

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. ⁶ C12Q 1/68 C07H 21/00	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2005년11월11일 10-0482917 2005년04월04일
---	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-1998-0705638	(65) 공개번호	10-1999-0081925
(22) 출원일자	1998년07월23일	(43) 공개일자	1999년11월15일
번역문 제출일자	1998년07월23일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1997/001304	(87) 국제공개번호	WO 1997/27331
국제출원일자	1997년01월23일	국제공개일자	1997년07월31일

(81) 지정국

국내특허 : 아일랜드, 알바니아, 오스트레일리아, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 쿠바, 체코, 에스토니아, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 케냐,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 벨라루스, 키르기즈스탄,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 오스트리아, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 영국,

(30) 우선권주장	08/589,260	1996년01월23일	미국(US)
	60/010,462	1996년01월23일	미국(US)
	60/010,462	1996년01월23일	미국(US)

(73) 특허권자 퀴아진 지노믹스, 인코포레이티드
미국 워싱턴주 98021 보텔 220번 스트리트 사우쓰이스트 1631

(72) 발명자 반 네스 제프리
미국 워싱턴주 98125 시애틀 49번 애비뉴 노쓰이스트 10020

 테이본 존 씨
미국 워싱턴주 98011 보텔 노쓰이스트 166번 플레이스 12117

 하우버트 제이 제프리
미국 워싱턴주 98005 벨레뷰 노쓰이스트 30번 스트리트 12740

 멀리건 존 티
미국 워싱턴주 98105 시애틀 17번 애비뉴 노쓰이스트 5823

(74) 대리인 김영관
 이병호
 홍동오

심사관 : 백경업

(54) 핵산분자의서열을결정하는방법및이를위한조성물

요약

핵산 분자의 서열을 결정하기 위한 방법 및 화합물, 및 이로부터의 조성물이 제공된다. 당해 방법으로 다중 핵산 서열을 동시에 결정할 수 있다. 당해 화합물을 태그로서 사용하여 선택된 표적 핵산 분자에 상보적인, 태그 부착된 핵산 단편을 발생시킨다. 각 태그는 특정한 뉴클레오타이드와 상관이 있으며 바람직한 양태에서는 질량 분광분석법에 의해 탐지 가능하다. 이와 같이 태그 부착된 단편을 일련의 길이로 분리시킨 후, 태그를 상기 태그 부착된 단편으로부터 절단한다. 바람직한 양태에서는, 상기 태그를 질량 분광분석법으로 탐지하고 이로부터 핵산 분자의 서열을 결정한다. 당해 방법의 개별적인 단계는, 예를 들면, 시스템 내로 혼입함으로써 자동화 포맷으로 사용할 수 있다.

대표도

도 3

명세서

기술분야

본 발명은 일반적으로 핵산 분자의 서열을 결정하는 방법 및 이를 위한 조성물에 관한 것이며, 더욱 구체적으로 언급하면, 본 발명은 다중 핵산 서열을 동시에 결정하게 해주는 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경기술

데옥시리보핵산(DNA) 서열 분석은 생물학 분야에서 기본적인 기술 중의 하나이다. 이는 분자 생물학의 핵심이고 기타 생물학 관련 분야에서도 신속하게 확산되고 있다. 사람 게놈 프로젝트는 완전한 사람 유전자 코드를 판독하기 위한 다국적 노력의 일환이다. 이는 지금까지 생물학 분야에서 진행되어 온 것 중에서 가장 큰 프로젝트이며 이미 시작되어 의학 분야에 상당한 영향을 미치고 있다. 보다 저렴하고 신속한 서열 분석 기술의 개발이 이러한 프로젝트의 성공을 보장해줄 것이다. 실제로, 서열 분석 기술을 향상시키기 위한 상당한 노력들이 사람 게놈 프로젝트의 NIH 및 DOE 브랜치에 의해 지원되어 왔으나, 실상에 있어서 상당한 영향을 미치지지는 못하였다[참조: Sulston and Waterston, Nature 376:175, 1995].

과거 20년 동안, 핵산 서열을 결정하고 분석하는 것이 생물학적 연구 조사의 주요 테마 중의 하나로서 자리잡아 왔었다. 이러한 과정과 이에 대한 새로운 연구 수단 및 방법들로 인해, 과학자들은 유전자와 유전자 산물을 연구할 수 있게 되었으며 이로써 이들 유전자의 기능을 보다 잘 이해할 뿐만 아니라 새로운 치료제 및 진단제를 개발할 수 있었다.

1977년에 개발된 2가지 상이한 DNA 서열 분석 기술이 현재에도 광범위하게 지속적으로 사용되고 있다. 간략하게 언급하면, 디데옥시-종결기를 이용하는 생거(Sanger)[Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 74:5463, 1977]에 기술된 효소적 방법은 DNA 폴리머라제에 의해 일본쇄 주형으로부터 DNA 쇄를 합성하는 것을 포함한다. 이러한 생거의 서열 분석 방법은 디데옥시뉴클레오타이드(ddNTPs)가 정상의 데옥시뉴클레오타이드와 동일한 방식(보다 저효능이긴 하지만)으로 성장하는 쇄 내로 혼입된다는 사실에 근거한 것이다. 그러나, ddNTPs는 이들에 쇄 연장에 필요한 3'-OH 그룹이 결여되어 있다는 점에서 정상의 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs)와 상이하다. ddNTP를 DNA 쇄 내로 혼입하는 경우, 3'-하이드록시 그룹의 부재로 인해 새로운 포스포디에스테르 결합의 형성이 억제되고 이러한 DNA 단편은 주형 DNA 내의 염기에 상보적인 ddNTP로 종결된다. 막삼(Maxam) 및 길버트(Gilbert) 방법[참조: Maxam and Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 74:560, 1977]은 본래의 DNA의 화학적 분해 방법을 이용한다(양 경우에 있어서 DNA는 클로날이어야만 한다). 양 방법은 특정 지점으로부터 시작되고 서열 분석되어야 하는 DNA 단편 내에 발견되는 각 염기에서 종결되는 단편 집단을 생성시킨다. 각 단편의 종결은 본래의 DNA 단편 내에 있는 특정 염기의 위치에 좌우된다. 이러한 DNA 단편은 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 분리되며 DNA 염기(아데닌, 시토신, 티민, 구아닌; 또한 각각 A, C, T, G로서 공지됨)의 순서는 상기 겔의 방사선사진으로부터 판독한다.

성가신 DNA 풀링 서열 분석 방법[참조:Church and Kieffer-Higgins, Science 24:185, 1988]은 DNA 서열 분석에 대한 보다 최근의 접근 방법 중의 하나이다. 풀링 서열 분석 방법은 수 많은 DNA 주형(샘플)을 풀링하는 단계 및 이러한 샘플

풀을 풀로서 프로세싱하는 단계로 이루어진다. 이러한 프로세싱의 말기에 서열 정보를 분리하기 위해서, 관심있는 DNA 분자를 초기에 한 세트의 올리고뉴클레오타이드 "태그"에 연결시킨다. 이와 같이 태그가 연결된 DNA 분자를 풀링하고, 증폭시킨 다음, 96웰 플레이트에서 화학적으로 단편화한다. 이와 같이 풀링된 샘플을 전기영동시킨 후, DNA를 고체 지지체에 옮긴 다음, 특정의 표지된 일련의 올리고뉴클레오타이드와 하이브리드화한다. 이어서, 이들 막을, 각 세트의 프로브에서 표준 DNA 서열 분석 방법으로부터의 것과 유사한 방사선사진을 생성시키면서 본래의 풀에 태그가 존재하는 것 만큼 수 차례간 프로브시킨다. 따라서, 각 반응과 겔은 사용된 프로브의 수가 곱해진 통상적인 반응과 겔로부터 수득된 것과 동등한 일정 양의 데이터를 산출시킨다. 알칼린 포스포타제가 리포터 효소로서 사용되는 경우, 화학 발광성 검정 포맷에서 검출되는 1,2-디옥세탄 기질을 사용될 수 있다. 그러나, 이러한 풀링 방법의 주요 단점은 이러한 서열이 서열 분석 겔을 서던 블롯팅하고 이러한 막을 상기 풀 내의 각 클론에 대해 한번 하이브리드화함으로써만이 판독될 수 있다는 점이다.

서열 분석 방법상에 있어서의 진척에 덧붙여, 자동화 DNA 서열 분석의 출현으로 인해 속도 측면에서의 진척이 있어 왔다. 간단하게 언급하면, 이러한 방법은 형광성 표지된 프라이머를 이용하며 이는 방사선 표지된 성분들을 이용하는 방법을 대체하고 있다. 형광성 염료를 이러한 서열 분석용 프라이머 또는 ddNTP-종결기에 부착시킨다. 로봇 성분들은 현재 선형 증폭 방법을 개발시킨 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 기술을 활용하고 있다. 현재 상업적으로 이용되고 있는 서열 분석 방법은 모든 4가지 디데옥시-종결기 반응들이 단일 레인 상에서 수행되도록 한다. 각 디데옥시-종결기 반응은 독특한 형광성 프라이머(각 염기 유형:A,T,C,G에 대한 하나의 형광단)에 의해 나타난다. 단지 하나의 주형 DNA(즉, DNA 샘플)만이 각 레인당 나타난다. 일반적인 겔은 64개 상이한 레인에서 64개 샘플 이하를 동시에 전기영동시킨다. 상이한 ddNTP-말단화된 단편은 상기 겔 레인을 광 조사시킨 다음 발색단으로부터 방출된 빛을 탐지함으로써 탐지한다. 각 전기영동 단계는 약 4 내지 6시간 소요된다. 각 전기영동 분리단계는 약 400 내지 600 뉴클레오타이드(nt)를 분리함으로, 서열기당 1시간에 약 6000nt가 서열분석될 수 있다.

핵산의 단량체성 구성분을 연구하기 위해 질량 분광법을 이용하는 것은 이미 문헌[참조:Hignite, Biochemical Applications of Mass Spectrometry, Waller and Dermer(eds.), Wiley-Interscience, Chapter 16, p.527, 1972]에 기술되어 있다. 간단하게 언급하면, 보다 큰 올리고머의 경우, 14개 염기 이하 길이의 보호된 합성 올리고뉴클레오타이드 및 4개 염기 이하 길이의 보호되지 않은 올리고에 대한 플라즈마 탈착에 의해 초기에 실질적인 성공이 거두었다. 단백질을 사용하는 경우에 같이, 올리고뉴클레오타이드에 대한 ESI-MS의 적용 가능성이 입증되었다[참조:Covey et al., Rapid Comm. in Mass Spec. 2:249-256, 1988]. 이들 중은 산성 브릿징 포스포디에스테르 및/또는 말단 포스페이트 잔기에 전하를 부여하면 용액 중에서 이온화되고 나트륨 부가물 이외에 기상 다중 전하된 분자 음이온을 생성시킨다.

통상의 효소적 ddNTP 기술에 의해 100개 미만의 염기를 갖는 DNA를 서열 분석하는 것은 보다 큰 DNA 주형에 대해서 보다도 더 복잡하기 때문에, 화학적 분해가 종종 사용된다. 그러나, 이러한 화학적 분해 방법은 방사성 ^{32}P 말단 표지된 물질 약 50pmol, 6단계의 화학적 공정, 전기영동을 이용한 분리 및 필름 노출을 필요로 한다. 작은 올리고뉴클레오타이드(14nt)의 경우, 전기분무 이온화(ESI) 및 푸리에 변환(FT) 질량 분광측정(MS)이 상당히 더 신속하고 보다 민감하다. 높은 (10^5) 분해능에서 측정된 다중 하전된 이온의 해리 생성물은 연속적으로 주쇄 절단된 것으로서 서브-피코몰 량의 샘플에 대해 1분 미만 내에 완전한 서열을 제공한다[참조: Little et al., J.Am. Chem. Soc. 116:4893, 1994]. 분자량 측정의 경우, ESI/MS가 보다 큰 단편에 대해 용도가 확장되었다[참조:Potier et al., Nuc. Acids Res. 22:3895, 1994]. ESI/MS는 100여 만큼 큰 뉴클레오타이드의 서열을 분석하고 이러한 뉴클레오타이드에서의 정확한 돌연변이의 위치를 결정하는 전통적인 방법에 유용한 보충 방법이다. 보다 민감한 ESI 공급원을 이용하여 $50\text{여 } 3 \times 10^{-13}\text{mol}$ 을 부하함으로써 최근에 스펙트럼 데이터를 수득하였다[참조: Valaskovic, Anal. Chem. 68:259, 1995].

질량 분광법에 의해 DNA 서열분석하기 위한 다른 접근 방법은 DNA를 특정 원자의 개개의 동위원소로 표지시키고 각종 크기의 DNA 혼합물을 전기영동에 의해 분리시킨 후 질량 스펙트럼 분석으로 간단히 상기 동위원소들을 구별해야만하는 방법이다. (앞서 기술된 접근 방법은 질량 분광측정기의 분리능을 활용하여 상이한 길이의 DNA 올리고뉴클레오타이드를 분리 및 탐지하는데, 이는 기껏해야 어려운 제안일 뿐이다). 다음에 기술된 과정 모두는 특정 서열분석용 프라이머를 하나의 뉴클레오타이드에 의해 길이가 다양한 일련의 DNA 단편으로 전환시키는 생거의 과정을 이용하고 있다. 이와 같이 효소적으로 합성된 DNA 분자는 각각 본래의 프라이머, 관심있는 DNA의 일부의 복제된 서열 및 디데옥시 종결기를 함유한다. 즉, 프라이머를 함유하고 하나의 뉴클레오타이드 잔기에 의해 길이가 서로 상이한 한 세트의 DNA 분자가 생성된다.

브레넨(Brennen) 등[참조: Biol. Mass. Spec., New York, Elsevier, p.219, 1990]은 모세관 전기영동에 의해 분리되는 DNA 단편을 탐지하는데 유용한 DNA 표지로서 황의 4가지 안정한 동위원소를 사용하는 방법에 대해 기술하고 있다. ddNTPs의 α -티오 동족체를 사용하여, 단일 황 동위원소를 각 DNA 단편에 혼입시킨다. 따라서, 각각의 4가지 유형의 DNA 단편(ddTTP, ddATP, ddGTP, ddCTP-말단화된)을 말단 뉴클레오타이드에 따라서 독특하게 표지시킬 수 있는데; 예

를 들면, A로 종결되는 단편에 대해서는 ^{32}S 로 표시시키고, G로 종결되는 단편에 대해서는 ^{33}S 로 표시시키고, C로 종결되는 단편에 대해서는 ^{34}S 로 표시시키고, T로 종결되는 단편에 대해서는 ^{36}S 로 표시시키며, 이를 전기영동 칼럼에 대해 함께 혼합하고, 변형된 잉크-젯 프린터 헤드에 의해 수 피코리터의 분획을 수득한 다음, 로(furnace)에서 완전히 연소시킨다. 이러한 공정으로 인해, 표지된 DNA가 SO_2 로 산화되며, 이를 사중극자 또는 자기 섹터 질량 분광계로 분석한다. 이러한 SO_2 질량 단위 표시는 A로 종결되는 단편에 대해서는 64이고, G로 종결되는 단편에 대해서는 65이고, C로 종결되는 단편에 대해서는 66이며, T로 종결되는 단편에 대해서는 68이다. 이들 DNA 단편들이 상기 칼럼으로부터 나타남에 따라 이들의 분리능을 유지하는 것은 충분히 작은 분획을 취하는 것에 좌우된다. 이러한 질량 분광계는 모세 겔 칼럼에 직접적으로 커풀링되기 때문에, 분석 속도는 전기영동 속도에 의해 결정된다. 이러한 공정은 불행하게도 비용이 많이 들고, 방사능 기체를 방출시키며 상용화되지 못하였다. 다음 2가지 기타 기본적인 구속 요인이 또한 이러한 접근법에 대해 작용한다; (a) 질량이 64, 65, 66 또는 68인 어떠한 기타 성분(동중 오염물)들도 이에 대해 허용될 수 없으며 (b) 황 동위원소의 자연 존재비(%)(^{32}S 는 95.0이고 ^{33}S 는 0.75이며 ^{34}S 는 4.2이고 ^{36}S 는 0.11이다)가 민감도와 비용을 결정한다는 것이다. ^{32}S 의 자연 존재비가 95%이기 때문에, 다른 동위원소들은 >99%가 되도록 보장되어 오염되고 있는 ^{32}S 를 제거해야만 한다. 존재비가 <1%인 동위원소는 99% 정도로 보장되는데 비용이 꽤 들며; ^{36}S 가 100배 정제되는 경우일지라도 이는 ^{36}S 에 대해서 보다는 훨씬 더 많은 ^{34}S 를 함유한다.

길버트는 올리고머 합성기, 막상의 어레이, 하이브리드화를 탐지하는 탐지기 및 중앙 컴퓨터로 구성된 자동화 DNA 서열 분석기에 대해 기술하고 있다[EPA 29108678.2]. 상기 합성기는 임의로 추출된 서열의 다중 올리고머를 합성하고 이를 표시시킨다. 이러한 올리고머를 사용하여 막 상에 고정화된 DNA를 프로브한다. 상기 탐지기는 하이브리드화 패턴을 확인하고 이들 패턴을 중앙 컴퓨터로 보내어 여기서 서열을 작제한 다음 올리고머의 다음 합성 단계시의 서열을 예측한다. 반복 과정이긴 하지만, DNA 서열은 자동화 형식으로 수득될 수 있다.

브레넨은 올리고머의 연결 과정을 근거로 하여 핵산의 서열을 분석하는 방법에 대해 기술하고 있다[미국 특허 제 5,403,708호]. 핵산 주형에 하이브리드화된 연결 생성물을 형성하는 방법 및 이를 위한 조성물이 기재되어 있다. 프라이머를 DNA 주형에 하이브리드화한 다음, 랜덤하게 연장된 올리고뉴클레오타이드의 풀을 또한 리가제의 존재하에서 상기 프라이밍된 주형에 하이브리드화시킨다. 이러한 리가제 효소는 하이브리드화된 올리고머를 프라이머에 공유적으로 연결시킨다. 이에 대한 변형으로, N 뉴클레오타이드의 일정 간격으로 떨어져 있는 핵산 주형 내의 제1 세트의 표적 뉴클레오타이드 잔기 중의 하나 이상의 구성원의 뉴클레오타이드 서열을 측정할 수 있다. 이러한 방법에서는, 표지되어 연결된 생성물이 형성되는데, 여기서는 상기 연결 생성물 내로 혼입된 표지의 위치 및 유형이, 표지된 뉴클레오타이드 잔기와 염기쌍을 이루는 핵산 주형 내의 뉴클레오타이드 잔기에 관한 정보를 제공해준다.

코스터(Koster)는 엑소뉴클레아제에 의해 DNA를 분해한 후 질량 분광분석법으로 DNA의 서열을 분석하는 방법에 대해 기술하고 있다[PCT/US 94/02938]. 이러한 방법은 DNA 서열이 직접적으로 결정된다는 점에서 간단하다[생거 반응은 사용되지 않는다]. DNA를 표준 벡터 내로 클로닝시키고, 5' 말단을 고정화시킨 다음 상기 쇄를 엑소뉴클레아제를 통하여 3' 말단에서 연속적으로 분해시키고 효소적 생성물(뉴클레오타이드)을 질량 분광분석법으로 탐지한다.

바이츠(Weiss) 등은 형광성 다중 DNA 서열 분석용 자동화 하이브리드화/영상 장치에 대해 기술하고 있다[PCT/US 94/11918]. 이러한 방법은 전형적인 생거 반응으로부터 야기된 크기 분리된 DNA 단편을 함유하는 막에 효소-연결된 프로브를 하이브리드화시키는 개념을 근거로 한 것이다.

서열 분석 정보에 대한 수요는 현재 존재하고 있는 서열분석기, 예를 들면, AB1377 및 Pharmacia ALF에 의해 공급될 수 있는 것 보다 더 크다. 현 기술의 주요 단점 중의 하나는 현 태깅 시스템을 사용하여 분리할 수 있는 태그의 수가 작다는 것이다. 앞서 논의된 처치(Church) 풀링 시스템은 더 많은 태그를 이용하지만, 이들 태그를 이용 및 탐지하는 데는 힘이 많이 든다.

본 발명은 앞서 기술된 방법 보다 속도와 민감도를 상당히 증진시키면서 핵산 분자의 서열을 분석하는데 이용될 수 있는 신규 방법 및 이를 위한 조성물에 관한 것이며 추가로 이와 관련된 잇점을 제공해준다.

발명의 요약

간단하게 언급하면, 본 발명은 핵산 분자의 서열을 결정하기 위한 방법, 화합물, 조성물, 키트 및 시스템을 제공해준다. 본 발명의 한 국면에 있어서, 핵산 분자의 서열을 결정하기 위한 방법이 제공된다. 이러한 방법은 (a) 선택된 표적 핵산 분자

에 상보적인, 태그 부착된 핵산 단편(여기서, 태그는 특정 뉴클레오타이드와 상관이 있으며 비-형광성 분광분석법 또는 전위차법에 의해 탐지가능하다)을 제조하는 단계; (b) 이와 같이 태그 부착된 단편을 일련의 길이로 분리하는 단계; (c) 상기 태그 부착된 단편으로부터 태그를 절단하는 단계; 및 (d) 비-형광성 분광분석법 또는 전위차법에 의해 상기 태그를 탐지하고, 이로부터 핵산 분자의 서열을 결정하는 단계를 포함한다. 바람직한 양태에서는, 상기 태그를 질량 분광분석법, 적외선 분광분석법, 자외선 분광분석법 또는 일정 전위 전류법에 의해 탐지한다.

또 다른 국면에 있어서, 본 발명은 화학식 $T^{ms}-L-X$ 의 화합물[여기서, T^{ms} 은 탄소, 하나 이상의 수소 및 플루오라이드, 및 산소, 질소, 황, 인 및 요오드 중에서 선택된 임의의 원자를 포함하는, 질량 분광분석법에 의해 탐지 가능한 유기 그룹이고; L은 당해 화합물을 대상으로 질량 분광분석법을 수행할 때 단일 이온화 전하 상태를 지지해주고 3급 아민, 4급 아민 및 유기산 중에서 선택되는 작용성 그룹을 포함하는 T^{ms} -함유 잔기가 상기 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되도록 해주는 유기 그룹이며; X는 하이드록실, 아미노, 티올, 카복실산, 할로알킬, 및 다른 잔기와의 커플링에 대한 그룹의 활성을 활성화시키거나 억제시키는 이들의 유도체 중에서 선택된 작용성 그룹이거나, 또는 핵산 단편의 3' 말단 이외의 위치에서 L에 부착된 핵산 단편인데, 단 당해 화합물은 X를 통하여 고형 지지체에 결합되지 않고 250달톤 미만의 질량을 갖지 않는다]을 제공한다.

또 다른 국면에 있어서, 본 발명은 다수의 화학식 $T^{ms}-L-MOI$ 의 화합물[여기서, T^{ms} 은 탄소, 하나 이상의 수소 및 플루오라이드, 및 산소, 질소, 황, 인 및 요오드 중에서 선택된 임의의 원자를 포함하는, 질량 분광분석법에 의해 탐지 가능한 유기 그룹이고; L은 상기 화합물을 대상으로 질량 분광분석법을 수행할 때 단일 이온화 전하 상태를 지지해주고 3급 아민, 4급 아민 및 유기산 중에서 선택되는 작용성 그룹을 포함하는 T^{ms} -함유 잔기가 상기 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되도록 해주는 유기 그룹이며; MOI는 핵산 단편이며, 여기서 L은 MOI의 3' 말단 이외의 위치에서 MOI에 접합되며, 단 2개의 화합물이 동일한 T^{ms} 또는 동일한 MOI를 갖지 않는다]을 포함하는 조성물을 제공한다.

또 다른 국면에 있어서, 본 발명은 물과 화학식 $T^{ms}-L-MOI$ 의 화합물[여기서, T^{ms} 은 탄소, 하나 이상의 수소 및 플루오라이드, 및 산소, 질소, 황, 인 및 요오드 중에서 선택된 임의의 원자를 포함하는, 질량 분광분석법에 의해 탐지 가능한 유기 그룹이고; L은 상기 화합물을 대상으로 질량 분광분석법을 수행할 때 단일 이온화 전하 상태를 지지해주고 3급 아민, 4급 아민 및 유기산 중에서 선택되는 작용성 그룹을 포함하는 T^{ms} -함유 잔기가 상기 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되도록 해주는 유기 그룹이며; MOI는 핵산 단편이며, 여기서 L은 MOI의 3' 말단 이외의 위치에서 MOI에 접합된다]을 포함하는 조성물을 제공한다.

또 다른 국면에 있어서, 본 발명은 여러 세트의 화합물을 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 각 세트의 화합물은 화학식 $T^{ms}-L-MOI$ [여기서, T^{ms} 은 탄소, 하나 이상의 수소 및 플루오라이드, 및 산소, 질소, 황, 인 및 요오드 중에서 선택된 임의의 원자를 포함하는, 질량 분광분석법에 의해 탐지 가능한 유기 그룹이고; L은 상기 화합물을 대상으로 질량 분광분석법을 수행할 때 단일 이온화 전하 상태를 지지해주고 3급 아민, 4급 아민 및 유기산 중에서 선택되는 작용성 그룹을 포함하는 T^{ms} -함유 잔기가 상기 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되도록 해주는 유기 그룹이며; MOI는 핵산 단편이며, 여기서 L은 MOI의 3' 말단 이외의 위치에서 MOI에 접합된다]을 가지며, 한 세트 내에서 모든 구성원은 동일한 T^{ms} 그룹을 가지며 MOI 단편은 ddAMP, ddGMP, ddCMP 및 ddTMP 중에서 선택된 동일한 디데옥시뉴클레오타이드로 종결되는 각종 길이를 지니고, 세트 사이에는 T^{ms} 그룹이 적어도 2amu 정도로 상이하다.

또 다른 국면에 있어서, 본 발명은 바로 전에 기술된 바와 같은 제1의 다수 세트의 화합물을, 제2의 다수 세트의 화학식 $T^{ms}-L-MOI$ 의 화합물[여기서, T^{ms} 은 탄소, 하나 이상의 수소 및 플루오라이드, 및 산소, 질소, 황, 인 및 요오드 중에서 선택된 임의의 원자를 포함하는, 질량 분광분석법에 의해 탐지 가능한 유기 그룹이고; L은 상기 화합물을 대상으로 질량 분광분석법을 수행할 때 단일 이온화 전하 상태를 지지해주고 3급 아민, 4급 아민 및 유기산 중에서 선택되는 작용성 그룹을 포함하는 T^{ms} -함유 잔기가 상기 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되도록 해주는 유기 그룹이며; MOI는 핵산 단편이며, 여기서 L은 MOI의 3' 말단 이외의 위치에서 MOI에 접합된다]과 배합하여 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 제2의 다수 세트의 화합물은 ddAMP, ddGMP, ddCMP 및 ddTMP 중에서 선택된 동일한 디데옥시뉴클레오타이드로 종결되는 MOI 서열을 지니는데, 단 제1의 다수 세트의 화합물에 존재하는 디데옥시뉴클레오타이드는 제2의 다수 세트의 화합물에 존재하는 것과 동일한 디데옥시뉴클레오타이드가 아니다.

또 다른 국면에 있어서, 본 발명은 DNA 서열 분석용 키트를 제공한다. 이러한 키트는 다수의 컨테이너 세트를 포함하며, 각 컨테이너 세트는 5개 이상의 컨테이너를 포함하는데, 여기서 제1 컨테이너는 벡터를 함유하고 제2, 제3, 제4 및 제5 컨

테이너는 화학식 T^{ms} -L-MOI의 화합물[여기서, T^{ms} 은 탄소, 하나 이상의 수소 및 플루오라이드, 및 산소, 질소, 황, 인 및 요오드 중에서 선택된 임의의 원자를 포함하는, 질량 분광분석법에 의해 탐지 가능한 유기 그룹이고; L은 상기 화합물을 대상으로 질량 분광분석법을 수행할 때 단일 이온화 전하 상태를 지지해주고 3급 아민, 4급 아민 및 유기산 중에서 선택되는 작용성 그룹을 포함하는 T^{ms} -함유 잔기가 상기 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되도록 해주는 유기 그룹이며; MOI는 핵산 단편이며, 여기서 L은 MOI의 3' 말단 이외의 위치에서 MOI에 접합된다]를 함유하며 이러한 제2, 제3, 제4 및 제5 컨테이너에 대한 MOI는 동일하고 컨테이너 세트 내의 벡터의 위치에 대해 상보적이며 각 컨테이너 내의 T^{ms} 그룹은 키트 내의 다른 T^{ms} 그룹과 상이하다.

또 다른 국면에 있어서, 본 발명은 핵산 분자의 서열을 결정하기 위한 시스템을 제공한다. 이러한 시스템은 태그 부착된 핵산 단편을 분리시키는 분리 장치; 태그 부착된 핵산 단편으로부터, 특정 뉴클레오타이드와 상관이 있고 전기화학적 탐지에 의해 탐지 가능한 태그를 절단시키는 장치; 및 일정 전위 전류 측정용 장치를 포함한다.

본 발명의 다른 양태에 있어서, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 250, 300, 350, 400, 450 또는 500가지 이상의 상이하고도 독특한 태그 부착된 분자를 소정의 반응 내에서 동시에 이용할 수 있으며, 여기서 각 태그는 선택된 핵산 단편, 프로브, 또는 제1 또는 제2 구성원에 대해 독특하며 별도로 동정할 수도 있다.

본 발명의 이들 국면 및 기타 국면은 다음 상세한 설명과 첨부된 도면을 참조로 하여 명백할 것이다. 또한, 특정 과정 또는 조성물(예:플라스미드 등)을 보다 상세히 기술하고 있는 각종 문헌들이 다음에 제시되며 이들 문헌의 전문이 본원에 참조 문헌으로 삽입되어 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 카복실 아마이드 말단을 갖는 태그를 방출시키기 위해, 화학적으로 절단 가능한 질량 분광학 태그의 펜타플루오로페닐 에스테르를 합성하기 위한 플로우차트를 도시한 것이다.

도 2는 카복실산 말단을 갖는 태그를 방출시키기 위해, 화학적으로 절단 가능한 질량 분광학 태그의 펜타플루오로페닐 에스테르를 합성하기 위한 플로우차트를 도시한 것이다.

도 3 내지 6 및 8은 36개의 광화학적으로 절단 가능한 질량 분광학 태그 세트의 테트라플루오로페닐 에스테르를 합성하기 위한 플로우차트를 도시한 것이다.

도 7은 36개의 아민-말단화된 광화학적으로 절단 가능한 질량 분광학 태그 세트를 합성하기 위한 플로우차트를 도시한 것이다.

도 9는 36개의 광화학적으로 절단 가능한 질량 분광학 태그 산의 테트라플루오로페닐 에스테르의 상응하는 세트로부터 제조된 36개의 광화학적으로 절단 가능한 질량 분광학 태그 부착된 올리고뉴클레오타이드의 합성 과정을 도시한 것이다.

도 10은 36개의 아민-말단화된 광화학적으로 절단 가능한 질량 분광학 태그의 상응하는 세트로부터 제조된 36개의 광화학적으로 절단 가능한 질량 분광학 태그 부착된 올리고뉴클레오타이드의 합성 과정을 도시한 것이다.

도 11은 질량 분광분석법에 의한 다중 태그의 동시 탐지를 예시한 것이다.

도 12는 알파-시아노 매트릭스 단독의 질량 분광 사진을 나타낸 것이다.

도 13은 규격 구조적으로 작제된 태그 부착된 핵산 단편을 도시한 것이다.

발명의 상세한 설명

간단히 언급하면, 본 발명의 한 국면에서는, 관심있는 분자 또는 이에 대한 전구체가 불안정한 결합(들)을 통하여 태그에 연결되어 있는 화합물에 제공된다. 따라서, 본 발명의 화합물은 다음 화학식을 갖는 것으로 예상할 수 있다:



상기식에서,

T는 태그 성분이고,

L은 불안정한 결합이거나 이러한 결합을 함유하는 링커 성분이며,

X는 관심있는 분자(MOI) 성분이거나 MOI를 T-L에 연결시킬 수 있는 작용성 그룹 성분(L_h)이다.

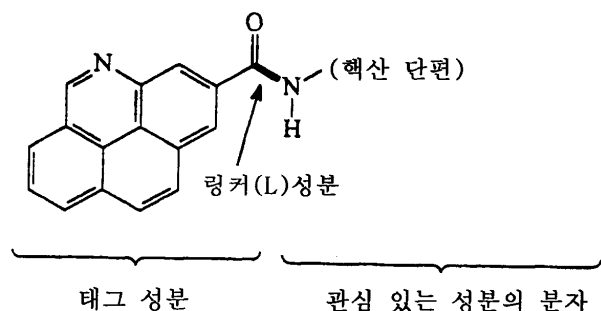
따라서, 본 발명의 화합물은 보다 구체적으로 다음 화학식으로 나타낼 수 있다:

T-L-MOI 및 T-L- L_h

다음에 상세히 언급될 이유로 인해, T-L-MOI 화합물 셋트를, 상기 불안정한 결합(들)을 파괴시키는 조건에 의도적으로 노출시킴으로써 상기 화합물의 나머지 부분으로부터 태그 잔기를 방출시킬 수 있다. 이러한 태그 잔기는 하나 이상의 분석 기술에 의해 특징화함으로써, 태그 잔기의 구조에 관한 직접적인 정보와 (가장 중요하게는) 상응하는 MOI의 정체에 관한 간접적인 정보를 제공한다.

L이 직접 결합인 본 발명의 대표적인 화합물의 간단한 한 예로서, 다음 화학식 i 에 언급된다:

[화학식 i]



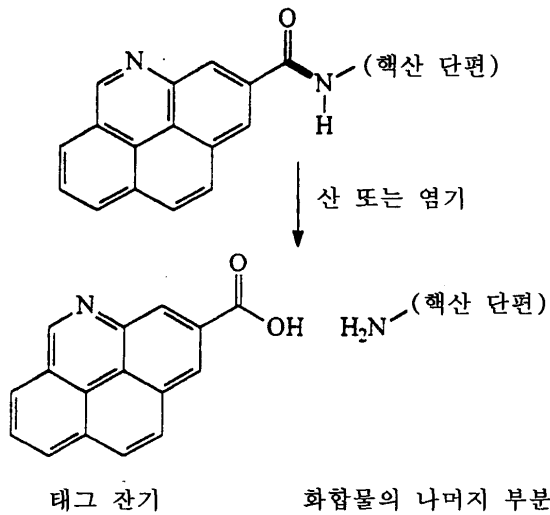
상기식에서,

T는 카보닐 그룹에 결합된 질소 함유 폴리사이클릭 방향족 잔기이고,

X는 MOI(및 특정하게는 아민 그룹에서 말단화되는 헥산 단편)이며,

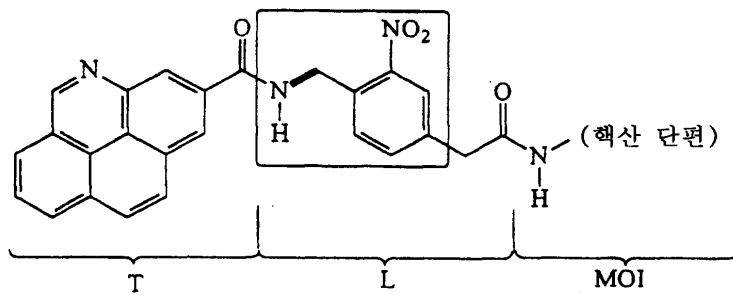
L은 아마이드 그룹을 형성하는 결합이다.

이러한 아마이드 결합은 T에서의 결합에 비해 불안정한 결합인데, 이는 당해 분야에서 인지된 바와 같이, 아마이드 결합은 하전되지 않은 태그 성분 내의 결합을 절단시키는 산 또는 염기 조건에 의해 화학적으로 절단(파괴)될 수 있기 때문이다. 따라서, 태그 잔기(즉, T를 함유하는 절단 생성물)는 다음에 도시된 바와 같이 방출시킬 수 있다:

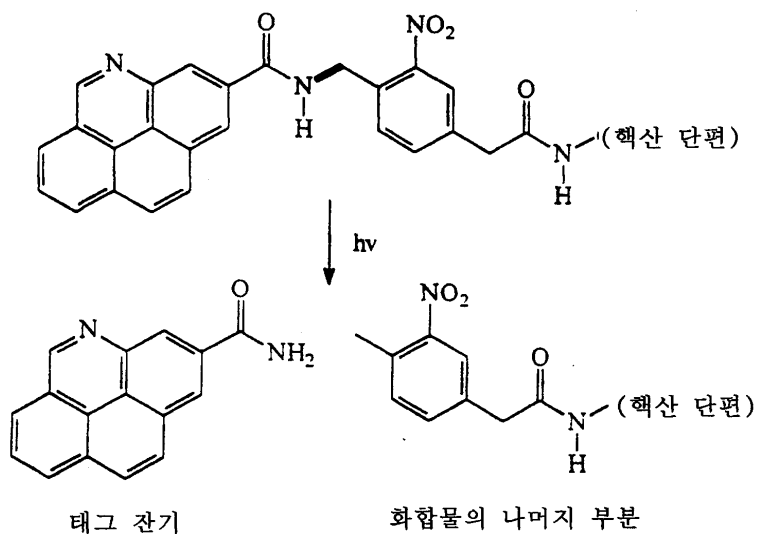


그러나, 링커 L은 다음에 화학식 ii로 제시된 본 발명의 대표적인 또 다른 화합물 예에서 나타낸 바와 같이 보다 더 단순한 직접 결합일 수 있다:

[화학식 ii]

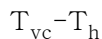


오르토-니트로벤질아민 잔기(화학식 ii 내에서 박스친 원자 참조)를 갖는 화합물은, 이러한 화합물을 특정 파장의 화학 방사선에 노출시키면 벤질아민 결합(화학식 ii에서 진한 선으로 표시된 결합 참조)이 선택적으로 절단될 것이라는 점에서 광분해적으로 불안정하다는 것은 널리 공지되어 있다. 따라서, 화학식 ii는 화학식 i와 동일한 T 및 MOI 그룹을 지니지만, 이러한 링커 그룹은 특히 불안정한 결합 내에 다중 원자 및 결합들을 함유하고 있다. 이와 같은 화학식 ii의 광분해로 인해 상기 화합물의 나머지 부분으로부터 다음과 같이 태그 잔기(T-함유 잔기)가 방출된다:



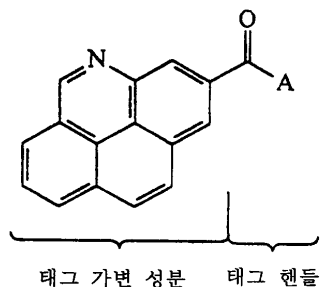
따라서, 본 발명은 적절한 절단 조건에 노출시, 해당 화합물의 나머지 부분으로부터 태그 잔기가 방출되도록 절단 반응이 진행되는 화합물을 제공한다. 본 발명의 화합물은 태그 잔기, MOI(또는 이에 대한 전구체, L_h) 및 2개의 그룹을 함께 연결해주는 불안정한 결합 관점에서 기술될 수 있다. 또 다르게는, 본 발명의 화합물은 이들을 형성하고 있는 성분 측면에서 기술될 수 있다. 따라서, 당해 화합물은 다음과 같이, 태그 반응물, 링커 반응물 및 MOI 반응물의 반응 생성물로서 기술될 수 있다.

태그 반응물은 화학적 핸들(T_h)과 가변 성분(T_{vc})으로 이루어지기 때문에, 이러한 태그 반응물은 다음 화학식으로 나타내어진다:



이러한 전문어를 예시하기 위하여, 화학식 ii의 화합물을 사용하기 위해 사용될 수 있는 태그 반응물을 나타내는 화학식 iii을 참조할 수 있다. 화학식 iii의 태그 반응물은 다음에 나타난 바와 같이 태그 가변 성분과 태그 핸들을 함유한다:

[화학식 iii]



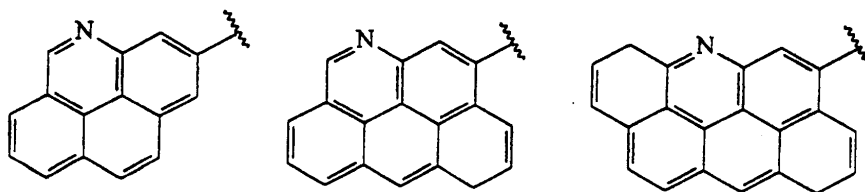
상기식에서,

태그 핸들($-C(=O)-A$)은 태그 반응물을 링커 반응물과 반응시켜 T-L 잔기를 형성해주기 위한 길을 제공할 뿐이고,

그룹 "A"는 카복실 그룹이 화학적으로 활성화된 상태이기 때문에, 다른 핸들과의 커플링할 준비가 되어 있다는 것을 지시해준다.

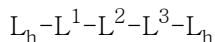
"A"는 기타 수 많은 가능성 중에서, 예를 들면, 하이드록실 그룹 또는 펜타플루오로페녹시일 수 있다. 본 발명은 다음에 보다 상세히 논의되는 바와 같은 태그 가변 성분에 결합될 수 있는 다수의 가능한 태그 핸들을 제공한다. 따라서, 이러한 태그 가변 성분은 화학식 T-L-X에서의 "T"의 일부이며 또한 L을 절단시키는 반응으로부터 형성되는 태그 잔기의 일부일 것이다.

또한 다음에 보다 상세히 논의되는 바와 같이, 태그 가변 성분은, 본 발명에 따르는 화합물 셋트를 제조하는데 있어서, 셋트의 구성원들이 독특한 가변 성분을 가져서 개개의 구성원이 분석 기술에 의해 서로 구별될 수 있도록 하는 것이 바람직하기 때문에 상기와 같이 명명된 것이다. 한 예로서, 화학식 iii의 태그 가변 성분은 다음 셋트의 한 구성원일 수 있는데, 여기서 상기 셋트의 구성원은 이들의 UV 또는 질량 스펙트럼에 의해 구별될 수 있다:



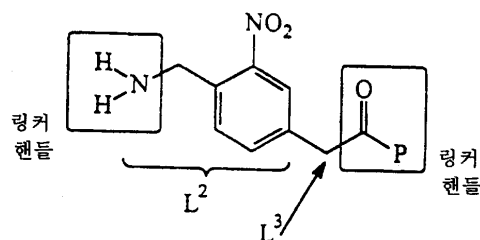
마찬가지로, 링커 반응물은 필수 불안정한 잔기(L^2)와 임의의 불안정한 잔기(L^1 및 L^3)로 구성되는 링커 불안정한 성분 [여기서, 임의의 불안정한 잔기는 핸들 L_h 로부터 L^2 을 분리시키는데 효과적으로 작용하고 필수 불안정한 잔기는 상기 링

커 불안정한 성분 내에 불안정한 결합을 제공하도록 작용한다]을 플랭크하는 이의 화학적 핸들(필수적으로 2개가 있으며, 이들 각각은 L_h 로서 명명될 수 있다) 측면에서 기재될 수 있다. 따라서, 상기 링커 반응물은 다음 화학식으로 나타낼 수 있다:



링커 반응물을 기재하기 위해 사용된 상기와 같은 명칭은 화학식 ii의 화합물로부터 작성된 화학식 iv의 관점에서 예시될 수 있다:

[화학식 iv]



화학식 iv 예시물로서, 원자들은 하나 이상의 작용성 역할에 기여할 수 있다. 따라서, 화학식 iv에서, 벤질 질소는 벤질 탄소-질소 결합이 특히 광분해적으로 절단되기 쉽다는 점에서, 당해 링커 반응물을 아미드 형성 반응을 통하여 태그 반응물에 연결시켜 주는데 있어서 화학적 핸들로서 작용을 하고 또한 연속적으로 불안정한 잔기 L^2 구조의 필수적인 일부분으로서 작용한다. 화학식 iv는 또한 링커 반응물이 L^1 그룹은 갖고 있지 않지만 L^3 그룹(이러한 경우, 메틸렌 그룹)을 가질 수 있다는 것을 예시해준다. 마찬가지로, 링커 반응물은 L^3 그룹은 갖고 있지 않지만 L^1 그룹은 갖고 있을 수 있거나, L^1 및 L^3 그룹 둘다를 가질 수 있거나, 또는 L^1 과 L^1 그룹 어느 것도 갖고 있지 않을 수 있다. 화학식 iv에서, 카보닐 그룹 다음에 그룹 "P"이 존재한다는 것은 이러한 카보닐 그룹이 반응으로부터 보호된다는 것을 의미한다. 이와 같은 형태로 가정하면, 태그 반응물(iii)의 활성화된 카복실 그룹은 링커 반응물(iv)의 아민 그룹과 정확히 반응하여 아미드 결합을 형성할 수 있으며 화학식 T-L- L_h 을 제공할 수 있다.

MOI 반응물은 관심있는 분자의 적합한 반응성 형태이다. 이러한 관심있는 분자가 핵산 단편인 경우, 적합한 MOI 반응물은 5' 하이드록실 그룹을 통하여 포스포디에스테르 그룹에 결합된 다음 아미노 그룹에서 종결되는 알킬렌 쇠에 결합된 핵산 단편이다. 이어서, 이러한 아미노 그룹을 화학식 iv의 카보닐 그룹과 반응시킴으로써,(물론, 카보닐 그룹을 탈보호한 후 및 바람직하게는 아민 그룹과의 반응을 향한 카보닐 그룹을 연속적으로 활성화시킨 후에) MOI를 상기 링커에 연결시킬 수 있다.

연대순 측면에서 보면, 본 발명은 T-L-MOI를 형성하기 위하여 (화학적 태그 핸들과 태그 가변 성분을 갖는) 태그 반응물, (2개의 화학적 링커 핸들, 필수 불안정한 잔기 및 0 내지 2개의 임의의 불안정한 잔기를 갖는) 링커 반응물 및 (관심있는 분자 성분과 관심있는 화학적 분자 핸들을 갖는) MOI 반응물을 취하는 것으로 여겨진다. 따라서, T-L-MOI를 형성하기 위하여, 태그 반응물과 링커 반응물을 먼저 함께 반응시켜 T-L- L_h 를 제공한 다음, MOI 반응물을 상기 T-L- L_h 와 반응시켜 T-L-MOI를 제공하거나, 그 밖에(덜 바람직하게는) 링커 반응물과 MOI 반응물을 먼저 함께 반응시켜 L_h -L-MOI를 제공한 다음, L_h -L-MOI를 태그 반응물과 반응시켜 T-L-MOI를 제공한다. 편의상, 화학식 T-L-MOI를 갖는 화합물은 이러한 화합물을 형성하는데 사용될 수 있는 태그 반응물, 링커 반응물 및 MOI 반응물 측면에서 기술될 것이다. 물론, 동일한 화학식 T-L-MOI의 화합물은 기타(전형적으로는, 보다 더 성가신) 방법에 의해 제조될 수 있으며 이 또한 본 발명의 T-L-MOI 화합물의 범주에 속한다.

어떠한 경우에서든, 본 발명은 T-L-MOI 화합물에 절단 조건을 적용하여 태그 잔기가 상기 화합물의 잔여 부분으로부터 방출되도록 한다. 이러한 태그 잔기는 적어도 태그 가변 성분을 포함할 것이며 전형적으로 태그 핸들 중의 원자 일부 또는 전부, 태그 반응물을 링커 반응물에 연결시키는데 사용되는 링커 핸들로부터의 원자 일부 또는 모두, 임의의 불안정한 잔

기 L^1 (이러한 그룹이 T-L-MOI에 존재하는 경우)를 부가적으로 포함할 것이며 아마도 L^2 의 정확한 구조와 절단 화학의 성질에 따라서 필수 불안정한 잔기 L^1 의 일부분을 함유할 것이다. 편의상, 이러한 태그 잔기는 T-함유 잔기로서 지칭될 수 있는데, 이는 T가 전형적으로 태그 잔기의 주요 부분(질량 측면에서)을 구성할 것이기 때문이다.

이를 본 발명의 한 국면에 도입한다고 가정하면, 각종 성분 T, L 및 X가 보다 상세히 기술될 것이다. 이러한 기술은 T, L 및 X를 기술하는데 있어서 후술될, 다음 특정 용어의 정의로 시작된다.

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "핵산 단편"은 선택된 표적 핵산 분자에 상보적인(즉, 이의 모든 분획 또는 일정 부분에 상보적인) 분자를 의미하고 천연으로부터 유도되거나 비-천연 분자를 포함하여 합성적으로 또는 재조합적으로 생산된 분자일 수 있으며, 경우에 따라 이본쇄 또는 일본쇄 형태일 수 있고, 이의 예로는 올리고뉴클레오타이드(예를 들면, DNA 또는 RNA), 프라이머, 프로브, 핵산 동족체(예:PNA), 폴리머라제에 의해 5'에서 3' 방향으로 연장되는 올리고뉴클레오타이드, 화학적 또는 효소적으로 절단되는 핵산, 디데옥시 중결기로 중결되거나 3' 또는 5' 말단이 5' 또는 3' 말단에서의 중합을 억제시키는 화합물로 캡핑되는 핵산 및 이들의 배합물이 있다. 선택된 표적 핵산 분자에 대한 핵산 단편의 상보성은 일반적으로 이러한 단편 길이 전반에 걸쳐 약 70% 이상이 특이적 염기 쌍을 형성한다는 것을 의미한다. 바람직하게는, 핵산 단편은 약 80% 이상 특이적 염기 쌍을 형성하고 더욱 바람직하게는 약 90% 이상 특이적 염기 쌍을 형성한다. 미스매치 비율(%)(및 따라서 특이적 염기 쌍 형성 비율(%))을 결정하기 위한 검정법은 당해 분야에 널리 공지되어 있고 완전하게 염기 쌍 형성된 대조군을 참조로 할 때 T_m 의 함수로서의 미스매치 비율(%)을 근거로 한 것이다.

본원에서 사용된 바와 같은 용어 "알킬"은 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에 탄소수 1 내지 10, 바람직하게는 1 내지 6, 더욱 바람직하게는 1 내지 4의 포화 직쇄 또는 측쇄 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 이러한 라디칼의 예로는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소-프로필, n-부틸, 이소-부틸, 2급-부틸, 3급 부틸, 펜틸, 이소-아밀, 헥실, 데실 등이 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 용어 "알킬렌"은 탄소수 1 내지 10, 바람직하게는 1 내지 6, 더욱 바람직하게는 1 내지 4의 포화 직쇄 또는 측쇄 탄화수소 디라디칼을 지칭한다. 이러한 디라디칼의 예로는 메틸렌, 에틸렌($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 프로필렌 등이 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

용어 "알케닐"은 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에 총 2 내지 10개, 바람직하게는 2 내지 6개, 더욱 바람직하게는 2 내지 4개의 탄소 원자 내에 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 지닌 직쇄 또는 측쇄 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 이러한 라디칼의 예로는 에테닐, E- 및 Z-프로페닐, 이소-프로페닐, E- 및 Z-부테닐, E- 및 Z-이소부테닐, E- 및 Z-펜테닐, 데세닐 등이 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 용어 "알케닐렌"은 총 2 내지 10개, 바람직하게는 2 내지 6개, 더욱 바람직하게는 2 내지 4개의 탄소 원자 내에 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 지니는 직쇄 또는 측쇄 탄화수소 디라디칼을 지칭한다. 이러한 디라디칼의 예로는 메틸리덴($=\text{CH}_2$), 에틸리덴($-\text{CH}=\text{CH}-$), 프로필리덴($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) 등이 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

용어 "알키닐"은 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에 총 2 내지 10개, 바람직하게는 2 내지 6개, 더욱 바람직하게는 2 내지 4개의 탄소 원자 내에 하나 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 지닌 직쇄 또는 측쇄 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 이러한 라디칼의 예로는 에티닐(아세틸레닐), 프로피닐(프로파길), 부티닐, 헥시닐, 데시닐 등이 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 용어 "알키닐렌"은 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에, 총 2 내지 10개, 바람직하게는 2 내지 6개, 더욱 바람직하게는 2 내지 4개의 탄소 원자 내에 하나 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 지니는 직쇄 또는 측쇄 탄화수소 디라디칼을 지칭한다. 이러한 디라디칼의 예로는 에티닐렌($-\text{C}\equiv\text{C}-$), 프로피닐렌($-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-$) 등이 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

용어 "사이클로알킬"은 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에, 3 내지 8개, 바람직하게는 3 내지 6개 탄소 원자의 포화된 사이클릭 배열을 지칭한다. 이러한 사이클로알킬의 예로는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실 등이 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 용어 "사이클로알킬렌"은 사이클로알킬의 디라디칼 형태를 지칭한다.

용어 "사이클로알케닐"은 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에, 4 내지 8개, 바람직하게는 5 또는 6개 탄소 원자와 하나 이상의 이중 결합을 함유하는 사이클릭 카보사이클을 지칭한다. 이러한 사이클로알케닐 라디칼의 예로는 사이클로펜테닐, 사이클로헥세닐, 사이클로헵타디에닐 등이 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 용어 "사이클로알케닐렌"은 사이클로알케닐의 디라디칼 형태를 지칭한다.

용어 "아릴"은 페닐, 나프틸, 인데닐, 인다닐, 아줄레닐, 플루오레닐 및 안트라세닐로 이루어진 그룹 중에서 선택된 카보사이클릭(전적으로 탄소와 수소로만 이루어짐) 방향족 그룹; 또는 푸릴, 티에닐, 피리딜, 피롤릴, 옥사졸릴, 티아졸릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 2-피라졸리닐, 피라졸리디닐, 이속사졸릴, 이소티아졸릴, 1,2,3-옥사디아졸릴, 1,2,3-트리아졸릴,

1,3,4-티아디아졸릴, 피리다지닐, 피리미디닐, 피라지닐, 1,3,5-트라아지닐, 1,3,5-트리티아닐, 인돌리지닐, 인돌릴, 이소인돌릴, 3H-인돌릴, 인돌리닐, 벤조[b]푸라닐, 2,3-디하이드로벤조푸라닐, 벤조[b]티오펜닐, 1H-인다졸릴, 벤즈이미다졸릴, 벤즈티아졸릴, 푸리닐, 4H-퀴놀리지닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 시놀리닐, 프탈라지닐, 퀴나졸리닐, 퀴녹살리닐, 1,8-나프티리디닐, 프테리디닐, 카바졸릴, 아크리디닐, 페나지닐, 페노티아지닐 및 페녹사지닐로 이루어진 그룹 중에서 선택된 헤테로사이클릭 방향족 그룹을 지칭한다.

