(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.[6]
C12Q 1/68

(45) 공고일자 2004년06월14일
(11) 등록번호 10-0418460
(24) 등록일자 2004년02월02일

(21) 출원번호 10-1995-0026356
(22) 출원일자 1995년08월24일

(65) 공개번호 10-1996-0007791
(43) 공개일자 1996년03월22일

(30) 우선권주장 94202438.1 1994년08월25일 EP(EP)

(73) 특허권자 악조 노벨 엔.브이.
네덜란드 엔엘-6824 비엠 아르넴 벨페르베그 76

(72) 발명자 밥반게멘
네덜란드왕국,복스텔,코르타커14

아드리아나프레더리케슈킹크
네덜란드왕국,후텐,하버-오르트10

(74) 대리인 나영환
이상섭
김성기
신정건

심사관 : 신동환

(54) 추가증폭의표적이될수없는핵산증폭반응생성물의제조방법,이방법을이용한진단분석법,상기방법또는분석법을수행하는데적합한키트및용기

요약

본 발명은 추가 증폭의 표적이 될 수 없는 하나 이상의 프라이머 쌍을 이용하는 핵산 증폭 반응의 생성물을 제조하는 방법으로서, 올리고뉴클레오티드에 혼성화된 혼성화 복합체의 이중 가닥 부분을 분해로부터 보호하는 방식으로 변형된 올리고뉴클레오티드와 증폭 생성물 사이에 혼성화 복합체를 형성시키는 조건하에, 증폭 생성물을 프라이머 쌍의 혼성화 부위들 사이에 위치한 증폭 생성물의 뉴클레아제 연장체에 혼성화할 수 있는 상기 올리고뉴클레오티드와 접촉시키는 단계, 및 프라이머에 혼성화할 수 있는 혼성화 복합체의 적어도 일부가 분해되도록 하는 조건하에, 혼성화 복합체를 분해 처리하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
본 발명은 또한 전술한 방법을 수행하기 위해 샘플내 핵산 서열의 존재를 진단하는 분석법 및 전술한 방법을 수행하기 위한 키트에 관한 것이다.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 생물 공학 분야, 특히 핵산 증폭 분야에 관한 것이다.

PCR 및 기타 핵산 증폭 방법의 진단학적 응용에서 만나게 되는 가장 큰 문제점은 핵산의 오염으로 인한 허위 양성 반응이다(퀵, 에스, 및 알, 히구치. 1989. Awarding false positive with PCR. Nautre(런던) 339:237-238 참조). PCR의 정교한 민감성을 그 원상 회복성(undoing)으로 입증된다; 가까운 용기속으로 소량의 상기 서열을 이주하면 허위 양성의 결과를 가져올 수 있다. 핵산의 오염은 3 가지의 원천에서 기인할 수 있다. 한 가지는 다수의 표적 분자를 함유하는 임상 시료로서 시료들 사이의 교차 오염을 야기한다. 또 다른 하나는 사전 클로닝된 플라스미드 DNA에 의한, PCR에 사용된 시약의 오염이다. 세 번째 원천은 상기 표적 서열의 반복 증폭에 의한 실험실내 PCR 생성물(앰플리콘)의 축적이다. 후자는 특히 진단학적응용의 경우 관계가 있다.

플라스미드의 파편 및 오염물과 이전의 종류에서 생성된 PCR 생성물의 제한 단편에 의한 PCR의 잠재적 오염 외에도, 기타 원천의 이주물(carry-over)이 있다.피펫팅 장치의 통은 에어러졸로 오염되어 교차 감염을 초래할 수 있다. 면도날상에 뿐만 아니라 마이크로톰 날상에 DNA의 부착은 후속 PCR로 이주될 수 있다. 샘플 제조 또는 PCR 생성물의 분석중에 사용된 장치 역시, 예를 들면 겔 장치, 도트블롯장치, 원심분리기 또는 드라이 아이스/에탄올조는 오염의 잠재적 원천이 될 수 있다(에스. 퀵(1989), Amplification 2, 4 면 참조). 허위 음성률을 극도로 감소시키는 일부 일반 물리학적 조치는 핵산이 샘플로부터 분리되는 실험실 영역, 증폭 반응이 설정되는 실험실 영역 및 실제의 증폭과 검출이 일어나는 실험실 영역을 분리하는 것이다. 또한 샘플 제조 및 설정 반응에 이용되는 공급 및 피펫팅 장치를 별개의 세트로 사용하므로써 감소시킬 수도 있다. 그러나 실험실의 조직화와 관련된 상기 조치는 핵산 물질의 증폭 이후의 반응의 오염을 완전히 방지하지는 못할 것이며, 성가시고 비용이 많이 든다. 상기 사전 조치를 연구실에서 채택할 수는 있지만, 이것은 사전 포장의 질을 조절하는 진단용 키트를 이용할 때까지는 설비 실험실에 심각한 제한을 나타낼 것이다. 현재, 임상 미생물학 실험실은 PCR 만을 위한 공간도 없고, 허위 양성을 자주 조정할 의향도 없다.

앰플리콘 오염은 가장 심각한 종류의 오염이며, 불행하게도 표준 반응에서 생성되는 다수의 분자들로 인해 일어나는 경향이 매우 크다. 각 증폭 용기는 앰플리콘 사본을 10^{12} 개 만큼 다수 함유할 수 있고, 따라서 최소의 에어러졸 방울(10^{-6} μℓ)조차도 10^{5} 개 까지의 잠재 표적을 함유할 수 있다. 앰플리콘은 명확히 PCR 기질 로 입증되어 있고, 따라서 추가의 증폭의 이상적 표적이 된다. 수백 내지 수천의 증폭 반응을 최적화 및 새로운 세트의 시약 시험에서 수행할 수 있다는 사실을 고려하며, 앰플리콘 축적은 시약, 완충액, 실험실 유리제품, 오토클레이브 및 통기시스템의 오염에서 나타날 수 있다는 것이 놀라운 일은 아니다. 이 문제는 감염성질병의 진단에 특히 심각한데, 이 진단에서 분석은 통상 최대 민감도(1 내지 10개의 주형 분자)에 대해 맞춰진다.

일반적인 실험실 사전 조치외에도, 여러 물리적 방법들이 개발되어 비-표적 DNA와의 증폭 반응물의 오염을 극복하고 있다.

사전 증폭된 핵산 생성물과의 증폭 반응물의 오염을 감소시키는데 관한 다수의 특허 출원이 행해졌다. W0 9117.270호에는 변형된 증폭 프라이머를 사용하고, 변형된 증폭 반응 생성물(AP)을 변형된 AP를 선별적으로 제거하는 수단과 접촉시키므로써 현저하게 변형된 증폭 반응 생성물을 생산하는 것을 포함하는, 증폭 과정에서의 증폭 반응 생성물 오염을 감소시키는 방법이 개시되어 있다. 변형은 리간드,교차 결합제, 효소 인지 부위로부터 선별된다. 변형된 AP를 선별적으로 제거하는 바람직한 수단은 RNase 효소 부위를 사용한다. 이 방법은 RNase 부위를 DAN 프라이머상에 혼입시킬 때만 작용하며, 그렇지 않으면 RNase는 작용하지 않을 것이다. 이 방법은 PCR 또는 LCR에만 사용할 수 있으나, NASBA(RNA 증폭) 반응에는 사용할 수 없다. 한편, 변형된 AP를 제거하는 수단은 리간드, 특히 비오틴 또는 플루오레스세인(fluorescein)의 고정화된 특이 파트너인 것으로 기재되어 있다. 그러나 개시된 방법에서 재증폭은 생성물의 이주가 일어난 후에만 방지된다. 이것은 증폭 반응 생 성물의 검출 반응이 여전히 증폭 반응 생성물을 후속 증폭 반응에 이주시킬 수 있음을 의미한다.

