



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0101031
(43) 공개일자 2013년09월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7007586
(22) 출원일자(국제) 2011년08월25일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2013년03월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/049151
(87) 국제공개번호 WO 2012/027572
국제공개일자 2012년03월01일
(30) 우선권주장
61/402,350 2010년08월27일 미국(US)

(71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(72) 발명자
세샤기리, 소마세카르
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
(74) 대리인
위혜숙, 양영준

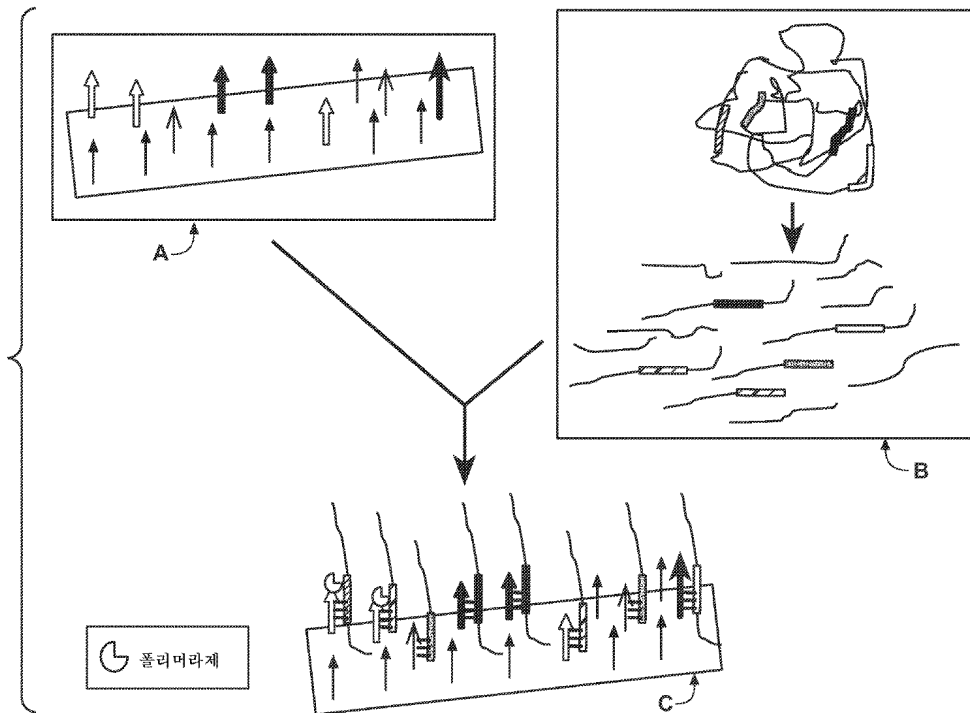
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 핵산 포획 및 서열분석을 위한 방법

(57) 요약

표적 핵산 분자를 포획하고 서열분석하는 방법이 제공된다. 게놈 DNA의 메틸화 상태를 결정하는 방법이 또한 제공된다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

(a) 고체 지지체를 혼성화 조건 하에 표적 핵산 분자를 포함하는 핵산의 혼합물에 노출시키며, 여기서 상기 표적 핵산 분자는 프라이밍-적격 형태로 고체 지지체 상에 고정화된 프라이머와 특정 혼성화 복합체를 형성하고;

(b) 미결합된 핵산 및 비특이적으로 결합된 핵산을 고체 지지체로부터 분리하고;

(c) 고체 지지체를 중합 조건 하에 폴리머라제 및 뉴클레오티드에 노출시키고;

(d) 주형으로서 표적 핵산 분자를 사용하는 폴리머라제에 의한 고정화된 프라이머로부터의 핵산 중합을 검출함으로써 표적 핵산 분자의 핵산 서열을 결정하는 것

을 포함하는, 표적 핵산 분자를 포획하고 서열분석하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 표적 핵산 분자가 게놈 DNA의 영역으로부터의 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 표적 핵산이 엑손의 전부 또는 일부를 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 표적 핵산 분자가 RNA이고, 폴리머라제가 역전사효소이고, 프라이머가 3' 폴리-T 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 표적 핵산 분자가 DNA이고, 폴리머라제가 DNA 폴리머라제인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 뉴클레오티드가 그의 말단 포스페이트에서 표지된 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 폴리머라제가 FRET 공여자로 표지되고, 뉴클레오티드가 FRET 수용자로 표지된 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, FRET 공여자가 형광 나노입자인 방법.

청구항 9

(a) 게놈 DNA 단편을 고체 지지체 상에 고정화시키고;

(b) 주형으로서 고정화된 게놈 DNA 단편을 사용하는 폴리머라제에 의한 핵산 중합을 검출함으로써 고체 지지체 상에 고정화된 게놈 DNA 단편의 핵산 서열을 결정하고;

(c) 고정화된 게놈 DNA 단편을 비설파이트 처리하고;

(d) 주형으로서 고정화된 비설파이트-처리 게놈 DNA 단편을 사용하는 폴리머라제에 의한 핵산 중합을 검출함으로써 고체 지지체 상에 고정화된 비설파이트-처리 게놈 DNA 단편의 핵산 서열을 결정하고;

(e) (b)에서 결정된 핵산 서열을 (d)에서 결정된 서열과 비교하는 것을 포함하며, 여기서 게놈 DNA 단편 내의 시토신 잔기의 전환은 잔기가 비설파이트 처리 전에 게놈 DNA 단편에서 비메틸화되었다는 것을 나타내고, 게놈 DNA 단편 내의 시토신 잔기의 전환의 부재는 잔기가 비설파이트 처리 전에 게놈 DNA 단편에서 메틸화되었다는 것을 나타내는 것인, 게놈 DNA 단편의 메틸화 상태를 결정하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 게놈 DNA 단편을 어댑터에 의해 고체 지지체에 고정화시키는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 어댑터가 프라이머 결합 부위를 함유하고, 프라이머 결합 부위 내의 시토신이 보호된 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, (b) 및/또는 (d)의 폴리머라제가 프라이머 결합 부위에 어닐링된 프라이머로부터 핵산 가닥을 중합시키는 것인 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, (b) 및/또는 (d)의 핵산 중합을 표지된 뉴클레오티드의 혼입 검출에 의해 검출하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 표지된 뉴클레오티드가 그의 말단 포스페이트에서 표지된 것인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, (b) 및/또는 (d)의 폴리머라제가 FRET 공여자로 표지되고, 뉴클레오티드가 FRET 수용자로 표지된 것인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, FRET 공여자가 형광 나노입자인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본원은 35 USC 119(e) 하에 2010년 8월 27일에 출원된 미국 가출원 번호 61/402,350을 우선권 주장하며, 그 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 핵산 혼합물로부터의 표적 핵산 분자의 분리 및 이러한 분자의 서열 결정에 관한 것이다.

배경기술

[0005] 전체 인간 게놈 서열의 완성 이후로, 게놈 연구는 변이, 예를 들어 질환-연관 돌연변이를 게놈 내에서 및 이들 사이에서 확인하는 "재서열분석"으로 이동하였다. 특정한 관심 영역, 예를 들어 엑손이 풍부한 "분배된" 게놈의 재서열분석은 그 영역의 "포획" 및 서열분석을 포함하는 여러 단계를 필요로 하였다. 예를 들어, 특정 마이크로어레이-기반 방법에서는, 게놈 DNA를 특정한 크기 범위의 단편으로 전단시키고; 단편을 말단-복구시키고, 특유한 어댑터에 라이게이션시키고, 증폭시키고; 이어서 증폭된 단편을 관심 참조 게놈 서열에 상보적인 프로브를 함유하는 마이크로어레이를 사용하여 포획하고; 포획된 (혼성화된) 단편을 용리하고, 증폭시키고; 증폭된 단편을 예를 들어 "차세대" 서열분석 기술 또는 재서열분석 어레이를 사용하여 서열분석한다. 예를 들어, WO 2008/115185; 문헌 [Okou et al. (2007) Nature Methods 4:907-909; Hodges et al. (2007) Nature Genetics 39:1522-1527]을 참조한다. 관심 핵산의 분리 및 서열분석에 요구되는 단계의 감소는 효율 및 정확도를 증가시키고, 잠재적으로 비용을 감소시킬 것이다. 본 발명은 이러한 필요를 충족시키고, 추가의 이점을 제공한다.

[0006] 일반적으로 게놈 내의 CpG 디뉴클레오티드에서 발생하는 시토신 메틸화는 유전자 조절 및 후성적 유전에서 중요한 역할을 수행한다. 게놈 영역의 메틸화 상태를 결정하기 위한 특정의 기존 방법은 비숄파이트 처리를 이용한 다. 이러한 방법에서, 변성된 게놈 DNA의 비숄파이트 이온에 대한 노출은 시토신의 우라실로의 탈아미노화를

일으키는 반면, 메틸화 시토신은 이러한 전환으로부터 보호된다. 전환 사건의 부재 또는 존재는 예를 들어 차세대 서열분석 방법 또는 프로브 어레이의 사용에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, WO 2010/085343을 참조한다. 이러한 방법은 종종 여러 단계, 예를 들어 비술피이트-처리된 DNA의 증폭, 포획, 용리 및 서열분석을 수반하거나, 또는 대안적으로 모든 관심 게놈 영역에서 전환 사건의 부재 또는 존재를 조사하기 위한 프로브의 설계를 필요로 하는데, 이는 고비용 및 노동 집약적일 수 있다. 또한, 이러한 방법은 개별 DNA 분자의 수준에서 메틸화 상태를 평가하지 않지만 대신에 특정한 관심 게놈 영역에 해당하는 핵산 분자의 집단을 관찰한다. 본 발명은 게놈 DNA의 메틸화 상태를 평가하고, 이에 따라 당업계의 필요를 충족시키고 다른 이점을 제공하는 보다 효율적이고 정확한 방법을 제공한다.

