(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
C12Q 1/68

(11) 공개번호 10-2004-0068122
(43) 공개일자 2004년07월30일

(21) 출원번호 10-2004-7005611
(22) 출원일자 2004년04월16일
번역문 제출일자 2004년04월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US2002/033012
(87) 국제공개번호 WO 2003/034029
(86) 국제출원출원일자 2002년10월15일
(87) 국제공개일자

(30) 우선권주장
60/329,427 2001년10월15일 미국(US)
60/329,428 2001년10월15일 미국(US)
60/329,619 2001년10월15일 미국(US)
60/329,620 2001년10월15일 미국(US)
60/364,416 2002년03월14일 미국(US)

(71) 출원인 바이오어레이 솔루션스 리미티드
미국, 뉴저지 07059, 워렌, 테크놀러지 드라이브 35

(72) 발명자 리,알리스시앙
미국,뉴욕14850,이타카,에스테이트드라이브5

하시미,가자라
미국,뉴저지07733,홀름델,아고스티나드라이브53

세울,마이클
미국,뉴저지07023,판우드,플리즌트애버뉴84

(74) 대리인 강명구

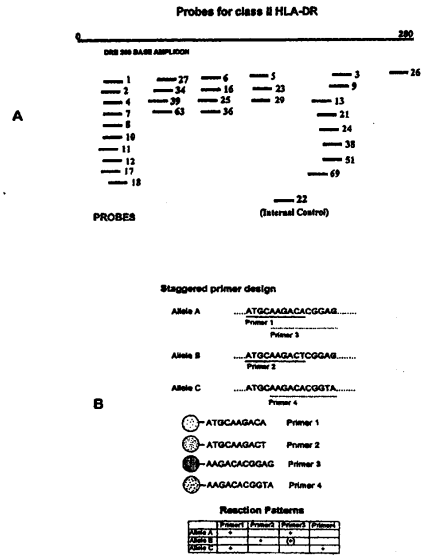
심사청구 : 없음

(54) 공동 검색과 효소-매개된 탐지에 의한 다형성 좌위의 다중분석

요약

본 발명은 적어도 한군데 이상의 지정된 위치에서 지정된 위치에 근접하게 위치한 비-지정 위치로부터 간섭받지 않고 다형성을 확인하는 방법과 그 공정을 제공한다. 지정된 각 부위의 조성을 결정하기 위해 지정 부위를 검색할 수 있는 프로브가 제공된다. 본 발명의 방법을 이용하여 CFTR 유전자와 HLA 유전자 내에 한가지 이상의 다형성을 확인할 수 있다.

대표도



명세서

기술분야

본 출원은 2001년 10월 14일 제출된 미국 분할 출원 60.329,427, 2001년 10월 15일 제출된 미국 분할 출원 60/329,620, 2001년 10월 14일 제출된 미국 분할 출원 60/329,428, 2001년 10월 15일 제출된 미국 분할 출원 60/329,619에 우선권을 주장한다.

본 발명은 분자 진단 및 유전자 유형분석(typing)이나 프로필링(profiling)에 관한다. 본 발명은 고도 다형성 유전자의 다중 분석을 위한 방법, 과정, 프로브에 관한다. 본 발명은 또한, 사람 백혈구 항원(HLA) 유전자 복합체와 낭포성 섬유증 전도성 막통 조절유전자(CFTR)의 분자 유형분석과 프로필링 및 이와 관련된 조성물, 방법, 설계에 관한다.

배경기술

이해(利害) 유전자의 핵산 서열에서 다형성을 효과적이고 신속하며 명확하게 분석하는 능력은 분자 진단 분석법의 개발에 중요한 역할을 하는데, 상기 분석법은 유전자 검사(genetic testing), 담체 스크리닝(carrier screening), 유전자 형분석(genotyping)이나 유전자 프로필링(genetic profiling), 동일성 검사(identity testing) 등에 이용된다. 가령, 유전자 검사와 담체 스크리닝의 목적은 특정 질환과 연관된 돌연변이가 이해 유전자에 존재하는 지를 결정하는 것이다. 질환을 유발하는 것으로 공지된 돌연변이를 포함하는 지의 여부와 상관없이, 다형성 좌위의 분석은 예로써 약리유전학적 유전자형분석 또는 HLA 분자 유형분석에서 임상적 이점을 제공하는데, 여기서 이식 공여자와 수용자의 HLA 좌위에서 대립유전자 대합(matching)의 정도는 동종 조직과 골수 이식의 배경에서 결정된다.

다량 환자 시료의 분석을 조장하는 것이 바람직한 다형성의 다중 분석은 새로운 다형성, 유전자 마커, 돌연변이가 확인되고 분석에 포함됨에 따라 증가하게 되는 상당한 수준의 복잡성에 직면한다. 높은 시료량을 수용하면서 신뢰할만한 분석 성과를 담보하기 위한 다중 형식의 분석에서 이런 복잡성을 처리하는 현존 방법의 한계 및 다형성과 돌연변이의 다중 분석의 신규한 방법의 결과적 요구가 본 발명의 요부이다. 가령, 낭포성 섬유증 막통 전도성(CFTR) 채널과 사람 백혈구 항원(HLA)을 인코드하는 유전자 좌위는 본 발명의 방법으로 분석한다. 섬유성 낭포증(CF)은 백인에서 가장 흔한 퇴행 질환중 하나이며, 미국에서 이환률이 2000명당 1명이다. 인구의 대략 4%는 CF 돌연변이중 하나를 보유한다. CFTR 유전자는 매우 가변적이다: 900개 이상의 돌연변이가 지금까지 동정되었다(http'//www.genet.sickddds.on.ca/cftr). CFTR 유전자의 특성화는 서열-특이적 프로브의 개발을 조장함으로써 CF의 분자 진단에 열쇠를 제공한다(Rommens et al., 1989; Riordan, et al., 1989; Kerein et al., 1989). 국립보건원(NIH)-후원 Consensus Development Conference는 CF의 양성 가족력을 갖 는 성인에서 CFTR 돌연변이에 대한 담체 스크리닝을 권고하였다(NIH 1997). American College of Medical Genetics(ACMG)의 Committee on Carrier Screening은 미국의 전체 인구에서 >0.1% 대립형질 빈도로 발생하는 25가지 CF 돌연변이를 포함하는 범-민족적 돌연변이 패널을 전체 인구 담체 스크리닝에 사용할 것을 권고하였다(http://www.faseb.org/genetics/acmg). ACMG 패널에서 돌연변이에는 아시케나지 유대인(Ashkenazi Jewish)과 흑인 인구에서 가장 흔한 돌연변이 역시 포함된다.

CFTR 돌연변이를 검출하기 위한 여러 방법이 보고되었다: 변성 구배 겔 전기영동법(Devoto et al., 1991); 단일 가

닥 형태 다형성 분석법(Plieth et al., 1992); RFLP(Friedman et al., 1991); 대립유전자-특이적 프라이머(ASP)로 증폭(Gremonesi et al., 1992), 대립유전자 특이적 올리고뉴클레오티드로 프로빙(probing)(ASO)(Saiki et al., 1986). 광범위하게 이용되는 방법은 PCR 증폭, 이후 증폭된 표적 가닥의 막으로의 블랏팅 및 정상('야생형') 또는 변이 형태에 대합하도록 설계된 올리고뉴클레오티드 가닥의 프로빙을 수반한다. 특히, 12 CF 돌연변이를 선별하는데 이런 도트 블랏 형식의 ASO 혼성화와 함께 다중 PCR이 이용되었다(Shuber et al., 1993). 여러 경우에, 기질-고정화 올리고뉴클레오티드 프로브의 어레이를 사용하여 '역 도트 블랏'형식으로 공지된 게놈 DNA 서열 변이의 탐지를 조장하였다(Saiki, RK et al., 1989). 사진식각 과정(photolithographic processes)에 의해 in-situ 합성된 짧은 올리고뉴클레오티드의 어레이를 사용하여 CFTR 유전자의 코딩 영역에서 공지된 돌연변이를 탐지하였다(Cronin, MT., et al., 1996). 역전사효소를 이용한 프라이머 연장은 CFTR에서 A508 돌연변이를 탐지하는 방법으로 보고되었다(Pastinen,T. , 2000). 이런 방식은 1989년에 처음 보고되었다(Wu, D. Y. et al, Proc. Nad. Acad. SE USA. 86:2757-2760(1989), Newton, C. R. et al, Nucleic Acids Res. 17:2503-2506(1989)). 아래에 더욱 상세하게 기술한 바와 같이, 이들 방법은 연구실 환경에서 적합한 탐지를 제공하긴 하지만, 많은 노동을 필요로 하고 처리속도가 완만하며 시료 처리량이 매우 적기 때문에 시료당 높은 비용을 필요로 한다.

반점 마이크로어레이와 관련하여, 여러 스포팅(spotting) 방법 및 많은 기질 재료와 프로브 고정화 방법이 보고되었다. 하지만, 현존 방법의 반점 어레이는 현저한 어레이-어레이 변이성뿐만 아니라 현저한 반점-반점 변이성을 보이는데, 이는 분석 신뢰성과 감수성을 제한한다. 이에 더하여, 반점 어레이는 500 ㎛ 중심에서 100 ㎛ 직경의 현행 반점 크기 이상으로 소형화시키는 것이 어렵기 때문에, 전체 시료량이 증가하고 혼성화 분석의 성과를 제한하는 느린 분석 동역학의 원인이 되는데, 반점 어레이에서 혼성화 분석을 완결하는데 18시간이 소요될 수 있다. 게다가, 반점 어레이의 사용은 매우 전문적인 공초점 레이저 스캐닝 기구를 통한 판독을 수반한다. 대안적 방식으로 사진식각 과정에 의해 in-situ 합성된 올리고뉴클레오티드 어레이가 보고되었다. 하지만, 어레이 제조의 복잡성은 기계적인 맞춤(customization)을 제한하고 진단 응용의 유통성 부족으로 상당한 비용이 발생한다.

주요 조직접합성 복합체(MHC)는 사람의 6번 크로모좀의 단완(short arm)에 위치하는 사람 백혈구 항원(BLA) 유전자 복합체를 보유한다. 상기 영역은 세포-세 포 상호작용 기초 면역 반응을 조절하는 세포-표면 단백질을 인코드한다. 다양한 I형 HLA 좌위는 세포 표면에서 β-2 마이크로글로불린과 결합하고 세포독성 T 림프구에 의한 표적 세포의 인식을 매개하는 44,000 달톤 폴리펩티드를 인코드한다. II형 HLA 좌위는 보조 T 림프구에 의한 표적 세포의 인식을 매개하는 29,000 달톤과 34,000 달톤 폴리펩티드로 구성되는 세포표면 이형이합체를 인코드한다. HLA 항원은 '자가'단백질의 상황에서 외래 병원성 펩티드를 T-세포에 제시함으로써, 면역 반응의 개시를 매개한다. 결과적으로, 펩티드의 대형 레퍼토리가 숙주의 면역 반응 잠재력을 증가시킨다는 점에서 바람직하다. 다른 한편, 상응하는 높은 면역학적 다형성 정도는 동종이식에서 현저한 차이를 나타내는데, HLA 좌위에서 미스매치는 동종이식편 거부반응의 주요 원인중 하나이다. 공여자와 수용자의 HLA 좌위에서 대립유전자 대합의 정도는 동종 조직과 골수 이식의 성공에 주요 인자이다.

I형 HLA 영역의 HLA-A, HLA-B, HLA-C 좌위 및 II형 HLA 영역의 HLA-DRB, HLA-DQB, HLA-DQA, HLA-DPB, HLA-DPA 좌위는 매우 높은 다형성 정도를 보인다. 현재까지, HLA 체계의 인자에 대한 WHO Nomenclature Committee는 225개의 HLA A 대립유전자(HLA A*0101, A*0201 등), 444개의 HLA-B 대립유전자, 111개의 HLA-C 대립유전자, 358개의 BLA-DRB 대립유전자, 22개의 HLA-DQA 대립유전자, 47개의 HLA-DQB 대립유전자, 20개의 HLA-DPA 대립유전자, 96개 HLA-DPB 대립유전자를 지정하였다(IMGT/HLA 서열 데이터베이스, http'//www3.ebi.ac.uk:80/imgt/hla/index.html; Schreuder, G. M. Th. et al, Tissue Antigens. 54:409-437(1999)).

HLA 유형분석은 이식 공여자의 면역학적 프로필을 결정하는데 통상적으로 이용되는 과정이다. HLA 유형분석의 목적은 이해 유전자 좌위에서 일단의 지정된 다형성의 분석에 기초하여, 필요 분석 수준에서 환자의 대립형질 형태의 결정이다. HLA의 분자 유형분석은 전통적인 혈청 유형분석보다 많이 선택되는 방법인데, 그 이유는 이런 분석이 생존 세포를 요구하지 않고 좀더 높은 대립형질 분석을 제공하며 적합하지 않은 II형으로 HLA 유형분석을 확대하기 때문이다(Erlich, H. A. et al, Immunity. 14:347-356(2001)).

임상적 HLA 유형분석에 현재 응용되는 한가지 방법은 증폭된 표적 서열에 혼성화되어 HLA 유형분석을 위한 기초 패턴을 산출할 수 있는 서열-특이적 올리고뉴클레오티드 프로브(SSO 또는 SSOP)와 공동으로 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 사용하는 것이다.

모든 가용한 HLA 대립유전자에 대한 서열 정보의 입수가능성은 공지된 HLA 다형성의 특성화 및 혼성화에 의한 서열분석을 위한 서열-특이적 올리고뉴클레오티드(SSO)와 대립유전자-특이적 올리고뉴클레오티드(ASO)의 설계를 가능하게 하였다(Saiki, R.K. Nature 324:163-166(1986), Cao, K. et al, Rev Immunogenetics, 1999: 1: 177-208).

'도트 블랏 형식'이라고 하는 SSO 분석의 한 구체예에서, DNA 시료는 환자로부터 추출하고 증폭시키며 8x12 격자 형식으로 일단의 나일론 막에 블랏하였다. 하나의 방사성-표지된 올리고뉴클레오티드 프로브는 이들 막에서 각 반점에 부가하였다; 혼성화이후, 반점은 자가방사사진으로 검사하고 파지티브(1) 또는 네거티브(0)로 기록하였다. 각 환자 시료에서, 모든 막의 분석으로부터 조립된 일련의 1과 0은 대립형질 형태를 정의한다. '역 도트 블랏 형식'으로 SSO

분석의 다중 형식에는 평면 지지체에 고정된 여러 세트의 올리고뉴클레오티드 프로브가 사용된다(Saiki, R. et al, Immunological Rev. 167: 193-199(1989), Erlich, H. A. Eur. J. Immunogenet. 33-55 (1991)).

HLA 유형분석의 다른 방법에서는 대립유전자를 구별하기 위하여 서열-특이적 프라이머(SSP)의 중합효소-촉매된 신장(elongation)을 이용한다. DNA 중합효소의 높은 특이성은 상기 방법에 우수한 특이성을 부여한다. SPP 방법에서, 각 다형성 서열 모티프에 특이적인 프라이머 쌍 또는 3'-> 5' 엑소뉴클레아제 활성이 부재하는 DNA 중합효소와 모티프의 쌍으로 PCR 증폭을 실시하여, 3' 말단이 주형과 완전히 상보적('대합된')인 프라이머에서만 신장(및 증폭)이 진행되도록 한다. 상응하는 PCR 산물의 존재는 겔 전기영동 분석법으로 확인한다. 고도 다형성 좌위의 예는 높은 다형성 발생률을 특징으로 하는 II형 HLA DR의 280 nt DNA 단편이다.

사진유형분석(phototyping)(Dupont, B. Tissue Antigen. 46: 353-354 (1995))이라고 하는 서열-특이적 프로브(SSP)의 사용에 기초한 HLA 유형분석이 I형과 II형 유형분석에 통상적으로 사용되는 상용 기술로 개발되었다(Bunce, M. et al, Tissue Antigens; 46:355-367(1995), Krausa, P and Browning, M. J., Tissue Antigens. 47: 237-244(1996), Bunce, M. et al, Tissue Antigens. 45:81-90(1995)). 하지만, 선행 SSP 방법에서 앰플리콘의 개별 탐지를 위한 광범위한 겔 전기영동 분석의 요구는 높은 처리량을 달성할 수 있는 다중 분석 형식의 실행에 현저한 장애물이다. 이런 문제점은 본 발명의 방법에 의해 극복된다.

신장 반응의 배경에서, 특히 다중 형식에서 고도 다형성 부위 및 비-지정 다형성 부위의 간섭 다형성으로서 효과는 선행 출원에서 고려되지 않았다. 따라서, 비-지정 부위의 존재를 수용하면서 이런 비-지정 부위로부터 간섭없이 지정 부위의 탐지가 가능한 다형성 좌위의 다중 분석을 위한 방법, 조성물, 과정을 제공하는 것이 필요하다.

본 발명의 요약

본 발명은 비-지정 다형성 부위의 존재하에 이런 비-지정 부위로부터 간섭없이 다중 지정된 다형성 부위의 공동 검색을 위한 방법과 과정을 제시한다. 이런 공동 검색을 조장하는 여러 세트의 프로브를 제시한다. 본 발명은 또한, HLA 유전자 복합체와 CFTR 유전자의 다형성 동정을 위한 방법, 과정, 프로브를 제시한다.

특히 다중 형식에서 프로브 연장 또는 신장을 이용한 탐지 방법의 특이성은 혼성화를 이용한 방법의 특이성보다 본질적으로 우수한데, 그 이유는 서열 형태의 구별이 차별적 혼성화가 아닌 효소 인식의 충실도(fidelity)에 의존하기 때문이다. 현재까지, 효소-매개된 분석법과 관련된 대부분의 출원에서는 단일 염기 프로브 연장을 이용한다. 하지만, HLP 유형분석의 SSP 방법에 이용되는 것과 유사한 프로브 신장은 본원에 개시된 바와 같이, 다형성의 다중 분석에 여러 이점을 제공한다. 따라서, 단일 뉴클레오티드 및 다중-뉴클레오티드 다형성이 쉽게 수용된다. 본원에서 밝힌 방법은 단일 표지 탐지로 실시되고 다형성 좌위의 공동과 연속 검색을 수용하며 프로브 설계에 복잡성을 병합한다.

본 발명의 한 측면은 한가지이상의 표적에 위치하는 지정된 다형성 부위에 뉴클레오티드의 공동 결정 방법을 제시한다. 상기 방법은 아래의 단계로 구성된다:

(a) 하나이상 세트의 프로브를 제공하고, 여기서 각 프로브는 지정된 다형성 부위에 근접 위치하는 한가지이상의 표적 뉴클레오티드 서열의 서열에 어닐링할 수 있고;

(b) 지정된 다형성 부위와 직접 정렬하는 프로브 서열이내에 검색 부위를 위치시킴으로써 혼성화 복합체의 형성이 가능하도록 상기 프로브 세트와 한가지이상의 표적 뉴클레오티드 서열을 접촉시키고;

(c) 각 혼성화 복합체에서 검색 부위와 지정된 다형성 부위 사이에 매치 또는 미스매치의 존재를 결정하고;

(d) 지정된 다형성 부위의 구성을 결정한다.

본 발명의 다른 측면은 생물학적 시료에서 이해 핵산 서열의 분석에서 발생된 분석 신호의 서열-특이적 증폭 방법을 제시한다. 상기 방법은 아래의 단계로 구성된다:

(a) 이해 서열과 혼성화 복합체를 형성할 수 있는 한 세트의 고정화 프로브를 제공하고;

(b) 이해 서열이 적어도 하나의 고정화 프로브에 어닐링하여 혼성화 복합체를 형성하는 조건하에 상기 세트의 고정화 프로브를 이해 서열을 포함하는 생물학적 시료와 접촉시키고;

(c) 혼성화 복합체를 중합효소와 접촉시켜 혼성화 복합체내에 포함된 프로브가 신장 또는 연장되도록 하고;

(d) 프로브의 신장 또는 연장을 광학 신호로 전환시키고;

(e) 상기 세트의 고정화 프로브로부터 광학 신호를 실시간으로 기록한다.

본 발명의 또 다른 측면은 한가지이상의 표적 핵산 서열에 위치하는 지정된 다형성 부위의 공동 검색을 위한 커버링 프로브 세트를 형성하는 방법을 제시한다. 상기 방법은 아래의 단계로 구성된다:

(a) 프로브의 검색 부위를 지정된 다형성 부위와 정렬할 수 있는 신장 프로브 서열을 결정하고;

(b) 완전한 세트의 퇴행 프로브를 추가로 결정하여, 프로브 검색 부위와 지정된 다형성 부위의 정렬을 유지하면서 모든 지정되지 않거나 비-선택적으로 지정된 다형성 부위를 수용하고;

(c) 모든 관용된 다형성을 제거하여 축퇴(degeneracy) 정도를 감소시킨다.

본 발명의 한 측면은 표적 폴리뉴클레오티드 서열에서 하나이상 지정된 위치에 다형성을 동정하는 방법을 제시한다. 상기 방법은 아래의 단계로 구성된다: (a) 상기 지정 부위를 검색할 수 있는 하나이상 프로브를 제공하고; (b) 다형성 각각에 근접 위치하는 비-지정 다형성 부위를 수용하면서 지정 부위 각각에 수치를 부여한다.

본 발명의 다른 측면은 표적 폴리뉴클레오티드 서열에서 하나이상 지정 부위에 다형성을 결정하는 방법을 제시한다. 상기 방법은 지정 부위에 대한 프로브 세 트를 제공하고 각 프로브의 말단 신장 개시에 따라 상기 프로브 세트를 서로 다른 프로브 하위군(subset)으로 분류하는 단계로 구성된다.

본 발명의 다른 측면은 복수 다형성 부위의 공동 검색 방법을 제시하는데, 상기 방법은 1회이상 온도 주기를 실시하여 표적의 선형 증폭을 달성함으로써 다중 신장 분석을 실시하는 단계로 구성된다.

본 발명의 또 다른 측면은 복수 다형성 부위의 공동 검색 방법을 제시한다. 상기 방법은 온도 조절된 조건하에 어닐링과 신장 단계의 조합을 실시함으로써 다중 신장 분석을 실시하는 단계로 구성된다.

본 발명의 다른 측면은 하나이상 연속 표적 서열에 위치하는 S 다형성 부위, P sub S := {c sub P(s); 1 ≤s≤ S}에서 뉴클레오티드 구성의 공동 검색 방법을 제시하는데, 상기 방법은 아래의 단계를 실시함으로써 한정된 세트의 가능 수치중 하나에 각 c Sub p를 부여하는 단계로 구성된다:

(a) 한 세트의 지정된 고정화 올리고뉴클레오티드 프로브를 제공하고, 여기서 각 프로브는 지정된 다형성 부위에 근접 위치하는 표적 서열에 바람직한 정렬로 어닐링할 수 있고, 여기서 바람직한 정렬은 지정된 다형성 부위에 직접적으로 병렬하는 프로브 서열에 검색 부위를 위치시키고, 상기 프로브는 신장 또는 연장 반응을 개시할 수 있는 말단 연장 개시(TEI) 영역을 추가로 보유하고;

(b) 한가지이상의 표적 서열이 상기 세트의 고정화 올리고뉴클레오티드 프로브에 어닐링하도록 하여 프로브-표적 혼성화 복합체를 형성하고;

(c) 각 프로브-표적 혼성화 복합체에서, 검색 부위 및 상응하는 지정된 다형 성 부위 사이의 구성에서 매치 또는 미스매치를 규정한다.

본 발명의 다른 목적, 특징, 장점은 후술된 무-제한적 구체예의 상세한 설명을 참고하면 좀더 분명하게 이해할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1A는 HLA-DR과 내부 대조에서 지정 부위를 검색하도록 설계된 프로브를 도시한다.

도 1B는 엇갈려 배열된 프라이머 설계를 도시한다.

도 2는 관용 효과(tolerance effect)에 기초한 대립유전자 결합 패턴의 변화를 도시한다.

도 3은 고정 서열과 다형성 탐지 서열을 분리하기 위한 연결된 프라이머 구조의 효용을 도시한다.

도 4는 대립유전자 조합에 의한 대립유전자 동정에서 모의된 다의(ambiguity)를 도시한다.

도 5는 대립유전자 조합에 기인하는 대립유전자 동정에서 다의를 감소시키는 한가지 방법을 도시한다.

도 6은 혼성화와 신장의 조합을 도시한다.

도 7은 합성 올리고뉴클레오티드를 표적으로 하는 모델 반응을 도시한다.

도 8은 eMAP 형식으로 실제 환자 시료를 검사하여 수득된 결과를 도시한다.

도 9는 DR 좌위에서 eMAP 프라이머 연장으로부터 수득된 결과를 도시한다.

도 10은 DR 좌위에서 eMAP로부터 수득된 결과를 도시한다.

도 11은 A 좌위 엑손 3에서 eMAP로부터 수득된 결과를 도시한다.

도 12는 A 좌위 엑손 3에서 eMAP SSP로부터 수득된 결과를 도시하고, 비-지정 다형성에 대한 관용의 예이다.

도 13은 다양한 변이 크기의 비드 고정화 프로브 신장을 도시한다.

도 14는 비드의 표면에 고정된 프라이머를 이용한 PCR을 도시한다.

도 15는 모아진 PCR 산물을 이용한 다중 프로브의 신장을 도시한다.

도 16은 다중 CF 돌연변이의 프로브 신장 결과를 도시한다. 도 16A는 합성 표적을 이용한 프로브 신장을 도시한다. 도 16B는 PCR 반응에서 비드를 이용한 프로브 신장을 도시한다.

도 17은 온도-조절된 순환 결과로 일원 신장을 도시한다.

도 18은 표지된 dNTP와 표지되지 않은 다른 3개의 dNTP를 이용한 프라이머 신장을 도시한다.

도 19는 표지된 ddNTP와 표지되지 않은 다른 3개의 dNTP를 이용한 프라이머 신장을 도시한다.

도 20은 프라이머 신장을 도시하는데, 여기서 4개의 표지되지 않은 dNTP가 신장에 사용되고, 산물은 연장되고 표지되지 않은 산물에 혼성화되는 표지된 올리고뉴클레오티드 프로브에 의해 탐지된다.

도 22는 서열 특이적 프로브가 고정되는 선형 증폭을 도시한다.

도 23은 헤어핀 프로브의 활용을 도시한다.

를 도시한다.

도 24는 섬유성 낭포증과 아시케나지 유대인 질환 돌연변이의 분석에 본 발명의 응용을 도시한다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 고도 다형성 좌위의 다중 분석을 위한 조성물, 방법, 설계를 제시한다; 다시 말하면, 고밀도의 특정한('지정된') 다형성 부위를 특징으로 하는 좌위 및 비-지정 간섭 다형성 부위. 따라서, 이런 부위의 다중 분석은 특정한 또는 지정 부위에 맞춰 설계된 프로브가 인접하는 다형성 부위를 커버하도록 동일한 표적에서 인접 부위를 지향하는 프로브의 서열에서 현저한 중복을 수반한다. CFTR와 BLA를 비롯한 중요한 유전자의 분석에서 간섭은 선행 기술에서 언급되지 않았다. 본 발명에 따른 방법을 예시하기 위하여, HLA 유전자 복합체와 CFTR 유전자를 분석한다.

본 발명은 고밀도의 다형성 부위를 보이는 핵산 서열에서 다형성('MAP')의 병렬 또는 다중 분석을 위한 조성물과 방법을 제시한다. 일정한 핵산 서열에서, 각 다형성 부위는 하나이상의 뉴클레오티드로 구성되는 차이를 포함한다.

본 발명은 핵산 서열에서 전체 세트의 지정된 다형성을 공동 검색하기 위한 방법과 조성물을 제시한다. 본 발명은 이들 각 부위에서 구성을 결정하기 위한 조성물, 방법, 설계를 제시하고, 따라서 이해 서열에 대한 가능한 형태 세트로부터 일정한 특정 시료에서 실제 형태를 선별하는데 필수적인 정보를 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 시료에서 가능 서열 세트를 좁히는 역할을 한다. 따라서, 특정 구체예에서 본 발명은 뉴클레오티드 동일성에 상응하는 가능 수치중 하나를 지정 부 위에 부여함으로써 서열 구성을 결정하는데 유용하다. 다른 구체예에서, 본 발명은 돌연변이 분석의 배경에서 '야생형'또는'돌연변이'의 지정에서처럼 공지된 참고 서열과 대합하거나 대합하지 않는 부위 구성을 결정하는

데 충분하다. 이렇게 제공된 서열 결정 능력은 본원에서 확인 서열분석(confirmatory sequencing) 또는 재서열분석(resequencing)이라 한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명은 낭포성 섬유증 막통 전도성 조절(CFTR) 유전자 및 사람 백혈구 항원(HLA) 유전자 복합체의 신장-매개된 다형성 다중 분석법(eMAP)을 제시한다.

본 발명의 방법과 조성물은 검색용으로 지정된 다형성 부위 이외에 다형성 부위를 보유하는 표준 영역의 다형성 분석의 신뢰성과 정확도를 개선하는데 유용하다. 이들 비-지정 부위는 분석에서 간섭원을 나타낸다. 특정한 분석 용도에 따라, 동일한 다형성 부위에 서로 다른 구성의 하나이상 프로브가 지정될 수 있는데, 이는 하기 실시예에서 상세히 설명한다. 본 발명의 특정한 목적은 이해 유전자에서 다형성의 효율적이고 신속하며 분명한 분석을 위한 조성물과 방법을 제시하는 것이다. 이런 분석법은 예로써 유전자 검사, 담체 스크리닝, 유전형분석 또는 유전자 프로필링, 동일성 검사, 기원 검사, 법의학에 맞게 설계된 분자 진단 분석에 유용하다.

표적 서열의 준비는 당분야에 공지된 방법으로 실시할 수 있다. 무-제한적 예에서, 세포 또는 조직의 시료는 환자로부터 얻는다. 이후, 표적 서열(예, HLA의 엑손 2와 3)을 포함하는 핵산 영역은 PCR(예, 비대칭 PCR)과 같은 표준 기술로 증폭한다.

다형성 부위를 탐지하는 프로브는 분석되는 다형성 부위의 구성이 프로브에 정렬된 부위의 구성과 상보적인('대합된') 경우에, 중합효소-촉매된 신장 반응의 개시 지점으로 기능한다. 일반적으로, 본 발명의 프로브는 무관한 DNA 표적 서열과의 어닐링을 피할 수 있을 만큼 충분히 길어야 한다. 특정 구체예에서, 프로브의 길이는 10 내지 50개 염기, 바람직하게는 15 내지 25개 염기, 좀더 바람직하게는 18 내지 20개 염기이다. 프로브는 당분야에 공지된 방법과 조성물을 이용하여 링커 성분을 통하여 고형 지지체에 고정될 수 있다.

본원에서 '핵산'또는'올리고뉴클레오티드'는 단일이나 이중-가닥 형태의 디옥시리보핵산 또는 리보핵산을 의미한다. 여기에는 합성 골격을 갖는 핵산 유사 구조가 포함된다. DNA 골격 유사체는 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에티트, 메틸소프로네이트, 포스포르아미데이트, 알킬 포스포트리에스테르, 설파메이트, 3'-티오아세탈, 메틸렌(메틸이미노), 3'-N-카르바메이트, 모르폴리노 카르바메이트, 펩티드 핵산(RNA) 등이다(Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach(Editor: F. Eckstein), IRL Press at Oxford University Press(1991); Antisense Strategies, Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 600, Eds.; Baserga and Denhardt(NYAS 1992); Milligan, J. Med. Chem., vol. 36, pp. 1923-1937; Antisense Research and Applications(1993, CRC Press). PNA는 비-이온성 골격, 예를 들면 N-2(2-아미노에틸) 글리신 단위를 보유한다. 포스포로티오에이트 연쇄는 WO 97/03211; WO 96/39159; Mata, Toxicol. Appl. Pharmacol. 144: 189-197(1997)에서 기술한다. 다른 합성 골격에는 메틸-포 스포네이트 연쇄 또는 교대로 나타나는 메틸포스포네이트와 포스포디에스테르 연쇄(Strauss-Soukup, Biochemistry, 36: 8692-8698 (1997)) 및 벤질포스포네이트 연쇄(Samstag, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 6: 153-156 (1996)) 등이 포함된다. 핵산에는 유전자, cDNA, mRNA가 포함된다.