W0 9201-814호에는, 통상적이지 않은 뉴클레오티드의 공유결합을 가수분해시키므로써 오염성 증폭 반응 생성물을 분해시키는 것을 포함하여 통상적인 nTP와 비통상적인 nTP의 혼합으로부터 생성된 이전의 증폭 반응으로부터의 핵산 서열로 오염된 핵산 증폭 반응 시스템의 오염물 제거 방법이 개시되어 있다.

인테그레이티드 DHA 테크놀로지스 인코오포레이티드의 EP 496483호에는, 증폭 반응의 리보스 잔기를 함유하는 프라이머 또는 폴리뉴클레오티드 기질을 사용하는 핵산 증폭 반응의 증폭 반응 생성물에 의한 오염을 감소시키고, 그후, 증폭 반응 생성물내 리보뉴클레오티드 연결체를 분해시키는 방법을 개시하고 있다. 증폭반응 생성물을 제거하여 이주를 방지하는 상기 분해 반응은 증폭된 생성물 검출후 및 따라서 잠재적 이주가 일어난 후에 일어난다. 이어서 추가의 증폭 반응전에 리보스의 분해 반응이 수행되어야 한다. 이 방법을 사용할 수 있는 증폭 반응은 PCR, LCR또는 전사계 반응이 있을 수 있다. 그것은 RNA를 이용하는 NASBA 또는 기타 다른 증폭 반응에는 사용할 수 없다.

라이프 테크놀로지즈 인코오포레이티드의 EP 522884호에는, 제1 샘플에서 증폭 반응시키는 단계와 증폭된 핵산이 엑소뉴클레이티드를 함유하지 않는 증폭 반응을 방지하지 않고는 증폭되지 않도록 제2 샘플을 처리하는 단계를 포함하는 핵산을 올리고뉴클레이티드 의존성 증폭 반응시키는 방법이 개시되어 있는데, 여기서 상기 증폭 반응은 하나 이상의 말단에 또는 그 근처에 외래-샘플 뉴클레오티드를 포함하 여 1종 이상의 올리고뉴클레오티드에 의존하여 증폭된 핵산을 생성시킨다. 또한 단일 가닥 핵산 및 4개 이상의 DNA 프로브를 제공하고, 프로브를 하이브리드화하는 사이클을 반복 실행하고, 연결하여 프로브 서열을 생성시키고, 샘플내 DNA를 변성시키고, 연결된 프로브 서열을 검출하므로써 샘플내 표적 핵산 서열을 검출하는 방법도 개시되어 있다. 제1 및 제2 프로브가 중요하다. 이들 프로브는 단일 가닥이고, 프로브들이 결합될 수 있도록 가닥 또는 표적 핵산의 부분에 하이브리드화할 수 있다. 제3 및 제4 프로브는 각각 제1 및 제2 프로브에 하이브리드화된다. 제4 프로브의 3' 뉴클레오티드와 제3 프로브의 5' 뉴클레오티드와 마찬가지로 적어도 제1 프로브의 3' 뉴클레오티드 및 제2 프로브의 5' 뉴클레오티드는 데옥시우리딘이다. 결합된 프로브 서열을 검출하기 전에, 샘플을 UDG로 처리하여 결합된 프로브의 우라실부와 데옥시리보스부 사이의 글라이코사이드 결합을 절단한다. 상기 방법의 변형인 EP 401-037호는 증폭된 핵산 역시 데옥시우리딘을 혼입하여 증폭 핵

