



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월30일  
(11) 등록번호 10-1515821  
(24) 등록일자 2015년04월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12Q 1/68* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2008-7007791  
(22) 출원일자(국제) 2006년08월31일  
심사청구일자 2011년08월31일  
(85) 번역출제출일자 2008년03월31일  
(65) 공개번호 10-2008-0052626  
(43) 공개일자 2008년06월11일  
(86) 국제출원번호 PCT/AU2006/001265  
(87) 국제공개번호 WO 2007/025340  
국제공개일자 2007년03월08일
- (30) 우선권주장  
2005205791 2005년09월01일 오스트레일리아(AU)  
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌  
J. Med. Microbiol., Vol. 52, Pt. 8, pp.  
681-683 (2003.08.)\*  
J. Virol. Methods, Vol. 126, No. 1-2, pp.  
53-63 (2005.06.)\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자  
오스다이어그나스틱스 피티와이 엘티디.  
오스트레일리아 2015 뉴사우스웨일스주 알렉산드리아 오리오르돈 스트리트 3/36
- (72) 발명자  
스탠리 케이스  
오스트레일리아 엔에스더블유 2010 달링허스트 시 엔알 웨스트 엔바운더리 스트리트 세인트 빈센트"스 하스피틀
- (74) 대리인  
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 26 항

심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **핵산의 증폭, 정량분석 및 동정 방법**

(57) 요약

본 발명은 핵산 분자의 풀로부터 복수의 선택된 핵산 분자들을 증폭 및 임의로 정량분석 및/또는 동정하는 개선된 방법에 관한 것이다. 1차 라운드 동시다중 증폭에서는 앰플리콘 (amplicon) 간에 반응 구성요소에 대한 심각한 경쟁이 일어나기 전의 시점까지 증폭반응이 진행되도록 한다. 그 후에는, 선택된 각 핵산 서열을 정량분석하기 위하여 통상적으로 형광 리포터를 포함하는 2차 라운드 증폭이 이어진다. 본 방법은 유전자 발현산물과 같이 다양한 기원으로부터의 핵산의 증폭 및 정량분석에 있어서 유용함으로써, 극히 제한된 시료 및 분해된 보관 기록 시료로부터 다수의 상기 산물을 증폭 및 정량분석할 수 있다.

(30) 우선권주장

2545613 2006년04월05일 캐나다(CA)

60/713,636 2005년09월01일 미국(US)

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

핵산 분자의 풀로부터 선택된 복수의 핵산 분자들을 증폭하는 방법으로서,

(a) 앰플리콘을 생성하기 위해 1차 라운드 동시다중 증폭반응 (first round multiplex amplification reaction)에서 복수의 선택된 핵산 분자들을 증폭하는 단계로, 상기 증폭 반응은 선택된 핵산 서열에 특이적인 복수의 외부 프라이머 (outer primer) 쌍들을 포함하고, 여기서 추가 증폭이 더 이상 달성되지 않는 지점 너머 다회 주기가 진행될 경우, 생산될 폴리뉴클레오티드 총량의 5%를 초과하지 않도록 상기 증폭 반응이 다회 주기 동안 진행되도록 하며, 상기 외부 프라이머 쌍들은 상기 1차 라운드 동시 다중 증폭 반응 후에 고갈되지 않는, 단계;

(b) 상기 앰플리콘 및 남아있는 반응 성분들을 상기 1차 라운드 동시다중 반응으로부터 회석하여 복수의 2차 라운드 증폭 반응을 수행하는 단계로, 각각은 최소한 하나의 내부 프라이머 쌍을 포함하고, 각 쌍은 상기 선택된 핵산 서열의 하나에 특이적이며, 여기서, 상기 회석은 2차 라운드 증폭에서 추가적인 프라이밍이 상기 내부 프라이머에 의해 지시되도록 최소한 25배 회석이며, 이에 따라 상기 내부 프라이머에 의해 프라이밍된 상기 선택된 핵산 서열만을 증폭하는, 단계; 및

(c) 상기 복수의 2차 라운드 증폭 반응에서 상기 선택된 핵산 분자를 추가로 증폭함에 따라 각 2차 라운드 반응이 내부 프라이머로부터 상기 복수의 선택된 핵산 분자의 서브셋을 각각 추가적으로 증폭하는 단계;

를 포함하는 방법.

**청구항 2**

핵산 분자의 풀로부터 선택된 복수의 핵산 분자들을 증폭하는 방법으로서,

(a) 앰플리콘을 생성하기 위해 1차 라운드 동시다중 증폭 반응에서 복수의 선택된 핵산 분자를 증폭하는 단계로서, 상기 증폭 반응은 외부 프라이머를 포함하는 복수의 1차 라운드 프라이머 쌍을 포함하고, 각 프라이머 쌍은 선택된 핵산 서열에 특이적이고, 여기서 추가 증폭이 더 이상 달성되지 않는 지점 너머 다회 주기가 진행될 경우, 생산될 폴리뉴클레오티드 총량의 5%를 초과하지 않도록 상기 증폭 반응이 다회 주기 동안 진행되도록 하며, 상기 외부 프라이머 쌍들은 상기 1차 라운드 동시 다중 증폭 반응 후에 고갈되지 않는, 단계;

(b) 상기 앰플리콘 및 남아있는 반응 성분들을 상기 1차 라운드 동시다중 반응으로부터 회석하여 복수의 2차 라운드 증폭 반응을 수행하는 단계로, 각각은 2차 라운드 프라이머의 최소한 한 쌍을 포함하고, 각 쌍은 내부 프라이머 및 상기 외부 프라이머 중 하나를 포함하며, 상기 선택된 핵산 서열의 하나에 특이적이며, 여기서, 상기 회석은 2차 라운드 증폭에서 추가적인 프라이밍이 상기 2차 라운드 프라이머에 의해 지시되도록 최소한 25배 회석이며, 이에 따라 상기 2차 라운드 프라이머에 의해 프라이밍된 상기 선택된 핵산 서열만을 증폭하는, 단계; 및

(c) 상기 복수의 2차 라운드 증폭 반응에서 상기 선택된 핵산 분자를 추가로 증폭함에 따라 각 2차 라운드 반응이 상기 2차 라운드 프라이머로부터 상기 복수의 선택된 핵산 분자의 서브셋을 각각 추가적으로 증폭하는 단계;

를 포함하는 방법.

**청구항 3**

핵산 분자의 풀로부터 선택된 핵산 분자들의 수를 산정하는 방법으로서,

(a) 앰플리콘을 생성하기 위해 1차 라운드 동시다중 증폭반응에서 복수의 선택된 핵산 분자들을 증폭하는 단계로, 상기 증폭 반응은 복수의 외부 프라이머 쌍들을 포함하되 각 쌍은 선택된 핵산 서열에 특이적이고, 여기서 추가 증폭이 더 이상 달성되지 않는 지점 너머 다회 주기가 진행될 경우 생산될 폴리뉴클레오티드 총량의 5%를 초과하지 않도록 상기 증폭 반응이 다회 주기 동안 진행되도록 하며, 상기 외부 프라이머 쌍들은 상기 1차 라운드 동시 다중 증폭 반응 후에 고갈되지 않는, 단계;

(b) 상기 앰플리콘 및 남아있는 반응 성분들을 상기 1차 라운드 동시다중 반응으로부터 회석하여 복수의 2차 라운드 증폭 반응을 수행하는 단계로, 각각은 탐지가능한 리포터 및 최소한 하나의 내부 프라이머 쌍을 포함하고, 각 쌍은 상기 선택된 핵산 서열의 하나에 특이적이며, 여기서, 상기 회석은 2차 라운드 증폭에서 추가적인 프라이밍이 상기 내부 프라이머에 의해 지시되도록 최소한 25배 회석이며, 이에 따라 상기 내부 프라이머에 의해 프라이밍된 상기 선택된 핵산 서열만을 증폭하는, 단계;

(c) 상기 복수의 2차 라운드 증폭 반응에서 상기 선택된 핵산 분자를 추가적으로 증폭함으로써, 각각의 2차 라운드 반응이 상기 내부 프라이머로부터 각각 선택된 복수의 핵산 분자의 서브셋을 추가적으로 증폭하는 단계; 및

(d) 각각의 2차 라운드 증폭반응을 상기 탐지 가능한 리포터에 의해 관찰함으로써 각각의 선택된 서열의 선택된 핵산 분자의 수를 산정하는 단계;

를 포함하는 방법.

**청구항 4**

핵산 분자의 풀로부터 선택된 핵산 분자들의 수를 산정하는 방법으로서,

(a) 앰플리콘을 생성하기 위해 1차 라운드 동시다중 증폭반응에서 복수의 선택된 핵산 분자들을 증폭하는 단계로서, 상기 증폭 반응은 복수의 외부 프라이머 쌍들을 포함하되 각 쌍은 선택된 핵산 서열에 특이적이고, 여기서 추가 증폭이 더 이상 달성되지 않는 지점 너머 다회 주기가 진행될 경우 생산될 폴리뉴클레오티드 총량의 5%를 초과하지 않도록 상기 증폭 반응이 다회 주기 동안 진행되도록 하며, 상기 외부 프라이머 쌍들은 상기 1차 라운드 동시 다중 증폭 반응 후에 고갈되지 않는, 단계;

(b) 상기 앰플리콘 및 남아있는 반응 성분들을 상기 1차 라운드 동시다중 반응으로부터 회석하여 복수의 2차 라운드 증폭 반응을 수행하는 단계로, 각각은 탐지가능한 리포터 및 최소한 하나의 2차 라운드 프라이머 쌍을 포함하고, 각 쌍은 내부 프라이머 및 상기 외부 프라이머 중 하나를 포함하고, 상기 선택된 핵산 서열의 하나에 특이적이며, 여기서, 상기 회석은 2차 라운드 증폭에서 추가적인 프라이밍이 상기 2차 라운드 프라이머에 의해 지시되도록 최소한 25배 회석이며, 이에 따라 상기 2차 라운드 프라이머에 의해 프라이밍된 상기 선택된 핵산 서열만을 증폭하는, 단계;

(c) 상기 복수의 2차 라운드 증폭 반응에서 상기 선택된 핵산 분자를 추가로 증폭함에 따라 각 2차 라운드 반응이 상기 복수의 선택된 핵산 분자의 서브셋을 각각 추가적으로 증폭하는 단계; 및

(d) 각각의 2차 라운드 증폭반응을 탐지가능한 리포터에 의해 관찰함으로써 각각의 선택된 서열의 선택된 핵산 분자의 수를 산정하는 단계;

를 포함하는 방법.

**청구항 5**

제3항 또는 제4항에 있어서, 탐지가능한 리포터가 이중 가닥 DNA에 삽입되는 염료인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 6**

제3항 또는 제4항에 있어서, 탐지가능한 리포터가 단일 가닥 DNA와 상호작용하는 형광발생 탐침인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 7**

제3항 또는 제4항에 있어서, 선택된 각 서열의 복수의 선택된 핵산 분자들이 증폭되고 정량분석되도록, 2차 라운드 증폭반응이 복수의 프라이머 쌍 및 복수의 형광발생 탐침을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 8**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 분자가 DNA 분자를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 9**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 2차 라운드 증폭반응에 포함된 프라이머가 1차 라운드 증폭반응에

포함된 외부 프라이머 중의 적어도 하나에 비하여 더 높은 Tm을 가짐으로써, 2차 라운드 증폭반응의 올리고뉴클레오타이드 프라이밍 (oligonucleotide priming)이 더 높은 Tm을 가진 프라이머를 선호하는 쪽으로 편향되도록 하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 10**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 외부 프라이머 중 적어도 하나가 UTP 뉴클레오타이드를 포함함으로써 프라이머가 UNG 효소에 의해 분해될 수 있도록 하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 1차 라운드 증폭 종료시에 외부 프라이머를 UNG 효소 분해로 제거하여 1차 라운드 프라이머에 의한 2차 라운드 증폭반응의 오염을 방지하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 12**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 1차 라운드 동시다중 증폭반응이 1 내지 30 주기 범위, 5 내지 25 주기 범위, 5 내지 20 주기 범위, 또는 10 내지 20 주기 범위에서 진행되도록 하는 방법.

**청구항 13**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 동시다중 증폭반응이 4개 이상의 선택된 핵산 분자들을 증폭하는 방법.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 동시다중 증폭반응이 4 내지 150개 범위, 10 내지 150개 범위, 또는 20 내지 100개 범위의 선택된 핵산 분자들을 증폭하는 방법.

**청구항 15**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 다형성 (polymorphism), 돌연변이, 삽입 (insertion) 및 결실 (deletion)을 검출하는 방법에 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 16**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 및 장애의 진단 방법에 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 신생물의 진단에 사용되는 방법.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 신생물이 유방암 또는 결장 직장암 (colorectal cancer)인 방법.

**청구항 19**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 선택된 유기체의 검출 및 동정에 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 핵산 산물의 서열분석에 의해 상기 유기체를 검출 및 동정하는 방법.

**청구항 21**

제19항에 있어서, 상기 유기체가 박테리아, 바이러스, 진균류, 마이코플라스마 (mycoplasma) 및 기생충의 그룹 또는 그들의 조합으로부터 선택되는 방법.

**청구항 22**

제16항에 있어서, 용해 곡선 분석 (melt curve analysis)을 포함하는 방법.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 용해 곡선이 0.05 °C 내지 0.02 °C 범위의 해상도로 만들어지는 방법.

**청구항 24**

제22항에 있어서, 용해 곡선이 0.02 °C 미만의 해상도로 만들어지는 방법.

**청구항 25**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 증폭반응이 열 사이클링 기구 (thermal cycling apparatus)에서 자동적으로 진행되는 방법.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 열 사이클링 기구가 다중-웰 실시간 (multi-well real time) 열 사이클링 기구, 연속 유동 PCR (continuous flow PCR) 장치 또는 회전식 열 사이클링 기구 (rotary thermal cycling apparatus)인 방법.

**청구항 27**

삭제

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

삭제

**청구항 31**

삭제

**청구항 32**

삭제

**청구항 33**

삭제

**청구항 34**

삭제

**청구항 35**

삭제

**청구항 36**

삭제

**청구항 37**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 핵산의 증폭, 동정 및 정량분석 방법, 및 특히 진단, 법의학 및 연구 용도를 위한 복수의 유전자 또는 유전자 발현산물을 증폭하고 정량분석하거나 동정하는 개선된 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 소량의 분해된 핵산 시료로부터의 다중의 핵산 서열의 보다 더 정확한 증폭, 동정 및 정량분석에 관한 것이다.

[0002] 특히, 본 발명은 복수의 핵산 분자의 동시 증폭 및 정량분석에 관한 것으로서 이하 본 출원에 관련하여 기술하고자 한다. 그러나, 본 발명이 이러한 특정 분야의 용도에 한정되지 않음이 인식될 것이다.

**배경 기술**

[0003] 본 명세서 전반에 걸친 선행기술에 관한 모든 논의는 어떠한 경우에도 그러한 선행기술이 주지된 것이거나 당해 분야에서 공유의 상식의 일부임을 인정하는 것으로 간주되어서는 안 된다.

[0004] 유전자 발현 분석을 위한 공지 방법은 다수의 상이한 유전자를 대표하는 cDNA 분자 풀 (pool)로부터 단일 유전자의 발현산물을 대표하는 선택된 cDNA 서열을 증폭하기 위한 PCR 또는 네스티드 PCR (nested PCR)의 사용을 포함한다. 단일-유전자 PCR 반응에서 단일 유전자로부터의 유전자 발현산물은 통상 단일 주기의 PCR에서 한 쌍의 프라이머 (primer)를 사용하여 증폭된다. 통상의 네스티드 PCR 증폭반응에서는 매우 희귀한 단일 서열이 2개의 순차적 PCR 반응에 의해 증폭되며, 각각은 단일 네스티드 프라이머 조합을 사용하는 30-40 주기로 구성된다. 네스티드 PCR은 보통 희귀한 서열의 클론을 얻기 위해 사용되며, 유전자의 동정 또는 유전자 발현의 정량분석을 위한 것으로는 고려되지 않는다. PCR을 사용하여 유전자 발현 수준을 정량분석하기 위해서는, 각 증폭주기 후에 실시간으로 PCR 산물의 축적을 측정하는 재래식 정량적 실시간 PCR (qPCR)을 사용하여 통상적으로 관심의 대상인 각 PCR 산물의 양을 산정한다. 이는 본 명세서에 원용으로서 포함된 미국특허 제6,713,297호에 개시된 바와 같이, 통상적으로 삽입 염료 (intercalating dye), 마이너 그루브 결합 염료 (minor groove binding dye), 또는 빛을 가하면 리포터 (reporter)가 활성화되어 형광을 띄게 되고 유발된 형광을 통상 CCD 카메라 또는 광전자 증배관 (photomultiplier) 검출 시스템을 이용하여 검출하는 형광발생 탐침 (fluorogenic probe)과 같은 검출 가능한 리포터를 사용한다. 단일-유전자 분석 방법은 현재 일상적인 것이 된 반면에, 다중의 유전자 발현산물을 동시다중 PCR (multiplex PCR)의 동일한 PCR 반응 내에서 증폭해야 하는 경우에는 난관에 봉착하게 된다. 동시다중 증폭반응에서, 각각의 개별적인 유전자 발현산물은 PCR 과정에서 반응 구성요소에 대해 경쟁해야 하므로, PCR 반응 시작점에서 많은 카피 (copy) 수로 존재하는 고발현 유전자 산물이 필수적 반응 구성요소를 격리 시킴으로써 적은 카피 수로 존재하는 유전자 산물의 증폭을 사실상 방해한다. 이는 단지 적은 수로 존재하는 고발현 유전자를 의미할 수도 있는 증폭 유전자 산물의 풀을 만들어낸다. 이러한 산물의 분석은 복제 실험 간에 일어나는 많은 변이에 의해 더욱 복잡해짐으로써 유전자 발현의 정확한 정량분석을 매우 어렵게 한다. 프라이머 및 반응 구성요소의 최적화가 상기 문제점을 어느 정도 완화시키지만, 이는 통상적으로 대규모의 실험을 요하며 동시다중 반응에서 분석할 유전자의 수가 증가함에 따라 훨씬 더 어려워지고, 이로 인하여 광범위하게 최적화된 시스템에서 신뢰성 있는 분석이 가능한 유전자의 수는 통상 최대 4개이다. 유전자 발현 분석은 통상적으로 각각의 유전자 발현량이 산정될 것을 요하며, 이는 동시다중 PCR에서 더욱 복잡해진다.

