



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년10월06일  
(11) 등록번호 10-1447405  
(24) 등록일자 2014년09월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2013-7025318(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2005년10월17일  
심사청구일자 2013년10월25일  
(85) 번역문제출일자 2013년09월25일  
(65) 공개번호 10-2013-0113541  
(43) 공개일자 2013년10월15일  
(62) 원출원 특허 10-2007-7011244  
원출원일자(국제) 2005년10월17일  
심사청구일자 2010년10월15일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/037667  
(87) 국제공개번호 WO 2006/044994  
국제공개일자 2006년04월27일  
(30) 우선권주장  
60/619,654 2004년10월18일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
PNAS, Vol. 101, No. 7, pp. 1933-1938  
(2004.02.17.)

(73) 특허권자  
브랜டை스 유니버시티  
미국 매사추세츠 월탐 사우쓰 스트리트 415 (우  
02454)  
(72) 발명자  
왕, 로렌스, 제이.  
미국 02466 매사추세츠주 어번데일 듀필드 로드  
20  
라이스, 존  
미국 02169 매사추세츠주 퀸시 커먼 스트리트 268  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 12 항

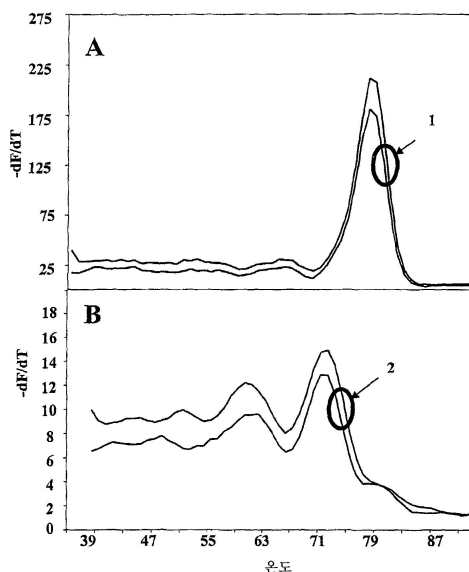
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 핵산 증폭을 위한 프라이머, 프로브 및 방법

(57) 요약

형광 DNA 염료 및 간접적으로 여기가능한 표지된 프라이머 및 프로브를 사용하는, PCR 증폭, 바람직하게는 LATE-PCR 동안 또는 이후의 균질 검출은 재현성 및 정량을 개선한다. 형광 DNA 염료 및 간접적으로 여기가능한 표지된 미스매치-허용 프로브를 사용하는, 비-대칭적 PCR 증폭, 바람직하게는 LATE-PCR 동안 또는 이후의 저온 균질 검출은 복합체 표적의 분석을 허용한다. LATE-PCR 증폭 이후 서열결정 샘플 제조 방법은 복잡함을 감소시키고 "단일 시험관" 공정을 허용한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**산체스, 아킬레스, 제이.**

미국 01701 매사추세츠주 프레이밍햄 포스터 드라이브 14

**피어스, 케네쓰**

미국 01760 매사추세츠주 네이틱 월넛 스트리트 52

**솔크, 제시**

미국 98105 워싱턴주 시애틀 웨스터 포인트 로드  
엔.이. 3011

**레이스, 아더**

미국 02476-5624 매사추세츠주 알링턴 알링턴 스트리트 윌리엄스스트리트 28

**하츠혼, 크리스티나**

미국 02492 매사추세츠주 니덤 그레이트 플레인 애비뉴 1560

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- a) LATE-PCR 방법에 의해, 하나 이상의 DNA 표적을 증폭시켜 하나 이상의 과량 프라이머 스트랜드 및 하나 이상의 제한 프라이머 스트랜드의 카피를 포함하는 증폭 생성물을 생성시키는 단계;
- b) 증폭 생성물을 5배 이상으로 희석시켜 세정된 증폭 생성물을 생성시키는 것으로 이루어지는 세정 단계; 및
- c) 세정된 증폭 생성물 내 하나 이상의 상기 스트랜드의 카피를 서열결정하는 단계를 포함하는, 순차적 DNA 증폭-서열결정 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 서열결정이 디데옥시 사이클 서열결정인 방법.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 증폭 생성물이 20배 이상으로 희석되는 것인 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 증폭 생성물이 20배 이상으로 희석되는 것인 방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 과량 프라이머 스트랜드가 서열결정되는 것인 방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 제한 프라이머 스트랜드가 서열결정되는 것인 방법.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 희석이 두 단계로 수행되는 것인 방법.

### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 희석이 증폭 생성물을 서열결정 시약의 혼합물과 결합시키는 것을 포함하는 것인 방법.

### 청구항 9

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 표적이 둘 이상의 표적을 포함하는 것인 방법.

### 청구항 10

제1항에 있어서, 하나의 제한 프라이머 스트랜드가 그것의 상보성인 과량 프라이머를 서열결정 프라이머로 사용하여 서열결정되고, 세정된 증폭 생성물 내 다른 과량 프라이머는 차단되는 것인 방법.

### 청구항 11

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 표적이 둘 이상의 변이체 서열을 포함하는 것인 방법.

### 청구항 12

제1항에 있어서, 과량 프라이머 스트랜드에 상보성인 제한 프라이머를 상기 세정된 증폭 생성물에 첨가하는 방법.

### 청구항 13

삭제

## 청구항 14

삭제

## 명세서

### 기술분야

- [0001] 본 발명은 중합효소 연쇄 반응을 이용하는 증폭을 포함하는 핵산 증폭 반응, 및 상기 반응을 서열결정 및 혼성화 프로브 검출 방법과 조합하여 이용하는 분석에 관한 것이다.

### 배경기술

- [0002] 핵산 증폭 기술 및 분석은 잘 알려져 있다. 일부 증폭 반응, 예를 들어 핵산 서열 기반 증폭 (NASBA)은 등온이다. 다른 반응, 예를 들어 중합효소 연쇄 반응 (PCR)은 열 사이클링을 이용한다. 증폭된 생성물의 형광 검출을 사용하는 바람직한 증폭 분석은 균질이고, 즉, 검출을 허용하기 위해 시약의 물리적인 분리 (예를 들어, 비결합된 프로브로부터 결합된 프로브의 분리)를 필요로 하지 않고, 단일 밀폐 용기 내에서 수행할 수 있다. 상기 분석은 생성물이 증폭 후 검출되는 종점 (end-point)일 수 있거나, 증폭이 진행할 때 생성물이 검출되는 실시간일 수 있다.
- [0003] PCR을 이용하는 핵산 증폭 및 분석은 예를 들어 미국 특허 4,683,202, 4,683,195 및 4,965,188과 일반적으로 문헌 [PCR PROTOCOLS, a guide to Methods and Applications, Innis et al. eds., Academic Press (San Diego, CA (USA) 1990)]에 기재되어 있다. 반응이 진행할 때 일부 또는 모든 PCR 사이클 동안 증폭된 생성물이 검출되는 실시간 분석을 포함한 균질 PCR 분석은 예를 들어 미국 특허 5,994,056, 5,487,972, 5,925,517 및 6,150,097에 기재되어 있다.
- [0004] PCR 증폭 반응은 일반적으로 대칭적이도록, 즉, 순방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 등몰 농도 및 동일 용융 온도 ( $T_m$ )로 사용함으로써 이중쇄 앰플리콘을 지수적으로 제조하도록 설계된다. PCR 반응에서 단일쇄 DNA를 직접 제조하기 위한 제한된 용도가 밝혀진 기술이 "비대칭적 PCR"이다 ([Gyllenstein and Erlich, "Generation of Single-Stranded DNA by the Polymerase Chain Reaction and Its Application to Direct Sequencing of the HLA-DQA Locus," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 7652-7656 (1988)]; 및 미국 특허 5,066,584). 비대칭적 PCR은 프라이머 중 하나가 다른 프라이머 농도의 1-20%의 제한 양으로 존재하도록 5배 내지 100배 희석되는 점에서 대칭적 PCR과 상이한 비-대칭적 PCR 증폭 방법이다. 그 결과, 증폭은 두 프라이머가 연장되어 이중쇄 생성물, 또는 앰플리콘을 생성하는 지수기에 이어, 단지 하나의 프라이머가 남아서, 단일쇄 앰플리콘을 생성하는 직선 증폭으로 이루어진다.
- [0005] 보다 최근에, 본 발명자들은 "Linear-After-The-Exponential" PCR (약어로, "LATE-PCR")로서 공지된 비-대칭적 PCR 증폭 방법을 개발하였다. LATE-PCR은 두 프라이머가 어닐링되고 연장되는 지수기에 이어, 제한 (Limiting) 프라이머의 소비 후 과량 (Excess) 프라이머만이 어닐링되고 연장되는 직선기로 이루어지는 비-대칭적 PCR 증폭이다 (모두 전문을 본원에 참고로 포함하는 문헌 [Sanchez et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 101: 1933-1938], 국제 특허 출원 공개 WO 03/054233 (2003년 7월 3일 공개), 및 [Pierce et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 102: 8609-8614] 참조).
- [0006] PCR 증폭에서 이중쇄 앰플리콘 생산을 모니터링하기 위한 편리하고 저렴한 방법은 이중쇄 DNA 내로 인터칼레이팅되거나 달리 상호작용할 때 형광을 내는 염료, 예를 들어 SYBR Green I 또는 SYBR Gold를 사용하는 것이다 (예를 들어, 미국 특허 5,994,056 참조). PCR 증폭 동안 실시간으로 수행되거나 증폭 후 수행되는 앰플리콘의 용융 온도 분석이 생성물 확인을 위해 사용된다. 상기 용융 온도 분석을 사용하는 한가지 문제는 염료 형광이 앰플리콘 크기의 함수라는 점이다. 다른 문제는 염료가 분석 동안 낮은 용융 온도를 갖는 증폭 생성물, 또는 앰플리콘으로부터 보다 높은 용융 온도를 갖는 앰플리콘으로 재분배하여 결과를 왜곡한다는 점이다. 상기 문제들을 해결하기 위해 2가지 방안이 제시되었다. 한가지 방안인 G 켄칭 (quenching)은 프라이머 디자인에 심한 제한을 부여하고, 큰 배경 형광을 유발한다 (Crockett AO, Wittwer CT. "Fluorescein-Labeled Oligonucleotides for Real-Time PCR: Using the Inherent Quenching of Deoxyguanosine Nucleotides" Anal. Biochem. 290:89-97 (2001)). 다른 방안인 SYBR 염료를 LC Green 염료로 교체하는 것은 풍부하게 존재하지 않는 서열에 대한 매우 적은 비율의 시그널을 얻고, 고도로 특수화된 소프트웨어 및 하드웨어를 요구한다 (Wittwer et al. High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen," Clin. Chem.

49:853-860 (2003)).

[0007] 형광-표지된 프로브는 실시간으로 또는 중점 분석에 의해 목적하는 앰플리콘의 축적을 측정하기 위해, PCR 분석을 포함하는 균질 핵산 증폭 분석에서 사용된다. 몇몇 이용가능한 유형의 프로브는 선형 단일쇄 프로브에 비해 유의하게 대립유전자-식별성이다. 실시간 프로브는 PCR 사이클의 연장 단계 동안 DNA 중합효소의 5'-내지-3' 엑소뉴클레아제 활성에 의해 절단되는 이중-표지된 선형 프로브 (미국 특허 5,210,015, 5,487,972 및 5,538,848 참조); 분자 비콘 (beacon) 프로브 (미국 특허 5,925,517, 6,103,476 및 6,365,729 참조); 마이너 그루브 (minor groove) 결합 프로브 (문헌 [Afonina et al. "Minor Groove Binder-Conjugated DNA Probes for Quantitative DNA Detection by Hybridization-Triggered Fluorescence," Biotechniques 32: 946-949 (2002)] 참조); 표적 스트랜드 상에 인접하게 혼성화될 때 FRET하는 선형 프로브 쌍; 그에 대해 표적이 표지된 프로브 스트랜드에 혼성화하기 위해 경쟁하는 켄칭된 이중쇄 선형 프로브 (문헌 [Li, Q. et al. (2002), Nucl. Acid. Res. 30:e5] 참조); 및 프로브가 표적에 결합하여 이중쇄 구역을 형성할 때 형광을 내는 비대칭적 시아닌 염료에 연결된 펩티드 핵산 (PNA) 올리고머인 소위 "라이트-업 (light-up)" 프로브를 포함한다. LATE-PCR을 위해, 본 발명자들은 저온 대립유전자-식별 프로브, 예를 들어 저온 분자 비콘 프로브를 이용하였다 (WO 03/045233 참조). 표지된 올리고뉴클레오타이드 프로브는 링커에 의해 프라이머에 부착될 수 있어서, 증폭 동안 프로브는 파괴되지 않고 대신 프라이머의 연장으로부터 생성되는 표적 서열에 자유롭게 혼성화한다. 그 예로는 Scorpions (등록상표) (분자 비콘 프로브가 부착된 프라이머), 및 Anglers (등록상표) (형광단-표지된 선형 프로브가 부착된 프라이머)가 있다 ([Lee, M.A. et al. (2002), Analytica Clinica Acta 457: 61:70]; [Whitcombe, D. et al. (1999), Nature Biotechnology 17: 804-807]). 형광 표지를 갖는 상기 복합체 구조의 프로브 부분은 프라이머 부분과 따로 혼성화한다. 따라서, 이들은 표지된 프로브 및 표지되지 않은 프라이머이고, 상기 용어를 본원에서 사용한다. 그러나, 표적-특이적 프로브는 이중쇄 생성물의 총 생산을 모니터링하는 능력이 결여된다.

[0008] 특정 프로브는 미스매치 (mismatch)-허용성이다. 미스매치-허용 프로브는 분석에서 검출 온도에서 하나 초과 표적 서열과 혼성화하여 그에 대한 검출가능한 신호를 생성하고, 이렇게 형성된 다양한 혼성체는 상이한 용접을 가질 것이다. 선형 또는 무작위 코일형 (random coil)의 단일쇄 프로브는 일반적으로 미스매치 허용성이다. 상기 프로브의 예로는 그의 형광 수준이 하나 또는 다른 표적 스트랜드에 혼성화시에 증가하는 내부 형광 잔기를 갖는 선형 프로브; 프로브가 하나 또는 다른 표적에 혼성화할 때 표지의 형광이 염료로부터의 FRET에 의해 발생하도록 SYBR Gold 및 SYBR Green I 염료와 조합으로 사용되는 형광 표지된 선형 프로브 (2002년 8월 28일 공개된 미국 특허 공개 US 2002/0119450 참조), 소위 "슬로피 (sloppy) 비콘", 및 FRET하는 선형 프로브 쌍의 변동 (미국 특허 6,472,156 참조)이 있다.

[0009] 각각 증폭 반응에서 생성된 하나의 가능한 표적 앰플리콘에만 결합하는 다수의 프로브를 사용하면 복잡한 반응 혼합물을 분석하는 또는 많은 가능한 표적 중에서부터 하나 또는 적은 표적을 검출하는 문제가 생긴다. 이용가능한 형광 검출은 일반적으로 8개 이하의 제한된 수의 형광단의 해상도를 허용한다. 예를 들어, 각각의 표적에 대한 상이한 대립유전자-식별 분자 비콘 프로브를 설계하고 각각의 프로브를 상이하게 표지함으로써 제한 다중화가 가능하다 (예를 들어, 문헌[Tyagi et al. (2000) Nature Biotechnology 18: 1191-1196] 참조). 각각 다수 색상의 분취액을 포함하는 대립유전자-식별 프로브의 혼합물은 프로브 신호 (signature)의 수를 연장시키고, 많은 (적어도 56개 이하) 표적 중 하나만이 실제 존재하는 경우 잘 수행하지만, 하나 초과 표적이 존재하는 경우 불분명한 결과를 얻는다.

[0010] 복합체 표적 또는 많은 가능한 표적 중 하나를 포함하는 많은 상황이 존재한다. 상기 상황에 대해 몇몇 방법이 개발되거나 제안되었지만, 모두 심각한 단점 및 한계를 갖는다. 국제 특허 출원 공개 WO 01/31062 (Tyagi 등)에서는 때때로 그들을 미스매치 허용성이 되도록 하고 PCR 증폭 반응의 어닐링 온도에서 다수 표적에 어느 정도 결합할 수 있도록 만드는 긴 루프 (loop) 서열을 갖는 분자 비콘 프로브인 "슬로피 비콘"으로 칭하는 기술을 설명하였다. 상기 프로브는 미스매치된 표적에 대한 불량한 반응 운동학의 단점이 있고, PCR 증폭의 연장 온도에서 완벽하게 매칭된 표적에 혼성화되어 남고 Taq DNA 중합효소에 의해 절단되기 쉽다. 또한, 분석 조건 하에 프로브-표적 혼성체의 용융 온도의 간접 표시만이 얻어지고, 이는 평형이 달성된 것으로 추정한다. FRET 프로브를 사용하는 대칭적 PCR 증폭에서 실시간 다중화가 설명되었다. 증폭을 저해하지 않도록, 모든 프로브-표적 혼성체의 용융 온도는 프라이머 어닐링 온도와 프라이머 연장 온도 사이의 좁은 온도 범위에 있도록 제한된다. 또한, 상기 방법은 정량적이지 않다. 상이한 색상의 FRET 프로브를 사용하는 증폭 후 멀티프로브 분석이 문헌 [Wittwer et al., "Real-Time Multiplex PCR Assays, Methods" 25: 430-442 (2001)]에 개시되었다. 대칭적 PCR 증폭 후 반응 혼합물은 신속하게 냉각된 다음, 존재하는 다양한 형광단에 대한 용융 곡선을 결정하기 위해 서서히 가열된다. 상기 방법은 정량적이지 않다. 또한, 복제물 대칭적 PCR 증폭 사이의 큰 산란 (scatter) 때

문에, 종점 분석은 대체로 단지 정성적인 경향이 있다.

- [0011] 서열결정 반응 생성물은 프로빙 (probing)에 대한 대안을 제공한다. 전통적인 디데옥시 서열결정은 증폭 반응, 예를 들어 대칭적 PCR 또는 LATE-PCR의 생성물을 사이클 서열결정을 위한 출발 물질로서 사용할 수 있다. 증폭된 생성물은 잔류하는 dNTP 및 프라이머를 제거하기 위해 에탄올 침전 또는 친화도 컬럼을 사용하여 정제되고, 하나의 서열결정 프라이머 및 형광 표지된 디데옥시 뉴클레오타이드를 사용하여 사이클 서열결정 반응되고, 모세관 겔 전기영동된다. "파이로서열결정 (Pyrosequencing)"은 당업계에 공지된 실시간, 등온, 합성에 의한 서열 (sequence-by-synthesis) 방법이다. 파이로서열결정을 위한 출발 물질의 제조에 지수적 증폭 방법, 예를 들어 PCR이 사용되면, 증폭된 생성물은 단일쇄 생성물의 단리 및 증폭 반응으로부터 dNTP, 파이로포스페이트 및 통합되지 않은 프라이머의 제거에 의해 세정해야 한다. LATE-PCR은 주로 단일쇄 생성물만을 생성하기 때문에 샘플 제조를 단순화시키지만, 그 자체에서 생성물을 세정할 필요를 제거하지는 않는다.
- [0012] 본 발명의 한 측면은 DNA 형광 염료, 예를 들어 SYBR Green I 또는 바람직하게는 SYBR Gold를 여기서킴으로써 간접적으로 여기된 형광단-표지된 선형 올리고뉴클레오타이드 프라이머로부터의 형광의 검출을 이용하는, 증폭 반응 (온도 사이클링 또는 등온)의 반응 생성물의 균질 검출을 위한 방법이다. 상기 염료는 인터칼레이팅되도록 전달되는 이중쇄 DNA와 회합할 때 형광을 발한다. 상기 방법은 검출 온도에서 형광을 관측하거나 (종점 검출), 증폭후 용융 분석에 의해 온도의 함수로서 형광의 변화를 확인함으로써 실시간으로 또는 증폭 반응 후 수행할 수 있다. 반응 혼합물이 다양한 반응 생성물의 용융 온도를 통해 가열됨에 따라, 특정 형광단-함유 프라이머를 함유하는 다양한 앰플리콘이 그들의 용융 온도에 도달하고 단일쇄로 되므로 형광은 점차 감소한다. 바람직한 방법은 프라이머 시그널 대 염료 시그널의 비를 계산하는 것을 포함한다.
- [0013] 본 발명의 다른 측면은 DNA 형광 염료 및 바람직하게는 프라이머 쌍의 일부로서 적어도 하나의 상기 표지된 프라이머, 및 임의로 증폭 시약을 포함하는 시약 키트에 관한 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 측면은 저온 검출 단계를 이용하는 LATE-PCR 반응의 반응 생성물을 검출하기 위한 균질 방법에 관한 것이다. 특정 실시태양은 반응 혼합물 내에, 본 발명에 따른 적어도 하나의 대립유전자-식별 프로브, 즉, 저온 (저  $T_m$  또는 초저  $T_m$ ) 표적-특이적 프로브이고, 프로브-표적 혼성체 내로 인터칼레이팅된 DNA 형광 염료, 예를 들어, 바람직하게는 SYBR Gold를 여기서킴으로써 간접적으로 여기되는 것을 제외하고는 일반적으로 문헌 [Li, Q. et al. (2002), Nucl. Acid. Res. 30:e5]에 기재된 유형의 켄칭된 이중쇄 프로브를 포함하는 것을 포함한다. 다른 실시태양은 반응 혼합물 내에 본 발명에 따른 적어도 하나의 간접적으로 여기가능한 미스매치-허용 프로브, 즉, 켄칭된 저온 프로브인 것을 제외하고는 일반적으로 미국 특허 출원 공개 US 2002/0119450 (Lee 및 Furst)에 기재된 유형의 켄칭된 단일쇄 프로브를 포함하는 것을 포함한다. 상기 다양한 방법은 LATE-PCR 증폭의 저온 검출 단계 동안 염료를 여기시키고, 상기 조건 하에 프로브로부터의 형광을 검출하여 표적 단일쇄 서열의 측정치를 제공하는 것을 포함한다. 특정 실시태양은 바람직하게는 반응 혼합물의 온도가 프로브의 용융 온도(들)를 초과하는 PCR 사이클의 연장 단계 동안 또는 단계의 끝에 염료 형광을 검출함으로써 반응 혼합물 내의 이중쇄 생성물(들)의 총량을 측정하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 특정 바람직한 방법은 프로브 시그널 대 염료 시그널의 비를 계산하는 것을 포함한다. 복제물 샘플의 경우에, 상기 비는 PCR 증폭에서 발생하는 것으로 공지된 증폭 수율에서 복제물 샘플 사이의 차이를 교정한다.
- [0015] 본 발명의 다른 측면은 상기 저온 대립유전자-식별 및 켄칭된 미스매치-허용 프로브; 적어도 하나의 상기 저온 표적-특이적 프로브를 증폭 시약 및 바람직하게는 형광 DNA 염료와 함께 포함하는 LATE-PCR 키트; 및 LATE-PCR 프라이머 및 적어도 하나의 상기 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 세트에 관한 것이다.
- [0016] 본 발명의 다른 측면은 다수의 앰플리콘이 존재하거나 존재할 수 있을 때 사용하기 위한 균질 검출 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 그들의 낮은  $T_m$ 으로 인해 증폭을 저해하지 않고 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 중합효소에 의해 가수분해 (절단)되지 않고, 가수분해되고 적합한 여기원에 의해 직접 여기되거나 적합한 여기원에 의해 여기된 형광 DNA 염료에 의해 간접적으로 여기될 때 형광 시그널을 방출하는 하나 이상의 저온 미스매치-허용 검출 프로브를 LATE-PCR 증폭 반응 혼합물 내에 포함하는 것을 포함한다. 상기 방법은 유전형 분석 (genotyping)과 같은 용도를 위해 단일-프로브 분석 및 다수-프로브 분석을 포함한다. 하나 초과인 프로브가 동일한 형광단으로 표지될 수 있고, 이 경우에 식별은 단일 프로브가 이용될 때와 같이 온도에 따른 형광의 변화에 따른다. 프로브는 상이한 형광단으로 표지될 수 있고, 이 경우에 색상 차이가 또한 식별을 위해 이용된다. 확인 및 정량의 목적을 위한 표적 사이의 식별은 동일한 또는 상이한 온도에서 형광단 사이의 형광 비, 및 형광단-대-염료 비를 포함할 수 있다. 검출은 바람직하게는 증폭 (실시간) 동안 및 보다 바람직하게는 LATE-PCR 증폭 프로토콜에 포함된 저온 검출 단계 동안 수행되고, 검출 단계는 다수의 온도에서의 검출을 포함



할 수 있다. 본 발명의 또 다른 측면은 상기 검출 방법에 유용한 단일쇄 선형 프로브에 관한 것이고, 상기 프로브는 미국 특허 출원 공개 U.S. 2002/0119450 (2002년 8월 29일)에 기재된 유형의 것, 즉 저온 (저  $T_m$  또는 초저  $T_m$ ) 프로브이고, 미스매치-허용성이고, 달리 저온에서의 2차 구조로부터 이루어질 형광을 켜치시키는 켜칭 잔기를 포함하는 것을 제외하고는 형광 DNA 염료로부터의 형광 방출에 의해 여기된 프로브일 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 측면은 LATE-PCR 증폭 생성물이 증폭 반응 챔버 (chamber), 용기, 웰, 슬라이드 또는 컨테이너 (container) 내에서 파이로서열결정을 위해 준비될 수 있도록 하는, 서열결정을 통한 증폭 (amplification-through-sequencing) 방법, 즉 작은 부피, 바람직하게는 17  $\mu$ l 이하에서 수행되는 LATE-PCR 증폭에서 이용할 수 있는 "단일 시험관 (single-tube)" 작업에 관한 것이다.

[0018] 본 발명의 다른 측면은 증폭 반응 혼합물의 증폭 후에 수성 희석만을 이용하는 디테옥시 서열결정을 위해 LATE-PCR 생성물을 준비하기 위한 방법에 관한 것이고, 이는 "단일 시험관" 작업으로 수행될 수 있다.

### 발명의 내용

[0019] 본원에서 핵산 프라이머, 프로브 및 앰플리콘의 용융 온도 ( $T_m$ )를 참조한다.  $T_m$ 은 대상 물질의 절반이 이중쇄로 존재하고 나머지는 단일쇄인 온도를 의미한다. 일반적으로, LATE-PCR에 대한 것을 제외하고는, 프라이머의  $T_m$ 은 프라이머 및 염 농도의 표준 조건에서 "%GC" 방법 (Wetmar, J.G. (1991) "DNA Probes: Applications of the Principles of Nucleic Acid Hybridization," Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26: 227-259) 또는 "2(A+T) 플러스 4(G+C)" 방법을 이용하여 계산된 값이다 (상기 두 방법은 잘 알려져 있다). 그러나, LATE-PCR은 증폭 개시시에 프라이머 농도를 고려하여 특정 반응에서 실제 프라이머 용융 온도를 고려한다 (문헌 [Sanchez et al. (2004) PNAS (USA) 101: 1933-1938] 및 [Pierce et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 102: 8609-8614] 참조).

[0020] 본원에서, 본 발명자들은 증폭의 개시시에 상기 농도-조정된 용융 온도를  $T_{m[0]}$ 로 칭하고, 이는 비-천연 뉴클레오타이드가 사용되는 경우에서와 같이 실험적으로 결정할 수 있거나, 하기 실시예에서 0.07 M 1가 양이온 농도인 염 농도 조정을 이용하여 "최근접 이웃 (nearest neighbor)" 방법 ([Santa Lucia, J. (1998), PNAS (USA) 95: 1460-1465]; 및 [Allawi, H.T. and Santa Lucia, J. (1997), Biochem. 36: 10581-10594])에 따라 계산할 수 있다. LATE-PCR은 또한 앰플리콘의 용융 온도를 고려할 수 있고, 이는 식:  $T_m = 81.5 + 0.41 (\%G+\%C) - 500/L + 16.6 \log[M]/(1 + 0.7[M])$  {여기서, L은 뉴클레오타이드에서 길이이고, [M]은 1가 양이온의 몰 농도임}을 사용하여 계산된다. 선형 또는 무작위 코일형 프로브의 용융 온도는 프라이머에 대한 것과 같이 계산된다. 구조화 프로브, 예를 들어 분자 비콘 프로브의 용융 온도는 실험적으로 결정할 수 있다.

[0021] 본원에서 사용되는 "LATE-PCR"은 하나의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 ("과량 프라이머")를 다른 프라이머 ("제한 프라이머") (자체는 형광 검출가능한 이중쇄 앰플리콘을 생산하기 위해 거의 충분한 PCR 사이클에서 소비되도록 200 nM까지의 낮은 농도로 사용된다)에 대해 적어도 5배 과량으로 사용하는 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 공정을 이용하는 비-대칭적 DNA 증폭을 의미하고, 여기서, 증폭 개시시 제한 프라이머의 농도-조정된 용융 온도 ( $T_{m[0]}^L$ )는 증폭 개시시 과량 프라이머의 농도-조정된 용융 온도 ( $T_{m[0]}^X$ )보다 최대 5°C 낮고, 바람직하게는 적어도 그 만큼 높고, 보다 바람직하게는 3-10°C 더 높고; 열 사이클링은 단일쇄 생성물, 즉, 과량 프라이머의 연장 생성물 (때때로 "과량 프라이머 스트랜드"로서 칭함)을 생산하도록 제한 프라이머의 소비 후 다수 사이클에 대해 지속된다.

[0022] 본 발명의 프라이머 및 프로브, 또는 본 발명의 방법 및 키트에서 유용한 프라이머 및 프로브는 넓은 의미에서 올리고뉴클레오타이드이고, 이는 이들이 DNA, RNA, DNA와 RNA의 혼합물일 수 있고, 비-천연 뉴클레오타이드 (예를 들어, 2' o-메틸 리보뉴클레오타이드) 및 비-천연 뉴클레오타이드간 연결기 (예를 들어, 포스포로티오에이트 연결기)를 포함할 수 있음을 의미한다. 프라이머 및 프로브는 둘 모두 부분적으로 반응 혼합물 내의 목적하는 서열에 혼성화함으로써 기능한다. 프라이머는 증폭 반응의 프라이머 어닐링 온도에서 그의 상보성 서열에 혼성화하고 DNA 중합효소에 의해 그의 3' 단부에서 연장될 수 있는 단일쇄 올리고뉴클레오타이드이다. 본 발명의 프라이머는 간접적으로 여기가능한 형광단에 의한 그의 프라이밍 서열의 혼성화를 신호하는 프라이머이다. 본 발명의 프로브, 또는 본 발명의 방법 및 키트에 유용한 프로브는 증폭 반응에서 또는 증폭 반응 이후 검출 온도 (들)에서 그의 의도된 표적 서열(들)에 혼성화할 수 있고 간접적으로 여기가능한 형광단에 의한 혼성화를 형광적으로 신호하는 단일쇄 올리고뉴클레오타이드이거나 상기 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 본원에서 사용되는

"프로브"는 증폭 반응에서 DNA 중합효소에 의해 연장되지 않는다. 완벽하게 상보성인 표적 서열에 대해 매우 특이적이고, 하나 또는 수개의 미스매칭된 염기를 갖는 밀접하게 관련된 서열을 강하게 거부하는 프로브는 "대립유전자 식별성이다". 적어도 하나의 적용가능한 검출 조건 하에 완벽하게 상보성인 서열뿐만 아니라 하나 이상의 미스매칭된 염기를 갖는 부분적으로 상보성인 서열에 혼성화하는 프로브는 "미스매치 허용" 프로브이다.

[0023] 본원에서 사용되는 "형광 DNA 염료"는 이중쇄 DNA와 회합될 때 형광 여기가능하게 되는 조성물, 예를 들어 SYBR Green I 또는 SYBR Gold이다. 형광 DNA 염료는 이중쇄 DNA 내로 인터칼레이팅되는 것으로 보고되었지만, 본 발명자들은 임의의 작용 이론에 매이기를 바라지 않는다.

