(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년08월13일
(11) 등록번호 10-0749185
(24) 등록일자 2007년08월07일

(21) 출원번호	10-2001-7016445	(65) 공개번호	10-2002-0011443
(22) 출원일자	2001년12월21일	(43) 공개일자	2002년02월08일
심사청구일자	2005년06월15일		
번역문 제출일자	2001년12월21일		
(86) 국제출원번호	PCT/US2000/016952	(87) 국제공개번호	WO 2000/79008
국제출원일자	2000년06월21일	국제공개일자	2000년12월28일

(81) 지정국 국내특허 : 그라나다, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르키즈스탐, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크맨, 터어키, 트리니아드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 가나, 감비아, 인도, 크로아티아, 인도네시아, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 아랍에미리트, 모잠비크, 벨리제,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 탄자니아, 모잠비크,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탐, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨,

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

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장 09/337,325 1999년06월21일 미국(US)

(73) 특허권자
크리스, 리처드
미국 85718 아리조나주 턱손 이스트 아베니다 드 포사다 2602

펠더, 스티븐
미국 85718 아리조나주 턱손 노쓰 카씨드럴 록크 플레이스 7064

(72) 발명자
크리스, 리처드
미국 85718 아리조나주 턱손 이스트 아베니다 드 포사다 2602

펠더, 스티븐

미국 85718 아리조나주 턱손 노쓰 카씨드럴 록크 플레이스 7064

(74) 대리인 김영
주성민

(56) 선행기술조사문헌
WO1999028494 A1 WO1997047640

심사관 : 조명선

전체 청구항 수 : 총 65 항

(54) 대량 처리 분석 시스템

(57) 요약

본 발명은 프로브의 반복 배열을 이용하여, 다수의, 대량 처리 생물학적 또는 화학적 분석을 동시에 수행하는 데 유용한 조성물, 기구 및 방법에 관한 것이다. 본 발명의 조합물은, 복수개의 테스트 영역을 함유하고, 이러한 영역중 2 이상, 바람직한 구현예로는, 이중 20 개 이상이 실질적으로 동일한 기판을 포함하는데, 각 테스트 영역들은 일반적인 앵커 분자의 배열을 함유한다. 상기 앵커는 이관능성 링커 분자와 연결되고, 이들 각각은 하나 이상의 앵커에 특이적인 부분과 목적하는 표적에 특이적인 프로브인 부분을 함유한다. 프로브의 생성된 배열을 이용하여 프로브와 특이적으로 상호반응하는 하나 이상의 표적 분자의 존재를 분석하거나 또는 활성을 시험한다. 본 발명의 한 구현예에로는, 테스트 영역 (웰일 수도 있음)을 더 작은 하위영역(톱니모양홈, 또는 물결모양홈)으로 더욱 세분한다.

특허청구의 범위

청구항 1.

a) 시료를 가하기에 앞서

i) 둘 이상이 실질적으로 동일한 다수의 공간적으로 분리된 영역을 포함하는 기판(surface)을 포함하고,

ii) 상기 영역 각각은 8개 이상의 상이한 올리고뉴클레오티드 앵커를 포함하며,

iii) 상기 올리고뉴클레오티드 앵커 각각에 결합된, 상기 올리고뉴클레오티드 앵커에 대해 특이적인 제1 부분 및 표적에 대해 특이적인 프로브를 포함하는 제2 부분을 갖는 이관능성 링커를 포함하는

조합물과, 상기 표적을 포함할 수 있는 시료를, 상기 표적이 상기 조합물에 결합하기에 효과적인 조건하에서 접촉시키는 단계,

b) 상기 조합물 및 임의 결합된 표적을 표지된 검출 프로브와 접촉시키는 단계, 및

c) 상기 검출 프로브를 검출하는 단계

를 포함하며, 여기서 상기 표적은 보호 단편으로서, 상기 시료를 상기 조합물과 접촉시키기 전에 PCR에 의해 증폭되는 것인, 하나 이상의 표적의 검출 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 표적이 2 개의 PCR 프라이머를 사용하는 PCR에 의해 증폭되고, 이들 프라이머 각각 또는 둘다는 프라이머를 고체 기판에 부착시킬 수 있는 화학적 변형을 포함하는 것인 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 표적이 2 개의 PCR 프라이머를 사용하는 PCR에 의해 증폭되고, 이들 프라이머 각각 또는 둘다는 하나 이상의 제한 효소 부위를 포함하는 것인 방법.

청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 표적이 2 개의 PCR 프라이머를 사용하는 PCR에 의해 증폭되고, 이들 프라이머 각각 또는 둘다는 프로테아제에 의해 절단될 수 있는 하나 이상의 펩티드 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 5.

제1항에 있어서, 상기 표적이 2 개의 PCR 프라이머를 사용하는 PCR에 의해 증폭되고, 이들 프라이머 각각 또는 둘다는 상기 검출 프로브에 대해 특이적인 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 6.

a) 시료를 가하기에 앞서

i) 둘 이상이 실질적으로 동일한 다수의 공간적으로 분리된 영역을 포함하는 기판을 포함하고,

ii) 상기 영역 각각은 8개 이상의 상이한 올리고뉴클레오티드 앵커를 포함하며,

iii) 상기 올리고뉴클레오티드 앵커 각각에 결합된, 상기 올리고뉴클레오티드 앵커에 대해 특이적인 제1 부분, 및 표적에 대해 특이적인 프로브를 포함하는 제2 부분을 갖는 이관능성 링커를 포함하는

조합물과, 상기 표적을 포함할 수 있는 시료를, 상기 표적이 상기 조합물에 결합하기에 효과적인 조건하에서 접촉시키는 단계,

b) 상기 조합물 및 임의 결합된 표적을 표지된 검출 프로브와 접촉시키는 단계, 및

c) 상기 검출 프로브를 검출하는 단계

를 포함하며, 여기서 상기 표적은 뉴클레아제 보호 단편이고, 상기 표지된 검출 프로브는 상향조절성 인광물질을 포함하는 것인, 하나 이상의 표적의 검출 방법.

청구항 7.

제6항에 있어서, 상기 조합물 및 임의 결합된 표적을 둘 이상의 상이한 표지된 검출 프로브와 접촉시키고, 표지된 프로브 각각은 상이한 상향조절성 인광물질을 포함하는 것인 방법.

청구항 8.

삭제

청구항 9.

제6항에 있어서, 상기 조합물 및 임의 결합된 표적을 둘 이상의 표지된 검출 프로브와 접촉시키고, 표지된 프로브 각각은 상이한 상향조절성 인광물질을 포함하는 것인 방법.

청구항 10.

a) 시료를 가하기에 앞서

i) 둘 이상이 실질적으로 동일한 다수의 공간적으로 분리된 영역을 포함하는 기판을 포함하고,

ii) 상기 영역 각각은 8개 이상의 상이한 올리고뉴클레오티드 앵커를 포함하며,

iii) 상기 올리고뉴클레오티드 앵커 각각에 결합된, 상기 올리고뉴클레오티드 앵커에 대해 특이적인 제1 부분 및 표적에 대해 특이적인 프로브를 포함하는 제2 부분을 갖는 이관능성 링커를 포함하는

조합물과, 상기 표적을 포함할 수 있는 시료를, 상기 표적이 상기 조합물에 결합하기에 효과적인 조건하에서 접촉시키는 단계,

b) 상기 조합물 및 임의 결합된 표적을, 상기 표적에 대해 특이적인 잔기, 및 상기 검출 링커와 상호작용하며 신호체를 포함하는 리포터 시약에 대해 특이적인 잔기를 포함하는 검출 링커와 접촉시키는 단계,

c) 상기 검출 링커를 상기 리포터 시약과 접촉시키는 단계, 및

d) 상기 신호체를 검출하는 단계

를 포함하고, 여기서 상기 표적은 뉴클레아제 보호 단편인, 하나 이상의 표적의 검출 방법.

청구항 11.

삭제

청구항 12.

제10항에 있어서,

b) 상기 조합물 및 임의 결합된 표적을, 상기 표적들 중 하나에 대해 특이적인 잔기 및 통상의 리포터 시약에 대해 특이적인 잔기를 각각 포함하는 둘 이상의 검출 링커와 접촉시키는 단계,

c) 상기 검출 링커를, 상기 검출 링커와 상호작용하며 신호체를 포함하는 상기 통상의 리포터 시약과 접촉시키는 단계, 및

d) 상기 신호체를 검출하는 단계

를 추가로 포함하는, 둘 이상의 표적의 검출 방법.

청구항 13.

제12항에 있어서, 상기 표적이 뉴클레아제 보호 단편인 방법.

청구항 14.

제12항에 있어서, 상기 신호체가 상향조절성 인광물질을 포함하는 것인 방법.

청구항 15.

a) RNA를 포함할 수 있는 시료를 상기 RNA에 대해 비특이적인 공통적인 3' 오버행 서열을 각각 포함하는 둘 이상의 보호 단편과, 보호 단편이 RNA에 혼성화되기에 효과적인 조건하에 인큐베이션하는 단계,

b) 상기 인큐베이션된 시료를, 상기 RNA에 혼성화된 상기 보호 단편의 일부 및, 임의로는, 혼성화된 상기 RNA의 일부 이외의 핵산을 절단하는 데 효과적인 하나 이상의 뉴클레아제로 처리하는 단계,

c) 상기 RNA에 혼성화된 상기 보호 단편 이외의 핵산 물질을 제거하여 보호 단편을 함유하는 시료를 제공하는 단계,

d) 시료를 가하기에 앞서

i) 둘 이상이 실질적으로 동일한 다수의 공간적으로 분리된 영역을 포함하는 기판을 포함하고,

ii) 상기 영역 각각은 8개 이상의 상이한 올리고뉴클레오티드 앵커를 포함하며,

iii) 상기 올리고뉴클레오티드 앵커 각각에 결합된, 상기 올리고뉴클레오티드 앵커에 대해 특이적인 제1 부분 및 하나 이상의 상기 보호 단편에 대해 특이적인 프로브를 포함하는 제2 부분을 갖는 이관능성 링커를 포함하는

조합물과, 상기 보호 단편을 함유하는 시료를, 상기 보호 단편이 상기 조합물에 결합하기에 효과적인 조건하에서 접촉시키는 단계,

e) 상기 조합물 및 임의 결합된 보호 단편을, 상기 보호 단편들 중의 하나에 대해 특이적인 잔기, 및 상기 공통적인 3' 오버행 서열에 대해 특이적인 잔기를 각각 포함하는 2개 이상의 검출 링커와 접촉시키는 단계,

f) 상기 검출 링커를, 통상의 리포터 시약에 특이적이고 신호체를 포함하는 리포터 시약과 접촉시키는 단계, 및

g) 상기 신호체를 검출하는 단계

를 포함하는, 2개 이상의 RNA의 검출 방법.

청구항 16.

제15항에 있어서, 상기 신호체가 상향조절성 인광물질을 포함하는 것인 방법.

청구항 17.

제15항에 있어서, 하나 이상의 상기 검출 링커를 블록킹된 검출 링커로 희석시키는 방법.

청구항 18.

a) 표적을 포함할 수 있는 시료를, 상기 표적에 특이적이고 이에 결합되는 뉴클레아제 보호 단편과 접촉시키고, 상기 시료를 잔류하는 단일가닥 핵산을 절단하기에 효과적인 뉴클레아제에 노출시킨 후,

시료를 가하기에 앞서

i) 둘 이상이 실질적으로 동일한 다수의 공간적으로 분리된 영역을 포함하는 기판을 포함하고,

ii) 상기 영역 각각은 2개 이상의 상이한 앵커를 포함하며,

iii) 상기 앵커 각각에 결합된, 상기 앵커에 대해 특이적인 제1 부분 및 상기 뉴클레아제 보호 단편에 대해 특이적인 프로브를 포함하는 제2 부분을 갖는 이관능성 링커를 포함하는 조합물과 상기에서 얻어진 시료를, 상기 뉴클레아제 보호 단편이 상기 조합물에 결합하기에 효과적인 조건하에서 접촉시키는 단계,

b) 상기 조합물 및 임의 결합된 뉴클레아제 보호 단편을, 상기 결합된 뉴클레아제 보호 단편들 중 하나에 대해 특이적인 제1 잔기 및 리포터 시약에 대해 특이적인 제2 잔기를 포함하는 하나 이상의 검출 링커와 접촉시키는 단계, 및

c) 상기 검출 링커를 검출하는 단계

를 포함하는, 하나 이상의 핵산 표적의 검출 방법.

청구항 19.

제18항에 있어서, 상기 리포터 시약은 상기 검출 링커와 상호작용하며 신호체를 포함하는 것이고,

d) 상기 검출 링커를 상기 리포터 시약과 접촉시키는 단계, 및

e) 상기 신호체를 검출하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 20.

제18항에 있어서, 상기 앵커가 올리고뉴클레오티드 앵커인 방법.

청구항 21.

a) 표적을 포함할 수 있는 시료를, 상기 표적에 특이적이고 이에 결합되는 뉴클레아제 보호 단편과 접촉시키고, 상기 시료를 잔류하는 단일가닥 핵산을 절단하기에 효과적인 뉴클레아제에 노출시킨 후,

시료를 가하기에 앞서

i) 둘 이상이 실질적으로 동일한 다수의 공간적으로 분리된 영역을 포함하는 기판을 포함하고,

ii) 상기 영역 각각은 2개 이상의 상이한 앵커를 포함하며,

iii) 상기 앵커 각각에 결합된, 상기 앵커에 대해 특이적인 제1 부분 및 상기 뉴클레아제 보호 단편들 중 하나에 대해 특이적인 프로브를 포함하는 제2 부분을 갖는 이관능성 링커를 포함하는 조합물과 상기에서 얻어진 시료를, 상기 뉴클레아제 보호 단편이 상기 조합물에 결합하기에 효과적인 조건하에서 접촉시키는 단계,

b) 상기 조합물 및 임의 결합된 뉴클레아제 보호 단편을, 상기 뉴클레아제 보호 단편들 중 하나에 대해 특이적인 제1 잔기 및 통상의 리포터 시약에 대해 특이적인 제2 잔기를 각각 포함하는 2개 이상의 검출 링커와 접촉시키는 단계, 및

c) 상기 검출 링커를 검출하는 단계

를 포함하는, 둘 이상의 핵산 표적의 검출 방법.

청구항 22.

제21항에 있어서, 상기 리포터 시약은 상기 검출 링커와 상호작용하며 신호체를 포함하는 것이고,

d) 상기 검출 링커를 상기 리포터 시약과 접촉시키는 단계, 및

e) 상기 신호체를 검출하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 23.

제21항에 있어서, 상기 앵커가 올리고뉴클레오티드 앵커인 방법.

청구항 24.

a) 보호 단편이 시료 중의 목적하는 핵산에 혼성화되기에 효과적인 조건하에, 시료를 목적하는 핵산에 대해 비특이적인 공통적인 3' 오버행 서열을 각각 포함하는 둘 이상의 보호 단편과 인큐베이션하는 단계,

b) 상기 인큐베이션된 시료를, 상기 목적하는 핵산에 혼성화된 상기 보호 단편의 일부 및, 임의로는, 혼성화된 상기 목적하는 핵산의 일부 이외의 핵산을 절단하는 데 효과적인 하나 이상의 뉴클레아제로 처리하는 단계,

c) 상기 목적하는 핵산에 혼성화된 상기 보호 단편 이외의 핵산 물질을 제거하여 보호 단편을 함유하는 시료를 제공하는 단계,

d) 시료를 가하기에 앞서

i) 둘 이상이 실질적으로 동일한 다수의 공간적으로 분리된 영역을 포함하는 기판을 포함하고,

ii) 상기 영역 각각은 2개 이상의 상이한 앵커를 포함하며,

iii) 상기 앵커 각각에 결합된, 상기 앵커에 대해 특이적인 제1 부분 및 상기 보호 단편들 중 하나에 대해 특이적인 프로브를 포함하는 제2 부분을 갖는 이관능성 링커를 포함하는

조합물과 상기 보호 단편을 함유하는 시료를, 상기 보호 단편이 상기 조합물에 결합하기에 효과적인 조건하에서 접촉시키는 단계, 및

e) 상기 조합물 및 임의 결합된 표적을, 상기 보호 단편들 중의 하나에 대해 특이적인 제1 잔기 및 상기 공통적인 3' 오버행 서열에 대해 특이적인 제2 잔기를 각각 포함하는 2개 이상의 검출 링커와 접촉시키는 단계

를 포함할 수 있는, 시료 중의 둘 이상의 목적하는 핵산 표적의 검출 방법.

청구항 25.

제24항에 있어서,

f) 상기 검출 링커를, 상기 공통적인 3' 오버행 서열에 대해 특이적이며 신호체를 포함하는 리포터 시약과 접촉시키는 단계, 및

g) 상기 신호체를 검출하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 26.

제24항에 있어서, 상기 앵커가 올리고뉴클레오티드 앵커인 방법.

청구항 27.

제26항에 있어서, 하나 이상의 검출 링커를 블록킹된 검출 링커로 희석시키는 방법.

청구항 28.

제23항에 있어서, 하나 이상의 상기 앵커가 수개의 이관능성 링커들과 결합되어 있고, 이들 링커 각각은 앵커에 대해 특이적인 제1 부분, 및 상이한 뉴클레아제 보호 단편에 대해 특이적인 프로브를 포함하는 제2 부분을 갖는 것인 방법.

청구항 29.

제18항에 있어서, 상기 앵커가 상이한 표적 특이성을 갖는 이관능성 링커로부터 분리되어 있는 것인 방법.

청구항 30.

제18항에 있어서, 상기 조합물이 다수의 상기 영역을 포함하며, 대량 처리 방법인 방법.

청구항 31.

a) 하나 이상의 표적에는 특이적이나 키트 중의 올리고뉴클레오티드 앵커에는 비특이적인 하나 이상의 뉴클레아제 보호 단편,

b) 둘 이상이 실질적으로 동일한 다수의 공간적으로 분리된, 둘 이상의 상이한 올리고뉴클레오티드 앵커를 각각 포함하는 영역을 포함하는 기판,

c) 하나 이상의 상기 올리고뉴클레오티드 앵커에 대해 특이적인 제1 부분 및 하나 이상의 상기 뉴클레아제 보호 단편에 대해 특이적이며 검출시 그에 결합하는 프로브를 포함하는 제2 부분을 갖는, 하나 이상의 이관능성 링커 분자를 포함하는 용기, 및

d) 상기 뉴클레아제 보호 단편들 중 하나에 대해 특이적인 제1 잔기 및 리포터 시약에 대해 특이적인 제2 잔기를 갖는 하나 이상의 검출 링커

를 포함하는, 시료 중 하나 이상의 핵산 표적의 검출에 유용한 키트.

청구항 32.

a) 하나 이상의 표적에는 특이적이나 키트 중의 다른 올리고뉴클레오티드에는 비특이적인 하나 이상의 뉴클레아제 보호 단편,

b) 올리고뉴클레오티드 앵커에 대해 특이적인 제1 부분, 및 하나 이상의 상기 뉴클레아제 보호 단편에 특이적이며 검출시 그에 결합하는 제2 부분을 갖는 하나 이상의 이관능성 링커, 및

c) 상기 뉴클레아제 보호 단편들 중 하나에 특이적인 제1 잔기 및 리포터 시약에 특이적인 제2 잔기를 갖는 하나 이상의 검출 링커

를 포함하는, 시료 중의 하나 이상의 핵산 표적의 검출에 유용한 키트.

청구항 33.

제18항에 있어서, 각 영역이 8개 이상의 상이한 앵커를 포함하는 것인 방법.

청구항 34.

제21항에 있어서, 각 영역이 8개 이상의 상이한 앵커를 포함하는 것인 방법.

청구항 35.

제24항에 있어서, 각 영역이 8개 이상의 상이한 앵커를 포함하는 것인 방법.

청구항 36.

a) 표적을 포함할 수 있는 시료를, 상기 표적에 특이적이고 이에 결합되는 뉴클레아제 보호 단편과 접촉시키고, 얻어진 생성물을 단일가닥 핵산을 절단하기에 효과적인 뉴클레아제에 노출시킨 후,

시료를 가하기에 앞서

i) 둘 이상이 실질적으로 동일한 다수의 공간적으로 분리된 영역을 포함하는 기판을 포함하고,

ii) 상기 영역 각각은 2개 이상의 상이한 앵커를 포함하며,

iii) 상기 앵커 각각에 결합된, 상기 앵커에 대해 특이적인 제1 부분 및 상기 뉴클레아제 보호 단편에 의해 보호된 상기 핵산 표적의 일부에 대해 특이적인 프로브를 포함하는 제2 부분을 갖는 이관능성 링커를 포함하는 조합물과 상기에서 얻어진 시료를, 상기 보호 단편이 상기 조합물에 결합하기에 효과적인 조건하에서 접촉시키는 단계,

b) 상기 조합물 및 임의 결합된 보호 부분을, 상기 결합된 보호 부분 중 하나에 대해 특이적인 제1 잔기, 및 리포터 시약에 특이적인 제2 잔기를 포함하는 하나 이상의 검출 링커와 접촉시키는 단계, 및

c) 상기 검출 링커를 검출하는 단계

를 포함하는, 하나 이상의 핵산 표적의 검출 방법.

청구항 37.

제36항에 있어서, 상기 리포터 시약은 상기 검출 링커와 상호작용하며 신호체를 포함하는 것이고,

d) 상기 검출 링커를 상기 리포터 시약과 접촉시키는 단계, 및

e) 상기 신호체를 검출하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 38.

제36항에 있어서, 각 영역이 8개 이상의 상이한 앵커를 포함하는 것인 방법.

청구항 39.

a) 시료를 가하기에 앞서

i) 둘 이상이 실질적으로 동일한 다수의 공간적으로 분리된 영역을 포함하는 기판을 포함하고,

ii) 상기 영역 각각은 2개 이상의 상이한 앵커의 로커스를 포함하며,

iii) 상기 각각의 로커스의 앵커 각각에 결합된, 상기 앵커에 대해 특이적인 제1 부분 및 표적에 대해 특이적인 프로브를 포함하는 제2 부분을 갖는 이관능성 링커를 포함하는

조합물과 상기 표적을 포함할 수 있는 시료를, 상기 표적이 상기 조합물에 결합하기에 효과적인 조건하에서 접촉시키는 단계를 포함하고,

상기 영역의 하나 이상의 로커스에 위치한 둘 이상의 앵커는 상이한 표적 특이성을 갖는 상이한 이관능성 링커에 결합된 것인, 하나 이상의 표적의 검출 방법.

청구항 40.

제39항에 있어서,

b) 상기 조합물 및 임의 결합된 표적을, 상기 결합된 표적들 중 하나에 대해 특이적인 제1 잔기 및 리포터 시약에 대해 특이적인 제2 잔기를 포함하는 하나 이상의 검출 링커와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 41.

제39항 또는 제40항에 있어서,

c) 상기 조합물 및 임의 결합된 표적을 하나 이상의 검출 프로브와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 42.

제41항에 있어서, 제1 검출 프로브는 제1 로커스에서 조합물과 결합된 제1 표적에 결합되고, 제2 검출 프로브는 동일한 로커스에서 조합물과 결합된 제2 표적에 결합되며, 제1 및 제2 검출 프로브가 동시 또는 순차적으로 검출되는 방법.

청구항 43.

제39항에 있어서, 상기 표적이 목적하는 핵산에 대해 특이적인 뉴클레아제 보호 단편인 방법.

청구항 44.

제40항에 있어서, 상기 표적이 목적하는 핵산에 대해 특이적인 뉴클레아제 보호 단편인 방법.

청구항 45.

제42항에 있어서, 상기 표적이 목적하는 핵산에 대해 특이적인 뉴클레아제 보호 단편인 방법.

청구항 46.

제39항에 있어서, 각 영역이 8개 이상의 상이한 앵커를 포함하는 것인 방법.

청구항 47.

제31항에 있어서, 각 영역이 8개 이상의 상이한 앵커를 포함하는 것인 키트.

청구항 48.

제31항에 있어서, e) 단일가닥 핵산 및(또는) DNA/RNA 이중나선 중 RNA 가닥을 절단하는 데 효과적인 하나 이상의 뉴클레아제를 추가로 포함하는 키트.

청구항 49.

a) 표적에는 특이적이나 키트 중의 올리고뉴클레오티드 앵커에는 비특이적인 하나 이상의 뉴클레아제 보호 단편,

b) 둘 이상이 실질적으로 동일한 다수의 공간적으로 분리된, 둘 이상의 상이한 올리고뉴클레오티드 앵커를 각각 포함하는 영역을 포함하는 기판,

c) 하나 이상의 상기 올리고뉴클레오티드 앵커에 대해 특이적인 제1 부분 및 하나 이상의 상기 뉴클레아제 보호 단편에 대해 특이적이며 검출시 그에 결합되는 프로브를 포함하는 제2 부분을 갖는, 하나 이상의 이관능성 링커 분자를 포함하는 용기,

d) 상기 뉴클레아제 보호 단편들 중 하나에 대해 특이적인 제1 잔기 및 리포터 시약에 대해 특이적인 제2 잔기를 갖는 하나 이상의 검출 링커, 및

e) 단일가닥 핵산 및/또는 DNA/RNA 이중나선 중 RNA 가닥을 절단하는 데 효과적인 하나 이상의 뉴클레아제

를 포함하는, 하나 이상의 핵산 표적의 검출에 유용한 키트.

청구항 50.

제40항에 있어서, 하나 이상의 검출 링커를 블록킹된 검출 링커로 희석시키는 방법.

청구항 51.

제44항에 있어서, 하나 이상의 검출 링커를 블록킹된 검출 링커로 희석시키는 방법.

청구항 52.

제45항에 있어서, 하나 이상의 검출 링커를 블록킹된 검출 링커로 희석시키는 방법.

청구항 53.

a) 표적을 포함할 수 있는 시료를, 상기 표적에 특이적이고 이에 결합되는 뉴클레아제 보호 단편과 접촉시키고, 상기 시료를 잔류하는 단일가닥 핵산을 절단하기에 효과적인 뉴클레아제에 노출시킨 후,

i) 둘 이상이 실질적으로 동일한 다수의 공간적으로 분리된 영역을 포함하는 기판을 포함하고,

ii) 상기 영역 각각은 2개 이상의 상이한 앵커의 로커스를 포함하며,

iii) 상기 각각의 로커스의 앵커 각각에 결합된, 상기 앵커에 대해 특이적인 제1 부분 및 상기 뉴클레아제 보호 단편에 대해 특이적인 프로브를 포함하는 제2 부분을 갖는 이관능성 링커를 포함하는 조합물과 상기에서 얻어진 시료를, 상기 뉴클레아제 보호 단편이 상기 조합물에 결합하기에 효과적인 조건하에서 접촉시키는 단계, 및

b) 상기 검출 링커를 검출하는 단계

를 포함하고, 상기 영역의 제1 로커스에 위치한 둘 이상의 앵커는 상이한 표적 특이성을 갖는 상이한 이관능성 링커에 결합된 것인,

하나 이상의 핵산 표적의 검출 방법.

청구항 54.

제53항에 있어서, 상기 결합된 보호 단편을 특이적인 검출 링커 및/또는 검출 프로브와 혼성화하여, 상기 핵산 각각에 상응하는 신호를 생성하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 55.

제54항에 있어서, 상기 시료 내에서 하나의 표적이 제2 표적보다 훨씬 많이 존재하고, 상기 제1 및 제2 로커스에서의 상이한 이관능성 링커의 수는 상기 제1 및 제2 표적에 상응하는 신호를 미세 조절(fine tune)하고(하거나), 블록킹된 검출 링커를 사용하여 상기 신호를 미세 조절하도록 조정된 것인 방법.

청구항 56.

제53항에 있어서,

a) 상기 조합물 및 임의 결합된 뉴클레아제 보호 단편을, 상기 결합된 뉴클레아제 보호 단편들 중 하나에 대해 특이적인 제1 잔기 및 리포터 시약에 대해 특이적인 제2 잔기를 포함하는 하나 이상의 검출 링커와 혼성화하는 단계,

b) 상기 검출 링커를, 신호체를 포함하는 상기 리포터 시약과 접촉시키는 단계, 및

c) 상기 신호체를 검출하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 57.

제56항에 있어서, 제1 검출 프로브는 제1 로커스에서 결합된 제1 뉴클레아제 보호 단편에 결합되고, 제2 검출 프로브는 동일한 로커스에서 결합된 제2 뉴클레아제 보호 단편에 결합되며, 제1 및 제2 검출 링커가 동시 또는 순차적으로 검출되는 방법.

청구항 58.

제39항에 있어서, 상기 영역이 튜브이고, 상기 앵커의 로커스가 상기 튜브 내에 선형 어레이로 배열된 것인 방법.

청구항 59.

제53항에 있어서, 상기 영역이 튜브이고, 상기 앵커의 로커스가 상기 튜브 내에 선형 어레이로 배열된 것인 방법.

청구항 60.

제39항에 있어서, 상기 표적들 중 하나 이상이 DNA 분자이고, 상기 표적들 중 하나 이상이 RNA 분자인 방법.

청구항 61.

제53항에 있어서, 상기 뉴클레아제 보호 단편들 중 하나 이상이 DNA 분자에 대해 특이적이고, 상기 뉴클레아제 보호 단편들 중 하나 이상이 RNA 분자에 대해 특이적인 방법.

청구항 62.

제53항에 있어서, 상기 시료를 상기 조합물과 접촉시키기 전에 표적인 보호 단편이 PCR에 의해 증폭되는 것인 방법.

청구항 63.

제62항에 있어서, 상기 표적이 2 개의 PCR 프라이머를 사용하는 PCR에 의해 증폭되고, 이들 프라이머 각각 또는 둘다는 프라이머를 고체 기판에 부착시킬 수 있는 화학적 변형을 포함하는 것인 방법.

청구항 64.

제39항 또는 제53항에 있어서, 상기 조합물 및 임의 결합된 표적을 표지된 검출 프로브와 접촉시키는 단계, 및 상기 검출 프로브를 검출하는 단계를 포함하고, 상기 표지된 검출 프로브는 상향조절성 인광물질을 포함하는 것인 방법.

청구항 65.

제44항 또는 제54항에 있어서, 상기 조합물 및 임의 결합된 표적을, 상기 호보 단편들 중 하나에 대해 특이적인 잔기 및 상기 표적에 대해 비특이적인 상기 보호 단편들 상의 공통적인 3' 오버행 서열에 대해 특이적인 잔기를 각각 포함하는 둘 이상의 검출 링커와 접촉시키는 단계,

상기 검출 링커를, 상기 공통적인 서열에 대해 특이적이며 신호체를 포함하는 리포터 시약과 접촉시키는 단계, 및

상기 신호체를 검출하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 66.

제53항에 있어서, 상기 조합물이 다수의 상기 영역을 포함하며, 대량 처리 방법인 방법.

청구항 67.

제53항에 있어서, 각 영역이 8개 이상의 상이한 앵커를 포함하는 것인 방법.

명세서

기술분야

본 출원은 미국출원 시리얼 번호 09/218,166 (1998.12.22 출원)의 C.I.P. 출원이며, 상기 출원의 전체 내용은 본 발명에 참고로 포함되어 있다. 본 출원은 가출원 60/068,291 (1997.12.19 출원) 및 미국출원 시리얼 번호 09/109,076 (1998.7.2 출원)을 우선권 주장하며, 상기 각 출원의 전체 내용은 본 발명에 참고로 포함되어 있다.

배경기술

본 발명은, 예컨대, 프로브의 반복된 배열(array)를 이용하여 다수의 생물학적 또는 화학적 분석을 동시에 실행하기에 유용한 조성물, 기구 및 방법에 관한 것이다. 다수의 영역은 각각 일반적 앵커(anchor)분자를 포함한다. 이 앵커는 이관능성 링커 분자와 결합되어 있으며, 각각은 하나 이상의 앵커에 대해 특이적인 부분 및 목적하는 표적에 대해 특이적인 프로브인 부분을 포함한다. 생성된 프로브의 배열은 프로브와 특이적으로 상호작용하는 하나 이상의 표적 분자의 존재를 분석하기 위하여 사용한다. 본 발명은 약제 개발, 분자 생물학, 생화학, 약리학 및 의약 진단 기술을 포함하나, 이에만 국한되지 않는, 분자 상호작용의 성질을 특징으로 하는 다양한 분야에 관한 것이다.

기판(surface) 또는 "칩" 상에 배열된 다수의 분자 프로브가 다양한 생물학적 및 화학적 분석에서 사용되어 왔다. 이런 분석은 목적하는 표적 분자가 어느 프로브와 상호작용하는지 측정하기 위하여 실행한다. 선별된 시험 조건하에서 표적 분자에 프로브를 노출시킨 후, 검출 장치로 표적 분자가 주어진 프로브와 상호작용하였는지 측정한다.

이러한 시스템은 프로브 또는 표적 분자에 관한 정보를 얻기 위한 다양한 스크리닝 방법에서 유용하다. 예컨대, 이것은, 다른 것들 중, 목적하는 수용체에 결합하는 펩티드 또는 잠재적 약제의 스크리닝; 예컨대, 많은 다른 것들 중, 유전적 돌연변이, 집단내 대립 변이체, 또는 특정 병원체 또는 병원체의 균주의 존재에 대한 시료의 스크리닝; 유전자 발현의 연구, 예컨대, 발현이 특정 생리학적 조건, 발전단계, 또는 질병 상태 등과 관련된 mRNA의 동정을 위하여 사용되어 왔다.

발명의 요약

본 발명은 다수의 생물학적 또는 화학적 분석을 동시에 실행하기 위한 조성물, 기구 및 방법을 제공하고, 다수의 시료-예컨대, 진단 분석에서 스크리닝하여야 하는 다수의 환자 시료, 또는 약제 개발의 방법에서 시험하여야 하는 다수의 잠재적 약제 또는 치료제의 대량 처리량의 분석을 가능케한다. 시료에서 하나 이상의 표적의 검출에 유용한 조합물(combination)이 제공된다. 이러한 조합물은 테스트영역으로 부를 수 있고, 웰일 수 있으며, 이의 적어도 둘은 실질적으로 동일한 다수의 공간적으로 분리된 영역으로 구성된 기판을 포함한다. 각 기판은 이러한 실질적으로 동일한 영역의 2 개 이상, 바람직하게는 적어도 20 개 이상, 예컨대, 적어도 약 25, 50, 96, 864 또는 1536 개 등으로 구성된다. 각각의 테스트 영역에는 하나 이상의 표적을 포함하는(또는 잠재적으로 포함하는) 시료의 도입을 위한 공간이 한정되어 있고, 생물학적 또는 화학적 배열(array)을 포함한다.("표적을 포함하는 시료" 또는 "시료내에서 표적의 검출"과 같은 문구는 표적이 포함되어 있지 않거나 검출되지 않는 측정(검출 시도) 또는 시료를 배제함을 의미하는 것은 아니다. 통상적인 의미에서, 본 발명은 표적이 검출되는 지에 대해 무관하게 표적이 시료내에 포함되어 있는지에 대해 측정하기 위한 배열을 수반한다). 이 배열은 각각의 앵커는, 앵커에 특이적인 제1 부분 및 표적의 하나 이상에 대해 특이적인 프로브를 포함하는 제2 부분을 갖는 이관능성 링커 분자와 결합된, 일반적 "앵커"를 포함한다. 본 발명의 조합물은, 선택적으로 검출 분자와 반응하는 하나 이상의 표적을 포함하는 시료와 접촉시킨후, 테스트영역에서 표적 분자와 프로브사이의 반응을 검출하는 검출장치로 확인한다. 이에 따라 검출결과가 얻어진다.

본 발명은 대량 처리 생물학적 분석에 특히 유용한 방법 및 조성물을 제공한다. 특히 바람직하는 구현예로서, 본 발명은 약제 개발을 위한 대량 처리 스크리닝에 사용될 수 있다. 예컨대, 대량 처리 분석은 한번에 많은 (예컨대 100) 96-웰 마이크로플레이트에서 실시할 수 있다. 플레이트의 각 웰은 약 36 앵커 및 링커 쌍의 배열을 이용함으로써 웰내에서 36 가지의 상이한 시험을 수행할 수 있다. 즉, 플레이트당 96 웰을 갖는 100 개의 플레이트 및 각각 웰당 36 개의 시험으로 총 345,000 시험이 가능하며; 예컨대, 9,600 개의 상이한 후보약제의 각각을 36 개의 상이한 변수 또는 분석에 대하여 동시에 시험할 수 있다. 대량 처리 분석은 한번에 단지 하나의 변수에 대하여 시험하는 분석보다 각각의 후보 약제에 대해 더 많은 정보를 제공한다. 예컨대, 한번의 초기 대량 처리 스크리닝 분석에서, 후보 약제가 선택적, 특이적 및(또는) 비독성인지의 여부를 결정하는 것이 가능하다. 높지 않은 처리량의 방법은 목적하는 각각의 후보 약제에 대한 변수를 시험하기위해 광범위한 후속 분석을 필요로하게 된다. 여러 유형의 대량 처리 스크리닝 분석이, 예컨대, 실시예 15-17 에 기재되어 있다. 광범위한 생물학적 분석을 동시에 수행하고, 한번에 매우 많은 분석(즉, 매우 대량 처리량)을 실시하는 능력은 본 발명의 두가지 중요한 장점이다.