[0005] 동시다중 PCR에 관한 현대적 시도

[0006] 상기 문제점에 대한 현대적 시도는, 유전자 발현산물에 결합하여 특이적 검출 가능 형광을 방출함으로써 각 유전자 발현산물을 개별적으로 검출하는 Taqman<sup>®</sup> 탐침과 같은 형광발생 검출 시스템의 사용을 포함한다 (Exner M. M., and Lewinski. M. A. (2002)). 라이트사이클러 (LightCycler) 및 ABI 프리즘 7700 (ABI PRISM 7700) 서열 검출 시스템을 사용하는 동시다중 실시간 PCR 반응의 감도는 DNA 폴리머라제의 농도에 종속적이다 (Molecular and Cellular Probes. 2002 Oct;16(5):351-7). 상기 탐침 및 그의 용도는 미국특허 제5,210,015호; 제5,487,972호; 제5,804,375호; 제5,994,056호; 제5,538,848호 및 제6,030,787호에 기술되어 있으며 본 명세서에 원용으로서 포함된다. 이는 상이한 과정에서 형광을 검출할 수 있는 다중 채널이 있는 실시간 열 사이클링 장비 (thermal cycling machine)를 필요로 한다. 추가로, Taqman<sup>®</sup> 탐침은 가격이 비싸고, 또한 탐침 결합을 위한 특이적 서열이 요구됨으로 인하여 분석 가능한 서열의 특정 영역이 제한될 수 있다.

[0007] 다른 형광발생 시도는, 본 명세서에 원용으로서 포함된 미국특허 제5,436,134호 및 제5,658,751호에 개시된 바

와 같이 임의의 유전자 발현산물로부터 증폭된 DNA에 삽입되었을 때 형광을 내는 SYBR-그린 염료 (SYBR-green dye)와 같은 일반적 검출 시스템의 사용을 포함한다. SYBR-그린은 가격이 저렴하고 우수한 형광발생 특성을 가졌지만, 각각의 유전자 산물에 대한 형광의 근원을 신뢰성 있게 결정하지 못하므로 동시다중 PCR에서의 유전자 발현 수준 산정에는 보통 적절하지 않다.

[0008] 검출 시스템으로서 형광발생 탐침 또는 SYBR-그린 염료의 사용 여부에 상관없이, 동시다중 PCR은 유전자 발현산물이 반응 구성요소에 대해 경쟁함으로 인해 다중의 유전자로부터 유전자 발현의 정확한 정량분석이 방해받는다 는 동일한 문제점을 여전히 안고 있다.

[0009] *고 처리량 시도 (High Throughput Approach)*

[0010] 동시다중 유전자 발현 측정에 대한 대안적 시도는 마이크로어레이 (microarrays)의 사용을 포함한다. 마이크로 어레이는 수천의 유전자 발현을 동시에 정량분석하기 위해 사용될 수 있다. 그러나 마이크로어레이는 통상 작업자의 고도 숙련, 다량의 시료 RNA 및 고가의 장비를 필요로 한다. 또한, 분석할 수 있는 유전자의 수가 방대한 반면에 유전자 발현의 정량분석 결과는 훨씬 부정확하여 종종 양성 오류 (false positives)를 야기한다.

[0011] 따라서 다중 유전자 발현의 정확한 정량분석이 요구되거나 특이적 핵산의 검출이 요구되거나 다중 핵산 산물의 생산이 요구되는 임의의 상황에 사용하기에 적당한 단순하고 저렴한 방법이 필요하다. 본 발명은 레이저 절제 현미경 (laser dissection microscopy) 시료, 단일 세포, 혈흔과 같은 극소량의 시료, 및 포르말린-고정된 파라핀-포매 (formalin-fixed paraffin-embedded) (FFPE) 절편 및 오래된 시료에서 채취된 것과 같이 부분적으로 단편화된 핵산을 포함하는 시료로부터 핵산을 증폭 및 검출하기에 특히 적합하다. 그러나, 본 발명의 방법은 대량의 시료 및 양질의 시료에 대해서도 동일하게 적용할 수 있다. 본 발명이 유용할 수 있는 상황의 예는 하기와 같은 것들을 포함하나 이에 한정되지는 않는다: 진단; 예후; 법의학; 환경 및 제품 시험 및 관찰; 생물학 무기 탐지; 연구 등.

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 선행 기술의 단점 중 적어도 하나의 극복 또는 완화, 또는 유용한 대안의 제공에 있다.

**발명의 상세한 설명**

[0013] **발명의 요약**

[0014] 본 발명은 핵산의 증폭 및 정량분석 방법 및 특히 진단, 법의학 및 연구 용도를 위한 복수의 유전자 발현산물을 증폭하고 정량분석하거나 동정하는 개선된 방법에 관한 것이다. 본 방법은 특히 소량의 출발 재료를 사용하여 다수의 유전자로부터 유전자 발현을 정량분석하거나 동정하기 위해 적용할 수 있으며, 또한 보관기록 (archival) 또는 법의학적 재료로부터 얻어지는 것과 같이 분해된 시료에도 이용할 수 있다. 본 발명의 방법이 게놈 DNA 또는 바이러스 DNA 와 같은 다른 근원으로부터의 핵산의 증폭에도 동일하게 적용할 수 있음을 당업자는 이해할 것이다. 본 발명은 2 라운드 (round)의 탠덤 증폭 프로토콜 (tandem amplification protocol)을 포함하며, 이는 복수의 선택된 핵산 서열을 증폭하는 1차 라운드 동시다중 증폭반응에 이어서 각 반응이 통상 선택된 핵산 서열 중 하나를 추가로 증폭하는 복수의 2차 라운드 증폭반응들을 포함한다.

[0015] 본 발명의 첫 번째 태양에 따라:

[0016] (a) 복수의 외부 프라이머 (outer primer) 쌍들을 포함하며 각 쌍이 선택된 핵산 서열에 특이적인 1차 라운드 동시다중 증폭반응에서 복수의 선택된 핵산 분자들을 증폭하고, 여기에서 앰플리콘 (amplicon) 간에 반응 구성 요소에 대한 심각한 경쟁이 일어나기 전의 시점까지 증폭반응이 진행되도록 하며;

[0017] (b) 선택된 핵산 분자들을 복수의 2차 라운드 증폭반응들에서 추가로 증폭시키며, 각각은 템플레이트 (template)로서 완결된 동시다중 반응물의 일부 및 적어도 한 쌍의 내부 프라이머 (inner primer)를 포함하고 각 쌍은 선택된 핵산 서열 중 하나에 대해 특이적임으로써, 각각의 2차 라운드 반응이 복수의 선택된 핵산 분자들의 서브셋 (subset)을 각각 추가로 증폭함을 특징으로 하여, 핵산 분자의 풀로부터 복수의 선택된 핵산 분자들을 증폭하는 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명의 두 번째 태양에 따라:

[0019] (a) 복수의 외부 프라이머 쌍들을 포함하며 각 쌍이 선택된 핵산 서열에 특이적인 1차 라운드 동시다중 증폭반응에서 복수의 선택된 핵산 분자들을 증폭하고, 여기에서 앰플리콘 간에 반응 구성요소에 대한 심각한 경쟁이

일어나기 전의 시점까지 증폭반응이 진행되도록 하며;

- [0020] (b) 선택된 핵산 분자들을 복수의 2차 라운드 증폭반응들에서 추가로 증폭시키며, 각각은 템플레이트로서 완결된 동시다중 반응물의 일부 및 적어도 한 쌍의 프라이머를 포함하고 각 쌍은 외부 프라이머 중의 하나 및 내부 프라이머를 포함하며 선택된 핵산 서열 중 하나에 대해 특이적임으로써, 각각의 2차 라운드 반응이 복수의 선택된 핵산 분자들의 서브셋 (subset)을 각각 추가로 증폭함을 특징으로 하여, 핵산 분자의 풀로부터 복수의 선택된 핵산 분자들을 증폭하는 방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 세 번째 태양에 따라:
- [0022] (a) 복수의 외부 프라이머 쌍들을 포함하며 각 쌍이 선택된 핵산 서열에 특이적인 1차 라운드 동시다중 증폭반응에서 복수의 선택된 핵산 분자들을 증폭하고, 여기에서 앰플리콘 간에 반응 구성요소에 대한 심각한 경쟁이 일어나기 전의 시점까지 증폭반응이 진행되도록 하며;
- [0023] (b) 선택된 핵산 분자들을 복수의 2차 라운드 증폭반응들에서 추가로 증폭시키며, 각각은 검출 가능한 리포터, 템플레이트로서 완결된 동시다중 반응물의 일부 및 적어도 한 쌍의 내부 프라이머를 포함하고 각 쌍은 선택된 핵산 서열 중 하나에 대해 특이적임으로써, 각각의 2차 라운드 반응이 복수의 선택된 핵산 분자들의 서브셋 (subset)을 각각 추가로 증폭하며;
- [0024] (c) 각각의 2차 라운드 증폭반응을 검출 가능한 리포터를 수단으로 관찰함으로써 각각의 선택된 서열의 선택된 핵산 분자의 수를 산정함을 특징으로 하여, 핵산 분자의 풀로부터 선택된 핵산 분자들의 수를 산정하는 방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 네 번째 태양에 따라:
- [0026] (a) 복수의 외부 프라이머 쌍들을 포함하며 각 쌍이 선택된 핵산 서열에 특이적인 1차 라운드 동시다중 증폭반응에서 복수의 선택된 핵산 분자들을 증폭하고, 여기에서 앰플리콘 간에 반응 구성요소에 대한 심각한 경쟁이 일어나기 전의 시점까지 증폭반응이 진행되도록 하며;
- [0027] (b) 선택된 핵산 분자들을 복수의 2차 라운드 증폭반응들에서 추가로 증폭시키며, 각각은 검출 가능한 리포터, 템플레이트로서 완결된 동시다중 반응물의 일부 및 적어도 한 쌍의 프라이머를 포함하고 각 쌍은 외부 프라이머 중의 하나 및 내부 프라이머를 포함하며 선택된 핵산 서열 중 하나에 대해 특이적임으로써, 각각의 2차 라운드 반응이 복수의 선택된 핵산 분자들의 서브셋 (subset)을 각각 추가로 증폭하며;
- [0028] (c) 각각의 2차 라운드 증폭반응을 검출 가능한 리포터를 수단으로 관찰함으로써 각각의 선택된 서열의 선택된 핵산 분자의 수를 산정함을 특징으로 하여, 핵산 분자의 풀로부터 선택된 핵산 분자들의 수를 산정하는 방법을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 한 구체예에서, 동시다중 텐덤-폴리머라제 연쇄반응 (Multiplex Tandem-Polymerase Chain Reaction) (MT-PCR) 방법의 완전한 네스티드 형태를 첫 번째 및 세 번째 태양에 따라 사용함으로써, 각각의 선택된 핵산 분자는 1차 라운드의 증폭에서는 한 쌍의 외부 프라이머를 사용하고 2차 라운드의 증폭에서는 2개의 내부 프라이머를 사용하여 증폭된다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 헤미-네스티드 MT-PCR (hemi-nested MT-PCR) 방법을 두 번째 및 네 번째 태양에 따라 사용함으로써, 각각의 선택된 핵산 분자는 1차 라운드의 증폭에서 한 쌍의 외부 프라이머를 사용하여 증폭되고, 선택된 핵산 분자 서열은 1차 라운드 증폭에서 사용된 외부 프라이머 중의 하나와 쌍을 이루는 1개의 내부 프라이머를 포함하는 한 쌍의 프라이머를 사용하여 2차 라운드 증폭에서 추가로 증폭된다.
- [0031] 바람직하게는, 형광발생 리포터는 SYBR-그린 또는 SYTO-9 염료이다.
- [0032] 다른 형광발생 염료들 또한 고려할 수 있음을 당업자는 이해할 것이다.
- [0033] 어떤 구체예에서, 형광발생 리포터는 형광발생 탐침이다.
- [0034] 어떤 구체예에서, 2차 라운드 증폭반응은 복수의 프라이머 쌍들 및 복수의 형광 탐침을 포함하여, 선택된 각 서열의 복수의 선택된 핵산 분자들이 선택된 핵산 서열에 대해 각각 특이적인 형광 탐침에 의해 증폭되고 정량분석되도록 한다.
- [0035] 2차 라운드 증폭반응이 동시에 또는 순차적으로 수행될 수 있음을 당업자는 인식할 것이다.

- [0036] 바람직하게는, 핵산 분자는 DNA 분자를 포함한다.
- [0037] 바람직하게는, 2차 라운드 증폭반응에 포함된 프라이머는 1차 라운드 증폭반응에 포함된 외부 프라이머 중의 적어도 하나에 비하여 높은 Tm을 가짐으로써, 2차 라운드 증폭반응의 올리고뉴클레오티드 프라이밍 (oligonucleotide priming)이 높은 Tm을 가진 프라이머를 선호하는 쪽으로 실질적으로 편향되도록 한다.
- [0038] 어떤 구체예에서, 외부 프라이머 중 적어도 하나는 UTP 뉴클레오티드를 포함함으로써, 프라이머가 UNG 효소에 의해 분해될 수 있도록 하며 1차 라운드 증폭 종료시에 외부 프라이머를 UNG 효소 분해로 제거하여 1차 라운드 프라이머에 의한 2차 라운드 증폭반응의 오염을 실질적으로 방지한다.
- [0039] 바람직하게는, 선택된 각 핵산 서열의 특이적 증폭을 제공하는 한도 내에서 앰플리콘 간에 반응 구성요소에 대한 심각한 경쟁이 일어나기 전의 시점까지 이들을 증폭시키는 증폭 과정에서 앰플리콘 간의 반응 구성요소에 대한 임의의 경쟁의 효과를 최소화하기 위하여, 사용되는 동시다중 증폭 주기의 수를 반응 개시점에서 사용된 핵산의 양을 고려하여 선택한다. 예를 들어, 약 50 ng 내지 약 500 ng의 핵산이 사용되는 경우, 약 10 주기의 동시다중 증폭이 바람직하다. 약 0.5 내지 약 50 ng의 핵산이 사용되는 경우, 약 15 주기의 동시다중 증폭이 바람직하다. 약 0.01 내지 약 0.5 ng의 핵산이 사용되는 경우, 약 20 주기의 동시다중 증폭이 바람직하다. 투입되는 핵산의 양이 적을수록 더 많은 수의 동시다중 증폭 주기가 사용될 수 있음은, 본 명세서에 제공되는 교시로부터 당업자에게 자명할 것이다.
- [0040] 바람직하게는, 1차 라운드 동시다중 증폭반응은 약 1 내지 약 30 주기 동안 진행되도록 한다. 더욱 바람직하게는, 1차 라운드 동시다중 증폭반응은 약 5 내지 약 25 주기 동안 진행되도록 하며, 더욱 바람직하게는 1차 라운드 동시다중 증폭반응은 약 5 내지 20 주기 동안 진행되도록 하고, 가장 바람직하게는 1차 라운드 동시다중 증폭반응은 약 10 내지 20 주기 동안 진행되도록 한다.
- [0041] 표준 동시다중 PCR 반응은 통상 한정된 수의 상이한 서열들 (예를 들어 4개 서열들) 만을 증폭, 정량분석 및 동정할 수 있는 반면에, 놀랍게도 본 발명의 방법은 150 개를 초과하는 선택된 서열들을 증폭, 정량분석 및/또는 동정할 수 있음이 발견되었다. 바람직하게는, 본 발명의 동시다중 증폭반응은 4 개를 초과하는 선택된 핵산 분자들을 증폭한다. 더욱 바람직하게는 동시다중 증폭반응은 약 4 내지 150 개의 선택된 핵산 분자들을 증폭한다. 더욱 바람직하게는, 동시다중 증폭반응은 약 10 내지 150 개의 선택된 핵산 분자들을 증폭하며, 가장 바람직하게는 동시다중 증폭반응은 약 20 내지 100 개의 선택된 핵산 분자들을 증폭한다.
- [0042] 주어진 시료 및 일군의 프라이머에 대하여 1차 라운드 동시다중 증폭반응에서 효과적으로 증폭될 수 있는 선택된 핵산 분자의 최대수는 각각의 경우에 요구되는 증폭 수준 및 2차 라운드 증폭에서 얻어지는 정량분석 결과의 정확도를 고려하여 결정해야 함을, 당업자는 이해할 것이다.
- [0043] 바람직하게는, 본 방법은 다형성 (polymorphisms), 돌연변이, 삽입 (insertions) 및 결실 (deletions)의 검출 방법에 사용된다.
- [0044] 한 구체예에서, 다형성, 돌연변이, SNP, 메틸화 (비설파이트 처리 후), 삽입 및 결실과 같은 핵산 변이체 (variant)를 검출하기 위하여 2차 라운드 증폭에 형광발생 탐침이 사용된다.
- [0045] 어떤 구체예에서, 본 방법은 질환 (disease) 및 장애 (disorder)의 진단에 사용된다.
- [0046] 어떤 구체예에서, 본 방법은 신생물의 진단에 사용된다.
- [0047] 어떤 구체예에서, 신생물은 유방암이다.
- [0048] 어떤 구체예에서, 신생물은 결장 직장암 (colorectal cancer)이다.
- [0049] 임의의 주어진 핵산 서열의 증폭 및/또는 정량분석에 의해 탐지될 수 있는 임의의 질환 또는 장애에 대한 진단적 시험에 있어서 본 발명의 방법이 유용할 것임을 당업자는 인식할 것이다.
- [0050] 어떤 구체예에서, 본 방법은 선택된 유기체의 검출 및 동정에 있어서 유용하다.
- [0051] 어떤 구체예에서, 유기체는 고해상도 용해 분석 (high resolution melt analysis)에 의해 검출 및 동정된다.
- [0052] 바람직하게는, 유기체는 박테리아, 바이러스, 진균류, 마이코플라스마 (mycoplasma) 및 기생충의 그룹으로부터 선택된다.
- [0053] 바람직하게는, 본 방법은 고해상도 용해 곡선 분석 (high resolution melt curve analysis)을 포함하며 용해

곡선 (melting curve)은 바람직하게는 약 0.05 °C 내지 약 0.02 °C 범위의 해상도 및 더욱 바람직하게는 0.02 °C 미만의 해상도에서 만들어진다.

[0054] 본 발명의 방법이 임의의 증폭 가능한 유전 물질에 적용될 수 있으며, 여기에서 상기 물질이 임의의 유기체로부터 유래될 수 있음을, 당업자는 이해할 것이다.

[0055] 바람직하게는 증폭반응은 열 사이클링 기구 (thermal cycling apparatus)에서 자동적으로 진행된다.