본원에서 '혼성화'는 엄밀한 조건하에 특정 뉴클레오티드 서열에 우선적으로 결합하는 핵산 분자의 결합, 중복 또는 혼성을 의미한다. '엄밀한 조건'은 프로브가 상응하는 표적 서열과 우선적으로 혼성화되고 다른 서열과는 거의 혼성화되지 않는 조건을 의미한다. '엄밀한 혼성화'는 서열 의존하고 상이한 조건하에 달라진다. 핵산의 혼성화와 관련된 교시는 예로써 Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier, NY (1993)에서 확인할 수 있다. 일반적으로, 고도로 엄밀한 혼성화와 세정 조건은 정의된 온도와 pH에서 특정 서열에 대한 열적 융점(Tm)보다 대략 5℃ 낮게 선택된다. Tmdms 표적 서열의 50%가 완전히 대합된 프로브에 혼성화되는 온도(정의된 강도와 pH하에)이다. 매우 엄밀한 조건은 특정 프로브에 대한 Tm에 동등한 온도 환경에서 분석을 실시함으로써 선택된다. 고도로 엄밀한 세정 조건의 예는 대략 15분동안 72℃에서 0.15 M NaCl이다. 엄밀한 세정 조건의 예는 15분동안 65℃에서 0.2xSSC 세정액이다(Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(2nd Ed), vol. 1-3(1989)).

본원에서 '지정 부위'는 일정한 핵산에서 이해 다형성 부위(즉, 동정을 의도하는 다형성 부위)로 정의된다. '비-지정 부위'는 일정한 핵산에서 지정 부위와 공존하지만 이해(利害)가 없는 임의의 다형성 부위를 의미한다.

본원에서 '상관된 지정 부위'는 상관이 발생하는 다형성 부위를 의미한다. 전형적으로, 이런 다형성 부위 세트의 각 구성원은 이런 세트가 속하는 대립유전자를 동정하기 위하여 동정된다.

본원에서 '선택적 지정 부위'는 본 발명에 따른 프로브 서열의 3'말단과 중복하는 일정한 핵산에서 이해 다형성 부위를 의미한다. '비-선택적 지정 부위'는 본 발명에 따른 프로브 서열의 3'말단과 중복하지 않는 이해 다형성 부위를 의미한다.

본원에서 '비-지정 간섭 부위'는 본 발명에 따른 프로브 서열의 3'말단으로부터 1-5개 염기이내에 위치하는 비-지정 다형성 부위를 의미한다. '비-지정 비-간섭 부위'는 본 발명에 따른 프로브 서열의 3'말단으로부터 5개 염기보다 멀리 위치하는 비-지정 부위를 의미한다. 비-지정 비-간섭 부위는 프로브 서열의 3'말단보다 5'말단에 근접하여 위치할 수

있다.

특정 구체예에서, 본 발명의 프로브는 '말단 신장 개시'영역('TEI' 영역) 및 중복 고정('DA') 영역을 포함한다. TEI 영역은 프로브 서열의 절편, 전형적으로 프로브의 3-4개 3'말단 위치를 의미한다. TEI 영역은 프로브의 중합효소-촉매된 신장을 개시하기 위하여 지정 다형성 부위에서 표적 핵산 서열의 일부와 정렬하도록 설계된다. 전형적으로, DA 영역은 프로브 서열에서 나머지 위치를 포함하고, 지정 다형성에 근접 위치하는 영역(3-5 염기이내)에서 표적 서열과 일부와 정렬하도록 설계된다.

본원에서 '인접 범위'는 일정한 핵산 가닥을 따라 1-5개 염기 길이를 의미 한다. '근접 범위'는 일정한 핵산 가닥을 따라 1-10개 염기 길이를 의미한다. '관용 범위'는 프로브의 어닐링과 신장을 여전히 허용하는 표적 서열에 혼성화되는 프로브의 TEI 영역에서 미스매치의 총수를 의미한다. 전형적으로, 혼성화된 프로브의 TEI 영역에서 2개 이상의 미스매치는 관용 범위를 벗어난다.

본원에서'마이크로구', '마이크로입자', '비드', '입자'는 상호 대체가능하다. 비드의 조성에는 플라스틱, 세라믹, 유리, 폴리스티렌, 메틸스티렌, 아크릴 중합체, 상자성 물질, 토리아 솔(thoria sol), 카본 프라파이트, 이산화티타늄, 락테스, 또는 가교-결합된 덱스트란, 예를 들면 세파로스, 셀룰로오스, 나일론, 가교-결합된 미셀, 테플론이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다('Microsphere Detection Guide'from Bangs Laboratories, Fishers IN). 이들 입자는 구형일 필요가 없으며 다공성일 수 있다. 비드 크기는 나노입자(예, 100 nm) 내지 밀리미터(예, 1 ㎜)인데, 바람직하게는 대략 0.2 마이크론 내지 200 마이크론, 좀더 바람직하게는 대략 0.5 내지 5 마이크론이다.

본 발명은 한 세트의 고정화 서열-특이적 올리고뉴클레오티드 프로브를 표적 핵산 가닥에 먼저 어닐링하고 상기 어닐링된 고정화 서열-특이적 올리고뉴클레오티드 프로브의 중합효소-촉매된 신장으로 지정 다형성 부위의 형태를 탐색함으로써, 한가지이상의 표적 가닥에서 한 세트의 지정 다형성 부위를 공동 검색할 수 있다. 신장 프로브는 일정한 표적에서 서열과 어닐링하고, 다라서 혼성화 복합체('이중')을 형성함으로써 지정 부위를 검색하도록 설계된다. 프로브의 3'말단은 표적에서 지정 부위 주위에 위치하고, 중합효소-촉매된 프로브 신장은 3'말단 프로브 구성이 검색 부위에서 표적의 구성과 대합(즉, 상보적)되면 개시된다. 프로브는 지정 부위가 3'말단의 근접 범위이내에 위치하도록 하는 방식으로 어닐링하도록 설계될 수 있다.

본 발명의 한 구체예에서, 둘이상의 프로브를 특정 지정 부위의 검색에 제공할 수 있다. 이들 프로브는 지정 다형성 부위의 특정 근접 범위내에서 검색 부위와 비-지정 다형성 부위에 다형성 또는 돌연변이의 가능성을 고려하여 설계된다. 이런 배경에서, '다형성'은 핵선 서열에서 임의의 변이를 의미하고, '돌연변이'는 표현형과 연관하거나 연관한 것으로 생각되는 유전자에서 서열 변이를 의미한다. 바람직한 구체예에서, 이런 다중성의 프로브 서열은 신장을 담보하기 위하여 근접 범위내에서 모든 위치에 특정 표적 서열과 대합하는 적어도 하나의 프로브를 보유한다.

특정 구체예에서, 본 발명은 한 세트의 L≥S 올리고뉴클레오티드 프라이머에 의해 N 길이의 표적 서열로부터 선택된 S 다형성 부위를 병렬 검색하는 조성물과 방법을 개시한다.

특정한 분석 용도에 따라, 동일한 다형성 부위에 서로 다른 구성의 하나이상 프로브가 지정될 수 있는데, 이는 하기 실시예에서 상세히 설명한다.

각 지정 프로브는 3'말단 주위에 검색 부위(혼성화 직후에, 분석되는 다형성 부위와 정렬한다)를 보유하는 길이 M의 뉴클레오티드 서열로 구성된다. 3'말단이 바람직하긴 하지만, 3'말단으로부터 3-4개 염기이내에 위치하는 것들이 사용될 수 있다. 프라이머는 고형상 담체에 고정되고(링커 서열 또는 다른 링커 성분을 통하 여 연결될 수 있다), 담체와의 결합으로 동정된다. 프로브 서열은, 프로브와 표적 사이의 혼성화 복합체를 형성하고 지정된 다형성 부위와 검색 부위의 정렬을 확보하기 위하여, 표적과 프라이머의 어닐링을 허용하도록 지정된다. 여기서 바람직한 배열은 프로브의 3' 말단에서 검색부위 그리고 지정된 다형성 부위와 3' 말단의 정렬을 제공한다. 주어진 검색 부위 구조의 지정된 프로브로 다형성 부위의 뉴클레오타이드의 조성을 검사하는 단계는 두 값 중의 한 부위로 배당된다. 즉, 즉 번호 1로 나타내는, 매치된(mathced), 또는 번호 0으로 나타내는 비-매치된 사이트. HLA 분자 유형분석에서, 길이 L의 결과물인 2진의 스트링은(binary string)은 필요한 유형분석 해상도를 위하여 대립유전자를 동정한다.

바람직한 실시예에서, 검색 단계는 지정된 프로브의 연장을 사용한다. 중합효소에 의하여 촉매되는 이 반응은, 존재하는 혼성화 복합체 내의 표적 서열의 서열을 반영하기(reflecting) 위하여 하나 또는 그 이상의 뉴클레오사이드 트리포스페이트를 프로브 서열에 첨가함으로써, 연장된 혼성화 복합체를 생성한다. 이 연장 반응의 진행을 위하여, 길이 M의 지정된 프라이머는 길이 M*≤M의 말단 연장 개시 영역을 보유하여야 한다. 이것은 여기서 또한 말단 연장 개시 서열 (또는 TEI 서열)로 지칭되며, 검색 부위를 보유한다. 지정된 검색 부위의 조성이 지정된 다형성 부위의 그것과 매치되는 경우 연장은 진행된다.

연속적인 연장을 탐지하는 선행기술의 방법은 표지된 데옥시 뉴클레오사이드 트리포스페이트 (dNTPs) 또는 디데옥

시 뉴클레오사이드 트리포스페이트 (ddNTPs)의 사용과 관련되어 개시되어 있다. 본원 발명은 또한, 표지된 dNTPs 또는 ddNTPs의 수용에서 사용가능한 중합효소의 효율을 감소함에 장점이 있는, 표지된 dNTPs 또는 ddNTPs의 필요를 배제하는 연속적인 연장의 탐지를 위하여 광학 신호(optical signatures)를 제공하는 신규한 방법을 개시한다.

그러나, 본원 발명과 관련하여 고려되는 고도 다형성 좌위 내의 다형성 부위의 밀도는, 선택된 다형성 부위로 유도되는 지정된 프라이머가, 지정된 다형성 부위에 근접한 표적 아서열(subsequence)에의 어닐링의 경우, 인접 다형성 부위와 중복되도록 할 것이다.

즉, 선택된 다형성 부위 중 하나에서 표적의 배열을 조사하도록 설계된, 그리고 정확한 표적 아서열(subsequence)에 어닐링하는 열안정성 및 특이성을 확보하기 위하여 충분한 길이로 구성된, 올리고뉴클레오타이드 프로브는 다른 근처의 다형성 부위와 정렬할 것이다. 이들 간섭하는 다형성 부위는 표적 서열 내의 비-선택적 지정 부위는 물론 비-지정 부위를 포함할 것이다.

용액 내에서 수행되는 다중 SSP 반응에서, 근처의 선택된 다형성에 도입된 지정된 프로브 사이의 부분적 중복은 동일 표적에 대한 프로브 사이의 상호 경쟁을 유도할 것이다. 본원 발명은 프로브 고정에 의하여 이 복잡성을 현저히 감소시켰다.

일반적으로 다중의 차벽적인 혼성화에서, 지정된 프로브 및 표적 사이의 하나 또는 그 이상의 미스매치는 혼성화 복합체의 열안정성에 영향을 줄 수 있다. 즉, 전체 반응 혼합물에 적용되는 어닐링 조건의 세트는, 프로브 및 표적 사이의 어닐링의 정도를 변화시킬 것이며 그리고 다음의 프로브 연장 반응의 결과에 영향 을 줄 것이다. 이것은 분석에 불확실성을 제공하여 다음의 재 서열화가 요구될 것이다.

지정된 프로브의 3'말단 또는 근처에서 검색 부위에 바로 근접하여 위치하는 비-지정 다형성 부위는, 연장 반응을 개시에서 프로브의 TEI 서열의 효율성에 특히 유해하다.

다중 뉴클레오타이드는 물론 단일 뉴클레오타이드 다형성을 고려할 때, 지정된 프라이머 내의 검색부위 그리고 다형성 부위 사이의 조성의 매치 그리고 미스매치 사이의 식별을 위하여 연장반응을 촉매하는 현재 사용가능한 중합효소의 능력은 프라이머의 3'말단으로부터 검색부위의 치환에 의존한다.

최적의 식별력을 발휘하는 바람직한 실시예에서, 검색부위는 프로브의 3'말단에 제공된다. $P_{M(s^*)}=\{cp_{(m)}; 1 \leq m \leq M\}$ 식에서 선택된 부위s* 에 대하여 지정된 길이 M의 프로브 서열로 주어지며, 지수 m은 프라이머의 5'에서 3'방향으로 증가하고, 이 배열은 프로브 서열에서 위치 M과 지정 부위 s*과의 정렬에 대한 것이다 ; 다중 뉴클레오타이드 다형성의 경우, 위치 M-1 (디뉴클레오타이드 다형성의 경우) 그리고 M-2 (트리뉴클레오타이드 다형성의 경우), 등등 또한 관련된다.

이들 환경 하에서 고도 다형성 좌위의 다중 분석에서 예측되는 바와 같이, 중합효소-촉매된 연장 반응의 적용에 의하여 제공되는 증진된 특이성의 장점은, SSO 분석의 성능의 제한과 밀접하게 관련된 '차선의' 어닐링 조건으로부터 야기되는 복잡성의 결과 현저히 감소되거나 상실된다.

어느 주어진 지정된 다형성 부위에 대한 동일 검색 부위 조성을 공유하는 다중 프로브 설계의 최적화와 관련하여, 간섭하는 다형성의 관용(tolerance)의 개념을 고려하는 것이 유용할 것이다. 단일 뉴클레오타이드 다형성 예시의 보편성의 제한 없이 고려하여, 3' 말단으로부터 M-1, M-2, ..., M-m* 위치로의 s*의 배열의 시프트는 점진적인 식별력을 감소를 유도한다. 즉, 지정된 다형성 부위가 안쪽의 프로브 위치, m*과 정렬하는 경우, 연장 반응은 매치와 미스매치를 더 이상 구별하지 못한다. 반대로, 프로브의 3' 말단에 검색부위를 배치하는 바람직한 실시예에서, 연장 반응의 효율성에 대한 근처의 비-지정 다형성의 해로운 영향은 마찬가지로 3' 말단으로 부터의 거리와 함께 감소한다. 즉, 1 그리고 m* 사이의 위치와 정렬된 비-지정 다형성은 연장 반응에 영향을 주지 않을 것이다.

프로브 내의 길이 M-m*+l의 말단서열은 여기서 주어진 프라이머의 TEI 서열로서 지칭된다. 일반적으로, $1 < m^* < M$, 그리고 TEI 서열은 말단 프로브 위치의 소수만을 포함할 것이다. ; 특정의 경우, m*=1, 그러므로 프로브 서열은 전체 프로브 서열을 포위(encompass)한다.

본원 발명은 다중 프로브의 설계에서 이들 공지된 서열의 변이를 고려함으로써 지정된 프로브 서열의 길이 내에서 간섭하는 다형성 부위의 존재를 수용한다. 특히, 주어진 프로브 길이 M에 대하여 제공되는 대체 프로브 서열의 배열의 숫자는 길이M-m*+1의 TEI서열의 존재의 결과 현저히 감소된다. 즉, 연장 반응의 효율적인 식별력을 확보하기 위하여, TEI 서열의 길이에 대하여 예상되는 대체 프로브 서열 배열을 제한하는 것은 충분하다.

바람직한 실시예에서, 모든 가능한 대체적 서열이 예상되며, 그러므로 이들 대체 프로브 서열 중 하나는 위치s m*, m*+1, ... M-1, M 모두의 표적과 매치될 것이다.

만일, 각각의 선택된 다형성 부위에서, 만약 이들 모든 프로브가 코드된 고형상 담체와의 고유 결합에 의하여 개별적으로 인코드 된다면, 예상되는 서열과 지정된 프로브의 다양성은 코딩의 복잡성을 증가시킨다. 그러나, 이들 복잡성은 통상의 고형상 담체위에 이 프로브의 세트를 배치함에 의하여 감소된다. 즉, 지정된 프로브의 검색 부위 조성만이 인코드 된다. 여기서 TEI 서열 풀링(pooling) 또는 프로브 풀링으로 지칭되는 개념임. 완전한 프로브 서열 풀링은 최초의 설계의 그것에 대한 코딩의 복잡성을 감소시킨다. 여기서 예상되는 프로브 서열은 제공되지 않았다. 부분적 풀링 또한 가능하다.

특정한 바람직한 실시예에서, 프로브의 신장에 사용된 중합효소는 3' to 5' 엑소뉴클레아제 활성이 부재인 DNA 중합효소이다. 그러한 중합효소의 예시에는 T7 DNA 중합효소, T4 DNA 중합효소, ThermoSequenase 그리고 Taq 중합효소가 포함된다.

표적 핵산 서열이 RNA인 경우, 역전사 효소가 사용될 수 있다. 중합효소 이외에, 바람직하게는 4가지의 모든 염기의, 뉴클레오사이드 트리포스페이트가 첨가된다. 예를 들면 dNTPs, 또는 유사체가 첨가될 수 있다. 다른 실시예에서는 ddNTPs가 첨가될 수 있다. Cye3-dUTP와 같은 표지된 뉴클레오타이드 유사체 또한 탐지를 촉진하기 위하여 사용될 수 있다.

연속적인(successful) 신장을 탐지하는 선행기술의 방법은 표지된 데옥시 뉴클레오사이드 트리포스페이트 (dNTPs) 또는 디데옥시 뉴클레오사이드 트리포스페이트 (ddNTPs)를 사용하는 것으로 개시되어 있다. 본 발명은 연속적인 신장을 탐지하기 위한 광학 신호(optical signatures)를 제공하는 신규한 방법을 제공하므로, 표지된 dNTPs 또는 ddNTPs의 필요를 배제한다. 이것은 현재 사용가능한 중합효소가 표지된 dNTPs 또는 ddNTPs를 수용하는데에 덜 효율적이므로 유익하다.

본 발명은 고도 다형성 표적 영역의 정밀한 다형성 분석을 위한 방법 및 조성을 제공한다. 여기서 사용된, 고도 다형성 서열은, 프로브에 의하여 접촉되는 서열의 범위내의, 지정된 또는 조사되는 다형성 부위뿐만 아니라, 분석에서의 잠정적 오류의 원인을 나타내는 비-지정 다형성 부위를 함유하는 것이다. 유사한 고려가 PCR 반응의 방법, 조성 그리고 설계에 관련된다. 바람직한 실시예에서, 아서열(subsequence)의 프라이밍(priming) 그리고 어닐링으로 구성된 PCR 프로브의 커버링 세트는 프로브 신장에 의한 비드-디스플레이된 앰플리콘을 생성하기 위하여 인코드된 마이크로입자에 나타내어진다. 비드의 조립품은, 프로브의 디코딩(decoding) 그리고 이미징(imaging)을 촉진하기 위한 증폭의 다음에 또는 전에, 평면의 기질 위에 형성될 수 있다.

일 실시예에서, 본 발명은 3' 말단 '프라이밍(priming)'아서열을 보유하기 위하여 설계된 프로브를 제공한다, 이것은 또한 여기서 말단 신장 개시 (TEI) 영역, 그리고 어닐링 아서열(subsequence)로서 지칭되며, 또한 여기서 DA (이중 Anchoring) 영역으로서 지칭된다. TEI 영역은 일반적으로 프로브 서열의 3'말단 위 치의 3 또는 4개를 포함한다. 이 TEI 영역은, 프로브의 중합효소-촉매된 신장의 개시를 위하여, 지정된 다형성 부위에 표적 서열의 부분과 정렬되도록 설계된다. 프로브 신장은 전체 TEI 영역 그리고 대응되는 표적 서열의 영역의 조성에서 완전한 매치를 나타낸다. 프로브 서열 내의 잔존 위치를 포함하는 DA 영역은, 바람직하게는 지정된 다형성에 가까운(3-5 염기 이내) 위치내의 표적 서열의 부분과 정렬되도록 설계된다. 이 DA(이중 anchoring) 영역은 특이적인 그리고 강한 어닐링을 확보하기 위하여 설계되며, 다형성 분석을 위하여 설계되지 않는다. 여기서 설명된 바와 같이, DA 그리고 TEI 영역은 프로브 내에서 서로 즉시 인접하게 위치될 수 있으며 또는 분자 구조(molecular tether)에 의하여 연결될 수도 있다. 후자의 접근은 지정 부위에 즉시 인접하게 위치된 비-지정 다형성을 피하기 위하여 DA 영역의 배치에 유연성을 허용한다. DA 영역의 길이 그리고 조성은 표적의 그 영역에 위치하는 하나 또는 그 이상의 비-지정 다형성의 존재를 수용하는 (즉, 고려하는) 동시에, 안정한 서열-특이적 혼성화 복합체 ('이중')의 형성을 촉진하기 위하여 선택된다. 어닐링 아서열의 길이는 표적의 비-선택된 아서열(subsequence) 및 프로브 사이의 서열 상동성을 최소화함에 의하여 교차-혼성화를 최소화하기 위하여 선택된다. 어닐링 아서열(subsequence)의 길이는 일반적으로 프라이밍 아서열(subsequence)의 그것을 초과하므로, 이중 형성의 실패는 일반적으로 신장 생성물을 생성의 실패를 의미한다.

신장 반응은 TEI 영역 내에 위치하는 다형성을 탐지하는 고도의 특이성을 제공한다. DA 영역에서 비-지정 다형성의 경우, 신장 반응은 특정 조건 하에서의 완 벽한 매치의 그것 보다 낮은, 또는 그에 비할 만한 수준으로 진행할 것이다. 이것은 신장 반응의 관용 효과로서 지칭된다. 관용은 여기서 예로서 개시된 바와 같이 지정된 그리고 비-지정 다형성을 분석하기 위한 프로브의 설계에 이용된다.

본 발명의 특정 실시예에서 고려되는 고도의 다형성 좌위에서의 다형성 부위의 밀도는, 지정된 다형성 부위에 근접한 표적 아서열에 어닐링하는 경우, 지정된 다형성 부위에 도입된 프로브가 인접 다형성 부위와 중복되도록 할 것이다. 즉, 선택적 지정 다형성 부위에서 표적의 배열을 조사하기 위하여 설계된, 그리고 정밀한 표적 아서열(subsequence)에 대한 어닐링의 열 안정성 및 특이성을 확보하기 위하여 충분한 길이로 구성된, 올리고뉴클레오타이드 프로브는 인접 다형성 부위와 정렬할 것이다. 이들 간섭 다형성 부위는 지정 부위는 물론 표적 서열의 비-지정 부위를 포함할 것이나, 선택적 다형성 부위는 포함하지 않는다.

특히, 본원 발명에서 관찰된 바와 같이 비-지정 다형성은 이중형성과 간섭하며, 이로써 프로브 신장을 완전히 억제하거나 또는 간섭할 것이다. 일 실시예에서, 본원 발명은 그러한 비-지정 다형성을 수용하기 위한 커버링 프로브 세트의 설계를 제공한다. 커버링 프로브 세트는 핵산 서열내의 지정 다형성 부위의 주어진 다중성을 공동으로 조사하는 프로브를 보유한다.

커버링 프로브 세트, 각각의 부위를 위하여, 표적에 어닐링 할 수 있는 적어도 하나의 프로브를 포함한다. 그러므로 다음의 신장반응에 기초하여, 그 부위의 2 가능한 값 중 하나에 할당되도록 한다. : '매치된' (신장) 또는 '매치되지 않은', (비 신장).

각각의 지정부위와 연관된 커버링 프로브 세트는 하나 또는 그 이상의 위치가 다른 둘 또는 그이상의 프로브를 함유할 수 있다. 이것은 또한 여기서 축퇴(degenerate) 세트로 지칭된다.

특정 실시예에서, 프로브 서열은 DNA에서 만나는 어느 뉴클레오타이드와 염기쌍을 형성할 수 있는 광범위한 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 특정 실시예에서, 프로브는 인코드된 마이크로입자에 부착될 수 있다. 그리고 특히, 커버링 세트 또는 축퇴 세트 내의 둘 또는 그 이상의 프로브는 마이크로입자의 동일 타입에 부착될 수 있다. 마이크로입자 또는 비드에 둘 또는 그이상의 프로브를 부착하는 공정을 '프로브 풀링(pooling)'이라고 칭한다.

커버링 프로브 세트의 설계는 여기서 유전적 분석의 2 대표 분야에서 다형성의 신장-중재 다중 분석과 관련하여 설명된다. : (1): CF의 돌연변이 분석 그리고 Ashkenazi Jewish (AJ) disease 담체 스크리닝의 경우에서와 같이, 다중 비상관된 지정된 다형성 그리고 돌연변이의 스코어링(scoring), 그리고 (2) HLA 분자 유형분석의 경우에서와 같이 다형성의 상관된 세트의 스코어링. 첫 번째 경우에서, 돌연변이의 전체의 다중성을 위한 커버링 세트는 다중 서브세트를 보유하며, 각각의 서브세트는 한 지정부위와 관련된다. 이런 경우, 둘 또는 그 이상의 프로브가 이형성(heterozygosity)을 확정하기 위하여 제공된다. 일반적인 SNP 동정 그리고 확인 서열 분석의 목적을 위하여, 축퇴 프로브 세트는 다형성 부위당 4개의 표지된 (예를 들면, 비드 디스플레이된) 프로브까지를 보유하도록 제공될 수 있다. 두 번째 경우, 커버링 세트는 여기서 부연하는 바와 같이, 세트 내의 프로브의 수를 최 소화하기 위하여 구성된 서브세트를 보유한다. 지정된 프로브의 세트는 신장 패턴에 기초하여 대립 유전자-특이적 서열 배열을 동정하기 위하여 설계된다.

비-지정 다형성 부위를 수용하거나 동정하는 방법은 특히 서열 특이적 프로브의 다중 신장과 관련하여 유용하며, 프로브의 단일 염기 연장과 결합하여 사용될 수도 있다. 이것은 또한 미니서열분석(minisequencing)으로도 알려져 있다 (예, Pastinen, et al. Genome Res. 7: 606-614 (1997)참조), 여기 참조 문헌으로서 편입됨).

본원 발명의 분석의 신장-중재 방법은, 단일-염기 프로브 연장 방법과 달리, SNPs 탐지 뿐 아니라, HLA와 같은 고도 다형성 유전자 좌위의 유형분석에서 통상적으로 관찰되는 삽입 그리고 결실은 물론 다중 (예, 이중, 삼중, 등등) 뉴클레오타이드 다형성과 같은 다른 타입의 다형성을 탐지에도 사용될 수 있다. 이들 복합 시스템에서, 본 발명의 방법에 따른 서열-특이적 프로브 신장은 탐지 단계를 단순화 한다. 이것은 둘 또는 그 이상의 프로브가 각각의 이해(interest) 다형성 표적 위치에 대하여 제공되며 그리고 탐지 단계는, 단일-염기 프로브 연장의 경우에서와 같이, 두 연장된 프로브를 구별하기 위해서보다는, 오직 신장된 둘 또는 그이상의 프로브를 결정하기 위하여 수행되기 때문이다. 따라서, 비록 본 발명의 방법이 탐색 단계에서 다중 형광자(fluorophore) 또는 발색단(chromophore) 표지의 사용을 수용하지만, 단일의 광범위한 표지가 일반적으로 서열 특이적 프로브 신장을 충족시킬 것이다. 이것은 다중 형식에서의 용도에서 적어도 둘이상의 형광자 또는 발색단 표지를 요구하는 단일-염기 연장 방법과 상반된다.

DNA 메틸화:

특정 실시예에서, DNA의 메틸화 상태를 결정하는 방법 및 조성이 제공된다. 사이토신 메틸화는 포유류 세포의 유전자의 발현 억제(silencing)에서 중요한 요소로 인식되어 왔다. 많은 전사인자의 인지 부위 내의 단일 CpG 디뉴클레오타이드에서의 사이토신 메틸화는 블록 결합(block binding)에 충분하며, 여러 질병과 관련된다. eMAP는 진단의 그리고 다른 목적을 위하여 게놈 DNA의 메틸화 상태를 결정하기 위하여 사용될 수 있다. 이 DNA는 소듐 바이설파이트 처리에 의하여 비메티틸화 사이토신에서 유라실로 변형된다. 뒤따른 바이설파이트의 제거 및 화학적 전환의 완성으로, 이 변형된 DNA는 PCR을 위한 주형으로 사용된다. 프로브의 쌍이 설계되는데, 하나는 이해 유전자를 위하여 최초로 메틸화된 DNA에 특이적이며, 그리고 하나는 메틸화되지 않은 DNA에 특이적이다. eMAP는 DNA 중합효소 그리고 하나의 표지된 dNTP 그리고 3 dNTPs 또는 ddNTPs의 표지되지 않은 혼합물로 수행된다. 특이적 비드 상에서 신장된 생성물은 메틸화 상태를 지시할 수 있다.

선택적 서열분석:

본 발명의 특정 실시예에서, 선택적 서열분석 (또한 '서열분석'으로 칭함)은 각각의 그러한 부위에서의 조성을 결정하기 위하여 핵산 서열내의 지정 다형성의 전체 세트의 공동 검색을 위하여 사용된다. 선택적 서열분석은 이해 서열을 위하여 가능한 배열의 세트로부터, 주어진 특이성 샘플 내의 실제 배열을 선택하기 위하여 또는 그 샘플 내의 가능한

서열의 세트를 좁히기 위하여 필요한 정보를 제공하기 위하여 사용될 수 있다. 선택적 서열분석에서, 연장 반응에 사용된 프로브의 길이 는 결정될 수 있는 서열의 길이를 결정한다. 보다 긴 DNA 서열을 위해서는, 엇갈려 배열된 프로브 설계가 서열을 서로 연결하기 위하여 사용될 수 있다. 따라서, 공지된 서열 조합이 확인될 수 있으며, 공지되지 않은 서열 조합은 새로운 대립 유전자로서 동정될 수 있다.

낭포 섬유증 담체 스크리닝 -

본 발명의 하나의 실질적 용도는 CFTR(낭포 섬유증 Transmembrane Conductance) 유전자에서의 비-지정 돌연변이 그리고 다형성의 거대한 세트의 환경 내에서 지정된 돌연변이 세트의 분석에 관련된다. 이 세트의 각각의 지정된 돌연변이는 질병과 관련되며 독립적으로 스코어되어야 한다. 가장 간단한 경우의 점 돌연변이에서, 두 인코드된 프로브가 지정 부위와 그들의 각각의 3' 말단의 정렬을 확보하기 위하여 제공된다. 하나의 프로브는 야생형을 그리고 다른 것은 변형된 ('돌연변이된') 표적 서열에 대한 것이다.

그러나, 지정 부위 근처에서 만나는 특이적 표적 서열 배열과 무관하게 신장을 확보하기 위해서는, 여기서 여러 실험예에서 설명된 바와 같이, 가능한 또는 유사한 배열과 매치를 제공하기 위하여 추가적인 프로부가 제공된다. 바람직한 실시예에서, 커버링프로브 세트는 모든 공지된 또는 대응되는 표적 아서열의 있음직한 변형에 대응되는 TEI서열을 나타내는 프로브를 함유하도록 구성된다. 이것은 지정 부위의 근접하는 범위 내에 위치하는 비-지정 다형성의 다른 점에서 신장-억제의 존재를 확보한다.

