



등록특허 10-2085242



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년03월05일
(11) 등록번호 10-2085242
(24) 등록일자 2020년02월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7033544
- (22) 출원일자(국제) 2012년05월17일
심사청구일자 2017년05월16일
- (85) 번역문제출일자 2013년12월17일
- (65) 공개번호 10-2014-0064735
- (43) 공개일자 2014년05월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2012/038436
- (87) 국제공개번호 WO 2012/158967
국제공개일자 2012년11월22일
- (30) 우선권주장
61/486,817 2011년05월17일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2010114599 A1*
J Clin Microbiol. 1996;34(3):501-507
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
디엑스테리티 다이아그노스틱스 인코포레이티드
미국 캘리포니아주 90220 란초 도밍게즈 스위트
116 에스. 란초 웨이 19500
- (72) 발명자
테르브루겐 로버트
미국 캘리포니아주 90226 맨하탄 비치 웰 스트리트 219
리우 엔보우
미국 캘리포니아주 91007 아르카디아 칼리타 스트리트 9835
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인태평양

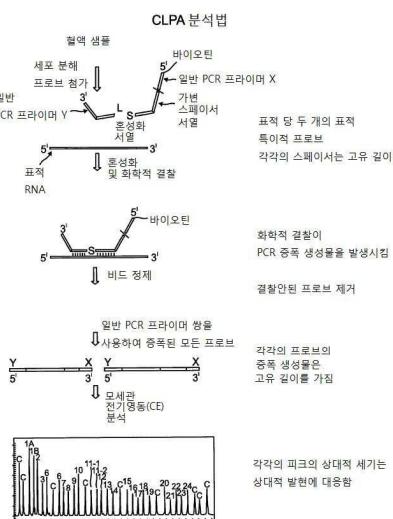
전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 표적 혼란 검출을 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

본 발명은 샘플 내에 존재하는 하나 이상의 표적을 검출하기 위한 조성물, 장치 및 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 서로 가깝게 근접하는 표적 혼란을 가역적으로 결합시키고 상보적 반응성 결찰 모이어티를 소유하는 둘 또는 그 이상의 결찰 프로브를 사용하는 단계를 포함한다. 이러한 프로브가 적절한 방향에서 표적에 결합될 때, 이들은 자발적인 화학적 결찰 반응을 수행할 수 있으며 이는 결찰 생성물을 생성하며 이러한 결찰 생성물을 직접 검출되거나 또는 증폭되어 앰플리콘을 생성하고 그 후 검출된다. 본 발명은 또한 샘플 RNA를 안정화시켜 분해가 분석 결과에 상당한 영향을 미치지 않도록 하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1

(72) 발명자

칠더스 존 레이

미국 캘리포니아주 90813 롱 비치 #308 더블유. 7
번 스트리트 403

김창희

미국 캘리포니아주 90275 란초 팔로스 베르데스 에
이파티. 214 비치뷰 드라이브 6600

아베디 마지드 알.

미국 캘리포니아주 91730 란초 쿠카몽가 하모니 드
라이브 10664

명세서

청구범위

청구항 1

샘플 내 복수의 상이한 표적 핵산의 검출 방법으로서, 각각의 표적 핵산은 제2 표적 도메인, 상기 제2 표적 도메인에 인접하는 제1 표적 도메인 및 상기 제1 및 제2 표적 도메인으로부터 전단(upstream) 또는 후단(downstream)에 위치하는 제3 표적 도메인을 포함하며, 상기 방법은:

(a) 각각이 다음을 포함하는 복수의 결찰(ligation) 기질을 제공하는 단계:

(i) 상기 표적 핵산 중 하나;

(ii) 다음을 포함하는 제1 결찰 프로브 세트:

(A) 다음을 포함하는 제1 핵산 결찰 프로브:

(1) 상기 하나의 표적 핵산 서열의 제1 표적 도메인에 혼성화된 제1 프로브 도메인;

(2) 5'-결찰 모이어티(moiety); 및

(B) 다음을 포함하는 제2 핵산 결찰 프로브:

(1) 상기 하나의 표적 핵산 서열의 제2 표적 도메인에 혼성화된 제2 프로브 도메인;

(2) 3' 결찰 모이어티;

(b) 리가아제 효소를 사용하지 않고 상기 제1 및 제2 핵산 결찰 프로브를 결찰하여 복수의 제1 결찰 생성물을 형성하는 단계;

(c) 포획 모이어티를 포함하는 표적 포획 프로브를 상기 표적 핵산의 상기 제3 표적 도메인에 혼성화시켜 표적 복합체를 형성하는 단계;

(d) 상기 포획 모이어티를 사용하여 지지체에 상기 표적 복합체를 포획하는 단계;

(e) 상기 복수의 제1 결찰 생성물을 증폭하여 앰플리콘을 형성하는 단계; 및

(f) 상기 앰플리콘을 검출하고,

이에 따라 상기 표적 핵산을 검출하는 단계를 포함하는, 샘플 내 복수의 상이한 표적 핵산의 검출 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 표적 핵산은 제5 표적 도메인 및 상기 제5 표적 도메인에 인접한 제4 표적 도메인을 추가로 포함하고;

상기 복수의 결찰 기질 각각은 상기 제4 표적 도메인에 혼성화된 제3 핵산 결찰 프로브 및 상기 제5 표적 도메인에 혼성화된 제4 핵산 결찰 프로브를 포함하는 제2 결찰 프로브 세트를 추가로 포함하며;

상기 방법은 리가아제 효소의 부존재 하에서 상기 제3 및 제4 핵산 결찰 프로브를 결찰하여서 상기 하나의 표적 핵산 서열이 다중 결찰 생성물을 포함하는 단계를 추가로 포함하고; 및

상기 검출 단계(f)는 상기 다중 결찰 생성물로부터 발생된 앰플리콘을 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 표적 핵산은 제7 표적 도메인 및 상기 제7 표적 도메인에 인접한 제6 표적 도메인을 추가로 포함하고;

상기 복수의 결찰 기질 각각은 상기 제6 표적 도메인에 혼성화된 제5 핵산 결찰 프로브 및 상기 제7 표적 도메인에 혼성화된 제6 핵산 결찰 프로브를 포함하는 제3 결찰 프로브 세트를 추가로 포함하며;

상기 방법은 리가아제 효소의 부존재 하에서 상기 제5 및 제6 핵산 결찰 프로브를 결찰하여서 상기 하나의 표적 핵산 서열이 다중 결찰 생성물을 포함하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,
상기 핵산 결찰 프로브 각각은 프라이머 서열을 추가로 포함하는 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,
상기 각각의 결찰 프로브 세트의 상기 핵산 결찰 프로브 중 적어도 하나는 가변 스페이서 서열을 추가로 포함하여서 상기 앰플리콘의 표적 특이적 길이를 갖는 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,
상기 각각의 결찰 프로브 세트의 단지 하나의 핵산 결찰 프로브가 상기 가변 스페이서 서열을 포함하는 방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서,
상기 핵산 결찰 프로브는 프라이머 서열을 포함하고, 상기 가변 스페이서 서열은 상기 프로브 도메인과 상기 핵산 결찰 프로브의 프라이머 서열 사이에 함유되는 방법.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,
상기 표적 포획 프로브의 상기 포획 모이어티는 포획 핵산 서열, 비드 및 결합 파트너 쌍의 하나의 결합 파트너로부터 선택되는 멤버를 포함하는 방법.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,
상기 5' 결찰 모이어티는 DABSYL을 포함하고 상기 3' 결찰 모이어티는 포스포로티오에이트를 포함하는 방법.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,
상기 3' 결찰 모이어티는 DABSYL을 포함하는 방법.

청구항 11

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,
상기 샘플은 구아니디니움 하이드로클로라이드(GuHCl)를 포함하는 완충액에 수집된 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서,
상기 샘플은 혈액인 방법.

청구항 13

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,
상기 표적 핵산은 DNA 또는 RNA를 포함하는 방법.

청구항 14

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

상기 검출 단계(f)는 모세관 전기영동, 질량 분광광도법,マイクロアレイ 분석, 시퀀싱, 실시간 PCR, 광 검출, 형광 검출, 생물발광 검출, 화학발광 검출, 전기화학적 검출, 전기화학발광 검출 및 측방 유동 검출로 이루어진 군으로부터 선택되는 기술을 사용하는 방법.

청구항 15

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

상기 표적 복합체를 형성하는 단계(c)는 상기 복수의 제1 결찰 생성물을 형성하는 단계(b)와 동시에 일어나는 방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

상기 검출 단계(f)는 모세관 전기영동에 의한 것인 방법.

청구항 22

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

상기 검출 단계(f)는 질량 분광광도법에 의한 것인 방법.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

샘플 내 복수의 표적 RNA 서열 검출 방법으로서, 각각의 표적 RNA 서열은 인접하는 제1 및 제2 표적 도메인 및 제3 표적 도메인을 포함하고, 상기 방법은:

(a) 샘플을 완충액 내에 수집하여 안정화된 샘플을 형성하는 단계;

(b) 상기 안정화된 샘플에서 청구항 1에 따른 분석을 수행하여 상기 복수의 표적 RNA 서열을 검출하는 단계를 포함하는, 샘플 내 복수의 표적 RNA 서열 검출 방법.

청구항 32

청구항 31에 있어서,

상기 샘플은 주위 실온에서 적어도 1주일 동안 안정한 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2011.5.17. 출원된 미국 특허출원 제61/486,817호에 대한 우선권을 주장하며, 2010.3.29. 출원된 미국 특허출원 제12/798,108호의 부분계속출원이며, 이를 각각은 그 전체가 여기에 참조문헌으로 수록된다.

[0003] 연방으로부터 후원을 받은 연구에 관한 진술

[0004] 본 발명은 중소기업혁신연구(SBIR, Small Business Innovation Research) 프로그램에 의해 수여된 승인 번호 (Grant No.) 1R43HG006656-01에 의한 정부 지원에 의해 수행되었다. 정부는 본 발명의 일부 권리를 가진다.

배경 기술

[0005] 발명의 배경

[0006] 특정 핵산의 검출은 진단 의학 및 분자 생물학 연구에 대한 중요한 도구이다. 유전자 프로브 분석법은 현재 예를 들어 박테리아 및 바이러스와 같은 감염성 미생물 식별, 정상 및 변종 유전자의 발현 탐지 및 암유전자와 같은 질병 또는 손상과 관련된 유전자 식별, 조직 이식 이전 호환성을 위한 조직 타이핑, 핵 사고 또는 유행성 독감 발생과 같은 비상 대응 상황에 대처하기 위한 법의학(forensic medicine)용 조직 또는 혈액 시료 매칭, 질병 예후 또는 원인 결정, 및 다른 종의 유전자 사이의 상동성 탐구를 비롯하여, 진단 의학 및 분자 생물학의 많은 영역에서 역할을 한다.

[0007] 이상적으로, 유전자 프로브 분석법은 민감하고, 특이적이며 쉽게 자동화될 수 있어야 한다. 민감도(즉, 낮은 검출 한계)를 위한 조건은 중합효소 연쇄 반응(PCR, polymerase chain reaction), 및 분석 이전에 특정 핵산 서열을 연구자들이 기하급수적으로 증폭시키는 것을 가능하게 하는 또 다른 증폭 기술의 개발에 의해 크게 완화되었다. 예를 들어, SNP 유전자위(SNP loci)의 복합 PCR(multiplex PCR) 증폭 및 후속하는 올리고뉴클레오타이드 어레이에 대한 혼성화는 동시에 수백의 SNP 유전자형에 사용될 수 있다.

[0008] 특이성은 유전자 프로브 분석법의 도전과제이다. 프로브와 표적 사이의 분자 상보성의 정도는 상호작용의 특이

성을 정의한다. 혼성화 반응에서 프로브, 표적, 및 염의 조성 및 농도 변화뿐만 아니라 반응 온도, 그리고 프로브의 길이는 모두 프로브/표적 상호작용의 특이성을 변화시킬 수 있다. 비록 일반적으로 종래 기술을 사용하여서는 어려울지라도, 완전한 상보성을 갖는 표적을 부정합(mismatch)을 갖는 표적과 구별하는 것이 가능할 수도 있는데, 왜냐하면 반응 조건의 작은 변화가 혼성화를 변화시킬 것이기 때문이다. 부정합 검출을 위한 기술은 부정합이 프로브 절단을 위한 자리를 생성하는 프로브 분해 분석법(probe digestion assay), 및 싱글 포인트 부정합이 결찰(ligation)을 방지하는 DNA 결찰 분석법(DNA ligation assay)을 포함한다.

[0009] 다양한 효소적 및 비-효소적 방법이 서열 변화를 검출하기 위하여 활용가능하다. 효소 기반 방법의 예는 인베이더(Invader)™, 올리고뉴클레오타이드 결찰 분석법(oligonucleotide ligation assay, OLA) 단일 염기 연장법(single base extension method), 대립형질 PCR(allelic PCR), 및 경쟁적 프로브 분석(competitive probe analysis)(예컨대 혼성화에 의한 경쟁적 서열화)를 포함한다. 효소적 DNA 결찰 반응은 해당 기술분야에 잘 알려져 있으며 SNP 검출, 효소적 증폭 반응 및 DNA 복구에 광범위하게 사용되어 왔다. 다수의 비-효소적 또는 템플릿 매개 화학적 결찰 방법이 또한 서열 변화를 검출하기 위하여 사용될 수 있다. 이는 예컨대 N-시아노이미다졸, 시아노겐 브로마이드, 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 하이드로클로라이드와 같은 커플링제를 사용하는 화학적 결찰 방법을 포함한다.

[0010] 유전자 연구를 위하여 RNA를 분석할 때 흔히 인식되는 문제점은 RNA 자체의 본질적인 불안정성이다. RNA는 본질적으로 생존 유기체 내에서 짧은 수명을 갖는데 왜냐하면 유기체가 RNA에 의존하는 후속 프로세스를 조절하는 RNA 농도를 조절하기 때문이다. 또한 RNA 파괴를 유발하는 많은 자연적인 프로세스가 존재한다.

[0011] 최근에 연구자들은 세포 내 유전자 발현의 분석을 위한 방법을 개발하기 위한 상당한 노력을 기울였다. 일반적으로 이는 존재하는 특정 mRNA 분자의 양에 대한 세포 함량을 분석함으로써 달성된다. 유전자 발현의 측정은 분석된 RNA 샘플이 생체 내 다수의 전사체(transcript)를 근접하게 닮는다는 기본 가정에 기초한다. 따라서, 세포로부터 추출 이후 RNA의 완전성을 유지하는 것이 가장 중요하다. 연구자들은 상이한 유전자들(mRNA)의 전사체가 상이한 안정성을 가지며 이는 분리 과정에서 일어나는 해당 RNA의 분해가 상이한 RNA 분자 사이에서 불균일하게 분포될 수 있다는 것을 인식하였다. 상이한 분해도를 갖는 RNA 샘플들의 한 가지 비교는 차동 유전자 발현의 마이크로어레이-기반 측정치의 최대 75%가 분해 바이어스에 의해 야기될 수 있음을 제시한다. Auer H, Liyanarachchi S, Newsom D, Klisovic MI, Marcucci G, Kornacker K (2003), *Nature Genetics* 35:292-293.

[0012] 효율적이고 특이적인 핵산 검출 및 세포로부터의 추출 이후 RNA의 안정성을 위한 방법 및 조성물에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

발명의 간단한 개요

[0014] 따라서, 본 발명은 신속한 표적 검출을 제공하는 비-효소적 화학적 결찰 반응을 위한 방법 및 조성물 그리고 크게 단순화된 표적 핵산 검출 및 측정 방법을 제공한다.

[0015] 한 양상에서, 본 발명은 한 샘플 내 복수의 상이한 표적 핵산을 검출하기 위한 방법을 제공하며, 여기서 각각의 표적 핵산은 제2 표적 도메인에 인접하는 제1 표적 도메인 및 상기 제1 및 제2 표적 도메인으로부터 전단(upstream) 또는 후단(downstream)에 위치하는 제3 표적 포획 도메인을 포함한다. 상기 방법은 (a) 복수의 결찰 기질을 제공하는 단계, 여기서 이들 각각은 표적 핵산 중 하나 및 제1 결찰 프로브 세트를 포함하며 상기 제1 결찰 프로브 세트는 (i) 제1 핵산 결찰 프로브, 이는 상기 하나의 표적 핵산 서열의 제1 표적 도메인에 혼성화된 제1 프로브 도메인 및 5'-결찰 모이어티(moity)를 포함함; (ii) 제2 핵산 결찰 프로브, 이는 상기 하나의 표적 핵산 서열의 제2 표적 도메인에 혼성화된 제2 프로브 도메인 및 3' 결찰 모이어티를 포함함;을 포함함; (b) 리가아제 효소를 사용하지 않고 상기 제1 및 제2 결찰 프로브를 결찰하여 복수의 제1 결찰 생성물을 형성하는 단계; (c) 포획 모이어티를 포함하는 표적 포획 프로브를 상기 표적 핵산의 상기 제3 표적 도메인에 혼성화시켜 표적 복합체를 형성하는 단계; (d) 상기 포획 모이어티를 사용하여 표면에 상기 표적 복합체를 포획하는 단계; 상기 결찰 생성물을 증폭하여 앰플리콘을 형성하는 단계; 및 (f) 상기 앰플리콘을 검출하고, 이에 따라 상기 표적 핵산을 검출하는 단계;를 포함한다.

[0016] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 표적 핵산은 제5 표적 도메인에 인접한 제4 표적 도메인을 추가로 포함하며 상기 복수의 결찰 기질 각각은 상기 제4 표적 도메인에 혼성화된 제3 핵산 결찰 프로브 및 상기 제5 표적 도메인에 혼성화된 제4 핵산 결찰 프로브를 포함하는 제2 결찰 프로브 세트를 추가로 포함한다. 이러한 구체 예에서, 상기 방법은 리가아제 효소의 부존재 하에서 상기 제3 및 제4 결찰 프로브를 결찰하여 이에 따라

상기 하나의 표적 핵산 서열이 다중 결찰 생성물을 포함하는 단계를 추가로 포함하며 상기 검출 단계(f)는 상기 다중 결찰 생성물로부터 발생된 앰플리콘을 검출하는 단계를 포함한다.

[0017] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 표적 핵산은 제7 표적 도메인에 인접한 제6 표적 도메인을 추가로 포함하며, 상기 복수의 결찰 기질 각각은 상기 제6 표적 도메인에 혼성화된 제5 핵산 결찰 프로브 및 상기 제7 표적 도메인에 혼성화된 제6 핵산 결찰 프로브를 포함하는 제3 세트의 결찰 프로브를 추가로 포함하며, 상기 방법은 리가아제 효소의 부존재 하에서 상기 제3 및 제4 결찰 프로브를 결찰하여 이에 따라 상기 하나의 표적 핵산 서열이 다중 결찰 생성물을 포함하는 단계를 추가로 포함한다.

[0018] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 결찰 프로브 각각은 프라이머 서열을 추가로 포함한다.

[0019] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 각각의 결찰 프로브 세트의 결찰 프로브 중 적어도 하나가 가변 스페이서 서열을 추가로 포함하며 이에 따라 앰플리콘의 표적 특이적 길이를 가진다.

[0020] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 각각의 결찰 프로브 세트의 단지 하나의 결찰 프로브가 가변 스페이서 서열을 가진다.

[0021] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 가변 스페이서 서열은 상기 프로브 도메인과 상기 결찰 프로브의 프라이머 사이에 함유된다.

[0022] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 표적 포획 프로브의 상기 포획 모이어티는 포획 핵산 서열, 비드(bead) 및 결합 파트너 쌍의 하나의 결합 파트너로부터 선택되는 멤버를 포함한다.

[0023] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 5' 결찰 모이어티는 DABSYL을 포함하고 상기 3' 결찰 모이어티는 포스포로티오에이트를 포함한다.

[0024] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 3' 결찰 모이어티는 DABSYL을 포함한다.

[0025] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 샘플은 구아니디니움 하이드로클로라이드(GuHCl)를 포함하는 완충액에 수집되었다. 대표적인 구체 예에서, 상기 샘플은 혈액이다.

[0026] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 표적 핵산은 DNA 또는 RNA를 포함한다.

[0027] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 검출 단계(f)는 모세관 전기영동, 질량 분광광도법(mass spectrometry), 마이크로어레이 분석, 시퀀싱, 실시간 PCR, 광 검출, 형광 검출, 생물발광 검출, 화학발광 검출, 전기화학적 검출, 전기화학발광 검출 및 측방 유동 검출로 이루어진 군으로부터 선택되는 기술을 사용한다.

[0028] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 혼성화 단계(c)는 상기 결찰 단계(b)와 동시에 일어난다.

[0029] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 본 발명은 샘플 내 복수의 상이한 표적 핵산을 검출하는 방법을 제공하며, 여기서 각각의 표적 서열은 인접하는 제1 및 제2 표적 도메인을 포함하며, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다: (a) 복수의 결찰 기질을 제공하는 단계, 여기서 이들 각각은 상이한 표적 핵산 중 하나; 제1 핵산 결찰 프로브, 이는 상기 하나의 표적 핵산의 제1 표적 도메인에 상보적인 제1 프로브 도메인, 제1 프라이머 서열, 및 5'-결찰 모이어티를 포함함; 및 제2 핵산 결찰 프로브, 이는 상기 하나의 표적 핵산의 제2 표적 도메인에 상보적인 제2 프로브 도메인, 제2 프라이머 서열, 및 3' 결찰 모이어티를 포함함. 상기 결찰 프로브 중 하나는 가변 스페이서 서열을 포함한다. 상기 방법은 (b) 리가아제 효소의 부존재 하에서 제1 및 제2 결찰 프로브를 결찰하여 복수의 상이한 결찰 생성물을 형성하는 단계, 여기서 상이한 결찰 생성물은 상이한 표적 특이적 길이를 가짐; (c) 상기 결찰 생성물을 증폭하는 단계; 및 (d) 상기 상이한 표적 길이에 기초하여 상기 상이한 결찰 생성물의 존재를 검출하는 단계를 추가로 포함한다.

[0030] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 표적 핵산 서열은 RNA 또는 DNA이다.

[0031] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 샘플은 혈액으로부터 유래된다.

[0032] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 샘플은 파라핀 포매 샘플(paraffin embedded sample)로부터 유도된다.

[0033] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 검출 단계는 모세관 전기영동 또는 질량 분광광도법에 의한 것이다.

- [0034] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 제1 프라이머 각각은 동일하며 상기 제2 프라이머 각각은 동일하다.
- [0035] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 본 발명은 표적 핵산 서열을 검출하기 위한 키트를 제공하며, 여기서 상기 표적 서열은 인접하는 제1 및 제2 표적 도메인을 포함하며, 상기 키트는 다음을 포함한다: (a) 6M GuHCl을 포함하는 2X 과쇄 완충액(lysis buffer); (b) 제1 결찰 프로브, 이는 (i) 상기 제1 표적 도메인에 상보적인 제1 프로브 도메인; (ii) 제1 프라이머 서열; 및 (iii) 5'-결찰 모이어티를 포함함; 및 (c) 제2 핵산 결찰 프로브, 이는 (i) 상기 제2 표적 도메인에 상보적인 제2 프로브 도메인; (ii) 제2 프라이머 서열; 및 (iii) 3' 결찰 모이어티를 포함함.
- [0036] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 결찰 프로브 중 하나 또는 둘 모두는 가변 스페이서 서열을 추가로 포함한다.
- [0037] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 본 발명은 샘플 내 복수의 상이한 표적 핵산을 검출하는 방법을 제공하며, 여기서 각각의 표적 서열은 인접하는 제1 및 제2 표적 도메인을 포함하며, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다: (a) 반응 혼합물을 제공하는 단계, 이는 (i) 혈액을 포함하는 표적 샘플; 및 (ii) 3M GuHCl을 포함하는 1X 과쇄 완충액;을 포함함; (b) 상기 반응 혼합물을 복수의 상이한 프로브 세트와 접촉시키는 단계, 여기서 각각의 프로브 세트는 (i) 다음을 포함하는 제1 결찰 프로브: (1) 상기 하나의 표적 핵산의 제1 표적 도메인에 상보적인 제1 프로브 도메인; (2) 제1 프라이머 서열; 및 (3) 5'-결찰 모이어티; 및 (iii) 다음을 포함하는 제2 핵산 결찰 프로브: (1) 상기 하나의 표적 핵산의 제2 표적 도메인에 상보적인 제2 프로브 도메인; (2) 제2 프라이머 서열; 및 (3) 3'-결찰 모이어티;를 포함함; (d) 리가아제 효소의 부존재 하에서 상기 제1 및 제2 결찰 프로브를 결찰하여 복수의 상이한 결찰 생성물을 형성하는 단계; (e) 상기 상이한 결찰 생성물을 증폭하는 단계; 및 (f) 상기 결찰 생성물의 존재를 검출하는 단계.
- [0038] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 결찰 프로브는 가변 스페이서 서열을 추가로 포함한다.
- [0039] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 표적 핵산은 RNA이다.
- [0040] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 제1 및 제2 결찰 프로브 중 하나는 결합 파트너 쌍 중 하나를 추가로 포함하며, 증폭 단계 이전에, 또 다른 결합 쌍을 포함하는 비드가 첨가되어 상기 결찰된 생성물을 포획한다.
- [0041] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 검출 단계는 상기 가변 스페이서 서열을 사용하여 수행된다.
- [0042] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 본 발명은 샘플 내 복수의 표적 RNA 서열을 검출하기 위한 방법을 제공하며, 여기서 각각의 표적 핵산 서열은 인접하는 제1 및 제2 표적 도메인 그리고 제3 표적 도메인을 포함한다. 상기 방법은 샘플을 완충액 내에 수집하여 안정화된 샘플을 형성하는 단계; 상기 안정화된 샘플에서 전술한 것 중 어느 하나에 따르는 분석법을 수행하여 복수의 표적 핵산을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0043] 전술한 바에 따르는 또 다른 구체 예에서, 상기 샘플은 주위 실온에서 적어도 1주일 동안 안정하다.
- 도면의 간단한 설명**
- [0044] **도면의 간단한 설명**
- 도 1은 CLPA-CE 분석법의 한 구체 예의 개략도이다.
- 도 2는 CLPA-MDM 분석법의 한 구체 예의 개략도이다.
- 도 3은 2-프로브 및 3-프로브 CLPA 반응의 한 구체 예를 나타내는 개략도이다.
- 도 4는 3'-DABSYL 이탈기를 갖는 DNA를 제조하기 위하여 사용될 수 있는 DNA 합성 레진의 개략도이다.
- 도 5는 CLPA-CE 분석법의 한 구체 예에 대한 프로세스 흐름에 관한 개략도이다.
- 도 6은 CLPA 분석법을 위한 프로브 디자인을 나타내는 개략도이며 여기서 프로브는 크기-변형 스타페 서열을 함유한다.
- 도 7은 CLPA-CE에 의해 분석된 샘플에 대한 전기영동 분리 프로파일을 나타낸다.
- 도 8은 CLPA-CE 분석에서 표적 농도와 피크 높이 사이의 선형 관계를 나타낸다.

도 9는 전립선 FFPE 조직의 슬라이스를 갖는 여러 표적(각각의 표적에 대한 좌측 막대) 및 비표적 대조군(pNTC-각각의 표적에 대한 우측 막대)에 대한 루미넥스 신호(Luminex Signal)와 비교한 FFPE 조직 샘플의 분석에 대한 데이터를 나타낸다.

도 10은 용액 상태/비결합(unbound) CLPA 프로브 세트로부터 결합된(bound) CLPA 프로브 세트를 분리하기 위하여 사용된 표적 포획 방법의 개략도이다.

도 11은 단일 표적 포획 프로브를 따라 샘플 표적에 결합된 다중, 고유 CLPA 프로브 세트의 개략도이다.

도 12는 본 발명의 한 구체 예의 가능한 방향의 또 다른 개략도이며, 이를 통하여 샘플 완전성 검증에서의 특별한 용도를 알 수 있다. 도 12A는 포획 프로브가 결찰 프로브 세트의 "후단(downstream)"에 있는 점을 제외하고는 도 11과 유사한 방향을 도시한다. CM은 포획 모이어티이다. 해당 분야의 기술자에 의해 이해되듯이, 흔히 3' 말단에 도시되지만, CM은 포획 프로브의 3' 또는 5' 중 어느 한쪽 말단에 있을 수 있다. 또한, 표적 도메인에 혼성화되지 않는 각각의 결찰 프로브 부분은 도 11에 제시된 바와 같이, 비제한적으로 프라이머 결합 도메인, 사이즈 태그, 포획 서열 등을 포함하는 많은 상이한 기능부를 함유한다. 도 12A는 결찰 프로브 세트가 샘플 완전성 평가에 대하여 약 25-30% 증가하여 표적의 길이 상부에 이격되어 있는 상황을 제시한다. 해당 분야의 기술자에 의해 이해되고 이해에서 설명되듯이, 상이한 결찰 프로브 세트의 이격은 필요에 따라 변할 수 있다. 도 12B는 대안적인 방향을 도시한다. 도 12C는 완전성 평가 또는 잉여 둘 모두를 위하여 사용될 수 있는 방향을 도시한다.

도 13A-C는 SNP 검출에서 사용하기 위한 본 발명의 구체 예의 여러 개의 개략도를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 발명의 상세한 설명

본 발명의 실시는 다른 지시가 없더라도 유기 화학, 고분자 기술, 문자 생물학(재조합 기술 포함), 세포 생물학, 생화학, 및 면역학의 종래 기술 및 설명을 포함할 수 있으며, 이는 해당 분야의 통상의 기술자에게 알려져 있다. 이러한 종래 기술은 폴리머 어레이 합성, 혼성화, 결찰, 파지 디스플레이, 및 라벨을 사용하는 혼성화 검출을 포함한다. 적절한 기술의 특수한 입증은 이하에 제시된 실시예를 참조하여 달성될 수 있다. 그렇지만, 또 다른 균등한 종래 과정 또한 물론 사용될 수 있다. 이러한 종래 기술 및 설명은 다음과 같은 표준 실험 지침서에서 찾을 수 있다: *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series* (Vols. I-IV), *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, *Cells: A Laboratory Manual*, *PCR Primer: A Laboratory Manual*, and *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (all from Cold Spring Harbor Laboratory Press), Stryer, L. (1995) *Biochemistry* (4th Ed.) Freeman, New York, Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" 1984, IRL Press, London, Nelson and Cox (2000), Lehninger, *Principles of Biochemistry* 3rd Ed., W. H. Freeman Pub., New York, N.Y. and Berg et al. (2002) *Biochemistry*, 5th Ed., W. H. Freeman Pub., New York, N.Y., 이들 모두는 여기서 모든 목적을 위한 참조로서 그 전체가 수록된다.

[0047] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되듯이, 단수형태 부정관사 및 정관사는 문장이 명백하게 다르게 지시하지 않는 한 복수를 포함한다. 따라서 예컨대, "중합효소(polymerase)"에 대한 설명은 한 가지 시약 또는 이들 시약의 혼합물을 지시하며, "방법"에 대한 설명은 해당 분야의 통상의 기술자에게 알려진 균등한 단계들 및 방법들에 대한 설명을 포함하는 식이다.

[0048] 다른 정의가 없는 한, 본 명세서에 사용된 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에서 언급된 모든 공개문헌은 상기 공개문헌에 개시된 장치, 조성물, 제제 및 방법을 설명하고 개시하기 위한 목적을 위하여 참조로서 여기서 수록되며 이들은 현재 설명되는 발명과 결합되어 사용될 수도 있다.

[0049] 수치 범위가 제공되면, 문장에서 명백하게 다른 지시가 없는 한 하한의 단위의 10분의 1 정도에서, 해당 범위의 상한 및 하한 사이의 각각의 삽입되는 값, 언급된 범위 내 또 다른 임의 언급되거나 삽입된 값이 본 발명의 범위에 포함된다는 것이 이해된다. 언급된 범위 내 임의의 특별하게 제외된 한계치라는 가정하에, 더 작은 범위에 독립적으로 포함될 수 있는 이들 더 작은 범위의 상한 및 하한이 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 언급된 범위가 한계치들 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 경우, 이들 포함된 한계치의 둘 모두를 제외하는 범위가 또한 본 발명에 포함된다.

[0050] 이하의 설명에서, 다양한 구체적인 상세사항이 본 발명의 더욱 완전한 이해를 제공하기 위하여 제시된다. 그렇지만, 본 발명이 이를 구체적인 상세사항 중 하나 또는 그 이상 없이도 실시될 수 있음을 해당 분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 또 다른 예에서, 해당 분야의 기술자에게 잘 알려진 공지된 특징 및 과정은 본 발명을 불명확하게 하는 것을 방지하기 위하여 기술하지 않았다.

[0051] 모든 수치 지정, 예컨대, pH, 온도, 시간, 농도, 및 분자량은 범위를 포함하여 근사값이며 이는 0.1의 증가분만큼 (+) 또는 (-)로 변한다. 비록 항상 명백하게 언급되는 것은 아닐지라도, 모든 수치 지정은 그 앞에 "약"이 온다는 것으로 이해될 것이다. 용어 "약"은 또한 정확한 값 "X" 및 예컨대 "X + 0.1" 또는 "X - 0.1"의 미민한 증가분을 포함한다. 비록 항상 명백하게 언급되는 것은 아닐지라도, 본 명세서에 개시된 시약은 단지 예시적인 것이며 이들의 균등물이 해당 분야에 공지되어 있음이 또한 이해될 것이다.

I. 개요

[0053] 본 발명은 샘플 내 표적 핵산을 검출하는 방법 및 조성물을 포함한다. 일반적으로, 표적 핵산은 화학적 결찰의 단계를 포함하는 방법을 통하여 검출되는데 여기서 표적 핵산의 인접하는 도메인에 혼성화된 두 개의 결찰 프로브가 외부 리가아제 효소의 사용 없이 결찰된다.

[0054] 본 발명은 서로 가깝게 근접하는 표적 핵산을 가역적으로 결합시키고 상보적 반응성 결찰 모이어티를 소유하는 둘 또는 그 이상의 결찰 프로브(본 명세서에서 또한 "올리고뉴클레오타이드 프로브"라 칭함)를 사용하는 방법을 제공한다. 결찰 반응에서, 프로브가 적절한 방향으로 표적에 결합한 경우, 이들은 자발적인 화학적 결찰 반응을 수행할 수 있으며 이는 리가아제 효소의 사용에 의존하지 않는 결찰된 올리고뉴클레오타이드 생성물을 산출한다. 따라서 관심 표적의 존재가 상기 결찰된 올리고뉴클레오타이드 생성물(또한 여기서 "결찰 생성물"이라 칭함)의 존재 또는 양을 여러 상이한 방법으로 측정함으로써 결정될 수 있다. 이하에서 설명하듯이, 결찰 프로브는 다양한 추가 기능부를 함유할 수 있는데, 예를 들면 비제한적으로, 예컨대 이하에서 더욱 완전하게 설명하듯이, 광학, 및 전기화학적 라벨, 등과 같은 유도 라벨(direct label)을 비롯하여 결찰된 올리고뉴클레오타이드 생성물의 식별, 정량화 또는 검출에 도움을 주는 검출가능한 라벨, 특정 표적에 대하여 특이화되도록 크기가 정해져서 이에 따라 특정 크기의 결찰 생성물(또는 이러한 결찰 생성물로부터 발생한 앰플리콘)을 검출하는 것이 특정 표적 핵산 서열의 존재 및/또는 양을 식별하게 되는 핵산 서열을 포함하는 가변 스페이서 서열 즉 "사이즈 태그"를 포함한다. 하나 또는 그 이상의 결찰 프로브에 포함된 또 다른 선택적인 기능부는 고체 지지체(예컨대 마이크로어레이, 마이크로비드, 나노입자, 등) 상에서의 후속 포획을 위하여 디자인된 포획 모이어티이며, 이는 비제한적으로, 바이오팁과 같은 결합 파트너, 앵커링 올리고뉴클레오타이드 서열(또한 여기서 "앵커 서열" 또는 포획 서열"이라 칭함), 결찰된 생성물의 농축 또는 조작을 촉진하는 분자 핸들(마그네틱 입자, 올리고뉴클레오타이드 코딩 서열), 및 DNA 또는 RNA 중합효소와 같은 효소를 통하여 상기 결찰된 생성물의 후속 2차 증폭을 조장하는 프로모터 및 프라이머 서열을 포함한다.

[0055] 바람직하게는, 본 발명의 결찰 반응은 이하에서 설명하듯이, 비록 일부 2차 반응이 중합효소와 같은 효소의 사용에 의존할지라도, 본 발명의 결찰 반응은 외부에서 첨가된 리가아제 및 추가적인 효소의 존재를 필요로 하지 않는다. 표적의 증폭은 또한 결찰 생성물의 전환(turnover)을 포함할 수 있으며, 여기서 결찰 생성물은 템플릿 또는 표적 핵산에 대한 낮은 또는 동등한 친화도를 가져서 결찰 프로브를 분리시킨다. 따라서, 혼성화된 프로브의 결찰 즉시, 상기 결찰 생성물은 표적으로부터 분리되어, 표적을 자유롭게 하여 새로운 결찰 반응을 위한 템플릿으로서 작용하도록 한다. 그 대신에, 열 사이클링이 수행되어 결찰 생성물을 표적 서열로부터 제거시켜 새로운 결찰 프로브가 결찰의 또 다른 사이클을 위하여 혼성화되도록 할 수 있다.

