



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.	(45) 공고일자	2006년11월24일
<i>C12Q 1/68</i> (2006.01)	(11) 등록번호	10-0649165
	(24) 등록일자	2006년11월16일

(21) 출원번호	10-2004-7008441	(65) 공개번호	10-2005-0028904
(22) 출원일자	2004년06월03일	(43) 공개일자	2005년03월23일
심사청구일자	2004년06월03일		
변역문 제출일자	2004년06월03일		
(86) 국제출원번호	PCT/KR2002/001781	(87) 국제공개번호	wo 2003/050305
국제출원일자	2002년09월19일	국제공개일자	2003년06월19일

(30) 우선권주장	PCT/KR2001/002133	2001년12월08일	세계지적재산권기구(WIPO)(WO)
	PCT/KR2002/000816	2002년05월01일	세계지적재산권기구(WIPO)(WO)

(73) 특허권자 주식회사 씨젠
서울시 송파구 방이동 65-5 태원빌딩 8층,9층

(72) 발명자 천종윤
서울특별시 송파구 방이동 89 올림픽선수기자촌아파트 319-1301

(74) 대리인 양부현
윤여강
이문섭

심사관 : 신경아

전체 청구항 수 : 총 86 항

(54) 어닐링 조절 프라이머 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 핵산 증폭에서 어닐링 특이성을 개선하는 어닐링 조절 프라이머 및 핵산 증폭-관여 기술의 모든 분야에서의 그의 응용에 관한 것이다. 본 발명의 프라이머는 (a) 혼성화될 주형 핵산의 하나의 위치에 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 갖는 3'-말단 부위; (b) 전-선택 아비트러리 (arbitrary) 뉴클레오타이드 서열을 갖는 5'-말단 부위; 및 (c) 상기 3'-말단과 5'-말단 사이에 위치해 있고 최소 하나의 유니버설 염기 (universal base) 또는 비-구별성 염기 유사체 (non-discriminatory base analog)를 포함하며, 어닐링 온도에 따라 상기 프라이머의 어닐링 부위를 조절하는 조절자 부위를 특징으로 한다.

대표도

도 1A

특허청구의 범위

청구항 1.

다음에 포함하는 핵산 증폭에서 어닐링 특이성을 개선하기 위한 어닐링 조절 프라이머: (a) 혼성화될 주형 핵산의 하나의 위치에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 갖는 3'-말단 부위; (b) 전-선택 아비트러리 (arbitrary) 뉴클레오타이드 서열을 갖는 5'-말단 부위; 및 (c) 상기 3'-말단과 5'-말단 사이에 위치해 있고 최소 2개의 유니버설 염기 (universal base) 또는 비-구별성 염기 유사체 (non-discriminatory base analog)를 포함하며, 어닐링 온도에 따라 상기 프라이머의 어닐링 부위를 조절하는 조절자 부위.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 5'-말단 부위의 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열은 상기 주형 핵산상의 어떠한 위치에 대하여도 상보적이지 않은 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 상기 주형 핵산은 gDNA, cDNA 또는 mRNA인 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 4.

제 3 항에 있어서, 상기 gDNA 또는 cDNA는 단쇄 또는 이중쇄 DNA인 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 5.

제 1 항에 있어서, 상기 핵산 증폭은 제1차 어닐링 온도 및 제2차 어닐링 온도 하에서 실시되는 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 6.

제 5 항에 있어서, 상기 핵산 증폭의 제1차 어닐링 온도는 상기 제2차 어닐링 온도와 동일하거나 낮은 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 7.

제 5 항에 있어서, 상기 3'-말단 부위는 상기 제1차 어닐링 온도에서의 어닐링에 참여하고 상기 5'-말단 부위는 상기 제2차 어닐링 온도에서의 프라이밍 위치로 작용하는 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 8.

제 5 항에 있어서, 상기 조절자 부위는 상기 제1차 어닐링 온도에서 상기 프라이머의 어닐링 부위를 3'-말단 부위로 제한하는 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 9.

제 5 항에 있어서, 상기 제1차 어닐링 온도는 약 30℃ 내지 68℃인 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 10.

제 5 항에 있어서, 상기 제2차 어닐링 온도는 약 50℃ 내지 72℃인 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 11.

제 1 항에 있어서, 상기 어닐링 조절 프라이머는 일반식 5'-Xp-Yq-Zr-3'으로 표현되며, 상기 Xp는 주형 핵산의 어떤 위치에 대하여도 상보적이지 않은 전-선택 아비트리리 뉴클레오타이드 서열을 갖는 5'-말단 부위를 나타내며; 상기 Yq는 최소 2개의 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체를 포함하는 조절자 부위를 나타내고; 상기 Zr는 혼성화될 주형 핵산의 하나의 위치에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 갖는 3'-말단 부위를 나타내며; 상기 p, q 및 r은 뉴클레오타이드의 수이고; 상기 X, Y 및 Z는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 12.

제 11 항에 있어서, 상기 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체는 자연의 DNA/RNA 염기들에 대하여 구별 없이 자연의 DNA/RNA 염기들의 각각과 염기쌍을 형성할 수 있는 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 13.

제 11 항에 있어서, 상기 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체는 디옥시이노신, 이노신, 7-디아자-2'-디옥시이노신, 2'-아자-2'-디옥시이노신, 2'-OMe 이노신, 2'-F 이노신, 디옥시 3-니트로피롤, 3-니트로피롤, 2'-OMe 3-니트로피롤, 2'-F 3-니트로피롤, 1-(2'-디옥시-베타-D-리보푸라노실)-3-니트로피롤, 디옥시 5-니트로피롤, 5-니트로인돌, 2'-OMe 5-니트로인돌, 2'-F 5-니트로인돌, 디옥시 4-니트로벤즈이미다졸, 4-니트로벤즈이미다졸, 디옥시 4-아미노벤즈이미다졸, 4-아미노벤즈이미다졸, 디옥시 네블라린, 2'-F 네블라린, 2'-F 4-니트로벤즈이미다졸, PNA-5-인트로인돌, PNA-네블라린, PNA-이노신, PNA-4-니트로벤즈이미다졸, PNA-3-니트로피롤, 모르포리노-5-니트로인돌, 모르포리노-네블라린, 모르포리노-이노신, 모르포리노-4-니트로벤즈이미다졸, 모르포리노-3-니트로피롤, 포스포라미데이트-5-니트로인돌, 포스포라미데이트-네블라린, 포스포라미데이트-이노신, 포스포라미데이트-4-니트로벤즈이미다졸, 포스포라미데이트-3-니트로피롤, 2'-O-메톡시에틸이노신, 2'-O-메톡시에틸 네블라린, 2'-O-메톡시에틸 5-니트로인돌, 2'-O-메톡시에틸 4-니트로-벤즈이미다졸, 2'-O-메톡시에틸 3-니트로피롤 및 상기 염기의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 14.

제 11 항에 있어서, 상기 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체는 디옥시이노신, 이노신, 1-(2'-디옥시-베타-D-리보푸라노실)-3-니트로피롤 또는 5-니트로인돌인 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 15.

제 11 항에 있어서, 상기 조절자 부위는 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체를 갖는 뉴클레오타이드의 연속 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 16.

제 11 항에 있어서, 상기 디옥시리보뉴클레오타이드는 자연의 dNMP, 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 17.

제 11 항에 있어서, 상기 p는 15 내지 60의 정수인 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 18.

제 11 항에 있어서, 상기 q는 최소 3인 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 19.

제 11 항에 있어서, 상기 q는 최소 4인 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 20.

제 11 항에 있어서, 상기 q는 2 내지 15의 정수인 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 21.

제 11 항에 있어서, 상기 r은 6 내지 50의 정수인 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 22.

제 11 항에 있어서, 상기 p는 15 내지 60의 정수, q는 2 내지 15의 정수, 그리고 r은 6 내지 30의 정수인 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 23.

제 11 항에 있어서, 상기 X_p 는 유니버설 프라이머 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 24.

제 11 항에 있어서, 상기 X_p 는 제한효소의 인식 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 25.

제 11 항에 있어서, 상기 X_p 는 검출 또는 분리를 위한 표지를 갖는 최소 하나의 뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 26.

제 11 항에 있어서, 상기 Z_r 는 mRNA의 폴리아데노신(폴리A) 테일과 혼성화되는 뉴클레오타이드 서열인 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 27.

제 26 항에 있어서, 상기 Z_r 는 최소 10개의 연속된 디옥시티미딘 뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 28.

제 26 항에 있어서, 상기 Z_r 는 최소 10개의 연속된 디옥시티미딘 뉴클레오타이드를 포함하고, 그의 3'-말단에 3'-V를 갖 으며, 상기 V는 디옥시아데노신, 디옥시시티딘 및 디옥시구아노신으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 29.

제 26 항에 있어서, 상기 Z_r 는 최소 10개의 연속된 디옥시티미딘 뉴클레오타이드를 포함하고, 그의 3'-말단에 3'-NV를 갖 으며, 상기 V는 디옥시아데노신, 디옥시시티딘 및 디옥시구아노신으로 구성된 군으로부터 선택되며, 상기 N은 디옥시아 데노신, 디옥시티미딘, 디옥시시티딘 및 디옥시구아노신으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 어닐링 조 절 프라이머.

청구항 30.

제 11 항에 있어서, 상기 Z_r 는 주형 핵산의 타겟 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열인 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 31.

제 11 항에 있어서, 상기 Z_r 는 랜덤 뉴클레오타이드 서열인 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 32.

제 11 항에 있어서, 상기 Z_r 는 유전자 패밀리의 컨센서스 서열에 상보적인 서열인 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이 머.

청구항 33.

제 11 항에 있어서, 상기 Z_r 는 전결정된 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 복수의 조합으로부터 선택되 는 축퇴성(degenerate) 뉴클레오타이드 서열인 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 34.

제 11 항에 있어서, 상기 Z_r 는 최소 하나의 리보뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 35.

제 11 항에 있어서, 상기 Z_r 는 대립유전자 위치 (allelic site)에 상보적인 최소 하나의 뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 36.

제 11 항에 있어서, 상기 Z_r 는 타겟 핵산에 미스매치 (mismatch) 되는 변이유발을 위한 최소 하나의 미스매치 뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 어닐링 조절 프라이머.

청구항 37.

상기 제 1 항 내지 제 36 항 중 어느 한 항의 프라이머 또는 프라이머 세트를 포함하는 키트.

청구항 38.

제 37 항에 있어서, 상기 키트는 상기 제 1 항 내지 제 36 항 중 어느 한 항의 어닐링 조절 프라이머의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머 또는 프라이머쌍을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 39.

DNA 또는 핵산 혼합물의 핵산 서열을 증폭하는 방법에 있어서, 상기 방법은 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40.

제 39 항에 있어서, 상기 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

(a) 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 프라이머 각각은 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 핵산 서열의 한 부위와 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 핵산 서열의 상기 부위와 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 상기 핵산 서열의 증폭 산물이 생성되는, 제1차 어닐링 온도에서 상기 핵산 서열의 제1단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,

(b) 단계 (a)에 이용된 프라이머와 동일한 프라이머 또는 단계 (a)에서 이용된 프라이머의 5'-말단 부위에 상당한 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사

이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 증폭 산물의 3'- 및 5'-말단에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 증폭 산물이 재증폭되는, 고엄격 (high stringent) 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (a)의 증폭 산물의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

청구항 41.

DNA 또는 핵산 혼합물로부터 타깃 핵산 서열을 선택적으로 증폭하는 방법에 있어서, 상기 방법은 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42.

제 41 항에 있어서, 상기 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

(a) 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 프라이머 각각은 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 타깃 핵산 서열의 한 부위와 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 타깃 핵산 서열과 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 상기 타깃 핵산 서열의 증폭 산물이 생성되는, 제1차 어닐링 온도에서 상기 타깃 핵산 서열의 제1단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,

(b) 단계 (a)에 이용된 프라이머와 동일한 프라이머 또는 단계 (a)에서 이용된 프라이머의 5'-말단 부위에 상당한 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 증폭 산물의 3'- 및 5'-말단에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 증폭 산물이 재증폭되는, 고엄격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (a)의 증폭 산물의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

청구항 43.

mRNA로부터 타깃 핵산 서열을 선택적으로 증폭하는 방법에 있어서, 상기 방법은 mRNA의 역전사 단계 및 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 44.

제 43 항에 있어서, 상기 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

(a) 주형 유도 효소적 디옥시리보핵산 합성을 발생하는 데 충분한 조건 하에서, 상기 mRNA의 폴리A 테일에 혼성화되는 올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머에 상기 mRNA를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNA를 역전사하여 상기 올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNA에 상보적인 제1차 DNA쇄를 생성하는 단계;

(c) 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 프라이머 각각은 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 타깃 핵산 서열의 한 부위와 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 타깃 핵산 서열과 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 상기 타깃 핵산 서열의 증폭 산물이 생성되는, 제1차 어닐링 온도에서 상기 단계 (b)의 제1차 DNA쇄의 상기 타깃 핵산 서열의 제1단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,

(d) 단계 (c)에 이용된 프라이머와 동일한 프라이머 또는 단계 (c)에서 이용된 프라이머의 5'-말단 부위에 상당한 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 증폭 산물의 3'- 및 5'-말단에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 증폭 산물이 재증폭되는, 고염격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (c)의 증폭 산물의 제2 단계 증폭을 실시하는 단계.

청구항 45.

둘 또는 그 이상의 핵산 시료 내의 분별적으로 발현되는 mRNA에 상보적인 DNA를 검출하는 방법으로서, 상기 방법은 mRNA의 역전사 단계 및 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46.

제 45 항에 있어서, 상기 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- (a) mRNA 전사체의 제1 군집을 대표하는 제1 핵산 시료 및 mRNA 전사체의 제2 군집을 대표하는 제2 핵산 시료를 제공 하는 단계;
- (b) 상기 제1 핵산 시료 및 제2 핵산 시료 각각을 상기 제 1 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항의 제1차 프라이머에 접촉시키는 단계로서, 상기 제1차 프라이머의 3'-말단 부위는 상기 분별적으로 발현되는 mRNA의 제1 위치에 상보적인 혼성화 서열을 포함하며, 상기 접촉은 주형 유도 효소적 디옥시리보핵산 합성을 발생하는데 충분한 조건 하에서 실시하는 단계;
- (c) 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 분별적으로 발현되는 mRNA를 역전사하여 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 제1 핵산 시료 내의 상기 분별적으로 발현되는 mRNA에 상보적인 제1차 cDNA쇄의 제1 군집을 생성하고, 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 분별적으로 발현되는 mRNA를 역전사하여 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 제2 핵산 시료 내의 상기 분별적으로 발현되는 mRNA에 상보적인 제1차 cDNA쇄의 제2 군집을 생성하는 단계;
- (d) 상기 제1차 cDNA쇄의 제1 및 제2 군집 각각을 정제하고 정량하는 단계;
- (e) 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 제2차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 프라이머는 그의 3'-말단 부위에 제1차 cDNAs쇄의 제1 및 제2 군집의 제2 위치에 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 사이클은 상기 제2차 프라이머가 제1차 cDNAs쇄의 각각의 군집의 제2 위치에 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 제2차 cDNA쇄의 제1 및 제 2 군집이 생성되는, 제1차 어닐링 온도에서 상기 단계 (d)의 제1 차 DNA쇄의 제1 및 제 2 군집 각각의 제1단계 증폭을 실시하는 단계;
- (f) 단계 (b) 및 (e)에 이용된 제1차 및 제2차 프라이머와 동일한 프라이머, 또는 단계 (b) 및 (e)에서 이용된 제1차 및 제2 차 프라이머의 5'-말단 부위에 상당한 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 제2차 cDNA쇄의 3'- 및 5'-말단에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 제2차 cDNA쇄의 증폭 산물이 생성되는, 고염격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (e)의 제2차 cDNA쇄 각각의 제2단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,
- (g) 단계 (f)에서 수득한 증폭 산물의 제1 및 제2 군집에서 개별적인 증폭산물의 존재 또는 레벨을 비교하는 단계.

청구항 47.

mRNA의 3'-말단 부위에 상당한 cDNA 부위를 포함하는 타겟 cDNA 단편의 고속 증폭방법으로서, 상기 방법은 mRNA의 역전사 단계 및 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 48.

제 47 항에 있어서, 상기 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- (a) 주형 유도 효소적 디옥시리보핵산 합성을 발생시키는 데 충분한 조건 하에서, 상기 mRNA의 폴리A 테일에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 3'-말단 부위에 포함하는 상기 제 1 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항의 제1차 프라이머에 상기 mRNA를 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNA를 역전사하여 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNA에 상보적인 제1차 cDNA쇄의 군집을 생성하는 단계;
- (c) 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 제2차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소한 사이클을 포함하고, 상기 프라이머는 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 제1차 cDNA쇄들 중 하나의 한 위치에 상보적인 유전자-특이 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 갖고, 상기 사이클은 제2차 프라이머가 상기 제1차 cDNA쇄들 중 하나의 유전자-특이 위치와 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 유전자-특이 제2차 cDNA쇄가 생성되는, 제1차 어닐링 온도에서 상기 제1차 cDNA쇄의 제1단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,
- (d) 단계 (a) 및 (c)에 이용된 제1차 및 제2차 프라이머와 동일한 프라이머 또는 단계 (a) 및 (c)에서 이용된 제1차 및 제2차 프라이머 각각의 5'-말단 부위에 상당한 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 유전자-특이 제2차 cDNA쇄의 3'- 및 5'-말단에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 유전자-특이 cDNA쇄의 증폭 산물이 생성되는, 고염격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (c)의 유전자-특이 제2차 cDNA쇄의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

청구항 49.

mRNA의 5'-말단 부위에 상당한 cDNA 부위를 포함하는 타겟 cDNA 단편의 고속 증폭방법으로서, 상기 방법은 mRNA의 역전사 단계 및 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50.

제 49 항에 있어서, 상기 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- (a) 주형 유도 효소적 디옥시리보핵산 합성을 발생시키는 데 충분한 조건 하에서, mRNA의 한 부위에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 cDNA 합성 프라이머로서 올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머 또는 랜덤 (random) 프라이머에 mRNAs를 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 cDNA 합성 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNAs를 역전사효소를 이용하여 역전사하여 상기 cDNA 합성 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNAs에 상보적인 제1차 cDNA쇄의 군집을 생성하여, 결국 mRNA-cDNA 중간체를 생성하는 단계;

(c) 역전사효소의 말단 전이효소 반응을 통하여 상기 mRNA-cDNA 중간체의 상기 제1차 cDNA쇄의 3'-말단에 시토신 잔기를 테일링 (tailing)시키는 단계;

(d) 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체의 군에 의해 분리되는 3'-말단 부위 및 5'-말단 부위를 포함하며, 상기 3'-말단 부위는 상기 제1차 cDNA쇄의 3'-말단의 시토신 테일에 혼성화되는 최소 3개의 구아닌 잔기를 그의 3'-말단에 포함하며, 상기 5'-말단 부위는 전-선택된 아비트리리 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 단계 (c)로부터 형성된 상기 제1차 cDNA쇄의 3'-말단의 시토신 테일을 접촉시켜, 상기 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단 부위를 상기 시토신 테일에 혼성화시키는 단계;

(e) 역전사효소를 이용하여 상기 제1차 cDNA쇄의 3'-말단을 연장함으로써, 상기 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 추가 서열을 생성시키는 단계로서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 연장 반응에서 주형의 작용을 하고, 결국 전장 제1차 cDNA쇄를 연장시키는 단계;

(f) 다음의 단계를 포함하며, 제1차 어닐링 온도에서 단계 (e)로부터 수득한 상기 전장 제1차 cDNA쇄의 제1단계 증폭을 실시하는 단계:

(i) 제1차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 프라이머는 상기 전장 제1차 cDNA쇄의 3'-말단 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 사이클은 상기 제1차 프라이머가 상기 전장 제1차 cDNA쇄의 3'-말단과 어닐링되는 조건에서 실시되는 제2차 전장 cDNA쇄를 생성시키는 단계;

(ii) 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 제2차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 프라이머는 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 제2차 전장 cDNA쇄들 중 하나의 한 부위에 상보적인 유전자-특이 혼성화 서열을 갖으며, 상기 사이클은 상기 제2차 프라이머가 상기 제2차 전장 cDNA쇄들 중 하나의 유전자-특히 위치에 어닐링되는 조건에서 실시되는 유전자-특이 cDNA쇄를 생성시키는 단계; 그리고,

(g) 단계 (f)-(i) 및 (f)-(ii)에 이용된 제1차 및 제2차 프라이머와 동일한 프라이머 또는 단계 (f)-(i) 및 (f)-(ii)에 이용된 제1차 및 제2차 프라이머의 각각의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드를 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 유전자-특이 cDNA쇄의 3'- 및 5'-말단에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 유전자-특이 cDNA쇄의 증폭 산물이 생성되는, 고염격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 유전자-특이 cDNA쇄의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

청구항 51.

mRNA에 상보적인 전장 이중쇄 cDNAs의 군집을 증폭하는 방법으로서, 상기 방법은 mRNA의 역전사 단계 및 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상기 제 1 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 52.

제 51 항에 있어서, 상기 방법은 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

(a) 주형 유도 효소적 디옥시리보핵산 합성을 발생하는 데 충분한 조건 하에서, 상기 mRNA의 폴리 A 테일에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 3'-말단 부위에 포함하는 상기 제 1 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항의 제1차 프라이머에 상기 mRNAs를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNAs를 역전사효소를 이용하여 역전사하여 상기 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNAs에 상보적인 제1차 cDNA쇄의 군집을 생성하여, 결국 mRNA-cDNA 중간체를 생성시키는 단계;

(c) 역전사효소의 말단 전이효소 반응을 통하여 상기 mRNA-cDNA 중간체의 상기 제1차 cDNA쇄의 3'-말단에 시토신 잔기를 테일링시키는 단계;

(d) 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체의 군에 의해 분리되는 3'-말단 부위 및 5'-말단 부위를 포함하며, 상기 3'-말단 부위는 상기 제1차 cDNA쇄의 3'-말단의 시토신 테일에 혼성화되는 최소 3개의 구아닌 잔기를 그의 3'-말단에 포함하며, 상기 5'-말단 부위는 전-선택된 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 단계 (c)로부터 형성된 상기 제1차 cDNA쇄의 3'-말단의 시토신 테일을 접촉시켜, 상기 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단 부위를 상기 시토신 테일에 혼성화시키는 단계;

(e) 역전사효소를 이용하여 상기 제1차 cDNA쇄의 테일링된 3'-말단을 연장함으로써, 상기 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 추가 서열을 생성시키는 단계로서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 연장 반응에서 주형의 작용을 하고, 결국 전장 제1차 cDNA쇄를 연장시키는 단계; 그리고,

(f) 단계 (a) 및 (d)에 이용된 제1차 프라이머 및 올리고뉴클레오타이드와 동일한 프라이머에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍 또는 단계 (a) 및 (d)에 이용된 제1차 프라이머 및 올리고뉴클레오타이드의 각각의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드를 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 전장 제1차 cDNA쇄의 3'- 및 5'-말단 서열에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 mRNAs에 상보적인 전장 cDNA쇄의 증폭 산물이 생성되는, 단계 (e)로부터 생성된 상기 전장 제1차 cDNA쇄의 증폭을 실시하는 단계.

청구항 53.

mRNAs에 상보적인 5'-풍부화 (5'-enriched) 이중쇄 cDNAs를 증폭하는 방법으로서, 상기 방법은 mRNAs의 역전사 단계 및 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54.

제 53 항에 있어서, 상기 방법은 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

(a) 주형 유도 효소적 디옥시리보핵산 합성을 발생하는 데 충분한 조건 하에서, 3'-말단 부위에 최소 6개의 랜덤 뉴클레오타이드 서열을 갖는 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 제1차 프라이머에 상기 mRNAs를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 제 52 항의 단계 (b)-(e)를 실시하여 5'-풍부화 제1차 cDNAs를 연장시키는 단계; 그리고,

(c) 단계 (a) 및 (b)에 이용된 제1차 프라이머 및 올리고뉴클레오타이드의 각각의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드를 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 5'-풍부화 제1차 cDNA쇄의 3'- 및 5'-말단 서열에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 5'-풍부화 cDNA쇄의 증폭 산물이 생성되는, 단계 (b)로부터 생성된 상기 5'-풍부화 제1차 cDNA쇄의 증폭을 실시하는 단계.

청구항 55.

2쌍 이상의 프라이머를 이용하여 2개 이상의 타겟 뉴클레오타이드 서열을 동일한 반응에서 동시에 증폭하는 방법에 있어서, 상기 방법은 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 56.

제 55 항에 있어서, 상기 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

(a) 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머쌍들을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 프라이머 각각은 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 타겟 핵산 서열의 한 부위와 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 타겟 핵산 서열과 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 타겟 뉴클레오타이드 서열들의 증폭 산물이 생성되는, 제1차 어닐링 온도에서 2개 이상의 타겟 뉴클레오타이드 서열의 제1단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,

(b) 단계 (a)에 이용된 프라이머와 동일한 프라이머쌍들 또는 단계 (a)에서 이용된 프라이머쌍들의 각각의 5'-말단 부위에 상당한 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍들을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 단계 (a)의 증폭 산물의 3'- 및 5'-말단에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 증폭 산물들이 동일 반응에서 재증폭되는, 고엄격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (a)의 증폭 산물의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

청구항 57.

프라이머를 이용하여 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하는 gDNA의 DNA 핑거프린트를 생성하는 방법에 있어서, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 58.

제 57 항에 있어서, 상기 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

(a) 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머 또는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 프라이머 각각은 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 gDNA상의 위치에 상보적인 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 갖으며, 상기 사이클은 상기 프라이머 또는 프라이머쌍이 상기 gDNA에 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 DNA 핑거프린트로 특징되는 독립의 (discrete) DNA 단편들의 세트가 생성되는, 제 1차 어닐링 온도에서 gDNA로부터 게놈의 특징적인 독립의 DNA 단편들의 세트인 DNA 핑거프린트의 제1단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,

(b) 단계 (a)에 이용된 프라이머 또는 프라이머쌍, 또는 단계 (a)에서 이용되는 프라이머 또는 프라이머쌍의 각각의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머 또는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 단계 (a)로부터 생성된 독립의 DNA 단편들의 세트의 3'- 및 5'-말단에 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 독립의 DNA 단편들의 세트가 재증폭되는, 고엄격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (a)로부터 생성된 독립의 DNA 단편들의 세트의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

청구항 59.

mRNA 시료의 RNA 핑거프린트를 제조하는 방법에 있어서, 상기 방법은 역전사 단계 및 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상기 제 1 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 60.

제 59 항에 있어서, 상기 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

(a) 주형 유도 효소적 디옥시리보핵산 합성을 발생시키는 데 충분한 조건 하에서, 혼성화되는 상기 mRNA 시료의 폴리 A 테일에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 갖는 상기 제 1 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항의 제1차 프라이머에 상기 mRNA 시료를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNA 시료를 역전사하여 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNA 시료에 상보적인 제1차 cDNA쇄의 군집을 생성하는 단계;

(c) 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 제2차 프라이머 또는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 프라이머 각각은 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 제1차 cDNA쇄의 위치와 상보적인 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 갖으며, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 mRNA 시료에 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 RNA 핑거프린트로 특징되는 독립의 (discrete) cDNA 단편들의 세트가 생성되는, 제1차 어닐링 온도에서 단계 (b)에서 생성된 제1차 cDNA쇄의 군집의 제1단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,

(d) 단계 (c)에 이용된 프라이머 또는 프라이머쌍, 또는 단계 (c)에서 이용되는 프라이머 또는 프라이머쌍의 각각의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머 또는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 단계 (c)에서 생성된 독립의 cDNA 단편들의 세트의 3'- 및 5'-말단에 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 독립의 cDNA 단편들의 세트가 재증폭되는, 고염격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (c)에서 생성된 독립의 cDNA 단편들의 세트의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

청구항 61.

mRNA 시료로부터 멀티유전자 패밀리의 보존성 호몰로지 단편 (conserved homology segments)을 동정하는 방법에 있어서, 상기 방법은 역전사 단계 및 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 62.

제 61 항에 있어서, 상기 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

(a) 주형 유도 효소적 디옥시리보핵산 합성을 발생시키는 데 충분한 조건 하에서, 혼성화되는 상기 mRNA 시료의 폴리 A 테일에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 갖는 상기 제 1 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항의 제1차 프라이머에 상기 mRNA 시료를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNA 시료를 역전사하여 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNA 시료에 상보적인 제1차 cDNA쇄의 군집을 생성하는 단계;

(c) 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 제2차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 프라이머 각각은 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 제1차 cDNA쇄의 보존성 호몰로지 단편의 아미노산 서열을 암호화하는 축퇴성 서열 또는 컨센서스 서열에 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 사이클은 상기 제2차 프라이머가 제1차 cDNA쇄의 상기 컨센서스 서열 또는 축퇴성 서열에 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 상기 컨센서스 서열 또는 축퇴성 서열을 갖는 3'-말단 cDNA 단편이 생성되는, 제1차 어닐링 온도에서 단계 (b)에서 생성된 제1차 cDNA쇄의 군집의 제1단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,

(d) 단계 (a) 및 (c)에 이용된 제1차 프라이머 및 제2차 프라이머와 동일한 프라이머, 또는 단계 (a) 및 (c)에 이용된 제1차 프라이머 및 제2차 프라이머 각각의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 3'-말단 cDNA 단

편의 3'- 및 5'-말단에 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 3'-말단 보존성 호몰로지 cDNA 단편이 증폭되는, 고염격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (c)에서 생성된 3'-말단 cDNA 단편의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

청구항 63.

제 61 항에 있어서, 상기 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

(a) 상기 제 52 항의 단계 (a)-(e)를 실시하여 전장 cDNA쇄를 생성하는 단계;

(b) 다음의 단계를 포함하며, 제1차 어닐링 온도에서 단계 (a)에서 수득한 상기 전장 제1차 cDNA쇄의 제1단계 증폭을 실시하는 단계:

(i) 제1차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 프라이머는 상기 전장 제1차 cDNA쇄의 3'-말단 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 사이클은 상기 제1차 프라이머가 상기 전장 제1차 cDNA쇄의 3'-말단과 어닐링되는 조건에서 실시되는 제2차 전장 cDNA쇄를 생성시키는 단계;

(ii) 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 제2차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 프라이머는 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 제2차 cDNA쇄의 보존성 호몰로지 단편의 아미노산 서열을 암호화하는 축퇴성 서열 또는 컨센서스 서열에 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 사이클은 상기 제2차 프라이머가 제2차 전장 cDNA쇄의 상기 컨센서스 서열 또는 축퇴성 서열에 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 상기 컨센서스 서열 또는 축퇴성 서열을 갖는 5'-말단 cDNA 단편을 생성시키는 단계;

(c) 단계 (b)-(i) 및 (b)-(ii)에 이용된 제1차 및 제2차 프라이머와 동일한 프라이머 또는 단계 (b)-(i) 및 (b)-(ii)에 이용된 제1차 및 제2차 프라이머의 각각의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드를 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 5'-말단 cDNA 단편의 3'- 및 5'-말단에 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 5'-말단 보존성 호몰로지 cDNA 단편이 증폭되는, 고염격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (b)에서 생성된 5'-말단 cDNA 단편의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

청구항 64.

gDNA로부터 멀티유전자 패밀리의 보존성 호몰로지 단편을 동정하는 방법에 있어서, 상기 방법은 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 65.

제 64 항에 있어서, 상기 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

(a) 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머 또는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 프라이머 각각은 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 gDNA상의 보존성 호몰로지 단편의 아미노산 서열을 암호화하는 축퇴성 서열 또는 컨센서스 서열에 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 사이클은 상기 프라이머가 상기 gDNA의 컨센서스 서열 또는 축퇴성 서열에 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 상기 컨센서스 서열 또는 축퇴성 서열을 갖는 게놈 DNA 단편을 생성시키는 단계; 그리고,

(b) 단계 (a)에 이용된 프라이머 또는 프라이머쌍, 또는 단계 (a)에서 이용되는 프라이머 또는 프라이머쌍의 각각의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머 또는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장

및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 단계 (a)로부터 생성된 게놈 DNA 단편의 3'- 및 5'-말단에 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 보존성 호몰로지 게놈 DNA 단편이 증폭되는, 고염격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (a)에서 생성된 게놈 DNA 단편의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

청구항 66.

타깃 핵산 내의 뉴클레오타이드 변이를 동정하는 방법에 있어서, 상기 방법은 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 67.

제 66 항에 있어서, 상기 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

(a) 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 제1차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 제1차 어닐링 온도에서 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 상기 타깃 핵산에 상보적인 제1차 DNA쇄를 생성시키는 제1단계 증폭을 실시하는 단계로서, 상기 프라이머는 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 타깃 핵산의 제1 위치의 전-선택된 서열에 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 제1차 프라이머 및 제1 위치 각각은 상기 뉴클레오타이드 변이에 해당하는 의문 위치 (interrogation position)를 포함하며, 결과적으로 상기 의문 위치가 상기 제1 위치의 그에 상응한 뉴클레오타이드에 상보적인 제1 프라이머의 상보적 뉴클레오타이드에 의해 차지되면, 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 상기 타깃 핵산에 상보적인 상기 제1차 DNA쇄를 생성시키는 단계;

(b) 다음의 단계를 포함하며, 고염격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 단계 (a)에서 수득한 상기 제1차 DNA쇄의 제2단계 증폭을 실시하는 단계:

(i) 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 제2차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 프라이머는 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 타깃 핵산의 제2 위치에 있는 전-선택된 서열에 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 사이클은 상기 제2차 프라이머가 상기 타깃 핵산의 상기 제2 위치에 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 상기 제1차 DNA쇄에 상보적인 제2차 DNA쇄를 생성시키는 단계; 그리고,

(ii) 단계 (a) 및 (b)-(i)에 이용된 제1차 및 제2차 프라이머와 동일한 프라이머 또는 단계 (b)-(i)에서 생성된 상기 제2차 DNA쇄의 3'- 및 5'-말단에 상보적인 또는 상당한 혼성화 서열을 갖는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 제2차 DNA쇄의 3'- 및 5'-말단에 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 3'- 및 5'-말단에 상기 타깃 핵산의 상기 제1 위치 및 제2 위치를 포함하는 상기 제2차 DNA쇄를 증폭하여 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 상기 제2차 DNA쇄에 상당한 짧은 타깃 뉴클레오타이드 단편을 생성시키는 단계.

청구항 68.

제 66 항에 있어서, 상기 방법은 다음의 단계를 포함하며, 제1차 증폭과정 및 제2차 증폭과정의 두 개의 개별적 증폭과정을 이용하여 실시되고, 상기 제2차 증폭과정은 두 단계 증폭을 이용하여 실시되는 것을 특징으로 하는 방법:

(a) 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하는, 양말단 사이에 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 짧은 DNA쇄 단편을 생성시키기 위한 제1차 증폭과정을 실시하는 단계로서, 상기 프라이머쌍 각각은 상기 타깃 핵산의 한 위치의 전-선택된 서열에 상보적인 혼성화 서열을 포함하며, 상기 뉴클레오타이드 변이는 상기 전-선택된 서열들 사이에 위치해 있고, 상기 프라이머쌍 중 최소 하나는 3'-말단 부위에 상기 혼성화 서열을 갖는 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머이며, 결과적으로 양말단 사이에 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 상기 짧은 DNA쇄 단편을 생성시키는 단계;

(b) 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 제1차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 제1차 어닐링 온도에서 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 상기 짧은 DNA쇄 단편에 상보적인 제1차 DNA쇄를 생성하기 위한 제2차 증폭과정의 제1단계 증폭을 실시하는 단계로서, 상기 프라이머는 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 타겟 핵산의 제1 위치의 전-선택된 서열에 상보적인 혼성화 서열을 갖고, 상기 제1차 프라이머 및 제1 위치 각각은 상기 뉴클레오타이드 변이에 해당하는 의문 위치 (interrogation position)를 포함하며, 결과적으로 상기 의문 위치가 상기 제1 위치의 그에 상당한 뉴클레오타이드에 상보적인 제1 프라이머의 상보적 뉴클레오타이드에 의해 차지되면, 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 상기 타겟 핵산에 상보적인 상기 제1차 DNA쇄를 생성시키는 단계; 그리고,

(c) 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 제2차 어닐링 온도에서 단계 (a)의 상기 제1차 DNA쇄의 제2단계 증폭을 실시하는 단계로서, 상기 프라이머쌍 중 한 프라이머는 단계 (a)에서 이용된 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머와 동일하고, 다른 프라이머는 단계 (b)에서 이용된 상기 제1차 프라이머와 동일하고, 또는 상기 프라이머쌍의 각각의 프라이머는 상기 제1차 DNA쇄의 3'- 및 5'-말단에 상보적인 또는 상당한 혼성화 서열을 갖고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 제1차 DNA쇄의 3'- 및 5'-말단에 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 제1차 DNA쇄가 증폭됨으로써 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 상기 제1차 DNA쇄에 상당한 짧은 타겟 뉴클레오타이드 단편을 생성시키는 단계.

청구항 69.

타겟 핵산에서 변이유발 (mutagenesis)하는 방법에 있어서, 상기 방법은 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 70.

제 69 항에 있어서, 상기 변이유발은 위치-지정 변이유발이고, 다음의 단계를 포함하는 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되는 것을 특징으로 하는 방법:

(a) 상기 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 프라이머 각각은 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 타겟 핵산 서열의 한 부위와 상보적인 혼성화 서열을 갖고, 상기 혼성화 서열은 위치-지정 변이를 발생시키기 위하여 최소 하나의 미스매치 (mismatch) 뉴클레오타이드를 갖고, 상기 사이클은 프라이머 또는 프라이머쌍이 상기 타겟 뉴클레오타이드 서열과 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 위치-지정 변이 위치를 포함하는 증폭 산물이 생성되는, 제1차 어닐링 온도에서 상기 타겟 핵산 서열의 제1단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,

(b) 단계 (a)에 이용된 프라이머와 동일한 프라이머 또는 단계 (a)에서 이용된 프라이머의 5'-말단 부위에 상당한 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 증폭 산물의 3'- 및 5'-말단에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 위치-지정 변이 위치를 포함하는 증폭 산물이 재증폭되는, 고엄격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (a)의 증폭 산물의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

청구항 71.

삭제

청구항 72.

삭제

청구항 73.

삭제

청구항 74.

삭제

청구항 75.

삭제

청구항 76.

삭제

청구항 77.

삭제

청구항 78.

삭제

청구항 79.

삭제

청구항 80.

삭제

청구항 81.

삭제

청구항 82.

제 40 항에 있어서, 상기 제1단계 증폭에서 이용되는 상기 프라이어쌍은 (i) 제 1 항 내지 제 25 항의 프라이어로부터 선택되는 어닐링 조절 프라이어 및 (ii) 제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 프라이어엣 조절자 부위가 없는 프라이어의 조합인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 83.

삭제

청구항 84.

삭제

청구항 85.

삭제

청구항 86.

삭제

청구항 87.

삭제

청구항 88.

삭제

청구항 89.

삭제

청구항 90.
삭제

청구항 91.
삭제

청구항 92.
삭제

청구항 93.
삭제

청구항 94.
삭제

청구항 95.
삭제

청구항 96.
삭제

청구항 97.
삭제

청구항 98.
삭제

청구항 99.
삭제

청구항 100.
삭제

청구항 101.
삭제

청구항 102.
삭제

청구항 103.
삭제

청구항 104.
삭제

청구항 105.
삭제

청구항 106.
삭제

청구항 107.
삭제

청구항 108.
삭제

청구항 109.
삭제

청구항 110.
삭제

청구항 111.
삭제

청구항 112.
삭제

청구항 113.
삭제

청구항 114.
삭제

청구항 115.
삭제

청구항 116.
삭제

청구항 117.
삭제

청구항 118.
삭제

청구항 119.
삭제

청구항 120.
삭제

청구항 121.
삭제

청구항 122.
삭제

청구항 123.
삭제

청구항 124.

삭제

청구항 125.

삭제

청구항 126.

삭제

청구항 127.

삭제

청구항 128.

삭제

청구항 129.

상기 제 39 항에 기재된 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 쌍을 포함하는 핵산 증폭용 키트.

청구항 130.

상기 제 41 항에 기재된 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 쌍을 포함하는, DNA로부터 타겟 핵산 서열을 선택적으로 증폭하기 위한 키트.

청구항 131.

상기 제 43 항에 기재된 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 쌍을 포함하는, mRNA로부터 타겟 핵산 서열을 선택적으로 증폭하기 위한 키트.

청구항 132.

상기 제 45 항에 기재된 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 쌍을 포함하는, 분별적으로 발현되는 mRNA에 상보적인 DNA를 검출하기 위한 키트.

청구항 133.

상기 제 47 항에 기재된 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 쌍을 포함하는, mRNA의 3'-말단 부위에 상당한 cDNA 부위를 포함하는 타겟 cDNA 단편을 고속으로 증폭하기 위한 키트.

청구항 134.

상기 제 49 항에 기재된 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 쌍을 포함하는, mRNA의 5'-말단 부위에 상당한 cDNA 부위를 포함하는 타겟 DNA 단편을 고속으로 증폭하기 위한 키트.

청구항 135.

상기 제 51 항에 기재된 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 쌍을 포함하는, mRNA에 상보적인 전장 이중쇄 cDNAs의 군집을 증폭하기 위한 키트.

청구항 136.

상기 제 53 항에 기재된 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 쌍을 포함하는, mRNAs의 5'-말단 지역에 상보적인 5'-풍부화 (5'-enriched) 이중쇄 cDNAs를 증폭하기 위한 키트.

청구항 137.

상기 제 55 항에 기재된 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 세트를 포함하는, 2개 이상의 타겟 뉴클레오타이드 서열을 동시에 증폭하기 위한 키트.

청구항 138.

상기 제 57 항에 기재된 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 쌍을 포함하는, gDNA에 의한 DNA 핑거프린트를 생성하기 위한 키트.

청구항 139.

상기 제 59 항에 기재된 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 쌍을 포함하는, mRNA에 의한 DNA 핑거프린트를 생성하기 위한 키트.

청구항 140.

상기 제 61 항에 기재된 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 쌍을 포함하는, mRNA로부터 멀티유전자 패밀리의 보존성 호몰로지 단편 (conserved homology segments)을 동정하기 위한 키트.

청구항 141.

삭제

청구항 142.

상기 제 64 항에 기재된 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 쌍을 포함하는, gDNA로부터 멀티유전자 패밀리의 보존성 호몰로지 단편을 동정하기 위한 키트.

청구항 143.

상기 제 66 항에 기재된 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 쌍을 포함하는, 타겟 핵산에서 뉴클레오타이드 변이를 동정하기 위한 키트.

청구항 144.

상기 제 69 항에 기재된 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 쌍을 포함하는, 타겟 핵산에서 변이유발하기 위한 키트.

청구항 145.

삭제

명세서

기술분야

본 발명은 어닐링 조절 프라이머 및 그의 용도에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 핵산 증폭에서 어닐링 특이성 (specificity)을 개선하는 어닐링 조절 프라이머 및 핵산 증폭-관련 기술의 모든 분야에서의 그의 응용에 관한 것이다.

배경기술

핵산 증폭은 분자 생물학 분야에서 이용되는 다양한 방법에서 필수적인 과정이고, 이에 다양한 증폭 방법이 제시되었다. 예를 들어, Miller, H. I. 등 (WO 89/06700)은, 프로모터/프라이머 서열을 타겟 단일가닥 DNA ("ssDNA")에 혼성화시킨 다음 상기 서열의 많은 RNA 카피를 전사하는 과정을 포함하는 핵산서열 증폭 방법을 개시하고 있다. 다른 공지의 핵산 증폭 방법들은 전사 증폭 시스템을 포함한다 (Kwoh, D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:1173(1989); 및 Gingeras T.R. et al., WO 88/10315).

"디-올리고뉴클레오타이드" 서열을 갖는 핵산의 존재하에서 둘 또는 그 이상의 올리고뉴클레오타이드의 라이게이션을 하여 상기 디-올리고뉴클레오타이드를 증폭하는 방법도 공지되어 있고, (Wu, D.Y. et al., *Genomics* 4:560 (1989)), 상기 방법은 라이게이션 연쇄 반응 (LCR)이라 한다.

Davey, C. 등 (유럽특허출원 공개번호 제329,822호)은 단일가닥 RNA ("ssRNA"), ssDNA 및 이중가닥 DNA (dsDNA)를 순환적으로 합성하는 핵산 증폭 방법을 개시하고 있다. 상기 ssRNA는 첫 번째 프라이머 올리고뉴클레오타이드에 대한 첫 번째 주형이며, 이는 역전사 효소 (RNA-의존 DNA 중합효소)에 의해 연장된다. 이어, 상기 RNA는 리보뉴클레아제 H의 작용에 의해 DNA:RNA 이합체로부터 제거된다. 형성된 ssDNA는 두 번째 프라이머에 대한 두 번째 주형이 되며, 이는 RNA 중합효소 프로모터의 서열을 포함한다. 그런 다음, DNA 중합효소에 의해 상기 프라이머가 연장되며, 결과적으로 이중가닥 DNA ("dsDNA") 분자가 형성되며, 상기 분자는 상기 프라이머들 사이에 있는 원래의 RNA와 동일한 서열 및 한쪽 말단에 프로모터 서열을 갖게 된다. 상기 프로모터 서열은, 적합한 RNA 중합효소에 의해 많은 RNA 카피를 생성하는 데 이용될 수 있다. 상기 카피들은 상술한 사이클로 재진입하여 매우 빠른 증폭을 가능하게 한다.

중합효소 연쇄 반응 (이하, "PCR"이라 한다)으로 공지된 가장 많이 이용되는 핵산 증폭 방법은 이중가닥 DNA의 변성, DNA 주형에로의 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 어닐링 및 DNA 중합효소에 의한 프라이머 연장의 반복된 사이클 과정을 포함한다 (Mullis 등, 미국 특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호; Saiki et al. 1985). PCR에 이용되는 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 DNA의 반대쪽 가닥에 어닐링되도록 디자인되며, 프라이머의 DNA 중합효소-촉매 연장 생성물은 다른 프라이머를 위한 주형 가닥으로 작용한다. PCR 증폭 과정은 DNA 서열의 지수적 증가를 초래하며, 증폭된 DNA 서열의 길이는 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 5'-말단에 의해 결정된다.

핵산 증폭, 특히, PCR 증폭에서의 성공은 프라이머가 자신의 타겟 서열에만 어닐링하는 특이성에 의존하기 때문에, 상기의 분자 상호작용을 최적화하는 것이 중요하다. 프라이머가 그의 완전한 상보체에만 어닐링하는지 또는 하나 또는 그 이상의 미스매치 (mismatch) 뉴클레오타이드 서열을 갖는 서열에도 어닐링하는 지 여부는, 어닐링 온도에 따라 결정된다. 일반적으로, 어닐링 온도가 높으면, 완전한 매치 (match) 주형에 대한 프라이머의 특정 어닐링 가능성이 더욱 높아지고, 이에 타겟 서열만 증폭될 가능성이 더욱 높아진다. 어닐링 온도가 낮으면, 주형과 프라이머간의 보다 많은 미스매치에 대하여 내성 (tolerance)이 발생하고, 결국 비-타겟 서열에 대한 증폭이 증가한다. 어닐링 온도를 조절하면, 주형과 프라이머 사이의 페어링 특이성을 변화시킬 수 있다. 예를 들어, 하나의 프라이머만 존재하는 대조군에서 생성물이 발생한다면, 이러한 결과는 상기 단일 프라이머가 주형의 하나 이상의 부위에 어닐링한다는 것을 나타낸다. 이러한 경우, 어닐링 온도를

상승시키는 것이 바람직하다. 프라이머의 어닐링 특이성에 대한 어닐링 온도의 상기 효과를 고려하면, 어닐링 온도에 따라 프라이머 어닐링을 조절할 수 있어 프라이머 디자인에 무관하게 프라이머의 어닐링 특이성을 개선시킬 수 있는 어닐링 조절 프라이머 시스템에 대한 강한 요구가 있음을 알 수 있다.

어닐링 온도뿐만 아니라, 프라이머 길이, GC 양 및 PCR 생성물의 길이와 같이 프라이머 서치 파라미터들은 프라이머의 어닐링 특이성을 위해 고려되어야 한다. 만일, 상술한 파라미터를 만족하는 프라이머가 이용되면, 프라이머 어닐링은 특정화되며, 타겟 DNA 증폭에서 프라이머의 어닐링 특이성은 상당히 개선되며, 프라이머에 의해 초래되는 백그라운드 문제와 비-특이성 생성물의 문제가 해결된다. 잘 디자인된 프라이머는 비-특이성 어닐링 및 백그라운드 문제를 해결할 뿐만 아니라 RNA-PCR에서 cDNAs 또는 게놈 주형들을 구별할 수 있게 한다.

프라이머 어닐링 특이성을 개선하기 위하여 많은 방법들이 개발되었고, 이에 소망하는 생성물의 증폭이 가능하게 되었다. 예를 들어, 터치다운 PCR (Don et al., 1991), 핫 스타트 PCR (DAquila et al., 1991), 네스티드 PCR (Mullis and Faloona, 1987) 및 부스터 PCR (Ruano et al., 1989)이 있다. 다른 접근 방식도 보고되어 있는 데, 이들은 다양한 인헨서 화합물을 이용하여 PCR의 특이성을 개선한다. 상기 인헨서 화합물들은 반응의 효과적인 어닐링 온도를 증가시키는 화합물, DNA 결합 단백질 및 상업적으로 구입가능한 시약을 포함한다. 그러나, 모든 PCR에서 성공을 담보할 수 있는 마술적인 첨가제는 없으며, 또한 어닐링 온도와 같은 조건들이 다른 환경에서 다수의 다른 첨가제들에 대하여 시험하는 것은 매우 지루한 작업이다. 비록, 상술한 접근 방식들은 프라이머 어닐링 특이성을 개선하는 데 어느 정도 기여를 하지만, 상술한 방법들은 PCR 증폭에 이용되는 프라이머로부터 초래되는 문제점, 예컨대, 비-특이적 생성물 및 높은 백그라운드에 대한 근본적인 해결책은 되지 못한다.

많은 경우에 있어서, 프라이머 서열은 주형 서열에 대한 완전한 상보물이 되는 것을 요구하지 않는다. 주형과 완전하게 매치되어야 하는 프라이머의 부위는 3'-말단이며, 이는 상기 말단이 DNA 중합효소에 의해 연장되는 부위이기 때문이며, 이에 정확한 타겟 서열에 대한 어닐링 특이성을 담보하는 데, 상기 말단이 가장 중요하다. 프라이머의 5'-말단은 타겟 서열에 대한 어닐링의 특이성을 결정하는 데 덜 중요하며, 주형에 대하여 비상보적인 추가적인 서열, 예컨대, 제한효소 위치와 프로모터 서열을 운반하도록 변형될 수 있다 (McPherson and Moller 2000). 하기와 같이, 상술한 개념은 본 발명의 어닐링 조절 프라이머의 디자인에 적용된다.

PCR-관련 기술들은 타겟 DNA 서열의 증폭뿐만 아니라, 생물학과 의학의 연구 분야에서 다양한 응용과 방법에 널리 이용되고 있으며, 예컨대, 역전사 효소 PCR (RT-PCR), 분별 디스플레이 (Differential Display) PCR (DD-PCR), 공지 또는 미지의 유전자의 클로닝, cDNA 말단의 고속 증폭 (RACE) 및 PCR-관여 게놈 분석 (McPherson and Moller, 2000)이 있다. 다음은 PCR 응용의 대표적인 예들이다.