특정 실시예에서, 비-지정 부위에서 만나는 특이적 표적 배열의 동정은 커버 링 프로브 세트에서 제공되는 서열의 하나가 신장을 확보하기 위하여 충분히 가깝게 표적서열에 매치되고 따라서 매치TEI 영역 내에 정확이 표적 서열이 매치되는 한 불필요하다. 이 경우, 동일한 3' 말단을 공유하는 모든 또는 일부의 커버링 프로브는 동일한 코드에 지정될 수 있다. 바람직한 실시예에서, 이러한 프로브는 동일한 고형 지지체('프로브 풀링')와 결합될 수 있다. 프로브 풀링은 필요한 TEI 서열의 수를 나타내기 위하여 요구되는 구별가능한 고형 지지체의 수를 감소시킨다. 특히 바람직한 실시예에서, 고체 지지체는 구별할 수 있는 마이크로입자의 어레이 또는 세트의 형태로 제공되며, 이것은 본래의 장소에서 디코드(decoded)될 수 있다. 표적 영역 내의 추가적 다형성을 동정하기 위하여 커버링 프로브 세트에 추가적 프로브를 개입하는 것은 다양한 모집단의 유전자형(haplotype)을 밝히기 위하여 유용한 방법이다.

HLA -

본 발명의 다른 용도는 사람 백혈구 항원 (HLA) 복합체의 유전적 분석에 관련된다. 이것은 HLA 인코딩 클래스I HLA 항원 (바람직하게는 HLA-A, HLA-B, HLA-C 또는 이들의 다른 조합) 그리고 클래스II BLA 항원 (바람직하게는 HLA-DR, HLA-DQ, HLADP 또는 이들의 다른 조합을 포함하는)의 영역 내의 하나 또는 그 이상의 대립 유전자의 동정을 허용한다.

클래스I 그리고 II 유전자 좌위는 또한 동시에 분석될 수 있다.

다중 비상관된 지정된 돌연변이의 독립적 스코어링과 반대로, 대립 유전자 (또는 대립 유전자의 그룹)의 동정은 신장 반응의 전체 세트의 스코어링에 의존한 다. 각각의 이들 반응은 지정 다형성 부위의 선택적 세트의 멤버에 도입되는 하나 또는 그 이상의 프로브에 관련된다. 이들 신장 반응의 세트는 특정 신장 신호 패턴을 생성한다. 바람직한 실시예에, 두 가지 패턴(binary pattern)이 생성된다. 매치되는 (그러므로 신장된) 프로브는 값 '1' 할당, 그리고 비 신상된 프로브는 'O'. 주어진 길이의 이 두 패턴은('스트링') 훌륭하게 대립 유전자 또는 대립 유전자의 그룹을 동정한다.

BLA 유형분석을 위하여 필요한 프로브의 총 개수는 필요한 해상도에 따른다. '해상도' 라는 용어는 여기서 대립유전자의 식별의 정도를 지시한다. 바람직하게는, 본 발명의 방법은 다른 항원 그룹을 구별하는데 충분한 BLA 대립 유전자의 유형분석을 허용한다. 예를 들면, A*01 그리고 A*03는 임상 용도에서 구별되어야 하는 다른 항원이다. NMDP (국립 골수 기증 프로그램 : National Marrow Donor Program)은 증여자의 분자 유형 분석을 위한 패널을 권장하였다. NMDP 패널에서 요구하는 저-내지-중 해상도는 다른 항원 그룹은 항상 구별되어야 한다는 것을 의미한다. 더욱이, 비록 모든 대립 유전자가 구별될 필요는 없으나, 한 그룹 내의 대립 유전자의 적어도 일부는 구별되어야 한다. 특정 실시예에서, 본원 발명은 NMDP 표준 (www.NMDPresearch.org : 여기에서 참조문헌으로 편입됨)에서 정의된 바와 같이 allows 유형분석 of the HLA 대립 유전자의 저 내지 중 해상도의 유형분석을 허용한다.

이러한 해상도로, A*01 , A*03 등., 은 항상 동정될 것이다. A*0101 그리고 A*0102는 반드시 구별되지 않을 수 있다. SSO 방법의 경우, 현재의 NMDP 패널은 HLA-A의 30 프로브; HLA-B의 48 그리고 HLA-DR-B 31를 보유한다. 고 해상도 HLA 유형분석은 각각의 그룹 내에서 대부분의 대립 유전자가 동정되는 상태를 칭한다. 이 경우, A*0101 그리고 A*0102는 구별될 것이다. 이러한 해상도에 도달하기 위해서, 약 500 내지 1000 프로브가 클래스I 그리고 클래스1 모두의 유형분석을 위하여 요구될 것이다. 특정 실시예에서, 본원 발명의 방법은 적어도 여기에 참조문헌으로 편입된 Cao, et al., Rev. Immunogentics, 1: 177-208 (1999)에 개시된 정도의 고 해상도의 HLA 유형분석을 제공

한다.

본 발명은 또한 신장 반응 신호 패턴에 기초한 고유 대립 유전자 할당을 생성하기 위하여 그러한 지정부위에 대한 프로브 세트의 설계를 위한 그리고 지정부위를 위한 전략을 제공한다. 커버링 프로브의 설계는 명백히 각각의 프로브의 DA 그리고 TEI 영역의 독특한 개별적 기능을 고려한다.

주어진 지정부위와 연관된 프로브의 커버링 세트는 서브세트를 보유하기 위하여 구성된다. 각각의 서브세트를 차례로 동일한 TEI 영역을 나타내는 프로브를 보유한다. TEI 영역 내의 단일 위치의 미스매치, 또는 DA 영역 내의 셋 또는 그 이상의 미스매치는 신장을 방해한다. 따라서, 그러한 조성의 차이를 나타내는 두 프로브의 신장은 일반적으로 독특한 신장 패턴을 생성할 것이다. 모든 그러한 프로브는 그들이 개별적으로 인코드 되는 한 병렬적 신장반응에서 다중화(multiplexed)될 수 있다. 바람직한 실시예에서, 인코딩은 컬러-인코드된 비드에 프로브가 부착됨으로써 수행된다.

두 위치 까지만 다른 DA 아서열(subsequence)을 나타내는 그리고 동일한 TEI 아서열(subsequence)을 나타내는 프로브는 일반적으로 완벽한 매치의 그것보다 낮거나 또는 그에 견줄 만 한 수득율(그리고 그러므로 신호 강도)로 신장반응을 생성할 것이다. 미스매치의 관용성(tolerance)을 지시하는 첫 번째 경우, 문제가 되는 프로브에 의하여 매치된 대립유전자의 세트는, DA 영역 내에소 관용되는 미스매치 서열을 나타내는 대립 유전자를 포함하도록 확장될 것이다. 부분적 관용성만을 지시하는 두 번째 경우, 대립 유전자 매칭 패턴을 더 밝히기 위하여 여기서 세 가지 접근법이 설명된다. 첫 번째 접근법에서, 개별적인 DA 영역에 하나 또는 두 뉴클레오타이드 다형성을 나타내는 프로브는 커버링 세트 내에 포함된다. 표적서열에 관한 정보는 커버링 세트 내의 다른 프로브에 의하여 생성되는 신호의 강도를 양적으로 비교함에 의하여 얻어진다. 두 번째 접근법에서, 사슬(tether)에 의하여 결합된 분리된 DA 그리고 TE1 영역을 포함하는 프로브는 표적 다형성을 피하기 위하여 TEI 영역으로부터 더 멀리 DA 영역이 배치되도록 사용된다. 세 번째 접근법에서, 프로브는 매치된 대립 유전자의 세트의 오직 적당한 확정을 제공하는 그러한 경우에 선택적으로 풀링(pooled) 된다.

본 발명 프로브는 특정 실시예에서 바람직하게는 HLA 유전자 좌위(locus) 내에서 대립 유전자 조합과 상관(correlate)하는 것으로 알려진 특정 표적 서열에 상보적으로 되도록 설계된다. 알려진 다형성은 검색할 수 있는 사용 가능한 서열의 데이타베이스 (예, www.NMDPresearch.org) 또는 문헌에 나타난 것들이다. 특정 실시예에서, 이해(interest) BLA 유전자는 BLA 클래스I 그룹, (예, HLA-A, HLA-B 또는 HLA-C 또는 이들의 조합)에 속한다. 다른 실시예에서, 이해(interest) BLA 유전 자는 HLA 클래스II 그룹, (예, DR, DQ , DP 또는 이들의 조합)에 속한다. HLA 클래스I 그리고 클래스II 좌위는 조합하여 검사될 수 있으며 그리고 공동 검색에 의하여 검사될 수 있다.

앞서 SSP/겔 방법에서 적용된 프로브 또한 본 발명에 사용될 수 있다. 바람직하게는, Bunce et al., Tissue Antigen, 46: 355-367 (1995) and/or Bunce et al., Tissue Antigen, 45:81-90 (1995), (각각은 참조문헌으로 여기에 편입됨)에서 설정된 프로브 세트가 본 발명의 프로브를 제조하기 위하여 사용된다. WO 00/65088; 유럽 특허출원 제. 98 111696.5호 ; WO 00/70006; 그리고 Erlich et al., Inmumity, 14: 347-356 (2001), (각각은 참조문헌으로 여기에 편입됨)에서 제공된 프로브 서열 또는 HLA 서열 정보는 본 발명의 프로브의 설계에 사용될 수 있다.

인코드된 비드 어레이(array)의 복잡성은 필요한 유형분석 해상도를 수용하기 위하여 쉽게 조정된다. 예를 들면, 32 타입의 비드가 네 독특한 서브어레이의 각각을 위하여 사용되는 경우, 총 128 프로브가 다중 신장 반응에서 HLA 클래스I 그리고 클래스II 유형분석을 위하여 중간 해상도의 수준에 도달하기 위하여 사용될 것이다. 이와 유사하게, 128 타입의 비드 그리고 4 서브 어레이, 또는 64 타입의 비드 그리고 8 서브어레이로, 총 512 프로브가 다중 신장 반응에서 HLA 클래스I 그리고 클래스II 유형분석의 고해상도에 도달하기 위하여 사용가능할 것이다.

인코드된 비드 어레이 형식은 고도의 작업처리 분석에 사용가능하다. 예를 들면, 본 발명의 특정 실시예는 96-웰(well) 마이크로플레이트의 규모를 수용할 수 있는 형식에서 다중 샘플을 수용하는 담체를 제공한다. 그러므로 이 샘플 분포는 표준 로봇의 액체 취급 장치(standard robotic fluid handling apparatus)에 의하여 취급될 수 있다. 이 형식(format)은 칩상에 고정된 다중 인코드된 비드 어레이을 수용할 수 있으며 단일 멀티 칩 담체 상의 다중 수동자(patient) 샘풀의 각각을 위한 다중 유형분석 반응의 동시적인 완성을 허용한다. 수동자(patient)당 128타입을 테스트하는 96-웰 담체에서, 10,000 유전자형 이상이 현재의 SSP 또는 SSO 방법론으로는 도달할 수 없는 작업 처리량의 속도로 결정될 수 있다.

본 발명의 특정 실시예에서, 신장 반응은 동일 DNA 표적 가닥 상의 아서열(subsequence)과 상관하기 위하여 혼성화 반응과 조합할 수 있다. 이 능력을 여기서 '페이싱(phasing)'이라 칭한다. 페이싱은 주어진 신장 패턴은 대립 유전자의 다른 조합에 의하여 발생된다는 가능성으로부터 야기된 대립 유전자 할당의 모호함을 해결한다. 유사하게, 페이싱은 동일 DNA 가닥 또는 염색체에 대한 다형성을 지정하기 위한 haplotying의 환경에서 유용한다.

본 발명의 특성 실시예에서, 신장 반응의 어닐링 그리고 신장 단계는 한-단계 반응으로서 조합될 수 있다. 더욱이, 연

속적인 또는 불연속적인 온도 변화를 생성하기 위한 수단은 다중 반응에서 다른 용융 온도로 프로브를 위한 다중 최적 조건을 수용하기 위하여 시스템에 편입될 수 있다.

본 발명의 특정 실시예에서, 인코드된 비드 어레이은 고형 기질 상에 형성된다. 이들 고형 기질은 유리 또는 반도체와 같은 적절한 고체 물질을 포함할 수 있으며, 이것은 충분한 기계적 강도를 가지며 필요한 경우 제조 단계에 편입될 수 있다. 일 실시예에서, 고형 기질은 '칩(칩)'으로 알려진 불연속 유닛으로 분리된다. 인코드된 비드 어레이을 포함하는 칩은 개별적으로 또는, 만일 그들이 다중칩 담체에 부하되는 경우, 그룹으로 가공될 수 있다. 예를 들면, 온도 제어의 표준 방법은, 단일 칩에 또는 다중칩 담체에 대한, 온도 변화의 미리 프로그램된 서열을 적용하기 위하여 또는 작동 온도를 조절하기 위하여 쉽게 적용된다. 더욱이, 칩은 PCT/US01/20179에 개시된 바와 같이, READ (Random encoded array detection)의 직접 이미징(imaging) 능력으로 분석될 수 있다. 이 내용은 여기 참조문헌으로 편입된다. READ를 사용하여, 칩 상의 인코드된 비드의 전체 어레이의 다중 분석이 가능하다. 더욱이, READ형식에서, 미리 프로그램된 온도 사이클의 적용은 신장 생성물의 실시간 칩-상의(real-time on-칩) 증폭을 제공한다. 주어진 게놈, 미토콘드리아의 또는 다른 DNA에서, 선형 칩-상(on-칩)의 증폭은 PCR과 같은 선-분석 DNA 증폭에 대한 필요를 제거할 것이다. 그러므로 전체 유형 분석 분석법을 완결하는데 요구하는 시간을 극적으로 단축한다. 시체의 유형분석과 간은 시간에 민감한 적용이 그러므로 가능하다. 더욱 중요하게는, 이 접근법은 많은 유전자 스크리닝 그리고 다형성 분석을 제한하는 단계인 PCR 다중성(multiplexing)의 복잡성을 제거한다. 바람직한 실시예에서, 유동성 카트리지가 온도의 제어는 물론 시약 그리고 샘플의 주입을 위하여 제공된다.

일 실시예에서, 본 발명은 다형성 분석 방법의 제공하며, 여기서 각각의 표적 핵산 서열은 하나 또는 그 이상의 '어닐링-연장-탐지-변성' 온도 사이클을 적용함으로써 다중 신장 반응에서 주형으로 사용된다. 이 방법은 신장 생성물의 본래의 장소에서의 (in-situ) 탐지로 선형 증폭을 달성한다. 이 부가적 능력은 폴리뉴클레 오타이드 샘플의 서열-특이적 증폭의 첫 번째 단계에 대한 필요성을 제거한다.

분석 절차의 통합 그리고 사이클링 방법에 의한 신호의 증폭은 유전자 분석의 완성을 가속화하고 단순화 할 뿐만 아니라, 다중 PCR 절차의 개발, 시험, 도구에 대한 필요성을 제거한다. 본 발명의 방법은 또한 다중 수동자(patient) 샘플의 동시적인 유전자 분석을 위한 고도의 작업 처리 형식을 제공한다.

본 발명의 몇몇 실시예는 다른 표적의 수를 동시에 평가하도록 하는 서열-특이성 프로브의 다중 신장을 위하여 제공된다. 특정 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드 프로브는 예를 들면 실리콘 또는 유리 표면과 같은 단일 표면 상에 프로브의 조밀한 패턴을 생성하기 위하여 고형 지지체위에 고정된다. 특정 실시예에서, 미리 합성된 올리고뉴클레오타이드 프로브는 예를 들면, 플라스틱, 화학적으로 변형된 유리, 유리, 화학적으로 변형된 실리콘, 실리콘을 포함하는 고형 지지체 상에 고정된다. 이들 고형 지지체는 극히 미세한 비드의 형태일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 어레이의 해상도는 전달 시스템의 공간적 해상도 그리고 전달된 뉴클레오타이드 용액 부피의 물리적 공간 요구값 모두에 의해 결정된다. [참조. Guo, et al., Nucleic acids Res. 22. 5456-5465 (1994); Fahy, et al., Nucleic acid Res. 21: 1819-1826 (1993); Wolf, et al., Nuc. Acids Res. 15: 2911-2926 (1987); and Ghosh, et al., Nuc. Acids Res. 15: 5353-5372 (1987).]

본 발명은 다중 분석 방법을 제공한다. 특정 실시예에서, 신장 프로브 세트는, 예를 들면, 프로브를 공간적으로 분리함에 의하여 그리고/또는 프로브 본질을 화학적으로 인코딩함에 의하여, 그들의 본질을 보존하는 방법으로 고형상에 고정된 다. 하나 또는 그 이상의 용액이 낳은(solution-borne) 표적은 그 후, 어닐링 그리고 신장 반응에서 고정된 프로브의 다중성과 접촉하도록 한다. 이 고정에 의한 프로브 상호의 공간적 분리는 신장 생성물의 동정에 있어서의 모호함을 감소시킨다. 따라서, 본 발명은, (i) 각각의 PCR 증폭을 위한 2 프로부의 필요; (ii) 다중 동질성 반응에서 HLA과 같은 고도의 다형성 유전자를 위한 중복 프로브 사이의 경쟁; 그리고 (iii) 그러한 다중 반응에서 특이성 생성물간의 구별의 어려움 때문에 고도의 작업처리 형식에 적합하지 않은, 현존하는 PCR-SSP 방법을 능가하는 장점을 제공한다.

바람직한 실시예에서, 프로브는, 그들의 개별적인 5' 말단을 통하여, 부착된 프로브를 특이적으로 구별하는 화학적으로 또는 물리적으로 구별 가능한 특성을 갖는 인코드된 마이크로입자 ('비드')에 부착된다. 프로브는 비드를 접촉하는 용액에 함유된 표적 이해 서열을 포착한다. 특정 비드상에 나타난 프로브의 신장은 광학적으로 탐지 가능한 신호 또는 광학적으로 탐지 가능한 신호로 전환될 수 있는 화학적 신호를 생성한다. 다중 신장 반응에서, 각각의 관여하는 비드의 광학적 신호는 특이적으로 그 비드에서 나타나는 프로브에 대응한다. 프로브 신장 단계의 다음, 예를 들면 플로우 사이토메트리(flow cytometry)에 의한 입자 동정 그리고 탐지 방법에 의하여 프로브의 본질을 결정할 수 있다.

특정 실시예에서, 비드는 신장 단계 전에 기질 상에 평면으로 정렬될 수 있다. 비드는 또한 신장 단계 후에 이미징(imaging)을 촉진하기 위하여 평면 기질 상에 조립될 수 있다. 여기서 제공되는 공정 그리고 시스템은 다중 수동자(patient) 샘플의 동시적인 유전자 분석 그리고 비드의 전체 어레이의 즉각적인 이미징(imaging)을 허용하는 고도 작업처리 분석 형식을 제공한다.

비드의 어레이는 무작위(random) 인코드된 어레이일 수 있으며, 여기서 어레이 내에서 비드의 화학적으로 또는 물리적으로 구별 가능한 특성은 비드에 부착된 올리고뉴클레오타이드 프로브의 본질을 나타낸다. 어레이는 READ 형식에 따라 형성될 수 있다.

비드 어레이는 용도-특이적 기질을 형성하기 위하여 분리 배치 공정을 적용함으로써 제조될 수 있다. (예, 웨이퍼 규모에서의 칩). 인코드된 그리고 올리고뉴클레오타이드 프로브에 부착된 비드는 (예, 약 10^{8} 비드/100㎕ 현탁액의 규모에서) 기질과 조합되고 (예, 실리콘 칩) 기질의 지정된 영역 상에 조밀한 어레이를 형성하기 위하여 조립된다. 특정 실시예에서, 비드 어레이는 3.2 ㎛직경의 4000비드를 보유하며 그리고 300 ㎛ by 300 ㎛의 규모를 갖는다. 다른 크기의 비드로, 밀도는 변화될 것이다. 다중 비드 어레이는 또한 동일한 칩에서 유지되는 불연속적인 액체 분획 내에서 동시에 형성될 수 있다. 그러한 방법은 미국 출원 번호 제10.192,351, (2002년 7월 9일 출원)에 개시되며, 이것은 여기에서 전체가 참조문헌으로 편입된다.

비드 어레이는 미국 특허 제6.251.691호 그리고 PCT 국제출원 제 PCT//US 00/25466호)에 개시된 바와 같이 총괄적으로 'LEAPS'로 지칭되는 방법에 의하여 형성될 수 있으며, 두 문헌은 여기에서 참조문헌으로 편입된다.

본 발명에서 사용되는 기질(예, 칩)은 LEAPS의 계면 패턴화 (interfacial patterning) 방법에 따른 평면 전극의 형태로 될 수 있다. 예를 들면, 기질은 적용되는 AC 전기장의 존재 하에서 임피던스 기울기의 요구되는 배열을 생성하기 위하여 산화물 또는 다른 유전체 물질로 패턴화될 수 있다. 패턴은 AC-장 유도 액체 흐름(AC field-induced fluid flow)의 요구되는 배열 그리고 대응되는 입자의 전달을 생성하기 위하여 설계될 수 있다. 기질은 반도체 가공 기술을 사용하여 웨이퍼 규모에 패턴화될 수 있다. 또한, 기질은 유동성 도관(fluidic conduits) 그리고 구획의 필요한 짜임을 기질에 부가하기 위하여 UV-패턴화 가능한, 광학적으로 투명한 중합체의 박막을 침착함에 의하여 구획될 수 있다. 이들 도관 그리고 구획은 하나 또는 여러 개의 불연속적 분획에서 액체를 제한한다. 그러므로 주어진 기질 상에 다중 샘플을 수용한다.

비드 어레이은 전해질 용액과 같은 편광화 가능한(polarizable) 액체 매질을 함유하는 그리고 갭에 의하여 분리된 두 전극으로 제 2 평면 전극에 실질적으로 평행한 제 1 평면 전극을 제공함으로써('샌드위치' 배열) LEAPS를 사용하여 제조될 수 있다. 제 2 평면 전극의 안쪽 또는 표면은 계면 패턴화 (interfacial patterning) 방법으로 패턴화 될 수 있다. 비드는 갭으로 도입된다. AC 전압이 갭에 도입되는 경우, 비드는 제 2 전극(예, '칩') 상에 무작위 인코드 어레이(random encoded array)를 형성한다.

LEAPS의 다른 실시예에서, 비드의 어레이는 광-감수성 전극 (예, '칩')상에 형성될 수 있다. 바람직하게는, 전술한 이 샌드위치 배열이 또한 평면 광감수성 전극 그리고 다른 평면 전극과 사용될 수 있다. 또 다시, 두 전극은 갭으로 분리되며 그리고 전해질을 보유한다. 이 기능화 된(functionalized) 그리고 인코드된 비드는 갭에 도입된다. 빛과 조합하여 AC 전압을 적용함에 따라, 비드는 광-감수성 전극 상에 어레이를 형성한다.

본원 발명의 특정 실시예에서, 비드는 화학적으로 또는 물리적으로 구별 가능한 특성과 관련될 수 있다. 이것은 예를 들면, 방사 강도, 흥분 상태의 주기(excited-state lifetime), 방사 파장, 여기(excitation) 파장에 의하여 스펙트럼으로 구별 가능한 하나 또는 그 이상의 형광자 또는 발색단 염료를 함유하는 것들과 같은, 광학적으로 구별 가능한 꼬리표의 세트로 비드를 염색함으로써 제공된다. 광학적으로 구별 가능한 꼬리표는 예를 들면, Fulwyler, US 4,717,655 (Jan 5, 1988)에 개시된 바와 같이, 특화된 비율로 비드를 염색하기 위하여 사용될 수 있다. 염색은 또한 이 기술분야에 공지된 방법에 따라 입자의 팽창에 의하여 수행될 수 있다. (Molday, Dreyer, Rembaurn amp; Yen, J. Mol Biol 64, 75-88 (1975); L. Bangs, 'Uniform latex particles, Seragen Diagnostics, 1984). 예를 들면, 12 타입까지의 비드가 팽창에 의하여 인코드 되었으며 그리고 2가지 색으로 벌크 염색되었다. 각각은 개별적으로 4 강도 수준이며, 4가지의 명목상 몰 비율로 혼합되었다. 다른 방법으로서, 국제 출원 제 PCT/US 98/10719 (전체가 참조문헌으로 편임됨)에서 개시된 컬러 인코딩 조합 방법(combinatorial color 인코딩)은 광학적으로 구별 가능한 꼬리표를 비드 어레이에 부여하기 위하여 사용될 수 있다. 화학적 인코딩 이외에, 비드는 또한 PCT/USO/20179에 개시된 공정에 의하여 자성이 될 수 있다.

염료로의 화학적 인코딩 이외에, 특정 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 갖는 비드는 공간적으로 분리될 수 있으며('공간적 인코딩'), 그러므로 비드의 위치는 비드의 본질에 대한 정보를 제공한다. 공간적 인코딩은, 예를 들면, LEAPS(Light-controlled Electrokinetic Assembly of Particles near Surfaces)를 사용함에 의하여 배열 조립 과정에서 단일 액체상 내에서 수행될 수 있다. LEAPS는 전기장의 변화에 대응하여 그리고/또는 기질 상에 발사되는 빛의 패턴에 따라 요구되는 배열에서 평면 비드 어레이를 조립하기 위하여 사용될 수 있다.

LEAPS는 어레이 조합을 중재하는 전기유체력(electrohydrodynamic forces)을 조절하기 위하여 실리콘 칩 그리고 용액 사이의 계면에서 임피던스의 측면 기울기(lateral gradients)를 생성할 수 있다. 전기적 요구값은 적정 수준이다. : 일반적으로 $10V_{pp}$ 미만의 낮은 전압 이 일반적으로 100㎛인두 평면 전극 사이의 액체 갭을 가로질러 적용된다. 이 조립 공정은 신속하며 광학적으로 프로그램 가능하다. : 수천개의 비드를 보유하는 어레이는 적용된 전기장 하에서

수초 내에 형성된다. 다중 서브배열의 형성은 또한 분획화된 칩 표면상에 유지되는 다중 액체 상에서 또한 발생할 수 있다.

배열의 형성 다음에, 배열은 고정될 수 있다. 예를 들면, 비드 어레이는 무작위 인코드 어레이를 생성하기 위하여 DC 전압을 적용함으로써 고정된다. 일반적으로 5-7 V (2-6㎛ 범위의 비드 그리고 갭 크기 100-150 ㎛를 위한)으로 설정되며 'reverse bias' 배열로 <30 초 동안 적용되어 그러므로 n-도프된 실리콘 기질이 양 극(anode)을 형성하는, DC 전압은 어레이 내의 인접 비드 사이의 접촉을 촉진하는 정도로 어레이가 압축되는 것을 야기한다. 그리고 동시에 전극 표면에 직접 근접하는 고전기장의 영역을 향하여 비드가 움직이도록 야기한다. 일단 충분히 가깝게 근접하면, 비드는 물리적 흡착을 중재하는 반데르발스 힘(van der Waals forces)에 의하여 고정된다. 이 흡착 공정은 비드 표면에 비드 표면으로부터 연장되는 '사슬(tethers)'의 집단을 제공함으로써 촉진된다. ; 폴리라이신 그리고 스트렙타비딘이 이 목적으로 사용된다.

특정 실시예에서, 입자 어레이는 화학적 수단, 예를 들면 복합 젤-입자 박막을 형성함으로써 고정될 것이다. 그러한 젤-복합 입자 막막을 형성하는 한 예시적인 방법에서, 마이크로입자의 현탁액이 제공되며, 이것은 또한 본래 장소에서의(in-situ) 젤 형성을 위한 개시인자(initiator), 모노머, 그리고 가교제(crosslinker)를 보유한다. 입자들은 LEAPS을 사용함으로써 기질 상에 평면 집합으로 조립된다. 진동수 100 헤르쯔에서 수 킬로헤르쯔 범위의 1-20V $_{pp}$ 의 AC 전압이 액체 갭을 가로지르는 전극 사이에 적용된다. AC 전압의 | 존재 하에서, 액체 상의 중합은 적외선 (IR) 램프를 사용하여 셀을 열적으로 ~40-45℃로 가열함에 의하여 또는 수은 램프 광원을 사용하는 반응의 광개시(photoinitiating)에 의하여 어레이 집함 이후에 촉발된다. 결과물인 젤은 효과적으로 입자어레이를 포위한다. 젤은 20% 내지 5%의 다양한 모노며 농도의 비스아크릴아마이드 그리고 아크릴아마이드의 혼합물로 구성될 수 있다. (아크릴아마이드 : 비스아크릴아마이드 = 37.5 : 1 몰비), 그러나 다른 낮은 점도의 수용성 모노머 또는 모노머 혼합물 또한 사용될 수 있다.

이 공정에 의하여 제조된 화학적으로 고정된 기능화된(functionalized) 마이크로 입자 어레이는 다양한 생물 분석법, 예를 들면 리간드 수용체 결합 분석법(ligand receptor binding assays)에 사용될 수 있다.

일 예에서, 열적 하이드로겔(thermal hydrogels)은 중합 혼합물의 전체 이온 강도는 0.1 mM 내지1.0 mM 범위에 있음을 확보하기 위하여 낮은 농도에서 열적 개시인자로서 아조디이소부틸아미딘 디하이드로클로라이드(azodiisobutyramidine dihydrochloride)를 사용하여 형성된다. UV 중합에 사용되는 개시인자는 Irgacure 2959 (2-Hydroxy-4'-hydroxyethoxy methylpropiophenone, Ciba Geigy, Tarrytown, NY)이다. 개시인자는 중량으로 1.5%가 되도록 모노머에 가한다.

특정 실시예에서, 입자 어레이는 기계적인 수단에 의하여 고정될 수 있다. 예를 들면, 마이크로웰(microwells)의 어레이는 실리콘 기질의 낮은 임피던스 영역에서 표준 반도체 가공 방법에 의하여 제조될 수 있다. 입자 어레이를 그러한 구조를 사용하여 형성될 수 있다. 특정 실시예에서 LEAPS 중재 유체력(hydrodynamic) 그리고 판드로 모티브힘(ponderomotive forces)은 구멍 어레이(hole array)에서 입자를 운반하고 축적하기 위하여 사용된다. 그 다음 AC 장은 끄고 입자는 마이크로웰에 갇히며 따라서 기계적으로 제한된다. 여분의 비드는 기질 표면 상에 공간적으로 정렬된 무작위의 비드 어레이을 뒤로하고 제거된다.

기질 (예, 칩)은 유체성 상호연결을 통하여 샘플 및 시약이 안 밖으로 운반되도록 하는 하나 또는 그 이상의 둘러싸인 분획에 배치될 수 있다. 반응은 또한 미세 적정 플레이트과 같은 개방 분획 형식에서 수행될 수 있다. 시약은 로봇 액체 취급 장치에 의하여 칩의 생부에 분급될 수 있으며, 다중 샘플은 동시에 가공될 수 있다. 이러한 형식은 존재하는 마이크로 적정 플레이트 형식을 위한 액체 취급 및 표준 샘플 가공을 수용하며 샘플 가공과 어레이 탐지를 통합한다.

