(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl. [6]
C12Q 1/68

(45) 공고일자 2001년12월01일
(11) 등록번호 10-0289793
(24) 등록일자 2001년02월22일

(21) 출원번호 10-1994-0702630
(22) 출원일자 1994년07월29일
번역문 제출일자 1994년07월29일
(86) 국제출원번호 PCT/US1993/01040
(86) 국제출원출원일자 1993년01월29일

(65) 공개번호 특1995-0700425
(43) 공개일자 1995년01월16일

(87) 국제공개번호 WO 1993/15228
(87) 국제공개일자 1993년08월05일

(81) 지정국 국내특허 : 캐나다, 일본, 대한민국, 미국,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 리히텐슈타인, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀랜드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴,

(30) 우선권주장 07/827.975 1992년01월29일 미국(US)

(73) 특허권자 히타치 케미칼 컴패니, 리미티드
테츠오 토미나가
일본국, 도쿄도 163, 신주쿠구, 니시신주쿠, 2-초오메 신주쿠-미츠이 빌딩 넘버1-1

(72) 발명자 켈러,실리아
미합중국,캘리포니아주92630,엘토로,둔디이25971
미츠하시,마사토
미합중국,캘리포니아주92714,이어빈,브룩몬트8
아키타야,타츠오
일본국,히타치이바라키,타카스츠-마치,1-초오메,16-15-2,히라사와테라스20-2

(74) 대리인 김영철

심사관 : 최규환

(54) 폴리누클레오티드고정지지체

요약

본 발명은 불용성 지지체와 그 지지체에 결합된 폴리누클레오티드를 포함하는 누클레오티드 고정 지지체를 제공한다. 이 폴리누클레오티드는 mRNA 폴리(A) 꼬리에 상보적인 적어도 하나의 서열을 포함한다. 누클레오티드 고정 지지체는 이중가닥 cDNA외에도 센스와 안티센스 cDNA의 합성을 포함하여 다양한 방법에 유용하다. 누클레오티드 고정지지체

는 또한 센스와 안티센스 mRNA의 합성에도 유용하다. 부가적으로, 누클레오티드 고정 지지체는 또한 DNA 서열을 특정 방향으로 벡터에 위치시키는 개선된 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 폴리누클레오티드를 불용성 지지체에 결합시키는 새로운 방법을 포함한다.

대표도

도 1

명세서

[발명의 명칭]

폴리누클레오티드 고정 지지체

[발명의 배경]

대부분의 생명체에 있어서, 유전정보는 DNA의 형태로 저장된다. 이 DNA는 mRNA(messenger RNA)로 전사되고 mRNA는 단백질로 번역된다. 진핵생물체에서는 때때로 체세포 DNA(genomic DNA)가 성숙한 mRNA로 전환되는 과정에서 약간의 유전정보의 손실이 있다. 이 손실은 인트론/엑손, RNA스플라이싱(splicing) 또는 단백질 프로세싱에 의한 것이다. 그러므로, 단백질구조의 유전적 기초는 체세포 DNA보다는 mRNA를 이용한 연구가 좀더 유리하다.

불행하게도, mRNA는 매우 불안정하며 실험을 어렵게 만드는 다양한 RNA분해효소(이하 "RNase"라 칭함)에 의하여 쉽게 절단된다. 그런 이유로 많은 연구자들이 관심있는 mRNA분자의 DNA사본(cDNA)을 연구하는 방법을 선택해 왔다. 이 사본들은 레트로바이러스(retrovirus)로부터 분리된 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 만들어지는데, 역전사효소는 목표 mRNA의 단일가닥 DNA사본을 만들어낸다.

이중가닥 cDNA(ds-cDNA : double stranded cDNA)는 일반적으로 단일가닥 cDNA(ss-cDNA : single stranded cDNA)보다 안정하다. DNA중합효소를 사용하여 단일가닥 cDNA를 이중가닥 cDNA로 전환하는 방법은 당업계에서 공지되어 있다.

이중가닥 cDNA에 저장된 유전정보는 그 후 다양한 제조방법(Protocol)에 사용될 수 있는데, 예를 들면 이중가닥 cDNA를 발현벡터에 삽입하고 그 후 다양한 세포에 도입하는 것 등이다. 이러한 벡터 상에 존재하는 프로모터들과 제한효소 인식부위들은 이중가닥 cDNA의 전사와 번역을 연구하는 수단으로 사용될 수 있다.

폴리펩티드 암호서열을 포함하는 mRNA 누클레오티드(센스 mRNA)를 전사하기 위한 프로모터에 기초한 벡터를 이용하는 것 외에 상보적인 cDNA가닥으로부터 안티센스 mRNA가 생산될 수도 있다. 안티센스 mRNA는 기능이 밝혀지지 않은 mRNA나 단백질의 생물학적 기능을 이해하는데 유용한 수단이다. 안티센스 mRNA분자들은 목표 mRNA에 어닐링(annealing)함으로써 번역을 방해하여 특이성 단백질의 생성을 차단하는데 이용된다. 그러므로 이러한 유형의 번역억제(translation inhibition)는 질병상태의 다양성과 관련된 다양한 유전자 산물의 연구에 중요할 것이다.

단일가닥 cDNA는, DNA중합효소를 이용한 이중가닥 cDNA합성 촉매반응에 사용되는 것 이외에, 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, 이하 "PCR"이라 칭함)의 주형(template)으로 사용될 수 있다. 이 방법은 상반되는 누클레오티드 개시체들과 열에 안정한 DNA 중합효소를 사용함으로써 특이성 유전자서열을 빠르게 그리고 많이 재생산할 수 있게 한다. 어닐링과 DNA합성을 여러 번 반복하면 목표 유전자의 여러 개의 사본을 빨리 생산할 수 있다. 그러므로 단일가닥 센스 cDNA는 특히 그에 상응하는 이중가닥 cDNA조각을 증폭하는데 이용될 수 있다.

이중가닥 cDNA를 생산하는 최근의 공지 제조방법 중 하나는 액상법(liquid phase method)으로서 샘부룩(Sambrook) 등의 "Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed." Cod Spring Harbor Press Cold Spring Harbor (1989)(이하에서는 "Molecular Cloning"이라 칭함)에 기술되어 있다. 상기 매뉴얼의 상세한 내용은 본 명세서에 참고로 포함되어 있다. 액상법에서 안티센스 단일가닥 cDNA는 역전사효소를 사용하여 mRNA로부터 생산되고, 그후 RNase에 의해 mRNA가 분해된다. 이중가닥 cDNA는 남아있는 안티센스 단일가닥 cDNA의 상보적 사슬로부터 DNA 전사효소를 사용하여 합성된다. 역전사효소 이후의 DNA 전사효소 반응은 역전사효소가 합성된 단일가닥 cDNA의 3′말단에 자기 개시 루우프 구조(self-priming loop structure)를 남기므로 특별한 개시체(primer)를 필요로 하지 않는다.

액상법에 의하여 결과적으로 생산된 이중가닥 cDNA는, 그 분자의 방향성을 확인할 마커(marker)를 가지고 있지 않다. 따라서 새로 합성된 이중가닥 cDNA는, 50%의 클론이 전사하기에 잘못된 방향으로 존재할 것이기 때문에, 클로닝 벡터에 즉시 삽입될 수 없다. 그러므로 벡터에 mRNA를 올바른 방향으로 신속하게 클로닝하는 방법이 바람직하다.

단일가닥 cDNA 또는 이중가닥 cDNA는 고체상 물질(solid phase material)을 사용하여 생산될 수도 있다(I. Raineri et al. in Nucleic Acids Research, 19:4010(1991)). 고체상법(solid phase method)에서는 때때로 다공성 비드(beads)에 고정된 폴리데옥시티미딘산(이하, "poly dT"라 칭함)이 mRNA의 폴리아데닐산(polyadenlic acids, 이하, "poly A"라 칭함) 꼬리와 혼성화(hybridization)된다. 그리고 나서 안티센스 단일가닥 cDNA는 역전사효소에 의하여 결합상태의 poly A 꼬리를 가진 mRNA로부터 합성된다. 주형 RNA가 전달된 후 cDNA의 두번째 가닥이 DNA 중합효소에 의해 합성된다. 결과물인 이중가닥 cDNA는 그의 안티센스 가닥을 비드에 고정시키게 된다.

그렇지만 고체상법은 불용성 지지체와 분리될 수 없는 산물을 얻는다. 이 문제를 극복하기 위하여 단일가닥 cDNA는 지지체에 고정된 이중가닥 cDNA를 열을 가하여 분리시킬 수 있고, 그런 다음 PCR을 이용하여 이중가닥 cDNA를 합성하는데 이용한다. 그러나, 이것은 반응에 또 하나의 과정을 추가하게 되고, 매번의 PCR반응마다 적절한 개시체 세트(set)를 요구한다.

따라서 분리된 mRNA로부터 결합되지 않은 상태의 이중가닥 cDNA 클론을 생산하는 간단한 방법이 요구된다. 이 방법은 될 수 있으면 결합되지 않은 상태이며 올바른 방향으로 클로닝할 수 있는 산물을 생산해야 할 것이다.

cDNA 클론에서 mRNA를 합성하는 다양한 방법이 알려져 있다. 한 예가 시치조(S. Shichijo) 등이 "Journal of Neuroscience Research"(30:316-320(1991))에서 설명한 액상법이다. 이 방법에서는 이중가닥 cDNA가 RNA 개시체를 함유한 벡터에 삽입된다. 그 이후 벡터는 제한효소절단방법으로 선형화된(linearized) RNA중합효소를 사용하여 mRNA가 합성된다. 합성된 mRNA는 주형 DNA를 제거하기 위해 DNA분해효소(이하 "DNase"라 칭함)로 처리한다. 필요하다면 새로 합성한 RNA의 말단에 말단 전이효소(Terminal Transferase)라는 효소와 dATP를 사용하여 poly A 꼬리를 부가할 수 있다.

mRNA를 생산하는 고체상법 또한 잘 알려져 있다. 히로노리 테라다(Hironori Terada) 등의 "Movement analysis of transcription by immobilized DNA"(Biophysics 31: 49-52(1991))는 이러한 방법 중의 하나를 설명한다. 이 방법에서 DMA서열은 박테리오파아지λ의 게놈에서부터 제한효소절단방법으로 절단되어 "점착성 말단(sticky ends)"을 가진 무작위 DNA조각이 된다. 비오틴으로 처리된(biotinylated) dUTP를 사용하여 이 점착성 말단을 메꾸는데에는 T4 DNA중합효소가 사용된다. 제한효소는 T4 DNA중합효소에 의한 DNA 합성 중 비오틴처리된 dUTP가 혼성화할 노출된 dA 누클레오티드를 가지는 점착성 말단을 남기도록 선택된다. 이후에 무작위 서열들은 아비딘을 함유한 아크릴아미드 지지체에 고정된다. 자연의 프로모터 서열을 포함하는 서열로부터 T7 RNA중합효소 또는 SP6 RNA중합효소를 사용하여 mRNA를 합성할 수 있다. 이 체계는 박테리오파아지 λ 전사의 역학적 분석을 연구하기 위하여 고안되

었다.

mRNA 합성방법인 액상법과 고체상법은 모두 단점이 있다. 액상법은 RNA프로모터를 함유하는 벡터를 사용해야 하고 또한 삽입이후 벡터는 선형의 서열로 변환되어야 한다. 고체상법은 정보의 원천이 mRNA가 아닌 고정된 체세포 DNA이기 때문에 항상 완전한 유전정보를 제공하는 것은 아니다. 그러므로 개량된 mRNA 합성방법이 요구된다.

"Nucleic Acids Research(19:1350(1991))"에서 스탬(Stamm) 등은 손쉬운 PCR 실험의 이용을 위하여 고체 지지체에 아미노 링크(amino link)로 공유결합된 올리고누클레오티드에 대해 설명하였다. 이 기술은 특별히 cDNA나 RNA를 생산하기 위한 것은 아니다. 더욱이 지지체에 공유결합된 올리고누클레오티드를 제거하기 위한 메카니즘이 전혀 제시되지 않았다.

[발명의 요약]

이 발명은 폴리누클레오티드 고정 지지체와 관련된 것인데, 이것은 유전자의 저장과 분석, 폴리누클레오티드 고정 지지체를 사용한 유전자 저장법, 그리고 단일가닥 센스 cDNA, 이중가닥 cDNA, 센스 mRNA, 안티센스 mRNA의 합성방법에 유용하다.

본 발명에서는 일실시예로서 불용성 지지체와 그 지지체에 결합된 폴리누클레오티드를 포함하는 누클레오티드 고정 지지체를 제공한다. 이 폴리누클레오티드는 mRNA의 poly A 꼬리에 상보적인 적어도 하나의 서열을 포함한다. 이 누클레오티드 고정 지지체는 이중가닥 cDNA외에도 센스 cDNA와 안티센스 cDNA의 합성을 포함하여 다양한 방법에 유용하다. 또한 누클레오티드 고정 지지체는 센스 mRNA와 안티센스 mRNA의 합성에도 유용하다. 그뿐만 아니라, 누클레오티드 고정 지지체는 벡터에 cDNA 서열을 올바른 방향으로 위치시키는 개량된 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 불용성 지지체에 폴리누클레오티드를 결합하는 새로운 방법을 포함한다. 본 발명은 올리고(dT)와 같이 mRNA의 poly A 꼬리에 상보적인 서열을 포함하는 폴리누클레오티드에 초점을 맞춘다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 이 폴리누클레오티드가 제한효소 인식부위와 RNA 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 폴리누클레오티드는 일반적으로 마이크로타이터 플레이트(microtiter plate)와 같은 불용성 디쉬(insoluble dish)에 고정된다. 본 발명의 바람직한 일 실시예에서는, 마이크로타이터 플레이트에는 두개 이상의 웰(well)이 있으며 그 각각에는 다른 폴리누클레오티드가 고정되어 있다. 본 발명의 폴리누클레오티드 고정 지지체는 완전한 길이의 이중가닥 cDNA, 센스 단일가닥 cDNA, 안티센스 단일가닥 cDNA, 센스 mRNA, 안티센스 mRNA의 합성에 이용할 수 있다. 또한 고정된 단일가닥 cDNA는 이중가닥 cDNA합성이나 DNA합성을 반복 실시하는 동안에도 충분히 오랫동안 안정하다.

본 발명의 일 실시예는 불용성 디쉬와 이에 결합된 폴리누클레오티드로 이루어진 누클레오티드 고정 지지체이다. 여기에서 불용성 디쉬로는 마이크로타이터 플레이트가 바람직하다. 결합된 폴리누클레오티드는 mRNA의 poly A 꼬리(예를들어 Poly(dT))와 상보적인 적어도 하나의 서열을 포함한다. 한 바람직한 실시예에서 이 폴리누클레오티드는 적어도 하나 이상의 제한효소부위를 포함한다. 좀 더 바람직한 발명의 실시예에서 이 폴리누클레오티드는 제한효소 인식부위 외에도 RNA프로모터 부위를 가진다. 본 발명의 대체적 실시예는 적어도 하나의 RNA 프로모터를 포함하는 폴리누클레오티드가 불용성 지지체에 결합된 형태이다. 가장 바람직한 유형은 T7이나 SP6 RNA 프로모터를 포함하는 것이다.

본 발명의 다른 유형은 적어도 하나의 제한효소 인식부위를 포함하는 폴리누클레오티드가 불용성 지지체에 결합된 것이다. 바람직한 제한효소는 EcoR I, Not I, Sma I과 Sal I을 포함한다. 폴리누클레오티드의 바람직한 서열은 Seq ID NO. 4, 13, 14 중 하나이다. 바람직한 실시예에서 결합된 폴리누클레오티드는 길이로 볼 때 30 내지 100 뉴클레오티드 사이이다.

본 발명의 또 다른 실시예에서 이중가닥 cDNA고정 지지체는 바람직하게는 이중가닥 cNDA의 적어도 한 쪽 사슬은 m

RNA의 poly A 꼬리와 상보적인 하나 이상의 서열을 포함하는 불용성 디쉬이다. 본 발명의 바람직한 실시예에서 적어도 이중가닥 cDNA의 한쪽 가닥은 RNA 프로모터를 포함하며, 좀더 바람직한 것은 이중가닥 cDNA가 적어도 두 개의 다른 RNA 프로모터를 포함하는 것이다. 상기 프로모터들이 T7 또는 SP6 RNA프로모터 중 하나라면 더욱 바람직하다. 상기 이중가닥 cDNA 고정 지지체의 대체적 실시예는 서열 중 적어도 하나의 제한효소 인식부위를 가진 것이다.

본 발명의 또 다른 실시예는 폴리누클레오티드를 결합하여 이중가닥 cDNA 고정 지지체를 생산하는 방법이다. 여기에 적어도 하나의 RNA프로모터를 포함하는 것이 바람직하다. 또한 폴리누클레오티드는 mRNA의 poly A 꼬리와 상보적인 적어도 하나의 서열을 포함하는 것이 바람직하다. 그 이후에 poly A 꼬리가 있는 mRNA를 함유하는 세포 용균액과 같은 용액을 누클레오티드 고정 지지체에 가함으로써 mRNA의 poly A 꼬리와 결합상태의 상보적 서열간에 혼성화가 일어나게 한다. 그리고 좀더 바람직한 방법은 지지체와 용액을 배양하는 것이다. 그리하여 일차 액상(liquid phase)과 고체상(solid phase)을 형성한다. 상기의 것보다 좀더 바람직한 방법은 배양 후 첫번째 액상을 제거하는 것이다. 혼성반응 후 어닐링된 mRNA에 상보적인 안티센스 cDNA를 생산한다. 그리고 나서 그 안티센스 cDNA에 상보적인 cDNA를 생산한다.

위 방법의 매우 바람직한 실시예에서는 일차적 반응혼합물로서 역전사효소, dATP, dCTP. dGTP, dTTP를 필요로 한다. 그리고 나서 위의 일차적 반응혼합물과 고체상 물질을 배양한다. 배양후, 배양된 고체상 물질에 RNase, DNA 중합효소, DNA 리가아제, dATP, dCTP, dGTP, dTTP를 가한다. 그 후 고체상을 배양하고 그 결과 이차 액상이 생성되면 이를 제거하는 것이 바람직하다.

본 발명의 다른 실시예는 이중가닥 cDNA 고정 지지체를 생성한 후 액상을 제거함으로써 이중가닥 cDNA를 저장하는 방법이다.

본 발명의 다른 대체적 실시예는 상기한 대로 이중가닥 cDNA고정 지지체를 생성함으로써 고체 지지체 상에서 안티센스 mRNA를 만드는 방법이다. 여기에서 지지체와 결합상태인 이중 가닥 cDNA는 부가적으로 RNA 프로모터를 포함한다. 그리고 나서 전사개시 시약이 들어있는 시료용액을 가하여 안티센스 mRNA를 생산한다. 바람직한 방법은 지지체와 시료용액을 배양하여 안티센스 mRNA를 생산하는 것이다. 그리하여 일차 액상과 고체상이 생성된다. 여기에서 반응을 시작하기 위한 일련의 반응단계들은 다음과 같다.

