



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0052681
(43) 공개일자 2011년05월18일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7005036

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년08월10일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2011년03월03일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/053253

(87) 국제공개번호 WO 2010/017543

국제공개일자 2010년02월11일

(30) 우선권주장

61/136,040 2008년08월08일 미국(US)

(71) 출원인

스미스 디렉션 인크.

미국 21040 메릴랜드주 에지우드 레이크사이드 불
레바드 2202

(72) 별명자

링크, 존, 로버트

미국 19808 텔라웨어주 월밍턴 바베리 드라이브
226

보이즈, 배리, 에드워드

미국 19808 텔라웨어주 월밍턴 워즈워드 드라이브
119

(74) 대리인

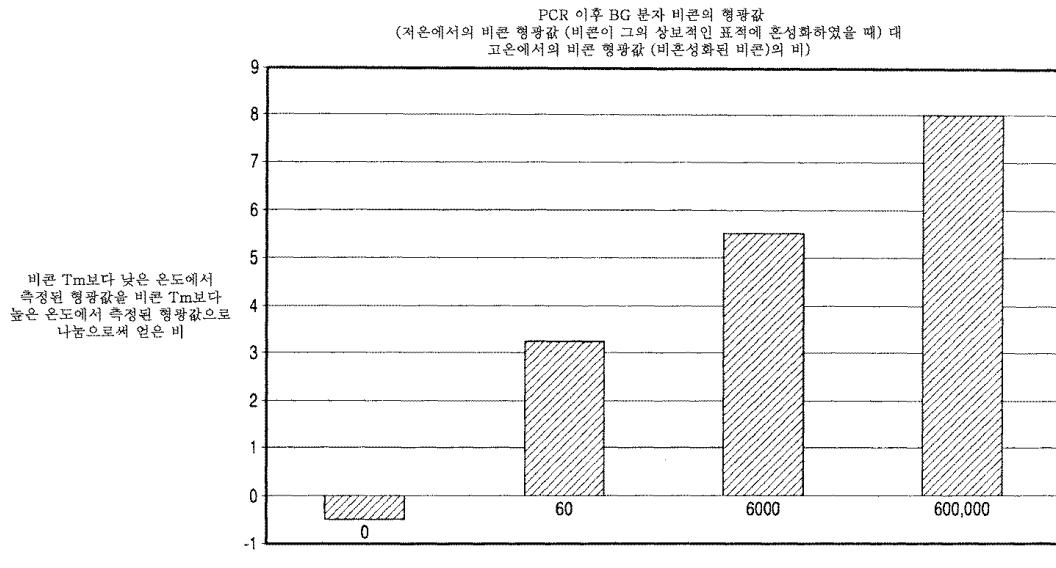
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 35 항

(54) PCR 검정을 위한 검출 알고리즘

(57) 요약

본 출원은 예를 들면, PCR 반응에서 사용되는 것과 같은, 표지된 핵산 프로브의 검출 정확도를 개선시키는 방법을 제공한다. 그러한 방법은 고온 및 저온이라는 2개의 상이한 온도에서 예를 들면, 형광과 같은 표지 강도를 측정한 후, 고온에서의 표지 강도에 대한 저온에서의 표지 강도의 비를 산출하는 것을 포함한다. 또 다른 방법은 PCR 이후 적어도 2개의 시점에서 표지 강도를 측정하고, 시간의 함수로서 표지 강도의 기울기를 산출하는 것을 포함한다. 표적 핵산에 결합하는 프로브의 혼성화 반응 속도를 측정함으로써 온-속도 기울기를 산출할 수 있고, 이를 통해 본 방법은 우수한 검출 특이성을 갖게 된다.

대 표 도

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 표적 핵산을 함유할 것으로 의심되는 샘플을 상기 표적 핵산과 혼성화하는 표지된 핵산 프로브와 접촉시키는 단계;
 - (b) 제1 온도 및 제2 온도에서 표지 강도를 측정하되, 여기서 제1 온도는 제2 온도보다 낮은 온도인 단계;
 - (c) (i) 제1 온도에서의 표지 강도 대 (ii) 제2 온도에서의 표지 강도의 비를 산출하되, 여기서 적어도 0.8의 비는 표적 핵산이 존재한다는 것을 지시하는 것인 단계
- 를 포함하는, 표지된 핵산 프로브가 그의 표적 핵산에 혼성화하는 것을 검출하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 적어도 0.9의 비가 표적 핵산이 존재한다는 것을 지시하는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 제1 온도가 표지된 핵산 프로브의 T_m 보다 낮고, 제2 온도가 표지된 핵산 프로브의 T_m 보다 높은 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 제2 온도가 약 85°C, 약 86°C, 약 87°C, 약 88°C, 약 89°C, 약 90°C, 약 91°C, 약 92°C, 약 93°C, 약 94°C, 또는 약 95°C인 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 제1 온도가 약 40°C, 약 41°C, 약 42°C, 약 43°C, 약 44°C, 약 45°C, 약 46°C, 약 47°C, 약 48°C, 약 49°C, 약 50°C, 약 51°C, 약 52°C, 약 53°C, 약 54°C, 약 55°C, 약 56°C, 약 57°C, 약 58°C, 약 59°C, 약 60°C, 약 61°C, 약 62°C, 약 63°C, 약 64°C, 약 65°C, 약 66°C, 약 67°C, 약 68°C, 약 69°C, 약 70°C, 약 71°C, 또는 약 72°C인 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 제1 온도가 약 50°C이고, 상기 제2 온도가 약 95°C인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 표지된 핵산 프로브가 형광 표지를 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 핵산 프로브가, 소광자 분자와 형광 표지가 매우 근접해 있는 경우에는 형광 표지의 형광 발산이 검출불가능하거나, 또는 소광자 분자와 형광 표지가 매우 근접해 있지 않은 경우의 것보다 적어도 더 낮도록, 형광 표지의 발산을 흡수하는 소광자 분자를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 핵산 프로브가 분자 비콘 또는 선형 프로브인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 표적 핵산이 DNA인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 표적 핵산이 RNA인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, (b) 및 (c)를 적어도 2회 반복하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 반복 측정을 기초로 하여 평균비를 산출하는 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, (b) 및 (c)를 동일한 제1 및 제2 온도에서 반복하는 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 측정하는 단계를 PCR 반응 이후에 수행하는 방법.

청구항 16

제13항 또는 제14항에 있어서, PCR 반응이

- i) 표적 핵산을 함유할 것으로 의심되는 샘플을 적합한 프라이머, 효소 및 기질을 포함하는 용액 중의 표지된 핵산 프로브와 접촉시켜 반응 혼합물을 형성하는 단계; 및
- ii) 표적 핵산의 증폭에 적합한 변성, 어닐링, 및 확장 온도에서 상기 반응 혼합물을 사이클링시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 17

(a) 표적 핵산을 함유할 것으로 의심되는 샘플을 상기 표적 핵산과 혼성화하는 표지된 핵산 프로브와 접촉시키는 단계;

(b) 적어도 2개의 상이한 시점에서 표지 강도를 측정하는 단계; 및

(c) 시간의 함수로서 표지 강도의 기울기를 산출하는 단계

를 포함하는, 표지된 핵산 프로브가 그의 표적 핵산에 혼성화하는 것을 검출하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 표지된 핵산 프로브가 표적 핵산에 결합하였을 때에 표지된 핵산 프로브에 의해 발생되는 신호의 강도가 표지된 핵산 프로브가 표적 핵산에 결합하지 않았을 때에 표지된 핵산 프로브에 의해 발생되는 신호의 강도와 비교하여 더 크다면, 이는 (+)의 기울기가 표적 핵산이 존재한다는 것을 지시하는 것인 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, (-) 또는 0의 기울기가 표적 핵산이 존재하지 않는다는 것을 지시하는 것인 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 표적 핵산이 DNA인 방법.

청구항 21

제17항에 있어서, 표적 핵산이 RNA인 방법.

청구항 22

제17항에 있어서, 표지된 핵산 프로브가 형광 표지된 핵산 프로브인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 핵산 프로브가 문자 비콘 또는 선형 프로브인 방법.

청구항 24

제17항에 있어서, 측정하는 단계를 등온 조건 동안 수행하는 방법.

청구항 25

제17항에 있어서, 측정하는 단계를 PCR 반응 이후에 수행하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 측정하는 단계를 PCR 반응 종결 이후 경과 시간 약 1분 내지 약 10분 이내에 종결하는 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, 측정하는 단계를 적어도 5개의 상이한 시점에서 수행하는 방법.

청구항 28

제25항에 있어서, PCR 반응이

- i) 표적 핵산을 함유할 것으로 의심되는 샘플을 적합한 프라이머, 효소, 기질 및 완충액을 포함하는 용액 중의 표지된 핵산 프로브와 접촉시켜 반응 혼합물을 형성하는 단계; 및
- ii) 표적 핵산의 증폭에 적합한 변성, 어닐링, 및 확장 온도에서 상기 반응 혼합물을 사이클링시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제17항에 있어서, 기울기를 시간 함수로서의 표지 강도의 1차 도함수를 구함으로써 산출하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 시간 함수로서의 표지 강도를 시간의 함수로서 표지 강도 측정값을 최소제곱법 피팅으로 산출하는 방법.

