



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0111543
(43) 공개일자 2007년11월21일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) Int. Cl.
 C12N 15/11 (2006.01) C07H 21/00 (2006.01)
 C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/10 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2007-7022882</p> <p>(22) 출원일자 2007년10월05일
 심사청구일자 2007년10월05일
 번역문제출일자 2007년10월05일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/KR2006/000746
 국제출원일자 2006년03월03일</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2006/095981
 국제공개일자 2006년09월14일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020050018419 2005년03월05일 대한민국(KR)
 PCT/KR2005/001206 2005년04월26일 세계지적재산권기구(WIPO)(WO)</p> | <p>(71) 출원인
 주식회사 씨젠
 서울시 송파구 방이동 65-5 태원빌딩 8층,9층</p> <p>(72) 발명자
 천종윤
 서울 송파구 방이동 89번지 올림픽선수기자촌아파트 319-1301</p> <p>(74) 대리인
 양부현</p> |
|--|--|

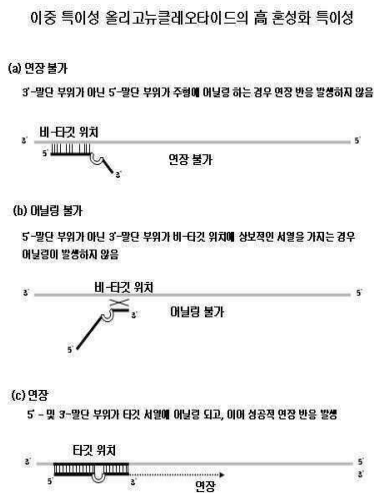
전체 청구항 수 : 총 59 항

(54) 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 사용한 방법 및 이중특이성 올리고뉴클레오타이드

(57) 요약

본 발명은 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 사용한 주형 의존성(template-dependent) 연장 반응(extension reaction)에 의한 다양한 방법 및 세 개의 다른 T_m 부위를 포함하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 고 혼성화 특이성 및 미스매치 허용성을 지니는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드의 특징들이 강조되어 있다.

대표도 - 도1A



특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 주형-의존적 연장 반응에 의해 핵산분자를 제조하는 방법:

(a) 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 주형 핵산 분자에 어닐링시키는 단계로서, 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드는 5' -고 T_m 특이성 부위(5' -high T_m specificity portion), 3' -저 T_m 특이성 부위(5' -low T_m specificity portion) 및 분할 부위(separation portion), 세개의 부위를 포함하며, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 혼성화되는 상기 주형 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 상기 분할 부위는 최소 두 개의 유니버설 염기를 포함하고, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 상기 주형 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지고; 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m 은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m 보다 높으며, 상기 분할 부위는 3개의 부위 중에서 가장 낮은 T_m 을 가지고; 상기 분할 부위는 상기 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위가 상기 주형 핵산에 어닐링되는 조건 하에서 비염기쌍 버블 구조를 형성하며, 상기 어닐링은 3' -저 T_m 특이성 부위 단독에 의한 어닐링이 발생되지 않는 조건 하에서 실시되고; 그리고

(b) 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 연장하여 상기 주형 핵산 분자에 상보적인 핵산 분자를 제조하는 단계.

청구항 2

적어도 하나의 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 프라이머 세트를 이용하여, 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성 과정을 적어도 두 사이클을 실시하여 상기 타깃 핵산 서열을 증폭시키는 단계를 포함하고; 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드는 5' -고 T_m 특이성 부위, 3' -저 T_m 특이성 부위 및 분할 부위 세 개의 부위를 포함하며, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 혼성화 되는 상기 타깃 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 상기 분할 부위는 최소 두 개의 유니버설 염기를 포함하고, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 상기 타깃 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지고; 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m 은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m 보다 높으며, 상기 분할 부위는 3개의 부위 중에서 가장 낮은 T_m 을 가지고; 상기 분할 부위는 상기 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위가 상기 타깃 핵산에 어닐링되는 조건 하에서 비염기쌍 버블 구조를 형성하며; 상기 증폭 반응에서의 어닐링은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위 단독에 의한 어닐링이 발생되지 않는 조건 하에서 실시되는 것을 특징으로 하는 DNA 또는 핵산 혼합물에서 타깃 핵산 서열을 선택적으로 증폭하는 방법.

청구항 3

프라이머 쌍 중 적어도 하나의 프라이머는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드인 둘 이상의 프라이머 쌍을 이용하여 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성 과정을 적어도 두 사이클을 실시하여 타깃 뉴클레오타이드 서열들을 증폭시키는 단계를 포함하며, 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드는 5' -고 T_m 특이성 부위, 3' -저 T_m 특이성 부위 및 분할 부위, 세 개의 부위를 포함하며, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 혼성화되는 상기 뉴클레오타이드 서열의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 상기 분할 부위는 최소 두 개의 유니버설 염기를 포함하고, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 상기 타깃 뉴클레오타이드 서열의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지고, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m 은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m 보다 높으며, 상기 분할 부위는 3개의 부위 중에서 가장 낮은 T_m 을 가지고; 상기 분할 부위는 상기 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위가 상기 타깃 뉴클레오타이드 서열에 어닐링되는 조건 하에서 비염기쌍 버블 구조를 형성하며; 증폭 반응에서의 어닐링은 3' -저 T_m 특이성 부위 단독에 의한 어닐링이 발생되지 않는 조건 하에서 실시되는 것을 특징으로 하는, 동일한 반응에서 동시에 두 개 이상의

프라이머 쌍을 사용하여 두 개 이상의 타겟 뉴클레오타이드 서열을 증폭하는 방법.

청구항 4

다음의 단계를 포함하는, 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 DNA 또는 핵산 혼합물에서 타겟 핵산 분자를 시퀀싱하는 방법:

(a) 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 시퀀싱 프라이머로 이용하여 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성 과정을 적어도 두 사이클을 실시하여 시퀀싱할 상기 핵산 분자에 상보적인 핵산 분자를 제조하는 단계로서; 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드는 5' -고 T_m 특이성 부위, 3' -저 T_m 특이성 부위 및 분할 부위 세 개의 부위를 포함하며, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 혼성화되는 상기 타겟 핵산 분자의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 상기 분할 부위는 최소 두 개의 유니버설 염기를 포함하고, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 상기 타겟 핵산 분자의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지고; 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m 은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m 보다 높으며, 상기 분할 부위는 3개의 부위 중에서 가장 낮은 T_m 을 가지고; 상기 분할 부위는 상기 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위가 상기 타겟 핵산 분자에 어닐링되는 조건 하에서 비염기쌍 버블 구조를 형성하며; 제조 반응에서의 어닐링은 3' -저 T_m 특이성 부위 단독에 의한 어닐링이 발생되지 않는 조건 하에서 실시되고; 그리고

(b) 상기 제조된 상보적인 핵산 분자의 뉴클레오타이드 서열을 결정하는 단계.

청구항 5

다음의 단계를 포함하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드의 주형-의존적 연장반응에 의해 유전적 다변성을 가진 핵산 분자를 검출하는 방법:

(a) 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 주형 핵산 분자에 어닐링시키는 단계로서, 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드는 5' -고 T_m 특이성 부위, 3' -저 T_m 특이성 부위 및 분할 부위 세 개의 부위를 포함하며, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 혼성화 되는 상기 주형 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 상기 분할 부위는 최소 두 개의 유니버설 염기를 포함하고, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 상기 주형 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지고; 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m 은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m 보다 높으며, 상기 분할 부위는 3개의 부위 중에서 가장 낮은 T_m 을 가지고; 상기 분할 부위는 상기 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위가 상기 주형 핵산에 어닐링되는 조건 하에서 비염기쌍 버블 구조를 형성하며, 상기 어닐링은 3' -저 T_m 특이성 부위 단독에 의한 어닐링이 발생되지 않고, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위 및/또는 상기 3' -저 T_m 특이성 부위가 그 타겟 위치에 대하여 하나 이상의 미스매치 염기를 가질 경우 발생하는 조건에서 어닐링이 발생하고;

(b) 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 연장하여 상기 주형에 상보적인 상기 핵산 분자를 제조하는 단계; 그리고

(c) 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드의 상기 주형-의존적 연장 반응의 발생 여부를 검출하는 단계.

청구항 6

다음의 단계를 포함하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드의 주형-의존적 연장반응에 의해 핵산 시료에서 타겟 뉴클레오타이드 서열을 검출하는 방법:

(a) 혼성화, 주형-의존적 연장 및 변성 과정을 적어도 한 사이클 포함하는, 기질 상에 고정된 프로브로서의 이중 특이성 올리고 뉴클레오타이드를 연장하는 단계로서, 상기 혼성화는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 핵산 시료에 접촉시킴으로써 실시되고, 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드는 5' -고 T_m 특이성 부위(5' -high T_m specificity portion), 3' -저 T_m 특이성 부위(5' -low T_m specificity portion) 및 분할 부위(separation portion), 세 개의 부위를 포함하며, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 혼성화되는 상기 타겟 뉴클레오타이드 서열의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 상기 분할 부위

는 최소 두개의 유니버설 염기를 포함하고, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 상기 타겟 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지고; 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m 은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m 보다 높으며, 상기 분할 부위는 3개의 부위 중에서 가장 낮은 T_m 을 가지고; 상기 분할 부위는 상기 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위가 상기 타겟 뉴클레오타이드 서열에 어닐링 되는 조건 하에서 비 염기쌍 버블 구조를 형성하며, 증폭 반응에서의 어닐링은 3' -저 T_m 특이성 부위 단독에 의한 어닐링이 발생되지 않는 조건 하에서 실시되고; 그리고

(b) 주형-의존적 연장 반응의 발생 여부를 분석하는 단계.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분할 부위내의 유니버설 염기는 디옥시이노신, 이노신, 7-디아자-2'-디옥시이노신, 2'-아자-2'-디옥시이노신, 2'-OMe 이노신, 2'-F 이노신, 디옥시 3-니트로피롤, 3-니트로피롤, 2'-OMe 3-니트로피롤, 2'-F 3-니트로피롤, 1-(2'-디옥시-베타-D-리보푸라노실)-3-니트로피롤, 디옥시 5-니트로피롤, 5-니트로인돌, 2'-OMe 5-니트로인돌, 2'-F 5-니트로인돌, 디옥시 4-니트로벤즈이미다졸, 4-니트로벤즈이미다졸, 디옥시 4-아미노벤즈이미다졸, 4-아미노벤즈이미다졸, 디옥시 네블라린, 2'-F 네블라린, 2'-F 4-니트로벤즈이미다졸, PNA-5-인트로인돌, PNA-네블라린, PNA-이노신, PNA-4-니트로벤즈이미다졸, PNA-3-니트로피롤, 모르포리노-5-니트로인돌, 모르포리노-네블라린, 모르포리노-이노신, 모르포리노-4-니트로벤즈이미다졸, 모르포리노-3-니트로피롤, 포스포라미데이트-5-니트로인돌, 포스포라미데이트-네블라린, 포스포라미데이트-이노신, 포스포라미데이트-4-니트로벤즈이미다졸, 포스포라미데이트-3-니트로피롤, 2'-O-메톡시에틸이노신, 2'-O-메톡시에틸 네블라린, 2'-O-메톡시에틸 5-니트로인돌, 2'-O-메톡시에틸 4-니트로-벤즈이미다졸, 2'-O-메톡시에틸 3-니트로피롤 및 상기 염기의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 유니버설 염기는 디옥시이노신, 1-(2'-디옥시 베타-D-리보푸라노실)-3-니트로피롤 또는 5-니트로인돌인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 유니버설 염기는 디옥시이노신인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분할 부위는 유니버설 염기를 갖는 뉴클레오타이드의 연속 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 3' -저 T_m 특이성 부위보다 길이가 긴 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 혼성화되는 상기 주형 핵산의 상기 위치에 대하여 완벽하게 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 15 내지 40 뉴클레오타이드 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 15 내지 25 뉴클레오타이드 길이를 갖는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 15

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분할 부위는 적어도 3 뉴클레오타이드 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분할 부위는 3 내지 10 뉴클레오타이드 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 3 내지 15 뉴클레오타이드 길이를 지니는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 15 내지 25 뉴클레오타이드 길이, 상기 분할 부위는 3 내지 10 뉴클레오타이드 길이 및 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 3 내지 15 뉴클레오타이드 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m 는 40°C-80°C인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m 는 10°C-40°C인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분할 부위의 ΔT_m 는 3°C-15°C 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 어닐링은 45°C-68°C 범위의 온도에서 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 1 항 또는 제 5 항에 있어서, 상기 타겟 핵산 서열의 제조는, 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드 어닐링, 연장 및 변성과정을 포함하는 주형-의존적 연장 반응의 과정을 반복함으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서, 상기 증폭반응은 중합효소 연쇄반응에 따라 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

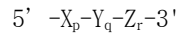
제 4 항에 있어서, 상기 시퀀싱할 타겟 핵산 분자는 지놈 DNA 또는 cDNA 파플레이션 내에 포함된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제 5 항에 있어서, 상기 유전적 다변성을 지닌 핵산 분자는 유전적 다변성을 갖는 바이러스의 핵산인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

다음의 일반식으로 나타내는 주형-의존적 연장 반응에 의하여 핵산 분자를 제조하기 위한 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드:



X_p 는 혼성화 되는 주형 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지는 5' -고 T_m 특이성 부위를 나타내며, Y_q 는 최소 두개의 유니버설 염기를 포함하는 분할 부위를 나타내고, Z_r 는 주형 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지는 3' -저 T_m 특이성 부위를 나타내며, p, q 및 r은 뉴클레오타이드의 개수이고, X, Y 및 Z는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이고; 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m 은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m 보다 높으며, 상기 분할 부위는 3개의 부위 중에서 가장 낮은 T_m 을 가지고; 상기 분할 부위는 상기 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위가 상기 주형 핵산에 어닐링되는 조건 하에서 비염기쌍 버블 구조를 형성하여, 상기 주형 핵산에 대한 어닐링 특이성 측면에서 상기 5' -고 T_m 특이성 부위가 3' -저 T_m 특이성 부위로부터 분리되도록 하며, 상기 올리고뉴클레오타이드의 어닐링 특이성은 5' -고 T_m 특이성 부위 및 3' -저 T_m 특이성 부위 둘 모두에 의해 결정되어 상기 올리고뉴클레오타이드의 전체 어닐링 특이성이 증가된다.

청구항 28

제 27 항에 있어서, 상기 분할 부위의 상기 유니버설 염기는 디옥시이노신, 이노신, 7-디아자-2 '-디옥시이노신, 2-아자-2' -디옥시이노신, 2 '-OMe 이노신, 2'-F 이노신, 디옥시 3-니트로피롤, 3-니트로피롤, 2'-OMe 3-니트로피롤, 2'-F 3-니트로피롤, 1-(2' -디옥시-베타-D-리보푸라노실)-3-니트로피롤, 디옥시 5-니트로피롤, 5-니트로인돌, 2'-OMe 5-니트로인돌, 2'-F 5-니트로인돌, 디옥시 4-니트로벤즈이미다졸, 4-니트로벤즈이미다졸, 디옥시 4-아미노벤즈이미다졸, 4-아미노벤즈이미다졸, 디옥시 네블라린, 2'-F 네블라린, 2'-F 4-니트로벤즈이미다졸, PNA-5-인트로인돌, PNA-네블라린, PNA-이노신, PNA-4-니트로벤즈이미다졸, PNA-3-니트로피롤, 모르포리노-5-니트로인돌, 모르포리노-네블라린, 모르포리노-이노신, 모르포리노-4-니트로벤즈이미다졸, 모르포리노-3-니트로피롤, 포스포라미데이트-5-니트로인돌, 포스포라미데이트-네블라린, 포스포라미데이트-이노신, 포스포라미데이트-4-니트로벤즈이미다졸, 포스포라미데이트-3-니트로피롤, 2'-0-메톡시에틸이노신, 2'-0-메톡시에틸 네블라린, 2'-0-메톡시에틸 5-니트로인돌, 2'-0-메톡시에틸 4-니트로벤즈이미다졸, 2'-0-메톡시에틸 3-니트로피롤 및 상기 염기의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드.

청구항 29

제 28 항에 있어서, 상기 유니버설 염기는 디옥시이노신, 1-(2' -디옥시 베타-D-리보푸라노실)-3-니트로피롤 또는 5-니트로인돌인 것을 특징으로 하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드.

청구항 30

제 29 항에 있어서, 상기 유니버설 염기는 디옥시이노신인 것을 특징으로 하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드.

청구항 31

제 27 항에 있어서, 상기 분할 부위는 유니버설 염기를 갖는 뉴클레오타이드의 연속서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드.

청구항 32

제 27 항에 있어서, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 3' -저 T_m 특이성 부위보다 길이가 긴 것을 특징으로 하는 이

중 특이성 올리고뉴클레오타이드.

청구항 33

제 27 항에 있어서, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 혼성화되는 상기 주형 핵산의 상기 위치에 대하여 완벽하게 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드.

청구항 34

제 27 항에 있어서, 상기 p는 15 내지 40의 정수인 것을 특징으로 하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드.

청구항 35

제 34 항에 있어서, 상기 p는 15 내지 25의 정수인 것을 특징으로 하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드.

청구항 36

제 27 항에 있어서, 상기 q는 최소 3인 것을 특징으로 하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드.

청구항 37

제 27 항에 있어서, 상기 q는 3 내지 10의 정수인 것을 특징으로 하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드.

청구항 38

제 27 항에 있어서, 상기 r은 3 내지 15의 정수인 것을 특징으로 하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드.

청구항 39

제 27 항에 있어서, 상기 p는 15 내지 25의 정수, 상기 q는 3 내지 10의 정수 및 상기 r은 3 내지 15의 정수인 것을 특징으로 하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드.

청구항 40

제 27 항에 있어서, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m 는 40°C-80°C인 것을 특징으로 하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드.

청구항 41

제 27 항에 있어서, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m 은 10°C-40°C인 것을 특징으로 하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드.

청구항 42

제 27 항에 있어서, 상기 분할 부위의 상기 분할 부위의 T_m 는 3°C-15°C 인 것을 특징으로 하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드.

청구항 43

다음의 단계를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 어닐링 특이성을 올리고 뉴클레오타이드의 구조에 의해 이중적으로 결정되도록 하는 방법:

(a) 타깃 핵산 서열을 선택하는 단계;

(b) (i) 상기 타깃 핵산에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열과 (ii) 적어도 두 유니버설 염기를 포함하는 분할 부위를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 서열을 디자인 하여 상기 분할 부위가 상기 혼성화 서열 사이에 끼여 들어가(intervene) 상기 올리고뉴클레오타이드에서 세 개의 부위를 형성하도록 하는 단계; 그리고

(c) 상기 분할 부위의 5' -방향쪽의 부위는 분할 부위의 3' -방향쪽 부위보다 높은 T_m 을 가지고, 상기 분할 부위는 상기 세 부위에서 가장 낮은 T_m 을 가지도록 상기 올리고뉴클레오타이드에서 상기 분할 부위의 위치를 결정

하는 단계로서, 이에 의해 (i) 상기 올리고뉴클레오타이드의 5' -고 T_m 특이성 부위는 상기 타깃 핵산에 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며, (ii) 상기 올리고뉴클레오타이드의 3' -저 T_m 특이성 부위는 상기 타깃 핵산에 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지고; 그리고 (iii) 상기 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위 사이의 상기 분할 부위는 적어도 두 유니버설 염기를 포함하며; 그리고 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m보다 높고 상기 분할 부위는 3개의 부위 중에서 가장 낮은 T_m을 가져, 서로 간에 다른 T_m 값을 지닌 세 개의 구분된 부위를 가지는 올리고뉴클레오타이드를 제공하며,

상기한 구성에 의해 상기 올리고뉴클레오타이드의 타깃 핵산에 대한 어닐링 특이성은 상기 5' -고 T_m 특이성 부위 및 3' -저 T_m 특이성 부위에 의해 이중으로 결정된다.

청구항 44

제 43 항에 있어서, 상기 분할 부위의 상기 유니버설 염기는 디옥시이노신, 이노신, 7-디아자-2 '-디옥시이노신, 2-아자-2' -디옥시이노신, 2 '-OMe 이노신, 2'-F 이노신, 디옥시 3-니트로피롤, 3-니트로피롤, 2'-OMe 3-니트로피롤, 2'-F 3-니트로피롤, 1-(2' -디옥시-베타-D-리보푸라노실)-3-니트로피롤, 디옥시 5-니트로피롤, 5-니트로인돌, 2'-OMe 5-니트로인돌, 2'-F 5-니트로인돌, 디옥시 4-니트로벤즈이미다졸, 4-니트로벤즈이미다졸, 디옥시 4-아미노벤즈이미다졸, 4-아미노벤즈이미다졸, 디옥시 네블라린, 2'-F 네블라린, 2'-F 4-니트로벤즈이미다졸, PNA-5-인트로인돌, PNA-네블라린, PNA-이노신, PNA-4-니트로벤즈이미다졸, PNA-3-니트로피롤, 모르포리노-5-니트로인돌, 모르포리노-네블라린, 모르포리노-이노신, 모르포리노-4-니트로벤즈이미다졸, 모르포리노-3-니트로피롤, 포스포라미데이트-5-니트로인돌, 포스포라미데이트-네블라린, 포스포라미데이트-이노신, 포스포라미데이트-4-니트로벤즈이미다졸, 포스포라미데이트-3-니트로피롤, 2'-0-메톡시에틸이노신, 2'-0-메톡시에틸 네블라린, 2'-0-메톡시에틸 5-니트로인돌, 2'-0-메톡시에틸 4-니트로벤즈이미다졸, 2'-0-메톡시에틸 3-니트로피롤 및 상기 염기의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 45

제 44 항에 있어서, 상기 유니버설 염기는 디옥시이노신, 1-(2' -디옥시 베타-D-리보푸라노실)-3-니트로피롤 또는 5-니트로인돌인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46

제 45 항에 있어서, 상기 유니버설 염기는 디옥시이노신인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 47

제 43 항에 있어서, 상기 분할 부위는 유니버설 염기를 갖는 뉴클레오타이드의 연속서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 48

제 43 항에 있어서, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 3' -저 T_m 특이성 부위보다 길이가 긴 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 49

제 43 항에 있어서, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 혼성화되는 상기 주형 핵산의 상기 위치에 대하여 완벽하게 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50

제 43 항에 있어서, 상기 p는 15 내지 40의 정수인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 51

제 50 항에 있어서, 상기 p는 15 내지 25의 정수인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 52

제 43 항에 있어서, 상기 q는 최소 3인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 53

제 43 항에 있어서, 상기 q는 3 내지 10의 정수인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54

제 43 항에 있어서, 상기 r은 3 내지 15의 정수인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 55

제 43 항에 있어서, 상기 p는 15 내지 25의 정수, 상기 q는 3 내지 10의 정수 및 상기 r은 3 내지 15의 정수인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 56

제 43 항에 있어서, 상기 5' -고 T₆ 특이성 부위의 T₆은 40℃-80℃인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 57

제 43 항에 있어서, 상기 3' -저 T₆ 특이성 부위의 T₆은 10℃-40℃인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 58

제 43 항에 있어서, 상기 분할 부위의 T₆은 3℃-15℃ 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 59

제 43 항에 있어서, 상기 주형-의존적 연장 반응은 중합효소 연쇄반응인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드(dual specific oligonucleotide)를 사용한 다양한 방법 및 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 사용한 주형 의존성(template-dependent) 연장 반응(extension reaction)에 의한 다양한 방법 및 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이다.

배경기술

<2> 핵산 증폭은 분자 생물학 분야에서 이용되는 다양한 방법에서 필수적인 과정이고, 이에 다양한 증폭 방법이 제시되었다. 예를 들어, Miller, H. I. 등 (WO 89/06700)은, 프로모터/프라이머 서열을 타겟 단일가닥 DNA("ssDNA")에 혼성화시킨 다음 상기 서열의 많은 RNA 카피를 전사하는 과정을 포함하는 핵산서열 증폭 방법을 개시하고 있다. 다른 공지의 핵산 증폭 방법들은 전사 증폭 시스템을 포함한다(Kwoh, D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:1173(1989); 및 Gingeras T.R. et al., WO 88/10315).