산 자체로는 주형으로 작용할 수 없음을 개시하고 있다.
W0 9200384호에는, 증폭 반응 사이클을 정지시킨 후, 증폭 반응 생성물이 추가의 증폭 반응을 할 수 없도록 하고/하거나, PCR의개시전에, 동일한 프라이머를 사용하여 PCR 반응에서 이미 형성된 증폭 반응 생성물의 반응을 선택적으로 방지하는 사전 처리를 실시하는 방법이 개시되어 있다. 이 프라이머는 리보스 잔기, 및 상보적 서열에서 절단을 야기하거나 또는 아니면 2개의 프라이머에 의해 결합된 DNA의 두 사슬 사이에 공유 결합을 형성하는 작용제(예: 소랄렌)를 함유할 수 있다. 소랄렌은 이중 가닥 DNA에 이식되고 23 내지 400 nm의 파장의 광으로 광활성화 된 후에 가닥간 교차 결정을 형성할 것이다. 또다른 선택은 모든 PCR 시약 수용 Taq DNA-폴리머라제의 존재하에 게놈 DNA의 감마선 조사를 이용하는 것이다. 조사후 PCR 혼합물은 새로이 첨가된 표적 DNA를 증폭시킬 수 있는 채로 유지되나, 보다많은 용량은 증폭 효율을 감소시키는 것 같다. 불활성화는 DNA 주형의 길이와 성질에 의존하며, 모든 개별 증폭 시스템에 대해 최적화되어야 한다.
PCR에서 오염을 조절하기 위한 UV 조사의 사용 및 가능한 결점 역시 광범위하게 논의되어 왔다. DNA의 비-이량체 광손상외에도, UV-불활성의 주경로는 동일한 DNA 가닥상에서 인접한 피리미딘의 교차 결합이다. 이 반응은 광-가역성이며, 이량체를 이룬 피리미딘 쌍과 비이량체 피리미딘 쌍 사이에 정상 상태가 이루어질 것이다. 이량체화된 피리미딘 분획은 주어진 DNA 표적의 관찰된 UV-불활성화 %를 나타낸다.
이량체화의 가역성으로 인해, DNA 표적의 길이와 내부 서열이 고려되어야 한다. 보다 다수의 티미딘 쌍을 갖는 보다 긴 서열은 보다 작은 서열보다 불활성화하기가 더 용이하다. 그럼에도 불구하고 Taq DNA 폴리머라제 및 진정한 표적 DNA를 연속적인 UV-조사후 첨가하므로써 특정 레벨의 허위 양성 PCR 신호를 생성시킬 수 있다(BFE 제8권, 1991, 10. 10. 마틴 하인리히, PCR carry-over 참조).
소랄렌 유도체 4'-아미노에틸-4,5'디메틸이소소랄렌(4'-AMDMIP)의 사용 방법 이 개시되어 있다(치미노, 쥐, 디., 케이. 씨. 메체트, 제이. 더블유. 테스먼, 제이. 이. 하스트 에스. 티. 아이작, 1991 Nucleic Acids Res. 19:99-107 및 아이작, 에스.티.등, 1991 Nucleic Acids Res. 19:109-116 참조), 상기 화합물은 증폭반응 전에 PCR 혼합물에 첨가하며; 상기 화합물은 실질적으로 프라이머 접합 활성 또는 Taq 폴리머라제 활성을 간섭하지 않으며 열 안정성이 있다. 증폭 반응후 폴리프로필렌 반응전에 튜브를 열고, 튜브를 장파장의 UV 광에 노출시키는데, 이 때 UV광은 튜브를 투과하여 이소소랄렌을 광화학적으로 활성화하나 DNA를 손상시키지는 않는다. 그 후 활성화된 소랄렌은 증폭된 DNA상에 피리미딘 잔기를 가진 시클로부탄 부가물을 형성하는데, 이 부가물은 Taq 폴리머라제가 후속 증폭 반응에서 분자를 횡단하지 못하게 한다. 이과 정의 효율은 부분적으로 확률에 의해 정해지며, 앰 플리콘의 길이 및 뉴클레오티드 염기 조성에 따라 매우 높은 수도 있다. 일반적으로 약 50%의 G+C의 함량을 가지고 300 bp 이상의 길이를 가진 앰플리콘의 경우 실제로 완전한 오염 제거를 달성할 수 있다. 그러나, 이소소랄렌 및 우리딘을 사용하는 두 오염 제거 방법은 개선의 여지가 있다. 광화학적 방법에서, PCR의 억제는 이소소랄렌 고농도에서 관찰되었는데, 이 농도는 매우 짧거나 또는 GC가 매우 풍부한 앰플리콘을 불활성화하는데 필요하다. 또한, 내부 하이브리드화 프로브를 앰플리콘검출에 사용하는 경우, 증폭된 DNA 내 이소소랄렌 교차 결합의 존재를 보충하는 데에 낮은 하이브리드화 긴급도가 필요할 수 있다. UNG 프로토콜이 가진 잠재적인 문제점으로는 PCR 과정에서 변성 및 접합에 사용되는 고온에서 UNG 활성의 불완전한 제거를 들 수 있다. PCR의 초기 사이클에서 우라실-함유 가닥은 만들어지자마자 불활성화될 수 있기 때문에 잔류의 UNG 활성은 시스템의 민감성에 영향을 끼칠 수 있다. 또한, 다수의 PCR 프로토콜에서 TTP를 dTTP로 치환하면 민감도를 회복하는데 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트 풀의 조성을 요하면서 보다 낮은 증폭 효율을 산출하게 된다.
본 발명은 전술한 다양한 방법들의 결점을 나타내지 않는 핵산의 증폭 반응 후의 반응을 위한 오염 방지 화학의 개발에 경주되었다. 구체적으로 RNA를 이용하는 방법의 오염 방지 화학(예: NASBA)이 바람직하다. 또한, 본 발명에 따른 방법은 증폭된 생성물의 부분적인 분해를 기초로하여, 역시 올리고뉴클레이티드 하이브리드화에 의해 증폭된 생성물을 검출할 수 있다. 핵산의 분해는 특이적 DNase(DNaseI, 제한효소, 엔도뉴클레아제, 엑소뉴클레아제) 및 RNase(RNase A, RNase T1, RNase U, 엑소뉴클레아제)를 사용하거나, 또는 DNA 및 RNA를 동시에 분해시킬 수 있는 비-특이적 뉴클레아제(S1 뉴클레아제, RNase가 유리되지 않은 DNaseI 등)를 사용하므로써 수행할 수 있다.
본 발명은 추가의 증폭의 표적이 될 수 없는 핵산 증폭 반응 생성물을 제조하는 방법에 관한 것인데, 이 때, 증폭 반응은 하나 이상의 프라이머쌍을 이용하며, 상기 방법은 증폭된 생성물의 뉴클레오티드 연장체(프라이머쌍의 하이브리드화부위 사이에 위치함)에 하이브리드화할 수 있는 올리고뉴클레이티드(올리고뉴클레오티드에 하이브리드화된 하이브리드화 복합체의 이중 가닥 부분이 분해되지 않게 보호하는 방식으로 변형시킴)와 증폭된 생성물을, 올리고뉴클레오티드와 증폭 생성물 사이에 하이브리드화 복합체가 생성되게 하는 조건하에 접촉시키는 단계, 및 프라이머에 하이브리드화할 수 있는 하이브리드화 복합체의 적어도 그 부분이 분해되도록 하는 조건하에 상기 하이브리드화 복합체를 분해 처리하는 단계를 포함한다.
본 발명에 따른 방법에서, 검출 뉴클레오티드는 또다른 뉴클레오티드를 사용 하여 연장시킬 수 없는 3' 말단을 포함하는 것이 바람직하다. 이를 달성하는 방법은 당업자에게는 공지되어 있다. 또한, 본 발명의 적합한 실시 양태에서, 하이브리드화 복합체의 부분적 분해 단계는 증폭 생성물과 검출 올리고뉴클레오티드의 복합체를 분해하지 않는 뉴클레아제를 사용하므로써 수행할 수 있다. 뉴클레아제에 의해 분해되지 않는 검출 올리고뉴클레오티드의 예는 뉴클레아제에 의한 분해를 방지하기에 충분한 다수의 뉴클레오티드의 2'-0-메틸 변형을 포함하는 올리고뉴클레오티드이며, 상기 방법으로 변형된 뉴클레오티드만을 포함하는 올리고뉴클레이티드가 바람직하다. NASBA 증폭 반응의 경우, DNA 및 RNA 둘다 증폭되기 때문에, DNA 및 RNA 둘다 동시에 분해되어야 방법이 성공적으로 된다. 그러므로, 그러한 경우, 본 발명에 따른 방법은 DNA 및 RNA를 둘다 분해시키는 뉴클레아제 또는 그들의 혼합물을 사용하여 수행할 수 있다. DNase I, 제한효소, 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제와 같이 DNA만을 분해하는 특이적 DNase를 사용하여 분해를 수행할 수도 있다.구체적으로, RNA를 분해시킬 경우는, RNase U, RNase A 또는 엑소뉴클레아제와 마찬가지

로, RNase T와 같은 특이적 RNase를 사용할 수 있다. DNA 및 RNA를 동시에 분해할 수 있는 비특이적 뉴클레아제를 사용하여 분해를 수행할 수도 있다. 또다른 실시 태양에서는, 상기 방법의 분해 단계는 뉴클레아제를 사용하여 효소적으로 분해하기 보다는 화학적으로 수행할 수 있다.