청구항 31

제17항에 있어서, 기울기를 하기 방정식:

$$y = mx + b$$

(여기서, y 는 표지 강도이고, x 는 시간이며, m 은 기울기임)에 따라 시간의 함수로서 표지 강도 데이터를 피팅하여 산출하는 방법.

청구항 32

제17항에 있어서, 선의 기울기를 하기 수학식:

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

(여기서, m 은 선의 기울기이며, (x_1, y_1) 및 (x_2, y_2) 는 시간상 적어도 2개의 상이한 점이며, $x_1 \neq x_2$ 임)을 사용함으로써 산출하는 방법.

청구항 33

제17항에 있어서, 표지된 핵산 프로브 및 표적 핵산의 혼성화 반응 속도를, 시간의 함수로서 표지 강도의 기울기에 기초하여 산출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 34

제17항에 있어서, 각각 상이한 표적 핵산과 혼성화하는 적어도 2개의 표지된 핵산 프로브가 존재하고, 여기서

각 프로브는 상이한 온도에서 혼성화하는 것인 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 표지된 핵산 프로브가 각각 동일한 표지를 갖는 것인 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)하에, 2008년 8월 8일에 출원된 미국 가출원 번호 제61/136,040호 (상기 문헌의 전문이 본원에서 참고로 인용된다)에 대한 우선권을 주장한다.

[0002] 본 출원은 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 사용하여 핵산을 검출하는 분야에 관한 것이다. 본 출원은 표지된 프로브가 표적에 혼성화하는 데 온도가 미치는 효과를 평가함으로써, 및 시간 함수로서의 표지 강도의 함수로서 프로브의 표적에의 혼성화 속도를 산출함으로써 PCR을 사용하여 표적 핵산을 검출하는 것에 대한 특이성, 및 이에 따른 감도를 증가시키는 방법을 제공한다.

배경 기술

[0003] 핵산의 증폭은 샘플 중의 특이적인 핵산을 검출하는 데 있어서 매우 유용한 도구가 되어 왔다. 예를 들면, 미국 특허 번호 제4,683,202호에 기술되어 있는 바와 같이, PCR은 표적 핵산, 상기 표적 핵산에 상보적인 DNA 중합화를 위한 프라이머 뿐만 아니라, 필요한 뉴클레오시드 및 완충 시약을 포함하는 반응에서 열 안정한 DNA 폴리머라제, 예를 들면, Taq 폴리머라제의 씨모사이클링을 사용하여 핵산을 증폭시키는 데 사용된다. 구체적인 필요에 따라 다수의 PCR 변형 방법이 개발되었으며, 그 예는 문헌 [*Current Protocols in Molecular Biology* (April 2008, Print ISSN: 1934-3639; Online ISSN: 1934-3647)]에서 살펴볼 수 있다. 예를 들면, 생체외 및 환경 샘플로부터의 병원체 검출, 시험관내 진단, 유전자 검정, 포렌식(forensic), 식품 및 농작물 시험, 및 친자 감별을 비롯한 다양한 목적을 위해 DNA 및 RNA 표적의 존재를 검출하는 데 광범위하게 사용되는 기법이다.

[0004] PCR은 오직 제한된 실험실 조건하에서만 수행되는 기법으로부터 현장 검정에 유용한 기법으로까지 진화하였다. 이러한 진화는 가능하게는 휴대용 PCR 장치의 출현으로 이루어졌다. 상기와 같은 장치는 고가이고, 소요 시간이 오래 걸리고, 고된 실험실 프로세싱은 필요없이, 특히, 병원체 검출, 포렌식 샘플링, 또는 심지어는 의학적 상태에 대한 신속한 진단을 위해 적합화될 수 있다. 생물무기를 신속하고 정확하게 확인하는 것이 중요한 바, 생물테러리즘에 대항하는 데 있어서 본 분야에서 PCR의 사용은 특히 중요하다.

[0005] 조절형 실험실 환경을 조성할 수 없음에도 불구하고 현장 적용은 여전히 강력하고 정확한 검정을 필요로 하고 있다. 표적 DNA를 검출하는 데 있어서 현장 검정과 실험실 검정은 거의 유사하지만, 조직 샘플로부터의 세균 감염 진단에 있어서 PCR 검정 대 종래의 배양 기법을 비교해 보면, PCR 방법이 72시간 동안 진행되는 실험실 배양보다 감도가 더 낮은 것으로 나타났다 (문헌 [Emanuel et al. *J. Clin. Microbiol.* (2002) 41:689-693]). 따라서, PCR 감도 개선이 신속한 검출 방법을 개발하고자 하는 목적이 된다.

[0006] 특히, 반응에서 반응 속도 및 표적의 증폭량을 측정하기 위해 형광 리포터 분자를 사용하는 경우에 있어서 여전히 신호 특이성이 임의의 PCR 검정의 감도를 제한하는 주된 한계로 남아있다. 일반적으로 비특이적인 혼성화를 설명하기 위해서 음성 대조군 반응에서 배경 형광을 공제시키는 것이 사용되기는 하지만, 표적 핵산은 검출되기 위해서는 역치량보다 더 낮은 양으로 존재하여야 한다고 제한하는 바, 상기 방법은 여전히 조잡하다.

발명의 내용

[0007] 발명의 요약

[0008] 본원에서는 (a) 표적 핵산을 함유할 것으로 의심되는 샘플을 상기 표적 핵산과 혼성화하는 표지된 핵산 프로브와 접촉시키는 단계; (b) 제1 온도 및 제2 온도에서 표지 강도를 측정하되, 여기서 제1 온도는 제2 온도보다 낮은 온도인 단계; (c) (i) 제1 온도에서의 표지 강도 대 (ii) 제2 온도에서의 표지 강도의 비를 산출하되, 여기서 적어도 0.8의 비는 표적 핵산이 존재한다는 것을 지시하는 것인 단계를 포함하는, 표지된 핵산 프로브가 그의 상보적인 핵산 표적에 혼성화하는 것을 검출하는 방법을 제공한다. 추가의 실시양태에서, (b) 단계 및 (c) 단계를 적어도 2회 반복한다. 추가의 실시양태에서, (b) 단계 및 (c) 단계를 동일한 제1 및 제2 온도에서 반복한다. 제1 온도 측정을 제2 온도 측정 이전에 수행할 수 있거나, 그 반대로 수행할 수 있다. 추가의 실시양태

에서, 본 방법은 PCR 이후의 검출 기법으로서 사용된다. 추가의 실시양태에서, 본 방법은 샘플의 온도가 한 온도에 이르게 한 후, 예를 들면, 15초, 30초, 및 45초와 같은 3개 이상의 시점에 상기와 동일한 단일의 온도에서 표지 강도를 측정하는 단계를 추가로 포함한다. 추가의 실시양태에서, 본 방법은 예를 들면, 15초, 30초, 및 45초와 같은 3개 이상의 시점에 상이한 온도에서 표지 강도를 측정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0009] 한 실시양태에서, 적어도 0.9의 비는 표적 핵산이 존재한다는 것을 지시하는 것이다.

[0010] 또 다른 실시양태에서, 제1 온도는 표지된 핵산 프로브의 Tm보다 낮고, 제2 온도는 표지된 핵산 프로브의 Tm보다 높다. 추가의 실시양태에서, 제1 온도는 약 40°C, 약 41°C, 약 42°C, 약 43°C, 약 44°C, 약 45°C, 약 46°C, 약 47°C, 약 48°C, 약 49°C, 약 50°C, 약 51°C, 약 52°C, 약 53°C, 약 54°C, 약 55°C, 약 56°C, 약 57°C, 약 58°C, 약 59°C, 약 60°C, 약 61°C, 약 62°C, 약 63°C, 약 64°C, 약 65°C, 약 66°C, 약 67°C, 약 68°C, 약 69°C, 약 70°C, 약 71°C, 또는 약 72°C이다.

[0011] 또 다른 실시양태에서, 제2 온도는 약 85°C, 약 86°C, 약 87°C, 약 88°C, 약 89°C, 약 90°C, 약 91°C, 약 92°C, 약 93°C, 약 94°C, 또는 약 95°C이다.

[0012] 또 다른 실시양태에서, 제2 온도는 약 85°C, 약 86°C, 약 87°C, 약 88°C, 약 89°C, 약 90°C, 약 91°C, 약 92°C, 약 93°C, 약 94°C, 또는 약 95°C이다.

[0013] 또 다른 실시양태에서, 제1 온도는 약 50°C이고, 제2 온도는 약 95°C이다.

[0014] 또 다른 실시양태에서, 표지된 핵산 프로브는 형광 표지를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 핵산 프로브는 소광자 분자와 형광 표지가 상대적으로 매우 근접해 있는 경우에는 형광 표지의 형광 발산이 검출불가능하거나, 또는 소광자 분자와 형광 표지가 근접해 있지 않은 경우의 형광 발산에 대한 검출가능성보다 적어도 더 낮도록, 형광 표지의 발산을 흡수하는 소광자 분자를 추가로 포함한다. 추가의 실시양태에서, 핵산 프로브는 분자 비콘 또는 선형 프로브이다.

[0015] 한 실시양태에서, 표적 핵산은 DNA 또는 RNA이다.

[0016] 한 실시양태에서, 평균비는 반복 측정을 기초로 하여 산출된다.

[0017] 추가의 실시양태에서, 측정하는 단계를 PCR 반응 이후에 수행한다.