다양한 생리학적 또는 실험적 조건들 (예컨대, 분화, 암발생, 약물 처리) 하에서 세포에 의해 분별적으로 조절되는 유전자를 동정하기 위한 기술은 현대 생물학에서 매우 중요하게 되었다. 다양한 세포 종류 또는 세포 발달의 다양한 단계에서 유전자 발현의 차이를 스크리닝하기 위한 방법 중 하나는 분별 디스플레이 PCR (DD-PCR)이며, 이는 Liang과 Pardee에 의해 1992년에 제시되었다. 상기 방법은 10-mer 아비트러리 (arbitrary) 프라이머의 조합과 앵커 (anchored) cDNA 프라이머를 이용하며, 폴리(A) 테일로부터 유래되고 업스트림쪽으로 약 50-600 뉴클레오타이드가 연장된 단편을 생성한다. 3 앵커 올리고(dT) 프라이머와 짧은 5 아비트러리 프라이머를 이용함으로써, 트랜스크립톰 (transcriptome)의 서브세트들이 증폭되며, 생성된 cDNA 단편들은 변성 폴리아크릴아미드 겔에서 일반적으로 분리되며, 오토라디오그래프로 가시화된다.

상기 방법은 간단하고 신속하며, 총 RNA의 소량만을 요구하지만, 종래의 DD-PCR 방법은 많은 단점이 있다. 짧은 아비트러리 프라이머를 사용하기 때문에, 분별 밴딩 패턴은 종종 재현되지 않으며, 많은 실험실들은 재현가능한 결과를 얻는 데 상당한 어려움을 겪고 있다. 분별 디스플레이된 밴드의 최소 40%는 잘 훈련된 실험자에 의해서도 재현되지 않는다 (Bauer et al., 1994). 더욱이, 분별 발현의 패턴은 노던 블롯에서 재현되지 않으며, 위양 결과의 백분율은 90%까지 증가될 수 있다 (Sompayrac et al., 1995). 대체 방법에 따르면, 보다 더 긴, 예컨대, 20 베이스 길이의 랜덤 프라이머를 사용하는 데, 이 방법도 상술한 재현가능성의 문제를 만족할 정도로 해결하지는 못한다 (Ito et al., 1994). DD-PCR에서 낮은 재현가능성을 초래하는 다른 요인들로서, 밴딩 패턴을 얻기 위하여 사용되는 출발물질의 불충분한 양 및 매우 낮은 농도의 dNTP (2-5 μ M)가 있다 (Matz and Lukyanov, 1998). 또한, 상기 방법으로는 희귀 전사체를 검출하는 것이 어렵다 (Matz and Lukyanov, 1998). DD-PCR로부터 수득되는 cDNA 단편은 짧고 (전형적으로 100-500 bp) 3'-비번역 부위에 해당하는 유전자의 3'-말단에 해당하기 때문에, 상기 cDNA 단편은 종종 충분한 코딩 부위를 포함하지 않는다. 따라서, 상당한 서열 상동성, 유전자 분류에 대한 정보 및 기능의 추정이 없으며, 노동력이 많이 소요되는 전장 cDNA 스크링이 요구된다 (Matz and Lukyanov, 1998).

일반적으로 분별 디스플레이 방법은 변성 폴리아크릴아미드 겔을 이용하는 방사능 검출 기술을 이용한다. 반응 생성물의 방사능 검출은 분별 디스플레이의 이용을 적합한 시설을 갖춘 실험실로 제한한다. 장시간의 노출 시간 및 폴리아크릴아미드 겔로부터 목적의 밴드를 분리하는 문제는 분별 디스플레이 기술의 또 다른 문제점이다. 최근에 제안된 비방사능 분별 디스플레이 방법들은, 은 염색 (Gottschlich et al. 1997; Kociok et al., 1998), 형광-표지 올리고뉴클레오타이드 (Bauer et al. 1993; Ito et al. 1994; Luehrsen et al., 1997; Smith et al., 1997), 바이오틴화 프라이머의 이용 (Korn et al., 1992; Tagle et al., 1993; Rosok et al., 1996) 및 에티뮴 브로마이드-염색 겔 (Rompf and Kahl, 1997; Jefferies et al., 1998; Gromova et al., 1999)을 포함한다. 그러나, 이러한 방법들은 여전히 제한된 성공만을 보일뿐이다. 만일, 반응 생성물이 에티뮴 브로마이드-염색 아가로스 겔에서 간단하게 검출될 수 있고, 실험 결과가 재현가능하며 신뢰성이 있다면, DD-PCR 분석의 속도는 크게 증가할 것이고, 방사능의 이용도 피할 수 있다.

타겟 분별 디스플레이 (targeted differential display)라 통칭되는 다른 PCR-관련 접근 방법은, 보존적 단백질 도메인을 갖는 멀티유전자 패밀리의 멤버의 증폭을 가능하게 하는 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 이용한다. 유전자 패밀리는, 유전자 생성물에 의해 수행되는 특정 기능으로 특징되며, 구조적으로 하나 또는 그 이상의 보존적 부위 (도메인)를 공통적으로 갖는 유전자들의 군이다. 유전자 패밀리의 예는 MADS-박스, 호메오유전자 패밀리와 전사인자 패밀리를 포함한다. 사이클린, 사이토카인 및 글로빈 유전자 패밀리는 의학적 관심이 높은 유전자 패밀리아이다. Prosite 데이터베이스는 공통 도메인 및 서열 모티프를 갖는 단백질들의 목록을 제공한다. PCR에 이용되는 올리고뉴클레오타이드는 낮은 어닐링 온도에서 이용되는 특정 프라이머, 또는 보다 엄격한 조건에서 이용되는 축퇴성 (degenerate) 프라이머 혼합물이다 (Stone and Wharton, 1994). 그러나, 축퇴성 프라이머를 이용한 증폭은 다수의 문제점을 갖고 있으며, 최적화 과정을 요구한다. 과도한 비특이적 증폭을 피할 수 있게 어닐링 온도를 가능한 높게 유지하는 것이 중요하며, 경험적으로 출발온도는 55°C가 바람직하다. 축퇴성 프라이머들이 아미노산 서열 또는 보존적 도메인 서열에 기초하여 디자인되기 때문에, 일반적으로 상기 온도를 유지하는 것이 어렵다. 축퇴성 프라이머와 어닐링 온도 사이의 만족할만한 관련성을 만들기 위하여, 프라이머 디자인에 무관하게 어닐링 온도, 특히 68°C와 같은 고온을 수용할 수 있는 어닐링 조절 프라이머의 사용이 요구된다.

또 다른 PCR-관련 기술은 RNA 핑거프린팅을 위한 아비트러리 프라이밍 PCR (AP-PCR)이다. AP-PCR 방법의 장점은 간단성이다 (Welsh and McClelland, 1991; Williams et al., 1990). AP-PCR은 단일 프라이머 또는 프라이머의 한쌍을 이용하며, 상기 프라이머는 10-mer 또는 18-mer의 길이를 갖는다. 상기 방법은 하이브리드 세포주의 DNA 핑거프린트를 제공하거나 (Ledbetter et al., 1990) 특정 게놈 부위를 제공하기 위하여 (Welsh and McClelland, 1990; Williams et al., 1990), 사용되었다. 상기 방법은 박테리아, 균류 및 식물에서의 게놈 분석, 동정 및 군집 연구를 위한 매우 유용한 도구를 제공하며, 개체 분리물이 신속하게 비교 분석된다. 예를 들어, 상기 방법은 병원체를 동정하거나 특정 균주 또는 병원타입의 발생을 규명하는 도구로서 이용될 수 있다. 일반적으로, AP-PCR은, 주형의 부위로부터 DNA 합성을 개시할 때 단일 프라이머를 이용하며, 프라이머는 상기 부위에 불완전하게 매치된다. 이러한 과정이 작동되도록 하기 위하여, 초기 사이클, 일반적으로 처음 5번의 사이클 동안은 낮은 엄격 조건 (stringency, 37-50°C)에서 실시하여야 하며, 이 조건에서 프라이머는 게놈상의 불완전 위치에 어닐링된다. 이어, 상기 엄격조건은 증가되어 (55°C), 표준의 PCR 증폭 조건이 되며, 추가적인 30-35 사이클이 수행된다. AP-PCR은 명료한 결과가 요구되는 친자 시험과 같은 분야에는 추천되지 않으며, 이는 비친자 결과가 종종 나오기 때문이다. 네스티드 PCR을 포함하는 대체 AP-PCR 방법이 개발되기는 하였으나 (McClelland et al., 1993; Ralph et al., 1993), 재현가능성은 여전히 해결되지 않고 있다. 패턴은 날마다 또는 실험실마다 다르게 나온다 (Meunier and Grimont, 1993).

다른 PCR-관련 응용은 RACE (rapid amplification of cDNA end)이다. RACE는 mRNA의 5'- 또는 3'-말단에 해당하는 cDNA 부위를 증폭하는 과정으로서 (Frohman et al., 1988), 회귀 전사체를 성공적으로 분리하는 데 사용되고 있다. 부분적인 cDNA, 게놈 엑손 또는 펩타이드로부터 얻은 서열 데이터를 이용하여 유전자-특정 프라이머가 제작된다. 3' RACE에서, mRNA의 폴리A 테일은 PCR 증폭을 위한 프라이밍 위치로 이용된다. 올리고-dT 프라이머 및 역전사효소를 이용하여 mRNAs가 cDNAs로 전환된다. 유전자-특정 프라이머 및 폴리A 부위에 어닐링하는 프라이머를 이용하여 생성된 cDNAs가 직접적으로 PCR 증폭된다.

3' RACE에서의 원칙이 5' RACE에도 적용되지만, 폴리A 테일이 없다. 따라서, 다른 방법을 이용하여 cDNA의 5'-말단을 태깅함으로써 5' RACE를 수행한다 (Fromont-Racine et al., 1993; Schaefer, 1995; Franz et al., 1999). 호모폴리머 테일링 및 라이게이션 앵커 테일링과 같은 5' RACE을 위한 방법들은 첫 번째 가닥 cDNA 합성이 완료된 후 일련의 효소 반응을 요구한다 (Schaefer, 1995). 각각의 효소 과정은 실패를 도입하고 cDNA의 완전성을 파괴할 수 있는 가능성을 갖고 있다. 최근에, CapFinder (Chenchik et al., 1998; Chenchik et al. 미국 특허 제5,962,271호 및 제5,962,272호)로 통칭되는 대체방법이 개발되었다. 상기 기술은 역전사 효소의 이중 기능을 이용하며, 상기 기능 중 하나는 말단 전이효소 활성으로서 이에 의해 cDNA의 3'-말단에 비주형 뉴클레오타이드가 추가되며, 다른 기능은 주형 스위칭 활성으로서 이에 의해 주형이 두 번째 주형으로 스위칭된다. 이러한 특성들은, 레트로바이러스의 라이프 사이클 동안에 이용되는 것이다 (Clark,

1988; Kulpa et al., 1997). 물로니 뮤라인 류케미아 바이러스 (M-MLV) 역전사 효소 (RT)는, 망간 또는 고농도의 마그네슘의 존재 하에서, 새로 합성되는 cDNAs의 3'-말단에 4개의 비주형-유래 시토신 잔기를 종종 첨가한다 (Schmidt and Mueller, 1999). 상기 방법은 전장 cDNAs의 증폭을 가능하게 하며, 이는 완전한 (캡핑된) mRNA가 주형으로 작용하는 경우, M-MLV RT가 선호적으로 cDNA에 C 잔기를 첨가하기 때문이다.

그러나, 5'-RACE를 위한 CapFinder 기술은, cDNA 합성에서 이용되는 CapFinder 및 올리고-dT 프라이머의 오염으로부터 유래되는 DNA 스미어 (smear)와 같은 백그라운드 문제로부터 자유롭지 못하다 (Chenchik et al., 1998). 상기 프라이머는 반응 혼합물에 존재하는 모든 cDNA에 어닐링할 수 있기 때문에, 상기 프라이머의 잔여량은 높은 백그라운드 문제를 초래한다. 또한, 3'-RACE 및 전장 cDNA 증폭도 동일한 백그라운드 문제를 갖고 있는 데, 이는 cDNA 합성 과정에서 이용되는 프라이머의 오염 때문에 초래되며, 상기 프라이머는 PCR 반응에서 비-특정 산물을 생성한다 (Chenchik et al., 1998). 상기한 문제를 극복하기 위한 새로운 기술이 최근에 개발되었다. 그 중 한 기술은, 소망하지 않은 PCR 산물의 생성을 억제하는 스텝-아웃 PCR이다 (Matz et al., 1999). 그러나, 상기 기술은 단일 DNA가 아닌 DNA 스미어 문제를 여전히 갖고 있다 (Schramm et al., 2000). 또 다른 기술은, cDNA 합성과정에 이용되는 모든 오염물을 제거하는 과정 및 고상 cDNA 합성을 이용하는 것이다 (Schramm et al., 2000). 그러나, 이 방법의 주 단점은 고가이고, 시간이 많이 소용된다는 것이다. 따라서, cDNA 합성에 이용되는 올리고-dT 또는 CapFinder 프라이머와 같은 프라이머 오염으로부터 발생하는 문제점을 완벽하게 제거하면서도, 보다 효과적이고, 간단하며, 그리고 신속한 저가의 기술이 요구되고 있다.

RACE 기술뿐만 아니라, cDNA 라이브러리 구축을 위한 기술들에서, 유전자의 5'-말단은 cDNA 군집에서 과소 평가되는 경향이 있고, 이러한 경향은 cDNA 가닥 합성시에 폴리(dT) 프라이머가 이용되고 출발물질이 제한되는 경우에 특히 그러하다. 상기 문제를 해결하기 위하여 많은 기술들이 개발되었으나, 대부분의 기술들은 공통된 한계를 갖고며, 많은 고유의 문제점을 갖은 채로 전장 cDNAs 또는 5'-풍부화 (enriched) cDNAs를 생성하고 있다. 상기 기술들은 다수의 효소 과정을 요구하기 때문에 복잡하고 고가이며 시간 소요가 크고, 현저한 민감성을 나타내지 않는다 (Carninci et al., 1997; Suzuki et al., 1997; Guegler et al. 미국특허 제6,083,727호 및 제6,326,175호; Hayashizaki. 미국특허 제6,143,528호). 따라서, 전장 또는 5'-풍부화 cDNAs의 제조, 특히 한정된 출발물질을 가지고 제조하는 방법을 개선하기 위한 시도가 계속적으로 이루어지고 있다.

멀티플렉스 (multiplex) PCR은 PCR의 다른 변형 형태로서, 동일한 반응물에서 하나 이상의 프라이머쌍을 이용하여 하나 이상의 타겟 서열을 동시에 증폭할 수 있다. 1988년에 최초로 소개된 이후 (Chamberlain et al., 1988), 이 방법은, 유전자 결실의 분석 (Anonymous, 1992; Henegariu, et al., 1994), 변이 및 유전자다형성 분석 (Shuber et al., 1993; Mutirangura et al., 1993), 정량분석 (Zimmermann et al., 1996) 및 RNA 검출 (Zou et al., 1998)을 포함하는 DNA 분석의 다양한 분야에 성공적으로 이용되고 있다. 감염 질환의 분야에서, 이 기술은, 바이러스, 박테리아, 균류 및/또는 기생충의 동정을 하는 데 가치 있는 방법으로 평가되고 있다.

그러나, 멀티플렉스 PCR로부터 얻은 결과는, 증폭 과정의 인위적 요소 때문에 종종 복잡하게 나온다. 이러한 오류의 결과로서, 반응 실패에 의한 "위음" 결과 그리고, 가짜 생성물의 증폭과 같은 "위양" 결과를 포함하며, 상기 위양 결과는, 진실된 인지 서열과 관련되어 있지만 그와는 명백히 다른 서열에 프라이머가 어닐링하기 때문에 발생된다. 멀티플렉스 PCR에서, 프라이머는 그의 혼성화 카이네틱스 (kinetics)가 동일한 멀티플렉스 반응물에 이용되는 다른 프라이머의 혼성화 카이네틱스와 유사하도록 디자인되어야 한다. 어닐링 온도 및 프라이머 농도는 어느 정도 계산될 수 있지만, 일반적으로 조건들은 각각의 멀티플렉스 반응에 대하여 경험적으로 결정되어야 한다. 프라이머쌍이 증가될수록 비특이 프라이밍 가능성이 증가되기 때문에, 각각의 프라이머쌍을 추가할 때마다 조건들을 변형시켜야 한다. 더욱이, 반응물에 대한 경쟁 (예컨대, 프라이머의 고갈)으로부터 초래되는 인위적 요소는 멀티플렉스 PCR에서 더욱 증가되며, 동일하지 않게 증폭된 산물의 수율의 차이는 사이클이 진행될수록 더욱 커지기 때문이다. 따라서, 멀티플렉스 PCR의 반응 조건을 최적화하는 것은 인력과 시간이 많이 소요되는 작업이다. 서로 다른 멀티플렉스 PCR는 독특한 반응조건들을 갖기 때문에, 새로운 진단시험 방법의 개발은 비용을 많이 요구한다.

따라서, 사용되는 프라이머의 상이한 특성에 무관하게, 정교한 최적화 과정이 필요없이 멀티플렉스 PCR을 실시할 수 있는 프라이머에 대한 요구가 당업계에 있다. 또한, 다수의 증폭 산물 각각의 동일한 양을 동일 반응에서 동시에 생산하는 멀티플렉스 PCR을 가능하게 하는 프라이머에 대한 요구가 당업계에 있다.

단일염기다형성 (SNPs)은, 인간 게놈에서 가장 공통적으로 발견되는 유전자 변이이며, 질병-관련 좌위에 대한 마커 및 약리유전학 연구에 중요한 마커이다 (Landegren et al., 1998; Roses, 2000). SNPs는 인간 게놈에서 평균 1000 bp 당 하나의 비율로 발견되며, 총 3백만개 이상이 있을 것으로 추정된다. SNPs를 검출하기 위하여 다양한 기술들이 이용되고 있다. 그러나, DNA의 증폭이 주요한 장애요인이다. 가장 최근의 분석 방법은 각각의 타겟 SNP를 포함하는 시료 DNA의 단편의 많은 카피를 생성하는 단계를 포함한다. 전형적인 임상 시료에서 수집되는 DNA는 소량이기 때문에 상기 증폭 단계는 일

반적으로 필수적인 단계이다. 또한, 증폭은 분석의 시그널-to-노이즈 비율을 개선하여 검출의 신뢰성을 증가시킨다. 대부분의 게놈타이핑 기술은 PCR을 이용한 증폭을 이용한다. 가장 중요하게는, PCR 증폭의 특이성은 SNP 게놈타이핑에서 PCR의 응용에 필수적이다. 따라서, PCR의 특이성을 개선하는 방법을 SNP 게놈타이핑 분석에 적용하는 것은 유리한 것이다. 또한, 상기 방법이 단일 분석 세트에서 다수의 분석결과를 제공할 수 있다면 (멀티플렉스 분석), 이는 매우 바람직하다.

상술한 바와 같이, 개선을 위한 다양한 시도들이 이루어지고 있으나, 핵산 증폭, 특히 PCR 증폭 과정을 포함하는 모든 방법 및 기술들은, 이용되는 프라이머의 비특이성으로부터 야기되는 제한과 문제점, 예컨대, 위양결과, 재현가능성의 악화 및 높은 백그라운드 문제점으로부터 완전히 자유롭지 못한 실정이다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 특허문헌 및 논문이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 특허문헌 및 논문의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 상세한 설명

종래의 프라이머 및 핵산 증폭이 관여하는 다양한 방법들의 문제점을 해결하고자 예의 연구 노력한 결과, 본 발명자는 크게 개선된 특이성을 가지는 핵산 증폭을 가능하게 하며, 핵산 증폭-관여 기술의 모든 분야에 무제한적으로 응용될 수 있는 신규한 어닐링 조절 프라이머를 개발하였다.

따라서, 본 발명의 목적은 핵산 증폭에서 어닐링 특이성을 개선하기 위한 어닐링 조절 프라이머를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 DNA 또는 핵산 혼합물 주형의 핵산 서열을 증폭하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 DNA 또는 핵산 혼합물 주형으로부터 타겟 핵산 서열을 선택적으로 증폭하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 mRNA로부터 타겟 핵산 서열을 선택적으로 증폭하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 둘 또는 그 이상의 핵산 시료 내의 분별적으로 발현되는 mRNA에 상보적인 DNA를 검출하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 mRNA의 3'-말단 부위에 상당한 (corresponding) cDNA 부위를 포함하는 타겟 cDNA 단편의 고속 증폭방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 mRNA의 5'-말단 부위에 상당한 cDNA 부위를 포함하는 타겟 cDNA 단편의 고속 증폭방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 mRNAs에 상보적인 전장 이중쇄 cDNAs의 군집 (population)을 증폭하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 mRNAs에 상보적인 5'-풍부화 (5'-enriched) 이중쇄 cDNAs를 증폭하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 2개 이상의 타겟 뉴클레오타이드 서열을 동시에 증폭하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 gDNA의 DNA 핑거프린트를 생성하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 mRNA 시료의 RNA 핑거프린트를 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 멀티유전자 패밀리의 보존성 호몰로지 단편 (conserved homology segments)을 동정하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 타겟 핵산 내의 뉴클레오타이드 변이를 동정하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 타겟 핵산에서 변이유발 (mutagenesis)하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 어닐링 조절 프라이머를 포함하는 키트를 제공하는 데 있다.

본 발명의 목적은 핵산 증폭 과정이 관여하는 다양한 방법에 이용되는 키트를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 핵산 증폭 관여 프로세스를 위한 어닐링 조절 프라이머의 용도를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

본 발명은 (a) 핵산 증폭의 특이성 (specificity)을 개선하기 위한 어닐링 조절 프라이머 및 (b) 그의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 어닐링 조절 프라이머 (annealing control primer, 이하, "ACP"라 한다)는, 어닐링 온도에 따라 프라이머 어닐링을 조절할 수 있고, 이에 핵산 증폭 (특히, PCR)의 특이성을 크게 개선시킬 수 있다. ACP의 원리는 최소 하나의 유니버설 염기 (universal base) 또는 비-구별성 염기 유사체 (non-discriminatory base analog)에 의해 분할된 명백한 3'- 및 5'-말단 부위를 갖는 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 구성에 있다. 본 발명자는 3'- 및 5'-말단 부위 사이에 위치한 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체가, 핵산 증폭 과정 동안에 어닐링 온도에 따라 주형 핵산에 프라이머가 어닐링하는 것을 조절하는 조절자로서의 역할을 수행한다는 것을 발견하였다. 3'- 및 5'-말단 부위 사이에 위치하는 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체의 존재는, 특정 온도에서 프라이머 어닐링을 3'-말단 부위로 한정할 뿐만 아니라 5'-말단 부위의 어닐링을 방해하며, 이는 결국 어닐링 특이성을 크게 개선하는 결과를 초래한다. ACP의 3'- 및 5'-말단 부위 사이에 위치한 유니버설 염기는 각각의 부위를 한정하도록 디자인된다. 이러한 이유 때문에, 핵산 증폭 동안에 특정한 엄격 (stringency) 조건 하에서 프라이머 어닐링 특이성을 개선하는 작용의 관점에서, 본 발명의 ACP는 종래의 프라이머와 근본적으로 상이하다.

본 발명의 ACP는 핵산 증폭-관여 응용분야에 매우 효과적이며 광범위하게 이용될 수 있다. 또한, 종래의 PCR 기술들에서의 프라이머 어닐링 특이성과 관련된 다양한 문제점들이 ACP에 의해 근본적으로 해결될 수 있다. 핵산 증폭 (특히, PCR)에서 ACP 이용에 의해 얻을 수 있는 주요한 혜택은 다음과 같다:

(a) 3'- 및 5'-말단 부위 사이에 위치한 유니버설 염기 잔기군의 존재는, 3'-말단 부위가 주형과 어닐링되는 조건하에서, 프라이머 어닐링 부위를 3'-말단 부위로 한정하기 때문에, 프라이머의 어닐링 서열은 정확하게 조절되며, 이는 소망하는 길이의 어닐링 서열을 갖는 프라이머의 제작을 가능하게 한다. 이와 같은 특성은, 프라이머의 어닐링 부위가 제한적이어야 하는 경우 (예컨대, 단일뉴클레오타이드 다형성 (SNP) 유전형결정, DNA 마이크로어레이 스크리닝, 및 분별적으로 발현되는 유전자의 검출), 특히 유용하다.

(b) 3'- 및 5'-말단 부위 사이에 위치한 유니버설 염기 잔기군의 존재는, 3'-말단 부위가 주형과 어닐링되는 조건하에서, 5'-말단 부위가 주형에 어닐링되는 것을 방해하며, 결국 어닐링에 관여하지 않는 5'-말단 부위는 3'-말단 부위에 어닐링 특이성을 제공한다.

(c) 프라이머 어닐링의 특이성은 단일 염기 미스매칭 (mismatching)을 검출할 수 있을 정도로 매우 높다. 따라서, 타겟 (target) 핵산내의 뉴클레오타이드 변이, 예컨대, 단일뉴클레오타이드 다형성 및 점돌연변이를 동정하는 데 매우 유용하다.

(d) ACP는 프라이머 디자인에 있어서의 "프라이머 서치 변수" (예컨대, 프라이머 길이, 어닐링 온도, GC 양 및 PCR 산물 길이)에 대한 높은 관용성 (tolerance)을 갖게 한다.

(e) ACP 시스템은 두-단계 PCR 증폭 (two-stage PCR amplifications)을 제공하여 비특이성 증폭이 배제된 산물을 제공한다.

(f) PCR 증폭의 효율이 증가하여, 희귀 mRNAs의 검출을 용이하게 한다.

(g) PCR 산물의 재현성을 증가시켜, 시간 및 비용을 크게 절약하게 한다.

ACP의 원리

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 혼성화될 주형 핵산의 하나의 위치에 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 갖는 3'-말단 부위; (b) 전-선택 아비트러리 (arbitrary) 뉴클레오타이드 서열을 갖는 5'-말단 부위; 및 (c) 상기 3'-말단과 5'-말단 사이에 위치해 있고 최소 하나의 유니버설 염기 (universal base) 또는 비-구별성 염기 유사체 (non-discriminatory base analog)를 포함하며, 어닐링 온도에 따라 상기 프라이머의 어닐링 부위를 조절하는 조절자 부위를 포함하는 핵산 증폭에서 어닐링 특이성을 개선하기 위한 어닐링 조절 프라이머를 제공한다.

ACP의 원리는 최소 하나의 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체에 의해 분리된 명백한 3'- 및 5'-말단 부위를 갖는 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 조성, 그리고 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 있어서 3'- 및 5'-말단 부위에 대한 조절자 부위의 영향에 있다. ACP의 3'- 및 5'-말단 부위 사이에 있는 최소 하나의 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체를 포함하는 조절자 부위의 존재는, 프라이머 어닐링 특이성의 개선을 초래하는 주요소이다.

용어 "주형"은 핵산을 나타낸다. 용어 "핵산"은 단일쇄 또는 이중쇄 형태의 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 중합체 (자연 뉴클레오타이드의 공지 유사체 포함)이다. 따라서, 본 발명의 ACP는 단일쇄 또는 이중쇄 gDNA, cDNA 또는 mRNA 주형을 이용한 핵산 증폭에 이용될 수 있다. 본 발명의 프라이머와 관련하여 사용되는 용어 "부위 (portion)"는 조절자 부위에 의해 분리된 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 용어 "3'-말단 부위" 또는 "5'-말단 부위"는 조절자 부위에 분리된, 본 발명 프라이머의 3'-말단 또는 5'-말단에 있는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "프라이머"는 합성 또는 자연의 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머는 핵산쇄 (주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합체의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용한다. 증폭의 최대 효율을 위하여, 바람직하게는 프라이머는 단일쇄이다. 바람직하게는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드이다. 본 발명의 프라이머는 자연 (naturally occurring) dNMP (즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 프라이머는, 중합체의 존재하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, 용융분야 및 프라이머의 소스 (source)에 따라 결정된다. 용어 "어닐링" 또는 "프라이밍"은 주형 핵산에 올리고디옥시뉴클레오타이드 또는 핵산이 병치 (apposition)되는 것을 의미하며, 상기 병치는 중합효소가 뉴클레오타이드를 중합시켜 주형 핵산 또는 그의 일부분에 상보적인 핵산 분자를 형성하게 한다.

ACP의 3'-말단 부위는 타겟 핵산 분자에 어느 한 위치에 실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 프라이머와 관련하여 사용되는 용어 "실질적으로 상보적인 (substantially complementary)"은 소정의 어닐링 조건하에서 프라이머가 주형 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 어닐링된 프라이머는 중합효소에 의해 연장되어 주형의 상보체를 생성한다. 따라서, 상기 용어는 용어 "완전히 상보적인 (perfectly complementary)" 또는 이와 관련된 용어와 다른 의미를 갖는다. ACP의 3'-말단 부위는, ACP가 프라이머로서의 작용을 할 수 있는 범위 내에서, 주형에 대한 하나 또는 그 이상의 미스매치를 가질 수 있다는 것은 당연하다. 가장 바람직하게는, ACP의 3'-말단 부위는 주형의 한 위치에 완전히 상보적인, 즉 미스매치되는 서열이 없는 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

ACP의 3'-말단 부위는, 주형 서열 및 응용분야에 따라 다양한 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, ACP가 역전사 과정을 포함하는 방법 (예컨대, 분별 디스플레이 PCR, RACE, 전장 cDNA의 증폭, 핑거프린팅, 보존성 호몰로지 단편 등)에 적용되는 경우, 3'-말단 부위는 mRNA의 폴리아데노신 (폴리 A) 테일에 혼성화되는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있으며, 바람직하게는, 최소 8개의 디옥시티미딘 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 최소 10개의 디옥시티미딘 뉴클레오타이드 및 가장 바람직하게는 최소 10개의 연속적인 디옥시티미딘 뉴클레오타이드를 갖는다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상술한 역전사-관여 프로세스에 있어서, ACP의 3'-말단 부위는 그의 3'-말단에 3'-V를 갖는 최소 10개의 연속적인 디옥시티미딘 뉴클레오타이드를 가지며, 상기 V는 디옥시아데노신, 디옥시시티딘 및 디옥시구아노신으로 구성된 군으로부터 선택된다. 다른 구현예에 따르면, 상기 3'-말단 부위는 그의 3'-말단에 3'-NV를 갖는 최소 10개의 연속적인 디옥시티미딘 뉴클레오타이드를 가지며, 상기 V는 디옥시아데노신, 디옥시시티딘 및 디옥시구아노신으로 구성된 군으로부터 선택되고, 상기 N은 디옥시아데노신, 디옥시티미딘, 디옥시시티딘 및 디옥시구아노신으로 구성된 군으로부터 선택된다.

또한, ACP가 타겟 핵산 서열의 증폭에 이용되는 경우, 그의 3'-말단 부위는 타겟 서열에 실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하며; 분별 디스플레이 PCR에 이용되는 경우, 3'-말단 부위는 mRNA로부터 형성된 cDNA의 한 위치에 실질적으로 상보적인 아비트러리 서열을 포함하며; RACE에 이용되는 경우, 3'-말단 부위는 mRNA로부터 형성된 cDNA의 한 위치에 실질적으로 상보적인 유전자-특이 서열을 포함하며; 5'-풍부화 (enriched) cDNAs의 증폭에 이용되는 경우, 3'-말단 부위는 mRNAs 내의 위치에 실질적으로 상보적인 최소 6개의 뉴클레오타이드를 포함하는 랜덤 서열을 포함하며; 보존성 호몰로지 단편의 동정에 이용되는 경우, 3'-말단 부위는 유전자 패밀리의 컨센서스 서열에 실질적으로 상보적인 뉴

클레오타이드 서열 또는 전결정된 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드들의 복수의 조합으로부터 선택되는 축퇴성 서열 (degenerate sequence)을 포함하고; 타겟 핵산 내의 뉴클레오타이드 변이 (예컨대, 대립유전자위)의 동정에 이용되는 경우, 3'-말단 부위는 뉴클레오타이드 변이에 상당한 (corresponding) 뉴클레오타이드에 상보적인 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

용어 "아비트러리 (arbitrary)" 뉴클레오타이드 서열은 증폭될 타겟 핵산의 서열에 대한 정보 없이 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 용어 아비트러리는 용어 "랜덤"과 혼동되어서는 안되며, "랜덤" 프라이머는 서로 상이한 랜덤 서열을 갖는 프라이머들의 랜덤 군집으로 구성된 프라이머를 의미한다. 보존성 호몰로지 단편의 동정에 ACP가 이용되는 것과 관련하여 사용되는 용어 "축퇴성" 서열은 아미노산 서열로부터 번역되는 뉴클레오타이드 서열을 의미하며, 상기 축퇴성 서열은 유전자 코돈의 축퇴성 때문에 하나의 아미노산 서열로부터 뉴클레오타이드 서열의 풀 (pool)을 형성한다.

ACP의 바람직한 구현예에 따르면, 5'-말단 부위의 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열은 주형 핵산상의 어떠한 위치에 대하여도 실질적으로 상보적이지 않다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 어닐링 조절 프라이머는 일반식 5'-X_p-Y_q-Z_r-3'으로 표현되며, 상기 X_p는 주형 핵산의 어떤 위치에 대하여도 실질적으로 상보적이지 않은 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 갖는 5'-말단 부위를 나타내며; 상기 Y_q는 최소 하나의 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체를 포함하는 조절자 부위를 나타내고; 상기 Z_r는 주형 핵산의 한 위치에 실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 3'-말단 부위를 나타내며; 상기 p, q 및 r은 뉴클레오타이드의 수이고; 상기 X, Y 및 Z는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이다.

최소 하나의 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체를 포함하는 상기 조절자 부위는, 핵산 증폭 과정에서 어닐링 온도의 변화와 관련하여 ACP의 주기능을 가능하게 한다. 용어 "유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체"는 자연의 DNA/RNA 염기들에 대하여 구별 없이 자연의 DNA/RNA 염기들의 각각과 염기쌍을 형성할 수 있는 것을 의미한다.

축퇴성 프라이머에서 불확실한 위치의 뉴클레오타이드가 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체에 의해 치환되는 것은 공지된 사실이며, 상기 유니버설 염기는 디옥시이노신 (Ohtsuka et al, 1985; Sakanari et al., 1989), 1-(2'-디옥시-베타D-리보푸라노실)-3-니트로피롤 (Nichols et al., 1994) 및 5-니트로인돌 (Loakes and Brown, 1994)을 포함하며, 상기 염기들은 4종의 종래 염기들과 비특이적으로 염기쌍을 이루기 때문에 축퇴성 프라이머의 디자인과 관련된 문제점을 해결하는 데 이용된다. 그러나, 디옥시이노신, 1-(2'-디옥시-베타D-리보푸라노실)-3-니트로피롤 및 5-니트로인돌과 같은 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체가 PCR 과정에서 프라이머 어닐링의 특이성을 증가시킬 수 있다는 연구는 아직까지 없다.

프라이머 내에 디옥시이노신, 1-(2'-디옥시-베타D-리보푸라노실)-3-니트로피롤 및 5-니트로인돌과 같은 유니버설 염기의 존재는, 염기쌍에서의 약한 수소결합 결합 때문에, 낮은 어닐링 온도를 초래한다. 이러한 이론을 확장하여, 본 발명자는, 프라이머의 3'말단 및 5'-말단 사이에 위치한 연속적인 유니버설 염기는 낮은 용해온도를 갖는 부분을 형성시키며, 상기 부분은 프라이머의 3'- 및 5'- 말단 부위 각각에 경계를 형성시키며, 각 부위의 어닐링에 영향을 미칠 것이라는 추론을 하였다. 이러한 이론은 본 발명의 어닐링 조절 프라이머의 기초를 제공한다.

바람직한 구현예에서, ACP는, 3'- 및 5'-말단 부위 사이에 최소 2개, 보다 바람직하게는 최소 3개의 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체 잔기를 포함한다. 유리하게는, 3'- 및 5'-말단 부위 사이의 유니버설 염기는 최대 15 잔기의 길이를 갖는다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, ACP는 2-15개의 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체 잔기를 포함한다. 가장 바람직하게는, 3'- 및 5'-말단 부위 사이의 유니버설 염기는 약 5 잔기의 길이를 갖는다.

유니버설 염기의 최적 수, 즉 5 잔기를 고려하면, 특정 어닐링 온도에서 핵산 증폭 과정에서 주형에 5'-말단 부위가 어닐링 되는 것을 억제하기 위하여, ACP의 3'- 및 5'-말단 부위 사이의 유니버설 염기의 최소의 수가 바람직하다. 프라이머 서열에서 유니버설 염기의 길이 (8-10개의 염기)는 ACP에서 유니버설 염기의 기능에 크게 영향을 미치지 않는다.

3'- 및 5'-말단 서열 사이의 유니버설 염기 잔기의 이용은 본 발명의 주 특징으로서, 상기 유니버설 염기 잔기는 각각의 부위 (3'- 및 5'-말단)에, 핵산 증폭, 예컨대, PCR에서 어닐링 온도에 따른 어닐링 특이성을 제공한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 조절자 부위의 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체는 디옥시이노신, 이노신, 7-디아자-2'-디옥시이노신 (7-deaza-2'-deoxyinosine), 2-아자-2'-디옥시이노신, 2'-OMe 이노신, 2'-F 이노신, 디옥시 3-니트로피롤, 3-니트로피롤, 2'-OMe 3-니트로피롤, 2'-F 3-니트로피롤, 1-(2'-디옥시-베타-D-리보푸라노실)-3-

니트로피콜, 디옥시 5-니트로피콜, 5-니트로인돌, 2'-OMe 5-니트로인돌, 2'-F 5-니트로인돌, 디옥시 4-니트로벤즈이미다졸, 4-니트로벤즈이미다졸, 디옥시 4-아미노벤즈이미다졸, 4-아미노벤즈이미다졸, 디옥시 네불라린 (deoxy nebularine), 2'-F 네불라린, 2'-F 4-니트로벤즈이미다졸, PNA-5-인트로인돌, PNA-네불라린, PNA-이노신, PNA-4-니트로벤즈이미다졸, PNA-3-니트로피콜, 모르포리노-5-니트로인돌, 모르포리노-네불라린, 모르포리노-이노신, 모르포리노-4-니트로벤즈이미다졸, 모르포리노-3-니트로피콜, 포스포라미데이트-5-니트로인돌 (phosphoramidate-5-nitroindole), 포스포라미데이트-네불라린, 포스포라미데이트-이노신, 포스포라미데이트-4-니트로벤즈이미다졸, 포스포라미데이트-3-니트로피콜, 2'-O-메톡시에틸 이노신, 2'-O-메톡시에틸 네불라린, 2'-O-메톡시에틸 5-니트로인돌, 2'-O-메톡시에틸 4-니트로-벤즈이미다졸, 2'-O-메톡시에틸 3-니트로피콜 및 상기 염기의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 바람직하게는, 상기 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체는 디옥시이노신, 이노신, 1-(2'-디옥시-베타-D-리보푸라노실)-3-니트로피콜 또는 5-니트로인돌이며, 가장 바람직하게는 디옥시이노신이다.

본 발명의 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 바람직한 길이는, 소망하는 어닐링 특이성 및 주형에 혼성화되는 데 필요한 소망하는 특이성을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 수에 의해 결정된다. 예를 들어, 20개 뉴클레오타이드의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 10개 뉴클레오타이드의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 보다 특이성이 높으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 뉴클레오타이드를 첨가하면 할수록 주형에 대한 프라이머의 어닐링 온도가 증가하기 때문이다.

ACP의 3'- 및 5'-말단 부위 서열의 길이는, ACP를 이용하는 각각의 응용 분야에서의 목적에 부분적으로 의존한다. 바람직한 구현예에서, ACP의 3'-말단 부위의 길이는 최소 6 뉴클레오타이드이며, 상기 길이는 프라이머 어닐링에 있어서 최소 길이 요건으로 판단된다. 보다 바람직하게는, 3'-말단 부위 서열의 길이는 10-25 뉴클레오타이드이고, 최대 60 뉴클레오타이드까지이다. 다른 구현예에서, ACP의 3'-말단 부위는 디옥시리보뉴클레오타이드뿐만 아니라 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.

본 발명의 다른 바람직한 구현예에서, ACP의 5'-말단 부위의 길이는 최소 15 뉴클레오타이드이고, 상기 길이는 고염격 (high stringent) 조건 하에서 어닐링에 필요한 최소 길이 요건으로 판단된다. 바람직하게는, 5'-말단 부위 서열의 길이는 최대 60 뉴클레오타이드이다. 보다 바람직하게는, 5'-말단 부위 서열의 길이는 6-50 뉴클레오타이드이고, 가장 바람직하게는, 20-25 뉴클레오타이드이다. 전체 ACP의 길이는 35-50 뉴클레오타이드이고, 최대 100 뉴클레오타이드이다.

ACP의 5'-말단 부위는, 주형 핵산상의 어떠한 위치에 대하여도 실질적으로 상보적이지 않은 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 상기 뉴클레오타이드 서열은 후속의 증폭 과정에서 프라이밍 위치로서 작용할 수 있다. 용어 "전-선택 아비트러리 (pre-selected arbitrary)" 뉴클레오타이드 서열은 자연 또는 변형 뉴클레오타이드의 특정 서열을 포함하는, 특정된 또는 전-선택된 디옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드 또는 혼합 디옥시리보뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 본 발명의 일 구현예에서, 5'-말단 부위의 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열은 T3 프로모터 서열, T7 프로모터 서열, SP6 프로모터 서열 및 M13 전방향 또는 역방향 유니버설 서열과 같은 유니버설 프라이머 서열을 포함할 수 있다. ACP의 5'-말단 부위에 긴 아비트러리 서열 (약 25 내지 60 염기)을 이용하면, ACP의 효율이 감소되고, 짧은 서열 (약 15 내지 17 염기)을 이용하면, 고염격 조건에서의 어닐링 효율이 감소된다. ACP의 5'-말단 부위에 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 후속의 증폭 과정에서 프라이밍 위치로 이용하는 것은 본 발명의 또 다른 주요한 특징이다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, ACP의 이점, 즉 어닐링 특이성의 개선이 손상되지 않는 범위내에서, ACP의 5'-말단 부위를 변형할 수 있다. 예를 들어, 5'-말단 부위는 제한효소(들) 인식 서열(들)을 포함할 수 있으며, 상기 서열은 증폭 산물이 적합한 벡터 내로 클로닝하는 것을 용이하게 한다. 또한, 5'-말단 부위는 증폭 산물의 검출 또는 분리용 표지를 갖는 최소 하나의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 적합한 표지는 형광단, 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소, 매스 표지, 전자밀집입자, 효소, 조인자, 효소에 대한 기질, 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디옥시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 헵텐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 5'-말단 부위는 박테리오파아지 RNA 중합효소 프로모터 부분을 포함할 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, ACP는 PCR에 적용된다. 보다 바람직하게는, PCR은 제1차 어닐링 온도 및 제2차 어닐링 온도, 즉 상이한 염격 조건 하에서 실시된다. 제1차 어닐링 온도는 제2차 어닐링 온도와 동일하거나 낮으며, 바람직하게는 제2차 어닐링 온도는 제1차 어닐링 온도보다 높다. 상이한 두 어닐링 온도에서 실시되는 PCR 과정, 즉 두-단계 PCR에서, ACP의 3'-말단은 제1차 어닐링 온도에서의 어닐링에 참여하고, 제1단계 증폭의 생성물에 삽입된 ACP의 5'-말단은 제2차 어닐링 온도에서 프라이밍 위치로 작용한다. 이러한 경우에 있어서, ACP의 이점은 다음과 같다:

(1) ACP의 조절자 부위는 최소 하나의 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체를 포함하고 상기 조절자 부위는 염기쌍에서 약한 수소결합 상호작용 때문에 ACP에서 다른 부위들보다 낮은 T_m 을 갖기 때문에, 제1차 어닐링 온도에서 주형의

한 위치에 ACP의 3'-말단 부위가 어닐링하는 조건 하에서, ACP의 조절자 부위는 주형 핵산에 어닐링 되는 경향이 낮다. 따라서, ACP의 3'- 및 5'-말단 부위 사이에 최소 하나의 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체를 포함하는 조절자 부위의 존재는 제1차 어닐링 온도에서 프라이머 어닐링 부위를 3'-말단 부위로 한정하게 되며,

(2) 제1차 어닐링 온도에서 어닐링에 참여하지 않는 5'-말단 부위는 3'-말단 부위가 주형에 어닐링되는 것을 방해하는 작용을 하고,

(3) 따라서, 제1차 어닐링 온도의 조건 하에서, 3'-말단 부위 서열의 특이적 어닐링이 발생하는 세기는 비특이적 어닐링이 발생하는 세기보다 강하며, 결국 3'-말단 부위에서의 프라이머 어닐링 특이성이 개선되고,

(4) 5'-말단 부위 서열이 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 경우, 3'-말단 부위 서열의 어닐링 및 연장에 의해 생성된 반응 산물의 후속 증폭에서, 상기 5'-말단 부위는 제1차 어닐링 온도보다 높은 제2차 어닐링 온도, 즉 고염격 조건에서, 프라이밍 위치로 작용을 하며;

(5) 결과적으로, 제2차 어닐링 온도에서 각각의 PCR 사이클에 대하여 반응산물의 2배 증가의 이론적 값에 근접된 수준으로, 3'-말단 부위 서열의 어닐링 및 연장에 의해 생성된 반응 산물만이 증폭된다.

따라서, ACP의 3'-말단 부위는 제1차 어닐링 온도에서만 주형에 대한 어닐링 위치로 작용하며, 3'-말단 부위 서열의 어닐링 및 연장에 의해 생성된 반응 산물의 후속 증폭을 위한 제2차 어닐링 온도에서 5'-말단 부위는 프라이밍 위치로 작용한다.

본 발명의 ACP는 프라이머-관여 핵산 증폭을 위한 다양한 방법, 예컨대, Miller, H. I. (WO 89/06700)와 Davey, C. 등 (EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응 (LCR, Wu, D.Y. et al., *Genomics* 4:560 (1989)), 중합효소 리가아제 연쇄 반응 (Barany, PCR Methods and Applic., 1:5-16(1991)), Gap-LCR (WO 90/01069), 교정 연쇄 반응 (EP 439,182), 3SR (Kwong et al., *PNAS, USA*, 86:1173(1989)) 및 NASBA (미국 특허 제5,130,238호)에 매우 유용하다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 프라이머 또는 프라이머 세트를 포함하는 키트를 제공한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 키트는 ACP의 5'-말단 부위에 상당한 (corresponding) 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머 또는 프라이머쌍을 추가적으로 포함하며; 5'-말단 부위가 유니버설 프라이머 서열을 포함하는 경우, 보다 바람직하게는 본 발명의 키트는 유니버설 프라이머를 포함한다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 PCR 반응에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소, DNA 중합효소 조인자 및 디옥시리보뉴클레오타이드-5'-트리포스페이트를 포함할 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 다양한 폴리뉴클레오타이드 분자, 역전사 효소, 다양한 완충액 및 시약, DNA 중합효소의 활성을 억제하는 항체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 포지티브 및 네가티브 대조군 반응을 수행하는 데 필요한 시약을 포함할 수 있다. 특정 반응에서 이용되는 시약의 최적양은 본 명세서의 내용을 파악한 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 키트는 분리된 패키지 또는 구획에 상술한 성분들을 포함한다.

본 발명의 ACP는 다양한 핵산 증폭-관련 기술들에 적용될 수 있다. ACP의 우수한 효과가 나타나는 대표적인 예는 다음과 같다:

I. 핵산 서열의 증폭;

II. 타겟 핵산 서열의 증폭;

III. 멀티플렉스 DNA 증폭;

IV. 분별 발현 (differentially expressed)되는 유전자의 동정;

V. cDNA 말단의 고속 증폭 (RACE);

VI. 전장 cDNA의 증폭;

VII. 5'-풍부화 cDNA의 증폭;

VIII. DNA 또는 RNA 핑거프린팅;

IX. 멀티유전자 패밀리의 보존성 호몰로지 단편의 동정;

X. 뉴클레오타이드 서열 변이의 동정;

XI. 변이유발; 및

XII. 다른 응용분야

I. (타깃) 핵산 서열의 증폭에의 응용

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 DNA 또는 핵산 혼합물의 핵산 서열을 증폭하는 방법에 있어서, 상기 방법은 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상술한 ACPs 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, ACP의 구조에 따른 프라이머의 3'-말단 부위는 혼성화될 핵산 서열의 한 부위와 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖는다.

본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함하는 DNA 또는 핵산 혼합물의 핵산 서열을 증폭하는 방법을 제공한다:

(a) 상술한 ACP 중 어느 한 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 프라이머 각각은 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 핵산 서열의 한 부위와 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 핵산 서열의 상기 부위와 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 상기 핵산 서열의 증폭 산물이 생성되는, 제1차 어닐링 온도에서 상기 핵산 서열의 제1단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,

(b) 단계 (a)에 이용된 프라이머와 동일한 프라이머 또는 단계 (a)에서 이용된 프라이머의 5'-말단 부위에 상당한 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 증폭 산물의 3'- 및 5'-말단에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 증폭 산물이 재증폭되는, 고엄격 (high stringent) 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (a)의 증폭 산물의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

본 발명의 방법이 타깃 (target) 핵산 서열을 증폭하는 데 이용되는 경우, 이용되는 프라이머쌍의 3'-말단 부위는 혼성화되는 타깃 핵산 서열의 한 부위와 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖는다. 따라서, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 DNA 또는 핵산 혼합물로부터 타깃 핵산 서열을 선택적으로 증폭하는 방법에 있어서, 상기 방법은 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 ACP로부터 유래된 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, ACP의 구조에 따른 프라이머의 3'-말단 부위는 혼성화될 타깃 핵산 서열의 한 부위와 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖는다.

본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 또는 핵산 혼합물로부터 타깃 핵산 서열을 선택적으로 증폭하는 방법을 제공한다:

(a) 상술한 ACP 중 어느 한 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 프라이머 각각은 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 타깃 핵산 서열의 한 부위와 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 타깃 핵산 서열과 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 상기 타깃 핵산 서열의 증폭 산물이 생성되는, 제1차 어닐링 온도에서 상기 타깃 핵산 서열의 제1단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,

(b) 단계 (a)에 이용된 프라이머와 동일한 프라이머 또는 단계 (a)에서 이용된 프라이머의 5'-말단 부위에 상당한 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 증폭 산물의 3'- 및 5'-말단에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 증폭 산물이 재증폭되는, 고엄격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (a)의 증폭 산물의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

증폭되는 주형이 mRNA인 경우, cDNA 제조가 증폭에 앞서 필요하다. 따라서, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명은 mRNA로부터 타깃 핵산 서열을 선택적으로 증폭하는 방법에 있어서, 상기 방법은 mRNA의 역전사 단계 및 프라이머를 이

용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상술한 ACP로부터 유래된 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, ACP의 구조에 따른 프라이머의 3'-말단 부위는 혼성화되는 타겟 핵산 서열의 한 부위와 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖는다.

본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 mRNA로부터 타겟 핵산 서열을 선택적으로 증폭하는 방법을 제공한다:

(a) 주형 유도 효소적 디옥시리보핵산 합성을 발생하는 데 충분한 조건 하에서, 상기 mRNA의 폴리A 테일에 혼성화되는 올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머에 상기 mRNA를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNA를 역전사하여 상기 올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNA에 상보적인 제1차 DNA쇄를 생성하는 단계;

(c) 상술한 ACP의 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 프라이머 각각은 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 타겟 핵산 서열의 한 부위와 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 타겟 핵산 서열과 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 상기 타겟 핵산 서열의 증폭 산물이 생성되는, 제1차 어닐링 온도에서 상기 단계 (b)의 제1차 DNA쇄의 상기 타겟 핵산 서열의 제1단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,

(d) 단계 (c)에 이용된 프라이머와 동일한 프라이머 또는 단계 (c)에서 이용된 프라이머의 5'-말단 부위에 상당한 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 증폭 산물의 3'- 및 5'-말단에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 증폭 산물이 재증폭되는, 고엄격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (c)의 증폭 산물의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

본 발명의 증폭 방법은 본 발명의 ACP를 이용하기 때문에, 과도한 반복성을 초래하는 본 명세서의 복잡성을 피하기 위하여 공통된 내용은 그 기재 생략한다.