<3> 중합효소 연쇄반응(이하, "PCR"이라 한다)으로 공지된 가장 많이 이용되는 핵산 증폭 방법은 이중가닥 DNA의 변성, DNA 주형에로의 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 어닐링 및 DNA 중합효소에 의한 프라이머 연장의 반복된 사이클 과정을 포함한다 (Mullis 등, 미국 특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호; Saiki et al., (1985) *Science* 230, 1350-1354). PCR에 이용되는 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 DNA 주형의 반대쪽 가닥에 어닐링되도록 디자인된다. DNA 중합효소에 의해 프라이머는 연장되며 그 연장 생성물은 다음 과정에서 다른 프라이머를 위한 주형 가닥으로 작용한다. PCR 증폭 과정은 DNA 단편의 지수적 증가를 초래하며, 증폭된 DNA 단편의 길이는 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 5 '-말단에 의해 결정된다.

- <4> 핵산 증폭, 특히, PCR 증폭에서의 성공은 하나의 프라이머가 자신의 타겟 서열에만 어닐링하는 특이성에 의존하기 때문에, 상기의 분자간 상호작용을 최적화하는 것이 중요하다. 프라이머가 그의 완전한 상보체에만 어닐링하는지 또는 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 뉴클레오타이드 서열을 갖는 서열에도 어닐링하는 지 여부는, 어닐링 온도에 따라 결정될 수 있다. 일반적으로, 어닐링 온도가 높으면, 완전한 매치(match) 주형에 대한 프라이머의 특정 어닐링 가능성이 더욱 높아지고, 이에 타겟 서열만 증폭될 가능성이 더욱 높아진다. 반대로 낮은 어닐링 온도에서는 주형과 프라이머간의 보다 많은 미스매치가 발생할 가능성이 있다. 이런 현상의 관점에서 어닐링 온도를 조절하면, 주형과 프라이머 사이의 결합 특이성을 변화시킬 수 있다. 예를 들어, 만일 산물이 없다면 온도가 어닐링 하기에 너무 높은 경우일 수 있다. 만일 하나의 프라이머만 존재하는 대조군에서 다양한 길이의 생성물이 발생한다면, 이러한 결과는 상기 단일 프라이머가 주형의 하나 이상의 부위에 어닐링한다는 것을 나타낸다. 이러한 경우, 어닐링 온도를 상승시키는 것이 바람직하다.
- <5> 어닐링 온도뿐만 아니라, 프라이머 길이, GC 양 및 PCR 생성물의 길이와 같은 프라이머 서치 파라미터(primer search parameters)들은 프라이머의 어닐링 특이성을 위해 고려되어야 한다. 만일, 상술한 파라미터를 만족하는 프라이머가 이용되면, 프라이머 어닐링은 특정화되며, 타겟 DNA 증폭에서 프라이머의 어닐링 특이성은 상당히 개선되며, 프라이머에 의해 초래되는 백그라운드 문제와 비-특이성 생성물의 문제가 해결된다. 잘 디자인된 프라이머는 비-특이적 어닐링 및 백그라운드 문제를 해결할 뿐만 아니라 RNA-PCR에서 cDNAs 또는 게놈 주형들을 구별할 수 있게 한다.
- <6> 프라이머 어닐링 특이성을 개선하고, 이에 소망하는 생성물의 증폭이 가능하게 하기 위하여 많은 방법들이 개발되었다. 예를 들어, 터치다운 PCR(Don et al., (1991) Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.*, 19, 4008), 핫 스타트 PCR (DAquila et al., (1991) Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. *Nucleic Acids Res.*, 19, 3749), 네스티트 PCR (Mullis and Faloona, (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350) 및 부스터 PCR (Ruano et al., (1989) Biphasic amplification of very dilute DNA samples via booster PCR. *Nucleic Acids Res.* 17, 5407)이 있다.
- <7> 다른 접근 방식도 보고 되어 있는 데, 이들은 다양한 인핸서 화합물을 이용하여 PCR의 특이성을 개선한다. 인핸서 화합물에는 효과적인 어닐링 반응 온도를 증가시키는 화학물질, DNA 결합 단백질, 상업적 이용 가능한 반응물질 등이 포함된다. 그러나, 모든 PCR에서 성공을 담보할 수 있는 마술적인 첨가제는 없으며 어닐링 온도 같은 다양한 조건하에서 다른 첨가물을 테스트하는 일은 지루한 작업이다. 비록, 상술한 접근 방식들은 프라이머 어닐링 특이성을 개선하는 데 어느 정도 기여를 하지만, 상술한 방법들은 PCR 증폭에 이용되는 프라이머로부터 초래되는 문제점, 예컨대, 비-특이적 생성물 및 높은 백그라운드에 대한 근본적인 해결책은 되지 못한다.
- <8> PCR-관련 기술들은 타겟 DNA 서열의 증폭뿐만 아니라, 생물학과 의학의 연구 분야에서 다양한 응용과 방법에 널리 이용되고 있으며, 예컨대, 역전사 효소 PCR(RT-PCR), 분별 디스플레이(Differential Display) PCR(DD-PCR), 알려지거나 또는 알려지지 않은 유전자의 클로닝, cDNA 말단의 고속 증폭(RACE), 아비트러리 프라이밍(arbitrary priming) PCR(AP-PCR), 멀티플렉스(multiplex) PCR, SNP 게놈타이핑, PCR-관여 게놈 분석 (McPherson and Moller, (2000) PCR. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, NY)이 있다.
- <9> 비록 각 방법마다 개선된 접근 방법이 지속적으로 소개되고 있으나, 상술한 바와 같이 핵산 증폭, 특히 PCR 증폭 과정을 포함하는 모든 방법 및 기술들은, 이용되는 프라이머의 비특이성으로부터 야기되는 제한과 문제점, 예컨대, 위양결과(false positives), 재현가능성의 악화 및 높은 백그라운드 문제점으로부터 완전히 자유롭지 못한 실정이다.
- <10> 한편, DNA 혼성화는 분자생물학에서는 기본적인 과정이며 이온 세기, 염기 조성, 핵산분자가 결합하는 단편의 길이, 미스매치 정도 및 변성제의 존재에 의하여 영향을 받는다. 이러한 DNA 혼성화를 이용한 기술은 특이적 핵산 염기서열 결정에 매우 유용하며 임상진단, 유전자 관련 연구 및 법의학 분석에서도 매우 가치있다. 예를 들어, Wallace 및 그 공동연구자들은 단일 염기 변화와 같은 미묘한 서열 차이도 짧은 올리고머(예, 14-mer)를 이용하여 충분히 구별할 수 있으며, 이는 β -글로빈 유전자에서 점돌연변이의 분자적 분석에 있어 어떻게 적용될 수 있는지 보여주었다(Wallace, B.R., et al., (1981) The use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes. Hybridization of oligonucleotides of mixed sequence to rabbit β -globin DNA. *Nucleic Acids Res.* 9, 879-894; 및 Conner, B.J., et al. (1983) Detection of sickle cell β -globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 278-282).

- <11> 상보적인 가닥을 정확하게 동정하는 올리고뉴클레오타이드 혼성화 방법의 강력한 힘에도 불구하고, 이 기술은 아직도 한계에 직면해 있다. 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 하이브리드(hybrid)는 긴 핵산의 하이브리드보다 매우 불안정하며, 이것은 낮은 용해 온도에서 반영된다. 하이브리드의 불안정성은 올리고뉴클레오타이드 혼성화를 디자인할 때 고려되는 가장 중요한 요소 중의 하나이다. 완전하게 매치되는 상보체(complement) 및 단지 하나의 염기가 미스매치되는 상보체 사이의 안정성 차이는 T_m (이합체 용해 온도)에 있어서 약 0.5°C 차이가 발생할 정도로 매우 작다. 올리고머가 짧으면 짧을수록(보다 복잡한 혼합물에서 상보적인 가닥의 동정을 가능하게 함), 단일 염기 미스매치가 전체 이합체의 안정성에 미치는 영향이 더 커진다. 그러나, 이런 짧은 올리고뉴클레오타이드의 단점은 이들이 완전하게 상보적인 서열에 대해서도 약하게 혼성화 된다는 것이다. 따라서, 이러한 점을 고려하여 혼성화는 감소된 염격 조건에서 실시되어야 하며, 이는 결국 혼성화의 특이성을 크게 감소시키는 결과를 초래한다.
- <12> 올리고뉴클레오타이드 혼성화의 특이성을 개선하기 위한 많은 노력이 있어왔다. 고-민감성 혼성화를 위하여 DNA 염기를 화학적으로 변성하는 방법(Azhikina et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:11460-11462(1993)) 및 미스매치를 구별해 내는 능력을 개선하기 위해 혼성화를 낮은 온도에서 장시간 실시한 후 세척하는 방법(Drmanac et al., *DNA and Cell Biology*, 9:527-534 (1990))이 제안되었다. 최근에는, 인위적인 미스매치를 이용하여 DNA 혼성화에서 단일뉴클레오타이드다형성(SNPs)의 구별정도를 증가시킬 수 있는 다른 방법이 소개되었다(Guo et al., *Nature Biotechnology*, 15:331-5(1997)). 또한, 미합중국 특허 제6,077,668, 6,329,144, 6,140,054, 6,350,580, 6,309,824, 6,342,355 및 6,268,128호를 포함하는 다수의 미합중국 특허는 혼성화를 위한 프로브 및 그의 응용에 관하여 개시하고 있다. 개발된 각각의 방법에 있어서, 개선된 접근들이 계속적으로 소개되고 있지만, 올리고뉴클레오타이드 혼성화를 포함하는 모든 방법 및 기술들은 비특이적 올리고뉴클레오타이드 혼성화에 의한 제한 및 문제로부터 완전히 자유로울 수는 없다.
- <13> 더욱이, 스팟팅(spottting) 및 기질 상에 올리고뉴클레오타이드를 고정화하는 것 그리고 최적 혼성화 조건의 수립 실패 등과 같은 인위적인 요인은 혼성화의 네거티브 데이터에 영향을 줄 가능성이 있다. 특히, 잘못된 결과의 영향은 고속 스크리닝법(high throughput screening method)으로 얻어진 결과에서 크게 나타난다. 스팟팅 및 혼성화에 내재된 인위적인 요인들은 올리고뉴클레오타이드-기반의 DNA 마이크로어레이의 큰 단점이 된다.
- <14> 또한, 향상된 속도, 민감성 및 속도를 갖는 DNA 서열 분석 기술의 개발은 생물학 연구에서 매우 중요하다. 20여년 전에 개발된 전통적인 DNA서열화 방법(Sanger et al.*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74:5463-5467)은, 추가적인 응용분야에서 속도 및 비용의 측면에서 제한이 있었다. 따라서 여러 새로운 기술이 제안되었다. 유망한 세 가지 방법에는 혼성화에 의한 시퀀싱(Brain and Smith, *J. Theor. Biol.*, 135:303-307(1988); Dramanac et al., *Genomics*, 4:114-128(1989); Southern, E.M. Patent WO/10977(1989)), 연결(ligation)과 절단(cleavage)에 기반한 페러럴 시그네처 시퀀싱(parallel signature sequencing)(Brenner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:1665-1670(2000)) 및 파이로시퀀싱(pyrosequencing)(Ronaghi et al., *Anal. Biochem.*, 242:84-89(1996); *Science* 281:363-365(1998)) 등이 있다. 상기 기술에 있어 시퀀싱의 성공여부는 절대적으로 시퀀싱 프라이머의 타깃 핵산에 대한 혼성화 특이성에 의존한다. 시퀀싱 프라이머의 혼성화 특이성을 고려하면 현재 방법들은 시퀀싱 반응을 수행하기 위해 넣어주는 주형 핵산의 길이에 있어 제한이 있다. 일반적으로 시퀀싱 프라이머의 특이적 혼성화 후 연장하기 위해서는 바람직하게는 수백 염기쌍보다 작은 핵산 주형을 사용하여 시퀀싱 반응이 수행된다.
- <15> 그러나 진보된 연구를 위해선 증가된 속도, 민감성, 대용량화된 DNA 시퀀싱이 핵산 주형의 크기에 제한되지 않아야 한다. 이러한 관점에서, 시퀀싱 프라이머가 높은 특이성으로 타깃 핵산과 혼성화 된다면, 핵산 주형의 과플레이션에서부터 하나의 타깃 핵산의 직접적인 시퀀싱이 가능하다.
- <16> 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 특허문헌 및 논문이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 특허문헌 및 논문의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 상세한 설명

- <17> 본 발명자는 프라이머 또는 프로브로 사용된 종래의 올리고뉴클레오타이드, 그리고 핵산 혼성화 과정이 포함된 다양한 방법들의 문제점과 단점을 제거하기 위하여, 보다 높은 특이성으로 주형-의존적 반응을 수행하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 발명하였고 올리고뉴클레오타이드 혼성화 또는 어닐링을 포함하는 다양한 방법

에서 이의 뛰어난 응용성을 규명하였다.

- <18> 따라서 본 발명의 목적은 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 주형-의존적 연장 반응에 의해서 핵산 분자를 제조하는 방법을 제공하는데 있다.
- <19> 본 발명의 다른 목적은 하나의 DNA 또는 핵산 혼합물에서 타겟 핵산 서열을 선택적으로 증폭시키는 방법을 제공하는데 있다.
- <20> 본 발명의 또 다른 목적은 동일한 반응에서 두개 이상의 프라이머 쌍을 이용하여 동시에 두개 이상의 타겟 뉴클레오타이드 서열을 증폭하는 방법을 제공하는데 있다.
- <21> 본 발명의 다른 목적은 하나의 DNA 또는 핵산 혼합물에서 핵산 분자를 시퀀싱 하기위한 방법을 제공하는데 있다.
- <22> 본 발명의 또 다른 목적은 유전적 다양성을 가진 핵산분자를 주형-의존적 연장 반응으로 검출하는 방법을 제공하는데 있다.
- <23> 본 발명의 다른 목적은 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드-고정 마이크로어레이를 사용하여 핵산 시료에서 타겟 뉴클레오타이드 서열을 검출하는 방법을 제공하는데 있다.
- <24> 본 발명의 또 다른 목적은 주형-의존성 연장 반응에 의해 핵산 분자를 제조하기 위한 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 제공하는데 있다.
- <25> 본 발명은 다른 목적은 올리고뉴클레오타이드의 어닐링 특이성이 올리고뉴클레오타이드 구조를 통해 이중으로 결정될 수 있도록 하는 방법을 제공하는데 있다.
- <26> 본 발명의 또 다른 목적은 올리고뉴클레오타이드의 어닐링 특이성을 개선시키기 위한 방법을 제공하는데 있다.
- <27> 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.
- <28> 본 발명은 (a) 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 이용한 다양한 방법 및 (b) 상기 방법에 이용되는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이다. 본 발명의 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드(이하 "DS oligo"라 한다)는 개선된 특이성으로 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산에 어닐링되도록 하여, 핵산 증폭(특히, PCR)의 특이성 및 혼성화 반응을 크게 개선할 수 있도록 한다.

<29> **이중 특이성 올리고뉴클레오타이드(DS Oligo)**

<30> 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 일반식으로 표현되며 주형-의존적 연장 반응에 의한 핵산 분자를 합성하기 위한 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 제공한다:



<32> X_p는 혼성화 되는 주형 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지는 5' -고 T_m 특이성 부위를 나타내며, Y_q는 최소 두개의 유니버설 염기를 포함하는 분할 부위를 나타내고, Z_r는 혼성화되는 주형 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지는 3' -저 T_m 특이성 부위를 나타내며, p, q 및 r은 뉴클레오타이드의 개수이고, X, Y 및 Z는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이고; 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m보다 높으며, 상기 분할 부위는 3개의 부위 중에서 가장 낮은 T_m을 가지고; 상기 분할 부위는 상기 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위가 상기 주형 핵산에 어닐링되는 조건 하에서 비염기쌍 버블 구조를 형성하여, 상기 주형 핵산에 대한 어닐링 특이성 측면에서 상기 5' -고 T_m 특이성 부위가 3' -저 T_m 특이성 부위로부터 분리되도록 하며, 상기 올리고뉴클레오타이드의 어닐링 특이성은 5' -고 T_m 특이성 부위 및 3' -저 T_m 특이성 부위 둘 모두에 의해 결정되어 상기 올리고뉴클레오타이드의 전체 어닐링 특이성이 증가된다.

<33> DS 올리고뉴클레오타이드(이하 "DS oligo"라 한다)를 언급하면서 사용되는 용어 "이중 특이성(dual specificity)"은 DS 올리고뉴클레오타이드의 특징을 표현하기 위한 조어로서, 타겟 서열에 대한 DS 올리고뉴클레오타이드의 어닐링 특이성이, 분리된 두 부위, 즉 5' -고 T_m 특이성 부위 및 3' -저 T_m 특이성 부위에 의해 이중으로 결정되는 것을 의미한다. 일반적으로, 프라이머 또는 프로브의 어닐링 특이성은 그 연속되는 전체 서열에 의해 지배

된다. 반대로, DS oligo의 어닐링 특이성은 분할 부위에 의해 분리된 두 부위(5'-고 T_m 특이성 부위 및 3'-저 T_m 특이성 부위)에 의해 이중으로 결정되며, 상기 세 부위는 하나의 올리고뉴클레오타이드 서열 내에 위치한다. 이러한 이중 특이성은 DS oligo가 프라이머 및 프로브로서 더욱 높은 특이성을 나타내도록 하며, 이는 종래기술에 대하여 본 발명이 신규성 및 진보성을 갖도록 한다.

- <34> 한편, 본 발명자는 WO 03/050303에 개시된 것처럼 어닐링 특이성을 증가시키기 위해 ACP(annealing control primer)를 이미 개발한 바가 있으며, 상기 특허 문건의 교시 내용은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 본 발명의 DS oligo는 다음의 측면에 있어 ACP와 명확히 다르다: (i) DS oligo는 타깃 서열과 혼성화 되도록 두개의 특이성 부위를 가지지만 ACP는 하나의 특이성 부위를 가지며; (ii) DS oligo에서의 세 부위는 T_m 측면에서 명확히 구별되는 반면에 ACP에서의 부위들은 그러하지 않으며; (iii) DS 프라이머는 5'-고 T_m 특이성 부위 및 3'-저 T_m 특이성 부위 모두에서 어닐링이 발생할 때만 주형에 상보적인 핵산 분자를 합성하기 위하여 연장되는 반면에 ACP는 3'-말단 부위에 어닐링이 발생하는 경우에도 연장되고; (iv) 따라서 DS oligo의 연장 또는 혼성화 특이성은 두개의 분할된 부위, 즉 5'-고 T_m 특이성 부위 및 3'-저 T_m 특이성 부위 의해 이중으로 결정되나, 반면에 ACP 경우는 단지 3'-말단 부위만에 의해 지배된다. 따라서, DS oligo의 타깃 서열에 대한 어닐링 또는 혼성화 특이성은 APC보다 훨씬 크며, 이는 DS oligo가 ACP에 대하여 신규하고 진보적임을 나타내는 것이다.
- <35> DS oligo의 두드러진 특징은 하나의 올리고뉴클레오타이드 분자내에 구분되는 특징을 가진 세 개의 다른 부위를 가진다는 것이다: 5'-고 T_m 특이성 부위, 3'-저 T_m 특이성 부위 및 분할 부위.
- <36> DS oligo는 주형-의존적 연장반응을 포함하는 다양한 방법과 분석에 유용하다. 본 명세서에서 사용된 용어 “주형-의존적 연장 반응(template-dependent extension reaction)”은 타깃 서열에 혼성화 된 올리고뉴클레오타이드 분자를 연장하는 반응을 의미하며, 이는 올리고뉴클레오타이드의 말단에 연속적인 뉴클레오타이드를 결합시켜 이루어지고, 이 경우 연장된 서열은 상보적인 주형 서열에 의해 결정된다.
- <37> DS oligo의 혼성화(어닐링) 특이성을 설명하는 원리의 대표적인 예는 도 1A에 도시되어 있다. 도 1A를 참조하면, DS oligo가 보다 상세히 설명될 것이다.
- <38> DS oligo의 5'-고 T_m 특이성 부위만이 주형에 어닐링 되는 경우, 상기 부위는 주형-의존적 연장을 위한 프라이밍 위치로 작용할 수 없으며, 결국 연장 반응이 발생하지 않는다.
- <39> DS oligo의 5'-고 T_m 특이성 부위는 비-타깃 서열에 어닐링 되는 반면에, 보다 짧은 서열을 가지는 3'-저 T_m 특이성 부위는 비-타깃 서열에 어닐링 하지 않는다. 그 이유는 5'-고 T_m 특이성 부위 및 3'-저 T_m 특이성 부위는 어닐링 측면에서 분할 부위에 의해 분리되기 때문이다. 즉, 3'-저 T_m 특이성 부위는 5'-고 T_m 특이성 부위와는 상대적으로 독립적인 방식으로 어닐링에 관여하고, 3'-저 T_m 특이성 부위의 어닐링은 5'-고 T_m 특이성 부위의 어닐링에 의해 덜 영향 받는다. 이러한 맥락에서, 3'-저 T_m 특이성 부위가 비-타깃 서열에 어닐링 할 가능성은 매우 낮다.
- <40> 3'-저 T_m 특이성 부위만이 비-타깃 위치에 상보적인 서열을 가지는 경우에는, 특정 높은 엄격조건 예컨대 5'-고 T_m 특이성 부위의 어닐링을 위한 엄격 조건에서는 어닐링이 일어나지 않는다. 바람직한 구현예에 따르면, 3'-저 T_m 특이성 부위의 T_m 보다 높은 어닐링 온도를 갖는 엄격 조건하에서 DS oligo를 사용하여 주형-의존적 연장반응을 실시하는 것이 유리하다.
- <41> 5'-고 T_m 특이성 부위 및 3'-저 T_m 특이성 부위 모두가 주형에 실질적으로 상보적인 서열을 갖는 경우, DS oligo는 그 주형에 어닐링 될 수 있고, 따라서 성공적인 연장 반응이 발생한다.
- <42> 이론에 구속되지 않으면서 판단하건대, 분할 부위는 3'-저 T_m 특이성 부위를 어닐링 조건(예, 온도 및 서열 상보성)에 더 민감하게 만드는 것으로 판단된다. 따라서, 3'-저 T_m 특이성 부위와 비-타깃 서열 사이에 비-특이적 혼성화가 생길 가능성은 특정 어닐링(또는 엄격) 조건하에서 더욱 낮아진다. 5'-고 T_m 특이성 부위뿐만 아니라 3'-저 T_m 특이성 부위가 그 타깃 서열에 어닐링 되는 경우, 3'-저 T_m 특이성 부위의 3'-말단은 DNA 중합

효소에 의해 연장되는 위치를 만든다.