발명의 내용

[0007] 개요

[0008] 한 측면에서, (a) 고체 지지체를 혼성화 조건 하에 표적 핵산 분자를 포함하는 핵산의 혼합물에 노출시키며, 여기서 상기 표적 핵산 분자는 프라이밍-적격 형태로 고체 지지체 상에 고정화된 프라이머와 특정 혼성화 복합체를 형성하고; (b) 미결합된 핵산 및 비특이적으로 결합된 핵산을 고체 지지체로부터 분리하고; (c) 고체 지지체를 중합 조건 하에 폴리머라제 및 뉴클레오티드에 노출시키고; (d) 주형으로서 표적 핵산 분자를 사용하는 폴리머라제에 의한 고정화된 프라이머로부터의 핵산 중합을 검출함으로써 표적 핵산 분자의 핵산 서열을 결정하는 것을 포함하는, 표적 핵산 분자를 포획하고 서열분석하는 방법이 제공된다.

[0009] 한 실시양태에서, 표적 핵산 분자는 게놈 DNA의 영역으로부터의 것이다. 한 이러한 실시양태에서, 표적 핵산은 엑손의 전부 또는 일부를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 표적 핵산 분자는 RNA이고, 폴리머라제는 역전사효소이고, 프라이머는 3' 폴리-T 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 표적 핵산 분자는 DNA이고, 폴리머라제는 DNA 폴리머라제이다. 또 다른 실시양태에서, 뉴클레오티드는 그의 말단 포스페이트에서 표지된다. 한 이러한 실시양태에서, 폴리머라제는 FRET 공여자로 표지되고, 뉴클레오티드는 FRET 수용자로 표지된다. 한 이러한 실시양태에서, FRET 공여자는 형광 나노입자이다.

[0010] 추가 측면에서, (a) 게놈 DNA 단편을 고체 지지체 상에 고정화시키고; (b) 주형으로서 고정화된 게놈 DNA 단편을 사용하는 폴리머라제에 의한 핵산 중합을 검출함으로써 고체 지지체 상에 고정화된 게놈 DNA 단편의 핵산 서열을 결정하고; (c) 고정화된 게놈 DNA 단편을 비술피이트 처리하고; (d) 주형으로서 고정화된 비술피이트-처리 게놈 DNA 단편을 사용하는 폴리머라제에 의한 핵산 중합을 검출함으로써 고체 지지체 상에 고정화된 비술피이트-처리 게놈 DNA 단편의 핵산 서열을 결정하고; (e) (b)에서 결정된 핵산 서열을 (d)에서 결정된 서열과 비교하는 것을 포함하며, 여기서 게놈 DNA 단편 내의 시토신 잔기의 전환은 잔기가 비술피이트 처리 전에 게놈 DNA 단편에서 비메틸화되었다는 것을 나타내고, 게놈 DNA 단편 내의 시토신 잔기의 전환의 부재는 잔기가 비술피이트 처리 전에 게놈 DNA 단편에서 메틸화되었다는 것을 나타내는 것인, 게놈 DNA 단편의 메틸화 상태를 결정하는 방법이 제공된다.

[0011] 한 실시양태에서, 게놈 DNA 단편은 어댑터에 의해 고체 지지체 상에 고정화된다. 한 이러한 실시양태에서, 어댑터는 프라이머 결합 부위를 포함하고, 프라이머 결합 부위 내의 시토신은 보호된다. 한 이러한 실시양태에서, (b) 및/또는 (d)의 폴리머라제는 프라이머 결합 부위에 어닐링된 프라이머로부터 핵산 가닥을 중합시킨다. 또 다른 실시양태에서, (b) 및/또는 (d)의 핵산 중합은 표지된 뉴클레오티드의 혼입 검출에 의해 검출된다. 한 이러한 실시양태에서, 표지된 뉴클레오티드는 그의 말단 포스페이트에서 표지된다. 한 이러한 실시양태에서, (b) 및/또는 (d)의 폴리머라제는 FRET 공여자로 표지되고, 뉴클레오티드는 FRET 수용자로 표지된다. 한 이러한 실시양태에서, FRET 공여자는 형광 나노입자이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 상보적 올리고뉴클레오티드를 사용하는 올리고뉴클레오티드 어레이 상에서의 전단된 DNA의 선택 영역의 직접 포획, 및 DNA를 포획하는데 사용되는 올리고뉴클레오티드의 유리 3' 말단, 표지된 폴리머라제 및 표지된 dNTP (DNA의 실시간 합성 동안 부가된 염기 (서열) 및 폴리머라제의 직접 모니터링을 허용할 것임)의 사용에 의한 포획된 DNA의 직접 서열분석을 도시한다.

도 2는 상보적 올리고뉴클레오티드로 코팅된 비드를 사용하는 전단된 DNA의 선택 영역의 직접 포획 및 이후의 이러한 비드의 정렬, 및 DNA를 포획하는데 사용되는 올리고뉴클레오티드의 유리 3' 말단, 표지된 폴리머라제 및 표지된 dNTP (DNA의 실시간 합성 동안 부가된 염기 (서열) 및 폴리머라제의 직접 모니터링을 허용할 것임)의 사

용에 의한 포획된 DNA의 서열분석을 도시한다.

도 3은 폴리-dT 올리고뉴클레오타이드 어레이 상에서의 RNA의 직접 포획, 및 폴리-dT 올리고뉴클레오타이드의 유리 3' 말단 및 역전사효소를 사용하는 그의 cDNA로의 전환에 의한 포획된 RNA의 서열분석을 도시한다. cDNA 전환 후에, cDNA는 폴리-A 프라이머, 표지된 폴리머라제 및 표지된 dNTP (DNA의 실시간 합성 동안 부가된 염기 (서열) 및 폴리머라제의 직접 모니터링을 허용할 것임)의 사용에 의해 서열분석된다. 대안적으로, 포획된 RNA는 표지된 역전사효소 및 표지된 dNTP (DNA의 실시간 합성 동안 부가된 염기 (서열) 및 역전사효소의 직접 모니터링을 허용할 것임)의 사용에 의해 직접 서열분석되어 서열을 수득할 수 있다.

도 4는 비드 상에 고정화된 폴리-dT 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 RNA의 직접 포획, 표면 상에서의 비드 정렬, 이어서 폴리-dT 올리고뉴클레오타이드의 유리 3' 말단 및 역전사효소를 사용하는 cDNA로의 전환에 의한 포획된 RNA의 서열분석을 도시한다. cDNA 전환 후에, cDNA는 폴리-A 프라이머, 표지된 폴리머라제 및 표지된 dNTP (DNA의 실시간 합성 동안 부가된 염기 (서열) 및 폴리머라제의 직접 모니터링을 허용함)의 사용에 의해 서열분석된다. 대안적으로, 포획된 RNA는 표지된 역전사효소 및 표지된 dNTP (DNA의 실시간 합성 동안 부가된 염기 (서열) 및 역전사효소의 직접 모니터링을 허용함)의 사용에 의해 직접 서열분석되어 서열을 수득할 수 있다.

도 5는 서열분석의 제2 라운드가 비술피이트 처리 후에 수행되어 메틸화 시토신의 우라실로의 전환을 허용하는 연속 반응에서 어레이 상에서의 동일한 DNA 분자의 서열분석에 의한 핵산 메틸화 상태 결정을 도시한다. 적절한 프라이머, 표지된 폴리머라제 및 표지된 dNTP는 DNA의 실시간 합성 동안 부가된 염기 (서열) 및 폴리머라제의 직접 모니터링을 허용한다.

도 6은 서열분석의 제2 라운드가 비술피이트 처리 후에 수행되어 메틸화 시토신의 우라실로의 전환을 허용하는 연속 반응에서 비드 상에서의 동일한 DNA 분자의 서열분석에 의한 핵산 메틸화 상태 결정을 도시한다. 적절한 프라이머, 표지된 폴리머라제 및 표지된 dNTP는 DNA의 실시간 합성 동안 부가된 염기 (서열) 및 폴리머라제의 직접 모니터링을 허용한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 발명의 실시양태의 상세한 설명

[0014] I. 정의

[0015] "비술피이트 처리"는 비보호 시토신을 우라실로 전환시키기에 충분한 농도에서 비술피이트 이온 (예를 들어, 마그네슘 비술피이트 또는 나트륨 비술피이트)에 대한 핵산의 노출을 지칭한다. "비술피이트 처리"는 또한 적절한 농도에서 비보호 시토신을 우라실로 전환시키는데 사용될 수 있는 다른 시약, 예를 들어 디술피이트 및 히드로젠술피이트에 대한 핵산의 노출을 지칭한다. "비술피이트 처리"는 일반적으로 비술피이트 이온 또는 다른 시약에 대한 노출 후에, 염기, 예를 들어 NaOH에 대한 핵산의 노출을 포함한다.

[0016] "시토신 잔기의 전환"은 비술피이트 처리의 결과로서 시토신 잔기의 우라실 잔기로의 전환을 지칭한다.

[0017] "엑손"은 게놈의 코딩 영역을 지칭한다.

[0018] "혼성화 조건"은 상보적 핵산 가닥의 혼성화를 허용하는 조건을 지칭한다.

[0019] "핵산 서열의 결정"은 표적 핵산 분자의 적어도 하나의 뉴클레오타이드, 일부 실시양태에서는 다수의 뉴클레오타이드의 동일성의 결정을 지칭한다.

[0020] "고정화된" 및 "고정화"는 상보적 염기 쌍형성 이외의 수단에 의한 고체 지지체에 대한 직접 또는 간접적인 핵산의 부착을 지칭한다. 특정 혼성화 복합체 내의 2개의 핵산 가닥 중 적어도 1개가 상기 정의된 바와 같이 고체 지지체에 "고정화된"다면 특정 혼성화 복합체는 고체 지지체에 고정화된 것으로 여겨진다.

[0021] "표지"는 직접적으로 또는 간접적으로 검출될 수 있는 임의의 모이어티를 지칭한다.

[0022] "핵산"은 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체를 지칭한다.

