

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
C12Q 1/68

(11) 공개번호 특2001-0012175  
(43) 공개일자 2001년02월 15일

(21) 출원번호	10-1999-7010124	(87) 국제공개번호	WO 1998/50583
(22) 출원일자	1999년11월02일	(87) 국제공개일자	1998년11월12일
번역문제출일자	1999년11월02일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1998/08853		
(86) 국제출원출원일자	1998년05월01일		
(81) 지정국	EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 핀란드 사이프러스		
	국내특허 : 오스트레일리아 캐나다 일본 대한민국		
(30) 우선권주장	60/045,430 1997년05월02일 미국(US)		
(71) 출원인	젠-프로브 인코포레이티드 다니엘 엘. 캐시앙, 헨리 엘. 노르호프, 피터 알. 쉬어리		
(72) 발명자	미국 캘리포니아주 92121 샌디에고 제네틱 센터 드라이브 10210 바이스부르크, 윌리엄, 지. 미국92128캘리포니아주샌디에고비아메다노스11738 쇼, 제이, 에이치. 미국92127캘리포니아주샌디에고크레션트웨이17844 베커, 마이클, 엠. 미국92131캘리포니아주샌디에고메도우데일레인12819 마즈레씨, 메르대드 미국92127캘리포니아주샌디에고서니필드플레이스15895		
(74) 대리인	주성민, 김영		

**심사청구 : 없음**

**(54) 폴리뉴클레오타이드의 2단계 혼성화 및 포획법**

**요약**

포획 프로브 및 두 상이한, 바람직하게는 단지 온도가 상이한 혼성화 조건을 사용하여 고정된 프로브가 부착된 고체 지지체 상에 시료 중의 표적 폴리뉴클레오타이드를 포획하는 방법이 개시된다. 두 혼성화 조건은 혼성화의 순서를 조절하여, 제1 혼성화 조건은 포획 프로브와 표적 폴리뉴클레오타이드를 혼성화하고, 제2 혼성화 조건은 포획 프로브와 고정된 프로브를 혼성화하여 고정된 포획 프로브, 포획 프로브 및 표적 폴리뉴클레오타이드의 복합체를 형성한다. 표적 폴리뉴클레오타이드를 포획하고, 포획된 표적 폴리뉴클레오타이드를 증폭하고, 증폭된 서열을 검출함으로써 시료 중의 표적 폴리뉴클레오타이드의 존재를 측정하는 방법이 개시된다.

**대표도**

**도4**

**색인어**

2단계 혼성화 방법, 폴리뉴클레오타이드의 포획, 표적 폴리뉴클레오타이드의 분리

**명세서**

**기술분야**

본 발명은 시료에 존재할 수 있는 폴리뉴클레오타이드를 고체 지지체에 포획하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 시료 중의 다른 물질로부터 표적 폴리뉴클레오타이드를 분리하는 데 특히 유용하며, 바람직하게는 시료 중의 표적 폴리뉴클레오타이드의 존재를 검출하는 진단 방법의 일부로 이용된다.

**배경기술**

표적 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 시료 성분으로부터 정제될 수 있고(있거나) 서로 다른 기술을 사용하여 존재 유무를 검출할 수 있는, 시료에 존재하는 폴리뉴클레오타이드이다. 이러한 기술은 대개 감염증 또는 병원성 병의 존재를 나타내는 표적 폴리뉴클레오타이드의 존재를 검출하는 진단 방법의 일부로 수행된다.

표적 폴리뉴클레오타이드에 존재하는 표적 폴리뉴클레오타이드 염기 서열 영역의 존재는 표적 서열에 혼성화하는 핵산 프로브를 사용하는 등의 여러 방법으로 검출할 수 있다. 프로브는 미생물, 바이러스, 사람 유전자, 식물 또는 동물 유전자, 및(또는) 병원성 병의 특징 등의 서로 다른 표적 서열을 검출하도록 고안할 수 있다.

진단 방법에 종종 사용되는 표적 폴리뉴클레오타이드를 정제하는 기술은 표적 폴리뉴클레오타이드를 고체 지지체에 포획하는 것을 포함한다. 고체 지지체는 표적 폴리뉴클레오타이드 정제 방법의 1회 이상의 세척 단계 동안 표적 폴리뉴클레오타이드를 보유한다.

Ranki 등의 미국 특허 제4,486,539호에는 표적 폴리뉴클레오타이드를 포획하고 그의 존재를 검출하는 혼성화 샌드위치 기술이 공개되어 있다. 이 기술은 고체 지지체에 결합된 프로브로 표적 폴리뉴클레오타이드를 포획하고 포획된 표적 폴리뉴클레오타이드와 검출 프로브를 혼성화하는 것을 포함한다. 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼성화되지 않은 검출 프로브는 고체 지지체로부터 쉽게 세척 제거된다. 따라서 남아있는 방사성 동위원소는 처음에 시료에 존재하는 표적 폴리뉴클레오타이드와 결부된 것이다.

Stabinsky의 미국 특허 제4,751,177호에는 표적 폴리뉴클레오타이드와, 고체 지지체에 고정된 폴리뉴클레오타이드 모두에 혼성화하는 매개 폴리뉴클레오타이드를 사용하는 방법이 개시되어 있다. 매개 폴리뉴클레오타이드는 고체 지지체에 표적 폴리뉴클레오타이드를 결합시켜 결합 표적물을 만든다. 표지된 프로브를 결합된 표적물에 혼성화하고 결합되지 않은 표지 프로브를 고체 지지체로부터 세척 제거할 수 있다.

Engelhardt 등의 미국 특허 제4,894,324호 및 동 제5,288,609호에는 표적 폴리뉴클레오타이드를 검출하는 방법이 개시되어 있다. 이 방법은 표적 폴리뉴클레오타이드와 동일한 가닥 또는 반대 가닥에 상보적인 2개의 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 단편을 사용하여 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 두가닥 혼성화물을 형성한다. 한 실시 형태에 따르면 두가닥 혼성화물은 지지체에 포획될 수 있다.

Cape 등의 유럽 특허 공개 공보 제0 370 694호에는 고체상 포획 수단을 사용한 핵산의 검출 방법 및 검출 키트가 개시되어 있다. 이 방법에서는 프라이머 및 프라이머 연장 생성물을 고정화하는 특정 결합 파트너로 표지된 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용한다. 표지물은 고체 지지체에 결합된 그의 수용체와 특이적으로 복합체를 형성한다.

## 발명의 요약

본 발명의 한 측면에 따르면 표적 폴리뉴클레오타이드, 포획 프로브, 및 고정된 프로브를 포함하는 혼합물을 포획 프로브와 표적 폴리뉴클레오타이드로 구성된 포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드의 혼성화 복합체의 형성은 유리하게 하지만 고정된 프로브와 포획 프로브로 구성된 고정된 프로브:포획 프로브의 혼성화 복합체의 형성은 불리하게 하는 제1 혼성화 조건에서 반응시키고; 이어서 고정된 프로브:포획 프로브의 혼성화 복합체의 형성을 유리하게 함으로써 고정된 프로브, 포획 프로브 및 표적 폴리뉴클레오타이드로 구성된 고정된 프로브:포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드의 혼성화 복합체에서 표적 폴리뉴클레오타이드를 포획하는 단계를 포함하는, 시료에 존재하는 표적 폴리뉴클레오타이드의 포획 방법을 개시한다. 한 실시 형태에 따르면 제1 반응 단계는 포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드의 혼성화 복합체의  $T_m$  이하 및 고정된 프로브:포획 프로브의 혼성화 복합체의  $T_m$  이상의 온도를 사용하고, 제2 반응 단계에서는 고정된 프로브:포획 프로브의 혼성화 복합체의  $T_m$  이하의 온도를 사용한다. 바람직하게는 제2 반응 단계는 제1 혼성화 조건의 온도를 약  $10^\circ\text{C}$  이상, 또는 약  $20^\circ\text{C}$  이상 감소시킴으로써 성취된다. 한 실시 형태에 따르면 제1 반응 단계에서는 약  $60^\circ\text{C}$ 의 온도를 사용하며, 제2 반응 단계에서는 약  $40^\circ\text{C}$  이하의 온도를 사용한다. 이 방법은 또한 고정화된 프로브:포획 프로브:표적 혼성화 복합체를 정제하는 단계도 포함한다. 본 방법의 다른 실시 형태는 표지된 프로브를 표적 폴리뉴클레오타이드와 혼성화하고 표지된 프로브를 검출함으로써 고정된 프로브:포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드 혼성화 복합체 중 표적 폴리뉴클레오타이드를 검출하는 단계를 포함한다. 본 방법은 또한 표적 폴리뉴클레오타이드를 증폭시켜 증폭된 핵산을 바람직하게는 전사와 결부된 증폭법으로 생성하는 단계도 포함할 수 있다. 증폭 단계가 포함될 경우 본 방법은 바람직하게는 표적 폴리뉴클레오타이드에 상보적인 증폭된 핵산과 표지된 프로브를 혼성화하여 표지된 프로브를 검출하는 단계를 포함하는 증폭 핵산의 검출 단계도 포함할 수 있다. 본 방법은 또한 검출 단계에서 혼성화되지 않은 표지된 프로브를 제거하는 단계도 포함할 수 있다. 바람직한 실시 형태에 있어서, 반응 단계 모두는 길이가 5개 이상의 뉴클레오타이드 염기인 인지 기의 포획 프로브-결합 영역을 포함하는 고정된 프로브, 및 길이가 5개 이상의 뉴클레오타이드 염기인 인지의 고정된 프로브-결합 영역을 포함하는 포획 프로브를 사용하는 것을 포함하되, 단, 포획 프로브-결합 영역은 고정된 프로브-결합 영역에 상보적이다. 바람직하게는 포획 프로브 결합 영역은 (a) 하나 이상의 당-포스포디에스테르 결합, 또는 하나 이상의 펩티드 핵산기, 하나 이상의 포스포로티오에이트 결합, 또는 이들이 배합된 결합을 포함하는 제1 골격, 및 (b) 제1 골격에 결합된 10개 이상의 뉴클레오타이드 염기 인지 기 (여기서, 각 뉴클레오타이드 인지 기는 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민, 우라실 또는 이노신과 수소 결합할 수 있는 기임)를 포함하며; 고정된 프로브 결합 영역은 (a) 하나 이상의 당-포스포디에스테르 결합, 또는 하나 이상의 펩티드 핵산기, 하나 이상의 포스포로티오에이트 결합, 또는 이들이 조합된 결합을 포함하는 제2 골격, 및 (b) 제2 골격에 결합되어 있으며, 제1 골격에 결합된 뉴클레오타이드 염기 인지 기에 수소결합할 수 있는 10개 이상의 뉴클레오타이드 염기 인지 기를 포함한다. 본 방법의 한 실시 형태에 따르면 포획 프로브 결합 영역은 10개 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 동종중합체로 이루어지며, 고정된 프로브 결합 영역은 25개 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 동종중합체로 이루어지는데, 이 중 10개 이상의 뉴클레오타이드는 포획 프로브 결합 영역의 10개의 뉴클레오타이드에 상보적이다. 바람직하게는 포획 프로브 결합 영역은 약 14개의 결합성 A 또는 T 염기를 포함하며, 고정된 프로브 결합 영역은 여기에 상보적인 약 30개의 염기 서열을 포함한다. 바람직한 실시 형태에 따르면 반응 단계는 고정된 프로브와 포획 프로브의 혼합물을 사용하는데, 여기서, 각각의 프로브는 데옥시뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 2'-메톡시 치환 뉴클레오타이드, 2'-할로 치환 뉴클

레오티드 성분, 또는 이들의 배합물을 포함한다.

본 발명의 다른 측면은 시료 중의 표적 뉴클레오타이드의 존재를 측정하는 방법이다. 이 방법은 시료에 존재하는 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼성화할 수 있는 포획 프로브를 제공하는 단계; 포획 프로브와 표적 폴리뉴클레오타이드의 혼성화를 유리하게 하는 제1 반응 온도에서 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함하고 있으리라 생각되는 시료와 포획 프로브를 혼합시켜 포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드 복합체를 생성하는 단계; 포획 프로브에 혼성화할 수 있는 고정된 프로브를 제공하는 단계; 고정된 프로브와 포획 프로브의 혼성화를 유리하게 하는 제2 반응 온도에서 포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드 복합체 및 고정된 프로브를 반응시킴으로써 고정된 프로브:포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드 복합체로 이루어진 포획된 표적 폴리뉴클레오타이드를 생성하는 단계; 포획된 표적 폴리뉴클레오타이드를 정제함으로써 정제된 표적 폴리뉴클레오타이드를 생성하는 단계; 정제된 표적 폴리뉴클레오타이드를 증폭시킴으로써 증폭된 핵산을 생성하는 단계; 및 증폭된 핵산을 검출하여 샘플 중의 표적 폴리뉴클레오타이드의 존재를 측정하는 단계를 포함한다.

### 도면의 간단한 설명

도 1a 및 b는 고체 지지체 (10)에 부착된 "(a)"로 표시된 고정된 프로브, 및 "(b)"로 표시된 포획 프로브를 사용하여 "(c)"로 표시된 표적 폴리뉴클레오타이드를 포획하는 두가지 상이한 혼성화 조건의 사용을 개략적으로 예시한다. 도 1a에서 제1 혼성화 조건은 포획 프로브 (b)와 표적 폴리뉴클레오타이드 (c)를 혼성화하여 포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드 복합체 (15)를 형성하게 하지만, 포획 프로브 (b)와 고정된 프로브 (a)는 혼성화되지 않게 한다. 도 1b에서, 제2 혼성화 조건은 포획 프로브 (b)와 고정된 프로브 (a)를 혼성화하여 고정된 프로브:포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드 복합체 (20)를 형성하게 한다.

도 2는 전사 결부 증폭법 (단계 (B) 내지 (F))을 사용하여 포획된 표적 폴리뉴클레오타이드를 증폭시키는 것을 포함하는 방법의 단계 A 내지 F를 예시한다. 도 2에서는 단계 (A), 고체 지지체 (10)에 부착된 고정된 프로브 (a), 포획 프로브 (b), 및 표적 폴리뉴클레오타이드 서열 (c)가 도 1과 마찬가지로 표시되어 있다. RNA 폴리머라제에 의해 인지되는 프로모터 서열을 "P"로 표시하였으며, "(-)"는 핵산의 5' 말단을 나타내며 "(+)"는 상보성 핵산의 3' 말단을 나타내고 점선 "(---)"은 핵산 중합을 나타낸다.

도 3a, 3b 및 3c는 도 1에서와 마찬가지로 표시된, 고체 지지체 (10)에 부착된 고정된 프로브 (a), 포획 프로브 (b), 및 "(d)"로 나타낸 표지된 프로브를 사용하여 표적 폴리뉴클레오타이드 (c)의 존재를 검출하는 두 가지 상이한 혼성화 조건의 사용을 예시한다. 도 3a에서 제1 혼성화 조건은 포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드:표지된 프로브 복합체 (30)의 형성을 가능하게 한다. 도 3b에서, 제2 혼성화 조건은 고정된 프로브:포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드:표지된 프로브의 복합체 (40)의 형성을 가능하게 하는데, 결합되지 않은 표지된 프로브 (50)는 남겨둔다. 도 3c에서, 결합되지 않은 표지된 프로브는 세척 제거하고 정제된 고정 프로브:포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드:표지된 프로브의 복합체 (40)는 남겨졌다.

도 4는 T<sub>14</sub> 서열로 이루어진 고정된 프로브가 부착된 고체 지지체 (10)의 예를 예시하며; 상부 프로브 (우측의 "(a)" 부근)는 T<sub>14</sub> 고정 프로브가 상보성 A<sub>14</sub> 서열을 포함하는 포획 프로브 (3'

A<sub>14</sub>TTTGTGACGTAACTTGATTATCAAG 5' (서열 번호: 1))에 혼성화하는 (염기들 사이에 ":"로 나타냄) 고정된 프로브:포획 프로브에 존재하고; 중간 프로브 (우측의 "(b)" 부근)는 더 큰 서열 (말단 "NNNNNN" 서열로 나타냄) 내에서 표적 서열 (5' CAGTCATTGGAAGTAAGTAGTTC 3' (서열 번호: 2))에 혼성화하는 포획 프로브에 혼성화된 고정된 프로브를 포함하는 고정된 프로브:포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드 복합체에 존재하고; 하부 프로브 (우측의 "(c)" 부근)는 혼성화되지 않는 고정된 T<sub>14</sub> 프로브이다.