본원에서 정의된 바와 같은 "아릴" 그룹은 수소, 할로젠, 하이드록실, 아미노, 니트로, 트리플루오로메틸, 트리플루오로메톡시, 알킬, 알케닐, 알키닐, 시아노, 카복시, 카보알콕시, 1,2-디옥시에틸렌, 알콕시, 알케녹시 또는 알키녹시, 알킬아미노, 알케닐아미노, 알키닐아미노, 지방족 또는 방향족 아실, 알콕시-카보닐아미노, 알킬설폰아미노, 모폴리노카보닐아미노, 티오모폴리노카보닐아미노, N-알킬 구아니디노, 아르알킬아미노설폰; 아르알콕시알킬; N-아르알콕시우레아; N-하이드록시우레아; N-알케닐우레아; N,N-(알킬, 하이드록실)우레아; 헤테로사이클릴; 티오아릴옥시 치환된 아릴; N,N-(아릴, 알킬)하이드라지노; Ar'-치환된 설폰헤테로사이클릴; 아르알킬 치환된 헤테로사이클릴; 사이클로알킬 및 사이클로알케닐 치환된 헤테로사이클릴; 사이클로알킬 융합된 아릴; 아릴옥시 치환된 알킬; 헤테로사이클릴아미노; 지방족 또는 방향족 아실아미노카보닐; 지방족 또는 방향족 아실 치환된 알케닐; Ar' 치환된 아미노카보닐옥시; Ar', Ar'-이치환된 아릴; 지방족 또는 방향족 아실-치환된 아실; 사이클로알킬카보닐알킬; 사이클로알킬 치환된 아미노; 아릴옥시카보닐알킬; 포스포로디아미드 산 또는 에스테르로 이루어진 그룹 중에서 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 치환체를 독립적으로 함유할 수 있다.

"Ar"는 수소, 할로젠, 하이드록실, 아미노, 니트로, 트리플루오로메틸, 트리플루오로메톡시, 알킬, 알케닐, 알키닐, 시아노, 1,2-디옥시에틸렌, 1,2-디옥시에틸렌, 알콕시, 알케녹시, 알키녹시, 알킬아미노, 알케닐아미노 또는 알키닐아미노, 알킬카보닐옥시, 지방족 또는 방향족 아실, 알킬카보닐아미노, 알콕시카보닐아미노, 알킬설폰아미노, N-알킬 또는 N,N-디알킬 우레아로 이루어진 그룹 중에서 선택된 1 내지 3개의 치환체를 갖는 상기 정의된 바와 같은 카보사이클릭 또는 헤테로사이클릭 아릴 그룹이다.

용어 "알콕시"는 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에, 알킬 에테르 라디칼(여기서, 용어 "알킬"은 앞서 정의된 바와 같다)을 지칭한다. 적합한 알킬 에테르 라디칼의 예로는 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 이소 프로폭시, n-부톡시, 이소 부톡시, 2급 부톡시, 3급 부톡시 등이 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

용어 "알케녹시"는 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에, 화학식 알케닐-O-의 라디칼(여기서, 용어 "알케닐"은 앞서 정의된 바와 같다)을 지칭하지만, 단 에놀 에테르 라디칼은 아니다. 적합한 알케녹시 라디칼의 예로는 알릴옥시, E- 및 Z-3-메틸-2-프로페녹시 등이 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

용어 "알키닐옥시"는 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에, 화학식 알키닐-O-의 라디칼(여기서, 용어 "알키닐"은 앞서 정의된 바와 같다)을 지칭하지만, 단 이놀 에테르 라디칼은 아니다. 적합한 알키닐옥시 라디칼의 예로는 프로파길옥시, 2-부틸닐옥시 등이 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

용어 "티오알콕시"는 화학식 알킬-S-의 티오에테르 라디칼(여기서, 알킬은 앞서 정의된 바와 같다)을 지칭한다.

용어 "알킬아미노"는 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에, 모노- 또는 디-알킬-치환된 아미노 라디칼(즉, 화학식 알킬-NH- 또는 (알킬)₂-N-의 라디칼)(여기서, 용어 "알킬"은 앞서 정의된 바와 같다)을 지칭한다. 적합한 알킬아미노 라디칼의 예로는 메틸아미노, 에틸아미노, 프로필아미노, 이소프로필아미노, 3급 부틸아미노, N,N-디에틸아미노 등이 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

용어 "알케닐아미노"는 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에, 화학식 알케닐-NH- 또는 (알케닐)₂-N-의 라디칼(여기서, 용어 "알케닐"은 앞서 정의된 바와 같다)을 지칭하지만, 단 에나민은 아니다. 적합한 알케닐아미노 라디칼의 예는 알릴아미노 라디칼이다.

용어 "알키닐아미노"는 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에, 화학식 알키닐-NH- 또는 (알키닐)₂-N-의 라디칼(여기서, 용어 "알키닐"은 앞서 정의된 바와 같다)을 지칭하지만, 단 이나민은 아니다. 적합한 알키닐아미노 라디칼의 예는 프로파길 아미노 라디칼이다.

용어 "아미드"는 $-N(R^1)-C(=O)-$ 또는 $-C(=O)-N(R^1)-$ [여기서, R^1 은 본원에서 수소 뿐만 아니라 기타 그룹을 포함하는 것으로 정의된다]을 지칭한다. 용어 "치환된 아미드"는 R^1 이 수소가 아닌 상황을 지칭하는 반면, 용어 "치환되지 않은 아미드"는 R^1 이 수소인 상황을 지칭한다.

용어 "아릴옥시"는 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에, 화학식 아릴-O-의 라디칼(여기서, 아릴은 앞서 정의된 바와 같다)을 지칭한다. 아릴옥시 라디칼의 예로는 페녹시, 나프톡시, 피리딜옥시 등이 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

용어 "아릴아미노"는 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에, 아릴-NH-의 라디칼(여기서, 아릴은 앞서 정의된 바와 같다)을 지칭한다. 아릴아미노 라디칼의 예로는 페닐아미노(아닐리도), 나프틸아미노, 2-, 3- 및 4-피리딜아미노 등이 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

용어 "아릴-융합된 사이클로알킬"은 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에, 아릴 라디칼과 2개의 인접한 원자를 공유하는 사이클로알킬 라디칼(여기서, 용어 "사이클로알킬" 및 "아릴"은 앞서 정의된 바와 같다)을 지칭한다. 아릴-융합된 사이클로알킬 라디칼의 예는 벤조융합된 사이클로부틸 라디칼이다.

용어 "알킬카보닐아미노"는 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에, 알킬-CONH-의 라디칼(여기서, 용어 "알킬"은 앞서 정의된 바와 같다)을 지칭한다.

용어 "알콕시카보닐아미노"는 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에, 알킬-CONH-의 라디칼(여기서, 용어 "알킬"은 앞서 정의된 바와 같다)을 지칭한다.

용어 "알킬설폰아미노"는 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에, 알킬-SO₂NH-의 라디칼(여기서, 용어 "알킬"은 앞서 정의된 바와 같다)을 지칭한다.

용어 "아릴설폰아미노"는 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에, 아릴-SO₂NH-의 라디칼(여기서, 용어 "알킬"은 앞서 정의된 바와 같다)을 지칭한다.

용어 "N-알킬우레아"는 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에, 알킬-NH-CO-NH-의 라디칼(여기서, 용어 "알킬"은 앞서 정의된 바와 같다)을 지칭한다.

용어 "N-아릴우레아"는 단독으로 또는 조합하여 사용하든지 간에, 아릴-NH-CO-NH-의 라디칼(여기서, 용어 "알킬"은 앞서 정의된 바와 같다)을 지칭한다.

용어 "할로젠"은 불소, 염소, 브롬 및 요오드를 의미한다.

용어 "탄화수소 라디칼"은 독립적인 안정한 분자가 되는데 단일 수소원자 만을 필요로 하는 탄소 원자와 수소 원자의 배열을 지칭한다. 따라서, 탄화수소 라디칼은 탄소 원자 상에 하나의 개방 원자가 부위를 가지며, 이를 통하여 탄화수소 라디칼은 다른 원자에 결합될 수 있다. 알킬, 알케닐, 사이클로알킬 등이 탄화수소 라디칼의 예이다.

용어 "탄화수소 디라디칼"은 독립적인 안정한 분자가 되는데 2개의 수소원자를 필요로 하는 탄소 원자와 수소 원자의 배열을 지칭한다. 따라서, 탄화수소 라디칼은 탄소 원자 상에 2개의 개방 원자가 부위를 가지며, 이를 통하여 탄화수소 라디칼은 다른 원자에 결합될 수 있다. 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 사이클로알킬렌 등이 탄화수소의 디라디칼의 예이다.

용어 "하이드로카빌"은 또 다른 잔기가 결합될 수 있는 단일 원자가 부위를 갖는, 전적으로 탄소와 수소 만으로 이루어진 안정한 모든 배열을 지칭하며, 이의 예로는 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 아릴(아릴 환 내로의 히테로원자의 삽입이 없음), 아릴알킬, 알킬아릴 등으로 공지된 것들이 있다. 탄화수소 라디칼은 하이드로카빌의 또 다른 명칭이다.

용어 "하이드로카빌렌"은 또 다른 잔기가 결합될 수 있는 2개의 원자가 부위를 갖는, 전적으로 탄소와 수소 만으로 이루어진 안정한 모든 배열을 지칭하며, 이의 예로는 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 사이클로알킬렌, 사이클로알케닐렌, 아릴렌 (아릴렌 환 내로의 헤테로원자의 삽입이 없음), 아릴알킬렌, 알킬아릴렌 등이 있다. 탄화수소 라디칼은 하이드로카빌렌의 또 다른 명칭이다.

용어 "하이드로카빌-O-하이드로카빌렌"은 산소 원자에 결합된 하이드로카빌 그룹을 지칭하며, 여기서 산소 원자는 또한 하이드로카빌렌 그룹이 다른 잔기에 결합되는 2개의 원자가 부위 중의 한 부위에서 하이드로카빌렌 그룹에 결합되어 있다. 용어 "하이드로카빌-S-하이드로카빌렌", "하이드로카빌-NH-하이드로카빌렌" 및 "하이드로카빌-아미드-하이드로카빌렌"은 동일한 의미를 지니는데, 산소가 황, -NH- 또는 아미드 그룹으로 각각 대체된 것이다.

용어 N-(하이드로카빌)하이드로카빌렌은 2개의 원자가 부위 중의 하나가 질소 원자와 결합되고 질소 원자가 동시에 수소와 하이드로카빌 그룹과 결합되는 하이드로카빌렌 그룹을 지칭한다. 용어 N,N-디(하이드로카빌)하이드로카빌렌은 2개의 원자가 부위 중의 하나가 질소 원자와 결합되고 질소 원자가 동시에 2개의 하이드로카빌 그룹과 결합되는 하이드로카빌렌 그룹을 지칭한다.

용어 "하이드로카빌아실-하이드로카빌렌"은 아실(-C(=O)-) 그룹을 통하여 하이드로카빌렌 그룹의 2개의 원자가 부위 중의 한 부위에 결합된 하이드로카빌 그룹을 지칭한다.

용어 "헤테로사이클릴하이드로카빌" 및 "헤테로사이클릴"은 탄소 원자와 산소, 질소, 인 및 황 중에서 선택된 4개 이하의 원자(헤테로원자로서 지칭됨)를 포함하는 원자의 안정한 사이클릭 배열을 지칭한다. 이러한 사이클릭 배열은 3 내지 7개 원자의 모노사이클릭 환 또는 8 내지 11개 원자의 바이사이클릭 환 형태일 수 있다. 이러한 환들은 포화되거나 불포화(방향족 환을 포함함)될 수 있으며 임의로 벤조융합될 수 있다. 환 내의 질소 및 황 원자는 질소의 4급화 형태를 포함하여 어떠한 산화 형태일 수 있다. 헤테로사이클릴하이드로카빌은 어떠한 엔도사이클릭탄소 또는 헤테로원자에 부착되어 안정한 구조를 만들 수 있다. 바람직한 헤테로사이클릴하이드로카빌로는 1개 또는 2개의 질소 헤테로원자를 함유하는 5 내지 7원 모노사이클릭 헤테로사이클이 있다.

치환된 헤테로사이클릴하이드로카빌은 이의 하나 이상의 환 원자가 환을 연장시키지 않는 지시된 치환체에 결합된, 앞서 정의된 바와 같은 헤테로사이클릴하이드로카빌을 지칭한다.

하이드로카빌 및 하이드로카빌렌 그룹을 참조로 하면, 용어 "하나 이상의 수소가 동수의 플루오라이드로 대체되는 앞서 언급한 것 중의 어느 것의 유도체"란 탄소, 수소 및 플루오라이드 원자만을 함유하고 다른 원자는 함유하고 있지 않은 분자를 지칭한다.

용어 "활성화된 에스테르"는 아민, 알콜 또는 티올 친핵체 등의 친핵체에 의해 용이하게 대체될 수 있는 "이탈 그룹"을 함유하는 에스테르이다. 이러한 이탈 그룹은 널리 공지되어 있고 이의 예로는 N-하이드록시석신이미드, N-하이드록시벤조트리아졸, 할로젠(할라이드), 알콕시(테트라플루오로페놀레이트, 티오알콕시 포함) 등이 있다. 용어 "보호된 에스테르"는 마스킹되거나 비반응성인 에스테르 그룹을 지칭한다[참조:Greene, "Protecting Groups In Organic Synthesis"].

상기 정의 관점에서, 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 기타 화학 용어는 당해 분야의 숙련인에 의해 용이하게 이해될 수 있다. 용어는 단독으로 사용되거나 조합하여 사용될 수 있다. 라디칼의 바람직한 및 보다 바람직한 쇠 길이는 이러한 모든 조합물에도 적용된다.

A. 태그 부착된 핵산 단편의 제조

앞서 인지된 바와 같이, 본 발명의 한 국면은 각 레인에서 16개 태그 이상을 사용하게 해주는 DNA 서열 분석에 대한 총괄적인 개략도를 제공하는데; 여기서는 통상적인 형광성 근거한 서열 분석과 마찬가지로, 지속적으로 탐지하면서, 태그를 탐지할 수 있고 크기 분리가 진행됨에 따라 서열이 판독된다. 이러한 개략도는 태그 부착된 분자의 크기 분리를 근거로 하는 어떠한 DNA 서열 분석 기술에도 적용 가능하다. 본 발명 내에서 사용하기에 적합할 뿐만 아니라 핵산의 서열을 분석하는데 적합한 태그 및 링커는 다음에 보다 상세히 논의된다.

1. 태그

본원에서 사용된 바와 같은 "태그"는 일반적으로 "관심있는 분자"를 독특하게 동정하는데 사용되는 화학적 잔기를 지칭하고, 더욱 구체적으로 언급하면, 태그 가변 성분 뿐만 아니라 태그 반응물, 태그 성분 및 태그 잔기 중의 어떠한 것에서 이에 가장 밀접하게 결합될 수 있는 모든 것을 지칭한다.

본 발명에 유용한 태그는 몇가지 특성을 지닌다:

1) 당해 태그는 다른 모든 태그와 구별되어질 수 있다. 이와 같이 다른 화학적 잔기와 구별되는 성질은 태그의 크로마토그래피적 행위(특히 절단 반응 후), 이의 분광학적 또는 전위차적 성질 또는 이들의 몇몇 조합을 근거로 할 수 있다. 태그를 유용하게 구별시켜 주는 분광학적 방법으로는 질량 분광학(MS), 적외선(IR), 자외선(UV) 및 형광성 방법이 있으며 MS, IR 및 UV가 바람직하고 MS가 가장 바람직한 분광학적 방법이다. 전위차 전류법이 바람직한 전위차적 방법이다.

2) 당해 태그는 10^{-22} 내지 10^{-6} 몰로 존재하는 경우에 탐지되어질 수 있다.

3) 당해 태그는 이를 독특하게 동정하고자 하는 MOI에 부착시킬 수 있는 화학적 핸들을 보유한다. 이러한 부착은 MOI에 직접적으로 이루어질 수 있거나 "링커" 그룹을 통하여 간접적으로 이루어질 수 있다.

4) 당해 태그는 부착 및 MOI로부터의 절단을 포함하여 이에 적용되는 모든 조작과 태그를 부착시키는 동안의 MOI에 대한 모든 조작에 대해서 화학적으로 안정적이다.

5) 당해 태그는 태그가 부착되는 동안 MOI에 대해 수행된 조작을 실질적으로 방해하지 않는다. 예를 들면, 태그를 올리고뉴클레오티드에 부착시키는 경우, 이러한 태그는 올리고뉴클레오티드에 대해 수행된 어떠한 하이브리드화 또는 효소적 반응(예: PCR 서열 분석 반응)을 실질적으로 방해하지 말아야 한다. 유사하게, 태그를 항체에 부착시키는 경우, 이는 항체에 의한 항원 인식을 실질적으로 방해하지 말아야 한다.

특정 분광학적 또는 전위차적 방법에 의해 탐지되는 것으로 여겨지는 태그 잔기는 이러한 방법에 의해 탐지의 민감도와 특이성을 증진시키는 성질을 보유해야 한다. 전형적으로, 태그 잔기는 이들 성질을 지닐 것인데, 이는 전형적으로 이들 태그 잔기의 대부분을 구성하게 될 태그 가변 성분으로 고안되었기 때문이다. 다음 논의에서, 단어 "태그"의 사용은 전형적으로 태그 잔기(즉, 태그 가변 성분을 함유하는 절단 생성물)를 지칭하지만, 태그 가변 성분 자체를 지칭하는 것으로 간주될 수도 있는데, 이는 이러한 가변 성분이 독특하게 탐지 가능한 특성을 전형적으로 제공해주는 태그 잔기의 특정 부분이기 때문이다. 화학식 T-L-X의 화합물에 있어서, "T" 부분은 태그 가변 성분을 함유할 것이다. 이러한 태그 가변 성분을, 예를 들면, 질량 분광분석법에 의해 특징화하도록 고안한 경우, T-L-X의 "T" 부분은 T^{ms} 로서 지칭될 수 있다. 마찬가지로, T를 함유하는 T-L-X로부터의 절단 생성물은 T^{ms} 함유 잔기로서 지칭될 수 있다. 다음 분광학적 및 전위차적 방법이 T^{ms} 함유 잔기를 특징화하는데 사용될 수 있다.

a. MS 태그의 특징

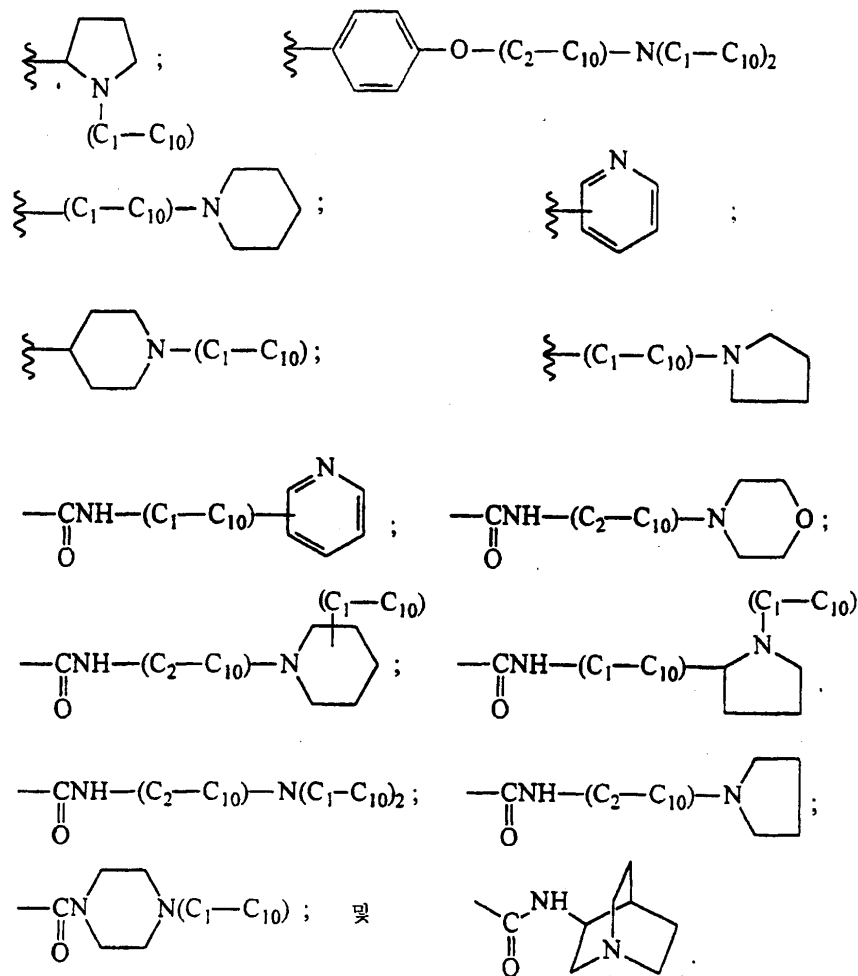
태그가 질량 분광분석법에 의해 분석 가능한 경우(즉, 태그가 MS-판독 가능한 태그이며, 본원에서 MS 태그 또는 T^{ms} 함유 잔기로서 지칭된다), 이러한 태그의 필수 양상은 이온화될 수 있다는 것이다. 따라서, MS-판독 가능한 태그를 고안하는데 있어서 MS 내에서의 이온화 조건하에서 음전하 또는 양전하를 수반할 수 있는 화학적 작용기를 상기 태그 내에 혼입시키는 것이 바람직한 요소이다. 이러한 양상은, 특히 전기분무 이온화에 있어서, 이온 형성의 효능을 증진시켜 주고 전반적인 탐지 민감도를 보다 향상시켜준다. 이온화된 전하를 지지해주는 화학적 작용기는 T^{ms} 또는 L 또는 이들 둘다로부터 유도할 수 있다. 질량 분광분석법에 의해 탐지되는 분석물의 상대 민감도를 증진시킬 수 있는 요인은 문헌[참조: Sunner, J., et al., Anal. Chem. 60:1300-1307(1988)]에 논의되어 있다.

음전하의 수반을 촉진시켜 주는데 바람직한 작용기는 페놀릭 하이드록실, 카복실산, 포스포네이트, 포스페이트, 테트라졸, 설포닐 우레아, 퍼플루오로 알콜 및 설포산 등의 유기산이다.

이온화 조건하에서 양전하의 수반을 촉진시키는데 바람직한 작용기는 지방족 또는 방향족 아민이다. MS 태그의 탐지능을 향상시켜 주는 아민 작용성 그룹의 예로는 4급 아민(즉, 각각 탄소 원자에 대한 4개의 결합을 가지는 아민; Aebersold, US Patent No. 5,240,859 참조) 및 3급 아민(즉, 피리딘에 존재하는 것과 같은 C=N-C 그룹을 포함하는, 각각 탄소 원자에 대한 3개의 결합을 가지는 아민; Hess et al., Anal. Biochem. 224:373, 1995; Bures et al., Anal. Biochem. 224:364,

1995 참조)이 있다. 장애된 3급 아민이 특히 바람직하다. 3급 및 4급 아민은 알킬 또는 아릴일 수 있다. T^{ms} 함유 잔기는 적어도 하나의 이온화 가능한 종을 보유해야만 하지만, 하나 이상의 이온화 가능한 종을 보유할 수도 있다. 바람직한 하전 상태는 태그당 단일 이온화된 종이다. 따라서, 각 T^{ms} 함유 잔기(및 각 태그 가변 성분)이 단일 장애된 아민 또는 유기산 그룹만을 함유하는 것이 바람직하다.

T^{ms} 함유 잔기의 일부를 형성할 수 있는데 적합한 아민 함유 라디칼로는 다음과 같은 것들이 있다:



질량 분광분석법에 의한 태그의 동정은 이의 분자량 대 전하비(m/z)를 근거로 하는 것이 바람직하다. MS 태그의 바람직한 분자량 범위는 약 100 내지 2,000 달톤이고, 바람직하게는 T^{ms} 함유 잔기는 질량이 약 250달톤 이상, 더욱 바람직하게는 약 300달톤 이상, 더 더욱 바람직하게는 약 350달톤 이상이다. 질량 분광계가 약 200 내지 250달톤 이하의 모(parent) 이온을 갖는 잔기들을 구별하는 것은 (정확한 기기에 따라서) 대체로 어렵기 때문에, 본 발명의 바람직한 T^{ms} 함유 잔기는 상기 범위 이상의 질량을 가진다.

앞서 설명한 바와 같이, T^{ms} 함유 잔기는 태그 가변 성분에 존재하는 것 이외의 원자를 함유할 수 있으며, 실제로 T^{ms} 자체 내에 존재하는 것 이외의 원자를 함유할 수 있다. 따라서, T^{ms} 자체의 질량은 T^{ms} 함유 잔기의 질량이 약 250달톤 이상인 한은 약 250달톤 미만일 수 있다. 따라서, T^{ms}의 질량은 15(즉, 메틸 라디칼) 내지 약 10,000달톤, 바람직하게는 100 내지 약 5,000달톤, 더욱 바람직하게는 약 200 내지 약 1,000 달톤의 범위일 수 있다.

상기 태그에 하나 이상의 동위원소를 상당량으로 갖는 원자가 혼입되는 경우에는 태그를 질량 분광분석법에 의해 구별하는 것이 비교적 어렵다. 따라서, 질량 분광학적 동정용으로 의도된 바람직한 T 그룹(T^{ms} 그룹)은 탄소, 하나 이상의 수소

및 플루오라이드, 및 산소, 질소, 황, 인 및 요오드 중에서 선택된 임의의 원자를 함유한다. 다른 원자가 T^{ms} 에 존재할 수도 있지만, 이들의 존재로 인해 질량 스펙트럼 데이터의 분석을 다소 보다 더 어렵게 만들 수 있다. 바람직하게는, T^{ms} 그룹은 수소 및/또는 플루오라이드 이외에, 탄소, 질소 및 산소 원자만을 가진다.

플루오라이드는 임의의 원자이긴 하지만, T^{ms} 그룹이 이를 함유하는 것이 바람직하다. 수소와 비교해서, 플루오라이드는 물론, 훨씬 더 질량이 많다. 따라서, 수소가 아니라 플루오라이드가 존재함으로 인해 보다 고질량의 T^{ms} 그룹이 생성됨으로써, T^{ms} 그룹의 질량이 앞서 바람직한 것으로 언급된, 250달톤 초과에 도달할 수 있다. 또한, 수소를 플루오라이드로 대체하면, T^{ms} 함유 잔기에 대한 휘발성이 보다 더 커지게 되며 질량 분광계를 탐지 방법으로서 사용하게 되면 분석물의 보다 큰 휘발성은 이의 민감도를 증진시켜 준다.

T^{ms} 의 분자식은 $C_{1-500}N_{0-100}O_{0-100}S_{0-10}P_{0-10}H_{\alpha}F_{\beta}I_{\gamma}$ (여기서, α , β 및 γ 의 합은 달리 충족되지 않는 한 C, N, O, S 및 P 원자의 원자수를 충족시키는데 충분하다)의 범위 내에 속한다. 상기 $C_{1-500}N_{0-100}O_{0-100}S_{0-10}P_{0-10}H_{\alpha}F_{\beta}I_{\gamma}$ 는 T^{ms} 이 100 개 정도로 많은 질소 원자("N₀₋"은 T^{ms} 이 어떠한 질소 원자도 함유할 필요가 없다는 것을 의미한다), 10개 정도의 황 원자 및 10개 정도의 인 원자를 임의로 함유하는 것 이외에, 적어도 하나의 탄소 원자를 함유하고 1 내지 500개 탄소 원자 중의 어떠한 수로도 함유할 수 있다는 것을 의미한다. 부호 α , β 및 γ 는 T^{ms} 내의 수소, 플루오라이드 및 요오드 원자의 수를 나타내며, 여기서 이들 수의 둘은 0일 수 있고 이들 수의 합이 달리 충족되지 않는 한 C, N, O, S 및 P 원자의 총 원자수와 동일하다. 바람직하게는, T^{ms} 은 $C_{1-50}N_{0-10}O_{0-10}H_{\alpha}F_{\beta}$ (여기서, α 및 β 의 합은 잔기 내에 각각 존재하는 수소와 플루오라이드 원자의 수와 동일하다)의 범주에 속하는 분자식을 갖는다.

b. IR 태그의 특징

유기 화학적 그룹을 IR 탐지하는 2가지 주요 형태, 즉 라만(Raman) 산란 IR 및 흡광 IR이 있다. 라만 산란 IR 스펙트럼과 흡광 IR 스펙트럼은 상보적인 분광학적 방법이다. 일반적으로, 라만 여기는 결합 편극도 변화에 좌우되는 반면, IR 흡광도는 결합 쌍극자 모멘트 변화에 좌우된다. 약한 IR 흡광선은 강한 라만 선이 되고 그 반대로 될 수도 있다. 파수는 IR 스펙트럼에 특징적인 유니트이다. 별도로 응용되는 IR 태그에 대한 다음 3가지 스펙트럼 영역이 있다: 12500 내지 4000 cm^{-1} 에서의 니어 IR, 4000 내지 600 cm^{-1} 에서의 미드 IR, 600 내지 30 cm^{-1} 에서의 파(far) IR. 특정 화합물이 MOI, 프로브 또는 프라이머를 동정하기 위해 태그로서 작용해야 하는 경우 본원에서 기술된 용도를 위해, 미드 스펙트럼 영역이 바람직할 것이다. 예를 들면, 카보닐 스트레치(1850 내지 1750 cm^{-1})는 카복실산, 카복실릭 에스테르 및 아마이드, 및 알킬 및 아릴 카보네이트, 카바메이트 및 케톤에 대해 측정된 것이다. N-H 결합(1750 내지 1600 cm^{-1})은 아민, 암모늄 이온 및 아마이드를 동정하기 위해 사용될 것이다. 1400 내지 1250 cm^{-1} 에서, R-OH 굴곡이 탐지될 뿐만 아니라 아마이드 내의 C-N 스트레치가 탐지된다. 방향족 치환 패턴은 900 내지 690 cm^{-1} 에서 탐지된다(ArNH₂에 대한 C-H 굴곡, N-H 굴곡). 포화 C-H, 올레핀, 방향족 환, 이중 및 삼중 결합, 에스테르, 아세탈, 케탈, 암모늄 염, N-O 화합물(예: 옥심, 니트로, N-옥사이드 및 니트레이트), 아조, 하이드라존, 퀴논, 카복실산, 아마이드 및 락탐 모두는 진동 적외선 상관 데이터를 보유한다[참조:Pretsch et al., Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds, Springer-Verlag, New York, 1989]. 바람직한 화합물은 2230 내지 2210 cm^{-1} 에서 매우 강한 니트릴 스트레칭 진동을 나타내는 방향족 니트릴을 포함할 것이다. 기타 유용한 유형의 화합물은 2140 cm^{-1} 와 2100 cm^{-1} 사이에 가파른 흡광 밴드를 유발시키는 강력한 스트레칭 진동을 지니는 방향족 알킨이다. 제3 화합물 유형은 2160 내지 2120 cm^{-1} 영역에서 강력한 흡광 밴드를 나타내는 방향족 아지드이다. 티오시아네이트는 2275 내지 2263 cm^{-1} 에서 강력한 흡광도를 나타내는 대표적인 화합물이다.

c. UV 태그의 특징

유기 발색단 유형 및 이들 각각의 UV-가시적 성질의 복잡성이 스코트[참조:Scott, Interpretation of the UV Spectra of Natural Products, Pergamon Press, New York, 1962]에 의해 제시된다. 발색단은 특정한 광흡수에 대해 책임이 있는 원자 또는 원자나 전자의 그룹이다. 접합된 시스템에서 π 내지 π^* 최대에 대한 실험상 물이 존재한다[참조:Pretsch et al., Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds, p.B65 and B70, Springer-Verlag, New York, 1989]. 바람직한 화합물(접합된 시스템을 가짐)은 n 내지 π^* 및 π 내지 π^* 전이를 보유한다. 이러한 화합물은 산 바

이올렛 7, 아크리딘 오렌지, 아크리딘 엘로우 G, 브릴리언트 블루 G, 콩고 레드, 크리스탈 바이올렛, 말라키트 그린 옥살레이트, 메타닐 엘로우, 메틸렌 블루, 메틸 오렌지, 메틸 바이올렛 B, 나프톨 그린 B, 오일 블루 N, 오일 레드 O, 4-페닐아조페놀, 사프라니 O, 솔벤트 그린 3, 및 수단 오렌지 G로 예시되며, 이들 모두는 시판되고 있다[Aldrich, Milwaukee, WI]. 기타 적합한 화합물이, 예를 들면, 문헌[참조: Jane, I., et al., J. Chrom. 323:191-225(1985)]에 열거되어 있다.

d. 형광성 태그의 특징

형광성 프로브는 이들의 흡광도와 형광성 방출 파장 및 세기에 의해 가장 직접적으로 동정하고 정량화한다. 방출 스펙트럼(형광성 및 인광성)이 흡광 스펙트럼 보다 훨씬 더 민감하고 보다 특이적으로 측정하게 해준다. 여기된 상태의 반감기 및 형광 비등방성 등의 기타 광물리학적 특징은 보다 덜 광범위하게 사용된다. 일반적으로 가장 유용한 세기 파라미터는 흡광에 대해서는 몰 소광 계수(ϵ)이고 형광에 대해서는 양자 수득률(QY)이다. ϵ 의 값은 단일 파장에서 명시되는 반면(통상적으로 프로브의 흡광 최대), QY는 전체 형광 스펙트럼 프로필에 걸친 총 광자 방출의 측정치이다. 협소한 광학 밴드폭(<20nm)이 통상적으로 (흡광을 통하여) 형광 여기에 사용되는 반면, 형광 탐지 밴드폭은 최대 민감도에 대한 완전한 스펙트럼으로부터 최대 분해에 대한 좁은 밴드(~20nm) 까지 범위로 훨씬 더 가변적이다. 프로브 분자당 형광 세기는 ϵ 및 QY의 산물에 비례한다. 현재 실질적으로 중요한 발색단 중에서 이들 파라미터의 범위는 ϵ 의 경우에는 대략 10,000 내지 100,000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 이고 QY에 대해서는 0.1 내지 1.0이다. 형광성 태그로서 작용할 수 있는 화합물은 다음과 같다: 플루오레세인, 로다민, 람다 블루 470, 람다 그린, 람다 레드 664, 람다 레드 665, 아크리딘 오렌지 및 프로피듐 요오다이드[이들 모두는 Lambda Fluorescence Co.(Pleasant Gap, PA)로부터 시판되고 있다]. 닐 레드, 텍사스 레드, 리사민TM, BODIPYTM 등의 형광성 화합물은 Molecular Probes(Eugene, OR)로부터 시판되고 있다.

e. 전위차적 태그의 특징

전기화학적 탐지(ECD)의 원리는 특정 인가 전압에서, 전자가 제공되거나 허용됨으로써 측정될 수 있는 전류를 생성시키는 화합물의 산화 또는 환원을 근거로 한 것이다. 특정 화합물을 대상으로 전위차를 적용하면, 이러한 분자는 전자의 손실(산화) 또는 획득(환원)을 수반하는 작동 전극 표면에서의 분자 재배열이 진행되며, 이러한 화합물을 전자적이 된다고 언급하고 이에 전기 화학적 반응이 진행된다. EC 탐지기는 HPLC 용출액이 흐르는 전극 표면에 전압을 적용한다. 전기 활성 화합물은 실제 시간에 전류 피크를 발생시키면서, 컬럼으로부터 제공된 전자(산화) 또는 획득된 전자(환원)를 방출시킨다. 중요하게는, 발생된 전류의 양은 분석물의 농도와 인가 전압 모두에 의해 좌우되며, 이때 각 화합물은 산화 또는 환원되기 시작하는 특정 전압을 갖는다. 현재 가장 대중적으로 사용되고 있는 전기화학적 탐지기는 전위가 일정하게 유지되고 전기 화학적 반응으로부터 발생된 전류가 측정되는 전류 탐지기이다. 이러한 유형의 분광분석법은 현재 "일정 전위 전류법"으로 명명된다. ESA, Inc.(Chelmsford, MA)로부터 시판되고 있는 전류계가 있다.

탐지 효율이 100%인 경우, 이와 같이 전문화된 탐지기를 "전기량" 탐지기로 명명한다. 전기량 탐지기는 이들 유형의 탐지기가 특정 어레이에 유용하도록 만드는 선별도 및 민감도와 관련하여 수 많은 실제적인 잇점을 지니도록 민감하다. 전기량 탐지기에서, 소정 농도의 분석물에 대해, 단일 전류를 작동 전극에 대한 인가 전위(전압)의 함수로서 플롯팅한다. 이로써 생성된 S자형 그래프를 전류-전압 곡선 또는 동력학적 볼타마그램(voltammogram)(HDV)으로 칭한다. HDV는 관찰된 시그널을 최대화해주는 작동 전극에 대한 인가 전위를 가장 잘 선택하게 해준다. ECD의 주요 장점은 서브펩토몰(subfemtomole) 범위에서 전류 탐지 수준을 지니면서 이의 고유한 민감도이다.

수 많은 생화학물질, 약제 및 살충제를 포함하여, 수 많은 화학물질 및 화합물이 전기 화학적으로 활성이 있다. 크로마토그래피적으로 공용출되는 화합물은 이들의 반-파 전위(시그널 최대 절반에서의 전위)가 30 내지 60mV로만 상이한 경우 일지라도 효과적으로 분해될 수 있다.

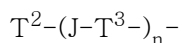
최근에 개발된 전기량 센서는 액체 크로마토그래피 근거한 분리법에서 탐지기로서 사용되는 경우에, 공용출되는 화합물의 민감도, 이의 동정 및 분해를 제공해준다. 따라서, 이들 어레이된 탐지기는 이러한 탐지기 자체에서 수행된 또 다른 셋트의 분리를 부가해준다. 전류 측정은 원칙적으로 데이터가 획득될 수 있는 속도에 의해서만 제한되는 16 채널을 갖는다. EC 어레이 상에서 분해될 수 있는 수 많은 화합물은 크로마토그래피적으로 제한된다(즉, 플레이트 카운트 제한됨). 그러나, 크로마토그래피적으로 공용출되는 둘 이상의 화합물이 30 내지 60mV의 반 파 전위차를 가지는 경우, 이러한 어레이는 상기 화합물을 구별할 수 있다. 특정 화합물이 전기화학적 활성 능력을 지니는지의 여부는 EC 활성 그룹(즉, -OH, -O, -N, -S)의 보유에 좌우된다.

전기량 탐지기를 사용하여 성공적으로 탐지되는 화합물로는 5-하이드록시트리프타민, 3-메톡시-4-하이드록시페닐-글리콜, 호모젠티스산, 도파민, 메탄프린, 3-하이드록시키누레닌르, 아세토미노펜, 3-하이드록시트리프톨, 5-하이드록시인돌

아세트산, 옥탄설폰산, 페놀, o-크레졸, 피로갈룰, 2-니트로페놀, 4-니트로페놀, 2,4-디니트로페놀, 4,6-디니트로크레졸, 3-메틸-2-니트로페놀, 2,4-디클로로페놀, 2,6-디클로로페놀, 2,4,5-트리클로로페놀, 4-클로로-3-메틸페놀, 5-메틸페놀, 4-메틸-2-니트로페놀, 2-하이드록시아닐린, 4-하이드록시아닐린, 1,2-페닐렌디아민, 벤조카테킨, 부투론, 클로르톨루론, 디우론, 이소프로투론, 리누론, 메토브로무론, 메톡시우론, 모놀리누론, 모누론, 메티오닌, 트립토판, 티로신, 4-아미노벤조산, 4-하이드록시벤조산, 4-하이드록시쿠마르산, 7-메톡시쿠마린, 아피게닌, 바이칼레인, 카페산, 카테킨, 센타우레인, 클로로젠산, 다이드제인, 다티세틴, 디오스메틴, 에피카테킨 갈레이트, 에피갈로 카테킨, 에피갈로 카테킨 갈레이트, 유게놀, 유파토린, 퍼룰산, 피세틴, 갈란긴, 갈산, 가르데닌, 게니스테인, 겐티스산, 헤스페리딘, 이리게닌, 카엠페롤, 류코아니딘, 루테올린, 만고스틴, 모린, 미리세틴, 나린긴, 나리루틴, 페라르곤딘, 페오니딘, 프롤레틴, 프라텐세인, 프로토카테쿠산, 람네티, 케르세틴, 사쿠라네티, 스쿠텔라레인, 스코폴레틴, 시린지알데히드, 시린지산, 탄게리틴, 트록세루틴, 움벨리페론, 바닐산, 1,3-디메틸 테트라하이드로이소퀴놀린, 6-하이드록시도파민, r-살소리놀, N-메틸-r-살소리놀, 테트라하이드로이소퀴놀린, 아미트립틸린, 아포모르핀, 캅사이신, 클로르디아제폭사이드, 클로르프로마진, 다우노루비신, 데시프라민, 독세핀, 플루오세틴, 프롤라제팜, 이미프라민, 이소프로테레놀, 메톡사민, 모르핀, 모르핀-3-글루쿠로니드, 노르트리프틸린, 옥사제팜, 페닐에프린, 트리미프라민, 아스코르브산, N-아세틸 세로토닌, 3,4-디하이드록시벤질아민, 3,4-디하이드록시만델산(DOMA), 3,4-디하이드록시페닐아세트산(DOPAC), 3,4-디하이드록시페닐알라닌(L-DOPA), 3,4-디하이드록시페닐글리콜(DHPG), 3-하이드록시아트라닐산, 2-하이드록시페닐아세트산(2HPAC), 4-하이드록시벤조산(4HBAC), 5-하이드록시인돌-3-아세트산(5HIAA), 3-하이드록시키누레닌, 3-하이드록시만델산, 3-하이드록시-4-메톡시페닐에틸아민, 4-하이드록시페닐아세트산(4HPAC), 4-하이드록시페닐락트산(4HPLA), 5-하이드록시트립토판(5HTP), 5-하이드록시트립토폴(5HTOL), 5-하이드록시트립타민(5HT), 5-하이드록시트립타민 설페이트, 3-메톡시-4-하이드록시페닐글리콜(MHPG), 5-메톡시트립타민, 5-메톡시트립토판, 5-메톡시트립토폴, 3-메톡시티라민(3MT), 3-메톡시티로신(3-OM-DOPA), 5-메틸시스테인, 3-메틸구아닌, 부토테닌, 도파민, 도파민-3-글루쿠로니드, 도파민-3-설페이트, 도파민-4-설페이트, 에피네프린, 에피닌, 폴산, 글루타티온(환원됨), 구아닌, 구아노신, 호모겐티스산(HGA), 호모바닐산(HVA), 호모바닐릴 알콜(HVOL), 호모베라트산, 호바 설페이트, 하이폭산틴, 인돌, 인돌-3-아세트산, 인돌-3-락트산, 키누레닌, 펠라토닌, 메탄프린, N-메틸트립타민, N-메틸티라민, N,N-디메틸트립타민, N,N-디메틸티라민, 노르에피네프린, 노르메탄에프린, 옥토파민, 피리독살, 피리독살 포스페이트, 피리독스아민, 신에프린, 트립토폴, 트립타민, 티라민, 우르산, 바닐릴만델산(vma), 크산틴 및 크산토신이 있다. 기타 적합한 화합물은 문헌[참조: Jane, I. et al., J. Chrom. 323:191-225(1985) and Musch, G., et al., J. Chron.348:97-110(1985)]에 제시되어 있다. 이들 화합물은 당해 분야에 공지된 방법에 의해 화학식 T-L-X의 화합물 내로 혼입될 수 있다. 예를 들면, 카복실산 그룹을 갖는 화합물을 아민, 하이드록실 등과 반응시켜 T와 L사이에 아마이드, 에스테르 및 기타 연결을 형성할 수 있다.

상기 성질 이외에 및 의도된 탐지 방법에 상관없이, 태그가 모듈라 화학 구조를 갖는 것이 바람직하다. 이는 조합 화학 기술을 사용하여 다수의 구조적으로 관련된 태그를 작제하는데 도움을 준다. 예를 들면, T^{ms} 그룹은 바람직하게는 몇몇 특성을 지닌다. 이는 바람직하게는, T^{ms} 함유 잔기를 대상으로 질량 분광분석법을 수행하는 경우에 단일 이온화 전하 상태를 지지해주는 작용성 그룹(보다 간단하게는, "질량 스펙 민감도 증진제" 그룹 또는 MSSE로서 지칭됨)을 함유한다. 또한, 상기 그룹은 바람직하게는, T^{ms} 함유 그룹 계열에서 한 구성원으로서 작용할 수 있는데, 여기서 상기 계열의 구성원 각각은 상이한 질량/전하비를 지니지만, 질량 분광계에서 대략적으로 동일한 민감도를 지닌다. 따라서, 상기 계열의 구성원들은 바람직하게는 동일한 MSSE를 갖는다. 화합물 계열의 생성을 허용하기 위해서는, 모듈라 합성 개략도를 통하여 태그 반응물을 제조하는 것이 편리한 것으로 밝혀졌으며, 따라서 태그 성분 스스로가 모듈을 포함하는 것으로 간주될 수 있다.

T^{ms} 그룹의 구조에 대한 바람직한 모듈라 접근법에 있어서, T^{ms} 은 다음 화학식을 갖는다:



상기식에서,

T²는 질량 범위가 15 내지 500달톤인, 탄소와 수소, 플루오라이드, 요오다이드, 산소, 질소, 황 및 인 중의 하나 이상으로부터 형성된 유기 잔기이고,

T³는 질량 범위가 50 내지 1000달톤인, 탄소와 수소, 플루오라이드, 요오다이드, 산소, 질소, 황 및 인 중의 하나 이상으로부터 형성된 유기 잔기이고,

J는 직접 결합이거나, 아미드, 에스테르, 아민, 설페이드, 에테르, 티오에스테르, 디설페이드, 티오에테르, 우레아, 티오우레아, 카바메이트, 티오카바메이트, 시프 염기, 환원된 시프 염기, 이민, 옥심, 하이드라존, 포스페이트, 포스포네이트, 포스포아미드, 포스포아미드, 설포네이트, 설포아미드 또는 탄소-탄소 결합 등의 작용성 그룹이며,

n은 1 내지 50의 정수이고 n이 1을 초과하는 경우, 각 T^3 및 J는 독립적으로 선택된다.

모듈라 구조 $T^2-(J-T^3-)_n$ 은 T-L-X 화합물 계열 내로의 도입을 편리하게 해주며, 여기서 상기 계열의 각 구성원은 상이한 T 그룹을 갖는다. 예를 들면, T가 T^{2ms} 이고 각 계열 구성원이 동일한 MSSE를 갖는 것이 바람직한 경우, T^3 그룹 중의 하나가 이러한 MSSE 구조를 제공할 수 있다. T^{ms} 의 질량 측면에서 특정 계열의 구성원들 간의 가변성을 제공하기 위해서는, T^2 그룹이 계열 구성원 간에 다양할 수 있다. 예를 들면, 하나의 계열 구성원은 T^2 =메틸을 가질수 있는 반면, 또 다른 구성원은 T^2 =에틸을 가질수 있으며 또 다른 구성원은 T^2 =프로필 등을 가진다.

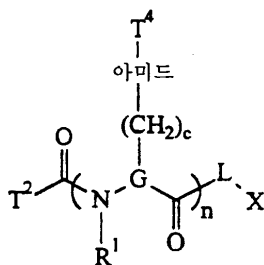
질량의 "그로스" 또는 상당한 급등을 제공하기 위해서는, 상당한(예를 들면, 수 백개) 질량 유닛을 T-L-X에 가하도록 T^3 그룹을 고안할 수 있다. 이러한 T^3 그룹을 분자량 범위 조정제 그룹("WRA")로서 지칭할 수 있다. WRA는 제한된 범위에 걸쳐 확장되는 질량을 지니게 될 단일 세트의 T^2 그룹을 사용하여 작동되는 경우에 다소 유용하다. 단일 세트의 T^2 그룹을 사용하여, 하나 이상의 WRA T^3 그룹을 T^{ms} 내로 간단히 혼입함으로써 광범위한 질량을 갖는 T^{ms} 그룹을 생성시킬 수 있다. 따라서, 간단한 예를 이용하여, 특정 세트의 T^2 그룹이 T^{ms} 에 대해 250 내지 340달톤의 질량 범위를 부여하는 경우, T^3 그룹에서 예시된 바와 같이 100달톤을 갖는 단일 WRA를 첨가하게 되면, 동일한 세트의 T^2 그룹을 사용하면서 350 내지 440달톤의 질량 범위에 근접하게 된다. 유사하게, (각각 T^3 그룹으로서의) 2개의 100달톤 MWA 그룹을 첨가하게 되면, 450 내지 540달톤의 질량 범위에 근접하게 되며, 여기서 이와 같이 WRA 그룹을 증액해서 첨가하는 것을 지속적으로 수행하여 T^{ms} 그룹에 대해 상당히 큰 질량 범위에 근접할 수 있다. 바람직한 화학식 $T^2-(J-T^3-)_n-L-X$ 의 화합물은 화학식 $R_{VWC}-(R_{WRA})_w-R_{MSSE}-L-X$ (여기서, VWC는 " T^2 " 그룹이고 각각의 WRA 및 MSSE 그룹은 " T^3 " 그룹이다)을 갖는다. 이러한 구조는 도 13에 도시되어 있으며 이는 T^{ms} 의 제조에 대한 하나의 모듈라 접근을 나타낸다.

화학식 $T^2-(J-T^3-)_n$ 에 있어서, T^2 및 T^3 는 바람직하게는 하이드로카빌, 하이드로카빌-O-하이드로카빌렌, 하이드로카빌-S-하이드로카빌렌, 하이드로카빌-NH-하이드로카빌렌, 하이드로카빌-아미드-하이드로카빌렌, N-(하이드로카빌)하이드로카빌렌, N,N-디(하이드로카빌)하이드로카빌렌, 하이드로카빌아실-하이드로카빌렌, 헤테로사이클릴하이드로카빌(여기서, 헤테로원자는 산소, 질소, 황 및 인 중에서 선택된다), 치환된 헤테로사이클릴하이드로카빌(여기서, 헤테로원자는 산소, 질소, 황 및 인 중에서 선택되고 치환체는 하이드로카빌, 하이드로카빌-O-하이드로카빌렌, 하이드로카빌-NH-하이드로카빌렌, 하이드로카빌-S-하이드로카빌렌, N-(하이드로카빌)하이드로카빌렌, N,N-디(하이드로카빌)하이드로카빌렌 및 하이드로카빌아실-하이드로카빌렌 중에서 선택된다) 중에서 선택된다. 또한, T^2 및/또는 T^3 은 앞서 열거된 전위 T^2/T^3 그룹 중의 어떠한 유도체일 수 있기 때문에, 하나 이상의 수소가 플루오라이드로 대체된다.

또한, 화학식 $T^2-(J-T^3-)_n$ 에 관해서, 바람직한 T^3 -은 $-G(R^2)-$ [여기서, G는 단일 R^2 치환체를 갖는 C_{1-6} 알킬렌쇄이다]이다. 따라서, G가 에틸렌($-CH_2-CH_2-$)인 경우, 2개의 에틸렌 탄소 중의 하나가 R^2 치환체를 가질 수 있으며, R^2 는 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 아릴 융합된 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 아릴, 아르알킬, 아릴 치환된 알케닐 또는 알키닐, 사이클로알킬 치환된 알킬, 사이클로알케닐 치환된 사이클로알킬, 비아릴, 알콕시, 알케녹시, 알키녹시, 아르알콕시, 아릴 치환된 알케녹시 또는 알키녹시, 알킬아미노, 알케닐아미노 또는 알키닐아미노, 아릴 치환된 알킬아미노, 아릴 치환된 알케닐아미노 또는 알키닐아미노, 아릴옥시, 아릴아미노, N-알킬우레아 치환된 알킬, N-아릴우레아 치환된 알킬, 알킬카보닐아미노 치환된 알킬, 아미노카보닐 치환된 알킬, 헤테로사이클릴, 헤테로사이클릴 치환된 알킬, 헤테로사이클릴 치환된 아미노, 카복시알킬 치환된 아르알킬, 옥소카보사이클릴 융합된 아릴 및 헤테로사이클릴알킬; 사이클로알케닐, 아릴 치환된 알킬, 및 아르알킬, 하이드록시 치환된 알킬, 알콕시 치환된 알킬, 아르알콕시 치환된 알킬, 알콕시 치환된 알킬, 아르알콕시 치환된 알킬, 아미노 치환된 알킬, (아릴 치환된 알킬옥시카보닐아미노) 치환된 알킬, 티올 치환된 알킬, 알킬설폰릴 치환된 알킬, (하이드록시 치환된 알킬티오) 치환된 알킬, 티오알콕시 치환된 알킬, 하이드로카빌아실아미노 치환된 알킬, 헤테로사이클릴아실아미노 치환된 알킬, 하이드로카빌 치환된 헤테로사이클릴아실아미노 치환된 알킬, 알킬설폰

닐아미노 치환된 알킬, 아릴설폰닐아미노 치환된 알킬, 모르폴리노-알킬, 티오모르폴리노-알킬, 모르폴리노 카보닐 치환된 알킬, 티오모르폴리노카보닐 치환된 알킬, [N-(알킬, 알케닐 또는 알키닐)- 또는 N,N-[디알킬, 디알케닐, 디알키닐 또는 (알킬, 알케닐)-아미노]카보닐 치환된 알킬, 헤테로사이클릴아미노카보닐, 헤테로사이클릴알킬렌아미노카보닐, 헤테로사이클릴아미노카보닐 치환된 알킬, 헤테로사이클릴알킬렌아미노카보닐 치환된 알킬, N,N-[디알킬]알킬렌아미노카보닐, N,N-[디알킬]알킬렌아미노카보닐 치환된 알킬, 알킬 치환된 헤테로사이클릴카보닐, 알킬 치환된 헤테로사이클릴카보닐-알킬, 카복실 치환된 알킬, 디알킬아미노 치환된 아실아미노알킬, 및 아르기닌, 아스파라긴, 글루타민, S-메틸 시스테인, 메티오닌 및 이의 상응하는 설폭사이드 및 설폰 유도체, 글리신, 루이신, 이소루이신, 알로-이소루이신, 3급 루이신, 노르루이신, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 프롤린, 알라닌, 오르니틴, 히스티딘, 글루타민, 발린, 트레오닌, 세린, 아스파르트산, 베타-시아노알라닌 및 알로트레오닌 중에서 선택된 아미노산 측쇄; 알리닐 및 헤테로사이클릴카보닐, 아미노카보닐, 아미도, 모노- 또는 디알킬아미노카보닐, 모노 또는 디아릴아미노카보닐, 알킬아릴아미노카보닐, 디아릴아미노카보닐, 모노- 또는 디아실아미노카보닐, 방향족 또는 지방족 아실; 및 아미노, 카복시, 하이드록시, 머캅토, 모노- 또는 디알킬아미노, 모노- 또는 디아릴아미노, 알킬아릴아미노, 디아릴아미노, 모노- 또는 디아실아미노, 알콕시, 알케녹시, 아릴옥시, 티오알콕시, 티오알케녹시, 티오알키녹시, 티오아릴옥시 및 헤테로사이클릴 중에서 선택된 치환체에 의해 임의로 치환된 알킬이다.