[0056] 바람직하게는 열 사이클링 기구는 다중-웰 실시간 (multi-well real time) 열 사이클링 기구이다.

[0057] 어떤 구체예에서, 열 사이클링 기구는 연속 유동 PCR (continuous flow PCR) 장치이다.

[0058] 어떤 구체예에서, 열 사이클링 기구는 회전식 열 사이클링 기구 (rotary thermal cycling apparatus)이다.

[0059] 본 발명의 다섯 번째 태양에 따라:

[0060] (i) 하나 이상의 선택된 핵산 서열을 하나 이상의 검출 가능한 리포터와 혼합하고;

[0061] (ii) 하나 이상의 검출 가능한 리포터에 의해 발생하는 신호를 측정함으로써 용해 곡선을 만들고;

[0062] (iii) 용해 곡선으로부터 하나 이상의 선택된 핵산 서열을 동정 및/또는 정량분석하는 단계를 포함하는, 적어도 하나의 선택된 핵산 서열을 동정 및/또는 정량분석하는 방법을 제공한다.

[0063] 바람직하게는, 용해 곡선은 약 0.05 °C 내지 약 0.02 °C 범위의 해상도 및 더욱 바람직하게는 0.02 °C 미만의 해상도에서 만들어진다.

[0064] **바람직한 구체예의 설명**

[0065] 상대적으로 소량인 핵산 시료로부터 대 그룹의 유전자 발현을 짧은 시간에 저렴한 비용으로 정확하게 측정하기 위하여 동시다중 텐덤 폴리머라제 연쇄반응 (MT-PCR)이라 칭하는 2 라운드 텐덤 PCR 프로토콜을 설계하였다.

[0066] 다수의 유전자 발현 산물들이 반응 구성요소에 대해 경쟁하는 동시다중 PCR의 고유한 문제점은, 동시다중 증폭이 미리 선택된 주기 수에 한정되어 앰플리콘 간의 경쟁이 최소화되는 본 발명에 의해 극복된다. 2-라운드 증폭을 사용함으로써 감도를 개선하여, 이전까지는 단일 유전자의 발현산물과 같이 단일의 선택된 서열로부터의 산물을 정량분석할 수 있을 뿐인 양의 시료를 사용하여 통상 일군의 유전자로부터의 발현산물인 모든 선택된 핵산 서열들이 측정될 수 있도록 한다. 2차 라운드 핵산 증폭이 급속 사이클링 변수 (rapid cycling parameter)를 사용할 수 있으므로 전체 진행시간을 단축할 수 있다.

[0067] 바람직한 구체예에서, 이전까지는 동시다중 반응으로부터의 다중 서열을 검출하기 위해 요구되었던 고가의 표지된 올리고뉴클레오티드 탐침을 사용하는 대신에 SYBR-그린 DNA 측정을 사용함으로써 비용이 절감된다.

[0068] 또 다른 구체예에서, 2차 라운드 증폭반응에서 단일의 선택된 핵산 서열 또는 복수의 선택된 핵산 서열의 증폭 산물을 검출 및 정량분석하기 위하여 Taqman<sup>®</sup> 탐침과 같은 형광발생 탐침도 사용된다.

[0069] 임상 시료로부터 유전자 발현 수준을 분석하기 위하여, 적절한 조직, 즉 통상 포름알데히드에 보존된 생검 시료, 혈액 시료 또는 다른 조직으로부터 먼저 RNA를 추출한다. 그 다음에는 RNA 시료로부터 역전사에 의해 cDNA를 제조하며, 이는 대량의 발현 서열로부터 cDNA를 제조하기 위한 무작위 핵사머 (무작위 프라이밍을 위한)를 이용하거나, 더욱 바람직하게는 유전자-특이적 방법에 의해 실행된다.

[0070] 바람직한 구체예에서 역전사 반응 (RT 반응)은 선택된 관심 대상 핵산에 특이적인 각 쌍의 외부 프라이머를 사용하는 다중-유전자-특이적 프라이밍 (multi-gene-specific priming) 방법을 이용하여 수행된다. 상기 동일한 외부 프라이머는 이후에 1차 라운드 동시다중 증폭에서 관심 대상인 특이적 유전자 발현산물을 증폭하기 위해 사용되며, 그 방법은 본 명세서에 기술된다. 동일한 프라이머를 역전사 및 1차 라운드 증폭에 사용함으로써 반응 혼합물에 사용되는 올리고뉴클레오티드의 수를 감소시킨다. 유전자 특이적 프라이밍 또한 RNA 분해와 관련된 문제점들을 감소시킴으로써 여러 해 동안 보관되어온 포름알데히드-고정된 파라핀-포매 (FFPE) 표본으로부터 추출된 RNA에 MT-PCR을 사용할 수 있도록 한다. RT 반응은 약 1 분간 수행되며, 이는 이후의 증폭을 위하여 요구되는 cDNA를 생성시키기에 충분하다. 동시다중 증폭 앰플리콘은 통상 약 150 bp 미만의 길이이며, 효율적인 역전사 및 이후의 증폭을 용이하게 한다. 소량의 RT 효소를 반응에 사용함에 의해서도 개선된 결과가 얻어지며, 바람직한 구체예에서 약 1 유니트/ $\mu$ l의 MMLV 또는 슈퍼스크립트 III (superscript III) 효소가 RT 반

응에 사용된다.

- [0071] 역전사 효소는 PCR 반응의 저해제이며 동시다중 증폭 전에 이 효소를 제거 또는 변성시킴이 유용하다. 바람직한 구체예에서, 역전사 효소는 동시다중 증폭 단계 전에 약 95 °C에서의 가열 단계에 의해 변성된다. 이는 또한 1차 라운드 동시다중 증폭을 위한 준비로서 cDNA를 변성시키는 역할도 한다.
- [0072] 바람직하게는, 1차 라운드 반응에서 효소를 안정화시키기 위하여 담체 단백질 (carrier protein)을 첨가한다. BSA, 크리스탈린 및 다른 단백질 또는 안정제들도 사용 가능한 적당한 대안이지만, 상기 목적을 위해서는 저렴한 비용과 약 95 °C에서의 안정성으로 인하여 젤라틴이 만족스럽다.
- [0073] 1차 라운드 동시다중 증폭은 통상 동시다중 증폭에서 다수의 발현 유전자 또는 서열 산물의 공-증폭 (co-amplification)을 허용하기 위해 요구되는 구성요소 및 외부 프라이머를 포함한다.
- [0074] 사용할 장비를 고려하여 반응 체제를 선택할 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다. 예를 들어, 72 증폭반응의 운영에 사용할 수 있는 "진-디스크 (Gene-Disc)" (Corbett Research, Sydney, Australia)를 사용할 경우에, 이러한 디스크 하나를 사용하여 약 24 유전자의 발현산물을 삼중실험으로, 또는 72 유전자를 개별적으로 정량분석할 수 있으며, 또는 대안으로서 약 32 유전자 발현산물을 96-웰 플레이트 체제를 사용하여 삼중실험으로 정량분석할 수 있고, 또는 요구되는 통계적 유효성을 고려하여 그 수를 선택할 수 있다.
- [0075] 하기의 체제는 코베트 리서치 (Corbett Research) "진-디스크"의 사용에 관련된 것이나, 편의에 따라 384-웰 플레이트, 96-웰 플레이트 또는 연속 유동 장치와 같은 임의의 적당한 다른 체제가 사용될 수 있음을 당업자는 이해할 것이다.
- [0076] 바람직하게는, 각각의 1차 라운드 동시다중 증폭에서, 약 72 쌍의 외부 프라이머가 약 72 서열을 동시 증폭하기 위해 사용되며, 각각은 다른 발현 서열 또는 유전자의 발현산물을 대표한다.
- [0077] 바람직하게는, 완전-네스티드 MT-PCR의 경우에는 약 250 bp 이하, 또는 헤미-네스티드 MT-PCR의 경우에는 약 150 bp 이하의 DNA 앰플리콘으로 구성되는 DNA 단편들을 각 유전자 발현산물로부터 증폭하도록 외부 프라이머가 설계된다.
- [0078] 이보다 더 긴 길이의 선택된 핵산 서열에 대해서도 표준 실험기술을 이용하여 본 발명을 적용할 수 있으며, 여기에서 RT 반응에 소요되는 시간의 길이 및 증폭 중에 사용되는 연장 시간과 같은 조건의 변경 또한 적당한 cDNA 합성 및 증폭을 달성하기 위해 증가시킬 수 있음을, 당업자는 인식할 것이다.
- [0079] 동시다중 증폭 중의 앰플리콘 간의 반응 구성요소에 대한 경쟁 문제를 극복하기 위하여, 사용된 RNA 투입 수준에 따라 상대적으로 적은 수의 주기로 증폭반응을 운영한다. 자동화된 기기에서는 동시다중 증폭반응에서의 총 DNA 합성 수준을 SYBR-그린 염료와 같은 삽입 형광발생 염료로 측정하여 상기 시점을 초과하지 않음을 확인한다. 1차 라운드 동시다중 증폭에서 앰플리콘의 증폭이, 더 이상 추가의 증폭이 이루어지지 않는 주기 수를 넘을 때까지 반응을 진행시킬 경우 생산될 폴리뉴클레오티드 총량의 5%를 초과하여 생산하지 않도록, 선택된 핵산의 상대적 과잉도 (abundance) 및 이용 가능한 시료의 양을 고려하여 1차 라운드 동시다중 증폭에 사용되는 주기 수를 최적화할 수 있다. 이러한 방법 변형에 의하여, 동시다중 증폭 중에 그들의 각 앰플리콘 간에 반응 구성요소에 대한 심각한 경쟁이 일어나는 수준까지 선택된 핵산 서열 (예를 들어 유전자 발현 산물)의 풀이 증폭되는 것이 방지된다. 합성된 핵산 총량이 아직 상대적으로 적으므로, 항상 과량의 시약이 존재하며, 따라서 동시다중 증폭반응 내에서 앰플리콘 간의 경쟁이 실질적으로 최소화된다.
- [0080] 동시다중 증폭의 주기 수는 검출반응의 목적하는 감도에 따라 선택된다. 바람직하게는, 약 50 - 500 ng의 RNA 시료로부터 유전자 발현을 검출하기 위하여 약 10 주기의 동시다중 증폭이 사용된다. 바람직하게는, 약 0.5 내지 50 ng의 RNA로부터 유전자 발현을 검출하기 위하여 약 15 주기가 사용되며, 약 0.01 내지 0.5 ng의 RNA로부터의 검출을 위하여 약 20 주기가 사용된다. 더 적은 양의 RNA가 투입될 경우 더 많은 수의 동시다중 증폭 주기가 사용될 수 있음을 당업자는 인식할 것이다.
- [0081] 실제로, 동일한 타입 및 양의 시료를 사용하는 경우에, 동일한 수의 동시다중 증폭 주기를 사용하는 MT-PCR 에세이 간의 유전자 발현을 비교한다.
- [0082] 바람직한 구체예에서 이러한 1차 라운드 증폭을 10 ng의 투입 RNA 또는 DNA와 함께 15 주기 운영하며 앰플리콘 간의 경쟁 가능성을 추가로 감소시키기 위하여 고농도의 뉴클레오티드 트리포스페이트 (약 0.3 mM)를 반응 혼합물에 포함시킨다. 1차 라운드 동시다중 증폭에서의 외부 프라이머 농도 또한 약 0.1 μM로 감소시킴으로써, 반응 산물이 2차 라운드 증폭반응으로 이전될 때 이러한 프라이머의 농도를 추가로 감소시켜 이러한 프라이머에

의한 2차 라운드 증폭반응에의 영향을 감소시켰다.

- [0083] 이로써 동시다중 증폭에서의 앰플리콘 간의 심각한 경쟁 문제가 완화되지만, 상기와 같이 적은 수의 증폭 주기를 사용하여 얻어진 증폭은 발현 핵산 서열의 정확한 검출 또는 정량분석을 위한 충분한 증폭을 제공하지 못하며 완결된 동시다중 증폭반응 혼합물은 아직 다수의 발현 핵산 서열로부터 유래된 증폭산물의 풀을 포함한다. 독립적인 2차 라운드 증폭반응에서 상기 풀로부터 특이적인 선택된 서열들을 추가로 증폭함으로써 각각의 유전자 또는 발현 서열로부터의 증폭산물을 실질적으로 개별적 토대에서 분석하기에 충분할 만큼 증폭되도록 하여 핵산 서열의 원래 풀로부터 각각의 선택된 핵산서열을 정확하게 검출 및 정량분석한다.
- [0084] 2차 라운드 PCR에 사용되는 프라이머 및 Taq 폴리머라제의 양을 줄임으로써 프라이머 이량체의 형성과 같은 비-특이적 산물의 형성 가능성이 추가로 감소된다. 어떤 구체예에서, 각 20  $\mu$ l의 2차 라운드 증폭반응에 대해 약 0.5 유니트의 Taq를 사용하며 프라이머 농도는 약 0.2  $\mu$ M로 감소시킨다. 바람직하게는, 이러한 조건 하에서 GC가 많은 앰플리콘의 증폭을 촉진하기 위하여 약 2% DMSO가 첨가된다.
- [0085] 바람직한 구체예에서, 미약하게 발현되는 유전자로부터 유전자 발현산물의 정확한 정량분석을 위해서는 통상 약 35 주기의 2차 시기 증폭으로 충분하다. 1차 라운드 동시다중 증폭반응 전에 상이한 양의 출발 재료로부터 증폭된 핵산의 정량분석을 위하여 1차 및 2차 라운드 증폭에서의 주기 수 또한 변경될 수 있으며, 여기에서 사용된 출발 재료의 양이 적을수록 더 많은 1차 및 2차 라운드 증폭 주기 수가 통상적으로 요구됨을, 당업자는 인식할 것이다.
- [0086] 한 구체예에서, 완결된 1차 라운드 동시다중 증폭반응으로부터 한 분획을 취하여, 각각 개별적인 2차 라운드 증폭반응 혼합물을 포함하는 몇 개의 독립적인 시험관에 첨가한다. 2차 라운드 증폭반응 혼합물에 첨가할 때 분획이 적당 수준으로 희석되도록 하기 위하여, 2차 라운드 반응 혼합물에 첨가하기 전에 상기 분획을 희석하거나 소량의 1차 라운드 산물을 이전할 수 있다.
- [0087] 바람직하게는, 각각의 2차 라운드 반응 시험관에 첨가하기 전에 1차 라운드 동시다중 증폭산물의 25 $\times$  희석을 실시하며, 여기에서 분획이 2차 라운드 증폭반응내에서 희석될 때 약 100 $\times$  의 수준으로 추가 희석이 일어난다. 희석 수준은 변경될 수 있으나, 이는 통상적으로 1차 라운드 외부 프라이머의 잔류분이 2차 라운드 증폭에서 각각의 선택된 핵산 서열의 정량분석 정확도에 영향을 미침을 방지하기에 충분할 만큼 높은 비율이어야 함을, 당업자는 인식할 것이다.
- [0088] 상기 희석 단계는 1차 라운드 동시다중 증폭반응으로부터 2차 라운드 증폭으로 건너가는 1차 라운드 외부 프라이머의 양이 미미함을 보장함으로써, 2차 라운드 증폭에서의 추가 프라이밍이 2차 라운드 프라이머에 의해 실질적으로 주도되어, 선택된 2차 라운드 프라이머에 의해 프라이밍 되는 선택된 분자만이 실질적으로 증폭되도록 한다.
- [0089] 바람직하게는, 각각의 개별적인 2차 라운드 증폭반응은 한 쌍의 내부 프라이머를 포함하며, 이는 1차 라운드 동시다중 증폭에서 증폭되는 선택된 유전자 또는 발현 서열 중 하나의 앰플리콘 중의 하나 안에 있는 부분영역 (subregion)에 상보적이도록 선택된다. 각 쌍의 내부 프라이머는 더 짧은 앰플리콘을 증폭하며 바람직한 구체예에서 이러한 짧은 앰플리콘은 약 70-90 bp 이하이다.
- [0090] 다른 구체예에서, 헤미-네스티드 MT-PCR에서 선택된 핵산 서열을 추가로 증폭하기 위하여 1차 라운드 외부 프라이머 중 하나의 추가적 양을 상응하는 내부 프라이머 중 하나와 조합하여 2차 라운드 증폭반응에 첨가하며, 여기에서 상기 앰플리콘은 바람직하게는 약 150 bp 이하이다.
- [0091] 따라서 대부분의 증폭이 일어나는 2차 라운드 증폭에서 관심의 대상인 각 유전자 또는 발현 서열에 대한 증폭반응을 분리함으로써, 각 앰플리콘이 그의 추가 분석을 용이하게 하는 독립적인 상태에서 다른 서열들과의 경쟁 없이 증폭된다.
- [0092] 바람직한 구체예에서, 2차 라운드 프라이머를 동결건조 형태로 2차 라운드 PCR 반응 용기에 함유시킴으로써 진행 시간을 단축한다. 적당한 반응용기의 예는 "진-디스크" (Corbett Research), 96 웰 PCR 플레이트 또는 384-웰 PCR 플레이트 (Applied Biosystems, USA)를 포함한다. 1차 라운드 증폭 산물/반응 구성요소 혼합물을 2차 라운드 증폭에 앞서 반응 용기에 첨가한다.
- [0093] 바람직하게는, 오류 프라이밍의 발생을 줄이고 진행 시간을 단축시키기 위하여 고속 사이클링 조건 (fast cycling conditions)을 사용하여 2차 라운드 증폭반응을 운영한다.
- [0094] 본 발명의 한 구체예에서, 편의상 1차 시기 동시다중 증폭은 72-웰 "진-디스크" 체제에 기초하여 약 36 유전자

를 위한 외부 프라이머를 포함함으로써, 약 10 ng의 총 RNA로부터 역전사된 cDNA를 사용하는 이중실험으로 각각의 증폭을 실행하도록 한다. 1차 라운드 증폭반응은 약 2% DMSO 존재 하에 각각 약 0.1 μM의 농도로 외부 프라이머들을 포함한다. 약 10 증폭 주기의 1차 라운드의 종료점에서 반응 산물을 약 25× 희석하고, 이렇게 희석된 산물 약 5 μl를 2차 라운드 증폭에 도입한다. 2차 라운드 증폭에서는, 관심의 대상인 유전자가 템플레이트에 이미 풍부해졌으므로, 고속 사이클링을 사용한다. 추가로 내부 프라이머들은 동시다중 증폭으로부터 생산된 선택된 앰플리콘 내에 결합하도록 설계된다. 이러한 내부 프라이머는 약 70-90 bp의 짧은 앰플리콘의 증폭을 가능하게 하여 2차 라운드 증폭에 짧은 연장 시간이 사용되도록 한다. 통상적으로 2차 라운드 증폭 사이클링 조건은 95 °C에서 1 s, 60 °C에서 10 s 및 72 °C에서 10 s이다.