- <43> 본 명세서에서 사용하는 용어 “올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)”는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타깃 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성되는 것이다. 올리고뉴클레오타이드는 혼성화에 있어 최대 효율을 위하여 바람직하게는 단일쇄이다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오타이드는 올리고디옥시리보뉴클레오타이드이다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 올리고뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 골격 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 펩타이드 핵산 (PNA)(M. Egholm et al., *Nature*, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미테이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 핵소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로핵시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.
- <44> 본 명세서에서 사용되는 용어 “프라이머”는 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합제의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있다. 증폭의 최대 효율을 위하여, 바람직하게는 프라이머는 단일쇄이다. 바람직하게는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드이다. 본 발명의 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- <45> 프라이머는, 중합제의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, 응용분야 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정된다. 용어 “어닐링” 또는 “프라이밍”은 주형 핵산에 올리고디옥시뉴클레오타이드 또는 핵산이 병치(apposition)되는 것을 의미하며, 상기 병치는 중합효소가 뉴클레오타이드를 중합시켜 주형 핵산 또는 그의 일 부분에 상보적인 핵산 분자를 형성하게 한다. 본 명세서 용어 “혼성화(hybridization)”는 상보적인 단일쇄 핵산으로부터 이중쇄 핵산을 형성함을 의미한다. 용어 “어닐링”과 “혼성화”는 차이가 없으며, 본 명세서에서 혼용된다.
- <46> 본 명세서에서 사용된 용어 “프로브(probe)”는 타깃 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 부위를 포함하는 단일쇄 핵산 분자이다.
- <47> 본 명세서에서 본 발명의 DS oligo를 언급하면서 사용하는 용어 “부위(portion)”는 분할 부위에 의해 분리되는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 용어 “5'-고 T_m 특이성 부위(5'-high T_m specificity portion)” 또는 용어 “3'-저 T_m 특이성 부위(3'-low T_m specificity portion)”는 각각 본 발명의 DS oligo의 5' -말단과 3' -말단에서의 뉴클레오타이드 서열을 의미하며, 이는 분할 부위에 의해 분리된다. DS oligo를 언급하면서 사용하는 용어 5'-고 T_m 특이성 부위”는 세 부위 중에서 가장 높은 T_m을 가지고, 주형 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지는 부위를 의미한다. DS oligo와 관련하여 “3'-저 T_m 특이성 부위(3'-low T_m specificity portion)”는 5'-고 T_m 특이성 부위보다는 낮은 T_m을 갖지만, 분할 부위보다는 높은 T_m을 가지고, 주형 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지는 부위를 의미한다.
- <48> 본 발명에서 사용하는 용어 “T_m”는 핵산 이중쇄 분자중 반이 단일쇄가 되는 용융 온도(melting temperature)를 의미한다. DS oligo의 부위를 언급하면서 사용되는 용어 “고 T_m(high T_m)” 및 “저 T_m(low T_m)”은 절대 T_m 값이 아니라 상대 T_m 값을 의미한다. 즉, 5'-고 T_m 특이성 부위의 T_m이 3'-저 T_m 특이성 부위의 T_m보다 상대적으로 높다는 것만이 요구될 뿐이다.

<49> 상기 5' -고 T_m 특이성 부위와 3'-저 T_m 특이성 부위는 혼성화 되는 주형 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지도록 디자인 된다. DS oligo와 관련하여 용어 “실질적으로 상보적인(substantially complementary)” 는 올리고뉴클레오타이드가 충분히 상보적이어서 지정된 어닐링 조건 또는 엄격 조건하에서 선택적으로 주형 핵산 서열에 혼성화 될 수 있어, 어닐링 된 올리고뉴클레오타이드가 중합 효소에 의해 연장되어 주형에 상보적인 복사본을 형성할 수 있음을 의미한다. 따라서, 이 용어는 “완전하게 상보적인” 또는 이와 관련된 용어와는 다른 의미를 갖는다. DS oligo의 5'-고 T_m 특이성 부위 및 3'-저 T_m 특이성 부위는, 상기 DS oligo가 프라이머 또는 프라브로서 작용할 수 있는 범위 내에서, 주형에 대하여 하나 이상의 미스매치를 가질 수 있다. 가장 바람직하게는, DS oligo의 5'-고 T_m 특이성 부위 및/또는 3'-저 T_m 특이성 부위는 주형의 한 위치에 대하여 완전하게 상보적인 즉, 미스매치가 없는 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

<50> DS oligo의 성공적인 실시를 위해 5'-고 T_m 특이성 부위의 T_m이 3'-저 T_m 특이성 부위의 T_m보다 높아야 함은 필수적이다. 바람직하게는 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m는 40-80°C, 보다 바람직하게는, 40-75°C, 보다 더 바람직하게는 50-68°C, 그리고 가장 바람직하게는 50-65°C이다. 바람직하게는 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m는 10-40°C, 보다 바람직하게는, 15-40°C, 그리고 가장 바람직하게는 20-35°C이다. 바람직하게는, 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m는 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m 보다 최소 3°C 높으며, 보다 바람직하게는 최소 10°C, 보다 더 바람직하게는 최소 15°C, 그리고 가장 바람직하게는 최소 20°C 높다. 유리하게는, 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m는 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m 보다 5-70°C 높으며, 바람직하게는 10-70°C, 보다 바람직하게는 10-60°C, 보다 더 바람직하게는 10-50°C, 보다 더욱 더 바람직하게는 10-40°C 그리고 가장 바람직하게는 20-40°C 높다.

<51> 바람직한 구현예에 따르면, 5' -고 T_m 특이성 부위는 3' -저 T_m 특이성 부위보다 길다. 5' -고 T_m 특이성 부위는 바람직하게는, 15 내지 40 뉴클레오타이드 길이를 가지고, 보다 바람직하게는 15 내지 30 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는, 20 내지 25 뉴클레오타이드 길이를 가진다. 3' -저 T_m 특이성 부위는 바람직하게는, 3 내지 15 뉴클레오타이드 길이를 가지고, 보다 바람직하게는 5 내지 15 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는, 6 내지 12 뉴클레오타이드 길이를 가진다.

<52> 최소 두 유니버설 염기를 포함하는 분할 부위는 DS oligo의 이점과 특징을 결정하는 한 요소이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “유니버설 염기(universal base)”는 자연의 DNA/RNA 염기들에 대하여 구별 없이 자연의 DNA/RNA 염기들의 각각과 염기쌍을 형성할 수 있는 염기를 의미한다.

<53> 축퇴성 프라이머에서 불확실한 위치의 뉴클레오타이드가 유니버설 염기에 의해 치환되는 것은 공지된 사실이며, 상기 유니버설 염기는 디옥시이노신(Ohtsuka et al, (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 2605-2608; Sakanari et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 4863-4867), 1-(2 '-디옥시-베타-D-리보푸라노실)-3-니트로피롤(Nichols et al.,(1994) *Nature* 369, 492-493) 및 5-니트로인돌(Loakes and Brown, (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 4039-4043)을 포함하며, 상기 염기들은 4종의 종래 염기들과 비특이적으로 염기쌍을 이루기 때문에 축퇴성 프라이머의 디자인과 관련된 문제점을 해결하는 데 이용된다. 그러나, 이러한 유니버설 염기들이 어닐링(혼성화) 또는 증폭 동안에 버블 구조를 생성하고 그 때 두 반대 인접한 서열을 분리하도록 올리고뉴클레오타이드 분자에서 하나의 부위를 형성하여, 결국 두 분할 특이성 (어닐링) 부분을 통해 이중 특이성에 의해 타겟 서열에 프라이머 또는 프로브의 어닐링 특이성을 증가시킬 수 있다는 연구는 아직까지 없다.

<54> 바람직한 구현예에 따르면, 분할 부위의 유니버설 염기는 디옥시이노신, 이노신, 7-디아자-2 '-디옥시이노신(7-deaza-2 '-deoxyinosine), 2-아자-2' -디옥시이노신, 2 '-OMe 이노신, 2'-F 이노신, 디옥시 3-니트로피롤, 3-니트로피롤, 2'-OMe 3-니트로피롤, 2'-F 3-니트로피롤, 1-(2' -디옥시-베타-D-리보푸라노실)-3-니트로피롤, 디옥시 5-니트로피롤, 5-니트로인돌, 2'-OMe 5-니트로인돌, 2'-F 5-니트로인돌, 디옥시 4-니트로벤즈이미다졸, 4-니트로벤즈이미다졸, 디옥시 4-아미노벤즈이미다졸, 4-아미노벤즈이미다졸, 디옥시 네불라린(deoxy nebularine), 2'-F 네불라린, 2'-F 4-니트로벤즈이미다졸, PNA-5-인트로인돌, PNA-네불라린, PNA-이노신, PNA-4-니트로벤즈이미다졸, PNA-3-니트로피롤, 모르포리노-5-니트로인돌, 모르포리노-네불라린, 모르포리노-이노신, 모르포리노-4-니트로벤즈이미다졸, 모르포리노-3-니트로피롤,포스포라미데이트-5-니트로인돌(phosphoramidate-5-nitroindole), 포스포라미데이트-네불라린, 포스포라미데이트-이노신, 포스포라미데이트-4-니트로벤즈이미다졸, 포스포라미데이트-3-니트로피롤, 2'-0-메톡시에틸 이노신, 2'-0-메톡시에틸 네불라린, 2'-0-메톡시에틸 5-

니트로인돌, 2'-0-메톡시에틸 4-니트로-벤즈이미다졸, 2'-0-메톡시에틸 3-니트로피롤 및 상기 염기의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 보다 바람직하게는 상기 유니버설 염기 또는 비-구별성 염기 유사체는 디옥시이노신, 1-(2 '-디옥시-베타-D-리보푸라노실)-3-니트로피롤 또는 5-니트로인돌이며, 가장 바람직하게는 디옥시이노신이다.

- <55> 분할 부위에서 상기 유니버설 염기는 연속적인 방식으로 포함될 수 있고 또는 dNMPs와 같은 다른 뉴클레오타이드와 함께 간헐적으로 포함될 수 있다. 바람직하게는, 상기 분할 부위는 유니버설 염기, 바람직하게는 디옥시이노신을 갖는 뉴클레오타이드의 연속서열을 포함한다.
- <56> DS oligo에서 분할 부위는 3개의 부위 중에서 가장 낮은 T_m 을 갖는 것이 필수적이며, 이에 의해 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위가 주형 핵산에 어닐링되는 조건 하에서 분할 부위는 비염기쌍 버블 구조를 형성하며, 주형 핵산에 대한 어닐링 특이성 측면에서 5'-고 T_m 특이성 부위는 3'-저 T_m 특이성 부위로부터 분리되고, 결국 상기 올리고뉴클레오타이드의 어닐링 특이성은 5'-고 T_m 특이성 부위 및 3'-저 T_m 특이성 부위에 의해 이중으로 결정되어 올리고뉴클레오타이드의 전체 어닐링 특이성이 상당히 개선된다. 바람직하게는 분할 부위의 T_m 는 3-15°C 이며, 보다 바람직하게는 4-15°C이며, 가장 바람직하게는 5-10°C이다.
- <57> 바람직한 구현예에 따르면, 5'-고 T_m 특이성 부위와 3'-저 T_m 특이성 부위 사이의 분할 부위는 최소 3개의 유니버설 염기를 포함하고, 보다 바람직하게는 최소 4개의 유니버설 염기를, 그리고 가장 바람직하게는 최소 5개의 유니버설 염기를 포함한다. 바람직한 구현예에 따르면, 상기 분할 부위는 2-10개의 유니버설 염기를 포함하고, 보다 바람직하게는 3-10개 유니버설 염기를, 더욱 더 바람직하게는 4-8 유니버설 염기를, 그리고 가장 바람직하게는 5-7 유니버설 염기를 포함한다.
- <58> 보다 긴 서열을 갖는 프라이머 또는 프로브가 필요한 경우, DS oligo의 이점은 가장 두드러진다. 예컨대, 종래 기술에 따르면 혼성화 서열로서 35 bp 이상의 뉴클레오타이드 서열을 가지는 프라이머는 비-특이적 증폭물 (amplicon)을 생성하기 쉽다. 반대로 DS oligo는 긴 서열을 갖는 경우에도 특이적 증폭물만을 생성하는 데, 그 이유는 DS oligo가 주형과의 상호작용(즉, 어닐링) 측면에서 각각 분리된 두개의 혼성화 서열(즉, 5'-고 T_m 특이성 부위 및 3'-저 T_m 특이성 부위)을 가지기 때문이다. 예컨대, DS oligo는 타겟 서열에 상보적인 35-45 bp의 혼성화 서열을 포함할 수 있다. 이런 관점에서, 본 발명은 종래 프라이머 디자인 전략에서는 비-실용적인 것으로 간주되는 보다 긴 서열을 갖는 프라이머를 디자인 할 수 있도록 한다는 것을 알 수 있다.
- <59> 바람직한 구현예에 따르면, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 15 내지 25 뉴클레오타이드 길이, 상기 분할 부위는 3 내지 10 뉴클레오타이드 길이 그리고 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 3 내지 15 뉴클레오타이드 길이를 갖는다.
- <60> 보다 바람직하게는, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 15 내지 25 뉴클레오타이드 길이, 상기 분할 부위는 3 내지 10 뉴클레오타이드 길이 및 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 5 내지 15 뉴클레오타이드 길이를 갖는다. 가장 바람직하게는, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 15 내지 25 뉴클레오타이드 길이, 상기 분할 부위는 5 내지 7 뉴클레오타이드 길이; 그리고 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 6 내지 10 뉴클레오타이드 길이를 갖는다. 실시예에 설명된 전형적이고 예시적인 DS oligo에 따르면, 5'-고 T_m 특이성 부위는 약 20 뉴클레오타이드 길이이고; 분할 부위는 약 5 뉴클레오타이드 길이이며; 3'-저 T_m 특이성 부위는 약 8-10 뉴클레오타이드 길이이다.
- <61> 가장 바람직한 구현예에서, DS oligo는 다음 일반식으로 나타낸다: 5 '-X_b-(dI)_q-Z_r-3' (X_b 및 Z_r의 정의 및 특징은 상술한 바와 같으며, dI는 디옥시이노신을, (dI)_q은 유니버설 염기를 갖는 뉴클레오타이드의 연속서열을 포함하는 분할 부위를 나타내고 q는 5-7의 정수이다).
- <62> 흥미롭게도, 타겟 서열에 대한 미스매치를 허용(tolerate)하는 엄격 조건하에서 본 발명의 DS oligo는 미스매치 허용성을 갖는다는 것이다.
- <63> DS oligo의 미스매치 허용성을 지배하는 원리에 대한 구조적 대표예는 도 1B에 도시되어 있다. 5'-고 T_m 특이성 부위와 3'-저 T_m 특이성 부위 모두가 주형에 어닐링 되는 조건하에서, 5'-고 T_m 특이성 부위에서는 하나

이상, 바람직하게는 한 개 내지 세 개의 염기 미스매치가 허용된다. 3'-저 T_m 특이성 부위에서는 하나 이상, 바람직하게는 한 개 내지 두 개의 염기 미스매치가, 5'-고 T_m 특이성 부위와 3'-저 T_m 특이성 부위 모두가 주형에 어닐링 되는 조건하에서 허용될 수 있다. 또한, 5'-고 T_m 특이성 부위 및 3'-저 T_m 특이성 부위 모두가 주형에 어닐링 되는 조건하에서 5'-고 T_m 특이성 부위 및 3'-저 T_m 특이성 부위에서는 하나 이상, 바람직하게는 한 개 내지 다섯 개의 염기 미스매치가 허용될 수 있다.

<64> DS oligo에 미스매치 허용성을 부과하기 위하여, 어닐링 조건, 특히 어닐링 온도가 중요하다. 3'-저 T_m 특이성 부위 단독에 의해서는 어닐링이 발생하지 않는 조건에서 어닐링이 실시되며, 5'-고 T_m 특이성 부위 및/또는 3'-저 T_m 특이성 부위가 타깃 위치에 대하여 하나 이상(그러나 제한된 개수)의 미스매치 염기를 가지는 경우, 모든 부위들에 의한 어닐링이 발생한다. 미스매치 허용성을 가지는 DS oligo는 유전적 다변성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 증폭하거나 검출하는데 요구된다. 미스매치 허용성을 갖는 DS oligo는 유전적 다변성을 나타내는 타깃 서열에 어닐링 될 수 있고, 결국 성공적인 증폭과 목적의 뉴클레오타이드를 검출 하도록 한다. 즉, 본래 어닐링과 혼성화의 특이성을 극적으로 증가시키기 위해 개발된 DS oligo는, 어닐링 또는 엄격 조건이 적합하게 조절되는 조건 하에서 미스매치 허용을 요구하는 방법에서도 사용될 수 있다.

<65> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 어닐링 특이성을 올리고 뉴클레오타이드의 구조에 의해 이중적으로 결정되도록 하는 방법이 제공 된다: (a) 타깃 핵산 서열을 선택하는 단계; (b) (i) 상기 타깃 핵산에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열과 (ii) 적어도 두 유니버설 염기를 포함하는 분할 부위를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 서열을 디자인 하여 상기 분할 부위가 상기 혼성화 서열 사이에 끼여 들어가(intervene) 상기 올리고뉴클레오타이드에서 세 개의 부위를 형성하도록 하는 단계; 그리고 (c) 상기 분할 부위의 5' -방향쪽의 부위는 분할 부위의 3' -방향쪽 부위보다 높은 T_m 을 가지고, 상기 분할 부위는 상기 세 부위에서 가장 낮은 T_m 을 가지도록 상기 올리고뉴클레오타이드에서 상기 분할 부위의 위치를 결정하는 단계로서, 이에 의해 (i) 상기 올리고뉴클레오타이드의 5' -고 T_m 특이성 부위는 상기 타깃 핵산에 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며, (ii) 상기 올리고뉴클레오타이드의 3' -저 T_m 특이성 부위는 상기 타깃 핵산에 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지고; 그리고 (iii) 상기 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위 사이의 상기 분할 부위는 적어도 두 유니버설 염기를 포함하며; 그리고 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m 은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m 보다 높고 상기 분할 부위는 3개의 부위 중에서 가장 낮은 T_m 을 가져, 서로 간에 다른 T_m 값을 지닌 세 개의 구분된 부위를 가지는 올리고뉴클레오타이드를 제공하며, 상기한 구성에 의해 상기 올리고뉴클레오타이드의 타깃 핵산에 대한 어닐링 특이성은 상기 5' -고 T_m 특이성 부위 및 3' -저 T_m 특이성 부위에 의해 이중으로 결정된다.

<66> 본 방법은 올리고뉴클레오타이드의 어닐링 특이성을 극적으로 증가시켜 타깃 서열과 혼성화 되도록 하는 새로운 접근을 제공한다. 또한 본 방법은 올리고뉴클레오타이드의 어닐링 특이성을 개선하기 위한 방법으로 표현될 수도 있다. 게다가 본 발명은 타깃 서열에 혼성화 되는 올리고뉴클레오타이드의 어닐링 특이성을 개선하기 위하여 최소 두개의 유니버설 염기를 포함하는 분할 부위를 사용하는 방법으로 표현될 수 있다.

<67> 본 발명은 상술한 DS oligo를 제조하는데 이용된다. 따라서 불필요한 반복기재를 피하기 위하여, 이들 사이의 공통된 내용은 반복기재하지 않지만, 공통 내용은 본 발명의 방법의 상세한 설명에 삽입된다.

<68> 프라이머나 프로브를 디자인하기 위해 종래 대부분의 방법들은 타깃 서열에 혼성화할 수 있는 서열만을 사용한다. 또한, 올리고뉴클레오타이드의 어닐링 특이성을 증가시키기 위하여 종래에는 온도와 이온 농도와 같은 증폭 또는 혼성화 조건을 조절하였다.

<69> 반대로, 본 발명의 방법은 올리고뉴클레오타이드 자체에 새로운 특징을 도입함으로써 어닐링 특이성을 증가시키는 새로운 전략을 제공한다. 올리고뉴클레오타이드의 어닐링 특이성이 이중으로 결정될 수 있는 것과 관련하여 본 명세서에서 사용되는 용어 “올리고뉴클레오타이드 구조에 의해(through a structure of the oligonucleotide)”는 어닐링 특이성이 이중적으로 결정되도록 하는 새로운 특징을 올리고뉴클레오타이드에 부여함으로써 올리고뉴클레오타이드의 구조가 올리고뉴클레오타이드의 어닐링 특이성에 크게 기여하는 것을 의미한다.

<70> 본 발명의 방법에 있어서, (i) 타깃 핵산에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열 및 (ii) 최소 두 개의 유니버설

염기를 포함하는 분할 부위를 가지는 올리고뉴클레오타이드의 서열을 디자인하는 것이 중요하다. 이 단계에서, 상기 올리고뉴클레오타이드의 구조 윤곽은 5' -말단 부위/분할 부위/3' -말단 부위로 나타난다. 5' -말단 및 3' -말단 두 부분은 타깃 핵산에 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 가지고 분할 부위가 그 사이에 끼어 들어간다(intervene).

<71> 본 발명에서 가장 중요한 단계는 분할 부위의 5' -방향 쪽의 부위가 분할 부위의 3' -방향쪽 부위보다 높은 T_m 을 가지고, 상기 분할 부위는 상기 세 부위에서 가장 낮은 T_m 을 가지도록 상기 올리고뉴클레오타이드에서 상기 분할 부위의 위치를 결정하는 단계이며, 이에 의해 다른 T_m 값을 갖는 세 개의 구분된 부위를 가지는 올리고뉴클레오타이드가 제공된다.

<72> 본 방법에 의해 올리고뉴클레오타이드 내에 삽입된 새로운 구조적 특징들은 다음과 같다: (i) 올리고뉴클레오타이드 서열내의 세 개의 구분된 부위(5' -고 T_m 특이성 부위, 분할 부위 및 3' -저 T_m 특이성 부위); (ii) 세 개 부위의 서로 다른 T_m 값; (iii) 5' -고 T_m 특이성 부위 와 3' -저 T_m 특이성 부위 사이에 있으며 최소 두 개의 유니버설 염기를 포함하는 분할 부위; (iv) 분할 부위에 의해 어닐링 측면에서 분리되며, 어닐링 단계에서 타깃과 상호작용하는 두 부위; (v) 5' -고 T_m 특이성 부위, 3' -저 T_m 특이성 부위 및 분할 부위 순의 T_m 값. 이러한 구조적 특징은, 본 발명에 의해 최종적으로 제공되는 올리고뉴클레오타이드의 어닐링 특이성이 5' -고 T_m 특이성 부위 및 3' -저 T_m 특이성 부위 두 부분에 의해 이중적으로 결정되도록 하며, 이는 타깃 서열에 대한 올리고뉴클레오타이드의 어닐링 특이성을 크게 증가되도록 한다.

<73> 본 발명의 방법에 따라 디자인 되고 제조된 올리고뉴클레오타이드는 상술한 세 부위를 가지지 않는 것보다 매우 높은 어닐링 특이성을 보인다.

<74> DS oligo의 특징과 이점은 다음과 같이 설명될 수 있다:

<75> (a) DS oligo의 분할 부위는 최소 두 개의 유니버설 염기를 포함하며, 이는 DS oligo에서 가장 낮은 T_m 을 생성하도록 하여, 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위가 주형 핵산에 어닐링되는 조건 하에서 비염기쌍 버블 구조를 형성하도록 한다. 이러한 비염기쌍 버블 구조는 어닐링 특이성 측면에서 5' -고 T_m 특이성 부위가 3' -저 T_m 특이성 부위로부터 분리되도록 하며;

<76> (b) 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m 이 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m 보다 높고, 분할 부위는 가장 낮은 T_m 을 가지며, 이 특징은 3' -저 T_m 특이성 부위 단독에 의한 어닐링이 발생되지 않는 엄격 조건을 설정하는 것을 가능하도록 하며;

<77> (c) 따라서, DS oligo의 전체적 어닐링 특이성은 5' -고 T_m 특이성 부위 및 3' -저 T_m 특이성 부위 모두에 의해 이중으로 결정되고;

<78> (d) 결국, DS oligo의 전체 어닐링 특이성은 크게 증가된다.

<79> 본 발명의 DS oligo는, 다양한 분야 즉 (i) Miller, H. I. 방법(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등 (EP 329,822), 라이가제 연쇄 반응(LCR, Wu, D.Y. et al., *Genomics* 4:560 (1989)), 중합효소 라이가제 연쇄 반응 (Barany, PCR Methods and Applic., 1:5-16(1991)), 갭-LCR (WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(EP 439,182), 3SR (Kwoh et al., PNAS, USA, 86:1173(1989)) 및 NASBA(U.S. Pat. No. 5,130,238) 등과 같은 프라이머-관련 핵산 증폭 방법들과, (ii) 사이클 시퀀싱 (Kretz et al., (1994) *Cycle sequencing. PCR Methods Appl.* 3:S107-S112) 및 파이로시퀀싱(Ronaghi et al., (1996) *Anal. Biochem.*, 242:84-89; 및 (1998) *Science* 281:363-365) 등과 같은 프라이머 연장-관련 기술들, 및 (iii) 올리고뉴클레오타이드 마이크로어레이를 사용한 타깃 뉴클레오타이드 서열의 탐지와 같은 혼성화-관련 기술들에서 매우 유용하다.

