



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0155394
(43) 공개일자 2022년11월22일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6818 (2018.01) C12Q 1/6834 (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12Q 1/6818 (2018.05)
C12Q 1/6834 (2018.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7038647(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2015년08월11일
심사청구일자 2022년11월16일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2021-7012283
원출원일자(국제) 2015년08월11일
심사청구일자 2021년05월10일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2022년11월03일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2015/044609</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2016/025452
국제공개일자 2016년02월18일</p> <p>(30) 우선권주장
62/035,783 2014년08월11일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
루미넥스 코퍼레이션
미합중국 텍사스주 78727-6115 오스틴시 테크놀로지 불리버드가 12212</p> <p>(72) 발명자
존슨, 스콧, 씨.
미합중국, 78727 텍사스, 오스틴, 테크놀로지 불리버드 12212, 루미넥스 코퍼레이션 내</p> <p>아람, 니콜라스
미합중국, 78702 텍사스, 오스틴, 메이플 애비뉴 1605</p> <p>휘트먼, 더그
미합중국, 78681 텍사스, 라운드 록, 레이스 오크 루프 1204</p> <p>(74) 대리인
특허법인오리진</p> |
|---|---|

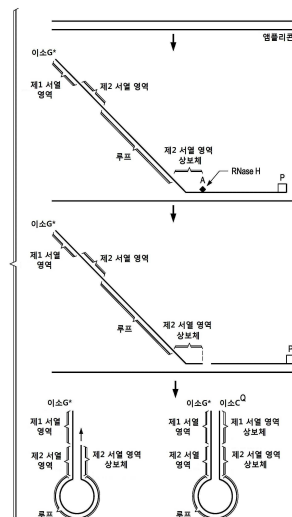
전체 청구항 수 : 총 152 항

(54) 발명의 명칭 핵산 검정에서 개선된 용융 판별 및 멀티플렉싱을 위한 프로브

(57) 요약

핵산의 검출 및 정량화를 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 특정의 구현예에서, 방법들은 표적 핵산 분자의 존재 하에서 엔도리보뉴클레아제(예를 들면, RNase H)에 대해 민감한 리보뉴클레오타이드 위치를 포함하는 절단가능한 프로브의 사용을 포함한다. 구현예의 프로브는 리포터 및/또는 퀀칭 잔기에 연결된 비-천연 뉴클레오타이드를 또한 포함할 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C12Q 2521/301 (2013.01)

C12Q 2525/161 (2013.01)

C12Q 2525/301 (2013.01)

C12Q 2527/101 (2019.08)

C12Q 2563/107 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 샘플을, 제1 절단가능한 프로브와 접촉시키는 단계로, 상기 프로브는 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍(reporter-quencher pair)의 제1 구성원(member)으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는, 단계;
- (b) 상기 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써, 표적 핵산과 하이브리드화하는 프로브를 절단시켜 트렁케이티드(truncated) 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계;
- (c) 트렁케이티드 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브(hairpin probe)를 형성하도록 하는 단계;
- (d) 상기 헤어핀 프로브를, 제1 서열 영역의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 염기 쌍화(pairing)할 수 있는 리포터-퀀처 쌍의 제2 구성원(member)으로 표지된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에서 연장시키는 단계; 및
- (e) 상기 절단가능한 프로브 및 상기 헤어핀 프로브 상의 표지로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출함으로써 표적 핵산을 검출하는 단계를 포함하는, 표적 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

제2 서열 영역(ii)의 역 상보체인 서열의 부위가 상기 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 엔도리보뉴클레아제가 RNase H인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 RNase H가 RNase HII인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 엔도리보뉴클레아제가 열안정성 RNase HII 효소인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 엔도리보뉴클레아제가 호열성, 핫스타트(hotstart), RNaseHII 효소인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 절단가능한 프로브가 (v) 제2 서열 영역과 당해 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열 사이의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 루프 서열을 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 루프 서열이, 길이가 4 내지 20개의, 6 내지 15개의 또는 10 내지 15개의 뉴클레오타이드인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 루프 서열이 적어도 3 내지 5개의 연속된 A 뉴클레오타이드를 포함하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 절단가능한 프로브가 리보뉴클레오타이드 염기의 3'에 위치한 연장-차단 변형(extension-blocking modification)을 포함하는 방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 절단가능한 프로브가 루프 서열내에서 연장-차단 변형을 포함하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 제2 서열 영역이, 길이가 6 내지 20개의 뉴클레오타이드인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 제1 서열 영역이, 길이가 4 내지 20개의 뉴클레오타이드인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서,

표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 서열이, 길이가 10 내지 50개의 뉴클레오타이드인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 절단가능한 프로브의 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기가 상기 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열의 바로 3'에 위치하는 방법.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 절단가능한 프로브의 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기가 상기 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 서열의 3' 말단으로부터 적어도 4개의 염기에 위치하는 방법.

청구항 17

제1항에 있어서,

상기 절단가능한 프로브가 상기 표적 핵산 서열의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 1 내지 5개의 리보뉴클레오타이드를 포함하는 서열을 포함하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 절단가능한 프로브가 상기 표적 핵산 서열의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 3 내지 5개의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 방법.

청구항 19

제1항에 있어서,

리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표시된 상기 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드가 상기 절단가능한 프로브의 5' 말단에 위치하는 방법.

청구항 20

제1항에 있어서,

상기 절단가능한 프로브가 3' 말단에서 연장-차단 변형을 포함하는 방법.

청구항 21

제1항에 있어서,

상기 절단가능한 프로브의 제2 서열 영역이 적어도 50%의 G/C 함량을 포함하는 방법.

청구항 22

제1항에 있어서,

상기 절단가능한 프로브의 제2 서열 영역이, 길이가 6 내지 15개의 뉴클레오타이드인 방법.

청구항 23

제1항에 있어서,

상기 절단가능한 프로브의 제2 서열 영역이 하나 이상의 비-천연 염기를 포함하는 방법.

청구항 24

제1항에 있어서,

엔도리보뉴클레아제의 절단 후에 상기 트렁케이트된 절단가능한 프로브 및 표적 핵산이 상기 표적 핵산에 대한 상기 절단가능한 프로브의 어닐링 온도보다 낮은 융점을 갖는 방법.

청구항 25

제1항에 있어서,

엔도리보뉴클레아제의 절단 후에 상기 트렁케이트된 절단가능한 프로브 및 상기 표적 핵산이 55℃ 미만의 융점을 갖는 방법.

청구항 26

제1항에 있어서,

리포터-퀀처 쌍의 상기 제1 구성원이 리포터인 방법.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 리포터가 형광단인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서,

시그날에 있어서의 변화가 형광성 시그날에 있어서의 감소인 방법.

청구항 29

제1항에 있어서,

표지로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계가, 샘플의 온도가 변화함에 따라 리포터로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 리포터로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계가, 샘플의 온도가 헤어핀 프로브의 융점 이상으로 증가함에 따라 상기 리포터로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 31

제1항에 있어서,

상기 절단가능한 프로브가 고체 지지체 상에 부착되어 있는 방법.

청구항 32

제1항에 있어서,

적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드 또는 퀀터-표지된 비-천연 뉴클레오타이드가 이소G이고 다른 것이 이소C인 방법.

청구항 33

제1항에 있어서,

(a) 상기 샘플을 제2 절단가능한 프로브와 접촉시키는 단계로, 상기 프로브가 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀터 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 제2 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는, 단계;

(b) 상기 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써, 표적 핵산과 하이브리드화하는 프로브를 절단시켜 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계;

(c) 상기 트렁케이트된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계;

(d) 상기 제1 서열 영역의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 염기 쌍화(base-pairing)할 수 있는 리포터-퀀터 쌍의 제2 구성원으로 표지된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에서 상기 헤어핀 프로브를 연장시키는 단계; 및

(e) 상기 절단가능한 프로브 및 상기 헤어핀 프로브 상의 표지로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출함으로써 제2 표적 핵산을 검출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서,

(a) 상기 샘플을 제3, 제4, 제5 또는 제6의 절단가능한 프로브와 접촉시키는 단계로, 상기 프로브가 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀터 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 제3, 제4, 제5 또는 제6의 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는, 단계;

(b) 상기 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써, 표적 핵산과 하이브리드화하는 프로브를 절단시켜 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계;

- (c) 상기 트렁케이트된 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계;
- (d) 상기 헤어핀 프로브를 제1 서열 영역의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 염기 쌍화할 수 있는 리포터-퀀처 쌍의 제2 구성원으로 표시된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에서 연장시키는 단계; 및
- (e) 상기 절단가능한 프로브 및 상기 헤어핀 프로브 상의 표지로부터의 시그널에 있어서의 변화를 검출함으로써 제3, 제4, 제5 또는 제6의 표적 핵산을 검출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 35

제33항에 있어서,

제1 및 제2 표적 핵산의 존재를 검출하는 단계가 필수적으로 동시에 수행되는 방법.

청구항 36

제33항에 있어서,

제1 및 제2 표적 핵산의 존재를 검출하는 단계가 순차적으로 수행되는 방법.

청구항 37

제33항에 있어서,

제1 및 제2 프로브가 구별가능한 리포터를 포함하는 방법.

청구항 38

제33항에 있어서,

제1 및 제2 프로브가 동일한 리포터를 포함하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서,

상기 제1 및 제2 프로브에 의해 형성된 헤어핀 프로브가 구별가능한 융점을 포함하는 방법.

청구항 40

제34항에 있어서,

제1, 제2, 제3, 제4, 제5 및 제6의 프로브 각각에 의해 형성된 헤어핀 프로브가 구별가능한 표지 또는 구별가능한 융점을 포함하는 방법.

청구항 41

제34항에 있어서,

상기 제1, 제2, 제3, 제4, 제5 및 제6의 절단가능한 프로브 각각이 동일한 제1 서열 영역, 제2 서열 영역 및/또는 상기 제2 서열 영역과 상기 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열 사이의 동일한 루프 서열을 포함하는 방법.

청구항 42

제1항에 있어서,

표적 핵산을 등온 증폭을 사용하여 증폭시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 43

제1항에 있어서,

절단가능한 프로브를 사용하여 시그널을 등온적으로 증폭시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 44

제1항에 있어서,

다수의 폴리머라제 연쇄 반응(polymerase chain reaction) 주기를 수행하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 45

제44항에 있어서,

표지로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계가 다수의 폴리머라제 연쇄 반응 주기를 수행하기 전 및 후에 상기 시그날을 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 46

제44항에 있어서,

표지로부터 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계가 상기 다수의 폴리머라제 연쇄 반응 주기의 수행 후에만 상기 시그날을 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 47

제46항에 있어서,

상기 표지로부터의 검출된 시그날을 비-하ybrid화 프로브 상의 표지로부터의 참고 시그날에 대한 상기 표지의 시그날의 예정된 비와 비교하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 48

제44항에 있어서,

샘플에서 표적 핵산의 양을 정량화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 49

제48항에 있어서,

샘플에서 표적 핵산의 양을 정량화하는 단계가:

표준 곡선을 사용하는 단계; 핵산 표적의 상대적인 양을 측정하는 단계; 종점 정량화(end-point quantitation)를 사용하는 단계; 또는 시그날이 배경(background)이상으로 검출될 수 있는 PCR 주기 수를 존재하는 표적의 양과 관련시킴으로써 상기 핵산 표적의 양을 측정하는 단계;

를 포함하는 방법.

청구항 50

5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 표적 핵산의 제1 쌍 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 제1 절단 가능한 프로브를 포함하는 조성물.

청구항 51

제50항에 있어서,

5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 제2 표적 핵산의 제1 쌍 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 제2 절단가능한 프로브를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 52

제51항에 있어서,

제1 및 제2 프로브가 구별가능한 리포터를 포함하거나 구별가능한 융점을 지닌 헤어핀 프로브를 형성하는 조성물.

청구항 53

제51항에 있어서,

적어도 4개의 프로브를 포함하는 조성물.

청구항 54

제50항에 있어서,

리포터-표지되거나 퀀처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 55

제50항에 있어서,

폴리머라제, 엔도리보뉴클레아제 효소, 참고 프로브(reference probe) 또는 유리된 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 56

하기를 포함하는, 키트(kit):

(a) 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 제1 절단가능한 프로브; 및

(b) 리포터-표지된 비-천연 뉴클레오타이드; 퀀처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드; 또는 엔도리보뉴클레아제 효소.

청구항 57

제56항에 있어서,

적어도 4개의 프로브를 포함하는 키트.

청구항 58

제57항에 있어서,

상기 프로브가 구별가능한 리포터를 포함하고/하거나 구별가능한 융점을 지닌 헤어핀을 형성하는 키트.

청구항 59

제56항에 있어서,

폴리머라제, 참고 프로브, 유리 뉴클레오타이드, 참고 샘플 또는 키트의 사용을 위한 지시사항을 추가로 포함하는 키트.

청구항 60

(a) 샘플을, 프로브의 제1 세트와 접촉시키는 단계로, 프로브의 상기 세트가 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역과 동일하고, 절단가능한 프로브로부터의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 동일한 적어도 하나의 표지되지 않은 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열; 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 프로브(capture probe)를 포함하는, 단계;

(b) 상기 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써, 표적 핵산과 하이브리드화되는 프로브를 절단시켜 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계;

(c) 트렁케이트된 절단가능한 프로브가 포획 프로브와 하이브리드화되도록 하는 단계;

(d) 포획 프로브내의 적어도 하나의 표지되지 않은 비-천연 뉴클레오타이드와 염기-쌍화(base-pairing)를 이룰 수 있는 리포터-퀀처 쌍의 제2 구성원으로 표지된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에서 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 연장시켜서 연장된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계; 및

(e) 연장된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계;

(f) 절단가능한 프로브 및 헤어핀 프로브 상의 표지로부터 시그날의 변화를 검출함으로써 표적 핵산을 검출하는 단계

를 포함하는, 표적 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 61

제60항에 있어서,

상기 절단가능한 프로브가 상기 표적 핵산 서열의 제1 쉼 상의 제1 영역에 대해 상보성인 1 내지 5개의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 방법.

청구항 62

제60항에 있어서,

상기 엔도리보뉴클레아제가 RNase H인 방법.

청구항 63

제62항에 있어서,

상기 RNase H가 RNaseHII인 방법.

청구항 64

제60항에 있어서,

상기 엔도리보뉴클레아제가 열안정성 RNase HII 효소인 방법.

청구항 65

제60항에 있어서,

상기 엔도리보뉴클레아제가 호열성, 핫스타트, RNaseHII 효소인 방법.

청구항 66

제61항에 있어서,

상기 절단가능한 프로브가 표적 핵산 서열의 제1 쉼 상의 제1 영역에 대해 상보성인 3 내지 5개의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 방법.

청구항 67

제60항에 있어서,

상기 절단가능한 프로브 상의 포획 서열이 하나 이상의 비-천연 염기를 포함하는 방법.

청구항 68

제60항에 있어서,

엔도리보뉴클레아제의 절단 전에 절단가능한 프로브 및 포획 프로브가 55℃ 미만의 용점을 갖는 방법.

청구항 69

제60항에 있어서,

상기 절단가능한 프로브가 3' 말단에서 연장-차단 변형을 포함하는 방법.

청구항 70

제60항에 있어서,

상기 절단가능한 프로브가 리보뉴클레오타이드 염기의 3'에 위치한 연장-차단 변형을 포함하는 방법.

청구항 71

제60항에 있어서,

상기 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원이 리포터인 방법.

청구항 72

제71항에 있어서,

상기 리포터가 형광단인 방법.

청구항 73

제72항에 있어서,

시그날에 있어서의 상기 변화가 형광성 시그날에 있어서의 감소인 방법.

청구항 74

제60항에 있어서,

표지로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계가, 샘플의 온도가 변화함에 따라 리포터로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 75

제74항에 있어서,

리포터로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계가, 샘플의 온도가 헤어핀 프로브의 용점 이상으로 증가함에 따라 상기 리포터로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 76

제60항에 있어서,

상기 포획 프로브가 고체 지지체 상에 부착되어 있는 방법.

청구항 77

제60항에 있어서,

상기 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드 또는 퀀처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드가 이소G이고 다른 것이 이소C인 방법.

청구항 78

제60항에 있어서,

(a) 샘플을 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 제2 표적 핵산의 제1 채 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역과 동일하고 절단가능한 프로브로부터의 적어도 하나의 비-천연 뉴클

레오타이드와 동일한 적어도 하나의 표지되지 않은 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열; 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제 2 세트와 접촉시키는 단계;

(b) 상기 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써, 제2 표적 핵산과 하이브리드화되는 프로브를 절단시켜 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계;

(c) 상기 트렁케이트된 절단가능한 프로브가 포획 프로브와 하이브리드화되도록 하는 단계;

(d) 상기 포획 프로브내의 적어도 하나의 표지되지 않은 비-천연 뉴클레오타이드와 염기-쌍화할 수 있는 퀀처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에서 상기 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 연장시키는 단계; 및

(e) 상기 연장된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계;

(f) 상기 절단가능한 프로브 및 헤어핀 프로브 상의 표지로부터 시그널내 변화를 검출함으로써 제2 표적 핵산을 검출하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 79

제78항에 있어서,

(a) 샘플을, 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 제3, 제4, 제5 또는 제6의 표적 핵산의 제1 쇠 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역과 동일하고 절단가능한 프로브로부터의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 동일한 적어도 하나의 표지되지 않은 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는, 프로브의 제3, 제4, 제5 또는 제6 세트와 접촉시키는 단계;

(b) 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써, 제3, 제4, 제5 또는 제6의 표적 핵산과 하이브리드화하는 프로브를 절단시켜 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계;

(c) 상기 트렁케이트된 절단가능한 프로브가 상기 포획 프로브와 하이브리드화하도록 하는 단계;

(d) 상기 포획 프로브내의 적어도 표지되지 않은 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 염기-쌍화할 수 있는 퀀처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에서 상기 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 연장시켜서 연장된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계;

(e) 상기 연장된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계;

(f) 상기 절단가능한 프로브 및 헤어핀 프로브 상의 표지로부터의 시그널의 변화를 검출함으로써 제3, 제4, 제5 또는 제6의 표적 핵산을 검출하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 80

제78항에 있어서,

제1 및 제2 표적 핵산의 존재를 검출하는 단계가 필수적으로 동시에 수행되는 방법.

청구항 81

제78항에 있어서,

제1 및 제2 표적 핵산의 존재를 검출하는 단계가 순차적으로 수행되는 방법.

청구항 82

제78항에 있어서,

프로브의 제1 및 제2 세트가 구별가능한 리포터를 포함하는 방법.

청구항 83

제78항에 있어서,

프로브의 제1 및 제2 세트가 동일한 리포터를 포함하는 방법.

청구항 84

제83항에 있어서,

프로브의 제1 및 제2 세트에 의해 형성된 상기 헤어핀 프로브가 구별가능한 융점을 포함하는 방법.

청구항 85

제79항에 있어서,

프로브의 상기 제1, 제2, 제3, 제4, 제5 및 제6 세트에 의해 형성된 상기 헤어핀 프로브가 구별가능한 리포터 또는 구별가능한 융점을 포함하는 방법.

청구항 86

제60항에 있어서,

등온 증폭을 사용하여 상기 표적 핵산을 증폭시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 87

제60항에 있어서,

다수의 폴리머라제 연쇄 반응 주기를 수행하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 88

제87항에 있어서,

표지로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계가 다수의 폴리머라제 연쇄 반응 주기를 수행하기 전 및 후에 상기 시그날을 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 89

제87항에 있어서,

표지로부터 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계가 상기 다수의 폴리머라제 연쇄 반응 주기의 수행 후에만 시그날을 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 90

제89항에 있어서,

표지로부터의 검출된 시그날을 비-하ybrid화 프로브 상의 표지로부터의 참고 시그날에 대한 상기 표지의 시그날의 예정된 비와 비교하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 91

제87항에 있어서,

샘플에서 상기 표적 핵산의 양을 정량화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 92

제91항에 있어서,

샘플에서 상기 표적 핵산의 양을 정량화하는 단계가:

표준 곡선을 사용하는 단계; 상기 핵산 표적의 상대적인 양을 측정하는 단계; 중점 정량화를 사용하는 단계; 또는 상기 시그널이 배경이상으로 검출될 수 있는 PCR 주기 수를 존재하는 표적의 양과 관련시킴으로써 상기 핵산 표적의 양을 측정하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 93

5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 표적 핵산의 제1 쇠 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역과 동일하고, 절단가능한 프로브로부터의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 동일한 적어도 하나의 표지되지 않은 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제1 세트를 포함하는 조성물.

청구항 94

제93항에 있어서,

5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 제2 표적 핵산의 제1 쇠 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역과 동일하고 절단가능한 프로브로부터의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 동일한 적어도 하나의 표지되지 않은 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제2 세트를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 95

제94항에 있어서,

프로브의 제1 및 제2 세트가 구별가능한 리포터를 포함하거나 구별가능한 융점을 지닌 헤어핀 프로브를 형성하는 조성물.

청구항 96

제94항에 있어서,

프로브의 적어도 4개의 세트를 포함하는 조성물.

청구항 97

제93항에 있어서,

리포터-표지되거나 퀀처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 98

제93항에 있어서,

폴리머라제, 참고 프로브 또는 유리된 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 99

(a) 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; 및 (iii) 표적 핵산의 제1 쇠 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역과 동일하고 절단가능한 프로브로부터의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 동일한 적어도 하나의 표지되지 않은 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제1 세트; 및

(b) 리포터-표지된 비-천연 뉴클레오타이드; 퀀터-표지된 비-천연 뉴클레오타이드; 또는 엔도리보뉴클레아제 효소

를 포함하는 키트.

청구항 100

제99항에 있어서,

프로브의 적어도 4개의 세트를 포함하는 키트.

청구항 101

제100항에 있어서,

프로브의 세트가 구별가능한 리포터를 포함하고/하거나 구별가능한 융점을 지닌 헤어핀 프로브를 형성하는 키트.

청구항 102

제99항에 있어서,

폴리머라제, 참고 프로브, 유리된 뉴클레오타이드, 참고 샘플, 또는 키트의 사용을 위한 지시사항을 추가로 포함하는 키트.

청구항 103

(a) 샘플을, 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀터 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 표적 핵산의 제1 채 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역의 부분에 대해 동일한 서열 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제1 세트와 접촉시키는 단계;

(b) 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써, 표적 핵산과 하이브리드화되는 절단가능한 프로브를 절단시켜 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계;

(c) 트렁케이트된 절단가능한 프로브가 포획 프로브와 하이브리드화되도록 하는 단계;

(d) 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 연장시켜서 연장된 프로브를 형성시키는 단계;

(e) 연장된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계;

(f) 헤어핀 프로브를 절단가능한 프로브의 5' 말단에서 적어도 하나의 표지된 비-천연 뉴클레오타이드와 염기-쌍화할 수 있는 리포터-퀀터 쌍의 제2 구성원으로 표지된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에 추가로 연장시키는 단계; 및

(g) 절단가능한 프로브 및 헤어핀 프로브 상의 표지로부터 시그널 변화를 검출함으로써 표적 핵산을 검출하는 단계

를 포함하는, 표적 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 104

제103항에 있어서,

절단가능한 프로브가 상기 표적 핵산 서열의 제1 채 상의 제1 영역에 대해 상보성인 1 내지 5개의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 방법.

청구항 105

제103항에 있어서,

상기 엔도리보뉴클레아제가 RNase H인 방법.

청구항 106

제105항에 있어서,
상기 RNase H가 RNaseHII인 방법.

청구항 107

제103항에 있어서,
상기 엔도리보뉴클레아제가 열안정성 RNase HII 효소인 방법.

청구항 108

제103항에 있어서,
상기 엔도리보뉴클레아제가 호열성, 핫스타트, RNaseHII 효소인 방법.

청구항 109

제104항에 있어서,
절단가능한 프로브가 표적 핵산 서열의 제1 채 상의 제1 영역에 대해 상보성인 3 내지 5개의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 방법.

청구항 110

제103항에 있어서,
절단가능한 프로브 상의 포획 서열이 하나 이상의 비-천연 염기를 포함하는 방법.

청구항 111

제103항에 있어서,
엔도리보뉴클레아제의 절단 전에 절단가능한 프로브 및 포획 프로브가 55℃ 미만의 용점을 갖는 방법.

청구항 112

제103항에 있어서,
절단가능한 프로브가 3' 말단에서 연장-차단 변형을 포함하는 방법.

청구항 113

제103항에 있어서,
절단가능한 프로브가 리보뉴클레오타이드 염기의 3'에 위치한 연장-차단 변형을 포함하는 방법.

청구항 114

제103항에 있어서,
리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원이 리포터인 방법.

청구항 115

제114항에 있어서,
상기 리포터가 형광단인 방법.

청구항 116

제115항에 있어서,
시그날에 있어서의 상기 변화가 형광성 시그날에 있어서의 감소인 방법.

청구항 117

제103항에 있어서,

표지로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계가, 상기 샘플의 온도가 변화함에 따라 리포터로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 118

제117항에 있어서,

리포터로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계가, 상기 샘플의 온도가 헤어핀 프로브의 융점 이상으로 증가함에 따라 상기 리포터로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 119

제103항에 있어서,

상기 포획 프로브가 고체 지지체 상에 부착되어 있는 방법.

청구항 120

제103항에 있어서,

적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드 또는 퀀처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드가 이소G이고 다른 것이 이소C인 방법.

청구항 121

제103항에 있어서,

(a) 상기 샘플을 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 제2 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역의 부분에 대해 동일한 서열 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제2 세트와 접촉시키는 단계;

(b) 상기 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써, 표적 핵산과 하이브리드화되는 절단가능한 프로브를 절단시켜 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계;

(c) 상기 트렁케이트된 절단가능한 프로브가 포획 프로브와 하이브리드화되도록 하는 단계;

(d) 상기 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 연장시켜서 연장된 프로브를 형성시키는 단계;

(e) 상기 연장된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계;

(f) 상기 헤어핀 프로브를 절단가능한 프로브의 5' 말단에서 적어도 하나의 표지된 비-천연 뉴클레오타이드와 염기-쌍화할 수 있는 리포터-퀀처 쌍의 제2 구성원으로 표지된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에 추가로 연장시키는 단계; 및

(g) 상기 절단가능한 프로브 및 헤어핀 프로브 상의 상기 표지로부터 시그날내 변화를 검출함으로써 제2 표적 핵산을 검출하는 단계,

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 122

제121항에 있어서,

(a) 상기 샘플을 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 제3, 제4, 제5 또는 제6의 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역의 부분에 대해 동일한 서열 영역 및 (ii) 절단가능

한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제3, 제4, 제5 또는 제6 세트를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써, 표적 핵산과 하이브리드화되는 절단가능한 프로브를 절단시켜 트렁케이티드 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계;

(c) 상기 트렁케이티드 절단가능한 프로브가 포획 프로브와 하이브리드화하도록 하는 단계;

(d) 상기 트렁케이티드 절단가능한 프로브를 연장시켜서 연장된 프로브를 형성시키는 단계;

(e) 상기 연장된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계;

(f) 상기 헤어핀 프로브를 상기 절단가능한 프로브의 5' 말단에서 적어도 하나의 표지된 비-천연 뉴클레오타이드와 염기-쌍화할 수 있는 리포터-퀀처 쌍의 제2 구성원으로 표지된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에서 추가로 연장시키는 단계; 및

(g) 상기 절단가능한 프로브 및 헤어핀 프로브 상의 표지로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출함으로써 제3, 제4, 제5 또는 제6의 표적 핵산을 검출하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 123

제121항에 있어서,

제1 및 제2 표적 핵산의 존재를 검출하는 단계가 필수적으로 동시에 수행되는 방법.

