

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. ⁶ C07H 21/04 C12P 19/34		(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2002년06월20일 10-0316498 2001년11월21일
(21) 출원번호	10-1995-0700406	(65) 공개번호	특 1995-0702999
(22) 출원일자	1995년02월04일	(43) 공개일자	1995년08월23일
번역문제출일자	1995년02월04일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1993/07138	(87) 국제공개번호	WO 1994/03472
(86) 국제출원일자	1993년07월28일	(87) 국제공개일자	1994년02월17일
(81) 지정국	국내특허 : 오스트레일리아 캐나다 일본 대한민국 노르웨이		
(30) 우선권 주장	07/925405 1992년08월04일 미국(US)		
(73) 특허권자	젠-프로브 인코포레이티드 다니엘 엘. 캐시앙, 헨리 엘. 노르호프, 피터 알. 쉬어리		
(72) 발명자	미국 캘리포니아주 92121 샌디에고 제네틱 센터 드라이브 10210 맥도노우, 쉐를, 에이취. 미합중국92122캘리포니아주샌디에고로빈스스트리트4697 캐시앙, 다니엘, 엘. 미합중국92124캘리포니아주샌디에고탐보르로드3911 디타굽타, 나니브후산 미합중국92130캘리포니아주샌디에고커루드코트4221 맥알리스터, 다이안, 엘. 미합중국92123캘리포니아주샌디에고앤솔래비뉴8664 하몬드, 필립, 더블유 미합중국92116캘리포니아주샌디에고노쓰애비뉴4620 리더, 토마스, 비. 미합중국92029캘리포니아주에스콘디도앤젤레스글렌1863 주성민		
(74) 대리인			

심사관 : 임혜준

(54) 핵산서열증폭방법

명세서

<1> 발명의 분야

<2> 본 발명은 단독으로 존재하거나 또는 동종 또는 이종의 핵산 혼합물 내의 크거나 작은 한 성분으로서 존재하는 특정 핵산 서열 또는 "표적 서열"의 카피의 수를 증가시키는 방법에 관한 것이다. 핵산의 혼합물은 진단 시험용, 환경 시험용, 연구 조사용, 시약 또는 물질 제조용, 클로닝과 같은 다른 공정용 또는 기타 목적으로 채취한 샘플에서 발견되는 것일 수 있다.

<3> 특정 핵산 서열의 선택적 증폭은 특이성을 그대로 유지시키면서 진단 및 환경 검정의 선택성을 증가시키는 데 있어서, 각종 연구 과정의 선택성, 편리함, 정밀도 및 신뢰도를 증가시키는 데 있어서, 그리고 여러 목적을 위한 특정 올리고뉴클레오타이드의 대량의 공급물을 제공하는 데 귀중한 가치가 있다.

<4> 본 발명은 실시할 때의 편리함으로 인해 환경 및 진단 시험에 사용하기에 특히 적합하다.

<5> 발명의 배경

<6> 특정 핵산 서열의 검출 및(또는) 정량화는 미생물의 동정 및 분류, 감염성 질환의 진단, 유전자 이상의 검출 및 특성화, 암과 관련된 유전자 변화의 동정, 질병에 대한 유전적 감수성의 연구, 및 여러 유형의 치료에 대한 반응의 측정을 위한 기술로서 점차 중요해지고 있다 또한, 식료품, 환경 표본, 종자 저장물 및 특정 미생물의 존재 여부를 검출할 필요가 있을 수 있는 기타 종류의 물질에 있어서 미생물을 검출 및 정량화하는 데 있어서도 그러한 기술의 용도가 점차 확대되고 있다. 상기한 검출 및(또는) 정량화의 기타 용도는, 핵산 서열의 관련성을 측정하는 것을 사용하여 범죄 혐의자를 확인하고, 친자확인 분쟁을 해결하며, 계통학적 및 계통발생학적 계보를 구축하고, 각종의 생물 형태를 분류하는 것을 도와왔던 법정 과학, 인류학, 고고학 및 생물학 분야에서 찾아볼 수 있다.

<7> 특정 핵산 서열을 검출 및 정량화하는 일반적인 방법은 핵산 혼성화 방법이다. 이 방법은 상보적 이거나 또는 본질적으로 상보적인 서열을 포함하는 두 개의 핵산 가닥이 적절한 조건 하에서 특이적으로 결합하여 이중 가닥 구조를 형성하는 능력에 기초한다. 특정 핵산 서열(소위 "표적 서열")을 검출 및(또는)정량화하기 위해서는, 이러한 표적 서열의 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 서열을 포함하는 표지된 올리고뉴클레오타이드(소위 "프로브")를 제조한다. 이 프로브를 표적 서열을 포함하고 있는 것으로 추정되는

샘플과 혼합하며, 혼성체 형성을 위해 적합한 조건을 조성한다. 만약 샘플 중에 표적 서열이 존재한다면 프로브는 그것에 혼성화된다. 이어서, 이 프로브-표적물 혼성체를 여러 방법중 한 방법으로 단일 가닥 프로브로부터 분리시킨다. 이어서, 혼성체와 결합된 표지물의 양을 측정하여 샘플 중의 표적 서열의 양으로 나타낸다.

<8> 핵산 혼성화 검정법의 감도는 주로 프로브의 특이 활성화, 혼성화 반응의 속도 및 정도, 혼성화된 프로브와 혼성화되지 않은 프로브를 분리하는 방법의 성능 및 표지물이 검출될 수 있는 감도에 의해 제한을 받는다. 가장 감도가 높은 과정은 속도, 편리함 및 경제성과 같은 통상적인 임상 및 환경 시험을 위해 요구되는 특성중 다수가 결여될 수 있다. 또한, 이들 과정의 감도는 필요로 하는 많은 용도를 위해 충분하지 않을 수도 있다.

<9> 여러 성분들과 이러한 유형의 검정의 구성 단계와의 상호 작용으로 인해, 감도와 특이성간에는 거의 항상 역관계가 있다. 따라서, 프로브의 특이 활성을 증가시키는 것과 같은 검정의 감도를 증가시키기 위해 행해지는 단계는 잘못된 양성 시험 결과의 비율을 증가시킬 수도 있다. 감도와 특이성간의 상관성은 혼성화 검정의 감도를 향상시키는 데 심각한 장벽이 되어 왔다. 이 문제에 대한 한 해결책은 증폭 과정을 통해 존재하는 표적 서열의 양을 특이적으로 증가시키는 것일 것이다. 샘플중의 나머지 서열에 코딩된 정보는 거의 증폭시키지 않고서 표적 서열의 특정 부분을 증폭시키면 감도를 증가시킴과 동시에 특이성에 대해서 양보하지 않을 수 있다.

<10> "중합효소 연쇄 반응" 또는 "PCR"로 명명되는 핵산 서열의 특이한 증폭 방법은 Mullis(Mullis) 등의 문헌에 기술되어 있다[미합중국 특허 제4,683,195호, 동 제4,683,202호, 및 동 제4,800,159호, 유럽 특허 출원 제86302298.4호, 동 제 86302299.2호 및 동 제87300203.4호, Methods in Enzymology, 제155권, 1987, 제 335 내지 350 페이지 참조]. 이 과정은 상보적 서열인 각 가닥을 주형으로 사용하여 한꺼번에 일어나는 반복된 횡수의 프라이머 의존성 핵산 합성을 이용한다. 증폭되는 서열은 프라이머 분자의 합성 개시 위치에 의해 정해진다. 프라이머는 표적 서열 또는 그의 상보물의 제3 말단부에 상보적이고, 핵산 합성이 개시되기 위해 그러한 부위와 결합하여야만 한다. 신장 생성물의 합성이 끝나면, 다음 합성 단계가 시작되기 전에 일반적으로 가열 변성화에 의해 가닥들을 분리한다. PCR 과정에서, 양 가닥의 상보적 서열의 카피가 합성된다.

<11> 각 회의 PCR 반응의 종결시에 새롭게 합성된 가닥들을 분리하기 위해 PCR에서 사용되는 가닥 분리 단계는 흔히 가열 변성화법이다. 따라서, 가열 변성화 단계와 다음 회의 DNA 합성이 개시되는 시기 사이에는 열안정 효소가 필요하거나 또는 새로운 효소가 첨가되어야만 한다. PCR 과정의 단점은 여러 개의 상이한 온도와 극단적 온도 사이에서 반응 온도의 주기 반복이 요구된다는 것이다. PCR 과정을 보다 편리하게 만들기 위해서는, 프로그램 가능한 가열 주기화 기계가 요구된다.

<12> PCR 반응에 사용된 프라이머중 하나에 프로모터 서열을 도입한 후 수 회의 주기동안 PCR을 통해 증폭시킨 후 단일 가닥 RNA의 전사를 위한 주형으로서 이중 가닥 DNA를 사용하는, RNA 전사 과정과 PCR 과정을 결합시킨 예가 있었다(예를 들어, 무라카와(Murakawa) 등의 문헌, DNA 7:287-295 (1988) 참조).

<13> 특정 핵산 서열을 증폭시키기 위한 다른 방법들은, 프로모터 서열 포함 프라이머를 사용하여 프로모터 서열을 포함하는 중간 단계의 이중 가닥 DNA 분자를 제공하는, 일련의 프라이머 혼성화 단계, 신장 단계 및 변성화 단계를 포함한다. 상기 이중 가닥 DNA는 표적 서열의 RNA 카피를 다수 생성하기 위하여 사용된다. 얻어진 RNA 카피는 추가의 카피를 생성하기 위한 표적 서열로 사용될 수 있고, 여러 주기들이 병렬적으로 행해질 수 있다[예를 들어, 부르그(burg) 등의 국제 공개 제 89/1050호; 진저라스(Gingeras) 등의 동 제88/10315호(소위 "전사 증폭 체계 (transcription amplification system)" 또는 TAS); 카시안(kacian) 및 훌츠 (Fultz)의 유럽 특허 출원 제89313154호; 데이비(Davey) 및 말렉(Malek)의 동 제88113948.9호; 말렉 등의 국제 공개 제91/02818호 참조].

<14> 월커(Walkwer) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89:392-396 (1992년 1월)]은 본 발명의 선행 기술로서는 인정되지 않지만, 최초 표적 서열을 생성하기 위한 제한 엔도뉴클레아제와 신장 반응 및 이에 따른 증폭을 가능하게 하기 위하여 DNA/DNA 복합체에 니킹(nicking) 효소를 사용하여, DNA 주형으로서 사용하기 위한 올리고뉴클레오티드 유도 증폭 방법을 기술하고 있다. 벡커(Becker) 등의 유럽 특허 출원 제88306717.5호는 프라이머를 표적 서열에 혼성화시키고, 생성된 이중 가닥 분자를 신장 반응 및 증폭시키기 전에 절단하는 것으로 이루어지는 증폭 방법을 기술하고 있는데, 프라이머가 혼성화 영역을 지나 신장되는 경우에는 신장시키기 전에 절단할 필요가 있으며, 임의의 불필요한 신장 반응이 증폭 단계 이전에 생기지 않도록 하기 위해 프라이머를 그의 제3 말단에서 차단시켜야만 한다. 우르데아 (Urdea)의 국제 특허 제91/10746호는 T7 프로모터 서열을 혼입시키는 시그널 증폭 방법을 기술하고 있다.