<80> 본 발명의 DS oligo는 다양한 핵산 증폭, 시퀀싱 및 혼성화-관련 기술에 적용할 수 있다. DS oligo의 응용성을 입증하는 대표적인 예는 다음과 같다:

<81> **I. 핵산 분자 제조에 응용**

<82> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 이용하

여 주형-의존적 연장 반응에 의해 핵산분자를 제조하는 방법이 제공된다:

- <83> (a) 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 주형 핵산 분자에 어닐링시키는 단계로서, 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드는 5' -고 T_m 특이성 부위(5' -high T_m specificity portion), 3' -저 T_m 특이성 부위(5' -low T_m specificity portion) 및 분할 부위(separation portion), 세개의 부위를 포함하며, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 혼성화되는 상기 주형 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 상기 분할 부위는 최소 두개의 유니버설 염기를 포함하고, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 상기 주형 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지고; 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m보다 높으며, 상기 분할 부위는 3개의 부위 중에서 가장 낮은 T_m을 가지고; 상기 분할 부위는 상기 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위가 상기 주형 핵산에 어닐링되는 조건 하에서 비염기쌍 버블 구조를 형성하며, 상기 어닐링은 3' -저 T_m 특이성 부위 단독에 의한 어닐링이 발생되지 않는 조건 하에서 실시되고; 그리고
- <84> (b) 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 연장하여 상기 주형 핵산 분자에 상보적인 핵산 분자를 제조하는 단계.
- <85> 본 발명의 제조 방법은 본 발명의 DS oligo를 이용하기 때문에, 과도한 반복성을 초래하는 본 명세서의 복잡성을 피하기 위하여 공통된 내용은 그 기재를 생략한다.
- <86> DS oligo를 사용하는 본 발명의 응용은 어닐링과 연장 단계를 포함하는 주형-의존적 연장 반응에 의하여 타깃 서열에 상보적인 핵산 서열을 선택적으로 제조하는 개선된 방법을 제공한다. 특히 타깃서열에 상보적인 핵산 서열의 제조는 어닐링, 연장 및 변성과정을 포함하는 주형-의존적 연장 반응의 과정을 반복함으로써 이루어질 수 있다.
- <87> 본 발명의 방법은 주형 핵산 분자에 상보적인 핵산 분자를 제조하는데 사용될 수 있다. 그러한 분자는 DNA 또는 RNA 이다. 상기 분자는 이중쇄 또는 단일쇄 형태일 수 있다. 출발 물질로서의 핵산이 이중쇄인 경우, 두쇄를 단일쇄로, 또는 부분적인 단일쇄 형태로 만드는 것이 바람직하다. 쇄를 분리하는 방법은 열, 알카리, 포름아미드, 우레아 및 글리록살 처리, 효소적 방법(예, 헬리카아제 작용) 및 결합 단백질등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 쇄 분리는 80-105°C의 온도로 열 처리하여 달성될 수 있다. 상술한 처리를 이루기 위한 일반적인 방법들은 Joseph Sambrook, 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001)에서 제공된다.
- <88> mRNA가 출발물질로 이용되는 경우, 역전사 단계가 어닐링 단계를 실시하기 전에 필요하며, 역전사 단계의 상세한 내용은 Joseph Sambrook 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 Noonan, K. F. et al., *Nucleic Acids Res.* 16:10366 (1988)에 개시되어 있다. 역전사를 위해서, mRNA의 폴리 A 테일에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머가 이용된다. 올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머는 dTMPs로 이루어져 있고, dT 프라이머가 프라이머로서 작용할 수 있는 한 그 중 하나 또는 그 이상은 다른 dNMPs로 대체될 수 있다. 역전사 단계는 RNase H 활성을 갖는 역전사 효소를 가지고 행해질 수 있다. RNase H 활성을 갖는 효소를 이용하는 경우, 반응조건을 주의하여 선택하면 개별적인 RNase H 절단 단계를 생략할 수 있다.
- <89> 본 발명의 방법은, 주형 핵산 분자가 특정 서열 또는 길이를 가질 것을 요구하지 않는다. 특히, 상기 분자들은 자연의 원핵세포 핵산, 진핵세포(예컨대, 원생동물과 기생동물, 균류, 효모, 고등 식물, 하등 동물 및 포유동물과 인간을 포함하는 고등동물) 핵산, 바이러스(예컨대, 헤르페스 바이러스, HIV, 인플루엔자 바이러스, 엡스타인-바 바이러스, 간염 바이러스, 폴리오바이러스 등) 핵산 또는 비로이드 핵산을 포함한다. 또한 상기 핵산 분자는 화학적으로 합성되었거나 또는 합성될 수 있는 핵산 분자를 포함한다. 따라서, 상기 핵산 서열은 자연에서 발견되거나 또는 발견되지 않는 것이다.
- <90> 본 발명을 위해 사용되는 DS oligo는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어 이중쇄 구조를 형성한다. 이러한 이중쇄 구조를 형성하는 데 적합한 어닐링 조건은 Joseph Sambrook, 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., 등, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 설명되어 있다.

- <91> DS oligo의 5' -고 T_m 특이성 부위 및 3' -저 T_m 특이성 부위의 서열은 엄격한 상보성을 가질 필요는 없고, 단지 서열에 실질적으로 상보적이어서 안정적인 이중체 구조를 형성할 수 있으면 된다. 따라서, 이중체 구조를 형성할 수 있는 범위 내에서 완전한 상보성으로부터 이탈이 허용된다. 주형 핵산의 한 위치에 대한 DS oligo의 어닐링은 중합효소에 의한 주형-의존적 중합반응을 위한 전제조건이다. DS oligo가 상보적인 핵산에 염기쌍을 형성한 요소들(참조 Joseph Sambrook, 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., 등, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985))은 실질적으로 프라이밍 효율에 영향을 준다. DS oligo의 뉴클레오타이드 조성은 어닐링이 최적화 되는 온도에 영향을 주며 결국 프라이밍 효율에 영향을 줄 수 있다.
- <92> 어닐링 단계 동안에 DS oligo의 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위는 혼성화 부위 또는 특이성 결정 위치(즉, 이중 특이성 결정 위치)로서 중요한 역할을 하나, 반면에 분할 부위는 혼성화 위치로서 역할을 하지 않고 주형과 결합하지 않는다.
- <93> 다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 방법의 연장 단계에 사용될 수 있으며, 이는 *E. coli* DNA 중합효소 I의 “클레나우” 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는, 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이고, 이는 *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, 및 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)를 포함한다. 중합 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg²⁺와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 소망하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 소망된다.
- <94> 본 방법에 있어서 어닐링 또는 혼성화는 DS oligo와 주형 핵산 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 엄격조건 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 엄격조건은 서열-의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다. 본 방법에서 어닐링 단계는 일반적으로 높은 엄격조건하에서 실시된다. 그러나 만약 본 방법이 미스매치 허용을 요구하는 방법에 적용된다면, 하나 이상(그러나, 제한된 개수)의 미스매치에도 불구하고 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위가 주형에 어닐링 하는 엄격 조건하에서 어닐링 단계를 수행하는 것이 바람직하다. 그러한 미스매치 허용은 유전적 다변성을 가진 유전자의 증폭 또는 검출에 있어 매우 유용하다. 엄격 조건은 공지된 기준으로부터 쉽게 결정될 수 있다.
- <95> 어닐링 단계는 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m보다 높은 어닐링 온도에서 실시하여 3'-저 T_m 특이성 부위 만에 의한 어닐링이 발생하지 않도록 하는 것이 유리하다. 바람직하게는 어닐링 온도는 3'-저 T_m 특이성 부위의 T_m 보다 최소 5°C, 보다 바람직하게는 최소 10°C, 보다 더 바람직하게는 최소 15°C 및 가장 바람직하게는 최소 20°C 높다.
- <96> 바람직한 구현예에서, 어닐링 온도는 40-75°C, 보다 바람직하게는 45-72°C, 보다 더 바람직하게는 50-68°C, 및 가장 바람직하게는 55-65°C이다. 본 방법에 적합한 어닐링 온도는 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m 값과 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m 값을 독립적으로 고려함으로써 결정될 수 있다. 즉 본 방법의 어닐링 온도는 5' -고 T_m 특이성 부위 및 3' -저 T_m 특이성 부위 모두의 전체 길이와 전체 뉴클레오타이드 조성에 의해 결정되는 것이 아니라, 5' -고 T_m 특이성 부위 및/또는 3' -저 T_m 특이성 부위의 개별적 길이와 뉴클레오타이드 조성에 의해 결정된다. 보통 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m 값을 고려하여 어닐링 온도를 결정하게 되며, 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m 값 보다 매우 높으며 이것이 최적의 것이 된다.
- <97> 어닐링 단계에서 미스매치 허용이 요구된다면 어닐링 온도가 위에서 제시된 것보다 낮도록 조정하는 것이 바람직하다.
- <98> 본 방법은 특정 목적을 달성하기 위해 공지의 다른 과정과 결합될 수 있다. 예를 들어, 제조된 산물의 분리(또는 정제)는 연장과정에 후속될 수 있다. 상기 과정은 겔 전기영동, 컬럼 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 또는 혼성화에 의해 실시될 수 있다. 또한, 본 발명의 증폭 산물은 적합한 클로닝 벡터에 삽입될 수 있다. 또한, 본 발명의 제조 산물은 발현 벡터를 가지는 적합한 숙주에서 발현될 수 있다.

<99> **II. 타깃 핵산 서열 증폭에 응용**

<100> 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 프라이머로서 한쌍의 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 사용하여, 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성 과정을 적어도 두 사이클을 실시하여 타깃 핵산 서열을 증폭시키는 단계를 포함하고; 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드는 5' -고 T_m 특이성 부위, 3' -저 T_m 특이성 부위 및 분할 부위 세 개의 부위를 포함하며, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 혼성화되는 상기 타깃 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 상기 분할 부위는 최소 두개의 유니버설 염기를 포함하고, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 상기 타깃 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지고; 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m보다 높으며, 상기 분할 부위는 3개의 부위 중에서 가장 낮은 T_m을 가지고; 상기 분할 부위는 상기 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위가 상기 타깃 핵산에 어닐링되는 조건 하에서 비염기쌍 버블 구조를 형성하며; 상기 증폭 반응에서의 어닐링은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위 단독에 의한 어닐링이 발생되지 않는 조건 하에서 실시되는 것을 특징으로 하는 DNA 또는 핵산 혼합물에서 타깃 핵산 서열을 선택적으로 증폭하는 방법을 제공한다.

<101> 본 발명의 증폭 방법은 본 발명의 DS oligo를 이용하기 때문에, 과도한 반복성을 초래하는 본 명세서의 복잡성을 피하기 위하여 공통된 내용은 그 기재 생략한다. 또한 본 방법은 어닐링과 연장 과정을 포함하게 때문에 과도한 반복성을 초래하는 본 명세서의 복잡성을 피하기 위하여 두 방법에서의 공통된 내용은 그 기재 생략한다. 예컨대, 사용된 DS oligo의 조성과 구조 및 어닐링과 연장을 위한 조건들은, 본 방법과 앞서 설명한 핵산 분자를 제조하기 위한 방법 사이에서 공통된다.

<102> 본 발명의 DS oligo를 사용하는 본 응용은 핵산 증폭, 바람직하게는 PCR(중합효소 연쇄 반응)을 실시함으로써 하나의 핵산 또는 핵산 혼합물(DNA 또는 mRNA)에서 타깃 핵산 서열을 선택적으로 증폭하는 개선된 방법을 제공할 수 있다.

<103> 위에서 설명한대로 DS oligo를 사용하여 이중체 DNA의 타깃 핵산을 선택적으로 증폭하는 도시적 그림은 도 2에 묘사되었다. 도 2에서 보여진 것처럼, DS oligo의 한 쌍은 변성된 이중체 DNA 주형에 어닐링 된다.

<104> 어닐링 동안에 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위는 혼성화 부위 또는 특이성 결정 위치(즉, 이중 특이성 결정 위치)로서 중요한 역할을 하나, 반면에 분할 부위는 혼성화 위치로서 역할을 하지 않으며 주형과 결합하지 않는다. 이 때 분할 부위는 두 말단 부위, 즉 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위를 공간적으로 분리시켜 DS oligo의 전체 특이성이 이중적으로 결정되도록 DS oligo에서 버블 구조를 형성한다. 후속의 반응의 상세 내용은, 상술한 당업계의 공지된 종래 프라이머-관련 핵산 증폭과 유사하다.

<105> 핵산 서열을 증폭하기 위한 본 방법은 공지된 다양한 프라이머-관련 핵산 증폭에 따라 수행될 수 있다. 바람직하게는 그 방법은 U.S. 특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,15호에 개시된 PCR 공정, 보다 바람직하게는 핫 스타트 PCR 방법에 따라 수행될 수 있다.

<106> 도 3은 DS oligo를 사용하여 mRNA의 타깃 핵산을 선택적으로 증폭하는 것을 보여준다. 첫 번째 단계에서, 다양한 생물 시료에서 얻어진 mRNA는 mRNA의 폴리 A 테일에 혼성화 가능한 올리고 dT 프라이머 및 역전사효소를 사용하여 역전사된다. 역전사의 상세한 기작은 Joseph Sambrook, 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., 등, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985))에서 찾을 수 있다. 후속의 반응의 상세한 내용은 상술한 공지의 종래 프라이머-관련 핵산 증폭의 것과 유사하다.

<107> **III. 멀티플렉스 DNA 증폭에 응용**

<108> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 프라이머로서 둘 이상의 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드 쌍을 이용하여 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성 과정을 적어도 두 사이클을 실시하여 타깃 뉴클레오타이드 서열들을 증폭시키는 단계를 포함하며, 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드는 5' -고 T_m 특이성 부위, 3' -저 T_m 특이성 부위 및 분할 부위, 세 개의 부위를 포함하며, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 혼성화되는 상기 뉴클레오타이드 서열의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 상기 분할 부위는 최소 두개의 유니버설 염기를 포함하고, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 상기 타깃 뉴클레오타이드 서열의 한

위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지고, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m보다 높으며, 상기 분할 부위는 3개의 부위 중에서 가장 낮은 T_m을 가지고; 상기 분할 부위는 상기 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위가 상기 타깃 뉴클레오타이드 서열에 어닐링되는 조건 하에서 비염기쌍 버블 구조를 형성하며; 증폭 반응에서의 어닐링은 3' -저 T_m 특이성 부위 단독에 의한 어닐링이 발생되지 않는 조건 하에서 실시되는 것을 특징으로 하는, 동일한 반응에서 동시에 두개 이상의 프라이머 쌍을 사용하여 두개 이상의 타깃 뉴클레오타이드 서열을 증폭하는 방법을 제공한다.

<109> 본 발명의 DS oligo를 사용한 본 응용은 동일한 반응에서 한 쌍 이상의 프라이머를 사용하여 한 개 이상의 타깃 서열을 증폭하는 개선된 방법을 제공한다. 일반적으로, 10개 이상의 타깃 서열을 동시에 증폭시키도록 멀티플렉스 PCR 조건을 설계하는 것은 상당히 어려운데, 그 이유는 하나의 특정 부위(locus)라도 비특이적 부산물 없이 증폭될 수 있도록 최적의 PCR 반응이 요구되기 때문이다. 반응에서 완벽한 DNA-DNA 매치가 발생하도록 하기 위해서는 충분히 높은 온도에서 어닐링이 이뤄지도록 할 필요가 있기 때문에, 본 발명의 DS oligo는 증폭의 특이성을 개선시키는 그의 기능 때문에 멀티플렉스 DNA 증폭의 최적화에 이상적이다. 본 명세서에서 사용된 “멀티플렉스 PCR(Multiplex PCR)”은 하나의 중합효소 연쇄 반응(PCR) 혼합물에서 멀티플렉스 DNA 타깃을 동시에 증폭하는 것을 의미한다.

<110> 본 발명의 특정 구현예에서, 멀티플렉싱 공정은 상기 DS oligo의 프라이머쌍을 사용하여 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성 과정을 최소 두 사이클을 실시하는 단계를 포함하는 증폭 반응을 실시하는 단계를 포함하며, 상기 프라이머는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드로서 5' -고 T_m 특이성 부위, 3' -저 T_m 특이성 부위 및 분할 부위, 세 개의 부위를 포함하며, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 혼성화되는 상기 뉴클레오타이드 서열의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 상기 분할 부위는 최소 두개의 유니버셜 염기를 포함하고, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 상기 타깃 뉴클레오타이드 서열의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지고, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m보다 높으며, 상기 분할 부위는 3개의 부위 중에서 가장 낮은 T_m을 가지고; 상기 분할 부위는 상기 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위가 상기 타깃 뉴클레오타이드 서열에 어닐링되는 조건 하에서 비염기쌍 버블 구조를 형성하며; 증폭 반응에서의 어닐링은 3' -저 T_m 특이성 부위 단독에 의한 어닐링이 발생되지 않는 조건 하에서 실시되는 것을 특징으로 한다.

<111> 본 발명인 DS oligo를 사용한 본 응용은 하나 이상의 타깃 뉴클레오타이드 서열 및 프라이머 쌍을 사용하는 것을 제외 하고는, 앞서 설명한 핵산 서열의 증폭방법에 따라 실시되기 때문에, 과도한 반복성을 초래하는 본 명세서의 복잡성을 피하기 위하여 그들 간의 동일한 내용은 그 기재를 생략한다. 예컨대, 사용된 DS oligo의 조성 및 구조 그리고 증폭을 위한 조건 등은 앞서 설명한 핵산분자의 증폭방법과 공통된다.

<112> 바람직한 구현예에 따르면, 어닐링 온도는 약 40-70℃이고, 보다 바람직하게는 45-68℃, 보다 더 바람직하게는 50-65℃ 및 가장 바람직하게는 55-65℃이다.

<113> 바람직한 구현예에서, 타깃 뉴클레오타이드 서열 각각으로부터 증폭된 산물들은 추후 분석을 위해 크기가 다르다. 바람직한 구현예에 따르면, 멀티플렉스 타깃 뉴클레오타이드 서열의 증폭 산물은 크기분별을 통해 분석될 수 있다. 크기 분별 비교는 공지된 다양한 방법 즉, 폴리아크릴아미드 겔 매트릭스 또는 아가로스 겔 매트릭스를 통한 전기연동 및 뉴클레오타이드 시퀀싱을 통해 실시된다. 뉴클레오타이드 시퀀싱은 다양한 제조사로부터 구입가능한 자동화 서열기를 가지고 신속하게 실시될 수 있다.

<114> 아래 실시예에서 예시된 것처럼, 본 발명의 멀티플렉싱은, 공지된 종래 멀티플렉스 방법의 비-특이성 문제뿐만 아니라 백그라운드 문제를 제거한다.

<115> 멀티플렉스 증폭의 이점은 수많은 질병 또는 특이적 뉴클레오타이드 서열 변이(예, 단일 뉴클레오타이드다형성 또는 점 돌연변이)를 같은 반응에서 분석할 수 있다는데 있다. 동시에 분석할 있는 분석물의 수는 무제한이다; 그러나, 상한 제한은 약 20 개이며, 이는 분석을 위해서 요구되는 크기 차이 및 증폭된 산물을 분석할 수 있는 방법 등에 의존하는 것으로 판단된다.

<116> 본 발명의 방법은 유전적 및 전염성 질병의 진단, 성 결정, 유전적 연관 분석 및 범죄 과학 연구 등에 적용될 수 있다.

- <117> **IV. DNA 시퀀싱에 응용**
- <118> 상술한 개선된 특이성은, 용액-상(solution-phase) 시퀀싱(특히, 사이클링 시퀀싱)의 프라이머로서 또는 고상 시퀀싱(특히, 올리고뉴클레오타이드 칩 시퀀싱)의 프로브로서 DS oligo가 직접 시퀀싱(direct sequencing)에 사용되도록 한다.
- <119> 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는, 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 DNA 또는 핵산 혼합물에서 타깃 핵산분자를 시퀀싱하는 방법이 제공한다:
- <120> (a) 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 시퀀싱 프라이머로 이용하여 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성 과정을 적어도 두 사이클을 실시하여 시퀀싱할 상기 핵산분자에 상보적인 핵산분자를 제조하는 단계로서; 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드는 5' -고 T_m 특이성 부위, 3' -저 T_m 특이성 부위 및 분할 부위 세개의 부위를 포함하며, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 혼성화되는 상기 타깃 핵산 분자의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 상기 분할 부위는 최소 두개의 유니버설 염기를 포함하고, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 상기 타깃 핵산 분자의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지고; 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m보다 높으며, 상기 분할 부위는 3개의 부위 중에서 가장 낮은 T_m을 가지고; 상기 분할 부위는 상기 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위가 상기 타깃 핵산분자에 어닐링되는 조건 하에서 비염기쌍 버블 구조를 형성하며; 제조 반응에서의 어닐링은 3' -저 T_m 특이성 부위 단독에 의한 어닐링이 발생되지 않는 조건 하에서 실시되고; 그리고
- <121> (b) 상기 제조된 상보적인 핵산 분자의 뉴클레오타이드 서열을 결정하는 단계.
- <122> 일반적으로, DNA 시퀀싱은 막삼-길버트 시퀀싱, 썬거 시퀀싱, 파이로시퀀싱 및 엑소뉴클레아제 절단 시퀀싱 같은 다양한 방법에 의해 실시되어 왔다. 본 발명의 시퀀싱 방법은 열 사이클 시퀀싱뿐만 아니라 파이로시퀀싱을 개선한다.
- <123> 본 방법은 썬거 다이디옥시 방법의 다양한 변형된 방법에 따라 실시될 수 있다. 본 발명의 열 사이클 시퀀싱은 PCR 증폭된 핵산 주형에 대하여 실시될 수 있다. 또한 본 발명에 따르면, 열 사이클 시퀀싱은 시퀀싱 전에 PCR 증폭되지 않은 핵산 주형에 대하여 실시될 수 있다.
- <124> 간략하게, 썬거 시퀀싱은, DNA 중합효소가 2' ,3' -다이디옥시뉴클레오타이드를 핵산 연쇄에 삽입하여 연쇄 반응을 종결시키는 것에 근거한다(Sanger et al., (1977) *PNAS, USA 74:5463*). 썬거에 의해 발명된 상기 방법은 다이디옥시 연쇄 종결 방법을 의미한다. 이 방법의 가장 전통적인 과정에서, 시퀀싱 대상의 DNA 절편은 M13과 같은 단일쇄 DNA 파아지에 클로닝 된다. DNA 중합효소 I의 클레나우 단편에 의하여 상보적 가닥이 프라이밍 합성될 때, 상기 파아지 DNA는 주형으로 이용된다. 상기 프라이머는 클로닝 된 인서트의 3' 말단 가까운 곳의 M13 벡터 구역과 특이적으로 혼성화하기 위해 제조된 올리고뉴클레오타이드이다. 네 개의 시퀀싱 반응 각각에서, 4종의 디옥시뉴클레오타이드 중 1종에 대한 다이디옥시 유사체의 충분한 양이 존재하는 하에서, 프라이머 합성이 실시되며, 이에 의해 상기 종결-말단 뉴클레오타이드의 삽입에 의해 무작위적으로 연장 반응이 종결된다. 다이디옥시의 디옥시 형태에 대한 상대적인 농도는, 겔 전기연동을 통해 분석될 수 있는 모든 가능한 연쇄 길이에 해당하는 일련의 종결 반응이 이루어지도록 조절된다. 합성되는 연쇄에서 삽입되는 표지(tag)는, 전기연동 각 트랙에서 DNA 패턴의 오토라디오그램 이미지를 얻는데 사용된다. 클로닝 된 핵산 주형에서 디옥시뉴클레오타이드의 서열은 4개의 레인에서 밴드의 패턴을 조사함으로써 결정된다.
- <125> 썬거 방법의 변형으로서, 열 사이클 시퀀싱 방법은 일반적으로 핵산 시퀀싱 프라이머, 디옥시뉴클레오사이드 트리포스페이트, 하나 이상의 다이디옥시뉴클레오사이드 트리포스페이트(ddNTPs), 적절한 완충액, 열 안정 DNA 중합효소(예, Taq 중합효소) 및 시퀀싱 될 핵산 주형을 포함하는 용액의 사용을 포함한다. 열 사이클 시퀀싱의 상세한 내용은 U.S. Pat. Nos. 5,432,065, 5,723,298, 5,756,285, 5,817,797 and 5,831,06에서 찾을 수 있으며, 그 내용은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 상기 방법의 공정은 일반적으로 일반적인 PCR과 유사한 열 사이클링 조건하에서 실시된다.
- <126> 핵산 주형에 대하여 시퀀싱 반응을 실시하고, 이어 반응 산물들을 분석하여 서열을 결정한다. 상당한 수의 검출 방법들이 공지되었다. 이러한 방법들은 Ausubel, F. M. 등, *Current Protocols in Molecular Biology*, (1993) John Wiley & Sons, Inc., New York에서 설명된 것처럼 일반적으로 라디오뉴클레오타이드, 형광, 적외선 및 화학발광 레이블 등을 포함하는 표지의 검출을 포함한다.