[0095] 1차 라운드 외부 프라이머의 추가의 쌍들이 포함됨으로 인하여 2차 라운드 증폭에서 원치 않는 추가의 산물이 야기되거나 2차 라운드 동안에 선택된 앰플리콘의 정량분석 정확도가 손상되지 않는 한도 내에서, 1차 라운드 동시다중 반응에서 공-증폭할 수 있는 서열의 수가 변경될 수 있음을, 당업자는 인식할 것이다.

[0096] 2차 라운드 증폭에 도입된 반응 산물에는 선택된 관심 대상 핵산 서열이 풍부하므로, 2차 시기는 고속 사이클링 조건을 사용할 수 있고 제한된 농도의 프라이머 및 효소를 함유하며, 이는 2차 라운드 증폭에서 고유하고 정확한 앰플리콘 산물의 형성을 이끌어낸다. 그 결과로서, 분석을 복잡하게 하거나 방해하는 비-특이적 DNA 분자 또는 프라이머 이량체에 의한 오염이 실질적으로 없는 2차 라운드 증폭산물이 얻어진다.

[0097] 2차 라운드 증폭에 사용되는 반응 혼합물은 바람직하게는 검출 가능한 리포터 구성요소, 예를 들어 형광 염료 또는 형광발색단 (fluorophore)-함유 탐침, 예를 들어 Taqman<sup>®</sup> 탐침을 포함하며, 이러한 탐침을 사용하기 위해서는 특이적 어닐링 (annealing) 온도가 요구됨을 당업자는 인식할 것이다.

[0098] 바람직한 구체예에서, 리포터 구성요소는 증폭된 DNA의 존재에 대해 비-특이적 방법으로 반응하여 형광을 발생하는 SYBR-그린 염료이며, 여기에서 형광의 수준은 2차 라운드 증폭반응 내에 존재하는 증폭된 DNA의 양에 비례한다. 이러한 형광 발생을 관찰하고 각 반응 내에 존재하는 발현 서열 또는 유전자 산물의 양을 정량분석하기 위하여, 2차 라운드 증폭반응은 바람직하게는 실시간 PCR 기기 안에서 관찰된다.

[0099] 다른 구체예에서, 2차 라운드 증폭반응은 복수의 선택된 핵산 서열에 대한 프라이머를 포함할 수 있으며, 여기에서 선택된 핵산 서열의 검출 및 정량분석은 Taqman<sup>®</sup> 탐침과 같은 형광발생 탐침 또는 다른 적당한 표지된 올리고뉴클레오티드 탐침을 사용하여 실행된다.

[0100] 추가의 구체예에서, 본 발명의 방법은 다양한 형질 (예를 들어 포유류에서의 연구대상 형질 및 질환소질)과 관련된 특이적 서열, SNP, 메틸화 (비설파이트 반응 후), 유전적 장애 등을 검출하기 위한 DNA 분석에 적용된다.

[0101] 본 발명은 소량 시료의 분석이 가능하므로 본 방법이 생물학-무기 탐지를 포함하여 법의학적 분석 및 식품, 조직, 물, 토양 대기의 기생충, 바이러스, 진균류, 박테리아, 및 마이코플라스마에 의한 오염의 탐지 등에 있어서 유용하나 이에 한정되지 않음을, 당업자는 인식할 것이다.

[0102] 또 다른 구체예에서, PCR 전의 핵산 처리 및 PCR 반응의 준비는 CAS1200 로봇 (Corbett Research), MultiPROBE<sup>®</sup> II 핵산 워크스테이션 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) 및 epMotion<sup>™</sup> 5075 워크스테이션 (Eppendorf<sup>®</sup>)과 같은 적당한 기구 또는 당업계에 주지된 다른 기구를 이용하여 자동화된다.

[0103] 바람직하게는, 원용으로서 본 명세서에 포함된 미국특허 제4,683,202호, 제4,683,195호 및 제4,965,188호에 기술된 바와 같이, 핵산 증폭 시스템은 PCR 시스템이다.

[0104] 바람직하게는, 핵산의 증폭, 검출 및 정량분석은 자동화된 정량분석 PCR 열 사이클링 기구, 예를 들어 로터 진 RG6000 (Rotor Gene RG6000) (Corbett Research), 어플라이드 바이오시스템즈 7900HT (Applied Biosystems 7900HT) 또는 다른 적당한 기기에서 반응을 운영 및 관찰함으로써 이루어지며, 이러한 예는 본 명세서에 원용으로서 포함된 유럽특허 제1157744호 및 미국특허 제6,713,297호에 개시되어 있다.

[0105] 바람직하게는, 유전자 발현 측정은 동일한 MT-PCR 회분 (batch)에서 실행된 비교 유전자 (comparator gene)와 대비하여 표현하며 실질적으로 유사한 조건 하에 실행된 유전자 발현 측정과만 비교한다.

[0106] 다른 구체예에서, 증폭반응은 리가아제 연쇄반응 (ligase chain reaction), 자립적 서열 복제 (self-sustaining sequence replication), 연쇄 환형 증폭(rolling circle amplification), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification), 등온 DNA 증폭 (isothermal DNA amplification) 등일 수 있다.

- [0107] 본 발명의 방법이, 포유류 (인간을 포함); 조류; 어류; 식물; 파충류; 절지동물; 복족류; 박테리아; 바이러스; 진균류 및 마이코플라스마를 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 생존 세포 또는 유기체에 적용될 수 있음을, 당업자는 인식할 것이다.
- [0108] 본 발명의 방법이, 약 0.01 ng의 RNA 가 이용 가능한 단일 포유류 세포 및 약 10 ng의 RNA가 얻어지는 단일 FFPE 조직 절편과 같은 시료로부터의 선택된 핵산의 수준을 검출하기 위해 사용될 수 있음도, 당업자는 인식할 것이다.
- [0109] 바람직하게는, 증폭반응은 다중-웰 실시간 열 사이클러 (cycler) 또는 연속 유동 PCR 장치에서 유체공학 로봇에 의해 자동적으로 진행된다.
- [0110] 또 다른 구체예에서, 2차 라운드 증폭은 외부 프라이머에 비하여 더 높은 온도에서 어닐링 되는 (더 높은 T<sub>m</sub>) 내부 프라이머를 포함함으로써, 2차 라운드 증폭의 어닐링 단계가 더 높은 온도에서 운영되도록 하여, 내부 프라이머를 사용하는 2차 라운드 증폭을 특이적으로 프라이밍함에 의해 2차 라운드 증폭반응 중에 외부 프라이머에 의한 프라이밍을 실질적으로 방지한다.
- [0111] 추가의 구체예에서, 하나 이상의 UTP 뉴클레오티드를 하나 이상의 외부 프라이머 내에 혼입시킴으로써 이러한 프라이머들이 UNG 효소에 의해 분해될 수 있도록 하며, 이로 인하여 1차 라운드 증폭의 종료시에 외부 프라이머가 제거될 수 있으므로 1차 라운드 프라이머에 의한 2차 라운드 증폭반응의 오염을 실질적으로 방지한다.
- [0112] 또 다른 구체예에서, 본 방법은 백혈병의 형태 등과 함께 양성 및 악성 양자 모두의 다양한 고형 종양으로부터 선택되는 신생물의 진단과 같은 진단 방법에 사용된다.
- [0113] 기술된 핵산 분자는 RNA, DNA 및 cDNA 분자를 포함하나, 증폭이 가능한 관련 변이체들 또한 고려됨이 이해되어야 한다.
- [0114] 올리고뉴클레오티드 탐침 내에 혼입될 수 있는 형광성 부위의 예는 하기의 예들을 포함하나 이에 한정되지는 않는다: 카복시-X-로다민, 플루오레신, 6-테트라메틸로다민-5(6)-카복사미드, BODIPY 493/503<sup>TM</sup>, BODIPY-F1-X<sup>TM</sup>, (4,6-디클로로트리아지닐)아미노플루오레신, 6-카복시플루오레신, 6-((5-디메틸아미노나프탈렌-1-술포닐)아미노) 핵사노에이트, 오레곤 그린 500<sup>TM</sup> (Oregon Green 500<sup>TM</sup>), 오레곤 그린 488<sup>TM</sup>, 로돌 그린<sup>TM</sup> (Rhodol Green<sup>TM</sup>), 오레곤 그린 514<sup>TM</sup>, 로다민 그린-X<sup>TM</sup> (Rhodamine Green-X<sup>TM</sup>), NBD-X, 테트라클로로플루오레신, 2',4',5',7'-테트라브로모술포플루오레신, BODIPY-F1 BR2<sup>TM</sup>, BODIPY-R6G<sup>TM</sup>, 6-카복시-4'-5'-디클로로-2',7'-디메톡시플루오레신, BODIPY-530/550<sup>TM</sup>, 핵사클로로플루오레신, 카복시로다민 6G<sup>TM</sup>, BODIPY 558/568<sup>TM</sup>, BODIPY-TMR-X<sup>TM</sup>, 1-(3-카복시벤질)-4-(5-(4-메톡시페닐)옥사졸-2-일)피리디니움 브로마이드, BODIPY-564/570<sup>TM</sup>, Cy3<sup>TM</sup>, 6-(테트라메틸로다민-5(6)-카복사미드)핵사노에이트, 로다민 레드-X<sup>TM</sup> (Rhodamine Red-X<sup>TM</sup>), BODIPY-576/589<sup>TM</sup>, BODIPY-581/591<sup>TM</sup>, 텍사스-레드-X<sup>TM</sup> (Texas-Red-X<sup>TM</sup>), Cy3.5<sup>TM</sup>, BODIPY-TR-X<sup>TM</sup>, Cy5<sup>TM</sup>, 카복시나프토폴루오레신, Cy5.5<sup>TM</sup>.
- [0115] **정의**
- [0116] 본 명세서의 문맥에서, 용어 "검출 가능한 리포터"는 핵산의 양을 측정하는 검출 가능한 수단을 제공하는 구성 요소를 의미하며, 이는 방사성-표지된 구성요소, 및 형광성 부위를 혼입시키는 염료 및 탐침 (예를 들어 Taqman probes®)과 같은 형광 리포터 등을 포함한다.
- [0117] 본 명세서의 문맥에서, 용어 "형광 리포터"는 (1) 형광을 발생할 수 있으며 특이적 표적 DNA 서열에 결합하여 그 핵산의 양을 정량분석할 수 있는 방법으로 특이적 검출 가능한 형광을 방사하는 뉴클레오티드 염기를 혼입하는 올리고뉴클레오티드 서열 (탐침 또는 형광발생 탐침으로도 알려져 있음) 또는 (2) DNA에 결합하여 서열의 검출, 및/또는 정량분석 및/또는 동정을 할 수 있는 방법으로 형광을 방사하는 염료 (예를 들어 SYBR-그린 염료)인 검출 가능한 리포터를 의미한다.
- [0118] 본 명세서의 문맥에서, 용어 "탐침" 또는 "형광발생 탐침"은, 형광을 발생할 수 있으며 특이적 표적 DNA 서열에 결합하여 그 핵산의 양을 정량분석할 수 있는 방법으로 특이적 검출 가능한 형광을 방사하는 뉴클레오티드 염기를 혼입하는 올리고뉴클레오티드 서열을 의미한다. 이는 또한 "검출 가능한 리포터" 및 "형광 리포터"의 정의 안에 들어간다.
- [0119] 본 명세서의 문맥에서, 용어 "폴리머라제 연쇄반응" 및 그의 두문자어 "PCR"은 당업자에게 이해되는 평상적 의

미에 따라 사용된다. PCR 방법의 예는 일반적인 분자생물학 교과서 및 당업계에 사용되는 참조 메뉴얼에서 찾을 수 있다 (예를 들어, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (1989) Ed H A Erlich, Stockton Press, New York). PCR의 한 예는 통상적으로 열-안정성 폴리머라제 및 다수의 시약들 및 2개의 짧은 프라이머를 사용하여 선택된 핵산 서열을 증폭하기 위해 이용되며, 여기에서 증폭할 서열은 그 서열에 결합하는 프라이머를 포함함으로써 "선택"된다. 한 프라이머는 증폭할 서열의 (+) 가닥의 한쪽 말단에 상보적 염기대합 (complementary base pairing)에 의해 결합하고 다른 한 프라이머는 (-) 가닥의 다른 쪽 말단에 결합한다. 새로 합성된 DNA 가닥 (앰플리콘)은 이후에 동일한 프라이머 서열에 대한 추가의 템플레이트로 작용할 수 있으므로, 프라이머 어닐링, 가닥 연장 (strand elongation), 및 해리 (dissociation)의 연속적인 라운드는 선택된 서열을 신속하고 고도로 특이적으로 증폭한다.

- [0120] 본 명세서의 문맥에서, 용어 "앰플리콘"은 PCR과 같은 핵산 증폭과정에 의해 생산된 새로 합성된 DNA 가닥을 의미한다.
- [0121] 본 명세서의 문맥에서, 용어 "프라이머" 및 "올리고뉴클레오티드"는 핵산 증폭 (통상 PCR 반응에서) 또는 역전사 반응에서 증폭 (복제) 과정을 개시하기 위해 사용되는 짧은 길이의 폴리뉴클레오티드 사슬 DNA를 의미한다.
- [0122] 본 명세서의 문맥에서, 용어 "외부 프라이머"는 도 1에 설명하는 바와 같이 하나 이상의 상응하는 내부 프라이머에 의해 결합되는 영역의 바깥쪽에 있는 위치에서 선택된 핵산 서열 또는 앰플리콘과 결합하는 프라이머를 의미한다. 본 명세서의 문맥에서, 용어 "내부 프라이머"는 도 1에 설명하는 바와 같이 외부 프라이머 결합 위치의 안쪽에 있는 위치에서 선택된 앰플리콘과 결합하는 프라이머를 의미한다.
- [0123] 본 명세서의 문맥에서, 용어 "네스티드 PCR" "완전한-네스티드 PCR" 또는 "탠덤 PCR"은 2개 이상 라운드 (단계)의 핵산 증폭을 의미하며, 이는 통상 2 라운드의 PCR을 포함하고, 여기에서 1차 라운드 PCR은 선택된 핵산 분자를 증폭하기 위하여 한 쌍의 외부 프라이머를 사용하고 2차 라운드 증폭은 선택된 증폭 핵산 분자로부터 유래된 앰플리콘을 추가로 증폭하기 위하여 외부 프라이머 결합 위치의 안쪽에 있는 위치에서 앰플리콘에 결합하는 한 쌍의 내부 프라이머를 사용한다.
- [0124] 본 명세서의 문맥에서, 용어 "헤미-네스티드 PCR" 또는 "헤미-탠덤 PCR"은 1차 라운드 외부 프라이머 중의 하나가 2차 라운드 증폭반응에도 포함되어 다른 1차 라운드 외부 프라이머의 결합 위치의 안쪽 위치에서 동일한 앰플리콘에 결합하는 상응하는 내부 프라이머와 협력하여 선택된 앰플리콘의 증폭을 프라이밍하는 형태의 PCR 반응을 의미한다.
- [0125] 본 명세서의 문맥에서, 용어 "동시다중 PCR" 또는 "동시다중 핵산 증폭" 또는 "동시다중 증폭"은 하나를 초과하는 쌍의 프라이머를 포함함으로써 도 1에 설명하는 바와 같이 단일 반응 용기 내에서 둘 이상의 상이한 선택된 핵산 서열들이 반응에 의해 증폭되는 핵산 증폭반응 (통상 PCR)을 의미한다.
- [0126] 본 명세서의 문맥에서, 용어 "선택된 핵산 분자" 및 "선택된 핵산 서열"은 특이적 핵산 서열의 핵산 분자를 의미한다. 예를 들어, 유전자 발현 분석의 문맥에서, 하나의 선택된 핵산 서열은 특이적 핵산 서열인 특이적 유전자의 유전자 발현산물을 의미할 것이며, 한편, 복수의 선택된 핵산 서열은 복수의 특이적 유전자의 유전자 발현산물을 의미할 것이다.
- [0127] 본 명세서의 문맥에서, 용어 "핵산"은 뉴클레오티드 서브유닛으로 구성된 복잡한 유기산 분자를 의미한다. 두 가지의 주된 핵산은 DNA 및 RNA이다. 이는 게놈 DNA, 미토콘드리아 DNA, 엽록체 DNA, cDNA 등과 같은 모든 서브타입의 핵산을 포함한다. 이는 또한 mRNA, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA 등과 같은 다양한 형태의 RNA도 의미한다.
- [0128] 본 명세서의 문맥에서, 용어 "cDNA"는 mRNA로부터 역전사에 의해 생산된 DNA 서열을 의미한다. cDNA는 그의 서열이 원래의 mRNA 서열에 상보적이기 때문에 붙여진 이름이다.
- [0129] 본 명세서의 문맥에서, 용어 "포유류"는 인간, 반려동물, 예를 들어 고양이 및 개, 가축, 예를 들어 말, 소, 돼지 및 양 등을 포함한다.
- [0130] 본 명세서의 문맥에서, 용어 "동결건조된"은 종종 결정화되거나 분말화된 건조 형태의 물질을 의미한다.
- [0131] 본 명세서의 문맥에서, 용어 "유기체"는 임의의 종의 식물, 동물, 박테리아, 진균류, 바이러스, 마이코플라스마 또는 유전자 조작 유기체를 의미하며, 기생충 DNA 서열 등에 이르기까지 확장된다.
- [0132] 본 명세서의 문맥에서, 용어 "Tm"은, 올리고뉴클레오티드 프라이머에 적용할 경우, 올리고뉴클레오티드가 그의

상보적 핵산 서열과 복선 (duplex)을 이루며 결합하는 확률이 통상 50%가 되는 온도를 의미한다.

[0133] 본 명세서의 문맥에서, 용어 "UTP"는 우리딘트리포스페이트를 의미한다.

[0134] 본 명세서의 문맥에서, 용어 "우라실 N-글리코실라제 (UNG)"는 데옥시우리딘을 함유하는 DNA에서 데옥시리보오스 당 및 우라실 간의 N-글리코시드 결합을 가수분해할 수 있는 효소를 의미한다.