<15> 핵산을 증폭시키는 다른 방법에는 유럽 특허 출원 제320,308호에 기술되어 있는 리가아제 연쇄 반응(LCR)이 있으며, 이 방법에서는 4개 이상의 개별 올리고프로브가 사용되며, 제3 및 제4 올리고프로브가 제1 및 제2 올리고프로브와 혼성화됨으로써 연결(ligation)시 변성 및 검출될 수 있는 결합된 프로브를 형성하도록, 이 올리고프로브들 중 2개가 동일한 표적 가닥의 양 말단에 적합한 방향으로 혼성화된다. 또다른 방법은 본 발명의 선행 기술로서는 인정되지 않으나 1991년 5월 15일자로 공고된 유럽 특허 공고 제0 427 073호에 기술되어 있는 것으로서, 이 방법에서는 헤어핀(hairpin)을 형성할 수 있고 이 헤어핀에 기능성 프로모터 영역을 갖는 팔린드롬성 프로브가 표적 서열에 혼성화된 후, 표적 서열에 혼성화된 또다른 올리고뉴클레오티드에 연결되어 특정 RNA 전사체가 생성될 수 있다.

<16> RNA에 의해 유도되는 중합효소, 바람직하게는 Q β 레플리카제의 결합을 위한 인식 서열을 갖는 재조합 단일 가닥 RNA 분자를 사용하면 비교적 많은 양의 소정 RNA를 제조할 수 있다(예를 들어, 크레이머(Kramer) 등의 미합중국 특허 제 4,786,600호 참조). 특정 서열을 변형체 분자의 DNA 카피 속으로 삽입하고, 또한 이것을 발현 벡터 속으로 클론화하고, 이것을 RNA로 전사하고, 이어서 이것을 Q β 레플리카제를 사용하여 복제하기 위해서는 여러 단계가 필요하다.

<17> 정의

<18> 본 명세서에서, 다음의 용어들은 별도의 언급이 없는 한 다음 의미를 갖는다.

<19> A. 핵산

<20> "핵산"은 RNA 또는 DNA뿐만 아니라, 서열로 존재할 수 있고 본 발명의 수행을 방해하지 않는 모든 뉴클레오타이드 유사체나 그의 분자를 의미한다.

<21> B. 주형

<22> "주형"은 핵산 중합효소에 의해 복제될 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 주형은 RNA 또는 DNA중 어느 하나이고, 중합효소에 따라 단일 가닥, 이중 가닥 또는 부분적 이중 가닥 형태를 가질 수 있다. 합성된 카피는 주형에 상보적이다. 본 발명에서, 카피(copy)란 또한 당 업계에서 통상 상동 서열로 칭해지는, 주형과 대응한 RNA 또는 DNA 서열을 갖는 핵산을 말한다.

<23> C. 프라이머

<24> "프라이머"는 주형에 상보적인 올리고뉴클레오타이드로서, 주형에 혼성화하여 역전사효소 같은 DNA 중합효소에 의한 합성의 개시를 위한 프라이머/주형 결합체를 제공하며, 이 올리고뉴클레오타이드는 그의 제3' 말단에 주형에 상보적인 염기가 공유결합을 통해 추가 연결되면서 신장되어, 이 결과 프라이머 신장 생성물이 생성된다. 원래 역전사효소를 비롯한 공지된 모든 DNA 중합효소가 DNA 합성을 개시하기 위해서는 올리고뉴클레오타이드를 단일 가닥 주형에 결합("프라이밍")시킬 필요가 있다. 적절한 상황에서, 프라이머는 프로모터-프라이머의 부분이 될 수도 있다. 이러한 프라이머는 일반적으로 10 내지 100 염기 길이, 바람직하게는 20 내지 50 염기 길이를 갖는다.

<25> D. 프로모터 또는 프로모터 서열

<26> "프로모터" 또는 "프로모터 서열"은 핵산 분자에 결합하여 특정 부위에서 RNA의 전사를 개시하는 신호로 DNA 의존성 RNA 중합효소("전사효소")에 의해 인식되는 특정 핵산 서열이다. 상기 결합을 위해, 이러한 전사효소는 일반적으로 프로모터 및 그의 상보물이 이중 가닥일 것을 요하나, 주형 부분이 이중 가닥일 필요는 없다. 개개의 DNA 의존성 RNA 중합효소는 전사를 촉진하는 그의 효율면에 있어서 놀라운 정도로 다양할 수 있는 각종의 상이한 프로모터 서열을 인식한다. RNA 중합효소가 전사를 개시하기 위해 프로모터 서열에 결합하는 경우, 그 프로모터 서열은 전사된 서열의 일부는 아니다. 따라서, 이에 의해 생성된 RNA 전사체는 프로모터 서열을 포함하지 않을 것이다.

<27> E. 프로모터-프라이머

<28> 프로모터-프라이머는 프로모터와 프라이머를 포함한다. 이것은 표적 핵산 서열의 제3' 말단에서 나 또는 그 부근에서 결합하는 표적 핵산 서열의 제3' 말단에 충분히 상보적인 올리고뉴클레오타이드로서, 이것은 프로모터-프라이머가 표적 서열의 말단과 충분히 가까운 위치에서 결합하여, 검정, 시험, 클로닝 또는 증폭된 핵산의 기타 용도에 요구되는 요건들을 충족시킬 정도로 표적 서열의 충분한 증폭을 가능하게 한다는 것을 의미한다. 프로모터-프라이머는 주형으로서 사용되어 표적 핵산 서열의 제3' 말단(제3' 단부라고도 함)으로부터 신장되는 상보적 핵산 서열을 생성하여, 결과적으로 이중 가닥을 붕괴시킬 수도 있는 임의의 변형 또는 효소적으로 활성화되기 쉬운 이중 가닥 프로모터를 생성할 것이다. 이러한 프로모터-프라이머는 일반적으로 40 내지 100 염기 길이, 바람직하게는 40 내지 60 염기 길이를 갖는다.

<29> DNA- 또는 RNA 의존성 DNA 중합효소는 또한 주형으로서 표적 서열을 사용하여 표적 핵산 분자에 상보적인 가닥을 생성한다.

<30> F. 변형 프라이머 또는 프로모터-프라이머

<31> 프라이머 또는 프로모터-프라이머의 제3' 말단은 이로부터 진행되는 신장 반응의 속도 및(또는) 정도를 저지 또는 저하시키기 위하여 변형 또는 차단시킬 수 있다. 변형된 것 및 비변형된 것 모두를 갖는 프라이머 또는 프로모터-프라이머는 본 발명의 목적에 맞는 본질적으로 동일한 핵산 서열로 이루어진다. 즉, 변형 프라이머 또는 프로모터-프라이머는 변형 및 비변형된 올리고뉴클레오타이드가 모두 표적 핵산 서열상의 효과상 동일한 위치(± 약 10개의 염기)에 혼성화한다는 점에 있어서 상이한 결합 서열(프라이머)을 포함하지 않는다. 또한, 변형 프로모터-프라이머는 비변형 프로모터-프라이머와 상이한 인식 서열(프로모터)을 함유하지 않는다. 이것은, 약 10개의 염기내에서는 변형 및 비변형된 프라이머 또는 프로모터-프라이머가 동일하고, 동일한 RNA 중합효소에 의해 인식되며, 다소간의 동일 표적 서열(비록 반드시 정확하게 동일한 그 위치는 아니지만)에 혼성화한다는 것을 의미한다. 바람직한 실시 태양에서, 변형 및 비변형된 프라이머 또는 프로모터-프라이머는 변형된 것을 제외하고는 동일하다.

<32> 프라이머 또는 프로모터-프라이머의 표적 상보적 부분의 제3' 말단은 당 업계의 숙련자들에게 공지되어 있는 각종의 방법으로 변형시킬 수 있다. 프로모터-프라이머에 대한 적절한 변형은 리보뉴클레오타이드, 3' -데옥시뉴클레오타이드 잔기, 예컨대 코르디세핀(Cordycepin, CO, 글렌 연구소 : Glen Research), 3' ,2' -디데옥시 뉴클레오타이드 잔기, 포스포로티오에이트와 같은 비(非)포스포디에스테르 골격 결합을 갖는 변형된 뉴클레오타이드, 및 아놀드(Arnold) 등의 PCT 출원 제US 88/ 03173호에 기재되어 있는 비뉴클레오타이드 결합(RS) 또는 알칸-디올 변형체 [윌크(Wilk) 등의 문헌(Nuc. Acids Res. 18 : 2065, 1990)에 기재되어 있음](RP)를 첨가하는 것이 포함되거나, 또는 이러한 변형은 단순히 표적 핵산에 비상보적인 혼성화 서열에 대한 하나 이상의 뉴클레오타이드 잔기 3' 로 이루어질 수 있다. 물론, 다른 효과적인 변형도 역시 가능하다.

<33> 증폭 반응에서는 변형 및 비변형된 올리고뉴클레오타이드의 혼합물이 사용될 수 있으며, 비변형 올리고뉴클레오타이드에 대한 변형 올리고뉴클레오타이드의 비율은 넓은 범위, 예컨대 1:1 내지 1,000:1로 하여 사용할 수 있다. 또한, 상이한 3' 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 혼합물을 사용할 수도 있다.

<34> G. 플러스(+) 및 마이너스(-) 가닥(들)

<35> 핵산 합성에 관한 논의는 핵산 이중 가닥의 두 개의 상보적 가닥을 명명하는 용어를 채택함으로써 크게 단순화 및 명료화된다. 전통적으로, 단백질 또는 RNA 구조체를 생성하는 데 사용되는 서열을 코딩하는 가닥은 "플러스" 가닥으로, 그리고 그의 상보물은 "마이너스" 가닥으로 명명된다. 현재 많은 경

우에, 양 가닥은 기능적인 것으로 알려져 있고, 따라서 한 가닥에 "플러스"라는 명칭과 다른 한 가닥에 "마이너스"라는 명칭을 부여하는 것이 임의적인 것임에 틀림없다. 그럼에도 불구하고, 이들 용어는 핵산의 서열 배열을 명명하는 데 매우 유용하고, 본 발명에 서는 그러한 목적으로 "플러스" 가닥이 제1 프라이머 또는 프로모터-프라이머와 결합하는 본래의 표적 서열 가닥을 의미하는 것으로 사용될 것이다.