<127> 레이블은 프라이머 또는 ddNTP, 바람직하게는 ddNTP로 표지될 수 있다. 가장 바람직한 레이블은 6-카르복시폴루오리세인, 6-카르복시-X-로다민, 3-(ε-카르복시페틸)-3'-에틸-5,5'-디메틸옥사카르보시아닌, 6-카르복시-X-로다민, 4,4-디플루오로-4-보라-3 α, 4 α-디아자-s-인다세네-3-프로피온산유도체 및 4,7-디클로로로다민 염색제 등을 포함하는 형광물질이다.

<128> 바람직하게는 어닐링 온도는 40-70°C, 보다 바람직하게는 45-68°C 및 가장 바람직하게는 50-65°C이다.

<129> 본 방법은 아래의 실시예에서 보여지는 것처럼 타깃 핵산 분자의 높은 특이적 시퀀싱을 나타낸다. 보다 상세하게는, 마우스 태반-특이적 호메오박스 패밀리의 유전자인 *Psx1* 및 *Psx2*는 DS oligo의 독특한 구조를 가지도록 디자인된 시퀀싱 프라이머를 사용하여 분별적으로 시퀀싱 될 수 있다. 시퀀싱 프라이머의 전체 서열들이 3'-저 T_m 특이성 부위에서 단지 하나의 염기가 차이가 있다는 점을 고려한다면, 상술한 분별적 시퀀싱을 보다 명확하게 파악할 수 있다.

<130> 놀랍게도, 본 발명은 지노믹 DNA 또는 cDNA 파플레이션 내에 포함된 타깃 핵산 분자가 정제 또는 분리 없이도 직접 시퀀싱 되도록 한다. 지노믹 DNA 또는 cDNA 파플레이션 내에 있는 타깃 핵산 분자를 성공적으로 직접 시퀀싱 했다는 보고는 아직까지 없다. 본 발명의 시퀀싱 방법이 총 RNA로부터 얻은 cDNA 파플레이션 내에 포함된 타깃 핵산 분자를 직접적으로 시퀀싱 하도록 적용되는 경우, 본 방법은 다음의 단계를 포함한다:

<131> (a) 주형 유도의 효소적 디옥시리보뉴클레오타이드 산 합성이 발생하기에 충분한 조건에서 mRNAs의 파플레이션을 mRNA의 폴리 A 말단에 혼성화되는 올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머와 접촉시키는 단계;

<132> (b) 올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머가 혼성화 된 상기 mRNA를 역전사하는 단계로서, 상기 올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머가 혼성화된 mRNA에 상보적인 제 1차 cDNA쇄를 생성하는 단계;

<133> (c) 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 시퀀싱 프라이머로 이용하여 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 변성 과정을 최소 두 사이클을 실시하여 시퀀싱할 제1차 cDNA쇄에 상보적인 핵산분자를 합성하는 단계로서; 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드는 5' -고 T_m 특이성 부위, 3' -저 T_m 특이성 부위 및 분할 부위 세개의 부위를 포함하며, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 혼성화되는 상기 타깃 핵산 분자의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 상기 분할 부위는 최소 두개의 유니버설 염기를 포함하고, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 상기 타깃 핵산 분자의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지고; 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m 은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m 보다 높으며, 상기 분할 부위는 3개의 부위 중에서 가장 낮은 T_m 을 가지고; 상기 분할 부위는 상기 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위가 상기 타깃 핵산분자에 어닐링되는 조건 하에서 비염기쌍 버블 구조를 형성하며; 상기 합성 반응에서의 어닐링은 3' -저 T_m 특이성 부위 단독에 의한 어닐링이 발생되지 않는 조건 하에서 실시되고; 그리고

<134> (d) 상기 제조된 제1차 cDNA쇄의 뉴클레오타이드 서열을 결정하는 단계.

<135> **V. 유전적 다변성을 가진 핵산분자의 검출에 응용**

<136> 본 발명의 다른 태양에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드의 주형-의존적 연장반응에 의해 유전적 다변성을 가진 핵산분자를 검출하는 방법을 제공한다:

<137> (a) 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 주형 핵산 분자에 어닐링시키는 단계로서, 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드는 5' -고 T_m 특이성 부위, 3' -저 T_m 특이성 부위 및 분할 부위 세 개의 부위를 포함하며, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 혼성화 되는 상기 주형 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 상기 분할 부위는 최소 두개의 유니버설 염기를 포함하고, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 상기 주형 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지고; 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m 은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m 보다 높으며, 상기 분할 부위는 3개의 부위 중에서 가장 낮은 T_m 을 가지고; 상기 분할 부위는 상기 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위가 상기 주형 핵산에 어닐링되는 조건 하에서 비염기쌍 버블 구조를 형성하며, 상기 어닐링은 3' -저 T_m 특이성 부위 단독에 의한 어닐링이 발생되지 않고, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위 및/또는 상기 3' -저 T_m 특이성 부위가 그 타깃 위치에 대하여 하나 이상의 미스매치 염기를 가질 경우 발생하는 조건에서 어닐링이 발생하고; 그리고

- <138> (b) 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 연장하여 상기 주형에 상보적인 상기 핵산 분자를 제조하는 단계;
- <139> (c) 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드의 상기 주형-의존적 연장 반응의 발생 여부를 검출하는 단계.
- <140> 본 발명의 DS oligo를 사용한 본 응용은 앞서 설명한 핵산 서열을 제조하기 위한 방법에 따라 실시되기 때문에, 과도한 반복성을 초래하는 본 명세서의 복잡성을 피하기 위하여 공통된 내용은 그 기재를 생략한다.
- <141> 본 발명의 DS oligo를 사용하는 본 응용은, 어닐링과 연장 단계를 포함하는 주형-의존적 연장 반응에 의하여 유전적 다변성을 가진 핵산 서열을 선택적으로 검출하는 개선된 방법을 제공 할 수 있다. 특히 유전적 다변성을 가진 타깃 핵산 서열의 검출은 어닐링, 연장 및 변성 단계를 포함하는 주형-의존적 연장 반응의 과정을 반복함으로써 이루어질 수 있다.
- <142> 본 발명은 DS oligo의 미스매치 허용성(tolerance)에 기초한다.
- <143> 유전적 다변성은 다양한 지놈에서 보고 되어있다. 이러한 현상은 관심 대상의 유전자 또는 지놈을 실패 없이 검출하는데 방해물로 간주되어 왔다. 본 발명은 미스매치 허용성을 가진 DS oligo를 사용하여 그러한 종래 문제를 해결하는 방법을 제공한다. 일정한 서열을 가진 DS oligo는 유전적 다변성을 보이는 여러 타깃 서열들에 어닐링될 수 있고, 결국 목적의 뉴클레오타이드 서열을 성공적으로 증폭하고 검출할 수 있다. 즉, 어닐링과 혼성화 특이성을 급격하게 향상시킬 목적으로 처음에 발명된 DS oligo는, 어닐링 또는 엄격 조건이 적절하게 조절되는 조건 하에서 미스매치 허용성을 요구하는 방법에도 사용될 수 있다.
- <144> *미스매치 허용성을 나타내는 DS oligo를 제공하기 위하여, 얻을 수 있는 모든 뉴클레오타이드 서열들을 정렬하여 파악된 핵산 분자의 보존 구역에 기초하여 DS oligo를 디자인 하는 것이 바람직하다.
- <145> 본 명세서에서 사용된 용어 “보존 구역(conserved region)”은 다양한 여러 뉴클레오타이드 서열 간에 상당히 유사한, 유전자의 뉴클레오타이드 서열 또는 단백질의 아미노산 서열의 단편을 의미한다. 이 용어는 용어 “보존 서열(conserved sequence)” 과 혼용된다.
- <146> 바람직한 구현예에서, 보존 구역내의 가장 보존된 서열은 DS oligo의 3'-말단 부위에 위치하고, 가장 낮게 보존된 서열은 분할 부위에 위치한다. 5' -고 T_m 특이성 부위 및/또는 3' -저 T_m 특이성 부위, 바람직하게는 5'-고 T_m 특이성 부위는 DS oligo의 미스매치 허용성 때문에 타깃 위치에 하나 이상, 바람직하게는 하나 내지 세 개, 보다 바람직하게는 하나 또는 두개의 미스매치 염기를 갖는다. DS oligo에 미스매치 허용성을 부과하기 위해, 어닐링 조건, 특히 어닐링 온도는 중요하다. 상기 어닐링은 5'-고 T_m 특이성 부위 및/또는 3'-저 T_m 특이성 부위가 하나 이상의 미스매치 염기를 가지는 경우, 3' -저 T_m 특이성 부위 단독에 의한 어닐링이 발생되지 않으나 모든 부위에 의한 어닐링이 발생하는 조건하에서 실시된다.
- <147> 바람직하게는 어닐링 온도는 약 40-70℃, 보다 바람직하게는 45-68℃, 그리고 가장 바람직하게는 50-65℃이다.
- <148> 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명은 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 따라 실시된다.
- <149> 본 방법의 검출 단계는 다수의 종래 기술에 의해 실시될 수 있다. 예컨대, 젤 상에서 검출하기 충분한 산물을 생성하도록 본 발명의 방법이 반복하여 실시되는 경우, 주형-의존 연장 산물의 검출은 종래의 젤 전기연동에 의해 용이하게 실시될 수 있다. 분광학적 측정, 광화학적 측정, 생화학적 측정, 생전자적 측정, 면역화학적 측정, 전자적 측정 및 화학적 측정에 의해 검출가능한 레이블을 포함하는 경우, 주형-의존적 연장 반응의 발생 여부를 검출하기 위하여 적당한 측정이 실시될 수 있다.
- <150> 유전적 다변성은 바이러스 지놈에서 가장 빈번히 발견되고 발생한다(Nathalie B. et al., (2004) *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3532; Tera C. 등, (2002) *Journal of Infectious Diseases*, 185, 1660; Takashi E. 등., (2004) *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 126; and Elizabeth R. 등, (2001) *Clinical Infectious Diseases*, 32, 1227). 따라서 본 발명에 따라 검출될 유전적 다변성을 지닌 핵산 분자는, 유전적 다변성을 나타내는 바이러스의 핵산이 바람직하다. 예컨대, 유전적 다변성을 보이는 인간 메타뉴모바이러스를 PCR에 의해 검출하는데에 본 발명이 적용되는 경우, DS oligo 구조를 가지도록 디자인된 가장 바람직한 프라이머 세트는 제39서열 (5' 프라이머) 및 제40서열 (3' 프라이머) 또는 제39서열 및 제41서열 (3' 프라이머)에 기재되어 있다.
- <151> **VI. 마이크로어레이에 고정된 DS oligo를 사용하여 타깃 뉴클레오타이드 서열의 검출에 응용**

- <152> 본 응용은 DS oligo-고정된 마이크로어레이 상에서 주형-의존적 반응을 반복 실시하여 타겟 뉴클레오타이드 서열을 검출하는 신규한 방법이다.
- <153> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드의 주형-의존적 연장반응에 의해 핵산 시료에서 타겟 뉴클레오타이드 서열을 검출하는 방법을 제공한다:
- <154> (a) 혼성화, 주형-의존적 연장 및 변성 과정을 적어도 한 사이클 포함하는, 기질 상에 고정된 프로브로서의 이중 특이성 올리고 뉴클레오타이드를 연장하는 단계로서, 상기 혼성화는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 핵산 시료에 접촉시킴으로써 실시되고, 상기 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드는 5' -고 T_m 특이성 부위(5' - high T_m specificity portion), 3' -저 T_m 특이성 부위(5' -low T_m specificity portion) 및 분할 부위(separation portion), 세 개의 부위를 포함하며, 상기 5' -고 T_m 특이성 부위는 혼성화되는 상기 타겟 뉴클레오타이드 서열의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 상기 분할 부위는 최소 두 개의 유니버설 염기를 포함하고, 상기 3' -저 T_m 특이성 부위는 상기 타겟 핵산의 한 위치에 대하여 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지고; 상기 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m은 상기 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m보다 높으며, 상기 분할 부위는 3개의 부위 중에서 가장 낮은 T_m을 가지고; 상기 분할 부위는 상기 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위가 상기 타겟 뉴클레오타이드 서열에 어닐링 되는 조건 하에서 비 염기쌍 버블 구조를 형성하며, 증폭 반응에서의 어닐링은 3' -저 T_m 특이성 부위 단독에 의한 어닐링이 발생되지 않는 조건 하에서 실시되고; 그리고
- <155> (b) 주형-의존적 연장 반응의 발생여부를 분석하는 단계.
- <156> DS oligo-고정 마이크로어레이를 사용하여 핵산 시료에서 타겟 뉴클레오타이드 서열을 검출하기 위한 도시적 그림은 도 4에 나타나 있다.
- <157> DS oligo를 사용하는 본 방법은 최적화 절차에 의하여 결정되는 적합한 혼성화 조건 하에서 실시될 수 있다. 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 올리고뉴클레오타이드의 길이 및 GC 양 그리고 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 예를 들어, 상대적으로 짧은 올리고뉴클레오타이드가 사용되는 경우 낮은 엄격조건이 바람직하다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인 할 수 있다.
- <158> DS oligo는 기질 상에 고정된다. 바람직한 기질은 막, 필터, 칩, 슬라이드, 물, 피버, 자기 또는 비자기 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 거대분자, 미세입자 및 모세관 튜브와 같은 적합한 고체 또는 반-고체 지지체를 포함한다. 고정화는 화학 반응 또는 자외선에 의한 공유결합에 의해 이루어진다. 본 발명의 구현예에서, DS oligo는 예폭시 화합물 또는 알데하이드 그룹을 포함하도록 변형된 유리 표면 또는 폴리리신-코팅된 표면에 결합된다. 또한 DS oligo는 연결자(예, 에틸렌 글리콜 올리고모 및 디아민)를 통해 기질에 결합된다. 포토리토그래피, 잉크젯팅, 기계적 마이크로스프팅 및 이의 유사 방법과 같은 종래 제조 기술에 의하여, DS oligo는 어레이 또는 어레이들로 제작될 수 있다.
- <159> 본 방법에 따르면, 연장 단계에서 사용되는 dNTPs는 바람직하게는 레이블 된다. 레이블링을 위하여 분광학적 측정, 광화학적 측정, 생화학적 측정, 생전자적 측정, 면역화학적 측정, 전자적 측정 및 화학적 측정에 의해 검출 가능한 물질들이 사용된다. 예컨대 레이블에는 P³² 및 S³⁵ 같은 방사능동위원소, 화학발광 화합물, 형광 마커와 염료 같은 분광학적 마커, 그리고 자기 레이블 등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 염료에는 퀴노린 염료, 트리아릴메탄 염료, 프탈레인, 아조 염료 및 시아닌 염료 등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 형광 마커에는 플루오리신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 로다민, 리사민(lissamine) 그리고 Cy3와 Cy5 (Pharmacia)를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 레이블링은 공지된 다양한 방법에 따라 실시된다.
- <160> 기질에, 바람직하게는 고체 지지체에 고정화된 프로브로서의 DS oligo와 핵산 시료의 타겟 뉴클레오타이드 서열이 혼성화 된 다음, 타겟 뉴클레오타이드 서열과 혼성화된 DS oligo는 주형-의존적 단계에서 dNTPs, 바람직하게는 형광-레이블된 dNTPs 및 DNA 중합효소를 사용하여 연장된다. (a) 단계를 반복적으로 실시하여 DS oligo 모두 또는 대부분이 타겟 뉴클레오타이드 서열과 혼성화 되도록 하여, 보다 재현성 있는 혼성화 분석 결과를 얻을

수 있도록 하는 것이 바람직하다.

<161> 혼성화의 발생은 사용된 레이플 타입에 따라 공지된 다양한 방법들로 확인된다. 예컨대, 형광 현미경, 바람직하게는 콘포칼 형광 현미경이 형광 레이플을 검출하기 위하여 사용되고, 그러한 장치로 검출된 신호의 세기는 혼성화 정도에 비례하여 증가한다. 일반적으로 형광 현미경에는 혼성화 세기의 정량적인 이차원 이미지를 형성하는 스캐닝 장치가 부착된다. 그러한 장치로 검출되는 신호의 세기는 혼성화 정도와 주형-의존적 연장의 정도에 비례한다.

<162> 본 발명은 실시예에 의해 보다 자세히 설명된다. 하기의 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

<175> **실시예 1: 이중 특이성(DS) 올리고뉴클레오타이드를 이용한 PCR 특이성**

<176> 마우스 사이토카인 패밀리 유전자인 IL-19와 IL-1 베타의 타겟 뉴클레오타이드 서열을 증폭하기 위하여, 본 발명에 의해 개발된 DS 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 이용했다. DS 프라이머를 이용한 IL-19와 IL-1 베타의 타겟 뉴클레오타이드 서열의 증폭 과정과 결과가 기재되어 있다.

<177> 다음의 종래 프라이머 서열을 선택하였고, 이는 DS 올리고뉴클레오타이드와 PCR 특이성을 비교하기 위하여 사용했다:

<178> 실시예에서 사용된 IL-19 특이적 종래 프라이머는 다음과 같다(500 bp):

<179> IL19-5'-0 5'-GTCTCATCTGCTGCCCTTAAGTCTCTAGGAGAACT-3' (제 1서열); 및

<180> IL19-3'-0 5'-CATAGGCCTGGAAGAAGCCGCTTACAATAAGTTAG-3' (제 2서열).

<181> 실시예에서 사용된 IL-1 베타 특이적 종래 프라이머는 다음과 같다(550 bp):

<182> IL1b-5'-0 5'-GGAGAGTGTGGATCCCAAGCAATACCCAAAGAAG-3' (제 3서열); 및

<183> IL1b-3'-0 5'-AGACCTCAGTGCAGGCTATGACCAATTCATCCC-3' (제 4서열).

<184> 백그라운드 및 비특이적 산물 생성과 같은 종래 프라이머 서열부터 야기되는 주된 문제점들을 DS 올리고뉴클레오타이드가 해결할 수 있는지 여부를 검증하기 위하여 본 발명인 DS 올리고뉴클레오타이드를 종래의 프라이머 서열에 적용했다.

<185> 5' 부위와 3' 부위 사이에 폴리디옥시이노신(polydeoxyinosine)[poly(dI)] 링커를 가지는 분할 부위를 제외하고는 DS 프라이머는 종래 프라이머와 동일한 서열을 포함한다. DS 프라이머는 5' -고 T_m 특이성 부위의 T_m이 3' -저 T_m 특이성 부위의 T_m보다 높으면서 분할부위의 T_m이 3가지 부위 중에서 가장 낮은 T_m을 갖도록 디자인된다.

<186> 실시예에서 사용된 IL-19에 대한 DS 프라이머는 다음과 같다(500 bp):

<187> IL19-5' 5'-GTCTCATCTGCTGCCCTTAAIIIIITAGGAGAACT-3' (제 5 서열); 및

<188> IL19-3' 5'-CATAGGCCTGGAAGAAGCCGIIIIICAATAAGTTAG-3' (제 6 서열)이다. 여기서 I 는 디옥시이노신이다.

<189> 실시예에서 사용된 IL-1 베타에 대한 DS 프라이머는 다음과 같다(550 bp):

<190> IL1b-5' 5'-GGAGAGTGTGGATCCCAAGCIIIIICCAAAGAAG-3' (제 7 서열); 및

<191> IL1b-3' 5'-AGACCTCAGTGCAGGCTATGIIIIITTCATCCC-3' (제 8 서열)이다. 여기서 I 는 디옥시이노신이다.

<192> ICR 마우스의 태반 조직에서 분리한 지놈 DNA 2 μl(50 ng), 15 mM MgCl₂(Roche)를 포함하는 10x PCR 완충액 2 μl, dNTP 2 μl(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 2 mM), 5' DS 또는 종래 프라이머 1 μl(10 μM), 3' DS 또는 종래 프라이머 1 μl(10 μM), 및 Taq 중합효소 0.5 μl(5 units/μl;Roche)를 포함하는 20 μl 최종 부피에서 타겟 PCR 증폭을 실시하였고; 반응 혼합물을 포함하는 튜브를 예열된(94℃) 열 사이클러에 놓았으며; 샘플을 94℃에서 5분간 변성시키고, 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 72℃에서 1분 과정을 30번 반복한 후 72℃에서 7분간 처

리하였다.

<193> 증폭된 산물을 2% 아가로스 젤에서 전기연동을 통해 분석했고 EtBr(ethidium bromide)로 염색해 검출하였다. PCR 산물은 자기방사법 또는 실버 염색과 같은 비방사능 검출법(Gottschlich et al., (1997) *Res. Commun. Mol. Path. Pharm.* 97, 237-240; Kociok, N., et al. (1998) *Mol. Biotechnol.* 9, 25-33), 또는 형광표지을 리고뉴클레오타이드를 이용한 방법(Bauer D., et al., (1993) *Nucleic Acids Res.* 21, 4272-4280; Ito, T. et al., (1994) *FEBS Lett.* 351, 231-236. Luehrsen, K.R. et al., (1997) *BioTechniques* 22, 168-174; Smith, N.R. et al., (1997) *BioTechniques* 23, 274-279) 및 바이오틴화 프라이머를 이용한 방법(Korn, B. et al., (1992) *Hum. Mol. Genet.* 1, 235-242; Tagle, D.A. et al., (1993) *Nature* 361, 751-753; Rosok, O. et al., (1996) *BioTechniques* 21, 114-121)에 의해 변성 폴리아크릴아마이드 젤 상에서 검출할 수 있다.

<194> 도 5에서 볼 수 있듯이, 사이토카인 패밀리 유전자인 IL-1b와 IL-19를 IL-1b-5' 와 IL-1b-3', 그리고 IL-19-5' 와 IL-19-3' 각 프라이머 세트틀 사용하여 타겟 PCR 증폭한 결과, 각각 IL-1 베타(라인 2)에서는 550-bp, IL-19(라인 4) 경우는 500-bp로 예상된 크기에 해당하는 단일 밴드를 형성한다. 이 후 클론들의 클로닝과 서열 분석을 통해 그 밴드는 IL-1 베타와 IL-19단편임을 확인할 수 있었다. 반대로, [Poly(dI)]를 포함하지 않는 종래 프라이머 세트(IL19-5'-0과 IL19-3'-0; IL1b-5'-0과 IL1b-3'-0)의 경우는 비특이적 산물이 생성되었다(도 5, 라인 1과 라인 3). 이러한 결과는, 3가지 다른 T_m 부위(5' -고 T_m 특이성 부위, 3' -저 T_m 특이성 부위 및 분할 부위)를 갖도록 디자인된 DS 프라이머는, 백그라운드와 비특이적 산물의 생성과 같은 종래 프라이머 서열들이 유발하는 문제점들을 극복하고 PCR 특이성을 크게 향상시킬 수 있다는 것을 보여주는 것이다.

<195> **실시예 2: 이중 특이성(DS) 올리고뉴클레오타이드를 이용한 PCR 특이성 평가**

<196> 본 발명의 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드는, 그 독특한 구조에 의해 높은 혼성 특이성 및 미스매치 허용성(tolerance)을 나타내는 것을 특징으로 하며, 이는 혼성화 엄격성(stringency)에 의존한다. DS 올리고뉴클레오타이드의 높은 혼성 특이성은, 5' - 과 3' -부위 두 부위 모두가 주형에 어닐링 되는 높은 엄격 조건하에서 이루어진다. 반면, DS 올리고뉴클레오타이드의 미스매치 허용성은, 제한되지 않는 하나 이상의 염기쌍 미스매치가 존재함에도 불구하고 5' -과 3' - 부위 모두가 주형에 어닐링 되는 엄격 조건하에서 이루어진다.