[0018] 또 다른 실시양태에서, PCR 반응은 i) 표적 핵산을 함유할 것으로 의심되는 샘플을 적합한 프라이머, 효소 및 기질을 포함하는 용액 중의 표지된 핵산 프로브와 접촉시켜 반응 혼합물을 형성하는 단계; 및 ii) 표적 핵산의 증폭에 적합한 변성, 어닐링, 및 확장 온도에서 상기 반응 혼합물을 사이클링시키는 단계를 포함한다.

[0019] 본원에서는 (a) 표적 핵산을 함유할 것으로 의심되는 샘플을 상기 표적 핵산과 혼성화하는 표지된 핵산 프로브와 접촉시키는 단계; (b) 적어도 2개의 상이한 시점에서 표지 강도를 측정하는 단계; 및 (c) 시간의 함수로서 표지 강도의 기울기를 산출하는 단계를 포함하는, 표지된 핵산 프로브가 그의 표적 핵산에 혼성화하는 것을 검출하는 방법을 추가로 제공한다. 단계 (b)에서 수행한 바와 같이, 상이한 시점에 측정하는 단계는 등온 조건하에서 또는 상이한 온도에서 수행될 수 있다.

[0020] 추가의 실시양태에서, 표지된 핵산 프로브가 표적 핵산에 결합하였을 때에 표지된 핵산 프로브에 의해 발생되는 신호의 강도가 표지된 핵산 프로브가 표적 핵산에 결합하지 않았을 때에 표지된 핵산 프로브에 의해 발생되는 신호의 강도와 비교하여 시간이 경과함에 따라 증가하였다면, 여기서 (+)의 기울기는 표적 핵산이 존재한다는 것을 지시하는 것이다. 추가의 실시양태에서, (-) 또는 0의 기울기는 표적 핵산이 존재하지 않는다는 것을 지시하는 것이다.

[0021] 추가의 실시양태에서, 핵산 프로브는 분자 비콘 또는 선형 프로브이다.

[0022] 한 실시양태에서, 표적 핵산은 DNA 또는 RNA이다.

[0023] 한 실시양태에서, 측정하는 단계는 등온 조건하에서 수행한다. 추가의 실시양태에서, 측정하는 단계는 PCR 반응 이후에 수행한다. 추가의 실시양태에서, 측정하는 단계는 PCR 반응 종결 이후 경과 시간 약 1분 내지 약 10분 이내에 종결한다. 추가의 실시양태에서, 측정하는 단계는 적어도 5개의 상이한 시점에서 수행한다. 추가의 실시양태에서, 측정하는 단계는 PCR 반응 종결 이후 15초, 30초, 및 45초에 수행한다.

[0024] 또 다른 실시양태에서, PCR 반응은 (i) 표적 핵산을 함유할 것으로 의심되는 샘플을 적합한 프라이머, 효소, 기질 및 완충액을 포함하는 용액 중의 표지된 핵산 프로브와 접촉시켜 반응 혼합물을 형성하는 단계; 및 (ii) 표

적 핵산의 증폭에 적합한 변성, 어닐링, 및 확장 온도에서 상기 반응 혼합물을 사이클링시키는 단계를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 어닐링 및 확장 온도는 동일한 온도이다.

[0025] 한 실시양태에서, 기울기는 시간 함수로서의 표지 강도의 1차 도함수를 구함으로써 산출한다. 추가의 실시양태에서, 시간 함수로서의 표지 강도는 시간의 함수로서 표지 강도 측정값을 최소제곱법 피팅으로 산출한다. 추가의 실시양태에서, 기울기는 하기 방정식: $y = mx + b$ (여기서, y는 표지 강도이고, x는 시간이며, m은 기울기임)에 따라 시간의 함수로서 표지 강도 데이터를 피팅하여 산출한다.

[0026] 추가의 실시양태에서, 표지 강도의 기울기에 기초한 표지된 핵산 프로브 및 표적 핵산의 혼성화 반응 속도를 시간의 함수로서 산출한다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 비콘 T_m 보다 낮은 온도에서의 형광값을 비콘 T_m 보다 높은 온도에서의 형광값으로 나눔으로써 얻은 비를 나타내는 그래프이다. 오직 바실루스 글로비기(*bacillus globigii*) (BG) 주형 (이는 생물학적 무기 연구용의 대용 유기체임)을 함유하는 샘플에서만 양성비 (+)로 나타났고, BG 주형을 포함하지 않는 대조군 샘플에 대해서는 음성비 (-)로 나타났다. 따라서, 도 1은 비 값을 사용함으로써 위양성(false positive)은 최소화시키면서 비록 소량인 표적 샘플도 양성으로 검출할 수 있다는 것을 제시한다.

도 2는 3-10분간에 걸쳐 샘플 6개의 형광값에 대한 기울기 측정 결과를 나타낸 것이다. 표적 서열인 BG 주형을 함유하는 샘플만이 유일하게 (+)의 기울기를 나타내었다.

도 3은 2개의 상이한 시점에 2개의 온도에서의 표지 강도를 사용하면 위양성은 최소화시키면서, 안트락스(Anthrax)에 특이적인 핵산인 표적 핵산의 존재 여부를 정확하게 검출할 수 있는지 여부를 결정하기 위해 수행한 PCR 반응의 결과를 나타낸 것이다. 본 결과는 안트락스가 신뢰할 수 있을 정도로 검출되었음을 나타낸다.

도 4는 2개의 상이한 시점에 2개의 온도에서의 표지 강도를 사용하면 위양성은 최소화시키면서, 툴라레미아(Tularemia)에 특이적인 핵산인 표적 핵산의 존재 여부를 정확하게 검출할 수 있는지 여부를 결정하기 위해 수행한 PCR 반응의 결과를 나타낸 것이다. 본 결과는 툴라레미아가 신뢰할 수 있을 정도로 검출되었음을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] "핵산 프로브"란, 표적 서열에 상보적임으로써 표적 서열에 특이적으로 혼성화하는 RNA 또는 DNA인 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 프로브의 길이는 임의의 적합한 길이일 수 있으며, 일부 실시양태에서, 프로브의 길이는 20 내지 1000개의 염기이다. 임의로, 프로브는 적어도 하나의 검출가능한 리포터 분자로 표지, 예를 들면, 그에 연결되어 있다. 형광 리포터 분자가 리포터 분자로서 사용될 수 있다. 형광 리포터가 형광 소광자 분자에 매우 근접해 있는 경우에 상기 리포터로부터의 형광 발산이 상기 소광자에 의해 적어도 부분적으로 흡수되고, 이로써 리포터의 검출가능한 신호는 감소될 수 있도록 형광 리포터는 올리고뉴클레오티드의 한쪽 말단에 부착되고, 형광 소광자 분자는 상기 올리고뉴클레오티드의 반대쪽에 부착되어 있을 수 있다. 이러한 분자는 또한 올리고뉴클레오티드의 내부 부분에 부착될 수도 있다. 이러한 소광 기전은 형광 공명 에너지 전이 (FRET)로서 알려져 있으며, 이러한 기전을 통해서, 프로브가 표적에 결합하지 않았을 때와 비교하였을 때 프로브가 표적에 결합하였을 때에 표지 강도가 더 높은 프로브가 생성된다. 프로브를 표지하는 기타 다른 방법으로는 방사성 동위원소, 단일 형광단, DNA 인터칼레이트성 염료 (예를 들면, SYBR 그린), 화학 발광 분자, 친화성 태그 등을 연결시키는 것을 포함한다. 프로브가 표적에 혼성화하는 것은 문헌 [Tsourkas et al. *Nuc. Acids Res.* (2003) 31:1319-1330] (상기 문헌의 전문이 본원에서 참고로 인용된다)에 기재되어 있는 바와 같이, 당업계에 공지된 방법 및 수학식을 사용하여 산출할 수 있다.

[0029] "분자 비콘"이란, 표적에 상보적인 서열을 프로브 중간에 가지고 있고, 5' 및 3' 말단에 이종성인 서열을 포함하며, 프로브가 표적에 결합하지 않았을 때 및 스템 구조의 유효 T_m 보다 낮은 온도에서는 스템-루프 구조를 형성하는 것인 프로브를 의미한다. 분자 프로브의 상보적인 서열은 표적에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상보적일 수 있다. 스템-루프를 통해 5' 및 3' 말단이 매우 근접해 있을 수 있게 되고, 이로써 리포터 및 소광자 분자는 상호작용을 함으로써 표지 강도는 감소하게 된다. 표적에 결합하였을 때 리포터와 소광자 분자 사이의 거리는 좀 더 멀어질 수 있고, 이로써 표지 강도는 증가하게 된다. 따라서, 유리 분자 비콘은 신호를 거의 발생시키지 않거나 전혀 발생시키지 않는 반면, 표적 서열에

결합한 분자 비콘은 비콘-표적 하이브리드의 유효 T_m 과 유사하거나, 그보다 낮은 온도에서 더욱더 강한 표지 강도를 갖게 된다. 분자 비콘 프로브는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌 [Maras et al., *Clinica Chemica Acta* (2006) 363:48-60]에 기재되어 있다.

[0030] "선형 프로브"란 특정의 2차 구조를 갖지 않는 프로브를 의미한다. 프로브는 표적에 대해 100% 상보적일 수 있거나, 또는 오직 부분적으로 상보적일 수 있다. 예를 들면, 프로브는 표적에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상보적일 수 있다.