1) 고체상에 RNA중합효소, ATP, CTP, GTP와 UTP가 들어있는 반응혼합물을 dNTP 중 한 종류가 표지되어 있다면 바람직하다.

2) 고체상과 반응혼합물을 배양시키고 고체상과 반응혼합물을 가열한다. 그 결과로 생성된 안티센스 mRNA를 포함한 액상이 생성된다. 그 이후에 액상을 얻어내고 이를 DNase처리하여 반응을 계속 진행시키는 것이 바람직하다.

본 발명의 또 다른 실시예는 다음의 단계와 같이 고체 지지체에 센스 mRNA를 생성하는 방법이다.

(a) mRNA poly A 꼬리에 상보적인 적어도 하나의 서열과 적어도 하나의 DNA 프로모터와 적어도 하나의 제한효소 인식부위를 가지는 폴리누클레오티드를 불용성 지지체에 결합시켜 누클레오티드 고정 지지체를 형성한다.

(b) poly A 꼬리가 있는 mRNA를 포함한 시료용액을 누클레오티드 고정 지지체에 가한다.

(c) mRNA의 poly A꼬리를 상보적 서열과 혼성화시킨다.

(d) mRNA에 상보적인 안티센스 cDNA를 생산하기 위해 mRNA를 주형으로 사용한다.

(e) 안티센스 CDMA와 상보적인 센스 cDNA를 생산한다. 그리하여 지지체에 고정된 이중가닥 cDNA를 형성한다.

(f) 이중가닥 어댑터(double stranded adapter)를 이중가닥 cDNA에 가한다. 이 어댑터는 불용성 지지체에 결합된 폴리누클레오티드 상의 RNA 프로모터, 제한효소 인식부위와는 다른 제2의 RNA프로모터, 제2의 제한효소 인식부위 중 적어도 하나를 포함한다. 선택적으로, 이중가닥 어댑터와 DNA 리가아제를 함유한 반응혼합물을 고체상에 가할 수 있다.

(g) 제2의 제한효소인식부위를 인식하는 제한효소로 이중가닥 cDNA를 분해한다.

(h) 제2의 RNA 프로모터를 이용하여 RNA를 전사함으로써 DNA/RNA 이중가닥(duplex)을 만든다. 이 반응은 고체상에 ATP CTP, GTP, TTP및 제2의 RNA 프로모터와 반응하는 RNA 중합효소를 포함하는 혼합물을 고체상에 가하고 이를 배양하여 DNA/RNA 이중가닥을 생성한다. 선택적으로 상기한 dNTP중 하나가 표지될 수 있다.

(i) DNA/RNA 이중가닥을 변성시킨다. 바람직하게는 가열한다. 그리하여 센스 mRNA를 함유하는 액상을 생성한다. 그리고 선택적으로 액상을 DNase로 처리한다.

본 발명의 다른 실시예는 다음의 단계에 따라 이중가닥 cDNA를 생산하는 방법이다.

1. mRNA를 함유하는 샘플용액을 누클레오티드 고정 지지체에 가한다.

2. 샘플용액과 지지체를 배양하여 일차 액상과 고체상을 생성한다.

3. 일차 액상을 제거한다.

4. 역전사효소, dATP, dCTP, dGTP, dTTP를 함유한 일차 반응혼합물을 상기의 표지된 누클레오티드와 함께 고체상에 가한다.

5. 일차 반응혼합물을 고체상과 배양시킨다.

6. RNase, DNA중합효소, DNA 리가아제, dATP, dCTP, dGTP, dTTP가 함유된 이차 반응혼합물을 고체상에 가한다.

7. 이차 반응혼합물을 고체상과 배양한다.

본 발명의 다른 실시예는 상기한 방법으로 이중가닥 cDNA를 생성함으로써 센스 단일가닥 cDNA를 생산하는 방법이다. 그리고 나서 2차 반응혼합물과 고체상을 가열하면 센스 단일가닥 cDNA가 함유된 2차 액상이 생성된다.

본 발명의 다른 바람직한 실시예는 상기한 바와 같이, 이중가닥 cDNA를 생산함으로써 안티센스 단일가닥 cDNA를 생산하는 방법이다. 그 후 2차 반응혼합물과 고체상물질을 가열하면 센스 단일가닥 cDNA를 함유한 2차 액상이 생성되고 그 후 안티센스 단일가닥 cDNA를 함유한 고체상 물질을 얻는다.

다른 유사한 일 실시예는 앞서 기술한 이중가닥 cDNA 고정 지지체를 이용하여 센스 단일가닥 cDNA를 생산하는 방법이다. 센스 cDNA와 안티센스 cDNA가 액상에서 이중가닥 cDNA를 형성한 후 이중가닥 cDNA는 변성되고 액상이 얻어진다.

본 발명중 유사한 실시예는 센스 단일가닥 cDNA를 생산하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 액상에서 이중 가닥-cDNA 고정 지지체를 생산하는 방법을 포함한다. 여기에서 이중가닥 cDNA의 한쪽 사슬은 불용성 지지체에 결합되어 있고 다른쪽 사슬은 mRNA의 poly A 꼬리와 상보적인 최소한 하나의 서열을 포함한다. 그 후 이중가닥 cDNA 고정 지지체를 변성시켜 액상을 얻는다.

본 발명의 다른 실시예는 이중가닥-cDNA 고정 지지체를 생산함으로써 안티센스 이중가닥 cDNA를 생산하는 방법이다. 여기에서 센스 cDNA와 안티센스 cDNA는 액상에서 이중가닥 cDNA를 형성한다. 바람직하기로는 이중가닥 cDNA는 이 방법에서 선택적으로 절단할 수 있는 제한효소 인식부위를 가진다. 이중가닥 cDNA를 변성하고 액상을 제거한 후 남은 고체상 물질은 안티센스 단일가닥 cDNA를 함유하고 있을 것이다.

이 발명의 다른 실시예는 cDNA 서열을 특이성 방향으로 벡터에 위치시킴으로써 cDNA 벡터를 조작하는 방법을 기술한다. 한 가지 방법은 다음의 단계에 따라 수행된다.

(a) 상기의 방법으로 이중가닥 cDNA 고정 지지체를 생산한다. 여기에서 불용성 지지체에 결합된 폴리누클레오티드는 첫번째 제한효소 인식부위를 포함한다.

(b) 위 이중가닥 cDNA에 이중가닥 어탭터(double-stranded adaptor)를 가한다.

이 어댑터는 위 폴리누클레오티드 상의 제1제한효소 인식부위와는 다른 제한효소 인식부위를 가진다.

(c) 제1 제한 효소 인식부위를 인식하는 제한효소와 제2 제한효소 인식부위를 인식하는 제한효소로 이중가닥 cDNA를 분해한다. 그리하여 그 첫번째 말단에는 첫번째 접착성 말단이 있고 두번째 말단에는 두번째 접착성 말단이 있는 비결합 이중가닥 cDNA를 형성한다.

(d) 첫번째 접착성 말단과 상보적인 서열을 가진, 바람직하기로는 두번째 접착성 말단에 상보적인 서열도 가진 벡터에 이중가닥 cDNA를 연결시킨다.

본 발명의 부가적 태양은 첫번째 단일사슬 폴리누클레오티드를 두번째 단일가닥 폴리누클레오티드와 혼성화함으로써 적어도 하나의 푸린 염기를 가진 첫번째 단일가닥 폴리누클레오티드를 노출된 수황화(sulfhydryl) 잔기가 있는 불용성 지지체에 고정시키는 방법이다. 지지체는 선택적으로 일차 아민 화합물로 처리된다. 이 복합체는 이후의 반응에서 푸린 염기를 보호할 것이다. 그 후에 말레이미드 그룹(maleimide group)을 가진 폴리누클레오티드를 형성하기 위하여 첫번째 폴리누클레오티드의 5′ 말단을, 바람직하게는 이중가닥 복합체를 변성시킨 후에, 말레이미드 화합물과 반응시킨다. 선택할 수 있는 말레이미드 화합물의 한 가지로 설포(sulfo)-SMCC가 있다. 그 후 반응은 첫번째 폴리누클레오티드의 5′ 말단에 있는 말레이미드기를 불용성 지지체에 결합된 수황화기에 부착시킬 것이다.

상기한 바와 같이 폴리누클레오티드를 불용성 지지체에 부착시키는 방법에서 한가지 바람직한 실시예는 SATA를 가진 아민잔기와 불용성 지지체 상의 노출된 아민 잔기를 반응시킴으로써 그 수황화 잔기를 생산하는 것이다. 반응시킨 복합체는 수산화 아민으로 탈아세틸화 반응시킨다.

[도면의 간단한 설명]

제1도는 첫번째 폴리누클레오티드 탐침(probe)을 불용성 지지체에 말레이미드 방법으로 고정시키는 방법을 도시한 것이다.

제2도는 첫번째 누클레오티드 탐침을 불용성 지지체에 카르보디 이미드 방법으로 고정시키는 방법을 도시한 것이다.

제3(a)~(h)도는 폴리누클레오티드 고정 지지체로부터 센스 단일가닥 cDNA, 안티센스 mRNA, 센스 mRNA를 합성하는 방법의 개괄적 원칙을 나타낸다.

제4(a)도 및 제4(b)도는 본 발명의 방법으로 합성한 Gs 단백질의 안티센스 mRNA(A)와 센스 mRNA(B)의 아가로스 겔 전기영동 사진을 나타낸다.

제5(a)~(c)도는 폴리누클레오티드 고정 지지체에 의해 얻어진 Gs 단백질의 단일가닥 cDNA를 PCR방법으로 증폭한 이중가닥 cDNA의 아가로스 겔 전기영동 사진을 나타낸다. 제5(a),(b),(c)도는 동일한 플레이트로부터 첫번째, 두번째, 세번째 합성한 것을 나타낸다.

제6도는 본 발명 방법으로 인간 말초혈액 백혈구의 준 발암유전자(jun oncogene)를 PCR 증폭한 이중가닥 cDNA의 아가로스 겔 전기영동한 사진을 나타낸다.

제7(a)도 및 제7(b)도는 본 발명의 방법으로 인간 말초혈액 백혈구의 여러 가지 유전자를 PCR 증폭시킨 이중가닥 cDNA의 아가로스 겔 전기영동 사진을 나타낸다.

제8도는 본 발명의 방법으로 Gs 단백질을 PCR 증폭시킨 이중가닥 cDNA의 아가로스 겔 전기영동 사진을 나타낸다.

[발명의 상세한 설명]

[정의]

다음의 공지된 약자는 아래와 같이 사용된다.

A : 아데닌

C : 시토닌

G : 구아닌

T : 티민

U : 우라실

dATP : 데옥시 아데노신 삼인산

dCTP : 데옥시 시티딘 삼인산

dGTP : 데옥시 구아노신 삼인산

dTTP : 데옥시 티미딘 삼인산

본 발명의 목적을 위하여 "불용성 디쉬"는 물이 주성분인 완충용액이나 올리고누클레오티드 합성에 일반적으로 사용되는 용액에 불용성인 오목하거나 평평한 지지기구로 정의된다. 바람직하게는 본 발명에 사용되는 불용성 디쉬는 액체를 담을 수 있는 것이다. 따라서 바람직한 유형은 마이크로타이터 디쉬(microtiter dish) 플라스틱판 또는 나일론 막을 포함하지만, 예를들어 플라스틱이나 다른 불용성 비드는 포함하지 않는다.

제한효소에 의해 선택적으로 절단되는 누클레오티드 서열은 여기에서 "제한효소 인식부위"로 정의된다. 그러한 인식부위는 여러 개 알려져 있으며, 어떤 주어진 서열은 한개 이상의 인식부위를 포함할 수 있다.

예를들어, 어떤 서열은 Not I와 EcoR I 각각에 대한 인식부위를 포함할 수 있다.

"RNA 프로모터"는 여기에서 RNA 중합효소가 인식하여 그곳에서부터 3′ 쪽으로 누클레오티드의 전사를 시작할 수 있는 누클레오티드 서열로 정의된다. 예를들어 T7 프로모터(Seq ID No.1)의 누클레오티드 서열은 5′-AATACGACTCACTATAG-3′과 같다.

RNA 프로모터의 다른 예로 SP6 프로모터(Seq ID No. 2)는 아래와 같다.

5′-CATTTAGGTGACACTATAGAA-3′

“불용성 지지체”는 여기에서 본 발명의 범위 내에서 주어진 과정 동안 사용되는 용액에 의해 용해되지 않고 가열과정 동안 용해되지 않는 물질 또는 녹지 않는 물질로 정의된다. 불용성 지지체의 예로는 (플라스틱 마이크로타이터 플레이트, 유리 마이크로타이터 플레이트 및 나일론 막을 포함하는) 불용성 디쉬를 포함하며, 또한 아가로즈와 플라스틱 비드를 포함한다.

본 발명에서, 센스 mRNA는 유전정보와 동일한 mRNA를 나타낸 반면, 안티센스 mRNA는 센스 mRNA와 상보적인 폴리누클레오티드를 지칭한다. 센스 단일사슬 cDNA는 비록 cDNA의 우라실 염기가 mRNA에서는 티민으로 바뀌고, 리보누클레오티드가 데옥시리보누클레오티드로 바뀌지만 센스 mRNA의 그것과 동일한 유전정보를 포함한다.

본 발명에 사용되는 물은 그 안에 들어있는 RNase의 활성을 충분히 감소시키기 위하여 DEPC(디에틸 피로카르본산, diethylpyrocarbonate)으로 처리하는 것이 바람직하다.

DEPC 처리는 물에 0.1% DEPC를 가하여 37℃에서 하룻밤 동안 배양한 후 오토클레이브(autoclave) 한다.

[본 발명의 개괄]

본 발명을 이용하여 이중가닥 cDNA, 단일가닥 cDNA, 센스 mRNA, 안티센스 mRNA를 마이크로타이터 플레이트와 같은 불용성 디쉬 내에서 결합상태의 올리고누클레오티드 서열로부터 빠르고 효과적으로 합성할 수 있다. 이 체계의 이점은 RNA가 불용성 디쉬에 결합되어 있을 때 용액을 쉽게 바꿀 수 있다는 것이다. 종래에는 용액상태의 RNA를 회수하기 위하여 용액 교체시 매번 에탄을 침전이나 이와 유사한 과정이 필요했다. 본 발명의 바람직한 유형에서 제한효소인식부위, RNA프로모터 서열, poly dT 서열을 포함하는 누클레오티드서열은 마이크로타이터 플레이트의 웰에 공유결합된다. 세포질 mRNA를 포함하는 세포 용균액은 더 이상 정제하지 않고 웰에 위치시킬 수 있다. 바람직한 실시예에서 올리고(dT) 누클레오티드 가닥은 mRNA의 poly A 꼬리와 수소결합할 것이다. mRNA가 그 표적에 어닐링되어 고정되어 있는 동안 혼성조건을 해치지 않고 용액교체를 수행할 수 있다.

단일가닥 cDNA는 고정화된 mRNA에 데옥시누클레오티드와 역전사효소를 가함으로써 생성될 수 있다. 그리고 나서 용액을 DNA중합효소와 데옥시누클레오티드가 들어 있는 용액으로 교체함으로써 이중가닥 cDNA를 쉽게 생산할 수 있다. 안티센스 mRNA는 공유결합된 올리고누클레오티드 상의 프로모터 결합부위를 목표로 하는 RNA중합효소를 가함으로써 전사될 수 있다. 더욱이 다른 제한효소인식부위들과 두번째 RNA 프로모터 서열을 함유한 어댑터는 바람직하고 유리하게 이중가닥 cDNA의 비결합 말단과 연결될 수 있다.

그 이후, 센스 mRNA는 연결된 어댑터를 목표로 하는 RNA중합효소를 가하여 줌으로써 빠르고 간편하게 전사될 수 있다. 단일가닥 센스 cDNA는 고정화된 단일가닥 안티센스 cDNA로부터 반복적으로 합성될 수 있다. 이 발명은 기초적인 분자생물학과 분석뿐만 아니라 다양한 질병의 진단과 치료에도 이용될 수 있다.

본 발명자는, mRNA의 poly A 꼬리에 상보적인 적어도 하나의 서열을 포함하는 폴리누클레오티드를 불용성 지지체에 고정화시킨 것이 이론 분자생물학과 응용 분자생물학 모두에 유용한 다양한 누클레오티드 합성과 프로세싱 기술에 중요한 잇점을 제공할 수 있다는 것을 발견하였다. 이러한 잇점들 중의 다수는 계속되는 본 발명의 설명에서 분명해질 것이다.

[본 발명의 결합 폴리누클레오티드]

이상에서 논의된 대로, 고정화된 올리고누클레오티드는 mRNA poly A 꼬리에 상보적인 누클레오티드 서열을 포함한다. 그와 같은 상보적인 서열은 poly A 뿐만 아니라 올리고(dT)를 포함할 수도 있다. 그와 같은 서열의 길이는 15 내지 80염기 사이가 바람직하며, 좀더 바람직하게는 30 내지 100염기가 적당하다.

30 내지 100 mers를 포함하는 다양한 길이의 폴리누클레오티드 서열은 본 기술분야에서 보통의 지식을 가진 자에게 알려진 기술을 사용하여 수월하게 합성될 수 있다. 이 기술은 mRNA poly A 꼬리에 상보적인 서열, mRNA 프로모터 서열, 및/또는 다양한 제한 효소 인식부위를 가지는 서열의 합성방법을 포함한다. DNA 합성기(Synthesizer)는 그와 같은 합성을 촉진시키는데 사용될 수 있다. 그와 같은 DNA 합성기 중 하나가 캘리포니아주 로스앤젤레스의 Applied Biosystems사에 의해 제조되었다.

본 발명의 바람직한 실시예에서, mRNA의 poly A 꼬리와 상보적인 적어도 하나의 서열을 포함하는 폴리누클레오티드는 누클레오티드 고정 지지체를 형성하기 위해 불용성 지지체에 결합된다. 바람직하게는 이들 서열은 길이에서 30 내지 100 누클레오티드이다. 특별히 바람직한 실시예에서, 고정된 폴리누클레오티드는 RNA 프로모터, 및/또는 제한효소 인식부위를 포함한다. 바람직하게는, 3′ 말단이 mRNA poly A 꼬리와 혼성화할 때, 5′ 말단은 불용성 지지체에 결합된다.

이와 같이, 고정화 과정에서 본 발명자는 여러 가지 다른 폴리누클레오티드 서열을 사용하였다. 특별히 바람직한 서열은 poly dT서열, EcoR I과, Not I 인식 서열 그리고 T7프로모터를 포함한다. 이러한 서열의 사용은 여기에 제시된 많은 실시예에서 기술되었다. 그러나 그 외의 다른 제한효소 인식서열 및 프로모터를 사용에 의해서도 유사한 결과를 얻었다. 예를들어 Sma I-Sal I과 T7 프로모터의 사용은 여기에 기술된 어느 방법에도 현저한 영향을 미치지 않았다. 우리는 또한 EcoR I-Not I와 SP6 프로모터를 이용하였다.