본 발명의 특정 실시예에서, 인코드된 비드는 기질 표면상에 조립되나, 어레이 상태로는 아니다. 예를 들면, 비드 현탁액을 기질의 다중 영역에 스포팅(spotting) 하고 비드가 중력 하에서 정착하도록 함으로써 비드의 집단은 기질 상에 형성된다. LEAPS에 의하여 형성된 비드 어레이와 반대로, 이들 집단은 일반적으로 비드의 클럼핑(clumping) 또는 스태킹(stacking)과 관련된 저 밀도 또는 비-평면 배열의 무질서한 배열을 취한다. 그러나, 기질상의 불연속적 위치의 다수에 화학적으로 인코드된 비드의 혼합물을 스포팅함으로써 도달된 공간적 그리고 컬러 인코딩의 조합은 여전히 다중성을 허용한다.

특정 실시예에서, 어레이의 디코드된 이미지(decoded image)로의 분석 후에 어레이의 이미지의 비교는 프로브의 신장은 물론, 화학적으로 또는 물리적으로 구별 가능한 성질을 나타내는데 사용된다. 이 비교는 예를 들면, 광학적 현미경과 이미지 탐색기(imaging detector) 그리고 컴퓨터화된 이미지 캡춰 그리고 분석 장비를 사용하여 수행될 수 있다. 어레이의 분석 이미지는 프로브의 신장을 나타내는 광학적 신호를 탐색하기 위하여 취한다. 디코드된 이미지는 비드 표면상에 나타나 는 프로브를 특이적으로 동정하는 화학적으로 그리고/또는 물리적으로 구별 가능한 특성을 결정하기 위하여 취한다. 이러한 방법으로 어레이 내의 각각의 입자 상의 프로브의 본질은 구별 가능한 특성에 의하여 동정된다.

이미지 분석 알고리즘이 디코딩 그리고 이미지 분석으로부터 얻은 데이터의 분석에 사용된다. 이들 알고리즘은 어레이 내의 각 비드의 정량적 데이터를 얻기 위하여 사용될 수 있다. 분석 소프트웨어는 자동적으로 주형으로서 어레이의 명시야상(bright-field image)을 사용하여 비드 중심을 배치하고, 비드를 타입에 따라 그룹화 하고, 개별적인 비드에 대한 정량적 강도를 할당하고, 혈청 샘플의 불규칙한 형태의 '기질'물질에 의하여 제조된 것과 같은 '흠결'을 제거하며, 배경 강도의 통계를 분석하며 그리고 대응되는 변이에 따라 모든 비드 타입의 배경-보정된 평균 강도를 산출한다. 이러한 알고리즘의 예시는 PCT/US01/20179에서 설정되어 있다.

프로브 신장은 예를 들면 신장된 프로브를 나타내는 비드로부터 기원하는 광학적 신호의 변화에 의하여, 또는 광학적 신호로 전환될 수 있는 화학적 신호의 변화에 의하여 나타날 수 있다. 이 목적을 위한 직접적인 그리고 간접적인 표지 방법은 이 기술분야에 잘 알려져 있다. 직접적 표지는 신장으로부터 초래되는 광학적 기호의 변화를 지시한다. ; 간접적 표지는 탐지 가능한 광학적 신호를 생성하는 하나 또는 그 이상의 부가적 단계를 요구하는 신장에 의하여 유도되는 변화를 지시한다. 특정 실시예에서, 형광자 또는 발색단 염료는 프로브 신장의 성분으로서 뉴클레오타이드의 하나에 부착된다. 그러므로 프로브 신장은 예를 들면 형광 강도의 변화에 의하여 또는 신장 생성물을 나타내는 비드의 광학적 신호의 다른 변화를 제공 함에 의하여 비드의 광학적 신호를 변화시킨다.

실시예

본원 발명은 이하에서 실시예로부터 더 잘 이해될 것이다. 이들 실시예는 상세한 설명을 위한 것이며 발명을 제한하고자 하는 것이 아님을 이해하여야 할 것이다.

실시예 1 - 다중 SSP 분석 을 위한 엇갈려 배열된 프로브 설계

각각의 다형성에 대한 프로브는 고형상 담체에 고정되어 다중 공동 어닐링 그리고 연장 반응이 최소한의 상호 간섭으로 진행할 수 있는 형식을 제공한다. 특히, 이 방법은 도 1에 도시된바와 같은 중복하는 프로브를 수용하는 설계를 제공한다. 이 실시예에서, 우리는 3 대립 유전자를 고려하였다. : 대립 유전자 A, 대립 유전자 B 그리고 대립 유전자 C. 프로브 1 그리고 2 는 그들의 개별적인 3'말단과 정렬하는 SNPs를 탐지하며, 프로브 3 그리고 4는 그들의 개별적인 3'말단과 정렬하는 두-뉴클레오타이드 다형성을 탐지한다. 프로브 1 그리고 2 에 의하여 표적되는 다형성 부위는 프로브 3 그리고 4에 의하여 표적되는 것들의 5 뉴클레오타이드 상류에 위치한다. 이 설계는 지정 다형성 부위에서 완벽한 매치가 있는 경우, 각각의 프로브가 그것의 대응되는 표적에 결합되도록 하며 신장이 진행되도록 한다. 따라서, 프로브 1 그리고 3은 대립 유전자 A와 매치하고, 프로브 2 그리고 가능하게는 프로브 3은 대립 유전자 B와 매치하며, 그리고 프로브 1 그리고 4 는 대립 유전자 C 와 매치한다.

실시예2: HLA 유형분석을 위한 프로브의 설계

DRB 유전자의 염기 106 내지 염기 125의 범위로부터 다형성 영역의 분석을 위한 프로브를 설계하기 위하여, 20염기 길이의 단편의 22개의 다른 타입의 서열이 DRB 데이터베이스에 배치되었다. 이들은 아래 표에 나열된다.

7	DRB1*0101	TTCTTGTGGCAGCTTAAGTT
104	DRB1*03011	TTCTTGGAGTACTCTACGTC
26	DRB1*04011	TTCTTGGAGCAGGTTAAACA
1	DRB1*0434	TTCTTGGAGCAGGTTAAACC
3	DRB1*07011	TTCCTGTGGCAGGGTAAGTA

1	DRB1*07012	TTCCTGTGGCAGGGTAAATA
28	DRB1*0801	TTCTTGGAGTACTCTACGGG
1	DRB1*0814	TTCTTGGAGTACTCTAGGGG
1	DRB1*0820	TTCTTGGAGTACTCTACGGC
1	DRB1*0821	TTCTTGGAGTACTCTATGGG
1	DRB1*09012	TTCTTGAAGCAGGATAAGTT
2	DRB1*10011	TTCTTGGAGGAGGTTAAGTT
1	DRB1*1122	TTCTTGGAGCAGGCTACACA
1	DRB1*1130	TTCTTGGAGTTCCTTAAGTC
18	DRB1*15011	TTCCTGTGGCAGCCTAAGAG
9	DRB3*01011	TTCTTGGAGCTGCGTAAGTC
1	DRB3*0102	TTCTTGGAGCTGTGTAAGTC
1	DRB3*0104	TTCTCGGAGCTGCGTAAGTC
16	DRB3*0201	TTCTTGGAGCTGCTTAAGTC
1	DRB3*0212	TTCTTGCAGCTGCTTAAGTC
6	DRB4*01011	TTCTTGGAGCAGGCTAAGTG
14	DRB5*01011	TTCTTGCAGCAGGATAAGTA

첫 번째 컬럼은 세 번째 컬럼에 나열된 서열을 공유하는 대립유전자의 수를 보유한다. 두 번째 컬럼은 대립 유전자의 이름을 보유한다. 우리는 TEI 영역으로서 20-염기 단편의 마지막 세 염기를 선택하였다. 다음의 그룹을 얻기 위하여 그들의 영역에 따라 서열의 세트를 분류하였다. :

	1	104	DRB1*03011	TTCTTGGAGTACTCTACGTC
e1				
		1	DRB1*1130	TTCTTGGAGTgCctTAaGTC
		9	DRB3*01011	TTCTTGGAGctgcgTAaGTC
		1	DRB3*0102	TTCTTGGAGctgTgTAaGTC
		1	DRB3*0104	TTCTcGGAGctgcgTAaGTC
		16	DRB3*0201	TTCTTGGAGctgctTAaGTC
e2				
		1	DRB3*0212	TTCTTGcAGctgctTAaGTC
	2	7	DRB1*0101	TTCTTGTGGCAGCTTAAGTT
		1	DRB1*09012	TTCTTGaaGCAGgaTAAGTT
		2	DRB1*10011	TTCTTGgaGGAGgTTAAGTT
	3	26	DRB1*04011	TTCTTGGAGCAGGTTAAACA
		1	DRB1*1122	TTCTTGGAGCAGGcTAcACA
	4	1	DRB1*0434	TTCTTGGAGCAGGTTAAACC
	5	3	DRB1*07011	TTCCTGTGGCAGGGTAAGTA
		14	DRB5*01011	TTCtTGcaGCAGGaTAAGTA
	6	1	DRB1*07012	TTCCTGTGGCAGGGTAAATA
	7	28	DRB1*0801	TTCTTGGAGTACTCTACGGG
e3				
		1	DRB1*0814	TTCTTGGAGTACTCTAgGGG
		1	DRB1*0821	TTCTTGGAGTACTCTAtGGG
	8	1	DRB1*0820	TTCTTGGAGTACTCTACGGC
	9	18	DRB1*15011	TTCCTGTGGCAGCCTAAGAG
	10	6	DRB4*01011	TTCTTGGAGCAGGCTAAGTG

동일한 그룹의 서열에 대하여, 그룹의 첫 번째 서열 그리고 나머지 사이의 변이가 아래의 경우에서 나타나 있다. 우리의 프로브 설계 규칙의 적용을 설명하기 위하여 3 프로브 서열이 사용된다. 첫 번째 그룹 내의 첫 번째 서열은 프로브 el으 로서 선택된다. ; 첫 번째 그룹의 6번째 서열은 프로브 e2로서 선택된다. ; 그리고 7번 서열의 첫 번째 그룹은 프로브 e3로서 선택된다.

표적 그리고 프로브의 TEI 영역의 완벽한 상보성에 대한 요구로 인하여 , 그룹 2 내지 그룹 1O의 서열은 el 그리고 e2에 대한 신장 생성물을 생성하지 않는다. 이와 유사하게, 7번 그룹이 아닌 그룹의 서열은 e3에 대하여 신장 생성물을 생성하지 않는다. 각각의 그룹은 신장 반응 패턴과 관련하여 다른 것들과 차이가 있다.

동일한 그룹의 서열에 대하여, 두 타입의 상황이 있다. 예를 들면, el 그리고 e2는 어닐링 영역 내의 6위치의 하나의 뉴클레오타이드가 다르다. 따라서, el 그리고 e2와 매치되는 표적은 다른 서열에 대하여 신장 생성물을 생성하지 않을 것이며, el 그리고 e2 는 또한 독특한 프로브이다. 유사하게, 그룹 1의 2번째 내지 7번째 서열에 대한 표적은 프로브 1에 대하여 신장 생성물을 생성하지 않을 것이다.

el과 매치되는 표적을 제외하고, 아래에 나타난 바와 같이, 남은 5 서열은 e2와 오직 하나 또는 두 뉴클레오타이드만 다르다.

		1,2 .....M	
16	DRB3*0201	TTCTTGGAGCTGCTTAAGTC	e2
1	DRB1*1130	TTCTTGGAGtTcCTTAAGTC	a
9	DRB3*01011	TTCTTGGAGCTGCgTAAGTC	b
1	DRB3*0102	TTCTTGGAGCTGtgTAAGTC	c
1	DRB3*0104	TTCTcGGAGCTGCgTAAGTC	d
1	DRB3*0212	TTCTTGcAGCTGCTTAAGTC	e

이들 서열은 교차 반응성(cross-reactive)이다. 개별적인 위치 M-7 그리고 M-14에서 한 염기로 e2와 다른, 서열 b 그리고 e에 대한 표적이 프로브 e2에 어닐되는 경우, 어닐링 영역의 비-지정 다형성(s)은 관용될 것이며 그리고 신장 반응은 완벽하게 매치된 서열과 같이 실질적으로 동일한 정도로 진행할 것이다.

e2와 두 뉴클레오타이드가 다른, 서열 a, c, 그리고 d에 대한 표적이 프로브 e2에 어닐링되는 경우, 신장 반응은 비-지정 다형성(s)에 의 부분적 관용성만을 나타낼 것이다. 이 상황을 개선하기 위한 하나의 접근법은 a, c, 그리고 d에 대한 분리된 프로브를 제공하는 것이며, 그리고 나서 정확한 서열을 동정하기 위하여 신호의 강도를 분석함에 의하여 신장 생성물의 수득율을 정량적으로 분석하는 것이다. 대체적인 방법의 하나는 어닐링 그리고 TEI 영역을 분리할 수 있도록 하기 위하여 물리적 링커 (예, a tether)를 e2 프로브에 첨가함으로써 어닐링 영역 모두에서 비-지정 다형성을 교량(bridge)하는 것이다.

7번째 그룹의 서열에 대하여, 다른 두 서열은 e3 프로브에 의하여 부분적으로 관용될 것이다. 이들 세 서열은 풀링(pooled)될 것이다. e2 프로브는 28 대립 유전자 대신 30 대립 유전자에 대한 신장 생성물을 산출할 것이다.

실시예3: 대립 유전자 결합 패턴을 변형하기 위하여 미스매치 관용성(Tolerance)을 사용

프로브 DR-13e, GGACATCCTGGAAGACGA,가 DRB 유전자의 염기 281-299의 표적에 사용되었다. 대립 유전자 DRB1*0103을 포함하는, 34 대립 유전자s, 는 이 서열에 완벽하게 매치된다. 따라서, 결합 패턴에서, l3e는 이들 34 대립 유전자에 대하여 양성이다. (즉, 13e는 이들 34 대립 유전자와 신장 생성물을 산출할 것이다.). 몇 개의 부가적 대립 유전자는 동일한 TEI 영역을 나타내나, 그들의 개별적인 어닐링 영역에서 비-지정 다형성을 나타낸다. 예를 들면, DRB1 * 0415과 같은 5 대립 유전자는 위치 4에 A 대신에 T를 보유한다. 그리고 DRB1 * 1136과 같은 4 대립유전자는 그 위치에 C를 보유한다. 어닐링 영역 내의 미스매치 관용성에 의하여 , 이들 9 대립 유전자에 상보적인 표적 서열은 완벽하게 매치된 서열의 그것과 유사한 신장 반응 패턴을 생성할 것이다. 이 결과는 도 2에 도시된다. TO-3 그리고 TO-4는 각각대립 유전자 *0415 그리고 *1136 에 완전하게 상보적인 서열이다.

DRB1*0103	GACATCCTGGAAGACGA	34 alleles
DRB1*0415	GACTTCCTGGAAGACGA	5 alleles
DRB1*1136	GACCTCCTGGAAGACGA	4 alleles

실시예4: 비-지정 다형성을 교량(Bridge)하기 위한 프로브 내의 링커 구조의 설계

도 3에 도시된 바와 같이, 앵커(anchor) 서열은 특이적인 그리고 강한 어닐링을 확보하기 위하여 보존된(conserved) 서열 영역으로부터 유도된다. 이것은 다형성 탐지를 위하여 설계되지 않는다. 그 목적을 위하여, 다형성 탐지를 위한 보다 짧은 서열이 중성의 화학적 링커 방법에 의하여 앵커링 서열에 부착된다. 다형성 탐지를 위하여 설계된 서열의 보다 짧은 길이는 지정 부위의 즉각적 근처에 있는 비-지정 다형성에 대한 잠재적인 간섭을 제한할 것이며 따라서 그러한 간섭 다형성을 수용하기 위하여 요구되는 가능한 서열 조합의 수를 감소시킬 것이다. 이 접근법은 특정 상황에서 고도의 조밀한 다형성 부위를 피한다. 예를 들면, 부가적 다형 성(s)을 고려한 프로브를 사용하여 실시예 3에 나열된 서열 사이를 구별하는 것이 가능할 것이다. 링커의 도식적 디자인과 서열이 이하에 나열된다. :

linker 13-5	AGCCAGAAGGAC/Spacer 18/spacer 18/GGAAGACGA
linker 13-8	AGCCAGAAGGAC/Spacer 18/spacer 18/AGACGA
linker 13-11	AGCCAGAAGGAC/Spacer 18/spacer 18/CGA

실시예5: 페이싱(PHASING)

본원 발명은 또한 둘 또는 그이상의 대립 유전자 조합이 동일한 반응 패턴을 생성할 수 있는 경우, 그것이 야기하는 모호성을 감소시키는 데 유용하다. 도 4 및 5에서 도시된 바와 같이, 동일한 다중 반응에 존재하는 경우 프로브 1 그리고 프로브 3과 매치하는- 그리고 그러므로 신장 생성물을 생성하는 - 대립 유전자 그리고 프로브 2 그리고 프로브 4와 매치하는 대립 유전자 B는, 프로브 1 그리고 2과 매치하는 대립 유전자 C 그리고 프로브 3 그리고 프로브 4와 매치하는 대립 유전자 D의 조합에서 그러하듯이, 동일한 총 반응 패턴을 생성한다. 이러한 모호성은, 프로브 3과 동일한 다형성 부위를 표적하기 위해 설계된 표지된 탐지 프로브를 사용하는 혼성화에 의하여 프로브 1의 신장 생성물을 분석하기 위하여 본 발명에서 제공된 탐지방법을 사용함으로써 제거되거나 감소될 수 있다. 만일 분석 결과가 양성인 경우, 프로브 1 그리고 프로브 3이 동일한 대립 유전자와 연관되므로 오직 하나의 대립 유전자 조합, 즉 조합 1,이 가능하다. 탐지 프로브는 본 발명에서 개시된 방법 또는 이 기술분야에 방법을 사용함에 의하여 표지(labeld)될 수 있다. 만일 이 동정 탐지 단계가 다중 신장 반응 탐지와 함께 수행되는 경우, 도 5에 도시 된 바와 같이 신장 탐지 그리고 프로브 혼성화 탐지를 위하여 다른 표지가 사용된다.

이 방법에서, 모호성은 혼성화와 결합된 신장을 사용하는 동일한'상(phase)'에 둘 또는 그이상의 다형성을 지정함으로써 해결된다. 페이싱(Phasing)은 이 기술분야에서 설계된 다른 유전자 연구에서의 일배체(haplotype) 분석을 위하여 중요한 관심사로서 빠르게 알려지고 있다. 보다 많은 프로부가 표적과 순차적으로 반응함에 의하여 포함될 수 있다. 또는 이들은 탐지를 위하여 다른 표지와 함께 동일한 반응에 배치될 수 있다. 조합하는 프로브으 신장 및 혼성화 반응의 능력은 ELA-B 엑손 3으로부터 샘플 서열을 사용하여 실험에서 증명된다. 이 결과는 도 6에 도시된다. A 프로브 SB3P은 반응에서 신장되었으며 그리고 신장된 생성물은 표지된 DNA 프로브를 사용하여 탐지되었다. 도 6A 그리고 6B에 도시된 두 샘플, SB 127r 및 SB3P, 그리고 SB285r 및 SB3P는 각각 동일한 상(phase)에 있다.

실시예6 - 무작위 인코드 프로브 어레이(Random Encoded Probe Array)을 사용한 모델 HLA 유형분석 반응

다형성의 식별을 설명하기 위하여, 모델 반응이 표적으로서 합성된 단일 가닥을 사용하여 수행되었다. 3.2 ㎛ 직경의 컬러 인코드된, 토실-기능화된 비드가 고형상 담체로서 사용되었다. 32 구별 가능한 컬러 코드의 세트가 기술분야에 공지되 표준 방법을 사용하여(Bangs. L. B., 'Uniform Latex Particles'. Seragen Diagnostics Inc., p.40) 그리고 청색 염료 (흡수/방출 419/466 nm) 그리고 녹색 염료(흡수/방출 504/511)의 다른 조합을 사용하여 입자를 염색함으로써 생성되었 다. 염색된 비드는 바이오티닐레이티드 프로브(biotinylated probe)의 고정을 중재하기 위하여 뉴트라비딘(Neutravidin) (Pierce, Rockford, IL), 바이오틴 결합 단백질, 과 기능화되었다. 전형적인 소-규모 커플링 반응에서, 1%의 비드를 보유하는 200 ㎕의 현탁액이 500 ㎕의 100mM 인산 완충액/pH 7.4 (완충액 A)로 3회 세척되고 500 ㎕의 그 완충액으로 재현탁 되었다. 20 ㎕의 5mg/ml 뉴트라빈을 비드 현탁액에 가한 다음, 반응은 밀봉되고 그리고 37°C에서 하룻밤 두었다. 커플된 비드는 그 후 500 ㎕의 PBS/pH 7.4 및 10mg/ml BSA (완충액 B)로 한번 세척되었고, 500 ㎕의 그 완충액에 재현탁하고 비드 표면의 반응하기 않은 부위를 차단(block)하기 위하여 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 차단(blocking)후, 비드는 완충액 B로 3번 세척되었고 그 완충액 200 ㎕에 저장되었다.

모델 반응 시스템에서, 두 쌍의 프로브가 그들의 개별적인 3'말단에 SNPs를 보유하도록 합성되었다. 개별적인 서열은 다음과 같았다.:

SSP13: AAGGACATCCTGGAAGACG;

SSP24: AAGGACATCCTGGAAGACA;

SSP16: ATAACCAGGAGGAGTTCC

SSP36: ATAACCAGGAGGAGTTCG.

프로브는 5' 말단에서 바이오티닐레이트되었다. ; 15-카본 트리에틸렌 글리콜 링커가 바이오틴 그리고 올리고뉴클레오타이드 사이에 다음 반응에서 표면 고정의 붕괴효과를 최소화하기 위하여 삽입되었다. 각각의 프로브에 대하여, 인코드된 비드에의 커플링은 50 μℓ 의 비드 현탁액을 사용하여 수행되었다. 비드는 500 μℓ 의 20 mM 트리스/ pH 7.4, 0.5M NaCl (완충액 C)로 한번 세척되었으며 그리고 300 μℓ의 그 완충액에 재현탁되었다. 2.5 μℓ의 a 100 μM 프로브 용액을 비드 현탁액에 가하였으며 그리고 실온에서 30분간 반응시켰다. 비드는 그 후 20 mM 트리스/pH7.4, 150 mM NaCl, 0.01% 트리톤으로 3회 세척하였으며 2OmM 트리스/pH 7.4, 150 mM NaCl에 저장하였다. 33 염기 길이의 아래의 합성 표적이 제공되었다.

TA16:	GTCGAAGCGCAGGAACTCCTCCTGGTTATGGAA
TA36:	GTCGAAGCGCACGAACTCCTCCTGGTTATAGAA
TA13:	GGCCCGCTCGTCTTCCAGGATGTCCTTCTGGCT
TA24:	GGCCCGCTTGTCTTCCAGGATGTCCTTCTGGCT

표적은 칩 상의 네 프로브 (SSP13, SSP24, SSP16, SSP36)와 반응하도록 하였다. 0.2 M NaCl, 0.1 % 트리톤 X-100, 10 mM 트리스/pH 8.0, 0.1 mM EDTA 의 어닐링 완충액 내의 10 μℓ 의 100 nM 표적용액의 분취량이 칩에 적용되었으며 30°C에서 15분간 반응되었다. 이 칩은 그 후 동일한 완충액으로 한번 세척하고 그리고 제조자가 제공하는 관련 완충액내의 100nM의 TANIRA-ddCTP (흡수/방출 550.580) (PerkinElmer Bioscience, Boston, MA), 10 μM dATP-dGTP-dTTP, ThermoSequenase (Amersham, Piscataway, NJ)를 포함하는 연장 반응 혼합물과 커버되었다. 이 반응은 60°C에서 5분간 진행되도록 하였으며, 칩은 그 후 H_2O로 세척되었다. 칩의 디코딩 및 분석 이미지는 청색, 녹색 디코딩 이미지 그리고 분석 이미지, 각각을 위하여 HQ 내로우 밴드 GFP 그리고 HQ Cy3 필터, 하이드록시 쿠마린을 보유하는 자동 필터 교환기와 함께하는 니콘 형광 E800 현미경을 사용하여 얻었다. Apogee CCD KX 85 (Apogee Instruments, Auburn, CA)가 이미지 획득을 위하여 사용되었다. 각각 의 반응에서, 완벽하게 매치하는 표적만이 연장되어, 여기서 시험된 SNPs의 경우, 13-배(fold) 내지 30-배(fold)의 범위 내에서 매칭 그리고 비-매칭 표적 사이의 식별을 생성하였다. ; 이것은 도 7에서 TA13에 대하여 도시된다.

실시예7 - 수동자(patient) 샘플의 HLA-DR 유형분석

수동자(patient)로부터 추출된 DNA 샘플은 표준 PCR 프로토콜을 사용하여 진행되었다. 다음의 프라이머는 일반적인 DR 증폭을 위하여 사용되었다.

forward primer :	GATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG
reverse primer :	GCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC.

PCR 프로토콜은 다음과 같았다. : 95°C 7분의 한 사이클, 95 °C 30 초의 35 사이클, 60°C 30 초 그리고 72°C 1 분 그리고 72 °C 7분의 한 사이클.

287 염기 길이 그리고 DR 좌위를 커버하는 PCR 생성물은 100°C에서 5분 동안 변성되고, 얼음에서 냉각되고 실시예 6의 모델 반응에서와 같이 어닐링 완충액과 혼합되었다. lOμℓ의 분취량이 각각의 칩에 적용되었고 그리고 40°C에서 15분 동안 반응되었다. 신장 반응 그리고 다음의 이미지 획득은 전술한 실시예 6과 같이 진행되었다.

수동자(patient) 샘플로부터 생성된 PCR 생성물을 사용하는 서열-특이적 프로브의 다중연장은 프로브의 설계에 따른 결과를 생성하였다.

병렬적으로 테스트된 네 프로브(SSP13, SSP16, SSP24, SSP36) 중에서, SSP13는 신장되었으며, 관련되지 않은 SSP16 그리고 SSP36 프로브에서와 같이 SNP 프로브 SSP24은 오직 배경 결합만을 나타내었다. 도 8에 도시된 바와 같이, SSP의 다중 신장은 매치 그리고 비-매치하는 서열-특이적 올리고뉴클레오타이드 프로브의 혼성화에 기초한 분석을 위하여 대략 두-배로부터 적어도 20배 까지 매치 그리고 비매치 SNPs 사이의 구별을 현저하게 증진시켰다.

실시예8: 그룹-특이적 증폭

그룹-특이적 증폭 (GSA)을 위한 프라이머는 SSOs과의 다중 혼성화가 헤테로의 대립 유전자 조합의 불명료한 지정을 산출하는 경우 가장 빈번하게 사용된다. 이런 경우, GSA 프라이머가 특이적 대립 유전자의 선택된 세트를 증폭하기 위하여 선택되어 모호성을 감소시킨다. 분석을 지연시키는 노력이 많이 드는 부가적 분석 단계임. 본원 발명의 방법을 사용하여, 바람직하게는 무작위 인코드 비드 어레이 상의 프로브를 나타내는 실시예에서, GSA 프라이머는 다중 반응에 프로브로서 편입될 수 있으며, 이로써 전체 분석의 두 번째 단계를 제거한다.

실시예9: 세포계(Cell-lines)를 사용하는 HLA- DR, -A 그리고 -B 좌위(Loci)의 분석

HLA-DR, HLA-A 그리고 BLA-B의 신장-중재 다중 분석을 위한 프로브가 설계되었으며 표준 세포계를 사용하여 테스트 되었다. 프로브는 이미 논문(Bunce, M. et al, Tissue Antigens. 46: 355-367 (1995), Krausa, P and Browning, M.J., Tissue Antigens. 47: 237-244 (1996), Bunce, M. et al, Tissue Antigens. 45:81-90 (1995))에서 보고된 SSP 프로부로부터 유도되었다.

DR에 사용된 프로브는 :

SR2: ACGGAGCGGGTGCGGTTG
SR3: GCTGTCGAAGCGCACGG
SR11: CGCTGTCGAAGCGCACGTT
SR19: GTTATGGAAGTATCTGTCCAGGT
SR23: ACGTTTCTTGGAGCAGGTTAAAC
SR32: CGTTTCCTGTGGCAGGGTAAGTATA
SR33: TCGCTGTCGAAGCGCACGA
SR36: CGTTTCTTGGAGTACTCTACGGG
SR39: TCTGCAGTAGGTGTCCACCA
SR45: CACGTTTCTTGGAGCTGCG
SR46: GGAGTACCGGGCGGTGAG
SR48: GTGTCTGCAGTAATTGTCCACCT
SR52: CTGTTCCAGGACTCGGCGA
SR57: CTCTCCACAACCCCGTAGTTGTA
SR58: CGTTTCCTGTGGCAGCCTAAGA
SR60: CACCGCGGCCCGCGC
SR67: GCTGTCGAAGCGCAAGTC
SR71: GCTGTCGAAGCGCACGTA
NEG AAAAAAAAAAAAAAAAAA

이 프로브의 일부는 그들의 개별적 3'말단에 SNP 부위를 갖는다. 예를 들면, : SR3 그리고 SR33 (각각, G 그리고 A); SR11, SR67 그리고 SR71 (각각 T,C, 그리고 A). 또한, 프로브 SR3 그리고 33는 3'말단에서 SR11, 67 그리고 71 그룹 프로브에 대하여 한 염기로 엇갈려 배열된다.

SR3	GCTGTCGAAGCGCACGG
SR33	TCGCTGTCGAAGCGCACGA
SR11	CGCTGTCGAAGCGCACGTT
SR67	GCTGTCGAAGCGCAAGTC
SR71	GCTGTCGAAGCGCACGTA

반응 조건은 실시예 7에 설명된 것과 같으며, 다만, 어닐링 온도는 40 ℃대신 55 ℃, 그리고 연장 온도는 60 ℃ 대신 70℃ 였다. 이중 가닥 DNA가 실시예 7에서와 같이 사용되었다. 단일-가닥 DNA는 현재 조건에서 더 나은 결과를 생성하였다. 단일-가닥 DNA는 오직 하나의 프로브로 동일한 PCR 프로그램에서 초기의 PCR 생성물을 재-증폭함으로써 생성되었다. 두 세포계에 대한 결과, W51 그리고 SPOO10,가 도 9 그리고 도 10에 도시된다. 음성 대조인, NEG은 선택된 비드의 타입과 커플되었다.

다른 프로브 마이너스 NEG에 대한 신호 강도는 프로브에 대한 진정한 신호로 고려되었으며 이 값은 도에서 도시되었다. Y 축 유닛은 실험에서 사용된 카메라로 부터의 신호유닛 이었다. 음성 그리고 양성 프로브 사이의 구분은 각각의 샘플에서 명백하였다. 특히, SSO 분석에서 일반적으로 부딪히는 상황과는 반대로, 각각의 프로브에 대한 믿을 만한 역치를 결정하기 위하여 다른 샘플에 대한 비교를 만드는 것은 필요하지 않았다.

HLA-A에 대하여 사용한 프로브는 :

SAD CACTCCACGCACGTGCCA
SAF GCGCAGGTCCTCGTTCAA
SAQ CTCCAGGTAGGCTCTCAA
SAR CTCCAGGTAGGCTCTCTG
SAX GCCCGTCCACGCACCG
SAZ GGTATCTGCGGAGCCCG
SAAP CATCCAGGTAGGCTCTCAA
SA8 GCCGGAGTATTGGGACGA
SA13 TGGATAGAGCAGGAGGGT

SA16 GACCAGGAGACACGGAATA

도 11 및 12에 도시된, A 좌위 엑손 3에 대한 결과는 또한 명료하였다. 도 12는 또한 비-지정 다형성에 대한 미스매치 관용성의 예를 나타낸다. 즉, 위치M-18에서 A 대신 C를 나타내는 대립 유전자 O2Ol는 프로브 SAAP에 완벽하게 매치되지 않으며, 신장 반응은 그럼에도 불구하고 진행되었다. 이것은 중합효소가 프로브의 3' 말단에서 지정 다형성에 대한 완벽한 매치를 탐지하고 그리고 t위치 M-18에서 미스매치를 관용하였기 때문이다.