[0031] 달리 언급하지 않는 한, "프로브"는 일반적으로 핵산 프로브, 분자 비콘, 및 선형 프로브를 지칭한다. 다시 말해, 달리 언급하지 않는 한, 본원에서 사용하는 바, "프로브"는 핵산 프로브, 분자 비콘, 및 선형 프로브를 포함한다.

[0032] "표적 핵산"이란, 상보적인 PCR 프라이머 및 프로브를 사용하여 검출하고자 하는, 샘플 중의 핵산을 의미한다. 표적은 DNA, 예를 들면, 게놈 DNA, 세균 DNA, 바이러스 DNA, 에피좀 DNA, 또는 합성 DNA일 수 있다. 표적은 RNA, 예를 들면, mRNA, rRNA, tRNA, 바이러스 RNA, 세균 RNA, 또는 합성 RNA일 수 있다. 표적 핵산을 함유하는 샘플은 임의의 공급원으로부터 유래된 것일 수 있다. 그러한 샘플로는 예를 들면, 생물학적 샘플, 환경 샘플, 임상 샘플, 시험관내 샘플, 및 조직 샘플을 포함한다. 예를 들면, 샘플은 세균전 제제로 오염된 것으로 의심되는 물질로부터 기원하는 것일 수 있다. 표적 핵산의 구체적인 예로는 안트라스, 틀라레미아, 플라크, 및 팬 오르토폭스(pan orthopox) 게놈의 적어도 일부를 코딩하는 핵산을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. PCR 반응에서 사용하기 위해 상기 샘플로부터 핵산을 추출하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 그러한 방법을 사용할 수 있다.

[0033] 프로브 및 프라이머는 단일 반응에서 하나 초과의 표적을 검출하기 위해 다중화될 수 있다. 일반적으로, 상이한 프라이머 세트는 상이한 표적 핵산을 증폭시킬 것이며, 그 표적을 검출하는 프로브는 상이한 표지, 예를 들면, 상이한 형광단을 가질 수 있으며, 이로써 2개의 표적이 동일 반응에서 구별될 수 있게 된다. 그러한 방법은 예를 들면, 문헌 [Belanger et al. *J. Clin. Microbiol.* (2002) 40:1436-1440]에 기술되어 있는 것과 같이, 당업계에 같이 공지되어 있다. 또 다른 실시양태에서, 상이한 프라이머 세트는 상이한 표적 핵산을 증폭시킬 것이며, 그 표적을 검출하는 프로브는 동일한 표지, 예를 들면, 동일한 형광단을 가질 수 있다. 프로브는, 각각의 프로브가 동일한 표지를 가졌음에도 불구하고 같은 반응에서 구별될 수 있게 하는 상이한 온도에서 혼성화될 수 있다. 이것이 온도 간격에서의 다중화인 것으로 간주될 수 있다.

[0034] 추가로, 다중 표적을 스크리닝하기 위해, 예를 들면, 샘플 중의 병원체 유기체, 또는 질환 유전자를 스크리닝하기 위해 다중 반응을 이용할 수 있다. 그러한 반응은 예를 들면, 96-웰 플레이트와 같은 다중웰 포맷으로 수행될 수 있다.

[0035] "표지 강도"란 프로브로부터 검출되는 신호의 진폭을 의미한다. 특정의 검출되는 신호는 프로브에 따라 달라질 것이다. 예를 들면, 형광은 형광 프로브로 표지된 프로브에 대하여 검출될 것이다. FRET 기반의 프로브 표지화를 사용하는 경우, 표지 강도는 표적에 결합된 프로브의 결합량에 비례하는 바, 이에 따라 샘플 중 표적의 양에 비례하는 것이다. 유사하게, 예를 들면, SYBR 그린과 같은 DNA 인터칼레이트성 리포터 분자가 사용될 경우, 새로 합성된 더블 스트랜드 DNA 중에 더 많은 리포터가 흡입될수록 형광은 증가하게 된다. 따라서, 표지 강도는 표적 핵산이 샘플 중에 존재하는지 여부, 및 임의로는 샘플 중에 존재하는 표적의 양을 측정하는 수단으로서 사용될 수 있다. 예를 들면, 표지 강도를, 공지된 표적의 양을 사용하여 작성된 표준 곡선과 비교하고 그 결과를 보간법으로 처리하여 샘플 중에 존재하는 표적의 양을 측정할 수 있다. 상기 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0036] 일부 실시양태에서, 표지 강도를 기록하거나, 나타내기 위해 프록시 단위를 사용할 것이다. 예를 들면, 장치는 특정 전압으로서 형광 프로브로부터 형광을 검출하거나 기록할 수 있다. 이러한 특정 일례에서 상기와 같은 프록시 단위인 전압이 표지 강도로서 간주될 수 있다.

[0037] "혼성화하다"라는 것은 2개의 싱글 스트랜드 폴리뉴클레오티드가 조합하여 더블 스트랜드 폴리뉴클레오티드로 이루어진 하나의 스트랜드를 형성하는 것을 의미하는 것이다. 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있고, 이는 DNA-DNA, RNA-RNA, 또는 DNA-RNA 더블 스트랜드 폴리뉴클레오티드 또는 3개의 스트랜드 하이브리드를 형성할 수 있다. 혼성화는 서열 특이성을 띠고, 혼성화 반응 속도는 예를 들면, 문헌 [Tsourkas et al. *Nuc. Acids Res.* (2003) 31:1319-1330] (상기 문헌의 전문이 본원에서 참고로 인용된다)에 기술되어 있는 바와 같이, 2차 방정식을 사용함으로써 산출될 수 있다. 혼성화 반응 속도는 또한 분자 비콘이 상동성인 서열에 혼성화하는 동안 시간 경과

에 따른 분자 비콘의 형광 증가를 측정함으로써 산출될 수 있다. 분자 비콘의 한쪽 말단은 형광 분자로 표지되고, 나머지 다른 한쪽은 소광자 분자로 표지된다. 분자 비콘이 그의 상보적인 서열에 혼성화하게 되면, 리포터 플루오르는 소광자 분자로부터 물리적으로 분리되어 형광은 증가하게 된다. 이어서, 표지 강도의 기울기를 사용하여 형광 증가 속도로서 혼성화 반응 속도를 측정할 수 있다.

[0038] "T_m" 또는 "용융 온도"란 프로브 분자 중 50%가 표적 핵산에 혼성화되고, 프로브 분자 중 50%는 용액 중에 유리 상태로 남아있게 되는 온도를 의미한다. T_m은 예를 들면, 식 $T_m = 2[A+T] + 4[G+C]$ 를 사용하여 산출할 수 있거나, 이러한 목적으로 특별히 개발된 소프트웨어 프로그램에 의해 측정될 수 있다. T_m 산출은 당업계 내에 공지되어 있다.

[0039] "시간의 함수로서 표지 강도의 기울기"란 시간의 함수로서 표지 강도의 플롯 또는 표지 강도 변화를 나타내는 선의 기울기를 의미한다. 프로브가 그의 특이적인 상보적인 주형에 혼성화하게 되면, 표지 강도는 증가한다. 주어진 기간이 경과함에 따라 더 많은 프로브들이 주형에 혼성화하게 되고, 이를 통해 시간이 경과함에 따라 형광 (표지 강도)은 증가하게 된다. 따라서, 기울기는 시간 경과에 따른 강도, 또는 시간 경과에 따른 강도 변화로서 측정될 수 있다. 상기 기울기는 예를 들면, 시간의 함수로서 표지 강도의 1차 도함수를 구하거나, 시간의 함수로서 표지 강도 측정값을 최소제곱법 피팅으로 산출하거나, 또는 하기 방정식: $y = mx + b$ (여기서, y는 표지 강도이고, x는 시간이며, m은 기울기임)에 따라 시간의 함수로서 표지 강도 데이터를 피팅함으로써 산출할 수 있다. 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여 기울기를 측정할 수 있다. 추가로, 표지된 핵산 프로브 및 표적 핵산의 혼성화 반응 속도는 이러한 방식으로 시간의 함수로서 표지 강도의 기울기에 기초하여 산출될 수 있다.

[0040] 점 (x₁, y₁) 및 (x₂, y₂)로 정의되는 선의 기울기는 하기 수학식을 사용함으로써 측정될 수 있다:

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

[0041] [0042] (여기서, m은 선의 기울기이며, x₁ ≠ x₂임). 상기 방정식은 당업자에 의해 여러 방법에서 사용될 수 있다. 예를 들면, 직선을 데이터에 피팅한 후, 상기 수학식을 적용시켜 기울기 m을 결정할 수 있다. 별법으로, 기울기 m은 다수의 다른 점에 대해서 산출될 수 있고, 그 평균값의 기울기로 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시간상 순차적인 데이터 점을 사용하여 기울기는 반복적으로 산출될 것이다.

[0043] "약"이라는 것은 값이 명시된 값의 ±5% 범위 내에 있다는 것을 의미하는 것이다.