[0056] 본 발명은 비제한적으로 DNA 및 RNA 표적을 비롯하여 샘플 내 하나 또는 그 이상의 핵산 표적의 검출을 위한 조성물, 장치 및 방법을 제공한다. 핵산 표적 검출을 위한 비-효소적 접근법 사용의 장점은 비-자연적 DNA 유사체 구조에 대한 낮은 민감성, RNA 표적 서열을 사용하는 능력 및 가변적 상황에서의 낮은 비용 및 높은 견고성을 포함한다. 특히, 본 명세서에 개시된 방법은 상당한 샘플 제조를 요구하지 않는데; 즉, 결찰 반응이 검출을 위한 효소적 프로세스를 억제하거나 비활성화시킬 수 있는 오염물 및 완충액의 존재 하에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 혈액 샘플이 고도 변성 안정화 완충액에 수집되고, 프로브가 첨가되고, 효소적 프로세스를 변성시킬 수 있는 조건 하에서, 반응이 수행될 수 있다. 비순수 샘플 내에서 표적 핵산, 특히 RNA를 분석할 수 있는 이러한 능력은 의료 진단(유전자 발현 프로파일링 및 SNP 검출 포함), 법의학적 적용, 및 환경적 독성물질 및/또는 방사능으로 인한 손상에 대한 테스트와 같은 분야에서 특히 유용한다. 또한, 본 발명의 방법 및 조성물은 파라핀-포매 샘플을 비롯하여, 분해된 샘플로부터 핵산을 검출하는데 유용하며, 여기서 파라핀 내 고정(fixing) 및 포매(embedding) 프로세스는 샘플 핵산의 분해를 야기한다.

- [0057] 또한, 본 발명의 한 구체 예는 표적 핵산 "완전성(integrity)"에 관련된 분석법을 제공한다. 즉, 예컨대 고정된 샘플 내 mRNA, 또는 핵산과 관련하여 해당 분야에 알려진 바와 같이, 핵산은 시간이 지남에 따라 분해된다. 도 11 및 도 12에 제시되고 이하에서 더욱 상세하게 설명되듯이, 본 발명은 샘플의 완전성 평가를 가능하게 하는 다중 결찰 복합체의 사용을 허용한다. 유사하게, 표적 서열 당 이러한 다중 결찰 복합체의 사용은 또한 예컨대 샘플을 2회 또는 3회 시험하는 것과 유사하게, 반복을 통한 데이터 및 분석법 완전성을 위하여 사용될 수 있다.
- [0058] 또 다른 양상에서, 본 발명은 샘플 내에서 핵산을 안정화시키는 역할을 하는 완충액을 제공한다. 일반적으로 이러한 완충액은, 비제한적 구체 예에서, 구아니디니움 하이드로클로라이드를 비롯하여, 카오토로픽 양이온 (chaotropic cation)을 포함하는 변성제를 포함한다. 본 발명의 특정 구체 예에서, 샘플이 본 발명의 완충액에 직접 수집되고, 그 후 후속하여 결찰 프로브의 혼성화 및 결찰이 샘플로부터 핵산을 정제할 필요 없이 상기 완충액에서 수행된다. 일부 구체 예에서, 완충액에 수집된 샘플이 먼저 희석되고 그 후 후속하여 둘 또는 그 이상의 결찰 프로브를 혼성화시키고 결찰시키는 본 명세서에 개시된 방법이 상기 샘플로부터 표적 핵산을 정제할 필요 없이 상기 희석된 샘플 내에서 수행된다.
- [0059] 전술한 바와 같이, 본 발명의 결찰 프로브는 표적 핵산에 혼성화되고 그 후 리가아제 효소를 사용하지 않고 결찰된다. 결찰 이후, 발생된 신규 생성물("결찰 생성물")은 선택적으로 효소적 또는 화학적 반응에 의해 증폭될 수 있다. 바람직한 구체 예에서, 화학적 결찰 반응은 예컨대 일반 PCR 프라이머(universal PCR primer)와 같은 PCR 프라이머 사이트를 갖는 두 개의 프로브를 결합시킨다. 또한, 본 발명의 한 구체 예에서, 결찰 프로브 중 하나 또는 둘 모두는 스타페 서열, 즉 가변 스페이서 서열을 함유하는데, 이는 각각의 프로브 세트(즉, 각각의 표적 서열)에 대한 상이한 길이를 가져서 그 결과 표적-특이성 길이를 갖는 결찰 생성물을 산출하도록 디자인된다. 결찰 이후, 정의된 길이 올리고뉴클레오타이드가 PCR에 이제 의해 기하급수적으로 증폭될 수 있다. 본 발명의 한 양상에 따르면, 프로브는 결찰된 올리고뉴클레오타이드 생성물의 식별, 정제, 정량화 또는 검출에 도움을 주는 검출가능한 라벨(예컨대 형광 라벨, 전기화학적 라벨, 마그네틱 비드, 나노입자, 바이오틴, 등)을 가질 수 있다. 프로브는 또한 선택적으로 자신의 구조 내에 다음을 포함할 수 있다: 고체 지지체(마이크로어레이, 마이크로비드, 나노입자) 상에서의 후속 포획을 위하여 디자인된 앵커링 올리고뉴클레오타이드 서열, 결찰된 생성물의 농축 또는 조작을 촉진하는 분자 핸들(마그네틱 입자, 올리고뉴클레오타이드 코딩 서열), 및 DNA 또는 RNA 중합효소와 같은 효소를 통하여 상기 결찰된 생성물의 후속 2차 증폭을 조장하는 프로모터 서열.
- [0060] 신속하게 진행되는 본 발명의 결찰 반응은 관심 표적에 대하여 특이적이며, 각각의 표적에 대한 결찰된 생성물의 다중 복사본을 생성하며, 이는 검출가능한 신호의 증폭(가끔 본 명세서에서 "생성물 전환(product turnover)"이라 칭함)을 야기한다. 본 발명의 결찰 반응은 이하에서 설명하듯이, 비록 일부 2차 반응이 중합효소와 같은 효소의 사용에 의존할지라도, 본 발명의 결찰 반응은 외부에서 첨가된 리가아제 및 추가적인 효소의 존재를 필요로 하지 않는다. 결찰 화학은 전술한 많은 화학적 모이어티로부터 선택될 수 있다. 바람직한 화학은 일반적 제조 기술에 용이하게 포함되고, 저장 동안 안정하고, 적절하게 디자인된 결찰 프로브 세트에 포함될 때 표적 특이성 결찰에 대한 큰 선호성을 입증할 수 있는 것이다. 또한, 효소에 의한 후속 증폭을 포함하는 구체 예에 대하여, 효소에 의하여 효율적으로 가공될 수 있는 결찰 생성물을 산출하는 결찰 화학 및 프로브 디자인(비자연적 뉴클레오타이드 유사체 포함)이 바람직하다. 표적의 증폭은 예컨대, 결찰 생성물이 템플릿 또는 표적 핵산에 대한 낮은 또는 동등한 친화도를 가져서 결찰 프로브를 분리시키는 불안정화에 의하거나, 또는 과잉 프로브의 존재 하의 표준 열사이클링에 의한, 결찰 생성물의 전환(turnover)을 포함할 수 있다. 따라서, 혼성화된 프로브의 결찰 즉시, 상기 결찰 생성물은 표적으로부터 분리되어, 표적을 자유롭게 하여 새로운 결찰 반응을 위한 템플릿으로서 작용하도록 한다.
- [0061] 본 발명의 또 다른 양상에 있어서 그리고 이하에서 더욱 상세하게 설명하는 바와 같이, 본 발명의 분석법의 특이성은 선택적으로 표적 포획 프로브에 의해 개선된다. 본 발명의 표적 포획 프로브는 표적 핵산 및 포획 모이어티 상의 도메인에 대하여 상보적인 도메인을 포함한다. 표적 포획 프로브는 결찰 프로브와의 결찰 반응에 참여하지 않으며, 그 대신에 결찰 프로브의 전단 또는 후단에 있는 표적 핵산에 대하여 혼성화하도록 디자인된다. 표적 핵산에 대한 표적 포획 프로브의 혼성화는 표적 핵산, 표적 포획 프로브, 및 상기 표적 핵산 상에 형성된 모든 결찰 생성물을 포함하는 표적 복합체를 생성한다. 표적 복합체는 그 후 표면 또는 기질(예컨대 비드)에 결합될 수 있으며, 모든 비결합된 반응물이 상기 표면 또는 기질에 결합된 표적 복합체로부터 분리될 수 있다. 따라서, 결찰 프로브와 성공적으로 혼성화된 표적 핵산의 최초 샘플의 서브세트 상에서 모든 후속하는 증폭 및/또는 검출 단계가 수행되기 때문에, 후속하는 분석법의 특이성이 개선된다.
- [0062] 본 발명의 전술한 양상 및 또 다른 양상 그리고 구체 예는 이하의 섹션에서 더욱 상세하게 설명된다.

[0063]

II. 샘플

[0064]

한 양상에서, 본 발명은 샘플 내 표적 핵산(또한 여기서 "표적 서열"로 칭함)의 존재 또는 부존재를 검출하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 해당 분야의 기술자에 의해 이해되듯이, 샘플은, 체액(비체한적으로, 거의 모든 생물체의 혈액, 소변, 혈청, 림프, 침, 항문과 같은 분비물, 땀 및 정액을 포함하며, 포유류 샘플이 바람직하며 인간 샘플이 더욱 바람직함); 환경 샘플(비체한적으로, 공기, 농업, 물, 및 토양 샘플을 포함); 식물 재료; 생물무기 샘플; 연구 샘플(예컨대, 샘플은 예컨대 게놈(genomic) DNA의 일반적 증폭과 같은 증폭 반응의 생성물일 수 있음); 정제된 게놈 DNA, RNA, 단백질 등과 같은 정제된 샘플; 원료 샘플(박테리아, 바이러스, 게놈 DNA, 등);을 비롯하여, 많은 것들을 포함할 수 있으며, 해당 분야의 기술자에 의해 이해되듯이, 거의 모든 실험적 조작이 샘플 상에서 수행될 수 있었다. 일부 구체 예는 siRNA 및 마이크로RNA를 표적 서열로서 사용한다(Zhang et al., *J Cell Physiol.* (2007) 210(2):279-89; Osada et al., *Carcinogenesis.* (2007) 28(1):2-12; 및 Mattes et al., *Am J Respir Cell Mol Biol.* (2007) 36(1):8-12, 이들 각각은 모든 목적, 특히 표적 서열과 관련된 특정한 모든 개시를 위하여 그 전체가 참조로서 여기에 수록된다).

[0065]

본 발명의 일구 구체 예는 저장된(예컨대 동결된 및/또는 보존된) 또는 신선한 조직으로부터의 샘플을 사용한다. 파라핀-포매 샘플은 많은 구체 예에서 특히 유용한데, 왜냐하면 이를 샘플이 상기 샘플과 관련된 추가 데이터의 존재로 인하여 진단 및 예측에 대하여 매우 유용하기 때문이다. 본 명세서에 개시된 고정된 파라핀-포매 조직 샘플은 저장 가능한 조직 샘플 또는 보존 조직 샘플(archival tissue sample)을 의미한다. 대부분의 환자-유래된 병리 샘플은 조직학적 분석과 이후의 보존적 저장(archival storage)을 가능하게 하기 위하여 통상적으로 고정되고 파라핀-포매된다. 이러한 샘플은 흔히 종래 핵산 검출 방법에 대하여 유용하지 않은데, 왜냐하면 이러한 연구는 핵산 샘플의 고도의 완전성을 요구하며 이에 따라 핵산 발현의 정확한 측정이 수행될 수 있어야 하기 때문이다. 흔히, 파라핀-포매 샘플에서의 유전자 발현 연구는 단백질 발현 수준을 모니터링하기 위한 면역조직화학 염색(immunohistochemical staining)을 사용하는 정성적 모니터링에 국한된다.

[0066]

WO 2007/133703에 개시된 바와 같이 고정된 파라핀-포매 샘플로부터 핵산을 정제하기 위한 많은 기술들이 존재하며 상기 문헌의 모든 내용은 모든 목적 특히 파라핀-포매 샘플로부터의 핵산의 정제와 관련된 모든 개시사항을 위한 참조로서 여기에 수록된다. Foss 등의 *Diagnostic Molecular Pathology*, (1994) 3:148-155 및 Paska, C. 등의 *Diagnostic Molecular Pathology*, (2004) 13:234-240에 개시된 방법 및 Ambion's RecoverAll Total Nucleic acid Isolation 키트와 같은 시판 중인 키트가 그 전체에 참조로서 포함된다. 통상적인 방법은 자일렌 또는 또 다른 유기 용매를 사용하는 추출을 통하여 조직으로부터 파라핀을 제거하는 단계로부터 시작하여, 조직 및 단백질을 절단하여 상기 조직으로부터 게놈 물질이 방출되는 것을 돋는 단백분해효소(proteinase) K와 같은 단백질분해효소(protease) 및 열로 처리하는 단계가 후속된다. 방출된 핵산은 그 후 멤브레인 상에 포획되거나 또는 용액으로부터 침전되고, 불순물을 제거하거나 또는 mRNA 분리 경우를 위하여 세척되며, 원치 않는 DNA를 분해시키기 위해 DNase 처리 단계가 가끔 추가된다.

[0067]

본 명세서의 추가적인 상세사항에서 논의되듯이, 표적 분석물 및 상기 표적 분석물을 검출하기 위하여 사용되는 결찰 프로브 둘 모두가 본 발명에 따라 핵산을 포함할 수 있다. "핵산" 또는 "올리고뉴클레오타이드" 또는 문언적 균등물은 여기서 서로 공유결합으로 연결된 적어도 두 개의 뉴클레오타이드를 의미한다. 표적 핵산은 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 비록 일부 경우에, 이하에서 설명되듯이, 핵산 유사체가 포함되며 이는 대안적인 백본을 가질 수 있을지도(특히 결찰, 라벨 또는 포획 프로브의 사용을 위한), 본 발명의 핵산은 일반적으로 (예컨대 표적 서열의 경우에서) 포스포디에스테르 결합을 함유할 것이며, 이는 예컨대, 포스포르아마이드(Beaucage et al., *Tetrahedron* (1993) 49(10):1925 및 그 참조문헌; Letsinger, *J. Org. Chem.* (1970) 35:3800; Sprinzl et al., *Eur. J. Biochem.* (1977) 81:579; Letsinger et al., *Nucl. Acids Res.* (1986) 14:3487; Sawai et al., *Chem. Lett.* (1984) 805; Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.* (1988) 110:4470; 및 Pauwels et al., *Chemica Scripta* (1986) 26:141), 포스포로티오에이트 (Mag et al., *Nucleic Acids Res.* (1991) 19:1437; 및 U.S. Pat. No. 5,644,048), 포스포로디티오에이트 (Briu et al., *J. Am. Chem. Soc.* (1989) 111:2321, 0-메틸포포로아미다이트 결합(Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press 참조), 및 웨타이드 핵산 백본 및 결합 (Egholm, *J. Am. Chem. Soc.* (1992) 114:1895; Meier et al., *Chem. Int. Ed. Engl.* (1992) 31:1008; Nielsen, *Nature*, (1993) 365:566; Carlsson et al., *Nature* (1996) 380:207 참조, 이들 모두는 그 전체가 참조로서 여기에 수록됨)을 포함한다. 또 다른 유사 핵산은 다음을 포함하여 바이사이클릭 구조를 갖는 것을 포함한다: 잠금 핵산(locked nucleic acid), Koshkin et al., *J. Am. Chem. Soc.* (1998) 120:13252 3); 양성 백본(positive backbone) (Denpcy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:6097; 비-이온성 백본 (U.S. Pat. Nos. 5,386,023, 5,637,684,

5,602,240, 5,216,141 및 4,469,863; Kiedrowshi et al., *Angew. Chem. Int'l. Ed. English* (1991) 30:423; Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.* (1988) 110:4470; Letsinger et al., *Nucleoside & Nucleotide* (1994) 13:1597; Chapters 2 and 3, *ASC Symposium Series* 580, Ed. Y. S. Sanghui 및 P. Dan Cook; Mesmaeker et al., *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* (1994) 4:395 ; Jeffs et al., *J. Biomolecular NMR* (1994) 34:17; Xu et al., *Tetrahedron Lett.* (1996) 37:743) 및 비-리보오스 백본, U.S. Pat. Nos. 5,235,033 및 5,034,506, 그리고 Chapters 6 and 7, *ASC Symposium Series* 580, Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook에 기재된 것 포함. 하나 또는 그 이상의 카르보사이클릭 당을 함유하는 핵산이 또한 핵산의 정의 내에 포함된다 (Jenkins et al., *Chem. Soc. Rev.* (1995) pp 169-176 참조). 몇 가지의 핵산 유사체가 Rawls, *C & E News* Jun. 2, 1997 page 35에 개시된다. 이들 참조문헌 모두는 모든 목적을 위하여, 그리고 특히 핵산과 관련된 모든 개시사항을 위하여 그 전체가 참조로서 명백하게 여기에 수록된다. 리보오스-포스페이트 백본의 이러한 변성을 라벨 또는 또 다른 모이어티의 침가를 촉진하기 위하여, 생리학적 환경에서 이러한 분자의 안정성 및 반감기를 증가 또는 감소시키기 위하여, 기타 등을 위하여 수행될 수 있다.

[0068] 예를 들어, 발명의 결찰 모이어티의 사용은, 사용된 화학에 의존하는 일부 경우에 있어서, 결찰 생성물로서 핵산 유사체를 산출할 수 있다. 예를 들어, 이하의 반응식 1에 제시된 바와 같이, 일부 결찰 모이어티의 사용은 포스포티오에스테르 결합을 야기한다.

[0069] 해당 분야의 기술자에 의해 이해되듯이, 이러한 핵산 유사체 모두는 본 발명에서 그 용도를 찾을 수 있다. 또한, 자연적으로 발생하는 핵산 및 유사체의 혼합물이 예를 들어 결찰 모이어티의 사이트에서 생성될 수 있으며, 유사체 구조가 사용될 수 있다. 그 대신에, 상이한 핵산 유사체의 혼합물, 및 자연적으로 발생하는 핵산 및 유사체의 혼합물이 생성될 수 있다.

[0070] 핵산 유사체는 예를 들어 웹타이드 핵산 (PNA, WO 92/20702, 그 전체가 참조로서 여기에 수록됨) 및 잠금 핵산 (LNA, Koshkin AA et al. *Tetrahedron* (1998) 54:3607-3630., Koshkin AA et al. *J. Am. Chem. Soc.* (1998) 120:13252-13253., Wahlestedt C et al. *PNAS* (2000) 97:5633-5638, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 여기에 수록됨)을 포함할 수 있다. 일부 응용예에서 이러한 유형의 유사체 백본은 개선된 혼성화 속도론, 개선된 열적 안정성 및 부정합 서열에 대한 개선된 민감도를 나타낼 수 있다.

[0071] 핵산은 특이성에 따라 단일 가닥 또는 이중 가닥으로 될 수 있거나, 또는 이중 가닥 또는 단일 가닥 서열 둘 모두의 부분을 함유할 수 있다. 핵산은 DNA, 게놈 및 cDNA, RNA 또는 혼성일 수 있으며, 여기서 핵산은 디옥시리보- 및 리보-뉴클레오타이드의 임의 결합, 및 자연적으로 발생하는 핵염기(우라실, 아데닌, 티민, 시토신, 구아닌) 및 비-자연적으로 발생하는 핵염기(이노신, 자타닌, 하이포자타닌, 이소시토신, 이소구아닌, 5-메틸시토신, 슈도이소시토신, 2-티오우라실 및 2-티오티민, 2-아미노퓨린, N9-(2-아미노-6-클로로퓨린), N9-(2,6-디아미노퓨린), 하이포잔틴, N9-(7-데아자-구아닌), N9-(7-데아자-8-아자-구아닌) 및 N8-(7-데아자-8-아자-아데닌), 5-프로핀일-우라실, 2-티오-5-프로핀일-우라실) 등을 포함하는 염기들의 임의 결합을 함유한다. 본 명세서에서 사용되듯이, 용어 "핵염기"는 "뉴클레오시드" 와 "뉴클레오타이드", 그리고 핵산 유사체의 모노머를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 각각 염기를 함유하는 웹타이드 핵산의 개별 유닛이 여기서 핵염기라 불린다.

[0072] 표적 서열의 영역 내에서 단일-가닥 상태로 존재하지 않는 핵산 샘플(예컨대 표적 서열)은 일반적으로 검출 또는 혼성화 이전에 해당 영역에서 단일-가닥이 된다. 일반적으로, 핵산 샘플은 열 또는 화학적 변성을 사용하여 표적 서열의 영역에서 단일-가닥이 될 수 있다. 증폭을 통하여 획득된 폴리뉴클레오타이드에 대하여, 단일-가닥 증폭 생성물을 발생시키기에 적합한 방법이 선호된다. 단일-가닥 증폭 생성물 폴리뉴클레오타이드를 발생시키기에 적합한 증폭 프로세스의 비-제한적인 예는 T7 RNA 중합효소 유출 전사법(run-off transcription), RCA, 비 대칭 PCR(Bachmann et al., *Nucleic Acid Res.* (1990) 18:1309), 및 비동기식 PCR(WO 01/94638)을 포함하여, 여기에 제한되는 것은 아니다. PNA 개방제(PNA opener)의 사용과 같이(U.S. Patent No. 6,265,166), 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드의 영역을 단일 가닥으로 만들기 위한 공지된 방법이 또한 폴리뉴클레오타이드 상의 단일-가닥 표적 서열을 발생시키기 위하여 사용될 수도 있다.

표적 핵산

[0074] 여기서 더욱 논의되듯이, 본 발명은 표적 서열을 검출하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. "표적 서열" 또는 "표적 핵산" 또는 문언적 균등물은 여기서 핵산의 단일 가닥 상의 핵산 서열을 의미한다. 표적 서열은 유전자의 일부분, 조절 서열, 게놈 DNA, cDNA; mRNA, 마이크로RNA 및 rRNA를 포함하는 RNA, 또는 또 다른 것일 수 있다. 여기서 개략화되듯이, 표적 서열은 샘플로부터의 표적 서열이거나, 또는 증폭 반응의 생성물과 같은 2차 표적 등일 수 있다. 더 긴 서열이 더욱 특이적이라는 이해 하에서, 표적 핵산은 임의 길이일 수 있다. 해당 분야의

기술자에 의해 이해되듯이, 상보적인 표적 서열은 많은 형태를 취할 수 있다. 예를 들어, 표적 핵산은 더 큰 핵산 서열, 즉 유전자 또는 mRNA의 전부 또는 일부, 라스미드 또는 계놈 DNA의 제한 단편, 등 내에 함유될 수 있다. 이들의 임의 또는 모든 결합이 특정 분석법에서 표적 핵산으로서의 역할을 한다. 많은 경우에, 복합 분석법 (multiplex assay)이 수행되는데, 여기서 복수의 표적 서열이 예컨대 유전자 발현 프로파일링을 위하여 동시에 검출되며, 이하에서 더욱 상세하게 설명된다.

[0075] 일반적으로, 각각의 표적 서열은 복수의 상이한 표적 도메인으로 구성된다. 각각의 표적 서열은, 이하에서 설명되듯이, 한 세트의 결찰 프로브, 또는 그 이상에 대한 혼성화를 위한 적어도 한 쌍의 결찰 도메인을 가진다. 예를 들어, 샘플 표적 서열의 제1 표적 도메인은 제1 결찰 프로브와 혼성화하고, 표적 서열 내 제2 표적 도메인은 제2 결찰 프로브와 혼성화하여, 예컨대 동시적인 화학적 결찰을 허용하기에 충분한 공간적 근접도 내로 화학적 결찰 모이어티를 이동시킨다.

[0076] 일반적으로, 표적 결찰 도메인의 각각의 쌍은 서로 인접한데, 즉 상기 두 도메인을 분리시키는 뉴클레오타이드가 없다. 이는 표적 서열의 일반적인 검출(예컨대 표적 서열로서 mRNA를 사용하는 유전자 발현 프로파일링), 이하에서 설명되는 전이 반응, 뿐만 아니라 단일 뉴클레오타이드 단형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 검출을 위한 용도가 존재한다. SNP 검출에 대하여, 표적 서열은 서열 정보가 요구되는 위치를 포함하며, 일반적으로 여기서 "검출 위치"라 불린다. 일부 구체 예에서, 검출 위치는 단일 뉴클레오타이드이지만, 일부 구체 예에서, 서로 인접하거나 또는 하나 이상의 뉴클레오타이드에 의해 분리된 복수의 뉴클레오타이드를 포함할 수도 있다. 여기서 사용된 "복수"는 적어도 둘을 의미한다. 여기서 사용되듯이, 혼성에서 검출 위치 염기와 염기쌍을 형성하는 결찰 프로브의 염기를 "조사 위치(interrogation position)"라 한다.

[0077] 각각의 샘플 표적 핵산은 추가적으로 결찰 도메인의 다중 쌍을 가질 수 있다. 즉, 1, 2, 3 또는 그 이상의 결찰 프로브 세트가 여러 위치에서 동일 표적 서열과 혼성화할 수 있으며, 도 11 및 12에 일반적으로 도시된다. 이하에서 더욱 완전하게 설명되듯이, 표적 핵산 당 다중 결찰 도메인의 사용은 샘플 내 표적 핵산(및/또는 최초 샘플)의 완전성을 평가하기 위한 기초으로서 작용할 수 있다.

[0078] 샘플 표적 핵산은 결찰 도메인에 부가하여 또 다른 도메인을 함유할 수 있다. 일부 구체 예에서, 본 발명의 표적 핵산은 표적 포획 도메인이 혼성화될 수 있는 표적 포획 도메인을 포함한다. 일반적으로, 도 11에 도시되며 분석법의 목적에 따라서, 표적 포획 도메인은 표적 핵산의 "전단(upstream)", "후단(downstream)" 또는 "중간(in-between)"의 하나 또는 그 이상의 결찰 도메인일 수 있다.

[0079] 구체화되지 않는 한, 용어 "제1" 및 "제2"는 표적 서열의 5'-3' 방향과 관련하여 서열의 방향을 부여하는 것으로 의미되는 것은 아니다. 예를 들어, 상보적 표적 서열의 5'-3' 방향을 가정하면, 제1 표적 도메인은 제2 도메인에 대하여 5'에 위치하거나, 또는 제2 도메인에 대하여 3'에 위치할 수 있다. 참조의 용이성 및 비제한성을 위하여, 이를 도메인은 종종 5'에서 3' 방향으로 표시되는 표적 서열을 일반 규칙으로 하여, "전단" 및 "후단"으로 불린다. 그렇지만, 결찰 도메인이 방향을 가져서 이에 따라 결찰 프로브 세트의 3' 및 5' 결찰 모이어티가 완전하게 인접하여(예컨대 삽입된 핵염기 없음) 또는 결찰 모이어티에 부착된 링커가 결찰을 가능하게 하는 거리 내에서 서로 혼성화한다는 것에 유념하여야 한다.

[0080] 일부 구체 예에서, 표적 결찰 도메인의 쌍이 분리될 수도 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 결찰 증폭이 바람직한 경우, 결찰 프로브는 링커를 사용할 수도 있으며 혼성화될 때 표적 서열의 하나 이상의 핵염기에 의해 분리되어 결찰된 생성물에 혼성화 불안정성을 부여한다. 또 다른 응용에서, 이하에서 더욱 상세하게 논의되듯이, 본 발명의 완충액은 샘플 내 핵산, 특히 RNA를 안정화시키는데 유용하다. 본 발명의 몇몇 양상에서, 샘플은 본 발명의 완충액에 수집된다. 또 다른 구체 예에서, 이하에서 더욱 상세하게 논의되듯이, 이러한 완충액은 변성제, 환원제, 계면활성제, pH 완충액, EDTA, 및 이들의 임의 조합 중 하나 이상을 포함한다.

III. 완충액

[0082] 한 양상에서, 본 발명은 핵산(여기서 또한 "샘플 핵산" 또는 "표적 핵산"으로 불림)을 안정화시키는 방법 및 조성물을 제공한다. 여기에 사용된 "안정화"는 샘플 내 핵산이 심지어 주위 실온 또는 그 이상에서 저장될 때 시간 기간 동안 분해에 저항성인 것을 의미한다. 일부 구체 예에서, 본 발명의 완충액에 함유된 핵산은 약 1일 내지 약 3개월 동안 실온 또는 그 이상에서 안정하다. 안정화는 이하에서 더욱 논의되듯이 핵산 완전성에 대한 분석법을 포함하여, 해당 기술분야에서 공지된 임의 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 또 다른 구체 예에서, 완충액 내에 저장된 샘플 내 핵산의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%가 완충액 내에 저장되지 않은 샘플 내의 것보다 더 적은 분해를 나타내는 경우, 본 발명의 완충액 내에 함유된 핵산을 포함하는

샘플은 완충액 내에 저장되지 않은 샘플과 비교하여 증가된 안정성을 갖는 것으로 평가된다. 또 다른 구체 예에서, 샘플 내 적어도 대부분의 핵산이 완충액 내에 저장되지 않은 샘플과 비교하여 감소된 분해를 나타내는 경우, 샘플은 본 발명의 완충액에 의해 안정화되는 것으로 식별된다. RNA 샘플의 안정성은 핵산 샘플의 평균 크기를 측정하는 것을 추구하는 모세관 전기영동 방법에 의해 종종 평가된다. 안정화된 샘플은 비-안정화된 샘플보다 더 긴 평균 크기를 가질 것이다. 본 발명의 또 다른 양상은 표적 핵산의 평균 크기 및 상관성에 의해 표적 핵산의 분해 수준을 평가하기 위하여 사용될 수 있는 하나 또는 그 이상의 표적 포획 프로브와 조합된 다중 결찰 프로브 세트의 사용이다.

[0083] 본 발명의 완충액은 선택적으로 그리고 임의 조합으로 하나 이상의 변성제, 환원제, 계면활성제, pH 완충액, EDTA와 같은 칼레이터, 및 이들의 임의 조합을 포함할 수 있다. 이해되듯이, 본 발명의 완충액은 동일 클래스 내의 여러 유형의 구성성분을 포함할 수도 있는데 - 예컨대, 본 발명의 완충액은 하나 이상의 유형의 계면활성제와 조합된 하나 이상의 상이한 종류의 변성제, 등을 포함할 수 있다.

[0084] 본 발명의 완충제의 장점은 샘플 내 RNA와 같은 핵산을 안정화시키기 위하여 사용되어서 이에 따라 샘플이 본 명세서에 기재된 방법에 따라 완충 용액으로부터 직접적으로 분석될 수 있다는 점이다. 환연하면, 본 발명의 완충 용액에 함유된 샘플은 RNA의 분리 또는 정제 없이 본 명세서에 개시된 화학적 결찰 및 검출 방법에 사용될 수 있다. 본 발명의 완충액의 또 다른 장점은 완충액 내에 샘플을 수집할 때 세포 파쇄(cell lysis)가 일어나며, 이에 따라 샘플로부터 표적 핵산을 방출시키는 추가 과정을 요구하지 않는다는 점이다.

[0085] 대표적인 구체 예에서, RNA를 포함하는 샘플은 pH 7.5에서 구아니디니움 하이드로클로라이드, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 디티오타이톨(DTT), Triton X-100, 및 Tris-HCl을 포함하는 완충 용액 내에 혼합될 수 있다. 또 다른 구체 예에서, RNA를 포함하는 샘플은 pH 7.5에서 구아니디니움 이소티오시아네이트, EDTA, DTT, Triton X-100, 및 Tris-HCl을 포함하는 완충 용액 내에 혼합될 수 있다. RNA는 이러한 완충 용액에서 안정적이며 RNA의 분해를 조장할 수 있는 또 다른 샘플 구성요소로부터 RNA를 분리시킬 필요가 없다.

[0086] 또 다른 구체 예에서, 본 발명의 완충액은 바람직하게는 변성제, 특히 카오트로픽 양이온을 포함하는데, 이는 RNA의 2차 구조를 펼치는 것을 도움으로써 여기에 개시된 방법 및 분석법에 있어서 반응 및 결합 효율성을 증가시키는 효과를 가진다. 통상적인 카오트로픽 분자(Chaotropic molecule)는 구아니디니움 하이드로클로라이드, 구아니디니움 이소티오시아네이트, 베타인 또는 글리콜린 베타인, 우레아, 티오우레아, 및 리튬 퍼클로레이트이다. 이론에 의해 제한됨이 없이, 핵산 내 3차 구조의 분쇄에 효과적인 카오트로픽제(chaotropic agent)가 바람직하며 또한 용액에서의 핵산 표적의 용해도를 유지시키는 카오트로픽제가 특히 유리하다. 본 발명의 완충액, 특히 카오트로픽 양이온을 포함하는 완충액의 장점은 완충액이 용액 내에 샘플의 핵산을 유지시킨다는 것이다. 이는 혈액-기반 시험을 위하여 전달 시스템에서 사용되는 다른 종래 완충액과 대조적인데, 종래 완충액은 샘플의 핵산(특히 RNA) 주변에 양이온 철을 침전/형성하는 경향이 있다. 본 발명의 완충액이 용액 내 핵산을 유지하기 때문에, 또한 본 발명의 분석법의 화학적 결찰 방법이 효소를 요구하지 않기 때문에, 시료가 완충액에 수집될 수 있고 결찰 프로브(및 많은 구체 예에서, 표적 포획 프로브)가 샘플 및 형성되는 결찰 생성물에 첨가될 수 있다. 혼성화 조건을 변화시키고 그 후 추가 분석을 위하여 결찰 생성물 또는 표적 복합체를 방출시키기 위하여, 완충액이 있는 샘플은 변성제를 희석시키기 위해 단순하게 희석될 수 있고 이에 따라 혼성화 조건을 변화시킬 수 있으며, 이는 본 명세서에 개시된 방법 및 해당 분야에 공지된 방법 중 임의 것을 사용하는 핵산의 분석을 가능하게 한다.

[0087] 또 다른 구체 예에서, 본 발명의 완충액은 약 5 내지 약 8.5의 pH를 가진다. 더욱 바람직하게는 완충 용액은 약 6 내지 8의 pH를 가지며 더더욱 바람직하게는, 대략 7.3 또는 7.5의 pH를 가진다.

[0088] 이하의 섹션은 예시적인 완충액 성분을 더욱 상세하게 논의한다. 비록 이들 성분들 각각이 별도로 논의되지만, 본 발명은 이하의 완충액 성분들뿐만 아니라 해당 분야의 공지된 임의 또 다른 성분들의 임의 조합을 포함한다.

변성제

[0089] 바람직한 구체 예에서, 본 발명의 완충액은 1종 이상의 변성제를 포함한다. 여기서 사용되는 변성제는 2차 및 3차 구조의 손실을 동반하면서 핵산의 이중 나선(double helix)을 펴는 역할을 하는 모든 물질을 의미한다. 또 다른 구체 예에서, 변성제는 비제한적으로 구아니디니움 하이드로클로라이드(GuHCl) 및 구아니디니움 이소티오시아네이트를 비롯하는, 카오트로픽 양이온을 포함한다.

[0091] 또 다른 구체 예에서, 변성제는 구아니디니움 하이드로클로라이드이며, 약 1 몰 내지 약 8 몰의 농도로 존재하며, 더욱 바람직하게는 약 2 몰 내지 약 4 몰의 농도로 존재하며, 더더욱 바람직하게는 대략 3몰의 농도로 존재

한다. 또 다른 구체 예에서, 본 발명의 완충액 내 GuHCl의 농도는 약 0.2-10, 0.5-9, 1-8, 1.5-7, 2-6, 2.5-5, 및 3.0-4.0 몰 범위이다. 또 다른 구체 예에서, 본 발명의 완충액 내 GuHCl의 농도는 약 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15 몰이다.

[0092] 또 다른 구체 예에서, 변성제는 구아니디니움 이소티오시아네이트이며, 약 1 몰 내지 약 8 몰의 농도로 존재하며, 더욱 바람직하게는 약 2 몰 내지 약 4 몰의 농도로 존재하며, 더욱 바람직하게는 대략 3 몰의 농도로 존재한다. 또 다른 구체 예에서, 본 발명의 완충액 내 구아니디니움 이소티오시아네이트의 농도는 약 0.2-10, 0.5-9, 1-8, 1.5-7, 2-6, 2.5-5, 및 3.0-4.0 몰 범위이다. 또 다른 구체 예에서, 본 발명의 완충액 내 구아니디니움 이소티오시아네이트의 농도는 약 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15 몰이다.

[0093] 이해되듯이, 해당 분야에 공지된 또 다른 변성제가 구아니디니움 하이드로클로라이드 및 구아니디니움 이소티오시아네이트에 대하여 앞에서 열거한 것과 유사한 농도에서 본 발명의 완충액 내에 사용될 수 있다.

[0094] 일부 구체 예에서, 구아니디니움 염과 같은 염의 고농도의 사용과 같이, 이를 시약은 또한 파쇄제(lysis agent)로서 작용한다. 해당 분야의 기술자에 의해 이해되듯이, 일반적으로, 세포 파쇄제로서 또한 역할을 하는 변성제의 사용이 특히 유용하나, 본 발명은 또한 첫 번째 별도의 파쇄 단계 및 후속하는 변성제 추가 단계의 사용을 고려한다.

계면활성제

[0095] 일부 구체 예에서, 본 발명의 완충액은 1종 이상의 계면활성제를 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 계면활성제는 비제한적으로 Triton X-100 및 소듐 N-라우로일사르코신을 포함한다.

[0097] 또 다른 구체 예에서, 계면활성제는, 중량으로, 약 0.1% 내지 약 5% 농도에서 본 발명의 완충액 내에 존재한다. 또 다른 구체 예에서, 계면활성제는, 중량으로, 약 0.1%-10%, 0.5%-9.5%, 1%-9%, 1.5%-8.5%, 2%-8%, 2.5%-7.5%, 3%-7%, 3.5%-6.5%, 4%-6%, 및 4.5%-5.5%의 농도로 존재한다. 바람직한 구체 예에서, 계면활성제는 약 0.5% 내지 약 3%의 농도를 가진다. 또 다른 구체 예에서, 계면활성제는 중량으로 대략 1.5%의 농도를 가진다.

pH 완충액

[0099] 일부 구체 예에서, 본 발명의 완충액은 1종 이상의 pH 완충액을 포함한다. 이러한 pH 완충액은 비제한적으로 Tris를 포함한다. 또 다른 구체 예에서 pH 완충액은 해당 분야의 통상의 기술자에게 공지된 많은 것 중 어느 하나일 수 있다. 일반적으로 본 발명에 사용된 pH 완충액은 작업 pH의 하나의 pH 단위 내 pKa를 갖는 시약을 포함한다.