청구항 124

제121항에 있어서,

제1 및 제2 표적 핵산의 존재를 검출하는 단계가 순차적으로 수행되는 방법.

청구항 125

제121항에 있어서,

프로브의 제1 및 제2 세트가 구별가능한 리포터를 포함하는 방법.

청구항 126

제121항에 있어서,

프로브의 제1 및 제2 세트가 동일한 리포터를 포함하는 방법.

청구항 127

제126항에 있어서,

프로브의 제1 및 제2 세트에 의해 형성된 헤어핀 프로브가 구별가능한 융점을 포함하는 방법.

청구항 128

제122항에 있어서,

프로브의 제1, 제2, 제3, 제4, 제5 및 제6 세트에 의해 형성된 헤어핀 프로브가 구별가능한 리포터 또는 구별가능한 융점을 포함하는 방법.

청구항 129

제103항에 있어서,

등온 증폭을 사용하여 상기 표적 핵산을 증폭시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 130

제103항에 있어서,

다수의 폴리머라제 연쇄 반응 주기를 수행하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 131

제130항에 있어서,

표지로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계가 다수의 폴리머라제 연쇄 반응 주기를 수행하기 전 및 후에 상기 시그날을 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 132

제130항에 있어서,

표지로부터 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계가 상기 다수의 폴리머라제 연쇄 반응 주기의 수행 후에만 상기 시그날을 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 133

제132항에 있어서,

표지로부터의 검출된 시그날을 비-하이브리드화 프로브 상의 표지로부터의 참고 시그날에 대한 상기 표지의 시그날의 예정된 비와 비교하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 134

제130항에 있어서,

샘플에서 상기 표적 핵산의 양을 정량화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 135

제134항에 있어서,

샘플에서 상기 표적 핵산의 양을 정량화하는 단계가:

표준 곡선을 사용하는 단계; 상기 핵산 표적의 상대적인 양을 측정하는 단계; 종점 정량화를 사용하는 단계; 또는 상기 시그날이 배경 이상으로 검출될 수 있는 PCR 주기 수를 존재하는 표적의 양과 관련시킴으로써 상기 핵산 표적의 양을 측정하는 단계,

를 포함하는 방법.

청구항 136

5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 표적 핵산의 제1 채 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역의 부분에 대해 동일한 서열 영역; 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제1 세트를 포함하는 조성물.

청구항 137

제136항에 있어서,

5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 제2 표적 핵산의 제1 채 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역의 부분에 대해 동일한 서열; 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제2 세트를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 138

제136항에 있어서,

프로브의 제1 및 제2 세트가 구별가능한 리포터를 포함하고/하거나 구별가능한 융점을 지닌 헤어핀을 형성하는 조성물.

청구항 139

제137항에 있어서,

프로브의 적어도 4개의 세트를 포함하는 조성물.

청구항 140

제136항에 있어서,

리포터-표지된 또는 퀀처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 141

제136항에 있어서,

폴리머라제, 참고 프로브 또는 유리된 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 142

(a) 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역의 부분에 대해 동일한 서열 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제1 세트; 및

(b) 리포터-표지된 비-천연 뉴클레오타이드; 퀀처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드; 또는 엔도리보뉴클레아제 효소

를 포함하는 키트.

청구항 143

제142항에 있어서,

프로브의 적어도 4개의 세트를 포함하는 키트.

청구항 144

제143항에 있어서,

프로브의 상기 세트가 구별가능한 리포터를 포함하고/하거나 구별가능한 융점을 지닌 헤어핀을 형성하는 키트.

청구항 145

제142항에 있어서,

폴리머라제, 참고 프로브, 유리된 뉴클레오타이드, 참고 샘플, 또는 키트의 사용을 위한 지시사항을 추가로 포함하는 키트.

청구항 146

(a) 샘플을 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍으로 표지된 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브와 접촉시키는 단계;

(b) 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써, 표적 핵산과 하이브리드화되는 절단가능한 프로브를 절단시켜 트렁케이트된 프로브를 형성시키는 단계;

- (c) 트렁케이트된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계;
- (d) 트렁케이트된 헤어핀 프로브를 제1 서열 영역 상에 연장시켜서 형광단 및 퀀처가 물리적으로 분리되도록 하는 단계; 및
- (e) 리포터로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출함으로써 표적 핵산을 검출하는 검출하는 단계, 를 포함하는, 표적 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 147

제146항에 있어서,

리포터-퀀처 쌍의 하나의 구성원이 절단가능한 프로브의 5' 말단에 존재하는 방법.

청구항 148

제146항에 있어서,

- (a) 샘플을 적어도 제2 절단가능한 프로브와 접촉시키는 단계로, 상기 프로브가 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍을 포함하는 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 제2(또는 추가)의 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는, 단계; (b) 상기 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써, 표적 핵산과 하이브리드화되는 프로브를 절단시켜 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계; (c) 트렁케이트된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계; (d) 상기 헤어핀 프로브를 상기 제1 서열 영역 상에 연장시키는 단계; 및 (e) 상기 리포터로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출함으로써 제2 표적 핵산을 검출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 149

제148항에 있어서,

- 제1 및 제2 절단가능한 프로브의 절단 및 연장 후 제1 절단가능한 프로브 및 제2 절단가능한 프로브가 (i) 동일한 리포터를 갖고; (2) 상이한 용융 온도(T_m)를 갖는 방법.

청구항 150

- (a) 샘플을, 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 서열을 포함하는 제1 절단가능한 프로브와 접촉시키는 단계;
- (b) 절단가능한 프로브 및 상부 프라이머를 표적 핵산에 하이브리드화시키고 5' 뉴클레아제 활성을 지닌 폴리머라제를 사용하여 연장을 수행하는 단계;
- (c) 절단가능한 헤어핀 프로브가 뉴클레아제 활성을 지닌 폴리머라제와 접촉할 때까지 핵산 서열을 연장시킴으로써, 표적 핵산과 하이브리드화되는 프로브를 절단시켜 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계;
- (d) 트렁케이트된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계;
- (e) 헤어핀 프로브를 제1 서열 영역의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 염기-쌍화할 수 있는 리포터-퀀처 쌍의 제2 구성원으로 표지된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에서 연장시키는 단계; 및
- (f) 헤어핀 프로브 상의 표지로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출함으로써 표적 핵산을 검출하는 단계, 를 포함하는, 표적 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 151

제150항에 있어서,

헤어핀 프로브 상에서 용융 분석을 수행하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 152

- (a) 샘플을 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍으로 표지된 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보적인 서열을 포함하는 제1 절단가능한 헤어핀 프로브와 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 절단가능한 프로브 및 상부 프라이머를 표적 핵산에 하이브리드화하고, 5' 뉴클레아제 활성을 지닌 폴리머라제를 사용하여 연장을 수행하는 단계;
- (c) 상기 절단가능한 헤어핀 프로브가 뉴클레아제 활성을 지닌 폴리머라제와 접촉할 때까지 핵산 서열을 연장시킴으로써, 표적 핵산과 하이브리드화되는 프로브를 절단하여 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계;
- (d) 상기 절단된 프로브가 자체로 하이브리드화하여 절단된 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계;
- (e) 상기 절단된 헤어핀 프로브를 자체 상에서 연장시켜 형광단 및 퀀처가 물리적으로 분리되도록 하는 단계; 및
- (f) 상기 연장된 헤어핀 프로브로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출함으로써 표적 핵산을 검출하는 단계, 를 포함하는, 표적 핵산의 존재를 검출하기 위한 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 전후 참조

[0002] 본 출원은 2014년 8월 11일자로 출원된 미국 가특허원 제62/035,783호의 이익을 청구하며, 이의 전문은 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 서열 목록의 도입

[0004] 8KB (Microsoft Windows[®]에서 측정됨)이고 2015년 8월 11일자로 생성된 파일명 "LUMNP0129W0_ST25.txt" 속에 포함된 서열 목록은 전자 제출에 의해 본원과 함께 출원되며 본원에 참고로 포함된다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 발명은 일반적으로 분자 생물학 분야에 관한 것이다. 보다 특히, 이는 핵산의 검출에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 관련 기술의 설명

[0008] 폴리머라제 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction: PCR)은 살아있는 유기체를 사용하지 않고 효소적으로 복제하는 DNA에 대한 분자 생물학 기술이다. PCR은 유전병의 검출, 유전자 지문(genetic fingerprint)의 확인, 감염성 질병의 진단, 유전자의 클로닝(cloning), 친부확인 시험, 및 DNA 연산과 같은 다양한 업무를 위한 의학적 및 생물학적 연구에 일반적으로 사용된다. PCR은 이의 확대된 증폭 및 정밀한 능력으로 인하여 핵산 검출을 위한 선택 방법으로써 분자 생물학자에 의해 채택되어 왔다. DNA 검출은 종-점(end-point)에서, 또는 PCR 반응의 고조기(plateau phase)에서 전형적으로 수행되어, 출발하는 주형을 정량화하기 어렵다. 실시간 PCR 또는 역학적 PCR은 반응이 진행됨에 따라서 앰플리콘 농도를 기록함으로써 종-점 PCR 분석의 능력을 진전시킨다. 앰플리콘 농도는 증폭된 표적과 연관된 형광성 시그널 변화를 통해 가장 흔히 기록된다. 또한, 실시간 PCR은 밀폐된 시스템 속에서 수행될 수 있기 때문에 오염이 제한된다는 점에서, 종-점 검출에서 유리하다. 다른 장점으로, 보다 큰 민감성, 역동 범위(dynamic range), 속도, 및 보다 적은 요구되는 공정들이 포함된다.

[0009] 수개의 검정 화학(assay chemistries)이 실시간 PCR 검출법에서 사용되어 왔다. 이들 검정 화학은 이분쇄(double-stranded) DNA 결합 염료, 이중-표지된 올리고뉴클레오타이드, 예를 들면, 헤어핀 프라이머(hairpin primer), 및 헤어핀 프로브(hairpin probe)를 사용함을 포함한다. 그러나, 현재의 실시간 PCR의 단점은 이의 제한된 멀티플렉싱 능력이다. 현재의 실시간 PCR 기술은 용액 속에서 유리된 리포터 형광색소(fluorochrome)를 사용한다. 이러한 설계는 멀티플렉스 반응(multiplex reaction) 내에서 각각의 검정을 위한 스펙트럼적으로 명백한 형광색소의 사용이 필수적이다. 예를 들면, 4개의 표적 서열을 검출하기 위해 설계된 멀티플렉스 반응은 대조군을 포함하지 않는 스펙트럼 차등화에 의해 4개의 상이한 유리 부유 형광색소를 구별할 수 있는 장치를 필요

로 할 수 있다. 이들 요건은 실질적인 멀티플렉싱 능력을 제한할 뿐 아니라, 이러한 장치가 전형적으로 다수의 방출 공급원, 검출인자, 및 필터를 필요로 하기 때문에 비용을 증가시킨다. 현재의 실시간 PCR 기술은 약 1 내지 6개 플렉스(plex)의 멀티플렉싱 능력을 갖는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 DNA의 증폭 및 검출을 위한 시스템 및 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 구현에는 증폭된 표적 서열을 탈착시키는데 사용하기 위한 검출가능한 프로브의 멀티플렉싱 능력을 현저히 증가시키는 시스템 및 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 제1 구현예에서, (a) 샘플을, 5'로부터 3'까지, (i) 표지(label)를 포함하는 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열 영역; 및 (iv) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는, 절단가능한 프로브와 접촉시키는 단계; (b) 상기 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써 표적 핵산과 하이브리드화하는 프로브를 절단시켜 트렁케이티드(truncated) 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계; (c) 트렁케이티드 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브(hairpin probe)를 형성하도록 하는 단계; (d) 헤어핀 프로브를 연장시키는 단계; 및 (e) 표지로부터 시그널(signal)에 있어서의 변화를 검출함으로써 표적 핵산을 검출하는 단계를 포함하는, 표적 핵산의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 특정의 구현예에서, 제1 서열 영역 (i)내 표지는 리포터-퀀처 쌍(reporter-quencher pair)이고 제1 서열 영역 상의 헤어핀 프로브의 연장은 리포터와 퀀처 사이의 거리를 변화시키거나; 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드이고 제1 서열 영역상의 헤어핀 프로브의 연장은 리포터-퀀처 쌍의 제2 구성원으로 표지된 상보성의 비-천연 뉴클레오타이드의 혼입(incorporation)을 생성한다. 특정의 구현예에서, 제2 서열 영역(iii)의 역 상보체인 서열 모두, 이의 일부, 또는 어느 것도 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 헤어핀 프로브 상에서 용융 분석을 수행하는 단계를 추가로 포함한다.

[0012] 일 구현예에서, (a) 샘플을, 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원(member)으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브와 접촉시키는 단계; (b) 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써 표적 핵산과 하이브리드화하는 프로브를 절단시켜 트렁케이티드 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계; (c) 트렁케이티드 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계; (d) 제1 서열 영역의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 염기-쌍화를 이룰 수 있는 리포터-퀀처 쌍의 제2 구성원으로 표지된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에서 헤어핀 프로브를 연장시키는 단계; 및 (e) 절단가능한 프로브 및 헤어핀 프로브 상의 표지로부터의 시그널에 있어서의 변화를 검출함으로써 표적 핵산을 검출하는 단계를 포함하는, 표적 핵산의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 특정의 구현예에서, 제2 서열 영역 (iii)의 역 상보체인 서열의 일부는 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 헤어핀 프로브 상에서 용융 분석을 수행하는 단계를 추가로 포함한다.

[0013] 다른 구현예에서, (a) 샘플을, 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍으로 표지된 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브와 접촉시키는 단계; (b) 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써 표적 핵산과 하이브리드화하는 절단가능한 프로브를 절단시켜 트렁케이티드 프로브를 형성시키는 단계; (c) 트렁케이티드 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계; (d) 상기 헤어핀 프로브를 제1 서열 영역 상으로 연장시켜 리포터와 퀀처 사이의 거리가 증가되도록 하는 단계; 및 (e) 리포터로부터의 시그널에 있어서의 변화를 검출함으로써 표적 핵산을 검출하는 단계를 포함하는, 표적 핵산의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 특정의 구현예에서, 상기 리포터-퀀처 쌍의 하나의 구성원은 절단가능한 프로브의 5' 말단에 있다. 일부 구현예에서, 리포터-퀀처 쌍의 하나의 구성원은 제1 서열 영역의 5' 말단에 있고 리포터-퀀처 쌍의 다른 구성원은 제1 서열 영역의 3' 말단에 있다. 특정의 구현예에서, 리포터는 형광성 염료이다. 특정의 구현예에서, 제2 서열 영역 (iii)의 역 상보체인 서열 모두, 이의 일부, 또는 어느 것도 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성일 수 있다. 일부 구현예에서, 상

기 방법은 헤어핀 프로브 상에서 용융 분석을 수행하는 단계를 추가로 포함한다.

- [0014] 특정의 구현예에서, (a) 절단가능한 프로브는 (v) 제2 서열 영역과 제2 서열 영역의 역 상보성인 서열 사이에 하나 이상의 뉴클레오타이드의 루프 서열을 추가로 포함한다. 일부 국면에서, 상기 루프 서열은 길이가 4 내지 20개, 6 내지 15개 또는 10 내지 15개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 국면에서, 상기 루프 서열은 적어도 3 내지 5개의 연속된 A 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 루프 서열은 하나 이상의 폴리머라제 연장 차단 잔기(polymerase extension blocking moieties)를 포함한다. 특정의 국면에서, 루프 서열은 하나 이상의 뉴클레오타이드 및 하나 이상의 연장 차단 잔기의 조합을 포함할 수 있다. 폴리머라제 연장 차단 잔기는 루프 서열의 일부 또는 모두로서 사용할 수 있다. 연장 차단 잔기의 예는 탄소 스페이서(carbon spacer)를 포함한다. 탄소 스페이서는 길이가 3 내지 36개 탄소 원자일 수 있는 스페이서를 포함할 수 있다. 내부 올리고뉴클레오타이드 탄소 스페이서의 일반적인 예는 길이가 3, 9, 및 18개 탄소 원자인 스페이서를 포함한다. 탄소 스페이서를 사용하여 절단가능한 프로브가 비-특이적인 이분체 PCR 생성물을 형성하는 것을 방지할 수 있다. 또한, 탄소 스페이서를 사용하여 헤어핀 프로브의 용융 온도(T_m)를 조절할 수 있다. 다른 폴리머라제 연장 차단 잔기는 비-천연 뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 또는 임의의 다른 비-뉴클레오타이드 화학 잔기(moiety)를 포함할 수 있다.
- [0015] 특정의 국면에서, 제2 서열 영역은 길이가 6 내지 20개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 특정의 국면에서, 제2 서열 영역 상보체는 길이가 6 내지 20개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 특정의 국면에서, 제1 서열 영역은 길이가 4 내지 20개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 특정의 국면에서, 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대하여 상보성인 서열은 길이가 6 내지 50개, 10 내지 50개, 또는 6 내지 30개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 특정의 국면에서, 절단가능한 프로브의 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기는 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열(본원에서 제2 서열 영역 상보체로서 또한 언급함)의 바로 3'에 위치할 수 있다. 특정의 국면에서, 절단가능한 프로브의 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기는 표적 핵산의 제1 쇄의 첫번째 영역에 대해 상보성인 서열의 3' 말단으로부터 적어도 4개의 염기에 위치할 수 있다. 위에서 언급한 바와 같이, 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열 모두, 이의 일부, 또는 어느 것도 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성일 수 있다.
- [0016] 특정의 국면에서, 절단가능한 프로브는 표적 핵산 서열의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 1 내지 5개의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 일부 국면에서, 절단가능한 프로브는 표적 핵산 서열의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 3 내지 5개의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0017] 특정의 국면에서, 절단가능한 프로브는 리보염기(ribose)의 3' 및/또는 5' 및 달리는 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 프로브의 서열 내에 위치할 수 있는, 비-염기 쌍화 변형(non-base pairing modification)을 포함할 수 있다. 이들 변형은 표적 서열과 염기 쌍을 이루지 않는 천연 또는 비-천연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있거나, 탄소 스페이서 또는 다른 비-뉴클레오타이드 화학 잔기를 포함할 수 있다. 리보뉴클레오타이드의 상부 또는 하부에, 그러나, 표적 서열에 대해 달리 상보성인 프로브의 영역 내에서 비-염기 쌍화 변형을 위치시키는 것은 절단가능한 프로브의 특이성을 증진시킬 수 있다. 비-염기 쌍화 잔기는 리보뉴클레오타이드로부터 상부 또는 하부로 2 내지 20개의 뉴클레오타이드 사이에 위치할 수 있다. 특정의 국면에서, 비-염기 쌍화 잔기는 리보뉴클레오타이드의 상부 또는 하부의 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 5개, 또는 이의 임의의 범위의 뉴클레오타이드에 위치한다.
- [0018] 특정의 국면에서, 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드는 절단가능한 프로브의 5' 말단에 위치할 수 있다. 특정의 국면에서, 절단가능한 프로브는 3' 말단에서 연장-차단 변형을 포함할 수 있다. 특정의 국면에서, 절단가능한 프로브의 제2 서열 영역은 적어도 50%의 G/C 성분을 포함할 수 있다. 특정의 국면에서, 절단가능한 프로브의 제2 서열 영역은 길이가 6 내지 15개인 뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0019] 특정의 국면에서, 절단가능한 프로브의 제2 서열 영역은 하나 이상의 비-천연 염기를 포함할 수 있다. 특정의 국면에서, 엔도리보뉴클레아제 또는 5'-뉴클레아제 절단 후, 트렁케이트된 절단가능한 프로브 및 표적 핵산은 55°C 미만의 용점을 가질 수 있다.
- [0020] 특정의 국면에서, 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원은 리포터일 수 있다. 특정의 국면에서, 본 구현예에서 사용하기 위한 리포터는 형광단일 수 있다. 따라서, 일부 경우에, 시그널에 있어서의 변화는 형광성 시그널에 있어서의 감소일 수 있다. 특정의 국면에서, 표지로부터 시그널에 있어서의 변화를 검출하는 것은 리포터로부터의 시그널에 있어서의 변화(또는 변화율)를 검출하는 것, 예를 들면, 샘플의 온도가 변함에 따른, 시그널의 비퀀칭을 포

함할 수 있다. 일부 국면에서, 리포터로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 것은, 샘플의 온도가 헤어핀 프로브의 용점 이상으로 증가(또는 이하로 감소)하므로 리포터로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 것을 포함할 수 있다.

[0021] 특정의 국면에서, 절단가능한 프로브는 고체 지지체에 부착될 수 있다.

[0022] 구현예의 특정의 국면은 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드(iv)의 사용에 관한 것이다. 일부 국면에서, 비-천연 뉴클레오타이드는 이소염기(isobase), 예를 들면, 이소-구아닌(isoG) 또는 이소-시토신(isoC)이다. 특정의 국면에서, 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드 또는 퀀처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드는 isoG일 수 있고 다른 것은 isoC일 수 있다.

[0023] 추가의 국면에서, 상기 방법은 (a) 샘플을, 5'로부터 3' 까지 (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 제2(또는 추가의) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 제2(또는 추가)의 절단가능한 프로브와 접촉시키는 단계; (b) 상기 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써, 표적 핵산과 하이브리드화시켜 트렁케이팅된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계; (c) 트렁케이팅된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계; (d) 제1 서열 영역의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 염기-쌍화를 이룰 수 있는 리포터-퀀처 쌍의 제2 구성원으로 표지된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에서 헤어핀 프로브를 연장시키는 단계; 및 (e) 절단가능한 프로브 및 헤어핀 프로브 상의 표지로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출함으로써 제2(또는 추가)의 표적 핵산을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들면, 제1 및/또는 제2 표적 핵산의 존재를 검출하는 단계는 순차적으로 또는 필수적으로 동시에 수행될 수 있다. 여전히 추가의 국면에서, 제1 및 제2 프로브는 구별가능한 리포터를 포함할 수 있다. 다른 국면에서, 제1 및 제2 프로브는 동일한 리포터를 포함할 수 있으며, 일부 경우에, 제1 및 제2 프로브는 구별가능한 용점(예를 들면, 서로에 대해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30℃까지 상이한 용점, 또는 이들 내에서 유용가능한 어떠한 범위)을 갖는 헤어핀을 포함할 수 있다.

[0024] 여전히 추가의 국면에서, 상기 방법은 멀티플렉스 방법이며 (a) 샘플을, 5'로부터 3' 까지 (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 제3, 제4, 제5 또는 제6의 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 제3, 제4, 제5 또는 제6의 절단가능한 프로브와 접촉시키는 단계; (b) 상기 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써, 표적 핵산과 하이브리드화시켜 트렁케이팅된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계; (c) 트렁케이팅된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계; (d) 제1 서열 영역의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 염기-쌍화를 이룰 수 있는 리포터-퀀처 쌍의 제2 구성원으로 표지된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에서 헤어핀 프로브를 연장시키는 단계; 및 (e) 절단가능한 프로브 및 헤어핀 프로브 상의 표지로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출함으로써 제3, 제4, 제5 또는 제6의 표적 핵산을 검출하는 단계를 포함한다. 예를 들면, 제1 및/또는 제2 표적 핵산의 존재를 검출하는 단계는 순차적으로 또는 필수적으로 동시에 수행될 수 있다. 여전히 추가의 국면에서, 제1 및 제2 프로브는 구별가능한 리포터를 포함할 수 있다. 다른 국면에서, 제1 및 제2 프로브는 동일한 리포터를 포함할 수 있으며, 일부 경우에, 제1 및 제2 프로브에 의해 형성된 헤어핀 프로브는 구별가능한 용점(예를 들면, 서로에 대해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30℃까지 상이한 용점, 또는 이들 내에서 유용가능한 어떠한 범위)을 포함할 수 있다. 일 국면에서, 상기 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 및/또는 제6의 프로브 조사로 형성된 상기 헤어핀 프로브는 구별가능한 표지 또는 구별가능한 용점을 포함할 수 있다.

[0025] 다른 구현예에서, 상기 방법은 (a) 샘플을, 5'로부터 3' 까지 (i) 리포터-퀀처 쌍을 포함하는 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 제2(또는 추가)의 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 제2(또는 추가)의 절단가능한 프로브와 접촉시키는 단계; (b) 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써 표적 핵산과 하이브리드화되는 프로브를 절단시켜 트렁케이팅된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계; (c) 트렁케이팅된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계; (d) 헤어핀 프로브를 제1 서열 영역 상으로 연장시키는 단계; 및 (e) 리포터로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출함으로써 제2(또는 추가)의 표적 핵산을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들면, 제1 및/또는 제2 표적 핵산의

존재를 검출하는 것은 순차적으로 또는 필수적으로 동시에 수행될 수 있다. 여전히 추가의 국면에서, 제1 및 제2 프로브는 구별가능한 리포터를 포함할 수 있다. 다른 국면에서, 제1 및 제2 프로브는 구별가능한 융점(예를 들면, 서로에 대해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30℃, 또는 이들 내에서 유도가능한 어떠한 범위까지 상이한 용융 온도)을 지닌 헤어핀을 포함한다.

[0026] 여전히 추가의 국면에서, 상기 방법은 멀티플렉스 방법이며 (a) 샘플을 5'로부터 3' 까지 (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표시된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 제3, 제4, 제5 또는 제6의 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 제3, 제4, 제5 또는 제6의 절단가능한 프로브와 접촉시키는 단계; (b) 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써 표적 핵산과 하이브리드화되는 프로브를 절단시켜 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계; (c) 트렁케이트된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계; (d) 제1 서열 영역의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 염기-쌍화할 수 있는 리포터-퀀처 쌍의 제2 구성원으로 표시된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에서 헤어핀 프로브를 연장시키는 단계; 및 (e) 절단가능한 프로브 및 헤어핀 프로브 상의 표시로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출함으로써 제3, 제4, 제5 또는 제6의 표적 핵산을 검출하는 단계를 포함한다. 예를 들면, 제1 및/또는 제2 표적 핵산의 존재를 검출하는 것은 순차적으로 또는 필수적으로 동시에 수행될 수 있다. 여전히 추가의 국면에서, 제1 및 제2 프로브는 구별가능한 리포터를 포함할 수 있다. 다른 국면에서, 제1 및 제2 프로브는 동일한 리포터를 포함할 수 있으며, 일부 경우에, 제1 및 제2 프로브에 의해 형성된 헤어핀 프로브는 구별가능한 융점(예를 들면, 서로에 대해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30℃, 또는 이들 내에서 유도가능한 어떠한 범위까지 상이한 융점)을 포함할 수 있다. 일 국면에서, 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 및/또는 제6 프로브 각각에 의해 형성된 헤어핀 프로브는 구별가능한 표지 또는 구별가능한 융점을 포함할 수 있다.