[0135] 본 명세서의 문맥에서, 어구 "앰플리콘 간에 반응 구성요소에 대한 심각한 경쟁이 일어나기 전의 시점"은, 증폭 반응 내의 주기 또는 시기로서, 이를 초과하여 선택된 핵산 서열을 추가로 증폭할 경우 2차 라운드 증폭에서 얻어지는 정량분석의 정확도에 불리함이 초래되는 주기 또는 시기를 의미한다. 임의의 특정 메카니즘 또는 이론에 구애되지 않기를 원하며, 정량분석의 정확도에 대한 불리함이라 지칭한 것은 dNTP 및 프라이머와 같은 반응 구성요소에 대한 증폭 서열 (앰플리콘) 간의 경쟁에 기인하는 것으로 보여진다. 주기의 수가 증가함에 따라 상기 구성요소는 점점 더 희박해지며, 따라서 반응 내에서의 농도가 낮아진다. 이용 가능한 반응 구성요소가 더 제한됨에 따라, 더 풍부한 핵산 종의 증폭이 선호되며, 이는 2차 라운드 증폭반응에서 정량분석의 정확도를 손상시킨다. 그러므로 선택된 각 핵산 서열의 특이적 증폭을 제공하는 한도 내에서 증폭 과정에서의 앰플리콘 간의 반응 구성요소에 대한 임의의 경쟁의 효과를 최소화하기 위하여, 동시다중 증폭의 최적 주기 수는 핵산 투입량을 고려하여 선택된다. 실제로, 예를 들어 50-500 ng의 핵산이 사용되는 경우, 앰플리콘 간에 반응 구성요소에 대한 심각한 경쟁이 일어나기 전의 시점까지 선택된 핵산 분자를 증폭하기 위해서는 약 10 주기의 동시다중 증폭으로 충분하다. 마찬가지로, 0.5-50 ng의 핵산이 사용되는 경우, 약 15 주기의 동시다중 증폭이 바람직하다. 0.01-0.5 ng의 핵산이 사용되는 경우, 약 20 주기의 동시다중 증폭이 바람직하다. 더 적은 양의 핵산이 투입되는 경우, 더 많은 수의 동시다중 증폭 주기가 사용될 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 동시다중 증폭반응 주기의 수는 통상적으로 2차 라운드 증폭에서 평가되는 정량분석의 정확도에 악영향을 미칠 만큼 많은 양의 선택된 핵산 서열 산물의 생산을 유발하지 않는다.

[0136] 이하, 본 발명을 한정되지 않는 실시예와 관련하여 더욱 상세히 기술하고자 한다.

### 실시예

[0160] **실시예 1. 단일 시료로부터의 동시다중 증폭을 사용하고 2차 라운드 증폭에 SYBR-그린 검출 시스템을 혼입하여 다수의 상이한 유전자 발현을 측정하기 위하여 MT-PCR이 이용될 수 있다.**

[0161] SYBR-그린 리포터 염료와 같은 일반적 리포터를 사용하는 다중 유전자 발현산물의 동시다중 증폭 및 측정이 현재로서는 불가능하다. 그러나, MT-PCR 방법은 다수 유전자의 발현산물을 동시에 증폭할 수 있다. MT-PCR 방법은 도 1에 탠덤 및 헤미-탠덤 구체예를 설명하는 MT-PCR에서의 프라이머 배열을 나타내는 개요도로서 약술되어 있다. "RT"로 표시된 역방향 외부 프라이머는 통상 설명된 증폭반응에 앞선 역전사 반응 중에 각각의 유전자에 특이적인 cDNA의 합성을 프라이밍하기 위해 사용된다. 실제로는 별개의 72개 유전자의 발현산물을 증폭함이 통상적이지만, 양자의 방법을 별개의 4개 유전자의 유전자 발현산물 (1-4)을 증폭 및 정량분석하는 과정에 나타내었다. 핵산 종의 정량분석이 이루어지는 2차 라운드 증폭반응에는 내부 프라이머가 사용되는 반면에, 탠덤 MT-PCR에서는 외부 프라이머가 동시다중 프라이머로 사용된다. 헤미-탠덤 MT-PCR에서는 1차 라운드 동시다중 증폭반응 및 2차 라운드 증폭반응 간에 있어서 내부 프라이머 중의 하나가 공통적이다.

[0162] MT-PCR 방법이 다중 유전자로부터의 발현산물의 정량분석에 특히 효과적임을 입증하기 위하여, MCF7 인간 상피 세포로부터 추출한 50 ng의 RNA를 SYBR-그린 검출을 이용하여 별개의 72 유전자로부터의 발현산물을 동시에 정량분석하는 72-웰 "진 디스크" 체제로 헤미-탠덤 MT-PCR 에세이에 사용하였다. 1차 시기 과정에서, 72 올리고 뉴클레오티드 프라이머 쌍이 사용되었으며, 이들 중 24는 표 1 및 2에 나타내었다. 각 프라이머 쌍은 주어진 유전자 발현산물에 대해 특이적이며, 이들은 역전사 효소 및 Taq 폴리머라제와 함께 50 ng의 RNA에 첨가되었다. 역방향 유전자 특이적 PCR 프라이머들이 역전사를 위한 프라이머로 작용하는 55 °C에서 1 분의 역전사 반응 후에, 역전사 효소를 95 °C에서 5 분간 변성시키고 72 유전자를 10 주기 동안 공-증폭하였다. 각 주기는 95 °C에서 5 초, 60 °C에서 20 초, 72 °C에서 20 초로 유지하였다. 72 유전자에 상응하는 앰플리콘이 풍부해진 결과 산물을 분획으로 나누어 각 분획을 동시다중 증폭에 사용된 외부 프라이머 중의 하나 및 선택된 앰플리콘에 특이적인 상응하는 내부 프라이머를 사용하여 도 1에 설명하는 헤미-탠덤 MT-PCR 방법을 이용하여 삼중실험으로 추가 증폭 및 정량분석 하였다. 상기 시기에는 95 °C에서 1 초, 60 °C에서 10 초, 72 °C에서 10 초의 주기를 채택하였다. 두 시기의 에세이는 임의의 수의 홀드 온도 (hold temperature) 및 사이클링 조건을 조합할 수 있는 RG3000 로터-진 실시간 열 사이클러 (RG3000 Rotor-Gene Real Time Thermal Cycler) (Corbett Research)에서 수행되었다. 삼중실험의 24 유전자 발현 측정을 의미하는 72 증폭반응의 결과를 도 2a에 설명하였다. 각

유전자의 삼중실험 측정에 상응하는 3 개 선의 각 세트가 거의 동일한 곡선을 나타내었으므로, 이러한 결과는 각 유전자 발현산물이 재현가능한 방법으로 증폭되었음을 보여준다. 중요한 것은, 이러한 산물이 또한 고도의 특이성을 가지고 증폭되었다는 점으로서, 이는 각 반응이 각각의 경우에 단일한 증폭산물을 생산하였음을 보여주는 도 2c에 나타난 바이오에널라이저 '겔' 이미지 및 도 2b에 나타난 상응하는 용해 곡선에 의해 입증되는 바와 같이 상기 반응에서 2차 증폭산물이 검출되지 않았기 때문이다.

[표 1]

**헤미-덴덤 HT-PCB 1차 라운드 프라이머**

유전자	순방향	역방향
ESR1	GATGAATCTGCAGGGAGG	TCGGTGGATATGGTCCTTCT
TOP2A	TGCTACACATTTCCAGATGA	GATTCTTGGTTTTGGCAGGA
CCND1	GCGGAGGAGAAACAAACAGAT	TGACGCGGTAGTAGGACAGG
PTEN	TGGCACGTGTGTTTCACAAG	AGGTAACGGCTCAGGGAAC
MDM2	GAGCAGGCAAAATGTGCAATA	TTTTGTGCACCAACAGACTTT
TP53	GGAGCACTAAGCGAGCACTG	CCTCATTCAAGCTCGGAAC
VEGF	CAAGATCCGCAGACGTTTAA	GGAGGCTCCTTCCTCCTG
MYC	TGCTCCATGAGGAGACACC	CTCTGACCTTTTGCCAGGAG
PgR	GTCAGIGGGCAGATGCTGTA	AGCCCTTCCAAAGGAAATTGT
RSG	TGGGCTGGTACAAGATCAC	GCCTCCATGTTCAAGTTCTC
GSTM3	GGGAAATTCCTCATGGTTTGC	CGATTTTCTCCAAAGCCTCA
MKI67	CCCCACCTCAGAGAGTTTTG	GGGCGTTTTTGTACTCGTTT
MELK	GGAGCAAAAAGGAAGGGTTCT	TGCATTGTCACCTTTCCCAAA
MAD2L1	TCTTGGAAAAGATGGCAATTI	TGCAGAAAATGTCACCGTAG
BUB1	CTCAGCAACAAACCATGGAA	TCCACATATCCAAATGAGGAAG
TPD52	GCAAGACGTGACAGCAACAT	TTCCAGCTTTTTGGTGATGA
HPRT	GCAGACTTTCCTTCCCTTGG	TTTCAAATCCAACAAAAGTCTGG
NAT1	ATTCAAAGCCAGGAGAAGCA	TCGGATCTGGTGTGAAGAA
E2F1	ATCAAAGCCCTCTGTGAGAC	TGGTGGTGGTGGACACTATGG
TGFB2	GCATGCCCGTATTTATGGAG	TTGGGTGTTTTGCCAATGTA
TGFB3	GGGCTTTGGACACCAATTAC	GCAGATGCTTCAGGGTTCAG
SMAD4	AGGACAGCAGCAGAATGGAT	GGAATGCAAGCTCATTGTGA
RELA	GTCTGTCCGTGTCCTCCAT	GGTCCGCTGAAAGGACTCTT
BTF3	CAGGAAAAACTCGCCAAACT	TGGATCACTGTTCCCTTGGTTT

[0163]

[0164]

[0165]

[0166]

[표 2]

**헤미-멘덤 MT-PCR 2차 라운드 프라이머**

유전자	훈빙항	역방향
ESR1	GATCAATCTGCAGGGAGG	TCCAGAGACITTCAGGGTGCT
TOP2A	TGCTACACATTTCCCAGATGA	CGGTAGTGGAGGTGGAAGAC
CCND1	GCGGAGGAGAACAAACAGAT	GGCCGATTGGAAATGAACT
PTEN	TGGCACTGTTGTTTCAAAAG	TCACTTTAGCTGGCAGACC
MDM2	GAGCAGGCAAATGTGCAATA	AAGCAATGGCTTTGGTCTAA
TP53	GGAGCACTAAGCGAGCACTG	CACGGATCTGAAGGGTGAAA
VEGF	CAAGATCCCGAGACGTGTAA	TCACATCTGCAAGTACGTTCC
MYC	TGCTCCATGAGGAGACACC	CCTGCCTCTTTTCCACAGAA
FgR	GTCAGTGGCCAGATGCTGTA	TGCCACATGGTAAGGCATAA
BSG	TGGCCCTGGTACAAGATCAC	GCGA.GGAACTCACGAAGAAC
GSTM3	GGGAAATTCTCATGGTTTGC	CAGGCACTTGGGGTCAAATA
MKI67	CCCCACCTCAGAGAGTTTTC	GGGCTTGCAGAGCATTTATC
MELK	GGAGCAAAAGGAAGGGTCT	CAACAGTTGATCTGGATTCACATA
MAD2L1	TCTTGAAAGATGGCAGTTT	CGGATTCATCTGGATAGC
BUB1	CTCAGCAACAAACCATGGAA	GTGCCAAAGACATCCAATA
TPD52	GCAAGACGTGACAGCAACAT	GAGCCAACAGACGAAAAAGC
HPRT	GCAGACITTTGCTTTCCTTGG	ACACTTCGTGGGGTCTTTT
NAT1	ATTCAAGCCAGGAAGAAGCA	CAATGTCCATGATCCCCTT
E2F1	ATCAAAGCTTCTCTTGAGAC	CTCAGGGCACAGGAAAACAT
TGFB2	GCATGCCCGTATTTATGGAG	GCAGCAAGGAGAAGCAGATG
TGFB3	GGGCTTTGGACACCAATTAC	GCAGATGCTTCAGGGTTCAG
SMAD4	AGGACAGCAGCAGAATGGAT	GTTTTGGTGGTGAGGCAAAT
RELA	CTCCTGTGCGTGTCTCCAT	GTTTCTCCTCAATCCGGTGA
BTF3	CAGGAAAAACTCGCCAAACT	TCACTCTGCTGTGGCTGTCT

[0167]

[0168]

실시에 2. 보관기록 FFPE 조직시료에서 발견되는 것과 같은 단편화된 핵산의 소량 시료로부터, 유전자 발현산물과 같은 핵산 정량분석을 위하여 MT-PCR이 이용될 수 있다.

[0169]

보관기록 포르말린-고정된 파라핀-포매 (FFPE) 시료로부터의 유전자 발현의 정량분석이 그 절실한 필요성에도 불구하고 제한적인 것은, 이러한 표본으로부터의 RNA 회수율이 낮고 (10 μm 절편 당 약 10 ng) 회수된 분자가 심하게 단편화된 특성을 가졌기 때문이다. 임의의 RNA 단편이 측정하고자 하는 앰플리콘 및 RNA의 3' 말단을 양자 모두 포함할 가능성이 낮기 때문에, 올리고-dT 프라이머를 사용하는 선형 RNA 증폭 또는 역전사는 불가능하다. 따라서 종래 프로토콜은 유전자 특이적 또는 무작위 프라이밍된 (random primed) 역전사를 이용하여 각 시료로부터 아주 적은 수의 유전자들의 발현을 정량분석할 수 있을 뿐이다.

[0170]

심하게 단편화되고 분해된 핵산으로부터 다수의 유전자를 동시에 증폭함에 있어서 MT-PCR 방법이 특히 효과적임을 입증하기 위하여, RNA 추출 전에 10 년간 보관되어온 단일 시편의 FFPE 이종이식 (xenograft) 표본으로부터 먼저 RNA를 추출하였다. 약 4 mm 직경 및 10 μm 두께의 절편으로부터, 프로티나제 K 분해 및 실리카 컬럼 정제 (Ambion)를 이용하여 RNA를 추출하였다. FFPE 시편으로부터 추출된 총 RNA의 1/3은, 약 3 ng을 함유하는 것으로 평가되었으며, 이를 실시에 1에 기술한 바와 같이 표 1 및 2에 나타낸 외부 및 내부 프라이머를 이용하여 15

주기의 동시다중 증폭을 사용하는 헤미-텐덤 MT-PCR 방법에 사용하였다. 삼중실험으로 증폭된 24 유전자로부터의 유전자 발현 프로필을 도 3a에 설명하였다. 이는 증폭 곡선의 높은 재현성에 의해 입증되었듯이 아주 적은 양의 단편화된 RNA로부터의 유전자 발현산물의 효과적이고 재현성 있는 증폭 및 정량분석에 본 방법이 사용될 수 있음을 보여준다. 중요한 것은, 이러한 산물이 또한 고도의 특이성을 가지고 증폭되었다는 점으로서, 이는 각 반응이 각각의 경우에 단일 피크로 대표되는 단일한 증폭산물을 생산하였음을 보여주는 도 3b에 나타난 상응하는 용해 곡선에 의해 입증되는 바와 같이 상기 반응에서 2차 증폭산물이 검출되지 않았기 때문이다. 이러한 결과는 단일 세포, 레이저 절제 조직 생검 (laser dissected tissue biopsies), 법의학적 시료 등에서 얻어지는 것과 같이 아주 적은 양의 핵산 템플레이트로부터 다수의 상이한 핵산 서열을 증폭하기 위해 본 방법이 효과적으로 사용될 수 있음을 입증한다.

[0171] **실시예 3. 단일 세포 및 레이저 절제로부터 얻어진 극소시료 (microsample)에서의 핵산의 증폭 및 정량분석을 위한 MT-PCR의 사용.**

[0172] 단일 포유류 세포로부터 통상적으로 얻어지는 RNA 템플레이트의 대략적인 총량과 균등한 단 10 pg의 RNA 시료를 사용하여 24 유전자의 발현산물을 증폭 및 정량분석하기 위하여 20 주기의 동시다중 증폭을 포함하는 MT-PCR 방법을 사용하였다. 도 4a는 10 pg의 MCF7 RNA로부터 24 유전자의 정량분석을 나타내고 도 4b는 각 증폭산물에 상응하는 용해 곡선을 나타낸다. 24 유전자 발현산물 중 20개가 원치 않는 2차적 증폭산물 없이 검출 및 정량 분석되었다. 이러한 결과는 단일 세포, 레이저 절제 조직 생검 (laser dissected tissue biopsies), 법의학적 시료 등에서 얻어지는 것과 같이 아주 적은 양의 핵산 템플레이트로부터 다수의 상이한 핵산 서열을 증폭하기 위해 본 방법이 효과적으로 사용될 수 있음을 보여준다. 나타난 바와 같이, 이렇게 적은 양의 시료로부터 핵산을 충분히 증폭하기 위해서는 동시다중 증폭 단계에서 상대적으로 많은 수의 주기를 사용할 필요가 있으며, 상기 경우에는 20 주기로 충분하였다. 본 방법은 시료의 양이 종종 극히 제한되고 핵산이 심하게 분해/단편화된 구조를 가진 법의학적 적용 등에 있어서 특히 유용하다.

[0173] **실시예 4. MT-PCR을 위한 적절한 반응 조건 및 변수의 확립.**

[0174] 주어진 동시다중 반응 시스템을 위한 동시다중 증폭 주기의 적절한 수를 확립하기 위해서는, 주어진 시료/프라이머 시스템에 대한 적절한 주기 수를 실험적으로 결정하여야 한다. 이상적으로는, 2차 라운드 증폭에서 각각의 선택된 핵산 서열의 정확한 증폭을 용이하게 하기에 충분한 수준의 증폭을 제공하기 위해 충분한 수의 주기 동안 동시다중 증폭 단계를 운영하여야 한다. 그러나 선택된 핵산 서열의 추가 증폭이 2차 라운드 증폭에서 얻어지는 정량분석의 정확도에 불리함을 초래하는 주기 수를 초과하여 진행하지 않도록 동시다중 증폭 주기의 수를 제한하여야 한다. 정량분석의 정확도에 대한 불리함이라 지칭한 것은 dNTP 및 프라이머와 같은 반응 구성요소에 대한 증폭 서열 (앰플리콘) 간의 경쟁에 기인하는 것으로 보여진다. 주기의 수가 증가함에 따라 상기 구성요소는 점점 더 희박해지며, 따라서 반응 내에서의 농도가 낮아진다.