### 발명의 상세한 설명

본 발명은 포획 프로브와 두 가지 상이한 혼성화 조건을 사용하여 고체 지지체에 표적 폴리뉴클레오타이드를 포획하는 방법을 특징으로 한다. 상이한 혼성화 조건을 사용하여 포획 프로브와 고정된 프로브와 혼합된 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 시료의 혼성화 정도를 조절한다. "혼성화 조건"은 하나의 단일가닥 핵산이 두번째의 단일가닥 핵산에 수소결합하여 혼성화 복합체 (본원 명세서에서는 때로 "복합체"로 언급됨)를 생성하는 반응에서 사용되는 누적 환경을 의미한다. 누적 환경은 예를 들어 단일 가닥 핵산을 포함하는 수용액 또는 유기 용액의 농도 및 성분 (예를 들어 염, 킬레이트제 및 비경쟁적 억제 핵산) 및 반응 혼합물의 온도를 포함한다. 누적 환경에 기여할 수 있는 다른 요소로는 예를 들어 수소 결합이 일어나게 하는 시간량, 반응물을 보유하는 챔버의 물리적 기하학, 및 혼성화 동안 혼합 또는 교반의 사용이 있다. 이러한 모든 환경 조건은 당 업계에 잘 알려져 있다 (예를 들어 Sambrook 등의 문헌 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 제2판 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 미국 콜드 스프링 하버 소재, 1989) 참조]. 본 발명에 있어서, 제1 혼성화 조건은 표적 폴리뉴클레오타이드에 포획 프로브가 혼성화하는 것을 촉진하는 반면 포획 프로브와 고정된 프로브의 혼성화는 본질적으로 배제하며, 반면 제2 혼성화 조건은 포획 프로브와 고정된 프로브의 혼성화를 촉진한다.

고정된 프로브는 고정된 지지체에 포획 프로브를 결합시키는 수단을 제공한다. 고정된 프로브는 결합된 표적 폴리뉴클레오타이드를 결합되지 않은 물질로부터 분리하는 것을 촉진하는 고체 지지체에 결합된 염기 서열 인지 분자이다. 임의의 공지된 지지체, 예를 들어 매트릭스 및 무입자 용액이 사용될 수 있다. 예를 들어 고체 지지체는 니트로셀룰로스, 나일론, 유리, 폴리아크릴레이트, 혼합된 중합체, 폴리스티렌, 실란 폴리프로필렌, 및 바람직하게는 자성 입자일 수 있다. 특히 바람직한 지지체는 단일분산성 (즉 크기 면에서 약 5%로 균일함)이어서 일관된 결과를 나타내는, 자동화된 분석법에 사용하기에 특히 유리한 자성 구이다.

고정되는 프로브는 본 발명에 사용되는 제1 및 제2 혼성화 조건 동안 안정한 결합 또는 상호작용에 의해 고체 지지체에 직접 또는 간접적으로 결합되어 있다. 직접 결합은 고정되는 프로브 분자가 개재 기 없이 고체 지지체에 결합될 경우 일어난다. 예를 들어 직접 결합은 공유 결합, 킬레이팅, 또는 이온 상호작용을 통한 것일 수 있다. 간접 결합은 고정되는 프로브가 하나 이상의 링커에 의해 고체 지지체에 결합되는 경우 일어난다. "링커"는 둘 이상의 상이한 분자를 안정한 복합체로 결합시키는 수단이며 결합 파트

너 세트의 하나 이상의 성분을 포함한다.

결합 파트너 세트의 구성원은 서로를 인지하여 서로에게 결합할 수 있다. 결합 파트너 세트는 예를 들어 수용체와 리간드, 효소와 기질, 효소와 보조인자, 효소와 조효소, 항체와 항원, 당과 렉틴, 바이오틴과 스트렙타비딘, 리간드와 칼레이트제, 니켈과 히스티딘, 실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드 염기 인지 분자, 및 상보성 동중합체 핵산 또는 중합체 핵산의 동중합체 부분일 수 있다. 결합 파트너 세트의 성분은 결합에 참여하는 구성원의 영역이다.

본 발명의 방법에는 많은 상이한 실시 형태가 있다. 한 실시 형태에 따르면 링커는 고체 지지체에 직접 결합되며, 결합쌍 세트의 성분을 통하여 고정된 프로브에 결합된다. 다른 실시 형태에 따르면 하나 이상의 링커가 존재하는데, 제1 링커는 고체 지지체에 직접 결합하며 하나 이상의 제2 링커는 결합쌍 세트의 성분을 통하여 고정된 프로브에 결합한다. 추가의 링커를 사용하여 제1 및 제2 링커를 결합시킬 수 있다.

"염기 서열 인지 분자"는 골격에 의해 함께 결합된 뉴클레오타이드 염기 인지 기를 포함하는 중합체이다. 뉴클레오타이드 염기 인지 기는 상보성 분자와 혼성화하는 서열 정보를 제공한다. 개개의 뉴클레오타이드 염기 인지 기는 아데닌 (A), 구아닌 (G), 시토신 (C), 티민 (T), 우라실 (U) 또는 그의 유도체에 수소결합할 수 있다. 염기 서열 인지 분자의 골격은 특히 핵산의 염기에 혼성화하는 동안 수소 결합에 적합한 배향 및 간격을 갖는 뉴클레오타이드 염기 인지 기를 제공한다. 염기 서열 인지 분자는 예를 들어 RNA, DNA, 펩티드, 핵산 또는 그의 유도체일 수 있다.

포획 프로브는 표적 폴리뉴클레오타이드와 고정된 프로브를 안정하게 결합시키는 수단을 제공한다. 포획 프로브는 하나 이상의 염기 서열 인지 부분인 표적 폴리뉴클레오타이드 결합 영역 및 고정된 프로브 결합 영역을 포함한다. 이 두 결합 영역은 하나 이상의 염기 서열 인지 분자에 존재할 수 있으나, 바람직하게는 2개의 결합 영역을 포함하는 단일 염기 서열 인지 분자에 포함된다. 다른 실시 형태에 따르면, 포획 프로브는 표적 폴리뉴클레오타이드 결합 영역 및 고정된 프로브 결합 영역을 포함한다. 이들 두 결합 영역은 하나 이상의 염기 서열 인지 분자에 존재할 수 있지만 바람직하게는 2개의 결합 영역을 포함하는 단일 염기 서열 인지 분자에 포함된다. 다른 실시 형태에 따르면 포획 프로브는 하나 이상의 링커에 의해 함께 결합된 2개의 상이한 염기 서열 인지 분자에 존재하는 표적 폴리뉴클레오타이드 결합 영역 및 고정된 프로브 결합 영역을 포함한다. 예를 들어 고정된 프로브 결합 영역은 제1 염기 서열 인지 분자에 존재할 수 있으며, 표적 폴리뉴클레오타이드 결합 영역은 제2 염기 서열 인지 분자에 존재할 수 있고, 2개의 상이한 분자는 제1 및 제2 염기 서열 인지 분자에 혼성화하는 염기 서열 인지 분자인 링커에 의해 결합된다.

본 발명은 시료에 존재하는 표적 폴리뉴클레오타이드를 포획하는 방법을 포함한다. 먼저, 시료, 포획 프로브, 및 고정된 프로브를 포함하는 혼합물을 구성된 제1 혼성화 조건에서 반응시켜 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼성화된 포획 프로브로 구성된 포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드의 복합체를 형성한다. 제1 혼성화 조건은 포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드 복합체의  $T_m$  이하의 온도 및 고정된 프로브:포획 프로브 혼성체의  $T_m$  이상의 온도를 사용한다. 바람직하게는 제1 혼성화 조건에서는 50% 미만의 포획 프로브가 고정된 프로브:포획 프로브의 복합체에 존재한다. 더 바람직하게는 제1 혼성화 조건에서 25% 미만, 훨씬 바람직하게는 10% 미만, 가장 바람직하게는 1% 미만의 포획 프로브가 고정된 프로브:포획 프로브 복합체에 존재한다.

이어서 제2 혼성화 조건을 사용하여 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼성화하는 포획 프로브에 혼성화된 고정된 프로브로 구성된 고정된 프로브:포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드의 복합체를 형성한다. 제2 혼성화 조건의 온도는 고정된 프로브:포획 프로브 혼성화 복합체의  $T_m$  이하이며 따라서 고정된 프로브:포획 프로브 복합체를 형성시킬 수 있다. 바람직하게는 고정된 프로브는 포획 프로브와 비교하여 과량으로 존재한다.

" $T_m$ "은 두 염기 서열 인지 분자 사이에 형성된 혼성화 복합체의 50%가 변성되는 용융 온도를 의미한다.  $T_m$  이하의 온도에서는 혼성화 복합체 형성이 유리한 반면  $T_m$  이상의 온도에서는 복합체 형성이 유리하지 않다.

포획 프로브 또는 고정된 프로브를 포함하는 혼성화 복합체의  $T_m$ 과 관련하여 하나 이상의 존재할 수 있는 링커와의 혼성화를 통하여 형성된 복합체가 포함된다. 링커가 존재할 경우 혼성화 복합체의  $T_m$ 은 당 업계의 숙련자에 의해 용이하게 계산될 수 있는 바와 같이 복합체의 전체 안정성을 반영한다. 예를 들어 세 올리고뉴클레오타이드로 구성된 포획 프로브에서 제2 올리고뉴클레오타이드에 혼성화하는 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1  $T_m$ , 및 제3 올리고뉴클레오타이드에 혼성화하는 제2 올리고뉴클레오타이드의 제2  $T_m$ 이 있다. 더 낮은 이러한 제1 및 제2  $T_m$ 은 포획 프로브의 안정성, 및 포획 프로브를 구성하는 세 올리고뉴클레오타이드가 특정 혼성화 조건 하에서 혼성화된 채 남아있을지를 결정한다.

본원 명세서에 기재된 다른 복합체와 마찬가지로 포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드의 혼성화 복합체는 명시된 성분 외에 추가의 기를 포함할 수 있다. 이러한 추가의 기로는 예를 들어 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼성화하는 표지된 프로브 또는 표적 폴리뉴클레오타이드의 증폭에 유용하며 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼성화하는 올리고뉴클레오타이드가 있다. 본 발명의 기능에 영향을 미치지 않는 추가의 기도 존재할 수 있다.

표지된 프로브는 검출가능한 기를 포함하는 염기 서열 인지 분자이다. 검출가능한 기는 예를 들어 형광성 잔기, 화학발광성 잔기, 방사성 동위원소, 바이오틴, 아비딘, 효소 또는 효소 기질, 또는 반응성 기일 수 있다.

본 발명의 방법은 정제하는 단계를 더 포함할 수 있다. "정제하는"은 정제 이전에 시료를 구성하는 하나 이상의 성분을 시료의 하나 이상의 다른 성분으로부터 제거하는 것을 의미한다. 시료 성분은 핵산을 포함하며 단백질, 탄수화물, 지질 및 표지된 프로브 등의 물질도 포함할 수 있다. 바람직하게는 정제 단계에서는 시료에 존재하는 비표적 핵산의 약 70% 이상, 더 바람직하게는 약 90% 이상, 훨씬 바람직하게는

약 95% 이상이 제거된다.

본 발명의 방법은 또한 포획 후 (본원 명세서에서 "포획 표적물"로 나타냄) 정제된 표적 폴리뉴클레오타이드를 증폭시켜 증폭된 핵산을 생성하는 것도 포함할 수 있다. 표적 핵산을 증폭시키는 데에는 전체 표적 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 단편, 또는 전체 표적 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 단편과 상보적인 핵산의 다수의 카피를 생성하기 위하여 핵산 폴리머라제를 사용한다. 당 업계에 잘 알려진 적절한 증폭 기술은 예를 들어 전사 결부 증폭법, 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR), 레플리카제 (replicase) 매개 증폭법, 및 리가제 연쇄 반응 (LCR)을 포함한다.

"그의 단편"의 증폭은 완전한 표적 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 상보체 (complement)보다 작은 것을 포함하는 증폭된 핵산의 생성을 나타낸다. 이러한 단편은 표적 폴리뉴클레오타이드의 부분을 예를 들어 표적 폴리뉴클레오타이드의 내부 위치에 혼성화하고 이 위치로부터 중합화를 개시하는 증폭 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 증폭시킴으로써 생성할 수 있다. 바람직하게는 증폭된 단편은 검출가능한 표적 서열을 포함한다. 증폭된 핵산의 존재는 예를 들어 증폭된 핵산에 표지된 프로브를 혼성화하는 등의 잘 알려진 상이한 기술을 사용하여 검출할 수 있다. 당 업계에 잘 알려진 기타 핵산 검출 방법으로는 예를 들어 겔 여과법, 겔 전기영동법, 및 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)가 있다.

표지된 프로브를 사용하여 정제된 포획 표적물의 존재를 검출할 수 있다. 바람직하게는 정제 단계를 사용하여 포획된 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼성화하는 결합된 표지 프로브로부터 결합되지 않은 표지된 프로브를 제거한다. 정제 단계는 포획된 표적 폴리뉴클레오타이드를 정제하는 것과 동시에 사용될 수 있다. 별법으로, 표지된 프로브를 정제된 포획 표적 폴리뉴클레오타이드에 첨가하고 결합되지 않은 표지된 프로브를 후속의 정제 단계에서 제거할 수 있다.

시료 성분 또는 혼성화 반응 성분 (예를 들어 결합되지 않은 표지된 프로브)과 관련된 "제거"는 원하지 않는 성분의 70% 이상이 보유된 성분으로부터 분리됨을 의미한다. 더 바람직하게는 원하지 않는 성분의 90% 이상, 훨씬 바람직하게는 95% 이상이 제거된다. 성분들은 예를 들어 세척 방법을 사용하는 등의 표준 방법을 사용하여 제거할 수 있다.

포획된 표적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 포획 프로브 또는 별도의 검출 프로브에 위치할 수 있는 검출가능한 균일성 표지물을 사용하여 검출할 수 있다. "검출가능한 균일성 표지물"은 표지물이 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼성화되는 분자상에 존재하는지의 여부에 기초하여 그의 존재가 균일한 방식으로 검출될 수 있는 표지물을 나타낸다. 따라서 검출가능한 균일성 표지물은 혼성화되지 않은 표지물 형태로부터 혼성화된 표지물 형태를 물리적으로 옮기지 않고 검출할 수 있다. 검출가능한 균일성 표지물은 예를 들어 Arnold 등의 미국 특허 제5,283,174호; Woodhead 등의 미국 특허 제5,656,207호; 및 Nelson 등의 미국 특허 제5,658,737호 등의 예에서 이전에 기술되어 있다.

고정된 프로브는 포획된 프로브의 하나 이상의 반복적인 염기 서열에 상보적인 하나 이상의 반복적인 염기 서열을 포함할 수 있다. 이들 반복적인 상보성 서열은 바람직하게는 결합 영역 (즉, 고정된 프로브의 포획 프로브 결합 영역, 및 포획 프로브의 고정된 프로브 결합 영역)으로 작용하는, 길이가 5개 이상의 염기인 서열이다. 고정된 프로브 및 포획 프로브의 반복적인 상보성 서열은 두 프로브간의 혼성화를 촉진한다.

"반복적인" 서열은 규칙적으로 반복하는 염기 서열의 서열, 예를 들어 폴리-아데닌 ( $A_n$ ), 폴리-티민 ( $T_n$ ), 폴리-시토신 ( $C_n$ ), 및 폴리-구아닌 ( $G_n$ )의 핵산 동중중합체에 의해 형성된 것을 나타낸다. 반복적인 서열은 또한 혼합된 핵산 중합체, 예를 들어 AT 반복체 ( $[AT]_n$ )도 포함한다.

바람직하게는 포획 프로브의 반복적인 염기 서열은 고정된 프로브의 반복적인 상보성 염기 서열보다 길다. 두 프로브의 반복적인 상보성 서열의 길이는 고정된 프로브:포획 프로브의 복합체의  $T_m$ 을 결정한다. 포획 프로브의 반복적인 염기 서열이 길면 고정된 프로브의 반복적인 염기 서열에 결합되는 것이 촉진되는데, 이는 추가의 길이가 표적 폴리뉴클레오타이드의 2차 구조 사이의 거리를 제공하기 때문이며, 이러한 거리가 제공되지 않을 경우 고정된 프로브에 혼성화하는 것이 방해받게 된다. 바람직하게는 고정된 프로브의 반복적인 염기 서열의 길이는 약 10개 이상의 염기, 훨씬 바람직하게는 약 14개의 염기이며, 상보성 포획 프로브의 반복적인 염기 서열의 길이는 약 10개 이상의 염기, 더 바람직하게는 약 14개 이상의 염기, 훨씬 바람직하게는 약 25개 이상의 염기, 가장 바람직하게는 약 30개의 염기이다.