[0044] "PCR"이란, 샘플로부터 유래된 것일 수 있는 표적; DNA 폴리머라제, 예를 들면, Taq 폴리머라제 또는 기타 다른 열 안정성 폴리머라제; 상기 표적에 상보적인 적어도 하나의 프라이머; 표적의 증폭부에 상보적인 프로브; 데옥시뉴클레오파트 트리포스페이트; 및 2가 양이온을 포함하는 완충액 용액을 포함하는, 반응 온도의 일련의 사이클링에 기초한 반복적인 표적 핵산 증폭 반응을 의미하는 것이다. 성분들의 적합한 농도는 당업계에 공지되어 있고, 공지된 최적 파라미터에 따라 조정될 수 있다. 각 사이클은 전형적으로 85-100°C에서의 변성, 37-60°C에서의 어닐링, 및 40-75°C에서의 신장이라는 3개의 단계를 포함한다. 각 단계는 10-300초, 바람직하게는 30-120초 동안 지속될 수 있다. 상기 단계들의 정확한 온도는 공지된 파라미터에 따라 표적 서열에 따라서 달라질 수 있다. 예를 들면, 어닐링 온도는 프라이머의 T_m보다 대략 5°C 더 낮은 온도일 수 있는데, 상기 프라이머의 T_m은 상기 기술한 바와 같이 산출될 수 있다. PCR 단계에 대한 최적의 온도를 산출하는 데 이용가능한 소프트웨어 프로그램은 다수가 존재한다. 각 사이클은 변성이라는 제1 단계, 및 어닐링 단계 및 신장 단계가 함께 조합된 제2 단계라는 2개의 단계를 포함할 수 있다. 임의로는 "고온의 출발" 폴리머라제에 대한 개시 변성 단계가 포함될 수도 있다. 추가로, 임의의 남아있는 싱글 스트랜드 DNA 분자가 완전하게 확장될 수 있도록 하기 위해 최종 신장 단계를 포함할 수도 있다. PCR을 수행하기 위한 구체적인 프로토콜은 당업계에 공지되어 있고, 이는 예를 들면, 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology (April 2008, Print ISSN: 1934-3639; Online ISSN: 1934-3647)]에서 살펴볼 수 있다.

[0045] PCR 반응 사이클은 초기, 후기, 및 최종 단계인 것을 특징으로 할 수 있다. 초기 단계에서는 표적 서열의 이중화율이 거의 100%에 도달할 정도로 기하급수적인 증폭이 일어난다. 시약이 다 소모되면, 반응은 후기 단계에 진입하게 되고, 그 효율은 하락한다. 본 단계에서의 반응은 실제로 시약의 이용가능성과 폴리머라제 성능에 따라 고도한 가변성을 띠지만, 때때로 본 단계는 선형 단계로서 불린다. 최종 단계는 시약과 효소가 모두 소모됨에 따라 더 이상 추가의 표적 서열이 누적되지 않는 안정기이다.

- [0046] 정량적 또는 Q-PCR로도 또한 지칭되고, 원래는 5' 뉴클레아제 PCR 검정으로서 기술되는 것인 "실시간 PCR"이란 PCR 반응이 일어나는 동안 이중 표지된 프로브 (표지 강도)가 효소적으로 절단됨으로써 발생된 신호를 측정하는 것을 의미하는 것이다. 표적 서열에 결합한 프로브의 절단에 의해서 발생된 신호는 반응에서 표적 서열의 양에 비례한다. 신호를 공지의 기준과 비교함으로써 샘플 중에 존재하는 표적의 양을 측정할 수 있다.
- [0047] "종점 PCR"이란 전형적으로 반응의 후기 또는 최종 단계에서 표지 강도를 측정하는 것을 의미한다. 시약이 완전하게 다 소모될 필요는 없다. 실시간 PCR과 비교하였을 때, 본 방법을 사용할 경우 샘플 중의 표적이 덜 정확하게 정량화될 수는 있지만, 표적은 최대한도로 증폭될 수 있고, 이를 통해 PCR 반응의 최종 단계에서 표적은 보다 더 풍부하게 존재하게 됨으로써 강력한 검출이 이루어진다.
- [0048] "비대칭 PCR"이란 표적 핵산 중 하나의 스트랜드를 나머지 다른 하나의 스트랜드보다 더 많이 우선적으로 증폭시키는 데 사용되는 PCR 기법을 의미한다. 일반적으로, 선호하는 핵산에 대한 프라이머를 아주 많은 과량으로 사용함으로써 표적 핵산을 우선적으로 증폭시킬 수 있다. 특히, 비대칭 PCR 프로토콜은 당업계에 공지되어 있다.
- [0049] 증폭된 표적을 특이적으로 검출하는 것은 표지 강도를 측정하는 유형 또는 시간과는 상관없이 모든 PCR 반응에 대하여 제한적인 특징으로서 남아있다.
- [0050] PCR은 임의의 적합한 씨모사이클러 및 포맷으로, 예를 들면, 96 또는 384 웰 플레이트로 수행될 수 있다. 별법으로, PCR 반응은 현장에서 적합한 장치, 예를 들면, 바이오시크™ 플러스(BIOSEQ™ PLUS) 장치로 수행될 수 있다.
- [0051] 시간의 함수로서 표지 강도의 기울기는 예를 들면, 컴퓨터 소프트웨어 또는 하드웨어를 사용함으로써 자동으로 산출할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표지 강도가 검출되고, 데이터 조작 처리를 위해 상기 검출 결과가 프로세서로 전송된다. 프로세서는 필요한 산출을 수행하고, 데이터를 수치, 그래프, 또는 기타 다른 해석가능한 결과로 사용자에게 회송한다. 다른 실시양태에서, 사용자는 신호 강도를 수득하고, 상기 데이터를 수작업으로 조작 처리한다. 데이터는 표준 수학적 방법 또는 컴퓨터 프로그램, 예를 들면, 마이크로소프트 엑셀(Microsoft's EXCEL) 프로그램 (2007년 버전)을 사용하여 데이터를 수작업으로 조작 처리할 수 있다.
- [0052] 한 실시양태에서, 적어도 2개의 상이한 온도에서 표지 강도를 측정함으로써 표지된 핵산 프로브의, 그의 표적 핵산에의 혼성화를 검출할 수 있다. 한 실시양태에서, 본 방법은 표적 핵산을 함유할 것으로 의심되는 샘플을, 표적 핵산과 혼성화하는 표지된 핵산 프로브와 접촉시키고, 제1 온도 및 제2 온도에서 표지 강도를 측정하되, 여기서 제1 온도는 제2 온도보다 낮거나, 또는 그 반대인 것을 포함한다.
- [0053] 비는 저온에서의 표지 강도를 고온에서의 표지 강도로 나눔으로써 산출할 수 있다. 따라서, 산출값이 높으면 높을수록 반응물에 포함되어 있는 표적의 농도는 높은 것이다. 특정의 비 수치는 사용되는 기기의 표지 강도 스케일을 비롯한, 다수의 인자에 따라 달라진다. 비가 1 초과이면 이는 표적이 존재함을 지시한다고 볼 수 있다. 일부 실시양태에서, 비가 약 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.5, 2, 5, 10, 20, 또는 50이면, 이는 표적이 존재함을 지시하는 것이다. 비는 또한 표적의 존재량을 산출하는 데에도 사용될 수 있다. 상기와 같은 측정은 예를 들면, 상기 비를 표준과 비교함으로써 이루어질 수 있다. 표적 핵산의 존재 여부를 지시하는 비를 측정하는 데 있어서의 또 다른 측면은 검정의 잡음으로도 불릴 수 있는 것인, 표적 핵산을 함유하지 않는 반응물의 기준선 비를 측정하는 것이다. 표적 핵산의 존재 여부를 결정하는 비는 예를 들면, 잡음에서 표준 편차가 5 이상인 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산의 존재를 지시하는 것인 비는 잡음에서 표준 편차가 2, 4, 6, 8, 10, 또는 15 또는 그 초과인 것일 수 있다. 사용되는 프로브에 따라서 그 양은 또한 표준과 비교할 필요없이 그 비로부터 직접적으로 산출될 수도 있다.
- [0054] 표지 강도를 측정하는 온도는 특정 적용 용도에 따라 달라질 수 있고, 적합한 온도는 당업자에 의해 쉽게 판단될 수 있다. 온도를 선택하는 것은 프로브의 T_m 및 서열에 따라 달라질 것이다. 구체적으로, 고온은 프로브의 T_m 보다 더 높을 것이며, 저온은 프로브의 T_m 보다 더 낮을 것이다. 일부 실시양태에서, 고온은 적어도 약 90°C 가 될 것이며, 저온은 약 50°C 이하가 될 것이다. 예를 들면, 고온은 적어도 95°C, 100°C, 105°C, 또는 110°C 가 될 수 있고, 저온은 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 또는 45°C가 될 수 있다.
- [0055] 일부 실시양태에서, 강도는 2개 초과의 온도에서 측정될 것이다. 예를 들면, 강도는 제1, 제2, 및 제3 온도에서 측정될 수 있는데, 상기 제1, 제2, 및 제3 온도는 각각 상이한 온도이다. 모든 온도에서의 값이 유사하다면, 이는 특이적인 결합을 지시하는 것이다. 값이 유사하다는 것은 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 3% 이하, 또는 1% 이하 만큼 상이한 값을 의미할 수 있다. 사용되는 온도의 개수를 증가시킴으로써 결과

에 대한 신뢰도를 증가시킬 수 있다.

[0056] 비는 하나 또는 수개의 시점에서 산출될 수 있다. 예를 들면, 표지 강도는 PCR 반응의 대상인 표적 핵산의 존재를 측정하기 위해 PCR 반응 이후에 측정될 수 있다. 표지 강도는 또한 PCR 반응 수행하기 이전에 측정될 수 있다. 따라서, 표적 핵산의 존재를 지시하는 것인 비를 통해 불필요한 PCR을 회피할 수 있다.