요약하면, 본 발명의 구체적인 실시 양태에서, 증폭 반응, 구체적으로 사전에 생성된 증폭 반응물과의 NASBA 증폭 반응과 같은 RNA를 사용한 증폭 반응의 오염을 방지하고, 하이브리드화 분석 같은 것으로 증폭 생성물을 검출하기 위해 뉴클 레아제와 뉴클레아제 내성 프로브(2'-0-Me-올리고뉴클레오티드)를 병합 사용하는 방법으로서 신규한 것이다. 현재까지 공지된 오염 방지 화학 또는 방법은 NASBA와 같은 RNA 증폭 반응에는 작용하지 않을 것이다. 이것에 대한 유일한 예외는 이론적으로 사용될 수 있는 이소소랄렌을 사용한 증폭 생성물의 증폭후 오염물 제거 방법이다. 그러나, 현재까지 실제로 NASBA 증폭 반응과 상용성이 있는 적합한 이소소랄렌은 발견되지 않았다. 본 발명의 방법은 모든 유형의 증폭 반응의 오염 방지에 사용될 수 있으나, 구체적으로 NASBA 반응과 같은 RNA증폭 반응의 오염 문제를 해결한다. 본 방법이 구체적으로 에어러졸 방울로 인한 이주를 제거하는데 관한 것이면, 본 방법은 최종 반응 혼합물의 에어러졸 방울에 존재하는 증폭 가능한 증폭 생성물의 양이 검출할 수 없는 양이 되도록, 즉 μℓ당 증폭 가능한 생성물이 10^{5} 분자이하, 바람직하게는 μℓ당 증폭 가능한 생성물이 10^{4} 분자 이하가 되도록 사용하는 것이 바람직하다. 이것은 충분한 양의 뉴클레아제를 사용하여 조정될 수 있다. 당업자라면 그것을 뉴클레아제 활성을 기준으로 결정할 수 있을 것이다. 뉴클레아제 활성을 배치마다 변하기 때문에, 구체적인 양을 제시할 수는 없다. 이것은 당업자에게는 널리 공지된 바와 같이 상황에 따라 결정되어야 할 것이다.

본 발명에 따른 방법에서, 올리고뉴클레오티드는 검출용으로 사용할 수 있으나, 고정화 작용을 할 수도 있다. 올리고뉴클레오티드를 검출용으로 사용할 경우, 그것은 검출용 마커, 예를 들면 효소(HRP, AP), 형광성 기, 전기화학적 발광 표지, 염료 또는 방사성 동위원소를 구비할 수 있다. 하이브리드화된 핵산의 검출용으로 공지된 통상 사용되는 검출용 마커는 모두 본 발명에 따른 방법에 사용할 수 있으며, 그것들은 당업자에게 명백한 사항이다. 본 발명에 따른 방법은 또한 분해전에 제2의 올리고뉴클레오티드를 첨가함으로써 수행할 수 있는데, 상기 제2의 올리고뉴클레오티드는 증폭된 핵산과의 하이브리드화가 일어나기에 충분히 증폭 생성물의 뉴클레오티드 연장체와 상동성이 있다. 상기 제2의 올리고뉴클레오티드는 제1 올리고뉴클레오티드를 고정화 목적으로 사용할 경우에 검출용 마커를 구비하여 사용하며, 그 역도 가능하다. 제2의 올리고뉴클레오티드는 제1 올리고뉴클레오티드와 동시에 첨가할 수 있다. 제2 올리고뉴클레오티드의 하이브리드화용 뉴클레오티드연장체는 증폭에 사용된 두 프라이머의 하이브리드화 부위 사이에 위치하고, 제1 올리고뉴클레오티드에 하이브리드화하는 증폭 생성물의 연장체의 마지막 뉴클레오티드중 4개 뉴클레오티드의 범위에 있다. 인접하는 것이 가장 좋은 두 올리고뉴클레오티드들 사이에 작은 갭으로서 존재하도록 올리고뉴클레오티드를 선택하고, 증폭 생성물과 올리고뉴클레오티드의 하이브리드화 복합체를 생성하면서 하이브리드화가 일어나도록 하는 조건을 만드는 것이 바람직하다. 또한 중간 세정 단계를 가지면서 각 단계 다음에 두 올리고뉴클레오티드를 첨가할 수도 있다. 올리고뉴클레오티드는 자체가 공지된 방법으로 5' 또는 3' 말단을 통해 고정화시킬 수 있고, 이어서 그 자체가 공지된 방법으로 검출할 수 있다. 제2 올리고뉴클레오티드를 첨가할 경우, 제2 뉴클레오티드는 5' 또는 3' 말단에 검출용 마커를 구비하거나, 또는 역으로 제1 뉴클레오티드는 검출용 마커를 구비하고 제2 뉴클레오티드는 복합체를 고정화할 수 있다. 본 발명의 일 실시 양태에서는, 올리고뉴클레오티드중 하나가 다른 올 리고뉴클레오티드와 하이브리드화하는 증폭 생성물의 연장체의 마지막 뉴클레오티드에 근접한 쪽, 바람직하게는 인접한 쪽에서 테일링(tailing)을 나타낼 수도 있다. 바람직한 실시 양태에서는, 두 올리고뉴클레오티드가 다른 올리고뉴클레오티드와 하이브리드화하는 증폭 생성물의 연장체의 마지막 뉴클레오티드에 근접한 쪽, 바람직하게는 인접한 쪽에 테일링을 나타낼 수도 있다. 이 테일링은 생성 복합체를 안정화시키는 것 같으므로, 상기 테일링은 2개 이상의 뉴클레오티드의 길이, 바람직하게는 4개 이상의 뉴클레오티드의 길이에 걸쳐 상보적인 것이 바람직하다.

본 발명에 사용할 올리고뉴클레오티드는 증폭 반응 조건하에 10개 이상의 뉴클레오티드의 길이, 바람직하게는 11 내지 30개 뉴클레오티드의 길이에 걸쳐 증폭생성물에 하이브리드화하여 양호한 하이브리드화 및 안전성을 이루는 것이 바람직하다. 이 방법은 또한, 핵산, 검출 또는 고정화용 특이 항체를 사용하여 수행할수 있는데, 이 때, 상기 항체는 프라이머 쌍들 사이의 핵산을 인지한다.

하이브리드화 및 분해 단계는 30 내지 80 ° C의 온도, 바람직하게는 40 내지 70 ° C, 보다 바람직하게는 40내지 64 ° C의 온도에서 성공적으로 수행할 수 있다. 이 온도 범위는 이 방법이 NASBA증폭 반응에 사용하기에 매우 적합함을 뜻한다.

이주 오염의 위험을 최소화하기 위해, 본 발명에 따른 방법은 증폭 생성물의 분해전에 증폭 생성물의 용기가 가능한 한 적은 회수로 열리는 방식으로, 바람직하게는 용기가 단 한번 열리는 방식으로, 보다 바람직하게는 전혀 열리지 않는 방식으로 수행하는 것이 바람직하다. 본 발명에 따른 방법에서 반응물의 첨가는 용기내에 분해전에 하이브리드화가 일어나는 방식으로 일어난다. 본 발명은 전술한 방법 에 관한 것일 뿐만 아니라, 샘플내 특이 핵산 서열의 존재를 진단하는 분석법에 관한 것이다. 상기 분석법은 a) 자체가 공지된 방법으로 샘플로부터 핵산을 분리하는 단계, b) 각 쌍이 자체가 공지된 방법으로 검출할 서열의 적어도 일부에 인접하는 하나의 프라이머쌍 또는 다수의 프라이머쌍을 사용하여, 검출할 서열의 적어도 일부를 포함하는 핵산의 일부를 증폭시키는 단계, c) 상기 b) 단계에서 생성된 증폭 혼합물 상에서 상기에 개시한 본 발명에 따른 방법을 수행하는 단계, 및 d) 자체가 공지된 방법으로 단계 c) 로부터 생성된 올리고뉴클레오티드 증폭 생성물의 검출용 마커를 검출하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 앰플리콘에 의한 이주 오염의 위험을 수반하지 않고 증폭 반응후에 진단 시험을 수행할 수 있도록 임상 실험실에서 통상의 방법으로 수해할 수 있어야 한다.

