



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년01월19일

(11) 등록번호 10-2490693

(24) 등록일자 2023년01월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6816 (2018.01) C12Q 1/6823 (2018.01)

C12Q 1/6825 (2018.01) C12Q 1/6834 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6816 (2018.05)

C12Q 1/6823 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2018-7036460

(22) 출원일자(국제) 2017년05월16일

심사청구일자 2020년05월15일

(85) 번역문제출일자 2018년12월14일

(65) 공개번호 10-2019-0012184

(43) 공개일자 2019년02월08일

(86) 국제출원번호 PCT/US2017/032947

(87) 국제공개번호 WO 2017/201073

국제공개일자 2017년11월23일

(30) 우선권주장

62/337,074 2016년05월16일 미국(US)

62/492,889 2017년05월01일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020050044668 A*

US20140371088 A1*

WO2013055995 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

나노스트링 테크놀로지스, 인크.

미국 워싱턴 (우편번호 98109) 시애틀 스위트
2000 페어뷰 애비뉴 노스 530

(72) 발명자

카피조브 루스텀

미국 98109 워싱턴주 시애틀 마이너 애비뉴 노스
391 #402

더너웨이 드웨인 엘

미국 98115 워싱턴주 시애틀 노스이스트 94번가
2751

그레고리 마크

미국 98125 워싱턴주 시애틀 24번 애비뉴 노스
스트 14327

(74) 대리인

김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 19 항

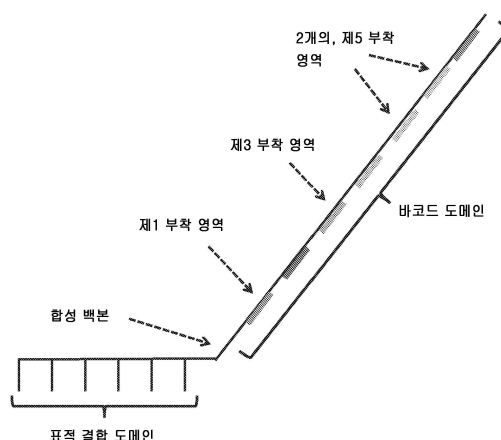
심사관 : 김현태

(54) 발명의 명칭 샘플 중 표적 핵산을 검출하는 방법

(57) 요약

본 발명은 샘플 중 표적 핵산을 정확하고, 신속하며, 감응성인 다중 방식으로 검출, 식별, 및 정량화하는 프로브, 방법, 키트, 및 장치를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6825 (2018.05)

C12Q 1/6834 (2018.05)

C12Q 2523/319 (2013.01)

C12Q 2563/113 (2013.01)

C12Q 2563/185 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

샘플 중 표적 핵산을 검출하는 방법으로서,

(1) 샘플을, 표적 핵산의 제1 특정 영역을 인식하고 그에 결합할 수 있는 프로브와 접촉시키는 단계로서, 프로브는 표적 결합 도메인 및 바코드 도메인을 포함하고,

표적 결합 도메인은 4개 이상의 뉴클레오티드를 포함하고, 표적 핵산의 제1 특정 영역을 인식하고 그에 결합할 수 있으며, 표적 결합 도메인은 알고 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하고;

바코드 도메인은, 제1 리포터 복합체의 제1 상보적 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 제1 부착 영역, 및 제2 리포터 복합체의 제2 상보적 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 제2 부착 영역을 포함하며;

제1 부착 영역의 서열은 제2 부착 영역의 서열과 상이한 것인 단계;

(2) 제1 검출가능한 표지를 포함하는 제1 리포터 복합체의 제1 상보적 핵산 분자를 제1 부착 영역에 결합시킴으로써, 검출가능한 표지를 제1 부착 영역과 회합시키는 단계;

(3) 제1 부착 영역과 회합된 제1 검출가능한 표지를 검출하는 단계;

(4) 제1 검출가능한 표지를 제거하는 단계;

(5) 제2 검출가능한 표지를 포함하는 제2 리포터 복합체의 제2 상보적 핵산 분자를 제2 부착 영역에 결합시킴으로써, 검출가능한 표지를 제2 부착 영역과 회합시키는 단계; 및

(6) 제2 부착 영역과 회합된 제2 검출가능한 표지를 검출하는 단계

를 포함하고,

검출가능한 표지를 포함하는 각 리포터 복합체가, 광 절단가능한 링커를 통해 1차 핵산 분자에 간접적으로 연결된 상보적 핵산 분자를 포함하고,

단계 (4)에서의 제1 검출가능한 표지의 제거는, 제1 리포터 복합체를, 적어도 하나의 광 절단가능한 링커를 절단하는 데 충분한 광과 접촉시켜 제1 검출가능한 표지를 유리시키는 것을 포함하고,

제1 부착 영역과 회합된 제1 검출가능한 표지 및 제2 부착 영역과 회합된 제2 검출가능한 표지의 선형적 순서 또는 순차적 순서가, 표적 핵산의 특정 영역을 식별함으로써, 샘플 중 표적 핵산을 검출하는 것인, 샘플 중 표적 핵산을 검출하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 바코드 도메인은, 제3 리포터 복합체에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 제3 부착 영역을 포함하고;

제3 부착 영역의 서열은 또 다른 부착 영역의 서열과 상이한 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

(7) 제2 검출가능한 표지를 제거하는 단계로서, 제2 검출가능한 표지의 제거는, 적어도 제2 리포터 복합체를, 적어도 하나의 광 절단가능한 링커를 절단하는 데 충분한 광과 접촉시켜 제2 검출가능한 표지를 유리시키는 것을 포함하는, 단계;

(8) 제3 검출가능한 표지를 포함하는 제3 리포터 복합체의 제3 상보적 핵산 분자를 제3 부착 영역에 결합시킴으로써, 검출가능한 표지를 제3 부착 영역과 회합시키는 단계; 및

(9) 제3 부착 영역과 회합된 제3 검출가능한 표지를 검출하는 단계

를 추가로 포함하고, 제1 부착 영역과 회합된 제1 검출가능한 표지, 제2 부착 영역과 회합된 제2 검출가능한 표지, 및 제3 부착 영역과 회합된 제3 검출가능한 표지의 선형적 순서 또는 순차적 순서가, 표적 핵산의 특정 영역을 식별함으로써, 샘플 중 표적 핵산을 검출하는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 바코드 도메인은, 리포터 복합체에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 적어도 4개의 부착 영역을 포함하고;

각각의 부착 영역의 서열은 또 다른 부착 영역의 서열과 상이한 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 바코드 도메인 내의 각 부착 영역이, 검출가능한 표지를 포함하는 리포터 복합체의 상보적 핵산 분자에 의해 순차적으로 결합되고, 순차적으로 결합된 상보적 핵산 분자의 검출가능한 표지가 검출될 때까지,

(a) 각각의 검출가능한 표지를 제거하는 단계로서, 각각의 검출가능한 표지의 제거는 각각의 리포터 복합체를, 적어도 하나의 광 절단가능한 링커를 절단하는 데 충분한 광과 접촉시켜 각각의 검출가능한 표지를 유리시키는 것을 포함하는, 단계;

(b) 검출가능한 표지를 포함하는 리포터 복합체의 상보적 핵산 분자를 각각의 부착 영역에 결합시킴으로써, 검출가능한 표지를 각각의 부착 영역과 회합시키는 단계; 및

(c) 부착 영역과 회합된 각각의 검출가능한 표지를 검출하는 단계

를 반복하고, 각 부착 영역과 회합된 검출가능한 표지의 선형적 순서 또는 순차적 순서가, 표적 핵산의 특정 영역을 식별함으로써, 샘플 중 표적 핵산을 검출하는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 광원은 아아크 램프, 레이저, 집속 UV 광원 및 발광 다이오드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 검출가능한 표지는, 각각, 자신의 방출 스펙트럼에 의해 식별될 수 있는 복수의 모이어티를 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 검출가능한 표지는 형광 모이어티를 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 각 모이어티의 방출 스펙트럼이 동일하거나, 또는 상이한 것인 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 적어도 하나의 모이어티의 방출 스펙트럼이 다른 모이어티와 상이한 것인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 프로브에의 결합 후, 표적 핵산의 제1 위치를, 기재에 선택적으로 결합하는 제1 결합 친화성 시약을 포함하는 제1 포획 프로브와 결합시킴으로써 표적 핵산을 기재에 고정화시키고, 제1 포획 프로브는 프로브가 표적 핵산에 결합하는 위치와 상이한, 표적 핵산 상의 위치에서 표적 핵산에 결합하는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 각 1차 핵산 분자는 적어도 1개의 2차 핵산 분자에 하이브리드화되는 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 각 2차 핵산 분자는 독립적으로, 절단가능한 링커를 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 절단가능한 링커는 독립적으로, 광 절단가능한 링커, 화학적으로 절단가능한 링커 및 효소적으로 절단가능한 링커의 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 2차 핵산 분자 또는 분자들은 적어도 하나의 검출가능한 표지를 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제12항에 있어서, 각 2차 핵산 분자는 적어도 하나의 검출가능한 표지를 포함하는 적어도 1개의 3차 핵산 분자에 하이브리드화되는 것인 방법.

청구항 17

제12항에 있어서, 각 2차 핵산 분자는 적어도 하나의 검출가능한 표지를 포함하는 적어도 1개의 3차 핵산 분자에 하이브리드화되고, 각 2차 핵산 분자는 독립적으로, 절단 가능한 링커를 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 각 리포터 복합체의 1차 핵산 분자는 적어도 6개의 2차 핵산 분자에 하이브리드화되고, 각 2차 핵산 분자는 적어도 5개의 3차 핵산 분자에 하이브리드화되고, 각 3차 핵산 분자는 적어도 하나의 검출가능한 표지를 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제15항에 있어서, 각 2차 핵산 분자는 광 절단가능한 링커를 포함하는 것인 방법.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

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

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2016년 5월 16일 출원된 U.S.S.N. 62/337,074, 및 2017년 5월 1일 출원된 U.S.S.N. 62/492,889를 우선권으로 주장한다. 상기 각 출원의 내용은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 본 출원은 EFS-웹을 통해 ASCII 포맷으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 이는 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다. 2017년 5월 16일 생성된 상기 ASCII 사본은 NATE-032001W0_ST25.txt로 명명되고, 그 크기는 22,780 바이트이다.

배경 기술

[0005] 현재 생물학적 샘플 중 핵산을 검출하는 다양한 방법이 있기는 하지만, 개선되고, 정확하며, 신속하고, 감응성인 다중 방식의 표적 핵산 검출, 식별, 및 정량화가 여전히 요구되고 있다. 본 발명은 이러한 요구를 다룬다.

발명의 내용

[0006] 본 발명은 샘플 중 표적 핵산을 정확하고, 신속하며, 감응성인 다중 방식으로 검출, 식별, 및 정량화하는 프로브, 방법, 키트, 및 장치를 제공한다.

[0007] 본 발명의 한 측면은 샘플 중 1 이상의 표적 핵산을 검출하는 방법이다. 본 방법은 샘플을, 1 이상의 표적 분자의 제1 특정 영역을 인식하고 그에 결합할 수 있는 1 이상의 프로브와 접촉시키는 단계로서, 1 이상의 프로브는 표적 결합 도메인 및 바코드 도메인을 포함하고, 표적 결합 도메인은 적어도 4개의 뉴클레오티드, 바람직하게, 6개 이상의 뉴클레오티드를 포함하고, 표적 핵산의 제1 특정 영역을 인식하고 그에 결합할 수 있고, 표적 결합 도메인은 알고 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하고; 바코드 도메인은 제1 상보적 핵산 분자, 제1 리포터 복합체의 제1 상보적 핵산 분자 또는 제1 하이브리드화 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 제1 부착 영역, 및 적어도 제2 상보적 핵산 분자, 적어도 제2 리포터 복합체의 적어도 제2 상보적 핵산 분자 또는 적어도 제2 하이브리드화 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 적어도 제2 부착 영역을 포함하는 바코드 도메인을 포함하고, 제1 부착 영역의 서열은 적어도 제2 부착 영역의 서열과 상이한 것인 제1 단계를 포함한다. 본 방법은 (2) 검출가능한 표지를 포함하는 제1 상보적 핵산 분자, 또는 검출가능한 표지를 포함하는 제1 리포터 복합체의 제1 상보적 핵산 분자를 제1 부착 영역에 결합시킴으로써, 검출가능한 표지를 제1 부착 영역과 회합시키는 단계; (3) 제1 부착 영역과 회합된 검출가능한 표지를 검출하는 단계; (4) 제1 검출가능한 표지 또는 제1 상보적 핵산 분자를 제거하는 단계; (5) 검출가능한 표지를 포함하는 적어도 제2 상보적 핵산 분자, 또는 검출가능한 표지를 포함하는 적어도 제2 리포터 복합체의 적어도 제2 상보적 핵산 분자를 적어도 제

2 부착 영역에 결합시킴으로써, 검출가능한 표지를 적어도 제2 부착 영역과 회합시키는 단계; 및 (6) 적어도 제2 부착 영역과 회합된 검출가능한 표지를 검출하는 단계인 추가 단계들로서; 제1 부착 영역과 회합된 검출가능한 표지 및 적어도 제2 부착 영역과 회합된 검출가능한 표지의 선형적 순서 또는 순차적 순서가, 1 이상의 표적 분자의 특정 영역을 식별함으로써, 샘플 중 1 이상의 표적 핵산을 검출하는 것인 추가 단계를 포함한다. 단계 (4) 및 (5)는 순차적으로 또는 동시에 이루어질 수 있다.

[0008] 실시양태에서, 단계 (4)에서 제1 상보적 핵산의 제거는 제1 부착 영역을, 검출가능한 표지가 없는 제1 하이브리드화 핵산 분자와 접촉시킴으로써, 제1 상보적 핵산 분자를 결합 해제시키고, 제1 부착 영역에 검출가능한 표지가 없는 제1 하이브리드화 핵산 분자를 결합시키는 것, 또는 제1 상보적 핵산 분자를 제거하는 데 충분한 pH, 염 농도, 및/또는 온도의 변화를 포함한다.

[0009] 실시양태에서, 바코드 도메인은 적어도 제3 상보적 핵산 분자, 적어도 제3 리포터 복합체의 적어도 제3 상보적 핵산 분자 또는 적어도 제3 하이브리드화 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 적어도 제3 부착 영역을 포함할 수 있고, 적어도 제3 부착 영역의 서열은 또 다른 부착 영역의 서열과 상이한 것이다.

[0010] 실시양태에서, 본 방법은 (7) 제2 검출가능한 표지 또는 제2 상보적 핵산 분자를 제거하는 단계; (8) 검출가능한 표지를 포함하는 적어도 제3 상보적 핵산 분자, 또는 검출가능한 표지를 포함하는 적어도 제3 리포터 복합체의 적어도 제3 상보적 핵산 분자를 적어도 제3 부착 영역에 결합시킴으로써, 검출가능한 표지를 적어도 제3 부착 영역과 회합시키는 단계; 및 (9) 제3 부착 영역과 회합된 검출가능한 표지를 검출하는 단계로서, 적어도 제3 부착 영역과 회합된 검출가능한 표지, 제1 부착 영역과 회합된 검출가능한 표지, 적어도 제2 부착 영역과 회합된 검출가능한 표지, 및 적어도 제3 부착 영역과 회합된 검출가능한 표지의 선형적 순서 또는 순차적 순서가, 1 이상의 표적 분자의 특정 영역을 식별함으로써, 샘플 중 1 이상의 표적 핵산을 검출하는 것인 단계를 추가로 포함할 수 있다. 단계 (7) 및 (8)은 순차적으로 또는 동시에 이루어질 수 있다.

[0011] 실시양태에서, 단계 (7)에서 제2 상보적 핵산의 제거는 제2 부착 영역을, 검출가능한 표지가 없는 제2 하이브리드화 핵산 분자와 접촉시켜 제2 상보적 핵산 분자를 결합 해제시키고, 제2 부착 영역에 검출가능한 표지가 없는 제2 하이브리드화 핵산 분자를 결합시키는 것, 또는 제2 상보적 핵산 분자를 제거하는 데 충분한 pH, 염 농도, 및/또는 온도의 변화를 포함한다.

[0012] 실시양태에서, 바코드 도메인은 적어도 제4 상보적 핵산 분자, 적어도 제4 리포터 복합체 또는 적어도 제4 하이브리드화 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 적어도 제4 부착 영역을 포함할 수 있고, 적어도 제4 부착 영역의 서열은 또 다른 부착 영역의 서열과 상이한 것이다. 실시양태에서, 바코드 도메인은 적어도 제5 상보적 핵산 분자, 적어도 제5 리포터 복합체 또는 적어도 제5 하이브리드화 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 적어도 제5 부착 영역을 포함할 수 있고, 적어도 제5 부착 영역의 서열은 또 다른 부착 영역의 서열과 상이한 것이다. 실시양태에서, 바코드 도메인은 적어도 제6 상보적 핵산 분자, 적어도 제6 리포터 복합체 또는 적어도 제6 하이브리드화 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 적어도 제6 부착 영역을 포함할 수 있고, 적어도 제6 부착 영역의 서열은 또 다른 부착 영역의 서열과 상이한 것이다. 실시양태에서, 바코드 도메인은 적어도 제7 상보적 핵산 분자, 적어도 제7 리포터 복합체 또는 적어도 제7 하이브리드화 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 적어도 제7 부착 영역을 포함할 수 있고, 적어도 제7 부착 영역의 서열은 또 다른 부착 영역의 서열과 상이한 것이다.

[0013] 실시양태에서, 바코드 도메인 내의 각 부착 영역이 검출가능한 표지를 상보적 핵산 분자에 의해 순차적으로 결합되고, 순차적으로 결합된 상보적 핵산 분자의 검출가능한 표지가 검출될 때까지, 각각의 검출가능한 표지 또는 상보적 핵산 분자를 제거하는 단계; 검출가능한 표지를 포함하는 상보적 핵산 분자, 또는 검출가능한 표지를 포함하는 리포터 복합체의 상보적 핵산 분자를 각각의 부착 영역에 결합시킴으로써, 검출가능한 표지를 각각의 부착 영역과 회합시키는 단계; 및 부착 영역과 회합된 각각의 검출가능한 표지를 검출하는 단계가 반복되고, 각 부착 영역과 회합된 검출가능한 표지의 선형적 순서 또는 순차적 순서가, 1 이상의 표적 분자의 특정 영역을 식별함으로써, 샘플 중 1 이상의 표적 핵산을 검출한다.

[0014] 실시양태에서, 검출가능한 표지가 없는 제1 하이브리드화 핵산 분자는 적어도, 제1 상보적 핵산 분자의 핵산 서열을 포함한다.

[0015] 실시양태에서, 제1 부착 영역은 적어도 하나의 플랭킹 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 유사체에 인접해 있을 수 있다. 검출가능한 표지가 없는 제1 하이브리드화 핵산 분자는 상기 제1 부착 영역에 인접한 적어도 하나의 플랭킹 단일 가닥 폴리뉴클레오티드에 부분적으로 상보적 핵산 서열을 추가로 포함할 수

있다.

- [0016] 실시양태에서, 검출가능한 표지가 없는 적어도 제2 하이브리드화 핵산 분자는 적어도, 적어도 제2 상보적 핵산 분자의 핵산 서열을 포함한다.
- [0017] 실시양태에서, 적어도 제2 부착 영역은 적어도 하나의 플랭킹 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 유사체에 인접해 있을 수 있다. 검출가능한 표지가 없는 적어도 제2 하이브리드화 핵산 분자는 적어도 제2 부착 영역에 인접한 적어도 하나의 플랭킹 단일 가닥 폴리뉴클레오티드에 부분적으로 상보적 핵산 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0018] 실시양태에서, 바코드 도메인은 다당류, 펩티드, 펩티드 핵산, 폴리펩티드, 또는 단일 가닥형 가닥 DNA, 단일 가닥 RNA, 또는 단일 가닥 PNA로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 합성 백본을 포함할 수 있다.
- [0019] 실시양태에서, 1 이상의 프로브는 단일 가닥 또는 이중 가닥 RNA, DNA, PNA, 또는 다른 폴리뉴클레오티드 유사체 또는 표적 결합 도메인과 바코드 도메인 사이의 PEG 스페이서를 포함할 수 있다. 스페이서는 이중 가닥 DNA 일 수 있다.
- [0020] 실시양태에서, 제1 리포터 복합체의 제1 상보적 핵산 분자, 적어도 제2 상보적 핵산 분자 및 적어도 제2 리포터 복합체의 적어도 제2 상보적 핵산 분자는 독립적으로 RNA, DNA, PNA, 또는 다른 폴리뉴클레오티드 유사체이다.
- [0021] 실시양태에서, 적어도 제3 상보적 핵산, 또는 제3 리포터 복합체의 적어도 제3 상보적 핵산은 RNA, DNA, PNA, 또는 다른 폴리뉴클레오티드 유사체일 수 있다.
- [0022] 실시양태에서, 상기 표적 결합 도메인 내의 적어도 하나의 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드 또는 핵산 유사체일 수 있다. 상기 표적 결합 도메인 내의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 또는 적어도 6개의 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드 또는 핵산 유사체일 수 있다. 상기 표적 결합 도메인 내의 각 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드 또는 핵산 유사체일 수 있다. 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드 또는 적어도 하나의 핵산 유사체는 잠금 핵산(LNA: locked nucleic acid)일 수 있다. 적어도 변형된 뉴클레오티드 또는 적어도 하나의 핵산 유사체는 범용 염기를 포함할 수 있다.
- [0023] 실시양태에서, 표적 핵산을 먼저 적어도, 표적 핵산의 제1 위치를, 기재에 선택적으로 결합하는 제1 친화성 결합 시약을 포함하는 제1 포획 프로브와 결합시킴으로써 기재에 고정화시킬 수 있다. 실시양태에서, 프로브에의 결합 후, 적어도, 표적 핵산의 제1 위치를, 기재에 선택적으로 결합하는 제1 친화성 결합 시약을 포함하는 제1 포획 프로브와 결합시킴으로써 표적 핵산을 기재에 고정화시킨다. 실시양태에서, 제1 포획 프로브는 1 이상의 프로브가 표적 핵산에 결합하는 위치와 상이한, 표적 핵산 상의 위치에서 표적 핵산에 결합한다. 표적 핵산은 제1 위치에서 기재에 고정화된 표적 핵산을 연장시키는 데 충분한 힘(예컨대, 중력, 동유체력, 전자기력, 플로우 스트레칭(flow-stretching), 리시딩 메니스커스 기법(receding meniscus technique), 또는 이들의 조합)을 가함으로써 신장시킬 수 있다. 표적 핵산의 적어도 제2 위치를, 기재에 선택적으로 결합하는 친화성 결합 시약을 포함하는 적어도 제2 포획 프로브와 결합시킴으로써 표적 핵산을 기재에 추가로 고정화시킬 수 있다. 전형적으로, 제2 포획 프로브는 1 이상의 프로브 및 제1 포획 프로브가 표적 핵산에 결합하는 위치와 상이한, 표적 핵산 상의 위치에서 표적 핵산에 결합한다. 표적 핵산을 적어도 프로브의 일부, 또는 상보적 핵산 분자 또는 리포터 복합체의 일부를, 기재에 선택적으로 결합하는 제3 친화성 결합 시약을 포함하는 적어도 제3 포획 프로브와 결합시킴으로써 기재에 추가로 고정화시킬 수 있다. 표적 핵산을 프로브의 일부, 적어도 하나의 상보적 핵산 분자 또는 적어도 하나의 리포터 복합체의 일부를, 제4 친화성 결합 시약을 통해 기재에 결합시킴으로써 기재에 추가로 고정화시킬 수 있다. 전형적인 친화성 결합 시약으로는 리간드, 항원, 탄수화물, 수용체, 렉틴, 항체, 비오틴, 아비딘, 합텐, 및 알고 있는 서열을 가지는 핵산을 포함한다. 표적 핵산을 약 3 내지 적어도 10개의 위치에서 기재에 고정화시킬 수 있다. 힘은, 일단 표적 핵산의 제2 위치가 기재에 고정화되고 나면 제거될 수 있다. 실시양태에서, 고정화된 표적 핵산은 신장된다.
- [0024] 실시양태에서, 제1 포획 프로브는 제2 친화성 시약을 포함할 수 있다.
- [0025] 실시양태에서, 제1 포획 프로브의 제2 친화성 시약은 1 이상의 프로브의 제1 친화성 시약과 상이한 것이다.
- [0026] 실시양태에서, 제1 포획 프로브는 제2 친화성 시약과 상이한 제3 친화성 시약을 추가로 포함할 수 있다.
- [0027] 실시양태에서, 제1 친화성 시약, 제2 친화성 시약, 및 제3 친화성 시약은 상이한 것이다.
- [0028] 실시양태에서, 표적 결합 도메인 중 뉴클레오티드 개수는 바코드 도메인 내의 상이한 부착 영역의 개수와 같다.

- [0029] 실시양태에서, 표적 결합 도메인 중 뉴클레오티드 개수는 바코드 도메인 내의 상이한 부착 영역의 개수보다 적어도 하나 더 많을 수 있다.
- [0030] 실시양태에서, 표적 결합 도메인 중 뉴클레오티드 개수는 바코드 도메인 내의 부착 영역의 개수의 적어도 2배이다.
- [0031] 실시양태에서, 표적 결합 도메인 중 뉴클레오티드 개수는 8개이고, 바코드 도메인 내의 부착 영역의 개수는 3개이다.
- [0032] 실시양태에서, 표적 결합 도메인 중 뉴클레오티드 개수는 바코드 도메인 내의 상이한 부착 영역의 개수보다 적어도 하나 더 적을 수 있다.
- [0033] 실시양태에서, 프로브의 표적 결합 도메인은 적어도 6개의 뉴클레오티드, 또는 적어도 8개의 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0034] 실시양태에서, 프로브의 표적 결합 도메인은 10-100, 20-60 또는 3,550개의 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0035] 실시양태에서, 적어도 제1 부착 영역은 바코드 도메인 상의 제1 위치로부터 분지된다. 실시양태에서, 적어도 제2 부착 영역은 바코드 도메인 상의 적어도 제2 위치로부터 분지된다. 실시양태에서, 각 부착 영역은 바코드 도메인 상의 위치로부터 분지된다. 바코드 도메인은 적어도 2개의 제1 부착 영역을 포함하는 제1 위치를 포함할 수 있고, 적어도 2개의 제1 부착 영역은 제1 상보적 핵산 분자 또는 제1 리포터 복합체의 제1 상보적 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 동일한 핵산 서열을 포함한다. 바코드 도메인은 적어도 2개의 제2 부착 영역을 포함하는 적어도 제2 위치를 포함할 수 있고, 적어도 2개의 제2 부착 영역은 적어도 제2 상보적 핵산 분자 또는 제2 리포터 복합체의 제2 상보적 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 동일한 핵산 서열을 포함한다. 바코드 도메인은 적어도 2개의 제3 부착 영역을 포함하는 적어도 제3 위치를 포함할 수 있고, 적어도 2개의 제3 부착 영역은 적어도 제3 상보적 핵산 분자 또는 제3 리포터 복합체의 제3 상보적 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 동일한 핵산 서열을 포함한다.
- [0036] 실시양태에서, 바코드 도메인 내의 각 위치는 동일한 개수의 부착 영역을 포함할 수 있다. 실시양태에서, 바코드 도메인 내의 적어도 하나의 위치는 1개 초과와 부착 영역을 포함할 수 있다. 바코드 도메인 내의 각 위치는 1개 초과와 부착 영역을 포함할 수 있다.
- [0037] 실시양태에서, 바코드 도메인 내의 적어도 하나의 위치는 또 다른 위치보다 더 많은 개수의 부착 영역을 포함할 수 있다.
- [0038] 실시양태에서, 바코드 도메인 상의 적어도 하나의 위치는 그의 부착 영역의 1 내지 50개의 카피를 포함할 수 있고, 예컨대, 바코드 도메인 상의 각 위치는 그의 부착 영역의 1 내지 50개의 카피를 포함할 수 있다.
- [0039] 실시양태에서, 1 이상의 프로브는 바코드 도메인에 작동가능하게 연결된 표적 결합 도메인의 다수의 카피를 포함할 수 있다.
- [0040] 실시양태에서, 검출가능한 표지를 포함하는 각 리포터 복합체는 1차 핵산 분자에 직접적으로 연결된 상보적 핵산 분자를 포함할 수 있다.
- [0041] 실시양태에서, 검출가능한 표지를 포함하는 각 리포터 복합체는 핵산 스페이서를 통해 1차 핵산 분자에 간접적으로 연결된 상보적 핵산 분자를 포함할 수 있다.
- [0042] 실시양태에서, 검출가능한 표지를 포함하는 각 리포터 복합체는 핵산 스페이서와 유사한 기계적 특성을 가지는 중합체 스페이서를 통해 1차 핵산 분자에 간접적으로 연결된 상보적 핵산 분자를 포함할 수 있다.
- [0043] 실시양태에서, 검출가능한 표지를 포함하는 각 리포터 복합체는 절단가능한 링커를 통해 1차 핵산 분자에 간접적으로 연결된 상보적 핵산 분자를 포함한다.
- [0044] 실시양태에서, 절단가능한 링커는 광 절단가능한, 화학적으로 절단가능한 또는 효소적으로 절단가능한 것이다. 전형적으로, 각 절단가능한 링커는 독립적으로 모든 다른 링커로부터 절단가능하다.
- [0045] 실시양태에서, 광 절단가능한 링커는 광원, 예컨대, 아아크 램프, 레이저, 집속 UV 광원 또는 발광 다이오드에 의해 절단된다.
- [0046] 실시양태에서, 각 상보적 핵산 분자는 약 8개의 뉴클레오티드 내지 약 20개의 뉴클레오티드, 예컨대, 약 10개의

뉴클레오타이드, 약 12개의 뉴클레오타이드, 및 약 14개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

- [0047] 실시양태에서, 각 1차 핵산 분자는 적어도 하나의 2차 핵산 분자, 예컨대, 적어도 2개의 2차 핵산 분자, 적어도 3개의 2차 핵산 분자, 적어도 4개의 2차 핵산 분자, 적어도 5개의 2차 핵산 분자, 및 적어도 6개의 2차 핵산 분자에 하이브리드화될 수 있다. 2차 핵산 분자 또는 분자들은 적어도 하나의 검출가능한 표지를 포함할 수 있다.
- [0048] 실시양태에서, 2차 핵산 분자는 절단가능한 링커를 포함할 수 있다. 예를 들어, 절단가능한 링커는 광 절단가능한, 화학적으로 절단가능한 또는 효소적으로 절단가능한 것이다. 실시양태에서, 1차 핵산 분자에 하이브리드화된 다양한 2차 핵산 분자는 모두 동일한 절단가능한 링커, 절단가능한 링커 비포함, 각종 절단가능한 링커의 조합, 또는 각종 절단가능한 링커 및 절단가능한 링커 비포함의 조합을 포함할 수 있다.
- [0049] 실시양태에서, 각 2차 핵산 분자는 적어도 하나의 검출가능한 표지를 포함하는 적어도 하나의 3차 핵산 분자, 예컨대, 적어도 하나의 검출가능한 표지를 포함하는 예컨대, 적어도 2, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5, 적어도 6, 또는 적어도 7개의 3차 핵산 분자에 하이브리드화될 수 있다.
- [0050] 실시양태에서, 적어도 하나의 2차 핵산 분자는 1차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않고, 3차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않는 영역을 포함할 수 있다. 실시양태에서, 각 2차 핵산 분자는 1차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않고, 3차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않는 영역을 포함할 수 있다. 1차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않고, 3차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않는 영역은 1차 핵산 분자에 직접적으로 연결된 상보적 핵산 분자의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 1차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않고, 3차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않는 영역은 2차 핵산 분자의 말단에 위치할 수 있다. 1차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않고, 3차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않는 영역은 약 8개의 뉴클레오타이드 내지 약 20개의 뉴클레오타이드, 예컨대, 약 12개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0051] 실시양태에서, 1 이상의 표적 핵산은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 또는 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000개 이상, 및 그 사이의 임의 개수의 상이한 표적 핵산을 포함할 수 있다.
- [0052] 실시양태에서, 본 방법은 샘플 중 적어도 하나의 표적 단백질을 검출하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0053] 실시양태에서, 적어도 하나의 표적 단백질은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 또는 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000개 이상, 및 그 사이의 임의 개수의 상이한 표적 단백질을 포함할 수 있다.
- [0054] "하나 이상의," "적어도 하나의"라는 용어 등은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 또는 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000개 이상, 및 그 사이의 임의 개수를 포함하나, 이에 제한되지 않는 것으로 이해된다.

- [0055] "복수 개," "적어도 2개," "2개 이상," "적어도 제2"라는 용어 등은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 또는 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000개 이상, 및 그 사이의 임의 개수를 포함하나, 이에 제한되지 않는 것으로 이해된다. 따라서, "적어도 2개의 표지 부착 위치"는 2개의 표지 부착 위치, 4개의 표지 부착 위치, 6개의 표지 부착 위치, 8개의 표지 부착 위치, 10개 이상의 표지 부착 위치를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 본 개시내용은 또한 (1) 샘플을, 1 이상의 표적 분자의 제1 특정 영역을 인식하고 그에 결합할 수 있는 1 이상의 프로브와 접촉시키는 단계로서, 1 이상의 프로브는 표적 결합 도메인 및 바코드 도메인을 포함하고, 표적 결합 도메인은 적어도 4개의 뉴클레오티드를 포함하고, 표적 핵산의 제1 특정 영역을 인식하고 그에 결합할 수 있고, 표적 결합 도메인은 알고 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하고; 바코드 도메인은 제1 상보적 핵산 분자 또는 제1 리포터 복합체의 제1 상보적 핵산 분자에 의해 결합되는 핵산 서열을 포함하는 제1 부착 영역, 및 적어도 제2 상보적 핵산 분자 또는 적어도 제2 리포터 복합체의 적어도 제2 상보적 핵산 분자에 의해 결합되는 적어도 제2 부착 영역을 포함하는 바코드 도메인을 포함하고; 제1 상보적 핵산 분자 또는 제1 리포터 복합체의 제1 상보적 핵산 분자는 제1 검출가능한 표지를 포함함으로써, 검출가능한 표지를 제1 부착 영역과 회합시키고; 적어도 제2 상보적 핵산 분자 또는 적어도 제2 리포터 복합체의 적어도 제2 상보적 핵산 분자는 제2 검출가능한 표지를 포함함으로써, 검출가능한 표지를 적어도 제2 부착 영역과 회합시키며; 제1 부착 영역의 서열은 적어도 제2 부착 영역의 서열과 상이한 것인 단계; (2) 제1 부착 영역과 회합된 제1 검출가능한 표지 및 적어도 제2 부착 영역과 회합된 제2 검출가능한 표지를 검출하는 단계; (3) 제1 검출가능한 표지를 제거하는 단계; (4) 적어도 제2 부착 영역과 회합된 제2 검출가능한 표지를 검출하는 단계를 포함하고, 제1 부착 영역과 회합된 제1 검출가능한 표지 및 적어도 제2 부착 영역과 회합된 제2 검출가능한 표지의 선허적 순서 또는 순차적 순서가, 1 이상의 표적 분자의 특정 영역을 식별함으로써, 샘플 중 1 이상의 표적 핵산을 검출하는 것인, 샘플 중 1 이상의 표적 핵산을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0057] 단계 (4)에서의 검출은 단계 (2)에서의 제1 부착 영역과 회합된 제1 검출가능한 표지 및 적어도 제2 부착 영역과 회합된 제2 검출가능한 표지의 검출로부터의 신호로부터, 단계 (4)에서의 적어도 제2 부착 영역과 회합된 제2 검출가능한 표지로부터의 신호를 차감하는 것을 포함할 수 있다.
- [0058] 바코드 도메인은 제1 상보적 핵산 분자 또는 제1 리포터 복합체의 제1 상보적 핵산 분자에 의해 결합되는 핵산 서열을 포함하는 제1 부착 영역, 적어도 제2 상보적 핵산 분자 또는 적어도 제2 리포터 복합체의 적어도 제2 상보적 핵산 분자에 의해 결합되는 적어도 제2 부착 영역, 및 적어도 제3 상보적 핵산 분자 또는 적어도 제3 리포터 복합체의 적어도 제3 상보적 핵산 분자에 의해 결합되는 적어도 제3 부착 영역을 포함할 수 있고; 제1 상보적 핵산 분자 또는 제1 리포터 복합체의 제1 상보적 핵산 분자는 제1 검출가능한 표지를 포함함으로써, 검출가능한 표지를 제1 부착 영역과 회합시키고; 제2 상보적 핵산 분자 또는 적어도 제2 리포터 복합체의 제2 상보적 핵산 분자는 제2 검출가능한 표지를 포함함으로써, 검출가능한 표지를 적어도 제2 부착 영역과 회합시키며; 제3 상보적 핵산 분자 또는 적어도 제3 리포터 복합체의 제3 상보적 핵산 분자는 제3 검출가능한 표지를 포함함으로써, 검출가능한 표지를 적어도 제3 부착 영역과 회합시키고; 적어도 제3 부착 영역, 적어도 제2 부착 영역 및 적어도 제3 부착 영역의 서열은 상이하고; 본 방법은, (2) 제1 부착 영역과 회합된 제1 검출가능한 표지, 적어도 제2 부착 영역과 회합된 제2 검출가능한 표지, 및 제3 부착 영역과 회합된 적어도 제3 검출가능한 표지를 검출하는 단계; (3) 제1 검출가능한 표지를 제거하는 단계; (4) 적어도 제2 부착 영역과 회합된 제2 검출가능한 표지, 및 제3 부착 영역과 회합된 적어도 제3 검출가능한 표지를 검출하는 단계; (5) 제2 검출가능한 표지를 제거하는 단계; (6) 적어도 제3 부착 영역과 회합된 제3 검출가능한 표지를 검출하는 단계로서; 제1 부착 영역과 회합된 제1 검출가능한 표지, 적어도 제2 부착 영역과 회합된 제2 검출가능한 표지, 및 제3 부착 영역과 회합된 적어도 제3 검출가능한 표지의 선허적 순서 또는 순차적 순서가, 1 이상의 표적 분자의 특정 영역을 식별함으로써, 샘플 중 1 이상의 표적 핵산을 검출하는 것인 단계를 포함한다.
- [0059] 단계 (4)에서의 검출은 단계 (2)에서의 제1 부착 영역과 회합된 제1 검출가능한 표지, 적어도 제2 부착 영역과 회합된 제2 검출가능한 표지, 및 제3 부착 영역과 회합된 적어도 제3 검출가능한 표지의 검출로부터의 신호로부터

터, 단계 (4)에서의 적어도 제2 부착 영역과 회합된 제2 검출가능한 표지, 및 제3 부착 영역과 회합된 적어도 제3 검출가능한 표지로부터의 신호를 차감하는 것을 포함할 수 있다.

[0060] 단계 (6)에서의 검출은 단계 (4)에서의 적어도 제2 부착 영역과 회합된 제2 검출가능한 표지, 및 제3 부착 영역과 회합된 적어도 제3 검출가능한 표지의 검출로부터의 신호로부터, 단계 (6)에서의 제3 부착 영역과 회합된 적어도 제3 검출가능한 표지로부터의 신호를 차감하는 것을 포함할 수 있다.