ACP를 이용하는 본 응용은 핵산 증폭, 바람직하게는, PCR을 실시하여, 핵산 (DNA 또는 mRNA) 또는 핵산의 혼합물로부터 타겟 핵산 서열을 선택적으로 증폭하는 개선된 방법을 제공한다. ACP의 효과는, 종래의 프라이머에 프라이머 디자인에 있어서의 "프라이머 서치 변수" (예컨대, 프라이머 길이, 어닐링 온도, GC 양 및 산물 길이)에 무관하게 프라이머 어닐링 특이성을 제공하기 때문에, 타겟 핵산 단편을 증폭하는 데 이용되는 종래의 프라이머가 상기 변수에 너무 민감하여 특이적 핵산 증폭 산물을 생성시키지 못하는 경우에, ACP를 이용하는 것이 특히 추천된다.

신규한 ACP 시스템을 이용하여 이중쇄 DNA의 타겟 핵산을 선택적으로 증폭하는 대표적인 과정은 도 1A에 도시되어 있다. 도 1B는 신규한 ACP 시스템을 이용하여 mRNA의 타겟 핵산을 선택적으로 증폭하는 대표적인 과정을 도시하고 있다. 도 1A 및 1B를 참조하여, 본 발명의 방법을 보다 상세히 설명한다.

핵산 서열을 증폭하는 본 발명의 방법은 당업계에 공지된 다양한 프라이머-관련 핵산 증폭 방법들에 따라 실시될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 방법은 본 발명자에 의해 개발된 두 단계 증폭 과정에 따라 실시되며, 보다 바람직하게는, 증폭은 당업계에 공지된 중합효소 연쇄 반응에 따라 실시되며, 가장 바람직하게는, 핫 스타트 (hot start) PCR 방법에 따라 실시된다.

핵산 서열을 증폭하기 위한 본 발명의 방법은 소망하는 어떠한 핵산 분자의 증폭에도 이용될 수 있다. 이러한 핵산 분자는 DNA 또는 RNA이다. 상기 핵산 분자는 이중쇄 또는 단일쇄일 수 있고, 바람직하게는 이중쇄이다. 출발물질로서 핵산이 이중체인 경우, 두쇄를 단일쇄로, 또는 부분적인 단일쇄 형태로 만드는 것이 바람직하다.쇄를 분리하는 방법은, 열, 알칼리, 포름아미드, 우레아 및 글리코살 처리, 효소적 방법 (예, 헬리카아제 작용) 및 결합 단백질질을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 쇄 분리는 80-105°C의 온도로 열 처리하여 달성될 수 있다. 상술한 처리의 일반적인 방법은 Joseph Sambrook, 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001)에 개시되어 있다.

mRNA가 출발물질로 이용되는 경우, 역전사 단계가 증폭 전에 필요로 하며, 역전사 단계의 상세한 내용은 Joseph Sambrook, 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Noonan, K. F. et al., *Nucleic Acids Res.* 16:10366 (1988)에 개시되어 있다. 역전사 단계에서,

mRNA의 폴리 A 테일에 혼성화되는 올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머가 이용된다. 올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머는 dTMPs로 이루어져 있고, dT 프라이머가 프라이머로서 작용할 수 있는 한도 내에서 dTMPs 중 하나 또는 그 이상은 다른 dNMPs로 대체될 수 있다. 역전사 단계는 RNase H 활성을 갖는 역전사 효소에 의해 이루어질 수 있다. RNase H 활성을 갖는 효소를 이용하는 경우, 반응조건을 주의있게 선택하면 개별적인 RNase H 절단 과정을 피할 수 있다.

본 발명의 방법은, 증폭될 분자가 특정 서열 또는 길이를 가질 것을 요구하지 않는다. 특히, 증폭될 수 있는 분자는 자연의 원핵세포 핵산, 진핵세포 (예컨대, 원생동물과 기생동물, 균류, 효모, 고등 식물, 저등동물 및 포유동물과 인간을 포함하는 고등동물) 핵산, 바이러스 (예컨대, 헤르페스 바이러스, HIV, 인플루엔자 바이러스, 엡스타인-바 바이러스, 간염 바이러스, 폴리오 바이러스 등) 핵산 및 비로이드 핵산을 포함한다. 또한, 상기 핵산 분자는 화학적으로 합성되었거나 또는 합성될 수 있는 핵산 분자를 포함한다. 따라서, 상기 핵산 서열은 자연에서 발견되거나 또는 발견되지 않는 것이다.

본 발명에 이용되는 ACP는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중쇄 구조를 형성한다. 이러한 이중쇄 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., 등, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시되어 있다. ACP의 3'-말단 부위의 서열은 완전한 상보성을 나타낼 필요는 없고, 단지 안정된 이중쇄 구조를 형성할 수 있을 정도의 실질적으로 상보적인 서열을 가지면 된다. 따라서, 이중쇄 구조의 형성을 위한 혼성화를 완전히 배제하지 않는 한도 내에서 완전한 상보성 (complete complementarity)으로부터의 이탈이 허용된다. 주형 핵산 상의 한 부위에 ACP가 혼성화되는 것은 중합효소에 의한 주형-의존성 중합반응의 선제 조건이다. 상보적인 핵산에 ACP가 염기쌍을 형성하는 데 영향을 미치는 인자 (Joseph Sambrook, 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 Haymes, B.D., 등, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C.(1985))는 프라이밍 효율에 영향을 미친다. ACP의 뉴클레오타이드 조성은 최적의 어닐링을 위한 온도에 영향을 미치며 따라서 프라이밍 효율에도 영향을 미친다.

다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 증폭 단계에 이용될 수 있으며, *E. coli* DNA 중합효소 I의 "클레나우" 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는, 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이고, 이는 *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, 및 *Pyrococcus furiosus* (Pfu)를 포함한다. 상기 중합효소 대부분은 박테리아 그 자체로부터 분리될 수 있고 또는 상업적으로 구입할 수 있다. 또한, 본 발명에 이용되는 중합효소는 중합효소를 암호화하는 클로닝 유전자의 높은 레벨을 발현하는 세포로부터 수득할 수 있다. 중합 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg^{2+} 와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 소망하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 소망된다.

증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 사실, 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 한다. 따라서, 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될 수 있다.

제1단계 증폭 과정에 이용되는 ACPs의 세트의 5'-말단 부위들은 동일하거나 또는 상이한 서열을 포함하며; 만일, 서열이 동일한 경우, 5'-말단 부위 서열에 상당한 1종의 프라이머가 제2단계 증폭에서 이용될 수 있고; 만일, 서열이 상이한 경우, ACPs의 각각의 5'-말단 부위 서열에 상당한 2종의 프라이머가 제2단계 증폭에서 이용될 수 있다.

본 발명의 다른 변형예에 따르면, 본 발명은 ACP를 이용하여 핵산 또는 핵산 혼합물로부터 타겟 핵산 단편을 선택적으로 증폭하는 방법을 제공하며, 이 방법의 제1단계 증폭에서, ACP의 세트 대신에 ACP와 종래의 프라이머로 이루어진 프라이머 세트가 이용될 수 있다. 본 명세서에서 용어 "종래의 프라이머 (conventional primer)"는 ACP와 다른 구조, 특히 유니버설 염기를 포함하는 조절자 부위의 존재의 측면에서 ACP와 다른 구조를 갖는 프라이머를 의미한다. 종래의 프라이머는 단지 ACP와 함께 제1단계 증폭 과정에 첨가되며, 제2단계 증폭 과정에서는 ACP의 5'-말단 부위 서열에 상당한 1종의 전-선택 아비트러리 프라이머만이 첨가된다. 바람직한 구현예에서, 제1단계 증폭에 이용되는 ACP쌍의 각각의 3'-말단 부위가 상이한 용해 온도 (T_m)을 갖는 경우에, 본 발명의 변형예가 이용될 수 있다. " T_m "은 프라이머의 반이 타겟 부위에 어닐링되는 시점에서의 온도를 나타낸다.

본 발명의 두 단계 증폭 과정 (mRNA를 이용하여 증폭하는 경우, 역전사 과정 포함)은 단지 시간적으로만 분리되어 있다. 제1단계 증폭 다음에 제2단계 증폭이 이어진다. 제1단계 증폭 반응 혼합물은, 제2단계 증폭 과정에서 ACPs의 5'-말단 부위의 서열에 어닐링하는 5'-말단 부위에 상당한 프라이머를 포함할 수 있으며, 이와 같은 사실은 5'-말단 부위에 상당한 프라이머가 제1단계 증폭 과정시에 또는 그 후에 반응 혼합물에 첨가될 수 있음을 의미한다.

다른 변형예로서, 제2단계 증폭 과정에서, ACPs의 5'-말단 부위에 상당한 프라이머 대신에, 제1단계 증폭 과정에 이용되는 ACPs의 전(全)서열이, 고염격 조건 하에서 제1단계 증폭 산물을 재증폭하는 데 프라이머로서 이용될 수 있으며, 이 경우, 저염격 조건에서 주형 핵산에 ACP 세트의 3'-말단 부위 서열이 어닐링 및 연장되어 생성된 제1단계 증폭 산물의 3'-및 5'-말단은 ACP의 서열 또는 그의 상보적 서열을 포함하며 또한 ACP 세트에 대한 완벽한 페어링 위치로서의 작용을 한다. 이러한 측면에서, 제1단계 증폭 과정에서 또는 그 후에 반응 혼합물에 ACPs의 5'-말단 부위에 상당한 프라이머를 추가적으로 첨가할 필요가 없기 때문에, 본 발명의 변형예는 바람직하다. 도 1A는 상술한 변형예에 따른 타깃 핵산의 선택적 증폭 과정을 도시한다.

본 발명에 있어서 어닐링 또는 혼성화는 뉴클레오타이드 서열과 ACP 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 염격 조건 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 염격 조건은 서열-의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다. 본 발명에서, 제2단계 증폭 과정은 제1단계 증폭과정보다 더 높은 염격 조건하에서 일반적으로 실시된다.

본 발명의 바람직한 구현예에서, 제1단계 증폭 과정에서의 제1차 어닐링 온도는 약 30℃ 내지 68℃이고, 보다 바람직하게는 40℃ 내지 65℃이다. 바람직하게는, 제2단계 증폭 과정에서의 제2차 어닐링 온도는 약 50℃ 내지 72℃이다. 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 제1차 어닐링 온도는 상기 제2차 어닐링 온도와 동일하거나 낮다. ACP의 3'-말단 부위 서열의 길이 또는 용해온도 (T_m)는 제1단계 증폭 과정의 어닐링 온도를 결정한다. 예를 들어, ACP가 3'-말단 부위에, 10 개의 아비트러리 뉴클레오타이드를 포함하는 경우, 제1단계 증폭과정의 어닐링 온도는 약 45℃ 내지 55℃가 바람직하다.

본 발명의 방법에 따르면, 저염격 조건하에서의 제1단계 증폭 과정은, 제1단계 증폭에서의 프라이머 어닐링의 특이성을 개선하기 위하여, 어닐링, 연장 및 변성의 최소 2 사이클을 실시하며, 그런 다음, 제2단계 증폭 과정이 고염격 조건하에서 보다 효과적으로 진행된다. 제1단계 증폭 과정은 30 사이클까지 실시될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 제1단계 증폭 과정은 2 사이클 실시된다. 다른 구현예에서, 고염격 조건하에서의 제2단계 증폭 과정은, 제1단계 산물을 증폭하기 위하여, 최소 1 사이클 (바람직하게는, 최소 5 사이클)이 실시되며, 45 사이클까지 실시될 수 있다. 보다 바람직한 구현예에서, 제2단계 증폭 과정은 25-35 사이클이 실시된다. 고염격 및 저염격 조건은 당업계에 공지된 표준으로부터 용이하게 결정할 수 있다. 용어 "사이클"은 타깃 핵산의 1 카피 (copy)를 생성하는 과정을 나타낸다. 사이클은 변성, 어닐링 및 연장 과정을 포함한다.

본 발명의 가장 바람직한 구현예에서, 증폭 과정은 미국특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호에 개시된 PCR에 따라 실시된다.

바람직한 구현예에서, 제1단계 증폭 과정이 실시될 때, ACP 프라이머쌍의 3'-말단 부위는 제1차 어닐링 온도에서의 어닐링에 참여하며, 제2단계 증폭 과정이 실시될 때, 프라이머쌍의 5'-말단 부위는 프라이밍 위치로서 작용을 한다. 이와 같이, 어닐링에 참여하는 부위가 변화되는 이유는 주로 ACP 그 자체의 특성, 특히 ACP의 조절자 부위 때문이다. 본 발명의 방법에 있어서, ACP의 조절자 부위는, 제1차 어닐링 온도에서 ACP의 어닐링 부위를 그의 3'-말단 부위로 제한할 수 있으며, 이와 같은 특성은 타깃 서열에 대한 어닐링 특이성을 크게 개선시킨다.

본 발명의 방법은 특정 목적을 위한 공지의 다른 과정과 결합될 수 있다. 예를 들어, 증폭 산물의 분리 (또는 정제)는 제2단계 증폭과정에 후속될 수 있다. 상기 과정은 겔 전기영동, 컬럼 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 또는 혼성화에 의해 실시될 수 있다. 또한, 본 발명의 증폭 산물은 클로닝용 담체에 삽입될 수 있다. 또한, 본 발명의 증폭 산물은 발현 벡터를 가지는 적합한 숙주에서 발현될 수 있다. 증폭 산물을 발현하기 위하여, 프로모터의 조절하 또는 프로모터에 작동적으로 연결된 증폭 산물을 운반하는 발현 벡터를 제조한다. 프로모터는 벡터 자체 또는 ACP의 5'-말단 부위에 상당한 증폭 산물의 말단 부위로부터 유래된다. 다양한 숙주-발현 시스템에서 단백질 또는 펩타이드 발현을 하기 위하여, 증폭산물 및 전사/번역/조절 서열을 포함하는 발현 벡터를 제작하는 많은 표준 기술들이 알려져 있다. 원핵세포 숙주용 프로모터는 *pLλ* 프로모터, *trp* 프로모터, *lac* 프로모터 및 *T7* 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 진핵세포 숙주용 프로모터는 메탈로티오네인 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, 그리고 폴리오마, 아데노바이러스 2, 시미안 바이러스 40 또는 시토메갈로 바이러스로부터 유래된 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 원핵세포 숙주의 예는 *E. coli*, 바실러스 서브틸리스, 그리고, 살로넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한

슈도모나스 종과 같은 장내세균을 포함한다. 미생물뿐만 아니라, 다세포 유기체로부터 유래된 세포 배양물도 숙주로서 이용할 수 있다. 척추동물 또는 무척추동물로부터 유래된 세포배양물이 이용될 수 있다. 포유동물 세포뿐만 아니라, 재조합 바이러스 발현 벡터 (예컨대, 배컬로바이러스)로 감염된 곤충세포 시스템; 및 재조합 바이러스 발현 벡터 (예컨대, 콜리플라우어 모자이크 바이러스, 담배 모자이크 바이러스)로 감염되거나 하나 또는 그 이상의 암호화 서열을 포함하는 재조합 플라스미드 발현 벡터 (예컨대, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물도 이용될 수 있다. 증폭산물로부터 발현된 폴리펩타이드는 당업계에 공지된 방법에 따라 정제될 수 있다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 세트를 포함하는 핵산 증폭용 키트를 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 세트를 포함하는, DNA로부터 타겟 핵산 서열을 선택적으로 증폭하기 위한 키트를 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 세트를 포함하는, mRNA로부터 타겟 핵산 서열을 선택적으로 증폭하기 위한 키트를 제공한다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 키트는 ACP의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 가지는 프라이머 또는 프라이머쌍을 추가적으로 포함하며; 5'-말단 부위가 유니버설 프라이머 서열을 포함하는 경우, 보다 바람직하게는 본 발명의 키트는 유니버설 프라이머를 포함한다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 PCR 반응에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소, DNA 중합효소 조인자 및 디옥시리보뉴클레오타이드-5'-트리포스페이트를 포함할 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 다양한 폴리뉴클레오타이드 분자, 역전사 효소, 다양한 완충액 및 시약, DNA 중합효소의 활성을 억제하는 항체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 포지티브 및 네가티브 대조군 반응을 수행하는 데 필요한 시약을 포함할 수 있다. 특정 반응에서 이용되는 시약의 최적량은 본 명세서의 내용을 파악한 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 키트는 분리된 패키지 또는 구획에 상술한 성분들을 포함한다.

II. 멀티플렉스 DNA 증폭에의 응용

본 발명의 ACP는 동일 반응에서 2종 이상의 프라이머쌍을 이용한 2종 이상의 타겟 서열을 증폭하는 개선된 방법을 제공한다. 일반적으로, 10종 이상의 타겟을 증폭하기 위한 PCR 조건을 설정하는 것이 매우 어려운데, 그 이유는 비특이적 부산물 없이 하나의 특정 타겟을 증폭하는 데에도 최적의 PCR 반응이 요구되기 때문이다. 따라서, 멀티플렉스 PCR을 하는 연구자들은 그 시스템의 최적화를 위하여 매우 힘든 작업을 한다. 완전한 DNA-DNA 매치를 가능할 정도의 충분히 높은 온도에서 어닐링 되는 것이 요구되기 때문에, 본 발명의 ACP는, 증폭 특이성을 개선하는 능력을 갖고 있기 때문에, 멀티플렉스 DNA 증폭의 최적화에 매우 이상적이다. 용어 "멀티플렉스 PCR"은 단일의 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 혼합물내의 멀티플렉스 DNA 타겟들을 동시에 증폭하는 것을 의미한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 2쌍 이상의 프라이머를 이용하여 2개 이상의 타겟 뉴클레오타이드 서열을 동일한 반응에서 동시에 증폭하는 방법에 있어서, 상기 방법은 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상술한 ACP 중 어느 한 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, ACP 구조에 따른 프라이머는, 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 타겟 핵산 서열의 한 부위와 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖는다.

본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함한다:

(a) 상술한 ACP의 프라이머쌍들을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 프라이머 각각은 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 타겟 핵산 서열의 한 부위와 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 타겟 핵산 서열과 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 타겟 뉴클레오타이드 서열들의 증폭 산물이 생성되는, 제1차 어닐링 온도에서 2개 이상의 타겟 뉴클레오타이드 서열의 제1단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,

(b) 단계 (a)에 이용된 프라이머와 동일한 프라이머쌍들 또는 단계 (a)에서 이용된 프라이머쌍들의 각각의 5'-말단 부위에 상당한 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍들을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 단계 (a)의 증폭 산물의 3'- 및 5'-말단에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 증폭 산물들이 동일 반응에서 재증폭되는, 고엄격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (a)의 증폭 산물의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

본 발명의 ACP를 이용한 본 적용은, 2종 이상의 타깃 뉴클레오타이드 서열 및 프라이머쌍을 이용하는 것을 제외하고는, 상술한 핵산 서열의 증폭 방법에 따라 실시되기 때문에, 과도한 반복성을 초래하는 본 명세서의 복잡성을 피하기 위하여 공통된 내용은 그 기재를 생략한다.

예를 들어, 증폭에 이용되는 ACP의 조성 및 구조 그리고 조건들은 상술한 핵산 서열의 증폭 방법과 본 멀티플렉스 증폭에서 공통되는 사항이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 타깃 뉴클레오타이드 서열의 각각으로부터 생성되는 증폭 산물은 후속의 분석에 적합하게 크기가 서로 다른 것이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 멀티플렉스 타깃 뉴클레오타이드 서열의 증폭 산물은 크기 분리 과정을 통해 분석될 수 있다. 크기 분리 비교는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시되며, 예컨대, 폴리아크릴아미드 겔 매트릭스 또는 아가로스 겔 매트릭스를 통한 전기영동과 뉴클레오타이드 시퀀싱이 있다. 뉴클레오타이드 시퀀싱은 다양한 회사로부터 구입 가능한 자동화 시퀀서를 이용하여 신속하게 실시할 수 있다.

하기의 실시예에 예시된 바와 같이, 본 발명의 ACP는 당업계에 공지된 멀티플렉스 핵산 증폭 방법에 이용되는 종래의 프라이머로부터 초래되는 비특이성 문제 뿐만 아니라 최종 증폭 산물이 백그라운드 문제로부터 자유롭도록 한다.

멀티플렉스 증폭의 이점은 다수의 질환 또는 특정 뉴클레오타이드 서열 변화 (예컨대, 단일 뉴클레오타이드 다형성 또는 점돌연변이)를 동일한 반응물에서 분석할 수 있다는 것이다.

동시에 실시할 수 있는 분석물의 수는 제한이 없지만; 그러나, 상한선은 약 20 분석물이고, 분해 (resolution)에 필요한 크기 차이 및 증폭 산물의 분해에 유용한 방법에 따라 결정된다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 세트를 포함하는, 2개 이상의 타깃 뉴클레오타이드 서열을 동시에 증폭하기 위한 키트를 제공한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 키트는 ACP의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 가지는 프라이머 또는 프라이머쌍을 추가적으로 포함하며; 5'-말단 부위가 유니버설 프라이머 서열을 포함하는 경우, 보다 바람직하게는 본 발명의 키트는 유니버설 프라이머를 포함한다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 PCR 반응에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소, DNA 중합효소 조인자 및 디옥시리보뉴클레오타이드-5'-트리포스페이트를 포함할 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 다양한 폴리뉴클레오타이드 분자, 역전사 효소, 다양한 완충액 및 시약, DNA 중합효소의 활성을 억제하는 항체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 포지티브 및 네가티브 대조군 반응을 수행하는 데 필요한 시약을 포함할 수 있다. 특정 반응에서 이용되는 시약의 최적양은 본 명세서의 내용을 파악한 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 키트는 분리된 패키지 또는 구획에 상술한 성분들을 포함한다.

본 발명의 방법 및 키트는 유전 질환 및 감염 질환의 진단, 성결정, 유전적 상관성 분석 그리고 법의학 연구에 적용될 수 있다.

III. 분별 발현 유전자 동정의 응용

본 발명의 ACP를 이용한 본 응용은 둘 또는 그 이상의 핵산 시료 내의 분별적으로 발현되는 mRNA에 상보적인 cDNAs를 검출하고 클로닝하는 개선된 방법을 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 둘 또는 그 이상의 핵산 시료 내의 분별적으로 발현되는 mRNA에 상보적인 DNA를 검출하는 방법으로서, 상기 방법은 mRNA의 역전사 단계 및 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상술한 ACP 중 어느 한 항의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, ACP 구조에 따른 프라이머는, 역전사 과정으로부터 생성된 cDNAs체의 한 부분에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열 (보다 바람직하게는, 아비트러리 서열)을, 그의 3'-말단 부위에 갖는다.

본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함한다:

(a) mRNA 전사체의 제1 군집 (population)을 대표하는 제1 핵산 시료 및 mRNA 전사체의 제2 군집을 대표하는 제2 핵산 시료를 제공하는 단계;

(b) 상기 제1 핵산 시료 및 제2 핵산 시료 각각을 상술한 ACP의 제1차 프라이머에 접촉시키는 단계로서, 상기 제1차 프라이머의 3'-말단 부위는 상기 분별적으로 발현되는 mRNA의 제1 위치에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 포함하며, 상기 접촉은 주형 유도 효소적 디옥시리보핵산 합성을 발생하는데 충분한 조건 하에서 실시하는 단계;

(c) 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 분별적으로 발현되는 mRNA를 역전사하여 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 제1 핵산 시료 내의 상기 분별적으로 발현되는 mRNA에 상보적인 제1차 cDNA쇄의 제1 군집을 생성하고, 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 분별적으로 발현되는 mRNA를 역전사하여 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 분별적으로 발현되는 mRNA에 상보적인 제1차 cDNA쇄의 제2 군집을 생성하는 단계;

(d) 상기 제1차 cDNA쇄의 제1 및 제2 군집 각각을 정제하고 정량하는 단계;

(e) 상술한 ACP의 제2차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 프라이머는 그의 3'-말단 부위에 제1차 cDNAs쇄의 제1 및 제2 군집의 제2 위치에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 사이클은 상기 제2차 프라이머가 제1차 cDNAs쇄의 각각의 군집의 제2 위치에 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 제2차 cDNA쇄의 제1 및 제2 군집이 생성되는, 제1차 어닐링 온도에서 상기 단계 (d)의 제1차 DNA쇄의 제1 및 제2 군집 각각의 제1단계 증폭을 실시하는 단계;

(f) 단계 (b) 및 (e)에 이용된 제1차 및 제2차 프라이머와 동일한 프라이머, 또는 단계 (b) 및 (e)에서 이용된 제1차 및 제2차 프라이머의 5'-말단 부위에 상당한 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 제2차 cDNA쇄의 3'- 및 5'-말단에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 제2차 cDNA쇄의 증폭 산물이 생성되는, 고염격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (e)의 제2차 cDNA쇄 각각의 제2단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,

(g) 단계 (f)에서 수득한 증폭 산물의 제1 및 제2 군집에서 개별적인 증폭산물의 존재 또는 레벨을 비교하는 단계.

본 발명의 ACP를 이용한 본 적용은, 상술한 핵산 서열의 증폭 방법에 따라 실시되기 때문에, 과도한 반복성을 초래하는 본 명세서의 복잡성을 피하기 위하여 공통된 내용은 그 기재 생략한다.

본 발명의 ACP를 이용한 분별 발현 유전자 (differentially expressed genes)를 동정하는 과정의 대표적인 예는 도 2A에 도시되어 있다.

본 발명의 방법에 있어서, mRNA 전사체의 군집을 나타내는 핵산 시료는 다양한 생물학적 물질로부터 수득할 수 있다. 일반적으로, 상기 제1 핵산 시료는 제1 세포로부터 발현되는 mRNA를 포함하고, 상기 제2 핵산 시료는 제2 세포에서 발현된 mRNA를 포함한다. 특히, 상기 제1 핵산 시료는 제1 발달단계의 세포에서 발현된 mRNA를 포함하고, 상기 제2 핵산 시료는 제2 발달단계의 세포에서 발현된 mRNA를 포함한다. 또한, 상기 제1 핵산 시료는 종양발생 세포에서 발현된 mRNA를 포함하고, 제2 핵산 시료는 정상세포에서 발현된 mRNA를 포함한다.

본 발명의 방법에서 단계 (e) 및 (f)는 프라이머를 제외하고는, 동일 반응 혼합물을 이용하여 단일 튜브 내에서 실시될 수 있으며, 이는 단계 (e) 및 (f)가 단지 시간적으로만 분리되어 있음을 의미하는 것이다. 5'-말단 부위에 상당한 프라이머는 제2차 cDNA쇄 합성시에 또는 후에 반응 혼합물에 첨가될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 5'-말단 부위에 상당한 프라이머는 단계 (e)가 완료된 직후에 반응혼합물에 첨가되며, 이어 제2차 cDNA쇄의 PCR 증폭이 이루어진다.

단계 (b) 및 (e)에서 각각 이용되는 제1차 및 제2차 ACP의 5'-말단 부위 서열은 동일하거나 또는 상이한 서열을 포함할 수 있으며; 만일, 서열이 동일한 경우, 5'-말단 부위 서열에 상당한 1종의 프라이머가 단계 (f)에서 이용될 수 있고; 만일, 서열이 상이한 경우, ACPs의 각각의 5'-말단 부위 서열에 상당한 2종의 프라이머가 단계 (f)에서 이용될 수 있다. 바람직하게는, 단계 (b) 및 (e)에서 이용되는 제1차 및 제2차 ACP의 5'-말단 부위 서열은 상이하고, 따라서, ACPs의 각각의 5'-말단 부위 서열에 상당한 2종의 프라이머가 단계 (f)에서 이용된다.

본 발명의 다른 변형예에 따르면, ACPs의 5'-말단 부위에 상당한 프라이머 대신에, 단계 (b) 및 (e)에서 이용되는 제1차 및 제2차 ACPs의 전(全)서열이, 고염격 조건 하에서 단계 (e)에서 수득한 제2차 DNA쇄 각각을 증폭하는 단계 (f)에서 프라이머로서 이용될 수 있으며, 이 경우, 제2차 ACP를 이용하여 초기에 합성된 제2차 DNA쇄의 3'- 및 5'-말단 각각은 제1차 ACP의 서열 및 제2차 ACP의 상보적인 서열을 포함하며, 제1차 및 제2차 ACPs에 대한 완벽한 페어링 위치로서의 작

용을 한다. 이러한 측면에서, 제1단계 증폭 과정에서 또는 그 후에 반응 혼합물에 ACPs의 5'-말단 부위에 상당한 프라이머를 추가적으로 첨가할 필요가 없기 때문에, 본 발명의 변형에는 바람직하다. 도 2B는 상술한 변형에 따른 분별 발현 유전자의 동정 과정을 예시한다.

유전자 발현의 차이를 검출하는 본 발명의 방법은, 다수의 cDNA 합성 앵커 프라이머를 요구하는 종래의 분별 디스플레이 PCR과는 상이하게, mRNA와 반응하는 단일의 cDNA 합성 프라이머 (제1차 ACP)를 이용한다. Liang 및 Pardee (1977)에 의해 제시된 분별 디스플레이 방법에서, 12개의 앵커 프라이머가 이용되었다. 예를 들어, T_{12MN} 의 서열 (M은 A, C 또는 G이고, N은 A, C, G 또는 T이다)을 가지는 앵커 프라이머들은 12종의 cDNA 군집을 생성한다. 최근에는, mRNAs의 폴리 A 테일의 5' 쪽에 바로 인접한 서열에 혼성화되는 3'-말단의 뉴클레오타이드의 수를 2에서 1 또는 3으로 변화시키거나, 또는 올리고 (dT)9-12 MN 테일을 유지하면서 최소 21개의 뉴클레오타이드가 되도록 5'-말단에 추가적인 뉴클레오타이드를 연장시켜서 변형된 앵커 프라이머가 제시된 바 있다 (Villeponteau et al., 1996, Combates et al., 2000).

본 발명은 분별 발현되는 유전자의 동정방법에 ACP를 적용하는 것에 관한 것으로서, 단계 (b)에 이용되는 제1차 ACP는 다음 일반식 (2)로 나타낸다: 5'-dX_p-dY_q-dT_r-3', 상기 일반식에서 dX는 4종의 디옥시리보뉴클레오타이드, A, C, G 또는 T 중 하나이고; dY는 PCR 동안에 어닐링 온도 변화에 따른 ACP의 주 기능을 결정하는 유니버설 염기를 포함하는 조절자 부위이며; dT는 T 디옥시리보뉴클레오타이드이고; p, q 및 r은 정수를 나타내며; dX_p는 전-선택 아비트러리 서열을 포함하는 5'-말단 부위를 나타내고; dY_q는 최소 2개의 유니버설 염기를 포함하며; dT_r는 3'-말단 부위를 나타내고; 3'-말단 부위의 뉴클레오타이드 서열은 5'-말단 부위보다 낮은 T_m 을 갖는다. 일반식 (2)는 기본적으로 일반식 (1)의 원칙을 따른다. 일반식 (2)의 3'-말단 부위는 mRNA의 폴리 A 테일에 어닐링하는 서열을 포함하며, mRNA의 역전사를 위한 cDNA 합성 프라이머로서 작용한다.

바람직한 구현예에서, 단계 (b)에 이용되는 제1차 ACP의 3'-말단 부위는 최소 6개의 T 뉴클레오타이드를 포함하며, 상기 길이는 프라이머 어닐링에 대한 최소 길이 요건으로 판단된다. 보다 바람직하게는, 3'-말단 부위 서열의 길이는 10 내지 20 T 뉴클레오타이드이고, 30 T 뉴클레오타이드까지일 수 있다. 가장 바람직하게는, 3'-말단 부위 서열의 길이는 약 15 T 뉴클레오타이드이다. 상기 프라이머는 dT₁₅ 어닐링 조절 프라이머 (dT₁₅-ACP)로 명칭된다. 바람직한 구현예에서, 제1차 프라이머는 일반식 5'-dX₁₅₋₃₀-dY₂₋₁₀-dT₁₀₋₂₀-3'을 가지며, 상기 일반식에서 dX는 디옥시리보뉴클레오타이드를 나타내며 상기 mRNAs의 제1 군집 및 제2 군집에 실질적으로 비상보적인 전-선택 아비트러리 서열을 포함하고; dY는 2-10개의 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체를 포함하는 조절자 부위를 나타내며; 그리고, dT는 mRNAs의 제1 군집 및 제2 군집의 상기 제1 위치에 어닐링할 수 있는 연속적인 디옥시티미딘을 나타낸다.

본 발명의 일 구현예에서, 단계 (b)에서 이용되는 제1차 ACP의 3'-말단 부위는 폴리 A 테일의 바로 인접한 업스트림쪽의 mRNA 서열에 혼성화되는 최소 하나의 추가적인 뉴클레오타이드를 그의 3'-말단에 포함할 수 있다. 제1차 ACP의 3'-말단에 있는 추가적인 뉴클레오타이드의 길이는 3 뉴클레오타이드까지일 수 있다. 예를 들어, dT는 그의 3'-말단에 3'-V를 추가적으로 포함할 수 있고, 상기 V는 디옥시아데노신, 디옥시시티딘 및 디옥시구아노신으로 구성된 군으로부터 선택된다. 또한, 상기 dT는 그의 3'-말단에 3'-NV를 추가적으로 포함할 수 있고, 상기 V는 디옥시아데노신, 디옥시시티딘 및 디옥시구아노신으로 구성된 군으로부터 선택되고, 상기 N은 디옥시아데노신, 디옥시티미딘, 디옥시시티딘 및 디옥시구아노신으로 구성된 군으로부터 선택된다. 가장 바람직하게는, 단계 (b)에서 이용되는 제1차 ACP의 3'-말단 부위 서열은 dT₁₅이다.

바람직한 구현예에서, 제1차 ACP의 전체 길이는 약 40-45 뉴클레오타이드이고, 그의 3'-말단 부위에 dT₁₅, 5'-말단 부위에 dX₂₀₋₂₅ 및 3'-과 5'-말단 사이에 dY₅를 포함한다. 제1차 ACP의 전체 길이는 최대 100 뉴클레오타이드이다. 제1차 프라이머는 서열목록 제30, 39, 57 및 61-63에 예시되어 있다.

본 명세서에서 제1차 ACP는 모든 mRNAs (mRNA의 미소한 부분은 제외)에 존재하는 mRNA의 폴리 A 테일에 혼성화된 다. 본 발명에서 이용되는 제1차 ACP의 이용은 단지 하나의 반응만을 초래하며 결국, 하나의 cDNA 군집만을 생성한다. 그러나, 분별 디스플레이 기술의 종래 앵커 프라이머에 의해서는 최소 3 내지 64개의 별개 cDNA 군집들이 생성된다. 본 발명의 ACP는, 각각의 실험 mRNA 군집으로부터 단일체 cDNA의 실질적으로 표준적인 풀 (pool)을 생성함으로써, 본 발명의 효율을 크게 증가시킨다.

단계 (d)에서, 제1차 ACP에 의해 합성된 cDNAs의 표준 풀은 정제되고, 스펙트로포토미터와 같은 당업계에 공지된 기술에 의해 정량화된다. 본 단계는 증폭 단계에 투입되는 반응물의 양을 정확하게 조절하고 둘 또는 그 이상의 시료의 최종 증

폭 산물을 비교하는 데 필요하다. 바람직하게는, 이 시점에서 생성된 cDNA의 양을 측정한다. 당업계에 공지된 어떠한 cDNA 정량 방법도 이용될 수 있지만, 보다 바람직하게는, 정량은 자외선 스펙트로포토미터를 이용하여 실시된다. UV 스펙트로포토미터 과정을 이용하는 경우, 약 260 nm의 UV광에서의 흡수도가 이용된다. cDNA 정량에 의해, 후속의 증폭 과정에서 시료간의 cDNA 양이 표준화된다.

제1차 ACP를 이용한 제1차 cDNA쇄의 합성 이후, 저염격 조건 하에서 변성, 어닐링 및 프라이머 연장의 최소 한 사이클에 의해 제2차 DNA쇄가 합성되며, 제1차 DNA쇄가 주형으로 이용된다.

제2차 ACP는 기본적으로 일반식 (1)의 원칙을 따르면, 그의 3'-말단 부위는 짧은 아비트러리 서열을 포함하고, 바람직하게는 5'-말단 부위보다 낮은 T_m 을 갖는다. 이 프라이머는 아비트러리 어닐링 조절 프라이머 (AR-ACP)로 명명된다. 바람직한 구현예에서, 제2차 ACP의 3'-말단 부위의 길이는 8 내지 15 뉴클레오타이드이다. 가장 바람직하게는, 제2차 ACP의 3'-말단 부위의 길이는 약 10 뉴클레오타이드이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 제2차 ACP는 일반식 5'-dX₁₅₋₃₀-dY₂₋₁₀-dZ₈₋₁₅-3'을 가지며, 상기 일반식에서 dX는 디옥시리보뉴클레오타이드를 나타내며 상기 제1차 cDNA쇄의 제1 군집 및 제2 군집에 실질적으로 비상보적인 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 포함하고; dY는 2-10개의 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체를 포함하는 조절자 부위를 나타내며; 그리고, dZ는 상기 DNA쇄의 제1 군집 및 제2 군집의 상기 제2 위치에 어닐링할 수 있는 혼성화 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 보다 바람직하게는, 제2차 ACP의 전체 길이는 약 40-45 뉴클레오타이드이고, 그의 3'-말단 부위에 dZ₁₀, 5'-말단 부위에 dX₂₀₋₂₅, 그리고 3'-과 5'-말단 부위 사이에 dY₅를 포함한다. 제2차 ACP의 전체 길이는 최대 100 뉴클레오타이드이다. 제2차 프라이머는 서열목록 제1-9, 13-18 및 20-23에 예시되어 있다.

본 발명의 제2차 ACP는 종래의 분별 디스플레이 변형 기술에서 이용하는 긴 아비트러리 프라이머와는 다르다. 예를 들어, Villeponteau et al.(1996)과 Diachenko et al.(1996)에 의해 제시된 종래의 긴 아비트러리 프라이머는, 최소 21 또는 25 뉴클레오타이드의 길이를 가지며, 전(全) 서열은 아비트러리 뉴클레오타이드로만 구성되어 있다. 이러한 종래의 긴 아비트러리 프라이머는, 초기 PCR 사이클에서 아비트러리 프라이밍을 가능하게 하는 데 필요한 낮은 어닐링 온도(약 40°C)에서 예측성 없이 혼성화되며, 결국 프라이머의 대표적 세트를 제작하는 것이 이론적으로 불가능하다. 더욱이, 상술한 저염격 조건 하에서 이용될 때, 긴 프라이머의 "접착성(stickiness)" 때문에, 많은 밴드들은 동일한 mRNA를 나타낸다.

분별 발현 유전자를 검출하는 본 발명의 방법의 이점은 주로 제2차 ACP의 이용에 기인한다. 제2차 ACP에서, 제2차 ACP의 어닐링이, 어닐링 온도에 따라서, 5'-말단 부위가 아닌 3'-말단 부위에 한정되도록 제작되었기 때문에, 결과적인 어닐링은 예측가능한 방식으로 나타나며, 결국 프라이머의 대표적 세트를 제작하는 것이 이론적으로 가능하게 된다. 또한, 종래의 분별 디스플레이 기술에서 이용되는 저염격 조건 하에서의 종래의 긴 프라이머의 "접착성(stickiness)"으로부터 초래되는 위양 데이터의 문제점이 제2차 ACP의 이용에 의해 극복된다.

단계 (e)에서 저염격 조건 하에서의 제2차 DNA쇄의 합성에 이용되는 어닐링 온도는 바람직하게는, 약 40°C 내지 65°C이고, 보다 바람직하게는 약 45°C 내지 55°C이며, 가장 바람직하게는 약 50°C이다. 그러나, 35°C 내지 45°C의 어닐링 온도를 이용하는 분별 디스플레이와는 상이하게, 본 발명의 방법에서 이용되는 저염격 조건의 어닐링 온도는 아비트러리 프라이머를 이용하는 전형적인 또는 개선된 분별 디스플레이에서의 어닐링 온도보다 높다.

분별 발현 유전자의 검출에 이용되는 본 발명의 다른 독특한 특징은 후속의 증폭을 통하여 초기 합성된 제2차 DNA쇄만을 증폭하는 것이며, 제2차 ACP를 이용하여 초기에 합성된 제2차 DNA쇄의 3'- 및 5'-말단은 제1차 ACP의 상보적 서열 및 제2차 ACP의 서열을 각각 포함하며, 따라서, 제1차 및 제2차 ACPs의 전체 서열, 또는 제1차 및 제2차 ACPs의 5'-말단 부위 서열은 제2차 DNA쇄의 증폭에서 3' 및 5' 프라이머 서열로 이용된다.

본 발명에서 ACP는 특정 산물의 증폭을 야기하기 때문에, 거짓 산물 및 낮은 재현성과 같은 주요한 미해결 문제점의 원인을 근본적으로 제거할 수 있으며, 상기 문제점은 공지된 분별 디스플레이 방법에서 종래의 아비트러리 및 dT 프라이머가 증폭 산물뿐만 아니라 제1차 및 제2차 DNA쇄에 비특이적으로 어닐링하기 때문에 발생된다.

바람직한 구현예에서, 단계 (e)의 제2차 DNA쇄의 합성은, 아비트러리 프라이밍이 가능하도록 저염격 조건하에서 최소 1 사이클의 증폭을 통해 실시되며, 후속의 사이클을 통하여, 단계 (f)에서 고염격 조건 하에서 제2차 DNA쇄의 증폭이 보다 효율적으로 진행된다. 가장 바람직하게는, 단계 (e)에서 제2차 DNA쇄의 합성은 저염격 조건 하에서 1 사이클의 증폭에 의해 실시된다.

본 발명의 바람직한 구현예에서, 단계 (e)에서 합성된 제2차 DNA쇄의 증폭은 고염격 조건에서 실시되며, 단계 (b) 및 (e)에서 이용된 제1차 및 제2차 ACPs의 전체 서열 각각을 프라이머 서열로서 이용하고, 제2차 DNA쇄의 3'- 및 5'-말단은 제1차 및 제2차 ACPs에 대한 완벽한 페어링 위치를 제공한다. 이 때, 제1차 및 제2차 ACPs는, 고염격 하에서 제2차 DNA쇄의 3'- 및 5'-말단의 어닐링 및 연장 반응을 제외하면, 주형 핵산에 대한 어떠한 어닐링에도 관여하지 않으며, 이는 제1차 및 제2차 ACPs의 3'-말단 부위들은 비교적 낮은 어닐링 온도를 요구하고, 또한 고염격 조건은 3'-말단 부위들이 제2차 DNA쇄의 3'- 및 5'-말단을 제외한 주형의 어떠한 위치에도 어닐링되지 않게 하기 때문이다. 따라서, 어닐링 온도에 따라 주형에 선택적으로 어닐링하는 것을 가능하게 하는 ACP의 이러한 기능 때문에, 공지 분별 디스플레이 기술의 주문제작점인, 증폭 산물의 위양 데이터의 발생 및 마이너 mRNA종이 과소 평가되는 문제점이 해결된다. 이러한 측면에서, 고염격 조건과 저염격 조건에서 동일한 프라이머를 이용하는 점에서 공통되는 기술적 사항을 갖지만, 본 발명의 방법과 종래의 분별 디스플레이 방법은 크게 차이가 있다.

바람직한 구현예에서, 단계 (f)의 고염격 조건에서 증폭을 위한 어닐링 온도는 약 55℃ 내지 72℃이다. 가장 바람직하게는, 고염격 조건에서의 어닐링 온도는 약 65-68℃이다.

바람직한 구현예에서, 단계 (f)의 고염격 조건에서의 증폭은 최소 10 사이클 최대 50 사이클을 실시하며, 단계 (e)에서 합성된 제2차 DNA쇄가 PCR 과정을 통해 증폭된다. 가장 바람직하게는, PCR 증폭은 40-45 사이클이 실시된다.

바람직하게는, 제2차 cDNA는 PCR, 보다 바람직하게는 핫 스타트 PCR 방법에 의해 합성된다. 상기 핫 스타트 PCR 방법에 따르면, DNA 중합효소 없는 완전한 반응물이 준비되고 반응 튜브를 열순환기에서 90℃ 이상에서 인큐베이션하여 초기의 변성 단계를 실시한다. 이어, 상기 튜브를 70℃ 이상으로 유지하면서, DNA 중합효소 적당량을 첨가한다. 바람직한 구현예에 따르면, 제2차 cDNA 합성의 완전한 반응이 이루어진 다음 반응 혼합물에 제2단계 증폭용 프라이머를 첨가하되, 90℃ 이상과 같은 변성 온도에서 첨가한다. 반응 튜브를 약 90℃로 유지하면서, 제2단계 증폭용 프라이머의 적당량을 반응물에 첨가한다.

제1차 및 제2차 ACPs의 5'-말단 부위의 전-선택 아비트러리 서열을 이용하여 제2차 DNA쇄를 합성하고 증폭하는 구체적인 실시예는 다음과 같다: 제2차 DNA쇄를 저염격 조건 하에서, 어닐링, 연장 및 변성을 포함하는 제1단계 증폭의 1 사이클에 의해 합성하고; 제1차 cDNA, PCR 반응 완충액 (예컨대, Roche사로부터 구입가능한 것), dNTP 및 제2차 ACP를 포함하는 반응 혼합물을 약 94℃에서 전열한 다음, 상기 반응 혼합물을 포함하는 반응 튜브의 온도를 약 94℃로 유지하면서, Taq 중합효소 (예컨대, Roche사로부터 구입가능한 것)를 반응 혼합물에 첨가하며; PCR 반응을 다음의 조건으로 실시한다: 94℃ 1분, 50℃ 3분 및 72℃ 1분의 1 사이클, 이어 94℃에서 증폭 산물을 변성. 단계 (e)에서 제2차 DNA쇄 합성이 종료된 다음, 5' 전-선택 아비트러리 프라이머 및 3' 전-선택 아비트러리 프라이머를 반응 혼합물에 첨가한 다음 제2단계 증폭을 다음과 같이 실시한다: 94℃ 40초, 68℃ 40초 및 72℃ 40초를 40 사이클, 이어 72℃에서 5분 동안 최종 연장반응.

제1차 및 제2차 ACPs의 5'-말단 부위의 전-선택 아비트러리 서열을 이용하는 대신에, 단계 (b) 및 (e)의 제1차 및 제2차 ACPs의 전체 서열을 이용하면서 단일 튜브에서 제2차 DNA쇄를 합성하고 증폭하는 변형예는 다음과 같이 실시된다:

제2차 DNA쇄를 저염격 조건 하에서, 어닐링, 연장 및 변성을 포함하는 제1단계 증폭의 1 사이클에 의해 합성하고; 제1차 cDNA, PCR 반응 완충액 (예컨대, Roche사로부터 구입가능한 것), dNTP, 제1차 ACP (dT₁₅-ACP) 및 제2차 ACP (AR-ACP)를 포함하는 반응 혼합물을 약 94℃에서 전열한 다음, 상기 반응 혼합물을 포함하는 반응 튜브의 온도를 약 94℃로 유지하면서, Taq 중합효소 (예컨대, Roche사로부터 구입가능한 것)를 반응 혼합물에 첨가하며; PCR 반응을 다음의 조건으로 실시한다: 94℃ 1분, 50℃ 3분 및 72℃ 1분의 1 사이클, 그런 다음, 어닐링, 연장 및 변성을 포함하는 제2단계 PCR 증폭을 다음의 조건으로 실시한다: 94℃ 40초, 65℃ 40초 및 72℃ 40초를 40 사이클, 이어 72℃에서 5분 동안 최종 연장 반응.

제1단계 증폭의 1 사이클에 의해 제2차 cDNA쇄를 합성할 때 아비트러리 ACP (제2차 ACP)의 적당량이 이용된다. 단계 (e)에서 이용되는 제2차 ACP의 양이 너무 낮은 경우에는, 증폭 산물의 재현성이 없다. 반대로, 단계 (e)에서 이용되는 제2차 ACP의 양이 과도한 경우에는, PCR시 DNA 스미어 (smear)와 같은 백그라운드 문제가 발생된다. 바람직한 구현예에서, 단계 (e)의 제2차 ACP의 농도는 약 0.1 μM 내지 1.0 μM이다. 가장 바람직하게는, 제1차 ACP 및 제2차 ACP의 농도는 약 0.2 μM 이다. 바람직한 구현예에서, 단계 (f)에서 이용되는 프라이머의 농도는 약 0.1 μM 내지 1 μM이고, 가장 바람직하게는 약 0.4 μM이다.

유전자 발현의 차이를 규명하는 본 발명의 방법의 또 다른 중요한 특징은 높은 어닐링 온도를 이용하는 것이다. 단계 (f)에서 이용되는 높은 어닐링 온도는 PCR 과정 동안 프라이머 어닐링의 특이성을 증가시키며, 이는 위양 생성물을 완전하게 제거하고 재현성을 증가시킨다. 종래의 분별 디스플레이 기술의 주문제작된 위양 데이터 문제점을 해결하는 것은, 분별 디스플레이에서 동정된 cDNA 단편을 확인하는 스크리닝 단계에서 특히 중요하다.

단계 (f)로부터 수득한 증폭 산물의 존재 또는 레벨을 비교하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 단계 (f)의 증폭 산물의 제1 및 제2 군집 각각은 전기영동으로 분해 (resolution)되어 분별 발현된 mRNAs를 동정하게 된다. 보다 바람직하게는, 생성된 PCR cDNA 단편은 에티뮴 브로마이드-염색 아가로스 젤에서 검출된다. 본 발명의 다른 주 특징은 분별 발현 mRNAs를 동정하기 위하여 에티뮴 브로마이드-염색 아가로스 젤을 이용하는 것이다. 일반적으로, 종래의 분별 디스플레이 방법은 변성 폴리아크릴아미드 젤을 이용한 방사능 검출 기술을 이용한다. 그러나, 본 발명의 방법에 따르면, 두 단계 증폭을 통해 수득한 cDNA 단편의 큰 양은, 에티뮴 브로마이드-염색 아가로스 젤만으로도 증폭된 cDNAs의 검출을 가능하게 하며, 이는 결국 분석의 속도를 증가시키고 방사능동위원소의 이용을 불필요하게 한다.

선택적으로, 생성된 cDNA 단편은 변성 폴리아크릴아미드 젤에서 오토라디오그래피 또는 실버 염색 (Gottschlich et al., 1997; Kociok et al., 1998), 형광-표지 올리고뉴클레오타이드의 이용 (Bauer et al. 1993; Ito et al. 1994; Luehrsen et al., 1997; Smith et al., 1997) 및 바이오틴-표지된 프라이머의 이용 (Korn et al., 1992; Tagle et al., 1993; Rosok et al., 1996)과 같은 비-방사능 검출 방법으로 검출할 수 있다.

본 발명의 다른 구현예에서, 진단 목적으로 이용되는 경우, 증폭산물을 검출 또는 분석하기 위한 레이블링과 자동화 DNA 시퀀서와 같은 자동화 시스템을 이용하는 것이 바람직하다 (Bauer, et al., 1993).