본 발명의 방법을 사용하여 표적 폴리뉴클레오타이드가 시료에 존재하는지의 여부를 측정한다. 본 방법은 2회의 혼성화 단계, 정제 단계, 선택적인 증폭 단계 및 검출 단계를 포함하는 표적물 포획 단계를 포함한다. 표적 폴리뉴클레오타이드가 존재할 경우, 제1 혼성화에서 표적 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드의 복합체가 생성되며, 제2 혼성화 단계에서 고정된 프로브가 포획 프로브와 혼성화된다. 따라서 표적 폴리뉴클레오타이드가 존재할 경우 표적 폴리뉴클레오타이드의 포획 단계에 의해 고정된 프로브, 포획 프로브 및 표적 폴리뉴클레오타이드로 이루어진 고정된 프로브:포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드의 복합체가 형성된다. 표적 폴리뉴클레오타이드가 존재하지 않을 경우 이 고정된 프로브:포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드의 복합체는 형성되지 않으며, 단지 제2 혼성화의 고정된 프로브:포획 프로브의 복합체만이 형성된다. 표적 폴리뉴클레오타이드 포획 단계 동안 형성된 복합체를 정제하여 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 시료의 경우 정제된 표적 폴리뉴클레오타이드를 생성시킨다.

정제된 표적 폴리뉴클레오타이드를 증폭하고, 이어서 검출하거나, 정제된 표적 폴리뉴클레오타이드를 증폭 단계 없이 검출할 수 있다. 바람직하게는 정제된 포획 표적 폴리뉴클레오타이드 또는 증폭된 핵산의 존재를 표지된 프로브를 사용하여 검출한다. 더 바람직하게는 표지된 프로브는 표적 폴리뉴클레오타이드와 혼성화하여  $T_m$ 이 제1 혼성화 조건의 온도 이상인 표지된 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드의 복합체를 형성한다. 이 복합체에서 표지된 프로브가 검출되면 시료에 표적 폴리뉴클레오타이드가 존재함을 나타낸다.

선택적인 증폭 단계가 본 방법에 포함될 경우, 정제된 표적 폴리뉴클레오타이드를 증폭시켜 증폭된 핵산을 생성시키며, 이어서 상기 표지된 프로브를 사용하거나 또는 핵산을 검출하는 다양한 공지된 기술 (예를 들어 형광성 혼입 제제를 사용한 시각화)을 사용하여 이것을 검출한다. 증폭된 핵산이 검출된다는 것은

표적 폴리뉴클레오티드가 시료에 처음부터 존재하였음을 나타낸다.

포획 프로브를 표적 폴리뉴클레오티드에 혼성화하는 동안, 자유 포획 프로브의 농도를 최대화하고 당 업계의 숙련자에게 공지된 유리한 액체상 혼성화 동력학을 이용하기 위하여 포획 프로브는 고체 지지체에 결합되기 보다는 용액 중에 있는 것이 유용하다. 즉, 용액상 혼성화는 일반적으로 동일한 상보성 결합 서열을 사용하는 고체상 혼성화보다 100배 더 빨리 일어난다. 또한 시약 첨가 및 분리 횟수와, 화학적 복잡성의 수를 최소화하기 위하여 포획 프로브를 표적 폴리뉴클레오티드에 혼성화하기 전에 고정된 프로브를 첨가하는 것이 바람직하다. 본 발명의 이러한 측면은 특히 자동화된 분석법에 중요하다.

포획 프로브 및 상이한 두가지 혼성화 조건을 이용하여 고체 지지체 상에 표적 폴리뉴클레오티드를 포획하는 본 발명의 방법에서, 고정된 프로브, 포획 프로브, 및 표적 핵산을 보유하는 고체 지지체는 두가지 혼성화 조건 동안 존재할 수 있다. 포획된 표적 핵산은 포획된 표적물이 보유되는 조건을 사용하여 존재하는 다른 물질로부터 세척 제거함으로써 다른 물질로부터 정제될 수 있다. 이어서 정제된 표적 폴리뉴클레오티드는 적절한 조건을 사용하여, 예를 들어 포획 프로브:고정된 프로브의 복합체의  $T_m$  이상의 온도에서 반응시킴으로써 고체 지지체로부터 용출시킬 수 있다.

이 방법은 표적 폴리뉴클레오티드를 증폭시켜 용액에서 자유로운 상태인 더 많은 양의 증폭된 핵산을 생성시키는 진단 분석법의 일부로 특히 유용하다. 용액 중 증폭된 핵산은 핵산 혼성화법과 같은 잘 알려진 기술을 사용하여 검출할 수 있다.

본 발명의 방법을 사용하는 자동화된 진단 분석법은 예를 들어 (1) 표적 폴리뉴클레오티드에 특이적인 포획 프로브 및 고체 지지체에 결합되어 있는 고정된 프로브를 포함하는 용기에 표적 폴리뉴클레오티드를 보유하리라 여겨지는 시료를 첨가하고; (2) 제1 혼성화 조건에서 반응시키고 이어서 온도를 제2 혼성화 조건의 온도로 감소시킴으로써 2단계 혼성화를 수행하여 표적 폴리뉴클레오티드를 고체 지지체에 포획하며; (3) 고체 지지체에 결합되지 않은 시료 성분을 예를 들어 세척 단계를 사용함으로써 제거하고; (4) 표적 폴리뉴클레오티드의 전부 또는 일부의 핵산 증폭에 사용되는 올리고뉴클레오티드, 증폭을 수행하는 데 적절한 용액 성분, 및 증폭된 핵산에 혼성화하고 검출가능한 균일한 표지물을 포함하는 프로브를 포함하는 용액을 고체 지지체에 첨가하고; (5) 증폭된 핵산을 생성하고; (6) 증폭된 핵산을 예를 들어 증폭된 핵산에 혼성화하는 표지물로부터의 시그널을 생성시키기 위하여 시료를 처리함으로써 검출함으로써 수행할 수 있다. 시그널이 검출된다는 것은 시료에 표적 폴리뉴클레오티드가 존재한다는 것을 나타낸다. 상기 방법의 다른 변형법이 본원 명세서에 개시된 것을 기초로 하여 수행될 수 있다.

도 1 내지 3은 표적 폴리뉴클레오티드를 포획하고, 폴리뉴클레오티드 표적물을 선택적으로 증폭시키며, 폴리뉴클레오티드 표적물의 존재를 검출하는 본 발명의 용도를 개략적으로 나타낸다. 도 1 내지 3이 바람직한 실시 형태를 나타내지만, 당 업계의 숙련자는 본원 명세서에 제공된 상세한 설명에 기초하여 다른 변형법 또는 그에 상응하는 방법을 사용하여 본 발명을 실시할 수 있음을 알 것이다. 도 4는 동종중합체인 고정된 프로브를 통하여 고체 지지체에 부착될 수 있는 복합체의 형태의 예를 나타낸다.

도 1a 및 1b는 표적 폴리뉴클레오티드의 포획을 예시한다. 분석 초기에 고정된 프로브 (a)는 고체 지지체 입자 (10)에 결합되어 있고, 포획 프로브 (b) 및 표적 폴리뉴클레오티드 (c)는 용액 중에서 자유로운 상태이다. 도 1a를 언급하자면, 제1 혼성화 조건에서 포획 프로브:표적 폴리뉴클레오티드의 복합체 (15)는 용액 중에서 형성되지만 포획 프로브 (b)는 실질적으로 고정된 프로브 (a)에 결합되어 있지 않다. 제2 혼성화 조건에서 반응시키는 반응을 도 1b에 나타내었다. 제2 혼성화 조건에서 포획 프로브 (b)는 고정된 프로브 (a)에 혼성화함으로써 고정된 프로브:포획 프로브:표적 핵산의 복합체 (20)에서 표적 폴리뉴클레오티드 (c)를 포획한다. 바람직하게는 제2 혼성화 조건은 제1 혼성화 조건의 온도를 감소시킴으로써 동일한 용액에서 일어난다. 고정된 프로브를 통하여 고체 지지체에 부착될 수 있는 복합체의 구체예는 도 4에 예시되어 있다.

도 2는 전사와 결부된 증폭법을 사용하여 표적 폴리뉴클레오티드 서열 (c)를 증폭시키는 것을 더 포함하는 한 실시 형태를 예시한다. 핵산의 5' 및 3' 말단은 핵산을 나타내는 선 다음에 도면의 우측에 각각 (-) 및 (+)로 나타내며, 이러한 표기법을 사용하여 "(-)"로 표시된 가닥은 안티센스 가닥을 나타내고 "(+)"로 나타낸 가닥은 센스 가닥을 나타낸다. 화살표 (→ 또는 ←)로 끝나는 점선 (---)은 핵산의 상보적 가닥의 핵산 중합을 나타낸다.

도 2에서 단계 (A)는 도 1b에 나타낸 바와 마찬가지로 프로모터 서열 "P"를 포함하는 올리고뉴클레오티드에 혼성화하여 핵산 혼성화 복합체 (22)를 형성하는 포획된 표적 폴리뉴클레오티드 (c)를 예시한다. 역전사효소 등의 폴리머라제를 사용하여 상보성 DNA를 합성한다 (---로 나타냄). 단계 (B)에서 (-) 가닥은 프라이머 (24)에 혼성화하며 역전사효소를 사용하여 중합시킴으로써 ((---)로 나타냄) 이중가닥 프로모터 P를 포함하는 DNA 이중가닥 (23)을 형성한다. 단계 (B)에서 복합체 (23)은 용액 중에서 유리 상태인 것으로 나타내지만, 이 복합체는 고체 지지체 (10)으로부터 방출될 필요는 없다. (-) 가닥을 프라이머 (24)와의 혼성화에 이용되게 하는 것은 당 업계에 잘 알려진 서로 다른 기술, 예를 들어 변성 단계를 사용하거나 RNase H 활성을 사용하여 성취될 수 있다. 바람직하게는 표적 폴리뉴클레오티드가 RNA 폴리뉴클레오티드일 경우 RNase H 활성을 사용한다.

도 2의 단계 (C) 내지 (E)는 단계 (B)의 생성물로부터 증폭된 핵산을 생성시키는 것을 예시한다. RNA 폴리머라제, 예를 들어 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 프라이머 연장시 프라이머 (24)가 결합할 수 있는 (단계 (D)) 다수의 센스 RNA 전사체를 생성시킨다 (단계 (C)). 단계 (D)의 점선은 프라이머 연장을 나타낸다. 때로 프로모터 프라이머로도 나타내는 프라이머 (24)는 증폭을 시작하기 전에 첨가할 수 있다.

단계 (C)와 (F) 단계의 사이에 (-) 가닥이 프로모터 프라이머 (24)에 혼성화하는 데 사용된다. 도 2에서 단계 (D) 내지 (F)는 RNA 폴리머라제에 의해 인지되고 추가의 RNA 전사체를 생성하기 위하여 사용되는 이중가닥 프로모터를 형성하기 위한 프로모터 프라이머의 사용을 예시한다. 생성된 전사체는 다른 증폭 사이클에 사용될 수 있다 (도 2의 좌측에 단계 (F) 및 (C)를 연결하는 화살표로 나타냄). 증폭 단계는 하기 "전사와 결부된 증폭법" 표제 하에 더 상세하게 기술되어 있다.

도 3a 내지 3c는 표지된 프로브 (d)를 포함하는 표적 폴리뉴클레오티드 (c)의 포획 및 검출을 예시한다.

분석 초기에 시약 혼합물은 고체 입자 (10)에 결합된 고정된 프로브 (a), 포획 프로브 (b), 표적 폴리뉴클레오티드 (c), 및 용액 중에서 유리 상태인 표지된 프로브 (d)를 포함한다. 도 3a에 나타난 바와 같이 제1 혼성화 조건에서 포획 프로브:표적 폴리뉴클레오티드:표지된 프로브의 혼성화 복합체 (30)은 용액 중에서 형성된다. 도 3a에 나타난 포획 프로브 (b)는 제1 염기 서열 인지 폴리뉴클레오티드 (33) 및 제2 염기 서열 인지 폴리뉴클레오티드 (35)를 결합시키는 링커 (31)로 구성되어 있다. 제1 염기 서열 인지 폴리뉴클레오티드 (33)은 표적 폴리뉴클레오티드 결합 영역 (32)를 포함하며, 제2 염기 서열 인지 폴리뉴클레오티드 (35)는 고정된 프로브 결합 영역 (34)를 포함한다.

도 3b에 나타난 바와 같이 제2 혼성화 조건에서 포획 프로브:표적 폴리뉴클레오티드:표지된 프로브의 혼성화 복합체 (30)은 고정된 프로브 (a)에 혼성화함으로써 고정된 프로브:포획 프로브:표적 폴리뉴클레오티드:표지된 프로브의 복합체 (40) (즉 결합된 표지 프로브)를 생성한다. 이 복합체 (40)은 고정된 프로브 (a)가 고정된 프로브 결합 영역 (34)와 혼성화할 경우 형성된다. 제2 혼성화 조건은 제1 혼성화 조건의 온도를 감소시킴으로써 성취될 수 있다.

도 3c를 언급하자면, 세척 단계를 사용하여 고체 지지체 (10)에 부착된 복합체 (40)에 존재하는 결합된 표지 프로브 (d)로부터 결합되지 않은 표지 프로브 (나타내지 않음)를 제거할 수 있다. 결합된 표지 프로브 (d)가 검출된다는 것은 시료에 표적 폴리뉴클레오티드가 처음부터 존재하였음을 나타내는 것이다.

도 4는 고체 지지체 (10)의 예를 나타내는 것이며, 여기에는  $T_{14}$ 로 나타낸 고정된 프로브가 부착되어 있다. 상부의 고정된 프로브 (우측에 (a)로 나타냄)는 3'  $A_{14}$ TTTGTGAGTAACCTTGATTCATCAAG 5' (서열 번호 1)로 나타낸 포획 프로브의 상보적  $A_{14}$  서열에  $T_{14}$  프로브가 혼성화된 (염기들 사이에서 ":"로 나타냄) 고정된 프로브:포획 프로브의 복합체에서 나타난다.中间的 고정된 프로브 (우측에 (b)로 나타냄)는 5' CAGTCATTGGAAGTAAGTAGTTC 3' (서열 번호 2)로 나타낸 상보성 표적 서열에 혼성화하는 포획 프로브의 5' 영역을 포함하는 고정된 프로브:포획 프로브의 복합체의 성분을 포함하는 고정된 프로브:포획 프로브:표적 폴리뉴클레오티드의 복합체에서 나타난다. 예시된 표적 서열은 말단의 "NNNNNN" 서열로 나타낸 내부 서열이다. 가장 하부의 고정된 프로브 (우측에 (c)로 나타냄)는 혼성화되지 않는다.

#### 염기 서열 인지 분자

염기 서열 인지 분자는 적절한 반응 조건에서 충분히 상보적인 핵산과 혼성화되게 하는 서열 정보를 포함한다. "충분히 상보적인"은 상보성 염기들 사이에서 수소결합함으로써 염기 서열 인지 분자 (예를 들어 다른 상보성 핵산 염기 서열)에 혼성화할 수 있는 인접한 핵산 염기 서열을 의미한다. 상보성 염기 서열은 표준 염기 쌍 (예를 들어 G:C, A:T 또는 A:U 쌍)을 사용하여 염기 서열 인지 분자에서 각각의 위치에 상보적일 수 있다. 다르게는, 상보성 염기 서열은 표준 수소결합을 사용하는 상보적이지 않은 하나 이상의 잔기 (비염기 "뉴클레오티드" 등)를 포함할 수 있지만 전체 상보성 염기 서열은 적절한 혼성화 조건에서 염기 서열 인지 분자와 특이적으로 혼성화할 수 있다. 당 업계의 숙련자에게는 적절한 혼성화 조건이 잘 알려져 있거나 서열 조성에 기초하여 쉽게 예상될 수 있는 것이거나 통상적인 시험법을 사용하여 실험적으로 결정될 수 있다 (Sambrook 등의 문헌 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 제2판, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 미국 뉴욕주 콜드 스프링 하버 소재, 1989, 1.90-1.91, 7.37-7.57, 9.47-9.51 및 11.47-11.57, 특히 9.50-9.51, 11.12-11.13, 11.45-11.47 및 11.55-11.57). 이러한 염기 서열 인지 분자는 서열 정보를 제공하지 않는 추가의 기를 포함할 수 있다. 추가의 기는 존재할 경우 반응 조건에서 염기 서열 인지 분자가 충분히 상동적인 핵산에 혼성화하는 것을 방해하지 않아야 한다.

염기 서열 인지 분자는 골격에 의해 함께 결합된 뉴클레오티드 염기 인지 기를 포함한다. 뉴클레오티드 염기 인지 기는 핵산에 존재하는 뉴클레오티드 질소 포함 염기와 수소결합할 수 있다. 골격은 적절한 구조 및 간격을 제공하여 기가 핵산의 뉴클레오티드에 수소결합할 수 있게 한다.

