B 탄저균과 조류 독감은 선택과 동시 탐지 연구를위한 칩에 고정되었다. 칩은 StartingBlock 20 분간 차단 완충액으로 배양 하였다. 이어서, 칩은 5 X SSC 완충액 다른 RNA를 범람하고 15 분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양 하였다. 결합되지 않은 RNA를 1 X PBS 완충액으로 두번 세척 하였다. 칩은 그 다음 15 분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션 된 RNase H 버퍼의 RNase H (0.5 μ L, 5000 U ML⁻¹) (20 μ L, 1 X 뉴 잉글랜드 바이오 랩스, 입스, MA)과 함께 배양 하였다. 분해의 RNA는 클레 나우 큰 단편 (0.5 μ L, 5000 U ML⁻¹) 클레 노우 완충액 (20 μ L, 1 X 뉴 잉글랜드 바이오 랩스, 입스, MA) 및 비오틴 표지 된 dATP를 함께 인큐베이션 1 X PBS 완충액으로 두번 세척하고, (1 μ L, 0.4 밀리미터, 인비 트 로젠, 칼스 바드, CA). 칩은 1 X PBS 완충액으로 세척 한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 30 분간 배양 하였다. 금은 1 X PBS 버퍼로 세척 한 다음 1 시간 골드 복합 희석 버퍼 (100 μ L, KPL, Inc의, 게이 더스 버그, 메릴랜드)에 스트랩 타비 딘 (4 μ L를) 표시와 함께 칩 배양 하였다. 다크 스팟이 관찰 될 때까지 계속해서, 100 μ L 실버 강화 용액을 도포 하였다. 이 칩은 건조 더 실버 증착 및 공기를 중지하는 많은 양의 물로 세척 하였다. 사진은 CCD 카메라를 사용하여 촬영 하였다.

[0213] **ix. 칩 상의 탱기열 특이성**

[0214] 다른 프로브는 특이성 연구 탱기열 바이러스 (DENV) RNA의 다른 부분에서 설계되었습니다. 네 개의 탱기 혈청형 프로브는 100 μ M에서 발견하고, 37 $^{\circ}$ C에서 30 분간 배양 하였다. 그 후, 칩 StartingBlock (TBS, 피어스, 록 포드, IL)을 20 분 동안 차단 완충액으로 배양 하였다. 이 칩은 다음 5 X SSC 버퍼에 DENV-1 RNA로 넘쳐난다. 칩을 15 분 동안 65 $^{\circ}$ C에서 배양 하였다. 언 바운드 RNA를 1 X PBS로 두 번 세척 하였다. 칩은 그 다음 15 분 동안 65 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션 된 RNase H 버퍼의 RNase H (0.5 μ L, 5000 U / ml) (20 μ L, 1 X 뉴 잉글랜드 바이오 랩스, MA)과 함께 배양 하였다. 분해의 RNA는 클레 노우 완충액 클레 나우 큰 단편 (0.5 μ L, 5000 U / ml) (20 μ L, 1 X 뉴 잉글랜드 바이오 랩스, MA) 및 비오틴 표지 된 dNTP (1 μ L와 인큐베이션 1 X PBS 완충액으로 세 번 세척 하였다 0.4 mm의 인비 트 로젠, 칼스 바드, CA)을, 칩 1 X PBS 완충액으로 3 회 세척 한 다음 30 분 동안 65 $^{\circ}$ C에서 배양 하였다. 이어서, 칩은 금과 함께 배양 하였다 금 집합체 희석액에서 스트랩 타비 딘 (4 μ L)를 표지 (100 μ L, KPL, Inc의 게이 더스 버그, 메릴랜드) 1 X PBS로 세 번 세척 하였다. 이어서, 100 μ L은 강화 용액 (1 : 1, BB 국제 카디프, CF14 5DX, UK)를 흑점이 관찰 될 때까지 적용 하였다. 칩은 금 나노 입자의 증착은 상기 정지 물로 세척 하였다. 사진이 CCD 카메라를 사용하여 촬영 한 건조시.