<36> H. 표적 핵산 서열, 표적 서열

<37> "표적 핵산 서열" 또는 "표적 서열"은 증폭하고자 하는 목적 핵산 서열을 가지며, 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고, 증폭되거나 또는 증폭되지 않을 수 있는, 증폭시키고자 하는 서열의 다른 5' 또는 3' 서열을 포함할 수 있다.

<38> 표적 핵산 서열은 본 발명을 실행하는 동안 프로모터-프라이머가 혼성화하는 복합 서열을 포함한다. 표적 핵산 서열이 본래 단일 가닥인 경우에, 이 용어는 (+) 또는 (-) 가닥 중 어느 하나를 의미하며, 또한 표적 서열에 상보적인 서열을 의미할 것이다. 표적 핵산 서열이 본래 이중 가닥인 경우에, 이 용어는 (+) 및 (-) 가닥 모두를 의미한다.

<39> I. DNA-의존성 DNA 중합효소

<40> "DNA-의존성 DNA 중합효소"는 DNA 주형으로부터 상보적 DNA 카피를 합성하는 효소이다. 그 일례를 들면 박테리오파지 T7 DNA 중합효소이다. 공지된 모든 DNA-의존성 DNA 중합효소가 합성을 개시하기 위해서는 RNA 또는 DNA일 수 있는 상보적 프라이머 또는 공중합체를 필요로 한다. 적합한 상황에서, 소정 DNA-의존성 DNA 중합효소는 RNA 주형으로부터 상보적 DNA 카피를 합성할 수 있는 것으로 알려져 있다.

<41> J. DNA-의존성 RNA 중합효소(전사효소)

<42> "DNA-의존성 RNA 중합효소" 또는 "전사효소"는 (통상적으로 이중 가닥의) 프로모터 서열을 갖는 이중 가닥 또는 부분적 이중 가닥 DNA 분자로부터 RNA 카피를 다수 합성하는 효소이다. 본 발명은 프로모터-프라이머중에 단일 가닥으로 된 프로모터 서열과, 이들을 인식하는 RNA 중합효소를 포함한다는 것에 주목해야한다. RNA 분자("전사체")는 프로모터의 직하류 특정 부위에서 시작하여, RNA 분자의 5'에서 3' 방향으로 합성된다. 전사효소의 일례를 들면, 박테리오파지 T7, T3 및 SP6의 DNA-의존성 RNA 중합효소이다.

<43> K. RNA-의존성 DNA 중합효소(역전사효소)

<44> "RNA-의존성 DNA 중합효소" 또는 "역전사효소"는 RNA 주형으로부터 상보적 DNA 카피를 합성하는 효소이다. 또한, 공지된 모든 역전사효소는 DNA 주형으로부터 상보적 DNA 카피를 합성할 수 있는 능력이 있기 때문에 이들 역전사효소는 RNA- 및 DNA- 양자 의존성 DNA 중합효소이다. RNA 또는 DNA 주형중 어느 하나로 합성을 개시하기 위해서는 프라이머가 필요하다.

<45> L. RNAse H

<46> "RNAse H"는 RNA:DNA 이중 가닥 분자의 RNA 부분을 분해시키는 효소이다. RNAse H는 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제일 수 있다. 조류 마이엘로블라스토시스(myeloblastosis) 바이러스 및 몰로니(Moloney) 쥐 백혈병 바이러스 역 전사효소는 RNAse H 활성뿐만 아니라 중합효소 활성도 갖는다. 일부 클로닝된 역전사효소는 RNAse H 활성이 결핍되어 있다. 또한, 관련 중합효소 활성이 없는 RNAse H의 공급원으로서 입수가 가능한 것들이 있다. RNA:DNA 결합체로부터 RNA를 분리할 경우 변성이 생길 수도 있다. 이와 달리, RNAse H는 RNA의 일부가 용융되거나 또는 효소들이 RNA의 일부로부터 떨어지도록 여러 위치에서 RNA를 간단히 절단하거나 또는 생성된 RNA 단편은 중합효소에 의해 신장용 프라이머로 작용하도록 할 수 있다.

<47> M. 혼성화, 결합

<48> "혼성화" 및 "결합"은 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기 쌍에 의해 이중 가닥 분자(또는 "결합체")를 형성하기에 충분히 상보적인, 뉴클레오타이드 서열간의 이중 가닥 분자의 형성을 의미한다. 프로모터-프라이머 또는 프라이머가 표적물(주형)과 "혼성화"하는 경우에, 이러한 결합체(또는 혼성체)는 DNA 합성을 개시하기 위하여 DNA 중합효소에 의해 요구되는 프라이밍 기능을 하는 데 충분히 안정하다.

<49> N. 특이성

<50> 특이성은 서열 및 검정 조건에 따라 표적 및 비표적 서열을 식별하는 핵산 서열의 능력을 설명하는 핵산 서열의 특징이다.

<51> 발명의 요약

<52> 본 발명은 표적 핵산 서열의 다수 카피를 합성하는 신규의 자가촉매적 방법 (즉, 온도, pH 또는 이온 강도와 같은 반응 조건을 변화시킬 필요없이 자동적으로 순환하는 방법)에 관한 것이다.

<53> 본 발명은 표적 서열을 제1 올리고뉴클레오타이드[이 올리고뉴클레오타이드는 표적 서열의 3' -말단 부에 혼성화되기에 충분히 상보적인 결합 서열(이 서열만을 프라이머라 한다)을 가지며, 또한 이 결합 서열 5' 쪽에 이중 가닥 형태로 RNA 중합효소를 위한 프로모터로서 작용하는 서열을 포함하는 서열을 갖는다(이러한 배열을 프로모터-프라이머라 한다)] 및 제2 올리고뉴클레오타이드(이는 표적 서열의 상보물에 혼성화되기에 충분히 상보적인 결합 서열을 갖는 프라이머 또는 프로모터-프라이머이다)로, 올리고뉴클레오타이드/표적 서열 결합체가 형성되고 DNA 및 RNA 합성이 일어날 수 있는 조건하에 처리하는 것을 특징으로 한다. 본 발명에서 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드 중 하나 또는 둘다는 차단 및 비차단된 올리고뉴클레오타이드 서열(차단된 올리고뉴클레오타이드는 DNA 중합효소에 의한 프라이머 신장의 속도 및(또는) 정도를 방지 또는 감소시키기 위한 변형된 3' 말단을 갖는다)의 혼합물, 또는 상이한 3' 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 혼합물이다. 이러한 혼합물은 차단된 올리고뉴클레오타이드만을 사용하거나 비차단된 올리고뉴클레오타이드만을 사용하는 것에 비해 특이적 증폭 반응의 효율을 상당히 증진시킨다. 이러한 올리고뉴클레오타이드의 비율은 증폭될 특정 주형 서열에 따라 변할 수 있으나, 일반적으로 차단 대 비차단된 올리고

뉴클레오타이드의 비가 1:1 내지 1000:1 이다. 본 발명은 표적 서열이 정의된 3' 또는 5' -말단을 가질 것을 요하지 않는다.

<54>

본 발명의 한 국면은, (a) 표적 서열을, 표적 서열의 3' -말단부에 혼성화되기에 충분히 상보적인 결합 서열을 가지며, 또한 이 결합 서열 5' 쪽에 이중 가닥 형태로 RNA 중합효소를 위한 프로모터로서 작용하는 서열을 포함하는 서열을 갖는 제1 프로모터-프라이머 올리고뉴클레오타이드로, 올리고뉴클레오타이드/표적 서열 결합체가 형성되고 DNA 합성이 적절한 중합효소(예를 들어, DNA 중합효소)에 의해 개시될 수 있는 조건하에 처리하고; (b) 제1 올리고뉴클레오타이드/표적 결합체를 신장 반응 조건하에 인큐베이션 시켜서 표적의 3' -말단이 신장되어 RNA 중합효소를 위한 혼성 주형을 생성한 다음; (c) 이 혼성 주형을, 프로모터 서열을 인식하는 RNA 중합효소를 사용하여 표적 서열의 다수 RNA 카피가 생성될 수 있는 조건하에 인큐베이션시키는 것을 포함한다. 본 발명에는 또한 RNA:DNA 혼성체 중 RNA 부분을 선택적으로 분해하는 효소(예. RNase H)의 작용에 의해 단계(b)에서 RNA 표적 서열의 3' 말단을 생성하는 것도 포함된다. 이와 같이 생성된 RNA는 보다 많은 생성물을 생성하도록 자가촉매적으로 순환한다.

<55>

본 발명은 또 다른 방법으로서, (a) 핵산(예, RNA 또는 DNA) 표적 서열을 제1 올리고뉴클레오타이드 프라이머 또는 프로모터-프라이머와, 제1 올리고뉴클레오타이드/표적 서열 결합체가 형성되어 적절한 중합효소(예, DNA 중합효소)에 의해 DNA 합성이 개시될 수 있는 조건하에 접촉시키고; (b) 제1 올리고뉴클레오타이드를 표적이 중합효소에 의해 주형으로 사용되어(제1 프라이머가 차단되지 않은 경우) 표적에 상보적인 제1 DNA 신장 생성물을 제공할 수 있는 신장 반응 조건하에 인큐베이션시키고; (c) 표적이 RNA 분자인 경우 RNA 표적만을 선택적으로 분해하는 효소를 사용하여 RNA 표적으로부터 DNA 신장 생성물을 분리하며, 표적이 DNA 분자인 경우, 2개의 DNA 가닥을(예를 들어, 90 내지 100°C로 가열하거나 기타 수단으로) 분리하고; (d) DNA 신장 생성물을 프라이머 또는 프로모터-프라이머를 포함하며 DNA 신장 생성물의 3' -말단부에 혼성화되기에 충분히 상보적인 결합 서열을 갖는 제2 올리고뉴클레오타이드와, 이 프라이머상의 임의의 차단 분자에 따라서 제2 올리고뉴클레오타이드/신장 생성물 결합체가 형성되고 DNA 합성이 상기와 같이 개시될 수 있는 조건하에 접촉시키는 것을 특징으로 한다. 이 발명에서, 제1 올리고뉴클레오타이드가 프로모터-프라이머가 아닌 경우 제2 올리고뉴클레오타이드가 프로모터-프라이머이며, 이는 제2 올리고뉴클레오타이드가 결합 서열 5' 쪽으로 RNA 중합효소를 위한 프로모터 서열을 포함하는 것을 의미한다. 또한, 제1 및(또는)제2 올리고뉴클레오타이드는 차단 및 비차단된 올리고뉴클레오타이드의 혼합물, 또는 상이한 3' 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 혼합물로 이루어진다.