예컨대, 아미노산 또는 변형된 올리고뉴클레오티드와 같은 일차 아민의 부착을 위해 유도된 표면을 갖는 폴리스티렌으로 만들어진 96-웰 DNA Bind 플레이트 (Corning Costar)를 이용한 한 구현예로서, 36 개의 상이한 올리고뉴클레오티드의 수집물을 앵커로 작용하는 모든 플레이트의 모든 웰의 표면상에 넣을 수 있다. 이 앵커는 유도된 폴리스티렌에 공유결합할 수 있고, 동일한 36 개의 앵커를 모든 스크리닝 분석에 대하여 사용할 수 있다. 임의의 특정 분석을 위해서는, 주어진 세트의 링커를 이용하여 각 웰의 표면을 목적하는 36 개의 상이한 표적 또는 분석 유형에 특이적이도록 프로그램화할 수 있고, 상이한 시험 시료는 각 플레이트내 96 웰의 각각에 적용할 수 있다. 동일한 세트의 앵커를 여러번 사용하여 목적하는 다른 표적 및 분석을 위해 웰의 표면을 재프로그램화시킬 수 있거나, 또는 동일한 세트의 링커와 함께 여러번 재사용할 수 있다. 이러한 유연성 및 재생성은 본 발명의 추가의 장점이다.

본 발명의 하나의 구현예는

a) 둘 이상이 실질적으로 동일한 다수의 공간적으로 분리된 영역을 포함하는 기판과,

b) 상기 영역에 포함된 8개 이상의 상이한 올리고뉴클레오티드 앵커와,

c) 상기 올리고뉴클레오티드 앵커 각각에 결합된, 상기 올리고뉴클레오티드 앵커에 특이적인 제1 부분과 표적(들)에 특이적인 프로브를 포함하는 제 2부분을 갖는 이관능성 링커를

시료를 첨가하기 이전에 포함하는,

시료 중의 하나 이상의 표적(들)을 검출하는 데 유용한 조합물이다.

본 발명의 또 다른 구현예는 a) 둘 이상이 실질적으로 동일한 다수의 공간적으로 분리된 영역을 포함하는 기판과,

b) 상기 영역에 포함된 8개 이상의 상이한 앵커와,

c) 상기 앵커 각각에 결합된, 상기 앵커에 특이적인 제1 부분과 표적(들)에 특이적인 프로브를 포함하는 제2 부분을 갖는 이관능성 링커를

시료를 첨가하기 이전에 포함하는,

시료 중의 하나 이상의 표적(들)을 검출하는 데 유용한 조합물이다.

본 발명의 또 다른 구현예는 표적을 상기 조합물에 결합시키기에 효과적인 조건하에서, 그 표적이 포함되어 있을 수 있는 시료를 상기 조합물과 접촉시키는 것을 포함하는, 하나 이상의 표적을 검출하는 방법이다. 또 다른 구현예는 적어도 2 개 이상의 RNA 분자를 표적으로 포함하는 시료와 함께, 조합물의 하나 이상의 프로브는 RNA 표적의 하나 이상에 대해 특이적인(즉, 선택적인) 핵산(예컨대, 올리고뉴클레오티드)인 전술한 바와 같은 조합물을, RNA 표적의 프로브로의 특이적 혼성화에 효과적인 조건하에서, 인큐베이션하는 것을 포함하는 RNA 발현 패턴의 측정방법이다. 또 하나의 구현예는, RNA 발현 패턴을 측정하는 전술한 방법인, RNA 발현 패턴을 조절하는 작용제 (또는 조건)의 존재하에서 생성된 RNA 발현 패턴과 상이한 일련의 조건하에서 생성된 RNA 발현 패턴을 비교하는 것을 더 포함하는 방법이다.

예로서, 도 1 및 도 2 에는 본 발명의 조합물 및 이를 이용하여 mRNA 표적을 검출하는 방법을 나타내었다. 도 2 에 나타낸 본 발명의 기판은 15 개의 동일한 테스트영역을 포함하고; 본 발명의 특히 바람직한 구현예로서, 이러한 테스트영역의 각각은 마이크로타이터 플레이트내 웰이다. 테스트영역의 각각은, 여기에서 번호 1-6 으로 나타낸 6 개의 상이한 앵커를 포함한다. 도 1 은 이러한 앵커들중 하나인, 본 발명의 가장 바람직한 구현예에 있어서, 올리고뉴클레오티드인 앵커 1 을 도식적으로 보여준다. 앵커 1에 부착된 링커 분자, 링커 1은 두 부분으로 구성된다. 앵커에 특이적인 제1 부분은 본 설명에서는 앵커에 특이적으로 혼성화될 수 있는 올리고뉴클레오티드이다. 목적하는 표적-여기에서는, 표적 mRNA 1-에 특이적인 프로브인 제2 부분은 본 설명에서는 상기 표적에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드이다. 비록 상기 도면에서는 나타내지는 않았지만, 나머지 5 개의 앵커의 각각도 앵커-특이적 부분을 통해 그 자신의 링커에 혼성화될 수 있고, 각각의 링커는, 예컨대, mRNA1와 상이한(또는 동일한) mRNA에 특이적인 프로브 부분을 포함할 수 있다. 이렇게 설명된 조합물은 mRNA 1의 존재에 대하여 (또는,동시에, 분석에서 다른 5 개의 프로브에의해 특정화된 (또는 프로그램된) mRNA 표적에 대하여) 동시에 15 개의 상이한 시료를 분석하는 데 사용할 수 있다. 분석을 실시하기 위해서는, 본 예에서 15 개의 독립적인 세포주들 중 하나로부터 유래한 RNA 추출물일 수 있는 각각의 시료를 상기 영역 또는 웰중 하나에 소량으로 첨가한 후, 프로브 및 표적의 혼성화에 효과적인 조건하에서 인큐베이션시킨다. mRNA 1 이 시료내 존재하는지에 대해 측정하기 위해서는, 패턴을 인식하고(거나) 각 영역내에서 시그널의 존재에 대한 특이적 위치를 확인할 수 검출장치를 사용한다. 만일 세포주를 이들의 mRNA 가 표지로 생체내에서 표식된 조건하에서 인큐베이션시키고, mRNA 1 이 시료내 존재하면, 검출기는 앵커/프로브 복합체 1 에 의해 한정된 위치에서 표식된 mRNA 로부터 발생되는 시그널을 검출할 것이다. 이와는 달리, mRNA 는 영역(웰)에 첨가되기 전 또는 후에, 시험관에서 직접적으로 표식될 수 있다. 이와는 달리, 도 1에서 설명한 바와 같이, mRNA는 프로브에 혼성화되기 전 또는 후에, 예컨대, RNA와 함께 프로브에 의해 인식되는 서열이외의 서열에 상보적인 표식된 "검출(detector)" 올리고뉴클레오티드(표적-특이적 리포터 올리고뉴클레오티드)을 인큐베이션시켜 간접적으로 표식시킬 수 있다. 설명된 예에서, 15 개의 시료를 동시에 분석할 수 있다. 20 개이상, 예컨대, 1536 개 이상의 시료를 본 발명으로 동시에 분석할 수 있기 때문에, 이것은 매우 대량 처리량의 분석 시스템이다.

여기에서 사용하는 바와 같은, "표적"이란 용어는 그의 존재, 활성 및(또는) 양을 측정하고자 하며, 주어진 프로브에 대해 친화성을 갖는 물질을 의미한다. 표적은 합성 또는 천연발생 물질일 수 있다. 또한, 이것은 이의 비변형 상태 또는 다른 종과의 집합체로서 사용될 수 있다. 표적은 직접적으로 또는 특이적 결합 물질을 통해, 결합원에 부착, 공유결합 또는 비공유결합될 수 있다. 본 발명에서 사용될 수 있는 표적의 예에는, 이에만 국한되지 않지만 수용체(비클, 지질, 세포막상의 또는 다양한 다른 수용체); 특이적 수용체에 결합하는 리간드, 아고니스트 또는 안타고니스트; 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 및 특이적 항원성 결정인자(예컨대 바이러스, 세포 또는 기타 물질)와 반응하는 항혈청; 약제 ; 핵산 또는 폴리뉴클레오티드 (mRNA, tRNA, rRNA, 올리고뉴클레오티드, DNA, 바이러스 RNA 또는 DNA, EST, cDNA, DNA 또는 RNA 유래의 PCR-증폭 산물, 및 이의 돌연변이, 변이체 또는 변형체); 단백질 (신경전달물질을 절단하는 데 관여하는 효소, 프로테아제, 키나아제 등과 같은 효소포함); 효소에 대한 기질; 펩티드; 보조인자; 렉틴; 당; 폴리사카라이드;세포 (세포 표면 항원을 포함할 수 있음); 세포막; 세포기관; 등 및 복합된, 공유결합으로 가교된 등의 형태로 존재할 수 있는 기타 이러한 분자 또는 다른 물질이 포함된다. 여기에서 사용하는 바와 같은, 핵산, 폴리뉴클레오티드, 다핵산 및 올리고뉴클레오티드의 용어는 교체가능하다. 표적은 또한 항-프로브로 칭할 수 있다.

여기에서 사용하는 바와 같은, "프로브"는 특정 표적에 의해 특이적으로 인식될 수 있는 물질, 예컨대, 분자이다. 잠재적 프로브/표적 또는 표적/프로브 결합 파트너의 유형에는 수용체/리간드; 리간드/항리간드; DNA/DNA, DNA/RNA, PNA(펩티드 핵산)/핵산을 포함한, 핵산(폴리뉴클레오티드)상호작용; 효소, 기타 촉매, 또는 기질, 소형분자 또는 주효인자 분자를 갖는 기타 물질; 등이 포함된다. 본 발명에서 고려되는 프로브의 예에는, 이에만 국한되지 않지만 금속,킬레이트화제, 또는 금속, 플라스틱, 세포막 수용체에 대한 아고니스트 및 안타고니스트, 톡신 및 독액, 바이러스 에피토프, 호르몬(예컨대, 오피오이드 펩티드, 스테로이드,등), 호르몬 수용체, 지질(인지질포함), 펩티드, 효소(예컨대 프로테아제 또는 키나아제), 효소 기질, 보조인자, 약제, 렉틴, 당, 핵산(올리고뉴클레오티드, DNA, RNA, PNA 또는 변형된 또는 치환된 핵산), 올리고사카라이드, 단백질, 효소, 폴리클로날 및 모노클로날 항체, 단일쇄 항체, 또는 이의 단편과 특이적으로 상호작용할 수 있는 다른 화합물을 포함한, 유기 및 무기 물질 또는 중합체가 포함된다. 프로브 중합체는 선형 또는 환형일 수 있다. 프로브는 특성적인 활성 또는 특성적인 결합에 의해, 포스포릴화 및 비포스포릴화 단백질 사이를 구별할 수 있다. 렉틴과 같은 프로브는 글리코실화 단백질들 사이를 구별할 수 있다. 여기에서 사용하는 바와 같은, 용어 핵산, 폴리뉴클레오티드, 다핵산 및 올리고뉴클레오티드는 대체가능하다. "프로브"로 전술한 물질중 임의의 것이 또한 "표적"으로 소용될 수 있고, 그 역도 성립된다.

임의의 상용성 기판이 본 발명과 함께 사용될 수 있다. 기판(통상적으로 고체)는, 단지 예로서, 폴리프로필렌 또는 폴리스티렌과 같은 플라스틱; 세라믹; 실리콘; (융합된)실리카, 석영 또는 유리 (예컨대, 이는 유리 현미경 슬라이드 또는 유리 커버 슬립의 두께를 가질 수 있다); 여과지와 같은 종이; 디아조화 셀룰로오스; 니트로셀룰로오스 필터; 나일론막; 또는 폴리아크릴아미드 또는 다른 유형의 겔 패드, 예컨대 여러가지 보편적이고 통상적인 임의의 방법으로 습윤 겔을 건조시킴으로써 제조되는, 예컨대 필름을 비롯한 고다공성 고체인, 에어로겔로 제조된 에어로패드 또는 에어로비드를 포함한 임의의 다양한 유기 또는 무기물질 또는 이의 배합물 중의 어느 것일 수 있다. 빛에 투명한 기재가 분석을 실시하는 방법에 광학검출이 수반되는 경우 유용하다. 바람직한 구현예로서, 기판은 멀티웰, 예컨대, 조직배양디쉬, 예컨대, 24-,96-256-,384-,864 또는1536-웰 플레이트 (예컨대, Corning Costar DNA Bind 플레이트와같은 변형된 플레이트)의 플라스틱 기판이다. 앵커는 기판과 직접적으로, 예컨대, 결합되거나, 또는 기판의 한 유형, 예컨대, 유리와 연결된 후, 다시, 예컨대, 마이크로타이터 디쉬의 플라스틱 "웰" 내에서 2 차 기판과 연결될 수 있다. 기판의 형태는 중요하지 않다. 이것은, 예컨대, 정방형, 직사각형 또는 원형과 같은 편평한 기판;곡면 기판;또는 비드, 입자, 줄, 침전물, 튜브, 구체와 같은 삼차원 기판; 등일 수 있다.

기판은 공간적으로 분리되고 검증가능한 또는 확인가능한 영역을 포함한다. 각 영역은 일단의 앵커를 포함한다. 영역이 어떻게 분리되고, 이들의 물성, 및 이들의 상호간의 상대적 배향은 중요하지 않다. 한 구현예로서, 영역은 액체의 통과를 막을 수 있는 임의의 물리적 장벽에 의해 상호간 분리될 수 있다. 예컨대, 바람직한 구현예로서, 영역은 멀티웰(예컨대, 조직배양)디쉬의 웰, 예컨대, 24-, 96-, 256-, 384-, 864- 또는 1536-웰 플레이트일 수 있다. 이와는 달리, 유리 기판과 같은 기판은 식각시켜, 예컨대, 864 또는 1536 개의 별개의 얕은 웰을 갖도록 할 수 있다. 이와는 달리, 기판은 구획 또는 웰이 없는 영역, 예컨대, 편평한 기판, 예컨대, 플라스틱, 유리 또는 종이조각을 포함하고, 각각의 영역은 추가로 분리된 영역의 윤곽이 그려진 구조물(예컨대, 플라스틱 또는 종이조각) 을 덮어서 한정시킬 수 있다. 임의적으로, 기판은 각각의 영역의 윤곽을 그리기 전에, 미리 앵커 또는 링커와 연결된 앵커의 하나 이상의 배열을 포함할 수 있다. 또 하나의 구현예로서, 각 영역내 앵커의 배열은 앵커가 없는 기판상의 빈 공간에 의해, 또는 화학적 경계, 예컨대, 왁스 또는 실리콘으로 상호간 분리되어 적하물(droplet)이 번지는 것은 방지시킬 수 있다. 또 하나의 구현예로서, 영역은, 예컨대, Beattie et al(1995) .Chn.Chem. 4, 700-706에 개시되어 있는 바와 같은, 플로우-쓰로우(flow-through)분석용으로 고안된, 유체 조절 채널 또는 튜브로서 한정시킬 수 있다. 튜브는 임의 크기, 예를 들어 모세관 또는 보다 넓은 천공된 튜브일 수 있으며; 액체를 흘려보낼 수 있거나; 또는 부분적으로 또는 완전히 에어로즈 또는 폴리아크릴아미드 등의 겔로 충전될 수 있으며, 이를 통해 전기영동에 의해 화합물이 전달(패스 쓰로우, 플로우 쓰로우, 펌프 쓰로우)될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 튜브는 겔로 충전되고, 이 겔은 앵커의 결합을 위해 활성화되며, 다른 앵커들이 순차적으로 패스 쓰로우하여 겔 내에서 앵커의 선형 배열을 형성하도록 하고, 링커, 표적 등은 연속적으로 패스 쓰로우한다. 기판내 또는 상의 영역은 또한 기판자체를 변형시켜 한정시킬 수 있다. 예컨대, 플라스틱 기판은, 예컨대, 특정 유형의 중합체 (예, PEG 는 폴리스티렌 표면에 부착시킨후, 카르복실 또는 아미노기, 이중결합, 알데히드 등으로 유도시킨다)의 첨가를 위한 부위로서 소용될 수 있는, 변형된 또는 유도된 플라스틱으로 만들어진 부분을 포함할 수 있다. 이와는 달리, 플라스틱 기판은 앵커의 첨가를 위한 플레포옴으로 소용될 수 있는, 돌출부 또는 융기와 같은 성형된 구조물을 포함할 수 있다. 또다른 구현예에서, 영역은 겔 패드, 예컨대 폴리아크릴아미드 겔 패드 또는 에어로패드일 수 있으며, 이들은 유리 등의 기판 상에 원하는 패턴으로 배열되거나 유리와 석영 플레이트와 같은 두 기판 사이에 삽입된다. 앵커, 링커 등은 이러한 패드의 기판 상에 고정될 수 있거나 이들 사이에 끼워져 있을 수 있다. 기판 상의 겔 패드의 다양한 기타 배열도 당 분야의 숙련자에게 명백하며, 보편적이고 통상적인 방법으로 제조할 수 있다. 테스트영역의 상대적 배향은, 정방형 또는 직사각형 또는 기타 기판내 평행 또는 수직 배열, 원형 또는 다른 기판내 방사형 배열 또는 선형 배열 등을 포함하나 이에만 국한되지 않는 다양한 형태중 임의의 것을 취할 수 있다.

본 발명의 공간적으로 분리된 영역은 다수의 카피로 존재한다. 즉, 2 개 이상, 바람직하게는 20 개이상, 적어도 약 24, 50, 96, 256, 384, 864, 1536, 2025 개 이상 등의 실질적으로 동일한 공간적으로 분리된 영역이 존재한다. 반복된 영역의 수의 증가는 더욱 더 대량 처리량의 분석을 가능케한다. 여기에서 사용하는 것과 같은, 실질적으로 동일한 영역은 동일한 또는 실질적으로 동일한 앵커 및(또는) 앵커/링커 복합체의 배열을 포함하는 영역을 의미한다.

여기에서 사용하는 것과 같은, "실질적으로 동일한"의 의미는 배열 또는 영역이 본 발명에 따라 표적의 분석에서 다른 배열 또는 영역과 본질적으로 동일한 기능을 하도록 고안된 것을 의미한다. 기능, 즉, 표적의 검출성에 본질적으로 영향을 미치지 않는 차이점은 분석의 정확성에서 표적 측정 결과에 현저히 영향을 미치지 않는, 소형 뉴클레오티드 불완전함(결실/삽입체/치환) 또는 올리고 불완전함(불량한 기판 결합)등과 동일선상에 있다.

물론, 당분야의 숙련자는 기판상의 모든 영역이 상호간에 실질적으로 동일하여야 할 필요가 없음을 인정할 것이다. 예컨대, 만일 2 개의 상이한 세트의 배열을 평행하여 시험하고자 하면, 단일 기판상에 양 세트의 배열을 포함시키는 것이 이로울 것이다. 예컨대, 2 개의 상이한 세트의 배열은 엇갈리는 줄무늬 패턴으로 정렬시켜, 이들간의 비교를 용이하게 할 수 있다. 또 하나의 구현예로서, 실시자는 기판상에서 다른 영역과 구별할 수 있는 방식으로 검출될 수 있는 하나 이상의 영역을 포함시키기를 원할 수 있어, "지시(registration) 영역"으로 사용할 수 있다. 예컨대, 지시 영역은 기판상에서 영역의 위치를 정렬시키기 위한 "출발점"으로서 스캐닝 검출장치에 의해 인식될 수 있는 형광분자의 뚜렷한 패턴을 나타내는 올리고뉴클레오티드 또는 펩티드를 포함할 수 있다.

테스트 영역의 크기 및 물리적 간격은 제한되지 않는다. 통상적인 영역은 약 1 내지 약 700 mm^2, 바람직하게는 1 내지 약 40 mm^2의 면적이고, 약 0.5 내지 약 5 mm 의 간격을 가지며, 필요한 면적에 따라 정례적으로 선택한다. 바람직한 구현예로서, 영역은 약 5 mm 간격으로 이격된다. 예컨대, 각 영역은 직경이 약 100 μm 이고 500 μm 이격된 대략 원형의 앵커 반점의, 예컨대, 8 열 6 행의 직사각형 그리드를 포함할 수 있고; 이러한 영역은 약 20 mm 평방면적을 차지할 것이다. 좀더 큰 또는 작은 영역 면적 및 간격이 포함된다.

영역은 또한 영역내 일부 또는 모든 앵커가, 예컨대, 결각 또는 딤플을 이용하여 이웃하는 앵커와 물리적으로 분리되도록 추가로 세분시킬 수 있다. 예컨대, 영역내 세분구획(소영역)의 수는 약 10 내지 약 100 이상 또는 이하일 수 있다. 하나의 구현예로서, 1536-웰 디쉬 중 하나의 웰인 영역은 추가로 더 작은 웰, 예컨대, 약 4 내지 약 900, 바람직하게는 약 16 내지 약 36 웰로 세분시켜, 웰-중-웰의 배열을 형성시킬 수 있다. 도 4 참조. 이러한 딤플 기판은 단일 앵커(또는 앵커 집단)를 각각의 선정된 공간(로커스(locus))에 물리적으로 위치시키는 데 요구되는 오차허용도를 감소시키고, 앵커를 포함하는 면적의 크기는 좀더 균일하게 하여, 프로브에 결합하는 표적의 검출을 용이하게 한다.

여기에서 사용하는 바와 같은 용어 "앵커"는 임의의 실체 또는 물질, 예컨대, 기판에 결합된 (예컨대, 기판상에 고정된, 또는 공유결합된 또는 비공유결합된), 또는 이러한 기판의 일부 (예컨대, 플라스틱 기판의 유도된 부분)이고, 여기에 기술된 바와 같은 링커 또는 다른 물질과 특이적으로 상호작용하거나 결합될 수 있는 분자(또는 이러한 물질과 실질적으로 동일한 "기"(참조, 예컨대, 도 7)) 를 의미한다. 여기에서 사용하는 바와 같은, "앵커/링커 복합체"는 앵커 및 링커가 특이적 방식으로 분자 회합을 통해 결합하는 경우 존재한다. 링커와의 상호작용은 특정 공유결합에 의한 것과 같이, 비가역적이거나, 또는 핵산 혼성화에 의한 것과 같이, 가역적일 수 있다. 바람직한 구현예로서, 앵커는 임의의 길이 (예컨대, 올리고뉴클레오티드) 또는 유형 (예컨대, DNA, RNA, PNA, 또는 RNA 또는 DNA 분자의 PCR 산물) 일 수 있는 핵산이다. 핵산은 변형되거나 치환될 수 있다 (예컨대, 이노신과 같은 비자연발생 뉴클레오티드를 포함하는; 술파메이트, 술파미드, 포스포로티온에이트, 메틸포스폰에이트, 카르바메이트 등과 같은 다양한 공지된 결합을 통한 연결된; 또는 DNA-스트렙타비딘 콘쥬케이트 등과 같은 반합성 분자). 단일 가닥 핵산이 바람직하다. 앵커는 또한 펩티드 또는 단백질일 수 있다. 예컨대, 항원 또는 항-항체 분자인 링커의 일부에 특이적으로 결합하는, 단일쇄 항체 또는 이의 단편 또는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체 분자 또는 이의 단편일 수 있는 반면; 앵커는 펩티드일 수 있고, 이에 결합하는 링커의 일부는 항체 등일 수 있다. 또 하나의 구현예로서, 앵커는 특정 탄수화물에 대해 특이적인 렉틴(예컨대, 리뮬러스(Limulus), 땅콩, 멍빈(mung bean), 파세올러스(Phaseolus), 맥아 등)과 같은 유기체 유래의 콘카나발린 A 또는 애글루티닌)일 수 있다. 또 하나의 구현예로서, 앵커는, 예컨대, 올리고뉴클레오티드의 특정 고상 화학 합성을 위한 스테이지로서 소용될 수 있는 변형된 또는 유도된 플라스틱 중합체와 같은 유기 분자일 수 있다. 이런 경우, 유도된 플라스틱은 제조공정동안 조합물의 플라스틱 기판으로 완전히 형성된, 별개의, 유도된 양역의 배열로서 분포될 수 있다. 또 하나의 구현예로서, 앵커는 금속이온, 예컨대, Ni,Zn,Ca,Mg 등과 특정 단백질 또는 킬레이트화제 사이의 특이적 또는 우선적 결합을 이용할 수 있다. 예컨대, 앵커는 폴리히스티딘일 수 있고, 링커의 앵커-특이적 부분은 니켈일 수 있으며, 이는 니켈 킬레이트화제를 통해 표적-특이적 프로브에 부착된다. 이와는 달리, 킬레이트화제가 앵커일 수 있고, 폴리히스티딘을 프로브-관련 부분일 수 있다. 이와는 달리, 앵커는 무기 물질일 수 있다. 예컨대, 이것은 칼슘 또는 마그네슘과 같은 금속일 수 있고, 링커의 앵커-특이적 부분은 각각

EDTA 또는 EGTA 와 같은 우선적인 킬레이트화제 일 수 있으며, 이는 표적-특이적 프로브에 부착된다. 당분야의 숙련자는 광범위한 다른 유형의 분자가 또한, 프로브 및 표적과 함께 거론되는 일반 유형 같이, 앵커로서 소용될 수 있음을 인정할 것이다.

테스트 영역내 앵커의 수는 2 개이상, 바람직하게는 약 8 내지 약 900 개(그이상 또는 이하 포함), 좀더 바람직하게는 약 8 내지 약 300 개, 가장 바람직하게는 약 30 내지 약 100 개(예, 약 64)일 수 있다. 일부 바람직한 구현예에 있어서는, 96 테스트영역 (예, 웰)을 갖는 기판에 대해서는 약 16, 36, 45 또는 100개 앵커/테스트영역 또는 384 테스트영역 (예, 웰)을 갖는 기판에 대해 약 9, 16 또는 25 앵커/테스트영역이 존재한다. 가장 바람직한 구현예에 있어서는, 테스트영역내 각 앵커는 배열에서 모든 다른 앵커와 상이한 특이성을 갖는다. 그러나, 앵커의 둘 이상은 동일한 특이성을 공유할 수 있고, 모든 앵커는 동일할 수 있다. 본 발명의 조합물이 매우 많은 수의 테스트영역(예, 약 864, 1536 또는 그 이상)을 포함하여, 많은 수의 시험 시료가 한번에 처리될 수 있는, 하나의 구현예에 있어서는, 단지 제한된 수의 (예, 약 2, 4, 6 또는 9) 변수에 대해 상기 시료를 시험하는 것이 흥미로을 것이다. 즉, 매우 많은 수의 영역을 포함하는 조합물에 대해서는, 영역당 단지 2 내지 9 개의 앵커만을 갖는 것이 유익할 것이다.

테스트영역내 또는 상에서 앵커의 물리적 간격 및 상대적 배향은 제한받지 않는다. 통상적으로, 앵커사이의 거리는 약 0.003 내지 약 5mm 이하, 바람직하게는 약 0.03 내지 약 1 mm이다. 좀더 큰 또는 작은 앵커 간격(및 면적)이 포함된다. 앵커는 서로 및 영역의 경계에 대해 임의의 배향으로 정열될 수 있다. 예컨대, 이것은 정방형, 직사각형, 육각형 또는 다른 배열, 또는 방사선 또는 동심원내 중심으로부터 발산하는 앵커를 갖는 원형 배열와 같은 이차원적 배향으로 정열될 수 있다. 앵커는 또한 일차원적인 선형 배열로 정열될 수 있다. 예컨대, 올리고뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA 서열에 따라 특정 위치에 혼성화하여 초분자 배열, 또는 플로우 쓰로우 겔 내에서 선형 배열을 형성시킬 수 있다. 이와는 달리, 앵커는 "바-코드"형 구조로 깔 수 있다 (참조 도 6). 예컨대, 앵커는 서로간 평행한 긴 선으로 깔 수 있다. 각각의 긴 선간의 간격 또는 너비는 바코드를 닮은 단순하고, 인식가능한 패턴을 얻기 위하여 통상의 방식에서 변화시킬 수 있다. 예컨대, 첫번째 선과 세번째 선은 나머지 선에 비해 두배로 크게하고, 선들을 생략시킬 수 있다. 여분의 빈 선들은 마지막 선 뒤에 놓아 테스트영역을 구별시킬 수 있고, 바코드 패턴은 계속되는 테스트영역에서 반복될 수 있다.

앵커의 패턴은 분리된 분석 웰(테스트영역) 또는 별개의 분석 적하물의 위치에 대하여 엄격할 필요는 없다. 용어 "분석 위치" 는 분석 시료가 적용되는 분석 기판의 위치를 의미하는 것으로 사용될 것이다. (이것은 분석 시료의 별개의 적하물의 위치 또는 멀티-웰 플레이트상에 개별적인 분석 웰을 한정시키는 웰 또는 세퍼레이터의 위치에 의해 한정될 수 있다). 앵커 패턴 자체(예컨대, 올리고뉴클레오티드 앵커의 "바-코드" 형 패턴)는 정확하게 각 별개의 앵커가 위치하는 곳을패턴 인지로-바코드의 각각의 선이 나머지 선들에 대해 이들의 위치에 의해서 인지되는 것과 같이 한정시키기 위하여 사용한다. 따라서, 첫번째 앵커는 각 분석 위치의 한쪽 가장자리 또는 한쪽 구석에 있을 필요가 없다. 첫번째 앵커는 분석 위치에 대한 위치보다는 패턴 인지에 의해 발견될 것이다. 각각의 분석 위치에 의해 사용된 면적(예컨대, 적하물의 면적 또는 웰의 면적)이 앵커의 반복 패턴의 적어도 하나의 전 단위를 포함할 정도로 충분히 크기만 하다면, 각각의 분석 포인트는 패턴이 분석 위치의 영역내에 있는 곳이면 (바코드화된)패턴으로 특정화된 모든 표적에 대한 분석 위치에 대하여 시료를 시험할 것이다.

앵커는 각각의 테스트영역내에 엄격한 또는 심지어 고정된 패턴으로 정렬될 필요가 없다. 예컨대, 각 앵커는 테스트영역에서 무작위 위치를 취하는, 입자, 비드 등에 부착될 수 있다. 각 앵커의 위치는, 예컨대, 검출가능한 표지의 사용으로 측정될 수 있다. 예컨대, 앵커의 각 유형에 대해 특이적인 링커 분자는 상이한 형광성, 발광성 등의 표지로 표식시킬 수 있고, 특정 링커/앵커 쌍을 포함하는 입자의 위치는 링커로부터 생성되는 시그널의 성질, 예컨대, 여기 또는 방사 스펙트럼으로 확인할 수 있다. 당분야의 숙련가는 각각 식별가능한 스펙트럼을 갖는, 다양한 상기의 부착된 표지를 갖는 일단의 링커를 제조할 수 있다. 이와는 달리, 앵커는 직접적으로 표식시킬 수 있다. 예컨대, 앵커의 각 유형은 다른 유형의 앵커상의 표지와 상이한 스펙트럼으로 형광을 발하는 표지로 표식시킬 수 있다. 이와는 달리, 입자, 비드 등을 그 크기 및 형태에서 서로 다르게할 수 있다. 여기에 기재된 표식 및 검출 방법중 임의의 것을 사용할 수 있다. 예컨대, 형광은 주사 형광 현미경 또는 Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) 로, CCD-기재 이메징 시스템으로 측정할 수 있다.

앵커는 링커 분자의 한 부분- 앵커-특이적 부분- 과 상호작용하거나 특이적으로 결합될 수 있다. 용어 "상호작용" 또는 "결합된"은, 여기에서는 2 개의 물질 또는 화합물(예컨대, 앵커 및 링커의 앵커-특이적 부분, 프로브 및 이의 표적, 또는 표적 및 표적-특이적 리포터)가 의도하는 분석이 실행될 수 있도록 충분히 결합되어 (예컨대, 부착된, 혼성화된, 연결된, 어닐링된, 공유결합된 또는 이와는 달리 결합되어) 있는 것을 의미한다. "특이적" 또는 "특이적으로" 의 용어는, 여기에서는 2 개의 성분 (예컨대, 앵커 및 링커의 앵커-특이적 영역, 프로브 및 이의 표적, 또는 표적 및 표적-특이적 리포터)가 선택적으로 상호간 결합하고, 임의의 보호 기술의 부재하에서, 목표 성분에 결합시킬 의도가 없는 다른 성분에는 통상적으로 결합하지 않는 것을 의미한다. 특이적 상호작용을 달성하는 데 필요한 변수는, 예컨대, 당 분야의 통상의 방법을 이용하여 정례적으로 결정할 수 있다.

핵산에 대해서는, 예컨대, 당분야의 숙련가는 선별된 엄격한 조건하에서 핵산(예컨대, 올리고뉴클레오티드 앵커) 를 다른 핵산 (예컨대, 링커의 앵커-특이적 부분) 에 혼성화될 수 있도록 하는 반면, 다른 물질 또는 분자 (예컨대, 다른 올리고뉴클레오티드 링커)에 대한 비특이적 혼성화는 최소화시킬 특징(예컨대, 길이, 염기조성 및 상보성 정도)을 실험적으로 결정할 수 있다. 통상적으로, 앵커의 DNA 또는 다른 핵산 서열, 링커의 일부, 검출 올리고뉴클레오티드는 이의 결합 파트너에 대한 충분한 상보성을 가져 선별된 엄격한 혼성화 조건하에서 혼성화될것이며, Tm 은 약 10 내지 20℃, 실온이상(예컨대, 약 37℃) 이다. 통상적으로, 올리고뉴클레오티드 앵커는 길이가 약 8 내지 약 50 뉴클레오티드, 바람직하게는 약 15,20,25 또는 30 뉴클레오티드이다. 여기에서 사용하는 바와 같은, "높은 엄격한 혼성화 조건"은 혼성화시 핵산사이의 뉴클레오티드 상보성(동일성)이 95% 이상, 바람직하게는 약 97 내지 100% 인 임의의 조건을 의미한다. 그러나, 원하는 목적에 따라, 상보성이 덜 요구되는 조건, 예컨대, 약 90%, 85%, 75%, 50% 등에서 선택할 수 있다. 혼성화 반응 변수중 변할 수 있는 것은 염농도, 버퍼, pH, 온도, 인큐베이션 시간, 포름아미드와 같은 변성제의 양 및 유형 등이다. (참조, 예컨대, Sambrook et al. (1989). *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* (2d ed) Vols, 1-3, Cold Spring Harbor Press, New York; Hames *et al* (1985), *Nucleic Acid Hybridization*, IL Press; Davis *et al*. (1986), *Basic Methods in Molecular Biology,* Elsevir Sciences Publishing, Inc., New York). 예컨대, 핵산 (예컨대, 링커 올리고뉴크레오티드) 은 6X SSPE-T(0.9M NaCl, 60mM NaH_2PO_4, 6mM EDTA 및 0.05% Triton X-100) 와 같은 버퍼중 약 0.01 내지 약 5μM(바람직한 구현예로서는, 약 0.1μM) 의 농도에서, 약 0.1 내지 약 100 ㎕ 또는 그 이상 (바람직한 구현예로서는, 약 1 내지 약 50㎕, 가장 바람직하게는 약 40㎕)의 양으로, 테스트영역(예컨대, 멀티웰 플레이트의 웰-바람직한 구현예로서는, 96 또는 384 또는 그 이상의 웰 플레이트) 에 첨가하여, 약 4 내지 약 37℃ (바람직한 구현예로서는, 약 실온에서) 의 온도에서, 약 10 분 내지 약 3 시간이상 (바람직한 구현예로서는, 약 15 분이상) 동안 결합파트너 (예컨대, 기판상의 올리고뉴클레오티드 앵커)에 혼성화시킬 수 있다. 조건은 대량 처리가 가능하도록 선택할 수 있다. 본 발명의 하나의 구현예로서, 반응 조건은 생리학적 조건에 접근시킬 수 있다.