[0215] **x. RNA 마이크로 칩에 RNA 검출의 감도**

[0216] 칩들은 20 분 동안 블로킹 완충액 TBS로 배양 된 후 30 분 동안 LacZ를 프로브 고정화 하였다. 칩은 그 다음 5 X SSC 완충액의 상이한 농도에서 RNA LacZ를 범람하고 15 분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양 하였다. 언 바운드 RNA를 1 X

PBS 버퍼로 두 번 세척 하였다. 칩은 그 다음 15 분 동안 37 °C에서 다음의 RNase H 버퍼의 RNase H (0.5 μL, 5000 U ML⁻¹) (20 μL, 1 X 뉴 잉글랜드 바이오 랩스, 입스, MA)과 함께 배양 하였다. 분해의 RNA는 클레 나우 큰 단편 (0.5 μL, 5000 U ML⁻¹) 클레 노우 완충액 (20 μL, 1 X 뉴 잉글랜드 바이오 랩스, 입스, MA) 및 비오틴 표지 된 dATP를 함께 인큐베이션 1 X PBS 완충액으로 두 번 세척하고, (1 μL, 0.4 밀리미터, 인비 트 로젠, 칼스 바드, CA). 칩은 1 X PBS 완충액으로 세척 한 다음 37 °C에서 30 분간 배양 하였다. 이 칩은 다음 금을 배양 금 복합 회석 버퍼에 스트랩 타비 딘 (4 μL를) 표지 (100 μL, KPL, Inc의, 게이 더스 버그, 메릴랜드) 1 개 KPL 세척 완충액으로 세척 하였다. 다크 스팟이 관찰 될 때까지 계속해서, 100 μL 실버 강화 용액을 도포 하였다. 칩은 또한 실버 막을 증착하는 많은 양의 물로 세척 하였다. 공기 건조시 사진은 CCD 카메라를 사용하여 촬영 하였다.

[0217] xi. 신속한 검출

세 가지 다른 프로브 칩에 고정되었다 : 비오틴는 LacZ를 프로브, LacZ를 프로브와 BA 프로브를 표지. 고정화 후, 상기 칩은 5 X SSC 완충액의 상이한 농도에서의 LacZ RNA 샘플 범람하고, 5 분 동안 37 °C에서 배양 하였다. 결합되지 않은 RNA를 1 X PBS 완충액으로 두 번 세척 하였다. 다음에, 칩을 5 분 동안 37 °C에서 인큐베이션 된 RNase H 버퍼의 RNase H (0.5 μL, 5000 U / ml) (20 μL, 1 X 뉴 잉글랜드 바이오 랩스, 입스, MA)과 함께 배양 하였다. 분해 된 RNA를 다음 2 회 세척 하였다 1 X PBS 버퍼 클레 노우 완충액 클레 나우 큰 단편 (0.5 μL, 5000 U / ml) (20 μL, 1 X 뉴 잉글랜드 바이오 랩스, MA) 및 dATP를 표지 비오틴 (1 μL와 인큐베이션 0.4 mm의 인비 트 로젠, 칼스 바드, CA). 칩은 1 X PBS 완충액으로 세척 한 다음 37 °C에서 5 분간 인큐베이션 하였다. 금은 1 X PBS 완충액으로 세척 한 다음 37 °C에서 10 분간 금 접합체 회석액 (100 μL, KPL, Inc의 게이 더스 버그, 메릴랜드)에서 스트랩 타비 딘 (4 μL)을 표지하여 칩 인큐베이션 하였다. 이어서, 100 μL 은 강화 용액을 도포하고, 다크 스팟이 관찰 될시 15 분 동안 37 °C에서 배양 하였다. 건조 칩은 상기 증착 및 공기를 증지 물로 세척 하였다. 사진은 CCD 카메라를 사용하여 촬영 하였다. 검출은 1 시간 미만으로 달성 하였다.

[0219] xii. RNA 마이크로 칩 검출을 위한 E.Coli 총RNA에서의 RNA 샘플 준비

밤새 220에서 진탕하에 37 °C에서 배양 하였다 10 ml 루리아 브로 스 (LB, 시그마 알드리치, 세인트루이스, MO)은 박테리아 (10 μL 세포 배양. 콜라이 K-12 MG1655 대장균 세포)로 접종하고, RPM. 밤새 배양 한 후 분할 (각각 50 ml) 및 37 °C에서 1 시간 동안 배양 한 후, 250 mL의 삼각 플라스크에 LB (100 mL)을 함유하는 멸균에 첨가 하였다. 이소 프로필 β-D-1-D- 티오 갈 락토 피 라노 시드 (IPTG, 시그마 알드리치, 세인트루이스, MO)은 하나의 주 형틀 (최종 농도 1 mM)을 첨가 하였다. 기타, D로 - (+) 포도당 (시그마, 세인트 루이스, MO)를 (최종 농도 1 mM)을 첨가 하였다. 두 배양 물을 4 시간 동안 37 °C에서 배양 한 후, 세포를 원심 분리에 의해 수거 하였다. C는 RNA 추출 및 분리를 위해 나중에 사용될 세포 펠렛을 -80에서 저장 하였다. E. 콜라이의 총 RNA를 추출하고, 정제 MasterPure 전체 RNA 정제 키트 (에피 바이오 메디슨, WI)에있어서, 상기 절연 총 RNA는 TE 완충액에 용해시켰다 하였다하는 10mM 트리스 - 염산 (PH 7.5), 1mM의 EDTA]. 총 RNA의 양은 UV - 가시 분광 광도계 (베리안 사 사 클라라, CA)를 사용하여 흡광도를 측정함으로써 결정 하였다.