[0061] 본 개시내용은 또한 (1) 샘플을, 1 이상의 표적 분자의 제1 특정 영역을 인식하고 그에 결합할 수 있는 1 이상의 프로브와 접촉시키는 단계로서, 1 이상의 프로브는 표적 결합 도메인 및 바코드 도메인을 포함하고, 표적 결합 도메인은 적어도 4개의 뉴클레오타이드를 포함하고, 표적 핵산의 제1 특정 영역을 인식하고 그에 결합할 수 있고, 표적 결합 도메인은 알고 있는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 바코드 도메인은 제1 상보적 핵산 분자, 제1 리포터 복합체의 제1 상보적 핵산 분자 또는 제1 하이브리드화 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 제1 부착 영역, 및 적어도 제2 상보적 핵산 분자, 적어도 제2 리포터 복합체의 적어도 제2 상보적 핵산 분자 또는 적어도 제2 하이브리드화 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 적어도 제2 부착 영역을 포함하고; 제1 부착 영역의 서열은 적어도 제2 부착 영역의 서열과 상이한 것인 단계; (2) 제1 검출가능한 표지를 포함하는 제1 상보적 핵산 분자, 또는 제1 검출가능한 표지를 포함하는 제1 리포터 복합체의 제1 상보적 핵산 분자를 제1 부착 영역에 결합시킴으로써, 검출가능한 표지를 제1 부착 영역과 회합시키는 단계; (3) 제1 부착 영역과 회합된 제1 검출가능한 표지를 검출하는 단계; (4) 제1 검출가능한 표지 또는 제1 상보적 핵산 분자를 제거하는 단계; (5) 제2 검출가능한 표지를 포함하는 적어도 제2 상보적 핵산 분자, 또는 제2 검출가능한 표지를 포함하는 적어도 제2 리포터 복합체의 적어도 제2 상보적 핵산 분자를 적어도 제2 부착 영역에 결합시킴으로써, 검출가능한 표지를 적어도 제2 부착 영역과 회합시키는 단계; 및 (6) 적어도 제2 부착 영역과 회합된 제2 검출가능한 표지를 검출하는 단계를 포함하고, 제1 부착 영역과 회합된 제1 검출가능한 표지 및 적어도 제2 부착 영역과 회합된 제2 검출가능한 표지의 선허적 순서 또는 순차적 순서가, 1 이상의 표적 분자의 특정 영역을 식별함으로써, 샘플 중 1 이상의 표적 핵산을 검출하는 것인, 샘플 중 1 이상의 표적 핵산을 검출하는 방법을 제공한다. 단계 (4) 및 (5)는 순차적으로 또는 동시에 이루어질 수 있다.

[0062] 바코드 도메인은 적어도 제3 상보적 핵산 분자, 적어도 제3 리포터 복합체 또는 적어도 제3 하이브리드화 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 적어도 제3 부착 영역을 포함할 수 있고; 적어도 제3 부착 영역의 서열은 또 다른 부착 영역의 서열과 상이한 것이다.

[0063] 본 방법은 (7) 제2 검출가능한 표지 또는 제2 상보적 핵산 분자를 제거하는 단계; (8) 제3 검출가능한 표지를 포함하는 적어도 제3 상보적 핵산 분자, 또는 제3 검출가능한 표지를 포함하는 적어도 제3 리포터 복합체의 적어도 제3 상보적 핵산 분자를 적어도 제3 부착 영역에 결합시킴으로써, 검출가능한 표지를 적어도 제3 부착 영역과 회합시키는 단계; 및 (9) 적어도 제3 부착 영역과 회합된 제3 검출가능한 표지를 검출하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 여기서 제1 부착 영역과 회합된 제1 검출가능한 표지, 적어도 제2 부착 영역과 회합된 제2 검출가능한 표지, 및 적어도 제3 부착 영역과 회합된 제3 검출가능한 표지의 선허적 순서 또는 순차적 순서가, 1 이상의 표적 분자의 특정 영역을 식별함으로써, 샘플 중 1 이상의 표적 핵산을 검출한다. 단계 (7) 및 (8)은 순차적으로 또는 동시에 이루어질 수 있다.

[0064] 단계 (4)에서 제1 상보적 핵산의 제거는 (a) 제1 부착 영역을, 검출가능한 표지가 없는 제1 하이브리드화 핵산 분자와 접촉시킴으로써, 제1 상보적 핵산 분자를 결합 해제시키고, 제1 부착 영역에 검출가능한 표지가 없는 제1 하이브리드화 핵산 분자를 결합시키는 것, (b) 제1 상보적 핵산 분자를 제거하는 데 충분한 pH, 염 농도, 및/또는 온도의 변화를 포함할 수 있다.

[0065] 단계 (7)에서 제2 상보적 핵산의 제거는 (a) 제2 부착 영역을, 검출가능한 표지가 없는 제2 하이브리드화 핵산 분자와 접촉시켜 제2 상보적 핵산 분자를 결합 해제시키고, 제2 부착 영역에 검출가능한 표지가 없는 제2 하이브리드화 핵산 분자를 결합시키는 것, (b) 제2 상보적 핵산 분자를 제거하는 데 충분한 pH, 염 농도, 및/또는 온도의 변화를 포함할 수 있다.

[0066] 바코드 도메인은 적어도 제4 상보적 핵산 분자, 적어도 제4 리포터 복합체 또는 적어도 제4 하이브리드화 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 적어도 제4 부착 영역을 포함할 수 있고; 적어도 제4 부착 영역의 서열은 또 다른 부착 영역의 서열과 상이한 것이다.

[0067] 바코드 도메인은 적어도 제5 상보적 핵산 분자, 적어도 제5 리포터 복합체 또는 적어도 제5 하이브리드화 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 적어도 제5 부착 영역을 포함할 수 있고; 적어도 제5 부착

영역의 서열은 또 다른 부착 영역의 서열과 상이한 것이다.

- [0068] 바코드 도메인은 적어도 제6 상보적 핵산 분자, 적어도 제6 리포터 복합체 또는 적어도 제6 하이브리드화 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 적어도 제6 부착 영역을 포함할 수 있고; 적어도 제6 부착 영역의 서열은 또 다른 부착 영역의 서열과 상이한 것이다.
- [0069] 바코드 도메인은 적어도 제7 상보적 핵산 분자, 적어도 제7 리포터 복합체 또는 적어도 제7 하이브리드화 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 적어도 제7 부착 영역을 포함할 수 있고; 적어도 제7 부착 영역의 서열은 또 다른 부착 영역의 서열과 상이한 것이다.
- [0070] 바코드 도메인 내의 각 부착 영역이 검출가능한 표지를 포함하는 상보적 핵산 분자에 의해 순차적으로 결합되고, 순차적으로 결합된 상보적 핵산 분자의 검출가능한 표지가 검출될 때까지, (a) 각각의 검출가능한 표지 또는 상보적 핵산 분자를 제거하는 단계; (b) 검출가능한 표지를 포함하는 상보적 핵산 분자, 또는 검출가능한 표지를 포함하는 리포터 복합체의 상보적 핵산 분자를 각각의 부착 영역에 결합시킴으로써, 검출가능한 표지를 각각의 부착 영역과 회합시키는 단계; 및 (c) 부착 영역과 회합된 각각의 검출가능한 표지를 검출하는 단계를 반복하고, 각 부착 영역과 회합된 검출가능한 표지의 선행적 순서 또는 순차적 순서가, 1 이상의 표적 분자의 특정 영역을 식별함으로써, 샘플 중 1 이상의 표적 핵산을 검출한다.
- [0071] 검출가능한 표지가 없는 제1 하이브리드화 핵산 분자는 적어도, 제1 상보적 핵산 분자의 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [0072] 제1 부착 영역은 적어도 하나의 플랭킹 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 유사체에 인접해 있을 수 있다.
- [0073] 검출가능한 표지가 없는 제1 하이브리드화 핵산 분자는 상기 제1 부착 영역에 인접한 적어도 하나의 플랭킹 단일 가닥 폴리뉴클레오티드에 부분적으로 상보적 핵산 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0074] 검출가능한 표지가 없는 적어도 제2 하이브리드화 핵산 분자는 적어도, 적어도 제2 상보적 핵산 분자의 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [0075] 적어도 제2 부착 영역은 적어도 하나의 플랭킹 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 유사체에 인접해 있을 수 있다.
- [0076] 검출가능한 표지가 없는 적어도 제2 하이브리드화 핵산 분자는 적어도 제2 부착 영역에 인접한 적어도 하나의 플랭킹 단일 가닥 폴리뉴클레오티드에 부분적으로 상보적 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [0077] 단계 (3)에서 제1 검출가능한 표지의 제거는 제1 상보적 핵산 분자 또는 제1 리포터 복합체의 제1 상보적 핵산 분자를 제1 검출가능한 표지를 유리시키는 데 충분한 제1 상보적 핵산 분자의 위치로 가해지는 힘과 접촉시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0078] 단계 (5)에서 제2 검출가능한 표지의 제거는 제2 상보적 핵산 분자 또는 적어도 제2 리포터 복합체의 제2 상보적 핵산 분자를 제2 검출가능한 표지를 유리시키는 데 충분한 제2 상보적 핵산 분자의 위치로 가해지는 힘과 접촉시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0079] 단계 (4)에서 제1 검출가능한 표지의 제거는 제1 상보적 핵산 분자 또는 적어도 제1 리포터 복합체의 제1 상보적 핵산 분자를 제1 검출가능한 표지를 유리시키는 데 충분한 제1 상보적 핵산 분자의 위치로 가해지는 힘과 접촉시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0080] 단계 (7)에서 제2 검출가능한 표지의 제거는 제2 상보적 핵산 분자 또는 적어도 제2 리포터 복합체의 제2 상보적 핵산 분자를 제2 검출가능한 표지를 유리시키는 데 충분한 제2 상보적 핵산 분자의 위치로 가해지는 힘과 접촉시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0081] 제1 상보적 핵산 분자, 제1 리포터 복합체의 제1 상보적 핵산 분자, 적어도 제2 상보적 핵산 분자, 적어도 제2 리포터 복합체의 적어도 제2 상보적 핵산 분자, 적어도 제3 상보적 핵산 분자 또는 적어도 제3 리포터 복합체의 적어도 제3 상보적 핵산 분자 중 적어도 하나는 적어도 하나의 절단가능한 링커를 포함할 수 있다.
- [0082] 적어도 하나의 절단가능한 링커는 독립적으로 광 절단가능한, 화학적으로 절단가능한 및 효소적으로 절단가능한 링커의 군으로부터 선택될 수 있다. 각 절단가능한 링커는 독립적으로 모든 다른 링커로부터 절단가능한 것일 수 있다. 광 절단가능한 링커는 아아크 램프, 레이저, 집속 UV 광원, 및 발광 다이오드로 구성된 군으로부터 선

택되는 광원에 의해 절단될 수 있다. 힘은 광일 수 있다.

- [0083] 본 개시내용의 방법은 1 이상의 표적 핵산으로부터 프로브를 세척하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 세척은 표적 분자로부터 프로브를 제거하는 데 충분한 pH, 염 농도, 및/또는 온도의 변화를 포함할 수 있다.
- [0084] 본 개시내용의 방법은 (i) 샘플을, 1 이상의 표적 분자의 제2 특정 영역을 인식하고 그에 결합할 수 있는 적어도 제2 프로브와 접촉시키는 단계로서, 제2 특정 영역은 1 이상의 표적 분자의 제1 특정 영역과 상이한 것인 단계; (ii) 샘플을, 1 이상의 표적 분자의 제1 특정 영역을 인식하고 그에 결합할 수 있는 제1 프로브의 적어도 제2 카피와 접촉시키는 단계; 또는 (iii) 샘플을 적어도 제2 표적 분자의 제1 특정 영역을 인식하고 그에 결합할 수 있는 적어도 제3 프로브와 접촉시키는 단계로서, 적어도 제2 표적 분자는 1 이상의 표적 분자와 상이하고; 프로브는 표적 결합 도메인 및 바코드 도메인을 포함하고, 표적 결합 도메인은 적어도 4개의 뉴클레오타이드를 포함하고; 바코드 도메인은 제1 상보적 핵산 분자 또는 제1 리포터 복합체의 제1 상보적 핵산 분자에 의해 결합되는 핵산 서열을 포함하는 제1 부착 영역, 및 적어도 제2 상보적 핵산 분자 또는 적어도 제2 리포터 복합체의 적어도 제2 상보적 핵산 분자에 의해 결합되는 적어도 제2 부착 영역을 포함하는 바코드 도메인을 포함하는 것인 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0085] 본 개시내용의 방법은 (i) 샘플을, 1 이상의 표적 분자의 제2 특정 영역을 인식하고 그에 결합할 수 있는 적어도 제2 프로브와 접촉시키는 단계로서, 제2 특정 영역은 1 이상의 표적 분자의 제1 특정 영역과 상이한 것인 단계; (ii) 샘플을, 1 이상의 표적 분자의 제1 특정 영역을 인식하고 그에 결합할 수 있는 제1 프로브의 적어도 제2 카피와 접촉시키는 단계; 또는 (iii) 샘플을 적어도 제2 표적 분자의 제1 특정 영역을 인식하고 그에 결합할 수 있는 적어도 제3 프로브와 접촉시키는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 여기서, 적어도 제2 표적 분자는 1 이상의 표적 분자와 상이하고; 프로브는 표적 결합 도메인 및 바코드 도메인을 포함하고, 표적 결합 도메인은 적어도 4개의 뉴클레오타이드를 포함하고; 바코드 도메인은 제1 상보적 핵산 분자, 제1 리포터 복합체의 제1 상보적 핵산 분자 또는 제1 하이브리드화 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 제1 부착 영역, 및 적어도 제2 상보적 핵산 분자, 적어도 제2 리포터 복합체의 적어도 제2 상보적 핵산 분자 또는 적어도 제2 하이브리드화 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 적어도 제2 부착 영역을 포함한다.
- [0086] 본 방법은 적어도 제2 프로브, 제1 프로브의 적어도 제2 카피, 또는 적어도 제3 프로브를 이용하여 제3항의 단계 (1) 내지 (6)을 반복하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 본 방법은 적어도 제2 프로브, 제1 프로브의 적어도 제2 카피, 또는 적어도 제3 프로브를 이용하여 단계 (1) 내지 (9)를 반복하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 1 이상의 표적 핵산으로부터 프로브를 세척한 후, 단계 (1) 내지 (6), 또는 단계 (1) 내지 (9)를 최대 약 50회까지 반복할 수 있다.
- [0087] 검출가능한 표지는, 각각이 그의 방출 스펙트럼에 의해 식별될 수 있는 것인 복수의 모이어티를 포함할 수 있다. 검출가능한 표지는 양자점, 형광 모이어티, 비색 모이어티 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 바람직하게, 검출가능한 표지는 형광 모이어티를 포함할 수 있다. 각 모이어티의 방출 스펙트럼은 동일하거나, 또는 상이할 수 있다. 적어도 하나의 모이어티의 방출 스펙트럼은 다른 모이어티와 상이할 수 있다. 바람직한 측면에서, 신호는 방출 스펙트럼이다. 실시양태에서, 표지의 방출 스펙트럼 또는 스펙트럼들은 검출가능한 신호이다.
- [0088] 바코드 도메인은 다당류, 펩티드, 펩티드 핵산, 폴리펩티드, 또는 단일 가닥형 가닥 DNA, 단일 가닥 RNA, 또는 단일 가닥 PNA로부터 선택되는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 합성 백본을 포함할 수 있다. 1 이상의 프로브는 단일 가닥 또는 이중 가닥 RNA, DNA, PNA, 또는 다른 폴리뉴클레오타이드 유사체 또는 표적 결합 도메인과 바코드 도메인 사이의 PEG 스페이서를 포함할 수 있다. 한 바람직한 측면에서, 스페이서는 이중 가닥 DNA이다.
- [0089] 제1 상보적 핵산, 제1 리포터 복합체의 제1 상보적 핵산 분자, 적어도 제2 상보적 핵산 분자 및 적어도 제2 리포터 복합체의 적어도 제2 상보적 핵산 분자는 독립적으로 RNA, DNA, PNA, 또는 다른 폴리뉴클레오타이드 유사체일 수 있다. 적어도 제3 상보적 핵산 또는 제3 리포터 복합체의 적어도 제3 상보적 핵산은 RNA, DNA, PNA, 또는 다른 폴리뉴클레오타이드 유사체일 수 있다.
- [0090] 상기 표적 결합 도메인 내의 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드 또는 핵산 유사체일 수 있다. 상기 표적 결합 도메인 내의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 또는 적어도 6개의 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드 또는 핵산 유사체일 수 있다. 상기 표적 결합 도메인 내의 각 뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드 또는 핵산 유사체일 수 있다. 상기 표적 결합 도메인 내의 각 뉴클레오타이드는 첫 번째 및 마지막 뉴클레오타이드가 제외된, 변형된 뉴클레오타이드 또는 핵산 유사체일 수 있다.

- [0091] 적어도 하나의 변형된 뉴클레오타이드 또는 적어도 하나의 핵산 유사체는 잠금 핵산(LNA)일 수 있다. 적어도 하나의 변형된 뉴클레오타이드 또는 적어도 하나의 핵산 유사체는 범용 염기를 포함할 수 있다.
- [0092] 프로브에 의한 접촉 전에 먼저 적어도, 표적 핵산의 제1 위치를, 기재에 선택적으로 결합하는 제1 친화성 결합 시약을 포함하는 제1 포획 프로브와 결합시킴으로써 표적 핵산을 기재에 고정화시킬 수 있고, 제1 포획 프로브는 1 이상의 프로브가 표적 핵산에 결합하는 위치와 상이한, 표적 핵산 상의 위치에서 표적 핵산에 결합한다.
- [0093] 프로브에의 결합 후, 적어도, 표적 핵산의 제1 위치를, 기재에 선택적으로 결합하는 제1 결합 친화성 시약을 포함하는 제1 포획 프로브와 결합시킴으로써 표적 핵산을 기재에 고정화시킬 수 있고, 제1 포획 프로브는 1 이상의 프로브가 표적 핵산에 결합하는 위치와 상이한, 표적 핵산 상의 위치에서 표적 핵산에 결합한다.
- [0094] 표적 핵산은 제1 위치에서 기재에 고정화된 표적 핵산을 연장시키는 데 충분한 힘을 가함으로써 신장시킬 수 있다. 힘은 중력, 동유체력, 전자기력, 플로우 스트레칭, 리시딩 메니스커스 기법, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0095] 표적 핵산의 적어도 제2 위치를, 기재에 선택적으로 결합하는 제2 친화성 결합 시약을 포함하는 적어도 제2 포획 프로브와 결합시킴으로써 표적 핵산을 기재에 추가로 고정화시킬 수 있고, 제2 포획 프로브는 1 이상의 프로브 및 제1 포획 프로브가 표적 핵산에 결합하는 위치와 상이한, 표적 핵산 상의 위치에서 표적 핵산에 결합한다.
- [0096] 표적 핵산을 적어도 프로브의 일부, 또는 상보적 핵산 분자 또는 리포터 복합체의 일부를, 기재에 선택적으로 결합하는 제3 친화성 결합 시약을 포함하는 적어도 제3 포획 프로브와 결합시킴으로써 기재에 추가로 고정화시킬 수 있다.
- [0097] 프로브, 적어도 하나의 상보적 핵산 또는 적어도 하나의 리포터 복합체는 제4 친화성 결합 시약을 포함할 수 있다.
- [0098] 표적 핵산을 프로브의 일부, 적어도 하나의 상보적 핵산 분자 또는 적어도 하나의 리포터 복합체의 일부를, 제4 친화성 결합 시약을 통해 기재에 결합시킴으로써 기재에 추가로 고정화시킬 수 있다.
- [0099] 힘은, 일단 표적 핵산의 제2 위치가 기재에 고정화되고 나면 제거될 수 있다.
- [0100] 친화성 결합 시약은 독립적으로 리간드, 항원, 탄수화물, 수용체, 렉틴, 항체, 비오틴, 아비딘, 합텐, 및 알고 있는 서열을 가지는 핵산으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0101] 제1 포획 프로브는 20-60개의 뉴클레오타이드를 포함하는 표적 결합 도메인을 포함할 수 있고, 제1 포획 프로브는 1 이상의 프로브가 표적 핵산에 결합하는 위치와 상이한, 표적 핵산 상의 위치에서 표적 핵산에 결합한다. 제1 포획 프로브는 35-50개의 뉴클레오타이드를 포함하는 표적 결합 도메인을 포함할 수 있다.
- [0102] 제1 친화성 결합 시약은 제2 친화성 결합 시약과 상이할 수 있다.
- [0103] 제1 친화성 결합 시약, 제2 친화성 결합 시약, 제3 친화성 결합 시약 및 제4 친화성 결합 시약 중 적어도 하나는 다른 친화성 결합 시약과 상이할 수 있다.
- [0104] 표적 결합 도메인 중 뉴클레오타이드 개수는 바코드 도메인 내의 부착 영역의 개수의 적어도 2배일 수 있다. 표적 결합 도메인 중 뉴클레오타이드 개수는 8개일 수 있고, 바코드 도메인 내의 부착 영역의 개수는 3개일 수 있다. 표적 결합 도메인은 적어도 6개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 표적 결합 도메인은 적어도 8개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 표적 결합 도메인은 10-100개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 표적 결합 도메인은 20-60개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 표적 결합 도메인은 35-50개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0105] 각 상보적 핵산 분자는 약 8개의 뉴클레오타이드 내지 약 20개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 각 상보적 핵산 분자는 약 12개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 각 상보적 핵산 분자는 약 14개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0106] 적어도 제1 부착 영역은 바코드 도메인 상의 제1 위치로부터 분지될 수 있다. 적어도 제2 부착 영역은 바코드 도메인 상의 적어도 제2 위치로부터 분지될 수 있다. 각 부착 영역은 바코드 도메인 상의 위치로부터 분지될 수 있다.
- [0107] 바코드 도메인은 적어도 2개의 제1 부착 영역을 포함하는 제1 위치를 포함할 수 있고, 적어도 2개의 제1 부착 영역은 제1 상보적 핵산 분자 또는 제1 리포터 복합체의 제1 상보적 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 동일한 핵산 서열을 포함한다.

- [0108] 바코드 도메인은 적어도 2개의 제2 부착 영역을 포함하는 적어도 제2 위치를 포함할 수 있고, 적어도 2개의 제2 부착 영역은 적어도 제2 상보적 핵산 분자 또는 적어도 제2 리포터 복합체의 적어도 제2 상보적 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 동일한 핵산 서열을 포함한다.
- [0109] 바코드 도메인은 적어도 2개의 제3 부착 영역을 포함하는 적어도 제3 위치를 포함할 수 있고, 적어도 2개의 제3 부착 영역은 적어도 제3 상보적 핵산 분자 또는 적어도 제3 리포터 복합체의 적어도 제3 상보적 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 동일한 핵산 서열을 포함한다.
- [0110] 바코드 도메인 내의 각 위치는 동일한 개수의 부착 영역을 포함할 수 있다. 바코드 도메인 내의 적어도 하나의 위치는 1개 초과와 부착 영역을 포함할 수 있다. 바코드 도메인 내의 적어도 하나의 위치는 또 다른 위치보다 더 많은 개수의 부착 영역을 포함할 수 있다.
- [0111] 1 이상의 프로브는 바코드 도메인에 작동가능하게 연결된 표적 결합 도메인의 다수의 카피를 포함할 수 있다.
- [0112] 검출가능한 표지를 포함하는 각 리포터 복합체는 1차 핵산 분자에 직접적으로 연결된 상보적 핵산 분자를 포함할 수 있다. 검출가능한 표지를 포함하는 각 리포터 복합체는 핵산 스페이서를 통해 1차 핵산 분자에 간접적으로 연결된 상보적 핵산 분자를 포함할 수 있다. 검출가능한 표지를 포함하는 각 리포터 복합체는 핵산 스페이서와 유사한 기계적 특성을 가지는 중합체 스페이서를 통해 1차 핵산 분자에 간접적으로 연결된 상보적 핵산 분자를 포함할 수 있다. 검출가능한 표지를 포함하는 각 리포터 복합체는 절단가능한 링커를 통해 1차 핵산 분자에 간접적으로 연결된 상보적 핵산 분자를 포함할 수 있다.
- [0113] 절단가능한 링커는 독립적으로 광 절단가능한, 화학적으로 절단가능한 및 효소적으로 절단가능한 링커의 군으로부터 선택될 수 있다. 각 절단가능한 링커는 독립적으로 모든 다른 링커로부터 절단가능한 것일 수 있다. 광 절단가능한 링커는 아아크 램프, 레이저, 집속 UV 광원, 및 발광 다이오드로 구성된 군으로부터 선택되는 광원에 의해 절단될 수 있다.
- [0114] 각 1차 핵산 분자는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개의 2차 핵산 분자에 하이브리드화될 수 있다.
- [0115] 2차 핵산 분자 또는 분자들은 적어도 하나의 검출가능한 표지를 포함할 수 있다. 각 2차 핵산 분자는 적어도 하나의 검출가능한 표지를 포함하는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 또는 적어도 7개의 3차 핵산 분자에 하이브리드화될 수 있다. 적어도 하나의 2차 핵산 분자는 1차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않고, 3차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않는 영역을 포함할 수 있다. 1차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않고, 3차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않는 영역은 1차 핵산 분자에 직접적으로 연결된 상보적 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 1차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않고, 3차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않는 영역은 2차 핵산 분자의 말단에 위치할 수 있다. 1차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않고, 3차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않는 영역은 약 8개의 뉴클레오티드 내지 약 20개의 뉴클레오티드, 예컨대, 약 12개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 1차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않고, 3차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않는 영역은 약 12개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0116] 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 방법 중 임의의 것을 수행하기 위한 시약을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0117] 상기 측면 및 실시양태 중 임의의 것은 임의의 다른 측면 또는 실시양태와 조합될 수 있다.
- [0118] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 숙련가가 통상 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [0119] 본원에서 사용되는 바, 단수 형태의 단어는 또한 문맥상 달리 명백하게 명시되지 않는 한, 복수 형태의 단어를 포함하고; 예로서, "하나"("a," "an") 및 "그"라는 용어는 단수 또는 복수의 것으로 이해되고, "또는"이라는 용어는 포괄적인 것으로 이해된다. 예로서, "한 요소"란, 하나 이상의 요소를 의미한다.
- [0120] 본 명세서 전역에 걸쳐, "포함하는"이라는 단어, 또는 예컨대, "포함하다" 또는 "포함하는"이라는 파생어는 임의의 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소들, 정수들 또는 단계들의 군을 배제하는 것이 아니라, 언급된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소들, 정수들 또는 단계들의 군을 포함하는 것을 암시하는 것으로 이해될 것이다.
- [0121] 약이란, 언급된 값의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 또는 0.01% 내의 값인 것으로 이해될 수 있다. 문맥상 달리 분명하게 되지 않는 한, 본원에서 제공하는 모든 수치 값은 "약"이라는 단어

로 수식된다.

[0122]

본원에 기술된 것과 유사하거나, 또는 등가인 방법 및 물질이 본 발명의 실행 또는 시험에서 사용될 수는 있지만, 적합한 방법 및 물질을 하기에 기술한다. 본원에서 언급된 모든 공개 문헌, 특허 출원, 특허 및 다른 참고 문헌은 그 전문이 참조로 포함된다. 본원에서 인용된 참고문헌이 청구되는 본 발명의 선행 기술인 것으로 인정되는 것은 아니다. 의견 상충하는 경우, 정의를 포함하는 본 명세서를 통해 조정이 이루어질 것이다. 추가로, 물질, 방법 및 예는 단지 예시적인 것이며, 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본 발명의 다른 특징 및 이점은 하기의 상세한 설명 및 특허청구범위로부터 자명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0123]

본 특허 또는 출원 파일은 컬러로 작성된 적어도 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면을 포함하는 본 특허 또는 특허 출원 공개의 사본은 요청 및 필요한 수수료 납부시 관청으로부터 제공받게 될 것이다.

상기 특징 및 추가 특징은 첨부된 도면과 함께 해석될 때 하기 상세한 설명으로부터 더욱 명확하게 이해될 것이다.

도 1은 본 발명의 예시적인 프로브의 개략도를 보여주는 것이다.

도 2는 본 발명의 예시적인 프로브의 개략도를 보여주는 것이다.

도 3은 본 발명의 예시적인 프로브의 개략도를 보여주는 것이다.

도 4는 본 발명의 예시적인 프로브의 개략도를 보여주는 것이다.

도 5a는 본 발명의 방법의 한 단계를 도시한 것이다.

도 5b는 도 5a에서 시작된 본 발명의 방법의 한 단계를 도시한 것이다.

도 5c는 도 5a에서 시작된 본 발명의 방법의 한 단계를 도시한 것이다.

도 5d는 도 5a에서 시작된 본 발명의 방법의 한 단계를 도시한 것이다.

도 6은, 프로브 및 포획 프로브를 함께 표적 핵산에 첨가하여 3부분 복합체를 형성하는 것인, 1 단계 정제의 예를 도시한 것이다. 3부분 복합체는 포획 프로브의 친화성 시약을 통해 기체에 고정화됨으로써 정제된다.

도 7은 결합 모이어티를 포함하는 포획 프로브를 표적 핵산에 결합시킨 후, 결합 모이어티를 통해 포획 프로브-표적 핵산 복합체를 기체에 고정화시키고, 프로브를 고정화된 복합체에 결합시키는 것인, 1 단계 정제의 또 다른 예를 도시한 것이다.

도 8a는 다단계 정제의 예를 도시한 것이다. 친화성 시약을 포함하는 프로브를 표적 핵산에 결합시키고, 프로브-표적 핵산 복합체는 프로브의 친화성 시약을 통해 정제된다(제시되지 않음). 후에, 결합 모이어티를 포함하는 포획 프로브를 복합체에 결합시켜 3부분 복합체를 형성한다. 마지막으로, 3부분 복합체는 포획 프로브 결합 모이어티를 통해 기체에 고정화됨으로써 정제된다.

도 8b는 다단계 정제의 또 다른 예를 도시한 것이다. 친화성 시약을 포함하는 프로브를 표적 핵산에 결합시키고, 프로브-표적 핵산 복합체는 프로브의 친화성 시약을 통해 정제된다(제시되지 않음). 앞서 포획 프로브의 결합 모이어티를 통해 기체에 고정화된 포획 프로브는 정제된 프로브-표적 핵산 복합체를 포획함으로써 정제되고, 고정화된 3부분 복합체를 형성한다.

도 8c는 다단계 정제의 또 다른 예를 도시한 것이다. 친화성 시약을 포함하는 프로브를 표적 핵산에 결합시키고, 프로브-표적 핵산 복합체는 프로브의 친화성 시약을 통해 정제된다(제시되지 않음). 후에, 결합 모이어티를 포함하는 포획 프로브 및 (프로브 상의 친화성 시약과 상이한) 친화성 시약을 복합체에 결합시켜 3부분 복합체를 형성한다. 3부분 복합체는 포획 프로브 상의 친화성 시약을 통해 정제된다(제시되지 않음). 마지막으로, 정제된 3부분 복합체는 포획 프로브 상의 결합 모이어티를 통해 기체에 고정화된다.

도 8d는 다단계 정제의 또 다른 예를 도시한 것이다. 결합 모이어티 및 친화성 시약을 포함하는 포획 프로브를 표적 핵산에 결합시키고, 포획 프로브-표적 핵산 복합체는 포획 프로브의 친화성 시약을 통해 정제된다(제시되지 않음). 후에, 프로브를 복합체에 결합시켜 3부분 복합체를 형성한다. 마지막으로, 3부분 복합체는 포획 프로브의 결합 모이어티를 통해 기체에 고정화됨으로써 정제된다.

도 8e는 다단계 정제의 또 다른 예를 도시한 것이다. 결합 모이어티 및 친화성 시약 및 결합 모이어티를 포함하는 포획 프로브를 표적 핵산에 결합시키고, 포획 프로브-표적 핵산 복합체는 포획 프로브의 친화성 시약을 통해 정제된다(제시되지 않음). 후에, (포획 프로브 상의 친화성 시약과 상이한) 친화성 시약을 포함하는 프로브를 복합체에 결합시켜 3부분 복합체를 형성한다. 3부분 복합체는 프로브 상의 친화성 시약을 통해 정제된다. 마지막으로, 정제된 3부분 복합체는 포획 프로브 상의 결합 모이어티를 통해 기재에 고정화된다.

도 9a는 본 발명의 방법의 초기 단계를 보여주는 것이다.

도 9b는 검출가능한 표지를 포함하는 리포터 복합체의 개략도를 보여주는 것이다.

도 9c는 각각이 검출가능한 표지를 포함하는 것인 복수 개의 리포터 복합체를 보여주는 것이다.

도 9d는 도 9a에서 시작된 본 발명의 방법의 추가 단계를 보여주는 것이다.

도 9e는 도 9a에서 시작된 본 발명의 방법의 추가 단계를 보여주는 것이다.

도 9f는 도 9a에서 시작된 본 발명의 방법의 추가 단계를 보여주는 것이다.

도 10은 도 9d 및 도 9e에 제시된 단계, 및 그로부터 수득된 예시적인 데이터를 교대로 도시한 도해를 보여주는 것이다. 제시된 프로브의 단편은 서열 번호 70의 서열을 가진다.

도 11은 도 10에 제시된 방법의 변형법을 도시한 것이다. 제시된 프로브의 단편은 서열 번호 70의 서열을 가진다.

도 12a는 본 발명의 리포터 복합체의 다양한 디자인을 보여주는 것이다.

도 12b는 도 12a에 제시된 리포터 복합체로부터 수득된 형광 계수를 보여주는 것이다.

도 12c는 본 발명의 리포터 복합체를 구성하기 위한 예시적인 레시피를 보여주는 것이다.

도 13a는 "추가 핸들"을 포함하는 리포터 복합체의 디자인을 보여주는 것이다.

도 13b는 "추가 핸들"을 가지는 리포터 복합체로부터 수득된 형광 계수를 보여주는 것이다.

도 14a는 본 발명의 리포터 복합체의 2가지 예시적인 디자인의 하이브리드화 동역학적 성질을 보여주는 것이다.

도 14b는 본 발명의 리포터 복합체의 2가지 예시적인 디자인의 하이브리드화 동역학적 성질을 보여주는 것이다.

도 15a는 소형 바코드 프로브 디자인을 기술하는 것이다.

도 15b는 프로브가 더 낮은 저농도로 제공되었을 때의, 본 발명의 방법으로 수득된 데이터를 보여주는 것이다.

도 15c는 프로브가 더 높은 고농도로 제공되었을 때의, 본 발명의 방법으로 수득된 데이터를 보여주는 것이다.

도 16a는 복수 개의 표적 핵산을 동시에 검출하는 본 발명의 방법을 이용하여 수득된 데이터를 보여주는 것이다.

도 16b는 본 발명의 방법을 이용하여 수득된 데이터와, 검출가능한 표지를 포함하는 프로브를 이용하여 수득된 데이터를 비교한 것이다.

도 17a는 특정 DNA 표적의 Hyb & 계수 포획 및 검출을 입증하는 것이다.

도 17b는 100 플렉스의 포획 패널 중 표적 검출을 보여주는 것이다.

도 18은 다색 리포터의 강도 분포를 보여주는 것이다.

도 19는 14개 부류 모델(좌측) 및 10개 부류 모델에 대한 오류율을 보여주는 것이다.

도 20은 2색 리포터 프로브의 개략도를 보여주는 것이다.

도 21은 핵산의 표적화된 포획을 위한 프로브 하이브리드화 작업흐름을 보여주는 것이다.

도 22는 하플로타입의 장범위 페이징을 위해 사용된 핵산의 표적화된 포획을 보여주는 것이다.

도 23은 검출가능한 표지 및 절단가능한 링커를 포함하는 상보적 핵산 분자로도 또한 공지된 절단가능한 RPTR과 미리 복합체를 형성한 BC를 사용하는 서열분석 사이클링을 도시한 다이어그램이다.

도 24는 RPTR 절단 및 영상 차감을 사용하는 각 RPTR 식별 방법을 도시한 다이어그램이다.

도 25는 절단가능한 RPTR 프로브 구성의 다이어그램이고, 절단 변형의 예를 보여주는 것이다.

도 26은 하이브리드화 인큐베이션 시간이 다양하였고, 관측 시계당 총 계수를 사용하여, 제2 단계에서 RPTR 결합이 이어지는 것인 BC 단독인 것과 비교하여 BC/RPTR 복합체의 상대적인 효율을 측정하였다는 것을 보여주는 것이다. 사용된 BC 및 RPTR가 도 27에 제시되어 있다. BC/RPTR 복합체가 BC 단독인 것보다 더 느린 결합 동력학적 성질을 가지지만, 이는 더 장시간의 인큐베이션 시간으로 유사한 결합 효율을 달성할 수 있다.

도 27은 RPTR 아이덴티티는 영상 차감 접근법을 사용하여 결정될 수 있다는 것을 보여주는 것이다. 1회의 완전한 사이클 동안 BRAFex15-BC3 바코드를 절단가능한 RPTR과 미리 복합체를 형성시키고, 프로세싱하였다. 4개 피처가 영상 중 작은 부분으로부터 하이라이트화되고, 각 형광 채널의 변화는 막대 플롯으로 제시되어 있다. 먼저, 우라실 DNA 글리코실라제(UDG: Uracil DNA glycosylase) 및 DNA 글리코실라제-리아제 엔도뉴클레아제 VIII의 혼합물인 USER 효소 믹스를 사용하여, 스폿 3(sp3)에 결합된 RPTR에 대하여 절단을 수행한 후, 이어서, UV 광에 노출을 사용하여 스폿 1(sp1)에 대한 절단을 수행하였다. 스폿 2(sp2)에 결합된 RPTR는 절단불가능하였다.

도 28은 절단시 하프 컬러 GY RPTR의 검출 및 정확한 식별을 보여주는 것이다. BC를 1개의 UV 절단가능한 RPTR 및 2개의 절단불가능한 RPTR과 복합체를 형성시키고, 플로우 셀의 표면 상에 고정화된 DNA 표적에 하이브리드화시켰다. 단일 RPTR 절단을 위해 UV에 노출시키기 전, 및 그 이후에 RPTR의 형광 강도를 측정함으로써 얼마나 정확하게/어느 정도로 하프 컬러(즉, GG, 풀 컬러 RPTR 대신, GY)가 다른 리포터 존재하에서 검출될 수 있는지를 측정하였다.

도 29는 도 6과의 비교를 위해 절단시 풀 컬러 GY RPTR의 검출 및 정확한 식별을 보여주는 것이다. BC를 1개의 UV 절단가능한 RPTR 및 2개의 절단불가능한 RPTR과 복합체를 형성시키고, 플로우 셀의 표면 상에 고정화된 DNA 표적에 하이브리드화시켰다. 단일 RPTR 절단을 위해 UV에 노출시키기 전, 및 그 이후에 RPTR의 형광 강도를 측정함으로써 얼마나 정확하게/어느 정도로 풀 컬러(즉, GG)가 다른 리포터 존재하에서 검출될 수 있는지를 측정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0124] 본 발명은 정확하고, 신속하며, 감응성인 다중 방식의 샘플 중 표적 분자의 검출, 식별, 및 정량화를 제공하는 프로브, 방법, 키트, 및 장치를 제공한다.