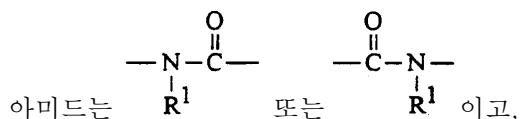
바람직한 화학식 $T^2-(J-T^3-)_n-L-X$ 는 다음 구조를 갖는다:



상기 구조에서,

G는 1개의 CH_2 그룹 상의 수소 및 단일 "G"로 나타낸 단지 1개의 CH_2 그룹 만이 $-(CH_2)_c$ -아미드- T^4 로 대체되도록 하는 $(CH_2)_{1-6}$ 이고,

T^2 및 T^4 는 식 $C_{1-25}N_{0-9}O_{0-9}H_aF_\beta$ 의 유기 잔기(여기서, α 및 β 의 합은 달리 언급되지 않는 한 C, N 및 O 원자의 원자수를 충족시키기에 충분하다)이며,

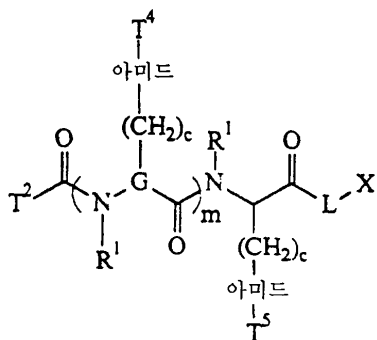


R^1 은 수소 또는 C_{1-10} 알킬이며,

c는 0 내지 4의 정수이고,

n은 1 내지 50의 정수이며, n이 1을 초과하는 경우, G, c, 아미드, R^1 및 T^4 는 독립적으로 선택된다.

추가적 바람직한 양태에 있어서, 화학식 $T^2-(J-T^3-)_n-L-X$ 의 화합물은 다음 구조를 갖는다:



상기 구조에서,

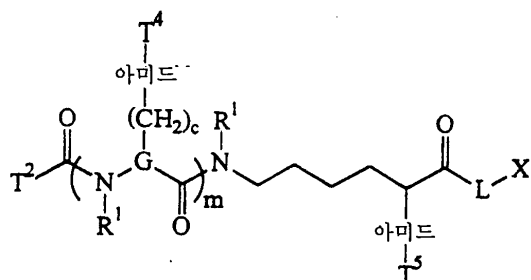
T^5 는 식 $C_{1-25}N_{0-9}O_{0-9}H_{\alpha}F_{\beta}$ 의 유기 잔기(여기서, α 및 β 의 합은 달리 언급되지 않는 한 C, N 및 O 원자의 원자수를 충족시키기에 충분하다)이며,

T^5 는 3급 또는 4급 아민 또는 유기 산을 포함하고,

m 은 0 내지 49 범위의 정수이며,

T^2 , T^4 , R^1 , L 및 X는 앞서 정의된 바와 같다.

화학식 $T^2-(J-T^3-)_n-L-X$ 의 또 다른 화합물은 다음 구조를 갖는다:



상기 구조에서,

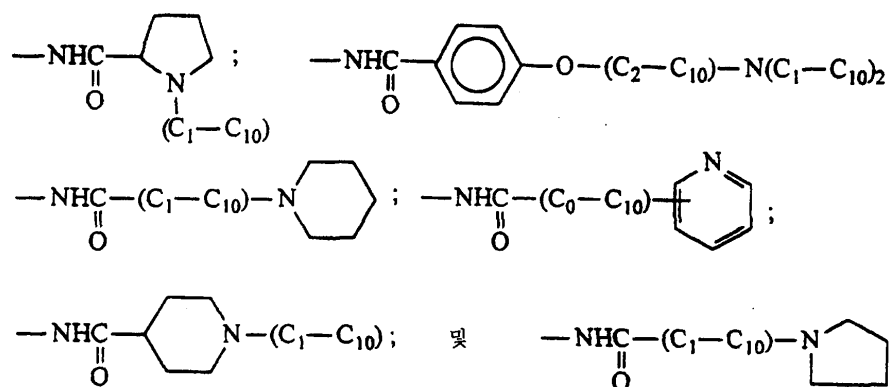
T^5 는 식 $C_{1-25}N_{0-9}O_{0-9}H_{\alpha}F_{\beta}$ 의 유기 잔기(여기서, α 및 β 의 합은 달리 언급되지 않는 한 C, N 및 O 원자의 원자수를 충족시키기에 충분하다)이며,

T^5 는 3급 또는 4급 아민 또는 유기 산을 포함하고,

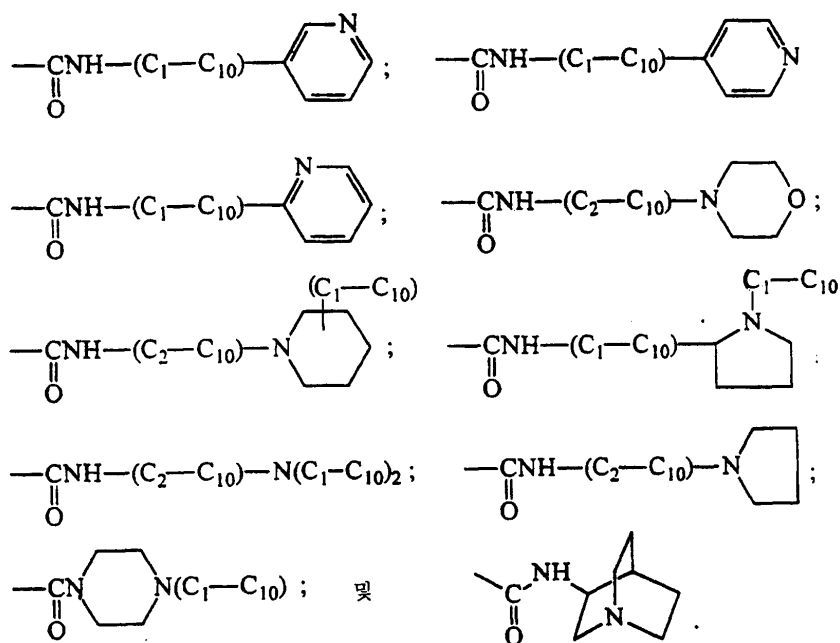
m 은 0 내지 49 범위의 정수이며,

T^2 , T^4 , c , R^1 , "아미드", L 및 X는 앞서 정의된 바와 같다.

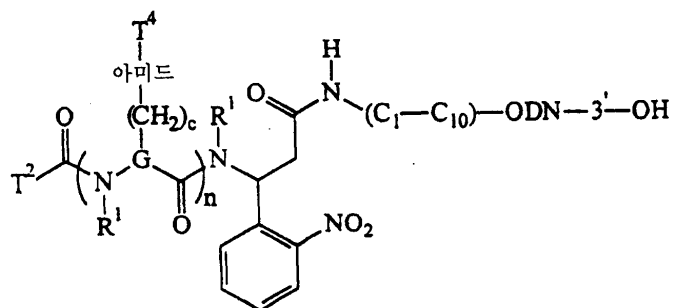
T^5 그룹을 갖는 상기 구조에 있어서, -아미드- T^5 는 바람직하게는 다음 것들 중의 하나이고, 이들은 유기산을 "G"로부터 연장되는 유리 아미노 그룹과 반응시킴으로써 편리하게 제조된다:



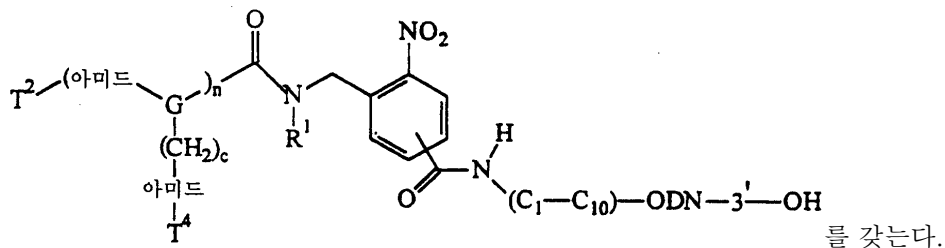
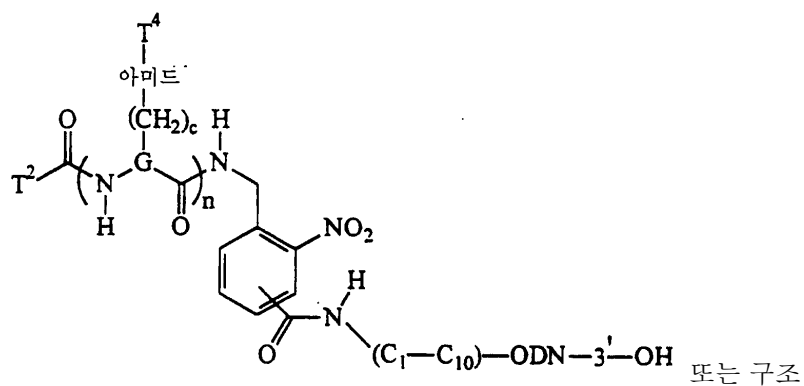
상기 화합물이 T^5 그룹을 지니고 "G" 그룹이 유리 카복실 그룹(또는 이의 반응성 등가물)을 지니는 경우, 다음 그룹이 바람직한 -아미드- T^5 그룹이며, 이들은 적당한 유기 아민을 "G" 그룹로부터 연장되는 유리 카복실 그룹과 반응시킴으로써 편리하게 제조될 수 있다:



본 발명의 3가지 바람직한 양태에 있어서, T-L-MOI는 구조



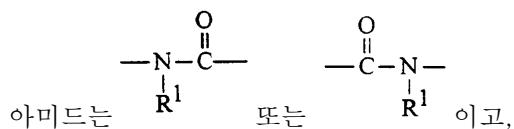
, 구조



상기 구조에서,

T^2 및 T^4 는 식 $C_{1-25}N_{0-9}O_{0-9}S_{0-3}P_{0-3}H_{\alpha}\beta\gamma$ 의 유기 잔기(여기서, α , β 및 γ 의 합은 달리 언급되지 않는 한 C, N, O, S 및 P 원자의 원자수를 충족시키기에 충분하다)이며,

G는 1개의 CH_2 그룹 및 각 G로 나타낸 CH_2 그룹 상의 1개의 수소만이 $-(CH_2)_c$ -아미드- T^4 로 대체되도록 하는 $(CH_2)_{1-6}$ 이고,



R^1 은 수소 또는 C_{1-10} 알킬이며,

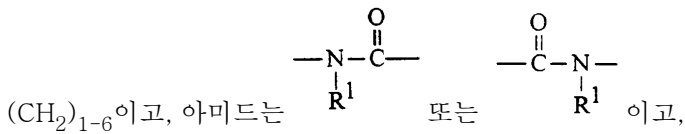
c 는 0 내지 4의 정수이고,

" C_2-C_{10} "는 탄소수 2 내지 10의 하이드로카빌렌 그룹을 나타내며,

"ODN-3'-OH"는 말단 3' 하이드록실 그룹을 갖는 핵산 단편(즉, 이러한 핵산 단편의 3' 말단 이외에서 (C_1-C_{10}) 에 연결된 핵산 단편)을 나타내고,

n 은 1 내지 50의 정수이며, n 이 1을 초과하는 경우, G, c , 아미드, R^1 및 T^4 는 독립적으로 선택된다.

바람직하게는 단일 탄소 원자에 3개의 헤테로원자가 결합되지 않는 다. 상기 구조에서, T² 및 T⁴는 식 C₁₋₂₅N₀₋₉O₀₋₉H_αF_β의 유기 잔기(여기서, α 및 β의 합은 달리 언급되지 않는 한 C, N 및 O 원자의 원자수를 충족시키기에 충분하다)이며, G는 1개의 CH₂ 그룹 및 각 G로 나타난 CH₂ 그룹 상의 1개의 수소 만이 -(CH₂)_c-아미드-T⁴로 대체되도록 하는



R¹은 수소 또는 C₁₋₁₀ 알킬이며, c는 0 내지 4의 정수이고, "ODN-3'-OH"는 말단 3' 하이드록실 그룹을 갖는 핵산 단편을 나타내고, n은 1 내지 50의 정수이며, n이 1을 초과하는 경우, G, c, 아미드, R¹ 및 T⁴는 독립적으로 선택된다.

T²-C(=O)-N(R¹)- 그룹을 함유하는 상기 제시된 바와 같은 구조에 있어서, 이러한 그룹은 NH(R¹)-의 아민을 다음 중에서 선택된 유기 산(이들 모두는 단지 예시적이며 가능한 유기 산을 총망라하게 열거한 것은 아니다)과 반응시킴으로써 형성시킬 수 있다: 포름산, 아세트산, 프로피올산, 프로피온산, 플루오로아세트산, 2-부티노산, 사이클로프로판카복실산, 부티르산, 메톡시아세트산, 디플루오로아세트산, 4-펜티노산, 사이클로부탄카복실산, 3,3-디메틸아크릴산, 발레산, N,N-디메틸글리신, N-포밀-Gly-OH, 에톡시아세트산, (메틸티오)아세트산, 피롤-2-카복실산, 3-푸로산, 이속사졸-5-카복실산, 트랜스-3-헥세노산, 트리플루오로아세트산, 헥사노산, Ac-Gly-OH, 2-하이드록시-2-메틸부티르산, 벤조산, 니코틴산, 2-피라진카복실산, 1-메틸-2-피롤카복실산, 2-사이클로펜텐-1-아세트산, 사이클로펜틸아세트산, (S)-(-)-2-피롤리돈-5-카복실산, N-메틸-L-프롤린, 헵타노산, Ac-b-Ala-OH, 2-에틸-2-하이드록시부티르산, 2-(2-메톡시에톡시)아세트산, p-톨루산, 6-메틸니코틴산, 5-메틸-2-피라진카복실산, 2,5-디메틸피롤-3-카복실산, 4-플루오로벤조산, 3,5-디메틸이속사졸-4-카복실산, 3-사이클로펜틸프로피온산, 옥타노산, N,N-디메틸석신남산, 페닐프로피올산, 신남산, 4-에틸벤조산, p-아니스산, 1,2,5-트리메틸피롤-3-카복실산, 3-플루오로-4-메틸벤조산, Ac-DL-프로파길글리신, 3-(트리플루오로메틸)부티르산, 1-피페리딘프로피온산, N-아세틸프롤린, 3,5-디플루오로벤조산, Ac-L-Val-OH, 인돌-2-카복실산, 2-벤조푸란카복실산, 벤조트리아졸-5-카복실산, 4-n-프로필벤조산, 3-디메틸아미노벤조산, 4-에톡시벤조산, 4-(메틸티오)벤조산, N-(2-푸로일)글리신, 2-(메틸티오)니코틴산, 3-플루오로-4-메톡시벤조산, Tfa-Gly-OH, 2-나프토산, 퀴날딘산, Ac-L-Ile-OH, 3-메틸인덴-2-카복실산, 2-퀴놀린카복실산, 1-메틸인돌-2-카복실산, 2,3,6-트리플루오로벤조산, N-포밀-L-Met-OH, 2-[2-(2-메톡시에톡시)에톡시]아세트산, 4-n-부틸벤조산, N-벤조일글리신, 5-플루오로인돌-2-카복실산, 4-n-프로폭시벤조산, 4-아세틸-3,5-디메틸-2-피롤카복실산, 3,5-디메톡시벤조산, 2,6-디메톡시니코틴산, 사이클로헥산펜타노산, 2-나프틸아세트산, 4-(1H-피롤-1-일)벤조산, 인돌-3-프로피온산, m-트리플루오로메틸벤조산, 5-메톡시인돌-2-카복실산, 4-페닐벤조산, Bz-b-Ala-OH, 4-디에틸아미노벤조산, 4-n-부톡시벤조산, 3-메틸-5-CF₃-이속사졸-4-카복실산, (3,4-디메톡시페닐)아세트산, 4-비페닐카복실산, 피발로일-Pro-OH, 옥타노일-Gly-OH, (2-나프톡시)아세트산, 인돌-3-부티르산, 4-(트리플루오로메틸)페닐아세트산, 5-메톡시인돌-3-아세트산, 4-(트리플루오로메톡시)벤조산, Ac-L-Phe-OH, 4-펜틸옥시벤조산, Z-Gly-OH, 4-카복시-N-(푸르-2-일메틸)피롤리딘-2-온, 3,4-디에톡시벤조산, 2,4-디메틸-5-CO₂Et-피롤-3-카복실산, N-(2-플루오로페닐)석신남산, 3,4,5-트리메톡시벤조산, N-페닐안트라닐산, 3-페녹시벤조산, 노나노일-Gly-OH, 2-페녹시피리딘-3-카복실산, 2,5-디메틸-1-페닐피롤-3-카복실산, 트랜스-4-(트리플루오로메틸)신남산, (5-메틸-2-페닐옥사졸-4-일)아세트산, 4-(2-사이클로헥세닐옥시)벤조산, 5-메톡시-2-메틸인돌-3-아세트산, 트랜스-4-코틴카복실산, Bz-5-아미노발레르산, 4-헥실옥시벤조산, N-(3-메톡시페닐)석신남산, Z-Sar-OH, 4-(3,4-디메톡시페닐)부티르산, Ac-o-플루오로-DL-Phe-OH, N-(4-플루오로페닐)글루타람산, 4'-에틸-4-비페닐카복실산, 1,2,3,4-테트라하이드로아크리딘카복실산, 3-페녹시페닐아세트산, N-(2,4-디플루오로페닐)석신남산, N-데카노일-Gly-OH, (+)-6-메톡시-a-메틸-2-나프탈렌아세트산, 3-(트리플루오로메톡시)신남산, N-포밀-DL-Trp-OH, (R)-(+)-a-메톡시-a-(트리플루오로메틸)페닐아세트산, Bz-DL-Leu-OH, 4-(트리플루오로메톡시)페녹시아세트산, 4-헵틸옥시벤조산, 2,3,4-트리메톡시신남산, 2,6-디메톡시벤조일-Gly-OH, 3-(3,4,5-트리메톡시페닐)프로피온산, 2,3,4,5,6-펜타플루오로페녹시아세트산, N-(2,4-디플루오로페닐)글루타람산, N-운데카노일-Gly-OH, 2-(4-플루오로벤조일)벤조산, 5-트리플루오로메톡시인돌-2-카복실산, N-(2,4-디플루오로페닐)디글리콜아민, Ac-L-Trp-OH, Tfa-L-페닐글리신-OH, 3-요오도벤조산, 3-(4-n-펜틸벤조일)프로피온산, 2-페닐-4-퀴놀린카복실산, 4-옥틸옥시벤조산, Bz-L-Met-OH, 3,4,5-트리에톡시벤조산, N-라우로일-Gly-OH, 3,5-비스(트리플루오로메틸)벤조산, Ac-5-메틸-DL-Trp-OH, 2-요오도페닐아세트산, 3-요오도-4-메틸벤조산, 3-(4-n-헥실벤조일)프로피온산, N-헥사노일-L-Phe-OH, 4-노닐옥시벤조산, 4'-(트리플루오로메틸)-2-비페닐카복실산, Bz-L-Phe-OH, N-트리데카노일-Gly-OH, 3,5-비스(트리플루오로메틸)페닐아세트산, 3-(4-n-헵틸벤조일)프로피온산, N-헵타노일-L-Phe-OH, 4-데실옥시벤조산, N-(α,α,α-트리플루오로-m-톨릴)안트라닐산, 니플롬산, 4-(2-하이드록시

헥사플루오로이소프로필)벤조산, N-미리스토일-Gly-OH, 3-(4-n-옥틸벤조일)프로피온산, N-옥타노일-L-Phe-OH, 4-운데실옥시벤조산, 3-(3,4,5-트리메톡시페닐)프로피오닐-Gly-OH, 8-요오도나프토산, N-펜타데카노일-Gly-OH, 4-도데실옥시벤조산, N-팔미토일-Gly-OH 및 N-스테아로일-Gly-OH. 이들 유기산은 다음 제조기관[참조:Advanced Chem Tech, Louisville, KY; Bachem Bioscience Inc., Torrance, CA; Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA; Farchan Laboratories Inc., Gainesville FL; Lancaster Synthesis, Windham NH; and MayBridge Chemical Company(c/o Ryan Scientific), Columbia, SC] 중의 하나 이상의 기관으로부터 시판되고 있다. 이들 회사로부터의 카타로그는 산을 동정하기 위해 앞서 사용되는 약어를 사용하고 있다.

f. 태그를 제조하기 위한 수단으로서의 조합 화학

조합 화학은 큰 화학적 라이브러리의 생산을 유도하는 합성 방법의 한 유형이다[예를 들면, PCT 공개공보 제WO 94/08051 참조]. 이들 조합 라이브러리는 관심있는 분자(MOI)를 동정하기 위한 태그로서 사용될 수 있다. 조합 화학은 다양한 구조의 상이한 "빌딩 블록" 셋트를 서로 체계적이고도 반복적으로 공유 연결시켜 다양한 분자 존재물의 큰 어레이를 생성시키는 것으로서 정의될 수 있다. 빌딩 블록은 수 많은 천연 및 합성 형태를 취할 수 있으며, 예를 들면, 친핵체, 친전자체, 디엔, 알킬화 또는 아실화제, 디아민, 뉴클레오타이드, 아미노산, 당, 지질, 유기 단량체, 실패 및 이들의 배합물이 있다. 빌딩 블록을 연결하기 위해 사용되는 화학 반응은 알킬화, 아실화, 산화, 환원, 가수분해, 치환, 제거, 부가, 폐환, 축합 반응 등을 포함할 수 있다. 이러한 공정은 올리고머성, 비올리고머성 또는 이들의 조합물인 화합물의 라이브러리를 생산할 수 있다. 올리고머성인 경우, 상기 화합물은 측쇄, 비측쇄 또는 사이클릭일 수 있다. 조합 방법에 의해 제조될 수 있는 올리고머성 구조의 예로는 올리고펩티드, 올리고뉴클레오타이드, 올리고사카라이드, 폴리지질, 폴리에스테르, 폴리아미드, 폴리우레탄, 폴리우레아, 폴리에테르, 폴리(인 유도체), 예를 들면, 포스페이트, 포스포네이트, 포스포르아미드, 포스포아미드, 포스파이드, 포스포아미드 등, 및 폴리(황 유도체), 예를 들면, 설펜, 설펜네이트, 설펜아이드, 설펜아미드, 설펜아미드 등이 있다.

통상적인 유형의 올리고머성 조합 라이브러리의 한 예는 펩티드 조합 라이브러리이다. 최근 펩티드 화학 및 분자 생물학 분야에서의 혁신으로 인해, 수천만 내지 수억의 상이한 펩티드 서열로 구성되는 라이브러리를 제조하여 사용할 수 있다. 이러한 라이브러리는 3가지 넓은 카테고리로 나눌 수 있다. 하나의 카테고리는 가용성 비-지지체 결합된 펩티드 라이브러리를 화학적으로 합성한 것을 포함한다[참조:Houghten et al., Nature 354:84, 1991]. 두 번째 카테고리는 플라스틱 핀, 수지 비드 또는 면 등의 고체 지지체 상에 존재하는, 지지체 결합된 펩티드 라이브러리를 화학적으로 합성한 것을 포함한다[참조:Geysen et al., Mol. Immunol. 23:709, 1986; Lam et al., Nature 354:82, 1991; Eichler and Houghten, Biochemistry 32:11305, 1993]. 이들 2가지 카테고리에서, 빌딩 블록은 전형적으로 L-아미노산, D-아미노산, 천연이 아닌 아미노산, 또는 이들의 몇몇 혼합물 또는 조합물이다. 세 번째 카테고리는 섬유상 파아지 입자 또는 플라스틱미드의 표면에 펩티드 또는 단백질을 제조하기 위해 분자 생물학적 접근 방법을 이용한다[참조:Scott and Craig, Curr. Opinion Biotech. 5:40, 1994]. 가용성의 비-지지체 결합된 펩티드 라이브러리는 태그로서 사용하는 것을 포함하여 수 많은 적용 분야에 적합한 것으로 여겨진다. 펩티드 라이브러리에서의 이용 가능한 화학적 다양성 레파토리는 과메틸화화 같은 단계에 의해 확장될 수 있다[참조:Ostresh et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91:11138, 1994].

펩티드 주쇄가 변형되고/되거나 아미드 결합이 모사 그룹으로 대체된, 펩티드 조합 라이브러리의 수 많은 변이체가 가능하다. 사용될 수 있는 아미드 모사 그룹으로는 우레아, 우레탄 및 카보닐메틸렌 그룹이 있다. 측쇄가 알파 탄소 보다는 오히려 각 아미노산의 아미드 질소로부터 나오도록 주쇄를 재구성하면, 펩토이드로서 공지된 화합물의 라이브러리가 제공된다[참조:Simon et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89:9367, 1992].

또 다른 통상 유형의 올리고머성 조합 라이브러리는 올리고뉴클레오타이드 조합 라이브러리인데, 여기서 빌딩 블록은 각종 유기 및 무기 그룹이 포스페이트 결합으로 치환될 수 있고 질소 또는 황이 에테르 결합에서 산소로 치환될 수 있는 것을 포함하여 천연 또는 비-천연 뉴클레오타이드 또는 폴리사카라이드 유도체의 몇몇 형태이다[참조:Schneider et al., Biochem. 34:9599, 1995; Freier et al., J.Med.Chem. 38:344, 1995; Frank, J. Biotechnology 41:259, 1995; Schneider et al., Published PCT WO 942052; Ecker et al., Nucleic Acids Res. 21:1853, 1993].

보다 최근에, 비올리고머성의 작은 분자 화합물의 집단을 조합적으로 생산하는 방법이 기술되었다[참조:DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90:690, 1993; Bunin et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91:4708, 1994]. 작은 분자 라이브러리로 만드는데 적합한 구조는 광범위한 유기 분자, 예를 들면, 헤테로사이클릭 화합물, 방향족 화합물, 지환족 화합물, 지방족 화합물, 스테로이드, 항생제, 효소 억제제, 리간드, 호르몬, 약물, 알카로이드, 오피오이드, 테르펜, 포르피린, 독신, 촉매 뿐만 아니라 이들의 배합물을 포괄한다.

g. 태그의 조합적 합성에 특이적인 방법

다양한 세트의 아민 함유 MS 태그를 제조하고 사용하기 위한 2가지 방법이 다음에 열거되어진다. 양 방법에서, 고체상 합성을 이용하여, 조합 화학 기술을 활용하여 수 많은 태그 부착된 링커를 동시에 나란히 합성할 수 있다. 첫 번째 방법에서는, 올리고뉴클레오타이드로부터 태그를 절단하여, 결과적으로 카복실 아마이드를 방출시킨다. 두 번째 방법에서는, 태그를 절단하여 카복실산을 생성시킨다. 이들 방법에 사용된 화학 성분 및 연결 요소는 다음과 같이 약어된다:

R = 수지

FMOC = 플루오레닐메톡시카보닐 보호 그룹

All = 알릴 보호 그룹

CO₂H = 카복실산 그룹

CONH₂ = 카복실릭 아마이드 그룹

NH₂ = 아미노 그룹

OH = 하이드록실 그룹

CONH = 아마이드 결합

COO = 에스테르 결합

NH₂-Rink-CO₂H = 4-[(α-아미노)-2,4-디메톡시벤질]-페녹시부티르산(Rink 링커)

OH-1MeO-CO₂H = (4-하이드록시메틸)페녹시부티르산

OH-2MeO-CO₂H = (4-하이드록시메틸-3-메톡시)페녹시아세트산

NH₂-A-COOH = 측쇄에 지방족 또는 방향족 아민 작용기를 갖는 아미노산

X1....Xn-COOH = 독특한 분자량을 갖는 다양한 카복실산 세트

올리고1...올리고(n) = 올리고뉴클레오타이드 세트

HBTU = O-벤조트리아졸-1-일-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트

방법 1에서 단계 순서는 다음과 같다:

OH-2MeO-CONH-R

↓ FMOC-NH-Rink-CO₂H; 커플(예: HBTU)

FMOC-NH-Rink-COO-2MeO-CONH-R

↓ 피페리딘(FMOC 제거)

NH₂-Rink-COO-2MeO-CONH-R

↓ FMOC-NH-A-COOH; 커플(예: HBTU)

FMOC-NH-A-CONH-Rink-COO-2MeO-CONH-R

↓ 피페리딘(FMOC 제거)

NH₂-A-CONH-Rink-COO-2MeO-CONH-R

↓ n개의 분취량으로 나눔

↓↓↓↓↓ n개의 상이한 산 X1...Xn-COOH로 커플

X1...Xn-CONH-A-CONH-Rink-COO-2MeO-CONH-R

↓↓↓↓↓ 1% TFA를 이용하여 수지로부터 태그 부착된 링커를 절단함

X1...Xn-CONH-A-CONH-Rink-CO₂H

↓↓↓↓↓ n 올리고(올리고1...올리고(n))에 커플(예:Pfp 에스테르를 포함)

X1...Xn-CONH-A-CONH-Rink-CONH-올리고1...올리고(n)

↓ 태그 부착된 올리고를 풀링함

↓ 서열분석 반응을 수행

↓ 서열분석 반응으로부터 상이한 길이 단편을 분리(예:HPLC 또는 CE를 포함)

↓ 25 내지 100% TFA를 사용하여 링커로부터 태그를 절단함

X1...Xn-CONH-A-CONH

↓

질량 분광분석법에 의해 분석함

방법 2에서의 단계 순서는 다음과 같다:

OH-1MeO-CO₂-All

↓ FMOC-NH-A-CO₂H;커플(예:HBTU)

FMOC-NH-A-COO-1MeO-CO₂-All

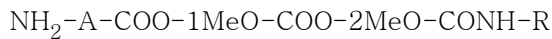
↓ 팔라듐(알릴 제거)

FMOM-NH-A-COO-1MeO-CO₂H

↓ OH-2MeO-COOH-R;커플(예:HBTU)

FMOC-NH-A-COO-1MeO-COO-2MeO-CONH-R

↓ 피페리딘(FMOC 제거)

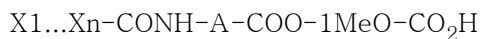


↓ n개의 분취량으로 나눔

↓↓↓↓↓ n개의 상이한 산 X1...Xn-COH 로 커플



↓↓↓↓↓ 1% TFA를 이용하여 수지로부터 태그 부착된 링커를 절단함



↓↓↓↓↓ n 올리고(올리고1...올리고(n))에 커플(예:Pfp 에스테르를 포함)



↓ 태그 부착된 올리고를 풀링함

↓ 서열분석 반응을 수행

↓ 서열분석 반응으로부터 상이한 길이 단편을 분리(예:HPLC 또는 CE를 통

함)

↓ 25 내지 100% TFA를 사용하여 링커로부터 태그를 절단함



↓

질량 분광분석법에 의해 분석함

2. 링커

본원에서 사용된 바와 같은 "링커" 성분(또는 L)은 직접 공유 결합이거나, 또는 공유 화학 결합을 통하여 "태그"(또는 T)를 "관심있는 분자"(또는 MOI)에 연결시키는데 사용되는 유기 화학 그룹을 의미한다. 또한, 직접 결합 자체, 또는 링커 성분 내의 하나 이상의 결합은, T를 T-L-X 화합물(MOI 성분을 포함)의 나머지 부분으로부터 방출시킬 수 있는(달리 말하면, 절단시킬 수 있는) 조건하에서 절단 가능하다. T 내에 존재하는 태그 가변 성분은 이러한 절단 조건에 대해 안정적이어야 한다. 바람직하게는, 이러한 절단은 수 분내, 바람직하게는 약 15초 이하로 신속하게 수행할 수 있다.

일반적으로, 링커를 사용하여 각 다수 세트의 태그를 각각의 유사하게 큰 세트의 MOIs에 연결시킨다. 전형적으로, 단일 태그-링커 연결체를 (각종 T-L-MOI를 제공하기 위하여 각 MOI에 부착시키지만, 몇몇 경우에는, 하나 이상의 태그-링커 연결체를 (각종 (T-L)_n-MOI를 제공하기 위하여) 각각의 개별적인 MOI에 부착시킬 수 있다. 본 발명의 또 다른 양태에 있어서, 링커 상의 다중의 독립적인 부위를 통하여 둘 이상의 태그를 단일 링커에 결합한 다음, 이러한 다중 태그-링커 연결체를 (각종 (T)_n-L-MOI를 제공하기 위하여) 개별적인 MOI에 결합시킨다.

태그 부착된 MOIs 세트를 다양하게 조작한 후, 특정 화학적 및/또는 물리적 조건을 사용하여 링커 내의 하나 이상의 공유 결합을 절단시키면, 상기 MOIs로부터 태그가 방출된다. 이러한 절단 가능한 결합은 태그, 링커 및 MOI가 함께 연결될 때 형성되는 동일한 결합 중의 일부이거나 그렇지 않을 수도 있다. 링커의 고안은 대부분 절단이 수행될 수 있는 조건을 결정할 것이다. 따라서, 링커는 이들이 특별하게 영향을 받기 쉬운 절단 조건에 의해 동정될 수 있다. 링커가 빛에 불안정한 경

우(즉, 화학 방사선에 대한 노출에 의해 절단되기 쉬운 경우), 이러한 링커는 L^{hv} 로서 명칭될 수 있다. 마찬가지로, 명칭 L^{acid} , L^{base} , $L^{[O]}$, $L^{[R]}$, L^{enz} , L^{elc} , L^{Δ} 및 L^{ss} 은 특히 산, 염기, 화학적 산화, 화학적 환원, 효소의 촉매적 활성(더욱 간단하게는 "효소"), 전기화학적 산화 또는 환원, 승온("열") 및 티올 교환에 의해 각각 절단되기 쉬운 링커를 지칭하는데 사용할 수 있다.

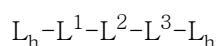
특정 유형의 링커는 단일 유형의 절단 조건에 불안정한 반면, 다른 링커는 수 가지 유형의 절단 조건에 불안정하다. 또한, [(T)m-L-MOI 유형 구조를 제공하기 위하여) 다중 태그를 결합시킬 수 있는 링커에서는, 각각의 태그 결합 부위가 상이한 절단 조건에 불안정할 수 있다. 예를 들면, 2개의 태그가 결합되는 링커에서는, 이러한 태그 중의 하나가 염기에만 불안정할 수 있고 다른 하나가 광분해에만 불안정할 수 있다.

본 발명에 유용한 링커는 다음 몇몇 잇점을 지니고 있다:

- 1) 링커는 이를 MOI에 부착시킬 수 있는 화학적 핸들(L_h)을 지닌다.
- 2) 링커는 태그를 이러한 링커에 부착시킬 수 있는 제2의 별도의 화학적 핸들(L_h)을 지닌다. 다중 태그가 단일 링커에 부착되는 경우[(T)n-L-MOI 유형 구조], 각 태그에 대해 별개의 핸들이 존재한다.
- 3) 링커는 이에 대해 수행되는 모든 조작에 대해 안정적이지만, T 함유 잔기가 MOI를 포함하는 화합물의 나머지 부분으로부터 방출되도록 절단해주는 조건의 예외이다. 따라서, 이러한 링커는 태그를 링커에 부착시키는 동안, 링커를 MOI에 부착시키는 동안, 및 태그와 링커(T-L)를 MOI에 부착시키면서 MOI에 대한 어떠한 조작을 하는 동안에도 안정적이다.
- 4) 링커는 T-L을 MOI에 부착시키는 동안 이러한 MOI에 대해 수행된 조작을 실질적으로 방해하지 않는다. 예를 들면, T-L을 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 경우, T-L은 이러한 올리고뉴클레오타이드에 대해 수행된 어떠한 하이브리드화 또는 효소적 반응(예:PCR)도 실질적으로 방해하지 말아야 한다. 유사하게, T-L이 항체에 부착된 경우, 이는 이러한 항체에 의한 항원 인식을 실질적으로 방해하지 말아야 한다.
- 5) 화합물의 나머지 부분으로부터의 태그 절단은 태그의 탐지능에 불리한 영향을 미치지 않는 물리적 또는 화학적 방법을 사용하여 고도로 조절된 방식으로 일어난다.

제시된 어떠한 링커에 대해서도, 링커를 광범위한 MOIs에 부착시킬 수 있고 광범위한 태그가 링커에 부착될 수 있는 것이 바람직하다. 이러한 가요성은 이로 인해 일단 제조된 T-L 접합체의 라이브러리가 수 가지 상이한 셋트의 MOIs를 사용할 수 있게 하기 때문에 유리하다.

앞서 언급된 바와 같이, 바람직한 링커는 다음 화학식을 갖는다:



상기식에서,

각 L_h 는 링커를 태그 반응물과 관심있는 분자 반응물에 연결하는데 사용될 수 있는 반응성 핸들이고,

L^2 은 링커의 필수 부분인데, 이는 L^2 이 링커에 불안정성을 부여하기 때문이고,

L^1 및 L^3 은 핸들 L_h 로부터 L^2 를 분리시키는데 효과적으로 작용하는 임의의 그룹이다.

L^1 (정의에 의하자면, L^3 보다는 T에 더 가깝다)은 필수 불안정한 잔기 L^2 로부터 T를 분리시키는 작용을 한다. 이러한 분리 절단 반응이 T 함유 잔기의 구조에서 랜덤한 변화를 야기시킬 수 있는 특성의 반응성 종류(예를 들면, 자유 라디칼)를 발생시킬 때 유용할 수 있다. 절단 부위가 T 함유 잔기로부터 추가로 분리됨에 따라, 이러한 절단 부위에 형성된 반응성 종류가 T 함유 잔기의 구조를 파손시킬 경향이 적어지게 된다. 또한, L^1 내의 원자가 전형적으로 T 함유 잔기에 존재하게 될

것이기 때문에, 이들 L^1 원자는 T 함유 잔기에 바람직한 특성을 부여할 수 있다. 예를 들면, T 함유 잔기가 T^{ms} 함유 잔기이고 장애된 아민이 바람직하게는 이러한 T^{ms} 함유 잔기 구조의 일부로서(예를 들면, MSSE로서 작용하기 위하여) 존재하는 경우, 이러한 장애된 아민은 L^1 불안정한 잔기에 존재할 수 있다.

다른 예에 있어서, L^1 및/또는 L^3 이 링커 성분 내에 존재할 수도 있는데, 이는 단지 링커 판매 공급자가 이러한 L^1 및/또는 L^3 그룹을 갖는 형태로 링커를 판매하는 것을 선택하였기 때문이다. 이러한 경우, L^1 및/또는 L^3 그룹을 갖는 링커가 이들을 혼입시킨 화합물에 대해 어떠한 특정 성능을 부여할 수 없긴 하지만, (이들 그룹이 절단 반응을 억제하지 않는 한은) 이들 링커를 사용하는데 유해하지는 않다. 따라서, 본 발명은 L^1 및/또는 L^3 그룹이 링커 성분 내에 존재할 수 있도록 해준다.

L^1 및/또는 L^3 그룹은 직접 결합(이러한 경우 상기 그룹이 효과적으로 존재하지 않는다), 하이드로카빌렌 그룹(예: 알킬렌, 아릴렌, 사이클로알킬렌 등), -O-하이드로카빌렌(예: -O-CH₂-, -O-CH₂CH(CH₃)- 등) 또는 하이드로카빌렌-(O-하이드로카빌렌)_w(여기서, w는 1 내지 약 10의 정수이다)(예: -CH₂-O-Ar-, -CH₂-(O-CH₂CH₂)₄- 등)일 수 있다.

고체상 합성의 출현과 함께, 특이적 반응 조건에 영향을 받기 쉬운 링커에 관한 상당 수의 문헌이 개발되었다. 전형적인 고체상 합성에서는, 고체 지지체가 불안정한 링커를 통하여 반응성 부위에 결합되고 합성될 분자가 이러한 반응성 부위에서 발생된다. 분자를 완전하게 합성한 후, 고체 지지체-링커-분자 작제물을 대상으로 절단 조건을 적용하여 고체 지지체로부터 분자를 방출시킨다. 이러한 맥락에서 사용하도록 개발된(또는 이러한 맥락에서 사용될 수 있는) 불안정한 링커는 본 발명에서 링커 반응물로서 또한 즉시 사용될 수 있다.

문헌[참조:Lloyd-Williams, P., et al., "Convergent Solid-Phase Peptide Synthesis", Tetrahedron Report No. 347, 49(48):11065-11133(1993)]은 화학 방사선(즉, 광분해) 뿐만 아니라 산, 염기 및 기타 절단 조건에 불안정한 링커에 관한 심도있는 논의를 제공해준다. 불안정한 링커에 관한 추가의 정보원은 당해 분야에 널리 공지되어 있다.

앞서 언급된 바와 같이, 상이한 링커 고안물은 상이한 특이적인 물리적 또는 화학적 조건하에서 절단능("불안정성")을 부여할 것이다. 각종 링커 고안물을 절단시키는 작용을 하는 조건의 예로는 산, 염기, 산화, 환원, 플루오라이드, 티올 교환, 광분해 및 효소적 조건이 있다.

앞서 열거된 링커에 대한 일반적인 기준을 충족시키는 절단 가능한 링커의 예는 당해 분야의 숙련인에게 널리 공지될 것이며 Pierce(Rockford, IL)로부터 입수 가능한 카타로그에서 발견되는 것들을 포함한다. 이의 예는 다음과 같다:

- 하이드록실아민에 의해 절단 가능한(37°C에서 3 내지 6시간 동안 1M) 아민 반응성 가교결합 시약인 에틸렌 글리코비스(석신이미딜석시네이트)(EGS);

- 0.015M 나트륨 페리오데이트에 의해 절단 가능한, 아민 반응성 가교결합 시약인 디석신이미딜 타르타레이트(DST) 및 설포-DST;

- 염기(pH 11.6)에 의해 절단 가능한, 아민 반응성 가교결합 시약인 비스[2-(석신이미딜옥시카보닐옥시)에틸]설포(BSOCOES) 및 설포-BSOCOES;

- 티올 교환 또는 환원에 의해 절단 가능한 피리딜리티올 가교결합제인 1,4-디-[3'-(2'-피리딜리티오(프로피온아미도))부탄(DPDPB)];

- 티올 교환 또는 환원에 의해 절단 가능한 피리딜리티올 가교결합제인 N-[4-(p-아지도살리실아미도)-부틸]-3'-(2'-피리딜리티오)프로피온아미드(APDP);

- 티올 교환 또는 환원에 의해 절단 가능한 광반응성 가교결합제인 비스-[베타-4-(아지도살리실아미도)에틸]-디설파이드;

- 티올 교환 또는 환원에 의해 절단 가능한 광반응성 가교결합제인 N-석신이미딜-(4-아지도페닐)-1,3'-디티오프로피오네이트(SADP);

· 티올 교환 또는 환원에 의해 절단 가능한 광반응성 가교결합제인 설포석신이미딜-2-(7-아지도-4-메틸쿠마린-3-아세트아미드)에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(SAED);

· 티올 교환 또는 환원에 의해 절단 가능한 광반응성 가교결합제인 설포석신이미딜-2-(m-아지도-o-니트로벤즈아미드)-에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(SAND).

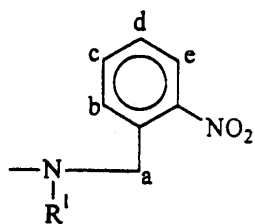
태그를 방출시키는데 사용될 수 있는 절단 가능한 링커 및 절단 조건의 기타 예는 다음과 같다. 실릴 연결 그룹은 플루오라이드에 의해 또는 산성 조건하에서 절단시킬 수 있다. 3-, 4-, 5- 또는 6-치환된-2-니트로벤질옥시 또는 2-, 3-, 5- 또는 6-치환된-4-니트로벤질옥시 연결 그룹은 광자 공급원에 의해 절단될 수 있다 (광분해). 3-, 4-, 5- 또는 6-치환된-2-알콕시페녹시 또는 2-, 3-, 5- 또는 6-치환된-4-알콕시페녹시 연결 그룹은 $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ (산화)에 의해 절단될 수 있다. NCO_2 (우레탄) 링커는 하이드록사이드(염기), 산 또는 LiAlH_4 (환원)에 의해 절단될 수 있다. 3-펜테닐, 2-부테닐 또는 1-부테닐 링킹 그룹은 O_3 , $\text{O}_5\text{O}_4/\text{IO}_4^-$ 또는 KMnO_4 (산화)에 의해 절단될 수 있다. 2-[3-, 4- 또는 5-치환된 푸릴]옥시 연결 그룹은 O_2 , Br_2 , MeOH 또는 산에 의해 절단될 수 있다.

기타 불안정한 연결 그룹의 절단 조건으로는 다음과 같은 것이 있다: t-알킬옥시 연결 그룹을 산에 의해 절단할 수 있고; 메틸(디알킬)메톡시 또는 4-치환된-2-알킬-1,3-디옥솔란-2-일 연결 그룹은 H_3O^+ 에 의해 절단할 수 있으며; 2-실릴에톡시 연결 그룹은 플루오라이드 또는 산에 의해 절단될 수 있고; 2-(X)-에톡시(여기서, X는 케토, 에스테르, 아미드, 시아노, NO_2 , 설파이드, 설폭사이드, 설펜이다) 연결 그룹은 알칼리성 조건에 의해 절단할 수 있으며; 2-, 3-, 4-, 5- 또는 6-치환된 벤질옥시 링킹 그룹은 산에 의해 또는 환원적 조건하에서 절단될 수 있고; 2-부테닐옥시 연결 그룹은 $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RhCl}(\text{H})$ 에 의해 절단될 수 있으며; 3-, 4-, 5- 또는 6-치환된-2-브로모페녹시 링킹 그룹은 Li, Mg 또는 BuLi에 의해 절단될 수 있고; 메틸티오메톡시 연결 그룹은 Hg^{2+} 에 의해 절단될 수 있고; 2-(X)-에틸옥시(여기서, X는 할로젠이다) 연결 그룹은 Zn 또는 Mg에 의해 절단될 수 있고; 2-하이드록시에틸옥시 연결 그룹은 산화(예를 들면, $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ 를 사용함)에 의해 절단될 수 있다.

바람직한 링커는 산 또는 광분해에 의해 절단되는 것이다. 고체상 펩티드 합성용으로 개발된 산-불안정한 몇몇 링커는 태그를 MOI에 연결하는데 유용하다. 이들 링커 중 일부가 최근 문헌[참조: Lloyd-Williams et al., Tetrahedron 49:11065-11133(1993)]에 기재되어 있다. 한가지 유용한 유형의 링커는 p-알콕시벤질 알콜을 기준으로 한 것이며, 이들 중 2가지, 즉 4-하이드록시메틸페녹시아세트산 및 4-(4-하이드록시메틸-3-메톡시페녹시)부티르산은 업체[Advanced Chem Tech, Louisville, KY]로부터 시판되고 있다. 양 링커를 벤질알콜에 대한 에스테르 결합을 통하여 태그에 부착시키고 카복실산에 대한 아미드 결합을 통하여 아민 함유 MOI에 부착시킬 수 있다. 이들 분자에 의해 연결된 태그는 트리플루오로아세트산의 농도를 다양하게 하면서 MOI로부터 방출시킨다. 이들 링커의 절단으로 인해, 태그 상의 카복실산이 유리된다. 2,4-디메톡시-4'-(카복시메틸옥시)-벤즈하이드릴아민(FMOC-보호된 형태로 Advanced Chem Tech로부터 시판 중임) 등의 관련 링커를 통하여 부착된 태그를 산 절단시키면, 이와 같이 방출된 태그 상의 카복실릭 아미드가 유리된다.

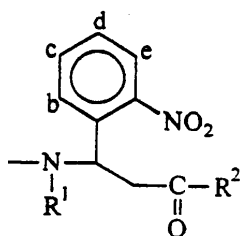
본원에 유용한 광불안정한 링커는 대부분이 또한 고체상 펩티드 합성용으로 개발되었다[Lloyd-Williams review 참조]. 이들 링커는 통상적으로 2-니트로벤질에스테르 또는 2-니트로벤질아미드를 기준으로 한 것이다. 최근 문헌에 보고된 광불안정한 링커의 2가지 예는 4-(4-(1-Fmoc-아미노)에틸)-2-메톡시-5-니트로페녹시)부타노산[Holmes and Jones, J. Org. Chem. 60:2318-2319, 1995] 및 3-(Fmoc-아미노)-3-(2-니트로페닐)프로피온산[Brown et al., Molecular Diversity 1:4-12, 1995]이다. 양 링커는 카복실산을 통하여 MOI 상의 아민에 부착시킬 수 있다. 태그를 이러한 링커에 부착시키는 것은 태그 상의 카복실산과 링커 상의 아민 간에 아미드를 형성함으로써 이루어진다. 광불안정한 링커의 절단은 통상적으로 당해 분야의 숙련인에게 공지된 세기 및 시간에서 350nm 파장의 UV 광선을 사용하여 수행한다. 링커의 절단으로 인해, 태그 상의 1급 아미드가 유리된다. 광절단 가능한 링커의 예로는 니트로페닐 글리신 에스테르, 엑소- 및 엔도-2-벤조노르보르네일 클로라이드 및 메탄 설포네이트, 및 3-아미노-3-(2-니트로페닐) 프로피온산이 있다. 효소적 절단의 예로는 에스테르 결합을 절단시킬 에스테라제, 포스포디에스테르 결합을 절단시킬 뉴클레아제, 펩티드 결합을 절단시킬 프로테아제 등이 있다.

바람직한 링커 성분은 다음에 나타낸 바와 같이 오르토-니트로벤질 구조를 갖는다:



여기서, a, b, c, d 또는 e 위치의 1개의 탄소 원자가 L^3-X 로 치환되고 L^1 (이는 바람직하게는 직접 결합이다)이 상기 구조에서 $N(R^1)$ 의 좌측에 존재한다. 이러한 링커 성분은 "a"로 표시된 탄소와 $N(R^1)$ 간의 결합을 선택적으로 광-유도하여 절단시키기 쉽다. R^1 의 정체는 전형적으로 절단 반응에 중요하지 않지만, R^1 은 바람직하게는 수소 및 하이드로카빌 중에서 선택된다. 본 발명은 상기 구조에서, $-N(R^1)-$ 이 $-O-$ 로 대체될 있음을 제공해준다. 또한, 상기 구조에서, b, c, d 또는 e 위치 중의 하나 이상의 위치가 알킬, 알콕시, 플루오라이드, 클로라이드, 하이드록실, 카복실레이트 또는 아마이드에 의해 임의로 치환될 수 있으며, 이들 치환체는 각각 독립적으로 선택된다.

화학적 핸들 L_n 을 갖는 추가의 바람직한 링커 성분은 다음 구조를 갖는다:



상기 구조에서, b, c, d 또는 e 위치 중의 하나 이상의 위치가 수소, 알킬, 알콕시, 플루오라이드, 클로라이드, 하이드록실, 카복실레이트 또는 아마이드에 의해 치환될 수 있고, R^1 은 수소 또는 하이드로카빌이며, R^2 은 $-OH$ 또는 또 다른 잔기와 커플링하기 위하여 카복실산을 보호하거나 이를 활성화시키는 그룹이다. 플루오로카본 및 하이드로플루오로카본 그룹은 또 다른 잔기와 커플링을 대하여 카복실산을 활성화시키는데 바람직한 그룹이다.

3. 관심있는 분자(MOI)

MOI의 예로는 핵산 또는 핵산 동족체(예: PNA), 핵산의 단편(즉, 핵산 단편), 합성 핵산 또는 단편, 올리고뉴클레오타이드(예: DNA 또는 RNA), 단백질, 펩티드, 항체 또는 항체 단편, 수용체, 수용체 리간드, 리간드 쌍의 구성원, 사이토킨, 호르몬, 올리고사카라이드, 합성 유기 분자, 약물 및 이들의 조합물이 있다.

바람직한 MOI는 핵산 단편이다. 바람직한 핵산 단편은 염기 서열분석용으로 사용되는 벡터에 존재하는 서열에 상보적인 프라이머 서열이다. 바람직하게는, 핵산 단편은 이러한 단편의 3' 말단 이외의 위치, 가장 바람직하게는 5' 말단에서 태그에 직접 또는 간접적으로 부착된다. 핵산 단편은 유전자 데이터베이스[참조:Dib et al., Nature 380:152-154, 1996 and CEPH Genotype Database, <http://www.cephb.fr>] 및 시판자[예를 들면, Promega, Madison, WI]를 근거로 하여 구입하거나 제조할 수 있다.

본원에서 사용된 바와 같이, MOI는 MOI를 T-L- L_n 화합물에 연결시키는데 유용한 작용기를 함유하는 MOI의 유도체를 포함한다. 예를 들면, 5' 말단에 포스포디에스테르를 갖는 핵산 단편(여기서, 포스포디에스테르는 또한 알킬렌아민에 결합된다)은 MOI이다. 이러한 MOI는 본원에 참조문헌으로 삽입된 미국 특허 제4,762,779호에 기재되어 있다. 내부 변형을 지닌 핵산 단편 또한 MOI이다. 핵산 단편의 내부 변형의 예는 염기(예: 아데닌, 구아닌, 시토신, 티미딘, 우라실)에 반응성 작용성 그룹을 부가하여 이를 변형시키는 것이다. 이와 같이 내부적으로 변형된 핵산 단편은, 예를 들면, Glen Research[Herndon, VA]로부터 시판되고 있다. 핵산 단편의 내부 변형의 또 다른 예는 비염기성 포스포르아미데이트를 사용하여 핵산 단편의 당과 포스페이트 그룹 간에 삽입되는 변형된 포스포디에스테르를 합성하는 것이다. 상기 비염기성

포스포르아미데이트는 이러한 포스포르아미데이트-유도된 잔기를 함유하는 핵산 단편이 또 다른 잔기, 예를 들면, T-L-L_n 화합물에 연결되도록 해주는 반응성 그룹을 함유한다. 이러한 비염기성 포스포르아미데이트는 예를 들면, Clontech Laboratories, Inc.(Palo Alto, CA)로부터 시판되고 있다.