RNA 단편화, 가열, alkaline- 및/또는 금속 - 촉매 프래그먼트에 의해 수행 하였다. 알칼리 촉매 분열을 들어, 전체 RNA (0.1 μL, 3 μg의 / μL)를 수산화 나트륨으로 분해되었다 (NaOH를, 최종 농도 50 ~ 500 밀리미터) 몇 분 동안 95°C에서. 가수 분해 반응은 중화 및 마이크로 칩 하이브리드 화 및 검출을위한 준비 준비된 RNA 샘플을 제공하고, 아세트산을 첨가하여 케칭시켰다. 금속 이온 - 촉매 단편화, 총 RNA 5 분 동안 95°C에서 염화 마그네슘 (MgCl2를, 최종 농도 10mM이) 및 염화 아연 트리스 -HCl의 (ZnCl2가, 최종 농도 10mM이) (PH 7.4, 25 mM)을 가열 하였다. 냉각 후, 5 배 SSC는 마이크로 칩의 하이브리드 및 검출을위한 준비 준비된 RNA 샘플을 제공하는 조각 전체 RNA, 추가되었다.

[0222] xiii. 직접적 NaOH 처리에 의한 대장균에서 급속한 RNA 샘플 준비

대장균 펠렛 (2 μL, 4 M 아세트산 추가) 중화하고 원심 분리 (10,000 rpm으로 한 후, 95°C에서 3 분 동안의 NaOH (20 μL, 400 mM)을 처리한다 (예 1 ml의 LB 배양에서와 같은)) 1 분 동안 침전물을 제거합니다. 상층 액을 마이크로 칩 하이브리드 및 검출을위한 준비의 RNA 샘플입니다. RNA 샘플 준비는 5 분 이내에 달성 될 수 있다.

[0224] xiv. RNA의 마이크로 칩에 직접적이고 신속한 RNA 검출을 위한 일반 프로토콜

SSC 완충액 (0.75 M의 NaCl, 75 mM의 시트르산 나트륨, pH를 7.0)에 용해 된 RNA 샘플 (20 μm)을 5-15 분 동안

37 °C에서 인큐베이션과 혼성화 한 다음, 설계 RNA 프로브 고정화 마이크로 칩 상에 첨가 하였다. 언 바운드 RNA를 1X PBS 버퍼 (137 mM의 염화나트륨, 2.7 밀리미터의 KCl, 11.8 밀리미터 나-PO4, 산도 7.4)로 두 번 세척하여 제거 하였다. 칩은 5-15분 37 °C에서 1X의 RNase H 버퍼의 RNase H (2.5 U, 뉴 잉글랜드 바이오 랩스, 입스, MA) (20 µL)과 함께 배양 하였다. 분해 된 RNA를 클레 나우 (2.5 U, 뉴 잉글랜드 바이오 랩스, 입스, MA) 및 바이오틴 - 표지 된 dNTP (인비, 베드, CA, 각 0.4 mM의 최종 농도)와 인큐베이션 1X PBS 완충액으로 두 번 칩을 세척하여 제거 하였다 5-20 분 동안 37 °C에서 1X 클레 나우 완충액 (20 µL)에. 두 번 1X PBS 완충액으로 칩을 세척 한 후, 칩은 스트렙 타비 딘 - 표지 된 금 나노 입자와 함께 배양 하였다 (4 µL, KPL, Inc의 게이 더스 버그, 메릴랜드)의 버퍼 (100 µL) 5-30 분 동안, 칩을 세척 하였다 1X PBS 버퍼와 두 번. 이어서,은 강화 용액 (1 100 µL : 1 혼합물 BB 국제 카디프, CF14 5DX, UK)의 어두운 스폿 배열 될 때까지 5 ~ 30 분 동안 37 °C에서 칩 상에 도포하고, 칩 배양 칩의 표면에 형성 하였다. 칩은 증착을 종결 물로 세척하고 자연 건조시켰다. 칩 스폿 어레이는 직접적이고 신속한 RNA 검출 욕안 (또는 돋보기의 도움으로) (RNA 샘플 제제를 포함한 전체 검출 시간 45 분)에 의해 관찰 하였다. RNA 마이크로 칩의 표면 상에 스폿 어레이 이미지는 촬영 및 현미경-CCD 카메라 촬상 시스템으로 분석 하였다.

