(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년09월07일
(11) 등록번호 10-1550489
(24) 등록일자 2015년08월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7026077
(22) 출원일자(국제) 2011년03월08일
심사청구일자 2012년10월10일
(85) 번역문제출일자 2012년10월05일
(65) 공개번호 10-2012-0139780
(43) 공개일자 2012년12월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/027473
(87) 국제공개번호 WO 2011/112534
국제공개일자 2011년09월15일
(30) 우선권주장
61/311,642 2010년03월08일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2009017784 A2
WO2009019008 A1*
US5849497 A
CLINICAL CHEMISTRY. 2009, vol. 55, no. 4, pages 748-756.
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
다나-파버 캔서 인스티튜트 인크.
미국 메사추세츠 02215 보스턴 브룩클린 애비뉴 450
(72) 발명자
마크리지오고스, 제라시모스
미국 02467 매사추세츠주 체스넛 힐 페이선 로드 63
(74) 대리인
양영준, 양영환

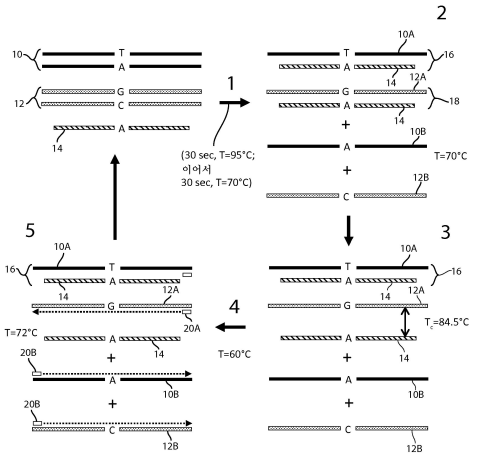
전체 청구항 수 : 총 18 항 심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 **기준 차단 서열을 이용한 완전 ＣＯＬＤ－ＰＣＲ 풍부화**

(57) 요 약

본 발명은 샘플 중 저 풍부도 대립유전자를 풍부화시키는 방법, 조성물, 및 소프트웨어에 관한 것이다. 특히, 완전 COLD-PCR의 풍부화 효율을 개선하고, 사이클 시간을 단축시키기 위한, 증폭 반응 혼합물 중의 과량의 기준 차단 서열의 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

a. 프라이머 쌍 및 하기 구성요소:

기준 서열, 및 상기 기준 서열에 대해 적어도 50% 서열 동일성을 갖는 하나 이상의 표적 서열을 갖고, 양자 모두는 또한 상기 프라이머 쌍에 의해 증폭 가능한, 핵산 샘플, 및

프라이머 쌍 결합 부위 사이에서 기준 서열의 가닥 중 하나의 서열의 적어도 일부와 완전하게 상보적인, 기준 서열의 양에 비해 몰(molar) 과량의 기준 차단 서열

을 포함하는 증폭 반응 혼합물을 제조하는 단계;

b. 반응 혼합물의 온도를 기준 서열 및 표적 서열의 용융 온도 (T_m)보다 높은 제1 변성 온도로 증가시켜 기준 서열의 변성된 가닥 및 표적 서열의 변성된 가닥을 형성하는 단계;

c. 반응 혼합물의 온도를 강하시켜 기준 차단 서열과 기준 서열의 상보적 가닥의 이종이중체, 및 기준 차단 서열과 표적 서열의 가닥의 이종이중체가 형성될 수 있도록 하는 단계;

d. 상기 반응 혼합물의 온도를 기준 차단 서열과 기준 서열의 상보적 가닥의 이종이중체의 변성에 비하여 기준 차단 서열과 표적 서열의 가닥의 상기 이종이중체를 차별적으로 더 변성시키는 임계 온도 (T_c)로 증가시켜서 상기 반응 혼합물 중 변성된 이중체로부터의 단일 가닥 기준 서열에 비하여 변성된 이종이중체로부터의 단일 가닥 표적 서열의 증가를 제공하는 단계;

e. 반응 혼합물의 온도를 강하시켜 상기 프라이머 쌍이 반응 혼합물 중 표적 서열의 단일 가닥 및 기준 서열의 임의의 단일 가닥과 어닐링할 수 있도록 하는 단계;

f. 상기 프라이머 쌍을 연장시켜 상기 기준 서열에 비해 상기 표적 서열을 풍부화시키는 단계; 및

g. 단계 b) 내지 f)를 순서대로 2회 이상 사이클로 반복하여 상기 기준 서열에 비해 상기 표적 서열을 풍부화시키는 단계

를 포함하는, 증폭 반응 혼합물에서 표적 핵산 서열을 풍부화시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 기준 차단 서열 상의 3'-말단이 연장 억제를 위해 차단되거나, 기준 차단 서열 가닥 상의 5'-말단이 Taq DNA 폴리머라제에 의한 5'→3' 엑소뉴클레올리시스(exonucleolysis)를 방지하는 뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

(i) 단계 a)에서 제공되는 기준 차단 서열이 단일 가닥 기준 차단 서열이거나,

(ii) 기준 차단 서열이 단계 a)에서 이중 가닥 기준 차단 서열로서 제공되고, 이는 단계 b)에서 반응 혼합물이 제1 변성 온도에 적용될 때 변성됨으로써 단일 가닥의 기준 차단 서열을 형성하는 것이거나,

(iii) 기준 차단 서열이 단일 가닥 DNA, RNA, 펩티드 핵산 또는 잠금 핵산(locked nucleic acid) 중 하나인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 기준 차단 서열이 단일 가닥 DNA, RNA, 펩티드 핵산 및 잠금 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 둘 이상의 핵산을 포함하는 키메라 서열인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 키메라 서열이 펩티드 핵산 또는 잠금 핵산을 포함하고, 키메라 서열 상의 펩티드 핵산 또는 잠금 핵산의 위치가, 돌연변이가 존재하는 위치를 매칭시켜 이를 통해 기준 차단 서열과 표적 서열의 가닥의 이종이중체를 변성시키는 데 필요한 온도 및 기준 차단 서열과 기준 서열의 상보적 가닥의 이종이중체를 변성시키는 데 필요한 온도 간의 차이가 최대화되도록 선택되는 것인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 기준 차단 서열이 그의 프라이머 결합 부위 사이에서 기준 서열의 가닥 중 하나와 완전하게 상보적이거나, 어느 한 말단에서 프라이머 결합 부위와 중첩되는 것이거나, 또는 기준 차단 서열이 기준 서열과 같거나 그보다 더 짧은 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 냉각 단계 c)가 1분 미만인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 기준 차단 서열이 25 nM의 양으로 반응 혼합물 중에 존재하는 것인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 이중 가닥 표적 서열의 용융 온도가 이중 가닥 기준 서열의 용융 온도보다 높거나 또는 같은 것인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 표적 서열이 동종접합성 돌연변이를 포함하는 것이거나, 또는 상기 표적 서열을 기준 서열과 차별적으로 메틸화시키고, 반응 혼합물에 대해 제1항의 방법을 수행하기 전에, 반응 혼합물을 중아황산나트륨으로 처리하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 기준 서열 및 표적 서열이 적어도 25개의 염기쌍을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 T_c가 1초 내지 60초 동안 적용되는 것인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, MALDI-TOF, HR-용융, 디-데옥시-서열분석, 단일-분자 서열분석, 파이로시퀀싱, 제2 세대 고-처리량 서열분석, SSCP, RFLP, dHPLC, CCM, 디지털 PCR 및 정량적-PCR로 이루어진 군으로부터 선택된 방법 중 하나 이상을 사용하여 풍부화된 표적 서열을 함유하는 상기 반응 혼합물을 분석하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 프라이머 쌍이 단계 c)에서 적용되는 온도보다 낮은 용융 온도를 갖는 것인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 반응 혼합물이 핵산 검출 염료를 함유하는 것인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 표지된 프로브를 사용하여 실시간 반응 조건 하에서 수행하는 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 프라이머 연장 단계 f)가 어닐링된 프라이머의 연장을 촉진하기 위하여 반응 혼합물의 온도를 증가시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 핵산 샘플을 PCR에 적용함으로써 상기 기준 서열 및 표적 서열을 먼저 증폭시키고, 이어서 증폭된 핵산 샘플의 적어도 일부를 제1항의 풍부화 방법에 적용하는 방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 핵산 샘플 중 출현율이 낮은 표적 서열, 예를 들어, 돌연변이의 증폭 및 풍부화 개선에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 완전 COLD-PCR (낮은 변성 온도에서의 동시-증폭(CO-amplification at Lower Denaturation temperature)) 동안의 기준 차단 서열의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 유전자 분석시 통상 부딪히게 되는 상황은 충분한 과량의 비-변이체 서열 ('기준 서열')의 존재하에 낮은 비율의 변이체 DNA 서열 ('표적 서열')을 동정해야 할 필요가 있는 경우를 수반한다. 그러한 상황에 대한 예로는 (a) 충분한 과량의 정상 대립유전자의 존재하에 소수의 돌연변이화된 대립유전자를 동정하고 서열분석하는 경우; (b) 후성유전학적 분석에서 충분한 과량의 비메틸화된 대립유전자의 존재하에 몇몇 메틸화된 대립유전자를 동정하는 경우 (또는 그 반대의 경우); (c) 미토콘드리아 DNA 중 낮은 수준의 이형질성을 검출하는 경우; (d) 바이러스 감염에서 약물-내성 유사-종을 검출하는 경우; 및 (e) 충분한 과량의 야생형 대립유전자의 존재하에 암 환자 (암 치료법의 성공 여부를 추적하거나, 재발을 검출하고자 하는 경우, 암을 앓는 것으로 의심되는 사람)의 혈액 중 종양-순환 DNA를 검출하는 경우를 포함한다.

[0003] 본 출원의 발명자들은 앞서 샘플 PCR 반응 혼합물 중 저빈도 대립유전자의 농도를 풍부화시키는 COLD-PCR 방법을 기술한 바 있다: 공개된 특허 PCT 출원인 국제 출원 번호 PCT US2008/009248 (발명의 명칭: "Enrichment of a Target Sequence," 현 미국 시리얼 번호 12/671,295, 발명자: 게라씨모스 마크리지오고스(Gerassimos Makrigiorgos), 본 발명의 양수인에게 양도됨)을 참조한다. 기술된 COLD-PCR 풍부화 방법은 임계 변성 온도 "T_c"에서 반응 혼합물을 인큐베이션시키는, 변형된 핵산 증폭 프로토콜에 기초한다. 선행 특허 출원에는 2가지 포맷의 COLD-PCR, 즉, 완전 COLD-PCR 및 고속 COLD-PCR이 개시되어 있다.

[0004] 완전 COLD-PCR에서, 반응 혼합물을 종래 PCR과 유사한, 기준 (예를 들어, 야생형) 및 표적 (예를 들어, 돌연변이체) 서열의 용융 온도보다 높은 것으로서 잘 선택되어진 제1 변성 온도 (예를 들어, 94℃)에 가한다.