4. 화학적 핸들(L_n)

화학적 핸들은 제1 분자의 일부로서 존재하는, 안정하지만 반응성인 원자상 배열이며, 여기서 핸들은 제2 분자의 일부로서 존재하는 상보 화학적 핸들과 화학 반응을 진행하여 두 분자 간에 공유 결합을 형성시킬 수 있다. 예를 들면, 이러한 화학적 핸들은 하이드록실 그룹일 수 있고 상보 화학적 핸들은 카복실산 그룹(또는 이의 활성화 유도체, 예를 들면, 하이드로플루오로아릴 에스테르)이며, 이때 이들 두 핸들 간의 반응으로 인해 두 분자를 함께 연결시켜 주는 공유 결합(특정하게는, 에스테르 그룹)이 형성된다.

화학적 핸들은 태그를 링커에 부착시키고 링커를 MOI에 부착시키는데 적합한 다수의 공유 결합-형성 반응에 사용할 수 있다. 이러한 반응으로는 알킬화(예를 들면, 에테르, 티오에테르를 형성하기 위함), 아실화(예를 들면, 에스테르, 아마이드, 카바메이트, 우레아, 티오우레아를 형성하기 위함), 포스포릴화(예를 들면, 포스페이트, 포스포네이트, 포스포르아미드, 포스폰아미드를 형성하기 위함), 설폰닐화(예를 들면, 설폰네이트, 설폰아미드를 형성하기 위함), 축합(예를 들면, 아민, 옥심, 하이드라존을 형성하기 위함), 실릴화, 디설파이드 형성, 및 광분해에 의해 니트렌 또는 카르벤 등의 반응성 중간체의 발생 반응이 있다. 일반적으로, 태그를 링커에 부착하는데 적합한 핸들 및 결합-형성 반응은 또한 링커를 MOI에 부착시키는데 적합하며 그 반대의 경우도 가능하다. 몇몇 경우에 있어서, MOI는 링커를 부착시키는데 필요한 핸들을 제공하기 위해 미리 변형 또는 유도체화 반응을 진행할 수 있다.

링커를 MOI에 부착시키는데 특히 유용한 결합의 한 가지 유형은 디설파이드 결합이다, 이를 형성시키는데는 링커 상의 티올 그룹("핸들")과 MOI 상의 또 다른 티올 그룹이 필요하다. 이때, 상기 2개의 티올 그룹을 티설파이드로서 함께 결합시키는데는 온순한 산화 조건이면 충분하다. 디설파이드 형성은 또한, 과량의 적당한 디설파이드 교환 시약, 예를 들면, 피리딜 디설파이드를 사용함으로써 유도될 수 있다. 디설파이드 형성은 용이하게 가역적이기 때문에, 이러한 디설파이드는 경우에 따라, 태그를 방출시키기 위한 절단 가능한 결합으로서 사용할 수도 있다. 이는 전형적으로 과량의 적당한 티올 교환 시약, 예를 들면, 디티오트레이틀을 사용하여 유사하게 온순한 조건하에서 수행한다.

태그(또는 링커를 지닌 태그)를 올리고뉴클레오타이드에 연결하는데 특히 관심있는 것은 아마이드 결합의 형성이다. 1급 지방족 아민 핸들은 6-모노메톡시트리틸헥실시아노에틸-N,N'-디이소프로필 포스포르아미다이트(Glen Research, Sterling, VA로부터 시판중임) 등의 포스포르아미다이트를 사용하여 합성 올리고뉴클레오타이드 내로 용이하게 도입할 수 있다. 아데노신 및 구아노신 등의 천연 뉴클레오타이드에 발견된 아민은 도입된 1급 아민과 비교할 때 거의 비-반응성이다. 이러한 반응성의 차이로 인해, 뉴클레오타이드 아민이 아닌, 도입된 1급 아민을 갖는 아마이드 및 관련 결합 그룹(예를 들면, 우레아, 티오우레아, 설폰아미드)을 선택적으로 형성시킬 수 있는 능력에 대한 기준이 형성된다.

분자 프로브 카타로그(Eugene, OR)에 열거된 바와 같이, 아민-반응성 작용성 그룹의 부분 목록으로는 활성화 카복실릭 에스테르, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 설폰릴 할라이드 및 디클로로트리아젠이 있다. 활성화 에스테르는 아민 변형에 탁월한 시약인데, 이는 형성된 아마이드 생성물이 매우 안정하기 때문이다. 또한, 이들 시약은 지방족 아민과의 반응성이 우수하고 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 아민과의 반응성이 낮다. 활성화 에스테르의 예로는 N-하이드록시석신아미드 에스테르, 펜타플루오로페닐 에스테르, 테트라플루오로페닐 에스테르 및 p-니트로페닐 에스테르가 있다. 활성화 에스테르는 이들이 카복실산을 함유하는 사실상 거의 모든 분자로부터 제조되기 때문에 유용하다. 활성화 에스테르를 제조하는 방법은 문헌[참조:Bodansky, Principles of Peptide Chemistry(2d ed.), Springer Verlag, London, 1993]에 열거되어 있다.

5. 링커 부착

전형적으로, 단일 유형의 링커를 사용하여 특정 세트 또는 계열의 태그를 특정 세트 또는 계열의 MOI에 연결시킨다. 본 발명의 바람직한 양태에 있어서, 단일의 균일한 과정이 수행되어 각종 T-L-MOI 구조 모두를 생성시킬 수 있다. 이는 일정 세트의 T-L-MOI 구조가 큰 경우에 특히 유리한데, 이는 조합 화학 또는 기타 병행되는 프로세싱 기술의 방법을 사용하여 상기 세트를 제조할 수 있기 때문이다. 유사한 방식으로, 단일 유형의 링커 사용으로 인해, 모든 각종 T-L-MOI 구조를 절단하는데 단일의 균일한 과정이 사용될 수 있게 된다. 다시 언급하면, 이는 큰 세트의 T-L-MOI 구조에 유리한데, 이는 상기 세트가 병행, 반복적 및/또는 자동화 방식으로 프로세싱될 수 있기 때문이다.

그러나, 본 발명의 다른 양태에서는, 2가지 이상 유형의 링커를 사용하여 상이한 서브셋트의 태그를 상응하는 서브셋트의 MOI에 연결시킨다. 이러한 경우, 다른 서브셋트의 MOI에 존재하는 링커를 절단하지 않고서도, 선택적인 절단 조건을 사용하여 각각의 링커를 독립적으로 절단할 수 있다.

다수의 공유 결합-형성 반응이 태그를 링커에 부착시키고 링커를 MOI에 부착시키는데 적합하다. 이러한 반응으로는 알킬화(예를 들면, 에테르, 티오에테르를 형성하기 위함), 아실화(예를 들면, 에스테르, 아마이드, 카바메이트, 우레아, 티오우레아를 형성하기 위함), 포스포릴화(예를 들면, 포스페이트, 포스포네이트, 포스포르아미드, 포스포아미드를 형성하기 위함), 설폰화(예를 들면, 설폰네이트, 설폰아미드를 형성하기 위함), 축합(예를 들면, 아민, 옥심, 하이드라존을 형성하기 위함), 실릴화, 디설파이드 형성, 및 광분해에 의해 니트렌 또는 카르벤 등의 반응성 중간체의 생성 반응이 있다. 일반적으로, 태그를 링커에 부착하는데 적합한 헨들 및 결합-형성 반응은 또한 링커를 MOI에 부착시키는데 적합하며 그 반대의 경우도 가능하다. 몇몇 경우에 있어서, MOI는 링커를 부착시키는데 필요한 헨들을 제공하기 위해 미리 변형 또는 유도체화 반응을 진행할 수 있다.

링커를 MOI에 부착시키는데 특히 유용한 결합의 한 가지 유형은 디설파이드 결합이다, 이를 형성시키는데는 링커 상의 티올 그룹("헨들")과 MOI 상의 또 다른 티올 그룹이 필요하다. 이때, 상기 2개의 티올 그룹을 티설파이드로서 함께 결합시키는데는 온순한 산화 조건이면 충분하다. 디설파이드 형성은 또한, 과량의 적당한 디설파이드 교환 시약, 예를 들면, 피리딜 디설파이드를 사용함으로써 유도될 수 있다. 디설파이드 형성은 용이하게 가역적이기 때문에, 이러한 디설파이드는 경우에 따라, 태그를 방출시키기 위한 절단 가능한 결합으로서 사용할 수도 있다. 이는 전형적으로 과량의 적당한 티올 교환 시약, 예를 들면, 디티오트레이톨을 사용하여 유사하게 온순한 조건하에서 수행한다.

태그를 올리고뉴클레오타이드에 연결하는데 특히 관심있는 것은 아마이드 결합의 형성이다. 1급 지방족 아민 헨들은 6-모노메톡시트리틸헥실시아노에틸-N,N'-디이소프로필 포스포르아미다이트(Glenn Research, Sterling, VA로부터 시판중임) 등의 포스포르아미다이트를 사용하여 합성 올리고뉴클레오타이드 내로 용이하게 도입할 수 있다. 아데노신 및 구아노신 등의 천연 뉴클레오타이드에 발견된 아민은 도입된 1급 아민과 비교할 때 거의 비-반응성이다. 이러한 반응성의 차이로 인해, 뉴클레오타이드 아민이 아닌, 도입된 1급 아민을 갖는 아마이드 및 관련 결합 그룹(예를 들면, 우레아, 티오우레아, 설폰아미드)을 선택적으로 형성시킬 수 있는 능력에 대한 기준이 형성된다.

분자 프로브 카타로그(Eugene, OR)에 열거된 바와 같이, 아민-반응성 작용성 그룹의 부분 목록으로는 활성화 카복실릭 에스테르, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 설폰일 할라이드 및 디클로로트리아젠이 있다. 활성화 에스테르는 아민 변형에 탁월한 시약인데, 이는 형성된 아마이드 생성물이 매우 안정하기 때문이다. 또한, 이들 시약은 지방족 아민과의 반응성이 우수하고 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 아민과의 반응성이 낮다. 활성화 에스테르의 예로는 N-하이드록시석신아미드 에스테르, 펜타플루오로페닐 에스테르, 테트라플루오로페닐 에스테르 및 p-니트로페닐 에스테르가 있다. 활성화 에스테르는 이들이 카복실산을 함유하는 사실상 거의 모든 분자로부터 제조되기 때문에 유용하다. 활성화 에스테르를 제조하는 방법은 문헌[참조:Bodansky, Principles of Peptide Chemistry(2d ed.), Springer Verlag, London, 1993]에 열거되어 있다.

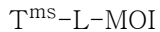
링커로서 작용할 수 있는 수 많은 시판용 가교결합 시약이 존재한다[참조:Pierce Cross-links, Pierce Chemical Co., Rockford, IL]. 이들 중의 일부는 호모이작용성 이미도에스테르 및 N-하이드록시석신이미드(NHS) 에스테르로 예시되는 호모이작용성 아민-반응성 가교결합 시약이다. 또한, 일련의 반응을 허용해주는 2개 이상의 상이한 반응성 그룹을 갖는 헤테로이작용성 가교결합 시약도 존재한다. 이미도에스테르는 알칼리성 pH에서 아민과 신속하게 반응된다. NHS 에스테르는 1급 또는 2급 아민과 반응될 때 안정한 생성물을 제공해준다. 말레이미드, 알킬 및 아릴 할라이드, 알파-할로아실 및 피리딜 디설파이드는 티올 반응성이다. 말레이미드는 6.5 내지 7.5의 pH 범위 내에서 티올(설프하이드릴) 그룹에 대해 특이적이고 알칼리성 pH에서 아민 반응성이 될 수 있다. 티오에테르 결합은 생리학적 조건하에서 안정적이다. 알파-할로아세틸 가교결합 시약은 요오도아세틸 그룹을 함유하고 설프하이드릴에 대해 반응성이다. 이미다졸은 요오도아세틸 잔기와 반응되지만, 이러한 반응은 매우 느리다. 피리딜 디설파이드는 티올 그룹과 반응하여 디설파이드 결합을 형성시킨다. 카보디이미드는 카복실을 하이드라자이드의 1급 아민에 커플링시켜 아실-하이드라진 결합의 형성을 야기시킨다. 아릴아지드는 UV 또는 가시광선에 노출될 때까지 화학적으로 불활성인 광친화성 시약이다. 이러한 화합물을 250 내지 460nm에서 광분해하는 경우, 반응성 아릴 니트렌이 형성된다. 이러한 반응성 아릴 니트렌은 비교적 비-특이적이다. 글리옥살은 아르기닌의 구아니디닐 부분에 대하여 반응성이다.

본 발명의 한 가지 전형적인 양태에 있어서, 태그를 먼저 링커에 결합시킨 다음, 태그와 링커의 연결체를 MOI에 결합시켜 T-L-MOI 구조를 형성시킨다. 또 다른 방법으로는, 링커를 먼저 MOI에 결합시킨 다음 링커와 MOI의 연결체를 태그에 연

결시킴으로써 동일한 구조를 형성시킨다. 한 예는 MOI가 DNA 프라이머 또는 올리고뉴클레오티드인 경우이다. 이러한 경우, 태그를 전형적으로 먼저 링커에 결합시킨 다음, T-L을 DNA 프라이머 또는 올리고뉴클레오티드에 결합시킨 후, 이를 예를 들면, 서열 분석 반응에 사용한다.

특정 태그가 MOI(예를 들면, 올리고뉴클레오티드 또는 DNA 서열화 프라이머)에 가역적으로 부착될 수 있는 한 가지 유용한 형태는 화학적으로 불안정한 링커를 통해서이다. 링커에 대한 한 가지 바람직한 고안은 링커가 휘발성 유기 산, 예를 들면, 트리플루오로아세트산(TFA)에 노출될 때 절단될 수 있도록 해준다. TFA는 특히, 전기분무를 포함하여 대부분의 MS 이온화 방법에 부합된다.

다음에 언급되는 바와 같이, 본 발명은 핵산 분자의 서열을 결정하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법에 의해 형성될 수 있는 조성물은 다수의 다음 화학식의 화합물을 포함한다:



여기에서, T^{ms} 은 질량 분광분석법에 의해 탐지 가능한 유기 그룹이다. T^{ms} 은 탄소, 하나 이상의 수소 및 플루오라이드를 함유하고 산소, 질소, 황, 인 및 요오드를 포함하는 임의의 원자를 함유할 수도 있다. L은 상기 화합물을 절단 조건에 노출시킬 때 T^{ms} -함유 잔기를 상기 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되도록 해주는 유기 그룹이다. 이와 같이 절단된 T^{ms} -함유 잔기는 상기 다수의 화합물을 대상으로 하여 질량 분광분석법을 수행할 때 단일 이온화 전하 상태를 지지해주는 작용성 그룹을 포함한다. 이러한 작용성 그룹은 3급 아민, 4급 아민 또는 유기산일 수 있다. MOI는 MOI의 5' 말단을 통하여 L에 접합되는 핵산 단편이다. "접합된"이란 용어는 중간체 L과 MOI간에 화학적 그룹, 예를 들면, 포스포디에스테르 그룹 및/또는 알킬렌 그룹이 존재할 수 있다는 것을 의미한다. 이러한 핵산 단편은 벡터의 특정 부분에 상보적인 서열을 지닐 수 있으며, 여기서 이러한 단편은 뉴클레오티드 합성을 개시시킬 수 있다.

상기 조성물에 있어서, 2개의 화합물이 동일한 T^{ms} 또는 동일한 MOI를 갖지 않는다. 달리 언급하면, 당해 조성물은 각 화합물이 독특한 T^{ms} 와 독특한 핵산 단편(독특한 염기 서열을 갖는다는 점에서 독특함) 모두를 갖는 다수의 화합물을 포함한다. 또한, 당해 조성물은 각 화합물이 독특한 T^{ms} (여기서, T^{ms} 는 다른 화합물이 질량 분광분석법에 의한 동일한 시그널을 제공하는 T^{ms} 를 전혀 갖지 않는다는 점에서 독특하다)를 갖는 것으로서 정의되는 다수의 화합물을 갖는 것으로 기술될 수 있다. 따라서, 당해 조성물은 각각 독특한 질량을 갖는 T^{ms} 를 지니는 다수의 화합물을 함유한다. 이러한 조성물은 또한 각 화합물이 독특한 핵산 서열을 갖는 것으로 정의되는 다수의 화합물을 갖는 것으로 기술될 수 있다. 이들 핵산 서열은 상기 조성물이 핵산 서열 분석용 벡터와 조합되는 경우에, 각 화합물이 단지 하나의 벡터에 대한 프라이머로서 작용하도록 의도적으로 독특하다. 독특한 T^{ms} 그룹을 갖는 화합물 세트는 독특한 핵산 서열을 갖는 동일한 화합물 세트이다.

바람직하게는, T^{ms} 그룹은 2가지 상이한 화합물 중의 T^{ms} 그룹 간에 2amu 이상, 더욱 바람직하게는 3amu 이상, 더욱 더 바람직하게는 4amu 이상의 질량 분리가 존재한다는 점에서 독특하다. 당해 조성물에는, 적어도 2가지 상이한 화합물, 바람직하게는 2가지 이상의 상이한 화합물, 더욱 더 바람직하게는 4가지 이상의 상이한 화합물이 존재한다. 이러한 조성물은 각 화합물이 독특한 T^{ms} 와 독특한 핵산 서열을 갖는 100가지 이상의 상이한 화합물을 함유할 수 있다.

예를 들면, 핵산 분자의 서열을 결정하는데 유용한 또 다른 조성물은 물과 화학식 $T^{ms}-L-MOI$ 의 화합물을 포함한다. 여기에서, T^{ms} 은 질량 분광분석법에 의해 탐지 가능한 유기 그룹이다. T^{ms} 은 탄소, 하나 이상의 수소 및 플루오라이드를 함유하고 산소, 질소, 황, 인 및 요오드를 포함하는 임의의 원자를 함유할 수도 있다. L은 상기 화합물을 절단 조건에 노출시킬 때 T^{ms} -함유 잔기를 상기 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되도록 해주는 유기 그룹이다. 이와 같이 절단된 T^{ms} -함유 잔기는 상기 다수의 화합물 각각을 대상으로 하여 질량 분광분석법을 수행할 때 단일 이온화 전하 상태를 지지해주는 작용성 그룹을 포함한다. 이러한 작용성 그룹은 3급 아민, 4급 아민 또는 유기산일 수 있다. MOI는 이의 5' 말단을 부착된 핵산 단편이다.

물 이외에, 상기 조성물은 수성 조성물의 pH를 약 5 내지 약 9의 범위 내로 유지하기 위하여 완충제를 함유할 수 있다. 더욱이, 당해 조성물은 효소, 염(예: $MgCl_2$ 및 $NaCl$), 및 dATP, dGTP, dCTP 및 dTTP 중의 하나를 함유할 수 있다. 바람직한 조성물은 물, $T^{ms}-L-MOI$ 및 ddATP, ddGTP, ddCTP 및 ddTTP 중의 하나(및 단지 하나)를 함유한다. 이러한 조성물은 디데옥시 서열 분석 방법에 사용하기가 적합하다.

본 발명은 여러 세트의 화합물을 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 각 세트의 화합물은 화학식 T^{ms} -L-MOI[여기서, T^{ms} 은 탄소, 하나 이상의 수소 및 플루오라이드, 및 산소, 질소, 황, 인 및 요오드 중에서 선택된 임의의 원자를 포함하는, 질량 분광분석법에 의해 탐지 가능한 유기 그룹이고; L은 상기 화합물을 대상으로 질량 분광분석법을 수행할 때 단일 이온화 전하 상태를 지지해주고 3급 아민, 4급 아민 및 유기산 중에서 선택되는 작용성 그룹을 포함하는 T^{ms} -함유 잔기가 상기 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되도록 해주는 유기 그룹이며; MOI는 핵산 단편이며, 여기서 L은 MOI의 5' 말단에서 MOI에 접합된다]을 가진다.

한 세트 내에서 모든 구성원은 동일한 T^{ms} 그룹을 가지며 MOI 단편은 ddAMP, ddGMP, ddCMP 및 ddTMP 중에서 선택된 동일한 디데옥시뉴클레오타이드로 종결되는 가변 길이를 지니고, 세트 사이에는 T^{ms} 그룹이 2amu 이상, 바람직하게는 3amu 정도로 상이하다. 다수의 세트는 바람직하게는 5 이상이고 100개 이상일 수 있다.

앞서 기술된 바와 같은 제1의 다수 세트의 화합물을 포함하는 바람직한 조성물에서는, 제2의 다수 세트의 화학식 T^{ms} -L-MOI의 화합물[여기서, T^{ms} 은 탄소, 하나 이상의 수소 및 플루오라이드, 및 산소, 질소, 황, 인 및 요오드 중에서 선택된 임의의 원자를 포함하는, 질량 분광분석법에 의해 탐지 가능한 유기 그룹이고; L은 상기 화합물을 대상으로 질량 분광분석법을 수행할 때 단일 이온화 전하 상태를 지지해주고 3급 아민, 4급 아민 및 유기산 중에서 선택되는 작용성 그룹을 포함하는 T^{ms} -함유 잔기가 상기 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되도록 해주는 유기 그룹이며; MOI는 핵산 단편이며, 여기서 L은 MOI의 5' 말단에서 MOI에 접합된다]이 부가적으로 존재한다. 제2의 다수 세트 내의 모든 구성원은 ddAMP, ddGMP, ddCMP 및 ddTMP 중에서 선택된 동일한 디데옥시뉴클레오타이드로 종결되는 MOI 서열을 지니는데, 단 제1의 다수 세트의 화합물에 존재하는 디데옥시뉴클레오타이드는 제2의 다수 세트의 화합물에 존재하는 것과 동일한 디데옥시뉴클레오타이드가 아니다.

본 발명은 또한, DNA 서열 분석용 키트를 제공한다. 이러한 키트는 다수의 컨테이너 세트를 포함하며, 각 컨테이너 세트는 5개 이상의 컨테이너를 포함하는데, 여기서 제1 컨테이너는 벡터를 함유하고 제2, 제3, 제4 및 제5 컨테이너는 화학식 T^{ms} -L-MOI의 화합물[여기서, T^{ms} 은 탄소, 하나 이상의 수소 및 플루오라이드, 및 산소, 질소, 황, 인 및 요오드 중에서 선택된 임의의 원자를 포함하는, 질량 분광분석법에 의해 탐지 가능한 유기 그룹이고; L은 상기 화합물을 대상으로 질량 분광분석법을 수행할 때 단일 이온화 전하 상태를 지지해주고 3급 아민, 4급 아민 및 유기산 중에서 선택되는 작용성 그룹을 포함하는 T^{ms} -함유 잔기가 상기 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되도록 해주는 유기 그룹이며; MOI는 핵산 단편이며, 여기서 L은 MOI의 5' 말단에서 MOI에 접합된다]를 함유한다. 이러한 제2, 제3, 제4 및 제5 컨테이너에 대한 MOI는 동일하고 컨테이너 세트 내의 벡터의 위치에 대해 상보적이며 각 컨테이너 내의 T^{ms} 그룹은 키트 내의 다른 T^{ms} 그룹과 상이하다.

바람직하게는, 이러한 키트 내에서의 다수는 3개 이상, 즉 3 세트의 컨테이너가 존재한다. 더욱 바람직하게는, 5 세트 이상의 컨테이너가 존재한다.

앞서 인지된 바와 같이, 본 발명은 핵산 분자의 서열을 결정하기 위한 방법 및 이를 위한 조성물을 제공해준다. 간략하게 언급하면, 이러한 방법은 일반적으로 (a) 선택된 표적 핵산 분자에 상보적인, 태그 부착된 핵산 단편(예를 들면, 핵산 분자의 제1 말단으로부터 제2 말단 까지 태그 부착된 단편이고; 여기서 상기 태그는 특정의 또는 선택된 뉴클레오타이드와 상관이 있으며 다양한 어떠한 방법에 의해서도 탐지될 수 있다)을 제조하는 단계; (b) 이와 같이 태그 부착된 단편을 일련의 길이로 분리하는 단계; (c) 상기 태그 부착된 단편으로부터 태그를 절단하는 단계; 및 (d) 상기 태그를 탐지하고, 이로부터 핵산 분자의 서열을 결정하는 단계를 포함한다. 이들 각각의 국면은 다음에 보다 상세히 논의될 것이다.

B. 서열 분석 방법

앞서 인지된 바와 같이, 본 발명은 핵산 분자의 서열을 결정하기 위한 방법을 제공한다. 간략하게 언급하면, 태그 부착된 핵산 단편이 제조된다. 이러한 핵산 단편은 선택된 표적 핵산 분자에 대해 상보적이다. 바람직한 양태에 있어서, 핵산 단편은 특정 핵산 분자의 제1 말단으로부터 제2 말단 까지, 더욱 바람직하게는 5' 말단으로부터 3' 말단 까지를 생성시킨다. 다른 바람직한 양태에 있어서, 태그 부착된 단편은 5'-태그 부착된 올리고뉴클레오타이드 프라이머 또는 태그 부착된 디데옥시뉴클레오타이드 종결기로부터 생성된다. 태그 부착된 핵산 단편의 태그는 특정한 뉴클레오타이드와 상관이 있고 분광분석법(형광성을 포함하지만, 바람직하게는 형광성 분석법 이외의 것이다) 또는 전위차법에 의해 탐지 가능하다. 바람직한 양태

에서, 5개 이상의 태그 부착된 핵산 단편이 생성되고 각 태그는 특정 핵산 단편에 대해 독특하다. 더욱 구체적으로 언급하면, 태그 부착된 단편의 수는 일반적으로 약 5 내지 2,000의 범위일 것이다. 태그 부착된 핵산 단편은 앞서 언급된 것을 포함하여 각종 화합물로부터 생성될 수 있다. 당해 분야의 숙련인은 본 발명의 방법이 본원에 기술된 대표적인 화합물 및 조성물만의 사용으로 한정되지 않는다는 것을 명백히 인지할 것이다.

태그 부착된 핵산 단편을 발생시킨 후, 이와 같이 태그 부착된 단편을 일련의 길이로 분리시킨다. 이러한 분리는 각종 기술에 의해 수행할 수 있다. 바람직한 양태에 있어서, 분리는 액체 크로마토그래피에 의한 것이며 특히 바람직한 것은 HPLC에 의한 것이다. 이어서, 태그를 태그 부착된 단편으로부터 절단시킨다. 태그를 방출시키기 위해 특정 결합을 파괴하기 위한 특별한 방법은 이러한 결합이 절단되기 쉬운 특별한 유형인지를 기준으로 하여 선택한다. 예를 들면, 광 민감성 결합(즉, 빛에 의해 파괴되는 결합)은 빛에 노출될 것이다. 이와 같이 방출된 태그는 분광분석법 또는 전위차법으로 탐지한다. 바람직한 탐지 수단은 분광분석법, 적외선, 분광분석법, 자외선 분광분석법 및 일정 전위 전류법(예를 들면, 전류 탐지기 또는 전기량 탐지기를 사용함)이다.

당해 분야의 숙련인은 상기 하나 이상의 단계가, 예를 들면, 기기의 사용으로 인해 자동화될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 또한, 상기 분리, 절단 및 탐지 단계를 연속적인 방식(예를 들면, 분리 및 절단에서 태그 탐지까지의 태그 부착된 단편의 연속적인 흐름/연속 유체 경로)으로 수행할 수 있다. 예를 들면, 각종 단계를 시스템 내로 혼입하여 이러한 단계가 연속적인 방식으로 수행될 수 있도록 한다. 이러한 시스템은 전형적으로 특정 기기 또는 기기 포맷의 조합체이다. 예를 들면, 분리되는(예를 들면, HPLC에 의한) 태그 부착된 핵산 단편을 절단용 장치(예를 들면, 광 반응기) 내로 유입한 다음, 태그 탐지기(예를 들면, 질량 분광계, 또는 전기량 또는 전류 탐지기) 내로 유입할 수 있다. 바람직하게는, 절단용 장치는 절단 반응에 최적인 파장이 선택될 수 있도록 조정 가능하다.

당해 분야의 숙련인에게는 핵산 서열을 분석하기 위한 본 발명의 방법이 각종 목적으로 수행될 수 있다는 것은 명백하다. 예를 들면, 이러한 본 방법의 용도는 바이러스성, 박테리아, 원핵 및 진핵성(예: 포유동물) 핵산 분자에 대한 1차 서열 결정; 돌연변이 탐지; 진단; 법의학; 동정; 및 다형성 탐지를 포함한다.

1. 서열 분석 방법

앞서 인지된 바와 같이, 본 발명의 화합물을 포함하는 화합물은 효소적 및 화학적 분해 방법 모두를 포함하여 각종 서열 분석 방법에 활용될 수 있다. 간략하게 언급하면, 디데옥시-종결기를 이용하는 생거[Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 74:5463, 1977]에 의해 기술된 효소적 방법은 DNA 폴리머라제에 의해 일본쇄 주형으로부터 DNA 쇄를 합성하는 것을 포함한다. 이러한 생거의 서열 분석 방법은 디데옥시뉴클레오티드(ddNTPs)가 정상의 데옥시뉴클레오티드와 동일한 방식(보다 저효능이긴 하지만)으로 성장하는 쇄 내로 혼입된다는 사실에 근거한 것이다. 그러나, ddNTPs는 이들에 쇄 연장에 필요한 3'-OH 그룹이 결여되어 있다는 점에서 정상의 데옥시뉴클레오티드(dNTPs)와 상이하다. ddNTP를 DNA 쇄 내로 혼입하는 경우, 3'-하이드록시 그룹의 부재로 인해 새로운 포스포디에스테르 결합의 형성이 억제되고 이러한 DNA 단편은 주형 DNA 내의 염기에 상보적인 ddNTP로 종결된다. 막삼 및 길버트 방법[참조: Maxam and Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 74:560, 1977]은 본래의 DNA의 화학적 분해 방법을 이용한다(양 경우에 있어서 DNA는 클로날이어야만 한다). 양 방법은 특정 지점으로부터 시작되고 서열 분석되어야 하는 DNA 단편 내에 발견되는 각 염기에서 종결되는 단편 집단을 생성시킨다. 각 단편의 종결은 본래의 DNA 단편 내에 있는 특정 염기의 위치에 좌우된다. 이러한 DNA 단편은 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 분리되며 DNA 염기(A, C, T, G)의 순서는 상기 겔의 방사선사진으로부터 판독한다.

2. 엑소뉴클레아제 DNA 서열 분석

DNA 뉴클레오티드 서열을 결정하는 과정은 라베이트(Labeit) 등에 의해 보고되었다[참조: S. Labeit, H. Lehrach & R.S.Goody, DNA 5:173-7, 1986; 데옥시뉴클레오시드 알파-티오텐리포스페이트를 사용한 DNA 서열 분석의 새로운 방법]. 이러한 방법의 제1 단계에서는, 각각 상응하는 모노포스페이트 대신 상이한 데옥시뉴클레오시드 포스포로티오에이트로 별개로 치환된 4개의 DNA가, DNA 폴리머라제의 의해 촉매된 주형 지시된 중합에 의해 제조된다. 제2 단계에서는, 이들 DNA를 대상으로 엄격한 엑소뉴클레아제 III 처리를 수행하여, 포스포로티오에이트 인티뉴클레오티드 결합으로 종결되는 말단만을 생성시킨다. 이어서, 이들을 표준 겔 전기영동 기술에 의해 분리시킬 수 있으며 이의 서열은 현재 사용된 서열 분석 방법에서와 같이 직접적으로 판독할 수 있다. 문헌[참조:Porter et al., K. W. Porter, J. Tomasz, F. Huang, A. Sood & B. R. Shaw, Biochemistry 34:11963-11969, 1995; N-7 시아노보란-2'-데옥시구아노신 5'-트리포스페이트는 DNA 폴리머라제에 대한 우수한 기질이다]에는 엑소뉴클레아제 내성체이고 수 많은 폴리머라제에 대한 우수한 기질인 새로운 셋트의 붕소-치환된 뉴클레오티드 동족체가 기재되어 있으며; 이들 염기는 또한 엑소뉴클레아제 DNA 서열 분석에 적합하다.

3. 다수의 완전한 길이의 cDNA를 서열 분석하기 위한 단순화된 방법

완전한 사람 게놈 서열을 생성하기 위한 대체 방안으로서 cDNA 서열 분석 방법이 제안되었다. 2가지 접근 방법이 시도되었다. 첫 번째 방법은 각 cDNA 클론의 한 말단에서 단일 DNA 서열 패스를 통하여 발현된 서열 태그(EST)를 발생시키는 것을 포함한다. 이러한 방법으로 인해, 발현된 서열의 유형 분포를 파악할 수 있으며 이러한 방법은 때때로 게놈 단편과의 유용한 상동성을 나타내지만, 전반적으로는 각 클론으로부터 불충분한 데이터가 제공되기 때문에 본 발명자들의 기본적인 지식에 전혀 영향을 주지 않는다. 두 번째 접근 방법은 cDNA의 가능한 작용을 지시할 수 있는 완전한 cDNA 서열을 발생시키는 것이다. 불행하게도, 대부분의 cDNA는 완전한 길이의 서열 결정의 자동화를 방해하는 1 내지 4킬로염기 범위의 크기이다. 현재 대규모로 사용되고 있는 가장 효과적인 방법인 배출량 높은 서열 생산법은 전형적으로 각 플랭크로부터 500개 미만 염기의 서열을 생성시키는, 벡터/프라이머 부위로부터의 서열 분석에 근거한 것이다. '프라이머 워킹'당 15 내지 18 염기 길이의 새로운 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 합성은 각 서열의 봉합을 허용할 수 있다. 완전한 길이의 cDNA 서열 분석을 위한 대체 방법은 보편적인 프라이머를 사용하여 서열 분석하는데 적합하지만 분자의 중복성 범위를 제공해주는 변형된 주형을 발생시키는 것이다.

각 cDNA 클론으로부터 별개의 라이브러리를 제조함으로써 샷건(Shotgun) 서열 분석 방법을 cDNA 서열 분석 연구에 적용할 수 있다. 그러나, 이들 방법은 초기 클로닝 상 동안 매우 노동 집약적이기 때문에, 1.5 내지 4.0킬로염기 단편을 분석하는데 광범위하게 사용되지는 않는다. 대신, 이들 방법은 일반적으로 표적 서열이 람다 또는 코스미드 삽입체에서와 같이 15 내지 40킬로염기 순서인 프로젝트에 적용되었다.

4. cDNA 서열 분석과 게놈 서열 분석 간의 유사성

cDNA 서열 분석법에서 분석될 개별적인 클론의 전형적으로 상이한 크기에도 불구하고, 대규모 게놈 DNA 서열 분석을 위한 요구 조건과 유사한데가 있다. 염기당 비용이 낮고 배출량이 높은 것 이외에도, 완전한 길이의 cDNA 서열 분석을 위한 이상적인 방법은 고정밀할 것이다. 현재 게놈 DNA 서열 분석을 위해 선호되고 있는 방법은 코스미드로부터 샷건 서열 분석용 라이브러리를 제조한 다음, ABI 형광성 DNA 서열 분석용 기기를 사용하여 랜덤하게 서열분석하고 지시된 노력으로 봉합(마무리)하는 것을 포함한다. 전반적으로, 이러한 형광성 샷건 접근법이 효능 및 정밀도 측면에서 현재 사용되고 있는 대체방법 보다 더 우수하다는 것에는 동의한다. 초기 샷건 라이브러리의 질은 서열 어셈블리의 용이성과 질을 결정하는데 중요한 요인이다. 이용 가능한 샷건 라이브러리 과정의 양질로 인해, 보다 작은 cDNA 클론의 혼합물을 함유하는 다중 샷건 라이브러리를 제조하기 위한 방법이 촉발되었다. 여기서는 서열 분석될 개별적인 클론을 라이브러리의 작제에 앞서 혼합한 다음, 컴퓨터 분석 단계에서 랜덤 서열분석법을 수행하면서 이를 동정한다. 개별적인 클론 간의 연결을, PCR에 의해 또는 벡터 암 서열의 동정에 의해 라이브러리 생성 동안 표시시킨다.

미생물을 이용한 방법 또는 PCR에 의해 클론을 제조할 수 있다. PCR을 사용하는 경우, 에러에 대한 위험을 최소화하기 위해서는 각 클론에 대한 3가지 반응이 사용된다.

원 패스 서열분석법은 게놈 DNA의 새로운 영역 내에서 중요한 서열의 동정을 신속히 수행하도록 고안된 새로운 기술이다. 간략하게 언급하면, 양질의 샷건 라이브러리가 제조된 다음 서열을 샘플링하여 80 내지 95% 유효범위를 수득한다. 코스미드의 경우 이는 전형적으로 약 200 샘플일 것이다. 필수적으로, 모든 유전자는 서열 유사성(BLAST) 또는 엑손 구조(GRILL2) 스크리닝을 이용하여 이러한 샘플에서 탐지된 하나 이상의 엑손을 가지기 쉽다.

"스키밍(skimming)"이 코스미드와 P1s에 성공적으로 적용되었다. 원 패스 서열분석법은 잠재적으로, 특정 위치상 클로닝 프로젝트에서 유전자를 발견하기 위한 가장 신속하고 비용이 가장 적게 드는 방법이다. 이러한 결과는 사실상 보장된다. 대부분의 연구가들은 현재 엑손 트래핑 및 관련 기술에 대한 코스미드 콘티그(contigs)를 개발하고 있다. 코스미드는 서열 스키밍에 가장 잘 적합하다. P1 및 기타 BACs는 상당히 더 저렴한데, 이는 샷건 라이브러리 작제와 중복체의 최소화 모두에 있어서 절약이 되었기 때문이다.

5. 샷건 서열 분석

샷건 DNA 서열 분석은 표적 DNA의 랜덤 단편화로부터 출발한다. 이어서, 랜덤 서열 분석을 이용하여 대다수의 데이터를 생성시킨다. 이때 지시된 상은 양 방향으로 각 세트의 적용 범위를 보장하면서 갭을 완성시킨다. 샷건 서열 분석은 비교적 저렴한 비용으로 높은 정밀도의 잇점을 부여해준다. 이러한 과정은 비교적 큰 단편의 분석에 가장 잘 적합하고 대규모 게놈 DNA 서열 분석에 선택되는 방법이다.

숫건 서열 분석을 정확하게 하고 효과적인 비용이 들게 하는데 중요한 몇가지 요인이 있다. 중요하게 고려해야 하는 것은 삽입체를 가지지 않거나 화학적 삽입체를 가지는 어떠한 클론도 연속적인 비효율적인 서열분석에서 생성되지 않을 것이기 때문에, 발생하는 숫건 라이브러리의 질이다. 고려해야하는 또 다른 요인은 랜덤한 서열 분석과 지시된 상의 서열 분석 간의 균형을 조심스럽게 맞추어, 불필요한 서열분석을 통하여 효능 상실을 최소한으로 하면서 높은 정밀도를 획득하는 것이다.

6. 서열 분석 화학: 태그 부착된-종결기 화학

최근 이용 가능한 2가지 유형의 형광성 서열 분석 화학물질, 즉 프라이머가 형광성으로 표지된 염료 프라이머와 디데옥시 종결기가 표지된 염료 종결기가 있다. 이들 각각의 화학물질은 Taq DNA 폴리머라제 또는 시퀀나제 효소와 함께 사용될 수 있다. 시퀀나제 효소는 G-C 풍부한 영역, 팔린드롬(palindromes), 간단한 반복물 및 서열 판독이 어려운 기타 물질을 통하여 용이하게 판독되는 것으로 보인다. 시퀀나제는 또한 혼합 집단의 서열을 분석하는데 좋다. 시퀀나제 서열 분석에는 주형 5 μ g, 하나의 연장물 및 다단계 클린업 공정을 필요하다. 태그 부착된 프라이머 서열 분석에는 4가지 별개의 반응, A, C, G 및 T 각각에 대해 하나의 반응 및 힘이 많이드는 클린업 프로토콜을 필요로 한다. Taq 종결기 사이클 서열분석 화학은 가장 힘이 드는 서열분석법이다. 이러한 방법을 사용하면, 어떠한 서열분석용 프라이머도 사용할 수 있다. 필요한 주형의 양은 비교적 적고 셋업으로부터 클린업까지의 전체 반응 공정은 시퀀나제 및 염료 프라이머 화학물과 비교해서 상당히 용이하다. 단지 1.5 μ g의 DNA 주형과 4pm의 프라이머가 필요하다. 이에 즉시 사용되는 반응 혼합물을 가한다. 이러한 혼합물은 완충제, 효소, dNTPs 및 표지된 디데옥시뉴클레오티드로 이루어진다. 이러한 반응은 4개 디데옥시 각각을 사이한 형광성 염료로 표지시키기 때문에 하나의 튜브 내에서 수행할 수 있다. 이들 표지된 종결기가 과량으로 상기 혼합물에 존재하는데, 이는 이들을 연장 동안에 혼입시키는 것이 어렵기 때문이다. 불명확한 DNA를 사용하면, 이들 고분자량 디데옥시의 혼입이 억제될 수 있다. 예비혼합물은 밴드 압축을 최소화하기 위하여 dITP를 포함한다. DNA 폴리머라제로서 Taq를 사용하면 상기 반응이 고온에서 수행될 수 있어 2차 구조 문제점 뿐만 아니라 비-특이적 프라이머 결합을 최소화할 수 있다. 완전한 각테일은 열 사이클러에서 변성, 어닐링 및 연장을 25주기 정도 거치게 되고 이로써 완료된 반응물은 세파맥스 G50(Pharmacia, Piscataway, NJ) 칼럼을 통하여 분사시키고 이를 5분 후에 진공 건조기에서 겔 부하에 즉시 사용한다.

7. 프라이머 고안

프라이머를 고안할 때, PCR 프라이머를 고안하는데 사용된 바와 동일한 기준이 사용되어야 한다. 특히, 프라이머는 길이가 18 내지 20 뉴클레오티드인 것이 바람직하고 3-프라임 말단 염기는 G 또는 C여야 한다. 프라이머는 또한, 바람직하게는 50°C 이상의 Tm이어야 한다. 18 뉴클레오티드 보다 짧은 프라이머는 작동은 되지만 권장되지는 않는다. 프라이머가 보다 짧을수록 주형 DNA 상의 하나 이상의 부위에서 결합될 가능성이 더 커지고 이의 Tm이 보다 낮아진다. 서열은 주형과 100% 매치되어야 한다. 특히 3-프라임 말단에 대한 어떠한 미스매치도 서열분석 능력을 상당히 저하시킬 것이다. 그러나, 5-프라임 말단을 지닌 프라이머는 이를 결합하는 3-프라임에서 약 18개 염기가 존재하는 한은 사용될 수 있다. 서열 크로마토그램으로부터 프라이머를 고안하는 경우, 고 신뢰도 영역이 사용되어야만 한다. 표준 크로마토그램 상에서 350 내지 400 염기를 통과하여 옮겨감에 따라, 피크는 더 넓어지고 염기 콜은 정교하지 않다. 본원에 기술된 바와 같이, 프라이머는 링커 또는 링커 태그가 부착될 수 있는 5' 핸들을 보유할 수 있다.

8. 핵산 주형 제조

태그 부착된 프라이머 DNA 서열 분석에서 가장 중요한 요인은 주형의 질이다. 간략하게 언급하면, 통상적인 한 가지 그릇된 인식은 주형이 수동 서열분석에서 작동하는 경우에는 이것이 자동화 서열분석으로 작동되어야 한다는 것이다. 사실상, 특정 반응이 수동 서열분석으로 작동하는 경우, 이는 자동화 서열분석으로 작동될 수 있지만, 자동화 서열분석은 훨씬 더 민감하고 형광성 서열분석법이 이용되면 불량한 주형은 데이터를 거의 또는 전혀 발생시키지 않을 수 있다. RNA를 포함하는 주형 제조 동안 적절하게 추출되지 못한 고염 농축물 및 기타 세포 물질은 마찬가지로 정확한 서열 정보를 수득하는 능력을 억제할 수 있다. 많은 미니 및 맥시 프랩 프로토콜은 수동 서열분석 또는 PCR에 대해서는 충분하게 우수하지만, 자동화(태그 부착된 프라이머) 서열분석에 대해서는 우수하지 않은 DNA를 생성시킨다. 또한, 폐놀은 나선 구조에 삽입될 수 있기 때문에 폐놀의 사용은 전혀 권장되고 있지 않다. 100% 클로로포름의 사용이면 충분하다. 본원에서 제공된 태그 부착된 프라이머 서열분석법에 특히 바람직한 수 많은 DNA 제조 방법이 있다. 특히, 세썬 클로라이드 체제 또는 쿼아젠(Chatsworth, CA) 맥시 예비용 칼럼(과부하되지 않도록 주의 해야한다)을 활용하는 맥시 프랩이 바람직하다. 미니 프랩의 경우, 프로메가의 매직 미니 프랩(Madison, WI) 등의 칼럼이 이용될 수 있다. PCR 단편 또는 제한 절단 단편과 같은 DNA 단편의 서열분석하는 경우, 저용점 아가로즈 겔로부터 목적하는 단편을 절단하고 진글린(GeneClean; La Jolla, CA)과 같은 생성물로 정제하는 것이 일반적으로 바람직하다. 단지 하나의 밴드가 겔로부터 절단되도록 하는 것이 매우 중요하다.

PCR 단편의 경우, PCR 프라이머 또는 내부 프라이머를 사용하여 적당한 단편이 서열분석되도록 한다. 서열 분석 소프트웨어로부터 최적의 성능을 수득하기 위해서는, 단편은 200 염기보다 커야만 한다. 이본쇄 또는 일본쇄 DNA는 이와 같은 방법에 의해 서열분석할 수 있다.

서열분석용 DNA를 제조하는 경우에 일반적으로 고려되는 부가의 요인은 숙주 균주를 선택하는 것이다. ABI(Foster City, CA) 및 Qiagen(Chatsworth, CA) 등의, 서열 분석용 장치 및 시약을 판매하는 회사가 전형적으로 바람직한 숙주 균주를 추천하고 있으며 DH5 알파, HB101, XL-1 Blue, JM109, MV1190 등의 균주를 앞서 권장하였다. 이러한 DNA 제제가 매우 클린한 경우일지라도, 서열을 수득하기 어렵게 만들 수 있는 기타 고유의 요인이 존재한다. G-C 풍부한 주형은 항상 완전히 서열분석하기가 어렵고 2차 구조 또한 문제점을 야기시킬 수 있다. 긴 반복체를 통한 서열분석은 종종 어려운 것으로 입증된다. 예를 들면, Taq가 폴리 T 스트래치를 따라 이동함에 따라, 이러한 효소는 종종 주형으로부터 이탈하여 T를 다시 뛰어넘어 뒤로 점프한다. 이로써 폴리 T 스트래치에서 X양의 Ts를 갖는 연장 생성물 및 폴리 T 스트래치에서 X-1, X-2 등 양의 Ts를 갖는 단편이 생성된다.

9. 분자상 별개인 클로닝 벡터의 사용

다양한 클로닝 벡터(M13) 및 상보적 서열분석용 프라이머를 이용하여 서열분석을 수행할 수도 있다. 간략하게 언급하면, 본 클로닝 벡터의 경우, 동일한 프라이머 서열이 사용되고 단지 4개의 태그가 이용되며(각 태그는 상이한 종결기(ddNTP)를 나타내는 상이한 발색단이다), 매 증폭 공정이 상이한 컨테이너에서 발생되어야 한다(컨테이너 당 하나의 DNA 샘플). 즉, 동일한 증폭 공정에서 2개 또는 상이한 DNA 샘플을 혼합하는 것은 불가능하다. 이용 가능한 4개의 태그만이 사용되면, 단지 하나의 DNA 샘플이 겔 라인당 수행될 수 있다. 4개의 태그만을 갖는 하나 이상의 DNA 샘플의 서열을 푸는데 편리한 방법이 없다. (이와 관련하여, 작업자는 현 기술을 사용할 때 상이한 DNA 샘플을 혼합하거나 오염시키는데 큰 주의를 하지 않는다).

4 태그의 배수를 겔 라인 또는 각각의 분리 공정당 수행할 수 있는 경우에 실질적인 잇점이 획득된다. 특히, 본 발명의 태그를 활용하여, 단일 증폭 반응 또는 컨테이너에서 하나 이상의 DNA 샘플을 프로세싱할 수 있다. 4 태그의 배수를 이용할 수 있는 경우, 각 태그 셋트를 증폭시켜야 하는 특정한 DNA 샘플에 할당할 수 있다. (태그 셋트는 각각 독특한 성질을 갖는 4가지 상이한 태그의 시리즈로 구성된다). 각 태그는 상이한 디데옥시-종결기, 즉 ddATP, ddGTP, ddCTP 또는 ddTTP를 나타낸다. 이러한 잇점을 이용하기 위해서는, 독특한 프라이밍 부위가 삽입된 일련의 벡터를 생성시켜야만 한다. 독특한 프라이밍 부위는 간단히, 벡터마다 상이한 18개 뉴클레오타이드의 특정 스트래치이다. 나머지 뉴클레오타이드 서열은 벡터마다 보존된다. 각 독특한 벡터에 상응하는 서열분석용 프라이머가 제조(합성)된다. 각 독특한 프라이머는 독특한 태그 셋트로 유도(또는 표지)된다.

연구중인 이들 각각의 분자 생물학 수단을 이용하면, 본 발명에서는 단일 컨테이너에서 다중 샘플을 프로세싱할 수 있다. 첫째, 서열분석해야 하는 DNA 샘플을 다수의 벡터 내로 클로닝한다. 예를 들면, 100개의 독특한 벡터가 이용가능한 경우, 100가지 연결 반응, 플레이팅 단계 및 플라그 채취 단계가 수행된다. 두 번째, 각 벡터 유형으로부터의 한 샘플을 풀링하여 100개의 독특한 DNA 단편 또는 샘플을 함유하는 100개의 독특한 벡터의 풀을 만든다. 따라서, 소정의 DNA 샘플을 동정하고 결합된 태그 셋트를 갖는 프라이머 셋트를 자동적으로 할당한다. 각각의 프라이머, 완충제, 폴리머라제(들), ddNTPs, dNTP 및 조인자를 반응 컨테이너에 가하고 증폭 공정을 수행한다. 이어서, 이러한 반응물을 대상으로 분리 단계를 수행하고 태그의 일시적인 외형으로부터 각각의 서열을 확립시킨다. 다중 DNA 샘플을 풀링하는 능력이 실질적인 잇점이다. 전형적인 PCR 반응의 시약 비용은 샘플당 약 \$2.00이다. 본원에 기술된 방법을 사용하면, 샘플을 기준으로 한 증폭 공정의 비용은 최소 100 정도 감소될 수 있다. 샘플 핸들링은 최소 100 정도 감소될 수 있으며 재료 비용도 감소될 수 있다. 대규모 증폭 로봇에 대한 필요성이 없어질 것이다.

10. 절단 가능한 질량 분광학 태그 부착을 위한 서열분석용 벡터

본 발명의 절단 가능한 질량 분광학 태그 부착(CMST)을 이용하여, 각각의 개별적인 서열 분석 반응을 분리 공정이 진행됨에 따라 독립적이고도 동시적으로 판독할 수 있다. CMST 서열분석에서는, 각 클로닝 벡터에 상이한 프라이머를 사용한다: 각 반응은 풀당 20개 클론을 사용하는 경우 20가지 상이한 프라이머를 갖는다. 각 프라이머는 벡터 중의 하나에 상응하고, 각 프라이머에 독특한 CMST 분자로 태그 부착시킨다. 각각의 풀링된 DNA 샘플에 대해 4가지 반응을 수행하여, 모든 벡터가 4개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머(각각은 서열에서 동일하지만 상이한 CMS 태그가 부착된다)를 갖게 된다. 4가지 별도의 서열 분석 반응물을 풀링하고 함께 수행한다. 20개 샘플을 풀링하는 경우, 80개 태그가 사용되고(샘플당 4개의 염기 x 20개 샘플), 이들 80개 모두는 겔이 수행됨에 따라 동시에 탐지된다.

백터의 작제는 제한 부위의 어느 한면 상에서 랜덤 20-머를 클로닝함으로써 수행할 수 있다. 이로써 생성된 클론을 서열 분석하고 백터로서 사용하기 위한 수를 선택한다. 선택된 각 백터에 대해 2개의 올리고뉴클레오타이드를 제조하는데, 이는 제한 부위의 각 측면에서의 서열과 상동성이고 3' 말단이 제한 부위를 향하도록 각각 배향된다. 각 프라이머에 대한 4개의 태그 부착된 제제를 제조하는데, 이는 상기 서열 분석 반응에서 각 염기에 대한 것이고 각각 독특한 CMS 태그가 표시되어 있다.

11. 가역적 태그의 사용에 의한 서열분석의 잇점

절단 가능한 태그를 서열분석 기술 및 관련 기술에 사용하는 경우에는 상당한 잇점이 있다. 첫째, 민감도의 증가로 인해, 측정에 앞서 특정 시간 동안 태그를 수집하는 능력과 마찬가지로 판독 길이가 더 길어지게 될 것이다. 절단 가능한 태그의 사용으로 인해, 겔의 전반적인 범위(예를 들면, 1 내지 1500 뉴클레오타이드(nt))에 걸친 밴드 폭을 동등하게 하는 시스템을 개발할 수 있다. 이는 450nt 보다 긴 길이를 판독할 수 있는 능력에 영향을 미칠 것이다.

절단 가능한 다중 태그(MW 확인제)의 사용은 다중 DNA 샘플이 단일 겔 레인 또는 분리 공정에서 수행될 수 있다는 잇점을 지니고 있다. 예를 들면, 단일 레인 또는 단편 사이징 공정에 대해 96개 이상의 샘플을 4가지 서열분석용 반응물(A,G,T,C)과 조합하기 위해 본원에서 기술된 방법을 이용할 수 있다. 독특한 프라이밍 부위를 갖는 다중 백터를 사용하는 경우, 384개 이상의 샘플을 겔 레인당 조합할 수 있다(상이한 종결기 반응물은 이러한 도식과 함께 증폭될 수 없다). 절단 가능한 태그를 이용하는 능력을 다중 백터를 사용하는 능력과 조합하면, DNA 서열분석 처리량이 가시적으로 10,000배 정도 증가된다. 또한, 본원에서 기술된 도식에서는 시약 사용이 감소되고, 1회용 물품의 사용이 감소되어, 사용자에게 대한 작동 비용이 감소된다.