[0023] "뉴클레오타이드"는 폴리머라제에 의해 성장하는 핵산 가닥에 혼입될 수 있는 뉴클레오타이드 및 그의 유사체를 지칭한다. 뉴클레오타이드는 DNA에 일반적으로 혼입되는 4가지 유형의 뉴클레오타이드 (아데닌, 구아닌, 시토신 및 티민); RNA에 일반적으로 혼입되는 4가지 유형의 뉴클레오타이드 (아데닌, 구아닌, 시토신 및 우라실); 변형된 염기를 갖는 뉴클레오타이드, 예컨대 이노신; 및 표지되거나 또는 달리 변형된 뉴클레오타이드를 포함하나 이에 제한

되지 않는다.

[0024] "폴리머라제"는 중합 조건 하에 성장하는 핵산 가닥에 뉴클레오티드를 혼입시킬 수 있는 효소 (자연 발생 또는 비-자연 발생) 또는 그의 효소적으로 활성인 단편을 지칭한다 (DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제 및 역전사효소를 포함하나 이에 제한되지는 않음).

[0025] "중합 조건"은 성장하는 핵산 가닥에 뉴클레오티드를 혼입시키기 위해 폴리머라제에 허용되는 조건을 지칭한다.

[0026] "프라이머"는 폴리머라제에 의해 뉴클레오티드가 첨가될 수 있는 핵산을 지칭한다. "첨가된"은 뉴클레오티드의 폴리머라제에 의한 프라이머로의 직접 첨가 뿐만 아니라 뉴클레오티드의 프라이머로부터 발생한 성장하는 핵산 가닥으로의 후속 첨가를 지칭한다.

[0027] "프라이밍-적격 형태"는 폴리머라제가 뉴클레오티드를 첨가할 수 있는 이용가능한 반응성 기를 갖는 프라이머를 지칭한다.

[0028] "고체 지지체"는 임의의 고체 기판을 지칭한다.

[0029] "특정 혼성화 복합체"는 엄격한 혼성화 조건 및/또는 엄격한 세척 조건 하에 형성할 수 있거나 또는 실질적으로 유지될 수 있는 혼성화 복합체를 지칭한다.

[0030] "표적 핵산 분자"는 임의의 관심 핵산 분자를 지칭한다.

[0031] "주형"은 폴리머라제가 상보적 핵산 가닥을 합성하는데 사용할 수 있는 단일-가닥 핵산 또는 이중-가닥 핵산의 변성된 영역을 지칭한다.

[0032] II. 표적 핵산 분자의 포획 및 서열분석

[0033] 한 측면에서, 본 발명은 고체 지지체 상에 고정화된 상보적 핵산, 예를 들어 프라이머를 사용하여 표적 핵산 분자를 포획하는 방법에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 표적 핵산 분자의 핵산 서열은 이어서 주형으로서 표적 핵산 분자를 사용하는 폴리머라제에 의한 프라이머로부터의 핵산 중합을 검출함으로써 결정된다. 검출은 단일-분자 수준에서, 실시간 또는 근실시간으로 일어난다.

[0034] 표적 핵산 분자

[0035] 다양한 실시양태에서, 표적 핵산 분자는 DNA이다. 한 실시양태에서, 표적 핵산 분자는 게놈, 예컨대 인간 게놈 또는 임의의 다른 유기체로부터의 게놈의 임의의 영역 ("표적 영역")에 해당할 수 있다. 표적 영역은 여러 메가염기의 하나 이상의 연속적 블록 또는 보다 작은 여러 인접 또는 비인접 영역, 예컨대 하나 이상의 염색체로부터의 엑손 모두, 또는 SNP를 함유하는 것으로 알려진 부위일 수 있다. 표적 영역을 함유하는 게놈은 부분적 이거나 완전할 수 있다. 게놈은 임의의 생물학적 공급원, 예컨대 환자 샘플 또는 풀링된 환자 샘플; 세포주 또는 세포 배양물; 생검 물질; 정상 조직 샘플 또는 종양 또는 다른 질환에 걸린 조직으로부터의 샘플; 및 당업자가 인지하게 될 다른 생물학적 공급원으로부터 유래될 수 있다. 한 실시양태에서, 표적 핵산을 함유하는 게놈 DNA는 일반적으로 약 200-600개 염기 쌍의 단편으로, 예를 들어 초음파처리 또는 유체역학력에 의해 전단되고, 표적 핵산 분자는 단편 또는 그의 분할 부분으로부터 포획된다. 또 다른 실시양태에서, 표적 핵산 분자는 코딩 또는 비-코딩 서열일 수 있다. 한 이러한 실시양태에서, 표적 핵산 분자는 엑손 또는 그의 부분이다.

[0036] 다양한 실시양태에서, 표적 핵산 분자는 RNA이다. 한 실시양태에서, 표적 핵산은 mRNA 전사체 또는 그의 부분이다. 한 이러한 실시양태에서, 표적 핵산은 폴리-A 꼬리를 갖는 mRNA 전사체 또는 그의 부분이다. 폴리-A 꼬리의 존재는 일반적으로 프라이머의 3' 말단에서, 충분한 길이의 폴리-T 서열을 포함하는 프로브 또는 프라이머에 대한 혼성화를 허용할 수 있다. 추가 실시양태에서, 표적 핵산 분자는 mRNA로부터, 예를 들어 역전사효소에 의해 생성된 cDNA이다.

[0037] 포획

[0038] 다양한 실시양태에서, 표적 핵산 분자는 핵산, 예를 들어 RNA, DNA (예를 들어, 게놈 DNA), 또는 cDNA 분자의 혼합물로부터 포획된다. 한 실시양태에서, 혼합물 내의 핵산은 표적 핵산 분자의 포획 전에 증폭된다. 이는, 예를 들어 혼합물 내의 핵산 분자의 말단에 범용 프라이밍 부위를 함유하는 어댑터를 라이게이션시킴으로써 달성될 수 있으며, 말단은 임의로 라이게이션 전에 말단-복구될 수 있다. 이에 따라, 범용 프라이머는 혼합물 내의 핵산을 증폭시키는데 사용될 수 있다.

[0039] 다양한 실시양태에서, 표적 핵산 분자는 고체 지지체 상에 고정화된 상보적 핵산을 사용하여 포획된다. 표적

핵산 분자 및 상보적 핵산 분자가 특정 혼성화 복합체를 형성할 수 있는 한, 상보적 핵산은 표적 핵산 분자에 완전히 상보적일 필요는 없으나, 미스매치를 함유할 수 있다. 한 실시양태에서, 상보적 핵산은 프라이머이다. 한 이러한 실시양태에서, 프라이머는 프라이밍-적격 형태로 고체 지지체 상에 고정화된다. 예를 들어, 3'-OH를 갖는 프라이머가 고체 지지체 상에 고정화되며, 3'-OH는 폴리머라제가 프라이머의 3' 말단에 뉴클레오티드를 첨가할 수 있도록 한다. 이는 프라이머가 프라이밍-적격인 한, 예를 들어 그의 5' 말단 또는 프라이머의 내부 영역에 의해 고체 지지체에 프라이머를 고정화시킴으로써 달성될 수 있다. 프라이머는 표적 핵산 분자와 특정 혼성화 복합체를 형성할 수 있는 한 임의의 길이일 수 있고, 특정 실시양태에서 프라이머는 적어도 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 또는 500개 염기 쌍 길이이다.

[0040] 고체 지지체 상에 핵산을 고정시키는 방법에 당업계에 널리 알려져 있다. 예를 들어, 핵산, 예컨대 상기 제공된 상보적 핵산은 공유 또는 비공유 연결에 의해 고체 지지체 상에 고정화될 수 있다. 적합한 화학물질 링커 및 다른 연결은 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 고정화될 핵산은 비오틴화되고 (예를 들어, 하나 이상의 비오틴화 뉴클레오티드를 함유함), 고체 지지체는 그의 표면 상에 스트렙타바딘을 가지며, 핵산의 비오틴 모이어티는 스트렙타바딘에 결합하여 핵산을 고정화시킨다. 추가 실시양태에서, 상기 실시양태에 제공된 바와 같은 고정화는 핵산을 고체 지지체 상에서 합성하여 달성된다. 예를 들어, 프라이머는 고체 지지체로부터 먼 프라이머 말단에 이용가능한 3'-OH를 남겨두면서 5'에서 3'로의 방향으로 뉴클레오티드를 중합시킴으로써 고체 지지체 상에서 합성될 수 있다. 고체 지지체, 예컨대 고밀도 마이크로어레이 상에서 5'에서 3'로의 방향으로 올리고뉴클레오티드를 합성하는 화학적 방법이 당업계에 공지되어 있고, 본원에 기재된 목적을 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Albert et al. (2003) "Light directed 5' → 3' synthesis of complex oligonucleotide microarrays," *Nucleic Acids Res.* 31(7):e35] (그의 전체내용이 본원에 참고로 포함됨)을 참조한다.

[0041] 다양한 실시양태에서, 고체 지지체는 핵산이 고정화될 수 있는 임의의 기판이다. 이러한 기판은 유리 (예를 들어, 유리 현미경 슬라이드), 금속, 세라믹, 중합체 비드 및 다른 기판을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 고체 지지체는 어레이, 예를 들어 마이크로어레이의 형태이다. 특정 실시양태에서, 핵산은 고체 지지체, 예를 들어 비드 상에 고정화될 수 있으며, 이는 이후에 또 다른 고체 지지체, 예를 들어 유리 슬라이드 또는 마이크로어레이 상에 포획되거나 달리 고정화된다.

[0042] 특정 실시양태에서, 상보적 핵산이 고정화된 고체 지지체는 혼성화 조건 하에 표적 핵산 분자를 함유하는 핵산의 혼합물에 노출된다. 이에 따라 표적 핵산 분자는 상보적 핵산과 특정 혼성화 복합체를 형성한다. 추가 실시양태에서, 고체 지지체를 세척하여 미결합된 핵산 및 비특이적으로 결합된 핵산을 제거함으로써, 혼합물에서 표적 핵산 분자 (특정 혼성화 복합체 내에 함유됨)를 다른 핵산으로부터 분리한다. 특정 실시양태에서, 핵산의 혼합물에 대한 고체 지지체의 노출 및/또는 고체 지지체의 세척은 각각 엄격한 혼성화 조건 및/또는 엄격한 세척 조건 하에 일어난다.