<56>

증폭 반응은 필요한 반응물과 반응 시약을 본질적으로 포함하는 혼합물 중에서 수행된다. 그러나, 그러한 혼합물은 본 발명의 증폭(예를 들어, 반응 메카니즘)에 질적인 영향을 미치지 않는 효소 또는 기타 대체물을 함유할 수 있다. 그러한 대체물은 관찰된 증폭의 양에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, 혼합물은 동일 표적 서열을 위한 다른 프로모터-프라이머를 함유하거나, "헬퍼" 올리고뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 그러한 헬퍼 뉴클레오타이드는 본 명세서에 참조로서 포함되는 호 건(Hogan)등의 미합중국 특허 제5,030,557호에 기재된 혼성화 헬퍼 프로브와 유사한 방법으로, 즉, 표적 핵산이 상당한 2차 구조를 가졌을지라도 프로모터-프라이머가 그의 표적 핵산에 결합하는 것을 도움으로써 사용된다. 그러한 헬퍼 올리고뉴클레오타이드의 사용에 있어서의 유사성에도 불구하고, 그러한 헬퍼 올리고뉴클레오타이드가 과정의 효율에 역 효과를 미치지 없이 증폭 프로토콜에 사용될 수 있다는 것은 놀라운 일이었다.

<57>

제1 올리고뉴클레오타이드가 프로모터-프라이머일 수 있고, 제2 올리고뉴클레오타이드는 프라이머일 수 있으며, 그 역도 가능하고, 또한 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드 둘다 동일한 프로모터(프로모터가 동일 RNA 중합효소에 의해 인식된다는 점에서) 또는 상이한 프로모터를 갖는 프로모터-프라이머일 수 있다. 상이한 프로모터를 사용하는 것은 증폭되는 핵산이 클로닝에 사용될 때 특히 유용하다. 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드 및 표적 서열로부터 생성된 RNA는 표적 서열이 다수 카피(이는 상보 및 상동 핵산 서열 둘 다를 의미한다)를 자가촉매적으로 합성하는데 사용될 수 있다.

<58>

본 발명의 변형된 프라이머 또는 프로모터-프라이머는 본질적으로, 주어진 프라이머 또는 프로모터-프라이머의 3' -말단 또는 그 부근(3개의 염기 이내)에 DNA 중합효소에 의한 주형상의 프라이머의 신장을 변화(감소 또는 차단)시키는 변형을 갖는 단일 핵산 서열로 구성된다. 바람직하게는 이러한 변형된 프라이머 또는 프로모터-프라이머가, 본질적으로 동일 핵산 서열로 구성된 비변형된 프라이머 또는 프로모터-프라이머와, 또한 상이한 핵산 서열의 하나 이상의 기타 프라이머 또는 프로모터-프라이머(이들은 차단 및 비차단된 올리고뉴클레오타이드의 혼합물일 수 있다)와 함께 혼합된다. 본 발명은 또한 3' 말단 또는 그 부근에 하나 이상의 변형을 갖는 프라이머 및 프로모터-프라이머의 혼합물을 사용하는 것을 포함한다.

<59>

또한, 증폭하고자 하는 서열이 DNA인 본 발명의 또 다른 국면에서, 적절한 예비 과정을 이용하는 것이 본 발명에 따라 증폭될 수 있는 RNA 카피의 생성을 증진시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 증폭 방법과 함께 사용하기 위한, 증폭되는 카피수를 증가시킬 뿐만 아니라 증폭을 위한 DNA 서열의 RNA 카피를 제공할 수 있는 예비적 과정에 관한 것이기도 하다.

<60>

또 다른 국면에서 본 발명은, 제2 프라이머 결합 부위 근처에 혼성화되어 RNase H의 기질을 형성하는 DNA 올리고뉴클레오타이드로 RNA 표적 서열을 처리함으로써, 이 RNA 표적 서열 중 정의된 5' 말단(즉, 공지 서열 중의 하나)를 생성하는 것을 특징으로 한다. 상기 DNA 올리고뉴클레오타이드 기질은 RNase H에 의해 절단되어 RNA 표적의 5' 말단을 정의하고, 이는 상술한 바와 같이 증폭될 수 있다.

<61>

또 다른 국면으로서, 본 발명은 DNA 중합효소(예를 들어, 역전사효소) 및 DNA-의존성 RNA 중합효소(전사효소)가 효소적 혼성화-분리 단계를 통해 협동적으로 작용하여 생성물을 제조하고, 이 생성물 스스로 추가의 생성물을 생성할 수 있어서, 열 사이클링과 같은 반응 조건의 조작을 필요로 하지 않는 자가촉매적 반응을 유도하는 것을 포함한다. 예비적 과정을 포함하는 본 발명의 몇몇 태양에서 예비적 과정의 초기 단계를 제외한 모든 단계가 한 온도에서 수행된다.

<62>

본 발명은 임상적, 환경적, 법의학 및 기타 샘플 중 특정 핵산 표적 서열을 검출하고(하거나) 정량하는 검정법 또는 각종 용도를 위해 특정 표적 서열의 DNA 및(또는) RNA 카피를 다수 생산하는 검정법의 일부로서 이용될 수 있다. 이러한 방법은 또한 클로닝을 위한 DNA 표적의 다수 개의 DNA 카피를 생

산하거나, 프로브를 생산하거나 서열화를 위해 RNA 및 DNA 카피를 생산하는 데 사용될 수도 있다.

<63> 전형적 검정법의 한 예에서, 증폭시퀀(RNA 또는 DNA 표적을 함유하는) 샘플을 완충제, 염(예, 마그네슘과 같은 2가 양이온), 뉴클레오타이드 트리포스페이트, (차단 및(또는) 비차단된) 프라이머 및(또는) 프로모터-프라이머, 디티오프로판올과 같은 티올 환원제 및 스퍼미딘과 같은 다가양이온을 함유하는 완충 농축물과 혼합한다. 반응을 임의로는 100 °C 부근에서 인큐베이션시켜 존재하는 2차 구조를 변성시킨다. 실온(약 20°C)로 냉각시킨다. DNA 및 RNA 의존성 DNA 중합효소 활성화, RNase H 활성화 및 DNA 의존성 RNA 중합효소 활성을 함유하는 효소들을 가한 다음, 혼합물을 37 내지 42 °C에서 약 10분 내지 4시간 동안 배양시킨다. 이어서, 발광성 표지된 프로브를 가하고, 60°C에서 10 내지 30분간 인큐베이션시키고, 비혼성화 프로브상의 표지물을 선택적으로 가수분해하는 용액을 가하고, 반응 혼합물을 60 °C에서 5 내지 10분 동안 인큐베이션시킨 후, 발광 측정계 중 잔류 화학적 발광을 측정함으로써 검정할 수 있다[참조: Arnold et al., PCT/US88/02746, 1988, 9월 21일자 출원, 1989, 3월 29일자 공개, 이의 기재 내용은 본 명세서에 참조로서 포함되며 "HPA"로 언급된다]. 본 발명의 생성물은 당 분야의 숙련가에 공지된 기타 여러가지 검정 시스템에 사용될 수 있다.

<64> 임의로는, 정의된 3'-말단이 없는 DNA 표적을 100°C 부근에서 인큐베이션시켜 임의의 2차 구조를 변성시키고 실온으로 냉각시킨다. 역전사효소를 가하고, 반응 혼합물을 42 °C에서 12분간 배양시킨다. 반응을 다시 100 °C 부근에서 변성시키되, 이번에는 DNA주형으로부터 프라이머 신장 생성물을 분리한다. 냉각 후, DNA 및 RNA 의존성 DNA 중합효소 활성화, RNase H 활성화 및 DNA 의존성 RNA 중합효소 활성을 갖는 효소를 가하고, 37 내지 42 °C에서 반응을 10분 내지 4시간 동안 배양시킨다. DNA 표적으로서, 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 정의된 3'-말단을 생성시킬 수 있다. 정의된 3'-말단은 본 분야에 공지된 기타 수단으로 생성시킬 수 있다.

<65> 또 다른 국면으로서, 본 발명은 본질적으로는, 서로 반대의 센스이며 표적 핵산 서열 및 그의 상보 서열의 3'-말단 각각 또는 그 부근에 혼성화될 수 있는 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드(여기서, 올리고뉴클레오타이드 중의 하나는 프로모터-프라이머이고 다른 하나는 프라이머 또는 프로모터-프라이머일 수 있으며, 올리고뉴클레오타이드 중 하나 또는 둘다가 본질적으로, 변형된 또는 비변형된 3'-말단을 갖는 단일 핵산 서열의 혼합물을 함유한다), DNA 의존성 DNA 중합효소, RNA-의존성 DNA 중합효소 및 RNA 중합효소를 함유하는 조성물(여기서, 혼합물은 유효하게 일정한 pH, 농도 및 온도에서 증폭이 일어나게 한다. 즉, 상기 조건 중 어느 하나도 사용자에게 의해 실제로 변화될 필요가 없다)을 특징으로 한다. 조성물은 또한 RNase H 활성화 및(또는) 본 명세서에 기재된 기타 성분들을 포함할 수 있다.

<66> 본 발명의 또 다른 국면은 본 증폭 방법, 또는 상술한 바와 같은 기타 증폭 방법에 유용한 특정 서열이 포함된 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 키트를 특징으로 한다. 그러한 서열은 하기 서열 목록에 기재된 것들을 포함하며, 효소(예, 중합효소 또는 제한 엔도뉴클레아제)에 의해 인식되는 기타 서열에 결합될 수도 있다. 특히, 이들 올리고뉴클레오타이드는 마이코박테리움 핵산, 예를 들어 엠, 튜버쿨로시스의 핵산을 증폭시키는 데 유용하며, 상기한 바와 같은 변형된 3'-말단을 가질 수 있다.

<67> 본 발명에 사용된 물질들은 진단용 키트 또는 진단 과정에 또는 기타 과정에 사용하기 위한 다른 히트의 일부로서 포함될 수 있으며, 본 발명은 키트 포맷에서 제공될 수 있는 다중-웰 기법에 적용시킬 수 있다.

<68> 도면의 간단한 설명

<69> 제1도는 RP로서 지칭되는 알칸-디올 변형체의 구조를 나타낸다.

발명의 상세한 설명

<70> 본 발명에 따르면, 특정 핵산 표적 서열을 검출 및(또는) 정량화하기 위한 검정법에 사용하거나 또는 각종 용도에 쓰이는 특정 표적 서열의 DNA 및(또는) RNA를 다수의 카피로 제조하기 위한, 특정 핵산 표적 서열의 신규 증폭 방법, 조성물 및 키트를 제공한다.