[0226] 이것은 본 발명의 방법 및 조성물은 특정 방법론, 프로토콜들에 한정되는 것은 아님은 당연하다, 이들로 설명 시약은 변할 수있다. 또한 본원에 사용 된 용어는 단지 특정한 실시 예를 설명하기위한 것이며, 첨부 된 청구항에 의해서만 제한 될 본 발명의 범위를 제한하기위한 것이 아님을 이해해야 한다.

[0227] 본 명세서 및 청구 범위에 사용 된 문맥이 명백히 달리 지시하지 않는 한, 단수 형태 "a", "an"및 "the"가 복수의 참조를 포함하는 것을 주목해야 한다. 따라서, 예를 들면, "키메라 프로브"는 이러한 키메라 프로브의 복수의 참조를 포함하는 행 "키메라 프로브"등 하나 이상의 키메라 프로브 및 그 기술 분야의 당업자에게 공지 된 균등 물에 대한 참조.

[0228] 본 명세서의 상세한 설명과 청구항 전체에서, 단어 "포함한다" 및 "포함하는"및 "포함하는" 수단으로서 단어의 변형, "포함하지만 이에 제한되지 않음"을, 예를 들면, 서로를 배제하는 것은 아니다 첨가제, 성분, 정수 또는 단계.

[0229] "선택적"또는 "임의로"는 이어서 기재된 사건, 상황 또는 재료 또는 이벤트 상황 또는 물질이 발생 또는 존재하고 수행 인스턴스 경우를 포함하는 것이 발생할 존재하거나 존재하지 않을 수 있다 것을 의미 발생하지 않거나 존재하지 않는다.

[0230] 범위는 본 명세서에서, "약"하나의 특정 값 및/또는 에 "약"다른 특정 값으로부터 다음과 같이 표현 될 수있다. 그러한 범위가 표현되면, 또한 특별히 고려되고 문맥이 달리 구체적으로 언급되지 않는 및/또는 다른 특정 값으로 하나의 특정 값으로부터 개시를 고려 하였다. 값들은 근사값으로서, 선행의 사용에 의해 표시되는 경우와 마찬가지로, "정보"는 그 문맥이 구체적으로 달리 표시하지 않는 한 특별히 고려되어야 고려 특정 실시 형태의 다른 값이 개시된 것으로 이해 될 것이다. 또한 상기 범위의 각 끝점은 상당한 양의 다른 엔드 포인트와 관련되어 있는 것으로 이해되며, 독립적으로 다른 엔드 포인트의 콘텍스트는 달리 구체적으로 언급되지 않는. 마지막으로, 이는 개별 값 및 명시 개시 범위 내에 포함 된 값을 하위 범위의 모든 또한 특별히 고려되고, 문맥 상 달리 표시되지 않는 한 구체적으로 개시된 것으로 간주되어야한다는 것을 이해하여야한다. 상기 특정 경우에 이러한 실시 형태의 일부 또는 모두를 명시 적으로 개시되어 있는지 여부에 관계없이 적용된다.

[0231] 다르게 정의되지 않는 한 일반적으로 개시된 방법 및 조성물에 속하는 당업자에 의해 이해되는, 본원에 사용 된 모든 기술적 및 과학적 용어는 동일한 의미를 갖는다. 어떤 방법 및 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 물질이 연습 또는 본 방법 및 조성물의 시험에 사용될 수 있지만, 특히 유용한 방법, 장치 및 재료가 기술되어있다. 본원에서 인용 된 간행물은 그들이 인용되는 재료는 본원에 참고로 구체적으로 인용된다. 어떠한 명세서 본 발명 선행 발명으로 이러한 공개에 선행하는 자격이 있지 않은 인정하는 것으로 해석되어서는 없다. 어떠한 입장 임의의 참고 문헌이 선행 기술을 구성하는 것으로 이루어진다. 참고 문헌의 논의는 그 저자들이 주장 어떤 상태, 및 출원인은 인용 된 문서의 정확성과 적절성에 도전 할 권리를 보유. 이는 명확하게 이해 될 것이며, 그 공보의 번호가 명세서, 이러한 기준이 서류의 어느 기술 분야의 일반적인 상식의 일부를 형성 인정을 구성하지 않는다.