[고정화 방법]

본 발명의 실시에서, 폴리누클레오티드는 불용성 지지체에 고정화된다. 공유결합, 이온결합과 물리적 흡착방법을 포함하여 다양한 방법들이 이용 가능하다. 그러나, 공유결합 방법이 바람직하다. 따라서 본 발명의 어떤 실시예에서, 폴리누클레오티드는 그 표면에 카르복실기, 아민기, 수산화기와 같은 작용기를 나타내는 마이크로타이터 플레이트에 고정된다. 표면에 카르복실기나 일차 아민기를 나타내는 플라스틱 플레이트 또는 처음에는 표면에 작용기가 없으나 후에 작용기를 부가한 플라스틱 플레이트 또한 사용될 수 있다. 바람직하게는, 이미 카르복실기나 1차 아민기를 그 표면에 나타내고 있는 플라스틱 플레이트를 사용한다. 표면에 카르복실기와 1차 아민기를 포함하는 플라스틱 플레이트의 예는 "수밀론(Sumilon)" 마이크로 플레이트 MS-3796F와 MS-3696F(스미토모 바켈리테에서 구입가능)이다.

작용기를 나타내는 불용성 지지체에 폴리누클레오티드를 고정화시키는 바람직한 실시예에서 폴리누클레오티드의 5′ 말단은 작용기와 공유결합된다. 이러한 작용기들에 폴리누클레오티드를 공유결합시키는 다양한 방법들 중의 어느 것이나 사용할 수 있다. 잘 알려진 바람직한 방법의 예로서 말레이미드법(maleimide method)과 카르보디 이미드법(carbodi imide method)이 포함된다.

제1도에 개시된 말레이미드법은 말레이미드기를 포함하는 물질과 수황화기를 포함하는 다른 물질간의 반응을 포함한다. 말레이미드법을 사용하여 고정 지지체에 폴리누클레오티드의 5′ 말단을 부착시키기 위하여 폴리누클레오티드의 5′ 말단은 말레이드 화합물과 반응시킨다. 적절한 말레이미드 화합물은 설포석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카르복시산(Sulfo-SMCC)이다.

아민기를 가진 지지체와 석신이미딜-5-아세틸티오아세트산(SATA)을 반응시키고, 이어 수산화아민을 사용하여 탈아세틸반응을 시킴으로써 지지체상에 수황화기(-SH)가 제공된다(설포-SMCC와 SATA는 Pierce Company를 포함하여 여러 시판회사로부터 구입할 수 있다). 결과물로 생성된 수황화기는 폴리누클레오티드 5′ 말단상의 말레이미드기와 반응할 수 있고 폴리누클레오티드 고정 지지체를 생성한다. 말레이미드법의 사용에서 본 발명자가 경험한 한가지 문제점은 플레이트상의 수황화기가 폴리누클레오티드의 5′ 말단에 있는 아민기뿐만 아니라 아데닌, 구아닌과 같은 푸린 염기의 1차 아민기와도 반응할 수 있다는 점이다. 폴리누클레오티드가 그 5′ 말단 쪽으로 고정화되는 것을 보장하기 위하여 고정화반응에 앞서 상보적인 폴리누클레오티드에 폴리누클레오티드를 짝짓기(pairing)시킴으로써 푸린 염기상의 아민기는 보호된다. 고정화 이후, 상보적 폴리누클레오티드는 가열과 같은 변성방법으로 제거될 수 있다.

카르보디이미드법은 제2도에 개시되었다. 이 방법은 아민기를 가진 카르보디이미드 화합물과 카르복실기를 가진 물질간의 반응을 포함한다. 카르보디이미드 화합물의 한 예는 1-에틸-3-(3-디에틸아미노프로필) 카르보디이미드 염화수소(이하, "EDC"라 칭함)이다. 카르보디이미드법에서 EDC를 사용하기 위하여 EDC는 우선 아민기를 함유한 EDC 화합물로 활성화되어야 한다. 이것은 N-수산화설포석신이미드(이하, "Sulf-NHS"라 칭함)와 반응되어야 한다. EDC와 설포-NHS 모두 Pierce Company를 포함하여 잘 알려진 시판회사로부터 구입할 수 있다.

폴리누클레오티드를 지지체에 부착시키는 바람직한 카르보디이미드법을 실시함에 있어서, 부착된 카르복실기를 가진 지지체가 사용된다. EDC는 설포-NHS와 반응하여 활성화된다. 활성화된 EDC는 결합된 카르복실기 표면을 포함하는 지지체와 반응한다. 그리고 나서 이것은 5′ 말단에 아민기를 가진 폴리누클레오티드와 반응하여 폴리누클레오티드 고정 지지체를 생성할 수 있다.

본 발명자는, 불용성 지지체상의 활성화될 아민기 또는 카르복실기의 비특이적 결합은, 바람직하게는 글리신과 같은 일차아민화합물로 폴리누클레오티드가 고정된 플레이트를 처리하면 효과적으로 감소시키거나 제거할 수 있다는 것을 발견하였다.

여러 가지의 다른 고정화방법이 사용될 수 있는데, 여기에는 테라다(Terada)등이 기술한 비오틴-아비딘 시스템(biotin-avidin system)이 포함된다.

[시료의 적용]

본 발명의 바람직한 방법에서 mRNA를 함유한 시료는 불용성 지지체에 적용되는데, mRNA poly A 꼬리에 상보적인 서열을 가지는 폴리누클레오티드가 지지체에 결합되어 있다. 시료내의 mRNA poly A 꼬리는 결합상태의 폴리누클레오티드와 혼성화될 수 있다. 이것은 본 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 잘 알려진 바와 같이 다양한 요소에 의존적인 온도에서 배양하면 된다. 이러한 요소들로서는 상보적 누클레오티드 서열의 길이, 상보적인 누클레오티드 서열에서 전체 염기 함유량에 대한 구아닌 또는 시토신의 비율(GC contents)(poly A 꼬리가 상보적일 때만 0%가 될 것이다.), 완충용액내의 NaCl 농도, 상보적 누클레오티드 서열에서 잘못 짝지어진 염기의 수, 그리고 누클레오티드의 유형 등이 있다. 본 발명의 바람직한 형태에서 다음의 방정식은 바람직한 배양온도를 계산하는데 사용될 수 있다.

$$T_{inc} = 16.6 \times \log(M) + 0.41(GC) + 81.5 - 67.5/n - 15(℃)$$

위의 식에서 M은 용액중의 NaCl 농도이고, GC는 GC 함유비(%)를 나타낸다. n은 누클레오티드 서열의 길이(누클레오티드의 수)를 나타낸다.

배양시간 또한 "Molecular Cloning Manual"에서 기술된 방법에 따라 결정될 수 있다.

배양시간은 바람직하게는 1시간 내지 오버나잇이고, 시료는 배양 중 부드럽게 휘저어주는 것이 바람직하다. 배양은 적절한 완충용액 내에서 수행된다. 노던 블랏(Northern Blot) 또는 도트 불랏(Dot Blot) 방법에서 RNA와 DNA를 혼성화하는데 사용되는 것과 같은 완충용액이 사용될 수 있다. 완충 용액은 RNase에 의하여 오염되지 않도록 준비하는 것이 바람직하다. 만일 RNase에 의하여 오염되면 거기서 부터 활성화는 가능한 낮게 조절되어야 한다. RNase가 없는 완충용액은 상업적으로 판매되고 있다.

이상에서 언급한 바와 같이, 본 발명의 방법에서 사용되는 물에서 RNase활성을 제거하기 위하여, 물은 디에틸피로카보네이트(DEPC)로 처리하는 것이 바람직하다. 바람직한 DEPC 처리는 물에 0.1% DEPC를 가한 후 37℃에서 오버나잇(overnight)으로 보관한 후 오토클레이브에서 멸균한다.

[세척절차]

바람직하게는, 배양 후 시료 중 결합되지 않은 성분은 불용성 지지체로부터 세척된다. 세척에 적당한 용액은 배양완충액이나 mRNA 정제 킷트(kit)에 포함된 완충용액이다. 그렇지만, 핵산의 유형에 따라 적절한 용액을 사용하는 것이 바람직하다. mRNA를 보유하기 위하여 세척용액은 1mM EDTA(Ethylen Diamine Tetra Acetate)와 0.5M NaCl이 들어 있는 pH7.5의 DEPC 처리된 20mM 트리스 용액이 바람직하다(이하 " RNA 세척용액 "이라 칭함). DNA를 보유하기 위하여 세척용액은 1mM EDTA와 0.5M NaCl을 함유한 pH7.5의 20mM 트리스 용액을 오토클레이브할 수 있다(이하에서 " DNA 세척용액 "이라 칭함).

[이중가닥 cDNA 고정 지지체]

본 발명에서 이중가닥 cDNA고정 지지체는 아래와 같이 얻어질 수 있다.

폴리누클레오티드와 그 mRNA 간에 혼성화 반응이 일어난다. 그런 후 mRNA주형으로부터 역전사효소를 사용하여 cDNA가 합성된다. mRNA는 바람직하게는 RNase H로 절단되고, 그 후 이중 가닥 cDNA는 바람직하게는 DNA 중합효소와 4가지 dXTP들과 리가아제에 의해 합성된다. 그 결과로서 불용성 지지체에 고정된 이중 가닥 cDNA의 구조체가 형성된다.

생산된 DNA의 상보적 사슬은 그 생산과정 동안 표지된 dXTP들을 도입함으로써 표지될 수 있다. 여러 가지 표지들이 사용될 수 있는데, 예를들어, 방사성 표지된 누클레오티드 또는 비오틴과 같은 시약들이 있고, 이들은 비색 정량반응(colorimetric reaction) 또는 발광반응(light-emitting reaction)에 의해 인지할 수 있다.

결합된 cDNA는 다른 다양한 기술에 사용될 수 있다. 본 발명의 특별히 바람직한 방법에 따라 만일 결합된 폴리누클레오티드가 RNA 프로모터 서열을 포함한다면 안티센스 RNA가 생산될 수 있다. 프로모터에 적절한 RNA중합효소가 네 가지 리보누클레오티드 삼인산과 함께 부가된다. 본 기술분야에서 보통의 지식을 가진 자들에게 자명한 바와 같이, 이 누클레오티드 삼인산 중 적어도 하나 이상이 표지되어 있다면 이 안티센스 RNA는 표지될 수 있다.

본 발명의 부가적으로 바람직한 방법에 따르면, RNA 블랏(blot) 분석에 상당하는 분석은 시료를 열변성시킨 후 결과적으로 생긴 결합상태의 안티센스 단일가닥 cDNA와 혼성화시킴으로써 수행될 수 있다. 열변성 후 센스 단일가닥 cDNA는 액상에 존재할 것이다. 이 센스 단일가닥 cDNA는 PCR, 서열 결정(Sequencing)과 같이 다양한 공지의 기술에 사용된다.

이 실행에 사용된 mRNA는 바람직하게는 정제된 RNA, 생물학적 시료에서 추출한 mRNA 또는 RNase로 억제된 세포 용균액이다. mRNA의 정제는 노던 불랏이나 도트 블랏 방법에 사용되는 최근의 mRNA 정제 방법을 따른다. 시판되는 킷트 또한 이용 가능하다. 세포 용균액 내의 RNase의 활성을 억제하기 위해서, 용균 완충액은 바람직하게는 200㎍/㎕

단백질 분해효소(preteinase K)와 10mM의 바나딜 리보누플레오사이드 복합체, 500 단위/㎕의 RNase 억제자(inhibitor), 0.5%의 SDS(Sodium Dodecyl Sulfate)와 EDTA를 함유한 pH 8.0의 용액이 사용된다.

배양온도는 그 실험이 핵산이 혼성화 실험인지 효소반응인지에 따라 각 경우마다 다양하다. 혼성화 반응은 상기 " 시료의 적용 " 이라는 제목의 부분에서 설명된 대로 수행된다.

효소반응의 경우에서 효소가 거의 억제되지 않는 어느 온도나 가능하지만 효소에 대하여 최적온도가 바람직하다. 배양시간은 30분에서 오버나잇까지 교반기로 진동을 가하거나 또는 진동시키지 않고 배양할 수 있다. 효소반응에서, 효소활성을 거의 억제하지 않는 어떤 완충용액도 가능하나, 각 효소 활성에 최적인 완충용액 성분이 가장 바람직하다. 그러나, 어떠한 완충용액이라도 RNase에 의하여 오염되지 않는 것이 중요하며, RNAsin과 같은 억제자를 사용하여 그 활성은 가능한 한 최소가 되도록 조절되어야 한다.

부가하여, 이중가닥 폴리누클레오티드 복합체의 변성 등을 위한 가열반응은 적절한 완충용액 내에서 수행된다.

고정된 이중가닥 cDNA를 함유한 불용성 지지체는 바람직하게는 0.5M NaCl과 1mM EDTA를 함유한 pH 7.6의 20mM 트리스 염화수소로 이루어진 DNase에 의해 오염되지 않은 용액조건 하에서 4℃로 최소한 1개월간 저장 가능하다.

고정된 폴리누클레오티드를 가진 불용성 지지체는 여러 번 재사용 가능하다. 사실상 본 발명자는 결합누클레오티드외 심각한 손실없이 누클레오티드 지지체를 여러 번 재사용하였다. 결합 폴리누클레오티드의 재사용을 위하여 혼성화된 mRNA를 cDNA로부터 절단, 제거하는 것은 배양 후 RNase가 함유된 용액으로 헹구어 냄으로써 수행될 수 있다. RNase 함유용액 대신 순한 NaOH용액 또한 결합 cDNA로부터 혼성화된 mRNA를 제거하는데 사용될 수 있다.

[제2 RNA프로모터와 센스 RNA의 합성]

본 발명에 따른 방법의 일 실시예서는, 제2 RNA프로모터가 요구된다. 이 제2 RNA프로모터로 센스 RNA의 생산을 이끌어내기 위하여 사용될 수 있다. 표지된 누클레오티드 삼인산은 표지된 센스 RNA의 생산에 사용될 수 있다. 제2 RNA프로모터의 누클레오티드 서열은 그의 3′쪽에 존재하는 유전정보의 전사의 개시에 사용되는 RNA 중합효소에 의해 인식된다. 제2 RNA프로모터는 일반적으로 이중가닥 cDNA 상의 제1 프로모터와 반대편에 위치시킨다. 이 서열은 바람직하게는 폴리누클레오티드 고정 불용성 지지체에서 제1 프로모터 서열보다 다른 프로모터의 결합부위를 암호화한다. 본 발명에서, 제2 RNA프로모터와 반응하는 RNA중합효소는 제1 RNA프로모터 서열과 교차반응하지 않아야 한다. 만약 제1 RNA프로모터가 예를들어 박테리오파아지 T7 이라면, 제2 RNA 프로모터는 예를들어 SP6 프로모터가 될 수 있다.

제2 프로모터를 제공하기 위하여, 제2 RNA프로모터와 제2 제한효소인식부위 모두를 포함한 어댑터를 사용할 수 있다. 그리고 나서 이 어댑터는 이중가닥 cDNA의 말단에 부가될 수 있다. 적절한 어댑터의 일례는 Sal I-SP6 어댑터이고, 이는 이하에서 제시된 바와 같다(Seq ID No.3)

5′-TCGACATTTAGGTGACACTATAGAA-3′

3′-GTAAATCCACTGTGATATCTT-5′

제2 제한효소인식부위는 바람직하게는 폴리누클레오티드 고정 불용성 지지체의 제한 효소인식부위와 같은 서열이 아니거나 또는 그 방향성이 같지 않아야 한다. 만일 제1 제한효소들이 예를들어 EcoR I 및/또는 Not I이라면 제2 제한효소는 Sma I 및/또는 Sal I이 될 수 있다.

[방향성 있는 클로닝]

한쪽 말단에 제1 제한효소인식부위를 포함하고 다른 쪽 말단에 제2 제한효소부위를 포함하는 이중가닥 cDNA분자는 블런트 말단 연결(blunt end ligation)에 의하여 제작된다. 제한효소인식부위와 RNA 프로모터 서열을 포함하는 이중가닥 올리고누클레오티드는 T4 리가아제와 같은 효소를 사용하여 이중가닥 cDNA의 비결합 말단에 연결된다. 제1 및 제2 제한효소인식부위가 다르기 때문에 이중가닥 cDNA 연결은 한 방향으로 일정할 것이다. 이러한 방법으로 벡터에의 cDNA 삽입의 방향성은 조절될 수 있다.

[본 발명의 도식적인 실시예]

제3도에는 본 발명의 바람직한 실시예가 개략적으로 도시되어 있다. 제한효소인식부위를 가진 30 내지 100-mers의 폴리누클레오티드 서열, RNA 프로모터 및 올리고(dT) 서열을 포함하는 불용성 고정 지지체(a)는 poly A 꼬리가 있는 mRNA의 시료용액에 혼합된다. 그 결과로 생긴 고정 폴리누클레오티드 mRNA 복합체는 결합된 누클레오티드의 올리고(dT) 꼬리를 개시체로 사용하고 mRNA를 주형으로 사용하여 역전사효소로 반응시킨다. 그 결과로서 mRNA-cDNA혼성체가 불용성 지지체(c)상에서 합성된다. RNase와 DNA 중합효소를 부가하면 RNA 절단과 mRNA-cDNA 혼성체의 불용성 지지체(d)에 첨부된 이중가닥 cDNA로의 변환이 일어난다. 그후에, 고정된 상기 이중가닥 cDNA는 예를 들어 저염도의 수용액에서 배양되고 그후에 가열되어 이중가닥 cDNA가 변성된다. 센스 단일가닥 cDNA는 유사염기짝과 수소결합을 유지할 수 없고, 용액내에서 자유로이 떠다닐 것이다(e). 그 이후에 비결합 상태의 센스 단일가닥 cDNA(e)는 관심있는 특이성 유전자를 증폭하기 위하여 PCR주형으로 사용될 수 있다.

앞서 언급된 이중가닥 cDNA고정 지지체(d)의 다른 사용은 안티센스 mRNA(f)를 생산하는 것이다. 이중가닥 cDNA의 안티센스 가닥에 특이성을 가진 RNA 중합효소는 RNA분자를 전사하기 위해 사용된다. 그 이후 안티센스 mRNA는 마이크로타이터 플레이트를 가열하고, 액상을 제거하고, RNase가 없는 DNase로 절단함으로써 안티센스 mRNA가 분리된다(f).

본 발명의 다른 실시예는 이중가닥 올리고누클레오티드를 연결표적(ligation target)으로 하여 이중가닥 cDNA 고정 지지체를 사용하는 것이다. 상기 올리고누클레오티드는 바람직하게는 제2 RNA 프로모터와 제2 제한효소인식부위에 대응하는 누클레오티드 서열을 포함한다(g). 이후 상기 복합체(g)는 제2프로모터로부터 전사하는 RNA 중합효소로 배양하면 센스 mRNA를 합성하는데 사용된다. 그후 마이크로타이터 플레이트를 가열하고, 액상을 제거하고 액상을 RNase없는 DNase로 절단하여 센스 mRNA가 분리된다(h).