HLA-B에 사용된 프로브는:

SB220	CCGCGCGCTCCAGCGTG
SB246	CCACTCCATGAGGTATTTCC
SB229	CTCCAACTTGCGCTGGGA
SB272	CGCCACGAGTCCGAGGAA
SB285	GTCGTAGGCGTCCTGGTC
SB221	TACCAGCGCGCTCCAGCT
SB197	AGCAGGAGGGGCCGGAA
SB127	CGTCGCAGCCATACATCCA
SB187	GCGCCGTGGATAGAGCAA
SB188	GCCGCGAGTCCGAGGAC
SB195	GACCGGAACACACAGATCTT

HLA-B 엑손 유형분성을 위하여 이들 프로브를 사용하는 실험은 참조 세포계(reference cell lines)를 사용하여 수행되었다. HLA-A로, 명료한 결과가 얻어졌다. (여기에 나타내지 않음)

실시예 10 : CF 돌연변이분석 - 프로브 신장을 위한 프로브 그리고 어레이 설계

이 실시예는 컬러-인코드 입자에 나타나는 프로브의 평면 어레이의 적용 그리고 설계를 설명한다. 이들 프로브는 여러 -가장 빈번하게는 그들의 개별적인 3'말단에서 또는 그 근처의 두 선택된 염기 조성을 나타내기 위하여 설계되며 그리고 CFTR 표적 유전자 내의 이해 지정 영역과 정렬하도록 설계된다.

유전자 은행(www.ncbi.nhn.nih.gov)으로 부터의 CFTR 유전자 서열이 ACMG-CF 돌연변이 패널에서 25 CFTR 돌연변이의 다중분석을 위한 sixteen-mer 프로브의 설계를 위하여 사용되었다. 프로브 서열은 프로브 3.0 (jp://www.genome.wi.mit.edu)을 사용하여 설계되었으며 그리고 개별적인 엑손 서열 (http://searchlauncher.bcm.tinc.edu/seqsearch/alignment.html)과 정렬되었다. 올리고뉴클레오타이드는 30-50% G+C rich염기 조성을 갖는 15 내지 21 뉴클레오타이드를 포함하도록 설계되었으며, 5'바이오틴 TEG (Synthegen TX)를 함유하도록 합성되었다. ; 작은 결실을 취급하기 위하여, TEI 영역의 다양한 서열이 프로브의 3'말단의 3-5위치 내에 배치되었다. 프로브의 조성은 아래의 표에 나열되어 있다.

순수한 청색 또는 청-록색으로 염색된 17 비드의 조합이 CF 돌연변이 분석과 함께 사용되었다. 48 염기 길이의 인간 β액틴 유전자 (Accession #X00351)이 합성되고 내부의 양성 대조로서 각 반응에서 사용되었다. 16 염기 길이의 상보적 프로브는 각각의 어레이에 포함되었다. 유전자 은행(www-ncbi.nh-n.nih.gov)으로부터 CFTR 유전자 서열이 ACMG-CF돌연변이 패널의 25 CFTR 돌연변이의 분석을 위한 프로브의 설계에 사용되었다. 이 프로브 서열은 프로브 0.3(http://www.genorne.wi.mit.edu)에 의하여 설계되었다. 각각의 프로브 서열은 개별적인 엑손 서열 (http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/qg@Lsearch/aglinment.htm)과 정렬되었다. 올리고뉴클레오타이드는 5'바이오틴 TEG (Synthegen TX)으로 합성되었으며 0.5 M NaCl의 존재 하에 비드 표변에 연결(coupled)되었다. 비드는 LEAPS에 의하여 칩의 표면상에 고정되었다.

엑손(EXON) 돌연변이 서열

3	G85E	CCC CTA AAT ATA AAA AGA TTC
	G85E-X	CCC CTA AAT ATA AAA AGA TTT
4	1148	ATT CTC ATC TCC ATT CCA A
	1148-X	ATT CTC ATC TCC ATT CCA G
	621+1G>T	TGT GTG CAA GGA AGT ATT AC
	621+1G>T-X	TGT GTG CAA GGA AGT ATT AA
	R117H	TAG ATA AAT CGC GAT AGA GC
	R117H-X	TAG ATA AAT CGC GAT AGA GT
5	711+1G>T	TAA ATC AAT AGG TAC ATA C
		TAA ATC AAT AGG TAC ATA A

7	R334W	ATG GTG GTG AAT ATT TTC CG
	R334W-X	ATG GTG GTG AAT ATT TTC CA
	R347P	ATT GCC GAG TGA CCG CCA TGC
	R347P-X	ATT GCC GAG TGA CCG CCA TGG
	1078delT	CAC AGA TAA AAA CAC CAC AAA
	1078delT-X	CAC AGA TAA AAA CAC CAC AA
	1078delT-X-2	CAC AGA TAA AAA CAC CAC A
9	A455E	TCC AGT GGA TCC AGC AAC CG
	A455E-X	TCC AGT GGA TCC AGC AAC CT
10	508	CAT AGG AAA CAC CAA AGA T
	I507	CAT AGG AAA CAC CAA A
	F508	CAT AGG AAA CAC CAA T
11	1717-1G>A	CTG CAA ACT TGG AGA TGT CC
	1717-1G>A	CTG CAA ACT TGG AGA TGT CT
	551D	TTC TTG CTC GTT GAC
	551D-X	TTC TTG CTC GTT GAT
	R553	TAAAGAAATTCTTGCTCG
	R553X	TAAAGAAATTCTTGCTCA
	R560	ACCAATAATTAGTTATTCACC
	R560X	ACCAATAATTAGTTATTCACG
	G542	GTGTGATTCCACCTTCTC C
	G542X	GTGTGATTCCACCTTCTC A
INT-12	1898	AGG TAT TCA AAG AAC ATA C
	1898-X	AGG TAT TCA AAG AAC ATA T
13	2183deLA	TGT CTG TTT AAA AGA TTG T

	2183deLA-X	TGT CTG TTT AAA AGA TTG C
INT 14B	2789	CAA TAG GAC ATG GAA TAC
	2789-X	CAA TAG GAC ATG GAA TAC T
INT 16	3120	ACT TAT TTT TAC ATA C
	3120-X	ACT TAT TTT TAC ATA T
18	D1152	ACT TAC CAA GCT ATC CAC ATC
	D1152	ACT TAC CAA GCT ATC CAC ATG
INT 19	3849+10kbC>T-WT1	CCT TTC Agg GTG TCT TAC TCG
	3849+10kbC>T-M1	CCT TTC Agg GTG TCT TAC TCA
19	R1162	AAT GAA CTT AAA GAC TCG
	R1162-X	AAT GAA CTT AAA GAC TCA
	3659delC-WT1	GTA TGG TTT GGT TGA CTT GG
	3659delCX-M1	GTA TGG TTT GGT TGA CTT GTA
	3659delC-WT2	GTA TGG TTT GGT TGA CTT GGT A
	3659delCX-M2	GTA TGG TTT GGT TGA CTT GT A
20	W1282	ACT CCA AAG GCT TTC CTC
	W1282-X	CT CCA AAG GCT TTC CTT
21	N1303K	TGT TCA TAG GGA TCC AAG
	N1303K-X	TGT TCA TAG GGA TCC AAC
b	β Actin	AGG ACT CCA TGC CCA G

프로브는 0.5 M NaCl의 존재 하에서 다르게 인코드된 비드에 부착되었으며,

순수한 청색 또는 청록색으로 염색된 비드는 LEAPS을 사용하여 칩의 표면 상에 고정되었다. 합성된 48염기 인간 β 액틴 유전자(Accession#X00351)은 각 반응에 내부 양성 대조로 포함되었다.

어레이 설계 - 바람직한 실시예에서, 25 CF 돌연변이는 각각의 그룹의 멤버 사이의 서열 상동성을 최소화하기 위하여 4개의 다른 그룹으로 분리되었다. 즉, 돌연변이는 그러한 그룹 내의 프로브 서열 사이의 중복을 최소화 하고 이로써 다중 분석의 조건 하에서 교차-혼성화를 최소화하기 위하여 분리된 그룹들로 분류되었다.

컬러-인코드 비드에 나타나는 각각의 그룹은 분리된 어레이로 조합되었다. (이 4-칩 어레이 설계의 결과는 다음의 실시예에서 설명된다.) 대체적인 로봇 어레이 설계 또한 여기에서 개시된다.

실시예11: READ 을 사용한 프로브 신장에 의한 다중 CF 돌연변이 분석

여러 수동자(patient)로부터 추출된 게놈 DNA는 L. McCurdy,Ihesis, Mount Sinai School of Medicine, 2000에 개시된 방법을 사용하여 다중 PCR (mPCR) 반응에서 대응되는 프로브로 증폭되었다. 이 문헌은 참조문헌으로서 편입된다. 이 mPCR 반응은 5' 말단에서 광범위(universal) 서열과 태그된 키메릭(chimeric) 프라이머를 사용한다. 안티센스 프라이머는 5'말단에서 포스포화된다. (Synthegen, TX). 24 증폭 사이클이 Perkin Elmer 9600 thermal cycler를 사용하여 수행되었다. 각각의 사이클은, 48초 램프로 94°C에서 10초 변성단계, 36초 램프로 60 °C에서 10초 어닐링 단계 그리고 72 °C에서 38초 램프로 40초 연장 단계를 포함하며, 각각의 반응 (50 μℓ)은 containing 500 ng 게놈 DNA, 1X PCR 완충액 (10 mM 트리스 HCL, 50 mM KCL, 0.1% 트리톤 X-100), 1.5 mM $MgC1_2$, 200 μM 각각의 PCR 그레이드 dNTPs 그리고 5 유닛 Taq DNA 중합효소를 포함한다. 최적의 프로브 농도는 각각의 프로브 쌍에 대하여 결정되었다. 증폭 후, 생성물은 상업적으로 이용 가능한 키트(Qiagen)를 사용하여 모든 시약을 제거하기 위하여 정제되었다. DNA 농도는 스펙트로포토메터 분석에 의하여 결정되었다.

PCR 생성물은 안티센스 5'-포스포화 프라이머로 증폭되었다.단일가닥 DNA 주형을 제조하기 위하여, PCR 반응 생성물은 2.5 유닛의 엑소뉴클레아제와 1X 완충액, 37℃에서 20분간 인큐베이트 되었다. 그 후, 75℃에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화 하였다. 이러한 조건 하에서, 효소는 5'포스포화 말단으로부터 이중 DNA의 하나의 가닥을 분해한다. 그리고 5'-포스포모노뉴클레오타이드를 방출한다. (J. W. Little, et al., 1967). 단일가닥 표적은 또한 이 기술분야에 공지된 다른 방법으로 제조될 수 있다.

단일 또는 풀링된 PCR 생성물 (각각 20 ng)은 1O mM 트리스-HCL (pH 7.4) 1mM EDTA, 0.2 M NaCl, 0.1 %트리톤 X- 100를 함유하는 어닐링 혼합물에 첨가되었다. 이 어닐링 혼합물은 비드-디스플레이된 CF 프로브 (실시예 10의)의 인코드된 어레이와 접촉하여 배치되었다. 그리고 37-55℃에서 20분간 인큐베이트 하였다. 연장 혼합물 - 3U의 Thermo Sequenase (Amersham Phannacia BiotechNJ), 1X 효소 완충액과 형광-표지된 또는 TAMRA-표지된 데옥시뉴클레오타이드 (dNTP) 유사체 (NEN Life Sciences) 그리고 1 μmole의 각각의 타입의 표지되지 않은 dNTP를 함유하는 - 이 그 후 첨가되었다. 그리고 신장 반응은 60℃에서 3분간 진행되었다. 'C. 비드 어레이는 탈이온, 멸균수(dsH_2O)로 5-15분간 세척되었다. 어레이 내의 각각의 비드로 부터의 형광 신호를 함유하는 이미지가 CCD 카메라가 장착된 형광 현미경을 사용하여 기록되었다. 이미지는 신장된 프로브 각각의 본질을 결정하기 위하여 분석되었다. 이 결과는 도 15에 도시된다.

실시예 12 : 커버링 프로브의 용도

CFTR 유전자의 엑손 10내에 몇가지 SNP가 확인되었다. 엑손 10에 있는 다형성은이 실시예 끝에 언급하였다. 다음의 9개 SNP는 CFTR 유전자에서 가장 흔한 돌연변이인 A508 △서열에서 확인되었다(http:Hsnp.cshl.org).

dbSNP213450 A/G
dbSNP180001 C/T
dbSNP1800093 G/T
1648 A/G
dbSNP100092 C/G
dbSNP1801178 A/G
dbSNP1800094 A/G
dbSNP1800095 G/A

모든 가능한 SNP가 합성되고, 컬러-인코드된 비드에 결합할 수 있도록 프로브를 만들었다. 표적 증폭을 위한 프라이머(실시예 11에서 설명)도 모든 가능한 SNP를 고려할 수 있도록 수정할 수 있다. 분석과정에서 수집한 정보는 돌연변이 확인과 SNP 확인하는 두부분으로 나눈다.

엑손 10 다형성

1 cactgtagct gtactacctt ccatctcctc aacctattcc aactatctga atcatgtgcc
61 cttctctgtg aacctctatc ataatacttg tcacactgta ttgtaattgt ctcttttact
121 ttcccttgta tcttttgtgc atagcagagt acctgaaaca ggaagtattt taaatatttt
181 gaatcaaatg agttaataga atctttacaa ataagaatat acacttctgc ttaggatgat
241 aattggaggc aagtgaatcc tgagcgtgat ttgataatga cctaataatg atgggtttta
301 tttccagact tcaCttctaa tgAtgattat gggagaactg gagccttcag agggtaaaat
361 taagcacagt ggaagaattt cattctgttc tcagttttcc tggattatgc ctggcaccat
421 taaagaaaat AtCAtctTtg gtgtttccta tgatgaatat agatacagaa gcgtcatcaa
481 agcatgccaa ctagaAgagG taagaaacta tgtgaaaact ttttgattat gcatatgaac
541 ccttcacact acccaaatta tatatttggc tccatattca atcggttagt ctacatatat
601 ttatgtttcc tctatgggta agctactgtg aatggatcaa ttaataaaac acatgaccta
661 tgctttaaga agcttgcaaa cacatgaaat aaatgcaatt tatttttaa ataatgggtt
721 catttgatca caataaatgc attttatgaa atggtgagaa ttttgttcac tcattagtga
781 gacaaacgtc tcaatggtta tttatatggc atgcatatag tgatatgtgg t

실시예 13: CF 돌연변이 분석- 모델 시스템을 이용한 온-비드(On-Bead) 프로브 연장

도 13에서는 CF 유전자 돌연변이 R1 17H을 감지하는 전체 과정을 나타낸다. 표적은 실시예 11에서 설명하는 것과 같이 PCR을 이용하여 증폭시켰다. 3'단부에 있는 가변성 17개 염기 프로브 두 개를 컬러 인코드된 비드상에 고정시

켰다. 표적 핵산을 TANIPA-라벨된 dCTP, 라벨안된 dNTPs, 열안정한 DNA 폴리메라제와 함께 추가하였다. 3'말단에 가변성 상보적인 17-mer 올리고뉴클레오티드 프로브는 시판되는 Synthegen TX를 이용하여 합성함으로써, 5' 바이오틴이 12-C 스페이스(Biotin-TEG)에 부착된 것이 포함되도록 하였고, 역상 HPLC를 이용하여 정제하였다. 프로브는 컬러 인코드된 비드상에 고정시켰다. 프로부를 컬러-인코드된 비드에 부착시켰다. 합성 48-mer 올리고뉴클레오티드를 제공하여, 엑손 4((R1 17H)에서 낭포성 섬 유증 유전자 돌연변이에 상응하는 지정된 가변성 부위에 A, T, C, G가 포함되도록 한다.

1μM 합성 표적을 10mM Tris-HCl(pH 7.4), 1mM EDTA, 0.2 M NaCl, 0.1% 트리톤 X를 포함하는 어닐링(annealing) 혼합물에 첨가하였다. 어닐링 혼합물이 인코드 비드와 접촉할 수 있도록 두고, 37℃에서 20분간 배양시켰다. 3U Thermo 서열(Amersham Pharmacia Biotech NJ), 1X 효소 완충액, TAMRA-라벨된 데옥시뉴클레오티드(dNTP) 유사체(NEN Life Sciences), 1μM 각 라벨된안된 dNTP를 포함하는 신장(elongation) 혼합물을 첨가하여, 60℃에서 3분간 신장 반응을 시켰다. 비드 어레이(array)를 5-15분간 dsH_2O으로 세척한 후에, CCD 카메라가 내장된 형광 현미경을 이용하여, 어레이내에 각 비드로부터 형광 시그날을 포함하는 상(image)을 기록하였다. CCD 카메라가 잡은 이미지로 시그날을 분석하여, 비드 컬러로부터 해독할 수 있는 두 개 프로브간에 시그날 강도를 비교하였다. 정상(야생형) 프로브가 정확하게 추가된 표적과 메치(match)되고 신장 생성물을 만드는 반면에, 돌연변이 프로브에서는 신장이 관찰되지 않았다. 그 결과를 도 16a에 나타내었다.

실시예 14: CF 돌연변이 분석-비드-태그된 프라이머를 이용한 PCR과 통합 감지

이 실시예에서는 상 분석을 위해, 현탁액내에 비드 표면상에서 프로브 신장, 칩(chip)의 표면상에 비드 어셈블리와, 고정에 대해 설명하였다. CFTR 유전자 돌연 변이 R1 17H에 상응하는 가변 3' 단부를 가지는 올리고뉴클레오티드를 디자인하여(도 14), 12 C 스페이스(Synthegen, Texas)를 가지는 5'바이오틴-TEG를 포함하도록 합성하였다. 다음에서 설명하는 것과 같이 푸른색 착색된 비드에 프로브를 고정시켰다: 2μM 프로브를 1X TE(100mM Tris-HCl, 10 mM EDTA), 500mM NaCl의 비드 용액에 첨가하고, 실온에서 45분간 반응시켰다. 비드를 TE로 1회, 150mM NaCl로 3회 세척하고, 동일한 용액 50μl에 현탁시켰다. 각 타입 비드 1μℓ를 PCR 혼합물(1X 완충액(100mM Tris-HCl, pH.9.0, 1.5mM $MgCl_2$, 500mM KCl), 40μM Cy5-라벨된 dCTP (Amersham Pharmacia Biotech NJ), 80μM 다른 세가지 타입의 dNTPs, 3U Taq DNA 폴리메라제(Amersham Pharmacia Biotech NJ)를 포함)에 첨가하였다. 정상(야생형) 상보 표적(40ng)을 증폭 직전에 PCR 혼합물에 첨가하였다. Perkin Elmer 9600 thermal cycler를 이용하여 11회 PCR 증폭을 실시하는데, 각 회마다 90℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 20초간 신장시키는 과정이 포함된다. 증폭후에, 비드를 1X TE 완충액으로 원심분리시킴으로써 4회 세척한 후에, 칩 표면에 둔다. 상기 실시예에서 설명한 것과 같이 상(image)를 기록하고, WO 01/98765에서 설명한 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. 그 결과에서 야생형 프로브가 결합된 비드에서는 특정 증폭이 나타나지만, 돌연변이 프로브에서는 증폭이 나타나지 않았다는 것을 알 수 있었다. 그 결과를 도16b에 나타내었다.

이 실시예에서는 즉석 상 분석을 위해 평편한 표면상에 연속적인 비드 어셈블리와 비드-태그된 프로브를 이용하여 다중 PCR 통합 감지에 대해 설명하였다. 적 절한 구체예에서, 온도 사이클링이 가능하고, 각 격실에 원하는 모든 앰플리콘 서브세트를 만들 수 있는 다수의 격실을 다음과 같은 용도에 이용할 수 있다; (1) 이 실시예에서 설명하는 것과 같이, 인코드 비드-태그된 프라이머를 이용하여 네 개의 각 격실에서 상이한 프로브 쌍을 이용하여 PCR을 실시하고, (2) 모든 PCR 반응 완료 후에, 앰플리콘을 나타내는 비드를 모으고, (3) 랜덤 어레이를 어셈블리하고; (4) 상을 기록하고 데이터를 분석한다. LEAPS를 포함하는 선행 기술의 7가지 방법 중 한 가지를 이용하여, 어레이 어셈블리를 완성할 수 있다.

실시예 15: CF 돌연변이 분석 - 온도 조절된 반응기에서 1단계 어닐링 및 신장

7명의 환자에서 추출한 게놈 DNA를 실시예 11에서 설명하는 것과 같이 다중 PCR(mPCR) 반응으로 상응하는 프라이머를 이용하여 증폭시켰다. 증폭후에, 시판하는 키트(Qiagen)를 이용하여 생성물을 정제하여, 모든 시약을 제거하였다. 분광광도 분석을 이용하여 DNA 농도를 결정하였다. 단일 또는 푸울(pool) PCR 생성물(각 20ng)을 10mM Tris-HCl(pH 7.4) 1mM EDTA, 0.2M NaCl, 0.1% 트리톤 X를 포함하는 어닐링 혼합물에 첨가하였다. 어닐링 혼합물을 3U Thermo 서열(Amersham Pharmacia Biotech, NJ), 1X 효소 완충액, 형광 라벨된 또는 TAMERA-라벨된 데옥시뉴클레오티드(dNTP) 유사체(NEN Life Sciences), 1-10μmole 각타입의 라벨안된 dNTP를 포함하는 신장 혼합물과 혼합시키고, 컬러-인코드된 비드상에 나열된 올리고뉴클레오티드 프로브 어레이와 접촉할 수 있도록 배치하였다. 온도 제어된 사이클러에서 어닐 링과 신장 반응이 진행되도록 하였다. 온도 단계는 다음과 같다; 65℃, 60℃, 55℃, 50℃, 45℃에서 각 3분씩, 각 온도간에 30초 조금 안되게 간격을 둔다. 그 다음 비드 어레이는 5 내지 15분간 dsH_2O로 세척하고, 어레이내에 각 비드로부터 형광 시그날을 포함하는 생(image)는 CCD 카메라가 내장된 형광 현미경을 이용하여 기록하였다. 각 신장 프로브를 확인하기 위해 상을 분석하였다. 일반적인 결과를 도 17에 나타내었다.

실시예 16: 커버링 프로브 풀링(Pooling)

지정된 다형성을 분석하기 위해서, 30-50% G+C 염기 조성으로된 20-mer 올리고뉴클레오티드 신장 프로브를 고안하여, 3' 단부에 가변 부위(G/T)를 가지도록 하였다. 지정안된 다형성 부위는 위치 10(C/A)과 15(T/G)에 있을 것으로 본다. 다음은 이와 같이 디자인 된 프로브를 요약하여 나타낸 것이다.

정상(야생형) 프로브 서열

Oligo 1: "G" at position 20, "C" at 10, and "T" at 15.
Oligo 2: "G" at position 20, "C" at 10, and "G" at 15.
Oligo 3: "G" at position 20, "A" at 10, and "T" at 15.
Oligo 4: "G" at position 20, "A" at 10, and "G" at 15.

돌연변이 브로브 서열

Oligo 1: "T" at position 20, "C" at 10, and "T" at 15.
Oligo 2: "T" at position 20, "C" at 10, and "G" at 15.

Oligo 3: "T" at position 20, "A" at 10, and "T" at 15.
Oligo 4: "T" at position 20, "A" at 10, and "G" at 15.

모든 프로브를 모아서(pool), 기존 실시예에서 설명하는 프로토콜을 이용하여 컬러-인코드된 비드에 부착시켰다. 단일 가닥 표적이 풀(pool) 프로브를 나타내는 비드상에 첨가되었을 때, 이들 프로브중 하나는 지정된 다형성과 완벽하게 정렬된다면 신장(elongation) 프로브를 만들 수 있을 것이다.

실시예 17: 이질성에서의 지정 다형성 및 이질성 배열

이질성과 이질성 배열을 구별하기 위해, 프로브 3' 단부와 배열된 C/A 지정된 다형성을 확인하고, 이형성 돌연변이에 대한 이형성이라고 하기 위해 2번째 프로브 세트를 포함하도록 기존 실시예의 디자인을 증대시켰다.

이전 실시예에서, 두가지 지정안된 다형성 부위는 위치 10(C/A)과 15(T/G)인 것으로 기대된다. 디자인을 다음과 같이 나타낼 수 있다.

세트 #1

Oligo 1: "C" at position 20, "C" at 10, and "T" at 15.
Oligo 2: "C" at position 20, "C" at 10, and "G" at 15.
Oligo 3: "C" at position 20, "A" at 10, and "T" at 15.
Oligo 4: "C" at position 20, "A" at 10, and "G" at 15.

세트 #2

Oligo 5: "A" at position 20, "C" at 10, and "T" at 15.
Oligo 6: "A" at position 20, "C" at 10, and "G" at 15.
Oligo 7: "A" at position 20, "A" at 10, and "T" at 15.
Oligo 8: "A" at position 20, "A" at 10, and "G" at 15.

세트 #1의 올리고뉴클레오티드를 모아서, 기존 실시예의 프로토콜을 이용하여 단일 색깔(가령, 그린) 코드된 비드에 부착시켰다. 세트 #2의 올리고뉴클레오티드를 모아서, 기존 실시예의 프로토콜을 이용하여 단일 색깔(가령, 오렌지) 코드된 비드에 부착시켰다. 비드를 모아서(pool), 기존에 설명된 것과 같이 칩의 표면에 고정시켰다. 그 다음, 표적을 도입시키고, 기존의 실시예에서 설명하는 것과 같이 온-칩(on-chip) 반응을 실시하였다. 그린 비드상에 있는 프로브만 신장되는 경우에, 개체는 정상(또는 야생형) 대립형질을 가진다. 오렌지 비드상에 프로브만 신장되는 경우에 개체는 돌연변이에 대해 상동성이다. 그린 및 오렌지 비드에 있는 프로브가 모두 신장된 경우라면, 개체는 이 대립형질에 대해 이질성을 가진다. 이와 같은 디자인이 공지의 돌연변이와 알려지지 않은 돌연변이를 확인하는데 이용될 수 있다.

실시예 18 - 확인 서열과정('재서열화')

본 발명의 디자인을 이용하여, 특정 부분을 재서열할 수 있다. CF 돌연변이 패널에서 1506V, I507V, F508C, 7T에 대해 리플렉스(reflex) 테스트의 경우에서와 같이 이 테스트를 이용하여, 온-칩 프로브 신장 반응을 확인할 수 있다. 문제가 되는 서열이 길이가 20 내지 30 염기인 경우, 모든 가변 부위의 다중 질문을 이용하여, 서열을 정할 수 있다. 실시예 16과 17에서 설명하는 것과 같이, 확실하지 않은 위치에 대한 특정 프로브를 고안하고, 프로브-풀링을 이용하여 실시한다.

실시예 19: 1개 라벨된 dNTP와 세 개 라벨안된 dNTP를 이용한 신장

적어도 한 개의 라벨된 dNTP를 결합시켜, 모든 신장 생성물을 실시간으로 감지하고, 코드된 고형상 케리어와의 연합을 이용하여 확인할 수 있다. 실시예 6과 7에서 설명하는 검사 조건을 이용하여, 신장 반응물에 테트라메틸로다민 dCTP와 라벨안된 dATP, dTTP, dGTP을 이용하여 도 18에서 설명하는 것과 같이 형광으로 라벨된 생성물을 만들 수 있다. 다른 염료로 라벨된 dNTPs(예를 들면, BODIPY 라벨된 dUTP, Cy5-라벨된 dUTP)를 이용할 수도 있다. 비슷한 방법으로, 임의 다르게 라벨된 dNTP도 이용할 수 있다. 신장 생성물의 길이는 DNA 폴리메라제가 허용할 수 있는 라벨된 dNTP양에 따라 달라진다. 이용할 수 있는 효소는 신장 생성물을 간접적으로 라벨시킬 수 있는 라벨된 아비딘 또는 항체를 이용하는 제 2 단계에서 반응할 수 있는 바이오틴 및 디고시게닌(digoxigenin)과 같은 스트랜드를 변형시킬 수 있는 것에 대해 상당히 높은 용인성을 보인다. 이와 같은 소분자를 이용하는 경우에, 길이가 수백 염기인 것으로 측정되는 신장 생성물이 만들어진다.

실시예 20: 한 개 라벨된 ddNTP, 세 개 라벨안된 dNTPs를 이용한 신장.

도 19에서 설명하는 것과 같이, 신장 반응을 종료하기 위해, TAMRA라벨된ddCTP를 결합시킬 수 있다. 실시예 6, 7에서 설명하는 것과 같이, TAMRA-라벨된 ddCTP를 이용하여, 온-칩 반응을 실행하였다. TAMRA-ddCTP와 라벨안된 dTTP, dATP, dGTP을 포함하는 반응 혼합물에서, 매칭 프로브에 표적을 어닐링시키고, 처음 ddCTP의 결합이 완성되면, 연장 반응을 종료한다. 맨 처음 염기가 결 합되면 단일 염기 연장 산물을 만들면서 반응이 종료되거나, 몇 개의 라벨안된 dNTPs가 결합된 후에 종료될 수도 있다.

실시예 21 : 4개의 라벨안된 dNTPs을 이용한 신장, 라벨된 프로브의 하이브리드에 의한 감지

라벨안된 전체 세트의 dNTPs를 이용하여 프로브를 신장시키면, '고유' 조건하에서, 온칩 반응 조건과 어닐된 주형의 길이에 의해서만 제한을 받는 수백 염기 길이를 가지는 신장 생성물이 만들어진다. 고온에서 변성, 신장 생성물의 일부분에 상응하는 서열을 가지도록 고안된 라벨된 올리고뉴클레오티드와 하이브리드시키는 제 2 단계에 의해, 이와 같은 신장 생성물을 감지한다. 이 과정은 도 20에서 설명하고 있다.

실시예 22: 4개의 라벨안된 dNTP를 이용한 신장, 라벨된 주형을 이용한 감지

다중 하이브디르 검사에서 통상적으로 이용되는 표준 프로토콜을 이용할 때, 라벨된 프로브를 결합시켜, PCR 과정동안에 분석을 하게 될 DNA 표적 자체에 라벨시킬 수 있다. 실시예 6, 7에서 설명하는 조건하에서, 라벨된 표적을 프로브에 어닐시킨다. 라벨된 dNTP를 이용하여 매취된 프로브를 신장시켰다. 신장 반응이 완성된 후에, 표적과 일치되지 않은 프로브에 의해 만들어진 복합체의 용융 온도($T_{non-match}$) 온도보다는 높게, 그러나, 표적과 매취되는 즉, 여기에서는 신장된 프로브에 의해 형성된 복합체의 용융 온도(T_{match})보다는 낮은 온도 값에 온도(T_{det})를 세팅하여 감지한다. 이중 부분이 길게 나타나는 복합체(표적과 일치된 프로브에 의해 형성된 복합체)가 일치안된 것에 의해 형성된 복합체보다 상당히 높은 안정성을 나타내기 때문에, $T_{non-match} < T < T_{-match}$ 이다. 일반적으로 T 값의 범위는 70℃ 내지 80℃이다. 이와 같은 조건하에서, 표적과 신장된 프로브에 의해서만 형성되는 복합체는 안정한 반면에, 표적과 일치되지 않은 프로브에 의해 형성된 프로브 즉, 상응하는 고형 상 캐리어로부터 나오는 형광 시그날이 사라진다. 즉, 다른 디자인과는 대조적으로, 매치되는 경우에 시그날 강도가 강해진다기 보다는 매치되지 않는 프로브에 관련된 시그날이 작아진다는 것이다. 도 21에서는 라벨된 dNTPs 또는 ddNTPs의 필요성을 없애는 디자인을 설명한다. 이 디자인은 본 발명의 적절한 구체예에서 이용할 수 있고, 라벨된 dNTPs 또는 ddNTPs가 인코드된 입자에 비-특이적으로 흡착되어, 배경 시그날을 증가시키게되어, 어레이의 분별력을 감소시키게 된다. 또한, 라벨된 표적을 이용하면, 이와 같은 프로토콜은 서열-특정 올리고뉴클레오티드 하이브리드에 의한 다형성 분석 방법과 바로 양립할 수도 있다.