본원에 기술된 전반적인 방법을 통하여 내부 대조군을 프로세싱하는 능력으로부터 부가의 잇점이 획득된다. 어떠한 세트의 샘플에 대해서도, 내부 컨트롤(control) 핵산을 당해 샘플(들)에 놓을 수 있다. 이는 현 구성으로는 가능하지 않다. 이러한 잇점으로 인해 증폭 공정, 분리 공정, 태그 탐지 시스템 및 서열 어셈블리의 컨트롤을 허용할 수 있다. 이는 컨트롤이 항상 모든 단계에서 샘플로부터 분리되는 현 시스템에 비해 상당한 잇점이다.

본원에서 기술된 조성물 및 방법은 또한, 이들이 본래 모듈라하고 어떠한 유형의 분리 공정 또는 방법에 대해서도 맞출 수 있고 또한, 각각의 기술의 어느 한 유형에서의 개선이 이루어지기 때문에 어떠한 유형의 탐지 시스템에 대해서도 맞출 수 있다. 예를 들면, 본원에 기술된 방법은 DNA 단편을 분리시킬 수 있는 마이크로조립된 장치 또는 "번들된" CE 어레이와 커플링할 수 있다.

C. DNA 단편의 분리

분석을 요구하는 샘플은 종종 복합 매트릭스 내의 많은 성분들의 혼합물이다. 공지되지 않은 화합물을 함유하는 샘플의 경우에는, 각각의 개별적인 성분이 다른 분석 방법에 의해 동정될 수 있도록 성분들을 서로 분리시켜야만 한다. 혼합물 내의 성분들의 분리 성질은 일정한 조건하에서 일정하기 때문에, 일단 결정되면 이들을 사용하여 각 성분을 동정 및 정량화할 수 있다. 이러한 과정은 크로마토그래피 및 전기영동 분석 분리 공정에서 전형적이다.

1. 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)

고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)는 용액에 용해되는 화합물을 분리하기 위한 크로마토그래피적 분리 기술이다. HPLC 기기는 이동상 저장소, 펌프, 주입기, 분리용 칼럼 및 탐지기로 구성된다. 분취량의 샘플 혼합물을 칼럼 내로 주입함으로써 화합물을 분리시킨다. 혼합물 중의 상이한 성분들은 이들이 이동 액체 상과 고정 상 간의 분별 행위의 차이로 인해 상이한 속도로 칼럼 내를 통과한다.

최근에, 화학적으로 결합된 알킬 쇠를 갖는 비-다공성 PS/DVB 입자 상에서의 IP-RO-HPLC가 유사한 분해도를 제공하면서 일본쇄 및 이온쇄 핵산의 분석에 있어서 모세 전기영동에 대한 신속한 대체방안인 것으로 밝혀졌다[참조:Huber et al., 1993, Anal.Biochem., 212, p351;Huber et al., 1993, Nuc. Acids Res., 21, p1061; Huber et al., 1993, Biotechniques, 16, p898]. 쇠 길이의 함수로서 이온쇄 DNA를 항상 보유하지는 않는(이는 AT 염기쌍이 GC 염기쌍 보다 더욱 강력하게 양전하 하전된 고정 상과 상호반응하기 때문이다) 이온 교환 크로마토그래피와 대조적으로, IP-RP-HPLC는 엄밀하게 크기-의존성 분리를 가능케 해준다.

이온쌍 형성 시약으로서 100mM 트리에틸암모늄 아세테이트를 사용하는 방법이 개발되었으며 포스포디에스테르 올리고뉴클레오티드가 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 알킬화 비-다공성 2.3 μ m 폴리(스티렌-디비닐벤젠) 입자 상에서 성공적으로 분리되었다[참조: Oefner et al., 1994, Anal. Biochem., 223, p39]. 기재된 기술로 인해, 50 내지 200 뉴클레오티드의 크기 범위 내에서 길이가 4 내지 8 염기쌍만이 상이한 PCR 생성물을 분리시킬 수 있다.

2. 전기영동

전기영동은 전기장에서 이온(또는 본원에서 기술된 경우에서와 같이 DNA)의 이동성을 기준으로 하는 분리 기술이다. 음전하 하전된 DNA는 양 전극으로 이동하고 양전하 이온은 음 전극 쪽으로 이동한다. 안전성 이유로, 하나의 전극은 통상 접지되고 다른 전극은 양성적으로 또는 음성적으로 바이어스된다. 하전된 종은 이들의 총 전하, 크기 및 형태에 따라서 상이한 이동 속도를 나타내므로, 분리될 수 있다. 전극 장치는 고압 전력 공급원, 전극, 버퍼 및 폴리아크릴아미드 겔 등의 버퍼용 지지체 또는 모세관 튜브로 구성된다. 개방 모세관 튜브를 수 많은 유형의 샘플에 사용하고 다른 겔 지지체는 통상적으로 단백질 혼합물 또는 DNA 단편 등의 생물학적 샘플에 사용한다.

3. 모세관 전기영동(CE)

이의 각종 표현에서의 모세관 전기영동(CE)(유리 용액, 등풍속선영동, 등전 포커싱, 폴리아크릴아미드 겔, 미셀라 전기역학적 "크로마토그래피")은 극히 작은 샘플 용적의 복합 혼합물을 신속하게 높은 분해 분리시키는 방법으로서 개발중이다. MS 고유의 민감도 및 선별도와 조합하여, CE-MS는 생분해를 위한 잠재적으로 강력한 기술이다. 본원에 기술된 신규 출원에서는, 이들 2가지 방법의 조합으로 인해, 현 서열 분석 방법의 등급을 몇몇 등급 순서 정도로 증가하는 탁월한 DNA 서열 분석 방법을 유도할 것이다.

CE와 전기분무 이온화(ESI) 유속 간의 상응 및 이들 둘다가 용액에서 이온성 종에 의해 촉진된다(및 이에 주로 사용된다)는 사실은 극도로 매력있는 조합에 대한 기준을 제공해준다. 모세관 영역 전기영동(CZE) 및 모세관 등풍속선영동 모두와 ESI를 기준으로 한 사중극자 질량 분광계의 조합이 다음 문헌에 기술되어 있다[참조: Olivares et al., Anal. Chem. 59:1230, 1987; Smith et al., Anal. Chem. 60:436, 1988; Loo et al., Anal. Chem. 179:404, 1989; Edmonds et al., J. Chroma. 474:21, 1989; Loo et al., J. Microcolumn Sep. 1:223, 1989; Lee et al., J. Chromatog. 458:313, 1988; Smith et al., J. Chromatog. 480:211, 1989, Grese et al., J. Am. Chem. Soc. 111:2835, 1989]. 작은 펩티드는 우수한(펩토몰) 민감도로 용이하게 CZE 분석될 수 있다.

DNA 단편에 대한 가장 강력한 분리 방법은 일반적으로 슬라브 겔 포맷의 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE)이다. 그러나, 현 기술의 주요 제한점은 서열분석 반응에서 생성된 DNA 단편의 겔 전기영동을 수행하는데 소요되는 시간이 비교적 길다는 것이다. 초박(ultrathin) 겔을 이용하는 모세관 전기영동을 사용하여 10배 증가시킬 수 있다. 첫 번째 접근으로 유리 용액에서는, 모든 DNA가 특정 염기의 부가와 동일한 이동성을 나타내면서 움직임에 따라 질량 및 전하가 보충된다. 폴리아크릴아미드 겔에서는, DNA 단편이 길이의 함수로서 시브되고 이동되며 이러한 접근은 지금 CE에 적용되고 있다. 가교결합된 폴리아크릴아미드를 사용하여 미터당 현저한 플레이트 수를 달성하였다[미터당 10^7 플레이트; Cohen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85:9660, 1988]. 이와 같이 기술된 바와 같은 CE 칼럼을 DNA 서열 분석에 이용할 수 있다. CE의 방법은 원칙적으로 표준 서열기에서 슬라브 겔 전기영동 보다 25배 정도 더 신속하다. 예를 들면, 시간당 약 300개 염기가 판독될 수 있다. 분리 속도는 과도한 열 생성없이도 겔에 적용될 수 있는 전기장의 크기에 의해 슬라브 겔 전기영동에서 제한된다. 따라서, 보다 큰 전기장 세기를 사용함으로써 보다 큰 CE 속도를 달성한다(CE 300V/cm 대 슬라브 겔 전기영동 10V/cm). 상기 모세관 포맷은 암페어수 및 전력과 이로써 생성되는 열 발생을 감소시킨다.

문헌[참조: Smith et al., Nuc. Acids. Res. 18:4417, 1990]에서는 처리량을 증가시키는 것과 병행해서 다중 모세관을 사용하는 것에 관해 제한되어 있다. 마찬가지로, 문헌[참조: Mathies and Huang, Nature 359:167, 1992]에서는 분리 공정을 모세관의 병행 어레이 상에서 수행하는 모세관 전기영동을 도입하였으며 고 처리량 서열분석인 것으로 입증되었다[참조: Huang et al., Anal. Chem. 64:967, 1992, Huang et al., Anal. Chem. 64:2149, 1992]. 모세관 전기영동의 주요 단점은 제한된 양의 샘플 만이 모세관 상으로 부하될 수 있다는 것이다. 모세관 전기영동 개시시 분리에 앞서 다량의 샘플을 농축시킴으로써, 부하능을 증가시키고 탐지 수준을 몇몇 등급 수준으로 저하시킬 수 있다. CE에서 예비농축시키는데 가장 널리 사용되고 있는 방법은 샘플 적층 방법이다. 샘플 적층 방법은 최근에 보고되었다[참조: Chien and Burgi, Anal. Chem. 64:489A, 1992]. 샘플 적층 방법은 샘플 완충제와 모세관 완충제 간의 매트릭스 차이, (pH, 이온 강도)에 의존하기 때문에, 이러한 샘플 영역을 가로지르는 전기장은 모세관 영역 보다 더 크다. 샘플 적층에 있어서, 저 농도 완충액 중의

큰 용적의 샘플을 모세관 칼럼의 헤드에서 예비농축시키기 위해 도입한다. 이러한 모세관을 동일한 조성이지만, 보다 고농도의 완충제로 채운다. 샘플 이온이 모세관 완충액 및 보다 낮은 전기장에 도달하게 되면, 이들 이온은 농축된 영역 내로 적층된다. 샘플 적층은 1 내지 3등급 정도 탐지능을 증가시킨다.

예비농축시키는 또 다른 방법은 분석물을 자유 영역 CE 분리하기에 앞서 등풍속선영동(ITP)을 적용하는 것이다. ITP는 전형적으로 CE와 연관된 낮은 nL 주입 용적과 대조적으로, 마이크로리터 용적의 샘플이 모세관 상으로 부하될 수 있게 해주는 전기영동 기술이다. 이러한 기술은 분석물 보다는, 보다 높은 이동성과 보다 낮은 이동성을 나타내는 2개의 완충액 사이에 샘플을 삽입하는(전해질을 리딩 및 트레일링함) 것에 의존한다. 이러한 기술은 본래, 분석물을 동일한 속도로 이동시키면서 순수한 영역으로 농축시키는 농축 기술이다. 이러한 기술은 현재 상기 기술된 적층 방법 보다는 덜 대중적인데, 이는 전해질을 리딩 및 트레일링하는데 몇가지 선택을 할 필요성이 있으며 또한 분리 공정 동안에 양이온성 또는 음이온성 종만을 분리시키는 능력이 있기 때문이다.

DNA 서열분석 공정의 핵심은 DNA 또는 올리고뉴클레오타이드 단편을 현저하게 선택적으로 전기영동 분리시키는 것이다. 이러한 방법은 각 단편이 분해되고 단지 뉴클레오타이드에 의해서만 상이하기 때문에 뛰어나다. 1000개 이하의 단편(1000bp)을 분리하는 것이 가능하였다. 절단 가능한 태그를 사용하여 서열 분석하는 추가의 잇점은 다음과 같다. 절단 가능한 태그가 사용될 때는 DNA 단편이 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 분리되는 경우에 슬라브 겔 포맷을 사용할 필요가 없다. 수 많은 샘플이 조합되기 때문에(4 내지 2000), 현재 통용되고 있는 염료-프라이머 또는 염료-종결기 방법(즉, ABI373 서열기)을 사용하는 경우에서와 같이 샘플을 병행해서 수행할 필요가 없다. 평행한 레인을 수행할 필요가 없기 때문에, 슬라브 겔을 사용할 이유가 없다. 따라서, 당업자는 전기영동 분리 방법에 튜브 겔 포맷을 사용할 수 있다. 문헌[참조:Grossman et al., Genet. Anal. Tech. Appl. 9:9, 1992]에는 튜브 겔 포맷을 슬라브 겔 포맷 대신 사용하는 경우에는 상당한 잇점이 획득된다고 나타나 있다. 이는 수행시간이 보다 신속하고(50% 정도) 고분자량 DNA 단편(1000nt 초과)을 훨씬 더 고분해시키는 슬라브 겔과 비교해서 튜브 포맷에서는 주울 열을 소산시키는 능력이 보다 더 크기 때문이다. 게놈 서열분석에서는 장시간 판독하는 것이 중요하다. 따라서, 서열분석에서 절단 가능한 태그를 사용하는 것은 사용자가 가장 높은 분리능을 보유하고 있으며 가장 효과적이고 민감한 DNA 분리 방법을 사용할 수 있게 해주는 부가의 잇점을 지니고 있다.

4. 마이크로조립된 장치

모세관 전기영동(CE)은 DNA 서열분석, 법의학적 분석, PCR 생성물 분석 및 제한 단편 사이징에 강력한 방법이다. CE는 전통적인 슬라브 PAGE 보다 훨씬 더 신속한데, 이는 모세관 겔을 사용하면 보다 높은 전위장이 적용될 수 있기 때문이다. 그러나, CE는 겔당 단지 하나의 샘플만이 프로세싱되도록 하는 단점을 지니고 있다. 이러한 방법은 CE의 보다 신속한 분리 시간과 다중 샘플을 병행해서 분석하는 능력이 조합된 것이다. 마이크로조립된 장치의 사용 이외의 중요한 개념은 레인 크기를 약 100마이크로미터로 소형화함으로써 전기영동에서 정보 밀도를 증가시키는 능력이다. 전자 산업은 대체로 크기가 1마이크론 미만인 회로를 만들기 위해 마이크로조립법을 이용하고 있다. 모세관 어레이의 통상 밀도는 모세관 튜브의 외부 직경을 제한한다. 채널 생성물을 마이크로조립시키면, 보다 고밀도의 어레이가 생성된다. 마이크로조립법으로 인해, 유리 섬유를 사용해서는 가능하지 않은 물리적 어셈블리가 가능해지고 상기 채널을 칩 상의 다른 장치에 직접적으로 연결시킬 수 있다. 분리 기술을 위해 마이크로칩 상에 작제된 장치는 거의 없다. 기체 크로마토그래피[참조:Terry et al., IEEE Trans. Electron Device, ED-26:1880, 1979] 및 액체 크로마토그래피[참조:Manz et al., Sens. Actuators B1: 249, 1990]이 실리콘 칩상에서 제작되었지만, 이러한 장치는 광범위하게 사용되고 있지 않다. 몇몇 그룹이 마이크로조립된 장치 상에서의 분리되는 형광성 염료 및 아미노산으로 보고되었다[참조:Manz et al., J. Chromatography 593:253, 1992, Effenhauser et al., Anal. Chem. 65:2637, 1993]. 최근에, 문헌[참조:Woolley and Mathies, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:11348, 1994]은 사진평판 및 화학적 에칭을 사용하여 유리 기판 상에 다수의 분리 채널을 만들 수 있다는 것을 나타내고 있다. 이러한 채널을 하이드록시에틸 셀룰로즈(HEC) 분리 매트릭스로 채운다. DNA 제한 단편이 2분 내로 분리될 수 있는 것으로 나타났다.

D. 태그의 절단

앞서 언급된 바와 같이, 상이한 링커 고안물은 상이한 특이적인 물리적 또는 화학적 조건하에서 절단능("불안정성")을 부여할 것이다. 각종 링커 고안물을 절단시키는 작용을 하는 조건의 예로는 산, 염기, 산화, 환원, 플루오라이드, 티올 교환, 광분해 및 효소적 조건이 있다.

앞서 열거된 링커에 대한 일반적인 기준을 충족시키는 절단 가능한 링커의 예는 당해 분야의 숙련인에게 널리 공지될 것이며 Pierce(Rockford, IL)로부터 입수 가능한 카타로그에서 발견되는 것들을 포함한다. 이의 예는 다음과 같다:

· 하이드록실아민에 의해 절단 가능한(37℃에서 3 내지 6시간 동안 1M) 아민 반응성 가교결합 시약인 에틸렌 글리코비스(석신이미딜석시네이트)(EGS);

· 0.015M 나트륨 페리오데이트에 의해 절단 가능한, 아민 반응성 가교결합 시약인 디석신이미딜 타르타레이트(DST) 및 설포-DST;

· 염기(pH 11.6)에 의해 절단 가능한, 아민 반응성 가교결합 시약인 비스[2-(석신이미딜옥시카보닐옥시)에틸]설포(BSOCOES) 및 설포-BSOCOES;

· 티올 교환 또는 환원에 의해 절단 가능한 피리딜디티올 가교결합제인 1,4-디-[3'-(2'-피리딜디티오(프로피온아미도))부탄(DPDTPB);

· 티올 교환 또는 환원에 의해 절단 가능한 피리딜디티올 가교결합제인 N-[4-(p-아지도살리실아미도)-부틸]-3'-(2'-피리딜디티오)프로피온아미드(APDP);

· 티올 교환 또는 환원에 의해 절단 가능한 광반응성 가교결합제인 비스-[베타-4-(아지도살리실아미도)에틸]-디설파이드;

· 티올 교환 또는 환원에 의해 절단 가능한 광반응성 가교결합제인 N-석신이미딜-(4-아지도페닐)-1,3'-디티오프로피오네이트(SADP);

· 티올 교환 또는 환원에 의해 절단 가능한 광반응성 가교결합제인 설포석신이미딜-2-(7-아지도-4-메틸쿠마린-3-아세트아미드)에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(SAED);

· 티올 교환 또는 환원에 의해 절단 가능한 광반응성 가교결합제인 설포석신이미딜-2-(m-아지도-o-니트로벤즈아미도)-에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(SAND).

태그를 방출시키는데 사용될 수 있는 절단 가능한 링커 및 절단 조건의 기타 예는 다음과 같다. 실릴 연결 그룹은 플루오라이드에 의해 또는 산성 조건하에서 절단시킬 수 있다. 3-, 4-, 5- 또는 6-치환된-2-니트로벤질옥시 또는 2-, 3-, 5- 또는 6-치환된-4-니트로벤질옥시 연결 그룹은 광자 공급원에 의해 절단될 수 있다 (광분해). 3-, 4-, 5- 또는 6-치환된-2-알콕시페녹시 또는 2-, 3-, 5- 또는 6-치환된-4-알콕시페녹시 연결 그룹은 $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ (산화)에 의해 절단될 수 있다. NCO_2 (우레탄) 링커는 하이드록사이드(염기), 산 또는 LiAlH_4 (환원)에 의해 절단될 수 있다. 3-펜테닐, 2-부테닐 또는 1-부테닐 연결 그룹은 O_3 , $\text{OsO}_4/\text{IO}_4^-$ 또는 KMnO_4 (산화)에 의해 절단될 수 있다. 2-[3-, 4- 또는 5-치환된 푸릴]옥시 연결 그룹은 O_2 , Br_2 , MeOH 또는 산에 의해 절단될 수 있다.

기타 불안정한 연결 그룹의 절단 조건으로는 다음과 같은 것이 있다: t-알킬옥시 연결 그룹을 산에 의해 절단할 수 있고; 메틸(디알킬)메톡시 또는 4-치환된-2-알킬-1,3-디옥솔란-2-일 연결 그룹은 H_3O^+ 에 의해 절단할 수 있으며; 2-실릴에톡시 연결 그룹은 플루오라이드 또는 산에 의해 절단될 수 있고; 2-(X)-에톡시(여기서, X는 케토, 에스테르 아미드, 시아노, NO_2 , 설파이드, 설폭사이드, 설포니다) 연결 그룹은 알칼리성 조건에 의해 절단할 수 있으며; 2-, 3-, 4-, 5- 또는 6-치환된 벤질옥시 연결 그룹은 산에 의해 또는 환원적 조건하에서 절단될 수 있고; 2-부테닐옥시 링킹 그룹은 $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RhCl}(\text{H})$ 에 의해 절단될 수 있으며; 3-, 4-, 5- 또는 6-치환된-2-브로모페녹시 연결 그룹은 Li, Mg 또는 BuLi에 의해 절단될 수 있고; 메틸티오메톡시 연결 그룹은 Hg^{2+} 에 의해 절단될 수 있고; 2-(X)-에틸옥시(여기서, X는 할로젠이다) 링킹 그룹은 Zn 또는 Mg에 의해 절단될 수 있고; 2-하이드록시에틸옥시 연결 그룹은 산화(예를 들면, $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ 를 사용함)에 의해 절단될 수 있다.

바람직한 링커는 산 또는 광분해에 의해 절단되는 것이다. 고체상 펩티드 합성용으로 개발된 산-불안정한 몇몇 링커는 태그를 MOI에 연결하는데 유용하다. 이들 링커 중 일부가 최근 문헌[참조: Lloyd-Williams et al., Tetrahedron 49:11065-11133(1993)]에 기재되어 있다. 한가지 유용한 유형의 링커는 p-알콕시벤질 알콜을 기준으로 한 것이며, 이들 중 2가지, 즉 4-하이드록시메틸페녹시아세트산 및 4-(4-하이드록시메틸-3-메톡시페녹시)부티르산은 업체[Advanced

Chem Tech, Louisville, KY]로부터 시판되고 있다. 양 링커를 벤질알콜에 대한 에스테르 결합을 통하여 태그에 부착시키고 카복실산에 대한 아미드 결합을 통하여 아민 함유 MOI에 부착시킬 수 있다. 이들 분자에 의해 연결된 태그는 트리플루오로아세트산의 농도를 다양하게 하면서 MOI로부터 방출시킨다. 이들 링커의 절단으로 인해, 태그 상의 카복실산이 유리된다. 2,4-디메톡시-4'-(카복시메틸옥시)-벤즈하이드릴아민(Fmoc-보호된 형태로 Advanced Chem Tech로부터 시판 중임) 등의 관련 링커를 통하여 부착된 태그를 산 절단시키면, 이와 같이 방출된 태그 상의 카복실릭 아미드가 유리된다.

본원에 유용한 광불안정한 링커는 대부분이 또한 고체상 펩티드 합성용으로 개발되었다[Lloyd-Williams review 참조]. 이들 링커는 통상적으로 2-니트로벤질에스테르 또는 2-니트로벤질아미드를 기준으로 한 것이다. 최근 문헌에 보고된 광불안정한 링커의 2가지 예는 4-(4-(1-Fmoc-아미노)에틸)-2-메톡시-5-니트로페녹시)부타노산[Holmes and Jones, J. Org. Chem. 60:2318-2319, 1995] 및 3-(Fmoc-아미노)-3-(2-니트로페닐)프로피온산[Brown et al., Molecular Diversity 1:4-12, 1995]이다. 양 링커는 카복실산을 통하여 MOI 상의 아민에 부착시킬 수 있다. 태그를 이러한 링커에 부착시키는 것은 태그 상의 카복실산과 링커 상의 아민 간에 아미드를 형성함으로써 이루어진다. 광불안정한 링커의 절단은 통상적으로 당해 분야의 숙련인에게 공지된 세기 및 시간에서 350nm 파장의 UV 광선을 사용하여 수행한다. 광화학적 절단용 기기의 시판회사의 예는 Aura Industries Inc(Staten Island, NY) 및 Agrenetics(Wilmington, MA)이다. 링커의 절단으로 인해, 태그 상의 1급 아미드가 유리된다. 광절단 가능한 링커의 예로는 니트로페닐 글리신 에스테르, 엑소- 및 엔도-2-벤조노르보르네일 클로라이드 및 메탄 설포네이트, 및 3-아미노-3-(2-니트로페닐) 프로피온산이 있다. 효소적 절단의 예로는 에스테르 결합을 절단시킬 에스테라제, 포스포디에스테르 결합을 절단시킬 뉴클레아제, 펩티드 결합을 절단시킬 프로테아제 등이 있다.

E. 태그의 탐지

탐지 방법은 전형적으로 몇몇 유형의 스펙트럼 영역에서 흡수 및 방사에 의존된다. 원자 또는 분자가 빛을 흡수하면, 유입되는 에너지가 양자화된 구조를 보다 높은 에너지 수준으로 여기시킨다. 여기 유형은 빛의 파장에 좌우된다. 자외선 또는 가시광선에 의해 전자를 보다 높은 오비탈로 향상시키고, 적외선에 의해 분자 진동을 여기시키며 마이크로파에 의해 회전 운동을 여기시킨다. 흡수 스펙트럼은 파장의 함수로서의 빛의 흡수이다. 원자 또는 분자의 스펙트럼은 이의 에너지 수준 구조에 의존된다. 흡수 스펙트럼은 화합물을 동정하는데 유용하다. 특정의 흡수 분광학적 방법으로는 원자 흡수 분광학(AA), 적외선 분광학(IR) 및 uv-vis 분광학(uv-vis)이 있다.

고 에너지 수준으로 여기되는 원자 또는 분자는 방사선을 방출함으로써 낮은 수준으로 붕괴될 수 있다. 이러한 빛 방출은 동일한 스핀 상태간에 전이가 존재하는 경우에는 형광성으로 칭하고 상이한 스핀의 상태 간에 전이가 발생하는 경우에는 인광성으로 칭해진다. 분석물의 방출 세기는 농도(저농도에서)에 비례하고 방출되는 종을 정량화하는데 유용하다. 특정의 방출 분광학적 방법으로는 원자 방출 분광학(AES), 원자 형광성 분광학(AFS), 분자상 레이저-유도된 형광성(LIF) 및 X선 형광성(XRF)이 있다.

전자기 방사선이 물질 내로 통과하는 경우, 대부분의 방사선은 이의 본래의 방향으로 지속되지만 소 분획은 다른 방향으로 산란된다. 유입되는 빛과 동일한 파장으로 산란되는 빛은 레일리(Rayleigh) 산란으로 불리운다. 진동으로 인해 투명한 고체에서 산란되는 빛(포논)은 브릴루앙(Brillouin) 산란으로 불리운다. 브릴루앙 산란은 전형적으로 입사광으로부터 0.1 내지 1 파수 정도 이동된다. 불투명한 고체에서 분자 또는 광학적 포논에서의 진동으로 인해 산란되는 빛은 라만 산란으로 불리운다. 라만 산란된 빛은 입사광으로부터 4000파수 정도로 많이 이동된다. 특정의 산란 분광학적 방법으로는 라만 분광학이 있다.

IR 분광학은 특정 샘플에 의한 중간-적외선의 흡수 파장 및 세기의 측정법이다. 중간-적외선(2.5 내지 50 μ m, 4000 내지 200 cm^{-1})은 분자 진동을 보다 높은 에너지 수준으로 여기시키기에 충분히 에너지발생적이다. IR 흡수 밴드의 파장은 특정 유형의 화학적 결합의 특징이고 IR 분광학은 일반적으로 유기 및 유기금속성 분자를 동정하는데 가장 유용하다.

인접-적외선 흡수 분광학(NIR)은 특정 샘플에 의한 인접-적외선의 흡수 파장 및 세기의 측정법이다. 인접-적외선은 800nm 내지 2.5 μ m(12,500 내지 4000 cm^{-1}) 범위로 확대되고 분자 진동의 오버톤 및 조합을 보다 높은 에너지 수준으로 여기시키기에 충분히 에너지발생적이다. NIR 분광학은 일반적으로 유기 작용성 그룹, 특히 O-H, N-H 및 C=O를 정량적으로 측정하는데 사용된다. NIR 기기의 성분 및 고안은 uv-vis 흡수 분광계와 유사하다. 광원은 통상적으로 텅스텐 램프이고 탐지기는 통상적으로 PbS 고체상 탐지기이다. 샘플 홀더는 유리 또는 석영일 수 있고 전형적인 용매는 CCl_4 및 CS_2 이다. NIR 분광학의 편리한 기기는 온 라인 모니터와 프로세스 컨트롤에 적합하게 만든다.

자외선 및 가시광선 흡수 분광학(uv-vis)은 특정 샘플에 의한 인접-자외선 및 가시광선의 흡수 파장 및 세기의 측정법이다. 진공 UV에서의 흡수는 100 내지 200nm(10 내지 $50,000\text{cm}^{-1}$)에서 발생되고 석영 UV에서의 흡수는 200 내지 350nm($50,000$ 내지 $28,570\text{cm}^{-1}$)에서 발생되며 가시광선은 350 내지 800nm($28,570$ 내지 $12,500\text{cm}^{-1}$)에서 발생되며 이는 비어-램버트-보거트 법에 의해 기재되어 있다. 자외선 및 가시광선은 외부 전자를 보다 높은 에너지 수준으로 증진 시키기에 충분히 에너지발생적이다. UV-vis 분광학은 통상적으로 용액 중의 분자 및 무기 이온 또는 복합체에 적용할 수 있다. 이러한 uv-vis 스펙트럼은 스펙트럼의 넓은 양상에 의해 제한된다. 광원은 통상적으로, uv 측정의 경우에는 수소 또는 이중수소 램프이고 가시광선 측정의 경우에는 텅스텐 램프이다. 이들 연속적인 광원의 파장은 프리즘 또는 격자 단색화 장치 등의 파장 분리기를 사용하여 선택한다. 이러한 파장 분리를 주사함으로써 스펙트럼을 획득하고 스펙트럼으로부터 또는 단일 파장에서 정량적으로 측정할 수 있다.

질량 분광계는 이온화 원자 또는 분자의 질량 대 전하비(m/z)의 차이를 이용하여 이들을 서로 분리시킨다. 따라서, 질량 분광분석법은 원자 또는 분자를 정량화하는데 유용하고 또한 분자에 관한 화학적 및 구조적 정보를 결정하는데 유용하다. 분자는 화합물을 동정하기 위해 구조적 정보를 제공해주는 특이한 단편화 패턴을 지닌다. 질량 분광계의 일반적인 작동은 다음과 같다. 기체상 이온을 생성시키고, 이 이온을 이들의 질량 대 분자비를 기준으로 하여 공간 또는 시간으로 분리하고 각 질량 대 전하비의 이온의 양을 측정한다. 질량 분광계의 이온 분리력은 $R=m/\Delta m$ (여기서, m 은 이온 질량이고 Δm 은 질량 스펙트럼에서 두 분해가능한 피크 간의 질량차이다)로서 정의되는 분해도로 기술된다. 예를 들면, 분해도가 1000인 질량 분광계는 m/z 가 100.1인 이온으로부터 m/z 가 100.0인 이온을 분해시킬 수 있다.

일반적으로, 질량 분광계(MS)는 이온 공급원, 질량 선택적 분석기 및 이온 탐지기로 구성된다. 자기 섹터, 사중극자 및 시보 고안물은 또한 이온을 공급원 영역으로부터 질량 분석기로 전이시키기 위해 추출 및 가속 이온 광학물을 필요로 한다. 몇몇 질량 분석기 고안물(자기 섹터 MS, 사중극자 MS 또는 시보 MS의 경우)의 상세한 설명은 다음에 논의된다. 자기 섹터 MS에 대한 단일 포커싱 분석기는 180, 90 또는 60도의 입자 빔 통로를 활용한다. 입자에 영향을 미치는 각종 힘은 상이한 질량 대 전하비를 갖는 이온을 분리시킨다. 이중-포커싱 분석기를 사용하는 경우, 이러한 유형의 기기에 정전 분석기를 가하여 역학 에너지가 상이한 입자를 분리시킨다.

사중극자 MS에 대한 사중극자 질량 필터는 나란히 배열된 4개의 금속 로드로 구성된다. 인가 전압은 4개의 로드 사이의 중앙에 위치한 비행 경로 아래를 돌아 다니는 이온의 궤적에 영향을 미친다. 소정의 DC 및 AC 전압의 경우, 특정 질량 대 전하비의 이온만이 사중극자 필터 내를 통과하고 다른 모든 이온은 이들의 본래의 경로를 이탈하여 이동된다. 로드 상의 전압이 변화됨에 따라 사중극자 필터를 통과하는 이온을 모니터링함으로써 질량 스펙트럼을 획득한다.

시보 질량 분광계는 상이한 질량의 이온을 분리시키기 위해 "드리프트 영역"을 통한 이전 시간차를 이용한다. 이는 이온이 펄스로 생성되고/되거나 펄스로 추출되어야만 하기 때문에 펄스된 모드로 작동된다. 펄스된 전기장은 모든 이온을 qV 의 역학 에너지(여기서, q 는 이온 전하이고 V 는 인가 전압이다)를 갖는 장-유리 드리프트 영역 내로 가속화시킨다. 이온 역학 에너지가 0.5mV^2 이기 때문에, 보다 가벼운 이온은 무거운 이온보다 보다 고속이고 보다 빨리 드리프트 영역의 말단에서 탐지기에 도달된다. 이온 탐지기의 출력은 시간의 함수로서 오실로스코프 상에 디스플레이되어 질량 스펙트럼을 생성시킨다.

이온 형성 공정은 질량 분광분석에 대한 출발점이 된다. 화학적 이온화는 분석물 분자(태그)와 반응하기 위한 시약 이온을 이용하여 광자 또는 하이드라이드 전이에 의해 이온을 형성시키는 방법이다. 시약 이온은 과량(태그에 대해 과량)의 메탄을 전자 충격(EI) 이온 공급원 내로 도입함으로써 생성된다. 전자 충돌로 인해 CH_4^+ 및 CH_3^+ 이 생성되며, 이는 추가로 메탄과 반응하여 CH_5^+ 및 C_2H_5^+ 를 형성한다. 태그를 이온화시키는 또 다른 방법은 플라즈마 및 글로우 방전에 의한 것이다. 플라즈마는 원자를 효과적으로 여기 및 이온화시키는 부분적으로 이온화된 뜨거운 기체이다. 글로우 방전은 두 전극 간에 유지된 저압 플라즈마이다. 전자 충격 이온화는 통상적으로 텅스텐 필라멘트로부터 발생된 전자 빔을 이용하여 기상 원자 또는 분자를 이온화시킨다. 상기 빔으로부터의 전자는 분석물 원자 또는 분자와 충돌하여 이온을 발생시킨다. 전기분무 이온화는 매우 미세한 니들과 일련의 스키머를 활용한다. 샘플 용액을 공급원 챔버 내로 분무하여 비말을 형성시킨다. 이러한 비말은 모세관으로부터 배출될 때 전하를 수반하고 용매가 비말을 기화시킴에 따라 고도로 하전된 분석물 분자를 남기면서 사라진다. ESI는 기화 또는 이온화시키기가 어려운 큰 생물학적 분자에 특히 유용하다. 고속 원자 포격(FAB)은 탈착 및 이온화를 야기시키면서 고체 샘플을 때리는 중성 원자, 전형적으로 Xe 또는 Ar의 고 에너지 빔을 활용한다. 이는 기상으로 만들기 어려운 큰 생물학적 분자에 사용된다. FAB는 분획화를 거의 유발시키지 않으며 통상적으로 큰 분자 이온 피크를 제공하기 때문에 분자량 결정에 유용하다. 원자상 빔은 전하 교환 셀을 통하여 이온 공급원으로부터 이온을 가속화시킴으로써 생성된다. 상기 이온은 중성 원자와 충돌중인 전자를 픽업하여 고 에너지 원자 빔을 형성시킨다. 레이저

이온화(LIMS)는 레이저 펄스가 샘플 표면으로부터의 물질을 제거하고 샘플 구성분의 일부를 이온화시키는 마이크로플라즈마를 생성시키는 방법이다. 매트릭스 보조된 레이저 탈착 이온화(MALDI)는 단백질 또는 DNA 단편과 같은 큰 생물학적 분자를 기화 및 이온화시키는 LIMS 방법이다. 이러한 생물학적 분자를 니코틴산 등의 고체 매트릭스에 분산시킨다. UV 레이저 펄스는 큰 분자 중의 몇몇을 이온화 형태로 기상 내로 운반시켜 이들이 질량 분광계에 추출되도록 하는 매트릭스를 제거시킨다. 플라즈마 탈착 이온화(PD)는 반대 방향으로 돌아 다니는 2개의 핵분열 단편을 생성시키는 ^{252}Cf 의 붕괴를 이용한다. 하나의 단편은 1 내지 10개 분석물 이온을 두들기면서 샘플을 때린다. 다른 단편은 탐지기를 때리고 데이터 획득 시작을 촉발시킨다. 이러한 이온화 방법은 큰 생물학적 분자에 특히 유용하다. 공명 이온화(RIMS)는 하나 이상의 레이저 빔이 기상 원자 또는 분자의 공명 내지 전이로 튕하여 이의 이온화 전위 이상의 단계별 양태로 증진시켜 이온을 발생시키는 방법이다. 2차적인 이온화는 $^3\text{He}^+$, $^{16}\text{O}^+$ 또는 $^{40}\text{Ar}^+$ 등의 이온 빔을 이용하고 샘플 표면 위로 초점을 맞추고 물질을 기상 내로 스퍼터한다. 스파크 공급원은 두 개의 전극을 가로지르는 전기 전류를 펄싱함으로써 고체 샘플에서 분석물을 이온화시키는 방법이다.

태그는 이것이 부착된 분자로부터 절단되기에 앞서, 동안 또는 절단 후에 하전될 수 있다. 이온 "탈착", 고체 또는 액체 표면으로부터 이온을 직접적으로 형성 또는 방출시키는 것을 근거로 하는 이온화 방법으로, 비휘발성이고 열적으로 불안정한 화합물에 대한 적용을 증가시킬 수 있었다. 이들 방법은 이온화에 앞서 중성 분자를 휘발시켜야 하는 필요성을 없애주며 일반적으로 분자상 조각의 열적 분해를 최소화시켜준다. 이들 방법으로는 필드 탈착[참조:Becky, Principles of Field Ionization and Field Desorption Mass Spectrometry, Pergamon, Oxford, 1977], 플라즈마 탈착[참조:Sundqvist and Macfarlane, Mass Spectrom. Rev. 4:421, 1985], 레이저 탈착[참조:Karas and Hillenkamp, Anal. Chem. 60:2299, 1988; Karas et al., Angew. Chem. 101:805, 1989], 고속 입자 포격[예를 들면, 고속 원자 포격, FAB, 2차적인 이온 질량 분광분석법, SIMS, Barber et al., Anal. Chem. 54:645A, 1982] 및 열분무 이온화(TS)[참조:Vestal, Mass Spectrom. Rev. 2:447, 1983]이 있다. 열분무는 액체 크로마토그래피와의 온 라인 조합에 광범위하게 적용된다. 지속적인 흐름 FAB 방법[참조:Caprioli et al., Anal. Chem. 58:2949, 1986]은 또한 상당한 효능을 나타내었다. 이온화/질량 분광분석법 조합의 보다 완벽한 리스트는 이온 트랩 질량 분광분석법, 전기분무 이온화 질량 분광분석법, 이온 분무 질량 분광분석법, 액체 이온화 질량 분광분석법, 대기압 이온화 질량 분광분석법, 전자 이온화 질량 분광분석법, 준안정성 원자 포격 이온화 질량 분광분석법, 고속 원자 포격 이온화 질량 분광분석법, MALDI 질량 분광분석법, 광이온화 시보 질량 분광분석법, 레이저 비말 질량 분광분석법, MALDI-TOF 질량 분광분석법, APCI 질량 분광분석법, 나노-분무 질량 분광분석법, 연무화된 분무 이온화 질량 분광분석법, 화학적 이온화 질량 분광분석법, 공명 이온화 질량 분광분석법, 2차적인 이온화 질량 분광분석법, 열분무 질량 분광분석법이다.

비휘발성의 생물학적 화합물에 적용되기 쉬운 이온화 방법은 중복되는 적용능 범위를 갖는다. 이온화 효능은 매트릭스 조성과 화합물 유형에 고도로 의존적이다. 현재 이용 가능한 결과는 TS에 대한 상한 분자량은 약 8000달톤이라는 것을 지시하고 있다[참조:Jones and Krolik, Rapid Comm. Mass Spectrom. 1:67, 1987]. TS는 주로 사중극자 질량 분광계와 함께 실시되기 때문에, 시보(TOF) 질량 분광계가 시판중이며 m/z 범위가 단지 탐지기 효능에 의해서만 제한된다는 잇점을 지니고 있다. 최근에, 2가지 부가의 이온화 방법이 도입되었다. 이들 2가지 방법은 지금 매트릭스 보조된 레이저 탈착 [MALDI, Karas and Hillenkamp, Anal. Chem. 60:2299, 1988; Karas et al., Angew. Chem. 101:805, 1989] 및 전기분무 이온화 방법(ESI)로서 지칭되고 있다. 양 방법은 매우 높은 이온화 효능(즉, 매우 높은 [생성된 분자 이온]/[소모된 분자])을 갖는다. 상기 기술의 최종 전위를 한정하는 민감도는 샘플 크기, 이온의 양, 유속, 탐지 효능 및 실제적인 이온화 효능에 의존적이다.

전기분무-MS는 1960년대에 처음 제안된 사상을 근거로 한것이다[참조:Dole et al., J. Chem. Phys. 49:2240, 1968]. 전기분무 이온화(ESI)는 질량 분광학에 의한 분석용의 하전된 분자를 생성시키는 하나의 수단이다. 간략하게 언급하면, 전기분무 이온화는 강력한 정전기장에서 액체를 분사시킴으로써 고도로 하전된 비말을 생성시킨다. 일반적으로 대기압에서 건조 욕 기체에서 형성되는, 상기와 같이 고도로 하전된 비말은, 전하 반발이 "쿨롱 폭발"을 리드하면서 응집력을 극복할 때까지 중성 용매의 증발에 의해 수축된다. 이온화의 정확한 메카니즘은 논의의 여지가 있고 몇몇 그룹은 가설을 제안한다 [참조:Blades et al., Anal. Chem. 63:2109-14, 1991; Kebarle et al., Anal. Chem. 65:A972-86, 1993; Fenn, J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 4:524-35, 1993]. 이온 형성의 최종 공정과 무관하게, ESI는 온순한 조건하에서 용액으로부터 하전된 분자를 생성시킨다.

소량의 유기 분자에 대하여 유용한 질량 스펙트럼 데이터를 수득하는 능력은 이온의 효율적인 생산에 좌우된다. ESI에 대한 이온화 효능은 분자와 연결된 양전하의 정도와 관련된다. 실험적으로 이온화를 증진시키는 것은 통상적으로 산성 조건을 사용하는 것과 연관이 있다. 이온화를 증진시키는 또 다른 방법은 가능한 경우 4급 아민을 사용하는 것이다[참조:Aebersold et al., Protein Science 1:494-503, 1992; Smith et al., Anal. Chem. 60:436-41, 1988].

전기분무 이온화 방법이 다음과 같이 보다 상세히 기재되어 있다. 전기분무 이온 생성에는 다음 두 가지 단계가 필요하다: 대기압 근처에서 고도로 하전된 비말을 산포시킨 다음, 증발을 유도하는 조건을 적용하는 단계. 분석물 분자 용액을 높은 전기 전위로 유지되는 니들 내로 통과시킨다. 니들의 말단에서, 용액은 분석물 분자를 함유하는 고도로 하전된 작은 비말의 운무 내로 산포된다. 이와 같이 작은 비말은 신속하게 증발되고 장 탈착 또는 잔여 증발 공정에 의해, 광자화된 단백질 분자가 기상 내로 방출된다. 전기분무는 일반적으로, 높은 전기장을 모세관 튜브로부터 액체의 작은 흐름(일반적으로 1 내지 10 μ L/min)으로 적용함으로써 생성된다. 3 내지 6kV의 전위차가 전형적으로, 모세관과 0.2 내지 2cm 떨어져서 위치한 역 전극 간에 적용된다(여기서, 이온, 하전된 클러스터 및 심지어 하전된 비말은 탈용매화도에 따라서 작은 오리피스스를 통하여 MS에 의해 샘플링될 수 있다). 전기장은 모세관 말단에서의 액체 표면 상에 전하를 축적시키므로; 액체 유속, 저항 및 표면 장력이 비말 제조에 중요한 요인이다. 높은 전기장으로 인해, 액체 표면이 붕괴되고 고도로 하전된 액체 비말이 형성된다. 모세관 바이어스에 따라서 양성적으로 또는 음성적으로 하전된 비말이 생성될 수 있다. 음이온 모드는 전기 방전을 억제하기 위하여 산소와 같은 전자 스캐빈저의 존재를 필요로 한다.

광범위한 액체를 정전기적으로 진공 내로 분무하거나, 또는 분사제의 보조하에 분무할 수 있다. 분사하기 위해 전기장만을 사용하게 되면, 액체 전도도 및 유전 상수 범위에 대해 몇가지 실제적인 제한이 야기된다. 10⁻⁴M 미만의 수성 전해질 용액에 상응하는 유용한 액체 유속에서 안정한 전기분무를 위해 실온에서 10⁻⁵옴 미만의 용액 전도도가 요구된다. ESI-MS에 가장 유용한 것으로 발견된 모드에서는, 적당한 액체 유속으로 인해, 액체가 미세한 운무로서 분산된다. 모세관으로 불려 비말 직경의 단거리는 종종 다소 일정하며 1 μ m 순이다. 특히 중요한 것은 총 전기분무 이온 전류가 보다 높은 액체 유속에 대해서만 약간 증가된다는 것이다. 가열하는 것이 전기분무를 조작하는데 유용하다는 증거가 있다. 예를 들면, 약간의 가열로 인해, 수성용액이 용이하게 전기분무되어지는데, 이는 아마도 감소된 점도와 표면 장력에 기인된 것이다. 열적으로 보조된 및 기체 분사 보조된 전기분무 모두는 보다 높은 액체 유속이 사용될 수 있게 해주지만, 비말 하전도는 저하된다. 분자 이온을 형성시키기 위해서는, 초기 비말 집단의 증발에 영향을 미치는 조건이 필요하다. 이는 적당한 온도(<60°C)에서 무수 기체의 유동에 의해, 경계면을 통한 이송 동안에 가열함으로써 및 (특히 이온 트래핑 방법의 경우에는) 비교적 저압에서 강력한 충돌에 의해서 보다 고압에서 수행할 수 있다.

근원적인 ESI에 대한 상세한 공정이 아직 불확실하긴 하지만, ESI에 의해 생성된 극히 작은 비말은 용액 중에 실 전하를 수반하는 거의 모든 조각이 잔류 용매의 증발 후에 기상으로 전이될 수 있게 해준다. 이때, 질량 분광분석적 탐지에는 이온이 탈용매화 후에도 탐지 가능한 m/z 범위(사중극자 기기의 경우 <4000달톤)를 가져야 할 뿐만 아니라 충분히 효과적으로 생성 및 전달되어야 하는 것을 필요로 한다. 광범위한 용질은 이미 ESI-MS에 적용하기 쉬운 것으로 밝혀졌으며 분자량에 대한 이온화 효율의 상당한 의존성이 결여되어 있다는 것은 고도로 구별되지 않고 광범위하게 적용 가능한 이온화 공정을 제안하는 것이다.

전기분무 이온 "공급원"은 대기압 근처에서 작용한다. 전기분무 "공급원"은 전형적으로, 역 전극에 대해 액체 용액을 전기적으로 바이어싱하기 위한 방법을 혼입하는 금속 또는 유리 모세관이다. 용액, 전형적으로 분석물을 함유하는 물-메탄올 혼합물 및 종종 기타 첨가제(예: 아세트산)은 모세관 말단으로 유동된다. 필수적으로 어떠한 용매 시스템도 수용할 수 있는 ESI 공급원이 문헌[참조:Smith et al., Anal. Chem. 62:885, 1990]에 기재되어 있다. ESI에 대한 전형적인 유속은 1 내지 10 μ L/min이다. ESI-MS의 주요 요구사항은 고압 영역으로부터 이온을 가능한한 효율적으로 MS 내로 샘플링 및 수송하는 것이다.

ESI의 효율은 본원에 기술된 본 발명에 유용한 극도로 민감한 측정에 대한 기준을 제공하면서 매우 높을 수 있다. 일반적인 기기 성능은 단일 하전된 조각에 대해 탐지기에서 약 2 x 10⁻¹²A 또는 약 10⁷ 계수/s의 총 이온 전류를 제공할 수 있다. 이러한 기기 성능을 기준으로 하여, 10⁻¹⁰M 또는 약 10⁻¹⁸mol/s 정도로 낮은 단일 하전된 조각의 농도는, 분석물이 완전하게 이온화되는 경우에 탐지 가능한 이온 전류(약 10계수/s)를 제공할 것이다. 예를 들면, 모세관 영역 전기영동을 이용하여 ESI 경계면을 사용하는 4급 암모늄 이온에 대해 낮은 아토몰 탐지 제한값이 획득되었다[참조:Smith et al., Anal. Chem. 59:1230, 1988]. 분자량이 1000인 화합물의 경우, 전하 평균 수는 1이고, 전하 상태의 대략적인 수는 1이며, 피크 폭(m/z)이 1이고 최대 세기(이온/s)는 1 x 10¹²이다.

ESI 질량 스펙트럼을 획득하는데 실제로 소모되는 샘플은 거의 없다[참조:Smith et al., Anal. Chem. 60:1948, 1988]. 스펙트럼의 일정 부분을 동시에 탐지시키면서, 섹터 기기를 갖는 어레이 탐지기를 사용함으로써 상당한 정확이 또한 획득될 수도 있다. 현재 ESI에 의해 형성된 이온의 약 10⁻⁵만이 탐지되기 때문에, 기기 성능을 제한하는 요인에 대한 주의는 증가된 민감도에 대한 기준을 제공할 수 있다. 당해 분야의 숙련인 본 발명이 이온화 및 탐지 방법서의 개선을 도모하고 이를 포괄한다는 것을 명백히 인지할 것이다.

경계면을 분리용 기기(예:젤)와 탐지기(예:질량 분광계) 사이에 위치시키는 것이 바람직하다. 이러한 경계면은 바람직하게는 다음 성질을 갖는다: (1) 별도의 시간 간격으로 DNA 단편을 수집하는 능력, (2) DNA 단편을 농축시킴, (3) 전기영동 완충액 및 환경으로부터 DNA 단편을 제거함, (4) 태그를 DNA 단편으로부터 절단함, (5) 태그를 DNA 단편으로부터 분리시킴, (6) DNA 단편을 배치함, (7) 태그를 휘발성 용액에 위치시킴, (8) 태그를 휘발 및 이온화시킴 및 (9) 태그를 질량 분광계 내로 도입시키는 전기분무 장치로 태그를 놓아두거나 수송시킴.

이러한 경계면은 또한, DNA 단편이 젤의 바닥으로부터 용출됨에 따라 이를 "수집"하는 능력을 지닌다. 이러한 젤은 슬라브 젤, 관상 젤, 모세관 등으로 구성될 수 있다. DNA 단편은 몇몇 방법에 의해 수집될 수 있다. 첫 번째 방법은 DNA 단편을 전극 위로 또는 근처에 수집시키는 전기장을 사용하는 것이다. 두 번째 방법은 젤의 바닥 내로 통과된 액체 스트림을 유도시킴으로써 DNA 단편을 수집하는 것이다. 양 방법의 국면을 조합할 수 있는데, 여기서는 나중에 전기장의 사용으로 인해 농축될 수 있는 유동 스트림 내로 DNA가 수집된다. 최종 결과는 DNA 단편이 분리 방법이 수행되는 환경으로부터 제거된다는 것이다. 즉, DNA 단편은 전기장의 사용으로 인해 한가지 용액 유형으로부터 또 다른 용액 유형으로 "드래그"될 수 있다.

DNA 단편이 일단 적당한 용액(전기분무 및 질량 분광분석에 부합됨) 내에 있으면, 태그를 이러한 DNA 단편으로부터 절단시킬 수 있다. 이어서, 전기장을 적용함으로써 DNA 단편(또는 이의 잔여분)을 태그로부터 분리시킬 수 있다(바람직하게는, 태그는 DNA 태그의 전하와 반대되는 전하이다). 이어서, 전기장 또는 유동 액체를 사용함으로써 태그를 전기분무 장치 내로 도입한다.

형광성 태그는 이의 흡수 및 형광 방출 파장 및 세기에 의해 대부분 직접적으로 동정 및 정량화할 수 있다.

통상적인 스펙트로플루오로미터가 지속적인 범위의 여기 및 방출 파장(I_{EX} , I_{S1} , I_{S2})극도로 가용성이긴 하지만, 유동 세포측정계와 같이 보다 특수화된 기기 및 레이저 주사 현미경은 단일 고정 파장에서 여기될 수 있는 프로브를 필요로 한다. 최신의 기기에서, 이는 통상적으로 488-nm 라인의 아르곤 레이저이다.

프로브 분자당 형광 세기는 ϵ 및 QY의 생성물에 비례한다. 실제적으로 중요하게 통용되는 발색단 중에서의 이들 파라미터의 범위는 ϵ 의 경우에는 10,000 내지 100,000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 이고 QY의 경우에는 0.1 내지 1.0이다. 흡수가 고 강도 발광에 의해 포화에 대하여 조종되는 경우, 여기된 발색단의 비가역적 파손(광표백)이 형광성 탐지능을 제한하는 요인이 된다. 광표백의 실제적인 영향은 문제의 형광성 탐지 기술에 좌우된다.

당해 분야의 숙련인은 특정 장치(경계면)가 분리와 탐지 단계 사이에 놓여져서 크기 분리 및 태그 탐지를 지속적으로 작용(실시간)할 수 있게 한다는 것을 명백하게 인지할 것이다. 이는 분리 방법 및 기기를 탐지 방법 및 단일 장치를 형성하는 기기와 연합시킨다. 예를 들면, 경계면을 질량 분광분석법 또는 일정전위 전류법에 의해 분리 기술과 탐지 사이에 위치시킬 수 있다.

경계면의 기능은 주로 분석물로부터 태그를 방출시키는 것이다(예를 들면, 질량 분광분석법). 이러한 경계면의 몇몇 대표적인 이행법이 있다. 경계면의 고안은 절단 가능한 링커의 선택에 의존적이다. 빛 또는 광 절단 가능한 링커의 경우, 에너지 또는 광자 공급원이 필요하다. 산 불안정한 링커, 염기 불안정한 링커 또는 디설파이드 링커의 경우, 경계면 내에 시약을 첨가하는 것이 필요하다. 열 불안정한 링커의 경우, 에너지 열 공급원이 필요하다. 효소 민감성 링커의 경우에는 효소 첨가가 필요하며, 예를 들면, 펩티드 링커의 경우에는 특이적 프로테아제가 필요하고 DNA 또는 RNA 링커의 경우에는 뉴클레아제가 필요하며 절단 후에 불안정한 링커(예를 들면, 화학발광성 기질과 유사함)의 경우에는 글리코실라제, HRP 또는 포스포타제가 필요하다. 경계면의 다른 특징으로는 최소의 밴드 확장, 질량 분광계 내로의 주입 이전에 태그로부터 DNA 분리가 있다. 분리 기술로는 전기영동 방법 및 기술, 친화 기술, 크기 보유(투석), 여과 등이 있다.