[0043] 본원에 사용된 "혼성화"는 상보적 핵산 가닥의 쌍형성을 지칭한다. 혼성화 및 혼성화 강도 (즉, 핵산 가닥 사이에 회합의 강도)는 핵산 사이의 상보성의 정도, 조건의 엄격도, 혼성화 복합체의 T_m 및 핵산의 G:C 비와 같은 요인에 의해 영향을 받는다. 본 발명이 특정한 세트의 혼성화 조건에 제한되지 않지만, 엄격한 혼성화 조건이 이용될 수 있다. 엄격한 혼성화 조건은 통상적인 방법을 이용하여 당업자에 의해 경험적으로 결정될 수 있다. 엄격한 혼성화 조건은 서열-의존적이고, 또한 환경 요인, 예컨대 염 농도 및 유기 용매의 존재에 의존한다. 일반적으로, 엄격한 혼성화 조건은 지정된 이온 강도 및 pH에서 특정 핵산 서열에 대한 열 용융점 (T_m) 보다 약 5°C 내지 20°C 더 낮도록 선택된다. 특정 실시양태에서, 엄격한 혼성화 조건은 상보적 핵산과 결합된 특정 핵산에 대한 열 용융점보다 약 5°C 내지 10°C 더 낮다. T_m 은 핵산 (예를 들어, 표적 핵산 분자)의 50%가 완벽하게 매치된 프라이머에 혼성화되는 (지정된 이온 강도 및 pH 하의) 온도이다.

[0044] 유사하게, 엄격한 세척 조건은 통상적인 방법을 이용하여 당업자에 의해 경험적으로 결정될 수 있다. 예를 들어, 고체 지지체, 예를 들어 어레이 상에 고정화된 특정 혼성화 복합체로부터 비특이적으로 결합된 핵산의 분리를 허용하는 엄격한 세척 조건이 확립될 수 있다. 한 실시양태에서, 어레이는 혼성화 조건 (예를 들어, 엄격한 혼성화 조건)에 노출된 후에, 연속적으로 보다 낮은 농도의 염 및/또는 보다 높은 농도의 세제를 함유하는 완충제로, 및/또는 증가하는 농도에서 특정 대 비특정 혼성화에 대한 신호-대-노이즈 비가 특정 혼성화, 예를 들어 완전하거나 실질적으로 완전한 상보성을 공유하는 핵산 가닥 사이의 혼성화의 검출을 용이하게 하기에 충분히 높을 때까지 세척한다. 특정 실시양태에서, 엄격한 세척 조건은 약 30°C, 37°C, 42°C, 45°C, 50°C 또는 55°C의 온도를 포함할 것이다. 특정 실시양태에서, 엄격한 세척 조건은 $\leq 1M$, $\leq 500mM$, $\leq 250mM$, $\leq 100mM$, $\leq 50mM$ 또는 $\leq 25mM$ 이지만 $\geq 10mM$ 인 염 농도를 포함할 것이다. 엄격한 혼성화 조건의 예는 하기와 같다: 50%

포름아미드, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M 시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 6.8), 0.1% 피로인산나트륨, 5 x 덴하르트 용액, 초음파처리된 연어 정자 DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, 및 10% 텍스트란 술페이트, 42℃. 엄격한 세척 조건의 예는 하기와 같다: EDTA를 함유하는 0.1 x SSC, 55℃.

[0045] 서열 결정

[0046] 혼합물에서 표적 핵산 분자 (특정 혼성화 복합체 내에 함유됨)를 다른 핵산으로부터 분리한 후에 표적 핵산 분자를 서열분석할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 이 단계는 일반적으로 "재서열분석"으로 지칭되며, 참조 계층으로부터의 표적 영역의 서열은 이미 알려져 있다. 현재의 재서열분석 방법은 특정 혼성화 복합체로부터의 표적 핵산 분자의 용리에 이어 표적 핵산 분자의 증폭을 필요로 하고, 이어서 증폭된 표적 핵산 분자는 "차세대" 서열분석 기술 (예를 들어, 병렬식 고처리량 서열분석이 가능한 서열분석 플랫폼) 또는 재서열분석 어레이 (구체적으로 핵산의 별개의 절편에서 돌연변이의 부재 또는 존재를 검출하는 프로브를 함유하는 마이크로어레이)를 사용하여 서열분석된다. 용리 및 증폭 단계에 대한 필요는 시간- 및 자원-소모적이고, 이는 샘플의 손실을 일으키거나, 다르게는 표적 핵산 분자 집단 내에서 개별 표적 핵산 분자를 편파적으로 나타낼 수 있다.

[0047] 따라서, 다양한 실시양태에서, 표적 핵산 분자의 재서열분석은 특정 혼성화 복합체로부터 이를 용리시키지 않고 발생한다. 이는 특정 혼성화 복합체 내에 함유된 상보적 핵산이 프라이밍-적격 형태로 고체 기판 상에 고정화된 프라이머인 한 실시양태에서 달성될 수 있다. 예를 들어, 프라이머는 표적 핵산 분자의 특정한 영역에 혼성화될 수 있고, 핵산 표적 분자의 나머지는 단일-가닥 형태이다. 따라서, 폴리머라제는 주형으로서 표적 핵산 분자의 단일-가닥 (비혼성화) 부분을 사용하여 프라이머의 이용가능한 3'-OH에 뉴클레오티드를 첨가할 수 있을 것이다. 폴리머라제에 의해 합성된 핵산 가닥을 사용하여 표적 핵산 분자의 서열을 결정한다.

[0048] 따라서, 특정 혼성화 복합체가 프라이머를 통해 고정화된 고체 지지체는 중합 반응 혼합물에 노출될 수 있다. 한 실시양태에서, 중합 반응 혼합물은 폴리머라제 및 뉴클레오티드를 포함한다. 폴리머라제는 DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제 또는 역전사효소일 수 있다. 표적 핵산 분자가 RNA인 경우에, 폴리머라제는 역전사효소일 수 있다. 표적 핵산 분자가 DNA인 다른 실시양태에서, 폴리머라제는 DNA 폴리머라제이다. 특정의 예시적인 DNA 폴리머라제는 박테리아 DNA 폴리머라제 (예를 들어, 이. 콜라이(E. coli) DNA pol I, II, III, IV 및 V, 및 DNA pol I의 클레나우 단편); 바이러스 DNA 폴리머라제 (예를 들어, T4 및 T7 DNA 폴리머라제); 고세균 DNA 폴리머라제 (예를 들어, 썬무스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*) (Taq) DNA 폴리머라제, 피로코쿠스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*) (Pfu) DNA 폴리머라제, "딥 벤트(Deep Vent)" DNA 폴리머라제 (뉴 잉글랜드 바이오랩스 (New England BioLabs))); 진핵 DNA 폴리머라제; 및 그의 조작 또는 변형된 변이체를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 특정의 예시적인 RNA 폴리머라제는 T7, T3 및 SP6 RNA 폴리머라제, 및 그의 조작 또는 변형된 변이체를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 특정의 예시적인 역전사효소는 HIV, MMLV 및 AMV로부터의 역전사효소 뿐만 아니라 상업적으로 입수가능한 역전사효소, 예컨대 SUPERScript (인비트로젠(Invitrogen), 캘리포니아주 칼스배드)를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0049] 특정 실시양태에서, 중합 반응 혼합물 내의 뉴클레오티드 및/또는 폴리머라제가 표지된다. 한 실시양태에서, 1, 2, 3 또는 4가지 유형의 뉴클레오티드가 차별적으로 표지된다. 한 이러한 실시양태에서, 4가지 상이한 유형의 뉴클레오티드가 4가지 상이한 표지로 표지된다. 예를 들어, dNTP의 경우에, 아데닌 (또는 기능적으로 동등한 유사체), 구아닌 (또는 기능적으로 동등한 유사체), 시토신 (또는 기능적으로 동등한 유사체) 및 티민 (또는 기능적으로 동등한 유사체)은 상이한 표지, 예를 들어 상이한 형광단으로 각각 표지된다. 마찬가지로, rNTP의 경우에, 아데닌 (또는 기능적으로 동등한 유사체), 구아닌 (또는 기능적으로 동등한 유사체), 시토신 (또는 기능적으로 동등한 유사체) 및 우라실 (또는 기능적으로 동등한 유사체)는 상이한 표지, 예를 들어 상이한 형광단으로 각각 표지된다. 적합한 표지는 발광, 광발광, 전계발광, 생물발광, 화학발광, 형광 및/또는 인광 표지를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 형광 표지는 크산틴 염료, 플루오레세인, 시아닌, 로다민, 쿠마린, 아크리딘, 텍사스 레드 염료, BODIPY, ALEXA, GFP 및 그의 변형을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 표지는 뉴클레오티드에 직접 부착될 수 있거나 적합한 링커를 통해 부착될 수 있다. 표지는 폴리머라제가 성장하는 핵산 가닥에 뉴클레오티드를 혼입시키는 능력을 유익하게 방해하지 않는 임의의 위치에서 뉴클레오티드에 부착될 수 있다. 한 실시양태에서, 표지는 뉴클레오티드의 포스페이트, 예를 들어 뉴클레오티드의 말단 포스페이트에 부착되며, 뉴클레오티드의 포스페이트 쇠 및 이에 따라 표지는 성장하는 핵산 가닥으로의 뉴클레오티드의 혼입시에 절단된다. 표지된 뉴클레오티드 및/또는 폴리머라제는 폴리머라제에 의해 합성된 핵산 가닥의 검출을 허용할 수 있다.