이 발명의 다양한 태양들이 다음의 실시예와 관련되어 좀더 자세히 설명된다. 이 실시예들은 단지 발명을 설명하기 위한 것이며 본 발명을 한정하는 것은 아니다.

[실시예 1]

시험관 내에서 합성된 Gs 단백질 특이성 mRNA로부터 단일가닥 cDNA, 이중가닥 cDNA, 센스 mRNA, 안티센스 mRNA의 합성과 Gs 단백질 특이성 이중가닥 cDNA의 PCR증폭.

(1) 폴리데옥시누클레오티드의 합성

EcoR I과 Not I이라는 서로 다른 두 제한효소의 인식부위, T7 RNA 프로모터 서열, 그리고 5′ 부터 3′ 말단 방향으로 일련으로 존재하는 17개의 티민잔기를 포함한 53-mer 폴리데옥시리보누클레오티드는 DNA 합성기(Applied Biosystems, 모델 380B)를 사용하여 합성되었다. 이 폴리데옥시리보누클레오티드(Seq ID No.4)의 서열은 다음과 같다.

5′-AGCTGAATTC GCGGCCGCAA TACGACTCAC TATAGTTTT T TTTTTTTTTTTTT-3′

Applied Biosystems의 방법에 따르면 1차 아민기는 또한 "Aminolink-2"(Applied Biosystems)를 사용하여 이 폴리데옥시리보누플레티드의 5′말단에 도입될 수 있었다. 합성후 폴리데옥시리보누클레오티드는 약 30%의 수산화암모늄과 55℃, 오버나잇으로 처리된 후 Speed-vac 진공 원심 분리기(Savant)로 건조되었고 1mg/1㎖로 DEPC 처리된 물에 재현탁시킨 후 -20℃에서 보관하였다.

(2) 폴리데옥시리보누클레오티드의 마이크로타이터 플레이트 상에의 고정화 DEPC 처리된 물을 20mM EDC(Pierce)와 10mM 설포-NHS(Pierce)가 되게 만들어 이 용액 24㎕(2㎍)와 혼합하여 마이크로타이터 플레이트 웰(Sumitomo-bakelite, 모델 MS-3796F)에 가하였다.

37℃에서 오버나잇 배양후 반응용액은 0.5M NaCl, 1mM EDTA를 함유한 pH 7.6 20mM 트리스 완충용액으로 교체되었고, 4℃에서 보관했다.

(3) mRNA의 준비

쥐(rat)의 Gs 단백질 mRNA가 다음과 같이 마련되었다.

쥐 Gs단백질 cDNA를 포함하는 플라스미드 벡터 pGEM2 100㎍이 R. R. Reed 박사(존스 홉킨스 대학)에 의해 제공되었다. 플라스미드는 Nhe(Promega) 100단위로 37℃에서 2시간동안 처리하여 선형화되었다. 동일 부피의 트리스 혼합용액(포화페놀, 클로로포름, 이소아밀알콜이 각각 25:24:1의 비율로 존재하는 pH 7.4의 용액)을 이용하여 추출한 후 DNA는 3M 아세트산 나트륨 0.1부피와 얼음처럼 찬 에탄올 2.5부피를 가하여 30분 동안 드라이아이스 상에서 침전되었다. DNA는 4℃에서 20분간 15,000rpm으로 다시 원심분리(Tomy, 모델 MTX-150)되었다.

침전은 70% 에탄올 1 ㎖에 재현탁시키고 4℃에서 5분간 15,000 rpm으로 다시 원심분리했다. 상층액을 제거한 후, 침전물은 Speed-vac 진공 원심분리기(Savant)로 건조되어 DEPC 처리된 물에 재현탁시켰다. 이 튜브 내에 5× RNA 전사 완충액(Promega) 20㎕,100mM DTT 10㎕, RNase 억제제(RNasin, Promega) 100단위, 2.5mM 리보누클레오티드 혼합물(Promega) 20㎕, T7 RNA중합효소(Promega) 100단위를 가하고, 최종부피가 100㎕가 되도록 DEPC 처리된 물을 가하였다. 37℃에서 2시간 동안 배양한 후 RNase가 없는 DNase(Promega) 100단위(100㎕)를 가하여 37℃에서 몇 분동안 더 반응시켰다.

DNA 절단 후 반응혼합물은 동일부피의 혼합물(수화페놀, 플로로포름, 이소아밀알콜이 25 : 24 : 1의 비율로 포함하고 있는 혼합물)로 처리하여 추출하였다.

합성된 RNA는 3M 아세트산 나트륨 0.1부피와 찬 에탄올 2.5부피를 가하여 30분간 드라이아이스에서 침전시켰다. 이 RNA는 4℃ 그리고 침전물은 70%에탄올 1㎖에 재현탁시킨후 4℃에서 15,000 rpm으로 5분간 다시 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후, 침전물은 Speed-vac 진공원심분리기(Savant)로 건조되어 DEPC처리한 물로 재현탁시켰다. 이 RNA의 광학밀도는 분광광도계로 260nm에서 결정하였다(Hitachi사, U-2000).

RNA농도는 1.0 OD_{260} =40㎍/㎖의 계산을 기초로 하여 1 mg/㎖에 맞추었다.

5㎕ 분취량이 -70℃에서 사용전까지 보관되었다.

(4) 마이크로타이터 플레이트 상의 이중가닥 cDNA합성

합성된 Gs mRNA는 DEPC처리된 물로 희석되고 각기 Gs mRNA를 5㎍, 1㎍, 100ng, 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg 또는 0.1pg 함유한 5㎍시료에 45㎕의 용균 완충액을 가하여 잔존하는 RNase활성을 불활성화시키기 위하여 45℃에서 1시간 동안 배양하였다. 최종 NaCl 농도가 0.5M이 되도록 각 튜브에 5M NaCl 총액을 가하였다. 그후 용액을 폴리데옥시리보누클레오티드 고정 마이크로타이터 웰에 두었다. 결합 올리고(dT) 폴리데옥시리보누클레오티드와 mRNA의 poly A 꼬리가 혼성화하도록 30분간 실온에서 배양한 후, 각 웰은 RNA 세척 완충액으로 두번씩 세척하였다.

제1 cDNA 가닥의 합성을 시작하기 위하여 세척 후 75mM 염화칼륨, 3mM 염화마그네슘, 10mM DTT, 각 0.5mM의 dGTP, dATP, dTTP, dCTP(RT 완충용액내의), 역전사효소 500단위(Supersript, Gibco-BRL)를 함유한 pH 8.3, 50mM의 트리스-염화수소 50㎕를 각 웰에 가하였다. 이 반응은 37℃에서 1시간 배양되었다.

이러한 cDNA "첫 가닥"의 합성 후, 완충용액은 100mM 염화칼슘, 5mM 염화마그네슘, 10mM 황화암모늄, 0.15mM β-니코틴 아미드아데닌디누클레오티드(β-NAD^+), dATP, dCTP, dGTP, dTTP 각 0.25mM, 1.2mM DTT, 65단위/㎕의 DNA 리가아제, 250단위/㎕의 DNA중합효소, 13단위/㎕ RNase H(Gibco-BRL)를 함유한 pH 7.5의 25mM의 트리스-염화수소 50㎕로 교체되었다(이상은 이중가닥 cDNA합성 완충액).

그리고 앞서 합성된 제1 가닥으로부터 이중가닥 cDNA를 합성하기 위하여 16℃에서 3시간 동안 배양하였다. 배양 후, 용액은 0.5M 염화나트륨, 1mM EDTA를 함유한 pH 7.6의 20mM 트리스 염화수소 완충액으로 교체되어 4℃에서 저장하였다.

(5) 결합된 누클레오티드로부터 단일가닥 cDNA의 제작

상기 문단(4)에서 설명된 대로 합성된 결합 이중가닥 cDNA는 cDNA 세척용 완충액으로 다섯 차례 세척하였다. 그후 상보적인 cDNA 가닥들을 열변성시키기 위하여 10분간 80℃에서 DEPC 처리된 물 50㎕에서 배양하였다. 결합되지 않은 단일가닥 DNA를 포함하는 용액은 즉시 새로운 0.65㎖ 튜브에 옮겨져서 -20℃에서 저장되었다.

플레이트는 이중가닥 cDNA 합성용 완충용액으로 다시 문단(4)에서 설명된 대로 16℃에서 3시간 동안 이중가닥 cDNA를 합성하는데 재사용되었다. 이 과정은 3번 반복되어 단일의 웰로부터 3개의 단일가닥 cDNA를 생성하였다.

(6) 안티센스 mRNA의 합성

문단 (4)에서 설명된 대로 합성된 이중가닥 cDNA는 RNA세척용 완충용액으로 다섯번 세척되어 5× RNA 전사용 완충액(Promega) 10㎕ 10mM 리보누클레오티드 혼합액(Promega) 10㎕, 그리고 T7 RNA 중합효소(Promega) 20단위(1㎕)에 DEPC 처리한 물을 가하여 최종 부피 50㎕에서 배양하였다.

37℃에서 1시간동안 배양하여 전사 개시한 후, 플레이트는 90℃에서 8분 동안 가열하고, 결합되지 않은 안티센스 mRNA를 포함하는 용액은 즉시 새 튜브로 옮겨졌다. RNase없는 DNase(Promega)를 새 튜브에 가하고 잔존하는 DNA를 절단하기 위하여 37℃에서 30분간 더 반응시켰다.

그후 반응 혼합물은 물에 포화된 페놀, 클로로포름, 이소아밀알콜이 25:24:1의 비율로 함유된 혼합물의 동일 부피로 일단 추출하였다. 합성된 RMA는 에탄을 침전되어 4℃에서 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하였다(Tomy, MTX-150). 침전물은 70% 에탄을 1㎖에 재현탁시키고 4℃에서 15,000 rpm으로 5분간 다시 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 침전물은 Speed-vac 진공원심분리기(Savant)로 건조되었고, DEPC함유한 물 5㎕로 재현탁되었다. 결과물인 안티센스 mRNA 분자는 이하와 같이 아가로스 겔 전기영동으로 분석되었다.

40mM 아세트산 나트륨, pH 8.0(5 × 포름알데히드 겔 완충액), 10㎕ 포름아미드, 3.5㎕ 포름알데히드를 함유한 pH 7.0의 0.1M MOPS 2㎕와 5㎕ mRNA를 혼합하고 45℃에서 15분간 가열하였다. 그 후 mRNA 용액은 10mM EDTA, pH 8.0의 0.25%브로모페놀 블루, 0.25%의 자일렌 시아놀 FF(포름알데히드 겔 전개 완충용액)와 1mg/㎖ 에티듐 브로마이드/㎖를 함유한 50%글리세롤 2㎕와 mRNA용액을 혼합하여 1%아가로스 겔 상에 전개하였다.

전기영동은 100V, 6.5cm 넓이에서 1시간 동안 pH 7.0의 10mM 인산완충용액에서 수행되었다. 전기영동 이후 겔은 UV에 노출되어, 형광을 발하는 RNA 띠가 제4(a)도에서 나타난 대로 폴라로이드 필름 상에 기록되었다.

제4(a)도에서 1레인(lane)은 문단(3)에서 설명된 Gs단백질 mRNA 기준시료를 나타낸다. 2,3 레인은 문단(6)에서부터 합성된 mRNA의 두개의 분리된 실험을 나타낸다. 합성된 mRNA의 크기는 대략 2000 염기로서 DNA 기준시료보다 약간 크며 3′말단에 폴리데옥시리보누클레오티드가 부가된 결과인 것으로 추측된다.

(7) 센스 mRNA 합성

문단(4)에서 설명된 내용에 따라 한정된 이중가닥 cDNA가 결합된 마이크로타이터 웰은 cDNA 세척용 완충용액으로 세번 세척되고 5× 리가아제 완충액(Gibco-BRL)10㎕, DEPC 처리된 물 31㎕, Sal I-SP6 올리고누클레오티드 어댑터 Seq ID NO.3 4㎕(4㎕)와 T4 리가아제(Gibco-BRL) 5단위(5㎕)로 16℃에서 오버나잇으로 배양하였다. cDNA 세척용 완충용액으로 각 웰을 3차례 세척한 후 5㎕의 H buffer(Boerhinger-Mannheim), DEPC 처리된 물 44㎕ 그리고 Sal I(Boerhinger-Mannheim) 10단위(1㎕)를 부가하였다. 이 용액은 Sal I 인식부위에서 절단시키기 위하여 37℃에서 2시간 동안 배양되었다. 그후 각 웰은 RNA 세척용 완충용액으로 5차례 세척되고, 5× RNA 전사용 완충용액(Pramega) 10㎕, 10mM DTT 5㎕, RNase 억제제(RNasin, Promega) 50단위(1.25㎕),10mM 리보누클레오티드 혼합물 10㎕, SP6 RNA중합효소(Promega) 20단위(1㎕)로 배양하였다. 최종 부피가 50㎕가 되도록 DEPC 처리된 물을 가하였다.

37℃에서 1시간동안 배양한 후, 플레이트는 90℃에서 8분간 가열되고, 액상은 즉시 새로운 튜브로 옮겨졌다. RNase 없는 DNase(Promega) 10단위(10㎕)를 가한 후 반응은 잔존하는 DNA를 절단하기 위하여 37℃에서 30분간 더 진행되었다. 그 후 반응 혼합물은 물에 포화된 페놀, 클로로포름, 이소아밀알콜이 25:24:1의 비율로 함유된 혼합물의 동일 부피로 추출되었다. 합성된 RNA는 에탄올로 침전되었고, RNA는 4℃에서 15,000 rpm으로 20분간 원심분리되었다(Tomy사, MTX-150). 침전물은 70% 에탄을 Im㎕에 재현탁되고 4℃에서 15,000 rpm으로 다시 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 침전물은 건조되어 DEPC처리된 물 5㎕에 재현탁되었다.

결과물인 mRNA분자는 문단(6)에서 설명된 바와 같이 아가로스 겔 전기영동으로 분석되었고, 제4(b)도에 나타난 바와 같이 폴라로이드 필름 상에 형광을 발하는 RNA띠가 기록되었다. 제4(b)도의 1,2,3 레인은 각각 문단(3)에서 설명된 대로 컨트롤 Gs 단백질 mRNA와 문단(6)과 문단(7)으로부터 합성된 mRNA를 나타낸다. 합성된 mRNA의 크기는 대략 2000 염기로서 컨트롤 mRNA보다 약간 크며, 이것은 아마도 분자의 3′말단과 5′말단에 폴리데옥시리보누클레오티드의 부가에 의한 것으로 추측된다.

(8) Gs 단백질 특이성 이중가닥 cDNA의 증폭을 위한 PCR개시체의 합성

G 단백질 α 소단위에 특이한 센스(G2-a)와 안티센스(G4-as) 올리고데옥시리보누클레오티드가 (1)에서 설명한 대로 DNA 합성기에서 합성되었다.

그 누클레오티드 서열은 다음과 같다:

G2-s 5′-AGCACCATTGTGAAGCAGATGA-3′ (Seq ID No.5)

G4-as 5′-CTCTGGCCTCCCACATCAAACA-3′ (Seq ID No.6)

(9) cDNA의 PCR 증폭

문단(5)에 설명된 단일가닥 cDNA 1㎕에 올리고누클레오티드 개시체 G2-s와 G4-as 각각 0.1㎍(1㎕), 10× PCR완충용액(Promega) 5㎕, 25mM 염화마그네슘 1㎕, 10mM dNTP 혼합물(Promega) 4㎕, Taq 중합효소(Promega) 0.5㎕, DEPC 처리된 물 36.5㎕를 가한다. 미네랄 오일(mineral oil) 두 방울을 반응 혼합물 상층에 떨어뜨려 증발을 방지한다. 반응은 처음에 95℃로 10분간 가열한 후 더말 사이클러(Thermal Cycler, Perkin-Elmer Cetus, 모델 480)에서 55℃에서 1.5분간 어닐링하고, 72℃에서 4분간 연장반응, 95℃에서 1.5분간 변성반응을 30번 순환 반복하여 PCR을 수행한다.

유사한 실험에서 Gs 단백질 cDNA(1㎕ 내에 10ng)는 양성 기준시료(positive control)로 사용되었다. 결과물인 PCR 생성물 10㎕는 10× 전개 완충액(0.25% 브로모패놀블루, 0.25% 자일렌 시아놀 FF, 15% 피콜 유형400) 1㎕와 혼합되어 65℃에서 5분간 가열된 후 5㎍/ml의 에티듐 브로마이드를 함유한 1.5% 아가로스 겔에 적용되었다.

전기영동은 1× TBE 완충액(0.001M EDTA를 함유한 pH 8.0, 0.045M 트리스-보레이드 완충액)에서 100V, 6.5cm 넓이로 대략 1시간 동안 수행되었다. 전기영동 이후, 누클레오티드는 형광을 발하고 제5도에 도시된 바와 같이 폴라로이드 필름상에 기록되었다. 제5(a),(b),(c)도에서 겔은 연속적인 3회 실험으로부터 얻어진 결과물이다. 겔의 레인 2~10번은 문단(5)에서 설명된 시작 mRNA(starting mRNA)를 각각 5㎍, 1㎍, 100ng, 10ng, 100pg, 10pg, lpg, 0.1pg 함유한 것이다. 레인 11번은 음성 기준시료(negative control)이고 어떤 mRNA도 함유되지 않은 것이다. 제5도에서 보듯이 Gs 단백질 DNA는 레인 1의 양성 기준시료의 그것과 유사하게, 대략 500염기쌍의 크기를 가진 농도 10-100pg의 시작 mRNA로부터 재생 증폭되었다.

[실시예 2]

이중가닥 cDNA, 센스 단일가닥 cDNA의 합성과, 인체백혈구(leukocytes)로부터의 준 발암유전자(jun oncogene)-특이성 이중가닥 cDNA의 PCR증폭.

(I) 폴리데옥시리보누클레오티드-고정 마이크로타이터 플레이트

폴리데옥시리보누클레오타이드-고정 마이크로타이터 플레이트가 실시예 1의 문단(2)에 설명되어 있는 바와 같이 제작된다.

(II) 인체백혈구로부터의 세로 용균액의 제작

3㎖의 헤파린처리(heparinized)혈액을 포스페이트 완충염수(saline)(PBS)로 3배 희석시키고, 15㎖의 튜브에서 3㎖의 이소림프(isolymph)(Gallard-Schlesinger) 위에 오버레이시켰다. 30분 동안 400× g에서 원심분리시킨 이소림프와 플라즈마 사이의 중간층에 있는 세포를 새 튜브에 수집하고 PBS로 3번 세척하였다. 150㎕의 용균 완충액을 세포 침전물(cellular pellet)에 첨가하였고 18G 니들(needle)을 통해 반복 통과시켜 셀을 완전히 용균시켰다. RNase활성도(activity)를 감소시키기 위하여 간헐적으로 흔들면서 30분 동안 45℃에서 세포 용균액을 배양시켰다.