주어진 뉴클레오티드 염기 인지 기는 특정 뉴클레오티드 (예를 들어 A, G, C, T, 및 U)에 상보적일 수 있으며 따라서 핵산에 존재하는 뉴클레오티드와 수소결합할 수 있다. 뉴클레오티드 염기 인지 기는 또한 다른 뉴클레오티드와 수소결합할 수도 있다. 예를 들어 이노신이 뉴클레오티드 염기 인지 기일 경우 이노신은 U, A, 또는 C와 수소결합할 수 있다.

바람직한 뉴클레오티드 염기 인지 기는 질소 포함 퓨린 또는 피리미딘 염기, 또는 그의 유도체이며, 이들은 A, G, C, T, U 또는 이노신 (I)과 수소결합할 수 있다. 염기 인지 기의 예로는 A, G, C, T, U 또는 I, 및 그의 유도체를 들 수 있다. 유도체의 예로는 천연 퓨린 및 피리미딘 염기 대신 사용되는 변형된 퓨린 또는 피리미딘 염기, 예를 들어  $N^4$ -메틸 데옥시구아노신, 데아자- 또는 아자-퓨린 및 데아자- 또는 아자-피리미딘이 있으며, 피리미딘 염기는 5 또는 6 위치에서 치환기를 가지고, 퓨린 염기는 2, 6 또는 8 위치에서 변경되거나 대체된 치환체를 가진다. 이러한 유도체 및 그의 합성법은 당 업계에 잘 알려져 있다 (Cook의 PCT 국제 특허 공개 공보 제WO 93/13121호 참조). 추가의 예로는

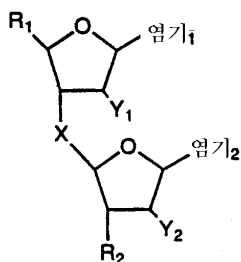
2-아미노-6-메틸아미노퓨린,  $O^6$ -메틸구아닌, 4-티오-피리미딘, 4-아미노-피리미딘, 4-디메틸히드라진-피리미딘,  $O^4$ -알킬-피리미딘, 및 당 업계에 공지된 기타의 것을 들 수 있다.

염기 서열 인지 분자의 골격은 당 업계에 공지된 다른 기 또는 결합으로 구성될 수 있다. 바람직하게는 골격은 하나 이상의 당-포스포디에스테르 결합, 하나 이상의 펩티드 핵산 골격 기, 하나 이상의 포스포로티오에이트 결합 또는 그의 배합된 결합을 포함한다.

하기 화학식 I의 화합물은 당 기가 펜토포라노실 기인 당-포스포디에스테르 형태의 골격 기를 나타낸다.



# 화학식 I



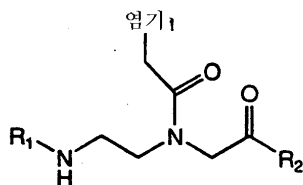
당 기는 포스포디에스테르 결합 또는 다른 적절한 결합에 의해 함께 결합되어 있다.

화학식 I에서 X는 두 당을 결합시키는 기를 나타낸다. X의 예로는  $-P(O)_3-$ ,  $-NHP(O)_3-$ ,  $-OCOO-$ ,  $-OCH_2CONH-$ ,  $-OCH_2COO-$  및  $-OCONH-$ 를 들 수 있다. 본원 명세서에 제공된 다른 예와 마찬가지로 개시된 것을 기초로 하여 당 업계에 잘 알려진 다른 것도 사용될 수 있다.  $Y_1$  및  $Y_2$ 는 독립적으로 선택되는 기이다.  $Y_1$  및  $Y_2$ 의 예로는 H, OH, 4개 이하의 탄소 원자를 포함하는 알콕시, 할로겐, 및  $C_1-C_4$  알킬이 있다. 바람직하게는  $Y_1$  및  $Y_2$ 는 독립적으로 H, OH, F, 또는  $OCH_3$ 이다. 염기<sub>1</sub> 및 염기<sub>2</sub>는 독립적으로 선택되는 뉴클레오타이드 염기 인지 기이다. 바람직하게는 염기<sub>1</sub> 및 염기<sub>2</sub>는 독립적으로 A, G, C, T, U 또는 이노신 (I)이다.  $R_1$  및  $R_2$ 는 추가의 당-포스포디에스테르 형태의 기, 펩티드 핵산, 및 서열 정보를 제공하지 않는 잔기, 예를 들어 염기가 아닌 "뉴클레오타이드" (포스포디에스테르 골격은 포함하지만 뉴클레오타이드 염기 인지 기는 결여됨), 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 다당류, 폴리펩티드, 펩티드, 및 다른 비뉴클레오타이드 결합을 포함할 수 있는 선택되는 기를 나타낸다. 다른 형태의 비뉴클레오타이드 링커가 잘 알려져 있다 (Arnold 등의 미국 특허 제5,585,481호 참조).

염기 서열 인지 분자의 성분일 수 있는 화학식 I의 유도체는 골격 중 다른 형태의 당을 갖는 분자로 당 업계에 공지되어 있다. 예를 들어 염기 서열 인지 분자는 결합 잔기에 의해 연결되어 있고 헤테로시클릭 염기가 부착되어 있는 시클로부틸 잔기를 가질 수 있다 (예를 들어 Cook 등의 PCT 국제 특허 공개 공보 제WO 94/19023호 참조).

다른 형태의 염기 서열 인지 분자의 골격은 예를 들어 펩티드 핵산에 존재하는 펩티드 형태의 결합이다. "펩티드 핵산"은 데옥시리보스 포스페이트 골격이 이전에 기술된 바와 같이 슈도펩티드 골격에 의해 대체된 DNA 유사체를 나타낸다 (Hyrup & Nielsen, 1996, Bioorg. & Med. Chem. 4:5-23; Hydig-Hielsen 등의 PCT 국제 특허 공개 공보 제WO 95/32305호 참조). 바람직하게는 펩티드 핵산은 하기 화학식 II에 나타난 바와 같이 N-(2-아미노에틸)글리신 단위로 구성되어 있다.

## 화학식 II



상기 식 중  $R_1$ ,  $R_2$ , 및 염기1은 화학식 I의 화합물에서 기재한 바와 같다.

염기 서열 인지 분자는 올리고뉴클레오타이드 및 변형된 올리고뉴클레오타이드의 제조를 위한 공지된 방법, 예를 들어 표준 유기 합성법을 사용하여 제조할 수 있다 (예를 들어 Eckstein, F., Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach, 1 내지 5장, 1991; Caruthers 등, Meth. In Enzymol, 154권, p287, 1987; Bhatt, 미국 특허 제5,252,723호; Klem 등, PCT 국제 특허 공개 공보 제WO 92/07864호; Cook, PCT 국제 특허 공개 공보 제WO 93/13121호; Miller 등, PCT 국제 특허 공개 공보 제WO 94/15619호; McGee 등, PCT 국제 특허 공개 공보 제WO 94/02051호; Cook 등, PCT 국제 특허 공개 공보 제WO 94/19023호; Hyrup 등, Bioorg. Med. Chem. 4:5-23, 1996; 및 Hydig-Hielsen 등, PCT 국제 특허 공개 공보 제WO 95/32305호; Ordoukhanian 등, Nuc. Acids Res. 25(19):3783-3786, 1997; Myer 등, Bioconj. Chem. 7(4):401-412, 1996; Schultz 등, Nuc. Acids Res. 24(15):2966-2973, 1996; Woo 등, Nuc. Acids Res. 24(13):2470-2475, 1996; Agris 등, Biochimie 77: 125-134, 1995; Berressem 등, Nuc. Acids Res. 23(17):3465-3472, 1995; Seela 등, Nuc. Acids Res. 23(13):2499-2505, 1995; Vinayak 등, Nuc. Acids Symp. Ser. 33:123-125, 1995; Limbach 등, Nuc. Acids Res. 22(12):2183-2196, 1994; Gryaznov 등, Nuc. Acids Res. 20(8):1879-1882, 1992; Kawana 등, Nuc. Acids Symp. Ser. 25: 93-94, 1991; Pfeleiderer 등, Nuc. Acids Symp. Ser. 24: 29-32, 1991; Wagner 등, Nuc. Acids Res. 19(21):5965-5971, 1991; Marquez 등, Nuc. Acids Symp. Ser. 22: 35-36, 1990; Lin 등, Nuc. Acids Res. 17(24):10373-10383, 1989; Farrance 등, Anal. Biochem. 179(1):60-65, 1989; Gildea 등, Nuc. Acids Res. 17(6):2261-2281, 1989; Yeung 등,



Nuc. Acids Res. 16(10):4539-4544, 1988; Pon 등, Nuc. Acids Res. 13(18):6447-6465, 1985; Millican 등, Nuc. Acids Res. 12(19):7435-7453, 1984; Schinazi 등, J. Med. Chem. 21(11): 1141-1146, 1978 참조).

바람직한 염기 서열 인지 분자는 독립적으로 (i) 하나 이상의 당-포스포디에스테르 형태의 기, 하나 이상의 펩티드 핵산 기, 하나 이상의 포스포로티오에이트 기, 또는 그의 배합된 결합을 포함하는 골격, 및 (ii) 골격에 결합된, A, G, C, T, U 또는 I와 수소결합할 수 있는 독립적으로 선택된 뉴클레오타이드 염기 인지 기를 포함한다. 염기 서열 인지 분자는 데옥시뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 2'-메톡시 치환 리보뉴클레오타이드, 또는 2'-할로 치환 리보뉴클레오타이드인 선택된 성분을 포함할 수 있다. 바람직하게는 하나 이상의 상기 성분은 염기 서열 인지 기의 약 70% 이상, 더 바람직하게는 약 80% 이상, 훨씬 바람직하게는 약 90% 이상, 가장 바람직하게는 약 100%를 구성한다.

#### 고체 지지체로의 고정화

염기 서열 인지 기는 여러 공지된 방법으로 서로 다른 형태의 지지체에 결합되어 고정된 프로브를 형성할 수 있다. 화학적 표준 기술을 사용하여 합성된 올리고뉴클레오타이드를 고체 지지체에 공유결합으로 결합시키는 것은 종래에 기술되어 있었다 (Lund 등, Nuc. Acids Res. 16:10861-10880, 1988; 유럽 특허 출원 공개 공보 제0444120호). 특히 바람직한 고체 지지체는 분리 단계에서 유용한 자성 입자인데, 이는 자성 입자가 반응 용기 위치로 끌려와 그 위치에 고정될 수 있는 반면 결합되지 않은 용액 성분은 세척 제거되기 때문이다. 자성 입자는 표준 기술로 제조하거나 시판되는 원료로부터 얻을 수 있다.

#### $T_m$ 및 혼성화 조건

본 발명의 방법은 포획 프로브:표적물의 복합체와 고정된 프로브:포획 프로브의 복합체의 형성 시기를 조절하기 위하여 혼성화 조건을 서로 다르게 한다. 혼성화되는 두 염기 서열 인지 분자의 능력은 구조 및 주위 반응 환경에 따라 달라진다. 반응 환경은 2중 이상의 인지 분자를 포함하는 용액의 조성 및 용액 온도를 포함한다.

특정 분석 조성을 사용하면, 혼성화 복합체는 분석 온도가 이 복합체의  $T_m$  이상일 경우 불안정하지 않다. 당 업계에 잘 알려진 용액 인자, 예를 들어 염 농도 및 변성제의 존재가 주어진 복합체의  $T_m$ 에 영향을 줄 수 있다. 혼성화 복합체를 구성하는 두 염기 서열 인지 분자는 본원 명세서에 제공된 상세한 설명 및 당 업계에 잘 알려진 기술에 기초하여 본 발명에서 사용하기에 적절한  $T_m$  특성을 갖도록 제작할 수 있다 (예를 들어 Sambrook 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 제2판 (미국 뉴욕주 콜드 스프링 하버 소재의 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), 1.90-1.91, 7.37-7.57, 9.47-9.51 및 11.47-11.57, 특히 9.50-9.51, 11.12-11.13, 11.45-11.47 및 11.55-11.57).

혼성화 복합체의 안정성은 두 염기 서열 인지 분자인 뉴클레오타이드 염기 인지 기, 및 염기 서열 인지 분자의 골격 사이의 상보성 정도와 길이에 의해 영향을 받는다. 예를 들어 두 염기 서열 인지 분자 사이에 형성된 복합체의  $T_m$ 은 서로 100% 미만의 상보성 내부 영역을 갖도록 이 분자를 제작함으로써 감소시킬 수 있다. 이것은 미스매치 또는 링커 성분, 예를 들어 비뉴클레오타이드 링커 및 비염기성 "뉴클레오타이드"를 포함함으로써 성취될 수 있다. 링커 성분은 반대 가닥의 염기와 반대편에 위치하거나 가닥으로부터 불거져 나와 복합체의 안정성을 감소시킬 수 있다. 반대 가닥에 존재하는 뉴클레오타이드 염기 인지 기의 형태는 또한 프로브 혼성화 복합체의 안정성에 영향을 준다. 예를 들어 G:C 쌍은 A:T 쌍보다 더 강한데, 이는 A:T 쌍과 비교하여 G:C 쌍에서 수소결합력이 증가하기 때문이다.

염기 서열 인지 분자의 골격 조성은 다른 방식으로 조정되어 혼성화 복합체의 안정성에 영향을 줄 수 있다. 바람직한 골격은 펩티드 핵산에 존재하는 것과 같은 펩티드 결합, 및 리보핵산 및 데옥시리보핵산, 또는 그의 유도체에 존재하는 것과 같은 당-포스포디에스테르 형태의 결합이다. 일반적으로 펩티드 핵산은 상응하는 DNA 서열보다는 RNA와 더 강한 복합체를 형성한다. 더 바람직하게는 당 기와 이 기를 결합하는 결합 모두가 복합체의 안정성에 영향을 줄 수 있는 당-포스포디에스테르 형태의 결합으로 이루어진다. 예를 들어 당의 영향은 2'-메톡시 치환 RNA 기에서 증명될 수 있는데, 여기서 2'-메톡시 치환 RNA와 상보성 2'OH RNA 사이에 형성된 혼성화 복합체는 일반적으로 상응하는 DNA-RNA 복합체보다 더 안정하다. 2'-플루오로 치환 RNA는 본질적으로 복합체 안정성에 대하여 2'-메톡시 치환 RNA와 동일한 형태의 효과를 갖는다.

2개의 당 기를 결합시키는 결합은 전체 전하 또는 전하 밀도에 영향을 줌으로써, 또는 두 분자 성분 사이의 입체 장애적 결합에 영향을 줌으로써 혼성화 복합체의 안정성에 영향을 줄 수 있다. 벌크 결합으로부터의 입체 장애적 상호작용은 복합체의 안정성을 감소시키는 벌지 (bulge)를 생성한다. 하전된 결합 (예를 들어 포스포로티오에이트) 또는 중성 (예를 들어 메틸포스포네이트) 기가 복합체의 안정성에 영향을 줄 수 있다.

$T_m$ 은 표준 계산법을 사용하여 예상되고 당 업계에 잘 알려진 통상의 시험 기술을 사용하여 측정될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어 Sambrook 등의 문헌 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 제2판 (미국 뉴욕주 콜드 스프링 하버 소재의 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), 1.90-1.91, 7.37-7.57, 9.47-9.51 및 11.47-11.57, 특히 9.50-9.51, 11.12-11.13, 11.45-11.47 및 11.55-11.57] 및 Hogan 등의 미국 특허 제5,547,842호에 기술되어 있다.

본 발명의 바람직한 실시 형태의 제1 혼성화 용액에서 포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드 복합체의  $T_m$ 은 고정된 프로브:포획 프로브 복합체의  $T_m$ 보다 약 5°C 이상, 더 바람직하게는 약 10°C 이상, 훨씬 바람직하게는 20°C 이상, 가장 바람직하게는 약 25°C 이상 더 크다.

#### 혼성화 조건의 변화

혼성화 조건을 변화시키는 바람직한 방법은 분석 성분을 포함하는 혼성화 용액의 온도를 변화시키는 것이다. 온도는 용액에 시약을 첨가하지 않고 쉽게 변화시킬 수 있어 온도를 자동화에 더 알맞도록 할 수 있

다. 자동 분석법은 본 발명의 바람직한 실시 형태이다. 바람직하게는 제2 혼성화 조건은 제1 혼성화 조건의 온도를 약 10°C 이상, 더 바람직하게는 15°C 이상, 훨씬 바람직하게는 약 20°C 이상, 가장 바람직하게는 약 25°C 이상 감소시킴으로써 성취된다. 그러나 용액의 이온 세기를 증가시키거나 변성제로 용액을 휘석시키는 등의 혼성화 조건의 엄격도를 감소시키는 공지된 방법을 사용하여 제2 혼성화 조건을 얻을 수 있다.