<197> 마우스 태반에서 발견되는 것으로 확인된 새로운 유전자인 DEG10(Kim, Y.J. et al., (2004) Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *BioTechniques* 36:424-434; XM_129567)의 3'-RACE 실험으로, 본 발명에 따라 개발된 DS 올리고뉴클레오타이드의 이중 특이성을 혼성 특이성과 미스매치 허용성의 관점에서 평가하였다. 이 평가를 위해 양쪽 부위의 몇 개의 뉴클레오타이드를 다른 뉴클레오타이드로 치환하여 타겟 주형 서열에 미스매치가 되도록 하였다.

<198> 실시예에서 사용된 5' -DEG10-특이적 DS 프라이머는 다음과 같다:

<199> DEG10-5'-108: 5'-TGTAGTTTTGGGTTTCCTCCIIIIICTCCGATG-3' (제 9 서열);

<200> DEG10-5'-103: 5'-TGTAGTTTTGGGTTTCCTCCIIIIICTGCCATC-3' (제 10 서열);

<201> DEG10-5'-102: 5'-TGTAGTTTTGGGTTTCCTCCIIIIICTCCATC-3' (제 11 서열);

<202> DEG10-5'-101: 5'-TGTAGTTTTGGGTTTCCTCCIIIIICTCCATG-3' (제 12 서열);

<203> DEG10-5'-158: 5'-TGTACTTATGCGTATCGTCCIIIIICTCCGATG-3' (제 13 서열);

<204> DEG10-5'-138: 5'-TGTACTTTTTCGTTTCGTCIIIIICTCCGATG-3' (제 14 서열); 및

<205> DEG10-5'-128: 5'-TGTAGTTATGGGTATCCTCCIIIIICTCCGATG-3' (제 15 서열)이다.

<206> 여기서 치환된 뉴클레오타이드는 밑줄과 볼드체로 표시되었고, I는 디옥시이노신을 나타낸다.

<207> A. 높은 엄격조건 하에서의 PCR 특이성의 증가

<208> 상기 설명한대로 역전사효소에 의해 제1차 cDNA쇄를 합성하기 위하여, ICR 마우스의 17.5-dpc(E17.5) 태반 조직으로부터 총 RAN를 분리 및 이용하였다(Hwang, I.T., et al., (2003) Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *BioTechniques* 35:1180-1184). 총 RNA를 다음과 같이 조성된 반응 부피 20 μl에서 42°C로 1.5 시간동안 역전사 반응을 실시했다: 총 RNA 3 μl, 5 x 완충액(Promega, USA) 4 μl, dNTPs 5 μl(각각 2 mM), 10 μM cDNA 합성 프라이머 2 μl(oligo(dT)₂₀-Adapter), RNase 저해제 0.5 μl

(40 units/ μ l, Promega), 및 역전사효소 1 μ l(200 units/ μ l, Promega). 초-정제된 H₂O 180 μ l를 넣어 제1차 cDNA쇄를 희석했다. cDNA 합성 프라이머인 올리고(dT)₁₈-ACP1은 5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIII(T)₁₈-3'이며 여기서 I는 디옥시이노신이다.

<209> 희석시킨 제 1차 cDNA쇄 2 μ l(30 ng), 15 mM MgCl₂(Roche)가 포함된 10 x PCR 완충액 2 μ l, dNTP (dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 2 mM) 2 μ l, DEG10-특이적 DS 프라이머(10 μ M) 1 μ l, oligo(dT)₁₅-ACP2 (10 μ M) 1 μ l 및 Taq 중합효소(5 unit/ μ l; Roche) 0.5 μ l을 포함한 최종 부피 20 μ l에서 DEG10의 3'-RACE를 실시하였고; 반응 혼합물이 포함된 튜브를 예열된(94°C) 열 사이클러에 두었으며; 94°C에서 샘플을 5분간 변성시킨 후 94°C에서 1분, 68°C에서 1분, 72°C에서 1분 과정을 30번 반복한 다음 72°C에서 7분간 항온 처리했다. 올리고(dT)₁₅-ACP2는 5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIII(T)₁₅-3'이며 여기서 I는 디옥시이노신이다.

<210> B. DS 올리고뉴클레오타이드의 미스매치 허용

<211> DEG10의 3'-RACE를 실시하기 위한 샘플 DS 프라이머, 주형 및 PCR 조건들을 실시예 2A와 동일하게 하였고, 어닐링 온도는 다르게 하였다. 다음 조건에서 PCR 증폭을 실시했다: 94°C에서 5분, 60°C에서 3분 및 72°C에서 3분 과정을 1회 실시; 그 다음 94°C에서 40초, 65°C에서 1분 및 72°C에서 40초 과정을 29회 반복 실시 및 72°C에서 7분 동안 최종 연장 사이클.

<212> 결과적으로, 도 6A는 DEG10의 3'-RACE 실험에서 DS 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 고 혼성 특이성을 보여준다. 5'-DEG10-특이적 DS 프라이머(DEG10-5'-108)는 DEG10 3'-RACE에서 예상한 677 bp 산물을 생성시켰다(레인 1). 반대로, 5' 부위 또는 3' 부위에서 미스매치 서열을 지닌 다른 프라이머들(DEG10-5'-103, DEG10-5'-102, DEG10-5'-101, DEG10-5'-158, DEG10-5'-138 및 DEG10-5'-128)은 어떠한 산물도 생성시키지 않았다: 3' 부위에서 3개(레인 2), 2개(레인 3), 또는 1개(레인 4)염기의 미스매치; 5' 부위에서 5개(레인 5), 3개(레인 6), 또는 2개(레인 7)염기의 미스매치.

<213> 이러한 결과는, DS 프라이머의 이중 특이성이 높은 엄격 조건하에서 3' -말단뿐만 아니라 5' -말단에서 미스매치 염기를 구별할 수 있음을 증명하는 것이다.

<214> 일반적으로 주형에 완벽하게 상보적 이어야 하는 프라이머 부위는 3' -말단인데, 그 이유는 이 말단이 DNA 중합효소에 의해 연장되는 부위이고 따라서 정확한 타깃 서열에 어닐링이 발생하도록 하는 가장 중요한 부위이기 때문이다. 반면에 프라이머의 5' -말단은 타깃 서열에 어닐링의 특이성을 결정하는데 덜 중요하며 주형에 상보적이지 않은 제한효소 부위(restriction site)와 프로모터 서열 같은 추가 서열을 지닐 수 있도록 변형될 수 있다(McPherson, M.J., Moller, S.G. (2000) PCR. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y.). 이와 대조적으로, 독특한 구조에 기인한 이중 특이성에 의해 나타나는 DS 프라이머의 특별한 이점은, 3' -말단뿐만 아니라 5' -말단에서 미스매치 염기를 구별할 수 있도록 한다.

<215> 도 6B는 DS 올리고뉴클레오타이드의 미스매치 허용의 한 예를 DEG10의 3'-RACE로 보여준 것이다. 5' - 또는 3' -말단 부위에 미스매치 뉴클레오타이드가 전혀 없거나 몇 개 있더라도 DS 프라이머(DEG10-5'-108, DEG10-5'-101, DEG10-5'-128 및 DEG10-5'-138)는 DEG10 3'-RACE의 예상되는 677 bp 산물을 여전히 생성했다(레인 1,4,6 및 7). 반면 5' 또는 3' 부위에 더 많은 미스매치 뉴클레오타이드를 지닌 다른 프라이머(DEG10-5'-103, DEG10-5'-102, DEG10-5'-158)는 어떠한 산물도 생성하지 않았다(레인 2, 3 및 5). 상기 결과는 미스매치 허용을 요구하는 다양한 뉴클레오타이드 서열의 증폭에 DS 프라이머가 이용될 수 있음을 나타내는 것이다.

<216> 요약하면, 상기 결과들은 DS 프라이머의 다음과 같은 원리를 뒷받침한다:

<217> 1) 어닐링이 5' -고 T_m 특이성 부위와 3' -저 T_m 특이성 부위 양쪽 부분에서 발생할 경우에만, DS 프라이머는 주형과 상보적인 핵산 분자를 합성하기 위해 연장되며(레인 1); 그러나,

<218> 2) 어닐링이 3' -저 T_m 특이성 부위가 아니라 단지 5' -고 T_m 특이성 부위에서 발생할 경우는, DS 프라이머는 주형에 상보적인 핵산 분자를 합성하기 위해 연장되지 않고(레인 2-4); 그리고

<219> 3) 3' -저 T_m 특이성 부위의 서열이 주형과 완벽히 매치되는 경우조차도 높은 엄격 조건하에서는 3' -저 T_m 특이성 부위만으로는 어닐링이 발생하지 않는다(레인 5-7). 어닐링 부위와 관련하여, DS 프라이머는, 초기 PCR 단계에서 3' -말단 부위만 어닐링 되는 경우 연장되는 어닐링 조절 프라이머(ACP)와 명백히 다르다(Hwang, I.T., et al., (2003) Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification.

BioTechniques 35:1180-1184).

<220> 실시예 3: 이중 특이성 (DS) 올리고뉴클레오타이드를 이용한 단일 염기 구별

<221> 단일 염기 구별에 대한 DS 올리고뉴클레오타이드의 이중 특이성을 증명하기 위해, 마우스 태반 특이적 호메오박스 패밀리 유전자인 *Psx1* 과 *Psx2*의 cDNAs를 종래의 프라이머 또는 DS 프라이머 중 어느 하나를 사용하여 증폭했다. 두 *Psx* cDNAs 간의 전체 서열 상동성은 뉴클레오타이드 수준에서 91% 이었다(Han, Y.J., et al., (2000) Identification and characterization of *Psx2*, a novel member of the *Psx* (placenta-specific homeobox) family. *Gene* 241:149-155). 하나 또는 두개의 염기 차이에 의해 *Psx1*과 *Psx2*이 구별되도록 5' - 프라이머를 디자인 했다(도 7A). 그러나 3' -프라이머는 두 *Psx* cDNAs의 보존된 서열을 갖도록 디자인 하였다. *Psx1*- 과 *Psx2*-특이적 종래 및 DS 프라이머 서열은 다음과 같다:

<222> *Psx1*-5'-10: 5'-AAGGAAGACATGCTGGTGATGGTCTTCTAGCT-3' (제 16 서열);

<223> *Psx2*-5'-10: 5'-AAGGAAGACATGCTGGTGATGGTCTTCTGGCC-3' (제 17 서열);

<224> *Psx1*-5'-11: 5'-AAGGAAGACATGCTGGTGATIIIIITTTCTAGCT-3' (제 18 서열);

<225> *Psx2*-5'-11: 5'-AAGGAAGACATGCTGGTGATIIIIITTTCTGGCC-3' (제 19 서열);

<226> *Psx1*-5'-40: 5'-TCTTGCACGATGGATGGGTGTGGATGAATGTGA-3' (제 20 서열);

<227> *Psx2*-5'-40: 5'-TCTTGCACGATGGATGGGTGTGGATGAATCTGA-3' (제 21 서열);

<228> *Psx1*-5'-41: 5'-TCTTGCACGATGGATGGGTGIIIIIGAATGIGA-3' (제 22 서열);

<229> *Psx2*-5'-41: 5'-TCTTGCACGATGGATGGGTGIIIIIGAATCIGA-3' (제 23 서열); 및

<230> *Psx*-3'-2: 5'-TTCATCCACCCATCCATCIIIIAGATCCCT-3' (제 24 서열),

<231> 여기서 *Psx1*- 또는 *Psx2*-특이적 뉴클레오타이드는 밑줄과 볼드체로 나타냈다

<232> A. 제1차 cDNA쇄의 합성

<233> 3' -RACE와 *Psx* cDNA의 타깃 PCR의 출발물질로서 실시예 2에서 합성된 마우스 태반의 제1차 cDNA쇄를 사용했다.

<234> B. *Psx1*-과 *Psx2*-특이적 DS 프라이머를 이용한 *Psx1*과 *Psx2* 의 3' RACE

<235> 희석된 1차 cDNA쇄 2 μ l(30 ng), 15 mM MgCl₂를 포함한 10x PCR 완충용액(Roche) 2 μ l, dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 2 mM) 2 μ l, 5' -*Psx1*-과 5' -*Psx2*- 특이적 DS 또는 종래 프라이머(10 μ M) 1 μ l, oligo(dT)₁₅-ACP2 (10 μ M) 1 μ l 및 Taq 중합효소(5 unit/ μ l; Roche) 0.5 μ l를 포함한 최종 부피 20 μ l에서 *Psx1* 및 *Psx2* 의 3' -RACE를 수행했으며; 예열된(94 $^{\circ}$ C) 열 사이클러에 반응 혼합물이 포함된 튜브를 두었고; 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 샘플을 변성시킨 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 60-65 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 과정을 30번 반복한 다음 72 $^{\circ}$ C에서 7분 동안 항온 처리했다.

<236> C. *Psx1*- 및 *Psx2*-특이적 DS 프라이머를 사용한 *Psx1* 및 *Psx2* 타깃 핵산 증폭

<237> 희석된 1차 cDNA쇄 2 μ l(30 ng), 15 mM MgCl₂가 포함된 10 x PCR 반응 버퍼(Roche) 2 μ l, dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 2 mM) 2 μ l, 5' -*Psx1*- 또는 5' -*Psx2*- 특이적 DS 프라이머 또는 종래 프라이머(10 μ M) 중 하나 1 μ l, *Psx*-3'-2(10 μ M) 1 μ l 및 Taq 중합효소(5 unit/ μ l;Roche) 0.5 μ l를 포함한 최종 부피 20 μ l에서 *Psx1*과 *Psx2* 의 타깃 PCR 증폭을 실시했고; 반응 혼합물이 포함된 튜브를 예열된(94 $^{\circ}$ C) 열 사이클러에 (thermal cycler)에 두었고; 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 샘플을 변성시킨 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 60-65 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 과정을 30번 반복한 다음 72 $^{\circ}$ C에서 7분 동안 항온 처리했다.

<238> 결론적으로 도 7B는 5' *Psx1*- 또는 *Psx2*- 특이적 프라이머가 3' -RACE와 타깃 PCR의 산물을 생성함을 보여준다. 두 *Psx* cDNA는 3' -말단쪽에서 29 bp가 제거 또는 첨가되어 서로 다르기 때문에, 3' -RACE에 의해 29 bp 차이가 나는 산물들이 증폭되는 것을 예상할 수 있다. *Psx1*- 또는 *Psx2*-특이적 DS 프라이머인 *Psx1*-5'-41 및 *Psx2*-5'-41을 사용한 *Psx1* cDNA의 3' -RACE는 각각 311 bp(레인 1)과 282 bp(레인 2)로 예상 크기와 일치하는 단일 밴드를 생성시켰다. 3' -RACE에 의해 생성된 산물의 추후 서열 분석을 통하여, 5' -*Psx1*- 및 -*Psx2*- 특이성 프라이머는 각각 *Psx1*과 *Psx2* cDNA를 각각 증폭하였음을 확인했다. 반대로, DS 올리고뉴클레오타이드의 원리를 따르지 않는 종래 프라이머(*Psx1*-5'-40과 *Psx2*-5'-40)는 두 *Psx* cDNAs를 구별하지 못했다(레인 3과 레인

4).

<239> 상기 결과는 본 발명에 따른 DS 프라이머가 하나의 단일 염기 미스매치를 구별할 수 있음을 보여주는 것이다. 따라서 점돌연변이를 동정하거나 또는 단일뉴클레오타이드다형성(SNPs)을 지노타이핑을 하는 데, 본 발명의 DS 올리고뉴클레오타이드가 적용될 수 있다.

<240> **실시예 4: 이중 특이성(DS) 올리고뉴클레오타이드를 이용한 cDNA 풀에서 타겟 cDNA 직접 시퀀싱**

<241> 새로운 cDNA를 동정하고 분리하고자 하는 대부분의 시도들은 mRNA 서열의 단지 일부분만을 대표하는 클론을 얻는 결과를 초래한다. 일단 부분 서열을 확인하면 전사체의 나머지 부분은 전형적인 cDNA 라이브러리 스크리닝 또는 RACE(cDNA 말단 고속 증폭)와 같은 PCR에 근거한 방법들을 통해 종종 얻게 되고, 이후 그 얻어진 cDNA를 시퀀싱 하게 된다. 따라서 현재의 모든 방법들은 전사체의 나머지 부분에 대한 서열정보를 얻기 위한 필수 단계이다. 만일 미싱(missing) 서열정보를 타겟 세포로부터 얻은 cDNA 과플레이션으로부터 직접 얻는다면, 이런 시간-소비적인 필수 과정을 완전히 회피하게 되며 또한 조 생물시료(crude biological sample)로부터 타겟 cDNA 서열을 직접적으로 결정할 수 있다.

<242> 태반의 제1차 cDNA쇄 풀을 사용하여 마우스 태반 특이적 호메오 박스 유전자인 *Psx*의 cDNA를 직접 시퀀싱 하기 위하여, 본 발명의 DS 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로서 사용했다. 태반 cDNA 풀로부터 태반 특이적 유전자 cDNA를 직접 시퀀싱 하는 방법과 결과들을 이곳에 설명하였다. 실시예 3에서 이용된 것과 동일한 5' - *Psx* 특이적 DS 프라이머를 사용했다. 이들 프라이머는 *Psx* 1-5'-11, *Psx* 2-5'-11, *Psx* 1-5'-41 및 *Psx* 2-5'-41이다.

<243> A. 제1차 cDNA쇄 형성

<244> *Psx* cDNAs를 직접 시퀀싱 하기 위해 주형으로써 실시예 2에서 합성된 마우스 태반의 제1차 cDNA쇄를 사용했다.

<245> B. *Psx* 특이적 DS 프라이머를 이용하여 태반 cDNA 풀에서 *Psx* cDNA의 직접 시퀀싱

<246> 회석시킨 제1차 cDNA쇄 13 μ l(150 ng), ABI PRISM Big Dye Terminator 반응 혼합물(Applied Biosystems, USA) 2 μ l, 5x 시퀀스 완충액(Applied Biosystems) 2 μ l 및 5' -*Psx1*- 또는 5' -*Psx2*- 특이적 DS 프라이머(1 μ M) 중 하나 1.6 μ l를 포함한 최종 부피 20 μ l에서 사이클 시퀀싱 반응을 실시하였고; 반응 혼합물이 포함된 튜브를 예열된(94 $^{\circ}$ C) 열 사이클러에 두었으며; 샘플을 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨 후 94 $^{\circ}$ C에서 10초, 50-60 $^{\circ}$ C에서 3분 및 60-65 $^{\circ}$ C에서 4분 과정을 40-50번 반복하였다. 시퀀싱 산물을 다음과 같이 정제했다. 1) 3 M의 소듐아세트레이트(pH 4.6) 2 μ l와 신선하고 차가운 100% EtOH 50 μ l를 첨가, 2) 30분 동안 -75 $^{\circ}$ C로 유지, 3) 13,000 g에서 15-30분간 원심분리 및 상층액 제거, 4) 70% EtOH 200 μ l로 세척, 5) 13,000 g에서 15-30분간 원심분리 및 상층액을 조심스럽게 제거 및 건조. 시퀀싱 산물을 ABI PRISM 3100 유전 분석기에서 분석하기 바로 전에 HiDi 포름아미드 10 μ l에서 펠렛(pellet)을 재현탁 하였다.

<247> 놀랍게도, *Psx* DS 프라이머들은 그들의 특이적 *Psx* cDNAs를 정확히 시퀀싱 하였다. 즉 *Psx1* 특이적 DS 프라이머(*Psx1*-5'-41)는 오직 *Psx1* cDNA를 시퀀싱 했고, *Psx2* 특이적 DS 프라이머(*Psx2*-5'-41)는 오직 *Psx2* cDNA만을 시퀀싱 했다(도 8). *Psx2*에서의 29 bp 결손 지역이 검정 막대로 표시되었다. 반대로, DS 올리고뉴클레오타이드의 원리를 따르지 않는 종래 프라이머(*Psx1*-5'-40 및 *Psx2*-5'-40)는 두 *Psx* cDNAs를 구별하지 못했다.

<248> 이러한 결과는 DS 프라이머가 PCR 증폭에서 뿐만 아니라 사이클 시퀀싱에서도에서 단일 염기 미스매치를 구별할 수 있음을 나타낸다.

<249> **실시예 5: DS 올리고뉴클레오타이드를 이용한 멀티플렉스(multiplex) PCR**

<250> 멀티플렉스 PCR에서 DS 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 응용을 증명하기 위해, 9개의 다른 사이토카인 패밀리 유전자를 DS 프라이머로 증폭했다. DS 프라이머를 이용한 멀티플렉스 PCR 증폭의 방법 및 결과를 이곳에 설명했다. 각 사이토카인 유전자의 가장 긴 엑손 서열을 이용하여 50 bp 래더(ladder)를 생성하도록 사이토카인 패밀리 유전자-특이적 DS 프라이머를 디자인했다.

<251> 실시예에서 사용된 IL-3에 대한 DS 프라이머는 다음과 같다(200 bp):

<252> IL3-5' 5'-GCTGCCAGGGGTCATTCIIIIICTGGATGA-3' (제 25 서열); 및

<253> IL3-3' 5'-GGCCATGAGGAACATTCAGAI IIIIGGTGCTCT-3' (제 26 서열).

<254> 실시예에서 사용된 IL-15에 대한 DS 프라이머는 다음과 같다(250 bp):

- <255> IL15-5' 5'-ATGTAGCAGAATCTGGCTGCIIIIIATGTGAGG-3' (제 27 서열); 및
- <256> IL15-3' 5'-ATGTGATCCAAGTGGCTCATIIIIICCTTGTTAGG-3' (제 28 서열).
- <257> 실시예에서 사용된 IL-18에 대한 DS 프라이머는 다음과 같다(300 bp):
- <258> IL18-5' 5'-AGGAAATGGATCCACCTGAIIIIITGATGATATA-3' (제 29 서열); 및
- <259> IL18-3' 5'-ATGGAATACAGGCGAGGTCIIIIAAGGCGCA-3' (제 30 서열).
- <260> 실시예에서 사용된 IL-25에 대한 DS 프라이머는 다음과 같다(350 bp):
- <261> IL25-5' 5'-AGCTCTCCAAGCTGGTGATCIIIIICAAGGCGG-3' (제 31 서열); 및
- <262> IL25-3' 5'-GAGCTGCCCTGGATGGGGTTIIIIIGTGGTCCT-3' (제 32 서열).
- <263> 실시예에서 사용된 IL-2에 대한 DS 프라이머는 다음과 같다(400 bp):
- <264> IL2-5' 5'-CTCTGACAACACATTTGAGTGCIIIIICGATGATGAG-3' (제 33 서열); 및
- <265> IL2-3' 5'-GTGCTGTCCTAAAAATGACAGAIIIIIIGAGCTTATTT-3' (제 34 서열).
- <266> 실시예에서 사용된 IL-6에 대한 DS 프라이머는 다음과 같다(450 bp):
- <267> IL6-5' 5'-CCAATGCTCTCCTAACAGATAAIIIIAGTCACAGAA-3' (제 35 서열); 및
- <268> IL6-3' 5'-AGGTAAACTTATACATTCCTCAAGAAIIIIITGGCTAGG-3' (제 36 서열).
- <269> 실시예에서 사용된 IL-19에 대한 DS 프라이머는 다음과 같다(500 bp):
- <270> IL19-5' 5'-GTCTCATCTGCTGCCCTTAAIIIIITAGGAGAACT-3' (제 5 서열); 및
- <271> IL19-3' 5'-CATAGGCCTGGAAGAAGCCGIIIIICAATAAGTTAG-3' (제 6 서열).
- <272> 실시예에서 사용된 IL-1 베타에 대한 DS 프라이머는 다음과 같다(550 bp):
- <273> IL1b-5' 5'-GGAGAGTGTGGATCCCAAGCIIIIICCAAAGAAG-3' (제 7 서열); 및
- <274> IL1b-3' 5'-AGACCTCAGTGCAGGCTATGIIIIITTCATCCC-3' (제 8 서열).
- <275> 실시예에서 사용된 IL-10에 대한 DS 프라이머는 다음과 같다(600 bp):
- <276> IL10-5' 5'-AAGGCCATGAATGAATTTGAIIIIIITCATCAACTG-3' (제 37 서열); 및
- <277> IL10-3' 5'-TGACAGTAGGGGAACCTCTIIIIIGCTGCAGG-3' (제 38 서열)

<278> A. 사이토카인 패밀리 유전자-특이적 DS 프라이머 한 세트를 이용한 모노플렉스(monoplex) PCR

<279> 마우스 지놈 DNA 2 μ l(50 ng), 15 mM MgCl₂을 포함함 10x PCR 완충액 (Roche) 2 μ l, dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 2 mM) 2 μ l, 각 사이토카인 패밀리 유전자-특이적 5' DS 프라이머(10 μ M) 1 μ l, Taq 중합효소(5 unit/ μ l; Roche) 0.5 μ l를 포함한 최종 부피 20 μ l에서 각각의 사이토카인 패밀리 유전자에 대한 단일 타겟 PCR 증폭을 실시했고; 반응 혼합물이 포함된 튜브는 예열된(94 $^{\circ}$ C) 열 사이클러(thermal cycler)에 두었으며; 샘플을 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 60-65 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 과정을 30번 반복한 다음 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 항온 처리했다.