(III) 마이크로타이터 플레이트에서의 이중가닥 cDNA합성

5M NaCl용액을 문단(II)에서 제작된 세포 용균액에 첨가하고 최종 농도를 용균 완충액으로 10, 100, 1000배로 희석하였다. 희석된 각각의 시료 50㎖를 폴리데옥시리보누클레오티드 고정 마이크로타이터의 웰에 첨가하고, 결합된 폴리-(dT) 서열과 분리된 세포 mRNA의 poly A 꼬리 사이에서 혼성화가 일어나게 하기 위하여 30분 동안 상온에서 배양하였다. 배양 후, 용균 완충액을 제거하고 각각의 웰을 RNA 세척 완충액으로 2번 세척하였다. 50㎕의 RT 완충용액과

500단위의 역전사효소를 각각의 웰에 첨가하고 cDNA 제1 가닥 합성을 개시시키기 위하여 1시간동안 37℃에서 배양하였다. 상기 완충용액을 50℃의 이중가닥 cDNA합성 완충액으로 대체시키고, 이중가닥 cDNA합성이 일어나도록 상기 플레이트를 3시간동안 16℃에서 배양시켰다.

(IV) 플레이트로부터 단일가닥 cDNA의 제작

문단(II)에 설명된 바와 같이 합성된 이중가닥 cDNA를 cDNA 세척완충액으로 5번 세척하고, 상보적인 DNA 가닥을 가열 변성시키기 위하여 50μℓ의 DEPC처리한 물에서 10분 동안 80℃로 배양시켰다. 액체 상층액을 즉시 새 0.65㎖ 튜브로 운반하고, -20℃로 저장시켰다.

(V) 준(Jun)발암 유전자 특이성 mRNA의 증폭을 위한 PCR 개시체의 합성

준 발암유전자에 대해 특이한 센스(jun-s) 및 안티센스(jun-as) 올리고데옥시리보누클레오티드를 실시예 1의 문단(I)에 설명되어 있는 바와 같은 DNA합성기에서 합성시켰다. 누클레오티드 서열은 다음과 같다.

Jun-s 5′-CCC TGA AGG AGG AGC CGC AGA C-3 (Seq ID No.7)

Jun-as 5′-CGT GGG TCA AGA CTT TCT GCT TGA GCT G-3′ (Seq ID No.8)

(VI) cDNA의 PCR증폭

문단(IV)에 설명되어 있는 바와 같이, 세포용균액으로부터의 1μℓ의 25mM $MgCl_2$, 4μℓ의 10mM dNTP혼합물(Promega), 0.5μℓ의 Tag 중합효소(Promega), 그리고 36.5μℓ의 DEPC 처리한 물을 혼합한다. 증발을 방지하기 위하여 2방울의 미네랄 오일을 반응 혼합물 위에 오버레이(overlay)시킨다. 먼저 반응혼합물을 10분 동안 95℃에서 가열한 다음, 실시예 1의 문단(9)에 설명되어 있는 바와 같이 1.5분 동안 45℃와 55℃ 사이에서 어닐링(annealing), 4분 동안 72℃에서 연장반응(extension) 그리고 1.5분 동안 95℃에서 변성반응의 30순환반응으로 더말 사이클러(Thermal cycler)(Model 480, Pertain-Elmer Cetus)에서 PCR을 수행한다.

그 다음 10μℓ의 결과 PCR 생성물을 1의 10 × 전개 완충액과 혼합하고, 5μℓ/㎖의 에티듐 브로마이드(ethidium bromide)를 함유하는 1.5% 아가로스 겔(agarose gel)에 가한다. 약 1시간 동안 100V/6.5cm폭으로 1× TBE 완충용액에서 전기영동 시킨다. 전기영동 후에 제4도에 도시되어 있는 바와 같이 폴라로이드 필름 위에 형광 DNA 띠(fluorescent DNA bands)를 기록한다. 제6도의 1-8 레인(lane)은 각각 백혈구 용균액의 1:1000 희석, 완전한 길이(fulllength)(1㎖의 혈액과 동일함), 1:10 그리고 1:100 희석의 복제시험(duplicate experiments)을 나타낸다. 제6도에 도시되어 있는 바와 같이, 준 발암유전자는 370 염기쌍(base pairs)의 계산 크기를 보이는 1:10과 1:100희석으로부터 증폭된다. 이 크기는 372 염기쌍의 이론값과 유사하다.

[실시예 3]

인체 백혈구로부터의 태치키닌 수용체(tachykinin receptor)-특이성 이중가닥 cDNA의 PCR증폭.

i) 태치키닌 수용체(tachykinin receptor) - 특이성 mRNA의 증폭을 위한 PCR 개시체의 합성

실시예 1의 문단(1)에 설명되어 있는 바와 같이 합성장치를 이용하여 태치키닌 수용체에 대해 특이한 센스(tac-s) 및 안티센스(tat-as) 올리고데옥시리보누클레오티드를 합성시킨다. 누클레오티드 서열은 다음과 같다.

tac-s 5′-GCCAGCATCTACTCCATGAC-3′ (Seq ID No. 9)

tac-as 5′- GGGCAGCCACGAGATGG-3′ (Seq ID No. 10)

ii) cDNA의 PCR증폭

실시예 2의 문단(IV)에 설명되어 있는 바와 같이, 세포 용균액으로부터의 1㎕의 단일가닥 cDNA, 각각 0.1㎍(1㎕)의 tac-s 및 tac-as 올리고누클레오티드, 5㎕의 10× PCR완충용액, 1㎕의 25mM $MgCl_2$, 4㎕의 10mM dNTP혼합물, 0.5㎕ Tag중합효소 그리고 36.5㎕의 DEPC 처리한 물을 혼합한다. 증발을 방지하기 위하여 2 방울의 미네랄 오일을 반응혼합물 위에 오버레이시킨다. 먼저 반응혼합물을 70분 동안 95℃에서 가열한 다음, 실시예 1의 문단(9)에 설명되어 있는 바와 같이 1.5분 동안 45℃와 55℃ 사이에서 어닐링, 4분 동안 72℃에서 연장반응 그리고 1.5분 동안 95℃에서 변성반응의 30사이클로 서멀 사이클러(Model 480, Perkin-Elmer Cetus)에서 PCR을 수행한다.

그 다음 10㎕의 PCR생성물을 1㎕의 10× 전개완충액과 혼합하고, 5㎍/㎖의 에티디움 브로마이드를 함유하는 1.5% 아가로스겔에 가한다. 약 1시간 동안 100V/6.5cm폭에서 1× TBE 완충용액에서 전기영동 시킨다. 전기영동 후에, 폴라로이드 필름 위에 DNA띠를 기록한다. 결과는 아래의 실시예 4에 설명되어 있다.

[실시예 4]

인체 백혈구로부터의 오르니틴 데카르복실라제(ornithine decarboxylase:ODC)-특이성 이중가닥 cDNA의 PCR증폭.

a) ODC-특이성 mRNA의 증폭을 위한 PCR개시체의 합성

실시예 1의 문단(1)에 설명되어 있는 바와 같이 DNA합성장치에서 ODC에 대해 특이한 센스(ODC-s) 및 안티센스(ODC-as) 올리고데옥시리보누클레오티드를 합성시킨다. 누클레오티드 서열은 다음과 같다.

ODC-s 5′- GACTCTGGAGTGAGAATCATA-3′ (Seq ID No. 11)

ODC-as 5′- ATCCAATCACCCACATGCATT-3′ (Seq ID No. 12)

(b) cDNA의 PCR증폭

세포 용균액로부터의 1㎕의 단일가닥 cDNA, 각각 0.1㎍(1㎕)의 ODC-s 및 ODC-as 올리고누클레오티드, 5㎕의 10× PCR완충용액, 1㎕의 25mM $MgCl_2$, 4㎕의 10mM의 dNTP혼합물, 0.5㎕ Tag중합효소 그리고 36.5㎕의 DEPC처리한 물을 혼합한다. 증발을 방지하기 위하여 2 방울의 미네랄 오일을 반응혼합물 위에 오버레이시킨다. 실시예 1의 문단(9)에 설명되어 있는 바와 같이 PCR반응을 수행한다. 그 다음 10㎕의 PCR반응생성물을 1㎕의 10× 전개완충액과 혼합하고, 5분 동안 65℃에서 가열하고, 5㎍/㎕의 에티디움 브로마이드를 함유하는 1.5% 아가로스 겔에 가한다. 약 1시간 동안 100V/6.5cm폭으로 1× TBE 완충용액에서 전기영동 시킨다. 전기영동 후에 DNA띠가 형광을 발하도록 겔을 UV광에 노출시키고, 제7도에 도시되어 있는 바와 같이 폴라로이드 필름 위에 기록한다.

제7도에서 레인(A) 및 (B)은 45℃와 55℃의 어닐링 온도를 나타낸다. 레인 1, 2 및 3은 각각 ODC, 태치키닌 수용체 그리고 준 발암유전자에 대한 개시체를 나타낸다. 제7도에 도시되어 있는 바와 같이, ODC에 대한 유전자는 45℃와 55℃의 어닐링 온도 모두에서 증폭되지만 태치키닌 수용체와 준 발암유전자에 대한 유전자들은 45℃에서만 증폭된다.

[실시예 5]

폴리데옥시리보누클레오티드-고정 마이크로타이터 플레이트 위에 합성된 이중가닥 cDNA로부터의 cDNA 라이브러리(library)의 작제(construction)와 cDNA라이브러리의 박테리아로의 도입.

(1) 마이크로타이터 플레이트 위에 합성된 이중가닥 cDNA로의 SP6-Sal I 어댑터의 연결

실시예 2의 문단(III)에 설명되어 있는 바와 같이 마이크로타이터 플레이트에 합성된 인체백혈구 이중가닥 cDNA를 SP6-Sal I 어댑터로 연결한 다음, 실시예 1의 문단(7)에 설명되어 있는 바와 같이 cDNA를 Sal I으로 절단시킨다.

(2) 마이크로타이터 플레이트로부터의 이중가닥 cDNA의 제거

전술한 바와 같이 Sal I 절단시킨 후, cDNA 세척완충액으로 웰을 3번 세척하고, 고정 폴리데옥시리보누클레오티드 상의 Not I부위를 절단시키기 위하여 하룻밤 동안 37℃에서 5㎕의 H완충용dor, 44㎕의 DEPC 처리한 물, 그리고 10단위(1㎕)의 Not I(Boerhinger-Mannheim)에서 배양시켰다. 그 다음 반응혼합물을 새로운 0.65-㎖ 튜브로 이동시키고, Not I를 불활성화(deactivate)시키기 위하여 2분 동안 65℃에서 가열하였다.

(3) 벡터(cDNA라이브러리 작제)로의 이중가닥 cDNA의 연결

전술한 바와 같이 10㎕의 가열 변성된 이중가닥 cDNA를 4㎕의 5× T4 리가아제 완충용액, DEPC 처리한 물, Not I-Sal I으로 미리 절단된 1㎕(50ng)의 pSPORT 벡터(Gibco-BRL), 1㎕의 T4리가아제와 혼합하고, cDNA와 벡터를 연결시키기 위하여 3시간 동안 상온에서 배양시켰다. cDNA벡터 복합체를 침전시키기 위하여, 5㎕(5mg)의 효모 tRNA(Gibco-BRL), 12.5㎕의 7.5M아세트산 암모늄 그리고 70㎕의 에탄올을 반응혼합물에 가하고 하룻밤 동안 -70℃에서 유지시켰다. 4℃에서 20분 동안 15,000rpm으로 DNA를 원심분리시키고(MTX-150, Tomy), 그 침전물을 1㎖의 70%에탄올에서 재현탁시키고 4℃에서 5분 동안 15,000rpm으로 재원심분리시켰다. 상층액을 제거한 후, 그 침전물을 Speed-vac 진공원심분리기(Savant)에 의하여 건조시키고, DEPC 처리한 물에서 재현탁시켰다.

(4) 형질전환

전술한 바와 같이, cDNA-연결 플라스미드를 5㎕의 DEPC 처리한 물에서 재현탁시켰다. 그 다음 1㎕를 얼음 위의 25㎕의 감응세포(competent cells)와 혼합한후, 0.1cm 큐베트(cuvette)(BioRad)에 위치시켰다. 플라스미드를 세포내로 합체(incorporate)시키기 위하여 16.6kV/cm에서 전기형질전환(electroporation) 시켰다. 1㎖의 SOC배지를 큐베트에 가한 다음, 세포를 새 10-㎖ 폴리프로필렌 튜브로 이동시켰다.

225 rpm으로 계속해서 흔들면서 정확히 1시간 동안 37℃에서 세포 혼합물을 배양시켰다. 셀을 SOC배지로 10배 그리고 100배 희석한 후, 5㎕를 100㎍/㎖ 앰피실린(ampicillin)을 함유하는 액체영양배지 한천 플레이트 위에 뿌리고 하룻밤 동안 37℃에서 배양시켰다. 군체(colonies)의 갯수는 수작업으로 계산하였다.

표 1에 나타나 있는 바와 같이, 1㎖의 혈액백혈구를 나타내는 각각의 웰로부터 대략 600,000 내지 900,000의 군체가 얻어졌다.

시험갯수	군체갯수*
1	900,000
2	850,000
3	600,000

*: 1㎖의 혈액백혈구로부터의 군체의 갯수.

이 시험(experiment)은 이중가닥 cDNA가 증폭되어 계속하여 플라스미드 벡터안에 클론될 수 있음을 보여준다. 상기의 방법은 효율적이면서도 신속하다는 장점이 있다.

[실시예 6]

단일가닥 및 이중가닥 cDNA의 합성, 상이한 올리고누클레오티드-결합 플레이트로부터 시험관내에서 합성된 Gs 단백질-특이성 mRNA로부터의 Gs 단백질 -특이성 이중가닥 cDNA의 PCR증폭.

(1) 폴리데옥시리보누클레오티드의 합성

T7 RNA프로모터(promoter) 서열(Sequence) 다음 일련의 5′ 내지 3′ 말단의 17개의 티민(thymine) 잔기물(residues) Sma I와 Sal I과 같은 2개의 서로 다른 제한 효소 인식부위를 함유하는 50-mers의 폴리데옥시리보누클레오티드를 실시예 1에 설명되어 있는 바와 같이 합성시킨다. 이 폴리데옥시리보누클레오티드의 실제 서열(actual sequence)은 다음과 같다.

5'-GGGGCCCGGGGTCGACAATACGACTCACTATAGTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (Seq ID No. 13)

SP6 RNA프로모터서열 다음 일련의 5' 내지 3'말단의 17개의 티민잔기와 EcoR I와 Not I와 같은 2개의 서로 다른 제한효소인식부위를 함유하는 56 - mers의 폴리데옥시리보누클레오티드를 실시예 1에 설명되어 있는 바와 같이 합성시킨다. 이 폴리데옥시리보누클레오티드의 실제 서열은 다음과 같다.

5'GGGGGAATTCGCGGCCGCCATTTAGGTGACACTATAGAATTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (Seq ID No. 14)

또한 실시예 1에 설명되어 있는 바와 같이 아미노링크(Aminolink) 2를 사용하여 1차 아민잔기를 이들 폴리데옥시리보누클레오티드의 5'말단에 도입시킨다.

(2) 마이크로타이터 플레이트위로의 폴리데옥시리보누클레오티드의 고정

DEPC 처리한 물에서 제작된 각각 241㎕의 20mM EOC(Pierce)와 10mM의 sulfur-NHS(Pierce)를 2㎕(2㎍)의 합성된 폴리데옥시리보누클레오티드와 혼합하고, 마이크로타이터 플레이트(MS - 3796F, Sumitomo-bakelite)의 웰에 가하였다. 이 플레이트를 하룻밤 동안 37℃에서 배양시킨 후, 각각의 웰의 반응용액을 1mM EDTA와 0.5M NaCl을 함유하는 20mM 트리스 pH 71.6으로 대체(replaced)시키고 이 플레이트를 사용될 때까지 4℃에서 저장시켰다.

(3) 마이크로타이터 플레이트 위의 이중가닥 cDNA합성

실시예 1에 설명되어 있는 바와 같이 합성된 Gs mRNA를 2㎍/50㎕에서 0.5M(43페이지 누락)하였다. 제6(a)도에서, 레인 2와 3은 Seq ID NO. 13의 서열을 가지는 폴리누클레오티드로 고정된 플레이트로부터의 2개의 연속적인(consecutive) 시험의 결과를 나타내고 레인 5와 6은 Seq ID NO. 14의 서열을 가지는 폴리누플레오티드로 고정된 플레이트로부터의 2개의 연속적인 시험의 결과를 나타낸다. 레인 1과 4는 적용된 mRNA없이, 각각 Seq ID No. 13 및 14의 서열을 가지는 폴리누클레오티드로 고정된 플레이트로부터의 음성 기준시표이다.

이와 같은 상기의 실시예들은 본 발명의 광범위한 응용을 보여주는 것이다. 그러나 이들 실시예들은 예시적인 것이고 본 발명을 한정하는 것이 아니기 때문에, 본 발명의 범주는 하기의 특허청구범위를 참조로 하여 해석되어야 한다.

[서열목록]

(1)일반정보

(i)출원인: 켈러, 실리아

미츠하시, 마사토

아키타야, 타츠오

(ii)발명의 명칭: 폴리누클레오티드 고정 지지체

(iii)서열의 수: 12

(iv)우편주소

(A)수취인: 노베, 마르텐스, 올선 앤드 베어

(B)스트리트: 뉴포트 센터 드라이브 식스틴스 플로어 620

(C)시티: 뉴포트 비치

(D)주: 캘리포니아

(E)국가: 미합중국

(F)우편번호: 92660

(v)컴퓨터 해독 가능 형태

(A)매체유형: 플로피디스크

(B)컴퓨터: IBM PC 호환기종

(C)운영 체제: PC-DOS/MS-DOS

(D)소프트웨어: Patently Release #1.0. Version #1.25

(vi)출원데이터

(A)출원번호:

(B)출원일:

(C)분류:

(vii)대리인 정보

(A)성명: 알트만, 다니엘 이.