[0175] 주어진 1차 라운드 동시다중 증폭반응에 사용할 적절한 주기 수의 확립을 위한 지침으로서, 가장 풍부한 mRNA 종 또는 핵산 서열의 지수적 증폭 (exponential amplification)이 1차 라운드 증폭 동안에 심각하게 증가되어서는 안된다. 상이한 RNA 투입량을 각각 포함하는 개별적인 RT 반응들을 이용하여 1차 라운드 증폭 동안에 생산된 핵산의 양을 반응 관찰을 위한 SYBR-그린 염료의 포함에 의해 시험함으로써 심각한 증가를 점검할 수 있다. 이러한 경우에 증폭반응은 가장 풍부한 RNA 선택종인 하나의 선택된 핵산 서열에 특이적인 프라이머만을 포함하며, 따라서 이러한 반응은 동시다중 증폭반응이 아닌 단성식 (uniplex) 반응이다. 도 5에 나타난 바와 같이, 50-500 ng의 RNA 투입은 최초 10 주기의 반응 이내에서 풍부한 RNA 종으로부터의 적은 양의 핵산만을 생산하므로, 이것이 상기 범위의 투입 RNA와 함께 사용할 적절한 주기 수임을 보여준다. 사용할 동시다중 증폭 주기의 적절한 수를 확립하기 위한 일반적 규칙으로서, 추가의 사이클링이 더 이상 추가의 증폭을 생산하지 않을 만큼의 충분한 주기 수까지 반응을 진행시킬 경우에 통상적으로 생산될 총량의 5%를 초과하는 폴리뉴클레오티드가 합성되는 시점을 넘을 때까지 동시다중 증폭이 진행되는 것을 방지해야 한다.

[0176] 따라서, 일상적인 연구 적용에 대해서는 10 주기의 동시다중 PCR이 권장된다. 이는 단일 유전자의 유전자 발현 산물을 분석하기 위해 약 50 ng의 RNA가 일반적으로 사용되는 재래식 qPCR과 비교된다.

[0177] 5-50 ng의 RNA를 투입하는 경우에는, 도 5에 나타난 바와 같이 최초 15 주기의 반응은 가장 풍부한 RNA들에 대한 적은 양만의 핵산을 생산하므로, 따라서 FFPE 절편으로부터의 RNA 시료 분석을 포함하는 상기 규모의 시료에

대해서는 15 주기의 동시다중 PCR이 권장된다.

[0178] 0.01-5 ng의 RNA를 투입하는 경우에는, 도 5에 나타난 바와 같이 풍부한 RNA 종의 심각한 증폭이 일어나기 전에 20 주기의 동시다중 증폭이 가능하였다. 따라서 법의학, 미생물 및 레이저 절제 현미경 시료에 대해서는 20 주기의 동시다중 PCR이 권장된다. 어떤 경우에는 25 주기를 초과하는 동시다중 PCR이 실용적일 수 있음을 당업자는 인식할 것이나, 실제로 극소량의 시료를 분석하기 위해 동시다중 증폭 단계에서 25 주기 이상의 증폭을 사용한다면 이러한 높은 주기 수는 프라이머 이량체 및 2차적 산물의 생성을 선호한다. 유사한 범위의 감도가 RNA에서와 같이 DNA 분석에도 적용될 것이다.

[0179] RNA 템플레이트 투입량 또는 동시다중 증폭 주기 수를 변화시킬 때 정량분석의 정확도를 직접 비교하기 위하여, 상기 변수를 변동시키면서 24 유전자의 유전자 발현산물을 증폭 및 정량분석하였다. 35 주기의 2차 라운드 증폭 동안에 얻어진 정량분석 결과를, 0.1 ng 또는 1.0 ng의 RNA가 사용된 경우 (도 6a) 및 10 또는 15 주기의 동시다중 증폭이 사용된 경우 (도 6b)에 대해 비교하였다. 각각의 경우에, 데이터를 표준화하기 위하여 23 유전자의 발현을 동일한 탠덤 MT-PCR 에세이 내의 비교 유전자에 대한 비율로서 정량분석 및 비교하였다. 도 6a는 0.1 또는 1 ng의 RNA를 사용하였을 경우, 상관계수 0.96을 나타내면서 유사한 측정이 얻어짐을 보여줌으로써, 사용된 RNA 양의 배율 변화가 유사한 상대적 정량분석 값을 유발함을 입증하였다. 상이한 수의 동시다중 증폭 주기를 사용하여 동일한 RNA 양을 측정하였을 경우, 상관계수는 0.96 보다 더욱 높았으나, 예상대로 절대 배율 차이 (absolute fold difference)에 있어서 계통 오차 (systematic error)가 발생하였다 (도 6b). 이는 유전자 발현의 정량분석과 같이 핵산의 양을 정량분석할 때에는, 각 복제 실험은 이들이 동일한 수의 동시다중 증폭 주기를 채용했을 경우에만 비교해야 함을 보여준다.

[0180] **실시예 5. 프라이머 이량체의 형성을 최소화하기 위한, 탠덤 PCR에서 사용할 적당한 Taq 폴리머라제, 프라이머 농도 및 역전사 효소의 확립.**

[0181] 미약하게 발현되는 유전자로부터의 유전자 발현산물을 정량분석하기 위해서는, 분석에 충분할 만큼 산물을 증폭하기 위하여 통상적으로 많은 수의 증폭 주기가 사용되어야 한다. 이러한 경우에는 일반적으로 프라이머 이량체가 형성되며, 이는 재래식 방법에 의한 효과적인 정량분석을 복잡하게 하거나 방해할 수 있다. 본 발명의 방법을 사용하여 이러한 문제점을 최소화하기 위하여, 일군의 희소 유전자 (ERBB2, ESR1, TP53, MYC 및 GEM)의 유전자 발현산물을 증폭 및 정량분석하는 실험에서 2차 라운드 증폭반응에 포함되어야 하는 Taq 폴리머라제의 수준을 최적화하였다. 20  $\mu$ l 반응에 약 0.2  $\mu$ M의 프라이머 및 2% DMSO와 함께 약 0.5 유닛의 Taq를 포함하였을 때, 도 7a에 보는 바와 같이 깨끗한 용해 곡선을 나타내는 최적의 성과가 얻어졌다. 2차 라운드 증폭반응에서 0.5 U 또는 1.0 U의 Taq를 사용했을 때의 비교는 도 7a 및 7b에 각각 나타난 용해 곡선 결과에 의해 설명되며, 이는 더 높은 수준의 Taq (예를 들어 1.0 U)를 사용했을 때 프라이머 이량체가 형성될 수 있음을 입증한다.

[0182] 후속의 증폭에 앞서 RNA 템플레이트로부터 cDNA를 합성하는 과정에서 역전사 효소 (MMLV)의 양을 변화시키면서 유사한 실험을 실시하였다. 선택된 고발현 (TOP2A, BTF3, MDM2, RPL35) 및 미약한 발현 유전자 (ESR1)을 증폭하기 위하여 본 방법을 사용하였으며, 역전사 (RT) 반응의 MMLV 양의 변화가 이후의 2차 라운드 증폭반응의 품질에 미치는 영향을 도 7c 및 7d에 나타난 용해 곡선 결과에 의해 설명하였다. 도 7c의 용해 곡선은 약 20 U의 MMLV가 초기 RT 반응에 사용되었을 때 심각한 2차적 증폭 산물이 얻어지지 않았음을 보여준다. 그러나, 약 200 U MMLV의 높은 수준을 사용하였을 때에는, 도 7d에 나타난 용해 곡선 결과에 보이는 다중 피크에 의해 설명되는 바와 같이 이후에 비-특이적 산물의 증폭이 유발된다. 슈퍼스크립트 III (Superscript III) 역전사 효소 (Invitrogen)를 사용하였을 때에도 유사한 결과가 얻어졌다. 따라서 통상적인 20  $\mu$ l RT 반응에 약 20 U의 역전사 효소를 사용함이 권장된다.

[0183] **실시예 6. 다중 실험에서의 정량분석 평가의 재현성 비교.**

[0184] 50 ng의 동일한 회분의 RNA로부터 4 회의 상이한 날에, 10 회의 독립적인 MT-PCR 반응을 수행하였다. 탠덤 MT-PCR은 실시예 1에 기술한 바와 같이 1차 라운드에서 10 주기의 동시다중 PCR을 사용하여 수행하였다. 단일 실험 내에서, 20  $\mu$ l RT 혼합물을 3 $\times$ 6  $\mu$ l 분획으로 나누어 3 세트의 24 유전자 측정에 사용하고 이를 평균하여 표 3에 나타난 데이터를 산출하였다. 상기 측정의 평균을 10 회 실험 간에 비교하였다. 한 유전자 (Nat1)는 RNA에 없었으므로 편평 사이클링 곡선 (flat cycling curve)을 나타내었다. Ct 값에서 변동계수 (coefficient of variation)는 검출된 23 유전자 모두에 대하여 평균값 0.03을 가지며 0.01 내지 0.05의 범위에서 변동함으로써

MT-PCR 실험 간에 특히 높은 수준의 정밀도 (precision)를 입증하였다.

[표 3]

**다중 실험에서의 유전자 발현 정량분석 평가의 비교**

유전자	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	평균	SD	CV
ESR1	28.1	28.1	28.2	28.0	28.0	27.8	27.7	27.5	27.7	27.6	27.9	0.24	0.01
TGF2A	19.8	20.7	21.5	20.9	21.5	20.1	20.4	20.1	19.7	19.7	20.4	0.69	0.05
CCND1	18.5	19.6	19.8	18.9	18.5	17.7	16.9	17.7	18.2	18.1	18.4	0.88	0.05
PTEN	18.3	19.1	19.4	18.8	18.5	17.8	18.0	18.4	18.1	18.8	18.5	0.51	0.03
MDM2	20.7	21.7	22.4	21.5	21.0	20.3	20.2	21.0	20.7	20.4	21.0	0.70	0.03
TP53	19.8	20.0	20.4	20.0	19.1	18.1	18.1	19.3	19.1	19.0	19.3	0.78	0.04
VEGF	26.2	26.6	26.7	26.7	25.7	25.0	24.2	24.8	25.4	26.4	25.8	0.89	0.03
MYC	24.0	25.3	24.9	24.2	23.4	22.5	22.6	23.1	22.9	22.9	23.6	1.00	0.04
PgR	21.5	22.2	22.4	21.9	22.5	21.2	20.9	20.9	20.8	21.0	21.2	0.67	0.03
BSG	18.2	18.6	19.2	18.4	17.9	17.1	16.8	17.7	17.8	17.8	18.0	0.70	0.04
GSTM3	20.3	21.1	22.0	21.6	20.7	19.7	20.5	19.8	19.6	19.9	20.5	0.83	0.04
MKI67	17.3	18.3	18.4	17.8	17.9	17.4	16.6	17.3	17.4	17.5	17.6	0.53	0.03
MELK	21.1	22.3	23.1	22.5	22.1	21.3	21.6	21.3	21.2	21.4	21.8	0.67	0.03
MAD2L1	24.2	24.5	24.7	24.2	23.9	23.0	23.2	22.2	23.1	22.6	23.7	0.72	0.03
BUB1	25.4	26.2	26.4	26.7	26.0	25.2	24.7	24.7	25.0	24.9	25.5	0.74	0.03
TPD52	23.4	24.6	24.4	24.3	23.5	23.0	22.8	22.7	22.7	23.0	23.4	0.74	0.03
HPRT	26.5	26.0	26.0	25.6	24.9	23.9	24.9	25.6	24.8	24.2	25.2	0.84	0.03
NAT1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	
E2F1	20.1	21.2	20.6	20.5	19.7	19.0	18.2	19.4	19.3	19.4	19.7	0.88	0.04
TGFB2	23.0	24.5	24.6	23.9	23.8	23.1	22.6	23.0	22.8	23.3	23.5	0.70	0.03
TGFB3	25.3	26.7	26.1	26.3	24.9	23.6	22.4	24.3	24.5	24.3	24.8	1.32	0.05
SMAD4	23.6	24.7	24.4	24.1	23.5	23.0	22.3	23.3	23.4	23.3	23.6	0.65	0.03
NEK3	25.0	26.8	25.9	26.1	24.1	23.2	23.1	25.7	24.3	23.8	24.6	1.29	0.05
BTH3	14.2	14.9	14.9	14.6	14.5	14.1	13.6	14.0	14.2	14.1	14.3	0.42	0.03
Mean													0.03

**실시예 7. 진단법에서 암-관련 유전자 발현의 정량분석에 있어서의 세포주 모델을 사용하는 MT-PCR의 이용**

**7.1 종양 유래 세포주에서의 유전자 발현 측정**

종양 유래 인간 유방암 세포주는 그의 기원인 종양세포의 유전자 구성 (genetic makeup) 및 생리학적 특성을 많이 보존하고 있는 것으로 믿어진다. 본 연구에서는 헤미-네스티드 PCR에 의하여 15 인간 유방암 세포주에서 24 유전자의 발현 수준을 삼중실험으로 측정하였다.

**7.2 재료**

외부 프라이머 혼합물은 표 4에 열거된 24 쌍의 프라이머를 각각 2 μl 씩 100 μM의 농도로 4 μl의 물과 혼합하여 제조하였다.

**동결건조 프라이머를 가진 코베트 리서치 "진-디스크"의 준비**

0.2 ml 시험관에 100 μM 농도로 10 μl의 순방향 프라이머 스톱 용액, 100 μM 농도로 10 μl의 상응하는 역방향 프라이머 스톱 용액 및 605 μl의 물을 포함하도록, 표 5에 표시된 바와 같은 프라이머 쌍을 각각 함유하는 유전

자 특이적 프라이머 혼합물을 준비하였다. CAS1200 로봇 (Corbett Research)을 사용하여 코베트 리서치 진 디스크에 5  $\mu$ l의 각 프라이머 혼합물을 삼중실험으로 분획화 하였다. 상기 분획을 진 디스크 내에서 스피드백 동결건조기 (SpeedVac lyophiliser)로 가열하면서 15 분간 동결건조한 후 진 디스크 열 밀봉기 (heat sealer)를 사용하여 160  $^{\circ}$ C에서 디스크를 밀봉하였다. 각 디스크는 사용 전에 4  $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

[0194]

*RT-PCR 및 PCR 스톱 용액*

[0195]

젤라틴-무 RNase (Gelatin-RNase free) (5 ml)

[0196]

50 mg의 젤라틴 (Sigma G-2625)을 물 5.0 ml 및 DEPC 5  $\mu$ l에 가하고 60  $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 가끔씩 혼합하면서 배양한 후 사용 전에 -20  $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

[0197]

10 $\times$  RT 완충액 (10 ml)

[0198]

30 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM KCl, 1 mM DTT 및 0.1 mg/ml 젤라틴을 포함하는 500 mM TrisHCl (pH 8.5). 이 용액은 사용 전에 0.5 ml 분획으로 20  $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

[0199]

10 $\times$  PCR 완충액 (10 ml)

[0200]

500 mM KCl, 30 mM MgSO<sub>4</sub>, 및 1  $\mu$ g/ml 젤라틴을 포함하는 200 mM TrisHCl (pH 8.5). 이 용액은 사용 전에 0.5 ml 분획으로 20  $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

[0201]

7.3 방법

[0202]

약술하면, RNeasy 방법 (Qiagen)을 사용하여 각 세포주 배양물로부터 RNA를 추출하고 각 RT-PCR 반응에 50 ng이 사용되도록 희석하였다. RT-PCR 반응 혼합물을 0.2 ml 얇은 벽 PCR 시험관에 하기와 같은 것들을 포함시켜 준비하였다: 50 ng의 총 RNA, 각 프라이머의 최종 농도 0.1  $\mu$ M의 외부 프라이머 혼합물, 0.3 mM dNTPs (Roche), RT-PCR 완충액, 2%까지의 DMSO, 0.5  $\mu$ l의 RNasin, 20 유닛의 MMLV (Invitrogen), 1 유닛의 Taq DNA 폴리머라제 (Invitrogen).

[0203]

*1차 라운드 동시다중 증폭*

[0204]

각 시험관을 RG3000 (Corbett Research)에 넣어 하기와 같이 열처리하였다: 55  $^{\circ}$ C에서 1 분 (역전사), 95  $^{\circ}$ C에서 5 분 (RT 변성) 후에 10 주기의: 95  $^{\circ}$ C에서 10 초, 60  $^{\circ}$ C에서 20 초, 72  $^{\circ}$ C에서 20 초. 이로써 동시다중 PCR 단계가 완결되며 산물은 물로 1:50 희석하였다.

[0205]

*2차 라운드 증폭반응 혼합물*

[0206]

500  $\mu$ l의 동시다중 증폭산물을 각 1.5 ml의 PCR 반응 혼합물에 가하여 하기와 같은 최종 농도가 되도록 하였다: 0.2 mM dNTPs, 2% DMSO, 25 U/ml Taq, PCR 완충액, SYBR-그린 1:20,000 희석. 20  $\mu$ l의 PCR 반응 혼합물을 진 디스크 (동결건조된 내부 프라이머를 포함하는) 내의 각 위치에 가하고 PCR을 하기의 35 주기 실시하였다: 95  $^{\circ}$ C에서 1 초, 60  $^{\circ}$ C에서 10 초, 72  $^{\circ}$ C에서 10 초. 72  $^{\circ}$ C 연장 단계의 종점에서 형광을 측정하였다. 상기 프로토콜이 또한 탠덤 및 헤미-탠덤 MT-PCR 양자 모두를 사용하여 성공적으로 적용되었음에 유념해야 한다.

[0207]

7.4 결과

[0208]

탠덤 MT-PCR을 사용하여 각 세포주 내에서의 상피세포 성장인자 수용체 유전자 (EGFR) 발현을 정량분석하였다. 각 세포주로부터 얻어진 데이터를 내부 비교 유전자에 의해 표준화하여 15 세포주 각각에서의 EGFR 발현의 상대적 정량분석을 제공하고 이를 도 8에 나타낸 바와 같이 병행하여 비교하였다. 15 세포주 중에서 2 개에서만 EGFR이 고발현됨을 볼 수 있으며, 이는 BT20 및 SKBR3이다. BT20 및 SKBR3은 양자 모두 상기 유전자를 과발현하는 것으로 알려져 있으며 이러한 결과는 도 8의 정량적 병행 비교의 MT-PCR 정량분석 결과에 의해 정확하게 반영된다. 이러한 종류의 정보는 암 환자의 치료에 있어서 가치를 지니며 어떤 경우에는 적당한 약물 치료의 결정을 위한 필요 정보를 제공할 것이다.