#### 증폭

증폭은 표적 폴리뉴클레오타이드의 카피수를 증가시킨다. 증폭 조건은 하나 이상의 핵산 폴리머라제를 사용함으로써 핵산 주형에 상보적인 핵산 가닥을 생성하는 핵산 중합에 알맞은 것이다. 증폭 조건은 1종 이상의 효소, 증폭 올리고뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드 트리포스페이트 기질, 완충제, 및 적절한 온도에서의 반응을 포함한다. 구체적인 조건은 당 업계에 잘 알려져 있으며 사용되는 핵산 증폭법의 유형에 따라 달라진다.

#### 효소

핵산 증폭을 수행하는데 적절한 핵산 폴리머라제는 쉽게 구매가능하거나 단리 및 정제될 수 있다. 이러한 폴리머라제로는 예를 들어 에스케리키아 콜라이 (*Escherichia coli*) DNA 폴리머라제 I, 바실러스 스테로모필러스 (*Bacillus stearothermophilus*) DNA 폴리머라제 I, 비. 칼도테넥스 (*B. Caldopenex*) DNA 폴리머라제 I, T4 DNA 폴리머라제, 및 Taq 폴리머라제 등의 DNA-의존성 DNA 폴리머라제를 들 수 있다. 다른 적절한 효소로는 예를 들어 T7 RNA 폴리머라제, T3 RNA 폴리머라제, 및 SP6 RNA 폴리머라제와 같은 DNA-의존성 RNA 폴리머라제가 있다. 적절한 효소로는 예를 들어 조류 골수종 바이러스 (AMV) 역전사효소 및 MMLV (Moloney murine leukemia virus) 역전사효소 등의 RNA-의존성 DNA 폴리머라제도 있다. 증폭은 또한 레플리카제 (예를 들어 Q $\beta$ -레플리카제), 리가제 (예를 들어 이. 콜라이 DNA 리가제 및 T4 DNA 리가제) 또는 이러한 효소류의 배합물을 사용하여 이루어질 수 있다.

#### 증폭 올리고뉴클레오타이드

"증폭 올리고뉴클레오타이드"는 표적 핵산 또는 그의 보완물에 혼성화하며 증폭 반응에 참여하는 올리고뉴클레오타이드이다. 증폭 올리고뉴클레오타이드의 예로는 프라이머 및 프로모터-프라이머가 있다.

증폭 올리고뉴클레오타이드의 선택은 사용되는 증폭 방법 및 증폭할 핵산에 따라 달라진다. 특정 증폭 올리고뉴클레오타이드는 본 발명의 실시자에 의해 선택되는 원하는 표적 핵산의 서열 및 증폭 방법에 따라 당 업계의 숙련자에 의해 쉽게 고안되며 합성될 수 있다. 통상 사용되는 증폭 올리고뉴클레오타이드의 예로는 뉴클레오타이드 염기 서열과 유사하거나 이 서열에 상보적이며 표적 핵산에 상보적이지 않은 핵산 서열 영역을 선택적으로 포함할 수 있는 것을 들 수 있다. 예를 들어 증폭 올리고뉴클레오타이드는 RNA 폴리머라제에 의해 인지되는 프로모터 서열 또는 레플리카제에 의해 인지되는 염기 서열을 포함할 수 있다.

유사 증폭 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산의 영역에 완전하게 상보적인 핵산 (예를 들어 표적 핵산이 RNA일 경우 cDNA)에 혼성화할 수 있는 영역을 포함한다. 유사 올리고뉴클레오타이드는 상보성 표적 서열의 3' 말단에 가까운 위치에서 상보성 핵산에 혼성화할 수 있다. 유사 올리고뉴클레오타이드는 또한 상보적이지 않은 영역, 예를 들어 프로모터 서열 영역, 및(또는) 하나 이상의 변형 영역, 예를 들어 핵산 폴리머라제 활성을 억제하는 변형 영역을 포함할 수 있다. 바람직하게는 유사 올리고뉴클레오타이드는 약 10개 이상, 더 바람직하게는 약 12개 이상의 인접한 염기를 포함하며, 이들은 표적 핵산의 영역에 완전하게 상보적인 핵산에 상보적이다. 인접한 염기는 바람직하게는 표적 핵산 서열의 영역과 약 80% 이상, 더 바람직하게는 약 90% 이상, 가장 바람직하게는 약 100%의 상보성을 가진다. 유사 올리고뉴클레오타이드의 길이는 바람직하게는 약 12 내지 60개의 뉴클레오타이드 염기이며 선택적으로 변형된 뉴클레오타이드 염기를 포함할 수 있다.

주형에 상보적인 증폭 올리고뉴클레오타이드는 표적 서열의 3' 위치에서 표적 핵산과 혼성화할 수 있는 영역을 포함한다. 주형에 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 5' 프로모터 영역과 같은 비상보성 영역을 포함할 수 있다. 바람직하게는 표적에 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 약 10개 이상, 더 바람직하게는 약 12개 이상의 인접한 염기를 포함하며, 이들은 표적 핵산 서열 영역에 상보적이다. 인접한 염기는 바람직하게는 약 80% 이상, 더 바람직하게는 약 90% 이상, 가장 바람직하게는 약 100% 이상 표적 서열의 영역에 상보적이다. 주형에 상보적인 올리고뉴클레오타이드의 길이는 바람직하게는 12 내지 60개의 염기이며 이 올리고뉴클레오타이드는 선택적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

"프라이머"는 주형에 혼성화할 수 있고 공지된 중합 반응에서 효과적으로 연장될 수 있는 선택적으로 변형된 올리고뉴클레오타이드를 나타낸다. 프라이머의 5' 영역은 표적 핵산에 비상보성일 수 있다. 5' 비상보성 영역이 프로모터 서열을 포함할 경우 이것은 "프로모터-프라이머"로 칭해진다. 프라이머 또는 프로모터-프라이머는 표적 핵산과 유사하거나 상보적일 수 있다.

#### 전사와 결부된 증폭

전사와 결부된 증폭법에서는 RNA 폴리머라제를 사용하여 핵산 주형으로부터 다수의 RNA 전사체를 생성한다. 일반적으로 전사와 결부된 증폭법에서는 RNA 폴리머라제, DNA 폴리머라제, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트, 리보뉴클레오타이드 트리포스페이트, 및 프로모터-주형 상보성 올리고뉴클레오타이드를 사용한다. 유사 올리고뉴클레오타이드도 종종 사용된다.

전사와 결부된 증폭법의 다른 변형법도 당 업계에 잘 알려져 있다.

다른 반응 조건 및 다른 증폭 올리고뉴클레오타이드의 수 및 유형을 사용하는 다른 변형법의 예가 Burg 등의 미국 특허 제5,437,990호; Kacian 등의 미국 특허 제5,399,491호 및 5,554,516호; Kacian 등의 PCT 국제 특허 공개 공보 제WO 93/22461호; Gingeras 등의 PCT 국제 특허 공개 공보 제WO 88/01302호; Gingeras 등의 PCT 국제 특허 공개 공보 제WO 88/10315호; Malek 등의 미국 특허 제5,130,238호; Urdea 등의 미국 특허 제4,868,105호 및 5,124,246호; McDonough 등의 국제 특허 공개 공보 제WO 94/03472호; 및 Ryder 등의 PCT 국제 특허 공개 공보 제WO 95/03430호에 상세하게 기술되어 있다.

간단히 말해서 일반적으로 전사와 결부된 증폭법에서는 이중 가닥으로 만들어질 경우 RNA 폴리머라제에 의해 인지되는 5' 염기 서열을 포함하는 프로모터-주형 상보성 올리고뉴클레오타이드 (도 2에서 "P"로 나타냄), 및 표적 서열의 3' 위치에서 주형 핵산과 혼성화할 수 있는 3' 서열 영역 (도 2의 단계 (A)에 나타냄)을 사용한다. 프로모터-주형 상보성 올리고뉴클레오타이드와 주형의 혼성화 후 이중 가닥 프로모터가 주형으로부터의 상향에 형성된다. 이중 가닥 프로모터는 프로모터-주형 상보성 올리고뉴클레오타이드의 폴리머라제 매개 프라이머 연장으로 표적 상보성 가닥을 생성하고 (도 2의 단계 (A)), 이어서 유사 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 (예를 들어 도 2의 단계 (B)의 프라이머 (24)) 및 유사 올리고뉴클레오타이드의 프라이머 연장 (도 2의 단계 (B))에 의해 형성될 수 있다. 표적 핵산의 프라이머 연장과 관련된 다른 공지된 기술도 이중 가닥 프로모터를 형성하는 데 적절하다.

전사와 결부된 증폭은 RNA 폴리머라제 활성을 가지는 효소가 프로모터 영역에 결합하여 5'에서 3' 방향으로 단일 가닥 RNA 전사체를 합성함으로써 시작된다 (도 2의 단계 (C)). 단일 주형을 사용하여 다수의 RNA 전사체 (예를 들어 100 내지 3,000개)가 전사와 결부된 증폭법에 의해 생성될 수 있다 (예를 들어 도 2의 단계 (C) 내지 (F)를 반복함으로써).

본 발명의 바람직한 실시 형태에 있어서, RNase H 활성을 사용하는 전사와 결부된 증폭법은 표적 증폭에 사용된다. 이것에 의해 본질적으로 일정한 반응 조건에서 많은 양의 단일 가닥 증폭 핵산이 생성된다. 더 바람직하게는 RNase H 활성은 역전사효소에 의해 주어진다.

#### 기타 증폭 방법

본 발명의 방법의 증폭 단계에 레플리카제 매개 증폭법, 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR), 및 리가제 연쇄 반응 (LCR) 등의 기타 공지된 증폭법이 사용될 수 있다. 레플리카제 매개 증폭법에서는 자가 복제 RNA 분자, 및 레플리카제, 예를 들어 QB-레플리카제 (예를 들어 Kramer 등의 미국 특허 제4,786,600호; PCT 국제 특허 공개 공보 제WO 90/14439호 참조)가 사용된다. PCR 증폭법은 잘 알려져 있으며 DNA 폴리머라제, 프라이머 및 열적 사이클링을 사용하여 DNA 또는 cDNA의 두 상보적 가닥의 다수 카피를 합성한다 (예를 들어 Mullis 등의 미국 특허 제4,683,195호, 동 제4,683,202호 및 동 제4,800,159호; Methods in Enzymology, 1987, 155권: 335-350 참조). LCR에서는 4개 이상의 별도의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 혼성화, 라이게이션, 및 변성을 다수 수행하여 표적 및 그의 상보성 가닥을 증폭시킨다 (유럽 특허 출원 공개 제0 320 308호 참조).

#### 표적 폴리뉴클레오타이드의 검출

표적 폴리뉴클레오타이드의 존재 여부는 검출 프로브를 사용하는 다른 기술을 사용하여 검출하고(하거나) 증폭된 핵산을 검출할 수 있다. 바람직하게는 표적 폴리뉴클레오타이드는 표적 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 증폭 생성물, 특히 표적 폴리뉴클레오타이드에 상보적인 증폭된 핵산에 혼성화하는 표지된 프로브를 사용하여 검출한다.

표지된 프로브는 서로 다른 형태의 표지물을 포함할 수 있으며 서로 다른 기술을 사용하여 표지물을 검출할 수 있다. 예를 들어 잘 알려진 프로브 표지물로는 방사성 동위원소, 형광성 잔기, 화학발광성 잔기, 및 촉매 기 (예를 들어 반응에 참여하여 색상 변화를 일으키는 효소)를 들 수 있다. 이러한 표지된 프로브의 제조 및(또는) 사용의 예는 Sambrook 등의 문헌 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 제2판 (미국 뉴욕주 쿨드 스프링 하버 소재의 Cold Spring Harbor Laboratory Press), 제10장]; Nelson 등의 미국 특허 제5,658,737호; Woodhead 등의 미국 특허 제5,656,207호; Hogan 등의 미국 특허 제5,547,842호; Arnold 등의 미국 특허 제5,283,174호; Kourilsky 등의 미국 특허 제4,581,333호; 및 Becker 등의 유럽 특허 출원 공개 제0 747 706호에 상세하게 기술되어 있다.

표지된 프로브는 표적 폴리뉴클레오타이드, 증폭된 핵산, 또는 표적 폴리뉴클레오타이드 또는 증폭된 핵산에 직접 또는 간접적으로 혼성화하는 매개 분자에 혼성화할 수 있다. 간접적인 혼성화는 함께 혼성화되는 다수의 매개 분자를 사용함으로써 행해질 수 있다.

증폭된 핵산은 표지된 프로브를 사용하거나 잘 알려진 기타 핵산 검출법을 사용하여 검출할 수 있다. 예를 들어 증폭된 핵산은 표지된 전구체를 사용하여 증폭 동안 표지하거나 형광성 혼입제 (예를 들어 에티움 브로마이드)를 사용하여 증폭 후에 표지할 수 있다. 표지된 증폭 핵산은 잘 알려진 방법, 예를 들어 겔 여과법, 겔 전기영동법, 및 HPLC를 사용하여 검출할 수 있다.

하기 실시예는 본 발명의 바람직한 몇몇 실시 형태를 예시하는 것이며, 당 업계의 숙련자는 다른 시약 및 반응 조건을 사용하여 본 발명의 방법을 동일하게 실시할 수 있음을 알 것이다.

#### <실시예 1>

상보성 길이를 달리하여  $T_m$ 을 조정하기

혼성화 복합체의  $T_m$ 을 조정하는 한 가지 방법은 이 복합체를 구성하는 두 개의 핵산 사이에 상보성의 길이를 변화시키는 것이다. 실시예 1은 복합체 내의 상보성 길이의 차이로 인한  $T_m$ 의 변화를 보여준다.

올리고뉴클레오타이드 제1 가닥 및 제2 가닥 간에 혼성체를 형성시켰다. 제1 가닥은 데옥시티미딘 ( $dT_{40}$ )의 동종중합체이고, 제2 가닥은 크기가 각기 다른 데옥시아데노신 ( $dA_n$ )의 동종중합체였다. 이들 올리고뉴클레오타이드는 표준적인 핵산 합성 방법을 써서 합성했다.

두 가닥 (각각 350 pmol)을 2X 혼성화 완충액 (200 mM 속신산 리튬 (pH 5.1-5.2), 17% 라우릴황산 리튬 (LLS), 3 mM 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA), 3 mM 에틸렌 글리콜 N,N,N',N'-테트라아세트산 (EGTA))이 함유된 40  $\mu$ l 부피로 혼합하고 30 분 동안 55 °C에서 가열했다. 그 다음 각 복합체를 1X 혼성화 완충액 (즉 2X 혼성화 완충액의 절반 농도)을 써서 300  $\mu$ l로 희석시켰다.

이 용액에서  $T_m$ 은 흡광도가 이동 (shift)을 검출하여 결정했다. 간단히 말하자면 반응 혼합물의 온도를

점차 증가시키면서 260 nm에서 흡광도를 측정하고, 그 온도 범위에 걸쳐 이 용액의 흡광도 이동을 검출했다.  $T_m$ 은 흡광도 이동의 중점에서의 온도이다. 아래 표 1은  $dA_n$ 이  $dA_{10}$  내지  $dA_{40}$ 으로 변할 때 혼성화 복합체의  $T_m$  결과를 보여준다.

[표 1]

혼성체	$T_m$
$dA_{40}:dT_{40}$	70.3 °C
$dA_{30}:dT_{40}$	68.4 °C
$dA_{25}:dT_{40}$	64.5 °C
$dA_{20}:dT_{40}$	61.5 °C
$dA_{15}:dT_{40}$	56.0 °C
$dA_{10}:dT_{40}$	50.4 °C

이 결과로부터 알 수 있는 바와 같이 상보성 길이가 증가할수록 복합체의  $T_m$ 도 증가했다. 긴 혼성화 복합체 (예를 들면  $dA_{30}:dT_{40}$ )일수록 파생 쌍 (예를 들면 30량체, 29량체, 28량체 쌍 등)의 형성으로 인해 혼합물 내에 여러 형태의 혼성화 복합체가 존재할 것이기 때문에 흡광도 이동이 상대적으로 넓게 나타나는 경향이 있다.

더 짧은 혼성화 중합체를 낳는 동중중합체 조합 (예를 들면 15량체 복합체까지 형성할 수 있는  $dA_{15}:dT_{40}$ )은  $T_m$ 이 약 60 °C 아래였다.