[0100] 일부 구체 예에서, pH 완충액은 약 10 mM 내지 약 100 mM의 농도로 본 발명의 완충액 내에 존재한다. 바람직한 구체 예에서, pH 완충액은 약 20 mM 내지 약 50 mM의 농도, 더욱 바람직하게는 대략 30 mM의 농도를 가진다. 또 다른 구체 예에서, pH 완충액은 약 5-150, 10-140, 15-130, 20-120, 25-110, 30-100, 35-90, 40-80, 45-70, 및 50-60 mM의 농도를 가진다.

환원제

[0102] 일부 구체 예에서, 본 발명의 완충액은 1종 이상의 환원제를 포함한다. 이러한 환원제는 비제한적으로 디티오틴(DTT) 및 머캡토에탄올을 포함할 수 있다.

[0103] 또 다른 구체 예에서, 환원제는 약 1 mM 내지 약 100 mM의 농도를 가진다. 바람직한 구체 예에서, 환원제는 약 4 mM 내지 약 7 mM의 농도, 심지어 더욱 바람직하게는 대략 5 mM의 농도를 가진다. 또 다른 구체 예에서, 환원제는 약 0.5-10, 1-9.5, 1.5-9, 2-8.5, 2.5-8, 3-7.5, 3.5-7, 4-6.5 mM의 농도를 가진다. 또 다른 구체 예에서, 환원제는 약 1-150, 10-140, 15-130, 20-120, 25-110, 30-100, 35-90, 40-80, 45-70, 및 50-60 mM의 농도를 가진다.

EDTA

[0105] 또 다른 구체 예에서, 본 발명의 완충액은 약 1 mM 내지 약 100 mM로 EDTA를 포함한다. 더욱 바람직하게는 EDTA는 약 10 mM 내지 약 50 mM의 농도, 심지어 더욱 바람직하게는, 대략 20 mM의 농도를 가진다. 또 다른 구체 예에서, EDTA는 약 1-150, 10-140, 15-130, 20-120, 25-110, 30-100, 35-90, 40-80, 45-70, 및 50-60 mM의 농도로 존재한다. 또 다른 구체 예에서, EDTA는 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 mM의 농도를 가진다.

[0106] 추가 완충액 성분

본 발명의 완충액은 해당 분야에 공지된 임의 추가 성분, 특히 핵산을 포함하는 반응에서 유용한 해당 분야에 공지된 성분을 추가로 포함할 수 있다. 추가 성분은 비제한적으로 다음을 포함할 수 있다: 보조제, 희석제, 결합제, 안정화제, 염(NaCl 및 MgCl₂ 포함), 친유성 용매, 보존제, 등. 완충액 성분은 또한 약학 부형제 및 첨가제, 단백질, 펩타이드, 아미노산, 지질, 및 탄수화물(예컨대, 모노사카라이드, 디-, 트리-, 테트라-, 및 올리고사카라이드를 포함하는 당; 알디톨, 알돈산, 에스테르화된 당 등과 같은 유도된 당; 및 폴리사카라이드 또는 당 폴리머)을 포함할 수 있으며, 이들은 단독으로 또는 조합으로 중량 또는 부피로 1-99.99%를 포함하여, 단독으로 또는 조합으로 존재할 수 있다. 대표적인 단백질 부형제는 인간 혈청 알부민(HSA), 재조합 인간 알부민(rHSA), 젤라틴, 카제인, 등과 같은 혈청 알부민을 포함한다. 완충능으로 또한 기능할 수 있는 대표적인 아미노산/황체 성분은 알라닌, 글리신, 아르기닌, 베타인, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 시스테인, 리신, 류신, 이소류신, 발린, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파르탐 등을 포함한다. 탄수화물 부형제가 또한 본 발명의 범위 내에 의도되는데, 그 예에는 비제한적으로 과당, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 소르보스 등과 같은 모노사카라이드; 락토스, 수 크로스, 트레할로스, 셀로비오스 등과 같은 디사카라이드; 라피노스, 멜레지토스, 말토덱스트린, 텍스 트란, 전분 등과 같은 폴리사카라이드; 및 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 자일리톨, 소르비톨(글루시톨) 및 미오이노시톨과 같은 알디톨이 포함된다.

[0108] 본 발명의 완충액의 용도

본 발명의 완충액은 여기서 논의되는 샘플 수집, 화학적 결찰, 또는 분석법에서 사용될 수 있다.

일부 구체 예에서, 표적 핵산을 함유하는 샘플이 본 발명의 완충액에 수집된다. 본 발명의 완충액의 장점은 이들이 샘플 내에 함유된 핵산을 안정화시키는 경향이 있다는 점이다. 따라서, 종종 수집 즉시, 특히 RNA에 대하여 발생하기 시작하는 분해가 본 발명의 완충액에 의해 적어도 어느 정도 억제되며, 이는 본 발명의 방법을 사용하는 또 다른 분석에 대하여 강건한 표적 핵산 세트를 제공한다.

또 다른 구체 예에서, 샘플이 본 발명의 완충액에 수집되는 즉시, 결찰 프로브 및 선택적으로 표적 포획 프로브(이하에서 더욱 상세하게 논의됨)가 표적 핵산의 정제 없이 완충액 내 샘플에 직접 추가될 수 있다. 일부 구체 예에서, 완충액 내 샘플은 프로브(결찰 및 표적 포획 프로브 포함)의 추가 이전에 먼저 희석된다. 본 발명의 결찰 방법이 효소에 의존적이지 않기 때문에, 결찰 프로브의 혼성화 및 결찰은 샘플로부터 핵산의 정제 없이 그리고 리가아제 효소의 사용에 의존하지 않으면서 발생할 수 있다. 이는 샘플의 핵산 내에서 일어나는 분해를 제한하는 추가적인 역할을 한다.

[0112] IV. 결찰 프로브 및 화학적 결찰 방법

한 양상에서, 본 발명의 결찰 프로브는, 프로브가 상보적인 화학적 모이어티를 갖는 또 다른 폴리머성 종과 동시적인 화학적 결찰 반응을 수행하도록 하는 연속적인 특이적 방법 및 프로세스로 핵산 표적과 상호작용을 할 수 있는 임의 폴리머성 종을 포함한다. 한 구체 예에서, 결찰 프로브는 DNA, RNA, PNA, LNA, 이들의 변성체 및/ 또는 이들의 모든 혼성체(예컨대 DNA/RNA 혼성체, DNA/LNA 혼성체, DNA/PNA 혼성체)일 수 있다. 바람직한 구체 예에서, 결찰 프로브는 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

본 발명의 결찰 프로브는, 프로브가 공간적으로 근접한 표적 폴리뉴클레오타이드의 일부분에 결합할 때, 화학적 결찰 반응이 프로브들 사이에서 일어나도록 디자인된다. 일반적으로, 프로브는 화학적으로 반응성인 모이어티(여기서는 일반적으로 "결찰 모이어티"로 칭함)를 포함하며 특정 방향에서 표적 폴리뉴클레오타이드에 결합하며, 이에 따라 상기 화학적으로 반응성인 모이어티는 공간적으로 근접하게 되며, 그 결과 리가아제 효소를 사용하지 않고 발생하는 동시적 결찰 반응을 유발한다.

한 구체 예에서, 본 발명은 결찰 프로브들, 일반적으로 제1 및 제2 결찰 프로브의 세트를 제공하지만, 본 발명의 일부 구체 예에서 둘 이상을 사용하는 것이 개시된다. 또한, 여기서 제시되듯이, 일부 경우에 결찰보다 전이 반응이 일어나며; "결찰 프로브"는 "전이 프로브"를 포함한다. 각각의 결찰 프로브는 핵산 부분을 포함하며, 이는 종종 표적 도메인 중 하나에 실질적으로 상보적인 "결찰 도메인" 또는 "프로브 도메인"으로 본 명세서에서 불린다. 본 발명의 프로브는 표적 서열에 상보적이 되도록 디자인되며 이에 따라 본 발명의 표적 서열과 프로브의 혼성화가 일어난다. 여기서 개략화되듯이, 이러한 상보성은 완전할 필요는 없으며; 본 발명의 표적 서열과 프로브 사이의 혼성화와 상호작용하는 임의 수의 염기 쌍 부정합이 존재할 수 있다. 그렇지만, 변종의 수가 너무 많아서 심지어 최저 염격도의 혼성화 조건 하에서 혼성화가 일어나지 않는다면, 서열은 상보적인 서열이 아니다. 따라서, 여기서 "실질적 상보적"은 프로브가 표적 서열에 대하여 충분히 상보적이어서 정상 반응 조건 하

에서 혼성화하는 것을 의미한다. "동일" 서열은 핵염기의 짧은 서열의 길이에 걸쳐서, 완전한 상보성이 존재하는 것이다. 높은, 중간의, 및 낮은 염격도 조건을 포함하여 다양한 혼성화 조건이 본 발명에서 사용될 수 있으며; 예컨대 Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Edition, 1989, 및 Ausubel, et al, *Short Protocols in Molecular Biology*를 참조하고, 이들은 참조로소 수록된다. 혼성화 조건은 또한 해당 분야에 공지된 바와 같이, 비-이온성 백본, 예컨대 PNA가 사용될 때 변할 수 있다.

[0116] 본 발명의 한 양상에서, 프로브의 길이는 표적 서열의 길이, 요구되는 특이성, 반응(예컨대 결찰 또는 전이) 그리고 혼성화 및 세척 조건에 따라 변하도록 디자인된다. 일반적으로, 이러한 양상에서 결찰 프로브는 약 5 내지 약 150개 핵염기 범위이며, 약 15 내지 약 100개가 바람직하며 약 25 내지 약 75개가 특히 바람직하다. 일반적으로, 이러한 길이는 결찰 및 전이 프로브에 동일하게 적용된다.

[0117] 본 발명의 또 다른 구체 예에서, 본 명세서에서 "CLPA-CE"로 불리고 이하에서 더욱 완전하게 설명되듯이, 프로브 길이는 각각의 관심 표적에 대하여 변하도록 디자인되며 이에 따라 길이 변화에 기초하여 식별되고 분석될 수 있는 결찰 생성물을 발생시킨다.

[0118] 본 발명의 결찰 프로브는 폴리뉴클레오타이드 표적에 대하여 특이적이 되도록 디자인된다. 이러한 프로브는, 화학적으로 반응성인 결찰 모이어티가 공간적으로 근접하는 방식으로, 서로 공간적으로 근접한 상태에서 표적에 결합하고 배향된다. 한 양상에서, 둘 또는 그 이상의 프로브가 표적 폴리뉴클레오타이드 상의 거의 인접한 사이트에 결합하도록 디자인된다. 바람직한 구체 예에서, 두 개의 프로브가 표적에 결합하여 이에 따라 하나의 올리고뉴클레오타이드 프로브의 5' 말단에 있는 결찰 모이어티가 또 다른 프로브의 3' 말단에 있는 결찰 모이어티와 상호작용할 수 있다. 바람직한 구체 예에서, 결찰 모이어티 사이의 결찰 반응은 외부 리가아제 효소의 사용 없이 일어나며, 여기서 또한 "화학적 결찰"이라 불린다. 결찰 프로브 세트는 결찰 모이어티의 존재로 인하여 리가아제를 사용하는 결찰을 하지 않음을 인지하여야 한다.

[0119] SNP 검출의 경우, 한 세트의 결찰 프로브는 일부 경우에 실제로 셋 또는 넷 또는 다섯의 상이한 결찰 프로브를 포함하며, 이들 중 일부는 대립형질 특이적(allele specific)이다. "대립형질 특이적(allele specific)" 프로브 또는 프라이머는 표적 서열에 혼성화되어 대립형질을 식별하는 프로브 또는 프라이머를 의미한다. 일부 경우, 예를 들어, SNP가 (예를 들어 도 13에 도시된 것과 같은) 이대립형질(biallelic)일 때, 세개 결찰 프로브의 한 세트가 사용되며, 이들 중 둘은 검출 위치에서 상이한 뉴클레오타이드를 함유한다. 즉, 해당 분야에 공지된 바와 같이, 결찰 복합체의 접합점에서의 부정합은 결찰을 유발하지 않거나 또는 감소된 양의 결찰을 유발할 것이다. 따라서, 프로브의 방향에 의존하여, 도 13A 및 도 13C에 도시되는 바와 같이 검출 위치는 "전단" 프로브 또는 후단 프로브의 말단 위치에 있을 수 있다. 부정합은 또한 프로브 내부에 위치할 수 있으며 부정합 식별은 프로브를 식별하는 부정합의 결합 강도 즉 T_m 의 차이에 기초한다(도 13B에 도시됨). 이대립형질 SNP의 경우, 표적 서열 상의 조사 위치(interrogation position)에 대응하는, 검출 위치의 뉴클레오타이드가 상이한 점을 제외하고는, 두 개의 프로브가 동일한 프로브 도메인을 가진다. 따라서, 피검체가 동질접합체(T/T 또는 C/C)인지 또는 이질접합체(T/C 또는 C/T)인지 여부에 의존하여, 프로브 사이에서 결찰이 일어난다. 또한 본 발명에서, 일반적으로 부정합 검출 결찰 프로브 사이의 추가적인 차이가 존재하며 이는 어느 프로브가 바람직하게 결찰되었는지를 용이하게 식별하는 것을 가능하게 한다. 예를 들어, "A" 대립형질 프로브가 15 뉴클레오타이드(15mer)의 가변 스페이서 서열을 가질 수 있으며 "G" 대립형질 프로브가 20 뉴클레오타이드(20mer)의 가변 스페이서 서열을 가질 수 있으며, 프로브들은 상이한 포획 도메인 또는 라벨 서열 등을 가질 수 있다.

[0120] 유사하게, 해당 분야의 기술자에 의해 이해되듯이, 삼대립형질(triallelic) 또는 사대립형질(quadallelic) SNP는 세트 내 4개 (동일 표적 도메인을 갖는 3개 프로브 및 다른 표적 도메인을 갖는 1개) 또는 5개 (동일 표적 도메인을 갖는 4개 프로브 및 다른 표적 도메인을 갖는 1개) 결찰 프로브를 사용한다.

[0121] 해당 분야의 기술자에 의해 이해되듯이 프라이머 및 프로브 핵산의 크기는 변할 수 있으며, 프로브의 각 부분 및 프로브의 전체 길이는 일반적으로 5 내지 500 뉴클레오타이드 길이 만큼 변한다. 각 부분은 바람직하게는 10 내지 100이며, 더욱 바람직하게는 15 내지 50이며, 특히 바람직하게는 10 내지 35이며, 이는 용도 및 증폭 기술에 의존한다. 따라서, 예를 들어, 프로브의 일반 프라이밍 사이트(universal priming site)는 각각 바람직하게는 약 15-20 뉴클레오타이드 길이이며, 특히 18이 바람직하다. 프로브의 어댑터 서열(adapter sequence)은 바람직하게는 15-25개 뉴클레오타이드 길이이며, 특히 20개가 바람직하다. 프로브의 표적 특이적 부분은 바람직하게는 15-50 뉴클레오타이드 길이이다. 또한, 프라이머는 추가 증폭 프라이밍 사이트를 포함할 수 있다. 바람직한 구체 예에서, 상기 추가 증폭 프라이밍 사이트는 T7 RNA 중합효소 프라이밍 사이트이다.

[0122] 다수의 비-효소적 또는 템플릿 매개 화학적 결찰 방법이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 이는 예컨대 N-시아노

이미다졸, 시아노겐 브로마이드, 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 하이드로클로라이드와 같은 커플링제를 사용하는 화학적 결찰 방법을 포함한다. 다음 문헌 참조: Metelev, V.G., et al., *Nucleosides & Nucleotides* (1999) 18:2711; Luebke, K.J., 및 Dervan, P.B. *J. Am. Chem. Soc.* (1989) 111:8733; 및 Shabarova, Z.A., et al., *Nucleic Acids Research* (1991) 19:4247, 이들 각각은 모든 목적 및 특히 화학적 결찰과 관련된 모든 기술을 위하여 그 전체가 참조로서 여기에 수록된다. 여기에 그 전체가 참조로서 수록되는 Kool(US 특허 7,033,753)은 유전적 다형성(polymorphism)을 검출하기 위한 화학적 결찰 및 형광 공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET)의 사용을 개시한다. 이러한 프로세스의 판독은 형광 강도의 용액 상 변화에 기초한다. 여기에 그 전체가 참조로서 수록되는 Terbrueggen(US 특허 공개 12008/0124810)은 마이크로어레이 검출을 통한 핵산의 검출을 위한 화학적 결찰 방법, 조성물 및 시약의 사용을 개시한다. 또 다른 화학적 결찰 방법은 5'-토실레이트 또는 5'-아이오도 그룹과 3'-포스포로티오에이트 그룹을 반응시켜서, 가교성 포스포디에스테르 산소 원자 중 하나를 대체하는 황 원자를 갖는 DNA 구조를 유발한다. 다음 문헌을 참조하라: Gryanov, S.M., 및 Letsinger, R.L., *Nucleic Acids Research* (1993) 21:1403; Xu, Y. 및 Kool, E.T. *Tetrahedron Letters* (1997) 38:5595; 그리고 Xu, Y. 및 Kool, E.T., *Nucleic Acids Research* (1999) 27:875, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 여기에 수록된다. Letsinger et al (US 특허 5,780,613, 그 전체가 참조로서 여기에 수록됨)은 인접하는, 템플릿-결합 올리고뉴클레오타이드의 비가역적, 비효소적, 공유적 자동결찰을 미리 개시하였는데, 여기서 하나의 올리고뉴클레오타이드는 5' 대체가능 그룹을 가지며 또 다른 올리고뉴클레오타이드는 3' 티오포스포릴 그룹을 가진다. 화학적 결찰 방법을 개시하는 이들 참조문헌 각각은 모든 목적을 위하여 그리고 특히 화학적 결찰과 관련된 모든 개시사항을 위하여 그 전체가 참조로서 여기에 수록된다.

[0123]

한 양상에서, 본 발명의 결찰 반응은 전이 반응을 포함한다. 이러한 구체 예에서, 프로브는 함께 결찰되는 올리고뉴클레오타이드 프로브 대신에 표적 서열에 혼성화하여 결찰 생성물을 형성하며, 하나의 올리고뉴클레오타이드 프로브로부터 다른 것으로의 분자 단위(형광염료, 냉각제 등과 같은 리포터 분자 포함)의 핵산-유도 전이(nucleic acid-directed transfer)가 발생한다. 이러한 전이 반응은 결찰 반응과 유사하지만, 둘 또는 그 이상의 프로브가 참여하는 대신, 프로브 중 하나가 전이 분자에 결찰되고 또 다른 프로브는 화학 반응의 "이탈(leaving)"이다. 중요하게는, 결찰 반응과 유사하게, 전이 반응은 핵산 표적에 대한 전이 프로브의 근접 결합에 의해 촉진되며, 이에 따라 전이 반응이 일어나기에 충분한 서로간의 근접거리에서(예컨대 인접 사이트) 단지 프로브가 표적 핵산에 혼성화되는 경우 상당한 신호가 검출된다.

[0124]

한 양상에서, 본 발명은 화학적 결찰 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 제1 및 제2 결찰 프로브의 결찰 모이어티가 동시에 반응할 수 있는 조건 하에서 적어도 하나의 제1 및 제2 결찰 프로브를 표적 핵산에 결합시켜 "결찰 기질"을 형성하는 단계, 외부 리가아제의 부존재 하에서 상기 프로브들을 함께 결찰하는 단계를 포함하며; 외부 리가아제가 반응에 첨가되지 않으며 그 대신에 반응이 리가아제를 사용하지 않고 진행된다. 전이 반응의 경우, 이는 "결찰 기질" 또는 "전이 기질"이라 불릴 수 있다. 여기서 "결찰 기질"은 적어도 하나의 표적 핵산 서열 및 둘 이상의 결찰 프로브를 포함하는 화학적 결찰용 기질을 의미한다. 유사하게, "결찰 기질"의 정의에 "전이 기질"이 포함되며, 이는 적어도 하나의 표적 핵산 서열 및 둘 이상의 전이 프로브를 포함한다. 일단 화학적 결찰 단계가 일어나면, 반응의 생성물은 종종 "결찰 복합체"라 불리며, 이는 결찰된 프로브 및 이들이 여전히 혼성화되어 있는 표적을 포함한다.

[0125]

본 발명의 일부 구체 예에서, 예를 들어 추가적인 특이성이 요구되는 경우, 둘보다 많은 결찰 프로브가 사용될 수 있으며, 이는 일반적으로 도 3에 도시된다. 이러한 구체 예에서, "중간(middle)" 결찰 프로브가 또한 인접하거나 또는 표적 서열의 하나 이상의 핵염기에 의해 이격될 수 있다. 바람직한 구체 예에서, 결찰 반응은 리가아제 효소의 존재를 요구하지 않으며 모든 추가(예컨대 외부) 리가아제의 부존재하에서 결합 프로브 사이에서 동시에 일어난다.

[0126]

적절한 조건 하에서, 화학적 결찰은 어떠한 추가 활성화제 또는 자극제의 첨가 없이 동시에 일어날 수 있다. 그 대신에, "활성화제" 또는 외부 자극제가 화학적 결찰 반응을 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 활성화제의 예는 비제한적으로 카르보디이미드, 시아노겐 브로마이드(BrCN), 이미다졸, 1-메틸이미다졸/카르보디이미드/시스타민, N-시아노이미다졸, 디티오프로필(DTT), 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP) 및 또 다른 환원제 뿐만 아니라 자외선, 열 및/또는 압력 변화와 같은 외부 자극을 포함한다.

[0127]

여기에 개략화되듯이, 본 발명의 결찰 모이어티는 인자 수에 따라 다양한 배열(configuration)을 취할 수 있다. 여기에 설명된 대부분의 화학이 일반적으로 3'에서 5' 방향으로 진행하는 포스포라미다이트 반응에 사용된다. 즉, 레진이 분자의 5' 말단에서 포스포라미다이트의 부착을 허용하는 화학을 함유한다. 그렇지만, 해당 분야에 공지된 바와 같이, 포스포라미다이트는 5'에서 3' 방향으로 진행하도록 사용될 수 있으며; 즉 본 발명은 여기에

개시된 것과 반대 방향성을 갖는 모이어티를 포함한다.

[0128] 결찰 프로브(또는 전이 프로브)의 각각의 세트는 제1 결찰 모이어티와 제2 결찰 모이어티의 한 세트를 함유한다. 이들 결찰 모이어티 쌍의 식별은 사용될 결찰의 화학에 의존한다. 또한, 여기에 개시되듯이, 링커(불안정화 링커 포함)가 하나 또는 둘 모두의 결찰 프로브의 프로브 도메인과 결찰 모이어티 사이에 존재할 수 있다. 일반적으로, 논의의 용이성을 위하여, 여기에서의 설명은 용어 "전단(upstream)" 및 "후단(downstream)" 결찰 프로브를 사용할 수 있으나, 이것이 제한적인 것으로 의미되는 것은 아니다.

[0129] 결찰 프로브의 상이한 세트가 여기에 개시된 모든 분석법 및 방법에서의 사용을 위하여 디자인될 수 있다. 결찰 프로브 세트가 표적 핵산의 하나 이상의 표적 도메인을 지향하는 결찰 프로브를 포함하도록 디자인될 수 있거나, 상이한 프로브 세트가 상이한 표적 핵산을 지향하도록 디자인될 수 있다. 예를 들어, 두 개의 결찰 프로브가 사용되는 구체 예에서 특정 표적 핵산의 검출을 위하여, 한 세트의 결찰 프로브는 제1 프로브(예컨대, "전단 프로브")가 제1 표적 도메인을 지향하는 프로브 도메인을 포함하도록 디자인된다. 상기 세트는 또한 상기 제1 표적 도메인에 인접하고 그 후단에 있는 제2 표적 도메인을 지향하는 제2 결찰 프로브(예컨대, "후단 프로브")를 포함한다. 상기 제1 및 제2 표적 도메인은 일부 구체 예에서 하나, 둘, 또는 세개의 뉴클레오타이드 간격에 의해 이격될 수도 있다. 이러한 세트의 결찰 프로브는 따라서 이들이 지향하는 표적 핵산의 존재를 식별하기 위하여 검출될 수 있는 결찰 생성물을 생성한다. 또 다른 구체 예에서, 상이한 세트의 결찰 프로브가 상이한 표적 핵산을 검출하기 위하여 디자인될 수 있다. 또 다른 구체 예에서, 상이한 세트의 결찰 프로브는 동일한 표적 핵산을 검출하도록 디자인되며 - 이러한 구체 예에서, 상이한 세트의 결찰 프로브는 동일 표적 핵산의 상이한 도메인에 지향되며, 따라서 동일 표적 핵산은 사용되는 상이한 프로브 세트의 수에 의존하여 다중 결찰 생성물을 가질 수 있다. 이해되듯이, 2보다 많은 결찰 프로브가 단일 결찰 생성물을 형성하기 위하여 사용되는 구체 예에서의 사용을 위하여 프로브 세트를 디자인할 때, 유사한 디자인의 사용될 수 있다.

할로 이탈기 화학

[0130] 본 발명의 한 구체 예에서, 화학은 5' 할로겐 이탈기 기술에 기초하며 이는 일반적으로 Gryanov, S.M., 및 Letsinger, R.L., (1993) *Nucleic Acids Research*, 21:1403; Xu, Y. 및 Kool, E.T. (1997) *Tetrahedron Letters*, 38:5595; Xu, Y. 및 Kool, E.T., (1999) *Nucleic Acids Research*, 27:875; Arar et al., (1995), *BioConj. Chem.*, 6:573; Kool, E. T. et. al, (2001) *Nature Biotechnol* 19:148; Kool, E. T. et. al., (1995) *Nucleic Acids Res*, 23 (17):3547; Letsinger et al., U.S. Pat. No. 5,476,930; Shouten et al., U.S. Pat. No. 6,955,901; Andersen et al., U.S. Pat. No. 7,153,658에 개시되어 있으며, 이들 모두는 여기에 참조로서 명백하게 수록된다. 이러한 구체 예에서, 제1 결찰 프로브는 자신의 5' 말단에서 5' 이탈기를 갖는 뉴클레오시드를 포함하며, 제2 결찰 프로브는 자신의 3' 말단에서 3' 티오포스포릴과 같은 3' 친핵성 그룹을 갖는 뉴클레오시드를 포함한다. 5' 이탈기는 해당 분야의 통상의 기술자에게 공지된 많은 통상적인 이탈기를 포함할 수 있으며, 예를 들어 할로-종(I, Br, Cl) 및 Abe 및 Kool, J. Am. Chem. Soc. (2004) 126:13980-13986에 개시된 그룹과 같은 그룹을 포함하며, 상기 문헌은 그 전체가 참조로서 여기에 수록된다. 본 발명의 이러한 양상의 더욱 바람직한 구체 예에서, 제1 결찰 프로브는 가요성 링커(flexible linker)를 통하여 부착된 5' 이탈기 및 3' 티오포스포릴 그룹을 갖는 후단 올리고뉴클레오타이드를 가진다. 이러한 배열은 반응 속도의 상당한 증가를 유도하고 모든 표적을 위하여 생성되는 결찰된 생성물의 많은 복사본을 유발한다.

[0132] 폴리뉴클레오타이드 템플릿의 5'에서 3' 방향의 관계에서 템플릿의 "전단" 측면(즉, 왼쪽, 즉 5' 측면) 상에 결합하는 올리고뉴클레오타이드로서 정의되는 "전단" 올리고뉴클레오타이드는 자신의 5' 말단으로서 5'-이탈기를 포함한다. 친핵체로서 황, 셀레늄, 또는 텔루륨을 포함하는 S_N2 반응에 참여할 수 있는 모든 이탈기가 사용될 수 있다. 이탈기는 탄소에 부착된 원자 또는 그룹으로서 변성 포스포릴 그룹의 친핵체(황, 셀레늄, 또는 텔루륨)에 의한 탄소 원자에 대한 친핵성 공격에서 이탈기는 음이온으로서 이탈한다. 적절한 이탈기는 비제한적으로 할라이드, 예컨대 아이오다이드, 브로마이드 또는 클로라이드, 토실레이트, 벤젠설포네이트 또는 p-니트로페닐에스테르, 뿐만 아니라 RSO₃를 포함하며, 여기서 R은 폐닐; 또는 F, Cl, Br, I, 알킬(C1 내지 C6), 니트로, 시아노, 설포닐 및 카르보닐을 포함하는 1개 내지 5개의 원자 또는 그룹에 의해 치환된 폐닐이거나, 또는 R은 1개 내지 6개 탄소를 갖는 알킬이다. 이탈기는 바람직하게는 아이오다이드이며, 전단 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에 있는 뉴클레오시드는 DNA의 경우 5'-디옥시-5'-아이오도-2'-디옥시뉴클레오시드이다. 적절한 5'-디옥시-5'-아이오도-2'-디옥시뉴클레오시드의 예는 비제한적으로 5'-디옥시-5'-아이오도티미딘 (5'-I-T), 5'-디옥시-5'-아이오도-2'-디옥시시티딘 (5'-I-dC), 5'-디옥시-5'-아이오도-2'-디옥시아데노신 (5'-I-dA), 5'-디옥시-5'-아이오도-3-데아자-2'-디옥시아데노신 (5'-I-3-데아자-dA), 5'-디옥시-5'-아이오도-2'-디옥시구아노신 (5'-I-

dG) 및 5'-디옥시-5'-아이오도-3-데아자-2'-디옥시구아노신 (5'-I-3-데아자-dG), 그리고 이들의 포스포로아미다이트 유도체를 포함한다(도 2 참조). RNA 올리고뉴클레오타이드의 경우, 적절한 5'-디옥시-5'-아이오도뉴클레오시드의 유사체 예는 비제한적으로 5'-디옥시-5'-아이오도우라실 (5'-I-U), 5'-디옥시-5'-아이오도시티딘 (5'-I-C), 5'-디옥시-5'-아이오도아데노신 (5'-I-A), 5'-디옥시-5'-아이오도-3-데아자아데노신 (5'-I-3-데아자-A), 5'-디옥시-5'-아이오도구아노신 (5'-I-G) 및 5'-디옥시-5'-아이오도-3-데아자구아노신 (5'-I-3-데아자-G), 그리고 이들의 포스포로아미다이트 유도체를 포함한다. 바람직한 구체 예에서, 전단 결찰 프로브는 2'-디옥시리보뉴클레오타이드를 함유하며 다만 5' 이탈기를 포함하는 5' 말단 상의 변성 뉴클레오타이드가 리보뉴클레오타이드이다. 전단 뉴클레오타이드의 이러한 구체 예가 유리한데 왜냐하면 두 번째(penultimate) 2'-디옥시리보뉴클레오타이드와 말단 5' 리보뉴클레오타이드 사이의 결합이 염기를 사용하여 절단되기 쉽기 때문이다. 이는 예컨대 고체 지지체에 결합된 올리고뉴클레오타이드 프로브의 잠재적 재사용을 가능하게 하며, 이하에서 더욱 상세하게 논의한다. 이하세어 더욱 완전하게 설명되듯이 CLPA 분석법에 대하여, "전단" 프로브의 5' 이탈기는 가장 바람직하게는 DABSYL이다.

[0133] 전단 올리고뉴클레오타이드의 후단에 있는, 즉 3'에 대응하는 폴리뉴클레오타이드 템플릿에 결합하는 "후단" 올리고뉴클레오타이드는 자신의 3' 말단으로서, 자신의 3' 하이드록실에 링크된 뉴클레오시드, 포스포로티오에이트 그룹 (즉, "3'-포스포로티오에이트 그룹"), 포스포로셀레노에이트 그룹 (즉, "3'-포스포로셀레노에이트 그룹), 또는 포스포로텔루로에이트 그룹 (즉, "3'-포스포로텔루로에이트 그룹")을 포함한다. 자동 결찰에 사용되는 화학은 따라서 황-매개, 셀레늄-매개, 또는 텔루륨 매개이다. 자체-결찰은 5' 가교성 포스포로티오에스테르(--0--P(0)(0.sup.-)--S--), 포스포로셀레노에스테르(--0--P(0)(0.sup.-)--Se--) 또는 포스포로텔루로에스테르(--0--P(0)(0.sup.-)--Te--)를 함유하는 결찰 생성물을 산출하며, 이들은 후단 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단을 포함하는 그룹으로 명명된다. 이러한 비-자연적, 보존적 가교성 디에스테르는 두 개의 인접한 뉴클레오타이드 사이에 위치하며 자연 발생적인 5' 가교성 포스포디에스테르를 대체한다. 놀랍게도, 셀레늄-매개 결찰은 황-매개 결찰보다 3 내지 4배 빠르며, 셀레늄-함유 결찰 생성물은 Se--P 결합의 낮은 결합 강도에도 불구하고 매우 안정적이었다. 또한, 가교성 포스포로셀레노에스테르, 뿐만 아니라 가교성 포스포로텔루로에스테르는 매우 온화한 조건 하에서 은이온 또는 수은 이온에 의해 선택적으로 절단될 것으로 예상된다(Mag et al., *Nucleic Acids Res.* (1991) 19:1437 1441 참조).

[0134] 한 구체 예에서, 후단 올리고뉴클레오타이드는 2'-디옥시리보뉴클레오타이드를 함유하며 다만 3' 포스포로티오에이트, 포스포로셀레노에이트, 또는 포스포로텔루로에이트를 포함하는 3' 말단 상의 변성 뉴클레오타이드가 리보뉴클레오타이드이다. 이러한 전단 뉴클레오타이드의 구체 예가 유리한데 왜냐하면 두 번째(penultimate) 2'-디옥시리보뉴클레오타이드와 말단 리보뉴클레오타이드 사이의 결합이 염기를 사용하여 절단되기 쉬우며, 이는 예컨대 고체 지지체에 결합된 올리고뉴클레오타이드 프로브의 잠재적 재사용을 가능하게 하기 때문이다. 이하에서 더욱 완전하게 설명되듯이, CLPA 분석법에 대하여, "후단" 프로브는 가장 바람직하게는 자신의 3' 말단에서 3'-포스포로티오에이트를 포함한다.

[0135] "전단" 및 "후단" 올리고뉴클레오타이드는 선택적으로 단일 올리고뉴클레오타이드의 두 개의 말단으로 구성되며, 여기서 이벤트 결찰이 원형 결찰 생성물을 산출함에 주목하여야 한다. 선형 전구체 올리고뉴클레오타이드의 5' 및 3' 말단 상의 가교 영역은 폴리뉴클레오타이드 표적에 대한 5' 및 3' 가교 영역의 결합을 허용하기에 충분한 다수의 중간 뉴클레오타이드에 의해 연결되어야만 한다.

[0136] 본 발명에서 제공되는 조성물은 5'-디옥시-5'-아이오도-2'-디옥시뉴클레오시드, 예를 들어 5'-디옥시-5'-아이오도티미딘 (5'-I-T), 5'-디옥시-5'-아이오도-2'-디옥시시티딘 (5'-I-dC), 5'-디옥시-5'-아이오도-2'-디옥시아데노신 (5'-I-dA), 5'-디옥시-5'-아이오도-3-데아자-2'-디옥시아데노신 (5'-I-3-데아자-dA), 5'-디옥시-5'-아이오도-2'-디옥시구아노신 (5'-I-dG) 및 5'-디옥시-5'-아이오도-3-데아자-2'-디옥시구아노신 (5'-I-3-데아자-dG), 그리고 이들의 포스포로아미다이트 유도체, 뿐만 아니라 자신의 5' 말단으로서, 본 발명의 5'-디옥시-5'-아이오도-2'-디옥시뉴클레오시드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 본 발명에서 제공되는 조성물은 또한 5'-디옥시-5'-아이오도뉴클레오시드 예컨대 5'-디옥시-5'-아이오도우라실 (5'-I-U), 5'-디옥시-5'-아이오도시티딘 (5'-I-C), 5'-디옥시-5'-아이오도아데노신 (5'-I-A), 5'-디옥시-5'-아이오도-3-데아자아데노신 (5'-I-3-데아자-A), 5'-디옥시-5'-아이오도구아노신 (5'-I-G) 및 5'-디옥시-5'-아이오도-3-데아자구아노신 (5'-I-3-데아자-G), 그리고 이들의 포스포로아미다이트 유도체, 뿐만 아니라 자신의 5' 말단으로서, 본 발명의 5'-디옥시-5'-아이오도뉴클레오시드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 또한 3'-포스포로셀레노에이트 그룹 또는 3'-포스포로텔루로에이트 그룹을 포함하는 뉴클레오시드, 그리고 자신의 3' 말단으로서 3'-포스포로셀레노에이트 그룹 또는 3'-포스포로텔루로에이트 그룹을 포함하는 뉴클레오시드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 본

발명에 포함된다. 이러한 종류의 변성 뉴클레오시드 중 어느 하나 또는 둘 모두를 함유하는 올리고뉴클레오타이드가 또한 본 발명에 포함되며, 다양한 뉴클레오시드 및 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법이 또한 본 발명에 포함된다. 본 발명에 따라 5' 또는 3' 말단의 어느 하나 또는 둘 모두에서 변성되는 올리고뉴클레오타이드는 필수적인 것은 아니며 선택적으로 검출가능한 라벨, 바람직하게는 방사선라벨, 형광 엔지니어링 도너 또는 어셉터 그룹, 액시미 라벨, 또는 이들의 임의 조합을 포함한다.

[0137] 또한, 일부 경우, 치환기가 또한 보호기(가끔 여기서 "PG"로 불림)일 수 있다. 적절한 보호기는 보호될 원자 및 모이어티가 노출될 조건에 의존할 것이다. 광범위한 보호기가 공지되어 있으며; 예컨대, DMT가 포스포라미다이트 화학에서 보호기로서 자주 사용되나(도면에 설명됨); 그렇지만, DMT는 이러한 구체 예에서 또 다른 보호기로 대체될 수도 있다. 다양한 보호기가 적절하며; 예를 들어 Greene's Protective Groups in Organic Synthesis를 참조하고, 이는 보호기 및 관련 화학에 대하여 참조로서 여기에 수록된다.