[0024] 본 발명의 프라이머는 형광 DNA 염료와 함께 사용되고, 간접적으로 여기가능한 형광단으로 표지된 선형 단일쇄 올리고뉴클레오티드이고, 즉, 프라이머가 반응 혼합물 내의 주형 스트랜드에 혼성화하여 이중쇄 DNA의 구역을 형성하고, DNA 형광 염료를 여기서시키거나 DNA 형광 염료에 의해 흡수되지만 샘플 상에서 형광단은 빛을 내지 않는 과량의 빛 (반드시는 아니지만 보통 가시광)을 낼 때, 형광단이 빛을 방출한다. 에너지는 형광 공명 에너지 전이 (FRET)에 의해 형광 DNA 염료로부터 부근 형광단으로 전이되는 것이 보고되었지만, 본 발명자들은 임의의 작용 이론에 매이기를 바라지 않는다. 본 발명자들은 상기 상황에서 빛을 방출하는 형광단을 "간접적으로 여기된" 형광단으로 칭한다. 본 발명의 프로브는 마찬가지로 이중쇄 DNA에 결합하는 형광 염료 ("형광 DNA 염료")와 함께 사용되고, 상기 간접적으로 여기가능한 형광단으로 표지되어, 프로브가 반응 혼합물 내의 표적 스트랜드에 혼성화하고 염료가 여기될 때, 형광단은 빛을 방출한다.

[0025] 본원에서 사용되는 "키트"는 증폭 또는 분석을 수행하기 위한 시약의 집합체를 의미한다. 키트는 "완전할" 수 있고, 즉, 증폭 또는 증폭-검출의 모든 단계에 필요한 모든 시약을 포함할 수 있다. 별법으로, 키트는 상기 작업을 위해 필요한 특정 시약이 포함되지 않아 "부분적일" 수 있다. 본 발명의 완전 및 부분 키트는 샘플 준비, 예를 들어 핵산 분리 및 역전사를 위한 시약을 추가로 포함할 수 있다. 서열결정은 2개의 키트, 예를 들어 완전 LATE-PCR 증폭 키트 및 완전 사이클 서열결정 키트를 포함할 수 있거나, 2개가 단일 키트 내로 합해될 수 있다.

[0026] 본원에서 사용되는 "올리고뉴클레오티드 세트"는 증폭 또는 분석을 수행하기 위한 프라이머, 또는 프라이머 및 프로브의 집합체를 의미한다. 서열결정을 위해, 올리고뉴클레오티드 세트는 예를 들어 LATE-PCR 증폭을 위한 제한 프라이머 및 과량 프라이머, 및 사이클 서열결정을 위한 하나 이상의 추가의 서열결정 프라이머를 포함할 수 있다. 혼성화 프로브 분석을 위해, 올리고뉴클레오티드 세트는 예를 들어 LATE-PCR 증폭을 위한 제한 프라이머 및 과량 프라이머, 및 적어도 하나의 형광단-표지된 혼성화 프로브를 포함할 수 있다.

[0027] 본원에서 사용되는 "단일 시험관" 방법은 일련의 적어도 2개 작업, 예를 들어 샘플 준비, 증폭 또는 서열결정이 샘플을 하나의 컨테이너 (시험관, 반응 웰, 미세유동 장치 내의 챔버, 유리 슬라이드, 또는 반응 혼합물을 보유할 수 있는 임의의 다른 기구)로부터 다른 컨테이너로 전달하지 않으면서 수행될 수 있는 것을 의미한다.

[0028] 낮은 용융 온도의 프로브 (즉, 낮은 용융 온도의 프로브-표적 혼성체를 형성하는 프로브)가 증폭 개시 전에 증폭 반응 혼합물에 첨가되고 원하는 경우에만 사용될 수 있다. 온도를 전체 또는 일부의 증폭 반응 동안 프로브의 용융 온도를 초과하여 유지함으로써, 프로브는 그의 표적에 혼성화되는 것이 방지되고 가능하게는 반응의 효능을 감소시키는 것이 방지된다. LATE-PCR 분석의 특정 실시태양에서는 저온 프로브를 사용한다. 본원에서 사용되는 "저  $T_m$  프로브"는 증폭 개시시에 농도-조정된 용융 온도 ( $T_{m[0]}$ )가 LATE-PCR 분석에서 제한 프라이머의  $T_{m[0]}$ 보다 적어도  $5^\circ\text{C}$  미만인 혼성화 프로브를 의미하고; "초저  $T_m$  프로브"는  $T_{m[0]}$ 이 LATE-PCR 반응의 지수기의 평균 프라이머 어닐링 온도보다 적어도  $5^\circ\text{C}$  미만인 혼성화 프로브를 의미한다. 본 발명자들은 종종 프로브를 LATE-PCR 반응에 1 마이크로몰 ( $\mu\text{M}$ ) 농도로 첨가한다. 따라서, 프로브를 설계할 때, 본 발명자들은 때때로 1  $\mu\text{M}$ 의 공칭 농도를 사용하는 것 외에는 앞서 설명한 바와 같이 계산된 공칭  $T_{m[0]}$ 를 사용한다. 대부분의 저  $T_m$  및 초저  $T_m$  프로브는 1  $\mu\text{M}$  농도에서 계산된  $T_{m[0]}$ 가  $30-55^\circ\text{C}$ 이다.

[0029] 저온 프로브를 사용하는 검출은 저온 검출을 필요로 하고, 여기서 프로브-표적 혼성물의 온도는 형광 표지된 프로브가 혼성화하고 신호하도록 하기 위해 충분히 저해된다. 이는 증폭 종결 (종점)시에 또는 증폭후 용융 분석에서 이루어질 수 있다. 별법으로, 저온 검출 단계는 실시간 분석을 위해 LATE-PCR 증폭의 직선기의 일부 또는 모든 사이클 내에 포함될 수 있다. 바람직하게는, 상기 단계는 프라이머 연장 후 및 고온 스트랜드 용융 (또는 "변성") 전에 발생하지만, 프라이머 어닐링 단계에 포함될 수도 있다. LATE-PCR 분석에서 저온 검출 단계는 프라이머 어닐링 온도보다 적어도  $5^\circ\text{C}$  미만인 온도의 감소를 의미한다.



- [0030] 본 발명에 따른 특정 방법은 형광단-표지된 프라이머 또는 혼성화 프로브를, 이중쇄 DNA에 결합하는 형광 염료와 조합하여 사용하고, 염료를 여기시키지만 형광단(들)을 여기시키지 않는 파장에서 염료를 자극하고, 상기 절차에 의해 간접적으로 자극된 형광단에 의해 방출된 형광을 검출하는 것을 포함한다. 본 발명에 따른 방법의 일부 실시태양은 염료로부터의 형광 방출을 또한 검출하는 것을 포함한다. 특정 바람직한 방법은 형광단 방출 대 염료 방출의 비를 계산하는 것을 추가로 포함한다.
- [0031] 본 발명의 한 실시태양은 핵산 증폭 혼합물에 형광 DNA 염료, 예를 들어 SYBR Green I 또는 바람직하게는 SYBR Gold, 및 본 발명에 따른 적어도 하나의 증폭 프라이머, 즉, DNA 중합효소에 의해 연장가능하고, 상기 설명된 바와 같이 프라이밍을 신호하도록 간접적으로 여기가능한 형광단으로 표지되는 선형 단일쇄 올리고뉴클레오타이드를 첨가하고; 상기 표지된 프라이머를 어닐링하고 연장시키는 것을 포함하는 증폭 반응, 바람직하게는 PCR 반응 (LATE-PCR 포함)을 수행하고; 증폭 (실시간 검출) 동안 또는 증폭의 완료 후 (증폭 반응의 종결시에 또는 후속적인 열 분석 (용융 곡선) 동안 종점 검출), 염료를 여기시키고 형광단으로부터의 형광 방출을 단독으로 또는 염료로부터의 형광 방출을 검출하는 것과 조합하여 검출하는 것을 포함한다. 적절한 증폭 프로토콜 디자인에 의해, 이중쇄 생성물의 용융 분석이 증폭 반응에서 목적하는 지점에서 포함될 수 있다. 상기 실시태양에서, 이중쇄 DNA 내로 통합되는 프라이머만이 형광을 낼 것이다. 통합되지 않은 프라이머는 형광을 내지 않을 것이고, 따라서 비결합된 프라이머를 물리적으로 분리시킬 필요가 없다. 방법은 균질이다. 또한, 형광단 방출은 표지된 프라이머를 포함하는 생성물의 이중쇄 구역으로부터만 발생하고, 모든 이중쇄 생성물로부터 발생하는 것은 아니다. 하기 실시예 1은 상기 개선을 증명한다. 다양한 길이의 혼합된 연장 생성물을 생산하기 위해 설계된 단일-연장 사이클에서, 프라이머의 형광단으로부터의 방출의 검출에 기초한 용융 곡선은 모든 생성물을 보여준 반면, 염료로부터의 방출의 검출에 기초한 용융 곡선은 그렇지 않았음을 보여준다. 실시예 1은 또한 등은 반응에서 상기 실시태양의 방법의 사용을 증명한다.
- [0032] 당업자가 이해할 바와 같이, 형광 DNA 염료, 예를 들어 SYBR Green I이 인터칼레이팅된 염료로부터 FRET에 의해 여기되는 형광 표지된 프라이머 또는 프로브와 함께 사용될 때 형광 겹침 (overlap)에 대해 교정하는 것이 일반적으로 중요하다. 이는 형광 DNA 염료는 대개 프라이머 또는 프로브에 의해 방출된 형광을 측정하기 위해 사용된 빛의 파장을 포함할 수 있는 넓은 스펙트럼 범위에 걸쳐 빛을 방출하기 때문에 그러하다. 목적하는 교정은 1) 염료 단독의 방출 스펙트럼을 확립하고; 2) 각각의 샘플 내의 염료 방출의 강도를 프라이머 또는 프로브의 방출 파장보다 더 짧은 파장에서 측정하고; 3) 단계 1 및 2의 지식을 이용하여 프라이머 또는 프로브의 방출 파장에서 염료 방출의 강도를 계산하고; 4) 프라이머 또는 프로브의 방출 파장에서 측정된 총 강도로부터 상기 계산된 염료 강도를 공제함으로써 달성할 수 있다. 많은 시판 기계, 예를 들어 ABI 7700 및 Cepheid Smart Cycler가 상기 교정을 수행하기 위한 소프트웨어를 제공한다. 별법으로, 염료 스펙트럼, 염료 방출 단독, 및 총 염료/프로브 방출의 측정이 이루어질 수 있고, 교정을 위한 만족스러운 공식은 수동으로 적용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 US 2002/0119450 (Lee 및 Fuerst)에서는 Light Cycler 상에서 SYBR Green I 형광 겹침의 상기 측정을 위한 공식 및 수동 교정을 기재한다.
- [0033] 본원에 기재된 모든 실시예는 ABI 7700 상에서 수행하고, 염료 단독의 형광이 기록되는지 여부와 무관하게, 형광 DNA 염료가 간접적으로 여기된 형광 프라이머 또는 프로브와 함께 사용되는 모든 경우에 형광 겹침에 대해 교정하기 위해 기계 소프트웨어를 사용하였다.
- [0034] 적어도 하나의 프라이머가 상기 설명된 바와 같이 간접 여기를 위해 형광단-표지되는 단일 프라이머 쌍을 사용하는 PCR 증폭에 대해, 본 실시태양에 따른 용융 곡선 분석은 의도된 생성물(들)과 비-특이적 생성물 사이를 구분할 수 있다. 각각의 쌍의 적어도 하나의 구성원이 형광단-표지되고, 각각의 쌍에 대해 상이한 형광단이 사용되는 다수 프라이머 쌍을 사용하는 다중 PCR 증폭에 대해, 상이한 의도된 생성물은 색상에 의해 및 상이한 형광단과 연관된 용융 온도에 의해 구분될 수 있다. 일반적으로 PCR 증폭에 대해, 형광단 방출(들) 및 염료 방출은 각각 특이적 생성물(들)의 증강을 추적하고 모든 이중쇄 생성물의 증강을 추적하기 위해 반응 동안 모니터링할 수 있다.
- [0035] 증폭 반응의 분석은 형광단 방출 (혼성화된 프라이머 또는 프로브에 특이적인 시그널) 대 염료-방출 시그널 (이는 그렇게 특이적이지 않다)의 비를 이용할 수 있다. 예를 들어, 상기 비는 복제물 반응 사이의 변동에 대해 교정한다. 또한, 분석은 표지된 프라이머가 연장 생성물(들) 내로 통합됨에 따라 크기가 감소하는 프라이머-주형 용융 피크를 이용할 수 있다.
- [0036] 본 발명은 형광 DNA 염료, 염료가 여기될 때 간접적으로 여기되는 형광단으로 표지된 프라이머를 포함하는 적어도 하나의 프라이머 쌍, 및 바람직하게는 LATE-PCR에 의해 프라이머에 의해 규정된 구역을 증폭시키기 위한 시

약을 포함하는, 증폭 키트 및 부분 키트를 포함한다.

[0037] 본 발명에 따른 방법의 다른 실시태양은 핵산 증폭 혼합물에 형광 DNA 염료, 예를 들어 SYBR Green I 또는 바람직하게는 SYBR Gold, 및 본 발명의 프로브일 수 있는, 적어도 하나의 간접적으로 여기가능하고 켄칭된 대립유전자-식별 저  $T_m$  또는 초저  $T_m$  혼성화 프로브를 첨가하는 것을 포함한다. 본 발명의 대립유전자-식별 프로브는 문헌 [Li, Q. et al. (2002), "A New Class of Homogeneous Nucleic Acid Probes Based on Specific Displacement Hybridization," Nucl. Acid Res. 30: (2)e5]에 기재된 이중쇄 프로브의 유형이되 (표적에 상보성인 형광단-표지된 선형 올리고뉴클레오타이드 프로브 스트랜드, 및 프로브 스트랜드보다 일반적으로 2-10 뉴클레오타이드 더 짧은 켄처-표지된 상보성 스트랜드), 이들은 염료를 여기시킴으로써 간접적으로 여기되는 형광단으로 표지되고, 저  $T_m$  또는 초저  $T_m$  프로브로서 LATE-PCR 증폭에서 사용하기에 적합한 낮은 용융 온도를 갖는다. 이중쇄 프로브의 대립유전자-식별 능력은 상기 문헌 [Li et al.]에 기재된 바와 같이 조정될 수 있고, 배경 형광의 수준도 조정될 수 있다. 또한, 배경 형광은 형광 잔기에 인접한 구아니딘 잔기를 포함함으로써 감소될 수 있다 (소위 "G-켄칭").

[0038] 본 실시태양의 방법은 상기 혼합물을 이용한 증폭, 및 프로브가 대립유전자-식별 방식으로 혼성화하는 온도에서의 검출을 포함한다. 바람직한 실시태양은 LATE-PCR 반응의 직선 증폭기 동안 저온 검출 단계를 이용하고 (여기서 상기 프로브는 합성되는 단일쇄 앰플리콘에 혼성화한다), 형광 DNA 염료를 형광단(들)을 직접적으로 여기시키지 않는 파장에서 여기시키고, 상기 방식으로 간접적으로 여기되는 프로브의 형광단(들)로부터의 형광을 관측하는 것을 포함한다. 다른 실시태양은 증폭에 이은 저온 검출을 중점 결정으로서 포함한다. 일부 실시태양은 염료로부터의 방출을 검출하는 것을 추가로 포함하고, 특정 바람직한 실시태양은 프로브(들) 방출 대 염료 방출의 비를 계산하는 것을 포함한다. 염료 방출의 검출은 가장 바람직하게는 반응 혼합물의 온도가 존재하는 모든 프로브의 용융 온도를 초과하는 동안 검출 단계의 개시시에 수행된다. 축적하는 또는 축적된 이중쇄 분자 (염료 시그널)로부터 및 축적하는 또는 축적된 단일쇄 분자 (각각의 프로브로부터의 시그널)로부터의 데이터는 상기한 방식으로 비를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 본 실시태양의 방법은 또한 형광단 표지가 염료로부터의 방출에 의해 자극되지만 염료를 여기시키기 위해 사용된 파장에 의해 자극되지 않으면, 국제 출원 공개 WO 03/054233에 기재된 바와 같이 저온 분자 비콘 프로브의 사용을 포함한다.

[0039] 본 발명은 또한 저온 검출 단계 (중점 또는 실시간)와 함께 비-대칭적 증폭, 바람직하게는 LATE-PCR 증폭을 수행하기 위한 시약을 포함하고, 형광 DNA 염료, 적어도 하나의 프라이머 쌍, 바람직하게는 과량 프라이머 및 제한 프라이머를 포함하는 LATE-PCR 프라이머 쌍, 및 증폭 반응의 단일쇄 생성물 (과량으로 존재하는 프라이머의 연장 생성물)을 위한 적어도 하나의 형광단-표지된 저  $T_m$  또는 초저  $T_m$  혼성화 프로브를 포함하는 LATE-PCR 분석 키트 및 부분 키트를 포함하고, 여기서 상기 프로브는 의도된 검출 온도에서 미스매치 허용성이 아니라 대립유전자-식별성이고, 프로브의 형광단은 염료의 여기에 의해 간접적으로 여기된다. 바람직한 키트 및 부분 키트에서, 적어도 하나의 프로브는 본 발명의 대립유전자-식별 프로브이다. 본 발명은 또한 비-대칭적 증폭, 바람직하게는 LATE-PCR 증폭을 위한 적어도 하나의 프라이머 쌍, 및 바람직하게는 SYBR 염료에 의해 상기한 바와 같이 간접적으로 여기가능하도록 형광단으로 표지된 적어도 하나의 저  $T_m$  또는 초저  $T_m$  켄칭된 대립유전자-식별 이중쇄 프로브, 및 상기 이중쇄 프로브 자체를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 세트를 포함한다.

[0040] 본 발명에 따른 방법의 또다른 실시태양은 비-대칭적 증폭 반응 혼합물, 바람직하게는 LATE-PCR 반응 혼합물에, 형광 DNA 염료, 예를 들어 SYBR Gold, 및 반응에서 증폭을 위해 존재할 수 있거나 존재할 수 없는 하나의 가능한 단일쇄 앰플리콘 표적 서열에 완벽하게 상보성이고 존재할 수 있는 적어도 하나의 다른 가능한 단일쇄 앰플리콘 표적 서열에 보다 덜 완벽하게 상보성인 적어도 하나의 미스매치-허용성 단일쇄 선형 혼성화 프로브를 포함하는 검출 시약을 첨가하는 것을 포함한다. 본 실시태양에서 유용한 프로브는 염료로부터의 형광 방출에 의해 간접적으로 여기가능한 형광단으로 표지된 단일 스트랜드이다. 이들은 일반적으로 완벽하게 매칭된 표적을 의미하는, 존재할 수 있는 그들의 가장 상보성인 가능한 표적에 관하여 저  $T_m$  또는 바람직하게는 초저  $T_m$  프로브이다. 이들은 증폭 반응의 지수적 증폭기 동안 프라이머 어닐링 온도보다 수℃까지 더 높고, 바람직하게는 더 낮고, 보다 바람직하게는 적어도 5℃ 더 낮은 완벽하게 상보성인 표적에 대한  $T_{m[0]}$ 을 갖는 것이 바람직하다. 프로브는 본 발명에 따른, 즉, 저온에서 2차 구조의 형성으로 인한 시그널을 제거하기 위해 켄칭된 선형 (또는 무작위 코일형) 프로브, 또는 무작위 코일형 프로브일 수 있다. 본 발명에 따른 켄칭된 선형 프로브는 바람직하게는 한 단부에서 형광단 및 다른 단부에서 비-형광 켄칭 잔기를 갖고, 프로브의 3' 단부 상의 것은 프로브가 연장되는, 즉, 프라이머로서 기능하는 것을 방지하기 위해 첨가된 포스페이트 캡 (cap)을 대체한다.

- [0041] 본 실시태양은 상기 혼합물을 비-대칭적, 바람직하게는 LATE-PCR 증폭시켜 단일쇄 앰플리콘 분자를 생성하고, 증폭 반응 혼합물을 혼성화시에 신호를 내는 적어도 하나의 미스매치 허용성 프로브를 사용하여 열 분석에 적용한다. 열 분석은 증폭 반응이 완료된 후뿐만 아니라 제한 프라이머의 소비 후 단일쇄 생성물이 생산되는 열 사이클 동안 LATE-PCR 저온 검출 단계 동안에도 수행할 수 있다. 열 분석은 온도가 저하되거나 상승함에 따라 각각 형성되거나 탈안정화되는 프로브-표적 혼성체의 용융 온도에 따라 각각의 프로브의 표적을 밝힌다. 온도가 저하함에 따라, 프로브는 먼저 그의 완벽하게 매칭된 표적 (존재하는 경우)에 혼성화하고 형광 시그널을 방출할 것이다. 온도가 더욱 저하함에 따라, 프로브는 점차 "보다 미스매칭된" 표적에 연속적으로 혼성화하고 각각의 경우에 증가된 형광 시그널을 방출할 것이다. 선행 실시태양에 관련하여 설명한 바와 같이, 반응에서 이중쇄 분자 축적의 모니터링을 허용하고 복제물 샘플 사이의 산란을 감소시키도록 비율의 사용을 허용하기 위해 바람직하게는 프로브가 혼성화되지 않을 때, 즉, 프로브(들)의  $T_m$ 을 초과하는 온도에서 형광 DNA 염료로부터의 방출을 또한 검출할 수 있다.
- [0042] 본 발명은 형광 DNA 염료, 적어도 하나의 프라이머 쌍, 바람직하게는 과량 프라이머 및 제한 프라이머를 포함하는 LATE-PCR 프라이머 쌍, 및 단일쇄 증폭 생성물(들)을 위한, 필요한 경우 켄칭된 적어도 하나의 미스매치-허용 저  $T_m$  또는 초저  $T_m$  무작위 코일형 프로브를 포함하는 비-대칭적 증폭, 바람직하게는 LATE-PCR 증폭을 위한 시약을 함유하는 키트, 및 상기 프라이머 및 프로브를 함유하는 부분 키트 및 올리고뉴클레오타이드 세트, 및 상기 프로브 자체를 포함한다.
- [0043] LATE-PCR 분석의 저온 검출 단계, 바람직하게는 프라이머 연장 이후 및 스트랜드 용융 전 저온 검출 단계를 이용하는 본 발명에 따른 방법은 하나 초과인 프라이머 쌍을 함유하고 하나 이상의 단일쇄 앰플리콘 (각각의 표적에 대해 하나의 프로브)을 생성하는 다중 프로브 분석, 및 다수 표적에 대해 적어도 하나의 프로브를 함유하는 멀티프로브 분석을 포함한다. 저온 검출 단계를 갖는 특정한 바람직한 방법은 프라이머 연장 이후 및 스트랜드 용융 전 저온 검출 단계를 포함한다. 상기 분석에서 검출 단계 동안, 온도는 프라이머 어닐링 온도보다 30℃ 만큼 또는 심지어 40℃ 낮게 강하될 수 있어서, 검출을 위한 큰 온도차를 제공한다. 대립유전자-식별 프로브는 색상 (형광단 방출 파장)에 의해 구별될 수 있는 것에 추가로, 용융 온도의 차이에 의해 구별될 수 있다. 예를 들어, 그들의 표적에 대한  $T_m$ 이 각각 30, 35, 40 및 45℃인 4가지 상이한 FAM-표지된 대립유전자-식별 프로브는 바로 증폭후 용융 분석에 의해서가 아니라 반응 온도가 저하되거나 상승함에 따라 실시간으로 또는 증폭 이후 종점 결정으로서 구분될 수 있다. 상기 증가된 자유도는 동일한 반응에서 사용될 수 있는 상이한 프로브의 수를 유의하게 증가시킨다. 미스매치-허용 프로브는 완벽하게 매칭된 표적에 대한 것보다 미스매칭된 표적에 대한  $T_m$ 이 보다 낮을 것이다. 혼성화시 신호를 내는 상이한 색상의 저온 미스매치-허용 프로브를 조합하면 저온 검출 동안 온도 의존성 형광 방출 곡선의 패턴을 생성시킨다. 본 발명에 따른 방법은 증폭후 용융 분석으로 및 또한 LATE-PCR 저온 검출 단계의 창 내의 몇몇 온도에서 형광을 모니터링함으로써 실시간으로 혼성된 표적의 구성원을 확인하기 위해 상기 방출 곡선, 미분 (derivative) 곡선, 및 하나의 온도 또는 상이한 온도에서 이들의 비의 사용을 포함한다. 상기 비는 동일한 프로브/프로브, 상이한 프로브/프로브 비, 프로브/염료 비, 및 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0044] LATE-PCR 키트, 부분 키트 및 올리고뉴클레오타이드 세트는  $T_m$ 에 의해 구분될 수 있는 동일한 색상의 적어도 2개의 대립유전자-식별 프로브, 또는 상이한 표적에 대한 그의 혼성화가  $T_m$ 에 의해 구분될 수 있는 적어도 2개의 미스매치-허용 프로브, 바람직하게는 형광 DNA 염료를 여기서킴으로써 간접적으로 여기된 켄칭된 무작위 코일형 프로브를 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명은 서열결정 반응 (디데옥시 서열결정 또는 합성에 의한 서열결정 방법, 예를 들어 파이로서열결정)을 위해 LATE-PCR 증폭의 증폭 생성물을 준비하기 위한 개선된 방법을 포함한다. 특히, 본 발명자들은 단일 반응 컨테이너, 예를 들어, 미세원심분리관 내에서 상기 출발 물질의 생성 및 준비를 증명하였다. 바람직한 실시태양은 LATE-PCR 반응 혼합물 내에 미스프라이밍을 억제하기 위한 시약, 가장 바람직하게는 전분을 본원에 참고로 포함하는 본 발명자들의 미국 특허 가출원 60/619,620 (발명의 명칭: "Reagents and Methods for Improving Reproducibility and Reducing Mispriming in PCR Amplification")에 개시된 시약을 포함한다. 디데옥시 서열결정을 위해, 본 발명자들은 샘플 희석의 단일 단계에 의해 서열결정을 위해 LATE-PCR 증폭 생성물을 준비하는 것을 증명하였고, 상기 방법을 "희석 및 시행"으로 칭한다. 파이로서열결정을 위해, 본 발명자들은 프라이머 어닐링 이전에 LATE-PCR 생성물 혼합물에 파이로서열결정 효소/기질 시약의 첨가만을 필요로 하는 방법을 증명하였다.



[0046] 본 발명에 따른 방법은 또한 동일한 컨테이너, 예를 들어 동일한 반응 시험관 또는 미세유동 장치의 동일한 챔버 내에서 LATE-PCR 증폭 및 파이로서열결정을 위한 샘플 준비를 포함하고, 이를 모두 짧게 "단일 시험관" 방법으로 칭한다. 전통적인 파이로서열결정에서, DNA는 하나의 프라이머가 비오틴 분자로 5' 표지되는 대칭적 PCR에 의해 증폭된다. 증폭 후에, 단일쇄 DNA (ssDNA)를 단리시키고 파이로포스페이트 (PPi), dNTP 및 PCR 프라이머를 포함하는 파이로서열결정을 저해하는 PCR 반응의 잔류 성분을 세척 제거하기 위해 스트렙타딘 코팅된 비드를 진공 또는 자기 장비와 함께 사용한다. ssDNA를 생성하는 그의 능력으로 인해, LATE-PCR은 스트랜드 분리에 대한 필요를 제거하고, PCR로부터 남은 4가지 저해 성분을 제거하기 위해 동일 컨테이너 방법과 조합될 때 샘플 준비를 단순화시킨다. 상기 방법의 하나에서, 증폭 종료시에 남아 있는 dNTP를 제거할 필요는 LATE-PCR 증폭 반응 혼합물 내에 제한량의 dNTP를 사용함으로써 최소화되고, 이때 파이로서열결정을 위해 충분한 ssDNA를 생산하기에 충분한 양을 사용하도록 주의한다. PPi를 제거하기 위해 파이로포스파타제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 파이로포스파타제, 예를 들어 효모 파이로포스파타제가 증폭 생성물에 첨가되고, 파이로서열결정으로 진행하기 전에 효소를 변성시키기 위해 혼합물은 가열된다. 제한 프라이머는 LATE-PCR 증폭 후 남지 않고, 잔류하는 과량 프라이머는 증폭 동안 과량 프라이머로부터 연장된 스트랜드 (과량 프라이머 스트랜드)를 프라이밍할 수 없기 때문에, 남은 프라이머는 많은 경우에 제거할 필요가 없다. 그러나, 이로서열결정을 위해 사용된 온도를 포함하여 과량 프라이머의  $T_m$  미만의 온도에서 과량 프라이머에 혼성화하는 올리고뉴클레오티드를 LATE-PCR 반응 혼합물 내에 포함시킴으로써, 잠재적인 미스프라이밍이 제거될 수 있다. 별법으로, 파이로서열결정을 위해 사용된 온도에서 과량 프라이머에 의한 잠재적인 미스프라이밍을 제거하기 위해, 3' 단부에서 연장에 대해 차단되고 과량 프라이머에 완전 상보성인 올리고뉴클레오티드가 LATE-PCR 증폭 후에, 그러나 파이로서열결정 전에 첨가될 수 있다. 증폭 동안 제한 프라이머로부터 연장된 스트랜드 (제한 프라이머 스트랜드)의 3' 단부에서 과량 프라이머에 의한 미스프라이밍을 제거하기 위한 제3 방법은 결합 부위에 대해 과량 프라이머를 능가하도록 과량 프라이머와 동일한 서열을 함유하는 3' 차단된 올리고뉴클레오티드를 충분한 농도로 사용하는 것을 포함한다.

[0047] "단일 시험관" 샘플 준비의 보다 바람직한 방법은 특정 증폭을 위한 적절한 제한 dNTP 농도를 결정하는 필요를 제거한다. 본 방법에서, 본 발명자들은 먼저 파이로서열결정 효소/기질 시약을 LATE-PCR 생성물에 첨가하고, 이는 dNTP 및 PPi를 제거한다. 이어서, 첨가된 서열결정 프라이머를 사용하여 프라이머 어닐링시키고, 이어서 파이로서열결정을 위해 개별 dNTP를 첨가한다. 별법으로, dNTPase 활성을 갖는 정제된 효소, 예를 들어 감자 아피라제의 첨가에 의해 dNTP를 제거한 후, 가열하여 효소를 실효시킬 수 있고, 파이로포스파타제 활성을 갖는 정제된 효소, 예를 들어 효모 파이로포스파타제의 첨가에 의해 파이로포스페이트를 제거한 후, 가열하여 효소를 실효시킬 수 있다. 두 효소가 모두 사용되면, 이들을 동시에 첨가할 수 있다.

[0048] 본 발명에 따른 분석, 특히 LATE-PCR 분석은 바람직하게는 후기 단계에서 프로브 시그널을 감소시킬 수 있는 미스프라이밍을 제거하기 위한 수단을 포함한다. 본 발명자들은 반응 혼합물 내에 상기 설명된 본 발명의 미국 특허 가출원에 개시된 미스프라이밍-억제 시약을 포함시킴으로써 상기 "후크 (hook) 효과"를 성공적으로 제거하였다. 본 발명자들은 또한 반응에 첨가되는 중합효소의 농도를 조정함으로써 상기 효과를 제거하였다. 중합효소를 조정함으로써 미스프라이밍을 감소시키는 것은 ssDNA의 프로브를 사용하는 LATE-PCR 반응의 운동학의 면에서, 및 당업계에 공지된 다양한 수단에 의해 밝혀진 최종 생성물의 조성에 의해 관찰할 수 있다.

[0049] 본 발명의 하나 이상의 실시태양의 상세한 내용을 첨부하는 도면과 하기 상세한 설명에서 제시한다. 본 발명의 다른 특징, 목적 및 잇점은 상세한 설명 및 도면 및 청구의 범위로부터 자명할 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 용융 곡선 분석을 위한 본 발명의 방법에 따른 형광 표지된 프라이머의 사용을 보여준다.

도 2는 본 발명의 방법에 따른 단일쇄 생성물 대 이중쇄 생성물의 비의 사용을 통한 시그널 산란의 감소를 보여준다.