[0050] 특정 실시양태에서, 표적 핵산 분자의 서열은 폴리머라제에 의해 성장하는 핵산 가닥에 혼입된 뉴클레오티드를

이들이 혼입된 순서대로 확인하여 결정된다. 한 실시양태는 성장하는 핵산 가닥에 혼입된 뉴클레오티드의 표지를 이들이 혼입된 순서대로 직접적으로 또는 간접적으로 검출하고, 검출된 표지를 뉴클레오티드의 동일성과 관련시켜, 성장하는 핵산 가닥의 서열을 확인하는 것을 포함한다. 이에 따라 표적 핵산 분자 (또는 프라이머가 표적 핵산 분자의 센스 가닥에 혼성화되는지 안티센스 가닥에 혼성화되는지에 따라, 그의 상보체)의 서열이 결정된다. 이러한 실시양태에서, 표지의 검출, 및 이론상 표적 핵산 분자의 서열분석은 실시간으로 "단일 분자" 수준에서 일어난다. 표지가 성장하는 핵산 가닥으로의 뉴클레오티드의 혼입과 동시에 제거되어 생성된 핵산 가닥이 표지되지 않게 될 수 있다는 것이 상기 언급되고, 하기 추가로 예시된다.

[0051] 표지된 뉴클레오티드가 성장하는 핵산 가닥에 혼입될 때 이를 검출하는 특정 방법이 WO 2010/002939에 기재되어 있다. 이러한 방법은 "공여자" 분자 (FRET 공여자) 및 "수용자" 분자 (FRET 수용자)가 서로 충분히 근접하였을 때 이들 분자 사이의 피르스터 공명 에너지 전달 (FRET)에 따라 좌우된다. 특정한 실시양태에서, 폴리머라제는 FRET 공여자 형광단으로 표지되고, 뉴클레오티드는 FRET 수용자 형광단으로 표지된다. 폴리머라제가 성장하는 핵산 가닥에 뉴클레오티드를 혼입시킬 때, FRET 공여자 및 수용자 형광단은 근접하게 되어 FRET 공여자 형광단으로부터 FRET 수용자 형광단으로 에너지를 전달한다. 에너지 전달은 FRET 공여자 형광단의 방출 강도를 감소시키고, FRET 수용자 형광단의 방출 강도를 증가시킨다. FRET 수용자의 방출 스펙트럼의 검출은 혼입되는 뉴클레오티드의 동일성을 나타낸다. 한 실시양태에서, 폴리머라제에 부착된 FRET 공여자는 WO 2010/002939에 기재된 바와 같은 형광 나노입자, 예를 들어 나노결정, 보다 구체적으로 양자 점이다. FRET 공여자는 여기원, 예컨대 레이저로 발광시킬 수 있고, 이 때 공여자 방출이 생산된다. 추가 실시양태에서, 상이한 FRET 수용자는 하나 이상의 유형의 뉴클레오티드 각각에, 특히 3 또는 4가지 유형의 뉴클레오티드 각각에 부착된다. FRET 수용자는 상기 논의된 임의의 형광 표지일 수 있다.

[0052] 표지는 전하 결합 장치 및 내부 전반사 현미경검사를 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 적합한 방법 또는 장치를 이용하여 검출될 수 있다.

[0053] 특정 실시양태에서, 표적 핵산 분자가 폴리A-RNA인 경우에, 표적 핵산 분자는 폴리-T 서열을 포함하는 프라이머를 사용하여 포획된다. cDNA는 역전사효소를 사용하여 프라이머로부터 합성된다 (그러나 서열분석되지 않음). 이어서, 표적 핵산 분자는 새로 합성된 cDNA 가닥을 남겨두면서 고체 지지체 상에서 특정 혼성화 복합체로부터 변성되고, 이제 프라이머를 통해 고체 지지체 상에 고정화된다. 이어서, 고체 지지체는 폴리-A를 포함하는 프라이머에 노출되고, 이는 새로 합성된 cDNA에 혼성화된다. 새로 합성된 cDNA는 상기 제공된 바와 같이 고체 지지체를 중합 반응 혼합물에 노출시킴으로써 서열분석되며, DNA 폴리머라제는 폴리A 프라이머로부터 핵산 가닥을 합성한다.

[0054] 상기 방법을 이용하여, 다중 표적 핵산 분자는 각각의 관심 표적 핵산 분자에 특이적인 프라이머를 선택하고, 고체 지지체의 이산 구역, 예를 들어 마이크로어레이 상에 프라이머를 고정화시킴으로써 분리 및 서열분석된다. 이러한 방법에서, 관심 표적 핵산 분자는 고처리량 방법으로 분리 및 서열분석될 수 있다.

[0055] III. 메틸화 조건의 결정

[0056] 또 다른 측면에서, 본 발명은 게놈 DNA 단편을 고체 지지체에 고정화시키고; 주형으로서 게놈 DNA 단편을 사용하는 폴리머라제에 의한 뉴클레오티드의 중합을 검출함으로써 고정화된 게놈 DNA 단편의 핵산 서열을 결정하고; 새로 합성된 핵산 가닥으로부터 고정화된 게놈 DNA 단편을 변성시키고; 고체 지지체를 비솔파이트에 노출시키고; 주형으로서 표적 핵산 분자를 사용하는 폴리머라제에 의한 뉴클레오티드의 중합을 검출함으로써 게놈 DNA 단편의 핵산 서열을 결정함으로써, 게놈 DNA 단편 내의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태를 결정하는 방법에 관한 것이다.

[0057] 게놈 DNA 단편

[0058] 게놈 DNA 단편은 임의의 게놈, 예컨대 인간 게놈 또는 임의의 다른 유기체로부터의 게놈으로부터 수득될 수 있다. 게놈은 부분적이거나 완전할 수 있다. 게놈은 임의의 생물학적 공급원, 예컨대 환자 샘플 또는 풀링된 환자 샘플; 세포주 또는 세포 배양물; 생검 물질; 정상 조직 샘플 또는 종양 또는 다른 질환에 걸린 조직으로부터의 샘플; 및 당업자가 인지하게 될 다른 생물학적 공급원으로부터 유래될 수 있다. 한 실시양태에서, 게놈 DNA는 일반적으로 약 200-600개 염기 쌍의 단편으로, 예를 들어 초음파처리 또는 유체역학력에 의해 전단된다. 다른 실시양태에서, 게놈 DNA는 효소적 소화에 의해 단편화된다.

[0059] 게놈 DNA 단편의 고정화

[0060] 게놈 DNA 단편은 임의의 다양한 방법에 의해 고체 지지체에 고정화될 수 있다. 게놈 DNA 단편은 공유 또는 비

공유 연결에 의해 고체 지지체에 직접적으로 또는 간접적으로 고정화될 수 있다. 적합한 화학적 링커 및 다른 연결은 당업자에게 공지되어 있다. 특정한 실시양태에서, 게놈 DNA 단편은 변성되며, 이는 단일-가닥 형태로 고체 지지체에 고정화된다. 게놈 DNA 단편, 예를 들어 단일-가닥 게놈 DNA 단편은 핵산 연결 또는 어댑터에 의해 고체 지지체에 고정화된다. 예를 들어, 어댑터는 게놈 DNA 단편의 한쪽 또는 양쪽 말단에 라이게이션될 수 있으며, 이 때 어댑터는 고체 지지체에 고정화된다. 어댑터는 단일-가닥, 예를 들어 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 특정 실시양태에서, 어댑터가 먼저 게놈 DNA 단편에 라이게이션된 후에 고체 지지체에 고정화되거나 또는 대안적으로 어댑터가 먼저 고체 지지체에 고정화된 후에 게놈 단편이 고체 지지체 상에서 어댑터에 라이게이션된다. 특정의 추가 실시양태에서, 어댑터가 비오틴화되고 (예를 들어, 하나 이상의 비오틴화 뉴클레오타이드를 함유함), 고체 지지체는 그의 표면 상에 스트렙타바딘을 가지며, 비오틴 모이어터는 스트렙타바딘에 결합하여 어댑터를 고정화시킨다.

[0061] 고정화된 게놈 DNA 단편의 배향은 고체 지지체로부터 5'→3' 또는 고체 지지체로부터 3'→5'일 수 있다. 한 실시양태에서, 고정화된 게놈 DNA 단편은 고체 지지체로부터 3'→5' 배향된다. 추가 실시양태에서, 고정화된 게놈 DNA 단편은 단일-가닥이다. 추가 실시양태에서, 단일-가닥 게놈 단편은 어댑터, 예를 들어 올리고뉴클레오타이드에 의해 고체 지지체에 고정화된다. 특정한 실시양태에서, 게놈 DNA 단편은 단일-가닥이고, 고체 지지체에 고정화된 어댑터와 라이게이션되며, 어댑터 및 게놈 DNA 단편은 고체 지지체로부터 3'→5' 배향된다.

[0062] 서열분석

[0063] 고정화된 게놈 DNA 단편은 고체 지지체 상에서 서열분석된다. 특정 실시양태에서, 게놈 DNA 단편은 단일-가닥 형태로 고체 지지체 상에 고정화되거나 또는 이중-가닥 형태로 고체 지지체 상에 고정화되며, 이는 전체적으로 또는 부분적으로 고체 지지체에 고정화되어 남아있는 단일-가닥 형태로 전환될 수 있다.

[0064] 특정 실시양태에서, 고체 지지체는 혼성화 조건 하에 프라이머에 노출되며, 프라이머 및 게놈 DNA 단편은 특정 혼성화 복합체를 형성한다. 특정의 다른 실시양태에서, 고체 지지체는 혼성화 조건 하에 프라이머에 노출되며, 프라이머 및 어댑터는 특정 혼성화 복합체를 형성한다. 한 이러한 실시양태에서, 어댑터는 게놈 DNA 단편이 라이게이션되는 올리고뉴클레오타이드이며, 어댑터는 고체 지지체 상에 고정화된다. 상기 실시양태에서, 게놈 DNA 단편 또는 어댑터에서 프라이머가 결합하는 핵산 서열 내의 시토신은, 예를 들어 보호기를 가짐으로써 비숄파이트 처리로부터 발생하는 탈아미노화로부터 보호된다. 보호기는 예를 들어 메틸 기일 수 있고, 보호된 시토신은 5-메틸시토신일 수 있다.