[0125] **샘플 중 하나 이상의 핵산을 검출하기 위한 프로브**

[0126] 본 발명은 표적 결합 도메인 및 바코드 도메인을 포함하는 프로브에 관한 것이다. 표적 결합 도메인 및 바코드 도메인은 작동가능하게 연결, 예컨대, 공유적으로 연결될 수 있다. 프로브는 임의적으로 표적 결합 도메인과 바코드 도메인 사이에 스페이서를 포함한다. 스페이서는 적절한 기계적 특성을 가진 임의의 중합체, 예를 들어, (1 내지 100개의 뉴클레오타이드, 예컨대, 2 내지 50개의 뉴클레오타이드로 이루어진) 단일 또는 이중 가닥 DNA 스페이서일 수 있다. 이중 가닥 DNA 스페이서의 비제한적인 예로는 서열 번호 25 내지 서열 번호 29로 커버되는 서열을 포함한다. 바코드 도메인에 포함될 수 있는 추가의 예시적인 서열은 서열 번호 30 내지 서열 번호 69에 열거되어 있다.

[0127] 본 발명의 프로브의 비제한적인 예는 도 1 내지 5에 제시되어 있다.

[0128] 도 1은 본 발명의 프로브의 개략도를 보여주는 것이다. 본 예시적인 프로브는 6개의 뉴클레오타이드의 표적 결합 도메인을 가진다. 각 프로브의 표적 결합 도메인은 알고 있는 뉴클레오타이드 서열을 가진다. 바코드 도메인은 하나 이상의 부착 영역을 포함하고; 도 1에서는 6개의 부착 영역이 존재한다. 제1 부착 영역, 제3 부착 영역, 및 제5 부착 영역이 표시되어 있다. 제5 위치는 2개의 부착 영역을 포함한다. 바코드 도메인 상의 각 위치는 다중 부착 영역을 가질 수 있다. 예를 들어, 한 위치는 1 내지 50개의 부착 영역을 가질 수 있다. (위치 1 내지 4 및 6 대비 위치 5에 제시된 바와 같이) 바코드 도메인 내의 특정 위치는 다른 위치보다 더 많은 부착 영역을 가질 수 있고; 대안적으로, 바코드 도메인 내의 각 위치는 동일한 개수의 부착 영역을 가진다. 비록 제시되어 있지는 않지만, 각 부착 영역은 상보적 핵산 분자(RNA 또는 DNA)에 가역적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의(즉, 1 내지 50개, 예컨대, 10 내지 30개) 핵산 서열(들) 카피를 포함한다. 도 1에서, 부착 영역은 바코드 도메인을 구성하는 선형 폴리뉴클레오타이드 분자에 통합되어 있다. 부착 위치의 선형 순서 및/또는 위치의 선형 순서가 표

적 결합 도메인의 결합 대상이 되는 표적 핵산의 특정 영역을 식별시켜 준다.

- [0129] 도 2는 본 발명의 프로브의 개략도를 보여주는 것이다. 본 예시적인 프로브는 5개의 뉴클레오타이드의 표적 결합 도메인을 가진다. 각 프로브의 표적 결합 도메인은 알고 있는 뉴클레오타이드 서열을 가진다. 제1 부착 영역이 표시되어 있고; 바코드 도메인 상의 제1 위치는 바코드 도메인에 결합되어 있지 않은 (통합되어 있지 않은) 2개의 제1 부착 영역을 포함한다. 바코드 도메인의 일부 및 2개의 제4 부착 영역을 포함하는, 바코드 도메인 상의 제4 위치가 동그라미로 표시되어 있다. 2개의 제6 부착 영역이 표시되어 있다. 각 위치는 2개의 부착 영역을 가지지만; 그러나, 바코드 도메인 상의 각 위치는 1개의 부착 영역 또는 다수의 부착 영역, 예컨대, 2 내지 50개의 부착 영역을 가질 수 있다. 비록 제시되어 있지는 않지만, 각 부착 영역은 상보적 핵산 분자(RNA 또는 DNA)에 가역적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의(즉, 1 내지 50개, 예컨대, 10 내지 30개) 핵산 서열(들) 카피를 포함한다. 도 2에서, 바코드 도메인은 부착 영역이 연결된/분지된 선형 폴리뉴클레오타이드 분자이고; 부착 영역은 폴리뉴클레오타이드 분자에 통합되어 있지 않다. 부착 위치의 선형 순서 및/또는 위치의 선형 순서가 표적 결합 도메인의 결합 대상이 되는 표적 핵산의 특정 영역을 식별시켜 준다.
- [0130] 도 3은 본 발명의 프로브의 또 다른 개략도를 보여주는 것이다. 본 예시적인 프로브는 4개의 뉴클레오타이드의 표적 결합 도메인을 가진다. 각 위치가 제시되어 있으며, 3개의 부착 영역은 상기 위치에 연결/상기 위치로부터 분지되어 있다.
- [0131] 도 4는 본 발명의 프로브의 추가의 또 다른 개략도를 보여주는 것이다. 본 예시적인 프로브는 10개의 뉴클레오타이드의 표적 결합 도메인을 가진다. 그러나, 오직 처음 6개의 뉴클레오타이드만이 표적 핵산에 특이적이다. ("n₁ 내지 n₄"로 표시된) 제7 내지 제10 뉴클레오타이드는 표적 결합 도메인의 길이를 증가시켜 프로브가 하이브리드화하여 표적 핵산에 하이브리드화된 상태 그대로 유지될 수 있는 가능성에 영향을 주기 위해 부가된 것이다. "n" 뉴클레오타이드는 4개의 정규 염기 중 임의의 것과 염기쌍을 형성할 수 있는 범용 염기(예컨대, 이노신, 2'-데옥시이노신(히포크산틴 데옥시뉴클레오타이드) 유도체, 니트로인돌, 니트로아졸 유사체, 및 소수성 방향족 비수소 결합 염기)를 가질 수 있다. 실시양태에서, "n" 뉴클레오타이드는 표적 결합 도메인의 특정 뉴클레오타이드 앞에 올 수 있다. 실시양태에서, "n" 뉴클레오타이드는 표적 결합 도메인의 특정 뉴클레오타이드 뒤에 올 수 있다. 도 4에서, 4개의 "n" 뉴클레오타이드가 제시되어 있지만; 그러나, 표적 결합 도메인은 4개 초과 또는 4개 미만의 "n" 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 표적 결합 도메인에는 "n" 뉴클레오타이드가 없을 수도 있다. 제2 위치는 바코드 도메인의 제2 위치에 연결/상기 위치로부터 분지된 6개의 부착 영역을 포함한다.
- [0132] 표적 결합 도메인은 적어도 4개의 뉴클레오타이드, 예컨대, 적어도, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개 이상의 뉴클레오타이드를 가진다. 표적 결합 도메인은 10-100, 20-160 또는 35-50개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 표적 결합 도메인은 바람직하게 폴리뉴클레오타이드이다. 표적 결합 도메인은 표적 핵산에 결합할 수 있다.
- [0133] 프로브는 합성 백본에 작동가능하게 연결된 표적 결합 도메인의 다수의 카피를 포함할 수 있다.
- [0134] 프로브는 하이브리드화 및/또는 탈하이브리드화의 가능성 및 그의 발생 속도를 제어하도록 디자인될 수 있다. 일반적으로, 프로브의 T_m이 낮을수록, 프로브가 표적 핵산에 및/또는 표적 핵산으로부터 탈하이브리드화하게 되는 속도는 더 빨라지고, 가능성은 더 커질 것이다. 따라서, T_m이 더 낮은 프로브를 사용하는 것이 표적 핵산에 결합하는 프로브의 개수를 감소시키게 될 것이다.
- [0135] 표적 결합 도메인의 길이가 부분적으로는 프로브 하이브리드화 가능성 및 표적 핵산에 하이브리드화된 상태 유지에 영향을 미친다. 일반적으로, 표적 결합 도메인 길이가 길수록(뉴클레오타이드 개수가 더 많을수록), 표적 뉴클레오타이드 중에 상보적인 서열이 존재할 가능성은 더 작아진다. 반대로, 표적 결합 도메인 길이가 짧을수록, 표적 뉴클레오타이드 중에 상보적인 서열이 존재할 가능성은 더 커진다. 예를 들어, 6-mer 서열이 표적 핵산 중에 위치할 가능성은 1/4096인데 반해, 4-mer 서열이 표적 핵산 중에 위치할 가능성은 1/256이다. 결과적으로, 길이가 더 긴 프로브 집합물과 비교하였을 때, 가능하게는 길이가 더 짧은 프로브 집합물이 주어진 핵산 스트레치에 대하여 더 많은 위치에서 결합하게 될 것이다.
- [0136] "표적 핵산"이라는 용어는 샘플 중 그의 존재가 본 발명의 프로브, 방법, 및 장치에 의해 측정되는 핵산 분자(DNA, RNA, 또는 PNA)를 의미하여야 한다. 일반적으로, "표적 핵산," "핵산 분자," "핵산 서열," "핵산," "핵산 단편," "올리고뉴클레오타이드" 및 "폴리뉴클레오타이드"라는 용어는 상호교환적으로 사용되고, 이는 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드, 또는 그의 유사체인, 다양한 길이일 수 있는 중합체 형태의 뉴클레오타이드를 포함하나, 이에 제한되지 않는 것으로 의도된다. 핵산의 비제한적인 예로는 유전자, 유전자 단편, 엑손, 인트론, 유전자간 DNA(제한 없이, 이염색질 DNA 포함), 메신저 RNA(mRNA: messenger RNA), 전달 RNA, 리보솜

RNA, 리보자임, 짧은 간섭 RNA(siRNA: small interfering RNA), 비코딩 RNA(ncRNA: non-coding RNA), cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지형 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 서열의 단리된 DNA, 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브, 및 프라이머를 포함한다.

- [0137] 특정의 구체적인 실시양태에서, 표적 분자는 염색체가 아니다. 다른 구체적인 실시양태에서, 표적 분자 크기는 1,000 kb(또는 1 mb) 이하인 크기, 500 kb 이하인 크기, 250 kb 이하인 크기, 175 kb 이하인 크기, 100 kb 이하인 크기, 50 kb 이하인 크기, 20 kb 이하인 크기, 또는 10 kb 이하인 크기이다. 추가의 다른 구체적인 실시양태에서, 표적 분자는 그의 세포 환경으로부터 단리된 것이다.
- [0138] 본 방법은 샘플, 예컨대, 유기체로부터의 샘플로부터 수득된 핵산 분자를, 및 바람직하게는 전환(또는 증폭) 단계 없이 식별하고, 정량화한다. 한 예로서, RNA 식별 방법의 경우, 본 방법은 RNA를 식별할 수 있기 전에 RNA 분자를 DNA 분자로 전환(즉, cDNA 합성을 통해 전환)시킬 필요가 없다. 증폭 또는 전환이 요구되지 않기 때문에, 대부분의 경우, 본 발명의 핵산은, 핵산이 샘플 중에 존재할 때, 또는 그가 샘플로부터 수득되었을 때, 핵산 중에 존재하는 임의의 독특한 염기 및/또는 후생적 마커를 보유할 것이다. 상기 독특한 염기 및/또는 후생적 마커는 당업계에서 공지된 다수의 방법으로 손실된다.
- [0139] 표적 핵산은 임의의 샘플 또는 핵산 공급원, 예컨대, 임의의 세포, 조직, 또는 유기체, 시험관내, 화학적 합성기 등으로부터 수득될 수 있다. 표적 핵산은 당업계에서 승인받은 임의의 방법에 의해 수득될 수 있다. 실시양태에서, 핵산은 임상적 피험체의 혈액 샘플로부터 수득된다. 핵산은 당업계에 널리 공지된 방법 및 키트를 사용하여 공급원 또는 샘플로부터 추출, 단리, 또는 정제될 수 있다.
- [0140] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 샘플은 사실상 임의 유기체(포유동물 샘플이 바람직하고, 인간 샘플이 특히 바람직하다)의, 세포(1차 세포 및 배양된 세포주 포함), 세포 용해물 또는 추출물(제한하는 것은 아니지만, RNA 추출물; 정제된 mRNA 포함), 조직 및 조직 추출물(제한하는 것은 아니지만, RNA 추출물; 정제된 mRNA 포함); 체액(제한하는 것은 아니지만, 혈액, 소변, 혈청, 림프, 담즙, 뇌척수액, 간질액, 수양액 또는 유리체액, 초유, 객담, 양수, 타액, 향문 및 질 분비액, 땀 및 정액 포함), 누출물, 삼출물(예컨대, 농양, 또는 임의의 다른 감염 또는 염증 부위로부터 수득된 액), 또는 관절(예컨대, 정상 관절, 또는 질환, 예컨대, 류머티스성 관절염, 골관절염, 통풍 또는 화농성 관절염에 의해 이환된 관절)로부터 수득된 액; 환경 샘플(제한하는 것은 아니지만, 공기, 농업상, 물 및 토양 샘플 포함); 생물학전 작용제 샘플; 세포의 액, 세포 배양물로부터의 세포외 상등액, 박테리아 봉입체, 세포 구획, 세포 주변세포질, 미토콘드리아 구획을 비롯한 연구용 샘플을 포함하나, 이에 제한되지 않는 임의의 개수의 것을 포함할 수 있다.
- [0141] 생체분자 샘플은 생물학적 표본으로부터 간접적으로 유래된 것일 수 있다. 예를 들어, 관심 표적 분자가 세포 전사체, 예컨대, 메신저 RNA인 경우, 본 발명의 생체분자 샘플은 메신저 RNA의 역전사에 의해 제조된 cDNA를 함유하는 샘플일 수 있다. 또 다른 예에서, 본 발명의 생체분자는 생물학적 표본에 대하여 분별, 예컨대, 크기 분별 또는 막 분별을 수행함으로써 생성된다.
- [0142] 본 발명의 생체분자는 "천연"인 것, 즉, 조작 또는 처리되지 않은 것이거나, 또는 "처리될 수 있으며," 이러한 처리는 약물을 비롯한 후보 작용제에의 노출, 유전자 조작(예컨대, 유전자 부가 또는 결실)을 비롯한, 임의의 개수의 처리를 포함할 수 있다.
- [0143] 표적 핵산을 포함하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 단편화될 수 있다. 바람직하게, 단편화는 효소적 또는 기계적 수단에 의해 수행된다. 기계적 수단은 초음파 파쇄 또는 물리적 전단일 수 있다. 효소적 수단은 뉴클레아제(예컨대, 데옥시리보뉴클레아제 I(DN아제 I)) 또는 하나 이상의 제한 엔도뉴클레아제로 분해함으로써 수행될 수 있다.
- [0144] 표적 핵산을 포함하는 핵산 분자가 무손상 염색체일 때, 염색체를 단편화하는 것을 막는 단계를 취하여야 한다.
- [0145] 표적 핵산은 당업계에 널리 공지되어 있는 바와 같이, 변형된 뉴클레오티드를 포함하는, 천연 또는 비천연 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0146] (표적 결합 도메인, 바코드 도메인, 및 임의의 임의적인 도메인을 포함하는) 본 발명의 프로브의 총 길이는 약 20 나노미터 내지 약 50 나노미터일 수 있다. 프로브의 백본은 약 120개의 뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자일 수 있다.
- [0147] 바코드 도메인은 합성 백본을 포함한다. 합성 백본 및 표적 결합 도메인은 작동가능하게 연결되어 있고, 예컨대, 공유적으로 부착되어 있거나, 또는 링커를 통해 부착되어 있다. 합성 백본은 임의의 물질, 예컨대, 다

당류, 폴리뉴클레오티드, 중합체, 플라스틱, 섬유, 펩티드, 펩티드 핵산, 또는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 바람직하게, 합성 백본은 강성이다. 실시양태에서, 백본은 6개의 DNA 이중 나선으로 이루어진 "DNA 오리가미"를 포함한다(예컨대, 문헌 [Lin *et al*, "Submicrometre geometrically encoded fluorescent barcodes self-assembled from DNA," *Nature Chemistry*; 2012 Oct; 4(10): 832-9] 참조). 바코드는 DNA 오리가미 타일로 제조될 수 있다(문헌 [Jungmann *et al*, "Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT", *Nature Methods*, Vol. 11, No. 3, 2014]).

[0148] 바코드 도메인은 복수 개의 위치, 예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 위치를 포함한다. 위치 개수는 표적 결합 도메인 내의 뉴클레오티드의 개수보다 적거나, 그와 같거나, 또는 그보다 많을 수 있다. 실시양태에서, 백본 도메인 내의 위치 개수보다 표적 결합 도메인 중 추가의 뉴클레오티드, 예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상 뉴클레오티드를 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 실시양태에서, 표적 결합 도메인 중 뉴클레오티드 개수는 바코드 도메인 내의 부착 영역의 개수의 적어도 2배이다. 추가의 실시양태에서, 표적 결합 도메인 중 뉴클레오티드 개수는 8개이고, 바코드 도메인 내의 부착 영역의 개수는 3개이다. 상기 기술된 바와 같이, 적어도 4개의 위치에 대한 충분한 공간이 있는 한, 바코드 도메인 길이에 대해서는 제한되지 않는다.

[0149] 바코드 도메인 내의 각 위치는 적어도 하나의 부착 영역, 예컨대, 1 내지 50개, 또는 그 초과와 부착 영역을 포함한다. 바코드 도메인 내의 특정 위치는 다른 위치보다 더 많은 부착 영역을 포함할 수 있고(예컨대, 제1 위치는 3개의 부착 영역을 가질 수 있는 반면, 제2 위치는 2개의 부착 위치를 가질 수 있고); 대안적으로, 바코드 도메인 내의 각 위치는 동일한 개수의 부착 영역을 가진다. 각 부착 영역은 상보적 핵산 분자(예컨대, DNA 또는 RNA)가 가역적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의(즉, 1 내지 50개, 예컨대, 10 내지 30개) 핵산 서열(들) 카피를 포함한다.

[0150] 각 부착 영역은 부착 영역이 합성 백본으로부터 분지되도록 합성 백본 중 변형된 단량체(예컨대, 변형된 뉴클레오티드)에 연결될 수 있다. 실시양태에서, 부착 영역은 폴리뉴클레오티드 백본에 통합되어 있고; 다시 말해, 백본은 단일 폴리뉴클레오티드이고, 부착 영역은 단일 폴리뉴클레오티드 서열의 일부이다. 실시양태에서, "바코드 도메인" 및 "합성 백본"이라는 용어는 동의어이다.

[0151] 각 프로브의 경우, 한 위치에서 각 부착 영역에 대한 뉴클레오티드 서열은 동일하다. 따라서, 프로브에서, 제1 위치 내의 각 제1 부착 영역은 동일한 뉴클레오티드 서열을 가진다. 유사하게, 제9 위치 내의 각 제9 부착 영역은 동일한 뉴클레오티드 서열을 가진다.

[0152] 프로브에서, 한 위치 내의 각 부착 영역 또는 부착 영역들은 독특한 서열을 가질 것이다. 또한, 제1 위치의 부착 영역은 제2 위치의 부착 영역과는 다른 핵산 서열을 포함할 것이다. 따라서, 제1 위치의 부착 영역 내의 핵산 서열에의, 제2 위치의 부착 영역에 특이적인 상보적 핵산 분자의 결합은 없을 것이다. 또한, 제2 위치의 부착 영역에의, 제3 위치의 부착 영역에 특이적인 상보적 핵산 분자의 결합은 없을 것이다.

[0153] 바코드 도메인 상의 각 위치는 하나 이상의(최대 50개, 바람직하게 10 내지 30개) 부착 영역을 포함할 수 있고; 따라서, 각 부착 영역은 하나 이상의(최대 50개, 바람직하게 10 내지 30개) 상보적 핵산 분자에 결합할 수 있다. 한 실시양태에서, 바코드 도메인 내의 적어도 하나의 위치는 1개 초과와 부착 영역을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 바코드 도메인 내의 적어도 하나의 위치는 또 다른 위치보다 더 많은 개수의 부착 영역을 포함한다. 예로서, 도 1의 프로브는 2개의 부착 영역을 포함하는 제5 위치를 가지고, 도 4의 프로브는 6개의 부착 영역을 가지는 제2 위치를 가진다. 실시양태에서, 한 위치에서의 부착 영역의 핵산 서열은 동일하고; 따라서, 상기 부착 영역에 결합하는 상보적 핵산 분자는 동일하다.

[0154] 대안적 실시양태에서, 한 위치에서의 부착 영역의 핵산 서열은 동일하지 않고; 따라서, 상기 부착 영역에 결합하는 상보적 핵산 분자는 동일하지 않고, 예컨대, 각각은 상이한 핵산 서열 및/또는 검출가능한 표지를 포함한다. 따라서, 대안적 실시양태에서, 함께 부착 영역에 부착된 동일하지 않은 핵산 분자들(예컨대, 그의 검출가능한 표지)의 조합은 표적 핵산 내의 뉴클레오티드를 식별하기 위한 코드를 제공한다.

[0155] 하기 표 1은 단지 예시적인 목적으로, 그의 바코드 도메인 중 최대 6개의 위치를 가지는 프로브에 대한 부착 영역에 대한 예시적인 서열 및 그에 결합하는 상보적 핵산 상의 검출가능한 표지를 제공한다.

표 1

바코드 도메인 내의 위치	부착 영역 내의 핵산 서열(5'→3')	검출가능한 표지를 포함하는 상보적인 핵산, 또는 리포터 복합체의 검출가능한 표지	서열 번호
1	ATACATCTAG	GFP	1
1	GATCTACATA	RFP	2
1	TTAGGTAAAG	CFP	3
1	TCTTCATTAC	YFP	4
2	ATGAATCTAC	GFP	5
2	TCAATGTATG	RFP	6
2	AATTGAGTAC	CFP	7
2	ATGTTAATGG	YFP	8
3	AATTAGGATG	GFP	9
3	ATAATGGATC	RFP	10
3	TAATAAGGTG	CFP	11
3	TAGTTAGAGC	YFP	12
4	ATAGAGAAGG	GFP	13
4	TTGATGATAC	RFP	14
4	ATAGTGATTC	CFP	15
4	TATAACGATG	YFP	16
5	TTAAGTTTAG	GFP	17
5	ATACGTTATG	RFP	18
5	TGTACTATAG	CFP	19
5	TTAACAAGTG	YFP	20
6	AACTATGTAC	GFP	21
6	TAActATGAC	RFP	22
6	ACTAATGTTC	CFP	23
6	TCATTGAATG	YFP	24

[0156]

[0157]

표 1에서 알 수 있는 바와 같이, 제1 부착 영역의 핵산 서열은 서열 번호 1 내지 서열 번호 4 중 하나일 수 있고, 제2 부착의 핵산 서열은 서열 번호 5 내지 서열 번호 8 중 하나일 수 있고, 제3 부착의 핵산 서열은 서열 번호 9 내지 서열 번호 12 중 하나일 수 있다.

[0158]

표 1은 주어진 부착 영역이 검출가능한 표지, 또는 검출가능한 표지를 포함하는 리포터 복합체를 포함하는 4개의 가능한 상보적 핵산 중 하나와 결합할 수 있다는 것을 보여준다. 따라서, 제1 위치의 부착 영역이 서열 번호 1을 포함한다면, 제1 위치는 GFP로 표지될 수 있고; 대안적으로, 제1 위치의 부착 영역이 서열 번호 2를 포함한다면, 제1 위치는 RFP로 표지될 수 있다. GFP, RFP, CFP 및 YFP 이외의 다른 검출가능한 표지가 사용될 수 있다. 추가로, 부착 영역에 대한 뉴클레오티드 서열은 표 1에 열거된 것과 상이할 수 있다.

[0159]

제1 위치의 부착 영역이 서열 번호 1을 포함하고, 제2 위치의 제2 부착 영역이 서열 번호 5를 포함하고, 제3 위치의 제2 부착 영역이 서열 번호 9를 포함할 때, 프로브는 GFP로 표지된 제1, 제2, 및 제3 위치를 가지게 될 것이다. 상기 3개의 위치 GFP 코드(즉, 검출가능한 표지의 선형 순서)가 프로브의 표적 결합 부위(예컨대, *GATA* 3)에 의해 결합된 표적 핵산을 식별시켜 준다.

[0160]

그러나, 예를 들어, 제1 위치의 부착 영역이 서열 번호 1을 포함하고, 제2 위치의 제2 부착 영역이 서열 번호 6을 포함하고, 제3 위치의 제2 부착 영역이 서열 번호 12를 포함할 때, 프로브는 각각 GFP, RFP, 및 YFP로 표지된 제1, 제2, 및 제3 위치를 가지게 될 것이다. 상기 3개의 위치 GFP-RFP-YFP 코드(즉, 검출가능한 표지의 선형 순서)가 프로브의 표적 결합 부위(예컨대, *MafB*)에 의해 결합된 표적 핵산을 식별시켜 준다. 종합해 보면, 각 위치에 대한 부착 영역의 선택이 프로브 백본이 생성할 수 있는 선형 컬러 코드를 정의하고; 이러한 선형 코드는 표적 결합 도메인의 알고 있는 뉴클레오티드 서열에 상보적인 특정 표적 핵산과 연관성을 가진다.

[0161]

유사하게, 예를 들어, 제1 위치의 부착 영역이 서열 번호 1을 포함하고, 제2 위치의 제2 부착 영역이 서열 번호 6을 포함하고, 제3 위치의 제2 부착 영역이 서열 번호 11을 포함할 때, 프로브는 각각 GFP, RFP, 및 CFP로 표지된 제1, 제2, 및 제3 위치를 가지게 될 것이다. 상기 3개의 위치 GFP-RFP-CFP 코드(즉, 검출가능한 표지의 선형

순서)가 프로브의 표적 결합 부위(예컨대, *Fat3*)에 의해 결합된 표적 핵산을 식별시켜 준다.

- [0162] 종합해 보면, 각각 *GATA3*, *MafB*, 및 *Fat3*에 결합하는 3개의 프로브가 샘플에 동시에 적용될 수 있고, *GATA3*, *MafB*, 및 *Fat3*의 존재 및 정량은 그의 검출가능한 표지의 선형 순서 차이에 기인하여 검출될 수 있다.
- [0163] 실시양태에서, 상보적 핵산 분자는 검출가능한 표지에 의해 결합될 수 있다. 대안적 실시양태에서, 상보적 핵산은 검출가능한 표지를 포함하는 리포터 복합체와 회합된다.
- [0164] 상보적 핵산의 뉴클레오티드 서열은 제한되지 않으며; 바람직하게, 이는 알고 있는 뉴클레오티드 서열과 실질적인 상동성(예컨대, 50% 내지 99.9%)을 가지지 않고; 이는 상보적 핵산 및 표적 핵산의 바람직하지 못한 하이브리드화를 막는 데 도움이 된다.
- [0165] 본 발명에서 유용한 리포터 복합체의 예는 도 9b에 제시되어 있다. 본 예에서, 상보적 핵산은 1차 핵산 분자에 연결되고(그로부터 분리되고), 이는 차례로 복수 개의 2차 핵산 분자에 하이브리드화되고, 이들은 각각 차례로, 하나 이상의 검출가능한 표지가 그에 부착되어 있는 복수 개의 3차 핵산 분자에 하이브리드화된다.
- [0166] 실시양태에서, 1차 핵산 분자는 약 90개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 2차 핵산 분자는 약 87개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 3차 핵산 분자는 약 15개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0167] 도 9c는 예시적인 리포터 복합체 집단을 보여주는 것이다. 프로브의 부착 영역 1에 하이브리드화하는 4개의 복합체가 도 9c의 좌측 상단 패널에 포함되어 있다. 프로브의 표적 결합 도메인의 뉴클레오티드 위치 1에 존재할 수 있는 각각의 가능한 뉴클레오티드에 대하여 한 유형의 리포터 복합체가 존재한다.
- [0168] 리포터 복합체는 다양한 디자인을 가질 수 있다. 예를 들어, 1차 핵산 분자는 적어도 하나의(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의) 2차 핵산 분자에 하이브리드화될 수 있다. 각 2차 핵산 분자는 적어도 하나의(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의) 3차 핵산 분자에 하이브리드화될 수 있다. 예시적인 리포터 복합체는 도 12a에 제시되어 있다. "4x3" 리포터 복합체는, 각각이 (각각 검출가능한 표지를 포함하는) 3개의 3차 핵산 분자에 하이브리드화되는 4개의 2차 핵산 분자에 하이브리드화되는 (상보적 핵산 분자에 연결된/상보적 핵산 분자로부터 분리된) 하나의 1차 핵산 분자를 가진다. 본 도면에서, 복합체의 각 상보적 핵산은 12개의 뉴클레오티드 길이("12개의 염기")이지만; 그러나, 상보적 핵산의 길이에는 제한이 없으며, 12개 미만 또는 12개 초과 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 우측 하단의 복합체는 그의 상보적 핵산과 그의 1차 핵산 분자 사이에 스페이서 영역을 포함한다. 스페이서는 20 내지 40개의 뉴클레오티드 길이인 것으로 식별되지만; 그러나, 스페이서의 길이에는 제한이 없으며, 20개의 뉴클레오티드보다 짧거나, 또는 40개의 뉴클레오티드보다 길 수 있다.
- [0169] 도 12b는 도 12a에 제시된 4개의 예시적인 리포터 복합체로부터 획득된 가변적인 평균(형광) 계수를 보여주는 것이다. 도 12b에서, 10 pM의 비오틴화 표적 주형을 스트렙타비딘으로 코팅된 플로우 셀(flow-cell) 표면 상에 부착시키고, 10 nM의 리포터 복합체를 플로우 셀 상에 유동시키고; 1분 동안 인큐베이션시킨 후, 플로우 셀을 세척하고, 플로우 셀을 영상화하고, 형광 피치를 계수하였다.
- [0170] 실시양태에서, 리포터 복합체는 "미리 구성된다." 즉, 복합체 중 각 폴리뉴클레오티드는 복합체를 프로브와 접촉시키기 전에 하이브리드화된다. 5개의 예시적인 리포터 복합체를 미리 구성하기 위한 예시적인 레시피가 도 12c에 제시되어 있다.
- [0171] 도 13a는, 2차 핵산 분자가 3차 핵산 분자에 하이브리드화되지 않고, 1차 핵산 분자로부터 원위부에 위치하는 "추가 핸들"을 가지는 대안적 리포터 복합체를 보여주는 것이다. 본 도면에서, 각 "추가 핸들"은 12개의 뉴클레오티드 길이("12 mer")이지만; 그러나, 그의 길이는 제한되지 않으며, 12개 미만 또는 12개 초과 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 실시양태에서, "추가 핸들"은 각각 상보적 핵산의 뉴클레오티드 서열을 포함하고; 따라서, 리포터 복합체가 "추가 핸들"을 포함할 때, 리포터 복합체는 리포터 복합체의 상보적 핵산을 통해 또는 "추가 핸들"을 통해 프로브에 하이브리드화할 수 있다. 따라서, 리포터 복합체가 프로브에 결합할 가능성은 증가된다. "추가 핸들" 디자인은 또한 하이브리드화 동역학적 성질을 개선시킬 수 있다. 이론으로 제한하지 않으면서, "추가 핸들"은 본질적으로 리포터 복합체의 상보적 핵산의 유효 농도를 증가시킨다.
- [0172] 도 13b는 도 12b에 기술된 절차를 사용하여 "추가 핸들"을 가지는 5개의 예시적인 리포터 복합체로부터 획득된 가변적인 평균(형광) 계수를 보여주는 것이다.
- [0173] 도 14a 및 14b는 두 예시적인 리포터 복합체에 대한 하이브리드화 동역학적 성질 및 형광 강도를 보여주는 것이다. 약 5분까지, 총 계수는 안정 수준에 이르기 시작하고, 이는 첨가된 대부분의 리포터 복합체가 이용가능한

표적을 발견하였다는 것을 시사하는 것이다.

[0174]

검출가능한 모이어티, 표지 또는 리포터는, 예컨대, 형광 모이어티, 비색 모이어티 등과 같은 검출가능한 모이어티의 직접적인 또는 간접적인 부착을 비롯한 다양한 방식으로 상보적 핵산에, 또는 3차 핵산 분자에 결합될 수 있다. 검출가능한 표지는, 각각이 동일하거나, 또는 상이할 수 있는 개별 방출 스펙트럼을 가지는, 복수의 검출가능한 모이어티를 포함할 수 있다. 예를 들어, 검출가능한 표지는 각각이 동일하거나, 또는 상이할 수 있는 방출 스펙트럼을 가지는 다중 형광단을 포함할 수 있다. 당업자는 핵산을 표지하는 것에 관한 참고문헌을 참조할 수 있다. 형광 모이어티의 예로는 황색 형광 단백질(YFP: yellow fluorescent protein), 녹색 형광 단백질(GFP: green fluorescent protein), 시안 형광 단백질(CFP: cyan fluorescent protein), 적색 형광 단백질(RFP: red fluorescent protein), 옴벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 시아닌, 단실 클로라이드, 피코시아닌, 피코에리트린 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 형광 표지 및 그의 뉴클레오티드 및/또는 올리고뉴클레오티드에의 부착은 문헌 [Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Ninth Edition (Molecular Probes, Inc., Eugene, 2002)]; [Keller and Manak, DNA Probes, 2nd Edition (Stockton Press, New York, 1993)]; [Eckstein, editor, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1991)]; 및 [Wetmur, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 26:227-259 (1991)]을 비롯한 다수의 리뷰에 기술되어 있다. 본 발명에 적용가능한 특정 방법은 하기 참고문헌 샘플에 개시되어 있다: 미국 특허 번호 4,757,141; 5,151,507; 및 5,091,519. 한 측면에서, 하나 이상의 형광 염료가 예컨대, 미국 특허 번호 5,188,934(4,7-디클로로플루오레세인 염료); 5,366,860(스펙트럼으로 분석가능한 로다민 염료); 5,847,162(4,7-디클로로로다민 염료); 4,318,846(에테르 치환된 플루오레세인 염료); 5,800,996(에너지 전달 염료); 5,066,580(Lee *et al.*)(크산틴 염료); 5,688,648(에너지 전달 염료) 등에 개시되어 있는 바와 같이, 표지된 표적 서열에 대한 표지로서 사용된다. 표지는 또한 하기 특허 및 특허 공개: 미국 특허 번호 6,322,901; 6,576,291; 6,423,551; 6,251,303; 6,319,426; 6,426,513; 6,444,143; 5,990,479; 6,207,392; 2002/0045045; 및 2003/0017264에 개시되어 있는 바와 같이, 양자점을 이용하여 수행될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "형광 표지"라는 용어는 하나 이상의 분자의 형광 흡수 및/또는 방출 특성을 통해 정보를 전달하는 신호전달 모이어티를 포함한다. 상기 형광 특성으로는 형광 강도, 형광 수명, 방출 스펙트럼 특징, 에너지 전달 등을 포함한다. 본원에서 사용되는 바, 형광 표지는, 각각이 동일하거나, 또는 상이할 수 있는 개별 형광 흡수 및/또는 방출 특성을 가지는, 복수의 검출가능한 모이어티를 포함할 수 있다. 예를 들어, 형광 표지는, 각각이 동일하거나, 또는 상이할 수 있는 방출 스펙트럼을 가지는 다중 형광단을 포함할 수 있다. 추가의 비제한적인 예에서, 형광 표지는 형광단 알렉사 플루오르(ALEXA FLUOR)TM 350, 알렉사 플루오르TM 405, 알렉사 플루오르TM 430, 알렉사 플루오르TM 532, 알렉사 플루오르TM 546, 알렉사 플루오르TM 568, 알렉사 플루오르TM 594 및 알렉사 플루오르TM 647의 임의 조합을 포함할 수 있다.

[0175]

뉴클레오티드 및/또는 올리고뉴클레오티드 서열 내로 쉽게 도입되는 상업적으로 이용가능한 형광 뉴클레오티드 유사체로는 Cy3-dCTP, Cy3-dUTP, Cy5-dCTP, Cy5-dUTP(Amersham Biosciences: 미국 뉴저지주 피츠카타웨이 소재), 플루오레세인-12-dUTP, 테트라메틸로다민-6-dUTP, 텍사스 레드(TEXAS RED)TM-5-dUTP, 캐스케이드 블루(CASCADE BLUE)TM-7-dUTP, BODIPY TMFL-14-dUTP, BODIPY TMR-14-dUTP, BODIPY TMTR-14-dUTP, 로다민 그린(RHODAMINE GREEN)TM-5-dUTP, 오레곤 그린R(OREGON GREENR)TM 488-5-dUTP, 텍사스 레드TM-12-dUTP, BODIPY TM 630/650-14-dUTP, BODIPY TM 650/665-14-dUTP, 알렉사 플루오르TM 488-5-dUTP, 알렉사 플루오르TM 532-5-dUTP, 알렉사 플루오르TM 568-5-dUTP, 알렉사 플루오르TM 594-5-dUTP, 알렉사 플루오르TM 546-14-dUTP, 플루오레세인-12-UTP, 테트라메틸로다민-6-UTP, 텍사스 레드TM-5-UTP, mCherry, 캐스케이드 블루TM-7-UTP, BODIPY TM FL-14-UTP, BODIPY TMR-14-UTP, BODIPY TM TR-14-UTP, 로다민 GREENTM-5-UTP, 알렉사 플루오르TM 488-5-UTP, 렉사 플루오르(LEXA FLUOR)TM 546-14-UTP(Molecular Probes, Inc.: 미국 오레곤주 유진 소재) 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 대안적으로, 상기 형광단 및 본원에서 언급된 것은 예를 들어, 포스포로아미다이트 또는 NHS 화학법을 이용하는 올리고뉴클레오티드 합성 동안 첨가될 수 있다. 다른 형광단을 가지는 뉴클레오티드의 통상적인 합성에 관한 프로토콜은 당업계에 공지되어 있다(문헌 [Henegariu *et al.* (2000) Nature Biotechnol. 18:345] 참조). 2-아미노퓨린은 올리고뉴클레오티드 서열 합성 동안 그의 서열에 직접 도입될 수 있는 형광 염기이다. 핵산은 또한 선형적으로 삽입성 염료, 예컨대, DAPI, YOYO-1, 에티디움 브로마이드, 시아닌 염료(예컨대, SYBR 그린) 등으로 염색될 수 있다.

[0176]

합성 후 부착을 위해 이용가능한 다른 형광단으로는 알렉사 플루오르TM 350, 알렉사 플루오르TM 405, 알렉사 플루오르TM 430, 알렉사 플루오르TM 532, 알렉사 플루오르TM 546, 알렉사 플루오르TM 568, 알렉사 플루오르TM 594, 알렉사 플루오르TM 647, BODIPY 493/503, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY 530/550, BODIPY TMR, BODIPY

558/568, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY TR, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, 캐스케이드 블루, 캐스케이드 옐로우(Cascade Yellow), 단실, 리사민 로다민 B, 마리나 블루(Marina Blue), 오레곤 그린(Oregon Green) 514, 파시픽 블루(Pacific Blue), 파시픽 오렌지(Pacific Orange), 로다민 6G, 로다민 그린, 로다민 레드, 테트라메틸 로다민, 텍사스 레드(Molecular Probes, Inc.(미국 오레곤주 유진 소재)로부터 이용가능), Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7(Amersham Biosciences: 미국 뉴저지주 피츠카 타웨이 소재) 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. PerCP-Cy5.5, PE-Cy5, PE-Cy5.5, PE-Cy7, PE-텍사스 레드, APC-Cy7, PE-알렉사 염료(610, 647, 680), APC-알렉사 염료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는, FRET 탠덤 형광단 또한 사용될 수 있다.

[0177] 형광 표지된 뉴클레오타이드 및/또는 올리고뉴클레오타이드 서열로부터 신호를 증강시키는 데 금속성 은 또는 금 입자가 사용될 수 있다(문헌 [Lakowicz *et al.* (2003) *BioTechniques* 34:62]).