본 발명의 방법에서 ACP의 특징을 고려하면, 분별 발현 유전자를 검출하고 클로닝하는 본 발명의 방법은 종래의 분별 디스플레이 기술과 근본적으로 상이하다.

결론적으로, 본 발명의 방법에서 ACP는 단지 제2차 DNA쇄만을 증폭하도록 하며, 고농도의 dNTP와 충분한 양의 출발물질의 사용을 가능하게 하며, 결국 다음과 같은 이점을 가져온다: a) 프라이머 어닐링 특이성 증가, b) 진정한 포지티브 결과를 확인하기 위한 힘든 작업을 요구하는 위양 데이터의 제거, c) 신뢰성 및 재현성의 개선, d) 희귀 mRNAs의 검출, e) 150 bp 내지 2.0 kb 크기의 광범위 PCR 산물의 생성, g) 분석 속도의 증가, h) 특히, 고숙련된 기술자를 요구하는 문제점의 극복, 그리고 i) 대표적 프라이머의 세트 디자인의 가능성 제시.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 세트 (제1차 및 제2차 프라이머)를 포함하는, 분별적으로 발현되는 mRNA에 상보적인 DNA를 검출하기 위한 키트를 제공한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 키트는 ACPs의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 가지는 프라이머 또는 프라이머쌍을 추가적으로 포함하며; 5'-말단 부위가 유니버설 프라이머 서열을 포함하는 경우, 보다 바람직하게는 본 발명의 키트는 유니버설 프라이머를 포함한다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 PCR 반응에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소, DNA 중합효소 조인자 및 디옥시리보뉴클레오타이드-5'-트리포스페이트를 포함할 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 다양한 폴리뉴클레오타이드 분자, 역전사 효소, 다양한 완충액 및 시약, DNA 중합효소의 활성을 억제하는 항체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 포지티브 및 네가티브 대조군 반응을 수행하는 데 필요한 시약을 포함할 수 있다. 특정 반응에서 이용되는 시약의 최적량은 본 명세서의 내용을 파악한 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 키트는 분리된 패키지 또는 구획에 상술한 성분들을 포함한다.

IV. cDNA 말단의 고속 증폭 (RACE)에로의 응용

본 발명의 ACP를 이용하는 본 응용은 cDNA 말단을 고속으로 증폭하는 방법, 소위 RACE 기술의 개선된 방법을 제공한다. 보다 상세하게는, 본 발명의 ACP는 3'- 및 5'-말단에 대한 RACE 기술에 적용되어 종래의 RACE 기술에서 이용된 프라이머로부터 초래된 백그라운드 문제점을 해결한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 mRNA의 3'-말단 부위에 상당한 cDNA 부위를 포함하는 타겟 cDNA 단편의 고속 증폭방법으로서, 상기 방법은 mRNA의 역전사 단계 및 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상술한 ACPs 중 어느 한 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다. 바람직하게는,

ACP 구조에 따른 상기 프라이머는 역전사 과정에서 생성된 cDNA의 한 위치에 실질적으로 상보적인 유전자-특이 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 그의 3'-말단 부위에 갖거나 또는 mRNAs의 폴리 A 테일에 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 3'-말단 부위에 갖는다.

본 발명의 구체적인 구현예에서, 본 발명의 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함한다:

- (a) 주형 유도 효소적 디옥시리보핵산 합성을 발생하는 데 충분한 조건 하에서, 상기 mRNA의 폴리A 테일에 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 3'-말단 부위에 포함하는 상술한 ACP 중 어느 하나의 제1차 프라이머에 상기 mRNA를 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNA를 역전사하여 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNA에 상보적인 제1차 cDNA쇄의 군집을 생성하는 단계;
- (c) 상술한 ACP 중 어느 하나의 제2차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 프라이머는 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 제1차 cDNA쇄들 중 하나의 한 위치에 실질적으로 상보적인 유전자-특이 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 갖으며, 상기 사이클은 제2차 프라이머가 상기 제1차 cDNA쇄들 중 하나의 유전자-특이 위치와 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 유전자-특이 제2차 cDNA쇄가 생성되는, 제1차 어닐링 온도에서 상기 제1차 cDNA쇄의 제1단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,
- (d) 단계 (a) 및 (c)에 이용된 제1차 및 제2차 프라이머와 동일한 프라이머 또는 단계 (a) 및 (c)에서 이용된 제1차 및 제2차 프라이머 각각의 5'-말단 부위에 상당한 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 유전자-특이 제2차 cDNA쇄의 3'- 및 5'-말단에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 유전자-특이 cDNA쇄의 증폭 산물이 생성되는, 고염력 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (c)의 유전자-특이 제2차 cDNA쇄의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

본 발명의 ACP를 이용한 본 적용은, 상술한 핵산 서열의 증폭 방법에 따라 실시되기 때문에, 과도한 반복성을 초래하는 본 명세서의 복잡성을 피하기 위하여 공통된 내용은 그 기재를 생략한다.

신규한 ACP 시스템을 이용한 mRNA의 3'-말단에 상당한 3'-말단 부분을 포함하는 타겟 cDNA 단편을 증폭하는 본 발명의 방법, 소위 ACP-관여 3' RACE는 도 3에 예시되어 있다.

본 발명의 방법에서 단계 (c) 및 (d)는 프라이머를 제외하고는, 동일 반응 혼합물을 이용하여 단일 튜브 내에서 실시될 수 있으며, 이는 단계 (c) 및 (d)가 단지 시간적으로만 분리되어 있음을 의미하는 것이다. 5'-말단 부위에 상당한 프라이머는 제2차 cDNA쇄 합성시에 또는 후에 반응 혼합물에 첨가될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 5'-말단 부위에 상당한 프라이머는 단계 (2)가 완료된 직후에 반응혼합물에 첨가되며, 이어 제2차 cDNA쇄의 PCR 증폭이 이루어진다.

본 발명의 다른 변형예에 따르면, 제1차 및 제2차 ACPs의 5'-말단 부위에 상당한 프라이머 대신에, 제1차 및 제2차 ACPs의 전(全)서열이, 단계 (c)에서 수득한 제2차 cDNA쇄를 증폭하는 단계 (d)에서 3' 프라이머 및 5' 프라이머로서 이용될 수 있으며, 이 경우, 제2차 ACP를 이용하여 초기에 합성된 제2차 cDNA쇄의 3'- 및 5'-말단 각각은 제1차 ACP의 상보적인 서열 및 제2차 ACP의 서열을 포함하며, 제1차 및 제2차 ACPs에 대한 완벽한 페어링 위치로서의 작용을 한다. 도 3은 또한 상술한 변형예에 mRNA의 3'-말단에 상당한 3'-말단 부분을 포함하는 타겟 cDNA 단편을 증폭하는 과정을 예시한다.

3'-RACE에 대한 본 발명의 주 특징 중 하나는, cDNA 합성 프라이머로서, mRNA의 폴리A 테일에 실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1차 프라이머를 이용하고, 생성된 cDNAs를 후속의 증폭 과정에 직접적으로 주형으로 이용한다는 것으로, cDNA 합성 프라이머를 제거하는 정제 과정을 거치지 않는다.

상술한 ACP의 원리에 기재된 바와 같이, 상대적 고염력 조건 하에서 ACP의 3'- 및 5'-말단 부위에 미치는 조절자 부위의 영향 때문에, 후속의 증폭 과정시 주형에 제1차 ACP가 어닐링되는 것이 방해받을 수 있다. 결과적으로, 3'-RACE에 의한 본 응용은 정제과정을 제거함으로써 종래의 RACE 방법을 단순화하며, 또한, 본 발명에 이용되는 ACP는 백그라운드 문제점을 해결하며, ACPs 내의 3'- 및 5'-말단 부위 사이에 위치한 조절자의 부위의 존재에 의해 3'-말단 부위의 어닐링이 특정화된다. 반면, 3'-RACE용 올리고-dT 프라이머와 같은 종래의 cDNA 합성 프라이머는 PCR시 백그라운드, 비-특이적 산물을 생성시킨다. 바람직한 구현예에 따르면, cDNA 합성용 제1차 ACP의 일반식은 일반식 (2)와 동일하다.

유전자-특이 프라이머가 5' 프라이머로 이용되는 경우, 3'-말단 서열을 포함하는 단계 (c)의 타겟 cDNA 단편의 제1단계 증폭은 종래의 PCR 방법에 따라 실시된다. 서열과 관련하여 사용된 용어 "유전자-특이"는 당업자에게 공지된 특정 유전자의 부분 서열 또는 그의 상보체를 의미한다. 따라서, 유전자 특이 프라이머는 유전자-특이 서열을 포함하는 프라이머를 의미한다.

생성된 제2차 cDNA쇄는, 상술한 본 발명의 타겟 핵산 서열 증폭방법에 이용되는 제2단계 증폭 과정에 의해 증폭된다. 본 발명의 ACP는 프라이머 내에 안정된 T_m 을 형성시키고 또한 프라이머 디자인에 있어서의 "프라이머 서치 변수" (예컨대, 프라이머 길이, 어닐링 온도, GC 양 및 PCR 산물 길이)에 대한 관용성을 갖게 하기 때문에, 유전자-특이 프라이머 서열이 낮은 T_m 을 갖거나 상기 변수에 매우 민감하여 특정 산물을 생성하지 못하는 경우에, 유용하다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 mRNA의 5'-말단 부위에 상당한 cDNA 부위를 포함하는 타겟 DNA 단편의 고속 증폭방법으로서, 상기 방법은 mRNA의 역전사 단계 및 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상술한 ACPs 중 어느 하나의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, ACP 구조에 따른 상기 프라이머는 역전사 과정에서 생성된 cDNA의 한 위치에 실질적으로 상보적인 유전자-특이 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 그의 3'-말단 부위에 갖는다.

본 발명의 구체적인 구현예에서, 본 발명의 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함한다:

(a) 주형 유도 효소적 디옥시리보핵산 합성을 발생하는 데 충분한 조건 하에서, mRNA의 한 부위에 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 cDNA 합성 프라이머로서 올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머 또는 랜덤 (random) 프라이머에 mRNAs를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 cDNA 합성 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNAs를 역전사효소를 이용하여 역전사하여 상기 cDNA 합성 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNAs에 상보적인 제1차 cDNA쇄의 군집을 생성하여, 결국 mRNA-cDNA 중간체를 생성하는 단계;

(c) 역전사효소의 말단 전이효소 반응을 통하여 상기 mRNA-cDNA 중간체의 상기 제1차 cDNA쇄의 3'-말단에 시토신 잔기를 테일링 (tailing)시키는 단계;

(d) 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체의 군에 의해 분리되는 3'-말단 부위 및 5'-말단 부위를 포함하며, 상기 3'-말단 부위는 상기 제1차 cDNA쇄의 3'-말단의 시토신 테일에 혼성화되는 최소 3개의 구아닌 잔기를 그의 3'-말단에 포함하며, 상기 5'-말단 부위는 전-선택된 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 단계 (c)로부터 형성된 상기 제1차 cDNA쇄의 3'-말단의 시토신 테일을 접촉시켜, 상기 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단 부위를 상기 시토신 테일에 혼성화시키는 단계;

(e) 역전사효소를 이용하여 상기 제1차 cDNA쇄의 3'-말단을 연장함으로써, 상기 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 추가 서열을 생성시키는 단계로서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 연장 반응에서 주형의 작용을 하고, 결국 전장 제1차 cDNA쇄를 연장시키는 단계;

(f) 다음의 단계를 포함하며, 제1차 어닐링 온도에서 단계 (e)로부터 수득한 상기 전장 제1차 cDNA쇄의 제1단계 증폭을 실시하는 단계:

(i) 제1차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 프라이머는 상기 전장 제1차 cDNA쇄의 3'-말단 서열에 실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 사이클은 상기 제1차 프라이머가 상기 전장 제1차 cDNA쇄의 3'-말단과 어닐링되는 조건에서 실시되는 제2차 전장 cDNA쇄를 생성시키는 단계;

(ii) 상술한 ACPs 중 어느 하나의 제2차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 프라이머는 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 제2차 전장 cDNA쇄들 중 하나의 한 부위에 실질적으로 상보적인 유전자-특이 혼성화 서열을 갖으며, 상기 사이클은 상기 제2차 프라이머가 상기 제2차 전장 cDNA쇄들 중 하나의 유전자-특히 위치에 어닐링되는 조건에서 실시되는 유전자-특이 cDNA쇄를 생성시키는 단계; 그리고,

(g) 단계 (f)-(i) 및 (f)-(ii)에 이용된 제1차 및 제2차 프라이머와 동일한 프라이머 또는 단계 (f)-(i) 및 (f)-(ii)에 이용된 제1차 및 제2차 프라이머의 각각의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 유전자-특이 cDNA쇄의 3'- 및 5'-말단에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 유전자-특이 cDNA쇄의 증폭 산물이 생성되는, 고염격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 유전자-특이 cDNA쇄의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

신규한 ACP 시스템을 이용한 mRNA의 5'-말단에 상당한 5'-말단 부분을 포함하는 타겟 cDNA 단편을 증폭하는 본 발명의 방법, 소위 ACP-관여 5' RACE는 도 4A (올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머 이용) 및 도 4B (랜덤 프라이머 이용)에 예시되어 있다.

단계 (a)에서 이용되는 올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머에 대한 상세한 설명은, mRNA로부터 타겟 핵산 서열을 증폭하는 본 발명의 방법과 동일하다. 선택적으로, 타겟 mRNA의 크기가 커서 5' 완전 서열에 도달하기 전에 역전사 효소가 떨어지는 경우, cDNA 합성 프라이머로서 랜덤 프라이머가 이용된다.

바람직한 구현예에 따르면, 단계 (c), 시토신 잔기를 테일링하는 과정은 망간 이온의 존재 하에서 실시된다.

본 발명의 방법에서 단계 (f) 및 (g)는 프라이머를 제외하고는, 동일 반응 혼합물을 이용하여 단일 튜브 내에서 실시될 수 있으며, 이는 단계 (f) 및 (g)가 단지 시간적으로만 분리되어 있음을 의미하는 것이다. 단계 (f) 및 (g)에 이용되는 프라이머는 각각의 단계시에 또는 그 후에 반응 혼합물에 첨가될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 프라이머는 각각의 단계가 종료된 후 반응 혼합물에 첨가되며, 이어 제2차 cDNA쇄의 PCR 증폭이 실시된다.

유전자-특이 프라이머가 5' 프라이머로 이용되는 경우, 단계 (f)에서 5'-말단 서열을 포함하는 타겟 cDNA 단편의 증폭은 당업자에게 공지된 통상의 PCR 방법에 따라 고염격 조건 하에서 실시된다.

바람직한 구현예에서, 단계 (f)에서 5'-말단 서열을 포함하는 타겟 cDNA 단편의 증폭은 3'-말단 부위에 유전자-특이 서열을 포함하는 제2차 ACP를 이용하여, 상술한 본 발명의 타겟 핵산 서열 증폭방법에 이용되는 두 단계 PCR 증폭에 따라 실시된다. 본 발명의 ACP는 프라이머 내에 안정된 T_m 을 형성시키고 또한 프라이머 디자인에 있어서의 "프라이머 서치 변수" (예컨대, 프라이머 길이, 어닐링 온도, GC 양 및 PCR 산물 길이)에 대한 관용성을 갖게 하기 때문에, 유전자-특이 프라이머 서열이 낮은 T_m 을 갖거나 상기 변수에 매우 민감하여 특정 산물을 생성하지 못하는 경우에, 유용하다. 제2차 ACP의 일반식은 3'-말단 부위가 유전자-특이 서열을 포함하는 일반식 (1)과 동일하다.

3'-말단에 최소 3개의 구아닌 잔기를 포함하고, 역전사 효소에 의한 제1차 cDNA쇄의 3'-말단 연장을 위한 주형 스위칭 프라이머로 이용된다는 측면에서, 단계 (d)에 이용되는 올리고뉴클레오타이드는 캡파인더 (CapFinder) 프라이머 (Chenchik et al., 1998; Chenchik et al. 미국 특허 제5,962,271호 및 제5,962,272호)와 유사하다. 그러나, 상기 두 프라이머는 PCR시 어닐링 온도에 따라 주형 핵산에 대한 프라이머 어닐링을 조절할 수 있는 지 여부에 따라 명백한 차이가 있다. 캡파인더 프라이머는 ACP에서 프라이머 어닐링을 조절하는 데 관여하는 유니버설 염기 잔기군을 포함하지 않기 때문에, 5'-RACE용 캡파인더 PCR 방법 (Chenchik et al., 1998)은, PCR시 cDNA 합성에 이용되는 올리고-dT 프라이머와 캡파인더와 같은 프라이머의 오염으로부터 초래되는 DNA 스미어와 같은 높은 백그라운드 문제점을 갖는다. 반대로, 제1차 ACP의 유니버설 염기 잔기군은 프라이머 어닐링을 조절하는 데 중요한 역할을 하기 때문에, 본 발명의 방법은 PCR 증폭에서의 백그라운드 문제를 야기하지 않으며; 이는 5'-RACE에로의 ACP 응용의 주특징이다.

또한, 본 발명의 ACP가 5'-RACE 기술에 이용되는 경우, 고상 cDNA 합성과 같은 물리적 분리 과정과 cDNA 합성에서 이용되는 모든 오염물을 제거하기 위한 다른 대체방법 (Schramm et al., 2000)이 필요 없게 된다.

본 발명의 바람직한 구현예에서, 5'-RACE를 위하여 시토신 테일과 염기쌍을 형성하는 올리고뉴클레오타이드는 ACP와 유사한 구조를 가지며, 다음 일반식 (3)으로 나타낸다: 5'-dX₁₅₋₃₀-dY₂₋₁₀-dZ₁₋₁₀-G₃₋₅-3', 상기 일반식에서 dX는 디옥시리보뉴클레오타이드를 나타내며 전-선택 아비트러리 서열을 포함하고; dY는 2-10개의 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체를 포함하는 조절자 부위를 나타내며; dZ는 디옥시리보뉴클레오타이드를 나타내며 전-선택 아비트러리 서열을 포함하고; 그리고, G₃₋₅는 3-5개의 구아닌을 나타낸다.

가장 바람직하게는, 상기 3'-말단 부위 서열 dZ의 길이는 약 2-3 뉴클레오타이드이다. 본 발명의 일 구현예에서, 상기 5'-말단 부위 dX는 제한효소에 인식부위 서열을 포함할 수 있다.

상기 G_{3-5} 는 3-5개의 리보구아닌 또는 디옥시리보구아닌이거나, 또는 리보구아닌과 디옥시리보구아닌의 조합이다. 보다 바람직하게는, G_{3-5} 는 2개의 리보구아닌 및 1개의 디옥시리보구아닌 ($r(G)_2-d(G)-3'$)이며, 가장 바람직하게는 3개의 리보구아닌이다.

단계 (f)에서 유전자-특이 프라이머가 5'-RACE용 3' 프라이머로 이용되는 경우, 5'-말단 서열을 포함하는 타겟 cDNA 단편의 증폭은 당업계에 공지된 통상의 PCR 방법에 따라 고염격 조건 하에서 실시된다.

바람직한 구현예에서, 5'-말단 서열을 포함하는 타겟 cDNA 단편의 증폭은, 3'-말단 부위에 유전자-특이 서열을 포함하는 제2차 ACP를 이용하여, 상술한 본 발명의 타겟 핵산 서열 증폭방법에 이용되는 두 단계 PCR 증폭에 따라 실시된다. 본 발명의 ACP는 프라이머 내에 안정된 T_m 을 형성시키고 또한 프라이머 디자인에 있어서의 "프라이머 서치 변수"(예컨대, 프라이머 길이, 어닐링 온도, GC 양 및 PCR 산물 길이)에 대한 관용성을 갖게 하기 때문에, 유전자-특이 프라이머 서열이 낮은 T_m 을 갖거나 상기 변수에 매우 민감하여 특정 산물을 생성하지 못하는 경우에, 유용하다. 제2차 ACP의 일반식은 3'-말단 부위가 유전자-특이 서열을 포함하는 일반식 (1)과 동일하다.

RACE 기술에서의 ACP는, 상술한 cDNA 말단의 증폭에 기재된 바와 같이 종래의 RACE 기술을 상당히 단순화하고 개선시킨다. 본 발명의 주요한 특징은, 종래의 RACE 방법에서 이용되는 프라이머로부터 초래된 백그라운드 문제점을 극복한다는 것이다. 결과적으로, 본 발명의 방법은, 종래의 RACE 방법들과 비교하여, 보다 효율적이고, 편이하며, 노동력이 덜 필요하고, 보다 재현성이 높다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 세트 (제1차 및 제2차 프라이머 포함)를 포함하는, mRNA의 3'-말단 부위에 상당한 cDNA 부위를 포함하는 타겟 cDNA 단편을 고속으로 증폭하기 위한 키트를 제공한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 키트는 ACPs의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 가지는 프라이머 또는 프라이머쌍을 추가적으로 포함하며; 5'-말단 부위가 유니버설 프라이머 서열을 포함하는 경우, 보다 바람직하게는 본 발명의 키트는 유니버설 프라이머를 포함한다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 PCR 반응에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소, DNA 중합효소 조인자 및 디옥시리보뉴클레오타이드-5'-트리포스페이트를 포함할 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 다양한 폴리뉴클레오타이드 분자, 역전사 효소, 다양한 완충액 및 시약, DNA 중합효소의 활성을 억제하는 항체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 포지티브 및 네가티브 대조군 반응을 수행하는 데 필요한 시약을 포함할 수 있다. 특정 반응에서 이용되는 시약의 최적량은 본 명세서의 내용을 파악한 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 키트는 분리된 패키지 또는 구획에 상술한 성분들을 포함한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 세트 (cDNA 합성을 위한 올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머 및 랜덤 프라이머, 시토신 테일과 염기쌍을 형성하는 올리고뉴클레오타이드, 제1차 및 제2차 프라이머 포함)를 포함하는, mRNA의 5'-말단 부위에 상당한 cDNA 부위를 포함하는 타겟 DNA 단편을 고속으로 증폭하기 위한 키트를 제공한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 키트는 단계 (f)-(i) 및 (f)-(ii)에 이용되는 제1차 및 제2차 프라이머의 각각의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 가지는 프라이머 또는 프라이머쌍을 추가적으로 포함하며; 5'-말단 부위가 유니버설 프라이머 서열을 포함하는 경우, 보다 바람직하게는 본 발명의 키트는 유니버설 프라이머를 포함한다.

V. 전장 cDNA의 증폭으로의 응용

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 mRNAs에 상보적인 전장 이중쇄 cDNAs의 군집을 증폭하는 방법으로서, 상기 방법은 mRNA의 역전사 단계 및 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상술한 ACP 중 어느 한 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, ACP의 구조를 가지는 프라이머는 mRNAs의 폴리 A 테일에 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 다음의 단계를 포함한다:

- (a) 주형 유도 효소적 디옥시리보핵산 합성을 발생시키는 데 충분한 조건 하에서, 상기 mRNA의 폴리 A 테일에 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 3'-말단 부위에 포함하는 상술한 ACP 중 어느 하나의 제1차 프라이머에 상기 mRNAs를 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNAs를 역전사효소를 이용하여 역전사하여 상기 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNAs에 상보적인 제1차 cDNA쇄의 군집을 생성하여, 결국 mRNA-cDNA 중간체를 생성시키는 단계;
- (c) 역전사효소의 말단 전이효소 반응을 통하여 상기 mRNA-cDNA 중간체의 상기 제1차 cDNA쇄의 3'-말단에 시토신 잔기를 테일링시키는 단계;
- (d) 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체의 군에 의해 분리되는 3'-말단 부위 및 5'-말단 부위를 포함하며, 상기 3'-말단 부위는 상기 제1차 cDNA쇄의 3'-말단의 시토신 테일에 혼성화되는 최소 3개의 구아닌 잔기를 그의 3'-말단에 포함하며, 상기 5'-말단 부위는 전-선택된 아비트리리 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 단계 (c)로부터 형성된 상기 제1차 cDNA쇄의 3'-말단의 시토신 테일을 접촉시켜, 상기 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단 부위를 상기 시토신 테일에 혼성화시키는 단계;
- (e) 역전사효소를 이용하여 상기 제1차 cDNA쇄의 테일링된 3'-말단을 연장함으로써, 상기 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 추가 서열을 생성시키는 단계로서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 연장 반응에서 주형의 작용을 하고, 결국 전장 제1차 cDNA쇄를 연장시키는 단계; 그리고,
- (f) 단계 (a) 및 (d)에 이용된 제1차 프라이머 및 올리고뉴클레오타이드와 동일한 프라이머에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍 또는 단계 (a) 및 (d)에 이용된 제1차 프라이머 및 올리고뉴클레오타이드의 각각의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 전장 제1차 cDNA쇄의 3'- 및 5'-말단 서열에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 mRNAs에 상보적인 전장 cDNA쇄의 증폭 산물이 생성되는, 단계 (e)로부터 생성된 상기 전장 제1차 cDNA쇄의 증폭을 실시하는 단계.

본 발명의 ACP를 이용한 본 적용은, 상술한 핵산 서열의 증폭 방법을 이용하기 때문에, 과도한 반복성을 초래하는 본 명세서의 복잡성을 피하기 위하여 공통된 내용은 그 기재 생략한다. 또한, 폴리 A 테일에 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 3'-말단 부위에 포함하는 상술한 ACP는 본 발명의 3'-RACE에 이용되는 제1차 프라이머와 원칙적으로 동일하다. 또한, 단계 (f)에서 이용되는, 시토신 테일과 염기쌍을 형성하는 올리고뉴클레오타이드 및 프라이머쌍은 상술한 본 발명의 5'-RACE에 이용되는 것과 원칙적으로 동일하다.

전장 cDNA 분자를 증폭하는 본 발명의 방법은 도 5에 예시되어 있다.

전장 cDNAs를 증폭하는 방법에서의 ACP는, 종래의 기술들을 상당히 단순화하고 개선시킨다. 본 발명의 주요한 특징은, 종래의 방법에서 이용되는 프라이머로부터 초래된 백그라운드 문제점을 극복한다는 것이다. 결과적으로, 본 발명의 방법은, 종래의 방법들과 비교하여, 보다 효율적이고, 편이하며, 노동력이 덜 필요하고, 보다 재현성이 높다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 세트 (올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머, 시토신 테일과 염기쌍을 형성하는 올리고뉴클레오타이드, 그리고 단계 (f)에서 이용되는 프라이머 (들) 포함)를 포함하는, mRNA에 상보적인 전장 이중쇄 cDNAs의 군집을 증폭하기 위한 키트를 제공한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 키트는 단계 (a) 및 (d)에서 이용되는 프라이머 및 올리고뉴클레오타이드 각각의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 가지는 프라이머쌍을 추가적으로 포함하며; 5'-말단 부위가 유니버설 프라이머 서열을 포함하는 경우, 보다 바람직하게는 본 발명의 키트는 유니버설 프라이머를 포함한다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 PCR 반응에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소, DNA 중합효소 조인자 및 디옥시리보뉴클레오타이드-5'-트리포스페이트를 포함할 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 다양한 폴리뉴클레오타이드 분자, 역전사 효소, 다양한 완충액 및 시약, DNA 중합효소의 활성을 억제하는 항체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 포지티브 및 네가티브 대조군 반응을 수행하는 데 필요한 시약을 포함할 수 있다. 특정 반응에서 이용되는 시약의 최적량은 본 명세서의 내용을 파악한 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 키트는 분리된 패키지 또는 구획에 상술한 성분들을 포함한다.

VI. 5'-풍부화 cDNA의 증폭에로의 응용

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 mRNAs의 5'-말단 부분에 상당한 cDNA 부분을 포함하는 5'-풍부화 (5'-enriched) 이중쇄 cDNAs의 군집을 증폭하는 방법으로서, 상기 방법은 mRNAs의 역전사 단계 및 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상술한 ACP 중 어느 하나의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, cDNA 합성에 이용되며 ACP의 구조를 갖는 프라이머는 그의 3'-말단 부위에 최소 6개의 랜덤 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 다음의 단계를 포함한다:

- (a) 주형 유도 효소적 디옥시리보핵산 합성을 발생시키는 데 충분한 조건 하에서, 3'-말단 부위에 최소 6개의 랜덤 뉴클레오타이드 서열을 갖는 상술한 ACP 어느 하나의 제1차 프라이머에 상기 mRNAs를 접촉시키는 단계;
- (b) 상술한 전장 이중쇄 cDNAs의 군집을 증폭하는 방법의 단계 (b)-(e)를 실시하여 5'-풍부화 제1차 cDNAs를 연장시키는 단계; 그리고,
- (c) 단계 (a) 및 (b)에 이용된 제1차 프라이머 및 올리고뉴클레오타이드의 각각의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 5'-풍부화 제1차 cDNA쇄의 3'- 및 5'-말단 서열에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 5'-풍부화 cDNA쇄의 증폭 산물이 생성되는, 단계 (b)로부터 생성된 상기 5'-풍부화 제1차 cDNA쇄의 증폭을 실시하는 단계.

본 발명의 ACP를 이용한 본 적용은, 상술한 핵산 서열의 증폭 방법을 이용하기 때문에, 과도한 반복성을 초래하는 본 명세서의 복잡성을 피하기 위하여 공통된 내용은 그 기재를 생략한다. 또한, 단계 (c)에서 이용되는, 시토신 테일과 염기쌍을 형성하는 올리고뉴클레오타이드 및 프라이머쌍은 상술한 본 발명의 5'-RACE에 이용되는 것과 원칙적으로 동일하다.

mRNAs에 상보적인 5'-풍부화 이중쇄 cDNAs의 군집을 증폭하는 본 발명의 방법은 도 6에 예시되어 있다.

용어 "5'-풍부화 cDNAs"는 cDNAs가 생성되는 mRNAs의 5'-말단의 뉴클레오타이드 서열 정보를 포함하는 cDNA 분자를 의미한다.

제1차 프라이머의 일반식은 3'-말단 부위가 랜덤 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 일반식 (1)과 동일하다. 바람직한 구현예에서, 단계 (a)에서 이용되는 제1차 프라이머의 3'-말단 부위는 최소 6개의 랜덤 디옥시리보뉴클레오타이드를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 단계 (a)에서 이용되는 제1차 프라이머의 5'-말단 부위는 제한효소 인식 서열을 포함할 수 있다.

종래의 방법은 프라이머 어닐링을 조절할 수 없는 종래의 프라이머를 이용하기 때문에, mRNA 분자에 상보적인 5'-풍부화 cDNA 분자를 증폭하는 데, 본 발명의 방법보다 더 많은 단계를 요구한다. 반대로, 본 발명의 방법은 ACP 내의 유니버설 염기 잔기군의 영향에 의하여 초래되는 프라이머 어닐링 조절 때문에, 간편하고 효과적이다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 세트 (제1차 프라이머, 시토신 테일과 염기쌍을 형성하는 올리고뉴클레오타이드)를 포함하는, mRNAs에 상보적인 5'-풍부화 이중쇄 cDNAs를 증폭하기 위한 키트를 제공한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 키트는 단계 (a) 및 (b)에서 이용되는 프라이머 및 올리고뉴클레오타이드 각각의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 가지는 프라이머쌍을 추가적으로 포함하며; 5'-말단 부위가 유니버설 프라이머 서열을 포함하는 경우, 보다 바람직하게는 본 발명의 키트는 유니버설 프라이머를 포함한다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 PCR 반응에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소, DNA 중합효소 조인자 및 디옥시리보뉴클레오타이드-5'-트리포스페이트를 포함할 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 다양한 폴리뉴클레오타이드 분자, 역전사 효소, 다양한 완충액 및 시약, DNA 중합효소의 활성을 억제하는 항체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 포지티브 및 네가티브 대조군 반응을 수행하는 데 필요한 시약을 포함할 수 있다. 특정 반응에서 이용되는 시약의 최적량은 본 명세서의 내용을 파악한 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 키트는 분리된 패키지 또는 구획에 상술한 성분들을 포함한다.

VII. DNA 또는 RNA 핑거프린팅으로의 응용

ACP를 이용한 본 응용은 게놈 DNA 내의 다형성 검출 (DNA 핑거프린팅) 또는 mRNA 수준에서의 분별 발현되는 유전자의 검출 (RNA 핑거프린팅) 방법에 대한 개선을 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하는 gDNA의 DNA 핑거프린트 (fingerprint)를 생성하는 방법에 있어서, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상술한 ACPs 중 어느 하나의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, ACP 구조를 갖는 상기 프라이머는 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 gDNA상의 위치에 실질적으로 상보적인 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

본 발명의 특정 구현예에서, 본 발명의 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며 다음의 단계를 포함한다:

(a) 상술한 ACPs 중 어느 하나의 프라이머 또는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 프라이머 각각은 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 gDNA상의 위치에 실질적으로 상보적인 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 갖으며, 상기 사이클은 상기 프라이머 또는 프라이머쌍이 상기 gDNA에 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 DNA 핑거프린트로 특징되는 독립의 (discrete) DNA 단편들의 세트가 생성되는, 제1차 어닐링 온도에서 gDNA로부터 게놈의 특징적인 독립의 DNA 단편들의 세트인 DNA 핑거프린트의 제1단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,

(b) 단계 (a)에 이용된 프라이머 또는 프라이머쌍, 또는 단계 (a)에서 이용되는 프라이머 또는 프라이머쌍의 각각의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머 또는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 단계 (a)로부터 생성된 독립의 DNA 단편들의 세트의 3'- 및 5'-말단에 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 독립의 DNA 단편들의 세트가 재증폭되는, 고염격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (a)로부터 생성된 독립의 DNA 단편들의 세트의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명은 mRNA 시료의 RNA 핑거프린트를 제조하는 방법에 있어서, 상기 방법은 역전사 단계 및 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상술한 ACPs 중 어느 하나의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, ACP 구조를 갖는 상기 프라이머는, 역전사과정에 의해 생성된 cDNA쇄 상의 위치와 실질적으로 상보적인 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 갖거나 또는 mRNA 시료의 폴리 A 테일에 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

본 발명의 특정 구현예에서, 본 발명의 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함한다:

(a) 주형 유도 효소적 디옥시리보핵산 합성을 발생시키는 데 충분한 조건 하에서, 혼성화되는 상기 mRNA 시료의 폴리 A 테일에 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 갖는 상술한 ACPs 중 어느 하나의 제1차 프라이머에 상기 mRNA 시료를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNA 시료를 역전사하여 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNA 시료에 상보적인 제1차 cDNA쇄의 군집을 생성하는 단계;

(c) 상술한 ACPs 중 어느 하나의 제2차 프라이머 또는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 프라이머 각각은 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 제1차 cDNA쇄의 위치와 실질적으로 상보적인 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 갖으며, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 mRNA 시료에 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 RNA 핑거프린트로 특징되는 독립의 (discrete) cDNA 단편들의 세트가 생성되는, 제1차 어닐링 온도에서 단계 (b)에서 생성된 제1차 cDNA쇄의 군집의 제1단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,

(d) 단계 (c)에 이용된 프라이머 또는 프라이머쌍, 또는 단계 (c)에서 이용되는 프라이머 또는 프라이머쌍의 각각의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머 또는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 단계 (c)에서 생성된 독립의 cDNA 단편들의 세트의 3'- 및 5'-말단에 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 독립의 cDNA 단편들의 세트가 재증폭되는, 고염격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (c)에서 생성된 독립의 cDNA 단편들의 세트의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

본 발명의 ACP를 이용한 본 적용은, 상술한 핵산 서열의 증폭 방법을 이용하기 때문에, 과도한 반복성을 초래하는 본 명세서의 복잡성을 피하기 위하여 공통된 내용은 그 기재를 생략한다. 또한, RNA 핑거프린팅은 원칙적으로 분별 발현 mRNA에 상보적인 DNA 검출하는 본 발명의 방법을 따른다.

용어 "게놈 DNA (genomic DNA)"는 한 종의 완전한 유전물질을 포함하는 DNA의 한 군집을 의미한다. 따라서, 게놈 DNA는 특정 종에 존재하는 유전자들의 완전한 세트를 포함한다. 또한, 한 종의 완전한 유전자 세트는 게놈 (genome)으로도 표현된다. 용어 DNA 또는 RNA "핑거프린팅"은 게놈의 특징이 되는 독립의 (discrete) DNA 증폭 산물의 한 세트 또는 mRNA 시료의 특징이 되는 독립의 cDNA 단편들의 한 세트를 의미한다.

아비트러리 프라이머를 이용하는 종래의 PCR 핑거프린팅에서, 소위 AP-PCR에서, 낮은 어닐링 온도가 아비트러리 프라이머를 달성하기 위하여 요구되기 때문에, PCR 증폭의 초기 2-5 사이클 동안 비엄격 조건 하에서 짧거나 긴 아비트러리 프라이머가 이용되며, 이러한 특징 때문에, 후속의 증폭과정이 고엄격 조건 하에서 실시된다 하여도, 분리된 단편들의 상당 부분은 재현성이 없다.

AP-PCR과는 다르게, 핑거프린팅을 위한 ACP-관여 PCR은, ACP의 3'- 및 5'-말단 부위 사이에 위치한 유니버설 염기 잔기군의 기능 때문에, PCR시 프라이머 어닐링의 특이성을 증가시키며, 상기 유니버설 염기 잔기군은 어닐링 위치를 ACP의 3'-말단 부위로 한정시킴으로써, 높은 어닐링 온도에서 3'-말단 부위가 어닐링되도록 한다. 따라서, 핑거프린팅을 위한 ACP-관여 PCR은 위양 산물을 완벽하게 제거하고 재현성을 상당히 증가시킨다.

본 발명의 바람직한 구현예에서, ACP는 그의 3'-말단 부위에 최소 6 뉴클레오타이드의 아비트러리 서열을 포함한다. 보다 바람직하게는, 3'-말단 부위의 길이는 8-15 뉴클레오타이드이고, 가장 바람직하게는 약 10 뉴클레오타이드이다.

단일 ACP 또는 ACPs의 쌍은 DNA 핑거프린팅에서 다형성 (polymorphism)을 검출하는 데 이용될 수 있다. 바람직하게는, ACPs의 쌍이 DNA 핑거프린팅을 위해 이용되며, 이는 단일 아비트러리 ACP보다 ACPs의 쌍이 더욱 많은 산물을 생성하기 때문이다.

ACP를 이용하는 DNA 핑거프린팅의 예는 다음의 조건으로 두 단계 PCR 증폭에 의해 실시된다: 증폭 반응은, 저엄격 조건 하에서 어닐링, 연장 및 변성 반응을 포함하는 제1단계 PCR의 두 사이클에 의해 실시되고; 게놈 DNA, PCR 반응 완충액, $MgCl_2$, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP)와 ACPs의 쌍을 포함하는 반응 혼합물을 전열한 다음, Taq 중합효소를 반응혼합물에 첨가하며; 제1단계 PCR이 완료된 후, ACPs의 5'-말단 부위에 상당한 전-선택 아비트러리 프라이머 JYC4를 반응 혼합물에 첨가한 다음, 제2단계 PCR 증폭을 실시한다.

DNA 핑거프린팅을 생성하기 위하여, ACP의 적당량을 이용하는 것이 바람직하다. ACP의 양이 너무 낮은 경우에는, 생성되는 증폭 산물의 재현성이 없다. 반대로, ACP의 양이 과도한 경우에는, PCR시 DNA 스미어와 같은 백그라운드 문제가 발생된다. 바람직한 구현예에서, ACP의 농도는 약 0.1 μM 내지 2 μM 이다. 가장 바람직하게는, ACP의 농도는 약 1.4 μM 이다.

바람직한 구현예에서, ACPs의 5'-말단 부위에 상당한 프라이머의 농도는 약 0.1 μM 내지 2 μM 이고, 가장 바람직하게는, 약 0.8 μM 이다.

게놈 DNA 및 mRNA 시료는 다양한 생물학적 물질과 조건 하에서 수득할 수 있다. 예를 들어, 상기 시료는 식물, 동물 (인간) 및 미생물 그리고 상이한 개별 유기체들로부터 얻을 수 있다.

증폭 산물은 젤 전기영동에 의해 분석할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 생성된 PCR 산물은 변성 폴리아크릴아미드 젤에서 오토라디오그래피 또는 실버 염색 (Gottschlich et al., 1997; Kociok et al., 1998), 형광-표지 올리고뉴클레오타이드의 이용 (Bauer et al. 1993; Ito et al. 1994; Luehrsen et al., 1997; Smith et al., 1997) 및 바이오틴-표지된 프라이머의 이용 (Korn et al., 1992; Tagle et al., 1993; Rosok et al., 1996)과 같은 비-방사능 검출 방법으로 검출할 수 있다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 세트를 포함하는, gDNA 또는 mRNA를 이용한 DNA 핑거프린팅을 생성하기 위한 키트를 제공한다. 핵산 서열 증폭용 키트 그리고 분별 발현 mRNA에 상보적인 DNA의 검출용 키트에 대한 설명은 본 발명의 키트에도 적용된다.

VIII. 멀티유전자 패밀리의 보존성 호몰로지 단편의 동정예로의 응용

ACP를 이용한 본 응용은 멀티유전자 패밀리의 보존성 호몰로지 단편 (conserved homology segments)을 동정하는 방법에 대한 개선을 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 mRNA 시료로부터 멀티유전자 패밀리의 보존성 호몰로지 단편을 동정하는 방법에 있어서, 상기 방법은 역전사 단계 및 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상술한 ACPs 중 어느 하나의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, ACP 구조를 갖는 상기 프라이머는 그의 3'-말단 부위에 역전사과정으로부터 생성된 cDNA쇄의 보존성 호몰로지 단편의 아미노산 서열을 암호화하는 축퇴성 서열 또는 컨센서스 (consensus) 서열에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열 및/또는 mRNAs의 폴리 A 테일에 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

본 발명의 특정 구현예에서, 본 발명의 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며 다음의 단계를 포함한다:

(a) 주형 유도 효소적 디옥시리보핵산 합성을 발생시키는 데 충분한 조건 하에서, 혼성화되는 상기 mRNA 시료의 폴리 A 테일에 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 갖는 청구항 1-29 중 어느 한 항의 제1차 프라이머에 상기 mRNA 시료를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNA 시료를 역전사하여 상기 제1차 프라이머가 혼성화되는 상기 mRNA 시료에 상보적인 제1차 cDNA쇄의 군집을 생성하는 단계;

(c) 청구항 1-25 중 어느 한 항의 제2차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 프라이머 각각은 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 제1차 cDNA쇄의 보존성 호몰로지 단편의 아미노산 서열을 암호화하는 축퇴성 서열 또는 컨센서스 서열에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 사이클은 상기 제2차 프라이머가 제1차 cDNA쇄의 상기 컨센서스 서열 또는 축퇴성 서열에 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 상기 컨센서스 서열 또는 축퇴성 서열을 갖는 3'-말단 cDNA 단편이 생성되는, 제1차 어닐링 온도에서 단계 (b)에서 생성된 제1차 cDNA쇄의 군집의 제1단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,

(d) 단계 (a) 및 (c)에 이용된 제1차 프라이머 및 제2차 프라이머와 동일한 프라이머, 또는 단계 (a) 및 (c)에 이용된 제1차 프라이머 및 제2차 프라이머 각각의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 3'-말단 cDNA 단편의 3'- 및 5'-말단에 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 3'-말단 보존성 호몰로지 cDNA 단편이 증폭되는, 고염격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (c)에서 생성된 3'-말단 cDNA 단편의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

상기 본 발명의 특정 구현예는, 원칙적으로, 제2차 프라이머를 제외하고는, 상술한 본 발명의 3'-RACE 방법을 따른다.

본 발명의 다른 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함한다:

(a) 상술한 전장 이중쇄 cDNA의 군집을 증폭하는 방법의 단계 (a)-(e)를 실시하여 전장 cDNA쇄를 생성하는 단계;

(b) 다음의 단계를 포함하며, 제1차 어닐링 온도에서 단계 (a)에서 수득한 상기 전장 제1차 cDNA쇄의 제1단계 증폭을 실시하는 단계:

(i) 제1차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 프라이머는 상기 전장 제1차 cDNA쇄의 3'-말단 서열에 실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 사이클은 상기 제1차 프라이머가 상기 전장 제1차 cDNA쇄의 3'-말단과 어닐링되는 조건에서 실시되는 제2차 전장 cDNA쇄를 생성시키는 단계;

(ii) 청구항 1-25 중 어느 한 항의 제2차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 프라이머는 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 제2차 cDNA쇄의 보존성 호몰로지 단편의 아미노산 서열을 암호화하는 축퇴성 서열 또는 컨센서스 서열에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 사이클은 상기 제2차 프라이머가 제2차 전장 cDNA쇄의 상기 컨센서스 서열 또는 축퇴성 서열에 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 상기 컨센서스 서열 또는 축퇴성 서열을 갖는 5'-말단 cDNA 단편을 생성시키는 단계; 그리고,

(c) 단계 (b)-(i) 및 (b)-(ii)에 이용된 제1차 및 제2차 프라이머와 동일한 프라이머 또는 단계 (b)-(i) 및 (b)-(ii)에 이용된 제1차 및 제2차 프라이머의 각각의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드를 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한

프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 5'-말단 cDNA 단편의 3'- 및 5'-말단에 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 5'-말단 보존성 호몰로지 cDNA 단편이 증폭되는, 고염격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (b)에서 생성된 5'-말단 cDNA 단편의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

상기 본 발명의 특정 구현에는, 원칙적으로, 제2차 프라이머를 제외하고는, 상술한 본 발명의 5'-RACE 방법을 따른다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 gDNA로부터 멀티유전자 패밀리의 보존성 호몰로지 단편을 동정하는 방법에 있어서, 상기 방법은 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상술한 ACPs 중 어느 하나의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, ACP 구조를 갖는 상기 프라이머는 그의 3'-말단 부위에 gDNA상의 보존성 호몰로지 단편의 아미노산 서열을 암호화하는 축퇴성 서열 또는 컨센서스 서열에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖는다.

본 발명의 특정 구현에에서, 본 발명의 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며 다음의 단계를 포함한다:

(a) 상술한 ACPs 중 어느 하나의 프라이머 또는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 프라이머 각각은 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 gDNA상의 보존성 호몰로지 단편의 아미노산 서열을 암호화하는 축퇴성 서열 또는 컨센서스 서열에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 사이클은 상기 프라이머가 상기 gDNA의 컨센서스 서열 또는 축퇴성 서열에 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 상기 컨센서스 서열 또는 축퇴성 서열을 갖는 게놈 DNA 단편을 생성시키는 단계; 그리고,

(b) 단계 (a)에 이용된 프라이머 또는 프라이머쌍, 또는 단계 (a)에서 이용되는 프라이머 또는 프라이머쌍의 각각의 5'-말단 부위에 상당한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머 또는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 단계 (a)로부터 생성된 게놈 DNA 단편의 3'- 및 5'-말단에 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 보존성 호몰로지 게놈 DNA 단편이 증폭되는, 고염격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (a)에서 생성된 게놈 DNA 단편의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

상기 본 발명의 방법은, 원칙적으로, 프라이머를 제외하고는, 상술한 본 발명의 타겟 핵산 서열의 증폭방법을 따른다.

본 발명의 ACP를 이용한 본 적용은, 상술한 핵산 서열의 증폭 방법을 이용하기 때문에, 과도한 반복성을 초래하는 본 명세서의 복잡성을 피하기 위하여 공통된 내용은 그 기재를 생략한다. 또한, mRNA를 출발물질로 이용하는 경우, 본 발명의 3'- 또는 5'-RACE 방법은, 멀티유전자 패밀리의 보존성 호몰로지 단편을 동정하는 본 발명의 방법에 원칙적으로 적용된다.

멀티유전자 패밀리의 보존성 호몰로지 단편을 동정하는 방법에 이용되는 ACP의 일반식은, ACP의 3'-말단 부위에, 보존성 호몰로지의 아미노산 서열을 암호화하는 축퇴성 서열 또는 유전자 패밀리의 컨센서스 서열에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 가지는, 일반식 (1)과 동일하다.

축퇴성 프라이머를 제작하는 데에는 두가지 기본적인 방법이 있다: (a) 정제된 단백질로부터 얻은 펩타이드 서열 데이터를 이용하는 방법; 및 (b) 유전자 패밀리들을 정렬 (alignment)하여 얻은 컨센서스 단백질 서열 데이터를 이용하는 방법. 목적 유전자의 오소로그들 (orthologs)을 상이한 유기체들로부터 클로닝하였거나, 유전자가 유전자 패밀리의 일원인 경우, 단백질 서열 정렬을 만드는 것이 가능하다.

상기한 방법들은, 예를 들어, 크게 보존된 부분의 컨센서스 서열로부터 축퇴성 프라이머를 제작하기 위한 적합한 부분을 찾아낼 수 있다. 축퇴성 프라이머를 이용한 증폭은 가끔 문제점이 있고, 최적화 과정을 요구한다. 첫 번째 변수는 어닐링 온도이다. 과도한 비특이 증폭을 피하기 위해서는 어닐링 온도를 가능한 높게 유지하는 것이 중요하며, 바람직하게는 출발 온도는 55°C이다. 일반적으로, 상기한 원칙을 따르는 것이 어려운데, 그 이유는 축퇴성 프라이머가 아미노산 서열을 기초로 하여 제작되어야 하기 때문이다. 그러나, 본 발명의 ACP는 상기한 요건을 만족시켜야 하는 필요를 제거하는 데, 그 이유는 ACP는 프라이머 디자인과 무관하게 제2단계 PCR 증폭에서 65°C와 같은 높은 어닐링 온도를 사용하는 것을 가능하게 하기 때문이다.

본 발명의 바람직한 구현에 따르면, 제2차 프라이머는 컨센서스 서열의 아미노산 서열을 암호화하는 복수의 뉴클레오타이드들로부터 선택되는 축퇴성 서열을 포함하는 프라이머들의 풀 (pool)이다.

용어 "보존성 부분 (conserved region)" 및 보다 특징적으로 "멀티유전자 패밀리의 한 유전자의 보존성 부분"은 유전자 패밀리의 멤버들 사이에 상당한 상동성을 가지는 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자의 뉴클레오타이드 서열의 단편을 의미한다. 상동성 정도는 다양하다. 어떠한 경우, 보존성 부분은 패밀리의 멤버들 사이에 동일하다. 다른 경우, 패밀리의 멤버들 사이에 보존된 아미노산 단편을 암호화하지만, 뉴클레오타이드 서열이 상당히 다른 경우도 있다. 용어 "컨센서스 서열"은, 다수의 유사한 뉴클레오타이드 서열들을 비교할 때, 특정 위치에서 가장 빈번하게 발견되는 염기들을 의미한다.

선택적으로, 보존성 호몰로지 단편을 동정하는 본 발명의 방법은, 분별 발현 mRNAs를 검출하는 방법과 결합될 수 있다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 세트를 포함하는, mRNA 또는 gDNA로부터 멀티유전자 패밀리의 보존성 호몰로지 단편을 동정하기 위한 키트를 제공한다. 상술한 핵산 서열 증폭용 키트, 3'-RACE 및 5'-RACE를 위한 키트에 대한 설명은 본 발명의 키트에도 적용된다.

IX. 뉴클레오타이드 변이의 동정에서의 응용

ACP를 이용한 본 응용은 타깃 핵산 내의 뉴클레오타이드 변이 (variation)를 동정하는 방법에 대한 개선을 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 타깃 핵산 내의 뉴클레오타이드 변이를 동정하는 방법에 있어서, 상기 방법은 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상술한 ACPs 중 어느 하나의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, ACP 구조를 갖는 프라이머는 (a) 그의 3'-말단 부위에 타깃 핵산의 제1 위치의 전-선택된 서열에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 제1차 프라이머 및 제1 위치 각각은 상기 뉴클레오타이드 변이에 해당하는 의문 위치 (interrogation position)를 포함하는 제1차 프라이머, 및/또는 (b) 타깃 핵산의 제2 위치의 전-선택된 서열에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 가지는 제2차 프라이머이다.