이런 성질은 자기 비드에 부착된 고정 폴리- $dT_{14}$  또는  $dT_{30}$  프로브 100  $\mu$ g을 용액 중의  $^{32}$ P-표지  $dA_{30}$  포획 프로브 2.5 pmol과 반응시켜서 추가로 시험했다. 반응물을 혼성화 완충액 (3 mM EDTA, 3 mM EGTA, 17% LLS, 190 mM 숙신산, 250 mM 수산화리튬, pH 5.1  $\pm$  0.1)에서 30 분 동안 60 °C 또는 실온 (약 25 °C)에서 각 혼성화 조건에 대해 5개의 복제본을 반응시켰다. 실온에서는 표지된  $dA_{30}$  프로브의 평균 90 % 및 88 %가 각각  $dT_{14}$  및  $dT_{30}$  프로브에 혼성화되었고, 60 °C에서는 표지된  $dA_{30}$  프로브의 평균 61 % 및 1 %가 각각  $dT_{14}$  및  $dT_{30}$  프로브에 혼성화되었다.

이런 혼성화 특징은 다음 실시예에서 입증된 바와 같이 두 가지 온도의 혼성화 조건에 고정된 프로브가 존재하는 2 단계 혼성화 분석에서 이용되었다.

#### <실시예 2>

##### 2 단계 혼성화

실시예 2는 두 가지 혼성화 온도를 써서 표적 폴리뉴클레오타이드를 포획하는 2 단계 혼성화 방법을 보여준다. 한 분석 조건에서는 포획 프로브, 표적 폴리뉴클레오타이드, 고정된 프로브가 두 혼성화 조건에서 모두 혼합물 상태로 동시에 존재했다. 다른 분석에서는 첫번째 혼성화 조건에서 포획 프로브를 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼성화한 후 고정된 프로브를 첨가했다. 첫번째 분석의 동시 혼합물은 시약 첨가 단계가 거의 필요없기 때문에 유리하지만 동시 혼합물을 써서 수행한 2 단계 혼성화에서보다는 고정된 프로브를 별도로 첨가하는 것이 일반적으로 약 2배 더 높은 신호를 낳았다.

포획 프로브 올리고뉴클레오타이드 및 아크리디늄 에스테르 (AE)-표지 표적 폴리뉴클레오타이드를 합성하고, 표준적인 기술을 써서 검출했다. 그러한 기술은 문헌 (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) 10 장, Nelson et al., 미국 특허 제5,658,737호, Woodhead et al., 미국 특허 제5,656,207호, Hogan et al., 미국 특허 제5,547,842호, 및 Arnold et al., 미국 특허 제5,283,174호)에 기재된 바와 같이 당업계에 공지되어 있다.

우선 포획 프로브 (1.25 pmol) 및 AE-표지 표적 폴리뉴클레오타이드를 30 분 동안 60 °C에서 1X 혼성화 완충액 (실시예 1 참조)에 Seradyn 자기 비드에 부착된 폴리-T 고정된 프로브 100  $\mu$ g가 있는 상태로 또는 없는 상태로 반응시키고, 실온으로 옮겨와 30 분 동안 놓아두었다. 자기 비드에 부착된, 고정된 프로브 없이 60 °C에서 반응시킨 시료의 경우에는 이 고정된 프로브 (1X 혼성화 용액 50  $\mu$ l 중의 것)를 제2 반응 개시점에서 첨가했다. 고정된 프로브가 이미 함유되어 있는 분석에 1X 혼성화 완충액 50  $\mu$ l를 첨가함으로써 두 시료의 부피는 동일하게 유지했다. 고정된 프로브는 자기 비드인 고체 지지체에 부착된  $dT_{14}$  또는  $dT_{30}$ 의 동중중합체였다. 포획 프로브는 표적 폴리뉴클레오타이드 (Neisseria gonorrhoeae 16S rRNA 서열)의 서열에 상보적인 염기 서열 및 폴리-A 테일  $dA_{15}$  또는  $dA_{30}$ 을 갖는 폴리뉴클레오타이드였다. 표적 서열은 AE-표지 N. 고노르호에 16S rRNA였다. 이런 조합을 사용하여, 표적 서열과 포획 프로브의 표적 상보성 서열을 첫번째 혼성화 (60 °C)에서 혼성화하고, 포획 프로브의 dA 영역을 고정된 프로브의 dT 영역과 두번째 혼성화 (실온)에서 혼성화함으로써 고정된 프로브: 포획 프로브: 표적 폴리뉴클레오타이드 복합체를 형성했다.

자기장을 걸어 고정된 프로브가 있는 자기 비드를 반응 용기의 한 지점으로 끌어당긴 후 결합 완충액 (50 mM 숙신산 리튬, 100 mM LiCl, 1.5 % LLS, 1.5 mM EDTA, 1.5 mM EGTA, pH 5.2)으로 2회 세척하여, 포획된 AE-표지 표적 폴리뉴클레오타이드를 정제했다. 이 비드를 재현탁하고 포획된 표적 폴리뉴클레오타이드를 AE 표지에서 생기는 화학발광을 측정하여 검출했다. 화학발광은 문헌 (Arnold et al., Clinical Chemistry

35: 1588-1594 (1989), Nelson et al., 미국 특허 5,658,737호)에서 기재된 바와 실질적으로 같은 방법을 써서 상대적 광도 (Relative Light Unit, RLU)로 검출했다. RLU 결과를 표 2에 나타냈으며, 이 값은 각 시료 3개의 사본에 대해 시험한 값의 평균치이다.

[표 2]

고정된 프로브의 폴리-T	포획 프로브의 폴리-A	고정된 프로브를 제2 혼성화 전에 첨가	고정된 프로브, 두 혼성화시에 모두 존재
dT <sub>30</sub>	dA <sub>30</sub>	54,895 <sup>1</sup>	31,608
	dA <sub>15</sub>	44,558	30,290
dT <sub>14</sub>	dA <sub>30</sub>	65,313 <sup>2</sup>	63,240
	dA <sub>15</sub>	43,285	37,479
1 표지된 표적의 62 % 포획을 나타냄			
2 표지된 표적의 67 % 포획을 나타냄			

표 2의 결과는 포획 프로브 및 고정된 프로브를 사용하되, 고정된 프로브의 경우 두 혼성화시에 모두 반응 혼합물에 존재하거나 또는 제2 혼성화 전에 첨가하여 표적 폴리뉴클레오타이드를 효과적으로 포획하는데 2 단계 혼성화가 사용될 수 있음을 보여준다. 따라서 이 방법은 두 혼성화시에 모두 모든 시약이 동시 존재하여 시약 첨가 단계가 거의 필요없는 경우에 표적 포획을 달성할 수 있다. 표 2의 결과는 또한 상대적으로 짧은 상보성 서열 (dT<sub>14</sub> 및 dA<sub>15</sub>)이 고정된 프로브 : 포획 프로브 : 표적 폴리뉴클레오타이드 복합체에서 표적 포획에 효과적임을 보여준다. 14량체 고정된 프로브를 사용하면 고정된 프로브가 제2 혼성화에 첨가되든 또는 두 혼성화시에 모두 존재하든지와 상관없이 실질적으로 동일한 신호를 낳는다. dT<sub>30</sub> : dA<sub>15</sub> 조합과 비교할 때 dT<sub>14</sub> : dA<sub>30</sub> 조합으로 더 높은 신호가 얻어진다는 것에서 알 수 있는 바와 같이 고정된 프로브 단독 중합체가 더 짧은 것이 포획 프로브 단독 중합체가 더 짧은 것보다는 더 유리한 것으로 보인다.

### <실시예 3>

#### 증폭된 표적 서열에 의한 2 단계 혼성화

본 실시예는 본 발명의 2 단계 혼성화법이 마이코박테륨 투버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 표적 폴리뉴클레오타이드가 임상 시료에 존재한다는 것을 보여준다. 이 분석 결과 다른 마이코박테륨 종[즉, 엠.보비스(*M. bovis*), 엠.시미아에(*M. simiae*) 및 엠.아프리카눔(*M. africanum*), 종종 통칭하여 엠.투버쿨로시스 복합체라 불리지만 본원에서는 간략하게 엠.투버쿨로시스로 기재됨] 검출 가능하다.

기본적인 절차는 다음 단계들을 포함한다. 임상 시료(예를 들어, 타액, 기관지폐포 세정물 또는 기관지 세척물로부터의 침전물 500  $\mu$ l)을 동일 부피의 용균용 완충액(2.2 M LiCl, 250 mM HEPES 완충액, pH 7.5, 4%(w/v) LLS 함유)에 가하고 용균물 중의 유기체를 가열 멸균(95 °C에서 15 분 동안)하여 시료의 용균물을 제조하였다. 엠.투버쿨로시스가 임상 시료 중에 존재하는 경우 엠.투버쿨로시스로부터 유래된 표적 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, rRNA 서열)는 용균물 중에 존재할 것이다. 용균물의 분액(250  $\mu$ l)을 동일 부피의, 엠.투버쿨로시스 표적 서열에 특이적인 포획 프로브 및 고체 지지체에 결합된 고정화 프로브를 함유하는 용액과 혼합하였다. 포획 프로브는 엠.투버쿨로시스 rRNA에 상보적인 5' 15 염기 서열, 내부 T<sub>3</sub> 및 3'dA<sub>40</sub> 테일을 함유하는 58 염기 올리고뉴클레오타이드이었다. 고정화 프로브는 카르보디이미드 화학작용(실질적으로는 종래에 문헌[Lund, et al., Nuc. Acids Res. 16:10861-10880, 1988]에 기재되어 있음)에 의해 자성 입자(0.7-1.05  $\mu$ 의 입자, 미국 인디애나주 인디애나폴리스 세러딘 소재)의 고체 지지체에 결합된 폴리-dT<sub>14</sub> 서열이었다. 이 분석에서 반응마다 포획 프로브 5 pmol 및 고정화 프로브 입자 50  $\mu$ g를 사용하였다. 혼합물을 두 다른 온도(60 °C에서 20 분 동안, 25 °C에서 15 분 동안)에서 연속으로 배양하였다. 첫번째 온도에서 엠.투버쿨로시스가 상보적인 포획 프로브의 서열이 표적 서열에 혼성화되었는데, 그 이유는 혼성화 복합체의 T<sub>m</sub>이 60 °C 보다 높기 때문이며, 두번째 온도에서 동중합체 고정화 프로브가 포획 프로브의 상보적 동중합체 영역에 혼성화되었는데, 그 이유는 dA:dT 복합체의 T<sub>m</sub>이 약 50 °C 미만이기 때문이다. 두 온도에서 배양한 후 실제로 실시예 2에 기재된 자기장을 이용하여 자성 비드를 용액으로부터 분리하였다. 엠.투버쿨로시스가 시료 중에 존재하는 경우 이 자성 비드는 고정화 프로브:포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드로 이루어진 혼성화 복합체에 결합하였다. 엠.투버쿨로시스가 시료 중에 존재하지 않는 경우 비드는 고정화 프로브 및 포획 프로브로 이루어진 혼성화 복합체에 결합하였다. 비드를 완충액에 재현탁한 후 자성 분리 단계를 반복함으로써 비드를 세척 시마다 세척 완충액 1 ml로 2 회 세척하였다. 이어서 실제로 문헌[Kacian et al., U.S. Pat Nos. 5,399,491 및 5,554,516]에 기재된 방법을 이용하여 증폭이 수반되는 전사를 하기 위해, 세척된 비드를 핵산 증폭제 용액 75  $\mu$ l에 재현탁하였다. 60 °C에서 10 내지 15 분 동안에 이어 41.5 내지 42 °C에서 5 분 동안, 비드 및 15 pmol의 엠.투버쿨로시스 표적 폴리뉴클레오타이드에 특이적인 각 프라이머를 증발을 막기 위해 불활성 오일층(200  $\mu$ l)으로 덮인 반응 혼합물(40 mM 트리즈마 염기, pH 7.5, 17.5 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% 폴리비닐피롤리돈(PVP), 각각 1 mM의 dNTP, 각각 4 mM의 rNTP)에서 배양하였다. 역전사(25  $\mu$ l 중 약 750 유닛 및 약 2,000 유닛의 T7 RNA 폴리머라제)를 반응 혼합물에 첨가하고 표적 폴리뉴클레오타이드의 증폭을 41.5 내지 42 °C에서 2 시간 동안 진행하였다. 증폭된 엠.투버쿨로시스 표적 서열은 화학발광으로 검출된 AE-표지된 프로브로 검출하고, 실제로 종래에 문헌[U.S. Pat. No. 5,658,737의 25 번째 난 27 내지 46 줄; Nelson et al., 1996, Biochem. 35:8429-8438에서 8432]에 기재된 상대적 밝기 단위(RLU)로 표현하였다. 각 분석시에 음성적 억제제는 시약은 시료 대신 동일 부피의 음성적 타액을 사용한다는 것을 제외하고는 모두 동일한 시약으로 이루어졌고, 양성적 억제제는 시료 대신 50  $\mu$ l의 추출된 전체 세포질 RNA(약 2000 카피의 rRNA를 함유

함)를 포함하면서 모두 동일한 시약으로 이루어졌다. 시료를 각 분석(RLU No.1 및 RLU No.2)에 대해 2회 반복 시험하였다.

(표준 임상적 도말 표본 분석 및(또는) BACTEC 브로쓰 배양 결과를 기초로 함) 엠.투버쿨로시스 존재하에서 각각 양성인 것으로 판명된 15개 임상 시료에 대한 분석 결과를 표 3에 제시하였다.

[표 3]

시료 번호	도말 표본 결과	배양 결과	RLU No. 1	RLU No. 2
1	양성	알 수 없음	$3.04 \times 10^6$	$2.87 \times 10^6$
2	양성	알 수 없음	$3.09 \times 10^6$	$2.99 \times 10^6$
3	양성	알 수 없음	$3.18 \times 10^6$	$3.00 \times 10^6$
4	양성	알 수 없음	$3.28 \times 10^6$	$3.23 \times 10^6$
5	양성	양성	$2.97 \times 10^6$	$3.04 \times 10^6$
6	양성	양성	$3.16 \times 10^6$	$2.94 \times 10^6$
7	알 수 없음	양성	$2.87 \times 10^6$	$2.98 \times 10^6$
8	음성	양성	$3.46 \times 10^4$	$2.05 \times 10^6$
9	음성	양성	$3.11 \times 10^6$	$2.99 \times 10^6$
10	음성	양성	$3.09 \times 10^6$	$3.09 \times 10^6$
11	음성	양성	$1.35 \times 10^6$	$6.15 \times 10^5$
12	음성	양성	$3.01 \times 10^6$	$3.13 \times 10^6$
13	음성	양성	$2.90 \times 10^6$	$2.88 \times 10^6$
14	음성	양성	$3.12 \times 10^6$	$3.07 \times 10^6$
15	음성	양성	$2.93 \times 10^6$	$3.00 \times 10^6$
양성적 억제	적용할 수 없음	적용할 수 없음	$2.98 \times 10^6$	$2.89 \times 10^6$
음성적 억제	적용할 수 없음	적용할 수 없음	$3.45 \times 10^3$	$5.67 \times 10^3$

표 3의 결과로부터 알 수 있듯이, 1종 이상의 임상 시료 분석 결과를 기초로 하였을 때 엠.투버쿨로시스에 양성인 시료 모두는 음성적 억제에 비해 2 단계 혼성화 분석에서 양성인 것으로 시험되었다. 양성적 결과는 음성적 억제 보다 약 10 배 이상 큰 RLU 기록을 갖는 시료를 기초로 하였다. 대부분의 시료에서 양성적 결과는 음성적 억제에 비해 약 100 배 이상 큰 RLU 기록을 기초로 하였다. 일반적으로 시료 중 엠.투버쿨로시스 표적 폴리뉴클레오티드를 지시하는 화학발광 분석은 음성적 억제에서 검출되는 것 보다 약 1,000 배 더 크고 기본적으로는 양성적 억제와 동일하거나 그 이상이다.

#### <실시예 4>

다양한 농도의 네이세리아 고노르호에아에(*Neisseria gonorrhoeae*) 표적의 검출을 위한 2 단계 혼성화 분석

본 실시예는, 본 발명의 2 단계 혼성화를 사용하여 세균 감염의 표지가 되는 표적 폴리뉴클레오티드를 5 fg 정도로 소량 검출할 수 있음을 보였다. 표적 폴리뉴클레오티드는 네이세리아 고노르호에아에(*N. gonorrhoeae*)에 특이적인 rRNA 서열이었다(문헌[Hogen et al. U.S. Pat. No. 5,541,308; Nelson et al. 1996, Biochem. 35: 8429-8438]). 더우기, 상기 결과는, 시료를 0 내지 4 °C에서 3 일간 보관시 약간의 변이를 가지면서 재생가능하였고, 1, 2 및 3 일째에 분석하였다. 분석된 네이세리아 고노르호에아에 표적 폴리뉴클레오티드 5 fg 및 50 fg의 양은 각각 1 개 세포 및 10 개 세포에 존재하는 rRNA와 일치하였다.