[0178] 올리고뉴클레오타이드 서열에 적합한 다른 표지로는 플루오레세인(FAM, FITC), 디곡시게닌, 디니트로페놀(DNP), 단실, 비오틴, 브로모데옥시우리딘(BrdU), 헥사히스티딘(6xHis), 포스포르-아미노산(예컨대, P-tyr, P-ser, P-thr) 등을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 하기 합텐/항체 쌍: 비오틴/a-비오틴, 디곡시게닌/a-디곡시게닌, 디니트로페놀 (DNP)/a-DNP, 5-카복시플루오레세인(FAM)/a-FAM이 검출을 위해 사용되며, 각 항체는 검출가능한 표지로 유도체화된다.

[0179] 본원에 기술된 검출가능한 표지는 스펙트럼으로 분석가능한 것이다. 복수 개의 형광성 표지와 관련하여 "스펙트럼으로 분석가능하다"는 것은 표지의 형광 방출 밴드가 충분히 상이하고, 즉, 충분히 비중복성을 띠며, 이로써, 미국 특허 번호 4,230,558; 4,811,218 등에서, 또는 문헌 [Wheless *et al.*, pgs. 21-76, in *Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis* (Academic Press, New York, 1985)]에서 기술된 시스템에 의해 예시된 바와 같이, 각각의 표지가 부착되는 분자 태그는 예컨대, 대역 통과 필터 및 광전자 증배관 등을 이용하는 표준 광검출 시스템에 의해 각 표지에 의해 생성된 형광 신호에 기초하여 구별될 수 있다는 것을 의미한다. 한 측면에서, 스펙트럼으로 분석가능한 유기 염료, 예컨대, 플루오레세인, 로다민 등은 파장 방출 최대치가 적어도 12 nm만큼 이격되어 있고, 또 다른 측면에서는, 적어도 40 nm만큼 이격되어 있다는 것을 의미한다. 또 다른 측면에서, 킬레이팅된 란타늄 화합물, 양자점 등이 스펙트럼으로 분석가능하다는 것은 파장 방출 최대치가 적어도 10 nm만큼 이격되어 있고, 추가 측면에서, 적어도 15 nm만큼 이격되어 있다는 것을 의미한다.

[0180] 핵산을 검출하는 방법

[0181] 본 발명은 본 발명의 프로브를 사용하여 핵산을 검출하는 방법에 관한 것이다. 본 방법의 예는 도 6 내지 11에 제시되어 있다.

[0182] 본 방법은 본 발명의 1 이상의 프로브를 기재에 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 위치에) 고정화된 표적 핵산에 가역적으로 하이브리드화시키는 단계를 포함한다.

[0183] 기재는 당업계에 공지된 임의의 고체 지지체, 예컨대, 표적 핵산을 고정화시킬 수 있는 코팅된 슬라이드 및 미세유체 장치일 수 있다. 특정 실시양태에서, 기재는 표면, 막, 비드, 다공성 물질, 전극 또는 어레이이다. 표적 핵산은 당업자에게 자명한 임의의 기재 상에 고정화될 수 있다.

[0184] 실시양태에서, 표적 핵산은 표적 핵산의 일부분에 상보적인 도메인을 포함하는 포획 프로브에 의해 결합된다. 상기 일부분은 표적 핵산의 단부일 수 있거나, 또는 단부 쪽에 있지 않을 수도 있다.

[0185] 예시적인 유용한 기재로는 리간드, 항원, 탄수화물, 핵산, 수용체, 렉틴 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 결합 모이어티를 포함하는 것을 포함한다. 포획 프로브는 기재의 결합 모이어티와 결합할 수 있는 결합 모이어티를 포함한다. 유용한, 반응성 모이어티를 포함하는 기재의 예로는 에폭시, 알데히드, 금, 히드라지드, 술포히드릴, NHS-에스테르, 아민, 티올, 카복실레이트, 말레이미드, 하이드록시메틸 포스포네, 이미도에스테르, 이소시아네이트, 하이드록실, 펜타플루오로페닐-에스테르, 소랄렌, 피리딜 디술폰드 또는 비닐 술폰, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 하이드로겔, 또는 그의 혼합물을 포함하는 표면을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 유용한, 반응성 모이어티를 포함하는 기재의 예로는 옵트어레이(OptArray)-DNA NHS 그룹(Acceler8), 넥스테리온 슬라이드 AL(Nexterion Slide AL)(Schott) 및 넥스테리온 슬라이드 E(Schott)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0186] 포획 프로브의 결합 모이어티는 비오틴이고, 기재는 아비딘(예컨대, 스트렙트아비딘)을 포함한다. 아비딘을 포함하는 유용한 기재는 상업적으로 이용가능한 것으로서, TB0200(Acceler8), SAD6, SAD20, SAD100, SAD500, SAD2000(Xantec), 슈퍼아비딘(SuperAvidin)(Array-It), 스트렙트아비딘 슬라이드(카탈로그 #MPC 000,

Xenopore) 및 스트랩트아비딘n슬라이드(카탈로그 #439003, Greiner Bio-one)를 포함한다.

- [0187] 실시양태에서, 포획 프로브의 결합 모이어티는 아비딘(예컨대, 스트랩트아비딘)이고, 기재는 비오틴을 포함한다. 상업적으로 이용가능한 것으로서, 비오틴을 포함하는 유용한 기재로는 옵티어레이(Optiarray)-비오틴(Accler8), BD6, BD20, BD100, BD500 및 BD2000(Xantec)을 포함한다.
- [0188] 실시양태에서, 포획 프로브의 결합 모이어티는 광활성화에 의해 기재에 결합할 수 있는 반응성 모이어티를 포함할 수 있다. 기재는 광반응성 모이어티를 포함할 수 있거나, 또는 나노리포터의 제1 부분은 광반응성 모이어티를 포함할 수 있다. 광반응성 모이어티의 일부 예로는 아릴 아지드, 예컨대, N((2-피리딜디티오)에틸)-4-아지도살리실아미드; 플루오르화된 아릴 아지드, 예컨대, 4-아지도-2,3,5,6-테트라플루오로벤조산; 벤조페논계 시약, 예컨대, 4-벤조일벤조산의 숙신이미딜 에스테르; 및 5-브로모-데옥시우리딘을 포함한다.
- [0189] 실시양태에서, 포획 프로브의 결합 모이어티는 당업자에게 자명한 다른 결합 쌍을 통해 기재에 고정화될 수 있다.
- [0190] 기재에의 결합 후, 표적 핵산은 표적 핵산을 연장시키는 데 충분한 힘(예컨대, 중력, 동유체력, 전자기력 "일렉트로스트레칭", 플로우 스트레칭, 리시딩 메니스커스 기법, 및 이들의 조합)을 가함으로써 신장될 수 있다.
- [0191] 표적 핵산은 표적 핵산의 제2 부분에 상보적인 도메인을 포함하는 제2 포획 프로브에 의해 결합될 수 있다. 상기 부분은 표적 핵산의 단부일 수 있거나, 또는 단부 쪽에 있지 않을 수도 있다. 제2 포획 프로브의 결합은 표적 핵산의 신장 이후에 또는 신장 동안 이루어질 수 있거나, 또는 신장되지 않은 표적 핵산에 대하여 이루어질 수 있다. 제2 포획 프로브는 상기 기술된 바와 같이 결합을 가질 수 있다.
- [0192] 포획 프로브는 검출가능한 표지, 즉, 기준(fiducial) 스폿을 포함할 수 있거나, 또는 그와 회합될 수 있다.
- [0193] 포획 프로브는 샘플로부터 표적 핵산을 단리시킬 수 있다. 포획 프로브는 표적 핵산을 포함하는 샘플에 첨가된다. 포획 프로브는 표적 핵산의 영역에 상보적인 포획 프로브의 영역을 통해 표적 핵산에 결합한다. 표적 핵산이 포획 프로브의 결합 모이어티에 결합하는 모이어티를 포함하는 기재와 접촉할 때, 핵산은 기재 상에 고정화된다.
- [0194] 사용자가 고도로 단편화된 샘플로부터 가능한 한 많은 표적 핵산 분자를 확실하게 "포획"할 수 있도록 하기 위해, 각각이 표적 핵산의 상이한 영역에 상보적인 복수 개의 포획 프로브를 포함하는 것이 도움이 된다. 예를 들어, 3개의 포획 프로브 풀이 존재할 수 있으며, 제1 풀은 표적 핵산의 5' 단부 인근의 표적 핵산의 영역에 상보적이고, 제2 풀은 표적 핵산의 중간 부분의 영역에 상보적이고, 제3 풀은 표적 핵산의 3' 단부 인근의 표적에 상보적이다. 이는 표적 핵산당 "n개의 관심 영역"으로 일반화될 수 있다. 본 예에서, 단편화된 표적 핵산의 각 개개의 풀은 비오틴 태그를 포함하거나, 또는 그에 결합한 포획 프로브에 결합하였다. 입력 샘플 중 $1/n$ (n = 표적 핵산 중 별개의 영역의 개수)이 각 풀 챔버에 대해 단리된다. 포획 프로브는 관심 표적 핵산에 결합한다. 이어서, 표적 핵산은 기재에 부착된 아비딘 분자에 포획 프로브의 비오틴을 통해 고정화된다. 임의적으로, 표적 핵산은 예컨대, 플로우 또는 정전기력을 통해 연신된다. 전체 n개의 풀은 동시에 연신 및 결합될 수 있거나, 또는 완전히 연신된 분자의 개수를 최대화시키기 위해, (가장 5' 쪽의 영역을 포획하는) 풀 1이 먼저 연신되고, 결합된 후; 이어서, (표적 영역의 중간 부분을 포획하는) 풀 2가 이어서 연신되고 결합되고; 마지막으로, 풀 3이 연신되고 결합될 수 있다.
- [0195] 필요한 별개의 포획 프로브의 개수는 표적 핵산 단편 크기와 역의 관계를 가진다. 다시 말해, 고도로 단편화된 표적 핵산의 경우, 더 많은 포획 프로브가 요구될 것이다. 고도로 단편화되고, 분해된 표적 핵산을 가지는 샘플 유형의 경우(예컨대, 포르말린 고정된 파라핀 포매된 조직), 포획 프로브의 다중 풀을 포함하는 것이 유용할 수 있다. 다른 한편으로는, 예컨대, 시험관내에서 수득된 단리된 핵산과 같이, 긴 표적 핵산 단편을 가지는 샘플의 경우, 5' 단부의 단일 포획 프로브가 충분한 것일 수 있다.
- [0196] 본 발명의 프로브 또는 포획 프로브는, 각각이 리간드, 항원, 탄수화물, 핵산s, 수용체, 렉틴, 합텐, 및 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 하나 이상의 친화성 시약을 포함할 수 있다. 친화성 시약을 통해 프로브 또는 포획 프로브와 표적 핵산에 의해 형성된 복합체를 정제할 수 있다. 상기 정제로 검출하고자 하는 표적 핵산의 농도는 농축된다.
- [0197] 실시양태에서, 친화성 시약은 비오틴이고, 정제 수단(예컨대, 고체 지지체에 부착된 것)은 아비딘(예컨대, 스트랩트아비딘)을 포함한다.
- [0198] 실시양태에서, 친화성 시약은 아비딘(예컨대, 스트랩트아비딘)이고, 정제 수단(예컨대, 고체 지지체에 부착된

것)은 비오틴을 포함한다.

- [0199] 실시양태에서, 친화성 시약은 알고 있는 서열을 가진 핵산을 포함한다. 따라서, 친화성 시약을 포함하는 프로브 또는 포획 프로브는 친화성 시약에 상보적 핵산을 포함하는 정제 프로브를 사용하여 샘플로부터 정제될 수 있다. 유사하게, 친화성 시약을 포함하는 프로브 또는 포획 프로브를 포함하는 복합체는 친화성 시약을 포함하는 에 상보적 핵산을 포함하는 정제 프로브를 사용하여 샘플로부터 정제될 수 있다. 동일한 표적 핵산에 대한, 프로브에 대한 친화성 모이어티 및 포획 프로브에 대한 친화성 모이어티는 상이한 핵산 서열을 가질 수 있다. 대안적으로, 각각 동일한 표적 핵산에 대한, 프로브에 대한 친화성 시약 및 포획 프로브에 대한 친화성 시약은 동일한 핵산 서열을 가질 수 있다. 프로브 집단 중 각 프로브에 대한 각 친화성 시약은 동일한 핵산 서열을 가질 수 있다. 포획 프로브 집단 중 각 포획 프로브에 대한 각 친화성 시약은 동일한 핵산 서열을 가질 수 있다. 프로브 집단 중 각 프로브에 대한 각 친화성 시약은 상이한 핵산 서열을 가질 수 있다. 포획 프로브 집단 중 각 포획 프로브에 대한 각 친화성 시약은 상이한 핵산 서열을 가질 수 있다.
- [0200] 실시양태에서, 친화성 시약은 합텐이고, 정제 수단(예컨대, 고체 지지체에 부착된 것)은 단백질 결합 도메인(예컨대, 항체)을 포함한다.
- [0201] 도 5a는 표적 핵산에 결합된 프로브의 개략도를 보여주는 것이다. 표적 핵산은 TCAGTG 서열을 포함한다. 프로브의 바코드 도메인은 특정의 선형 컬러 코드 또는 "검출가능한 표지의 선형 순서"를 이용하여 결합된 TCAGTG를 특이적으로 식별시켜 주는 부착 영역을 포함하도록 디자인되었다. 검출가능한 표지를 포함하는 상보적 핵산, 또는 리포터 복합체의 제1 풀은 상단에 제시되어 있고, 상기 풀의 각 구성원은 상이한 뉴클레오타이드 서열 및 연관된 검출가능한 표지(예컨대, 녹색 표지 및 시안색 표지)를 가진다. 한 예로서, 제1 풀 중 핵산은 표 1의 서열 번호 1 내지 4에 상보적인 서열을 가진다. 도 5a에서, 프로브의 제1 부착 영역은 제1 위치는 시안색 표지로 표지되어야 한다는 것을 명시하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열(들)을 포함한다(예컨대, 부착 영역은 표 1의 서열 번호 3을 포함한다). 따라서, 제1 부착 위치에 특이적이고, 시안 표지를 보유하는 상보적 핵산만이 오직 제시된 프로브의 바코드 도메인의 제1 위치에 결합할 수 있다. 시안 표지는 결합된 표적 핵산을 식별시켜 주는 선형 컬러 코드 중 제1 컬러이다.
- [0202] 제1 위치와 연관된 컬러가 본 발명의 시스템에서 영상화되고, 기록된다.
- [0203] 상보적 핵산 또는 리포터 복합체 풀의 개수는 바코드 도메인 내의 위치의 개수와 동일하다. 따라서, 바코드 도메인이 6개의 위치를 가지는 경우, 프로브 상에서 6개의 풀이 사이클링될 것이다.
- [0204] 프로브는 처음에 표적 핵산을 포함하는 샘플에 포획 프로브가 첨가될 때, 표적 핵산에 제공될 수 있다(도 6 참조). 상기 프로브는 표적 핵산에 대한 감응성 및 특이성을 증가시키기 위하여 상이한 농도, 상이한 완충제 조건, 예컨대, 염, 및 상이한 온도에서 제공될 수 있다.
- [0205] 포획 프로브 및 프로브는 다단계 정제 정제를 위한 친화성 시약을 가질 수 있다(도 7 및 8a 내지 8e 참조). 오직 하나만 정제하는 데 사용할 수 있거나, 또는 단부 둘 모두를 정제할 수 있다. 정제는 표적 포획의 특이성 및 순도를 증가시킬 것이다.
- [0206] 프로브는 표적 핵산에 제공될 수 있고, 처음에는 검출가능한 표지를 포함하는 상보적 핵산 또는 검출가능한 표지를 포함하는 리포터 복합체가 완전히 없는 표적 핵산에 결합될 수 있다. 상기 프로브는 검출가능한 상보적 핵산을 포함하는 프로브보다 더 작을 것이다. 상기 프로브는 검출가능한 표지를 포함하는 프로브보다 더 높은 농도로 제공될 수 있다. 상기 작은 프로브는 더욱 신속하게 및 더욱 효율적으로 표적 핵산에 결합할 것이다. 따라서, 검출가능한 표지를 포함하는 프로브를 사용할 때 요구되는 시간 대비의 시간 분율로 데이터를 제공한다.
- [0207] 대안적으로, 표적 핵산과 프로브의 접촉 전에, 프로브는 그의 제1 위치에서 검출가능한 표지를 포함하는 상보적 핵산 또는 리포터 복합체에 하이브리드화될 수 있다. 따라서, 그의 표적 핵산과 접촉하였을 때, 프로브는 그의 제1 위치로부터 검출가능한 신호를 방출할 수 있고, 바코드 도메인 상의 제1 위치에 대한 상보적 핵산 또는 리포터 복합체의 제1 풀을 제공할 필요가 없다.
- [0208] 도 5b는 도 5a에 제시된 방법을 계속 진행하는 것이다. 바코드 도메인의 제1 위치 내의 부착 영역에 결합한, 제1 상보적 핵산(또는 리포터 복합체)은 검출가능한 표지가 없는, 제1 하이브리드화 핵산으로 대체되었다. 검출가능한 표지가 없는, 제1 하이브리드화 핵산은 검출가능한 표지를 포함하는 앞서 결합된 상보적 핵산, 또는 앞서 결합된 리포터 복합체를 대체한다. 이로써, 바코드 도메인의 제1 위치는 검출가능한 신호를 더 이상 방출하지 않게 된다.

- [0209] 검출가능한 표지가 없는, 하이브리드화 핵산은 검출가능한 표지를 포함하는 앞서 결합된 상보적 핵산, 또는 앞서 결합된 리포터 복합체와 동일한 서열(예컨대, 서열 번호 1 내지 서열 번호 24)을 포함할 수 있다. 바람직하게, 검출가능한 표지가 없는, 하이브리드화 핵산은 검출가능한 표지를 포함하는 앞서 결합된 상보적 핵산, 또는 앞서 결합된 리포터 복합체보다 길이가 더 길 것이다. 이러한 경우, 하이브리드화 핵산은 부착 영역에 인접한 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 유사체 영역에 상보적인 서열을 추가로 포함한다. 이론에 의해 제한고자 하지 않으면서, 하이브리드화 핵산과 관련된, 검출가능한 표지를 포함하는 상보적 핵산보다 길이가 더 긴 하이브리드화 핵산은 바코드 도메인에 대하여 더욱 큰 친화성을 가질 것이며, 검출가능한 표지를 포함하는 상보적 핵산을 쉽게 대체할 수 있을 것이다. 상기 하이브리드화 핵산과 관련된 상보적 핵산보다 길이가 더 긴 상기 하이브리드화 핵산은 도 10 및 11에 제시되어 있다.
- [0210] 실시양태에서, 검출가능한 표지를 포함하는 상보적 핵산 또는 리포터 복합체는 부착 영역으로부터 제거될 수는 있지만, 검출가능한 표지가 없는 하이브리드화 핵산으로 대체될 수는 없다. 이는 예를 들어, 카오토로픽제를 첨가함으로써, 온도를 증가시킴으로써, 염 농도에 변화를 줌으로써, pH를 조정함으로써 및/또는 동유체력을 가함으로써 이루어질 수 있다. 본 실시양태에서, 더 적은 수의 시약(즉, 검출가능한 표지가 없는 하이브리드화 핵산)이 요구된다.
- [0211] 도 5c는 청구된 본 발명의 방법을 계속 진행하는 것이다. (예컨대, 표 1의 서열 번호 5 내지 8에 상보적인 서열을 가지는) 상보적 핵산 또는 리포터 복합체의 제2 풀이 상단에 제시되어 있고, 풀의 각 구성원은 상이한 검출가능한 표지 및 상이한 뉴클레오타이드 서열을 가진다. 또한, 제1 풀의 상보적 핵산 또는 리포터 복합체의 상보적 핵산에 대한 뉴클레오타이드 서열은 제2 풀의 것에 대한 뉴클레오타이드 서열과 다르다. 제2 풀로부터의 것이고, 황색의 검출가능한 표지를 포함하는 상보적 핵산만이 오직 바코드 도메인의 제2 위치에 결합한다(예컨대, 상보적 핵산은 표 1의 서열 번호 8에 상보적인 서열을 가진다).
- [0212] 제2 위치와 연관된 컬러가 본 발명의 시스템에서 영상화되고, 기록된다.
- [0213] 실시양태에서, 도 5c에 제시된 단계가 도 5b에 제시된 단계에 후속된다. 일단 (도 5a의) 상보적 핵산 또는 리포터 복합체의 제1 풀이 (도 5b의) 검출가능한 표지가 없는 제1 하이브리드화 핵산으로 대체되고 나면, 이때, (도 5c에 제시된 바와 같은) 상보적 핵산 또는 리포터 복합체의 제2 풀이 제공된다. 대안적으로, 도 5c에 제시된 단계가 도 5b에 제시된 단계가 동시에 이루어진다. (도 5b의) 검출가능한 표지가 없는 제1 하이브리드화 핵산은 (도 5c에 제시된 바와 같은) 상보적 핵산 또는 리포터 복합체의 제2 풀과 함께 동시에 제공된다.
- [0214] 도 5d는 도 5c에 제시된 방법을 계속 진행하는 것이다. 바코드 도메인 상의 제1부터 제5 위치가 검출가능한 표지를 포함하는 상보적 핵산 또는 리포터 복합체에 의해 결합되었고, 그의 위치와 연관된 컬러가 영상화 및 기록되었고, 상보적 핵산은 검출가능한 표지가 없는 하이브리드화 핵산으로 대체되었다. 바코드 도메인의 제6 위치가 현재 검출가능한 표지를 포함하는 상보적 핵산 또는 리포터 복합체에 의해 결합되고, 이를 통해 표적 결합 도메인 내의 제6 위치는 구아닌(G)에 결합되는 것으로 식별된다.
- [0215] 제6 위치와 연관된 컬러가 본 발명의 시스템에서 영상화되고, 기록된다.
- [0216] 이 시점에서, 프로브 백본의 전체 선형 컬러 코드(즉, 검출가능한 표지의 선형 순서)가 검출되었고; 이어서, 상기 선형 코드는 표적 결합 도메인의 알고 있는 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 특정 표적 핵산과 연관화된다. 한 예로서, 그린, 시안, 레드, 옐로우, 옐로우, 레드인 선형 컬러 코드를 방출할 수 있는 프로브는 *Fat2*에 결합될 수 있다. 따라서, 본 발명의 시스템이 그린, 시안, 레드, 옐로우, 옐로우, 레드인 선형 컬러 코드를 기록하였다면, 이때 사용자는 *Fat2*가 샘플 중에 존재하였다는 것을 알게 될 것이다.
- [0217] 프로브의 백본 도메인과 연관된 각 컬러가 순차적으로 검출되기 때문에, 각 컬러 표지를 구별하고, 분석하기 위해 프로브 백본을 신장시켜야 할 필요가 없을 수도 있다. 이는 이전 세대의 핵산 검출 프로브에 비하여 우수한 장점이다.
- [0218] 상기 언급된 바와 같이, 검출가능한 표지를 포함하는 상보적 핵산 또는 리포터 복합체는 부착 영역으로부터 제거될 수는 있지만, 검출가능한 표지가 없는 하이브리드화 핵산으로 대체될 수는 없다.
- [0219] 필요한 경우, 검출가능한 표지 교환 속도는 검출가능한 표지 교환 속도를 가속화시키는 소형 단일 가닥 올리고 뉴클레오타이드를 도입함으로써 가속화될 수 있다(예컨대, "토-홀드(Toe-Hold)" 프로브; 예컨대, 문헌 [Seeling *et al.*, "Catalyzed Relaxation of a Metastable DNA Fuel"; *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128(37), pp12211-12220] 참조).

- [0220] 도 5a 내지 5d와 유사하게, 도 9a 및 9d 내지 9f는 본 발명의 방법의 단계를 보여주는 것이지만; 그러나, 도 9a 및 9d 내지 9f는 (검출가능한 표지를 포함하는) 리포터 복합체가 프로브의 부착 영역에 결합한다는 것으로 명확하게 보여주는 것이다. 도 9d 및 9e는 리포터 복합체에 하이브리드화된 프로브로부터 순차적으로 방출된 형광 신호를 보여주는 것이다.
- [0221] 도 10은 도 9d 및 9e에 제시된 단계를 요약해 놓은 것이다. 도면 상단에는 예시적인 프로브의 뉴클레오티드 서열이 제시되어 있고, 프로브의 중요한 도메인이 식별표시되어 있다. 프로브는 그의 표적 결합 도메인과 그의 바코드 도메인 사이에 임의적인 이중 가닥 DNA 스페이서를 포함한다. 바코드 도메인은 순서대로 "F flank 1" 부분, "AR-1" 부분, "AR-1/F flank 2" 부분, "AR-2" 부분, 및 "AR-2/F flank 3" 부분을 포함한다. 단계 1에서, "AR-1 Detect"는 프로브의 "AR-1" 및 "AR-1/F flank 2" 부분에 하이브리드화된다. "AR-1 Detect"는 제1 위치 터미딘을 코딩하는 검출가능한 표지를 포함하는 리포터 복합체 또는 상보적 핵산에 상응한다. 따라서, 단계 1은 도 9d에 상응하는 것이다. 단계 2에서, "Lack 1"은 프로브의 "F flank 1" 및 "AR-1" 부분에 하이브리드화된다. "Lack 1"은 (도 9e에서 검은색 막대로 도시된, 제1 부착 영역을 커버하는) 프로브의 제1 부착 영역에 특이적인, 검출가능한 표지가 없는, 하이브리드화 핵산에 상응하는 것이다. 리포터 복합체 또는 상보적 핵산에 대해 5'인, "F flank 1" 위치에 하이브리드화함으로써, 하이브리드화 핵산은 프로브로부터 리포터 복합체/상보적 핵산을 더욱 효율적으로 대체한다. "F flank" 부분은 또한 "토-홀드"로도 공지되어 있다. 단계 3에서, "AR-2 Detect"는 프로브의 "AR-2" 및 "AR-2/F flank 3" 부분에 하이브리드화된다. "AR-2 Detect"는 제2 위치 구아닌을 코딩하는 검출가능한 표지를 포함하는 상보적 핵산 또는 리포터 복합체에 상응한다. 따라서, 단계 3은 도 9e에 상응하는 것이다. 본 실시양태에서, 검출가능한 표지가 없는 하이브리드화 핵산 및 검출가능한 표지를 포함하는 상보적 핵산/리포터 복합체가 순차적으로 제공된다.
- [0222] 대안적으로, 검출가능한 표지가 없는 하이브리드화 핵산 및 검출가능한 표지를 포함하는 상보적 핵산/리포터 복합체가 동시에 제공된다. 상기 대안적 실시양태는 도 11에 도시되어 있다. 단계 2에서, "Lack 1"(검출가능한 표지가 없는 하이브리드화 핵산)이 "AR-2 Detect"(제2 위치 구아닌을 코딩하는 리포터 복합체)와 함께 제공된다. 상기 대안적 실시양태는 두 단계를 하나로 조합하는 바, 이에 도 10에 도시된 실시양태보다 시간상 더욱 효과적일 수 있다.
- [0223] 본 개시내용의 검출가능한 표지는 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 검출가능한 표지는 현미경, 카메라, 마이크로프로세서 및/또는 컴퓨터 시스템 중 하나 이상의 것을 포함하는 시스템에 의해 검출될 수 있다. 한 측면에서 카메라는 CCD 카메라이다. 한 측면에서, 현미경, 카메라, 및 컴퓨터 시스템은 상보성 금속 산화물 반도체(CMOS(complementary metal-oxide semiconductor)-칩)를 포함할 수 있다.
- [0224] **복수 개의 핵산에 대한 다중 방식의 검출**
- [0225] 실시양태에서, 복수 개의 핵산이 동시에 검출되고, 즉, 다중 방식으로 검출된다. 이를 위해, 별개의 프로브로 이루어진 세트 또는 집단이, 고정화된 핵산 표적 샘플에 제공된다. 프로브 세트 또는 집단은 바람직하게 적어도 2개, 예컨대, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000개 이상의 프로브 종을 포함한다.
- [0226] 프로브 세트는 표적화하고자 하는 세포 유형 또는 조직 유형에 기초하여 미리 정의될 수 있다. 예를 들어, 조직이 유방암일 경우, 이때 프로브 세트는 유방암 세포와 관련된 발현된 핵산(예컨대, *Her2*, *EGFR*, 및 *PR*)에 대한 프로브, 및/또는 정상적인 유방 조직에서 발현되는 핵산에 대한 프로브를 포함할 것이다. 추가로, 프로브 세트는 표적화하고자 하는 세포 또는 조직의 발생 상태에 기초하여 미리 정의될 수 있다.
- [0227] 나노스트링 테크놀로지스(NanoString Technologies)[®] n카운터(nCounter)[®] 시스템 및 방법을 통해 복수 개의 (800개 이상의), 별개의 표적 단백질 및/또는 표적 핵산을 동시에 다중 방식으로 식별할 수 있다.
- [0228] **정의:**
- [0229] 특정 예시적인 실시양태에서, 본원에서 사용되는 바, "어닐링" 및 "하이브리드화"라는 용어는 상호교환적으로 사용되며, 이는 안정적인 이중체를 형성한다는 것을 의미한다. 한 측면에서, 안정적인 이중체란, 이중체 구조가 예컨대, 이중체 가닥의 Tm보다 약 5°C 낮거나, 또는 약 5°C 높은 온도 및 낮은 염 농도, 예컨대, 0.2 M 미만, 또는 0.1 M 미만, 또는 당업자에게 공지된 염 농도와 같은 조건하에서의 엄격한 세척에 의해 파괴되지 않는다는 것을 의미한다. 이중체와 관련하여 사용될 때, "완벽하게 매칭된"이라는 용어는 이중체를 구성하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 올리고뉴클레오티드 가닥이 서로 이중 가닥 구조를 형성함으로써 각 가닥의 모든 뉴클레오티드가 나머지 다른 가닥 중 뉴클레오티드와 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍을 형성한다는 것을 의미한다. "이

중체"라는 용어는 사용될 수 있는 2-아미노퓨린 염기, PNA 등과 뉴클레오타이드 유사체, 예컨대, 테옥시이노신, 뉴클레오타이드의 쌍 형성을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 두 올리고뉴클레오타이드 사이의 이중체에서 "미스매치"란, 이중체에서 뉴클레오타이드 쌍이 왓슨-크릭 결합을 이루지 못한다는 것을 의미한다.

[0230] 본원에서 사용되는 바, "하이브리드화 조건"이라는 용어는 전형적으로 약 1 M 미만, 더욱 일반적으로, 약 500 mM 미만, 및 더욱더 일반적으로 약 200 mM 미만인 염 농도를 포함할 것이다. 하이브리드화 온도는 5°C 정도로 낮을 수 있지만, 전형적으로는 22°C 초과, 더욱 전형적으로는 약 30°C, 및 대개는 약 37°C 초과일 수 있다. 하이브리드화는 일반적으로 엄격한 조건하에서, 예컨대, 프로브가 그의 표적 서브서열에 특이적으로 하이브리드화할 수 있는 조건하에서 수행된다. 엄격한 조건은 서열 의존적이며, 다른 환경에서는 상이하다. 단편의 길이가 길수록, 특이적인 하이브리드화를 위해 더 높은 하이브리드화 온도가 요구될 수 있다. 염기 조성 및 상보적인 가닥의 길이, 유기 용매의 존재 및 염기 미스매칭 정도를 비롯한 다른 인자가 하이브리드화의 엄격성에 영향을 줄 수 있는 바, 단독으로 어느 한 절대 척도보다는 파라미터 조합이 더욱 중요하다.

[0231] 일반적으로, 엄격한 조건은 정의된 이온 강도 및 pH에서 특정 서열에 대한 T_m보다 약 5°C 더 낮게 선택된다. 예시적인 엄격한 조건은 적어도 25°C의 온도 및 pH 7.0 내지 8.3에서 적어도 0.01 M 내지 1 M 이하의 Na 이온 농도(또는 다른 염)인 염 농도를 포함한다. 예를 들어, 25-30°C의 온도 및 5X SSPE(750 mM NaCl, 50 mM Na 포스페이트, 5 mM EDTA, pH 7.4)인 조건이 대립유전자에 특이적인 프로브 하이브리드화에 적합하다. 엄격한 조건에 대해서는 예를 들어, 문헌 [Sambrook, Fritsche and Maniatis, "Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed." Cold Spring Harbor Press (1989)] 및 [Anderson Nucleic Acid Hybridization, 1st Ed., BIOS Scientific Publishers Limited (1999)]를 참조한다. 본원에서 사용되는 바, "특이적으로 ~에 하이브리드화하는" 또는 "~에 특이적으로 하이브리드화하는"이라는 용어 또는 유사 용어는 엄격한 조건하에서 분자가 실질적으로 특정 뉴클레오타이드 서열 또는 서열들에 결합, 이중체 형성, 또는 하이브리드화한다는 것을 의미한다.

[0232] 프로브의 특정 위치와 회합된 검출가능한 표지는 1회 또는 다회에 걸쳐 "판독"될 수 있고(예컨대, 그의 형광이 검출될 수 있고); "판독"은 "베이스콜(basecall)"이라는 용어와 동의어일 수 있다. 다중 리드는 정확도를 향상시킨다.

[0233] 본원에서 사용되는 바, "hybe 및 seq 사이클"은 특정 프로브 또는 프로브 집단 상의 각 부착 영역을 검출하는데 필요한 모든 단계를 지칭한다. 예를 들어, 표적 핵산 상의 6개의 위치를 검출할 수 있는 프로브의 경우, 한 "hybe 및 seq 사이클"은 적어도, 프로브를 표적 핵산에 하이브리드화하고, 프로브의 바코드 도메인 상의 6개의 각 위치의 부착 영역에 상보적 핵산/리포터 복합체를 하이브리드화하고, 6개의 각 위치와 회합된 검출가능한 표지를 검출하는 것을 포함할 것이다.

[0234] "k-mer 프로브"라는 용어는 본 발명의 프로브와 동의어이다.

[0235] 본원에 기술된 방법을 실행하고/거나, 결과를 기록할 수 있는 임의의 장치를 사용하여 본 방법을 실행할 수 있고/거나, 결과를 기록할 수 있다. 사용될 수 있는 장치의 예로는 모든 유형의 컴퓨터를 비롯한, 전자 컴퓨터 장치를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 컴퓨터에서 본원에 기술된 방법을 실행하고/거나, 기록할 때, 컴퓨터가 본 방법의 단계를 수행하도록 설정하는 데 사용될 수 있는 컴퓨터 프로그램은 컴퓨터 프로그램을 포함할 수 있는 임의의 컴퓨터 판독가능한 매체에 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 컴퓨터 판독가능한 매체의 예로는 디스켓, CD-ROM, DVD, ROM, RAM, 비일시적 컴퓨터 판독가능한 매체, 및 다른 메모리 및 컴퓨터 저장 장치를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 컴퓨터가 본 방법의 단계를 수행하고/거나, 결합된 표적 핵산을 식별하고/거나, 결과를 기록하도록 설정하는 데 사용될 수 있는 컴퓨터 프로그램 또한 전자 네트워크 상에, 예를 들어, 인터넷, 인트라넷, 또는 다른 네트워크 상에 제공될 수 있다.

[0236] "소모품 카드(Consumable Card)"는 당업계에 공지된 형광 영상화 장치로 도입될 수 있다. 다수의 다양한 피처를 가진 임의의 형광 현미경은 본 판독을 수행할 수 있다. 예를 들어: 광역장 램프, 레이저, LED, 다광자, 공초점 또는 내부 전반사 조명여 여기 및/또는 검출에 사용될 수 있다. 필터 기반 또는 격자 기반 스펙트럼 분석(하나 이상의 스펙트럼으로 분석되는 방출 파장)을 포함하는 카메라(단일 또는 다중) 및/또는 광전자 증배관(단일 또는 다중)이 형광 현미경의 방출 검출 채널 상에서 가능하다. 표준 컴퓨터는 소모품 카드, 상기 카드를 통해 이동하는 시약, 및 형광 현미경에 의한 검출, 둘 모두를 제어할 수 있다.

[0237] 프로브는 상업적으로 이용가능한 카트리지, 소프트웨어, 시스템, 예컨대, n카운터 카트리지(nCounter[®] Cartridge)를 사용하는 n카운터[®] 시스템을 사용하여 검출되고, 정량화될 수 있다.

- [0238] 본 발명과 관련된 추가의 교시는 하기: U.S. 8,148,512, U.S. 7,473,767, U.S. 7,919,237, U.S. 7,941,279, U.S. 8,415,102, U.S. 8,492,094, U.S. 8,519,115, U.S. 2009/0220978, U.S. 2009/0299640, U.S. 2010/0015607, U.S. 2010/0261026, U.S. 2011/0086774, U.S. 2011/0145176, U.S. 2011/0201515, U.S. 2011/0229888, U.S. 2013/0004482, U.S. 2013/0017971, U.S. 2013/0178372, U.S. 2013/0230851, U.S. 2013/0337444, U.S. 2013/0345161, U.S. 2014/0005067, U.S. 2014/0017688, U.S. 2014/0037620, U.S. 2014/0087959, U.S. 2014/0154681, U.S. 2014/0162251, 및 U.S. 14/946,386 중 하나 이상의 것(상기 문헌은 각각 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 기술되어 있다.
- [0239] 상기 측면 및 실시양태 중 임의의 것은 본원 요약 및/또는 상세한 설명 섹션에 개시된 바와 같이 임의의 다른 측면 또는 실시양태와 조합될 수 있다.
- [0240] **실시예**
- [0241] **실시예 1: 본 발명을 통해 표적 핵산을 신속하게 및 고효율로 검출할 수 있다.**
- [0242] 도 15a에서, "소형 바코드" 프로브는 30-50 mer 범위의 표적 검출 서열, 및 바코드 서열을 포함하였다. "프로브 B"는 특정 서열(30-50 mer) 및 표면에의 증착을 위해 비오틴과 함께 범용 태그를 가졌다.
- [0243] 표적 핵산을 포함하는 샘플에 고농도의 프로브를 제공하고, 적용시킬 수 있다. 본 발명의 프로브는 검출가능한 표지를 포함하는 프로브보다 10배 내지 1,000배 더 높은 농도로 제공될 수 있다. 부분적으로는, 상기와 같은 고농축 프로브가 표적 핵산을 신속하게 검출한다.
- [0244] 도 15b에서는 프로브가 250 pM로 제공되었고, 도 15c에서는 프로브가 2.5 nM로 제공되었다. 표준 n카운터 작업 흐름을 이용한 다른 실험에서, 검출가능한 표지를 포함하는 프로브는 25 pM으로 제공된다. 도 15a에서, 포획 프로브는 100 pM로 제공되었고, 도 15b에서는, 포획 프로브가 2.5 nM로 제공되었다. 표준 n카운터 작업흐름을 이용한 다른 실험에서, 검출가능한 표지를 포함하는 포획 프로브는 100 pM로 제공된다. 도 15a 및 15b는 표적 핵산이 10분 경과 후에 검출될 수 있다는 것을 보여주는 것이다. 본 실험에서 유의적인 표적 검출은 프로브가 더 낮은 저농도인 경우에는 약 2시간 경과후에, 및 프로브가 더 높은 고농도인 경우에는 약 30분 이내에 달성되었다(도 16a). 표준 n카운터 작업흐름을 이용한 다른 실험에서, 검출가능한 표지를 포함하는 프로브는 표적 핵산을 검출하는 데 약 16시간 30분이 소요된다.
- [0245] 도 16a는 본 발명의 프로브 및 방법을 사용하여 4개의 표적 핵산을 동시에 검출하였을 때의 평균 계수를 보여주는 것이다. 4개의 표적 핵산은 Myc(녹색), Oaz1(청색), RPL13A(오렌지색), 및 TubB(적색)였다. 프로브 및 포획 프로브를 2.5 nM로 제공하였고, 표적 핵산은 100 ng의 인간 참조 RNA였다. 도 16b는 본 방법이, 프로브가 (도에서 "스프린트(Sprint)"로 식별되는) 검출가능한 표지를 제공받는 것인 방법보다 약 9배 더 효율적이라는 것을 보여주는 것이다. 본 결과는 표준 n카운터 작업흐름과 비교하여 훨씬 더 짧은 시간에 효율이 현저히 증가하였음을 보여준다.
- [0246] **실시예 2: Hyb & 계수에서 사용하기 위한 FFPE 조직 프로세싱을 위한 샘플 제조**
- [0247] 먼저, 서열분석하고자 하는 핵산을 단일 단계 프로세스로 포르말린 고정된, 파라핀 포매된(FFPE: formalin-fixed, paraffin embedded) 조직으로부터 추출한다. 두께 10 μ m의 FFPE 쉘(curl) 하나 이상을 수계 핵산 추출용 완충제 중에서 가열하여 동시에 파라핀 왁스를 용융시키고, 조직을 분해하고, 핵산을 세포로부터 유리시킨다. 적합한 추출용 완충제는 당업계에 공지되어 있고, 전형적으로는 프로테이나제, 계면활성제, 예컨대, 트리톤(Triton)-100, 킬레이트제, 예컨대, EDTA, 및 암모늄 이온을 포함한다. FFPE 쉘 및 추출용 완충제를 56°C에서 30분 동안 인큐베이션시켜 조직으로부터 파라핀을 분리하고, 프로테이나제 K가 조직 구조를 분해하고, 포매된 세포를 계면활성제에 노출시켜 세포가 용해될 수 있도록 한다. 조직 파라핀 제거 및 분해 프로세스 동안 시약 혼합을 돕기 위해 8분 간격으로 3회에 걸쳐 용액을 도립시킨다. 상기 단계 후, 용액을 98°C까지 가열하여 포름알데히드 가교 결합의 역전을 촉진시켜 핵산 추출을 추가로 돕는다.
- [0248] 일단 FFPE 조직으로부터 핵산이 추출되고 나면, 공극 크기가 2.7 μ m인 유리 섬유 필터(Whatman)를 이용하여 용액을 여과함으로써 조직 파편 및 엉겨 있는 파라핀을 제거한다. 생성된 용액은, 포르말린 고정 프로세스 및 보관 조건에 기인하여 고도로 단편화된 핵산을 함유하는 균질한 반투명 용액이다. 추가 단편화가 필요할 경우, 코바리스(Covaris) 초점형 초음파 파쇄기를 사용하여 DNA를 기계적으로 전단 가공할 수 있다. 완충제 조건에 기인하여, 핵산을 전단 가공하기 위해서는 연장된 초음파 파쇄가 요구된다. 50 W 최대 입사력, 20% 충격 계수, 200 사이클/버스트인 표준 설정 환경을 사용하여 초음파 파쇄를 600초 사용하여 (도면에서 관찰되는 바와 같이) 포

획된 표적을 최대로 증가시켰다. 길이가 더 짧은 단편을 얻기 위해, 21,000 g로 4℃에서 15분 동안 원심분리함으로써 유화된 파라핀을 여과된 용액으로부터 침전시킬 수 있다. 이를 통해 DNA를 약 225 bp 미만으로 전단 가공시킬 수 있다.