도 3은 16S 리보솜 RNA 유전자에 대한 통상적인 미스매치-허용 프로브, 또는 본 발명의 방법에 따라 설계된 동일한 표적에 대한 2가지 상이한 버전의 켄칭된 미스매치-허용 프로브를 사용하여 얻은 용융 곡선 분석을 통한 5종의 마이코박테리아 (Mycobacteria)의 확인을 비교하여 보여준다.

도 4는 본 발명의 방법에 따른 16S 리보솜 RNA 유전자에 대한 2개의 미스매치-허용 프로브만을 사용하는 5종의 마이코박테리아의 확인을 보여준다.

도 5는 본 발명의 방법에 따라 설계된 16S 리보솜 RNA 유전자에 대한 2개의 미스매치-허용 프로브를 사용하는, 도 3에 나타난 용융 곡선의 1차 미분 (first derivative) 분석을 통한 5종의 마이코박테리아의 확인을 보여준다.

도 6은 본 발명의 방법에 따른 16S 리보솜 RNA 유전자에 대한 2개의 미스매치-허용 프로브로부터 상이한 온도에서 수집된 형광 시그날의 비를 사용하는 5종의 마이코박테리아의 확인을 보여준다.

도 7은 LATE-PCR 및 본 발명의 방법에 따른 야생형 대립유전자에 대한 단일 저  $T_m$  미스매치-허용 프로브를 사용하는, 인간 Hex A 유전자의 G269 돌연변이에 대한 동중첩합성 및 이중중첩합성 샘플의 중점 유전형 분석을 보여준다.

도 8은 LATE-PCR, 동일한 색상으로 표지된 대립유전자 식별 저  $T_m$  프로브, 및 용융 곡선의 1차 미분 분석을 이용하는, 인간 남성 섬유증 막전도 조절자 (CFTR) 유전자의 3가지 상이한 대립유전자의 별개의 확인을 보여준다.

도 9는 동일한 색상으로 표지된 대립유전자 식별 저  $T_m$  프로브, 및 용융 곡선의 1차 미분 분석을 이용하는, 인간 남성 섬유증 막전도 조절자 (CFTR) 유전자의 다양한 대립유전자의 상이한 조합의 동시 확인을 보여준다.

도 10은 본 발명의 방법에 따라 수집된 2가지 온도에서의 형광의 변화를 플로팅함으로써, 인간 남성 섬유증 막전도 조절자 (CFTR) 유전자의 상이한 대립유전자 조합의 확인을 보여준다.

도 11은 2개 온도 표준화 분석 (배경 교정과 함께)을 보여준다.

도 12는 2개 온도 표준화 분석 (배경 교정 없이)을 보여준다.

도 13은 3개 온도 표준화 분석을 보여준다.

도 14는 본 발명의 방법에 따른 파이로서열결정을 위한 LATE-PCR 샘플 준비의 "회석 및 시행" 방법을, 동일한 분석을 위한 LATE-PCR 샘플 준비의 통상적인 방법과 비교하여 보여준다.

도 15는 단일 시험관 LATE-PCR 방법에 의해 제조된 단일 세포로부터 얻은 파이로그래 (Pyrogram)이다. 화살표는 a) 동중첩합성 야생형, b) 이중중첩합성, 및 c) 동중첩합성 돌연변이체 세포의  $\beta$ -글로빈 IVS 110 부위를 나타낸다.

도 16은 50 초과의 염기쌍에 대해 수행된 파이로서열결정 반응으로부터의 파이로그래이다. 뉴클레오타이드 분배 순서를 각각의 피크 아래에 나열하고, 예상된 서열을 위에 기록한다.

도 17은 본 발명의 방법에 따른 디데옥시 서열결정을 위한 LATE-PCR 샘플의 준비의 "회석 및 시행" 방법으로부터, 및 동일한 분석에 대한 LATE-PCR 샘플의 준비의 통상적인 방법으로부터 생성된 디데옥시 서열결정 크로마토그래프이다.

도 18은 동일한 반응에서 동일한 DNA 주형으로부터의 하나 초과 생성물의 LATE-PCR 증폭으로부터의 전기영동 겔이다.

도 19는 도 18의 LATE-PCR 증폭의 생성물의 회석 및 시행 디데옥시 서열결정으로부터의 크로마토그래프이다.

도 20은 LATE-PCR 증폭에 의해 생성된 ssDNA 및 dsDNA의 양이 독립적으로 측정될 수 있고, 비 ssDNA/dsDNA (이는 다시 그때까지 축적된 ssDNA의 양이 "회석 및 시행" 방법을 통한 후속적인 서열결정을 위해 충분한지 결정하기 위해 사용될 수 있다)를 계산하기 위해 사용될 수 있음을 보여준다.

도 21은 2개의 밀접하게 관련되지만 상이한 서열을 갖는 LATE-PCR 앰플리콘의 50:50 혼합물 상에 사용된 "회석 및 시행" 방법으로부터 생성된 디데옥시 서열결정 크로마토그래프이다.

도 22는 "회석 및 시행" 방법을 통해 구분될 수 있는, 밀접하게 관련되지만 상이한 서열을 갖는 혼합된 LATE-PCR 앰플리콘의 감도 범위를 보여준다.

도 23은 LATE-PCR이 적어도 하나의 단일 미스매치-허용 프로브와 함께, 중점 용융 곡선을 생성하기 위해 사용될 수 있고, 이는 다시 밀접하게 관련되지만 상이한 서열을 갖는 2 이상의 혼합된 LATE-PCR 앰플리콘의 상대적인 양을 정량하기 위해 사용될 수 있음을 보여준다.

도 24는 각각 상이한 3가지의 양의 계놈 DNA를 사용하여 2가지 상이한 농도의 Taq 중합효소를 사용하여 수행된 몇몇 LATE-PCR 분석의 운동학을 보여준다.



상이한 도면에서 유사한 참조 부호는 유사한 성분을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0051] 본 발명은 직접적으로 형광단에 의해 강하게 흡수되는 파장의 빛 (가시광이거나 아님)을 적용함에 의해서가 아니라, 대신에 부근 형광 DNA 염료, 예를 들어 SYBR Green 또는 바람직하게는 SYBR Gold를 여기시키는 파장의 빛을 적용함으로써 간접적으로 여기되는 적어도 하나의 형광단-표지된 프라이머로부터의 형광 방출의 검출을 포함하는 핵산 증폭 분석, 예를 들어 PCR 분석, 및 모든 또는 일부의 증폭 시약을 함유하는 완전 및 부분 키트, 및 상기 표지된 프라이머를 함유하는 올리고뉴클레오타이드 세트, 및 또한 프라이머 자체를 포함한다.
- [0052] 증폭 프라이머는 잘 알려져 있다. 본 발명에 따른 프라이머는 표적 스트랜드에 혼성화하고 적절한 중합효소에 의해 연장되는 일반적으로 50 염기 길이 미만의 짧은 올리고뉴클레오타이드이다. 프라이머는 천연 뉴클레오타이드로 구성될 수 있거나, 비-천연 뉴클레오타이드 및 비-천연 뉴클레오타이드간 연결을 포함할 수 있다. 프라이머는 일반적으로 선형 올리고뉴클레오타이드이지만, 2차 구조를 포함할 수 있다 (예를 들어, 문헌[Nazarenko IA, Bhatnagar SK, Hohman RJ (1997), "A Closed Tube Format for Amplification and Detection of DNA Based on Energy Transfer," Nucleic Acids Res. 25:2516-2521] 참조). 증폭은 종종 각각 순방향 프라이머 및 역방향 프라이머로 이루어지는 하나 이상의 프라이머 쌍의 사용을 포함한다. 본 발명에 따른 방법, 키트 및 올리고뉴클레오타이드 세트에서, 프라이머 쌍의 하나의 프라이머 또는 둘 모두의 프라이머는 부근 형광 DNA 염료가 자극될 때 형광을 내는 공유 결합된 형광단으로 표지될 수 있다. 표지된 프라이머가 주형 스트랜드에서 그의 상보성 서열에 혼성화할 (또는 어닐링할) 때, 이중체 구역이 형성된다. 형광 DNA 염료는 내부에 인터칼레이팅됨으로써 또는 달리 상기 구역과 회합하고, 프라이머의 형광단에 대해 부근인 상기 구역에서 형광으로 되어, 염료가 형광단을 직접적으로 여기시키지 않는 파장에서 자극될 때, 형광단은 그의 특징적인 파장을 방출한다. 이들 프라이머는 실시간으로 또는 종점 검출에 의해 PCR 및 프라이머 연장 분석으로부터 생성되는 것과 같은 DNA 중합효소의 연장에 의해 생성되는 생성물의 합성을 모니터링하기 위해 및(또는) 용융 곡선 분석에 의해 생성물 특이성을 평가하기 위해 사용될 수 있다.
- [0053] DNA 중합효소에 의한 연장을 위한 기질로서 사용되는 본 발명에 따른 프라이머, 예를 들어 PCR 증폭 (대칭적 또는 비-대칭적, 예를 들어 특히 LATE-PCR)을 위한 프라이머는 임의의 뉴클레오타이드 위치에서 공유 결합된 형광단으로 표지되어, 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 3' 단부는 연장에 대해 이용가능하게 유지된다. 프라이머는 문헌 [Li, Q. et al. (2002) ("A New Class of Homogeneous Nucleic Acid Probes Based on Specific Displacement Hybridization," Nucl. Acid Res. 30: (2)e5)]에 기재된 이중체 프로브의 디자인을 가질 수 있다. 프라이머의 올리고뉴클레오타이드에 대한 유일한 서열 제한은 올리고뉴클레오타이드가 자체를 간접 형광단 여기시키는 임의의 2차 구조를 갖지 않아야 하는 점이고, 이는 일반적으로 2 염기쌍을 초과하는 2차 구조가 없음을 의미한다. 형광단 잔기는 사용된 여기원 파장에 의해 직접적으로 눈에 띄게 여기되지 않아야 하지만, 염료는 사용된 여기원 파장에 의해 직접적으로 여기되어야 하고; 일반적으로 형광단이 형광 공명 에너지 전이 (FRET)를 겪는 거리보다 멀지 않은 거리에 인접하여 존재시에 형광 DNA 염료가 여기될 때 형광단은 방출하여야 하고; 선택된 형광단의 방출 스펙트럼은 필터 또는 스펙트럼 디컨볼루션 (deconvolution)의 사용에 의해 형광 DNA 염료의 방출 스펙트럼으로부터 구분되어야 한다. 이들 조건 하에, 형광단은 DNA 중합효소에 의한 연장을 포함하는 프라이머 어닐링 이후 이중체 생성물 내로 통합될 때 형광을 낸다. 가열하는 동안 형광단을 함유하는 이중체 DNA의 특정 스트레치 (stretch)의 용융 온도 ( $T_m$ )에 도달될 때 형광의 손실이 일어난다.
- [0054] 형광 DNA 염료와 함께 본 발명에 따른 프라이머의 사용을 위한 조건 (프라이머 및 DNA 염료 농도, DNA 염료 여기 파장)은 형광이 염료의 방출 파장 대신 또는 그에 추가로 프라이머 형광단에 대응하는 방출 파장에서 수집되는 것을 제외하고는, 반응 과정에서 프라이머 연장 반응 (PCR 포함) 생성물의 합성을 모니터링하기 위해, 및 형광 DNA 염료만을 사용하는 용융 곡선 분석에 의해 연장 생성물 특이성을 평가하기 위해 당업계에 공지된 것과 동일하다. 이들 조건 하에, 형광 시그널은 반응 내의 모든 이중체 서열보다는 프라이머를 함유하는 이중체 서열로부터 유래한다.
- [0055] 본 발명에 따른 방법 및 시스템에 대한 DNA 염료의 성능 비교를 하기 실시예 1 및 도 1에 기록된 실험에 의해 수행하였다. 형광단-표지된 프라이머를 SYBR Green 염료의 존재 하에, 및 프라이머 연장 구역 가까운 주형 스트랜드에 혼성화된 비교적 긴 비-연장가능 올리고뉴클레오타이드의 존재 하에 DNA 중합효소에 의해 연장시켰다. 이는 주형 스트랜드-비연장된 프라이머 혼성체, 짧은 프라이머-연장 생성물, 및 비-연장가능 올리고뉴클레오타이드를 갖는 생성물 혼합물을 생성시켜, 주형을 갖는 혼성체는  $T_m$ 이 60°C (형광단 (Cy5)-표지된 프라이머) 내지

79℃ (비-연장가능 올리고뉴클레오타이드)이고, 프라이머-연장 생성물은 상기 2개의  $T_m$  사이에 놓인다.

[0056] 염료로부터의 형광 관독 및 형광단으로부터의 형광 관독을 모두 사용하여 최종 반응 혼합물 (2중 샘플)에 대해 표준 용융 곡선 분석을 수행하였다. 용융 곡선을 도 1에 제시한다. 패널 A는 염료 방출을 이용하여 얻은 용융 곡선 1이다. 유일한 피크는 79℃ (비연장가능 올리고뉴클레오타이드의 용융 온도)이다. 다른 피크는 보이지 않고, 심지어 비연장된 프라이머의 피크도 보이지 않는다. 패널 A는 용융 곡선의 생성 동안 SYBR Green 염료의 보다 높은  $T_m$  혼성체로의 이동을 증명하고, 이는 보다 낮은  $T_m$  혼성체의 존재를 차폐시킨다. 패널 B는 형광단 방출을 이용하여 얻은 용융 곡선 2이다. 이는 60℃ (비연장된 프라이머-주형 혼성체의  $T_m$ )에서 피크, 및 69℃ 내지 79℃ 사이의 온도에서 추가의 피크, 즉, 프라이머 연장 생성물의 표시인 피크를 보여준다. 용융 곡선 1에 나타난 바와 같이 염료의 이동 경향에도 불구하고 보다 낮은  $T_m$ 이 보인다. 본 발명에 따른 형광단 방출을 모니터링하면 모든 혼성체 중이 그의 정확한 농도에서 혼합물에서 형광단으로 표지된 것을 알 수 있다.

[0057] 프라이머 쌍의 적어도 하나의 구성원이 본 발명에 따른 프라이머인 단일 쌍의 프라이머를 사용하는 PCR 증폭의 경우에, 특이적 생성물은 예상된 용융 온도를 갖고 비특이적 생성물은 예상되지 않은 용융 온도를 갖기 때문에 용융 곡선 분석은 단일 형광물질을 사용하여 특이적 및 비-특이적 생성물 사이를 구별할 수 있다. 각각의 프라이머 쌍의 적어도 하나의 구성원이 본 발명에 따른 프라이머인 하나 초과와 프라이머 쌍을 사용하는 다중 PCR 증폭의 경우에, 2가지 상이한 특이적 생성물은 상이하지만 예상된  $T_m$  값을 갖기 때문에 및(또는) 사용된 2가지 상이한 프라이머가 상이한 형광단으로 표지되기 때문에 서로로부터 구별될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머를 사용하는 용융 곡선 분석을 진행하는 증폭 반응 동안 또는 반응의 끝에 수행할 수 있다.

[0058] 반응 과정 동안 본 발명에 따른 하나 이상의 프라이머의 통합은 또한 PCR 과정 동안 하나 이상의 표적의 증폭 정도, 또는 등온 연장 반응의 과정 동안 이중체 DNA의 하나 이상의 스트레치의 합성을 정량적으로 측정하기 위해 이용될 수 있다. 어느 경우든, 전장 이중체 생성물 분자(들)의 양은 시간 경과에 따라 형광 증가의 반복 검출에 의해 추적될 수 있거나, 반응의 끝에 측정될 수 있다. 또한, 등온 반응 또는 열 사이클 반응의 과정 동안 본 발명에 따른 하나 이상의 프라이머의 통합은 부분 생성물, 즉 주형 스트랜드를 따라 연장하기 시작하지만, 그들의 최대 가능 길이에 도달하지 않은 생성물의 존재 및(또는) 축적을 측정하기 위해 이용될 수 있다. 상기 경우에, 부분 생성물의 용융 온도는 전장 생성물의 용융 온도보다 더 낮지만, 그들이 유래되는 표지된 프라이머의 용융 온도보다 더 높다. 또한, 부분 또는 전장 생성물 스트랜드 내로의 표지된 프라이머의 통합과 동시에, 프라이머/주형 DNA-DNA 혼성체로부터 생성된 용융 온도 피크의 크기는 감소하고, DNA 합성의 추가의 측정치로서 사용될 수 있다.

[0059] 상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 프라이머의 통합에 의해 합성된 이중체 DNA 또는 앰플리콘의 각각의 스트레치는 결합된 SYBR 염료로부터 FRET 또는 다른 메카니즘에 의해 간접적으로 자극될 때 프라이머의 공유 결합된 형광단의 방출 과정에서 형광 시그널을 생성한다 ("프라이머-특이적-시그널"). 동일한 이중체 DNA는 또한 SYBR 염료의 방출 과정에서 형광 시그널을 생성하며 ("총-SYBR-시그널", 반응 내에 존재하는 모든 이중체 서열의 합), 이는 모든 이중체 서열이 통합된 표지된 프라이머를 갖는지에 무관하게 형광을 내기 때문이다. 따라서, 본 발명에 따른 프라이머는 형광 시그널을 다음 비의 면에서 분석하기 위해 사용될 수 있다: (프라이머-특이적-시그널/총-SYBR-시그널), 이하 (PSS/TSS) 값. (PSS/TSS) 값의 면에서 데이터 분석은 복제물 반응 사이의 형광 DNA 염료 시그널 (TSS)의 변동에 대해 교정한다. 이는 LATE-PCR 증폭의 경우에 단일체 앰플리콘 합성 속도가 반응의 지수기의 끝에 축적된 이중체 앰플리콘의 양에 비례하기 때문에 특히 유용하다. 따라서, 복제물 반응 사이에 이중체 DNA 수준의 작은 차이는 단일체 앰플리콘 축적 속도를 변경시킨다.

[0060] 앰플리콘이 증폭후 용융-곡선 분석에 의해 구분가능하다면, 동일한 형광단으로 표지된 하나 초과와 프라이머를 사용하는 것이 또한 가능하다. 상기 원리의 실례에 대해서는 도 1의 패널 B를 참조한다. 최종 연장 단계 (종점) 또는 중간 연장 단계일 수 있는 연장 단계의 끝에서 공통 형광단으로부터의 시그널은 형광단을 포함하는 총 앰플리콘의 표시를 제공한다. 용융 곡선 분석은 생성물 사이를 구별하고 그들의 농도의 정량적 측정치를 제공한다.

[0061] LATE-PCR은 다른 잇점 중에서도 조치를 취할 수 있는 큰 "온도 공간 (space)"을 제공하는 비-대칭적 PCR 증폭이다 (WO 03/054233 및 문헌[Sanchez et al. (2004), 상기 인용] 참조). LATE-PCR은 단일체인 증폭 생성물 ("앰플리콘")을 검출하기 위해 "저  $T_m$ " 및 "초저  $T_m$ " 혼성화 프로브의 사용을 허용한다. SYBR 염료로부터의 방출에 의해 간접적으로 여기가능한 형광단을 갖는 미스매치-허용 분자 비콘 프로브 또는 선형 (무작위 코일형) 프로브와 같은 미스매치-허용 프로브가 그럴 수 있는 바와 같이, 단일 염기쌍 미스매치에 대해 식별할 수 있는 대립유

전자-식별 프로브, 예를 들어 대립유전자-식별 분자 비콘 프로브를 포함하여 특정 분석에서 단일-표적-특이적인 다양한 종류의 프로브가 LATE-PCR과 함께 저  $T_m$  및 초저  $T_m$  프로브로서 사용될 수 있다. 본 발명자들은 상기 형광단으로 표지된 대립유전자-식별 분자 비콘 프로브가 그럴 수 있는 바와 같이, 반응 내에서 단일쇄/이중쇄 비의 결정을 허용하는, LATE-PCR 분석에서 저  $T_m$  및 초저  $T_m$  프로브로서 유용한 새로운 종류의 대립유전자-식별 프로브를 고안하였다.

[0062] 본 발명에 따른 대립유전자-식별 프로브는 문헌 [Li, Q. et al. (2002), Nucl. Acid Res. 30: (2)e5]]에 따른 변형된 이중쇄, 대립유전자-식별, 켄칭된 프로브이다. 이들은 다음 변형을 갖는다: 이들은 이중쇄 DNA 형광 염료, 예를 들어 SYBR Green 또는 SBYR Gold를 여기함으로써 간접적으로 여기가능하지만 염료를 자극하기 위해 사용된 파장에 의해 직접적으로 여기가능하지는 않은 형광단으로 표지되고 (이러한 점에서 상기 논의된 프라이머와 유사한), 이들은 저  $T_m$  또는 초저  $T_m$  프로브가 되도록 구성된다. 그의 표적 서열에 결합되지 않을 때, 상기 프로브는 보다 짧은 상보성 올리고뉴클레오티드에 결합한다. 본 발명자들은 상보성 올리고뉴클레오티드가 프로브로부터의 배경 형광을 감소시키기 위해 켄처, 예를 들어 DabcyI 또는 Black Hole™ 켄처를 포함하는 것을 선호한다. 별법으로 또는 추가로, 배경 형광은 형광단에 인접한 구아니딘 잔기를 포함함으로써 감소될 수 있다 (G-켄칭). 완전 상보성 표적 스트랜드의 존재 하에, 보다 짧은 상보성 스트랜드는 치환되고, 보다 긴 형광단-표지된 스트랜드는 표적에 혼성화하고, 형광단은 비켄칭되고, 그의 특징적인 파장에서 형광을 내도록 염료로부터 에너지를 수용할 수 있도록 된다. 상이한 표적에 대한 이들 프로브 중 몇몇 (상이한 형광단으로 표지된)은 다중 분석을 위해 사용될 수 있다.

[0063] 상기 대립유전자-식별 프로브는 그를 저  $T_m$  또는 초저  $T_m$ 이 되도록 만드는 분석에서 농도-조정된 용융 온도 ( $T_{m[0]}$ )를 갖도록 설계된다. 프로브-표적 혼성체의  $T_{m[0]}$ 는 간편하게 결정되고 경험적으로 조정되지만, 계산된 값이 조정을 최소화하도록 적어도 우수한 출발점으로서 사용될 수 있다. 형광단-표지된 스트랜드에 상대적인 상보성 프로브 스트랜드의 길이 및 농도는 최대 대립유전자 식별을 위해 경험적으로 조정된다. 본 발명자들은 형광단-표지된 스트랜드보다 1-3 뉴클레오티드 더 짧은 길이, 및 형광단-표지된 스트랜드 농도의 1-1.2배 농도를 사용하여 출발한다.

[0064] LATE-PCR 분석에서, 상기 대립유전자-식별 프로브는 저온 검출 단계에서, 바람직하게는 제한 프라이머의 소비 이후의 사이클에서 프라이머 연장 단계에 이어 사용된다. 다수 사이클에 걸친 실시간 관독에 대해, SYBR 염료가 여기되고, 형광은 두 염료로부터 및 형광단(들)로부터 모두 관독된다. 본 발명자들은 온도가 프로브(들)의  $T_m$ 을 초과할 때 PCR 연장 단계의 종결 동안 또는 종결시에 염료 시그널을 관독하고, 프로브 (본 발명에 따른 대립유전자-식별 프로브, 또는 적절하게 표지된 분자 비콘 프로브)가 혼성화될 때 낮은 검출-단계 온도 동안 형광단 방출을 관독하는 것을 선호한다. 이어서, 각각의 프로브의 형광 대 총-SYBR-시그널의 비를 결정한다. 상기 비는 생성물 축적의 차이로 인한 복제물 분석 사이의 차이를 최소화한다. 차이가 최소화되기 때문에, 상기 비는 종점 분석을 위해서도 사용될 수 있다.

[0065] 본 발명에 따른 프라이머 및 프로브에 의해 허용되는 단일쇄 생성물 대 이중쇄 생성물의 비의 사용은 언급된 바와 같이 복제물 분석 사이의 산란을 감소시키기 위한 기술이다. 이는 반응 운동학을 드러내지 않는 종점 분석을 위해 특히 중요하다. 한 예는 두 대립유전자에 대해 하나의 프라이머 쌍, 및 본 발명에 따른 대립유전자-식별 프로브를 사용하는, 동중접합성 샘플을 이중접합성 샘플로부터 구별하기 위한 LATE-PCR 분석이다. 도 2는 저온 검출 단계가 SYBR 염료 (본 경우에, SYBR Gold), Cy5로 표지된 하나의 대립유전자에 대한 대립유전자-식별 프로브, 염료의 여기, 및 염료 (72°C (연장 온도)에서) 및 형광단 (55°C (프라이머 연장 후 저온 검출)에서)으로부터의 시그널의 관독을 사용하여 수행되는 LATE-PCR 증폭에 적용될 때 달성된 산란의 감소를 설명한다. 패널 A는 복제물 동중접합성 샘플 (원 21) 및 복제물 이중접합성 샘플 (원 22)에 대한 형광단으로부터의 실시간 관독을 제시한다. 명백한 바와 같이, 복제물 사이의 산란은 차이를 흐리게 한다. 그러나, 패널 B는 동중접합성 샘플 (원 23) 및 이중접합성 샘플 (원 24)에 대한 Cy5 시그널 대 SYBR 시그널의 비를 플로팅한다. 산란 감소는 종점 분석을 허용하기에 충분하다.

[0066] 본 발명은 또한 형광 DNA 염료 (예를 들어, SYBR Green I 또는 SYBR Gold)로부터의 방출에 의해 여기가능한 형광단으로 표지되고, 바람직하게는 말단 표지되고, 배경 형광을 감소시키도록 켄칭되는 미스매치 허용성 저  $T_m$  또는 초저  $T_m$  선형 단일쇄 프로브를 포함한다. 상기 프로브는 표적의 부재 시에 형광을 억제하는 켄칭 잔기를 갖는다. 미스매치-허용 선형 프로브는 온도가 저하될 때 접혀서 짧은 이중쇄 구역을 형성하는 경향이 있다. 저온 LATE-PCR 검출 단계의 사용은 상기 경향을 악화시킨다. 이는 프로브 서열이 표적 서열에 혼성화될 때 발생



하지 않는다. 프로브가 반응 혼합물 내에 존재하는 SBYR 염료로부터의 방출에 의해 여기되는 형광단을 포함하면, 염료는 비결합된 프로브 분자의 의도하지 않은 이중체 구역 내로 인터칼레이팅되거나 달리 상기 구역과 회합하여, FRET에 의해 프로브의 형광단을 여기서킨다. 결과는 저온에서 배경 형광의 증가이다.

[0067] 본 발명에 따른 미스매치-허용 프로브의 켄칭은 비결합된 프로브 내의 의도하지 않은 2차 구조로부터 생성되는 형광단 형광을 켄칭시키는 위치에서 프로브에 켄칭 잔기, 예를 들어, Dabcyl 또는 Black Hole™ 켄처 (BHQ)의 첨가에 의해 얻어진다. 본 발명자들은 가능할 때마다 켄처를 형광단의 반대편 단부에 첨가하는 것을 선호한다. 하기 실시예 2는 2가지의 가능한 다음 기술을 예시한다: 2차 구조에 단순히 켄처를 첨가하거나, 켄칭된 헤어핀 (hairpin), 즉, 켄처를 형광단에 근접하게 하는 특이적으로 설계된 2차 구조를 구성하는 것, 또는 둘 모두. 바람직하게는, 구성된 2차 구조의  $T_m$ 은 임의의 대안적인 2차 구조의  $T_m$ 보다 적어도 5°C 더 높아서, 표적의 부재 시에 대부분의 프로브 분자는 헤어핀 배위로 존재하고 배경 형광은 낮다. 구성된 스템 (stem)의  $T_m$ 은 완벽하게 매칭된 표적에 혼성화된 프로브의  $T_m$  미만이고, 그의 미스매칭된 표적에 혼성화된 프로브의  $T_m$ 에 유사하여, 스템 내의 서열의 표적에 대한 혼성화는 스템의 형성에 의해 방지되지 않는다.

[0068] 핵산 표적의 검출 및 확인은 혼성화될 때 신호를 내는 하나 또는 다수의 저온 미스매치 허용성 프로브, 예를 들어 미스매치-허용 분자 비콘 프로브, DNA 염료를 여기서킴으로써 간접적으로 여기된 선형 단일체 프로브, 및 본 발명에 따른 켄칭된 선형 프로브를 사용함으로써 달성할 수 있다. 특정 실시태양에 대해 프로브 혼합물은 본 발명에 따른 적어도 하나의 대립유전자-특이적 프로브를 또한 포함할 수 있다. 유용한 기술은 프로브 중 적어도 하나에 관하여 유사한  $T_m$ 을 갖는 표적들 사이를 구별하기 위해 2개의 프로브의 형광의 비를 온도의 함수로서 사용하는 것이다. 상기 비의 곡선은 때때로 표적의 "형광 신호"로서 칭해진다.

[0069] 저온 검출 단계를 포함하는 LATE-PCR에서, 검출 온도의 효과를 형광 신호의 효과와 조합하는 것이 가능하다. 본 발명자들이 본 발명에 따른 켄칭된, 단일체의, 간접적으로 여기가능한 프로브를 포함하지만 이로 제한되지 않는 다수의 미스매치-허용 프로브와 함께 사용하는 분석은 이중체 DNA를 변형시키기 위한 고온 단계 (95°C에서 2분), 이어서 제한 프라이머 및 과량 프라이머를 모두 사용하는 지수기 증폭 (95°C에서 10초, 60°C에서 15초, 및 78°C에서 40초의 30 사이클), 이어서 지수기의 완료 및 그 동안 프로브 검출 단계가 포함되는 후속적인 직선기 (95°C에서 10초, 60°C에서 15초, 78°C에서 40초, 55°C에서 20초, 50°C에서 20초, 45°C에서 20초, 및 40°C에서 20초의 40 사이클)로 이루어지는 LATE-PCR 증폭이다. 이는 프라이머 어닐링 온도 (60°C) 미만의 4개 검출 온도를 제공한다. 이중체 생산은 임의의 프로브의  $T_m$ 을 초과하는 프라이머-연장 온도 (78°C)에서 SYBR 염료로부터의 방출에 의해 모니터링할 수 있다. 형광단 방출은 55°C 내지 40°C의 각각의 저온에서 모니터링할 수 있다. 마지막 사이클에 이어, 온도는 낮은 값, 예를 들어 30°C로 강하되고, 용융 분석을 위해 서서히 증가될 수 있다. 검출된 형광 수준 외에, 형광단 형광 대 염료 형광의 비 및 형광단 형광의 비가 앰플리콘-구분 정보를 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0070] 도면 중 특정 도면은 상기 가능성을 이용하는 기술을 예시한다. 도 4는 마이코박테리아의 몇몇 종의 16s 리보솜 RNA 유전자에 대한 2개의 미스매치-허용 프로브의 용융 거동을 보여준다. 2개의 프로브를 사용하였다: 실시예 2에 기재된 헤어핀-형성, 켄칭된 프로브 (서열 5'-Cy5-CTG GAT AGG ACC ACG AGG CCA G-BHQ II-3' (서열 2)) 및 TAMRA-표지된 프로브 (서열 5'-G CAT GTC TTG TGG TGG-T AMRA-3' (서열 3)). 비켄칭된 후자의 프로브는 몇몇 종에 대해 배경을 초과하는 식별가능한 시그널을 제공하는 것으로 밝혀졌다. 도 4의 패널 A는 표적을 갖지 않는 (선 41), 엠. 아시아티쿰 (*M. asiaticum*) (선 42), 엠. 고르도나에 (*M. gordonae*) (선 43), 엠. 헤이델부르겐제 (*M. heidelbergense*) (선 44), 엠. 말모엔세 (*M. malmoense*) (선 45) 및 엠. 마리눔 (*M. marinum*) (선 46)을 갖는 헤어핀 프로브에 대한 용융 곡선을 제시한다. 패널 B는 표적을 갖지 않는 (선 47), 엠. 아시아티쿰 (선 48), 엠. 고르도나에 (선 49), 엠. 헤이델부르겐제 (선 50), 엠. 말모엔세 (선 51), 및 엠. 마리눔 (선 52)을 갖는 TAMRA-표지된 프로브에 대한 용융 곡선을 제시한다. 도 4의 패널 C는 TAMRA 형광 대 Cy5 형광의 비를 플로팅한다: 엠. 아시아티쿰 (선 53), 엠. 고르도나에 (선 54), 엠. 헤이델부르겐제 (선 55), 엠. 말모엔세 (선 56) 및 엠. 마리눔 (선 57).