예컨대, 앵커 또는 링커의 일부로서 소용될 수 있는 다른 유형의 물질 또는 분자(예, 폴리펩티드, 렉틴 등)의 고안 및 결합 파트너와의 특이적인 상호작용을 달성시키기 위해 요구되는 조건은 당분야에서는 정례적이고 통상적인 것이다(예, Niemeyer *et al*(1994), *Nucl.Acids Res.* 22, 5530-5539; Fodor *et al* (1996). 미국 특허 No. 5,510,270;Pirrung *et al* (1992), 미국 특허 No. 5,143,854 에 기술되어 있음). 이들중 인큐베이션 변수는 버퍼, 염농도, pH, 온도, 인큐베이션 시간, 캐리어 및(또는) 비특이적 상호작용을 감소시키는 제제 또는 조건의 존재 등이다. 예컨대, 앵커로서 항체를 함유하는 테스트영역에 (예, 멀티웰 플레이트의 웰-바람직한 구현예로는, 96 또는 384 또는 이상의 웰 플레이트) 항-항체(예, 항원 또는 항체 특이적 이차 항체)를, 예컨대, 6X SSPE-T, PBS 또는 생리식염수와 같은 버퍼중 약 10pM 내지 약 10nM (바람직한 구현예로서는, 약 1nM) 의 농도에서, 약 0.1 내지 약 100 ㎕ 또는 그 이상 (바람직한 구현예로서는, 약 1 내지 약 50 ㎕, 가장 바람직하게는 약 40㎕)의 양으로 첨가하여, 기판상의 앵커와 함께 약 4 내지 약 45℃ (바람직한 구현예로서는, 약 4℃)의 온도에서, 약 10 분 내지 약 3 시간이상 (바람직한 구현예로서는, 약 15 분이상) 동안 인큐베이션시킨다. 펩티드 앵커의 경우, 약 5 내지 약 20 아미노산 길이가 바람직하다.

본 발명의 일부 구현예에 있어서, 배열내의 각각의 앵커는 선별된 반응 조건하에서, 이의 대응하는 링커의 앵커-특이적 부분과 배열내 다른 앵커가 상호작용하는 것과 실질적으로 동일한 정도로 상호작용할 수 있다. 이 것은 앵커가 링커의 실질적으로 균일한 배열, 그러므로 프로브를 특정화하는 것을 보장할 수 있다.

테스트 영역내 앵커는 "일반적"세트 일 수 있고, 이의 각 앵커는 하나 이상의 다양한 상이한 링커와 상호작용할 수 있으며, 이의 각각은 이러한 앵커에 특이적인 부분을 가지나 상이한 "프로브" 부분을 가져; 일반적 앵커의 단일 배열은 다양한 세트의 프로브를 프로그램화 또는 한정하기 위해 사용할 수 있다. 이러한 앵커의 일반적 분석의 유연한 성질은 도 1 및 2 를 참고로 하여 설명될 수 있다. 도 2는 15 개의 테스트영역이 포함된 기판을 나타내며, 이의 각각은 6 개의 상이한 앵커의 배열을 포함하며, 이는 본 예에서는 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 도 1은 이러한 (올리고뉴클레오티드) 앵커중 하나인, 앵커 1을 도식적으로 보여주며, 이는 앵커 1에 특이적인 제1 부분 및 표적 mRNA 1에 특이적인 제2 부분을 포함하는 링커 1과 결합한다. 이와는 달리, 링커 1과 같이 앵커 1에 대해 특이적인 제1 부분을 포함하나, 표적 mRNA 1 대신 표적 mRNA 2에 대해 특이적인 제2 부분을 포함하는 링커 2로 치환시킬 수 있다. 따라서, 앵커 1은 둘이상의 상이한 표적 mRNA 중 어느 하나에 대한 프로브를 특정화(또는 프로그램, 또는 한정, 또는 결정)시키기 위하여 사용할 수 있다. 올리고뉴클레오티드 또는 펩티드의 고 분석 패턴(배열)을 발생 및 부착하는 공정은 고가이고, 시간이 많이 소비되며/또는 육체적으로 힘들 수 있다. 광범위한 프로브 배열을 프로그램하기 위하여 앵커의 미리 형성된 배열을 사용하는 것은 본 발명의 하나의 장점이다.

비록 도 2에 나타낸 일반적 앵커는 올리고뉴클레오티드 프로브의 패턴을 한정시키지만, 동일한 앵커 배열을 또한 사용하여 다른 프로브, 예컨대, 수용체 단백질의 배열을 프로그램화시킬 수 있다(참조 도 3). 분명히, 앵커/링커 상호작용의 유형의 범위, 예컨대, 단백질/항체 조합과 같은 "샌드위치된" 또는 "업힌" 프로브의 복합층이 주어진다면 많은 퍼뮤테이션(permutation)이 가능하다. 따라서, 본 발명에 따른 앵커의 기판 자체는 새로운 이점을 제공한다.

본 발명의 하나의 구현예로서, 앵커는 링커와 가역적으로 상호작용할 수 있어; 일반적 세트의 앵커는 재사용하여 다양한 세트의 프로브를 프로그램화할 수 있다. 예컨대, 올리고뉴클레오티드 앵커는, 예컨대, 두개의 올리고뉴클레오티드를 분해시켜 이차 링커에 재결합시킬 수 있는 가열단계로 링커의 올리고뉴클레오티드부분으로부터 분리될 수 있다. 만들기에 고가이고, 시간이 많이 걸리며/또는 육체적으로 힘들 수 있는, 앵커 배열의 재사용은 본 발명의 또 하나의 이점이다.

앵커는 반드시 링커와 상호작용할 필요는 없다. 예컨대, 앵커는 플루오로크롬과 같은 검출성 분자에 커플링(직접적으로 또는 간접적으로)되어, 예컨대, 시험 기판과 검출기사이의 표시를 위하여, 그리드내 반점을 국소화시키는데 소용될 수 있다. 이와는 달리, 앵커는 공지된 양의 검출성 분자로 표식하여, 예컨대, 검도를 위한 내부 정량화 마커로서 소용될 수 있다.

여기에서 사용하는 바와 같은 용어 "링커"는 선택된(지명된) 앵커 또는 앵커의 서브세트에 특이적인 ("앵커-특이적") 제1 부분(또는 일부분) 및 목적하는 표적에 대해 특이적인("표적-특이적") 프로브인 제2 부분으로 이루어진 이관능성 물질을 의미한다. 링커의 두 부분은 공유 또는 비공유 결합을 통해 부착될 수 있고, 중간체를 통해 직접적으로 부착될 수도 있다.

링커의 앵커-특이적 부분의 화학적 성질은, 물론, 이와 상호작용하는 앵커 또는 앵커들의 관능성이다. 예컨대, 만일 앵커가 올리고뉴클레오티드이면, 이와 사호작용하는 링커의 일부는, 예컨대, 올리고뉴클레오티드에 특이적으로 결합하는 펩티드, 또는 선별된 엄격한 혼성화 조건하에서 올리고뉴클레오티드에 효과적 및 특이적으로 혼성화할 수 있는 핵산일 수 있다. 핵산은, 예컨대, 올리고뉴클레오티드, DNA, RNA, PNA, PCR 산물 또는 치환된 또는 변형된 핵산일 수 있다(예컨대, 이노신과 같은 비자연발생 뉴클레오티드를 함유하는; 술파메이트, 술파미드, 포스포로티오에이트, 메틸포스폰에이트, 카르바메이트와 같은 다양한 공지된 연결을 통해 연결된; 또는 DNA-스트렙타비딘 콘쥬게이트등과 같은 반합성 분자). 단일 가닥 부분이 바람직하다. 올리고뉴클레오티드 앵커에 특이적인 링커의 부분의 길이는 약 8 내지 약 50 뉴클레오티드, 바람직하게는 약 15,20,25 또는 30 뉴클레오티드이다. 만일 앵커가 항체이면, 항체와 상호작용하는 링커의 부분은, 예컨대, 항-항체, 항원 또는 앵커와 특이적으로 상호작용할 수 있는 이러한 분자들중 하나의 소단편일 수 있다. 전술한 앵커의 다른 유형과 특이적으로 상호작용하고, 링커의 앵커-특이적 부분으로 작용할 수 있는 물질 또는 분자는 당분야에 주지되어 있고, 통상의 방법을 사용하여 고안할 수 있다(예, 상기 참조).

링커의 표적-특이적 부분의 화학적 성질은, 물론, 이의 프로브이고, 상호작용하는 표적의 관능성이다. 예컨대, 만일 표적이 특정 mRNA 이면, 링커의 표적-특이적 부분이, 예컨대, 선별된 혼성화 조건하에서, 표적에는 특이적으로 결합하나, 간섭(interfering) RNAs 또는 DNAs 에는 결합하지 않는 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 당 분야의 숙련가는, 당분야에서 인정된 방법을 이용하여, 비특이적인, 간섭 DNA 또는 RNA (예컨대, 상기 참조)에는 최소한으로 혼성화하면서, 표적에는 최적으로 혼성화될 올리고뉴클레오티드의 특징을 실험적으로 결정할 수 있다. 통상적으로, 과량의 비표적 RNA 의 배경에 존재하는 표적 mRNA 를 식별하기 위하여 사용하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 길이는 약 8 내지 약 50 뉴클레오티드, 바람직하게는 약 18, 20, 22 또는 25 뉴클레오티드이다. 경쟁 표적의 큰 배경이 존재하지 않는 생화학적 분석에서 사용하는 올리고뉴클레오티드 프로브는 더 짧다. 당분야에서 인정된 방법(예, 컴퓨터 프로그램 BLAST)을 이용하여, 올리고뉴클레오티드 프로브의 서열을 상호 무관하고 공지된 유전 정보에서 잠재적 간섭 서열과 다르도록 선택할 수 있다. 올리고뉴클레오티드 프로브의 RNA로의 특이적 혼성화를 허용할 혼성화 조건의 선택은 당분야에서 인정된 방법(예, 상기 참조)을 이용하여 정례적으로 결정할 수 있다. 예컨대, 임의적으로 비특이적 결합을 감소시키는 제제 (예, 약 0.5mg/ml 분해된 청어 또는 연어 정자 DNA, 또는 이스트 RNA)를 함유하는, 6X SSPE-T 또는 다른 것과 같은 버퍼중의, 올리고뉴클레오티드 프로브 배열 (상기 참조)를 함유하는 시험영역에 표적 RNA[예, 멀티웰 마이크로타이터 플레이트의 웰(예, 96 또는 384 또는 그 이상의 웰)과 같이, 임의의 용기에서 육성된(임의적으로 목적하는 제제로 처리하여) 조직 또는 세포로부터 추출된 mRNA 또는 총 RNA]을 첨가하여, 약 10 분 내지 18 시간 이상(바람직한 구현예로서는, 약 3 시간)의 기간동안 경험적으로 결정된 온도에서 인큐베이션시킨다. 혼성화의 엄격성은 링커의 앵커-특이적 부분과 앵커를 결합시키는 데 사용하는 엄격성과 동일하거나 또는 그보다 못할 수 있다. 다른 유형의 프로브의 사용 및 고안이 또한 전술한 바와 같이 당분야에서는 정례적인 것이다.

링커의 앵커-특이적 및 표적-특이적 부분은 임의의 다양한 공유 또는 비공유결합으로 결합(부착, 연결)시킬 수 있으며, 이의 성질은 본 발명에서는 본질적인 것은 아니다. 이 두 부분은 직접적으로 또는 중간체 분자를 통해 결합될 수 있다. 링커의 양 부분이 올리고뉴클레오티드인 하나의 구현예로서, 이것은 포스포디에스테르 결합과 같은 공유결합에 의해 결합되어 단일의 공선형(colinear)핵산을 형성할 수 있다. 앵커-특이적인 부분이 올리고뉴클레오티드이고, 표적-특이적인 부분이

수용체, 예컨대 수용체 단백질인 또 다른 구현예에 있어서, 이 두 부분은 바이오틴 및 스트렙타비딘 분자를 통해 연결될 수 있으며, 이의 예는 도 3 에 나타내었다. 이러한 연결의 많은 변형이 공지되어 있다 (예, 참조 Niemeyer *et al* (1994).*NAR* 22, 5530-5539). 이와는 달리, 이 두 부분은 직접적으로 결합될 수 있다. 예컨대, 올리고뉴클레오티드는 아미드화한 후 직접적으로(예, 가교결합으로) 아미드 결합을 통해 펩티드 또는 단백질에 결합시키거나, 또는 아미드 결합 또는 리피드 부착을 통해 막 성분에 결합시킬 수 있다. 이러한 공유 또는 비공유 결합을 형성시키는 방법은 통상적이고, 당분야의 숙련가에 의해 용이하게 최적화 될 수 있다.

두 물질을 결합시켜 (예, 2 개의 핵산, 2 개의 단백질, 단백질 + 핵산, 또는 기타를 인큐베이션시켜) 복합체 (예, 앵커/링커 복합체) 를 형성시킨후, 생성된 복합체는 특이적 상호작용은 온전히 남기나 비특이적으로 결합된 물질은 제거시키기 위하여 경험적으로 결정된 조건을 이용하여, 임의적으로 처리하여(예, 세정하여) 비결합 물질(예, 링커) 를 제거할 수 있다. 예컨대, 반응 혼합물은 복합체 (예, 앵커/링커 복합체)을 얻기 위하여 사용하는 것과 동일하거나 또는 다소 보다 엄격한 조건하에서 약 1 내지 10 배 또는 그 이상으로 세정할 수 있다.

본 발명의 조합물은 통상의 기술을 이용하여 정례적으로 제조할 수 있다.

본 발명에서 사용할 수 있는 기판의 일부는 용이하게 구입할 수 있다. 바람직한 구현예로서, 기판은 Cornign Costar 에서 시판하고 있는 변형된 플레이트와 같은 96-, 384- 또는 1536-웰 마이크로타이터 플레이트이다. 이와는 달리, 교대로 결각 또는 "딤플" 을 포함하는 웰로 이루어진 기판은 알루미늄 또는 강철과 같은 물질을 미세가공하여 금형을 만든후, 플라스틱 또는 유사한 물질을 금형에 미세주입하여 도 4 에 나타낸 것과 같은 구조물을 만듬으로써 형성시킬 수 있다. 이와는 달리, 유리, 플라스틱, 세라믹 등으로 구성된 도 4 에 나타낸 것과 같은 구조물은, 예컨대, 도 5 에 나타낸 것과 같은 세 조각: 시료 웰사이에 분리벽을 형성시킬, 웰 세퍼레이터(도 5a) 로 불리우는 제 1 섹션; 각 시험웰내에 세분구획 또는 딤플을 형성시킬 서브디바이더(subdivider)(도 5b) 로 불리우는 제 2 섹션; 및 시험웰의 기저부 및 플레이트의 베이스를 형성시킬 베이스(도 5c)로 불리우는 제 3 섹션으로부터 조립될 수 있다. 세퍼레이터는, 예컨대, 세조각이 결합되었을 때 각각의 구멍이 시험 웰의 웰을 형성할, 관통된 구멍을 갖는 실리콘과 같은 재료일 수 있다. 서브디바이더는, 예컨대, 스크린 또는 미세한 그물망의 형태의 실리콘과 같은 얇은 조각의 재료일 수 있다. 베이스는, 예컨대, 생화학적 분석에 사용하는 전형적인 마이크로플레이트의 기저부의 형태의 유리와 같은 편평한 재료일 수 있다. 베이스의 상부 기판은 도 5c 에 나타낸 바와 같이 편평하거나, 또는 각각의 시료 웰내에, 완전한 세분구획 또는 웰을 제공하는 서브바이더와 나란히 하여 결각으로 형성될 수 있다. 이 세조각은 표준방법, 예컨대, 실리콘 웨이퍼의 조립에서 사용하는 방법으로 결합시킬 수 있다.

올리고뉴클레오티드 앵커, 링커 부분 또는 검출분자는 통상의 기술, 예컨대, 시판되는 올리고뉴클레오티드 합성기 및(또는) 이렇게 합성된 서브프래그먼트를 함께 라이게이션시켜 합성할 수 있다. 본 발명의 하나의 구현예로서, 올리고뉴클레오티드 앵커와 같은 미리형성된 핵산 앵커는 사진석판 또는 실크스크린 화학 부착, 잉크제트 기술에 의한 부착, 모세관, 스크린 또는 유체 채널 칩, 전극 배열을 이용한 전기화학적 패터닝, 핀 또는 퀼과의 접촉, 또는 변성후 베이킹 또는 필터상에 자외선 조사를 포함한 임의의 다양한 통상의 기술로 테스트영역의 기판상 또는 기판내에 위치시킬 수 있다(참조, 예컨대, Rava *et al*(1996).미국 특허 No. 5,545,531;Fodor *et al* (1996).미국 특허 No. 5,510,270;Zanzucchi *et al* (1997).미국 특허 No. 5,643,738; Brennan (1995).미국 특허 No. 5,474,796;PCT WO 92/10092; PCT WO 90/15070). 앵커는 테스트영역의 기판의 상부에 위치시키거나 또는, 예컨대, 폴리아크릴아미드 겔 패드의 경우, 앵커의 일부가 기판으로부터 돌출하는 방식으로 기판에 함침시켜 링커와의 상호작용에 이용할 수 있다. 바람직한 구현예로서, 미리형성된 올리고뉴클레오티드 앵커는 유리 아미노기로 5' 말단에서 유도시키고; 50mM 포스페이트 버퍼, pH 8.5 및 1 mM EDTA 와 같은 버퍼중에 정례적으로 경험적으로 결정되는 농도(예, 약 1 μM)에서 용해시키고; 상부 기판이 새로운 건조 DNA Bind 플레이트 (Corning Costar)의 것인 시험 웰내에서 특정위치에 약 10.4 나노리터의 방울로 Pixus nanojet 분산기 (Cartesian Technologies) 로 분산시킨다. 올리고뉴클레오티드 부착 및 증발의 상대적 속도에 따라, 제조동안 웰내 습도를 조절하는 것이 필요할 수 있다. 또 하나의 구현예로서, 올리고뉴클레오티드 앵커는, 예컨대, 성장중인 올리고뉴클레오티드사슬의 광-활성 탈보호 (함께 "마스크" 하는 부위를 이용하여)와 같은 통상의 방법을 이용하여, 또는 나노제트 분산기를 이용한 불활성화 화합물의 나노리터 방울의 정형된 분산으로 테스트영역의 기판상에서 직접 합성시킬 수 있다. 단일 뉴클레오티드는 수용하는 모든 성장하는 서열의 탈보호를 한후, 뉴클레오티드를 기판에 교대로 첨가할 수 있다.

펩티드, 단백질, 렉틴, 킬레이트 구현물, 플라스틱 및 기타 유형의 앵커 또는 링커 부분은 또한 정례적으로 생성될 수 있고, 앵커는 적당한 이용가능한 기술을 이용하여 기판 상 또는 내에 위치시킬 수 있다(참조, 예, Fodor *et al* (1996).미국 특허 No. 5,510,270; Pirrung *et al* (1992). 미국 특허 5,143,854; Zanzucci *et al* (1997). 미국 특허 No. 5,643,738; Lowe *et al* (1985). 미국 특허 No. 4,562,157;Niemeyer *et al*(1994). NAR 22, 5530-5539).

본 발명의 일부 구현예에 있어서, 개시된 조합물은 다양한 스크리닝 방법에서 및(또는) 프로브 또는 표적 분자의 수준, 활성 또는 구조에 관한 정보를 얻기 위하여 사용한다. 이러한 분석은 Multi Array Plate Screen(MAPS)법 또는 분석으로 부르며, 앵커 또는 앵커 + 분석에 사용되는 프로브의 배열을 포함하는 기판은 MAPS 배열 또는 MAPS 플레이트로 부른다.

반응 혼합물, 분석, 또는 스크리닝 방법의 구성요소는 임의의 순서로 조립할 수 있다. 예컨대, 앵커, 링커 및 표적은 순차적으로 조립되거나; 또는 리포터의 존재 또는 부재하에서, 표적 및 링커는 용액에서 조립한후 앵커와 접촉시킬 수 있다.

본 발명의 하나의 구현예는 하기의 단계로 구성된 하나 이상의 표적을 검출하는 방법에 관한 것이다 :

a) 표적과 링커사이에서 1 차 혼성화 생성물을 수득하는 데 효과적인 조건하에서, 표적을 포함할 수 있는 시료를, 올리고뉴클레오티드 앵커에 특이적인 제1 부분과 표적에 특이적인 프로브를 포함하는 제2 부분을 가진 이관능성 링커를 접촉시키고,

b) 1 혼성화 생성물과 조합물사이의 2 혼성화 생성물을 수득하기에 효과적인 조건하에서, 상기 제 1 혼성화 산물과 조합물을 접촉시키는데, 상기 조합물은,상기 1 차 혼성화 생성물을 첨가하기 전에, 하기와 같이 이루어지며,

1) 다수의 공간적으로 분리된 영역으로 이루어지고, 이러한 영역들 중 2 개 이상이 실질적으로 동일한 기판, 각 영역은

2) 8 개 이상의 상이한 올리고뉴클레오티드 앵커를 함유한다,

c) 상기 1 차 혼성화 생성물 또는 상기 2 차 혼성화 생성물을 표지된 검출 프로브와 접촉시키고, 및

d) 상기 검출 프로브를 검출한다.

하기에 기술된 각각의 분석 또는 방법은 대량 처리량 방식으로 수행할 수 있으며, 여기에서 많은 수의 시료 (예, 조합물내 영역의 수에 따라, 약 864,1036, 1536, 2025 또는 그 이상)을 각각의 플레이트 또는 기판에서 신속하고 동시에 분석한다. 또한, 많은 플레이트 또는 기판은 한번에 처리될 수 있다. 예컨대, 약제 개발의 방법에서, 각각은 후보 약제 (예, 소형분자, 펩티드, 올리고뉴클레오티드 또는 기타 물질의 변종과 같은 조합 화학 라이브러리의 원)를 함유하는 다수의 시료를 전술한 바와 같은 조합물의 분리된 영역에 첨가하거나 또는 조합물의 분리된 영역에 후에 첨가되는 생물학적 또는 생화학적 시료에 첨가한후, 이 영역에 위치한 프로브 배열과 함께 인큐베이션시킬 수 있으며; 분석은 시료의 각각에 대해서 실행할 수 있다. 고밀도 마이크로플레이트, DNA-스포팅 기구, 및 좀더 밀집된 마이크로프레이트, 로봇공학, 향상된 분산기, 정교한 검출시스템 및 데이타관리 소프트웨어로부터 데이타를 발생시키고 수집하는 레이져 기술과 같은 최근의 출현 및 계속적인 개발로, 본 발명의 방법을 사용하여 하루에 만 또는 백만개 또는 그 이상의 화합물을 스크리닝 또는 분석할 수 있다.

예컨대, 프로브가 올리고뉴클레오티드인 구현예에 있어서, 분석은 유전적 변이 또는 결함 (예, 낭종성 섬유증과 같은 질병과 관련된 다형성 또는 특정 돌연변이. 참조, 예컨대, Iitia *et al* (1992).*Molecular and Cellular Probes* 6, 505-512)); 병원성 유기체 (예, 세균, 바이러스 및 프로토조아,이의 숙주는 사람을 포함한 동물 또는 식물이다) 또는 특정 생리학적 상태 또는 질병의 징후인 mRNA 전사 패턴의 존재에 대한 다수의 시료의 진단성 핵산 또는 폴리뉴클레오티드 스크리닝 (예, 결합 또는 다른 분석) 일 수 있다. EST (완전한 길이의 카피포함) 의 일부를 포함하는 핵산 프로브 배열을 사용하여 EST 가 유래하는 세포 (또는 기타)에 의해 생성된 전사 패턴을 평가할 수 있다. 핵산 프로브는 또한 펩티드, 단백질 또는 특정 핵산 서열에 특이적으로 결합하는 단백질 도메인(그 역도 성립)을 검출할 수 있다.

또 하나의 구현예에 있어서, 본 발명의 조합물은 사용하여, 예컨대, 단백질, 핵산, 소형분자등의 상호작용과 같은 생화학적 반응-예컨대, 항원 및 항체 사이의 상호작용;또는 수용체(예, 정제된 수용체 또는 세포막에 결합하는 수용체) 및 이의 리간드, 아고니스트 또는 안타고니스트의 상호작용; 또는 효소 (예,프로테아제 또는 키나아제) 및 이들의 기질, 또는 기질의 산물로의 전환에서의 양의 증가 또는 감소; 및 많은 기타의 것들의 상호작용의 효율 또는 특이성을 모니터할 수 있다. 이러한 생화학적 분석은 사용하여 프로브 또는 표적의 특성을 특징화하거나, 스크리닝 분석의 기초로서 사용할 수 있다. 예컨대, 특정 프로테아제(예,프로테아제 Xa 및 VIIa 와 같은 혈액응고에 관련된 프로테아제)의 존재에 대한 시료의 스크리닝을 위해서, 시료는 프로브가 목적하는 각각의 프로테아제에 특이적인 형광성 기질인 조합물상에서 분석할 수 있다. 만일 표적 프로테아제가 결합하여 기질을 절단하면, 기질은 형광을 발하고, 통상적으로, 예컨대 두 에너지 전이쌍 사이의 절단 및 분리의 결과로, 시그널이 검출될 수 있다. 또 하나의 예로서, 특정 키나아제 (예, Src, 티로신 키나아제 또는 ZAP70) 의 존재에 대하여 시료를 스크리닝하기 위해서는, 목적하는 하나 이상의 키나아제를 함유하는 시료를, 프로브가 목적하는 키나아제중 하나에 의해 선택적으로 인산화될 수 있는 펩티드인 조합물상에서 분석시킬 수 있다. 당분야에서 인정된, 정례적으로

결정가능한 조건을 사용하여, 시료는 적당한 버퍼에서 기질의 배열 및 필요한 보조인자와 함께, 경험적으로 결정된 기간동안 인큐베이션시킬 수 있다. (몇몇의 경우에서, 예컨대, 목적하는 키나아제의 활성을 조절하는 인자의 생화학적 연구를 위해, 각각의 키나아제의 농도는 각각의 기질이 유사한 속도로 인산화되도록 조정할 수 있다). 경험적으로 결정된 조건하에서 각각의 반응을 처리(예, 세정) 하여 키나아제 및 원하지 않는 반응 성분(임의적으로) 을 제거한후, 인산화된 기질은, 예컨대, 검출성 시약, 예컨대, 형광표식된 항-포스포티로신 또는 항-포스포세린 항체(예, 약 10 nM, 또는 이상 또는 이하의 농도에서)함께 인큐베이션시켜 검출할 수 있고, 시그널을 검출할 수 있다. 또 하나의 예로서, 결합 분석을 실시할 수 있다. 예컨대, GRB2 SH2 또는 ZAP70 SH2 와 같은 SH2 도메인은 적당한 인산화 펩티드의 프로브 배열 상에서 분석할 수 있거나;또는 혈액 혈청은 면역결핍의 존재에 대하여 특정 수용체의 프로브 배열 상에서 스크리닝할 수 있다. 또한, 효소-연결 분석이 이러한 배열 포맷에서 수행될 수 있다. 또한 본 발명의 조합물은 사용하여, 야생형의 대응부보다 더 활성이거나 덜 활성인 돌연변이 효소를 검출하거나, 또는 제초제 또는 살충제를 포함한 다양한 제제에 대하여 스크리닝할 수 있다.

물론, MAPS 분석을 사용하여 시료내 활성 표적의 양을 정량화(측정)할 수 있으나, 단 프로브는 완전히 채워지지 않는다. 즉, 약 90% 이하의 이용가능한 프로브 부위가 표적과 결합(또는 반응 또는 혼성화)된다. 이러한 조건하에서, 많은 표적을 갖는 것은 더 많은 프로브가 결합되도록 하는 것이기 때문에 표적은 정량화될 수 있다. 한편, 약 90% 이상의 이용가능한 프로브 부위가 결합된 조건하에서, 존재하는 표적을 좀더 많이 갖는 것은 프로브에 결합된 표적의 양을 실질적으로 증가시키지 않을 것이다. 지금까지 언급한 유형의 표적중 임의의 것을 이러한 방식으로 정량화할 수 있다. 예컨대, 실시예 6 에는 올리고뉴클레오티드 표적의 정량화가 기재되어 있다. 더욱이, 이것은 표적이 과량으로 존재하더라도 (예, 만일 이것이 MAPS 프로브 배열내에 이용가능한 프로브의 양을 포화시킬 정도로 많은 양으로 존재하면)하더라도, 공지된 양의 비표식된 표적을 결합 혼합물에 첨가함으로서, 반응의 "감도를 변경"시켜 이러한 다량의 표적조차 정량화시킬 수 있음이 실증되었다.

또 하나의 구현예에 있어서, 본 발명의 조합물은 사용하여 표적 및 주어진 프로브의 상호작용을 조절하는 작용제에 대하여 스크리닝할 수 있다. 제제는 프로브, 표적 또는 표적 + 프로브에 의해 형성된 복합체와 직간접적으로 상호작용하여 표적/프로브 상호작용을 조절할 수 있다. 조절은 이에만 국한되지 않으나 프로브에 대한 표적의 결합 친화성에서의 증가 또는 감소, 표적 및 프로브가 결합하는 속도에서의 증가 또는 감소, 프로브의 표적에의 결합의 경쟁적 또는 비경쟁적 억제, 또는 몇몇의 경우에서 프로브 및(또는) 표적 상호작용의 증가 또는 감소를 가져올 수 있는 프로브 또는 표적의 활성에서의 증가 또는 감소를 포함한 다양한 형태를 취할 수 있다. 또한, 이러한 제제는 비변형 상태 또는 다른 종과의 집합체로 사용할 수 있고; 이것은 직접적으로 또는 특정의 결합 물질을 통해, 결합 원에 부착, 공유 또는 비공유결합될 수 있다. 예컨대, 잠재적 "혈액 희석제" 또는 혈액응고를 유발하는 프로테아제의 케스케이드중 하나와 상호작용하는 제제를 동정하기 위해서, 목적하는 프로테아제의 칵테일을 다수의 후보 제제로 시험한후, 전술한 바와 같이 활성에 대하여 시험할 수 있다. 본 발명에서 사용할 수 있는 제제의 다른 예는 매우 다양하며, 제초제 및 살충제가 포함되다. 실시예 16 및 17 에는 특정 키나아제를 선택적으로 억제하는 제제, 또는 SH2 도메인과 인산화 펩티드사이의 상호작용의 선택적 억제제에 대한 대량 처리 분석이 기재되어 있다.

또 하나의 구현예로서, 본 발명의 조합물은 유전자 발현의 패턴을 조절하는 작용제에 대하여 스크리닝하는 데 사용할 수 있다. 예컨대, 일단의 유전자로부터 발현의 패턴이 특정 생리학적 상태 또는 발달 단계, 또는 질병 상태("상관성"유전자, RNAs 또는 발현 패턴)과 상관있는 mRNA 종을 동정하기 위해서 올리고뉴클레오티드의 분석을 사용할 수 있다. "상관있는" 또는 "상관성" 이란 용어는, RNA 의 합성 패턴이 세포의 생리학적 조건과 관련있으나, 주어진 RNA 의 발현이 특정 생리학적 상태에 관여하거나 또는 원인일 필요는 없음을 의미한다. 예컨대, 특정 질병 상태에 대한 모델로서 소용되는 세포에서 발현, 상향조절(upconverted) 및(또는) 하향조절(downconverted)된 mRNA의 소형 서브세트를 동정할 수 있고; 병리학적 표현형을 보이지 않는 정상의 세포에서 발현과 비교시 이러한 변형된 발현의 패턴은 질병 상태의 지시계로서 소용될 수 있다 ("지시계" 유전자, RNA, 또는 발현 패턴). 용어 "상관성" 및 "지시계" 는 대체하여 사용하는 것이 가능하다. 예컨대, 포르볼 미리스테이트와 같은 종양 프로모터로 처리된 세포는 종양 성장의 초기 단계에서 보여지는 패턴을 모방하는 유전자 발현의 패턴을 보일 것이다. 종양의 다른 모델에 있어서, 마우스 인슐린노마 세포(예, 세포주 TGP61) 은 아데노바이러스로 감염되었을 때, 예컨대 c-Jin 및 MIP-2 의 발현에서 증가를 보이는 반면, GAPDH 및 L32 와 같은 하우스키핑 유전자의 발현은 실질적으로 영향을 받지않고 남는다.

질병 모델 유래의 세포와 접촉후, 직접적으로 또는 간접적으로, 및 생체내 또는 시험관 (예, 조직배양)에서 지시계 발현 패턴을 조절하는 작용제는, 질병으로 고통받는 유기체 (예, 인간 또는 다른 동물, 또는 식물) 에 대한 치료제 또는 약제로서 작용할 것이다. 제제는 또한 핵산을 직접적으로, 예컨대 인 비트로(시험 튜브)발현 시스템에서 접촉시켜 발현 패턴을 조절할 수 있다. 여기에서 사용하는 바와 같은 "조절" 이란 용어는 측정가능한 반응에서 수반되는 분자등의 양 및(또는) 활성을 증가시키거나 또는 감소시킴을 의미한다. 본 발명의 조합물은 이러한 제제를 스크리닝하는 데 사용할 수 있다. 예컨대, 일련의 세포(예, 질병 모델 유래) 는 일련의 제제와 접촉시킨후 (예, 약 10 분 내지 약 48 시간 또는 그 이상의 기간동안), 정례적인, 당분야에서 인정된 방법 (예, 시판용 키트)을 이용하여, 총 RNA 또는 mRNA 추출물을 제조할 수 있다. 만일 RNA

의 양을 증폭시키고자 한다면, RT-PCR 증폭과 같은 표준 방법을 이용할 수 있다 (참조, 예컨대, Innis *et al* eds., (1996) *PCR Protocols: A Guide to Methods in Amplification,* Academic Press, New York). 이 추출물 (또는 이로부터 유래한 증폭산물)은 적당한 지시계 RNA 에 대한 프로브를 포함하는 다수의 실질적으로 동일한 배열와 접촉(예, 인큐베이션)시킬 수 있으며, 지시계 발현 패턴에서의 변화와 관련된 이러한 제제는 동정될 수 있다. 실시예 15 에는 질병 상태와 상관있는 유전자의 발현을 변경시킬 수 있는 화합물에 대해 스크리닝하는 대량 처리 분석이 기재되어 있다.

마찬가지로, 특정 생리학적 상태 또는 발증 상태과 관련된 발현 패턴을 조절하는 작용제를 동정할 수 있다. 이러한 제제는 배아 발달 또는 생리학적 반응의 조절에 관여된 물질, 또는 제초제 또는 살충제와 같은 농경제에서 중요한 물질과 같은 환경 인자를 포함한, 합성의 또는 자연발생 물질일 수 있다. 또한, 이러한 제제는 이들의 비변형 상태 또는 다른 종과의 집합체로서 사용할 수 있고; 이것은 직접적으로 또는 특정 결합 물질을 통해 결합원에 부착, 공유 또는 비공유결합될 수 있다.

본 발명의 또 하나의 구현예는

a) 공간적으로 분리된 다수의 영역을 포함하며, 이 영역들 중 2개 이상이 실질적으로 동일한 것이고, 각 영역이 8 개 이상의 상이한 올리고뉴클레오티드 앵커를 포함하는 것인 기판, 및

b) 상기 하나 이상의 앵커에 특이적인 제1 부분과 하나 이상의 상기 표적에 특이적인 프로브를 함유하는 제2 부분을 갖는 이관능성 링커 분자가 담긴 용기를

시료를 첨가하기 이전에 포함하는, 시료 중의 하나 이상의 표적을 검출하기에 유용한 키트이다.

하나의 구현예에 있어서, 상기 a) 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 앵커에 특이적인 제1 부분과 하나 이상의 상기 표적에 특이적인 프로브를 함유하는 제2 부분을 갖는 이관능성 링커 분자를 하나 이상의 상기 올리고뉴클레오티드 앵커에 부착하기 위한 지침서가 제공된다. 이 지침서에는, 예컨대,(이에만 국한되는 것은 아니다) 기판상에서의 각각의 앵커에 대한 설명, 얼마 만큼의 앵커가 존재하는 지, 앵커가 기판의 어디에 위치하고 있는지에 대한 지시, 및 링커를 앵커에 특이적으로 부착(연결, 결합 등)시키는 프로토콜이 포함된다. 예컨대, 만일 앵커가 올리고뉴클레오티드이면, 지침서에는 실시자가 링커의 상보적인 앵커-특이적 부분을 앵커와 특이적으로 상호작용 (예, 혼성화) 하도록 고안할 수 있는, 각 앵커의 서열이 포함되며; 만일 앵커가 펩티드이면, 지침서에는 예컨대, 펩티드와 특이적으로 상호작용할 항체에 관한 정보가 포함될 수 있다. 지침서에는 또한 앵커 및 링커를 결합시키기 위한 프로토콜, 예컨대, 인큐베이션의 온도 및 시간과 같은 혼성화 (또는 다른 유형의 결합)에 대한 조건 및 시약, 비결합 분자(예, 폐기물)를 제거하기 위한 조건 및 시약 등이 포함된다. 더욱이, 지침서에는 제작에 대한 정보 및 여기에서 거론된 임의의 유형의 조절 링커의 사용 및, 예컨대, 조합물로 수행할 분석을 정량화, 정상화, "미세 조절(fine-tuen)" 또는 검선하기 위한 방법의 사용이 포함된다. 지시 사항에는 본 출원에 개시되어 있는 임의의 변수, 조건 또는 구현예가 포함될 수 있으며, 이 모든 것은 당분야의 숙련자에 의해 통상의 절차로 정례적으로 수행될 수 있다.