[0138] "알킬 그룹" 또는 문언적 균등물은 여기서 칙체 또는 측체 알킬 그룹을 의미하며, 칙체 알킬 그룹이 바람직하다. 측체의 경우, 하나 또는 그 이상의 위치, 및 특정하지 않는 한 임의 위치에서 가지칠 수 있다. 알킬 그룹은 약 1 내지 약 30 탄소 원자(C1-C30) 범위일 수 있으며, 바람직한 구체 예에서 약 1 내지 약 20 탄소 원자(C1-C20)를 사용하며, 약 C1에서 약 C12 내지 약 C15가 바람직하며, C1 내지 C5가 특히 바람직하며, 일부 구체 예에서 알킬 그룹은 훨씬 더 클 수 있다. 또한 알킬 그룹의 정의에는 예컨대 C5 내지 C6 고리의 사이클로 알킬 그룹, 및 질소, 산소, 황 또는 인을 갖는 헤테로사이클릭 고리가 포함된다. 알킬은 또한 헤테로알킬을 포함하며, 황, 산소, 질소, 및 실리콘의 헤테로원자가 바람직하다. 알킬은 치환된 알킬 그룹을 포함한다. "치환된 알킬 그룹"은 여기서 전술한 하나 이상의 치환 모이어티 "R"을 추가로 포함하는 알킬 그룹을 의미한다.

[0139] "아미노 그룹" 또는 문언적 균등물은 여기서 NH₂, --NHR 및 --NR₂ 그룹을 의미하며, 여기서 R은 전술한 바와 같다. 일부 구체 예에서, 예를 들어 웨타이드 결찰 반응의 경우, 1차 및 2차 아민이 특히 사용되며, 1차 아민이 일반적으로 더 빠른 반응 속도를 나타낸다.

[0140] "니트로 그룹"은 여기서 --NO₂ 그룹을 의미한다.

[0141] "황 함유 모이어티"는 여기서 황 원자를 함유하는 화합물을 의미하며, 비제한적으로 티아-, 티오- 및 설포-화합물, 티올(--SH 및 --SR), 및 설플아이드(--RSR--)를 포함한다. 모이어티를 함유하는 특정 유형의 황은 티오에스테르(-(CO)-S-)이며, 통상 치환된 티오에스테르(-(CO)-SR)이다. "황 함유 모이어티"는 여기서 황을 함유하는 화합물을 의미하며, 비제한적으로 포스핀 및 포스페이트(phosphate)를 포함한다. "실리콘 함유 모이어티"는 여기서 실리콘을 함유하는 화합물을 의미한다.

[0142] "에테르"는 여기서 --O--R 그룹을 의미한다. 바람직한 에테르는 알콕시 그룹을 포함하며, --O--(CH₂)₂CH₃ 및 --O--(CH₂)₄CH₃ 가 바람직하다.

[0143] "에스테르"는 여기서 --COOR 그룹을 의미한다.

[0144] "할로겐"은 여기서 브롬, 요오드, 염소, 또는 불소를 의미한다. 바람직한 치환된 알킬은 CF₃, 등과 같은 부분적 또는 완전한 할로겐화 알킬이다.

[0145] "알데히드"는 여기서 --RCOH 그룹을 의미한다.

[0146] "알코올"은 여기서 --OH 그룹, 및 알킬 알코올 --ROH을 의미한다.

[0147] "아미도"는 여기서 --RCONH-- 또는 RCONR-- 그룹을 의미한다.

[0148] "에틸렌 글리콜"은 여기서 --(O--CH₂--CH₂)_n-- 그룹을 의미하며, 에틸렌 그룹의 각 탄소 원자가 단일 또는 이중 치환, 즉 --(O--CR₂--CR₂)_n--일 수 있으며, R은 전술한 바와 같다. 산소 대신 또 다른 헤테로원자를 갖는 에틸렌 글리콜 유도체(즉, --(N--CH₂--CH₂)_n-- 또는 --(S--CH₂--CH₂)_n--, 또는 치환 그룹)이 또한 바람직하다.

[0149] 또한, 일부 구체 예에서, R 그룹은 작용기일 수 있으며, 냉각제, 불안정화 모이어티 및 형광염료를 포함한다(이하에서 정의됨). 본 구체 예에서 특정 용도의 형광염료는 비제한적으로 플루오레세인(Fluorescein) 및 그 유도체, TAMRA(테트라메틸-6-카르복시로다민), 알렉사 염료(Alexa dye), 및 시아닌 염료(Cyanine dye)(예컨대 Cy3 및 Cy5)를 포함한다.

[0150] 냉각제 모이어티 또는 분자는 해당 분야에 공지되어 있으며, 일반적으로 또 다른 분자의 여기된 상태를 불활성

화시킬 수 있는 방향족, 다중환 화합물이다. 형광체-냉각제 쌍(Fluorophore-quencher pairs)가 해당 분야에 공지되어 있다. 적절한 냉각제 모이어티는 비제한적으로 Biosearch Technologies사가 시판중인 Dabsyl(디메틸아미니(아조벤젠) 설포닐) Dabcyl(디메틸아미노(아조벤젠)카르보닐), Eclipse Quencher(Glen Research Catalog) 및 블랙홀 냉각제(BHQ-1, BHQ-2 및 BHQ-3)를 포함한다.

[0151] 할로 이탈기를 갖는 프로브를 제조하는 방법이 해당 분야에 공지되어 있으며; 예를 들어 다음 문헌을 참조하라: Abe et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006)103(2):263-8; Silverman et al., *Nucleic Acids Res.* (2005) 33(15):4978-86; Cuppolletti et al., *Bioconjug Chem.* (2005) 16(3):528-34; Sando et al., *J Am Chem Soc.* (2004) 126(4):1081-7; Sando et al., *Nucleic Acids Res Suppl.* (2002) 2:121-2; Sando et al., *J Am Chem Soc.* (2002) 124(10):2096-7; Xu et al., *Nat Biotechnol.* (2001) 19(2):148-52; Xu et al., *Nucleic Acids Res.* (1998) 26(13):3159-64; Moran et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) 94(20):10506-11; Kool, U.S. Pat. No. 7,033,753; Kool, U.S. Pat. No. 6,670,193; Kool, U.S. Pat. No. 6,479,650; Kool, U.S. Pat. No. 6,218,108; Kool, U.S. Pat. No. 6,140,480; Kool, U.S. Pat. No. 6,077,668; Kool, U.S. Pat. No. 5,808,036; Kool, U.S. Pat. No. 5,714,320; Kool, U.S. Pat. No. 5,683,874; Kool, U.S. Pat. No. 5,674,683; 및 Kool, U.S. Pat. No. 5,514,546, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 여기에 수록된다.

친핵체 결찰 모이어티

[0153] 일부 구체 예에서, 본 발명의 결찰 프로브는 아민과 같은 친핵체를 포함하는 결찰 모이어티를 포함한다. 티올 및 아민 둘 모두를 포함하는 결찰 모이어티는 일부 반응에서 특정한 용도를 가진다. 일반적으로, 친핵체 결찰 모이어티가 1차 또는 2차 아미노에 근접하는 티올 그룹을 함유하고 S에서 N 아실으로의 이동 동안 5원 또는 6원 고리 전이 상태가 달성되도록 상대적 위치결정이 이루어지는 경우, 친핵체 결찰 모이어티는 매우 다양한 잠재적 아미노, 티올 화합물을 포함할 수 있다.

[0154] 따라서, 1, 2 또는 1, 3 아민 티올 그룹을 포함하는 친핵체 결찰 분자가 특히 유용하다. 반응 시간이 중요한 일부 구체 예에서 1차 아민이 유용한데, 왜냐하면 이하에서 논의되듯이 비록 2차 아민이 불안정화에 기여하는 아실 전이효소 반응(acyl transferase reaction)에서 유용할지라도, 반응 시간은 일반적으로 2차 아민보다 1차 아민의 경우 더 빠르다. 아미노와 티올 그룹 사이의 탄소는 비-수소 R 그룹으로 치환될 수 있으며, 일반적으로 탄소 당 단지 하나의 비-수소 R 그룹이 사용된다. 또한 인접하는 R 그룹은 함께 결합하여 고리 구조를 형성할 수 있으며, 치환 및 비치환 사이클로알킬 및 아릴 그룹(헤테로사이클로알킬 및 헤테로아릴 포함) 및 이들의 치환 및 비치환 유도체를 포함한다. 1,2 아미노 티올 그룹이 사용되고 인접하는 R 그룹이 부착되는 경우, 일반적으로 인접하는 R 그룹이 아릴 그룹 대신 사이클로알킬 그룹(헤테로사이클로알킬 및 이들의 치환 유도체 포함)을 형성하는 것이 선호된다.

[0155] 이러한 구체 예에서, 불안정화를 위한 사슬의 4개 시그마 결합 수축의 생성을 위하여, 교체 결찰 모이어티는 아실 전이효소 반응에 의존한다.

링커

[0157] 많은 구체 예에서, 링커(가끔 여기서 "L" 또는 "-(링커)_n-으로 나타냄)(여기서 n은 0 또는 1임)가 선택적으로 결찰 프로브 내 여러 위치에 포함될 수 있다. 적절한 링커는 알킬 및 아릴 그룹(헤테로알킬 및 헤테로아릴 포함), 및 이들의 치환 유도체를 포함한다. 일부 경우, 예를 들어 자연적 펩타이드 결찰 반응(Native Peptide Ligation reaction)이 수행된 경우, 링커는 아마이드 결합에 기초하거나 이를 함유하는 아미노산일 수 있다. 여기에서 논의되듯이, 일부 링커는 결찰 프로브가 하나 이상의 핵염기에 의해 분리되어, 결찰 생성물 내 비염기적 사이트(abasic site)를 형성하도록 하며, 이는 이하에서 논의되듯이 불안정화 모이어티로서의 역할을 한다.

불안정화 모이어티

[0159] 본 발명의 한 양상에 따르면, 효소의 도움 없이 각각의 표적 분자에 대하여 결찰 생성물의 복수의 복제물을 생성하는 것이 요구된다. 이러한 목적을 달성하는 한 가지 방법은 화학적 결찰 반응 이후 결찰 생성물을 표적으로부터 분리시켜 새로운 프로브 세트가 표적으로 결합하도록 하는 것을 포함한다. 결찰 생성물 전환을 증가시키기 위하여, 표적으로부터의 생성물 분리를 증가시키는 프로브 디자인, 기구, 및 화학적 결찰 반응 화학이 바람직하다. 적절한 불안정화 모이어티는 이하에서 논의되며 비제한적으로 표적 사이트에 대한 올리고뉴클레오타이드의 전체 결합 에너지의 감소를 유발하는 분자단을 포함한다. 잠재적인 예는 비제한적으로 알킬 사슬, 하전 복합체, 및 고리 구조체를 포함한다.

- [0160] 종래 연구에 의하면 생성물 분리를 달성하고 생성물 전환을 증가시키기 위한 한 가지 방법이 반응 혼합물을 "열 순환(heat cycle)"시키는 것임이 밝혀졌다. 열 순환법(Heat cycling)은 반응의 온도를 변화시켜 원하는 결과를 촉진하는 공정이다. 가장 흔한 열 순환법은 단순하게 반응 혼합물의 온도를 상승시켜 이에 따라 반응 온도가 결찰 생성물의 용융 온도 이상으로 잠시 동안 상승하여서 생성물이 표적으로부터 분리되도록 하는 형태를 취한다. 냉각 즉시, 새로운 세트의 프로브가 표적에 결합할 수 있으며, 또 다른 결찰 반응이 일어난다. 이러한 열 순환 과정은 PCR과 같은 효소 반응에 대하여 광범위하게 실행되고 있다.
- [0161] 열 순환법이 생성물 전환을 달성하기 위한 한 방법인 한편, 열 순환법을 사용하지 않고 상당한 생성물 전환을 유발하도록 프로브를 디자인하는 것이 가능하다. 결찰 생성물의 용융 온도를 감소시키는 것을 돋는 프로브 디자인 및 결찰 화학은 반응 사이클의 생성물 억제를 감소시킴으로써 생성물 전환을 증가시킨다.
- [0162] 따라서, 한 양상에서, 프로브의 결찰 동안, 표적 서열에 대한 결찰 생성물의 혼성화를 불안정화시키는 역할을 하는 원소(예컨대 불안정화 모이어티)를 포함하도록 브로브가 디자인된다. 그 결과, 결찰 기질은 결찰 이후에 분리되고, 결찰 생성물의 전환을 유발하는데, 예컨대 2개의 결찰 프로브를 포함하는 결찰 생성물이 표적 서열로부터 탈혼성화(dehybridize)하고, 또 다른 프로브 세트에 대한 혼성화를 위하여 표적 서열을 해방(free)시킨다.
- [0163] 또한, 자유(예컨대 탈혼성화된) 결찰 프로브의 농도를 증가시키는 것은 또한 표적 서열로부터 결찰 생성물(또는 전이 생성물)의 방출쪽으로 평형을 이동시키는 것을 도울 수 있다. 따라서, 본 발명의 일부 구체 예는 표적의 농도보다 1,000,000배 더 높은 프로브의 농도를 사용하며, 한편 또 다른 구체 예에서 프로브 농도는 표적의 농도보다 10,000 내지 100배 더 높다. 해당 분야의 기술자에 의해 이해되듯이, 자유 프로브의 농도를 증가시키는 것은 생성물 전환(예컨대 증폭)을 달성하기 위하여 단독으로 또는 여기서 개시된 또 다른 구체 예와 함께 사용될 수 있다. 프로브 농도를 증가시키는 것이 증가된 생성물 전환을 유발할 수 있는 한편, 이는 또한 프로브가 수분해 및 비-표적 매개 결찰과 같은 상당한 비-표적 반응(off target reaction)을 유발할 수 있다.
- [0164] 한 양상에서, 프로브 원소는 결찰 생성물의 용융 온도를 낮추는 구조체를 포함한다. 일부 구체 예에서, 프로브 원소는 인접하지 않은 표적 핵염기에 혼성화하도록 디자인되는데, 예컨대 혼성화되지만 결찰은 안된 프로브들 사이에 "간극(gap)"이 존재한다. 일반적으로, 이는 프로브 도메인과 결찰 모이어티 사이의 하나 또는 두 개의 링커를 사용하여 수행된다. 즉, 제1 프로브 도메인과 제1 결찰 모이어티 사이에 하나의 링커, 제2 프로브 도메인과 제2 결찰 모이어티 사이에 하나의 링커, 또는 둘 모두가 존재할 수 있다. 일부 구체 예에서, 간극은 단일 핵염기를 포함하며, 또한 요구에 따라 그 이상이 사용될 수 있다. 해당 분야의 통상의 기술자에 의해 이해되듯이, 반응 속도론과 링커의 길이 사이의 교환이 존재할 수 있는데; 결찰을 유발하는 접촉이 속도록적으로 바람직하지 않은 만큼 링커의 길이가 긴 경우, 더 짧은 링커가 바람직할 수 있다. 그렇지만, 일부 경우에, 속도론이 중요하지 않은 경우, 간극 및 산출된 링커의 길이는 연결 간극(spanning gap)이 1 내지 10개 핵염기만큼 되도록 더 길 수 있다. 일반적으로, 이러한 구체 예에서, 중요한 것은 링커의 길이가 대략적으로 간극 내 핵염기의 수에 대응하는 것이다.
- [0165] 본 발명의 이러한 구체 예의 또 다른 양상에서, 표적 서열에 대응하여 결찰 생성물 내 비염기적 사이트(abasic site)의 형성은 듀플렉스(duplex)를 불안정화시키는 역할을 한다. 예컨대, Abe 및 Kool (*J. Am. Chem. Soc.* (2004) 126:13980-13986)은 2개의 상이한 8-mer 올리고뉴클레오타이드 프로브(Bu42 및 DT40)가 동일 7-mer 프로브 (Thio 4)와 결찰할 때 전환을 비교하였다. Thio4가 DT40에 결찰될 때, 거의 자연적 DNA 구조를 갖는 연속 15-mer 올리고뉴클레오타이드 프로브가 형성되며 이는 DNA 표적과 완벽하게 정합되어야 한다. 그렇지만, Thio4가 Bu42에 결찰될 때, 15-mer 올리고뉴클레오타이드 프로브가 형성되며, 프로브가 표적에 결합될 때, 중간에 비염기적 사이트를 가지며 이는 알칸 링커에 의해 연결된다. 표적에 결합될 때 이들 두 프로브의 용융 온도(T_m)를 비교하면 대략 12°C의 용융 온도 차이(Bu42에 대하여 58.5, DT40에 대하여 70.7°C)를 나타낸다. 이러한 12°C의 용융 온도 차이는 프로브 세트(10,000배 과량, 10 μ M 농도)가 표적(1nM)에 비하여 대규모 과량으로 존재할 때 25°C에서 생성물 전환의 약 10배 증가(91.6- Bu42 대 8.2 DT40)를 유발하였다. 유사하게, Dose 등(Dose 2006)은 두 개의 동일한 서열, 화학적으로 결찰된 PNA 프로브에서 T_m 의 4°C 감소(53°C 대 57°C)가 생성물 전환에서 대략 4배의 증가를 어떻게 유발하는지에 대하여 밝혀냈다.
- [0166] 최근 연구는 박테리아 및 인간 세포 내부에서 RNA 발현을 모니터링하고 단일 염기 부정합을 검출하기 위한 화학적 결찰 기반 냉각 자동-결찰(Quenched Auto-Ligation, QUAL) 프로브의 용도를 입증하였다(WO 2004/0101011, 참조로서 여기에 수록됨).
- [0167] 한 구체 예에서, 불안정화 모이어티는 안정화 모이어티의 제거에 기초한다. 즉, 결찰 프로브가 표적에 대한 혼성화를 안정화시키는 모이어티를 함유하는 경우, 안정화 모이어티의 결찰 및 방출 즉시, 결찰 생성물의 안정성

이 감소한다. 따라서, 생성물 억제를 감소시키기 위한 한 가지 일반적인 방법은 초기 화학적 결찰 반응 동안 또는 2차 반응 후 결찰 동안 분자에 결합하는 부홈(minor groove)과 같은 분자단을 방출하는 프로브를 개발하는 것이다. 올리고뉴클레오타이드 서열에 의존하여, Kutyavin(Kutyavin 1997 및 Kutyavin 2000)에 의해 개시된 디하이드로피롤로인돌트리펩타이드(DPI₃)와 같은 부홈 결합제는, 올리고뉴클레오타이드 프로브의 말단에 콘쥬게이트할 때 듀플렉스 핵산의 T_m을 최대 40°C 만큼 증가시킬 수 있다. 이와 대조적으로, DPI3의 이탈 형태(unattached version)는 동일 듀플렉스의 T_m을 단지 2°C 정도 증가시킨다. 따라서, 부홈 결합제가 강화된 결합력을 갖는 프로브 세트를 생성하기 위하여 사용될 수 있으나, 만약 반응 동안 부홈 결합제가 이탈되면, 결합 증강도가 떨어지고 결찰 생성물은 부홈 결합제가 여전히 부착되어 있는 프로브에 비하여 감소된 T_m을 나타낼 것이다.

[0168] 적절한 부홈 결합 분자는 비제한적으로 디하이드로피롤로인돌트리펩타이드(DPI₃), 디스타마이신 A, 및 피롤-이미다졸 폴리아마이드를 포함한다(Gottesfeld, J.M., et al., *J. Mol. Biol.* (2001) 309:615-629).

[0169] 부홈 결합 분자에 추가하여, 결합 삽입체(tethered intercalator) 및 관련 분자가 또한 올리고뉴클레오타이드 듀플렉스의 용융 온도를 상당히 증가시킬 수 있으며, 이러한 안정화는 결합안된 상태에서 상당히 감소한다 (Dogan, et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2004) 126:4762-4763 및 Narayanan, et al., *Nucleic Acids Research*, (2004) 32:2901-2911).

[0170] 유사하게, 해당 분야의 기술자에 의해 이해되듯이, 삼중 나선 형성이 가능한 부착된 올리고뉴클레오타이드 단편 (DNA, PNA, LNA, 등)을 갖는 프로브는 안정화 모이어티로서 작용할 수 있는데, 이는 방출시, 표적 서열에 대한 결찰 생성물의 안정화 감소를 유발한다(Pooga, M, et al., *Biomolecular Engineering* (2001) 17:183-192).

[0171] 결찰 생성물의 결합력을 감소시킴으로써 생성물 억제를 감소시키기 위한 또 다른 방법은 결찰 포인트에 비염기적 사이트를 삽입시키는 것이다. 이러한 방법은 Abe(*J. Am. Chem. Soc.* (2004) 126:13980-13986)에 의하여 종래 입증되었으나, 결찰 프로브와 표적 사이의 정렬을 긴장시킴으로써 T_m 감소를 더욱 증폭시키도록 2차 프로브 재배열을 디자인할 수 있다. 예를 들어, Dose(*Org. Letters* (2005) 7:20 4365-4368) 등은 이상적인 12 시그마 결합으로부터 13으로 RNA 염기들 사이의 스페이싱을 변화시키는 재배열 후-결찰이 4°C 만큼의 T_m 감소를 어떻게 유발하는지를 밝혔다. 표적에 대한 생성물의 결합에 간섭하거나 또는 올리고뉴클레오타이드 염기의 손실을 유발하는 더 큰 재배열 및 2차 반응은 T_m을 더욱 감소시킬 수 있다.

[0172] 본 발명은 재배열 동안 최대 4개 시그마 결합의 사슬 수축을 야기하는 결찰 반응을 위한 반응 및 조성물을 제공하며, 이는 Dose에 의해 개시된 화학을 사용하는 1개 염기 화장에 비하여 재배열-후 T_m에 상당한 영향을 미쳐야 한다. 이러한 화학은 아실 전이 보조에 기초하며 이는 종래 개시되었다(Officer et al., *J Am Chem Soc.* (2002) 124(17):4642-6). 사슬 수축 완료 이후, 별도의 분자 또는 자신과 또 다른 반응을 할 수 있는 자유-티올이 발생한다. 예를 들어, 이러한 티올은 올리고뉴클레오타이드를 심하게 꼬이게하기 위해 내부 티오에스테르와 반응할 수 있으며 표적에 결합하는 결찰 생성물의 능력을 더욱 감소시킨다.

[0173] 따라서, 이러한 구체 예에서, 결찰 생성물과 두 번째 반응을 할 작용기를 방출하는 결찰 반응은 결찰 생성물과 표적 서열의 혼성 안정성을 감소시킨다.

가변 스페이서 서열

[0175] 표적 도메인, 결찰 모이어티, 및 선택적인 링커에 추가하여, 본 발명의 하나 이상의 결찰 프로브는 가변 스페이서 서열(또한 "스터퍼 서열"이라 함)을 가질 수 있다. 이러한 가변 스페이서 서열은 여기서 더욱 상세하게 논의 되는 CLPA-CE 분석법에서 특히 유용하다. 즉, 가변 스페이서 서열은 생성물이 예를 들어 모세관 전기영동(CE)을 사용하여 길이에 기초하여 검출될 때 표적 서열을 식별하는 일종의 "라벨" 또는 "바코드"로서 작용할 수 있다.

[0176] 가변 스페이서 서열은 가변 길이를 가질 수 있는 결찰 프로브의 도메인이다. 이를 가변 길이는 일부 구체 예에서 결찰 프로브의 도메인(예컨대, 프로브 도메인)이 혼성화할 수 있는 특정 표적 서열에 대하여 특이적일 것이며, 이에 따라 스터퍼 서열을 함유하는 결찰 프로브의 결찰로부터 도출되는 결찰 생성물의 길이는 표적-특이적 길이이다. 결과적으로, 이러한 결찰 생성물로부터 발생하는 모든 앰플리콘은 또한 표적-특이적 길이를 가질 것이다. 또 다른 구체 예에서, 가변 스페이서 서열은 유사한 길이의 모든 결찰 생성물이 후속하는 증폭 반응의 효율성을 촉진하도록 디자인된다.

[0177] 일부 구체 예에서, 결찰 프로브 쌍 중 단지 하나의 결찰 프로브가 가변 스페이서 서열을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 결찰 프로브 둘 모두가 가변 스페이서 서열을 포함한다. 셋 또는 그 이상의 결찰 프로브가 사용되는

일부 구체 예에서, 특정 결찰 생성물을 형성하는 하나 이상의 결찰 프로브는 가변 스페이서 서열을 함유할 수 있으나, 일반적으로 일부 구체 예에서 가변 스페이서 서열을 함유하는 것은 말단 프로브 중 하나 또는 둘 모두이다.

[0178] 또 다른 구체 예 및 전술한 바에 따라, 가변 스페이서 서열은 표적 핵산의 임의 또 다른 도메인 뿐만 아니라 샘플 내 임의 표적 핵산에 대하여 실질적으로 비-상보적(non-complementary) 결찰 프로브의 영역 내에 함유된다.

[0179] 또 다른 구체 예에서, 결찰 프로브(이하에서 더욱 상세하게 논의됨)는 프라이머 서열을 함유한다. 전술한 바에 따라, 가변 스페이서 서열은 일부 구체 예에서 프로브 도메인(표적 서열에 혼성화하는 결찰 프로브 영역)과 프라이머 서열 사이에 함유되며, 이에 따라 앰플리콘이 가변 스페이서 서열을 함유한다.

[0180] 또 다른 양상에서, 본 발명의 가변 스페이서 서열은 DNA 또는 RNA와 같은 핵산을 포함한다. 가변 스페이서 서열은 또한 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드 둘 모두의 결합을 포함할 수도 있다. 가변 스페이서 서열은 또한 뉴클레오타이드 유사체, 링커, 또는 본 발명의 결찰 및/또는 표적 포획 프로브에 선택적으로 존재하는 여기에 논의된 임의 추가 모이어티를 추가로 포함할 수 있다.

[0181] 일반적으로, 다중 표적 서열이 동시에 검출되는 복합 분석법에 있어서, 가변 스페이서 서열은, 결찰 생성물; 또는 샘플 내 또 다른 결찰 생성물 또는 앰플리콘으로부터 유래된 상이한 뉴클레오타이드 길이를 갖도록 각각의 결찰 생성물로부터 유래된 앰플리콘; 중 어느 하나 또는 둘 모두를 산출하도록 디자인된다. 즉, 어느 하나의 표적 핵산으로부터 유래된 앰플리콘은 다른 표적 핵산으로부터 유래된 앰플리콘의 길이와 다르다. 유사하게, 도 6 및 도 11에 도시된 바와 같이 다중 결찰 프로브 세트가 단일 표적에 대하여 사용되는 경우, 각각의 결찰 생성물 및/또는 앰플리콘은 상이한 길이를 가져서, 상이한 생성물의 검출을 가능하게 할 것이다.

[0182] 가변 스페이서 서열의 상이한 길이는 검출 시스템의 민감도에 의존할 것이다. Life Technologies사의 Genetic Analyzer 시스템 또는 Beckman Coulter사의 PACE 시스템과 같은 정교한 모세관 전기영동(CE) 시스템에 대하여, 결찰 생성물 및/또는 앰플리콘은 분리되고, 그 후 이들의 길이가 변할 때 1개만큼이나 적은 뉴클레오타이드에 의해 검출될 수 있다. 더 낮은 크기 분해능을 갖는 또 다른 CE는 분해능에 의존하여 5 내지 100개 염기 쌍의 길이 차이를 요구할 수 있다. 일반적으로, 고분해능 CE 시스템은 더 긴 분리 채널 길이 및 종종 더 긴 분리 시간을 요구한다. 또한, 변성 모세관 전기영동 시스템은 비-변성 시스템보다 더욱 우수한 분해능을 갖는 경향이 있다. 일반적으로, 가변 스페이서 서열은 1 내지 100개 범위 염기의 뉴클레오타이드 차이를 유발하도록 디자인되며 5 내지 20개 염기가 바람직하다. 더 큰 크기 차이가 사용될 수 있으나, 종종 추가 비용을 요구하거나 또는 단일 테스트에서 조합될 수 있는 가능한 결찰 프로브의 수를 감소시킨다.

[0183] 또한, 가변 스페이서 서열은 사용될 수 있는 상이한 "바코드"의 수를 확장시키기 위해 또 다른 라벨과 결합되어 사용될 수 있다. 즉, 가변 스페이서 서열 길이는 이를 제2 라벨과 인코딩시킴으로써 "재사용"될 수 있는데; 예를 들면, 20개 뉴클레오타이드의 가변 스페이서 서열을 함유하는 하나의 앰플리콘은 제1 색깔의 형광 라벨을 사용할 수 있으며, 20mer 스페이서 서열을 함유하는 또 다른 앰플리콘은 또 다른 색깔의 형광 라벨을 사용할 수 있다. 동일 크기의 이들 앰플리콘은, 법의학에서 통상 사용되는 것과 같이 상이한 과장(색깔) 생성물을 갖는 앰플리콘을 식별할 수 있는 멀티-채널 CE 기기를 사용하여 동시에 검출될 수 있다.

결찰 프로브의 또 다른 기능부

[0185] 표적 도메인, 결찰 모이어티, 및 선택적인 링커에 부가하여, 본 발명의 하나 이상의 결찰 프로브는 추가적인 기능부를 포함할 수 있는데, 비제한적으로 프로모터 및 프라이머 서열(또는 분석법에 따라 이들의 보체), 라벨, 서열에 결합하는 라벨 프로브, 및 포획 또는 앵커 서열을 포함한다.

[0186] 많은 구체 예에서, 결찰 프로브는 후속하는 증폭 단계를 위한 필수 프라이밍 사이트 또는 사이트들을 함유하도록 구성된다. 바람직한 구체 예에서 프라이밍 사이트는 일반 프라이밍 사이트이다. "일반 프라이밍 사이트" 또는 "일반 프라이밍 서열"은 여기서 증폭을 위하여 프라이머에 결합하는 프로브의 서열을 의미한다.

[0187] 바람직한 구체 예에서, 하나의 일반 프라이밍 서열 또는 사이트가 사용된다. 이러한 구체 예에서, 바람직한 일반 프라이밍 서열은 RNA 중합효소 T7 서열이며, 이는 이하에서 개략화되듯이 T7 RNA 중합효소가 어댑터 서열의 RNA 복제본을 만드는 것을 가능하게 한다. T7 RNA 중합효소의 사용에 관한 추가 문헌은 U.S. Pat. Nos. 6,291,170, 5,891,636, 5,716,785, 5,545,522, 5,922,553, 6,225,060 및 5,514,545가 있으며, 이들 모두는 여기에 참조로서 명백하게 수록된다.

[0188] 바람직한 구체 예에서, 예를 들면 PCR과 같은 2개의 프라이머를 요구하는 증폭 방법이 사용되는 경우, 각각의

프로브는 바람직하게는 전단 일반 프라이밍 사이트(UUP) 및 후단 일반 프라이밍 사이트(DUP)를 포함한다. 다시 언급하지만, "전단" 및 "후단"이 특정한 5'-3' 방향의 전달을 의미하는 것이 아니며, 시스템의 방향에 의존할 것이다. 바람직하게는, 단지 단일 UUP 서열 및 단일 DUP 서열이 프로브 세트에 사용되지만, 해당 분야의 기술자에 의해 이해되듯이, 또 다른 분석법 또는 또 다른 복합 분석은 복수의 일반 프라이밍 서열을 사용할 수 있다. 일부 구체 예에서 프로브 세트는 상이한 일반 프라이밍 서열을 포함할 수 있다. 또한, 일반 프라이밍 사이트가 바람직하게는 표적 프로브(또는 결찰된 프로브)의 5' 및 3' 말단에 위치하며, 프라이밍 서열이 측면에 붙은 서열들만이 증폭될 것이다.

[0189] 또한, 일반 프라이밍 서열은 분석법의 특이성을 보장하기 위한 특정 분석법 및 호스트 게놈을 고려하여 가능한 독특하도록 선택된다. 그렇지만, 해당 분야의 기술자에 의해 이해되듯이, 프라이밍 서열/프라이머의 세트가 사용될 수 있으며; 즉, 하나의 반응이 제1 프라이밍 서열 또는 서열들의 세트를 갖는 500개 표적 프로브 및 제2 서열 또는 서열들의 세트를 갖는 또 다른 500개 프로브를 사용할 수 있다.

[0190] 해당 분야의 기술자에 의해 이해되듯이, 2개의 프라이밍 서열이 사용될 때, 2개 프라이밍 사이트의 방향은 일반적으로 서로 다르다. 즉, 하나의 PCR 프라이머는 제1 프라이밍 사이트에 직접 혼성화할 것이며, 또 다른 PCR 프라이머는 제2 프라이밍 사이트의 보체(complement)에 혼성화할 것이다. 환연하면, 제1 프라이밍 사이트는 센스 방향(sense orientation)이며, 제2 프라이밍 사이트는 안티센스 방향(antisense orientation)이다.

[0191] 해당 분야의 기술자에 의해 이해되듯이, 일반적으로, 고도 다중 반응이 수행될 수 있으며, 일반 프라이밍 사이트 모두는 모든 반응이 대하여 동일하다. 그 대신에, 일반 프라이밍 사이트 및 대응하는 프로브의 "세트"가 동시에 또는 순차적으로 사용될 수 있다. 일반 프라이밍 사이트는, 여기서 개략화되는 다양한 방법에서 검출되는 복수의 앰플리콘을 형성하기 위한 변성 프로브를 증폭하기 위하여 사용될 수 있다. 바람직한 구체 예에서, 일반 프라이밍 사이트 중 하나는 T7 사이트이다. 일부 구체 예에서 이러한 프라이밍 사이트는 RNA 합성을 위한 템플릿으로서의 역할을 한다.

[0192] 바람직한 구체 예에서, 여러 표적을 동시에 검출할 때, 반응 내 모든 올리고뉴클레오타이드 결찰 프로브 세트는 동일한 프로모터 또는 프라이머 쌍 결합 사이트를 함유하도록 디자인되며 그 결과 결찰 및 정제에 후속하여, 적절한 경우, 모든 결찰 생성물이 동일 효소 및/또는 동일 프라이머를 사용하여 동시에 증폭될 수 있다. 환연하면, 여러 표적 핵산의 검출을 포함하는 구체 예에서, 상이한 표적 핵산 서열을 지향하는 결찰 프로브를 함유하는 상이한 결찰 프로브 세트는 일부 구체 예에서 동일한 프로모터 또는 프라이머 쌍 결합 사이트(예컨대, "일반(universal)" 프라이머 결합 사이트)를 소유할 수 있으며 그 결과 이들 결찰 프로브의 혼성화 및 결찰로부터 유래한 결찰 생성물은 동일한 효소 및/또는 프라이머를 사용하여 증폭될 수 있다.

[0193] 한 구체 예에서, 하나 이상의 결찰 프로브는 프로모터 서열을 포함한다. 프로모터 서열을 사용하는 구체 예에서, 프로모터 서열 또는 이의 보체는 적절한 중합효소가 자신과 상호작용하는 것을 허용하는 충분한 길이일 것이다. 중합효소 상호작용을 위하여 충분히 긴 서열의 상세한 설명은 특히 *Sambrook and Russell*에 개시되어 있으며, 이는 모든 목적 및 특히 중합효소를 위한 프로모터 서열과 관련된 모든 개시사항을 위하여 참조로서 여기에 수록된다. 일부 구체 예에서, 증폭 방법은 적어도 1회의 증폭 순환, 예를 들면, 중합효소와 프로모터의 상호작용; 중합효소를 사용하여 템플릿-의존성 방법으로 뉴클레오타이드의 가닥을 합성하는 단계; 및 신규-형성된 핵산 듀플렉스를 변성시켜 가닥들을 분리시키는 단계;로 구성된 순차적인 과정을 포함한다.

[0194] 또 다른 구체 예에서, 결찰 프로브들 중 하나 또는 둘 모두는 프라이머 서열을 포함한다. 이하에서 개략화되듯이, 본 발명의 결찰 생성물은 효소적 증폭 반응과 같은 또 다른 반응에서 사용될 수 있다. 한 구체 예에서, 결찰 프로브는 또 다른 수준의 증폭을 가능하게 하도록 디자인된 프라이머 서열을 포함한다. 여기에 사용된 바와 같이, 용어 "프라이머"는 정제된 제한효소 절개(restriction digest)에서와 같이 자연적으로 발생하거나 또는 합성적으로 생성되는 뉴클레오타이드 서열을 의미하는데, 이는 핵산 가닥에 상보적인 프라이머 연장 생성물의 합성이 도입되는 조건에 놓일 때, 즉 적절한 완충액("완충액"은 pH, 이온 강도, 및 공동인자를 포함함) 내 그리고 적절한 온도에서 상이한 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 중합효소의 존재 하에 놓일 때, 핵산 서열 합성의 개시 포인트로서 작용할 수 있다. 프라이머의 하나 이상의 뉴클레오타이드는 예를 들어, 메틸 그룹, 바이오틴 또는 디옥신계닌 모이어티, 형광 태그의 첨가에 의하거나 또는 방사선활성 뉴클레오타이드를 사용하여 변성될 수 있다. 프라이머 서열은 템플릿의 정확한 서열을 반영할 필요는 없다. 예를 들면, 비-상보적 뉴클레오타이드 단편이 프라이머의 5' 말단에 부착될 수 있으며, 프라이머 서열의 나머지는 표적 가닥에 실질적으로 상보적이다.

[0195] 여러 프라이밍 서열 및 프라이머들을 사용함으로써, 제1 결찰 생성물은 또 다른 결찰 생성물에 대한 템플릿으로

서 작용할 수 있다. 이를 프라이머 서열은 PCR 반응에 대한 프라이밍 사이트로서 작용할 수 있으며, 이는 결찰 생성물을 증폭시키기 위해 사용될 수 있다. PCR 반응에 부가하여, 또 다른 증폭 반응이 프라이밍 서열을 포함할 수 있으며, 이는 비제한적으로 리가아제 사슬 반응, 인베이더(Invader)TM, 닉 번역(nick translation)(NICK)에 의한 위치적 증폭, 프라이머 연장/닉 번역, 및 해당 분야에 공지된 방법을 포함한다. 여기에 사용되듯이, "증폭"은 특정 핵산의 복제 수의 증가를 의미한다. 증폭 반응에서 체외에서 생성된 특정 핵산의 복제물을 "앰플리콘" 또는 "증폭 생성물"이라 한다.

[0196] 증폭은 또한 제2 결찰 반응을 통하여 일어날 수 있는데, 여기서 프라이머 사이트는 최초 결찰 생성물을 생성한 제1 결찰 프로브 세트와 동일한 서열을 포함하거나 포함하지 않을 수 있는 신규 결찰 프로브 세트를 위한 혼성화 사이트로서 작용한다. 표적 서열은 따라서 증폭의 후속 순환에서 결찰 생성물의 증폭을 통하여 기하급수적으로 증폭된다.