[0249]

이어서, 표적 포획은 신속한 하이브리드화 단계 동안 포획 프로브 쌍을 표적에 결합시킴으로써 수행된다. 5' 포획 프로브는 표적 증착 프로세스 동안 표적이 스트렙타아비딘으로 코팅된 플로우 셀 표면에 결합할 수 있도록 하기 위해 3' 비오틴 모이어티를 함유한다. 3' 포획 프로브는 정제 프로세스 동안 비드에 결합할 수 있는 5' 태그 서열(G-서열)을 함유한다. 반응 속도는 반응 속도를 최대화시키기 위해 낮은 나노몰 범위로 첨가되는 포획 프로브 농도에 의해 구동된다. 포획 프로브는 창 생성을 위해 관심 영역 측면에 위치하는 방식으로 표적에 하이브리드화된다. 각 DNA 표적을 위해, 포획 프로브 세트는 또한 표적의 안티센스 가닥에 하이브리드화하고, 재어닐링을 막기 위해 창과 동일한 서열로 구성된 올리고를 포함한다. 포획 프로브를 함유하는 용액을 3분 동안 98℃까지 가열하여 계층 DNA를 변성시킨 후, 65℃에서 15분 동안 인큐베이션시킨다. 상기 하이브리드화 반응을 위해 400 mM 내지 600 mM 범위 농도의 NaCl을 사용한다. 실험적으로 입증된, 100개 초과 표적으로 구성된 패널이, 표적화된 DNA 영역의 유전자 및 엑손에 대해 상세하게 기술된 하기 표 2에 열거되어 있다.

표 2

유전자	표적
ABL1	ABL1_ex4
	ABL1_ex6
	ABL1_ex7
AKT1	AKT1_ex6
ALK	ALK_ex26
APC	APC_ex5
	APC_ex16
	APC_ex17
	APC_ex17
	APC_ex17
	APC_ex17
ATM	ATM_ex8
	ATM_ex9
	ATM_ex11
	ATM_ex26
	ATM_ex34
	ATM_ex39
	ATM_ex49
	ATM_ex49
	ATM_ex55
	ATM_ex59
BRAF	BRAF_ex8
	BRAF_ex11
	BRAF_ex13
	BRAF_ex15
CDH1	CDH1_ex9
CSF1R	CSF1R_ex3
	CSF1R_ex22
CTNNB1	CTNNB1_ex3
	CTNNB1_ex6
	CTNNB1_ex16
EGFR	EGFR_ex3
	EGFR_ex10
	EGFR_ex15
	EGFR_ex18
	EGFR_ex20
	EGFR_ex21

[0250]

ERBB2	ERBB2_ex7
ERBB4	ERBB4_ex4 ERBB4_ex5 ERBB4_ex7 ERBB4_ex8 ERBB4_ex23 ERBB4_ex25
EZH2	EZH2_ex8 EZH2_ex11 EZH2_ex15
FBXW7	FBXW7_ex2 FBXW7_ex5 FBXW7_ex7 FBXW7_ex8 FBXW7_ex9 FBXW7_ex10
FGFR1	FGFR1_ex6
FGFR2	FGFR2_ex7
FLT3	FLT3_ex11 FLT3_ex12 FLT3_ex21
GNAQ	GNAQ_ex5
IDH1	IDH1_ex4 IDH1_ex10
IDH2	IDH2_ex4
JAK2	JAK2_ex3 JAK2_ex7 JAK2_ex14 JAK2_ex20
KDR	KDR_ex7 KDR_ex7 KDR_ex9 KDR_ex11 KDR_ex27 KDR_ex30
KIT	KIT_ex5 KIT_ex9 KIT_ex14 KIT_ex14 KIT_ex17 KIT_ex18

[0251]

KRAS	KRAS_ex2 KRAS_ex3 KRAS_ex4
MEK	MEK_ex3
MET	MET_ex2 MET_ex3 MET_ex11 MET_ex14 MET_ex16 MET_ex19
MLH1	MLH1_ex12 MLH1_ex16
NOTCH1	NOTCH1_ex26
NRAS	NRAS_ex2 NRAS_ex3 NRAS_ex3 NRAS_ex4
PDGFRA	PDGFRA_ex1 PDGFRA_ex4 PDGFRA_ex7 PDGFRA_ex10 PDGFRA_ex11 PDGFRA_ex14 PDGFRA_ex15 PDGFRA_ex16 PDGFRA_ex18 PDGFRA_ex23
PIK3CA	PIK3CA_ex2 PIK3CA_ex3 PIK3CA_ex7 PIK3CA_ex10 PIK3CA_ex14 PIK3CA_ex21 PIK3CA_ex21
PTEN	PTEN_ex5 PTEN_ex7 PTEN_ex8
PTENP1	PTENP1_ex1
RB1	RB1_ex10 RB1_ex17 RB1_ex17

[0252]

	RB1_ex20 RB1_ex22
RET	RET_ex12 RET_ex15
SMAD4	SMAD4_ex3 SMAD4_ex8 SMAD4_ex9 SMAD4_ex10 SMAD4_ex11
SMARCB1	SMARCB1_ex5
TP53	TP53_ex4 TP53_ex6

[0253]

[0254]

표적화된 DNA 영역이 포획 프로브와 결합된 후, 이는 나머지 게놈 DNA로부터 정제됨으로써 표적 농축액이 생성된다. 3' 포획 프로브의 결합 서열에의 안티센스 올리고(항 G 서열)로 코팅된 비드를 실온에서 15분 동안 포획 반응 믹스와 함께 인큐베이션시킨다. 결합 단계 후, 비드를 0.1x SSPE를 3회에 걸쳐 세척함으로써 비표적 DNA

및 비오틴 함유 5' 포획 프로브를 제거한다. 세척 후, 비드를 14 μl 의 0.1x SSPE 중에 재현탁시킨 후, 45°C에서 10분 동안 가열하여 비드로부터 정제된 DNA 표적을 용출시킨다. 용출 후, 1 μl 의 5 M NaCl을 첨가함으로써 포획 프로브가 확실하게 DNA 표적에 결합된 상태 그대로 유지될 수 있도록 한다.

[0255] 샘플 제조 프로세스의 마지막 단계는 DNA 표적의 플로우 셀 표면 상에의 증착으로서, DNA 표적은 본원에 개시된 바와 같이 본 발명의 프로브를 사용하여 분석될 수 있다. 시린지 펌프를 사용하여 표적이 플로우 셀 유체 채널 내로 로딩되는 속도를 제어함으로써 모든 표적이 채널 높이 전체에 걸쳐 확산될 시간을 가지게 하고, 스트랩트 아비딘 표면에 결합할 수 있게 한다. 이러한 로딩 방법을 통해 표적의 밀도 구배가 생성되고, 단위 면적당 분자의 최고 개수는 유체 채널 유입구에서 가장 크고, 배출구 쪽으로 채널 길이를 따라 유체 유동 방향으로 감소된다. 0.35 $\mu\text{l}/\text{초}$ 의 유속은 채널 길이 약 10 mm, 채널 너비 1.6 mm 및 높이 40 μm 에서 정량적 포획을 달성한다. 일단 표적이 비오틴화된 5' 포획 프로브에 의해 표면에 결합하고 나면, 3' 포획 프로브의 결합 서열의 역 상보체인 비오틴화된 올리고(G 후크) 용액을 주입하여 표적의 유리 단부를 핀 다운시켜 브릿지 구조를 생성하고, 중간부의 ssDNA 영역이 관심 창이 된다. 이어서, G 서열 올리고 용액을 첨가하여 표면 상의 과량의 G 후크에 하이브리드화시켜 표면 상의 ssDNA의 양을 감소시킨다.

[0256] 농축된 표적을 식별하기 위해, 패널 중 단일 표적에 특이적으로 결합할 수 있도록 15 mer 프로브를 디자인하였다. 독특한 바코딩 올리고에 상기 프로브를 부착시킬 수 있는 어댑터 서열을 3' 단부에 포함하는 프로브를 합성하였다. 각 바코딩 올리고는 표적 식별을 위해 리포터 프로브에 결합할 수 있는 3개의 리포터 결합 도메인을 함유하였고, 이를 통해 4 컬러 리포터 화학법을 사용한 64 플렉스 판독이 가능하였다. 상기 식별 프로브를 유체 채널 내로 주입하고, 1분 동안 인큐베이션시켜 표적에 하이브리드화할 수 있게 하였다. 이어서, 0.1x SSPE로 수행되는 엄격한 세척을 사용하여 비결합 및 비특이적으로 결합된 올리고를 제거한다. 3 라운드의 리포터 프로브 하이브리드화를 사용하여 표적의 독특한 바코딩에 기초하여 표적을 식별한다. 게놈의 선택된 영역을 포획하는 이중 포획 프로브 시스템과 표적 특이적 식별 프로브 사용의 조합으로 표적 농축 및 검출을 위한 고도로 특이적인 시스템을 제공한다. 도 17a는 40개의 표적으로 이루어진 패널이 포획되고, 3 μg 의 정제되고, 전단된 gDNA로부터 열거된 것인, 특이성을 도시한 것이다. 레인 1은, gDNA가 존재하지 않은 레인 2와 비교하여, 모든 포획 프로브가 함께 사용되었을 때, 일반 표적이 계수를 검출하였다는 것을 입증한다. 레인 3의 청색 및 황색 리포터로 또는 레인 4의 녹색 및 적색으로 검출되는 표적에 대하여 농축된 포획 프로브만을 포함함으로써 시스템의 특이성이 입증된다.

[0257] DNA 추출, 포획 및 검출로 이루어진 상기 작업흐름을 3가지 FFPE 조직 유형: 편도성, 폐, 흑색종에 적용시켰다. 모든 조직 유형의 경우, 100 플렉스 암 표적 패널의 포획 및 검출 결과, 1 로그의 균일도 내에서 >95%의 표적이 식별되었다. 3가지 조직 유형 간의 이들 표적에 대한 계수는 도 17b에 제시되어 있다.

[0258] 실시예 3: Hyb & Seq를 위한 다색 리포터 영상 프로세싱

[0259] 영상 프로세싱 파이프라인은 하기 단계: 배경 차감, 정합, 피쳐 검출, 및 분류를 포함한다. 배경 차감에서, 임의의 주어진 채널의 평균 배경은 샷 잡음 및 노출의 함수이다. 본 발명자들의 시스템에서, 청색 채널은 더욱 큰 편차와 함께 커핑된, 최고치의 배경 수준을 가진다. 반경 7 픽셀의 원형 구조화 요소를 가지는 간단한 토포그래프 필터를 적용하여 국제화된 배경 차감을 수행한다.

[0260] 정합을 위해, 관심 피쳐는 다색 및 멀티사이클 피쳐 분석을 위하여 완벽하게 정렬되어야 한다. 본 시스템은 2가지 형태의 정합을 필요로 한다. 제1 형태의 경우, 국소 어파인 변환이 단일 획득 스택 내의 모든 영상 채널에 적용된다. 이러한 변환은 광학 시스템의 함수이고, 따라서, 주어진 장치에 대해 일관된다. 상기 함수를 매회 실행마다 미리 컴퓨팅하고, 획득되는 모든 영상마다 그에 적용시킨다. 제2 형태의 경우, 실행하는 동안 기계식 갠트리의 드리프트를 포착하는 정규화된 교차 상관관을 이용하여 강성 변위 형태로 전체 변환을 컴퓨팅한다.

[0261] 다음 단계는 피쳐 검출이다. 일단 모든 영상을 정합하고 나면, 매칭된 필터, 즉, LoG(가우스 라플라스: Laplace of Gaussian) 필터를 사용하여 피쳐를 검출한다. (피쳐의 회절 한계에 매칭되는) 고정 커널 크기, 및 (상응하는 채널의 파장에 매칭되는) 가변 표준 편차를 이용하여 필터를 적용시킴으로써 매칭시켜 스폿 반응을 증강시킨다. 국소 최대값을 사용하여 잠재적인 리포터 위치를 식별한다. 각 식별된 피쳐에 대한 연관된 강도 값을 분류를 위해 검색한다.

[0262] 최종 단계는 분류이다. 가우스 나이브-베이지(Gaussian naive-Bayes) 모델을 사용하여 다색 리포터 강도를 분류한다. 모델은 리포터 강도가 비의존적이며, 정규 분포를 따른다고 가정한다. 이어서, 모델은 최대 사후 확률(maximum a posteriori) 또는 MAP 법칙을 사용하여 (모든 채널 \mathcal{X}_i 에서 강도에 의해 명시되는) 특정 피쳐 \hat{y} 가

특정 부류(C_k)에 속하게 될 확률을 계산한다:

$$\hat{y} = \underset{k \in \{1, \dots, K\}}{\operatorname{argmax}} p(C_k) \prod_{i=1}^n p(x_i | C_k)$$

[0263]

[0264]

기록 코딩된 이중 컬러에 대한 강도 분포는 도 18에 제시되어 있다. 본 도면은 2가지 염료 청색 및 적색을 사용하는 코딩 스킴을 도시한 것이다. 2 컬러 코딩 시나리오에서는 6개 부류(배경 포함)가 존재할 수 있다. 실행된 시스템에서, 4가지 컬러를 선택한 경우에는 잠재적으로 14개 부류가 생성된다. 단일의 절반 분포 대 완전한 염료 분포 사이에는 일부 중복될 수 있다는 점에 주의한다. 결론적으로 이들 부류 사이의 분류는 도 19에 제시된 바와 같이, 더 높은 오류율을 나타내었고, 최대 분류 오류율은 'xG'와 'GG' 사이의 11.8%였다. 10개 부류 모델에 대한 분류 오류율은 0.2% 미만이다. 각 리포터는 최대 8개 부류를 요구하기 때문에, 분류 오류가 최소인 것을 선택하는 것이 간단하다.

[0265]

실시예 4: 2색 리포터 프로브의 기능, 디자인, 제조, 및 시험

[0266]

2색 리포터 프로브는 프로브의 바코드 도메인 내의 세 영역(R_1 , R_2 , R_3)에 순차적으로 결합한다. 각 영역은 2색 형광 조합, 예컨대, "청색-청색" 또는 "녹색-황색"에 의해 정의된 8가지 "컬러"를 코딩한다. 3개의 순차적인 "컬러"가 각 프로브에 대하여 기록되고, 이는 차례로, 육량체 서열을 구성하는 3개의 디뉴클레오타이드의 리딩에 상응한다. 2색 리포터 프로브는 하기와 같이 디자인된다: 2색 리포터 프로브는 각 컬러에 대하여 15개의 형광 염료를 보유하고, 이로써, 리포터 프로브당 총 30개의 염료를 포함하도록 디자인된, 37 DNA 올리고머 분지형 구조체이다. 37 올리고머는 3개 크기로 분류되는데: (1) 한 96 nt 메인브랜치(MainBranch)는, 추후에 육량체의 기록에 사용되는 12-mer 단일 가닥 DNA 서열 및 6개의 서브브랜치(SubBranch)에 하이브리드화되는 6개의 14-mer인 2개 부분으로 구성되고, (2) 6개의 89 nt 서브브랜치 각각의 것은 메인브랜치에 하이브리드화되는 1개의 14-mer 및 5개의 다이 올리고(Dye oligo)에 하이브리드화되는 5개의 15-mer 반복부인 2개 부분으로 구성되고, (3) 5개의 15 nt 다이 올리고 각각의 것은 상기 올리고의 5' 단부에 1개의 형광 염료 변형을 가진다.

[0267]

2색 리포터 프로브에 대하여 중요한 디자인 특징들 중 하나는 4가지 상이한 형광 염료들 사이의 별개의 서브브랜치 및 다이 올리고 서열이다. 이는 상이한 형광 염료들 사이의 "컬러 스와핑" 또는 교차 하이브리드화를 막는다. 예를 들어, 알렉사 488 형광단 또는 청색 컬러에 대한 각 15-mer 다이 올리고는 오직 청색 서브브랜치에만 상보적인 서열에 상응한다. 청색 서브브랜치는 황색, 적색, 또는 녹색이 아닌, 오직 메인브랜치 상의 청색 14-mer 서열에만 상보적인 별개의 14-mer 서열을 추가로 가진다. 그러므로, 특이적인 메인브랜치는 어떤 15 + 15 염료 조합을 보유하게 되는지를 기술하는 특정 2색 서열을 가지게 될 것이다.

[0268]

2색 리포터 프로브의 또 다른 중요한 디자인 특징은 하기: (1) R_1 , R_2 , 및 R_3 사이의 별개의 12-mer 서열, (2) 고도의 특이성을 가지고, 한 영역당 8개의 상이한 컬러를 코딩하여야 한다는 점, (3) 8개의 상이한 컬러 사이의 높은 결합율 및 균일도, 및 (4) 경쟁적 토홀드 서열을 통한 모든 12-mer의 효율적인 제거를 충족시켜야 하는 메인브랜치 상의 12-mer 서열이다.

[0269]

2색 리포터 프로브는 하기 기술되는 바와 같이 제조된다. 4개의 형광 염료(B= 청색, G= 녹색, Y= 황색, R= 적색)가 10개의 가능한 2색 조합(BB, BG, BR, BY, GG, GR, GY, RR, YR, YY)을 만든다. 프로브의 3개의 바코드 영역 각각에 대하여 10개의 2색 조합 중 단지 8개만이 사용되고, 이로써, 24개의 상이한 리포터 프로브($8+8+8=24$)가 생성된다.

[0270]

2색 리포터 프로브 제조는 (1) 다이 올리고의 서브브랜치에의 하이브리드화 및 (2) 다이+서브브랜치의 메인브랜치에의 하이브리드화인 2개의 순차적인 하이브리드화 단계로 이루어진다. 실온에서 30분 동안 4.2X SSPE 완충제 중에서 100 μ M의 서브브랜치 및 600 μ M의 다이 올리고를 조합함으로써 4개의 별개의 다이의 서브브랜치에의 하이브리드화 반응물을 제조한다. 이어서, 4.8X SSPE 중에서 별개로 2 μ M의 메인브랜치, 7.2 μ M의 서브브랜치+다이 1, 및 7.2 μ M의 서브브랜치+다이 2를 사용하여 24개의 리포터 프로브를 제조한다. 상기 반응물을 45°C에서 5분 동안 가열하고, 실온에서 30분 동안 냉각시킨다. 이어서, 24개의 다이+서브브랜치의 메인브랜치에의 하이브리드화 반응물을 바코드 도메인(즉 R_1 , R_2 , R_3)에 상응하는 3개의 상이한 플로 풀링한다. 예를 들어, 각 리포터 프로브를 200 nM인 최종 작업 농도로 10배 희석시키면서, R_1 바코드 도메인에 결합하는 8개의 상이한 2색 리포터 프로브(각각 2 μ M씩)를 함께 풀링한다.

[0271]

리포터 프로브 제조 후, 품질 보증을 위해 표준 시험을 수행한다. 3개의 별개의 플로우 셀에서 3개의 리포터 프

로브 풀을 각각 그의 상응하는 바코드 영역(R_1 , R_2 , 또는 R_3)에의 결합에 대해 시험한다. 시험은, 오직 도메인만이 존재하고, 플로우 셀 상에 고정화된 변형된 프로브 구성체에 대해 수행된다. 각 컬러를 나타내는 8개의 12-mer 모두 다중화되고, 8개의 2색 리포터 프로브는 모두 높은 컬러 계수를 가지는 것으로 식별될 것으로 예측된다.

[0272] 2색 리포터 프로브의 개략도는 도 2에 제시되어 있다. 이들 프로브는 (도 21에 도시된) 핵산의 표적화된 포획을 위한 간단한 프로브 하이브리드화 작업흐름에서 사용된다. 도 22는 관심 하플로타입을 식별하는 데 있어서의 이들 프로브의 용도와 관련된 상기 프로브의 추가의 능력을 보여주는 것이다.

[0273] 실시예 5: 3개의 2색 리포터 프로브 및 영상 차감

[0274] 본 실시예는 표면 고정화된 표적에의 결합 전의, 3개의 리포터 복합체의 용액 중 서열분석 프로브에의 사전 하이브리드화를 입증한다. 용액 중에서의 하이브리드화가 표면 하이브리드화보다 훨씬 더 효율적인 것으로 보이며, 샘플링에서부터 응답까지의 총 실행시간을 현저히 단축시키기 위해 서열분석 실험 전에 수행될 수 있다. 3개의 리포터 아이덴티티는 서열분석 프로브로부터 리포터를 (화학적 또는 광학적 방법을 통해) 순차적으로 절단하고, 형광 강도 손실을 측정함으로써 측정된다.

[0275] 본 개시내용은, 바코드 도메인이 각각의 가능한 욕량체 서열에 대한 것인, 검출가능한 표지를 포함하는 상보적 핵산 분자 또는 검출가능한 표지를 포함하는 리포터 복합체의 상보적 핵산 분자에 의해 결합될 수 있는 것인, 본원에서 프로브로도 또한 기술되는, 4,096개의 바코드 분자(BC)로 이루어진 세트 중 하나가 플로우 셀의 표면 상에 고정화된 표적 분자에 하이브리드화하는 것을 필요로 한다. 바코드, 및 표적 내의 연관된 욕량체 서열의 아이덴티티는, 본원에서 검출가능한 표지를 포함하는 상보적 핵산 분자 또는 검출가능한 표지를 포함하는 리포터 복합체의 상보적 핵산 분자로도 또한 기술되는, 3개의 2색 형광 리포터 프로브(RPTR)의 결합 및 판독을 필요로 한다. RPTR을 플로우 셀로 유동시킴에 따라 이는 BC에 하이브리드화되고, 이를 영상화하고, 순차적인 방식으로 토 홀딩함으로써 제거하고, 각각의 BC 판독을 위해서는 3회의 RPTR 유동 사이클이 요구된다.

[0276] 도 23은 플로우 셀로 유동되기 전에 3개의 RPTR 프로브가 모두 BC에 하이브리드화하는 것을 보여주는 것이다. 확실하게 거의 100%의 BC/RPTR 복합체가 적절하게 형성될 수 있도록 하기 위해, 사용 전에 상기 BC/RPTR 복합체를 정제할 수 있다. BC/RPTR 복합체는 표면 상에서 표적에 하이브리드화되고, 모두 6개 컬러(3개의 2색 RPTR)로부터의 형광 신호를 함유하는 영상이 촬영된다. 이어서, 리포터 중 하나를 절단하고, 이로써, 복합체로부터 형광 염료가 제거된다. 절단 기전은 본원에서 더욱 상세하게 논의된다. 이어서, 단 4개 컬러(2개의 2색 RPTR)로부터의 형광 신호를 함유하는 제2 영상이 촬영된다.

[0277] 도 24에 제시된 바와 같이, 손실된 RPTR의 아이덴티티는 6개 컬러 영상 및 4개 컬러 영상 비교를 통해 얻을 수 있다. 이어서, 상이한 절단 기전을 사용하여 제2 RPTR을 제거하고, 2개 컬러(1개의 색 RPTR)로부터의 형광 신호를 함유하는 제3 영상이 촬영된다. 다시, 2개 컬러 영상 및 4개 컬러 영상 비교에 의해, 절단된 RPTR의 아이덴티티를 결정한다. 남은 형광 신호가 제3 RPTR을 식별함으로써 BC를, 및 이로써, 표적 중에 존재하는 욕량체 서열을 명확하게 식별할 수 있다.

[0278] 도 25에 제시된 바와 같이, 최종적으로는 본원에서 2차 핵산 분자로도 또한 기술되는, "메인브랜치" 올리고에 하이브리드화되는, 본원에서 3차 핵산 분자로도 또한 기술되는, 6개의 "서브브랜치" 올리고에 하이브리드화되는 30개의 다이드 올리고로 구성된 서열분석 사이클 중 처음 두 판독에서 사용된 절단가능한 RPTR은 비절단가능한 버전과 유사한 방식으로 구성된다. 이들 RPTR은 BC에 결합하는 "메인브랜치"의 부분과, "서브브랜치" 및 염료에 결합하는 부분 사이에 배치된, 예컨대, 광 절단가능한 변형, 화학적으로 절단가능한 변형 및 효소적으로 절단가능한 변형과 같은 수개의 절단가능한 변형 중 임의의 것 중 하나 이상의 것을 포함하는 "메인브랜치" 올리고를 합성함으로써 절단가능한 것으로 제조된다. 화학적으로 절단가능한 변형의 예는 디설피드 모이어티를 포함한다. 효소적으로 절단가능한 변형의 예는 데옥시우라실(du) 함유 모이어티(New England Biolabs로부터의 'USER' 효소 믹스를 사용하여 절단가능)를 포함한다. 1회의 서열분석 사이클 내에서 2개의 RPTR에 대해 사용되는 절단가능한 변형은 순차적인 절단이 가능하도록 상이하여야 한다.

[0279] 본 방법의 중요한 특성 및 이점은 (1) BC/RPTR 복합체가 서열분석 실험 전에 미리 제조될 수 있고, 이로써, 하이브리드화를 더욱 잘 제어할 수 있고(즉, 표면 hyb 대신 용액 중에서의 hyb, 및 훨씬 더 긴 장시간의 hyb 시간); (2) 본 방법은, (a) BC/RPTR 복합체는 각 BC가 확실하게 3개의 RPTR을 모두 가지도록 하기 위해 HPLC 정제될 수 있고, (b) 절단 효율이 RPTR 하이브리드화 및 토홀드 효율보다 유의적으로 더 높기 때문에, 명확하게 식별되는 BC의 개수를 현저하게 증가시킬 수 있는 잠재능이 있으며; (3) 본 방법은, (a) 각 RPTR의 BC에의 결합

을 위해 하이브리드화 시간이 요구되지 않고, (b) 절단 동역학적 성질은 RPTR 신호를 제거하는 데, 하이브리드화에도 또한 기반하는 것인 토홀딩보다 유의적으로 더 빠르고, (c) 훨씬 더 적은 시약 유동 단계가 요구되기 때문에(비록 UV 절단가능한 링커를 사용한다면, 단 6개의 유동 단계가 요구되기는 하지만, 현행 방법의 경우, 14개 단계 대비 8개), 서열분석 실행 시간면에 있어서 훨씬 더 빠르다는 점이다. 이는 또한 더 적은 영상 촬영이 요구된다(7개의 영상 대비 4개, 또는 최종적으로 물 세척이 수행된 경우, 저조도 영상은 누락시켜, 6개의 영상 대비 3개).

[0280] 단일 BC, UV 절단가능한 RPTR, 데옥시우라실(dU) 함유 RPTR(New England Biolabs로부터의 'USER' 효소 믹스를 사용하여 절단가능), 및 표준 RPTR을 이용하여 원리 증명 실험을 수행하였다. 이들 성분들은 BC/RPTR 복합체에 하이브리드화되었고, 플로우 셀 상에 고정화된 합성 50 mer BRAF 엑손 15 표적 서열에 하이브리드화되었다. 먼저 전체 BC/RPTR 복합체를 영상화한 후, 이어서, USER 효소로 처리하여 dU 함유 RPTR을 제거하고, 다시 영상화함으로써 스폿 아이덴티티를 결정하였다. 이어서, 도 27에 제시된 바와 같이, UV 광 노출을 사용하여 광절단가능한 RPTR을 절단하고, 제3 영상을 촬영하였다. 영상 내 4개의 클러스터링된 피치를 프로세싱하여 그의 형광 강도를 측정하였고, 단순 차감을 통해 3개의 RPTR 아이덴티티를 정확하게 식별할 수 있었다.

[0281] 본 접근법의 경우, 주요한 잠재적인 위험은 BC/RPTR 복합체의 크기, 및 그와 연관된, 표면에 고정화된 표적에의 하이브리드화 동역학적 성질이 느리다는 점이었다. BC 단독인 것과 비교하여 BC/RPTR 복합체의 증가된 크기가 실제로 결합 동역학적 성질을 저속화시키지 않지만; 그러나, 이는 도 26에 제시된 바와 같이, 더욱 긴 장시간의 인큐베이션 시간을 통해 극복될 수 있다. 하이브리드화 시간 손실은 다른 단계에서의 효율 및 감소(즉, RPTR hyb 제거, 영상화 감소, 유동 단계 감소 등)에 의해 상쇄될 수 있다.

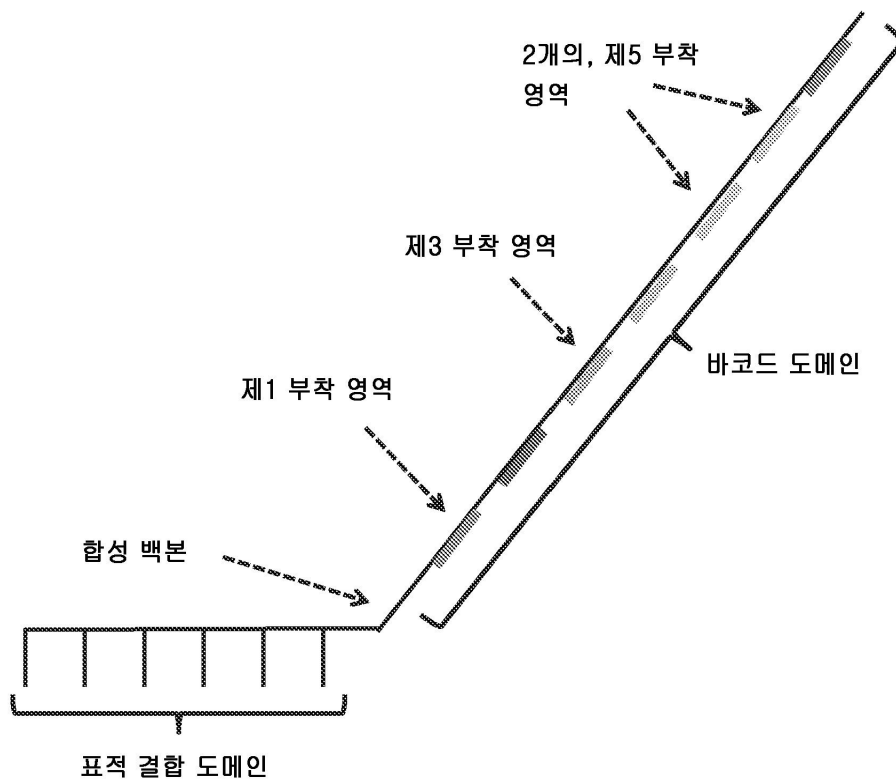
[0282] 본 발명자들은 또한 절반 염료 RPTR가 영상 차감 방법을 사용하여 검출될 수 있는지 여부를 시험하였다. 이들 염료는 더 작은 신호를 가지고 있기 때문에, 신뢰가능한 방식으로 식별한다는 것은 더욱 어려울 수 있다. 이를 시험하기 위해, 다수의 유사 컬러 RPTR(주로 그린 및 옐로우)을 포함하는 바코드 세트를 제조하였고, 도 28 및 도 29에 제시된 바와 같이, 오직 스폿 1 RPTR만이 절단가능하였다. 스폿 1 RPTR을 절단하기 위해 UV에 노출시키기 전 및 그 이후에 영상을 촬영하였다. PC-GY 및 PC-GG, 둘 모두 검출가능하였고, 염료 손실 개수에 의해 예측되는 것과 유사한 정도의 강도 변화를 보였다(예컨대, __YYGY로 절단된 GYYYGY RPTR은 그의 그린을 50% 및 그의 옐로우를 25% 손실하게 될 것이다). 일련의 염료 컬러 및 부류 및 관련된 서열은 하기 표에 제시되어 있다.