또한, 태그(또는 핵산-링커-태그 작제물)를 포획 전기영동적으로 농축시킨 다음, 선택된 특정한 유형의 이온화 방법과 부합되는 대체 시약 스트림 내로 방출시키는 것이 가능하다. 경계면은 또한 마이크로비드 상에 태그(또는 핵산-링커-태그 작제물)를 포획하고, 이러한 비드를 챔버 내로 슈팅한 다음 레이저 탈착/기화를 수행할 수 있다. 또한, 대체 완충액 내로(예를 들면, 모세관 전기영동 완충액으로부터 투과성 막을 가로질러 소수성 완충액 내로) 유도하여 추출할 수도 있다. 또한 몇몇 용도에서는 경계면의 추가의 기능을 포함할 지도 모르는 질량 분광계 내로 태그를 간헐적으로 운반하는 것이 바람직할 수도 있다. 경계면의 또 다른 기능은 각 칼럼에 대한 시간 슬롯을 회전시키면서 태그를 다중 칼럼으로부터 질량 분광계 내로 운반하는 것이다. 또한, 태그를 단일 칼럼으로부터 시간에 의해 분리된 다중 MS 탐지기 내로 운반하고, 수 밀리초 동안 각 셋트의 태그를 수집한 다음, 질량 분광계로 운반시킬 수 있다.

다음은 본 발명에서 사용될 수 있는 분리 및 탐지 기술에 대한 대표적인 판매원의 목록이다. Hoefer Scientific Instruments(San Francisco, CA)는 서열분석용 전기영동 장비(Two StepTM, Poker FaceTM II)를 제작한다. Pharmacia Biotech(Piscataway, NJ)는 DNA 분리 및 서열분석용 전기영동 장비(PCR-SSCP 분석용 PhastSystem, DNA 서열분석용 MacroPhor System)를 제작한다. Perkin Elmer/Applied Biosystems Division(ABI, Foster City, CA)는 형광성 염료를 기준으로 한 반-자동화 서열분석기(ABI373 및 ABI377)를 제작한다. Analytical Spectral Devices(Boulder, CO)는 UV 분광계를 제작한다. Hitachi Instruments(Tokyo, Japan)는 원자 흡수 분광계, 형광성 분광계, LC 및 GC 질량 분광계, NMR 분광계 및 UV-VIS 분광계를 제작한다. PerSeptive Biosystems(Framingham, MA)는 질량 분광계(VoyagerTM Elite)를 생산한다. Bruker Instruments Inc.(Manning Park, MA)는 FTIR 분광계(Vector 22), FT-라만 분광계, 시보 질량 분광계(Reflex IITM), 이온 트랩 질량 분광계(EsquireTM) 및 말디 질량 분광계를 제작한다. Analytic Technology Inc.(ATI, Boston, MA)는 모세관 겔 전기영동 유니트, UV 탐지기 및 다이오드 어레이 탐지기를 제작한다. Teledyne Electronic Technologies(Mountain View, CA)는 이온 트랩 질량 분광계(3DQ DiscoveryTM 및 3DQ ApogeeTM)를 제작한다. Perkin Elmer/Applied Biosystems Division(Foster City, CA)는 전기분무와 부합되는 시엑스 질량 분광계(트리플 사중극자 LC/MS/MS, API 100/300)를 제작한다. Hewlett-Packard(Santa Clara, CA)는 질량 선택적 탐지기(HP 5972A), MALDI-TOF 질량 분광계(HP G2025A), 다이오드 어레이 탐지기, CE 유니트, HPLC 유니트(HP1090) 및 UV 분광계를 생산한다. Finnigan Corporation(San Jose, CA)는 질량 분광계[자기 섹터(MAT 95 STM), 사중극자 분광계(MAT 95 SQTM) 및 4가지 기타 관련된 질량 분광계]를 제작한다. Rainin(Emeryville, CA)는 HPLC 기기를 제작한다.

본원에 기술된 방법 및 조성물은 절단된 태그의 사용이 특정한 샘플 유형 및 뉴클레오티드 정체에 대한 맵으로서 작용될 수 있게 해준다. 각 서열분석 방법의 초기에, 특정한(선택된) 프라이머를 특정한 독특한 태그에 할당한다. 이러한 태그는 샘플 유형, 디데옥시 종결기 유형(생거 서열분석 반응의 경우), 또는 바람직하게는 이들 둘다에 대해 맵핑한다. 구체적으로 언급하면, 태그를 프라이머 유형에 대해 맵핑하여 결국 벡터 유형에 대해 맵핑하고, 궁극적으로는 샘플 정체에 대해 맵핑한다. 이러한 태그를 또한, 태그 부착된 프라이머가 놓여지는 디데옥시뉴클레오티드 반응을 참조로 하여 디데옥시 종결기 유형(ddTTP, ddCTP, ddGTP, ddATP)에 대해 맵핑할 수 있다. 이어서, 서열분석 반응을 수행하고 이로써 생성된 단편을 연속적으로 시간에 따라 크기별로 분리한다.

태그를 단편으로부터 일시적인 프레임으로 절단하고 일시적인 프레임으로 측정 및 기록한다. 이러한 서열은 태그 맵을 일시적인 프레임과 비교함으로써 작제된다. 즉, 사이징 단계 후 일정 시간에 모든 태그 정체를 기록하고 관련된 것은 일시적인 프레임에서 서로 관련되어진다. 사이징 단계는 하나의 뉴클레오티드 증가분석 핵산 단편을 분리시키므로 이와 관련된 태그 정체는 하나의 뉴클레오티드 증가분석 분리된다. 디데옥시-종결기 또는 뉴클레오티드 맵 및 샘플 유형의 선견으로 인해, 특정 서열을 선형 방식으로 용이하게 추론한다.

다음 실시예가 예시할 목적으로 제공되지만, 이에 제한되지는 않는다.

달리 언급되지 않는다면, 본 실시예에서 사용된 바와 같은 화학물질은 Aldrich Chemical Company(Milwaukee, WI)로부터 취득될 수 있다. 지시된 의미를 갖는 다음 약어가 본원에서 사용된다:

ANP = 3-(Fmoc-아미노)-3-(2-니트로페닐)프로피온산

NBA = 4-(Fmoc-아미노메틸)-3-니트로벤조산

HATU = O-7-아자벤조트리아졸-1-일-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트

DIEA = 디이소프로필에틸아민

MCT = 모노클로로트리아진

NMM = 4-메틸모르폴린

NMP = N-메틸피롤리돈

ACT357 = Advanced ChemTech, Inc.(Louisville, KY)로부터의 ACT357 펩티드 합성기

ACT = Advanced ChemTech, Inc.(Louisville, KY)

NovoBiochem = CalBiochem-NovaBiochem International, San Diego, CA

TFA = 트리플루오로아세트산

Tfa = 트리플루오로아세틸

iNIP = N-메틸이소니페코트산

Tfp = 테트라플루오로페닐

DIAEA = 2-(다이소프로필아미노)에틸아민

MCT = 모노클로로트리아진

5'-AH-ODN = 5'-아미노헥실-말단화 올리고데옥시뉴클레오타이드

실시예

실시예 1

절단 가능한 MW-확인제 서열분석에 사용하기 위한 산 불안정한 링커의 제조

A. 카복실 아미드 말단을 갖는 태그를 유리시키기 위해, 화학적으로 절단 가능한 질량 분광학 태그의 펜타플루오로페닐 에스테르의 합성(도 1은 이러한 반응도식을 나타낸다)

단계 A. 펜타젤 S AC 수지(화합물 II; ACT로부터 시판중임; 1당량)을 ACT357 펩티드 합성기(ACT)의 수집 용기에서 DMF로 현탁시킨다. DMF 중의 화합물 I (3당량), HATU(3당량) 및 DIEA(7.5 당량)를 가하고 수집 용기를 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고 수지를 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척한다. 수지에 대한 I의 커플링과 세척 단계를 반복하여 화합물 II를 수득한다.

단계 B. 수지(화합물 III)를 DMF 중의 25% 피페리딘과 혼합하고 5분 동안 진탕시킨다. 수지를 여과시킨 다음, DMF 중의 25% 피페리딘과 혼합하고 10분 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고 수지를 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척하며, 이를 단계 C에 직접적으로 사용한다.

단계 C. 단계 B로부터 탈보호된 수지를 DMF에 현탁시키고 이에, DMF 중의, 이의 측쇄에 아민 작용기를 함유하는 FMOC-보호된 아미노산(화합물 IV, 예를 들면, 알파-N-FMOC-3-(3-피리딜)-알라닌, Synthertech, Albany, OR로부터 시판중임; 3당량), HATU(3당량) 및 DIEA(7.5당량)를 가한다. 이 용기를 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고 수지를 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척한다. 수지에 대한 IV의 커플링과 세척 단계를 반복하여 화합물 V를 수득한다.

단계 D. 수지(화합물 V)를 단계 B에 기술된 바와 같이 피페리딘으로 처리하여 FMOC 그룹을 제거한다. 이어서, 탈보호된 수지를 수집 용기로부터 ACT357에 의해 16개 반응 용기 내로 동등하게 나눈다.

단계 E. 단계 D로부터의 탈보호된 수지의 16개 분취량을 DMF에 현탁시킨다. 각각의 반응 용기에 DMF 중의, 적당한 카복실산 VI₁₋₁₆(R₁₋₁₆CO₂H; 3 당량), HATU(3당량) 및 DIEA(7.5당량)를 가한다. 이 용기를 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고 수지의 분취량을 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척한다. 분취량의 수지에 대한 VI₁₋₁₆의 커플링과 세척 단계를 반복하여 화합물 VII₁₋₁₆를 수득한다.

단계 F. 일정 분취량의 수지(화합물 VII₁₋₁₆)를 CH₂Cl₂(3X)으로 세척한다. 각각의 반응 용기에 CH₂Cl₂ 중의 1% TFA를 가하고 용기를 30분 동안 진탕시킨다. 용매를 반응 용기로부터 개별적인 튜브 내로 여과시킨다. 분취량의 수지를 CH₂Cl₂(2X) 및 MeOH(2X)로 세척하고 여액을 개별적인 튜브 내로 합한다. 개별적인 튜브를 진공하에 증발시켜 화합물 VIII₁₋₁₆을 제공한다.

단계 G. 각각의 유리 카복실산 VIII₁₋₁₆을 DMF에 용해시킨다. 각 용액에 피리딘(1.05당량)을 가한 다음 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트(1.1당량)를 가한다. 혼합물을 실온에서 45분 동안 교반시킨다. 용액을 EtOAc로 희석시키고, 1M 수성 시트르산(3X) 및 5% 수성 NaHCO₃(3X)으로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키며, 여과시킨 다음 진공하에 증발시켜 화합물 IX₁₋₁₆를 제공한다.

B. 카복실산 말단을 갖는 태그를 유리시키기 위해, 화학적으로 절단 가능한 질량 분광학 태그의 펜타플루오로페닐 에스테르의 합성(도 2는 이러한 반응도식을 나타낸다)

단계 A. 4-(하이드록시메틸)페녹시부티르산(화합물 I; 1당량)을 CHCl₃ 중의 DIEA(2.1당량) 및 알릴 브로마이드와 합하고 2시간 동안 환류 가열한다. 혼합물을 EtOAc로 희석시키고, 1N HCl(2X), pH 9.5 탄산염 완충액(2X) 및 염수(1X)로 세척하고 Na₂SO₄로 건조시키며, 진공하에 증발시켜 화합물 I의 알릴 에스테르를 제공한다.

단계 B. 단계 A로부터의 화합물 I의 알릴 에스테르(1.75당량)을 CH₂Cl₂ 중에서 이의 측쇄에 아민 작용기를 함유하는 FMOC-보호된 아미노산(화합물 II, 예를 들면, 알파-N-FMOC-3-(3-피리딜)-알라닌, Synthertech, Albany, OR로부터 시판중임; 1당량), N-메틸모르폴린(2.5당량) 및 HATU(1.1당량)와 합하고 실온에서 4시간 동안 교반시킨다. 이 혼합물을 CH₂Cl₂로 희석시키고, 1M 수성 시트르산(2X), 물(1X) 및 5% 수성 NaHCO₃(2X)으로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키며, 진공하에 증발시킨다. 화합물 III을 섬광 크로마토그래피(CH₂Cl₂로 ⇒ EtOAc)하여 분리한다.

단계 C. 화합물 III을 CH₂Cl₂에 용해시키고, Pd(PPh₃)₄(0.07당량) 및 N-메틸아닐린(2당량)을 가하고 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반시킨다. 이 혼합물을 CH₂Cl₂로 희석시키고, 1M 수성 시트르산(2X) 및 물(1X)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키며, 진공하에 증발시킨다. 화합물 IV을 섬광 크로마토그래피(CH₂Cl₂로 ⇒ EtOAc + HOAc)하여 분리한다.

단계 D. 텐타젤 S AC 수지(화합물 V; 1당량)을 ACT357 펩티드 합성기(Advanced ChemTech Inc.(ACT), Louisville, KY)의 수집 용기에서 DMF로 현탁시킨다. DMF 중의 화합물 IV(3당량), HATU(3당량) 및 DIEA(7.5 당량)를 가하고 수집 용기를 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고 수지를 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척한다. 수지에 대한 IV의 커플링과 세척 단계를 반복하여 화합물 VI를 수득한다.

단계 E. 수지(화합물 VI)를 DMF 중의 25% 피페리딘과 혼합하고 5분 동안 진탕시킨다. 수지를 여과시킨 다음, DMF 중의 25% 피페리딘과 혼합하고 10분 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고 수지를 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척한다. 이어서, 탈보호된 수지를 수집 용기로부터 ACT357에 의해 16개 반응 용기 내로 동등하게 나눈다.

단계 F. 단계 E로부터의 탈보호된 수지의 16개 분취량을 DMF에 현탁시킨다. 각각의 반응 용기에 DMF 중의, 적당한 카복실산 VII₁₋₁₆(R₁₋₁₆CO₂H; 3 당량), HATU(3당량) 및 DIEA(7.5당량)를 가한다. 이 용기를 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고 수지의 분취량을 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척한다. 분취량의 수지에 대한 VII₁₋₁₆의 커플링과 세척 단계를 반복하여 화합물 VIII₁₋₁₆를 수득한다.

단계 G. 일정 분취량의 수지(화합물 VIII₁₋₁₆)를 CH₂Cl₂(3X)으로 세척한다. 각각의 반응 용기에 CH₂Cl₂ 중의 1% TFA를 가하고 용기를 30분 동안 진탕시킨다. 용매를 반응 용기로부터 개별적인 튜브 내로 여과시킨다. 분취량의 수지를 CH₂Cl₂(2X) 및 MeOH(2X)로 세척하고 여액을 개별적인 튜브 내로 합한다. 개별적인 튜브를 진공하에 증발시켜 화합물 IX₁₋₁₆을 제공한다.

단계 H. 각각의 유리 카복실산 IX₁₋₁₆을 DMF에 용해시킨다. 각 용액에 피리딘(1.05당량)을 가한 다음 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트(1.1당량)를 가한다. 혼합물을 실온에서 45분 동안 교반시킨다. 용액을 EtOAc로 희석시키고, 1M 수성 시트르산(3X) 및 5% 수성 NaHCO₃(3X)으로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키며, 여과시킨 다음 진공하에 증발시켜 화합물 X₁₋₁₆를 제공한다.

실시예 2

T-L-X의 광분해적 절단의 입증

실시예 13에서 제조된 바와 같은 T-L-X 화합물을 실온에서 7분 동안 UV-근처광으로 조사한다. 350nm에서 방출 피크를 지니는 라요네트 형광성 UV 램프(Southern New Ultraviolet Co., Middletown, CT)를 UV 광의 공급원으로서 사용한다. 이 램프를 샘플을 갖는 페트리 디쉬로부터 15cm 떨어진 위치에 놓아둔다. SDS 겔 전기영동은 접합체의 >85%가 이들 조건하에서 절단된다는 것을 나타낸다.

실시예 3

형광성 표지된 프라이머의 제조 및 발색단의 절단의 입증

올리고뉴클레오타이드의 합성 및 정제

판매원에 의해 공급된 표준 포스포르아미다이트 화학, 또는 H-포스포네이트 화학(Glenn Research Sterling, VA)을 이용하여 자동화 DNA 합성기 상에서 올리고뉴클레오타이드(ODNs)를 제조한다. 적당하게 블록킹된 dA, dG, dC 및 T 포스포르아미다이트가 이들 형태로 시판중이며 합성 뉴클레오시드가 용이하게 적당한 형태로 전환될 수 있다. 판매원에 의해 공급된 표준 포스포르아미다이트, 또는 H-포스포네이트 화학을 이용하여 올리고뉴클레오타이드를 제조한다. 올리고뉴클레오타이드는 표준 방법을 적절히 적용시켜 정제한다. 5'-트리틸 그룹을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 0.1N Et₃NH⁺OAc⁻, pH 7.0 중에서 15% 내지 55% MeCN의 구배를 이용하여 12마이크로미터의 300# 라닌(Emeryville, CA) Dynamax C-8 4.2x250mm 역상 칼럼을 사용하여 HPLC 상에서 20분에 걸쳐 크로마토그래피한다. 탈트리틸화가 수행되는 경우, 올리고뉴클레오타이드를 겔 추출 크로마토그래피하여 추가로 정제한다. 이러한 올리고뉴클레오타이드의 양에 대한 분석학적 체크를 알칼리성 pH에서 및 PAGE에 의해 PRP-칼럼을 사용하여 수행한다.

2,4,6-트리클로로트리아진 유도된 올리고뉴클레오타이드의 제조: 10 내지 1000 μ g의 5' 말단 아민 연결된 올리고뉴클레오타이드를 19 내지 25 $^{\circ}$ C에서 30 내지 120분 동안 알칼리성(바람직하게는, pH 8.3 내지 8.5) 완충액에서 10% n-메틸 피롤리돈 중의 과량의 재결정화된 시아누릭 클로라이드와 반응시킨다. 최종 반응 조건은 pH 8.3의 0.15M 붕산나트륨, 2mg/ml 재결정화된 시아누릭 클로라이드 및 500 μ g/ml 각각의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진다. 반응되지 않은 시아누릭 클로라이드는 G-50 세파텍스(Pharmacia, Piscataway, NJ) 상에서 사이즈 제거 크로마토그래피하여 제거한다.

이어서, 활성화되고 정제된 올리고뉴클레오타이드를 pH 8.3의 0.15M 붕산나트륨 중의 100배 물 과량의 시스타민과 실온에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응되지 않은 시스타민은 G-50 세파텍스 칼럼 상에서 사이즈 제거 크로마토그래피하여 제거한다. 이어서, 유도된 ODNs를 아민 반응성 발색단과 반응시킨다. 유도된 ODN 제제를 3분획으로 나누고 각 분획을 (a) 20배 물 과량의 텍사스 레드 설포닐 클로라이드(Molecular Probes, Eugene, OR), (b) 20배 물 과량의 리사민 설포닐 클로라이드(Molecular Probes, Eugene, OR), 또는 (c) 20배 물 과량의 플루오레세인 이소티오시아네이트와 반응시킨다. 최종 반응 조건은 실온에서 1시간 동안 pH 8.3의 0.15M 붕산나트륨으로 이루어진다. 반응되지 않은 발색단은 G-50 세파텍스 칼럼 상에서 사이즈 제거 크로마토그래피하여 정제한다.

올리고뉴클레오타이드로부터 발색단을 제거하기 위하여, ODNs를 1 x 10⁻⁵몰로 조정된 다음 TE(TE는 0.01M 트리스, pH 7.0, 5mM EDTA이다)에서 희석을 수행한다(12, 3배 희석). 100 μ l 용적의 ODNs에 25 μ l의 0.01M 디티오프레이톨(DTT)을 가한다. 동일한 셋트의 대조군에는 DDT를 가하지 않는다. 혼합물을 실온에서 15분 동안 인큐베이팅한다. 블랙 미세역가 플레이트에서 형광성을 측정한다. 이 용액을 인큐베이션 튜브(150마이크로리터)로부터 제거하고 블랙 미세역가 플레이트(Kynatek Laboratories, Chantilly, VA)에 놓아둔다. 이어서, 상기 플레이트를, 플루오레세인의 경우에는 495nm의

여기 파장을 사용하고 520nm에서 방출을 모니터하고, 텍사스 레드와 경우에는 591nm의 여기 파장을 사용하고 612nm에서 방출을 모니터하고, 리사민의 경우에는 570nm의 여기 파장을 사용하고 590nm에서 방출을 모니터하여, 플루오로프칸 II 형광계(Flow Laboratories, McLean, VA)를 이용하여 직접적으로 판독한다.

발색단의 몰	절단되지 않은 RFU	절단된 RFU	유리 RFU
1.0x10 ³ M	6.4	1200	1345
3.3x10 ⁶ M	2.4	451	456
1.1x10 ⁶ M	0.9	135	130
3.7x10 ⁷ M	0.3	44	48
1.2x10 ⁷ M	0.12	15.3	16.0
4.1x10 ⁷ M	0.14	4.9	5.1
1.4x10 ⁸ M	0.13	2.5	2.8
4.5x10 ⁹ M	0.12	0.8	0.9

상기 데이터는 발색단이 ODN으로부터 절단되는 경우에는 형광에 비해 약 200배 증가된다는 것을 지시해주고 있다.

실시예 4

태그 부착된 M13 서열 프라이머의 제조 및 태그 절단의 입증

2,4,6-트리클로로트리아진 유도된 올리고뉴클레오타이드의 제조: 1000 μ g의 5' 말단 아민 연결된 올리고뉴클레오타이드(5'-헥실아민 TGTAACGACGGCCAGT-3')(서열 1)를 19 내지 25 $^{\circ}$ C에서 30 내지 120분 동안 알칼리성(바람직하게는, pH 8.3 내지 8.5) 완충액에서 10% n-메틸 피롤리돈 중의 과량의 재결정화된 시아누릭 클로라이드와 반응시킨다. 최종 반응 조건은 pH 8.3의 0.15M 붕산나트륨, 2mg/ml 재결정화된 시아누릭 클로라이드 및 500 μ g/ml 각각의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진다. 반응되지 않은 시아누릭 클로라이드는 G-50 세파텍스 상에서 사이즈 제거 크로마토그래피하여 제거한다.

이어서, 활성화되고 정제된 올리고뉴클레오타이드를 pH 8.3의 0.15M 붕산나트륨 중의 100배 물 과량의 시스타민과 실온에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응되지 않은 시스타민은 G-50 세파텍스 칼럼 상에서 사이즈 제거 크로마토그래피하여 제거한다. 이어서, 유도된 ODNs를 각종의 아미드와 반응시킨다. 유도된 ODN 제제를 12분획으로 나누고 각 분획을 (1) 4-메톡시벤조산, (2) 4-플루오로벤조산, (3) 톨루산, (4) 벤조산, (5) 인돌-3-아세트산, (6) 2,6-디플루오로벤조산, (7)니코틴산 N-옥사이드, (8)2-니트로벤조산, (9) 5-아세틸살리실산, (10) 4-에톡시벤조산, (11) 신남산 또는 (12) 3-아미노니코틴산의 펜타플루오로페닐 에스테르와 (25몰 과량으로) 반응시킨다. 이러한 반응은 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 pH 8.3의 0.2M 붕산나트륨에서 이루어진다. 유도된 ODNs는 G-50 세파텍스 상에서 사이즈 제거 크로마토그래피하여 제거한다.

올리고뉴클레오타이드로부터 태그를 제거하기 위하여, ODNs를 1 x 10⁻⁵몰로 조정된 다음, 50% EtOH(V/V)을 갖는 TE(TE는 0.01M 트리스, pH 7.0, 5mM EDTA이다)에서 희석을 수행한다(12, 3배 희석). 100 μ l 용적의 ODNs에 25 μ l의 0.01M 디티오프레이톨(DTT)을 가한다. 동일한 쉷트의 대조군에는 DDT를 가하지 않는다. 실온에서 30분 동안 인큐베이션한다. 이어서, NaCl를 0.1M에 가하고 2용적의 EtOH를 가하여 ODNs를 침전시킨다. ODNs를 4 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 14,000 x G로 원심분리시킴으로써 용액으로부터 제거한다. 상등액을 보존하고 완전하게 건조시킨다. 이어서, 펠렛을 25 μ l MeOH에 용해시킨다. 이어서, 펠렛을 태그의 존재에 대해 질량 분광분석법으로 시험한다.

이러한 작업에 사용된 질량 분광계는 외부 이온 공급원 푸리에 변환 질량 분광계(FTMS)이다. MALDI 분석용으로 제조된 샘플을 직접적인 프로브의 팁에 적층시키고 이온 공급원 내로 삽입한다. 샘플에 레이저 펄스를 조사하면, 이온이 공급원으로부터 추출되어, 초전도성 자석의 구멍 내부에 위치한 FTMS 분석기 셀에 초점을 맞추어 이들을 수송해주는 긴 사중극자 이온 가이드 내로 통과시킨다.

스펙트럼은 다음 정보를 생성시킨다. 다음 분자량에서 25에서부터 100 상대 강도까지의 강도로 변화하는 피크: (1) 212.1amu는 4-메톡시벤조산 유도체를 지시해주고, (2) 200.1amu는 4-플루오로벤조산 유도체를 지시해주고, (3) 196.1amu는 톨루산 유도체를 지시해주고, (4) 182.1amu는 벤조산 유도체를 지시해주고, (5) 235.2amu는 인돌-3-아세트산 유도체를 지시해주고, (6) 218.1amu는 2,6-디플루오로벤조산 유도체를 지시해주고, (7) 199.1amu는 니코틴산 N-

옥사이드 유도체를 지시해주고, (8) 227.1amu는 2-니트로벤즈아미드를 지시해주고, (9) 179.18amu는 5-아세틸살리실산 유도체를 지시해주고, (10) 226.1amu는 4-에톡시벤조산 유도체를 지시해주고, (11) 209.1amu는 신남산 유도체를 지시해주고, (12) 198.1amu는 3-아미노니코틴산 유도체를 지시해준다.

이들 결과는 MW-확인제가 프라이머로부터 절단되고 질량 분광분석법에 의해 탐지 가능하다는 것을 지시해준다.

실시예 5

HPLC 분리 방법을 사용하고, 분획을 수집하며, MW 확인제를 절단하고 MW 확인제의 질량(및 이의 정체)를 결정한 다음 서열을 추론하는 서열분석법의 증명

다음 올리고뉴클레오티드가 실시예 4에 기술된 바와 같이 제조된다:

DMO 767:5'-헥실아민-TGTAAAACGACGGCCAGT-3'(서열 1)

DMO 768:5'-헥실아민-TGTAAAACGACGGCCAGTA-3'(서열 2)

DMO 769:5'-헥실아민-TGTAAAACGACGGCCAGTAT-3'(서열 3)

DMO 770:5'-헥실아민-TGTAAAACGACGGCCAGTATG-3'(서열 4)

DMO 771:5'-헥실아민-TGTAAAACGACGGCCAGTATGC-3'(서열 5)

DMO 772:5'-헥실아민-TGTAAAACGACGGCCAGTATGCA-3'(서열 6)

DMO 773:5'-헥실아민-TGTAAAACGACGGCCAGTATGCAT-3'(서열 7)

DMO 774:5'-헥실아민-TGTAAAACGACGGCCAGTATGCATG-3'(서열 8)

상기 언급된 각각의 5' 말단 아민 연결된 올리고뉴클레오티드 100 μ g을 19 내지 25 $^{\circ}$ C에서 30 내지 120분 동안 10% n-메틸 피롤리돈 알칼리성(바람직하게는, pH 8.3 내지 8.5) 완충액 중의 과량의 재결정화된 시아누릭 클로라이드와 반응시킨다. 최종 반응 조건은 pH 8.3의 0.15M 붕산나트륨, 2mg/ml 재결정화된 시아누릭 클로라이드 및 500 μ g/ml 각각의 올리고뉴클레오티드로 이루어진다. 반응되지 않은 시아누릭 클로라이드는 G-50 세파텍스 칼럼 상에서 사이즈 제거 크로마토그래피하여 제거한다.

이어서, 활성화되고 정제된 올리고뉴클레오티드를 pH 8.3의 0.15M 붕산나트륨 중의 100배 몰 과량의 시스타민과 실온에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응되지 않은 시스타민은 G-50 세파텍스 칼럼 상에서 사이즈 제거 크로마토그래피하여 제거한다. 이어서, 유도된 ODNs를 다음의 특정한 펜타플루오로페닐 에스테르와 반응시킨다: (1) 4-메톡시벤조산을 갖는 DMO767, (2) 4-플루오로벤조산을 갖는 DMO768, (3) 톨루산, (4) 벤조산을 갖는 DMO769, (5) 인돌-3-아세트산을 갖는 DMO770, (6) 2,6-디플루오로벤조산을 갖는 DMO771, (7)니코틴산 N-옥사이드를 갖는 DMO772, (8)2-니트로벤조산을 갖는 DMO773.

8개의 유도된 ODNs 각각 10ng을 함께 혼합한 다음 HPLC에 의해 크기 분리한다. 이 혼합물을 25 μ l의 증류수에 놓아둔다. 완전한 샘플을 다음 칼럼 내로 주입한다. LiChrospher 4000 DMAE, 50-10mm 칼럼을 사용한다(EM Separations, Wakerfield, RI). 용출제 A는 20% ACN, pH 7.4 중의 20mM Na₂HPO₄이고; 용출제 B는 용출제 A + 1M NaCl, pH 7.4이다. 유속은 1ml/min이고 탐지는 UV @280nm이다. 구배는 다음과 같다: 0분 @100% A 및 0% B, 3분 @100% A 및 0% B, 15분 @80% A 및 20% B, 60분 @0% A 및 100% B, 63분 @0% A 및 100% B, 65분 @100% A 및 0% B, 70분 @100% A 및 0% B. 분획을 0.5분 간격으로 수집한다.

올리고뉴클레오티드로부터 태그를 제거하기 위하여, 100 μ l의 0.05M 디티오프레이톨(DTT)을 각 분획에 가한다. 실온에서 30분 동안 인큐베이션한다. 이어서, NaCl를 0.1M에 가하고 2용적의 EtOH를 가하여 ODNs를 침전시킨다. ODNs를 4 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 14,000 x G로 원심분리시킴으로써 용액으로부터 제거한다. 상등액을 보존하고 원심분리시키면서 진

공하에 완전하게 건조시킨다. 이어서, 펠렛을 25 μ l MeOH에 용해시킨다. 이어서, 펠렛을 MW 확인제의 존재에 대해 질량 분광분석법으로 시험한다. 동일한 MALDI 기술을 실시예 4에서 기술된 바와 같이 이용한다. 다음 MW(태그)가 시간의 함수로서 질량 스펙트럼에서 관찰된다:

분획 번호	시간	MW	분획 번호	시간	MW
1	0.5	없음	31	15.5	212.1
2	1.0	없음	32	16	212.1
3	1.5	없음	33	16.5	212.1
4	2.0	없음	34	17	212.1; 200.1
5	2.5	없음	35	17.5	200.1
6	3.0	없음	36	18	200.1
7	3.5	없음	37	18.5	200.1
8	4.0	없음	38	19	200.1; 196.1
9	4.5	없음	39	19.5	200.1; 196.1
10	5.0	없음	40	20	196.1
11	5.5	없음	41	20.5	196.1
12	6.0	없음	42	21	196.1; 182.1
13	6.5	없음	43	21.5	182.1
14	7.0	없음	44	22	182.1
15	7.5	없음	45	22.5	182.1; 235.2
16	8.0	없음	46	23	235.2
17	8.5	없음	47	23.5	235.2
18	9.0	없음	48	24	235.2; 218.1
19	9.5	없음	49	24.5	218.1
20	10.0	없음	50	25	218.1
21	10.5	없음	51	25.5	218.1; 199.1
22	11	없음	52	26	199.1
23	11.5	없음	53	26.5	199.1; 227.1
24	12	없음	54	27	227.1
25	12.5	없음	55	27.5	227.1
26	13	없음	56	28	없음
27	13.5	없음	57	28.5	없음
28	14	없음	58	29	없음
29	14.5	없음	59	29.5	없음
30	15	없음	60	30	없음

따라서, 태그의 일시적인 겉보기 분자량은 212.1, 200.1, 196.1, 182.1, 235.2, 218.1, 199.1, 227.1이다. 212.1amu는 4-메톡시벤조산 유도체를 지시하고, 200.1amu는 4-플루오로벤조산 유도체를 지시해주고, 196.1amu는 톨루산 유도체를 지시해주고, 182.1amu는 벤조산 유도체를 지시해주고, 235.2amu는 인돌-3-아세트산 유도체를 지시해주고, 218.1amu는 2,6-디플루오로벤조산 유도체를 지시해주고, 199.1amu는 니코틴산 N-옥사이드 유도체를 지시해주고, 227.1amu는 2-니트로벤즈아미드를 지시해주기 때문에, 서열을 5'-ATGCATG-3'-로서 추론할 수 있다.

실시예 6

단일 HPLC 분리 방법에서 2개의 DNA 샘플의 서열분석의 증명

본 실시예에서는 2개의 DNA 샘플이 단일 분리 방법에서 서열분석된다.

다음 올리고뉴클레오티드가 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조된다:

DMO 767:5'-핵심아민-TGTAAAACGACGGCCAGT-3'(서열 1)

DMO 768:5'-핵심아민-TGTAAAACGACGGCCAGTA-3'(서열 2)

DMO 769:5'-핵심아민-TGTAAAACGACGGCCAGTAT-3'(서열 3)

DMO 770:5'-핵심아민-TGTAAAACGACGGCCAGTATG-3'(서열 4)

DMO 771:5'-핵심아민-TGTAAAACGACGGCCAGTATGC-3'(서열 5)

DMO 772:5'-핵심아민-TGTAAAACGACGGCCAGTATGCA-3'(서열 6)

DMO 775:5'-핵심아민-TGTAAAACGACGGCCAGC-3'(서열 9)

DMO 776:5'-핵심아민-TGTAAAACGACGGCCAGCG-3'(서열 10)

DMO 777:5'-핵심아민-TGTAAAACGACGGCCAGCGT-3'(서열 11)

DMO 778:5'-핵심아민-TGTAAAACGACGGCCAGCGTA-3'(서열 12)

DMO 779:5'-핵심아민-TGTAAAACGACGGCCAGCGTAC-3'(서열 13)

DMO 780:5'-핵심아민-TGTAAAACGACGGCCAGCGTACC-3'(서열 14)

상기 언급된 각각의 5' 말단 아민 연결된 올리고뉴클레오타이드 100 μ g을 19 내지 25 $^{\circ}$ C에서 30 내지 120분 동안 10% n-메틸 피롤리돈 알칼리성(바람직하게는, pH 8.3 내지 8.5) 완충액 중의 과량의 재결정화된 시아누릭 클로라이드와 반응시킨다. 최종 반응 조건은 pH 8.3의 0.15M 붕산나트륨, 2mg/ml 재결정화된 시아누릭 클로라이드 및 500 μ g/ml 각각의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진다. 반응되지 않은 시아누릭 클로라이드는 G-50 세파덱스 칼럼 상에서 사이즈 제거 크로마토그래피하여 제거한다.

이어서, 활성화되고 정제된 올리고뉴클레오타이드를 pH 8.3의 0.15M 붕산나트륨 중의 100배 몰 과량의 시스타민과 실온에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응되지 않은 시스타민은 G-50 세파덱스 칼럼 상에서 사이즈 제거 크로마토그래피하여 제거한다. 이어서, 유도된 ODNs를 다음의 특정한 펜타플루오로페닐 에스테르와 반응시킨다: (1) 4-메톡시벤조산을 갖는 DMO767 및 니코틴산 N-옥사이드를 갖는 DMO773, (2) 4-플루오로벤조산을 갖는 DMO768 및 2-니트로벤조산을 갖는 DMO774, (3) 톨루산 및 아세틸살리실산을 갖는 DMO775, (4) 벤조산을 갖는 DMO769 및 4-에톡시벤조산을 갖는 DMO776, (5) 인돌-3-아세트산을 갖는 DMO770 및 신남산을 갖는 DMO777, (6) 2,6-디플루오로벤조산을 갖는 DMO771 및 3-아미노니코틴산을 갖는 DMO778. 따라서, 각 세트의 ODNs에 대해서 하나의 태그가 존재한다.

12개의 유도된 ODNs 각각 10ng을 함께 혼합한 다음 HPLC에 의해 크기 분리한다. 이 혼합물을 25 μ l의 증류수에 놓아둔다. 완전한 샘플을 다음 칼럼 내로 주입한다. LiChrospher 4000 DMAE, 50-10mm 칼럼을 사용한다(EM Separations, Wakerfield, RI). 용출제 A는 20% ACN, pH 7.4 중의 20mM Na₂HPO₄이고; 용출제 B는 용출제 A + 1M NaCl, pH 7.4이다. 유속은 1ml/min이고 탐지는 UV @280nm이다. 구배는 다음과 같다: 0분 @100% A 및 0% B, 3분 @100% A 및 0% B, 15분 @80% A 및 20% B, 60분 @0% A 및 100% B, 63분 @0% A 및 100% B, 65분 @100% A 및 0% B, 70분 @100% A 및 0% B. 분획을 0.5분 간격으로 수집한다.

올리고뉴클레오타이드로부터 태그를 제거하기 위하여, 100 μ l의 0.05M 디티오프레이톨(DTT)을 각 분획에 가한다. 실온에서 30분 동안 인큐베이션한다. 이어서, NaCl를 0.1M에 가하고 2용적의 EtOH를 가하여 ODNs를 침전시킨다. ODNs를 4 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 14,000 x G로 원심분리시킴으로써 용액으로부터 제거한다. 상등액을 보존하고 원심분리시키면서 진공하에 완전하게 건조시킨다. 이어서, 펠렛을 25 μ l MeOH에 용해시킨다. 이어서, 펠렛을 태그의 존재에 대해 질량 분광분석법으로 시험한다. 동일한 MALDI 기술을 실시예 4에서 기술된 바와 같이 이용한다. 다음 MW(태그)가 시간의 함수로서 질량 스펙트럼에서 관찰된다:

분획 번호	시간	MW	분획 번호	시간	MW
1	0.5	없음	31	15.5	212.1, 199.1
2	1.0	없음	32	16	212.1, 199.1
3	1.5	없음	33	16.5	212.1, 199.1
4	2.0	없음	34	17	212.1, 200.1, 199.1, 227.1
5	2.5	없음	35	17.5	200.1, 199.1, 227.1
6	3.0	없음	36	18	200.1, 227.1
7	3.5	없음	37	18.5	200.1, 227.1, 179.18
8	4.0	없음	38	19	200.1, 196.1, 179.18
9	4.5	없음	39	19.5	200.1, 196.1, 179.18
10	5.0	없음	40	20	196.1, 179.18, 226.1
11	5.5	없음	41	20.5	196.1, 226.1
12	6.0	없음	42	21	196.1; 182.1, 226.1
13	6.5	없음	43	21.5	182.1, 226.1, 209.1
14	7.0	없음	44	22	182.1, 209.1
15	7.5	없음	45	22.5	182.1; 235.2, 209.1, 198.1
16	8.0	없음	46	23	235.2, 198.1
17	8.5	없음	47	23.5	235.2, 198.1
18	9.0	없음	48	24	235.2; 198.1, 218.1
19	9.5	없음	49	24.5	218.1
20	10.0	없음	50	25	218.1
21	10.5	없음	51	25.5	없음
22	11	없음	52	26	없음
23	11.5	없음	53	26.5	없음
24	12	없음	54	27	없음
25	12.5	없음	55	27.5	없음
26	13	없음	56	28	없음
27	13.5	없음	57	28.5	없음
28	14	없음	58	29	없음
29	14.5	없음	59	29.5	없음
30	15	없음	60	30	없음

따라서, 셋트 #1에 대한 태그의 일시적인 겉보기 분자량은 212.1, 200.1, 196.1, 182.1, 235.2, 218.1, 199.1, 227.1이고 셋트 #2에 대한 태그의 일시적인 겉보기 분자량은 199.1, 227.1, 179.1, 226.1, 209.1, 198.1이다. 212.1amu는 4-메톡시벤조산 유도체를 지시하고, 200.1amu는 4-플루오로벤조산 유도체를 지시해주고, 196.1amu는 톨루산 유도체를 지시해주고, 182.1amu는 벤조산 유도체를 지시해주고, 235.2amu는 인돌-3-아세트산 유도체를 지시해주고, 218.1amu는 2,6-디플루오로벤조산 유도체를 지시해주고, 199.1amu는 니코틴산 N-옥사이드 유도체를 지시해주고, 227.1amu는 2-니트로벤즈아미드를 지시해주고, 179.18amu는 5-아세틸살리실산 유도체를 지시해주고, 226.1amu는 4-에톡시벤조산 유도체를 지시해주고, 209.1amu는 신남산 유도체를 지시해주고, 198.1amu는 3-아미노니코틴산 유도체를 지시해주기 때문에, 제1 서열은 -5'-TATGCA-3'-로서 추론할 수 있고 제2 서열은 -5'-CGTACC-3'-로서 추론할 수 있다. 따라서, 분리 단계당 하나 이상의 DNA 샘플의 서열을 분석할 수 있다.

실시예 7

화학식 R_{1-36} -Lys(ϵ -iNIP)-ANP-T_{FP}의 화합물 셋트의 제조

도 3은 36개 T-L-X 화합물($X=L_n$) 셋트의 병행 합성을 도시한 것이며, 여기서 L_n 은 활성화 에스테르(특히, 테트라플루오로페닐 에스테르)이고, L^2 은 오르토-니트로벤질아민 그룹이며 L^3 은 L_n 및 L^2 을 연결해주는 메틸렌 그룹이고, T는 리신

의 카복실산 그룹이 L^2 벤질아민 그룹의 질소 원자에 연결되어 아마이드 그룹을 형성시킨 모듈라 구조이며, 가변 중량 성분 R_{1-36} (여기서, R 그룹은 본원에서 정의된 바와 같은 T^2 에 상응하고 본원에 열거된 특정한 카복실산 중의 어느 것을 통하여 도입될 수 있다)이 리신의 α -아미노 그룹을 통하여 결합되며, 이와 동시에 질량 스펙 민감도 증진제 그룹(N-메틸이소니펙코트산을 통하여 도입됨)이 리신의 ϵ -아미노 그룹을 통하여 결합된다.

도 3 참조:

단계 A. 노바신 HMP 수지(NovaBiochem으로부터 시판중임; 1당량)를 ACT357의 수집 용기에서 DMF로 현탁시킨다. DMF 중의 화합물 I (ACT로부터 시판되고 있는 ANP; 3당량), HATU(3당량) 및 NMM(7.5 당량)을 가하고 수집 용기를 1 시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고 수지를 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척한다. 수지에 대한 I의 커플링과 세척 단계를 반복하여 화합물 II를 수득한다.

단계 B. 수지(화합물 II)를 DMF 중의 25% 피페리딘과 혼합하고 5분 동안 진탕시킨다. 수지를 여과시킨 다음, DMF 중의 25% 피페리딘과 혼합하고 10분 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고 수지를 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척하며, 이를 단계 C에 직접적으로 사용한다.

단계 C. 단계 B로부터 탈보호된 수지를 DMF에 현탁시키고 이에, DMF 중의, 이의 측쇄에 아민 작용기를 함유하는 FMOC-보호된 아미노산(FMOC-리신(Aloc)-OH, PerSeptive Biosystems로부터 시판중임; 3당량), HATU(3당량) 및 NMM(7.5당량)를 가한다. 이 용기를 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고 수지를 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척한다. 수지에 대한 FMOC-리신(Aloc)-OH의 커플링과 세척 단계를 반복하여 화합물 IV를 수득한다.

단계 D. 수지(화합물 IV)를 CH_2Cl_2 (2X)으로 세척한 다음 CH_2Cl_2 중의 $(PPh_3)_4Pd(O)(0.3당량)$ 및 $PhSiH_3$ (10당량)에 현탁시킨다. 혼합물을 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고 수지를 CH_2Cl_2 (2X)로 세척한다. 팔라듐 단계를 반복한다. 용매를 제거하고 수지를 CH_2Cl_2 (2X), DMF 중의 N,N-디이소프로필에틸암모늄 디에틸디티오카바메이트(2X), DMF(2X)로 세척하여 화합물 V를 제공한다.

단계 E. 단계 D로부터의 탈보호된 수지를 단계 C에 기술된 바와 같이 N-메틸이소니펙코트산과 커플링하여 화합물 VI를 수득한다.

단계 F. Fmoc 보호된 수지 VI를 수집 용기로부터 36개 반응 용기로 ACT357에 의해 동등하게 나누어 화합물 VI_{1-16} 를 수득한다.

단계 G. 상기 수지(화합물 VI_{1-16})을 단계 B에 기술된 바와 같이 피페리딘으로 처리하여 Fmoc 그룹을 제거한다.

단계 H. 단계 G로부터의 탈보호된 수지의 36개 분취량을 DMF에 현탁시킨다. 각각의 반응 용기에 DMF 중의, 적당한 카복실산($R_{1-16}CO_2H$; 3 당량), HATU(3당량) 및 NMM(7.5당량)을 가한다. 이 용기를 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고 수지의 분취량을 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척한다. 분취량의 수지에 대한 $R_{1-16}CO_2H$ 의 커플링과 세척 단계를 반복하여 화합물 $VIII_{1-36}$ 를 수득한다.

단계 I. 일정 분취량의 수지(화합물 $VIII_{1-36}$)를 CH_2Cl_2 (3X)으로 세척한다. 각각의 반응 용기에 약 90:5:5 TFA:H₂O: CH_2Cl_2 를 가하고 용기를 120분 동안 진탕시킨다. 용매를 반응 용기로부터 개별적인 튜브 내로 여과시킨다. 분취량의 수지를 CH_2Cl_2 (2X) 및 MeOH(2X)로 세척하고 여액을 개별적인 튜브 내로 합한다. 개별적인 튜브를 진공하에 증발시켜 화합물 IX_{1-36} 을 제공한다.

단계 J. 각각의 유리 카복실산 IX_{1-36} 을 DMF에 용해시킨다. 각 용액에 피리딘(1.05당량)을 가한 다음 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트(1.1당량)를 가한다. 혼합물을 실온에서 45분 동안 교반시킨다. 용액을 EtOAc로 희석시키고, 5% 수성 $NaHCO_3$ (3X)으로 세척하고, Na_2SO_4 로 건조시키며, 여과시킨 다음 진공하에 증발시켜 화합물 X_{1-36} 를 제공한다.

실시예 8

화학식 R_{1-36} -Lys(ϵ -iNIP)-NBA- T_{FP} 의 화합물 셋트의 제조

도 4는 36개 T-L-X 화합물($X=L_h$) 셋트의 병행 합성을 도시한 것이며, 여기서 L_h 은 활성화 에스테르(특히, 테트라플루오로페닐 에스테르)이고, L^2 은 오르토-니트로벤질아민 그룹이며 L^3 은 L_h 과 L^2 을 연결해주는 직접 결합이고, 여기서 L_h 는 L^2 그룹의 방향족 환에 직접적으로 연결되어 있으며, T는 리신의 카복실산 그룹이 L^2 벤질아민 그룹의 질소 원자에 연결되어 아미드 그룹을 형성시킨 모듈라 구조이며, 가변 중량 성분 R_{1-36} (여기서, R 그룹은 본원에서 정의된 바와 같은 T^2 에 상응하고 본원에 열거된 특정한 카복실산 중의 어느 것을 통하여 도입될 수 있다)이 리신의 α -아미노 그룹을 통하여 결합되며, 이와 동시에 질량 스펙 민감도 증진제 그룹(N-메틸이소니펙코트산을 통하여 도입됨)이 리신의 ϵ -아미노 그룹을 통하여 결합된다.

도 4 참조:

단계 A. 노바신 HMP 수지를 실시예 7의 단계 A에 기술된 과정에 따라서 화합물 I [문헌(Brown et al., Molecular Diversity, 1, 4(1995))의 과정에 따라서 제조된 NBA]과 커플링시켜 화합물 II를 수득한다.

단계 B. 수지(화합물 II)를 실시예 7의 단계 B 내지 J에 기술된 바와 같이 처리하여 화합물 X_{1-36} 를 수득한다.

실시예 9

화학식 iNIP-Lys(ϵ - R_{1-36})-ANP- T_{FP} 의 화합물 셋트의 제조

도 5는 36개 T-L-X 화합물($X=L_h$) 셋트의 병행 합성을 도시한 것이며, 여기서 L_h 은 활성화 에스테르(특히, 테트라플루오로페닐 에스테르)이고, L^2 은 오르토-니트로벤질아민 그룹이며 L^3 은 L_h 과 L^2 을 연결해주는 메틸렌 그룹이고, T는 리신의 카복실산 그룹이 L^2 벤질아민 그룹의 질소 원자에 연결되어 아미드 그룹을 형성시킨 모듈라 구조이며, 가변 중량 성분 R_{1-36} (여기서, R 그룹은 본원에서 정의된 바와 같은 T^2 에 상응하고 본원에 열거된 특정한 카복실산 중의 어느 것을 통하여 도입될 수 있다)이 리신의 ϵ -아미노 그룹을 통하여 결합되며, 이와 동시에 질량 스펙 민감도 증진제 그룹(N-메틸이소니펙코트산을 통하여 도입됨)이 리신의 α -아미노 그룹을 통하여 결합된다.

도 5 참조:

단계 A 내지 C. 실시예 7에서와 동일함.

단계 D. 수지(화합물 IV)를 실시예 7의 단계 B에 기술된 바와 같이 피페리딘으로 처리하여 FMOC 그룹을 제거한다.

단계 E. 단계 D에서 수지 상의 탈보호된 α -아민을 실시예 7의 단계 C에 기술된 바와 같이 메틸이소니펙코트산과 커플링하여 화합물 V를 수득한다.

단계 F. 실시예 7에서와 동일함.

단계 G. 수지(화합물 VI- $_{1-36}$)를 실시예 7의 단계 D에 기술된 바와 같이 팔라듐으로 처리하여 Alloc 그룹을 제거한다.

단계 H 내지 J. 화합물 X_{1-36} 를 실시예 7에서와 동일한 방식으로 제조한다.

실시예 10

화학식 R_{1-36} -Glu(γ -DIAEA)-ANP- T_{FP} 의 화합물 셋트의 제조

도 6은 36개 T-L-X 화합물($X=L_n$) 세트의 병행 합성을 도시한 것이며, 여기서 L_n 은 활성화 에스테르(특히, 테트라플루오로페닐 에스테르)이고, L^2 은 오르토-니트로벤질아민 그룹이며 L^3 은 L_n 과 L^2 을 연결해주는 메틸렌 그룹이고, T는 글루탐산의 α -카복실산 그룹이 L^2 벤질아민 그룹의 질소 원자에 연결되어 아마이드 그룹을 형성시킨 모듈라 구조이며, 가변 중량 성분 R_{1-36} (여기서, R 그룹은 본원에서 정의된 바와 같은 T^2 에 상응하고 본원에 열거된 특정한 카복실산 중의 어느 것을 통하여 도입될 수 있다)이 글루탐산의 α -아미노 그룹을 통하여 결합되며, 이와 동시에 질량 스펙 민감도 증진제 그룹(N-메틸이소니펙코트산을 통하여 도입됨)이 글루탐산의 γ -카복실산을 통하여 결합된다.

도 6 참조:

단계 A 및 B. 실시예 7에서와 동일함.

단계 C. 탈보호된 수지(화합물 III)를 실시예 7의 단계 C에 기술된 커플링 방법을 사용하여 Fmoc-Glu-(OAl)-OH와 커플링시켜 화합물 IV를 수득한다.

단계 D. 수지(화합물 IV) 상의 알릴 에스테르를 $CH_2Cl_2(2X)$ 으로 세척한 다음 CH_2Cl_2 중의 $(PPh_3)_4Pd(O)(0.3\text{당량})$ 및 N-메틸아닐린(3당량)의 용액과 혼합한다. 혼합물을 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고 수지를 $CH_2Cl_2(2X)$ 로 세척한다. 팔라듐 단계를 반복한다. 용매를 제거하고 수지를 $CH_2Cl_2(2X)$, DMF 중의 N,N-디이소프로필에틸암모늄 디에틸티오키바메이트(2X), DMF(2X)로 세척하여 화합물 V를 제공한다.

단계 E. 단계 D로부터의 탈보호된 수지를 DMF에 현탁시키고, HATU(3당량) 및 NMM(7.5당량)을 혼합함으로써 활성화시킨다. 용기를 15분 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고 수지를 NMP(1X)로 세척한다. 수지를 2-(디이소프로필아미노)에틸아민(3당량) 및 NMM(7.5당량)과 혼합한다. 용기를 1시간 동안 진탕시킨다. 수지에 대한 2-(디이소프로필아미노)에틸아민의 커플링 및 세척 단계를 반복하여 화합물 VI를 수득한다.

단계 F 내지 J. 실시예 7에서와 동일함.

실시예 11

화학식 R_{1-36} -Lys(ϵ -NIP)-ANP-Lys(ϵ -NH₂)-NH₂의 화합물 세트의 제조

도 7은 36개 T-L-X 화합물($X=L_n$) 세트의 병행 합성을 도시한 것이며, 여기서 L_n 은 아민(특히, 리신 유도된 잔기의 ϵ -아미노 그룹)이고, L^2 은 오르토-니트로벤질아민 그룹이며 L^3 은 L_n 과 L^2 을 연결해주는 카복스아미드 치환된 알킬렌아미노아실알킬렌 그룹이고, T는 리신의 카복실산 그룹이 L^2 벤질아민 그룹의 질소 원자에 연결되어 아마이드 그룹을 형성시킨 모듈라 구조이며, 가변 중량 성분 R_{1-36} (여기서, R 그룹은 본원에서 정의된 바와 같은 T^2 에 상응하고 본원에 열거된 특정한 카복실산 중의 어느 것을 통하여 도입될 수 있다)이 리신의 α -아미노 그룹을 통하여 결합되며, 이와 동시에 질량 스펙 민감도 증진제 그룹(N-메틸이소니펙코트산을 통하여 도입됨)이 리신의 ϵ -아미노 그룹을 통하여 결합된다.