[0197] 본 발명의 이러한 양상의 또 다른 구체 예에서, 프라이머 서열은 네스티드 결찰 반응(nested ligation reaction)에 대하여 사용된다. 이러한 네스티드 결찰 반응에서, 여기에 개시된 방법을 사용하여 제1 결찰 반응이 달성되어 이에 따라 결찰 생성물은 바이오틴화 프라이머(biotinylated primer)를 사용하여 원하는 가닥에 포획되고 스트렙타비딘으로 코팅된 비드(특히 마그네틱 비드) 상에 포획된다. 결찰 생성물이 포획된 이후, 제2 결찰 반응은 포획 비드, 프로브, 등에 부착된 결찰 생성물의 말단으로부터(즉, 후단으로부터) 공간적으로 제거된 결찰 생성물의 섹션 내에서 프라이머 서열에 대한 결찰 프로브의 혼성화에 의해 달성된다. 2차 결찰 반응을 위하여 적어도 하나의 프라이머 서열이 앵커 또는 포획 서열을 포함한 결찰 프로브가 아닌 결찰 프로브에 상보적인 결찰 생성물의 영역 내에 위치할 것이다. 이러한 제2 결찰 반응으로부터 유래한 결찰 생성물은 따라서 제1 화학적 결찰로부터 성공적으로 형성된 이들 서열로부터 단지 성공적으로 유래될 것이며, 이에 따라 증폭 반응으로부터 모든 "가성 양성(false positives)"을 제거한다. 또 다른 구체 예에서, 2차 반응에 사용된 프라이머 서열은 PCR과 같은, 또 다른 유형의 증폭 반응을 위한 프라이머 사이트일 수 있다.

[0198] 한 구체 예에서, 하나 이상의 결찰 프로브는 앵커 서열(anchor sequence)을 포함한다. "앵커 서열"은 여기서 검출 목적을 위하여 지지체에 대한 결찰 생성물의 부착을 가능하게 하는 결찰 프로브의 성분을 의미한다. 검출을 위한 적절한 수단은 부착된 적절한 포획 모이어티를 갖는 지지체를 포함한다. 일반적으로, 이러한 부착은 앵커 서열과 포획 프로브와의 혼성화를 통하여 일어날 것이며, 상기 포획 프로브는 실질적으로 앵커 서열에 상보적이다.

[0199] 바람직한 구체 예에서, 프로브 중 하나는 "앵커" 서열(가끔, 해당 분야 및 본 명세서에서 "짚 코드(zip code)" 또는 "바코드" 또는 "어댑터"라 불림)을 추가로 포함한다. 어댑터는 "일반 어레이(universal array)"의 사용을 가능하게 하는 프로브의 고정화를 촉진한다. 즉, 표적 특이적이 아닌, 오히려 개별(바람직하게는) 인공 어댑터 서열에 특이적인 포획 프로브를 함유하는 어레이(고체상 또는 액체상 어레이)가 발생된다.

[0200] 따라서, "어댑터 서열"은 일반적으로 표적 서열에 대하여 토착적이지 않은, 즉 이질적이며, 그러나 표적 서열에 첨가되거나 부착된 핵산이다. 본 문맥에서, "표적 서열"은 주된 샘플 표적 서열을 포함할 수 있거나, 또는 여기에 개시된 반응의 반응물 또는 생성물과 같은 유도된 표적일 수 있으며; 따라서 예를 들면, 표적 서열이 OLA 반응에서 PCR 생성물, 제1 결찰 프로브 또는 결찰 프로브 등일 수 있음에 주목하여야 한다. 용어 "바코드", "어댑터", "어드레스", 태그" 및 "짚코드"는 모두 핵산 단편 풀의 분리를 가능하게 하기 위하여 앰플리콘에 첨가되는 인공 서열을 설명하기 위하여 사용되었다. 한 가지 바람직한 어댑터의 형태는 혼성화 어댑터이다. 본 구체 예에서 어레이의 표면 상에서 상보적인 포획 프로브에 대한 혼성화를 가능하게 하도록 어댑터가 선택된다. 어댑터는 프로브 및 표적 서열의 고유 식별자로서 역할을 한다. 일반적으로, 어댑터 및 대응하는 어레이 상의 포획 프로브의 세트는, 표적 서열 및 상기 표적 서열 외부의 더 큰 핵산 서열 상의 서열(예컨대 게놈 DNA 내의 서열)을 포함하여, 반응 혼합물의 또 다른 성분들 및 서로간의 교차-혼성화를 최소화하기 위하여 개발된다. 어댑터의 또 다른 형태는 질량 분광광도법, 전기영동 이동도에 기초하여 분리될 수 있는 전기영동 태그 등을 사용하여 분리될 수 있는 질량 태그(mass tag)이다. 일부 어댑터 서열은 U.S. Ser. No. 09/940,185(2001.08.27. 출원)에 개시되어 있으며, 이는 그 전체가 참조로서 여기에 수록된다. 바람직한 어댑터는 이하의 기준을 만족하는 것들이다. 이들은 게놈, 특히 인간 게놈에서는 발견되지 않으며, 이들은 바람직하지 않은 구조, 예컨대 헤어핀 루프(hairpin loop)를 갖지 않는다.

[0201] 한 구체 예에서 어댑터 서열의 사용은 더욱 "일반적인(universal)" 표면의 생성을 가능하게 하는데; 즉, 한정된 세트의 포획 프로브를 포함하는 하나의 표준 어레이가 모든 응용에서 생성되고 사용될 수 있다. 최종-사용자는 상이한 용해성 표적 프로브를 디자인함으로써 어레이를 맞춤형화할 수 있는데, 이는 해당 분야의 기술자에 의해

이해되듯이 일반적으로 단순하며 저비용적이다. 바람직한 구체 예에서, 서로 다르며 일반적으로 인공적인 포획 프로브의 어레이가 생성되는데; 즉, 포획 프로브는 공지된 표적 서열에 대한 상보성을 갖지 않는다. 앵커 서열이 그 후 표적 프로브에 삽입될 수 있다.

[0202] 해당 분야의 기술자에 의해 이해되듯이, 앵커 서열의 길이는 요구되는 결합 "세기" 및 요구되는 상이한 앵커의 수에 따라 변할 것이다. 바람직한 구체 예에서, 어댑터 서열은 약 6 내지 약 500개 염기 쌍 길이 범위이며, 약 8 내지 약 100개가 바람직하며, 약 10 내지 약 25개가 특히 바람직하다.

[0203] 바람직한 구체 예에서, 어댑터 서열은 표적 프로브가 결합된 표적 분석물을 특이적으로 식별한다. 즉, 어댑터 서열은 자신을 표적 분석물에 결합시킬 필요가 없으나, 시스템은 어댑터의 존재를 검출함으로써 표적 분석물의 식별을 가능하게 한다. 따라서, 결합 및 혼성화 분석 및 세척 이후, 어댑터를 포함하는 프로브가 증폭된다. 어댑터의 검출이 그 후 표적 핵산의 존재에 대한 식별로서 역할을 한다.

[0204] 한 구체 예에서 어댑터는 식별자 영역; 및 전술한 바와 같이 일반 어레이 상의 포획 프로브에 상보적인 영역; 둘 모두를 포함한다. 이러한 구체 예에서, 앰플리콘은 일반 어레이 상의 포획 프로브에 혼성화한다. 어댑터의 검출은 어댑터 서열에 상보적인 프로브와의 혼성화 이후 달성된다. 바람직하게는 프로브는 여기에 설명된 바와 같이 라벨링된다.

[0205] 일반적으로, 가변 스페이서 서열과 유사하게, 고유 어댑터 서열이 각각의 고유 표적 분석물에 대하여 사용된다. 즉, 특정 어댑터 서열의 설명 또는 검출은 상기 어댑터 서열을 함유하는 표적 프로브가 결합하는 표적 분석물의 식별을 가능하게 한다. 그렇지만, 여기서 논의되는 바와 같이, 일부 경우에, 어댑터 서열을 "재사용"하고 하나 초과의 표적 분석물이 어댑터 서열을 공유하도록 하는 것이 가능하다.

[0206] 바람직한 구체 예에서 어댑터는 특정 표적 분자를 표시하는 상이한 서열 또는 특징부를 함유한다. 즉, 각각의 어댑터는 특이적으로 표적 서열을 식별한다. 전술한 바와 같이, 어댑터는 증폭되어 앰플리콘을 형성한다. 어댑터는 표적 분석물, 즉 특정 표적 핵산의 존재에 대한 식별로서 검출된다.

[0207] 본 발명의 이러한 양상의 한 구체 예에서, 전단 올리고뉴클레오타이드는, 관심 표적에 결합하지 않지만 후속하여 적절한 고체 지지체 또는 일부 유형의 장치 상에 결찰 생성물을 포획시키기 위하여 사용되는 또 다른 뉴클레오타이드 분절을 가지도록 디자인된다. 본 발명의 이러한 양상의 바람직한 구체 예에서, 후단 올리고뉴클레오타이드는 자신에게 부착된 검출가능한 라벨을 가지며, 이에 따라 결찰 이후, 산출된 생성물은 3' 말단에서 고체 지지체를 위한 포획 서열 및 5' 말단에서 검출가능한 라벨을 함유할 것이며, 단지 결찰 생성물만이 포획 서열 및 라벨 둘 모두를 함유할 것이다.

[0208] 특히 다중 표적 검출과 관련된 본 발명의 또 다른 양상에서, 프로브 세트의 각각의 전단 프로브는 DNA 어레이 상의 상이한 위치에 대응하는 3' 말단에서의 고유 서열(또한 여기서 "앵커 서열"이라 함)을 가지도록 디자인될 수 있다. 프로브 세트의 각각의 후단 프로브는 선택적으로 또 다른 후단 프로브와 동일한 검출가능한 라벨을 함유하지만, 고유 표적은 각각의 표적에 대응하는 서열에 결합한다. DNA 어레이와의 혼성화 이후, 어드레스 서열(전단 프로브) 및 라벨(후단 프로브) 둘 모두를 갖는 결찰 프로브만이 관찰가능할 것이다. 본 발명의 또 다른 양상에서, 검출가능한 라벨은 전단 프로브에 부착될 수 있으며 포획 서열은 후단 프로브의 일부일 수 있으며, 그 결과 결찰 생성물은 결찰 생성물의 3' 말단쪽으로 더욱 치우친 검출가능한 라벨 및 5' 말단쪽의 포획 서열을 포함할 것이다. 정확한 배열은 합성의 용이성을 고려할 뿐만 아니라 후속하여 결찰 반응 생성물을 검출하기 위하여 사용될 장치의 특징을 통하여 최선책으로 결정된다.

[0209] 앵커 서열은 핵산 및 비-핵산 부분 둘 모두를 가질 수 있다. 따라서, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜 링커를 비롯하여 알킬 그룹과 같은 가요성 링커가 앵커 서열의 핵산 부분과 지지체 표면 사이에 공간을 제공하기 위하여 사용될 수 있다. 이는 결찰 생성물이 클 때 특히 유용할 수 있다.

[0210] 또한, 일부 경우에, "일반 어레이"의 포획 프로브에 대응하는 앵커 서열의 세트가 사용될 수 있다. 해당 분야에 공지된 바와 같이, 어레이는 포획 프로브로서 합성 유전 서열로 생성될 수 있으며, 이는 분석되는 샘플의 표적 서열에 대하여 비-상보적이나 결찰 프로브 세트의 어레이 결합 서열에 대하여 상보적이 되도록 디자인된다. 이들 "일반 어레이(universal array)"는 여러 종류의 샘플 및 진단 시험에 사용될 수 있는데 왜냐하면 프로브의 동일 어레이 결합 서열이 재사용되거나/상이한 표적 인식 서열과 쌍을 이룰수 있기 때문이다.

[0211] 한 구체 예에서, 하나 이상의 결찰 프로브는 라벨(label)을 포함한다. "라벨" 또는 "라벨링된"은 여기서, 화합물이 화합물의 검출을 가능하게 하기 위하여, 예컨대 결찰 프로브 또는 결찰 또는 전이 생성물이 공지된 검출 방법, 예컨대, 전자적, 분광학적, 광학학적, 또는 전기화학발광학적 방법을 사용하여 검출가능하게 되도록 하기

위하여 부착된 적어도 하나의 원소, 동위원소 또는 화학 화합물을 가지는 것을 의미한다. 일반적으로, 라벨은 다음과 같이 세 가지로 분류된다: a) 동위원소 라벨, 이는 방사선활성 또는 중질 동위원소(heavy isotope)일 수 있음; b) 자기적, 전기적, 열적; 및 c) 착색 또는 발광 염료; 한편 라벨은 효소 및 예컨대 마그네티크 입자와 같은 입자를 또한 포함한다. 염료는 발색단 또는 인광체(phosphors)일 수 있으며, 바람직하게는 형광성 염료이며, 이는 강한 신호 때문에 우수한 신호대잡음비를 제공한다. 본 발명에서의 사용을 위한 적절한 염료는 비제한적으로 형광성 란타나이드 착물, 유로퓸(Europium) 및 테르븀(Terbium)의 착물 포함, 플루오레세인(Fluorescein), 플루오레세인 이소티오시아네이트, 카르복시플루오레세인(FAM), 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 로다민, 테트라메틸로다민, 웜밸리페론, 에오신, 에리트로신, 쿠마린, 메틸-쿠마린, 피렌, 말라사이트 그린, Cy3, Cy5, 스틸벤, 루시퍼 엘로우, 캐스케이드 블루, 텍사스 레드, 알렉사 염료, 단실 클로라이드, 피코에리틴, 그린 형광 단백질 및 이의 파장 이동 변성체, 보디피, 및 다음 문헌에 개시된 것과 같은 해당 분야에 공지된 또 다른 것들을 포함한다: Haugland, Molecular Probes Handbook, (Eugene, Oreg.) 6th Edition; The Synthegen catalog (Houston, Tex.), Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Ed., Plenum Press New York (1999), 및 6th Edition of the Molecular Probes Handbook by Richard P. Haugland에 개시된 것들, 이들은 여기서 참조로서 명백하게 수록됨. 또 다른 라벨은 U.S. Ser. No. 09/315,584에 개시된 나노크리스탈 또는 Q-도트를 포함하며, 상기 문헌은 참조로서 여기에 명백하게 수록된다.

[0212] 바람직한 구체 예에서, 라벨은 결합 파트너 쌍의 일부인 보조 라벨이다. 예를 들면, 라벨은 합텐 또는 항원일 수 있으며, 이들은 자신들의 결합 파트너에 결합할 것이다. 바람직한 구체 예에서, 결합 파트너는 연장된 및 비-연장된 프라이머의 분리를 가능하게 하기 위하여 고체 지지체에 부착될 수 있다. 예를 들면, 적절한 결합 파트너 쌍은 비제한적으로, 항원(예컨대 단백질(펩타이드 포함)) 및 항체(이의 단편 포함(FAbs, 등)); 단백질 및 소형 문자, 바이오틴/스트렙타비딘 포함; 효소 및 기질 또는 억제제; 또 다른 단백질--단백질 상호작용 쌍; 수용체-리간드; 및 탄수화물 및 이의 결합 파트너;를 포함한다. 핵산--핵산 결합 단백질 쌍이 또한 유용하다. 일반적으로, 프라이머 내로의 함침을 위해 쌍 중 더 작은 것이 NTP에 부착된다. 바람직한 결합 파트너 쌍은 비제한적으로 바이오틴(또는 이미노-바이오틴) 및 스트렙타비딘, 디게옥시닌 및 Abs, 그리고 Prolinx™ 시약을 포함한다.

[0213] 바람직한 구체 예에서, 결합 파트너 쌍은 바이오틴 또는 이미노-바이오틴 및 스트렙타비딘을 포함한다. 이미노-바이오틴은 pH 4.0 완충액에서 스트렙타비딘으로부터 해리된 이미노-바이오틴으로서 바람직하며 한편 바이오틴은 거친 변성제(예컨대 95°C에서 6M 구아니디니움 HCl, pH 1.5 또는 90% 포름아마이드)를 요구한다.

[0214] 바람직한 구체 예에서, 결합 파트너 쌍은 기본 검색 라벨(예를 들면, 결찰 프로브에 부착됨) 및 상기 기본 검색 라벨에 특이적으로 결합할 항체를 포함한다. "특이적으로 결합"은 여기서 파트너가 쌍과 시스템의 또 다른 성분 또는 불순물과의 차이를 구별하기에 충분한 특이성을 가지면서 결합하는 것을 의미한다. 결합은 비-특이적 결합을 제거하는 단계를 포함하여, 분석법의 조건 하에서 결합을 유지하기에 충분하여야 한다. 일부 구체 예에서, 쌍의 해리 상수는 약 10^{-4} 내지 10^{-6} M^{-1} 미만일 것이며, 약 10^{-5} 내지 10^{-9} M^{-1} 미만이 바람직하며 10^{-9} M^{-1} 이 특히 바람직하다.

[0215] 바람직한 구체 예에서, 보조 라벨은 화학적 변성가능한 모이어티이다. 이러한 구체 예에서, 반응성 작용기를 갖는 라벨이 핵산에 삽입된다. 작용기는 그 후 후속하여 기본 라벨로 라벨링될 수 있다. 적절한 작용기는 비제한적으로 아미노 그룹, 카르복실 그룹, 말레이미드 그룹, 옥소 그룹 및 티올 그룹을 포함하며, 아미노 그룹 및 티올 그룹이 특히 바람직하다. 예를 들면, 아미노 그룹을 포함하는 기본 라벨은 예를 들면 해당 분야에 공지된 바와 같이 링커를 사용하여, 아미노 그룹을 포함하는 보조 라벨에 부착될 수 있으며; 예를 들면, 호모- 또는 헤테로-이작용성 링커가 공지되어 있다(1994 Pierce Chemical Company catalog, technical section on cross-linkers, pages 155 200 참조, 참조로서 여기에 수록됨).

[0216] 이러한 구체 예에서, 라벨은 또한 라벨 프로브 결합 서열 또는 이의 보체일 수 있다. "라벨 프로브"는 여기서 결합 서열에 실질적으로 상보적이며 일반적으로 직접적으로 라벨링된 핵산을 의미한다.

[0217] 본 발명의 조성물은 일반적으로 공지된 합성 기술을 사용하여 제조된다. 일반적으로, 표준 포스포라미다이트 화학에 기초하는 방법론이 본 발명의 하나의 양상에 있어서 특히 유용하지만, 해당 분야의 통상의 기술자에 의해 이해되듯이 여러 핵산 합성 반응이 공지되어 있다. 형광염료 및 냉각제 첨가의 간격조절은 공지되어 있다.

VI. 표적 포획 프로브

[0219] 일부 양상에서, 그리고 여기서 논의된 결찰 프로브의 모든 설명에 부합하여, 본 발명은 표적 포획 프로브의 사

용을 추가로 포함한다. 이들 표적 포획 프로브는 일반적으로 결찰 프로브의 화학적 결찰 반응에 참여하지 않으며, 분석법의 특이성을 증가시키는데 유용하다. 여기서 더욱 설명되는 바와 같이, 표적 포획 프로브는 여기서 설명되는 바와 같이 결찰 프로브로부터 형성된 결찰 생성물로부터 전단 또는 후단에서 표적 핵산에 혼성화한다. 표적 포획 프로브를 표적 핵산에 혼성화시키는 것은 표적 핵산, 하나 이상의 결찰 생성물, 및 표적 포획 프로브를 포함하는 표적 복합체를 형성한다. 표적 포획 프로브는 고체 지지체 또는 비드 상에 표적 복합체를 포획하기 위하여 사용될 수 있는 포획 모이어티를 함유한다. 지지체 또는 비드 상의 포획 이후, 비-결합 종이 제거된다. 표적 복합체(또한 여기서 "포획 복합체"라 함) 및/또는 결찰 생성물이 그 후 분석되거나 증폭된다(예컨대 PCR).

[0220] 일반적으로, 본 발명의 표적 포획 프로브는 표적 핵산 및 또 다른 포획 모이어티에 혼성화하는 도메인을 함유하며 상기 또 다른 표적 모이어티는 혼성화 또는 또 다른 상호작용을 통하여 표적 포획에 결합하는 복합체/분자를 선택적으로 포획하기 위하여 사용될 수 있다. 일부 구체 예에서, 포획 모이어티는 포획 핵산 서열, 비드, 또는 결합 파트너 쌍의 결합 파트너(예컨대 바이오틴, 이는 자신의 결합 파트너 스트렙타비딘에 의해 포획될 수 있음)일 수 있다.

[0221] 표적 포획 프로브는 핵산의 표적 도메인에 혼성화하는 결찰 프로브로부터 전단 또는 후단에서 혼성화하도록 디자인될 수 있다. 일부 구체 예에서, 표적 포획 프로브는 결찰 프로브의 소정의 거리 내에서 혼성화할 것이다.

[0222] 여기서 논의되듯이, 본 발명의 방법은 결찰 프로브가 리가아제 효소의 첨가 없이 화학적 결찰을 자발적으로 수행하는 조건 하에서 표적 핵산의 표적 도메인에 대한 하나 이상의 결찰 프로브의 혼성화를 포함한다. 결찰 프로브와 함께 표적 포획 프로브를 사용하는 본 발명의 구체 예에서, 하나 이상의 결찰 프로브의 혼성화 이전, 이후 또는 동시에, 표적 포획 프로브가 표적 핵산에 혼성화될 수 있음이 이해될 것이다. 유사하게, 표적 포획 프로브의 혼성화가 결찰 프로브의 자발적 결찰 이전, 이후 또는 동시에 일어날 수 있다.

[0223] 일부 구체 예에서, 다중 표적 포획 프로브가 표적 핵산에 적용된다. 이해되듯이, 이러한 다중 포획 프로브는 표적 길이에 따라 임의 지점에 혼성화하도록 디자인될 수 있다. 단일 결찰 생성물이 표적 핵산 상에 형성되는 구체 예에서, 다중 결찰 프로브는 결찰 생성물을 양쪽 측면에 결합시키기 위하여 사용될 수 있다. 이러한 구체 예는 핵산 완전성의 품질 제어 또는 평가에서 특히 유용한데, 왜냐하면 분해된 표적 핵산이 다중 표적 포획 프로브가 사용될 때 포획될 수 있는 가능성성이 증가하기 때문이다.

[0224] 다중 결찰 생성물이 표적 핵산 상에서 형성되는 구체 예에서, 다중 표적 포획 프로브는 또한 표적 핵산에 혼성화할 수도 있다. 전술한 바와 같이, 이러한 다중 표적 포획 프로브는 표적 핵산의 길이에 따라 상이한 지점에서 혼성화하도록 디자인될 수 있다. 일부 구체 예에서, 표적 포획 프로브는 표적 핵산의 3', 5' 또는 3'와 5' 말단 모두에서 또는 이에 근접하여 혼성화하도록 디자인된다. 또 다른 구체 예에서, 표적 포획 프로브는 표적 핵산 상에 형성된 상이한 결찰 생성물들의 전단, 후단 및/또는 이들 사이의 영역에 혼성화하도록 디자인될 수 있다.

VII. 분석법 및 검출 방법

[0225] 예시적인 양상에서, 본 발명은 샘플 내 복수의 상이한 표적 핵산을 검출하는 방법을 제공한다. 이러한 표적 핵산은 적어도 제1 및 제2 표적 도메인을 포함하며, 여기서 상기 제1 및 제2 표적 도메인은 서로 인접한다. 표적 핵산은 또한 표적 포획 도메인인 제3 도메인을 포함할 수 있으며, 상기 표적 포획 도메인은 제1 및 제2 표적 도메인의 전단 또는 후단(즉, 5' 또는 3')에 위치한다.

[0226] 바람직한 구체 예에서, 본 발명의 분석법은 전술한 표적 도메인 및 표적 포획 도메인을 포함하는 표적 핵산을 포함하는 결찰 기질을 제공하는 단계를 포함한다. 이들 결찰 기질 각각은 제1 및 제2 핵산 결찰 프로브를 포함하는 제1 결찰 프로브 세트를 추가로 포함한다. 제1 핵산 결찰 프로브는 표적 핵산 서열의 제1 표적 도메인에 혼성화하고, 제2 핵산 결찰 프로브는 표적 핵산 서열의 제2 표적 도메인에 혼성화한다. 이러한 구체 예에서, 제1 표적 도메인은 제2 표적 도메인의 전단에 있다. 제1 핵산 결찰 프로브는 5' 결찰 모이어티를 추가로 포함하고 제2 핵산 결찰 프로브는 3' 결찰 모이어티를 추가로 포함한다. 제1 및 제2 표적 도메인이 서로 인접하기 때문에, 표적 도메인에 혼성화된 2개의 결찰 프로브의 결찰 모이어티는 서로 인접하며 리가아제 효소의 사용 없이 결찰을 수행하여 결찰 생성물을 형성할 수 있다.

[0227] 본 발명의 구체 예는 표적 포획 프로브를 표적 핵산의 제3 표적 포획 도메인에 혼성화시켜 표적 복합체를 형성하는 단계를 추가로 포함한다. 표적 복합체는 따라서 표적 핵산, 제1 표적 도메인에 혼성화된 제1 결찰 프로브, 제2 결찰 도메인에 혼성화된 제2 결찰 프로브 및 제3 표적 포획 도메인에 혼성화된 표적 포획 프로브를 포함한다. 표적 포획 프로브는 표면 또는 기질(예컨대 비드) 상에서 표적 복합체의 포획을 가능하게 하는, 포획 모이어티를 포함한다. 표적 복합체를 포획하는 것은 표적 복합체를 비결합 표적 핵산 또는 결찰 프로브로부터 분리

하기 위하여 사용될 수 있는데-환언하면, 표적 포획 프로브의 사용은 결찰 생성물이 성공적으로 형성되었던 이들 표적 핵산을 분리시키는 방법을 제공한다.

[0229] 본 발명의 분석법은 상이한 결찰 기질로부터 형성된 결찰 생성물을 증폭시켜 앰플리콘을 형성하는 단계 및 후속하여 앰플리콘을 검출하여 표적핵산을 검출하는 단계를 추가로 포함한다.

[0230] 이해되듯이, 본 발명의 분석법은 다중 표적 도메인에 지향된 다중 결찰 프로브 세트를 사용할 수 있다. 예를 들면, 핵산은 제5 표적 도메인에 인접한 제4 표적 도메인을 추가로 포함할 수 있으며, 결찰 기질은 상기 제4 표적 도메인에 혼성화된 제3 결찰 프로브 및 상기 제5 표적 도메인에 혼성화된 제4 결찰 프로브를 포함하는 제2 결찰 프로브 세트를 추가로 포함한다. 전술한 제1 및 제2 결찰 프로브와 같이, 제3 및 제4 결찰 프로브는 리가아제 효소를 사용하지 않고 결찰하며, 따라서 표적 핵산은 다중 결찰 생성물을 포함한다. 표적 포획 프로브는 또한 표적 핵산에 혼성화되어 다중 결찰 생성물, 표적 핵산 및 표적 포획 프로브를 포함하는 표적 복합체를 형성할 수 있다. 전술한 바와 같이, 이들 표적 복합체는 표면 상에 포획될 수 있으며 다중 결찰 생성물이 일부 구체 예에서 증폭되어 앰플리콘을 형성할 수 있으며, 이는 그 후 검출될 수 있다.

[0231] 유사하게, 표적 핵산은 제7 표적 도메인에 인접하는 제6 표적 도메인을 추가로 포함할 수 있으며, 제5 및 제6 결찰 프로브를 함유하는 제3 결찰 프로브 세트가 각각 제6 및 제7 표적 도메인에 혼성화될 수 있다. 여기에 논의된 모든 결찰 프로브와 같이, 제5 및 제6 결찰 프로브는 리가아제 효소를 사용하지 않고 결찰되며, 이에 따라 다중 결찰 생성물(즉, 제1 및 제2 결찰 프로브의 결찰로부터 형성된 결찰 생성물 및/또는 제3 및 제4 결찰 프로브로부터 형성된 결찰 생성물)을 포함하는 표적 핵산을 생성한다. 이해되듯이, 표적 핵산은 임의 수의 표적 도메인을 함유할 수 있으며, 이에 따라 임의 수의 결찰 프로브 세트가 사용되어 본 발명에 따라 표적 핵산 상에서 결찰 생성물을 형성할 수 있다.

[0232] 다중 결찰 생성물을 포함하는 전술한 모든 표적 핵산은 하나 이상의 표적 포획 프로브와 더욱 혼성화하여 표적 복합체를 형성할 수 있다. 이들 표적 복합체는 그 후 기질 상에서 포획될 수 있다. 표적 복합체의 결찰 생성물은 그 후 해당 분야에 공지되고 여기서 논의된 방법을 사용하여 증폭되어 앰플리콘을 형성하고, 이들 앰플리콘은 그 후 표적 핵산의 존재를 검출 및/또는 정량화하기 위하여 검출된다.

[0233] 일부 구체 예에서, 여기에 개시된 방법 중 어느 하나에 따라 형성된 결찰 생성물은 증폭되지 않고 그 대신에 여기에 개시된 방법 중 어느 하나를 사용하여 직접 검출된다.

[0234] 결찰 또는 전이 반응 생성물을 검출하기 이전에, 추가적인 증폭 반응이 있을 수 있다. 예컨대 표적 복제 당 생성된 결찰 생성물의 수를 증가시킴으로써, 표적 서열의 검출에 대한 신호를 증가시키기 위하여 2차 증폭 반응이 사용될 수 있다. 한 구체 예에서, 임의 수의 표준 증폭 반응이 결찰 생성물에서 수행될 수 있는데, 비제한적으로 특히 가닥 교체 증폭(strand displacement amplification, SDA), 핵산 서열 기반 증폭(NASBA), 결찰 증폭 및 중합효소 연쇄 반응(PCR); 다수의 PCR 변형 포함, "정량 경쟁 PCR" 또는 "QC-PCR", "임의 프라임 PCR(arbitrarily primed PCR)" 즉 "AP-PCR", "면역-PCR", "Alu-PCR", "PCR 단일 가닥 구조적 다형성(conformational polymorphism)" 즉 "PCR-SSCP", "역전사효소(reverse transcriptase) PCR" 즉 "RT-PCR", "바이오틴 포획 PCR", "벡토레트(vectorette) PCR", "팬핸들(panhandle) PCR", 및 "PCR 선택 cDNA 삭감(subtraction)"을 포함한다. 한 구체 예에서, 증폭 기술이 PCR이 아니다. 일부 구체 예에 따르면, 간극-충전(gap-filling) 결찰, 비제한적으로 간극-충전 OLA 및 LCR 포함, 가교 올리고뉴클레오타이드 결찰, FEN-LCR, 및 교정 결찰과 같은 결찰 기술을 사용할 수 있다. 이들 기술의 설명은 특히 U.S. Pat. No. 5,185,243, 공개된 유럽 특허 출원 EP 320308 및 EP 439182, 공개된 PCT 특허 출원 WO 90/01069, 공개된 PCT 특허 출원 WO 02/02823, 및 U.S. 특허 출원 Ser. No. 09/898,323에서 찾을 수 있다.

[0235] 표준 효소적 증폭 반응에 추가하여, 최초 생성된 결찰 생성물이 2차 화학적 결찰 반응의 표적일 수 있는 프로브 계획을 디자인할 수 있다.

[0236] 또한, "사전증폭 반응"이 출발 샘플 핵산에 대하여 수행되어 화학적 반응 결찰을 위한 추가 표적 서열을 생성할 수 있다. 예를 들면, 전면적 게놈 증폭이 수행될 수 있다.

[0237] 해당 분야의 통상의 기술자에 의해 이해되듯이, 본 발명의 방법 및 조성물을 사용하는 분석법은 요구되는 응용에 의존하여 다양한 구성을 취할 수 있으며, 인 시츄(in situ) 분석법(FISH와 유사), 용액 기반 분석법(예컨대 형광염료 및/또는 냉각제의 전이/제거), 및 불균질 분석법(예컨대 고밀도 어레이의 사용과 같은, 조작, 제거 및/또는 검출을 위한 고체 지지체 사용)을 포함할 수 있다. 또한, 분석법은 여기에 개략화되듯이 예컨대 표적 서열의 사전-증폭 및 결찰이 일어난 후의 2차 증폭 반응과 같은, 추가적인 반응을 포함할 수 있다.

- [0238] 본 발명의 이러한 양상과 관련된 분석법은, 여기서 설명되듯이, 예컨대 형광 또는 화학발광의 발생과 같은 신호의 증가에 의존할 수 있다. 그렇지만, 해당 분야의 기술자에 의해 이해되듯이, 이러한 신호의 감소에 의존하는 분석법 또한 가능하다.
- [0239] 한 구체 예에서, 분석 반응은 FISH 반응과 유사하게, "인 시츄(*in situ*)"(또한 여러 분석 포맷에서 샘플에 따라 "체외(*in vitro*)" 및/또는 "생체외(*ex vivo*)"로 불림)에서 수행된다. 외부 효소가 첨가될 필요가 없기 때문에, 표적 서열의 존재 결정을 위한 조직학적 샘플, 특히 질병 상태 또는 또 다른 병리학과 관련된 것과 같은 시약이 세포에 첨가(생존, 전기천공, 고정, 등) 될 수 있다.
- [0240] 또한 "체외(*in vitro*)" 분석법은 표적 서열이 샘플로부터 추출되도록 수행될 수 있다. 샘플이 가공되고(예컨대 파라핀 포매 샘플을 위하여, 샘플이 제조될 수 있음), 시약이 첨가되며 반응이 진행되고, 후속하여 해당 분야에서 수행되는 바와 같이 검출이 이루어진다.
- [0241] 일부 구체 예에서, 결찰 생성물(또한 여기서 "결찰된 생성물"이라 함)이 고체 지지체를 사용하여 검출된다. 예를 들면, 결찰된 생성물은, 앵커 프로브/포획 프로브 혼성화 또는 또 다른 결합 기술, 예컨대 결합 파트너 쌍(예컨대 바이오틴 및 스트렙타비딘)을 사용하여, 비드에 부착된다. 한 구체 예에서, 전이 반응은 제1 결찰 프로브로부터 라벨을 포함하는 제2 결찰 프로브로 전이되는 바이오틴 모이어티를 유발한다. 스트렙타비딘을 포함하는 비드가 샘플과 접촉하고, 상기 비드는 예를 들면 FACS 기술을 사용하여, 라벨의 존재에 대하여 조사된다.
- [0242] 또 다른 구체 예에서, 결찰된 생성물은 불균질 분석법을 사용하여 검출된다. 즉, 반응이 용액에서 수행되고 생성물이 어레이 또는 비드와 같은 고체 지지체에 첨가된다. 일반적으로, 하나의 결찰 프로브가 앵커 서열 또는 결합 쌍 파트너(예컨대 바이오틴, 합텐, 등)를 포함하고 나머지는 라벨(예컨대 형광체, 라벨 프로브 결합 서열, 등)을 포함한다. 결찰된 생성물은 고체 지지체에 첨가되고, 상기 지지체는 선택적으로 세척된다. 이러한 구체 예에서, 단지 결찰된 생성물만이 포획되고 라벨링된다.
- [0243] 본 발명의 또 다른 양상에서, 올리고뉴클레오타이드 프로브 중 하나는 결찰된 생성물의 조작을 용이하게 하는 부착된 마그네틱 비드 또는 일부 또 다른 라벨(바이오틴)을 가진다. 마그네틱 비드 또는 라벨은 여기서 개략화된 임의 수의 배열을 사용하여 전단 또는 후단 프로브에 부착될 수 있다.
- [0244] 여기에 설명되듯이, 2차 반응이 수행될 수 있으며, 여기서 또 다른 작용성 모이어티(예컨대 앵커 서열, 프라이머, 라벨, 등)가 첨가된다. 유사하게, 2차 증폭 반응은 여기에 설명된 바와 같이 수행될 수 있다.
- [0245] 검출 시스템은 해당 분야에 공지되어 있으며, 광학 분석법(형광 및 화학발광 분석법 포함), 효소 분석법, 방사선라벨링, 표면 플라스몬 공명, 자기저항(magnetoresistance), 캔틸레버 편향(cantilever deflection), 시퀀싱(sequencing), 표면 플라스몬 공명, 등을 포함한다. 일부 구체 예에서, 결찰 생성물은 예를 들면, 2006/0068378(참조로서 여기에 수록됨)에 개시된 바와 같은 또 다른 분석법 기술에 사용될 수 있으며, 결찰 생성물은 콜로이드와 같은 경질 산란 입자들 사이의 링커로서 역할을 하여, 결찰 생성물의 존재 하에서 색깔 변화를 유발할 수 있다.
- [0246] 일부 구체 예에서, 검출 시스템이 샘플 수집 튜브 내에 포함될 수 있으며; 예를 들면, 혈액 수집 장치는 병원균 또는 질병의 검출을 가능하게 하기 위하여 튜브 또는 장치에 삽입된 분석물을 가질 수 있다.
- [0247] PCT 출원 WO 95/15971, PCT/US96/09769, PCT/US97/09739, PCT US99/01705, WO96/40712 및 WO98/20162(이들 모두는 그 전체가 참조로서 여기에 명백하게 수록됨)은 핵산 혼성화의 신규 검출 방법을 가능하게 하는, 전극을 비롯한 전자 전이 모이어티를 함유하는 핵산을 포함하는 신규 조성물을 개시한다.
- [0248] 증가된 현저성을 획득한 한 가지 기술은 특히 다양한 핵산 표적의 동시 측정을 포함하는 응용을 위한, DNA 어레이의 사용(Marshall et al., *Nat Biotechnol.* (1998) 16(1):27-31)을 포함한다. DNA 어레이는 유전자 발현 모니터링을 위하여 가장 흔히 사용되는데, 여기서 1 내지 100,000 핵산 표적(mRNA)의 상대 농도가 동시에 측정된다. DNA 어레이는 소규모 장치인데 여기서 핵산 앵커 프로브는 식별성있고 제조 시기에 알려진 패턴으로 표면에 부착되거나(Marshall et al., *Nat Biotechnol.* (1998) 16(1):27-31) 또는 비드 어레이의 경우와 같이 추후 정확하게 암호해석될 수 있다(Steemers et al., *Nat Biotechnol.* (2000) 18(1):91-4; and Yang et al., *Genome Res.* (2001) 11(11):1888-98.). 일련의 전단 가공 단계 이후, 관심 샘플은 DNA 어레이와 접촉하게 되며, 샘플 내 핵산 표적은 표면 상에서 앵커 올리고뉴클레오타이드에 혼성화하고, 샘플 내 표적 핵산의 완전성 및 종종 농도가 결정된다.
- [0249] 현재 사용되는 많은 핵산 검출 방법은 이들의 광범위한 적용성을 제한하는 특성 및/또는 제한점을 가진다. 예를

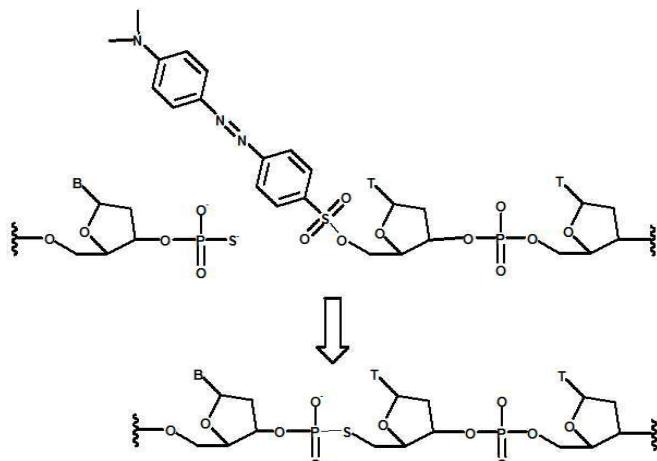
들면, DNA 마이크로어레이의 경우, 샘플을 마이크로어레이와 접촉시키기 이전에, 일반적으로 샘플에 대하여 수행되어야 하는 일련의 가공 단계가 존재한다. 비록 이러한 단계가 어레이의 제조자 및/또는 어레이를 판독하기 위해 사용되는 기술(형광, 전기화학, 화학발광, 자기저항, 캔틸레버 편향, 표면 플라즈몬 공명)에 따라 변하지만, 이들 가공 단계는 일반적으로 다음과 같은 일부 일반적인 카테고리에 포함된다: 핵산 분리 및 정제, 효소적 증폭, 검출 가능한 라벨 포함, 및 증폭-후 세척. 또 다른 통상적인 단계는 샘플 농축, 핵산 표적의 평균 크기를 감소시키기 위한 증폭된 표적 단편화, 및 PCR 증폭된 표적을 단일 가닥 종으로 전환시키기 위한 엑소뉴클레아제 절단(exonuclease digestion)이다.