[0057] 비는 고온 및 저온에서 각각 1회 판독하는 것에 기초하여 산출될 수 있다. 별법으로, 고온 및 저온에서 다중 판독하여 그 값의 평균값을 구할 수 있다. 그러한 평균값을 사용하여 부정확한 판독으로 인한 오류를 막을 수 있다.

[0058] 한 실시양태에서, 시간의 함수로서 표지 강도의 기울기를 측정함으로써 표지된 핵산 프로브의, 그의 표적 핵산에의 혼성화를 검출할 수 있다. 표적을 함유하는 샘플 중 표적의 양은 PCR에 기인하여 시간이 경과함에 따라 증가하기 때문에, 시간이 경과함에 따라 더 많은 프로브가 표적에 혼성화하게 된다. 따라서, 시간의 함수로서 표지 강도를 사용하여 샘플 중 표적의 존재에 대하여 측정할 수 있다. 또한, 시간의 함수로서 표지 강도를 사용하여 프로브/표적 상호작용의 혼성화 반응 속도를 측정할 수 있다.

[0059] 한 실시양태에서, 표적 핵산을 함유할 것으로 의심되는 샘플을 상기 표적 핵산과 혼성화하는 표지된 핵산 프로브와 접촉시키고, 다른 시점에 표지 강도를 측정하는 것을 포함한다. 시간의 함수로서 표지 강도의 기울기가 표적 핵산의 존재, 및 프로브의 표적 핵산에의 혼성화 반응 속도, 둘 모두를 지시한다. 구체적으로, 프로브가 표적에 혼성화였을 때에 프로브의 표지 강도가 증가하였다면, (+)의 기울기는 표적 핵산의 존재를 지시하는 것인 반면, 프로브가 혼성화할 표적이 존재하지 않을 때에 프로브의 표지 강도가 감소하였다면, (-) 또는 0의 기울기는 표적 핵산의 부재를 지시하는 것이다. 유사하게, 기울기는 또한 공지된 반응속도식을 사용하여 혼성화 반응 속도를 결정하는 데에도 사용될 수 있다.

[0060] 시간의 함수로서 표지 강도의 기울기는 당업자가 쉽게 알 수 있는 임의의 여러 방법으로 산출될 수 있다. 예를 들면, 표지 강도 데이터를 공지된 수치 방법을 사용하여 직선으로 피팅할 수 있다. 이러한 방법으로는 최소제곱법 피팅 (선형 및 비-선형 둘 다), 선형 회귀법 ($y = mx + b$), 최적 지수 곡선, 2차식 회귀법, 3차식 회귀법, 및 다항 회귀법을 포함한다. 표지 강도의 기울기는 데이터에 피팅되는 직선의 1차 도함수를 찾아냄으로써 분석적으로 또는 수치상으로 산출할 수 있다. 상기 수학적 계산은 당업자에게 공지되어 있다.

[0061] 표지 강도는 등온 조건하에 또는 상이한 온도에서 측정될 수 있다. 한 실시양태에서, 모든 표지 강도는 단일 온도에서 측정된다. 또 다른 실시양태에서, 표지 강도는 상이한 온도에서 측정될 수 있다. 이러한 상황은 PCR 반응 혼합물을 냉각 또는 가열하는 동안 일어날 수 있다. 추가의 또 다른 일례에서, 표지 강도는 상이한 온도에서 측정될 수 있다. 이러한 데이터에 기초하여 상이한 기울기를 산출할 수 있다. 예를 들면, 다중 데이터 점을 제1 온도, T1에서 얻은 후, 제2 온도, T2에서 다중 데이터 점을 얻을 수 있다. 이러한 데이터에 기초하여, 하나는 T1 데이터에 상응하는 것이고, 또 하나는 T2 데이터에 상응하는 것인, 2개의 다른 기울기를 산출할 수 있다. 표지 강도를 측정하는 온도를 달리함으로써, 혼성화 반응 속도를 연구할 수 있다.

[0062] 강도 측정은 언제든지 수행될 수 있다. PCR 이후에 측정할 수 있거나, PCR을 수행하는 동안에 측정할 수 있다. 일부 실시양태에서, PCR 이후 10분에 측정된다. 또한 PCR 이후 5, 4, 3, 2, 또는 1분에 측정될 수 있다. 한 실시양태에서, 약 15초, 30초, 및 45초째에 측정된다. 측정과 측정 사이의 시간은 달라질 수 있다. 예를 들면, 적어도 약 10초, 약 15초, 또는 약 20초 만큼의 간격을 두고 측정될 수 있다. 또한, 일정 기간에 걸쳐 빠르게 연속하여 측정될 수 있다.

[0063] 강도 측정 횟수 또한 달라질 수 있다. 일반적으로, 데이터 점의 개수를 증가시키면 선의 기울기에 대한 신뢰는 증가할 수 있다. 그러나, 기울기를 측정하는 데 단지 2개의 데이터 점이 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 2, 3, 또는 4개의 데이터 점이 상기 기울기를 측정하는 데 사용된다.

[0064] 실시예

[0065] 실시예 1: 2개의 온도에서 표지 강도를 측정하였을 때 위양성은 감소하였다.

[0066] 2개의 온도에서의 표지 강도를 사용하면 위양성은 최소화시키면서 표적 핵산의 존재 여부를 정확하게 검출할 수 있는지 여부를 결정하기 위해 PCR 반응을 수행하였다. 각각 25 μl 씩인 PCR 반응물은 하기 표 1에 기술되어 있고, 사용된 프라이머 서열은 하기 표 2에 기술되어 있다.

표 1

| PCR 반응물 | | |
|--------------------------------------|-----------------------|----------------|
| 성분 | 부피 | 최종 농도 |
| 5X 플래티늄(Platinum)® <i>Tfi</i> 반응 원증액 | 5 μ l | 1X |
| 10 mM dNTP 믹스, PCR 등급 | 0.5 μ l | 각각 200 μ M |
| 50 mM MgCl ₂ | 1.5 μ l | 3 mM |
| 프라이머 믹스 (각각 10 μ M) | 1 μ l | 각각 0.2 μ M |
| 주형 DNA | 필요에 따라 $\geq 1 \mu$ l | |
| 플래티늄 ® <i>Tfi</i> 액소(-) DNA 폴리머라제 | 0.2~0.4 μ l | 2~4 유니트 |
| 오토클레이브된 증류수 | 25 μ l가 될 때까지 첨가 | |

[0067]

표 2

| (서열 방향은 5'→3'이다) - 프라이머 | |
|--|-------------|
| TGC GTT CTG ACT GAA CAG CTG AT CG AG | BG_ 제한 프라이머 |
| TCCT CTT GAA ATT CCC GAAT GG | BG_ 초과 프라이머 |
| Fam- CTCGAGAAAGGTTGTCGTAAAACGCCTCGAG- Dabcyl | BG_ 비콘 |

[0068]

[0069] 하기와 같은 양을 갖는 합성 바실루스 글로비기 (BG) 주형: 0, 60, 6000, 또는 600,000개의 개놈 카페 등가물을 함유하는 4개의 이중 반응물 세트를 셋업하였다. 반응물을 85°C 내지 95°C 사이에서부터 50°C 내지 70°C 사이 까지 55회 사이클링하였다. 이어서, 반응물을 비콘의 T_m보다 낮은 40°C 내지 60°C로 감소시켰다. 약 5분 동안 매 15초마다 형광을 관독하였다. 이어서, 반응물을 80°C 내지 95°C 사이로 가열하고, 15초마다 5개의 관독값을 얻었다. 40°C 내지 60°C에서의 형광값을 80°C 내지 95°C에서의 형광값으로 나눈 비는 하기 표 3에 제시되어 있다.

표 3

| BG 주형 | 형광값 | 증가율(%) |
|---------|------|-----------|
| 카페수 | 비 | 카페수가 0 초과 |
| 0 | 0.35 | 0% |
| 60 | 1.36 | 285% |
| 6000 | 2.36 | 569% |
| 600,000 | 2.75 | 680% |

[0070]

[0071] 상기 기술된 바와 같이, 형광비가 1보다 작다면, 이는 표적 핵산이 반응물 중에 포함되어 있지 않다는 것을 지시하는 것인 반면, 형광비가 1보다 크다면, 이는 표적 핵산이 포함되어 있음을 지시하는 것이다. 따라서, 본 결과는 적어도 단지 60개 만큼의 플라크 카페도 본원에 기술된 비를 사용함으로써 신뢰할 수 있을 정도로 검출될 수 있다는 것을 입증한다.

[0072]

실시예 2: 시간 경과에 따라 표지 강도를 측정하였을 때 위양성은 감소하였다.

[0073]

시간의 함수로서 표지 강도를 사용하면 표적 핵산의 존재 여부를 측정할 수 있는지 여부를 결정하기 위해 PCR

반응을 수행하였다. 상기 실시예 1에 기술된 바와 같이 PCR 반응을 수행하였다.

[0074] 비콘 T_m 보다 낮은 온도에서의 형광값을 비콘 T_m 보다 높은 온도에서의 형광값으로 나눔으로써 비를 산출하였다. 도 1 및 하기 표 4는 PCR 반응물에 대하여 산출된 비를 나타낸다. 오직 주형을 함유하는 샘플에서만 비가 (+)인 것으로 나타났고, 반면, 음성 대조군에 대해서는 비가 (-)인 것으로 나타났다.