실시예 23: 실시간 온-칩(On-chip) 시그날 증폭

도 22에서 설명하는 것과 같은 평면형태로 이용되는 표준 온도 제어 장치를 이용하면, SSPs의 다중 신장에 프로그램된 온도 프로파일을 이용할 수 있다. 실시예 6, 7의 조건하에서, 주어진 두형이 반복된 '변성-어닐-신장' 사이클 과정 각각 에 있는 한 개 프로브 신장을 조절한다. 제 1 사이클에서, 표적 분자를 프로브에 결합시키고, 프로브를 신장 또는 연장시킨다. 그 다음 사이클에서, 표적 분자를 '변성' 상태(일반적으로 95℃)로 제 1 프로브로부터 해리시키고, '어닐' 상태(일반적으로 55℃)에서 또 다른 프로브 분자와 어닐시키고, '신장' 상태(일반적으로 72℃)에서 프로브가 신장되

는 것을 조정한다. N회 사이클에서 선형 증폭에 상응하는 프로토콜에 따라 각 주형이 N 프로브 신장을 조정한다(도 30). 인코드된 비드의 평면 어레이를 이용하여, 다중 신장 반응에서 프로브를 나타내는 적절한 구체예에서, 두 개 나란한 평평한 기질상에 포함된 반응 혼합물에 일련의 온도 사이클을 적용할 수 있다. 한 개 기질은 직접적인 광학적 접근과 인코드 비드의 전체 어레이의 직접적인 상(imaging)을 허용한다. 적절한 구체예에서는 각 사이클이 완료되는 시점에서 전체 비드 어레이의 상(image)이 바로 기록될 수 있도록 하여 실시간 증폭을 제공한다. 서열-특이적인 증폭없이 온-칩 선형 증폭을 이용하여 직접 감지에 게놈, 염색체 또는 다른 DNA를 이용할 수 있다. 샘플에 감지에 충분한 양의 DNA가 존재하기만 한다면, 가능하다. 비드-어레이 포맷에서, 각 비드에서 발생되는 시그날을 감지하는데, 10^{4} 형광포어(fluorophores)가 필요하다면, 30사이클의 선형 증폭 횟수를 ~300까지 필수 횟수를 줄일 수 있다. 어레이내에 100개의 필수 타입 비드로 추정한다면, 필수적으로 요구되는 형광포어의 수는 ~10^{5} 가 될 것이고, 이수는 임상 샘플에 일반적으로 이용될 수 있는 수이다. 예를 들면, 임상적으로 HLA의 분자 유형 분성을 위한 전형적인 PCR 반응은 0.1 내지 1㎍ 게놈 DNA를 이용하여 실 행할 수 있다. 1㎍ 사람 게놈 DNA는 약 10^{-18} moles에 상응, 6×10^{5} 의 원하는 유전자 복사체에 상응하는 양이다. 축소시킨 비드 어레이 플렛포옴에 이와 같은 소량의 샘플이 필요하고, 온칩 증폭으로 pre-PCR 샘플을 바로 이용하는 것이 가능해졌다. 이는 샘플 준비를 간단하게 하였을 뿐만 하이나 더 중요한 것은 다중 PCR의 복잡성을 해소하여, 다중 유전자 분석에서 비율-제한 단계의 복잡성을 해소시켰다.

실시예 24: CF 돌연변이 분석을 위한 지정된, 선택안된 다형성에 대한 프로브 라이브러리 작제

신장 프로브의 특이성을 증가시키고, 가짜 포지티브를 피하기 위해, 신장 프로브는 표적 서열에 있는 모든 공지의 다형성을 수용하도록 고안하였다. 또한, PCR 프라이머는 지정된 다형성과 비-지정된 다형성을 고려하여 고안하였다. 낭포성 섬유증을 위한 표준 집단 캐리어 스크리닝 패널내에 25 돌연변이중 하나인, CFTR 유전자내에 엑손 7의 위치 1172에서 G/C 돌연변이를 지정 다형성으로 선택하였다. 일반적인 집단 캐리어 스크리닝을 위한 돌연변이 패널에는 엑손 7내에 3개의 CF 돌연변이가 포함된다(http://www.faseb.org/유전자tics/acmg). 돌인 위치에 있는 다형성 G/T/A이 보고된 바 있고(httD://www.Renet.sickkids.on.ca/cftr), 또한, 위치 ll75, 1178, 1186, 1187, ll89에 비-지정 다형성이 있는 것으로 보고되었다. 이들 모든 다형성은 원하는 프로브 신장을 간섭할 수 있다.

대분자로 표시된 다수의 비-지정 다형성에 둘러싸인 R347P(굵은 **G** 로 나타냄) 에 대한 eMAP를 위한 축중성 프로브 세트 작제에 대해 하기에서 설명한다;

	5' 3'
Normal Target Sequence for Elongation:	Gca Tgg Cgg tca ctC GgC a
Degenerate Elongation Probe Set:	Ngt Ycc Ycc agt gaY RcY t
	3' 5'

이때, N은 a, c, g, t이고; R(puRines)은 a 또는 g이고, Y(pYrimidines)는 c 또는 t이고, 세트에서 128개 축중성을 나타낸다.

돌연변이 분석을 위한 프라이머 풀링(Pooling) - 축중 세트를 작제하는데 있어서 주요 목적은 프로브의 어닐링과 신장을 보장하기 위해, 표적서열에 충분히 근접하게 짝을 이루는 적어도 한가지 프로브를 제공하기 위함이다. 한 표적 서열 원칙적으로, 커버링 세트를 작제하는 방식에서 볼 수 있었던 것과 같이, 지정된 다형성과 연관된 모든 가능한 프로브 서열 전체 세트를 제공하여 실시할 수 있는데, 실시예에서 나타낸 것과 같이 128개의 축중성으로 모든 프로브가 완전한 프로브 플링을 위해 단일 비드 형에 위치할 경우에 약 2배 정도 검사 시그날 강도가 감소되도록 할 수 있다. 풀을 분리시키면 다중 비드 타입에 프로브 세트를 분포시킴으로써 상황을 개선할 수는 있으나, 어레이 복잡성이 증가된다. 우선, 프로브 풀을 최소 2개 또는 그 이상의 풀로 분할하고, 이때 각 풀은 지정 다형성 부위의 가능한 조성물 각각에 대해 프로브 위치 M(가령, 프로브의 3' 말단)에서 상보적인 조성물을 제공한다. 실시예에서, 지정 표적 조성물의 포지티브 확인을 위해, 4개 각 풀(pool)이 요구된다. 그 다음, 지정 부위로부터 거리 순서로 연속하여 비-지정 다형성 부위 를 검사하였다. 이 가운데, TEI 부위내에 위치가 신장을 보장하는 특히 중요한 위치가 된다. 즉, 각 풀(pool)을 TEI 부분 내에 있는 비-지정된 부위에 대한 모든 가능한 프로브 조성을 포함하다록 작제한다. 마지막으로, 가변성 유전자의 클로닝과 서열화를 위한 축중 프로브 작제에서와 같이, 표적에 G에 나란하게 배열되지 않았다는 것을 알고 있는 경우에, TEI 부분 외부에 있는 프로브 위치로 이노신과 같은 중성 염기를 배치시켜 세트의 축중성을 감소시킨다. 이 실시예에서, 프로브내에 비-지정 다형성의 위치는 M-16과 M-18가 적정하다. 즉, 4개 풀(pool) 각각의 최소 축중성은 4로 증가시켜, 이에 상응하는 시그날 강도를 감소시킨다.

경험상, 시그날 감소는 8개 인자로 제한하는 것이 바람직하다. 각각 한 개의 독특한 비드에 할당하고 8개 축중 프로브 서열을 포함하는 총 4개 풀(pool)이 표적 서열을 커버한다. 이들 서열은 M에 가변성인 풀(pool)에 대해 아래의 것과 유사하다;

CF 돌연변이 R347P용 프로브 풀(pool)

R347P	Cgt	Acc	Gcc	agt	gaG	GgC
	3'					5'
POOL 1	Cgt	Acc	Gcc	agt	gaG	IgI
	Cgt	Acc	Gcc	agt	gaC	IgI
	Cgt	Acc	Ccc	agt	gaG	IgI
	Cgt	Acc	Ccc	agt	gaC	IgI
	Cgt	Tcc	Gcc	agt	gaG	IgI
	Cgt	Tcc	Gcc	agt	gaC	IgI
	Cgt	Tcc	Ccc	agt	gaG	IgI
	Cgt	Tcc	Ccc	agt	gaC	IgI
POOL 2	Ggt	Acc	Gcc	agt	gaG	IgI
	Ggt	Acc	Gcc	agt	gaC	IgI
	Ggt	Acc	Ccc	agt	gaG	IgI
	Ggt	Acc	Ccc	agt	gaC	IgI
	Ggt	Tcc	Gcc	agt	gaG	IgI
	Ggt	Tcc	Gcc	agt	gaC	IgI
	Ggt	Tcc	Ccc	agt	gaG	IgI
	Ggt	Tcc	Ccc	agt	gaC	IgI
POOL 3	Agt	Acc	Gcc	agt	gaG	IgI
	Agt	Acc	Gcc	agt	gaC	IgI
	Agt	Acc	Ccc	agt	gaG	IgI
	Agt	Acc	Ccc	agt	gaC	IgI
	Agt	Tcc	Gcc	agt	gaG	IgI
	Agt	Tcc	Gcc	agt	gaC	IgI
	Agt	Tcc	Ccc	agt	gaG	IgI
	Agt	Tcc	Ccc	agt	gaC	IgI
POOL 4	Tgt	Acc	Gcc	agt	gaG	IgI
	Tgt	Acc	Gcc	agt	gaC	IgI
	Tgt	Acc	Ccc	agt	gaG	IgI
	Tgt	Acc	Ccc	agt	gaC	IgI
	Tgt	Tcc	Gcc	agt	gaG	IgI
	Tgt	Tcc	Gcc	agt	gaC	IgI
	Tgt	Tcc	Ccc	agt	gaG	IgI
	Tgt	Tcc	Ccc	agt	gaC	IgI

일반적으로, 안티센스 스트랜드상에 비-지정된 다형성 타입은 센스 스트랜드 상의 타입과는 상이할 수 있고, 안티센스 스트랜드용 축중 프로브 세트를 작제하는 것이 유익할 수도 있다. 축중 신장 프로브를 작제함으로써, 축중성을 최소화시키기 위해 유사한 규칙으로 축중 하이브리드반응 프로브 세트를 작제할 수도 있다.

실시예 25: eMAP에 의한 '단일 튜브' CF 돌연변이 분석

이 실시예는 eMAP 검사를 실행하기 위한 방법 및 조성에 관한 것으로, 반응기에서 어닐링과 신장 단계가 일어난다. 이 구체예는 반응기 간에 샘플 이동이 필요없고, 정제 또는 추출 과정이 필요없기 때문에, 검사를 간단하게 하고, 에러 발생 가능성을 줄여주기 때문에 유용하다. 예시적인 프로토콜을 다음에 제시하나 이에 국한시키지는 않는다.

몇몇 환자로부터 추출한 게놈 DNA를 다중 PCR(mPCR) 반응에서 이에 상응하는 프라이머와 증폭시켰다. PCR 조건과 시약 조성물은 다음과 같다;

프라이머 디자인: 센스 프라이머는 임의 변형없이 합성하고, 안티센스 프라이머는 5' 말단에 인산을 가지도록 하여 두 군에서 다중 PCR를 실행하였다. 제 1 군 증폭에는 엑손 5, 7, 9, 12, 13, 14B, 16, 18, 19가 포함된다. 제 2 군 증폭에는 엑손 3, 4, 10, ll, 20, 21, 인트론 19의 프라이머가 포함된다. 엑손 5, 7, 11상에서 5' 인산염 군 변성이 포워드(forward) 프라이머에 포함되어, 프로브 신장을 위한 안티센스 표적으로 이용한다. 역 프라이머상에 인산염기를 배치시켜 모든 다른 앰플리콘에 센스 표적을 이용할 수 있다.

PCR 마스트 혼합 조성물

10μℓ 반응/샘플

성분 용적(μℓ)

1OX PCR 완충액 1.0

25mM $MgCl_2$ 0.7

dNTPs(2.5mM) 2.0

프라이머 혼합물(Multiplex 1Ox) 1.5

Taq DNA polymerase 0.3

ddH_2O 1.5

DNA 3.0

총 10

PCR 사이클링

94°C에서 5분, 94°C에서 10초, 60°C에서 10초, 72°C에서 40초

72°C에서 5분, 사이클 회수 28-35.

반응 용적은 실험 필요에 따라 조정할 수 있다. Perkin Elmer 9600 thermal cycler를 이용하여 증폭을 실시하였다. 각 프라이머 쌍에 대해 적절한 프라이머 농도를 결정하였다. 증폭 후에, 5μℓ 생성물을 빼내 겔 전기영동을 하였다. 단일 스 트랜드 DNA 표적을 다음과 같이 만들었다: 2μℓ 엑소뉴클레아제를 5μℓ PCR 산물에 첨가하고, 37°C에서 15분간 배양한 후에, 80°C에서 15분간 효소를 변성시켰다. 변성 후에, 1μℓ 1OX 엑소뉴클레아제 완충액을 1μℓ λ엑소뉴클레아제(5U/μℓ)와 함께 첨가한 후에, 20분간 37°C에서 배양시키고, 10분간 75°C에서 가열하여 반응을 중단시켰다.

온 칩(ON CHIP) 신장

26CF 돌연변이에 대한 야생형 및 돌연변이 프로브를 비드 표면에 결합시키고, 칩 어레이상에서 어셈블리하였다. 프로브는 또한 두 개 집단으로 나누었다. 제 3 집단을 어셈블리하여 5T/7T/9T 다형성을 포함하는 리플렉스 테스트(reflex)를 하였다.

신장 군(group) 1, 칩 표면상에 총 31개 군

비드 클러스트 #1, 돌연변이

Components	Volume (μl)
10X PCR buffer	1.0
25 mM $MgCl_2$	0.7
dNTPs (2.5 mM)	2.0
Primer mix (Multiplex 10x)	1.5
Taq DNA polymerase	0.3
ddH2O	1.5
DNA	3.0
Total	10

PCR Cycling

94 °C 5 min, 94 °C 10 sec., 60 °C 10 sec., 72 °C 40 sec
72 °C 5 min., Number of cycles: 28-35

Cluster #	Mutation
1	711+1G>T-WT
2	711+1G>T-M
3	R334W-WT
4	R334W-M
5	1078delT-WT
6	1078delT-M
7	β Actin
8	R347P-WT
9	R347P-M
10	A455E-WT
11	A455E-M
12	1898+1G>A-WT
13	1898+1G>A-WT
14	2184delA-WT
15	2184delA-M
16	2789+5G-WT
17	2789+5G-M
18	BIOTIN
8	I148T-WT
9	I148T-M
10	508-WT
11	F508
12	I507
13	G542X-WT
14	G542X-M
15	G551D-WT
16	G551D-M
17	R553X-WT
18	R553X-M
19	BIOTIN
20	1717-1G>A-WT
21	1717-1G>A-M
22	R560T-WT
23	R560T-M
24	3849+10kbT-WT
25	3849+10kbT-M
26	W1282X-WT
27	W1282X-M
28	N1303K-WT
29	N1303K-M
30	OLIGO-C

신장 군(group) 2, 칩 표면상에 총 28개 군

비드 클러스트 #2, 돌연변이

Cluster #	Mutation
1	711+1G>T-WT
2	711+1G>T-M
3	R334W-WT
4	R334W-M
5	1078delT-WT
6	1078delT-M
7	β Actin
8	R347P-WT
9	R347P-M
10	A455E-WT
11	A455E-M
12	1898+1G>A-WT
13	1898+1G>A-WT
14	2184delA-WT
15	2184delA-M
16	2789+5G-WT
17	2789+5G-M
18	BIOTIN
19	3120+1G>A-WT
20	3120+1G>A-WT
21	R1162X-WT
22	R1162X-M
23	3659delC-WT
24	3659delC-M
25	D1152-WT
26	D1152-M
27	OLIGO-C

mPCR 군 2;

신장 군 3; 총 6개 군

비드 클러스트 #, 돌연변이

Cluster #	Mutation
1	β Actin,
1	Oligo C
2	5T
3	7T
4	9T
5	Biotin

단일 및 다중 표적 연장 검사에 이용할 수 있도록 신장 반응 완충액을 최적화시키는데, 이 완충액은 Tris-HCl(pH 8.5) 1.2 mM, EDTA 1 μM, DTT I1 μM, KCl 1μM, $MgCl_2$ 13μM, 2-멉칼토에탄올 10μM, 글리세롤 0.5%, Tween-20 0.05 %, Nonidet 0.05%을 포함한다. 1X 반응 완충액, 0.1 μM 각 라벨된 dNTP, 1.0μM dNTPs 혼합물, 3U DNA 폴리메라제, 5μℓ(~5ng) 표적 DNA(환자 샘플)을 포함하고 있는 각 칩에 10μℓ 신장 반응 혼합물을 첨가하였다. 반응 혼합물을 칩 표면에 첨가하고, 53℃에서 15분간 배양한 후에, 3분간 60℃에서 배양시켰다. 칩을 0.1% SDS를 포함하는 완충액으로 세척한 후에, 깨끗한 슬립으로 덮고, Bioarray Solutions 이 미징 시스템을 이용하여 분석하였다. 상을 분석하여 각 신장된 프로브를 확인하였다.

실시예 26: CF 돌연변이 분석 - 단일 튜브 칩-1단계 신장

51개 타입의 비드 표면상에 26개 CF 돌연변이 및 기준에 대한 프로브를 결합시켰다. 프로브 결합된 비드를 단일 칩 표면상에 어셈블리시켰다. 몇몇 환자에서 게놈 DNA를 추출하고, 기존 실시예에서 설명하는 것과 같이, 다중 PCR(mPCT) 반응에서 상응하는 프라이러로 증폭시켰다. 증폭후에, 단일 스트랜드 DAN 산물을 λ엑소뉴클라제를 이용하여 만들었다. 단일 또는 풀된 PCR 산물(~5ng)을 반응 완충액, 디옥시뉴클레오티드(dNTP) 유사체(NEN Life Sciences), 각 타입의 라벨안된 dNTP, DNA 폴리메라제(Amersham Pharmacia Biotech, NJ)를 포함하는 반응 혼합물에 첨가하였다. 어닐링/신장 반응을 허용하여, 온도 조절된 사이클러에서 반응을 진행시켰다. 53℃에서 20분: 60℃에서 3분. 비드 어레이를 5 내지 15분간 0.01% SDS를 포함하는 dsH_20로 세척하였다. 어레이내에 각 비드로부터 나오는 형광 시그날을 포함하는 상(image)은 CCD카메라가 있는 형광 현미경을 이용하여 기록하였다. 상을 분석하여, 각 신장된 프로브를 확인하였다. 다음에는 26개 CF 돌연변이를 포함하는 비드 칩 조성을 나타낸 것이다.

신장 군(group) 4, 총 51개 군

클러스터 # 돌연변이

Cluster #	Mutation
1	β Actin
2	G85E-WT
3	G85E-M
4	621+1G>T-WT
5	621+1G>T-M
6	R117H-WT
7	R117H-M
8	I148T-WT
9	I148T-M
10	711+1G>T-WT
11	711+1G>T-M
12	A455E-WT
13	A455E-M
14	508-WT
15	F508
16	I507
17	R533-WT
18	R533-M
19	G542-WT
20	G542-M
21	G551D-WT
22	G551D-M
23	R560-WT
24	R560-M
25	1898+1G-WT
26	1898+1G-M
27	2184delA-WT

28 2184delA-M
29 2789+5G>A-WT
30 2789+5G>A-M
31 3120+1G-WT
32 3120+1G-WT
33 D1152-WT
34 D1152-M
35 R1162-WT
36 R1162-M
37 OLIGO-C
38 W1282X-WT
39 W1282-M
40 N1303K-WT
41 N1303-M
42 R334-WT
43 R334-M
44 1078delT-WT
45 1078delT-M
46 3849-10kb-WT
47 3849-10kb-M
49 1717-1G>A-WT
50 1717-1G>A-WT
51 Biotin

실시예 27: 세 개 또는 그 이상의 아미노산 결손 또는 삽입을 eMAP를 이용하 여 확인.

신장을 이용하여 3개 또는 그 이상의 결손 또는 삽입을 가지는 돌연변이를 확인하였다. 3'단부에 돌연변이된 염기 3-5개를 배치시켜 프로브를 고안하였다. 돌연변이 염기를 포함하는 것(돌연변이전에 종료되는)과 포함하지 않는 것 중 하나로 야생형 프로브를 고안하였다. 다음은 ATCTC가 결손된 또는 AGGTA가 삽입되어 생성된 돌연변이의 예를 나타낸 것이다. 프로브 디자인은 다음과 같다.

1. WT1- ----------ATCTCgca
2. WT2- ----------
3. M1- ----------gca (deletion only)
4. M2- ----------AGGTAgca (deletion and insertion)

야생형 프로브는 상이하게 인코드된 비드 표면 또는 본 발명에서 설명된 것과 같이 풀(pool)된 비드에 결합시켰다. 돌연변이 1(M1: 결손) 및 2(M2: 삽입)에 대한 프로브를 다른 비드상에 결합시켰다. 두 가지 야생형 프로브는 유사한 정보를 제공하나, 돌연변이 프로브는 특정 샘플에서 확인되는 돌연변이 유형을 나타낸다.

실시예 28. 헤어핀 프로브

본 발명의 특정 구체예에서, 비드에 나타낸 프라임 프로브는 머리핀 형태를 만든다. 헤어핀 구조에는 도 23에서 볼 수 있는 것과 같이, TEI 부분에 상보적인 5'말단에 서열 단편과 DA 서열을 포함할 수 있다. 경쟁적인 하이브리드 반응동안에, DA부분이 표적 서열과 선호적으로 하이브리드되기만 하면, 헤어핀 구조가 개방된다. 이와 같은 조건하에, TEI 부분은 지정된 다형성 부분과 배열되고, 신장 반응 이 일어날 수 있다. 반응의 경쟁적 특징을 이용하여 프로브의 허용 수준을 조절할 수 있다.

실시예 29 맞춤 비드 어레이상에 나열된 대립형질 특이적인 다중 신장을 이용하여 낭포성 섬유증과, 아시케나지 유대인 질환 돌연변이 분석

낭포성 섬유증 돌연변이의 ACMG+ 패널을 위해 돌연변이에 대해 고처리량의 다중 분석을 위한 신규한 검사를 평가하였다. 또한, 아시케나지 유대인 질환(Ashkenazi Jewish disease) 패널을 개발하여, 테이-사츠(Tay-Sachs) 질환, 카나반(Canavan), 고세(Gaucher)질환, 니만-픽(Niemann-Pick) 질환, 블룸 증후군(Bloom Syndrome), 판코니(Fancomi) 빈혈증, 가족성자율신경이상증(Familial Dysautonomia), 점막지질분해증(mucolipodosis) IV의 원인이 되는 흔한 돌연변이를 감지하였다. 신장-중개된 다중 이형성 분석(eMAP)에서 3'말단 가변 서열을 포함하는 대립형질 특이적인 올리고뉴클레오티드(ASO)를 실리콘 칩상에 교대로 배열된 컬러-인코드된 비드상에 결합시킨다. 전체 어레이로부터 발생되는 형광 시그날의 즉석 이미징을 이용하면 정상 서열과 돌연변이 서열의 신장 생성물을 동시에 감지한다. 이 실시예에서, 수백개 임상 환자 샘플을 이용하여, ACMG CF 비드 칩을 평가하였다. 도 24에서 볼 수 있는 것과 같이, 검사는 표준 DNA 분석에 의해 확인되는 모든 돌연변이를 정확하게 기록하였다. 요약하면, 맞춤 비드를 포함하는 다중 신장 검사를 이용하면, ACMG+ 및 아쉬케나지(Ashkenazi) 질환 패널에 상응하는 돌연변이를 연구할 수 있었다. 이와 같은 맞춤 비드는 (1) 즉석 이미징- 검사를 위한 시간 이 2시간 이내이고 (2) 자동화된 상(image) 인식 및 분석 (3) 소형화 즉, 시약 소비가 적고, (4) 웨이퍼 기술을 이용하여 비드칩을 합성하여, 원한다면, 수만개의 칩을 대량 생산할 수 있는 등의 이유로 인하여 정점을 가진다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
다음의 단계를 포함하는, 하나 또는 그 이상의 표적 뉴클레오타이드 서열 내에 위치하는 지정된 다형성 부위에서의 뉴클레오타이드 조성의 공동결정을 위한 방법 :

(a) 각각의 프로브는 지정된 다형성 부위에 근접하는 범위 내에 위치하는 상기 하나 또는 그 이상의 표적 뉴클레오타이드 서열의 아서열(subsequence)에 어닐링 할 수 있는, 하나 또는 그 이상의 세트의 프로브를 제공하는 단계;

(b) 지정된 다형성 부위와 직접 정렬하는 프로브 서열이내에 검색 부위를 위치시킴으로써 혼성화 복합체의 형성이 가능하도록 상기 하나 또는 그 이상의 표적 뉴클레오타이드 서열과 프로브의 세트를 접촉하는 단계;

(c) 각 혼성화 복합체를 위하여, 검색 부위와 지정된 다형성 부위 사이에 매치 또는 미스매치의 존재를 결정하는 단계; 그리고

(d) 지정된 다형성 부위의 조성을 결정하는 단계.

청구항 2.
제 1항에 있어서, 상기 하나 또는 그 이상의 표적 뉴클레오타이드 서열은 하나 또는 그 이상의 프라이머 세트를 사용하는 다중 PCR 반응에서 제조되는 방법.

청구항 3.
제 2항에 있어서, 상기 프라이머 세트는 축퇴 프라이머 세트인 방법.

청구항 4.
제 1항에 있어서, 상기 표적은 게놈 DNA 단편인 방법.

청구항 5.
제 1항에 있어서, 상기 표적은 cDNA 단편인 방법.

청구항 6.
제 1항에 있어서, 하나 또는 그 이상의 세트의 프로브는 기질상에 spatially 인코드된된 방법.

청구항 7.
제 1항에 있어서, 하나 또는 그 이상의 세트의 프로브는 인코드된 마이크로입자 위에 고정되는 방법.

청구항 8.
제 7항에 있어서, 인코드된 마이크로입자는 무작위 인코드된 어레이(array)내로 어셈블리 되는 방법.

청구항 9.
제 1항에 있어서, 각각의 프로브는 신장 또는 연장 반응을 개시할 수 있는 말단 신장 개시영역을 보유하는 방법.

청구항 10.
제 1항에 있어서, 반응은 3'- ->5' 엑소뉴클레아제 활성이 부재하는 중합효소에 의하여 촉매 되는 방법.

청구항 11.
제 1항에 있어서, 단계 (c)는 하나 또는 그 이상의 데옥시뉴클레오타이드 트 리포스페이트를 추가하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 12.
제 11항에 있어서, 프로브를 연장 또는 신장할 수 있는 중합효소를 사용하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 13.
제 12항에 있어서, 중합효소는 3' -> 5' 엑소뉴클레아제 활성이 부재인 방법.

청구항 14.

제 11항에 있어서, 적어도 하나의 데옥시 뉴클레오타이드 트리포스페이트는 신장 생성물과 관련된 광학적으로 탐지할 수 있는 신호를 생성하도록 표지되는 방법.

청구항 15.
제 1항에 있어서, 프로브에 형광 라벨된 표적을 어닐링시켜, 형광 하이브드리 복합체를 만들어서, 광학 라벨을 하나 이상의 프로브에 부착시키는 방법.

청구항 16.
제 15항에 있어서, 신장된 하이브리드 복합체를 형성하도록 하나 또는 그 이상의 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트를 첨가함으로써 매치를 나타내는, 프로브를 연장 또는 신장할 수 있는 중합효소를 사용하는 단계를 추가 포함하는 방법.

청구항 17.
제 16항에 있어서, 표적과 비-매치된 프로브에 의해 형성된 임의 하이브리드 복합체의 용융 온도보다는 높고, 표적과 신장된 프로브에 의해 형성된 임의 연장된 하이브리드 복합체의 용융 온도보다는 낮은 값으로 온도를 정한 조건하에서 광학 신호를 감지하여 신장 산물을 확인하는 것이 추가 포함된 방법.

청구항 18.
제 15 항에 있어서, 프로브 세트에서 한가지 이상의 프로브를 인코드된 마이크로입자에 고정시키고, 광학 시그날 변화를 감지하는 방법.

청구항 19.
제 15 항에 있어서, 프로브 세트에서 한가지 이상의 프로브가 무작위로 인코드된 어레이에 배열된 인코드된 마이크로입자에 고정되는 방법.

청구항 20.
제 19 항에 있어서, 어레이는 공간적으로 인코드된 방식으로 배열되는 방법.

청구항 21.
제 15 항에 있어서, 광학 시그날에서 변화를 감지하고, 입자의 정체를 결정하는 방법.

청구항 22.
생물학적 시료에서 원하는 핵산 서열 분석시에 생성되는 발생된 분석 신호를 다음과 같이 단계로 서열-특이적 방식으로 증폭시키는 방법:

(a) 원하는 서열과 혼성화 복합체를 형성할 수 있는 한 세트의 고정화 프로브를 제공하는 단계;

(b) 원하는 서열이 적어도 하나의 고정화 프로브에 어닐링하여 혼성화 복합 체를 형성하는 조건하에 상기 세트의 고정화 프로브를 이해 서열을 포함하는 생물학적 시료와 접촉시키는 단계;

(c) 혼성화 복합체내에 포함된 프로브가 신장 또는 연장되도록 혼성화 복합체를 중합효소와 접촉시키는 단계;

(d) 프로브의 신장 또는 연장을 광학 신호로 전환시키는 단계;

(e) 상기 세트의 고정화 프로브로부터 광학 신호를 실시간으로 기록하는 단계.

청구항 23.
제 22 항에 있어서, 한 개 또는 그 이상의 사이클을 실행하는 단계가 추가되고, 이때 각 사이클은 '어닐링-신장/연장-감지-변성' 단계로 구성되며, 각 사이클로 인하여 기하급수적으로 신장 또는 연장된 프로브의 숫자가 증가되는 방법.

청구항 24.
제 23 항에 있어서,

(a) 하이브리드 복합체 형성이 잘되는 제 1 온도로 세팅하고;

(b) 중합효소-촉매된 신장을 선호하는 제 2 온도로 세팅하고;

(c) 신장 또는 연장을 광학 신호로 전환하고;

(d) 모든 고정된 프로브로부터 나오는 광학 신호를 기록/이미지화하고;

(e) 제 3 온도를 세팅하여 모든 하이브리드 복합체를 변성시키는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25.
아래의 단계를 포함하는, 한가지 이상의 표적 핵산 서열에 위치하는 지정된 다형성 부위의 공동 검색을 위한 커버링 프로브 세트를 형성하는 방법:

(a) 프로브의 검색 부위를 지정된 다형성 부위와 정렬할 수 있는 신장 프로브 서열을 결정하는 단계;

(b) 프로브 검색 부위와 지정된 다형성 부위의 정렬을 유지하면서, 모든 지정되지 않거나 비-선택적으로 지정된 다형성 부위를 수용하도록 완전한 세트의 퇴행 프로브를 추가로 결정하는 단계;

(c) 모든 관용된 다형성을 제거하여 축퇴(degeneracy) 정도를 감소시키는 단계.