도 7 참조:

단계 A. Fmoc-Lys(Boc)-SRAM 수지(ACT로부터 시판중임; 화합물 I)를 DMF 중의 25% 피페리딘과 혼합하고 5분 동안 진탕시킨다. 수지를 여과시킨 다음, DMF 중의 25% 피페리딘과 혼합하고 10분 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고 수지를 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척하며, 이를 단계 B에 직접적으로 사용한다.

단계 B. DMF 중의 수지(화합물 II), ANP(ACT로부터 시판중임; 3당량), HATU(3당량) 및 NMM(7.5당량)를 가하고 수집 용기를 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고 수지를 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척한다. 수지에 대한 I의 커플링과 세척 단계를 반복하여 화합물 III를 수득한다.

단계 C 내지 J. 수지(화합물 III)를 실시예 7의 단계 B 내지 I에서와 같이 처리하여 화합물 X_{1-36} 를 수득한다.

실시예 12

화학식 R_{1-36} -Lys(ϵ -T_{FA})-Lys(ϵ -NIP)-ANP-T_{FP}의 화합물 셋트의 제조

도 8은 36개 T-L-X 화합물($X=L_h$) 셋트의 병행 합성을 도시한 것이며, 여기서 L_h 은 활성화 에스테르(특히, 테트라플루오로페닐 에스테르)이고, L^2 은 오르토-니트로벤질아민 그룹이며 L^3 은 L_h 과 L^2 을 연결해주는 메틸렌 그룹이고, T는 제1 리신의 카복실산 그룹이 L^2 벤질아민 그룹의 질소 원자에 연결되어 아마이드 그룹을 형성시키고, 질량 스펙 민감도 증진제 그룹(N-메틸이소니펙코트산을 통하여 도입됨)이 제1 리신의 ϵ -아미노 그룹을 통하여 결합되며, 제2 리신 분자가 제1 리신의 α -아미노 그룹을 통하여 제1 리신에 결합되며 분자량 조정제 그룹(트리플루오로아세틸 구조를 가짐)이 제2 리신의 ϵ -아미노 그룹을 통하여 결합되는 모듈라 구조이며, 가변 중량 성분 R_{1-36} (여기서, R 그룹은 본원에서 정의된 바와 같은 T^2 에 상응하고 본원에 열거된 특정한 카복실산 중의 어느 것을 통하여 도입될 수 있다)이 제2 리신의 α -아미노 그룹을 통하여 결합된다.

도 8 참조:

단계 A 내지 E. 이들 단계는 실시예 7에서 단계 A 내지 E와 동일함.

단계 F. 수지(화합물 VI)를 실시예 7의 단계 B에 기술된 바와 같이 피페리딘으로 처리하여 FMOC 그룹을 제거한다.

단계 G. 탈보호된 수지(화합물 VII)를 실시예 7의 단계 C에 기술된 커플링 방법을 사용하여 Fmoc-Lys(Tfa)-OH와 커플링하여 화합물 VIII를 수득한다.

단계 H 내지 K. 수지(화합물 VIII)를 실시예 7에서 단계 F 내지 J와 같이 처리하여 화합물 X_{1-36} 를 수득한다.

실시예 13

화학식 R_{1-36} -Lys(ϵ -NIP)-ANP-5'-AH-ODN의 화합물 셋트의 제조

도 9는 실시예 7의 에스테르로부터 유도된 36개 T-L-X 화합물($X=MOI$, 여기서 MOI는 핵산 단편, ODN이다) 셋트의 병행 합성을 도시한 것이다(동일한 과정이 다른 T-L-X 화합물(여기서, X는 활성화 에스테르이다)의 경우에도 사용될 수 있다). MOI를 포스포디에스테르-알킬렌 아민 그룹을 통하여 MOI의 5' 말단을 통해 T-L에 접합시킨다.

도 9 참조:

단계 A. 문헌[참조:Van Ness et al., Nucleic Acids Res., 19, 3345(1991)]에서의 변형된 바이오티닐화 과정에 따라서 화합물 X_{1-36} 를 제조한다. 200mM 붕산나트륨(pH 8.3, 250mL) 중의 5'-아미노핵산 올리고뉴클레오타이드(화합물 X_{1-36} , 1mg) 중의 하나의 용액에 테트라플루오로페닐 에스테르(실시예 A로부터의 화합물 X_{1-36} , NMP 250mL 중의 100배 몰 과량) 중의 하나를 가한다. 반응물을 주위 온도에서 밤새 인큐베이팅한다. 반응되지 않고 가수분해된 테트라플루오로페닐 에스테르를 세파텍스 G-50 크로마토그래피하여 화합물 X_{1-36} 로부터 제거한다.

실시예 14

화학식 R_{1-36} -Lys(ϵ -NIP)-ANP-Lys(ϵ -(MCT-5'-AH-ODN))-NH₂의 화합물 셋트의 제조

도 10은 실시예 11의 아민으로부터 유도된 36개 T-L-X 화합물($X=MOI$, 여기서 MOI는 핵산 단편, ODN이다) 셋트의 병행 합성을 도시한 것이다(동일한 과정이 다른 T-L-X 화합물(여기서, X는 아민이다)의 경우에도 사용될 수 있다). MOI를 포스포디에스테르-알킬렌아민 그룹을 통하여 MOI의 5' 말단을 통해 T-L에 접합시킨다.

도 10 참조:

단계 A. 문헌[참조:Van Ness et al., Nucleic Acids Res., 19, 3345(1991)]에 기술된 바와 같이 5'-[6-(4,6-디클로로-1,3,5-트리아진-2-일아미노)헥실]올리고뉴클레오타이드 X II₁₋₃₆를 제조한다.

단계 B. 100mM 붕산나트륨(pH 8.3) 중의 1mg/ml의 농도로 5'-[6-(4,6-디클로로-1,3,5-트리아진-2-일아미노)헥실]올리고뉴클레오타이드(화합물 X II₁₋₃₆) 중의 하나의 용액에 R₁₋₃₆-Lys(ϵ -I-NIP)-ANP-Lys(ϵ -NH₂)-NH₂(실시예 11로부터의 화합물 X₁₋₃₆) 중에서 선택된 100배 몰 과량의 1급 아민을 가한다. 이 용액을 주위 온도에서 밤새 혼합한다. 반응되지 않은 아민을 세척액으로서 H₂O(3X)를 사용하여 3000MW 컷오프 막(Amicon, Beverly, MA)을 통하여 한외여과시킴으로써 제거한다. 용적을 100mL로 감소시킴으로써 화합물 X III₁₋₃₆를 분리시킨다.

실시예 15

CE 분리 방법을 사용하고, 분획을 수집하며, 태그를 절단하고 태그의 질량(및 이의 정제)를 결정한 다음 서열을 추론하는 서열분석법의 증명

본 실시예에서는, 2개의 DNA 샘플이 단일 분리 방법에서 서열 분석된다.

CE 기기

CE 기기는 Applied Biosystem, Inc.(Foster City, CA)로부터 시판되고 있는 기기의 브레드보드(breadboard) 버전이다. 이는 열 컨트롤 유닛을 사용하여 항온으로 유지될 수 있는 2개의 완충실이 봉입되어 있는 플렉시글라스 박스로 구성된다. 전기영동에 필요한 전압은 자기 안전 인터록이 있는 고압 전력 공급체(Gamman High, Voltage Research, Ormond Beach, FL), 및 인가 전위를 변화시키기 위한 컨트롤 유닛에 의해 제공된다. 개방 튜브 모세관에 대한 샘플 주입은 모세관을 가로질러 압력차를 발생시키는 수동 진공 펌프를 사용함으로써 수행한다(진공 주입). 겔 충전된 모세관의 경우, 샘플을 전기장을 적용함으로써 튜브 내로 전기영동시킨다(전기역학적 주입).

겔 충전된 모세관의 제조

25cm에서 탐지기 윈도우(여기서, 폴리이미드 코팅이 모세관으로부터 제거된다)가 있는 50cm 용합된 실리카 모세관(375mm o.d., 50mm i.d., Polymicro Technologies, Phoenix, AZ)을 본 분리에 사용한다. 모세관의 내부 표면을 (메틸아크릴옥시프로필)트리메톡시실란(MAPS)(Sigma, St. Louis, MO)로 유도체화하여 겔이 모세관 벽에 공유 부착되도록 한다[참조:Nashabeh et al., Anal. Chem. 63:2148, 1994]. 간략하게 언급하면, 트리플루오로아세트산, 탈이온수 및 아세톤을 칼럼 내로 연속적으로 유동시킴으로써 모세관을 세정한다. 아세톤 세척 후, 50/50 물/에탄올 용액 중의 MAPS의 0.2% 용액을 모세관 내로 통과시키고 실온에서 30분 동안 정치시켜 둔다. 용액을 흡인 제거하고 튜브를 적외 열 램프하에 30분 동안 건조시킨다.

고압하에 문헌[참조:Huang et al., J. Chromatography 600:289, 1992]에 기재된 과정의 변형법에 의해 겔 충전된 모세관을 제조한다. 5% 가교결합제 및 8.3 우레아를 갖는 4% 폴리(아크릴아미드) 겔을 여기서 보고된 모든 연구에 사용한다. 아크릴아미드 3.8g, N,N'-메틸렌비스(아크릴아미드) 0.20g 및 우레아 50g을 TBE 완충액 100mL(90mM 트리스 붕산염, pH 8.3, 0.2mM EDTA) 내로 용해시킴으로써 모액을 만든다. 10mL의 N,N,N',N'-테트라메틸에틸렌디아민(TEMED) 및 250mL의 10% 암모늄 퍼설파이트 용액을 사용하여 가교결합을 개시한다. 중합 용액을 신속하게 유도체화 칼럼 내로 통과시킨다. 이어서, 충전된 모세관을 물로 충전된 스틸 튜브 1 x m x 1/8in. i.d. x 1/4in. o.d.에 놓아 두고 압력을 HPLC 펌프를 사용하여 400바로 상승시킨 다음 이 압력에서 밤새 유지시킨다. 압력을 서서히 방출시키고 모세관을 제거한다. 칼럼의 각 말단으로부터 모세관의 짧은 단편을 사용하기 전에 제거한다.

DNA 단편의 분리 및 탐지

통상적인 전기영동에 의해 분리된 DNA 서열분석 반응에 관한 분석을 ABI 370A DNA 서열분석기 상에서 수행한다. 이러한 기기는 제조업자의 지시에 따라서 제조된, 샘플 웰로부터 탐지 영역 까지의 거리가 26cm이고 두께가 0.4mm인 슬라브 변성 우레아 폴리(아크릴아미드) 겔을 이용한다. Taq 폴리머라제를 이용하는 제조업자(Promega Corp., Madison, WI)에 의해 기술된 바와 같이 DNA 서열분석용 반응물을 제조하고 표준 과정에 의해 제조된 M13mp19 일본쇄 DNA 주형에 대해 수행한다. 서열 분석용 반응물을 암실에서 -20℃로 저장하고 샘플을 부하하기 직전에 포름아미드 중에서 3분 동안

90℃로 가열한다. 이들을 제조업자의 지시에 따라서 피펫만을 이용하여 370A 상에 부하하고 10,000V에서 10초 동안 전기역학적 주입에 의해 CE 상에 부하한다. 바닥 전극에 있는 액체 모두를 제거하고 이를 새로운 전해질로 대체함으로써 수행 도중에 10 μ l 분획을 수집한다.

올리고뉴클레오타이드로부터 태그를 제거하기 위하여, 100 μ l의 0.05M 디티오프레이톨(DTT)을 각 분획에 가한다. 실온에서 30분 동안 인큐베이션한다. 이어서, NaCl를 0.1M에 가하고 2용적의 EtOH를 가하여 ODNs를 침전시킨다. ODNs를 4℃에서 15분 동안 14,000 x G로 원심분리시킴으로써 용액으로부터 제거한다. 상등액을 보존하고 원심분리시키면서 진공하에 완전하게 건조시킨다. 이어서, 펠렛을 25 μ l MeOH에 용해시킨다. 이어서, 펠렛을 태그의 존재에 대해 질량 분광분석법으로 시험한다. 동일한 MALDI 기술을 실시예 4에서 기술된 바와 같이 이용한다. 다음 MW(태그)가 시간의 함수로서 질량 스펙트럼에서 관찰된다:

분획 번호	시간	MW	분획 번호	시간	MW
1	1	없음	31	31	212.1
2	2	없음	32	32	212.1, 199.1
3	3	없음	33	33	212.1, 199.1
4	4	없음	34	34	212.1, 200.1, 199.1, 227.1
5	5	없음	35	35	200.1, 199.1, 227.1
6	6	없음	36	36	200.1, 227.1
7	7	없음	37	37	200.1, 227.1, 179.18
8	8	없음	38	38	200.1, 196.1, 179.18
9	9	없음	39	39	200.1, 196.1, 179.18
10	10	없음	40	40	196.1, 179.18, 226.1
11	11	없음	41	41	196.1, 226.1
12	12	없음	42	42	196.1; 182.1, 226.1
13	13	없음	43	43	182.1; 226.1, 209.1
14	14	없음	44	44	182.1, 209.1
15	15	없음	45	45	182.1; 235.2, 209.1, 198.1
16	16	없음	46	46	235.2, 198.1
17	17	없음	47	47	235.2, 198.1
18	18	없음	48	48	235.2, 198.1, 218.1
19	19	없음	49	49	218.1
20	20	없음	50	50	218.1
21	21	없음	51	51	없음
22	22	없음	52	52	없음
23	23	없음	53	53	없음
24	24	없음	54	54	없음
25	25	없음	55	55	없음
26	26	없음	56	56	없음
27	27	없음	57	57	없음
28	28	없음	58	58	없음
29	29	212.1	59	59	없음
30	30	212.1	60	60	없음

셋트 #1에 대한 태그의 일시적인 겉보기 분자량은 212.1, 200.1, 196.1, 182.1, 235.2, 218.1, 199.1, 227.1이고 셋트 #2에 대한 태그의 일시적인 겉보기 분자량은 199.1, 227.1, 179.1, 226.1, 209.1, 198.1이다. 212.1amu는 4-메톡시벤조산 유도체를 지시하고, 200.1amu는 4-플루오로벤조산 유도체를 지시해주고, 196.1amu는 톨루산 유도체를 지시해주고, 182.1amu는 벤조산 유도체를 지시해주고, 235.2amu는 인돌-3-아세트산 유도체를 지시해주고, 218.1amu는 2,6-디플루오로벤조산 유도체를 지시해주고, 199.1amu는 니코틴산 N-옥사이드 유도체를 지시해주고, 227.1amu는 2-니트로벤즈아미드를 지시해주고, 179.18amu는 5-아세틸살리실산 유도체를 지시해주고, 226.1amu는 4-에톡시벤조산 유도체를

지시해주고, 209.1amu는 신남산 유도체를 지시해주고, 198.1amu는 3-아미노니코틴산 유도체를 지시해주기 때문에, 제1 서열은 -5'-TATGCA-3'-로서 추론할 수 있고 제2 서열은 -5'-CGTACC-3'-로서 추론할 수 있다. 따라서, 분리 단계당 하나 이상의 DNA 샘플의 서열을 분석할 수 있다.

실시예 16

질량 분광분석법에 의한 다중 태그의 동시적 탐지의 증명

본 실시예는 질량 분광분석법에 의해 다중 화합물(태그)을 동시에 탐지하는 능력에 대한 기술을 제공한다. 이러한 특정한 실시예에서는, 31개 화합물을 매트릭스와 혼합하고, 적층시키고 고정 지지체 상에서 건조시킨 다음, 레이저로 탈수시킨다. 이로써 생성된 이온을 질량 분광계 내로 도입한다.

다음 화합물(Aldrich, Milwaukee, WI로부터 구입)을 0.002M(화합물 당 기준으로 함)의 최종 농도가 되도록 등 물량을 기준하여 함께 혼합한다: 벤즈아미드(121.14), 니코틴아미드(122.13), 피라진아미드(123.12), 3-아미노-4-피라졸카복실산(127.10), 2-티오펜카복스아미드(127.17), 4-아미노벤즈아미드(135.15), 톨루미드(135.17), 6-메틸니코틴아미드(136.15), 3-아미노니코틴아미드(137.14), 니코틴아미드 N-옥사이드(138.12), 3-하이드로피콜린아미드(138.13), 4-플루오로벤즈아미드(139.13), 신남아미드(147.18), 4-메톡시벤즈아미드(151.17), 2,6-디플루오로벤즈아미드(157.12), 4-아미노-5-이미다졸-카복시아미드(162.58), 3,4-피리딘-디카복시아미드(165.16), 4-에톡시벤즈아미드(165.19), 2,3-피라진디카복스아미드(166.14), 2-니트로벤즈아미드(166.14), 3-플루오로-4-메톡시벤조산(170.4), 인돌-3-아세트아미드(174.2), 5-아세틸살리실아미드(179.18), 3,5-디메톡시벤즈아미드(181.19), 1-나프탈렌아세트아미드(185.23), 8-클로로-3,5-디아미노-2-피라진카복스아미드(187.59), 4-트리플루오로메틸-벤즈아미드(189.00), 5-아미노-5-페닐-4-피라졸-카복스아미드(202.22), 1-메틸-2-벤질-말로네이트(207.33), 4-아미노-2,3,5,6-테트라플루오로벤즈아미드(208.11), 2,3-나프탈렌디카복실산(212.22). 이들 화합물을 상기 언급된 농도에서 DMSO에 놓아둔다. 이어서, 1 μ l의 물질을 알파-시아노-4-하이드록시 신남산 매트릭스와 혼합하고(1:10,000 희석 후) 고체 스테리스 스틸 지지체 상에 적층시킨다.

이어서, 상기 물질을 프로테인 TOF 질량 분광계(Bruker, Manning Park, MA)를 사용하여 레이저에 의해 탈수시키고 생성된 이온을 작동의 선형 모드 및 반사 모드 모두에서 측정한다. 다음 m/z 값이 관찰된다(도 11):

121.1 $\Rightarrow$ 벤즈아미드(121.4)

122.1 $\Rightarrow$ 니코틴아미드(122.13)

123.1 $\Rightarrow$ 피라진아미드(123.12)

124.1

125.2

127.3 $\Rightarrow$ 3-아미노-4-피라졸카복실산(127.10)

127.2 $\Rightarrow$ 2-티오펜카복스아미드(127.17)

135.1 $\Rightarrow$ 4-아미노벤즈아미드(135.15)

135.1 $\Rightarrow$ 톨루미드(135.17)

136.2 $\Rightarrow$ 6-메틸니코틴아미드(136.15)

137.1 $\Rightarrow$ 3-아미노니코틴아미드(137.14)

138.2 $\Rightarrow$ 니코틴아미드 N-옥사이드(138.12)

138.2 $\Rightarrow$ 3-하이드로피콜린아미드(138.13)

139.2 ⇒ 4-플루오로벤즈아미드(139.13)

140.2

147.3 ⇒ 신남아미드(147.18)

148.2

149.2

4-메톡시벤즈아미드(151.17)

152.2

2,6-디플루오로벤즈아미드(157.12)

158.3

4-아미노-5-이미다졸-카복시아미드(162.58)

163.3

165.2 ⇒ 3,4-피리딘-디카복시아미드(165.16)

165.2 ⇒ 4-메톡시벤즈아미드(165.19)

166.2 ⇒ 2,3-피라진디카복시아미드(166.14)

166.2 ⇒ 2-니트로벤즈아미드(166.14)

3-플루오로-4-메톡시벤조산(170.4)

171.1

172.2

173.4

인돌-3-아세트아미드(174.2)

178.3

179.3 ⇒ 5-아세틸살리실아미드(179.18)

181.2 ⇒ 3,5-디메톡시벤즈아미드(181.19)

182.2 ⇒

나프탈렌아세트아미드(185.23)

186.2

8-클로로-3,5-디아미노-2-피라진카복스아미드(187.59)

188.2

189.2 ⇒ 4-트리플루오로메틸 벤즈아미드(189.00)

190.2

191.2

192.3

5-아미노-5-페닐-4-피라졸-카복스아미드(202.22)

203.2

203.4

1-메틸-2-벤질-말로네이트(207.33)

4-아미노-2,3,5,6-테트라플루오로벤즈아미드(208.11)

212.2 ⇒ 2,3-나프탈렌디카복실산(212.22)

219.3

221.2

228.2

234.2

237.4

241.4

상기 데이터는 31개 화합물 중의 22개가 예견된 질량을 갖는 스펙트럼에서 나타났고, 31개 화합물 중의 9개가 예상된 질량 보다는 $n + H$ 질량(1원자 질량 단위, amu)을 갖는 스펙트럼에서 나타났다는 것을 지시해준다. 후자 현상은 아마도 상기 화합물 내의 아민의 광자화로 인한 것이다. 따라서, 31개 화합물 중의 31개가 MALDI 질량 분광학에 의해 탐지된다. 더욱 중요하게는, 본 실시예는 다중 태그가 분광학 방법에 의해 동시에 탐지될 수 있다는 것을 입증해준다.

알파-시아노 매트릭스 단독(도 12)은 146.2, 164.1, 172.1, 173.1, 189.1, 190.1, 191.1, 192.1, 212.1, 224.1, 228.0, 234.3에서 피크를 제공해준다. 스펙트럼에서 확인된 기타 질량은 상기 화합물을 추가로 정체시키는데 어떠한 노력도 이루어지지 않았기 때문에 구입된 화합물 내의 오염물로 인한 것이다.

실시예 17

MW-확인제 표지된 프라이머, 방사선 표지된 프라이머, MW-확인제 표지된 디테옥시 증결기, 형광성 프라이머 및 형광성 디테옥시 증결기를 이용한 서열분석 과정

A. 제제 서열분석용 겔 및 전기영동

프로토콜은 다음과 같다. 4%, 6% 또는 8% 폴리아크릴아미드에 대해 다음 처방에 따라서 8M 우레아, 폴리아크릴아미드 겔을 제조한다.

	4%	5%	6%
우레아	48g	48	48g
40% 아크릴아미드/비스아크릴아미드	10ml	12.5ml	15ml
10X MTBE	10ml	10ml	10ml
ddH ₂ O	42ml	39.5ml	37ml
15% APS	500 μ l	500 μ l	500 μ l
TEMED	50 μ l	50 μ l	50 μ l

우레아(5505UA)를 Gibco/BRL(Gaithersburg, MD)로부터 취득한다. 모든 기타 물질은 Fisher(Fair Lawn, NJ)로부터 취득한다. 간략하게 언급하면, 우레아, MTBE 완충액 및 물을 합하고 55℃에서 5분 동안 인큐베이션하고 교반시켜 우레아를 용해시킨다. 혼합물을 간단하게 냉각시키고, 아크릴아미드/비스아크릴아미드 용액을 가하고 혼합하며, 전체 혼합물을 진공하에 5분 동안 탈기시킨다. APS 및 TEMED 중합제를 교반시키면서 가한다. 완전한 겔 혼합물을 0.15mm 스페이서를 갖는 탭핑된 유리 플레이트 상이에 즉시 따라 붓는다. ALCONOXTM(New York, NY) 세정제 및 온수로 먼저 세정하고 이중 증류수로 세정한 다음, 건조시킴으로써 플레이트를 준비한다. 전형적으로, 노치 유리 플레이트를 실란화제로 처리한 다음 이중 증류수로 세정한다. 따라부은 후, 겔을 즉시 수평으로 놓고, 웰 형성 콤을 삽입하고, 클램프시켜 배열하며, 겔이 30분 이상 동안 중합되도록 한다. 부하하기에 앞서, 겔의 바닥 주변 테이프와 웰 형성 콤을 제거한다. 이어서, 상부 및 하부 완충실을 상기 겔 플레이트로 클램프시키고 1X MTBE 전기영동 완충액을 상기 완충실에 가함으로써 수직 전기영동 장치를 어셈블리시킨다. 샘플 웰을 수행 완충액을 함유하는 시린지로 분출시키고, 각 샘플을 부하하기 직전에, 상기 웰을 겔 부하 팁을 사용하여 수행되는 완충액으로 분출시켜 우레아를 제거한다. 1 내지 2마이크로리터의 샘플을 겔 부하 팁이 있는 Pipetteman(Rainin, Emeryville, CA)을 사용하여 각 웰에 부하한 다음, 다음 지시에 따라서 전기영동시킨다(전기영동 동안, 상기 겔을 팬으로 냉각시킨다):

	중결 반응 폴리아크릴아미드 겔	전기영동 조건
짧다	5%, 0.15mm x 50cm x 20cm	22mA에서 2.25시간
길다	4%, 0.15mm x 70cm x 20cm	15mA에서 8-9시간
길다	4%, 0.15mm x 70cm x 20cm	15mA에서 20-24시간

각각의 염기 특이적 서열분석 반응 종결된(짧은 종결기를 가짐) 혼합물을 0.15mm x 50cm x 20cm 변성 5% 폴리아크릴아미드 겔에 부하하고, 긴 종결기로 종결된 반응물 혼합물은 전형적으로 절반으로 나누어 2개의 0.15mm x 70cm x 20cm 변성 4% 폴리아크릴아미드 겔에 부하한다.

전기영동 후, 완충액을 웰로부터 제거하고, 테이프를 제거하고 겔 플레이트를 분리시킨다. 이러한 겔을 3MM 왓트만 종이의 40mm x 20cm 시트로 옮기고, 플라스틱 웹으로 덮은 다음 Hoefer(San Francisco, CA) 겔 건조기 상에서 80℃하에 25분 동안 건조시킨다. 이와 같이 건조된 겔을 코닥(New Haven, CT) XRP-1 필름에 노출시킨다. 시그날의 강도와 방사선표지가 ³²P 또는 ³⁵S인지에 따라서, 노출 시간은 4시간으로부터 수 일로 다양하다. 노출 후, 필름을 현상제 및 고정제 용액에서 프로세싱함으로써 현상하고, 물로 세정한 다음 공기 건조시킨다. 오토라디오그램을 광 박스에 놓아두고, 서열을 수동으로 판독하고 데이터를 컴퓨터 내로 타이핑한다.

표지된 프라이머를 사용하는 Taq-폴리머라제 촉매된 사이클 서열분석. 각 염기-특이적 사이클 서열분석은 통상적으로 A 및 C 또는 G 및 T 반응에 대하여 각각 대략 100 또는 200ng 분리된 일본새 DNA를 포함한다. 일본새 사이클 서열분석 반응은 유사하게, 표준 알칼리성 분해 또는 구조도 변형된 알칼리성 분해 광정을 이용하여 분리된 대략 200 또는 400ng의 플라스미드 DNA를 함유한다. 주형 DNA를 제외한 모든 시약을 미리 등분되어 -20℃에서 저장된 예비혼합물로부터 하나의 피펫팅 단계로 가한다. 반응 완충액을 염기 특이적 뉴클레오티드 혼합물과 배합함으로써 반응 예비혼합물을 제조한다. 사용하기에 앞서, 상기 염기 특이적 반응 예비혼합물을 해동시키고 희석된 Taq DNA 폴리머라제 및 개개의 말단 표지된 다양한 프라이머와 합하여 최종 반응 혼합물을 생성시킨다. 상기 혼합물이 일단 제조되면, 4가지 분취량의 일본새 또는 일본새 DNA를, A, C, G 및 T 반응에 상응하는, 각 0.2ml의 얇은 벽의 반응 튜브의 바닥내로 피펫팅한 다음, 일정 분취량의

각각의 반응 혼합물을 각 튜브의 측면에 가한다. 이들 튜브는 미세역가 플레이트 포맷의 96-튜브/보존기 셋트 트레이의 일부이며, 이를 Perkin Elmer Cetus Cycler 9600(Foster City, CA)로 고정시킨다. 스트립 캡을 튜브/보존기 셋트 상으로 밀봉시키고, 상기 플레이트를 간단하게 원심분리시킨다. 이어서, 상기 플레이트를, 열 블록을 95°C로 예비가열시킨 사이클러에 놓아 두고 사이클링 프로그램을 즉시 시작한다. 사이클링 프로토콜은 95°C 변성; 55°C 어닐링; 72°C 연장; 95°C 변성; 72°C 연장; 95°C 변성; 및 4°C 최종 침지 파일에 연결된 72°C 연장의 15 내지 30사이클로 이루어진다.

이 단계에서, 반응물을 동결시키고 -20°C에서 수일 동안 저장할 수 있다. 풀링 및 침전시키기 앞서, 플레이트를 간단하게 원심분리시켜 중축합을 이용한다. 프라이머와 염기 특이적 반응물을 에탄올 내로 풀링하고, 침전된 DNA를 원심분리하여 수집한 다음 건조시킨다. 이들 서열분석 반응물을 -20°C에서 수일 동안 저장한다.

서열분석 반응에 대한 프로토콜은 다음과 같다. A 및 C 반응의 경우에는 1 μ l를 G 및 T 반응의 경우에는 2 μ l의 각 DNA 샘플(M13 주형의 경우 100ng/ μ l 및 pUC 주형의 경우 200ng/ μ l)을 0.2ml 얇은 막의 반응 튜브의 바닥에 피펫팅한다. AmpliTaq 폴리머라제(N801-0060)는 Perkin-Elmer Cetus(Foster City, CA)로부터 시판된다.

24클론에 대하여 30 μ l AmpliTaq 폴리머라제(5U/ μ l), 30 μ l 5X Taq 반응 완충액, 130 μ l ddH₂O 및 190 μ l 희석된 Taq의 혼합물을 제조한다.

염기 특이적 프라이머 및 희석된 Taq를 염기 특이적 뉴클레오티드/완충액 예비혼합물에 가함으로써 A, C, G 및 T 염기 특이적 혼합물을 제조한다:

A,C/G,T

60/120 μ l 5X Taq 사이클 서열분석용 혼합물

30/60 μ l 희석된 Taq 폴리머라제

30/60 μ l 각각의 형광성 말단 표지된 프라이머

120/240 μ l

B. MW-확인제 표지된 종결기 반응을 사용하는 Taq-폴리머라제 촉매된 사이클 서열 분석

DNA 사이클 서열분석에 있어서의 한 가지 문제점은 프라이머를 사용할 때 무리진 단편 셋트 분포도가 반응 혼합물 중의 주형 농도에 상당히 의존적이 되도록 반응 조건이 설정된다는 것이다. 표지된 종결기를 사용하는 DNA 사이클 서열분석 반응에 대한 무리진 단편 셋트 분포도가 상기 언급된 바와 같이 표지된 프라이머 반응물을 사용하는 경우에 수득된 것 보다 훨씬 덜 DNA 농도에 민감한 것으로 최근 관찰되었다. 또한, 종결기 반응물은 주형당 하나의 반응 튜브만을 필요로 하는 반면, 표지된 프라이머 반응물은 4개의 종결기 각각에 대해 하나의 반응 튜브를 필요로 한다. 다음에 기술된 프로토콜은 또한 본원에 기술된 96웰 주형 분리 및 96웰 반응 클린업 과정과 용이하게 조화된다.

0.5 μ g의 일본쇄 DNA 또는 1 μ g의 이본쇄 DNA를 0.2ml PCR 튜브에 놓아둔다. 1 μ l(일본쇄 주형의 경우) 또는 4 μ l(이본쇄 주형의 경우)의 0.8 μ M 프라이머 및 9.5 μ l의 ABI 공급된 예비 혼합물을 각 튜브에 가하고, ddH₂O를 사용하여 최종 농도가 20 μ l가 되도록 한다. 제조업자에 의해 기술된 바와 같은 종결기 프로그램을 이용하여 평상시대로 간단하게 원심분리하고 사이클링한다(즉, 96°C로 예비가열한 다음 15초간 96°C, 1초간 50°C, 4분간 60°C로 가열하는 것을 25회 한 다음, 4°C 고정되게 연결한다). 다음에 제시된 센트리-셉 칼럼(Amicon, Beverly, MA) 또는 G-50 미세역가 플레이트 과정을 이용하여 스핀 칼럼 정제 단계를 진행한다.

C. 센트리-셉 칼럼을 통한 종결기 반응 클린업

칼럼을 온화하게 탭핑하여 겔 물질이 칼럼의 바닥에 침전되도록 함으로써 칼럼을 준비한다. 칼럼 스톱퍼를 제거하고 0.75ml dH₂O를 가한다. 상기 칼럼을 막고 이를 수 차례 전위시켜 혼합한다. 겔을 30분 이상 동안 실온에서 수화시킨다. 칼럼을 4°C에서 수일 동안 저장할 수 있다. 4°C로 저장시킨 칼럼을 사용하기 전에 실온으로 가온시킨다. 칼럼을 전위시키고 겔을 침전시킴으로써 모든 공기 버블을 제거한다. 상부 말단 캡을 먼저 제거한 다음 하부 말단 캡을 제거한다. 칼럼을 하중에 의해 완전하게 배수시킨다. (주: 유동이 즉시 시작되지 않을 경우, 중간 압력을 피펫 벌브가 있는 칼럼에 적용한다). 칼

럼을 제공된 세척 튜브에 삽입한다. 2분 동안 1300xg로 가변 속도 미소원심분리로 방사하여 유체를 제거한다. 칼럼을 세척 튜브로부터 꺼내고 이를 샘플 수집 튜브 내로 삽입한다. 반응 혼합물(20 μ l)를 조심스럽게 제거하고 이를 겔 물질 위에 부하한다. 샘플을 오일로 덮어야 하는 사이클링 기기에서 인큐베이팅하는 경우, 반응물을 오일 바닥으로부터 조심스럽게 제거한다. 샘플 중의 소량의 오일(<1 μ l)이 결과에 영향을 미치지 않는다 할지라도, 샘플로 오일을 픽업하지 않는다. 샘플을 함유하는 피펫 팁의 말단에 있는 오일은 상기 팁을 깨끗한 표면(예를 들면, 반응 튜브) 상에 조심스럽게 접촉시킴으로써 제거한다. 각 칼럼을 1회만 사용한다. 고정각 로터가 있는 가변 속도 미세원심분리기에서 방사하는데, 이때 칼럼은 제1 방사에 대해서와 같은 방향으로 위치시킨다. 샘플을 진공 원심분리기에서 건조시킨다. 열 또는 오버 드라이를 적용하지 않는다. 경우에 따라, 반응물을 에탄올로 침전시킨다.

D. 세파텍스 G-50 충전된 미세역가 포맷 필터 플레이트를 통한 종결기 반응 클린업

세파텍스(Pharmacia, Piscataway, NJ)를 고정 분리시키므로; 플레이트에 가하기 전에 또는 매 8 내지 10웰을 충전시킨 후에 재현타시켜야만 한다. 400 μ l의 혼합된 세파텍스 G-50을 미세역가 필터 플레이트의 각 웰에 가한다. 미세역가 필터 플레이트를 미세역가 플레이트의 상단에 놓아두어 물과 테이프 사이드를 수집하여 이들이 원심분리 동안에 떨어져서 날지 않도록 한다. 1500rpm으로 2분 동안 방사한다. 미세역가 플레이트 내에 수집된 물을 따라 버린다. 미세역가 필터 플레이트를 미세역가 플레이트의 상단에 놓아두어 물과 테이프 사이드를 수집하여 이들이 원심분리 동안에 떨어져서 날지 않도록 한다. 부가의 100 내지 200 μ l의 세파텍스 G-50을 가하여 미세역가 플레이트 웰을 채운다. 1500rpm으로 2분 동안 방사한다. 미세역가 플레이트 내에 수집된 물을 따라 버린다. 미세역가 필터 플레이트를, 튜브를 갖는 미세역가 플레이트의 상단에 놓아두어 물과 테이프 사이드를 수집하여 이들이 원심분리 동안에 떨어져서 날지 않도록 한다. 20 μ l 종결기 반응물을 웰을 함유하는 각 세파텍스 G-50에 가한다. 1500rpm으로 2분 동안 방사한다. 수집된 용출액을 대략 1 내지 2시간 동안 스피드 백에 놓아둔다.

표지된 종결기를 이용한 시퀀나제TM(UBS, Cleveland OH) 촉매된 서열분석. 일본쇄 종결기 반응은 약 2 μ g의 페놀 추출된 M13-기준 주형 DNA를 필요로 한다. 이러한 DNA를 변성시키고, DNA, 프라이머 및 완충액을 65 $^{\circ}$ C에서 인큐베이팅함으로써 프라이머를 어닐링시킨다. 반응물을 실온으로 냉각시킨 후, 알파-티오-데옥시뉴클레오티드, 표지된 종결기 및 희석된 시퀀나제TM DNA 폴리머라제를 가하고 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이팅한다. 암모늄 아세테이트 및 에탄올을 가함으로써 반응을 중단시키고, DNA 단편을 침전시킨 다음 건조시킨다. 혼입되지 않은 종결기의 제거를 보조하기 위하여, DNA 펠렛을 에탄올로 2회 세정한다. 건조된 서열분석 반응물을 -20 $^{\circ}$ C에서 수일 동안 저장한다.

일본쇄 종결기 반응은 약 5 μ g의 구조도 변형된-알칼리성 분해 미디-프랩 정제된 플라스미드 DNA를 필요로 한다. 이러한 일본쇄 DNA를 수산화나트륨 중에서 65 $^{\circ}$ C 하에 인큐베이팅함으로써 변성시키고, 변성 후, 프라이머를 가하고, 산-완충제를 가함으로써 반응물을 중화시킨다. 반응 완충제, 알파-티오-데옥시뉴클레오티드, 표지된 염료 종결기 및 희석된 시퀀나제TM DNA 폴리머라제를 가하고 반응물을 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이팅한다. 암모늄 아세테이트를 가함으로써 반응을 중단시키고, DNA 단편을 침전시키고, 세정하며, 건조시킨 다음 저장한다.

일본쇄 반응의 경우:

다음 성분들을 1.5ml 미소원심분리 튜브에 가한다:

4 μ l ssDNA(2 μ g)

4 μ l 0.8 μ M 프라이머

2 μ l 10 x MOPS 완충제

2 μ l 10 x Mn²⁺/이소시트레이트 완충제

12 μ l

DNA를 변성시키고 프라이머를 어닐링시키기 위해, 반응물을 65 내지 70 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 인큐베이팅한다. 반응물을 실온에서 15분 동안 냉각시킨 다음, 간단하게 원심분리하여 축합을 이용한다. 각 반응물에, 다음 시약을 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 인큐베이팅한다.

7 μ l ABI 종결기 혼합물(카탈로그 번호 401489)

2 μ l 희석된 시퀀나제TM(3.25U/ μ l)

1 μ l 2mM α -S dNTPs

22 μ l

희석되지 않은 시퀀나제TM(카탈로그 번호 70775, United States Biochemicals, Cleveland, OH)는 13U/ μ l이고 사용하기 전에 USB 희석 완충제로 1:4로 희석시킨다. 20 μ l 9.5M 암모늄 아세테이트 및 100 μ l 95% 에탄올을 가하여 반응을 중단시키고 혼합한다.

상기 DNA를 빙수욕 중에서 10분 동안 침전시킨다. 4℃하의 미소원심분리기에서 10,000xg으로 15분 동안 원심분리시킨다. 상등액을 조심스럽게 따라내고 300 μ l의 70 내지 80% 에탄올을 가함으로써 펠렛을 세정한다. 혼합하고 다시 15분 동안 원심분리시킨 다음 상등액을 조심스럽게 따라 낸다.

세정 단계를 반복하여 혼입되지 않은 종결기를 효능적으로 제거한다. DNA를 스피드 벡에서 5 내지 10분 동안(또는 건조될 때까지) 건조시키고, 이와 같이 건조된 반응물을 -20℃에서 저장한다.

이분쇄 반응의 경우:

다음 성분들을 1.5ml 미소원심분리 튜브에 가한다:

5 μ l dsDNA(5 μ g)

4 μ l 1N NaOH

3 μ l ddH₂O

상기 반응물을 65 내지 70℃에서 5분 동안 인큐베이팅한 다음, 간단하게 원심분리시켜 축합을 이용한다. 다음 시약을 각 반응에 가하고, 와동시킨 다음 간단하게 원심분리시킨다:

3 μ l 8 μ M 프라이머

9 μ l ddH₂O

4 μ l MOPS-산 완충제

각 반응물에, 다음 시약을 가하고 37℃에서 10분 동안 인큐베이팅한다.

4 μ l 10X Mn²⁺/이소시트레이트 완충제

6 μ l ABI 종결기 혼합물

2 μ l 희석된 시퀀나제TM(3.25U/ μ l)

1 μ l 2mM α -S dNTPs

22 μ l

회석되지 않은 시퀀나제™(United States Biochemicals)는 $13\text{U}/\mu\text{l}$ 이고 사용하기 전에 USB 회석 완충제를 사용하여 1:4로 회석시킨다. $60\mu\text{l}$ 8M 암모늄 아세테이트 및 $300\mu\text{l}$ 95% 에탄올을 가하여 반응을 중단시키고 와동시킨다. 상기 DNA를 빙수욕 중에서 10분 동안 침전시킨다. 4°C 하의 미소원심분리기에서 $10,000\times g$ 으로 15분 동안 원심분리시킨다. 상등액을 조심스럽게 따라내고 $300\mu\text{l}$ 의 80% 에탄올을 가함으로써 펠렛을 세정한다. 샘플을 혼합하고 다시 15분 동안 원심분리시킨 다음 상등액을 조심스럽게 따라 낸다. 세정 단계를 반복하여 혼합되지 않은 종결기를 효능적으로 제거한다. DNA를 스피드 백에서 5 내지 10분 동안(또는 건조될 때까지) 건조시킨다.

E. 서열 겔 제조, 예비-전기영동, 샘플 부하, 전기영동, 데이터 수집, 및 ABI373 DNA 서열분석기 상에서의 분석

DNA 서열 분석용 폴리아크릴아미드 겔을 상기 언급된 바와 같이 제조하는데, 단 겔 혼합물을 중합시키기에 앞서 여과시킨다. 유리 플레이트를 조심스럽게 온수, 증류수 및 에탄올로 세정하여 탭핑하기에 앞서 잠재적인 형광성 오염물질을 제거한다. 변성되는 6% 폴리아크릴아미드 겔을 $0.3\text{mm} \times 89\text{cm} \times 52\text{cm}$ 탭핑된 플레이트 내로 따라붓고 36웰 콤으로 고정시킨다. 중합 후, 테이프 및 콤을 겔로부터 제거하고, 유리 플레이트의 외부 표면을 온수로 세정하고, 증류수 및 에탄올로 세정한다. 겔을 ABI 서열분석기 내로 어셈블리하고 레이저 주사에 의해 체크한다. 기선 변경이 ABI-연합된 맥킨토쉬 컴퓨터 디스플레이에서 관찰되는 경우, 상기 플레이트를 재세정시킨다. 연속적으로, 완충제 웰을 부착시키고, 전기영동 완충제를 가하며, 겔을 30W에서 10 내지 30분 동안 예비 전기영동시킨다. 샘플 부하하기에 앞서, 풀링되고 건조된 생성물을 와동시킴으로써 포름아미드/EDTA 부하 완충제에 재현탁시킨 다음, 90°C 에서 가열한다. 부하된 샘플의 수와 서열 데이터 프로세싱에 사용하기 위한 형광성 표지된 운동성 파일의 수를 지시해주는 Macintosh 컴퓨터 상의 ABI 데이터 수집 소프트웨어 내에서 샘플 시트를 발생시킨다. 샘플 웰을 시린지로 세정한 후, 홀수의 서열분석 반응물을 평편 팁핑된 겔 부하 탭이 장착된 마이크로피펫터를 사용하여 각각의 웰 내로 부하한다. 이어서, 웰을 다시 세정시키고 짝수의 샘플을 부하하기 전에 상기 겔을 5분 동안 전기영동시킨다. 염료-프라이머 및 염료-종결기에 사용된 필터 휠은 ABI 373A CPU 상에 구체화된다. 전형적으로, 전기영동 및 데이터 수집은 열 분배하는 알루미늄 플레이트가 장착된 ABI 373A 상에서 30W로 10시간 동안 수행한다. 데이터 수집 후, 탐지된 형광성 시그널이 상응하는 스캔 수와 관련이 있는 ABI 소프트웨어에 의해 영상 파일을 발생시킨다. 이때, 상기 소프트웨어는 시그널 세기를 기준으로 하여 샘플 레인 위치를 결정한다. 레인을 추적한 후, 각 레인에 대한 데이터의 단면적을 추출하고 기선 공제, 운동성 산정, 스펙트럼 디콘볼루션(deconvolution), 및 시간 교정에 의해 프로세싱한다. 프로세싱 후, 서열 데이터 파일을 NFS 셰어를 이용하여 SPATCstation 2로 옮긴다.

프로토콜: 36웰 콤을 사용하여 앞서 언급된 바와 같이 8M 우레아, 4.75% 폴리아크릴아미드 겔을 제조한다. 부하하기에 앞서, 겔 플레이트의 외부 표면을 세정한다. 이러한 겔 플레이트를 ABI 373A DNA 서열기(Foster City, CA) 내로 어셈블리하여 하부 스캔(통상적으로 블루) 라인이 컴퓨터 데이터 수집 윈도우 상에 디스플레이된 바와 같이 800 내지 1000의 세기값이 상응하도록 한다. 4색 스캔 라인의 기선이 평편하지 않을 경우, 유리 플레이트를 재세정한다. 알루미늄 열 분배 플레이트를 고정시킨다. 겔을 10 내지 30분 동안 예비 전기영동시킨다. 부하용 샘플을 준비한다. $3\mu\text{l}$ 의 FE를 각 튜브의 바닥에 가하고, 와동시키며, 90°C 에서 3분 동안 가열한 다음, 원심분리하여 축합을 재생이용한다. 시린지를 이용하여 샘플 웰을 전기영동 완충액으로 분출시킨다. 평편한-탭핑된 겔 부하용 피펫 팁을 사용하여, 각 홀수의 샘플을 부하한다. 상기 겔을 5분 이상 동안 예비전기영동시키고, 웰을 다시 분출시킨 다음, 각 짝수의 샘플을 부하한다. 전기영동을 시작한다(10시간 동안 30W). 데이터 수집 후, ABI 소프트웨어는 데이터 분석 소프트웨어를 자동적으로 개방할 것이며, 이는 영상된 겔 파일을 발생시킬 것이고, 각 샘플 레인에 대한 데이터를 추출할 것이며, 데이터를 프로세스할 것이다.

F. 앵커된 폴리(dT) 프라이머를 사용하여 긴 폴리(A) 말단을 함유하는 cDNA 클론의 이분쇄 서열분석

긴 폴리(A) 트랙을 함유하는 cDNA의 이분쇄 주형은 폴리(A) 말단의 하부를 어닐링시키는 벡터 프라이머를 사용하여서는 서열화하기가 어렵다. 이들 프라이머를 사용하여 서열분석하면, 긴 폴리(T) 래더에 이어서 판독하기가 어려울 수 있는 서열이 생성된다. 이러한 문제점을 피하기 위하여, (dT)₁₇와 3' 말단에 (dA) 또는 (dC) 또는 (dG)을 함유하는 3개의 프라이머를, 이러한 프라이머를 '앵커'하도록 고안하고 또한 폴리(A) 영역의 바로 하부 영역을 서열화하도록 고안한다. 이러한 프로토콜을 사용하여, 300bp 이상의 판독 가능한 서열을 획득할 수 있다. 이들 cDNA의 반대편 쇄의 서열은 폴리(A) 영역 상부의 삽입-특이적 프라이머를 사용하여 결정한다. cDNA의 폴리(A) 말단으로부터 바로 상부의 서열을 직접적으로 수득할 수 있는 능력이 cDNA로부터 서열 태그부착된 부위(STSs)를 대규모로 발생시키는데 특히 중요해야 한다.

이러한 프로토콜은 다음과 같다. 앵커된 (dT)₁₇를 DNA 합성기 상에서 3' 말단에서의 (dA) 또는 (dC) 또는 (dG)의 앵커를 이용하여 합성하고 올리고뉴클레오타이드 정제 카트릿지(Amicon, Beverly, MA) 상에서 정제 후에 사용한다. 앵커된 프라이머를 사용하여 서열화하기 위해서는, 0.2M 수산화나트륨 및 0.16mM EDTA를 함유하는 총 용적 $50\mu\text{l}$ 에서 플라스미

드 DNA 5 내지 10 μ g를 65℃에서 10분 동안 인큐베이팅함으로써 변성시킨다. 3개의 폴리(dT) 앵커된 프라이머(각 2pmol)를 가하고 이 혼합물을 즉시 얼음 위에 놓아둔다. 5ml의 5M 암모늄 아세테이트, pH 7.0을 가함으로써 용액을 중화시킨다.

150 μ l의 찬 95% 에탄올을 가함으로써 DNA를 침전시키고 펠렛을 찬 70% 에탄올로 2회 세척한다. 펠렛을 5분 동안 건조시킨 다음 MOPS 완충액 중에 재현탁시킨다. 상기 용액을 65℃에서 2분 동안 가열한 다음 15 내지 30분 동안 실온으로 서서히 냉각시킴으로써 프라이머를 어닐링시킨다. 상기 언급된 프로토콜을 사용하여 변형된 T7 DNA 폴리머라제 및 α -[³²P]dATP(>1000Ci/mmol)을 이용하여 서열화를 수행한다.

G. PCR 및 랜덤 숏건 클로닝을 기준으로 한 cDNA 서열분석

다음은 PCR 증폭, 랜덤 숏건 클로닝 및 자동화 형광 서열분석을 기준으로 하여 클론된 cDNA를 서열분석하는 방법이다. 이러한 PCR 기준 접근 방법은 통상의 "다양한" 전방향 및 역방향 프라이밍 부위와 스트라타젠 블루스크립트 벡터의 다중 클로닝 부위 사이에 프라이머 쌍을 이용한다. 전방향 또는 -16bs 프라이머에 대해서는 서열 5'-TCGAGGTCGACGGTATCG-3'(서열 15) 및 역방향 또는 +19bs 프라이머에 대해서는 서열 5'-GCCGCTCTAGAACTAG TG-3'(서열 16)을 갖는 이들 2개의 PCR 프라이머를 사용하여 1.2 내지 3.4kb 크기 범위의 충분한 양의 cDNA 삽입체를 증폭시켜 다음에 기술된 랜덤 숏건 서열분석 분석법이 성취할 수 있다.

프로토콜은 다음과 같다. 0.5ml 스냅 캡 튜브속에 각각 플라스미드 DNA 100ng, 각 프라이머 100pmoles, 5mM KCl, 10mM 트리스-HCl pH 8.5, 1.5mM MgCl₂, 각 dNTP 0.2mM 및 PE-Cetus Amplitaq 5단위를 함유하는 4개의 100 μ l PCR 반응물을, PE-Cetus 48 튜브 DNA 열 사이클러에서 95℃에서 1분, 55℃에서 1분 및 72℃에서 2분 동안의 25사이클 동안 인큐베이팅한다. 4개의 반응물을 폴링한 후, PCR 생성물을 함유하는 수용액을 분사기에 놓아두고, 글리세롤 약 0.5 내지 1.0ml를 가함으로써 2.0ml가 되게 하고, 이를 이소프로필 알콜/건 얼음 또는 포화 수성 NaCl/건 빙옥 속에 10분 동안 놓아둠으로써 -20℃에서 평형이 이루도록 한다. 2.5분 동안 25 내지 30psi 질소압을 적용함으로써 샘플을 -20℃에서 분사시킨다. 에탄올 침전을 수행하여 전단된 PCR 단편을 농축시키고, 단편을 평활 말단화하고 앞서 기술된 바와 같이 이. 콜라이 DNA 폴리머라제 및 T4 폴리뉴클레오티드 키나제의 클레노우 단편과 인큐베이팅함으로써 포스포릴화한다. 저 융점 아가로스 겔로부터 용출시킴으로써 0.4 내지 0.7kb 범위의 단편을 수득한다.

상기 기술로부터, 본 발명의 특정 양태가 예시 목적으로 본 명세서에 기술되어 있긴 하지만, 본 발명의 요지 및 범위를 벗어나지 않고서도 각종 변형이 만들어질수 있다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 본 발명은 첨부된 청구의 범위에 의해서만 제한된다.

서열 목록

(1) 일반적 정보:

(i) 출원인: 반 네스 제프리

테이본 존 씨

하우버트 제이 제프리

멀리건 존 티

(ii) 발명의 명칭: 핵산 분자의 서열을 결정하는 방법 및 이를 위한 조성물

(iii) 서열수: 16

(iv) 서신 주소:

(A) 수신인: 시드 앤드 베리

(B) 거리: 5번 애비뉴 701 콜롬비아 센터 6300

(C) 시: 시애틀

(D) 주: 워싱턴

(E) 국가: 미국

(F) 우편번호: 98104-7092

(v) 컴퓨터 판독형:

(A) 매체 유형: 플로피 디스크

(B) 컴퓨터: IBM PC 호환형

(C) 운영 시스템: PC-DOS/MS-DOS

(D) 소프트웨어: 페이턴트인 릴리즈 #1.0, 버전 #1.30

(vi) 현 출원 데이터:

(A) 출원 번호:

(B) 출원일: 1997. 1. 22.