본 발명은 또한 발명의 오염 방지 방법 또는 개시한 분석법을 수행하는 키트에 관한 것이며, 여기서 키트는 구체적으로 1) 목적 서열의 증폭용 프라이머쌍 또는 다수의 프라이머쌍, 2) 두 올리고뉴클레오티드는 그들의 서열이 서로의 4개 뉴클레오티드 이내에, 바람직하게는 서로에 인접한 증폭 서열과 하이브리드화하며, 각 올리고뉴클레오티드가 10

개 이상의 뉴클레오티드의 길이, 바람직하게는 11 내지 30개의 뉴클레오티드의 길이에 걸쳐 증폭 생성물과 상보적으로 되도록 존재하는 것을 조건으로, 프라이머쌍 사이의 한 위치에서 증폭 서열에 하이브리드화할 수 있는 프라이머쌍당 1 종 또는 2 종의 올리고뉴클레오티드 세트를 포함한다.

적합한 실시 양태에서 본 발명에 따른 키트는 증폭 생성물 및 올리고뉴클레오티드 복합체의 하이브리드화된 부분이 뉴클레아제에 의해 분해되지 않을 만큼 충 분한 수의 뉴클레오티드상에 2'-0-메틸의 형태의 변형을 가진 올리고뉴클레오티드를 포함하는데, 상기 변형은 올리고뉴클레오티드의 모든 뉴클레오티드에 존재하는 것이 바람직하다. 또한, 본 발명을 실시하는데 특히 적합한 키트는 추가로 핵산의 부분적 분해에 필요한 화합물(들)(예: 뉴클레아제)을 증폭 핵산을 분해하기에 충분한 양으로 함유하는 것이 바람직하다. 포함하는 특이 뉴클레아제(들)은 수행할 증폭 반응에 따라 다른데, 예를 들면, NASBA 에는 DNase 및 RNase 또는 PCR 에는 DNase를 사용한다. 증폭 생성물을 함유하는 용기를 여는 횟수를 최소화하기 위해, 본 발명에 따른 키트는 증폭 생성물에 올리고뉴클레오티드 (들)의 하이브리드화가 일어난 후에만 핵산의 부분적 분해에 필요한 화합물 (들)(예 : 뉴클레아제)이 반응혼합물에 접촉할 수 있는 방식으로 본 방법을 수행할 용기에 핵산에 부분적 분해에 필요한 화합물(들)(예 : 뉴클레아제)을 함유해야 한다. 본 발명에 따른 방법을 수행하기에 또는 본 발명에 따른 키트에 사용하기에 적합한 용기는 본 발명의 범위내에 속한다. 그러한 용기는 용기내 분리된 격실에서 핵산의 부분적 분해에 필요한 화합물(들)(예: 뉴클레아제)을 함유하는데, 여기서 상기 분리된 격실은 핵산의 부분적 분해에 필요한 화합물(들)(예: 뉴클레아제)과 분리된 격실의 분해후 용기의 나머지 부분이 접촉할 수 있도록 분해될 수 있다. 분리된 격실의 벽은 예를 들면, 핵산의 부분적 분해에 필요한 화합물 (들)(예 . 뉴클레아제)의 불활성화 온도 이하의 온도에서, 그리고 하이브리드화 복합체의 용융 온도 이하의 온도에서 분해될 수 있는 열분해성 물질을 포함할 수 있다. 그러한 열분해성 물질의 예는 왁스 또는 아가로스이다, 핵산의 부분적 분해에 필요한 화합물(들)(예 : 뉴클레아제)의 해당 지 연 방출 시스템의 기타 종류는 당업자에게는 명백한 사항이다. 본 발명의 아이디어는 반응 또는 증폭을 수행하는 용기를 가능한 한 적은 횟수로 열어 이주의 위험을 감소시킨다는 것이다. 하기 실시예에서 본 발명을 상설하며, 본 발명이 이들에게만 제한되는 것은 아니다.

실시 예 1

NASBA 반응을 키에비츠등(1990) 및 반 게멘등(1993)의 방법을 약간 변형시켜 수행하였다. 2 ㎕의 HIV-1 표적 핵산(RNA)에 21 ㎕의 반응 혼합물을 첨가하고 (최종 농도 : 40 mM 트리스, pH 8.5, 42 mM KCI, 12 mM $MgCl_2$ 5 mM DTT, 15% v/v DMSO, 1 mM의 각 dNTP, 2 mM의 각 NTP, 0.2 ㎛의 프라이머 1 및 0.2 ㎛의 프라이머 2), 65℃에서 5 분 동안 항온처리하였다. 41℃ 로 냉각시킨 후, 2 ㎕의 효소혼합물의 첨가로 증폭을 개시하였다(최종 농도 : 0.1 ㎍/㎕ BSA, 0.1 URNase H, 8 U AMV-역 전자효소 및 40 U T_7 RNA폴리머라제). 반응물을 총 25 ㎕의 부피로 41℃에서 75 분 동안 항온처리 하였다. 증폭된 NASBA 생성물의 뉴클레아제 처리는 5 ㎕의 NASBA 반응 혼합물, 5 ㎕의 1 x NRG 완충액(40 mM 트리스, pH=8.5, 42 mMKCI, 12 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 1 mM의 각 dNTP, 1 mM의 각 NTP), 1 ㎕의 100 mM $MgCl_2$ 및 RNase A 및 DNase I을 표 1에 나타낸 농도로 혼합하여 수행하였다. 최종 부피는 15㎕였고, 41℃에서 30 분동안 항온처리하였다. 각 뉴클레아제 항온처리에 대해, 일련의 희석물을 만들고, 2 ㎕의 적합한 희석물을 NASBA 재증폭 반응의 출발물로 사용하였다. 이들 재증폭은 65℃ 항온처리 없이 수행하였다. 그 결과를 표 1에 요약한다. RNase A (50 mg) 및 DNase I (100 내지 500 U)의 모든 시험한 배합물은 NASBA증폭 생성물의 재증폭을 방지하였다. 2×10^{-3} ㎕ 이사의 재증폭 NASBA 반응에서의 최초의 NASBA 반응물의 출발 부피는 모두 양성이 었다. 그러나, 그러한 상대적인 부피는 너무 커서 에어러졸을 형성하지 못하고, 따라서 이들 고부피가 NASBA를 오염시킬 가능성은 낮다.