[0027] 따라서, 일부 추가의 국면에서, 구현예에 따른 멀티플렉스 방법은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36개 이상의 명백한 프로브, 또는 이들 안에서 유도가능한 어떠한 범위의 사용을 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 프로브는 (1) 구별가능한 융점 또는 (2) 구별가능한 표지를 포함함으로써, 각각의 명백한 프로브로부터의 시그날이 개별적으로 구별될 수 있도록 한다. 일 국면에서, 제1, 제2, 제3, 제4, 제5 및/또는 제6의 절단가능한 프로브 각각은 동일한 제1 서열 영역, 제2 서열 영역 및/또는 제2 서열 영역과 당해 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열 사이에 동일한 루프 서열을 포함할 수 있다. 특정의 구현예에서, 루프 영역은 하나 이상의 폴리머라제 연장 차단 잔기를 포함할 수 있다.

[0028] 추가의 구현예에서, 5'로부터 3'까지, (i) 표지를 포함하는 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 적어도 제1 절단가능한 프로브를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정의 국면에서, 상기 '포함하는'은 리포터-표지되거나 퀀처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드를 추가로 포함할 수 있다. 특정의 구현예에서, 제1 서열 영역내 표지는 리포터-퀀처 쌍 또는 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표시된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드이다.

[0029] 일 구현예에서, 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표시된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는, 적어도 제1 절단가능한 프로브를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정의 국면에서, '포함하는'은 리포터-표지되거나 퀀처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드를 추가로 포함할 수 있다.

[0030] 일 구현예에서, 5'로부터 3'까지, (i) 형광단-퀀처 쌍으로 표시된 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 절단가능한 프로브를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0031] 특정의 국면에서, 조성물은 폴리머라제, 엔도리보뉴클레아제 효소, 참고 프로브 또는 유리된 뉴클레오타이드를 추가로 포함할 수 있다.

[0032] 특정의 국면에서, 절단가능한 프로브는 (v) 제2 서열 영역과 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열 사이에 하나 이

상의 뉴클레오타이드의 루프 서열을 추가로 포함할 수 있다. 일부 국면에서, 루프 서열은 길이가 4 내지 20개, 6 내지 15개 또는 10 내지 15개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 국면에서, 루프 서열은 적어도 3 내지 5개의 연속된 A 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 루프 서열은 하나 이상의 폴리머라제 연장 차단 잔기(polymerase extension blocking moieties)를 포함한다. 특정의 국면에서, 루프 서열은 하나 이상의 뉴클레오타이드 및 하나 이상의 연장 차단 잔기의 조합을 추가로 포함할 수 있다. 폴리머라제 연장 차단 잔기는 루프 서열의 일부 또는 모두로서 사용될 수 있다. 연장 차단 잔기의 예는 탄소 스페이서를 포함한다. 탄소 스페이서는 길이가 3 내지 36개 탄소 원자일 수 있는 스페이서를 포함할 수 있다. 내부 올리고뉴클레오타이드 탄소 스페이서의 일반적인 예는 길이가 3, 9, 및 18개 탄소 원자인 스페이서를 포함한다. 탄소 스페이서를 사용하여 절단가능한 프로브가 비-특이적인 이분쇄 PCR 생성물을 형성하는 것을 방지할 수 있다. 탄소 스페이서를 또한 사용하여 헤어핀 프로브의 용점(Tm)을 조절할 수 있다. 다른 폴리머라제 연장 차단 잔기는 비-천연 뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 또는 임의의 다른 비-뉴클레오타이드 화학 잔기를 포함할 수 있다.

[0033] 추가의 국면에서, 조성물은 상기 기술한 바와 같은 제2(또는 추가)의 절단가능한 프로브를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 상이한 프로브는 상이한 리포터 및/또는 상이한 용점을 가지는 것을 기준으로 구별가능할 수 있다. 예를 들면, 제2(또는 추가)의 프로브는 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표시된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 제2(또는 추가)의 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 특정의 국면에서, 제1 및 제2 프로브는 구별가능한 리포터를 포함할 수 있고/있거나 구별가능한 용점을 지닌 헤어핀을 형성할 수 있다. 특정의 국면에서, 절단가능한 프로브는 상기 논의한 바와 같은 (v) 루프 서열을 추가로 포함할 수 있다. 일부 국면에서, 조성물은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36개 이상의 프로브를 포함한다.

[0034] 일부 국면에서, 구현예의 방법은 다수의 폴리머라제 연쇄 반응 주기를 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 국면에서, 표지로부터 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계는 다수의 폴리머라제 연쇄 반응 주기를 수행하기 전, 동안 또는 후에 시그날을 검출하는 단계를 포함한다. 다른 국면에서, 표지로부터 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계는 다수의 폴리머라제 연쇄 반응 주기를 수행한 후에만 시그날을 검출하는 단계를 포함한다. 당해 국면에서, 상기 방법은 표지로부터의 검출된 시그날을 비-하ybrid화 프로브 상의 표지로부터의 참고 시그날에 대한 표지의 시그날의 예정된 비와 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0035] 일부 국면에서, 상기 구현예의 방법은 샘플에서 표적 핵산의 양을 정량화하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면, 샘플 속에서 표적 핵산의 양을 정량화하는 단계는: 표준 곡선을 사용하는 단계; 핵산 표적의 상대적인 양을 측정하는 단계; 종-점(end-point) 정량화를 사용하는 단계; 또는 시그날이 배경 이상으로 검출될 수 있는 PCR 주기 수를 존재하는 표적의 양과 관련시킴으로써 핵산 표적의 양을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0036] 추가의 구현예에서, 본원에 개시된 조성물 하나 이상을 포함하는 키트(kit)가 제공된다. 예를 들면, 일 구현예에서, (a) 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표시된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 제1 절단가능한 프로브; 및 (b) 리포터-표지된 비-천연 뉴클레오타이드; 퀀처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드; 또는 엔도리보뉴클레아제 효소를 포함하는 키트가 제공된다. 추가의 국면에서, 키트는 적어도 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 프로브를 포함한다. 일부 구현예에서, 프로브는 (v) 상기 논의한 바와 같은 루프 서열을 추가로 포함할 수 있다. 특정의 국면에서, 프로브는 구별가능한 리포터를 포함하거나 구별가능한 용점을 지닌 헤어핀 프로브를 형성할 수 있다. 일부 국면에서, 키트는 폴리머라제, 참고 프로브, 유리 뉴클레오타이드, 또는 키트의 사용을 위한 지시사항(instructions)을 추가로 포함할 수 있다.

[0037] 여전히 추가의 국면에서, (a) 샘플을, 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표시된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역과 동일하고 절단가능한 프로브로부터의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 동일한 적어도 하나의 표지되지 않은 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 프로브(capture probe)를 포함하는 프로브의 제1 세트와 접촉시키는 단계; (b) 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써 표적 핵산과 하이브리드화되는 프로브를 절단시켜 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단

계; (c) 트렁케이트된 절단가능한 프로브가 포획 프로브와 하이브리드화되도록 하는 단계; (d) 포획 프로브내의 적어도 하나의 표지되지 않은 비-천연 뉴클레오타이드와 염기-쌍화(base-pairing)를 이룰 수 있는 리포터-퀀처 쌍의 제2 구성원으로 표지된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에서 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 연장시켜서 연장된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계; (e) 연장된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계; 및 (f) 절단가능한 프로브 및 헤어핀 프로브 상의 표지로부터 시그널 내 변화를 검출함으로써 표적 핵산을 검출하는 단계를 포함하는, 표적 핵산의 존재를 검출하는 방법이 제공된다.

[0038] 추가의 국면에서, 상기 방법은 (a) 샘플을, 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 제2 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역과 동일하고 절단가능한 프로브로부터의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 동일한 적어도 하나의 표지되지 않은 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제2 세트와 접촉시키는 단계; (b) 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써 제2 표적 핵산과 하이브리드화되는 프로브를 절단시켜 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계; (c) 트렁케이트된 절단가능한 프로브가 포획 프로브와 하이브리드화되도록 하는 단계; (d) 포획 프로브내의 적어도 하나의 표지되지 않은 비-천연 뉴클레오타이드와 염기-쌍화할 수 있는 퀀처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에서 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 연장시키는 단계; (e) 연장된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계; 및 (f) 절단가능한 프로브 및 헤어핀 프로브 상의 표지로부터 시그널내 변화를 검출함으로써 표적 핵산을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0039] 특정의 국면에서, 절단가능한 프로브는 표적 핵산 서열의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 1 내지 5개의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 일부 국면에서, 절단가능한 프로브는 표적 핵산 서열의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 3 내지 5개의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함할 수 있다.

[0040] 여전히 추가의 국면에서, 상기 방법은 멀티플렉스 방법이고, (a) 샘플을, 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 제3, 제4, 제5 또는 제6의 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역과 동일하고 절단가능한 프로브로부터의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 동일한 적어도 하나의 표지되지 않은 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제3, 제4, 제5 또는 제6 세트와 접촉시키는 단계; (b) 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써, 제3, 제4, 제5 또는 제6의 표적 핵산과 하이브리드화하는 프로브를 절단시켜 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계; (c) 트렁케이트된 절단가능한 프로브가 포획 프로브와 하이브리드화되도록 하는 단계; (d) 포획 프로브내의 적어도 표지되지 않은 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 염기-쌍화할 수 있는 퀀처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에서 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 연장시켜서 연장된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계; (e) 연장된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계; 및 (f) 절단가능한 프로브 및 헤어핀 프로브 상의 표지로부터 시그널내 변화를 검출함으로써 제3, 제4, 제5 또는 제6의 표적 핵산을 검출하는 단계를 포함한다. 예를 들면, 제1 및/또는 제2 표적 핵산의 존재를 검출하는 것은 순차적으로 또는 필수적으로 동시에 수행될 수 있다. 여전히 추가의 국면에서, 프로브의 제1 및 제2 세트는 구별가능한 리포터를 포함할 수 있다. 다른 국면에서, 프로브의 제1 및 제2 세트는 동일한 리포터를 포함할 수 있으며, 일부 경우에, 제1 및 제2 프로브에 의해 형성된 헤어핀 프로브는 구별가능한 융점(예를 들면, 서로로부터 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30℃까지 상이한 융점, 또는 여기서 유도가능한 어떠한 범위)을 포함할 수 있다. 일 국면에서, 프로브의 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 및/또는 제6 세트 각각에 의해 형성된 헤어핀 프로브는 구별가능한 표지 또는 구별가능한 융점을 포함할 수 있다. 따라서, 일부 추가의 국면에서, 당해 구현예에 따르는 멀티플렉스 방법은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36개 이상의 별개의(distinct) 프로브의 세트를 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 프로브는 (1) 구별가능한 융점 또는 (2) 구별가능한 표지를 포함하여, 각각의 명백한 프로브로부터의 시그널이 개별적으로 구별될 수 있도록 한다.

- [0041] 특정의 국면에서, 절단가능한 프로브의 제2 서열 영역은 하나 이상의 비-천연 염기를 포함할 수 있다. 특정의 국면에서, 엔도리보뉴클레아제 절단 후, 트렁케이트된 절단가능한 프로브 및 표적 핵산은 55℃ 미만의 융점을 가질 수 있다.
- [0042] 특정의 국면에서, 리포터-퀵처 쌍의 제1 구성원은 예를 들면, 형광단과 같은 리포터일 수 있다. 일부 국면에서, 시그널에 있어서의 변화는 형광성 시그널에 있어서의 감소일 수 있다.
- [0043] 특정의 국면에서, 표지로부터 시그널에 있어서의 변화를 검출하는 단계는 샘플의 온도가 변함에 따른 리포터로부터의 시그널에 있어서의 변화를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 국면에서, 리포터로부터의 시그널에 있어서의 변화를 검출하는 것은 샘플의 온도가 헤어핀 프로브의 융점 이상으로 증가함에 따라 리포터로부터의 시그널에 있어서의 변화를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0044] 특정의 국면에서, 절단가능한 프로브 및/또는 포획 프로브는 고체 지지체에 부착될 수 있다.
- [0045] 추가의 구현예에서, 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀵처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역과 동일하고 절단가능한 프로브로부터의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 동일한 적어도 하나의 표지되지 않은 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제1 세트를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정의 국면에서, 상기 포함하는 것은 리포터-표지되거나 퀵처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드를 추가로 포함할 수 있다. 특정의 국면에서, 상기 조성물은 폴리머라제, 참고 프로브 또는 유리된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0046] 추가의 국면에서, 상기 조성물은, 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀵처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 제2 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역과 동일하고 절단가능한 프로브로부터의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 동일한 적어도 하나의 표지되지 않은 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제2 세트를 추가로 포함할 수 있다. 특정의 국면에서, 프로브의 제1 및 제2 세트는 구별가능한 리포터를 포함할 수 있고/있거나 구별가능한 융점을 지닌 헤어핀 프로브를 형성할 수 있다. 일부 국면에서, 상기 조성물은 프로브의 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36개 이상의 세트를 포함한다.
- [0047] 추가의 구현예에서, (a) 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀵처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; 및 (iii) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역과 동일하고 절단가능한 프로브로부터의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 동일한 적어도 하나의 표지되지 않은 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제1 세트; 및 (b) 리포터-표지된 비-천연 뉴클레오타이드; 퀵처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드; 또는 엔도리보뉴클레아제 효소를 포함하는 키트가 제공된다. 추가의 국면에서, 상기 키트는 프로브의 적어도 4개의 세트를 포함한다. 특정의 국면에서, 프로브의 세트는 구별가능한 리포터를 포함하거나 구별가능한 융점을 지닌 헤어핀 프로브를 형성할 수 있다. 일부 국면에서, 상기 키트는 폴리머라제, 참고 프로브, 유리된 뉴클레오타이드, 참고 샘플, 또는 키트의 사용을 위한 지시사항을 추가로 포함할 수 있다.
- [0048] 여전히 추가의 구현예에서, (a) 샘플을, 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀵처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역의 부분에 대해 동일한 서열 영역 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 절단가능한 프로브를 포함하는 프로브의 제1 세트와 접촉시키는 단계; (b) 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써, 표적 핵산과 하이브리드화되는 절단가능한 프로브를 절단시켜 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계; (c) 트렁케이트된 절단가능한 프로브가 포획 프로브와 하이브리드화되도록 하는 단계; (d) 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 연

장시켜서 연장된 프로브를 형성시키는 단계; (e) 연장된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계; (f) 헤어핀 프로브를 절단가능한 프로브의 5' 말단에서 적어도 하나의 표지된 비-천연 뉴클레오타이드와 염기-쌍화할 수 있는 리포터-퀀처 쌍의 제2 구성원으로 표지된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에 추가로 연장시키는 단계; 및 (g) 절단가능한 프로브 및 헤어핀 프로브 상의 표지로부터 시그널내 변화를 검출함으로써 표적 핵산을 검출하는 단계를 포함하는, 표적 핵산의 존재를 검출하는 방법이 제공된다.

[0049] 추가의 국면에서, 상기 방법은 (a) 샘플을, 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 제2 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역의 부분에 대해 동일한 서열 영역 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제2 세트와 접촉시키는 단계; (b) 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써, 표적 핵산과 하이브리드화되는 절단가능한 프로브를 절단시켜 트렁케이티드 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계; (c) 트렁케이티드 절단가능한 프로브가 포획 프로브와 하이브리드화되도록 하는 단계; (d) 트렁케이티드 절단가능한 프로브를 연장시켜서 연장된 프로브를 형성시키는 단계; (e) 연장된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계; (f) 헤어핀 프로브를 절단가능한 프로브의 5' 말단에서 적어도 하나의 표지된 비-천연 뉴클레오타이드와 염기-쌍화할 수 있는 리포터-퀀처 쌍의 제2 구성원으로 표지된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에 추가로 연장시키는 단계; 및 (g) 절단가능한 프로브 및 헤어핀 프로브 상의 표지로부터 시그널내 변화를 검출함으로써 제2 표적 핵산을 검출하는 단계를 포함한다.

[0050] 특정의 국면에서, 절단가능한 프로브는 표적 핵산 서열의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 1 내지 5개의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 일부 국면에서, 절단가능한 프로브는 표적 핵산 서열의 제1 쇄 상의 제1 영역에 상보성인 3 내지 5개의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함할 수 있다.

[0051] 여전히 추가의 국면에서, 상기 방법은 멀티플렉스 방법이며 (a) 샘플을 5'로부터 3' 까지 (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 제3, 제4, 제5 또는 제6의 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역의 부분에 대해 동일한 서열 영역 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 서열을 포하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제3, 제4, 제5 또는 제6 세트와 접촉시키는 단계; (b) 절단가능한 프로브를 엔도리보뉴클레아제와 접촉시킴으로써, 표적 핵산과 하이브리드화되는 절단가능한 프로브를 절단시켜 트렁케이티드 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계; (c) 트렁케이티드 절단가능한 프로브가 포획 프로브와 하이브리드화하도록 하는 단계; (d) 트렁케이티드 절단가능한 프로브를 연장시켜서 연장된 프로브를 형성시키는 단계; (e) 연장된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계; (f) 헤어핀 프로브를 절단가능한 프로브의 5' 말단에서 적어도 하나의 표지된 비-천연 뉴클레오타이드와 염기-쌍화할 수 있는 리포터-퀀처 쌍의 제2 구성원으로 표지된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에서 추가로 연장시키는 단계; 및 (g) 절단가능한 프로브 및 헤어핀 프로브 상의 표지로부터의 시그널에 있어서의 변화를 검출함으로써 제3, 제4, 제5 또는 제6의 표적 핵산을 검출하는 단계를 포함한다. 예를 들면, 제1, 제2 및/또는 추가의 표적 핵산의 존재를 검출하는 단계는 순차적으로 또는 필수적으로 동시에 수행될 수 있다. 여전히 추가의 국면에서, 프로브의 제1, 제2 및/또는 추가의 세트는 구별가능한 리포터를 포함할 수 있다. 다른 국면에서, 프로브의 제1, 제2 및/또는 추가의 세트는 동일한 리포터를 포함할 수 있으며, 일부 경우에, 제1 및 제2 프로브에 의해 형성된 헤어핀 프로브는 구별가능한 융점(예를 들면, 서로에 대해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30°C, 또는 이들 내에서 유도가능한 어떠한 범위까지 상이한 융점)을 포함할 수 있다. 일 국면에서, 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 및/또는 제6 프로브 세트 각각에 의해 형성된 헤어핀 프로브는 구별가능한 표지 또는 구별가능한 융점을 포함할 수 있다. 따라서, 일부 추가의 국면에서, 구현예에 따른 멀티플렉스 방법은 프로브의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36개 이상의 별개의 세트의 사용을 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 프로브는 (1) 구별가능한 융점 또는 (2) 구별가능한 표지를 포함하므로, 각각의 명백한 프로브로부터의 시그널은 개별적으로 구별될 수 있다.

[0052] 특정의 국면에서, 절단가능한 프로브의 제2 서열 영역은 하나 이상의 비-천연 염기를 포함할 수 있다. 특정의 국면에서, 엔도리보뉴클레아제 절단 후, 트렁케이티드 절단가능한 프로브 및 표적 핵산은 55°C 미만의 융점을

가질 수 있다.

- [0053] 특정의 국면에서, 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원은 예를 들면, 형광단과 같은 리포터일 수 있다. 일부 국면에서, 시그날에 있어서의 변화는 형광성 시그날에 있어서의 감소일 수 있다.
- [0054] 특정의 국면에서, 표지로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계는 샘플의 온도가 변함에 따른 리포터로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 국면에서, 리포터로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계는 샘플의 온도가 헤어핀 프로브의 융점 이상으로 증가함에 따라 리포터로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0055] 특정의 국면에서, 절단가능한 프로브 및/또는 포획 프로브는 고체 지지체에 부착될 수 있다.
- [0056] 추가의 구현예에서, 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역의 부분에 대해 동일한 서열 영역; 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제1 세트를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정의 국면에서, 상기 포함하는 것은 리포터-표지되거나 퀀처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드를 추가로 포함할 수 있다. 특정의 국면에서, 상기 조성물은 폴리머라제, 참고 프로브 또는 유리된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0057] 추가의 국면에서, 상기 조성물은 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 제2 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역의 부분과 동일한 서열; 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제2 세트를 추가로 포함할 수 있다. 특정의 국면에서, 프로브의 제1 및 제2 세트는 구별가능한 리포터를 포함하고/하거나 구별가능한 융점을 지닌 헤어핀 프로브를 형성할 수 있다. 일부 국면에서, 상기 조성물은 프로브의 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36개 이상의 세트를 포함한다.
- [0058] 추가의 구현예에서, (a) 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역; (ii) 포획 서열; 및 (iii) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 서열을 포함하는 절단가능한 프로브; 및 5'로부터 3'까지, (i) 절단가능한 프로브로부터의 서열 영역의 부분과 동일한 서열 및 (ii) 절단가능한 프로브의 포획 서열에 대해 상보성인 서열을 포함하는 포획 프로브를 포함하는 프로브의 제1 세트; 및 (b) 리포터-표지된 비-천연 뉴클레오타이드; 퀀처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드; 또는 엔도리보뉴클레아제 효소를 포함하는 키트가 제공된다. 추가의 국면에서, 상기 키트는 프로브의 적어도 4개의 세트를 포함한다. 특정의 국면에서, 프로브의 세트는 구별가능한 리포터를 포함하거나 구별가능한 융점을 지닌 헤어핀 프로브를 형성할 수 있다. 일부 국면에서, 상기 키트는 폴리머라제, 참고 프로브, 유리된 뉴클레오타이드, 참고 샘플, 또는 키트의 사용을 위한 지시사항을 추가로 포함할 수 있다.
- [0059] 다른 구현예에서, (a) 샘플을, 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍의 제1 구성원으로 표지된 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 서열을 포함하는 제1 절단가능한 프로와 접촉시키는 단계; (b) 절단가능한 프로브 및 상부 프라이머를 표적 핵산과 하이브리드화시키고, 5' 뉴클레아제 활성을 지닌 폴리머라제를 사용하여 연장을 수행하는 단계; (c) 절단가능한 헤어핀 프로브가 뉴클레아제 활성을 지닌 폴리머라제와 접촉할 때까지 핵산 서열을 연장시킴으로써 표적 핵산과 하이브리드화되는 프로브를 절단시켜 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계; (d) 트렁케이트된 절단가능한 프로브가 자체로 하이브리드화하여 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계; (e) 헤어핀 프로브를 제1 서열 영역의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와 염기-쌍화할 수 있는 리포터-퀀처 쌍의 제2 구성원으로 표지된 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에서 연장시키는 단계; 및 (f) 헤어핀 프로브 상의 표지로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출함으로써 표적 핵산을 검출하는 단계를 포함하는, 표적 핵산의 존재를 검출하기 위한 방법이 제공된다. 특정의 국면에서, 제2 서열 영역 (iii)의 역 상보체인 서열의 일부는 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성일 수 있다. 특정의 구현예에서, 상기 방법은 헤어핀 프로브 상의 용융 분석을 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

다.

- [0060] 다른 국면에서, 상기 방법은 (a) 샘플을, 5'로부터 3'까지, (i) 리포터-퀀처 쌍으로 표지된 제1 서열 영역; (ii) 제2 서열 영역; (iii) 제2 서열 영역의 역 상보체인 서열; 및 (iv) 표적 핵산의 제1 쇄 상의 제1 영역에 대해 상보성인 서열을 포함하는 제1 절단가능한 헤어핀 프로브와 접촉시키는 단계; (b) 절단가능한 프로브 및 상부 프라이머를 표적 핵산에 하이브리드화하고, 5' 뉴클레아제 활성을 지닌 폴리머라제를 사용하여 연장을 수행하는 단계; (c) 절단가능한 헤어핀 프로브가 뉴클레아제 활성을 지닌 폴리머라제와 접촉할 때까지 핵산 서열을 연장시킴으로써, 표적 핵산과 하이브리드화되는 프로브를 절단하여 트렁케이트된 절단가능한 프로브를 형성시키는 단계; (d) 트렁케이트된 프로브가 자체로 하이브리드화하여 절단된 헤어핀 프로브를 형성하도록 하는 단계; (e) 절단된 헤어핀 프로브를 자체 상에서 연장시켜 형광단 및 퀀처가 물리적으로 분리되도록 하는 단계; (f) 연장된 헤어핀 프로브로부터 시그날내의 변화를 검출함으로써 표적 핵산을 검출하는 단계를 포함하는, 표적 핵산의 존재를 검출하기 위한 방법이 제공된다.
- [0061] 구현예의 특정한 국면은 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드의 용도에 관한 것이다. 일부 국면에서, 비-천연 뉴클레오타이드는 이소-구아닌(isoG) 또는 이소-시토신(isoC)과 같은 이소염기이다. 당해 국면에서, 퀀처-표지된 비-천연 뉴클레오타이드는 동족 이소C(또는 이소G)이다. 여전히 추가의 국면에서, 제1 및/또는 제2 프라이머 중 적어도 하나는 표적-특이적인 서열내에 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함한다. 예를 들면, 일부 국면에서, 표적-특이적인 서열내 비-천연 뉴클레오타이드는 서열-특이적인 어닐링(annealing)을 조절함으로써 뉴클레오타이드의 서열-특이적인 증폭을 위한 프라이머-주형 하이브리드화를 향상시킨다(참고: 예를 들면, 본원에 참고로 포함된 PCT 공보 제WO/2011/050278호).
- [0062] 본원에 개시된 바와 같은 절단가능한 프로브의 절단 및 연장은, 절단가능한 프로브가 절단되어 연장되는 한편 반응 조건이 실질적으로 일정한 온도에서 유지되는 등온 조건하에서 수행될 수 있다. 시그날의 등온 증폭은 절단된 프로브의 단편 둘 다가 절단 전에 표적에 대한 프로브보다 더 낮은 용점을 지니기 때문에 달성될 수 있다. 이는 2개의 단편이 표적으로부터 연관되지 않아서 또 다른 프로브가 하이브리드화하고 절단되도록 한다. 당해 공정은 자체로 반복하여 다수의 프로브가 절단되어 일정 온도에서 단일의 표적으로부터 연장되도록 한다. 이러한 특성은 용융 분석에 의해 밀폐된 튜브 멀티플렉스된 검출과 관련된 다른 방법과 비교하여 독특하며, 이는 5'-뉴클레아제 활성에 의존하여 독특한 용융 신호를 수득하며, 이는 표적 또는 애플리콘의 시그날을 등온적으로 증폭시킬 수 없다. 그렇지 않으면, 본원에 개시된 바와 같은 절단가능한 프로브의 절단 및 연장은 PCR의 사이클링 온도 조건하에서와 같은, 비-등온 조건하에서 수행될 수 있다.
- [0063] 일부 국면에서, 구현예의 방법은 표적 서열을 증폭시키기 위한 증폭 단계를 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 절단가능한 프로브의 절단 및 연장은 증폭 공정 동안 또는 이에 후속하여 수행될 수 있다. 예를 들면, 증폭은 등온 증폭 또는 하나 이상의 폴리머라제 연쇄 반응 주기일 수 있다. 등온 증폭 기술은 예를 들면, 쇄 치환 증폭(SDA), 루프-매개된 증폭(LAMP), 롤링 환 증폭(RCA), 및 헬리카제-의존성 증폭(HAD)을 포함한다(참고: 예를 들면, Yan *et al.*, 2014). 일부 국면에서, 표지로부터 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계는 등온 증폭 또는 다수의 폴리머라제 연쇄 반응 주기를 수행하기 전, 동안, 또는 후에 시그날을 검출하는 단계를 포함한다. 다른 국면에서, 표지로부터 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계는 등온 증폭 또는 다수의 폴리머라제 연쇄 반응 주기를 수행한 후에만 시그날을 검출하는 단계를 포함한다. 당해 국면에서, 상기 방법은 표지로부터의 검출된 시그날을 비-하이브리드화 프로브에서 표지로부터의 참고 시그날에 대한 표지의 시그날의 예정된 비와 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0064] 일부 국면에서, 상기 구현예의 방법은 샘플에서 표적 핵산의 양을 정량화하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면, 샘플 속에서 표적 핵산의 양을 정량화하는 단계는 디지털 PCR을 사용하거나; 표준 곡선을 사용하거나; 핵산 표적의 상대적인 양을 측정하거나; 종점 정량화를 사용하거나; 시그날이 배경 이상으로 검출가능한 PCR 주기 수를 존재하는 표적의 양과 관련시킴으로써 핵산 표적의 양을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0065] 본 방법의 다양한 국면에서, 리포터로부터의 시그날에 있어서의 변화를 검출하는 단계는 샘플의 온도가 변함에 따른 시그날의 비퀀칭(unquenching)과 같이, 시그날내 변화(또는 변화율)를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 일 국면에서, 샘플의 온도는 샘플 속의 하나 이상의 프라이머의 헤어핀의 용점 이상으로 증가(또는 이하로 감소)될 수 있다. 2개 이상의 프라이머 세트가 존재하는 경우에, 샘플의 온도를 변화시키는 단계는 프라이머의 제1 및 제2 세트 내 제1 프라이머 둘 다의 헤어핀의 용점 이하인 온도로부터 헤어핀 둘 다의 용점 이상인 온도로 증가시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0066] 다양한 국면에서, 구현예의 프로브는 동일한 리포터를 포함할 수 있고 구별가능한 용점(예를 들면, 서로에 대해

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30℃, 또는 여기서 유도가능한 어떠한 범위까지 상이한 융점)을 지닌 헤어핀을 포함할 수 있다.