청구항 26.
제 25 항에 있어서, 커버링 세트에는 지정된 부위당 상이한 검색 조성을 가지는 적어도 두가지 프로브를 보유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27.
제 25 항에 있어서, 단계 C에서 프로브 풀링(pooling)을 이용하여 복합성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28.
한 개 또는 그 이상의 표적 뉴클레오티드상에 한 개 이상의 지정 위치에서 다형성을 확인하는 방법에 있어서,

(a) 지정 부위를 검색할 줄 수 있는 능력이 있는 한 개 이상의 프로브를 제공하고;

(b) 지정 부위를 검색할 수 있도록 고안된 한 개 이상의 프로브를 신장시켜 신장 생성물을 만들고;

(c) 두군데 이상 부위에서 조성을 결정하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29.
제 28 항에 있어서, 제 2 지정 부위에 신호를 줄 수 있도록 고안된 제 2 프로브를 신장 생성물에 어닐링시킴으로써 하이브리드 복합체를 형성하는 단계가 추가 포함된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30.
다음의 단계를 포함하는, 표적 폴리뉴클레오티드 서열에서 하나이상 지정된 위치에 다형성을 확인하는 방법:

(a) 상기 지정 부위를 검색할 수 있는 하나이상 프로브를 제공하는 단계;

(b) 다형성 각각에 근접 위치하는 비-지정 다형성 부위를 수용하면서 지정 부위 각각에 수치를 부여하는 단계.

청구항 31.
제 30 항에 있어서, 프로브와 표적 서열간에 상동성은 다중성을 통하여 분석하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32.
표적 뉴클레오티드 서열의 한 군데 이상의 지정 부위에서 다형성을 결정하는 방법에 있어서, 이 방법은 결손을 감지할 수 있는 한 쌍 이상의 프로브를 제공하는 단계로 구성되고, 이때 결손은 프로브의 3' 단부 또는 3'단부의 3-5개 염기내에 위치하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33.
표적 뉴클레오티드 서열의 두군데 이상이 지정 부위에서 다형성을 확인하는 방법에 있어서,

a) 대립형질을 지정할 수 있도록 지정된 다형성 부위의 다중성을 선별하고;

b) 지정된 부위의 다중성을 공동 검색할 수 있는 두 개 이상의 프로브를 제공하고;

c) 각 지정된 부위에 수치를 할당하고;

d) 수치를 복합시켜, 지정된 다형성 부근에 비-지정 부위를 수용하면서 대립형질 또는 대립형질 군을 확인하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34.
표적 폴리뉴클레오티드 서열에서 한 개 이상의 지정 부위에 다형성을 결정하는 방법에 있어서, 지정된 부위용 프로브 세트를 제공하고, 각 프로브의 단부 신장 개시에 따라 상이한 프로브 서브세트내에서 프로브 세트를 분류하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35.
제 34 항에 있어서, 프로브 세트를 다중화시키고, 프로브 세트내에 다른 프로브로부터의 간섭없이 프로브 세트내 각 프로브를 측정하고, 프로브 세트에 의해 용인되는 대립형질을 포함하도록 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 대립형질 매치 패 턴을 변경하는 단계가 추가로 포함된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36.
제 35 항에 있어서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 대립형질 매치 패턴을 변경하는 단계는 매치된 대립형질이 포함되도록 한 개 이상의 프로브 세트를 풀링(pooling)하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37.
제 36 항에 있어서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 대립형질 매치 패턴을 변경하는 단계는 프로브 세트에 의해 만들어지는 시그날 강도를 비교하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법

청구항 38.
제 37 항에 있어서, 프로브 세트상에 단부 신장 개시 부분과 이중 고정 부분을 분리시키는 단계가 추가 포함된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39.
다형성 부위의 다중성을 동시 검색하는 방법에 있어서, 표적을 선형 증폭시키기 위해 한 개 이상의 온도 사이클을 실행하여 다중 신장 검사를 실행하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40.
다중 다형성 부위를 동시 검색하는 방법에 있어서, 온도 조절된 상태에서 어닐링 및 신장 단계를 복합하여 다중화된 신장 검사를 실행하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41.
하나이상 연속 표적 서열에 위치하는 S 다형성 부위, P sub S := {c sub P(s); 1 ≤s≤ S}에서 뉴클레오티드 구성의 공동 검색 방법에 있어서, 상기 방법은 아래의 단계를 실시함으로써 한정된 세트의 가능 수치중 하나에 각 c sub P를 부여하는 단계로 구성되며:

(a) 한 세트의 지정된 고정화 올리고뉴클레오티드 프로브를 제공하고, 여기서 각 프로브는 지정된 다형성 부위에 근접 위치하는 표적 서열에 바람직한 정렬로 어닐링할 수 있고, 여기서 바람직한 정렬은 지정된 다형성 부위에 직접적으로 병렬하는 프로브 서열에 검색 부위를 위치시키고, 상기 프로브는 신장 또는 연장 반응을 개시할 수 있는 말단 연장 개시(TEI) 영역을 추가로 보유하고;

(b) 한가지이상의 표적 서열이 상기 세트의 고정화 올리고뉴클레오티드 프로브에 어닐링하도록 하여 프로브-표적 혼성화 복합체를 형성하고;

(c) 각 프로브-표적 혼성화 복합체에서, 검색 부위 및 상응하는 지정된 다형성 부위 사이의 구성에서 매치 또는 미스매치를 규정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42.
제 41 항에 있어서, 프로브를 기질상에 공간적으로 인크드되는 방식으로 고정시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43.

제 41 항에 있어서, 프로브는 인코드된 마이크로 입자상에 고정시키고, 다시 기잘상에 무작위 인코드된 어레이로 어셈블되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 44.
제 41 항에 있어서, 규정 단계는 프로브를 연장 또는 신장시킬 수 있는 폴리메라제를 이용하는데, 프로브의 검색 부위 조성은 한 개 이상의 뉴클레오시드 트리포스페이트를 추가하여 표적에서 지정된 다형성 부위의 것과 이들 프로브에 의해서만 매치되고, 이때 추가되는 한 개 이상의 뉴클레오시드 트리포스페이트중 하나를 라벨하여 광학적으로 감지 가능한 신호를 발생시킬 수 있는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 45.
제 41 항에 있어서, 제 1 단계에서 프라이머에 형광 라벨된 표적을 어닐링시켜 광학 하이브리드 복합체를 만들게 하여, 광학 신호가 모든 이용가능한 고정 프로브에 부착되도록 하고, 제 2 단계는 한 개 이상의 뉴클레오티드 트리포스페이트를 추가하여 연장된 하이브리드 복합체를 형성하게 하여, 이들 프로브와 단부 매치를 보이는 프로브를 연장 또는 신장시킬 수 있는 폴리메라제를 이용하는 것이고, 이때 임의 하이브리드 복합체의 용융 온도 이상, 임의 연장된 하이브리드 복합체의 용융 온도 이하 범위의 온도로 온도를 상승시키는 조건하에서 광학 신호를 안정화시켜 연장 또는 신장 생성물을 확인하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46.
제 45 항에 있어서, 프로브는 인코드된 마이크로입자상에 고정시키고, 광학 신호의 변화를 감지하고, Flow Cytomerty를 이용하여 입자 동정(identity)을 하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 47.
제 45 항에 있어서, 프로브는 무작위 인코드된 어레이내에 배열된 인코드된 마이크로입자에 고정시키고, 이때 어레이는 공간적으로 인코드시키는 방식으로 광학 배열되어 있고, 광학 신호의 변화를 감지하고, Flow Cytomerty를 이용하여 입자 동정(identity)을 하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 48.
생물학적 시료내에 원하는 핵산 서열 분석시에 형성되는 검사 시그날을 서열 특이적 증폭시키는 방법에 있어서, 이때 방법은 증폭된 시그날을 실시간으로 모니터할 수 있도록 하며, 다음과 같이 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

a) 장치내에 생성되는 공학 검사 시그날을 실시간으로 기록할 수 있는 관련 온도 조절 기구에 온도-조절된 샘플을 포함하는 장치를 제공하고;

b) 관심이 있는 서열과 하이브리드 복합체를 형성할 수 있고, 구별가능한 고정된 올리고뉴클레오티드 프로브 세프를 샘플을 포함하는 장치에 제공하고;

c) 서열을 고정된 올리고뉴클레오티드 프로브 세트에 어닐링시켜, 하이브리드 복합체를 형성하도록 하고;

d) 하이브리드 복합체와 폴리메라제를 접촉시켜, 하이브리드 복합체내에 포함된 매치된 프로브의 신장 또는 연장시키고;

e) 매치된 프로브의 신장 또는 연장을 광학 검사 시그날로 전환시키는 장치를 제공하고;

f) 실시간으로 고정된 프로브 세프로부터 광학 검사 시그날을 기록할 수 있는 광학 기록/이미지화 장치를 제공하고;

g) 한 개 이상의 '어닐링-연장-감지-변성' 사이클을 실행하는데, 이때 각 사이클은 기하급수적으로 신장 또는 연장된 프로브를 증가시키고, 다음의 단계로 구성된다;

(i) 하이브리드 복합체 형성이 잘되는 제 1 온도로 세팅하고;

(ii) 중합효소-촉매된 신장을 선호하는 제 2 온도로 세팅하고;

(iii) 신장 또는 연장을 광학 신호로 전환하고;

(iv) 모든 고정된 프로브로부터 나오는 광학 신호를 기록/이미지화하고;

(v) 제 3 온도를 세팅하여 모든 하이브리드 복합체를 변성시킨다.

청구항 49.
한 개 이상의 표적에서 다중 지적 부위의 배열을 동시에 확인하는 방법에 있어서,

a) 표적 증폭을 위한 프라이머를 제공하고;

b) 프로브 어레이를 제공하고;

c) 프로브 어레이를 이용하여 신장 생성물을 만들 수 있는 검사를 진행하고, 신장 생성물을 감지하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50.
한 개 이상의 핵산에서 적어도 한군데 지정 부위의 배열을 결정하는 방법에 있어서, 이 방법은 한 개 이상의 핵산 복사체 다수를 제공하고, 이때 핵산은 적어 도 한 개의 다형성을 가지며, 다음과 같은 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

a) 지정된 부위로 적어도 한 가지 다형성을 선택하고;

b) 지정된 부위의 조성을 결정하기 위해 각 지정된 부위를 동시 검색할 수 있는 두 개 이상 타입의 프로브를 제공하고, 각 타입의 프로브는

i) 지정된 부위에서 핵산의 일부와 배열될 수 있도록 고안되고, 프로브의 폴리메라제-촉진된 신장을 개시할 수 있는 말단 신장 개시 부분;

ii) 핵산의 상이한 부분과 배열할 수 있도록 고안된 가변성 이중 고정 부위로 구성되고;

c) 적어도 일부 프로브가 한 개 이상의 핵산에 하이브리드되도록 하는 조건하에 한 개 이상의 핵산 복사체 다수에 프로브를 접촉시키고;

d) 핵산에 어닐되는 프로부 세트를 신장시키기 위해 신장 반응을 실시하고;

e) 신장 반응을 감지하고;

f) 각 지정된 부위에 수치를 할당하는 단계.

청구항 51.
제 50 항에 있어서, 각 지정된 부위의 실체(identity)을 결정하기 위해 할당된 수치를 복합시키는 단계가 추가 포함된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 52.
제 51 항에 있어서, 적어도 한 개 지정 부위에 할당된 수치는 적어도 한 개 지정 부위에서 뉴클레오티드 실체에 상응하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 53.
제 51 항에 있어서, 적어도 한 개 지정 부위에 할당된 수치는 프로브가 핵산과 완벽하게 일치하는 경우에 '1'에 해당되고, 프로브가 핵산과 완벽하게 일치되지 않는 경우에 '0'에 해당되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54.
제 51, 52, 53항중 어느 한 항에 있어서, 수치를 복합하여, 대립형질 또는 대립형질 군의 실체를 결정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 55.
제 50 항에 있어서, 말단 신장 개시 부분은 이중 고중 부분에 바로 인접된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 56.
제 50 항에 있어서, 말단 신장 개시 부분은 분자 사슬(tether)에 의해 이중 고정 부분에 연결된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 57.
제 50 항에 있어서, 프로브세트내 프로브의 이중 고정 부분은 비-지정 부위에 다형성을 고려하여 고안된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 58.
제 50 항에 있어서, 한 개 이상의 핵산을 CFTR 유전자에서 얻는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 59.
제 58 항에 있어서, 프로브는 센스 또는 안티센스 DNA 스트랜드의 표적 서열과 배열되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 60.
제 59 항에 있어서, 프로브와 표적 서열의 상동성은 병렬 반응으로 분석하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 61.
제 50 항에 있어서, 적어도 한 개 다형성은 결손인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 62.
제 50 항에 있어서, 적어도 한 개 다형성은 삽입인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 63.
제 50 항에 있어서, 적어도 한 개 다형성은 단일 뉴클레오티드 다형성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 64.
제 62 항에 있어서, 각 프로브의 일부분은 결손을 감지할 수 있고, 이때 프로브의 일부분은 3' 단부에서 있거나 3'단부의 3 내지 5개 염기내에서 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 65.
제 50 항에 있어서, 한 개이상의 핵산을 HLA 유전자에서 얻는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 66.
제 63 항에 있어서, 동일한 단부 신장 부분을 가지는 프로브는 동일한 군으로 분류되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 67.
한 개 이상의 핵산내에 지정된 다형성 세트를 동시 검색하는 방법에 있어서,

a) 한 개 이상의 핵산 복사체 다수를 제공하고, 이때 한 개 이상의 핵산은 지정된 다형성 세트를 포함하며;

b) 각종 프로브 타입에 한 개 이상의 핵산 복사체 다수를 접촉시키고, 이때 각 타입의 프로브는 핵산에 어닐할 수 있고, 다른 다입의 프로브와는 상이한 길이를 가지며;

c) 프로브에 핵산을 어닐시키고;

d) 프로브를 신장시키고;

e) 신장된 프로브를 감지하고;

f) 핵산내에 지정 다형성 서열을 결정하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 68.
핵산 서열을 결정하는 방법에 있어서,

a) 핵산 복사체 다수를 제공하고, 이때 핵산은 적어도 한 개 다형성을 가지고;

b) 지정 부위로 적어도 한 개의 다형성을 선택하고;

c) 다수 프로브 타입을 제공하고, 이때 각 프로브 타입은

지정된 부위에서 핵산의 일부와 배열될 수 있도록 고안되고, 말단 신장 개시 부분이 지정 부위와 완벽하게 배열되면 프로브의 폴리메라제-촉진된 신장을 개시할 수 있는 말단 신장 개시 부분;

핵산의 상이한 부분과 배열할 수 있도록 고안된 가변성 이중 고정 부위로 구성되고; 이때, 다수의 각 프로브는 한 개 이상의 고형 서포트에 결합하고;

d) 핵산 서열을 결정하는 검사를 실행하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 69.
제 68 항에 있어서, 검사를 실행하는 단계는

핵산과 프로브를 접촉시키고, 이때 프로브는 비드로 구성된 고형 서포트에 결합되며, 비드는 평면 어레이에 배열되며;

핵산에 적어도 한가지 타입의 프로브를 어닐링시키고;

핵산에 어닐된 프로브를 신장시키고;

어떤 프로브가 신장되었는지를 결정하여, 핵산의 지정 다형성 부위의 서열을 결정하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 70.
한 개 이상의 핵산에서 적어도 한군데 지정 부위 서열을 결정하는 방법에 있어서,

1) 완충 용액을 제공하는데,

이때 완충 용액은 a)-d)로 구성되고;

a) 한 개 이상의 핵산 복사체 다수, 핵산에는 다형성 부위가 포함되고, 지정 부위로 선택된 적어도 한가지 다형성 부위를 가지며;

b) 두가지 이상의 프로브 타입,

이때 각 프로브타입은

지정된 부위에서 핵산의 일부와 배열될 수 있도록 고안되고, 말단 신장 개시 부분이 지정 부위와 완벽하게 배열되면 프로브의 폴리메라제-촉진된 신장을 개시할 수 있는 말단 신장 개시 부분;

핵산의 상이한 부분과 배열할 수 있도록 고안된 가변성 이중 고정 부위로 구성되고;

c) 폴리메라제;

d) dNTP 타입 다수, 이때, 적어도 한가지 타입의 dNTP는 라벨된 상태이고;

2) 한 개 이상의 핵산 복사체 다수에 프로브가 어닐될 수 있도록 제 1 온도로 완충 용액을 가열하고;

3) 어닐된 프로브가 신장될 수 있도록 제 2 온도로 완충 용액을 가열하고;

4) 신장된 프로브를 감지하여, 한 개 이상의 핵산에 지정 부위 서열을 결정하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 71.
한 개 이상의 핵산내에 적어도 한 개 지정 부위 서열을 결정하는 방법에 있어서,

한 개 이상의 핵산 복사체 다수를 제공하고, 각 핵산은 적어도 한 개의 다형성을 가지고;

지정 부위로 각 핵산상에 적어도 한 개 다형성을 선택하고;

두 개 이상 타입의 프로브를 제공하는데,

이때 각 프로브타입은

지정된 부위에서 핵산의 일부와 배열될 수 있도록 고안되고, 말단 신장 개시 부분이 지정 부위와 완벽하게 배열되면 프로브의 폴리메라제-촉진된 신장을 개시할 수 있는 말단 신장 개시 부분;

핵산의 상이한 부분과 배열할 수 있도록 고안된 가변성 이중 고정 부위로 구성되고; 두 개 이상의 프로브가 한 개 이상의 고형 서포트상에 결합되고;

한 개 이상의 핵산 복사체 다수에 프로브를 어닐링시키고,

핵산에 어닐된 프로브를 신장시키기 위해 신장 반응을 실행하고,

신장 반응을 감지하고,

지정 부위에 수치를 할당하고,

수치를 복합시켜 각 지정 부위 실체(identity)를 결정하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 72.
제 71 항에 있어서, 고형 서포트는 인코드된 비드이고, 이때 방법은 기질상 에 어레이를 만들기 위해 인코드된 비드를 어셈블링하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 73.
핵산 서열을 결정하는 방법에 있어서,

핵산 복사체 다수를 제공하고, 이때 핵산을 다형성을 가지며;

지정 부위로 적어도 한 개 다형성을 선택하고;

다양한 프로브 타입에 핵산 복사체 다수를 접촉시키고;

이때 각 프로브는 지정된 다형성 부위에서 핵산의 일부와 배열될 수 있고, 프로브의 폴리메라제-촉매된 신장을 개시시킬 수 있도록 단부 신장 개시 부분을 디자인하고, 핵산의 상이한 부분과 배열할 수 있도록 고안된 가변성 이중 고정 부위로 구성되고, 이때 프로브는 어레이에 있는 인코드된 비드에 고정되며;

프로브에 핵산의 어닐링을 촉진시키는 조건하에 프로브에 핵산을 접촉시키고;

적어도 한 개의 라벨된 dNTP를 이용하여 프로브상에 신장 반응을 실행하고;

어레이에 각 비드로부터 형광 시그날을 이미지화하여 신장된 프로브 실체를 결정하고;

핵산 서열을 결정하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 74.
핵산의 지정된 다형성 부위 서열을 결정용 키트에 여러 타입의 프로브로 구성되고, 이때 각 프로브에는

지정된 부위에서 핵산의 일부와 배열될 수 있도록 고안되고, 프로브의 신장을 개시할 수 있는 말단 신장 개시 부분;

핵산의 상이한 부분과 배열할 수 있도록 고안된 가변성 이중 고정 부위로 구성된 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 75.
제 74 항에 있어서, 프로브는 프로브의 인코드된 배열로 만들어진 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 76.

제 74 항에 있어서, 핵산에 프로브를 어닐링시키기 위한 검사를 실행하는 수단이 추가 포함되고, 이 검사 수단에는 어닐된 프로브를 신장시키는 수단이 추가 포함된 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 77.
제 74 항에 있어서, 신장된 프로브를 감지하는 수단이 추가 포함된 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 78.
핵산의 다수 다형성 부위를 동시 검색하는 방법에 있어서,

이 방법은

핵산에 다수의 다형성 부위를 제공하고;

한 개 이상의 '어닐링-연장-감지-변성' 사이클을 실행하는데, 이때 각 사이클은 기하급수적으로 신장 또는 연장된 프로브를 증가시키고, 다음의 단계로 구성 된다;

하이브리드 복합체 형성이 잘되는 제 1 온도로 세팅하고;

핵산 서열과 하이브리드 복합체를 형성할 수 있는 구별가능하고, 고정된 올리고뉴클레오티드 프로브 세트를 제공하고;

핵산을 고정된 올리고뉴클레오티드 프로브에 어닐링시켜, 매치된 프로브로 구성된 하이브리드 복합체 세트를 만들고;

중합효소-촉매된 신장을 선호하는 제 2 온도로 세팅하고;

하이브리드 복합체 세트와 폴리메라제를 접촉시켜 하이브리드 복합체내에 포함된 매치된 프로브를 신장시키고;

신장을 광학 신호로 전환하고;

모든 고정된 프로브 또는 신장 생성물로부터 나오는 광학 신호를 기록하고;

제 3 온도를 세팅하여 모든 하이브리드 복합체를 변성시키는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 79.
제 78 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드 프로브는 고형 서포트에 결합된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 80.
제 79 항에 있어서, 고형 서포트는 어레이내에 배열되어 있고, 어레이는 기질상에 위치한 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 81.
제 80 항에 있어서, 인코드된 비드는 어레이내에 배열되어 있고, 어레이는 기질상에 위치한 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 82.
제 81 항에 있어서, 기질은 칩인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 83.
핵산을 증폭시키는 방법에 있어서,

이 방법은

다양한 타입의 인코드된 비드에 결합된 다양한 타입이 프로브를 제공하고, 이때 각 타입의 프로브는 한가지 타입의 인코드된 비드에만 결합되고,

적어도 한가지 타입의 프로브에 어닐링될 수 있는 주형 분자를 제공하고;

적어도 1회 증폭 사이클을 실행하고, 적어도 한 개 사이클은 주형을 적어도 한가지 타입의 프로브에 어닐링시키고; 어닐된 프로브를 신장시키고; 어닐된 주형을 변성시키는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 84.
핵산에서 다형성 부위 조성을 결정하는 방법에 있어서,

다형성 부위를 가지는 핵산을 제공하고,

지정 부위로 적어도 두 개 다형성 부위를 선택하고,

지정된 부위를 검색할 수 있는 두 개 이상의 프로브를 제공하고,

지정 부위를 검색하여, 두 개 이상의 지정 부위를 만들고, 두 개 이상 부위에서 조성을 결정하고; 이때 지정 부위 검색 단계는 제 1 프로브와 핵산간에 하이 브리드 복합체를 만들고, 제 1 프로브를 신장시켜 신장된 생성물을 만들고, 제 2 지정 부위를 검색할 수 있도록 고안된 제 2 프로브를 신장 생성물에 어닐링시켜, 하이브리드 복합체를 만드는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 85.
제 84항에 있어서, 하이브리드 단계 다음에 추가 지정 부위에서 한 개 이상의 하이브리드 단계가 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 86.
신장 반응을 탐지하는 방법에 있어서,

다수의 프로브를 제공하고;

프로브 실체 확인이 가능하도록 인코드된 비드에 프로브를 결합시키고,

핵산, dATP, dCTP, dTTP, dGTP를 포함하는 용액에 인코드된 비드를 접촉시키고, 각 타입의 dNTP는 라벨로 구성되며;

폴리메라제를 제공하고;

신장 반응을 실행하고;

신장 반응 생성물을 감지하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 87.
제 86항에 있어서, 상기 라벨은 형광 태그인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 88.
신장 반응을 탐지하는 방법에 있어서,

다수의 프로브를 제공하고;

프로브 실체 확인이 가능하도록 인코드된 비드에 프로브를 결합시키고,

적어도 한 개 라벨된 dNTP와 세 개 dNTP로 구성된 용액과 접촉시키고;

폴리메라제를 제공하고;

신장 반응을 실행하고;

신장 반응 생성물을 감지하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 89.
신장 반응을 탐지하는 방법 :

다수의 프로브를 제공하고;

프로브 실체 확인이 가능하도록 인코드된 비드에 프로브를 결합시키고,

dATP, dCTP, dTTP, dGTP를 포함하는 용액에 인코드된 비드를 접촉시키고;

폴리메라제를 제공하고;

신장된 프로브를 만들기 위해, 신장 반응을 실행하고;

신장된 프로브의 일부분에 상보적이 되도록 고안된 라벨된 올리고뉴클레오티드 프로브를 제공하고,

프로브를 신장된 프로브에 제공하고;

신장 프로브를 감지하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 90.
신장 반응을 탐지하는 방법에 있어서

라벨된 표적 서열을 제공하고;

다양한 타입의 프로브를 제공하는데, 이때 각 타입 프로브중 하나는 라벨된 표적 서열에 정확하게 상보적이고;

인코드된 비드에 프로브를 결합시켜 각 타입 프로브를 확인할 수 있도록 하고;

라벨된 표적을 프로브에 어닐링시키고,

신장 반응을 실행하여, 어닐된 프로브를 얻고,

어닐된 프로브를 가열하는데, 이때 온도는 매치안된 프로브를 포함하는 이중 구조는 변성되면서 완전하게 매치되는 프로브에 상응하는 이중 구조는 보존할 수 있는 온도가 되며;

가열후에 결합된 표적 서열을 가지는 인코드된 비드를 결정하여 완전하게 매치된 프로브에 상응하는 신장 생성물을 확인하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 91.
실시예 2에 나열된 프로브로 구성된 그룹에서 선택되는 프로브.

청구항 92.
실시예 3에 나열된 프로브로 구성된 그룹에서 선택되는 프로브.

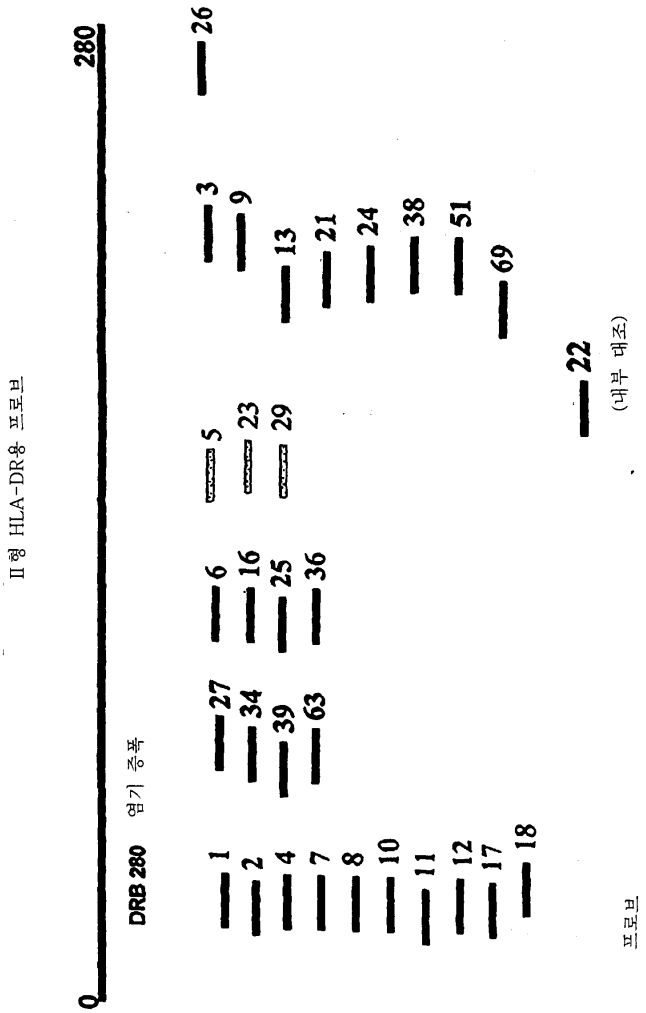
청구항 93.
실시예 9에 나열된 프로브로 구성된 그룹에서 선택되는 프로브.

청구항 94.
실시예 10에 나열된 프로브로 구성된 그룹에서 선택되는 프로브.

청구항 95.
실시예 12에 나열된 프로브로 구성된 그룹에서 선택되는 프로브.

도면

도면1a



도면1b

엇갈려 배열된 프라이머 설계

대립유전자 A .....ATGCAAGACACGGAG.....

Primer 1

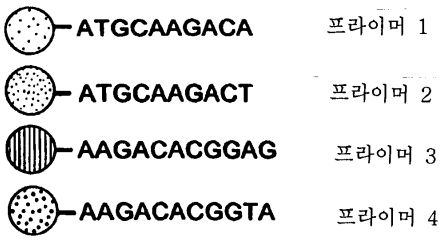
Primer 3

대립유전자 B .....ATGCAAGACTCGGAG.....

Primer 2

대립유전자 C .....ATGCAAGACACGGTA.....