(B)등록번호: 34.115

(C)참조번호: HITACHI.002A

(viii)통신정보

(A)전화: 714-760-0404

(B)팩스: 714-760-9502

(2) 1번 서열에 대한 정보

(i)서열특성

(A)길이: 17 염기쌍

(B)유형: 핵산

(C)가닥: 단일

(D)위상: 선형

(ii)분자유형: cDNA 내지 mRNA

(iii)하이포세티컬: 없음

(iv)안티센스: 없음

(v)원출처

(A)생물: T7 프로모터 서열

(vi)서열정의: Seq ID No. 1

AATACGACTC ACTATAG 17

(2) 2번 서열에 대한 정보

(i)서열특성

(A)길이: 21 염기쌍

(B)유형: 핵산

(C)가닥: 단일

(D)위상: 선형

(ii)분자유형: cDNA 내지 mRNA

(iii)하이포세티컬: 없음

(iv)안티센스: 없음

(v)원출처

(A)생물: SP6 프로모터 서열

(vi)서열정의: Seq ID No, 2

CATTTAGGTG ACACTATAGA A 21

(2) 3번 서열에 대한 정보

(i)서열특성

(A)길이: 염기쌍

(B)유형: 핵산

(C)가닥: 이중

(D)위상: 선형

(ii)분자유형: cDNA 내지 mRNA

(iii)하이포세티컬: 없음

(iv)안티센스: 없음

(v)원출처

(A)생물: Sal I - SP6 어댑터 서열

(vi)서열정의: Seq ID No. 3

TCGACATTTA GGTGACACTA TAGAA 25

(2) 4번 서열에 대한 정보

(i)서열특성

(A)길이: 53

(B)유형: 핵산

(C)가닥: 단일

(D)위상: 선형

(ii)분자유형: cDNA 내지 mRNA

(iii)하이포세티컬: 없음

(iv)안티센스: 없음

(V)원출처

(A)생물: EcoR I, Not I 및 T7 프로모터를 함유하는 53-mer 올리고

(vi)서열정의: Seq ID No. 4

AGCTGAATTC GCGGCCGCAA TACGACGTCAC TATAGTTTTT TTTTTTTTTT TTT 53

(2) 5번 서열에 대한 정보

(i)서열특성

(A)길이: 22

(B)유형: 핵산

(C)가닥: 단일

(D)위상: 선형

(ii)분자유형: cDNA 내지 mRNA

(iii)하이포세티컬: 없음

(iv)안티센스: 없음

(v)원출처

(A)생물: G2-S 올리고누클레오티드 개시체

(vi)서열정의: Seq ID No. 5

AGCACCATTG TGAAGCAGAT GA 22

(2) 6번 서열에 대한 정보

(i)서열특성

(A)길이: 22

(B)유형: 핵산

(C)가닥: 단일

(D)위상: 선형

(ii)분자유형: cDNA 내지 mRNA

(iii)하이포세티컬: 없음

(iv)안티센스: 없음

(v)원출처

(A)생물: G2-as 올리고누클레오티드 개시체

(vi)서열정의: Seq ID No. 6

CTCTGGCCTC CCACATCAAA CA 22

(2) 7번 서열에 대한 정보

(i)서열특성

(A)길이: 22

(B)유형: 핵산

(C)가닥: 단일

(D)위상: 선형

(ii)분자유형: cDNA 내지 mRNA

(iii)하이포세티컬: 없음

(iv)안티센스: 없음

(v)원출처

(A)생물: jun-s 올리고누클레오티드 개시체

(vi)서열정의: Seq ID No. 7

CCTGAAGGA GGAGCCGACAG AC 22

(2) 8번 서열에 대한 정보

(i)서열특성

(A)길이: 28

(B)유형: 핵산

(C)가닥: 단일

(D)위상: 선형

(ii)분자유형: cDNA 내지 mRNA

(iii)하이포세티컬: 없음

(iv)안 센스: 없음

(v)원출처

(A)생물: jun-as 올리고누플레오티드 개시체

(vi)서열정의: Seq ID No. 8

CGTGGGTCAA GACTTTCTGC TTGAGCTG 28

(2) 9번 서열에 대한 정보

(i)서열특성

(A)길이: 20

(B)유형: 핵산

(C)가닥: 단일

(D)위상: 선형

(ii)분자유형: cDNA 내지 mRNA

(iii)하이포세티컬: 없음

(iv)안티센스: 없음

(v)원출처

(A)생물: tac-s 올리고누클레오티드 개시체

(vi)서열정의: Seq ID No. 9

GCCAGCATCT ACTCCATGAC 20

(2) 10번 서열에 대한 정보

(i)서열특성

(A)길이: 17

(B)유형: 핵산

(C)가닥: 단일

(D)위상: 선형

(ii)분자유형: cDNA 내지 mRNA

(iii)하이포세티컬: 없음

(iv)안티센스: 없음

(v)원출처

(A)생물: tac-as 올리고누클레오티드 개시체

(vi)서열정의: Seq ID No. 10

GGGCAGCCAC GAGATGG 17

(2) 11번 서열에 대한 정보

(i)서열특성

(A)길이: 21

(B)유형: 핵산

(C)가닥: 단일

(D)위상: 선형

(ii)분자유형: cDNA 내지 mRNA

(iii)하이포세티컬: 없음

(iv)안티센스: 없음

(v)원출처

(A)생물: ODC-s 올리고누클레오티드 개시체

(vi)서열정의: Seq ID No. 11

GACTCTGGAG TGAGAATCAT A 21

(2) 12번 서열에 대한 정보

(i)서열특성

(A)길이: 21

(B)유형: 핵산

(C)가닥: 단일

(D)위상: 선형

(ii)분자유형: cDNA 내지 mRNA

(iii)하이포세티컬: 없음

(iv)안티센스: 없음

(v)원출처

(A)생물: ODC-as 올리고누클레오티드 개시체

(vi)서열정의: Seq ID No. 12

ATCCAATCAC CCACATGCAT T 21

(2) 13번 서열에 대한 정보

(i)서열특성

(A)길이: 50

(B)유형: 핵산

(C)가닥: 단일

(D)위상: 선형

(ii)분자유형: cDNA 내지 mRNA

(iii)하이포세티컬: 없음

(iv)안티센스: 없음

(v)원출처

(A)생물: Sma I 및 Sal I 부위 및 T7 RNA프로모터를 함유하는 50-mer 올리고

(vi)서열정의: Seq ID No. 13

GGGGCCCGGG GTCGACAATA CGACTCACTA TAGTTTTTTT TTTTTTTTTT 50

(2) 14번 서열에 대한 정보

(i)서열특성

(A)길이: 56

(B)유형: 핵산

(C)가닥: 단일

(D)위상: 선형

(ii)분자유형: cDNA 내지 mRNA

(iii)하이포세티컬: 없음

(iv)안티센스: 없음

(V)원출처

(A)생물: EcoR I 및 Not I 부위 및 SP6 RNA프로모터를 함유하는 56-mer올리고

(vi)서열정의: Seq ID No. 14

GGGGGAATTC GCGGCCGCCA TTTAGGTGAC ACTATAGAAT TTTTTTTTTTTTTTTTTT 56

(57) 청구의 범위

청구항 1.

동일한 안티센스 cDNA를 두 번 이상 사용하여 센스 단일가닥 cDNA를 제조하는 방법으로서, (a) mRNA의 폴리아데닐산의 꼬리에, 이에 상보적인 폴리누클레오티드의 5′ 말단을 고체 지지체에 공유결합시켜, 폴리누클레오티드가 링크된 고체 지지체를 생성하는 단계; (b) 폴리아데닐산 꼬리를 가지는 mRNA를 함유하는 시료용액을, 상기 폴리누클레오티드가 링크된 고체 지지체에 첨가하는 단계; (c) 상기 시료용액을 상기 폴리누클레오티드가 링크된 고체 지지체와 접촉시켜 배양하므로써, mRNA의 상기 폴리아데닐산 꼬리가, 그와 상보적인 상기 폴리누클레오티드 서열과 혼성화되어 1차 액상 및 1차 고체상이 형성되도록 하는 단계; (d) 상기 mRNA를 주형으로 이용하고 역전사효소를 사용하여, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP존재하에 효소합성하여, 상기 mRNA에 상보적인 안티센스 cDNA를 생성하는 단계; (e) RNase H, DNA 리가아제 및 DNA 중합효소를 첨가하여, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 존재하에 효소합성하여, 상기 안티센스 cDNA에 상보적인 상기 센스 cDNA를 생성하므로써, 상기 고체 지지체에 결합된 이중가닥 cDNA를 함유한 2차 고체상 및 2차 액체상을 생성하는 단계; (f) 상기 2차 액상을 제거하는 단계; (g) 상기 2차 고체상에 액체를 첨가하는 단계; (h) 상기 이중가닥 cDNA를 열변성시킴으로써 상기 센스 단일가닥 cDNA를 함유한 3차 액상과 상기 안티센스 cDNA를 함유한 3차 고체상을 형성하는 단계; (i) 상기 센스 단일가닥 cDNA를 획득하기 위하여 상기 3차 액상을 회수하는 단계; (j) DNA 리가아제 및 DNA 중합효소를 첨가하여, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 존재하에, 상기 3차 고체상 내의 상기 고체 지지체에 링크된 상기 안티센스 cDNA에 상보적인 센스 cDNA를 효소 합성함므로써, 4차 액상 및 상기 고체 지지체에 링크된 이중가닥 cDNA를 함유하는 4차 고체상을 생성하는 단계; (k) 상기 4차 액상을 제거하는 단계; (1) 상기 4차 고체상에 액체를 첨가하는 단계; (m) 상기 이중가닥 cDNA를 열변성시킴으로써 상기 센스 단일가닥 cDNA를 함유한 5차 액상과 상기 안티센스 cDNA를 함유한 5차 고체상을 형성하는 단계; 및 (n) 5차 액상을 획득하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 센스 단일가닥 cDNA 제조 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 단계(j)에서, 상기 센스 cDNA는 개시체의 첨가 없이 생성되는 것을 특징으로 하는 센스 단일가닥 cDNA 제조 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 고체 지지체는 마이크로타이터 플레이트인 것을 특징으로 하는 센스 단일가닥 cDNA 제조 방법.

청구항 4.

제1항에 있어서, 동일한 안티센스 cDNA로부터 추가적인 cDNA를 만들어내기 위하여 단계(j)부터 단계(n) 까지를 1회 이상 반복하는 순환단계(o)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 센스 단일가닥 cDNA 제조 방법.

청구항 5.

제4항에 있어서, 단계(i)와 단계(j) 사이, 단계(n)와 단계(o) 사이, 그리고 단계(o)에서의 각각의 추가적인 순환단계 후에, 각각의 고체상은 보존 용액 또는 건조상태로 보관되는 것을 특징으로 하는 센스 단일가닥 cDNA 제조 방법.

청구항 6.

동일한 안티센스 cDNA를 두 번 이상 사용하여 센스 단일가닥 cDNA를 제조하는 방법으로서, (a) mRNA의 폴리아데닐산의 꼬리에, 이에 상보적인 폴리누클레오티드의 5′ 말단을 고체 지지체에 공유결합시켜, 폴리누클레오티드가 링크된 고체 지지체를 생성하는 단계; (b) 폴리아데닐산 꼬리를 가지는 mRNA를 함유하는 시료용액을, 상기 폴리누클레오티드가 링크된 고체 지지체에 첨가하는 단계; (c) 상기 시료용액을 상기 폴리누클레오티드가 링크된 고체 지지체와 접촉시켜 배양하므로써, mRNA의 상기 폴리아데닐산 꼬리가, 그와 상보적인 상기 폴리누클레오티드 서열과 혼성화되어 1차 액상 및 1차 고체상이 형성되도록 하는 단계; (d) 상기 mRNA를 주형으로 이용하고 역전사효소를 사용하여, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 존재하에 효소합성하여, 상기 mRNA에 상보적인 안티센스 cDNA를 생성하는 단계; (e) RNase H, DNA 리가아제 및 DNA 중합효소를 첨가하여, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 존재하에 효소합성하여, 상기 안티센스 cDNA에 상보적인 상기 센스 cDNA를 생성하므로써, 상기 고체 지지체에 결합된 이중가닥 cDNA를 함유한 2차 고체상 및 2차 액상을 생성하는 단계; (f) 상기 2차 액상을 제거하는 단계; (g) 상기 2차 고체상에 액체를 첨가하는 단계; (h) 상기 이중가닥 cDNA를 열변성시킴으로써, 상기 센스 단일가닥 cDNA를 함유한 3차 액상과 상기 안티센스 cDNA를 함유한 3차 고체상을 형성하는 단계; (i) 상기 센스 단일가닥 cDNA를 획득하기 위하여 상기 3차 액상을 회수하는 단계; (j) DNA 리가아제 및 DNA 중합효소를 필수적으로 포함하는 반응혼합물을 첨가하여, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 존재하에, 상기 3차 고체상 내의 상기 고체 지지체에 링크된 상기 안티센스 cDNA에 상보적인 센스 cDNA를 효소 합성함으로써, 4차 액상 및 상기 고체 지지체에 링크된 이중가닥 cDNA를 함유하는 4차 고체상을 생성하는 단계; (k) 상기 4차 액상을 제거하는 단계; (1) 상기 4차 고체상에 액체를 첨가하는 단계; (m) 상기 이중가닥 cDNA를 열변성시킴으로써, 센스 단일가닥 cDNA를 함유한 5차 액상과 상기 안티센스 cDNA를 함유한 5차 고체상을 형성하는 단계; 및 (n) 5차 액상을 획득하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 센스 단일가닥 cDNA 제조 방법.

청구항 7.

제6항에 있어서, 동일한 안티센스 cDNA로부터 추가적인 cDNA를 만들어내기 위하여 단계(j)부터 단계(n) 까지를 1회 이상 반복하는 순환단계(o)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 센스 단일가닥 cDNA 제조 방법.

청구항 8.

제6항에 있어서, 상기 고체 지지체는 마이크로타이터 플레이트인 것을 특징으로 하는 센스 단일가닥 cDNA 제조 방법.

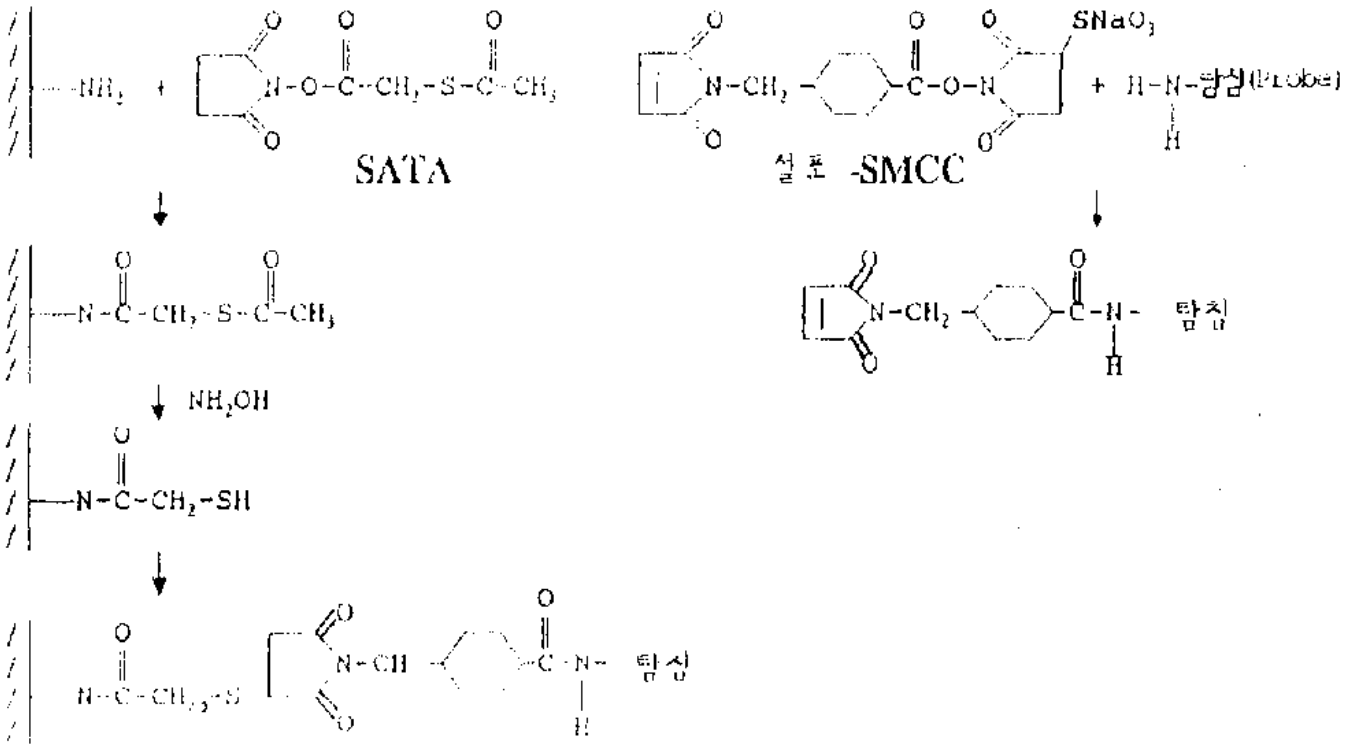
청구항 9.