본 출원의 다른 곳에서 거론한 바와 같이, 실시자는 앵커의 주어진 배열(또는 배열들) 을 포함하는 본 발명의 기판에, 다양한 유형의 링커를 부착시켜, 임의의 다양한 프로브 배열을 프로그래밍시킬 수 있다. 더욱이, 실시자는 본 발명의 기판으로부터 주어진 세트의 링커를 제거하여 다른 세트(첫번째 세트와 동일하거나 상이한)의 링커에 첨가하여, 주어진 기판을 여러번 재사용 할 수 있다. 이러한 유연성 및 재생성은 본 발명의 추가의 장점을 구성한다.

또 하나의 구현예에 있어서, 본 발명의 조합물을 사용하여 EST (Expressed Sequence Tag) 지도를 만들 수 있다. 즉, MAPS 분석은, 만일 있다면, EST 의 군의 어느 것이 동일한 유전자(들)의 상이한(또는 부분적으로 겹친)부분으로부터 발생하며, 만일 있다면, 어느 것이 유일한 것인지를 측정하기 위하여 사용할 수 있다. 도 18,19,20 및 21 에는, 이러한 분석, 본 예에서는, 만일 있다면,16 EST 의 어느 것이 공통 유전자에 "연결" 되어 있는지 측정하기위한 분석이 설명되어 있다. 분석의 첫번째 단계(도 18 참조)는 지도화시킬 EST의 각각을 이에 대응하는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프로브로 나타낸 배열을 조립하는 것이다. 지도화 할 EST 와 동일한 (또는 그이상) 의 배열의 수가 기판의 개별적 영역(예컨대, 웰)에 분포되어 있고; 설명된 예에서는 조합물의 기판은 각각 1-16 으로 번호붙인 16 개의 상이한 EST-특이적 올리고뉴클레오티드의 배열을 포함하는 16 개의 웰로 구성된다. EST 에 "대응하는"("EST-특이적인") 올리고뉴클레오티드는 선별된 엄격한 혼성화 조건하에서, 올리고뉴클레오티드가 상기 EST에 특이적으로 혼성화되나, 다른 비관련 EST 에는 혼성화되지 않도록 EST에 충분히 상보적인 것이다. 이런 유형의 EST-대응 올리고뉴클레오티드는 EST가 원래 발생된 유전자로부터 합성된 cDNA 의 코딩 또는 비코딩 가닥 또는 EST가 원래 발생된 유전자로부터 합성된 mRNA 에 특이적으로 결합 (최적의 조건하에서)할 수 있다. 올리고뉴클레오티드의 고안에서 고려되는 요소, 및 특이적 혼성화를 달성하기 위하여 최적화된 혼성화 변수는 본 출원의 어느 곳에 거론되어 있다. 배열을 조립하기 위해서는, 각각은 일반적 배열의 앵커중 하나에 대해 특이적인 부분 + 지도화할 EST 중 하나에 해당하는 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 부분을 포함하는, 링

커 분자를 제조하고; 링커는 본 출원의 어느 곳에서 기술한 바와 같은 앵커에 부착시킨다. 후속의 단계에서, 올리고뉴클레오티드 프로브의 하나 이상에 상보적인 서열을 포함할 수 있는 핵산의 혼합물 (예,mRNA 또는 단일 가닥 또는 변성된 cDNA) 을 함유하는 시료의 일정분량을 프로브 배열을 포함하는 영역(웰)의 각각에 첨가하고; 이어서 이 혼합물을 정례적으로 결정되는 최적의 조건하에서 인큐베이션시켜, 핵산이 상보적 프로브에 결합되도록 한다. 만일 여러 EST-특이적 프로브가 단일 핵산의 상이한 부분에 상보적이면, 이 핵산은 이러한 프로브 중 하나가 위치한 배열내 위치의 각각에 결합할 것이다.

후속의 단계에서, 상이한 검출 올리고뉴클레오티드 (설명된 실시예에서, 디텍터(detector) #1 내지 16)을 각각의 영역(웰)에 첨가한다 (참조 도 19). 검출 올리고뉴클레오티드는 EST 의 각각이 지도화될 수 있도록 고안한다. 각 EST-특이적 디텍터는 프로브 올리고뉴클레오티드가 대응하는 것보다 EST의 상이한 (적어도 부분적으로 비겹치는) 부분에 대응하여, 프로브 및 검출 올리고뉴클레오티드가 서로 간섭하지 않도록 한다. 예컨대, 도 18-20 의 EST 1, 2 및 6 에 해당하는 도 21 에 나타낸 EST 를 참작. 도 21 은 EST #1 및 #2 는 모두 유전자 X 로부터 수득되는(이것은 "연결"되어 있다)반면, EST # 6 는 상이한 비관련된 유전자로부터 수득되는 것을 나타낸다. 만일 유전자 X 로부터 생성된 것을 포함하여, mRNA 의 혼합물을 포함하는 시료의 일정분량을 도 18-20 에 나타낸 프로브 배열와 함께 인큐베이션시키면, 유전자 XmRNA 는 최적의 조건하에서, 프로브 1 및 2 를 갖는 위치에서 혼성화되나, 프로브 6 을 갖는 위치에서는 혼성화되지 않을 것이다. (물론, 각각의 mRNA 는 이것이 혼성화될 수 있는 프로브의 총합보다 많은 몰로 첨가되어야 한다). 만일 검출 올리고뉴클레오티드 1 이 영역 (웰)1 에 첨가되면, 이것은 프로브 배열의 위치 1 및 2 에서 결합된 유전자 XmRNA 에 혼성화될 것이나, 위치 6에는 혼성화되지 않을 것이다. 마찬가지로, 만일 검출 올리고뉴클레오티드 2를 다른 웰- 즉 웰#2- 에 첨가하면, 이것은 또한 위치 1 및 2에서 결합하고, 위치 6에서는 결합하지 않을 것이다. 이러한 방식으로, 실시자는 대량 처리량의 방식으로, EST의 어느 것이 연결되어 있는지, 즉, 동일한 유전자의 부분에 대해 코딩하는지 및 어느 EST 가 유일한지 결정할 수 있다. 도 20 에 나타낸 가설예에 있어서, 첫번째 3 EST는 동일한 유전자의 일부를 코딩하고, 마지막 5 EST는 다른 유전자의 일부를 코딩하며, 나머지 EST는 연결되지 않는다. 혼성화의 조건, 임의적 세정 단계, 검출방법 등이 다른 MAPS 분석과 관련하여 본 출원의 어느 곳에 거론되어 있다. MAPS 분석에 의해 수득되는 결합 데이타를 확인하기 위하여, 실시자는 센스 및 안티센스 프라이머로서 EST-특이적 올리고뉴클레오티드 프로브 쌍을이용하여 PCR 반응을 실시한다. 모든 쌍의 연결된 EST는 PCR 산물을 생산하여야한다. 이러한 쌍을 이룬 PCR 시험을 수행하여 Linkage MAPS 분석의 사용없이 직접적으로 결합을 측정할 수 있으나; 많은 반응이 필요할 것이고, 각각의 EST 프라이머는 센스 및 안티-센스 가닥 양쪽으로 합성되어야 할 것이다. 설명된 예에 있어서는, 180 번의 반응이 필요할 것이다.

하나의 태양으로서, 본 발명은 하기로 이루어진 다수의 EST 중 어느 것이 주어진 핵산에 대해 상보적인가 결정하는 방법에 관한 것이다 :

a) 하나 이상이 상기 EST 의 각각에 대응하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 고정된 배열와, 상기 주어진 핵산을 포함할 수 있는 시험 시료를 인큐베이션시켜 ,상기 올리고뉴클레오티드 프로브와 상기 핵산 사이에서 혼성화 산물을 수득하고,

b) 상기 올리고뉴클레오티드 프로브중 하나가 대응하는 EST 에 대응하나, 상기 올리고뉴클레오티드 프로브보다는 EST 의 상이한 부분에 특이적인 검출 올리고뉴클레오티드와 상기 혼성화 산물을 인큐베이션시키고,

c) 상기 배열중 어느 올리고뉴클레오티드 프로브가 상기 검출 올리고뉴클레오티드에 의해 표식되었는지 검출하며,

여기에서, 올리고뉴클레오티드 프로브의 상기 배열은 조합물의 영역상에서 고정화되며, 상기 조합물은

1) 조사하고자 하는 EST의 수와 실질적으로 동일한 수의 공간적으로 분리된 영역을 포함하는 기판과,

2) 상기 영역에 포함된, 조사하고자 하는 EST의 수와 동일한 다수의 상이한 앵커와

3) 상기 앵커에 각기 결합되며, 이 앵커에 특이적인 제1 부분 및 상기 EST의 하나 이상에 대응하는 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 제2 부분을 갖는 이관능성 링커를 포함한다.

또 하나의 태양으로서, 본 발명은 하기로 이루어진, 상기 EST가 상기 핵산에 상보적일 수 있고, 상기 EST 의 각각은 두개의 상이한 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하며, 이의 첫번째는 상기 EST 에 대응하는 올리고뉴클레오티드 프로브를 한정하고, 이의 두번째는 상기 EST 에 대응하는 검출 올리고뉴클레오티드 프로브를 한정하는 상기와 같은 방법에 관한 것이다 :

a) 상기 핵산의 분자를 포함하는 시료와, 영역은 올리고뉴클레오티드 프로브의 배열을 포함하고, 이의 하나 이상은 상기 EST의 각각에 대응하는 조합물의 하나 이상의 영역을 접촉시키고,

b) 상기 시료와 상기 영역을 인큐베이션시켜, 상기 핵산의 일부에 상보적인 상기 EST-대응 올리고뉴클레오티드 프로브에 상기 핵산의 분자를 결합시키고,

c)상기 EST-대응 올리고뉴클레오티드 프로브의 하나 이상에 결합된 상기 핵산의 분자를 포함하는 영영과 상기 배열의 올리고뉴클레오티드 프로브중 주어진 하나가 대응하는 EST 에 대응하는 검출 올리고뉴클레오티드를 인큐베이션시켜, 검출 올리고뉴클레오티드를 상기 주어진 올리고뉴클레오티드 프로브에 결합된 또는 상기 핵산에 상보적인 다른 올리고뉴클레오티드 프로브에 결합된 핵산 분자에 결합시키고,

d) 상기 검출 올리고뉴클레오티드의 존재를 검출하여, 상기 배열 중 어는 EST-대응 올리고뉴클레오티드 프로브가 상기 주어진 올리고뉴클레오티드 EST-대응하는 프로브에 결합하는 핵산의 일부에 상보적인가 동정하여, 어느 EST 가 상기 올리고뉴클레오티드 프로브의 배열이 조합물의 영역상에 고정화된 상기 주어진 핵산에 상보적인지 동정하며, 상기 조합물은 하기로 이루어진다 :

1) 조사하고자 하는 ESRs 의 수와 동일한 공간적으로 분리된 실질적으로 동일한 영역의 수로 이루어진 기판, 각 영역은

2) 조사하고자 하는 EST 의 수와 동일한 다수의 상이한 앵커를 함유하고, 각 앵커는,

3) 앵커에 대해 특이적인 제1 부분 및 상기 EST의 하나 이상에 대응하는 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 제2 부분을 갖는 이관능성 링커에 연결된다.

EST 맵핑(mapping) 분석의 성분들은 임의 순서로 모아질 수 있다. 예를 들어, 앵커, 링커 및 EST는 순차적으로 집합될 수 있거나; 또는 리포터의 존재 또는 부재하에서, 링커 및 EST 를 용액중에 모은 다음 앵커를 첨가할 수 있다.

또 다른 목적으로는, 본 발명은 복수개의 EST중 주어진 핵산에 상보성이 있는 것을 결정하는 방법에 관한 것으로, 하기와 같이 이루어진다:

a) 하나 이상의 상기 EST에 상응하는 프로브인 제1 부분과 앵커 올리고뉴클레오티드에 특이적인 제2 부분으로 이루어진 이관능성 올리고뉴클레오티드 링커분자의 수합물을, 상기 주어진 핵산을 함유할 수 있는 시험 시료와 함께 인큐베이션시켜 상기 올리고뉴클레오티드 프로브와 상기 핵산 사이의 1 차 혼성화 생성물을 수득하고,

b) 상기 1 차 혼성화 생성물을, 각 앵커 올리고뉴클레오티드가 하나 이상의 상기 링커분자의 앵커-특이적 부분에 상응하는 앵커 올리고뉴클레오티드의 고정된 배열과 인큐베이션시켜 앵커, 올리고뉴클레오티드 프로브 및 핵산을 함유하는 2 차 혼성화 생성물을 형성하고, 및

c) 상기 올리고뉴클레오티드 프로브중 하나와 대응되는 EST에 상응하지만, 올리고뉴클레오티드 프로브 보다는 EST의 다른 부분에 특이적인, 검출 올리고뉴클레오티드와, 상기 1 차 또는 2 차 혼성화 생성물을 인큐베이션시키고, 및

d) 상기 배열의 올리고뉴클레오티드 프로브를 상기 검출 올리고뉴클레오티드로 표지시켜 확인한다,

이때, 앵커 올리고뉴클레오티드의 상기 배열은 조합된 영역상에 고정되는데, 상기 조합물은 하기와 같이 이루어진다:

1) 연구되는 EST의 수 만큼 많은 공간적으로 분리되고, 실질적으로 동일한 영역들로 이루어진 포함하는 기판, 각 영역은

2) 연구되는 EST의 수 만큼의 많은 상이한 앵커들을 함유한다.

물론, EST를 맵핑하기 위한 상기 방법를 사용하여 목적하는 핵산에 대한 시험 서열 (예를 들어, 폴리뉴클레오티드)를 맵핑할 수 있다. 예를 들어, 2 개 이상의 클론된 DNA 단편 또는 cDNA가 동일한 게놈 DNA에 대해 맵핑되었는 지를 결정할 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어, 길고 복잡한 유전자의 구조 설명에 도움을 줄 수 있다. 유사한 방법으로, 하나 이상의 스플

라이스된 서열 또는 코딩 서열이 동일한 게놈 DNA에 대해 맵핑되었는 지를 결정할 수 있다. 이러한 결정법은, 예를 들어, 차별적인 스플라이싱 패턴을 특징으로 하는 질병 상태와 정상 상태를 구별하는 진단테스트에 사용될 수 있다. 기타 많은 맵핑 방법의 이용은 당업자에게 명백할 것이다.

또 다른 목적에서, 본 발명은 복수개의 폴리뉴클레오티드중 주어진 핵산에 상보성이 있는 것을 결정하는 방법에 관한 것으로,

하나 이상의 상기 폴리뉴클레오티드가 상기 핵산에 상보성이 있을 수 있고, 상기 폴리뉴클레오티드의 각각은 2 개의 상이한 올리고뉴클레오티드 서열로 이루어지는데, 그중 첫 번째는 상기 폴리뉴클레오티드에 상응하는 올리고뉴클레오티드 프로브로 정의되고, 두 번째는 상기 폴리뉴클레오티드에 상응하는 검출 올리고뉴클레오티드로 정의되며, 본 방법은 하기와 같이 이루어진다:

a) 상기 핵산 분자를 함유하는 시료를 조합물의 하나 이상의 영역과 접촉시키는데, 상기 영역은 올리고뉴클레오티드 프로브의 배열을 함유하고, 이중 하나 이상은 상기 폴리뉴클레오티드 각각에 해당하며,

b) 상기 시료를 상기 영역과 함께 인큐베이션시킴으로써, 상기 핵산 분자를 상기 핵산의 일부분에 상보성이 있는 상기 폴리뉴클레오티드-상응하는 올리고뉴클레오티드 프로브에 결합시키고,

c) 하나 이상의 상기 폴리뉴클레오티드-상응하는 올리고뉴클레오티드 프로브에 결합된 상기 핵산 분자를 함유하는 상기 영역을, 상기 배열의 주어진 올리고뉴클레오티드 프로브중 하나와 상응하는 폴리뉴클레오티드에 해당하는 검출 올리고뉴클레오티드와 함께 인큐베이션함으로써, 검출 올리고뉴클레오티드를 상기 핵산에 상보적인 상기 주어진 올리고뉴클레오티드 프로브 또는 다른 올리고뉴클레오티드 프로브에 결합된 핵산 분자에 결합시키고,

d) 상기 검출 올리고뉴클레오티드의 존재를 확인함으로써, 상기 배열의 올리뉴클레오티드-상응하는 올리고뉴클레오티드 프로브가 상기 주어진 올리고뉴클레오티드 폴리뉴클레오티드-상응하는 프로브에 결합하는 핵산의 일부분들과 상보적이라는 것을 확인하고, 그에 의해 폴리뉴클레오티드가 상기 주어진 핵산에 상보적이라는 것을 확인한다.

올리고뉴클레오티드 프로브의 상기 배열을 조합물의 영역상에 고정시키는데, 상기 조합물은 하기와 같이 이루어진다:

1) 조사되는 폴리뉴클레오티드의 수 만큼 많은 공간적으로 분리되고, 실질적으로 동일한 영역들로 이루어진 기판, 각 영역은

2) 조사되는 폴리뉴클레오티드의 수 만큼의 많은 상이한 앵커들을 함유하고, 각 앵커는

3) 앵커에 특이적인 제1 부분 및 하나 이상의 상기 폴리뉴클레오티드에 해당하는 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 제2 부분을 가지는 이관능성 링커와 연결되어 있다.

본 발명의 또 다른 목적으로는, EST 또는 다른 폴리뉴클레오티드를 맵핑하는 상기 방법들이 하나 이상의 단계들 사이에서 시료중의 결합되지 않은 부분들을 제거하는 것을 더 포함한다.

본 발명의 또 다른 구현예에서는, 목적하는 하나 이상의 RNA 표적 (예를 들어, mRNA, 또는 기타 형태의 RNA)를 역전사효소에 의해 cDNA로 전환시키고, 이 cDNA를 이어서 프로브 배열과 혼성화시킨다. 이러한 유형의 분석을 도 8에 도식적으로 나타낸다. RNA 추출물 (또는 정제된 mRNA)를 본 명세서에 기재된 세포 또는 조직으로부터 제조한다. 역전사효소 및 목적하는 RNA에 특이적인 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이어서 상기 RNA 시료에 첨가하고, 통상적으로 측정되고 최대한 활용될 수 있는 art-인식 조건 및 방법을 이용하여, cDNA의 첫 번째 가닥을 생성한다. 용어 "특이적 (specific)" 프라이머는 선별적인 엄격한 혼성화 조건하에서 목적하는 mRNA에 충분히 상보성이 있어서 이에 결합하고, 역전사효소에 의해 인식되지만, 의도하지 않은 핵산에는 결합하지 않는 것(특이적 혼성화를 수행하기 위한 적절한 반응 조건에 대해서는 상기 기재된 바를 참조)을 의미한다. 잔여 RNA (특정 프라이머에 의해 인식되지 않는 mRNA, 및(또는) RNA 추출물중, tRNA 또는 rRNA와 같은, 기타 형태의 오염성 RNA)는 다양한 리보뉴클레아제, 또는 알칼리 처리법과 같은 화학적 방법에 의해 제거될 수 있고, 단일가닥 cDNA가 남아서 이를 이어서 MAPS 프로브 배열과 접촉시킨다. 본 방법에서 역전사효소의 사용은, 뉴클레아제에 의한 분해에 민감하여 조작이 어려울 수 있는 RNA의 광범위한 조작의 필요성을 최소화한다. 더욱이, 특정 역전사효소 프라이머에 의해 생겨난 부가적인 특이성으로 인해 분석에 대한 특이성을 한층 더 부여한다.

경우에 따라, 상기 기재된 cDNA를 프로브 배열에 혼성화되기 전에 증폭시켜 시그날 강도를 증가시킬 수 있다. 상기 기재된 올리고뉴클레오티드 역전사효소 프라이머는, 그의 5' 말단에서, RNA 폴리머라제 (예를 들어, T7, T3 또는 SP2 폴리머라제 등)에 대한 개시 부위를 지정하는 서열 (이는 길이가 약 22-27 개의 뉴클레오티드일 수 있다)을 함유할 수 있다. 도 8에 나타낸 예에서는, T7 프로모터 서열이 역전사효소 프라이머에 첨가되었다. 폴리머라제 인식부위가 cDNA내로 도입되어, 적당한 RNA 폴리머라제에 의한 수회의 전사 (시험관내 전사, 또는 IVT)를 위한 인식부위를 제공할 수 있다. 경우에 따라, 상기 생성된 mRNA를, PCR 및 적당한 프라이머를 이용하여, 더욱 증폭할 수 있거나, 또는 cDNA 자체를 이와같이 증폭시킬 수 있다. 전사 및 PCR에 대한 공정은 통상적인 것으로 당 분야에 이미 공지되어 있다.

PCR의 유연성은 본 발명의 방법에 여러가지 변형을 가능하게 한다. 하나의 구현예에서, 표적을 증폭시키는 데 사용되는 PCR 프라이머의 하나 또는 둘다는 얻어진 PCR 생성물을 고체 지지체에 특이적 또는 비-특이적으로 부착시키는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 이러한 화학적 변형은 예컨대, 코스타(Costar) DNA 바인드 플레이트(Bind Plate) (예, N-옥시숙신이미드 에스테르로 변형된 것이거나, 미국 일리노이주 록포드 소재의 피어스(Pierce)로부터의 리액티-바인드(Reacti-Bind) 플레이트와 같은 말레산 무수물 코팅된 플레이트)와 같은 기판에 결합하도록 하는 5'-아미드화를 포함한다. 이러한 화학적 변형을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 생성하는 방법은 당 분야에서는 보편적이고 통상적이다. 이러한 변형된 프라이머를 포함하는 PCR 생성물은 고체 지지체를 비롯한 임의의 목적하는 지지체, 예를 들어 마이크로타이터 웰의 내벽, 비드 (예, 비-자기성 또는 자기성 비드), 또는 본원에 기재한 임의 유형의 기판에 부착될 수 있다. 물론, PCR 프라이머는 PCR 반응이 개시되기 전에 지지체에 부착될 수도 있다. PCR의 몇 사이클은 세척하지 않고 과량의 결합된 프라이머로 반복할 수 있어, 얻어지는 PCR 생성물이 지지체에 부착된 채로 남아 있다. 증폭된 표적 서열의 지지체로의 부착은 앵커 및(또는) 링커를 포함하는 기판과 접촉(예, 혼성화)되기 전, 또는 접촉된 후 상기 기판으로부터 방출된 후에 표적의 세척 (또는 정제)를 촉진시킬 수 있다. 또 다른 구현예에서, 표적을 증폭시키는 데 사용되는 PCR 프라이머 중 하나 또는 둘다는 하나 이상의 제한 효소 부위를 포함하여, 목적하는 표적 서열의 말단 또는 측면에 인접한 제한 부위의 유도를 가능하게 한다. 제한 부위는 앵커 및(또는) 링커를 포함하는 기판에 접촉(예, 혼성화)하기 전 또는 후에 PCR에 의해 증폭된 표적에 첨가될 수 있다. 이러한 방식으로 유도된 제한 부위는 예를 들면 표적 서열의 측면에 있는 클로닝 부위를 제공함으로써 증폭된 표적의 클로닝을 촉진시킬 수 있다. 제한 부위는 또한 증폭된 서열의 정제를 촉진시킬 수 있다. 예를 들면, 하나 이상의 제한 부위는 표적 특이 서열과 지지체로의 부착을 가능하게 하는 화학적 변형 사이의 PCR 프라이머 내에 위치할 수 있다. 표적이 변형된 PCR 프라이머를 사용하여 PCR 증폭되고 화학적 변형을 통해 지지체에 결합된 후, 세척하고 표적 서열에 인접한 제한 부위(들)에서 절단될 수 있으며, 이에 따라 세척된 표적이 방출된다 (도 23 참조).

물론, 제한 효소 부위 이외의 절단 가능한 부위, 예를 들어 특이 프로테아제에 의해 절단될 수 있는 펩티드, 또는 물리적, 화학적 또는 기타 방법에 의해 절단되고(거나) 방출될 수 있는 다른 성분을 상기 기재된 방법에 사용할 수도 있다.

또 다른 구현예에서, 표적의 증폭에 사용되는 PCR 프라이머의 하나 또는 둘다는 예컨대 표적-특이 리포터 또는 검출 링커에 특이적인 서열 (표적에 반드시 존재하는 것은 아님)을 포함할 수 있다.

물론, 상기 기재한 프라이머 변형은 임의의 목적하는 조합물을 함께 사용할 수 있으며, 분석 중 임의 단계에서 증폭된 생성물에 첨가할 수 있다. 실시예 21 및 22는 상기 기재한 몇몇 프라이머 변형이 증폭된 표적에 혼입되는 절차를 설명한다.

mRNA 표적이 MAPS 플레이트상에서의 분석전에 역전사효소에 의해 cDNA로 전환되고(거나) PCR에 의해 증폭되는 상기 기재된 방법은 상기 기재된 임의의 RNA-기재 분석에 대한 표준적인 MAPS 분석방법 대신에 사용될 수 있다.

본 발명의 또 다른 구현예로는, 목적하는 하나 이상의 핵산 표적을 특정 폴리뉴클레오티드 보호 단편에 혼성화시켜 뉴클레아제 보호 공정을 수행한 다음, 목적하는 표적에 혼성화한 상기 보호 단편들을 MAPS 플레이트상에서 분석한다. 목적하는 표적이 RNA이고 보호 단편이 DNA인 경우에는, 뉴클레아제 보호/MAPS 분석 (NPA-MAPS)은, 뉴클레아제 오염에 의한 분해에 민감하여 조작이 어려울 수 있는, RNA의 광범위한 조작의 필요성을 감소시킬 수 있다. 이러한 NPA-MAPS 분석에 있어서, 프로브 배열에서의 프로브는, 표준 MAPS 분석에서와 같이 목적하는 핵산 표적에 상보적이기 보다는, 목적하는 핵산 표적과 동일한 가닥의 올리고뉴클레오티드이다. NPA-MAPS 분석의 한 예를 도 9에 도식적으로 나타낸다.

NPA-MAPS 분석에 있어서, 목적하는 표적은, 게놈 DNA, cDNA, 바이러스DNA 또는 RNA, rRNA, tRNA, mRNA, 올리고뉴클레오티드, 핵산 단편, 변형된 핵산, 합성 핵산 등과 같이 어떠한 핵산도 될 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예로는, 조직 또는 세포의 RNA 추출물중에 존재하는 하나 이상의 mRNA 표적을 분석하기 위해 본 방법이 사용된다. 목적하는 표적을 함유하는 시료를 우선 선별적인 엄격한 조건하에서(특정 혼성화를 수행하기 위한 적절한 반응조건에 대해서는 상기 언급된 바를 참조) 하나 이상의 특정 보호 단편에 혼성화시킨다. 보호 단편은 목적하는 핵산 표적의 일부분에 대해 특이적인 폴리뉴클레오티드로, 이는 예를 들면, RNA, DNA (PCR 생성물 포함), PNA 또는 변형 또는 치환된 핵산일 수 있다. "특정

(spcific)" 보호 단편이란, 선별적인 엄격한 조건하에서 의도하는 결합 파트너에 충분히 상보성이 있어서 이에 결합하지만, 의도하지 않은 다른 핵산에는 결합하지 않는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 보호 단편은 길이가 10 개 이상, 바람직하게는 50 내지 약 100 개의 뉴클레오티드일 수 있고, 또는 cDNA 전체 길이와 거의 같은 길이일 수 있다. 바람직한 구현예로는, 보호 단편이 단일가닥인 DNA 올리고뉴클레오티드이다. 100 개 이상의 많은 표적에 대해 특이적인 보호 단편들이 하나의 혼성화 반응에 포함될 수 있다. 혼성화 후, 시료를 하나 이상의 뉴클레아제의 칵테일로 처리함으로써, 목적하는 핵산에 혼성화하고 있는 보호 단편 및 (경우에 따라서) 혼성화되어 핵산 보호 공정중에 뉴클레아제 분해로부터 보호된 핵산 표적의 일부분 (이중 혼성화물)을 제외하고 거의 모든 핵산을 파괴시킨다. 예를 들어, 시료가 세포 추출물을 함유한다면, 목적하는 것 이외의 게놈 DNA, tRNA, rRNA 및 mRNA 와 같은 원하지 않는 핵산들은 상기 단계에서 거의 파괴될 수 있다. 임의의 다양한 뉴클레아제가 사용될 수 있는데, 예를 들어, 혼성화된 복합체 및 시료에 존재하는 바람직하지 않은 핵산의 성질에 따라서, 판크레아 RNAse, 멍빈 뉴클레아제, S1 뉴클레아제, RNAse A, 리보뉴클레아제 T1, 엑소뉴클레아제 III 등이 포함된다. RNAse H 는 DNA 보호 단편에 결합되어 있는 잔여 RNA를 분해시키는데 특히 유용할 수 있다. 상기 효소의 반응조건은 당 분야에 이미 공지되어 있으며 경험에 의해 최대한 활용될 수 있다. 또한, 화학적 공정, 예를 들어, RNA의 알칼리 가수분해가 사용될 수 있다. 필요하다면, 시료를 당 분야에 잘 알려진 방법에 의해 추가 처리하여 혼성화되지 않은 물질을 제거 및(또는) 잔류 효소를 불활성화 또는 제거시킬 수 있다 (예를 들어, 페놀 추출법, 침전법, 컬럼 여과법 등). 뒷따라 뉴클레아제 분해 및 (선택적으로) 화학적 분해가 이어지는, 혼성화 공정를 뉴클레아제 보호 공정(nuclease protection)이라고 하며; 다양한 뉴클레아제 보호 공정이 문헌 [Lee *et al* (1987), *Meth Enzymol*. 152, 633-648. Zinn *et al* (1983), *Cell* 34, 865-879]에 기재되어 있다. 뉴클레아제 보호공정, 이어서 뉴클레아제를 불활성화시키는 (선택적인) 공정으로 처리된 시료를 MAPS 프로브 배열과 접촉하도록 위치시키고, MAPS 분석의 통상적인 단계들을 수행한다. 결합된 보호 단편들을, 표준 MAPS 분석법에 대해 본 명세서에 기재된 바와 같이, 표지된 표적-특이적 수용체와 혼성화시켜 검출할 수 있거나, 또는 보호 단편 자체를 검출가능한 분자로 공유결합 또는 비공유결합시켜 표지시킬 수 있다.

바람직한 구현예로는, 보호 단편을, 예를 들어, 표적-특이적 리포터와 혼성화시켜 표지하는 것 보다는, 직접 표지시킨다. 예로서, 리포터를 리간드-안티리간드 상호반응을 통해 보호 단편에 결합시키는데, 예를 들면, 스트렙토아비딘 효소 복합체를 비오티닐화된 보호 올리고뉴클레오티드에 첨가한다. 또 다른 예로는, 보호 단편을 화학적으로 변형하고 (예를 들어, 호스래디쉬 퍼옥시다제 (HRP) 또는 형광염료의 직접적인 커플링에 의해) 상기 화학적 변형은, 보호 단편의 핵산 부분과 함께 또는 그것 없이, (예를 들면, 효소처리 또는 화학적 처리에 의해 변형부를 절단한 후) 검출된다. 상기 방법중 하나로는, 보호 단편을 상응하는 링커 분자에 혼성시키기 전 또는 시킨 후에 표지시킬 수 있다.

뉴클레아제 보호 공정이 적절하게 수행되는 것을 조절하기 위해서, 즉, 비혼성화된 핵산이 의도하는 바대로 절단되는 것을 조절하기 위해서, 공정이 적절하게 수행된다면 뉴클레아제에 의해 절단되어야하는 돌출(비혼성화)분절을 함유하도록 하나 이상의 보호 단편을 디자인할 수 있다. 돌출 단편의 존재 또는 부재는 상보적이고, 표지된, 검출 프로브와의 혼성화에 의해 측정될 수 있고, 또는 보호 단편의 돌출 부분 자체를 검출가능한 분자로 공유결합 또는 비공유결합시켜 표지시킬 수 있다. 이러한 조절은 시료를 프로브 배열와 접촉하도록 위치시키기 전에, 또는 MAPS 분석 자체의 일부분으로서 수행될 수 있다. 이러한 조절 분석의 예는 실시예 15에 기재되어 있다. 물론, 상이한 표지들이 용이하게 구별될 수 있기 때문에 (예를 들어, 상이한 흡수스펙트럼을 가진 형광), 몇 가지 상이하게 표지된 올리고뉴클레오티드가 단일 분석에 포함될 수 있다. 또한, 겔 전기영동법에 의해 분석된 표준 뉴클레아제 보호 분석은 보호 단편이 예상만큼 진행되었지를 확인하기 위해서 분석 전개중에 사용될 수 있다.

표적의 검출 후, 검출 프로브 (예, HRP-표지된) 시그널은 제거(예, 변성, 괴사, 켄칭, 억제, 블록킹)될 수 있으며, 플레이트는 세척하여 후속 단계에 유해할 수 있는 임의의 얻어진 시약, 약물, 또는 완충액 (예, 변성제)을 제거한 후, 오버행 (overhang)은 다른 검출 프로브 (예, 또한 HRP-표지된)로 검출될 수 있다. 동일한 시그널 잔기를 갖는 상이한 검출 프로브 첨가에 이은 시그널 변성의 이용은 분석 중의 여러 단계에 이용할 수 있다. 두 개의 다른 형광 프로브 및 이중 색 검출의 이용은 변성 또는 시그널 블록킹없이 이용할 수 있다.

NPA-MAPS 분석은 시료중 표적의 양을 정량화하기 위해서 사용될 수 있다. 보호 단편이 혼성화 반응이 완료되도록 표적에 대해 충분히 많은 과량의 몰로 첨가된다면 뉴클레아제 보호 단계 후 남아있는 보호 단편의 양은 표적이 시료중에 얼마나 많이 존재하는 지를 반영할 것이다. 이러한 정량 반응의 한 예가 실시예 12 및 13에 기재된다.

NPA-MAPS 분석은 표준 MAPS 분석을 사용하는 상기 기재된 방법들을 수행하는데 이용될 수 있다.

바람직한 구현예에서, 폴리뉴클레오티드 보호 단편은 MAPS 플레이트상에서 보다는 질량 분광기에 의해서 측정된다. 가장 바람직한 구현예에서, 혼성화 또는 뉴클레아제 절단 단계중에 고체 기판에 결합(부착)하는 폴리뉴클레오티드는 없다. 혼성화 후, 혼성화된 표적은, 예를 들어, 뉴클레아제 또는 화학적 처리에 의해 분해되어, 단편들이 표적에 혼성화된 양에 정비례하여 보호 단편을 남겨놓을 수 있다. 이와는 달리, 표적의 (단일가닥) 혼성화된 부분, 또는 혼성화된 표적과 보호 단

편에 의해 형성된 이중가닥이 남도록 시료를 처리하여 더욱 처리할 수 있다. 분석될 시료를 혼성화 및 뉴클레아제 혼합물의 나머지로부터 분리하고 (예를 들어, 에탄올 침전법, 또는 흡착 또는 친화성 크로마토그래피 등에 의해), 용출시키거나 또는 가용화시키고, 대량 처리를 위해 루프 인젝션에 의해 질량 분광기내로 주입시킨다. 바람직한 구현예로는, 분석될 시료 (예를 들어, 보호 단편)을 기판에 흡착시키고, 당 분야에 잘 알려진 방법들을 이용하여, 레이저 탈착시켜 분석한다. 가장 높은 감도를 위해서, Fourier Transform Mass Spectrometry (FTMS) (또는 다른 유사한 진보한 방법)가 사용될 수 있으며, 펨토몰 이하의 각 보호 단편이 검출될 수 있다.

하나 (또는 그 이상)의 시료내에서 검출되는 보호 단편은 사용된 질량 분광기에 대해 독특한 시그날을 나타내도록 디자인될 수 있다. 한 구현예로는, 보호 단편들이 각기 혼성화 및 뉴클레아제 처리 후에 특징적인 분자량을 가지며, 그의 분자량 및 특징적인 이온화 및 절편 패턴은 그들의 농도를 측정하기에 충분할 것이다. 복합체 혼합물의 분석에 있어서 보다 높은 감도를 얻거나 이를 돕기 위해서, 보호 단편은 명백하게 특이적인 시그날을 나타내도록 디자인된 화학부위(chemical moiety)로 변형(예를 들어, 유도체화)될 수 있다. 예를 들어, 각 보호 단편은, 가닥의 혼성화 부분을 따라 하나 이상의 위치에서 올리고뉴클레오티드 가닥에 아미드 결합을 통해 부착되는 상이한 천연 또는 비천연 아미노산으로 유도체화될 수 있다. 적절한 에너지의 질량 분광기에 의해, 아미드 결합에서 절편이 발생하고, 아미노산의 특징 부분이 방출된다. 적절한 크기 (대략 80 내지 200 분자량)의 화학부위가 질량 분광기의 표식으로 사용되는 이러한 종류의 시도는, 상기 크기의 분자가 일반적으로 검출하기에 보다 용이하기 때문에 바람직하다. 또 다른 예로는, 화학적 변형은, 예를 들어, 아미노산과 같은 또 다른 분자로 유도체화될 수 있는 테트라알킬암모늄기와 같은 한정된 질량 분광 시그날을 가진 유기 분자이다. 또 다른 예로는, 양성 또는 음성 이온 시그날은 임의의 많은 제제들과의 반응에 의해 강화될 수 있다. 예를 들면, 양성 이온 검출을 강화하기 위해서, 피릴륨염 (예를 들어, 2-4-디테닐, 6-에틸 피릴늄 테트라플루오로보레이트, 또는 기타 다수)를 아민과 반응시켜 피리디늄염을 형성할 수 있고; 임의의 많은 다른 강화제를 사용하여 다른 양전하된 관능기를 형성할 수 있다 [참조, Quirke *et al* (1994), *Analytical Chemistry* 66, 1302-1315]. 유사하게, 임의의 많은 art-인식 제제들을 반응시켜 음성 이온 강화류들을 형성할 수도 있다. 물론, 화학적 변형은, 핵산으로부터 절단된 후 또는 핵산에 연결된 채로 검출될 수 있다. 각 보호 단편을 구별가능한 방법으로 동정되도록 함으로써, 수 많은 상이한 표적(예를 들어, 2, 6, 10, 16개, 또는 이상의 상이한 표적들)이 1회 분석에서 분석(예를 들어, 스크린)하는 것이 가능하다. 이러한 많은 분석들은 신속하고 용이하게 수행될 수 있다. 그러므로, 이러한 하나의 분석 또는 일련의 분석들은 본 명세서에서 밝힌 바와 같이 고처리량으로 수행될 수 있다.