<71> 본 발명은 비-특이적 부생성물을 감소시키는 비율의 동일한 핵산 서열로 본질적으로 이루어진, 차단 및 비-차단된 프로모터-프라이머의 혼합물, 또는 상이한 3'변형을 갖는 프로모터-프라이머를 사용하여 표적 서열의 RNA 카피를 합성하는 증폭 방법을 유리하게 제공한다. 본 발명에서, 증폭 방법은 광범위한 조건하에서 자발적으로 그리고 일정한 온도에서 일어난다. 하기에 기재하는 증폭 반응들은 일련의 필연적인 단계를 거친다. 각각의 단계의 상대 속도는 증폭 생성물의 유효 수율을 결정할 것이다. 차단 및 비차단된 프라이머의 혼합물을 사용하면 부 반응을 감소시켜서 증폭을 증진시킨다. "프라이머-다이머"와 같은 부 생성물이 증폭 반응의 효율에 영향을 미치는 것으로 문헌에 개시되어 있고, 당업계에 널리 공지되어 있다. 본 발명은 이러한 부 생성물의 생성 효율을 감소시켜서 증폭 효율을 개선한다.

<72> 본 발명에 적절한 DNA 중합효소로는 조류의 골수아구증 바이러스(AMV) 역 전사효소 및 몰로니 쥐의 백혈병 바이러스(MMLV) 역전사효소와 같은 역전사효소를 들 수 있다. 본 발명에서 사용되는 프로모터-프라이머 중으로 혼입하는 데에 적절한 프로모터 또는 프로모터 서열은 그 서열을 인식하고 그 서열에 결합하며 RNA 전사체를 생성함으로써 전사 과정을 개시하는 RNA 중합효소에 의해 특이적으로 인식되는 핵산 서열(자연 발생되거나, 합성하거나 또는 제한 엔도뉴클레아제소화에 의하여 얻음)이다. 출발 서열을 인식할 수 있는 공지되고 임수가능한 중합 효소가 있는 프로모터 서열이 사용하기에는 특히 적절하다. 이러한 프로모터는 박테리오파아지 T3, T7 또는 SP6로부터 얻은 것들과 같은 임의의 박테리오파아지 중합효소에 의해 인식되는 것들을 포함한다. 이 서열은 임의로는 RNA 중합효소에 대한 실제의 인식 부위 이상으로 신장되는 뉴클레오타이드 염기를 포함할 수 있어서, 분해 과정에 안정성 또는 민감성을 부여하거나 또는 전사 효율을 개선할 수 있다.

<73> 본 발명에 사용하기에 적합한 일부 역전사효소가 AHV 또는 MHLV 역전사효소와 같은 RNase H 활성을 가지더라도, 이 콜라이(E. coli) RNase H와 같은 외생의 RNase H를 가하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 실시예(아래를 참조)가 외래 RNase H를 가하는 것을 필요로 하지 않는다고 하더라도, AMV 역전사효소내에 존재하는 RNase H 활성은 반응 혼합물 중에 존재하는 비교적 다량의 이중 DNA에 의해 억제될

수 있다; 이 문제를 해결하는 한 가지 방법은 외생성 RNase H를 가하는 것이다. RNase H를 가하는 것이 요구되는 다른 경우는 올리고뉴클레오타이드가 표적 RNA 상에서 내부적으로 혼성화하는 때이다(즉, 표적 서열 뉴클레오타이드가 올리고뉴클레오타이드의 3' 및 5' 말단 모두를 지나 신장됨에 따라 올리고뉴클레오타이드가 혼성화됨).

<74> 본 발명은 제1 DNA 신장 반응에 의해 제조된 RNA-DNA 결합체를 분리하는 데에 변성 단계를 필요로 하지 않는다. 이러한 변성 단계는 실질적으로 반응 혼합물의 온도를 증가시키고(일반적으로 주변 온도에서 약 80°C 내지 약 105°C로), 그의 이온 강도를 감소시키며(일반적으로 10 x 이상), 또는 pH를 변화(일반적으로 pH를 10 이상으로 증가시킴)시키는 것과 같은 반응 조건의 조절을 필요로 한다. 이러한 반응 조건의 조절은 종종 효소 활성에 유해한 영향을 주고, 추가의 효소를 가하도록 하며, 또한 반응 혼합물을 더 조절하여 추가의 핵산 합성을 위하여 적절한 상태로 되돌리도록 한다.

<75> 혼합물 중의 제2 올리고뉴클레오타이드는 제1 올리고뉴클레오타이드와 유사하게 차단되거나 또는 변형될 수 있다. 본 발명의 한 면으로, 제1 올리고뉴클레오타이드가 변형되지 않는 경우, 제2 올리고뉴클레오타이드는 변형된다. 또한, 제1 올리고뉴클레오타이드가 프로모터-프라이머가 아닌 경우, 제2 뉴클레오타이드는 프로모터-프라이머이다. 또한, 제1 올리고뉴클레오타이드가 단지 프라이머인 경우, 이는 차단되지 않을 수 있고, 이 때 제2 올리고뉴클레오타이드는, 본질적으로는 단일한 핵산 서열로 이루어진 차단 및 비-차단된 성분 모두를 포함하는 프로모터-프라이머이다.

<76> 놀랍게도, 동일한 핵산 서열로 본질적으로 이루어진 상기와 같은 차단 및 비-차단된 올리고뉴클레오타이드의 혼합물은 비-특이적 생성물의 생성량을 감소시킴으로써 증폭의 효과를 향상시킨다.

<77> 제조된 RNA 카피 또는 전사체는 추가 조작할 필요없이 자가촉매적으로 증가될 수 있다.

<78> 본 발명의 또 다른 면으로는, 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드는 모두 프로모터-프라이머이고, 이 중 어느 하나 또는 모두는 각각 변형된 및 변형되지 않은 프로모터-프라이머 모두로 이루어질 수 있다. 상기의 경우에, 증폭 이외의 목적(예, 클로닝)을 위해 제2 프로모터를 도입하는 것이 아니라면 두 프로모터는 동일한 RNA 중합효소에 의해 인식되는 것이 바람직하다. 두 올리고뉴클레오타이드가 프로모터-프라이머인 경우에, 이중-가닥 주형의 양 가닥에 상보적인 전사체를 자가촉매 반응중에 제조할 수 있으며, 합성된 표적 서열의 카피의 수는 증가될 것이다.

<79> 제1 올리고뉴클레오타이드(프라이머 또는 프로모터-프라이머)가 표적 서열의 한 말단을 한정함에 따라, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드(프라이머 또는 프로모터-프라이머)는 다른 말단을 한정한다는 것을 유의하라; 이들 말단은 또한 특이적 제한 엔도뉴클레아제에 의하여, 또는 기타 다른 적절한 수단(이는 천연 3'-말단을 포함할 수 있음)에 의하여 한정될 수 있다. RNA 전사체는 원래의 표적 핵산과는 상이한 말단을 가질 수 있지만, 제1 올리고뉴클레오타이드와 제2 올리고뉴클레오타이드사이의 서열은 원상으로 존재한다. 상기 제조된 RNA 전사체는 추가 조작할 필요없이 상기 시스템 내에서 자동적으로 재순환될 수 있다. 따라서, 이 반응은 자가촉매적이다.

<80> 또한, 어느 올리고뉴클레오타이드도 그의 최초 서열에 실질적으로 생성되는 이중 가닥 DNA에 여분의 뉴클레오타이드 서열을 가할 수 있는 뉴클레오 서열 5'를 가질 수 있다는 것을 유의하라; 여분의 뉴클레오타이드 서열은 프로모터 서열에 한정되는 것은 아니다.

<81> 다른 실시태양으로, 본 발명은 단지 차단 올리고뉴클레오타이드, 또는 단지 비-차단된 올리고뉴클레오타이드, 또는 3'-말단에 또는 그 부위에 상이한 변형체의 혼합물로 된 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 프로모터-프라이머를 제공하는 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드로 이루어질 수 있다.

<82> 추가의 실시태양으로, 증폭을 개선하기 위한 첨가제의 존재하에 증폭을 수행할 수 있다. 디메틸 술폭사이드, 디메틸 포름아미드, 에틸렌 글리콜, 글리세롤 또는 아연과 같은 예들이 사용되어 왔다.

<83> 반응 혼합물의 성분들을 단계적으로 또는 한 번에 가할 수 있다. 반응은 유리하게는 성분 효소와 같은 반응 성분들의 안정성을 유지하기 위한 적절한 조건하에서 그리고 증폭 반응의 과정 중에 반응 조건을 변형 또는 조작하지 않고 수행한다.

<84> 본 발명을 임상적, 환경적, 법정상, 및 유사 샘플 내에서 특정 핵산 표적 서열을 검출 및(또는) 정량화하기 위한 또는 각종 용도의 특정 표적 서열의 DNA 및(또는) RNA의 카피를 다수로 제조하기 위한 검정법의 구성요소로서 사용할 수 있다.

실시예

<85> 서론

<86> 하기의 실시예를 통해 본 발명의 방법의 유용성을 증명한다. 이로서 본 발명을 한정하는 것은 아니며, 그렇게 간주되어서도 안된다.

<87> 별도의 지시가 없는 한 하기의 실기에 사용되는 증폭의 반응 조건은 42 °C에서 1 시간 동안 100 μ l 용적 중의 50 mM 트리스-HCl, 35 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 15 mM N-아세틸-시스테인, 4 mM rATP, 4 mM rCTP, 4 mM rGTP, 4 mM rUTP, 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1 mM dTTP, 10% 글리세롤, 10% 디메틸 술폭사이드, 300-600 단위 MMLV 역전사효소, 200-400 단위 T7 RNA 중합효소, 각각 0.15 μ M 프라이머 또는 프로모터-프라이머, 및 명시된 양의 주형 또는 효소이다. 유리하게는 디티오프레이톨, 스피미딘 및(또는) 폴리에틸렌이민(PEI) 또한 반응 혼합물에 가할 수 있다.

<88> 하기의 실시예에 사용되는 효소는 T7 또는 T3 RNA 중합효소 및 몰로니 쥐의 백혈병 바이러스(MMLV) 역전사효소이다. 상이한 프로모터 특이성을 갖는 기타 RNA 중합효소 또한 적절하다.

<89> 상대 증폭을 다음과 같이 측정하였다. 증폭 반응 혼합물의 샘플(일반적으로 10 μ l)을 약 75 fmol 프로브, 0.1 M 리튬 숙시네이트, pH 4.7, 2 % (w/v) 리튬 라우릴 술페이트, 15 mM 알드리티올, 20 mM

EDTA, 및 20 mM EGTA를 함유하는 발광 표지된 프로브(예를 들면, 아크리디늄 에스테르로 표지-상기 HPA 참조) 용액 100 μ l에 가하고 혼합하였다. 이어서, 반응물을 60 °C에서 20 분 동안 인큐베이션 시키고 냉각시켰다. 혼성화 반응물 각각에 0.6 M 붕산 나트륨(pH8.5, 1 % 트리톤 X-100) 300 μ l를 가하였다. 이어서 반응물을 혼합하고 60 °C에서 6 분 동안 인큐베이션시켜 비혼성화 프로브의 화학 발광 표지를 붕괴하였다. 비혼성화 프로브의 화학 발광 표지를 붕괴시키는 방법은 꽤 특이적이어서, 비혼성화 프로브의 매우 소량의 분획물만이 화학 발광으로 잔존한다. 반응물을 냉각시키고 잔존 화학 발광물을 200 μ l 0.1 % 과산화수소, 1 mM 질산, 및 계면 활성제, 및 200 μ l 1.0 N 수산화 나트륨을 가하면서 발광계 내에서 정량했다. 분석계에서, 혼성화 프로브는 광을 방출한다. 방출된 광자의 양을 발광계에서 측정하여 결과를 상대적 광 단위(Relative Light Units) 또는 RLU로서 기록하였다. 비혼성화 프로브의 화학 발광 표지를 붕괴시키는 반응은 100 % 효과적이지 않기 때문에, 일반적으로 약 1000 내지 2000 RLU의 범위 내에서 배경 농도의 신호로 존재한다.