이어서, 혼성화에 의해 기준-표적 이종이중체가 원활히 형성될 수 있도록 혼합물을 천천히 냉각시킨다. 온도를 8분 동안에 걸쳐 조절되는 방식으로 94℃에서 70℃로 일정하게 강하시키는 것이 적절한 혼성화가 확실히 이루어질 수 있도록 하는 데에는 전형적이다. 별법으로, 온도를 70℃로 급속으로 강하시키고, 적절한 혼성화가 확실히 이루어질 수 있도록 8 min 동안 상기 온도에서 유지시킨다. 일단 냉각되고 나면, 반응 혼합물은 기준-표적 이종이중체 뿐만 아니라, 기준-기준 동종이중체 (및 그보다 정도는 덜하지만, 표적-표적 동종이중체도)를 함유한다. 표적 서열과 기준 서열이 교차 혼성화하게 되면, 단쇄 (예를 들어, <200 bp) 이중 가닥 DNA 서열을 따라서 어느 곳에서든지 하나 이상의 단일 뉴클레오티드 미스매치 또는 삽입으로 인한 소수의 서열 차이가 상기 서열의 용융 온도 (T_m)에 작지만 예측가능한 변화를 가져올 것이다 (문헌 ([Lipsky, R.H., et al. (2001) Clin Chem, 47, 635-644]; [Liew, M., et al. (2004) Clin Chem, 50, 1156-1164])). 미스매치의 정확한 서열 콘택스트 및 위치에 따라, 0.1-20℃의 용융 온도 변화가 고려시 된다. 상기 참조된 특허 출원에 기술되어 있는 바와 같이, 완전 COLD-PCR은 이중 가닥의 기준 서열, 및 혼성화된 기준-표적 이종이중체 간에는 용융 온도에 있어 차이가 난다는 것을 전제로 한다. 냉각시켜 기준-표적 이종이중체가 형성될 수 있도록 한 후, 이중 가닥의 기준 서열에 대한 용융 온도보다는 낮지만, 더 낮은 기준-표적 이종이중체의 용융 온도보다는 높은 것으로 선택된 임계 변성 온도 (T_c)에서 반응 혼합물을 인큐베이션시켜 기준-기준 동종이중체보다는 교차 혼성화된 표적-기준 이종이중체를 차별적으로 변성시킨다.

[0005] 임계 변성 온도 (T_c)는 (기준-표적 이종이중체가 원활하게 변성되도록 하는 데에는 충분하지만) 기준 핵산 서열에 대한 PCR 효율이 갑자기 떨어지는 온도보다 낮은 온도이다. 예를 들어, 167 bp의 p53 서열은 PCR 변성 온도가 87℃로 설정된 경우에는 잘 증폭되며, 86.5℃에서는 적당히 증폭되며, PCR 변성이 86℃ 이하로 설정된 경우에는 어떤 검출가능한 생성물도 수득할 수 없다. 따라서, 이러한 예에서, T_c는 약 86.5℃ 이다. 임계 변성 온도 (T_c)에서의 중간 인큐베이션 이후, 프라이머는 변성된 이종이중체로부터의 변성된 표적 가닥 및 기준 가닥과 어닐링하고, 폴리머라제에 의해 연장됨으로써, 기준 서열에 비해 표적 서열의 농도는 강화된다. 완전 COLD-PCR의 장점 중 하나는 같은 프라이머 쌍이 표적 서열 및 기준 서열, 둘 모두에 대해 사용된다는 점이다.

[0006] 상기 참조된 특허 출원에 기술되어 있는 바와 같이, 고속 COLD-PCR은 이중 가닥의 기준 서열 (예를 들어, 야생형 서열), 및 이중 가닥의 표적 서열 (예를 들어, 돌연변이 서열) 간에는 용융 온도에 있어 차이가 난다는 것을 전제로 한다. 특히, 표적 서열의 용융 온도는 기준 서열의 것보다 더 낮아야 한다. 고속 COLD-PCR에서의 임계 변성 온도 (T_c)는 이중 가닥의 기준 핵산 서열에 대한 PCR 효율은 갑자기 떨어지지만, 여전히 이중 가닥의 표적 서열은 원활하게 변성되도록 하는 데에는 충분한 온도보다 낮은 온도이다. 고속 COLD-PCR 풍부화 사이클 동안, 반응 혼합물은 완전 COLD-PCR 사이클의 1 단계에서와 같이 기준 서열의 용융 온도보다 높은 온도 (예를 들어, 94℃)에서는 변성되는 것은 아니다. 대신, (a) 이중 가닥의 기준 서열의 용융 온도보다는 낮고, 더 낮은 이중 가닥의 표적 서열의 용융 온도보다는 높은 온도; 또는 (b) 기준 서열 및 표적 서열의 변성 정도 간에는 여전히 차별화를 형성하면서, 기준 서열 및 표적 서열, 둘 모두의 T_m보다 더 낮은 온도인 것으로 선택된 임계 변성 온도 (예를 들어, T_c = 83.5℃)에서 반응 혼합물을 인큐베이션시킨다. 임계 변성 온도 (T_c)에서의 인큐베이션 이후, 프라이머는 변성된 표적 가닥과 어닐링하고, 폴리머라제에 의해 연장됨으로써, 기준 서열에 비해 표적 서열의 농도는 강화된다. 또한, 같은 프라이머 쌍이 표적 서열 및 기준 서열, 둘 모두에 대해 사용된다.

[0007] 완전 COLD-PCR을 통한 풍부화는 고속 COLD-PCR을 통한 풍부화와 비교하였을 때, 상대적으로 비효율적이고, 시간이 소요되는 것으로 나타났다. 그러나, 고속 COLD-PCR의 사용은 이중 가닥의 표적 서열의 용융 온도이 이중 가닥의 기준 서열의 용융 온도보다 적합하게 더 낮을 경우에 적용되는 것으로만 제한된다. 예를 들어, 야생형 서열의 용융 온도과 동일하거나 그보다 높다면, 고속 COLD-PCR에 사용된 저빈도의 돌연변이 서열을 포함하는 샘플에 대한 서열분석 데이터에서는 돌연변이가 검출될 수 없을 것이다. 따라서, 완전 COLD-PCR 사이클의 효율 및 속도를 개선시키는 것이 바람직하다.

[0008] 상대적으로 완전 COLD-PCR이 비효율적인 것은 주로 특히 완전 COLD-PCR의 조기 사이클 동안에 형성되는 이종이중체가 부족하기 때문인 것으로 판단된다. 혼성화 단계 동안 저속 냉각이 최적화되기는 하지만 (예를 들어, 8분 동안에 걸쳐 94℃에서 70℃로 일정하게 냉각), 특별히 조기 단계 동안 매우 낮은 농도의 표적 (예를 들어, 돌연변이체) 가닥은 이종이중체를 형성할 수 있는 능력을 감소시킨다. 혼성화 시간을 연장시키는 것이 냉각에는 바람직하지 못하고, 어느 경우에는 풍부화를 개선시키는 데에도 특별히 효과가 있는 것으로 나타나지는 않았다. 완전 COLD-PCR이 고속 COLD-PCR에 비해 상대적으로 덜 효율적일 수 있는 또 다른 이유는 완전 COLD-PCR의 후기 단계 동안의 앰플리콘은 이종이중체를 형성하기 보다는 그의 동종이중체를 재형성하는 성향을 가지고 있기

때문이다.

[0009] 본 발명의 목적은 완전 COLD-PCR의 조기 단계 동안 이종이중체 형성의 효율을 개선시키는 것이다. 또 다른 목적은 완전 COLD-PCR에 대한 총 사이클 시간을 단축시키고자 하는 것이다.

발명의 내용

[0010] 발명의 개요

[0011] 본 발명은 샘플 중 저빈도 대립유전자를 풍부화시키는 방법에 관한 것이고, 특히, 완전 COLD-PCR의 효율을 개선시키고, 사이클 시간을 단축시키기 위한, 반응 혼합물 중 과량의 기준 차단 서열의 용도에 관한 것이다.

[0012] 본 발명은 상기 참조된 특허 출원인 국제 출원 번호 PCT US2008/009248 (발명의 명칭: "Enrichment of a Target Sequence," 현 미국 시리얼 번호 12/671,295, 발명자: 게라씨모스 마크리지오고스, 본 발명의 양수인에게 양도됨) (이 출원은 본원에 참고로 포함된다)의 도 1 및 2와 관련하여 기술된 COLD-PCR 방법의 변형을 수반한다. 더욱 구체적으로, 본 발명에 따라, 반응 혼합물을 변형된 완전 COLD-PCR 프로토콜에 따라 열 순환시키기 전에 공학처리된 기준 차단 서열 (예를 들어, 단일 가닥 올리고뉴클레오티드)을 과량으로 반응 혼합물에 첨가한다.

[0013] 변형된 완전 COLD-PCR 방법은 핵산 샘플을 함유하는 증폭 반응 혼합물을 제공하는 단계를 포함한다. 핵산 샘플은 기준 서열, 예를 들어, 야생형 서열을 포함할 것이고, 이는 또한 하나 이상의 표적 서열, 예를 들어, 하나 이상의 돌연변이 서열도 포함할 것으로 의심될 것이다. 언급한 바와 같이, 본 발명의 목적은 표적 서열의 농도를 풍부화시키고자 하는 것이며, 따라서, 대개의 경우, 본 방법은 존재시 표적 서열이 저빈도로 존재할 때에 사용될 것이다. 비록 본 방법은 특별히 약 1 내지 10개의 뉴클레오티드 서열 변화를 가진 돌연변이 대립유전자를 풍부화시킬 수 있도록 잘 적합화된 것이기는 하지만, 본 발명에 따른 표적 서열은 기준 서열과 적어도 50% 상동성이다. 표적 서열은 기준 서열에 대해 사용되는 것과 같은 프라이머 쌍을 사용하는 PCR을 통해 증폭될 수 있다. 언급한 바와 같이, 본 발명은 기준 차단 서열이 반응 혼합물 중에 과농도 수준으로 존재하는 것을 포함한다. 기준 차단 서열은, 프라이머 부위 사이에서, 기준 서열의 가닥 중 하나의 적어도 일부와 상보적이거나, 또는 프라이머 부위와 부분적으로 중첩되는 핵산 서열이다. 반응 혼합물에 첨가되는 기준 차단 서열은 단일 가닥인 것이 바람직할 수 있다 (그러나, 초기 변성 단계를 거쳐 변성된 단일 가닥의 기준 차단 서열을 얻게 된다는 점을 고려하면, 상기 기준 차단 서열은 또한 이중 가닥일 수도 있다).

[0014] 완전 COLD-PCR 프로토콜에 따라, 기준 서열뿐만 아니라, 표적 서열의 용융 온도 (T_m)보다도 높은 제1 변성 온도, 예를 들어, 95℃에 반응 혼합물을 가하여, 기준 서열 및 표적 서열의 변성된 가닥을 얻는다. 반응 혼합물을 냉각시켜, 예를 들어, 약 70℃로 냉각시켜 혼성화를 촉진시킨다. 과량의 기준 차단 서열의 존재하에 냉각이 일어나기 때문에, 기준 차단 서열은 기준 서열의 상보적인 가닥, 및 또한 표적 서열의 상보적인 가닥과 차별적으로 혼성화하게 된다. 예를 들어, 본 공정의 초반에 단일 가닥의 기준 차단 서열이 과량으로 첨가된다고 가정할 경우, 본 공정 중 상기 시점의 반응 혼합물은 기준 차단 서열과 상보적인 기준 (예를 들어, 야생형) 가닥의 이종이중체, 및 기준 차단 서열과 표적 (예를 들어, 돌연변이체) 가닥의 이종이중체를 함유하게 될 것이다. 상기 시점의 반응 혼합물은 또한 기준 서열 및 표적 서열에 대한 변성된 음성(negative) 가닥을 포함한다. 변형된 완전 COLD-PCR 사이클에 존재하는 형성된 이종이중체는 상기 참조된 특허 출원에 기술되어 있는 완전 COLD-PCR 프로토콜로 형성된 기준-표적 이종이중체와는 근본적으로 다르다. 과량의 기준 차단 서열을 공급하면, 종래 완전 COLD-PCR 프로토콜에서 (예를 들어, 약 8분)보다 더 빠르게 (예를 들어, 약 30초) 혼성화가 일어나도록 촉진된다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 냉각 혼성화 단계의 지속 시간은 1분 미만이다.