올리고뉴클레오티드가 그의 질량에 의해 직접 검출되는지 또는 독특한 분자 표적이 사용되는지와 상관없이, 검출되는 각 분자의 시그날은 공지된 농도의 순수한 제제로서 완전히 특성화될 수 있다. 이는 정확하게 시그날의 양을 측정(측량, 정량)할 수 있게 한다. 질량 분광법으로 검출되는 임의 분자에 대해서, 강도 및 윤곽은 정확하게 예측될 수 없다. 이온화된 분자의 경향, 절편화된 분자내에서 모든 화학 결합의 감도, 각 단편이 중복 하전 또는 단일 하전되는 정도는 모두 너무 복잡해서 예측되지 못한다. 그러나, 고정된 에너지를 가진 일정한 기구 및 시료 조작 특성에 대해서 시그날의 강도 및 윤곽은 극히 재현가능하다. 그러므로, 각 프로브에 대해서, 시그날은 단일 표준으로 특성을 부여할 수 있고, 실험 시그날은 정확하게 정량적으로 해석된다.

한편, 본 발명은 목적하는 하나 이상의 핵산을 검출하는 방법에 관한 것으로, 이는 목적하는 핵산을 함유하는 시료를 하나 이상의 보호 단편으로 뉴클레아제 보호처리를 하고, 혼성화된 이중나선 분자 또는 보호된 핵산, 또는 보호 단편을 질량 분광법으로 검출하는 것으로 이루어진다.

질량 분광법으로 핵산을 분석하는 방법은 당 분야에 이미 공지되어 있다 [참조, Alper *et al* (1998), *Science* 279, 2044-2045 및 Koster, U.S.Pat.No. 5,605,798].

상기 기재된 다양한 고처리량 분석과 더불어, 기타 많은 방법들도 당 분야의 숙련자에게는 명백할 것이다.

멀티프로브 분석을 이용하는 장점은 실제 실험의 프로브와 동일한 반응 조건으로 수행되는 많은 "대조구(control)" 프로브를 각 프로브 배열중에 포함할 수 있다는 것이다. 예를 들어, 배열에 있어서 각 영역은 양성 및(또는) 음성 대조구를 함유할 수 있다. 용어 "양성 대조구 프로브(positive control probe)"는, 예를 들어, 표적과 실질적으로 상호반응하거나, 또는 정량적으로 또는 정성적으로 공지된 방법으로 표적과 상호반응하므로써, 프로브/표적 상호반응에 대한 (내부)표준으로서 작용한다고 알려진 대조구 프로브를 의미하는 것으로 본 명세서에서 사용된다. 이러한 프로브에 의해서는 예를 들어, 혼성화 효율을 대조할 수 있다. 용어 "음성 대조구 프로브"는 표적과 실질적으로 상호반응하지 않는 것으로 알려진 대조구 프로브를 의미하는 것으로 본 명세서에서 사용된다. 이러한 프로브에 의해서는 예를 들어 혼성화 특이성을 비교할 수 있다. 이용될 수 있는 상기 형태의 대조구의 예로는, 올리고뉴클레오티드 프로브의 배열을 사용하여 질병와 상호관련있는 일련의 유전자 발현을 조절하는 작용제들을 스크린하는 분석을 생각해 볼 수 있다. 각 시료로 용균된 많은 세포, mRNA의 회수, 또는 혼성화 효율와 같은 변화에 대한 내부적인 표준 대조구로서, 프로브 배열은, 구조 유전자 (예를 들어, 액틴, 튜블린 등)

또는 DNA 결합 단백질 (예를 들어, 전사 조절인자 등)과 같은 하나 이상의 기본 수준 또는 구조적인 하우스-키핑 유전자 (그의 발현이 시험되는 제제에 의해 조절되지 않는 것으로는 예상된다)에 특이적인 프로브를 함유할 수 있다. 또한, 시험되는 제제들이 세포사 또는 독성과 같은 바람직하지 못한 부작용을 나타내는 지를 확인하기 위해서, 프로브 배열은 아폽토시스 (프로그래밍된 세포사) 과정의 일부분을 유도하는 것으로 공지된 유전자에 특이적 프로브, 또는 세포 외상(예를 들어, 열충격 단백질) 또는 세포 독성(예를 들어, p450 유전자)의 조건하에서 유도되는 프로브를 함유할 수 있다.

또 다른 대조구 프로브가 분석의 감도를 "미세 조절(fine tune)"하기 위해서 배열에 포함될 수 있다. 예를 들어, 특정 질병 상태와 연관된 mRNA의 생성을 조절하는 작용제에 대한 분석을 고려해 본다. 예비 분석이, 이러한 상태에서 상호관련된 mRNA 중 하나(일명, mRNA-A)가 다른 것들과 비교하여 과량으로 생성되어 그러한 시그날로 인해 나머지 mRNA를 제거한다는 것을 밝혀낸다면, 시그날의 강도를 균등하게 하기 위해서 분석을 "미세 조절"하도록 링커를 조정할 수 있다. mRNA-A 표적에 대해 디자인된 앵커-특이적 올리고뉴클레오티드 서열을 함유하지만 프로브-특이적 서열은 결여되어 있는 "블록킹된 링커(blocked linker)"를 첨가하여 표적-특이적 링커의 풀(pool)을 희석함으로써 상기 mRNA에 대한 분석의 감도를 감소시킬 수 있다. 블록킹된 링커와 블록킹되지 않은 링커의 적정 비율은 당 분야의 숙련자에게 보편적이고 통상적인 방법에 의해 결정될 수 있다.

활성 성분을 불활성성분으로 희석시킴에 의한 특정 표적에 대한 분석의 "미세 조절"은 분석 중 다른 단계에서 행할 수도 있다. 예를 들면, 표지된 표적-특이적 리포터를 "불활성" 표적-특이적 리포터, 예컨대 동일한 표적-특이적 잔기 (예, 올리고뉴클레오티드 서열)로 신호체(signaling entity) 없이, 또는 신호체의 불활성화되거나 불활성 형태로 희석시킴으로써 검출 수준에서 행할 수 있다. 본원에서 사용하는 용어 "신호체"는 표지, 표식, 분자, 또는 검출 가능한 시그널을 방출하거나 이러한 시그널을 생성시킬 수 있는 임의 물질, 예컨대 형광 분자, 발광 효소, 또는 본원에 기재된 여러 신호체 중의 임의의 것을 의미한다. 특히 바람직한 구현예에서, "미세 조절"은 검출 링커 (예를 들어, 복잡한 샌드위치형 검출 방법에 관한 부분, 실시예 23 및 도 24에서 기재하고 있는 검출 링커)로 표적-함유 복합체를 접촉시키는 단계에서 행할 수 있다. 한 세트의 검출 링커는 예컨대 분석 중에 각 개별 표적에 대한 민감도를 미세 조절하도록 설계할 수 있다. 예를 들면, 특정 표적이 시료 중에 매우 높은 수준으로 존재하는 것으로 알려져 있는 경우, 그 표적에 대한 검출 링커는 표적-특이적 잔기 (예, 올리고뉴클레오티드 서열)은 포함하지만 리포터 시약에 대해 특이적인 잔기는 포함하지 않거나, 표적-특이적 잔기 및 불활성 리포터 시약에 예비-결합된 리포터 시약-특이적 잔기를 포함하는 "블록킹된 검출 링커"의 실험적으로 측정 가능한 양으로 희석할 수 있다. 즉, 리포터 시약에 대해 특이적인 잔기를 포함하는 대신, 상기 잔기는 존재하지 않거나 리포터 시약과의 상호작용 (예, 혼성화)을 방지(예, 블록킹)할 수 있다. 이러한 미세 조절은 때때로 본원에서는 시그널 "감쇠(attenuation)"라 칭한다.

본 발명의 분석법으로 테스트되는 시료는 상기 기재된 임의의 표적 또는 기타들을 함유할 수 있다. 분석되는 액체 시료는 테스트 영역의 크기에 적당한 부피인, 약 100 나노리터 내지 약 100 마이크로리터의 범위정도일 수 있다. 바람직한 구현예로는, 약 1 마이크로리터의 액체 방울을 1536 웰 마이크로타이터 디쉬의 각웰에 떨어뜨린다. 시료를, 고처리량 분석에 적합한 임의의 각종 방법에 의해서, 예를 들면, 피펫팅, 잉크젯 분배에 의해서 또는 레플리케이팅 핀 툴(replicating pin tool)을 이용하여 프로브 배열에 접촉하게 위치시킬 수 있다. 프로브와 표적의 결합 또는 안정한 상호반응을 수행하기에 효과적인 조건(예를 들어, 염농도, pH, 온도, 인큐베이션시간, 등, 상기 참조)하에서 시료를 인큐베이션시킨다. 이러한 조건은 통상적으로 결정될 수 있다. 인큐베이션 후, 특이적 상호작용이 그대로 보존되도록 경험상 결정되는 조건을 이용하여, 시료를 선택적으로 처리(예를 들어, 세척)하여 결합되지 않은 표적을 제거하지만, 비-특이적으로 결합된 물질은 제거되지 않는다. 예를 들어, 프로브/표적 결합을 수행하기 위해 사용되는 것 보다 동일하거나 약간 더 엄격한 조건하에서 시료를 약 1 내지 10 회 이상 세척할 수 있다.

표적 RNA, 예를 들어, mRNA, rRNA, tRNA, 바이러스RNA 또는 전체RNA를 함유하는 시료를 임의의 다양한 방법으로 제조할 수 있다. 예를 들어, mRNA가 추출되는 시험관내 세포 배양액을, 마이크로타이터 플레이트의 각 웰과 같은, 기판의 영역위에 플레이트할 수 있다. 경우에 따라, 목적하는 세포 밀도가 달성된 후, 이러한 세포들을, 촉진제 또는 잠재적 치료제와 같은 목적하는 제제로 처리하는데, 이는 임의의 다양한 수단, 예를 들어, 레플리케이팅 핀 툴 (96 또는 384 핀 툴, Beckman 사 제), 피펫팅 또는 잉크젯 분배에 의해서 세포에 첨가될 수 있으며, 상기 세포를 분석에 따라 적정한 임의 시간 동안, 예를 들어 약 15 분 내지 약 48 시간 동안 인큐베이션시킨다. 시험관내 또는 생체내 원료에서 유래된 조직 또는 세포로부터의 추출물인, 전체RNA, mRNA 등을 보편적인, art-인식 방법(예를 들어, 시판되는 키트)을 이용하여 제조할 수 있다.

경우에 따라서, 특정 프로브(예를 들어, 목적하는 RNA와 적어도 부분적인 서열 상동성을 가지는 게놈DNA, rRNA, tRNA 또는 mRNA)에 혼성화를 위한 목적하는 RNA와 경합하는 핵산은, 혼성화를 수행하기 전에 뉴클레아제 보호(NP) 공정으로 시료를 예비처리함으로서 RNA 시료로부터 적어도 부분적으로 제거될 수 있다. 목적하는 RNA의 한 부분 이상에 대해 상보성이 있고 서열이 RNA에 특이적인 프로브의 서열과 부분적으로 또는 완전히 겹치는, 핵산 ("보호 단편", 이는 예를 들

어, RNA, DNA 또는 PNA 일 수 있다)을 시료중에 과량으로 도입하고, 보호 단편이 목적하는 RNA에 특이적으로 혼성화하는 선별적인 엄격한 혼성화 조건(적정한 반응 조건에 대해서는 상기 언급된 바를 참조)하에서 함께 인큐베이션한다. 상기 단계에서, 시료중 목적하는 RNA의 일부 또는 전부에 특이적인 보호 단편을 (예를 들어, 100 배, 또는 그 이상 많이) 첨가할 수 있다. 혼성화 후, 시료를 하나 이상의 뉴클레아제의 칵테일로 처리하여, 보호 단편에 상보적인 목적하는 각 RNA의 부분만을 제외하거나, 또는 보호 단편과 보호된 RNA 사이에 형성된 이중가닥을 제외하고 거의 모든 핵산을 파괴한다. 다음 단계에서, 이중가닥을 풀고 보호 단편을 분해하는 적당한 효소로 절단시켜 보호 단편을 상기 이중가닥으로부터 제거하여, 보호된 RNA를 거의 그대로 남길 수 있다. 혼성화된 복합체 및 시료중에 존재하는 바람직하지 못한 핵산의 성질에 따라, 임의의 각종 뉴클레아제, 예를 들어, 판크레아 RNAse, 멍 빈 뉴클레아제, RNAse H, (높거나 낮은 염을 갖는 절단 조건하에서의) S1 뉴클레아제, RNAse A, 리보뉴클레아제 T1, 엑소뉴클레아제 III, 엑소뉴클레아제 VII, RNAse CL3, RNAse PhyM, Rnase U2 등이 상기 언급된 절단 단계에 사용될 수 있다. 상기 효소에 대한 반응 조건은 당 분야에 잘 공지되어 있고 경험상 최대한 활용될 수 있다. 필요에 따라서, 시료를 당 분야의 공지된 방법으로 처리하여 비혼성화된 물질을 제거 및(또는) 잔류 효소를 불활성 또는 제거 (예를 들어, 페놀 추출법, 침전, 컬럼 여과 등)할 수 있다. 처리된 시료를 이어서 프로브 배열과 접촉하게 위치시킨다. 특이적 혼성화 및 잇따른 뉴클레아제 보호공정이 적절하게 수행되도록 조절하기 위해서, 반응 혼합물중에 표지된 보호 단편을 포함할 수 있다. 뉴클레아제 보호 공정이 적절하게 수행되도록, 예를 들어, 비-혼성화된 핵산이 의도한 대로 절단되도록 조절하기 위해서, 분석이 적절하게 수행된다면 뉴클레아제에 의해 절단되어야 하는 돌출(비혼성화)분절을 함유하도록 하나 이상의 보호 단편을 디자인할 수 있다. 돌출 단편의 존재 또는 부재는 상보적이고, 표지된 프로브로 혼성화시켜 확인할 수 있고, 또는 보호 단편의 돌출부분 자체를 검출가능한 분자로 표지할 수 있다.

본 발명의 방법에 있어서, 표적을 당 분야에 공지된 및(또는) 본 명세서 이외에 기재된 (예를 들어, 뉴클레아제 보호 단편의 검출을 위한) 임의의 다양한 방법으로 표지(표식)할 수 있다. 예를 들면, 표적 분자를, 화학발광 분자와 같은 검출을 위한 시그날을 제공하는 화학기, 또는 화학발광 분자의 생성을 촉매하는 효소, 또는 플루오레세인 또는 cy5와 같은 형광 분자, 또는 킬레이트화 란타니드 금속들중 하나와 같은 시간 분해되는 형광 분자, 또는 방사능 화합물로 직접 또는 간접적으로 커플링시킬 수 있다. 이와는 달리, 표적을 하나 이상의 표지된 표적-특이적 리포터(예를 들어, 항체, 도 1에 나타낸 올리고뉴클레오티드, 또는 프로브와 표적에 관련하여 상기 언급된 일반적인 형태의 분자)에 의해 프로브와 반응시킨 후 표지시킬 수 있다.

한 유형의 형광 분자는 "상향조절성 인광물질", 즉 흡수하여 장파장 (예, IR)에서 들뜬 후 보다 단파장 (예, 가시광선)에서 방출하는 플루오르(fluor)일 수 있다. 상향조절성 인광물질은 분석하고자 하는 전형적인 시료에 존재하는 대부분의 잠재적인 저해 물질보다 장파장에서 흡수하기 때문에, 보다 단파장에서 흡수하는 인광보다 상향조절성 인광물질은 시료 중에 존재하는 물질에 의해 야기되는 저해를 감소시킬 수 있다. 대부분의 상향조절성 인광물질의 좁은 방출 스펙트럼 역시 다수의 상이한 상향조절성 인광물질의 동시 검출을 가능하게 한다. 상향조절성 인광물질은 당 분야에서 공지되어 있으며 통상적이고, 예컨대 이터븀(Yb), 에르븀(Er), 툴륨(Tm) 및 프라세오디뮴(Pr)과 같은 희토류 금속 이온, 특히 옥시술파이드 염 형태를 포함한다. 80 개 이상의 많은 독립적으로 검출 가능한 상향조절성 인광물질이 기재되어 있다 (예를 들면, *Biological Agent Detection and Identification*, April 27-30, 1999, DARPA, Biological Warfare Defense, Defense Sciences Office 참조). 인광물질은 경우에 따라 임의 기판, 예컨대 미소구 또는 라텍스 비드에 부착될 수 있다. 다른 형광 표지와 같이, 상향조절성 인광물질은 충분히 가까운 링커, 표적 또는 리포터 상의 표지로의 에너지 전달 (또는 상기 표지에 의한 모듈레이션)에 의해 검출할 수 있다. 또한, 본원에 기재한 다른 신호체를 사용한 것과 마찬가지로, 상향조절성 인광물질은 표적의 정량화에 이용할 수 있으며, 본원에 기재한 여러가지 방법 중 임의의 것, 예컨대 뉴클레아제 보호 단편을 검출하는 데 사용할 수 있다.

물론, 상향조절성 인광물질은 또한 기판 상의 임의의 다른 부분, 예컨대 기판에 직접 결합되거나, 기판 상의 다른 올리고뉴클레오티드의 배열에 직접 결합되거나, 또는 사실상 균등하게 분포된 (다르거나 사실상 동일한) 앵커에 이관능성 링커를 통해 결합된 표적 (뉴클레아제 보호 단편 포함), 또는 기판 상의 임의 목적하는 조직 또는 패턴으로 분포된 표적을 검출하는 데 사용할 수 있다. 임의 기판, 예컨대 플로우-쓰로우 시스템, 또는 예컨대 비드와 같은 고체 기판을 사용할 수 있다. 본 발명의 임의 분석에 사용되는 비드는 임의 유형, 예컨대 임의 물질로 제조된 것, 자기성 및(또는) 비-자기성일 수 있으며, 단일 분석에 사용되는 비드는 사실상 동일하거나, 다른 크기 및(또는) 형상일 수 있다.

다양한 보다 복잡한 샌드위치-형 검출 방법도 또한 이용될 수 있다. 예를 들어, 표적에 특이적인 첫 번째 부위와 통상적인 (예를 들면, 동일한) 리포터 시약(예를 들어, 표지된 폴리뉴클레오티드, 항체 등)에 의해 인식될 수 있는 두 번째 부위를 함유하는 이관능성 분자에 표적을 혼성화시킬 수 있다. 임의의 의도한 수의 통상적인 리포터가 각 분석에 사용될 수 있도록 이관능성 분자를 디자인할 수 있다.

본 발명의 임의 방법에서, 다양한 복잡한 샌드위치형 검출 방법을 표지(표식) 표적에 사용할 수 있다. 예를 들면, 표적은 표적에 특이적인 제1 잔기 및 "리포터 시약"에 특이적인 제2 잔기를 함유하는 이관능성 (또는 다관능성) 분자 ("검출 링커")와 상호작용, 예컨대 혼성화할 수 있다. 용어 "~에 특이적"은 예컨대 프로브 및 표적의 상호작용의 측면에서 본원에서 사용하는 바와 같은 의미를 갖는다. 본원에서 사용하는 용어 "리포터 시약"은 표지된 폴리뉴클레오티드, 항체 또는 프로브 및 표적과 관련하여 본원에서 논의한 임의의 일반적인 유형의 분자를 나타낸다. 검출 링커의 이러한 두 잔기는 예컨대 프로브 및 표적과 관련하여 상기에서 논의한 임의의 방식으로 그들의 각 결합 파트너를 인식(상호작용 또는 결합)할 수 있다. 검출 링커는 또한 다른 서열, 예컨대 표적에는 특이적이지만 상응하는 앵커-결합된 링커의 표적-특이적 잔기와는 다른 (비겹치는) 서열을 포함할 수도 있다. 검출 링커에 존재하는 임의 서열은 검출 프로브 또는 리포터 시약에 대한 인식 서열로서 작용할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 검출 링커는 폴리뉴클레오티드이다.

검출 링커는 임의 목적하는 수의 통상의 리포터 시약이 분석에 사용될 수 있도록 디자인될 수 있다. 예를 들면, 한 세트의 검출 링커는 각 검출 링커가 다른 표적에 대하여 특이적이지만, 동일한 것(공통적인 것), 또는 제한된 수의 리포터 시약 중의 하나에 대한 결합 부위를 포함하도록 디자인될 수 있다. 단일 분석 중의 여러가지 표적을 표지시키기 위하여 제한된 수의 (예, 하나) 리포터 시약을 사용하는 능력은 비용 절감 및 더 낮은 백그라운드의 이점을 제공한다. 물론, 검출 링커/리포터 시약의 조합물을 상향조절성 인광물질에 의해 검출될 수 있는 표적 배열의 유형에 대해서 상기 기재한 바와 같이 기판 상의 임의 부분에 분포되는 표적을 검출하는 데 사용될 수 있다.

가장 바람직한 구현예에서, 검출 링커는 뉴클레아제 보호 단편을 검출하도록 디자인될 수 있으며, 이렇게 함으로써 뉴클레아제 보호 공정 (예, 실시예 15에 기재된 바와 같음) 중에 조절 "오버행" 서열로부터 뉴클레아제에 의해 절단된 보호 단편이 바람직하게 표지된다. 이러한 유형의 검출 방법은 도 24에 개략적으로 도시된다. 이러한 구현예에서, 검출 링커는 표적에 특이적인 제1 잔기, 및 바람직한 구현예에서, 분석 초기에 뉴클레아제 보호 단편의 사실상 전체에 존재하는, 통상적인 조절 오버행 서열에 특이적인 제2 잔기를 포함한다. 필요에 따라, 조절 오버행 서열이 뉴클레아제 보호 반응 동안에 뉴클레아제 보호 단편으로부터 절단된 경우, 검출 링커의 표적-특이적 잔기는 절단된 보호 단편에 혼성화하지만, 검출 링커의 조절 오버행-특이적 잔기는 결합되지 않아, 추가의 혼성화에 이용할 수 있도록 남아 있다. 한편, 뉴클레아제 보호 과정 중에 불완전 뉴클레아제 절단으로 인해 조절 오버행-특이적 서열이 보호 단편으로부터 절단되지 않은 경우, 검출 링커의 표적-특이적 잔기 및 조절 오버행-특이적 잔기는 모두 보호 단편에 혼성화하여 추가의 혼성화에 이용할 수 없게 된다. 바람직한 구현예에서, 뉴클레아제 보호 단편 및 결합된 검출 단편을 포함하는 복합체는 추가의 단계에서 신호체 (예, 본원에서 기재한 바와 같은 플루오로크롬, 합텐, 효소, 또는 검출 가능한 시그널 또는 시그널-생성체를 함유하는 임의 기타 분자), 및 검출 링커의 조절 오버행-특이적 잔기를 조절하는 데 특이적인 잔기 (예, 올리고뉴클레오티드)를 포함하는 리포터 시약과 혼성화한다.

리포터 시약은 바람직하게는 뉴클레아제 보호 단편의 조절 오버행 서열이 절단된 복합체 (즉, 검출 링커의 조절 오버행-특이적 잔기가 리포터 시약에 추가로 혼성화할 수 있는 복합체)에 결합되어 표지된다.

샌드위치 검출 방법의 수많은 기타 변형들은 당 분야의 숙련자에게는 자명하다.

결합 또는 기타 안정한 상호반응을 수행하기에 효과적인 조건하에서 표적을 표적-특이적 리포터와 인큐베이션할 수 있는 방법은 통상적으로 결정된다 (상기 참조). 예를 들어, 형광 올리고뉴클레오티드 리포터 (6×SSPE-T와 같은 완충액 또는 기타중에 약 10 nM 내지 약 1 μM 이상, 바람직하게는 약 30 nM 의 농도)를 약 15 분 내지 2 시간 이상 (바람직하게는 약 30 내지 60 분)동안 약 15℃ 내지 약 45℃의 온도 (바람직하게는 약 실온)에서 결합된 표적과 인큐베이션시킬 수 있다. 인큐베이션후, 시료를, 특이적 상온반응을 그대로 남도록 경험적으로 결정되는 조건을 이용하여, 선택적으로 처리(예를 들어, 세척)하여 결합되지 않은 표적-특이적 리포터를 제거하지만 비-특이적으로 결합된 물질은 제거하지 않는다. 예를 들어, 시료를 표적/리포터 결합을 수행하는데 사용된 조건 보다는 동일하거나 약간 더 엄격한 조건하에서 약 1 내지 10 회 이상 세척할 수 있다.

표적-특이적 리포터로의 표식은, 예를 들어, 표적-특이적 올리고뉴클레오티드 리포터가 프로브 올리고뉴클레오티드 보다는 표적 핵산 서열의 상이한 부분을 표적하는 경우 또는 프로브와 리포터 항체가 표적 항원의 상이한 에피토프를 인식하는 경우에 있어서, 초기 혼성화 반응에 대한 특이성을 한층 더 부여한다. 더욱이, 표적-특이적 리포터로의 표식은 반응의 감도를 "조절(tuning)"할 수 있다. 예를 들어, 상호관련있는 발현 패턴의 일부인 표적 mRNA가 매우 낮은 수준으로 발현된다면, 시그날의 수준은 결합된 표적을 몇몇 (예를 들어, 약 2 내지 약 5 개, 그 이상) 표적-특이적 올리고뉴클레오티드 리포터 (그 각각이 표적 mRNA 의 상이한 부분에 특이적으로 혼성화한다)에 혼성화시킴으로써 강화(시그날 증폭)될 수 있다.

2 가지 형태의 표지를 검출하는 능력은 MAPS 분석에 있어서 대조구의 추가적인 형태를 가능하게 한다. 특정 앵커 로커스(도 7은 3 가지 대표적인 앵커 로커스를 나타내고, 각각은 복수의 실질적으로 동일한 앵커(A, B 또는 C)를 함유한다)에 대해 디자인된 링커의 일부(예를 들어, 약 10 내지 100%)는 한쪽 말단에 부착된 표지(예를 들어, 플루오르)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 로다민 또는 Cy5 플루오르를 링커의 5' 말단에 부착시킬 수 있다. 이러한 변형된 링커를 "대조구 링커(control linker)"라고 명명한다. 링커와 대조구 링커의 혼합물을 앵커에 연결시키고 표적을 함유하는 시료를 생성된 프로브 배열과 인큐베이션시킨 후, 상이한 플루오르(예를 들어, 플루오레세인 또는 화학발광체와 같은 또 다른 검출 표지)를 나타내는 표적-특이적 리포터가 사용될 수 있고(또는 표적을 플루오르 또는 다른 검출 표지로 직접 표지시킬 수 있다); 및 상기 두 시그날의 비율을 결정할 수 있다. 대조구 링커의 존재는, 테스트 영역 내에서와 그 사이에서의 관능성 (예를 들어, 링커와 상호반응할 수 있는) 앵커의 수를 측정할 수 있도록 하고 (예를 들어, 시그날을 표준화시킬 목적으로, 배열의 각 로커스의 표적에 결합하는 능력을 테스트), 결합된 표적의 양의 정량화를 위한 기준을 제공하고, 앵커 로커스의 위치측정을 돕고 및(또는) 양성 대조구(예를 들어, 시료중에 표적의 부재로 인해 시그날이 없는 경우)를 제공한다. 본 발명의 한 구현예로는, 2 개의 상이한 표지 (예를 들어, 형광단)가 또한 2 개의 상이한 표적 분자의 군집을 검출하는데 사용될 수 있으나; 시그날의 공간적 분석에 의한 표적의 존재를 인식하는 능력은 상이한 표적 분자에 대해 한 가지 형태의 표지를 이용할 수 있게 한다.

표지 (예, 구별되는 파장에서 방출하는 형광 표지, 예컨대 플루오로신 및 로다민, 또는 다른 상향조절성 인광물질)를 독립적으로 검출하는 능력은 본 발명의 방법에 추가의 유연성을 제공한다. 예를 들면, 2개 이상의 표적 각각을 직접 또는 간접적으로 그 자체의 독특하게 검출 가능한 표지로 표지시킬 수 있다. 이는 기판 상의 편재된 표적의 위치를 확인하거나 편재된 비드의 크기에 의해 표적을 확인하는 것에 추가로(또는 대신) 표지에 특이적인 특징 (예, 방출 색)을 근거로 표적의 검출을 가능하게 한다. 발명의 또 다른 구현예로는, 다양한 표적이 영역 내의 단일 로커스에서 독립적으로 검출될 수 있다. 예를 들면, 2 이상 (예, 2, 3, 4, 5, 6 이상)의 표적은 (사실상 동일한) 앵커의 단일 군에 의해 정의된 로커스에서 검출될 수 있다. 즉, 한 세트의 링커를 사용할 수 있고, 이들 각각은 동일한 앵커에 대해 특이적인 앵커-특이적 부분 + 다른 표적에 대해 특이적인 표적-특이적 부분을 갖는다. 예컨대, 4개의 이러한 링커 세트를 사용하는 경우, 4개 모두 단일 로커스에서 앵커 군의 부재에 결합할 수 있어, 4개의 다른 표적이 상기 로커스에 결합되도록 한다. 이들 표적 각각이 다른 구별 가능한 표지로 (직접 또는 간접적으로) 표지되는 경우, 조사자는 로커스에서 4개의 표적 각각의 존재를 독립적으로 측정할 수 있다. 따라서, 예컨대 영역 내의 5개의 앵커 (앵커 군)의 배열을 사용하여 상기 기재한 시나리오에 따라 20 개나 되는 다른 표적을 검출할 수 있다. 이러한 분석은 실시예 24 및 도 25에 설명되어 있다. 유사하게, 단일 로커스에서뿐만 아니라, 심지어 임의의 원하는 방식으로, 비드 또는 플로우 쓰로우 기기와 같은 고체 기판 상에 단일 유형의 앵커가 분포되었을 때, 다수, 예컨대 80개 이상의 표적을 독립적으로 검출할 수 있으며, 이러한 비드 크기 또는 스캐터와 같은 다른 측면을 표적 확인 또는 표적 군에 대한 정보를 제공하는 데 이용될 수 있다.

본 발명의 또 다른 구현예로는, 목적하는 표적에 특이적인 "앵커(anchors)"가 링커와는 연결되지 않지만, 표적과는 직접적으로 결합하고; 표적은 다시 표적-특이적 수용체와 선택적으로 상호반응할 수 있다.

표지되거나 또는 표지되지 않은 표적은 당 분야에서 보편적이고 통상적인, 임의의 다양한 방법으로 검출될 수 있다 [참조, Fodor *et al* (1996), U.S.Pat.No. 5,510,270; Pirrung *et al* (1992), U.S.Pat.No. 5,143,854; Koster (1997), U.S.Pat.No. 5,605,798; Hollis *et al* (1997) U.S.Pat.No. 5,653,939; Heller (1996), U.S.Pat.No. 5,565,322; Eggers *et al* (1997), U.S.Pat.No. 5,670,332; Lipshutz *et al* (1995), *BioTechniques* 19, 442-447; Southern (1996) *Trends in Genetics* 12, 110-115]. 검출 방법에는 효소-기재 검출법, 비색 방법, SPA, 방사성 자동사진법, 질량 분광법, 전기 방법, 흡광 또는 발광 (화학발광 또는 전기발광 포함)의 검출법, 및 광산란 형태, 예를 들어, 표식을 이용한 현미경적 입자의 검출법이 포함된다. 또한, 형광 표지가, 예를 들어, 전하-커플링된 장치 (CCD) 또는 형광 현미경 (예를 들어, 스캐닝 또는 콘포칼 형광 현미경)으로의 영상에 의해, 또는 스캐닝 시스템을 CCD 배열 또는 광전배증관과 커플링하여, 또는 배열-기재 검출 방법 (예를 들어, 테스트 영역의 각 10-미크론 부분의 표면 포텐셜이 검출될 수 있고 또는 표면 플라스몬 공명이, 해상도가 충분히 높을 수 있다면, 사용될 수 있다)에 의해 검출될 수 있다. 이와는 달리, 배열은 링커, 표적 또는 리포터상에서 표지로의 에너지 전이(또는 변화)에 의해 검출될 수 있는 표지 (예를 들어, 플루오레세인 및 로다민과 같은, 한 쌍의 에너지 전이 프로브)를 함유할 수 있다. 형광-기재 검출 시스템의 군중에는, 형광 강도, 형광 편광 (FP), 시간-분해 형광, 형광 공명 에너지 전이 및 균일한 시간-방출 형광 (HTRE)가 있다. 반복되는 바-코드 형태 패턴의 분석은 패턴을 인식(다른 반점 또는 선에 상대적인 위치에 의해서 특정 표지된 표적에 대한 적당한 반점 또는 선을 확인)하고 이어서 표지의 강도를 정량화함으로써 수행될 수 있다. 바-코드 인식 장치 및 1차원 또는 2차원 배열의 분석에 대한 컴퓨터 소프트웨어는 보편적으로 생겨나며 및(또는) 시판되고 있다 [참조, Rava *et al* (1996), U.S.Pat.No. 5,545,531].

본 명세서에 기재된 바와 같은 기판 또는 영역을 제조하고, 본 명세서에 기재된 앵커, 링커, 프로브 및 검출 프로브와 같은 물질들을 합성 또는 정제하고 부착 또는 조립하고, 본 명세서에 기재된 표지 또는 표식된 물질들을 검출 및 분석하는 것을

포함하여, 본 발명의 배열을 구성하고 이용하는 방법은 이미 공지된 통상적인 기술이다. 상기 인용된 문헌들에 개시된 방법과 더불어, 하기 문헌을 참조 [Affymax, Affymetrix, Nanogen, Protogene, Spectragen, Millipore and Beckman에게 양도된 특허 (이로부터 본 발명에 유용한 생성물을 이용할 수 있다); 상기 인용된 것을 포함하여, 분자생물학 및 단백질 과학의 기본적인 교과서; 및 Cozette *et al* (1991), U.S.Pat. 5,063,081; Southern (1996), *Current Opinion in Biotechnology* 7, 85-88; Chee *et al* (1996), *Science* 274, 610-614; 및 Fodor *et al* (1993), *Nature* 364, 555-556].

실시예

실시예 1: 혼성화 특이성 (도 10 참조)

일반적인 MAPS 플레이트를, 미소적정 플레이트의 각 웰내에서 동일한 DNA 격자를 형성하는 잉크젯 디스펜서인, 픽서스 시스템 (Pixus system; Cartesian Technologies, Inc., Irvine, CA)을 이용하여 생성하였다. 모든 올리고뉴클레오티드를 Biosource International (Camarillo, CA)로부터 구입하였다. 상기 플레이트에 대해, 7 개의 상이한 올리고뉴클레오티드 앵커를 열쇠(Key)로 나타낸 (도면의 왼쪽면) 패턴으로 각 웰내에 분배하였다. 각 올리고뉴클레오티드를, 500 mM 인산나트륨(pH 8.5) 및 1 mM EDTA 를 함유하는 2 μM 용액으로부터 DNA 바인드 플레이트 (Corning Costar)의 웰로, 10 나노리터 방울인 2 개의 반점으로 분배한 다음 건조시켰다. 부착 후, 웰을 50 mM 트리스(pH 8)로 블록킹한 다음, 표면에 공유결합으로 부착되지 않은 올리고뉴클레오티드를 5×SSP 완충액중 0.1 % SDS 로 세척 제거하였다.