[0071] 다른 분석 기술은 형광단으로부터의 형광 변화의 속도를 온도의 함수로서 플로팅하기 위한 것이다. 도 5는 상기한 바와 같은 본 발명에 따른 상기 Cy5-표지된 켄칭된 헤어핀 프로브 및 TAMRA-표지된 비켄칭된 프로브에 대한 상기 플롯을 제시한다. 패널 A는 켄칭된 헤어핀 프로브의 플롯이고, 패널 B는 TAMRA-표지된 프로브의 플롯이다. 플롯은 엠. 아시아티쿰 (선 61, 71), 엠. 고르도나에 (선 62, 72), 엠. 헤이델부르겐제 (선 63, 73), 엠. 말모엔세 (선 64, 74), 및 엠. 마리눔 (선 65, 75)에 대한 용융 피크를 보여준다. 두 프로브를 사용하여,

5개 표적을 용융 피크에 의해 구별하는 것이 가능하다. Cy5-표지된 프로브 자체는 엠. 고르도나에 (선 62)를 다른 것들로부터 구별할 수 있었다. TAMRA-표지된 프로브 자체는 각각의 엠. 아시아티쿰 (선 71), 엠. 고르도나에 (선 72) 및 엠. 마리눔 (선 75)을 서로 구별할 수 있었다. 프로브는 함께 엠. 헤이텔부르겐제를 엠. 아시아티쿰으로부터 구별할 수 있었고, 이는 엠. 헤이텔부르겐제가 Cy5 프로브에서는 높은 피크를, TAMRA 프로브에서는 낮은 피크를 생성시킨 반면, 엠. 아시아티쿰은 반대로 생성시켰기 때문이다. 앰플리콘당 단일 프로브를 사용하면, 상대적 피크 높이는 생성물 농도의 차이를 반영할 수 있다. 그러나, 여기서 두 프로브는 동일한 앰플리콘을 검출하므로, 상대적 피크 높이는 프로브-표적 용융 특징의 차이를 반영한다.

[0072] 상기한 바와 같은 다른 분석 도구는 하나 이상의 형광 비, 예를 들어, 본원에 논의된 특정 실시태양에서, PCR 동안 동일한 온도에서 또는 상이한 온도에서 TAMRA 형광 대 Cy5 형광의 비를 사용하는 것이다. 프로브 설계를 위한 유용한 방법은 하나의 프로브를 참조용도로 기능하도록 다수 중에 공통적인 보존된 구역에 결합하도록 설계하거나, 또는 필요한 경우, 제한 프라이머 서열의 일부를 보존된 구역으로서 사용하는 것을 포함한다. 이는 LATE-PCR에 대한 선택사항이고, 이는 프로브  $T_m$ 이 제한 프라이머의  $T_m$  및 어닐링 온도보다 한참 더 낮아서 공통 서열을 갖는 프로브가 증폭을 저해하지 않기 때문이다. 도 6은 형광 비의 조합을 사용한 결과를 보여준다. 상기 실시태양에서, 본 발명자들은 하나의 비로서 각각 40°C의 검출 온도에서 수집된 TAMRA/Cy5 형광 값, 및 다른 비로서 각각 45°C 및 55°C의 검출 온도에서 수집된 TAMRA/Cy5 형광 시그널의 비를 사용하였다. 도 6은 특정 사이클, 본 경우에 사이클 50에서 두 비를 플로팅한다. 6개의 복제물은 다양한 중, 즉 엠. 아시아티쿰 (원 81), 엠. 고르도나에 (원 82), 엠. 헤이텔부르겐제 (원 83), 엠. 말모엔제 (원 84), 및 엠. 마리눔 (원 85)에 대한 비-겹침 데이터를 생성시켰다.

[0073] PCR 동안 상이한 온도에서 프로브 형광을 측정하는 것은 PCR 후의 용융물에 대한 분석을 제한하는 것에 비해 잇점을 갖는다. 하나의 잇점은 역치 사이클 ( $C_T$  값)이 도달된 후 특정 횟수의 사이클에서 형광 값을 비교하는 능력이다. 이는 상기한 바와 같이 SYBR 염료 (또는 다른 인터칼레이팅 염료)를 사용한 비의 사용을 가능하게 한다. 다른 잇점은 각각의 샘플이 앰플리콘 검출에 앞서 사이클 동안 각각의 온도에서 측정된 배경 형광을 갖는다는 점이다. 따라서, 배경 형광에서 샘플간 변동에 대해 정확한 조정이 이루어질 수 있다. PCR 동안 많은 온도에서 형광을 측정하는 것이 가능하여, 프로브가 상이한 표적에 대한 혼성화의 차이를 보이는 온도 범위에 걸쳐 거의 완전한 용융 분석을 제공한다. 상기 단계의 횟수 및 지속시간은 부분적으로 검출 장비의 능력에 좌우된다. 온도의 증가 또는 감소 동안 연속적인 형광 검출은 일부 써말 사이클러 (thermal cycler)를 사용하여 가능하다. 다수의 온도에서의 검출은 형광의 초기 상승이 예상되기 직전의 일부 지점까지 시작할 필요가 없다. 다수의 온도에서의 검출은 모든 사이클에서, 또는 일부 다른 간격으로, 예를 들어 매 5번째 사이클에서 실행될 수 있다. 초기 사이클 동안 다수의 검출 단계를 제거하고 상기 단계의 빈도를 감소시키면 증폭 반응을 완료시키기 위해 요구되는 총 시간을 감소시킨다. 프로브 형광 대 염료 형광의 비를 사용할 때, 바람직하게는 프로브 형광은 프로브가 그의 표적에 혼성화하는 온도에 걸쳐 측정되고, SYBR 형광은 프로브가 비결합된 온도에서 측정된다. 가장 바람직하게는, SYBR 형광은 연장 온도에서 측정된다. 프로브 형광은 SYBR 형광이 평탄역을 이루는 동안 역치 사이클 ( $C_T$ ) 값을 훨씬 초과하는 사이클에서 증가하므로, 이들 비는 증폭 반응 동안 변할 것이다. 따라서, 각각의 샘플의  $C_T$  값을 지난 특정 횟수의 사이클에서 개별 샘플의 비를 비교하는 것이 중요하다.

[0074] 단일쇄 DNA 생성물의 분석은 또한 그의 시그널이 하나 초과, 예를 들어 2 또는 3개의 상이한 온도에서 측정되는 단일 미스매치-허용 프로브를 사용하여 달성할 수 있다. 이어서, 생성되는 데이터는 2 이상의 온도에서 형광 값을 사용하여 비율로서 처리될 수 있다. 비율은 복제물 샘플 사이의 시그널 차이를 유의하게 감소시키고, 측정하고자 하는 대립유전자의 정량적 측정을 제공한다. 도 11은 2개의 온도에서 프로브 형광 수준을 보여준다. 도 11에 예시된 바와 같이, 프로브가 대립유전자 식별성이고 완전 상보성 대립유전자에만 결합하는 고온에서, 및 프로브가 완전 미스매치-허용성이고 표적 서열의 모든 가능한 대립유전자 변이체에 결합하는 보다 낮은 온도에서, 프로브의 과량 프라이머 스트랜드에 대한 혼성화로부터 생성되는 프로브 시그널을 수집한다. 고온 및 저온에서 형광의 측정 및 생성되는 비율의 계산을 또한 중점 분석으로서 수행할 수 있다. 본 발명자들은 상기 분석을 "2개 온도 표준화 분석 (배경 교정 없이)"으로 칭한다. 이들은 도 11에 예시된 바와 같이 동종접합성 및 이종접합성 유전형을 쉽게 구별한다. 상기 종류의 분석은 중점 균질 LATE-PCR 분석, QE-LATE-PCR 분석으로서 수행할 수 있다.

[0075] 도 11은 기준선-교정된 형광 시그널을 기록한다. 실시예 5에 논의된 바와 같이, 본 발명자들은 도 12에 도시된 바와 같은, ABI 7700으로부터 기준선-교정된 형광 시그널보다는 미교정 시그널을 사용하는 것을 선호한다. 기준선 교정은 잠재적으로 인공물을 개별 샘플의 표준화된 형광 비 내에 도입하고, 이는 교정 인자가 기준선을 규



정하기 위해 사용된 배경 형광 시그널의 의사 변동에 민감하기 때문이다. 미교정 형광 판독은 상기 인공물에 영향을 받지 않는다. 미교정 형광 시그널에 의지하면 분석을 형광계 능력을 갖는 임의의 PCR 써모사이클러에, 및 중점 형광 판독을 위한 온도-조절된 형광계와 조합하여 사용된 규정 써모사이클러에 적용가능하게 한다.

[0076] QE-LATE-PCR 유전형 분석은 2개 초과 온도에서 검출된 시그널의 비를 결정함으로써 더욱 개선될 수 있다. 중점 데이터를 표준화하기 위한 3-온도 방법은 다음 식에 의해 제시된다: 표준화된 형광 값 =  $(F_s - F_t) / (F_b - F_t)$  {여기서,  $(F_t)$  = 상단 온도에서의 형광,  $(F_b)$  = 저변 온도에서의 형광,  $(F_s)$  = 임의의 주어진 제3 온도에서의 형광}. 인간 p53 유전자 내의 SNP 부위의 동중접합성 및 이중중접합성 유전형에 적용된 3-온도 방법이 실시예 6에 기재되고 도 13에 도시된다.

[0077] 파이로서열결정은 당업계에 공지된 실시간, 등온, 합성에 의한 서열결정 방법이다. 이는 4가지 운동학상 균형을 이루는 효소인 DNA 중합효소, ATP 솔푸릴라제, 루시페라제 및 아피라제에 의해 촉매된다. 상기 방법은 단일쇄 DNA에 어닐링된 서열결정 프라이머를 포함한다. 각각의 뉴클레오티드는 주형 DNA의 서열에 따라 서열결정 프라이머의 3' 단부 내로의 그의 통합에 대해 개별적으로 분배되고 시험된다. 성공적인 통합은 통합된 뉴클레오티드의 양에 등물량으로 파이로포스페이트 (PPi)의 방출을 수반한다. ATP 솔푸릴라제는 방출된 PPi를 아데노신 5' 포스포솔페이트의 존재 하에 ATP로 정량적으로 전환시킨다. 이어서, ATP는 ATP의 양에 비례하는 양으로 가시광을 생성시키는, 루시페린의 옥시루시페린으로의 루시페라제-매개 전환을 유발한다. 빛은 전하 결합 소자 (CCD) 카메라에 의해 검출되고, 파이로그래프에서 피크로서 표시된다. 통합되지 않은 dNTP 및 과량의 ATP는 아피라제에 의해 계속 분해된다. 뉴클레오티드 서열은 통합된 뉴클레오티드의 양에 비례하는 파이로그래프에서 피크 높이 및 뉴클레오티드 분배의 순서로부터 결정된다.

[0078] LATE-PCR은 단일쇄 DNA를 효율적으로 생성하여, 전통적인 이중쇄 PCR 생성물로부터 단일쇄 주형을 생성하기 위해 요구되는 통상적인 파이로서열결정 샘플 준비 방법에 대한 필요성을 제거한다. 그러나, 파이로서열결정을 위한 LATE-PCR 생성물의 사용에는 증폭 반응으로부터 남은 시약 (파이로서열결정 화학을 저해할 dNTP, 파이로포스페이트, 및 과량 프라이머)의 효율적인 제거가 필요하다. 남은 시약의 제거는 컬럼 정제, 에탄올 침전, 또는 증폭 반응으로부터 dNTP, 파이로포스페이트 및 과량 프라이머의 제거를 위한 PCR 생성물 정제의 임의의 공지의 방법에 의해 달성할 수 있다. 세정 후, LATE-PCR로부터의 단일쇄 DNA는 서열결정 프라이머에 직접 어닐링되고 제조사의 지시에 따라 파이로서열결정을 위해 처리된다. 서열결정 프라이머에 이용가능한 유일한 주형이 단일쇄 DNA 생성물인 것을 보장하도록, LATE-PCR 샘플이 반응에서 생성된 이중쇄 생성물을 변형시키는 온도로 가열되지 않아야 하는 것이 중요하다. 실제로, 주형 DNA는 이미 단일쇄체이므로 프라이머 어닐링을 위해 LATE-PCR 샘플을 가열하는 것이 전혀 필요하지 않을 수 있다.

[0079] 본 발명자들은 서열결정 작업을 위한 샘플을 준비하기 위해 LATE-PCR 증폭을 단순화된 세정 방법과 조합하였다 (실시예 7 및 도 14 참조). 본 발명자들은 물리적인 PCR 생성물 정제를 포함하지 않고 단일 시험관 내에서 수행될 수 있는, 파이로서열결정을 위한 2가지의 LATE-PCR 샘플 준비 방법을 고안하였다. 제1 방법에서, LATE-PCR 증폭으로부터의 잔류하는 dNTP의 문제는 dNTP가 반응 과정에서 고갈되도록 (단일쇄 DNA, 즉 과량 프라이머 스트랜드의 불충분한 생산을 야기하도록 조기는 아니지만) 증폭 동안 제한량의 모든 dNTP를 사용함으로써 처리되고, 이는 일상적 실험에 의해 결정될 수 있다. LATE-PCR로부터 남은 파이로포스페이트의 문제는 LATE-PCR 샘플을 파이로포스파타제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 파이로포스파타제, 예를 들어 효모 파이로포스파타제로 처리한 후, 열 불활성화함으로써 처리된다. LATE-PCR 증폭으로부터 남은 과량 프라이머는, 제한 프라이머의 연장 생성물 (제한 프라이머 스트랜드)의 3' 단부 상에서 상기 프라이머에 대한 매칭 표적 서열이 A) 이중쇄 형태로 결합되어 쉽게 이용가능하지 않고, B) LATE-PCR 프라이머 비에 따라 과량 프라이머 스트랜드보다 5-20배 덜 풍부하므로 파이로서열결정을 저해하지 않을 것이다. 그러나, 파이로서열결정을 위해 사용된 온도에서 PCR 생성물 상에서 과량 프라이머에 의한 임의의 미스프라이밍 가능성을 제거하기 위해, 임의로 LATE-PCR 증폭 개시시에 과량 프라이머에 상보성인 올리고뉴클레오티드를 첨가할 수 있다. 상기 상보성 올리고뉴클레오티드는  $T_m$ 이 예를 들어, 그의 3' 단부에서 과량 프라이머보다 몇 개 뉴클레오티드가 더 짧음으로써 과량 프라이머  $T_m$ 보다 적어도 5-10°C 더 낮아야 하고, DNA 중합효소에 의한 올리고뉴클레오티드의 연장을 방지하도록 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 3' 단부에서 차단되어야 한다 (예를 들어, 포스페이트기의 포함에 의해). 상기 방식으로 디자인될 때, 상보성 올리고뉴클레오티드는 LATE-PCR 증폭을 저해하지 않고, 대신 파이로서열결정을 위해 사용된 온도에서 과량 프라이머와 안정한 이중쇄 혼성체를 형성하여, 과량 프라이머가 증폭된 물질 상의 다른 상보성 부위를 미스프라이밍하는 것을 방지한다. 별법으로, LATE-PCR 반응 후에 첨가되면 상보성 올리고뉴클레오티드는 동일한 길이 또는 과량 프라이머보다 최대 5-10°C 더 낮은  $T_m$ , 또는 둘 모두를 가질 수 있다. 추가로, 과량 프라이

며와 동일한 서열을 함유하는 3' 차단된 올리고뉴클레오타이드는 그의  $T_m$ 을 증가시키는 다른 변형 (예를 들어, 3' 단부에서 여분의 염기 또는 LNA 유사체의 사용 등)과 함께 또는 변형 없이, LATE-PCR 반응 후 제한 프라이머 스트랜드의 3' 단부 상의 상보성 부위에 대해 과량 프라이머를 증가하도록 충분한 농도로 첨가될 수 있다.

[0080] 제2 방법은 파이로서열결정을 위해 사용된 동일한 효소 및 기질 혼합물을 사용하는 LATE-PCR 샘플의 예비처리이며, 프라이머 어닐링 및 파이로서열결정을 위한 개별 dNTP의 첨가를 포함한다. 본 방법에서, 제조사의 권장 프로토콜의 순서는 역전된다 (즉, 정상 프로토콜은 프라이머 어닐링 이후 파이로서열결정 반응 혼합물의 첨가를 요구한다). 상기 방법에서, 파이로서열결정 혼합물 내에 존재하는 아피라제는 dNTP를 분해하는 한편, ATP 스푸릴라제 및 루시페라제는 파이로포스페이트를 ATP 및 빛으로 전환시킨다. 상기 용액에 함유된 루시페라제 및 루시페린은 PPi 및 dNTP의 파괴를 모니터링하기 위한 유용한 시스템을 제공한다. ATP 및 dATP는 모두 루시페라제에 대한 기질로서 역할을 하여, 파이로서열결정 기계에서 CCD 카메라에 의해 검출되는 샘플 광 출력의 증가는 세정에 대한 우수한 근사치로서 역할을 한다. 특정 준비를 위해 필요하다면, 특히 앰플리콘이 약 100 염기쌍보다 더 길거나 약 20 염기쌍 초과인 것이 서열결정되어야 하면, 상기 반응에 의해 고갈된 기질 (아데노신 5' 포스포스페이트 및 루시페린)은 DNA 서열결정의 개시 전에 보충된다. 일부 경우에, 초기 처리는 제조사의 프로토콜보다 더 많은 기질 혼합물을 필요로 할 것이다. 후속적인 프라이머 어닐링을 위해 가열 및 냉각이 요구되는 경우, 이들 시약은 파괴될 것이고, 파이로서열결정 전에 교체될 필요가 있다.

[0081] 제2 방법의 변형은 dNTPase 활성을 갖는 정제된 효소, 예를 들어 아피라제, 예를 들어 감자 아피라제, 및 파이로포스파타제 활성을 갖는 정제된 효소, 예를 들어 파이로포스파타제, 예를 들어 효모 파이로포스파타제의 첨가에 이어, 상기 효소의 열 불활성화, 프라이머 어닐링 및 이어서 통상적인 파이로서열결정을 하는 것이다. 다시, LATE-PCR로부터의 남은 과량 프라이머는 일반적으로 파이로서열결정을 저해하지 않을 것이지만, 저해하는 경우에 이들 프라이머는 상기 설명된 상보성 올리고뉴클레오타이드 방법을 이용하여 처리할 수 있다. 상기 제2 방법은 상이한 LATE-PCR 증폭에 대해 dNTP 농도의 조절을 필요로 하지 않고, 따라서 상당한 시간을 절약한다.

[0082] LATE-PCR 생성물의 직접 파이로서열결정은 사용된 파이로서열결정 장비에 따라 3-15 pmole, 때때로 10-15 pmole의 서열결정 프라이머에 어닐링된 0.5-4 pmole, 때때로 2-4 pmole의 준비된 단일체 생성물을 필요로 한다. 제2 및 제3 샘플 준비 방법에서, 파이로서열결정 혼합물의 최적 pH (PCR에 대한 pH 8.0 이상, 예를 들어 8.3에 비해 pH 7.5)를 보존하기 위해 첨가된 LATE-PCR 샘플의 부피는 총 파이로서열결정 반응의 1/2 미만, 때때로 1/3 미만인 것이 중요하다. 별법으로, 버퍼 농도 및 pH가 따라서 조정되면 LATE-PCR 생성물은 반응 부피의 1/2 초과를 포함할 수 있다. LATE-PCR 증폭의 다양한 상을 모니터링하기 위해 사용된 시약, 예를 들어 형광 DNA 염료 및 혼성화 프로브는 파이로서열결정과 적합성이고, 혼성화 프로브가 서열결정될 구역 또는 파이로서열결정 프라이머가 결합하는 구역에 결합하도록 설계되는 경우를 제외하고는 제거될 필요가 없다. 상기한 경우에, 과량 프라이머를 차단시키기 위해 상기 설명한 방법 중 하나를 혼성화 프로브를 차단하기 위해 이용할 수 있다. 본 발명자들은 본 발명자들의 동시 출원된 미국 특허 가출원 (발명의 명칭: "Reagents and Methods for Improving Reproducibility and Reducing Mispriming in PCR Amplification")에 개시된, 증폭 동안 미스프라이밍을 억제하기 위한 시약이 파이로서열결정 반응물 내 상기 화합물의 최종 농도가 300 nM 이하, 바람직하게는 200 nM 이하이고, 파이로서열결정을 위한 표준 DNA 증합효소 (엑스뉴클레아제-결핍 Klenow DNA 증합효소 단편)가 사용될 때 파이로서열결정과 적합성인 것을 결정하였다. 동일한 챔버 또는 컨테이너 내에서 준비 및 증폭을 허용하는 PCR 샘플 준비 기술 (예를 들어 미국 특허 공개 US-2003-022231-A1 참조)을 바람직하게는 10  $\mu$ l 이하, 예를 들어 2-10  $\mu$ l의 작은 부피에서 수행된 LATE-PCR 증폭과 조합하여 사용함으로써, 작은 군의 세포 (1 내지 10,000 세포)로부터 단일 시험관 포맷으로 파이로서열결정 정보를 얻는 것이 가능하다. 상기 "세포-대-서열 (Cell-to-Sequence)" 분석에 따라, 작은 군의 세포 (1 내지 10,000 세포)가 예를 들어 문헌 [Pierce et al (2002) Biotechniques 32(5): 1106-1111] (미국 특허 공개 US-2003-022231-A1 참조)에 기재된 PCR 샘플 제조 기술에 따라 증폭을 위해 준비되고, LATE-PCR 증폭되고, 상기한 바와 같이 단일 컨테이너, 웰, 시험관 또는 반응 챔버 내에서 파이로서열결정을 위해 직접 처리된다. 하기 실시예 8에서 증명되고 도 15에 나타난 바와 같이, 단일 시험관 방법은 심지어 단일 세포, 단일 분자 수준에서 정밀하고 정확한 유전형 분석을 허용한다.

[0083] 파이로서열결정을 위한 효소 기반 PCR 세정 방안의 일반적인 관심은 나중의 서열결정 동안 효소의 피드백 억제를 일으킬 수 있고 판독 길이를 짧게 할 수 있는 파괴 부산물의 과다생산이다. 이들은  $SO_4^{2-}$ , 옥시루시페린, 무기 포스페이트 (Pi), dNMP 및 AMP를 포함한다. Pi 및 dNMP의 풀 (pool)을 제한하는 한 방법은 PCR 동안 사용되는 dNTP의 농도를 감소시키는 것이다 (반드시는 아니지만 이들이 방법 1에서 상기 논의된 바와 같이 반응 동안 완전히 소비되는 농도까지). 600 염기 길이까지의 LATE-PCR 앰플리콘에 대한 정량적 PCR 관찰을 통해, 본

발명자들은 증폭 효능을 해치지 않으면서 dNTP 농도가 일상적으로 100 nM로 저하될 수 있음을 밝혔다. 상기 조건 하에, 효소적으로 준비된 LATE-PCR 반응물 상의 파이로서열결정은 실시예 9, 도 16에서 증명된 바와 같이 50 초과의 연속적인 염기에 대해 달성할 수 있다.

[0084] 디데옥시 서열결정의 경우에, 본 발명자들은 LATE-PCR 증폭 생성물의 유일한 필수 처리로서 회석을 포함하는 프로토콜을 개발하였다. 사이클 서열결정에 의한 LATE-PCR 증폭으로부터의 단일쇄 앰플리콘의 통상적인 디데옥시 서열결정에는 50 fmole의 상기 생성물 및 공지량의 생성물을 필요로 하고, 이는 모세관 전기영동이 생성물의 양에 민감하기 때문이다. 이중쇄 DNA의 합성을 모니터링하기 위해 SYBR Green I 형광 DNA 결합 염료, 및 단일쇄 앰플리콘의 합성을 모니터링하기 위해 Cy5로 표지된 선형 프로브를 사용하여, LATE-PCR 증폭을 모니터링할 수 있고, 이는 바람직하게는 본 발명자들의 미국 특허 가출원 (발명의 명칭: "Reagents and Methods for Improving Reproducibility and Reducing Mispriming in PCR Amplification")에 개시된 미스프라이밍-억제 시약을 포함한다. 상기 3가지 첨가물은 후속적인 서열결정 반응을 저해하지 않는다. LATE-PCR 반응에서, 이중쇄 생성물의 지수적 증폭 및 합성의 정도는 제한 프라이머의 양에 의해 규정되고, 출발 주형의 양에 독립적이다. 단일쇄 생산의 정도는 적어도 하나의 dNTP의 양을 한정함으로써 또는 원하는 경우 증폭 사이클의 수를 한정함으로써 제한될 수 있다.

[0085] 본 발명자들은 과량 프라이머 스트랜드 (즉, LATE-PCR에서 과량 프라이머로부터 제조된 스트랜드)의 서열결정을 위해, LATE-PCR 증폭물을 물로 적어도 총 20배 이상 희석시키면 과량 프라이머 스트랜드 생성물을 디데옥시 서열결정을 위한 출발 물질로서 적합하도록 만드는 것을 측정하였다. 본 발명의 모세관 시퀀서 (sequencer)에서 사용되는 양이 희석 후 서열결정될 물질 50 fmole의 요구되는 최소량을 함유하는 것을 보장하기 위해, 제한 프라이머의 농도가 25 나노몰 (nM) (25 fmole/ $\mu$ l)일 때 LATE-PCR 반응의 직선기는 적어도 200 펨토몰 (fmole)의 단일쇄 DNA/ $\mu$ l를 수득해야하고, 따라서 약 8배 과량의 단일쇄 DNA가 필요하다. LATE-PCR 증폭에 의해 생성된 단일쇄 DNA의 농도를 추정하기 위해, 본 발명자들은 반응의 끝에 이중쇄 DNA 내에 존재하는 스트랜드의 농도 (사이클 서열결정에 참여하고, 그의 농도가 제한 프라이머의 농도에 의해 규정되는)에 사이클당 제조된 단일쇄 DNA의 농도 (일반적으로 선형 합성의 각각의 사이클은 이론적인 생성물의 약 50%를 수득하고, 이론적인 생성물은 반응에서 이중쇄 DNA의 양 x 반응이 선형으로 남는 동안 사이클의 수인 것으로 추정한다)를 더한다. 형광단에 대한 실시간 형광 곡선의 평탄화에 의해 나타나는 바와 같이 반응의 과정에서 직선인 생성물 축적이 중지되면, 비-직선기 동안 단일쇄 DNA의 양은 반응이 증폭 반응의 최종 사이클로 직선일 때 마지막 사이클 사이에 형광 시그날의 증가 배수로부터 추측된다. 대개, LATE-PCR 증폭에서 생산된 단일쇄 생성물의 농도가 200 fmole/ $\mu$ l이면, 본 발명자들은 과량 프라이머 스트랜드를 25 fmole/ $\mu$ l에 1:8로 희석하고, 2  $\mu$ l의 희석된 생성물 (50 fmole)을 20  $\mu$ l 디데옥시 서열결정 반응에 직접 사용한다. 상기 조건 하에, LATE-PCR 생성물의 서열결정 반응으로의 총 희석 인수는 80배이다. 8  $\mu$ l의 희석된 LATE-PCR 생성물 (200 fmole)을 서열결정 반응에 사용하여 20 배의 총 희석으로 사용할 수 있고, 여전히 해석가능한 서열 크로마토그램을 얻는다.

[0086] PCR 증폭으로부터 남은 시약, 예를 들어 dNTP 및 프라이머가 디데옥시 서열결정을 저해할 것이기 때문에 샘플 정제가 필요하다. LATE-PCR은 에탄올 침전 또는 친화도 컬럼에 의한 샘플 준비를 물 중의 단순한 희석 단계로 교체한다. 디데옥시 서열결정을 위한 LATE-PCR의 준비는 25 fmole/ $\mu$ l의 농도로 과량의 단일쇄 DNA 생성물을 물 중에 적어도 8-10배 희석한 후, 50-200 fmole 단일쇄 DNA 생성물을 10 pmole 서열결정 프라이머를 함유하는 디데옥시-사이클 서열결정 반응물에 첨가하는 것만을 필요로 한다. 최종 디데옥시 서열결정 혼합물 내의 총 희석 인수는 적어도 20배이다. 상기 조건 하에, LATE PCR로부터 잔류하는 dNTP는 너무 희석되어 디데옥시 서열결정을 저해하지 않는다. LATE-PCR로부터의 남은 과량 프라이머도 또한 문제가 되지 않고, 이는 이들 프라이머가 결합하는 주형인 제한 프라이머 스트랜드가 희석 단계 후 매우 낮은 농도로 존재하여 과량 프라이머 스트랜드에 완전히 혼성화되기 때문이다. 상기 2가지 이유로, 과량 프라이머는 서열결정 프라이머로서 역할을 하지 않는다. 실시예 10 및 도 17은 본 발명의 "희석 및 시행" 방법의 유효성을 증명한다. 도 17은 대칭적 PCR 및 전통적인 샘플 준비 방법 (Qiagen 컬럼을 사용한 DNA 생성물의 정제에 이어, 겔 전기영동에 의한 정량; 총 준비 시간: 1 hr)을 이용하여 얻은 서열 크로마토그램, 및 LATE-PCR 및 물 중 희석 (총 준비 시간: 30초)을 이용하여 얻은 서열 크로마토그램을 제시한다. 서열 크로마토그램은 거의 동일하다.

[0087] 실시예 11 및 도 18-19는 동일한 반응에서 동일한 DNA 주형으로부터 하나 초과의 생성물의 LATE-PCR 증폭을 위한 전략을 설명한다. 따라서, 상기 반응은 인접 주형 내에서 2개의 별개의 서열을 증폭시키는 2쌍의 프라이머 (각각 과량 프라이머 및 제한 프라이머로 구성됨)를 함유한다. 2쌍의 프라이머는 두 과량 프라이머 및 두 제한 프라이머가 주형의 동일한 스트랜드에, 또는 주형의 반대편 스트랜드에 혼성화하도록 배열될 수 있다. 당업자가 이해할 바와 같이, 유사한 프라이머가 주형의 반대편 스트랜드에 혼성화할 때, 2개의 과량 프라이머는 그들



각각의 주형 스트랜드 상에서 "안쪽으로" 또는 "바깥쪽으로" 연장될 수 있다. 도 19는 또한 두 과량 프라이머 스트랜드의 서열이 동일한 반응 혼합물로부터 "회석 및 시행" 방법을 통해 얻어질 수 있음을 보여준다.

[0088] 실시예 12 및 도 20은 LATE-PCR 증폭에 의해 생성된 ssDNA 및 dsDNA의 양이 독립적으로 측정될 수 있고, 비 ssDNA/dsDNA를 계산하기 위해 사용될 수 있고, 상기 비는 다시 그때까지 축적된 ssDNA의 양이 "회석 및 시행" 방법을 통한 후속적인 서열결정을 위해 충분한지 결정하기 위해 사용될 수 있다.