[0015] 이어서, 표적 가닥을 기준 차단 서열과는 차별적으로 변성시키는데 충분한 임계 온도 (예를 들어, T_c=84.5℃)에 반응 혼합물을 가한다. 임계 온도 (T_c)는, 반응 혼합물이 T_c에서 인큐베이션되었을 때에 기준 차단 가닥과 상보적 기준 가닥의 이중체는 실질적으로 비변성 상태로 유지되지만, 기준 차단 가닥과 표적 가닥의 이중체는 실질적으로 변성될 수 있도록 하는 온도로 선택된다. "실질적으로"라는 용어는 주어진 변성 또는 비변성 형태가 적어도 60%, 및 바람직하게 적어도 90% 또는 더욱 바람직하게 적어도 98%인 것을 의미한다. 기준 차단 서열과 표적 가닥의 이중체의 용융 온도는 기준 차단 서열과 상보적 기준 가닥의 용융 온도보다 항상 낮은 온도가 되는데, 그 이유는 전자의 것은 미스매치를 함유하지만, 후자의 것은 그렇지 않기 때문이다.

[0016] 차별적인 변성 이후에, 프라이머 쌍이 반응 혼합물 중의 유리 표적 가닥 및 기준 가닥과 어닐링할 수 있도록 하기 위해 반응 혼합물의 온도를 강하시킨다. 추가로, 본 공정의 초반에 단일 가닥의 기준 차단 올리고뉴클레오

티드가 과량으로 첨가된다고 가정할 경우, 이론상 사이클 중 상기 시점에는 초기 변성 단계와 비교하여 표적 서열의 유리 가닥 2개와 단 하나의 유리 기준 가닥이 존재한다. 나머지 다른 하나의 기준 가닥은 기준 차단 서열과 혼성화하게 되고, 따라서, 증폭에는 이용되지 못한다. 이어서, 어닐링된 프라이머는 연장되고, 그 결과, 표적 서열은 기하급수적으로 증폭되는 반면, 기준 가닥은 단지 선형으로 증폭된다. 따라서, 표적 서열은 COLD-PCR 사이클 동안 샘플 중에서 기준 서열에 비해 점차적으로 풍부화된다.

[0017] 본 방법은 10 내지 30회 사이클 이상으로 반복될 수 있다. 이는 표적 앰플리콘의 풍부화를 실질적으로 증가시키고, 완전 COLD-PCR에 대한 사이클 시간을 단축시키는 것으로 밝혀졌다. 또한 종래 완전 COLD-PCR 프로토콜에서는 이종이중체를 형성하지 못했을 것인 동종접합성 돌연변이를 풍부화시킬 수도 있다.

[0018] 기준 차단 서열의 길이는 표적 서열 또는 기준 서열의 길이와 동일하거나, 또는 그보다 짧거나, 또는 긴 길이일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 기준 차단 서열은 서열 양측 상에서 수개의 염기만큼 표적 서열 및 기준 서열보다 더 짧은데, 이로 인해 프라이머는 눈에 띌 정도로 기준 서열에는 결합하지 못한다. 따라서, 기준 차단 서열은 표적 서열을 증폭시키는 프라이머에 의해 연장되지 못한다. 이로 인해, 임의로 기준 차단 서열의 3' OH 말단은 DNA-폴리머라제 연장에 대해 차단될 수 있다. 또한, 임의로 기준 차단 서열의 5'-말단은 Taq DNA 폴리머라제에 의한 5'→3' 엑소뉴클레올리시스(exonucleolysis) (즉, 혼성화된 기준 차단 서열의 분해)를 막을 수 있도록 프라이머 결합 부위와 부분적으로 중첩되는 뉴클레오티드 서열을 포함하도록 디자인될 수 있다.

[0019] 언급한 바와 같이, 기준 서열은 단일 가닥이거나, 또는 이중 가닥이다. 바람직한 실시양태에서, 기준 차단 서열은 단일 가닥 핵산이다. 그러나, 기준 차단 서열은 다른 형태, 예를 들어, 단일 가닥 DNA, RNA, 펩티드 핵산 (PNA) 또는 잠금 핵산 (LNA) 간의 키메라, 또는 또 다른 변형된 뉴클레오티드 형태를 취할 수 있다. 키메라 서열 상의 PNA 또는 LNA 위치는 돌연변이가 존재할 가능성이 있는 위치가 매치될 수 있도록 선택될 수 있는데, 이는 상기 위치에서의 잠재적인 미스매치의 효과를 최대화시키기 위함이다. 기준 차단 서열은 또한 단일 가닥 PNA 또는 단일 가닥 DNA일 수 있다.

[0020] 본 발명의 다른 실시양태 및 이점은 하기의 도면 및 상세한 설명의 리뷰를 통해 당업자에게 자명해질 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 선행 특허 출원인 국제 출원 번호 PCT/US2008/009248 (발명의 명칭: "Enrichment of a Target Sequence," 현 미국 시리얼 번호 12/671,295) (이 출원은 본원에 참고로 포함된다)에 기술된 바와 같은, 표적 서열을 선택적으로 풍부화시키는 완전 COLD-PCR에 대한 선행 기술의 실시양태를 도시한 것이다.

도 2는 증폭 반응 혼합물 중 과량의 기준 차단 서열의 존재를 통해 완전 COLD-PCR을 개선시키는 본 발명의 원리를 도시한 것이다.

도 3은 본 발명의 한 실시양태를 구현하기 위한 60 bp의 기준 차단 서열을 도시한 개략도이다. 밑줄 표시된 프라이머를 사용하여 87 bp 앰플리콘을 사전에 증폭시킨다. 각 가닥에 대해 상보적인 기준 차단 서열이 디자인되고, 이 기준 차단 서열은 3' 연장불가능한 포스페이트 기를 함유한다.

도 4는 각각 통상의 PCR, 반응 혼합물 중 기준 차단 서열을 이용하지 않은 완전 COLD-PCR; 반응 혼합물 중 과량의 기준 차단 서열을 이용한 완전 COLD-PCR, 및 고속 COLD-PCR을 사용하여 프로세싱된 샘플로부터의 PFSK-1 돌연변이 대립유전자 풍부화에 대한 생어(Sanger) 서열분석 데이터를 보여주는 것이다.

도 5는 각각 통상의 PCR, 반응 혼합물 중 기준 차단 서열을 이용하지 않은 완전 COLD-PCR; 반응 혼합물 중 과량의 기준 차단 서열 (RS) (60 bp)을 이용한 완전 COLD-PCR, 및 고속 COLD-PCR을 사용하여 프로세싱된 샘플로부터의 HCC1008 돌연변이 대립유전자 풍부화에 대한 생어 서열분석 데이터를 보여주는 것이다.

도 6은 각각 통상의 PCR, 반응 혼합물 중 기준 차단 서열을 이용하지 않은 완전 COLD-PCR; 반응 혼합물 중 과량의 기준 차단 서열 (RS)을 이용한 완전 COLD-PCR, 및 고속 COLD-PCR을 사용하여 프로세싱된 샘플로부터의 HCC2218 돌연변이 대립유전자 풍부화에 대한 생어 서열분석 데이터를 보여주는 것이다.

도 7은 각각 통상의 PCR, 반응 혼합물 중 기준 차단 서열을 이용하지 않은 완전 COLD-PCR; 반응 혼합물 중 과량의 기준 차단 서열 (RS)을 이용한 완전 COLD-PCR, 및 고속 COLD-PCR을 사용하여 프로세싱된 샘플로부터의 TL92 돌연변이 대립유전자 (1 bp G del) 풍부화에 대한 생어 서열분석 데이터를 보여주는 것이다.

도 8은 90 bp 기준 차단 서열 (RS)을 이용한 완전 COLD-PCR을 사용하여 프로세싱된, 샘플로부터의 HCC1008 돌연

변이 대립유전자 풍부화에 대한 생어 서열분석 데이터를 보여주는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 정의

[0023] 본원에서 사용되는 바, "표적 서열을 풍부화시킨다"라는 용어는 표적 서열의 양을 증가시키고, 샘플 중 상응하는 기준 서열에 대한 표적 서열의 비율을 증가시키는 것을 의미한다. 예를 들어, 샘플 중 표적 서열 대 기준 서열의 비가 초기에는 5% 대 95%인 경우, 70% 표적 서열 대 30% 기준 서열의 비가 되도록 하기 위해 증폭 반응에서 표적 서열을 차별적으로 증폭시킬 수 있다. 따라서, 기준 서열과 비교하여 표적 서열이 14배 풍부화된다.

[0024] 본원에서 사용되는 바, "표적 서열"이라는 용어는 상응하는 기준 서열보다 핵산 샘플 중에 덜 우세하게 존재하는 핵산을 지칭한다. 표적 서열은 샘플 중 기준 서열 + 표적 서열의 총량의 50% 미만을 구성한다. 표적 서열은 돌연변이 대립유전자일 수 있다. 예를 들면, 샘플 (예를 들어, 혈액 샘플)은 다수의 정상 세포와 소수의 암성 세포를 함유할 수 있다. 정상 세포는 비-돌연변이 또는 야생형 대립유전자를 함유하는 반면, 소수의 암성 세포는 체세포 돌연변이를 함유한다. 이러한 경우, 돌연변이체가 표적 서열이 되고, 반면에 야생형 서열은 기준 서열이 된다.

[0025] 본원에서 사용되는 바, "표적 가닥"은 표적 서열의 단일 핵산 가닥을 지칭한다.

[0026] 표적 서열은 상응하는 기준 서열과 적어도 50% 상동성이어야 하지만, 뉴클레오티드에 있어 기준 서열과 적어도 하나의 차이를 가져야 한다. 표적 서열은 기준 서열에 대해 사용된 것과 같은 프라이머 쌍을 사용하는 PCR을 통해 증폭될 수 있다.

[0027] 본원에서 사용되는 바, "기준 서열"이라는 용어는 상응하는 표적 서열보다 핵산 샘플 중에 더 우세하게 존재하는 핵산을 지칭한다. 기준 서열은 샘플 중 기준 서열 + 표적 서열의 총량의 50% 초과를 구성한다. 바람직하게, 기준 서열은 RNA 및/또는 DNA 수준으로 표적 서열보다 10X, 15X, 20X, 25X, 30X, 35X, 40X, 45X, 50X, 60X, 70X, 80X, 90X, 100X, 150X, 200X 이상인 것으로 표시된다. 본원에서 사용되는 바, "기준 가닥"은 기준 서열의 단일 핵산 가닥을 지칭한다.

[0028] 본원에서 사용되는 바, "야생형"이라는 용어는 군집내 특정 유전자에 대하여 가장 보편적으로 존재하는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 대립유전자를 지칭한다. 일반적으로, 야생형 대립유전자는 정상 세포로부터 수득될 것이다.

[0029] 본원에서 사용되는 바, "돌연변이"라는 용어는 핵산 서열 중 뉴클레오티드 변화 (즉, 단일 또는 다중 뉴클레오티드 치환, 결실, 또는 삽입)를 지칭한다. 돌연변이를 보유하는 핵산은 상응하는 야생형 폴리뉴클레오티드 서열과는 서열이 다른 핵산 서열 (돌연변이 대립유전자)을 가진다. 본 발명은 광범위하게는 체세포 돌연변이 및 다형태에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 더 많은 서열 변화를 가진 경우에서도 유용하기는 하지만, 특히 약 1 내지 10개 사이의 뉴클레오티드 서열 변화를 함유하는 돌연변이 대립유전자를 선택적으로 풍부화시키는 데 유용하다. 돌연변이 대립유전자는 전형적으로는 이환된 조직 또는 세포로부터 수득될 것이고, 이는 질환 상태와 관련이 있다.

[0030] 본원에서 사용되는 바, "용융 온도" 또는 "T_m"이라는 용어는 폴리뉴클레오티드가 그의 상보적인 서열로부터 해리되는 온도를 지칭한다. 일반적으로, T_m은 이중 가닥 핵산 분자 중 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍의 반쪽은 파괴되거나 해리되는 반면(즉, "용융됨"), 왓슨-크릭 염기쌍의 나머지 반쪽은 이중 가닥 구조로 온전한 상태로 유지될 때의 온도로서 정의될 수 있다. 다시 말해, T_m은 2개의 상보적인 서열 중 50%의 뉴클레오티드는 어닐링되고 (이중 가닥), 50%의 뉴클레오티드는 변성될 (단일 가닥) 때의 온도로 정의된다. 따라서, T_m은 이중 가닥에서 단일 가닥 핵산 분자로 전이되는 중간점 (또는 역으로, 단일 가닥에서 이중 가닥 핵산 분자로 전이되는 중간점)으로서 정의된다.