서열번호	부류	컬러	명칭	길이 (nt)	전체 서열
71	다이 올리고	B	5x 염료 B	15	/5A1ex488N/CCTGCGAATGAGTCG
72	다이 올리고	G	5x 염료 G	15	/5A1ex548N/TCGAGTGCAATGAGCT
73	다이 올리고	R	5x 염료 R	15	/5A1ex647N/AGTAGACCTGGCGTC
74	다이 올리고	Y	5x 염료 Y	15	/5TexRd-XN/ATCACCGTGCACTA
75	서브브랜치	B	5x6 염료 B	89	TGCGACGCCACCTATCGACTCATTCGCGAGGCGACTCATTGCGAGGCGACTC ATTCGCGAGGCGACTCATTGCGAGGCGACTCATTGCGAGG
76	서브브랜치	G	5x6 염료 G	89	AAGGTGTGCGACGCTAGCTCATGCACTCGAAGCTCATGCACTCGAAGCTCA TGCACTCGAAGCTCATGCACTCGAAGCTCATGCACTCGA
77	서브브랜치	R	5x6 염료 R	89	ACTGTTGCCGCCAAGACGCCAGGCTCTACTGACGCCAGGCTCTACTGACGC CAGGTCTACTGACGCCAGGCTCTACTGACGCCAGGCTCTACT
78	서브브랜치	Y	5x6 염료 Y	89	AACGCCATTTGCCGTAGCTGCGACGGTGATTAGCTGCGACGGTGATTAGCTG CACGGTGATTAGCTGCGACGGTGATTAGCTGCGACGGTGATT
79	메인브랜치	GG	R1 GG	96	AGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGCA CACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGAGATGAC
80	메인브랜치	GY	R1 GY	96	AGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGCA GGCGTTTCGGCAATGGCGTTTCGGCAATGGCGTTAGGCAAGATGAC
81	메인브랜치	YY	R1 YY	96	CGGCAATGGCGTTTCGGCAATGGCGTTTCGGCAATGGCGTTTCGGCAAA TGGCGTTTCGGCAATGGCGTTTCGGCAATGGCGTTAGGCTGAGATGAC
82	메인브랜치	BB	R1 BB	96	ATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGTCGCAATAGGTG CGTCGCAATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGTCGCAAGGACAGATGAC
83	메인브랜치	RR	R1 RR	96	TTGGCGGCAACAGTTTGGCGGCAACAGTTTGGCGGCAACAGTTTGGCGG CAACAGTTTGGCGGCAACAGTTTGGCGGCAACAGTAGGTAGATGAC
84	메인브랜치	GR	R1 GR	96	AGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTTTGGCGGC AACAGTTTGGCGGCAACAGTTTGGCGGCAACAGTAGTAGATGAC
85	메인브랜치	YR	R1 YR	96	CGGCAATGGCGTTTCGGCAATGGCGTTTCGGCAATGGCGTTTTCGGCGG CAACAGTTTGGCGGCAACAGTTTGGCGGCAACAGTAGGAGCATGAC
86	메인브랜치	BR	R1 BR	96	ATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGTCGCAATAGGTG CAACAGTTTGGCGGCAACAGTTTGGCGGCAACAGTAGGAGCATGAC
87	메인브랜치	BB	R2 BB	96	ATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGTCGCAATAGGTG CGTCGCAATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGTCGCAAGCCATGAAAAG
88	메인브랜치	BG	R2 BG	96	ATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGTCGCAAGGCTGC ACACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGAAAAG
89	메인브랜치	BY	R2 BY	96	ATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGTCGCAAGGCAAA TGGCGTTTCGGCAATGGCGTTTCGGCAATGGCGTTAGCATGAAAAG
90	메인브랜치	GG	R2 GG	96	AGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGCA CACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGAGAAAAG
91	메인브랜치	GR	R2 GR	96	AGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTTTGGCGGC AACAGTTTGGCGGCAACAGTTTGGCGGCAACAGTAGGTGGGAAAAG
92	메인브랜치	GY	R2 GY	96	AGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTCGGCAAT GGCGTTTCGGCAATGGCGTTTCGGCAATGGCGTTAGCGAGAAAAG
93	메인브랜치	RR	R2 RR	96	TTGGCGGCAACAGTTTGGCGGCAACAGTTTGGCGGCAACAGTTTGGCGG CAACAGTTTGGCGGCAACAGTTTGGCGGCAACAGTAGCTCGAAAAG
94	메인브랜치	YY	R2 YY	96	CGGCAATGGCGTTTCGGCAATGGCGTTTCGGCAATGGCGTTTCGGCAAA TGGCGTTTCGGCAATGGCGTTTCGGCAATGGCGTTAGCGTGGAAAAG
95	메인브랜치	BG	R3 BG	96	ATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGTCGCAAGGCTGC ACACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTGTAAGTCCGAAT
96	메인브랜치	YR	R3 YR	96	CGGCAATGGCGTTTCGGCAATGGCGTTTCGGCAATGGCGTTTTCGGCGG CAACAGTTTGGCGGCAACAGTTTGGCGGCAACAGTGTAACACCGAAT
97	메인브랜치	BB	R3 BB	96	ATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGTCGCAATAGGTG CGTCGCAATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGAAT
98	메인브랜치	BY	R3 BY	96	ATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGTCGCAATAGGTGCGTCGCAAGGCAAA TGGCGTTTCGGCAATGGCGTTTCGGCAATGGCGTTGTAATCCGAAT
99	메인브랜치	GG	R3 GG	96	AGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGCA CACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTGTAACGACCGAAT
100	메인브랜치	GY	R3 GY	96	AGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTCGGCAAT GGCGTTTCGGCAATGGCGTTTCGGCAATGGCGTTGTAAGCCGAAT
101	메인브랜치	RR	R3 RR	96	TTGGCGGCAACAGTTTGGCGGCAACAGTTTGGCGGCAACAGTTTGGCGG CAACAGTTTGGCGGCAACAGTTTGGCGGCAACAGTGATCGCCGAAT
102	메인브랜치	GR	R3 GR	96	AGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTAGGCTGCACACCTTTTGGCGGC AACAGTTTGGCGGCAACAGTTTGGCGGCAACAGTAGTAGTCCGAAT

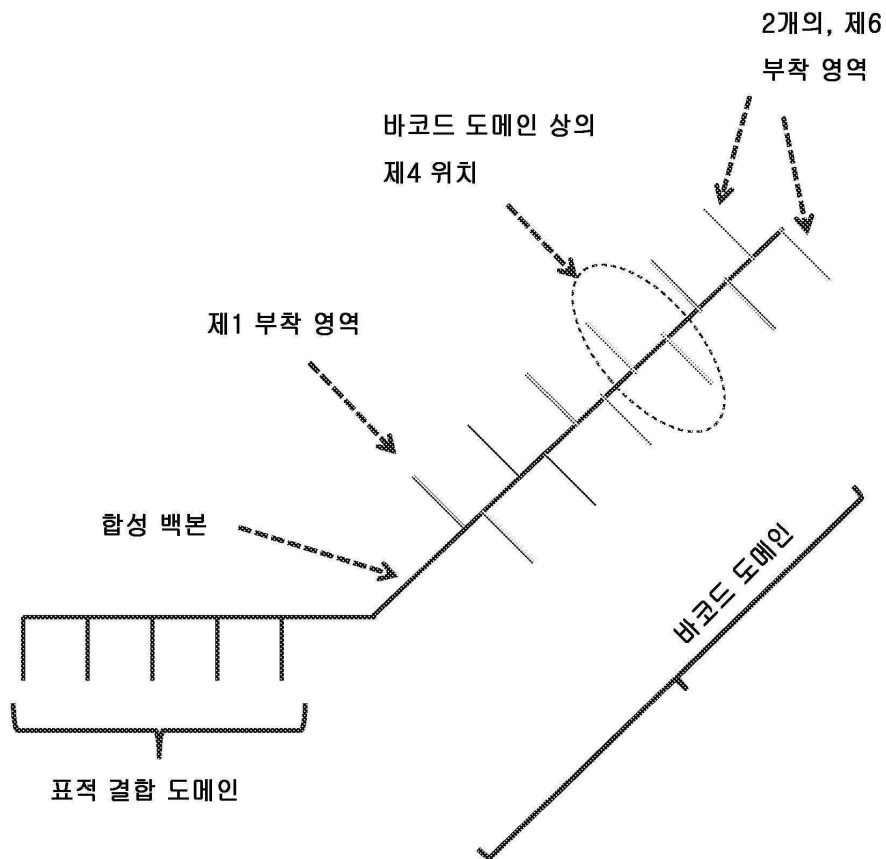
[0283]