사용을 위하여 센스 단일가닥 cDNA를 함유하는 액상과, mRNA사본으로서 보관되는 안티센스 단일가닥 cDNA를 함유하는 고체상을 동시에 제조하는 방법으로서, (a) mRNA의 폴리아데닐산의 꼬리에, 상보적인 폴리누클레오티드의 5′ 말단을 고정 지지체에 공유결합시켜, 폴리누클레오티드가 링크된 고체 지지체를 생성하는 단계; (b) 폴리아데닐산 꼬리를 가지는 mRNA를 함유하는 시료용액을, 상기 폴리누클레오티드가 링크된 고체 지지체에 첨가하는 단계; (c) 상기 시료용액을 상기 폴리누클레오티드가 링크된 고체 지지체와 접촉시켜 배양하므로써, mRNA의 상기 폴리아데닐산 꼬리가, 그와 상보적인 상기 폴리누클레오티드 서열과 혼성화되어 1차 액상 및 1차 고체상이 형성되도록 하는 단계; (d) 상기 mRNA를 주형으로 이용하고 역전사효소를 사용하여, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 존재하에 효소합성하여, 상기 mRNA에 상보적인 안티센스 cDNA를 생성하는 단계; (e) RNase H, DNA 리가아제 및 DNA 중합효소를 첨가하여, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 존재하에 효소합성하여, 상기 안티센스 cDNA에 상보적인 센스 cDNA를 생성하므로써, 상기 고체 지지체에 결합된 이중가닥 cDNA를 함유한 2차 고체상 및 2차 액상을 생성하는 단계; (f) 상기 2차 액상을

제거하는 단계; (g) 상기 2차 고체상에 액체를 첨가하는 단계; (h) 상기 이중가닥 cDNA를 열변성시킴으로써, 상기 센스 단일가닥 cDNA를 함유한 3차 액상과 상기 안티센스 cDNA를 함유한 3차 고체상을 형성하는 단계; (i) 증폭 또는 탐지를 위하여 사용될 센스 단일가닥 cDNA를 함유하는 상기 3차 액상을, mRNA사본으로서 보관되는 안티센스 단일가닥 cDNA를 함유하는 상기 3차 고체상으로부터 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

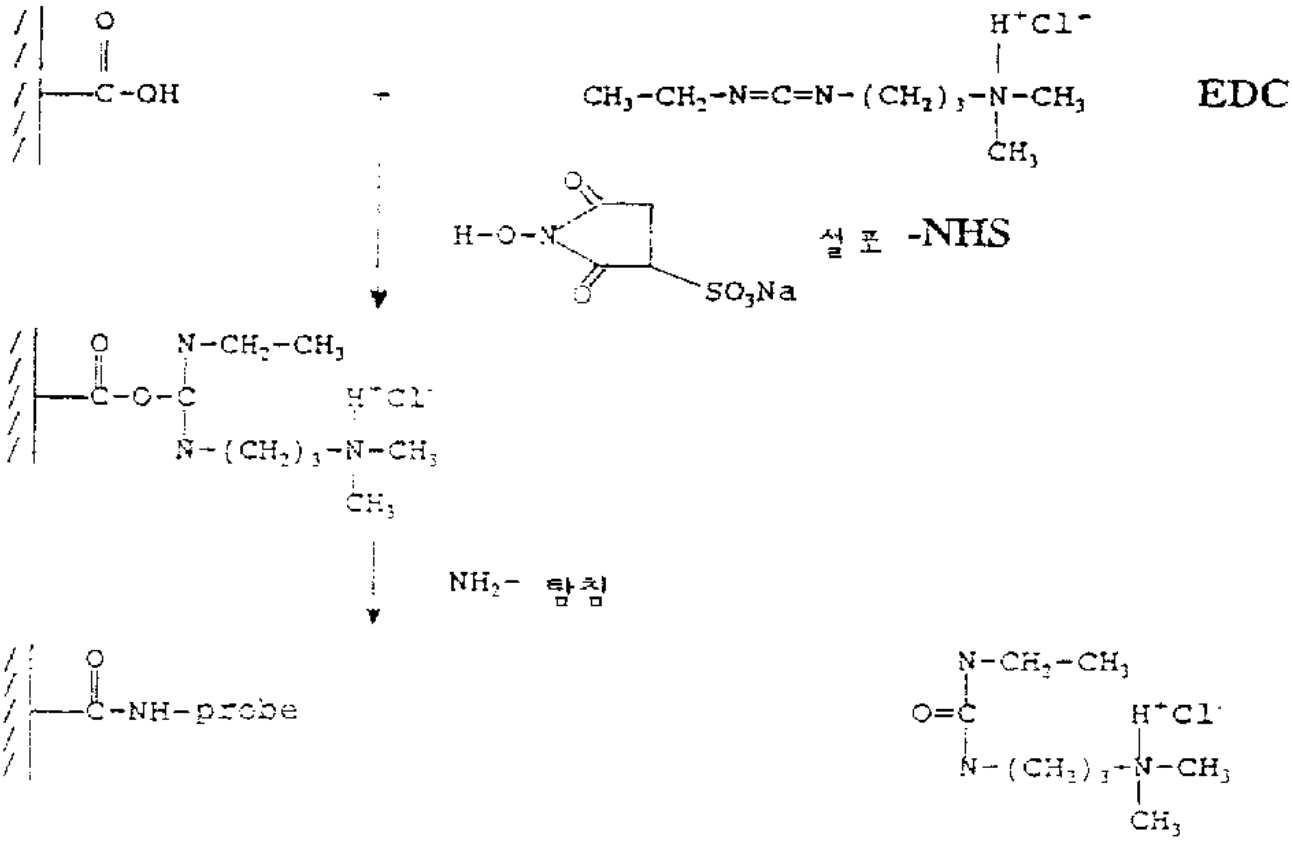
도면

도면 1



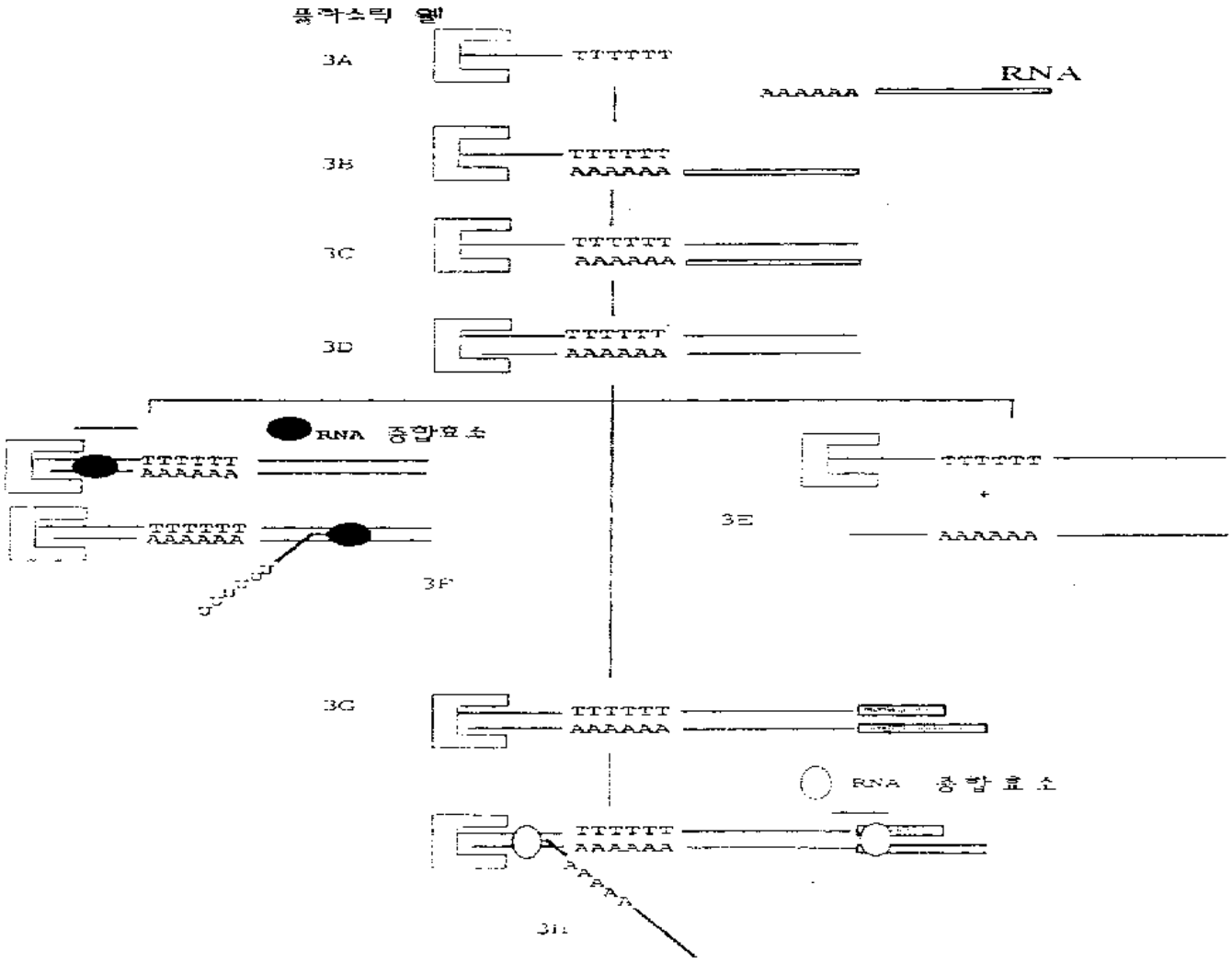
SATA: 석신이미딜- -아세틸티오아세트산
Sulfo-SMCC: 설포석신이미딜 -4-(N- 말레이미도메틸)
사이클로헥산-1- 카르복시산

도면 2

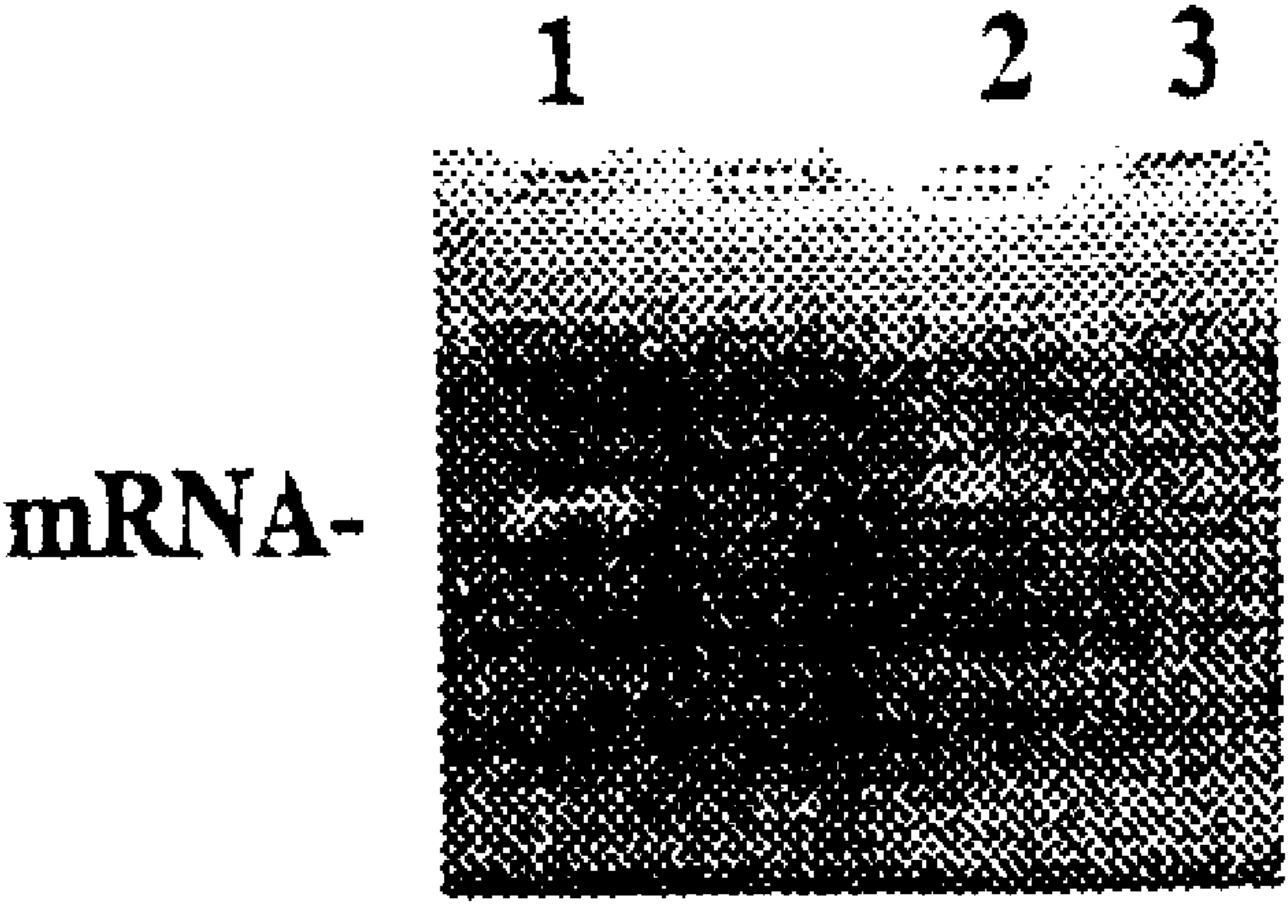


EDC: 1- 에틸 -3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 염화수소
설포 -NHS: N- 수산화설포석신이미드

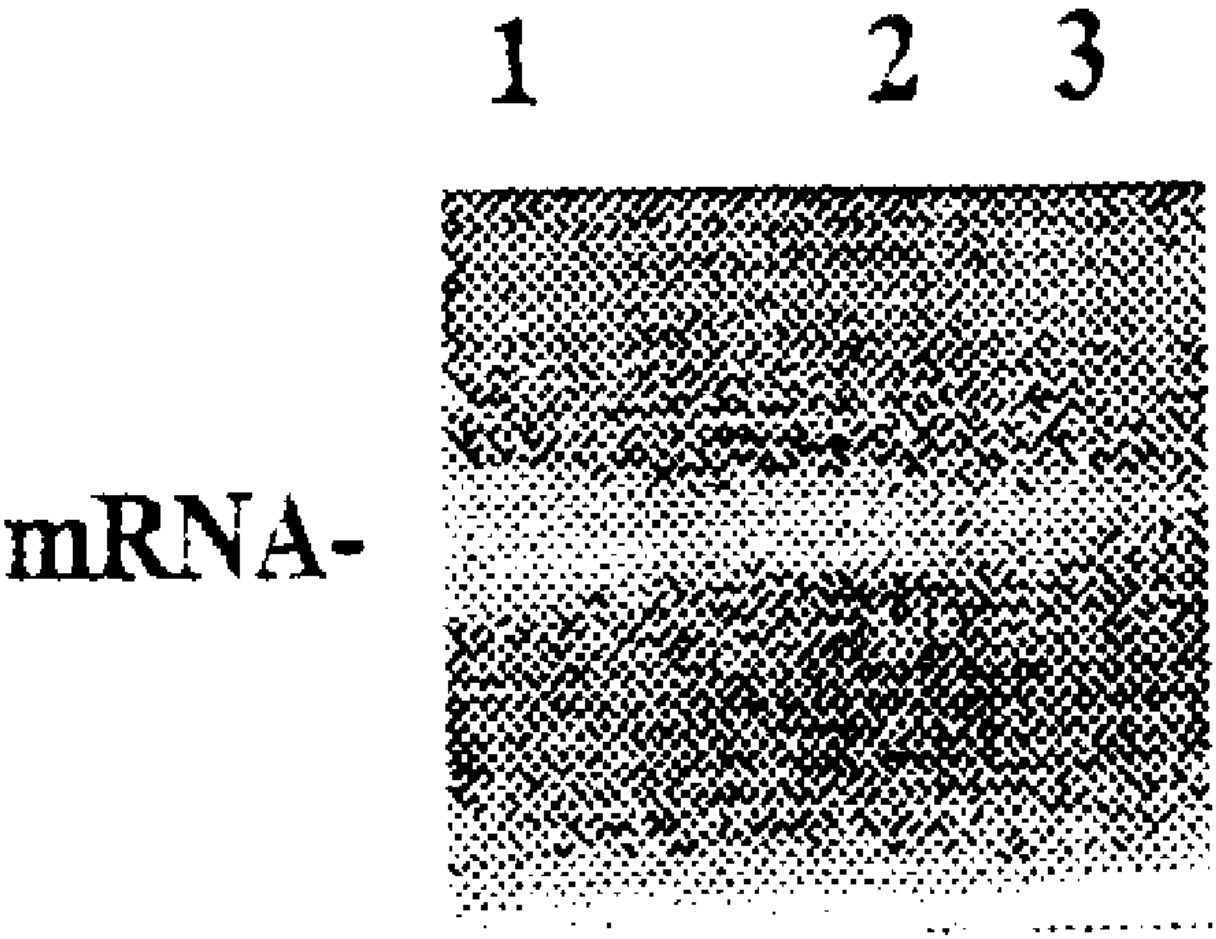
도면 3


플라스틱 웰
3A
TTTTTT
RNA
AAAAAA
3B
TTTTTT
AAAAAA
3C
TTTTTT
AAAAAA
3D
TTTTTT
AAAAAA
RNA 중합효소
TTTTTT
AAAAAA
TTTTTT
AAAAAA
3F
3E
TTTTTT
+
AAAAAA
3G
TTTTTT
AAAAAA
RNA 중합효소
TTTTTT
AAAAAA
AAAA
3H