[0031] T_m은 다수의 방법들에 의해, 예를 들어, 1991년 웨트머(Wetmur)에 따른 최근접 계산법에 의해 (문헌 [Wetmur, J. G. 1991. DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. Crit Rev Biochem Mol Biol 26: 227-259]), 및 올리고™ 프라이머 디자인(Oligo™ Primer Design)을 비롯한 시판 프로그램 및 인터넷 상에서 이용할 수 있는 프로그램에 의해 예측될 수 있다. 별법으로, T_m은 실제 실험을 통해 측정될 수 있다. 예를 들어, 이중 가닥 DNA 결합 또는 삽입성 염료, 예를 들어, 에티디움 브로마이드 또는 SYBR-그린 (몰레

큘라 프로브스(Molecular Probes))가 핵산의 실제 T_m을 측정하기 위한 용융 곡선 검정에 사용될 수 있다. 핵산의 T_m을 측정하는 추가의 방법이 당업계에 주지되어 있다. 이러한 방법들 중 일부는 본 발명자들의 선행 특허 출원인 국제 출원 번호 PCT US2008/009248 (발명의 명칭: "Enrichment of a Target Sequence," 현 미국 시리얼 번호 12/671,295) (이 출원은 본원에 참고로 포함된다)에 열거되어 있다.

[0032] 본원에서 사용되는 바, "기준 차단 서열"은 조작된 단일 가닥 또는 이중 가닥 핵산 서열, 예를 들어, 올리고뉴클레오티드이고, 바람직하게, 그의 길이는 표적 서열보다 짧다. 바람직한 실시양태에서, 기준 차단 서열은 서열 양측 상에서 기준 서열보다 수개의 염기 정도 더 짧은데, 이로 인해 프라이머는 눈에 띌 정도로 기준 서열에는 결합하지 못한다. 임의로 기준 차단 서열의 3' OH 말단은 DNA-폴리머라제 연장에 대해 차단되고, 5'-말단은 Taq DNA 폴리머라제에 의한 5'→3' 엑소뉴클레올리시스를 방지할 수 있도록 변형된다. 기준 차단 서열은 또한 반응 혼합물이 임계 온도 "T_c"에 가해졌을 때 기준 서열과 어닐링된 상태로 유지됨으로써 다른 형태, 예를 들어, 단일 가닥 DNA, RNA, 펩티드 핵산 (PNA) 또는 잠금 핵산 (LNA) 간의 키메라, 또는 또 다른 변형된 뉴클레오티드 형태를 취할 수 있다.

[0033] 본 발명와 관련하여 사용되는 바, "임계 온도" 또는 "T_c"라는 용어는 표적 가닥과 기준 차단 서열의 이중체를 차별적으로 변성시킬 수 있도록 선택된 온도를 지칭한다. 임계 온도 (T_c)는 반응 혼합물이 T_c에서 인큐베이션되었을 때에 기준 차단 가닥과 상보적 기준 가닥의 이중체는 실질적으로 비변성 상태로 유지되지만, 기준 차단 가닥과 표적 가닥의 이중체는 실질적으로 변성될 수 있도록 하는 온도로 선택된다. "실질적으로"라는 용어는 주어진 변성 또는 비변성 형태가 적어도 60%, 및 바람직하게 적어도 90% 또는 더욱 바람직하게 적어도 98%인 것을 의미한다. 하기 기술되는 실시예에서, 중간 인큐베이션 단계를 위해 선택된 임계 온도 "T_c"는 84.5℃인 반면, 제1 변성 온도는 95℃이다.

[0034] 본원에서 사용되는 바, "프라이머 쌍"이라는 용어는 PCR 반응 동안 증폭 생성물을 형성하도록 표적 서열 및 기준 서열의 맞은편 가닥과 어닐링하는 2개의 프라이머를 지칭한다. 프라이머가 원활하게 부착될 수 있도록 표적 서열 및 기준 서열은 적어도 25개의 염기로 이루어져야 한다. 프라이머 쌍은 반응물의 T_c보다 낮은 T_m을 가지도록 디자인된다.

[0035] 본원에서 사용되는 바, "상동성"은 두 중합체 분자, 예를 들어, 두 폴리뉴클레오티드 또는 두 폴리펩티드 간 서브유닛의 서열 유사성을 지칭한다. 서열 동일성 % 및 서열 유사성 %를 측정하는 데 적합한 알고리즘의 일례로는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이 있으며, 이는 각각 문헌 ([Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)] 및 [Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)])에 기재되어 있다. BLAST 분석을 수행하는 소프트웨어는 국립 생명 공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)의 웹 사이트 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)로부터 공개적으로 입수가능하다.

[0036] 일반 핵산 증폭

[0037] 한 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 핵산 샘플은 표적 서열 및 기준 서열을 가진 게놈 DNA를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법의 핵산 샘플은 핵산 증폭 반응에서 사전에 증폭된 표적 서열 및 기준 서열을 포함한다. 당업자는 핵산을 증폭시키는 데 이용될 수 있는 방법이 다수 존재한다는 것을 이해할 것이다. 아마도 가장 인기있는 방법은 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR; 예를 들어, (미국 특허 번호 4,683,195 및 4,683,202, 및 문헌 [Saiki et al., Science 230: 1350-1354 (1985)] 및 [Gyllensten et al., PNAS (USA) 85:7652-7656 (1985)] 참조)일 것이다. PCR 방법의 바람직한 변형 방법은 비대칭 PCR (예를 들어, 문헌 ([Mao et al., Biotechniques 27(4):674-678 (1999)]; [Lehbein et al., Electrophoresis 19(8-9): 1381-1384 (1998)]; [Lazaro et al., Mol. Cell. Probes 6(5):357-359 (1992)]; 및 미국 특허 번호 6,197,499 참조)이다. 다른 증폭 방법으로는 가닥 치환 증폭 (SDA) (문헌 [Walker et al., Nucleic Acids Res. 20(7): 1691-1696 (1992)] 뿐만 아니라, 미국 특허 번호 5,744,311, 5,648,211, 및 5,631,147 참조), 회전 환 증폭 (RCA) (PCT 공보 WO 97/19193 참조), 핵산 서열-기반형 증폭 (NASBA) (문헌 ([Compton, Nature 350:91-92 (1991)] 뿐만 아니라, 미국 특허 번호 5,409,818, 및 5,554,527 참조), 전사체 매개 증폭 (TMA) (문헌 ([Kwoh et al., PNAS (USA) 86: 1173-1177 (1989)] 뿐만 아니라, 미국 특허 번호 5,399,491 참조), 자립 서열 복제 (3SR) (문헌 [Guatelli et al., PNAS (USA) 87: 1874-1879 (1990)] 참조) 및 리가제 연쇄 반응 (LCA) (미국 특허 번호 5,427,930, 및 5,792,607 참조)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0038] 가장 간단한 형태의 PCR은 맞은편 가닥과 혼성화하고, 표적 DNA 중 관심의 대상이 되는 영역 측면에 위치하는

올리고뉴클레오티드 프라이머 2개를 사용하는, 특정 DNA 서열을 효소적으로 합성하는 시험관내 방법이다. 주형 변성, 프라이머 어닐링 및 DNA 폴리머라제에 의한 어닐링된 프라이머의 연장을 포함하는 반복적인 일련의 반응 단계를 거쳐 그의 말단이 프라이머의 5' 말단으로 한정되는 특정 단편이 기하급수적으로 축적되게 된다. PCR은 게놈 DNA 중 다른 서열에 비해 특정 DNA 서열을 10^9배 만큼 선택적으로 풍부화시킬 수 있는 것으로 보고되어 있다. PCR 방법은 또한 문헌 [Saiki et al., 1985, Science 230:1350]에 기재되어 있다.

[0039] PCR은 주형 DNA (표적 서열 및 기준 서열) (적어도 1 fg; 더욱 유용하게는, 1-1,000 ng) 및 적어도 25 pmol의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 실시된다. 전형적인 반응 혼합물은 2 ㎕의 DNA, 25 pmol의 올리고뉴클레오티드 프라이머, 2.5 ㎕의 적합한 완충제, 0.4 ㎕의 1.25 μM dNTP, 2.5 유닛의 Taq DNA 폴리머라제 (스트라타젠(Stratagene))를 포함하며, 탈이온수는 총 부피가 25 ㎕가 될 때까지의 양으로 포함한다. PCR은 프로그램화될 수 있는 열 순환기를 사용하여 실시된다.

[0040] PCR 사이클 각 단계의 시간 및 온도 뿐만 아니라, 사이클 횟수는 사실상 엄격도 요건에 따라 조정된다. 어닐링 온도 및 타이밍은 프라이머가 주형과 어닐링하는 효율 및 허용되는 미스매치 정도, 이 둘 모두에 의해 결정된다. 프라이머 어닐링 조건의 엄격도를 최적화시킬 수 있는 능력은 당업자의 지식 범위내 포함되어 있다. 30℃ 내지 72℃ 사이의 어닐링 온도가 사용된다. 주형 분자의 초기 변성은 보통 4분 동안 92℃ 내지 99℃ 사이에서 일어나며, 이어서, 변성 (15초 내지 1분 동안 94-99℃), 어닐링 (상기 논의된 바와 같이 결정된 온도; 1-2분), 및 연장 (1분 동안 72℃)으로 구성된 20-40회 사이클이 이어진다. 최종 연장 단계는 일반적으로 4분 동안 72℃에서 수행되고, 이어서 4℃에서의 무한 (0-24시간) 단계가 이어질 수 있다.

[0041] PCR은 핵산 폴리머라제, 또는 뉴클레오시드 트리포스페이트의 중합을 촉매화시키는 효소를 이용한다. 일반적으로, 효소는 표적 서열과 어닐링된 프라이머의 3'-말단에서의 합성을 개시하고, 이는 주형을 따라 5'-방향으로 진행될 것이다. 공지된 DNA 폴리머라제로는 예를 들어, 이. 콜라이(*E. coli*) DNA 폴리머라제 I, T7 DNA 폴리머라제, 써무스 써모필루스(*Thermus thermophilus*) (Tth) DNA 폴리머라제, 바실루스 스테아로써모필루스(*Bacillus stearothermophilus*) DNA 폴리머라제, 써모코쿠스 리토랄리스(*Thermococcus litoralis*) DNA 폴리머라제, 써무스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*) (Taq) DNA 폴리머라제 및 피로코쿠스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*) (Pfu) DNA 폴리머라제를 포함한다. "핵산 폴리머라제"라는 용어는 또한 RNA 폴리머라제를 포함한다. 핵산 주형이 RNA일 경우, "핵산 폴리머라제," 예를 들어, 역전사효소는 RNA-의존 중합 활성을 지칭한다.

[0042] 본 발명의 풍부화 절차는 PCR 장치, 예를 들어, 열 순환기 중에서, 또는 더욱 바람직하게는, 실시간 PCR 장치에서 실시간 반응 조건하에서 실시된다. 실시간 반응 조건은 추가로 PCR 생성물이 생산됨에 따라 이를 측정/검출하기 위해 핵산 검출제 (예를 들어, 염료 또는 프로브)를 사용한다.