<90> 동위원소로 표지된 프로브로의 혼성화를 이용한 분석법, 블롯팅법 및 전기영동법을 포함하여 기타 다른 분석 방법 또한 사용가능하다.

<91> 이들 반응 조건들이 반듯이 최적인 것은 아니며, 몇몇 시스템에 나타낸 바와 같이 가변적일 수 있다. 사용된 올리고뉴클레오타이드 서열은 다른 서열이 이들 또는 다른 표적 서열에 대하여 사용될 수 있으므로 예시적인 것으로 이해하여야 하며 한정적인 것으로 이해하여서는 안된다.

<92> 실시예 1

<93> 표적 RNA 내의 서열에 상보적인 변형된 프로모터-프라이머를 사용하여 증폭이 일어났다는 것을 보이기 위하여, 엠. 튜버쿨로시스(M.tuberculosis) rRNA 내의 서열에 상보적인 프로모터-프라이머(서열 번호 1)를 변화시키지 않거나 또는 3' 알칸 디올(RP) 또는 3' 코르디세핀(CO)으로 변형된 상태로 합성하고, 표적 RNA와 같은 동일 센스의 프라이머(서열 번호 2)와 표적 3 zmol을 함께 상기한 조건에서 인큐베이션시켰다. 반응물을 문헌[Hogan, 미합중국 특허 제5,030,557호, Mean for Enhancing Nucleic Acid Hybridization, 서열 번호 4 및 5]에 기재한 바와 같은 헬퍼 올리고뉴클레오타이드를 갖는 표적 RNA와 같은 동일 센스의 프로브(서열 번호 3)를 써서 분석하였다. 분석 결과, 3' 변형을 포함하는 프로모터-프라이머를 사용했을 때 의미있는 정도의 증폭이 일어나는 것으로 나타났다.

<94>	프로모터-프라이머 변화	RLU
<95>	변형 되지 않음	314,445
<96>	3' 코르디 세핀	71,382
<97>	변형 되지 않음	683,737
<98>	3'-RP	70,014

<99> 실시예 2

<100> 이 실험에서, 엠. 튜버쿨로시스 23S rRNA에 상보적인 서열의 프로모터-프라이머를 3' 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드를 사용하여 변형시켰다. 프로모터-프라이머 및 프라이머(서열 번호 6 및 7) 15 pmol을 써서 0.3 zmol의 표적 RNA를 증폭한 후, 헬퍼 프로브(서열 번호 9 및 10)를 가진 표적 RNA와 같은 동일 센스의 프로브(서열 번호 8)로 검출하였다. 그 결과, 3' 포스포로티오에이트로 변형된 프로모터-프라이머뿐만 아니라, 비변형 올리고뉴클레오타이드도 작동하는 것으로 나타났다.

<101>	프로모터-프라이머	RLU + 표적	RLU + 표적
<102>	변형되지 않음	2,614,079	899
<103>	3' 포스포로티오에이트	2,570,798	647

<104> 실시예 3

<105> 증폭 검정법에서 변형 및 비변형 프로모터-프라이머의 혼합물이 기능하는가를 밝히기 위하여, 15 pmol의 프라이머 및 프로모터-프라이머(하기 참조)를 사용하여 반응을 수행하고 실시예 1에서 기재한 바와 같이 분석하였다. 표적 RNA 3 zmol을 사용하였다.

		Pmol	프로모터-프라이머	
		변형되지 않음	CO-변형됨	RLU
실험 1	+ 표적	15	0	834,902
	+ 표적	3	12	971,938
	- 표적	3	12	1,456
실험 2	+ 표적	3	12	1,015,199
	+ 표적	0.1	15	961,041

<107> 결과는 차단 및 비차단된 올리고뉴클레오타이드의 혼합물이, 비차단 대 차단에 대한 비가 1:150일 때조차, 모두 비차단된 것들만큼 또는 그보다 더 잘 작동한다는 것을 나타낸다.

<108> 실시예 4

<109>

이 실험에서는 표적 RNA 3 zmol을 실시예 1에서와 같이 상이한 농도의 CO 차단 및 비차단된 프라이머 및 15 pmol CO 차단된 프로모터-프라이머와 0.1 pmol 비차단 프로모터-프라이머의 혼합물과 함께 인큐베이션시켰다. 생성물을 혼성화 분석법으로 검출하였다.

pmol 프라이머		RLU
차단	비차단	
0	15	969,522
10	5	802,840
13	2	648,271

<111>

만족스러운 증폭이 관찰된 것 이외에, 놀랍게도 비-주형 지정된 생성물의 양이 비차단된 올리고뉴클레오티드로 수행한 반응에 비해 차단된 올리고뉴클레오티드로 수행한 반응에서 상당히 적다는 것을 발견하였다.

<112>

실시예 5

<113>

이 실험에서는, 단일 올리고뉴클레오티드 서열과 두 개의 상이한 3' 변형체를 혼합하는 효과를 입증하였다. 표적 RNA 3 zmol을 실시예 1에서와 같이 증폭시켰다. 프로모터-프라이머를 비차단된 3'-말단, RP로 차단된 3'-말단 및 CO로 차단된 3'-말단 중 하나를 써서 합성하였다. 프라이머 2 pmol을 사용하였다.

Pmol 프로모터-프라이머			RLU
RP 변형됨	CO 변형됨	변형되지 않음	
0	15	0.1	450,157
2	13	0.01	681,647
2	13	0	678,871
5	10	0	755,839

<115>

이 실시예는 비변형 및 변형체의 혼합물 또는 변형된 프로모터-프라이머의 상이한 형태의 혼합물이 1 시간 내에 3 zmol의 RNA 표적을 검출할 뿐 아니라, 잘 증폭시킨다는 것을 나타낸다.

<116>

실시예 6

<117>

이 실험에서는, 변형 및 변형되지 않은 프라이머의 혼합물 및 프로모터-프라이머를 3 zmol 엔. 튜버쿨로시스 rRNA를 증폭하는 데에 사용하였다. 2 pmol RP-변형된 프로모터-프라이머 및 13 pmol CO-변형된 프로모터-프라이머의 혼합물을 변형된 프라이머 또는 변형되지 않은 프라이머 및 3'-포스포로티오에이트 뉴클레오티드 (PS)로 합성된 프라이머의 혼합물과 함께 인큐베이션시켰다. 서열 및 혼성화 프로브는 실시예 1에서와 같았다.

프라이머 변형체		
변형되지 않음	PS 변형됨	RLU
--	15 pmol	118,411
1 pmol	14 pmol	364,733
비 표적		1,266

<119>

이들 조건하에서, 변형 및 비변형 프라이머의 혼합물이 최선으로 작용하였다.

<120>

실시예 7

<121>

이 실험에서는, 80 zmol 나이세리아 고노르호에(*Neisseria gonorrhoeae*) rRNA를 이 rRNA에 상보적인 프라이머 (서열 번호 13) 및 표적 RNA와 동일한 센스의 28 pmol 3'-RP 차단된 및 2 pmol 비차단된 프로모터 프라이머(서열 번호 14)의 혼합물로 증폭시켰다. 몇몇 반응에서, 엔. 고노르호에(*N. gonorrhoeae*) rRNA에 혼성화할 수 있고 RNase H 기질을 생성할 수 있는 3'-차단된 올리고뉴클레오티드(서열 번호 15)를 그 증폭물에 가하였다. 반응의 분획물을 AE-표지된 프로브 및 rRNA 서열에 상보적인 두 개의 헬퍼 프로브(각각 서열 번호 16, 17 및 18)에 혼성화시켰다.

RLU - RNase H 기질 올리고 RLU + RNase H 기질 올리고

7,910	32,473
16,337	728,246
17,304	80,487
12,518	51,893

<123> 실시예 8

<124> 이 실험에서는, 프라이머(서열 번호 7) 및 T3 RNA 중합효소에 대한 프로모터를 포함하는 14 Pmol 3'-RP 차단 및 1 pmol 비차단된 프로모터 프라이머(서열 번호 19)의 혼합물을 써서 3 또는 30 zmol의 엠, 튜버쿨로시스 rRNA를 증폭시켰다. 이 반응을 450 단위의 MMLV RT를 사용하고, 200 단위의 T3 RNA 중합효소를 T7 RNA 중합효소로 대체하는 것을 제외하고는 실시예 1에서와 같이 수행하고, 반응을 40 분 후에 종결시켰다.

<125>	표적 농도	RLU 값
<126>	30 zmol	358,053
<127>	3 zmol	75,440
<128>	0 zmol	553

<129> 결과는 차단 및 비차단된 프로모터 프라이머의 혼합물이 역전사효소 및 T3 RNA 중합효소를 사용하여 RNA를 증폭하는 데에 사용할 수 있다는 것을 입증한다.

<130> 실시예 9

<131> 이 실시예에서, RP 변형된 프로모터 프라이머를 사용하는 표적 DNA의 증폭을 조사하였다. 3 zmol의 클로닝 HIV-1 DNA를 95 °C에서 5 분 동안 5'-ATAATCCACCTATCCAGTAGGAGAAAT-3'(서열 번호 20)의 프라이머 및 서열 5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACACCTTGTCTTATGTCCAGAATGCT-3'(서열 번호 21)의 프로모터 프라이머 30 pmol과 인큐베이션시켰다. 효소를 가한 후에, 반응을 37 °C에서 2 시간 동안 인큐베이션시켰다. 조건은 50 mM 트리스-HCl, 40 mM 아세트산칼륨 (pH 8), 18 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 2 mM 스퍼미딘, 6.2 mM GTP, 6.2 mM ATP, 2 mM CTP, 2 mM UTP, 0.2 mM dTTP, 0.2 mM dATP, 0.2 mM dGTP, 0.2 mM dCTP, 800 U MMLV RT, 400 U T7 RNA 중합효소였다. 프로모터 프라이머는 변형되지 않은 것이거나 또는 3' 말단에 RP로 변형된 것이었다. 반응을 그 프라이머와 같은 센스의 AE-표지된 프로브로 분석하였다. 나타낸 결과는 5 개의 중복 실험의 평균값이다.