상기 세척된 플레이트에 형광 표지된 링커 올리고뉴클레오티드를 첨가하고, 0.1% 트리톤 X-100을 함유하는 6×SSPE 중 실온에서 30 분간 혼성화시켰다. 이는 링커에 첨부된 바람직한 프로토콜이다. 링커 올리고뉴클레오티드는 합성중에 cy5-유도체화되었고, 25 개의 염기쌍 분절중에서 특정 앵커 올리고뉴클레오티드에 대해 상보성이 있었다. 7 개의 앵커 및 링커의 서열은 하기와 같다 (모두 5' 에서 3' 쪽으로 나타내었다):

#1 앵커*: 서열 1

TCCACGTGAGGACCGGACGGCGTCC

링커** 서열 2

GTCGTTTCCATCTTTGCAGTCATAGGATACTGAGTGGACGCCGTCCGGTCCTCACGTGGA

RNA 유사체(마우스 C-jun) 서열 3

CTATGACTGCAAAGATGGAAACGACGATGCTGAGTTGGACCTAACATTCGATCTCATTCA

검출 올리고뉴클레오티드*** 서열 4

TGAATGAGATCGAATGTTAGGTCCA

#2 앵커*: 서열 5

CACTACGGCTGAGCACGTGCGCTGC

링커** 서열 6

CTAGGCTGAAGTGTGGCTGGAGTCTGCAGCGCACGTGCTCAGCCGTAGTG

RNA 유사체(마우스 MIP-2) 서열 7

AGACTCCAGCCACACTTCAGCCTAGGATACTGAGTCTGAACAAAGGCAAGGCTAACTGAC

검출 올리고뉴클레오티드*** 서열 8

GTCAGTTAGCCTTGCCTTTGTTCAG

#3 앵커*: 서열 9

GTCAGTTAGCCTTGCCTTTGTTCAG

링커** 서열 10

ACCATGTAGTTGAGGTCAATGAAGGGCGCTCCCACAACGCTCGACCGGCG

RNA 유사체(마우스 GAPDH) 서열 11

CCTTCATTGACCTCAACTACATGGTGATACTGAGTGGAGAAACCTGCCAAGTATGATGAC

검출 올리고뉴클레오티드*** 서열 12

GTCATCATACTTGGCAGGTTTCTCC

#4 앵커*: 서열 13

GAACCGCTCGCGTGTTCTACAGCCA

링커** 서열 14

CTACCGAGCAAACTGGAAATGAAATTGGCTGTAGAACACGCGAGCGGTTC

RNA 유사체(마우스 L32 단백질) 서열 15

ATTTCATTTCCAGTTTGCTCGGTAGGATACTGAGTGAGTCACCAATCCCAACGCCAGGCT

검출 올리고뉴클레오티드*** 서열 16

AGCCTGGCGTTGGGATTGGTGACTC

#5 앵커*: 서열 17

CTCGTTCCGCGTCCGTGGCTGCCAG

링커** 서열 18

CTGGCAGCCACGGACGCGGAACGAG

#6 앵커*: 서열 19

CGGTCGGCATGGTACCACAGTCCGC

링커** 서열 20

GCGGACTGTGGTACCATGCCGACCG

#7 앵커*: 서열 21

GCGCGCCGCGTTATGCATCTCTTCG

링커** 서열 22

CGAAGAGATGCATAACGCGGCGCCG

* 앵커는 5' 말단에서 아미드를 가진 C12 스페이서로 합성되었다.

** 링커는 5' 말단에 부착된 Cy5 로 합성되었다.

*** 검출 올리고뉴클레오티드는 5' 말단에 부착된 비오틴으로 합성되었다.

각웰에 하나의 링커 또는 링커의 혼합물 (도면에 나타낸 바와 같이)를 과량 첨가하였다. ("all"로 표시된 웰에 7 가지 링커 모두의 혼합물을 첨가하였다). 인큐베이션 및 5×SSP 로 3 회 세척한 다음, 툰드라 이미저 (IRI, St. Catherines, Ontario)로 형광 사진을 도면의 오른편에 나타내었다. 알 수 있는 바와 같이, 링커는 그들의 상보적인 앵커과 특이적으로 결합함으로써 기판에 자가-집합한다.

8 개의 상이한 앵커들이 각 웰에 분산되어 있고 이어서 링커가 그들과 바람직하게 연결되어 있는 것을 제외하고는, 상기 공정을 반복한다. 24, 96, 384, 864 또는 1536 웰 플레이트의 각 웰에서 36개, 64 개 등의 상이한 앵커로 전체 공정을 반복한다.

실시예 2: 결합 동력학 (도 11 참조)

부착된 그의 상보성 앵커에 대한 Cy5-유도체화된 링커 번호 1의 혼성화 비율을, 링커의 상이한 농도에 대해서 나타냈다. 일반적인 MAPS 플레이트를, 앵커 1 이 웰 당 4 개의 반점에 부착된 것을 제외하고는, 도 1에서와 같이 제조하였다. 실온에서 0.1% 트윈-20을 함유하는 5×SSP중에서 인큐베이션을 시켰고, 웰을 5×SSP로 3 회 세척하였고, 결합된 형광성을 측정하였다. 플레이트의 형광 사진을 툰드라로 제작하였고, 뒷배경을 빼고 각 웰내에서의 각 반점의 통합된 강도를 툰드라 소프트웨어로 계산하였다. 각각의 2 개의 중복된 웰 내에서 4 개의 반점에 대한 통합된 강도에 평균 및 표준 편차를 도면으로 나타내었다.

실시예 3: 형광 링커

일반적인 MAPS 플레이트를, 상기 언급된 방법에 따라서, 웰 당 1 개의 반점(윗쪽 2 줄), 웰 당 4 개의 반점 (다음 4 줄) 또는 웰 당 16 개의 반점 (아랫쪽 2 줄)로 생겨난 하나의 앵커링 올리고뉴클레오티드로 제조하였다. 각 웰에 상보성이 있고, 형광 표지된 링커를 실시예 1에 기재된 바람직한 프로토콜에 의해 부착시켰다. 세척한 다음, 플레이트의 형광 사진을 툰드라로 제작하였다. 각 반점에서의 형광량은 관능성 링커가 표적에 얼마 만큼 혼성화되었는지를 나타낸다. 반복된 반점에서 검출된 시그날의 양은 상당히 반복재현가능하다.

실시예 4: 결합 곡선

실시예 3에 기재된 바와 같이 제조된 플레이트에 상이한 농도의 표적 올리고뉴클레오티드를 첨가하였다. 결합된 링커는 표적의 일부분에 상보적인 25-머 서열을 함유하였다. 표적을 총 부피 30 또는 100 마이크로리터인 0.05% SDS를 함유하는 5×SSC중에 첨가하고, 플레이트를 덮고 50 ℃에서 하룻밤동안 인큐베이션시켰다. 표적을 부착된 링커에 혼성화시킨 다음, 표적을 화학발광을 이용한 바람직한 프로토콜에 따라서 시각화하였다. 표적의 별개의 부분에 상보적인(링커에 상보성이 있는 동일한 부분에는 상보성이 없다) 25-머 서열을 함유하는, 비오티닐화된 검출 올리고뉴클레오티드를 30 nM로 첨가하였다. 과량의 비부착된 표적을 세척 제거한 후 30분간 비오티닐화된 검출체를 첨가할 수 있고, 또는 하룻밤 혼성화하는 동안 표적을 따라 첨가할 수 있다. 검출체를 부착한 다음, 기판을 5×SSC로 2회 세척하고, 0.1% 트윈-20 및 1% PEG (SSPTP)을 함유하는 1×SSP로 1회 세척하고, 250 ㎍/ml 호스 래디쉬 퍼옥시다제 접합된 스트렙토아비딘 (HRP:SA, Pierce 사제, Rockford, III.)의 1:50,000 희석액을 SSPTP중에 실온에서 5 시간 동안 첨가하였다. 웰을 SSPTP로 4 회 세척하고, 1 회 세척한 다음 수퍼 시그날 울트라 시약(Pierce)로 인큐베이션시켰다. 수분 후, 발광 영상을 툰드라

이미저로 모으는데, 예를 들어, 영상을 CCD 배열내에 5분간 축적시킬 수 있다. 낮은 수준의 표적이 일부 웰에서 ~5×10^{-13} M 만큼 적은 표적 농도로 시각화되었고; 시그날의 양은 일반적으로 ~10^{10} M의 표적 농도로 포화되었다. 반복되는 반점에서 검출된 시그날의 양은 상당히 반복재현가능하다.

실시예 5: 2 개의 올리고뉴클레오티드의 분석 (도 12 참조)

상기 언급된 바람직한 프로토콜을 이용하여 2 개의 상이한 표적 올리고뉴클레오티드에 대한 MAPS 혼성화 분석을 측정하는 결합 곡선을 나타내었다. 일반적인 MAPS 플레이트를 각 웰내에서 각기 4 회 반점으로 나타난 4 개의 상이한 앵커링 올리고뉴클레오티드로 제조하였다. 두 번째 및 네 번째 앵커에 대해서, 상보적인 링커 올리고뉴클레오티드를 기재된 바와 같이 기판상에 자가-집합시켰다. 2 개의 표적을 표시된 농도로 기재된 바와 같이 각 웰에 40 마이크로리터 첨가하고, 50 ℃에서 하룻밤 인큐베이션시켰다. 부착된 각 표적의 양은 각 표적에 특이적인 비오티닐화된 검출 올리고뉴클레오티드를 부착시킨 다음 기재된 바와 같이 HRP:SA 및 화학발광 이미지로 시각화시켰다. 아랫쪽 판넬에서, 이미지의 강도를 정량화하였다. 툰드라 이미저 패키지의 부분인 소프트웨어를 사용하여 윗쪽 판넬에 나타낸 화살표 사이의 선을 따라 이미지의 강도를 조사하였다. 표적의 가장 낮은 농도, 1.1 pM 에서, 조사된 이미지를 각 반점에서 이미 정의된 가우스 정수의 피크로 나타내고, 반면 표적의 농도 0 에서는, 가장 왼쪽의 시료에 나타낸 배경 피크와 구분되지 않았다.

실시예 6: 감도 변화 (도 13 참조)

MAPS 혼성화 분석은, 올리고뉴클레오티드를 기판에 결합시키고 그들을 표지시킴으로서, 일련의 올리고뉴클레오티드의 농도를 측정하는데 사용될 수 있다. 이는 적당하거나 또는 낮은 농도인 올리고뉴클레오티드에 대해서 잘 된다. 하나의 시료가 더 많은 올리고뉴클레오티드를 함유한다면, 더 많이 결합할 것이기 때문에, 이러한 경우에는 2 개의 시료가 구별될 수 있다. 한편, 표적화된 올리고뉴클레오티드의 농도가 기판에 대해 포화된다면 (예를 들어, 모든 결합 부위를 차지하기에 충분히 높다면), 이어서 농도가 증가한다면, 더 이상 결합할 수 없으므로, 그 양을 측정할 수 없다. 그러나, 표적의 결합 곡선은 비표지된 경합 시그날에 의해서 변화될 수 있다.

결합 데이타는 4 개의 상이한 올리고뉴클레오티드 표적에 대해 수득될 수 있고, 이 모두는 약 3 nM 에서 기판을 포화시켰다 (예를 들어, 최고 결합에 도달하였다). 비표지된 경합 표적을 모든 웰에 첨가하여, 표지된 올리고뉴클레오티드의 결합이 변화하여, 더 낮은 농도에서 덜 결합하고, 포화되는 수위가 상승 이동한다. 즉, 표적 1 및 3 에 대한 경합 올리고뉴클레오티드를 첨가할 수 있지만, 표적 2 및 4 에 대해서는 첨가하지 않았다. 이는 표적 1 및 3에 대해서만 분석의 감도를 변화시켰다. 이러한 방법으로, 상당히 상이한 농도의 올리고뉴클레오티드 표적들을, 예상되는 올리고뉴클레오티드의 상대량이 공지라면, 하나의 분석내에서 측정할 수 있다.

데이타를 하나의 올리고뉴클레오티드 표적의 결합에 대해 상기 설명된 바와 같이 정량화할 수 있다. 도 13은 분석에 경합 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것이 상기 표적에 대한 분석에 사용된 결합 곡선을 더 높은 농도로 변화시킨다는 것을 보여준다.

실시예 7: 4 개의 프로브의 용융 온도 (도 14 참조)

MAPS 분석에 의한, 앵커 올리고뉴클레오티드에 특이적으로 혼성화된 4 개의 상이한 형광 표지된 링커 올리고뉴클레오티드의 양을 온도가 상승함에 따라 도면으로 나타내었다. 4 개의 올리고뉴클레오티드를 우선 50 ℃에서 1 시간 동안 300 nM 으로 혼성화시켰다. 이어서 웰을 프로브 없이 SSC로 세척하고, 결합된 양을 형광에 의해 (50 ℃) 상기와 같이 측정하였다. 이어서 기판을 55 ℃에서 30 분간 인큐베이션시키고, 결합된 형광을 측정한 다음, 모든 온도에 대한 것을 나타내었다.

실시예 8: 검출 방법

2 개의 검출 방법을 직접 비교할 수 있다. 4 개의 올리고뉴클레오티드 앵커가 웰 당 4 개 반점으로 각기 부착된 MAPS 플레이트에, 둘 모두 공유결합으로 부착된 cy5 부위를 포함하거나 또는 비오틴기를 함유하는, 2 개의 올리고뉴클레오티드를 각 웰에 첨가하였다. 형광 링커을 관찰하고 측정하기 위해 기재된 바와 같이 epi-형광 측정법을 수행하였다. HRP:SA 및 화학발광 기질의 잇따른 첨가를 이용하는 MAPS 분석에 대해 기재된 바와 같이 화학발광 측정법을 수행하였다. 발생된 시그날은 대략적으로 동일한 규모이다. 그러나, 각 웰을 분리하는 벽을 포함하는 마이크로플레이트의 형태, 및 일시적인 액체의 거품 또는 유액의 미니스커스로 인한, epi-형광 이미지에서의 반사가 데이타 해석에 있어서 방해를 일으킬 수 있다.

실시예 9: 화학발광 생성물

호스 래디쉬 퍼옥시다제에 대한 화학발광 기질로서 이용가능한 2 개의 생성물을 MAPS 분석에 대한 검출 방법으로서 비교할 수 있다. MAPS 플레이트를 실시예 8 에서와 같이 제조하고, 비오티닐화된 링커 올리고뉴클레오티드와 함께 인큐베이션시켰다. 이어서 스트렙토아비딘에 커플링된 알칼린 포스파타제 (AlkPhos:SA) 또는 HRP:SA를 첨가한 다음, 세척하고 웰에 AlkPhos:SA 와 함께 CDP-Star (Tropix) 또는 HRP:SA와 함께 ECL-Plus를 첨가하였다. SA 유도체화된 효소 및 기질로의 표지는 웨스턴 블롯의 표지에 사용을 위해 제조사에서 제시한 바와 같다. 상기 2 개 (뿐만 아니라 다른 유용한 기질)는 모두 MAPS 플레이트레 올리고뉴클레오티드 혼성화를 평가하는데 사용될 수 있다.

실시예 10: 0.6 mm에서의 해상도

MAPS 분석에 대한 현행 시스템의 해상도를 웰 당 각기 4 회 반점이 나타난 웰에 대해 4 개의 상이한 올리고뉴클레오티드 앵커를 가지고, 0.6 mm의 피치 (중심 사이의 공간)를 갖는, MAPS 플레이트를 제조하여 시험하였다. 이어서 cy5-유도체화된 링커 또는 비오티닐화된 링커를 혼성화시키고 검출하여 상기와 같이 조사하였다. epi-형광 측정에 대해, 해상도가 더 높았다 (피치는 감소될 수 있다). 화학발광 검출 방법에 대해서는, 인접한 반점이 완전히 분리되지 않았으나, 그래도 상기 공간에서, 각각의 피크는 컴퓨터 디컨볼루션에 의해 명백하게 분석될 수 있다.

실시예 11: 뉴클레아제 보호 시험 프로토콜

뉴클레아제 보호 프로토콜을 위한 혼성화 및 뉴클레아제 처리의 적정 조건을 시험하기 위한 분석에 있어서, 뉴클레아제 보호 분석 키트 (Ambion, Austin, Texas)가 조건, 완충액 및 효소를 제공하기 위해 사용되었다. 8 개의 시료가 3 개의 완충액중 하나중에 제조되었다: Hyb Buff 1 은 100% 혼성화 완충액(Ambion); Hyb Buff 2 는 75% 혼성화 완충액 및 25% 혼성화 희석 완충액(Ambion); 및 Hyb Buff 3 은 각기 50% 이다. 시험 mRNA 에 상보적인 60 개의 잔기를 함유하는 70-머 올리고뉴클레오티드를 합성하고 (Biosource International, Camarillo, CA), 소랄렌-플루오레세인 (Psoralen-fluorescein; Schleicher and Schuell, Keene, NH)로, Ambion 사에 의해 소랄렌-비오틴의 표지를 위해 제시된 프로토콜에 따라서, 표지시켰다. 간단하게, 보호 단편을 10 분간 끓인 20 ㎕의 TE 완충액 (10 mM 트리스, 1 mM EDTA, pH 8)중에 50 ㎍/ml 으로 희석하고, 재빨리 얼음물에 냉각시켰다. DMF 중 130 ㎍/ml 소랄렌-플루오레세인을 4 ㎕ 첨가하고, 시료를 손에 들고 쓰는 장파장 UV 원으로 40 ℃에서 45 분간 발광시켰다. 유리 소랄렌-플루오레세인은 포화 부탄올로 추출하여 제거하였다. 사용된 mRNA 는, T7 프로모터 및 MaxiScript 키트 (Ambion)를 이용하여 안티센스 플라스미드 (pTR1-GAPDH-마우스 안티센스 대조구 템플레이트, Ambion)로부터 제조된, GAPDH 안티-센스 mRNA 이다. 짧은 보호 단편은 개별적으로 합성되고 유사하게 표지된 60-머 상보성 부분이다. 보호 단편의 서열은 하기와 같다:

보호 단편의 전체 길이 서열 23

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTGCTTGCTTGTCTAA

짧은 보호 단편 서열 24

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTGCTT

혼성화는 22 ℃ 또는 37 ℃ 에서 2 시간 동안 10 ㎕ 최종 부피에서 60 nM 인 GAPDH mRNA 와 20 nM 인 보호 단편을 혼합하여 수행되었다. 혼성화에 이어서, 200 ㎕의 뉴클레아제 혼합물을 제조자의 지시에 따라서 (Ambion Nuclease Protection Kit, 뉴클레아제 혼합물의 1:200 희석) 첨가하고 동일한 온도에서 30 분간 다시 인큐베이션시켰다. 혼성화 저해 완충액 (Ambion)으로 혼성화를 정지시키고, 올리고뉴클레오티드를 펠렛화시킨 다음 에탄올로 세척하였다. 10 ㎕의 1×겔 로딩 완충액 (Ambion)을 첨가하고 올리고뉴클레오티드를 15% TBE 우레아 겔상에서 분리하였다. 겔을 런닝 완충액내에서 30 분간 돌리고, 플라스틱판에 올려놓고 파장의 여기 및 발산을 선별하기 위한 플루오레세인 필터를 이용하여 툰드라로 이미지화시켰다. 이미지를 CCD 배열에 2분간 축적시켰다. 가장 좋은 조건은 Hyb Buff 2 에서 37 ℃ 로 또는 Hyb Buff 3 에서 22 ℃ 로 시료를 인큐베이션시키는 것이고, 짧은 보호 단편와 동일한 크기인 전체 길이의 보호 단편의 부분의 상당량을 나타내었다.

실시예 12: NPA-MAPS에 의한 mRNA 분석 (도 15 참조)

실시예 11에 기재된 바와 유사한 혼성화 및 뉴클레아제 처리 조건으로, 전체 NPA-MAPS 프로토콜을 사용하였다. 10 개의 시료로 분석을 수행하였다. 모두는 동일한 양의 70-머의 올리고뉴클레오티드 보호 단편 및 상이한 양의 GAPDH mRNA를 함유하였다. 50% 혼성화 완충액 및 0.08 mg/ml 효모 RNA (Ambion)을 함유하는 50% 희석 완충액중 10 ㎕인 혼성화 시료를 90℃로 6 분간 가열하고, 간단하게 원심분리하고, 70 ℃로 5 분간 가열한 다음 19 ℃로 냉각시키고 19 시간 동안 인큐베이션시켰다. 200 ㎕의 뉴클레아제 혼합물을 이어서 각 시료에 19 ℃에서 30 분간 첨가하였다. 각 시료로 부터 60 ㎕씩을 MAPS 분석에 분주하였다. 2 ㎕의 10 N NaOH 및 2 ㎕의 0.5M EDTA를 첨가하고, 시료를 90 ℃로 15분간, 37 ℃로 15 분간 가열하고, 실온에 20 분간 방치시켰다. 이어서 시료를 2 ㎕의 10 M HCl 로 중화시키고, 2M HEPES (pH 7.5) 및 200 nM 보호단편에 특이적인 비오티닐화 검출 올리고뉴클레오티드를 함유하는 12 ㎕의 20×SSC 를 1 ㎕의 10% SDS 와 함께 첨가하였다. 시료를 혼합하고, 80 ℃로 5 분간 가열하고, 각 시료의 35 ㎕ 분주 2 개를 MAPS 플레이트의 2 개의 웰에 피펫팅하였다 (각 시료를 두개로 나누고 MAPS 플레이트상에서 중복하여 수행하였다). 플레이트를, 이미 부착된 자가-집합 CY5-유도체화된, 보호 단편에 특이적인 링커로, 표준 MAPS 프로토콜에 따라서 제조하였다. MAPS 플레이트를 덮고 50 ℃에서 하룻밤동안 인큐베이션시키고, 기재된 바와 같이 발관을 수행하였다. 보호 단편만으로는 MAPS에 의해 어떻게 검출되는 지를 시각화하기 위한 대조구로서 분석중에 뉴클레아제를 첨가하지 않았다. 도면의 아랫부분에, 웰의 윗 줄에 대한 (이미저로 분석한)강도 조사를 나타내었다. 시료중에 존재하는 GAPDH mRNA 의 양 (즉, MAPS 플레이트에 분주한 후 각 중복된 웰에서의 양)을 도면에 기재하였다.

MAPS 플레이트에 사용된 올리고뉴클레오티드는 하기와 같다:

앵커* 서열 25

CGCCGGTCGAGCGTTGTGGGAGCGC

링커** 서열 26

CTTGAGTGAGTTGTCATATTTCTCGGATACTGAGTGCGCTCCCACAACGCTCGACCGGCG

보호 단편 (GAPDH에 대한 마우스 안티센스 mRNA에 상보적) 서열 27

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTGCTTGCTTGTCTAA

검출 올리고뉴클레오티드***-5' 말단에 비오틴으로 표지 서열 28

AAGCAGTTGGTGGTGCAGGATGCAT

* 앵커는 5' 말단에서 아미드와 함께 C12 스페이서로 합성되었다.

** 링커는 5' 말단에 부착된 Cy5 로 합성되었다.

*** 검출 올리고뉴클레오티드는 5' 말단에 부착된 비오틴으로 합성되었다.

실시예 13: 희석 곡선, NPA-MAPS (도 16 참조)

실시예 12에서 언급되고 도 15에 나타낸 데이타를 정량화하여 희석곡선으로 나타내었다. 2 개의 중복된 웰의 8 개의 반점 모두에 대한 평균 및 표준 편차를 mRNA 의 각 농도에 대해 도면으로 나타내었다. 결합 곡선을 하기의 형태로 포개놓았다:

결합된 분획 = 최대 결합* $1/(1 + IC_{50}/L)$

(이중, 최대 결합은 포화상태에서 결합된 최대값이고, 결합된 분획은 리간드 농도 L 에서 결합된 양이고, IC_{50} 은 결합된 분획이 최대 결합의 절반일 때의 리간드의 농도이다). 곡선은 도면에서 붉은 점으로 나타내고, 도면에 표지된 바와 같이 IC_{50}=4.2 펨토콜의 최고 적당한 값으로 그려졌다.

실시예 14: 마우스 간 RNA 추출물 전체에서 GAPDH mRNA 의 NPA-MAPS 분석

마우스 RNA 전체 추출물을 NPA-MAPS 분석법으로 GAPDH mRNA 에 대해 분석하여 희석 곡선을 나타내었다. 마우스 간으로부터의 총 RNA는 Qiagen 키트를 이용하여 제조되었다. RNA를 0.5 M Mg-아세테이트를 함유하는 70% EtOH로 침전시키고, 0.05% SDS 를 함유하는 10 ㎕의 5×SSC중에 1.8 nM 보호 단편을 재현탁시켰다. 첨가된 보호 단편은 70 염기 길이의 올리고뉴클레오티드로, 이중 60 개의 염기는 마우스 GAPDH 에 상보성이 있다. 마우스 GAPDH mRNA에 상보적인 단편이 사용되거나 ("보호 단편") 또는 서열의 보충물이 음성 대조구로서 사용된다("안티센스 단편").

보호 단편을 함유하는 RNA 시료를 90℃로 5 분간 가열하고, 시료를 70 ℃로 만들어 혼성화를 수행한 다음 밤새도록 천천히 실온으로 냉각시켰다. 1:10 희석된 S1 뉴클레아제 (Promega)를 30 ㎕의 1×S1 뉴클레아제 완충액(Promega)중에 19 ℃에서 30 분간 첨가하고, 1.6 ㎕의 10 N NaOH 및 2.7 ㎕의 0.5 M EDTA로 정지시켰다. 시료를 90 ℃로 15 분간 가열한 다음 37 ℃로 15 분간 가열하여 변성시키고 RNA를 파괴하고, 1.6 ㎕의 10 M HCl로 중화하고, 30 nM 비오티닐화된 검출 올리고뉴클레오티드를 첨가된, 0.05% SDS를 함유하고 200 mM HEPES (pH 7.5)가 보충된 5×SSC 중에 하룻밤동안 MAPS 상에서 인큐베이션시켰다. 세척 및 SA-HRP로의 시각화를 기재된 바와 같이 수행하였다. 시그날의 양은 마우스 RNA의 양이 감소함에 따라 (시료는 전체 마우스 RNA에 대해서 500, 170, 50, 5 또는 0.5 ㎍ 을 함유) 평행적으로 감소하였다. S1 뉴클레아제가 첨가되지 않은 2 개의 대조구 시료가 포함된다. 시그날은 상보적인 보호 단편에 대해서만 나타난다.

사용된 올리고뉴클레오티드:

안티센스 대조구 (실시예 12에서와 동일한 올리고뉴클레오티드):

앵커* 서열 25

CGCCGGTCGAGCGTTGTGGGAGCGC

링커** 서열 26

CTTGAGTGAGTTGTCATATTTCTCGGATACTGAGTGCGCTCCCACAACGCTCGACCGGCG

보호 단편 (GAPDH에 대한 마우스 안티센스 mRNA에 대해 상보적) 서열 27

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTGCTTGCTTGTCTAA

검출 올리고뉴클레오티드*** 서열 28

AAGCAGTTGGTGGTGCAGGATGCAT

센스 GAPDH mRNA 시료에 대해서:

앵커* 서열 25

CGCCGGTCGAGCGTTGTGGGAGCGC

링커** 서열 29

ATGCATCCTGCACCACCAACTGCTTGATACTGAGTGCGCTCCCACAACGCTCGACCGGCG

보호 단편 (GAPDH에 대한 마우스 안티센스 mRNA에 대해 상보적) 서열 30

AAGCAGTTGGTGGTGCAGGATGCATTGCTGACAATCTTGAGTGAGTTGTCATATTTCTCGGCTTGTCTAA

검출 올리고뉴클레오티드*** 서열 31

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAG

* 앵커는 5' 말단에서 아미드와 함께 C12 스페이서로 합성되었다.

** 링커는 5' 말단에 부착된 Cy5 로 합성되었다.

*** 검출 올리고뉴클레오티드는 5' 말단에 부착된 비오틴으로 합성되었다.

실시예 15: 대조구와의 뉴클레아제 보호 MAPS 분석

mRNA를 마우스 간으로부터 추출하고 뉴클레아제 보호를, GADPH 특이적 보호 단편은 마우스 GAPDH에 상보적인 60 개의 뉴클레오티드를 함유하고, 그에 이어서 표적에는 상보성이 없는 15 개의 "돌출" 뉴클레오티드를 단편의 3' 말단에 함유하는 것을 제외하고, 본래 실시예 14에 기재된 바와 같이 수행하였다. 혼성화 및 뉴클레아제 절단 후, 남아있는 보호 단편을, 2 개의 상이한 올리고뉴클레오티드 검출 단편를 사용하여 고정된 보호 단편을 검출하는 것을 제외하고, 실시예 14 에 기재된 바와 같이 MAPS 플레이트에 혼성화시켰다. 하나의 보호 단편은 보호 단편의 GAPDH-특이적 부분에 상보적이고, 대조구인, 다른 하나는 보호 단편의 15 개의 염기 돌출 부분에 상보적이다. 각 보호 단편은 상이한 복제 시료 (예를 들어, 상이한 웰에서)상에서 사용되므로, 보호 단편 모두 동일한 검출 분자로 표지될 수 있다. 본 실시예에서는, 두 단편이 HRP 로 표지되었다. 뉴클레아제를 첨가하지 않고, 두 보호 단편으로부터의 시그날을 나타내었고; 반면, 뉴클레아제 절단이 수행되는 경우에는, GAPDH 서열에 해당하는 시그날만이 검출될 수 있다. GAPDH-특이적 시그날의 양은, 보호 단편이 존재하는 GAPDH mRNA의 양에 비해 과량으로 첨가되기 때문에, 뉴클레아제로 절단되지 않은 상태에서 관찰된 것에 비해서 감소되었다. 이는 GAPDH mRNA의 양을 보호성 혼성화에 한정시키기 때문에, 형성된 이중가닥의 혼성화의 양 (그러므로 뉴클레아제로부터 보호된 보호 단편의 양)은 mRNA의 양을 반영한다. mRNA가 반응 혼합물에 포함되지 않는 경우에는, 뉴클레아제가 첨가된 경우에 시그날이 검출될 수 없다. 상기 발견은 분석의 혼성화 및 절단 단계가 바람직하게 발생되었다는 것을 증명하고 있다.

다양한 표적에 해당하는 보호 단편이 목적하는 분석에 포함되는 경우, 각 보호 단편은 동일한 15 개 염기의 돌출부분을 포함할 수 있다. 이는 하나의 보호 단편을 모든 시료의 남아있는 돌출에 대한 시험에 사용될 수 있도록 하였다.

실시예 16: 질병상태와 관련된 유전자 발현을 변화시킬 수 있는 화합물을 스크리닝하는 전사 분석

인간 종양으로부터 유래된 세포주가 사용되었다. 정상적인 세포에서 보다 더 높은 수준으로 30 개의 유전자를 발현한다는 것을 발견하였다 (즉, 이 30 개의 유전자는 정상 세포에서 보다 더 많이 사용되어 mRNA를 만들고 이어서 유전자가 지시하는 단백질을 만든다. 전사 분석은 각 유전자에 대한 mRNA가 얼마나 존재하는 지를 측정하여 유전자가 얼마나 사용되는 지를 측정한다). MAPS 플레이트상에서의 뉴클레아제 보호 분석 (NPA-MAPS)를 이용하여, 8800 개의 화학 화합물을 테스트하여 세포가 화합물의 존재하에서 성장하는 것이 6 개의 정상 (구조 "하우스키핑") 유전자의 발현에 영향을 주지 않고 30 개의 연관된 유전자중 일부의 발현을 감소시킬 수 있는 지를 밝혔다. 그러한 효과를 갖는 임의 화합물은 앞으로 이러한 종류의 종양을 치료하기 위한 약제의 개발에 유용할 수 있다.

약 10,000 내지 100,000개의 세포를 100 개의 96-웰 플레이트의 각 웰에 첨가하고 세포가 각 웰의 표면을 덮을 때 까지 2 일 간 성장시켰다. 각 플레이트의 8 개의 웰에 대해서는, 첨가없이 세포를 성장하도록 두었다. 각 플레이트의 나머지 88 개의 웰에는 상이한 화학 화합물의 효과만을 시험할 수 있도록 화학 화합물을 첨가하였다. 동시에 100 개의 플레이트를 사용하여, 8800 개의 화합물이 시험되거나 스크린될 수 있다. 세포를 화합물의 존재하에서 24 시간 동안 성장시킨 다음 세포를 분석을 위해 수합하였다. 각 플레이트에서의 세포를 96-웰 플레이트로부터의 시료중에 RNA를 제조하기 위한 지시에 따라서 (예를 들어, Qiagen RNase 96 키트에 따라서) 처리하였다. RNA가 제조된 후, 36 개의 상이한 mRNA 종류 각각의 양을, 30 개의 연관된 유전자 및 6 개의 정상 "하우스키핑" 유전자를 포함하는, NPA-MAPS 방법으로 정량화하였다. 목적하는 유전자중 하나에 각기 상응하는, 36 개의 DNA 올리고뉴클레오티드 보호 단편을 각 웰에 첨가하고 표적 mRNA 서열에 대해 선별된 엄격한 조건하에서 혼성화시켰다. 이어서 S1 뉴클레아제를 첨가하여 과량의 비혼성화된 DNA를 파괴하고, 시표를 화학적으로 처리하여 RNA 또한 파괴하였다. 각 시료에 대해 처리된 세포중에 mRNA가 얼마나 존재하는 지에 따른 비율로 36 개의 유전자 각각에 대한 올리고뉴클레오티드 보호 단편이 남아있다.

각 웰에서 36 개의 상이한 앵커 올리고뉴클레오티드의 복수개 배열을 함유하는, 100개의 96-웰 플레이트를, 각 웰에 36 개의 상이한 링커 올리고뉴클레오티드를 첨가하여 제조하였다. 일반적인 플레이트를 MAPS 플레이트로 전화시킨, 각 웰의 표면상의 링커 자가-집합은 36 개의 올리고뉴클레오티드 보호 단편 각각에 대한 특이적인 프로브를 함유하였다. 각 링커는 36 개의 앵커중 하나에 특이적인 부분과 36 개의 보호 올리고뉴클레오티드중 하나의 분절에 특이적인 부분을 포함한다. 100 개의 시료 플레이트의 각 웰로부터의 올리고뉴클레오티드 시료를 100 개의 MAPS 플레이트의 상응하는 웰에 첨가하였다. 선별된 엄격한 조건하에서 혼성화한 후, 화학발광 효소를 부착시킨 각 표적에 대한 검출 올리고뉴클레오티드를 첨가하여, 각 웰의 각각 특이적인 반점이 시료중에 존재하는 mRNA의 양에 비례하여 빛을 낸다. 6 개의 하우스키핑 유전자에 영향을 주지 않고 연관된 유전의 양을 감소시킨 것으로 나타난 웰들이 흥미롭다. 이러한 시료에 대해 세포에 첨가된 화합물은 항암제를 개발하는에 가능한 출발점이 된다.

실시예 17: 유도 및 구조 유전자 발현

감염되지 않은 ("대조구") 또는 아데노바이러스로 감염된 지 1 시간 후의("감염된") 마우스의 간으로부터, 실시예 14에 기재된 바와 같이 RNA를 제조하였다. 60 ㎍의 간 RNA를 각 시료로 사용하고, 시료를 중복하여 제조하였다. 분석 웰은 상기 기재된 3 개의 유전자에 해당하는, 3 종류의 중복 로커스를 함유하였다. 각 로커스는 3 개의 유전자중 하나에 해당하는 보호 단편에 상보적인 프로브를 함유하는 링커에 결합된 앵커를 함유하였다. 뉴클레아제 보호 MAPS 분석을 실시예 12에 기재된 바와 같이 수행하였고, 이미지를 수합하여 기재된 바와 같이 조사하였다. 수합된 본래의 이미지 데이타를 나타내고 그 강도를 3 개의 mRNA 표적 각각에 대한 중복된 웰에 대해 조사하였다. 조사선위의 숫자는 합해진 강도 수치이며 각 조건에 대한 표준 편차 (n=4)이다. 변화할 것으로 예측되지 않는, 하우스-키핑 유전자, GAPDH가 감염된 시료에서 1.3 배 적당히 증가하는 것을 나타났으나 이는 통계학적으로 중요하지 않다. MIP-2 및 c-jun의 전사는 각각 4 배 및 6 배 증가하였다. 이러한 발견은 2 개의 유전자, MIP-2 및 c-jun 가, 대조구인 구성적으로 발현되는 유전자-GAPDH와 비교하여, 아데노바이러스 감염에 반응하여 향상된 발현을 나타낸다는 것을 증명하였다.

실시예 18: 티로신 또는 세린 키나아제를 선택적으로 억제하는 화합물을 스크리닝하기 위한 효소 분석 (도 17 참조)

키나아제는 단백질에 포스페이트를 부착시키는 효소이다. 이중 많은 것이 정상세포 및 종양세포 성장을 자극하는 것으로 밝혀졌다. 그러므로, 특정 키나아제 (모든 키나아제는 아님)를 억제하는 화합물을 사용하여 키나아제가 병리학적으로 포함되는 지를 시험할 수 있고, 그렇다면, 약제학적 개발을 위한 출발점을 제공할 수 있다. 예를 들어, 세포 성장을 촉진하거나 또는 염증반응을 조절하는데 포함되는 5 종류의 티로신 키나아제는 src. lck, fyn, Zap70 및 yes이다. 각 키나아제는 티로신을 함유하는 짧은 펩티드로서, 부분적으로 동정된 기질이다. 이러한 키나아제 특이성의 일부는 중복되어 다른 키나아제가 일부 펩티드는 똑같은 정도로 그러나 다른 것에서는 우선적으로 인산화시킬 수 있다. 상기 5 개의 키나아제에 대해서, 광범위하게 특이적이고 중복되는 특이성을 나타내는 36개의 펩티드 기질이 선택된다.