[0065] 추가 실시양태에서, 고체 지지체는 중합 반응 혼합물에 노출된다. 한 실시양태에서, 중합 반응 혼합물은 DNA 폴리머라제 및 뉴클레오타이드를 포함하며, DNA 폴리머라제는 주형으로서 게놈 DNA 단편을 사용하여 프라이머로부터 핵산 가닥을 합성한다. 한 이러한 실시양태에서, DNA 폴리머라제는 어댑터와 특정 혼성화 복합체를 형성하는 프라이머로부터 핵산 가닥을 합성하며, 어댑터 (임의로) 및 게놈 DNA 단편이 주형으로서 사용된다. 예를 들어, 어댑터가 게놈 DNA 단편을 고체 지지체에 연결되면 (어댑터 및 게놈 DNA 단편은 고체 지지체로부터 3'→5' 방향으로 배향됨), 프라이머는 고체 지지체로부터 5'→3' 방향으로 어댑터에 혼성화되어, 주형으로서 어댑터를 사용하고 (임의로) 주형으로서 게놈 DNA 단편을 사용하여 5'→3' 방향으로 폴리머라제에 의한 합성을 프라이밍할 수 있다. 이러한 또 다른 실시양태에서, DNA 폴리머라제는 게놈 DNA 단편과 특정 혼성화 복합체를 형성하는 프라이머로부터 핵산 가닥을 합성하며, 게놈 DNA 단편이 주형으로서 사용된다.

[0066] 적합한 DNA 폴리머라제는 박테리아 DNA 폴리머라제 (예를 들어, 이. 콜라이 DNA pol I, II, III, IV 및 V, 및 DNA pol I의 클레나우 단편); 바이러스 DNA 폴리머라제 (예를 들어, T4 및 T7 DNA 폴리머라제); 고세균 DNA 폴리머라제 (예를 들어, 썬무스 아쿠아티쿠스 (Taq) DNA 폴리머라제, 피로코쿠스 푸리오수스 (Pfu) DNA 폴리머라제, "딤 벤트" DNA 폴리머라제 (뉴 잉글랜드 바이오랩스)); 진핵 DNA 폴리머라제; 및 그의 조작 또는 변형된 변이체를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0067] 특정 실시양태에서, 중합 반응 혼합물 내의 뉴클레오타이드 및/또는 폴리머라제가 표지된다. 한 실시양태에서, 1, 2, 3 또는 4가지 유형의 뉴클레오타이드가 차별적으로 표지된다. 한 이러한 실시양태에서, 4가지 상이한 유형의 뉴클레오타이드가 4가지 상이한 표지로 표지된다. 예를 들어, dNTP의 경우에, 아데닌 (또는 기능적으로 동등한 유사체), 구아닌 (또는 기능적으로 동등한 유사체), 시토신 (또는 기능적으로 동등한 유사체) 및 티민 (또는 기능적으로 동등한 유사체)은 상이한 표지, 예를 들어 상이한 형광단으로 각각 표지된다. 적합한 표지는 발광, 광발광, 전계발광, 생물발광, 화학발광, 형광 및/또는 인광 표지를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 형광 표지는 크산틴 염료, 플루오레세인, 시아닌, 로다민, 쿠마린, 아크리딘, 텍사스 레드 염료, BODIPY, ALEXA, GFP 및 그의 변형을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 표지는 뉴클레오타이드에 직접 부착될 수 있거나 적합한 링커를 통

해 부착될 수 있다. 표지는 폴리머라제가 성장하는 핵산 가닥에 뉴클레오티드를 혼입시키는 능력을 유의하게 방해하지 않는 임의의 위치에서 뉴클레오티드에 부착될 수 있다. 한 실시양태에서, 표지는 뉴클레오티드의 포스페이트, 예를 들어 뉴클레오티드의 말단 포스페이트에 부착되며, 뉴클레오티드의 포스페이트 쇄 및 이에 따라 표지는 성장하는 핵산 가닥으로의 뉴클레오티드의 혼입시에 절단된다. 표지된 뉴클레오티드 및/또는 폴리머라제는 폴리머라제에 의해 합성된 핵산 가닥의 검출을 허용할 수 있다.

[0068] 특정 실시양태에서, 게놈 DNA 단편의 서열은 폴리머라제에 의해 성장하는 핵산 가닥에 혼입된 뉴클레오티드를 이들이 혼입된 순서대로 확인하여 결정된다. 한 실시양태는 성장하는 핵산 가닥에 혼입된 뉴클레오티드의 표지를 이들이 혼입된 순서대로 직접적으로 또는 간접적으로 검출하고, 검출된 표지를 뉴클레오티드의 동일성과 관련시켜, 성장하는 핵산 가닥의 서열을 확인하는 것을 포함한다. 이에 따라 게놈 DNA 단편 (또는 게놈 DNA 단편의 센스 가닥이 고정화되는지 안티센스 가닥이 고정화되는지에 따라, 그의 상보체)의 서열이 결정된다. 이러한 실시양태에서, 표지의 검출, 및 이론상 게놈 DNA 단편의 서열분석은 실시간으로 "단일 분자" 수준에서 일어난다. 표지가 성장하는 핵산 가닥으로의 뉴클레오티드의 혼입과 동시에 제거되어 새로 합성된 핵산 가닥이 표지되지 않게 될 수 있다는 것이 상기 언급되고, 하기 추가로 예시된다.

[0069] 표지된 뉴클레오티드가 성장하는 핵산 가닥에 혼입될 때 이를 검출하는 특정 방법이 WO 2010/002939에 기재되어 있다. 이러한 방법은 "공여자" 분자 (FRET 공여자) 및 "수용자" 분자 (FRET 수용자)가 서로 충분히 근접하였을 때 이들 분자 사이의 피르스터 공명 에너지 전달 (FRET)에 따라 좌우된다. 특정한 실시양태에서, 폴리머라제는 FRET 공여자 형광단으로 표지되고, 뉴클레오티드는 FRET 수용자 형광단으로 표지된다. 폴리머라제가 성장하는 핵산 가닥에 뉴클레오티드를 혼입시킬 때, FRET 공여자 및 수용자 형광단은 근접하게 되어 FRET 공여자 형광단으로부터 FRET 수용자 형광단으로 에너지를 전달한다. 에너지 전달은 FRET 공여자 형광단의 방출 강도를 감소시키고, FRET 수용자 형광단의 방출 강도를 증가시킨다. FRET 수용자의 방출 스펙트럼의 검출은 혼입되는 뉴클레오티드의 동일성을 나타낸다. 한 실시양태에서, 폴리머라제에 부착된 FRET 공여자는 WO 2010/002939에 기재된 바와 같은 형광 나노입자, 예를 들어 나노결정, 보다 구체적으로 양자 점이다. FRET 공여자는 여기원, 예컨대 레이저로 발광시킬 수 있으며, 이 때 공여자 방출이 생산된다. 추가 실시양태에서, 상이한 FRET 수용자는 하나 이상의 유형의 뉴클레오티드 각각에, 특히 3 또는 4가지 유형의 뉴클레오티드 각각에 부착된다. FRET 수용자는 상기 논의된 임의의 형광 표지일 수 있다.

[0070] 표지는 전하 결합 장치 및 내부 전반사 현미경검사를 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 적합한 방법 또는 장치를 이용하여 검출될 수 있다.

[0071] 상기 방법을 이용하여, 다중 게놈 DNA 단편은 고체 지지체의 이산 구역, 예를 들어 마이크로어레이 상에 게놈 DNA 단편을 고정화시킴으로 분리 및 서열분석될 수 있다. 이러한 방법으로, 관심 게놈 DNA 단편은 고처리량 방법으로 고정화 및 서열분석될 수 있다.

[0072] 비술파이트 처리 및 처리후 서열분석

[0073] 게놈 DNA 단편의 서열분석 후에, 새로 합성된 DNA 가닥 및 게놈 DNA 단편으로 이루어진 특정 혼성화 복합체는 변성되어 (예를 들어, 열 또는 염기 변성에 의함), 게놈 DNA 단편으로부터 새로 합성된 DNA 가닥을 분리한다. 고체 지지체 상의 게놈 DNA 단편은 비술파이트 처리된다. 비술파이트 처리를 수행하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Herman et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826]에 기재되어 있다. 이에 따라 게놈 DNA 단편 내의 비보호 (비메틸화) 시토신이 우라실로 전환된다. 이어서, 게놈 DNA 단편에 상기 개략된 바와 같은 서열분석 프로토콜을 적용한다. 생성된 서열은 비술파이트 처리 전에 획득한 서열과 비교하여, 서열분석 프로토콜에 의해 생성된 새로 합성된 가닥에서 구아닌 대신에, 예를 들어 티민의 존재에 의해 나타내는 바와 같이 게놈 DNA 단편에서 우라실 잔기로 전환된 시토신 잔기를 확인한다. 전환된 잔기는 게놈 DNA 단편에서 비메틸화 상태를 나타내는 반면, 비전환된 잔기는 게놈 DNA 단편에서 보호된, 즉 메틸화된 상태를 나타낸다. 이러한 방법으로, 게놈 DNA 단편의 메틸화 상태가 결정된다.

[0074] 실시예

[0075] [a] DNA 분자의 직접 포획 및 실시간 서열분석

[0076] 관심 표적 핵산 분자를 함유하는 DNA (예를 들어, 관심 단백질 코딩 영역을 갖는 게놈 DNA)를 도 1B 및 2B에 나타낸 바와 같이 적절한 크기로 전단시킨다. 관심 영역에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 함유하는 기관, 예를 들어 어레이 (도 1A에 나타낸 바와 같음) 또는 비드 (도 2A에 나타낸 바와 같음)를 사용한다. 관심 영역은 예를 들어 엑손일 수 있다. 전단된 DNA로부터의 관련 영역을 포함하는 핵산을 올리고뉴클레오티드에 대한 혼성화

를 통해 기관 상에 포획한다. 도 1에서, 전단된 DNA로부터의 관련 영역을 포함하는 핵산을 어레이 상에서의 상보적 올리고뉴클레오티드에 대한 혼성화에 의해 포획한다. 도 2에서, 전단된 DNA로부터의 관련 영역을 포함하는 핵산을 비드 상에 용액 중에서 포획한다. 미결합된 DNA 및 비특이적으로 결합된 DNA를 세척한다. 도 2C에서, 비드를 추가의 기관, 예를 들어 정렬된 또는 비정렬된 어레이 상에 놓는다. 포획된 DNA를 도 1C 및 2C에 나타난 바와 같이 직접 서열분석한다. 이는 올리고뉴클레오티드의 유리 3' 말단 (프라이머로 기능함), 표지된 폴리머라제 및 표지된 dNTP (단일 분자 수준에서 DNA의 실시간 합성 동안 부가된 염기 및 폴리머라제의 직접 모니터링을 허용함)를 사용하여 달성된다.