[0067] 추가의 다양한 국면에서, 구현예에 따른 멀티플렉스 방법은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36개 이상의 명백한 프로브의 세트의 사용을 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 프로브 또는 프로브 세트는 (1) 구별가능한 융점을 지닌 헤어핀 또는 (2) 구별가능한 리포터를 포함함으로써, 각각의 명백한 프로브 또는 프로브 세트로부터의 시그날이 개별적으로 식별될 수 있도록 한다.

[0068] 추가의 구현예에서, 구현예의 하나 이상의 프로브 또는 프로브 세트를 포함하는 키트가 제공된다. 추가의 국면에서, 상기 키트는 엑소뉴클레아제 활성을 지닌 폴리머라제, 엔도리보뉴클레아제(예를 들면, RNase H), 참고 프로브, 유리된 뉴클레오타이드, 유리된 비-천연 뉴클레오타이드, 참고 샘플 및/또는 키트의 사용을 위한 지시사항을 추가로 포함한다.

[0069] 본원에 사용된 것으로서, 고체 지지체는 자기 특성을 지닌 비드(bead) 및/또는 용액 속에서 2차원 표면상 이들이 놓일 수 있도록 하는 밀도를 지닌 비드일 수 있다. 입자는 자기, 중력, 또는 이온력에 의해, 또는 화학 결합에 의해, 또는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 임의의 다른 수단에 의해 2차원 표면상에 일 방식으로 또는 달리 놓일 수 있다. 입자는 유리, 폴리스티렌, 라텍스, 금속, 양자 점(quantum dot), 중합체, 실리카, 금속 산화물, 세라믹, 또는 핵산, 또는 이후에 핵산에 부착될 수 있는 화학물질 또는 단백질에 결합시키는데 적합한 임의의 다른 물질로 이루어질 수 있다. 입자로 로드 형 또는 구형 또는 디스크 형일 수 있거나, 임의의 다른 형상을 포함할 수 있다. 입자는 또한 이들의 유형 또는 크기 또는 물리적 위치에 의해 구별될 수 있다. 입자는 염료 또는 하나 이상의 염료 또는 형광단의 비 또는 농도를 포함하는 조성물을 지님으로써 구체적으로 명백해질 수 있거나, 바코드 또는 홀로그래픽 영상 또는 입자 암호화의 다른 각인된 형태에 의해 구별될 수 있다. 입자가 자기 입자인 경우, 이들은 자기장의 적용에 의해 챔버(chamber)의 표면에 부착될 수 있다. 유사하게, 자기 입자는 자기장을 제거함으로써 챔버의 표면으로부터 분산될 수 있다. 자기 입자는 바람직하게는 상자성 또는 초상자성이다. 상자성 및 초상자성 입자는 자기장의 부재하에서 무시할 수 있는 자성을 가지지만, 자기장의 적용은 입자내 자기 도메인(domain)의 정렬을 유도하여 필드 공급원(field source)에 대해 입자를 유인할 수 있다. 장이 제거되는 경우, 자기 도메인은 무작위 배향으로 돌아와서 입자간 자기 유인 또는 반발은 없다. 초상자성화의 경우에, 도메인의 무작위 배향으로의 이의 되돌림은 거의 즉각적인 반면, 상자성 물질은 자기장의 제거 후 일부 기간 동안 도메인 정렬을 보유할 것이다. 입자가 충분한 밀도를 가지는 경우, 이들은 중력에 의해 챔버의 하단 표면에 유인될 수 있으며, 와동, 초음파, 또는 유체 운동에 의해서와 같은, 챔버의 교반에 의해 챔버의 하단 표면으로부터 분산될 수 있다. 챔버의 교반을 또한 사용하여 입자가 자기력 또는 이온력, 또는 흡입력, 또는 진공 여과, 또는 친화성, 또는 친수성 또는 소수성, 또는 이의 어떠한 조합과 같은 다른 힘에 의해 챔버의 표면에 유인되었던 방법 및 시스템에서 입자를 분산시키는데 있어서 추가로 보조할 수 있다.

[0070] 리포터 또는 표지화제는 이것이 부착된 분자(예를 들면, 핵산 서열)의 검출을 용이하게 하는 분자이다. 핵산을 표지하는데 사용될 수 있는 다수의 리포터 분자는 알려져 있다. 직접적인 리포터 분자는 형광단, 발색단, 및 방사선단(radiophore)을 포함한다. 형광단의 비-제한적 예는 적색 형광성 스쿠아린 염료, 예를 들면, 2,4-비스[1,3,3-트리메틸-2-인돌리닐리덴메틸]사이클로부텐디일리움-1,3-디옥솔레이트, 또는 적외선 염료, 예를 들면, 2,4-비스[3,3-디메틸-2-(1H-벤즈[e]인돌리닐리덴메틸)]사이클로부텐디일리움-1,3-디옥솔레이트, 또는 유기 형광성 스쿠아린 염료, 예를 들면, 2,4-비스[3,5-디메틸-2-피롤릴]사이클로부텐디일리움-1,3-디옥솔레이트를 포함한다. 형광단의 추가의 비-제한적 예는 양자점, Alexa Fluor™ 염료, AMCA, BODIPY™ 630/650, BODIPY™ 650/665, BODIPY™-FL, BODIPY™-R6G, BODIPY™-TMR, BODIPY™-TRX, Cascade Blue™, Cy2™, Cy3™, 및 Cy5™을 포함하나 이에 한정되지 않는 CyDye™, DNA 인터칼레이팅 염료(intercalating dye), 6-FAM™, 플루오레세인, HEX™, 6-JOE, Oregon Green™ 488, Oregon Green™ 500, Oregon Green™ 514, Pacific Blue™, REG, 피코에리트린 및 알로피코시아닌을 포함하나 이에 한정되지 않는 피코빌리단백질, Rhodamine Green™, Rhodamine Red™, ROX™, TAMRA™, TET™, 테트라메틸로다민, 또는 Texas Red™을 포함한다. 티라미드(PerkinElmer)와 같은 시그날 증폭 시약을 사용하여 형광성 시그날을 향상시킬 수 있다. 간접적인 리포터 분자는 바이오틴을 포함하며, 이는 검출용의 스트렙타비딘-피코에리트린과 같은 다른 분자에 결합하여야 한다. 형광 공명 에너지 전달 쌍 또는 염료-쿼터 쌍과 같은 표지의 쌍을 또한 사용할 수 있다.

[0071] 표지된 증폭 생성물은 직접적으로 또는 간접적으로 표지될 수 있다. 직접적인 표지화는 예를 들면, 표지된 프라

이머를 사용하거나, 표지된 dNTP를 사용하거나, 표지된 핵산 인터칼레이팅 제제를 사용하거나, 상기의 조합을 사용함으로써 달성할 수 있다. 간접적인 표지화는 예를 들면, 증폭 생성물에 표지된 프로브를 하이브리드화시킴으로써 달성할 수 있다.

[0072] 본원에 개시된 방법은 샘플에서 핵산 표적(들)의 초기 양을 정량화하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 정량화는 예를 들면, 대수 규모로 주기 수에 대해 형광성을 플롯팅함으로써 실시간 PCR의 대수기 동안 존재하는 DNA의 상대적인 농도를 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 이후에, DNA의 양은 상기 결과를 공지된 양의 DNA의 일련 희석물의 실시간 PCR에 의해 생산된 표준 곡선과 비교함으로써 측정할 수 있다. 추가로, 실시간 PCR을 역 전사 폴리머라제 연쇄 반응과 합하여 샘플 속에서 덜 풍부한 RNA를 포함하는 RNA를 정량화할 수 있다. 그렇지 않으면, 정량화는 디지털 PCR로 달성할 수 있다.

[0073] 표적 핵산 서열은 목적한 임의의 서열일 수 있다. 표적 핵산 서열을 함유하는 샘플은 핵산을 함유하는 임의의 샘플일 수 있다. 본 발명의 특징의 국면에서, 샘플은 예를 들면, 하나 이상의 유전적 변형 또는 다형성의 존재 또는 부재에 대해 스크리닝되는 대상체이다. 본 발명의 다른 구현예에서, 샘플은 병원체의 존재 또는 부재에 대해 시험되는 대상체로부터 기원할 수 있다. 샘플이 대상체로부터 취득되는 경우, 이는 흡입, 생검, 면봉(swabbing), 정맥천자, 요추 천자, 대변 샘플, 또는 뇨 샘플과 같이 당해 분야에서의 숙련자에게 공지된 방법에 의해 취득될 수 있다. 본 발명의 일부 국면에서, 샘플은 물, 토양, 또는 공기 샘플과 같은 환경적 샘플이다. 본 발명의 다른 국면에서, 샘플은 식물, 세균, 바이러스, 진균, 원생생물, 또는 후생동물로부터 기원할 수 있다.

[0074] 각각의 증폭 주기는 3개의 상을 갖는다: 변성 상, 프라이머 어닐링 상, 및 프라이머 연장 상. 증폭 주기는 바람직한 양의 증폭 생성물이 생산될 때까지 반복될 수 있다. 전형적으로, 증폭 주기는 약 10 내지 40배(times) 사이에서 반복된다. 실시간 PCR의 경우, 증폭 생성물의 검출은 전형적으로 각각의 증폭 주기 후 수행될 것이다. 본 발명의 특징의 국면에서, 증폭 생성물의 검출은 매 제2, 제3, 제4, 또는 제5의 증폭 주기 후에 수행될 수 있다. 검출은 또한 2회 이상의 증폭 주기가 분석되거나 검출되도록 수행될 수 있다. 증폭 주기는 증폭의 검출이 일어나는 동일한 체임버에서 수행될 수 있으며, 이 경우 당해 체임버는 가열 성분을 포함함으로써 체임버 내 온도가 증폭 주기의 변성 상, 프라이머 어닐링 상, 및 프라이머 연장 상에 대해 조절될 수 있다. 가열 성분은 전형적으로 프로세서의 조절하에 있을 수 있다. 그러나, 증폭 주기는 증폭의 검출이 일어나는 체임버와는 상이한 체임버 속에서 수행될 수 있으며, 이 경우, "증폭" 체임버는 가열 성분을 포함할 필요가 있으나 "검출" 또는 "영상" 체임버는 가열 성분을 가질 필요가 없을 수 있다. 증폭 및 검출이 별도의 체임버 속에서 일어나는 경우, 증폭 반응이 일어나는 유체는 예를 들면, 펌프 또는 피스톤에 의해 체임버 사이에서 이전될 수 있다. 펌프 또는 체임버는 프로세서의 조절하에 있을 수 있다. 그렇지 않으면, 유체는 예를 들면, 피펫을 사용하여 수동으로 체임버 사이에서 이전될 수 있다.

[0075] 증폭은 비-천연 뉴클레오타이드를 갖는 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 반응 혼합물 속에서 수행될 수 있다. 반응 혼합물의 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드는 제1 및/또는 제2 프라이머 세트의 프라이머 속에 존재하는 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드와의 염기쌍을 형성할 수 있다. 임의로, 비-천연 뉴클레오타이드는 형광단 및 퀀처를 포함할 수 있는 표지에 커플링된다. 퀀처는 제1 및/또는 제2 프라이머 세트의 프라이머 내에 존재하는 형광단을 퀀치할 수 있다.

[0076] 검출 단계는 집단의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 증폭시키는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들면, 검출 단계는 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드의 존재하에서 집단의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 증폭시키는 단계를 포함할 수 있다. 비-천연 뉴클레오타이드는 비-천연 뉴클레오타이드(예를 들면, 이소C 및 이소G)를 가질 수 있으며, 이는, 임의로 올리고뉴클레오타이드의 혼합물의 비-천연 뉴클레오타이드(예를 들면, 변성 올리고뉴클레오타이드 속에 존재하는 비-천연 뉴클레오타이드)와 염기-쌍화할 수 있다. 비-천연 뉴클레오타이드는 표지에 커플링될 수 있다. 적합한 표지는 형광단 및 퀀처를 포함한다.

[0077] 상기 방법을 사용하여 증폭 동안 순차적으로 또는 실시간으로 표적을 검출할 수 있다. 상기 방법은 정량적으로 사용될 수 있다.

[0078] 구현예의 특징의 국면은 엔도리보뉴클레아아제 효소 및 프로브가 DNA 표적 서열에 하이브리드화하는 경우 리보뉴클레오타이드(RNA) 위치를 갖는 프로브를 특이적으로 절단하기 위한 이러한 효소의 용도에 관한 것이다. 일부 국면에서, 엔도리보뉴클레아아제는 RNase H, 예를 들면, RNase HII이다. 특징의 구체적인 국면에서, 엔도리보뉴클레아아제는 열안정성 효소 또는 호열성, 핫스타트 효소(hotstart enzyme)(예를 들면, 열안정성 RNase HII 효소 및 호열성, 핫스타트 RNaseHII 효소)이다.

- [0079] 증폭은 하나 이상의 비-천연 뉴클레오타이드의 존재 및/또는 비-천연 뉴클레오타이드에 커플링된 적어도 하나의 퀀처의 존재하에서 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 퀀처에 커플링된 비-천연 뉴클레오타이드는 이소CTP 또는 이소GTP일 수 있다.
- [0080] 일부 방법에서, 제1 및 제2 표지는 상이할 수 있다. 일부 방법에서 제1 및 제2 퀀처는 상이할 수 있으며 2개의 상이한 형광단에 퀀칭될 수 있다. 다른 방법에서, 제1 및 제2 퀀처는 동일할 수 있고 2개의 상이한 형광단을 퀀칭할 수 있다.
- [0081] 본원에 기술된 방법은 앰플리콘(예를 들면, HIV의 증폭된 핵산 및 증폭된 대조군 핵산 중 적어도 하나의 증폭된 핵산)에 대한 용점을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 방법은 표적 핵산(이는 증폭된 표적 핵산을 포함할 수 있다)에 하이브리드화된 표지된 프로브를 포함하는 핵산 복합체에 대한 용점을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 용융 온도는 앰플리콘 또는 핵산 복합체를 온도의 구배에 노출시키고 표지로부터의 시그널을 관찰함으로써 측정할 수 있다. 임의로, 용융 온도는 (a) 앰플리콘을 온도의 구배에서 인터칼레이팅 제제(intercalating agent)와 반응시키는 단계 및 (b) 인터칼레이팅 제제로부터 검출가능한 시그널을 관찰하는 단계에 의해 측정할 수 있다. 핵산 복합체의 용융 온도는 (1) 프로브를 표적 핵산에 하이브리드화시켜 핵산 복합체를 형성시키는 단계(여기서, 프로브 및 표적 핵산 중의 적어도 하나는 표지를 포함한다); (2) 핵산 복합체를 온도 구배에 노출시키는 단계; 및 (3) 표지로부터 시그널을 관찰하는 단계에 의해 측정할 수 있다.
- [0082] 상기 방법은 임의의 적합한 조건 하 임의의 적합한 반응 챔버 속에서 수행할 수 있다. 예를 들면, 상기 방법은 반응 챔버를 열지 않고 반응 챔버 속에서 수행할 수 있다. 반응 챔버는 반응 챔버의 배열의 부분일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법의 단계들은 상이한 반응 챔버 속에서 별도로 수행될 수 있다.
- [0083] 본원에 개시된 방법은 소적(droplet) 내 수행될 수 있다. 유사하게, 본원에 개시된 조성물은 소적 내에 배치될 수 있다. 예를 들면, 본원에 개시된 절단가능한 프로브는 PCR 또는 소적을 사용하는 등은 증폭을 위한 많은 별도의 반응으로 분할될 수 있다. 따라서, 특정의 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 소적 속에 구획화시켜 정량적 디지털 PCR 반응, 또는 다른 정량적 디지털 증폭 반응을 수행할 수 있다. 문헌(참고: Vogelstein *et al.*, 1999, 9236-9241 페이지)에 기술된 바와 같이, 디지털 PCR 방법은 표적 핵산을 교란시켜 반응의 대부분이 1개 또는 0개의 표적 핵산 분자를 함유하도록 하는데 도움이 될 수 있다. 특정의 회색에서, 증폭 양성 반응의 수는 원래 존재하는 주형 분자의 수와 동일하다.
- [0084] 일부 구현예에서, 상기 방법은 샘플(예를 들면, 약 25 마이크로리터의 용적을 갖는 샘플) 속에서 표적 핵산의 약 100개 이하의 카피를 검출할 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 방법은 샘플(예를 들면, 약 25 마이크로리터의 용적을 갖는 샘플) 속에서 약 500개 카피, 1000개의 카피, 5000개의 카피, 또는 10,000개의 카피 이하를 검출할 수 있다.
- [0085] 다른 구현예에서, 상기 방법은 PCR의 약 150 주기 이하, PCR의 약 100 주기 이하, 약 90 주기 이하, 약 80 주기 이하, 약 70 주기 이하, 약 60 주기 이하, 약 50 주기 이하, 약 40 주기 이하, 또는 약 30주기 이하에서 실시간 검출을 사용하여 샘플(예를 들면, 약 25 마이크로리터의 용적을 갖는 샘플) 속에서 표적 핵산의 약 100개 카피 이하의 표적 핵산을 검출할 수 있다.
- [0086] 본원의 명세서에 사용된 것으로서, "단수(a, 또는 an)"는 하나 이상을 의미할 수 있다. 본원의 청구범위에 사용된 것으로서, 단어 "포함하는"과 함께 사용된 경우, 단어 "단수"는 하나보다는 하나 이상을 의미할 수 있다.
- [0087] 청구범위에 사용된 용어 "또는"의 용도는 기재내용이 단지 대안 및 "및/또는"을 언급하는 정의를 지지하지만, 대안만을 언급하기 위해 명쾌하게 나타내거나 대안이 상호 배타적이지 않다면 "및/또는"을 의미하는데 사용된다. 본원에 사용된 것으로서, "다른"은 적어도 제2 또는 그 이상을 의미할 수 있다.
- [0088] 본 명세서 전체에서, 용어 "약"은 장치, 값이 당해 값을 측정하는데 사용되는 방법, 또는 연구 대상체 중에 존재하는 변화에 대한 오차의 고유 변화를 포함함을 나타내기 위해 사용된다.
- [0089] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 장점은 다음의 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 상세한 설명 및 구체적인 실시예는, 본 발명의 바람직한 구현예를 나타내지만, 본 발명의 취지 및 영역 내 다양한 변화 및 변형이 당해 상세한 설명으로부터 당해 분야의 숙련가에게 명백해질 것이므로, 단지 예증의 방식으로 제공됨이 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0090]

다음의 도면은 본 명세서의 부분을 형성하며 본 발명의 추가의 국면을 추가로 증명하기 위해 포함된다. 본 발명은 본원에 나타난 구체적인 구현예의 상세한 설명과 함께 이들 도면중의 하나 이상을 참고함으로써 보다 잘 이해될 수 있다.

도 1a-b - 당해 구현예의 프로브 시스템을 나타내는 비제한적인 예시적인 개략도이다. 도 1a는 이의 5' 말단에서 리포터-표지된 이소G 뉴클레오타이드("이소G^{*}"), 제1 서열 영역("태그 A"), 제2 서열 영역("태그 B"), 루프 서열, 태그 B의 역 상보체인 서열 영역("태그 B 상보체"); 및 표적 앰플리콘에 대해 상보성인 서열("A"로 나타냄)을 포함한다. 절단가능한 프로브는 또한 "A" 서열내에 하나 이상의 리보뉴클레오타이드(실선 사각형으로 나타냄)를 포함하고 3' 말단 상에 연장을 차단하는 변형("P"로 나타냄)을 포함할 수 있다. 표적 앰플리콘의 존재 하에서 절단가능한 프로브는 앰플리콘에 하이브리드화되며 RNase H에 의해 리보뉴클레오타이드 위치에서 절단된다. 절단 후에, 프로브는 태그 B 및 태그 B 상보체 서열을 통해 자체로 하이브리드화하여 헤어핀을 형성할 수 있다. 프로브의 연장은 태그 A 서열에 대해 상보성인 서열을 합성할 것이며 퀀터 표지된 이소 C("이소C⁰")를 혼입할 것이다. 수득되는 헤어핀 프로브는 표지된 이소G의 형광성을 퀀칭한다. 도 1b, 프로브는 서열 및 서열 영역의 길이를 조절함에 의한 것과 같이, 독특한 용융 온도(T_m)를 가지도록 설계할 수 있다. 따라서, 용융 분석을 상이한 용융 온도를 갖는(및 따라서 상이한 온도에서 퀀칭되지 않는) 프로브를 차등화시킬 수 있다.

도 2 - 다양한 줄기(stem), 루프, T_m 및 델타 G를 지닌 구현예의 비-제한적인 예시적 프로브 컨스트럭트(construct). 당해 프로브는 도 1에서 상세하게 나타낸 바와 같이 설계하였다. 각각의 프로브의 서열이 나타나 있다(상부로부터 하부까지 나열된 SEQ ID NO: 1 내지 11). 태그 A 서열은 굵은 글씨체이며 줄기는 3개의 분절: 서열 특이적(B, 밀줄된 뉴클레오타이드), 공통 서열(C, 이탤릭체의 뉴클레오타이드) 및 형광단-표지된 이소염기로 끝나는 연장가능한 공통 서열(A, 굵은 글씨체의 뉴클레오타이드)로 구성된다.

도 3 - 구현예의 비-제한적이고 예시적인 표적-특이적인 프로브 설계(상부로부터 하부로 나열된 서열 번호 12 내지 21). 줄기의 3개의 분절은 도 2에 예증되어 있다.

도 4 - 그래프는 도 2에 나타낸 컨스트럭트의 헤어핀 폴딩을 평가하는데 사용된 온도 구배를 나타낸다.

도 5 - 그래프는 어닐링 온도가 단계적으로 강하됨에 따른 RTx-5 컨스트럭트에 대한 시간의 함수로서 형광성 퀀칭을 나타낸다(참고: 예를 들면, 도 4). 완전한 퀀칭은 71°C 온도 단계에 의해 관찰되었다.

도 6 - 그래프는 어닐링 온도가 단계적으로 강하함에 따른 RTx-10 컨스트럭트에 대한 시간의 함수로서 형광성 퀀칭을 나타낸다(참고: 예를 들면, 도 4). 완전한 퀀칭은 62°C 온도 단계에 의해 관찰되었다.

도 7 - 그래프는 어닐링 온도가 단계적으로 강하함에 따른 RTx-11 컨스트럭트에 대한 시간의 함수로서 형광성 퀀칭을 나타낸다(참고: 예를 들면, 도 4). 완전한 퀀칭은 41°C 온도 단계에 의해 관찰되었다.

도 8a 내지 도 8c - 그래프는 50°C, 62°C 및 68°C에서 컨스트럭트 RTx-1 및 RTx-2로부터 수득된 증폭(상부 패널) 및 용융 곡선(하부 패널)을 나타낸다.

도 9a 내지 도 9c - 그래프는 50°C, 62°C 및 68°C에서 컨스트럭트 RTx-7 및 RTx-8로부터 수득된 증폭(상부 패널) 및 용융 곡선(하부 패널)을 나타낸다.

도 10a 내지 도 10c - 그래프는 50°C, 62°C 및 68°C에서 컨스트럭트 RTx-9, RTx-10 및 RTx-11로부터 수득된 증폭(상부 패널) 및 용융 곡선(하부 패널)을 나타낸다.

도 11a 내지 도 11d - 그래프는 완전한 길이의 프로브 FL-RTx-2-20 (A), FL-RTx-2-12AT1 (B), FL-RTx-2c (C), 및 FL-RTx-2-12-AT-4 (D)의 증폭(상부 패널) 및 용융(하부 패널) 곡선을 나타낸다. 대조군; 물 = 얇은 실선, 임상적인 음성 표본 = 사선, 시험 프로브 결과는 굵은 실선으로 나타낸다.