[0209]

[표 4]

**템플 MT-PCB 1차 라운드 외부 프라이머**

유전자	순방향	역방향
ERBB2	ACATGACCCCAGCCCTCTAC	AGAGAGTCTTGGCCCTTCC
BSR1	TGGAGATCTTCGACATGCTG	GCCATCAGGTGGATCAAAGT
EGFR	CTTCAGCGATACAGCTCAG	GGTCTGGTAGTGTGGGTCT
TOP2A	GCTGATGATGTTAAGGGCAGT	GATTCTTGGTTTGGCAGGA
CCND1	TCCTCTCCAAAATGCCAGAG	TGAGGCGGTAGTAGGACAGG
PTEN	CAGTCAGAGGCCTATGTTT	AGGTAACGGCTGAGGGAACT
CDH1	AGCGTGTGTGACTGTGAAGG	CTCTCTCCGCCTCCTTCTT
CDKN1A	CCAATGTGGACCTGTCACTGT	AAGATGTAGAGCGGGCCTTT
MDM2	GAAGGAAACTGGGGAGTCTTG	TTTTTGTGCACCAACAGACTTT
BTF3	CCTTATTCGCTCCGACAAGA	TGGATCACTGTTCCTTGGTTT
RPL35	AAGGAGGAGCTGCTGAAACA	GCATGGCACGTGTCTTCTTA
VEGF	GAGCGGAGAAAGCATTGT	GCAGGCTCCTTCCTCCTG
TP53	CTTCGAGATGTTCCGAGAGC	TCTGAGTCAGGCCCTTCTGT
MYC	CCTACCCTCTCAACGACAGC	CTCTGACCTTTTGCCAGGAG
PgR	TGGTGTTTGGTCTAGGATGGA	AGCCCTTCCAAAGGAATGT
BSG	TGCTGGTCTGCAAGTCAGAG	GCTTCCATGTTTAGGTTCTT
MKI67	AGCAACCCCAAGTTGACAAG	GCGCGTTTTTGTACGTTT
GSTM3	TTGGAAGAGTTACCTTGGACAA	CGATTTTCTCCAAAGCCTCA
GEM	CTTCGAGAAGGCATCTGAGC	CCCTCAAACAGCTCCTTCAC
MELK	AAAGGGGGTTGGATAAGGTT	TGCATTGICACTTCCCAA
MAD2L1	TGTGGTGGAAACAACGAAAG	TGGCAGAAAATGTCACCGTAG
RUB1	CAGCAAAGTGTGAAACATCTGC	TCCACATATCCAAATGACGAAG
TPD52	GAGATCAAGCGGAAACTTGG	TTCAGCTTTTGGTGTGA
HPK1	GACCAGTCAACAGGGGACAT	TTTCAAATCCAACAAAGTCTGG

[0210]

[0211]

[표 5]

**텐덤 MT-PCR 2차 라운드 내부 프라이머**

	순방향 프라이머	역방향 프라이머
ERBB2	GTACCCCTGCCCCTCTGAGAC	CGAACATCTGGCTGGITCAC
ESR1	GATGAATCTGCAGGGAGAGG	TCCAGAGACTTCAGGGTGCT
EGFR	TCCTCCAGTGCCTGAATAC	GGGITCAGAGCCTGATTGTG
TOP2A	TGCTACACATTTCCAGATGA	CGGTACTGGACGTGGAAGAC
CCND1	GCGGAGGAGAACAACAGAT	GCGGGATTGGAAATGAACT
PTEN	TGGCACTGTTGTTTCAAAAG	TCACCTTTAGCTGGCAGACC
CDH1	ATTGCAAAATTCCTGCCATTC	CAGCAAGAGCAGCAGAATCA
CDKN1A	CACTCTCAGGGTCGAAAACG	GGATTAGGGCTTCTCTTGG
MDM2	GAGCAGGCAAAATGTGCAATA	AAGCAATGGCTTTGGTCTAA
BTF3	CAGGAAAACTCGCCAAACT	TCATCTGCTGTGGCTGTTCT
RPL35	GACCTGAAGGTGGAGCTGTC	ACTGTGAGAACACGGGCAAT
VEGF	CAAGATCCGCAGACGTGTAA	TCACATCTGCAAGTACGTTCCG
TP53	GGAGCACTAAGCGAGCACTG	CACGGATCTGAAGGGTGAAA
MYC	TGCICCATGAGGAGACACC	CCTGCCCTCTTTCCACAGAA
PgR	GTCAGTGGGCAGATGCTGTA	TGCCACATGGTAAGGCATAA
BSG	TGGCCCTGGTACAAGATCAC	GCGAGGAACTCACGAAGAAC
MKI67	CCCCACCTCAGAGAGTTTTG	GGGCTTGCAGAGCAATTTATC
GSTM3	GGGAAATCTCATGCTTTGC	CAGGCACTTGGGGTCAAATA
GEM	TGGTTGGCAACAAAAGTGAC	ACAGCTGCAGAGGCTCTCGAT
MELK	GGAGCAAAAGGAAGGGTCT	CAACAGTTGATCTGGATCACTAA
MAD2L1	TCTGGAAAAGATGCCAGTT	CGGATTTCACTCTGGATAGC
BUB1	CTCAGCAACAAAACCAATGAA	GTGUCAAAAGAGCAATGCAATA
TPD52	GCAAGACGTGACAGCAACAT	GAGCCAACAGACGAAAAAGC
HPRT	GCAGACTTTGCTTTCTTGG	ACACTTCGTGGGGTCTTTT

[0212]

[0213]

실시예 8. MT-PCR은 PCR로 측정할 수 있는 임의의 유전자에 대해 광범위한 적용성을 가진다: 상피세포에서 염색성 유전자 발현산물의 정량분석

[0214]

다른 임상적 관련 분야에서의 MT-PCR의 추가적 적용을 입증하기 위하여, 17 염색성 유전자의 발현을 인간 피부 생검으로부터 분리된 100 ng의 RNA로부터 정량분석하고 1차 라운드에서의 10 주기 동시다중 증폭 후에 35 주기의 2차 라운드 증폭을 사용하여 분석하였다. 도 9a에 나타낸 바와 같이 17 유전자 모두 삼중실험으로 효과적이며 정확하게 증폭되었다. 삼중측정은 각 유전자 발현산물이 높은 재현성을 지니고 측정되었음을 보여준다는 점이 주목할 만하다. 도 9b에 나타낸 상응하는 용해 곡선 또한 모든 2차 라운드 증폭반응이 2차 라운드에서의 35 주기 증폭 후에까지 비-특이적 산물, 프라이머 이량체 등에 의한 오염 없이 단일한 산물을 유발하였음을 보여준다. 증폭의 특이성은 도 9c에 나타낸 바와 같이 바이오에널라이저 (Agilent Technologies)를 사용하는 분석에 의해 추가로 확인되었으며, 이는 각 반응 내에 단일 PCR 산물이 존재함을 명확히 보여준다. 상기 MT-PCR 에세이에 사용된 유전자는, 표준 PCR 반응에서 독립적으로 에세이를 실시했을 때 단일한 산물을 생산함을 입증함으로써 확인되었다. 그 후에 이들은 암-관련 유전자 세트에 대해 미리 최적화된 고도의 동시다중 MT-PCR 반응에서 추가의 최적화 없이 함께 사용되었다. 상기 실시예는 독립적으로 에세이를 실시했을 때 양호하게 기능하는

임의의 PCR 반응은 고도의 동시다중 MT-PCR 반응에 추가의 최적화 없이 혼입되었을 때 실질적으로 유사한 방법으로 가능할 것임을 보여준다.

[0215] **실시예 9. 표적 서열의 동정을 위하여 고해상도-용해 분석 (High Resolution-Melt Analysis)과 조합된 MT-PCR.**

[0216] 표적 DNA 서열의 동정, 불균질한 시료에서의 상이한 바이러스 또는 박테리아 종의 검출, SNP의 검출 및 정량분석, DNA 메틸화 (비실콰이트 처리 후) 및 유전자형 결정 (genotyping)과 같은 광범위한 적용을 위하여, MT-PCR 방법은 또한 고-해상도 용해 곡선 분석과도 조합할 수 있다. 바람직하게는 이중 가닥 앰플리콘 DNA를 포화시키는 삽입 염료, 예를 들어 SYTO9, 에바그린 (EvaGreen) 또는 LC그린 (LCGreen)을 사용하는 용해 곡선 분석의 예는, 다중 바이러스 종의 검출 (Varga, A and James, D (2006) J. of Virol. Methods 132:146-153), 상이한 박테리아 종 (Bell CA and Patel R. (2005) Diagn Microbiol Infect Dis. 53(4):301-6), DNA 메틸화 분석 (Worm et al., (2001) Clinical Chemistry 47:1183-1189) 및 암 진단을 위한 돌연변이 및 유전자형 결정 분석 (Bernard, P.S. and Wittwer, C.T (2002) Clinical Chemistry 48(8): 1178-1185; Powell B.L. et al., (2002) Carcinogenesis 23(2):311-315)을 포함한다. 고-해상도 용해 분석은 PCR로 측정할 수 있는 임의의 유전자에 대해 광범위한 적용성을 명확히 가지고 있다.

[0217] 하나 또는 다중의 MT-PCR 산물을 함유할 수 있는 증폭반응으로부터 용해 곡선 프로필을 얻기 위하여, 산물(들)을 약 60°C에서 약 95°C까지 점진적으로 가열하며, 여기에서 DNA가 이중 가닥 형태로부터 단일 가닥 형태로 변화하는 온도에 이르렀을 때 SYTO-9 염료와 같은 형광 리포터가 증폭된 산물로부터 신속하게 해리되면서 특징적 온도에서 방사 형광의 감소가 유발된다. 이러한 형광 변화는 온도 구배를 따라 연속적 또는 정기적으로 관찰하며 형광의 변화를 온도 구배 축을 따라 도시하여 용해 곡선 프로필을 얻는다. 각각의 특이적 표적 PCR 산물은 특이적 용해 온도 (T<sub>m</sub>)를 가지므로, 도 10a 및 10b에 나타낸 바와 같이 그들의 상이한 용해 온도에 의해 이들을 동정할 수 있다. 로터-진 6000 (Rotor-gene 6000) (Corbett Research)의 정밀한 온도 조절은 0.02 °C 미만의 정확도로 용해 온도의 결정을 가능하게 한다. 이는 MT-PCR에 의해 증폭된 표적 내의 작은 돌연변이를 구별하거나 반응 내에서 정확한 표적이 증폭되었음을 확인하기에 충분하다. 도 10a에서는, 돌연변이가 일어나기 쉬운 TP53 유전자의 영역이 2개의 인간 유방암 세포주로부터 선택된 8개 시료로부터 MT-PCR에 의해 증폭되고 로터-진 6000에서 고해상도 용해에 의해 분석되었다. SKBR3 세포주로부터의 증폭산물이 돌연변이 TP53 유전자 영역 (용해 온도 86.46 °C)을 나타내며 야생형 TP53 유전자 영역 (용해 온도 87.16 °C)을 가진 MCF7 세포주의 증폭산물로부터 이를 용이하게 구별할 수 있음을 볼 수 있다. TP53 유전자의 어떤 파변이 모티프 (hypervariable motif)는 치료적 중요성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으므로, 상기 분석 및 그와 유사한 것들은 문헌 (Powell et al., supra)에도 논의된 바와 같이 예측 의학 (predictive medicine)에 있어서 유용할 수 있다. 도 10b는 상기 돌연변이를 나타내지 않는 TP53 유전자 영역에 대한 비교 연구를 보여준다. 상기 영역 또한 2개 세포주로부터 채취한 시료에 대해 MT-PCR을 사용하여 증폭되었다. 이 경우에, 곡선들은 SKBR3 및 MCF7로부터의 MT-PCR 증폭산물이 동일하며, 양자 모두 동일하게 84.90 °C의 용해 온도를 가졌음을 나타낸다. 용해 곡선 프로필의 정확도 (accuracy) 및 신뢰성 (reliability)을 개선하기 위해서는 2차 라운드 증폭반응의 최적화가 유익함을 추가로 유념해야 할 것이며, 이와 관련하여, 2차 라운드 증폭 혼합물에 DMSO가 포함되지 않는 것이 종종 유리하다.

[0218] **실시예 10. 박테리아 동정을 위하여 고해상도-용해 분석과 조합된 MT-PCR.**

[0219] 고-해상도 용해 곡선 분석 방법을 실시예 9에 기술된 바와 같이 다시 이용하였으나, 비교 유전자와의 동일성 또는 부동성 (dissimilarity)의 고민감성 측정을 위하여 용해 곡선의 표준화 후에 시험 DNA를 비교 DNA와 비교할 수 있도록, 비교 DNA 시료가 제공되었다. 도 11a 및 11b에, 엔테로코쿠스 (Enterococcus)의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머로 증폭한 다수의 박테리아 DNA 추출물의 용해 곡선을 나타내었다. 다른 박테리아의 16S 서열과의 유사성은, MT-PCR에 의한 네스티드 증폭 후일지라도 이들 역시 PCR 산물을 생산할 것임을 의미한다. 도 11a에 나타낸 영역들 간의 용해 곡선의 표준화 후에, 하나의 용해 곡선이 진성 (genuine) 엔테로코쿠스 용해 곡선으로 동정되었고 다른 모든 용해 곡선을 그와 비교하였다 (도 11b). 상기 도면에서 수평선은 비교 엔테로코쿠스 및 98% 신뢰도로 동정된 다른 한 시료의 엔테로코쿠스로부터 얻어졌다. 나머지 다른 용해 곡선들은 그들이 엔테로코쿠스일 수 있는 신뢰도가 극히 낮으므로 상이한 박테리아인 것으로 증명된다 (표 5). 산물의 순도가 결과의 신뢰성을 개선하므로 MT-PCR은 고해상도 용해 분석에 특히 적합하다. 또한, 법의학적 분석에 있어서 MT-PCR의 감도는 미량의 인간 조직의 분석이 아주 적합하며, 조직 적합 검사 (tissue typing)에 있어서 동시

에 결정할 수 있는 많은 수의 표적은 방법을 매우 정확하게 해준다.

[표 5]

시료	유전자형	신뢰도%
Enterococcus (comparator)	Enterococcus	100
Staphylococcus	Variation	0.62
Enterobacteriaceae	Variation	0.26
Streptococcus	Variation	0.23
Staphylococcus	Variation	0.38
Enterococcus	Enterococcus	98.28

MT-PCR 방법 및 고해상도 용해 곡선 분석을 포함하거나 그와 조합된 MT-PCR 방법이 다양한 형광 리포터를 포함하는 검출 시스템 및 다양한 열 사이클러 플랫폼 (thermocycler platforms)을 이용하여 수행될 수 있음을, 당업자는 이해할 것이다. 예를 들어, 증폭반응 및 용해 곡선 분석은 로타-진 6000을 이용하여 수행될 수 있으나, 라이트 사이클러® (Light cycler®) (Roche), ABI PRISM® 7000, 7700 및 7900 (Applied Biosystems), 스마트사이클러 (SmartCycler®) (Cepheid), 아이사이클러™ (iCycler™) (BioRad)와 같은 다른 시스템 및 당업자에게 공지된 다른 플랫폼을 이용해서도 이를 달성할 수 있다. 따라서, MT-PCR 방법 및 용해 곡선 분석을 포함하거나 그와 조합된 MT-PCR 방법은, SYBR-그린 I, SYTO9, LC 그린, 에바그린, 라이트사이클러® 탐침, LUX™ 형광발생 프라이머와 같은 다양한 형광 리포터 및 당업자에게 명백한 유사물을 사용하여 수행될 수 있다.

본 발명이 다수의 바람직한 구체예와 관련하여 기술되었으나, 본 발명의 범위를 이탈하지 않으면서 다수의 변형 및 개질이 가능함을 당업자는 인식할 것이다.

**도면의 간단한 설명**

도 1은 탠덤 및 헤미-탠덤 구체예 (각각 A 및 B)를 설명하는 MT-PCR에서의 프라이머 배열을 나타내는 개요도로서, 각각은 별개의 4개 유전자의 유전자 발현산물 (1-4)을 증폭 및 정량분석하는 과정에 나타내었다.

도 2a는 표 1 및 2의 프라이머 및 기술된 방법을 사용하여 코베트 리서치 RG3000 (Corbett Research RG3000)에서 삼중실험으로 측정하는 헤미-탠덤 MT-PCR에 의해 단일 RNA 시료로부터 수행된 삼중실험 유전자 발현 측정 중의 24개를 나타낸다.

도 2b는 도 2a에 나타난 24 유전자 측정에 관련된 용해 곡선이다.

도 2c는 바이오어널라이저 (Bioanalyzer)를 사용한 분석으로서 도 2a에 나타난 24 유전자에 대해 MT-PCR에 의하여 형성된 산물을 나타낸다.

도 3a는 FFPE 재료의 단일 절편에서 유래된 cDNA를 사용하는 24 유전자 발현 산물 증폭 곡선 (각각 삼중실험)으로서, 15 주기의 동시다중 PCR을 이용하여 선택된 72 유전자 발현산물의 풀로서 1차 증폭되고 이어서 이중 24가 2차 라운드 PCR에서 정량분석된 것이다.

도 3b는 도 3a에 나타난 24 유전자 측정에 대한 용해 곡선이다.

도 4a는 초기 20 주기의 동시다중 증폭 후의 2차 라운드 PCR에 나타난 바와 같이 10 pg의 투입 RNA로부터의 24 유전자 발현산물 증폭 곡선 (각각 삼중실험)이다.

도 4b는 도 4a에 나타난 24 유전자 측정에 대한 용해 곡선이다.