[0077] [b] RNA 분자의 직접 포획 및 실시간 서열분석

[0078] 폴리-A 꼬리를 함유하는 RNA를 도 3B 및 4B에 나타난 바와 같이 사용할 수 있다. 폴리-dT-함유 올리고뉴클레오티드를 함유하는 기관, 예를 들어 어레이 (도 3A에 나타난 바와 같음) 또는 비드 (도 4A에 나타난 바와 같음)를 또한 사용한다. RNA를 도 3C 및 4C에 나타난 바와 같이 폴리-dT 함유 올리고뉴클레오티드에 대한 폴리-A 꼬리의 혼성화를 통해 기관 상에 포획한다. 미결합된 RNA 및 비특이적으로 결합된 RNA를 세척하고, 포획된 RNA를 폴리-dT의 유리 3' 말단 및 역전사효소를 사용하여 cDNA로 전환시킨다. RNA의 cDNA로의 전환 후에, cDNA를 서열분석한다. cDNA를 서열분석하기 위한 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 어댑터를 새로 합성된 cDNA의 유리 3' 말단에 라이게이션시킨 후에 프라이머를 그 어댑터에 어닐링시킨다. cDNA를 상기 프라이머, 표지된 폴리머라제 및 표지된 dNTP (단일 분자 수준에서 DNA의 실시간 합성 동안 부가된 염기 및 폴리머라제의 직접 모니터링을 허용함)를 사용하여 서열분석한다. 대안적으로, 포획된 RNA를 표지된 역전사효소 및 표지된 dNTP (단일 분자 수준에서 cDNA의 실시간 합성 동안 부가된 염기 및 역전사효소의 직접 모니터링을 허용함)를 사용하여 직접 서열분석할 수 있다. (도 3C 및 4C 참조.)

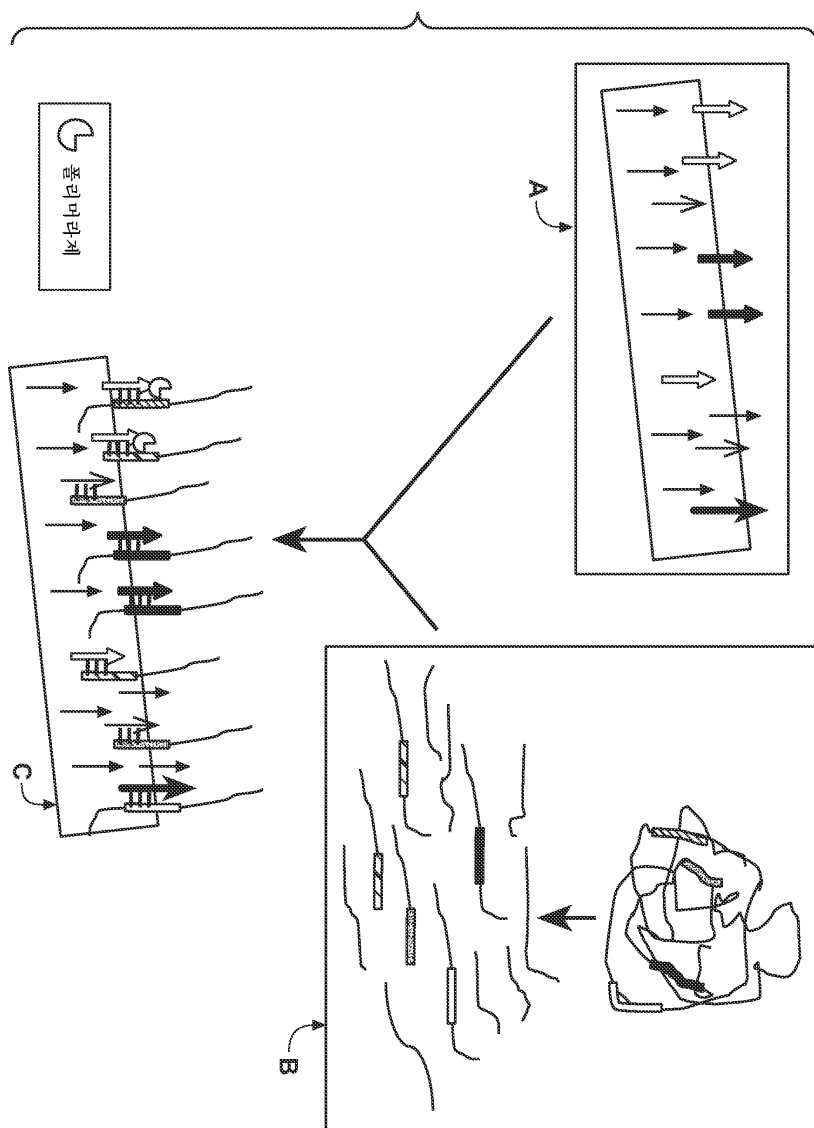
[0079] [c] 동일한 주형의 재귀적 서열분석에 의한 메틸화 상태 결정

[0080] DNA (예를 들어, 게놈 DNA)의 메틸화 상태를 결정하기 위해, 이를 도 5B 및 6B에 나타난 바와 같이 우선 적절한 크기로 전단시키고, 바람직하게는 단일 가닥으로 전환시킨다. 메틸화 올리고뉴클레오티드 (즉, 메틸시토신-함유 올리고뉴클레오티드)를 함유하는 기관, 예를 들어 어레이 (도 5A에 나타난 바와 같음) 또는 비드 (도 6A에 나타난 바와 같음)를 사용한다. 전단된 DNA를 도 5C 및 6C에 나타난 바와 같이 메틸화 올리고뉴클레오티드에 라이게이션시킨다. 이어서, 라이게이션된 DNA를 어레이 또는 비드 상의 메틸화 올리고뉴클레오티드에 상보적인 프라이머, 표지된 폴리머라제 및 표지된 dNTP (단일 분자 수준에서 DNA의 실시간 합성 동안 부가된 염기 및 폴리머라제의 직접 모니터링을 허용할 것임)를 사용하여 서열분석한다. 라이게이션된 DNA를 서열분석한 후에, 새로 합성된 가닥을 제거하고, 본래 DNA를 도 5D 및 6D에 나타난 바와 같이 비술파이트로 처리하여 메틸화 시토신을 우라실로 전환시킨다. 처리된 DNA를 프라이머, 표지된 폴리머라제 및 표지된 dNTP (단일 분자 수준에서 DNA의 실시간 합성 동안 부가된 염기 및 폴리머라제의 직접 모니터링을 허용할 것임)를 사용하여 서열분석한다. 동일한 분자로부터 비술파이트로의 처리 이전 및 이후에 수득한 서열의 비교는 DNA의 메틸화 상태를 결정할 것이다.

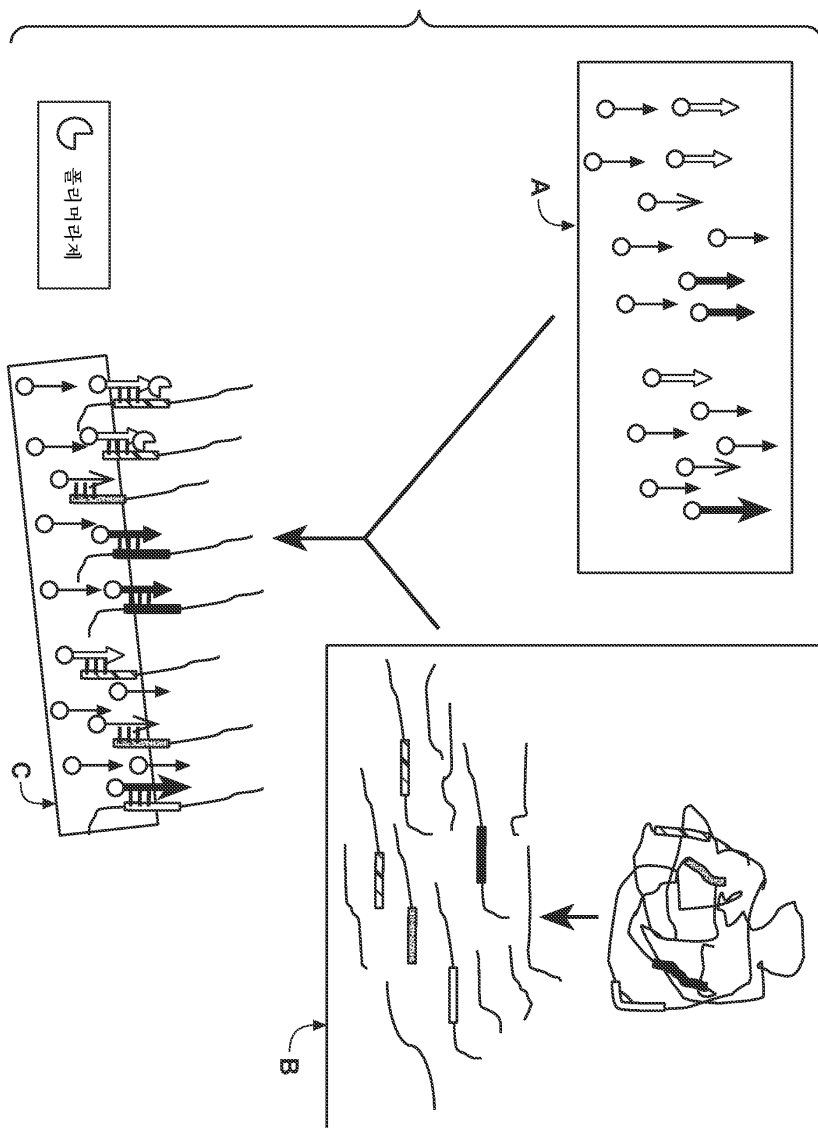
[0081] 본원에 인용된 모든 특허 및 간행물은 본원에 참고로 포함된다.