도면

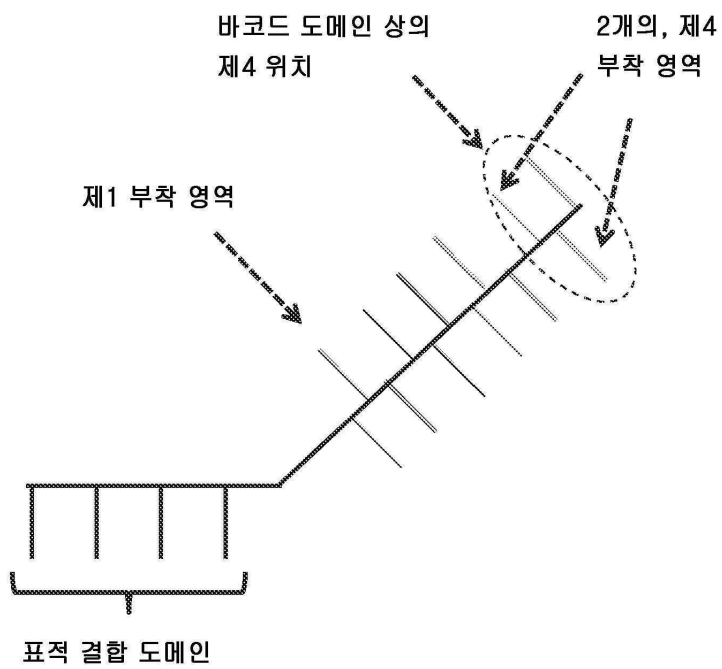
도면1



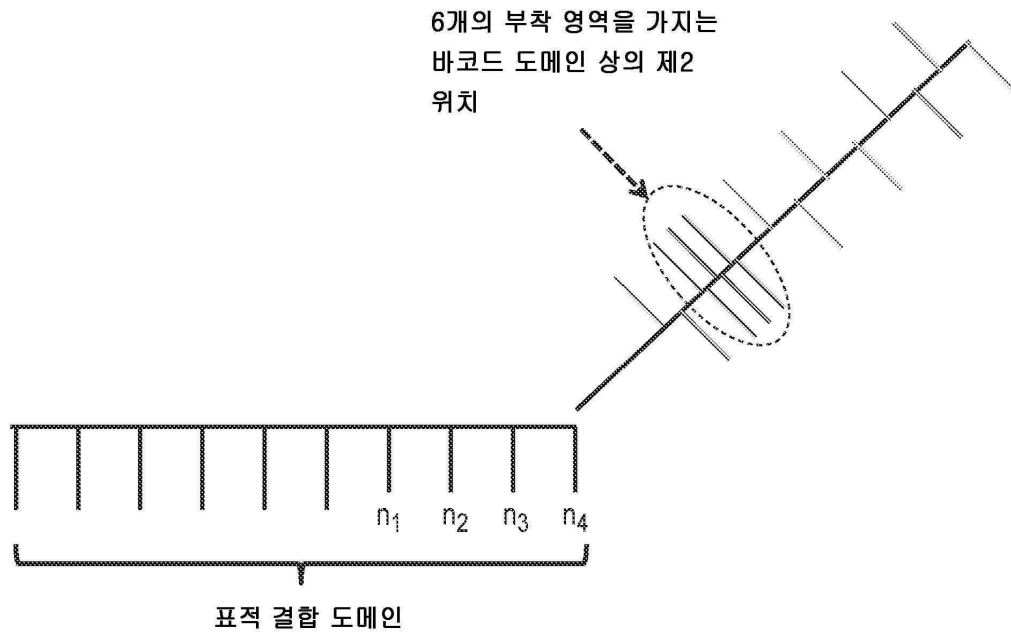
도면2



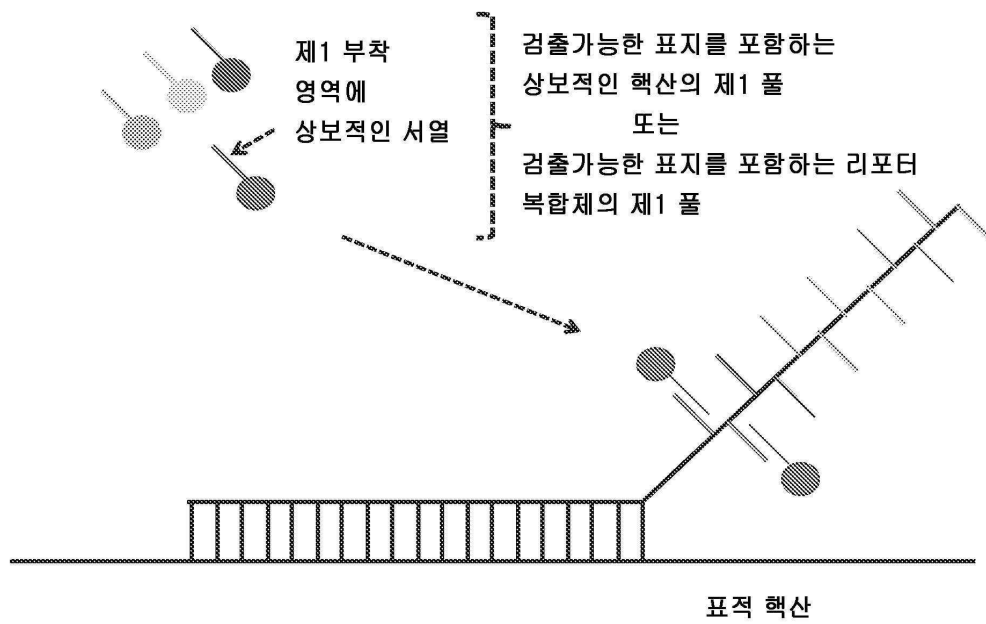
도면3



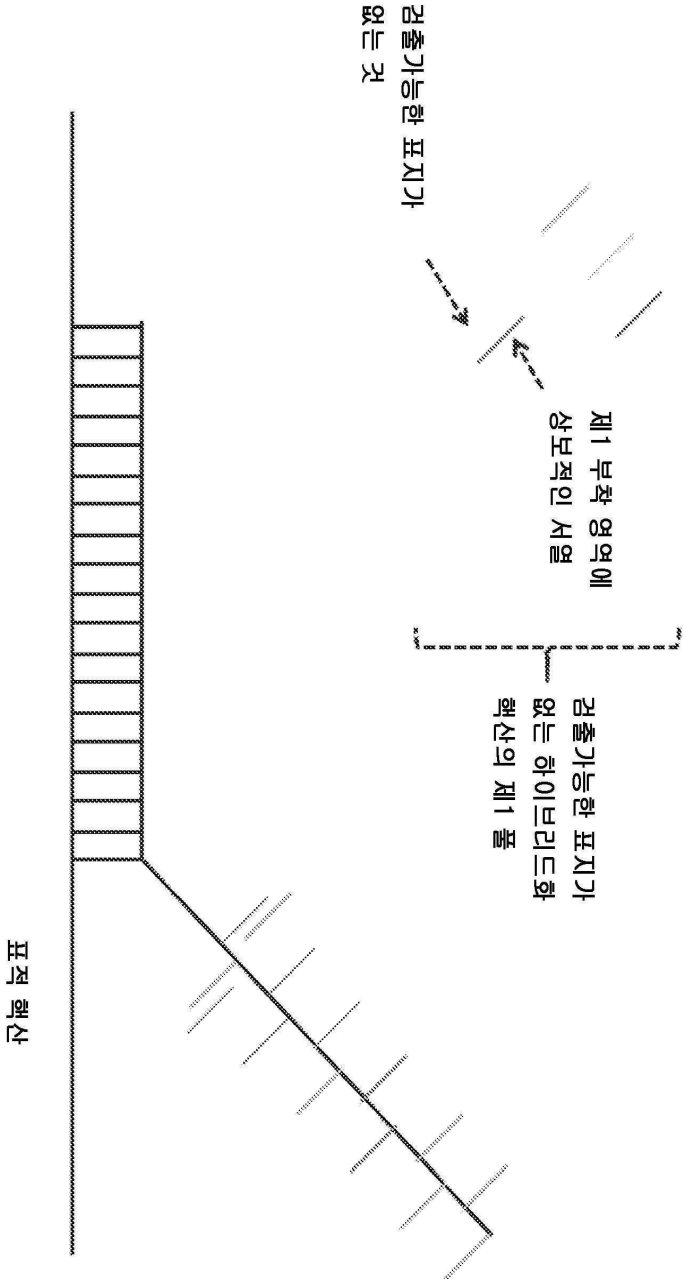
도면4



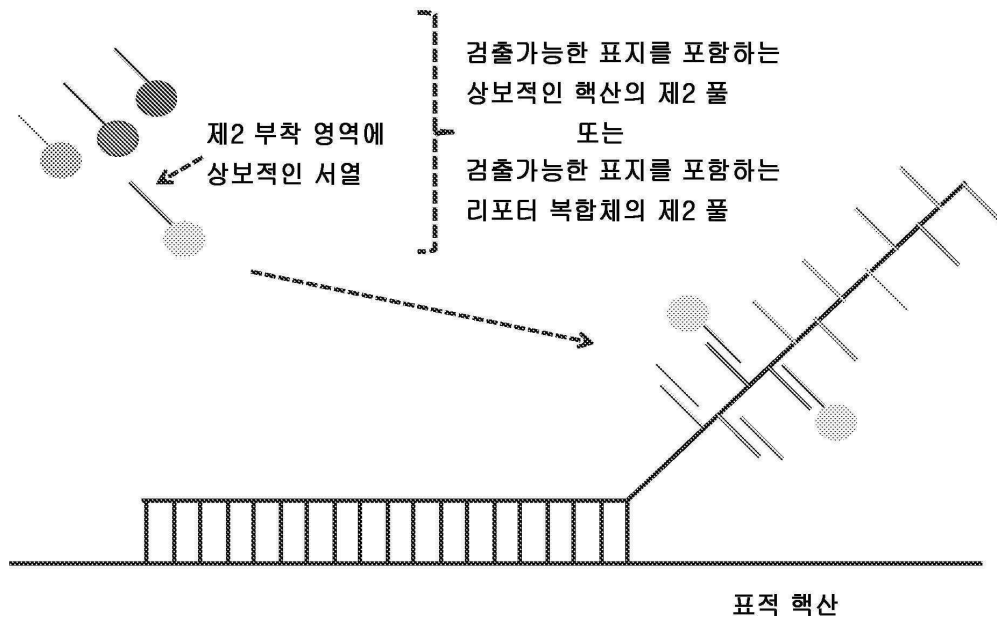
도면5a



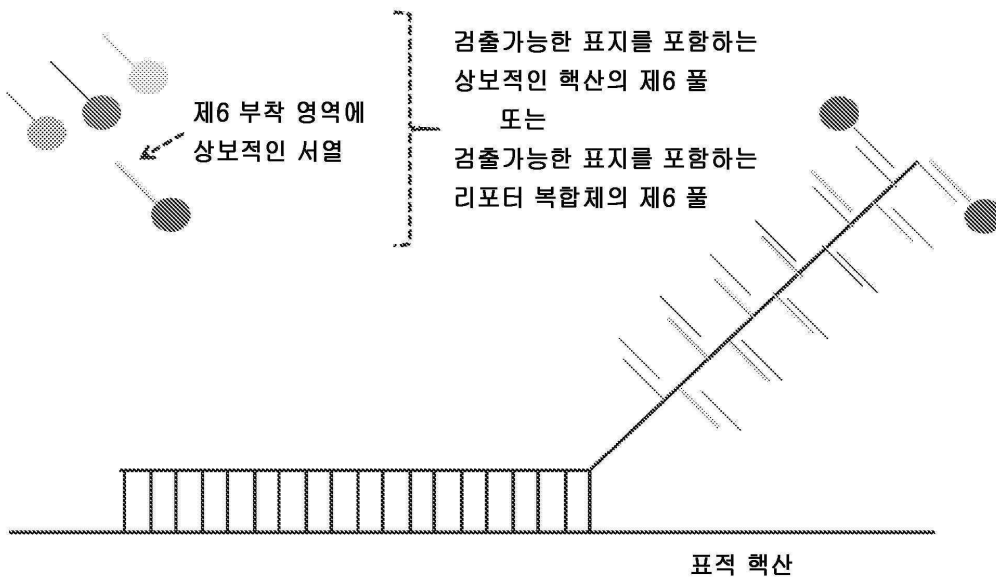
도면5b



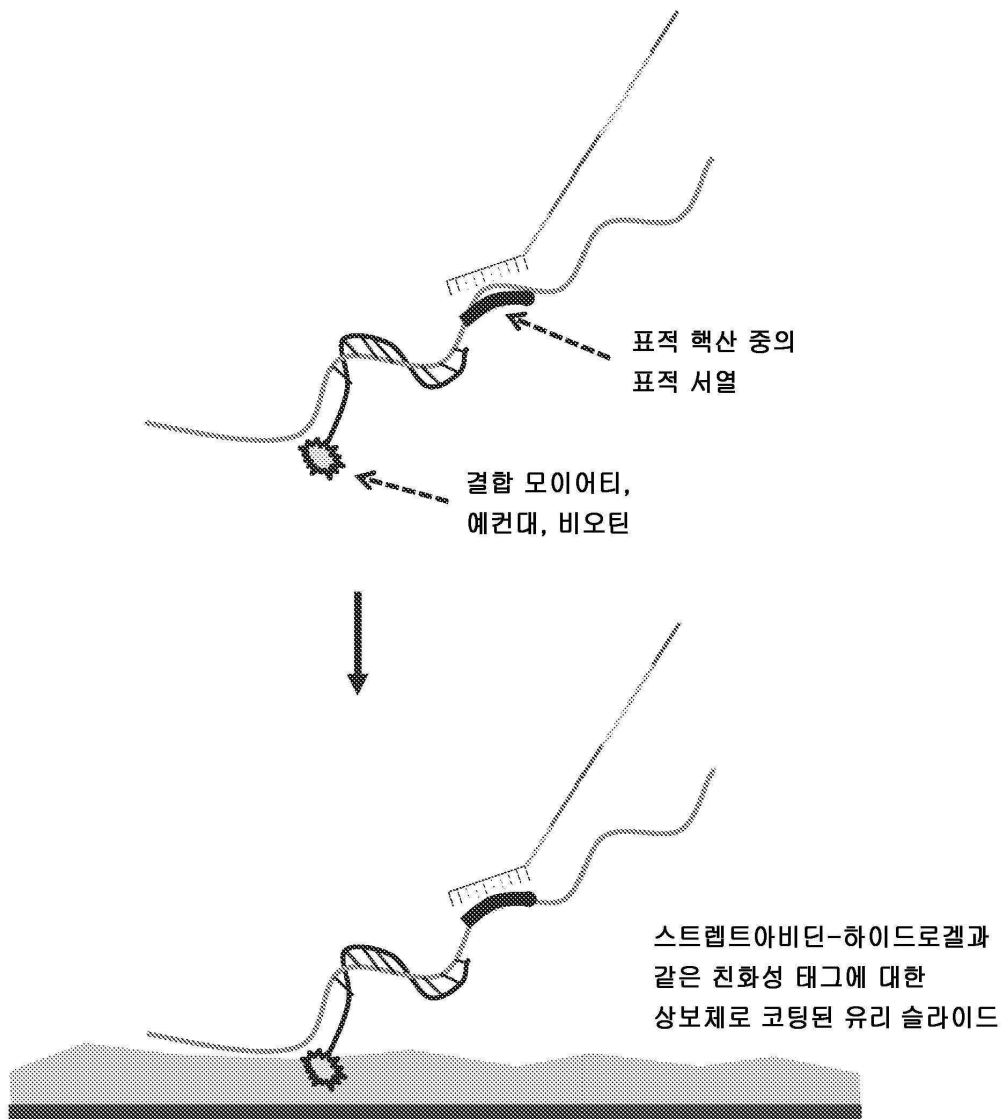
도면5c



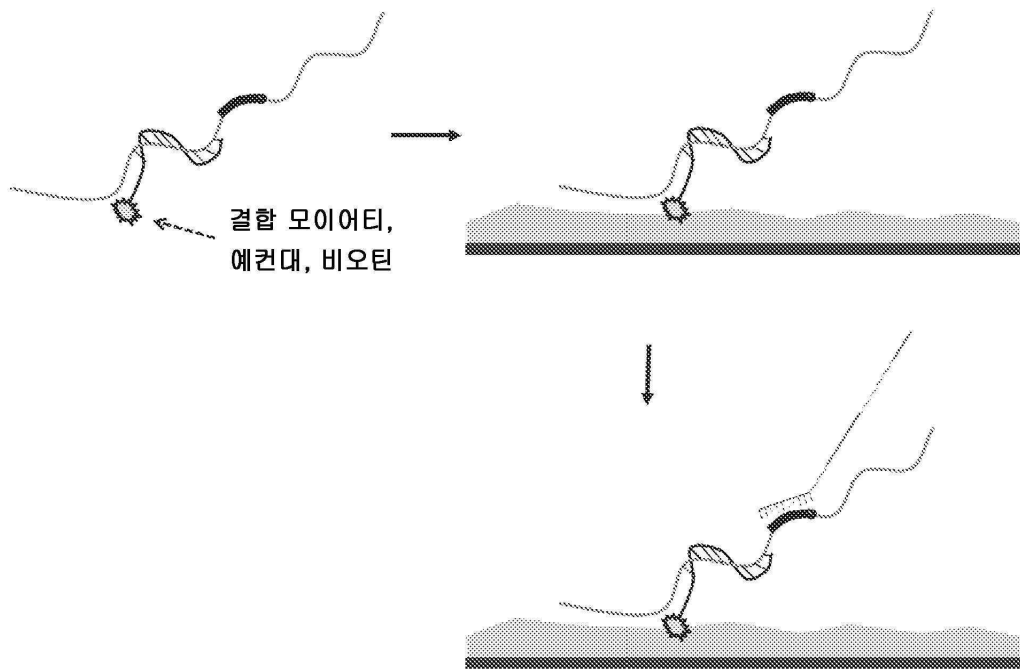
도면5d



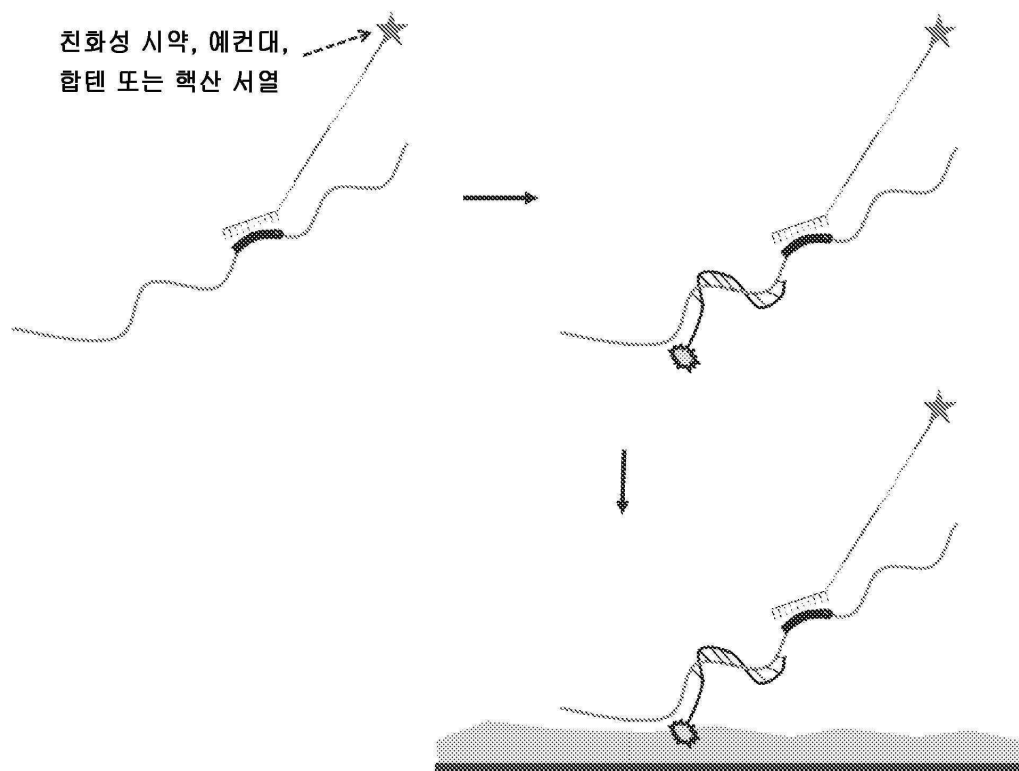
도면6



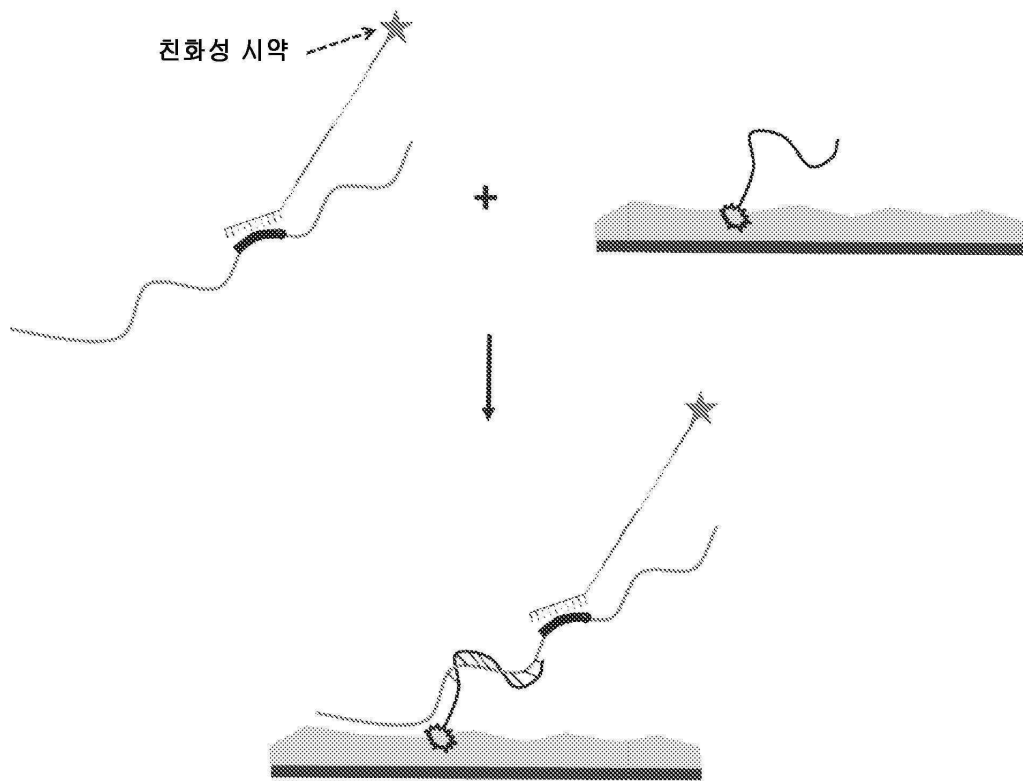
도면7



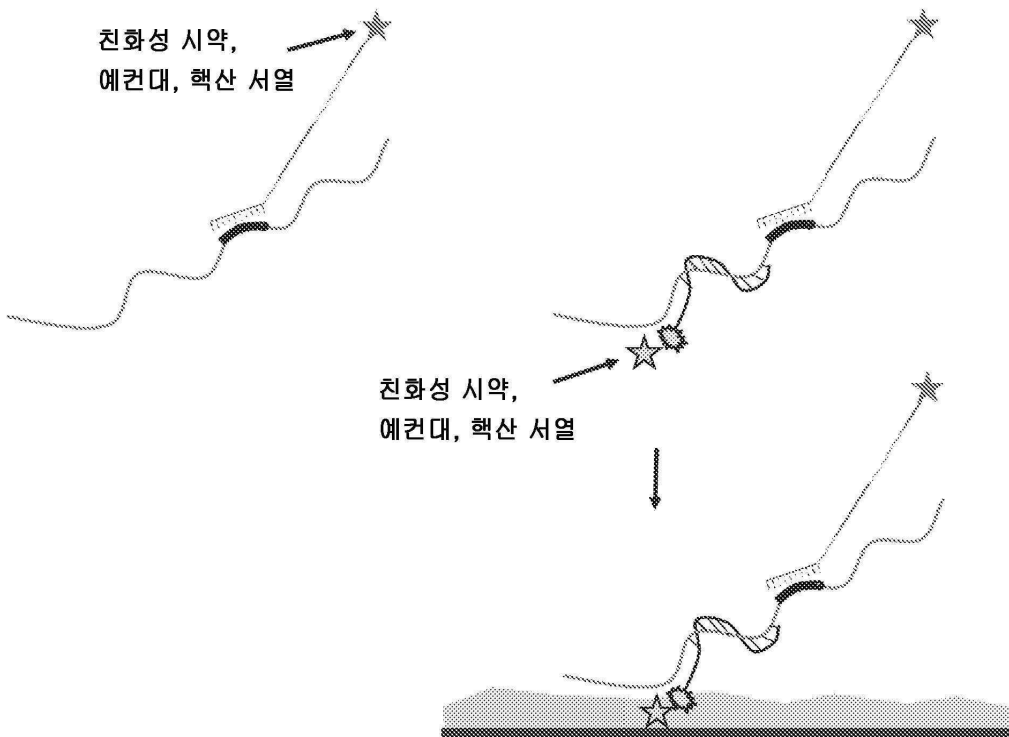
도면8a



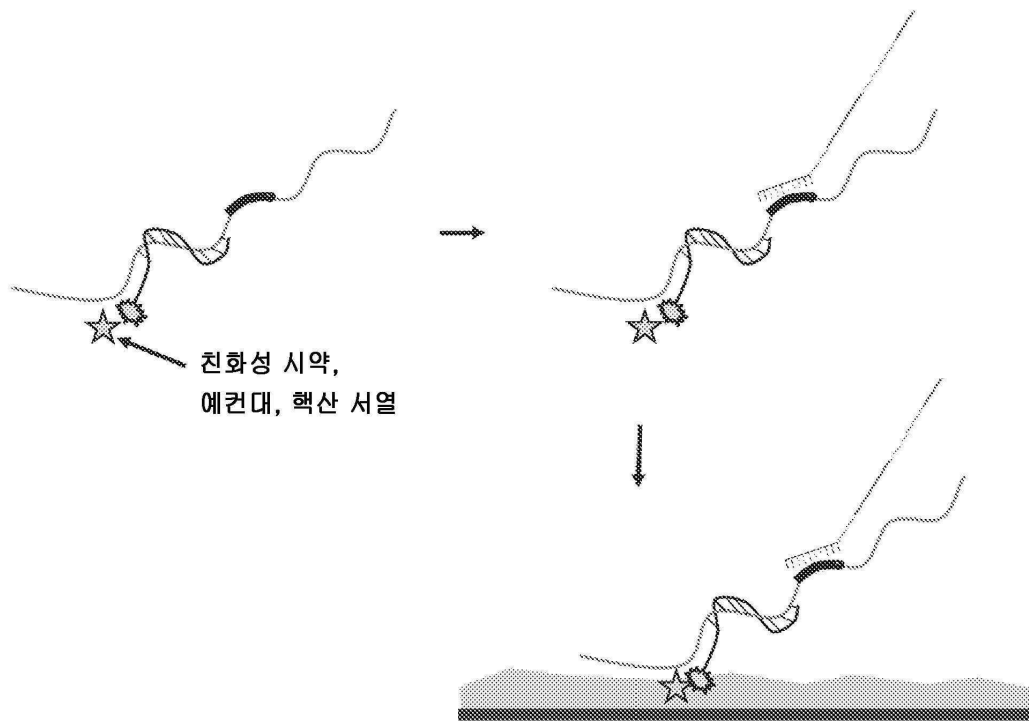
도면8b



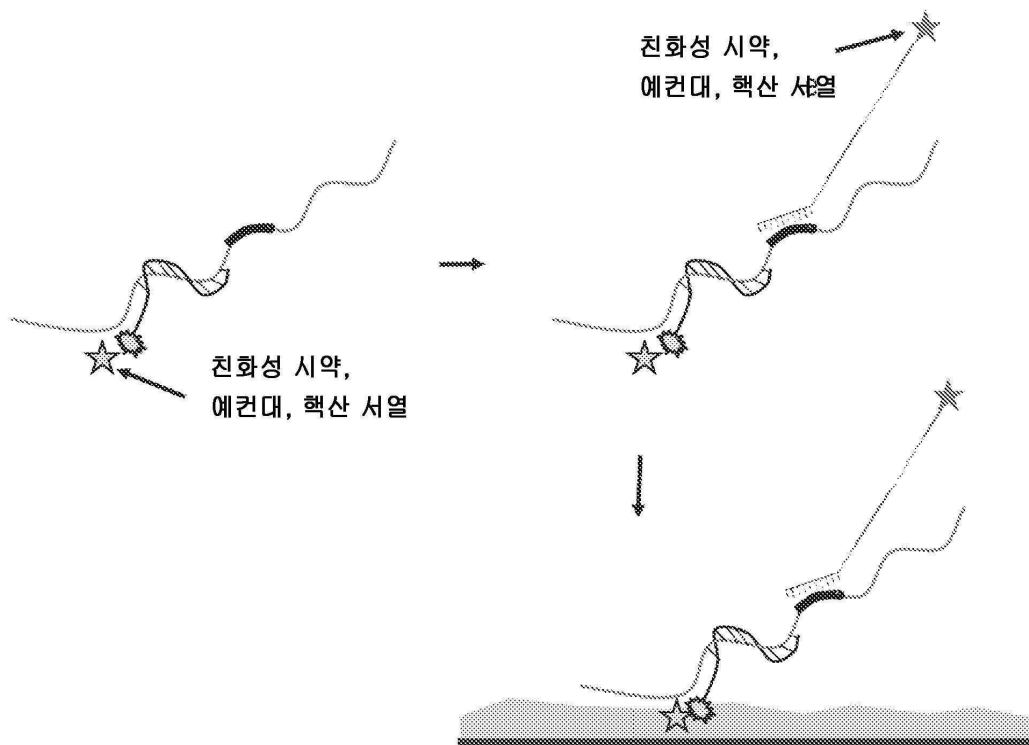
도면8c



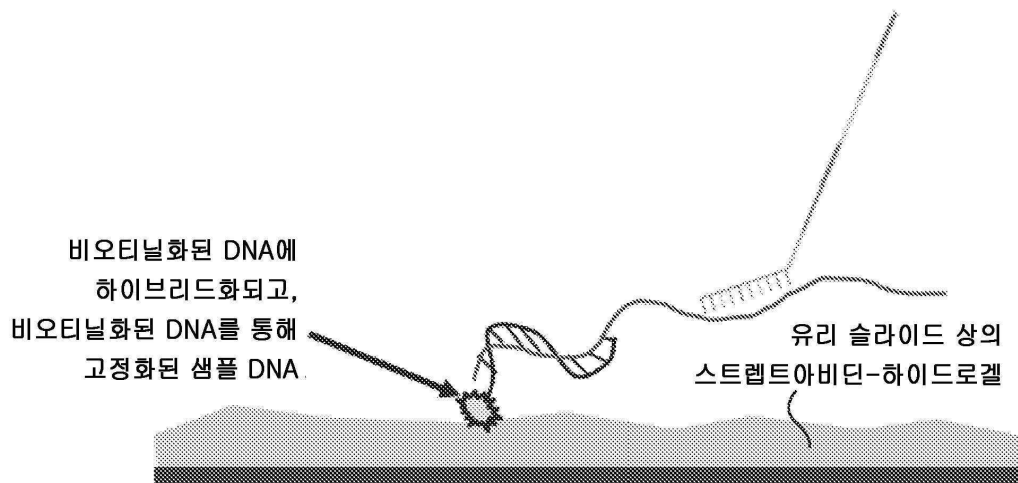
도면8d



도면8e



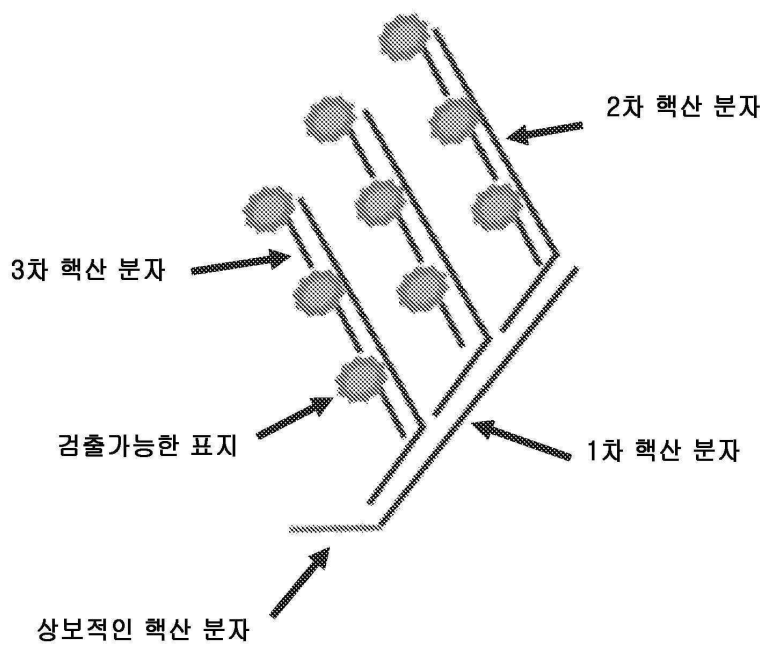
도면9a



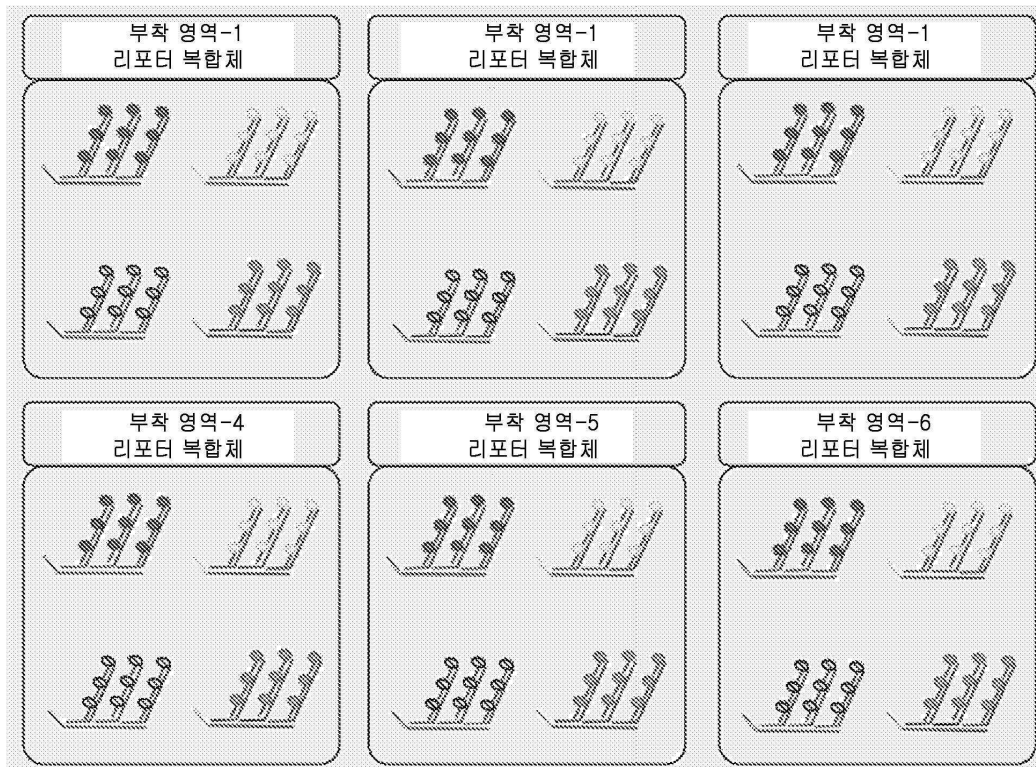
사이클 1 → 프로브 Hyb

도면9b

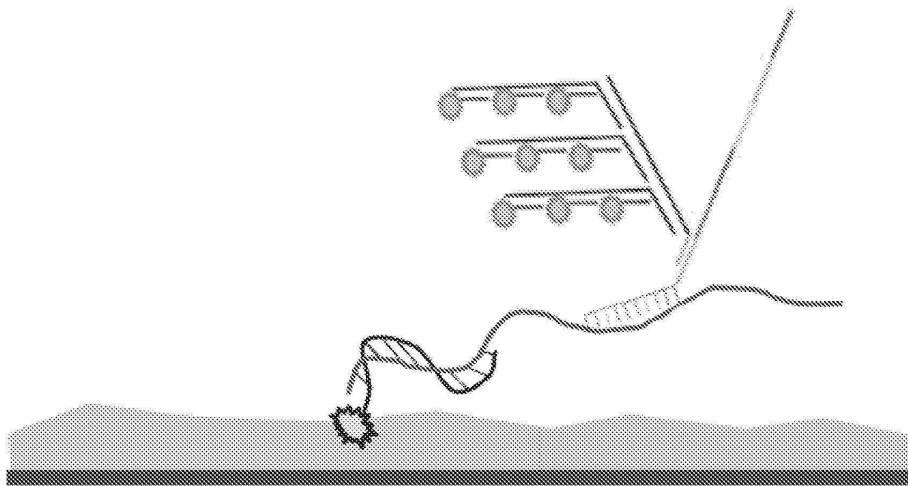
검출가능한 표지를 포함하는 리포터 복합체



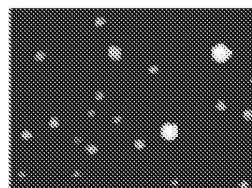
도면9c



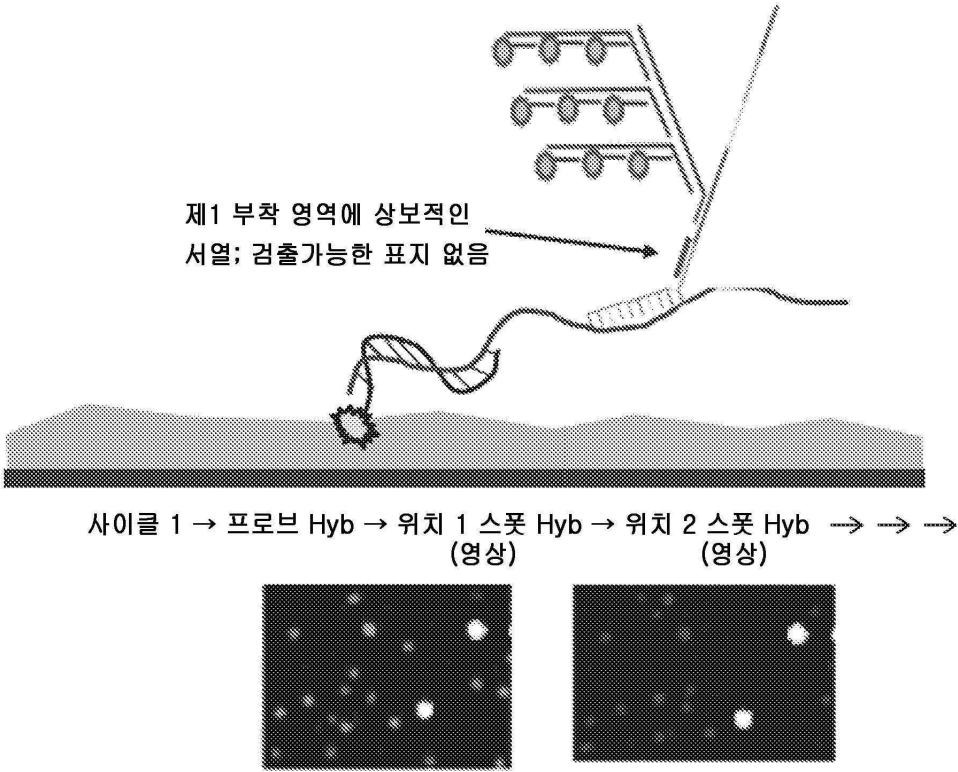
도면9d



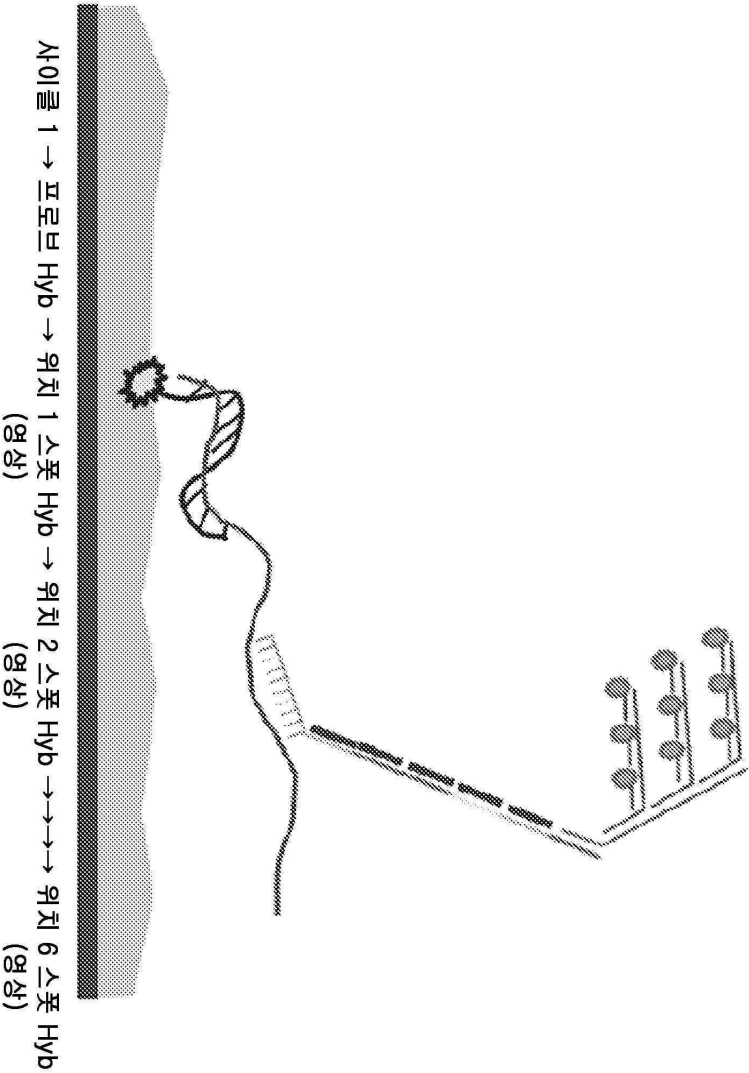
사이클 1 → 프로브 Hyb → 위치 1 스폿 Hyb
(영상)



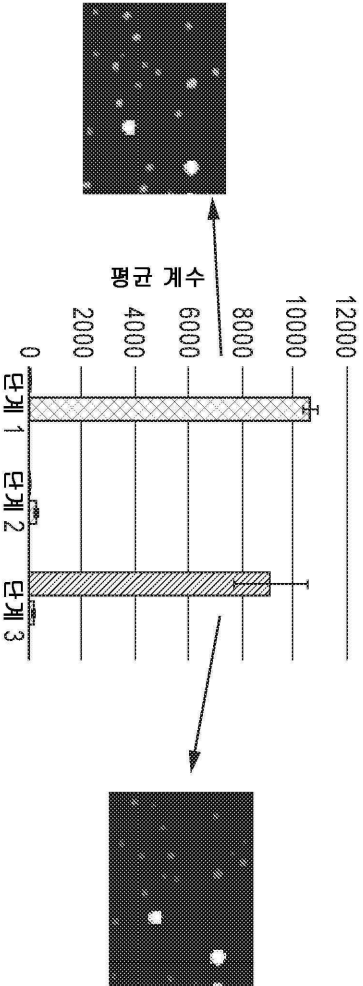
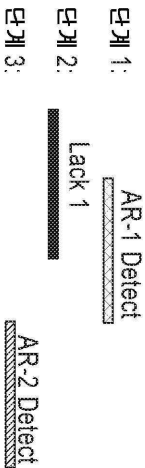
도면9e



도면9f



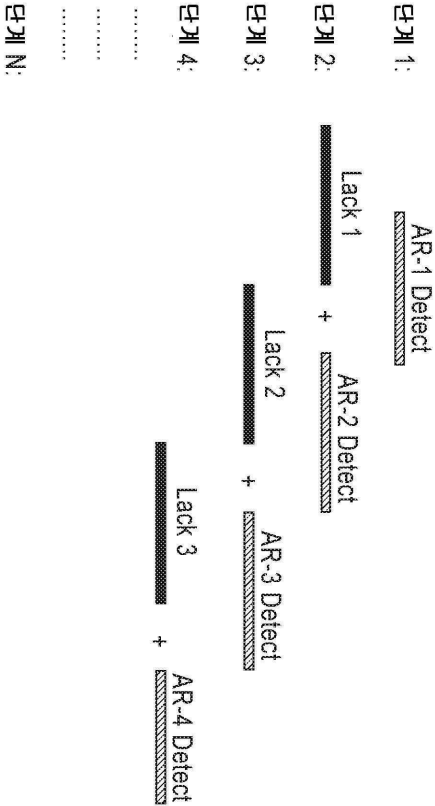
	표적 결함 도메인	(임의적) dsDNA 스페이서	Flank 1	AR-1	AR-1/ Flank 2	AR-2	AR-2/ Flank 3	AR-3	AR-3/ Flank 4	AR-4	AR-4/ Flank 5	...
V2 디자인	TTCACTTAG	CTGCTCAATTTGGCTGCATCCGTCCTACGCTG	GAGCTT	GTCAATC	CGTCCT	CTTTTC	ACTCCT	AGGCAT	TTGCCT	ATTGCG	CGTCCT	



Flank = 플랭킹 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드
AR = 부착 영역
Detect = 검출가능한 표지를 포함하는 상보적 핵산
Lack = 검출가능한 표지가 없는 하이브리드화 핵산 분자

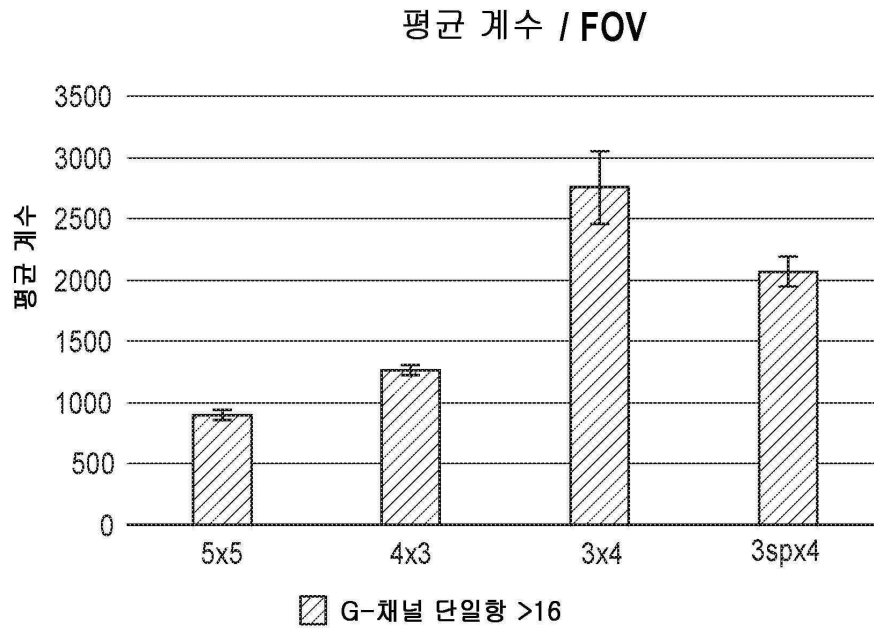
도면10

	도메인	(임의적) dsDNA 스페이서	Flank 1	AR-1	AR-1/ Flank 2	AR-2	AR-2/ Flank 3	AR-3	AR-3/ Flank 4	AR-4	AR-4/ Flank 5	...
V2 디자인	TTTCACTGAG	CTGTCTCATTTTGTCTGATCCATCTGTCCGTTCAAGTTG	GAGCTT	CTGATC	GGTCTCT	CTTTTTC	ACTTCCT	AGGAGAT	TTTCCCT	ATTTCG	CGTTCCT	



도면11

도면12b

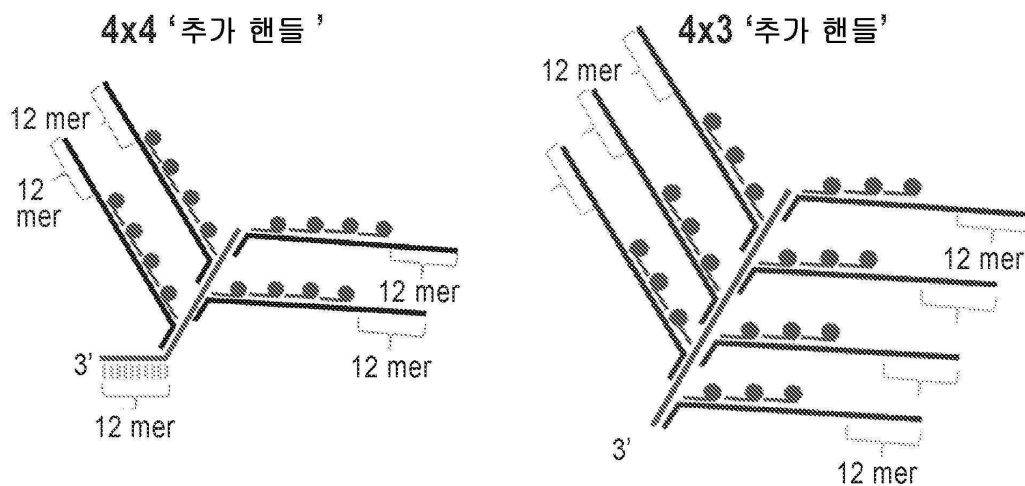


도면12c

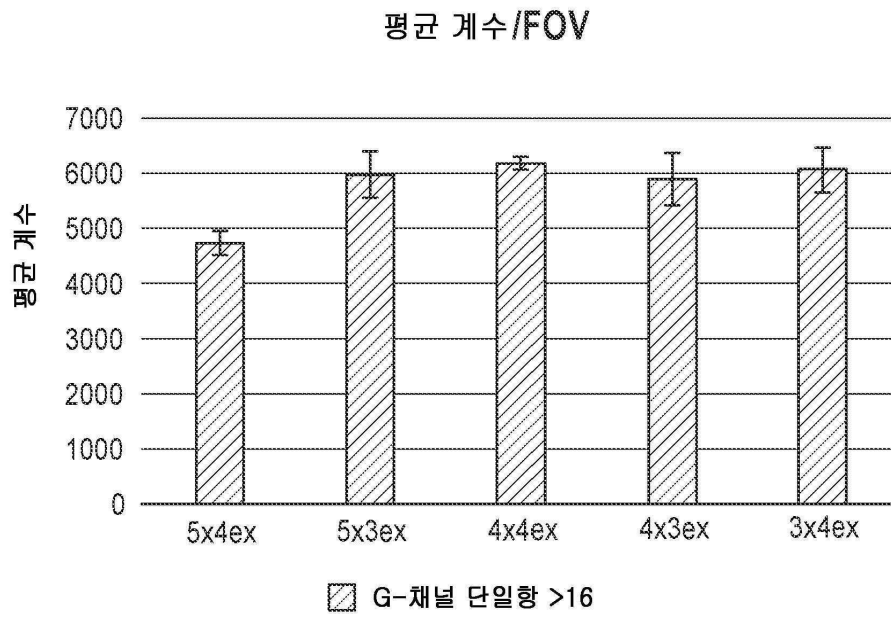
검출가능한 표지를 포함하는 리포터
복합체를 구성하기 위한 예시적인 레시피

부피 (uL)	1차 n.a.분자 (10uM)	2차 n.a.분자 (10uM)	3차 n.a.분자 (100uM)	H2O
5x4	1	4.5	2.25	92.25
5x3	1	4.5	1.8	92.7
4x4	1.28	4.5	2.25	91.97
4x3	1.28	4.5	1.8	92.42
3x4	1.8	4.5	2.25	91.45