(C) 분류:

(viii) 변호사/대리인 정보:

(A) 성명: 맥매스터즈 데이비드 디

(B) 등록 번호: 33,963

(C) 참조/소송 번호: 240052.416

(ix) 전자통신 정보:

(A) 전화: (206) 622-4900

(B) 팩시밀리: (206) 682-6031

(2) 서열 1에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 18 염기 쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 채: 일본채

(D) 형태: 선형

【서열 1】

TGTAAAACGA CGGCCAGT

18

(2) 서열 2에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 19개 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 출처: 일본채

(D) 형태: 선형

【서열 2】

TGTAAAACGA CGGCCAGTA

19

(2) 서열 3에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 20개 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 출처: 일본채

(D) 형태: 선형

【서열 3】

TGTAAAACGA CGGCCAGTAT

20

(2) 서열 4에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 21개 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 소재: 일본소재

(D) 형태: 선형

【서열 4】

TGTAAACGA CGGCCAGTAT G

21

(2) 서열 5에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 22개 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 소재: 일본소재

(D) 형태: 선형

【서열 5】

TGTAAACGA CGGCCAGTAT GC

22

(2) 서열 6에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 23개 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 쇠: 일본쇠

(D) 형태: 선형

【서열 6】

TGTAAACGA CGGCCAGTAT GCA

23

(2) 서열 7에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 24개 염기 쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 쇠: 일본쇠

(D) 형태: 선형

【서열 7】

TGTAAACGA CGGCCAGTAT GCAT

24

(2) 서열 8에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 25개 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 쇠: 일본쇠

(D) 형태: 선형

【서열 8】

TGTAAAACGA CGGCCAGTAT GCATG

25

(2) 서열 9에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 18개 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 출처: 일본채

(D) 형태: 선형

【서열 9】

TGTAAAACGA CGGCCACG

18

(2) 서열 10에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 19개 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 출처: 일본채

(D) 형태: 선형

【서열 10】

TGTAAAACGA CGGCCAGCG

19

(2) 서열 11에 대한 정보:

(i) 서열 특징

- (A) 길이: 20개 염기쌍
- (B) 유형: 핵산
- (C) 채: 일본채
- (D) 형태: 선형

【서열 11】

TGTAAACGA CGGCCAGCGT 20

(2) 서열 12에 대한 정보:

(i) 서열 특징

- (A) 길이: 21개 염기쌍
- (B) 유형: 핵산
- (C) 채: 일본채
- (D) 형태: 선형

【서열 12】

TGTAAACGA CGGCCAGCGT A 21

(2) 서열 13에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 22개 염기 쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 소재: 일본소재

(D) 형태: 선형

【서열 13】

TGTAAAACGA CGGCCAGCGT AC

22

(2) 서열 14에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 23개 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 소재: 일본소재

(D) 형태: 선형

【서열 14】

TGTAAAACGA CGGCCAGCGT ACC

23

(2) 서열 15에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 18개 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 쉐: 일본쉐

(D) 형태: 선형

【서열 15】

TCGAGGTCGA CGGTATCG

18

(2) 서열 16에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 18개 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 쉐: 일본쉐

(D) 형태: 선형

【서열 16】

GCCGCTCTAG AACTAGTG

18

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(a) 특정의 뉴클레오티드의 상관이 있고 분광분석법 또는 전위차법에 의해 탐지 가능한 유기 잔기인 태그가 부착되고, 선택된 표적 핵산 분자에 상보적인 핵산 단편들을 제조하는 단계;

(b) 상기 태그 부착된 단편들을 연속적인 길이로 분리시키는 단계;

(c) 상기 태그 부착된 단편들로부터 태그들을 절단하는 단계 및

(d) 분광분석법 또는 전위차법에 의해 태그들을 탐지하고 이로부터 특정 핵산 분자의 서열을 결정하는 단계를 포함하는, 핵산 분자의 서열을 결정하는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 태그의 질량 분광분석법, 적외선 분광분석법, 자외선 분광분석법 또는 일정 전위 전류법에 의해 탐지되는 방법.

청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서, 태그 부착된 단편들이 단계 (b)에서 겔 전기영동, 모세관 전기영동, 마이크로-채널 전기영동 및 HPLC 중에서 선택된 방법에 의해 분리되는 방법.

청구항 4.

제1항 또는 제2항에 있어서, 태그 부착된 단편들이 단계 (c)에서 산화, 환원, 산 분해, 염기 분해, 효소적, 전기화학적, 열적, 티올 교환 및 광 분해 방법 중에서 선택된 방법에 의해 절단되는 방법.

청구항 5.

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (a)에서 4개 내지 2,000개의 태그 부착된 핵산 단편들이 제조되고 각 태그가 특정 핵산 단편에 대해 특유한 방법.

청구항 6.

다음 화학식의 화합물.

$T^{ms}-L-X$

상기식에서,

T^{ms} 은 질량이 15 내지 1,000달톤이고 분자식이 $C_{1-500}N_{0-100}O_{0-100}S_{0-10}P_{0-10}H_{\alpha}F_{\beta}I_{\gamma}$ (여기서, α , β 및 γ 의 합은 달리 충족되지 않는 한, C, N, O, S 및 P 원자의 원자수를 충족시키기에 충분하다)인, 탄소, 하나 이상의 수소 및 플루오라이드, 및 산소, 질소, 황, 인 및 요오드 중에서 선택된 원자들을 포함하는, 질량 분광분석법에 의해 탐지 가능한 유기 그룹이고;

L은 당해 화합물을 대상으로 질량 분광분석법을 수행할 때 단일 이온화 전하 상태를 지지해주고 3급 아민, 4급 아민 및 유기산 중에서 선택되는 작용성 그룹을 포함하는 특유의 T^{ms} -함유 잔기가 상기 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되도록 해주는 유기 그룹이며;

X는 핵산 단편인데,

단, 당해 화합물은 X를 통하여 고체 지지체에 결합되지 않고 250달톤 이상의 질량을 갖는다.

청구항 7.

제6항에 있어서, L이 L^{hv} , L^{acid} , L^{base} , $L^{[O]}$, $L^{[R]}$, L^{enz} , L^{elc} , L^{Δ} 및 L^{ss} (여기서, 화학 방사선, 산, 염기, 산화, 환원, 효소, 전기화학적, 열적 및 티올 교환이 각각 T^{ms} 함유 잔기를 당해 분자의 나머지 부분으로부터 절단시켜 준다) 중에서 선택되는 화합물.

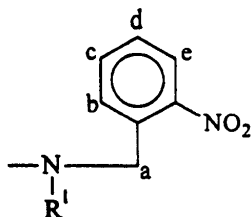
청구항 8.

제7항에 있어서, L^{hv} 이 식 $L^1-L^2-L^3$ (여기서, L^2 는 화학 방사선을 흡수하여 X로부터 T^{ms} 의 절단을 촉진시키는 분자 단편이고, L^1 및 L^3 은 독립적으로 직접 결합 또는 하이드로카빌렌, -O-하이드로카빌렌, 및 하이드로카빌렌-(O-하이드로카빌

렌)^w(여기서 w는 1 내지 10 범위의 정수이다)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 유기 잔기이고, L¹은 T^{ms}로부터 L²를 분리시키고 L³은 X로부터 L²을 분리시키며 L²가 화학 방사선을 흡수할 때는 L¹ 또는 L³ 어느 것도 결합 절단을 진행하지 않는다]을 갖는 화합물.

청구항 9.

제8항에 있어서, -L²-L³이 다음 화학식을 갖는 화합물.



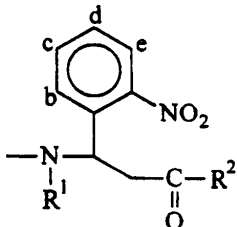
상기식에서,

a, b, c, d 또는 e 위치에서의 하나의 탄소 원자는 -L³-X로 치환되고 b, c, d 또는 e 위치 중의 하나 이상의 위치는 치환되지 않거나, C₁₋₁₀ 알킬, C₁₋₁₀ 알콕시, 플루오라이드, 클로라이드, 하이드록실, 카복실레이트 또는 아미드로 치환되며,

R¹은 수소 또는 하이드로카빌이다.

청구항 10.

제6항에 있어서, -L-X가 다음 화학식을 갖는 화합물.



상기식에서,

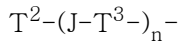
b, c, d 또는 e 위치중의 하나 이상의 위치가 수소, C₁₋₁₀ 알킬, C₁₋₁₀ 알콕시, 플루오라이드, 클로라이드, 하이드록실, 카복실레이트 또는 아미드로 치환되고,

R¹이 수소 또는 하이드로카빌이며,

R²가 헥산 단편이다.

청구항 11.

제6항에 있어서, T^{ms}가 다음 화학식을 갖는 화합물.



상기식에서,

T^2 는 하이드로카빌, 하이드로카빌-O-하이드로카빌렌, 하이드로카빌-S-하이드로카빌렌, 하이드로카빌-NH-하이드로카빌렌, 하이드로카빌-아미드-하이드로카빌렌, N-(하이드로카빌)하이드로카빌렌, N,N-디(하이드로카빌)하이드로카빌렌, 하이드로카빌아실-하이드로카빌렌, 헤테로사이클릴하이드로카빌(여기서, 헤테로원자는 산소, 질소, 황 및 인 중에서 선택된다), 치환된 헤테로사이클릴하이드로카빌(여기서, 헤테로원자는 산소, 질소, 황 및 인 중에서 선택되고 치환체는 하이드로카빌, 하이드로카빌-O-하이드로카빌렌, 하이드로카빌-NH-하이드로카빌렌, 하이드로카빌-S-하이드로카빌렌, N-(하이드로카빌)하이드로카빌렌, N,N-디(하이드로카빌)하이드로카빌렌 및 하이드로카빌아실-하이드로카빌렌 중에서 선택된다), 및 하나 이상의 수소가 동일한 수의 플루오라이드로 대체된 상기 그룹의 유도체 중에서 선택되고,

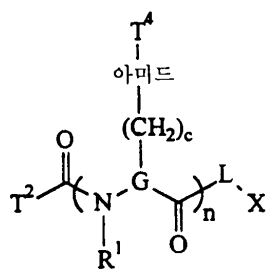
T^3 는 식 $-G(R^2)-$ (여기서, G는 단일 R^2 치환체를 갖는 C_{1-6} 알킬렌이고, R^2 는 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 아릴-융합된 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 아릴, 아르알킬, 아릴-치환된 알케닐 또는 알키닐, 사이클로알킬-치환된 알킬, 사이클로알케닐-치환된 사이클로알킬, 비아릴, 알콕시, 알케녹시, 알키녹시, 아르알콕시, 아릴-치환된 알케녹시 또는 알키녹시, 알킬아미노, 알케닐아미노 또는 알키닐아미노, 아릴-치환된 알킬아미노, 아릴-치환된 알케닐아미노 또는 알키닐아미노, 아릴옥시, 아릴아미노, N-알킬우레아-치환된 알킬, N-아릴우레아-치환된 알킬, 알킬카보닐아미노-치환된 알킬, 아미노카보닐-치환된 알킬, 헤테로사이클릴, 헤테로사이클릴-치환된 알킬, 헤테로사이클릴-치환된 아미노, 카복시알킬-치환된 아르알킬, 옥소카보사이클릴-융합된 아릴 및 헤테로사이클릴알킬; 사이클로알케닐, 아릴-치환된 알킬, 및 아르알킬, 하이드록시-치환된 알킬, 알콕시-치환된 알킬, 아르알콕시-치환된 알킬, 알콕시-치환된 알킬, 아르알콕시-치환된 알킬, 아미노-치환된 알킬, (아릴-치환된 알킬옥시카보닐아미노)-치환된 알킬, 티올-치환된 알킬, 알킬설폰아미노-치환된 알킬, (하이드록시-치환된 알킬티오)-치환된 알킬, 티오알콕시-치환된 알킬, 하이드로카빌아실아미노-치환된 알킬, 헤테로사이클릴아실아미노-치환된 알킬, 하이드로카빌-치환된-헤테로사이클릴아실아미노-치환된 알킬, 알킬설폰아미노-치환된 알킬, 아릴설폰아미노-치환된 알킬, 모르폴리노-알킬, 티오모르폴리노-알킬, 모르폴리노 카보닐-치환된 알킬, 티오모르폴리노카보닐-치환된 알킬, [N-(알킬, 알케닐 또는 알키닐)- 또는 N,N-[디알킬, 디알케닐, 디알키닐 또는 (알킬, 알케닐)-아미노]카보닐 치환된 알킬, 헤테로사이클릴아미노카보닐, 헤테로사이클릴알킬렌아미노카보닐, 헤테로사이클릴아미노카보닐-치환된 알킬, 헤테로사이클릴알킬렌아미노카보닐-치환된 알킬, N,N-[디알킬]알킬렌아미노카보닐, N,N-[디알킬]알킬렌아미노카보닐-치환된 알킬, 알킬-치환된 헤테로사이클릴카보닐, 알킬-치환된 헤테로사이클릴카보닐-알킬, 카복실-치환된 알킬, 디알킬아미노-치환된 아실아미노알킬, 및 아르기닌, 아스파라긴, 글루타민, S-메틸 시스테인, 메티오닌 및 이의 상응하는 설폰사이드 및 설폰 유도체, 글리신, 루이신, 이소루이신, 알로-이소루이신, 3급 루이신, 노르루이신, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 프롤린, 알라닌, 오르니틴, 히스티딘, 글루타민, 발린, 트레오닌, 세린, 아스파르트산, 베타-시아노알라닌 및 알로트레오닌 중에서 선택된 아미노산 측쇄; 알리닐 및 헤테로사이클릴카보닐, 아미노카보닐, 아미도, 모노- 또는 디알킬아미노카보닐, 모노- 또는 디아릴아미노카보닐, 알킬아릴아미노카보닐, 디아릴아미노카보닐, 모노- 또는 디아실아미노카보닐, 방향족 또는 지방족 아실; 및 아미노, 카복시, 하이드록시, 머캅토, 모노- 또는 디알킬아미노, 모노- 또는 디아릴아미노, 알킬아릴아미노, 디아릴아미노, 모노- 또는 디아실아미노, 알콕시, 알케녹시, 아릴옥시, 티오알콕시, 티오알케녹시, 티오알키녹시, 티오아릴옥시 및 헤테로사이클릴 중에서 선택된 치환체에 의해 치환될 수 있는 알킬 중에서 선택된다)이고,

J는 직접 결합이거나, 아미드, 에스테르, 아민, 설파이드, 에테르, 티오에스테르, 디설파이드, 티오에테르, 우레아, 티오우레아, 카바메이트, 티오카바메이트, 시프 염기, 환원된 시프 염기, 이민, 옥심, 하이드라존, 포스페이트, 포스포네이트, 포스포르아미드, 포스폰아미드, 설폰네이트, 설폰아미드 또는 탄소-탄소 결합 중에서 선택된 작용성 그룹이며,

n은 1 내지 50 범위의 정수이고, n이 1을 초과하는 경우, 각각의 T^3 및 J는 독립적으로 선택된다.

청구항 12.

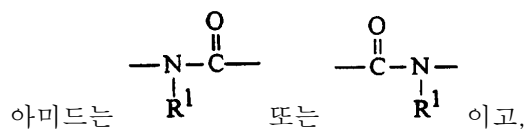
제11항에 있어서, 다음 화학식을 갖는 화합물.



상기식에서,

G는 1개의 CH₂ 그룹 상의 수소 및 각 G의 단지 1개의 CH₂ 그룹 만이 -(CH₂)_c-아미드-T⁴로 대체되는 (CH₂)₁₋₆이고,

T² 및 T⁴는 식 C₁₋₂₅N₀₋₉O₀₋₉S₀₋₃P₀₋₃H_αF_βI_γ의 유기 잔기(여기서, α, β 및 γ의 합은 달리 언급되지 않는 한 C, N, O, S 및 P 원자의 원자수를 충족시키기에 충분하다)이며,



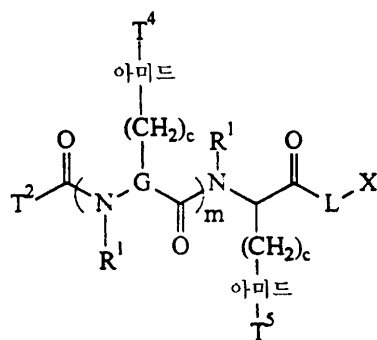
R¹은 수소 또는 C₁₋₁₀ 알킬이며,

c는 0 내지 4의 정수이고,

n은 1 내지 50 범위의 정수이며, n이 1을 초과하는 경우, G, c, 아미드, R¹ 및 T⁴는 독립적으로 선택된다.

청구항 13.

제11항에 있어서, 다음 화학식을 갖는 화합물.



상기식에서,

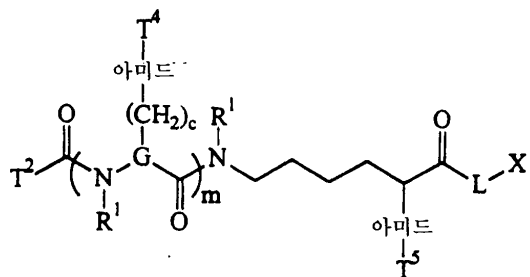
T⁵는 식 C₁₋₂₅N₀₋₉O₀₋₉S₀₋₃P₀₋₃H_αF_βI_γ의 유기 잔기(여기서, α, β 및 γ의 합은 달리 언급되지 않는 한 C, N, O, S 및 P 원자의 원자수를 충족시키기에 충분하다)이며,

T⁵는 3급 또는 4급 아민 또는 유기 산을 포함하고,

m은 0 내지 49 범위의 정수이다.

청구항 14.

제11항에 있어서, 다음 화학식을 갖는 화합물.



상기식에서,

T⁵는 식 C₁₋₂₅N₀₋₉O₀₋₉S₀₋₃P₀₋₃H_αF_βI_γ의 유기 잔기(여기서, α, β 및 γ의 합은 달리 충족되지 않는 한 C, N, O, S 및 P 원자의 원자수를 충족시키기에 충분하다)이며,

T⁵는 3급 또는 4급 아민 또는 유기 산을 포함하고,

m은 0 내지 49 범위의 정수이다.

청구항 15.

제6항 제7항 내지 제9항, 제10항, 제11항 및 제12항 내지 제14항 중의 어느 한 항에 따른 다수의 화합물을 포함하며, 2개의 화합물이 동일한 T^{ms} 또는 동일한 X를 갖지 않고, 한 쌍의 화합물이 포함되는 경우, X 잔기가 하나 이상의 상이한 염기에 의해 차이가 있음을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16.

물과, 제6항, 제7항 내지 제9항, 제10항, 제11항 및 제12항 내지 제14항 중의 어느 한 항에 따른 화합물을 포함하는 조성물.

청구항 17.

제6항에 따르는 여러 세트의 화합물을 포함하며, 한 세트 내에서 모든 구성원이 동일한 T^{ms} 그룹을 가지며 핵산 단편은 ddAMP, ddGMP, ddCMP 및 ddTMP 중에서 선택된 동일한 디데옥시뉴클레오타이드로 종결되는 각종 길이를 지니고, 세트 사이의 T^{ms} 그룹이 2amu 이상으로 상이한 조성물.

청구항 18.

제17항에 따른 제1의 다수 세트의 화합물, 및 제6항에 따른 제2의 다수 세트의 화합물을 포함하며, 제2의 다수 세트 내의 모든 구성원이 ddAMP, ddGMP, ddCMP 및 ddTMP 중에서 선택된 동일한 디데옥시뉴클레오타이드로 종결되는 핵산 서열을 지니는데, 단 제1의 다수 세트의 화합물에 존재하는 디데옥시뉴클레오타이드가 제2의 다수 세트의 화합물에 존재하는 것과 동일한 디데옥시뉴클레오타이드가 아닌 조성물.

청구항 19.

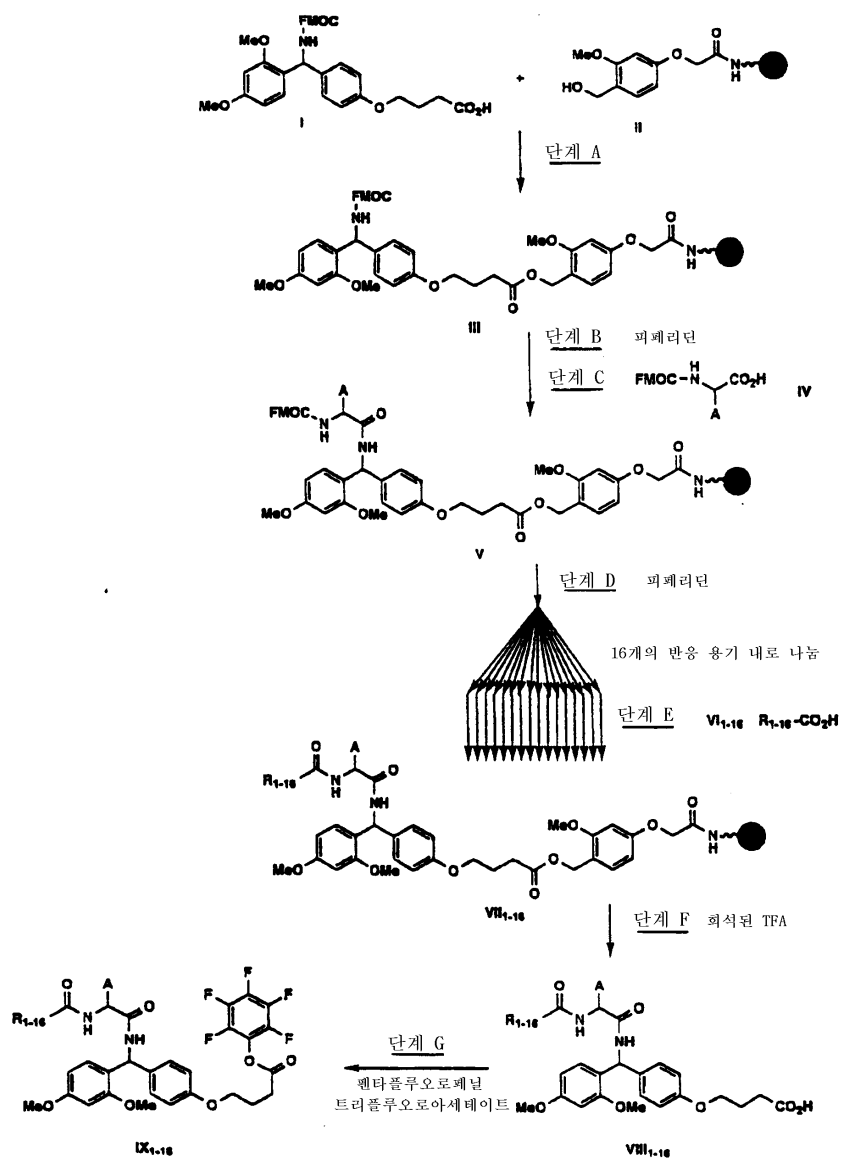
다수의 컨테이너 세트를 포함하며, 각 컨테이너 세트는 5개 이상의 컨테이너를 포함하는데, 여기서 제1 컨테이너는 벡터를 함유하고 제2, 제3, 제4 및 제5 컨테이너는 제6항, 제7항 내지 제9항, 제10항, 제11항 및 제12항 내지 제14항 중의 어느 한 항에 따르는 화합물을 포함하며, 제2, 제3, 제4 및 제5 컨테이너에서의 핵산 단편이 동일하고 컨테이너 세트 내의 벡터의 특정 부위에 대해 상보적이며 각 컨테이너 내의 T^{ms} 그룹의 키트 내의 다른 T^{ms} 그룹과 상이한 DNA 서열 분석용 키트.

청구항 20.

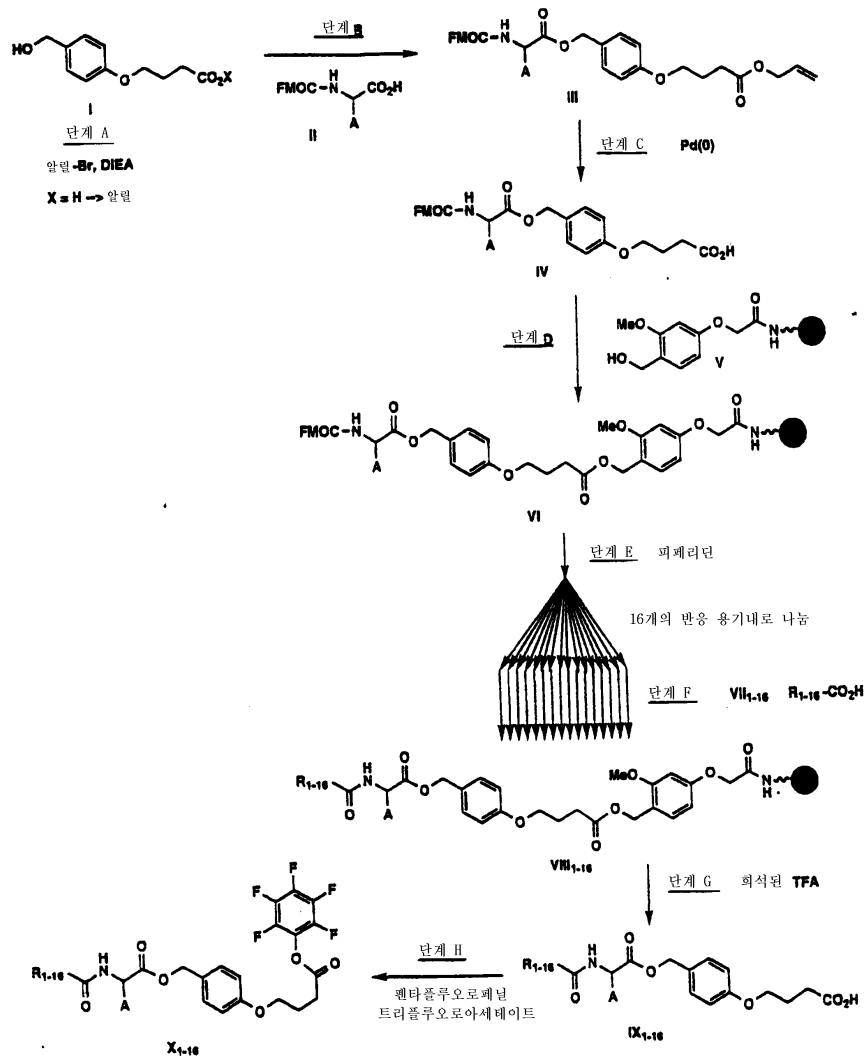
태그 부착된 핵산 단편들을 분리시키는 분리 장치; 태그 부착된 핵산 단편으로부터, 특정한 뉴클레오타이드와 상관이 있고 전기화학적 탐지에 의해 탐지 가능한 태그를 절단시키는 장치; 및 일정 전위 전류 측정용 장치를 포함하는, 제1항 또는 제2항에 따른 방법에 사용하기 위한 시스템.

도면

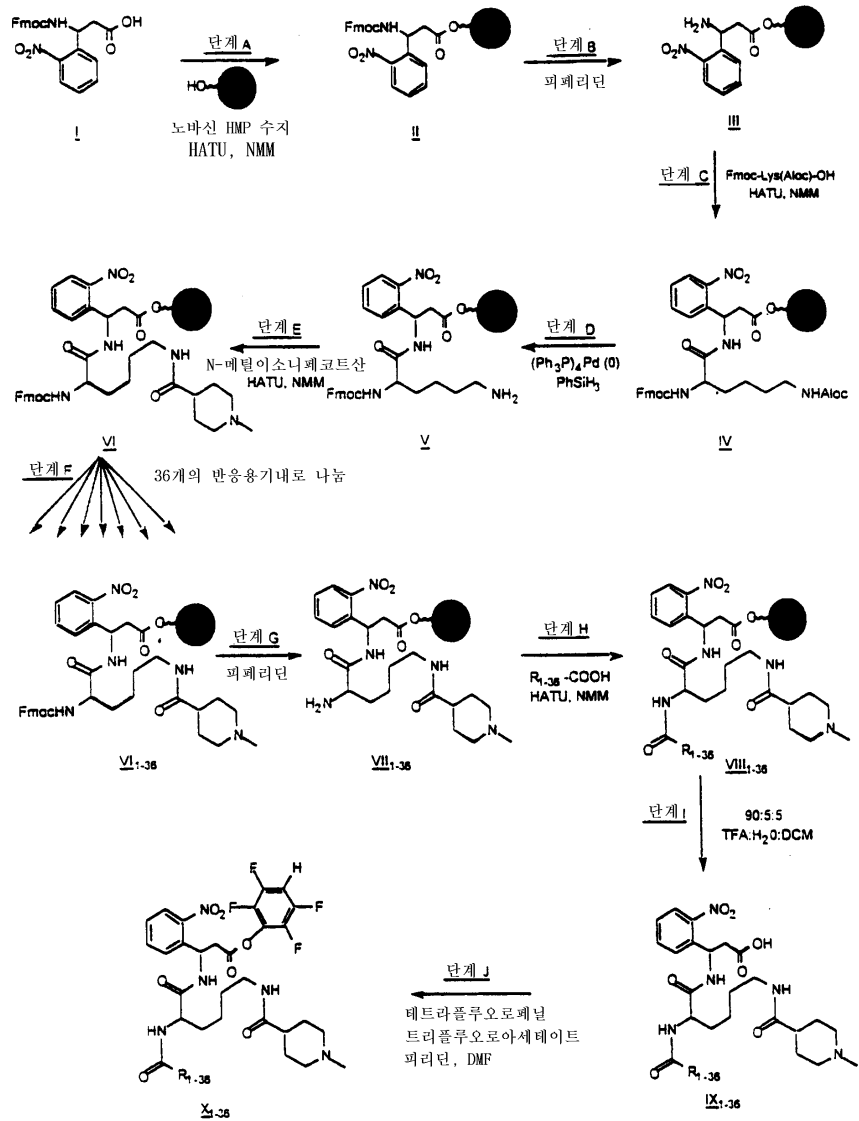
도면1



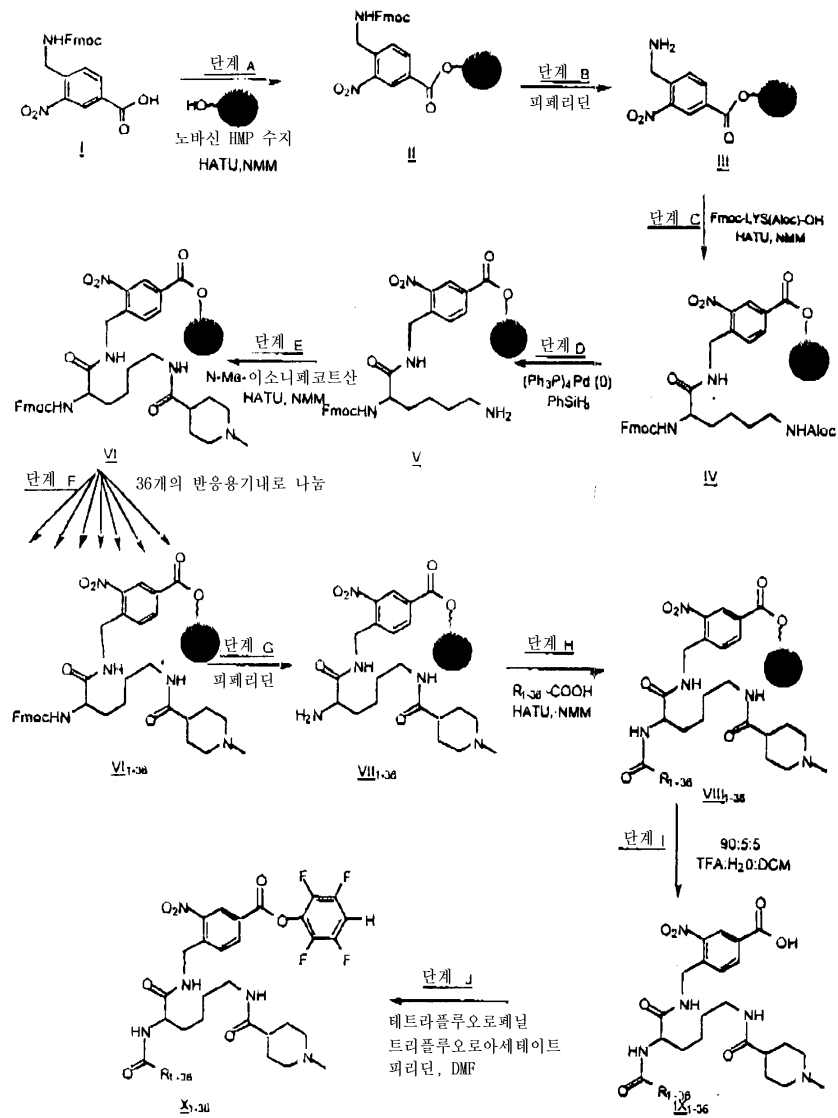
도면2



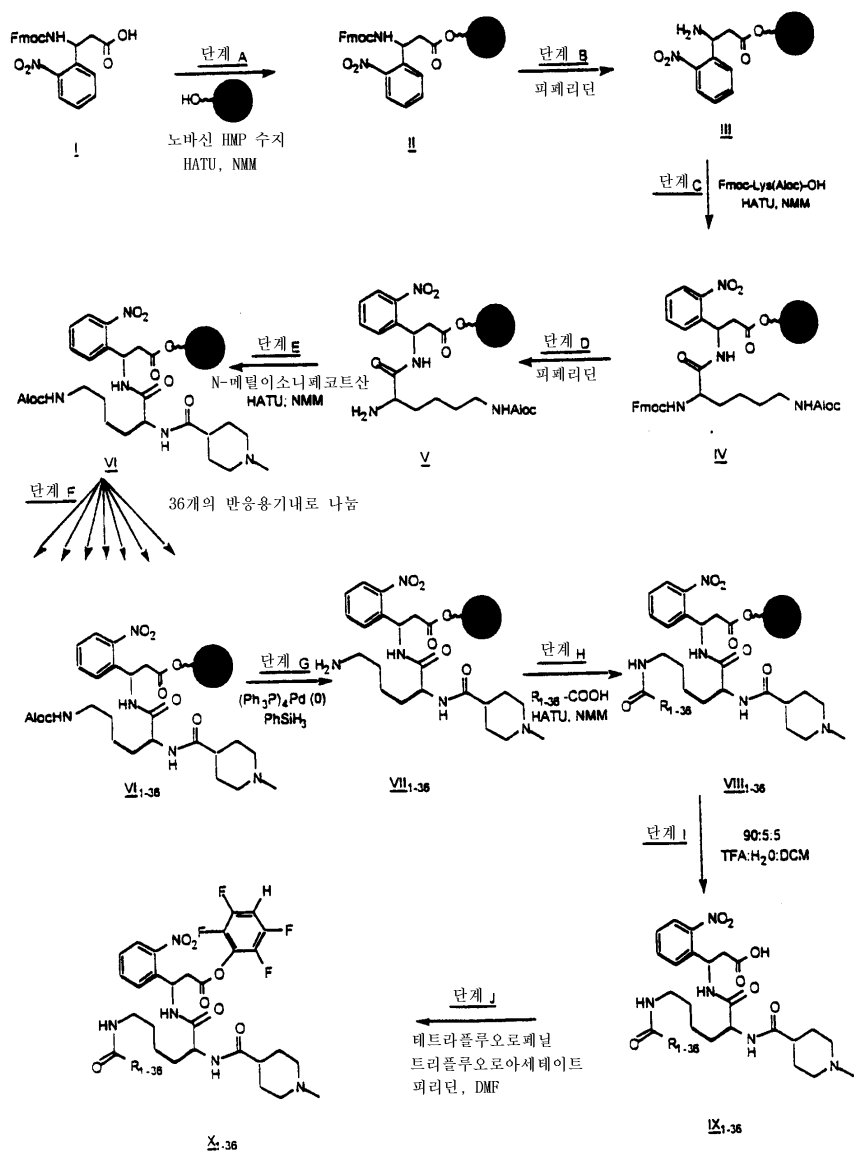
도면3



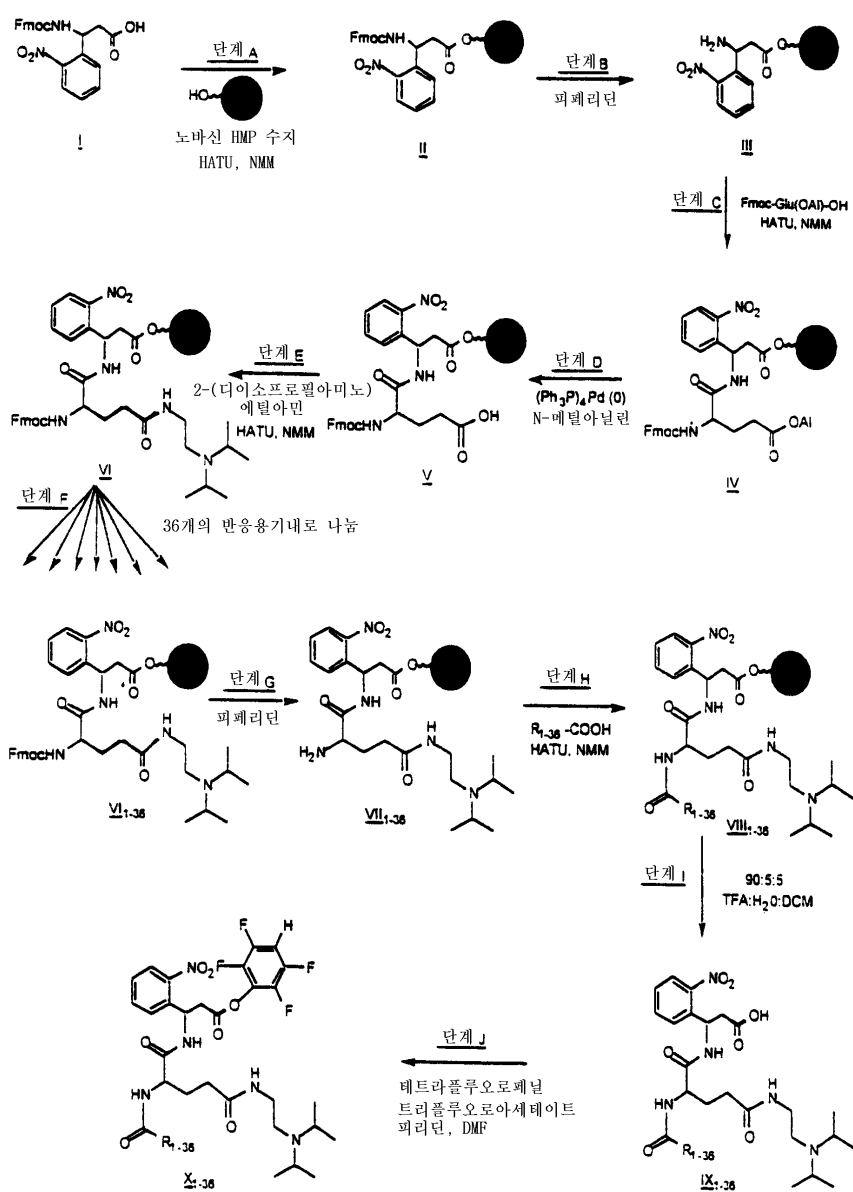
도면4



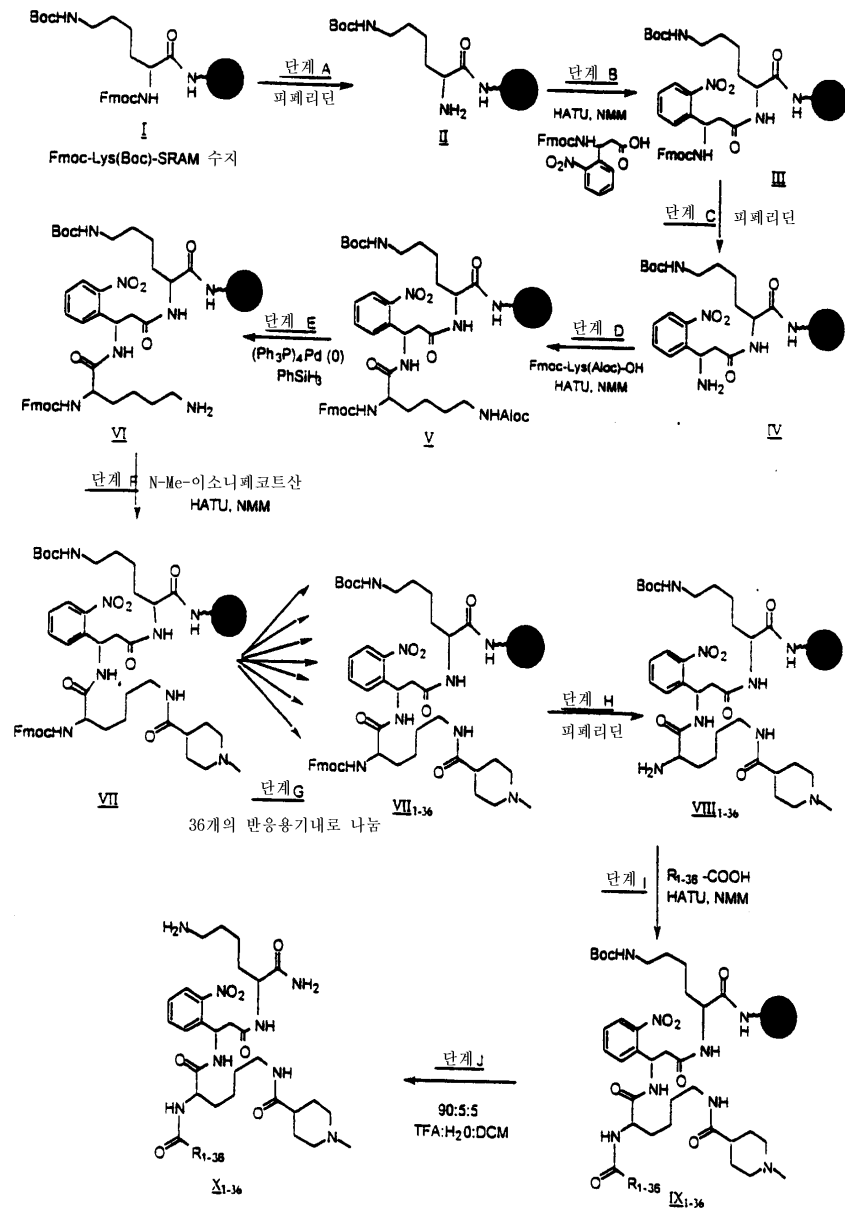
도면5



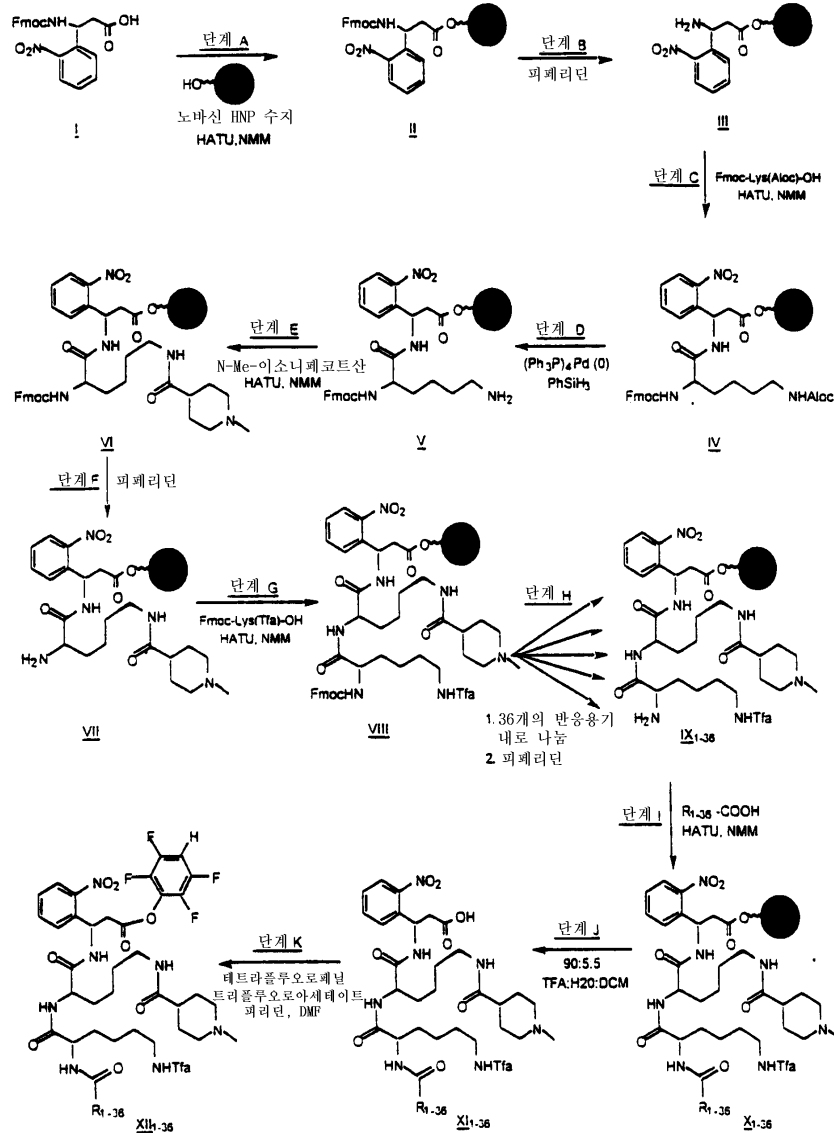
도면6



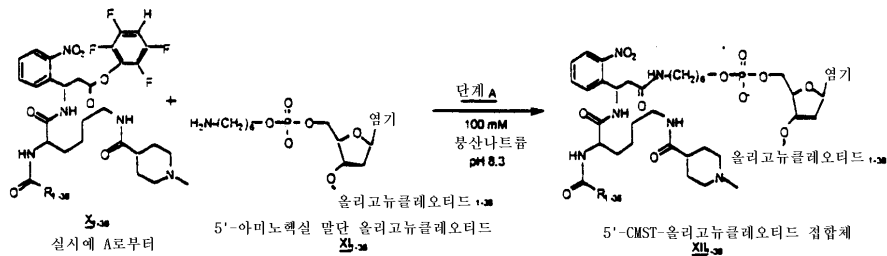
도면7



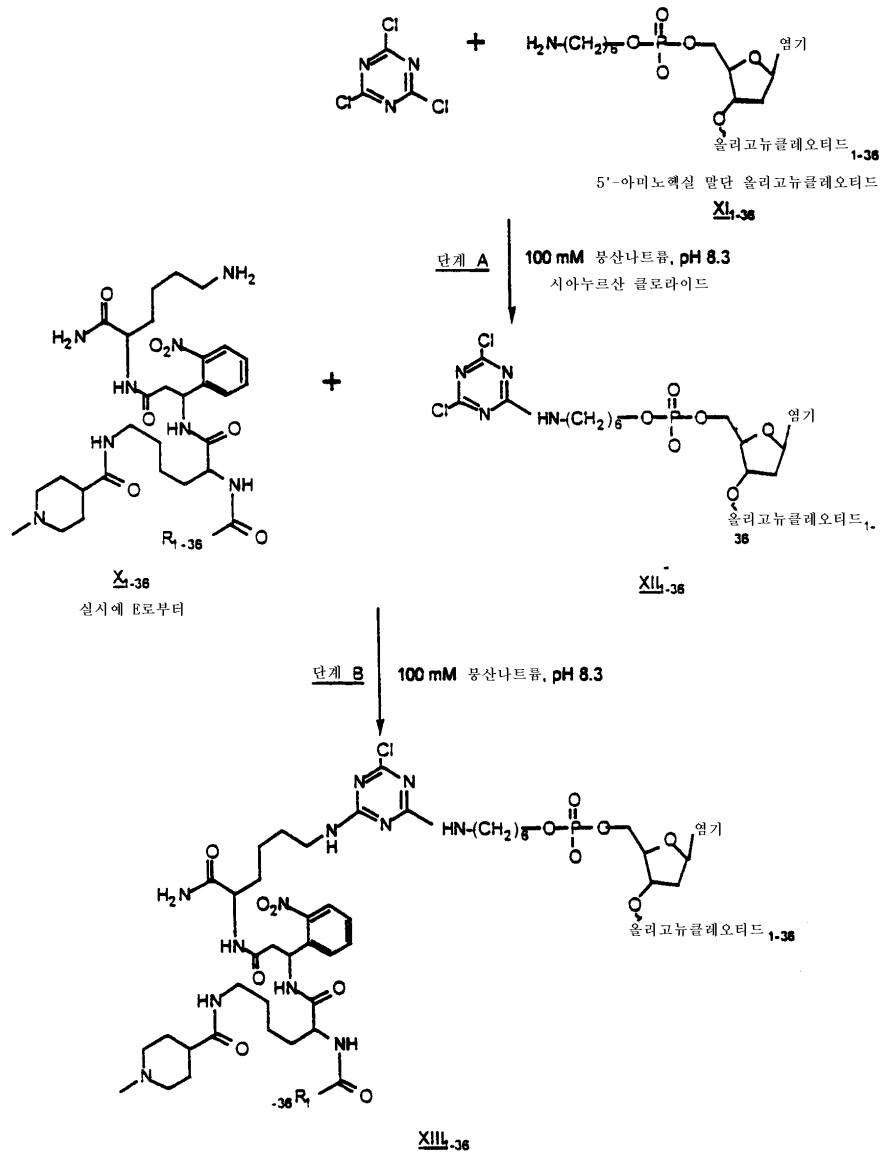
도면8



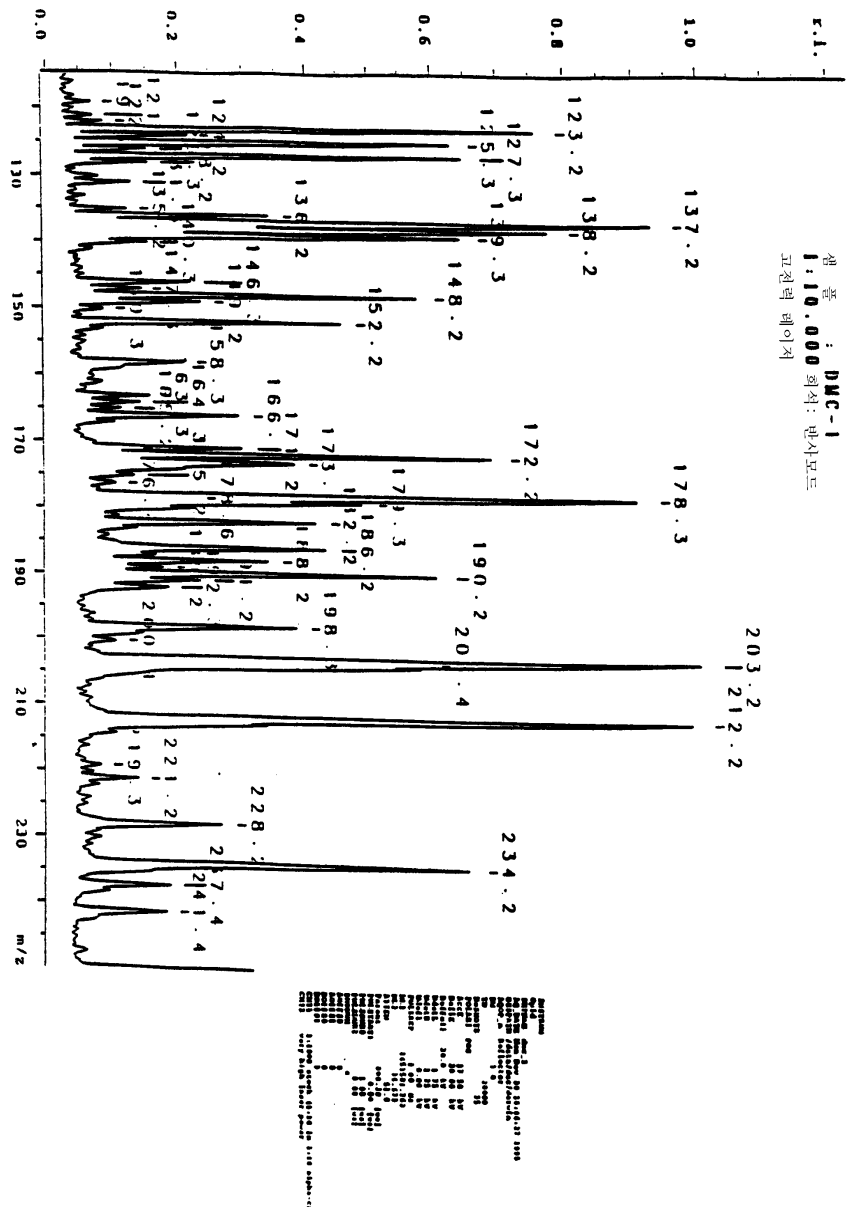
도면9



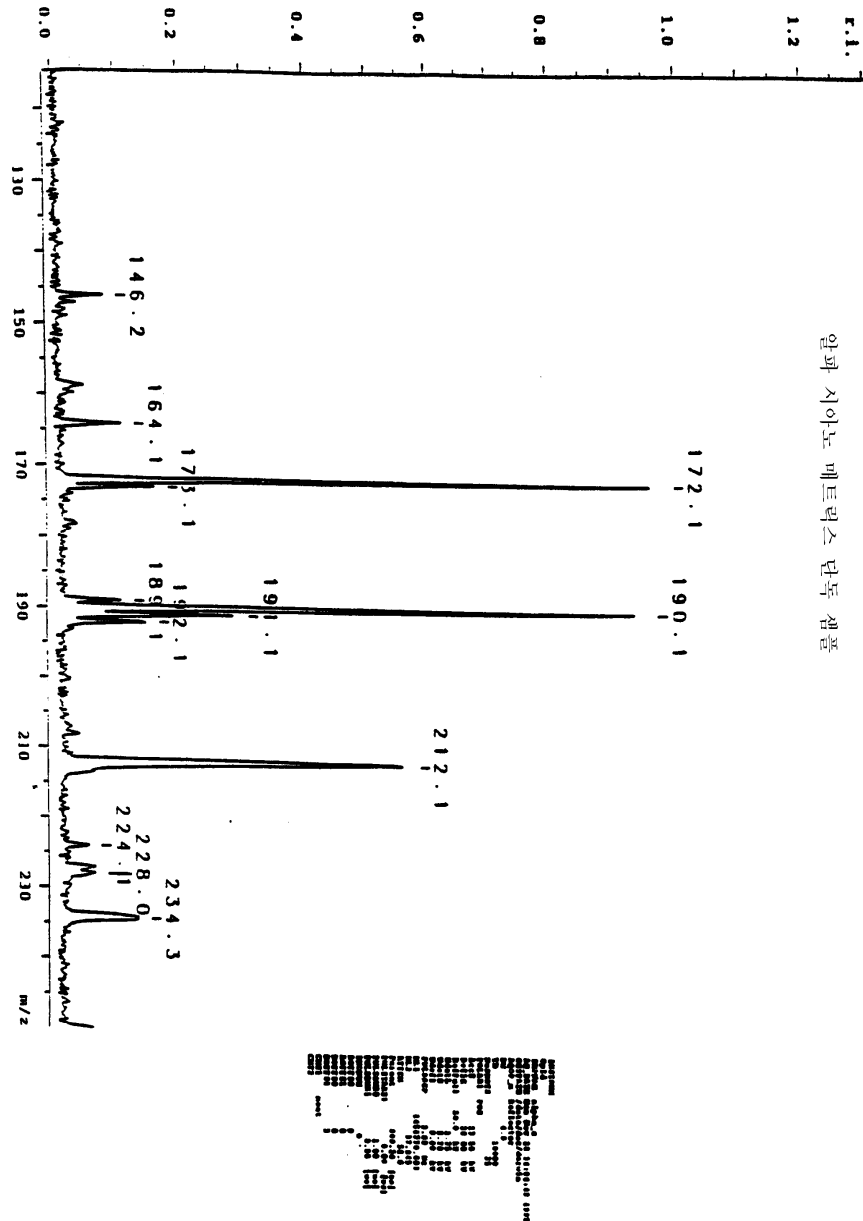
도면10



도면11



도면12



도면13