[0043] 샘플

[0044] 본원에서 사용되는 바, "샘플"은 관심의 대상이 되는 핵산 (표적 서열 및 기준 서열)을 함유하고 있거나, 또는 함유하는 것으로 추정되는 임의의 물질, 또는 그 자체가 관심의 대상이 되는 표적 핵산을 함유하고 있거나, 또는 함유하는 것으로 추정되는 핵산인 것인 임의의 물질을 지칭한다. 따라서, "샘플"이라는 용어는 핵산 (게놈 DNA, cDNA, RNA), 세포, 유기체, 조직, 체액, 또는 예를 들어, 혈장, 혈청, 척수액, 림프액, 윤활액, 뇨, 눈물, 대변, 피부, 기도, 장관 및 비뇨생식관의 외분비물, 타액, 혈액 세포, 종양, 기관, 조직, 시험관내 세포 배양물 구성요소의 샘플, 천연 단리물 (예를 들어, 식수, 해수, 고체 물질), 미생물 표본, 및 핵산 추적자 분자로 "마킹된" 사물 또는 표본을 포함하나, 이에 한정되지 않는 물질의 샘플을 포함한다.

[0045] 본 발명의 핵산 서열은 게놈 DNA로부터 증폭될 수 있다. 게놈 DNA는 하기 방법에 따라 조직 또는 세포로부터 단리될 수 있다. 별법으로, 본 발명의 핵산 서열은 당업계에 주지된 방법에 의해 혈액으로부터 단리될 수 있다.

[0046] 특정 조직으로부터 유래된 유전자의 변이체 형태를 원활히 검출하기 위해서 조직을 단리시킨다. 포유동물 조직으로부터 게놈 DNA를 단리시키기 위해 조직을 민싱(mince)하고, 액체 질소에서 냉동시킨다. 예비냉각된 유발과 유봉을 사용하여 냉동된 조직을 미세 분말로 분쇄하고, 조직 100 mg 당 1.2 ml의 분해용 완충제로 분해용 완충제 (100 mM NaCl, 10 mM 트리스-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% (w/v) SDS, 0.1 mg/ml 프로테이나제 K) 중에 현탁시킨다. 포유동물 조직 배양 세포로부터 게놈 DNA를 단리시키기 위해, 500 x g로 5 min 동안 원심분리하여 세포를 펠릿화하고, 1-10 ml 빙냉 PBS 중에 재현탁시키고, 500 x g 로 5 min 동안 재펠릿화하고, 1배 부피의 분해용 완충제 중에 재현탁시킨다.

[0047] 분해용 완충제 중의 샘플을 50℃에서 12-18시간 동안 (진탕시키면서) 인큐베이션시킨 후, 동량의 페놀/클로로포

름/이소아밀 알콜을 사용하여 추출한다. 원심분리 단계 (1,700 x g로 10 min) 이후 상이 분해되지 않았다면, 추가 용량의 분해용 완충제 (프로테이나제 K 포함하지 않음)를 첨가하고, 원심분리 단계를 반복한다. 2개의 상 사이의 경계면에 두꺼운 백색 물질이 뚜렷이 관찰되면, 유기 추출 단계를 반복한다. 추출한 후에, 상단의 수성층을 새 튜브로 옮기고, 상기 튜브에 1/2배 부피의 7.5 M 아세트산암모늄 및 2배 부피의 100% 에탄올을 첨가하게 된다. 1,700 x g로 2 min 동안 원심분리하여 핵산을 펠릿화하고, 70% 에탄올로 세척하고, 대기 건조시키고, 1 mg/ml로 TE 완충제 (10 mM 트리스-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)) 중에 재현탁시킨다. 0.1% SDS 및 1 ㎍/ml DNase 비함유 RNase의 존재하에 37℃에서 1시간 동안 샘플을 인큐베이션시키고, 추출 및 에탄올 침전 단계를 반복하여 잔류 RNA를 제거한다. 본 방법에 따라, 게놈 DNA의 수율은 대략 2 mg DNA/1 g 세포 또는 조직인 것으로 예측된다 (문헌 [Ausubel et al., 상기 문헌 동일]). 본 방법에 따라 단리된 게놈 DNA는 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

[0048] 표적 DNA는 또한 전혈로부터 추출될 수 있다. 예를 들어, 혈청 제조를 위한 경우, 항응고제를 함유하지 않거나, 또는 혈장 제조를 위한 경우, EDTA, 시트르산나트륨, 헤파린 또는 유사한 항응고제, 가장 바람직하게는 EDTA를 함유하는, 바람직하게는, 실리콘으로 처리된 유리를 포함한 채혈 튜브로 혈액을 표준 방법에 의해 채혈할 수 있다. 절대적으로 필요한 것은 아니지만, 바람직한 방법에서는 혈장 또는 혈청이 전혈로부터 분획화될 필요가 있다. 혈장 또는 혈청은 원심분리에 의해, 바람직하게는, 300 내지 800 x g로 5-10분 동안의 온화한 원심분리에 의해 전혈로부터 분획화될 수 있거나, 다른 표준 방법에 의해 분획화될 수 있다. 헤파린이 PCR을 방해할 수 있기 때문에, 헤파린으로 처리된 혈액을 사용하는 것은 헤파리나제로 전처리할 필요가 있을 수 있다. 따라서, 혈액 표본에 대해서는 EDTA가 바람직한 항응고제이다. 새로 채혈된 혈액 혈장 또는 혈청, 또는 냉동된 (보관된) 이후 해동된 혈장 또는 혈청이 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 보관된 혈장 또는 혈청은 -20℃ 내지 -70℃에서 유지시켜야 하고, 새로 채혈된 혈장 또는 혈청은 사용시까지 냉동된 상태로 유지시키거나, 얼음 상에서 유지시켜야 한다. 이어서, 당업계에 주지되어 있는 방법에 의해 DNA를 추출할 수 있다.

[0049] 본 발명의 방법을 사용하여 표적 서열에서 메틸화가 이루어졌는지 여부를 검출할 수 있다. 메틸화 검출 방법은 메틸화-감응 방식으로 DNA를 처리하는 화학적 또는 효소적 접근법을 포함한다. 화학적 처리법은 DNA를 중아황산나트륨과 함께 인큐베이션시키는 것을 포함하는데, 이를 통해 선택적으로 비-메틸화된 시토신은 우라실로 전환된다. 먼저, DNA를 열 변성시킨 후, 5 M 중아황산염 (pH 5-7)으로 처리한다. 중아황산염 처리 이전에, 기존의 우라실 제거를 위해 게놈 DNA를 전처리한다. 상기 전처리는 5 mM 히드록실아민 (pH 7)의 존재하의 우라실 글리코실라제 처리로 구성된다.

[0050] 표적 서열의 메틸화된 시토신이 우라실로 전환되기 때문에, 표적 서열은 (기준 차단 서열의 존재하에) 완전 COLD-PCR의 혼성화 냉각 단계에서 기준 차단 서열과 이중체를 형성하게 될 때 미스매치를 형성하게 될 것이다.

[0051] 기준 차단 서열 부재하에서의 완전 COLD-PCR (선행 기술)

[0052] 도 1은 상기 포함된 미국 출원 시리얼 번호 12/671,295 (발명의 명칭: "Enrichment of a Target Sequence")에서 설명된 바와 같이, 표적 서열 및 기준 서열을 함유하는 핵산 샘플 중 표적 서열을 풍부화시키기 위한 것으로서, 완전 COLD-PCR로 알려져 있는 선행 기술 방법을 도시한 것이다. 도 1은 상기 포함된 특허 출원의 도 1을 복제해 놓은 것이다.

[0053] 표적 서열 및 기준 서열은 게놈 DNA, cDNA, 바이러스 DNA, 포유동물 DNA, 태아 DNA 또는 박테리아 DNA를 비롯한, 다양한 공급원으로부터 수득될 수 있다. 기준 서열은 일반적으로 야생형 대립유전자이고, 표적 서열은 돌연변이 대립유전자이며, 그 반대의 상황 또한 적용될 수 있다. 돌연변이 대립유전자는 임의의 하나 이상의 뉴클레오티드 결실, 삽입 또는 변경을 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 돌연변이 대립유전자는 체세포 돌연변이이다. 다른 실시태양에서, 표적 서열은 메틸화된 DNA인 반면, 기준 서열은 비-메틸화된 DNA이다.

[0054] 본 방법은 증폭 반응 혼합물을 기준 서열의 용융 온도 "T_m"보다 높은 제1 변성 온도에 가하는 것을 포함한다 (도 1A, 단계 1). 핵산의 T_m은 실험을 통해 측정될 수 있거나, 계산에 의해 예측될 수 있다. 당업자는 핵산의 T_m을 측정하는 주지 방법들 다수를 잘 알고 있으며, 그러한 방법들 중 일부는 본원에 기술되어 있다. 제1 변성 온도는 PCR 반응의 변성 온도가 일반적으로 선택되는 바와 같이 일반적으로 선택되며, 표적 서열 및 기준 서열이 완전히 변성되도록 충분히 높아야 한다 (예를 들어, 94℃). 한 실시양태에서, 제1 변성 온도는 기준 서열의 T_m보다 약 1℃ 내지 30℃ 더 높고, 더욱 바람직하게는 기준 서열의 T_m보다 약 5℃ 내지 20℃ 더 높다.

[0055] 이어서, 증폭 반응 혼합물의 온도를 강하시켜 표적 서열 및 기준 서열이 혼성화되게 한다 (도 1A, 단계 2). 이

러한 어닐링 단계를 통해 표적 서열-표적 서열, 기준 서열-기준 서열 및 표적 서열-기준 서열의 이중체가 형성되지만, 표적 서열-기준 서열 이중체가 형성될 수 있도록 최적화되어야 한다. 본 방법에 사용되는 PCR 프라이머는 그가 이러한 중간 온도에서 표적 서열 및 기준 서열에 결합하지 못하도록 방해하는 용융 온도를 가지도록 디자인된다. 상기 언급한 바와 같이, 표적-기준 혼성화가 필요하다는 점 및 냉각을 위해 소요되는 시간이 상대적으로 길다는 점 (도 1A, 단계 2)이 적어도 일부 적용에서는 완전 COLD-PCR의 유효성을 제한한다는 것이 발견되었다.

[0056] 이어서, 반응 혼합물의 온도를 T_c로 증가시켜 표적-기준 혼성화 이중체가 차별적으로 변성되게 한다 (도 1A, 단계 3). 도 1에서 T_c 또는 임계 온도는 기준 서열의 T_m보다는 낮지만, 표적-기준 이중체의 T_m보다는 높은 것으로 선택된다. 앞서 언급한 바와 같이, 표적 서열과 기준 서열이 교차 혼성화하게 되면, 이중 가닥 DNA 서열을 따라서 어느 곳에서든지 하나 이상의 단일 뉴클레오티드 미스매치로 인한 소수의 서열 차이가 상기 서열의 용융 온도 (T_m)에 작지만 예측가능한 변화를 가져올 것이다 (문헌 ([Lipsky, R.H., et al. (2001) *Clin Chem*, 47, 635-644]; [Liew, M., et al. (2004) Clin Chem, 50, 1156-1164)])). 미스매치의 정확한 서열 환경 및 위치에 따라, 0.1-20℃ 범위의 용융 온도 변화가 나타날 수 있다. T_c는 일반적으로 약 1초 내지 5분, 더욱 바람직하게는 5초 내지 30초 동안 가해진다 (도 1A, 단계 3). 원하는 경우, 다수회 사이클 동안 단계 3과 2 사이에서 반복적으로 왕복 진행될 수 있다.

[0057] 표적-기준 혼성화 이중체의 차별적인 변성 이후에, 반응 혼합물의 온도를 강하시켜 하나 이상의 프라이머가 표적 서열과 어닐링하게 한다 (도 1A, 단계 4). 이어서, 어닐링된 프라이머를 핵산 폴리머라제에 의해 연장시켜 (도 1A, 단계 5), 샘플 중에 포함되어 있는 핵산 군집 중의 표적 서열을 풍부화시킨다.