- [0250] DNA 어레이를 샘플과 접촉시키기 이전의 많은 전단 가공 단계의 요구사항은 이러한 방법에 의해 핵산 표적을 검출하는 시간 및 비용을 상당히 증가시킬 수 있다. 이는 또한 획득된 데이터의 품질에 대한 상당한 함축성을 가질 수 있다. 예를 들어, 일부 증폭 과정은 표적 분해에 매우 민감하여 유입 핵산 물질이 잘 보존되지 않은 경우 잘 수행되지 않는다(Foss et al., *Diagn Mol Pathol.* (1994) 3(3):148-55). 전단 가공 단계의 수 및/또는 복잡성을 제거 또는 감소시킬 수 있는 기술은 비용을 상당히 감소시킬 수 있으며 DNA 어레이 시험으로부터 획득된 결과의 품질을 향상시킬 수 있다. 전단 가공 단계를 감소시키기 위한 한 가지 방법은 신호 세기를 증가시키고 특이성을 향상시키기 위하여 결찰 반응을 사용하는 것을 포함한다.
- [0251] 전술한 바와 같이, 분석법은 다양한 방법으로 수행될 수 있다. 고체 지지체 상에서의 검출을 사용하는 분석법에서, 본 발명에서 사용되는 어레이를 비롯한 다양한 고체 지지체가 존재한다.
- [0252] 일부 구체 예에서, 비드와 같은 고체 지지체가 본 발명에서 사용된다. 예를 들면, 결합 파트너 쌍(하나는 결찰 생성물 상에 있고 하나는 비드 상에 있음)이 전술한 바와 같이 비-결찰 반응물을 제거하기 위하여 사용될 수 있다. 이러한 구체 예에서, 마그네틱 비드가 특히 선호된다.
- [0253] 본 발명의 일부 구체 예에서, 포획 프로브가 검출을 위하여 고체 지지체에 부착된다. 예를 들면, 포획 프로브는 후속하여 예컨대 FACS와 같은 임의 적절한 기술을 사용하는 분석을 위하여 비드에 부착될 수 있다. 유사하게, 이하에서 설명되는 비드 어레이가 사용될 수도 있다.
- [0254] 한 구체 예에서, 본 발명은 어레이를 제공하며, 각각의 어레이 위치는 최소한의 공유결합으로 부착된 핵산 프로브를 포함하며, 이는 일반적으로 "포획 프로브"로 불린다. 여기서 "어레이"는 어레이 포맷인 다수의 핵산 프로브를 의미하며; 어레이의 크기는 어레이의 조성 및 최종 용도에 의존할 것이다. 약 2개의 상이한 포획 리간드 내지 수천개를 함유하는 어레이가 생성될 수 있다. 일반적으로, 전극-기반 분석법에서, 어레이는 전극의 크기, 뿐만 아니라 어레이의 최종 용도에 따라서, 2개 내지 100,000만큼 많이 또는 그 이상을 포함할 것이다. 바람직한 범위는 약 2 내지 약 10,000이며, 약 5 내지 약 1000이 선호되며, 약 10 내지 약 100이 특히 선호된다. 일부 구체 예에서, 본 발명의 조성물은 어레이 포맷이 아닐 수 있는데; 즉, 일부 구체 예에서, 단일 포획 프로브를 포함하는 조성물이 또한 제조될 수 있다. 또한, 일부 어레이에서, 다중 기질이 상이한 또는 동일한 조성물에서 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 큰 어레이는 다수의 더 작은 기질을 포함할 수도 있다. 핵산 어레이는 해당 분야에 공지되어 있으며, 여러 방식으로 분류될 수 있으며; 정렬된 어레이(예컨대 각각의 사이트에서 화합물을 용해하는 능력), 및 무작위 어레이(예컨대 비드 어레이)가 포함된다. 정렬된 어레이는 비제한적으로 포토리소그래피 기술(예컨대 Affymetrix GeneChip®, 탐지 기술(Synteni 등), 인쇄 기술(Hewlett Packard 및 Rosetta), 전극 어레이, 3차원 "겔 패드" 어레이 및 액체 어레이를 사용하여 제조된 것들을 포함한다.
- [0255] 바람직한 구체 예에서, 어레이는 기질 상에 존재한다. "기질" 또는 "고체 지지체" 또는 또 다른 문언적 균등물은 여기서 핵산의 부착 또는 결합에 적합한 분리된 개별 사이트를 함유하도록 변성될 수 있는 임의 물질을 의미한다. 기질은 다양한 물질을 포함할 수 있으며, 해당 분야의 통상의 기술자에 의해 이해되듯이, 비제한적으로 유리, 플라스틱, 폴리머, 금속, 금속질, 세라믹, 및 유기물을 포함한다. 고체 지지체가 비드(bead)인 경우, 다양한 기실이 가능하며, 비제한적으로 자성 재료, 유리, 실리콘, 텍스트란, 및 플라스틱을 포함한다.
- [0256] 이해되듯이, 그리고 또한 전술한 바와 같이, 많은 검출 방법이 본 발명에 따라 형성된 결찰 생성물(또는 결찰 생성물의 앰플리콘)의 존재 및 양을 검출하기 위하여 사용될 수 있다. 이러한 검출 방법은 여기에 논의된 모든 분석법에서 모든 결찰 생성물(또는 이의 앰플리콘)에 대하여 사용될 수 있다. 이러한 검출 방법은 비제한적으로 다음을 포함한다: 모세관 전기영동, 질량 분광광도법, 마이크로어레이 분석, 시퀀싱, 실시간 PCR, 광학 검출, 형광 검출, 생물발광 검출, 화학발광 검출, 전기화학적 검출, 전기화학발광 탐지 및 측방 유동 검출.
- [0257] 전술한 분석법에 추가하여, 본 발명에 사용된 특정 분석법은 화학적 결찰 의존성 프로브 증폭(chemical ligation dependent probe amplification, CLPA) 분석법을 포함하며, 이는 이하에서 더욱 상세하게 설명된다.

[0258] 화학적 결찰 의존성 프로브 증폭(CLPA)

일부 양상에서, 본 발명은 화학적 결찰 의존성 프로브 증폭(CLPA) 기술에 관련된다. CLPA는 결찰 생성물을 형성하기 위한 표적 특이적 결찰 프로브의 화학적 결찰에 기초한다. 이러한 결찰 생성물은 후속하여 효소적 증폭 반응을 위한 템플릿으로서 작용하여 앰플리콘을 생성하고 이는 후속하여 비제한적으로 다음과 같이 전술한 바와 같은 검출 방법을 포함하는 임의 적절한 수단을 사용하여 분석된다: 모세관 전기영동, 질량 분광광도법, 마이크로어레이 분석, 시퀀싱, 실시간 PCR, 광학 검출, 형광 검출, 생물발광 검출, 화학발광 검출, 전기화학적 검출, 전기화학발광 탐지 및 측방 유동 검출. CLPA는 비제한적으로 복잡한 유전자 서명 패턴의 분석을 포함하여 다양한 목적을 위하여 사용될 수 있다. 효소적 결찰 반응을 사용하는 예컨대 DASL (Bibikova, M., et al., American Journal of Pathology, (2004), 165:5, 1799-1807) 및 MLPA (Schouten, US 특허 6,955,901)와 같은 다른 기술과는 달리, CLPA는 화학적 결찰 반응을 사용한다.

[0260] 한 구체 예에서, CLPA 분석법은 표적 서열 상에 적절하게 위치할 때 자가-결찰을 할 수 있는 반응성 모이어티를 포함하는 둘 이상의 결찰 프로브의 사용을 포함한다. 바람직한 구체 예에서, 제1 프로브 상의 3'-포스포로티오에이트 모이어티는 제2 프로브 상의 5'-DABSYL 이탈기와 반응한다(이하의 반응식 1 참조).



[0261]

[0262] 반응식 1: 3' 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드(S-프로브)와 5' DABSYL 변성 올리고뉴클레오타이드(L-프로브) 사이의 화학적 결찰 반응

[0263] 5'-DABSYL 그룹은 또 다른 모이어티, 예컨대 요소보다 약 4배 더 빨리 반응하며, 또한 합성 동안 프로브의 정제를 단순화시킨다.

[0264] CLPA는 또 다른 서열-기반 혼성화 기술에 비해 몇가지 특별한 장점을 가진다. 첫째, CLPA는 미리 DNA 복제를 만들 필요 없이 RNA 분석에 직접 적용될 수 있다. 둘째, CLPA는 샘플 오염에 비교적 덜 민감하여 혈액, 소변, 타액 및 폐스(feces)와 같은 신체 샘플을 포함하는 불순한 샘플에 직접 적용될 수 있다. 셋째, CLPA는 또 다른 공지된 방법보다 더 적은 단계를 포함하여, 이에 따라 결과를 획득하기 위해 요구되는 시간을 감소시킨다. 또한, CLPA 프로브는 견조상태로 저장될 수 있으며, 적절하게 디자인된 시스템이 상보적 표적 서열의 존재 하에서 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드에 결합하기 위해 동시에 반응할 것이다. 화학적 결찰 반응은 탁월한 서열 선택도를 나타내며 단일 뉴클레오타이드 다형성(polymorphisms)을 구별하기 위해 사용될 수 있다.

[0265] 상당하게도, 효소적 결찰 방법과는 달리, CLPA는 DNA 및 RNA 표적에 대하여 거의 동일한 반응성을 나타내며 이는 이하에서 더욱 상세하게 설명되듯이 또 다른 공지된 시스템보다 CLPA를 더욱 효율적으로 만들고, CLPA가 사용될 수 있는 응용 범위를 확장시킨다.

[0266] 유리하게도, CLPA 분석법은 표적 핵산을 검출하기 위해 요구되는 단계들의 수를 감소시키며, 이는 상당히 더 짧은 시간 기간의 결과를 달성하는 잠재력을 제공한다. 예를 들면, 표준 역전사효소(RT)-다중 리가아제(multiplex ligase)-의존성 프로브 결찰(MLPA)을 위한 일반적인 프로세스 흐름은 다음 단계를 포함한다:

[0267] 1. 전체 RNA 분리.

- [0268] 2. 역전사효소를 사용하여 cDNA 복제물 생성.
- [0269] 3. 하룻밤 동안 MLPA 프로브 세트를 cDNA 표적에 혼성화시킴.
- [0270] 4. DNA 리가아제를 첨가하여 표적-결합된 프로브에 참여함.
- [0271] 5. 결찰 프로브 증폭, 예컨대 Taq 중합효소 및 형광 라벨링된 PCR 프라이머를 사용하는 PCR 증폭.
- [0272] 6. 예를 들면, CE에 의해 샘플 분석.
- [0273] 표준 RT-MLPA와는 달리, CLPA는, 결찰 이전에 RNA 분리 단계 및 역전사 반응을 수행하여 cDNA 복제물을 생성하는 단계를 포함하는 단계 필요 없이, 분석이 세포 및 혈액 파쇄물(lysate) 그리고 RNA 표적에서 직접 수행되도록 할 수 있다. 이는 결과 달성을 위한 시간을 단축시키고 더욱 신속한 분석을 달성하는 수단을 제공한다.
- [0274] 또 다른 구체 예에서, 본 발명의 CLPA는 포르말린 고정된 파라핀(=formalin fixed paraffin embedded, FFPE) 조직에서 수행된다. 또 다른 구체 예에서, FFPE 조직은 먼저 화학 변성제에 함침되어 조직을 파쇄하고, 그 후 여기에 개시된 임의 CLPA 방법을 거치게 된다. 또 다른 구체 예에서, 단백분해효소 K 및/또는 초음파가 사용되어 CLPA 방법의 적용에 앞서 FFPE 조직을 더욱 처리한다.
- [0275] 본 발명의 또 다른 구체 예에서, 더욱 신속한 반응 시간은 더 높은 프로브 농도에서 혼성화 반응을 유발시킴으로써 더욱 촉진된다. 따라서, 예를 들면, 유입 프로브 세트가 비교적 높은 농도, 예를 들면, 전형적으로 MLPA 반응에서 사용되는 것보다 약 100배 높은 농도에서 CLPA 반응에 포함될 수 있다. 프로브 농도를 상승시키는 것은 전형적으로 하룻밤에서 약 15 분 내지 약 1 시간으로 혼성화 단계에 소요되는 시간을 크게 감소시킨다.
- [0276] CLPA 프로브는 일반적으로 각각의 프로브에 대하여 250 나노몰(nM) 내지 0.01pM(피코몰)의 농도에서 반응에 포함된다. 일반적으로, 농도는 약 1nM 내지 약 1pM이다. 프로브 농도를 선택할 때 고려될 인자는 특정 분석법 및 분석된 표적을 포함한다. S-또는 포스포로티오에이트 또는 친핵체 프로브 및 L- 또는 이탈기 또는 DABSYL 함유 프로브가 표적 농도와 동일하거나 더 높은 농도로 포함된다. S- 및 L-프로브의 전체 농도는 10 마이크로몰(μ M)만큼 높게 도달할 수 있다. 비-제한적 실시예로서, 각각의 S 및 L 프로브에 대한 1nM x 250 CLPA 프로브 쌍은 500nm일 수 있으며(프로브 당 1nm x 쌍 당 2개 프로브 x 250개 표적) 각각의 프로브에 대한 10nM은 5 μ M의 전체 농도를 의미할 수 있다.
- [0277] 표적 농도는 일반적으로 약 10 마이크로그램의 전체 RNA 내지 약 10 나노그램 범위이나, 단일 유전자 복제만큼 적을 수 있다.
- [0278] 더 높은 프로브 농도가 사용될 때, 특히 고다중 분석(예컨대 약 5개 표적 이상)을 위하여, 증폭 이전에 정제 단계를 삽입시키는 것이 일반적으로 바람직하다. 본 발명의 이러한 양상의 한 구체 예에서, 멤브레인 포획, 마그네틱 비드 포획 및/또는 입자 포획을 포함하는 고체 지지체 기반 포획 방법이 사용될 수 있다. 바람직한 구체 예에서, 바이오틴/스트렙타비딘 마그네틱 비드 정제 프로토콜이 결찰 이후 및 효소적 증폭 이전에 사용될 수 있다. 일부 경우, 마그네틱 입자가 후속 증폭 반응을 방해하지 않으면서 증폭 마스터 혼합물에 직접적으로 첨가될 수 있다. 또 다른 경우, 포획된 올리고뉴클레오타이드를 비드로부터 방출시키고 방출된 올리고뉴클레오타이드 용액은 후속하여 존재하는 포획 입자 또는 표면 없이 증폭되는 것이 바람직하다.
- [0279] 바람직한 구체 예에서, CLPA는 핵산 표적 서열에 대한 한 세트의 프로브의 혼성화를 포함하며 이에 따라 프로브는 리가아제의 첨가 없이 자가-결찰을 수행할 수 있다. 결찰 생성물이 생성된 이후, 생성물의 검출 및 분석을 촉진하기 위하여 증폭이 일반적으로 사용된다. 이러한 목적을 위하여, 예컨대 일반 PCR 프라이머와 같은 PCR 프라이머를 포함하도록 프로브가 디자인된다. 바람직한 구체 예에서, 반응의 결찰 부분이 완결된 이후까지 일반 PCR 프라이머가 첨가되지 않으며, 종종 PCR 마스터 혼합물의 일부로서, 중합효소와 함께 표면 포획 정제(예컨대 표적 포획 프로브 사용, 이는 이하에서 더욱 상세하게 설명됨) 이후에 프라이머가 첨가된다.
- [0280] CLPA 프로브는 일정 위치의 반응성 모이어티를 소유하는데, CLPA 프로브가 핵산 표적에 결합할 때, 상기 반응성 모이어티는 근접 공간적 배향을 하며 리가아제 효소의 첨가 없이 결찰 반응을 수행할 수 있다. 바람직한 구체 예에서, 바람직한 구체 예에서 DNA 중합효소이며, RNA 중합효소와 같은 또 다른 효소를 포함할 수 있는 증폭 효소에 의해 효율적으로 증폭될 수 있는 결찰 반응 생성물을 산출하도록 화학적 결찰 모이어티가 선택된다. 이론적 제약 없이, DNA 및 RNA 중합효소에 의해 증폭될 수 있는 것으로 알려진 기질을 더욱 근사하게 닮은 반응 생성물을 생성하는 화학적 결찰 화학 및 프로브 세트는 CLPA 분석법에서 사용될 수 있는 효율적인 프로브 세트를 산출할 가능성이 더 크다. 특히 바람직한 반응 화학이 화학적 모이어티인데 이는 3'-포스포로티오에이트와 5' DABSYL 이탈기의 반응을 포함하는 반응식 1에 도시된 바와 같은 자연적 DNA(native DNA)를 근사하게 닮은 반응

생성물을 산출한다. 또 다른 바람직한 구체 예에서, 프로브 세트는 3'-디포스포로티오에이트(Miller, G.P. et al, Bioorganic and Medicinal Chemistry, (2008) 16:56-64, 이는 특히 프로브 및 3'-디포스포로티오에이트 화학과 관련된 모든 개시사항을 위해 그 전체가 참조로서 여기에 수록됨) 및 5'-DABSYL 이탈기를 포함한다.

[0281] 본 발명의 CLPA 프로브는 또한 결찰 생성물의 길이를 조절하기 위하여 스퍼터 서열(또한 여기서 가변 스페이서 서열이라 불림)을 포함할 수 있다. 스퍼터 서열의 길이는 결찰 프로브가 지향되는 표적 서열에 특이적일 수 있으며, 이에 따라 결찰 생성물의 분석을 촉진하는 편리한 수단을 제공한다. 스퍼터 서열은 어느 하나 또는 양쪽 프로브에 위치할 수 있다. 3'-포스포로티오에이트 프로브를 사용하는 구체 예에서, 바람직한 구체 예에서 스퍼터 서열은 이러한 프로브 상에 포함된다(또한 여기서 "S 프로브"라 불림). 또한 전술한 바와 같이, 스퍼터 서열은 표적 핵산에 대하여 비-상보적인 결찰 프로브의 영역에 위치할 수 있거나, 또는 스퍼터 서열은 표적 핵산의 도메인에 대하여 상보적인 영역과 적어도 부분적으로 겹치는 영역에 위치될 수 있다. 또 다른 구체 예에서, 스퍼터 서열은 프라이머 서열과 프로브 도메인 사이에 위치된다.

[0282] 본 발명의 또 다른 구체 예에서, CLPA-CE, 스퍼터 서열은, 길이 변화에 기초하는 특이적 표적 서열의 검출 및 식별을 위한 기반을 제공하는 하나 이상의 가변 길이 결찰 생성물을 생성하기 위하여 길이가 변한다. 바람직한 구체 예에서, 가변 길이 결찰 생성물은 모세관 전기영동(CE)에 의해 분석된다. 일반적으로, 스퍼터 서열이 포함되어 이에 따라 상이한 결찰 생성물의 길이가 적어도 1개 염기쌍 내지 약 10개 염기쌍 범위; 바람직하게는 1개 염기쌍 내지 4개 염기쌍 범위에서 변한다. 바람직한 구체 예에서, 상이한 결찰 생성물의 길이는 대략 80 bp 내지 약 400 bp; 바람직하게는 약 100 bp 내지 약 300 bp 범위; 더욱 바람직하게는 약 100 bp 내지 약 200 bp 범위에서 변한다. 또 다른 구체 예에서, 결찰 생성물이 약 5-1000, 10-950, 15-900, 20-850, 25-800, 30-750, 35-700, 40-650, 50-600, 55-550, 60-500, 65-450, 70-400, 75-350, 80-300, 85-250, 90-200, 95-150 염기쌍의 길이가 되도록 스퍼터 서열의 길이가 정해진다.

[0283] 일부 구체 예에서, CLPA 프로브는 결찰된 생성물의 분석 및 검출을 촉진하기 위한 또 다른 선택적인 원소를 더욱 함유할 수 있다. 이러한 원소는 결찰 프로브 쌍에 관한 색션에서 앞서 논의된 원소 중 임의 것을 포함한다. 예를 들면, 여기서 CLPA-MDM로서 불리는 구체 예에서(이하에서 더욱 상세하게 논의됨), 마이크로어레이 플랫폼 상에서 적절한 포획 서열에 결합하기 위하여 적어도 하나의 결찰 프로브가 어레이 결합 서열을 포함하는 것이 바람직하다. CLPA-MDM에 대하여, 상이한 CLPA 반응 생성물은 크기 차이에 의해 분리되지 않으며 어레이 결합 서열의 차이에 의해 분리된다. 이러한 구체 예에서, 각각의 CLPA 프로브가 DNA 마이크로어레이 상의 고유 사이트에 결합하도록 어레이 결합 서열의 서열이 변한다. CLPA-MDM에서 어레이 결합 서열의 길이는 일반적으로 15 내지 150개 염기, 더욱 구체적으로 20 내지 80개 염기, 및 가장 구체적으로 25 내지 50개 염기로 변한다.

[0284] 또 다른 구체 예에서, CLPA 프로브는 바람직하게는 또한 정제 및/또는 분석을 촉진하기 위한 또 다른 원소를 포함하며, 비제한적으로 라벨 예컨대 형광 라벨 및 합텐 모이어티, 예를 들면, 결찰 생성물의 정제 또는 검출을 위한 바이오틴을 포함한다. 예를 들면, 바이오틴을 포함하는 프로브 및/또는 결찰 생성물은 비드를 포함하여 임의 적절한 아비딘/스트렙타비딘 플랫폼 상에서 정제될 수 있다. 바이오틴/아비딘 포획 시스템이 바람직한 반면, 또 다른 합텐 시스템(예컨대 디곡신게닌(DIG) 라벨링)이 사용될 수 있으며, 혼성화/올리고뉴클레오타이드 포획이 사용될 수 있다. 후속 단계에서 포획 생성물을 비드로부터 방출시키는 것이 바람지할 때 혼성화/올리고뉴클레오타이드 포획이 바람직한 방법이다. 마그네틱 비드에 부가하여, 안티-합텐 라벨링된 지지체(여과지, 다공성 필터, 표면 포획)가 사용될 수 있다.

[0285] CLPA 프로브-라벨링은 말단 또는 중간에서, 양쪽 프로브 상에 수행될 수 있다. 바람직하게는 바이오틴이 포스포로티오에이트(S-프로브)의 5' 말단에 삽입된다.

[0286] 바람직한 구체 예에서, CLPA 프로브 세트는 상보적인 반응성 그룹을 갖는 2개의 올리고뉴클레오타이드 프로브로 구성된다(도 1 및 2). 또 다른 구체 예에서, CLPA 프로브 세트는 표적에서 인접하여 서로 결합하는 3개 이상의 프로브로 구성될 수 있다. 3-프로브 CLPA 반응의 바람직한 구체 예에서, 외부 프로브는 효소적 증폭 프라이머 결합 사이트를 함유하도록 디자인되며, 내부 프로브는 또 다른 프로브들 사이의 표적 영역에 연결하도록 디자인된다. 더욱 바람직한 구체 예에서, 외부 프로브는 비-상보적 반응성 그룹을 가지며 이들은 내부(중간) 프로브의 부존재 하에서는 서로 반응할 수 없다(도 3). 일부 경우에, 하나의 그룹이 어느 하나의 프로브의 5' 말단에 그리고 다른 프로브의 3'-말단에 있는 것을 제외하고는 외부 프로브 둘 모두가 유사한 반응성 모이어티를 가질 수 있으며, L-프로브 화학은 프로브 상의 위치를 제외하고는 또한 서로 유사할 수 있다. 해당 분야의 통상의 기술자에게 공지된 바와 같이, 또 다른 화학 시약 및 프로세스가, 2-프로브 CLPA 시스템을 위한 프로브와 비교하여 3-프로브 CLPA 반응을 위한 프로브를 제조하기 위해 필요할 수 있다.

- [0287] 3-프로브 CLPA 시스템의 바람직한 구체 예에서, 하나의 외부 프로브는 3' 포스포로티오에이트(3'S-프로브)를 포함하고, 나머지 외부 프로브는 5'-포스포로티오에이트(5'-S-프로브)를 함유하며 중앙 프로브는 3'- 및 5'-DABSYL 이탈기 둘 모두를 함유한다. 5'-DABSYL 이탈기 프로브의 제조는 이미 보고되었다(Sando et al, J. Am. Chem. Soc., (2002), 124(10) 2096-2097). 우리는 최근 3'-DABSYL 이탈기의 일상적인 삽입을 가능하게 하는 신규 DNA 합성 시약을 개발하였다(도 4 참조).
- [0288] 또 다른 구체 예 및 여기에 개시된 임의 CLPA 방법에 부합하여, 분석법은 본 발명의 완충액의 존재 하에 수행될 수 있다. 이러한 완충액은 앞서 상세하게 설명되며, 완충액 성분의 임의 조합이 본 발명의 CLPA 방법에서 유용할 수 있다. 바람직한 구체 예에서, 이하에서 설명되는 표적 포획 CLPA, CLPA-CE, 및 CLPA-MDM 방법을 포함하는 본 발명의 CLPA 방법은 구아니디니움 하이드로클로라이드와 같은 카보트로필 양이온을 포함하는 변성제를 포함하는 완충액을 비롯하여, 본 발명의 완충액에서 수행된다.
- [0289] 표적 포획 CLPA
- [0290] 또 다른 구체 예에서, 2 이상의 결찰 브로브를 사용하는 CLPA 분석법은 동일 핵산 표적 상의 CLPA 프로브 세트 전단 또는 후단에 결합하는 표적 포획 프로브와 조합될 수 있다. 이러한 표적 포획 프로브는 포획 모이어티(이는 비제한적으로 핫텐, 비드, 올리고뉴클레오타이드 포획 서열, 등을 포함할 수 있음)를 함유하며 이는 혼성화 또는 또 다른 상호작용을 통하여 표적 포획에 결합되는 복합체/분자를 선택적으로 포획하기 위하여 사용될 수 있다(도 10).
- [0291] 표적 포획 프로브는 여기에 논의된 CLPA의 임의 구체 예와 함께 사용될 수 있다.
- [0292] 앞서 더욱 상세하게 논의된 바와 같이, 1개보다 많은 표적 포획 프로브가 표적 핵산에 적용될 수 있다. 이들 다중 표적 포획 프로브는 표적 핵산의 3' 및 5' 말단 둘 모두에서 또는 여기에 근접하여 결합하거나 또는 다중 결찰 생성물들 사이에 표적 포획 프로브를 삽입시킴으로써, 하나 이상의 결찰 생성물을 측면에 부착하도록 디자인될 수 있다. 이하에서 더욱 상세하게 설명되듯이, 다중 표적 포획 프로브는 표적 핵산, 특히 RNA의 품질/완전성을 측정하기 위한 방법에 사용될 수 있다.
- [0293] CLPA-CE
- [0294] 한 양상에서, 본 발명은 가변 스페이서 서열을 함유하는 결찰 프로브를 사용하여 결찰 생성물을 생성하고, 이를 결찰 생성물은 그 후 모세관 전기영동을 통하여 검출되는 방법을 제공한다.
- [0295] 일부 구체 예에서, 먼저 결찰 생성물이 해당 분야에 공지된 임의 방법(PCR 포함)을 사용하여 증폭되어 앰플리콘을 생성하며, 그 후 앰플리콘의 모세관 전기영동을 사용하여 검출된다. 또 다른 구체 예에서, 결찰 생성물 및/또는 앰플리콘은 체처리 매트릭스(sieving matrix) 상의 크기 차동 모세관 전기영동(CE)에 의하거나 또는 슬라브 젤 전기영동에 의해 검출된다.
- [0296] CLPA-CE에 대한 개략적인 도면이 도 1에 제공된다. 본 도면에 도시된 구체 예에서, 혈액 샘플은 비제한적으로 화학적, 기계적 및 삼투적 세포 파쇄를 포함하여, 임의 적절한 수단에 의한 세포 파쇄를 거치게 된다. 바람직하게는, 화학적 파쇄가 사용된다.
- [0297] 화학적 파쇄에 후속하여, 표적 핵산을 지향하는 프로브가 적용된다. 도 6은 CLPA-CE 분석을 위한 프로브 세트의 디자인에 대한 일반적인 개략적 도면을 제공한다. 본 실시예에서, S 프로브는 결찰 생성물의 후속 증폭을 위한 일반 PCR 프라이머를 포함하도록 디자인된다. S 프로브는 또한 특정 표적 서열과 상호관계하는 길이를 갖도록 디자인된 스터퍼 서열을 포함한다. S 프로브는 또한 스터퍼 서열이 관련하는 표적 서열을 포함하는 표적 핵산의 표적 도메인에 상보적인 표적 결합 서열(또한 여기서 "프로브 도메인"이라 불림)을 포함한다. 이해되듯이, 한 세트의 프로브는 모두 동일 표적 도메인을 지향하는 복수의 S 프로브를 함유할 수 있거나, 또는 상기 세트는 상이한 표적 도메인을 지향하는 S 프로브의 혼합물을 함유할 수 있다. 유사하게, L-프로브는 S 프로브가 결합하는 표적 도메인에 인접하는 표적 도메인에 상보적인 표적 결합 서열을 포함한다. 본 구체 예에서, L-프로브는 또한 일반 프라이머를 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 하나 또는 둘 모두의 프로브는 형광체(FAM, Cy3, Cy5, 등)로 라벨링되지만, 이들은 또한 형광 라벨링 없이 검출될 수 있다. 라벨링은 일부 구체 예에서 형광 라벨링된 PCR 프라이머에 의해 달성된다.
- [0298] 도 6에 도시된 CLPA-CE 프로브의 구체 예에서, S 프로브는 또한 결찰안된 프로브의 정제 및 제거를 촉진하기 위해 5' 말단에 바이오틴 모이어티를 포함한다.
- [0299] 도 1에 도시된 바와 같이, S- 및 L-프로브가 표적 핵산에 혼성화된 이후, 프로브는 자발적 화학적 결찰을 수행

하여 결찰 생성물을 생성한다. 도 1에 따르는 일부 구체 예에서, 비드 정제 단계가 사용되어 결찰안된 프로브를 제거하지만, 결찰안된 프로브의 제거는 CLPA-CE 방법의 모든 구체 예에 대한 필수적 단계가 아니다. 결찰 및 선택사항으로 결찰안된 프로브의 제거 이후, 결찰 생성물이 증폭된다. 결찰 프로브가 일반 프라이머 서열을 포함하는 구체 예에서, 일반 PCR 프라이머 쌍이 앤플리콘을 생성하기 위해 사용된다. 또 다른 유형의 프라이머 서열을 사용하는 구체 예에서, 상보적인 프라이머 쌍이 앤플리콘을 발생하기 위하여 사용될 수 있다.

[0300] 결찰 프로브 중 하나(또는 일부 구체 예에서 둘 모두) 내의 가변 스페이서 서열의 존재로 인하여, 앤플리콘은 특정 표적 핵산에 대응하는 고유 길이를 가진다. 이를 앤플리콘은 그 후 모세관 전기영동 분석을 사용하여 분석되며, 각 퍼크의 상대적 세기가 상대적 발현에 대응한다. (도 1 및 도 7). 대안적인 구체 예에서, 또 다른 적절한 크기 분리 기술이 샘플 내 표적 핵산 발현을 결정하기 위하여 사용될 수 있다.

[0301] 또 다른 구체 예에서 그리고 전술한 바에 부합하여, CLPA-CE 방법은 표적 포획 프로브를 표적 핵산에 혼성화하는 단계를 포함한다. 표적 포획 프로브, 표적 핵산 및 결찰 생성물을 포함하는 산출된 표적 복합체는 그 후, 결찰 생성물의 증폭 이전에, 표적 포획 프로브의 포획 모이어티를 통하여 표면 또는 기질 상에서 포획된다. 또 다른 구체 예에서, 비결합 표적 핵산 및 결찰 프로브가 제거되어 단지 표적 복합체 및 결찰 생성물만 남긴다. 결찰 생성물은 그 후 증폭되고 여기에 개시된 방법 중 어느 하나에 따라 분석된다. 일부 구체 예에서, 결찰 생성물은 가열 및 변성제 또는 혼성화 조건을 변화시키기 위한 또 다른 시약의 첨가를 포함하여, 해당 분야에 공지된 방법을 사용하여 증폭 이전에 표적 복합체로부터 제거된다.

CLPA-MDM

[0303] 본 발명의 이러한 양상의 또 다른 구체 예에서, CLPA 결찰 생성물은 마이크로어레이 분석(CLPA-MDM)에 의해 분석/검출된다. CLPA-MDM의 개략적인 도면이 도 2에 제공된다. CLPA-MDM은 적어도 다음 관점에서 CLPA-CE와 다르다. 첫째, 프로브 세트는 디자인에서 다르다. 예를 들면, CLPA-MDM 프로브 세트의 일반적인 도면이 도 2에 제시된다. CLPA-CE 프로브와 같이, CLPA-MDM 프로브 세트는 결찰 생성물의 증폭을 위한 일반 프라이머를 포함할 수 있다. 이들은 또한 표적 특이성 서열, 뿐만 아니라 효소-독립적 결찰을 위한 결찰 모이어티를 포함한다. 부가적으로, CLPA-MDM 프로브는 또한 스터퍼 서열을 포함할 수 있으나, 이러한 스터퍼 서열의 목적은 효소적 증폭 효율성을 표준화하기 위하여 CLPA-MDM의 크기를 동일 길이로 조절하는 것이다. 앤플리콘 크기의 정규화가 요구조건은 아니지만 증폭 효율성을 위한 장점을 제공할 수 있다. CLPA-CE와 CLPA-MDM 프로브 세트의 디자인 사이의 두 번째 차이는 후자가 적절한 마이크로어레이 플랫폼에서의 사용을 위한 고유 어레이 결합 서열을 포함하는 것이다.

[0304] 본 발명의 CLPA-MDM 양상에 관하여, 마이크로어레이 결합 사이트(ABS 서열)가 검출을 위한 "일반" 마이크로어레이 플랫폼에서의 사용을 위한 프로브 디자인에 삽입된다. CLPA-CE 시스템과 유사하게, 프로브는 바람직하게는 예를 들면 형광 라벨링된 PCR 프라이머를 사용함으로써 형광체로 라벨링된다. 그 대신에, 예를 들면, 샌드위치 분석법 라벨링 기술이 최종 판독을 위하여 사용될 수 있다. 샌드위치 분석법은 스터퍼 서열을 대체하거나 또는 이에 부가하여 공통(일반적) 라벨 결합 사이트(LBS)로 프로브를 디자인하는 것 및 어레이 혼성화 단계 동안 상기 사이트에 결합할 2차 프로브를 사용하는 것을 포함한다. 서양고추냉이 퍼옥시다제(horse radish peroxidase, HRP) 라벨링된 올리고뉴클레오타이드와 유사한 화학발광 시스템, 또는 전기화학적 검출 시스템으로 어레이를 라벨링하는 것이 바람직할 때 상기 방법이 특히 유용하다. 일반적으로, 평면 마이크로어레이가 판독을 위하여 사용된다(예컨대 유리 슬라이드 또는 회로판에 스팟된 마이크로어레이) 그렇지만, 예컨대 Luminex 및 Illumina가 시판중인 것과 같은 비드 마이크로어레이가 또한 사용될 수 있다(예컨대 Luminex xMAP/xtag).