도 12 - 구현예의 프로브 시스템을 나타내는 비-제한적인 예시적 도해. 리포터 프로브는 이의 5' 말단에서 리포터-표지된 이소C 뉴클레오타이드("이소soC^{*}"), 제1 서열 영역("영역 1"), 이소G 및/또는 이소C 위치를 포함하는 서열("이소프라이머"); 및 앰플리콘에 대해 상보성인 서열("A"로 나타냄)을 포함한다. 앰플리콘에 대해 상보성인 서열은 또한 적어도 하나의 리보뉴클레오타이드 위치를 포함한다. 표적 앰플리콘의 존재하에서 리포터 프로브는 앰플리콘에 하이브리드화하며 RNase H에 의해 리보뉴클레오타이드 위치에서 절단된다. 절단 후, 리포터 프로브는 포획 올리고뉴클레오타이드("포획 올리고")에 하이브리드화할 수 있으며, 이는 이소프라이머에 대해 상보성인 포획 단편 및, 임의로, "A" 서열에 이어서, 미러 태그 영역(mirror tag region) 및 3' 표지되지 않은 이

소C가 오는 부위를 포함한다. 리포터 프로브의 연장은 포획 올리고 상의 미리 영역 1에 대해 상보성인 서열을 합성할 것이며 퀀처 표지된 이소G("이소G⁰")를 포함할 것이다. 연장된 리포터 프로브는 이제 영역 1 및 영역 1 상보성 서열을 포함하며, 이는 프로브가 헤어핀을 형성하도록 함으로써 표지된 이소C의 형광성을 퀀칭한다. 프로브는 제1 서열 영역의 서열 및 길이를 조절함에 의한 것과 같이, 독특한 용융 온도(T_m)를 가지도록 설계될 수 있다. 따라서, 용융 분석을 수행하여 상이한 용융 온도를 갖는(및 따라서 상이한 온도에서 퀀칭되지 않는) 차등 프로브에 대해 수행될 수 있다.

도 13 - 용융 분석 동안 수득된 데이터의 역위된 유도체의 그래프.

도 14 - 동일한 형광단을 사용한 멀티플렉스 프로브에 대한 용융 프로파일 데이터.

도 15 - 프로브가 형광단("F") 및 퀀처("Q") 둘 다, 및 리보절단("R") 부위를 포함하는 구현예의 프로브 시스템을 나타내는 비-제한적인 예시적 개략도. 리보절단 부위에서 절단 후에, 연장은 형광단 및 퀀처의 분리를 생성하므로 시그널내 검출가능한 변화가 관찰될 수 있다.

도 16 - 프로브가 형광단("F") 및 퀀처("Q") 둘 다를 포함하는 구현예의 프로브 시스템을 나타내는 비-제한적인 예시적인 개략도. 5' 뉴클레아제 절단에 이은 연장은 형광단 및 퀀처의 분리를 초래하여 시그널내 검출가능한 변화가 관찰될 수 있도록 한다.

도 17 - 프로브가 제2 서열 영역과 제2 서열 영역(B 및 B')의 역 상보체인 서열(B 및 B') 사이에 위치한 하나 이상의 뉴클레오타이드의 루프 서열을 포함하는 구현예의 프로브 시스템을 나타내는 비-제한적인 예시적 개략도로서, 여기서 상기 루프 서열은 표적 핵산의 서열에 대해 상보성이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0091]

예시적인 구현예의 설명

[0092]

용융 분석 검정은 용융 또는 어닐 피크를 이용하여 앰플리콘 실체를 구별하지만, 이들 용융 피크는 동일한 온도 근처에서 용융하는 앰플리콘 내에서 용이하게 구별되지 않으며 표적의 천연 서열 조성물에 속한다. 독특한 용융 프로파일을 지닌 헤어핀 서열을 생성함으로써, 멀티플렉싱을 단일 색상 채널에서 달성함으로써 다수의 색상 채널과 훨씬 더 멀티플렉싱을 허용할 수 있다.

[0093]

샘플에서 핵산을 검출하기 위한 방법 및 키트가 개시되어 있다. 전형적으로, 상기 방법은 형광단으로부터 방출된 시그널과 같은 시그널을 검출하는 단계를 포함한다. 또한, 표적 핵산의 검출에 사용될 수 있는, 올리고뉴클레오타이드, 특히 프로브가 개시되어 있다. 구현예의 특수한 방법에서는 형광단 당 다수의 용융 곡선의 생성에 의해 멀티플렉싱을 촉진하는 연장가능한 프로브를 사용한다. 일부 경우에, 상기 프로브는 3'-말단에서 서열-특이적인 테일(tail) 및 형광단 표지된 이소염기에서 종결하는 5' 말단에서 연장가능한 공통 서열로 구성된다. 다른 프로브계 화합물은 달리, 서열 특이적인 분절은 표적 확인 및, 검출을 위한 헤어핀의 방출에 사용된다. 일부 국면에서, 헤어핀의 방출은 프로브의 서열 특이적인 테일이 주형에 하이브리드화하므로 생성된 RNA/DNA 하이브리드의 절단을 기준으로 한다. 따라서, 서열-특이적인 분절의 염기중 어느 것도 또는 단지 몇개(예를 들면, 3-4개)가 헤어핀 구조내에 포함되며, 이는 주로 표적 독립적인 서열로 구성된다. 헤어핀의 연장가능한 분절(segment)의 길이를 변화시키는 것은 다양한 크기를 가진 헤어핀을 생성시켜서 형광단 당 다수의 용융 곡선의 생성을 허용한다.

[0094]

I. 정의

[0095]

본원에 사용된 것으로서 "핵산"은 DNA 또는 RNA, 일본쇄(single stranded) 또는 이본쇄(double stranded), 및 이의 어떠한 화학적 변형을 의미한다. 변형은 전체로서 핵산 리간드 염기 또는 핵산 리간드에 대한 추가의 전하, 극성, 수소 결합, 정전기적 상호작용, 및 유출성(fluxionality)을 포함하는 다른 화학 그룹을 제공하는 것들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 변형은 2'-위치 당 변형, 5-위치 피리미딘 변형, 8-위치 푸린 변형, 엑소사이클릭 아민에서 변형, 4-티오우리딘의 치환, 5-브로모 또는 5-요오도-우라실의 치환, 골격 변형, 메틸화, 및 특별한 염기-쌍화 조합, 예를 들면, 이소염기를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 본원에 기술된 핵산은 표준 염기 아데닌(A), 시토신(C), 구아닌(G), 티민(T), 및 우라실(U) 뿐 아니라 비-표준 또는 비-천연 뉴클레오타이드도 포함한다. 수소-결합 염기 쌍을 형성하는 비-표준 또는 비-천연 뉴클레오타이드는 예를 들면, 미국 특허 제5,432,272호, 제5,965,364호, 제6,001,983호, 제6,037,120호, 및 제6,140,496호에 기술되어 있으며, 이들 모두는 본원에 참고로 포함되어 있다. "비-표준 뉴클레오타이드" 또는 "비-천연 뉴클레오타이드"

에 의해, 이는 올리고뉴클레오타이드내로 혼입되기 쉽고 수소 결합, 또는 소수성, 엔트로피, 또는 반 데르 바알스 상호작용(van der Waals interaction)에 의해 상보성의 비-표준 또는 비-천연 뉴클레오타이드와 염기-쌍화하여 염기 쌍을 형성하기 쉬운 A, G, C, T, 또는 U 이외의 염기를 의미한다. 일부 예는 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제6,037,120호에 예증된 바와 같은 이소-C/이소-G, K/X, K/P, H/J, 및 M/N의 염기 쌍 조합을 포함한다.

[0096] 이러한 비-표준 또는 비-천연 뉴클레오타이드 쌍의 수소 결합은 2개 또는 3개의 수소 결합이 쌍을 이룬 비-표준 또는 비-천연 뉴클레오타이드의 수소 결합 수용체와 수소 결합 공여체 사이에서 형성되는 천연 염기의 것과 유사하다. 천연 염기와 이들 비-표준 또는 비-천연 뉴클레오타이드 사이의 차이점들 중 하나는 수소 결합 수용체 및 수소 결합 공여체의 수 및 위치이다. 예를 들면, 시토신은 상보성 수용체/공여체/공여체 염기인 구아닌과의 공여체/수용체/수용체 염기로 고려될 수 있다. 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제6,037,120호에 예증된 바와 같이, 이소-C는 수용체/수용체/공여체 염기이며 이소-G는 상보성 공여체/공여체/수용체 염기이다.

[0097] 올리고뉴클레오타이드에서 사용하기 위한 다른 비-천연 뉴클레오타이드는 예를 들면, 이들 둘 다 본원에 참고로 포함된 Ren, *et al.*, 1996 및 McMinn *et al.*, 1999에 논의된 바와 같은, 나프탈렌, 페난트렌, 및 피렌 유도체를 포함한다. 이들 염기는 안정화를 위해 수소 결합을 이용하지 않지만 대신 소수성 또는 반 데르 바알스 상호작용에 의존하여 염기 쌍을 형성한다.

[0098] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "샘플"은 이의 최광의 의미로 사용된다. 샘플은 혈액(또는 혈장 또는 혈청과 같은 혈액의 분획), 림프, 점액, 눈물, 뇨, 및 타액을 포함하나, 이에 한정되지 않는 체 조직 또는 체액을 포함할 수 있다. 샘플은 세포, 염색체, 세포기관, 또는 바이러스로부터의 추출물을 포함할 수 있다. 샘플은 DNA(예를 들면, 게놈성 DNA), RNA(예를 들면, mRNA), 및/또는 cDNA를 포함할 수 있으며, 이들 중 어느 것도 증폭되어 증폭된 핵산을 제공할 수 있다. 샘플은 용액 속에서 핵산을 포함할 수 있거나 기질(예를 들면, 미세배열의 부분으로서)에 결합할 수 있다. 샘플은 환경적인 위치(예를 들면, 물 줄기, 토양 등)로부터 수득된 물질 또는 비생체 접촉 매개물(즉, 하나의 숙주로부터 다른 것으로 병원체를 전달하는 무생물 대상)로부터 수득된 물질을 포함할 수 있다.

[0099] 용어 "핵산 원(핵산의 공급원)"은 핵산(RNA 또는 DNA)을 함유하는 임의의 샘플도 언급한다. 표적 핵산의 특히 바람직한 공급원은 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 뇌 척수액, 흉수액, 우유, 림프, 가래, 및 정액을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0100] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "검출 한계"는 검출되고 정량화될 수 있는 핵산과 같은 분석물의 최저 수준 또는 양을 말한다. 검출 한계는 그래프 측정된 값(예를 들면, 구체적인 반응 조건하에서 예를 들면, 2.0 마이크로그램 한계), 카피 수(예를 들면, 검출의 1×10^5 개의 카피 수), 또는 당해 분야에 공지된 다른 대표치로서 물 값(예를 들면, 검출의 2.0nM 한계)를 나타낼 수 있다.

[0101] 본원에 사용된 것으로서, 핵산 분자를 참고하여 용어 "분리된"은 핵산 분자의 천연 공급원 속에 존재하는 유기체 및 생물학적 물질(예를 들면, 혈액, 세포, 혈청, 혈장, 타액, 뇨, 대변, 가래, 비인두 흡인물 등)로부터 분리되는 핵산 분자를 말한다. cDNA와 같은, 분리된 핵산 분자는 재조합 기술에 의해 생산되는 경우 다른 세포 물질 또는 배양 배지를 실질적으로 함유하지 않거나, 화학적으로 합성되는 경우 화학적 전구체 또는 다른 화합물을 실질적으로 함유하지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드/단백질을 암호화하는 핵산 분자가 또한 분리되거나 정제될 수 있다. 핵산 분리 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있으며 총 핵산 분리/정제 방법, RNA-특이적인 분리/정제 방법, 또는 DNA-특이적인 분리/정제 방법을 포함할 수 있다.

[0102] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "미세배열"은 기관 상의 다수의 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩타이드, 또는 다른 화학적 화합물의 정렬을 말한다. 용어 "성분" 및 "배열 성분"은 미세배열 상에 독특하고 정의된 위치를 갖는 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩타이드, 또는 다른 화학적 화합물을 말한다.

[0103] 본원에 사용된 것으로서, 올리고뉴클레오타이드는 정의된 간격에서 주로 동일한 단량체 단위로 구성된 골격 상의 염기의 서열을 갖는 분자로 이해된다. 염기는 이들이 올리고뉴클레오타이드의 염기에 대해 상보성인 염기의 서열을 갖는 핵산과 결합할 수 있는 방식으로 골격 상에 정렬된다. 가장 일반적인 올리고뉴클레오타이드는 당 포스페이트 단위의 골격을 갖는다. 차이는 2' 위치에서 하이드록실 그룹을 가지지 않는 "dNTP"로 제조된 올리고데옥시리보뉴클레오타이드와 2' 위치에 하이드록실 그룹을 갖는, "NTP"로 제조된 올리고뉴클레오타이드 사이에서 이루어질 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 또한 유도체를 포함할 수 있으며, 여기서 하이드록실 그룹의 수소는 유기 그룹, 예를 들면, 알릴 그룹으로 대체된다.

- [0104] 올리고뉴클레오타이드는 적어도 2개의 뉴클레오타이드를 포함하는 핵산이다. 본원에 개시된 방법에 사용된 올리고뉴클레오타이드는 적어도 약 10개의 뉴클레오타이드 및 보다 전형적으로 적어도 약 15개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 본원에 개시된 방법에 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 약 10 내지 25개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드는 "프라이머"로서 작용하도록 설계될 수 있다. "프라이머"는 짧은 핵산, 일반적으로 ssDNA 올리고뉴클레오타이드이며, 이는 상보성 염기-쌍화에 의해 표적 폴리뉴클레오타이드에 어닐링될 수 있다. 프라이머는 이후에 DNA 폴리머라제 효소와 같은 폴리머라제 효소에 의해 표적 DNA 또는 RNA 쉘을 따라 연장될 수 있다. 프라이머 쌍은 핵산 서열(예를 들면, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의해)의 증폭(및 확인)에 사용될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 "프로브"로서 작용하도록 설계될 수 있다. "프로브"는 올리고뉴클레오타이드, 이의 상보체, 또는 이의 단편을 말하며, 이는 동일하거나, 대립형질, 또는 관련된 핵산 서열을 검출하는데 사용된다. 프로브는 검출가능한 표지 또는 리포터 분자에 부착된 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 대표적인 표지는 형광성 염료, 퀀처, 방사활성 동위원소, 리간드, 신틸레이션 제제, 화학발광성 제제, 및 효소를 포함한다.
- [0105] 올리고뉴클레오타이드는 샘플 속의 표적 핵산 서열에 대해 특이적이 되도록 설계할 수 있다. 예를 들면, 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산의 "안티센스(antisense)" 핵산 서열을 포함하도록 설계될 수 있다. 본원에 사용된 것으로서, 용어 "안티센스"는 특이적인 표적 핵산 서열의 "센스"(암호화) 쉘과 염기-쌍화할 수 있는 어떠한 조성을 말한다. 안티센스 핵산 서열은 표적 핵산 서열에 대해 "상보성"일 수 있다. 본원에 사용된 것으로서, "상보성"은 염기-쌍화에 의해 어닐링되는 2개의 일본체 핵산 서열들 사이의 관계를 기술한다. 예를 들면, 5'-AGT-3'는 이의 상보체, 3'-TCA-5'와 쌍을 이룬다. 일부 구현예에서, 프라이머 또는 프로브는 다양한 위치에서 미스매치를 포함하도록 설계될 수 있다. 본원에 사용된 것으로서, "미스매치"는 표준 왓슨-크릭 염기쌍(Watson-Crick base pair)을 포함하지 않는 뉴클레오타이드 쌍, 또는 수소 결합을 우선적으로 형성하지 않는 뉴클레오타이드 쌍을 의미한다. 미스매치는 표적내 특수한 염기 또는 염기들로부터 교차하여 치환된 천연 뉴클레오타이드 또는 비-천연 또는 비-표준 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 프로브 또는 프라이머 서열 5'-AGT-3'는 표적 서열 3'-ACA-5'와의 단일 미스매치를 가진다. 프로브 또는 프라이머의 5' "A"는 표적의 3' "A"와 미스매치된다. 유사하게, 표적 서열 5'-AGA-3'는 프로브 또는 프라이머 서열 3'-(iC)CT-5'와 미스매치한다. 여기서, 이소-C는 천연의 "T" 대신에 치환된다. 그러나, 서열 3'-(iC)CT-5'는 서열 5'-(iG)GA-3'와 미스매치되지 않는다.
- [0106] 올리고뉴클레오타이드는 변성 올리고뉴클레오타이드로서 또한 설계될 수 있다. 본원에 사용된 것으로서, "변성 올리고뉴클레오타이드"는 서열 차이가 집단의 각각의 올리고뉴클레오타이드내 구체적인 위치에서 발생하는 상이한 서열의 혼합물을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 집단, 혼주물(pool), 또는 이들 다수를 포함함을 의미한다. 다양한 치환은 어떠한 천연 또는 비-천연 뉴클레오타이드도 포함할 수 있으며, 어떠한 제공된 위치에서 상이한 가능한 뉴클레오타이드의 어떠한 수도 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 변성 올리고뉴클레오타이드는 대신에 R = iC 또는 iG, 또는 R = A 또는 G 또는 T 또는 C 또는 iC 또는 iG를 포함할 수 있다.
- [0107] 본원에 사용된 것으로서, 올리고뉴클레오타이드는 상보성 염기 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드와 수소 결합을 형성할 수 있다. 이들 염기는 A, G, C, T, 및 U, 및 또한 인공의 비-표준 또는 비-천연 뉴클레오타이드, 예를 들면, 이소-시토신 및 이소-구아닌을 포함할 수 있다. 본원에 기술된 것으로서, 올리고뉴클레오타이드의 제1 서열은 제1 서열의 연속된 염기(5'에서 3'로 판독)가 제2 서열의 연속된 염기(3'에서 5'로 판독)와 비교하여 염기 쌍화의 왓슨-크릭 규칙을 따르는 경우 올리고뉴클레오타이드의 제2 서열과 100% 상보성인 것으로 기술된다. 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 치환을 포함할 수 있다. 예를 들면, 인공 염기를 천연 염기 대신에 사용하여 인공 염기가 천연 염기와 유사한 특이적인 상호작용을 나타내도록 할 수 있다.
- [0108] 표적 핵산에 대해 특이적인 올리고뉴클레오타이드는 또한 표적 핵산 서열에 대해 "동족성(homology)"을 갖는 핵산 서열에 대해 특이적일 수 있다. 본원에 사용된 것으로서, "동족성"은 2개 이상의 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 2개 이상의 폴리펩타이드 서열 사이에 서열 유사성 또는, 상호교환가능하게, 서열 동질성을 말한다. 폴리뉴클레오타이드 서열에 적용된 것으로서 용어 "동질성 퍼센트" 및 "동질성%"는 표준화된 알고리즘(예를 들면, BLAST)를 사용하여 정렬된 적어도 2개의 폴리뉴클레오타이드 서열 사이의 잔기 미스매치의 퍼센트를 말한다.
- [0109] 표적 핵산에 대해 특이적인 올리고뉴클레오타이드는 적합한 조건하에서 표적 핵산에 대해 "하이브리드화"할 것이다. 본원에 사용된 것으로서, "하이브리드화" 또는 "하이브리드화하는"은 올리고뉴클레오타이드 일본체가 정의된 하이브리드화 조건하에서 염기 쌍화를 통해 상보성 쉘과 어닐링하는 공정을 말한다. "특이적인 하이브리드화"는 2개의 핵산 서열이 높은 상보성 정도를 공유함을 나타낸다. 특이적인 하이브리드화 복합체는 관대한 어닐링 조건하에서 형성되며 어떠한 후속적인 세척 단계 후 하이브리드화되어 남는다. 핵산 서열의 어닐링을 위한

관대한 조건은 당해 분야의 통상의 기술자에 의해 정기적으로 측정가능하며 예를 들면, 약 6xSSC의 존재하에서 65℃에서 일어날 수 있다. 하이브리드화의 엄격성(stringency)은 부분적으로 세척 단계가 수행되는 온도를 참고로 나타낼 수 있다. 이러한 온도는 전형적으로 규정된 이온 강도 및 pH에서 특이적인 서열에 대해 열 융점(T_m)보다 낮은 약 5℃ 내지 20℃이도록 전형적으로 선택된다. T_m 은 표적 서열의 50%가 완전하게 매치된 프로브에 하이브리드화하는 온도(정의된 이온 강도 및 pH)이다. T_m , 예를 들어, 최근접 매개변수(nearest-neighbor parameter)를 계산하기 위한 방정식, 및 핵산 하이브리드화를 위한 조건은 당해 분야에 공지되어 있다.

[0110] 본원에 사용된 것으로서, "표적" 또는 "표적핵산"은 올리고뉴클레오타이드, 예를 들면, 프로브 또는 프라이머와 적어도 부분적으로 상보적인 서열을 함유하는 핵산 분자를 말한다.

[0111] 본원에 사용된 것으로서, "핵산", "뉴클레오타이드 서열", 또는 "핵산 서열"은 뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 폴리뉴클레오타이드, 또는 이의 어떠한 단편 및 천연적으로 발생하는 또는 합성 분자를 말한다. 이들 용어는 또한 게놈 또는 합성 기원의 DNA 또는 RNA를 말하며, 이는 일본체 또는 이본체일 수 있고 센스 또는 안티센스 체, 또는 어떠한 DNA-유사 또는 RNA-유사 물질을 나타낼 수 있다. DNA 서열을 참고로 "RNA 등가물"은 질소성 염기 티민의 모든 발생이 우라실로 대체되고, 당 골격이 데옥시리보스 대신에 리보스로 구성된다는 것을 제외하고는 참고 DNA 서열로서 뉴클레오타이드의 동일한 선형 서열로 구성된다. RNA는 본원에 기술된 방법에 사용될 수 있고/있거나 본원에 기술된 방법에서 사용하기 위해 역 전사에 의해 cDNA로 전환될 수 있다.

[0112] 본원에 사용된 것으로서, "증폭" 또는 "증폭하는"은 핵산 서열의 추가의 카피의 생산을 말한다. 증폭은 일반적으로 당해 분야에 공지된 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)을 사용하여 수행된다. 용어 "증폭 반응 시스템"은 핵산의 표적 서열의 카피를 증가시키기 위한 어떠한 시험관내(*in vitro*) 수단도 언급한다. 용어 "증폭 반응 혼합물"은 표적 핵산을 증폭시키는데 사용된 다양한 시약을 포함하는 수성 용액을 언급한다. 이들은 효소(예를 들면, 열안정성 폴리머라제), 수성 완충액, 염, 증폭 프라이머, 표적 핵산, 뉴클레오타이드 트리포스페이트, 및 임의로, 적어도 하나의 표지된 프로브 및/또는 임의로, 증폭된 표적 핵산의 용융 온도를 측정하기 위한 적어도 하나의 제제(예를 들면, 이본체 핵산의 존재하에서 형광성에 있어서의 변화를 나타내는 형광성 인터칼레이팅 제제)를 포함할 수 있다.

[0113] 본원에 기술된 증폭 방법은 "실시간 모니터링" 또는 "연속 모니터링"을 포함할 수 있다. 이들 용어는 PCR의 주기 동안에, 바람직하게는 온도 전이 동안에 다수의 회수를 모니터링하는 단계, 및 보다 바람직하게는 각각의 온도 전이시 적어도 하나의 데이터 점을 수득하는 단계를 말한다. 용어 "동종 검출 검정"은 커플링된 증폭 및 검출을 포함하는 검정을 기술하기 위해 사용되며, 이는 "실시간 모니터링" 또는 "연속된 모니터링"을 포함할 수 있다.

[0114] 핵산의 증폭은 핵산 또는 이들 핵산의 소영역의 증폭을 포함할 수 있다. 예를 들면, 증폭은 적절한 프라이머 서열을 선택하고 PCR을 사용함으로써 30 내지 50개, 50 내지 100개, 또는 100 내지 300개 염기 사이의 핵산의 부위를 증폭시키는 단계를 포함할 수 있다. 추가의 국면에서, 증폭은 등온 증폭 기술(즉, 열 사이클링을 필요로 하지 않음)을 사용하여 달성할 수 있다. 예를 들면, 등온 핵산 증폭, 예를 들면, 루프 매개된 등온 증폭(LAMP)을 위한 방법은 미국 특허 공보 제6,410,278호, 및 미국 특허 공보 제20080182312호에 제공되며, 이들 각각은 이의 전문이 본원에 참고로 포함되어 있다.

[0115] 개시된 방법은 샘플에서 적어도 하나 이상의 핵산을 증폭시키는 단계를 포함할 수 있다. 개시된 방법에서, 증폭은 실시간 방법을 사용하여 모니터링할 수 있다.

[0116] 증폭 혼합물은 천연의 뉴클레오타이드(A, C, G, T, 및 U 포함) 및 비-천연 또는 비-표준 뉴클레오타이드(예를 들면, iC 및 iG 포함)를 포함할 수 있다. DNA 및 RNA 올리고뉴클레오타이드는 포스포디에스테르 결합에 의해 각각 커플링된 데옥시리보스 또는 리보스를 포함한다. 각각의 데옥시리보스 또는 리보스는 당에 커플링된 염기를 포함한다. 천연적으로 존재하는 DNA 및 RNA에 포함된 염기는 아데노신(A), 구아노신(G), 티미딘(T), 시토신(C), 및 우라실(U)이다. 이들 5개의 염기는 "천연 염기"이다. 왓슨 및 크릭에 의해 정교하게 만들어진 염기 쌍화의 법칙에 따라서, 천연 염기는 하이브리드화하여 푸린-피리미딘 염기 쌍을 형성하며, 여기서 G는 C와 쌍을 이루고 A는 T 또는 U와 쌍을 이룬다. 이들 쌍화 규칙은 올리고뉴클레오타이드의 상보성 올리고뉴클레오타이드와의 특이적인 하이브리드화를 촉진한다.

[0117] 천연 염기에 의한 염기 쌍의 형성은 각각의 염기 쌍의 2개의 염기 사이의 2개 또는 3개의 수소 결합의 생성에 의해 촉진된다. 염기들 각각은 2개 또는 3개의 수소 결합 공여체(들) 및 수소 결합 수용체(들)를 포함한다. 염기 쌍의 수소 결합은 하나의 염기 상의 적어도 하나의 수소 결합 공여체와 다른 염기 상의 수소 결합 수용체의

상호작용에 의해 각각 형성된다. 수소 결합 공여체는 예를 들면, 적어도 하나의 부착된 수소를 갖는 헤테로원자(예를 들면, 산소 또는 질소)를 포함한다. 수소 결합 수용체는 예를 들면, 전자의 단독 쌍을 갖는 헤테로원자(예를 들면, 산소 또는 질소)를 포함한다.

[0118] 본원에 사용된 천연 또는 비-천연 뉴클레오타이드는 비-수소 결합 부위에서 치환에 의해 유도체화되어 변형된 천연 또는 비-천연 뉴클레오타이드를 형성할 수 있다. 예를 들면, 천연의 뉴클레오타이드는 반응성 작용 그룹(예를 들면, 티올, 하이드라진, 알코올, 아민 등)을 뉴클레오타이드의 비-수소 결합 원자에 커플링시킴으로써 지지체에 부착하기 위해 유도체화될 수 있다. 다른 가능한 치환은 예를 들면, 바이오틴, 디옥시게닌, 형광성 그룹, 알킬 그룹(예를 들면, 메틸 또는 에틸) 등을 포함한다.