표 4

| BG 주형 카피수 | 형광값 |
|--------------|------|
| 0 | -0.5 |
| 60 | 3.25 |
| 6000 | 5.5 |
| 600,000 | 8 |

[0075]

[0076] BG 주형을 함유하거나, 또는 함유하지 않는 분말 샘플을 사용하여 표지 강도 또한 측정하였다. 구체적으로, 트레이닝 어세이(Training Assay) 소비재를 사용하여 (스미쓰 디텍션(Smiths Detection)으로부터 이용가능) 6개의 백색 분말 샘플을 바이오시크 플러스 기계 상에서 진행시켰다. 하나의 샘플은 음성 분말 (도 2에서 (-)으로 표지된 샘플)을 받고, 남은 5개의 샘플은 양성 BG 분말 (도 2에서 (+)으로 표지된 샘플)을 받았다. 샘플을 85°C 내지 95°C 사이에서부터 50°C 내지 70°C 사이까지 55회 사이클링하였다. 이어서, 반응 온도를 비콘의 T_m 보다 낮은 40°C 내지 60°C로 감소시키고, 10분 동안 매 15초마다 형광을 판독하였다. 3분에서 10분 사이에 판독된 형광 판독값을 산점도 상에서 플롯팅하고, 선형 회귀법을 사용하여 데이터를 피팅함으로써 기울기를 산출하였다. 이러한 기울기 값은 도 2에 제시되어 있다.

[0077]

본 실시예는 시간이 경과함에 따라 표지 강도를 측정하는 것을 사용하면 표적 서열의 존재 여부를 효과적으로 결정할 수 있다는 것을 입증한다. 어떠한 위양성도 관찰되지 않았다.

[0078]

실시예 3: 안트락스 pX01 검정을 사용하여 시간이 경과함에 따라 상이한 온도에서 표지 강도를 측정하였을 때 위양성은 감소하였다.

[0079]

2개의 상이한 시점에 2개의 온도에서의 표지 강도를 사용하면 위양성은 최소화시키면서 표적 핵산의 존재 여부를 정확하게 검출할 수 있는지 여부를 결정하기 위해 PCR 반응을 수행하였다. 각각 25 μl 씩인 PCR 반응물은 상기 표 1에 기술되어 있고, 사용된 프라이머 서열은 하기 표 5에 기술되어 있다.

표 5

| (서열 방향은 5'→3'이다) - 프라이머 | |
|---|-------------------------|
| TGGCTAATCAGCTTAAGGAACATCCCACAGAC | 안트락스 pX01_제한 프라이머 |
| TGCATAAAGCTGTAAAACATCACGA | 안트락스 pX01_초파 프라이머 |
| CAL 610- CAACGTGGAACAAAATAGCAATGAGGTAACGTTG- Dabcyl | 안트락스 pX01_비콘 |

[0080]

[0081] 도 2는 측정 결과를 나타낸다. 구체적으로, 표적율이라는 종열에 있는 값은 온-속도(on-rate) 기울기를 나타내는 것이고, 양성 판정 (POS)과 음성 판정 (NEG) 사이에서 관찰되는 차별적인 값의 예가 된다. 안트락스 주형을 함유하지 않는 3개의 샘플 (모듈 1, 2, 및 3)은 NEG 판정을 받았다. 약 60,000개의 안트락스 계놈 카피 등가물을 함유하는 3개의 샘플 (모듈 4, 5, 및 6)은 POS 판정을 받았다. NEG 판정을 받은 것은 (-)의 기울기를 나타낸 반면, POS 판정을 받은 것은 (+)의 기울기를 나타내었다. 엑셀에서의 기울기 함수인 $b = \text{Sum}((x - \text{Avg}(x)) * (y - \text{Avg}(y))) / \text{Sum}((x - \text{Avg}(x))^2)$ (여기서, x 는 x 좌표를 포함하는 기울기 중의 필드이고, y 는 y 좌표를

포함하는 기울기 중의 필드임)를 이용함으로써 상기 플롯에 제시되어 있는 2번째 및 4번째 데이터 점을 사용하여 기울기를 산출하였다. 본 결과는 2개의 상이한 시점에 2개의 온도에서의 표지 강도를 사용하면 위양성은 최소화시키면서 표적 핵산의 존재 여부를 정확하게 검출할 수 있다는 것을 입증한다.

[0082] **실시예 4:** 툴라레미아 검정을 사용하여 시간이 경과함에 따라 상이한 온도에서 표지 강도를 측정하였을 때 위양성은 감소하였다.

[0083] 2개의 상이한 시점에 2개의 온도에서의 표지 강도를 사용하면 위양성은 최소화시키면서 표적 핵산의 존재 여부를 정확하게 검출할 수 있는지 여부를 결정하기 위해 PCR 반응을 수행하였다. 각각 $25 \mu\text{l}$ 씩인 PCR 반응물은 상기 표 1에 기술되어 있고, 사용된 프라이머 서열은 하기 표 6에 기술되어 있다.

표 6

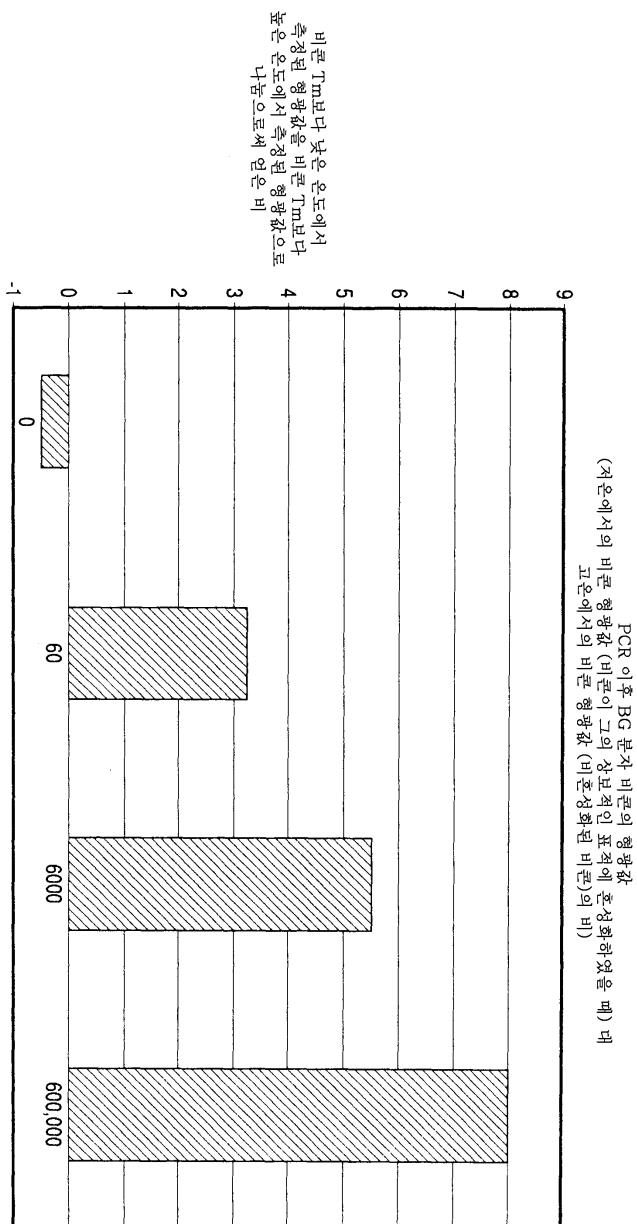
| (서열 방향은 5'→3'이다) - 프라이머 | |
|---|--------------------|
| AGCGTAAGATTACAATGGCAGGCTCCAGA | 툴라레미아 _ 제한 프라이머 |
| GCCCCAAGTTTATCGTTCTTCTCA | 툴라레미아 _ 조파 프라이머 |
| CAL 610- CCTCGTAAGTGCCATGATAACAAGCCGAGG-Dabcyl | 툴라레미아 _ 비콘 |

[0084]

도 3은 측정 결과를 나타낸다. 구체적으로, 표적율이라는 종열에 있는 값은 온-속도 기울기를 나타내는 것이고, 양성 판정 (POS)과 음성 판정 (NEG) 사이에서 관찰되는 차별적인 값의 예가 된다. 툴라레미아 주형을 함유하지 않는 3개의 샘플 (모듈 1, 2, 및 3)은 NEG 판정을 받았다. 약 60,000개의 툴라레미아 게놈 카페 등가물을 함유하는 3개의 샘플 (모듈 4, 5, 및 6)은 POS 판정을 받았다. NEG 판정을 받은 3개 중 2개는 (-)의 기울기를 나타낸 반면, NEG 판정을 받은, 세번째 것은 POS 판정에 사용되는 역치 아래의 약한 (+)의 기울기를 나타내었고, 이 경우, 그 값은 0.002였다. 이는 본 검정의 배경 잡음을 나타내는 것이다. POS 판정을 받은 것은 (+)의 기울기를 나타내었다. 엑셀에서의 기울기 함수인 $b = \text{Sum}((x - \text{Avg}(x)) * (y - \text{Avg}(y))) / \text{Sum}((x - \text{Avg}(x))^2)$ (여기서, x 는 x 좌표를 포함하는 기울기 중의 필드이고, y 는 y 좌표를 포함하는 기울기 중의 필드임)를 이용함으로써 상기 플롯에 제시되어 있는 2번째 및 4번째 데이터 점을 사용하여 기울기를 산출하였다. 본 결과는 2개의 상이한 시점에 2개의 온도에서의 표지 강도를 사용하면 위양성은 최소화시키면서 표적 핵산의 존재 여부를 정확하게 검출할 수 있다는 것을 입증한다.