본 발명의 특정 구현예에서, 본 발명의 방법은 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시되며, 다음의 단계를 포함한다:

(a) 상술한 ACPs 중 어느 하나의 제1차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 제1차 어닐링 온도에서 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 상기 타깃 핵산에 상보적인 제1차 DNA쇄를 생성시키는 제1단계 증폭을 실시하는 단계로서, 상기 프라이머는 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 타깃 핵산의 제1 위치의 전-선택된 서열에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 제1차 프라이머 및 제1 위치 각각은 상기 뉴클레오타이드 변이에 해당하는 의문 위치 (interrogation position)를 포함하며, 결과적으로 상기 의문 위치가 상기 제1 위치의 그에 상당한 뉴클레오타이드에 상보적인 제1 프라이머의 상보적 뉴클레오타이드에 의해 차지되면 (occupied), 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 상기 타깃 핵산에 상보적인 상기 제1차 DNA쇄를 생성시키는 단계;

(b) 다음의 단계를 포함하며, 고엄격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 단계 (a)에서 수득한 상기 제1차 DNA쇄의 제2단계 증폭을 실시하는 단계:

(i) 상술한 ACPs 중 어느 하나의 제2차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 프라이머는 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 타깃 핵산의 제2 위치에 있는 전-선택된 서열에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 사이클은 상기 제2차 프라이머가 상기 타깃 핵산의 상기 제2 위치에 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 상기 제1차 DNA쇄에 상보적인 제2차 DNA쇄를 생성시키는 단계; 그리고,

(ii) 단계 (a) 및 (b)-(i)에 이용된 제1차 및 제2차 프라이머와 동일한 프라이머 또는 단계 (b)-(i)에서 생성된 상기 제2차 DNA쇄의 3'- 및 5'-말단에 상보적인 또는 상당한 혼성화 서열을 갖는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 제2차 DNA쇄의 3'- 및 5'-말단에 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 3'- 및 5'-말단에 상기 타깃 핵산의 상기 제1 위치 및 제2 위치를 포함하는 상기 제2차 DNA쇄를 증폭하여 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 상기 제2차 DNA쇄에 상당한 짧은 타깃 뉴클레오타이드 단편을 생성시키는 단계.

본 발명의 ACP를 이용한 본 적용은, 상술한 핵산 서열의 증폭 방법을 이용하기 때문에, 과도한 반복성을 초래하는 본 명세서의 복잡성을 피하기 위하여 공통된 내용은 그 기재를 생략한다.

신규 ACP를 이용하여 단일 뉴클레오타이드 다형성 (SNP) 게놈타이핑 (genome typing)하는 본 발명의 구체적인 구현에는 도 7A에 예시되어 있다.

뉴클레오타이드 변이 동정용 ACP의 일반식은, 일반식 (1)과 동일하며, 이 경우, 3'-말단 부위에 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 타깃 핵산의 한 위치의 전-선택된 서열에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 포함하며, 상기 뉴클레오타이드 변이에 상당한 뉴클레오타이드 및 ACP의 상보적인 뉴클레오타이드는 의문 위치를 차지한다. 본 발명의 방법은, 타깃 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 시료 DNA의 단편 또는 환자혈액과 같은 시료로부터 얻은 게놈 DNA를 이용하여 두 단계 PCR 증폭에 따라 실시된다. 목적의 뉴클레오타이드 시료는 인간 핵산 및 감염성 질환을 야기하는 유기체로부터 얻을 수 있다.

두 단계 PCR 증폭에 따라 단일 뉴클레오타이드 다형성 (SNP) 게놈타이핑을 위한 방법은, 기본적으로, 게놈 DNA를 출발 물질로 하는 타깃 핵산 서열의 증폭 방법을 따른다. 또한, 본 발명의 멀티플렉스 DNA 증폭방법도 본 방법에 적용될 수 있다.

출발물질로서 타깃 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 시료 DNA의 단편을 이용하기 위하여, 단계 (a) 전에, 타깃 단편은 시료 DNA에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용하여 전(前)-증폭하는 것이 바람직하다. 또한, 멀티플 SNP 스크리닝을 위한 출발물질로서 SNP를 포함하는 2종 이상의 타깃 뉴클레오타이드 단편은 상술한 응용 II의 멀티플렉스 DNA 증폭에 의해 제조될 수 있다.

다형성 염기를 검출하기 위한 단계 (a)에 이용되는 제1차 ACP는, 그의 3'-말단 부위내에, 타깃 핵산내의 뉴클레오타이드 변이에 상당한 뉴클레오타이드에 상보적인 뉴클레오타이드에 의해 차지되는, 의문 위치를 포함하는 대립유전자-특이 ACP이다. 바람직하게는, 제1차 프라이머의 의문 위치는 3'-말단 부위의 중간에 위치한다. 보다 바람직하게는, 대립유전자-특이 ACP의 의문 위치는 3'-말단 뉴클레오타이드로부터 약 10 염기 내에 있다. 보다 더 바람직하게는, 대립유전자-특이 ACP의 의문 위치는 프라이머의 3'-말단 뉴클레오타이드로부터 약 6 염기 내에 있다. 다른 바람직한 구현예에서, 대립유전자-특이 ACP의 의문 위치는 3'-말단 뉴클레오타이드로부터 4-6 염기 이격된 위치에 있다. 가장 바람직하게는, 대립유전자-특이 ACP의 의문 위치는 3'-말단 뉴클레오타이드로부터 5 염기 이격된 위치에 있다. 용어 "3'-말단 뉴클레오타이드"는 ACP의 3'-말단에 위치한 뉴클레오타이드를 의미한다.

다른 구현예에서, 단계 (a)에서 이용되는 대립유전자-특이 ACP의 3'-말단 부위의 길이는 최소 6 뉴클레오타이드이고, 이는 프라이머 어닐링에 있어 최소 길이 요건이다. 바람직하게는, 3'-말단 부위 서열의 길이는 약 8 내지 20 뉴클레오타이드이다. 가장 바람직하게는, 3'-말단 부위 서열은 의문 위치를 포함하며 약 10 뉴클레오타이드의 길이를 가진다.

본 발명의 일 구현예에서, ACP는 자신의 3'-말단 부위에 최소 하나의 인위적인 미스매치(mismatch)를 가지며, 상기 미스매치는, DNA 이합체의 입체적 구조를 손상시키지 않으면서 4종의 염기와 최소한의 수소결합을 하는 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체이다. 상기 인위적 미스매치의 위치는 실험 디자인에 따라 다양할 수 있으나, 제1차 프라이머의 의문 위치에 인접한 것이 바람직하다.

바람직한 구현예에서, 제1차 또는 제2차 프라이머는 검출 또는 분리용 표지를 가지는 최소 하나의 뉴클레오타이드를 포함한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단계 (a)에서 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 제1차 DNA쇄는 프라이머 어닐링, 연장 및 변성의 1 사이클에 의해 생성된다. 단계 (b)-(i)에서 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 제2차 DNA쇄는, 바람직하게는, 프라이머 어닐링, 연장 및 변성의 1 사이클에 의해 생성된다. 바람직하게는, 단계 (b)-(ii)에서 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 제2차 DNA쇄는, 바람직하게는, 프라이머 어닐링, 연장 및 변성의 최소 5 사이클에 의해 증폭된다.

뉴클레오타이드 변이를 포함하는 증폭된 DNA쇄 단편을 이용하는 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 다음의 단계를 포함하며, 제1차 증폭과정 및 제2차 증폭과정의 두 개의 개별적 증폭과정을 이용하여 실시되고, 상기 제2차 증폭과정은 두 단계 증폭을 이용하여 실시된다:

(a) 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하는, 양말단 사이에 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 짧은 DNA쇄 단편을 생성시키기 위한 제1차 증폭과정을 실시하는 단계로서, 상기 프라이머 쌍 각각은 상기 타깃 핵산의 한 위치의 전-선택된 서열에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 포함하며, 상기 뉴클레오타

이드 변이는 상기 전-선택된 서열들 사이에 위치해 있고, 상기 프라이머쌍 중 최소 하나는 3'-말단 부위에 상기 혼성화 서열을 갖는 상술한 ACPs 중 어느 하나의 프라이머이며, 결과적으로 양말단 사이에 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 상기 짧은 DNA쇄 단편을 생성시키는 단계;

(b) 상술한 ACPs 중 어느 하나의 제1차 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 제1차 어닐링 온도에서 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 상기 짧은 DNA쇄 단편에 상보적인 제1차 DNA쇄를 생성하기 위한 제2차 증폭과정의 제1단계 증폭을 실시하는 단계로서, 상기 프라이머는 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 타깃 핵산의 제1 위치의 전-선택된 서열에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 제1차 프라이머 및 제1 위치 각각은 상기 뉴클레오타이드 변이에 해당하는 의문 위치 (interrogation position)를 포함하며, 결과적으로 상기 의문 위치가 상기 제1 위치의 그에 상당한 뉴클레오타이드에 상보적인 제1 프라이머의 상보적 뉴클레오타이드에 의해 차지되면, 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 상기 타깃 핵산에 상보적인 상기 제1차 DNA쇄를 생성시키는 단계; 그리고,

(c) 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 제2차 어닐링 온도에서 단계 (a)의 상기 제1차 DNA쇄의 제2단계 증폭을 실시하는 단계로서, 상기 프라이머쌍 중 한 프라이머는 단계 (a)에서 이용된 상술한 ACPs 중 어느 하나의 프라이머와 동일하고, 다른 프라이머는 단계 (b)에서 이용된 상기 제1차 프라이머와 동일하고, 또는 상기 프라이머쌍의 각각의 프라이머는 상기 제1차 DNA쇄의 3'- 및 5'-말단에 상보적인 또는 상당한 혼성화 서열을 갖으며, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 제1차 DNA쇄의 3'- 및 5'-말단에 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 상기 제1차 DNA쇄가 증폭됨으로써 상기 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 상기 제1차 DNA쇄에 상당한 짧은 타깃 뉴클레오타이드 단편을 생성시키는 단계.

신규 ACP를 이용한 단일 뉴클레오타이드 다형성 (SNP) 게놈타이핑에 대한 다른 특정 구현예는 도 7B에 예시되어 있다. 본 특정 구현예는 상술한 구현예와 유사하게 실시되기 때문에, 과도한 반복성을 초래하는 본 명세서의 복잡성을 피하기 위하여 공통된 내용은 그 기재를 생략한다.

본 발명의 방법은 단일 뉴클레오타이드 다형성 및 점 돌연변이 (치환, 결실 및 부가)를 포함하는 뉴클레오타이드 변이의 다양한 형태에 적용될 수 있다.

증폭 산물은 젤 전기영동에 의해 분석할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 생성된 PCR 산물은 변성 폴리아크릴아미드 젤에서 오토라디오그래피 또는 실버 염색 (Gottschlich et al., 1997; Kociok et al., 1998), 형광-표지 올리고뉴클레오타이드의 이용 (Bauer et al. 1993; Ito et al. 1994; Luehrsen et al., 1997; Smith et al., 1997) 및 바이오틴-표지된 프라이머의 이용 (Korn et al., 1992; Tagle et al., 1993; Rosok et al., 1996)과 같은 비-방사능 검출 방법으로 검출할 수 있다.

멀티플 SNP 스크리닝에 있어서, 멀티플렉스 DNA 증폭에 의해 생성된 증폭 산물들은 크기 분리에 의해 비교할 수 있다. 상기 크기 분리 비교는, 아가로스 젤 매트릭스 또는 폴리아크릴아미드 젤 매트릭스에서의 전기영동 또는 시퀀싱에 의해 실시될 수도 있다. 또한, 자동 분석용 형광-표지 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 이용하여 증폭 산물들을 검출할 수 있다.

용어 "의문 위치"는 타깃 핵산 내에 있는 목적의 특정 뉴클레오타이드 염기의 위치를 의미한다. 예를 들어, SNPs 분석에 있어서, 타깃 핵산 내의 "의문 위치"는 야생형과 다른 염기를 갖는 위치를 의미한다. 또한, 의문 위치는, 타깃 핵산의 의문 위치에 상보적인 프라이머의 뉴클레오타이드 서열의 위치를 포함한다. 타깃 핵산의 의문 위치는, 프라이머가 타깃 핵산에 혼성화될 때, 프라이머의 의문 위치에 대해 정반대쪽에 위치해 있다.

용어 "다형성"은 상이한 게놈들 또는 개체들에서 둘 또는 그 이상의 대체적인(alternative) 게놈 서열 또는 대립 유전자의 존재를 나타낸다. 용어 "다형적 (polymorphic)"은 특정 게놈 서열의 둘 또는 그 이상의 변이가 한 군집 내에서 발견되는 상태를 의미한다. "다형성 위치 (polymorphic site)"는 변이가 발생하는 좌위를 나타낸다. 단일 뉴클레오타이드 다형성 또는 SNP는 단일 염기쌍 변이이며, 전형적으로 다형성 위치에서 하나의 뉴클레오타이드가 다른 뉴클레오타이드로 치환되는 것을 나타낸다. 단일 뉴클레오타이드의 결실 또는 부가도 단일 뉴클레오타이드 다형성을 초래할 수 있다. 전형적으로, 상이한 게놈들 또는 상이한 개체들 사이에서, 다형성 위치는 두 개의 상이한 뉴클레오타이드에 의해 차지될 수 있다. 용어 "대립 유전자 (allele)"는 특정 게놈 좌위 또는 마커에서 자연적으로 발생하는 서열 변이들 (개체들의 군집에서 검출가능한 것)의 집합의 특정 멤버를 나타낸다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 세트 (제1차 및 제2차 프라이머 포함)를 포함하는, 타깃 핵산에서 뉴클레오타이드 변이를 동정하기 위한 키트를 제공한다. 상술한 핵산 서열 증폭용 키트에 대한 설명은 본 발명의 키트에도 적용된다.

X. 변이유발에로의 응용

ACP를 이용한 본 응용은 변이유발 (mutagenesis)하는 방법에 대한 개선을 제공한다. ACP-관여 PCR은 변이유발에 대한 최상의 도구를 제공하며, 상기 변이유발은 서열의 결실 또는 부가, 하나 또는 몇 개의 특정 뉴클레오타이드의 치환, 그리고 뉴클레오타이드 서열의 랜덤 변이를 포함한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 타겟 핵산에서 변이유발 (mutagenesis)하는 방법에 있어서, 상기 방법은 프라이머를 이용한 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머 중 최소 하나는 상술한 ACPs 중 어느 하나의 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, ACP 구조를 가지는 프라이머는, 그의 3'-말단 부위에 타겟 핵산 서열의 한 부위와 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 혼성화 서열은 변이를 발생시키기 위한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 두 단계 증폭과정을 이용하여 실시된다:

(a) 상술한 ACPs 중 어느 하나의 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 두 사이클을 포함하고, 상기 프라이머 각각은 그의 3'-말단 부위에 혼성화되는 상기 타겟 핵산 서열의 한 부위와 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖으며, 상기 혼성화 서열은 위치-지정 변이를 발생시키기 위하여 최소 하나의 미스매치 (mismatch) 뉴클레오타이드를 갖으며, 상기 사이클은 프라이머 또는 프라이머쌍이 상기 타겟 뉴클레오타이드 서열과 어닐링되는 조건에서 실시되며, 결과적으로 위치-지정 변이 위치를 포함하는 증폭 산물이 생성되는, 제1차 어닐링 온도에서 상기 타겟 핵산 서열의 제1단계 증폭을 실시하는 단계; 그리고,

(b) 단계 (a)에 이용된 프라이머와 동일한 프라이머 또는 단계 (a)에서 이용된 프라이머의 5'-말단 부위에 상당한 전-선택 아비트러리 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 사이클을 포함하고, 상기 사이클은 각각의 프라이머가 상기 증폭 산물의 3'- 및 5'-말단에 각각 어닐링되는 조건 하에서 실시되며, 결과적으로 위치-지정 변이 위치를 포함하는 증폭 산물이 재증폭되는, 고염격 조건인 제2차 어닐링 온도에서 상기 단계 (a)의 증폭 산물의 제2단계 증폭을 실시하는 단계.

상기 특정 구현예는 위치-지정 변이유발 방법에 관한 것이다.

본 발명의 ACP를 이용한 본 적용은, 상술한 핵산 서열의 증폭 방법을 이용하기 때문에, 과도한 반복성을 초래하는 본 명세서의 복잡성을 피하기 위하여 공통된 내용은 그 기재를 생략한다.

PCR 변이유발에 이용되는 ACP의 일반식은 3'-말단 부위가 위치-지정 변이유발 또는 랜덤 변이유발을 위한 서열을 포함하는 일반식 (1)과 동일하다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 어닐링 조절 프라이머 또는 어닐링 조절 프라이머의 세트를 포함하는, 타겟 핵산에서 변이유발을 하기 위한 키트를 제공한다. 상술한 핵산 서열 증폭용 키트에 대한 설명은 본 발명의 키트에도 적용된다.

XI. 다른 응용

본 발명의 ACP는 핵산 증폭, 특히 PCR을 포함하는 다양한 기술에 유용하다. 예를 들어, cDNA의 혼합 올리고뉴클레오타이드-프라이밍 증폭, 장범위 PCR, 선형 PCR, 역 PCR, 정량 PCR, 터치다운 PCR, 시퀀싱, *인 시투* PCR, 벡토레트 (vectorette) PCR 및 열 비대칭 인터레이스 PCR에 유용하다. 상기한 방법들의 일반적인 과정은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) and M.J. McPherson, et al., *PCR*, Springer-Verlag New York Inc., N.Y.(2000)에 개시되어 있다.

따라서, 본 발명은 핵산 증폭, 특히 PCR이 관여하는 방법들에 있어서 ACP의 모든 용도를 포괄한다.

본 발명의 ACP는, 핵산증폭-관여 기술들에 있어서 매우 효율적이고 광범위하게 적용될 수 있다. 또한, 종래의 핵산 증폭 기술들에 잔존하는 프라이머 어닐링 특이성과 관련된 다양한 문제점들이 ACP 및 본 발명의 방법들에 의해 근본적으로 해결된다. 핵산 증폭시 ACP의 이용으로부터 얻을 수 있는 주요한 이점은 다음과 같다:

(a) 3'- 및 5'-말단 부위 사이에 위치한 조절자 부위의 존재는, 3'-말단 부위가 주형과 어닐링되는 조건하에서, 프라이머 어닐링 부위를 3'-말단 부위로 한정하기 때문에, 프라이머의 어닐링 서열은 정확하게 조절되며, 이는 소망하는 길이의 어닐링 서열을 갖는 프라이머의 제작을 가능하게 한다 (또는 어닐링 부위를 조절할 수 있는 프라이머의 제작을 가능하게 한다). 이와 같은 특성은, 프라이머의 어닐링 부위가 제한적이어야 하는 경우 (예컨대, SNP 게놈타이핑, DNA 마이크로어레이 스크리닝, 및 분별적으로 발현되는 유전자의 검출), 특히 유용하다.

(b) 3'- 및 5'-말단 부위 사이에 위치한 조절자 부위의 존재는, 3'-말단 부위가 주형과 어닐링되는 조건하에서, 5'-말단 부위가 주형에 어닐링되는 것을 방해하며, 결국 어닐링에 관여하지 않는 5'-말단 부위는 3'-말단 부위에 어닐링 특이성을 제공한다.

(c) 프라이머 어닐링의 특이성은 단일 염기 미스매칭 (mismatching)을 검출할 수 있을 정도로 매우 높다. 따라서, 단일 뉴클레오타이드 다형성 (SNP) 게놈 타이핑에 대해 특히 유용하다.

(d) ACP는 프라이머 디자인에 있어서의 "프라이머 서치 변수" (예컨대, 프라이머 길이, 어닐링 온도, GC 양 및 PCR 산물 길이)에 대한 높은 관용성을 갖게 한다.

(e) ACP는 두-단계 핵산 증폭을 제공하여 비특이성 증폭이 배제된 산물을 제공한다.

(f) 핵산 증폭의 효율이 증가하여, 희귀 mRNAs의 검출을 용이하게 한다.

(g) 핵산 증폭 산물의 재현성을 증가시켜, 시간 및 비용을 크게 절약하게 한다.

PCR과 같은 핵산 증폭 기술이 생명공학 분야에 큰 영향을 준 만큼, 상술한 바와 같이 ACP는 무한한 응용성을 발휘하여, 현재의 핵산증폭 방법들의 원칙을 근본적으로 바꾸면서 그들을 일시에 업그레이드한다. 결론적으로, 핵산 증폭 기술이 도입된 이래로, ACP 및 상술한 응용들은 새로운 생명공학 시대의 장을 여는 전환점을 제공한다.

실시예

하기의 실시예에서, 다음의 약어들이 이용된다: M (molar), mM (millimolar), μ M (micromolar), g (gram), μ g (micrograms), ng (nanograms), l (liters), ml (milliliters), μ l (microliters), $^{\circ}$ C (degree Centigrade); Promega (Promega Co., Madison, 미국); Clontech (CLONTECH Laboratories, Palo Alto, 미국); Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, 독일); QIAGEN (QIAGEN GmbH, Hilden, 독일).

실시예에서 이용된 프라이머는 표 1에 나타나 있다.

실시예 1: ACP에서 유니버설 염기의 효과 분석

ACP의 3'- 및 5'-말단 부위에 위치한 유니버설 염기 잔기들의 효과는 마우스 수태산물 조직을 이용하여 RP-PCR로 분석하였다.

공지된 방법 (Chun et al., 1999; Hwang et al., 2000)에 따라, 임신 4.5일, 11.5일 및 18.5일의 마우스 스트레인 ICR의 전체 수태산물로부터, Tri-시약 (Sigma) 또는 LiCl/우레아 방법 (Hogan et al., 1994)를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. ACP를 이용한 cDNA 증폭의 두 개별적 실험을 실시하여 유니버설 염기, 특히 ACP의 3'- 및 5'-말단 부위에 위치한 디옥시이노신 잔기들의 효과를 다음과 같이 조사하였다: A. 디옥시이노신 군을 포함하지 않는 종래의 프라이머와 ACP를 비교하여 ACP의 3'- 및 5'-말단 부위에 위치한 디옥시이노신 잔기들의 효과; B. 디옥시이노신의 수의 변화에 따른 ACP의 3'- 및 5'-말단 부위에 위치한 디옥시이노신 잔기들의 효과.

실험은 다음의 가설에 기초하여 실시하였다:

(i) 유니버설 염기 잔기들의 존재는 염기쌍에서 약한 수소결합 상호작용 때문에 ACP에서 다른 부위들보다 낮은 T_m 을 갖기 때문에, 제1차 어닐링 온도에서 주형의 한 위치에 ACP의 3'-말단 부위가 어닐링하는 조건 하에서, 주형 핵산에로의 어닐링에 참여하지 않는다.

(ii) ACP의 3'- 및 5'-말단 부위에 최소 하나의 유니버설 염기 잔기의 존재는 5'-말단 부위의 어닐링을 방해하고 프라이머 어닐링 부위를 3'-말단으로 제한한다.

(iii) ACP의 3'-말단 부위는 PCR시 주형에 대한 어닐링 부위로서만 작용한다.

(iv) 10 T 뉴클레오타이드를 포함하는 dT_{10} 를 갖는 dT-ACP의 3'-말단 부위는 주형 핵산에 결합하기에는 너무 낮은 T_m 을 갖는다.

(v) 결국, dT_{10} -ACP는 높은 어닐링 온도에서 PCR 산물을 생성하지 않는다.

A. 디옥시이노신 군을 포함하지 않는 프라이머와 ACP를 비교하여 ACP의 3'- 및 5'-말단 부위에 위치한 디옥시이노신 잔기들의 효과 분석

(a) 제1차 cDNA쇄 합성

dT_{10} -JYC2 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGATTTTTTTTTTTT-3' (제29서열) 또는 dT_{10} -ACP1 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIITTTTTTTTTTTT-3' (제30서열)을 cDNA 합성 프라이머로 이용하였다.

총 RNA 3 μ g 및 10 μ M dT_{10} -JYC2 또는 10 μ M dT_{10} -ACP1 2 μ l를 20 μ l 최종 부피로 혼합하였다. 용액을 65°C에서 10분 동안 가열한 다음, 얼음상에서 쿨링하고, 마이크로원심분리하여 하부에 용매를 모았다. 얼음상의 어닐링된 프라이머/주형에 다음의 성분들을 순차적으로 첨가하였다: RNasin 리보뉴클레아제 억제제 (Promega) 0.5 μ l (40 units/ μ l), 5x 반응 완충액 (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 50 mM DTT; Promega) 4 μ l, 2 mM 디옥시뉴클레오타이드 혼합물 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 5 μ l, 및 몰로니-뮤라인 류케미아 바이러스 (M-MLV) 역전사효소 (200 units/ μ l; Promega) 1 μ l. 반응 혼합물 20 μ l를 37°C에서 90분 동안 반응시킨 다음, 마이크로원심분리하고, 얼음 위에 2분 동안 정치시켰다. 94°C에서 2분 동안 항온처리하여 반응을 정지시켰다.

(b) ACPs를 이용한 cDNA 증폭

3'- 및 5'-말단 부위에 위치한 디옥시이노신 군의 PCR시 효과를 dT_{10} -ACP1을 이용하여 분석하였다. 디옥시이노신 군을 포함하지 않는 dT_{10} -JYC2는 대조군으로 이용하였다.

ACP10 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCCATCGACC-3' (제13서열)를 5' 프라이머로 이용하였다.

제1차 cDNA쇄 50 ng, 10 x PCR 완충액 5 μ l, 10 μ M 5' 프라이머(ACP10) 1 μ l, 10 μ M 3' 프라이머 (dT_{10} -JYC2 or dT_{10} -ACP1) 1 μ l, 25 mM $MgCl_2$ 3 μ l, 2 mM dNTP 5 μ l, Taq 중합효소 (5 units/ μ l) 0.5 μ l를 포함하는 반응 혼합물 50 μ l에서 PCR 증폭을 실시하였다. PCR 반응은 다음의 조건으로 실시하였다: 94°C에서 5분, 이어 94°C 1분, 54°C 1분 및 72°C 1분의 30 사이클, 그런 다음 72°C에서 5분 동안 최종 연장반응. 증폭 산물을 2% 아가로스 젤에서 전기영동하고 에티딘 브로마이드 염색을 하여 분석하였다.

도 8에서 볼 수 있듯이, 디옥시이노신 군을 포함하는 dT_{10} -ACP1은 거의 산물을 생성하지 않았고 (레인 4-6), 반면, 디옥시이노신 군을 포함하지 않는 dT_{10} -JYC2는 복수의 증폭된 cDNA 산물을 생성하였다 (레인 1-3). 상술한 본 발명자의 가설과 일치되게, 본 실험의 결과를 통하여, 높은 어닐링 온도 하에서 주형 cDNA에 dT_{10} -ACP의 3'- 및 5'-말단이 어닐링하는 것에 대하여 3'- 및 5'-말단 부위에 위치한 디옥시이노신 군이 영향을 미친다는 것이 명확하게 되었고, 결국 상술한 가설에 기재된 바와 같이 산물이 생성되지 않았다.

B. 디옥시이노신의 수의 변화에 따른 ACP의 3'- 및 5'-말단 부위에 위치한 디옥시이노신 잔기들의 효과

(a) 제1차 cDNA쇄 합성

cDNA 합성 프라이머로서 dT₁₀-JYC2를 이용하여 마우스 수태산물의 총 RNA로부터 제1차 cDNA쇄를 상술한 방법에 따라 합성하였다.

(b) ACPs를 이용한 cDNA 증폭

디옥시이노신의 수의 변화에 따른 3'- 및 5'-말단 부위에 위치한 디옥시이노신 잔기들의 효과를 조사하기 위하여, 다른 수의 디옥시이노신 잔기를 포함하는 4종의 ACPs를 이용하여, 특정 엄격 조건 하에서 실험하였다.

ACP16 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIGCCATCGACC-3' (제20서열);

ACP17 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCCATCGACC-3' (제21서열);

ACP18 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIIIGCCATCGACC-3' (제22서열);

ACP19 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIIIIIGCCATCGACC-3' (제23서열); 및

디옥시이노신 군을 포함하지 않는 CRP2I0 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGCCATCGACC-3' (제19서열)를 대조군으로 이용하였다.

5'-말단에 dT₁₀-ACP의 전-선택 아비트러리 서열을 포함하는, 단계 (A)로부터 생성된 제1차 cDNA쇄를 주형으로 이용하였고, dT₁₀-ACP의 5'-말단 부위에 상당한 프라이머 JYC2 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGA-3' (제10서열)을 3' 프라이머로 이용하였다.

제1차 cDNA쇄 50 ng, 10 x PCR 완충액 5 μ l, 10 μ M 5' 프라이머(ACP16, 17, 18, 19 또는 CRP2I0) 1 μ l, 10 μ M 3' 프라이머 (JYC2) 1 μ l, 25 mM MgCl₂ 3 μ l, 2 mM dNTP 5 μ l, Taq 중합효소 (5 units/ μ l) 0.5 μ l를 포함하는 반응 혼합물 50 μ l에서 PCR 증폭을 실시하였다. PCR 반응은 다음의 조건으로 실시하였다: 94°C에서 5분, 이어 94°C 1분, 57°C 1분 및 72°C 1분의 30 사이클, 그런 다음 72°C에서 5분 동안 최종 연장반응. 증폭 산물을 2% 아가로스 젤에서 전기영동하고 에티딘 브로마이드 염색을 하여 분석하였다.

도 9에서 볼 수 있듯이, 디옥시이노신 군을 포함하지 않는 CRP2I0는 복수의 cDNA 증폭산물을 생성하였으나, 최소 2개의 디옥시이노신 잔기를 포함하는 ACPs는 상당히 감소된 cDNA 증폭산물을 생성하였으며, 더욱이, 8개 디옥시이노신 잔기를 포함하는 ACP는 거의 산물을 생성하지 않았다.

상술한 본 발명자의 가설과 일치되게, 염기쌍에서 약한 수소결합 상호작용을 하는 디옥시이노신의 특성 때문에 연속적인 디옥시이노신 잔기들의 군은 고엄격 조건 하에서 3'- 및 5'-말단 부위의 어닐링을 분리시키며, 결국 ACP의 3'-말단 부위의 주형에 대한 어닐링은 5'-말단 부위로부터 분리된다는 사실을, 본 실험의 결과를 통하여 알 수 있다.

실시에 2: ACP를 이용한 타깃 핵산 서열의 증폭 방법

마우스 태반-특이 호메오박스 (homeobox) 유전자 *Esx1* cDNA의 타깃 뉴클레오타이드 서열을 증폭하기 위하여 본 발명의 ACP를 이용하였다. ACPs를 이용한 *Esx1* cDNA의 타깃 뉴클레오타이드 서열의 증폭 과정 및 결과는 다음과 같다. 마우스 18.5일 태반으로부터 얻은 총 RNA (3 μ g)를 출발물질로 이용하였다. 제1차 cDNAs쇄를 실시에 1의 cDNA 합성과 동일한 조건 하에서 제조하였으며, 이때, 올리고-dT₁₅를 제1차 cDNA쇄 합성 프라이머로 이용하였다.

올리고-dT₁₅ 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (제54서열)

ACPs를 이용하여 *Esx1*의 타겟 cDNA 단편을 증폭하기 위하여, 생성된 제1차 cDNAs를 주형으로 이용하였다. 본 실시예에는 두 단계 PCR 증폭을 실시하며, 이는 본 발명의 특징 중 하나이다.

실시예에서 이용된 *Esx1*에 대한 종래의 프라이머는 다음과 같다:

EsxN7 5'-GCCGGTTGCAGAAGCACC-3' (제44서열);

EsxC6 5'-GAACCATGTTTCTGAATGCC-3' (제45서열);

EsxN1 5'-GAATCTGAAACAACCTTTCTA-3' (제48서열);

EsxC2 5'-GATGCATGGGACGAGGCACC-3' (제49서열);

EsxN3 5'-CGCCGCAACCCCTGCCCGCA-3' (제51서열); 및

EsxC5 5'-GATGCATGGGACGAGGCA-3' (제52서열).

당업계에 공지된 통상의 PCR 방법에 이용되어 높은 백그라운드 문제 및 비-특이적 산물을 생성시키는 3종의 프라이머 세트, EsxN7과 EsxC6, EsxN1과 EsxC2, 그리고 EsxN3과 EsxC5를 본 실시예에서 이용하였다.

단일-타겟 PCR 시스템에 따르면, 유사한 용해 온도 (T_m)를 갖는 프라이머를 선택하는 것이 바람직하다. 그러나, EsxN1 (T_m 50.7°C) 및 EsxC2 (T_m 71.9°C)의 프라이머 세트는 약 20°C의 용해온도 차이가 있고, EsxN3 (T_m 86.9°C) 및 EsxC5 (T_m 66.2°C)은 둘 모두 높은 용해 온도를 갖는다. 또한, ACP의 효과를 확인하기 위하여, 유사한 용해 온도를 가지는 EsxN7 (T_m 68.2°C) 및 EsxC6 (T_m 61.2°C)의 프라이머 세트를 선택하였다.

종래의 프라이머 세트로부터 야기되는 주 문제점인, 백그라운드 및 비특이적 산물과 같은 문제점을 ACP 시스템이 극복할 수 있는 지 여부를 확인하기 위하여, 종래의 프라이머 세트에 본 발명의 ACP를 적용하였다.

다음의 ACPs는 3'-말단 부위에 종래의 프라이머의 서열을 포함하며, 제1단계 PCR 증폭에서 *Esx1* 유전자-특이 프라이머로 이용되었다:

EsxN7-ACP 5' 프라이머 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCCGGTTGCAGAAGC ACC-3 (제46서열);

EsxC6-ACP 3' 프라이머 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGAACCATGTTTCT GAATGCC-3' (제47서열);

EsxN1-ACP 5' 프라이머 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGAATCTGAAACAACCT TTCTA-3' (제50서열);

EsxC2-ACP 3' 프라이머 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGATGCATGGGACGAG GCACC-3' (제55서열);

EsxN3-ACP 5' 프라이머 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICGCCGCAACCCCTGCCCGCA-3' (제53서열); 및

EsxC5-ACP 3' 프라이머 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGATGCATGGGACGA GGCA-3' (제56서열).

ACPs의 5'-말단 부위 서열은, 제2단계 PCR 증폭과정에서 전-선택 아비트러리 프라이머 서열로서만 작용한다: JYC2 및 JYC4 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCAT-3' (제12서열).

제1단계 PCR 증폭 동안에, EsxN7-ACP 및 EsxC6-ACP의 프라이머 세트를 각각 5' 및 3' 프라이머로 이용하였고, 520-bp의 *Esx1* cDNA 단편을 생성시켰고, EsxN1-ACP 및 EsxC2-ACP의 프라이머 세트를 각각 5' 및 3' 프라이머로 이용한 경우, 784-bp의 *Esx1* cDNA 단편을 생성시켰으며, EsxN3-ACP 및 EsxC5-ACP의 프라이머 세트를 각각 5' 및 3' 프라이머로 이용한 경우, 483-bp의 *Esx1* cDNA 단편을 생성시켰다.

제2단계 PCR 증폭 동안에, JYC4 및 JYC2를 전-선택 아비트러리 5' 및 3' 프라이머로 이용하였다 (프로토콜 A). 다른 방법으로서, JYC4 및 JYC2와 같이 전-선택 아비트러리 프라이머를 이용하는 대신에, ACPs의 전체 서열을 고염격 조건 하에서의 제2단계 증폭을 위한 5' 및 3' 프라이머로 이용하였다. 이러한 경우, 제1단계 PCR시 또는 그 후에 반응혼합물에 전-선택 아비트러리 프라이머를 첨가할 필요가 없다 (프로토콜 B).

프로토콜 A: 원스톱 두 단계 PCR 증폭

(A) 제1단계 PCR 증폭

핫 스타트 PCR 방법에 따라 제1단계 PCR 증폭을 실시하였고, 이 경우, DNA 중합효소 없는 완전한 반응물이 준비되고 반응 튜브를 열순환기에서 90°C 이상에서 인큐베이션하여 초기 변성 단계를 실시한다. 이어, 상기 튜브를 70°C 이상으로 유지하면서, DNA 중합효소 적당량을 첨가한다.

어닐링, 연장 및 변성으로 구성된 PCR의 2 사이클을 실시하여 제1단계 PCR 증폭을 하였다; 제1차 cDNA쇄 50 ng, 10 x PCR 완충액 (Promega) 5 μ l, 25 mM MgCl₂ 5 μ l, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 각각 2 mM) 5 μ l, 1 μ M 5' 프라이머 1.35 μ l 및 1 μ M 3' 프라이머 1.35 μ l를 포함하는 반응혼합물을 전열하고, 반응혼합물을 포함하는 튜브를 94°C로 유지하면서, Taq 중합효소 (5 units/ μ l, Promega) 0.5 μ l를 첨가하였으며; PCR 반응은 94°C 40초, 60°C 40초 및 72°C 40초의 2 사이클을 포함하고, 94°C에서 증폭 산물을 변성시켰다.

(B) 제2단계 PCR 증폭

Esx1 유전자-특이 ACPs를 이용하여 제1단계 PCR 증폭에 의해 생성된 cDNA 산물을, 높은 어닐링 온도 하에서 제2단계 PCR 증폭과정에 따라 증폭하였다. 제1단계 PCR 증폭 과정이 완료된 다음, 10 μ M 전-선택 아비트러리 프라이머 JYC4 및 JYC2, 각각 1 μ l를 제1단계 증폭으로부터 얻은 반응혼합물에 94°C와 같은 변성 온도 하에서 첨가하였다. 제2단계 증폭은 다음과 같이 실시하였다: 94°C 40초, 68°C 40초 및 72°C 40초의 35 사이클, 이어 72°C에서 5분 동안 최종 연장.

증폭 산물을 2% 아가로스 젤에서 전기영동하고 에티뮴 브로마이드 염색을 하여 분석하였다. 또한, 생성된 PCR 산물은 변성 폴리아크릴아미드 젤에서 오토라디오그래피 또는 실버 염색 (Gottschlich et al., 1997; Kociok et al., 1998), 형광-표지 올리고뉴클레오타이드의 이용 (Bauer et al. 1993; Ito et al. 1994; Luehrsen et al., 1997; Smith et al., 1997) 및 바이오틴-표지된 프라이머의 이용 (Korn et al., 1992; Tagle et al., 1993; Rosok et al., 1996)과 같은 비-방사능 검출 방법으로 검출할 수 있다.

도 10A-C에서 볼 수 있듯이, *EsxN7*-ACP 및 *EsxC6*-ACP, *EsxN1*-ACP 및 *EsxC2*-ACP, 그리고 *EsxN3*-ACP 및 *EsxC5*-ACP의 프라이머 세트 각각을 이용하여 *EsxI*을 원스톱 두 단계 PCR 증폭한 경우, 각각 520-bp (도 10A, 레인 2), 784-bp (도 10B, 레인 4) 및 483-bp (도 10C, 레인 3)의 *EsxI* cDNA 단편에 해당하는 단일 밴드가 형성되었다. 후속의 클로닝 및 클론의 서열 분석을 통하여, 상기 밴드가 *EsxI* cDNA 단편임을 확인할 수 있었다. 반면, ACP 세트의 3'-말단 부위에 해당하는 서열만을 포함하는 종래의 프라이머 세트는 비특이적 산물을 생성하였고, DNA 스미어와 같은 높은 백그라운드를 야기하였다 (도 10A, 레인 1; 도 10B, 레인 3; 도 10C, 레인 1과 2). ACP 세트를 이용한 생성된 PCR 산물은 그 5'- 및 3'-말단에 전-선택 아비트러리 서열을 포함하기 때문에, 전-선택 아비트러리 서열에 해당하는 추가적인 54-bp 서열 및 디옥시이노신 잔기들이 관찰되었다.

도 10A는 다음의 프라이머 세트에 의해 생성된 cDNA 증폭산물을 나타낸다: *EsxN7*과 *EsxC6*의 세트 (레인 1), 그리고 *EsxN7*-ACP와 *EsxC6*-ACP의 세트 (레인 2). 종래의 프라이머 세트, *EsxN7*과 *EsxC6*를 이용한 PCR 반응은 다음과 같이 실시하였다: 94°C에서 5분, 이어, 94°C 40초, 60°C 40초 및 72°C 40초의 30 사이클, 그런 다음, 72°C에서 5분 동안 최종 연장반응.

도 10B는 다음의 단일 프라이머 또는 프라이머쌍을 이용하여 생성된 cDNA 증폭산물을 나타낸다: 레인 1 및 2에서, 프라이머, *EsxN1* 및 *EsxC2*를 각각 이용하였고; 레인 3에서, *EsxN1*-ACP과 종래의 프라이머 *EsxC2*의 조합을 이용하였으며; 레인 4에서, 두 ACPs, *EsxN1*-ACP와 *EsxC2*-ACP를 이용하였다. 종래의 프라이머 세트, *EsxN1* 및 *EsxC2*를 60°C의 높은 어닐링 온도에서 이용한 경우, 타겟-특이 산물은 생성되지 않았다. ACP인 *EsxN1*-ACP과 종래의 프라이머 *EsxC2*의 조합을 이용한 경우, 종래의 프라이머 *EsxC2*의 비특이적 결합 때문에 타겟-특이 산물 및 비특이적 산물이 증폭되었다 (레

인 3). 그러나, ACP 세트를 이용한 경우, 단지 단일의 타깃-특이 산물만이 증폭되었고 (레인 4), 이와 같은 결과는, 단일-타깃 PCR 시스템에서 요구되는 프라이머의 융해온도와 관련된 "프라이머 디자인 변수"에 대한 관용성을 본 발명의 ACP가 프라이머에 제공한다는 것을 보여준다.

도 10C는 다음의 프라이머 세트에 의해 생성된 cDNA 증폭산물을 나타낸다: EsxN3 및 EsxC5의 세트를 레인 1 및 2에서 이용하였고, EsxN3-ACP 및 EsxC5-ACP의 프라이머 세트를 레인 3에서 이용하였다. 종래의 프라이머 세트, EsxN3 및 EsxC5를 이용한 PCR 반응은 다음과 같이 실시하였다: 94°C에서 5분, 이어, 94°C 40초, 58°C 40초 및 72°C 40초의 30 사이클, 그런 다음, 72°C에서 5분 동안 최종 연장반응 (레인 1). 종래의 프라이머 세트를 ACP 세트와 비교하기 위하여, ACP에서 이용되는 두 단계 PCR 증폭 과정을 실시하였고, 이 때, 어닐링 온도를 60°C에서 68°C로 증가시켰다 (레인 2). 실험 결과, 높은 T_m 을 갖는 종래의 프라이머를 이용하여 두 단계 PCR 증폭을 한 경우, 비특이적 산물의 생성 및 백그라운드 문제점은 해결되지 않았으나, 본 발명의 ACP는 종래의 프라이머로부터 야기되는 문제점들을 해결할 수 있었다.

프로토콜 B: 논스톱 두 단계 PCR 증폭

본 발명의 변형예로서, JYC4와 JYC2과 같은 전-선택 아비트러리 프라이머를 이용하는 대신에, ACPs의 전체 서열을 고염격 조건하의 제2단계 PCR 증폭과정에서 프라이머로 이용하였다. 이러한 경우, 제1단계 PCR 반응시 또는 그 후에 반응혼합물에 전-선택 아비트러리 프라이머를 첨가할 필요가 없다.

ACP, 5' ACP (10 μ M) 1 μ l 및 3' ACP (10 μ M) 1 μ l를 제1단계 PCR 증폭과정에 첨가하는 것을 제외하고는 프로토콜 A와 동일하게 논스톱 두 단계 PCR 증폭을 실시하였고, 이 때, 전-선택 아비트러리 프라이머를 첨가하는 과정이 없기 때문에, 제1단계 PCR 증폭 과정에 이어 지체 없이 제2단계 PCR 증폭이 실시된다.

증폭 산물을 2% 아가로스 젤에서 전기영동하고 에티뮴 브로마이드 염색을 하여 분석하였다. 또한, 생성된 PCR 산물은 변성 폴리아크릴아미드 젤에서 오토라디오그래피 또는 실버 염색 (Gottschlich et al., 1997; Kociok et al., 1998), 형광-표지 올리고뉴클레오타이드의 이용 (Bauer et al. 1993; Ito et al. 1994; Luehrsens et al., 1997; Smith et al., 1997) 및 바이오틴-표지된 프라이머의 이용 (Korn et al., 1992; Tagle et al., 1993; Rosok et al., 1996)과 같은 비-방사능 검출 방법으로 검출할 수 있다.

도 10D는 다음의 단일 프라이머 또는 프라이머쌍을 이용하여 논스톱 두 단계 세트에 의해 생성된 cDNA 증폭산물을 나타낸다: 레인 1 및 2에서, 프라이머 EsxN1 및 EsxC2를 각각 이용하였고; 레인 3에서, 프라이머쌍 EsxN1 및 EsxC2를 이용하였으며; 레인 4에서 EsxN1-ACP와 EsxC2-ACP를 이용하였다. 종래의 프라이머 세트, EsxN1 및 EsxC2를 이용한 경우, 타깃-특이 산물은 생성되지 않았다. ACP 세트를 이용하여 논스톱 두 단계 PCR 증폭을 실시한 경우, 단지 단일의 타깃-특이 산물만이 증폭되었고 (레인 4), 이와 같은 결과는 원스톱 두 단계 PCR 증폭의 결과와 일치하는 것이다 (도 10B).

본 실시예를 통하여, 당업계에 공지된 PCR 방법에 이용되는 종래의 프라이머로부터 야기되는 백그라운드 문제 및 비-특이성 문제를 본 발명의 ACP가 해결할 수 있음을 알 수 있다. 또한, 본 발명의 ACP는 유전자-특이 프라이머의 디자인에 무관하게 특정 산물을 생성시킬 수 있음을 알 수 있다.

실시예 3: ACP를 이용한 마우스 배 발달 동안의 분별 발현되는 mRNAs의 동정 및 특성 연구

본 발명의 ACP를 이용하여 배발달 단계에서 분별적으로 발현되는 mRNAs를 검출하였다. 특히, 출발물질로서 수태산물 총 RNAs의 상이한 단계를 이용하여 3가지 상이한 방법을 실시하였다. 이용되는 프라이머는 표 1에 기재되어 있다.

A1. 방법 1

단계 (1): 제1차 cDNA쇄 합성

cDNA 합성 프라이머로서 dT₁₀-ACP1 or JYC5-T₁₅-ACP를 이용하여, 실시예 1의 cDNA 합성에서 사용되는 조건과 동일한 조건 하에서 제1차 cDNA쇄를 제조하였다. 제조된 cDNAs를 스핀 컬럼 (PCR 정제 키트, QIAGEN)으로 정제하여 프라이머, dNTP 및 상기 시약들을 제거하였다. 260 nm에서 UV 스펙트로스코피를 이용하여 cDNA 농도를 결정하기 전에, 정제 과정을 실시하는 것이 필요하다. 각각의 시료로부터 얻은 동일량의 cDNAs를 이용하여, 본 발명의 ACP 시스템에 의한 증폭 패턴을 비교하였다.

단계 (2): ACP를 이용한 제1단계 PCR 증폭

제1단계 PCR 증폭을 위하여, 다음의 ACPs를 아비트러리 ACPs (AR-ACP)로 이용하였다:

ACP3 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCCATCGACS-3' (제3서열);

ACP5 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIAGGCGATGCS-3' (제5서열);

ACP8 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIICTCCGATGCS-3' (제8서열);

ACP10 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCCATCGACC-3' (제13서열);

ACP13 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIAGGCGATGCG-3' (제16서열); 및

ACP14 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIICTCCGATGCC-3' (제17서열).

dT₁₀-ACP1 및 AR-ACP의 5'-말단 부위 서열은 제2단계 PCR 증폭에서 전-선택 아비트러리 프라이머 서열로서 작용한다. 전-선택 아비트러리 프라이머는 JYC2 및 JYC4이다.

5' 및 3' 프라이머로서, AR-ACP (ACP3, ACP5, ACP8, ACP10, ACP13, 또는 ACP14) 중 어느 하나 그리고 dT₁₀-ACP1를 이용하여, 제1단계 PCR 증폭과정에 따라 단계 (1)로부터 생성된 제1차 cDNAs를 증폭하였다. 제1차 cDNA 50 ng, 10 x PCR 완충액 (Promega) 5 μ l, 25 mM MgCl₂ 3 μ l, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 각각 0.2 mM) 5 μ l, 1 μ M 5' 프라이머 5 μ l 및 1 μ M 3' 프라이머 5 μ l 및 Taq 중합효소 (5 units/ μ l; Promega) 0.5 μ l를 포함하는 반응 혼합물 50 μ l에서 제1단계 PCR 증폭을 실시하였다. PCR 반응은 다음의 조건으로 실시하였다: 94°C에서 5분, 이어 94°C 1분, 50°C 1분 및 72°C 1분의 20 사이클, 그런 다음 72°C에서 5분 동안 최종 연장반응.

제1단계 PCR 증폭의 사이클 수는 시료 종류에 따라 다양하다. 예를 들어, 마우스 수태산물 시료의 경우, 제1단계 PCR 증폭의 20 사이클을 이용하였다.

단계 (3): ACP의 5'-말단 부위 서열에 상당한 전-선택 아비트러리 프라이머를 이용한 제2단계 PCR 증폭

AR-ACP 및 dT₁₀-ACP1의 5'-말단 부위 서열에 상당한 2 종의 전-선택 아비트러리 프라이머 JYC4 및 JYC2를 이용하여 제2단계 PCR 증폭에 따라, 단계 (2)로부터 생성된 cDNA 증폭 산물을 재증폭 하였다. 제1차 cDNA 증폭산물 (50 μ l) 5 μ l, 10 x PCR 완충액 (Promega) 5 μ l, 25 mM MgCl₂ 3 μ l, 2 mM dNTP 5 μ l, 5' 프라이머 (10 μ M) 1 μ l, 3' 프라이머 (10 μ M) 1 μ l 및 Taq 중합효소 (5 units/ μ l) 0.5 μ l를 포함하는 반응 혼합물에서 제2단계 PCR 증폭을 실시하였다. PCR 반응은 다음의 조건으로 실시하였다: 94°C에서 5분, 이어 94°C 1분, 65°C 1분 및 72°C 1분의 30 사이클, 그런 다음 72°C에서 5분 동안 최종 연장반응.

A2. 방법 2

본 방법은 다음의 단계를 포함한다:

(a) mRNA 전사체의 제1 군집을 대표하는 제1 핵산 시료 및 mRNA 전사체의 제2 군집을 대표하는 제2 핵산 시료를 제공하는 단계;

(b) 상기 제1 핵산 시료 및 제2 핵산 시료 각각을 제1차 ACP에 접촉시키는 단계로서, 상기 제1차 ACP는 혼성화되는 mRNA 전사체의 제1 군집 및 제2 군집의 한 부분에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 포함하며,

(c) 상기 제1차 ACP가 혼성화되는 mRNA를 역전사하여 제1차 ACP가 혼성화되는 상기 제1 핵산 시료 내의 mRNA에 상보적인 DNA쇄의 제1 군집, 그리고 제1차 ACP가 혼성화되는 mRNA에 상보적인 DNA쇄의 제2 군집을 생성하는 단계;

(d) 역전사 단계 (c)의 결과 산물인 상보적인 DNA쇄를 정제하고 정량하는 단계;

(e) DNAs쇄의 제1 및 제2 군집에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 갖는 제2차 ACP를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 PCR 사이클을 포함하고, 저엄격 조건 하에서 DNA쇄의 제1 및 제2 군집 각각에 상보적인 제2차 DNA쇄를 제조하는 단계;

(f) 제1차 및 제2차 어닐링 조절 프라이머의 5'-말단 부위에 상당한 서열을 포함하는 2종의 전-선택 아비트러리 프라이머를 이용한 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성의 최소 한 PCR 사이클을 포함하고, 고엄격 조건 하에서 단계 (e)로부터 수득한 제2차 DNA쇄를 증폭하여 증폭 산물의 제1 군집 및 제2 군집을 생성하는 단계; 그리고,

(g) 증폭 산물의 제1 및 제2 군집에서 개별적인 증폭산물의 양을 비교하는 단계.