[0232] 물질, 조성물, 구성 요소, 단계, 방법 등의 설명은 다양한 옵션 및 대안을 포함 할 수도 있지만, 이는 것으로 해석해서는, 이러한 옵션 및 대안은 특히, 서로 또는 동등, 승인이 아니다해야 분명 대안이다. 따라서, 예를 들

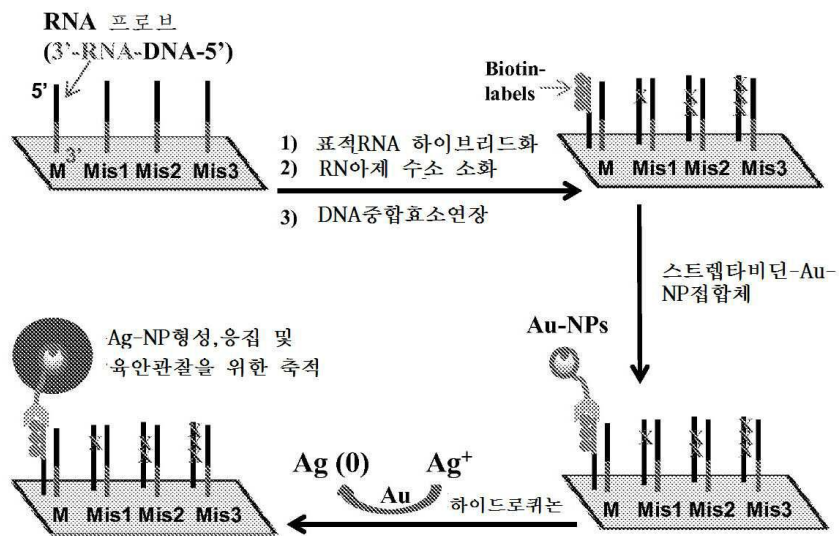
어, 다른 특이 적 결합 분자들의 목록은 목록에 특이적인 결합 분자는 다른에게 자명 한 것을 의미하지 않으며, 등가 또는 명백한의 입장이다.

[0233]

본원에 개시된 모든 구성 요소가되도록 의도되고, 본원에 구체적으로 개시되는 것으로 간주되어야한다. 또한, 본 명세서 내에서 식별 될 수있는 모든 서브 그룹 것으로 의도되며 구체적으로 본원에 개시되는 것으로 간주되어야한다. 그 결과, 특히 구성 요소의 구성 요소, 또는 서브 그룹이 특별히 포함 또는 제외하거나 사용에 포함 또는 구성 요소의 목록에서 제외 될 수 있다는 것이 고려된다. 당업자가 인식, 또는 통상의 실험만을 사용하여 확인할 수있을 것이며, 본 명세서에 설명 된 특정 방법 및 조성물의 실시 예에 많은 등가물. 이러한 등가물은하 기 특허 청구 범위에 의해 포함되도록 의도된다.

도면

도면1



도면2a

Dengue virus (DV) target RNA: 5'-GGAAGCUGUACGC-AUGGGGUA-3'

DV RNA Probes Immobilized on the DV RNA Microchip:

Match (M): 3'-NH-(2'-O-Me-CCUUCGACAUGCG)-TACCCCAT-5'

Mismatch-1 (Mis-1): -(2'-O-Me-CCUUCGACAUGCG)-TACCGCAT-5'

Mismatch-2 (Mis-2): -(2'-O-Me-CCUUCGACAUGCG)-TGCCACAT-5'

Mismatch-3 (Mis-3): -(2'-O-Me-CCUUCGACAUGCG)-CACCGTAT-5'

- 1) Target RNA hybridization
- 2) RNase H digestion on chip

Target RNA: 5'-GGAAGCUGUACGC-3'