<280> B. 사이토카인 패밀리 유전자 특이적 DS 프라이머 9세트를 이용한 멀티플렉스 PCR

<281> 사이토카인 패밀리 유전자 특이적 DS 프라이머 9세트를 이용해 단일의 튜브에서 멀티플렉스 PCR 증폭을 실시했고; 마우스 지놈 DNA 100 ng, 15 mM MgCl₂가 포함된 10x PCR 반응 버퍼(Roche) 5 μ l, dNTP (dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 2 mM) 5 μ l, 각 사이토카인 패밀리 유전자-특이적 5' DS 프라이머(0.2-5 μ M) 1 μ l, 각 사이토카인 패밀리 유전자-특이적 3' DS 프라이머(0.2-5 μ M) 1 μ l 및 Taq 중합효소(5 unit/ μ l; Roche) 0.5 μ l를 포함한 최종 부피 50 μ l로 반응 혼합물을 제조하였고; 반응 혼합물을 포함하는 튜브를 예열된(94 $^{\circ}$ C) 열 사이클러에 두었고; PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분, 50 $^{\circ}$ C에서 3분 및 72 $^{\circ}$ C에서 3분 과정을 1회 수행 한 후; 94 $^{\circ}$ C에서 40초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분 및 72 $^{\circ}$ C에서 40초 과정을 29회 반복 및 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 마지막 연장 사이클이다.

<282> 도 9에서 보듯이 멀티플렉스 PCR 증폭은 9개의 다른 사이토카인 유전자 산물에 대해 200 bp에서 600 bp까지 예

상된 크기와 일치하는 여러 밴드를 생성한다(도 4, 레인 1). 각 모노플렉스 PCR 증폭은, IL-3 경우의 200 bp (도 4, 레인 2), IL-15 경우 250 bp(도 4, 레인 3), IL-18 경우 300bp(도 4, 레인 4), IL-25 경우 350 bp(도 4, 레인 5), IL-2 경우 400 bp(도 4, 레인 6), IL-6 경우 450 bp(도 4, 레인 7), IL-19 경우 500 bp(도 4, 레인 8), IL-1 베타 경우 550 bp(도 4, 레인 9) 및 IL-10 경우 600 bp(도 4, 레인 10)로 각각 예상 크기와 일치하는 단일 밴드를 생성했다.

<283> 따라서 본 발명에 의해 개발된 DS 프라이머를 멀티플렉스 PCR에 성공적으로 적용할 수 있다는 것을 알 수 있다. DS 올리고뉴클레오타이드의 독특한 구조는 종래의 멀티플렉스 PCR이 지닌 일반적인 문제 즉, 프라이머 간섭 및 다이머(dimmer)형성을 해결한다.

<284> **실시예 6: 이중 특이성(DS) 올리고뉴클레오타이드의 미스매치 허용(tolerance)을 이용한 인간 메타뉴모바이러스(metapneumovirus) 검출**

<285> 미스매치 허용에서 DS 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 응용을 증명하기 위해, 진단 시료 내의 인간 메타뉴모바이러스(hMPV)를 검출하기 위하여 DS 프라이머를 이용했다. DS 프라이머를 이용해 인간 메타뉴모바이러스(hMPV)를 검출하는 방법과 결과를 이곳에 설명했다. 본 실시예는 특정 하나의 바이러스를 검출하는데 본 발명의 적용이 한정되도록 해석 되서는 안 된다.

<286> 모든 hMPV 분리물들의 서열을 정렬하여 얻은 융합 당단백질(F) 유전자의 보존 지역을 기초로 하여 DS 프라이머를 디자인 했다(표 1 참조). 이 분리물들의 유전적 다양성을 허용하기 위해, 프라이머를 다음 기준에 따라 디자인 했다: (a) 보존 지역은 한 개 이상의 미스매치 염기쌍이 존재하더라도, 적어도 30 뉴클레오타이드는 되도록 하고(표 1); (b) 보존 지역에서 미스매치가 가장 높은 비율로 나타나는 서열은 바람직하게는 DS 프라이머의 분할 부위에 위치하도록 하였으며(예, hMPV 5'-585, hMPV 3'-698, 및 hMPV 3'-1007); (c) 그렇지 않다면, 미스매치 뉴클레오타이드를 5' -말단 부위에 위치하도록 하였으며, 이 중 몇몇은 디옥시이노신 같은 유니버설 염기로 대체가 가능하고(예, hMPV 3'-698 및 hMPV 3'-1007); 그리고 (d) 3'-말단 부위에서 미스매치 된 하나 또는 두 개의 뉴클레오타이드를 축퇴성(degenerate) 염기나 유니버설 염기로 대체할 수 있다(예, hMPV 3'-1007).

표 1

모든 hMPV 분리물들의 융합 당단백질(F) 유전자의 보존 지역에 기초한 hMPV-특이적 DS 올리고뉴클레오타이드 프라이머

프라이머	서열	분리물 번호
바이러스 서열AGCTTCAGTCAATTCAACAGAA GGTTTC CTAAATGTTG.....	1
AGCTTCAGTCAATTCAACAGAA GATTT CTAAATGTTG.....	3
AGCTTCAGTCAATTCAACAGAA GATTC CTAAATGTTG.....	4
AGCTTCAGTCAATTCAACAGAA GATTT CTAAATGTTG.....	1
AGCTTCAGTCAATTCAACAGAA GATTC CTAAATGTTG.....	9
AGCTTCAGTCAATTCAACAGAA GGTTT CTAAATGTTG.....	14
5'-프라이머 (585) :	5' -AGCTTCAGTCAATTCAACAGAA IIII ICTAAATGTTG-3'	
바이러스 서열AACAT CAG TTTTTAT TGT CCTGCAGAT GTT GGCATGT.....	4
AACAT CAG TTTTTAT CTG CCCTGCAGAT GTT GGCATGT.....	3
AACAT TAG TTTTTAT CTG CCTGCAGAT GTT GGCATGT.....	12
AACAT CAG TTTTTAT CTG CCTGCAGAT GTT GGCATGT.....	2
AACAT CA TTTTTAT TGT CCTGCAGAT GTT GGCATGT.....	3
AACAT CA TTTTTAT TGT CCTGCAGAT GTT GGCATGT.....	3
AACAT CA TTTTTAT TGT CCTGCAGAT GTT GGCATGT.....	5
3'-프라이머(698) :	5' -AACAT CA TTTTTAT ITG TCCCTGC IIII ITGGCATGT-3'	
바이러스 서열TTGAT CTG CTCAGCA A CATT GAT TCCTG CTGCTGTGTC.....	2
TTGAT TG CTCAGCA A CATT GAT CCCTG CTGCTGTGTC.....	7
TTGAT TG CTCAGCA A CATT GAT CCCTG CA G CTGTGTC.....	8
TTGAT TG CTCAGC G ACATT GAT CCCTG CTGCTGTGTC.....	1
TTGAT TG CTCAGCA A CATT GAT CCCTG CTGCTGTGTC.....	1
TTGAT TG CTCAGCA A CATT AAT TCCTG CTGCTGTGTC.....	9
TTGAT TG CTCAGCA A CATT AAT TCCCG CTGCTGTGTC.....	2
3'-Primer (1007) :	5' -TTGAT ITG CTCAGC I ACATT GAT IIII IC W GCTGTGTC-3'	

- <287>
- <288> * hMPV 분리물들 사이의 유전적 변이는 밑줄 친 뉴클레오타이드로 표시되었다.
- <289> 실시예에서 사용된 hMPV F 유전자에 특이적인 DS 프라이머는 다음과 같다:
- <290> hMPV 5'-585 5'-AGCTTCAGTCAATTCAACAGAA**IIII**ICTAAATGTTG-3' (제 39 서열);
- <291> hMPV 3'-698 5'-AACAT**CA**TTTTTAT**ITG**TCCCTGC**IIII**ITGGCATGT-3' (제 40 서열); 및
- <292> hMPV 3'-1007 5'-TTGAT**ITG**CTCAGC**I**ACATT**GAT****IIII**IC**W**GCTGTGTC-3' (제 41 서열),

- <293> 여기서 W 는 A 또는 T이며, I는 디옥시이노신이다.
- <294> 제조사의 프로토콜에 따라 RNAzol B 방법을 이용하여 바이러스 총 RNA를 추출하였다(RNAzol LS; Tel-Test, Inc.). 다음과 같이 조성된 20 μ l의 반응 부피에서 바이러스 RNA를 사용하여 42°C에서 1.5시간 동안 cDNA를 합성하도록 역전사 반응을 실시하였다: 총 RNA 5 μ l(대략 100 ng), 5x 완충액 4 μ l(Invitrogen, USA), dNTPs(각 5 mM) 5 μ l, 10 μ M 랜덤 헥사디옥시뉴클레오타이드 2 μ l, RNAase 저해제 0.5 μ l(40 units/ μ l, Promega), 및 몰로니 뮤라인 백혈병(Moloney murine leukemia) 바이러스 역전사효소 1 μ l(200 units/ μ l, Promega).
- <295> 제1차 cDNA 2 μ l(30 ng), 15 mM MgCl₂가 포함된 10x PCR 완충액 2 μ l(Roche), dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 2 mM) 2 μ l, 5' hMPV- 특이적 DS 프라이머(hMPV 5'-585; 10 μ M) 1 μ l, 3' hMPV-특이적 DS 프라이머(hMPV 3'-698 또는 hMPV 3'-1007; 10 μ M) 1 μ l, 및 Taq 중합효소(5 unit/ μ l; Roche) 0.5 μ l를 포함한 최종 부피 20 μ l에서 hMPV F유전자의 타겟 PCR 증폭을 실시하였고; 반응 혼합물을 포함하는 튜브를 예열된(94°C) 열 사이클러에 두었고; 샘플을 94°C에서 5분간 변성시킨 후, 94°C에서 1분, 60-65°C에서 1분, 72°C에서 1분 과정을 30회 수행 한 다음 72°C에서 7분간 항온 처리하였다.
- <296> 도 10B에서 볼 수 있듯이, hMPV-특이적 DS 프라이머 각 쌍(hMPV 5'-585 및 hMPV 3'-698, 그리고 hMPV 5'-585 및 hMPV 3'-1007)은 각각 예상 크기인 150 bp와 459 bp의에 상응하는 단일 밴드를 생성한다(레인 1 및 레인 2). 추후 산물의 서열 분석에서, 상기 증폭 산물은 hMPV 융합 당단백질(F)유전자의 부분 서열임을 확인하였다. 반대로, 상기 프라이머들은 주형이 없는 네거티브 컨트롤 PCR에서는 어떠한 산물도 생성시키지 않는다(레인 4 및 레인 5). 포지티브 컨트롤로써 인간 베타-액틴 특이적 프라이머 세트를 사용했다(레인 3).
- <297> 이러한 결과는 호흡기 질병을 가진 환자로부터 hMPVs를 검출하는데 DS 프라이머가 적용될 수 있음을 나타낸다. 따라서 진단 분야에서 직면하는 모든 상황에 대하여, 본 발명의 DS 올리고뉴클레오타이드는 PCR 증폭의 프라이머 또는 올리고뉴클레오타이드 칩에서는 프로브로써 이용될 수 있음을 알 수 있다.
- <298> **실시예 7: DS 올리고-고정 마이크로어레이(Oligo-Immobilized Microarray)를 이용한 타겟 뉴클레오타이드의 검출**
- <299> DNA 합성기(Expedite 8900 Nucleic Acid Synthesis System, Applied Biosystems (ABI))를 이용하여, 표준 프로토콜에 따라 타겟 핵산 분자의 한 영역에 상보적인 DS 올리고들을 합성한다. 마이크로어레이를 위하여, 유리 슬라이드에 합성된 DS 올리고스를 고정한다. 그 다음, DNA 시료 50-200 ng, 10x PCR 완충액(Promega) 5 μ l, 15 mM MgCl₂ 5 μ l, 형광-표지된 dNTP (dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 2 mM) 5 μ l 및 Taq 중합효소(5 unit/ μ l; Promega) 0.5 μ l을 포함하는 주형-의존성 연장 반응 혼합물을 마이크로어레이에 첨가하고, 이후 마이크로어레이를 예열된(94°C) 열 사이클러에 둔다. 주형-의존성 연장 반응은 다음의 열 사이클에 따라 실시한다: 94°C에서 5분간 변성시킨 후, 94°C에서 1분, 50-65°C에서 1-3분 및 60-72°C에서 1-4분 과정을 15-50회 반복 수행 한 다음, 72°C에서 5분 동안 연장. 주형-의존성 연장반응 후, 연장된 DS 올리고들을 세척하고 마이크로어레이 스캐너로 형광 이미지를 얻어 올리고들을 검출한 후, 상기 이미지 분석을 한다.
- <300> **실시예 8: DS 올리고뉴클레오타이드를 이용한 단일뉴클레오타이드다형성(SNPs) 쪼타이핑(genotyping)**
- <301> DNA 합성기(Expedite 8900 Nucleic Acid Synthesis System, Applied Biosystems (ABI))를 이용하여 표준 프로토콜에 따라, 3' -저 Tm 특이성 부위의 중앙에 다형성 염기(의문 위치)가 위치한 DS 올리고들을 합성한다. 마이크로어레이를 실시하기 위해 합성된 올리고뉴클레오타이드를 유리 슬라이드에 고정한다. 그 다음, DNA 시료 50-200 ng, 10 x PCR 완충액(Promega) 5 μ l, 15 mM MgCl₂ 5 μ l, 형광-표지된 dNTP (dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 2 mM) 5 μ l 및 Taq 중합효소(5 unit/ μ l; Promega) 0.5 μ l을 포함한 주형-의존성 연장 반응 혼합물을 마이크로어레이에 첨가하고, 그 이후 마이크로어레이를 예열된(94°C) 열 사이클러에 둔다. 주형 의존성 연장 반응을 다음의 열 사이클에 따라 실시한다: 94°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C에서 1분, 50-65°C에서 1-3분, 60-72°C에서 1-4분 과정을 15-50회 반복 수행 한 다음 72°C에서 5분간 연장. 주형-의존형 연장반응 후에 연장된 DS 올리고들을 세척하고, 마이크로어레이 스캐너로 얻은 형광 이미지를 통하여 올리고들을 검출한 후, 그 이미지 분석을 한다.
- <302> 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 본 발명의 사상 범위 내에서의 변형 및 수정은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하며, 본 발명의 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 결정된다.

도면의 간단한 설명

- <163> 도 1A 및 1B는 주형-의존적 연장 반응에서 본 발명의 이중 특이성(DS) 올리고뉴클레오타이드의 원리를 도시한다. 도 1A는 높은 엄격조건 하에서 DS 올리고뉴클레오타이드의 고 혼성화 특이성을 보여준다. 도 1B는 DS 올리고뉴클레오타이드의 미스매치 허용(tolerance)을 보여준다.
- <164> 도 2는 본 발명의 DS 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 이중-가닥 DNA의 타깃 핵산을 선택적으로 증폭하는 과정을 나타낸다.
- <165> 도 3은 본 발명의 DS 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 mRNA의 타깃 핵산을 선택적으로 증폭하는 과정을 나타낸다.
- <166> 도 4는 올리고뉴클레오타이드 마이크로어레이 상의 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 타깃 핵산을 선택적으로 결정하는 주형-의존적 연장 반응을 나타낸다.
- <167> 도 5는 사이토카인 패밀리 유전자인 IL-1베타 및 IL-19를 종래 프라이머 세트(IL-1b-5'-0 및 IL-1b-3'-0, 레인 1; IL-19-5'-0 및 IL-19-3'-0, 레인3)와 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드(IL-1b-5' 및 IL-1b-3', 레인 2; IL-19-5' 및 IL-19-3', 레인4)를 사용한 PCR 증폭의 결과를 보여주는 아가로즈 겔 사진이다.
- <168> 도 6A는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드의 PCR 특이성을 증명하는 DEG 10 유전자의 3' -RACE(cDNA 말단의 고속 증폭) 결과를 보여주는 아가로즈 겔 사진이다. 레인 1은 완벽한 매치 서열을 갖는 프라이머에 대한 것이고, 레인 2-4는 3' -저 T_m 특이성 부위에서 각각 3, 2 및 1개의 염기 미스매치를 갖는 프라이머에 대한 것이며, 레인 5-7은 5' -고 T_m 특이성 부위서 각각 5, 3 및 2개의 염기 미스매치를 갖는 프라이머에 대한 것이다. M은 포에버 100-bp 레더 퍼스날라이저(Forever 100-bp Ladder Personalizer)의해 생성된 100-bp 크기의 마커이다.
- <169> 도 6B는 PCR에서 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드의 미스매치 허용을 증명하는 DEG 10 유전자의 3' -RACE 결과를 보여주는 아가로즈 겔 사진이다. 레인1은 완벽한 매치 서열을 갖는 하나의 프라이머에 대한 것이고, 레인 2-4는 3' -저 T_m 특이성 부위에서 각각 3, 2 및 1개의 염기 미스매치를 갖는 프라이머에 대한 것이며, 레인 5-7은 5' -고 T_m 특이성 부위서 각각 5, 3 및 2개의 염기 미스매치를 갖는 프라이머에 대한 것이다. M은 포에버 100-bp 레더 퍼스날라이저(Forever 100-bp Ladder Personalizer)의해 생성된 100-bp 크기의 마커이다.
- <170> 도 7A는 마우스 태반-특이적 호메오박스 패밀리 유전자인 *Psx1*과 *Psx2*의 3' 레이스를 위한 5' 프라이머들의 서열을 나타낸다. *Psx1*-5'-40 및 *Psx2*-5'-40은 종래 프라이머이고 *Psx1*-5'-41 및 *Psx2*-5'-41은 본 발명에 의해 디자인된 프라이머이다.
- <171> 도 7B는 *Psx1*과 *Psx2*의 3' -RACE 의 결과를 보여주는 아가로즈 겔 사진이다. 레인 1은 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드 프라이머인 *Psx1*-5'-41를 사용한 *Psx1*의 3'-RACE이고; 레인 2는 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드 프라이머인 *Psx2*-5'-41를 사용한 *Psx2*의 3'-RACE이며; 레인 3은 종래 프라이머인 *Psx1*-5'-40를 사용한 *Psx1*의 3'-RACE; 및 레인 4는 종래 프라이머인 *Psx2*-5'-40을 사용한 *Psx2*의 3'-RACE 결과이다. M은 포에버 100bp 레더 퍼스날라이저(Forever 100bp Ladder Personalizer)의해 생성된 100bp 크기의 마커이다.
- <172> 도 8은 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드 프라이머들인 *Psx1*-5'-41(*Psx1* 경우) 및 *Psx2*-5'-41(*Psx2* 경우)를 시퀀싱 프라이머로 사용해 마우스 태반 cDNA 풀에서 *Psx1* 와 *Psx2* 유전자를 직접 사이클링 시퀀싱 한 결과를 보여준다.
- <173> 도 9는 9세트의 사이토카인 패밀리 유전자-특이적 이중 특이성 프라이머들을 사용한 멀티플렉스 PCR 결과를 보여준다. 레인 1은 9개 사이토카인 유전자에 대한 멀티플렉스 PCR을; 레인 2는 IL-3(200 bp)에 대한 모노플렉스 PCR을; 레인 3은 IL-15(250 bp)에 대한 모노플렉스 PCR을; 레인 4는 IL-18(300 bp)에 대한 모노플렉스 PCR을; 레인 5는 IL-25(350 bp)에 대한 모노플렉스 PCR을; 레인 6은 IL-2(400 bp)에 대한 모노플렉스 PCR을; 레인 7는 IL-6(450 bp)에 대한 모노플렉스 PCR을; 레인 8은 IL-19(500 bp)에 대한 모노플렉스 PCR을; 레인 9는 IL-1베타(550 bp)에 대한 모노플렉스 PCR을; 및 레인 10은 IL-10(600 bp)에 대한 모노플렉스 PCR의 결과를 보여준다. M은 포에버 100-bp 레더 퍼스날라이저(Forever 100-bp Ladder Personalizer)의해 생성된 100-bp 크기의 마커이다.
- <174> 도 10은 인간 메타뉴모바이러스(hMPV) 융합 당단백질(F) 유전자를 이중 특이성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 결과를 보여준다. 레인 1, hMPV5'-585 및 hMPV 3'-689 프라이머 세트를 사용한 타깃

PCR; 레인 2, hMPV5'-585 및 hMPV 3'-1007 프라이머 세트를 사용한 타깃 PCR; 레인 3, 인간 베타-액틴 프라이머들을 사용한 타깃 PCR ; 레인 4, 주형이 없는 타깃 PCR; 레인 5, 주형이 없는 타깃 PCR.