표 1 : RNase A 및 DNase I에 의한 뉴클레아제 처리후 65℃ 항온처리하지 않은 NASBA 생성물의 재증폭

RNase A	DNase I	재증폭 NASBA에서 최초 NASBA 반응물의 출발 부피(㎕)		
		2×10^{-3}	2×10^{-6}	2×10^{-9}
50 ng	100 U(파마시아)	±	+	-
50 ng	250 U(파마시아)	±	-	+
50 ng	500 U(파마시아)	±	-	-
50 ng	100 U(깁코 BRL)	±	-	-
50 ng	250U(깁코 BRL)	±	-	-
50 ng	500 U(깁코 BRL)	±	-	-
50 ng	100 U(베링거)	±	-	-
50 ng	250 U(베링거)	±	-	-
50 ng	500 U(베링거)	-	-	-
-	-	+	+	+

3개 공급사의 DNase I을 시험하였다.

실시 예 2

NASBA 증폭 및 재증폭은 실시예 1과 동일하나, 차이는 재증폭을 65℃ 항은처 리하면서 수행한다는 것이다. 그 결과는 표 2에 요약한다.

표 2 : RNase A 및 DNase I에 의한 뉴클레아제 처리후 65℃ 항온처리한 NASBA 생성물의 재증폭

RNase A	DNase I	재증폭 NASBA에서 최초 NASBA 반응물의 출발 부피(㎕)		
		2×10^{-3}	2×10^{-4}	2×10^{-5}
50 ng	500 U	+	+	-
50 ng	700 U	+	+	-
50 ng	1000 U	+	-	-
100 ng	500 U	+	+	-
100 ng	700 U	+	+	-
100 ng	1000 U	+	±	-
-	-	+	+	+

본 실시예에서 재증폭은 또한 실시예 1의 경우보다 더 적은 정도이기는 해도 NASBA 증폭 생성물의 뉴클레아제 처리에 의해 억제되었다. 2×10^{-3} 및 2×10^{-4} ㎍의 부피의 재증폭의 억제는 일부 표적 핵산이 존재할 수는 있지만, NASBA 반응에 미치는 뉴클레아제의 음의 효과에 의해 야기된다. 그러나, 65℃의 항온처리는 뉴클레아제 활성을 제거하여 존재하는 핵산을 재증폭시킬 수 있게 한다. 65℃ 항온처리에 의한 재증폭의 방해시에, 50 또는 100 ng의 RNase A 농도와 함께 1000단위의 DNase I 농도가 가장 최상으로 작용하는 것 같다.

실시예 3

NASBA 증폭, 재증폭 및 뉴클레아제 처리는 실시예 1에서 기술한 것과 동일하 였다. 본 실시예에서는, 65℃ 항온처리 유무시의 재증폭을 비교하였다. 그 결과를 표 3에 요약한다.

표 3 : DNase 1 및 RNase A 처리후 65℃ 항온처리 유무시의 NASBA 증폭 생성물의 재증폭

DNase I	RNase A	65℃ 항온처리	재증폭 NASBA에서 최초 NASBA 반응물의 출발 부피(㎕)		
			2×10^{-3}	2×10^{-6}	2×10^{-9}
500 U	50 ng	유	+	-	-
500 U	50n g	무	-	-	-
-	-	유	+	+	+

65℃ 항온처리 유무시의 재증폭을 직접 비교해보면, 비교적 큰 출발 부피(즉, 2×10^{-3} ㎕)는 NASBA 재증폭 반응을 억제하기 충분한 뉴클레아제를 함유하는 것 같다. 65℃의 항온처리는 뉴클레아제 활성을 제거하여 존재하는 핵산의 재증폭을 일으킬 수 있다. 실제로 정상적인 사전 조치가 취해지는 경우, 이주 부피는 NASBA 재증폭 반응의 억제를 피하기에 충분히 낮아야 하며, 그 결과 65℃ 항온처리 단계 또는 기타 임의의 불활성화 단계는 불필요하다. 그러나, 사전 조치로서 재증폭 전에 핵산의 부분적 분해 작용을 하는 화합물의 불활성화 단계를 수행할 수 있다. 이것은 NASB뿐만 아니라 모든 기타 유형의 증폭 반응에 대해서도 유효하다.

실시 예 4

NASBA 증폭, 재증폭 및 뉴클레아제 처리를 실시예 1과 동일하게 실시하였다. 비교적 고부피를 사용할 경우(즉, 2×10^{-3} ㎕), 65℃ 항온처리하지 않은 재증폭의 억제 효과가 출발 부피의 뉴클레아제 활성에 의해 야기되는지 여부를 조사하기 위해 하기 실험을 실시하였다. 500 단위의 DNase I 및 50 ng의 RNase A로 NASBA 증폭물을 뉴클레아제 처리하고, 재증폭시킬 수 없으나 또 다른 표적 RNA 서열에 특이적인 프라이머와 함께 독립된 NASBA 증폭물에 2×10^{-3} ㎕를 첨가하였다. 이때 표적 RNA서열을 표 4에 나타낸 농도로 증폭 반응에 첨가하였다.

표 4 : DNase I/RNase A 처리한 NASBA 반응물 2×10^{-3} ㎕의 첨가후 독립된 RNA 표적 서열의 NASBA 증폭

DNase I/RNase A 처리한 NASBA 반응물의 첨가	65℃ 항온처리	출발 RNA 표적 서열(분자)			
		10^1	10^2	10^3	10^4
없음	유	+	+	+	+
$2 \times 10^{-3}\mu\ell$	유	+	+	+	+
$2 \times 10^{-3}\mu\ell$	무	-	-	-	-

상기 결과는 뉴클레아제 처리한 NASBA 반응물내 비교적 고부피의 억제용 뉴클레아제의 존재를 재삼 입증하고 있다. 뉴클레아제 활성은 5분의 65℃ 항온처리에 의해 제거될 수 있다.

실시예 1 내지 4로부터, 본 발명에 따른 방법에서 뉴클레아제 처리가 1,000 단위의 DNase I 및 50 ng의 RNase A 농도에서 NASBA 증폭 생성물의 재증폭을 방지 하는데 성공적이라고 결론지을 수 있다. 이 방법은 비교적 고부피의 출발물(2×10^{-3} μℓ)에서 재증폭시 억제되며, 샘플내 잔류 뉴클레아제의 존재로 인해 65℃ 항온처리가 없을 경우에는 보다 효과적으로 억제되기는 하지만, 65℃ 항온처리 유무하에 실시하는 재증폭에서 유효하다. 65℃ 항온 처리와 함께 뉴클레아제 처리한 NASBA 증폭 생성물의 재증폭은 2×10^{-4} μℓ 부피 또는 더 작은 부피의 증폭 생성물에서 성공적으로 억제될 수 있다(실시예 2 참조).

실시예 5

실시예 1에 기술한 대로 NASBA 증폭 및 뉴클레아제 처리를 하였다. 뉴클레아제 처리후 또는 뉴클레아제 처리와 동시에 NASBA 증폭 생성물을 검출하여야 한다.NASBA 증폭 생성물의 검출은 서열 특이적이어야 한다. 즉 1 종 이상의 특이 올리고 뉴클레오티드 프로브를 사용해야 한다. 하기 실험을 수행하고, NASBA 증폭후 증폭생성물(1 μℓ)을 45℃에서 30분 동안 1 ×NRG 완충액에서 올리고뉴클레오티드(10^{12} 분자)와 하이브리드화하였다. 하나의 표준 올리고뉴클레오티드, 하나의 2'-0-메틸올리고뉴클레오티드, 두 인접한 표준 올리고뉴클레오티드 및 두 인접한 2-0-메틸 올리오뉴클레오티드를 사용하여 하이브리드화하였다. 하이브리드화 후 RNase A(50 단위 및 DNase I (500 단위) 처리를 하였다(실시예 1 참조). 뉴클레아제 처리한 하이브리드화 샘플들을 에씨듐브로마이드로 염색된 20% 아크릴아미드 겔상에서 분석하였다. 그 결과를 표 5에 요약한다.