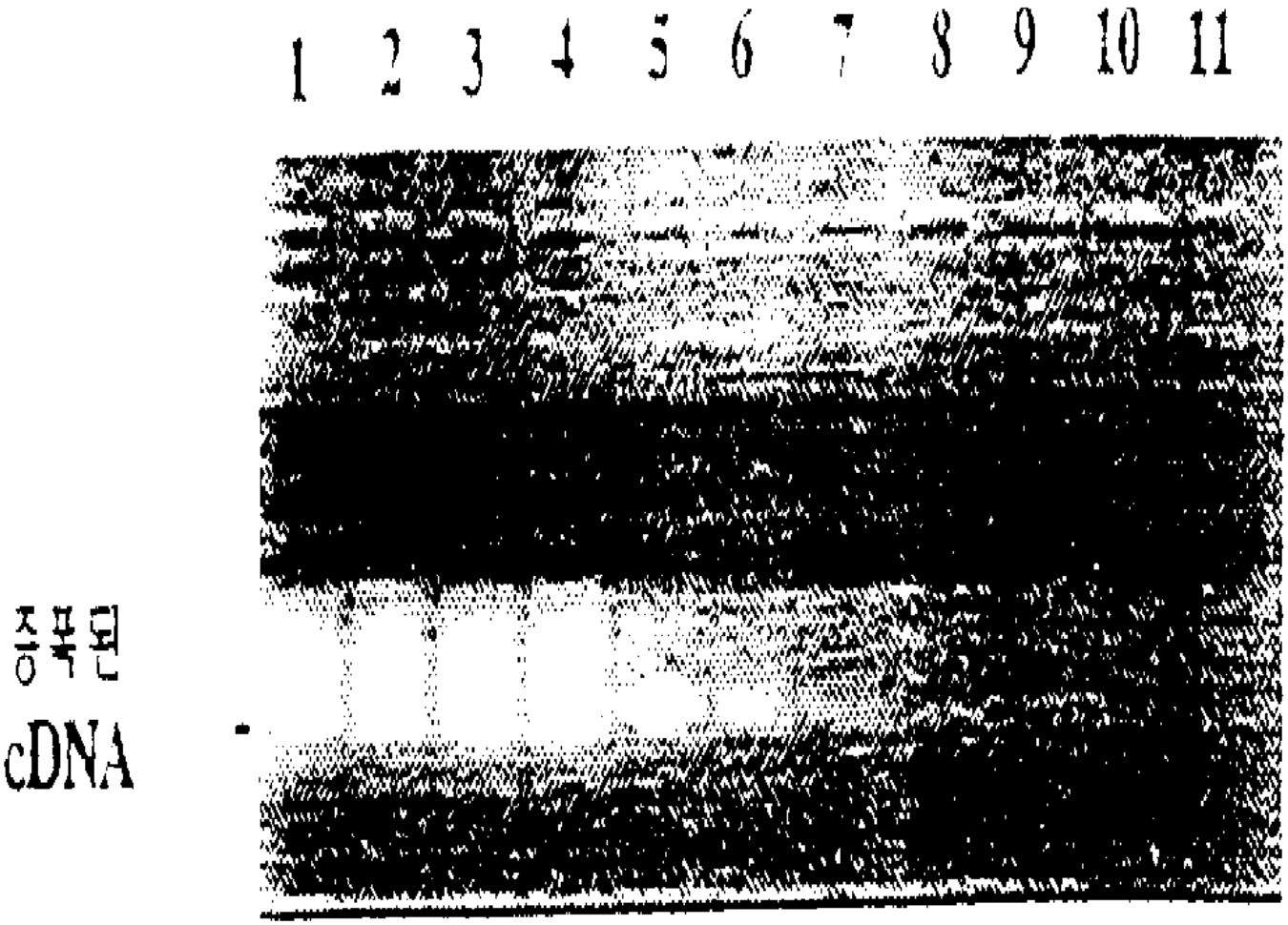
도면 4a



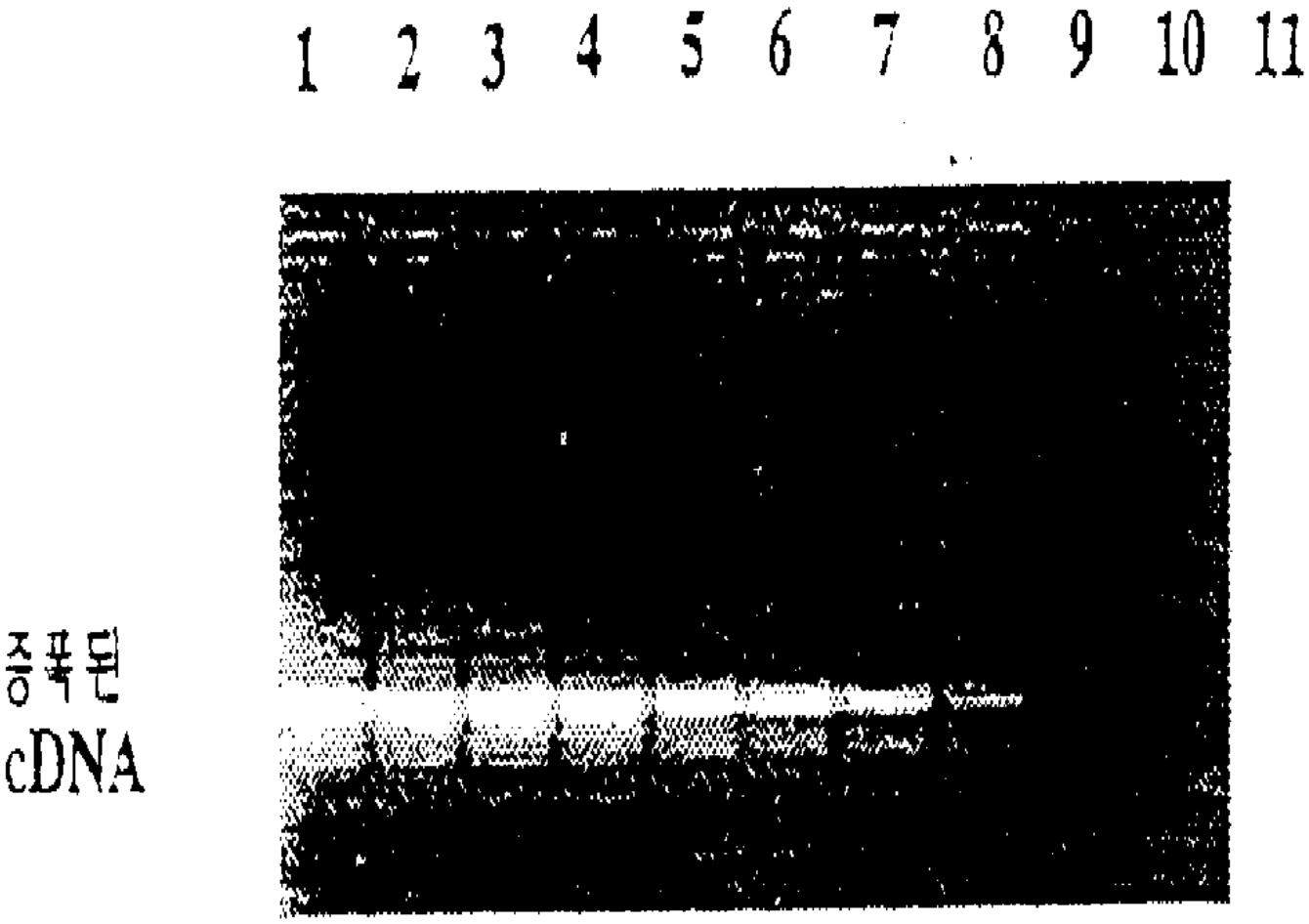
도면 4b



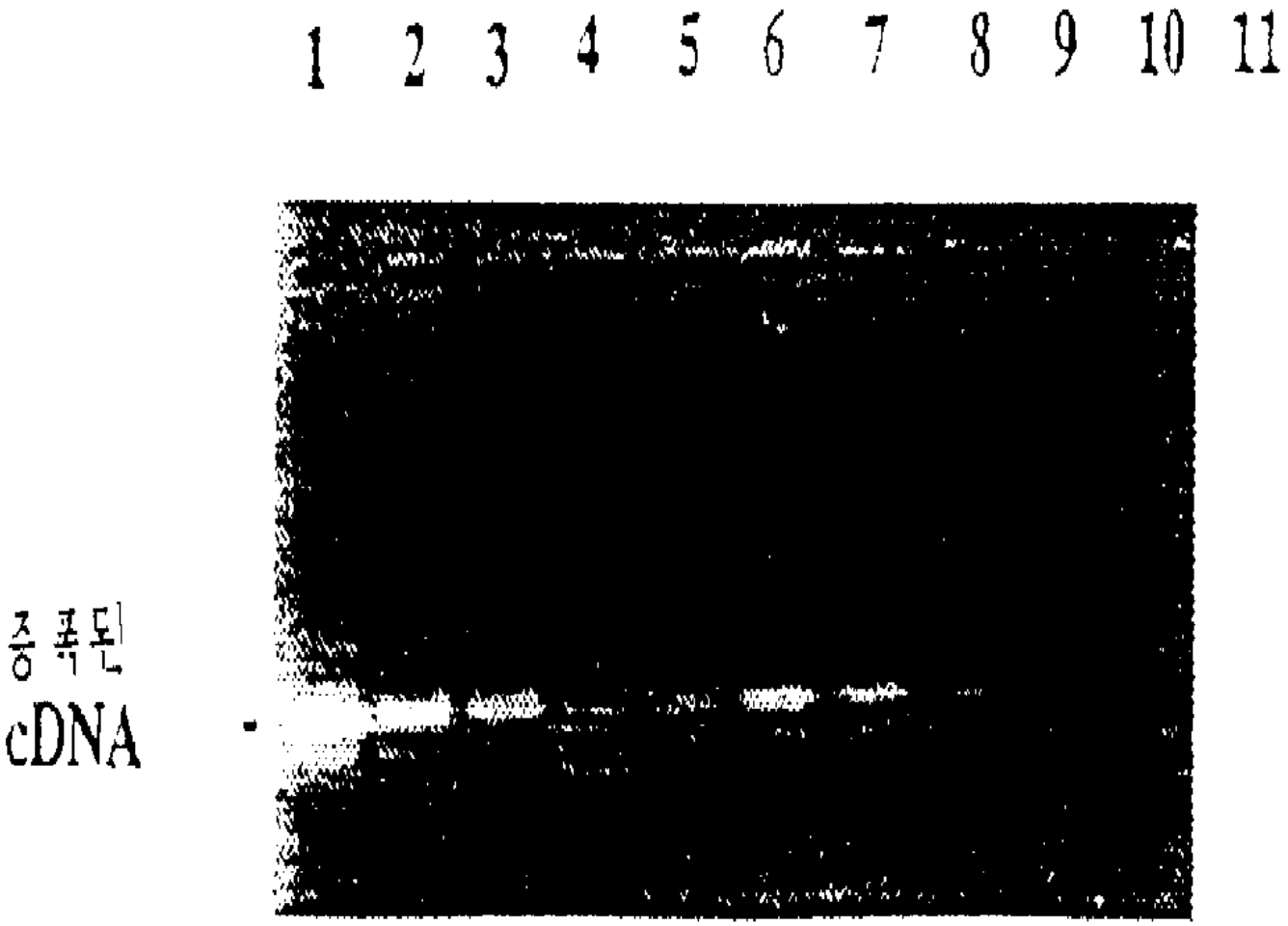
도면 5a



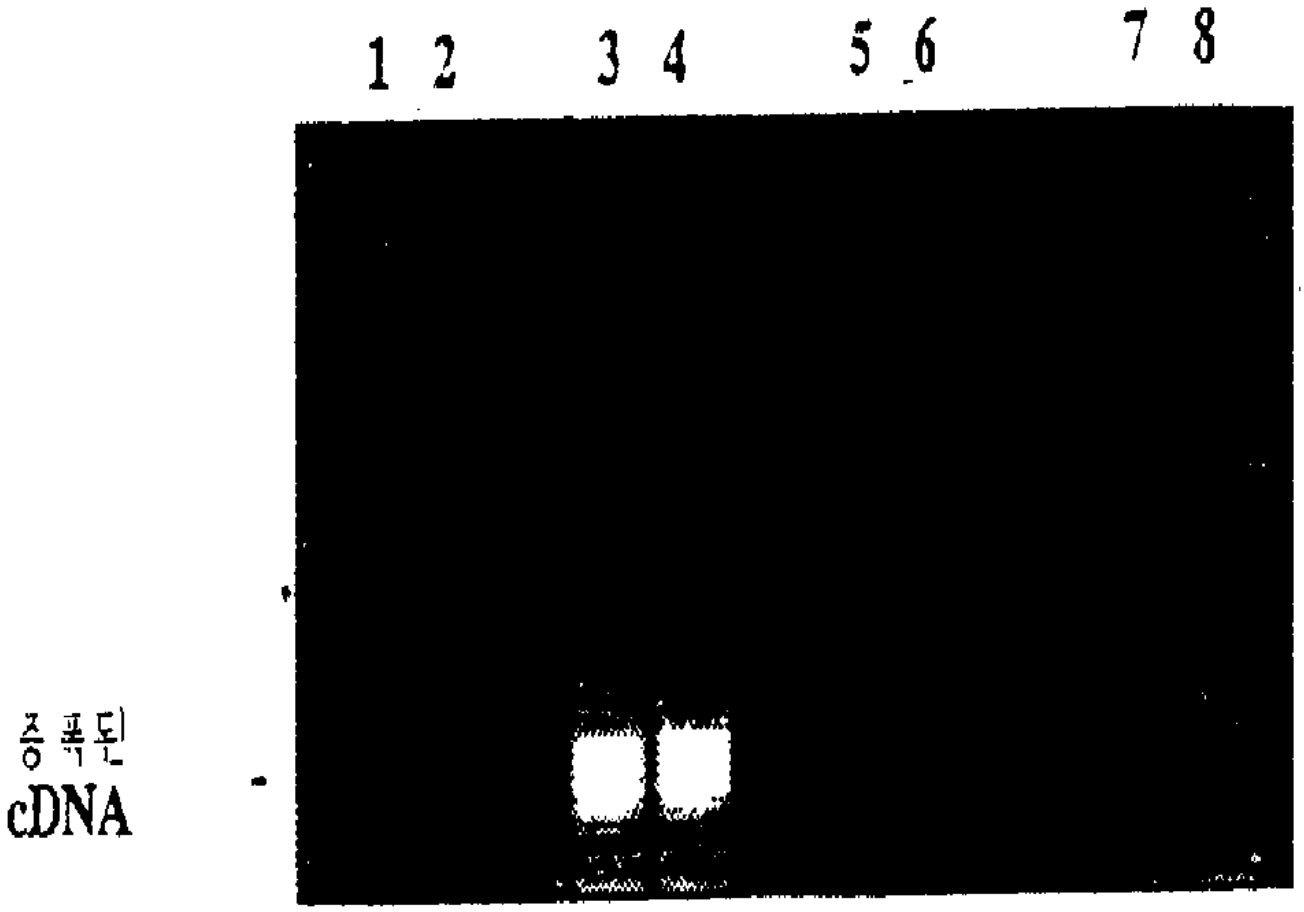
도면 5b



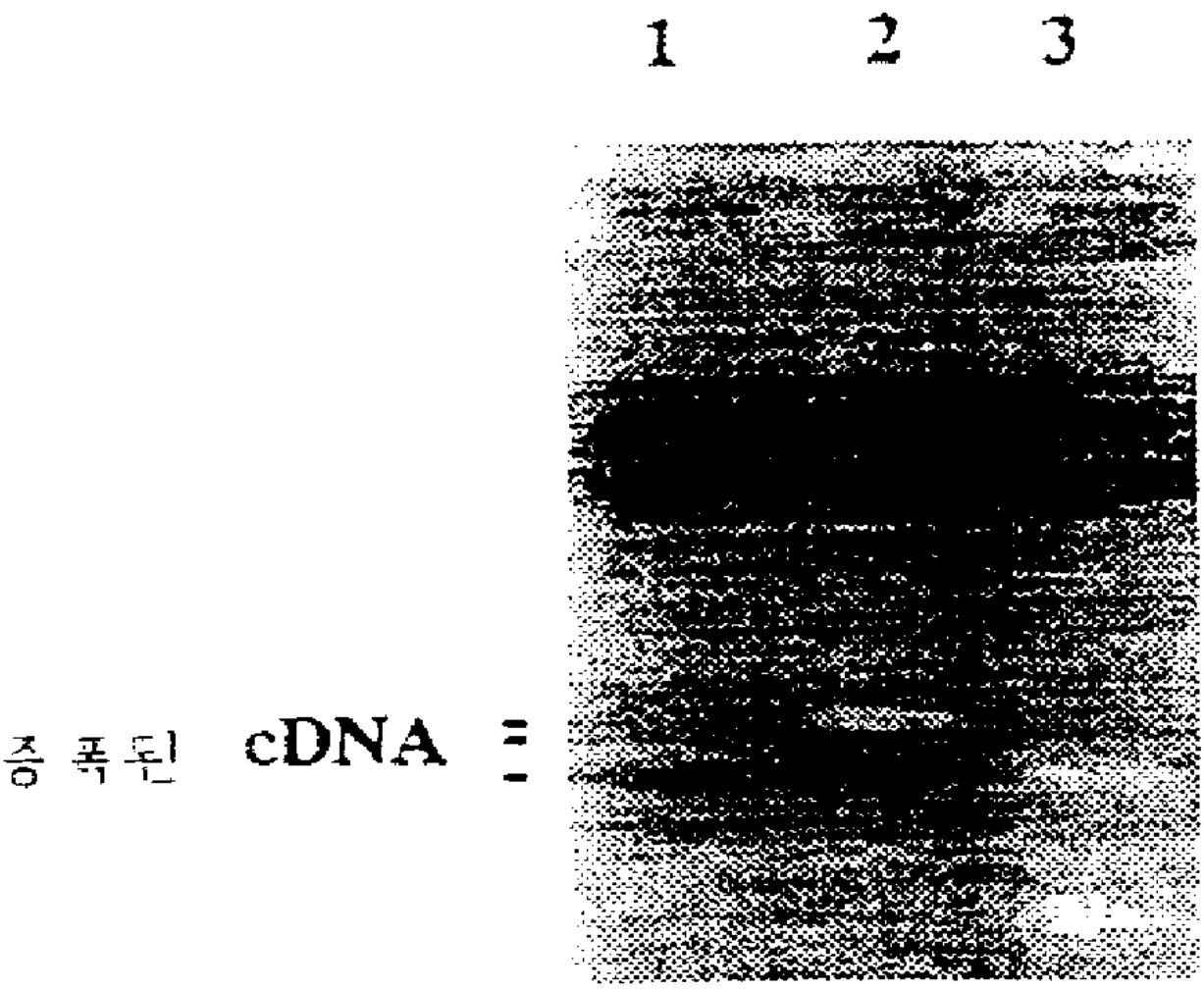
도면 5c



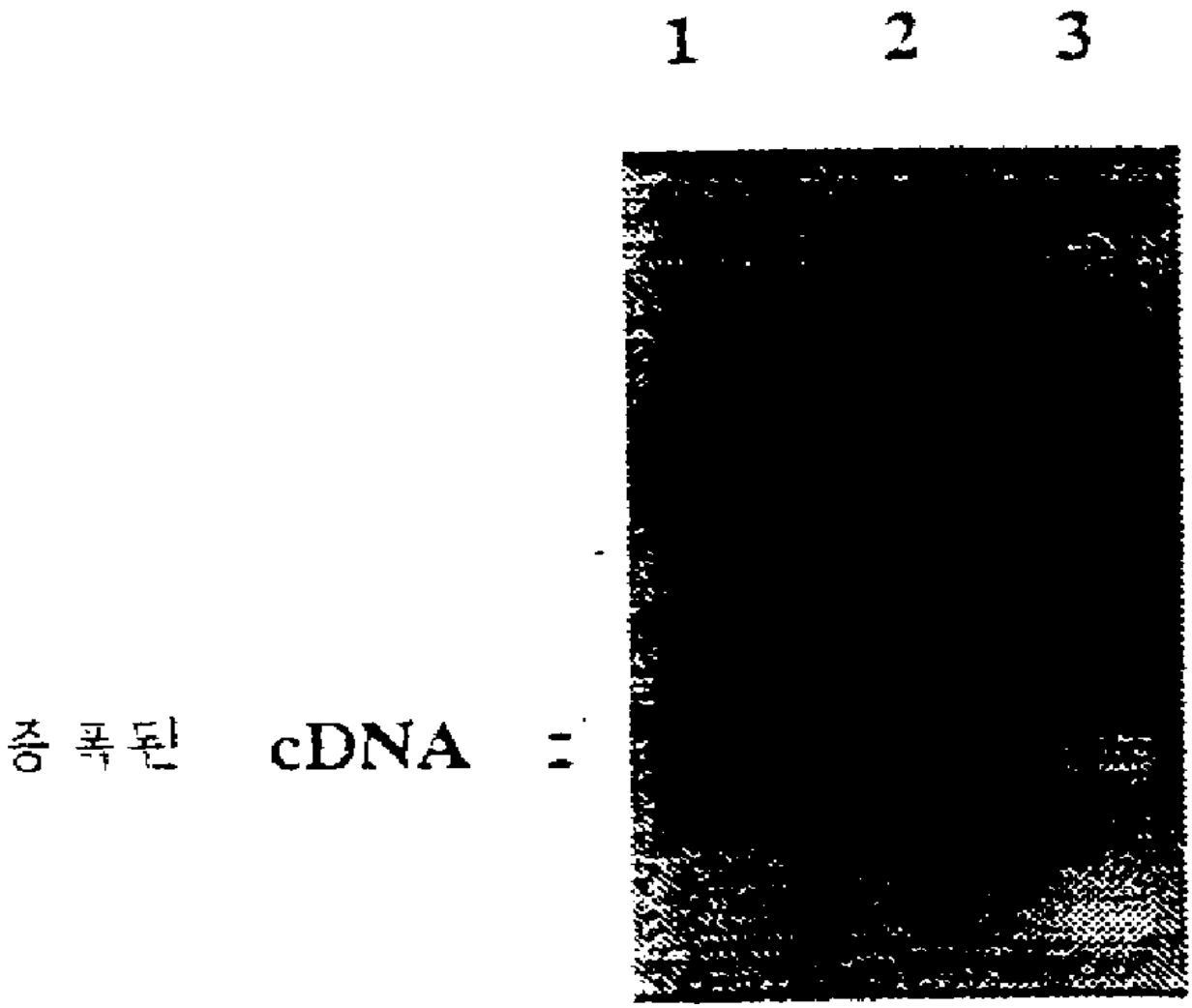
도면 6



도면 7a



도면 7b



도면 8