JYC5-T₁₅-ACP 5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIITTTTTTTTTTTTTTTT-3' (제61서열)를 이용하여 제1차 cDNAs쇄를 제조하였다.

JYC5-T₁₅-ACP의 5'-말단 부위 서열은 제2단계 PCR 증폭에서 3' 전-선택 아비트러리 프라이머 서열로만 작용한다:

JYC5 5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGAT-3' (제60서열).

단계 (1): 제1차 cDNAs쇄의 합성

1. 멸균된 0.2 ml 마이크로원심분리 튜브에서 총RNA 3 µg 및 10 µM JYC5-T₁₅-ACP 2 µl를 혼합한다.
2. 최종 부피 9.5 µl가 되도록 멸균 H₂O를 첨가한다. 내용물을 혼합하고 튜브를 마이크로원심분리기에서 간단히 스피닝한다.
3. 튜브를 80℃에서 3분 동안 항온처리 하거나 또는 동일목적으로 열순환기를 이용한다.
4. 튜브를 얼음상에서 2분 동안 저온처리한다. 튜브를 마이크로원심분리기에서 간단히 스피닝하여 내용물을 침전시킨다.
5. 동일한 반응 튜브에 다음의 시약을 첨가한다: 5 x 제1차쇄 완충액 (Promega) 4 µl, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 각각 2 mM) 5 µl, RNasin 억제제 (40 units/µl, Promega) 0.5 µl 및 M-MLV 역전사효소 (200 U/µl) 1 µl.
6. 내용물을 혼합하고 튜브를 마이크로원심분리기에서 간단히 스피닝한다.
7. 튜브를 42℃에서 90분 동안 항온처리한다.
8. 튜브를 94℃에서 2분 동안 항온처리하여 제1차쇄의 합성을 종결시킨다.
9. 튜브를 얼음상에 2분 동안 정치시킨다.
10. 프라이머, dNTP 및 상술한 시약들을 제거하기 위하여 스핀 컬럼 (PCR 정제 키트, QIAGEN)을 이용하여 생성된 cDNAs를 정제한다.
11. 이어, 260 nm에서 UV 스펙트로스코피를 이용하여 cDNAs의 농도를 측정한다.
12. 단계 2를 진행시킨다.

단계 (2): ACP를 이용한 제2차 cDNA쇄의 합성

본 발명의 ACPs를 이용한 증폭 양상을 비교하기 위하여, 각각의 시료로부터 얻은 cDNAs의 동일량을 사용하였다. 제2차 cDNA쇄를 아비트러리 ACP 10을 이용하여 핫 스타트 PCR 방법에 따라 합성하였다. 이 경우, DNA 중합효소 없는 완전한 반응물이 준비되고 반응 튜브를 열순환기에서 90℃ 이상에서 인큐베이션하여 초기 변성 단계를 실시한다. 이어, 상기 튜브를 90℃ 이상으로 유지하면서, DNA 중합효소 적당량을 첨가한다.

1. 멸균된 0.2 ml 마이크로원심분리 튜브에 다음의 시약을 혼합한다: 단계 1로부터 제조된 제1차 cDNA (50 ng/ μ l) 1 μ l, 10 x PCR 완충액 (Roche) 5 μ l, 2 mM dNTP 5 μ l, 10 μ M 아비트러리 ACP (5' 프라이머) 1 μ l 및 멸균 dH₂O 37.5 μ l을 포함하는 총 49.5 μ l의 부피.
2. 내용물을 혼합하고 튜브를 마이크로원심분리기에서 간단히 스피닝한다.
3. 94℃로 예열된 열순환기에 튜브를 놓는다.
4. 튜브의 온도를 94℃로 유지하면서 Taq 중합효소 (5 units/ μ l; Roche) 0.5 μ l를 반응물에 첨가한다.
5. 다음의 조건으로 PCR를 실시한다: 94℃ 5분, 50℃ 3분 및 72℃ 1분의 1 사이클, 그런 다음 제1차 증폭산물을 변성한다.

단계 (3): ACP의 5'-말단 부위 서열에 상당한 전-선택 아비트러리 프라이머를 이용한 제2차 cDNAs쇄의 PCR 증폭

1. 제1단계 PCR 증폭이 완료된 후, 튜브의 온도를 94℃로 유지하면서, 5' 및 3' ACPs의 5'-말단 부위 서열에 상당한 10 μ M JYC4 2 μ l 및 10 μ M JYC5 2 μ l를 단계 (2)의 반응 혼합물에 첨가한다.
2. 다음의 조건으로 제2단계 PCR 반응을 실시한다: 94℃ 40초, 68℃ 40초 및 72℃ 40초의 40 사이클, 그런 다음 72℃에서 5분 동안 최종 연장반응.

A3. 방법 3

본 발명의 변형예로서, 제1차 및 제2차 ACPs의 5'-말단 부위의 전-선택 아비트러리 서열 대신에, 방법 2의 단계 (b) 및 (e)에서 이용되는 제1차 및 제2차 ACPs의 전체 서열을 3' 및 5' 프라이머로 이용하여 방법 2의 단계 (e)로부터 수득한 제2차 DNA쇄를 고염격 조건 하에서 증폭하였다. 이 경우, 제2차 ACP를 이용하여 초기에 합성된 제2차 DNA쇄의 3'- 및 5'-말단은 제1차 ACP의 서열과 제2차 ACP의 상보적 서열을 각각 포함하며, 제1차 및 제2차 ACPs에 대한 완벽한 페어링 위치로 작용을 한다. 이러한 경우, 제1단계 PCR 반응시 또는 그 후에 반응혼합물에 전-선택 아비트러리 프라이머를 첨가할 필요가 없다.

단계 (1): 제1차 cDNA쇄 합성

cDNA 합성 프라이머로서 JYC5-T₁₅-ACP를 이용하여, 방법 2의 cDNA 합성에서 이용된 조건과 동일한 조건 하에서 제1차 cDNAs를 제조하였다.

단계 (2): 논스톱 두 단계 PCR를 이용한 제2차 cDNA쇄 합성 및 증폭

본 발명의 ACPs를 이용한 증폭 양상을 비교하기 위하여, 각각의 시료로부터 얻은 cDNAs의 동일량을 사용하였다. 제2차 cDNA쇄를 아비트러리 ACP 10을 이용하여 핫 스타트 PCR 방법에 따라 합성하였다. 이 경우, DNA 중합효소 없는 완전한 반응물이 준비되고 반응 튜브를 열순환기에서 90℃ 이상에서 인큐베이션하여 초기 변성 단계를 실시한다. 이어, 상기 튜브를 90℃ 이상으로 유지하면서, DNA 중합효소 적당량을 첨가한다.

1. 멸균된 0.2 ml 마이크로원심분리 튜브에 다음의 시약을 혼합한다: 단계 1로부터 제조된 제1차 cDNA (50 ng/ μ l) 1 μ l, 10 x PCR 완충액 (Roche) 5 μ l, 2 mM dNTP 5 μ l, 10 μ M 아비트러리 ACP (5' 프라이머) 1 μ l, 10 μ M JYC5-T₁₅-ACP (3' 프라이머) 및 멸균 dH₂O 36.5 μ l을 포함하는 총 49.5 μ l의 부피.

2. 내용물을 혼합하고 튜브를 마이크로원심분리기에서 간단히 스피닝한다.
3. 94℃로 예열된 열순환기에 튜브를 놓는다.
4. 튜브의 온도를 94℃로 유지하면서 Taq 중합효소 (5 units/ μ l; Roche) 0.5 μ l를 반응물에 첨가한다.
5. 다음의 조건으로 PCR를 실시한다: 94℃ 1분, 50℃ 3분 및 72℃ 1분의 1 사이클; 이어, 94℃ 40초, 65℃ 40초 및 72℃ 40초의 40 사이클, 그런 다음 72℃에서 5분 동안 최종 연장반응.

B. 전기영동 분석에 의한 PCR 증폭 산물의 분리 및 분별 디스플레이된 밴드의 회수

증폭산물을 2% 아가로스 젤에서 전기영동하여 분석하였고, 에티뮴 브로마이드로 염색하여 검출하였다. 배발달 (E4.5, E11.5 및 E18.5) 동안에 분별 발현된 몇 개의 주 밴드들을 선택한 다음, GENE CLEAN II 키트 (BIO 101)를 이용하여 젤로부터 추출하였다. 또한, 생성된 PCR 산물은 변성 폴리아크릴아미드 젤에서 오토라디오그래피 또는 실버 염색 (Gottschlich et al., 1997; Kociok et al., 1998), 형광-표지 올리고뉴클레오타이드의 이용 (Bauer et al. 1993; Ito et al. 1994; Luehrsens et al., 1997; Smith et al., 1997) 및 바이오틴-표지된 프라이머의 이용 (Korn et al., 1992; Tagle et al., 1993; Rosok et al., 1996)과 같은 비-방사능 검출 방법으로 검출할 수 있다.

C. 회수된 밴드의 재증폭

방법 1, 2 및 3에 이용된 동일한 전-선택 아비트러리 프라이머 및 PCR 조건을 이용하여, 단계 B로부터 수득한 밴드를 재증폭하였다.

D. 재증폭 단편의 클로닝 및 시퀀싱

각각의 증폭 산물을 pGEM-T Easy 벡터 (Promega)에 클로닝하고, BigDye Terminator cycle 시퀀싱 키트 (Perkin Elmer)를 이용하는 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Biosystem)를 사용하여 시퀀싱하였다. BLAST 검색 프로그램 (Basic Local Alignment Search Tool)을 이용하여 컴퓨터-보조 서열 분석을 실시하였다.

E. 노던 분석

수태산물 조직에서 얻은 총 RNA 20 μ g을 포름알데히드를 포함하는 변성 1% 아가로스 젤에서 분해하고, 나일론막 (Hybond-N, Amersham, 미국)으로 전이시킨 다음, QuikHyb 용액 (Stratagene, USA)에서 32 P-표지 서브클로닝된 PCR 산물과 58℃에서 하룻밤 동안 혼성화시켰다 (Chun et al., 1999; Hwang et al., 2000). 블롯들 (blots)들을 2 x SSC, 0.1% SDS에서 20분 동안 65℃에서 2번 세척한 다음, 1 x SSC, 0.1% SDS에서 20분 동안 2번 세척하고, 0.1 x SSC, 0.1% SDS에서 20분 동안 2번 세척하였다. 막을 Fuji 증감 스크린을 갖는 Kodak X-Omat XK-1 필름에 -80℃에서 노출시켰다.

도 11A-D는 cDNA 증폭 산물을 나타내며, 상이한 단계로부터 얻은 마우스 수태산물 시료를 다음의 프라이머 세트를 이용하여 방법 1에 따라 증폭하였다: 도 11A의 레인 1-3은 ACP3 및 dT₁₀-ACP1; 도 11B의 레인 1-6은 ACP5 및 dT₁₀-ACP1; 도 11B의 레인 7-12는 ACP8 및 dT₁₀-ACP1. 또한, 도 11B는 다른 ACP 세트를 이용하여 생성된 cDNA 증폭산물의 추가적인 결과이다. 도 11C-D는 ACP10와 dT₁₀-ACP1 (도 11C) 그리고 ACP14와 dT₁₀-ACP1 (도 11D) 2종의 프라이머 세트를 이용하여 생성된 증폭 산물을 나타낸다. 특정 단계에서 분별적으로 발현되는 많은 밴드들을 얻고, 이를 pGEM-T Easy 벡터 (Promega)에 클로닝한 다음, 시퀀싱 하였다. 서열 분석을 통하여, 2개의 신규 유전자를 제외한 모든 클론들이 공지된 유전자임을 알 수 있었다 (표 2). 발현 양상은 마우스 수태산물 단계 블롯 (Seegene, Inc., 서울, 대한민국)을 이용한 노던 블롯 분석으로 확인하였다.

도 12A는 cDNA 증폭 산물을 나타내며, 상이한 단계로부터 얻은 마우스 수태산물 시료 (E4.5: 레인 1; E11.5: 레인 2; E18.5: 레인 3)를 ACP10와 JYC5-T₁₅-ACP를 이용하여 방법 2에 따라 증폭하였다. 특정 단계에서 분별적으로 발현되는

많은 밴드들을 얻고, 이를 pGEM-T Easy 벡터 (Promega)에 클로닝한 다음, 시퀀싱 하였다. 서열 분석을 통하여, 1개의 DEG 2를 제외한 모든 클론들이 공지의 유전자임을 알 수 있었다 (표 2). 발현 양상은 마우스 수태산물 단계 블롯 (Seegene, Inc., 서울, 대한민국)을 이용한 노던 블롯 분석으로 확인하였다.

도 12B는 cDNA 증폭 산물을 나타내며, 상이한 단계로부터 얻은 마우스 수태산물 시료 (E4.5: 레인 3; E11.5: 레인 4; E18.5: 레인 5)를 ACP10와 JYC5-T₁₅-ACP를 이용하여 상술한 방법 3의 논스톱 두 단계 PCR 방법에 따라 증폭하였다. ACP10와 JYC5-T₁₅-ACP (레인 3-5)의 세트를 이용한 경우, 생성된 밴드들은 윈스톱 두 단계 PCR 방법에 따른 방법 2에서 얻은 것과 동일하였다. 그러나, 단일 프라이머, ACP10 (레인 1) 또는 JYC5-T₁₅-ACP (레인 2)를 이용한 경우, 산물은 생성되지 않았고, 이와 같은 결과는 ACP10와 JYC5-T₁₅-ACP가 세트로서 이용되는 경우에만 증폭 산물이 생성될 수 있음을 나타내는 것이다.

도 13은 DEG1 (A; 도 10A, 도 11 및 도 12의 화살표 1), DEG2 (C), DEG3 (B; 도 10A, 도 11 및 도 12의 화살표 2), DEG5 (E), DEG7 (F), 그리고 DEG8 (D; 도 10A, 도 11 및 도 12의 화살표 4)을 프로브로서 이용하여 6종의 상이한 클론을 노던 블롯 혼성화한 결과이다. 또한, DEG1 프로브를 본 발명에 의해 규명된 트로포마이오신 2의 동형체 (도 11 및 12의 화살표 1')와 혼성화시켰다. 아가로스 젤 분석과 일치되게, 노던 블롯 분석을 통하여, 클론들의 발현 양상은 아가로스 젤에서의 원래의 밴드들과 동일함을 규명하였고, 이 결과는 모든 클론들이 진실된 포지티브 산물임을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 ACP는 어떠한 위양 데이터 없이 오직 포지티브 산물만을 생성한다는 것을 알 수 있고, 이는 본 발명의 ACP가 위양 데이터의 문제점을 제거함을 의미한다.

도 14는 마우스 배 발달 동안에 DEG5의 발현에 대한 노던 블롯 혼성화 결과를 보여준다. 서열 분석을 통하여 신규 유전자로 밝혀진 DEG5는 흥미로운 발현 양상을 나타낸다: 초기 임신 단계 (E4.5)에서 강한 발현이 나타낸 이후에, 중기 단계에서 발현이 점차적으로 감소되었고, 후기 발달 단계 (E17.5 및 E18.5)에서는 다시 점차적으로 증가하였다.

본 실험 결과들을 통하여, ACP를 이용하여 분별 발현 유전자를 분리하는 본 발명의 방법은 단지 진실된 PCR 산물만을 생성시키며, 위양 산물을 완벽하게 제거한다는 것을 알 수 있다. 종래의 분별 디스플레이 기술의 주 문제점이었던 위양 데이터를 제거할 수 있다는 것은, 분별 디스플레이에 의해 동정된 cDNA 단편의 검증에 요구되는 힘든 노동을 피할 수 있다는 것을 의미한다.

실시예 5: ACP를 이용한 cDNA의 3'말단의 고속 증폭 (3'-RACE)

cDNA 합성에서 이용되는 종래의 올리고-dT 프라이머로부터 야기되는 백그라운드 문제를 본 발명의 ACP가 제거할 수 있다는 것을 증명하기 위하여, 본 실시예는 ACP-관여 3'-RACE 및 종래의 3'-RACE를 비교하였다.

종래의 3'-RACE에서, mRNA 분자의 폴리(A) 테일이 PCR 증폭을 위한 프라이밍 위치로 이용되었고, 올리고-dT 프라이머는 3' 프라이머로 이용하였다. 반대로, 본 발명의 ACP는 cDNA 합성을 위한 프라이밍 위치로서만 mRNA의 폴리(A) 테일을 이용하였고, 후속의 PCR 증폭에서는 이용하지 않았다.

cDNA 합성 프라이머로서 올리고 VdT₁₅-ACP 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIII TTTTTTTTTTTTTTTTV-3' (제57서열) (V는 A, C 또는 G이다)를 이용하여 실시예 1의 cDNA 합성과 동일한 조건하에서, 마우스 제1차 cDNAs쇄를 제조한 다음, cDNA 합성 프라이머의 제거를 위한 정제 과정 없이 상기 제1차 cDNAs쇄를 후속의 PCR 증폭의 주형으로 직접 이용하였다.

종래의 3'-RACE에서, 제1차 cDNAs쇄는 다음의 cDNA 합성 프라이머를 이용하여 제조하였다:

CDS III/3' 5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-(dT)₃₀-VN-3' (제35서열) (V는 A, C 또는 G이고; N은 A, C, T 또는 G이다).

상기 cDNA 합성 프라이머, CDS III/3'은 후속의 PCR 증폭에서 3' 프라이머로 이용되었다. 제1차 cDNA 증폭산물 50 ng, 10 x PCR 완충액 (Promega) 5 μ l, 유전자-특이 5' 프라이머 (10 μ M) 1 μ l, 전-선택 아비트러리 3' 프라이머 JYC2 (10 μ M) 또는 CDS III/3' (10 μ M) 1 μ l, 25 mM MgCl₂ 3 μ l, 2 mM dNTP 5 μ l 및 Taq 중합효소 (5 units/ μ l; Promega) 0.5 μ l를 포함하는 50 μ l의 반응 혼합물을 이용하여 PCR 증폭을 실시하였다. PCR 반응은 다음의 조건 하에서 실시하였다: 94°C에서 5분에 이어, 94°C 1분, 65°C 1분 및 72°C 1분의 30 사이클, 그런 다음 72°C에서 5분 동안 최종 연장반응. 증폭산

물을 2% 아가로스 젤에서 전기영동하고 에티뮴 브로마이드로 염색하여 분석하였다. 또한, 생성된 PCR 산물은 변성 폴리 아크릴아미드 젤에서 오토라디오그래피 또는 실버 염색 (Gottschlich et al., 1997; Kociok et al., 1998), 형광-표지 올리고뉴클레오타이드의 이용 (Bauer et al. 1993; Ito et al. 1994; Luehrsen et al., 1997; Smith et al., 1997) 및 바이오틴-표지된 프라이머의 이용 (Korn et al., 1992; Tagle et al., 1993; Rosok et al., 1996)과 같은 비-방사능 검출 방법으로 검출할 수 있다.

도 15는 베타-액틴 3'-RACE 결과이다. 종래의 3'-RACE (레인 1)을 ACP-관여 3'-RACE (레인 2)와 비교하였다. 종래의 3'-RACE는 비-특이 산물을 생성할 뿐만 아니라 DNA 스미어 문제점을 발생시켰으나, ACP-관여 3'-RACE는 단지 348-bp 크기의 단일의 밴드만을 생성하였다. 이러한 실험 결과는, ACP-관여 3'-RACE가 DNA 스미어와 같은 백그라운드 및 비-특이적 산물의 문제점들을 제거할 수 있음을 보여준다.

실시예 6: ACP를 이용한 5'-말단의 고속 증폭 (5'-RACE) 및 전장 cDNAs의 증폭 방법

본 발명의 ACP는 cDNA 단편의 5'-말단을 증폭하는 데 이용될 수 있다. 올리고 VdT₁₅-ACP 또는 랜덤 dN₆-ACP를 이용하여 제1차 cDNAs쇄를 제조하였다:

올리고 VdT₁₅-ACP 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIITTTTTTTTTTTTTTTT-3' (제57서열), V는 A, C 또는 G이다;

랜덤 dN₆-ACP 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIINNNNNN-3' (제58서열), N은 A, C, G 또는 T이다.

mRNA-cDNA 중간체의 형태로 존재하는 제1차 cDNA 서열의 완전한 합성 이후, 망간의 존재 하에, 역전사효소의 말단 전이효소 반응을 통하여 제1차 cDNA 서열의 3'-말단에 시토신 잔기를 테일링하였다. 제1차 cDNA 3'-말단 연장 ACP (rG3-ACP, rG2-ACP 또는 dG3-ACP)를 이용하여 제1차 cDNAs쇄의 3'-말단을 연장하였고, 이어, cDNA 합성 프라이머 및 제1차 cDNA 3'-말단 연장 ACP를 제거하기 위한 정제과정 없이, 후속의 PCR 증폭에서 제1차 cDNAs쇄를 직접적으로 주형으로 이용하였다.

제1차 cDNA 3'-말단 연장 ACP의 서열은 다음과 같다:

rG3-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGGr(GGG)-3' (제36서열);

rG2-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGGr(GG)-dG-3' (제37서열);

rG1-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGGr(G)-d(GG)-3' (제59서열); 또는

dG3-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGGd(GGG)-3' (제38서열) (r 및 d는 각각 리보뉴클레오타이드 및 디옥시리보뉴클레오타이드를 나타낸다).

A. 제1차 전장 cDNA쇄의 제조

프로토콜 A: ACP를 이용한 제1차 cDNA쇄의 제조

1. 멸균된 0.2 ml 마이크로원심분리 튜브에 다음을 혼합한다: 총RNA 3 µg 및 10 µM 올리고 VdT₁₅-ACP 또는 랜덤 dN₆-ACP 2 µl.
2. 최종 부피 10 µl가 되도록 멸균 H₂O를 첨가한다. 내용물을 혼합하고 튜브를 마이크로원심분리기에서 간단히 스피닝한다.
3. 튜브를 수욕에서 60°C에서 15분 동안 항온처리 하거나 또는 동일목적으로 열순환기를 이용한다.

4. 튜브를 얼음상에서 최소 2분 동안 저온처리한다. 튜브를 마이크로원심분리기에서 간단히 스피닝하여 내용물을 침전시킨다.
5. 동일한 반응 튜브에 다음의 시약을 첨가한다: 5 x 제1차쇄 완충액 (Invitrogen) 4 μ l, 0.1 M DTT 1 μ l, BSA (1 mg/ml) 2 μ l, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 각각 10 mM) 2 μ l, 100 mM MnCl₂ 0.4 μ l 및 RNasin 억제제 (40 units/ μ l, Promega).
6. 내용물을 혼합하고 튜브를 마이크로원심분리기에서 간단히 스피닝한다.
7. 튜브를 항온기 또는 열순환기에서 42°C에서 2분 동안 항온처리한다.
8. SuperScript II 역전사효소 (200 units/ μ l; Invitrogen) 1 μ l를 첨가한다.
9. 튜브를 항온기 또는 열순환기에서 42°C에서 1시간 동안 항온처리한다.
10. 10 μ M 제1차 cDNA 3'-말단 연장 ACP (rG3-ACP, rG2-ACP 또는 dG3-ACP) 1 μ l를 첨가한다.
11. SuperScript II 역전사효소 (200 units/ μ l; Invitrogen) 0.3 μ l를 첨가한다.
12. 튜브를 항온기 또는 열순환기에서 42°C에서 30분 동안 항온처리한다.
13. 튜브를 항온기 또는 열순환기에서 70°C에서 항온처리하여 제1차쇄 합성을 종결한다.
14. 튜브를 얼음 상에서 정치시키거나 -20°C에서 보관한다.

프로토콜 B: CapFinder 방법에 의한 제1차 전장 cDNA쇄의 제조

CapFinder 방법 (Clontech)에서는 다음의 프라이머를 이용하였다:

SMART IVTM 올리고뉴클레오타이드 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACG GCCr(GGG)-3' (제33서열); 및

5' PCR 프라이머 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' (제34서열), 및 CDS III/3' PCR 프라이머.

1. 멸균된 0.2 ml 마이크로원심분리 튜브에 다음을 혼합한다: 총RNA 3 μ g, 10 μ M CDS III/3' PCR 프라이머 (Clontech) 1 μ l 및 SMART IV 올리고뉴클레오타이드 (Clontech) 1 μ l.
2. 최종 부피 5 μ l가 되도록 멸균 H₂O를 첨가한다. 내용물을 혼합하고 튜브를 마이크로원심분리기에서 간단히 스피닝한다.
3. 튜브를 수욕에서 72°C에서 2분 동안 항온처리한다.
4. 튜브를 얼음상에서 2분 동안 저온처리한다. 튜브를 마이크로원심분리기에서 간단히 스피닝하여 내용물을 침전시킨다.
5. 동일한 반응 튜브에 다음의 시약을 첨가한다: 5 x 제1차쇄 완충액 (Clontech) 2 μ l, 20 mM DTT 1 μ l, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 각각 10 mM) 1 μ l 및 PowerScript 역전사효소 (Clontech) 1 μ l를 포함하는 10 μ l의 반응물.
6. 내용물을 혼합하고 튜브를 마이크로원심분리기에서 간단히 스피닝한다.
7. 튜브를 42°C에서 1시간 동안 항온처리한다.
8. 튜브를 얼음 상에서 정치시키거나 -20°C에서 보관한다.

B. PCR 증폭

프로토콜 C: ACP 시스템 또는 종래의 5'-RACE 방법을 이용하여 타겟 5'-말단 cDNA 단편의 증폭

본 실시예는 종래의 CapFinder 5'-RACE 기술 및 ACP-관여 5'-RACE 기술을 비교한다. 종래의 CapFinder 5'-RACE 기술은 과정 동안에 프라이머의 잔여량 때문에, 높은 백그라운드를 제거하지 못한다. cDNA 합성에 이용되는 CapFinder 프라이머, SMART IV 올리고뉴클레오타이드 (Clontech)와 cDNA 합성성 프라이머, CDS III/3' PCR 프라이머 (Clontech)와 같은 프라이머로부터 야기되는 백그라운드 문제점을 본 발명의 ACP가 제거할 수 있는 지 여부를 확인하기 위하여, 마우스 JunB 및 베타-액틴 cDNAs의 CapFinder 5'-RACE 및 ACP-관여 5'-RACE를 동일 조건에서 실시하였다. 마우스 JunB mRNA는 마우스 18.5일령 태반에서 상대적으로 희귀 전사체이며, 마우스 베타-액틴은 상대적으로 풍부한 전사체이다.

1. 멸균된 0.2 ml 마이크로원심분리 튜브에 다음의 시약을 혼합한다: 프로토콜 A 또는 B로부터 제조된 제1차 cDNA 1 μ l, 10 x PCR 완충액 (Promega) 5 μ l, 25 mM MgCl₂ 5 μ l, 2 mM dNTP 5 μ l, 10 μ M 유전자-특이 5'-RACE 프라이머 1 μ l, 10 μ M JYC2 또는 5' PCR 프라이머 (Clontech) 1 μ l, Taq 중합효소 (5 units/ μ l, Promega) 0.5 μ l 및 멸균 dH₂O 31.5 μ l을 포함하는 총 50 μ l의 부피.

2. 내용물을 혼합하고 튜브를 마이크로원심분리기에서 간단히 스피닝한다.

3. 다음의 조건으로 PCR 반응을 실시한다: 94°C에서 5분, 이어, 94°C 40초, 58°C 40초 및 72°C 1분의 30 사이클, 그런 다음 72°C에서 5분 동안 최종 연장반응.

4. 증폭산물을 2% 아가로스 겔에서 전기영동하고 에티듐 브로마이드 염색하여 분석한다.

또한, 생성된 PCR 산물은 변성 폴리아크릴아미드 겔에서 오토라디오그래피 또는 실버 염색 (Gottschlich et al., 1997; Kociok et al., 1998), 형광-표지 올리고뉴클레오타이드의 이용 (Bauer et al. 1993; Ito et al. 1994; Luehrsen et al., 1997; Smith et al., 1997) 및 바이오틴-표지된 프라이머의 이용 (Korn et al., 1992; Tagle et al., 1993; Rosok et al., 1996)과 같은 비-방사능 검출 방법으로 검출할 수 있다.

도 16에서 볼 수 있듯이, 5' PCR 프라이머 (Clontech) 및 유전자-특이 프라이머를 이용하여 마우스 JunB 및 베타-액틴 5'-RACE를 한 CapFinder 방법은 많은 연구자들이 언급한 바와 같이 (Chenchik et al., 1998; Matz et al., 1999; Schramm et al., 2000), DNA 스미어와 같은 높은 백그라운드를 생성하였지만 (레인 1 및 3), 본 발명의 ACP-관여 5'-RACE는, 마우스 JunB (레인 2) 또는 마우스 베타-액틴 5'-말단 cDNA 단편의 155-bp 또는 319-bp에 해당하는, 단일 밴드만을 생성하였다. 본 실시예를 통하여, 본 발명의 ACP가, cDNA 합성에 이용되는 프라이머의 제거를 위한 정제 과정 없이, cDNA 합성 동안의 프라이머 오염으로부터 야기되는 백그라운드 문제를 근본적으로 제거할 수 있음을 알 수 있다.

도 17은, CapFinder 방법에 의해 형성되는 비특이적 산물 (레인 1)이, 본 발명의 ACP에 의해서는 형성되지 않음을 보여준다. CapFinder 방법 (레인 1) 또는 ACP 방법 (레인 2, 3 및 4)에 의해 제1차 cDNA쇄를 제조하였고, 마우스 프로락틴-유사 단백질 PLP-C 알파의 5'-RACE를 위한 후속의 PCR 증폭에서, 제1차 cDNA쇄를 직접적으로 주형으로 이용하였다. PLP-C 알파-특이 5'-RACE 프라이머는 다음과 같다: PLP-C 알파 5'-GAGAGGATAGTTTCAGGGAC-3' (제40서열). 3'-말단에 3개의 리보구아닌 (rG3-ACP; 레인 3), 3개의 디옥시리보구아닌 (dG3-ACP; 레인 4), 또는 2개의 리보구아닌과 1개의 디옥시리보구아닌의 조합을 포함하는 제1차 cDNA쇄 3'-말단 연장 ACPs는 5'-말단 cDNAs를 생성하였고, 결과적으로 마우스 PLP-C 알파 5'-말단 cDNA 단편의 506-bp에 해당하는 단일 밴드가, PLP-C 알파의 5'-RACE를 위한 ACP-관여 PCR로부터 생성되었다.

프로토콜 D: ACP를 이용한 5' 풍부화 cDNA 단편의 증폭

프로토콜 A의 랜덤 dN₆-ACP를 이용하여 제1차 cDNAs쇄를 제조하였다. PCR 증폭은 핫 스타트 PCR 방법에 따라 실시하였다. 이 경우, DNA 중합효소 없는 완전한 반응물이 준비되고 반응 튜브를 열순환기에서 90°C 이상에서 인큐베이션하여 초기 변성 단계를 실시한다. 이어, 상기 튜브를 70°C 이상으로 유지하면서, DNA 중합효소 적당량을 첨가한다.

1. 멸균된 0.2 ml 마이크로원심분리 튜브에 다음의 시약을 혼합한다: 프로토콜 A의 랜덤 dN₆-ACP를 이용하여 제조된 제1차 cDNAs채 1 μ l, 10 x PCR 완충액 (Promega) 5 μ l, 25 mM MgCl₂ 5 μ l, 2 mM dNTP 5 μ l, 10 μ M JYC2 (3' 프라이머) 1 μ l, 10 μ M JYC4 (5' 프라이머) 1 μ l 및 멸균 dH₂O 31.5 μ l을 포함하는 총 49.5 μ l의 부피.
2. 내용물을 혼합하고 튜브를 마이크로원심분리기에서 간단히 스피닝한다.
3. 94℃로 예열된 열순환기에 튜브를 놓는다.
4. 튜브의 온도를 94℃로 유지하면서 Taq 중합효소 (5 units/ μ l; Promega) 0.5 μ l를 반응물에 첨가한다.
5. 다음의 조건으로 PCR를 실시한다: 94℃에서 5분, 이어, 94℃ 40초, 68℃ 40초 및 72℃ 1분의 30 사이클, 그런 다음 72℃에서 5분 동안 최종 연장반응.
6. 증폭산물을 2% 아가로스 젤에서 전기영동하고 에티듐 브로마이드 염색하여 분석한다.

또한, 생성된 PCR 산물은 변성 폴리아크릴아미드 젤에서 오토라디오그래피 또는 실버 염색 (Gottschlich et al., 1997; Kociok et al., 1998), 형광-표지 올리고뉴클레오타이드의 이용 (Bauer et al. 1993; Ito et al. 1994; Luehrsen et al., 1997; Smith et al., 1997) 및 바이오틴-표지된 프라이머의 이용 (Korn et al., 1992; Tagle et al., 1993; Rosok et al., 1996)과 같은 비-방사능 검출 방법으로 검출할 수 있다.

프로토콜 E: ACP를 이용한 전장 풍부화 cDNAs의 증폭

프로토콜 A의 올리고 VdT₁₅-ACP를 이용하여 제1차 cDNAs채를 제조하였다. PCR 증폭은 프로토콜 D와 같이 핫 스타트 PCR 방법에 따라 실시하였다.

1. 멸균된 0.2 ml 마이크로원심분리 튜브에 다음의 시약을 혼합한다: 프로토콜 A의 올리고 VdT₁₅-ACP를 이용하여 제조된 제1차 cDNAs채 1 μ l, 10 x PCR 완충액 (Promega) 5 μ l, 25 mM MgCl₂ 5 μ l, 2 mM dNTP 5 μ l, 10 μ M JYC2 (3' 프라이머) 1 μ l, 10 μ M JYC4 (5' 프라이머) 1 μ l 및 멸균 dH₂O 31.5 μ l을 포함하는 총 49.5 μ l의 부피.
2. 내용물을 혼합하고 튜브를 마이크로원심분리기에서 간단히 스피닝한다.
3. 94℃로 예열된 열순환기에 튜브를 놓는다.
4. 튜브의 온도를 94℃로 유지하면서 Taq 중합효소 (5 units/ μ l; Promega) 0.5 μ l를 반응물에 첨가한다.
5. 다음의 조건으로 PCR를 실시한다: 94℃에서 5분, 이어, 94℃ 40초, 68℃ 40초 및 72℃ 1분의 30 사이클, 그런 다음 72℃에서 5분 동안 최종 연장반응.
6. 증폭산물을 2% 아가로스 젤에서 전기영동하고 에티듐 브로마이드 염색하여 분석한다.

또한, 생성된 PCR 산물은 변성 폴리아크릴아미드 젤에서 오토라디오그래피 또는 실버 염색 (Gottschlich et al., 1997; Kociok et al., 1998), 형광-표지 올리고뉴클레오타이드의 이용 (Bauer et al. 1993; Ito et al. 1994; Luehrsen et al., 1997; Smith et al., 1997) 및 바이오틴-표지된 프라이머의 이용 (Korn et al., 1992; Tagle et al., 1993; Rosok et al., 1996)과 같은 비-방사능 검출 방법으로 검출할 수 있다.

ACP를 이용한 전장 cDNAs의 증폭방법의 효율을 확인하기 위하여, ACP 방법 또는 CapFinder 방법에 의해 증폭된 전장 cDNAs를 Hybond-N 막 (Amersham/United States Biochemical)에 블롯팅하였다. 마우스 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소 (GAPDH) cDNA를 랜덤 표지 키트 (Roche Diagnostics Co, Indianapolis, 미국)를 이용하여 [알파-³²P]dCTP로 표지한 다음, 프로브로 이용하였다.

도 18에서 볼 수 있듯이, GAPDH cDNA 프로브는 전장 GAPDH cDNA의 1.3-kb에 해당하는 단일 밴드를 검출하였다. 예상한 바와 같이, 상기 ACP 방법에 의해 생성된 PCR 산물의 시그널 (레인 2)은 CapFinder 방법에 의한 것 (레인 1)보다 몇 배 더 강하게 나타났다. 본 실시예를 통하여, 본 발명의 ACP 방법이 CapFinder 방법보다 전장 cDNAs를 효율적으로 증폭함을 알 수 있다.

실시예 7: ACP-관여 아비트러리 프라이밍 (arbitrarily primed) PCR을 이용한 게놈 핑거프린팅

마우스의 다형성을 검출하는 데에 본 발명의 ACP를 적용하였다. 마우스 스트레인 C57BL/6J, CBA, BALB/cJ, NOR, SPRETUS, PANCEVO, 및 한국 야생 마우스의 게놈 DNAs를 출발물질로 이용하였다. QIAamp 조직 키트 (QIAGEN, Hilden, 독일) 게놈 DNA를 이용하여 마우스의 간으로부터 게놈 DNA를 수득하였다. 이용된 아비트러리 ACPs는 다음과 같다:

ACP101 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICGGAGGATC-3' (제64서열);

ACP109 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICTGCAGGACG-3' (제65서열); 및

ACP116 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICGGAGCATCC-3' (제66서열).

아비트러리 ACPs의 세트, ACP101와 ACP109 (도 19A), 또는 ACP101와 ACP116 (도 19B)를, 마우스 게놈 핑거프린팅을 위한 프라이머로 이용하였다. PCR 증폭은, 상기 실시예 2에 기재된 방법에 따라 핫 스타트 PCR 방법으로 실시하였다. ACP를 이용한 게놈 핑거프린팅은 다음의 조건 하에서 PCR 두 단계 증폭에 따라 실시하였다: 어닐링, 연장 및 변성을 포함하는 제1단계 PCR의 2 사이클을 저엄격 조건 하에서 실시하여 증폭 반응을 수행하였고; 게놈 DNA 50 ng, 10 x PCR 완충액 (Promega) 5 μ l, 25 mM MgCl₂ 5 μ l, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 각각 2 mM) 5 μ l 및 ACPs쌍 (각각 10 μ M) 각각 7 μ l를 포함하는 총 49.5 μ l의 반응 혼합물을 94°C에서 예열한 다음, 반응혼합물을 포함하는 튜브의 온도를 94°C로 유지하면서 Taq 중합효소 (5 units/ μ l; Promega) 0.5 μ l를 첨가하고, PCR 반응을 다음과 같이 실시하였다: 94°C 40초, 52°C 3분 및 72°C 1분의 2 사이클, 그런 다음 94°C에서 증폭산물을 변성시킴. 제1단계 PCR이 완료된 후, ACPs의 5'-말단 부위에 상당한 전-선택 아비트러리 프라이머 JYC4 (10 μ M) 4 μ l를 반응 혼합물에 첨가하고 제2단계 PCR를 다음과 같이 실시하였다: 94°C 40초, 68°C 40초 및 72°C 40초의 40 사이클, 그런 다음 72°C에서 5분 동안 최종 연장반응.

증폭산물을 2.0% 아가로스 겔에서 전기영동하고 에티듐 브로마이드 염색하여 분석하고 사진촬영 하였다. 또한, 생성된 PCR 산물은 변성 폴리아크릴아미드 겔에서 오토라디오그래피 또는 실버 염색 (Gottschlich et al., 1997; Kociok et al., 1998), 형광-표지 올리고뉴클레오타이드의 이용 (Bauer et al. 1993; Ito et al. 1994; Luehrsen et al., 1997; Smith et al., 1997) 및 바이오틴-표지된 프라이머의 이용 (Korn et al., 1992; Tagle et al., 1993; Rosok et al., 1996)과 같은 비-방사능 검출 방법으로 검출할 수 있다.

도 19는, 다양한 마우스 스트레인의 게놈 DNA의 단편을 아비트러리 ACPs쌍을 이용하여 증폭한 결과이다. 게놈 핑거프린팅의 재현성을 확인하기 위하여, 상이한 2종의 ACPs 세트를 이용하여 각각의 마우스 스트레인의 2개의 핑거프린팅을 얻었다. ACP-관여 PCR 증폭을 통하여, 각각의 프라이머 세트로부터 몇 개의 DNA 단편을 얻었고, 결과는 재현성이 있었다. 마우스 스트레인에서의 다형성은 명백하였고, 이와 같은 결과는, ACP-관여 아비트러리 프라이밍 PCR에 의해 생성된 게놈 핑거프린팅에서의 다형성을 통하여 마우스 스트레인이 명백하게 구별됨을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 ACP는 다형성을 검출하고 유전자 지도를 구축하는 데 유용하다.

실시예 8: ACP-관여 PCR을 이용한 멀티플렉스 PCR

ACP가 멀티플렉스 PCR에 이용될 수 있는 지 여부를 확인하기 위하여, 종래의 프라이머 또는 ACP를 이용하여, 인간 백혈구 접착 분자 I (ELAM1)과 인간 p53 (TP53) 유전자의 단일 뉴클레오타이드 다형성을 포함하는 부위를 증폭하였다. ACPs를 이용한 멀티플렉스 PCR 증폭에 대한 방법 및 결과가 아래에 기재되어 있다. DNA 주형은 인간 태반으로부터 수득하였다.

ELAM1의 엑손 3 (155 bp)의 증폭에 이용된 종래의 프라이머는 다음과 같다:

ELAM1N1 5'-TTGCACACTGTTGATTCTAA-3' (제67서열); 및

ELAM1C1 5'-TTATTGATGGTCTCTACACA-3' (제68서열).

ELAM1의 엑손 10 (287 bp)의 증폭에 이용된 종래의 프라이머는 다음과 같다:

ELAM1N2 5'-CCACTGAGTCCAACATTC-3' (제69서열); 및

ELAM1C2 5'-CTGAAACACTTCCCACAC-3' (제70서열).

TP53의 엑손 4 (349 bp)의 증폭에 이용된 종래의 프라이머는 다음과 같다:

P53N1 5'-CCTCTGACTGCTCTTTTCAC-3' (제71서열); 및

P53C1 5'-ATTGAAGTCTCATGGAAGCC-3' (제72서열).

TP53의 엑손 7-8 (750 bp)의 증폭에 이용된 종래의 프라이머는 다음과 같다:

P53N2 5'-TGCTTGCCACAGGTCTC-3' (제73서열); 및

P53C2 5'-GCAGTGCTAGGAAAGAGG-3' (제74서열).

본 실시예에서 이용된 상술한 종래의 프라이머들은 공지의 멀티플렉스 PCR 방법에서 비-특이적 산물을 생성하는 것으로 알려진 것들이다.

멀티플렉스 PCR에서 종래의 프라이머의 이용으로부터 초래되는 비-특이적 산물의 생성과 같은 문제점을 ACP가 극복할 수 있는 지 여부를 확인하기 위하여, 본 발명의 ACPs를 상기 4종의 종래의 프라이머 세트에 적용시켰다.

ACP의 3'-말단 부위는 다음과 같이 종래의 프라이머의 서열을 포함하며, ACP의 크기는 종래의 프라이머보다 26 bp 또는 27 bp정도 크다.

ELAM1N1-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITGACACTGTTGATTCTAA-3' (제75서열);

ELAM1C1-ACP 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIITATTGATGGTCTCTACACA-3' (제76서열);

ELAM1N2-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCACTGAGTCCAACATTC-3' (제77서열);

ELAM1C2-ACP 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIICTGAAACACTTCCCACAC-3' (제78서열);

P53N1-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCTCTGACTGCTCTTTTCAC-3' (제79서열);

P53C1-ACP 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIATTGAAGTCTCATGGAAGCC-3' (제80서열);

P53N2-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITGCTTGCCACAGGTCTC-3' (제81서열); 및

P53C2-ACP 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIIGCAGTGCTAGGAAAGAGG-3' (제82서열).

ACP의 5'-말단 부위 서열은 전-선택 아비트러리 프라이머 서열을 포함하며, 제2단계 PCR 증폭에서만 작용한다:

JYC3 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGA-3' (제11서열), 및

JYC4 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCAT-3' (제12서열).

멀티플렉스 PCR 증폭은 윈스톱 또는 논스톱 두 단계 PCR 증폭에 따라 실시하였고, 이는 본 발명의 독특한 특징이다. PCR 증폭은 실시예 2와 같이 핫 스타트 PCR 방법으로 실시하였다.

프로토콜 A: 윈스톱 두 단계 PCR 증폭(A) 제1단계 PCR 증폭

어닐링, 연장 및 변성을 포함하는 제1단계 PCR의 2 사이클을 실시하여 제1단계 PCR 증폭을 실시하였고; 인간게놈 DNA 50 ng, 10 x PCR 완충액 (Promega) 8 μ l, 25 mM MgCl₂ 7 μ l, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 각각 2 mM) 5 μ l, 그리고, 5' ACP (10 μ M)과 3' ACP (10 μ M) 각각 0.5 μ l를 포함하는 총 49.5 μ l의 반응 혼합물을 94°C에서 예열한 다음, 반응혼합물을 포함하는 튜브의 온도를 94°C로 유지하면서 Taq 중합효소 (5 units/ μ l; Promega) 0.5 μ l를 첨가하고, PCR 반응을 다음과 같이 실시하였다: 94°C 40초, 60°C 40초 및 72°C 40초의 2 사이클, 그런 다음 94°C에서 증폭산물을 변성시킴.

(B) 제2단계 PCR 증폭

ACPs의 멀티플 세트를 이용한 제1단계 PCR 증폭에서 생성된 산물을 높은 어닐링 온도에서 다음과 같이 제2단계 PCR 증폭으로 증폭하였다. 제1단계 PCR이 완료된 후, 10 μ M 전-선택 아비트러리 프라이머 JYC3과 JYC4 각각 2 μ l를, 94°C와 같은 변성 온도에서 제1단계 증폭과정의 반응 혼합물에 첨가하였다. 제2단계 PCR를 다음과 같이 실시하였다: 94°C 40초, 68°C 40초 및 72°C 1분의 40 사이클, 그런 다음 72°C에서 5분 동안 최종 연장반응.

증폭산물을 2.0% 아가로스 젤에서 전기영동하고 에티뮴 브로마이드 염색하여 분석하였다. 또한, 생성된 PCR 산물은 변성 폴리아크릴아미드 젤에서 오토라디오그래피 또는 실버 염색 (Gottschlich et al., 1997; Kociok et al., 1998), 형광-표지 올리고뉴클레오타이드의 이용 (Bauer et al. 1993; Ito et al. 1994; Luehrsen et al., 1997; Smith et al., 1997) 및 바이오틴-표지된 프라이머의 이용 (Korn et al., 1992; Tagle et al., 1993; Rosok et al., 1996)과 같은 비-방사능 검출 방법으로 검출할 수 있다.

도 20 및 21은, 3종 또는 4종의 프라이머 세트를 이용하여 하나의 반응에서 게놈 DNA의 멀티플렉스 단편을 증폭한 결과를 보여준다. 종래의 프라이머 세트의 경우, 3종 (도 20A) 또는 4종 (도 21A)의 프라이머 세트는 타겟-특이 산물뿐만 아니라 비-특이적 산물도 생성시켰다. 반대로, ACPs의 3종 (도 20B) 또는 4종 (도 21B)의 프라이머 세트는 단지 멀티플렉스 타겟 산물만을 생성하였다. 따라서, 본 발명의 ACP는 멀티플렉스 PCR에 응용될 수 있다.

프로토콜 B: 논스톱 두 단계 PCR 증폭

본 발명의 변형예로서, JYC3과 JYC4와 같은 전-선택 아비트러리 프라이머를 이용하는 대신에, 각각의 ACP 세트의 전체 서열을 고염격 조건하의 제2단계 PCR 증폭과정에서 프라이머로 이용하였다. 이러한 경우, 제1단계 PCR 반응시 또는 그 후에 반응혼합물에 전-선택 아비트러리 프라이머를 첨가할 필요가 없다.

각각의 ACP 세트, 5' ACP (10 μ M) 1 μ l 및 3' ACP (10 μ M) 1 μ l를 제1단계 PCR 증폭과정에 첨가하는 것을 제외하고는 프로토콜 A와 동일하게 논스톱 두 단계 PCR 증폭을 실시하였고, 이 때, 전-선택 아비트러리 프라이머를 첨가하는 과정이 없기 때문에, 제1단계 PCR 증폭 과정에 이어 지체 없이 제2단계 PCR 증폭이 실시된다.

증폭 산물을 2% 아가로스 젤에서 전기영동하고 에티뮴 브로마이드 염색을 하여 분석하였다. 또한, 생성된 PCR 산물은 변성 폴리아크릴아미드 젤에서 오토라디오그래피 또는 실버 염색 (Gottschlich et al., 1997; Kociok et al., 1998), 형광-표지 올리고뉴클레오타이드의 이용 (Bauer et al. 1993; Ito et al. 1994; Luehrsen et al., 1997; Smith et al., 1997) 및 바이오틴-표지된 프라이머의 이용 (Korn et al., 1992; Tagle et al., 1993; Rosok et al., 1996)과 같은 비-방사능 검출 방법으로 검출할 수 있다.

윈스톱 두 단계 PCR 증폭의 결과와 일치되게 (도 21B), 논스톱 두 단계 PCR 증폭도 단지 타겟 멀티플렉스 특이 산물만을 생성하였다 (도 21C). 본 실시예를 통하여, 당업계에 공지된 멀티플렉스 PCR 방법에 이용되는 종래의 프라이머로부터 야기되는 백그라운드 문제 및 비-특이성 문제를 본 발명의 ACP가 해결할 수 있음을 알 수 있다.

실시에 9: ACP를 이용한 멀티유전자 패밀리의 보존성 호몰로지 단편의 동정

멀티유전자 패밀리의 보존성 호몰로지 단편을 검출하고 클로닝하는 데 본 발명의 ACP를 적용하였다. 본 실시예에서, 호메오박스 서열을 검출하기 위하여 축퇴성 프라이머를 디자인 하였다. 호메오박스 유전자들은, 60-aa DNA 결합 호메오도메인을 암호화하는 180-bp의 보존성 호메오박스에 의해 특징 지워진다. 마우스 배발달에 참여하는 호메오박스 유전자를 분리하기 위하여, 수태산물 발달의 3가지 다른 단계, 즉 마우스 4.5-, 11.5- 및 18.5일령 수태산물로부터 수득한 총 RNA를 출발물질로 이용하였다. 실시예 3의 cDNA 합성과 동일한 조건으로 제1차 cDNA쇄를 제조하였고, 이 경우 제1차 cDNA쇄 합성 프라이머로서 JYC5-T₁₅-ACP를 이용하였다.

다음의 ACPs는 3'-말단 부위에 호메오박스 서열에 대한 축퇴성 서열을 포함하며, 제1단계 PCR 증폭에서의 축퇴성 호메오박스-특이 프라이머로서 이용되었다:

JYC2-HD1 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGTNCRRGTGTGGTT-3' (제83서열);

JYC2-HD2 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGTNCRRGTCTGGTT-3' (제84서열); 및

JYC2-HD3 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGTNCRRGTTTGGTT-3' (제85서열).

실시예 2와 동일하게 핫 스타트 PCR 방법에 따라 PCR 증폭을 실시하였고, 원스톱 또는 논스톱 두 단계 PCR 증폭을 실시하였다. 다음은 원스톱 두 단계 PCR 증폭 과정의 예이다.