Pmol 프로모터 프라이머

변형되지 않음	변형됨	평균 RLU
30	0	127,223
26	4	411,692
0	30	743,877

<133> 표적 DNA의 증폭, 특히, 정의된 3'-말단이 없는 것의 증폭은 변형된 프로모터 프라이머를 프라이머를 사용하여 억제할 수 없다는 것은 예측할 수 없었던 놀라운 것이었다.

<134> 본 발명의 실시태양은 모든 관점, 특히, 상기한 상세한 설명에서 보다 첨부되는 특허청구의 범위에 의해 지시되는 본 발명의 범위에서 예시적인 것이며 제한적인 것으로 간주하여서는 안되며 따라서 특허 청구의 범위의 동일성의 의미와 범위 내에서의 모든 변경도 본 발명에 포함되는 것으로 이해된다.

<135> 서열 목록

<136> (1) 일반적 정보:

<137> (i) 출원인: 쉐를 에이취. 맥도노우

<138> 다니엘 엘. 캐시앙

<139> 나니브후산 다타굽타

<140> 다이안 엘. 맥알리스트어

<141> 필립 하몬드

<142> 토마스 비. 리더

<143> (ii) 발명의 명칭: 핵산 서열 증폭 방법

<144> (iii) 서열의 수: 21

<145> (iv) 서신 주소:

- <146> (A) 주소: 라이온 & 라이온
- <147> (B) 번지: 웨스트 6 번가 611
- <148> (C) 도시명: 로스 엔젤레스
- <149> (D) 주명: 캘리포니아주
- <150> (E) 국명: 미합중국
- <151> (F) 우편 번호: 90017
- <152> (v) 컴퓨터 판독 형:
- <153> (A) 디스켓 타입: 3.5" 디스켓, 1.44 Mb 저장
- <154> (B) 컴퓨터 기종: IBM PC 겸용
- <155> (C) 작동 시스템: IBM P.C. DOS(버전 5.0)
- <156> (D) 소프트웨어: 워드퍼펙트 (버전 5.1)
- <157> (iv) 현재의 출원 데이터:
- <158> (A) 출원 번호:
- <159> (B) 출원일:
- <160> (C) 분류 기호:
- <161> (vii) 우선권 주장 출원 데이터:
- <162> 하기에 기재한 출원을 포함한, 전 우선권 주장 출원: 없음
- <163> (A) 출원 번호:
- <164> (B) 출원일:
- <165> (iii) 대리인 정보:
- <166> (A) 성명: 바르부룩, 리차드 제이.
- <167> (B) 등록 번호: 32,327
- <168> (C) 참고/서류 번호: 197/136
- <169> (ix) 통신 정보:
- <170> (A) 전화 번호: (619) 552-8400
- <171> (B) 팩스: (213) 955-0440
- <172> (C) 텔렉스: 67-3510
- <173> (1) 서열 번호 1에 대한 정보
- <174> (i) 서열 특성
- <175> (A) 길이: 55
- <176> (B) 형태: 핵산
- <177> (C) 쌍의 수: 단일쇄
- <178> (D) 위상: 직쇄상
- <179> (ii) 서열 기재 서열 번호: 1;
- GAAATTAATA CGACTCACTA TAGGGAGACC ACAGCCGTCAGGGATAA CCCCACCAAC AAGCT 55
- <181> (2) 서열 번호 2에 대한 정보
- <182> (i) 서열 특성
- <183> (A) 길이: 31
- <184> (B) 형태: 핵산
- <185> (C) 쌍의 수: 단일쇄
- <186> (D) 위상: 직쇄상
- <187> (ii) 서열 기재 서열 번호: 2:
- GGGATAAGCC TGGGAAACTG GGTCTAATAC C 31
- <189> (3) 서열 번호 3에 대한 정보
- <190> (i) 서열 특성

<191>	(A) 길이: 24	
<192>	(B) 형태: 핵산	
<193>	(C) 쉼의 수: 단일쇄	
<194>	(D) 위상: 직쇄상	
<195>	(ii) 서열 기재 서열 번호: 3:	
	GTCTTGTGGT GGAAAGCGCTTTAG	24
<197>	(4) 서열 번호 4에 대한 정보	
<198>	(i) 서열 특성	
<199>	(A) 길이: 23	
<200>	(B) 형태: 핵산	
<201>	(C) 쉼의 수: 단일쇄	
<202>	(D) 위상: 직쇄상	
<203>	(ii) 서열 기재 서열 번호: 4:	
	CCGGATAGGA CCACGGGATG CAT	23
<205>	(5) 서열 번호 5에 대한 정보	
<206>	(i) 서열 특성	
<207>	(A) 길이: 20	
<208>	(B) 형태: 핵산	
<209>	(C) 쉼의 수: 단일쇄	
<210>	(D) 위상: 직쇄상	
<211>	(ii) 서열 기재 서열 번호: 5:	
	CGGTGTGGGA TGACCCCGCG	20
<213>	(6) 서열 번호 6에 대한 정보	
<214>	(i) 서열 특성	
<215>	(A) 길이: 47	
<216>	(B) 형태: 핵산	
<217>	(C) 쉼의 수: 단일쇄	
<218>	(D) 위상: 직쇄상	
<219>	(ii) 서열 기재 서열 번호: 6:	
	AATTTAATAC GACTCACTAT AGGGAGACCA GGCCACTTCC GCTAACC	47
<221>	(7) 서열 번호 7에 대한 정보	
<222>	(i) 서열 특성	
<223>	(A) 길이: 24	
<224>	(B) 형태: 핵산	
<225>	(C) 쉼의 수: 단일쇄	
<226>	(D) 위상: 직쇄상	
<227>	(ii) 서열 기재 서열 번호: 7:	
	CGCGGAACAG GCTAAACCGC ACGC	24
<229>	(8) 서열 번호 8에 대한 정보	
<230>	(i) 서열 특성	
<231>	(A) 길이: 23	
<232>	(B) 형태: 핵산	
<233>	(C) 쉼의 수: 단일쇄	
<234>	(D) 위상: 직쇄상	

<235>	(ii) 서열 기재 서열 번호: 8:	
	GGAGGATATG TCTCAGCGCT ACC	23
<237>	(9) 서열 번호 9에 대한 정보	
<238>	(i) 서열 특성	
<239>	(A) 길이: 38	
<240>	(B) 형태: 핵산	
<241>	(C) 쇄의 수: 단일쇄	
<242>	(D) 위상: 직쇄상	
<243>	(ii) 서열 기재 서열 번호: 9:	
	CGGCTGAGAG GCAGTACAGA AAGTGTCGTG GTTAGCGG	38
<245>	(10) 서열 번호 10에 대한 정보	
<246>	(i) 서열 특성	
<247>	(A) 길이: 36	
<248>	(B) 형태: 핵산	
<249>	(C) 쇄의 수: 단일쇄	
<250>	(D) 위상: 직쇄상	
<251>	(ii) 서열 기재 서열 번호: 10:	
	GGGTAACCGG GTAGGGGTTG TGTGTGCGGG GTTGTG	36
<253>	(11) 서열 번호 11에 대한 정보	
<254>	(i) 서열 특성	
<255>	(A) 길이: 28	
<256>	(B) 형태: 핵산	
<257>	(C) 쇄의 수: 단일쇄	
<258>	(D) 위상: 직쇄상	
<259>	(ii) 서열 기재 서열 번호: 11:	
	ATAATCCACC TATCCCAGTA GGAGAAAT	28
<261>	(12) 서열 번호 12에 대한 정보	
<262>	(i) 서열 특성	
<263>	(A) 길이: 55	
<264>	(B) 형태: 핵산	
<265>	(C) 쇄의 수: 단일쇄	
<266>	(D) 위상: 직쇄상	
<267>	(ii) 서열 기재 서열 번호: 12:	
	AATTTAATAC GACTCACTAT AGGGAGACCA CACCTTGTCT TATGTCCAGA ATGCT	55
<269>	(13) 서열 번호 13에 대한 정보	
<270>	(i) 서열 특성	
<271>	(A) 길이: 30	
<272>	(B) 형태: 핵산	
<273>	(C) 쇄의 수: 단일쇄	
<274>	(D) 위상: 직쇄상	
<275>	(ii) 서열 기재 서열 번호: 13:	
	GCACGTAGTT AGCCGGTGCT TATTCTTCAG	30
<277>	(14) 서열 번호 14에 대한 정보	
<278>	(i) 서열 특성	

- <279> (A) 길이: 53
- <280> (B) 형태: 핵산
- <281> (C) 쉼의 수: 단일쇄
- <282> (D) 위상: 직쇄상
- <283> (ii) 서열 기재 서열 번호: 14:
- AATTTAATAC GACTCACTAT AGGGAGAGCA AGCCTGATCC AGCCATGCCG CGT 53
- <285> (15) 서열 번호 15에 대한 정보
- <286> (i) 서열 특성
- <287> (A) 길이: 32
- <288> (B) 형태: 핵산
- <289> (C) 쉼의 수: 단일쇄
- <290> (D) 위상: 직쇄상
- <291> (ii) 서열 기재 서열 번호: 15:
- GCTTGC GCCC ATTGTCCAAA ATTTCCCACT GC 32
- <293> (16) 서열 번호 16에 대한 정보
- <294> (i) 서열 특성
- <295> (A) 길이: 18
- <296> (B) 형태: 핵산
- <297> (C) 쉼의 수: 단일쇄
- <298> (D) 위상: 직쇄상
- <299> (ii) 서열 기재 서열 번호: 16
- TCGGCCGCCG ATATTGGC 18
- <301> (17) 서열 번호 17에 대한 정보
- <302> (i) 서열 특성
- <303> (A) 길이: 40
- <304> (B) 형태: 핵산
- <305> (C) 쉼의 수: 단일쇄
- <306> (D) 위상: 직쇄상
- <307> (ii) 서열 기재 서열 번호: 17:
- AACGGCCTTT TCTTCCCTGA CAAAAGTCCT TTACAACCCG 40
- <309> (18) 서열 번호 18에 대한 정보
- <310> (i) 서열 특성
- <311> (A) 길이: 36
- <312> (B) 형태: 핵산
- <313> (C) 쉼의 수: 단일쇄
- <314> (D) 위상: 직쇄상
- <315> (ii) 서열 기재 서열 번호: 18:
- CGTAGTTAGC CGGTGCTTAT TCTTCAGGTA CCGTCA 36
- <317> (19) 서열 번호 19에 대한 정보
- <318> (i) 서열 특성
- <319> (A) 길이: 46
- <320> (B) 형태: 핵산
- <321> (C) 쉼의 수: 단일쇄
- <322> (D) 위상: 직쇄상