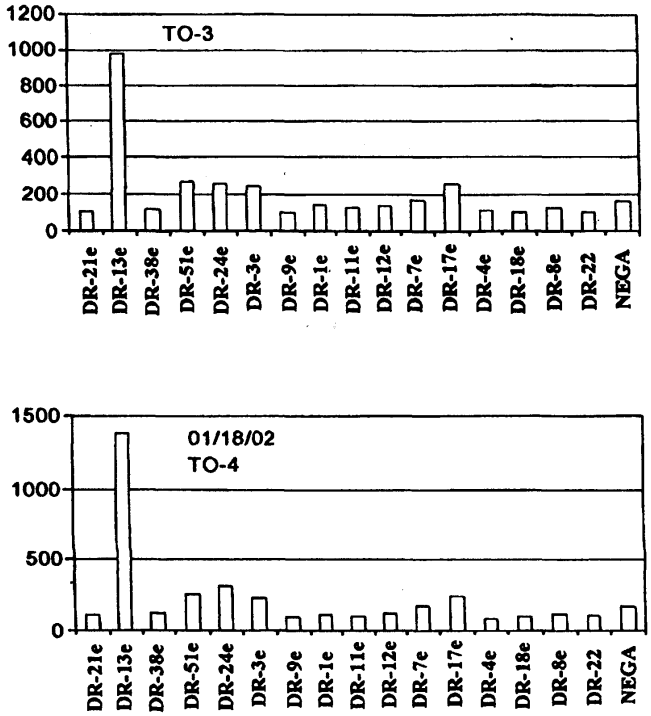
Primer 4



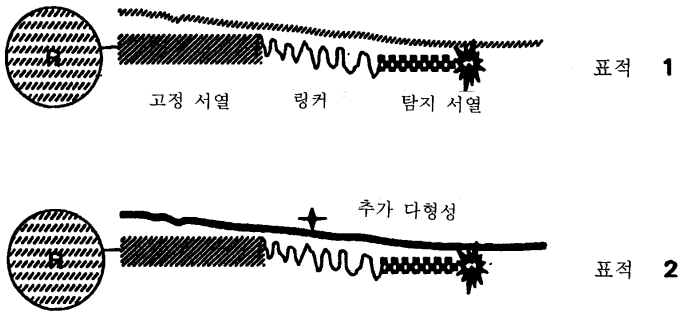
반응 패턴

	Primer1	Primer2	Primer3	Primer4
Allele A	+		+	
Allele B		+	(+)	
Allele C	+			+

도면2



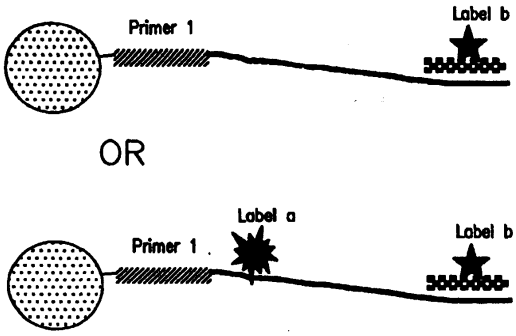
도면3



도면4

		Primer1	Primer2	Primer3	Primer4
Combination 1	Allele A	+		+	
	Allele B		+		+
	Total	+	+	+	+
Combination 2	Allele C	+	+		
	Allele D			+	+
	Total	+	+	+	+

도면5

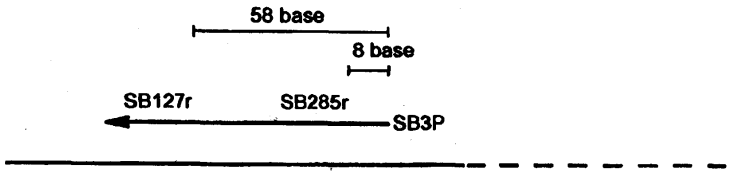


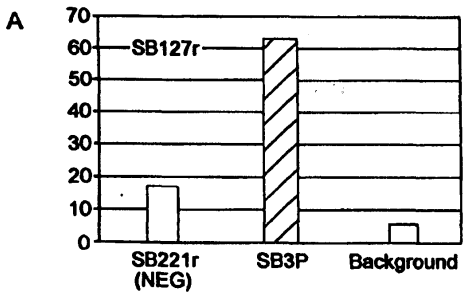
탐지 프로브는 프라이머 3의 다형성을 표적한다

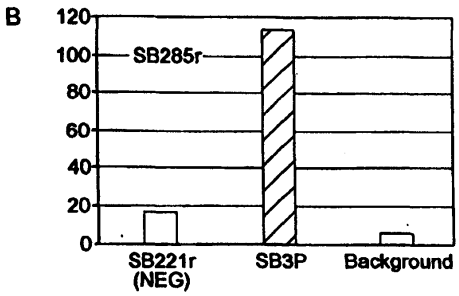
탐지 프로브는 프라이머 3의 다형성을 표적한다

도면6

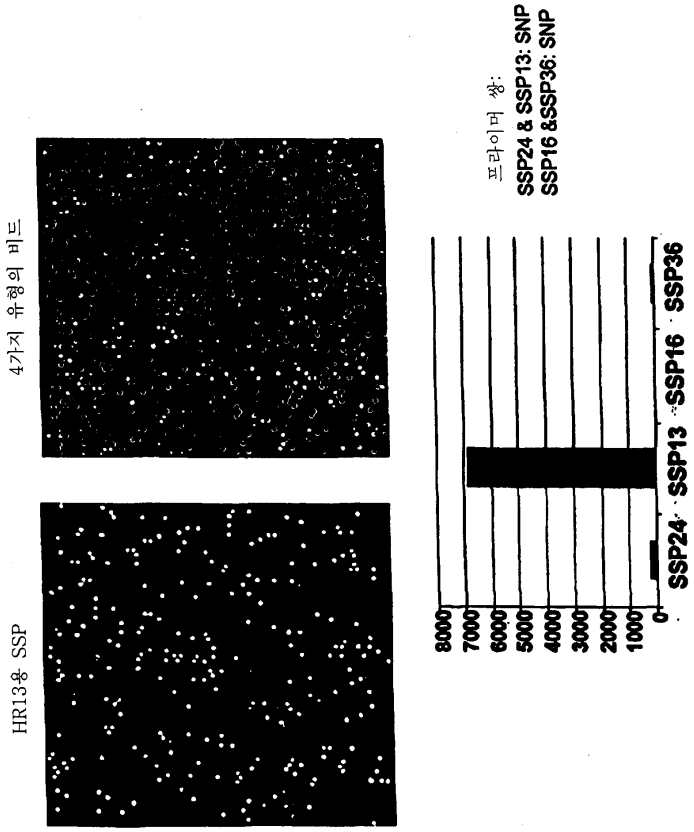
I형 B 엑손 3



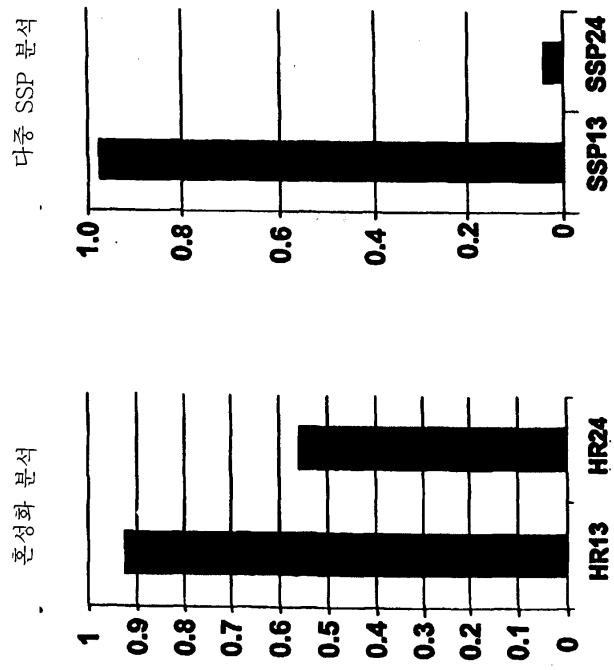




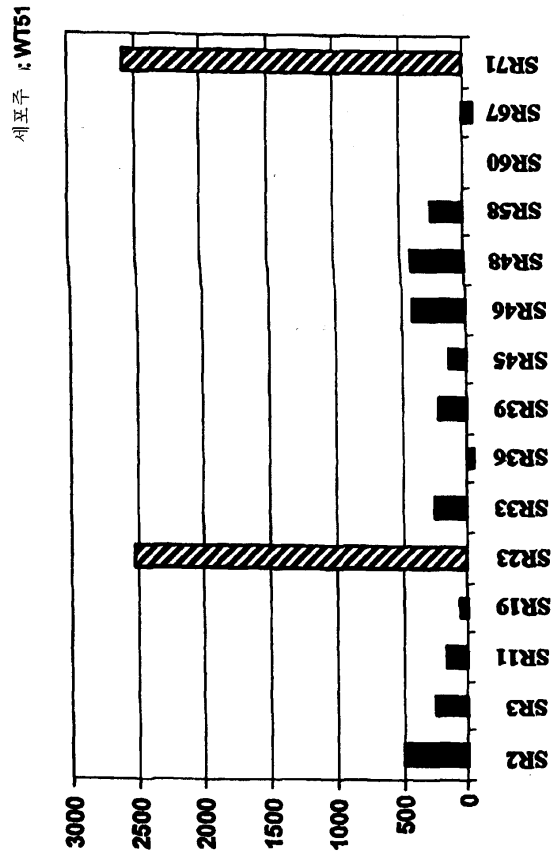
도면7


4가지 유형의 비드
HR13용 SSP
프라이머 쌍:
SSP24 & SSP13: SNP
SSP16 &SSP36: SNP
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
SSP24
SSP13
SSP16
SSP36

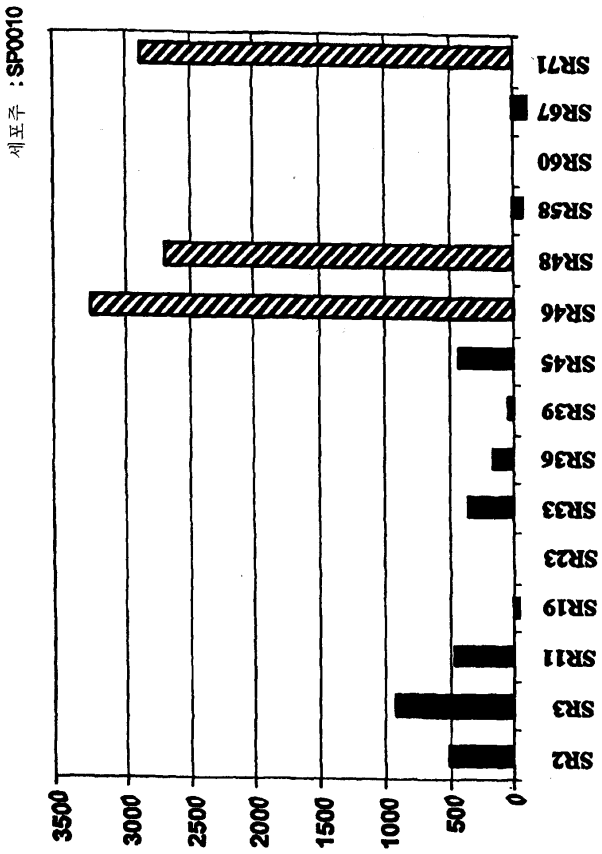
도면8


다중 SSP 분석
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
SSP13
SSP24
혼성화 분석
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
HR13
HR24

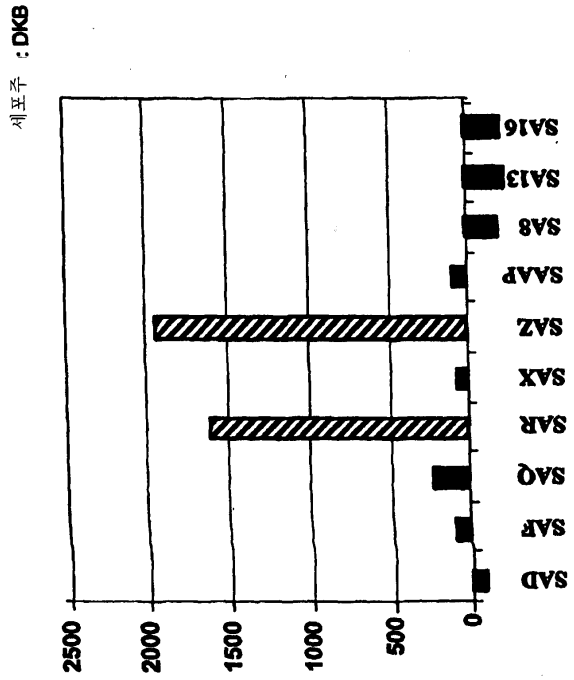
도면9


세포주 : WT51
SR71
SR67
SR60
SR58
SR48
SR46
SR45
SR39
SR36
SR33
SR23
SR19
SR11
SR3
SR2
3000
2500
2000
1500
1000
500
0

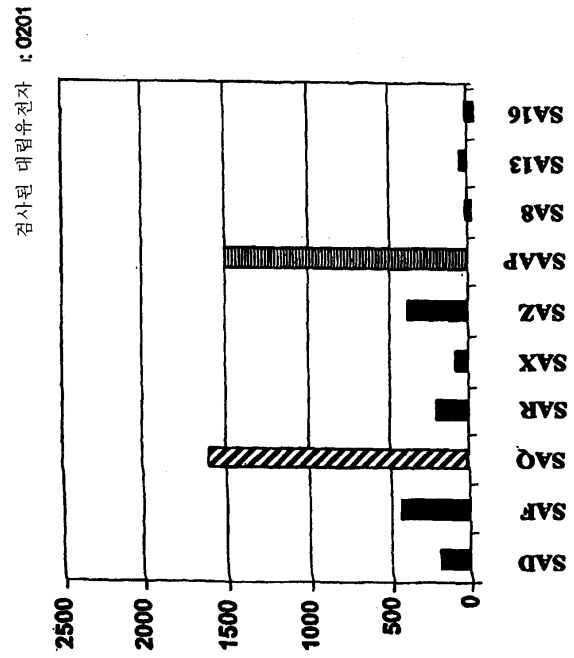
도면10


세포주 : SP0010
SR71
SR67
SR60
SR58
SR48
SR46
SR45
SR39
SR36
SR33
SR23
SR19
SR11
SR3
SR2
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0

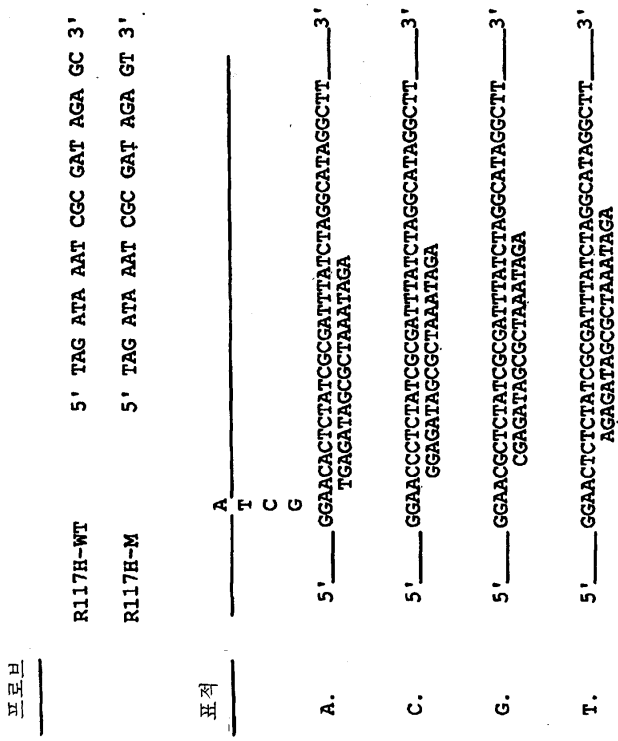
도면11


세포주 : DKB
SA16
SA13
SA8
SAAP
SAZ
SAX
SAR
SAQ
SAF
SAD
2500
2000
1500
1000
500
0

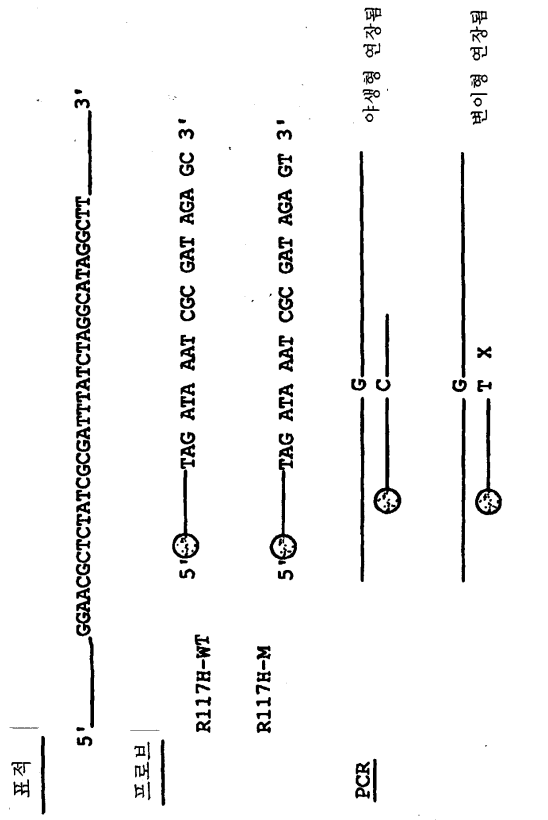
도면12


검사된 대립유전자 : 0201
SA16
SA13
SA8
SAAP
SAZ
SAX
SAR
SAQ
SAF
SAD
2500
2000
1500
1000
500
0

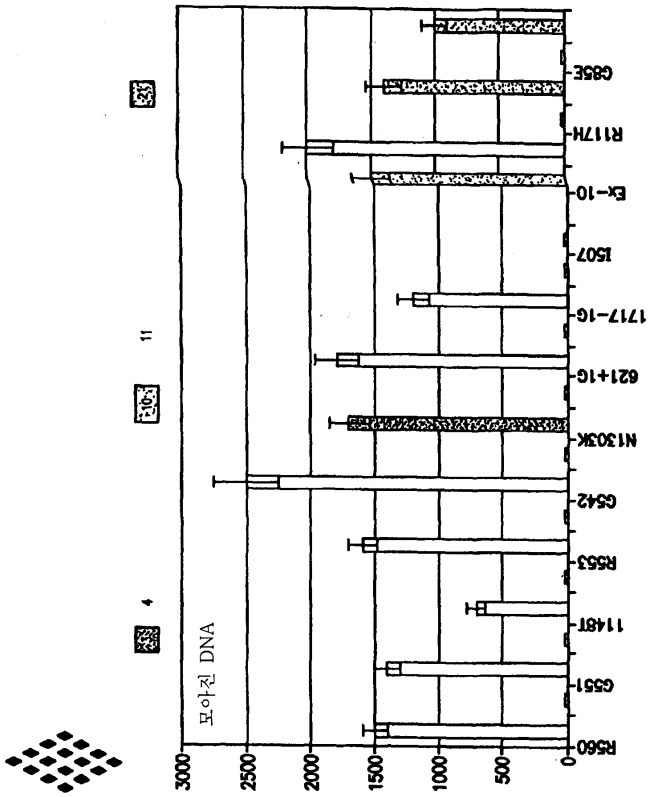
도면13


프로브
R117H-WT 5' TAG ATA AAT CGC GAT AGA GC 3'
R117H-M 5' TAG ATA AAT CGC GAT AGA GT 3'
표적
A
T
C
G
5'____GGAACACTCTATCGCGATTTATCTAGGCATAGGCTT____3'
TGAGATAGCGCTAAATAGA
A.
5'____GGAACCCTCTATCGCGATTTATCTAGGCATAGGCTT____3'
GGAGATAGCGCTAAATAGA
C.
5'____GGAACGCTCTATCGCGATTTATCTAGGCATAGGCTT____3'
CGAGATAGCGCTAAATAGA
G.
5'____GGAACTCTCTATCGCGATTTATCTAGGCATAGGCTT____3'
AGAGATAGCGCTAAATAGA
T.

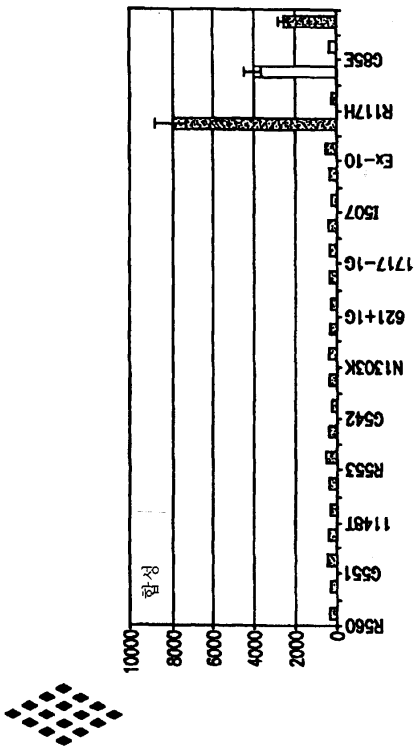
도면14


표적
5'____GGAACGCTCTATCGCGATTTATCTAGGCATAGGCTT____3'
프로브
R117H-WT 5'
TAG ATA AAT CGC GAT AGA GC 3'
R117H-M 5'
TAG ATA AAT CGC GAT AGA GT 3'
PCR
G
C
야생형 연장됨
G
T X
변이형 연장됨

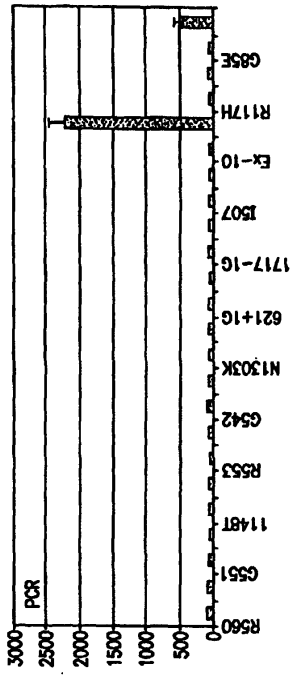
도면15


모아진 DNA
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
R560
G551
1148T
R553
G542
N1303K
621+1G
1717-1G
1507
Ex-10
R117H
G85E

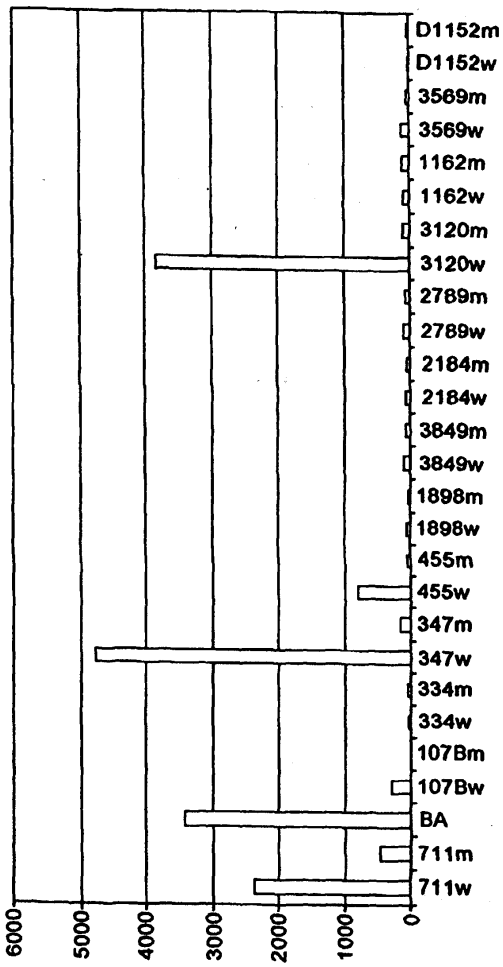
도면16a


합성
10000
8000
6000
4000
2000
0
R560
G551
1148T
R553
G542
N1303K
621+1G
1717-1G
1507
Ex-10
R117H
G85E

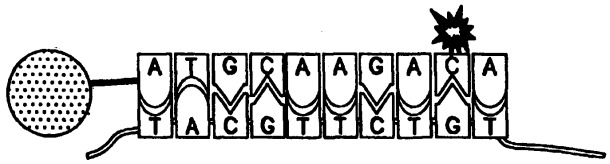
도면16b


R560
G551
1148T
R553
G542
N1303K
621+1G
1717-1G
1507
Ex-10
R117H
G85E
PCR
3000
2500
2000
1500
1000
500
0

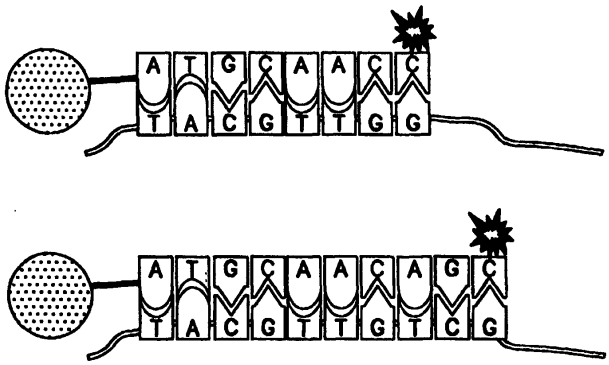
도면17


D1152m
D1152w
3569m
3569w
1162m
1162w
3120m
3120w
2789m
2789w
2184m
2184w
3849m
3849w
1898m
1898w
455m
455w
347m
347w
334m
334w
107Bm
107Bw
BA
711m
711w
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0

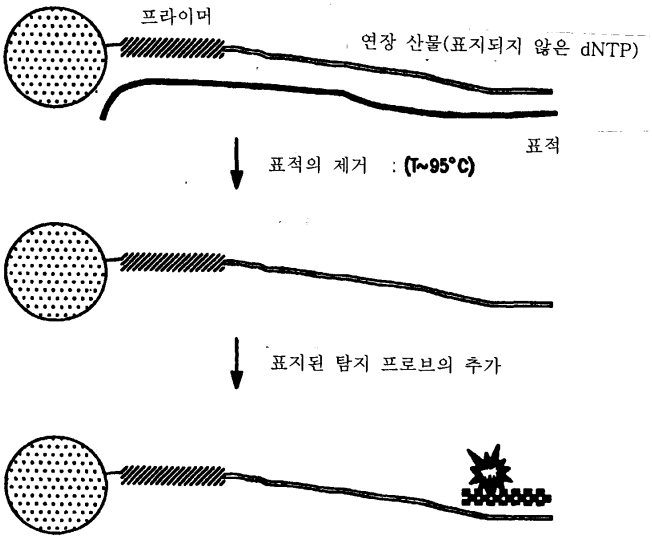
도면18



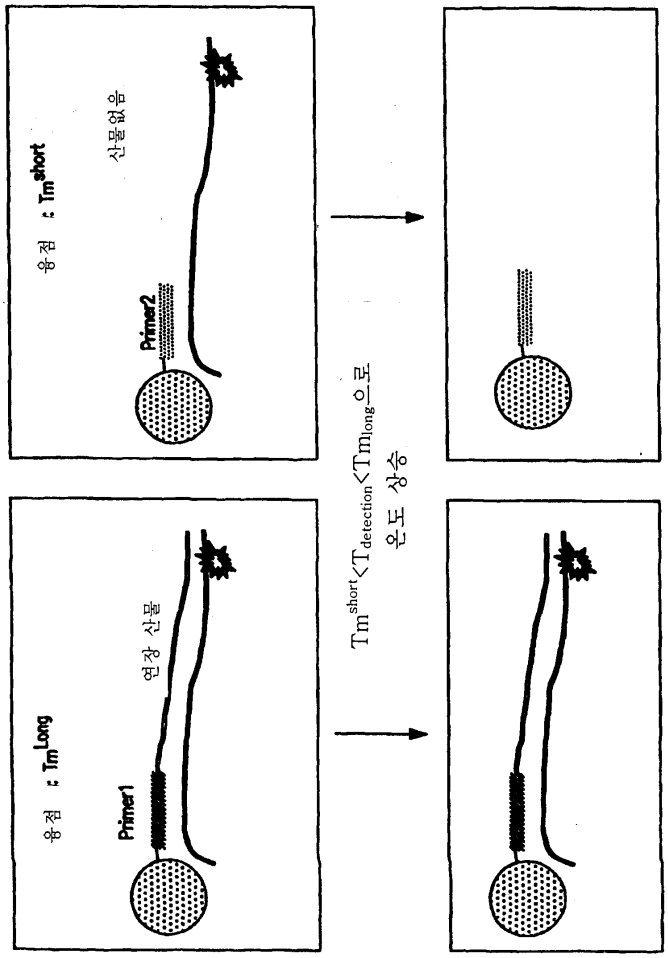
도면19



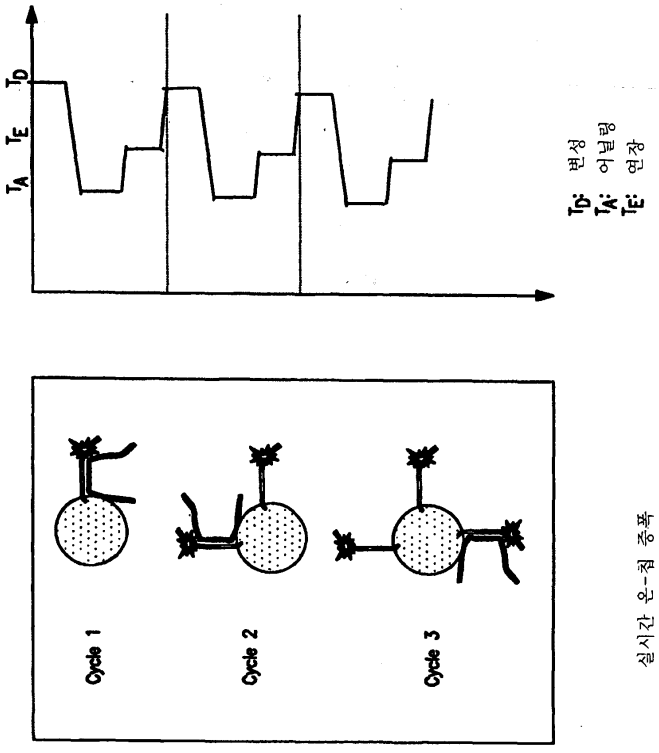
도면20



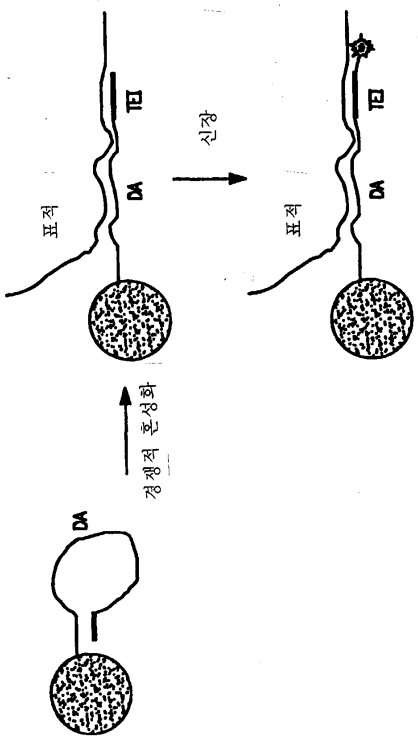
도면21


융점 : Tm short
산물없음
Primer2
융점 : Tm Long
연장 산물
Primer1
Tm short < T detection < Tm long 으로
온도 상승

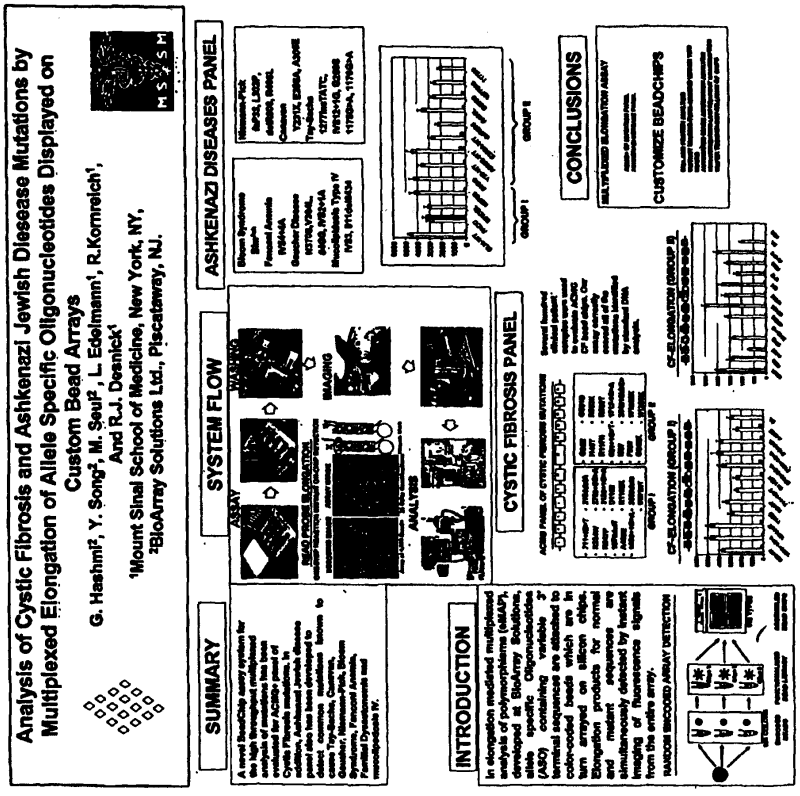
도면22


TA TE TD
TD: 변성
TA: 어닐링
TE: 연장
Cycle 1
Cycle 2
Cycle 3
실시간 온-줘 증폭

도면23


표적
DA
TEI
신장
표적
DA
TEI
경쟁적 혼성화
DA

도면24


Analysis of Cystic Fibrosis and Ashkenazi Jewish Disease Mutations by Multiplexed Elongation of Allele Specific Oligonucleotides Displayed on Custom Bead Arrays
G. Hashmi[2], Y. Song[2], M. Seul[2], L. Edelmann[1], R.Kornreich[1], And R.J. Desnick[1]
[1]Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, [2]BioArray Solutions Ltd., Piscataway, NJ.
SUMMARY
INTRODUCTION
SYSTEM FLOW
ASHKENAZI DISEASES PANEL
CYSTIC FIBROSIS PANEL
CONCLUSIONS
CUSTOMIZE BEADCHIPS