[0089] 실시예 13 및 도 21은 2개의 밀접하게 관련되지만 상이한 서열을 갖는 LATE-PCR 앰플리콘의 50:50 혼합물에 사용된 "회석 및 시행" 방법을 보여준다. 도 22는 밀접하게 관련되지만 상이한 서열을 갖는 2개의 LATE-PCR 앰플리콘의 90:10 및 10:90 비로 구성된 혼합물이 "회석 및 시행" 방법을 통해 순수한 100:0 및 0:100 혼합물, 및 30:70 및 70:30 혼합물로부터 구별될 수 있음을 보여준다. 상기 종류의 분석을 달성하기 위해, 각각의 이형체 포질성 (heteroplasmy) 위치에서 각각의 뉴클레오티드 피크의 관찰된 진폭을 상기 위치에서 동등한 "순수한" 뉴클레오티드의 예상된 진폭의 측면에서 교정하는 것이 필요하다. 일단 상기 분석이 수행되면, 각각의 서열의 상대적인 양은 진폭의 비  $[(\text{교정된 뉴클레오티드 1})/(\text{교정된 뉴클레오티드 1} + \text{교정된 뉴클레오티드 2})]$ 로서 계산될 수 있다. 따라서, 상이한 미토콘드리아 DNA 서열의 경우에서와 같이, 본원에 기재된 LATE-PCR 및 디데옥시 "회석 및 시행" 방법은 이형체포질성을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 이형체포질성을 측정하기 위한 디데옥시 방법이 수백개의 뉴클레오티드를 단일 분석에서 조사하기 위해 사용될 수 있으므로 특히 유리하다. 임의의 이론에 매이기를 바라지 않지만, 본 발명자들은 LATE-PCR이 단일쇄 앰플리콘의 고도의 균질 집단을 생성하기 때문에 본원에 설명된 방법이 대칭적 PCR 및 디데옥시-서열결정에 기반한 선행 기술의 시도와 반대로 작업하는 것으로 생각한다. 이와 반대로, 대칭적 PCR은 일부 부분적 앰플리콘 및 일부 미스프라이밍된 앰플리콘과 함께 전장 분자의 집단을 생성하는 경향이 있다.

[0090] 실시예 14 및 도 23은 LATE-PCR이 적어도 하나의 단일 미스매치-허용 프로브와 함께, 종점 용융 곡선을 생성하기 위해 사용될 수 있고, 이는 다시 밀접하게 관련되지만 상이한 서열을 갖는 2 이상의 혼합된 LATE-PCR 앰플리콘의 상대적인 양을 정량하기 위해 사용될 수 있음을 보여준다. 관련 앰플리콘의 혼합물의 정량적 종점 용융 분석 (QE) LATE-PCR은 LATE-PCR이 단일쇄 생성물을 생성한다는 사실에 의해 가능하게 된다. 따라서, 하나 이상의 표지된 미스매치-허용 프로브가 반응물 내에 존재할 때, 프로브(들)은 먼저 최대 상보성 표적 서열에 혼성화한 다음, 온도가 충분하게 저하되면 모든 관련 표적 서열에 혼성화한다. 따라서, 세트 내의 각각의 프로브/표적 혼성체는 그 자체의 용융 온도를 갖고, 각각의 프로브/표적 혼성체로부터 유래된 용융 피크의 크기는 각각의 축적된 표적 서열의 양을 정확하게 반영한다. 이어서, 각각의 용융 곡선의 진폭 또는 2차원 면적의 정량적 측정은 각각의 표적 서열의 상대적 풍부도를 계산하기 위해 사용될 수 있다. 도 23에 나타난 데이터는 상기 방법이 단일 뉴클레오티드가 상이한 2개의 서열의 0:100 - 10:90 - 50:50 - 90:10 - 100:0 혼합물을 구별하기 위해 99.7% 신뢰도를 갖고 사용될 수 있음을 증명한다.

[0091] 본 발명에 따른 분석은 본 발명의 미국 특허 가출원 60/619,620에 기재된 시약의 존재 하에 또는 부재 하에 수행되든지, 반응물에 첨가된 DNA 중합효소, 예를 들어 Taq 중합효소의 농도를 조정함으로써 미스프라이밍을 피하거나 최소화하도록 독립적으로 최적화될 수 있다. 중합효소를 조정함으로써 미스프라이밍을 감소시키는 것은 ssDNA의 프로브를 사용하여 LATE-PCR 반응의 운동학의 면에서, 및 당업계에 공지된 다양한 수단에 의해 밝혀진 최종 생성물의 조성에 의해 관찰될 수 있다. 본 발명자들은 전형적인 과잉 농도의 Taq 중합효소를 사용하여 출발하고, 이어서 단계별로 상기 농도를 감소시키는 것이 실험상 편리함을 발견하였다. 너무 적은 중합효소는 반응을 비효율적으로 만들 수 있는 한편 (생성물 증폭의 속도 또는 정도에서 유의한 감소로서 나타남), 최적 수준의 중합효소는 효율적인 dsDNA 증폭을 갖는 LATE-PCR 증폭 분석을 생성시키고 많은 사이클에 걸쳐 ssDNA 합성을 유지시켰다. 실시예 15는 최적 수준의 중합효소는 이중쇄 염료, 예를 들어 SYBR Green을 사용하여 관찰된 dsDNA 시그널 + 또한 SYBR Green을 사용하여 관찰된 dsDNA 생성물의 용융 곡선에 의해 판단될 수 있음을 증명한다. 실시예 16 및 도 24는 상기 분석이 상이한 양의 출발 물질로부터 생성된 특이적 ssDNA 생성물에 대해 프로빙될 때, 생성되는 플롯은 ssDNA 생산의 많은 사이클에 걸쳐 선형이고 평행함을 보여준다.

[0092] [실시예]

[0093] 실시예 1. 결합 염료 대 결합 염료 + 표지된 프라이머

[0094] 인터칼레이팅 염료의 성능을 상호작용 형광단을 포함하는 프라이머와 조합 사용된 염료의 성능과 비교하기 위해, 연장 분석을 수행하였다. 사용된 염료는 SYBR Green I의 1:40,000 희석액이었다.

[0095] 3가지 뉴클레오티드 스트랜드를 포함시켰다: DNA 주형, 연장가능 DNA 프라이머 (5'가 Cy5로 표지되고, 주형에

상보성이고,  $T_m$ 이 60°C임), 및 또한 표적에 상보성이고, 위치 3'에서 프라이머에 상보성이고, 또한 Cy5 형광단으로 표시되고, 79°C의 보다 높은  $T_m$ 을 갖는 비-연장가능 DNA 올리고뉴클레오타이드 (3' 단부가 포스페이트기로 차단됨). 프라이머와 비-연장가능 뉴클레오타이드 사이의 간격은 비-연장가능 올리고뉴클레오타이드까지의 프라이머 연장 생성물의  $T_m$ 이 모두 79°C 미만이 되도록 선택하였다.

[0096] 프라이머 연장 분석을 위한 반응 혼합물을 0.5 마이크로몰 ( $\mu$ M) 주형 DNA, 1.5  $\mu$ M 프라이머 및 1.5  $\mu$ M의 비-연장가능 올리고뉴클레오타이드를 포함하였다. 혼합물은 또한 1X PCR 버퍼, 3 밀리몰 (mM)  $MgCl_2$ , 250 나노몰 (nM)의 각각의 dNTP, 1:40,000X SYBR Green I, 및 Taq DNA 중합효소를 포함하였다. 반응 혼합물을 50°C로 2분 동안 가열하여 프라이머 및 비-연장가능 올리고뉴클레오타이드를 결합시키고, 비-연장가능 올리고뉴클레오타이드에 도달하지 않는 프라이머 연장 생성물을 생성하였다. 2중 샘플에 대해 실시하였다.

[0097] 프라이머-연장 반응 후, 생성물을 온도가 변화함에 따라 SYBR Green 염료가 여기되는 용융 분석에 적용하였다. 온도가 비연장된 프라이머 및 비-연장가능 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 용융 온도의 범위를 통해 증가될 때, 형광 관독은 염료의 방출 과정에서 및 형광단의 방출 과정에서 취하였다. 용융 곡선 (온도에 대하여 플로팅된 온도에 관한 형광의 1차 미분)을 도 1에 제시하고, 여기서 패널 A는 2개의 샘플에 대한 곡선 1을 제시하고 (염료 방출로부터의 데이터), 패널 B는 2개의 샘플에 대한 곡선 2를 제시한다 (Cy5 방출로부터의 데이터).

[0098] 실시예 2. 켄칭된 미스매치-허용 프로브.

[0099] 마이코박테리아의 16S 리보솜 RNA 유전자에 상보적인 컨센서스 서열을 갖는 표지된 프로브를 설계하였다. 2차 구조는 나트륨 농도를 70 밀리몰 (mM)로 설정하고 마그네슘 농도를 3 mM로 설정하여 Mfold 프로그램 (Zucker, M (2003), "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction," Nucleic Acids Res 31: 3406-3415)에 따라 예측하였다. 프로브의 서열은 Cy5-AATACTGGATAGGACC ACG AGG (서열 1)이었고, 예측된 2차 구조는 밀줄 친 구역의 혼성화에 의해 형성되었다. 프로브의 2차 구조의 예측된  $T_m$ 은 37°C이었다. 상기 프로브를 SYBR Green I 염료를 함유하는 혼합물 중에 표적이 없거나, 엠. 고르도나에 또는 엠. 아시아티쿰을 함유하는 샘플에서 시험하였고, 여기서 염료는 직접적으로 여기되고, 형광단은 다시 간접적으로 여기되었다. Cy5 형광 대 온도의 결과를 도 3의 패널 A에 제시한다. 선 31 (표적 없음)은 높은 배경 형광을 보여주지만, 선 32 (엠. 고르도나에) 및 선 33 (엠. 아시아티쿰)은 배경을 초과하는 식별가능한 시그널을 보여준다. 배경 형광을 켄칭시키기 위해, 비-형광 켄처 (Black Hole™ II 켄처)를 프로브의 3' 말단 뉴클레오타이드에 첨가하였다. 변형된 프로브를 유사하게 시험하였고, 결과를 도 3의 패널 B에 나타낸다. 알 수 있는 바와 같이, 배경 형광 (선 34, 표적 없음)은 현저하게 떨어졌고, 엠. 고르도나에 (선 35) 및 엠. 아시아티쿰 (선 36)으로부터의 시그널은 배경을 초과하여 훨씬 더 높았다.

[0100] 프로브를 켄칭시키는 다른 기술은 한 단부에서 적절한 형광단으로, 및 다른 단부에서 켄처로 말단 표지된 헤어핀 구조를 갖도록 프로브를 구성하는 것이다. 본 발명자들은 서열 Cy5-CTGGATAGGACCACGAGGCCAG-BHQII (서열 2)의 프로브를 구성하였고, 여기서 밀줄 친 서열은 상보성이고 헤어핀 스템을 형성한다. 본 발명자들은 스템을 달성하기 위한 목적으로 3'-말단 뉴클레오타이드를 첨가하였다. 완벽하게 매칭된 표적을 갖는 상기 프로브의 예측된 용융 온도는 60°C이다. 스템의 예측된  $T_m$ 은 약 48°C이다 (형광단-켄처 상호작용의 증가된 친화도에 기여하지 않는 40°C의 예측된 비변형된 뉴클레오타이드 스템  $T_m$ 을 기초로). 상기 프로브를 또한 상기한 바와 같이 시험하였고, 결과를 도 3의 패널 C에 제시한다. 배경 형광 (선 37, 표적 없음)은 매우 낮았고, 엠. 고르도나에 (선 38) 및 엠. 아시아티쿰 (선 39)으로부터의 시그널은 배경보다 높았다.

[0101] 실시예 3. 미스매치-허용 프로브를 사용하는 실시간 및 종점 유전형 분석.

[0102] 본 실시예는 실시간 LATE-PCR 증폭 및 SYBR 염료로부터의 방출에 의해 간접적으로 여기된, Cy5-표지된 저  $T_m$ 의 미스매치-허용 선형 프로브를 사용하는, 테이-삭스 (Tay-Sachs) 병의 원인인 인간 헥소스아미니다제 A (Hex A) 유전자의 G269 대립유전자에 대한 동종접합성 샘플 및 이종접합성 샘플의 확인을 설명한다. 프로브 혼성화를 LATE-PCR의 검출 온도 공간 내에서 각각의 증폭 사이클 동안 2회 모니터링하였다: 첫번째는 55°C (프로브가 본 분석에서 대립유전자-식별성이고 그의 완벽하게 매칭된 표적에만 독점적으로 결합하는 온도), 이어서 40°C (프로브가 미스매치-허용성이고 증폭 반응에서 그의 표적 서열의 대립유전자에 완전히 결합하는 온도). 미스매치-허용성 프로브를 사용하는 특이적 대립유전자 및 총 대립유전자의 검출은 복제물 샘플 사이의 앰플리콘 수율에서 확률적인 시험관 사이의 변동의 교정을 허용한다. 반응에서 대립유전자-특이적 대 전체 대립유전자의 비 (55°C에서 Cy5/40°C에서 Cy5)는 종점 유전형 분석에 대한 복제물 샘플의 표준화를 허용한다. 유전형 정보는 비



을 값들로부터 유래된다. 동종접합성 샘플의 경우에, 대립유전자-식별 조건 하에 검출된 프로브 시그널은 미스매치-허용 조건 하에 검출된 프로브 시그널과 동일하고, 이는 두 경우 모두에서, 프로브가 100%의 표적 서열 대립유전자에 결합하기 때문이다. 이와 반대로, 이종접합성 샘플의 경우에, 대립유전자-식별 조건 하에 검출된 프로브 시그널은 미스매치 허용성 조건 하에 검출된 프로브 시그널의 강도의 1/2이고, 이는 프로브가 대립유전자-식별 조건 하에 50%의 표적 서열 대립유전자에만 결합하지만, 미스매치 허용성 조건 하에 100%의 대립유전자에 결합하기 때문이다. 따라서, 동종접합성 샘플은 55℃에서 Cy5/40℃에서 Cy5 비가 이종접합성 샘플보다 더 높다. 상기 유전형 분석 방법은 단일 대립유전자의 검출에만 의존한다.

[0103] LATE-PCR 프라이머 및 프로브의 서열 및 농도 조정된 용융 온도 ( $T_{m[0]}$ )는 다음과 같다. 제한 프라이머는 서열 5' CGAGGTCATTGAATACGCACGGCTCC 3' (서열 3)을 갖는다. 그의 농도 조정된  $T_{m[0]}$ 은 25 nM에서 63.2℃이다. 과량 프라이머는 서열 5' TAACAAGCAGAGTCCCTCTGGT 3' (서열 4)를 갖는다. 그의 농도-조정된  $T_{m[0]}$ 은 1  $\mu$ M에서 61.8℃이다. 프로브는 서열 5' Cy5-GGGACCAGGTAAGAA 3' (서열 5)를 갖는다. 그의  $T_m$ 은 56.3℃이다. 이는 저  $T_m$  프로브이고, 65℃ 어닐링 온도와 함께 사용될 때 또한 초저  $T_m$  프로브이다.

[0104] 복제물 LATE-PCR 분석 (n=15)을 각각의 상이한 유전형 (동종접합성 G269 및 이종접합성 G269)에 대해 1X PCR 버퍼, 3 mM  $MgCl_2$ , 250 마이크로몰 ( $\mu$ M) dNTP, 25 nM 제한 프라이머, 1000 nM 과량 프라이머, 1.25 단위 Taq DNA 중합효소, 0.6  $\mu$ M Cy5-표지된 프로브, 및 1:40,000 희석액의 SYBR Gold I으로 설정하였다. PCR 사이클 파라미터는 95℃에서 3분, 이어서 95℃에서 10초, 65℃에서 20초, 및 72℃에서 20초의 25 사이클, 이어서 95℃에서 10초, 65℃에서 20초, 72℃에서 20초, 55℃에서 20초, 및 40℃에서 20초의 30 사이클 (55℃ 및 40℃에서 Cy5 채널에서 형광 획득)이었다. 도 7은 55℃에서 Cy5 시그널 대 40℃에서 Cy5 시그널의 비의 분석을 보여주고, 상기 비율이 프로브 검출 역치를 지난 임의의 증폭 사이클에 대한 중점 유전형 분석에 적합함을 증명한다. 도면에서, 동종접합성 샘플 (원 91)의 비율은 이종접합성 샘플 (원 92)의 비율의 약 2배이다.

[0105] 실시예 4. 상이한 용융 온도를 갖는 표적-특이적 프로브를 사용하는 다수 표적의 분석.

[0106] 보다 긴 단일 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, 비대칭적 PCR, LATE-PCR, 또는 롤링 서클 (rolling circle) 증폭 생성물)를 따라 또는 상이한 올리고뉴클레오타이드 상의 상이한 서열을 검출하고 정량하기 위해 각각 동일한 형광 단으로 표지된 다수 프로브를 조합하여 사용할 수 있다. 저  $T_m$  프로브를 사용하면 상기 표적에 대한 특이성을 증가시켜, 미스매칭된 표적으로부터 생성된 시그널을 크게 감소시키거나 제거한다. 상기 기술의 하나의 가능한 용도는 유전 질병을 유발시키는 공지 대립유전자를 확인하기 위해 인간 DNA의 유전형을 분석하는 것이다. 본 실시예는 프로브 디자인 및 생성물의 검출을 위한 온도 분석을 설명한다.

[0107] 출발점으로서, 본 발명자들은 잠재적으로 증폭 생성물 내에 존재할 수 있는 다음 표적을 선택하였다: 단백질의 아미노산 542를 코딩하는 구역에서 낭성 섬유증 막전도 조절자 (CFTR) 유전자의 정상 서열; Delta F508 돌연변이의 서열, 가장 일반적인 CFTR 돌연변이; 및 Delta F508 돌연변이에 대응하는 정상 서열.

[0108] 본 발명자들은 각각의 3개의 표적 서열에 대한 저  $T_m$  대립유전자-식별 프로브를 설계하였다. 프로브는 각각 형광단 FAM 및 켄처로 표지된 저온 분자 비콘 프로브였다. 3개의 프로브는 70 mM Tris-HCl 및 3 mM  $MgCl_2$ 를 함유하는 혼합물 중의 그들의 표적에 대해 상이한  $T_m$ 을 갖도록 설계하였다. "542 프로브"는  $T_m$ 이 40℃ (최근접 이웃 계산에 의한 예측된 값 41℃)이고; "508 정상 프로브"는  $T_m$ 이 47℃ (최근접 이웃 계산에 의한 예측된 값 46℃)이고; "Delta F508 프로브"는  $T_m$ 이 54℃ (최근접 이웃 계산에 의한 예측된 값 53℃)이었다. 도 8은 그로부터  $T_m$  값이 얻어진 용융 곡선을 제시한다. 도 8은 2중 샘플에 대한 542 프로브 (선 96), DF508 프로브 (선 97) 및 508 정상 프로브 (선 98)에 대한 온도의 함수로서 형광 판독의 음적 1차 미분을 보여준다. 표적 농도 1  $\mu$ M, 및 542 프로브 농도 2  $\mu$ M을 사용함으로써 대략 동일한 피크 높이가 얻어졌다. 본 발명자들은 대립유전자 식별을 검토하기 위해 미스매칭된 표적에 대한 각각의 프로브를 시험하였고, 완벽한 표적에 대한 형광이 미스매칭된 표적에 대한 형광의 5-10배임을 밝혔다.

[0109] 도 8로부터 작은  $T_m$  차이더라도 쉽게 해상가능함을 알 수 있다. 도 8과 같은 플롯으로부터, 4-5℃의 차이는 해상가능할 것이다. 실시간 PCR 썬말 사이클러에서 제공된 소프트웨어를 사용하는 디컨볼루션은 상기 양의 1/2 이 상이한  $T_m$ 의 해상도를 허용할 것이다.

- [0110] 형광의 음적 1차 미분을 조사하는 것은 올리고뉴클레오타이드 표적이 주어진 샘플 내에 존재하는지 결정하기 위한 방법이다. 도 9는 배경을 초과하는 형광을 사용하는 상기 분석을 보여준다. 정상 508 표적을 함유하지만 Delta F508 표적을 갖지 않는 샘플 (원 101)은 54℃에서 용융 피크를 갖고, 이는 분자 비콘-표적 혼성체의 표시이다. Delta F508 표적을 함유하지만 정상 표적을 갖지 않는 샘플 (원 102)은 약 47℃에서 용융 피크를 갖고, 이는 돌연변이체 서열을 갖는 비콘에 대한 혼성화의 표시이다. 두 표적을 모두 함유하는 샘플 (원 103)은 온도 범위에 걸쳐 넓은 피크를 갖고, 이는 두 분자 비콘-표적 혼성체로부터의 형광을 나타낸다. 542 아미노산에서 정상 서열의 존재 및 상대 농도는 약 40℃에서 용융 피크의 존재 및 상대 높이에 의해 표시된다. 542 정상 표적을 갖는 샘플 (각각의 숫자 군에 대해 직선)은 상기 온도에서 큰 피크를 갖고, 제2의 가장 일반적 CFTR 돌연변이와 동일한 상기 구역에서 단일 뉴클레오타이드 변화를 함유하는 542 돌연변이체 표적을 갖는 샘플 (각각의 숫자 군에 대해 점선)은 상기 온도에서 피크를 갖지 않고, 두 542 표적을 모두 갖는 샘플 (각각의 숫자 군에 대해 파선)은 중간 높이의 피크를 갖는다. 두 542 표적을 모두 갖는 샘플에서 피크의 높이는 이웃하는 Delta F508 용융 피크의 존재에 의해 영향을 받는다.
- [0111] 증폭 반응 과정 동안 완전 용융 프로필을 얻는 것이 항상 가능하거나 바람직하지는 않을 수 있다. 상기 설명된 샘플의 추가 분석은 제한된 수의 검출 단계가 혼합물 중의 특이적 올리고뉴클레오타이드를 확인하기 위해 요구되는 정보를 제공할 수 있음을 보여준다. 온도를 증가시키는 대신 감소시키는 것이 이용될 수 있다. 샘플을 70℃로 가열한 다음, 각 단계에서 30초 검출하면서 5℃씩 30℃로 저하시켰다. 정상 508 표적을 함유하지만 Delta F508 표적을 갖지 않거나, Delta F508 표적을 함유하지만 정상 표적을 갖지 않는 샘플은 60℃ 내지 50℃에서 형광의 변화를 기초로 구별될 수 있다. 표적 올리고뉴클레오타이드의 각각의 조합은 형광 변화의 독특한 패턴을 생성하였다. 55℃에서 형광 증가의 변화% 대 45℃에서 형광 증가의 변화%의 산란 플롯을 도 10에 도시한다. 상기 분석은 각각의 샘플 내에 존재하는 표적의 조합을 구별한다. 형광 강도 자체보다는 형광의 변화를 이용함으로써, 복제물 증폭 샘플에서 발생할 수 있는 바와 같이 샘플이 표적의 총 농도에서 상당히 다를 때에도 정확한 평가가 이루어질 수 있다. 도 10은 정상 508 + 정상 542 표적 (원을 그린 표지 111), 정상 508 + 두 542 표적 (112), 정상 508 + 돌연변이체 542 표적 (113), 두 508 + 정상 542 표적 (114), 두 508 + 두 542 표적 (115), 두 508 + 돌연변이체 542 표적 (116), Delta 508 + 정상 542 표적 (117), Delta 508 + 두 542 표적 (118), 및 Delta 508 + 돌연변이체 542 표적 (119)의 각각의 조합에 대한 2중 샘플을 포함한다. 증폭 반응의 각각의 사이클 또는 선택된 사이클 동안 상기 온도 프로필을 이용하여 유사한 분석이 실행될 수 있다. 공지의 유전형의 DNA를 갖는 몇몇 샘플이 증폭될 수 있고, 검출 데이터는 예상된 범위의 값을 확립하기 위해 사용될 수 있다. 이는 미지의 샘플로부터 유전형의 신속한 결정을 위한 방법을 제공할 것이다.
- [0112] 본 실시예에서 3개의 프로브만을 사용하였지만, 훨씬 더 많은 수의 프로브의 조합 사용이 가능하다. 프로브의 총 수에 대한 주요 제한은 검출을 위한 온도 범위 및 프로브-표적 혼성체 사이의 최소  $T_m$  차이이다. 이들은 다시 증폭 반응의 성질 및 장비 및 디컨볼루션 소프트웨어의 능력에 좌우된다. 예를 들어, 디컨볼루션을 위한 최소  $T_m$  차이가 3도이면 30도 온도 범위에 걸쳐 10개의 상이한 프로브-표적 조합이 구별될 수 있다. 상기 수치는 다수 형광단을 사용함으로써 몇배 증가될 수 있다.
- [0113] 실시예 5. 배경 교정을 수행할 때 또는 배경 교정을 수행하지 않을 때의 2개 온도 표준화.
- [0114] rs858521 SNP의 QE LATE-PCR 유전형 분석을, 단일 Cy5-표지된 미스매치-허용 프로브를 사용하여 미지의 DNA 샘플 및 동중접합성 대조물 rs858521 (CC 대립유전자) 및 이중접합성 대조물 (CG 대립유전자)을 사용하여 수행하였다. 증폭 및 검출은 보통 기준선-교정된 형광 시그널을 생성하는 ABI Prism Sequence Detector 7700 (어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems, 미국 캘리포니아주 포스터 시티))를 사용하여 수행하였다. 그러나, 비율을 사용하는 본 발명의 분석에 대해, 형광 시그널 비는 기준선-교정된 형광 시그널 (도 11)로부터 및 미교정 형광 시그널 (도 12)로부터 모두 얻었다. 도 11은 장비의 기준선-교정된 형광 시그널을 사용하는 50℃에서의 프로브의 형광 대 25℃에서의 그의 형광의 비를 증폭 반응의 사이클 수의 함수로서 제시한다. 도 11에서, 원 113은 동중접합성 대조물의 복제물이고, 원 114는 이중접합성 대조물의 복제물인 반면, 원 111 및 112는 미지의 것이다. 도 12는 미교정 형광 시그널을 사용하는 동일한 결과를 제시한다. 도 12에서, 원 116은 동중접합성 대조물의 복제물이고, 원 117은 이중접합성 대조물의 복제물이고, 원 115는 미지의 것이다. 표준화를 위해 기준선-교정된 형광 시그널을 사용하면 하나의 샘플 (도 11의 원 112)에 대해 불분명한 유전형 분석을 생성시켰다. 이와 반대로, 표준화를 위해 미교정 형광 시그널을 사용하면 모든 샘플에 대해 정확한 유전형 분석을 제공하였다. 상기 결과는 ABI Prism 7700 Sequence Detector 소프트웨어에서 기준선-교정이 시그널 표준화에 해를 끼치는 인공물을 도입할 수 있고 바람직하게는 사용되어서는 안된다는 것을 증명한다.

[0115] 실시예 6. 3개 온도 표준화.

[0116] rs858521 SNP 프라이머 및 단일 미스매치-허용 레조넌스 (resonance) 프로브를 함유하는 복제물 LATE-PCR 증폭 반응을 rs858521 유전자 SNP의 각각의 유전형에 대해 정제된 게놈 DNA (1800 게놈 동등량, 각각의 동종접합성 CC, 이종접합성 CG, 및 동종접합성 GG 유전형의 18 복제물 반응)을 사용하여 수행하였다. 증폭된 생성물을 도 13의 패널 A에 나타난 용융 곡선에 의해, 및 패널 B 및 패널 C에 나타난 바와 같이 데이터를 표준화시킴으로써 분석하였다. 도 13A는 LATE-PCR 증폭 후 용융 곡선 분석 동안 수집된 미교정 형광 시그널의 플롯을 보여준다. 사용되는 프로브는 보다 높은 온도에서 대립유전자-식별성이지만, 온도가 감소함에 따라 점차 보다 미스매치 허용성으로 되었다. 복제물 샘플 사이의 생성물 수율에서 고유 변동성이 상기 프로브에 대한 대립유전자 식별의 온도 창 (40°C-60°C, 합성 올리고뉴클레오타이드 표적을 사용하여 이전에 결정됨, 데이터를 나타내지 않음) 내에서 미교정 형광 시그널 (원 131)에 의한 이들 유전형의 식별을 방해한다. 도 13B는 모든 온도에서 표준화된 각 샘플로부터의 시그널을 상기 샘플에 대한 완전 미스매치-허용 온도 (25°C)에서 수집된 시그널에 대해 보여준다. 도 13B에서, 동종접합성 CC 대립유전자에 대한 표준화된 시그널은 원 132이고, 이종접합성 CG 대립유전자에 대한 표준화된 시그널은 원 133이고, 동종접합성 GG 대립유전자에 대한 표준화된 시그널은 원 134이다. 도면이 보여주는 바와 같이, 표준화는 시그널 산란을 감소시키고, 대립유전자 식별 창 내에서 각각의 유전형의 확인을 허용한다. 최대 분리는 52°C에서 관찰되었고, 이는 사용된 레조넌스 프로브의  $T_m$ 에 대응한다. 시그널 산란은 도 13A에 비해 도 13B에서 유의하게 감소되었지만, 운동학 플롯의 전개 (spread)로부터 판단하여 복제물 샘플 사이에 시그널 강도의 일부 변동성이 여전히 존재하였다. 도 13C는 상기 잔류 시그널 산란을 제거하는 최선의 방법이 각각의 온도에서 형광 시그널을 용융 곡선이 분기하기 시작하는 도 13B에서 관찰된 대립유전자 식별 창의 상단 및 저변 온도 (즉, 각각 40°C 및 60°C)에서 수집된 형광 시그널에 표준화시킴에 따른 것이었음을 보여준다. 도 13C에서, 동종접합성 CC 대립유전자에 대한 표준화된 시그널은 원 135이고, 이종접합성 CG 대립유전자에 대한 표준화된 시그널은 원 136이고, 동종접합성 GG 대립유전자에 대한 표준화된 시그널은 원 137이다. Fb 및 Ft가 각각 대립유전자 식별의 온도 창의 저변 및 상단을 향한 형광 관독이고, Fs가 용융 분석 동안 임의의 주어진 온도에서 형광 관독이면, 표준화된 형광 비는 다음과 같이 계산된다:

[0117] 3개-온도 표준화된 형광 비 =  $(F_s - F_t) / (F_b - F_t)$

[0118] 각각의 온도에서 형광 시그널의 임의의 주어진 샘플 내에서 40°C 및 60°C에서의 형광 시그널에 대한 동시 표준화는 형광 시그널 산란을 더욱 감소시켰고, 각각의 유전형으로부터의 복제물 용융 곡선을 매우 팽팽하게 되도록 하였다 (도 13C 참조). 단일 온도에서 계산된 형광 비, 즉, 대립유전자 식별 창의 상단 및 저변 온도 (즉, 60°C, 40°C에서)를 향한 형광 시그널을 사용하여 표준화된 프로브의  $T_m$  (52°C)은 99.7% 초과 확실히성을 가지면서 각각의 유전형을 특유하게 규정한다 (즉, 각각의 유전형에 대한 모든 가능한 형광 비의 99.7%를 포함하는 3개-표준 편차로 이루어지는 오차 박스 (error box)는 서로 잘 분리됨, 데이터를 나타내지 않음). 대립유전자 식별 창의 대응하는 상단 및 저변 온도 (즉, 71°C, 45°C)에 표준화된 프로브의  $T_m$  (57°C)에서 형광 시그널이 계산될 때, rs2270517 SNP 부위에 대해 유사하게 개선된 결과가 얻어졌다.

[0119] 실시예 7. LATE-PCR 생성물의 직접 파이로서열결정.