[0058] 본 방법의 단계들은 일반적으로 표적 서열 및 기준 서열을 충분히 증폭시키기 위해서 다수회 사이클 동안 반복된다. 한 실시양태에서, 본 방법의 단계들은 5-40회 사이클 동안 및 더욱 바람직하게는 10-30회 사이클 동안 반복된다. 최적의 사이클 횟수는 당업자에 의해 결정될 수 있다. 바람직하게, 본 방법은 PCR 장치에서, 더욱 바람직하게는, 실시간 검출 PCR 장치, 예를 들어, 스마트사이클러(SMARTCYCLER) 실시간 PCR 장치 (세페이드(Cepheid: 미국 캘리포니아주 써니베일)) 및 Mx3005P 실시간 PCR 장치 (스트라타젠: 미국 캘리포니아주 라호야)에서 실시간 반응 조건하에 실시된다. 본 실시양태에서, 반응 혼합물은 반응의 증폭 생성물을 정량화 및/또는 모니터링하기 위해 핵산 검출제 (예를 들어, 핵산 검출 염료, 예를 들어, SYBR 그린 염료 또는 LC-그린 염료 또는 형광 염료에 작동가능하게 커플링된 프로브)를 포함할 수 있다. 일단 표적 서열의 풍부화가 완료되고 나면, 예를 들면, 서열분석 반응에 사용하는 것과 같이, 샘플을 추가로 프로세싱할 수 있다. 풍부화된 대립유전자는 MALDI-TOF, HR-용융, 디-데옥시 서열분석, 단일-분자 서열분석, 제2 세대 고-처리량 서열분석, 파이로시퀀싱, RFLP, 디지털 PCR 및 정량적-PCR을 비롯한 다양한 방법에 의해 추가로 프로세싱될 수 있다 (도 1B 참조). 이들 프로세싱 기술 뿐만 아니라, 진단 검정에 관한 보다 상세한 설명은 상기 언급한 미국 출원 시리얼 번호 12/671,295 (발명의 명칭: "Enrichment of a Target Sequence")(이 출원은 본원에 참고로 포함된다)에 포함되어 있다.

[0059] 반응 혼합물 중의 과량의 기준 차단 서열을 사용한 완전 COLD-PCR 사이클

[0060] 도 2는 본 발명의 변형된 완전 COLD-PCR 방법에 따라 표적 서열을 풍부화시키는 것을 도시한 것이다. 먼저 (도 2, 단계 1), 핵산 샘플은 이중 가닥의 기준 서열 (10) (예를 들어, 야생형 서열)을 함유하고, 이중 가닥의 표적 서열 (12) (예를 들어, 돌연변이 서열)을 함유한다. 증폭 반응 혼합물은 샘플, 다른 PCR 성분, 및 본 발명에 따라 과농도 수준, 예를 들어, 25 nM의 기준 차단 서열 (14)을 함유한다. 도 2에서, 도시된 기준 차단 서열 (14)은 프라이머 부위에서 기준 서열 (10)의 가닥 (10A)의 하나와 상보적인 단일 가닥 핵산 서열이다.

[0061] 도 2의 단계 1의 반응 혼합물을 30초 동안 제1 변성 온도, 예를 들어, 95℃에 가하여 기준 서열 (10A, 10B), 및 표적 서열 (12A, 12B)의 변성된 가닥을 수득한다. 이어서, 혼성화를 촉진시키기 위해 반응 혼합물을 30초 동안 예를 들어, 70℃로 냉각시키는데, 상기 30초라는 시간은 선행 기술에서는 보통 8분간 냉각이 진행되었던 시간으로부터 그 기간이 극적으로 단축된 것이다. 과량의 기준 차단 서열 (14)의 존재하에서 냉각이 일어나기 때문에, 기준 차단 서열 (14)은 기준 서열 의 상보적인 가닥 (10A) 및 표적 서열의 상보적인 가닥 (12A)과 차별적으로 혼성화한다. 도 2의 단계 2는 70℃로의 혼성화 냉각 이후의 반응 혼합물의 상태를 도시한 것이다. 기준 차단 서열 (14)과 상보적 기준 가닥 (10A)의 이종이중체 (16), 및 기준 차단 서열 (14)과 상보적인 표적 가닥 (12A)의 이종이중체 (18) 이외에도, 반응 혼합물은 또한 각각 기준 서열 및 표적 서열의 변성된 음성 가닥 (10B) 및 (12B)를 함유한다.

[0062] 도 2의 단계 3에서, 반응 혼합물을 이어서 표적 가닥 (12A)과 기준 차단 서열 (14)의 이종이중체 (18)가 차별적으로 변성될 수 있도록 하는 온도로 선택된, 임계 온도 "T_c," 예를 들어, 84.5℃에 적용한다. 반응 혼합물이 "T_c"에서 인큐베이션될 때, 기준 차단 가닥 (14)과 상보적 기준 가닥 (10A)의 이중체 (16)는 실질적으로 비변성 상태로 유지되도록 하는 온도로 임계 온도 (T_c)가 선택된다. 기준 차단 서열 (14)이 기준 가닥 (10A)의 적어도 일부와 완전하게 상보적이고, 표적 가닥 (12A)과는 적어도 하나의 미스매치가 존재하는 바, 기준 차단 서열 (14)과 표적 가닥 (10B)의 이종이중체 (18)의 용융 온도는 항상 기준 차단 서열 (14)과 상보적 기준 가닥 (10A)의 이중체 (16)의 용융 온도보다는 낮을 것이다.

[0063] 도 2의 단계 4를 참조하여, 차별적인 변성 이후에, 반응 혼합물의 온도를 예를 들어, 60℃로 강하시켜 프라이머 쌍 (20A, 20B)이 반응 혼합물 중에서 유리 표적 가닥 (12A, 12B) 및 유리 기준 가닥 (10B)과 어닐링할 수 있도록 해야 한다. 기준 번호 (20A)는 전방향 프라이머를 지칭하고, 기준 번호 (20B)는 역방향 프라이머를 지칭한다. 앞서 기술된 바와 같이, 표적 서열 (12)은 기준 서열 (10)에 대해 사용된 것과 동일한 프라이머 쌍 (20A, 20B)을 통해 증폭될 수 있다. 도 2의 단계 5에는 초기 변성 단계와 비교하여 2개의 유리 가닥 (12A, 12B)과 단 하나의 유리 기준 가닥 (10B)이 도시되어 있다. 나머지 다른 하나의 기준 가닥 (10A)은 기준 차단 서열 (14)과 혼성화하고, 따라서, 증폭에는 이용되지 못한다. 이어서, 반응 혼합물의 온도를 예를 들어, 72℃로 승온시켜 어닐링된 프라이머 (20A, 20B)를 연장시킴으로써 기준 서열 (10)에 비해 반응 혼합물 중 표적 서열 (12)의 농도를 풍부화시킨다. 본 방법은 5 내지 30회 사이클 반복될 수 있다.

[0064] 도 2에 도시된 방법은 개별 프로토콜에 대해 최적화될 수 있으며, 최적화되어야 한다. 그러한 프로토콜은 원하는 경우, 다양한 PCR 및 실시간 PCR 장비를 작동시키기 위한 소프트웨어로 구현될 수 있다.

[0065] 바람직한 기준 차단 서열 디자인에 대한 고려 사항

[0066] 언급한 바와 같이, 기준 차단 서열은 많은 형태를 취할 수는 있지만, 바람직한 형태는 단일 가닥의 비-연장가능한 DNA이다. 더욱 구체적으로, 바람직한 기준 차단 서열은 하기와 같은 특징을 가진다:

[0067] (a) 최대 200 bp 길이의 단일 가닥 DNA를 포함하고;

[0068] (b) 기준 차단 서열과 어닐링되었을 때에는 프라이머가 눈에 띌 정도로 기준 서열에는 결합하지 못하고; 또한 기준 차단 서열 그 자체에도 눈에 띌 정도로 결합하지 못하도록 기준 차단 서열의 길이는 표적 서열보다 수개의 염기 (예를 들어, 서열 양측 상에서 8-12개 염기) 정도 더 짧으며;

[0069] (c) DNA-폴리머라제 연장에 대해 차단된 3'-말단을 포함한다.

[0070] 그러한 기준 차단 서열은 여러 방법들 중 한 방법으로 합성될 수 있다. 먼저, 서열의 3'-말단의 변형이 허용되는 표준 올리고뉴클레오티드 합성 방법을 사용하는 직접 합성에 의해 기준 차단 서열을 제조할 수 있다. 3'-말단은 포스페이트 기, 아미노 기, 디-데옥시-뉴클레오티드 또는 5'→3' 폴리머라제 연장을 차단하는 임의의 다른 모이어티를 포함할 수 있다. 별법으로, 기준 차단 서열은 최종 생성물로서 단일 가닥 DNA를 생성하는 PCR 반응 동안 폴리머라제 합성에 의해 제조될 수 있다. 이러한 경우, 생성된 단일 가닥 DNA는 기준 차단 서열에 필요한 정확한 서열에 상응한다. 폴리머라제 합성을 통해 단일 가닥 DNA를 합성하는 방법은 수개가 존재하며, 이는 당업자에게 주지되어 있다. 예를 들어, 비대칭 PCR 또는 LATE PCR이 적합할 것이다. 별법으로, 단일 가닥 DNA 기준 차단 서열은 이중 가닥 PCR 생성물을 고체 지지체 상에 결합시킴으로써 합성할 수 있다. 이는 둘 중 하나가 비오티닐화된 것인 프라이머 쌍을 사용하여 표준 PCR 반응을 수행함으로써 달성된다. PCR 후, PCR 생성물을 스트렙타비딘-코팅된 고체 지지체 (예를 들어, 자기 비드)와 함께 인큐베이션시켜 상기 비드에 결합할 수 있도록 한다. 이어서, 온도를 2-3분 동안 95℃로 승온시켜 DNA를 변성시키고, 비-비오티닐화된 DNA 가닥을 고정된 PCR 생성물로부터 용액으로 유리시킨다. 이어서, 상보적인 DNA 가닥을 포함하는 자기 비드를 제거하고, 용액 중에 남아 있는 단일 가닥 생성물이 기준 차단 서열로서의 역할을 한다.

[0071] 단일 가닥의 기준 차단 서열은 사용 이전에, 3'-말단이 폴리머라제 연장에 대해 차단되는 것이 바람직하다. 이는 당업자에게 주지된 여러 방법에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 용액 중 디-데옥시-뉴클레오티드 (ddNTP)의 존재하에 말단 데옥시뉴클레오티드 트랜스퍼라제 (TdT)와의 반응을 통해 단일 ddNTP를 단일 가닥의 기준 차단 서열의 말단에 부가할 수 있다. ddNTP가 폴리머라제 연장을 차단하는 역할을 한다. 별법으로, 기준 차단 서열의 3'-말단에 상보적인 올리고뉴클레오티드 주형을 사용하여 일시적인 이중 가닥 구조를 제공할 수 있다. 이어서, 폴리머라제를 사용하여 혼성화된 올리고뉴클레오티드 맞은편에 있는 기준 차단 서열의 3'-말단에 단일 ddNTP를 삽입할 수 있다.

[0072] 기준 차단 서열을 이중 가닥 형태로 합성하는 또 다른 방법에서는 효소 제한 부위가 드물게 함유되어 있는 프라이머를 사용하여 종래 PCR을 수행함으로써 관심의 대상이 되는 야생형 버전의 서열을 증폭시킨다. PCR 증폭 후, 제한 효소를 가하여 PCR 생성물의 양 말단 모두를 분해하고, 오버행을 생성한다. 이어서, 디-데옥시-뉴클레오티드의 존재하에 이러한 오버행을 폴리머라제 연장시켜 양측 상에 있는 3'-말단이 추가로 연장되지 못하도록 차단한다. 이어서, 이중 가닥의 3'-말단 차단형 PCR 생성물이 이중 가닥의 기준 차단 서열로서의 역할을 할 수 있다.