사용된 기본 절차는 하기 단계를 포함한다. 각 분석된 시료는, 물 400  $\mu$ l 중의 네이세리아 고노르호에아에 표적 폴리뉴클레오티드 0 fg(음성 대조), 5 fg 및 50 fg 중 어느 하나의 수용액 20  $\mu$ l를 합성 소변 대조(KOVATROL(상표명); Hycor Biomedical, Inc.) 400  $\mu$ l, 및; 네이세리아 고노르호에아에 표적 폴리뉴클레오티드 및 dT<sub>3</sub>dA<sub>30</sub> 서열에 상보적인 서열을 갖는 포획 올리고뉴클레오티드(6.25 nM) 함유 표적 포획(capture) 완충액(TCB: pH 7.5의 2.2 M LiCl, 250 mM HEPES 완충액 함유) 200  $\mu$ l과 혼합하였다. 고상 지지체로서 자기 입자에 부착된 고정 dT<sub>14</sub> 프로브를 100  $\mu$ g/ml로 가하고, 상기 혼합물을 2 개의 다른 온도(60 °C에서 20 분 및 25 °C에서 15 분)에서 연속적으로 반응시켰다. 포획 프로브: 표적 폴리뉴클레오티드 복합체의 T<sub>m</sub>이 60 °C를 넘기 때문에, 제1 온도에서 포획 프로브 및 표적 폴리뉴클레오티드를 혼성화하였고, dA:dT 복합체의 T<sub>m</sub>이 약 25 °C 미만이기 때문에, 제2 온도에서 고정 프로브 및 포획 프로브의 폴리-dA 부분을 혼성화하였다. 반응 후, 실시예 2에 기재된 바와 유사하게 자기장을 사용하여 용액으로부터 자기 비드를 분리하였다. 네이세리아 고노르호에아에 표적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 시료에 대하여, 자기 비드는 고정 프로브:포획 프로브:표적 폴리뉴클레오티드 복합체를 부착하는 반면, 음성 대조 시료에 대하여, 비드는 고정 프로브:포획 프로브를 부착하였다. 그 후, 실시예 3에 기재된 바와 유사하게 비드를 2 회 세척하고, 세척된 비드를 핵산 증폭 시약 75  $\mu$ l 중에 재현탁시키고, 네이세리아 고노르호에아에



표적 폴리뉴클레오티드에 특이적인 프라이머를 사용하여 실시예 3에 기재된 바와 같이 실질적으로 증폭시켰다. 증폭 후, 실시예 3에 기재된 바와 같이 화학발광 분석을 사용하여 검출된 AE-표지된 프로브를 사용하여, 증폭된 표적 서열을 검출하였고, 상기 신호를 상대적 광단위(RLU)로 표시하였다. 각 분석일에 대하여, 동일한 시약을 사용하여 음성 대조 및 양성 대조의 배경 RLU를 결정하였다. 각 실험 시료에 대한 RLU 결과를 포함하여 상기 분석 결과를 표 4에 나타내었고, 각 분석일에 대하여 2 개의 양성 대조 및 10 개의 음성 대조의 평균값을 얻었다. (두 개 시료의 평균) 배경값은, 각 1, 2 및 3 일에 대하여  $6.81 \times 10^2$ ,  $1.18 \times 10^3$  및  $6.61 \times 10^2$  RLU이었다.

[표 4]

시료	표적(fg)	1일째의 RLU	2일째의 RLU	3일째의 RLU
1	5	$7.78 \times 10^5$	$6.46 \times 10^5$	$6.95 \times 10^5$
2	5	$7.73 \times 10^5$	$7.08 \times 10^5$	$7.06 \times 10^5$
3	5	$8.30 \times 10^5$	$7.00 \times 10^5$	$6.57 \times 10^5$
4	5	$7.69 \times 10^5$	$7.34 \times 10^5$	$7.60 \times 10^5$
5	5	$7.73 \times 10^5$	$7.76 \times 10^5$	$7.95 \times 10^5$
6	5	$7.01 \times 10^5$	$6.47 \times 10^5$	$7.14 \times 10^5$
7	5	$7.32 \times 10^5$	$6.70 \times 10^5$	$7.63 \times 10^5$
8	5	$7.84 \times 10^5$	$7.23 \times 10^5$	$7.06 \times 10^5$
9	5	$7.45 \times 10^5$	$7.17 \times 10^5$	$7.18 \times 10^5$
10	5	$7.45 \times 10^5$	$7.11 \times 10^5$	$7.68 \times 10^5$
11	50	$8.58 \times 10^5$	$7.51 \times 10^5$	$7.57 \times 10^5$
12	50	$8.20 \times 10^5$	$4.61 \times 10^5$	$7.77 \times 10^5$
13	50	$7.66 \times 10^5$	$6.99 \times 10^5$	$7.21 \times 10^5$
14	50	$7.85 \times 10^5$	$7.97 \times 10^5$	$7.45 \times 10^5$
15	50	$8.17 \times 10^5$	$7.80 \times 10^5$	$7.76 \times 10^5$
16	50	$7.98 \times 10^5$	$7.33 \times 10^5$	$7.42 \times 10^5$
17	50	$7.51 \times 10^5$	$7.36 \times 10^5$	$7.41 \times 10^5$
18	50	$7.76 \times 10^5$	$8.01 \times 10^5$	$7.80 \times 10^5$
19	50	$7.24 \times 10^5$	$7.27 \times 10^5$	$7.62 \times 10^5$
20	50	$7.74 \times 10^5$	$7.54 \times 10^5$	$7.70 \times 10^5$
음성 대조(10)	0	201범위:167 내지 283	-218범위:0 내지 -578	74범위 0 내지 148

표 4에 나타낸 결과, 2 단계 혼성화 분석은 동일한 조건하에 시험된 표적 폴리뉴클레오티드를 함유하지 않는 시료의 것을 훨씬 넘는 화학발광을 내는, 5 fg 만량이나 소량의 네이세리아 고노르호에아에 표적 폴리뉴클레오티드를 재생가능하게 검출할 수 있음을 보였다. 더욱이, 시료를 3 일에 걸쳐 보관하고 상기 방법을 사용하여 재시험할 경우, 전체 시간에 대하여 상기 결과의 우수한 재생성을 보였다. 또한, 상기 결과는 3 일에 걸쳐 시료 대 시료의 우수한 재생성을 보였다.

#### <실시예 5>

임상 소변 시료내 세균을 검출하기 위한 2 단계 혼성화 분석

본 실시예는, 본 발명의 2 단계 혼성화를 사용하여 임상 소변 시료를 사용하여 세균 감염을 나타내는 표적을 검출할 수 있음을 보였다. 표적 폴리뉴클레오티드는 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*)에 특이적인 서열이었다. PCR-기초 분석을 사용하여, 클라미디아 트라코마티스에 대하여 독립적으로 시료를 시험하였고, 2 단계 혼성화 방법으로 얻어진 결과를 PCR-기초 분석으로 얻어진 결과를 비교하였다. PCR-기초 분석 결과를 기준으로 한 이들의 분류(양성 또는 음성)에 대하여 램덤 배열된 시료와 함께 2 단계 혼성화 방법을 사용하여 소변 시료를 2 중으로 시험하였다.

간략하게, 2 단계 혼성화 분석 절차는 하기와 같다. 각 반응 튜브는 클라미디아 트라코마티스 표적 폴리뉴클레오티드 및  $dT_{30}dA_{30}$  서열에 상보적인 서열을 갖는 포획 올리고뉴클레오티드 6.25 pmol 함유 TCB(실시예 4에 기재) 200  $\mu$ l을 포함하였고, 여기에 제조된 소변 시료(소변 400  $\mu$ l + TM 완충액 (100 mM  $(NH_4)_2SO_4$ , 50 mM HEPES, pH 7.5, 8 % LLS) 800  $\mu$ l 또는 대조(음성 대조는 KOVATROL(상표명) 400  $\mu$ l + TM 완충액 400  $\mu$ l이고, 양성 대조는 KOVATROL(상표명) 400  $\mu$ l + 클라미디아 트라코마티스 세포 RNA(즉, rRNA 표적 폴리뉴클레오티드) 5 fg를 함유하는 TM 완충액 400  $\mu$ l임) 800  $\mu$ l를 가하였다. 상기 튜브를 밀봉하여 혼합하고, 60 °C에서 30 분 및 40 °C에서 30 분 반응시켰다. 그 후, 상기 튜브를 자기장에 놓고, 고정 프로브를 갖는 자기 비드를 용액으로부터 분리시키고, 고정 성분을 실시예 2에 기재된 바와 같이 실질



적으로 2 회 세척하였다. 포획 프로브: 표적 폴리뉴클레오티드 복합체의  $T_m$ 이 60 °C를 넘기 때문에, 60 °C에서 포획 프로브 및 클라미디아 트라코마티스 표적 폴리뉴클레오티드를 혼성화하였고, dA:dT 복합체의  $T_m$ 이 약 52 °C 미만이기 때문에, 제2 온도에서 고정 폴리-dT 프로브 및 포획 프로브의 폴리-A 부분을 혼성화하였다. 증폭 시간이 1 시간인 것을 제외하고는, 실시예 3에 기재된 바와 같이, 75  $\mu$ l의 전사-관련 증폭용 시약 및 클라미디아 트라코마티스 표적 서열에 특이적인 프라이머를 사용하여 표적 폴리뉴클레오티드를 증폭시켰다. 클라미디아 트라코마티스 표적 서열에 특이적인 AE-표지된 프로브(100  $\mu$ l)를 가하여 혼합하고, 상기 혼합물을 60 °C에서 20 분 반응한 후, 선택 시약 300  $\mu$ l를 가하여 혼합하고, 반응한 후, RLU로서 검출하였다(실시예 3 참조).

표 5에는 2 단계 혼성화 분석("RLU"는 30 개의 소변 시료에 대한 2 중 시험의 평균이고, 5 개의 양성 대조 및 5 개의 음성 대조의 평균임) 및 PCR-기초 시험(클라미디아 트라코마티스 핵산 검출용 양성 및 음성)의 결과를 나타내었다.

[표 5]

시료 번호	PCR결과	RLU	시료 번호	PCR결과	RLU
1	양성	$4.42 \times 10^5$	17	음성	0
2	음성	$1.66 \times 10^3$	18	양성	$3.59 \times 10^5$
3	양성	$2.95 \times 10^5$	19	양성	$3.64 \times 10^5$
4	음성	0	20	양성	$3.51 \times 10^5$
5	양성	$1.62 \times 10^5$	21	양성	$3.75 \times 10^5$
6	양성	$4.15 \times 10^5$	22	음성	$9.15 \times 10^3$
7	양성	$5.76 \times 10^5$	23	양성	$3.21 \times 10^5$
8	음성	$3.692 \times 10^3$	24	음성	0
9	양성	$4.45 \times 10^5$	25	양성	$4.59 \times 10^5$
10	음성	0	26	음성	8
11	양성	$5.50 \times 10^5$	27	양성	$3.07 \times 10^5$
12	음성	0	28	양성	$3.52 \times 10^5$
13	음성	0	29	음성	0
14	음성	0	30	음성	0
15	음성	0	양성 대조	적용할 수 없음	$3.14 \times 10^5$
16	음성	0	음성 대조	적용할 수 없음	0

표 5에서 볼 수 있는 바와 같이, 분석된 모든 시료에서 2 단계 혼성화 방법은 PCR 기초 분석을 사용하여 독립적으로 포지티브 시험된 이들 시료에 대하여 양성 결과를 내었고, PCR-기초 분석을 사용하여 음성 시험된 모든 시료에 대하여, 또한 2 단계 혼성화 방법에 의해서 분석시 시료는 음성였다. 상대적으로 높은 ( $10^3$ ) 음성 신호를 갖는 음성 시료(시료 2, 8 및 22)에 대하여, 2중 분석은 항상 하나의 "0" RUL 신호 및 하나의 비교적 높은 배경 신호를 포함하였다. 따라서, 2 단계 혼성화 분석을 사용하여 임상적 소변 시료에 존재하는 세균을 검출할 수 있고, PCR 분석에서 얻어진 것들과 비교하여 양성 또는 음성 결과를 제공할 수 있었다.

#### <실시예 6>

시료 중 다중 박테리아 표적을 검출하기 위한 2단계 혼성화 분석

본 실시예는 본 발명의 2단계 혼성화 방법이 단일 시료 중 상이한 종의 박테리아 감염을 표시하는 다중 표적을 검출하기 위해 사용될 수 있음을 보여준다. 표적 폴리뉴클레오티드들은 나이제리아 고노로에(*Neisseria gonorrhoeae*) 및 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*)에 특이적인 서열들이고, 분석은 실질적으로 실시예 3 내지 6에 기술된 바와 같이 수행하였다. 이들 시료들을 또한 오염물 (1% 내지 10%(v/v) 혈액)로 스파이킹하였다.

분석은 실질적으로 실시예 3 내지 6에 기술된 바와 같이 수행하였고, 여기에서, 시료들은 표적 폴리뉴클레오티드를 함유하지 않거나 (음성 대조군); 5 fg의 클라미디아 트라코마티스 표적 폴리뉴클레오티드; 5 fg의 나이제리아 고노로에 표적 폴리뉴클레오티드; 또는 5 fg의 클라미디아 트라코마티스 표적 폴리뉴클레오티드와 5 fg의 나이제리아 고노로에 표적 폴리뉴클레오티드의 혼합물을 함유하는 정상노 (박테리아 오염이 없음)로 이루어졌다. 각각의 시료 세트에 대해, 분석 튜브는 또한 0%, 1%, 5% 또는 10%(v/v) 혈액을 포함하였다. 화학발광성 프로브를 사용하는 2개의 표적 서열의 동시 검출법은 클라미디아 트라코마티스 표적 폴리뉴클레오티드에 특이적인 오르토-F-AE 표지 프로브와 나이제리아 고노로에 표적 폴리뉴클레오티드에 특이적인 2-Me-AE 표지 프로브를 사용하는 실질적으로 문헌[넬슨(Nelson) 등, 1996, *Biochem.* 35:8429-8438, 8432에서]에 기술된 바와 같았다. 혈액 오염물이 상기한 바와 같이 시료 중 일부에 포함되는 것을 제외하고는, 실질적으로 실시예 5에 기술된 바와 같은 연속 혼성화 단계를 위해 노 시료를 제조하여 60°C에서 30분간, 이어서 40°C에서 30분간 인큐베이팅시켰다. 혼성화 복합체에서 고정된 프로브를 자기장과 세척 단계를 이용하여 정제하고, 정제된 표적 서열을 실시예 4 및 5에 기술된 바와 같은 클

라미디아 트라코마티스 표적 폴리뉴클레오티드와 나이제리아 고노로애 표적 폴리뉴클레오티드에 특이적인 프라이머들을 포함한 전사-연합 증폭 절차를 이용하여 증폭시켰다. 검출 시약을 첨가하고, 클라미디아 트라코마티스-특이적 표지 프로브와 나이제리아 고노로애-특이적 표지 프로브로부터 동시 화학발광을 검출하였다. 각각의 유형의 분석 시료에 대해, 4회 반복 분석하였고, RLU 결과 (각각의 유형의 시료에 대한 평균값)를 하기 표 6에 나타냈다. 표 6에서, 클라미디아 트라코마티스-특이적 표지 프로브에 대해 검출된 신호 (RLU)는 "CT"로 표시하고, 나이제리아 고노로애-특이적 표지 프로브에 대해 검출된 신호는 "NG"로 표시하였다.