1. 멸균된 0.2 ml 마이크로원심분리 튜브에 다음의 시약을 혼합한다: 제1차 cDNAs쇄 (50 ng/ μ l) 1 μ l, 10 x PCR 완충액 (Roche) 5 μ l, 2 mM dNTP 5 μ l, 10 μ M JYC2-HD1, JYC2-HD2와 JYC2-HD3 (5' 프라이머) 중 하나 1 μ l, 10 μ M JYC5-T₁₅-ACP (3' 프라이머) 1 μ l 및 멸균 dH₂O 36.5 μ l을 포함하는 총 49.5 μ l의 부피.

2. 내용물을 혼합하고 튜브를 마이크로원심분리기에서 간단히 스피닝한다.

3. 94°C로 예열된 열순환기에 튜브를 놓는다.

4. 튜브의 온도를 94°C로 유지하면서 Taq 중합효소 (5 units/ μ l; Roche) 0.5 μ l를 반응물에 첨가한다.

5. 다음의 조건으로 PCR를 실시한다: 94°C 1분, 52°C 3분 및 72°C 1분의 1 사이클, 이어, 94°C 40초, 65°C 40초 및 72°C 40초의 40 사이클, 그런 다음 72°C에서 5분 동안 최종 연장반응.

증폭산물을 2% 아가로스 젤에서 전기영동하고 에티듐 브로마이드 염색하여 분석하였다. 또한, 생성된 PCR 산물은 변성 폴리아크릴아미드 젤에서 오토라디오그래피 또는 실버 염색 (Gottschlich et al., 1997; Kociok et al., 1998), 형광-표지 올리고뉴클레오타이드의 이용 (Bauer et al. 1993; Ito et al. 1994; Luehrs et al., 1997; Smith et al., 1997) 및 바이오틴-표지된 프라이머의 이용 (Korn et al., 1992; Tagle et al., 1993; Rosok et al., 1996)과 같은 비-방사능 검출 방법으로 검출할 수 있다.

특정 단계에서 분별 발현된 많은 유전자들을 수득하였고, pGEM-T Easy 벡터(Promega)에 서브클로닝한 다음, 시퀀싱하였다. 서열 분석을 통하여, 몇 개의 클론들이 호메오박스 서열을 포함하고 있음을 알 수 있었다. 노던 블롯 또는 RT-PCR 분석을 통하여, 전기영동에서 관찰된 발현 패턴의 결과와 상기 클론들이 동일하다는 것을 알 수 있었다. 본 실시예를 통하여, 멀티유전자 패밀리의 보존성 호몰로지 단편을 분리하기 위한 ACP를 이용한 본 발명의 방법은 오직 진실된 PCR 산물만을 생성함을 알 수 있다. 멀티유전자 패밀리의 보존성 호몰로지 단편을 분리하기 위한 종래의 PCR-관련 기술들의 주 문제점인, 위양 데이터 문제점을 제거한 것은, cDNA 증폭산물의 검증에 요구되는 힘든 작업을 피할 수 있게 한다.

실시예 10: ACP-관련 PCR을 이용한 단일 뉴클레오타이드 다형성 게놈타이핑

단일 뉴클레오타이드 다형성 게놈타이핑에 ACP가 적용 가능한 지 여부를 확인하기 위하여, 종래의 프라이머 또는 ACP를 이용하여 인간 p53 (TP53) 유전자의 단일 뉴클레오타이드 다형성 (SNP)를 포함하는 부분을 증폭하였다. ACP를 이용한 SNP 게놈타이핑에 대한 과정 및 결과는 아래에 기재되어 있다. TP53 유전자의 엑손 4에 SNP를 가지는 인간 혈액 시료로부터 DNA 주형을 얻었다. 상기 다형성은, G가 C로 치환되어 아미노산 위치 72에서 Arg가 Pro으로 치환된 것이다. 다음의 프라이머 세트를 이용하여 각각의 주형으로부터 뉴클레오타이드 11991 내지 12339의 349 nt 서열을 증폭하였다:

P53N 5'-CCTCTGACTGCTCTTTTCAC-3' (제86서열) 및

P53C-ACP 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIATTGAAGTCTCATGGAAGCC-3' (제87서열).

말단 사이에 SNP를 포함하는 증폭산물을 주형으로 이용하고 대립유전자-특이 ACPs를 이용하여 SNP를 검출하였다:

P53N1A-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCCC G CGTGG-3' (제88서열),

P53N1B-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCCC C CGTGG-3' (제89서열),

P53N2A-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITCCCC G CGTG-3' (제90서열),

P53N2B-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITCCCC C CGTG-3' (제91서열),

P53N3A-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICTCCCC G CGT-3' (제92서열),

P53N3B-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICTCCCC C CGT-3' (제93서열),

P53N4A-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCTCCCC G CG-3' (제94서열),

P53N4B-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCTCCCC C CG-3' (제95서열),

P53N5A-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCTCCCC G -3' (제96서열), 및

P53N5B-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCTCCCC C -3' (제97서열).

각각의 대립형질-특이 ACP의 3'-말단 부위에 있는 다형성 염기는 밑줄이 있고, 다형성 염기 위치는 의문 위치로 간주된다. SNP 검출에 있어서 어닐링 특이성에 가장 중요한 위치를 결정하기 위하여, 대립형질-특이 ACP의 3'-말단으로부터 다른 위치에 상기 의문 위치를 놓았다.

대립형질-특이 ACP를 5' 프라이머로 이용하였다. P53N1A-ACP, P53N2A-ACP, P53N3A-ACP, P53N4A-ACP와 P53N5A-ACP 중 어느 하나 그리고 P53C-ACP를 야생형 A 게놈타이핑에 이용하였다. P53N1B-ACP, P53N2B-ACP, P53N3B-ACP, P53N4B-ACP와 P53N5B-ACP 중 어느 하나 그리고 P53C-ACP를 변이형 B 게놈타이핑에 이용하였다. ACP의 5'-말단 부위 서열을 제2단계 PCR 증폭에서 전-선택 아비트러리 프라이머 서열로 이용하였다:

JYC3 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGA-3' (제11서열), 및

JYC4 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCAT-3' (제12서열).

(A) 제1단계 PCR 증폭

어닐링, 연장 및 변성을 포함하는 PCR의 1 사이클을 실시하여 제1단계 PCR 증폭을 실시하였고; TP53 유전자의 엑손 4에서 SNP를 포함하는 타겟 게놈 증폭 단편 1 μ l, 10 x PCR 완충액 (Promega) 5 μ l, 25 mM $MgCl_2$ 5 μ l, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 각각 2 mM) 5 μ l, 그리고, 대립형질-특이 ACPs (10 μ M) 1 μ l를 포함하는 총 49.5 μ l의 반응 혼합물을 94°C에서 예열한 다음, 반응혼합물을 포함하는 튜브의 온도를 94°C로 유지하면서 Taq 중합효소 (5 units/ μ l; Promega) 0.5 μ l를 첨가하고, 3'-말단 부위에 10개의 뉴클레오타이드를 가지는 대립형질-특이 ACPs에 대하여, 다음과 같이 PCR 반응을 실시하였다: 94°C 40초, 55°C 40초 및 72°C 40초의 1 사이클, 그런 다음 94°C에서 증폭산물을 변성시킴. 3'-말단 부위에 8개의 뉴클레오타이드를 가지는 대립형질-특이 ACPs에 대하여, 다음과 같이 PCR 반응을 실시하였다: 94°C 40초, 50°C 40초 및 72°C 40초의 1 사이클, 그런 다음 94°C에서 증폭산물을 변성시킴. 생성된 산물은 타겟 게놈 단편에 상보적인 제1차 DNA쇄이다.

(B) 제2단계 PCR 증폭

제1단계 PCR에 의해 생성된 산물을, 제1차 어닐링 온도보다 높은 어닐링 온도에서 제2단계 PCR 증폭으로 증폭하였다. 제1단계 PCR이 완료된 후, 10 μ M 전-선택 아비트러리 프라이머 JYC3 1 μ l를, 94°C와 같은 변성 온도에서 제1단계 증폭과정의 반응 혼합물에 첨가하였다. 제2단계 PCR를 다음과 같이 실시하였다: 94°C 40초, 68°C 40초 및 72°C 40초의 30 사이클, 그런 다음 72°C에서 5분 동안 최종 연장반응.

증폭산물을 2.0% 아가로스 젤에서 전기영동하고 에티뮴 브로마이드 염색하여 분석하였다. 또한, 생성된 PCR 산물은 변성 폴리아크릴아미드 젤에서 오토라디오그래피 또는 실버 염색 (Gottschlich et al., 1997; Kociok et al., 1998), 형광-표지 올리고뉴클레오타이드의 이용 (Bauer et al. 1993; Ito et al. 1994; Luehrsen et al., 1997; Smith et al., 1997) 및 바이오틴-표지된 프라이머의 이용 (Korn et al., 1992; Tagle et al., 1993; Rosok et al., 1996)과 같은 비-방사능 검출 방법으로 검출할 수 있다.

도 22는 ACP를 이용한 대립형질-특이 증폭 결과이다. 야생형 A-특이 ACPs쌍 (P53N2A-ACP 및 P53C-ACP)은 동형접합 야생형 A (레인 1) 또는 이형접합 게놈 타이핑 (레인 3)을 갖는 시료로부터만 특정 타깃 산물을 생성하였으나, 동형접합 변이형 B 게놈타이핑을 갖는 시료로부터는 그러하지 않았다 (레인 5). 변이형 B-특이 ACPs쌍 (P53N2B-ACP 및 P53C-ACP)은 동형접합 변이형 B (레인 6) 또는 이형접합 게놈 타이핑 (레인 4)을 갖는 시료로부터만 특정 타깃 산물을 생성하였으나, 동형접합 야생형 A 게놈타이핑을 갖는 시료로부터는 그러하지 않았다 (레인 2). 이러한 실험 결과를 통하여, 본 발명의 ACP가 SNPs의 유전형을 검출하는 데 쉽고 경제적인 방법을 제공할 수 있다는 것을 알 수 있고, 이는 형광성 DNA 프로브 또는 포스트-PCR 과정이 필요 없기 때문이다. 3'-말단 부위에 의문 위치를 가지는 대립유전자-특이 ACPs는 어닐링 특이성을 개선시킨다. 더욱이, 대립유전자-특이 ACP는 3'-말단으로부터 5 염기 이격된 위치에 의문 위치를 가지기 때문에 (예컨대, P53N2A-ACP 및 P53N2B-ACP), 어닐링 특이성은 극대화된다.

대립유전자-특이 ACP의 사실적 (actual) 3'-말단으로부터 5 염기 이격된 위치가 의문 위치로서 가장 적합한 지 여부를 확인하기 위하여, 추가적인 여섯 개의 실험을 도 22와 같이 실시하였다. DNA 주형은 SNP를 가지는 인간 혈액 시료로부터 얻었다. SNP를 포함하는 여섯 개의 짧은 게놈 단편들은 다음의 프라이머 세트를 이용하여 증폭하였다:

베타-2 아드레날린 작동성 수용체 (ADRB2)

703N 5'-ATTCTGATGGTGTGGATTGTG-3' (제98서열) 및

SM703C 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIACCCTGGAGTAGACGAAGA-3' (제99서열)

케모카인 (c-c 모티프) 수용체 5 (CCR5)

028N 5'-CCTTCTGTGCTTGATGCTTTT-3' (제102서열) 및

SM028C 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIICAGGAAGGATGAGCATTTAG-3' (제103서열)

인터루킨 13 수용체

695N : 5'- AGAAAAACCAGAGGCAGCTT-3' (제106서열) 및

SM695C 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIAGCACAAACCAAGACACAGT-3' (제107서열)

백혈구 접착 분자-1 (LAM-1)

679N 5'-CTAGCTGCAAGTGACATCTCT-3' (제110서열) 및

SM679C 5'-TCACAGAGTATCCAAGCGIIIIITCAGTAAGAAGCCAGGAGAG-3' (제111서열)

타키키닌 수용체 3 (TACR3)

832N 5'-TTTTGGGTGGAGGCTAACAT-3' (제114서열) 및

SM832C 5'-TCACAGAAGTATGCCAGCGAIIIIAACGATGCAGACACCACCA-3'(제115서열)

인터루킨 1, 베타 (IL1B)

880N 5'-CTTCCACCAATACTCTTTTCC-3' (제118서열) 및

SM880C 5'-TCACAGAAGTATGCCAGCGAIIII GCATACACACAAGAGGCAGA-3'(제119서열)

말단 사이에 SNP를 포함하는 증폭 산물을 주형으로 이용하고 대립유전자-특이 ACPs를 이용하여 SNPs를 검출하였다:

베타-2 아드레날린 작동성 수용체 (ADRB2)

SM703-A 5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGGTAC A GGGC-3' (제100서열) 및

SM703-B 5'- GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGGTAC C GGGC-3' (제101서열)

케모카인 (c-c 모티프) 수용체 5 (CCR5)

SM028-A 5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIITCCAA A CCAA -3' (제104서열) 및

SM028-B 5'- GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIITCCAA C CCAA -3' (제105서열)

인터루킨 13 수용체

SM695-A 5'- GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIII CCATT T TAGG -3' (제108서열) 및

SM695-B 5'- GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIII CCATT G TAGG -3' (제109서열)

백혈구 접착 분자-1 (LAM-1)

SM679-A 5'- GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIICCAGA A CTTT -3' (제112서열) 및

SM679-B 5'- GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIICCAGA C CTTT -3' (제113서열)

타키키닌 수용체 3 (TACR3)

SM832-A 5'- GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGACTG G TAAA -3' (제116서열) 및

SM832-B 5'- GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGACTG A TAAA -3' (제117서열)

인터루킨 1, 베타 (IL1B)

SM880-A 5'- GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIAAAGC C ATAA -3' (제120서열) 및

SM880-B 5'- GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIAAAGC T ATAA -3' (제121서열)

도 23은 베타-2 아드레날린 작동성 수용체 (ADRB2) (A), 케모카인 (c-c 모티프) 수용체 5 (CCR5) (B), 인터루킨 13 수용체 (C), 백혈구 접착 분자-1 (LAM-1) (D), 타키키닌 수용체 3 (TACR3) (E) 및 인터루킨 1, 베타 (IL1B) (F)과 같은 유전자에 존재하는 SNPs에 대한 대립유전자-특이 증폭 결과이다. 도 22의 결과와 일치되게, 대립유전자-특이 ACP가 3'-말단으로부터 5 염기 이격된 위치에 의문 위치를 가지는 경우, 어닐링 특이성이 크게 증가된다.

야생형 A-특이 ACPs쌍은 동형접합 야생형 A (레인 1) 또는 이형접합 게놈 타이핑 (레인 3)을 갖는 시료로부터만 특정 타깃 산물을 생성하였으나, 동형접합 변이형 B 게놈타이핑을 갖는 시료로부터는 그러하지 않았다 (레인 5). 변이형 B-특이 ACPs쌍은 동형접합 변이형 B (레인 6) 또는 이형접합 게놈 타이핑 (레인 4)을 갖는 시료로부터만 특정 타깃 산물을 생성하였으나, 동형접합 야생형 A 게놈타이핑을 갖는 시료로부터는 그러하지 않았다 (레인 2).

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[표 1]

서열 번호	표시	서열정보
1	ACP1	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATTTTTAGGAGTGG-3'
2	ACP2	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATTTTTGGCGACGATS-3'
3	ACP3	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATTTTTGCCATCGACS-3'
4	ACP4	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATTTTTAGATGCCCGW-3'
5	ACP5	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATTTTTAGGCGATGCS-3'
6	ACP6	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATTTTTCTCCCGTS-3'
7	ACP7	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATTTTTGTGGCGGS-3'
8	ACP8	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATTTTTCTCGATGCS-3'
9	ACP9	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATTTTTCTGCGGTW-3'
10	JYC2	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGA-3'
11	JYC3	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGA-3'
12	JYC4	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCAT-3'
13	ACP10	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATTTTTGCCATCGACC-3'
14	ACP11	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATTTTTGCCATCGACG-3'
15	ACP12	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATTTTTAGGCGATGCC-3'
16	ACP13	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATTTTTAGGCGATGCG-3'
17	ACP14	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATTTTTCTCGATGCC-3'
18	ACP15	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATTTTTCTCGATGCG-3'
19	CRP210	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATGCCATCGACC-3'
20	ACP16	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATTTGCCATCGACC-3'
21	ACP17	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATTTGCCATCGACC-3'
22	ACP18	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATTTTTGCCATCGACC-3'
23	ACP19	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATTTTTGCCATCGACC-3'
24	dT- JYC3	5'-CACAGAAGTATGCCAAGCGACTCGAGTTTTTTTTTTTTTT-3'
25	dT- JYC2	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGATTTTTTTTTTTTTTT-3'
26	JYC2- T13C	5'-CTTGACTACGATACTGTGCGATTTTTTTTTTTTTTC-3'
27	JYC2- T13G	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGATTTTTTTTTTTTTTG-3'
28	JYC2- T13A	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGATTTTTTTTTTTTTTA-3'
29	dT ₁₀ - JYC2	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGATTTTTTTTTTT-3'
30	dT ₁₀ - ACP1	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIITTTTTTTTTT-3'
31	DEG2	GCCATCGACCGTTTCTCTAGCCCATCTTCATGTGTTTTAATGAGATGATATTAATTCATTACATTCATGGATAATATGTCCTGAGTACATTCTAATCTAGATTAACTTCAAA
32	DEG5	AGGCTATGCGGGCTGTACTCTGGGTGGCTGCCACAGTCTCATGAGAAACCAAGGGCAAAGGACCAAGGAAAAGGGTCTCAGGCCCTAAAGCAGTGGCTTCAACCATCCTAATGT

33	SMART IV	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACG GCGr (GGG)-3'
34	5' PCR 프라이머	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT -3'
35	CDS III/3'	5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-(dT) ₃₀ -VN-3'

표 1 계속

서열 번호	표시	서열 정보
36	rG3-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIIGGr (GGG)-3'
37	rG2-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIIGGr (GG)-dG-3'
38	dG3-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIIGGd (GGG)-3'
39	올리고dT ₁₈ -ACP	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIITTTTTTTTTTTTTTTTTT -3'
40	PLP-C 알파	5'-GAGAGGATAGTTTCAGGGAC -3'
41	JunB3	5'-CTCCGTGGTACGCCTGCTTTCTC -3'
42	β-액틴 1	5'-TCGTCACCCACATAGGAGTC -3'
43	β-액틴 2	5'-CTAAGAGGAGGATGGTCGC -3'
44	EsxN7	5'-GCCGGTTGCAGAAGCACC -3'
45	EsxC6	5'-GAACCATGTTTCTGAATGCC -3'
46	EsxN7-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIIGCCGGTTGCAGAAGCACC -3
47	EsxC6-ACP	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGAACCATGTTTCT GAATGCC -3'
48	EsxN1	5'-GAATCTGAAACAACTTTCTA -3'
49	EsxC2	5'-GATGCATGGGACGAGGCACC -3'
50	EsxN1-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIIGAATCTGAAACAAC TTCTA -3'
51	EsxN3	5'-CGCCGCAACCCCTGCCCGCA -3'
52	EsxC5	5'-GATGCATGGGACGAGGCA -3'
53	EsxN3-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIICGCCGCAACCCCTGCCCGCA -3'
54	올리고-dT ₁₅	5'-TTTTTTTTTTTTTTT -3'
55	EsxC2-ACP	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGATGCATGGGACGAGGCACC -3'
56	EsxC5-ACP	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGATGCATGGGACGAGGCA -3'
57	VdT ₁₅ -ACP	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIITTTTTTTTTTTTTTTTV -3'
58	dN ₆ -ACP	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIINNNNNN -3'
59	rG1-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIIGGr (G)-d(GG)-3'
60	JYC5	5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGAT -3'
61	JYC5-T ₁₅ -ACP	5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIITTTTTTTTTTTTTTTT -3'
62	JYC5-T ₁₅ V-ACP	5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIITTTTTTTTTTTTTTTTV -3'
63	JYC5-T ₁₅ VN-ACP	5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIITTTTTTTTTTTTTTTVN -3'
64	ACP101	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIICCGAGGATC -3'
65	ACP109	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIICTGCAGGACG -3'
66	ACP116	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIICGGAGCATCC -3'
67	ELAM1N1	5'-TTGCACACTGTTGATTCTAA -3'
68	ELAM1C1	5'-TTATTGATGGTCTCTACACA -3'
69	ELAM1N2	5'-CCACTGAGTCCAACATTC -3'
70	ELAM1C2	5'-CTGAAACACTTCCCACAC -3'
71	P53N1	5'-CCTCTGACTGCTCTTTTCAC -3'
72	P53C1	5'-ATTGAAGTCTCATGGAAGCC -3'
73	P53N2	5'-TGCTTGCCACAGGTCTC -3'
74	P53C2	5'-GCAGTGCTAGGAAAGAGG -3'
75	ELAM1N1-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIITTGACACTGTTGATTCTAA -3'

표 1 계속

서열 번호	표시	서열정보
76	ELAM1C1-ACP	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIITATTGATGGTCTCTACACA -3'
77	ELAM1N2-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIICCACTGAGTCCAACATTC -3'
78	ELAM1C2-ACP	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIICTGAAACACTTCCACAC -3'
79	P53N1-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIICCTCTGACTGCTCTTTTCAC -3'
80	P53C1-ACP	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIATTGAAGTCTCATGGAAGCC -3'
81	P53N2-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIITGCTTGCCACAGGTCTC -3'
82	P53C2-ACP	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIIGCAGTGCTAGGAAAGAGG -3'
83	JYC2-HD1	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGTNCRRGTGTGGTT -3'
84	JYC2-HD2	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGTNCRRGTCTGGTT -3'
85	JYC2-HD3	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGTNCRRGTTTGGTT -3'
86	P53N	5'-CCTCTGACTGCTCTTTTCAC -3'
87	P53C-ACP	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIATTGAAGTCTCATGGAAGCC -3'
88	P53N1A-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIICCCC <u>G</u> CGTGG-3'
89	P53N1B-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIICCCC <u>C</u> CGTGG-3'
90	P53N2A-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIITCCCC <u>G</u> CGTG-3'
91	P53N2B-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIITCCCC <u>C</u> CGTG-3'
92	P53N3A-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIICTCCCC <u>G</u> CGT-3'
93	P53N3B-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIICTCCCC <u>C</u> CGT-3'
94	P53N4A-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIIGCTCCCC <u>G</u> CG-3'
95	P53N4B-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIIGCTCCCC <u>C</u> CG-3'
96	P53N5A-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIIGCTCCCC <u>G</u> -3'
97	P53N5B-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIIGCTCCCC <u>C</u> -3'
98	703N	5'-ATTCTGATGGTGTGGATTGTG -3'
99	SM703C	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIACCTGGAGTAGACGAAGA -3'
100	SM703-A	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIIGGTAC <u>A</u> GGGC-3'
101	SM703-B	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIIGGTAC <u>C</u> GGGC-3'
102	028N	5'-CCTTCTGTGCTTGATGCTTTT -3'
103	SM028C	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIICAGGAAGGATGAGCATTTAG -3'
104	SM028-A	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIITCCAA <u>A</u> CCAA-3'
105	SM028-B	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIITCCAA <u>C</u> CCAA-3'
106	695N	5'-AGAAAAACCAGAGGCAGCTT -3'
107	SM695C	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIAGCACAAACCAAGACACAGT -3'
108	SM695-A	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIICATT <u>I</u> TAGG-3'
109	SM695-B	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIICATT <u>G</u> TAGG-3'
110	679N	5'-CTAGCTGCAAGTGACATCTCT -3'
111	SM679C	5'-TCACAGAGTATCCAAGCGIIIIITCAGTAAGAAGCCAGGAGAG -3'
112	SM679-A	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIICAGA <u>A</u> CTTT-3'
113	SM679-B	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIICAGA <u>C</u> CTTT-3'
114	832N	5'-TTTTGGGTGGAGGCTAACAT -3'
115	SM832C	5'-TCACAGAAGTATGCCAGCGAIIIIAACGATGCAGACACCACCA -3'

표 1 계속

서열 번호	표시	서열정보
116	SM832-A	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIIGACTG <u>G</u> TAAA -3'
117	SM832-B	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIIGACTG <u>A</u> TAAA -3'
118	880N	5'-CTTCCACCAATACTCTTTTCC -3'
119	SM880C	5'-TCACAGAAGTATGCCAGCGAIIIIIGCATACACAAGAGGCAGA -3'
120	SM880-A	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIIAAAGC <u>C</u> ATAA -3'
121	SM880-B	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIIAAAGC <u>I</u> ATAA -3'

S = G 또는 C

W = A 또는 T

V = A, G, 또는 C

N = A, G, C, 또는 T

I는 디옥시이노신

r은 리보오스

d는 디옥시리보오스

[표 2]
본 발명의 ACP에 의해 클로닝된 분별 발현 cDNA 단편

명명	동정	상동성
DEG1	트로포마이오신 2(베타)	마우스 92%
DEG2	신규	신규
DEG3	추정 단백질 (Tes 유전자)	마우스 99%
DEG4	프로테아제-6	마우스 92%
DEG5	신규	신규
DEG6	시토크롬 c 산화효소, 서브유닛 Vb	마우스 99%
DEG7	히드록실아실-조효소 A 탈수소효소 (Hadh)	마우스 98%
DEG8	트로포닌 T2, 심장 (Tnnt2)	마우스 94%
DEG9	RNA 결합 모티브 단백질, X 염색체	마우스 96%
DEG10	페록시레독신 6 (Prdx6)	마우스 89%
DEG11	11일령 또는 13일령 배자 cDNA	마우스 98%

참고문헌

Anonymous (1992) Diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies by polymerase chain reaction. A multicenter study. *JAMA* 267, 2609-2615.

Bauer, D., Muller, H., Reich, J., Ahrenkiel, V., Warthoe, P., Strauss, M. (1993) Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res.* 21, 4272-4280.

Bauer, D., Warthoe, P., Rohde, M., Struss, M. (1994) PCR Methods & App: Manual Supplement., pp. S97-S108. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Carninci, P., Westover, A., Nishiyama, Y., Ohsumi, T., Itoh, M., Nagaoka, S., Sasaki, N., Okazaki, Y., Muramatsu, M., Hayashizaki, Y. (1997) High efficiency selection of full-length cDNA by improved biotinylated cap trapper. *DNA Res.* 4, 61-66.

Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N., Caskey, C.T. (1988) Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16, 11141-11156.

- Chenchik, A., Zhu, Y., Diatchenko, L., Li, R., Hill, J., Siebert, P. (1998) Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SmartTM PCR. In Siebert, P. and Larrick, J. (eds), *Gene Cloning and analysis by RT-PCR*. Biotechniques Books, Natick, MA, pp. 305-319.
- Chenchik, A., Zhu, Y., Diatchenko, L., Siebert, P. Methods and compositions for generating full-length cDNA having arbitrary nucleotide sequence at the 3'-end. U.S. Pat. No. 5,962,271. Date of Patent: Oct. 5, 1999.
- Chenchik, A., Zhu, Y., Diatchenko, L., Siebert, P. Methods and compositions for full-length cDNA cloning using a template-switching oligonucleotide. U.S. Pat. No. 5,962,272. Date of Patent: Oct. 5, 1999.
- Chun, J.Y., Han, Y.J., Ahn, K.Y. (1999) Psx homeobox gene is X-linked and specifically expressed in trophoblast cells of mouse placenta. *Dev. Dyn.* 216, 257-266
- Clark, J.M. (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 16, 9677-9686.
- Combates, N., Pardinas, J.R., Parimoo, S., Prouty, S.M., Stenn, K.S. Technique for differential display. U.S. Pat. No. 6,045,998. Date of Patent: Apr. 4, 2000.
- D'Aquila, R.T., Bechtel, L.J., Videler, J.A., Eron, J.J., Gorczyca, P., Kaplan, J.C. (1991) Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. *Nucleic Acids Res.*, 19, 3749.
- Diachenko, L.B., Ledesma, J., Chenchik, A.A., Siebert, P.D. (1996) Combining the technique of RNA fingerprinting and differential display to obtain differentially expressed mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219, 824-828.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M.J., Dveksler, G.S. (1995) General concepts for PCR primer design. PCR primer: a Laboratory Manual., pp. 133-142, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., Mattick, J.S. (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.*, 19, 4008.
- Franz, O., Bruchhaus, I., Roeder, T. (1999) Verification of differential gene transcription using virtual northern blotting. *Nucleic Acids Res.*, 27, 1-3.
- Frohman, M.A., Dush, M.K., Martin, G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8998-9002.
- Fromont-Racine, M., Bertrand, E., Pictet, R., Grange, T. (1993) A highly sensitive method for mapping the 5' termini of mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 21, 1683-1684.
- Gottschlich, S., Goeoegh, t., Folz, B.J., Lippert, B.M., Werner, J.A. (1997) Optimized differential display and reamplification parameters for silver staining. *Res. Commun. Mol. Path. Pharm.* 97, 237-240.
- Gromova, I., Gromov, P., Celis, J.E. (1999) Identification of true differentially expressed mRNAs in a pair of human bladder transitional cell carcinomas using an improved differential display procedure. *Electrophoresis* 20, 241-248.
- Guegler, K., Tan, R., Rose, M.J. Methods and compositions for producing 5' enriched cDNA libraries. U.S. Pat. No. 6,083,727. Date of Patent: Jul. 4, 2000.

- Guegler, K., Tan, R., Rose, M.J. Methods and compositions for producing full length cDNA libraries. U.S. Pat. No. 6,326,175. Date of Patent: Dec. 4, 2001.
- Hogan, B., Bedding, R., Costantini, F., Lacy, E. (1994) Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Hwang, I.T., Lee, Y.H., Moon, B.C., Ahn, K.Y., Lee, S.W., Chun, J.Y. (2000) Identification and characterization of a new member of the placental prolactin-like protein-C (PLP-C) subfamily, PLP-C. *Endocrinology* 141, 3343-3352.
- Hayashizaki, Y. Method for forming full length cDNA libraries. U.S. Pat. No. 6,143,528. Date of Patent: Nov. 7, 2000.
- Henegariu, O., Hirschmann, P., Killian, K., Kirch, S., Lengauer, C., Maiwald, R., Mielke, K., Vogt, P. (1994) Rapid screening of the Y chromosome in idiopathic sterile men, diagnostic for deletions in AZF, a genetic Y factor expressed during spermatogenesis. *Andrologia*, 26, 97-106.
- Ito, T., Kito, K., Adati, N., Mitsui, Y., Hagiwara, H., Sakaki, Y. (1994) Fluorescent differential display: arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer. *FEBS Lett.* 351, 231-236.
- Jefferies, D., Botman, M. F., Lester, D., Whitehead, C. C., Thorp, B. H. (1998) Cloning differentially regulated genes from chondrocytes using agarose gel differential display. *Biochim. Biophys. Acta* 1396, 237-241.
- Kociok, N., Unfried, K., Eser, P., Krott, R., Schraermeyer, U., Heimann, K. (1998) The nonradioisotopic representation of differentially expressed mRNA by a combination of RNA fingerprinting and differential display. *Mol. Biotechnol.* 9, 25-33.
- Korn, B., Sedlacek, Z., Manca, A., Kioschis, P., Konecki, D., Lehrach, H., Poutska, A. (1992) A strategy for the selection of transcribed sequences in the Xq28 region. *Hum. Mol. Genet.* 1, 235-242.
- Kulpa, D., Topping, R., Telesnitsky, A. (1997) Determination of the site of first strand transfer during Moloney murine leukemia virus reverse transcription and identification of strand transfer-associated reverse transcriptase errors. *EMBO J.* 16, 856-865.
- Landegren, U., Nilsson, M., Kwok, P.-Y. (1998) Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res.* 8, 769-776.
- Liang, P., Pardee, A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-971.
- Ledbetter, S.A., Nelson, D.L., Warren, S.T., Ledbetter, D.H. (1990) Rapid isolation of DNA probes within specific chromosome regions by interspersed repetitive sequence polymerase chain reaction. *Genomics* 6, 475-481.
- Loakes, D., Brown, D.M. (1994) 5-Nitroindole as an universal base analog. *Nucleic Acids Res.* 22, 4039-4043.
- Loakes, D. The applications of universal DNA base analogues. *Nucleic Acids Res.* 29, 2437-2447.
- Luehrsen, K.R., Marr, L.L., Van Der Knaap, E., Cumberland, S. (1997) Analysis of differential display RT-PCR products using fluorescent primers and genescan software. *BioTechniques* 22, 168-174.
- Matz, M.V., Lukyanov, S.A. (1998) Different strategies of differential display: areas of application. *Nucleic Acids Res.* 26, 5537-5543.

- Matz, M., Shagin, D., Bogdanova, E., Britanova, O., Lukyanov, S., Diatchenko, L., Chenchik., A. (1999) Amplification of cDNA ends based on templateswitching effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Res.* 27, 1558-1560.
- McClelland, M., Chada, K., Welsh, J., Ralph, D. (1993). Arbitrary primed PCR fingerprinting of RNA applied to mapping differentially expressed genes. *In Symposium on DNA fingerprinting: State of the science*, November, 1992 (ed. S.D. Pena et al.). Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- McPherson, M.J., Moller, S.G. (2000) PCR. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, NY.
- Meunier, J.R., Grimont, P.A.D. (1993) Factors affecting reproducibility of amplified polymorphic DNA fingerprints. *Res. Microbiol.* 144, 373-379.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
- Mullis, K.B., Erlich, H.A, Arnheim, N., Horn, G.T., Saiki, R.K., Scharf, S.J. Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences. U.S. Pat. No. 4,683,195. Date of Patent: Jul. 28, 1987.
- Mullis, K.B. Process for amplifying nucleic acid sequences. U.S. Pat. No. 4,683,202. Date of Patent: Jul. 28, 1987.
- Mullis, K.B., Erlich, H.A, Arnheim, N., Horn, G.T., Saiki, R.K., Scharf, S.J. Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences. U.S. Pat. No. 4,800,159. Date of Patent: Jan. 24, 1989.
- Mutirangura, A., Greenberg, F., Butler, M.G., Malcolm, S., Nicholls, R.D., Chakravarti, A., Ledbetter, D.H. (1993) Multiplex PCR of three dinucleotide repeats in the Prader-Willi/Angelman critical region (15q11-q13): molecular diagnosis and mechanism of uniparental disomy. *Hum. Mol. Genet.*, 2, 143-151.
- Nichols, R., Andrews, P.C., Ahang, P., Bergstrom, D.E. (1994) A universal nucleoside for use at ambiguous sites in DNA primers. *Nature* 369, 492-493.
- Ohtsuka, E., Matsuka, S., Ikehara M., Takahashi, Y., Matsubara K. (1985) An alternative approach to deoxyoligonucleotides as hybridization probes by insertion of deoxyinosine at ambiguous codon positions. *J. Biol. Chem.* 260, 2605-2608.
- Ralph, D., Welsh, J., McClelland, M. (1993) RNA fingerprinting using arbitrary primed PCR identifies differentially regulated RNAs in Mink lung (Mv1Lu) cells growth arrested by TGF- β . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 10710-10714.
- Rompf, R., Kahl, G. (1997) mRNA differential display in agarose gels. *BioTechniques* 23, 28-32.
- Roses, A.D. (2000) Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature*, 405, 857-865.
- Rosok, O., Odeberg, J., Rode, M., Stokke, T., Funderud, S., Smeland, E. (1996) solid-phase method for differentially display of genes expressed in hematopoietic stem cells. *BioTechniques* 21, 114-121.
- Ruano, G., Fenton, W., Kidd, K.K. (1989) Biphasic amplification of very dilute DNA samples via "booster PCR" *Nucleic Acids Res.* 17, 5407.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.

- Sakanari, J.A., Staunton, C.E., Eakin, A.E., Craik, C.S. (1989) Serine proteases from nematode and protozoan parasites: Isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 4863-4867.
- Schaefer, B.C. (1995) Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: New strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal. Biochem.* 227, 255-273.
- Schmidt W.M., Mueller, M.W. (1999) CapSelect: A highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 27, e31.
- Schramm, G., Bruchhaus, I., Roeder, T. (2000) A simple and reliable 5'-RACE approach. *Nucleic Acids Res.* 28, e96.
- Shuber, A.P., Skoletsky, J., Stern, R., Handelin, B.L. (1993) Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis. *Hum. Mol. Genet.*, 2, 153-158.
- Smith, N.R., Aldersley, M., Li, A., High, A.S., Moynihan, T.P., Markham, A.F., Robinson, P.A. (1997) Automated differential display using a fluorescently labeled universal primer. *BioTechniques* 23, 274-279.
- Sompayrac, L., Jane, S., Burn, T.C., Tene, D.G., Danna, K.J. (1995) Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. *Nucleic Acids Res.* 23, 4738-4739.
- Stone, B., Wharton, W. (1994) Targeted RNA fingerprinting: the cloning of differentially-expressed cDNA fragments enriched for members of the zinc finger gene family. *Nucleic Acids Res.* 22, 2612-2618.
- Suzuki, Y., Yoshitomo-Nakagawa, K., Maruyama, K., Suyama, A., Sugano, S. (1997) Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library. *Gene* 200, 149-156.
- Tagle, D.A., Swaroop, M., Lovett, M., Collins, F.S. (1993) Magnetic bead capture of expressed sequences encoded within large genomic segments. *Nature* 361, 751-753.
- Villeponteau, B., Feng, J., Funk, W., Linskens, M.H.K. Method and kit for enhanced differential display. U.S. Pat. No. 5,580,726. Date of Patent: Dec. 3, 1996.
- Welsh, J., McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213-7218.
- Welsh, J., McClelland, M. (1991) Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. *Nucleic Acids Res.* 19, 5275-5279.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalki, J.A., Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.
- Zimmermann, K., Schogl, D., Plaimauer, B., Mannhalter, J.W. (1996) Quantitative multiplex competitive PCR of HIV-1 DNA in a single reaction tube. *BioTechniques* 21, 480-484.
- Zou, S., Stanfield, C., Bridge, J. (1998) Identification of new influenza B virus variants by multiplex reverse transcription-PCR and the heteroduplex mobility assay. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1544-1548.

도면의 간단한 설명

도 1A 및 1B는 본 발명의 ACP를 이용하여 이중체 DNA (1A) 또는 mRNA (1B)의 타겟 핵산을 선택적으로 증폭하는 방법을 도시한다.

도 2A 및 2B는 본 발명의 ACP를 이용하여 분별적으로 발현되는 유전자를 동정하는 방법을 도시한다.

도 3은 mRNA의 3'-말단에 상당한 3'-말단 부위를 포함하는 타깃 cDNA 단편을 본 발명의 ACP를 이용하여 증폭하는 방법을 도시한다.

도 4A 및 4B는 5'-말단에 상당한 5'-말단 부위를 포함하는 타깃 cDNA 단편을 본 발명의 ACP를 이용하여 증폭하는 방법을 도시한다. 제1차 cDNA쇄 합성 프라이머로서 올리고 dT (4A) 또는 랜덤 프라이머 (4B)를 이용한다.

도 5는 본 발명의 ACP를 이용하여 mRNA 분자에 상보적인 전장 cDNA 분자를 증폭하는 방법을 도시한다.

도 6은 5'-말단 정보를 포함하는 mRNA 분자에 상보적인 5'-풍부화 cDNA 분자를 본 발명의 ACP를 이용하여 증폭하는 방법을 도시한다.

도 7A는 본 발명의 ACP를 이용하여 단일 뉴클레오타이드 다형성 (SNP)을 검출하는 방법을 도시한다.

도 7B는 본 발명의 ACP를 이용하여 단일 뉴클레오타이드 다형성 (SNP)을 검출하는 다른 방법을 도시한다.

도 8은 ACP의 3'- 및 5'-말단 부위 사이에 위치한 디옥시이노신 군의 효과를 보여주는 아가로스 젤 사진이다. dT₁₀-JYC2 (제29서열)와 ACP10 (제13서열)의 세트(레인 1-3), 그리고 dT₁₀-ACP1 (제30서열)과 ACP10의 세트 (레인 4-6)를 이용하고 E4.5 (레인 1 및 4), E11.5 (레인 2 및 5), 그리고 E18.5 (레인 3 및 6)의 수태산물 조직으로부터 분리된 총 RNA를 이용하여 cDNA를 증폭하였다.

도 9는 PCR시 디옥시이노신의 수의 변화에 따른 ACP의 3'- 및 5'-말단 부위에 위치한 디옥시이노신 잔기들의 효과를 보여주는 아가로스 젤 사진이다. 레인 0, 2, 4, 6 및 8은 각각 디옥시이노신 잔기의 수를 나타낸다.

도 10A는 EsxN7과 EsxC6 프라이머 세트 (레인 1) 및 EsxN7-ACP과 EsxC6-ACP 프라이머 세트 (레인 2)를 이용하여 *EsxI*을 두 단계 PCR 증폭한 결과를 보여주는 아가로스 젤 사진이다.

도 10B는 EsxN1 (레인 1), EsxC2 (레인 2), EsxN1-ACP과 EsxC2 세트 (레인 3), 그리고 EsxN1-ACP과 EsxC2-ACP의 세트 (레인 4)를 이용하여 *EsxI*을 두 단계 PCR 증폭한 결과를 보여주는 아가로스 젤 사진이다.

도 10C는 EsxN3과 EsxC5의 세트 (레인 1 및 2) 그리고 EsxN3-ACP과 EsxC5-ACP의 세트 (레인 3)를 이용하여 *EsxI*을 두 단계 PCR 증폭한 결과를 보여주는 아가로스 젤 사진이다.

도 10D는 프라이머 EsxN1 (레인 1), EsxC2 (레인 2), EsxN1과 EsxC2의 쌍 (레인 3) 그리고 EsxN1-ACP과 EsxC2-ACP의 쌍 (레인 4)를 이용하여 *EsxI*을 두 단계 PCR 증폭한 결과를 보여주는 아가로스 젤 사진이다.

도 11A는 상이한 단계의 마우스 수태산물 조직을 이용하여 배발달 동안에 분별적으로 발현되는 mRNAs를 검출하는 데 이용된 ACP의 실시예를 보여주는 아가로스 젤 사진이다. ACP3 (제3서열) 및 dT₁₀-ACP1의 세트를 이용하여, E4.5 (레인 1), E11.5 (레인 2) 및 E18.5 (레인 3)의 수태산물 조직으로부터 분리된 총 RNA를 이용하여 cDNA를 증폭하였다. 화살표로 지적되는 밴드들은 분별 발현된 mRNAs의 cDNA 증폭 단편을 나타낸다. 화살표의 수는 도 13의 노던 블롯 분석에서 프로브로 이용된 cDNA 단편을 나타낸다.

도 11B는 상이한 단계의 마우스 수태산물 조직을 이용하여 배발달 동안에 분별적으로 발현되는 mRNAs를 검출하는 데 이용된 ACP의 실시예를 보여주는 아가로스 젤 사진이다. ACP5 (제5서열)과 dT₁₀-ACP1의 세트 (레인 1-6), 그리고 ACP8 (제8서열)과 dT₁₀-ACP1의 세트 (레인 7-12)를 이용하여, E4.5 (레인 1-2 및 7-8), E11.5 (레인 3-4 및 9-10) 및 E18.5 (레인 5-6 및 11-12)의 수태산물 조직으로부터 분리된 총 RNA를 이용하여 cDNA를 증폭하였다. 화살표로 지적되는 밴드들은 분별 발현된 mRNAs의 cDNA 증폭 단편을 나타낸다. 화살표의 수는 도 13의 노던 블롯 분석에서 프로브로 이용된 cDNA 단편을 나타낸다.

도 11C는 ACP10과 dT₁₀-ACP 프라이머의 세트를 이용하여 상이한 단계의 마우스 수태산물 시료 (E4.5: 레인 1 및 2; E11.5: 레인 3 및 4; E18.5: 레인 5 및 6)로부터 수득한 cDNA 증폭산물을 보여주는 아가로스 젤 사진이다.

도 11D는 ACP14와 dT₁₀-ACP 프라이머의 세트를 이용하여 상이한 단계의 마우스 수태산물 시료 (E4.5: 레인 1 및 2; E11.5: 레인 3 및 4; E18.5: 레인 5 및 6)로부터 수득한 cDNA 증폭산물을 보여주는 아가로스 젤 사진이다.

도 12A는 ACP10과 JYC5-T₁₅-ACP 프라이머의 세트를 이용하여 상이한 단계의 마우스 수태산물 시료 (E4.5: 레인 1 및 2; E11.5: 레인 3 및 4; E18.5: 레인 5 및 6)로부터 수득한 cDNA를 원스톱 두 단계 PCR 증폭한 산물을 보여주는 아가로스 젤 사진이다.

도 12B는 ACP10과 JYC5-T₁₅-ACP 프라이머의 세트를 이용하여 상이한 단계의 마우스 수태산물 시료 (E4.5: 레인 1 및 2; E11.5: 레인 3 및 4; E18.5: 레인 5 및 6)로부터 수득한 cDNA를 논스톱 두 단계 PCR 증폭한 산물을 보여주는 아가로스 젤 사진이다.

도 13은 배발달 동안에 분별적으로 발현된 mRNAs으로부터 증폭된 6개의 cDNA 단편에 대한 노던 블롯 분석 결과를 보여준다. 도 11에서 화살표로 표시된 6개의 ³²P-표지 단편을 노던 블롯 분석을 위한 프로브로 이용하였다. 화살표 1, 2, 3, 4, 5, 및 6은 각각 DEG1 (도 13A), DEG3 (도 13B), DEG2 (도 13C), DEG8 (도 13D), DEG5 (도 13E), 및 DEG7 (도 13F) 이고, DEG 서열 분석 결과는 표 1에 정리되어 있다. DEG2 (제31서열) 및 DEG5 (제32서열)은 신규 유전자로 규명되었다 (표 2). 대조군 패널 (각 패널의 하부)은 블롯팅 전의 젤을 보여주며, 에티듐 브로마이드로 염색되고 UV광 하에서 사진촬영되었으며, 로딩 대조군으로서 유사량의 18S 및 28S rRNA를 나타낸다.

도 14는 마우스 수태산물의 완전한 단계에서의 신규 유전자, DEG5의 발현 양상을 보여준다. 프로브로서 방사능-표지 DEG5 cDNA 단편을 이용하여 노던 블롯 분석을 실시하였다. 표시된 임신 시점의 마우스 수태산물로부터 총 RNA (20 µg/레인)를 준비하였다. 하부의 대조군 패널은 블롯팅 전의 젤을 보여주며, 에티듐 브로마이드로 염색되고 UV광 하에서 사진촬영되었으며, 로딩 대조군으로서 유사량의 18S 및 28S rRNA를 나타낸다.

도 15는 베타-액틴 3'-RACE에 대한 종래의 3'-RACE (레인 1) 및 ACP-관여 3'-RACE (레인 2)의 차이를 보여주는 아가로스 젤 사진이다.

도 16은 마우스 JunB (레인 1 및 2) 및 베타-액틴 5'-RACE (레인 3 및 4)에 대한 종래의 프라이머를 이용한 CapFinder 방법 (레인 1 및 3)과 ACP를 이용한 ACP-관여 방법 (레인 2 및 4) 사이의 차이를 보여주는 아가로스 젤 사진이다.

도 17은 PLP-C 알파 5'-RACE에 대한 종래의 프라이머를 이용한 CapFinder 방법 (레인 1)과 ACP를 이용한 ACP-관여 방법 (레인 2, 3 및 4) 사이의 차이를 보여주는 아가로스 젤 사진이다.

도 18은 마우스 전장 GAPDH cDNA를 CapFinder 방법 또는 ACP-관여 방법으로 증폭한 결과에 대한 노던 블롯 분석 결과이다.

도 19는 2종의 상이한 아비트리리 ACPs를 이용하여 7 가지 마우스 스트레인의 게놈 핑거프린팅 결과를 보여주는 아가로스 젤 사진이다.

도 20은 3종의 타깃 핵산을 증폭하는 데 있어서, 종래의 방법 (A) 또는 ACP-관여 방법 (B)에 의한 멀티플렉스 PCR 증폭 산물을 보여주는 아가로스 젤 사진이다.

도 21은 4종의 타깃 핵산을 증폭하는 데 있어서, 종래의 방법 (A) 또는 ACP-관여 방법 (B)에 의한 멀티플렉스 PCR 증폭 산물을 보여주는 아가로스 젤 사진이다. ACP-관여 멀티플렉스는 원스톱 (B) 또는 논스톱 (C) 두 단계 PCR 증폭으로 실시하였다.

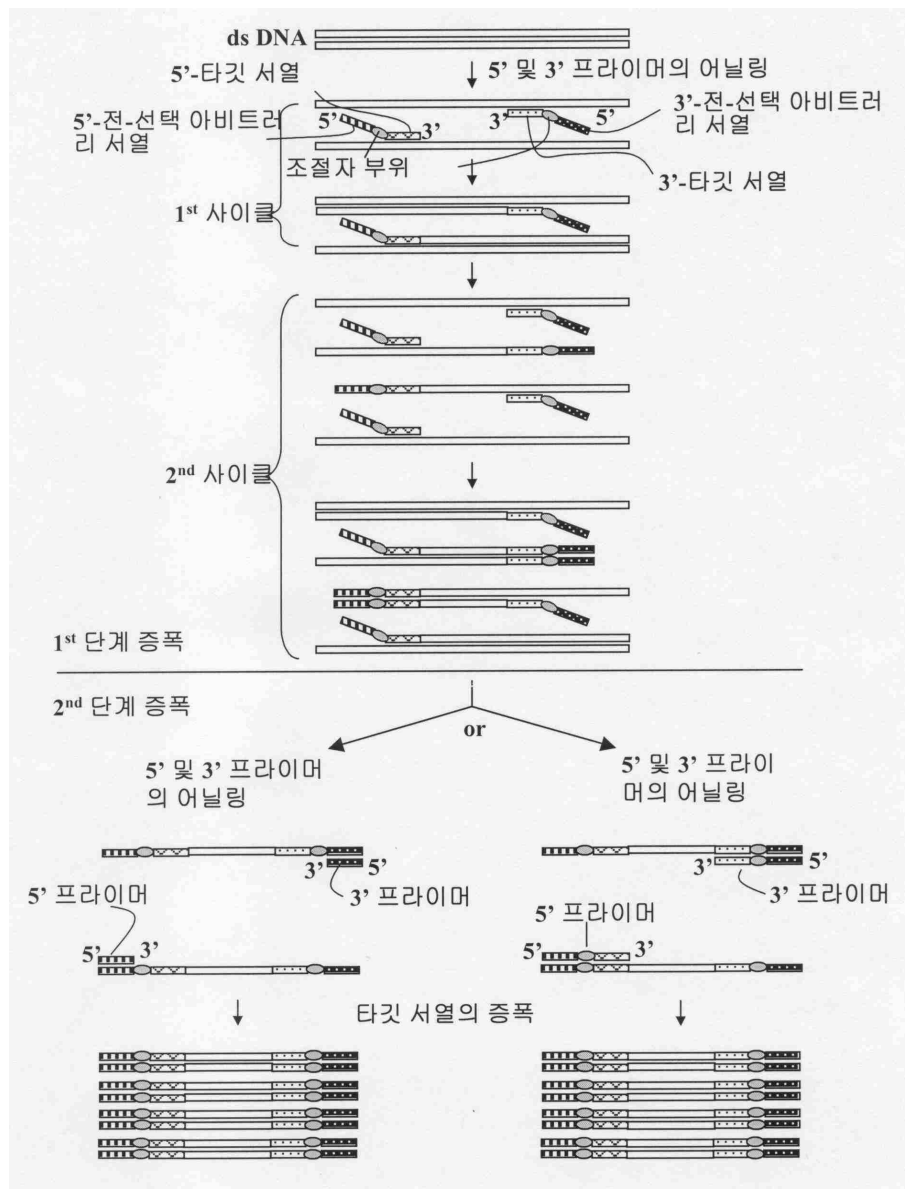
도 22는 인간 TP53 유전자의 엑손 4에 있는 SNP를 ACP를 이용하여 대립유전자-특이 증폭한 결과를 보여주는 아가로스 젤 사진이다.