[0073] 올리고뉴클레오티드-합성으로 생성된 기준 차단 서열의 구체적인 예

[0074] 2개의 기준 차단 서열, 즉 p53 엑손 8 섹션에 상응하는 60 bp (RBS60) 및 90 bp (RBS90) 기준 차단 서열을 합성하였다. 하기 표 1은 합성된 RBS60 및 RBS90 기준 차단 서열에 대한 서열 목록을 포함한다. RBS60 및 RBS90 서열, 둘 모두는 3'-차단 포스페이트 기를 사용하여 인터그레이티드 DNA 테크놀로지스, 인크.(Integrated DNA Technologies, Inc.)에 의해 합성되었다. 동일한 엑손 8 단편 중에 돌연변이를 포함하는 세포주를 사용하여 본 방법을 시험하였다 (표 1의 목록 참조).

[0075] 도 3은 변형된 완전 COLD-PCR 풍부화와 관련하여 RBS60 기준 차단 서열의 사용을 도시한 개략도이다. 밑줄 표시된 프라이머를 사용하여 87 bp 앰플리콘을 사전에 증폭시킨다. 도 3에서 상보적인 기준 차단 서열 (RBS60)을 기준 가닥에 대해 디자인한다. 도 3으로부터 알 수 있는 바와 같이, RBS60은 프라이머가 결합하지 못하게 방해하며, 연장을 방해하는 3' 포스페이트 기를 함유한다.

[0076] RBS60에 대한 프로토콜: 먼저, 종래 PCR, 및 프라이머 Ex8-167F 및 Ex8-167R (표 1)을 사용하여 p53 엑손 8로부터의 167 bp 서열을 증폭시켰다. 사용된 DNA는 야생형 DNA이거나, 또는 야생형 DNA에 돌연변이 DNA가 3%로 혼합되어 있는 혼합물이었다. 특이적인 돌연변이를 함유하는 사용된 돌연변이 세포주는 표 1에 열거되어 있다.

[0077] 이어서, PCR 생성물을 500배로 희석시켰다. 이어서, 167 bp 단편 내에 네스트된 영역을 증폭시키는 200 nM 프라이머 87f 및 87r, 및 25 nM 기준 차단 서열 RBS60의 존재하에 변형된 완전 COLD-PCR 반응을 수행하였다. 증폭을 위해 퓨젼(Phusion)™ 폴리머라제 (뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs))를 사용하였다. 완전 COLD-PCR 프로그램은 하기와 같았다: 종래 PCR (95℃에서 30 sec; 60℃에서 30 sec; 72℃에서 1 min) 5회 사이클; 이어서, 완전 COLD-PCR (95℃에서 30 sec; 70℃에서 30 sec; 이어서, T_c=84.5℃에서 3 sec, 이어서, 60℃에서 30 sec; 72℃에서 1 min) X 25의 25회 사이클. 별법으로, (RBS60 부재하의) 완전 COLD-PCR은 RBS60의 존재하에서 수행된 완전 COLD-PCR에 대한 것과 정확하게 동일한 프로그램을 적용시키되, 단, 반응 혼합물로부터 RBS60은 생략하여 수행하였다. RBS60 존재하의 완전 COLD-PCR (및 완전 COLD-PCR (RBS60 부재), 및 고속 COLD-PCR, 및 통상의 PCR)을 수행한 후, 장쇄 프라이머 30T-p53-87F를 사용하여 생성물의 서열을 분석하였다.

[0078] RBSS90에 대한 프로토콜: RBS60에 대해 상세하게 설명된 것과 같은 동일의 방법을 RBS90에 적용시키되; 단, 네스티드 완전 COLD-PCR에 대한 프라이머 세트는 p53-ex8-115F 및 p53-ex8-115R이고, RBS90에 대해 적용된 T_c는 T_c=84.4℃였다.

표 1

[0079]

올리고	서열 (5'→3')	출처
기준 차단 서열 **1 (RBS60)**		
Ex8-167F	GCTTCTCTTTTCCTATCCTG (서열: 1)	Li et al (2008)
Ex8-167R	CTTACCTCGCTTAGTGCT (서열: 2)	Li et al (2008)
87f	TGGTAATCTACTGGGACG (서열: 3)	Li et al (2008)
87r	CGGAGATTCTCTTCCTCT (서열: 4)	Li et al (2008)
30T-p53-87F	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTAATCTAC TGGGACG (서열: 5)	
60refseq-for	GGACGGAACAGCTTT (서열: 6)	
60refseq-rev	CTGGCCGCGTGTCTC (서열: 7)	
RBS60	5'CTCTGTGCGCCGGTCTCTCCCAGGACAGGCACAAACA CGCACCTCAAAGCTGTTCCGTCC-포스포-3' (서열: 8)	
기준 차단 서열 **2 (RBS90)**		
Ex8-167F	GCTTCTCTTTTCCTATCCTG (서열: 9)	Li et al (2008)
Ex8-167R	CTTACCTCGCTTAGTGCT (서열: 10)	Li et al (2008)
p53-ex8-115F	TTGCTTCTCTTTTCCTAT (서열: 11)	
p53-ex8-115R	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT GCTTCTCTTTTCCTATCC (서열: 12)	
RBS90	5'CTTCCTCTGTGCGCCGGTCTCTCCCAGGACAGGCACA AACACGCACCTCAAAGCTGTTCCGTCCCAGTAGATTAC CACTACTCAGGATAG-포스포-3' (서열: 13)	

[0080] 결과: RBS60에 대한 대표적인 결과는 도 4 내지 7에, 및 RBS90에 대한 것은 도 8에 도시되어 있다. 도 4 내지 7에서는 (RBS60 존재하의) 변형된 완전 COLD-PCR이 완전 COLD-PCR (RBS60 부재), 고속 COLD-PCR, 및 종래 PCR과 비교되어 있다.

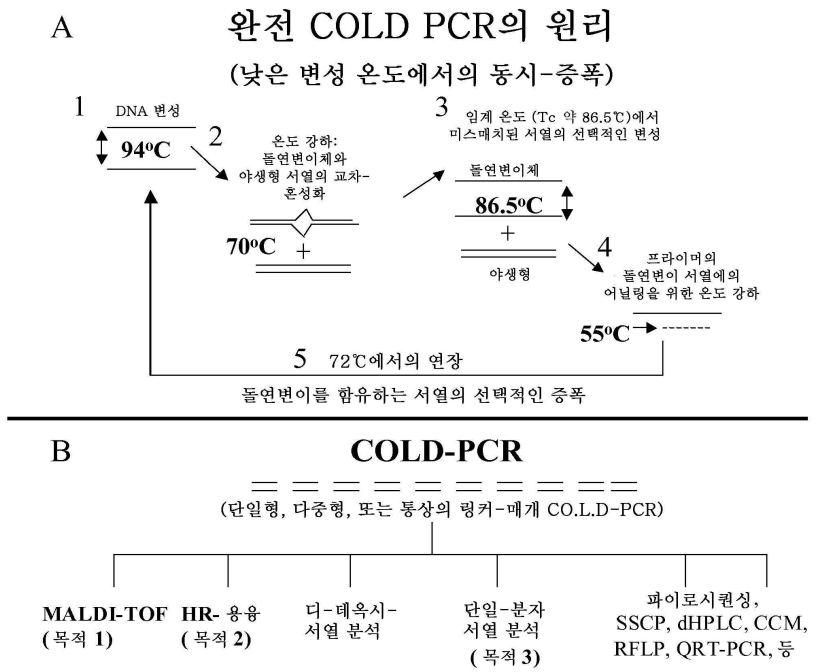
[0081] 도 4에는 돌연변이가 용융 온도를 증가시킨 상황인 경우, 변형된 완전 COLD-PCR (25 nM RBS)을 통한 풍부화가 강력하다 (3%에서 37%로의 증가)는 것이 도시되어 있다. 도 4에서 고속 COLD-PCR 및 종래 PCR을 사용하였을 때에는 돌연변이가 검출되지 못했다. 유사하게, 도 5에는 돌연변이가 용융 온도에 어떤 영향을 미치지 않는 상황인 경우, 변형된 완전 COLD-PCR (25 nM RBS)을 통한 풍부화가 강력하다 (3%에서 47%로의 증가)는 것이 도시되어 있다. 다시, 도 5에서 고속 COLD-PCR 및 종래 PCR을 사용하였을 때에는 돌연변이가 검출되지 못했다. 도 6에는 또한 돌연변이가 용융 온도를 강하시킨 상황인 경우, 변형된 완전 COLD-PCR (25 nM RBS)을 통한 풍부화가 강력하다 (3%에서 45%로의 증가)는 것이 도시되어 있다. 도 6에서, 고속 COLD-PCR를 통한 풍부화 또한 강력하였다 (즉, 이는 용융 온도 강하가 이유이다). 다시, 도 6에서 종래 PCR을 사용하였을 때에는 돌연변이가 검출되지 못했다. 도 7에는 온도 강하 결실에 대한 결과가 도시되어 있다. 변형된 완전 COLD-PCR (25 nM RBS)을 통한 풍부화는 강력하였고 (3%에서 45%로의 증가), 고속 COLD-PCR를 통한 풍부화도 마찬가지였다. 다시, 종래 PCR을 사용하였을 때에는 돌연변이가 검출되지 못했다.

[0082] 도 8은 RBS90을 사용하여 프로세싱된, 샘플로부터의 HCC1008 돌연변이 대립유전자 풍부화에 대한 생어 서열분석 데이터를 나타내며, 이는 90 bp 기준 차단 서열의 존재하에서의 변형된 완전 COLD-PCR에 의한 풍부화가 강력하다는 것을 도시한 것이다 (3%에서 38%로의 증가). 도 8의 결과를, RBS60을 사용하여 프로세싱된, 샘플로부터의 HCC1008 돌연변이 대립유전자 풍부화에 대한 생어 서열분석 데이터를 나타내는 도 5의 결과와 비교하였을 때, 상이한 길이의 기준 차단 서열을 사용한 본 발명의 방법이 강력하다는 것이 확증된다. 모든 경우에서 및 이제까지 연구된 모든 돌연변이에 있어서, (RBS 존재하의) 변형된 완전 COLD-PCR이 최고 성능을 지닌 것으로 보여지는데, 즉, 상기 PCR은 짧은 반응 시간 동안 모든 유형의 돌연변이 (T_m 증가, 유지, 또는 강하 돌연변이)를 풍부화시키며, 완전 COLD-PCR (RBS 부재)보다 풍부화 성능이 우수하다.

도면

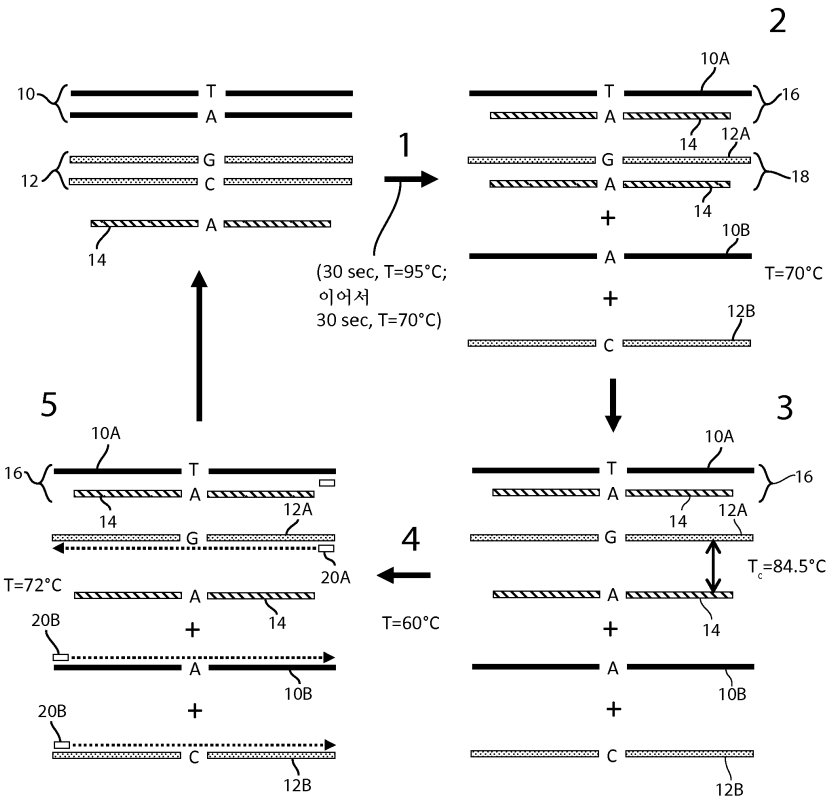
도면1

선행 기술



A. 풍부화 프로토콜에 관한 설명. 167 bp의 p53 엑손 8 서열에 관한 일례를 도시한 것이다. PCR 동안 서열을 따라서 어느 곳에서든지 미스매치가 형성되면, 이를 통해 매 PCR 사이클마다 소수의 (돌연변이) 대립유전자가 차별적으로 변성될 수 있고, 증폭될 수 있다. **B**. PCR을 풍부화 방법으로 대체함: 모든 PCR-기반 유전적 시험 검정은 상기 검정에 선행되는 PCR 단계 동안 돌연변이-풍부화에 의한 이점을 고수한다.