도면

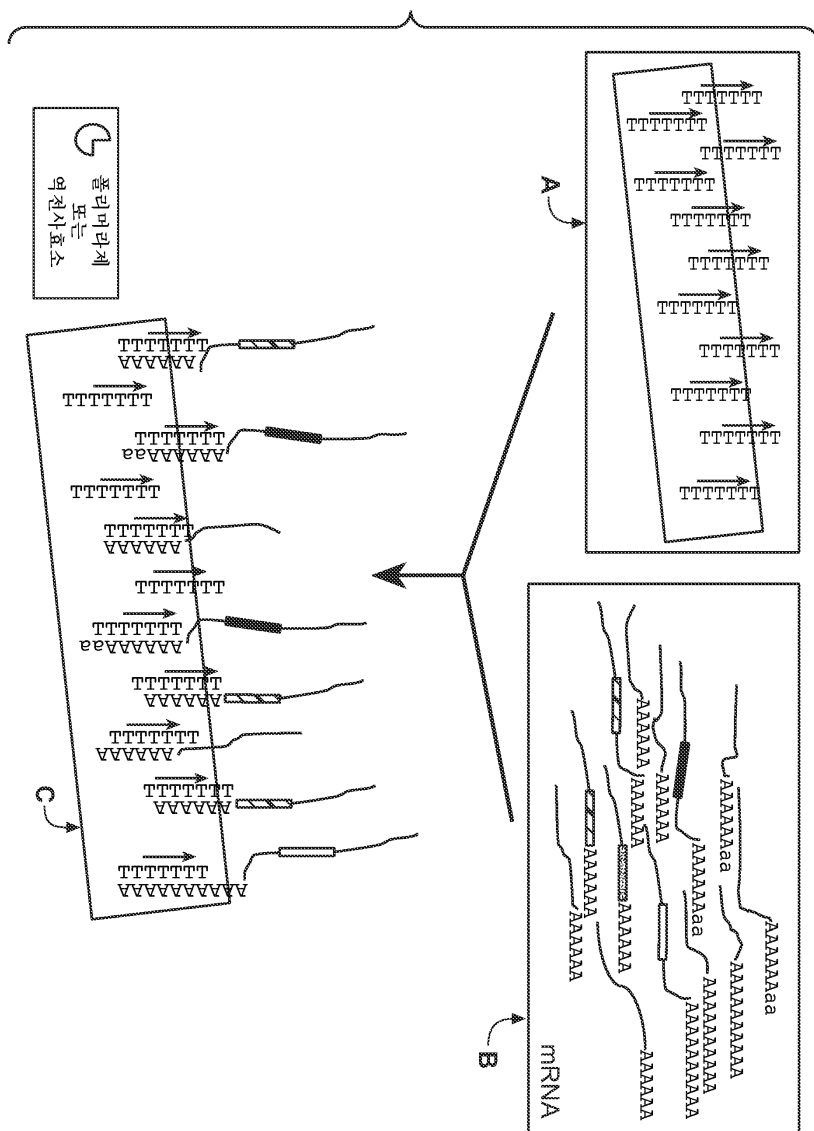
도면1



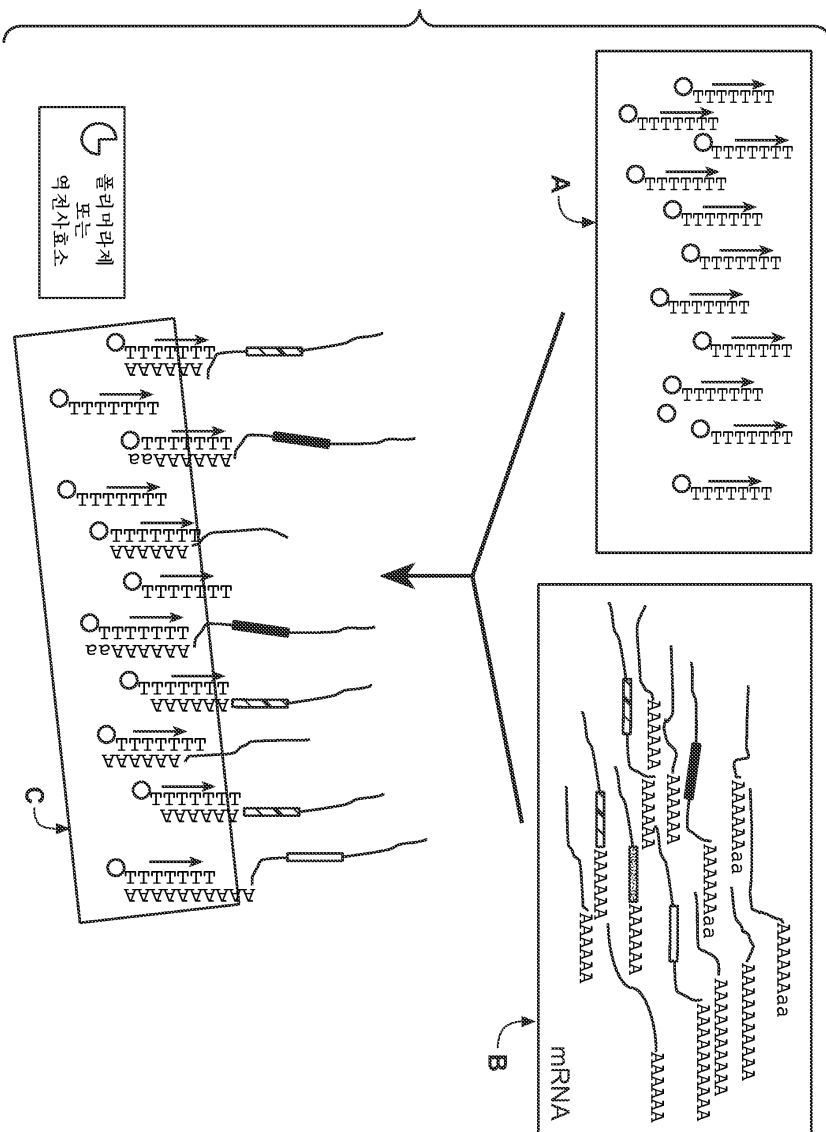
도면2



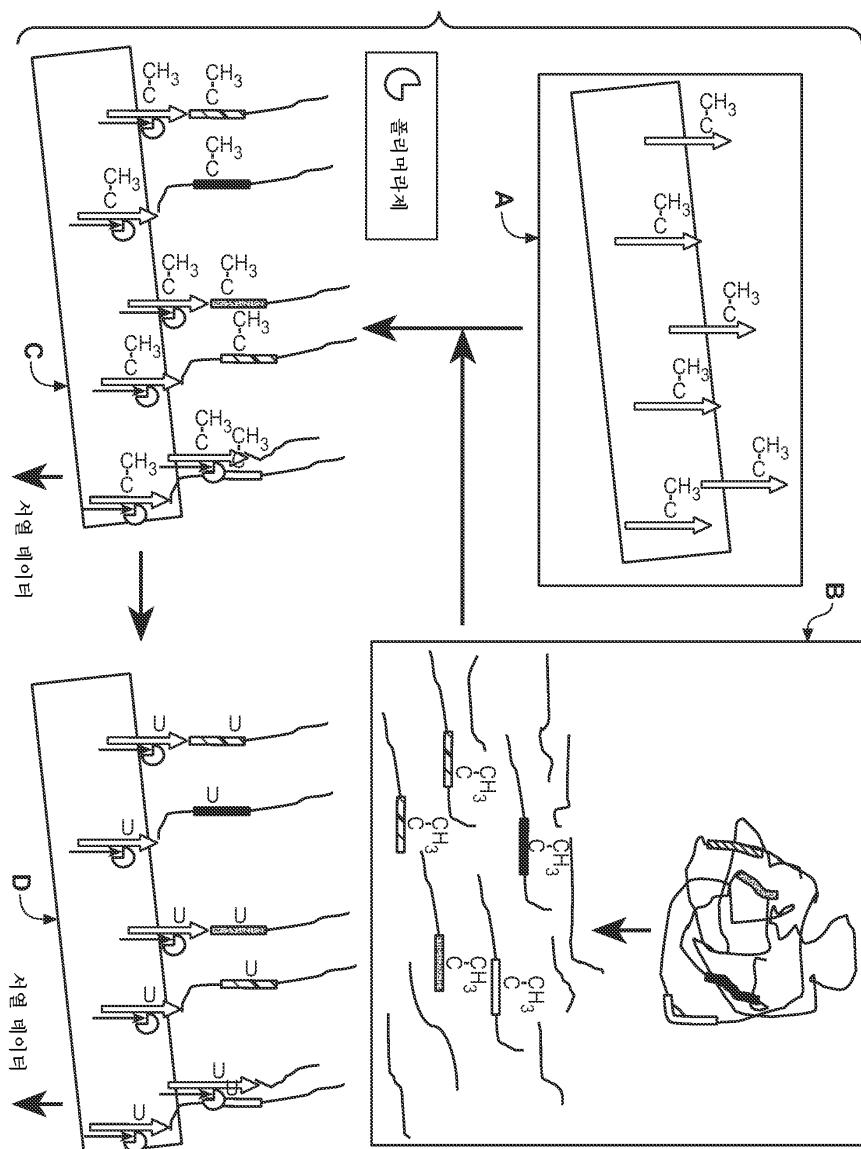
도면3



도면4



도면5



도면6