도 23은 베타-2 아드레날린 작동성 수용체 (ADRB2) (A), 케모카인 (c-c 모티프) 수용체 5 (CCR5) (B), 인터루킨 13 수용체 (C), 백혈구 접착 분자-1 (LAM-1) (D), 타키키닌 수용체 3 (TACR3) (E) 및 인터루킨 1, 베타 (IL1B) (F)과 같은 유전자에 존재하는 SNPs에 대한 대립유전자-특이 증폭 결과를 보여주는 아가로스 젤 사진이다.

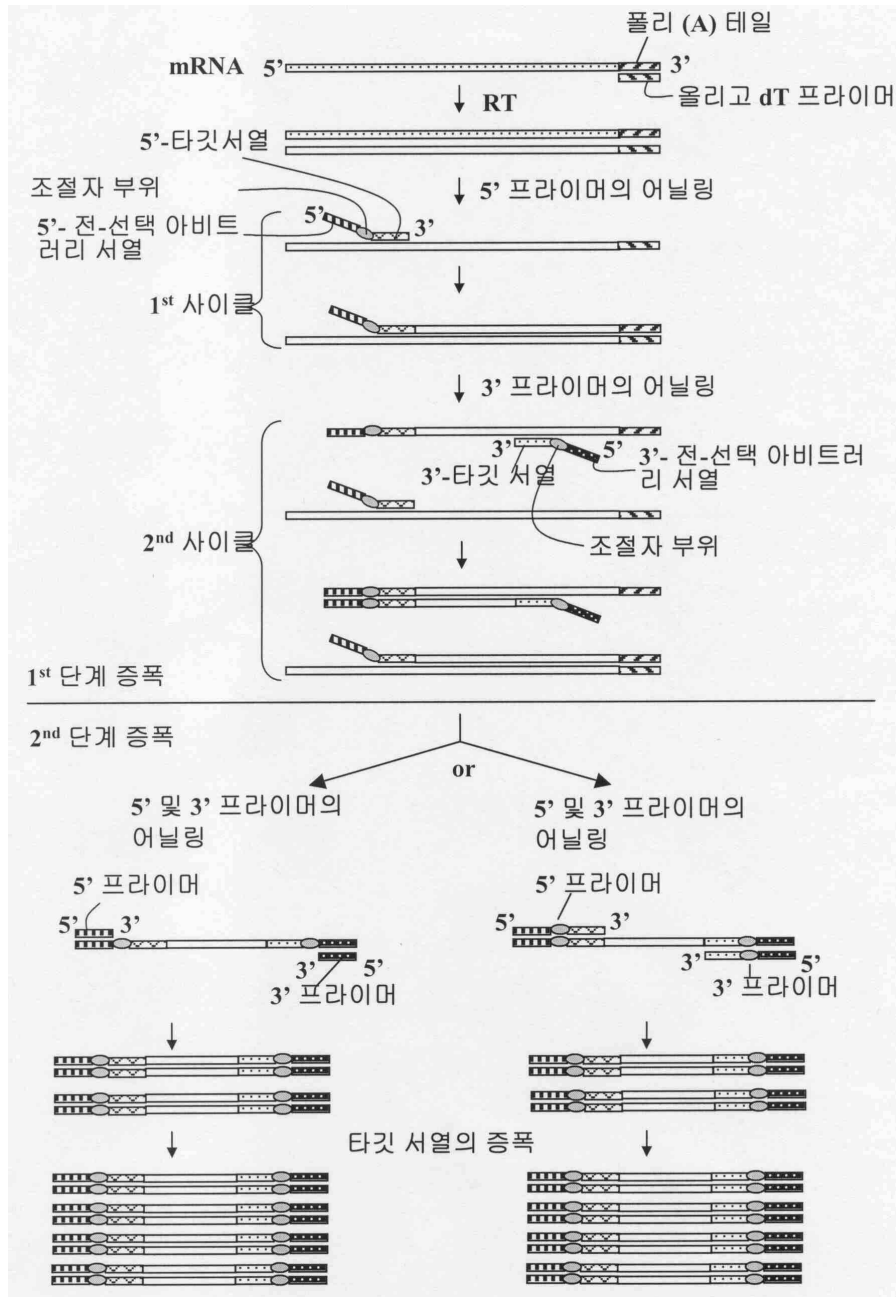
하기의 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

도면

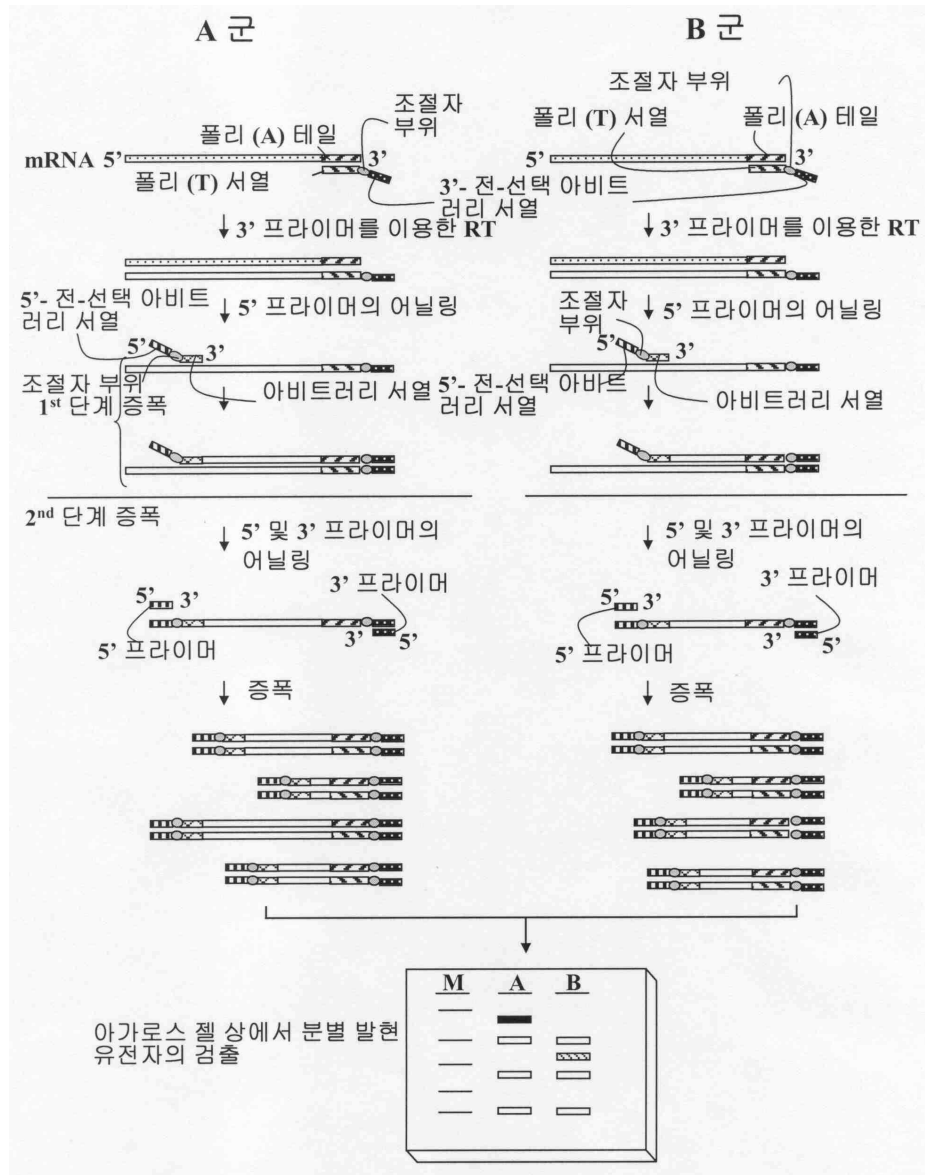
도면1A



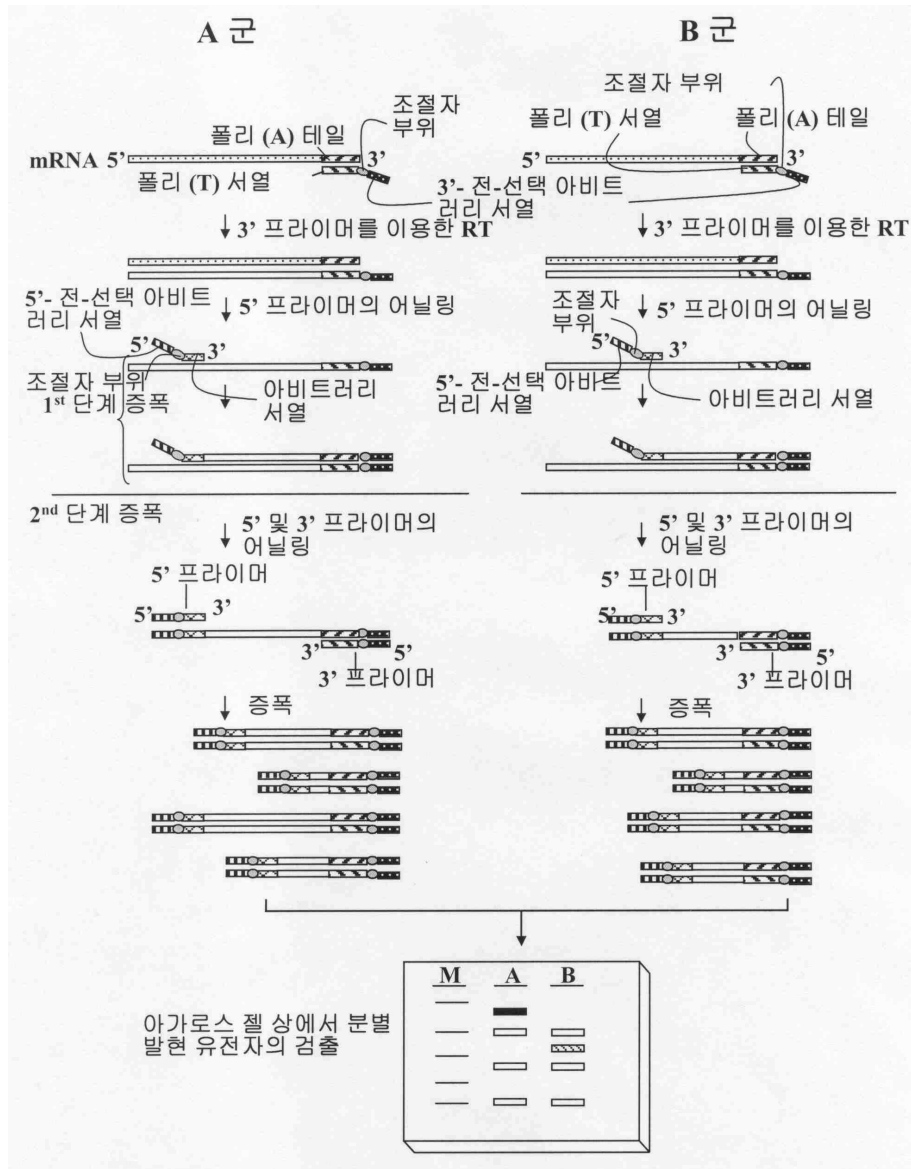
도면1B



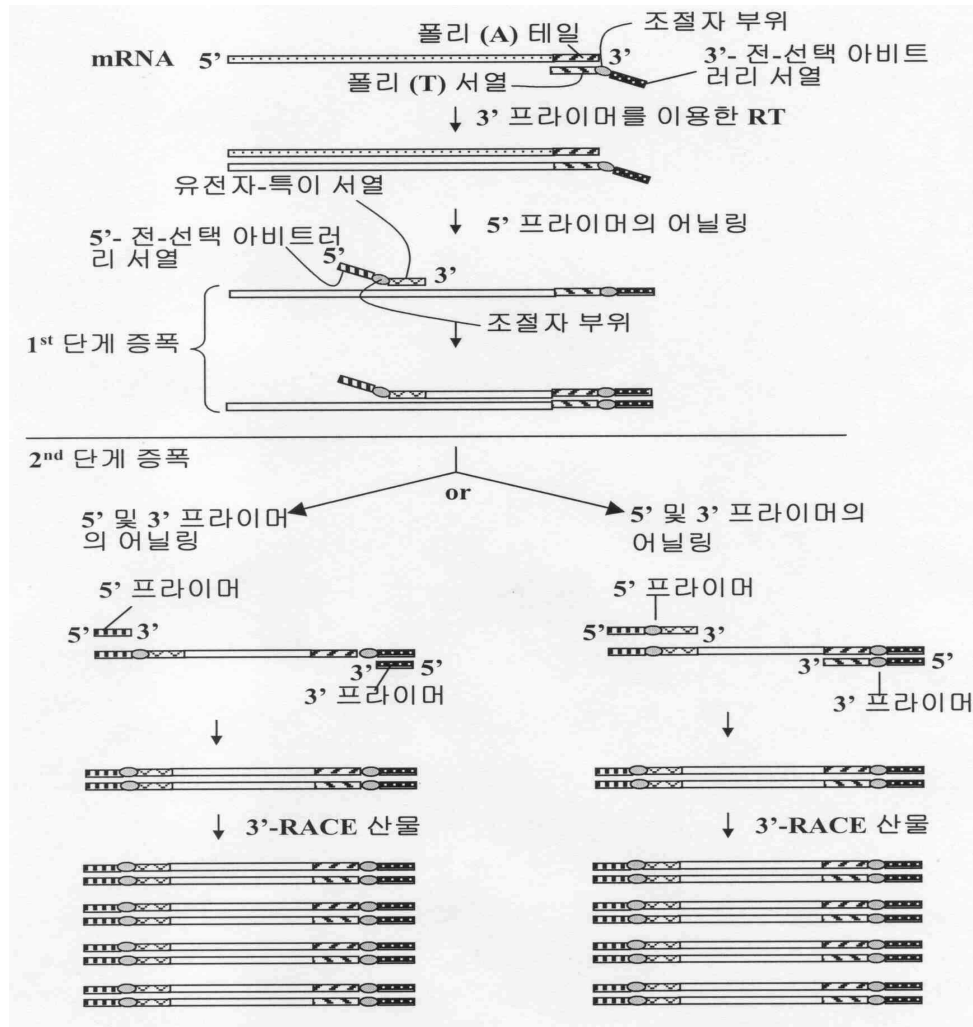
도면2A



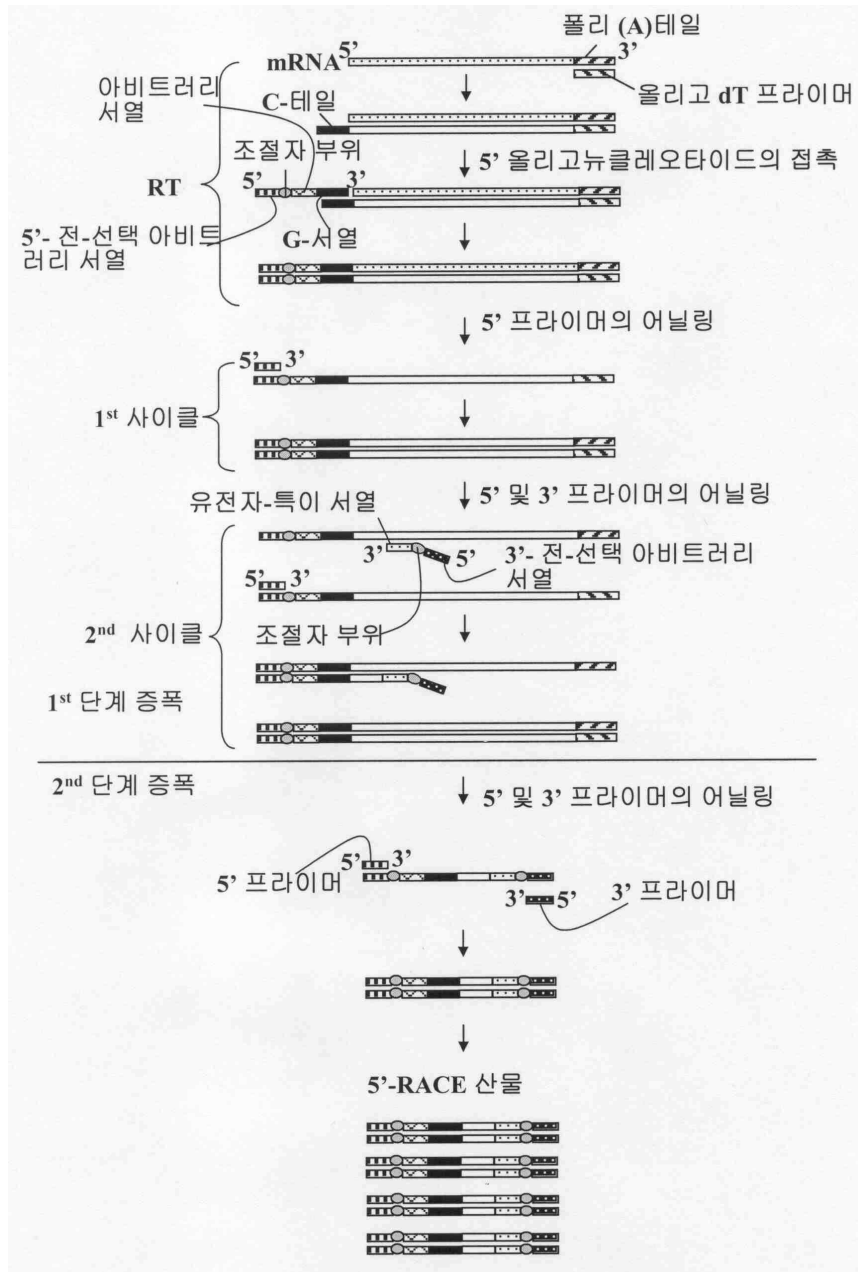
도면2B



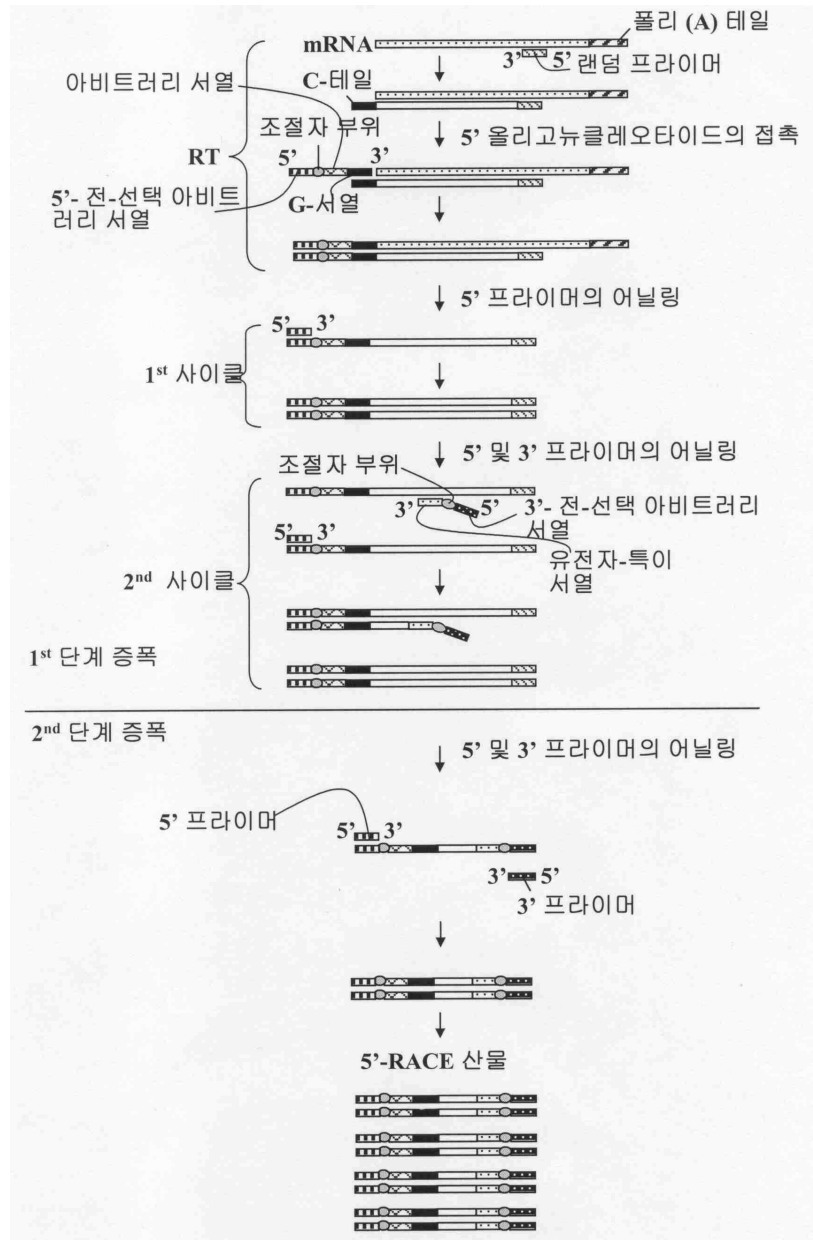
도면3



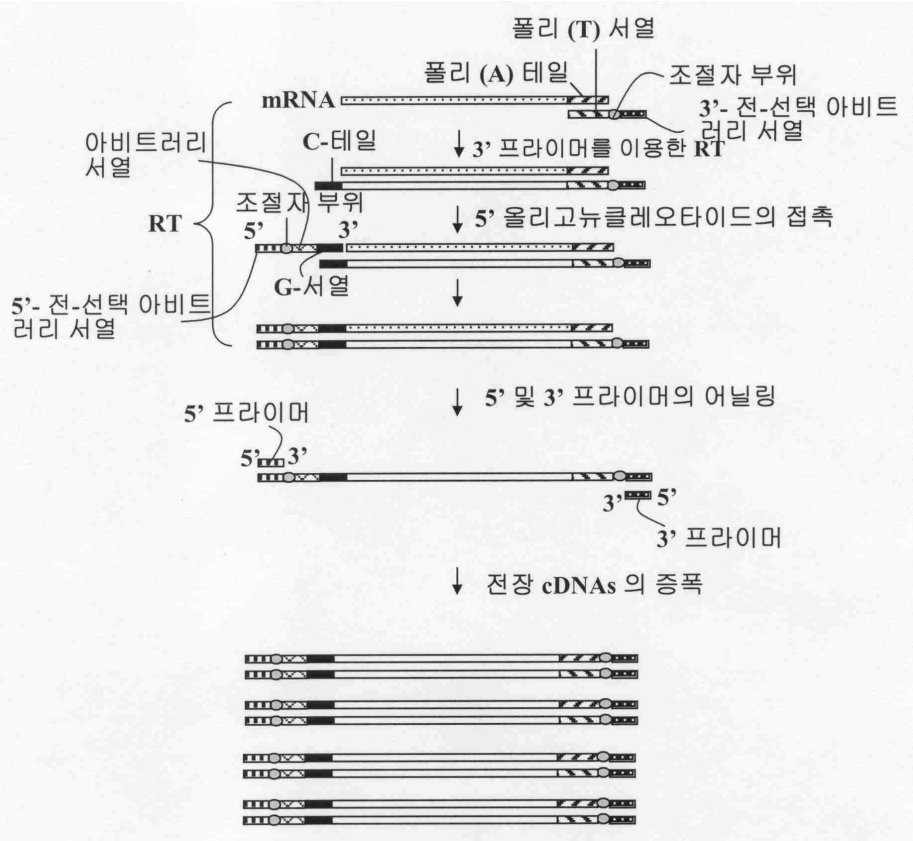
도면4A



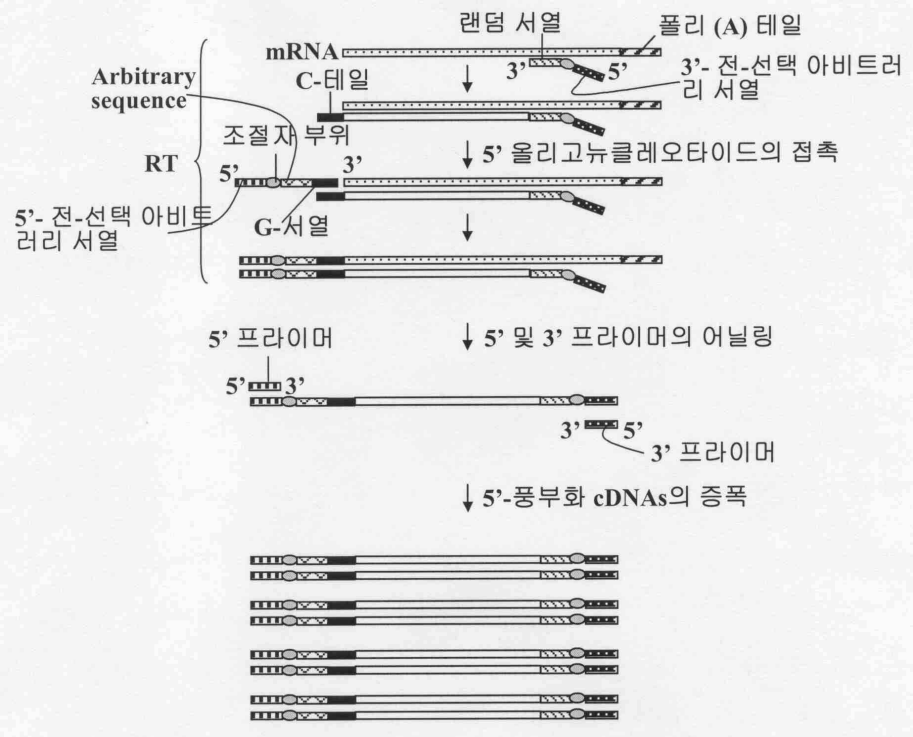
도면4B



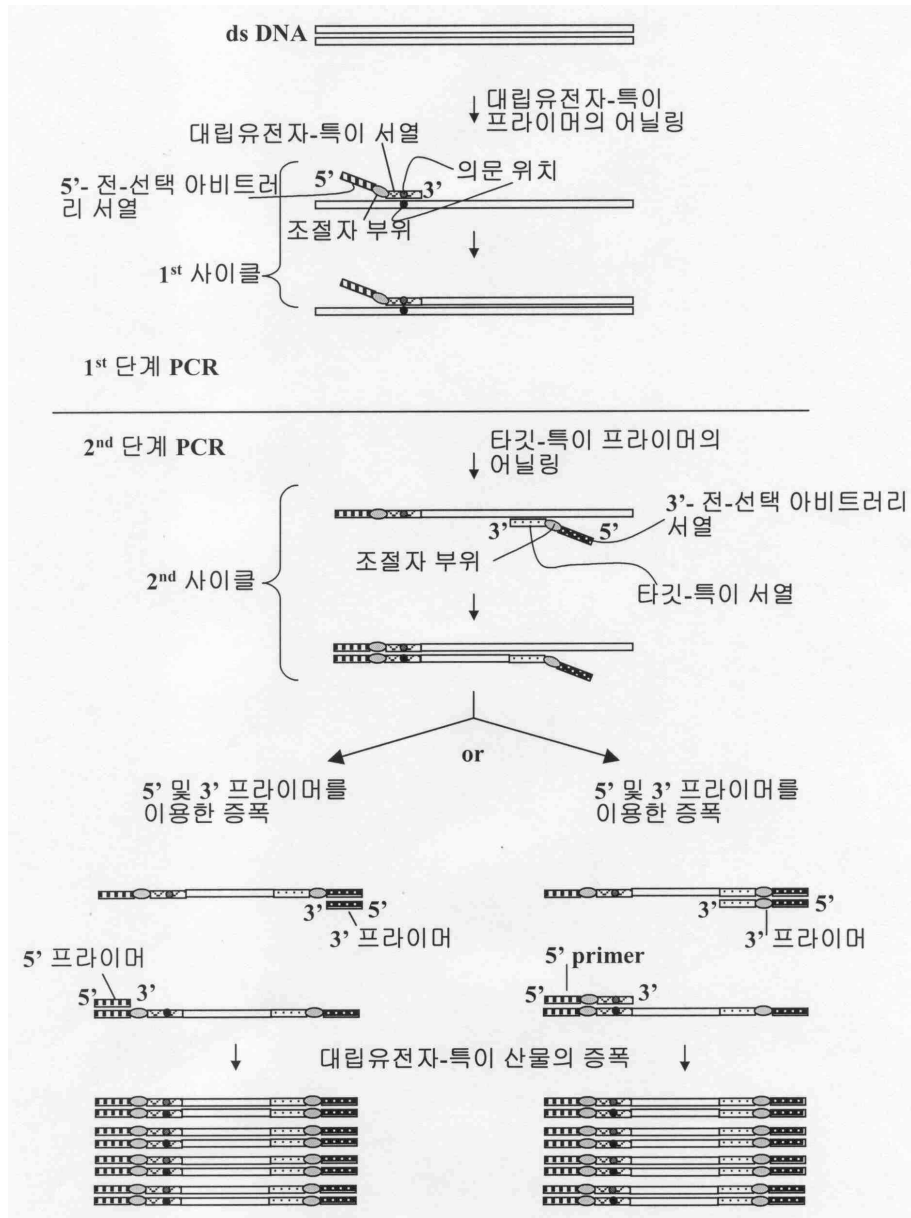
도면5



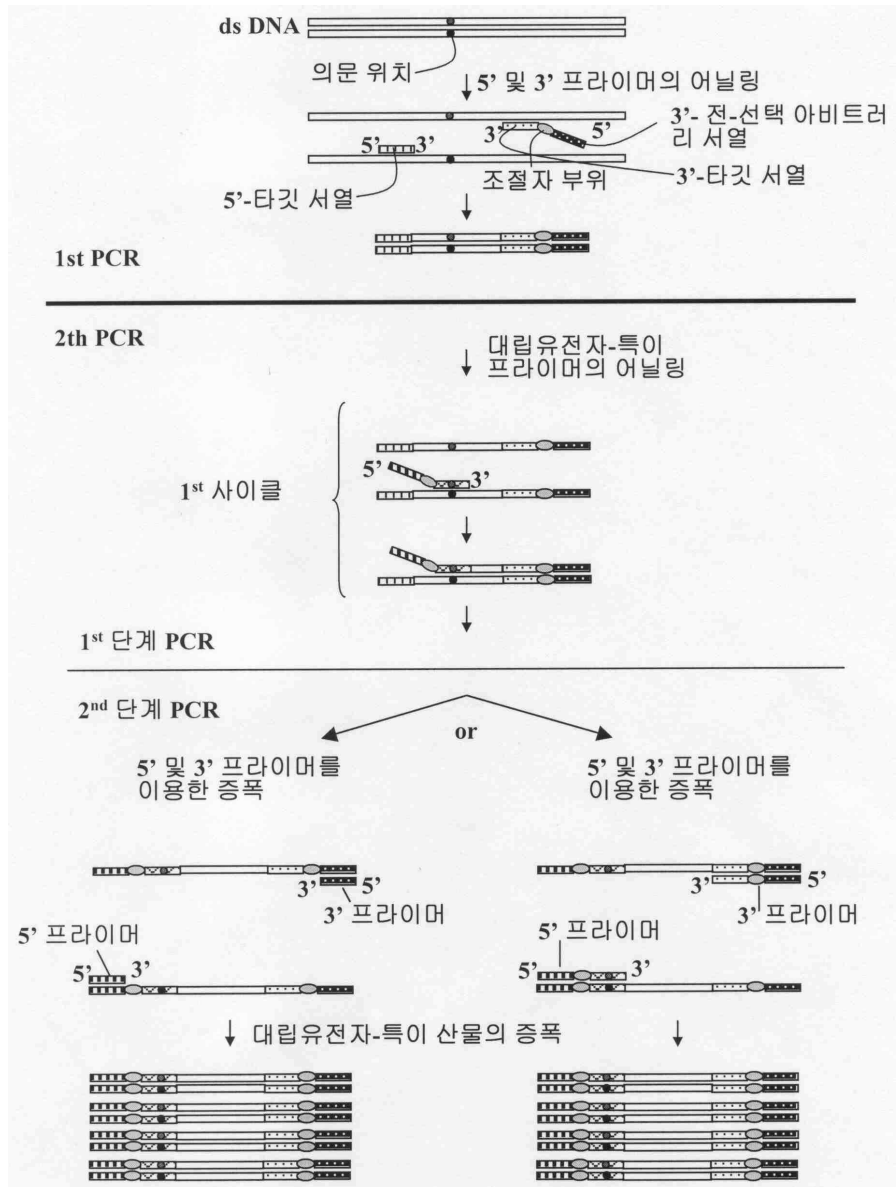
도면6



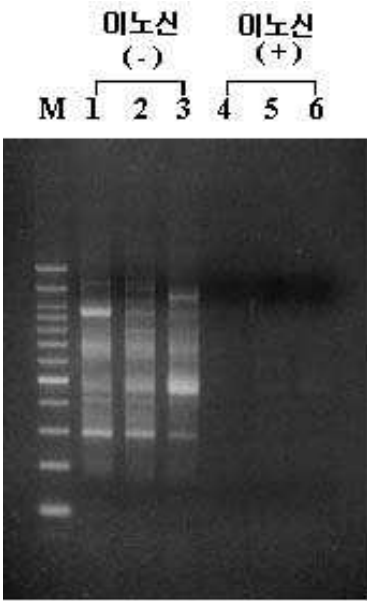
도면7A



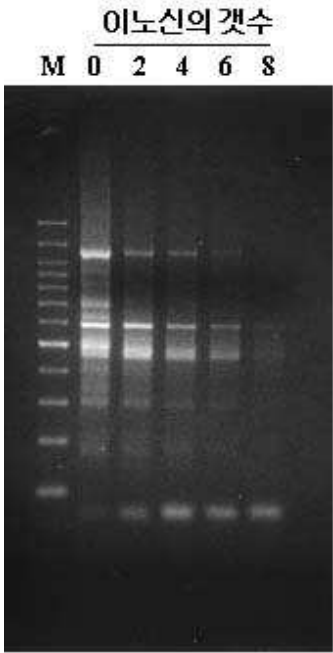
도면7B



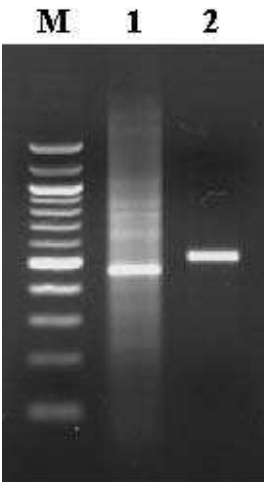
도면8



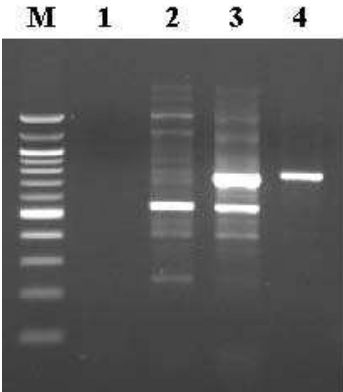
도면9



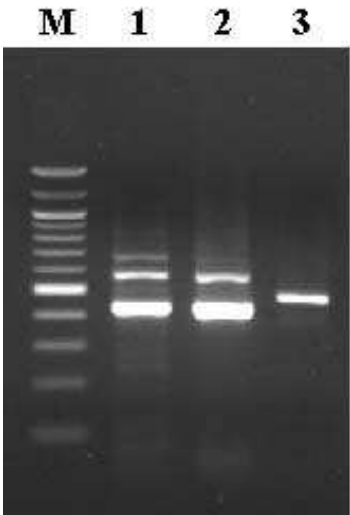
도면10A



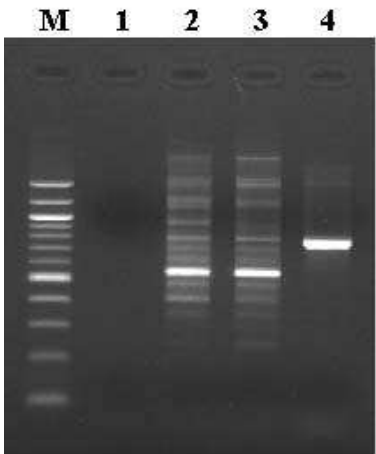
도면10B



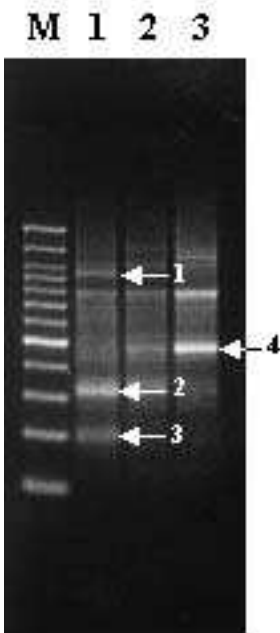
도면10C



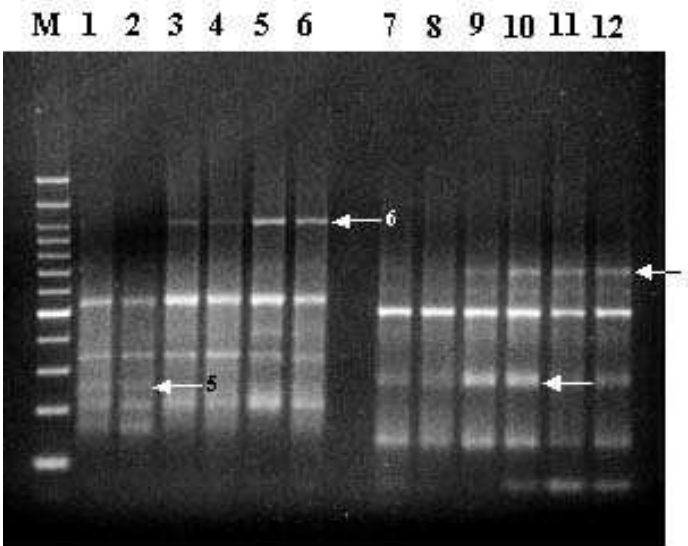
도면10D



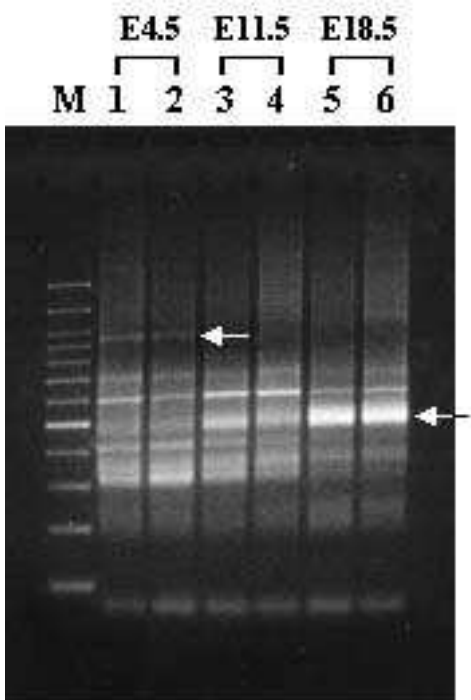
도면11A



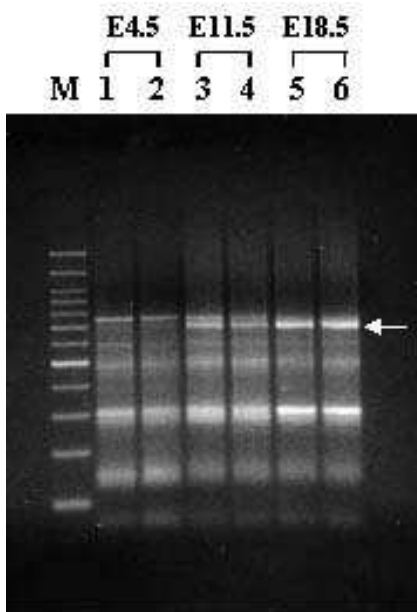
도면11B



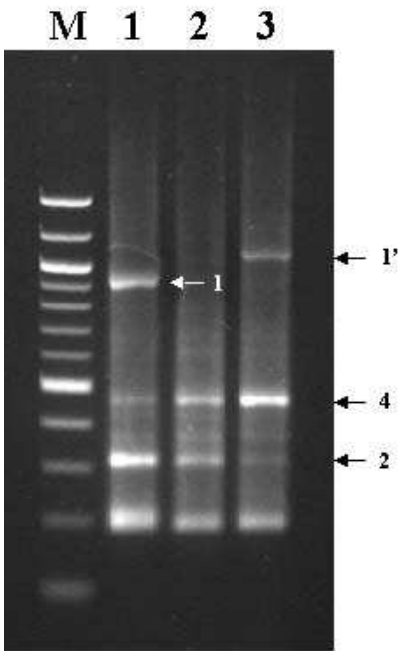
도면11C



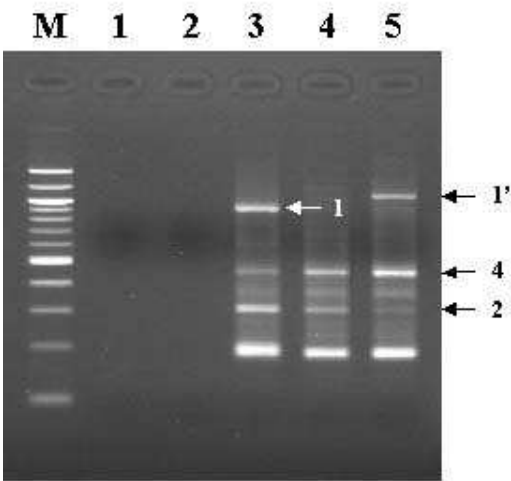
도면11D



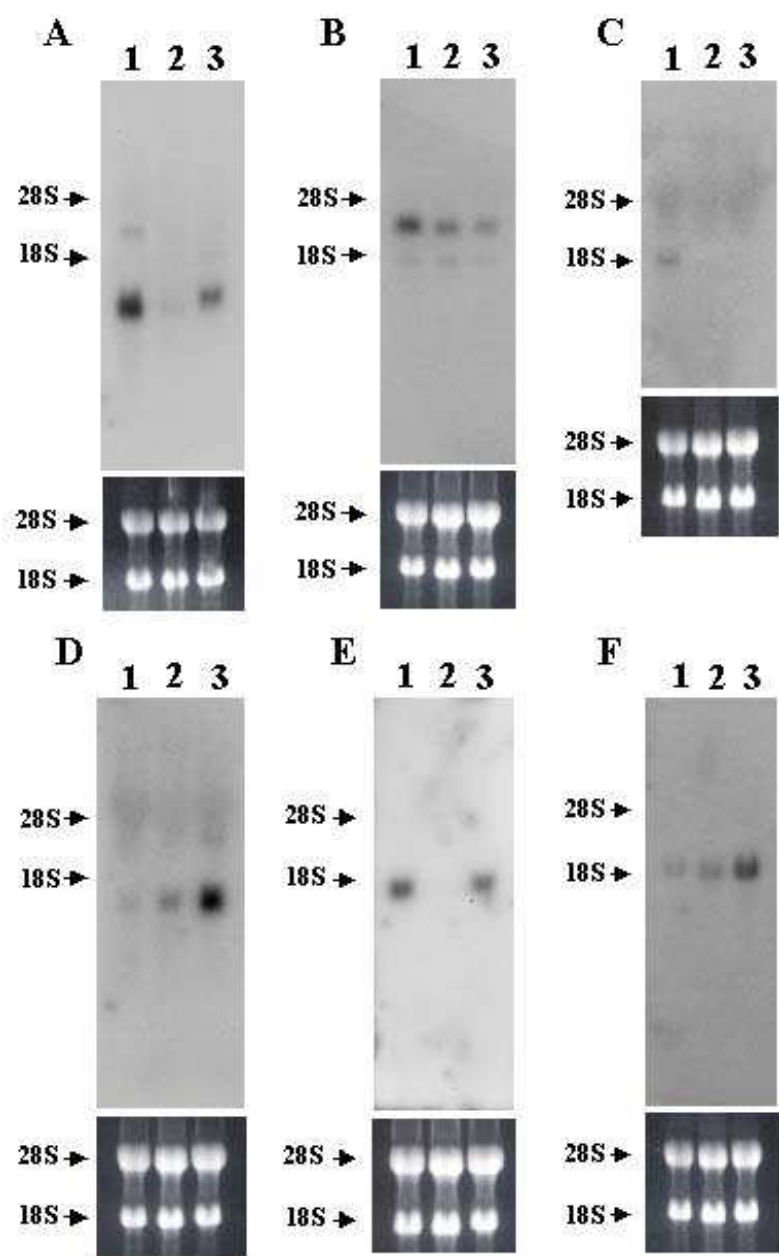
도면12A



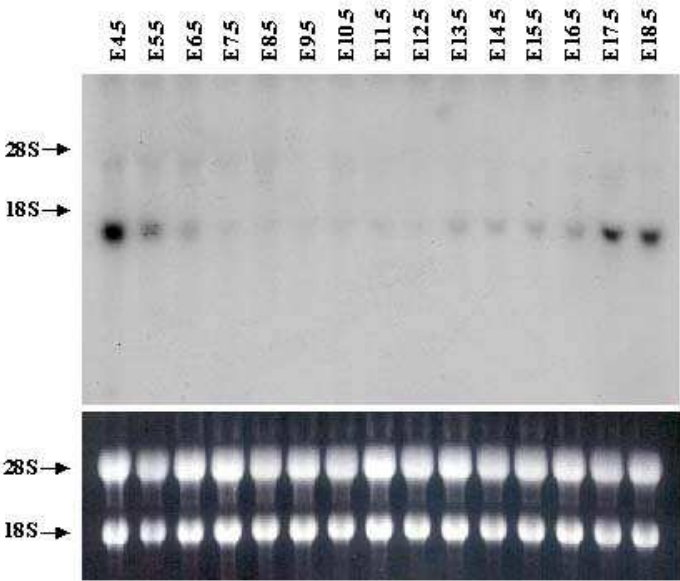
도면12B



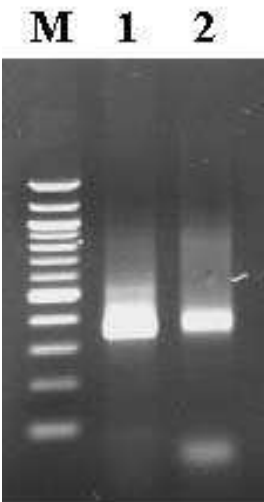
도면13



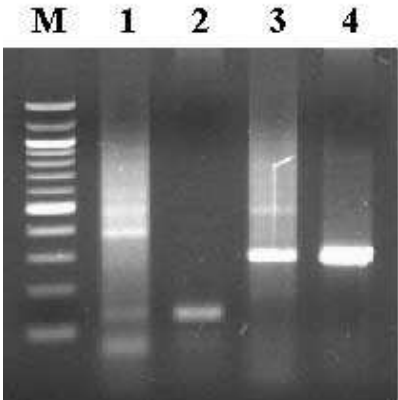
도면14



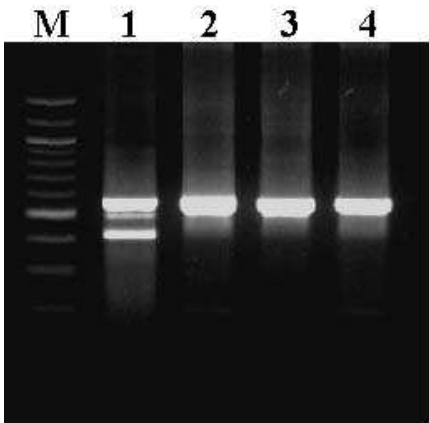
도면15



도면16



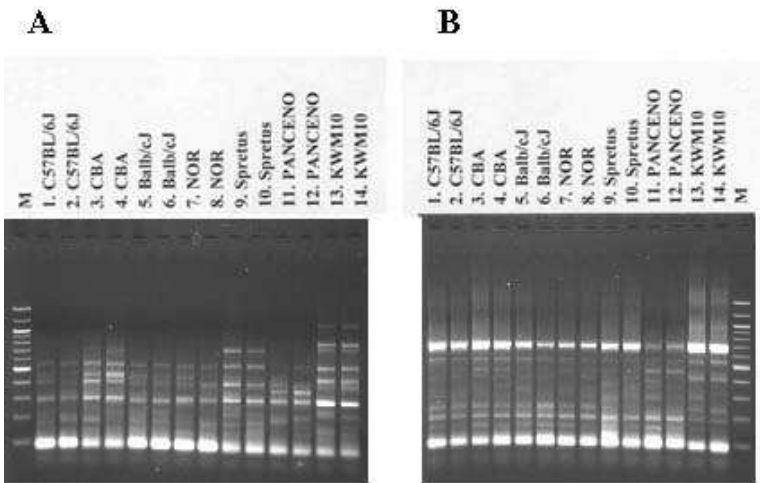
도면17



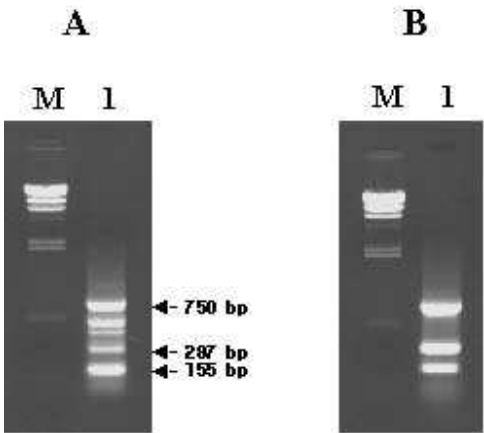
도면18



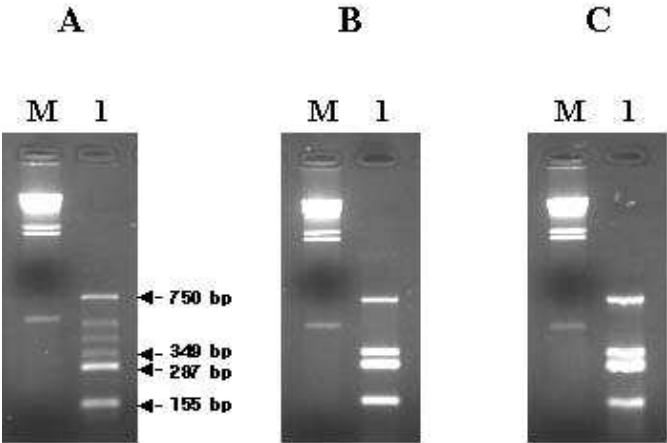
도면19



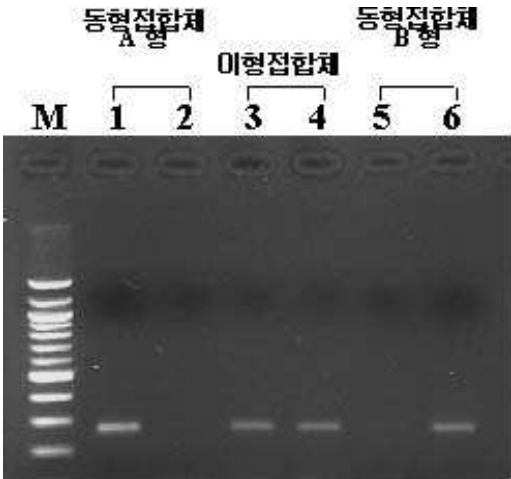
도면20



도면21



도면22



도면23