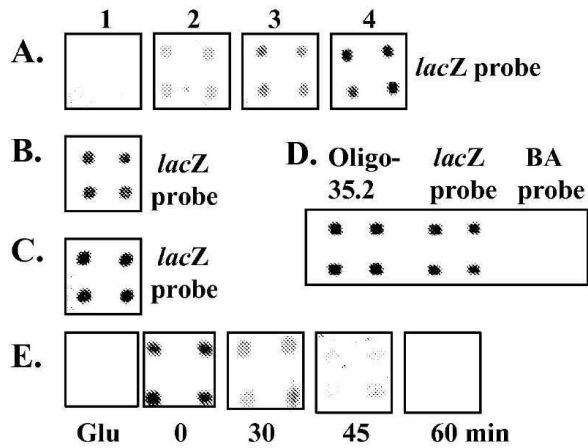
M Probe: 3'-NH-(2'-O-Me-CCUUCGACAUGCG)-TACCCCAT-5'

- 3) DNA polymerase extension with biotin-labeled dNTPs

Extended Target RNA: 5'-GGAAGCUGUACGC-(biotin-ATGGGGTA)-3'

M Probe: 3'-NH-(2'-O-Me-CCUUCGACAUGCG)-TACCCCAT-5'

도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Georgia State University Research Foundation, Inc.

Huang, Zhen

<120> RNA MICROCHIP DETECTION USING NANOPARTICLE-ASSISTED SIGNAL
AMPLIFICATION

<130> GSURF 2013-17 PCT

<150> 61/808,447

<151> 2013-04-04

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> RNA

<213> E. coli

<400> 1

auguggauug gcgauaaaaa acaa

24

<210> 2

<211> 35

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> LacZ Probe

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(10)

<223> DNA

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(25)

<223> RNA

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(25)

<223> 2'-O-Me modification

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(35)

<223> DNA

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> NH2 modification

<400> 2

gttggtttttt aucgccaau cacauctgtg aaaga

35

<210> 3

<211> 35

<212> RNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 3

aucuuuagaa gcuuuauug aagauaagaa aaaaa

35

<210> 4

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BA probe

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(9)

<223> DNA

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(24)

<223> RNA

<220><221> misc_feature
 <222> (10)..(24)
 <223> 2'-O-Me modification
 <220><221> misc_feature
 <222> (25)..(37)
 <223> DNA
 <220><221> misc_feature
 <222> (37)..(37)
 <223> NH2 modification
 <400> 4

gatttttttc uuauucucag auaatgcttc taaagat

37

<210> 5
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Avian influenza virus
 <400> 5

aaucucuug aaaaauugca gaccuaccaa aaacga

36

<210> 6
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BF Probe
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(8)
 <223> DNA
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(27)
 <223> RNA
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(27)
 <223> 2'-O-Me Modification

<220><221> misc_feature
 <222> (28)..(37)

<223> DNA
 <220><221> misc_feature
 <222> (37)..(37)
 <223> NH2 Modification
 <400> 6
 tcgtttttgg uaggucugca aaauuuuca gaagatt 37
 <210> 7
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> Avian influenza virus
 <400> 7
 cauuuauugu cgccuuuaa uacgguuuga aaagag 36
 <210> 8
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AF Probe
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(7)
 <223>
 > DNA
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(22)
 <223> RNA
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(22)
 <223> 2'-O-Me Modification
 <220><221> misc_feature
 <222> (23)..(35)
 <223> DNA
 <220><221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> NH2 Modification
 <400> 8
 ctcttttcaa accguuuua aggcgacgat aaatg 35

<210> 9
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Biotin-labeled LacZ DNA
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)

 <223> Biotin-Cy3 Modification
 <220><221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> NH2 Modification
 <400> 9
 gttgtttttt atcgccaatc cacatctgtg aaaga 35
 <210> 10
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Dengue virus
 <400> 10
 ggaagcugua cgcauggggu a 21
 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Match (M) probe
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(21)
 <223> 2'-O-Me-r Modification

 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> NH2 Modification
 <400> 11
 taccctatgc guacagcuuc c 21
 <210> 12

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mismatch-1 (Mis-1) probe
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(21)
 <223> 2'-O-Me-r Modification
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> NH2 Modification
 <400> 12
 tacgccatgc guacagcuuc c
 <210> 13

21

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mismatch-2 (Mis-2) probe
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(21)
 <223> 2'-O-Me-r Modification
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> NH2 Modification
 <400> 13

21

tacaccgtgc guacagcuuc c
 <210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mismatch-3 (Mis-2) probe
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(21)
 <223> 2'-O-Me-r Modification

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> NH2 Modification

<400> 14

tatgccacgc guacagcuuc c

21