[0119] 본원에 개시된 방법에 따른 비-천연 뉴클레오타이드의 용도는 샘플 속에 존재하는 핵산 서열의 검출 및 정량화를 증가하여 확장될 수 있다. 예를 들면, 비-천연 뉴클레오타이드는 핵산과 관련된 반응을 촉매하는 많은 효소에 의해 인식될 수 있다. 폴리머라제가 올리고뉴클레오타이드 쇄를 계속해서 중합시키고 연장시키기 위한 상보성 뉴클레오타이드를 필요로 하지만, 다른 효소는 상보성 뉴클레오타이드를 필요로 하지 않는다. 비-천연 뉴클레오타이드가 주형 속에 존재하고 이의 상보성의 비-천연 뉴클레오타이드가 반응 혼합물에 존재하지 않는 경우, 연장 프라이머를 비-천연 뉴클레오타이드를 지나 연장시키는 경우에 폴리머라제는 전형적으로 작동하지 않을 것이다(또는, 일부 예에서, 충분한 시간이 제공된 경우 염기를 잘못 혼입시킬 것이다). 그러나, 핵산과 관련된 반응을 촉매하는 다른 효소, 예를 들어, 리가제, 키나제, 뉴클레아제, 폴리머라제, 토포이소머라제, 헬리카제 등은 비-천연 뉴클레오타이드를 포함하는 반응을 촉매할 수 있다. 비-천연 뉴클레오타이드의 이러한 특징은 현재 개시된 방법 및 키트의 장점을 취할 수 있으며, 이의 영역내에 있다.

[0120] 비-천연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있는 본원에 개시된 뉴클레오타이드는 표지(예를 들면, 퀀처 또는 형광단)과 커플링될 수 있다. 커플링은 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 수행할 수 있다.

[0121] 본 방법의 올리고뉴클레오타이드는 프라이머로서 작용할 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 표지된다. 예를 들면, 올리고뉴클레오타이드는 검출가능한 시그널(예를 들면, 형광단)을 방출하는 리포터로 표지될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 비-천연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 올리고뉴클레오타이드는 A, C, G, T, 또는 U(예를 들면, iC 또는 iG)가 아닌 염기를 지닌 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드가 PCR을 위한 프라이머로서 사용되는 경우, 증폭 혼합물은 퀀처(예: 다브실(Dabcyl))로 표지되는 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 표지된 뉴클레오타이드는 적어도 하나의 비-천연 또는 비-표준 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 표지된 뉴클레오타이드는 A, C, G, T 또는 U(예를 들면, iC 또는 iG)가 아닌 염기를 갖는 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0122] 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 헤어핀과 같은 분자내 구조를 형성하지 않도록 설계될 수 있다. 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 헤어핀과 같은 분자내 구조를 형성하도록 설계될 수 있다. 예를 들면, 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드가 표적 핵산으로 하이브리드화되고, 임의로, 표적 핵산이 프라이머로서 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 증폭된 후 변경되는 헤어핀 구조를 형성하도록 설계될 수 있다.

[0123] 올리고뉴클레오타이드는 프라이머로서 증폭된 생성물 속에 혼입되는 경우 퀀칭을 나타내는 형광단으로 표지될 수 있다. 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드가 프라이머로서(예를 들면, 고유하게, 또는 형광성 유도 또는 형광성 탈퀀칭에 의해) 증폭된 생성물 속에 혼입된 후 검출가능한 시그널을 방출할 수 있다. 이러한 프라이머는 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들면, LightCyclerTM 프라이머, AmplifluorTM 프라이머, ScorpionTM 프라이머, 및 LuxTM 프라이머). 올리고뉴클레오타이드를 표지하는데 사용된 형광단은 이분체 핵산 속에 개재되는 경우 시그널을 방출할 수 있다. 이로써, 형광단은 올리고뉴클레오타이드가 핵산을 증폭하기 위한 프라이머로서 사용된 후 시그널을 방출할 수 있다.

[0124] 개시된 방법에 사용되는 올리고뉴클레오타이드는 샘플에서 적어도 하나의 핵산을 증폭시키기 위한 프라이머 및 샘플에서 적어도 하나의 핵산을 검출하기 위한 프로브로서 적합할 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 형광성 염료로 표지되며, 이는 검출가능한 시그널을 생산할 수 있다. 형광성 염료는 형광성 공명 에너지 전달(FRET)을 위한 형광성 공여체로서 작용할 수 있다. 검출가능한 시그널은 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 표적 핵산을 증폭시키는 경우에 퀀칭될 수 있다. 예를 들면, 증폭 혼합물은 형광단에 의해 방출된 검출가능한 시그널에 대한 퀀처로 표지된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 임의로, 올리고뉴클레오타이드는 제2 형광성 염료 또는 형광성 수용체(예를 들면, FRET에 대한 것)로서 작용할 수 있는 퀀처 염료로 표지될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드가 제1 형광성 염료 및 제2 형광성 염료로 표지되는 경우, 시그널은 제1 형광성

염료, 제2 형광성 염료, 또는 둘 다로부터 검출될 수 있다. 시그날은 온도의 구배(예를 들면, 앰플리콘, 표적 핵산에 하이브리드화된 프로브를 포함하는 복합체, 헤어핀, 또는 T 프로브 복합체에 대한 용융 온도를 측정하기 위하여)에서 검출될 수 있다.

[0125] 개시된 방법은 올리고뉴클레오타이드의 임의의 적합한 수를 사용하여서도 수행할 수 있다. 다수의 올리고뉴클레오타이드가 사용되는 경우(예를 들면, 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드), 상이한 올리고뉴클레오타이드가 검출 가능한 시그날을 생산할 수 있는 상이한 형광성 염료로 표시될 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 2개의 상이한 형광성 염료들 중 적어도 하나로 표시된다. 추가의 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 3개의 상이한 형광성 염료들 중 적어도 하나로 표시된다.

[0126] 일부 구현예에서, 각각의 상이한 형광성 염료는 올리고뉴클레오타이드를 표시하는데 사용된 상이한 형광성 염료들 중 임의의 다른 것에 의해 방출된 시그날로부터 구별될 수 있는 시그날을 방출한다. 예를 들면, 상이한 형광성 염료는 이들 중 모두가 각각의 다른 염료와 적어도 약 5nm(바람직하게는 적어도 약 10nm)까지 상이한 파장 방출 최대치를 가질 수 있다. 예를 들면, 상이한 형광성 염료는 이들 중 모두가 각각의 다른 염료와 적어도 약 5nm(바람직하게는 적어도 약 10nm)까지 상이한 파장 방출 최대치를 가질 수 있다.

[0127] 형광성 염료를 사용하여 상기 방법 중 핵산의 용융 온도를 측정하는 경우, 형광성 염료는 올리고뉴클레오타이드를 표시하는데 사용된 상이한 형광성 염료들 중 어느 다른 것에 의해 방출된 시그날로부터 구별될 수 있는 시그날을 방출할 수 있다. 예를 들면, 핵산의 용융 온도를 측정하기 위한 형광성 염료는 적어도 약 5nm(바람직하게는 적어도 약 10nm)까지 올리고뉴클레오타이드를 표시하는데 사용된 임의의 다른 형광성 염료의 파장 방출 최대치로부터 상이한 파장 방출 최대치를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산의 용융 온도를 측정하기 위한 형광성 염료는 올리고뉴클레오타이드를 표시하는데 사용된 상이한 형광성 염료들 중 임의의 다른 것보다도 상이한 파장 에너지에 의해 여기될 수 있다. 예를 들면, 핵산의 용융 온도를 측정하기 위한 형광성 염료는 적어도 약 5nm(바람직하게는 적어도 약 10nm)까지 올리고뉴클레오타이드를 표시하는데 사용되는 어떠한 형광성 염료의 파장 흡수 최대치와 상이한 파장 흡수 최대치를 가질 수 있다.

[0128] 상기 방법은 샘플에서 적어도 하나의 핵산(예를 들면, 앰플리콘 또는 표적 핵산에 하이브리드화된 프로브를 포함하는 핵산 복합체)의 용융 온도를 측정하는 단계를 포함할 수 있으며, 이는 핵산을 확인하는데 사용될 수 있다. 용점을 측정하는 단계는 앰플리콘 또는 핵산 복합체를 온도 구배에 노출시키는 단계 및 형광단으로부터 검출 가능한 시그날을 관찰하는 단계를 포함할 수 있다. 임의로, 상기 방법의 올리고뉴클레오타이드가 제1 형광성 염료로 표시되는 경우, 검출된 핵산의 용융 온도를 측정하는 단계는 제1 형광성 염료와는 상이한 제2 형광성 염료로부터의 시그날을 관찰하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 검출된 핵산의 용융 온도를 측정하기 위한 제2 형광성 염료는 인터칼레이팅 제제(intercalating agent)이다. 적합한 인터칼레이팅 제제는 SYBRTM Green 1 염료, SYBR 염료, 피코 그린(Pico Green), SYTO 염료, SYTOX 염료, 에티디움 브로마이드, 에티디움 단독이량체-1, 에티디움 단독이량체-2, 에티디움 유도체, 아크리딘, 아크리딘 오렌지, 아크리딘 유도체, 에티디움-아크리딘 이중이량체, 에티디움 모노아지드, 프로피디움 요오다이드, 시아닌 단량체, 7-아미노악티노마이신 D, YOYO-1, TOTO-1, YOYO-3, TOTO-3, POPO-1, BOBO-1, POPO-3, BOBO-3, LOLO-1, JOJO-1, 시아닌 이량체, YO-PRO-1, TO-PRO-1, YO-PRO-3, TO-PRO-3, TO-PRO-5, PO-PRO-1, BO-PRO-1, PO-PRO-3, BO-PRO-3, LO-PRO-1, JO-PRO-1, 및 이의 혼합물을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 적합한 구현예에서, 선택된 인터칼레이팅 제제는 SYBRTM 그린 1 염료이다.

[0129] 개시된 방법에서, 증폭된 표적 핵산 또는 리포터 프로브-주형 쌍 각각은 상이한 용융 온도를 가질 수 있다. 예를 들면, 증폭된 표적 핵산 또는 리포터 프로브-주형 쌍들 각각은 다른 증폭된 핵산 또는 리포터 프로브-주형 쌍들 중 어느 것의 용융 온도와 1 내지 10℃, 예를 들면, 적어도 약 1℃, 보다 바람직하게는 적어도 약 2℃, 또는 보다 더 바람직하게는 적어도 약 4℃까지 상이한 용점을 갖는다.

[0130] 본원에 사용된 것으로서, "표지" 또는 "리포터 분자"는 핵산을 표시하는데 유용한 화학적 또는 생화학적 잔기이다. "표지" 및 "리포터 분자"는 형광성 제제, 화학발광성 제제, 생원체성 제제, 퀀칭제, 방사성 핵종, 효소, 기질, 공동인자, 신틸레이션 제제, 억제제, 자기 입자, 및 당해 분야에 공지된 다른 잔기를 포함한다. "표지" 또는 "리포터 분자"는 측정 가능한 시그날을 생성할 수 있으며 올리고뉴클레오타이드에 공유결합으로 또는 비공유결합으로 결합될 수 있다.

[0131] 본원에 사용된 것으로서, "형광성 염료" 또는 "형광단"은 빛에 의해 여기되어 형광성을 방출할 수 있는 화학적 그룹이다. 일부 적합한 형광단은 빛에 의해 여기되어 인광을 방출할 수 있다. 염료는 형광성 공여체 염기로부터

형광성 시그널을 퀀칭할 수 있는 수용체 염료를 포함할 수 있다. 개시된 방법에 사용될 수 있는 염료는 형광단, 예를 들면, 적색 형광성 스쿠아린 염료, 예를 들면, 2,4-비스[1,3,3-트리메틸-2-인돌리닐리덴메틸]사이클로부텐 디일리움-1,3-디옥솔레이트, 적외선 염료, 예를 들면, 2,4-비스[3,3-디메틸-2-(1H-벤즈[e]인돌리닐리덴메틸)]사이클로부텐디일리움-1,3-디옥솔레이트, 또는 유기 형광성 스쿠아린 염료, 예를 들면, 2,4-비스[3,5-디메틸-2-피롤릴]사이클로부텐디일리움-1,3-디옥솔레이트를 포함한다. 형광단의 추가의 비-제한적 예는 양자점, Alexa Fluor™ 염료, AMCA, BODIPY™ 630/650, BODIPY™ 650/665, BODIPY™-FL, BODIPY™-R6G, BODIPY™-TMR, BODIPY™-TRX, Cascade Blue™, Cy2™, Cy3™, 및 Cy5™을 포함하나 이에 한정되지 않는 CyDye™, DNA 인터칼레이팅 염료 (intercalating dye), 6-FAM™, 플루오레세인, HEX™, 6-JOE, Oregon Green™ 488, Oregon Green™ 500, Oregon Green™ 514, Pacific Blue™, REG, 피코에리트린 및 알로피코시아닌을 포함하나 이에 한정되지 않는 피코빌리단 백질, Rhodamine Green™, Rhodamine Red™, ROX™, TAMRA™, TET™, 테트라메틸로다민, 또는 Texas Red™을 포함한다.

[0132] 형광성 염료 또는 형광단은 다른 반응성 분자에 대한 접합을 용이하게 하도록 개질된 유도체를 포함할 수 있다. 따라서, 형광성 염료 또는 형광단은 아민-반응성 유도체, 예를 들면, 형광단의 이소티오시아네이트 유도체 및/또는 석신이미딜 에스테르 유도체를 포함할 수 있다.

[0133] 개시된 방법의 올리고뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드는 퀀처로 표지될 수 있다. 퀀칭은 역학적 퀀칭(예를 들면, FRET), 정적 퀀칭, 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 적합한 퀀처는 다브실을 포함할 수 있다. 적합한 퀀처는 또한 암색 퀀처를 포함할 수 있으며, 이는 상표명 "BHQ"(예를 들면, BHQ-0, BHQ-1, BHQ-2, 및 BHQ-3, Biosearch Technologies, 캘리포니아주 노바토 소재) 하에 시판되는 흑색 홀 퀀처(black hole quencher)를 포함할 수 있다. 흑색 퀀처는 상표명 "QXL™"(Anaspec, 캘리포니아주 산 호세 소재) 하에 시판되는 퀀처를 포함할 수 있다. 흑색 퀀처는 또한 2,4-디니트로페닐 그룹을 포함하는 DNP-형 비-형광단을 포함할 수 있다.

[0134] 본원에 개시된 방법 및 조성물은 구획화된 반응에서 사용될 수 있다. 구획화된 반응을 위한 한가지 접근법은 소적을 사용하는 것이며, 이는 제2 유체 또는 제2 유체와 하나 이상의 표면에 의해 완전히 둘러싸인 제1 유체의 분리된 용적이다. 분자 진단 및 생명 과학 연구 분야에서, 이는 전형적으로 2개의 비혼화성 액체이다. 본원에 개시된 다양한 구현에는 비-수성의 연속상 속에 다수의 수성 소적을 포함하는 오일중 수 유액(water-in-oil emulsion)을 사용한다. 수성 소적 모두 또는 서브세트는 목적한 분석물을 함유할 수 있다. 유액은 흔히 하나 이상의 표면활성제의 존재하에서 2개의 비혼화성 상(예를 들면, 물 및 오일)을 결합함으로써 형성된다. 유액의 기본 유형은 수중 오일(oil-in-water: o/w), 오일중 수(water-in-oil: w/o), 및 이중-연속성이다. 소적-계 생물학적 검정에서, 유액은 전형적으로 수성 상 속에 함유된 검정 시약(예를 들면, PCR 프라이머, 염, 효소 등)이 들어있는 오일중 수 유액일 것이다. "오일" 상은 단일 오일 또는 상이한 오일의 혼합물일 수 있다. 임의의 적합한 비-수성 유액도 본원에 개시된 유액의 비-수성 연속 상을 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, 비-수성 연속 상은 광 오일, 실리콘 오일, 또는 플루오르화된 오일(예를 들면, Fluorinert FC-40 [Sigma-Aldrich])을 포함한다.

[0135] 소적(droplet)은 다양한 기술에 의해 영상화될 수 있다. 영상화를 촉진시키기 위해, 소적을 함유하는 조성물을 표면에 분산시켜 소적이 실질적으로 표면상의 단층에 분배되도록 할 수 있다. 영상화 표면은 예를 들면, 유리 또는 석영 체임버와 같은, 체임버 내에 또는 슬라이드 위에 존재할 수 있다. 소적, 및 또한 소적내 표지된 분석물 또는 반응 생성물(예를 들면, 헤어핀 프로브)은 영상화 시스템을 사용하여 검출할 수 있다. 예를 들면, 검출은 표지된 헤어핀 프로브로부터 방사된 영상화 형광성 파장 및/또는 형광성 강도를 포함할 수 있다. 소적이 또한 암호화된 미세구와 같은 암호화된 입자를 함유하는 구현예에서, 영상화는 암호화된 입자의 장식된 영상을 취하고 소적내 프로브를 검출하기 위한 검정 영상화를 취하는 단계를 포함할 수 있다. 탈암호화된 영상 및 검정 영상의 비교는 형광단의 조합을 사용함으로써 보다 큰 멀티플렉스 능력을 허용한다. 본 발명의 방법은 또한 직접 또는 간접적으로 표지된 증폭 생성물을 샘플 속의 DNA 또는 RNA의 농도와 관련시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 조성물을 사용하도록 조절될 수 있는 영상화 시스템의 예는 미국 특허 제 8,296,088호 및 미국 특허 공보 제2012/0288897호에 기술되어 있다.

[0136] 상기 논의된 바와 같이, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)은 소적 내에서 수행될 수 있는 반응의 예이다. 특히, 소적은 디지털 PCR(dPCR) 기술에서 유용하다. dPCR은 샘플을 분배시킴을 포함함으로써 샘플 속에 함유된 개개의 핵산 분자가 미세웰 플레이트내, 유액의 분산된 상내, 또는 핵산 결합 표면의 배열 내에서의 많은 별도의 영

역 내에 국제화되도록 한다. 각각의 구획(예를 들면, 소적)은 0 또는 0개보다 많은 분자를 함유함으로써, 음성 또는 양성 반응 각각을 제공할 것이다. 통상의 PCR과는 달리, dPCR은 샘플에서 표적 핵산의 초기 양을 측정하기 위한 다수의 증폭 주기에 의존적이지 않다. 따라서, dPCR은 표적 핵산을 정량화하기 위한 대수적 데이터에 대한 의존을 제거하고 절대적인 정량화를 제공한다. 유액 속의 비드 상의 핵산을 클론에 의해 증폭시키는, 비드 유액 PCR은 반응을 소적내로 분배하는 dPCR 기술의 한가지 예이다(참고: 예를 들면, 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제8,048,627호 및 제7,842,457호). dPCR을 하기 보다 상세히 논의된 바와 같은 유액에서 수행하는 경우, 유액은 열 안정성이어서 이것이 열 주기 조건에 견디도록 하여야 한다.

[0137] 유액(emulsion)에서 dPCR을 수행하는 다양한 방법이 존재한다. 예를 들면, 한가지 접근법에서 DNA 샘플을 적절한 농도로 희석시키고, PCR 시약(프라이머, dNTP 등)과 혼합하고 위에서 기술한 바와 같이 유액 속의 소적 내에 봉입함으로써 다수의 별개의 반응 샘플을 생성한다. 소적을 PCR 열 주기에 적용시키고 앰플리콘은 위에서 기술한 바와 같이 형광성(또는 다른 적합한 리포터) 영상화로 검출한다. 본 발명의 절단가능한 프로브 구현예와 관련하여, 앰플리콘은 프로브의 형광성(또는 다른 적합한 리포터)에 의해 검출된다.

[0138] 소적의 열 사이클링은 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 기술에 의해서도 수행될 수 있다. 예를 들면, 소적은 가열 및 냉각될 수 있는 튜브 또는 챔버 내에서 열 주기화될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 연속-유동 증폭을 사용하여 핵산 주형을 증폭시킨다. 연속된 유동 증폭의 다양한 방법이 보고되어 있다. 예를 들면, 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제7,927,797호는 연속 유동 PCR과 함께 사용된 단일중 수 유액을 기술한다. 등열 반응(예를 들면, 롤링 서클 증폭(rolling circle amplification), 전체 게놈 증폭, NASBA, 또는 쉘 대체 증폭)을 또한 소적 속에서 수행할 수 있다. 상기 시스템을 또한 사용하여 소적을 모니터링하면서 온도를 증가시키거나 감소시켜 소적당 용융 프로파일을 획득할 수 있으며, 이는 멀티플렉싱된 검출 및 정량화를 허용할 것이다. 프로브 자체가 소적내에서 사용되어 시그널을 등온적으로 증폭시켜 PCR 또는 다른 등온 증폭 반응과 같은 다른 형태의 증폭이 소적내 표적의 낮은 카피 수를 검출할 필요가 없도록 할 수 있다.

[0139] II. 실시예

[0140] 다음 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 입증하기 위해 포함된다. 당해 분야의 숙련가에게는 수반되는 실시예에 개시된 기술이 본 발명의 실시예에 있어서 잘 작용하도록 본 발명자에 의해 발견된 기술을 나타내므로, 이의 실시를 위한 바람직한 양식을 구성하는 것으로 고려될 수 있음이 인지되어야 한다. 그러나, 당해 분야의 숙련가는, 본 개시내용의 측면에서, 많은 변화가 개시된 특수한 구현예에서 이루어질 수 있으며 본 발명의 취지 및 영역으로부터 벗어남이 없이 동일하거나 유사한 결과를 여전히 획득할 수 있음을 인지하여야 한다.

[0141] 실시예 1 - 다중프로브 프로브 시스템(Multiprobe Probe system)

[0142] 분자 검정을 위한 용액 상 멀티플렉싱 전략은 10개를 초과하는 표적의 검출을 위한 다수의 형광성 용융 곡선의 생성과 함께 다수의 형광단의 사용에 의존한다. 본원에 개시된 다양한 구현예는 채널당 다수의 용융 곡선을 생성하기 위해 연장가능한 헤어핀 프로브를 이용함으로써 달성될 보다 높은 멀티플렉싱 능력을 허용하는 실시간 프로브계 화학을 제공한다. 당해 시스템에서 사용하기 위한 프로브의 예는 도 1a에 나타낸다. 당해 실시예에서, 절단가능한 프로브는 이의 5' 말단에서 리포터-표지된 이소G 뉴클레오타이드("이소G^{*}"), 제1 서열 영역("태그 A"), 제2 서열 영역("태그 B"), 루프 서열, 태그 B의 역 상보체인 서열 영역("태그 B 상보체"); 및 표적 앰플리콘에 대해 상보성인 서열("A"로 나타냄)을 포함한다. 절단가능한 프로브는 또한 "A" 서열내에 하나 이상의 리보뉴클레오타이드(실선 사각형으로 나타냄)를 포함하며 3' 말단에서 연장을 차단하는 변형("P"로서 나타냄)을 포함할 수 있다. 표적 앰플리콘의 존재하에서, 절단가능한 프로브는 앰플리콘에 하이브리드화하여 RNase H2에 의해 리보뉴클레오타이드 위치에서 절단된다(이는 어닐링된 RNA/DNA 하이브리드에서 리보뉴클레오타이드를 인식하여 절단한다), 절단 후, 프로브는 태그 B 및 태그 B 상보체 서열을 통해 자체로 하이브리드화하여 헤어핀을 형성할 수 있다. 프로브의 연장은 태그 A 서열에 대해 상보성인 서열을 합성할 것이며 퀀터 표지된 이소C("이소C⁰")를 혼입할 것이다. 수득되는 헤어핀 프로브 퀀터는 표지된 이소G의 형광성을 퀀터한다. 상기 프로브는 제1 및 제2 서열 영역의 서열 및 길이를 조절함에 의한 것과 같은 독특한 용융 온도(T_m)를 가지도록 설계될 수 있다. 따라서, 태그 A 및 태그 B 줄기 구조의 조성 및 길이는 헤어핀 프로브에 대해 어떠한 바람직한 용융 온도에서 해결하기 위하여 변화시킬 수 있다(참고: 도 1b).

[0143] 물질 및 방법

[0144] 프로브 설계 매개변수(Probe design parameters)

[0145] 절단가능한 프로브의 다수의 컨스트럭트를 표적 서열 특이적인 테일(절단 후)없이 설계하여 연장가능한 헤어핀을 위한 최적의 설계 매개변수를 측정하였다. 서열 특이적인 테일에 대해 표적화된 T_m 은 반응 온도($\sim 58^\circ\text{C}$)보다 10°C 더 높았다. 헤어핀 컨스트럭트를 설계하여 $T_m > 60^\circ\text{C}$ 가 되도록 함으로써 RNA/DNA 하이브리드의 절단 후 단일분자 구조의 형성을 허용하였다. 이들 컨스트럭트를 설계하여 루프 크기(염기의 수), 줄기 크기, 깎스 자유에너지(Gibbs free energy) 및 절단 후 헤어핀의 T_m 에 대한 요건을 측정하였다. 작제된 특이적인 프로브의 예가 나타나 있다(도 2). 개념 실험의 이들 증명을 위해, 루프의 각각의 측면에서 2개의 시토신 "클램프(clamp)"로 끝나는 다중-아데닌 잔기의 루프를 사용하였다(이텔릭체 서체 사이의 서열)

[0146] 1. 프로브의 폴딩

[0147] 온도 구배를 사용하여 95°C 내지 41°C 의 범위의 온도에 대한 헤어핀의 형광성 강도의 감소를 모니터링함으로써 이들 컨스트럭트의 폴딩 프로파일을 평가하였다. 도 2의 컨스트럭트를 BTP-KCl pH 9.1 완충액, 2.5mM dNTP, 2.5mM MgCl_2 , 1mM 답실-이소G 및 *타타* 태크 효소(*Clontech*)를 함유하는 반응 혼합물에 가하였다. 95°C 에서 초기 변성 단계 후, 반응 온도를 95°C 로부터 41°C 까지 각각의 간격에서 10초 유지하면서 3°C 의 증분으로 감소시켰다. 완전한 퀀칭이 각각의 컨스트럭트에 대해 관찰된 온도를 헤어핀의 폴딩 온도로서 기록하였다.

[0148] 2. 헤어핀-루프 형성의 효율: 프로브의 폴딩, 연장 및 퀀칭

[0149] 헤어핀 형성의 효율은 3개의 온도에서 각각의 컨스트럭트의 퀀칭률을 측정하여 평가하였다. 도 2의 컨스트럭트를 BTP-KCl pH 9.1 완충액, 2.5mM dNTPs, 1mM 이소G-답실- 및 *타타* 태크(*Taq*) 효소(*Clontech*)를 함유하는 반응 혼합물에 가하였다. 95°C 에서 2분의 활성화 단계 후, 반응물을 50°C , 62°C 및 68°C 에서 30분 동안 항온처리하여 헤어핀이 폴딩되고 연장되어 이소G-답실을 혼입하도록 하였다. 이는 60°C 에서 30초 및 95°C 까지 증분 증가의 용융 곡선 사이클링 프로토콜에 의해 수반되었다. 반응의 효율은 퀀칭이 달성된 경우 생성된 Ct 값으로 측정하였다.