도면2


1
2
3
4
5
10
12
14
16
18
20A
20B
10A
10B
12A
12B
T
A
G
C
(30 sec, T=95°C;
이어서
30 sec, T=70°C)
T=70°C
T=60°C
T=72°C
T_c=84.5°C

도면3

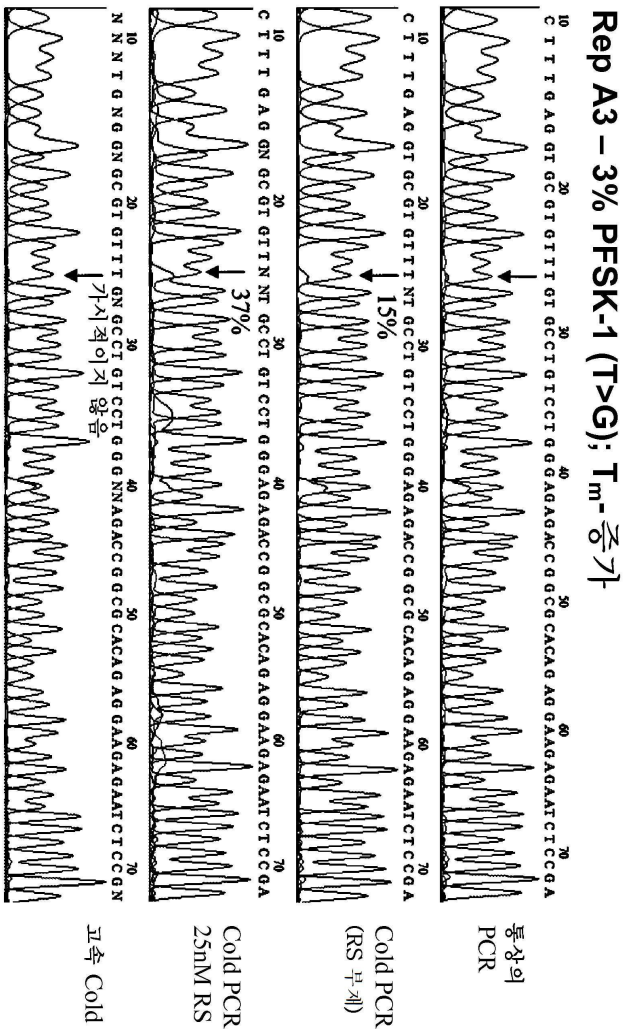
87bp 앰플리콘, RBS60

5'-TGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTTTGTGCCTGTCCTGGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGC-3'

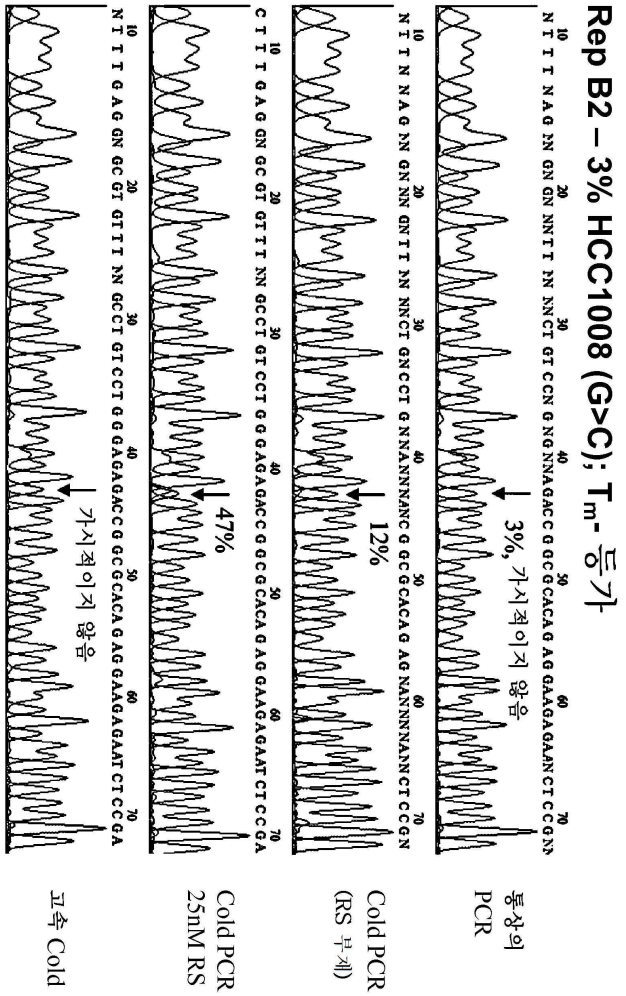
3'-PO_4-**5' RBS60**

3'-ACCATTAGATGACCCTGCCTTGTCGAAACTCCACGCACAAACACGGACAGGACCCTCTCTGGCCGCGTGTCTCCTTCTCTTAGAGGCG-5'

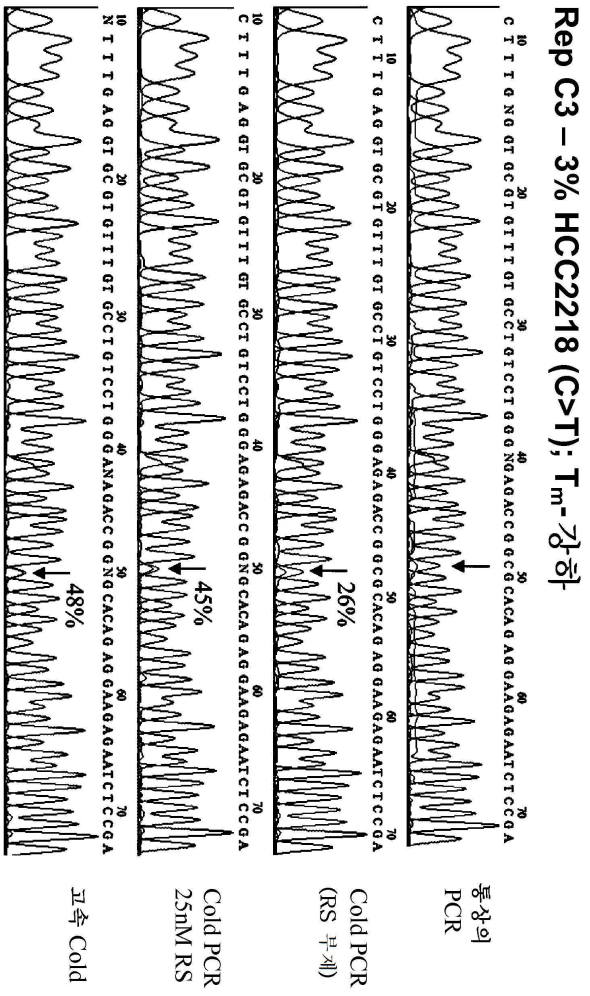
도면4


Rep A3 – 3% PFSK-1 (T>G); Tm-증가
통상의 PCR
Cold PCR (RS 부재)
15%
Cold PCR 25nM RS
37%
고속 Cold
가시적이지 않음

도면5


Rep B2 – 3% HCC1008 (G>C); Tm- 등가
3%, 가시적이지 않음
12%
47%
가시적이지 않음
통상의 PCR
Cold PCR (RS 부재)
Cold PCR 25nM RS
고속 Cold

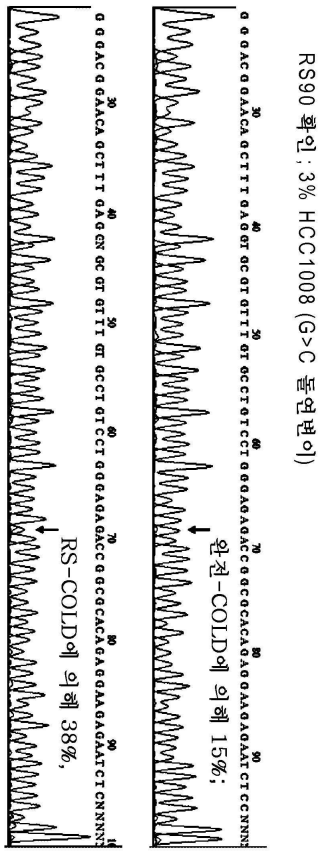
도면6


Rep C3 – 3% HCC2218 (C>T); Tm-강하
통상의 PCR
Cold PCR (RS 부재)
26%
Cold PCR 25nM RS
45%
고속 Cold
48%

도면7

결실에 대한 풍부화 예측치는 3개의 상이한 엽기 위치에 대한 피크 높이의 평균이다(*로 표시).

도면8



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Dana-Farber Cancer Institute, Inc.

Makrigiorgos, Gerassimos

<120> Full Cold-PCR Enrichment with Reference Blocking Sequence

<130> 5472-00027

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide primer for polymerase chain amplification of human p53 gene

<400> 1

gcttctcttt tcctatcctg 20

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide primer for polymerase chain amplification of human p53 gene

<400> 2

cttacctcgc ttagtgct 18

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide primer for polymerase chain amplification of human p53 gene

<400> 3

tggtaatcta ctgggacg 18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213

> Artificial

<220><223> Oligonucleotide primer for polymerase chain amplification of human p53 gene

<400> 4

cggagattct cttcctct 18

<210> 5

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide primer for polymerase chain amplification of human p53 gene

<400> 5

ttttttttt ttttttttt ttttttttt tggtaatcta ctgggacg 48

<210> 6

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide primer for polymerase chain amplification of

human p53 gene

<400> 6

ggacggaaca gcttt 15

<210> 7

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide primer for polymerase chain amplification of

human p53 gene

<400> 7

ctggccgcgt gtctc 15

<210> 8

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide that hybridizes to human p53 gene

<400> 8

ctctgtgcgc cggtctctcc caggacaggc acaaacacgc acctcaaagc tgttccgtcc 60

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide primer for polymerase chain amplification of

human p53 gene

<400> 9

gcttctcttt tcctatcctg 20

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide primer for polymerase chain amplification of human p53 gene

<400> 10

cttacctcgc ttagtgct 18

<210> 11

<211> 18

<

212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide primer for polymerase chain amplification of human p53 gene

<400> 11

ttgcttctct tttcctat 18

<210> 12

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide primer for polymerase chain amplification of human p53 gene

<400> 12

ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttgcttctct tttcctatcc 60

<210> 13

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide that hybridizes to human p53 gene

<400> 13

cttcctctgt gcgccggtct ctcccaggac aggcacaaac acgcacctca aagctgttcc 60

gtcccagtag attaccacta ctcaggatag 90