[0120] 복제물 LATE-PCR 증폭을 1X PCR 버퍼, 3 mM  $MgCl_2$ , 20 나노몰 (nM) dNTP, 25 nM 제한 프라이머, 1000 nM 과량 프라이머, 1.25 단위 Platinum Taq DNA 중합효소, 및 100 게놈 인간 DNA로 이루어진 25  $\mu$ l 부피에서 수행하였다. 제한 프라이머의 서열은 5' CCGCCCTTCTCTGCCCCCTGGT 3' (서열 6)이고, 과량 프라이머의 서열은 5' GCCAGGGGTTCCTACGTAGA 3' (서열 7)이었다. 상기 서열은 인간 헥소스아미니다제 A 유전자의 엑손 11로부터 94 염기쌍 절편을 증폭시킨다. LATE-PCR 증폭을 위해, 열 사이클 프로파일은 95°C에서 3분, 이어서 95°C에서 10초, 및 72°C에서 20초의 10 사이클, 이어서 95°C에서 10초, 67°C에서 20초, 및 72°C에서 20초의 55 사이클이었다. 반응 후, 16.6  $\mu$ l (선행 파이로서열결정 실험으로부터 경험상 추정된 바와 같이 3 pmole의 단일쇄 DNA (ssDNA)의 동등량)를 20 마이크로리터 ( $\mu$ l) 10 mM Tris-Cl pH 8.5와 혼합하고, 파이로서열결정을 위해 사용된 미세적정관의 웰에 넣었다. LATE-PCR-증폭 생성물로부터 잔류하는 dNTP 및 파이로포스페이트를 제거하기 위해, PSQ 96 SNP 시약 키트 (파이로시퀀싱, 인크. (Pyrosequencing, Inc, 미국 매사추세츠주 웨스트보로))로 제공되는 바와 같은 엑소뉴클레아제-결핍 Klenow DNA 중합효소, 아피라제, 루시페라제, ATP 술폰릴라제로 이루어진 표준 파이로서열결정 효소 혼합물, 및 루시페린 및 아테노신 5' 포스포술포네이트로 이루어진 표준 파이로서열결정 기질 혼합물을 제조사의 지시에 따라 PSQ 96 장비 (파이로시퀀싱, 인크.)를 사용하여 LATE-PCR 샘플을 포함하는 웰 내로 순차적으로 분배하고, 37°C에서 60초 동안 인큐베이션하였다. PSQ 96 장비에 의해 보통 자동으로 수행



되는 후속적인 dNTP 첨가를 장비에 프로그래밍된 디폴트 (default) 부피를 이용하여 10 mM Tris-Cl pH 7.5의 단일 첨가로 교체하였다. 상기 단계에 이어, LATE-PCR 샘플을 포함하는 웰에 2.5  $\mu$ l 10  $\mu$ M 서열결정 프라이머 (5' CTGGTACCTGAACCGTAT 3') (서열 8)을 첨가하였다. LATE-PCR 샘플에 첨가된 파이로서열결정 효소 및 기질 혼합물의 부피를 고려하여, 서열결정 프라이머의 최종 농도는 0.5  $\mu$ M이고 최종 부피는 50  $\mu$ l인 것으로 추정되었다. 서열결정 프라이머를 갖는 샘플을 다시 PSQ 96 장비에 되돌려 보내고, 제조사의 지시에 따라 처리하되, 보통 장비에 의해 수행되는 파이로서열결정 효소 및 기질 첨가를 유사한 부피의 10 mM Tris-Cl pH 7.5의 첨가, 이어서 dNTP의 첨가로 교체하였다. 생성되는 파이로그래를 도 14의 패널 A에 도시하고, 이는 특정 뉴클레오티드의 통합으로부터 생성되는 광 시그널을 보여준다. 피크의 높이는 각각의 첨가 동안 통합된 뉴클레오티드의 수에 대응한다. 도 14의 패널 C를 살펴보면, 각각의 처음 2개의 뉴클레오티드 (A, T) 중 하나가 주형 내로 통합된 후, 다음 뉴클레오티드 (C, C)의 2개가 통합되었고, 이와 같이 계속됨을 알 수 있다. 피크의 높이 및 뉴클레오티드 첨가 순서에 기초하여, 서열이 유도되고: 5' ATCCTATGGCCC 3' (서열 9), 후속적으로 인간 헥소스아미니다제 A 유전자에 대한 GenBank 서열 (GenBank 기탁 번호: S62068)을 사용하여 확인하였다. 상기 결과는 파이로서열결정을 위해 사용된 효소 및 기질 혼합물을 사용하여 LATE-PCR 샘플을 예비처리하면 프라이머 어닐링 및 반복 dNTP 첨가 후 LATE-PCR-증폭 생성물의 직접 파이로서열결정을 허용함을 증명한다. 상기 프로토콜을 제조사의 지시에 따르도록 변경시키면 (즉, 프라이머 어닐링을 수행한 후, 파이로서열결정 효소 및 기질 혼합물의 첨가) 주형 상에 통합된 것으로 가정되지 않는 dNTP의 첨가시 80% 가양성 피크를 생성시켰다. 이들 가양성 피크는 파이로서열결정에 앞서 LATE-PCR 증폭으로부터의 잔류하는 dNTP로부터 서열결정 프라이머의 부분 연장으로 인한 것이다.

[0121] 별도의 실험에서, 상기 설명된 동일한 LATE-PCR 샘플을 QIAquick PCR 정제 키트 (Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 정제하고, 10 mM Tris-Cl pH. 7.5에서 0.375 pmole/ $\mu$ l로 회수하였다. 8 마이크로리터 ( $\mu$ l)의 상기 용액 (총 3 pmole)을 상기 설명된 서열결정 프라이머와, 10 mM Tris-Cl pH. 7.5 중 50  $\mu$ l의 최종 부피 중 0.5  $\mu$ M의 서열결정 프라이머의 최종 농도로 혼합하였다. 샘플을 PSQ 96 장비를 사용하여 제조사의 지시에 따라 파이로서열결정하였다. 생성되는 파이로그래를 도 14의 패널 B에 도시한다. 전통적인 준비 방법은 보다 시간 소모적이고 고가이지만, 패널 A를 생성시킨 본 발명의 방법에 비해 우월한 데이터를 제공하지 않았다.

[0122] 실시예 8. LATE-PCR 생성물의 직접 파이로서열결정.

[0123] 단일 세포를 유전형 분석하기 위해, 복제물 LATE-PCR 증폭을 1X PCR 버퍼, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M dNTP, 100 nM 제한 프라이머, 1000 nM 과량 프라이머, 1.25 단위 AmpliTaq Gold DNA 중합효소 (어플라이드 바이오시스템즈)로 이루어지는 25  $\mu$ l 부피에서 수행하였다. 각각의 반응은 IVS-110 돌연변이에 대해 3개의 가능한 유전형 중 하나를 사용하여 문헌 [Pierce et al. (2002) Biotechniques 32(5): 1106-1111] (미국 특허 공개 US-2003-022231-A1 참조)에 기재된 바와 같이 제조된 단일 인간 림프아세포를 사용하여 개시하였다. 제한 프라이머의 서열은 5' GGCCATCACTAAAGGCACCGAGCACT 3' (서열 10)이고, 과량 프라이머의 서열은 5' GGGTTCTGATACGCACTGACTCTCTC 3' (서열 11)이었다. 상기 서열은 인간 염색체 11p 상의  $\beta$ -글로빈 유전자로부터 191 염기쌍 절편을 증폭시킨다. LATE-PCR 증폭을 위해, 열 사이클 프로파일은 95°C에서 10분, 이어서 95°C에서 10초, 66°C에서 15초 및 72°C에서 20초의 65 사이클이었다. 증폭 후에, 5  $\mu$ l을 6.64  $\mu$ l의 20 mM Tris-아세트이트 pH 7.6와 혼합하고, 파이로서열결정을 위해 사용된 광학 플레이트의 웰에 넣었다. LATE-PCR 증폭의 생성물로부터 잔류하는 dNTP 및 PPi를 제거하기 위해, Pyro Gold 시약 키트 (바이오테이지 에이비 (Biotage AB, 스웨덴 웁살라)) 내에 제공되는 표준 부피의 파이로서열결정 효소 혼합물 (엑소뉴클레아제-결핍 Klenow DNA 중합효소, 아피라제, 루시페라제, ATP 술포릴라제로 이루어짐) 및 표준 부피의 약 2배의 기질 혼합물 (루시페린 및 아데노신 5' 포스포소르베이트로 이루어짐)를 PSQ HS 96A 장비 (바이오테이지 에이비)를 사용하여, 효소 혼합물 펄스 시간: 23.5 ms; 기질 혼합물 펄스 시간: 44.0 ms; 시약 분배 압력: 400 mbar의 장비 세팅을 이용하여 LATE-PCR 샘플을 포함하는 웰 내로 순차적으로 분배하였다. 샘플을 광 출력이 배경 미만으로 떨어질 때까지 28°C에서 60초 동안 인큐베이션하였다. 이 후, 0.36  $\mu$ l의 10  $\mu$ M 서열결정 프라이머: 5' GACCACCAGCAGCCTAAG 3' (서열 12)를 각각의 샘플에 12  $\mu$ l의 총 반응 부피로 첨가한 다음, 80°C에서 2분 동안 어닐링시킨 후, 실온으로 10분 동안 냉각시켰다. 또한, 주형 스트랜드의 3' 단부가 자체에 접혀 연장하는 것을 방지하기 위해 900  $\mu$ M 농도의 LATE-PCR 제한 프라이머의 3' 포스포리화 버전 (서열 7)을 또한 여기에 첨가하였다. 이어서, 서열결정 프라이머를 갖는 샘플을 다시 PSQ HS 96A 장비에 되돌려 보내고, 보통의 효소 및 기질 혼합물 첨가를 포함하여 제조사의 지시에 따라 처리하였다. 동중첩합성 야생형, 이중중첩합성 및 동중첩합성 돌연변이체 유전형을 갖는 세포로부터 생성되는 파이로그래를 각각 도 15의 패널 A-C에 도시한다. 광 단위 및 피크 높이는 실시예 7에 설명된 바와 같다. 피크의 상대 높이는

각각의 위치에서 통합된 뉴클레오타이드의 수에 대응한다. 도 15의 패널 A를 살펴보면, 제2 피크 (T)가 높이가 제1 피크 (G)의 1/2이고, 제3 피크 (G)의 1/3이고, 제4 피크 (A)의 1/4이고, 피크 5-8 (TAGA)과 동일한 높이임을 알 수 있다. 따라서, 처음 8개 피크에 대한 서열은 GGTGGGAAAATAGA (서열 13)로 판독된다. 피크의 높이 및 뉴클레오타이드 첨가의 순서에 기초하여, 도 15의 패널 A의 야생형  $\beta$ -글로빈 서열이 유도되고, 후속적으로 인간  $\beta$ -글로빈 유전자에 대한 GenBank 서열을 사용하여 확인하였다. 이중접합성 (패널 B) 또는 동중접합성 (패널 C) 돌연변이는 화살표로 표시된 IVS-110 부위에서 확인되었다. 패널 B에서, 1.5 단위의 "C" 피크, 그 다음의 0.5 단위의 "T" 피크는 두 대립유전자의 "C" 염기, 그 다음의 하나의 대립유전자의 "C" 및 다른 대립유전자의 "T"를 나타낸다. 이들 결과는 LATE-PCR 샘플을 파이로서열결정을 위해 사용된 효소 및 기질 혼합물로 예비처리하면 프라이머 어닐링 및 반복 dNTP 첨가 후 LATE-PCR의 직접 파이로서열결정을 허용함을 증명한다. 상기 프로토콜을 제조사의 지시에 따르도록 변경시키면 (즉, 프라이머 어닐링을 수행한 후, 파이로서열결정 효소 및 기질 혼합물의 첨가) 주형 상에 통합된 것으로 가정되지 않는 dNTP의 첨가시 80% 가양성 피크를 생성시켰다. 상기 가양성 피크는 잔류하는 dNTP를 사용한 서열결정 프라이머의 부분 연장으로 인한 것이다.

[0124] 실시예 9. 긴 서열에 대한 LATE-PCR 생성물의 파이로서열결정.

[0125] LATE-PCR 증폭을 1X PCR 버퍼, 3 mM  $MgCl_2$ , 100  $\mu$ M dNTP, 100 nM 제한 프라이머, 1000 nM 과량 프라이머, 1.25 단위 AmpliTaq Gold DNA 중합효소 (어플라이드 바이오시스템즈) 및 50 nM의 미국 특허 가출원 (발명의 명칭: "Reagents and Methods for Improving Reproducibility and Reducing Mispriming in PCR Amplification")에 개시된 미스프라이밍-감소 시약 9-22DD로 이루어진 25  $\mu$ l 부피에서 수행하였다. 시약 9-22DD는 9개 뉴클레오타이드 길이의 스템 및 22 뉴클레오타이드 길이의 단일쇄 루프를 갖는 헤어핀 올리고뉴클레오타이드이다. 올리고뉴클레오타이드는 5' 말단 및 3' 말단 Dabcyl 잔기의 첨가에 의해 변형된다. 그의 뉴클레오타이드 서열은 5' CGCGGCGTCAGGCATATAGGATACCGGGACAGACGCCGCG 3' (서열 14)이다. 반응을 20 개놈 동등량의 인간 DNA를 사용하여 개시하였다. 제한 프라이머의 서열은 5' GGTCAGCGCCGGCTGCAAGTGTAGA 3' (서열 15)이고, 과량 프라이머의 서열은 5' GATGGGTGGAGCTTGCTTGAGG 3' (서열 16)이었다. 이들 서열은 인간 염색체 17p 상의 p53 유전자에 가까운 78 염기쌍 절편을 증폭시킨다. LATE-PCR 증폭을 위해, 열 사이클 프로파일은 95°C에서 10분, 이어서 95°C에서 10초, 66°C에서 10초 및 72°C에서 20초의 60 사이클이었다. 증폭 후에, 7.5  $\mu$ l의 생성물을 9.96  $\mu$ l 20 mM Tris-아세트이트 pH 7.6과 혼합하고, 파이로서열결정을 위해 사용된 광학 플레이트의 웰에 넣었다. LATE-PCR로부터의 잔류하는 dNTP 및 PPi의 제거를 위해, Pyro Gold 시약 키트 (바이오테이지 에이비) 내에 제공된 표준 부피의 파이로서열결정 효소 혼합물 (엑소뉴클레아제-결핍 Klenow DNA 중합효소, 아피라제, 루시페라제, ATP 술폰릴라제로 이루어짐) 및 표준 부피의 약 2배의 기질 혼합물 (루시페린 및 아데노신 5' 포스포술폰레이트로 이루어짐)을 PSQ HS 96A 장비 (바이오테이지 에이비)를 사용하여 효소 혼합물 펄스 시간: 23.5 ms; 기질 혼합물 펄스 시간: 44.0 ms; 시약 분배 압력: 400 mbar의 장비 세팅을 이용하여 LATE-PCR 샘플을 함유하는 웰 내로 순차적으로 분배하였다. 이어서, 샘플을 광 출력이 배경 미만으로 떨어질 때까지 28°C에서 60초 동안 인큐베이션하였다. 상기 앰플리콘에서, 제한 LATE-PCR 프라이머 (서열 10)을 파이로서열결정 프라이머로서 사용하였고, 이의 0.54  $\mu$ l의 10  $\mu$ M 용액을 각각의 샘플에 18  $\mu$ l의 총 반응 부피로 첨가한 다음 80°C에서 2분 동안 어닐링시킨 후, 실온으로 10분 동안 냉각시켰다. 이어서, 서열결정 프라이머를 갖는 샘플을 다시 PSQ HS 96A 장비로 되돌려 보내고, 보통의 효소 및 기질 혼합물 첨가를 포함하는 제조사의 지시에 따라 처리하였다. 생성되는 파이로그래프를 도 16에 도시한다. 피크의 상대 높이는 실시예 8에 설명된 바와 같이 각각의 위치에서 통합된 뉴클레오타이드의 수에 대응한다. GenBank 데이터베이스로부터 결정되는 바와 같이 정확하게 매칭하는 예상된 서열은 열 내의 주어진 염기 숫자를 나타내는 아래첨자와 함께 피크 상부에 기록된다 (즉,  $G_1C_1A_1G_2 = GCAGG$ ). 상기 결과는 LATE-PCR 샘플을 파이로서열결정을 위해 사용된 효소 및 기질 혼합물로 예비처리하면 50 염기쌍 초과 길이의 판독을 허용한다.

[0126] 실시예 10. LATE-PCR 생성물의 직접 디데옥시 서열결정

[0127] 테이-삭스병의 원인인 G269 돌연변이를 함유하는 인간 헥소스아미니다제 A 유전자의 엑손 7의 절편을 증폭시키기 위해, ABI Prism Sequence Detector 7700 (어플라이드 바이오시스템즈)을 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 서열은 GenBank 기탁 번호 M16417에 대응한다. 하나의 증폭은 LATE-PCR 증폭이고, 생성물은 직접적으로 디데옥시 서열결정시켰다. 대조 방법으로서, 프라이머 농도를 등물로 변화시키고, 통상적인 대칭적 PCR 증폭을 수행하고, 증폭된 생성물을 통상적인 정제 후 디데옥시 서열결정하였다.

[0128] 증폭 반응 혼합물 (최종 농도)



- [0129] 부피: 25  $\mu\text{l}$
- [0130] 1x PCR 버퍼 (인비트로젠 (Invitrogen, 미국 캘리포니아주 칼스바드))
- [0131] 3 mM  $\text{MgCl}_2$
- [0132] 10  $\mu\text{M}$  dNTP
- [0133] 0.6  $\mu\text{M}$  프로브 (LATE-PCR만)
- [0134] 1:41,666 희석액 SYBR Gold 염료 (몰레큘라 프로브스 (Molecular Probes, 미국 오레건주 유진))
- [0135] 1.25 단위 Platinum Taq DNA 중합효소 (인비트로젠)
- [0136] 6 ng 인간 게놈 DNA (1000 게놈에 동등량)
- [0137] 프라이머: LATE-PCR을 위해, 25 nM 제한 프라이머 및 1000 nM 과량 프라이머; (대조 방법을 위해, 300 nM의 각각의 동일한 프라이머).
- [0138] 올리고뉴클레오타이드 서열
- [0139] 제한 프라이머: 5' CGAGGTCATTGAATACGCACGGCTCC 3' (서열 17)
- [0140] 과량 프라이머: 5' TAACAAGCAGAGTCCCTCTGGT 3' (서열 18)
- [0141] 프로브: 5' Cy5 GGGACCAGGTAAGAA-포스페이트 3' (서열 19)
- [0142] 사이클 서열결정 반응 혼합물
- [0143] 부피: 20  $\mu\text{l}$
- [0144] 100 fmole 생성물이 서열결정된다.
- [0145] 5 pmole 서열결정 프라이머 (제한 프라이머 또는 과량 프라이머)
- [0146] 1x DTC5 Quick Start 마스터 믹스 (벡크만 콜터, 인크. (Beckman Coulter, Inc., 미국 캘리포니아주 풀러턴))
- [0147] [dNTP, ddNTP, 버퍼,  $\text{MgCl}_2$  포함].
- [0148] 디데옥시 서열결정
- [0149] 서열결정 반응 혼합물을 CEQ 2000 Due Termination Cycle 서열결정 키트 (벡크만 콜터)를 사용하는 CEQ 2000XL DNA Sequence (벡크만 콜터, 인크.)에서 제조사의 지시에 따라 사이클 서열결정 및 모세관 전기영동시켰다.
- [0150] LATE-PCR 증폭 및 서열결정 준비
- [0151] LATE-PCR 증폭 반응 혼합물을 다음과 같이 열 사이클링시켰다: 95°C에서 3분; 95°C에서 10초, 65°C에서 20초 및 72°C에서 20초의 20 사이클, 및 95°C에서 10초, 65°C에서 20초, 72°C에서 20초, 55°C에서 20초 및 40°C에서 20초의 70 사이클. 이중쇄 앰플리콘의 합성은 SYBR 염료를 여기시키고 72°C 프라이머-연장 단계 동안 그의 형광을 판독함으로써 모니터링하였다. 제한 프라이머의 소비 후 단일쇄 생성물의 합성은 SYBR 염료를 여기시키고 40°C 저온 검출 단계 동안 저  $T_m$  프로브의 Cy5 형광단으로부터의 형광을 판독함으로써 모니터링하였다.
- [0152] 과량 프라이머의 연장 생성물 100 fmole을 얻기 위해, 증폭 생성물의 희석이 필요하였다. 본 발명자들은 25  $\mu\text{l}$ 의 반응 생성물 중 생성물의 양을 다음 방식으로 추정하였다. 먼저, 초기 증폭 사이클 동안 제조된 이중쇄 생성물 중 생성물의 양은 제한 프라이머의 양에 의해 지시된다. 본 실시예에서는 25 nM이었고, 이는 25 fmole/ $\mu\text{l}$ 로 해석된다. LATE-PCR 증폭의 직선기 동안, 즉, 제한 프라이머의 소비 후 제조된 단일쇄 연장 생성물의 농도는 상기 직선기를 Cy5 형광 곡선의 검사에 의해 결정된 2 부분으로 나눔으로써 추정하였다: 증폭이 산술적으로 진행되는 제1 부분, 및 생성물 축적이 느려지는 제2 부분. 본 실시예에서 6 사이클인 제1 부분에 대하여, 본 발명자들은 문헌 [Gyllenstein, U.B.H. and Erlich, A. (1988), "Generation of Single-Stranded DNA by the Polymerase Chain Reaction and Its Application to Direct Sequencing of the HLA-DQA LOCUS," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7652-7656]을 기초로 50%의 증폭 효율을 가정하였다. 6 사이클 동안 단일쇄의 생산은 출발 농도 (25 fmole/ $\mu\text{l}$ ) x 사이클 수 (6) x 효율 (0.5)으로서 계산하였다. 추가 생산은 반응의 나머지 동안 Cy5 시그널에서 증가 백분율으로서 추정하였고, 본 경우에 233.3%이었다. 따라서, 직선기 동안 총 생산은 175

f mole/ $\mu$ l (25 x 6 x 0.5 x 2.333)이고, 상기 생성물의 총 농도 (이중쇄 앰플리콘 중 25 f mole/ $\mu$ l 포함)는 200 f mole/ $\mu$ l인 것으로 추정되었다. 사이클-서열결정 반응 혼합물에서 100 f mole을 얻기 위해, 본 발명자들은 증폭 생성물을 물로 1:8로 희석하고, 4  $\mu$ l의 희석된 생성물을 20  $\mu$ l 반응 혼합물 중에 사용하였다. 이해할 바와 같이, 이는 증폭 생성물이 최종적으로 1:40으로 희석되었음을 의미한다.

[0153] 제한 프라이머의 연장 생성물 100 f mole을 얻기 위해, 본 발명의 출발점은 증폭 반응의 생성물이 25 nM의 생성물, 또는 25 f mole/ $\mu$ l을 함유한 것이었다. 본 발명자들은 100 f mole의 목적하는 출발량을 얻기 위해 단순히 4  $\mu$ l의 증폭 생성물을 20  $\mu$ l 사이클-서열결정 반응 혼합물 중에 사용하였다.

[0154] 대조 증폭 및 서열결정 준비.

[0155] 증폭 반응 혼합물을 동일한 열 사이클 프로필로 처리하되, 단지 18회 (70회 대신)의 5-온도 사이클을 수행하였고, 이는 인터칼레이팅 염료 시그날의 실시간 플롯이 증폭이 상기 지점에서 평탄역을 이루었고 상기 지점에 목적하는 증폭 생성물만이 제조되었음을 나타내기 때문이다. 증폭의 끝에 증폭 혼합물 중 증폭 생성물을 QUIA quick PCR 정제 키트 (퀴아젠 (Qiagen, 미국 캘리포니아주 발렌시아))을 사용하여 제조사의 지시에 따라 통상적인 방식으로 정제하였다. 정제된 앰플리콘을 에티뮴 브로마이드 염색 (0.5  $\mu$ g/ml)에 의한 가시화 후 상이한 공지량의  $\phi$ X174 HindIII DNA 마커에 대하여 0.5x TBE 중 3% 아가로스 겔에서 겔 전기영동에 의해 정량하였다. 100 f mole을 함유하는 부피가 각각의 서열결정 프라이머를 갖는 사이클-서열결정 반응 혼합물에서 사용되었다.

[0156] 결과

[0157] LATE-PCR 및 대조 방법은 모두 Genbank 서열 정보 (기탁 번호 M 16417)에 대응하는 서열을 생산하였다. 도 17은 디데옥시 서열결정으로부터 얻어진 4개의 크로마토그래프를 포함한다. 패널 A는 서열결정 프라이머로서 제한 프라이머를 사용하는 사이클 서열결정을 갖는 LATE-PCR 방법으로부터의 것이다. 패널 B는 서열결정 프라이머로서 과량 프라이머를 사용하는 사이클 서열결정을 갖는 LATE-PCR 방법으로부터의 것이다. 패널 C는 서열결정 프라이머로서 과량 프라이머를 사용하는 대조 방법이다. 패널 D는 서열결정 프라이머로서 제한 프라이머를 사용하는 대조 방법이다. 각각의 크로마토그래프는 표지된 디데옥시 뉴클레오티드 및 결정된 뉴클레오티드 서열로부터 얻어진 형광 곡선을 포함한다.

[0158] 실시에 11. 동일한 반응에서 동일한 DNA 주형으로부터 하나 초과 생성물의 LATE-PCR 증폭을 위한 방법.

[0159] 과량 프라이머를 사용하여 어떠한 서열이 증폭되었는지에 기초하여 인간 미토콘드리아 DNA의 d-루프 구역 내에서 동일한 듀플렉스 (duplex) 반응으로 HV1 및 HV2 H 및 L 스트랜드로서 지정된 549개 및 464개 염기의 2개의 앰플리콘을 증폭시키기 위해, ABI Prism Sequence Detector 7700 (어플라이드 바이오시스템즈)을 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다.

[0160] 증폭 반응 혼합물 (최종 농도)

[0161] 부피: 25  $\mu$ l

[0162] 1x PCR 버퍼 (인비트로젠, 미국)

[0163] 3 mM MgCl<sub>2</sub> (인비트로젠)

[0164] 250  $\mu$ M dNTP (프로메가 (Promega))

[0165] 1.0  $\mu$ M 프로브 (LATE-PCR만)

[0166] 10x 희석액 SYBR Green 염료 (에프엠씨 바이오프러덕츠 (FMC Bioproducts, 미국 메인주 록랜드))

[0167] 1.25 단위 Platinum Taq DNA 중합효소 (인비트로젠)

[0168] 인간 혈액 림프구 게놈 DNA (100 mtDNA 게놈에 동등량)

[0169] 프라이머: LATE-PCR을 위해, 50 nM 제한 프라이머 및 1000 nM 과량 프라이머.

[0170] 올리고뉴클레오티드 서열

[0171] 프로브: 5' Cy5-TGCTAATGGTGGAG-포스페이트 3' (서열 20)

[0172] HV1-H

- [0173] 제한 프라이머: 5' GCCCGAGCGAGGAGAGTAGCACTCTTG 3' (서열 21)
- [0174] 과량 프라이머: 5' CACCAGTCTTGTAACCGGAGATGAA 3' (서열 22)
- [0175] HV2-H
- [0176] 제한 프라이머: 5' GTATGGGAGTGGGAGGGGAAAATAATGTGTTAG 3' (서열 23)
- [0177] 과량 프라이머: 5' AGGTCTATCACCTATTAACCACTCA 3' (서열 24)
- [0178] HV1-L
- [0179] 제한 프라이머: 5' CACCAGTCTTGTAACCGGAGATGAAAACC 3' (서열 25)
- [0180] 과량 프라이머: 5' CGAGGAGAGTAGCACTCTT 3' (서열 26)
- [0181] HV2-L
- [0182] 제한 프라이머: 5' AGGTCTATCACCTATTAACCACTCACGGG 3' (서열 27)
- [0183] 과량 프라이머: 5' GGAGGGGAAAATAATGTGTTAGT 3' (서열 28)
- [0184] 사이클 서열결정 반응 혼합물
- [0185] 부피: 25  $\mu$ l
- [0186] 100 fmole 생성물이 서열결정된다.
- [0187] 5 pmole 서열결정 프라이머 (제한 프라이머 또는 과량 프라이머)
- [0188] 1x DTC5 Quick Start 마스터 믹스 (벡크만 콜터, 인크.)
- [0189] [dNTP, ddNTP, 버퍼,  $MgCl_2$  포함].
- [0190] 디데옥시 서열결정
- [0191] 서열결정 반응 혼합물을 CEQ 2000 Dye Termination Cycle 서열결정 키트 (벡크만 콜터)를 사용하는 CEQ 2000XL DNA Sequence (벡크만 콜터, 인크.)에서 제조사의 지시에 따라 사이클 서열결정 및 모세관 전기영동시켰다.
- [0192] LATE-PCR 증폭 및 서열결정 준비
- [0193] LATE-PCR 증폭 반응 혼합물을 다음과 같이 열 사이클링시켰다: 95°C에서 3분; 95°C에서 15초, 64°C에서 10초 및 72°C에서 45초의 15 사이클, 및 95°C에서 15초, 64°C에서 10초, 72°C에서 45초, 및 HV1-H에 대해서 50°C에서 20초만의 50 사이클. 이중쇄 앰플리콘의 합성은 SYBR Green 염료를 여기시키고 72°C 프라이머-연장 단계 동안 그의 형광을 판독함으로써 모니터링하였다. 제한 프라이머의 소비 후 단일쇄 생성물의 합성은 SYBR 염료를 여기시키고 HV1-H 구역에 대해서만 50°C 저온 검출 단계 동안 저  $T_m$  프로브의 Cy5 형광단으로부터의 형광을 판독함으로써 모니터링하였다.
- [0194] 과량 프라이머의 연장 생성물 100 fmole을 얻기 위해, 증폭 생성물의 희석이 필요하였다. 본 발명자들은 25  $\mu$ l의 반응 생성물 중 생성물의 양을 다음 방식으로 추정하였다. 먼저, 초기 증폭 사이클 동안 제조된 이중쇄 생성물 중 상기 생성물의 양은 제한 프라이머의 양에 의해 지시된다. 본 실시예에서는 50 nM이었고, 이는 50 fmole/ $\mu$ l로 해석된다. LATE-PCR 증폭의 직선기 동안, 즉, 제한 프라이머의 소비 후 제조된 단일쇄 연장 생성물의 농도는 상기 직선기를 Cy5 형광 곡선의 검사에 의해 결정된 2 부분으로 나눔으로써 추정하였다: 증폭이 산술적으로 진행되는 제1 부분, 및 생성물 축적이 느려지는 제2 부분. 본 실시예에서 11 사이클인 제1 부분에 대하여, 본 발명자들은 문헌 [Gyllensten, U.B.H. and Erlich, A. (1988), "Generation of Single-Stranded DNA by the Polymerase Chain Reaction and Its Application to Direct Sequencing of the HLA-DQA LOCUS," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7652-7656]을 기초로 50%의 증폭 효율을 가정하였다. 11 사이클 동안 단일쇄의 생산은 출발 농도 (50 fmole/ $\mu$ l) x 사이클 수 (11) x 효율 (0.5)으로서 계산하였다. 추가 생산은 반응의 나머지 동안 Cy5 시그널에서 증가 백분율로서 추정하였고, 본 경우에 100%이었다. 따라서, 직선기 동안 총 생산은 275 fmole/ $\mu$ l (50 x 11 x 0.5 x 1.0)이고, 상기 생성물의 총 농도 (이중쇄 앰플리콘 중 50 fmole/ $\mu$ l 포함)는 325 fmole/ $\mu$ l인 것으로 추정되었다. 사이클-서열결정 반응 혼합물에서 100 fmole을 얻기 위해, 본 발명자들은 증폭 생성물을 물로 1:13으로 희석하고, 4  $\mu$ l의 희석된 생성물을 20  $\mu$ l 반응 혼합물 중에 사용하였다.