[표 6]

	음성 대조군	클라미디아 트라코마티스 표적	나이제리아 고노로애 표적	클라미디아 트라코마티스+나이제리아 고노로애 표적
혈액 없음	CT: 1NG: $1.86 \times 10^2$	CT: $2.18 \times 10^5$ $4.05 \times 10^2$	NG:CT: $4.90 \times 10^3$ $9.37 \times 10^5$	CT: $2.22 \times 10^5$ NG: $9.37 \times 10^5$
1% 혈액	CT: 52NG: $4.41 \times 10^2$	CT: $2.73 \times 10^5$ $1.38 \times 10^3$	NG:CT: $4.64 \times 10^3$ $9.54 \times 10^5$	CT: $1.73 \times 10^5$ NG: $9.80 \times 10^5$
5% 혈액	CT: 27NG: $4.42 \times 10^2$	CT: $1.91 \times 10^5$ $1.66 \times 10^3$	CTNG:ONG: $1.06 \times 10^6$	CT: $1.65 \times 10^5$ NG: $9.19 \times 10^5$
10% 혈액	CT: 14NG: $1.36 \times 10^2$	CT: $2.13 \times 10^5$ $1.85 \times 10^3$	CTNG:ONG: $1.05 \times 10^6$	CT: $1.35 \times 10^5$ NG: $1.12 \times 10^6$

표 6에 제시된 결과는 2단계 혼성화 분석이 단일 시료에서 2개의 표적을 동시에 검출하기 위해 사용될 수 있음을 보여준다. 음성 대조군은 클라미디아 트라코마티스 표적 단독, 나이제리아 고노로애 표적 단독 또는 합한 표적들을 함유하는 시료들의 신호에 비해 본질적으로 무시가능한 신호를 나타냈다. 두 표적의 검출은 10%(v/v) 까지의 혈액 오염물에 의해서도 저해되지 않았으며, 두 표적은 모두 10%(v/v) 까지의 혈액 오염물을 갖는 단일 시료에서도 동시에 검출되었다.

본 발명의 몇몇 실시태양을 본원에서 기술하였지만, 첨부된 특허 청구 범위에 정의된 본 발명의 취지와 범위를 벗어나지 않으면서 특정 프로브에 대해 다양한 변경을 할 수 있다.

## SEQUENCE LISTING

<110> GEN-PROBE INCORPORATED  
 <120> TWO-STEP HYBRIDIZATION AND CAPTURE OF A POLYNUCLEOTIDE  
 <130> GP088-KR  
 <140> PCTWUS98W08853  
 <141> 1998-05-01  
 <150> US 60/045,430  
 <151> 1997-05-02  
 <160> 2  
 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 <210> 1  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

<400> 1  
 gaactactta gttccaatga ctgtttaaaa aaaaaaaaaa

40

<210> 2  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic

construct

<400> 2

cagtcattgg aactaagtag ttc

23

### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1

a) 표적 폴리뉴클레오타이드, 포획 프로브, 및 고정된 프로브를 포함하는 혼합물을 포획 프로브와 표적 폴리뉴클레오타이드로 이루어진 포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드의 혼성화 복합체의 형성을 유리하게 하며 고정된 프로브와 포획 프로브로 이루어진 고정된 프로브:포획 프로브의 혼성화 복합체의 형성은 불리하게 하는 제1 혼성화 조건에서 반응시키는 단계; 및

b) 이어서 고정된 프로브:포획 프로브의 혼성화 복합체의 형성을 유리하게 하는 제2 혼성화 조건에서 이 혼합물을 반응시킴으로써 고정된 프로브, 포획 프로브 및 표적 폴리뉴클레오타이드로 이루어진 고정된 프로브:포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드의 혼성화 복합체에서 표적 폴리뉴클레오타이드를 포획하는 단계

를 포함하는, 시료에 존재하는 표적 폴리뉴클레오타이드의 포획 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 제1 반응 단계에서는 포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드의 혼성화 복합체의  $T_m$  이하의 온도 및 고정된 프로브:포획 프로브의 혼성화 복합체의  $T_m$  이상의 온도를 사용하고, 제2 반응 단계에서는 고정된 프로브:포획 프로브의 혼성화 복합체의  $T_m$  이하의 온도를 사용하는 방법.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 제2 반응 단계가 제1 혼성화 조건의 온도를 약 10℃ 이상 감소시키는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 4

제2항에 있어서, 제2 반응 단계가 제1 혼성화 조건의 온도를 약 20℃ 이상 감소시키는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 5

제2항에 있어서, 제1 반응 단계에서 약 60℃의 온도를 사용하고 제2 반응 단계에서 약 40℃ 이하의 온도를 사용하는 방법.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 고정된 프로브:포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드의 혼성화 복합체를 정제하는 단계를 더 포함하는 방법.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 표지된 프로브를 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼성화하고 표지된 프로브를 검출함으로써 고정된 프로브:포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드의 혼성화 복합체에서 표적 폴리뉴클레오타이드를 검출하는 단계를 더 포함하는 방법.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 폴리뉴클레오타이드를 증폭시켜 증폭된 핵산을 생성하는 단계를 더 포함하는 방법.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 증폭 단계가 전사와 결부된 증폭을 포함하는 방법.

#### 청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 증폭된 핵산을 검출하는 단계를 더 포함하는 방법.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 검출 단계가 표지된 프로브를 표적 폴리뉴클레오타이드에 상보적인 증폭된 핵산에 혼성화하고 표지된 프로브를 검출하는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 12

제7항 또는 제11항에 있어서, 검출 단계가 혼성화되지 않은 표지된 프로브를 제거하는 것을 더 포함하는 방법.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 두 반응 단계 모두가

길이가 5개 이상의 뉴클레오타이드 염기인 인지 기의 포획 프로브 결합 영역을 포함하는 고정된 프로브, 및 길이가 5개 이상의 뉴클레오타이드 염기인 인지 기의 고정된 프로브 결합 영역을 포함하는 포획 프로브를 포함하고, 포획 프로브-결합 영역이 고정된 프로브 결합 영역에 대해 상보적인 것인 방법.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 포획 프로브 결합 영역이

(a) 하나 이상의 당-포스포디에스테르 결합, 또는 하나 이상의 펩티드 핵산기, 하나 이상의 포스포로티오에이트 결합, 또는 그의 조합된 결합을 포함하는 제1 골격, 및

(b) 제1 골격에 결합되어 있으며 각 뉴클레오타이드 인지 기는 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민, 우라실 또는 이노신과 수소결합할 수 있는 10개 이상의 뉴클레오타이드 염기 인지 기를 포함하며;

고정된 프로브 결합 영역은

(a) 하나 이상의 당-포스포디에스테르 결합, 또는 하나 이상의 펩티드 핵산 기, 하나 이상의 포스포로티오에이트 결합 또는 그의 배합된 결합을 포함하는 제2 골격, 및

(b) 제1 골격에 결합된 뉴클레오타이드 염기 인지 기에 수소결합할 수 있는 제2 골격에 결합된 10개 이상의 뉴클레오타이드 염기 인지 기를 포함하는 방법.

**청구항 15**

제13항 또는 제14항에 있어서, 포획 프로브 결합 영역이 10개 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 동종중합체로 이루어지고, 고정된 프로브 결합 영역이 25개 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 동종중합체로 이루어지며, 그 중 10개 이상의 뉴클레오타이드는 포획 프로브 결합 영역의 10개의 뉴클레오타이드에 상보적인 것인 방법.

**청구항 16**

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 포획 프로브 결합 영역이 약 14개의 인접한 A 또는 T 염기를 포함하며, 고정된 프로브 결합 영역이 여기에 상보적인 약 30개의 염기 서열을 포함하는 방법.

**청구항 17**

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 반응 단계가 고정된 프로브 및 포획 프로브를 포함하는 혼합물을 사용하고, 각 프로브는 데옥시뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 2'-메톡시 치환 뉴클레오타이드, 2'-할로 치환 뉴클레오타이드 성분, 또는 그의 배합물을 포함하는 방법.

**청구항 18**

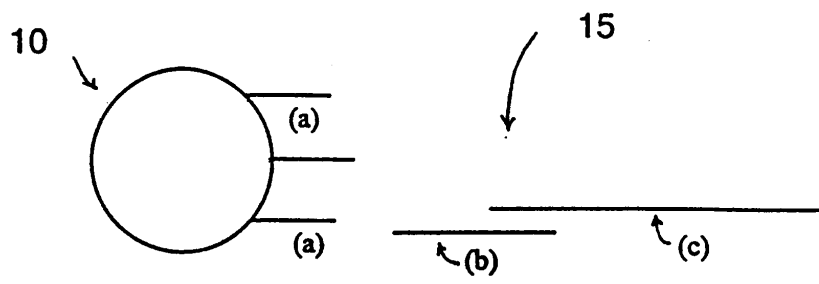
- 시료에 존재하는 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼성화할 수 있는 포획 프로브를 제공하는 단계;
- 포획 프로브와 표적 폴리뉴클레오타이드의 혼성화를 유리하게 하는 제1 반응 온도에서 포획 프로브와 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함하리라 여겨지는 시료를 혼합함으로써 포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드의 복합체를 생성하는 단계;
- 포획 프로브에 혼성화할 수 있는 고정된 프로브를 제공하는 단계;
- 고정된 프로브와 포획 프로브의 혼성화를 유리하게 하는 제2 반응 온도에서 포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드의 복합체와 고정된 프로브를 반응시킴으로써 고정된 프로브:포획 프로브:표적 폴리뉴클레오타이드 복합체를 포함하는 포획된 표적 폴리뉴클레오타이드를 생성하는 단계;
- 포획된 표적 폴리뉴클레오타이드를 정제함으로써 정제된 표적 폴리뉴클레오타이드를 생성하는 단계;
- 정제된 표적 폴리뉴클레오타이드를 증폭시킴으로써 증폭된 핵산을 생성하는 단계;
- 증폭된 핵산을 검출하여 시료에 표적 폴리뉴클레오타이드가 존재하는지를 측정하는 단계를 포함하는, 시료에서 표적 폴리뉴클레오타이드의 존재를 측정하는 방법.

**청구항 19**

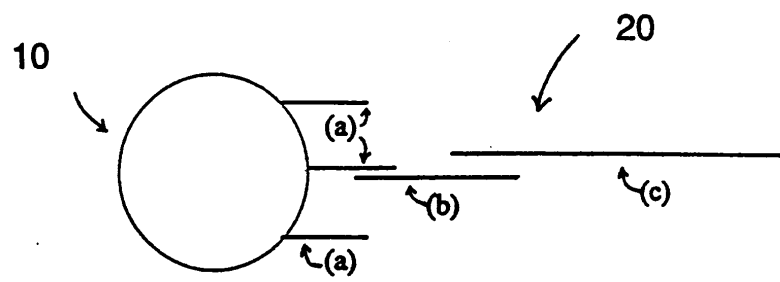
제18항에 있어서, 검출 단계가 표지된 프로브를 표적 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 일부에 상보적인 증폭된 핵산에 혼성화하여 표지된 프로브를 검출하는 것을 포함하는 것인 방법.

**도면**

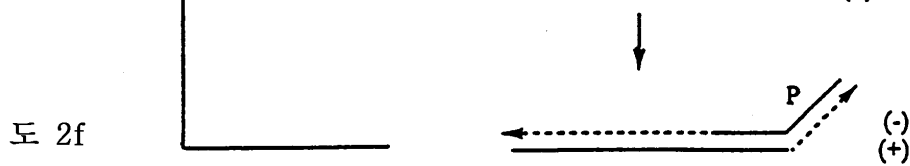
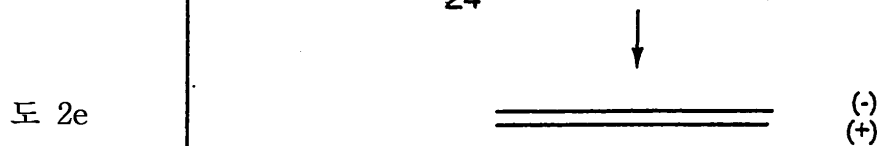
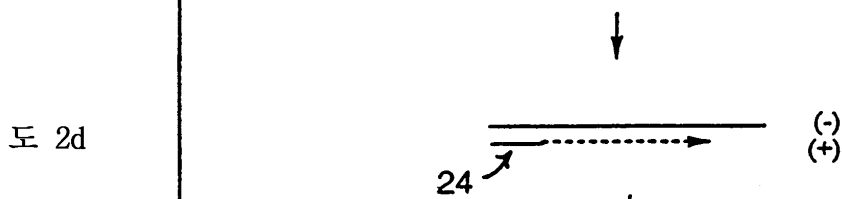
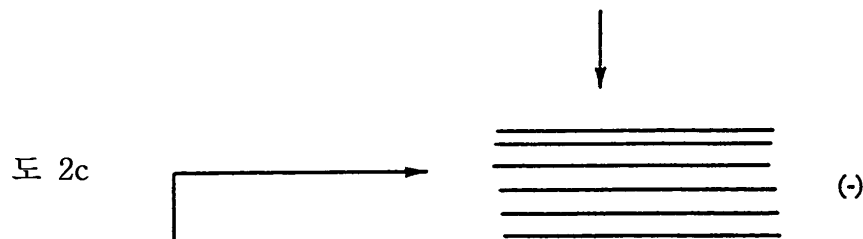
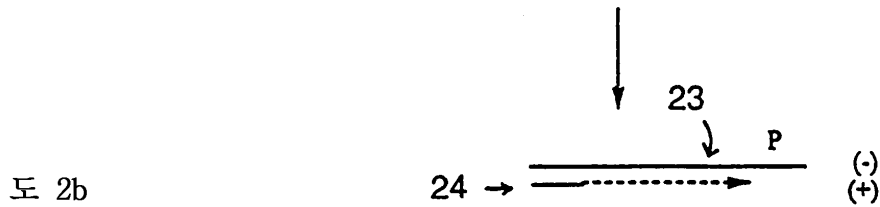
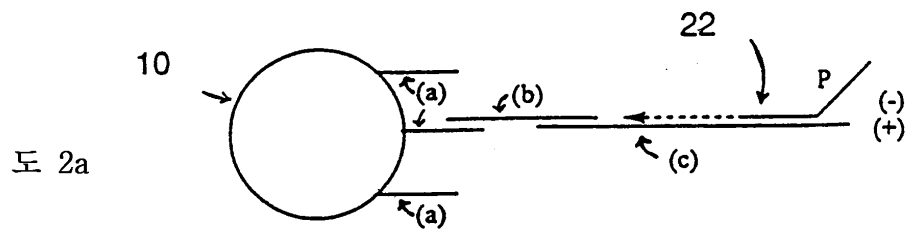
도면 1a



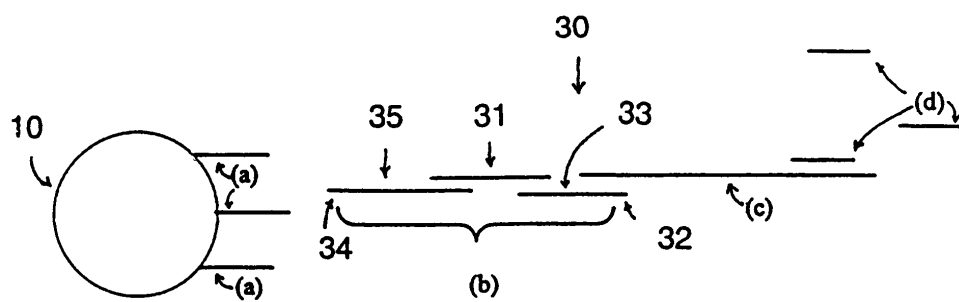
도면 1b



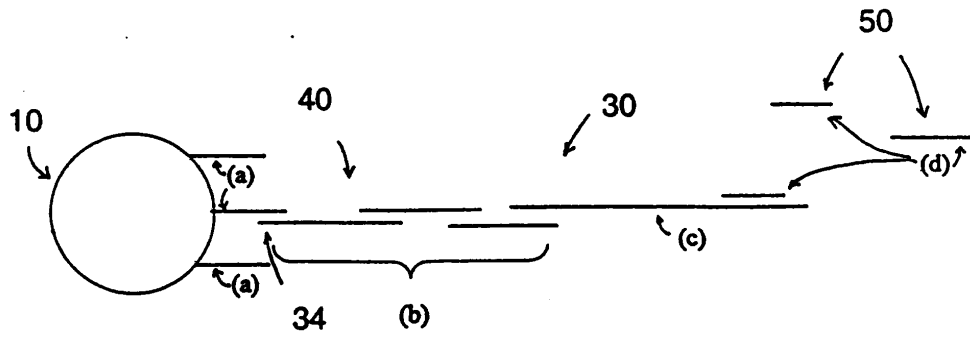
## 도면2



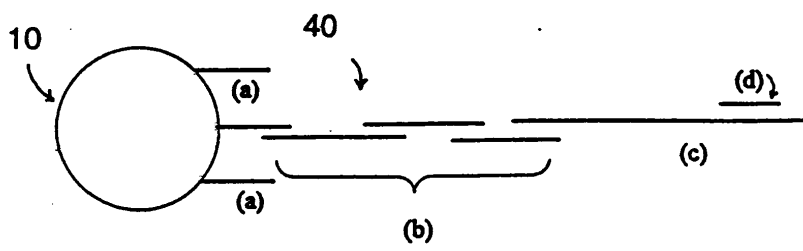
## 도면3a



도면3b



도면3c





도면4