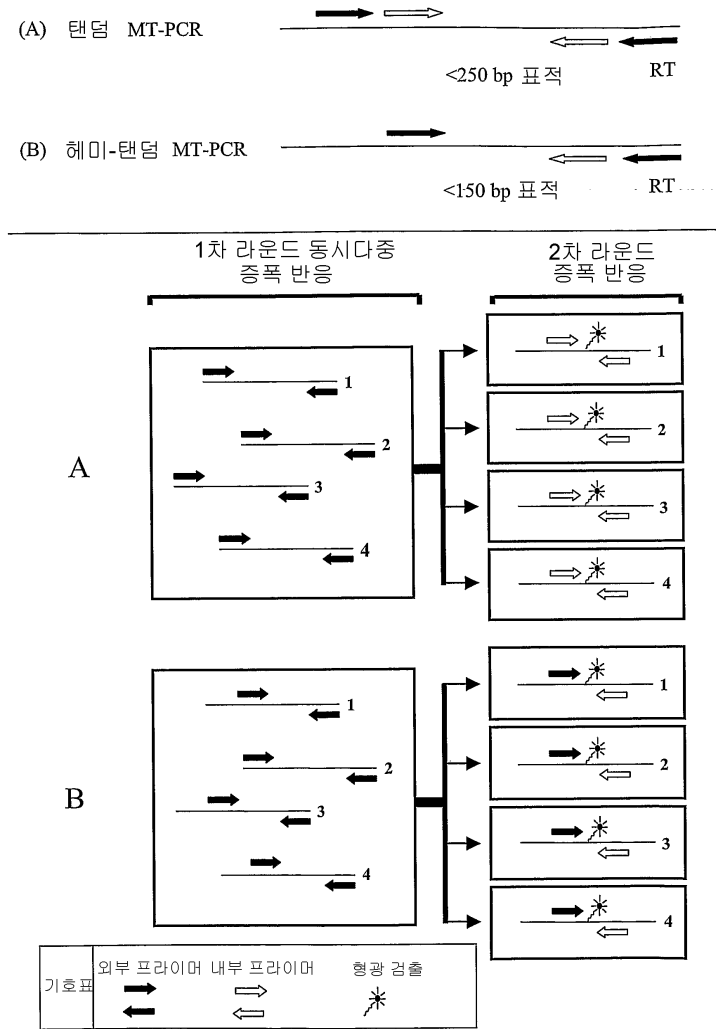
도 5는 증폭 과정에서 앰플리콘 (amplicon) 간의 반응 구성요소에 대한 경쟁을 방지하기 위한 동시다중 증폭 주기의 적당한 수의 결정을 나타낸다. 동시다중 PCR 단계의 조건 하에서 현재 유전자 세트에서 사용된 가장 풍부한 유전자 (BTF3)의 PCR이다. 5 ng, 50 ng 및 500 ng의 투입 RNA로부터 유래된 cDNA를 사용하여 각 증폭을 시작한 증폭 곡선을 도시한다.

도 6a는 비교 유전자 (comparator gene)에 상대적인 유전자 발현의 정량분석이 상이한 투입 RNA 양에서 유지됨을 나타낸다.

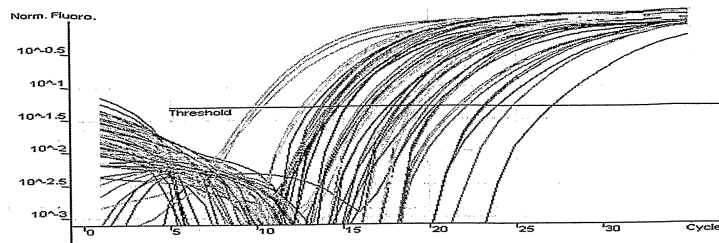
- [0147] 도 6b는 동시다중 증폭 주기 수의 변화 및 유전자 발현의 정량분석에 유발된 효과를 나타낸다.
- [0148] 도 7a는 탠덤 MT-PCR의 2차 라운드 증폭반응에서 반응당 0.5 유닛의 Taq 사용의 효과를 시험하기 위한 2차 라운드 증폭 후에 얻어진 용해 곡선이다.
- [0149] 도 7b는 도 7a에 나타낸 것과 동일한 실험으로서, 1.0 유닛의 Taq가 사용되었다.
- [0150] 도 7c는 탠덤 MT-PCR의 동시다중 증폭단계 전에 역전사를 위한 20 유닛의 역전사 효소 사용의 효과를 시험하기 위한 2차 라운드 증폭 후에 얻어진 용해 곡선이다.
- [0151] 도 7d는 도 7c에 나타낸 것과 동일한 실험으로서, 200 유닛의 역전사 효소가 사용되었다.
- [0152] 도 8은 MT-PCR의 추가적인 진단적 잠재력을 나타낸다: 15 세포주의 EGFR 유전자 발현으로서 이중에서 BT20 및 SKBR3은 EGFR을 과발현하는 것으로 알려져 있다.
- [0153] 도 9a는 인간 피부 생검으로부터 17 염증 유전자의 발현을 삼중실험으로 보여주는 MT-PCR에 의한 염증 유전자의 정량분석을 나타낸다.
- [0154] 도 9b는 도 9a의 증폭산물에 상응하는 용해 곡선이다.
- [0155] 도 9c는 도 9a의 증폭산물의 바이오에널라이저 분석을 나타낸다.
- [0156] 도 10a는 인간 유방암 세포주에서의 고해상도 용해 (high resolution melt)에 의한 TP53의 과변이 영역 (hypervariable region)의 분석을 나타낸다.
- [0157] 도 10b는 인간 유방암 세포주에서 고해상도 용해를 사용한 돌연변이가 없는 TP53 영역의 분석을 나타낸다.
- [0158] 도 11a는 다양한 박테리아 종에서 고해상도 용해를 사용한 16S RNA 앰플리콘의 분석을 나타낸다.
- [0159] 도 11b는 도 11a에 나타낸 표준화 용해 곡선 (normalized melt curve)의 차이의 플롯이다.

도면

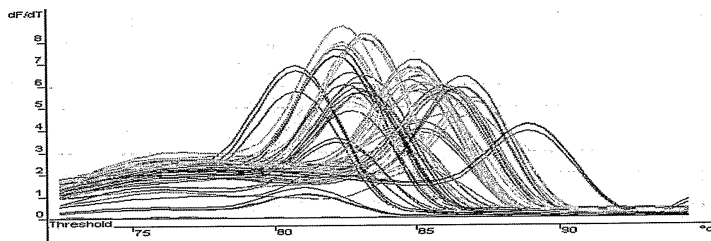
도면1



도면2A



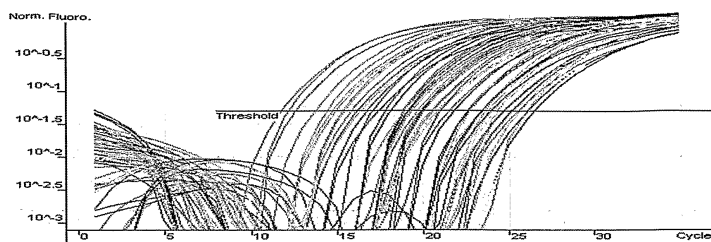
도면2B



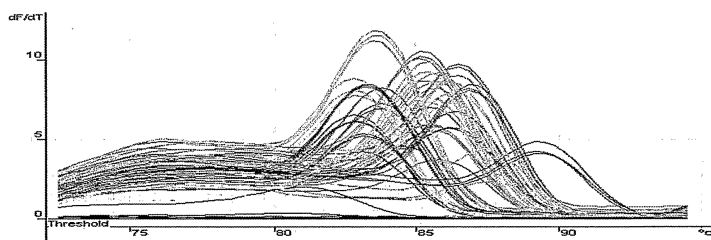
도면2C



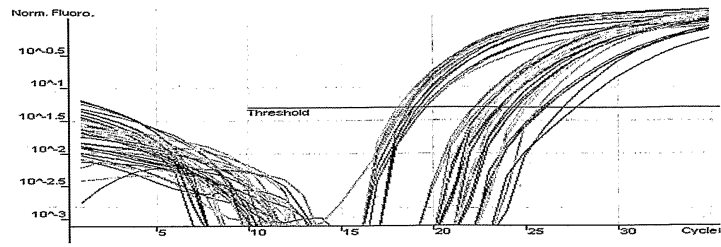
도면3A



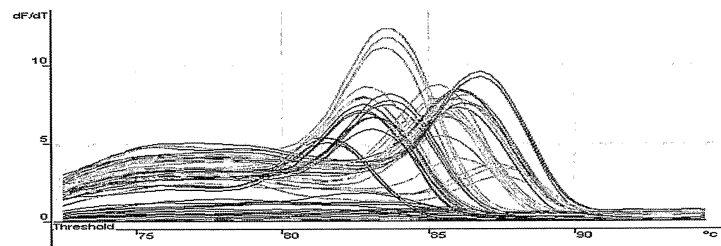
도면3B



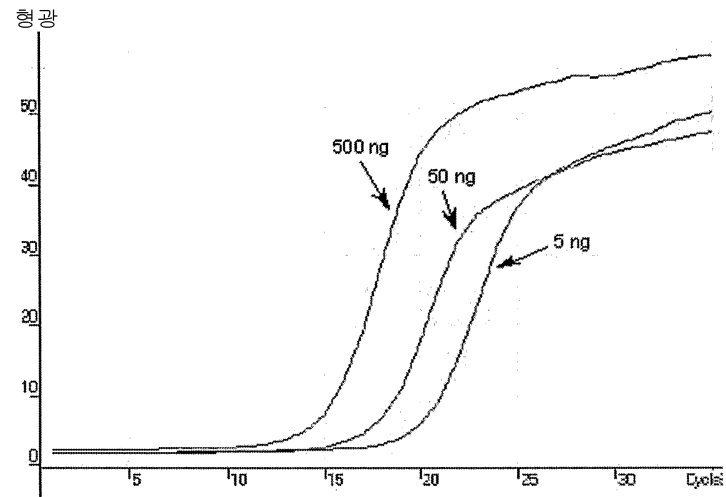
도면4A



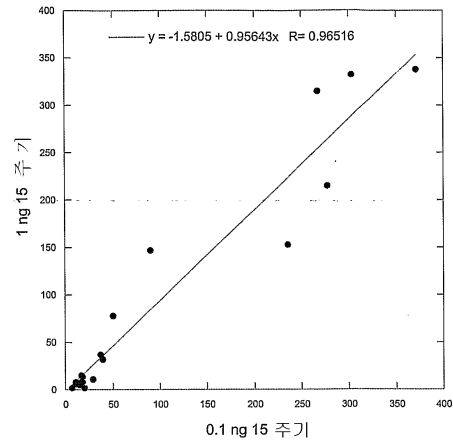
도면4B



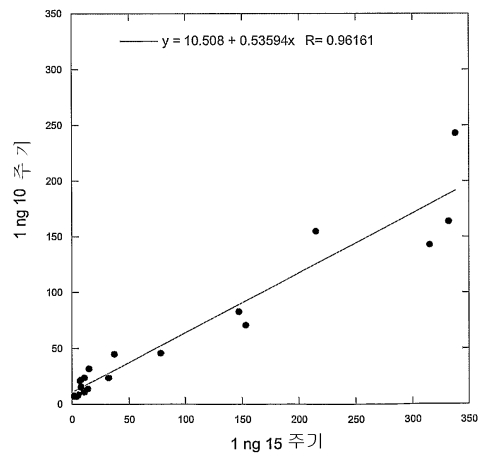
도면5



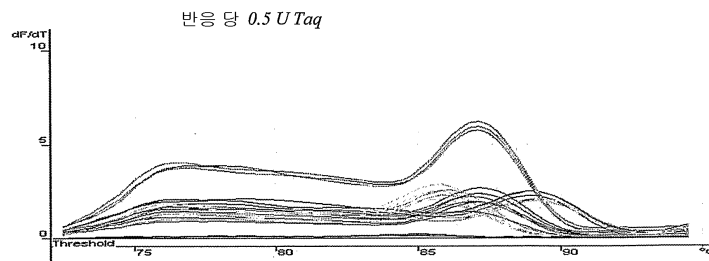
도면6A



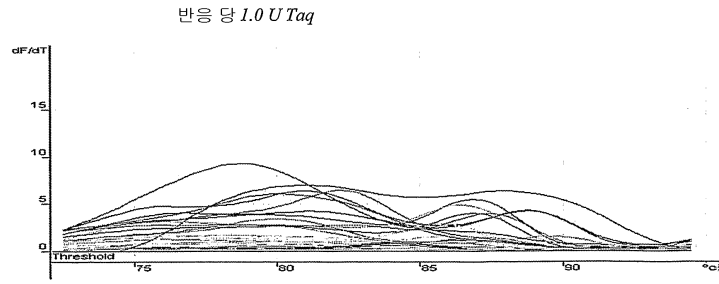
도면6B



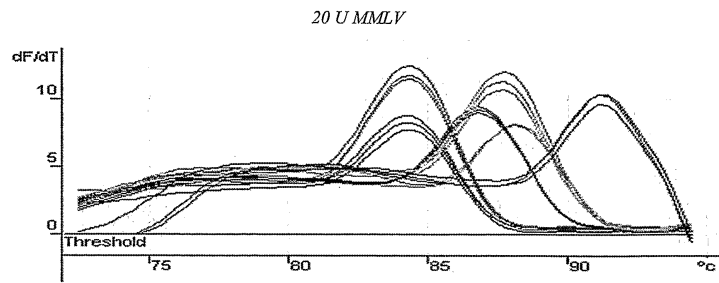
도면7A



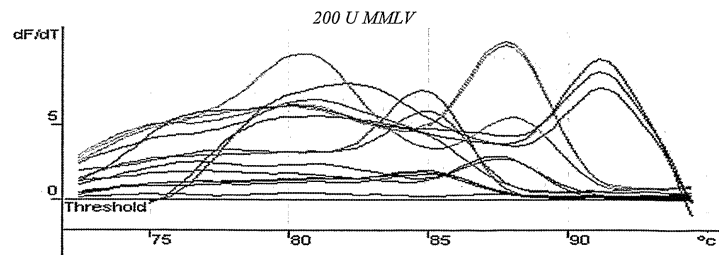
도면7B



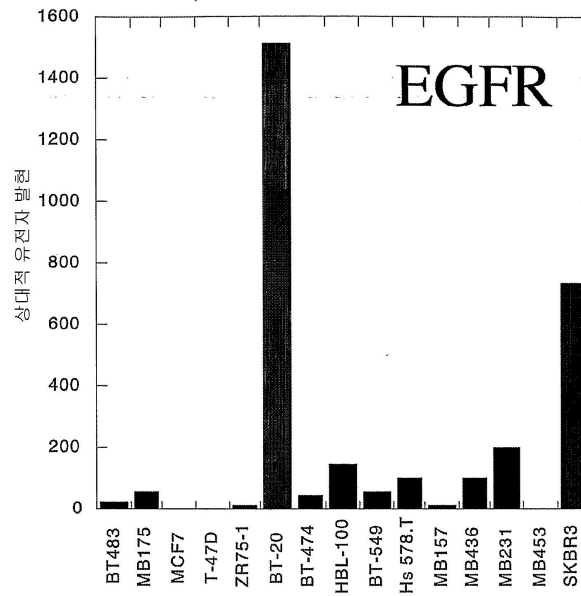
도면7C



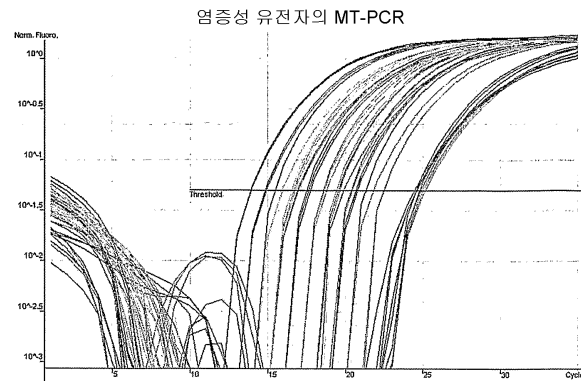
도면7D



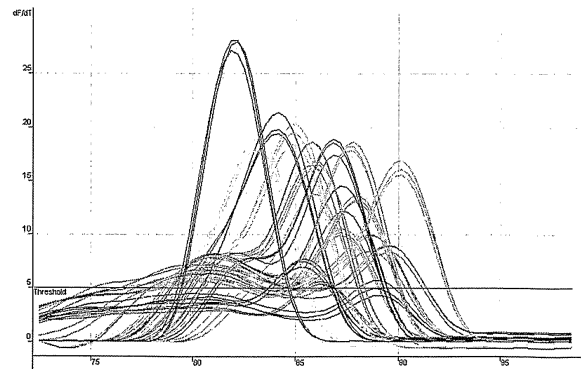
도면8



도면9A



도면9B

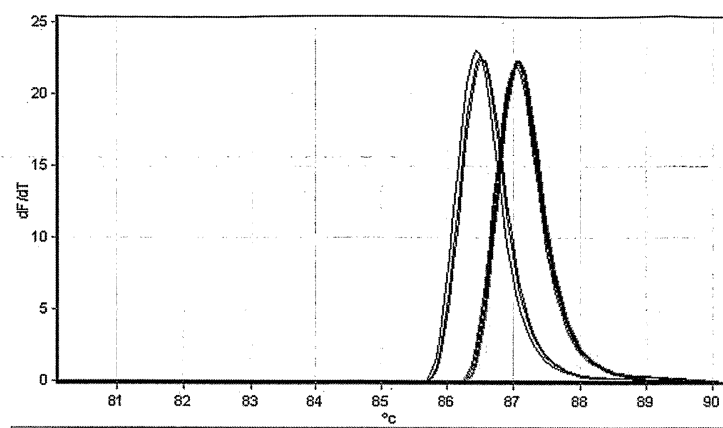


도면9C

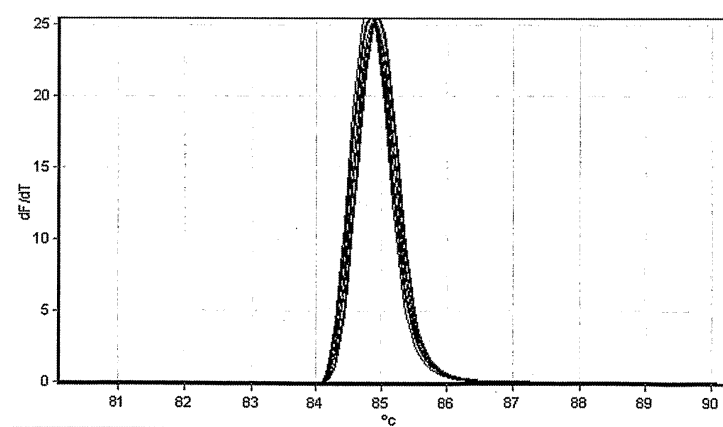
반응 산물의 바이오에너지 분석



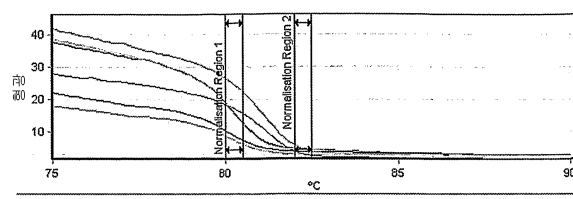
도면10A



도면10B



도면11A



도면11B