표 5 : 올리고뉴클레오티드 하이브리드화 및 DNase I/RNase A 처리후 NASBA 증폭 생성물의 검출

올리고뉴클레오티드 갯수	유형	RNase	DNase I	20% 아크릴 겔상에서의 신호 1올리고+RNA	2올리고+RNA
1	표준	-	-	+	
1	표준	50 ng	500 U	-	
1	2'-O-Me	-	-	+	
1	2'-O-Me	50 ng	500 U	+	
2	표준	-	-		+
2	표준	50 ng	500 U		-
2	2'-O-Me	-	-		+
2	2'-O-Me	50 ng	500 U		+

상기 결과는 2'-0-메틸 올리고뉴클레오티드가 뉴클레아제 처리에 내성이 있으며, 보다 중요하게는 2'-0-메틸 올리고뉴클레오티드와 증폭 NASBA 생성물(RNA) 사이의 하이브리드화 복합체가 뉴클레아제 처리에 내성이 있음을 나타낸다. 두 개의 인접한 2'-0-메틸 올리고뉴클레오티드와 NASBA 증폭 생성물(RNA) 사이의 하이브리드화 복합체는 또한 두 2'-0-메틸 올리고뉴클레오티드들 사이의 '틈(nick)'의 반대쪽 NASBA 증폭 생성물(RNA)의 절단에 대한 내성이 있다. 상기 결과는 뉴클레아제 처리에 내성이 있는 샌드위치 하이브리드화 방식을 개발할 수 있게 한다.

실시 예 6

실시예 1에 기술한 대로 NASBA 증폭 뉴클레아제 처리를 하였다. NASBA 증폭생성물은 자석 비드, 비오티닐화된 포착 프로브 및 HRP-표지한 검출 프로브를 사용 하여 2'-0-메틸 올리고뉴클레오티드와 하이브리드화시켰다. 이 하이브리드화에는 1 단계 및 2 단계 프로토콜을 모두 사용하였다.

1 단계 방법에서는, 5 μℓ의 NASBA증폭 생성물을 55 μℓ 하이브리드화 혼합물(5 × SSPE, 0.1% SDS, 0.1 분유, 10 μg/mℓ의 연어 정액 DNA, 3×10^6 스트렙트아비딘 코팅된 자석 비드, 15 pmol의 비오티닐화된 2'-0-Me 포착 프로브, 1×10^3 분자의 HRP 표지된 2'-0-Me 검출 프로브)에 첨가하고, 45℃에서 30분 동안 항온처리하였다. 비드는 2 × SSC, 0.1% BSA로 2회 세척하고, 1 × NRG 완충액 + 10 mM $MgCl_2$ 에 재현탁시켰다. DNase I 및 RNase A 처리는 실시예 1과 동일하였다. 이어서, 비드를 1 x TBS로 2회 세척하고, 비드상에 보유된 HRP 표지한 2'-0-Me 검출 프로브를 TMB/과산화물 기질(10 μℓ)을 첨가하여 검출하였다. 발색 반응은 50 μℓ의 250 mM 옥살산을 첨가하여

중지시키고, 450 nm에서의 광학 밀도를 판독했다.
2 단계 프로토콜에서는, NASBA 반응 혼합물(65 μℓ)을 2'-0-Me HRP표지한 검출 프로브 없이 동일한 하이브리드화 혼합물(5 μℓ)에 첨가하였다. 45℃에서 30분동안 항온처리한 후, 비드를 2 × SSC, 0.1 BSA로 2회 세척하고, 50 μℓ 하이브리드화 혼합물(5 × SSPE, 0.1% SDS, 0.1% 분유, 10 μℓ/mℓ의 연어 정액 DNA)에 재현탁시키고 1 × 10^{-3} HRP 표지한 2'-0-Me 검출 프로브를 첨가하였다. 45℃에서 30분 동안 항온처리하였다. 이어서, 비드를 2 × SSC, 0.1% BSA로 2회 세척하였다. DNase I 및 RNase A 처리는 실시예 1과 동일하였다. 비드를 2 × TBS로 2회 세척하고, 비드상에 보유된 HRP 표지한 2'-0-Me 검출 프로브를 TMB/과산화물 기질(100 μℓ)을 첨가하 여 검출하였다. 발색 반응은 50 μℓ의 250 mM옥살산을 첨가하여 정지시키고, 450 nM에서 광학 밀도를 판독하였다.
표 6 : 비드상에서의 샌드위치 하이브리드화에서 2'-0-Me 포착 및 검출 올리고뉴클레오티드를 사용한 NASBA 증폭 생성물의 검출

NASBA 생성물	프로토콜	RNase A	DNase I	OD 450
-	1 단계	-	-	0.05
5 μℓ	1 단계	-	-	1.70
5 μℓ	1 단계	50ng	-	1.40
5 μℓ	1 단계	-	500 U	0.80
5 μℓ	1 단계	50ng	500 U	0.70
-	2 단계	-	-	0.05
5 μℓ	2 단계	-	-	1.20
5 μℓ	2 단계	50ng	-	0.80
5 μℓ	2 단계	-	500 U	1.00
5 μℓ	2 단계	50ng	500 U	0.80

결론적으로, RNase A/DNase I 처리는 올리고뉴클레오티드 포착 및 검출을 위해 2'-0-Me를 사용하는 샌드위치 하이브리드화 분석에서 NASBA 증폭 생성물의 검출에 아무런 영향을 끼치지 않는다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
증폭 반응 생성물이 추가 증폭의 표적이 될 수 없으며, 하나 이상의 프라이머 쌍을 이용하는 핵산 증폭 반응의 생성물을 제조하는 방법으로서, 올리고뉴클레오티드에 하이브리드화된 하이브리드화 복합체의 이중 가닥 부분을 분해로부터 보호하기 위해 변형된 올리고뉴클레오티드와 증폭 생성물사이에 하이브리드화 복합체를 형성시키는 조건하에, 프라이머 쌍의 하이브리드화 부위들 사이에 위치한 증폭 생성물의 뉴클레오티드 연장체에 하이브리드화할 수 있는 상기 올리고뉴클레오티드와 상기 증폭 생성물을 접촉시키는 단계, 및 프라이머에 하이브리드화할 수 있는 하이브리드화 복합체의 부분이 분해되는 조건하에, 하이브리드화 복합체를 분해 처리하는 단계를 포함하는 것이 특징인 핵산 증폭 반응의 생성물의 제조 방법.

청구항 2.
제 1 항에 있어서,
상기 올리고뉴클레오티드가 또 다른 뉴클레오티드를 사용하여 연장시킬 수 없는 3' 말단을 포함하는 것이 특징인 핵산 증폭 반응의 생성물의 제조 방법.