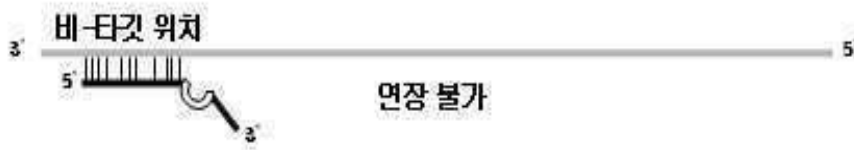
도면

도면1A

이중 특이성 올리고뉴클레오타이드의 高 혼성화 특이성

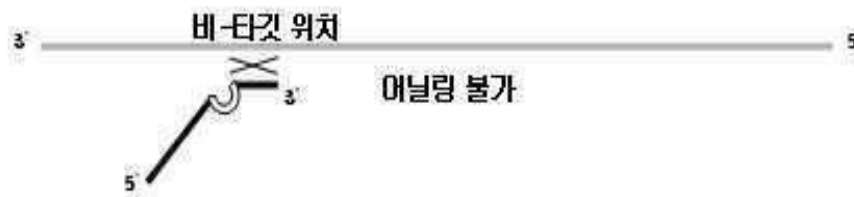
(a) 연장 불가

3'-말단 부위가 아닌 5'-말단 부위가 주형에 어닐링 하는 경우 연장 반응 발생하지 않음



(b) 어닐링 불가

5'-말단 부위가 아닌 3'-말단 부위가 비-타깃 위치에 상보적인 서열을 가지는 경우 어닐링이 발생하지 않음



(c) 연장

5 - 및 3'-말단 부위가 타깃 서열에 어닐링 되고, 이어 성공적 연장 반응 발생



도면 1B

이중 특이성 올리고뉴클레오타이드의 미스매치 허용성

(a) 연장

5'-말단 및 3'-말단 부위가 주형에 어닐링 되면 5'-말단 부위 쪽의 미스매치가 허용된다



(b) 연장

5'-말단 및 3'-말단 부위가 주형에 어닐링 되면 3'-말단 부위 쪽의 미스매치가 허용된다

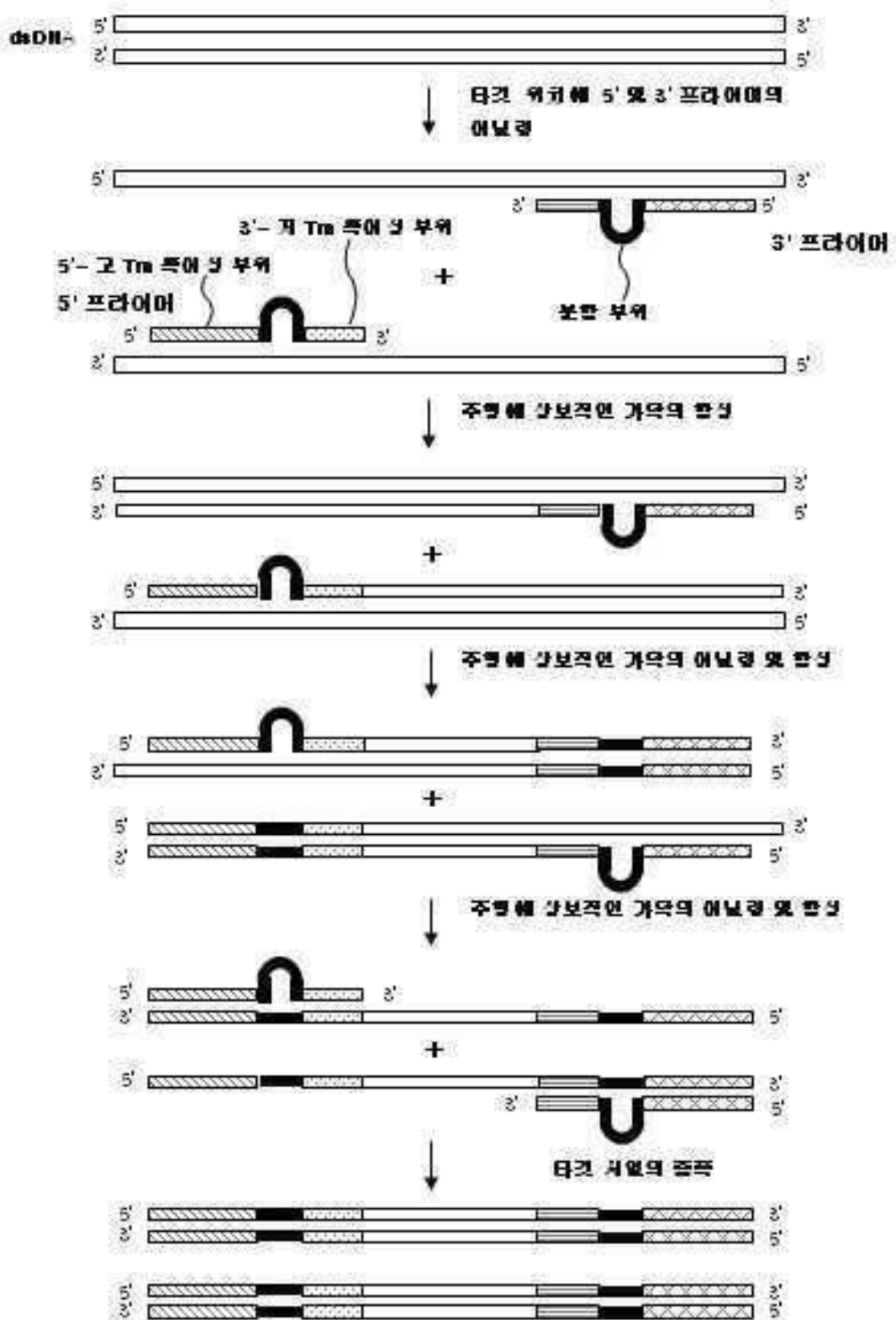


(c) 연장

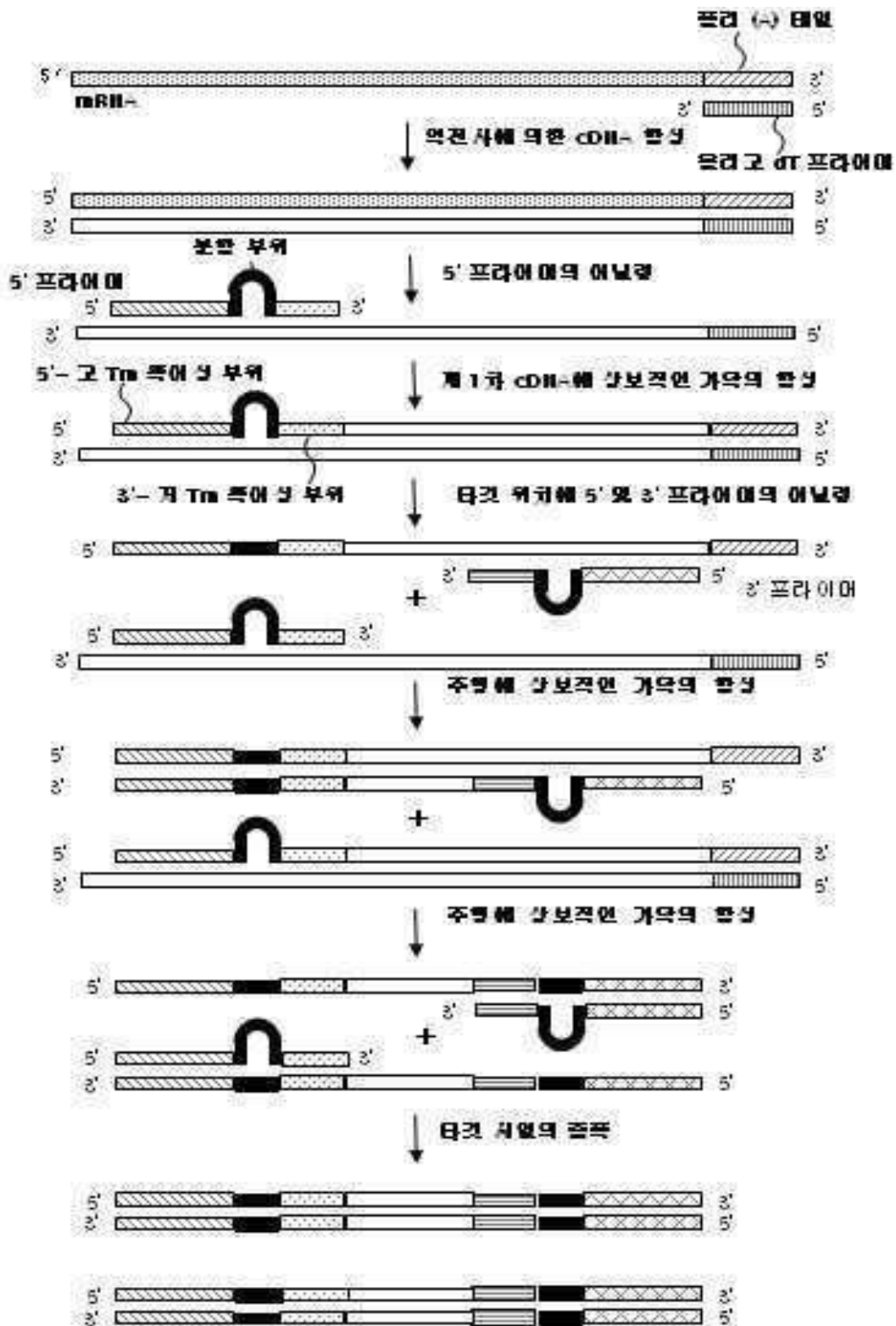
5'-말단 및 3'-말단 부위가 주형에 어닐링 되면 5'-및 3'-말단 부위 쪽의 미스매치가 허용된다



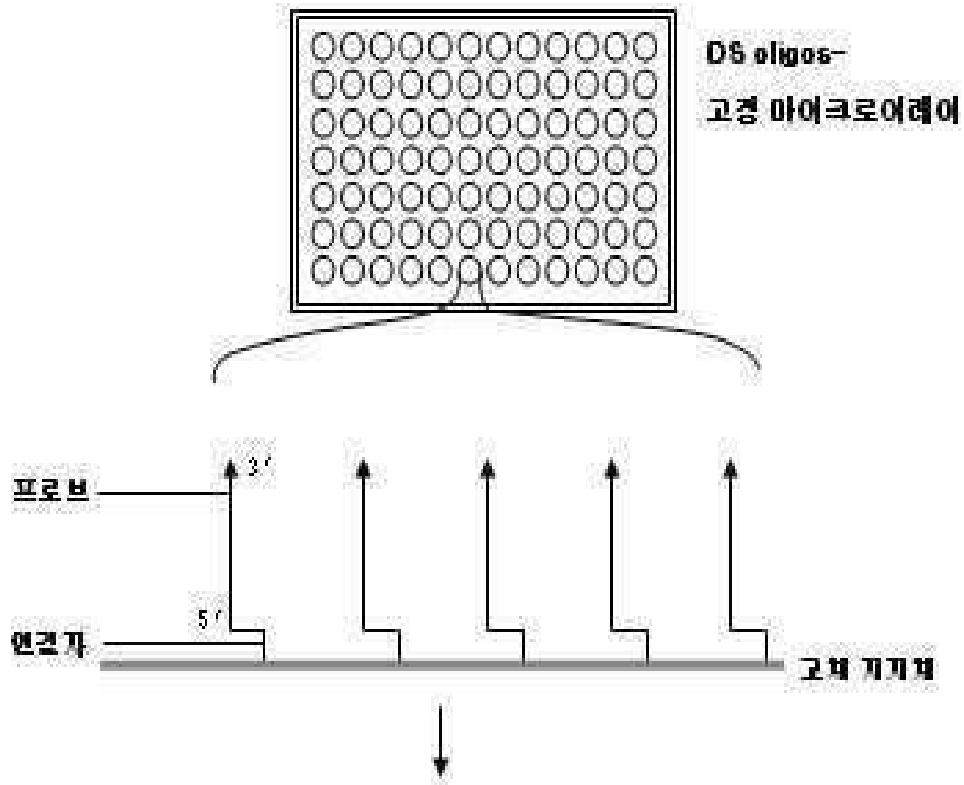
도면2



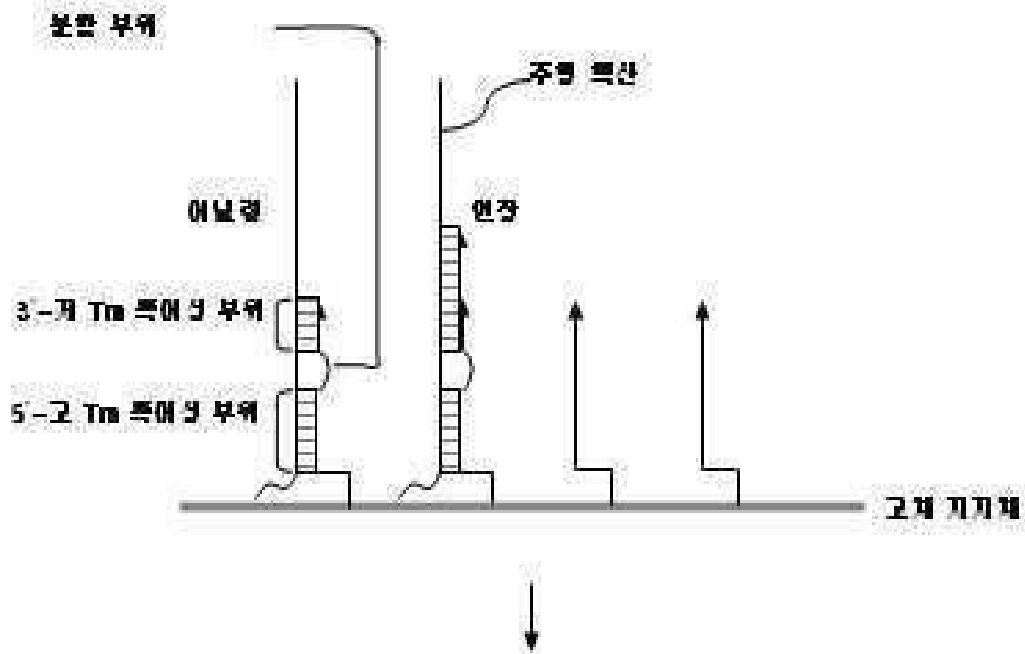
도면3



도면4A

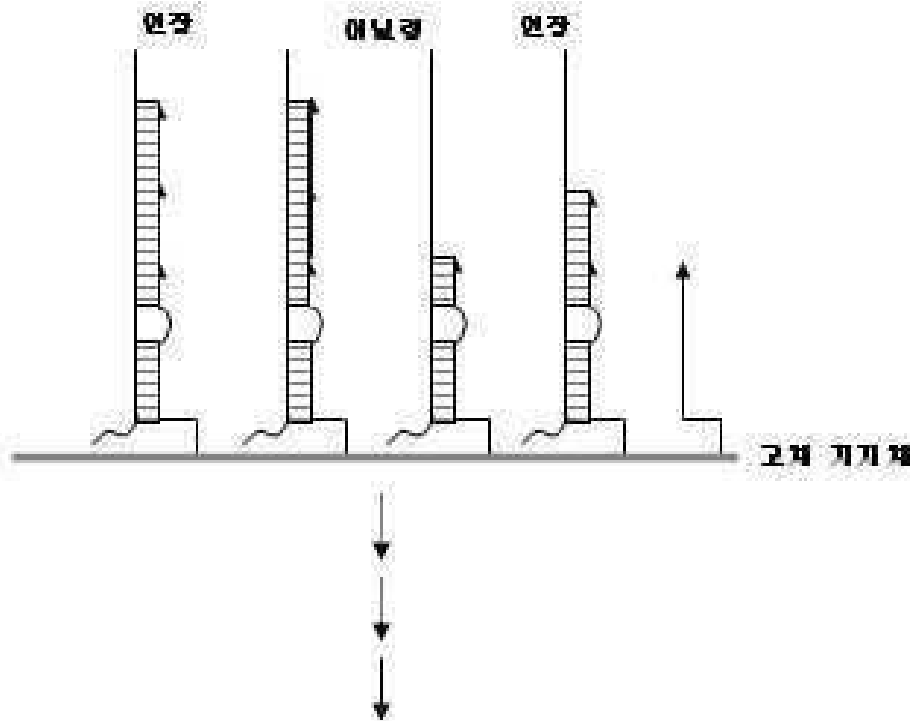


1^차 사이클: 주형 핵산이 타겟 올리고뉴클레오타이드 프로브에 혼성화 되고 이어 상보적 연장 반응 발생

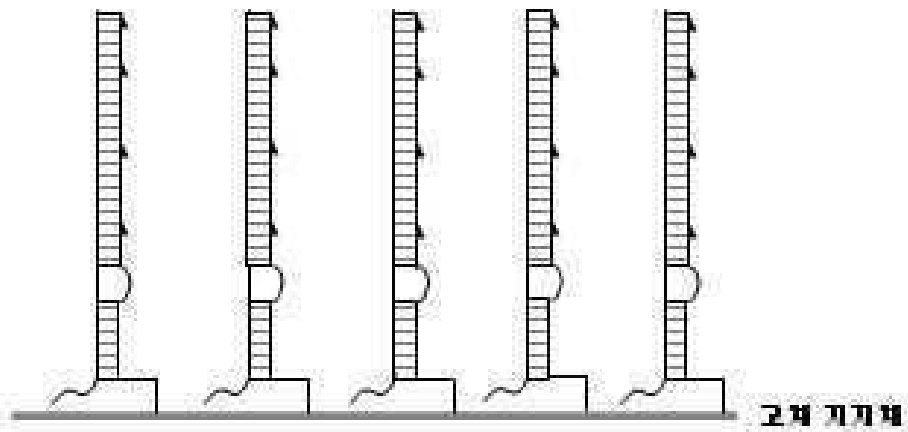


도면4B

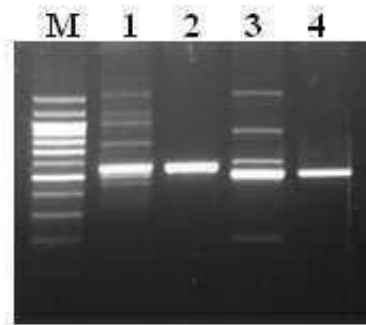
2번 사이클 : 비-혼입화된 타킷 올리고뉴클레오타이드 프로브가 주형 핵산에 혼입되고 이어 상보적 결합 반응 발생



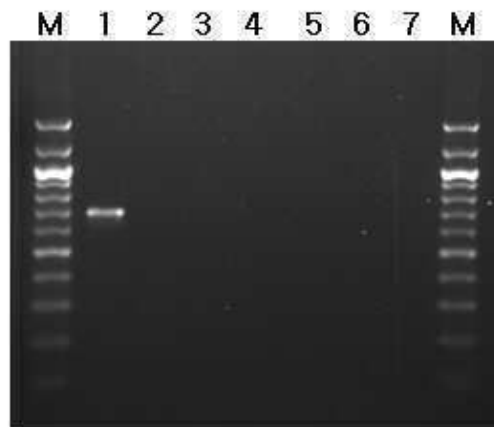
사이클은 전체 또는 대부분의 타킷 올리고뉴클레오타이드 프로브가 주형 핵산과 혼입될 때까지 반복된다



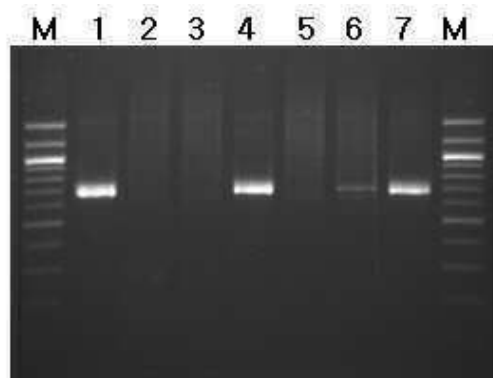
도면5



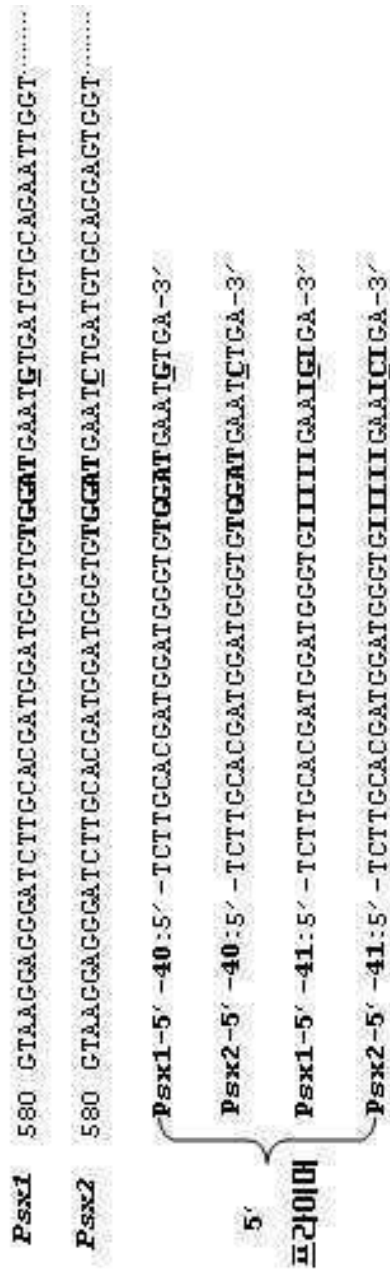
도면6A



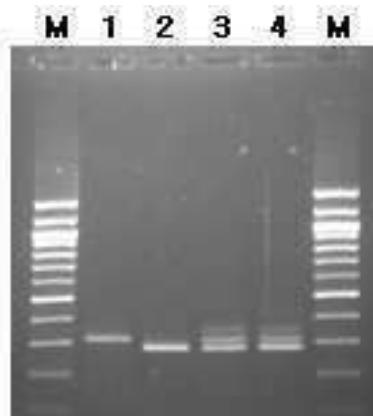
도면6B



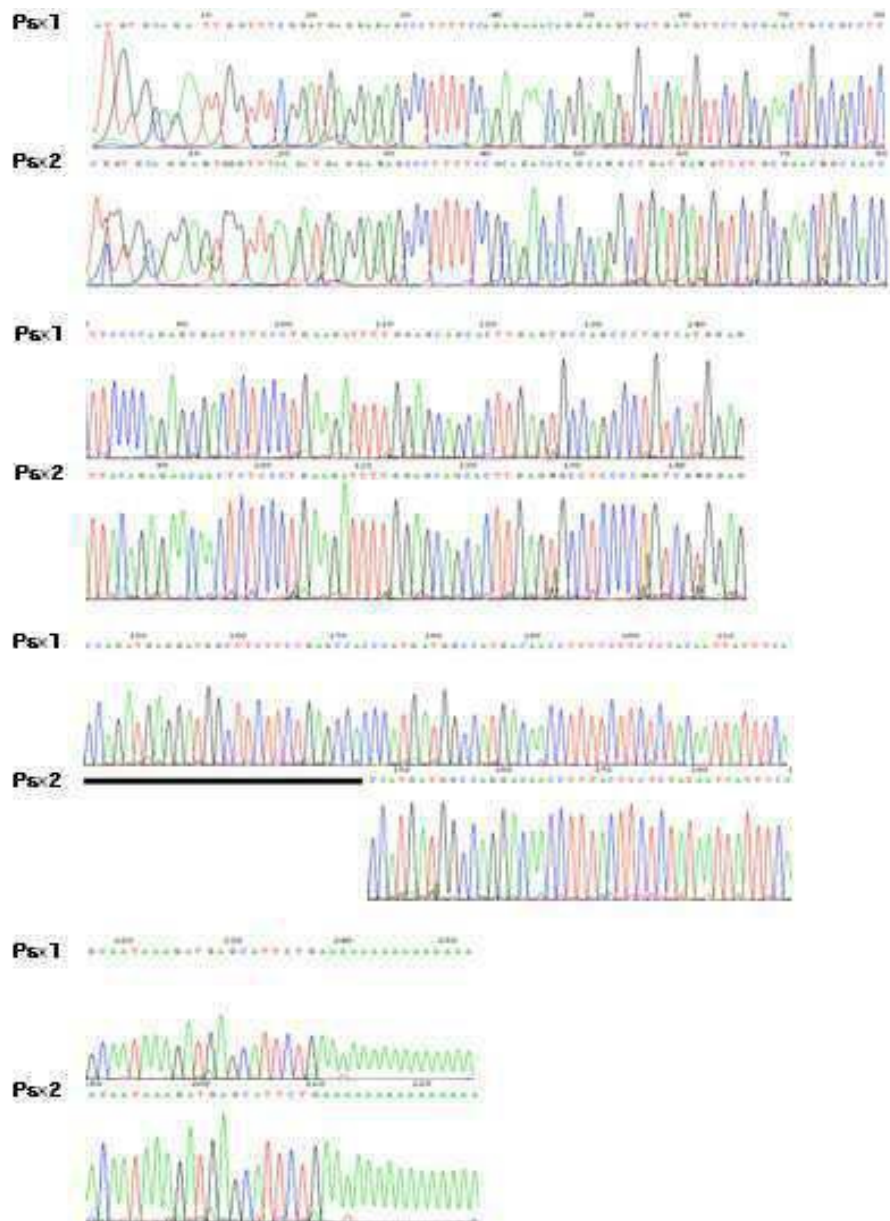
도면7A



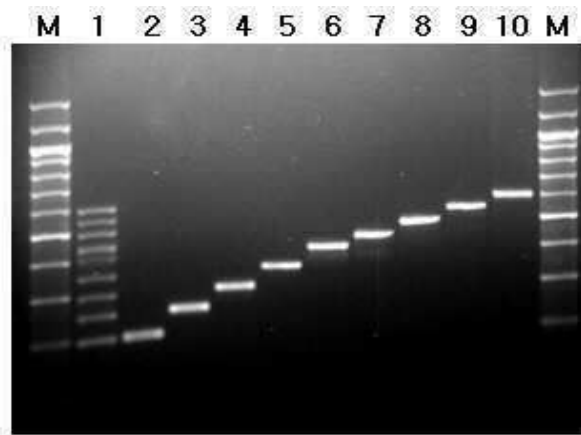
도면7B



도면8



도면9



도면10