핵산 품질 평가

[0306] 일부 양상에서, 표적 포획 프로브에 대하여 표적 핵산 상의 결합 위치가 상이한 다중 CLPA 프로브 세트가 핵산 품질을 평가하는 방법에서 사용된다(도11). 도 11에 도시된 구체 예에서, 표적 포획 프로브는 표적 핵산의 한쪽 끝단에 혼성화되고, 표적 핵산의 상이한 표적 도메인에 지향하는 상이한 프로브 세트로부터 생성된 다중 결찰 생성물이 표적 포획 프로브 및 다중 결찰 생성물을 포함하는 표적 복합체를 생성하기 위하여 사용된다.

[0307] 이러한 양상에서, 상이한 결찰 생성물로부터 유래한 신호의 차이가 핵산 표적의 품질의 평가를 제공한다. 예를 들면, 표적 포획 프로브로부터 더 멀리 있는 CLPA 프로브 세트(예컨대, 300-1000 bp 떨어짐)과 비교하여 표적 포획 프로브에 가장 근접하여 위치하는 고유 CLPA 프로브 세트(예컨대, 표적 포획 프로브로부터 1-100 bp 떨어짐)로부터의 포획 효율성/신호의 차이를 측정함으로써, 핵산 표적의 봉괴 또는 분해 수준을 추록할 수 있다. 또 다른 대표적인 구체 예에서, 상이한 CLPA 프로브 세트에 대하여 발생한 신호의 상대적 비율은 특정 핵산 표적에

대한 분해 수준의 측정치를 제공한다. 또 다른 구체 예에서, 결찰 프로브 세트는 이들이 표적 포획 프로브가 혼성화되는 도메인으로부터 공지 거리에서 표적 도멘인에 지향하도록 디자인된다. 이러한 구체 예에서, 표적 포획 프로브, 결찰 생성물 및 표적 핵산을 포함하는 표적 복합체가 표적 포획 프로브 상의 포획 모이어티를 통하여 표면 또는 기질 상에서 포획되며, 비결합 표적 핵산과 결찰 프로브는 상기 포획된 표적 복합체로부터 분리된다. 복수의 상이한 프로브 세트와 관련된 신호의 상대적 비율은 그 후 샘플 내 표적 핵산에 존재하는 분해 양의 표시를 제공하며, 결찰 생성물과 표적 포획 프로브 사이의 공지 거리는 표적 핵산의 분해를 정량화하기 위한 일종의 "분자 통치자(molecular ruler)"를 제공한다. 예를 들면, 도 11을 참조하면, 대표적인 구체 예에서 샘플 내 표적 핵산의 대부분이 CLPA 세트 2 및 CLPA 세트 3이 혼성화되는 도메인들 사이에 위치하는 도메인에서 분해되는 경우, CLPA 세트 1 및 2로부터의 신호는 CLPA 세트 3으로부터의 신호보다 비교적 더 클 것이다. 신호 사이의 상대적 비율은 샘플 내 표적 핵산의 길이 및 완전성에 대한 표시를 제공한다.

[0308] 해당 분야의 기술자에 의해 이해되듯이, 상이한 프로브 세트의 스페이싱(spacing)은 최초 표적이 크기 및 요망 정보에 의존할 것이다. 스페이싱은 비교적 등거리일 수 있거나(예컨대 3 프로브 세트의 사용은 전체 길이 간격의 약 30%를 이격시켰다), 또는 요구에 따라 클러스터가 될 수 있다.

[0309] 또 다른 구체 예에서, 다중 표적 포획 프로브는 핵산 표적의 품질 평가를 위하여 사용된다. 여기서 더욱 논의되듯이, 상이한 표적 포획 프로브는 표적 핵산 근처에 또는 이의 말단에서 혼성화하도록 디자인될 수 있으며, 또한 또는 대안적으로 상이한 결찰 생성물들 사이에서 혼성화하도록 디자인될 수 있다. 일부 구체 예에서, 두 개의 표적 포획 프로브가 하나 이상의 결찰 생성물의 전단 및 후단 모두의 도메인에 혼성화하도록 디자인된다. 두 개의 상이한 포획 프로브의 사용은 심지어 고도로 분해된 샘플에서도, 결찰 생성물을 포함하는 모든 표적 복합체가 표면 또는 기질 상에 효율적으로 포획되고, 결찰 생성물의 중쪽 이전에 비결합 표적 핵산 및 결찰 프로브로부터 분리되는 것을 보장하도록 돋는다.

[0310] 분해에 관한 정보는 샘플 내에 함유된 더욱 특이적인 RNA 및 핵산의 품질을 평가하는데 유용하다. 이러한 기술은 특히 포르말린 고정된 파라민 포매(FFPE) 조직 샘플 및 샘플 분해 위험성이 높은 또 다른 샘플 내 RNA의 품질을 평가하는데 유용하다.

[0311] 전술한 바와 같이, 포획 효율성의 차이는 신호들의 상대적인 비율을 측정함으로써 간접적으로 결정될 수 있다. 이러한 방법은 마이크로어레이, CE, 시퀀싱, 실시간 PCR 및 전술한 임의 방법에 따라 표적 핵산을 더욱 평가하기 위한 또 다른 핵산 분석 방법과 조합될 수 있다.

VIII. 하드웨어

[0313] 본 발명의 한 양상에서, Liu(2006)에 의해 개시된 것들과 유사한 유체 장치(fluidic device)가 본 발명에 개시된 방법을 자동화시키기 위하여 사용된다. 예를 들면 U.S. Patent No. 6,942,771을 참조하며, 이는 비제한적으로 카트리지, 장치, 펌프, 웰(well), 반응 챔버, 및 검출 챔버를 포함하는 구성요소에 대한 참조로서 여기에 수록된다. 유체 장치는 또한 세포 분리를 위한 멤브레인을 포함하여, 마그네틱 입자, 분리 필터 및 레진의 포획을 위한 영역을 포함한다(즉 Pall의 Leukotrap™). 상기 장치는 실시간 PCR 중쪽 동안 발생하는 형광 신호의 카트리지-내 영상화을 위한 검출 챔버(즉 SYBR 그린, Taqman, Molecular Beacons) 뿐만 아니라, 반응 생성물(앰플리콘 및 결찰 생성물)의 장치 내 분리 및 검출을 위한 모세관 전기영동 채널을 포함할 수 있다. 바람직한 구체 예에서, 모세관 전기영동 채널은 플라스틱 기질 내에 몰딩되고 체질 폴리머 매트릭스(sieving polymer matrix)(Applied Biosystems가 시판중인 POP-7™)로 채워질 수 있다. 체질-매트릭스를 함유하지 않는 채널이 또한 적절하게 디자인된 프로브 세트에서 사용될 수 있다.

[0314] 바람직한 구체 예에서, 본 발명의 장치는 각각의 스테이션 또는 스테이션 세트에서 유체를 로딩 또는 언로딩하기 위한 구성요소를 비롯하여, 유체 조작 구성요소를 포함한다. 유체 조작 시스템은 임의 수의 구성요소를 포함하는 로봇 시스템을 포함할 수 있다. 또한, 여기에 개시된 단계들 중 어느 하나 또는 모두가 자동화될 수 있으며; 이에 따라 예를 들면, 시스템이 완전하게 또는 부분적으로 자동화될 수도 있다.

[0315] 해당 분야의 기술자에 의해 이해되듯이, 비제한적으로, 하나 이상의 로봇 팔; 마이크로플레이트 위치조작을 위한 플레이트 조작기; 카트리지 및/또는 캡이 있는 훌더; 비-교차 오염 플레이트 상의 웰(well)을 위하여 뚜껑을 제거 및 교체하기 위한 자동화된 뚜껑 또는 캡 조작기; 샘플 분배를 위한 1회용 팁이 있는 팁 어셈블리; 샘플 분배를 위한 세척가능한 팁 어셈블리; 96 웰 로딩 블록; 냉각 시약 랙; 마이크로타이틀러 플레이트 퍼펫 받침대(선택적으로 냉각됨); 플레이트 및 팁용 적층 타워; 및 컴퓨터 시스템;을 포함하여, 다양한 구성요소가 사용될 수 있다.

- [0316] 완전 로봇 또는 마이크로유체 시스템은 스크리닝 응용의 모든 단계를 수행하기 위한 고산출 피펫팅을 비롯하여 자동화된 액체-, 입자-, 세포- 및 유기체-조작을 포함한다. 이는 액체, 입자, 세포, 및 유기체 조작 예컨대 흡입, 혼탁, 혼합, 희석, 세척, 정확한 부피 전송; 피펫 팀의 회수 및 폐기; 및 단일 샘플 흡입으로부터 다중 전달을 위한 동일 부피의 반복적 피펫팅을 포함한다. 이러한 조작은 교차-오염-없는 액체, 입자, 세포, 및 유기체 전송이다. 이를 기기들은 필터, 멤브레인, 및/또는 도우터 플레이트(daughter plate), 고밀도 전송, 풀-플레이트 연속 희석, 및 고용량 작업에 대한 마이크로플레이트 샘플의 자동화된 복제를 수행한다.
- [0317] 바람직한 구체 예에서, 화학적으로 유도된 입자, 플레이트, 카트리지, 튜브, 마그네틱 입자, 또는 분석 성분에 대한 특이성을 갖는 또 다른 고체상 매트릭스가 사용된다. 마이크로플레이트, 튜브 또는 임의 고체 상 매트릭스의 결합 표면은 비-극성 표면, 고도 극성 표면, 공유 결합을 촉진하기 위한 변성 텍스트란 코팅, 항체 코팅, 융합 단백질 또는 웨타이드를 결합하기 위한 친화성 매개물, 재조합 단백질 A 또는 G와 같은 표면-고정된 단백질, 뉴클레오타이드 레진 또는 코팅을 포함하며, 또 다른 친화성 매트릭스가 본 발명에서 유용하다.
- [0318] 바람직한 구체 예에서, 멀티 튜브, 홀더, 카트리지, 미니 튜브, 깊은-웰 플레이트, 미세원심분리(microfuge) 튜브, 저온유리병(cryovial), 스퀘어 웰 플레이트, 필터, 칩, 광학 센서, 비드, 및 기타 고체-상 매트릭스의 플랫폼 또는 다양한 볼륨을 갖는 플랫폼이 추가 용량을 위한 업그레이드 가능한 모듈 플랫폼 상에 수용된다. 이러한 모듈 플랫폼은 가변적 고속 오비탈 세이커, 그리고 원료 샘플, 샘플 및 시약 희석, 분석 플레이트, 샘플 및 시약 보관, 피펫 팀, 및 활성 세척 스테이션을 위한 명티-포지션 워크 데크를 포함한다.
- [0319] 바람직한 구체 예에서, 열순환기 및 온도조절 시스템이 예컨대 제어 블록 또는 플랫폼과 같은 열교환기의 온도를 안정화시키기 위하여 사용되어 0°C 내지 100°C에서 배양 샘플의 정확한 온도 제어를 제공하며; 이는 스테이션 열제어에 부가하거나 이를 대체할 수 있다.
- [0320] 바람직한 구체 예에서, 단일 또는 다중 마그네틱 프로브, 친화 프로브, 또는 피펫이 구비된 상호교환가능한 피펫 헤드(단일 또는 다중-채널)이 로봇처럼 액체, 입자, 세포, 및 유기체를 조작한다. 멀티-웰 또는 멀티-튜브 마그네틱 분리기 또는 플랫폼이 단일 또는 다중 샘플 포맷 내 액체, 입자, 세포, 및 유기체를 조작한다.
- [0321] 일부 구체 예에서, 기기는 검출기를 포함할 것이며, 이는 라벨 및 분석법에 따라 다양한 상이한 검출기일 수 있다. 바람직한 구체 예에서, 유용한 검출기는 다중 형광 채널을 갖는 혼미경; 형광을 제공하는 플레이트 판독기, 전기화학적 및/또는 전기적 임피던스 분석기, 단일 및 이중 파장 엔드포인트 및 속도론 능력을 갖는 자외선 및 가시광선 분광광도 검출, 형광 공명 에너지 전달(FRET), 발광, 퀸칭, 이-광자 여기, 및 세기 재배포(intensity redistribution); 데이터 및 영상을 포획하고 정량화 가능한 포맷으로 변환하기 위한 CCD 카메라, 모세관 전기 영동 시스템, 질량 분광광도기 및 컴퓨터 워크스테이션을 포함한다.
- [0322] 이러한 기기는 멸균 층류 또는 흡 후드에 적합할 수 있거나, 멀티-웰 플레이트 또는 튜브 내 세포 배양 성장 및 전송 그리고 유해한 작업을 위한 밀봉되며, 자가-함유 시스템이다. 생존 세포는 생존 세포 분석의 시계열을 위한 온도, 습도, 및 가스 제어를 비롯한, 제어된 성장 조건 하에서 성장될 수 있다. 세포의 자동화된 변환 및 자동화된 콜로니 피커가 요망 세포의 신속한 스크리닝을 촉진할 수 있다.
- [0323] 유동세포 계측(Flow cytometry) 또는 모세관 전기영동 포맷이 마그네틱 및 기타 비드, 입자, 세포 및 유기체의 개별 포획을 위하여 사용될 수 있다.
- [0324] 가변적인 하드웨어 및 소프트웨어가 여러 적용분야에 대한 기기 적합성을 허용한다. 소프트웨어 프로그램 모듈이 방법의 생성, 수정, 및 수행을 가능하게 한다. 시스템 진단 모듈이 기기 정렬, 교정 연결, 및 모터 작동을 가능하게 한다. 주문형 기구, 텁웨어, 및 액체, 입자, 세포 및 유기체 변환 패턴이 수행될 상이한 응용을 가능하게 한다. 데이터베이스가 방법 및 파라미터 저장을 허용한다. 로봇 및 컴퓨터 인터페이스가 기기들 사이의 통신을 가능하게 한다.
- [0325] 바람직한 구체 예에서, 로봇 장치는 버스를 통하여 메모리 및 입출력 장치 세트(예컨대, 키보드, 마우스, 모니터, 프린터 등)와 통신하는 중앙처리장치를 포함한다. 환언하면, 이하에서 개략화되듯이, 이는 본 발명의 다중 송수신 장치를 위한 CPU에 부가하거나 이를 대체할 수도 있다. 중앙처리장치, 메모리, 입출력 장치, 및 버스 사이의 상호작용은 해당 분야에 공지되어 있다. 따라서, 수행될 실험에 따라 다양한 상이한 과정이 CPU 메모리에 저장된다.
- [0326] 이러한 로봇 유체 조작 시스템은 완충액, 시약, 샘플, 세척액, 분석 성분 예컨대 라벨 프로브 등을 비롯하여, 많은 상이한 시약을 사용할 수 있다.

[0327] IX. 전체 프로세스

본 발명의 양상의 한 가지 명확한 장점은 특히 RNA 검출을 위하여 샘플을 안정화 완충액 내에 수집하는 능력이며, 이는 a) 샘플 분해 없는 시험 전 오랜 시간(특히 RNA의 분석에서의 사용에 유용한데, 왜냐하면 RNA가 종래 조건 하에서는 매우 빠르게 분해되기 때문) 및 b) 예컨대 고도 변성 염 농도와 같이, 효소적 분석이 수행되는 것을 방해하는 성분을 혼합물로부터 제거하기 위한 추가 정제 단계 없이 수집 완충액에서 분석을 수행하는 능력을 허용한다. 동시에 세포를 파쇄하고 오랜 시간 기간 동안(예컨대 수일 내지 수 주 또는 그 이상) RNA를 안정화시키는 완충액 내에 직접적으로 혈액과 같은 샘플을 수집하는 능력은 분석법 진행 이전에 원격 수집 및 시간 지연을 가능하게 한다. 또한, 이러한 방법은 따라서 열 노출 및/또는 냉각 연속 조작과 같은 조작을 위한 특별한 조건을 회피한다. 예를 들면, 샘플은 수집되어 통상적인 메일을 사용하여 전송되고 추가 단계 없이 시험될 수 있다.

[0329] 더욱이, 수집된 샘플에서 직접적으로 분석할 수 있는 능력은 종래 효소 기반 분석법을 위하여 샘플을 정제하기 위한 샘플 준비 단계의 사용보다 상당히 유리하다.

[0330] 또 다른 구체 예에서, 샘플은 하나의 지리적 위치에서 안정화 완충액 내에 수집되고 그 후 여기에 논의된 본 발명의 양상 및 구체 예 중 임의 것에 따라 샘플에 대하여 분석을 수행하기 이전에 또 다른 지리적 위치로 전송될 수 있다. 환언하면, 전술한 바와 같이, 본 발명은 안정화된 샘플을 산출하는 방법 및 조성물을 제공하며, 상기 안정화된 샘플은 하나의 지리적 위치에서 수집될 수 있으며 그 후 여기에 논의된 바와 같이 또 다른 지리적 위치에서 화학적 결찰 방법 및 분석법을 거치게 될 수 있다.

[0331] X. 키트

[0332] 본 발명의 또 다른 양상에서, 핵산 표적의 소정의 세트의 반복적인 검출을 위한 키트가 제공되는데 이는 검출 공정의 일부로서 여기에 개시된 바와 같은 프로브, 기술, 방법, 및 화학적 결찰 반응을 사용한다. 상기 키트는 프로브, 표적 서열, 설명서, 완충액, 및/또는 기타 분석 성분을 포함한다.

[0333] 또 다른 양상에서 본 발명은 변성제, 제1 결찰 프로브, 및 제2 결찰 프로브를 포함하는 완충 용액을 포함하는 샘플에서 RNA를 안정화시키고 그리고 검출 또는 정량화하기 위한 키트를 제공한다. 바람직한 구체 예에서, 변성제는 구아니디니움 하이드로클로라이드 및 구아니디니움 이소티오시아네이트로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 바람직한 구체 예에서, 완충 용액은 EDTA, 환원제, 계면활성제 및 pH 완충액을 추가로 포함한다. 특히 바람직한 구체 예에서, 환원제는 DTT 및 머캡토에탄올로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 바람직한 구체 예에서, 계면활성제는 Triton X-100 및 소듐 N-라우로일사르코신으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0334] 또 다른 양상에서, 본 발명은 표적 핵산 서열을 검출하기 위한 키트를 제공하며 여기서 상기 표적 서열은 인접한 제1 및 제2 표적 도메인을 포함한다. 이러한 키트는 다음을 포함할 수 있다: 6M GuHCl 및 적어도 하나의 결찰 프로브 세트를 포함하는 2x 파쇄 완충액, 여기서 상기 적어도 하나의 결찰 프로브 세트는 표적 핵산 서열의 제1 표적 도메인에 상보적인 제1 프로브 도메인을 포함하는 제1 결찰 프로브 및 표적 핵산 서열의 제2 표적 도메인에 상보적인 제2 프로브 도메인을 포함하는 제2 결찰 프로브를 포함한다. 전술한 바와 같이, 본 발명의 키트에 포함된 결찰 프로브는 스터파 서열, 프라이머 서열, 및 앵커 서열, 그리고 이들의 임의 결합을 포함하는 또 다른 기능부를 포함할 수 있다.

[0335] 실시예

[0336] 실시예 1: 5개 표적의 정량적 다중 검출

[0337] 다중(Multiplex) CLPA 반응을 각각의 CLPA 프로브(표 1)(각각 1nM의 S 및 L 프로브)의 존재 하에서 하나의 반응에 조합된 다섯개(5) DNA 표적 유사체(MOAP1(서열번호 5), PCNA(서열번호 9), DDB2(서열번호 12), BBC3(서열번호 16) 및 BAX(서열번호 19) 유전자의 부분에 대응)를 사용하여 수행하였다. 표적 유사체를 표 2에 제시된 바와 같이 상이한 농도로 수집하였다. 표적 유사체, S 프로브 및 L 프로브를 PCR 완충액(1X PCR 완충액은 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.3이다)에서 1시간 동안 50°C에서 배양하였다. 각 반응 혼합물의 1μl 분량을 일반 프라이머(서열번호 1 및 2, 300nM)의 존재 하에서 Dynamo SYBR 그린 PCR 혼합물을 사용하는 PCR 증폭을 위한 템플릿으로서 사용하였다. 샘플을 27회 순환 동안 PCR 순환시켰다(95°C 15분 그 후 95°C(10초), 60°C (24초), 72°C(10초)에서 27회 순환). PCR 증폭 이후, 샘플이 변성되고 ABI 3130 DNA 서열기(모세관 전기영동 기기)로 주입되었다. 3개 샘플에 대한 ABI의 CE 자취뿐만 아니라 피크 플롯 대 PCNA의 표적 유사체 농도를 도 7에

나타내며 유입 농도에 대한 함수로서 PCNA의 신호의 선형 반응 플롯을 도 8에 나타낸다.

표 1

프로브 및 표적 서열 정보

[0338]

서열번호	명칭	서열 상세사항	앰플리콘 크기
1	전방향 PCR 프라이머	FAM-GGGTCCCTAAGGGTTGGA	
2	역방향 PCR 프라이머	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA	
3	MOAP1-L	LTACATCCTCTAGCAATTACACTCTAGATTGGATCTGCTGGCAC	47
4	MOAP1-S	5'-바이오틴-GGGTCCCTAAGGGTTGGATAGGTAATGGCAGTGTAGAACCS	41
		결찰된 MOAP1 앰플리콘	88
5	MOAP1-표적 유사체	GTGTAATTGACTAGGAAGGATGTAGTTCTACACTGCCATTACCTA	
6	MOAP1-RNA 표적 유사체	GUGUAUUGACUAGGAAGGAUGUACUACACUGCCAUUUACCUA	
7	PCNA-L	LTGGTTGGTGTCAAATACTCTAGATTGGATCTGCTGGCAC	45
8	PCNA-S	바이오틴-GGGTCCCTAAGGGTTGGATCGAGTCTACAGATCCCCAATTTCATAGCTGAAACTTCTCCS	63
		결찰된 PCNA 앰플리콘	108
9	PCNA-표적 유사체	AGTATTTGAAGCACCAAACCAGGAGAAAGTTCAGACTATGA	
10	DDB2-L	LTAGCAGACACATCCAGGCTCTAGATTGGATCTGCTGGCAC	51
11	DDB2-S	바이오틴-GGGTCCCTAAGGGTTGGATCGAGTCTACTCCAACTTGACCACCA TTCGGCTACS	49
		결찰된 DDB2 앰플리콘	96
12	DDB2-표적 유사체	GCCTGGATGTGCTGCTAGTAGCCGAATGGTGGTCA	
13	DDB2-RNA 표적 유사체	GCCUGGAUGUGUCUGCUAGUAGCCGAUUGGUGGUCA	
14	BBC3-L	LTCCGAGATTTCCTCTAGATTGGATCTGCTGGCAC	38
15	BBC3-S	바이오틴-GGGTCCCTAAGGGTTGGATCCCAGACTCCTCCCTCTS	37
		결찰된 BBC3 앰플리콘	75
16	BBC3-표적 유사체	GGG GGA AAT CTC GGA AGA GGG AGG AGT CTG GG	
17	BAX-L	LTCACGGTCTGCCACGCTCTAGATTGGATCTGCTGGCAC	39
18	BAX-S	바이오틴-GGGTCCCTAAGGGTTGGATGAGTCTACTGAGATGG TGA GTC TAC ATGA TC CT TCCCGCCACAAAGATGGS	53
		결찰된 BAX 앰플리콘	92
19	BAX-표적 유사체	CGTGGCAGACCGTGACCATCTTGTGGCGGGA	
20	3-포스포로티오에이트 GAPDH	바이오틴-GGGTCCCTAAGGGTTGGACGGACGCCGTTCAACCACCTTCTTGA TGTGAS	51
21	중간 2L 프로브 GAPDH	LTCATATTGGCAGGTTTCTAGACGGCAGGTL	32
22	5'-포스포로티오에이트 GAPDH	SCAGGTCCACCACTGACACGGTGGCAGTTCTAGATTGGATCTGCTGGCAC	50
		결찰된 3-프로브 앰플리콘	133
24	GAPDH 표적 유사체	ACT GCC AAC GTG TCA GTG GTG GAC CTG ACC TGC CGT CTA GAA AAA CCT GCC AAA TAT GAT GAC ATC AAG AAG GTG GTG AAG CAG GCG TC	
25	GAPDH 3-L	LTTCCTAGACGGCAGGTCAAGGTCCACCACTGATCGACGAGACACTCTGCCAT CTAGATTGGATCTGCTGGCAC	
26	GAPDH 3-S	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACGGACCAACTCCTGCCATATCATCTGTACACCTTC TTGATGTCATCATATTGGCAGGTS	
27	GAPDH-3-FAM/BHQ-1 태 그맨(Taqman) 프로브	(FAM)ccaaactcctcgccatatacatctgtacaccccttttg(BHQ-1)	
28	GAPDH 4-L	LTGCTGATGATCTGAGGCTGTTGTCATACTGATGATCGACGAGACACTCTGCC ATCTAGATTGGATCTGCTGGCAC	
29	GAPDH-4-S	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACGATGGAGTTGATGCTGACGGAAGTCATAGTAAGCA GTTGGTGGTGCAGGAGGCATS	
30	GAPDH-4-QUASAR 670/BHQ-2 태그맨(Taqman) 프로브	(Quasar 670)tgctgacggaagtcatagtaagcagtgg(BHQ-2)	
31	PCNA 2-L	LTCCTGAGTGCCTCCAACACCTTCTGAGGATGATCGACGAGACACTCTGCCA TCTAGATTGGATCTGCTGGCAC	
32	PCNA 2-S	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACGGTACAACAAGACCCAGCTGACGACTCTTAATATC CCAGCAGGCCCTCGTTGATGAGGS	
33	PCNA 2-Cal Fluor Orange 560/BHQ-1	(CAL Red 610)ctgacgactcttaatcccagcaggcctcggt(BHQ-2)	

34	DDB2-2-L	LTAGTTCCAAGATAACCTGGTCCAGGCTGATGATCGACGAGACACTCTGCC ATCTAGATTGGATCTTGGCTGGCAC	
35	DDB2-2-S	바이오틴GGGTTCCCTAAGGGTTGGACGTTAGACGCCAATAGGAGTTCACTGG TGGCTACCACCCACTGAGAGGAGAAAAGTCATS	
36	DDB2-2-(CAL Fluor Orange 560/BHQ-1	(Cal Orange 560)cgccaataggagttcactggtggtacca(BHQ-2)	
37	MRPS5-TC	[바이오틴]GCCAGAGAGGTTACGTGGCGCTCTTCA	30
38	MRPS5-S	GGATGCTATGAGCGATCTGCAGCGTGCAGTCTCACATCTCCAGTCCAGTTG ACGS	58
39	MRPS5-L	LTCTGGAACCTCATCTTCTGGCTCTGGATCCTCCTAAGTGAATGTTGACAGGAT GCTCTAGATTGGATCTGCTGGCAC	79
		결찰된 MRPS5 앰플리콘	137
40	PCNA-TC	[바이오틴]TCTTCATCCTCGATCTGGGAGGCCAAGTAG	30
41	PCNA-S	GGATGCTATGAGCGATCTGCAGGCCACTATACATCTTACTATACTTTACTCTACAA CAAGGGGTACATCTGCAGACAS	76
42	PCNA-L	LTACTGAGTGTCAACCGTTGAAGAGAGTGGAGTGGCTTTGAAAGTCTTAGAT TGGATCTGCTGGCAC	70
		결찰된 PCNA 앰플리콘	146
43	CDR2-TC	[바이오틴]AGAGTGATCGGTATTTGTTCTCTGTTCA	29
44	CDR2-S	GGATGCTATGAGCGATCTGCAGCGCAATTCTATTCAATTCAAATCTAAAGA TCTCCTAAACACGTTGTATTCTGGAGGS	86
45	CDR2-L	LTGTTGAGGGAACTCACGGCTCTGGTTGACAGAGGCCAGTTAGGATGTTAC CACCGTAGATGTTGACAGGATCCTAGATTGGATCTGCTGGCAC	101
		결찰된 CDR2 앰플리콘	187
			*루미넥스 비 드(Luminex Bead) #
46	GAPDH-L	LTCCATTGATGACAAGCTCCGTTCTAGCTCGCCTCTAAGCTCCCTTAGT GAGGTTAAT	
47	GAPDH-S	바이오틴-TAATACGACTCACTATAAGGGCGAGTAGAAAGTTGAAATTGATTATG ATCTCGCTCCTGGAAGATGGTGTGGGATTS	12
48	ACTG2-L	LTCTCCCAGTGAATGAGGGCTGGTGTCTTGGCTCCCTTAGTGAGGGTTAA T	
49	ACTG2-S	바이오틴- TAATACGACTCACTATAAGGGCGAATTGAGAAAGAGATAATGATAGGGACTGGAG CACCGAGGGTATGAGAGGTCS	72
50	ACPP-L	LTTCAACTCCTGGCTAGTACACTTCGGTCTAGCGCTCCCTTAGTGAGGGTTAA T	
51	ACPP-S	바이오틴-TAATACGACTCACTATAAGGGCGTAAGAGTATTGAAATTAGTAAGA GGTCTCCATGCCGAAACACCAAAGTCACAAAC	66
52	RDH11-L	LTGTCATCTCAAAGCCATCTGCTGTCGGCTCCCTTAGTGAGGGTTAAT	
53	RDH11-S	바이오틴-TAATACGACTCACTATAAGGGCGTTGTTGTTAAGTATGTGATTTAG GGAGGAAGTGACCCAAGTGGTGTACTCCTAS	63
54	DES-L	LTGTTCTCTGCTTCTCCTCAACTGAATCTCCTCGCTCCCTTAGTGAGGG TTAAT	
55	DES-S	바이오틴-TAATACGACTCACTATAAGGGTATTGATAAGAGAATGAAGAAGTAT CCACGTCCGCTCGGAAGGCAGCCAAATS	68
56	프라이머 A3534-p	p-TAATACGACTCACTATAAGGG	
23	역방향프라이머 A3632-p	바이오틴-ATTAACCCTCACTAAAGGGA	

[0339] * 루미넥스 제품 삽입 시트 매드 TAG-플렉스 미세구(Luminex Product Insert Sheet MagTAG-Plex Microspheres).

[0340] L= DABSYL 결찰 모이어티

[0341] S=포스포로티오에이트 모이어티

[0342]

샘플 농도

샘플	표적 유사체 농도
1	10pM 최종 농도에서의 모든 표적 유사체
2	10pM의 MOAP1, DDB2 및 BBC3, 5pM의 PCNA 그리고 2pM의 BAX
3	10pM의 MOAP1, DDB2 및 BBC3, 1pM의 PCNA 그리고 0.5pM의 BAX

[0343]

실시예 2: MOAP1 및 DDB2 DNA 및 RNA 표적 유사체를 사용하는 CLPA 반응

[0344]

반응을 표 3에 제시된 바와 같이 DNA 또는 RNA 표적 유사체를 사용하여 MOAP1 및 DDB2 유전자 그리고 서열을 표적하도록 디자인된 CLPA 프로브 세트에 대하여 중복하여 수행하였다. 프로브 숫자는 표 1의 서열번호를 의미한다. 시약을 표 4에 제시된 농도 및 부피로 첨가하였다. 각각의 S-프로브, L-프로브 및 표적 유사체를 0.2mL PCR 튜브에서 50°C에서 60분 동안 가열하고 그 후 2.5mL의 CLPA 반응물을 40 증폭 순환으로 실시간 PCR 반응에서 템플릿으로 사용하였다. 중복 샘플에 대하여 실시간 PCR 데이터를 평균냈으며 이는 표 3에 제시된다(Ct 값 캘럼). RNA와 DNA 표적 유사체 사이의 Ct 값의 최소 차이가 관찰되었으며 이는 RNA와 DNA 기질에서의 유사한 프로브 결찰 효율성을 나타낸다.

표 3

[0345]

CLPA 프로브 세트

샘플	식별자	L-프로브 (1nM) 서열번호	S-프로브 (1nM) 서열번호	표적 유사체 (10pM) 서열번호	Ct 값
1	MOAP-1 DNA	3	4	5	19.5
2	MOAP-1 RNA	3	4	6	20
3	DDB2 DNA	10	11	12	21
4	DDB2 RNA	10	11	13	21

표 4

시약 표-실시예 1

1X PCR 완충액 완충액*	12.5μl
S-프로브 (1nM) & L-프로브 (1nM)	각각 2.5μl
표적 유사체 (100pM)	2.5μl
물	5.0μl
50°C에서 1시간 동안 가열	

[0347]

*1X PCR 완충액은 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH8.3

[0348]

실시예 3: 파쇄 완충액 및 파쇄된 혈액 내 DDB2 RNA 전사체의 직접 분석

[0349]

DDB2 메신저 RNA(mRNA)를 Ambion사의 체외(in-vitro) 전사 키트 및 Origene (SC122547)사의 cDNA 벡터 플라스미드를 사용하여 제조하였다. mRNA의 농도는 Invitrogen사의 피코그린(PicoGreen) RNA 분석법 키트를 사용하여 결정되었다. DDB2 프로브 세트(표 5)를 물 또는 전혈이 섞인 DDB2 mRNA 전사체의 상이한 농도로 시험하였다. 반응 혼합물 성분을 표 5에 나열한다. 샘플 1-4는 물 중의 10ng, 1ng, 0.1ng 및 0.01ng의 DDB2 전사체로 구성되었고, 샘플 5-8은 전혈에 섞인 동일 농도 범위로 구성되었다. 단백질 응고를 감소시키기 위하여 단백분해효소 K를 혈액 샘플에 첨가하는 것을 제외하고는 유사한 반응 프로토콜이 후속하였다. 본 과정은 다음과 같다: 시약을 표 5 및 표 6에 제시된 농도 및 부피로 첨가하였다.

[0350]

RNA 전사체는 후속하는 가열 단계 이전에 완충액과 결합되면 안정하였으며 어떠한 상당한 RNA 분해가 관찰되지 않으면서 수일 동안 이러한 완충 용액 내에 저장될 수 있다. S-프로브, mRNA 전사체, 구아니딘 하이드로클로라이드 파쇄 완충액, 및 물(샘플 1-4) 또는 전혈(샘플 5-8) 중 어느 하나를 80°C까지 5분 동안 가열하였으며 그 후 55°C 열 블록으로 이동시켰다. L-프로브, 세척 완충액, 스트렙타비딘 비드 및 단백분해효소 K를 첨가하고,

반응물을 55°C에서 60분 동안 배양했다. 샘플을 열 볼록으로부터 제거하고 마그네틱 비드가 다이날(dynal) MPC 96S 마그네틱 포획 플레이트를 사용하여 포획되었다. 상청액을 제거하고 비드를 3회 세척 완충액으로 세척하였다. 다이나모(DyNamo) SYBR 그린 PCR 마스터 혼합물(25 μ l, 1x) 및 일반 프라이머(서열번호 1 및 2, 300nM)를 비드에 첨가하고 샘플을 Stratagene MX4000 실시간 PCR 기기를 사용하여 30회 순환 동안 열 순환시켰다(95°C에서 15분, 95°C(10초), 60°C(24초), 72°C(10초)에서 30회 순환). Ct 값을 기록하고 증폭된 샘플을 알리전트 바이오분석기(Agilent Bioanalyzer) 2100에 주입하여 앰플리콘의 길이를 확인하였다. 모든 앰플리콘은 정확한 크기(~96bp)를 나타냈고 성능이 혈액 및 물 샘플에 상응하였으며 이는 파쇄된 혈액에서 직접적으로 RNA를 분석할 수 있는 능력을 입증한다. 결과를 아래 표 7에 요약하였다. 추가 실험에서, 최초 가열 단계 이전에 RNA 전사체가 완충 용액 내에 저장된 시간 길이(수 분 내지 수 시간 및 심지어 수 일)가 표 7에 요약된 결과를 상당히 변화시키지 않았음이 제시되었다.

표 5

CLPA 프로브 세트

샘플	식별자	L-프로브 (1nM)	S-프로브 (1nM)	RNA 전사체
1-8	DDB2	서열번호 10	서열번호 11	오리진 플라스미드(Origene Plasmid) SC122547

표 6

DDB2 반응 혼합물

샘플	1-4	5-8
GuHCl 파쇄 완충액(lysis buffer) (2X)	12.5ml	12.5ml
S-프로브 (5nM)	1ml	1ml
RNA 전사체 (10ng/ μ l to 0.01ng/ μ l)	1ml	1ml
전혈	0ml	12.5ml
물	12.5 μ l	0ml
80°C에서 5분 동안 가열, 얼음에서 냉각		
세척 완충액	20ml	15ml
L-프로브 (5nM)	1ml	1ml
Dynal M-270 비드	2ml	2ml
단백분해효소(proteinase) K (10mg/ml)	0ml	5ml
합	50ml	50ml
55°C에서 60분 동안 배양		

[0353] a) GuHCl 파쇄 완충액 (1X)은 3M GuHCl, 20mM EDTA, 5mM DTT, 1.5% Triton, 30mM Tris pH 7.2임.

[0354] b) 세척 완충액은 100mM Tris (pH 7.4), 0.01% Triton임.

표 7

물 대 혈액의 요약 결과

분석법	DDB2 농도	Ct 값	샘플
1	10ng	13.5	물
2	1ng	17	물
3	0.1ng	20.2	물
4	0.01ng	24	물
5	10ng	13.5	혈액
6	1ng	16	혈액
7	0.1ng	19.2	혈액
8	0.01ng	23.5	혈액

[0356] 실시예 4: 3-프로브 CLPA-CE 분석법

[0357] 반응을 DNA 표적 유사체 프로브 서열번호 24 및 3-프로브 CLPA 프로브 세트(서열번호 20, 21 및 22)를 사용하여 표 8에 제시된 바와 같이 중복하여 수행하였다. 프로브 숫자는 표 1의 서열번호를 의미한다. 시약을 표 9의 농도 및 부피로 첨가하였다. S-프로브, L-프로브 및 표적 유사체를 즉시 0.2mL PCR 투브에서 50°C에서 60분 동안 가열하고 그 후 2.5mL의 CLPA 반응물을 25°C에서 순환으로 다이나모(Dynamo) SYBR 그린 PCR 반응에서 템플릿으로 사용하였다. 중복 샘플에 대하여 실시간 PCR 데이터를 평균냈으며 이는 표 8에 제시된다(Ct 값 칼럼). 각각의 반응의 1mL 샘플을 그 후 Agilent Bioanalyzer 2100을 통하여 분석하여 반응 생성물의 크기를 결정하였다.