- [0195] 결과
- [0196] 4개의 가능한 조합이 존재한다: 1) HV1-H과 HV2-H, 2) HV1-L과 HV2-L, 3) HV1-H와 HV2-L, 4) HV1-L과 HV2-H. 도 18은 주형 없는 대조군 (NTC), 좌측 3개 레인; 100 카피의 게놈 DNA를 사용하여 시작한 반응으로부터의 앰플리콘, 다음 3개 레인; 및 최우측 레인, 100 염기쌍 래더 (ladder)의 전기영동으로부터 4% 아가로스 겔을 보여준다. 도 18은 반응의 개시에서 100 카피의 게놈 DNA를 사용하여 549 및 464 염기쌍의 HV1-H 및 HV2-H dsDNA 앰플리콘의 형성을 보여준다. 주형 없는 대조군 (NTC)은 증폭하지 않았다.
- [0197] 당업자가 이해할 바와 같이, 단일 주형으로부터 동일한 반응에서 2개의 단일쇄 앰플리콘을 증폭시키는데 있어서, DNA의 동일한 스트랜드로부터 또는 DNA의 상보성 스트랜드로부터 2개의 과량 프라이머 스트랜드가 생성될 수 있다. 본 발명자들은 두 방법을 성공적으로 사용하였다. 조합 HV1-H와 HV2-H 및 HV1-L과 HV2-L에서, 동일한 DNA 주형 스트랜드로부터 두 앰플리콘이 모두 생성된다. 조합 HV1-H와 HV2-L 및 HV1-L과 HV2-H에서, DNA의 상보성 스트랜드로부터 2개의 앰플리콘이 생성된다. 도 19A는 염기 16209-16169의 구역에서 듀플렉스 HV1-H와 HV2-H에서 앰플리콘 HV1-H에 대한 서열 정보를 표시한다. 도 19B는 염기 289-326의 구역에서 듀플렉스 HV1-H와 HV2-H에서 앰플리콘 HV2-H에 대한 서열 정보를 표시한다. 도 19C는 염기 16209-16169의 구역에서 듀플렉스 HV1-H와 HV2-L에서 HV1-H 앰플리콘에 대한 서열 정보를 표시한다. 도 19D는 염기 289-326의 구역에서 듀플렉스 HV1-H와 HV2-L에서 HV2-L 앰플리콘에 대한 서열 정보를 표시한다. LATE-PCR은 GenBank 서열 정보에 대응하는 서열을 생산하였다.
- [0198] 실시예 12. ssDNA 필요의 결정.
- [0199] LATE-PCR 증폭에 의해 생성된 단일쇄 DNA 및 이중쇄 DNA의 양을, "회석 및 시행" 디데옥시 서열결정을 위해 요구되는 ssDNA의 양을 결정하기 위해 사용할 수 있다. 인간 미토콘드리아 DNA의 d-루프 내에서 HV1 H로서 지정된 549 염기 앰플리콘을 증폭시키기 위해, ABI Prism Sequence Detector 7700 (어플라이드 바이오시스템즈)을 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. MtDNA는 인간 모간 (hair shaft)으로부터 용해 조건 하에 (문헌 [Peirce et al. (2002) Biotechniques 32(5); 1106-1111]에 기재된 바와 같이, 100  $\mu$ l의 용해 반응 혼합물 중 4  $\mu$ l DTT를 포함하여) 추출하였다. 모든 증폭은 LATE-PCR 증폭이었고, 생성물은 직접적으로 디데옥시 서열결정하였다.
- [0200] 증폭 반응 혼합물 (최종 농도)
- [0201] 부피: 25  $\mu$ l
- [0202] 1x PCR 버퍼 (인비트로젠)
- [0203] 3 mM  $MgCl_2$  (인비트로젠)
- [0204] 250  $\mu$ M dNTP (프로메가)
- [0205] 1.0  $\mu$ M 프로브 (LATE-PCR만)
- [0206] 10x 회석액 SYBR Green 염료 (에프엠씨 바이오프러덕츠)
- [0207] 1.25 단위 Platinum Taq DNA 중합효소 (인비트로젠)
- [0208] 1  $\mu$ l DNA 용해 용액 (~10 mtDNA 게놈에 동등량)
- [0209] 프라이머: LATE-PCR을 위해, 50 nM 제한 프라이머 및 1000 nM 과량 프라이머.
- [0210] 올리고뉴클레오타이드 서열
- [0211] HV1H: 제한 프라이머, 과량 프라이머 및 프로브는 실시예 11에서와 같다.
- [0212] 사이클 서열결정 반응 혼합물
- [0213] 실시예 11에서와 같다.
- [0214] 디데옥시 서열결정
- [0215] 실시예 11에서와 같다.
- [0216] LATE-PCR 증폭 및 서열결정 준비
- [0217] 실시예 11에서와 같다. CY5 및 SYBR Green 모두의 미교정 형광 데이터를 서열결정 반응에 이용가능한 생성물의



양을 결정하기 위해 사용하였다. CY5/SYBR Green 비를 미교정 데이터에서 모든 변동을 표준화시키기 위해 사용하였다.

[0218] 결과

[0219] LATE-PCR 증폭으로부터의 형광 데이터를 도 20의 패널 A 및 B에 제시한다. 도 20A, 예를 들어, 선 201은 비 ss-DNA/ds-DNA (프로브 시그널 대 염료 시그널)으로서 증폭 사이클 수에 대해 플로팅된 모든 모간 데이터를 보여준다. 상기 분석 방법은 지수적 증폭이 시작할 때, 또는 평탄역을 형성하는 수준에서의 변동을 최소화시키고, ss-DNA 증폭의 효능이 매우 늦게 시작한 하나를 제외하고는 모든 샘플에서 실질적으로 동일함을 증명한다.

[0220] 도 20B는 회색 및 시행 서열결정을 위한 그들의 준비를 확립하기 위해 LATE-PCR 분석의 세트를 모니터링하기 위한 방법을 보여준다. 플롯은 사이클 45 (사각형) 및 사이클 65 (다이아몬드)에서 모든 증폭된 샘플에 대한 계산된 비 ssDNA/dsDNA (프로브 시그널:염료 시그널 대 염료 시그널)를 보여준다. 비율이 0.06 내지 0.10이고 SYBR 값이 300 내지 600 인 샘플만 (박스 안의 것)이 서열결정을 위해 준비된다. 도 20B는 65 사이클 후 하나를 제외한 모든 샘플이 "회색 및 시행" 서열결정에서 사용하기 위해 충분한 ss-DNA를 축적하였음을 증명하기 위해 정량적 중점 분석 (QE LATE-PCR)의 용도를 확장시킨다.

[0221] 실시예 13. 다수 SNP를 갖는 애플리콘.

[0222] LATE-PCR 및 "회색 및 시행" 서열결정 방법의 감도는 다수 SNP를 갖는 애플리콘의 혼합물을 10% 해상도 수준으로 구별할 수 있다. PCR 증폭물은 유리 슬라이드에 부착된 2 mm 인간 모간 또는 단일 인간 염지지문으로부터의 것이었다. 모든 증폭은 LATE-PCR 증폭이었고, 생성물은 직접적으로 디데옥시 서열결정하였다. 최종 증폭 반응 혼합물, 올리고뉴클레오타이드 서열 (HV1-H), 사이클 서열결정 반응 혼합물, 및 디데옥시 서열결정, 및 LATE-PCR 증폭 및 서열결정 준비는 모두 실시예 11에 기재된 바와 같았다.

[0223] 3개 반응의 각각의 단일쇄 LATE-PCR 생성물의 10:90 내지 90:10으로부터의 혼합물을 앞서 설명된 "회색 및 시행" 디데옥시 프로토콜을 사용하여 서열결정하였다. 결과를 도 21 및 도 22에 나타낸다.

[0224] 도 21은 인간 혈액 림프구 및 인간 염지지문의 50:50 혼합물의 염기 16320 및 16311을 둘러싸는 10개 염기의 절편을 보여준다. 피크 높이는 디데옥시 서열에서 실제 100% 높이를 반영하고, 50:50 혼합물의 예상된 동일 높이가 아니다. 선 211은 상기 서열에서 G 염기에 대한 피크를 보여주고, 선 202는 서열 내의 동일한 위치에서 A 염기에 대한 피크를 보여준다. 동일한 구역에 대한 순수한 서열의 분석에 의해 증명가능한 바와 같은 디데옥시 서열결정의 형광측정 특징 때문에, 피크 212는 상이한 유전 서열을 갖는 인간 혈액 림프구 및 인간 모간의 50:50 혼합물에서 피크 211보다 더 높다.

[0225] 도 22는 각각의 5개의 SNP 위치에서 2개의 샘플의 역비례 백분율 (90:10, 70:30, 50:50, 30:70 및 10:90)을 보여준다. 샘플 1은 인간 모간으로부터의 것이고, 샘플 2는 다른 개인의 인간 염지지문으로부터의 것이다. 각각의 위치에서 각각의 피크의 높이를 디데옥시 서열의 출력물로부터 측정한다. 다음, 100% 샘플 1 또는 100% 샘플 2 대조물의 동일한 염기를 기초로 계산하였다. 도 22에서, 선 222는 혼합물 중 샘플 2의 의도된 백분율에 대해 플로팅된 혼합물 중 샘플 1의 의도된 백분율이다. 선 221은 실제 결과에 피팅된 선, 즉, 샘플 2의 의도된 백분율에 대해 플로팅된 혼합물 중 샘플 1의 관찰된 백분율이다. 샘플 2의 각각의 의도된 백분율에 대한 관찰된 백분율은 각각의 염기에 대해 하나씩, 5개의 지점이다. 데이터는 각각의 백분율에서 상이한 염기 사이에 산란이 매우 적음을 증명하지만, 또한 데이터는 관찰된 값의 선 221이 예측된 값의 선 (선 222)의 상단 상에 놓이지 않음을 보여주고, 이는 아마도 혼합물 중 샘플 1 및 샘플 2의 양이 정확히 동일하지 않기 때문이다.

[0226] 실시예 14. 혼합물의 구분

[0227] 100% 이중접합성 게놈 DNA로 이루어지는 샘플을 단일 뉴클레오타이드 변화에 대해 90% 이중접합성 DNA 및 10% 동중접합성 게놈 DNA로 이루어지는 샘플과 구별하기 위해, 본 발명자들은 먼저 인간 염색체 17에 위치하는 SNP 부위 rs858521에 대한 90% 이중접합성 DNA (C/G 대립유전자) + 동일한 SNP 부위에 대한 10% 동중접합성 DNA (C/C 대립유전자)로 이루어지는 DNA 혼합물을 생성하였다. SNP 부위는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=SNP>를 통해 접근가능한 NCBI dbSNP 데이터베이스에 실려 있다. 상기 DNA 혼합물은 매칭된 농도의 대응하는 이중접합성 및 동중접합성 DNA (미국 시애틀의 워싱턴 유니버시티의 레이드 래보라토리 (Reid Laboratory at the University of Washington) 제공)를 혼합함으로써 제조하였다. 혼합 목적의 각각의 게놈 DNA에 대한 DNA 농도는 하기 설명된 것과 유사한 LATE-PCR 샘플의 실시간 분석으로부터 유도된 SYBR 형광의 Ct 값에 기초하여 추정하였다. 일단 DNA 혼합물이 제조된 후, 본 발명자들은

100% 이중접합성 DNA 또는 90% 이중접합성 + 10% 동중접합성 DNA를 함유하는 복제물 LATE-PCR 반응물을 준비하였다. 각각의 LATE-PCR 샘플은 25  $\mu$ l의 최종 부피 중 1X Platinum Taq 버퍼 (인비트로젠), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 250  $\mu$ M dNTP 혼합물, 0.24X SyberGold I (인비트로젠), 200 nM 미스프라이밍 방지 시약 (본 발명자들은 Elixir 화합물 9-3iDD로 부름), 1.25 단위 Platinum Taq 중합효소 (인비트로젠), 1  $\mu$ M rs858521 과량 프라이머, 50 nM rs858521 제한 프라이머, 및 2.4  $\mu$ M rs858521 SNP G 대립유전자에 대한 레존센스 프로브, 및 1800 게놈 동등량의 적절한 게놈 DNA로 이루어졌다. rs858521 과량 프라이머의 서열은 5' CAATCCCTTGACCTGTGTGGAGAGAA 3' (서열 29)이다. rs858521 제한 프라이머의 서열은 5' TCCCCAGAGCCCAGCCGGTGTTCATTTTC 3' (서열 30)이다. rs858521 SNP G 대립유전자에 대한 레존센스 프로브의 서열은 5' [Cy5] CTCAGCTCAAACAATA [Phos] (서열 31)이다. 미스프라이밍 방지 시약의 서열은 5' Dabcy1-CGCTATAATGAAATTATAGCG-Dabcy1 (서열 32)이다.

[0228] 이들 샘플을 ABI 7700에서 95°C에서 3분의 1 사이클, 이어서 95°C에서 10초, 66°C에서 10초 및 72°C에서 20초의 45 사이클로 이루어지는 열 사이클 프로필을 사용하여 증폭시켰다. 반응의 끝에서, 반응물을 95°C로부터 25°C로 1°C 간격으로 1분 동안 용융시켰고, 각각의 온도에서 Cy5 채널에서 형광 획득하였다. 기준선 교정을 하지 않은 잘라낸 Cy5 형광 시그널을 Excel 컴퓨터 프로그램에 보냈다. 하나의 온도로부터의 형광 시그널을 용융 동안 다음 온도의 형광 시그널로부터 공제함으로써 형광 시그널의 1차 미분의 계산을 수행하였다. 결과를 도 23의 패널 A 및 B에 나타낸다. 도 23A는 형광 시그널 대 온도의 1차 미분의 플롯, 즉, 용융 곡선을 보여준다. 도 23A의 용융 곡선은 ABI 7700에서 열 변동으로 인한 노이즈 (noise)를 제거하기 위해 Excel의 이동 평균 함수를 사용하여 평탄화되었다. 도 23A는 프로브의 보다 높은 온도에서 그의 매칭된 G 대립유전자 표적에 대한 및 보다 낮은 온도에서 미스매칭된 C 대립유전자 표적에 대한 결합에 대응하는 용융 피크를 보여준다. 도 23A는 90% 이중접합성 + 10% 동중접합성 샘플 (원 231)이 100% 이중접합성 샘플 (원 232)에서 C 대립유전자 및 G 대립유전자 용융 피크의 높이에 비해 더 낮은 G 대립유전자 피크 및 더 높은 C 대립유전자 용융 피크를 나타냄을 보여준다. 상기 차이는 100% 이중접합성 샘플 (50% G 대립유전자: 50% C 대립유전자)에 비해 90% 이중접합성 + 10% 동중접합성 샘플 (55% C 대립유전자: 45% G 대립유전자)에서 예상된 보다 높은 비율의 C 대립유전자와 일치한다. C 대립유전자 피크의 높이 대 G 대립유전자 피크의 높이의 비를 도 23B에 막대 그래프로서 나타낸다. 우측의 막대 세트는 90% 이중접합성 + 10% 동중접합성 샘플 (원 231에 대응함)에 대한 것이다. 좌측의 보다 어두운 막대는 100% 이중접합성 샘플에 대한 것이다. 막대 세트에 대해 각각 통상적인 오차 박스 (233 및 234)를 보여준다. 상기 비율은 평균의 오차의 3개의 표준 편차를 반영하는 오차 박스의 겹침의 결여에 기초하여 99.7%의 확실성으로 100% 이중접합성 샘플을 90% 이중접합성 + 10% 동중접합성 샘플과 구별한다.

[0229] 실시예 15. 초기 중합효소 농도에 대한 LATE-PCR 반응의 감도.

[0230] 인간 미토콘드리아 DNA의 d-루프 구역 내에서 HVI-H로 지정된 549 염기 앰플리콘을 증폭시키기 위해 ABI 7700을 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 게놈 인간 DNA에 대한 반응 혼합물, 올리고뉴클레오타이드 서열 (HV1-H), 및 LATE-PCR 증폭은 실시예 11에 설명된 바와 같았지만, Platinum Taq DNA 중합효소의 단위는 샘플들 사이에서 다음과 같이 변화였다: 0.125, 0.250, 0.375, 0.50, 0.625 및 1.25 단위.

[0231] 용융 곡선 분석 (SYBR green 형광 대 온도)을 수행하였다. 용융 곡선은 상기 LATE-PCR 반응에 대해 Taq의 농도가 dsDNA 생성물의 특이성에 영향을 미치는 방식을 보여주었다. Platinum Taq 농도가 1.25 단위로부터 0.375 단위로 감소함에 따라, 복제물의 용융 피크에서 반영되는 바와 같이 반응의 특이성은 증가하였다. 농도를 0.250 단위로 더욱 저하시키면 특이성을 감소시켰다. 0.125 단위에서, 반응은 일어나지 않았다. 최대 특이성은 0.375 단위의 Taq 농도를 사용하여 발생하였다.

[0232] 실시예 16. 실시간 LATE-PCR 및 실시간 듀플렉스 LATE-PCR에서 Taq 농도의 함수로서 기울기 변동.

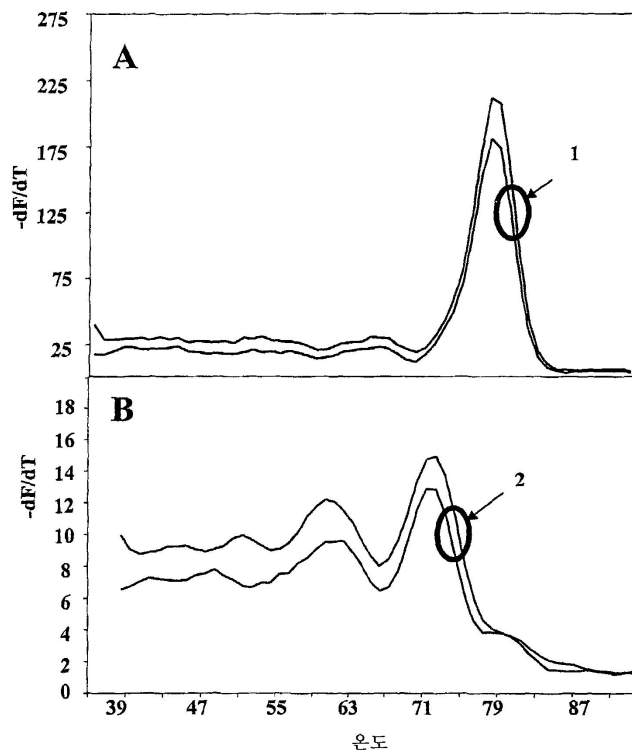
[0233] 본 발명자들은 쥐 Oct4 및 Xist 유전자 (각각 GenBank 기탁 번호 NM 013633 및 L04961)의 엑손 내에서 서열의 동시 증폭을 위한 듀플렉스 실시간 LATE-PCR 분석을 설계하였다. 각각의 반응은 50  $\mu$ l의 최종 부피로 실행하였고, 다음 시약을 함유하였다: 20 mM Tris-HCl, pH 8.4로 이루어진 1X PCR 버퍼 (인비트로젠), 및 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM의 각각의 dNTP, 50 nM의 서열 5' TGGCTGGACACCTGGCTTCAGACT 3' (서열 33)의 Oct4 제한 프라이머, 2  $\mu$ M의 서열 5' CAACTGGGGGACTAGGC 3' (서열 34)의 Oct4 과량 프라이머, 100 nM의 서열 5' GGTGCTACAGGAAAAAGATGGCGGCTCAA 3' (서열 35)의 Xist 제한 프라이머, 2  $\mu$ M의 서열 5' TGAAGAAACCACTAGAGGGCA 3' (서열 36)의 Xist 과량 프라이머, 1  $\mu$ M의 서열 5' TET-CCG CCT GGG ATG GCA TAC TGT GGA AGG CGG-Dabcy1 3' (서열 37)의 저 융점 Oct4 분자 비콘 프로브, 및 300 nM의 서열 5' Dabcy1-CGTTATAATGAAATTATAACG-Dabcy1 3' (서열 38)의 미스프라이밍 방지 시약 (본 발명자들은 화합물 9-3bDD로서 칭함). 항체-복합체화된 Platinum (등록상표) Taq DNA 중합효소 (인비트로젠)가 또한 PCR 혼합물 내에 1, 2, 또는 3 단위/분석의 농도로 포함되었

다. 본 실시예에서 Xist 앰플리콘의 검출을 위한 분자 비콘 프로브를 첨가되지 않았다.

- [0234] 상기 듀플렉스 LATE-PCR과 동시에, Oct4 앰플리콘만의 LATE-PCR 증폭에 대한 일련의 분석을 실행하였다. 이들 분석은 상기 언급된 듀플렉스와 동일한 조성을 가졌지만, Xist 제한 프라이머 및 Xist 과량 프라이머를 포함시키지 않았다.
- [0235] 마우스 게놈 DNA (시그마)를 모든 분석에 첨가하였고, PCR 증폭을 위한 주형을 제공하였다. 각각의 시험관에 첨가된 게놈의 수는 6 pg/게놈 크기를 기초로 1000으로 계산되었다 (문헌 [Vendrely and Vendrely (1949) Experientia 5: 327-329] 참조).
- [0236] 모든 분석은 2중으로 실행하였다. 증폭을 ABI Prism 7700 Sequence Detector (어플라이드 바이오시스템즈)에서 95℃에서 5분의 1 사이클; 95℃에서 10초, 63℃에서 20초, 및 72℃에서 30초의 6 사이클; 및 95℃에서 15초, 55℃에서 25초, 72℃에서 35초, 및 45℃에서 30초의 54 사이클 (45℃에서 TET 채널에서 형광 획득)으로 이루어진 열 사이클링 프로필로 수행하였다.
- [0237] 본 실험의 결과를 도 24에 나타내고, 이는 TET-Oct4 분자 비콘 프로브를 사용한 혼성화를 통해 Oct4 앰플리콘을 축적함으로써 생성된 형광 시그널을 플로팅한다. 한쌍의 프라이머만이 존재할 때, Taq 중합효소 농도를 1 단위/분석 (원 241)으로부터 2 단위/분석 (원 242) 또는 3 단위/분석 (원 243)으로 증가시키면 증가된 증폭 효능 때문에 시그널의 기울기를 보다 가파르게 만드는 효과를 가졌다. 원 242 및 243으로 확인된 시그널 (각각 2 및 3 단위/분석)은 산재되었고, 이는 최대 효능이 대략 이들 수준에서 도달하였음을 제한한다. 예상된 바와 같이, 듀플렉스 반응에 의해 생성된 선의 기울기 (원 244, 245 및 246)는 모든 경우에 단일 앰플리콘의 증폭에 의해 생성된 것보다 더 낮았고, 이는 Taq 중합효소가 상기 속도의 2배로 사용되었기 때문이다. 단일-앰플리콘 LATE-PCR의 경우에서와 같이, 듀플렉스 반응에서 Taq 농도를 1 단위/분석 (원 244)으로부터 2 단위/분석 (원 245) 또는 3 단위/분석 (원 246)으로 증대시키면 시그널 기울기를 증가시켰다. 2 단위/분석 (원 245)의 초기 기울기에 비해 3 단위/분석 (원 246)의 초기 기울기가 더욱 증가하지 않았고, 이는 다시 최대 효능에 도달되었음을 제한한다. 그러나, 2 단위/분석 샘플 (원 245)의 것과는 달리 3 단위/분석 샘플 (원 246)은 신속하게 평탁역에 도달하였고, 기울기는 감소하기 시작하였고, 이는 또한 3 Taq 단위/분석을 함유하지만 한쌍의 프라이머를 갖는 시험된 최고 Taq 농도의 존재 하에 (이는 샘플 243에 대한 경우와는 다르다) 미스프라이밍의 가능한 발생을 나타낸다. 듀플렉스에 비해 단일-앰플리콘 분석에서 이용가능한 Taq의 보다 높은 양에도 불구하고 (3 단위는 동시에 2개의 앰플리콘보다는 하나의 앰플리콘을 생성하기 위해 사용된다), Xist 프라이머의 첨가로 인해 듀플렉스에서 보다 많은 미스프라이밍이 발생하였다. 따라서, 미스프라이밍 없이 최대 효능을 얻기 위해, Taq 중합효소 농도는 반응에 첨가된 프라이머의 수 및 서열을 고려하여 최적화될 필요가 있다.