[0150] 3. 완전한 길이(full length)의 프로브를 사용한 단일-플렉스 RT-PCR

[0151] 증폭 반응에서 검출용 다중프로브 RTx 프로브를 사용한 실행가능성을 우선 단일플렉스(singleplex) RT-PCR 반응에서 평가하였다. 완전한 길이의 프로브(서열 특이적인 테일을 지님)의 다중 설계를 (도 2 내지 3에서) 평가된 헤어핀 설계를 기준으로 생성시켰다. 서열 특이적인 분절에 대한 표적 T_m 은 반응물의 어닐링 온도보다 $\sim 10^\circ\text{C}$ 더 높았다. 프라이머(표 1) 및 프로브의 서열은 인플루엔자 B 바이러스의 매트릭스 유전자를 기준으로 하였다. 인플루엔자 B 균주로부터 추출된 핵산: B/말레이시아/2506/04(Zeptometrix)를 단일-스텝 RT-PCR 반응에서 주형으로 사용하였다. 구체적으로, PCR 프라이머(전방 180nM, 역방 60nM) 및 프로브(120 nM)를 BTP-KCl pH 9.1 완충액, 2.5mM dNTP, 2.5mM MgCl_2 , 1mM 답실-이소G, *타타* 태크 효소(*Clontech*) 및 MMLV(Promega) 및 RNase H(IDT)를 함유하는 반응 혼합물에 가하였다. 다음의 사이클링 주기를 증폭 및 용융 곡선 분석에 사용하였다: 50°C , 5분; 95°C 에서 10분 동안; 95°C 에서 10초 동안, 58°C 에서 20초로 45주기에 이어 60°C 에서 30초 및 95°C 에서 1초의 용융 프로그램 후 40°C 에서의 냉각 단계로 종결하였다.

[0152] [표 1] PCR 프라이머

표 1

프라이머 명칭	서열	T_m ($^\circ\text{C}$)
FluB Fwd-short	GAA GCA TTT GAA ATA GCA GAA GG (SEQ ID NO: 22)	61
FluB Rev-short	CAC AGA GCG TTC CTA GTT TTA CT (SEQ ID NO: 23)	62.8

[0154] 결과

[0155] 헤어핀 루프의 용융 프로파일

[0156] 도 2의 헤어핀 프로브의 용융 프로파일을 생성하여 다양한 컨스트럭트의 폴딩 온도를 측정하였다. 이는 95°C 내지 41°C 의 온도 구배에 걸쳐서 형광성 강도에 있어서의 강하를 모니터링함으로써 측정하였다(도 4). 3개의 예시적인 컨스트럭트 RTx-5, RTx-10 및 RTx-11에 대한 퀀칭 프로파일을 나타내는 그래프를 도 5 내지 7에 각각 나타낸다. 모든 연구의 결과는 하기 표 2에 나타나 있다. 헤어핀 컨스트럭트 RTx-1, 2, 3, 5, 6, 7, 및 8은 연장된

헤어핀의 계산된 $T_m \sim 71^\circ\text{C}$ (IDT)에 상응하는 71°C 온도 단계까지 완전히 퀴칭된다. 헤어핀 컨스트럭트 RTx-4, 9 및 10은 62°C 에 의해 퀴칭되고 헤어핀 RTx-11은 41°C 에서 퀴칭되었다.

[표 2] 다양한 헤어핀 프로브에 대한 폴딩 온도의 요약

표 2

컨스트럭트	폴딩 온도($^\circ\text{C}$)	줄기(bp)	루프(bp)	델타G	T_m 줄기 루프($^\circ\text{C}$)	% GC
				(kcal.mole^{-1})		
RTx-1	71	8	7	-1.27	64.8	50
RTx-2		8	12	-1.06	63.6	50
RTx-3		7	7	-0.87	63.3	57
RTx-5		9	7	-1.62	65.7	44
RTx-6		9	12	-1.41	64.6	44
RTx-7		8	7	-0.93	62.9	50
RTx-8		8	12	-0.72	61.8	50
RTx-4	62	7	12	-0.66	62	57
RTx-9		6	7	-0.26	59.8	67
RTx-10		6	7	-0.53	61.7	67
RTx-11	41	5	7	-0.5	62	80

데이터와 비교된 줄기 루프의 T_m , 델타G 값, 루프 크기 및 줄기 크기를 비교하는 경우, 데이터는 헤어핀의 형성에 영향을 미치는 주요 인자가 줄기내 염기의 수임을 제안한다. 제2 인자는 정확한 폴딩 T_m 을 지닌 컨스트럭트의 델타 G가 62°C 및 41°C 의 T_m 을 지닌 컨스트럭트보다 더 낮으므로 헤어핀의 폴딩과 관련된 깃스 자유 에너지일 수 있다.

헤어핀 루프 형성의 효능

증폭

도 2로부터의 헤어핀 컨스트럭트를 사용하여 다양한 온도에서 헤어핀 형성의 효율을 측정하였다. 결과는 상기에서 제조된 관찰을 입증한다. 반응 속도는 프로브 RT-x 1, 2, 7, 및 8의 경우 매우 신속하다(도 8 및 도 9). 보다 느린 반응 속도가 프로브 RTx-9 및 10의 경우 관찰되었으며, 5 내지 10의 범위의 Ct 값 및 완전한 퀴칭을 위해 기록된 최대 Ct 값은 RTx 11, 30-35의 경우였다(도 10). 이들 헤어핀은 형성되어 연장되기 위해 보다 낮은 온도를 필요로 하며, 이는 폴딩에 보다 긴 시간이 요구되는 것으로 해석된다.

용융 곡선 분석

헤어핀 컨스트럭트 RTx 1, 2, 3, 및 4의 용융 곡선 분석은, 증가하는 온도가 보다 급격한 용융 곡선을 생성함을 나타낸다(도 8). 이는 기록된 T_m 에 있어서 약간의 이동을 동반한다. 보다 급격한 용융 곡선은 컨스트럭트 RT-x 5 및 6을 사용하여 62°C 에서 유사하게 생성되었으며, T_m 에 있어서의 이동은 관찰되지 않는다. 컨스트럭트 RTx-7 및 8의 용융 곡선 및 T_m 은 다른 헤어핀에 대해 관찰된 경향으로부터 벗어난다(도 9). 광의의 및 오버랩핑된 용융 곡선은 상기 생성된 데이터에 상응하는 컨스트럭트 RTx 9, 10, 및 11로 생성되었다(도 10).

완전한 길이의 프로브를 사용한 단일-플렉스 RT-PCR

완전한 길이의 프로브 설계를 도 2 및 도 3으로부터 헤어핀 컨스트럭트에서 생성된 데이터를 기준으로 생성시켰다. 표적화된 최소 줄기 크기는 8개 염기, 루프의 경우 12 내지 20개 잔기 및 헤어핀 루프의 경우 55°C 내지 66.4°C 의 T_m 이었다.

검출

모든 프로브는 34 내지 35 Ct의 범위에서 Ct 값을 생성하였다(도 11a 내지 11d). 대부분의 프로브의 용융 곡선은 하나의 종, 주로 연장된 헤어핀의 존재를 나타내었다. 약간의, 높은 T_m 피크는 일부 프로브의 경우 검출되었다.

[0169] 동일한 형광성 강도를 FL-RTx-2-12AT1 및 FL-RTx-2-12AT2를 제외한 모든 프로브에 대해 기록하였다. 이들 프로브의 계산된 헤어핀 루프 T_m 은 반응 온도(58℃)에 매우 근접한다. 반응 온도를 강하시키는 것은 형성된 헤어핀 분자의 수를 증진시켜 보다 우수한 검출을 제공할 수 있다.

[0170] 특이성

[0171] 2개의 음성 대조군을 포함시켰다(도 11a 내지 11d). 주형 음성 대조군(물)을 포함시키는 목적은 RNase H2에 의한 완전한 길이의 프로브의 절단으로 인한 헤어핀의 비특이적인 형성을 검출하기 위한 것이었다. 프로브 FL-RTx-2-12-AT-4(도 11d) 만이 프로브의 비-특이적인 절단을 제안할 수 있는 헤어핀과 동일한 크기인, 배경 비-특이적인 용융 곡선을 나타내었다. 사용된 제2 음성 대조군은 무증상 환자로부터 수집한 임상적인 음성 시험편이었다. 목적은 관련되지 않은 주형의 존재하에서 프로브의 특이성을 평가하는 것이었다. 프로브 중 어느 것도 주형과 어떠한 비-특이적인 상호작용을 나타내지 않았다.

[0172] 실시예 2 - 추가의 헤어핀 프로브 검출 시스템

[0173] 헤어핀 프로브 검출 시스템의 추가의 예는 도 12에 나타난다. 리포터 프로브는 이의 5' 말단에서 리포터-표지된 이소C 뉴클레오타이드("이소C^{*}"), 제1 서열 영역("영역 1"), 이소G 및/또는 이소C 위치를 포함하는 서열("이소프라이머"); 및 앰플리콘에 대해 상보성인 서열("A"로서 나타냄)을 포함한다. 앰플리콘에 대해 상보성인 서열은 또한 적어도 하나의 리보뉴클레오타이드 위치를 포함한다. 표적 앰플리콘의 존재하에서, 리포터 프로브는 앰플리콘에 하이브리드화하며 RNase H에 의해 리보뉴클레오타이드 위치에서 절단된다. 절단에 이어서, 리포터 프로브는 포획 올리고뉴클레오타이드("포획 oligo")에 하이브리드화할 수 있으며, 이는 이소프라이머에 대해 상보성인 포획 분절 및, 임의로 "A" 서열에 부위에 이어, 미리 영역 1 및 3' 표지되지 않은 이소C를 포함한다. 리포터 프로브의 연장은 포획 올리고 상에서 미리 태그에 대해 상보성인 서열을 합성할 것이며 퀴쳐 표지된 이소G("이소G⁰")를 혼입할 것이다. 연장된 리포터 프로브는 이제 태그 및 태그 상보성 서열을 포함하며, 이는 프로브가 헤어핀을 형성하도록 함으로써 표지된 이소C의 형광성을 퀴칭한다. 프로브를 제1 서열 영역의 서열 및 길이를 조절함에 의해서과 같이, 독특한 용융 온도(T_m)를 가지도록 설계할 수 있다. 따라서, 용융 분석을 수행하여 용융 온도가 상이한(및 따라서 상이한 온도에서 퀴칭되지 않는) 프로브를 차등화할 수 있다.

[0174] 도 12의 검정 시스템은 또한 포획 프로브가 이소염기를 필요로 하지 않도록 추가로 변형될 수 있다. 당해 시스템에서, 리포터 프로브는 이의 5' 말단에서 리포터-표지된 이소C 뉴클레오타이드("이소C^{*}"), 제1 서열 영역("영역 1"), 이소G 및/또는 이소C 위치를 포함하는 서열("이소프라이머"); 및 앰플리콘에 대해 상보성인 서열("A"로서 나타냄)을 포함한다. 앰플리콘에 대해 상보성인 서열은 또한 적어도 하나의 리보뉴클레오타이드 위치에서 포함한다. 표적 앰플리콘의 존재하에서, 리포터 프로브는 앰플리콘에 하이브리드화하며 RNase H에 의해 리보뉴클레오타이드 위치에서 절단된다. 절단에 이어서, 리포터 프로브는 포획 올리고뉴클레오타이드("포획 올리고")에 하이브리드화될 수 있으며, 이는 이소프라이머에 대해 상보성인 포획 분절, "A"서열 부위에 이어서, 미리 영역 1(이는 영역 1 서열의 부분과 동일하다)을 포함한다. 리포터 프로브의 연장은 포획 올리고 상에서 미리 영역 1에 대해 상보성인 서열을 합성할 것이다. 이후에, 절단가능한 프로브는 미리 영역 1에 대해 상보성인 서열을 지닌 영역 1 서열의 염기 쌍화에 의해 헤어핀을 형성할 수 있다. 헤어핀 서열의 추가의 연장은 퀴쳐 표지된 이소G("이소G⁰")를 혼입시킬 것이다. 프로브는 제1 서열 영역의 서열 및 서열 영역의 길이를 조절함에 의한 것과 같이, 독특한 용융 온도(T_m)를 가지도록 설계할 수 있다. 따라서, 용융 분석을 상이한 용융 온도를 갖는(및 따라서 상이한 온도에서 퀴칭되지 않는) 프로브를 차등화시킬 수 있다.

[0175] 도 15는 프로브가 형광단(F) 및 퀴쳐(Q) 둘 다를 포함하는 다른 구현예를 나타낸다. 일본쇄가 존재하는 경우 제1 서열 영역의 구조는 퀴쳐에 대한 형광단의 근접성이 형광단으로부터의 시그날의 검출가능한 퀴칭을 생성하도록 한다. 표적의 존재하에서, 프로브는 표적에 하이브리드화되며 리보뉴클레아제에 의해 리보뉴클레오타이드 위치에서 절단된다. 특수한 구현예에서, 제2 서열 영역 상보체, 리보뉴클레오타이드(들), 및 리보뉴클레오타이드(들)의 표적 특이적인 영역 3'는 표적에 대해 상보성이다. 프로브의 절단에 이어서, 제2 서열 영역 및 절단된 프로브의 제2 서열 영역 상보체는 서로에 대해 하이브리드화하여 헤어핀 구조를 형성한다. 절단된 프로브의 3' 말단의 제1 서열 영역으로의 연장은 퀴쳐로부터 보다 큰 거리에서 형광단을 위치시키는 구조를 갖는 이본쇄 분자를 생성함으로써 시그날내 검출가능한 변화가 관찰될 수 있도록 한다.

[0176] 도 16은 프로브가 형광단(F) 및 퀴쳐(Q) 둘 다를 포함하는 다른 구현예를 나타낸다. 일본쇄가 존재하는 경우 제

1 서열 영역의 구조는 퀀처에 대한 형광단의 근접성이 형광단으로부터의 시그날의 검출가능한 퀀칭을 생성하도록 한다. 표적의 존재하에서, 프로브는 표적에 하이브리드화되며 상부 프라이머를 연장시키는 폴리머라제의 5' 뉴클레아제 활성에 의해 절단된다. 이러한 특수한 구현예에서, 제2 서열 영역 상보체는 표적에 대해 상보성이 아니다. 프로브의 절단에 이어서, 제2 서열 영역 및 절단된 프로브의 제2 서열 영역 상보체는 서로에 대해 하이브리드화하여 헤어핀 구조를 형성한다. 절단된 프로브의 3' 말단의 제1 서열 영역으로의 연장은 퀀처로부터 보다 큰 거리에서 형광단을 위치시키는 구조를 갖는 이분쇄 분자를 생성함으로써 시그날내 검출가능한 변화가 관찰될 수 있도록 한다.

[0177] 도 17은 프로브가 리포터-퀀처 쌍의 하나의 구성원을 포함하는 구현예를 나타내며, 당해 특수한 경우에 이는 형광단(F)이다. 또한, 프로브는 제1 서열 영역, 제2 서열 영역, 루프 영역, 제2 서열 영역 상보체, 하나 이상의 리보뉴클레오타이드(들), 및 리보뉴클레오타이드(들)의 표적 특이적인 영역 3'를 포함한다. 당해 특수한 구현예에서, 루프 영역, 제2 서열 영역 상보체, 리보뉴클레오타이드(들), 및 리보뉴클레오타이드(들)의 표적 특이적인 영역 3'는 표적에 대해 상보성이다.

[0178] **실시예 3 - 역 전사 PCR에서 연장 차단체를 지닌 헤어핀 프로브의 용도**

[0179] Fwd 및 Rev 프라이머는 ATG0015 프로브 또는 T-FL-RTx2c 프로브와 잘 결합되었으며, 이는 ATG0015 프로브가 루프 영역에서 3개의 탄소 스페이서(iSpC3)를 함유하였고 T-FL-RTx2c는 그렇지 않았다는 점만이 상이하였다. 이들을 PCR 마스터 혼합물과 합하고 열 주기화한 후 열 분석하였다.

[0180] ATG0015: /56-FAM//iMe-isodC/ATATCAGTCATTTGCCCAAAA(SEQ ID NO: 24)/iSpC3/AAACCGCAAATGAC rCAT GAG ACA GTA TAG TAG CGC TGA(SEQ ID NO: 25)/3SpC3/

[0181] T-FL-RTx2c: /56-FAM//iMe-isodC/ATATCAGTCATTTGCCCAAAAAAACCGCAAATGAC rCAT GAG ACA GTA TAG TAG CGC TGA(SEQ ID NO: 15)/3SpC3/

[0182] Fwd 프라이머 - GAA GCA TTT GAA ATA GCA GAA GG (SEQ ID NO: 22)

[0183] Rev 프라이머 - CAC AGA GCG TTC CTA GTT TTA CT (SEQ ID NO: 23)

[0184] 역 전사 PCR을 주형의 부재하에 수행하여 용융 분석 동안 시그날에 있어서의 변화를 유발할 수 있는 비-특이적인 상호작용에 대해 모니터링하였다. 하기 PCR 마스터 혼합물을 25 µL 반응물에 대해 생성시키고 ABI Fast 7500 실시간 열 사이클러 상에서 작동시켰다. 열 프로파일은 5분 동안 50℃를 유지하고 2분 20초동안 95℃를 유지하며, 10초 동안 95℃ 및 23초 동안 57℃의 44 주기를 포함하였다. 용융 분석은 60 내지 95℃의 램핑(ramping) 및 매 0.5℃에서의 판독을 포함하였다.

[0185] **[표 3] PCR 마스터 혼합물 (PCR Master Mix)**

표 3

[0186]

시약	작업 농도
뉴클레아제가 없는 물	
10X ISolution	1x
100 mM MgCl ₂	2.5mM
1 M KCl	0.05M
FluB Fwd 프라이머	0.12M
FluB Rev 프라이머	0.06M
프로브	0.06M
RNase H2 HotStart	1mU
글리세롤이 없는 티타늄 태크	1x
MMLV 역 전사효소	0.75

[0187] 도 13은 용융 분석 동안 수득된 데이터의 역위된 유도체를 나타낸다. 77℃에서의 비-특이적인 용융 피크는 T-FL-RTx2c 프로브를 나타내며, 이는 루프 영역내에 3개의 탄소 스페이서를 결여하고 있다.

[0188] 이론에 얽매이지 않고, 50℃에서의 저온 역 전사효소 단계 동안에, 당해 경우의 Rev 프라이머는 루프 영역의 하부 프로브에 하이브리드화되며, 이는 프라이머가 루프를 통해 연장하여 표지된 이소염기로부터 퀀처를 혼입하도

록 한다. 당해 하이브리드화는 또한 리보염기가 절단되도록 함으로써, 프로브가 또한 프라이머를 따라 연장하도록 한다. 이본쇄 생성물은 PCR 반응 동안 증폭된다. 연장 차단제는 루프 영역을 따라 프라이머의 비-특이적인 연장을 방지하며, 이는 퀀처/형광단 쌍의 형성을 방지할 뿐 아니라, PCR에서 58℃ 어닐링 단계 동안에 증폭되기에 충분한 T_m을 지닌 이본쇄 생성물을 방지한다.

[0189] 실시예 4 - 단일 염료를 사용한 멀티플렉싱

[0190] 본 연구는 동일한 형광단을 가지지만 다양한 연장된 헤어핀 프로브의 T_m에 있어서 상이한 다수의 헤어핀 프로브를 사용하는 능력을 입증하였다. 동일한 형광단(FAM)을 갖는, 인플루엔자 A, 인플루엔자 B, 또는 아데노바이러스에 대해 특이적인 3개의 상이한 프로브를 동일한 PCR 튜브 속에서 함께 시험하였다. 인플루엔자 A, 인플루엔자 B, 또는 아데노바이러스의 추출된 바이러스 배양물을 함유하는 양성 대조군 샘플을 멀티플렉스 PCR 반응 성분을 함유하는 개개의 PCR 튜브에 위치시켰다. 이들 표적을 반응당 1000개 카피에서 시험하였다. 절단가능한 프로브 서열은 표 4에 나타낸다.

[0191] [표 4] 프로브 서열

표 4

표적 명칭	절단 프로브 서열(5' 내지 3')
FluB	/56-FAM//iMe-isodC/CAA AAA AAA GTCATGTTA CAAAAA(SEQ ID NO: 26)/iSpC3/AAACC TA ACATGAC rCATGAGACAGTATAGTAGCG(SEQ ID NO: 27)/3SpC3/
FluA	/56-FAM//iMe-isodC/C ATA TCA TCA TCA TCT C ATTTTAGGC CAAAAA(SEQ ID NO: 28)/iSpC3/AAACC GCCTAAAT rCCCCTTAGTCAGAGGTGAC(SEQ ID NO: 29)/3SpC3/
Adeno	/56-FAM//iMe-isodC/C TCC ATC CTC CTC CTC CTC TCT CTTCGAGA CAAAAA(SEQ ID NO: 30)/iSpC3/AAACC TCT CGAAG rCGTCCTGTCCGGC(SEQ ID NO: 31)/3SpC3/

[0193] 하기 PCR 마스터 혼합물(표 5)을 25 µL 반응물을 위해 생성시키고 Life Technologies Quant Studio 실시간 PCR 열 사이클러 상에서 작동시켰다. 열 프로파일은 5분 동안 50℃ 유지, 2분 20초 동안 95℃ 유지, 10초 동안 95℃ 및 23초 동안 57℃의 44 주기를 포함하였다. 용융 분석은 60 내지 95℃의 램핑 및 매 0.5℃에서의 판독을 포함하였다.

[0194] [표 5] PCR 마스터 혼합물

표 5

시약	최종 농도
뉴클레아제가 없는 물	
10X ISOLution	1x
1 M KCl	0.05M
MgCl ₂	2.5mM
Tris pH 8.0	10mM
비스트리스프로판	10mM
Fwd 프라이머	0.48M
Rev 프라이머	0.12M
프로브	0.02M
RNase H2 HotStart (I.D.T)	4mU/ µL
50x 글리세롤이 없는 티탄 태크(Clontech)	1x
MLV 역 전사효소(Promega)	2U/ µl

[0196] 도 14는 동일한 멀티플렉스 PCR 반응 혼합물을 사용하여 6개의 개개 반응물(1000개 카피/반응물에서 3개의 표적 각각에 대해 1개의 양성, 및 3개의 비 주형 대조군(NTC) 샘플)에 대한 용융 프로파일 데이터를 나타낸다. 도 14에서 알 수 있는 바와 같이, FluA, FluB, 및 아데노-특이적인 절단가능한 프로브 각각은 동일한 형광성 채널에서 명백한 용융 프로파일을 생성하였다. 따라서, 당해 실시예에서 3개의 상이한 바이러스가 동일한 형광성 표지를 사용하는 경우에 용융 프로파일에 의해 구별되었다.

[0197] * * *

[0198] 본원에 개시되고 청구된 방법 모두는 본 개시내용의 관점에서 과도한 실험없이 이루어지고 실행될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법이 바람직한 구현예의 측면에서 기술되었지만, 당해 분야의 숙련가에게는 변화가 본 발명의 개념, 취지 및 영역으로부터 벗어남이 없이 본원에 기술된 방법 및 방법의 단계 또는 단계의 순서에서 적용될 수 있음이 명백할 것이다. 보다 구체적으로, 화학적으로 및 생리학적으로 둘 다 관련된 특성의 제제가 본원에 기술된 제제를 대체할 수 있지만 동일하거나 유사한 결과가 달성될 수 있음이 명백할 것이다. 당해 분야의 숙련가에게 명백한 모든 이러한 유사한 대체 및 변형은 첨부된 청구범위에 의해 정의된 바와 같은 본 발명의 취지, 영역 및 개념내에 있는 것으로 고려된다.

[0199] **참고 문헌(REFERENCES)**

[0200] 다음의 참고 문헌은, 이들이 본원에 나타낸 것에 대해 보충적인 예시적인 과정 또는 다른 세부사항을 제공하는 정도까지, 본원에 참고로 구체적으로 포함된다.

[0201] 미국 특허 제4,942,124호; 제4,284,412호; 제4,989,977호; 제4,498,766호; 제5,478,722호; 제4,857,451호; 제4,774,189호; 제4,767,206호; 제4,714,682호; 제5,160,974호; 제4,661,913호; 제5,654,413호; 제5,656,493호; 제5,716,784호; 제5,736,330호; 제5,837,832호; 제5,837,860호; 제5,981,180호; 제5,994,056호; 제5,736,330호; 제5,981,180호; 제6,057,107호; 제6,030,787호; 제6,046,807호; 제6,057,107호; 제6,103,463호; 제6,139,800호; 제6,174,670호; 제6,268,222호; 제6,322,971호; 제6,366,354호; 제6,410,278호; 제6,411,904호; 제6,449,562호; 제6,514,295호; 제6,524,793호; 제6,528,165호; 제6,592,822호; 제6,939,720호; 제6,977,161호; 제7,226,737호; 제7,645,868호; 및 제7,955,802호

[0202] 미국 공개 공보 제2005/0191625호; 제2008/0182312호; 및 제2009/0148849호

[0203] McMinn *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:11585, 1999.

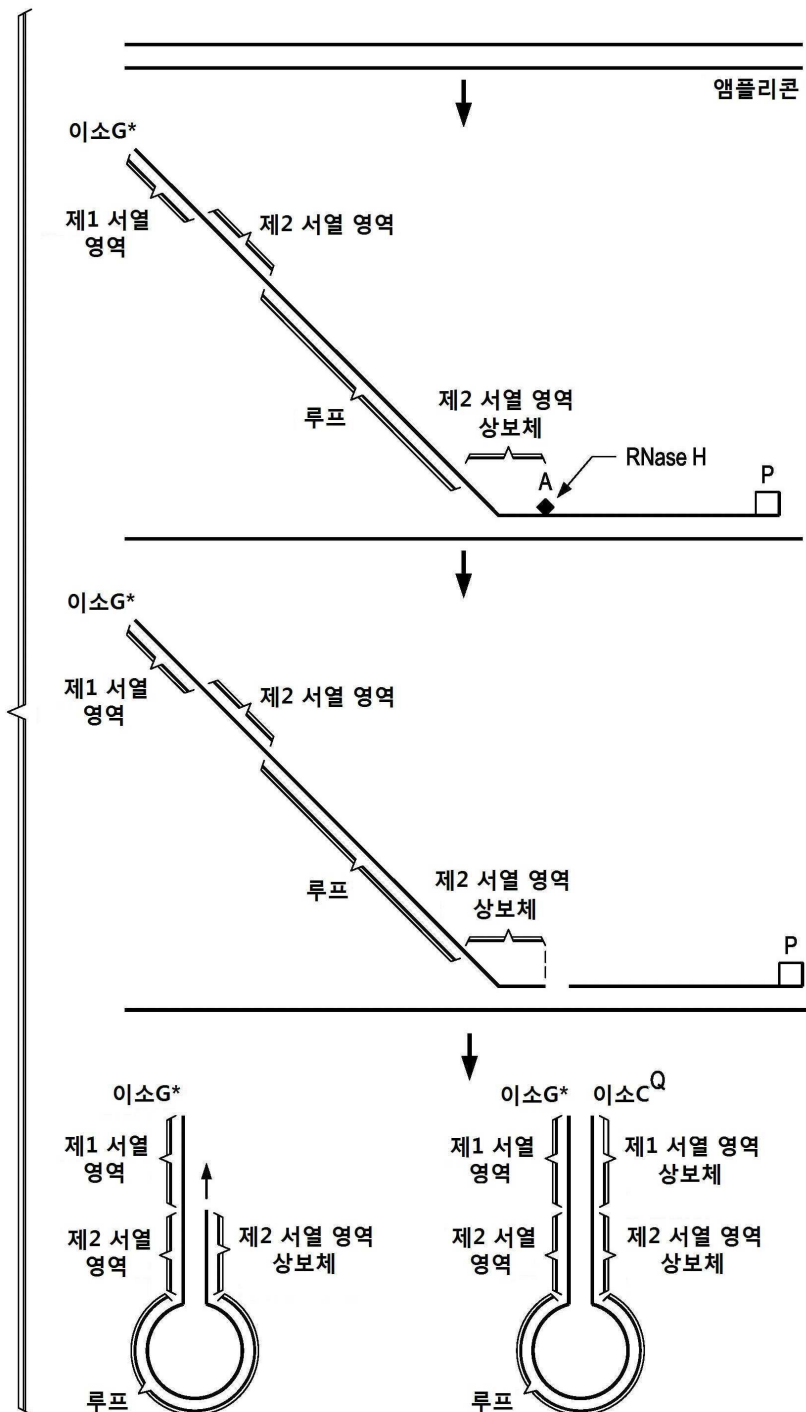
[0204] Ren *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 118:1671, 1996.