청구항 3.
제 1 항에 있어서,
증폭 생성물과 올리고뉴클레오티드 복합체의 이중 가닥 부분이 영향을 받지않는 뉴클레아제를 사용하여 상기 분해를 수행하는 것이 특징인 핵산 증폭반응의 생성물의 제조 방법.

청구항 4.
제 1 항 내지 제 3 항중 어느 하나의 항에 있어서,
상기 올리고뉴클레오티드가 올리고뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드상에 2'-0-메틸 변형의 존재로 인해 뉴클레아제에 의해 분해되지 않는 것이 특징인 핵산 증폭 반응의 생성물의 제조 방법.

청구항 5.
제 1 항 내지 제 3 항중 어느 하나의 항에 있어서,
뉴클레아제들의 혼합물을 사용하여 상기 분해를 수행하는 것이 특징인 핵산증폭 반응의 생성물의 제조 방법.

청구항 6.
제 1 항 내지 제 3 항중 어느 하나의 항에 있어서,

특이 DNase를 사용하여 상기 분해를 수행하는 것이 특징인 핵산 증폭 반응의 생성물의 제조 방법.

청구항 7.

제 1 항 내지 제 3 항중 어느 하나의 항에 있어서,
특이 RNase를 사용하여 상기 분해를 수행하는 것이 특징인 핵산 증폭 반응의 생성물의 제조 방법.

청구항 8.

제 1 항 내지 제 3 항중 어느 하나의 항에 있어서,
DNA 및 RNA를 둘다 동시에 분해할 수 있는 비특이적 뉴클레아제를 사용하여 상기 분해를 수행하는 것이 특징인 핵산 증폭 반응의 생성물의 제조 방법.

청구항 9.

제 1 항 내지 제 3 항중 어느 하나의 항에 있어서,
RNA를 증폭시키므로써 증폭 반응을 수행하는 것이 특징인 핵산 증폭의 생성물의 제조 방법.

청구항 10.

제 1 항 내지 제 3 항중 어느 하나의 항에 있어서,
증폭 반응이 NASBA 증폭 반응인 것이 특징인 핵산 증폭 반응의 생성물의 제조 방법.

청구항 11.

제 1 항 내지 제 3 항중 어느 하나의 항에 있어서,
상기 올리고뉴클레오티드가 검출용 마커를 구비하는 것이 특징인 핵산 증폭반응의 생성물의 제조 방법.

청구항 12.

제 1 항 내지 제 3 항중 어느 하나의 항에 있어서,
분해 반응전에 제2의 올리고뉴클레오티드를 첨가하며, 이 제2의 올리고뉴클레오티드는 증폭 생성물의 뉴클레오티드 연장체와 하이브리드화할 수 있으며, 이때 상기 뉴클레오티드 연장체는 증폭용으로 사용된 두 프라이머의 하이브리드화 부위 사이에 위치하고, 제2 올리고뉴클레오티드는 제1 올리고뉴클레오티드에 하이브리드화하는 증폭 생성물의 연장체의 마지막 뉴클레오티드의 4개 뉴클레오티드 범위내에 존재하며, 조건은 두 을리고뉴클레오티드와 증폭 생성물의 하이브리드화 복합체를 생성시키는 하이브리드화가 일어나도록 하는 조건인 것이 특징인 핵산 증폭 반응의 생성물의 제조 방법.

청구항 13.

제 12 항에 있어서,
상기 올리고뉴클레오티드중 하나를 5' 또는 3' 말단을 통해 고정화하고, 다른 올리고뉴클레오티드에는 5' 또는 3' 말단에 검출용 마커를 구비시킨 것이 특징인 핵산 증폭 반응의 생성물의 제조 방법.

청구항 14.

제 1 항 내지 제 3 항중 어느 하나의 항에 있어서,
상기 올리고뉴클레오티드가 10개 이상의 뉴클레오티드의 길이에 걸쳐 증폭 생성물에 하이브리드화하는 것이 특징인 핵산 증폭 반응의 생성물의 제조 방법.

청구항 15.

a) 핵산을 샘플로부터 분리하는 단계,
b) 검출할 서열에 인접한 두 개의 프라이머를 사용하여 검출할 서열을 포함하는 핵산의 일부를 증폭시키는 단계,
c) 상기 b) 단계에서 생성된 증폭 혼합물 상에서 제 1 항 내지 제 3 항중 어느 하나의 항에 따른 방법을 수행하는 단계, 및
d) 상기 단계 c)에서 생성된 올리고뉴클레오티드-증폭 생성물의 검출용 마커를 검출하는 단계
를 포함하는 샘플중의 특이 핵산 서열의 존재를 진단하는 분석법.

청구항 16.

제 1 항 내지 제 3 항중 어느 하나의 항에 따른 방법 또는 제 16 항의 분석법을 수행하는 키트로서, 구체적으로
1) 목적 서열의 증폭을 위한 하나의 프라이머쌍 또는 다수의 프라이머쌍, 및
2) 두 개의 올리고뉴클레오티드가 존재하는 경우, 그들의 서열이 서로의 4개의 뉴클레오티드의 범위내에서 증폭 서열과 하이브리드화하도록, 그리고 각각의 올리고뉴클레오티드가 10개 이상의 뉴클레오티드의 길이에 걸쳐 증폭생성물과 상보적이 되도록 하는 조건하에서, 프라이머 쌍 사이의 한 위치에서 증폭 서열에 하이브리드화할 수 있는 프라이머쌍당 1 종 또는 2 종의 올리고뉴클레오티드의 세트를 함유하는 키트.

청구항 17.

제 16 항에 있어서 ,
상기 올리고뉴클레오티드가 다수의 뉴클레오티드상에 2'-0-메틸 형태의 변형을 포함하여 증폭 생성물과 올리고뉴클레오티드의 복합체의 하이브리드화된부분이 뉴클레아제에 의해 분해되지 않도록 하는 것이 특징인 키트.

청구항 18.

핵산과 올리고뉴클레오티드 프로브(들)의 복합체를 부분적으로 분해시키는 화합물(들)을 용기내 분리된 격실에 함유하며, 이 때 상기 분리된 격실은 핵산과 올리고뉴클레오티드 프로브(들)의 복합체를 부분적으로 분해시키는 화합물(들)이 분리된 격실의 분해 후 용기의 나머지 부분과 접촉할 수 있도록 분해 가능한 것인, 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 하나의 항에 따른 방법을 수행하는 용기.

청구항 19.

제 18 항에 있어서,

상기 분리된 격실이 핵산과 올리고뉴클레오티드 프로브(들)의 복합체를 부분적으로 분해시키는 화합물(들)의 불활성화 온도 이하에서 그리고 하이브리드화 복합체의 용융 온도 이하에서 분해되는 열분해성 물질을 함유하는 용기.

청구항 20.

제 4 항에 있어서,

상기 변형은 상기 올리고뉴클레오티드를 형성하는 뉴클레오티드 각각에 존재하는 것이 특징인 핵산 증폭 반응의 생성물의 제조 방법.