표 8

[0358] CLPA 프로브 세트

샘플	식별자	3'-S 프로브 서열번호	2L-프로브 서열번호	5'-S 프로브 서열번호	표적 유사체 서열번호	앰플리콘 크기	Ct 값
1&2	GAPDH	20	21	22	24	약 135 bp	16.3
3&4	음성	20	21	22	24	관찰 안됨	CT 없음

표 9

[0359] 시약 표-실시예 4

1X PCR 완충액 완충액*	12.5mL
3 및 5' S-프로브 (10nM) & 2L-프로브 (10nM)	각각 2.5mL
표적 유사체 (1nM)	2.5mL
물	2.5mL
50°C에서 1시간 가열	

[0360] *1X PCR 완충액은 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH8.3임.

[0361] 실시예 5: mRNA의 다중 실시간 CLPA 검출

[0362] 0.2mL PCR 투브에 상이한 색깔 이중 라벨링된 프로브에 대한 고유 결합 사이트를 갖도록 조작된 4 세트의 CLPA 시약을 첨가하였다. 반응물을 표 10 및 표 11에 제시된 바와 같이 제조하였다. CLPA 프로브 세트 및 이중 라벨링된 프로브는 표 1의 36을 통하여 서열번호 25에 대응한다. S 및 L-오프 전사체 mRNA(GAPDH, PCNA 및 DDB2)를 2X 과쇄 완충액에 첨가하였다(GuHCl 과쇄 완충액(1X)은 3M GuHCl, 20mM EDTA, 5mM DTT, 1.5% Triton, 30mM Tris pH 7.2이다). mRNA 전사체는 후속하는 가열 단계 이전에 완충액과 결합되면 안정하였으며 어떠한 상당한 RNA 분해가 관찰되지 않으면서 수일 동안 이러한 완충 용액 내에 저장될 수 있다. 용액을 그 후 80°C까지 5분 동안 가열하였다. 샘플을 얼음에서 냉각시키고 스트렙타비딘 코팅된 마그네틱 비드(DYNAL M-270) 및 L-프로브를 첨가하였다. 샘플을 50°C에서 1시간 동안 가열하였다. 마그네틱 비드를 DYNAL MPC 플레이트 상에 포획하고 세척 완충액으로 2회 세척하였다. 비드를 다시 포획하고 다이나모(dynamo) PCR 1x 마스터믹스를 4개 상이한 이중 라벨링된 프로브 및 일반 PCR 프라이머(25μL 전체 부피)와 첨가하였다. FAM에서의 형광, 칼 플루오 오렌지(Cal Fluor orange) 560, 칼 플루오 레드(Cal Fluor Red) 610, 및 쿠아사르(Quasar) 670 채널과 함께 Stratagene MX4000 실시간 PCR 기기를 사용하여 30회(95°C에서 15 분, 95°C(10초), 60°C(24초), 72°C(10초)에서 30회 순환) 샘플을 열 순환시켰다. 각각의 채널에 대하여 관찰된 Ct 값을 기록하고 표 10에 나타냈다.

표 10

[0363]

실시예 5에 사용된 다중 시약

샘플	S 프로브 (25pM) 서열번호	L 프로브 (25pM) 서열 번호	표적	Ct (FAM)-GA PDH3	Ct (560)-DD B2	Ct (610)-PC NA	Ct (670)- GAPDH4
1 & 2	26, 29, 32, 35	25, 28 31, 34	250ng 이스트(yeast) tRNA; 40 pg GAPDH(Origene SC118869), 40 pg PCNA (SC118528), 40 pg DDB2 (SC122547) mRNA	25.5	24.5	24.8	25.8
3 & 4	26, 29, 32, 35	25, 28 31, 34	250ng 이스트(yeast) tRNA (음성)	Ct 없음	Ct 없음	Ct 없음	Ct 없음
5 & 6	26, 29, 32, 35	25, 28 31, 34	250ng 이스트(yeast) tRNA; 40 pg GAPDH(Origene SC118869), 40 pg PCNA (SC118528), 40 pg DDB2 (SC122547) mRNA	22.1	24.5	22.1	22.2
7 & 8	26, 29, 32, 35	25, 28 31, 34	250ng 이스트(yeast) tRNA (음성)	Ct 없음	Ct 없음	Ct 없음	Ct 없음

표 11

실시예 5에 사용된 추가 시약

GuHCl 과쇄 완충액 (2X)	12.5mℓ
S-프로브 (각각 0.25nM 스톡)	5mℓ
mRNAs (250ng tRNA +/- mRNAs)	5mℓ
물	2.5mℓ
80℃에서 5분 가열, 얼음에서 냉각	
물	18mℓ
L-프로브 (각각 0.25nm 스톡)	5mℓ
비드	2mℓ
합	50mℓ

[0365]

50℃에서 1시간 배양

[0366] 실시예 6: 포르말린-고정, 파라핀-포매 (FFPE) CLPA 분석법

[0367] 프로토콜:

[0368] 1. 각각 S 프로브(서열 IDs 47, 49, 51, 53, 및 55) 400pM 및 TE 완충액 25 μ l를 함유하는 25 μ l CLPA 과쇄 완충액(6M GuHCl, 40mM EDTA, 10mM DTT, 3% Triton X-100, 100mM Tris pH 7.5)을 200 μ l PCR 튜브에 첨가하였다.

[0369] 2. 포르말린-고정된, 파라핀-포매 (FFPE) 조직 블록을 마이크로톱 블레이드(microtome blade)(Leica, RM 2155)를 사용하여 두께 5 마이크론(micron)으로 절삭하고 병리 유리 슬라이드에 고정시켰다. 약 2mm x 5mm x 5 마이크론 크기의 FFPE 샘플을 유리 슬라이드로 긁어내고 PCR 튜브에 첨가하였다.

[0370] 3. FFPE 샘플 및 과쇄 완충액을 함유하는 PCR 튜브를 물 욕조 초음파기(sonicator)(Branson Ultrasonic s)에서 50 Hz로 5분 동안 55℃에서 초음파 조작한다.

[0371] 4. 튜브를 초음파 욕조로부터 제거하고 40 μ l의 단백분해효소 K 용액(2.5mg/ml) 및 10 μ l의 L-프로브 용액(각각의 프로브 중의 1nM, 서열 ID 46, 48, 50, 52, 및 54)을 혼합하면서 첨가하였다.

[0372] 5. 튜브를 55℃에서 3시간 동안 배양하였다.

[0373] 6. 샘플을 열 블록으로부터 제거하고, 샘플을 벤치탑 스윙-로터 원심분리기를 사용하여 1분 동안 3000rpm

에서 원심분리시켰다.

[0374] 7. 단지 상청액만을 프레쉬 PCR 투브로 옮겼다.

[0375] 8. Invitrogen/Dynal M-270 스트렙타비딘 코팅된 마그네틱 비드 상의 $2.0\mu\text{l}$ 를 첨가하고, 혼합하고 샘플을 5분동안 배양하였다.

[0376] 9. 비드를 Dynal MPC 96-S 마그네틱 플레이트를 사용하여 포획하고 상청액을 제거하였다.

[0377] 10. 비드를 $200\mu\text{l}$ 의 세척 완충액(100 mM tris buffer, pH 7.0)으로 2회 세척하였다.

[0378] 11. 최종 서체액을 버리고 비드를 $10\mu\text{l}$ 의 Dynamo F-450 Taq 중합효소 마스터 혼합물(Finnzymes) 및 $10\mu\text{l}$ 의 PCR 프라이머 세트(각각 600nM의 서열 ID 56 및 23)에 재현탁시켰다.

[0379] 12. 샘플을 그 후 프로토콜에 따라 열적으로 순환시켰다: 95°C 10 분 램프; 28회 순환 PCR: 94°C 에서 10 초 동안; 60°C 에서 20 초 동안; 72°C 에서 20 초 동안.

[0380] 13. 열 순환이 완결된 때, $1\mu\text{l}$ 엑소뉴클레아제를 각각의 PCR 반응 투브에 첨가하고 샘플을 20분 동안 37°C 에서 그 후 95°C 에서 2분 동안 배양했다.

[0381] 14. $2.5\mu\text{l}$ 의 PCR 반응물을 각각의 웰로부터 취하여 $22.5\mu\text{l}$ 의 Luminex Bead Mix에 첨가하였다. Luminex Bead Mix를 다음에 따라 제조하였다. 반응 당 각각의 세트에 대하여 2500개 미세구를 혼합함(비드 66, 63, 68, 12 및 72). 대략 20초 동안의 초음파처리 및 와류에 의해 1.1x (TM) 혼성화 완충액 중의 μl 당 각각의 미세구 세트 111개로 MagPlex-TAG 미세구 혼합물을 회석/농축함,

[0382] 15. 샘플을 그 후 95°C 에서 1.5 분 동안 그 후 37°C 에서 1시간 동안 서모믹서(Thermomixer)를 사용하여 교반하면서 배양하였다.

[0383] 16. SAPE를 1x (TM) 완충액(0.2M NaCl, 0.1M Tris, 0.08% Triton X-100, pH 8.0) 중의 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 회석시켜 리포터 믹스(Reporter Mix)를 제조함.

[0384] 17. $100\mu\text{l}$ 리포터 믹스를 각각의 웰에 첨가함. 부드럽게 혼합함.

[0385] 18. 37°C 에서 15분 동안 배양함.

[0386] 19. 그 후 MagTag 분석법을 제조자 프로토콜에 따라 발광 기기(Luminex instrument)에서 수행하였음.

[0387] 결과를 도 9에 나타냈다.

0388] 실시예 7: 표적 포획 CLPA 혈액 분석법

0.2mL PCR 투브에서, $25\mu\text{l}$ 의 전혈을 $25\mu\text{l}$ 의 2x GuHCl 파쇄 완충액과 혼합하였다. 샘플을 짧게 와류시켰다. 이러한 투브에 2.0nM 표적 포획 프로브(TC) 및 2.0nM S-프로브 프로브를 함유하는 용액 $25\mu\text{l}$ 를 첨가하였다. 상기 용액을 혼합하고 80°C 까지 5분 동안 가열하고 그 후 55°C 까지 냉각시켰다. 55°C 에서, 1.0nM L-프로브 및 $2\text{mg}/\text{mL}$ 의 단백분해효소 K를 함유하는 용액 $50\mu\text{l}$ 를 첨가하였다. S-프로브, L-프로브 및 TC 프로브 서열을 표 1, 서열 ID 37-45에 나열하였다. 용액을 혼합하고 55°C 까지 30분 동안 가열하였다. 30분 경과 후, $2\mu\text{l}$ 의 M-270 스트렙타비딘 코팅된 마그네틱 비드를 첨가하였다. 샘플을 부드럽게 피펫팅하여 혼합하고 이후 5분 동안 55°C 에서 배양하였다. 샘플을 고온 혈액으로부터 제거하고 즉시 96-웰 마그네틱 농축 플레이트(magnetic concentrator plate)(Dynal)에 놓았다. 15초 이후, 상청액을 완전하게 제거하였다. 비드를 $180\mu\text{l}$ 의 세척 완충액(100 mM tris buffer, pH 7.4, 0.01% triton)으로 3회 세척하였다. 완충액을 제거하고 각각 300nM 의 프라이머 1 및 2를 함유하는 PCR 혼합물을 첨가하였다. 샘플을 28회 순환 동안 열 순환시켰다(95°C 에서 2분, 94°C (10초), 60°C (20초) 및 72°C (20초)에서 28회 순환). 열 순환 이후, $2.0\mu\text{l}$ 의 PCR 생성물을 $1\mu\text{l}$ 의 ABI Genescan 600 V2 크기 표준 및 $17\mu\text{l}$ 의 포름아마이드와 혼합하였다. 샘플을 95°C 까지 5분 동안 가열하고 그 후 분석을 위해 ABI 3500 모세관 전기영동 기기에 위치시켰다. 단지 3개의 피크가 CE 추적의 110-200개 염기 쌍 범위 내에서 관찰되었다.

[0390]

실시예 7 결과

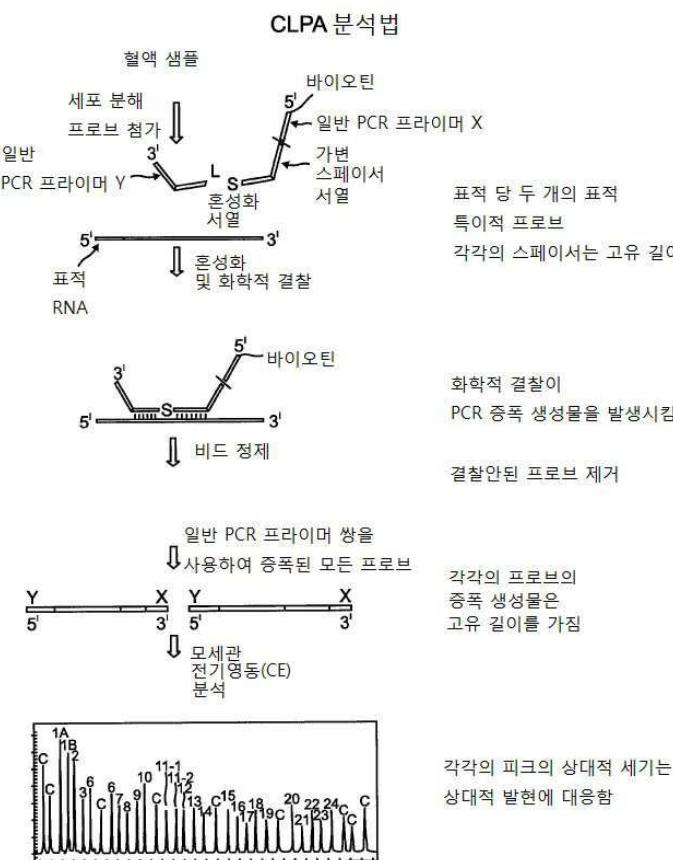
유전자	크기	피크 높이 (RFU)
MRPS5	137	30000
PCNA	146	28000
CDR2	187	4000

[0391]

본 발명은 현재-개시된 기술의 예시적 양상에서 방법, 시스템, 및/또는 구조 및 이들의 용도의 완전한 설명을 제공한다. 이러한 기술의 여러 양상이 어느 정도의 특정성으로 또는 하나 이상의 개별 양상과 관련하여 앞서 설명되었으나, 해당 분야의 통상의 기술자는 본 발명의 기술의 사상 또는 범위를 벗어나지 않으면서 여기에 개시된 양상의 다양한 대안책을 만들 수 있다. 많은 양상이 현재 설명되는 기술의 사상 또는 범위를 벗어나지 않으면서 형성될 수 있기 때문에, 적절한 범위는 이하에 첨부된 청구항 내에 존재한다. 그러므로 또 다른 양상이 고려된다. 또한, 명백하게 다르게 청구되거나 특정 순서가 본질적으로 청구항 언어에 의해 요구되는 경우가 아니라면, 모든 작업은 임의 순서로 수행될 수 있음이 이해되어야 한다. 전술한 설명에 포함되고 첨부된 도면에 제시된 모든 사항은 단지 특정 양상의 예시로서 해석되어야 하며 실시예에 한정되는 것은 아니다. 문맥으로부터 다르게 명백하거나 또는 명백하게 언급되는 경우가 아니면, 여기서 제공된 모든 농도 수치는 일반적으로 혼합물의 특정 성분의 추가 즉시 또는 그 이후에 일어나는 모든 전환과 무관한 혼합물 수치 또는 백분율에 관하여 제공된다. 이미 여기에 명백하게 수록되지 않는 정도로, 본 명세서에 관련된 모든 공개 참조문헌 및 특허 문헌은 모든 목적을 위하여 그 전체가 참조로서 여기에 수록된다. 상세사항이나 구조의 변화가, 이하의 청구항에 정의된 본 기술의 기본적인 요소를 벗어나지 않으면서 형성될 수 있다.

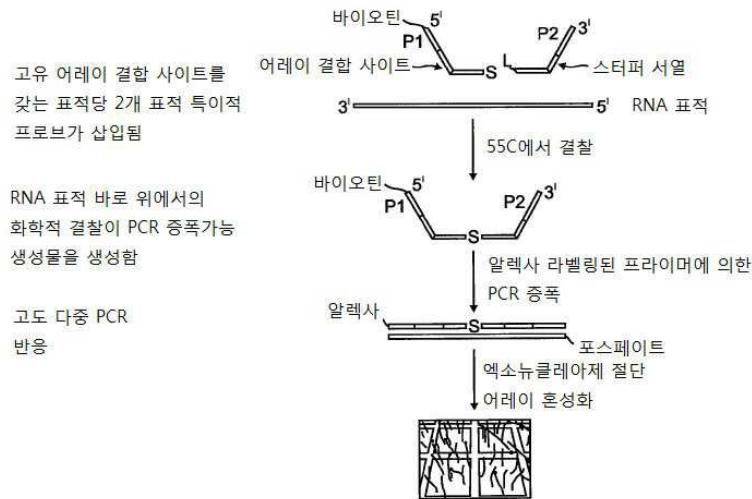
도면

도면1



도면2

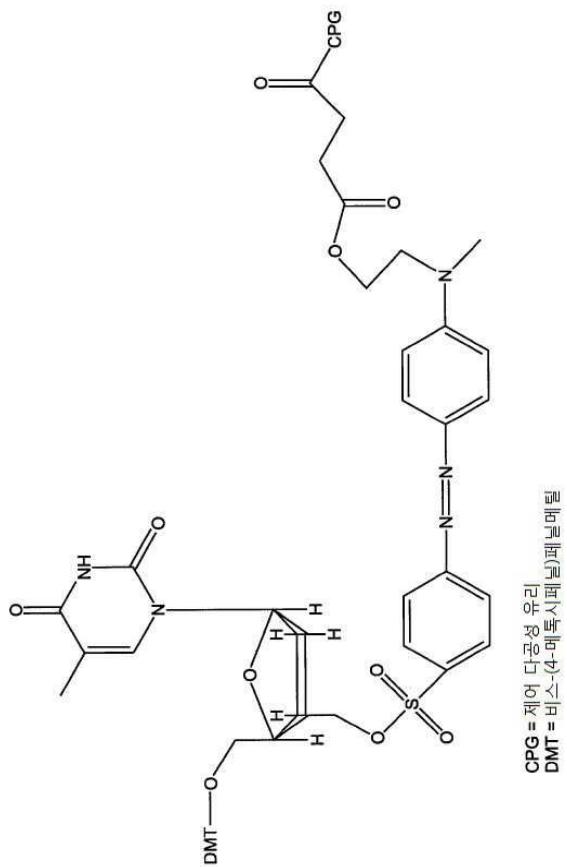
CLPA-MDM 분석법



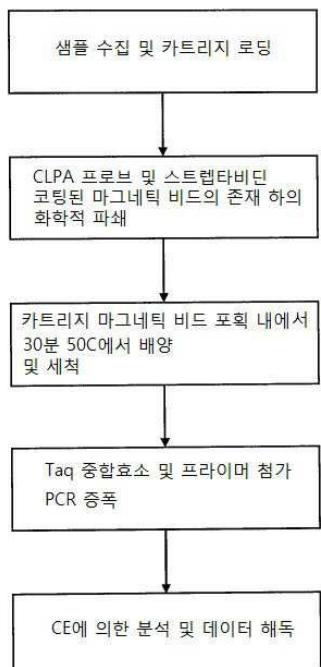
도면3



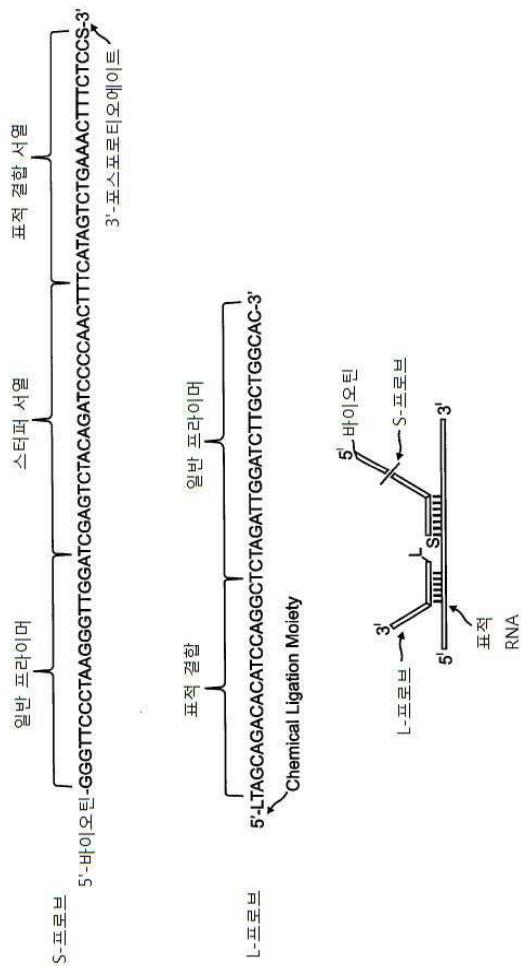
도면4



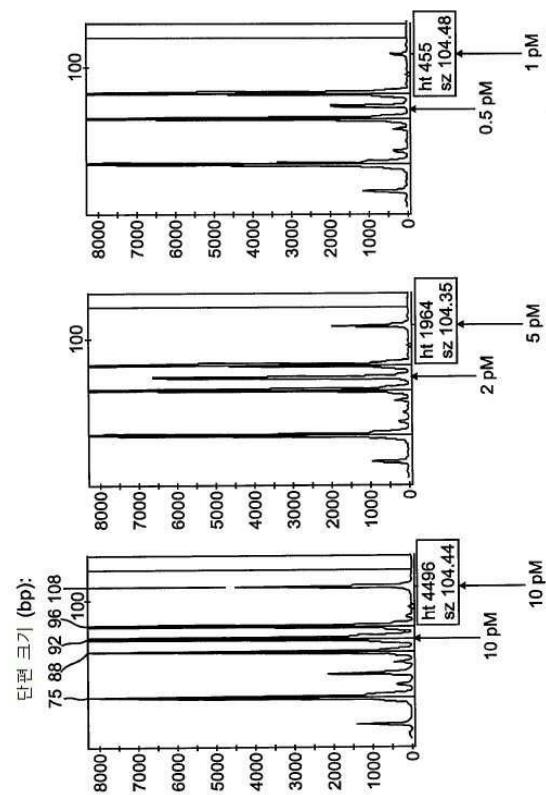
도면5



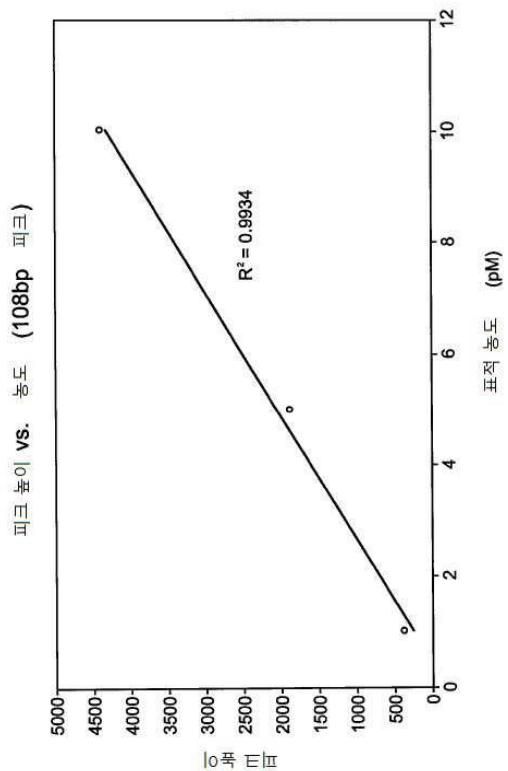
도면6



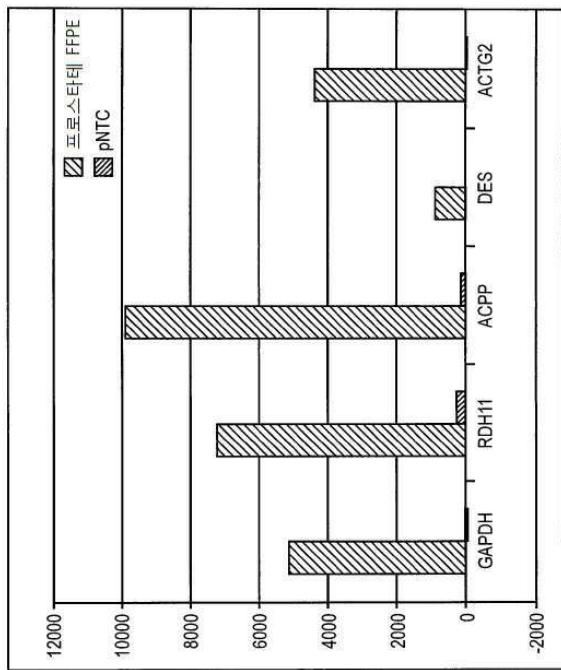
도면7



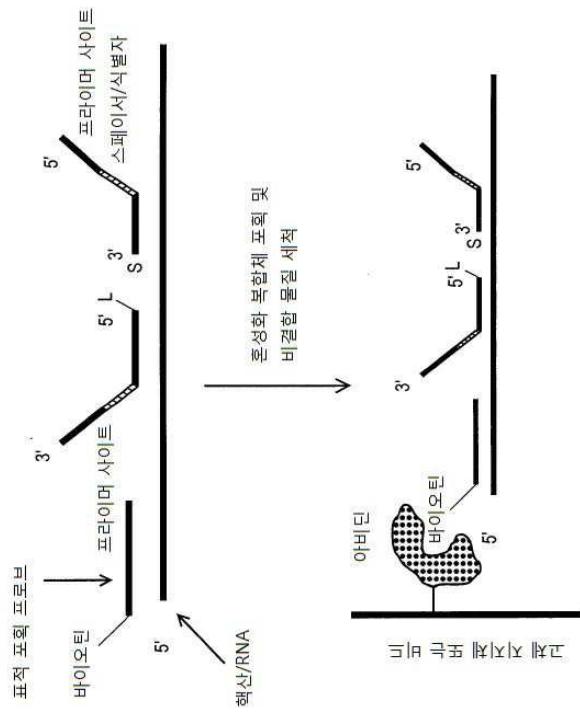
도면8



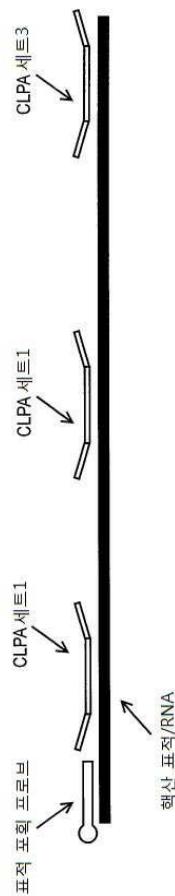
도면9



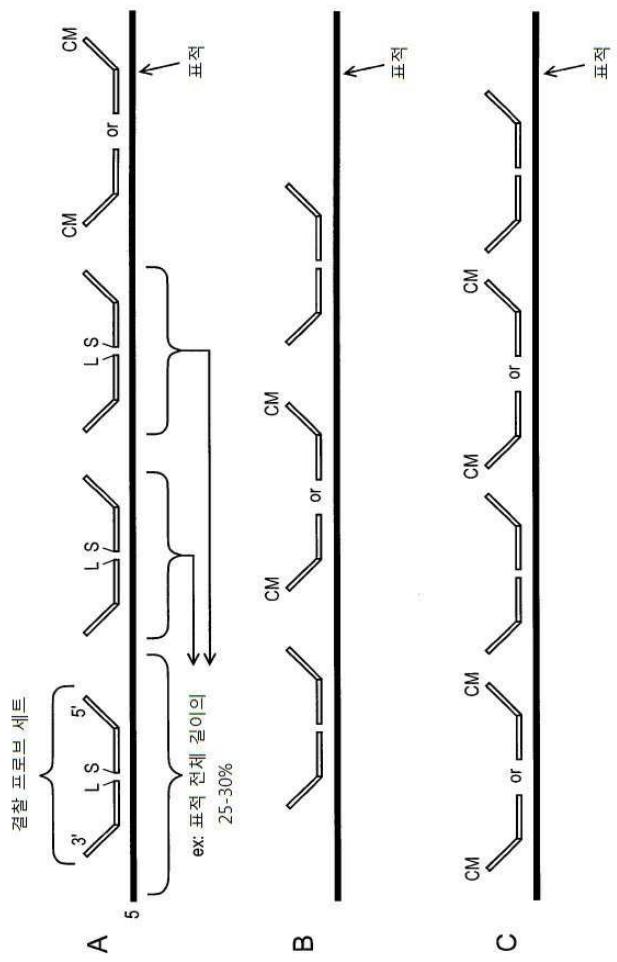
도면10



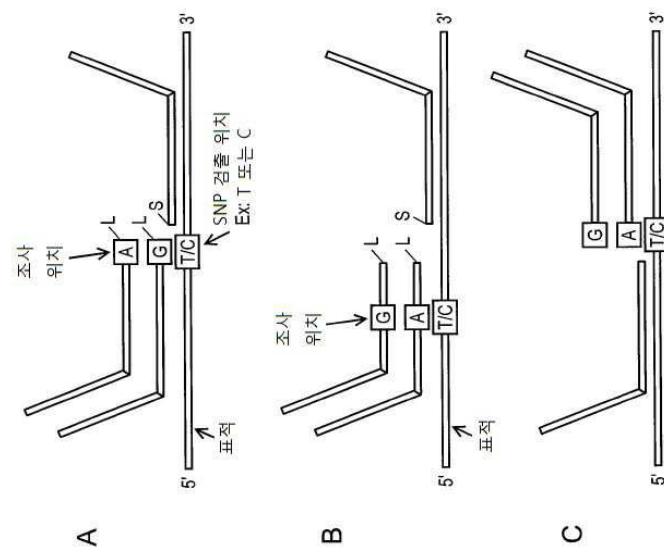
도면11



도면12



도면13



서열 목록

<110> DXTERITY DIAGNOSTICS INCORPORATED

<120> Methods and Compositions for Detecting Target Nucleic Acids

<130> 2013-fpa-6303

<150> 61/486,817

<151> 2011-05-17

<160> 56

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Primer

<400> 1

gggttccta agggttgg

19

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Primer

<400> 2

gtccagcaa gatccatct aga

23

<210> 3

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Probe

<400> 3

tacatcattt ctagtcaatt acactctaga ttggatcttg ctggcac

47

<210> 4

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Probe

<400> 4

gggttccta agggttggat aggttaatgg cagtgtagaa c

41

<210> 5

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 5

gtgtaattga ctaggaagga tgtagttcta cactgccatt taccta 46

<210> 6

<211> 46

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Probe

<400> 6

guguaauuga cuaggaagga uguaguucua cacugccauu uaccua 46

<210> 7

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Probe

<400> 7

tggtttgtg cttcaatac tctctagatt gcatcttgct ggcac 45

<210> 8

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Probe

<400> 8

gggttcccta agggttggat cgagtctaca gatccccaac tttcatagtc tgaaacttcc 60

tcc 63

<210> 9

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligonucleotide

<400>	9					
agtatttcaa	gcaccaaacc	aggagaaagt	ttcagactat	ga	42	
<210>	10					
<211>	41					
<212>						
>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	Synthetic Probe					
<400>	10					
tagcagacac	atccaggctc	tagattggat	cttgctggca	c	41	
<210>	11					
<211>	55					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	Synthetic Probe					
<400>	11					
gggttcccta	agggttggat	cgagtctact	ccaacttga	ccaccattcg	gctac	55
<210>	12					
<211>	36					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	Synthetic Oligonucleotide					
<400>	12					
gcctggatgt	gtctgctagt	agccgaatgg	tggtca		36	
<210>	13					
<211>	36					
<212>	RNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	Synthetic Oligonucleotide					
<400>	13					
gccuggaugh	gucugcuagu	agccgaaugg	ugguca		36	
<210>	14					
<211>	38					
<212>	DNA					

<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Probe
<400> 14
tccgagattt cccctctag attggatctt gctggcac 38
<210> 15
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Probe

<400> 15
gggtcccta agggtggat cccagactcc tccctct 37
<210> 16
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Oligonucleotide
<400> 16
ggggaaatc tcgaaagagg gaggagtctg gg 32
<210> 17
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Probe
<400> 17
tcacgtctg ccacgctcta gattggatct tgctggcac 39
<210> 18
<211> 53
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Probe
<400> 18
gggtcccta agggtggat gagtctacat gatcctccc gccacaaaga tgg 53
<210> 19

<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Oligonucleotide	
<400>	19	
cgtggcagac cgtgaccatc ttgtggcgg ga		32
<210>	20	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Probe	
<400>	20	
gggtcccta agggtggac ggacgcctgc ttaccacct tcttgatgtc a		51
<210>	21	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Probe	
<400>	21	
tcatattgg caggttttc tagacggcag gt		32
<210>	22	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Probe	
<400>	22	
caggccacc actgacacgt tggcagttct agattggatc ttgctggcac		50
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Primer	
<400>	23	

attaacccctc actaaaggga	20
<210> 24	
<211> 89	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 24	
actgccaacg tgcgtggg ggacctgacc tgccgtctag aaaaacctgc caaatatgat	60
gacatcaaga aggtggtaa gcaggcgtc	89
<210> 25	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Probe	
<400> 25	
ttttcttagac ggcaggtagt gtcaccaga tgatcgacga gacactctcg ccatctagat	60
tggatcttgc tggcac	76
<210> 26	
<211> 79	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Probe	
<400> 26	
gggtcccta agggttggac ggaccaactc ctcggccatcatctgtaca ccttcttgat	60
gtcatcatat ttggcaggt	79
<210> 27	
<211> 35	
<212>	
> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Probe	
<400> 27	
ccaactccctc gccatcatatctgtacacacct tcttg	35
<210> 28	

<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Probe
<400> 28
tgctgatgat ctggaggctg ttgtcatact gatgatcgac gagacactct cgccatctag 60
attggatctt gctggcac 78
<210> 29
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Probe
<400> 29
gggtcccta agggttggac gatggagttg atgctgacgg aagtcatagt aagcagtgg 60
tgggcagga ggcac 75
<210> 30
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Probe
<400> 30
tgctgacgga agtcatagta agcagttgg 30
<210> 31
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Probe
<400>
> 31
tcctgagtg cctccaacac cttttgagg atgatcgacg agacactctc gccatctaga 60
ttggatctt ctggcac 77
<210> 32
<211> 77
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Probe

<400> 32

tccttgatg cctccaacac cttcttgagg atgatcgacg agacactctc gccatctaga 60

ttggatcttg ctggcac 77

<210> 33

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Probe

<400> 33

ctgacgactc ttaatatccc agcaggcctc gtt 33

<210> 34

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Probe

<400> 34

ttagttcaa gataaccttg gttccaggct gatgatcgac gagacactct cgccatctag 60

attggatctt gctggcac 78

<210> 35

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Probe

<400>

> 35

gggttcccta agggttggac gtttagacgcc aataggagtt tcactggtagt ctaccaccca 60

ctgagaggag aaaagtcat 79

<210> 36

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Probe

<400>	36	
cgccaatagg agtttactg gtggctacca		30
<210>	37	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Probe	
<400>	37	
gccagagagg ttacgtggcg gctctttca		30
<210>	38	
<211>	58	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Probe	
<400>	38	
ggatgctatg agcgatctgc agcgtgcagt cttcacatct tcccaagtcca gtttgacg		58
<210>	39	
<211>	79	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Probe	
<400>	39	
tctggaacct catttctgg ctctggatcc ttcctaagt aatgttgaca ggatgctcta		60
gattggatct tgctggcac		79
<210>	40	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Probe	
<400>	40	
tcttcatcct cgatctggg agccaagtag		30
<210>	41	
<211>	76	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Probe

<400> 41

ggatgctatg agcgatctgc agccactata catcttacta tactttactc tacaacaagg 60

ggtacatctg cagaca 76

<210> 42

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Probe

<400> 42

tactgagtgt caccgttcaa gagagtggag tggctttgt aaagtcttct agattggatc 60

ttgctggcac 70

<210> 43

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Probe

<400> 43

agagtgatcg gtatttgtt ctctgttca 29

<210> 44

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Probe

<400> 44

ggatgctatg agcgatctgc agcgcaattc atttcattca caatcaatct aaagatctcc 60

ttaaacaacg ctttgttattc tggagg 86

<210> 45

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Probe

<400> 45

tgttgttagg gaactcacgg gctctgggtt gacagaggcc agttaggatg ttaccaccag 60

tgaatgtga caggatcctc tagattggat cttgctggca c 101

<210> 46

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Synthetic Probe

<400> 46

tccatttgatg acaagttcc cgttctcagc tcgcgttcta agttccctt tagtgagggt 60

taat 64

<210> 47

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Probe

<400> 47

taatacgaact cactataggg cgagtagaaa gttgaaatg attatgatct cgctcctgga 60

agatggtgat gggatt 76

<210> 48

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Probe

<400> 48

ttctccaggactgagggc tggtgtgtct ttggctccct ttagtgagggt ttaat 55

<210> 49

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Probe

<400> 49

taatacgact cactataggg cgaattgaga aagagataaa tcatagggac tggagcaccg	60
aggatgatgag aggttc	76
<210> 50	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Probe	
<400> 50	
ttcaactcct tggtagtac acttcggtct agcgctccct ttagtgaggg ttaat	55
<210> 51	
<211> 78	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Probe	
<400> 51	
taatacgact cactataggg cggtaagagt attgaaatata aagagggtc tccatgccga	60
aacaccaaaat tcacaaac	78
<210> 52	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Probe	
<400> 52	
tgtgcacatct aaagccatct gctgtttcg gctccctta gtgagggtta at	52
<210> 53	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Probe	
<400> 53	
taatacgact cactataggg cgttttgttta taatgtatgtt attttagggag gaagtgaccc	60
aagtgggttga ctcccta	76
<210> 54	

<211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Probe
 <400> 54
 tgttctctgc ttcttccttc aactgaatct ctcctgctt cccttagtg agggtaat 59

<210> 55
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Probe
 <400> 55
 taatacgact cactataggg tatttgataa gagaatgaag aagtatccac gtccgctcg 60
 aaggcagcca aat 73

<210> 56
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Primer
 <400> 56
 taatacgact cactataggg 20