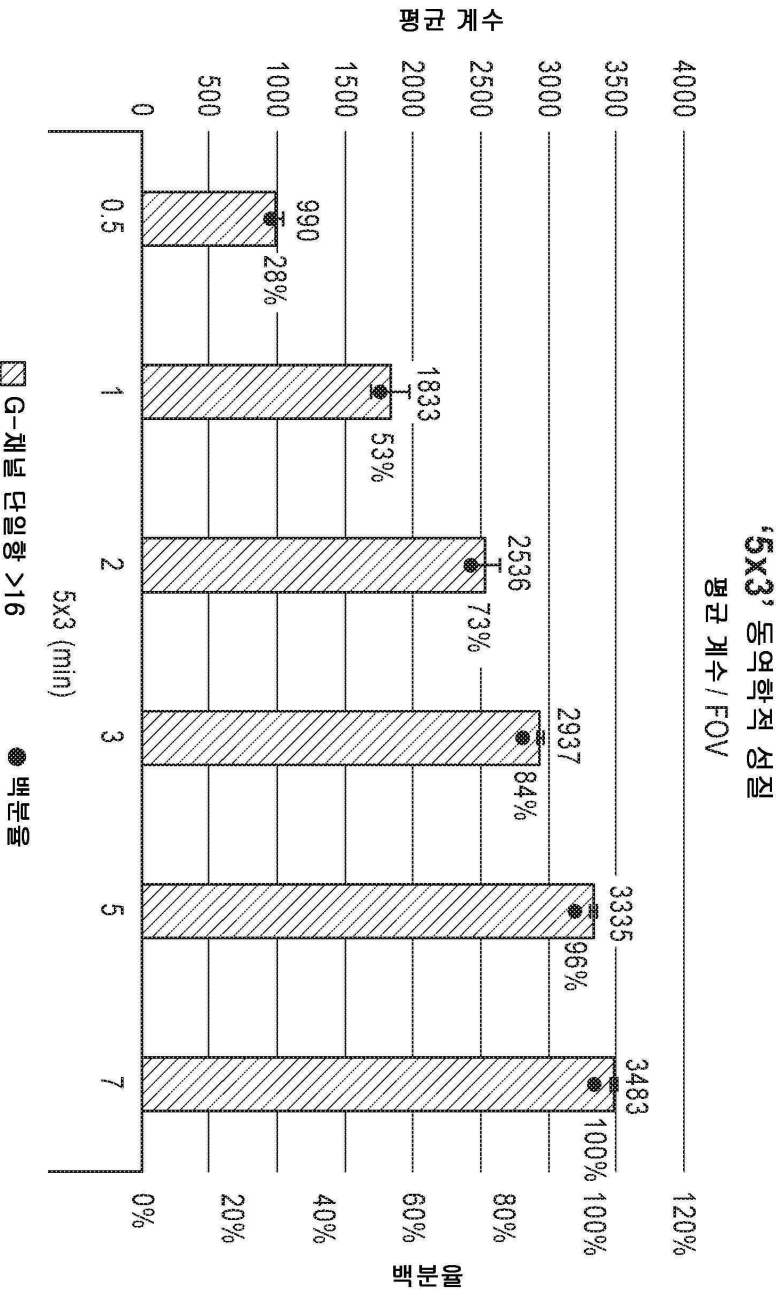
도면13a



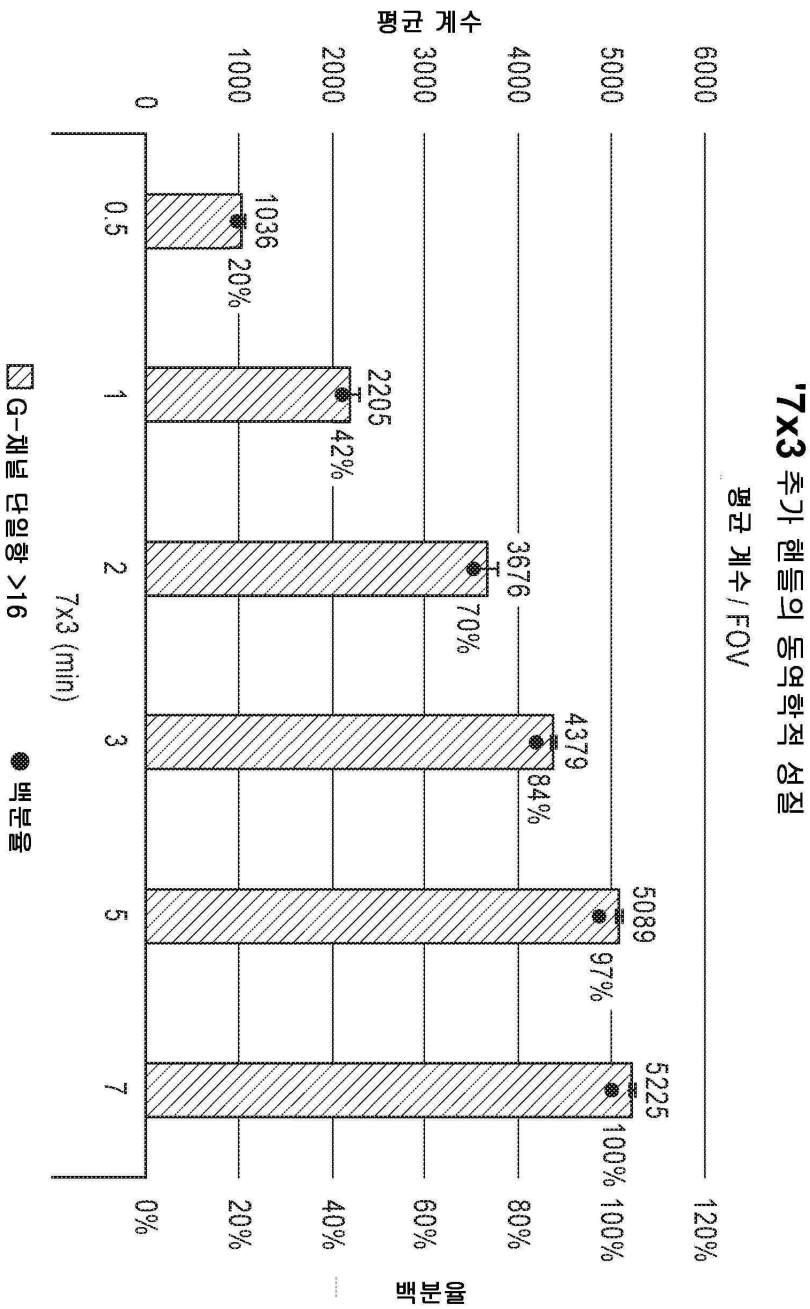
도면 13b



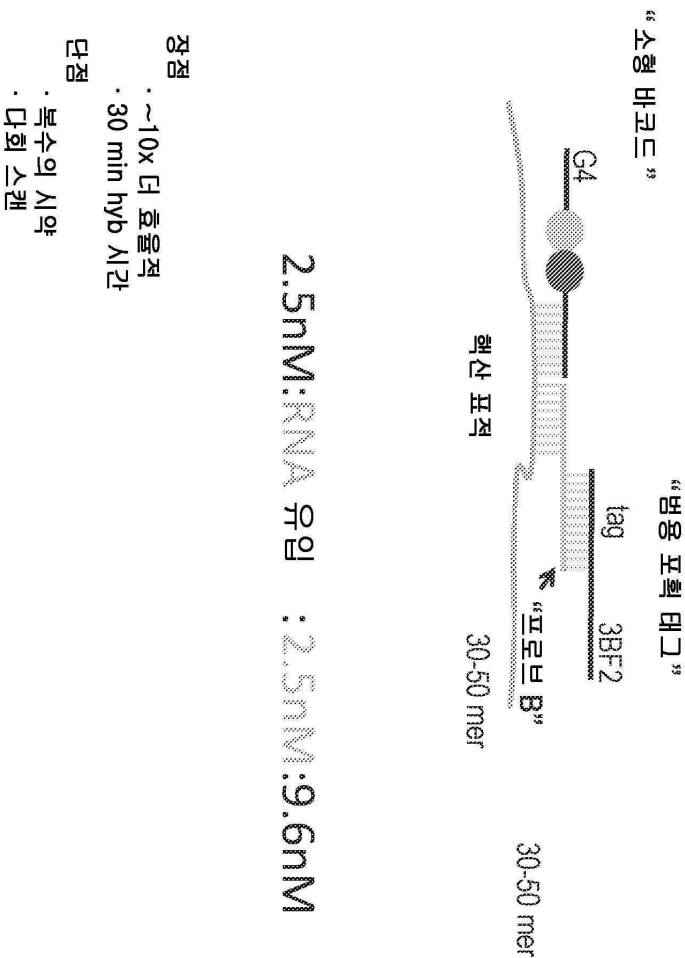
도면14a



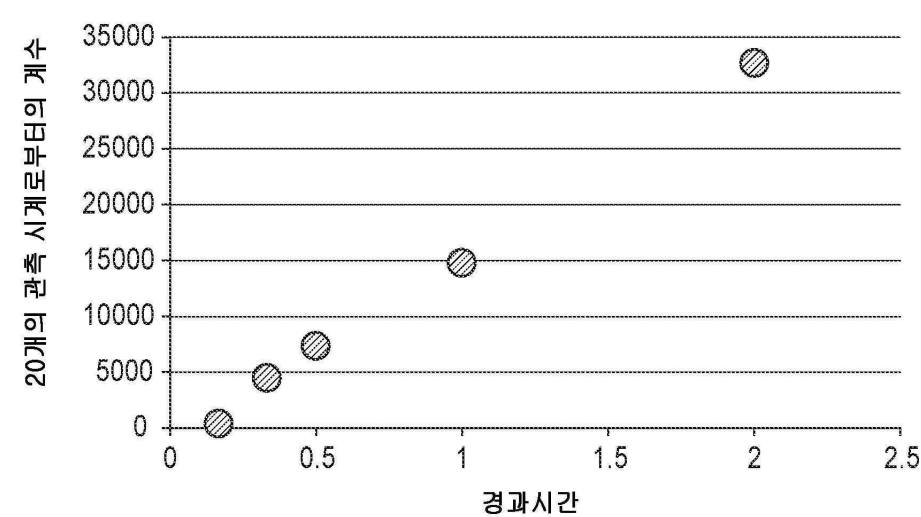
도면14b



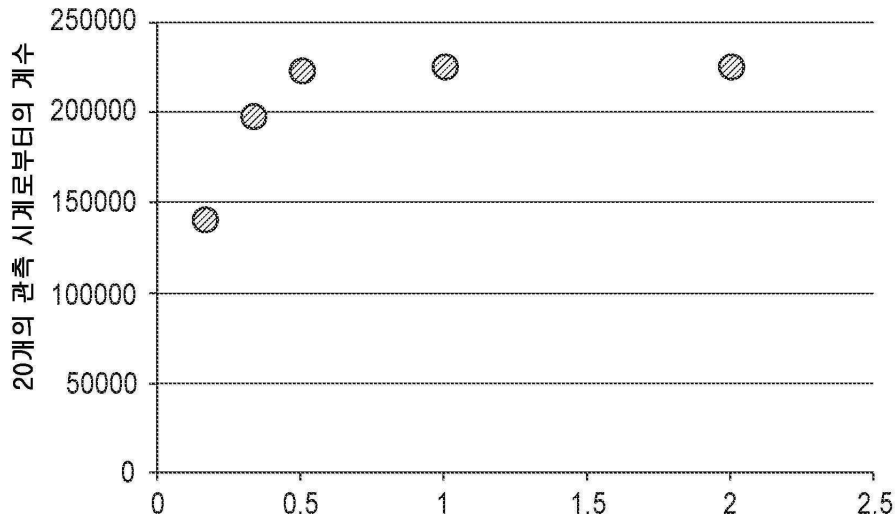
도면15a



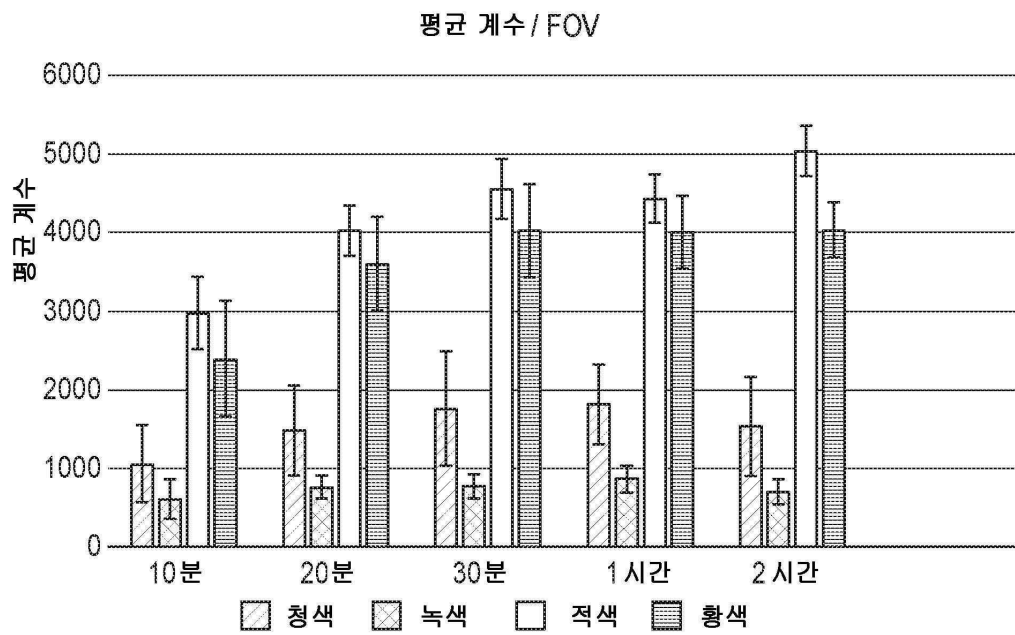
도면15b



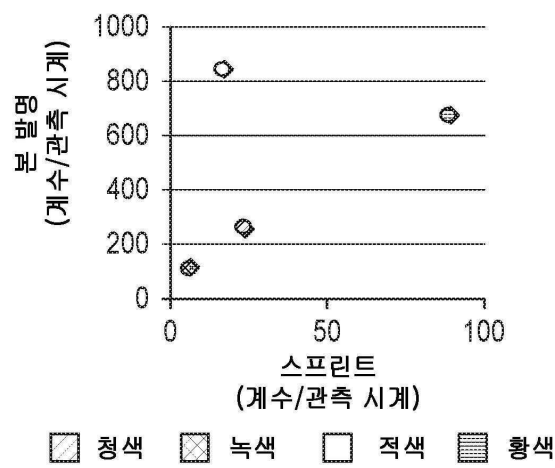
도면15c



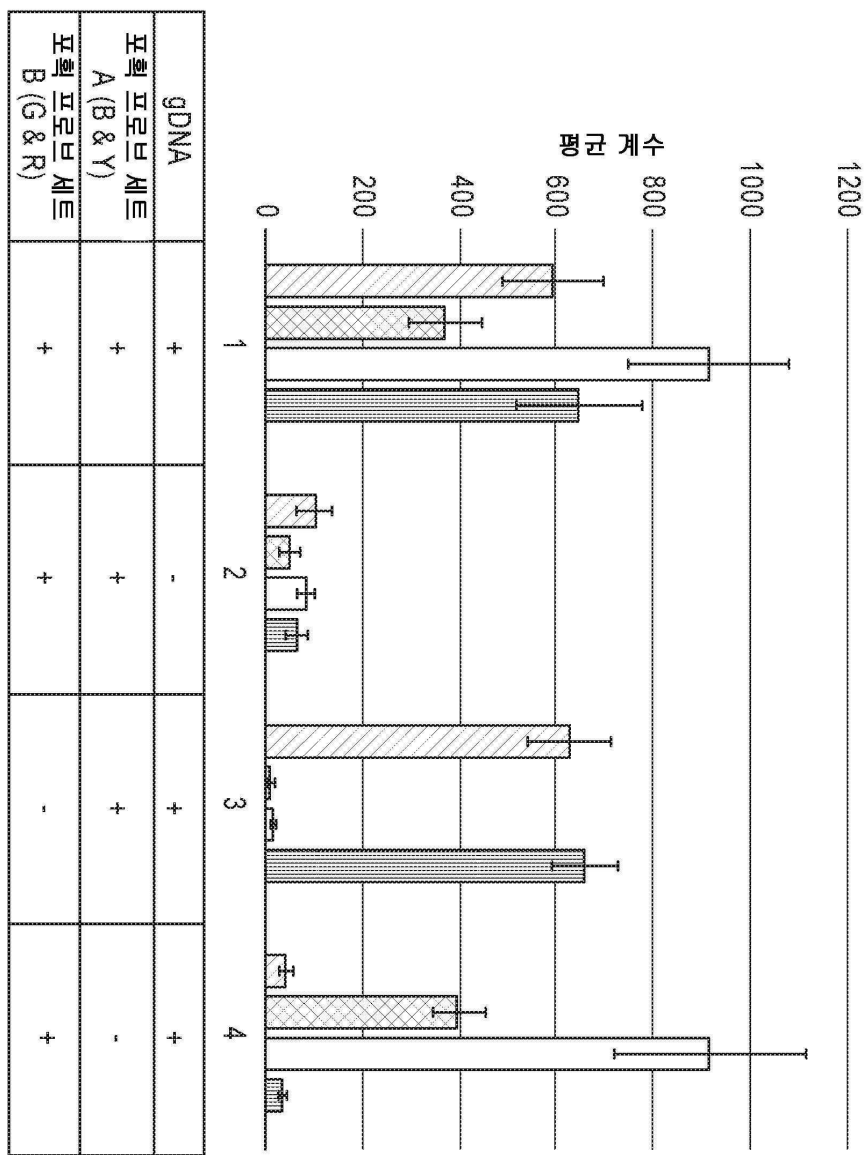
도면16a



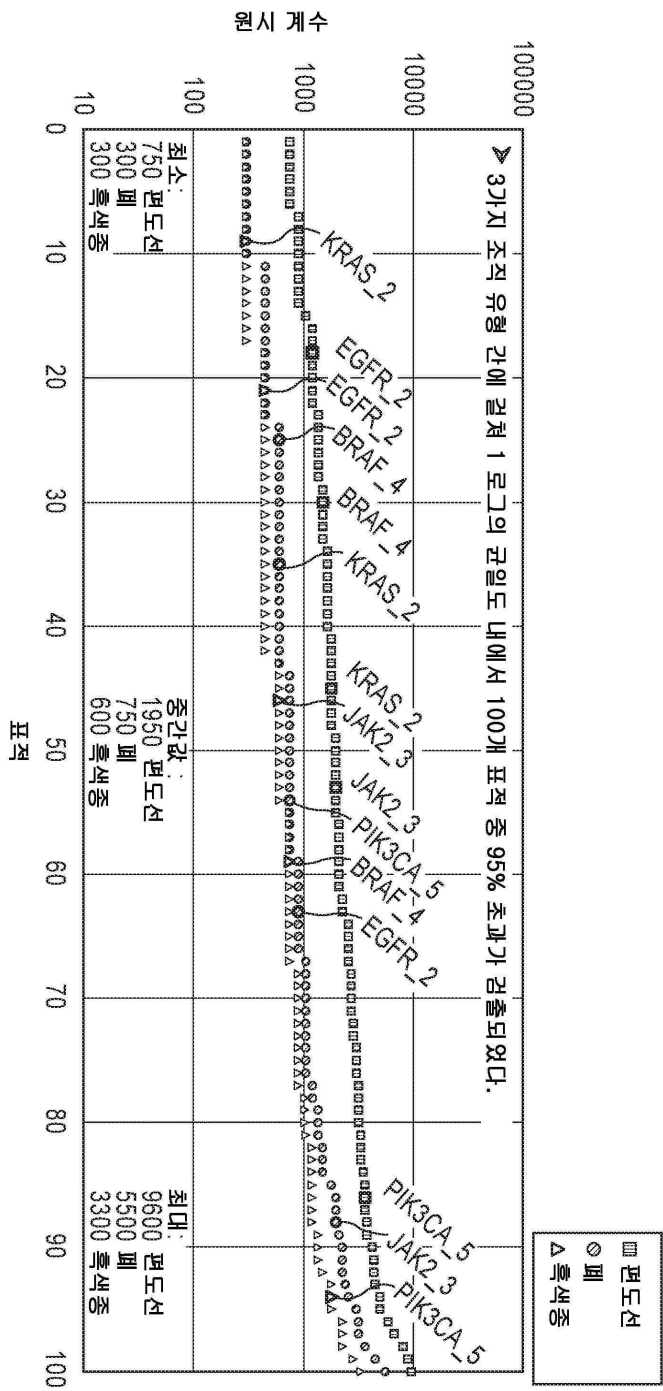
도면16b



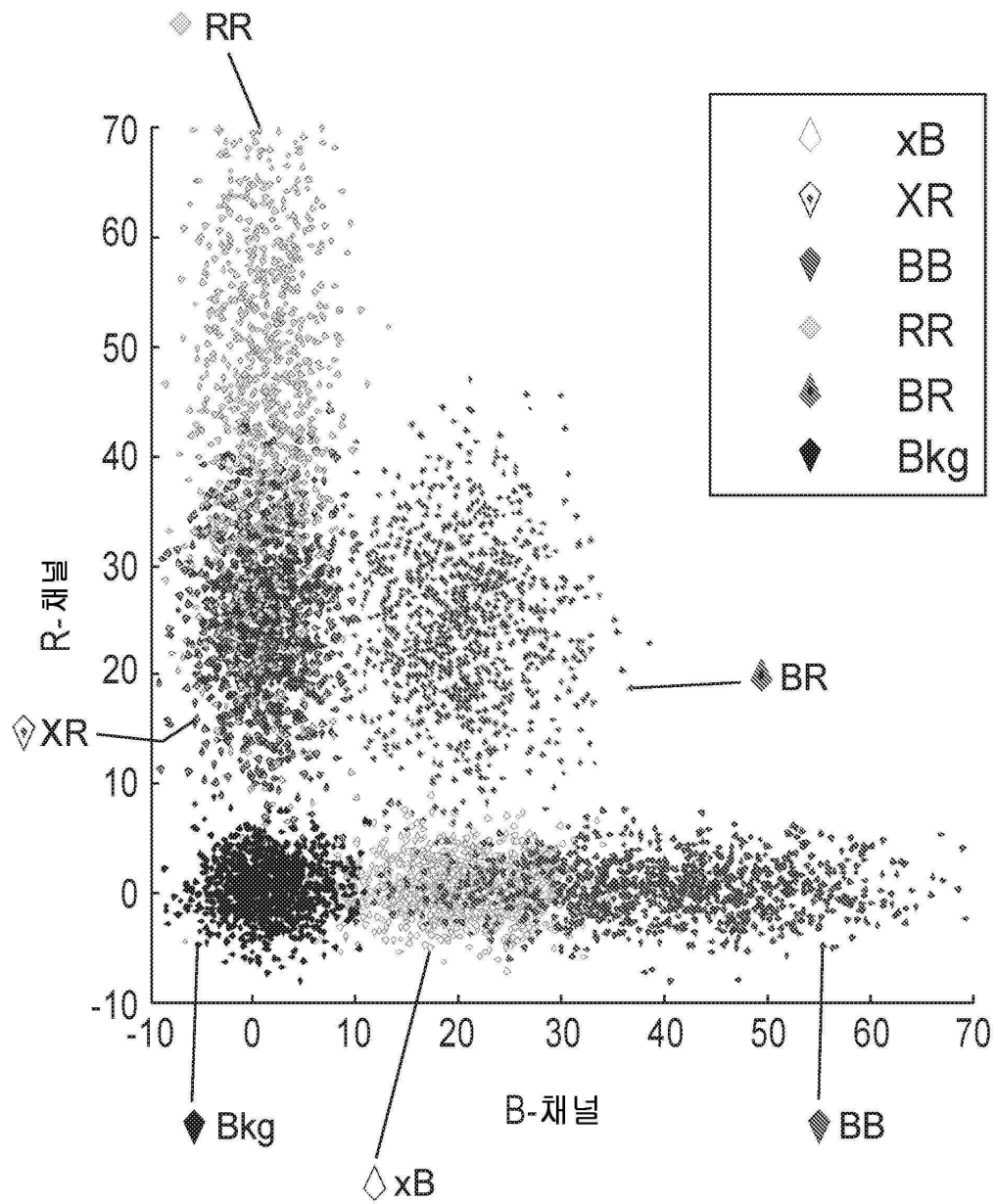
도면17a



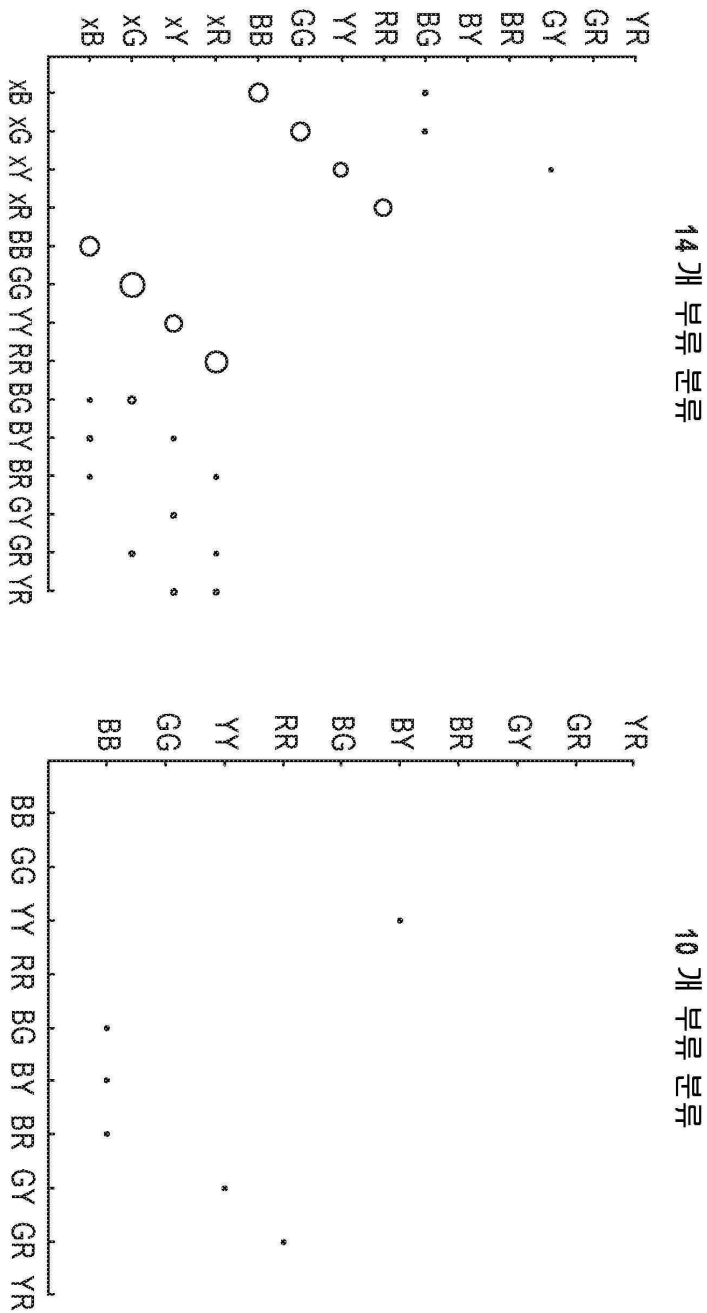
도면17b



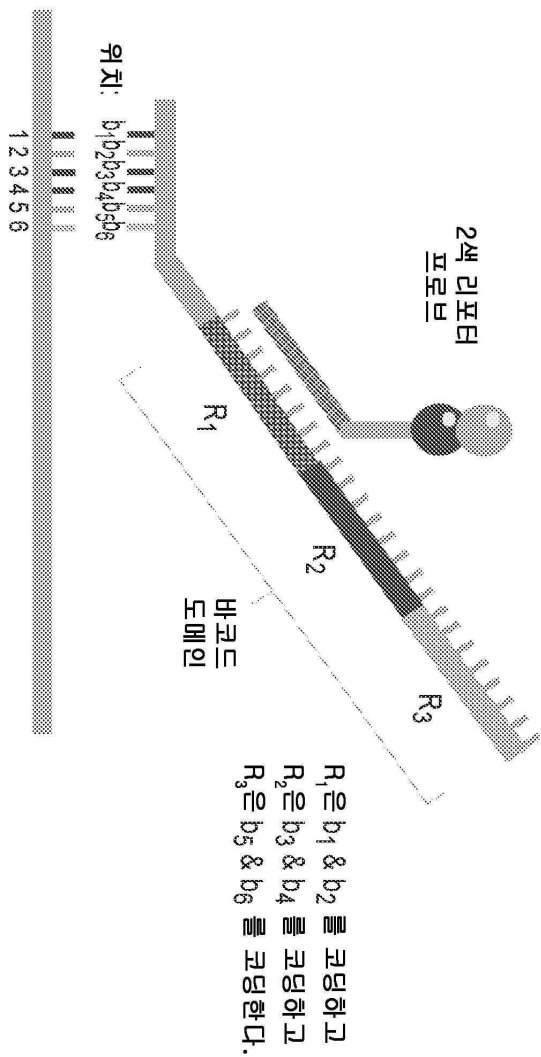
도면18



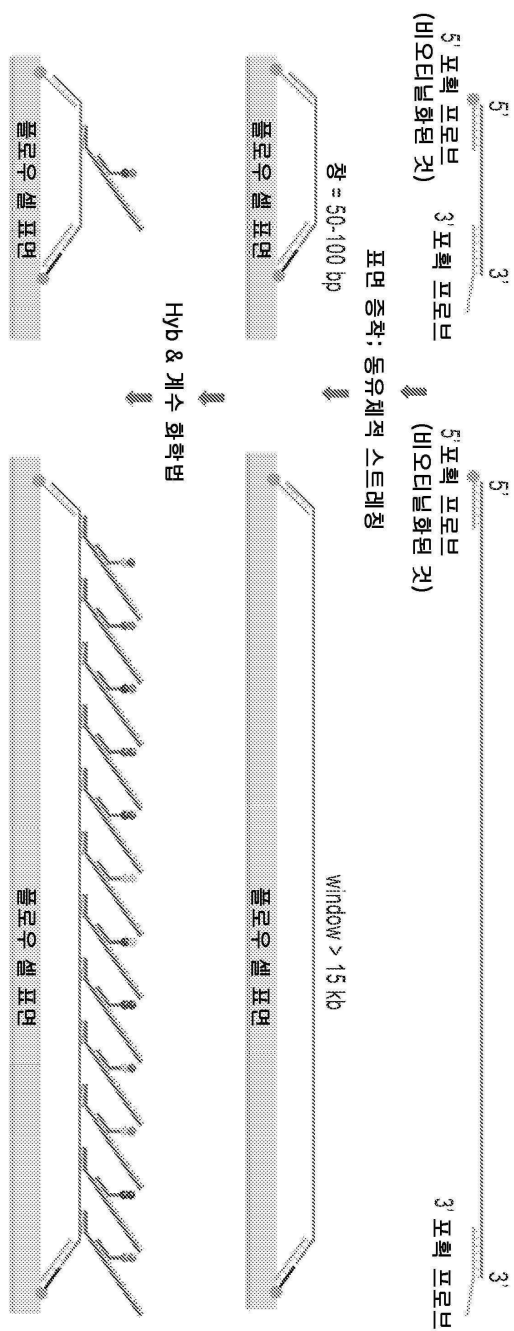
도면19



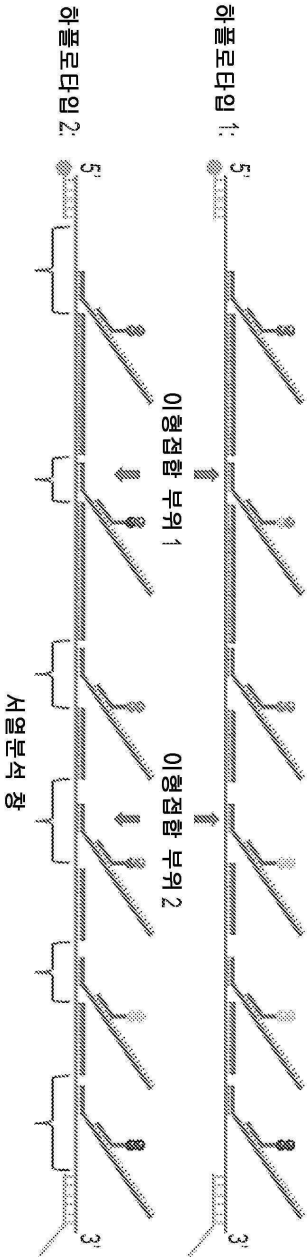
도면20



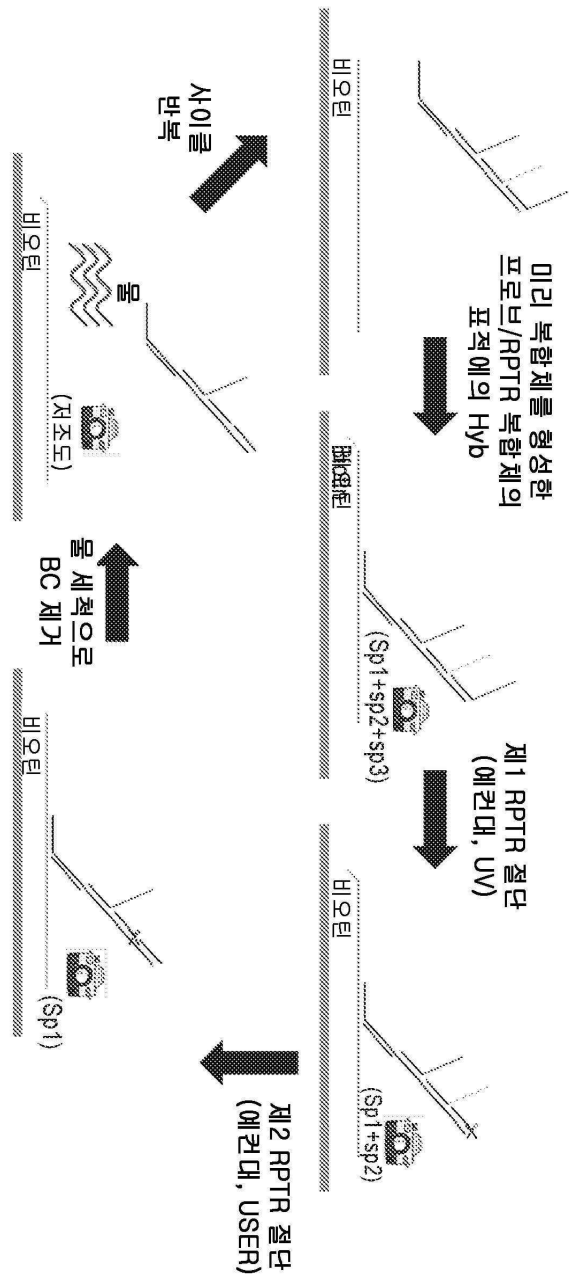
도면21



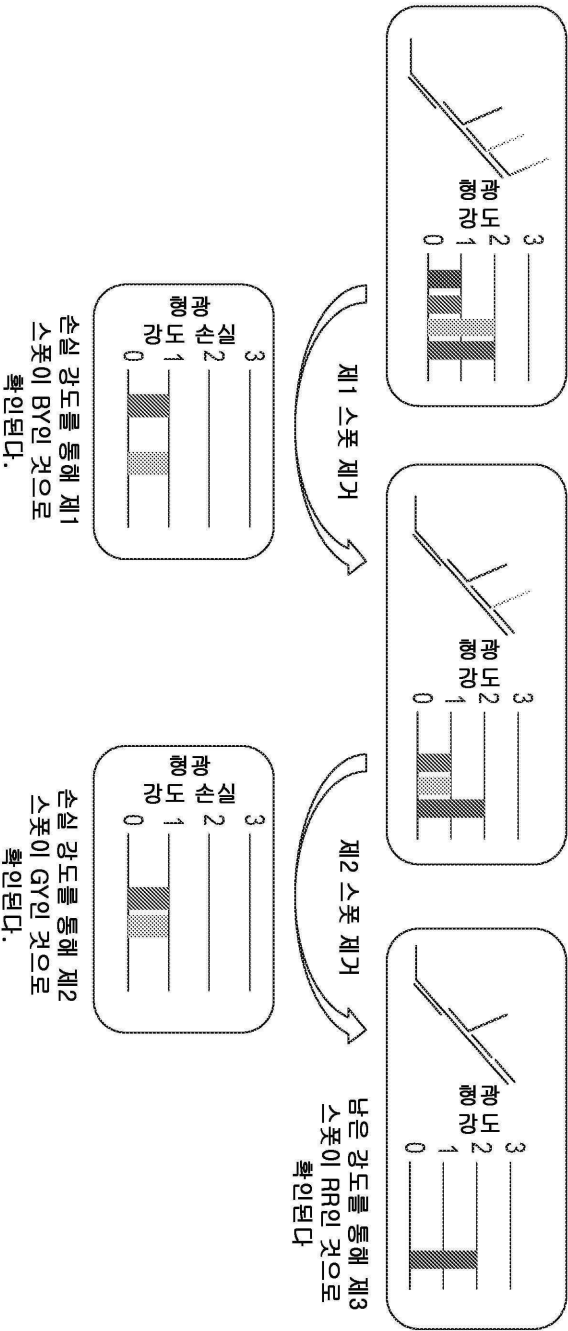
도면22



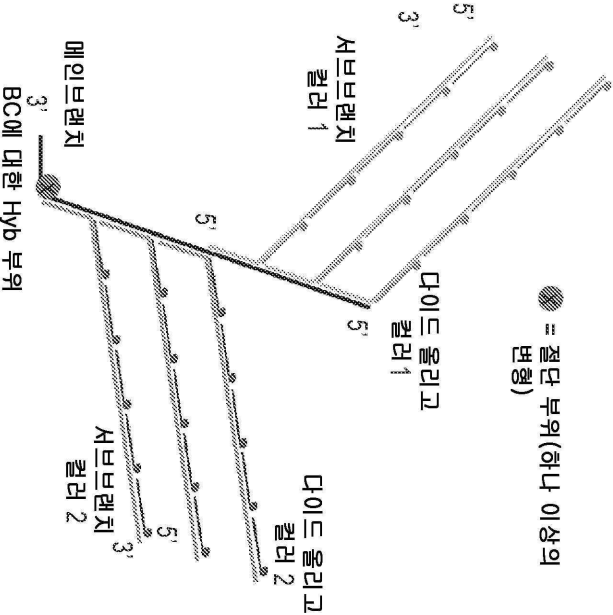
도면23



도면24

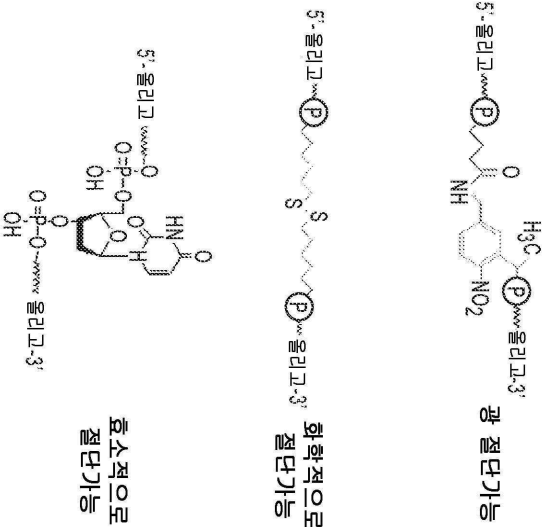


절단가능한 리포터 디자인

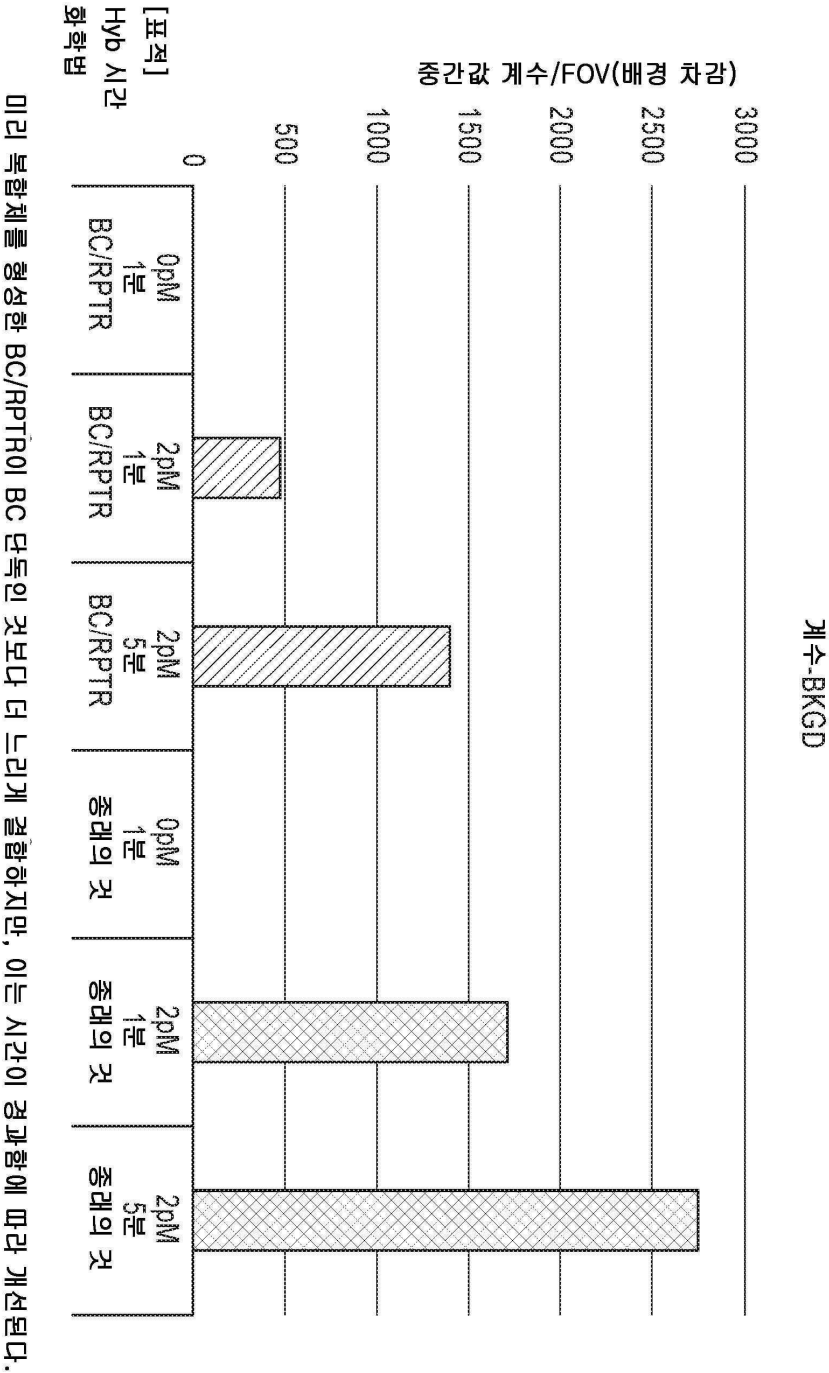


도면25

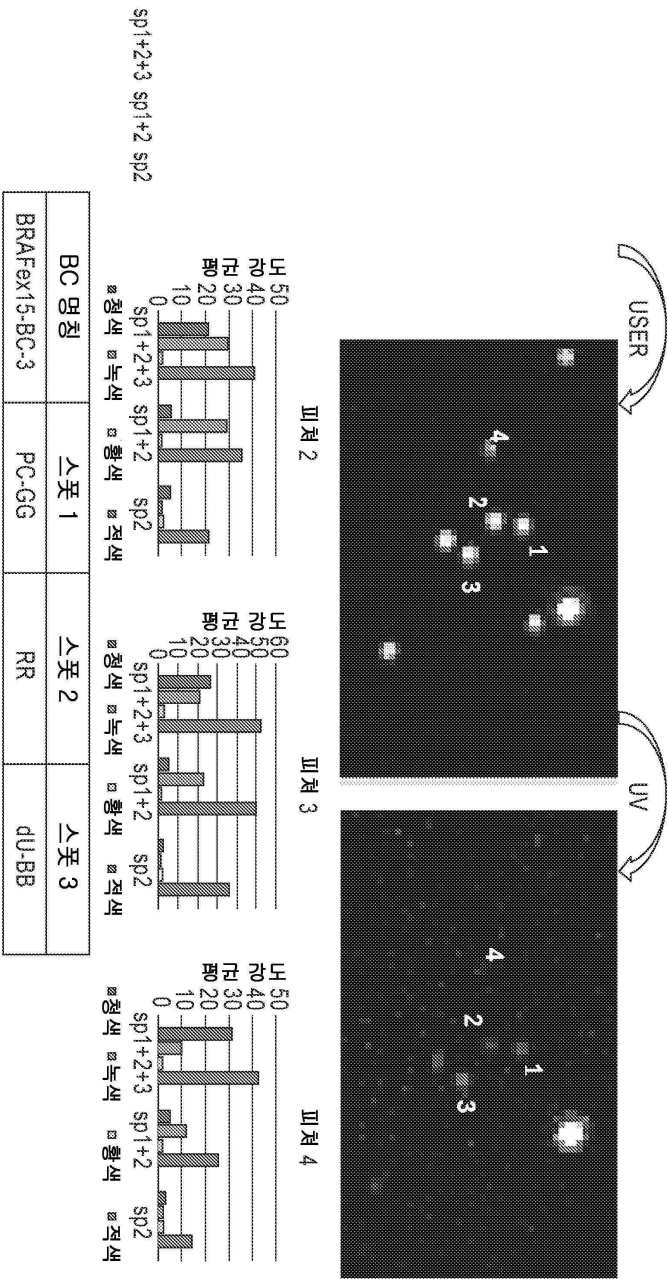
절단 변형의 예



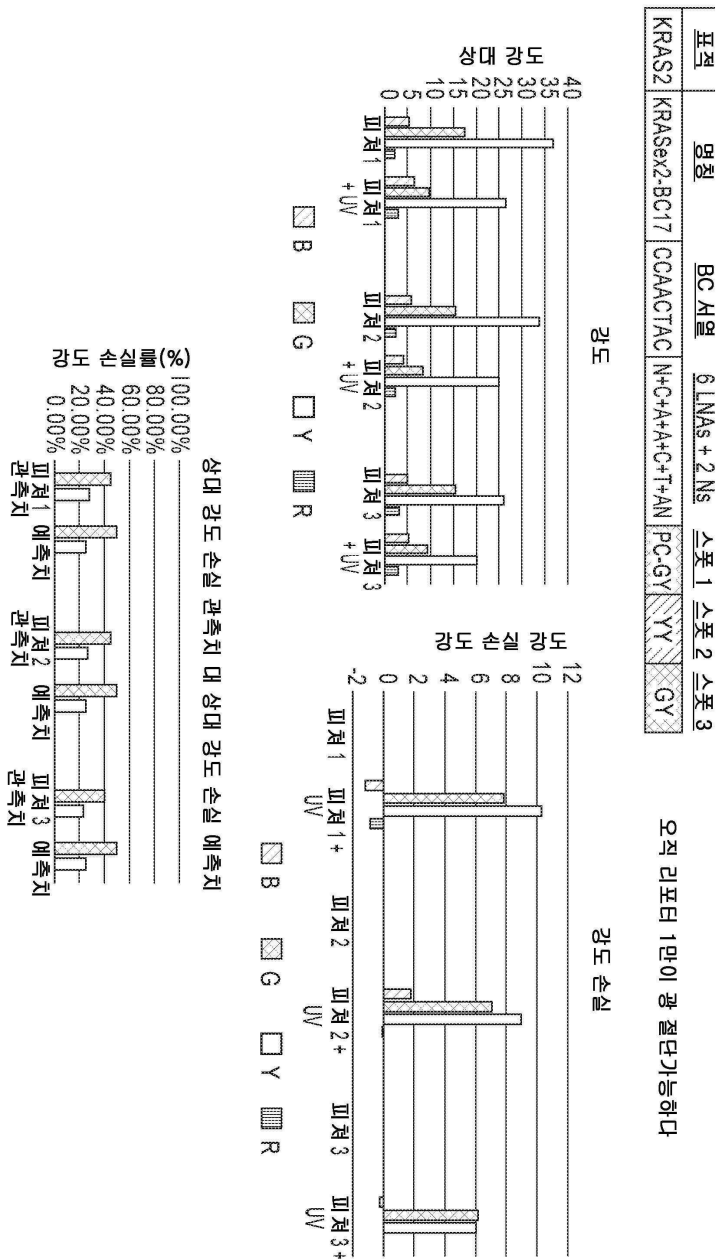
도면26



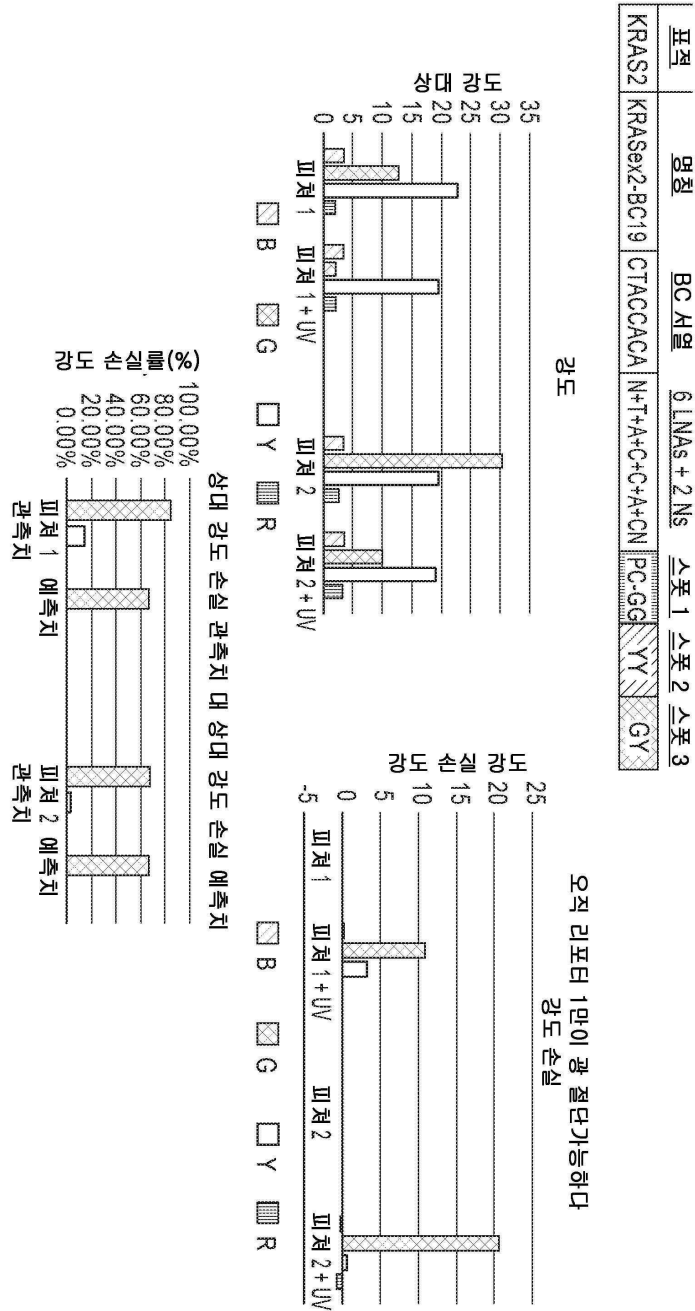
도면27



도면28



도면29



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> NanoString Technologies, Inc.
KHAFAIZOV, Rustem
DUNAWAY, Dwayne
GREGORY, Mark

<120> METHODS FOR DETECTING TARGET NUCLEIC ACIDS IN A SAMPLE

<130> NATE-032/001WO 321329-2402

<150> 62/337,074

<151> 2016-05-16

<150> 62/492,889

<151> 2017-05-01

<160> 102

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 1

atacatctag 10

<210> 2

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 2

gatctacata 10

<210> 3

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 3

ttaggtaaag 10

<210> 4

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 4

tcttcattac	10
<210> 5	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 5	
atgaatctac	10
<210> 6	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 6	
tcaatgtatg	10
<210> 7	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 7	
aattgagtac	10
<210> 8	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 8	
atgttaatgg	10
<210> 9	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 9	
aattaggatg	10
<210> 10	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 10	
ataatggatc	10
<210> 11	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 11	
taataaggtg	10
<210> 12	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 12	
tagttagagc	10
<210> 13	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 13	
atagagaagg	10
<210> 14	
<211> 10	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 14
 ttgatgatac 10
 <210> 15
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 15
 atagtgattc 10
 <210> 16
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 16
 tataacgatg 10
 <210> 17
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 17
 ttaagtttag 10
 <210> 18
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 18
 atacgttatg 10
 <210> 19

<211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 19
 tgtactatag 10

<210> 20
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 20
 ttaacaagtg 10

<210> 21
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 21
 aactatgtac 10

<210> 22
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 22
 taactatgac 10

<210> 23
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 23

actaatgttc	10
<210> 24	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 24	
tcattgaatg	10
<210> 25	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 25	
ctgtctcacc tctt	14
<210> 26	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 26	
ctgtctcacc tcttgctgca tcttgt	26
<210> 27	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 27	
ctgtctcacc tcttgctgca tctgtcggt tcacgttg	38
<210> 28	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	

<400> 28	
ctgtctcatc ttgtgcatc ctgtcgggtc acgttg	36
<210> 29	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 29	
ctgtctcatt ttgtgcatc ctgtccgttc acgttg	36
<210> 30	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 30	
cacgaacgtc ag	12
<210> 31	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 31	
catcgcatgc ct	12
<210> 32	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 32	
gtcatctcct ac	12
<210> 33	
<211> 12	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 33
 gtcacccgct ac 12
 <210> 34
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 34
 gtcacgcact ac 12
 <210> 35
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 35
 gtcaccttct ac 12
 <210> 36
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 36
 gtcacacact ac 12
 <210> 37
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 37
 gtcacactc ac 12
 <210> 38

<211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 38
 gtcattcttcg ac 12
 <210> 39
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 39
 gtcattcaact ac 12
 <210> 40
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 40
 gtcattccgta ac 12
 <210> 41
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 41
 gtcattccgaa ac 12
 <210> 42
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 42
 gtcattcaca ac 12

<210> 43
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 43
 gtcacattgc ac 12

<210> 44
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 44
 gtcacattgc ct 12

<210> 45
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 45
 gtcacccgac ct 12

<210> 46
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 46
 cttttcacct ct 12

<210> 47
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 47	
cttttcctct ct	12
<210> 48	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 48	
cttttcgact ct	12
<210> 49	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 49	
cttttctgct ct	12
<210> 50	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 50	
cttttctgta ct	12
<210> 51	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 51	
cttttctgtg ct	12
<210> 52	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 52
 cttttctgtc ct 12

<210> 53
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 53
 cttttcactc ct 12

<210> 54
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 54
 cttttcggtc ct 12

<210> 55
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 55
 cttttcgtag ct 12

<210> 56
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 56
 cttttccgtc ct 12

<210> 57
 <211> 12

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 57
 cttttctgac ct 12
 <210> 58
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 58
 aggcatgcga tg 12

 <210> 59
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 59
 aggcattgtg ct 12
 <210> 60
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 60
 aggcattgct ct 12
 <210> 61
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 61
 aggcatcttct ac 12

<210> 62
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 62
 aggcatacct ac 12
 <210> 63
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 63
 aggcatattgc ac 12
 <210> 64
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 64
 aggcatcgtc ct 12

 <210> 65
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 65
 tcctgtcggt tc 12
 <210> 66
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <400> 66

gttcaatgct ct	12
<210> 67	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 67	
attcgggtgct ct	12
<210> 68	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 68	
gatgcctgct ct	12
<210> 69	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 69	
tttgcttgct ct	12
<210> 70	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 70	
ttcactgtag ctgtctcatt ttgctgcac ctgtccgttc acgttggagc ttgtcatccg	60
tcctcttttc actcctaggc atttgccat tcggcgctct	100
<210> 71	
<211> 15	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <223> /5Alex488N/
 <400> 71
 cctgcgaatg agtcg 15
 <210> 72
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <223> /5Alex546N/
 <400> 72
 tcgagtgcac gagct 15
 <210> 73
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <223> /5Alex647N/
 <400> 73
 agtagacctg gcgtc 15
 <210> 74
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <223> /5TexRd-XN/
 <400> 74
 atcaccgtgc agcta 15
 <210> 75

<211> 89

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 75

tgcgacgcac ctatcgactc attcgaggc gactcattcg caggcgactc attcgaggc 60

gactcattcg caggcgactc attcgaggc 89

<210> 76

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 76

aagggtgtgca gcctagctca tgcactcgaa gctcatgcac tcgaagctca tgcactcgaa 60

gctcatgcac tcgaagctca tgcactcga 89

<210> 77

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 77

actgttgccg ccaagacgcc aggtctactg acgccaggtc tactgacgcc aggtctactg 60

acgccaggtc tactgacgcc aggtctact 89

<210> 78

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 78

aacgccattt gccgtagctg cacggtgatt agctgcacgg tgattagctg cacggtgatt 60

agctgcacgg tgattagctg cacggtgat 89

<210>

79

<211> 96
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 79
 aggctgcaca ccttaggctg cacaccttag gctgcacacc ttaggctgca caccttaggc 60
 tgcacacctt aggctgcaca ccttaggcga gatgac 96
 <210> 80
 <211> 96
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 80
 aggctgcaca ccttaggctg cacaccttag gctgcacacc ttcggcaaat ggcgttcggc 60
 aaatggcggtt cggcaaatgg cgttagggaa gatgac 96
 <210> 81
 <211> 96
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 81
 cggcaaatgg cggttcggcaa atggcggttcg gcaaatggcg ttcggcaaat ggcgttcggc 60
 aaatggcggtt cggcaaatgg cgttaggggtg gatgac 96
 <210> 82
 <211> 96
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 82
 ataggctcgt cgcaataggt gcgtcgcaat aggtgcgtcg caataggtgc gtcgcaatag 60
 gtgcgtcgca ataggctcgt cgcaaggaca gatgac 96
 <210> 83
 <211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 83

ttggcggcaa cagtttggcg gcaacagttt ggcggcaaca gtttggcggc aacagtttgg 60

cggcaacagt ttggcggcaa cagtaggtta gatgac 96

<210> 84

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 84

aggctgcaca ccttaggctg cacaccttag gctgcacacc ttttggcggc aacagtttgg 60

cggcaacagt ttggcggcaa cagtgtagaa gatgac 96

<210> 85

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 85

cggcaaatgg cgttcggcaa atggcgttcg gcaaatggcg ttttggcggc aacagtttgg 60

cggcaacagt ttggcggcaa cagtaggaac gatgac 96

<210> 86

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 86

ataggtgcgt cgcaataggt gcgtcgcaat aggtgcgtcg cattggcggc aacagtttgg 60

cggcaacagt ttggcggcaa cagtaggagt gatgac 96

<210> 87

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 87

atagggtgcgt cgcaataggt gcgtcgcaat aggtgcgtcg caataggtgc gtcgcaatag 60

gtgcgtcgca atagggtgcgt cgcaagccat gaaaag 96

<210> 88

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 88

atagggtgcgt cgcaataggt gcgtcgcaat aggtgcgtcg caaggctgca caccttaggc 60

tgacacacctt aggtgcgaca ccttagcgct gaaaag 96

<210> 89

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 89

atagggtgcgt cgcaataggt gcgtcgcaat aggtgcgtcg caggcgaat ggcgttcggc 60

aaatggcggtt cggcaaatgg cgtagcatc gaaaag 96

<210> 90

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 90

aggctgcaca ccttaggctg cacaccttag gctgcacacc ttaggctgca caccttaggc 60

tgacacacctt aggtgcgaca ccttagccga gaaaag 96

<210> 91

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 91

aggctgcaca ccttaggctg cacaccttag gctgcacacc ttttggcggc aacagtttgg 60

cggcaacagt ttggcggcaa cagtagctgg gaaaag 96

<210> 92

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 92

aggctgcaca ccttaggctg cacaccttag gctgcacacc ttcggcaaat ggcgttcggc 60

aaatggcggtt cggcaaatgg cgtagcga gaaaag 96

<210> 93

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 93

ttggcggcaa cagtttggcg gcaacagttt ggccggcaaca gtttggcggc aacagtttgg 60

cggcaacagt ttggcggcaa cagtagctcg gaaaag 96

<210> 94

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 94

cggcaaatgg cggttcggcaa atggcggttcg gcaaatggcg ttcggcaaat ggcgttcggc 60

aaatggcggtt cggcaaatgg cgtagcgtg gaaaag 96

<210> 95

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 95
ataggtgcgt cgcaataggt gcgtcgcaat aggtgcgtcg caaggctgca caccttaggc 60
tgcacacctt aggtgcaca ccttgtaagt ccgaat 96
<210> 96
<211> 96
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 96
cggcaaatgg cggtcggcaa atggcggttcg gcaaatggcg ttttggcggc aacagtttgg 60
cggcaacagt ttggcggcaa cagtgtaca ccgaat 96
<210> 97
<211> 96
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 97
ataggtgcgt cgcaataggt gcgtcgcaat aggtgcgtcg caataggtgc gtcgcaatag 60
gtgcgtcgca ataggtgcgt cgcagtacat ccgaat 96
<210> 98
<211> 96
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 98
ataggtgcgt cgcaataggt gcgtcgcaat aggtgcgtcg caggcgaat ggcgttcggc 60
aatggcgtt cggcaaatgg cggtgtaatc ccgaat 96
<210> 99
<211> 96
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 99

aggctgcaca ccttaggctg cacaccttag gctgcacacc ttaggctgca caccttaggc	60
tgcacacctt aggctgcaca ccttgtacga ccgaat	96
<210> 100	
<211> 96	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 100	
aggctgcaca ccttaggctg cacaccttag gctgcacacc ttggcgaat ggcgttcggc	60
aaatggcggtt cggcaaatgg cgtttagaa ccgaat	96
<210> 101	
<211> 96	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 101	
ttggcggcaa cagtttggcg gcaacagttt ggcggaaca gtttggcggc aacagtttgg	60
cggcaacagt ttggcggcaa cagtgtatcg ccgaat	96
<210> 102	
<211> 96	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 102	
aggctgcaca ccttaggctg cacaccttag gctgcacacc ttttggcggc aacagtttgg	60
cggcaacagt ttggcggcaa cagtgtagtt ccgaat	96