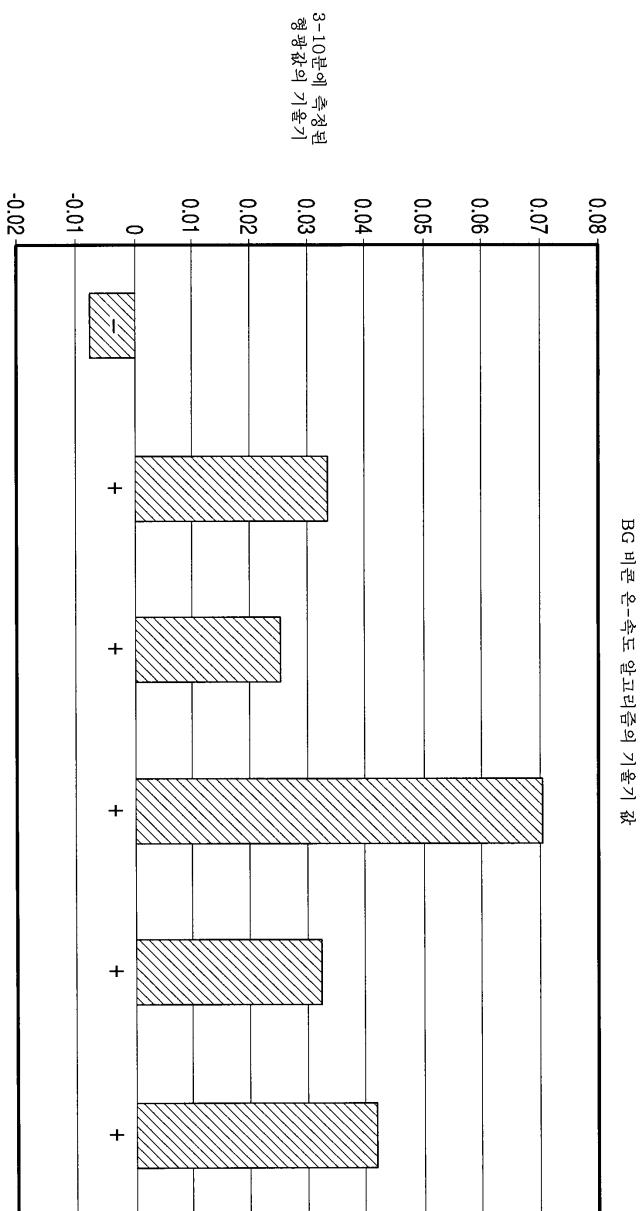
도면

도면1



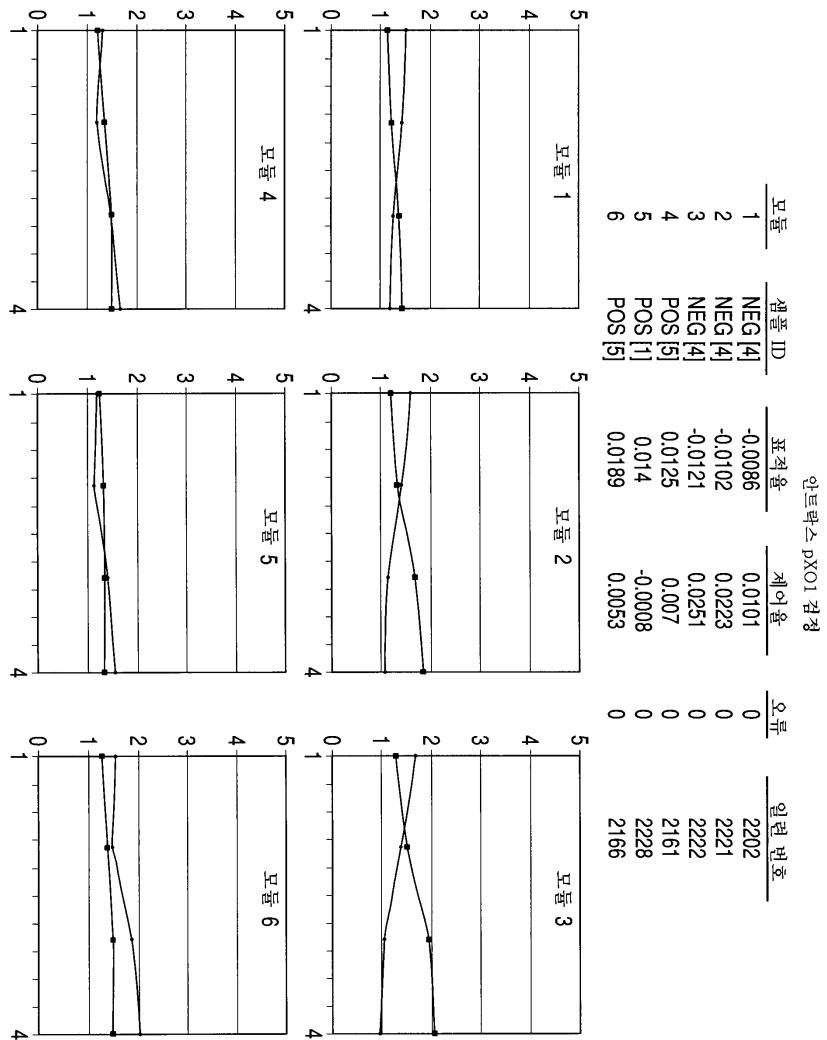
각 반응에서 BG 특이 주형의 계획 등가물 카피수

도면2

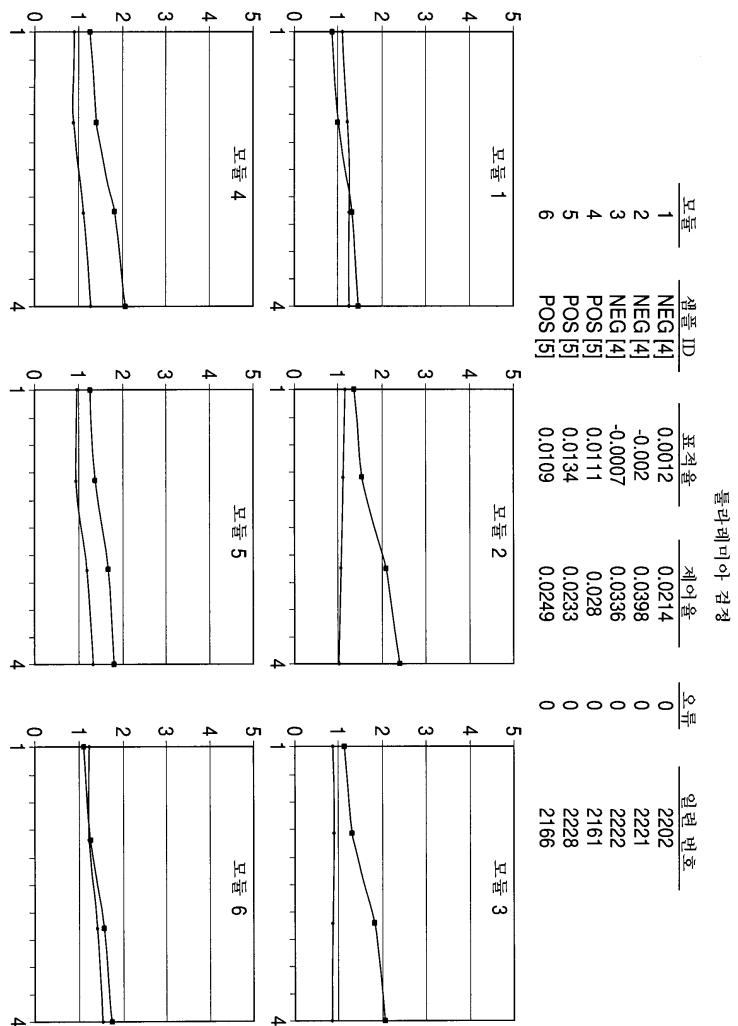


반응 유형(BG 특이 주형의 존재 또는 부재)

도면3



도면4



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SMITHS DETECTION INC.

<120> DETECTION ALGORITHM FOR PCR ASSAY

<130> 038519-0451

<140> PCT/US2009/053253

<141> 2009-08-10

<150> 61/136,040

<151> 2008-08-08

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 1

tgcgttctga ctgaacagct gatcgag

27

<210

> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 2

tcctcttgaa attcccaat gg

22

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 3

ctcgagaaag gttgtcgtaa aacgcctcga g

31

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 4

tggctaatca gcttaaggaa catcccacag ac

32

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 5

| | |
|-------------------------------|----|
| tgcataaaggc tgtaaaacat cacgaa | 25 |
|-------------------------------|----|

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 6

| | |
|--|----|
| caacgtggaa caaaaatagca atgaggtaac gttg | 34 |
|--|----|

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 7

| | |
|---------------------------------|----|
| agcgtaagat tacaatggca ggctccaga | 29 |
|---------------------------------|----|

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 8

| | |
|-------------------------------|----|
| gccccaaaggttt tatcgttctt ctca | 24 |
|-------------------------------|----|

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 9

cctcgtaagt gccatgatac aagccgagg

29