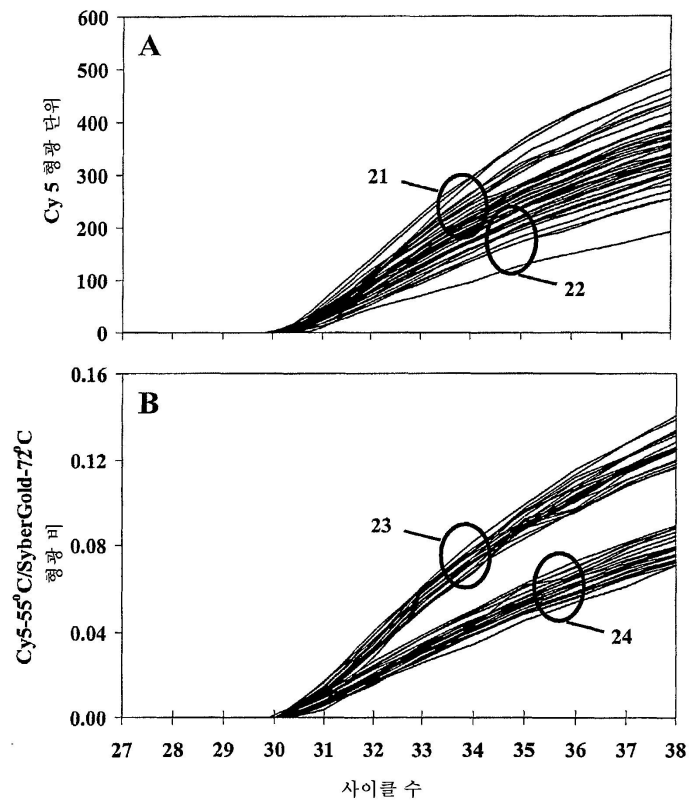
도면

도면1

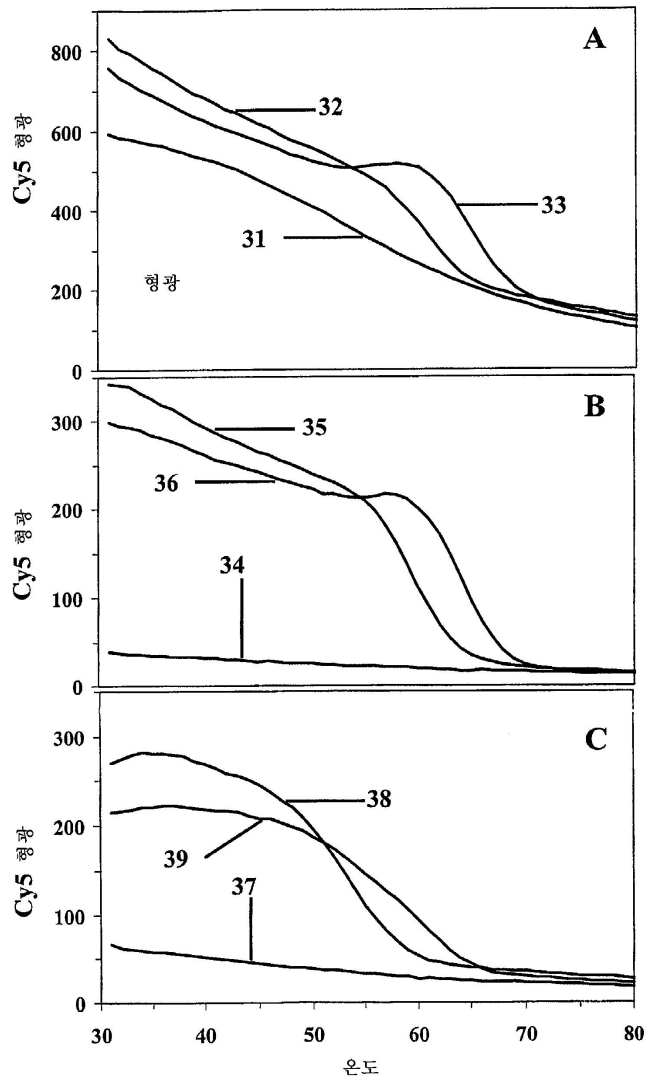




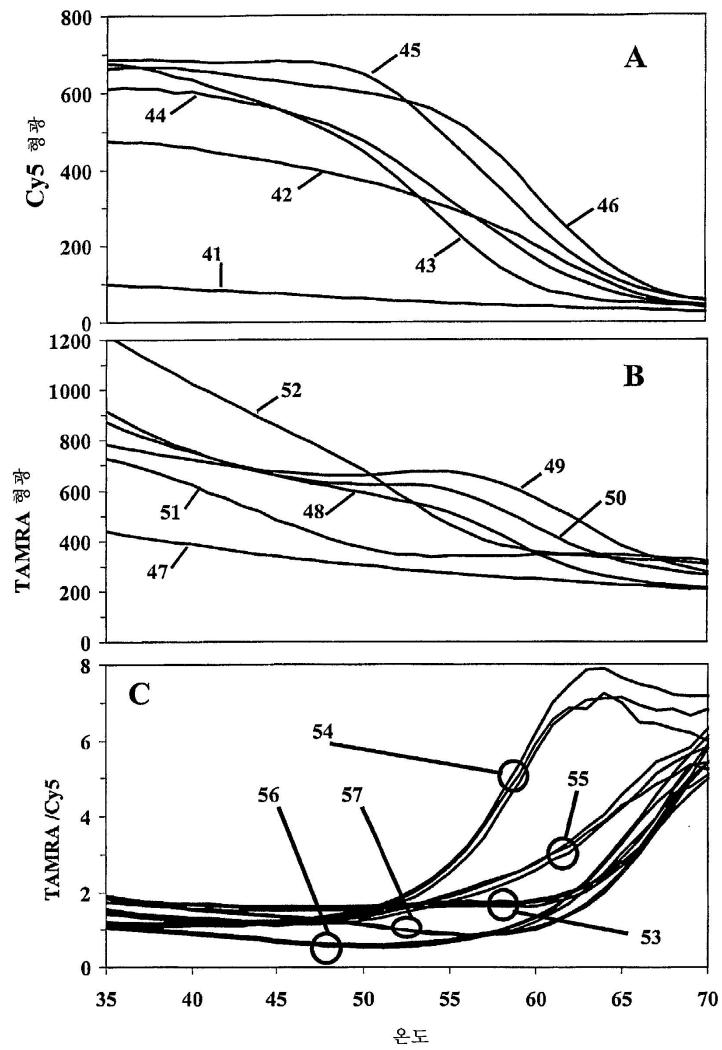
도면2



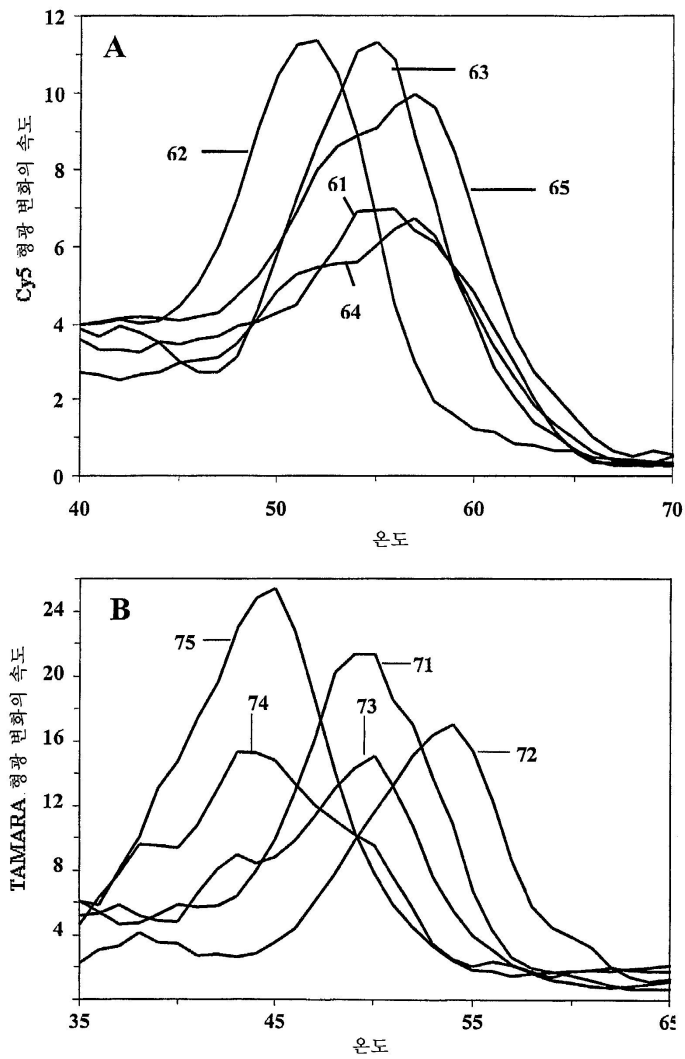
도면3



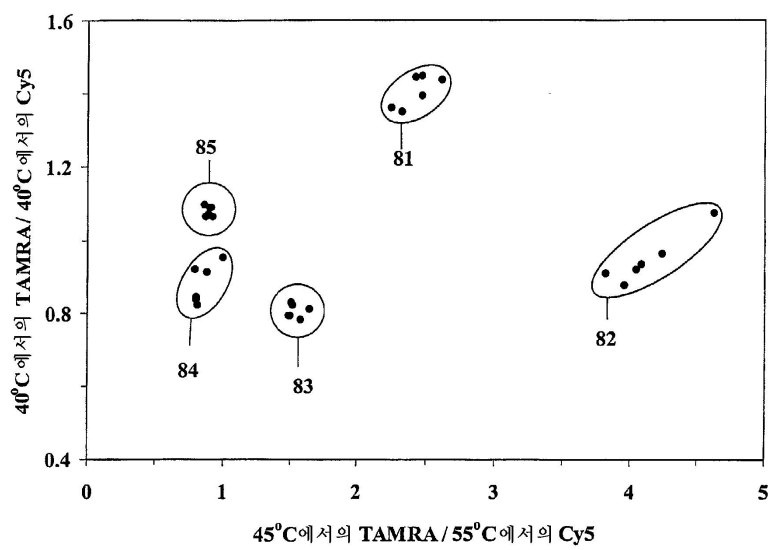
도면4



도면5

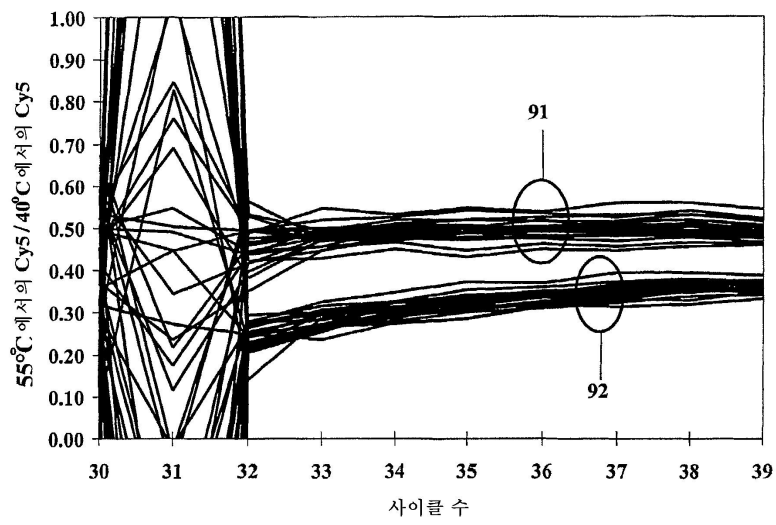


도면6

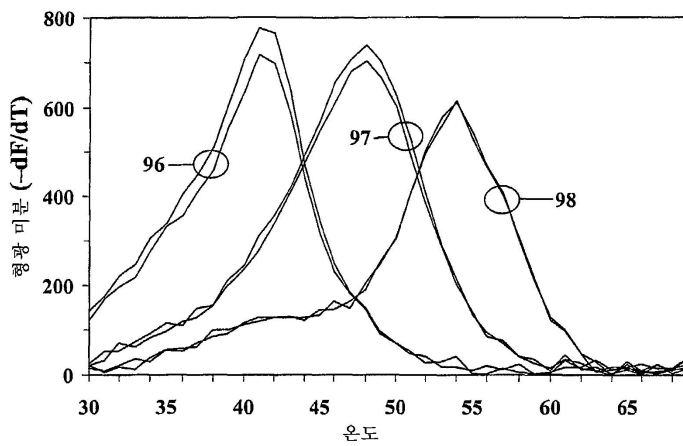




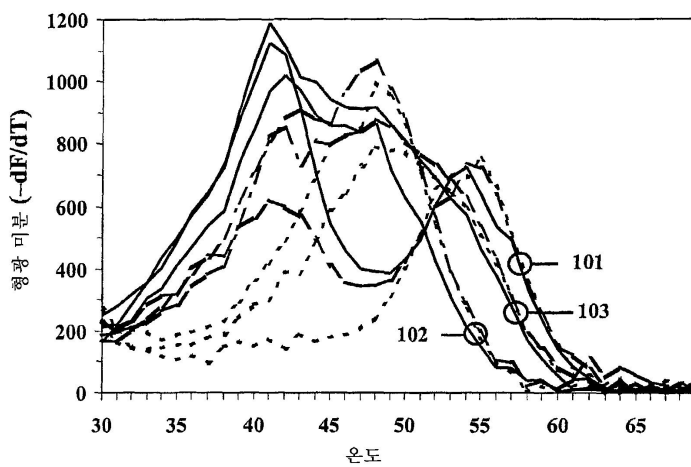
도면7



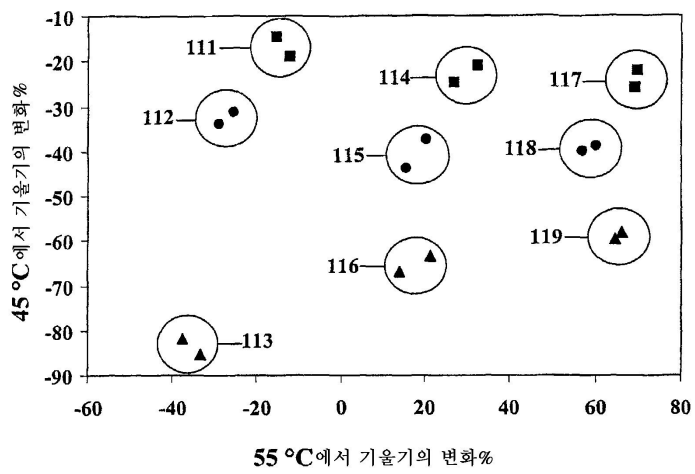
도면8



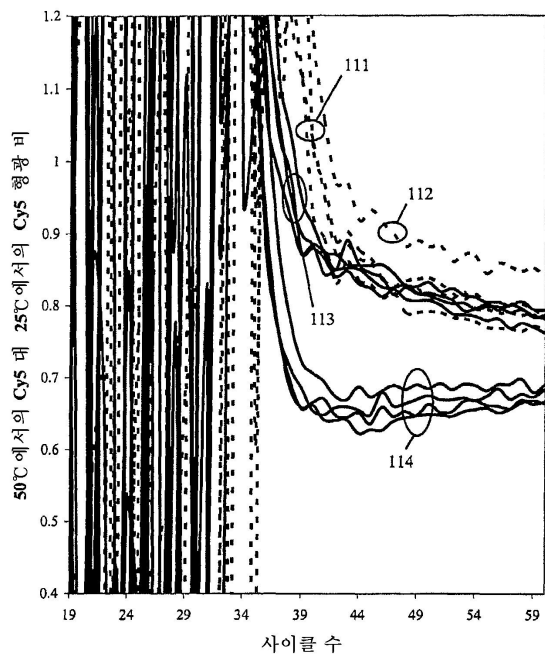
도면9



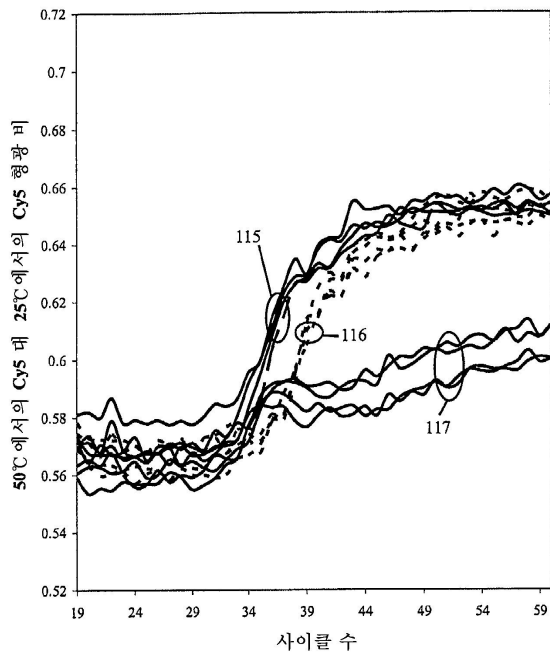
도면10



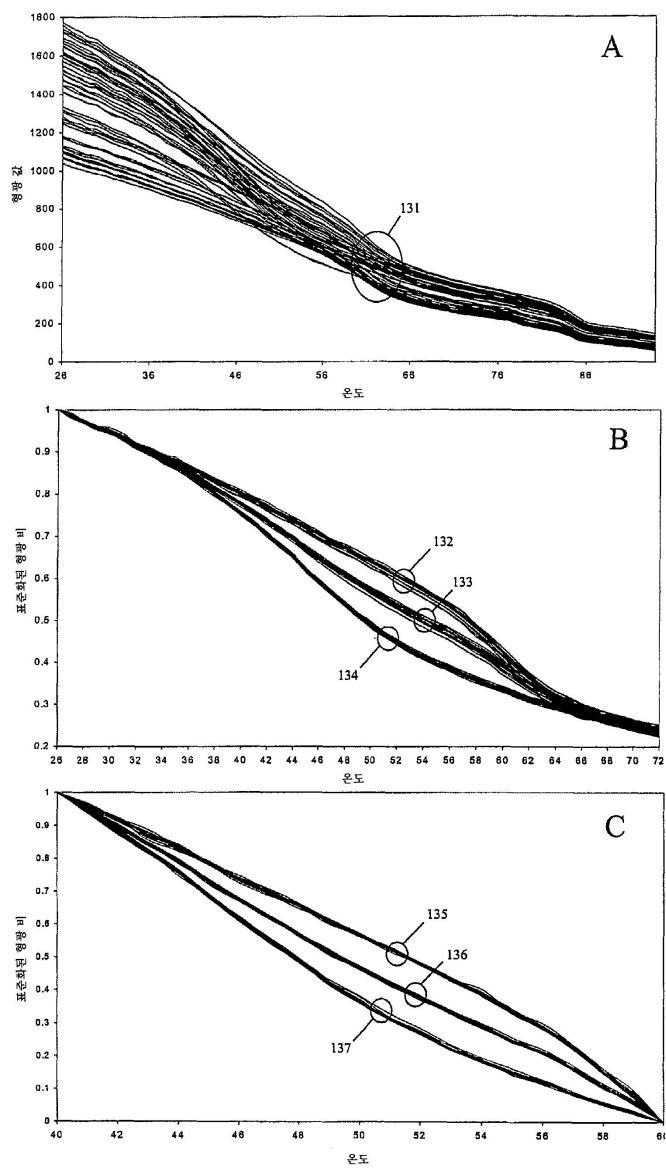
도면11



도면12

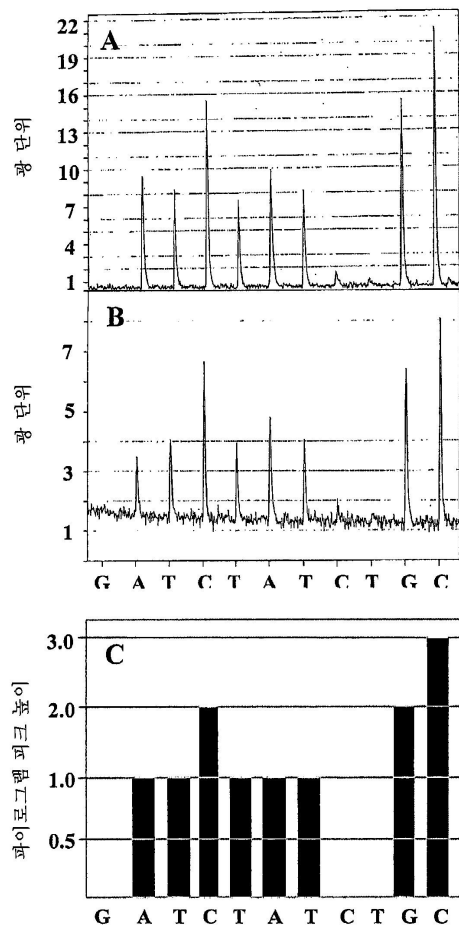


도면13

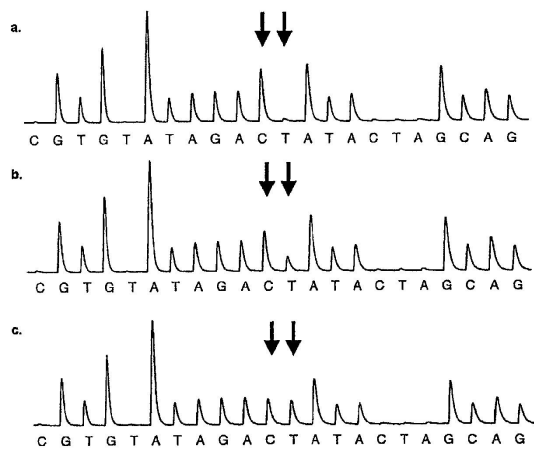




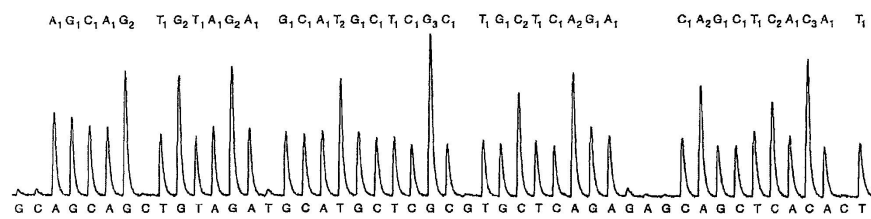
도면14



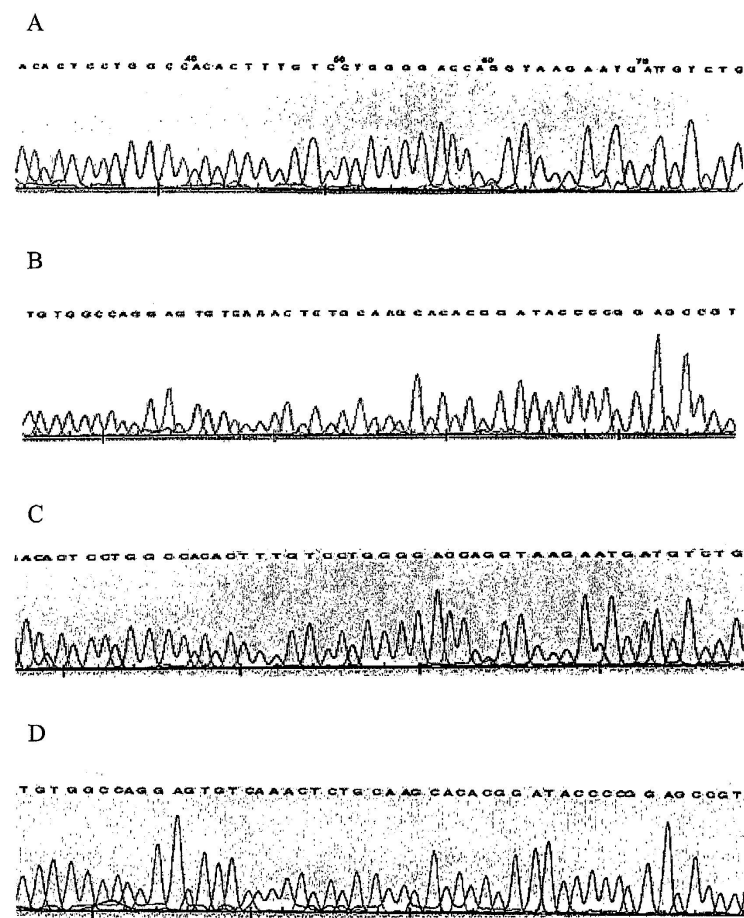
도면15



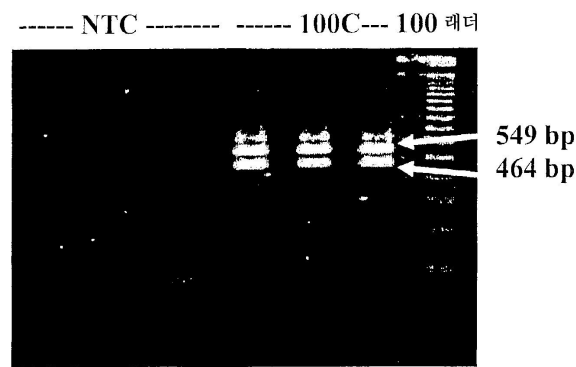
도면16



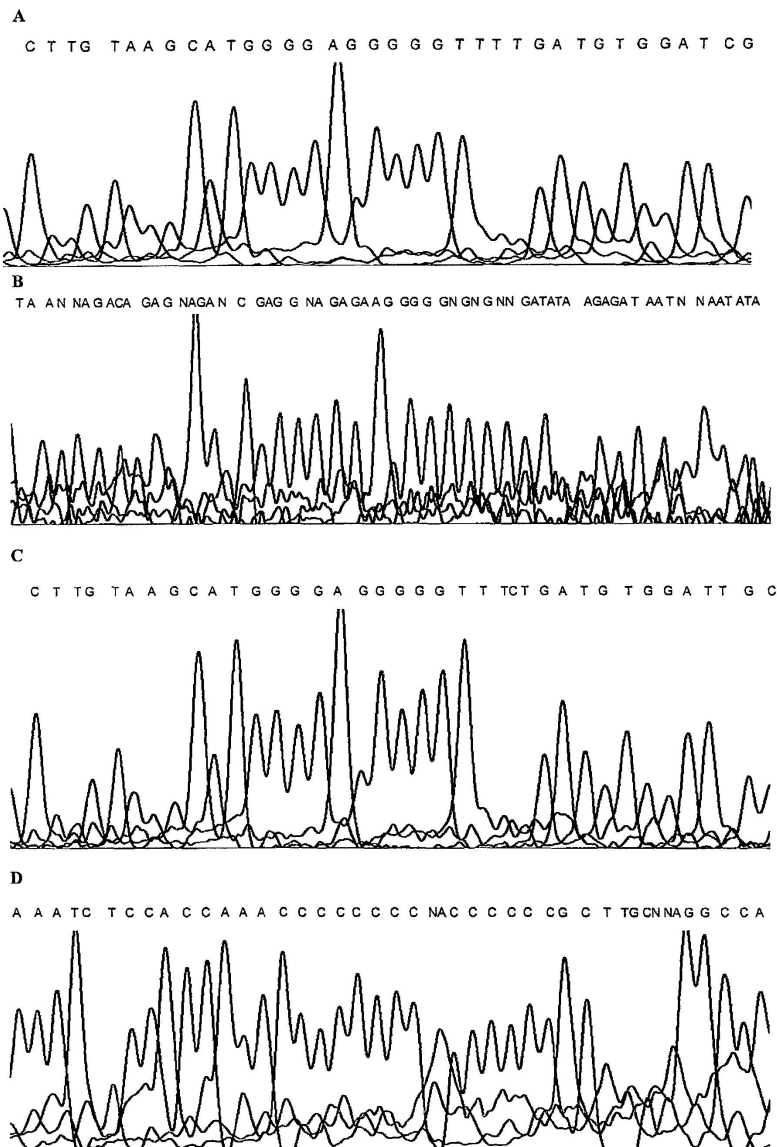
도면17



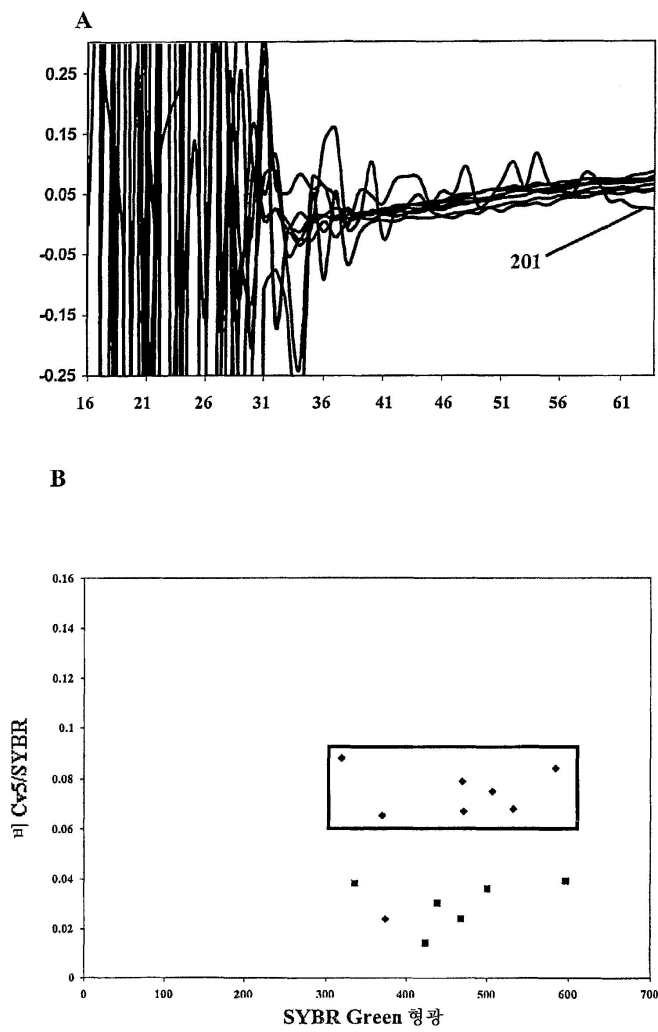
도면18



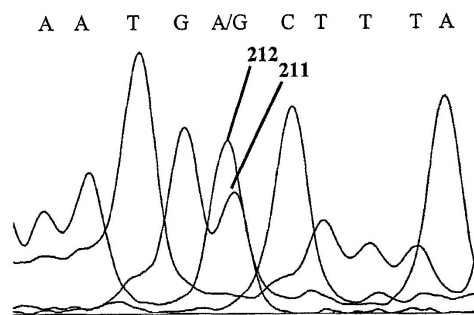
도면19



도면20

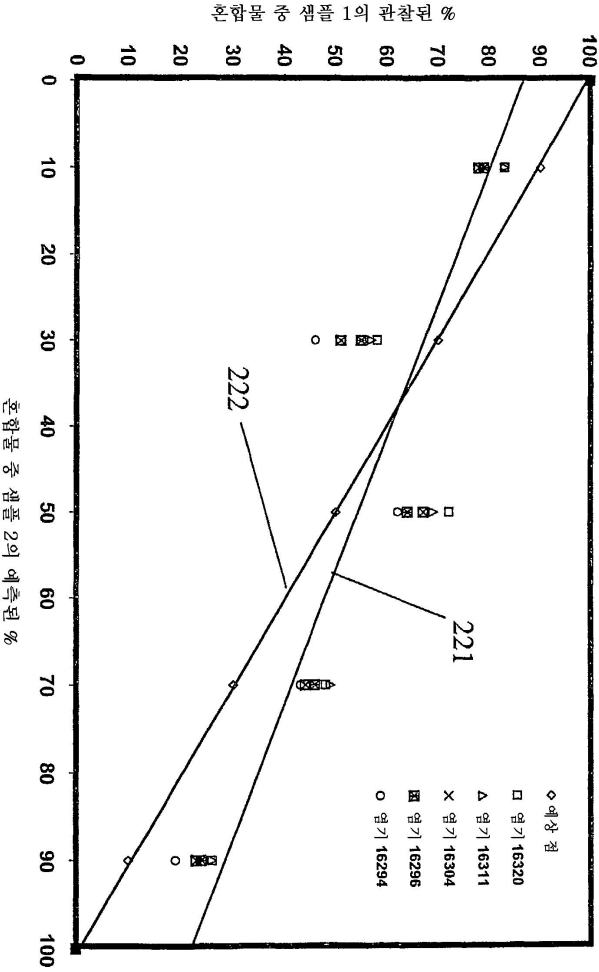


도면21

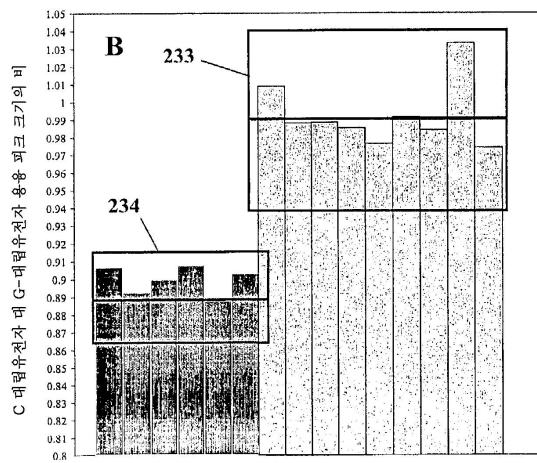
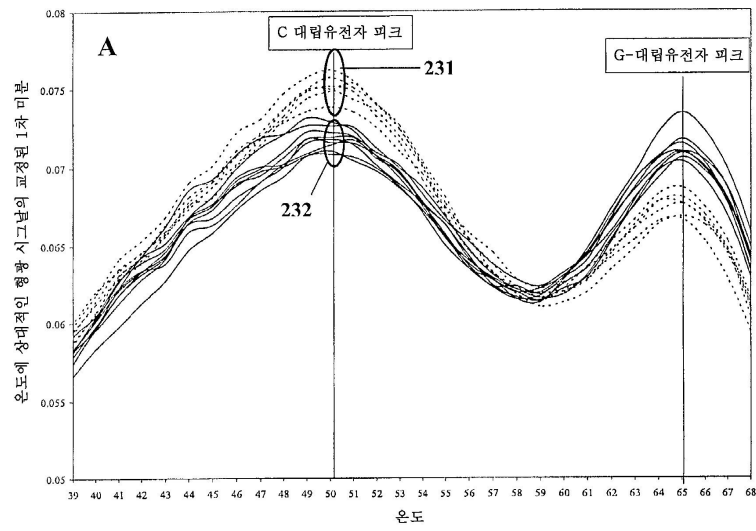




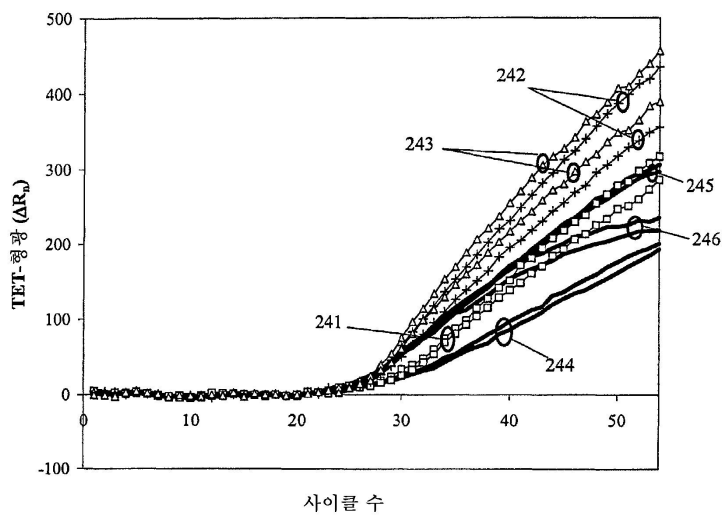
도면22



도면23



도면24



## 서열 목록

<110> Wangh, Lawrence J.

Rice, John  
 Sanchez, J. Aquiles  
 Pierce, Kenneth  
 Reis, Arthur  
 Salk , Jesse  
 Hartshorn, Cristina  
 <120> PRIMERS, PROBES AND METHODS FOR NUCLEIC  
 ACID AMPLIFICATION  
 <130> 08609-015001  
 <140> US 11/252,433  
 <141> 2005-10-17  
 <150> US 60/619,654  
 <151> 2004-10-18  
 <160> 51  
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0  
 <210> 1  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> probe  
 <400> 1  
 aatactggat aggaccacga gg 22  
  
 <210> 2  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> probe  
 <400> 2  
 ctggatagga ccacgaggcc ag 22  
  
 <210> 3  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> probe  
 <400> 3  
 gcatgtcttg tggtagg 16  
 <210> 4  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 4  
 taacaagcag agtcctctg gt 22  
 <210>  
 > 5  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> probe  
 <400> 5  
 gggaccaggt aagaa 15  
 <210> 6  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 6  
 ccgcccttct ctctgcccc tggtagg 24  
 <210> 7  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> primer



<400> 7	
gccaggggtt ccactacgta ga	22
<210>	
8	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 8	
ctggtacctg aaccgtat	18
<210> 9	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 9	
atcctatggc cc	12
<210> 10	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 10	
ggccatcact aaaggcaccg agcact	26
<210> 11	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 11	
gggtttctga tacgcactga ctctctc	27
<210> 12	

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 12

gaccaccagc agcctaag 18

<210> 13

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically generated oligonucleotide

<400> 13

ggtgggaaaa taga 14

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically generated oligonucleotide

<400> 14

cgcggcgta ggcataatagg ataccgggac agacgccgcg 40

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 15

ggtcagcgcc gggctgcaag tgtaga 26

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 16

gatgggtgga gcttgtcttg agg

23

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 17

cgaggtcatt gaatacgcac ggctcc

26

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 18

taacaagcag agtcctctg gt

22

<210> 19

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 19

gggaccaggt aagaa

15

<210> 20

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>	
<223> probe	
<400> 20	
tgctaattggt ggag	14
<210> 21	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 21	
gccccggagcg aggagagtag cactcttg	28
<210> 22	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 22	
caccagtctt gtaaaccgga gatgaa	26
<210> 23	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 23	
gtatgggagt gggaggggaa aataatgtgt tag	33
<210> 24	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	

<400> 24	
aggtctatca ccctattaac cactca	26
<210> 25	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 25	
caccagtctt gttaaccgga gatgaaaacc	30
<210> 26	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 26	
cgaggagagt agcactctt	19
<210> 27	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 27	
aggtctatca ccctattaac cactcacggg	30
<210> 28	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 28	



ggaggggaaa ataatgtgtt agt	23
<210> 29	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 29	
caatcccttg acctgttg gagagaa	27
<210> 30	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 30	
tccccagagc ccagccgtg tcattttc	28
<210> 31	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> probe	
<400> 31	
cttcagctca aacaata	17
<210> 32	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> mispriming prevention reagent	
<400> 32	
cgctataatg aaattatagc g	21

<210> 33	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 33	
tggtggaca cctggcttca gact	24
<210> 34	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 34	
caacttgggg gactaggc	18
<210> 35	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 35	
ggtcgtacag gaaaagatgg cggctcaa	28
<210> 36	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 36	
tgaaagaaac cactagaggg ca	22
<210> 37	
<211> 30	

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> probe  
 <400> 37  
 ccgcctggga tggcatactg tggaaggcgg 30

<210> 38  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> mispriming prevention reagent  
 <400> 38  
 cgttataatg aaattataac g 21

<210> 39  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetically generated oligonucleotide  
 <400> 39  
 gatctatctg c 11

<210> 40  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 40  
 cgtgtataga ctatactagc ag 22

<210> 41  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223> synthetically generated oligonucleotide  
 <400> 41  
 agcaggtggt aggagcattg ctcggtgctgc ctcaagacaa gctccacca t 51  
 <210> 42  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetically generated oligonucleotide  
 <400> 42  
 gcagcagctg tagatgcatg ctgcgtgct cagagagcag ctacact 48  
 <210> 43  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 43  
 acactgctgg ccacactttg tccyggggac caggtaagaa tgattgctg 50  
 <210> 44  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 44  
 tgtggccagg agtgtcaaac tctgcaagca cacggatacc cgggagccgt 50  
 <210> 45  
 <211> 49  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 45  
 acactcctgg ccagactttg tcctggggac caggtaagaa tgatgtctg 49  
 <210> 46  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 46

tgtggccagg agtgtcaaac tctgcaagca cacggatacc ccggagccgt	50
<210> 47	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetically generated oligonucleotide	
<400> 47	
cttctaagca tggggagggg gttttgatgt ggatcg	36
<210> 48	
<211> 64	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetically generated oligonucleotide	
<221> misc_feature	
<222> (1)...(64)	
<223> n = A,T,C or G	
<400> 48	
taannagaca gannagancg aggnagagaa ggggngngn ngatataaga gataatnaa	60
tata	64
<210> 49	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> synthetically generated oligonucleotide	
<400> 49	
cttctaagca tggggagggg gtttctgatg tggattgc	38
<210> 50	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	



<220>

<223> synthetically generated oligonucleotide

<221> misc\_feature

<222> (1)...(44)

<223> n = A,T,C or G

<400> 50

aaatctccac caaacccecc ccnacccecc gcttgcnag gcc

44

<210> 51

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetically generated oligonucleotide

<400> 51

aatgrcttta

10