- <323> (ii) 서열 기재 서열 번호: 19:
TAATATTAAC CCTCACTAAA GGGAGACCAG GCCACTTCCG CTAACC 46
- <325> (20) 서열 번호 20에 대한 정보
- <326> (i) 서열 특성
- <327> (A) 길이: 28
- <328> (B) 형태: 핵산
- <329> (C) 쇄의 수: 단일쇄
- <330> (D) 위상: 직쇄상
- <331> (ii) 서열 기재 서열 번호: 20:
ATAATCCACC TATCCCAGTA GGAGAAAT 28
- <333> (21) 서열 번호 21에 대한 정보
- <334> (i) 서열 특성
- <335> (A) 길이: 55
- <336> (B) 형태: 핵산
- <337> (C) 쇄의 수: 단일쇄
- <338> (D) 위상: 직쇄상
- <339> (ii) 서열 기재 서열 번호: 21:
AATTTAATAC GACTCACTAT AGGGAGACCA CACCTTGTCT TATGTCCAGA ATGCT 55

(57) 청구의 범위

청구항 1

표적 핵산 서열을 함유하는 샘플; 상기 표적 핵산 서열의 3'-말단 또는 그 부근에 혼성화될 수 있는 서열을 포함하는 제1 프라이머 또는 제1 프로모터-프라이머가 포함된 제1 올리고뉴클레오타이드; 상기 표적 핵산 서열의 상보물의 3'-말단 또는 그 부근에 혼성화될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 제2 프라이머 또는 제2 프로모터-프라이머가 포함된 제2 올리고뉴클레오타이드[여기서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 및 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 프로모터-프라이머를 포함하고, 이들 각각은 상기 표적 핵산 또는 그의 상보물의 동일 가닥에 혼성화될 수 있는 변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 변형 및 비변형 올리고뉴클레오타이드의 혼합물(여기서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 비변형된 올리고뉴클레오타이드에 비해 중합효소에 의한 상기 올리고뉴클레오타이드의 신장이 감소 또는 차단되게 변형된 것임)을 포함한다]; 하나 이상의 DNA 및(또는) RNA 의존성 DNA 중합효소; 및 상기 제1 또는 제2 프로모터-프라이머 중 하나 또는 둘다의 안에 있는 프로모터를 인식할 수 있는 RNA 중합효소를 포함하는, 제1 올리고뉴클레오타이드/표적 서열 결합체가 형성되고 DNA 및 RNA 합성이 일어나는 조건하에 인큐베이션 시키는 것을 포함하는, 표적 핵산 서열의 다수의 상동 또는 상보적 카피를 생성시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 표적이 RNA인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 인큐베이션을 RNase H 활성의 존재하에 수행하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 변형 및 비변형된 올리고뉴클레오타이드의 상기 혼합물이 하나 이상의 알칸 디올 변형, 3' 데옥시뉴클레오타이드 잔기의 부가, 하나 이상의 리보뉴클레오타이드, 비포스포디에스테르 결합을 갖는 뉴클레오타이드, 비-뉴클레오타이드 변형, 표적에 비상보적인 하나 이상의 염기 또는 디데옥시뉴클레오타이드를 포함하는 변형을 갖는 것인 방법.

청구항 5

제1항에, 있어서, 상기 DNA-의존성 DNA 중합효소 및 상기 RNA-의존성 DNA 중합효소가 역전사효소인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 역전사효소가 RNase H 활성을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 RNA 중합효소가 박테리오파지 T7, T3, 및 SP6 RNA 중합효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 방법이 본질적으로 일정한 온도에서 수행되는 방법.

청구항 9

제2항에 있어서, DNA- 및 RNA- 의존성 DNA 중합효소가 제공되는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, RNA 표적의 5' 말단에 혼성화될 수 있는 서열을 포함하는 제3 올리고뉴클레오타이드가 제공되는 방법.

청구항 11

표적 핵산 서열을 함유하는 샘플; 반대되는 센스의 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드[상기 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드 중의 하나는 상기 표적 핵산 서열의 3'-말단 또는 그 부근에 혼성화될 수 있고, 상기 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드 중의 다른 하나는 상기 표적 핵산 서열에 상보적인 핵산 서열의 3'-말단 또는 그 부근에 혼성화될 수 있으며, 상기 제1 또는 제2 올리고뉴클레오타이드 중 하나는 제1 프로모터-프라이머이며, 변형 및 비변형된 구성원을 모두 갖는 단일 핵산 서열을 포함하며 (여기서, 상기 변형된 올리고뉴클레오타이드는 비변형된 올리고뉴클레오타이드에 비해 중합효소에 의한 상기 올리고뉴클레오타이드의 신장이 감소되게 변형된 것이다), 상기 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드 중 다른 하나는 프라이머 또는 제2 프로모터-프라이머이다]; 하나 이상의 DNA 및(또는) RNA 의존성 DNA 중합효소, 및 상기 제1 및 제2 프로모터-프라이머 중 하나 또는 둘다의 안에 있는 프로 모터를 인식하는 RNA 중합효소를 포함하는 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 표적이 RNA인 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 조성물이 RNase H 활성을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 14

제11항 또는 제13항에 있어서, 상기 DNA-의존성 DNA 중합효소 및 상기 RNA-의존성 DNA중합효소 둘다 역전사효소인 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 역전사효소가 상기 RNase 활성을 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 16

단일 핵산 서열을 포함하며, xGCCGTCACCCCACCAACAAGCT,

xGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACC,

xCCAGGCCACTTCCGCTAACC, 및 xCGCGGAACAGGCTAAACCG -CACGC

(여기서 x는 존재하지 않거나 효소에 의해 인식되는 서열이다)로 이루어진 군으로부터 선택된 올리고뉴클레오타이드, 또는 상기 단일 핵산 서열 중 어느 하나에 상보적인 올리고뉴클레오타이드.

청구항 17

xGCCGTCACCCCACCAACAAGCT, xGGGATAAGCCT

-GGGAAACTGGGTCTAATACC 및 GTCTTGTGGTGGAAAGCGCTTTAG (여기서, x는 존재하지 않거나 효소에 의해 인식되는 서열이다)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 키트.

청구항 18

xCCAGGCCACTTCCGCTAACC, xCGCGGAACAGGCTAAACC

-GCACGC 및 GGAGGATATGTCTCAGCGCTACC (여기서 x는 존재하지 않거나 효소에 의해 인식되는 서열이다)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 키트.

청구항 19

마이코박테리움(Mycobacterium) 핵산을, 단일 핵산 서열을 포함하며

xGCCGTCACCCCACCAACAAGCT, xGGGATAAGCCTGGGAAACTGGG

-TCTAATACC, xCCAGGCCACTTCCGCTAACC 및 xCGCGGAACAGGC

-TAAACCGCACGC (여기서 x는 존재하지 않거나 효소에 의해 인식되는 서열이다)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드로 증폭시키는 것을 포함하는, 샘플 중 마이코박테리움 핵산의 증폭 방법.

청구항 20

단일 핵산 서열을 포함하며 GTCTTGTGGTGG

AAAGCGCTTTAG 및 GGAGGATATGTCTCAGCGCTACC로 이루어진 군으로부터 선택된 올리고뉴클레오타이드와, 샘플에서 유래된 핵산을 혼성화시키고, 상기 올리고뉴클레오타이드가 상기 샘플 중의 핵산으로 혼성화된 것을 검출하는 것을 포함하는, 샘플 중 엠. 튜버쿨로시스(M. tuberculosis) 핵산의 검출 방법.

청구항 21

서열 xGCCGTCACCCACCAACAAGCT 및

xGGGATAAGCCTGGG AAAGTGGGTCTAATACC(여기서, x는 존재하지 않거나 효소에 의해 인식되는 서열이다)을 포함하는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 폴리머로 엠. 튜버쿨로시스 핵산을 증폭시키고, 증폭된 핵산을 서열

GTCTTGTGGTGGAAAGCGCTTTAG을 포함하는 뉴클레오타이드 폴리머로 검출하는 것을 포함하는, 엠. 튜버쿨로시스 핵산의 검출 방법.

청구항 22

서열 xCCAGGCCACTTCCGCTAACC 및

xCGCGGAACAGGCTAAACCGCACGC(여기서, x는 존재하지 않거나 효소에 의해 인식되는 서열이다)을 포함하는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 폴리머로 엠. 튜버쿨로시스 핵산을 증폭시키고, 증폭된 핵산을 서열

GGAGGATATGTCTCAGCGCTACC를 포함하는 뉴클레오타이드 폴리머로 검출하는 것을 포함하는, 엠. 튜버쿨로시스 핵산의 검출 방법.

청구항 23

제17항에 있어서, 상기 서열의 하나 이상이 변형된 3'-말단을 갖는 것인 키트.

청구항 24

제16항에 있어서, 상기 서열 또는 이것에 상보적인 올리고뉴클레오타이드가 자신의 3'-말단에 변형을 갖는 것인 올리고뉴클레오타이드.

청구항 25

제19항에 있어서, 상기 서열의 하나 이상이 변형된 3'-말단을 갖는 것인 방법.

청구항 26

제18항에 있어서, 상기 서열의 하나 이상이 변형된 3'-말단을 갖는 것인 키트.

청구항 27

제21항에 있어서, 상기 서열의 하나 이상이 변형된 3'-말단을 갖는 것인 방법.

청구항 28

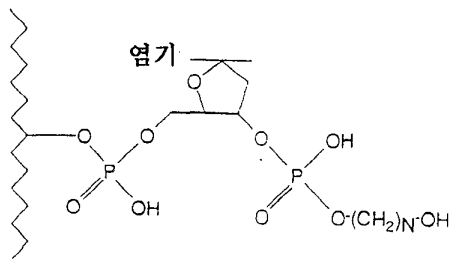
제22항에 있어서, 상기 서열의 하나 이상이 변형된 3'-말단을 갖는 것인 방법.

요약

본 발명은 실질적인 항온, 이온 강도 및 pH가 제공되는 조건하에서 표적 핵산 서열의 카피를 다수로 자가 합성하기 위한 방법, 조성물 및 키트를 제공하는데, 여기서 표적 서열의 다수의 RNA 카피는 바람직하게는 비-특정 생성물의 생성이 감소된 DNA 및 RNA 합성을 개시하기 위하여 차단 및 비차단된 프라이머 및(또는) 프로모터-프라이머를 사용한 추가의 카피를 자가 생산한다. 차단화제 또는 변형화제 중의 하나는 도면에 나타난 바의 알칸-디올이다. 본 발명은 임상적, 환경적, 법정상 및 유사한 샘플내에서의 특이적 핵산 서열, 클로닝 및 생성 프로브를 정량화하기 위한 검정법을 포함한, 목적에 사용되는 핵산 표적 서열의 카피를 생성하는 데에 유용하다.

대표도

제1도



도면

도면1