100 개의 96-웰 플레이트가 사용되고; 각 웰을 36 개의 일반적인 올리고뉴클레오티드 앵커를 함유한다. 36 개의 링커는 일반적인 올리고뉴클레오티드 배열 (앵커만을 가진)을 펩티드 기질을 포함하는 배열로 전화시켜 제조되었다. 36 개의 펩티드 기질을 합성하고 각각을 예를 들어, 5' 아미노기를 함유하는 올리고뉴클레오티드에 아미드 결합을 통해 공유결합으로 부착시켰다. 올리고뉴클레오티드는 앵커에 특이적으로 혼성화되는 서열을 함유한다. 펩티드/올리고 링커는 MAPS 플레이트의 모든 웰에 첨가되어 기판상에서 자가 집합되었다.

스크리닝을 위해서, (기질의 인산화 비율이 가능한 많이 균형을 이루도록 하는) 적절한 조건에서의 5 개의 키나아제를 시험되는 8800 개의 상이한 화합물중 하나씩을 함유하는 각 웰에 첨가하였다. 화합물을 단리된 효소를 직접 억제하는 능력에 대해서 시험하였다. 각 배열된 펩티드의 인산화 양은 티로신상에 인산화된 펩티드에만 결합하는 표지된 항체를 첨가함으로써 검출하였다. 포스포티로신 반점중 일부에서 감소를 나타내지만 반점 모두에 대한 것은 아닌 웰이 흥미롭다. 상기 웰에 첨가된 화합물을 시험된 키나아제의 가능한 선택적 억제제인지를 더 시험할 수 있다.

분석의 도식을 도 17의 상단에 나타내었다. 앵커중 하나에 상보적인 25 개의 염기쌍의 올리고뉴클레오티드가 티로신 포스포키나아제 효소의 펩티드 기질에 가교결합된, 키메라 링커 분자를 제조하였다. 키메라 올리고-펩티드 기질은 올리고뉴클레오티드 앵커의 배열상에 자가-집합하였고, 키나아제 효소를 사용하여 키메라의 펩티드 부분을 인산화시키고, 효소 반응을 진행시킨 후, 펩티드의 인산화 양을 부착된 검출 형광단 또는 효소를 가진 항-포스포티로신 또는 항-포스포세린 항체로 측정하였다.

분석 결과를 도면의 하단에 나타내었다. 단일 관능성 가교결합제, DSS (Pierce)를 사용하여 인산화된 티로신으로 합성된 펩티드의 N 말단에 올리고뉴클레오티드 링커의 5' 아미노기를 부착시켰다. 단일분자 코드로 나타낸 펩티드 서열은:

TSEPQpYQPGENL (서열 32)이고 pY 는 포스포티로신을 나타낸다. 키메라를 직접 이용하거나 또는 우선적으로 60 분 동안 pH를 14로 하여 티로신으로부터의 포스페이트기를 부분적으로 가수분해시켰다. 인산화된 또는 부분적으로 탈인산화된 키메라 분자는 1 시간 동안 나타낸 농도로 MAPS 플레이트내에 있는 상보적인 앵커 분자상에 자가-집합하였다. 세척 및 SSPTP 중의 0.3% BSA로 웰을 블록킹 후, HRP에 가교결합된 항포스포티로신 항체 (항체 4G10, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)를 SSPTP중에 1:3000 희석하여 1 시간 동안 첨가하고, 부착된 항체의 양을 화학발광 기질인, 수퍼 시그날 블레이즈 (Super Signal Blaze)로 검출하였다. 나타난 이미지를 CCD 배열상에서 1분간 축적시켰다. 예상한 바대로, 올리고-펩티드에 부착된 포스페이트의 양에 차이가 나타났다. 이러한 차이는 일련의 키나아제가 상이한 가능한 억제제로 처리되는 경우 어느 정도 활성을 갖는지를 측정하는 분석을 근거로 한다.

실시예 19: SH2 도메인과 인산화된 펩티드 사이의 상호반응에 대한 선택적 억제제의 검출을 위한 결합 분석

SH2 도메인은 일부 성장 조절 단백질의 도킹 서브유니트로서 제공된다. 도메인은 불완전환 특이성을 가진 단백질 또는 펩티드를 함유하는 포스포티로신에 결합한다. 즉, 일부 포스포티로신 펩티드는 하나 또는 수개만의 SH2 단백질에 특이적으로 결합하는 반면 다른 것들은 많은 SH2 단백질에 폭 넓게 결합한다.

이러한 분석을 위해서, 링커는 올리고뉴클레오티드에 공유결합으로 부착된 인산화된 펩티드이다. 펩티드 부위는 선택된 SH2 단백질의 군에 결합하는 그들의 능력에 따라 선별된다. 링커는 일반적인 MAPS 플레이트를 SH2 단백질의 군에 특이적인 리간드를 가진 플레이트로 전환시킨다. 100 개의 리간드를 가지고 있는 96-웰 MAPS 플레이트가 생성되었다. 단백질을 단리시키고, 예를 들어, cy5 형광 분자로 표지하였다.

SH2 도메인/포스포펩티드 상호반응의 억제제를 스크린하기 위해서, 표지된 SH2 단백질의 군을 100 개의 96-웰 MAPS 플레이트의 각 웰에 첨가하고, 각 웰에 상이한 시험 화합물을 첨가하였다. 그러므로, SH2 단백질과 그들의 포스포펩티드 리간드와의 상호반응에 대한 각각의 화합물의 효과를 시험하였다. 분석은 각 표면-결합된 펩티드 링커와 연결된 결합된 SH2 단백질의 형광도를 측정하였다. 모든 반점이 아닌 일부 반점에서 감소된 형광성을 나타내는 웰에 대해서, 첨가된 화합물을 SH2 도킹의 추정적인 선택적 억제제인 것으로 더욱 시험될 수 있다.

실시예 20: 고처리량 스크리닝 (도 22 참조)

단일 실험에서 96 웰로부터의 시그날의 검출을 증명하는 고처리량 MAPS 플레이트를 나타낸다. 동일한 올리고뉴클레오티드로의 혼성화를 80개의 웰에서 16회 반복하여 측정하였다. 나타낸 바와 같이, 1280 개의 혼성화 분석의 반복재현성은 매우 높다. 가장 왼쪽과 가장 오른쪽 컬럼은 올리고뉴클레오티드의 상이한 농도에 대한 시그날을 표준화시키기 위한 대조구를 제공한다.

유사한 방식으로, 16 개의 상이한 올리고뉴클레오티드를 각 웰에서 시험할 수 있고, 플레이트의 80 개의 상이한 웰에서 시험을 반복하였다. 물론, 훨씬 더 많은 수의 상이한 올리고뉴클레오티드 또는 다른 프로브 (예를 들어, 100 개의 뉴클레오티드 프로브)를 각 웰에서 분석할 수 있고, 많은 플레이트를 동시에 (예를 들어, 96-웰 마이크로타이터 플레이트와 같은, 플레이트 100 개) 시험할 수 있다. 각 시료에 대해 많은 수의 분석(예를 들어, 약 100 개의 상이한 분석)이 수행될 수 있고 및 동시에 많은 수의 시료(예를 들어, 약 96 ×100, 또는 9600 개의 상이한 시료)를 분석할 수 있다는 것으로 매우 고처리량을 제공한다.

실시예 21: 증폭된 표적의 제조 (도 23 참조)

PCR 프라이머 (프라이머 1)을 프라이머 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에서 도입된 화학적 변형을 통해 고상 지지체 (예, 비드 또는 반응 용기)에 부착시킨다. 상기 프라이머는 5' 내지 3'에 화학적 변형부, 제한 효소 부위, 및 목적하는 표적에 상보적인 서열 (예, 목적하는 mRNA의 cDNA 카피)을 포함한다. 상기 표적은 PCR 프라이머로서 부착된 프라이머 1과 프라이머 2를 이용하여 PCR에 의해 증폭되며, 프라이머 2는 5' 내지 3'에 검출 올리고뉴클레오티드에 특이적인 서열 및 프라이머 1과는 다른 부분의 표적에 상보적인 서열을 포함한다. PCR 증폭 후, 증폭된 표적 DNA를 세척하여 과량의 반응 물질을 제거하고, 프라이머 1 상의 제한 부위에 특이적인 제한 효소를 이용한 절단에 의해 고상 지지체로부터 방출시킨다. 따라서, 증폭된 프라이머는 액체 상으로 방출된다. 열적 방법 및(또는) 화학적 방법을 이용하여 제한 효소를 불활성화시키고 이중 가닥 DNA 생성물을 변성시킬 수 있다. 다음, 방출된 단일 가닥 DNA 표적 분자를 앵커 및(또는) 링커를 포함하는 기판과 접촉시킬 수 있고, 프라이머 2의 검출-특이적 서열에 상보적인 검출 올리고뉴클레오티드를 이용하여 상기 표적을 검출할 수 있다.

실시예 22: 증폭된 표적의 제조

PCR 프라이머 (프라이머 1)을 프라이머 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에서 도입된 화학적 변형을 통해 고상 지지체 (예, 비드 또는 반응 용기)에 부착시킨다. 상기 프라이머는 5' 내지 3'에 화학적 변형부, 프로테아제에 의해 절단될 수 있는 펩티드 서열, 및 목적하는 표적에 상보적인 서열 (예, 목적하는 mRNA의 cDNA 카피)을 포함한다. 펩티드 대신에, 특이적으로 절단될 수 있는 임의의 다른 요소를 사용할 수 있다. 예를 들어 실시예 21에 기재된 바와 같은 PCR 증폭 후, 여전히 고체 지지체에 부착되어 있는 PCR 생성물을 변성시키고, (임의로) 세척해내고, 지지체에는 단일 가닥 분자만 부착되어 있게 한다. 다음, 세척된 부착 분자를 (예를 들어, 적절한 프로테아제로 처리하여) 절단하고 방출시키고, 앵커 및(또는) 링커를 포함하는 표면과 접촉시킬 수 있다. 대안적으로, 증폭된 표적의 가닥을 변성시킨 후 방출시키고, 앵커 및(또는) 링커를 포함하는 표면과 접촉시킬 수 있다. 어떤 경우에는, 증폭된 표적 중 한 가닥만이 링커와 접촉 (예, 혼성화)되어, 증폭된 표적의 반대 가닥으로부터의 혼성화에 대한 경쟁이 감소되어 백그라운드가 감소된다. 링커는 증폭된 표적 가닥 중 하나에 또는 둘 다에 대해 특이적이도록 고안할 수 있다.

실시예 23: 검출 링커 및 리포터 제제에 대한 분석 (도 24 참조)

목적하는 mRNA를 포함하는 시료에 대해, 표적 특이적 잔기 및 조절 오버행 잔기 (mRNA에 대해 상보적이지 않음)를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 보호 단편으로서 사용하여 뉴클레아제 보호를 수행한다. 뉴클레아제 절단 후, 경우에 따라 도면에서 왼편에 도시한 바와 같이 조절 오버행 잔기를 절단할 수 있거나, 또는 도면에서 오른편에 도시한 바와 같이 오버행을 절단시키지 못할 수도 있다. 생성된 뉴클레아제 보호 단편은 검출 링커에 혼성화되며, 이 검출 링커는 표적 특이적 잔기 및 조절 오버행-특이적 잔기를 포함한다. 도면에서 왼편에 도시한 분석법에서는 검출 링커의 조절 오버행이 혼성화되지 않고 남아 있으나, 반대로 도면에서 오른편에 도시한 분석법에서는 검출 링커의 조절 오버행 잔기가 보호 단편의 잔류 조절 오버행 서열에 혼성화된다. 다음 단계 분석에서, 검출 링커의 조절 오버행 특이적 잔기와 상호작용할 수 있는 잔기를 포함하는 리포터 시약을 상기 복합체와 상호작용시킨다. 도면에서 왼편에 도시한 분석법에서는, 여전히 혼성화된 채로 남아 있는 검출 링커의 조절 오버행 특이적 잔기에 리포터 제제가 혼성화되고, 상기 복합체는 리포터 시약 상에 있는 신호체에 의해 검출될 수 있다. 반대로, 도면에서 오른편에 도시한 분석법에서는, 상보적인 서열이 혼성화될 수 없기 때문에 리포터 시약이 복합체에 결합되지 못하여, 복합체에 신호체가 연결되지 않는다.

본 발명의 여러 분석법에서, 리포터 시약은 검출 링커에 존재하는 임의의 서열과 상호작용할 수 있으며, 조절 오버행에 특이적인 서열로 한정되지 않는다.

실시예 24: 다중 플루오르 (도 25 참조)

5개의 로커스 A 내지 E를 포함하는 영역이 도 25에 도시되어 있다. 각 로커스는 서로 다른 군의 거의 동일한 앵커인 앵커 A 내지 E를 포함한다. 로커스 A에 있는 앵커에 4가지 다른 유형의 링커가 혼성화되며, 이들 각 링커는 앵커 A에 특이적인 잔기들을 포함한다. 그러나, 각각의 앵커는 다른 표적 특이적 잔기인 표적 1, 2, 3 또는 4를 포함한다. 유사하게, 4가지 다른 유형의 링커가 로커스 B에 혼성화된다. 각 링커는 앵커 B에 특이적인 잔기들을 포함하지만, 표적 특이적 잔기들은 표적 5, 6, 7 또는 8에 대해 특이적이다. 유사한 방식으로, 표적 9 내지 12는 로커스 C와, 표적 13 내지 16은 로커스 D와, 표적 17 내지 20은 로커스 E와 관련이 있다. 이들 각각의 표적들을 독립적으로 검출가능한 다른 플루오르, 예컨대 상향조절성 인광물질로 직접 또는 간접적으로 표지한다면, 5개의 지시된 로커스에 있는 모든 20개의 표적들을 독립적으로 검출할 수 있다.

실시예 25: 대량 처리 포맷으로 분석

이 실시예에서는, 본 발명의 전사 분석법을 이용하여 대량 처리 스크리닝에 용이한 포맷으로 유전자 발현 패턴의 변화를 검출 및 정량화하였다. 이 분석법의 모든 단계는 로봇으로 수행하였다. 일반적인 세척 단계를 다 기재하지는 않았다. 모든 반응은 당업계에 공지되고(되거나) 본원에 기재된 통상적인 방식으로 수행하였다.

THP-1 인간 단핵구를 96-웰 V-바닥 마이크로타이터 플레이트에서 50,000 또는 150,000 세포/웰로 성장시켰다. 세포를 비처리하거나, 또는 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트 (PMA)를 이용하여 48 시간 동안 분화시킨 후, 리포폴리사카라이드 (LPS)를 이용하여 4시간 동안 활성화시켰다. 처리 후, 세포를 구아니딘 이소티오시아네이트 중에서 용해시키고 필요할 때까지 냉동시켰다. mRNA를 비오틴-폴리dT에 결합된 스트렙타비딘-상자성 입자를 이용하여 수득하였다. 대안적으로, 트리-시약 (Sigma Chemical Co., 미저리주 세이트 루이스 소재)을 이용하여 추출함으로써 전체 RNA를 수득하였다. mRNA 또는 전체 RNA를 포함하는 시료에 대해 60량체 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 13개의 혼합물을 DNA 보호 단편으로서 사용하여 뉴클레아제 보호를 수행하며, 상기 올리고뉴클레오티드는 5' 내지 3'에 목적하는 표적 13개 (GAPDH, IL-1, TNF-α, 카텝신 G, 콕스-2, 시클린-2, 비멘틴, LD78-β, HMG-17, 오스테오폰틴, β-트롬보글로빈, 안지오텐신 또

는 액틴)에 특이적인 25량체; 스페이서 10량체; 일반적인 올리고뉴클레오티드 검출 프로브에 특이적인 25량체; 및 일반적인 조절 오버행 서열 15량체를 포함하였다. 이로써, mRNA는 화학량론적인 양의 "상응하는 DNA 보호 단편"으로 전환되고, 이는 이 분석법에서 표적으로서 작용하였다. 이들 상응하는 DNA 보호 단편을 조절 오버행 서열에 대해 특이적인 프로브와 함께 인큐베이션하는 대조 실험은, 경우에 따라 뉴클레아제 절단이 일어나는 경우에 예상되는 바와 같이, 실제로 목적하는 mRNA 표적에 특이적인 서열만이 상응하는 보호 단편에 존재한다는 것을 나타낸다.

표면은 본 발명의 방법에 따라 제조하였다. 96 웰 DNA 결합 플레이트의 각 웰에 6개의 다른 25량체 올리고뉴클레오티드 앵커 배열을 놓았다. 14개의 다른 앵커 화학종을 사용하였다. 한 앵커 화학종은 배열의 네 코너 중 3군데에서 사용하고, 13개의 다른 앵커 화학종을 배열의 나머지 위치들에서 각각 하나씩 사용하였다. 다음, 앵커를 한정된 직각 패턴으로 60량체 올리고뉴클레오티드 링커에 혼성화시키며, 이들 올리고뉴클레오티드 각각은 5' 내지 3'에 목적하는 표적 13개 중 하나에 상응하는 25량체, 스페이서 10량체, 및 앵커 중 하나에 특이적인 25량체를 포함하였다. 따라서, 다중 반복 16 스팟 배열 각각에서, 13개의 표적 특이적 링커 각각을 한정된 위치 (로커스)에서 상기 배열로 위치시켰다. 직각 배열에 대해서는 도 18을 참조한다. GAPDH에 상응하는 링커이며 내부 표준화 대조구로서 사용되는 구성적으로 발현된 하우스키핑 유전자는 각 배열 내부의 3개의 로커스에서 나타냈다. 대주 실험은, 링커 뿐만 아니라, 이 실험 사용된 보호 단편 및 검출 올리고뉴클레오티드가 목적하는 특이성을 발휘함을 나타냈다.

상기 기재된 바와 같이 제조된 상응하는 보호 단편의 혼합물을 포함하는 시료는 앵커/링커 배열에 혼성화되었다. 비처리 또는 유도된 배양물로부터 유래된 시료를 사용하였다. 다음, 각 로커스에서 혼성화된 보호 단편의 존재 및 양은 표지된 검출 올리고뉴클레오티드에 혼성화함으로써 검출되었다. 각 로커스에서 신호의 양을 표준화하기 위해, 검출 올리고뉴클레오티드를 본원에 기재된 바와 같이 적절한 양의 블록킹된 올리고머로 희석시켰다. 각 로커스에서 신호의 양은 가공하여 대조 GAPDH 신호에 대해 정규화시켰다. 얻은 데이타는 8개의 복제 시료에서 뿐만 아리나, 다른 날 수행한 세번의 독립된 실험으로부터 얻은 시료에서 재현가능하였다. 한 실험에서 13개의 전사체의 상대적인 양은 하기 표 1에 요약하여 나타냈다.

[표 1]

상대적 양 (105 세포/웰)

유전자	대조구		유도		비율
	평균	CV (n=16)	평균	CV (n=16)	
GAPDH	10110	7%	9833	9%	0.97
IL-1	527	56%	8124	38%	15.40
TNF	229	35%	2249	36%	9.80
GAPDH	9591	11%	10031	17%	1.05
카텝신 G	10394	31%	19649	46%	1.89
COX-2	415	39%	3557	25%	8.58
시클린-2	1728	23%	2960	25%	1.71
비멘틴	25641	25%	71074	20%	2.77
LD78	1298	39%	13437	20%	10.35
HMG-17	8286	19%	2405	20%	0.29
오스테오폰틴	5604	42%	19053	46%	3.40
트롬보글로불린	-53	-	31761	23%	>100
GAPDH	10299	13%	10136	12%	0.98
안지오텐신	3575	28%	6561	31%	1.84
액틴	12741	27%	21802	23%	1.71
(블랭크)	108	-	234	-	

실시예 26: 다중 배열 플레이트 데이타의 정량화를 위한 컴퓨터 알고리즘

바람직한 알고리즘은 MAPS 플레이트에서 모든 스팟의 위치에서 찾을 수 없으며, 데이타의 각 점에 대한 신호 크기의 최적 추정량을 자동적으로 계산한다. 바람직하게는, 알고리즘은 컴퓨터 프로그램으로 수행한다.

1- 시험하고자 하는 첫번째 웰을 포함하는 이미지의 각 픽셀 (픽쳐 요소)의 강도 값을 갖는 40 x 40 박스의 이미지 데이타의 작은 일부분을 선택한다.

2- 16개의 미지값을 이용하여 각 픽셀 위치에서 예상된 강도를 계산하는 함수를 정의한다. 미지값은 다음과 같다:

- 13개의 다른 미세배열 스팟 각각의 크기 (즉, DNA 배열의 각 위치에서 실제 신호의 밝기). 16개의 스팟 중 일부는 동일한 표적의 복제물이기 때문에 각 웰 내의 4 x 4 (=16)개의 스팟에 대해 13개의 미세배열 스팟이 있었다.

- 이 특정 웰 내의 스팟 4 x 4 배열의 정확한 위치를 정의하는 x 오프셋 및 y 오프셋.

- 웰 내의 픽쳐에서 백그라운드 강도.

각 픽셀 위치에 대한 함수를 이용하여 픽셀와 각 스팟 사이의 거리를 계산하고, 스팟 크기를 주어진 거리에 대한 충격 반응 함수와 곱함으로써 각 스팟이 픽셀에서 관찰된 강도를 갖게 하는 분담값을 합한다. 사용된 이미지의 경우, 충격 반응 함수는 적절한 가우스 및 로렌쯔 (상수) 반경의 합으로써 정의된다.

3- 변수값을 추측하여 사용중인 웰에 대한 적용을 신속히 시작한다. 이를 위해, 스팟이 있을 것으로 예상되는 픽쳐에서 16개 영역에 대한 평균 이미지 강도를 계산한다. 이들 16개 평균값으로부터 오프셋을 빼고, 상수 인자에 의한 차이를 비교한다. 오프셋 및 비교한 상수는 실험으로 정의한다. 결과를 재정렬하여 16개의 스팟을 13 크기와 조화시킨다. 백그라운드 및 오프셋을 위해 임의의 작은 수를 이용한다.

4- (16개의 미지값에 대해) 적용된 값을 곡선 적용에 의해 최적화한다. 특히, (물론 모든 계산식이 독립적으로 선형은 아니더라도) 16개의 미지값을 40 x 40 = 1600 계산식에 적용시키는 적용 함수를 선형화시키기 위한 마르쿠앗 (Marquadt) 절차를 갖는 비선형 최소 자승 알고리즘을 이용한다.

5- 개선된 정확도로 추정하기 위해 사용중인 웰에 대해 적용된 바와 같이 x, y 오프셋을 이용하며, 눈금은 마이크로플레이트의 다음 웰에 대한 것인다. 다음 인접 웰에 상대적인 9 밀리미터의 오프셋 (이미징 시스템의 확대 인자에 의해 각 픽셀들의 거리로 전환되었음)을 예상한다. 웰 사이의 거리가 플레이트 크기에 비해 비교적 짧기 때문에, 국소적 위치 추정치를 이용하는 것이 가장 정확하다.

6- 개선된 위치 추정치를 이용하여, 픽셀을 30 x 30 박스로 이동하여 다음 웰에 대한 보다 작은 박스의 이미지를 정의한다. 이로써 적용 과정이 보다 신속해진다.

각 웰에 대해 단계 2로 돌아가서 반복한다.

상기 기재된 바로부터, 당업자는 본 발명의 주요 특징을 용이하게 확인할 수 있고, 그의 정신 및 범위를 벗어나지 않고, 각종 용도 및 조건에 적합하게 본 발명을 변화 및 변형시킬 수 있다.

더 이상의 수고없이, 당업자는, 상기 기술된 바를 이용하여, 본 발명을 충분히 이용할 수 있을 것으로 여겨진다. 그러므로, 앞서 바람직한 특정 구현예는, 단시 예시적인 것으로 해석되어야 하며, 나머지 다른 부분을 이에 국한하는 것이 아니다.

상기 및 도면에서 인용된, 모든 출원, 특허 및 공보의 모든 개시는 본 발명에 참고문헌으로 포함되었다.

도면의 간단한 설명

도 1은 올리고뉴클레오티드에 대한 도면을 나타내고, 링커 1 은 앵커 1 에 특이적인 부분 및 표적 mRNA 1 에 특이적인 또 다른 부분 (프로브)을 함유하며, 표지된 검출 프로브 1 은 링커의 표적-특이적 부분의 서열과 상이한 표적 mRNA 1 의 서열에 특이적이다.

도 2는 15개의 테스트 영역을 함유하는 기판을 나타내고, 각각의 영역은 6 개의 앵커 올리고뉴클레오티드의 배열을 함유한다.

도 3은 수용체 결합 분석을 위한 링커의 도안을 나타내고, 링커의 앵커-특이적 부분은 비오틴 및 스트렙트아비딘 분자를 통해 프로브 부분 (수용체 단백질)과 연결되고, 수용체에 특이적 리간드를 형광 표지 분자로 표지한다. B: 비오틴. SA: 스트렙트아미딘. Rec: 수용체 단백질. Ligand: 수용체에 대한 천연 또는 합성 리간드. *: 리간드에 부착된 형광 표지 분자.

도 4는 21 개의 테스트 영역으로 이루어진 표면을 나타내고, 각 영역은 16개의 하위 영역 (톱니모양 홈, 물결모양 홈)으로 더욱 세분된다.

도 5a, 5b 및 5c는 도 4에 나타낸 바와 같은 기판으로 합체될 수 있는 3 개의 부분을 나타낸다. 도 5a는 웰 분리기를 나타내고; 도 5b는 세분기를 나타내고; 및 도 5c는 기판을 나타낸다.

도 6은 2 개의 테스트 영역을 나타내는데, 각각은 "바-코드"와 같은 형태인 직선 배열의 프로브 (또는 앵커)를 함유한다.

도 7은 3 개의 앵커 (A, B 및 C)를 함유하는 테스트 영역을 도식적으로 나타내는데, 그 각각은 다수의 카피 ("군")으로 존재한다. 각 앵커군의 위치를 "로커스(locus)"로 칭한다.

도 8은 특정 역전사효소에 의해 생긴 cDNA(s)가 MAPS 플레이트상에서 분석되는 분석법을 나타낸다.

도 9는 뉴클레아제 보호 방법을 이용한 분석법 (NPA-MAPS 분석법)을 나타낸다. 시료 RNA는 세포 또는 조직으로부터 제조되고 가는 웨이브 선으로 나타낸다. 굵은 선, 어두운 선 및 밝은 선으로 묘사된 폴리뉴클레오티드 보호 단편들의 군을 상기 RNA 시료에 첨가한다. 보호 단편의 어두운 부분은 특정 RNA 표적에 상보적이고 이 표적에 혼성화된 분절을 나타낸다. 밝은 부분은 돌출 부분: 상보적인 서열에 인접하지만 표적에는 상보적이지 않은 서열을 나타낸다. 보호 단편을 과량으로 첨가한다. 모든 유용한 표적을 보호 단편에 혼성화시킨 다음, 시료를 뉴클레아제의 적당한 칵테일 및 화학적 처리법으로 처리하여 원하지 않는 비-혼성화된 RNA 및 비-혼성화된 폴리뉴클레오티드를 파괴시킨다. 예를 들어, S1 뉴클레아제는 존재하는 어떠한 단일가닥 DNA도 파괴할 수 있다. 그러므로, 결합된 보호 단편의 돌출된 비-혼성화된 부분인 과량의 보호 단편이 가수분해된다. RNA는 리보뉴클레아제 H를 포함하는 리보뉴클레아제를 첨가하거나 또는 시료를 염기중에서 가열함으로써 가수분해될 수 있다. 절단된 보호 단편들의 집합이 잔존하고 이는 각각의 표적 RNA가 시료중에 얼마나 존재하는 지를 반영한다. 남아있는 보호 단편들을 MAPS 혼성화 분석법으로 측정한다.

도 10은 MAPS 분석에서 혼성화 특이성을 나타낸다.

도 11은 링커에 대한 앵커의 결합 동력학을 나타낸다.

도 12는 2 개의 올리고뉴클레오티드 표적의 MAPS 분석을 나타낸다.

도 13은 감도 변화의 정량화를 나타낸다.

도 14는 4 개의 올리고뉴클레오티드 링커/앵커 조합물에 대한 융점 측정을 나타낸다.

도 15는 NPA-MAPS에 의한 mRNA 분석을 나타낸다.

도 16은 NPA-MAPS로의 희석 곡선을 나타낸다.

도 17은 포스포티로신 잔기를 함유하는 펩티드를 검출하는 분석법을 나타낸다.

도 18은 EST를 맵핑하는 분석에서의 첫 번째 단계로, 맵핑될 EST의 각각에 해당하는 링커를 MAPS 플레이트상의 유전자 앵커의 배열상에 집합시키는 것을 나타낸다. 마이크로플레이트의 16 개의 웰 각각의 표면에 4 ×4 행렬로 배열된, 16 개의 상이한 올리고뉴클레오티드 프로브들을 함유하는 링커를 부착시킨다. 첫 번째 로커스가, 첫 번째 EST 서열의 부분에 상보적인, 올리고 1이고, 시험되는 16 개의 EST에 대해서도 각기 나타낸다.

EST가 수득되는 유전자로부터 생성된 cDNA 또는 mRNA 를 16 개의 웰 모두에 첨가하고 적당한 조건하에서 혼성화시켰다. 그러므로, 16 개의 EST 서열중 하나를 함유하는 임의의 cDNA 또는 mRNA를 그의 상보적인 프로브가 위치했던 로커스에 집합시킬 것이다.

도 19는 EST를 맵핑하는 분석에서의 다음 단계로, MAPS 플레이트에 검출 올리고뉴클레오티드를 첨가하는 것을 나타낸다. 플레이트의 각 웰은 맵핑될 EST중 하나에 해당하는 검출 올리고뉴클레오티드를 수용한다. 각 검출 올리고뉴클레오티드는 검출에 사용되는 분자에 커플링된 올리고뉴클레오티드로서, 예를 들어, 형광성 이미징법이 검출 방법인 경우라면, 플루오레세인이다. 각 검출 올리고뉴클레오티드는 EST중 하나에 상보적이지만, EST-특이적 프로브와는 상이하므로, 하나의 EST에 상보적인 프로브 및 올리고뉴클레오티드는 동시에 함께 결합할 수 있다.

세척 후, 하나의 검출 올리고뉴클레오티드를, 도면에서 숫자로 나타낸, 각 웰에 첨가한다. 즉, 첫 번째 EST에 상보적인 서열을 가진 검출 올리고뉴클레오티드를 첫 번째 웰에 첨가하고, 이러한 식으로 기타 등등 동일하다.

도 20a 및 b는 도 18 및 19에 나타낸 EST를 맵핑하는 분석 결과를 나타낸다. 검출 올리고뉴클레오티드를 혼성화하고 엄격한 적당한 조건으로 세척한 후, 마이크로플레이트의 16 개의 웰을, 예를 들어, CCD-근거한 형광 이미저로 형상화시킨다. 도 20a는 양식화된 결과를 나타낸다. 이는 각각의 EST-특이적 검출 올리고뉴클레오티드가 상응하는 EST-특이적 프로브에 의해 유지되는 mRNA 또는 cDNA를 표지시키는 것으로 예측된다. 예를 들어, 프로브 5는 로커스에서 5 번째 EST 서열을 함유하는 cDNA 또는 mRNA 를 집합시키므로, 5 번째 검출 올리고뉴클레오티드 또한 동일한 로커스에서 cDNA 또는 mRNA에 혼성화될 것이다. 이는 짝을 이룬 프로브로 표지된 각 검출 올리고뉴클레오티드로의 상기 양식화된 데이타에 대한 경우이다. 또한, 처음 3 개의 검출 올리고뉴클레오티드 각각은 처음 3 개의 프로브로 유지되는 cDNA 또는 mRNA를 표지시키고, 이러한 서열들이 동일한 유전자에 나란히 위치한다는 것을 보여준다. 유사하게, 마지막 5 개의 EST 는 연결되어 나타난다. 상기 데이타로부터 지정된 연결을 도 20b에 그래프로 나타낸다.

도 21은 도 18-20에 나타낸 프로브, 검출 올리고뉴클레오티드 및 EST #1, 2 및 6 의 관계를 나타낸다.

도 22는 대량 처리 분석을 나타낸다.

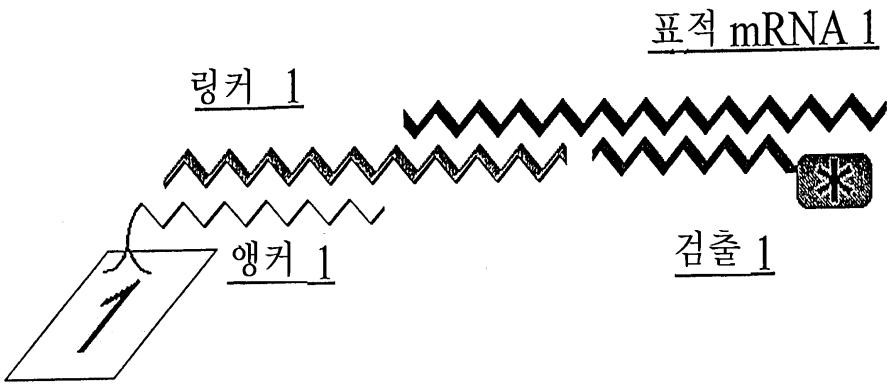
도 23은 증폭된 표적의 제조방법을 나타낸다.

도 24는 검출 링커 및 리포터 시약에 대한 분석을 나타낸다.

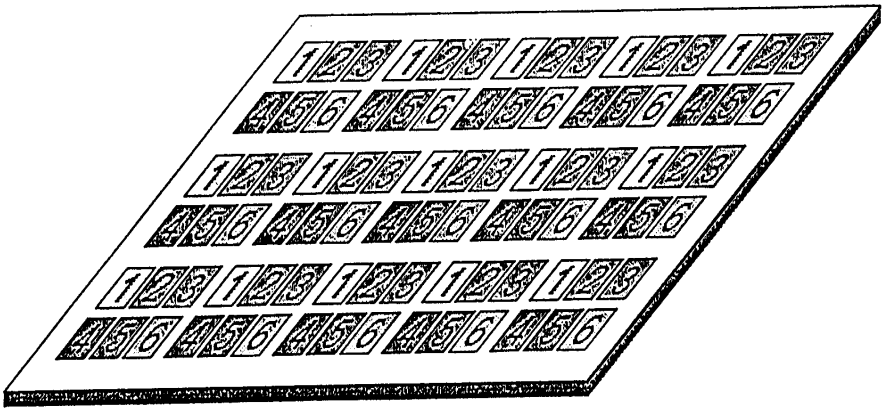
도 25는 다중 플루오르 (multiple flour)의 용도를 나타낸다.

도면

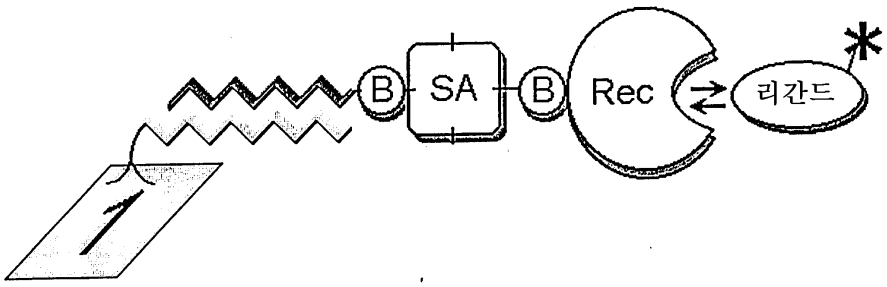
도면1



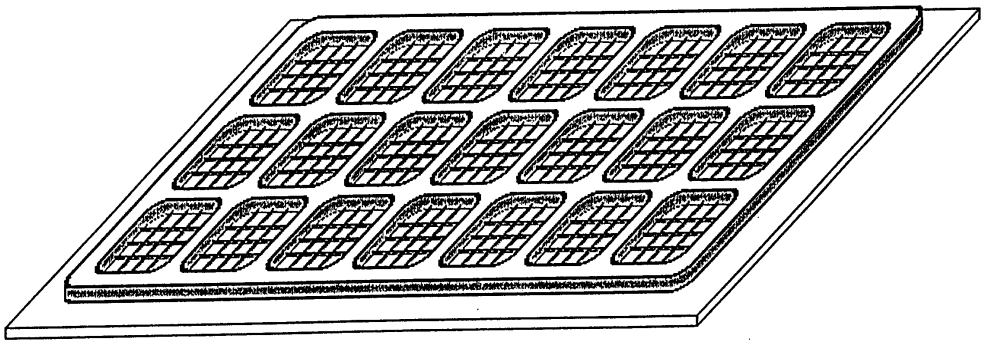
도면2



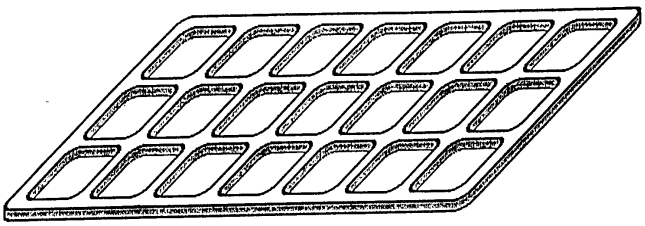
도면3



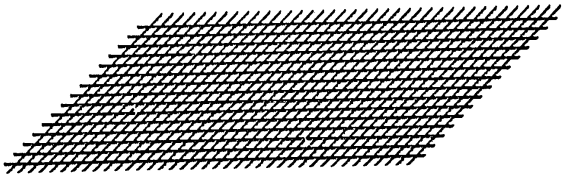
도면4



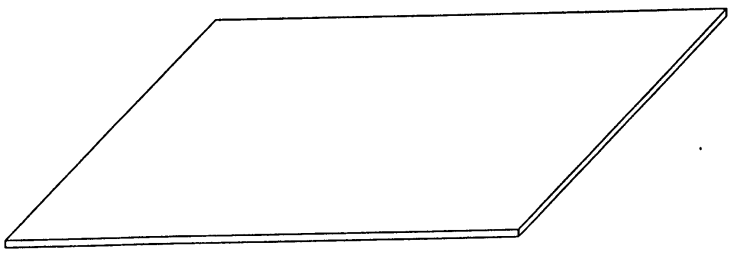
도면5a



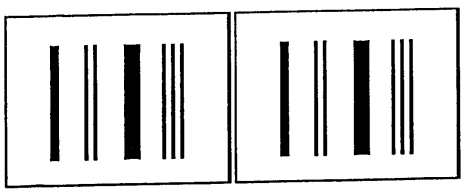
도면5b



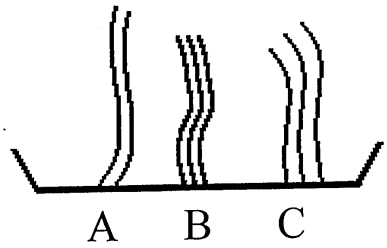
도면5c



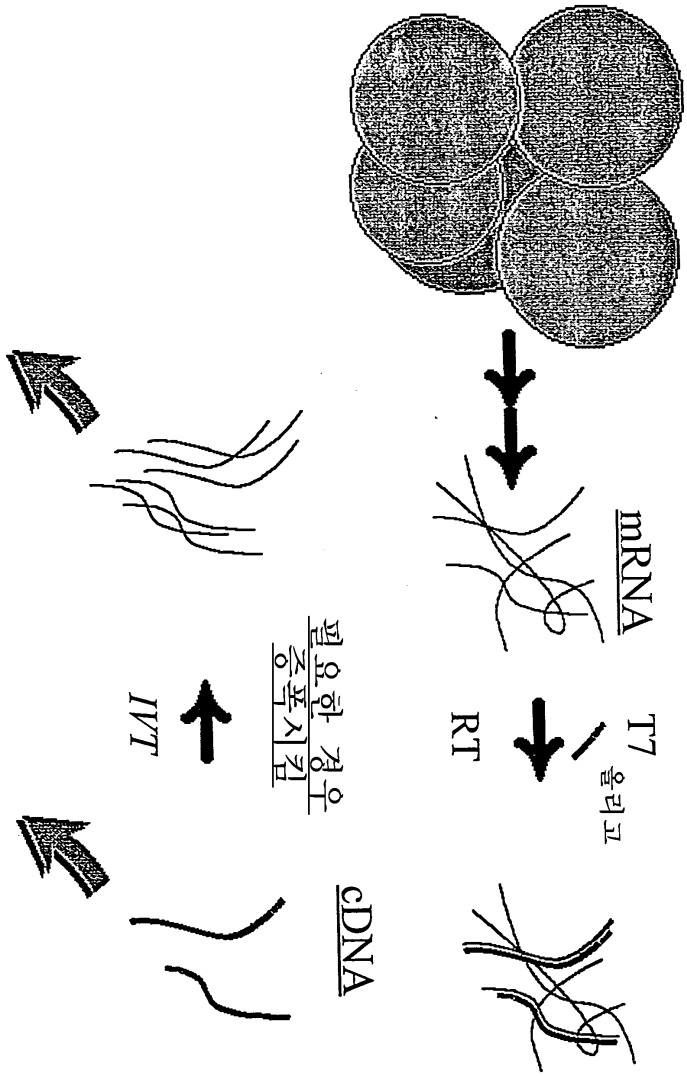
도면6



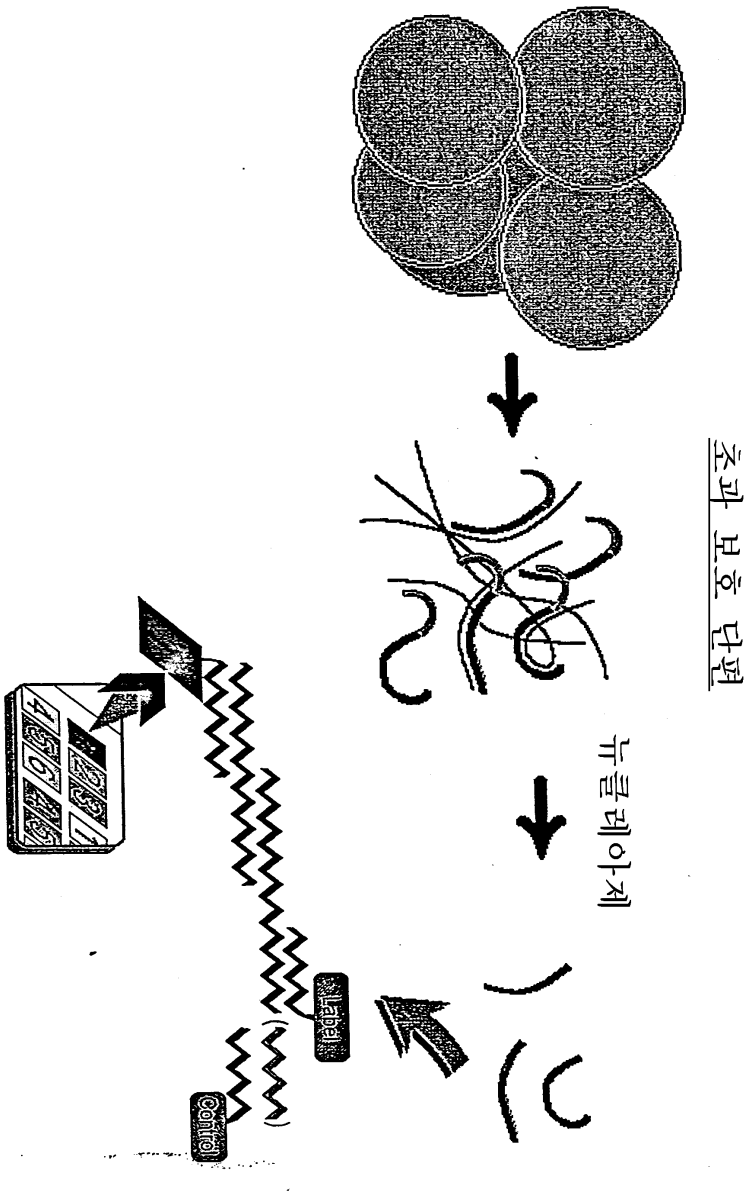
도면7



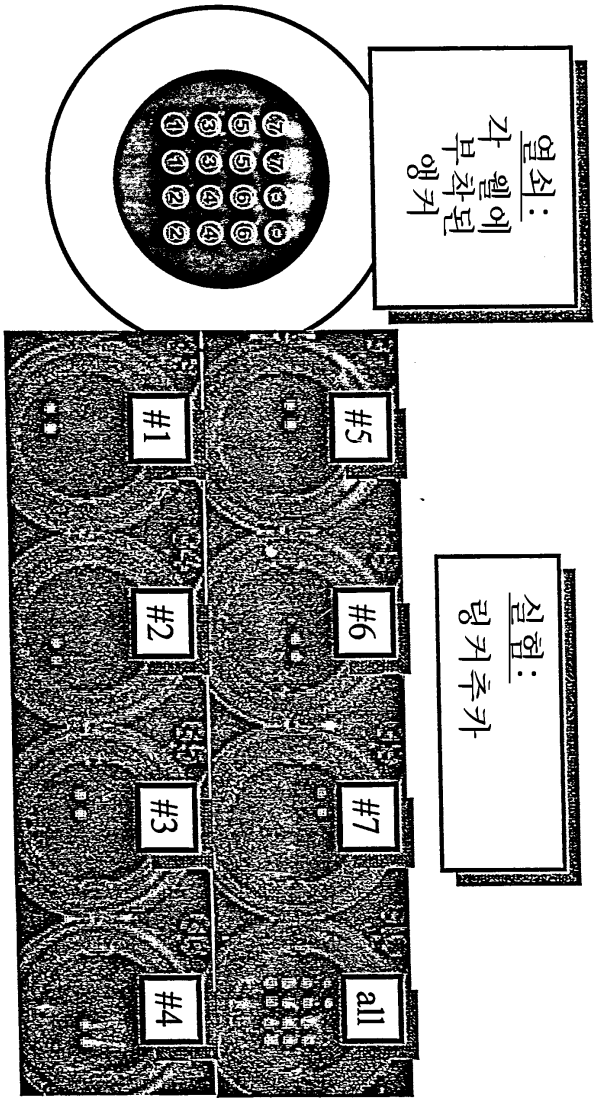
도면8



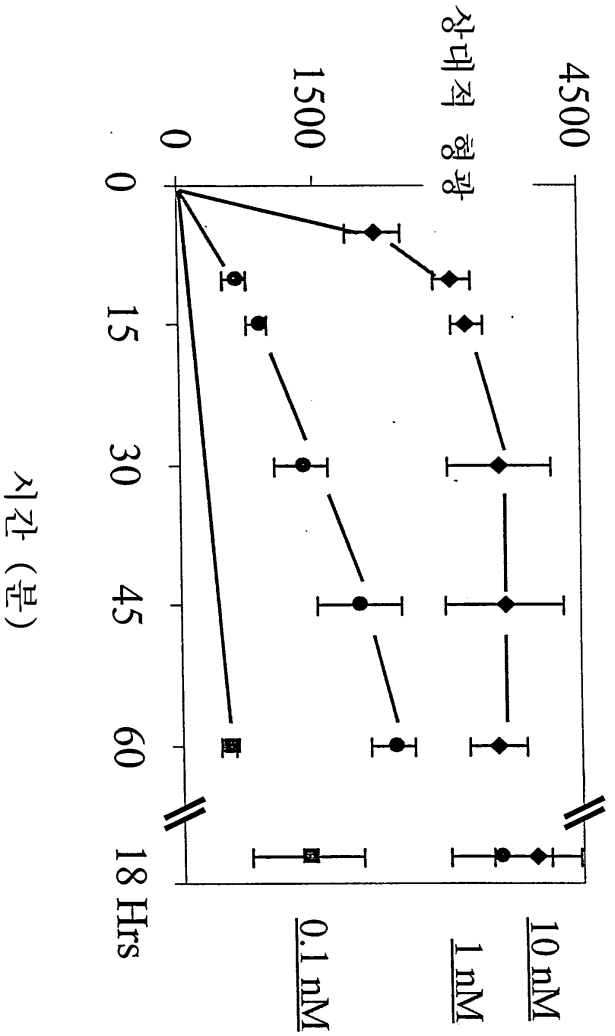
도면9



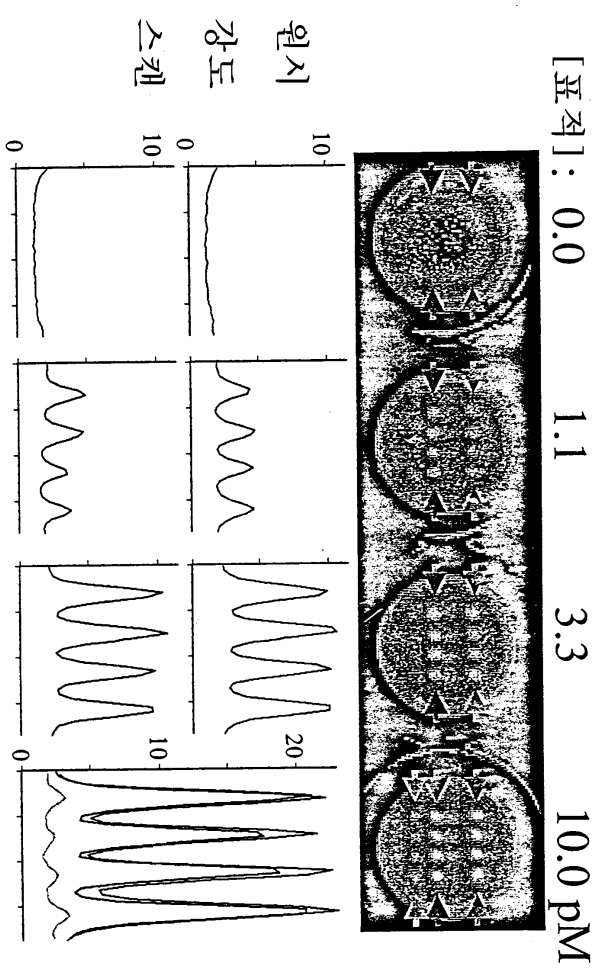
도면10



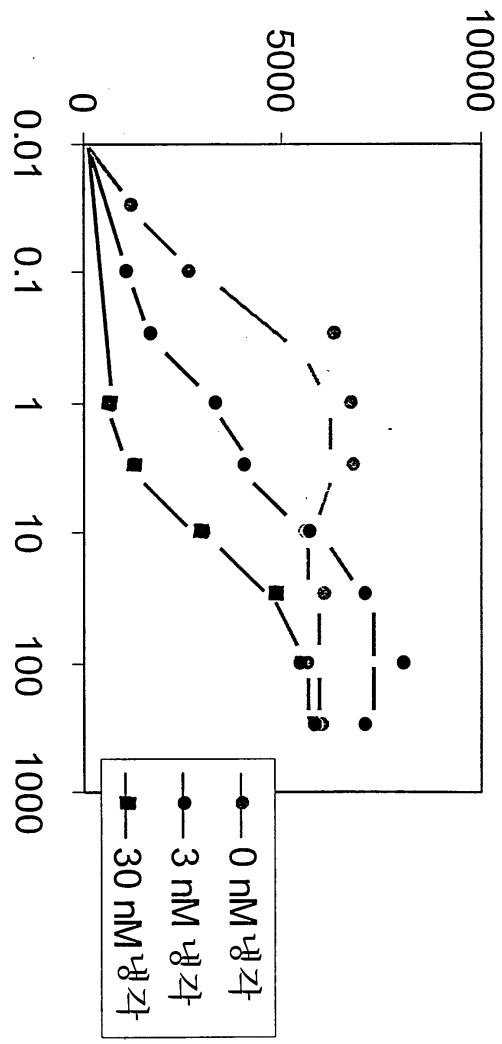
도면11



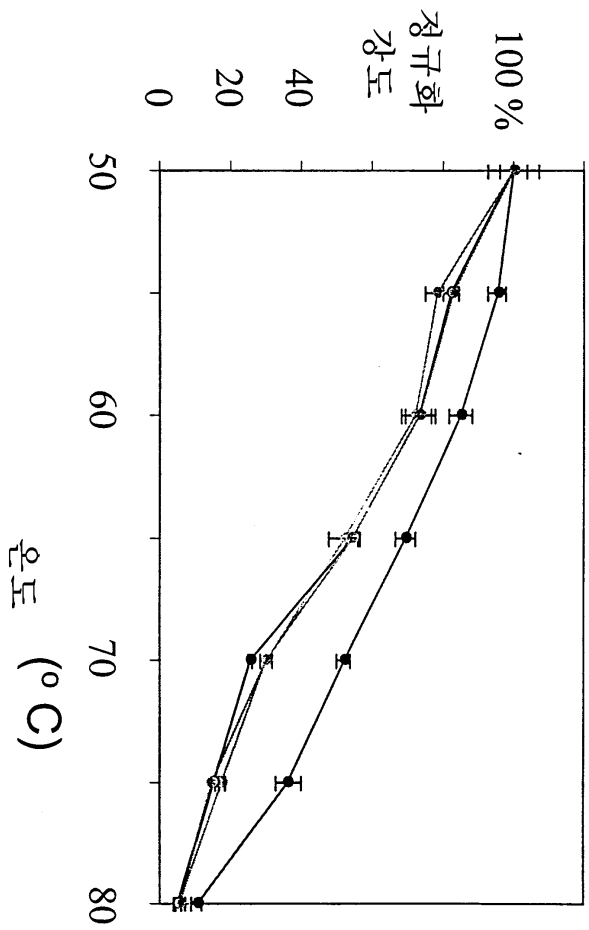
도면12



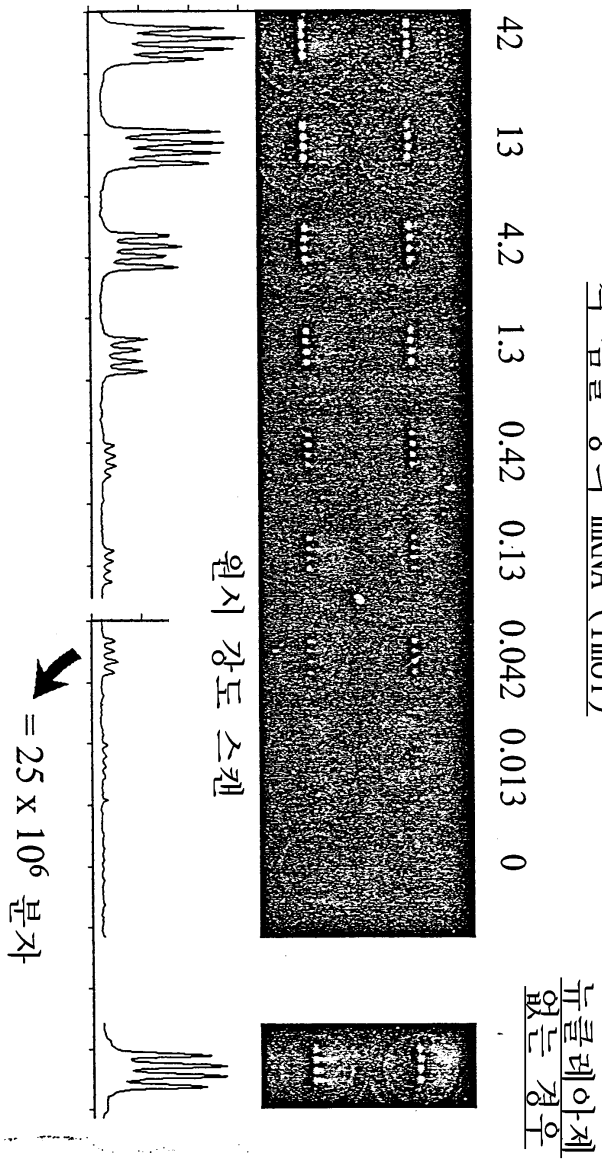
도면13



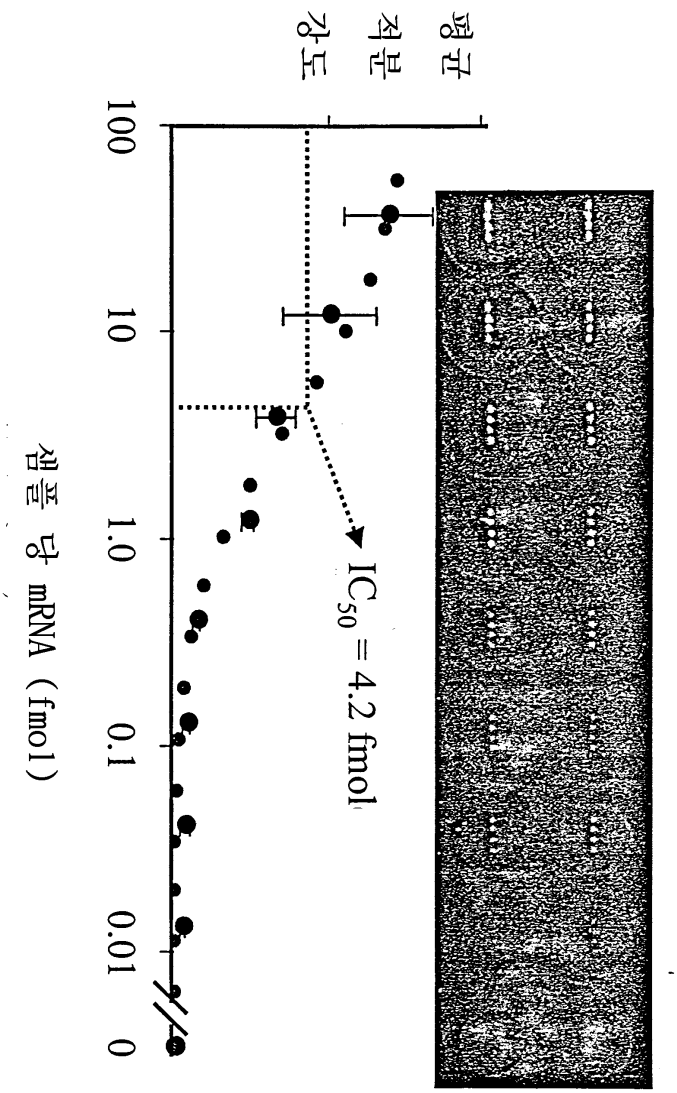
도면14



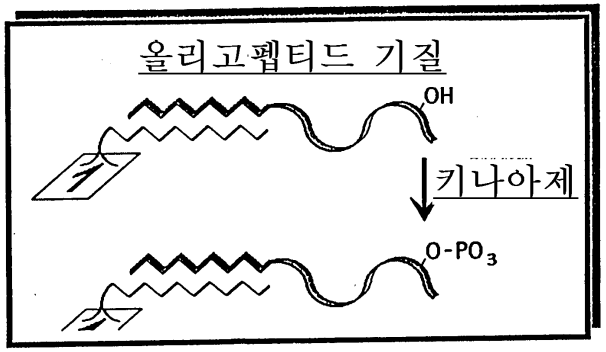
도면15


각 샘플 중의 mRNA (fmol)
42
13
4.2
1.3
0.42
0.13
0.042
0.013
0
뉴클레아제 없는 경우
원시 강도 스캔
= 25 x 10⁶ 분자

도면16



도면17

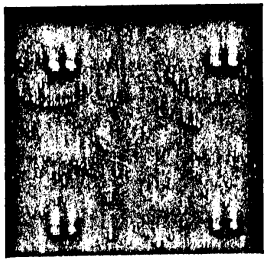


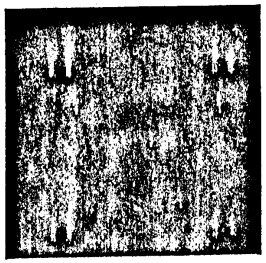
올리고펩티드의 농도

10 nM　　3 nM

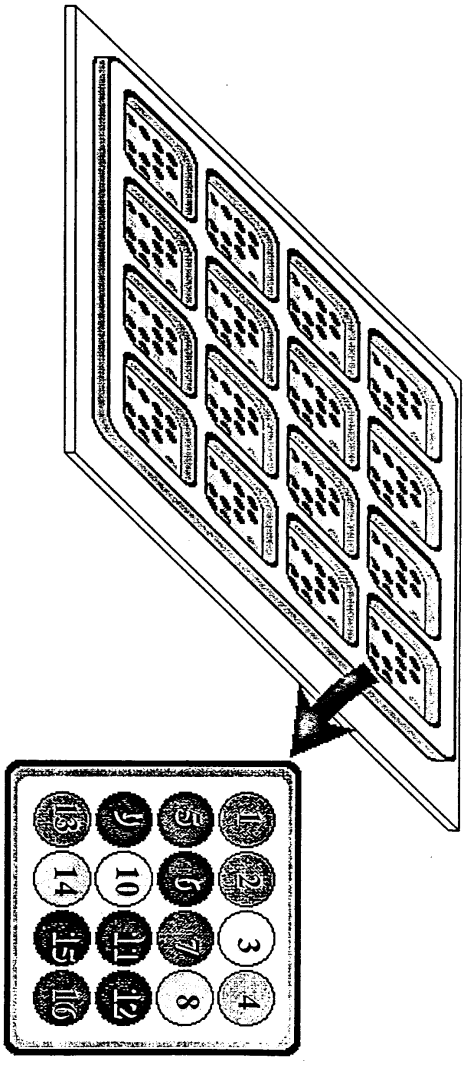
인산화 키메라

부분 *
탈인산화

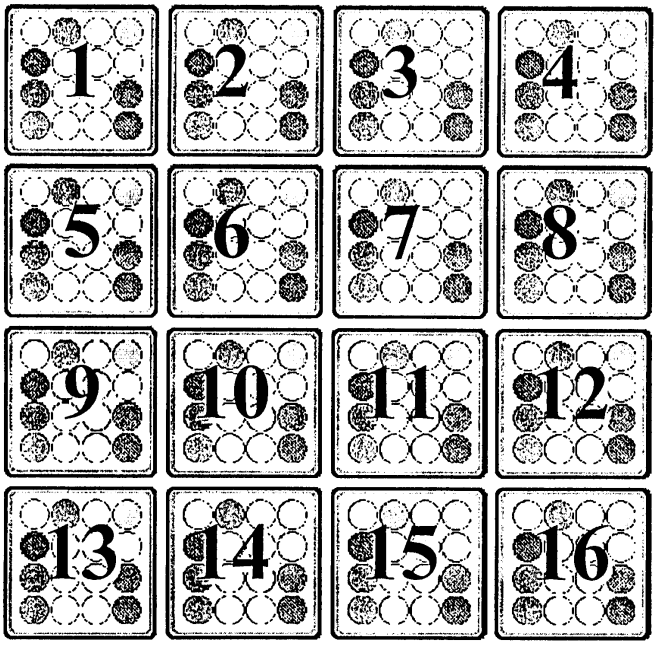




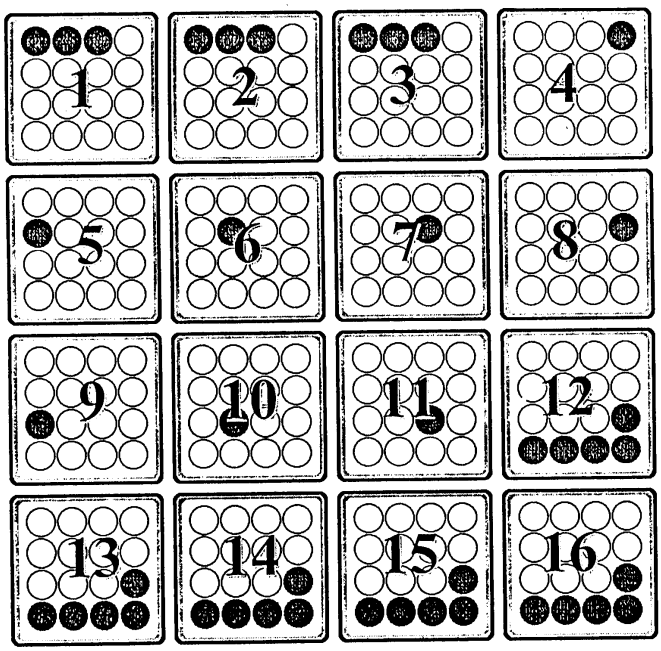
도면18



도면19

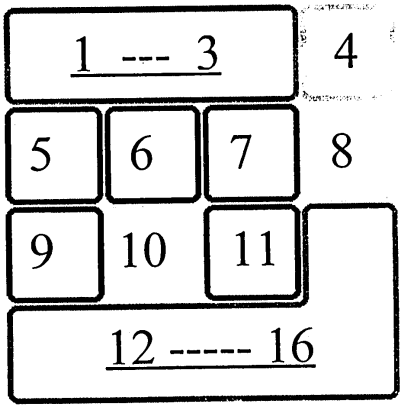


도면20a

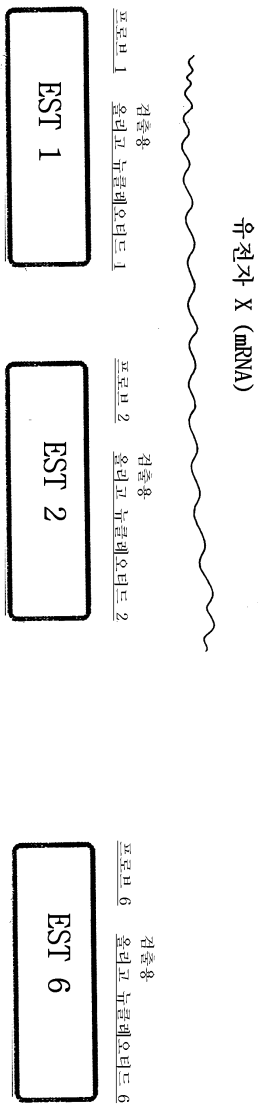


도면20b

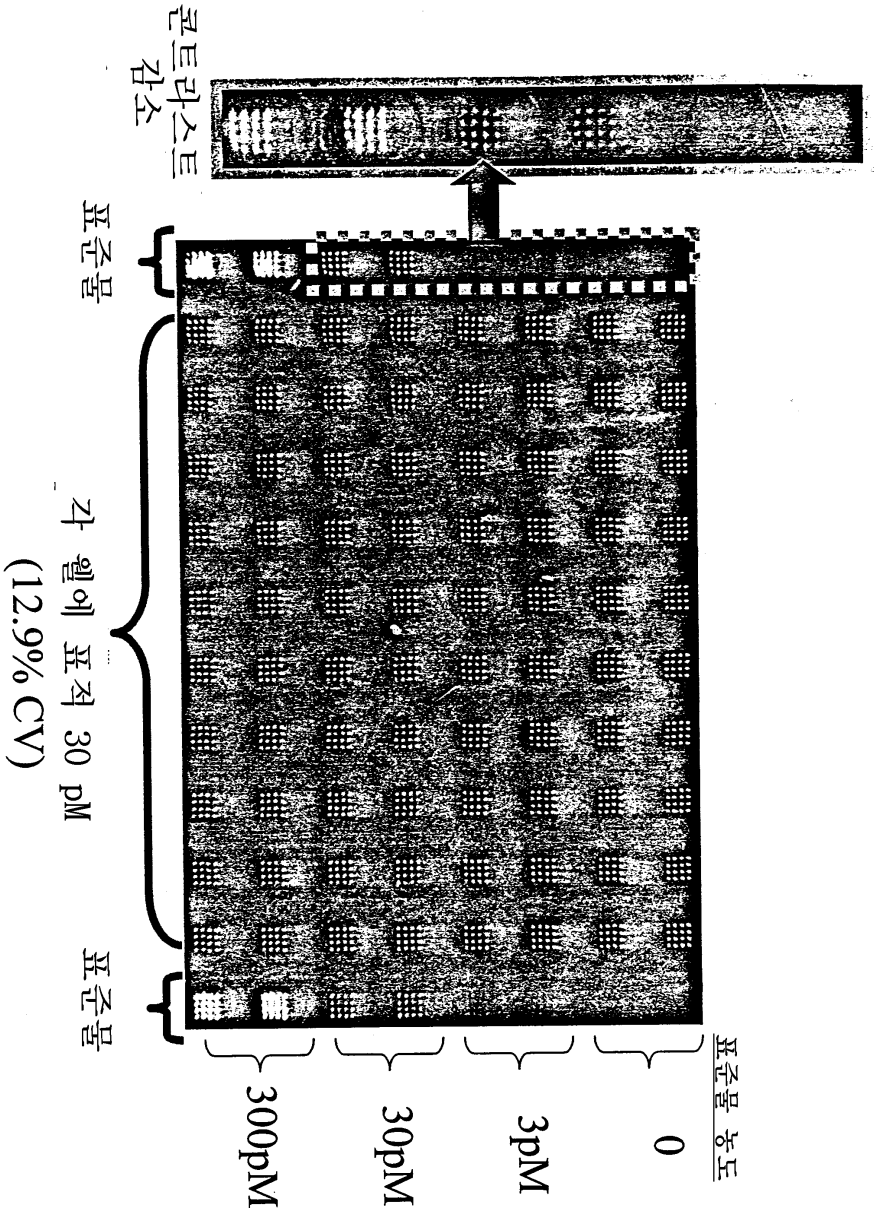
결합 배치도



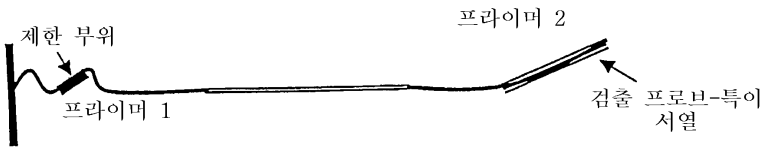
도면21


유전자 X (mRNA)
프로브 1
검출용 올리고 뉴클레오타드 1
EST 1
프로브 2
검출용 올리고 뉴클레오타드 2
EST 2
프로브 6
검출용 올리고 뉴클레오타드 6
EST 6

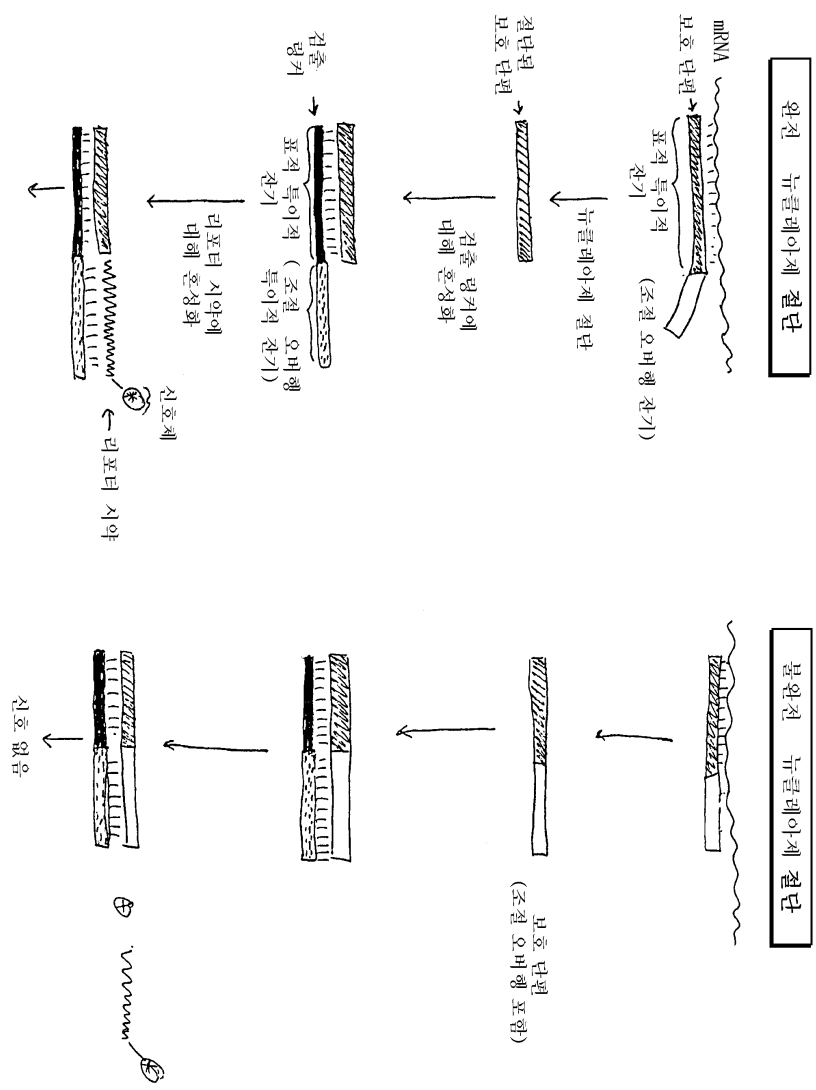
도면22


콘트라스트 감소
표준물
각 웰에 표적 30 pM (12.9% CV)
표준물
300pM
30pM
3pM
0
표준물 농도

도면23


제한 부위
프라이머 1
프라이머 2
검출 프로브-특이 서열

도면24


완전 뉴클레아제 절단
mRNA
보호 단편
표적 특이적 잔기
(조절 오버행 잔기)
뉴클레아제 절단
절단된 보호 단편
검출 링커에 대해 혼성화
검출 링커
표적 특이적 잔기
(조절 오버행 특이적 잔기)
리포터 시약에 대해 혼성화
신호체
리포터 시약
불완전 뉴클레아제 절단
보호 단편
(조절 오버행 포함)
신호 없음

도면25