[0205] Vogelstein *et al.*, P.C.R. Digital, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:9236-9241, 1996.

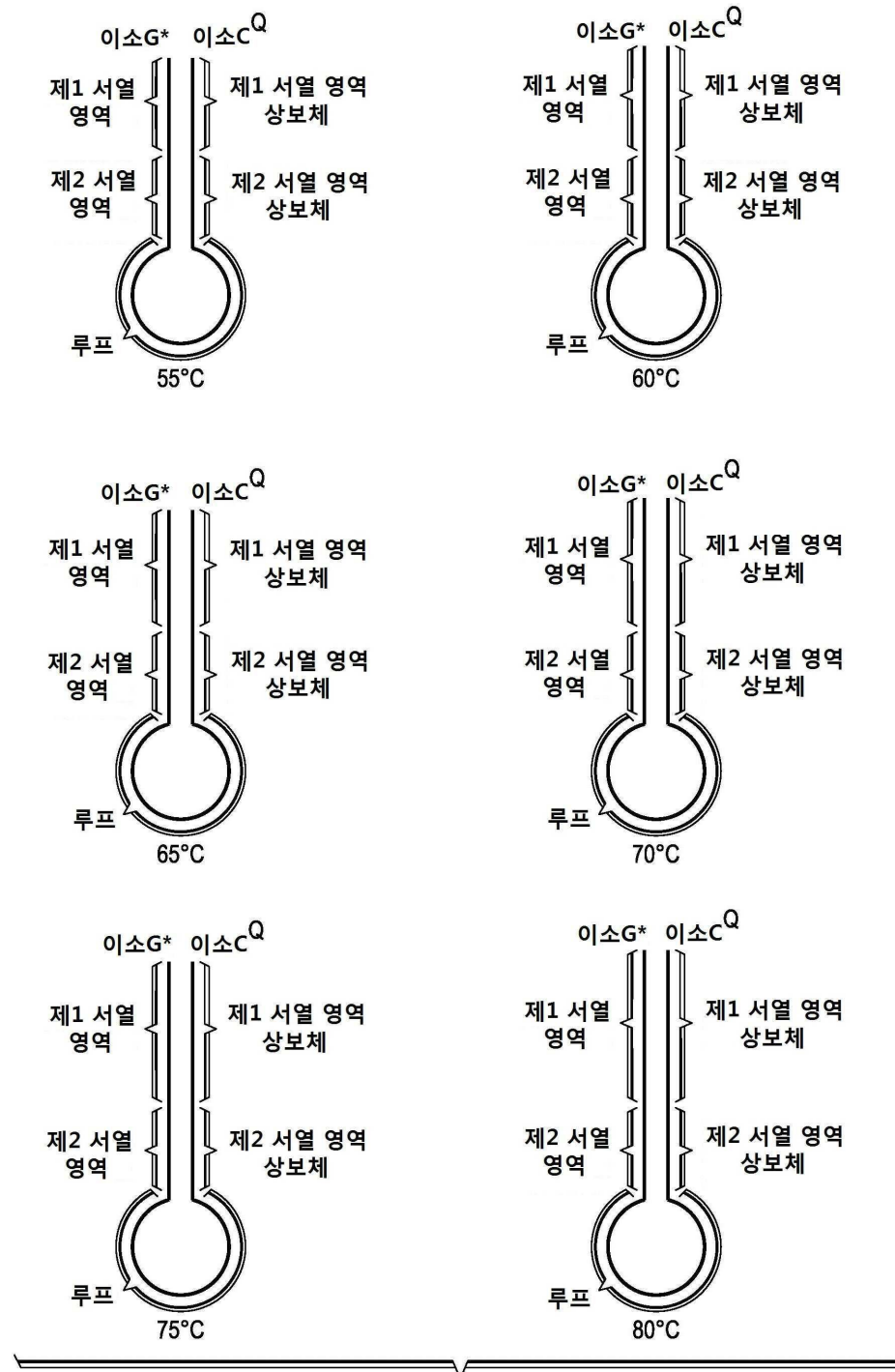
[0206] Yan *et al.*, "Isothermal Amplified Detection of DNA and RNA" *Mol. BioSyst.* 10:970-1003, 2014.

도면

도면1a



도면1b



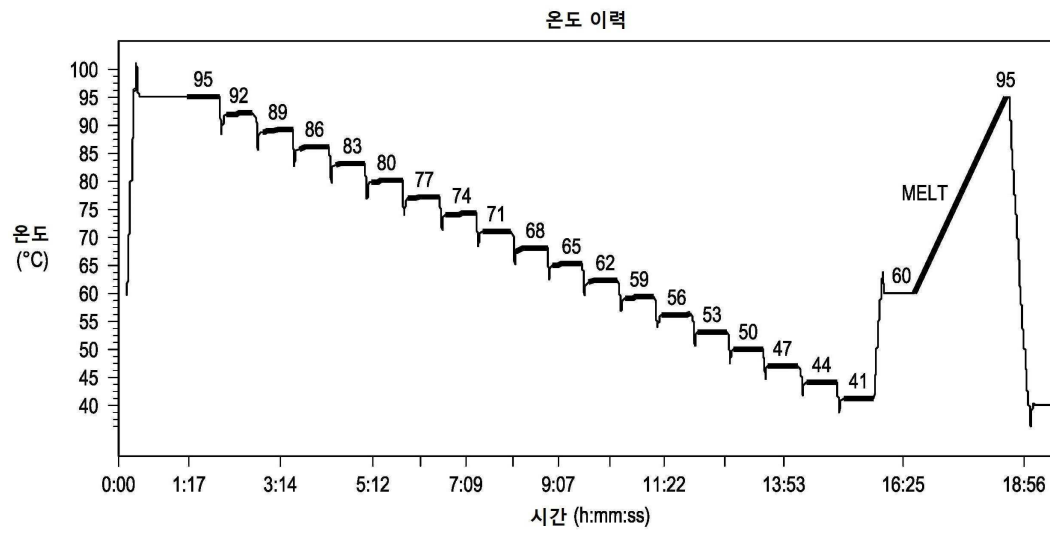
도면2

컨스트럭트	프로브 5'-3'	줄기 (bp)	B-B" (bp)	C-C" (bp)	루프 (bp)	ΔG (kcal.mole ⁻¹)	Tm 줄기 루프 (°C)
RTx-1	ATATCAGTCATTGCCCAAACCGCAATGAC	8	3	5	7	-1.27	64.8
RTx-2	ATATCAGTCATTGCCCAAAAAAACCGCAATGAC	8	3	5	12	-1.06	63.6
RTx-3	ATATCAGTCATTGCCCAAACCGCAAGAC	7	3	4	7	-0.87	63.3
RTx-4	ATATCAGTCATTGCCCAAAAAAACCGCAAGAC	7	3	4	12	-0.66	62
RTx-5	ATATCAGTCATTGCCCAAACCGCAATTGAC	9	4	5	7	-1.62	65.7
RTx-6	ATATCAGTCATTGCCCAAAAAAACCGCAATTGAC	9	4	5	12	-1.41	64.6
RTx-7	ATATCAGTCAGTGCCCAAACCCACTTGAC	8	4	4	7	-0.93	62.9
RTx-8	ATATCAGTCAGTGCCCAAAAAACCCACTTGAC	8	4	4	12	-0.72	61.8
RTx-9	ATATCAGGTCAGCCAAACCCGTGACC	6	5	1	7	-0.26	59.8
RTx-10	ATATCAGTCGTGCCCAAACCGCAGAC	6	3	3	7	-0.53	61.7
RTx-11	ATATCAGTCGCGCCAAACCGCGAC	5	3	2	7	-0.5	62

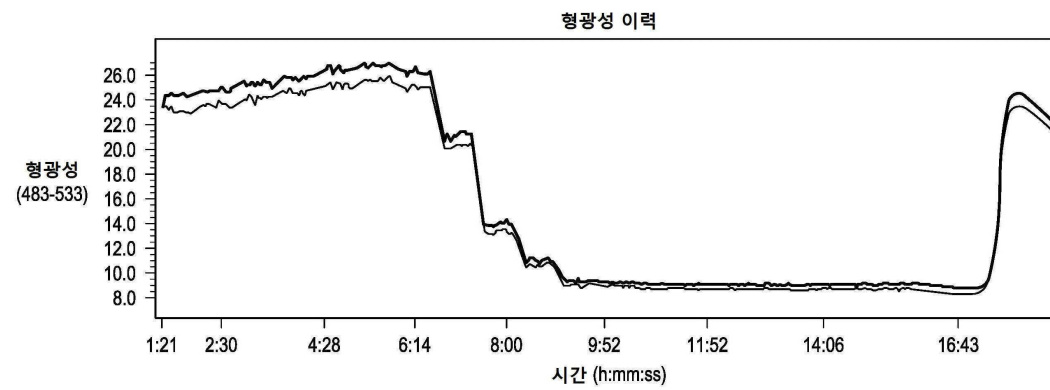
도면3

프로브 컨스트럭트	서열	줄기 (bp)		루프 (bp)	ΔG (kcal/mole)	Tm 줄기 루프 (°C)
RTx2-20	/56-FAM/T/iMe-isodC/ ATATCAGTCATTGCCCAAAAAAAAAAACCC GCAATGACrCATGAGACAGTATAGTAGCGCTGA/3SpC3/	3	5	20	-0.42	60.2
RTx-2	/56-FAM/T/iMe-isodC/ATATCAGTCATTGCCCAAAAAAAAAAACCC GCAATGACrCATGAGACAGTATAGTAGCGCTGA/3SpC3/	3	5	12	-1.06	63.6
RTx-2b	/56-FAM/T/iMe-isodC/ATATCAGTCATTGTGCCCAAAAAAAAAAACCC GCACATGACrCATGAGACAGTATAGTAGCGCTGA/3SpC3/	3	6	12	-2.28	68.7
RTx-2c	/56-FAM/T/iMe-isodC/ATATCAGTCATTTGCCCAAAAAAAAAAACCC GCAAAATGACrCATGAGACAGTATAGTAGCGCTGA/3SpC3/	3	6	12	-1.41	64.6
RTx-6	/56-FAM/T/iMe-isodC/ATATCAGTCATTGCCCAAAAAAAAAAACCC GCAATTGACrCATGAGACAGTATAGTAGCGCTGA/3SpC3/	4	5	12	-1.41	64.6
RTx-2-12AT-1	/56-FAM/T/iMe-isodC/ATATCAGTCATTGACCAAAAAAAAAAACCC TCAATGACrCATGAGACAGTATAGTAGCGCTGA/3SpC3/	3	5	12	0.09	57.5
RTx-2-12AT-2	/56-FAM/T/iMe-isodC/ATATCAGTCATTGTACCAAAAAAAAAAACCC GTAATGACrCATGAGACAGTATAGTAGCGCTGA/3SpC3/	3	5	12	0.54	55.1
RTx-2-12AT-3	/56-FAM/T/iMe-isodC/ATATCAGTCATTGTACCAAAAAAAAAAACCC GTACATGACrCATGAGACAGTATAGTAGCGCTGA/3SpC3/	3	6	12	-0.68	61.3
RTx-2-12AT-4	/56-FAM/T/iMe-isodC/ATATCAGTCATTGTACCAAAAAAAAAAACCC GTACAATGACrCATGAGACAGTATAGTAGCGCTGA/3SpC3/	3	7	12	-1.03	62.4
RTx-8-12AT-3	/56-FAM/T/iMe-isodC/ATATCAGTCATTGTGCCCAAAAAAAAAAAAA AAAAACCGCACATTGACrCATGAGACAGTATAGTAGCGCTGA/3SpC3/	4	6	20	-1.99	66.4

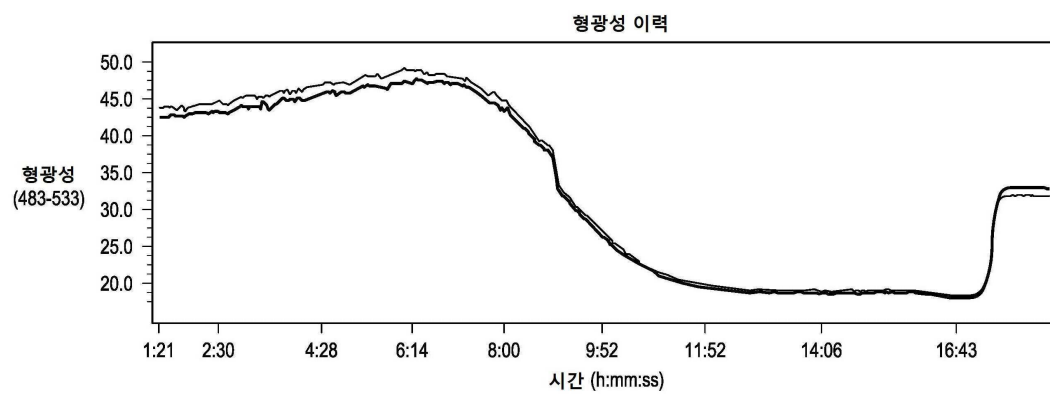
도면4



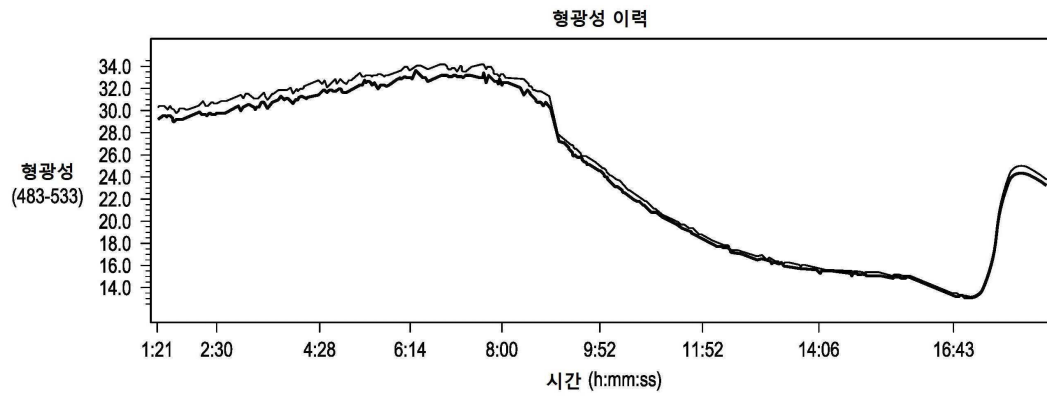
도면5



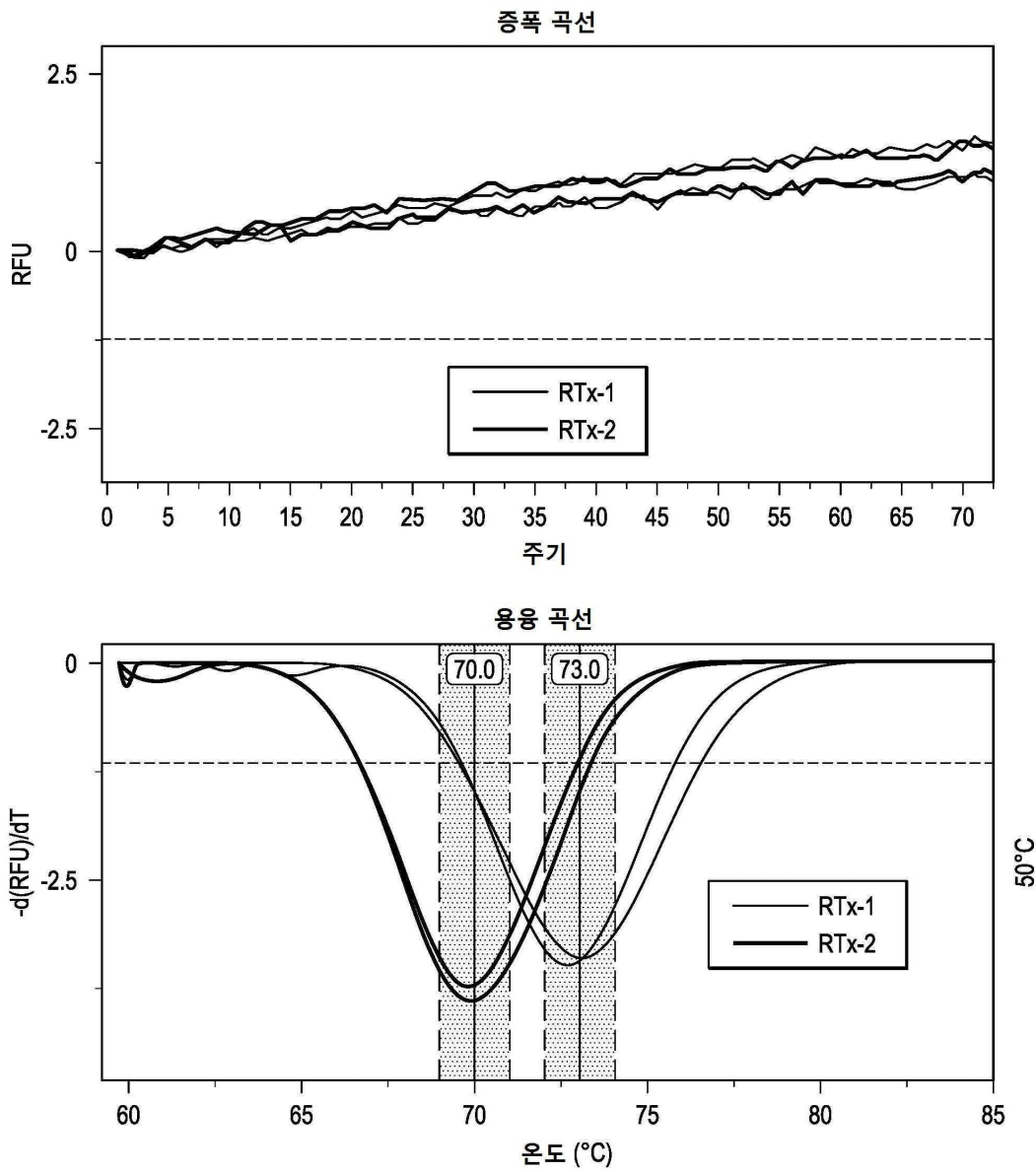
도면6



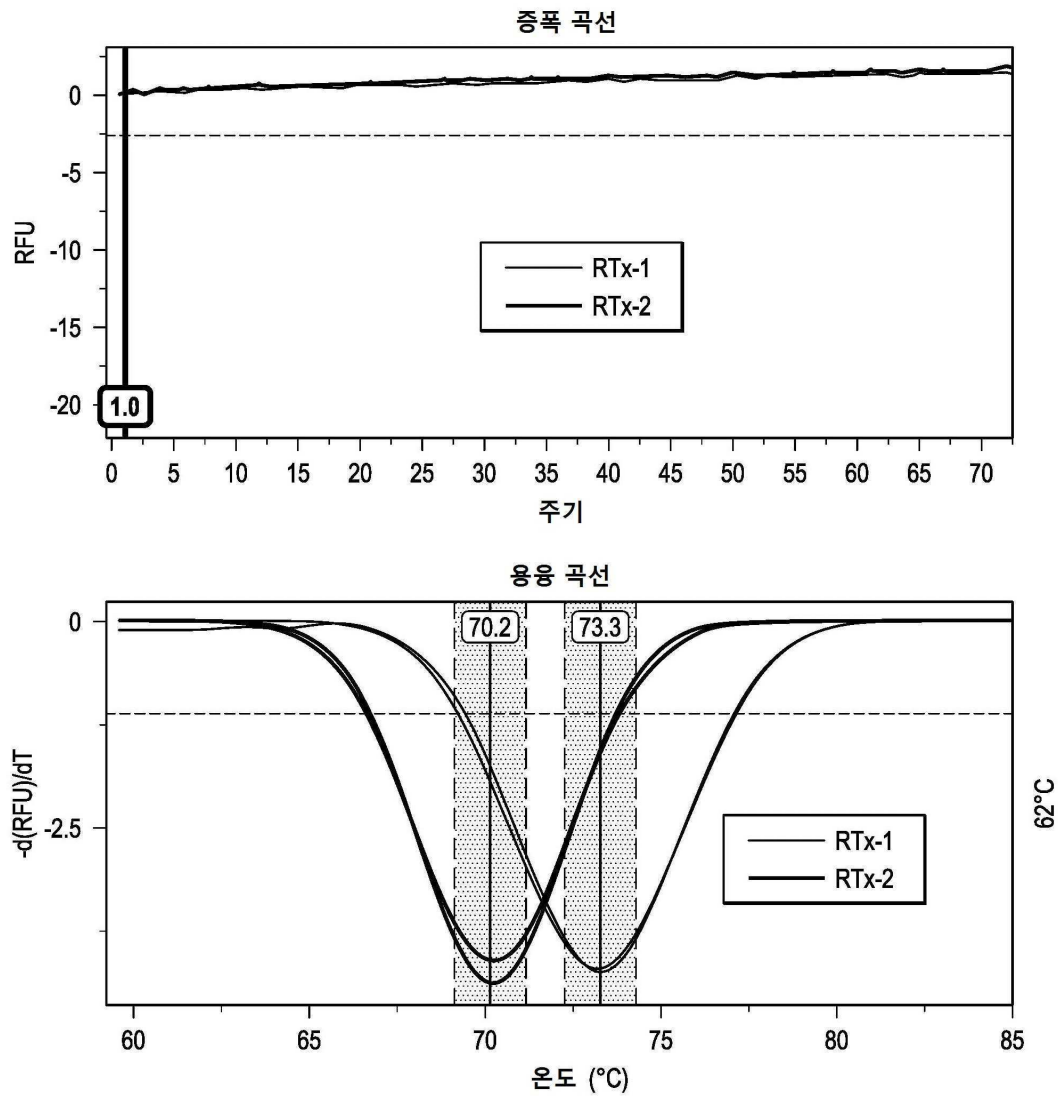
도면7



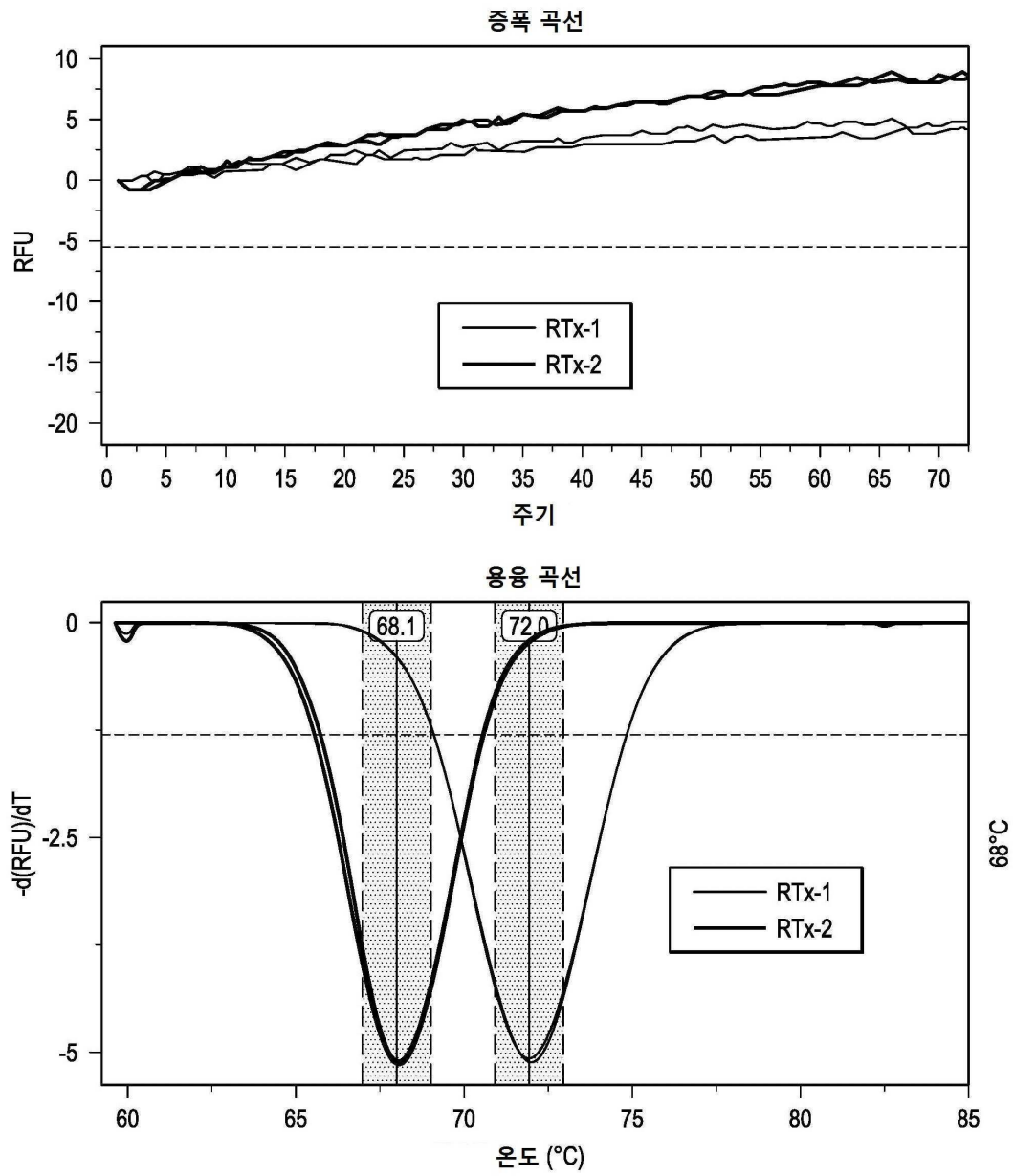
도면8a



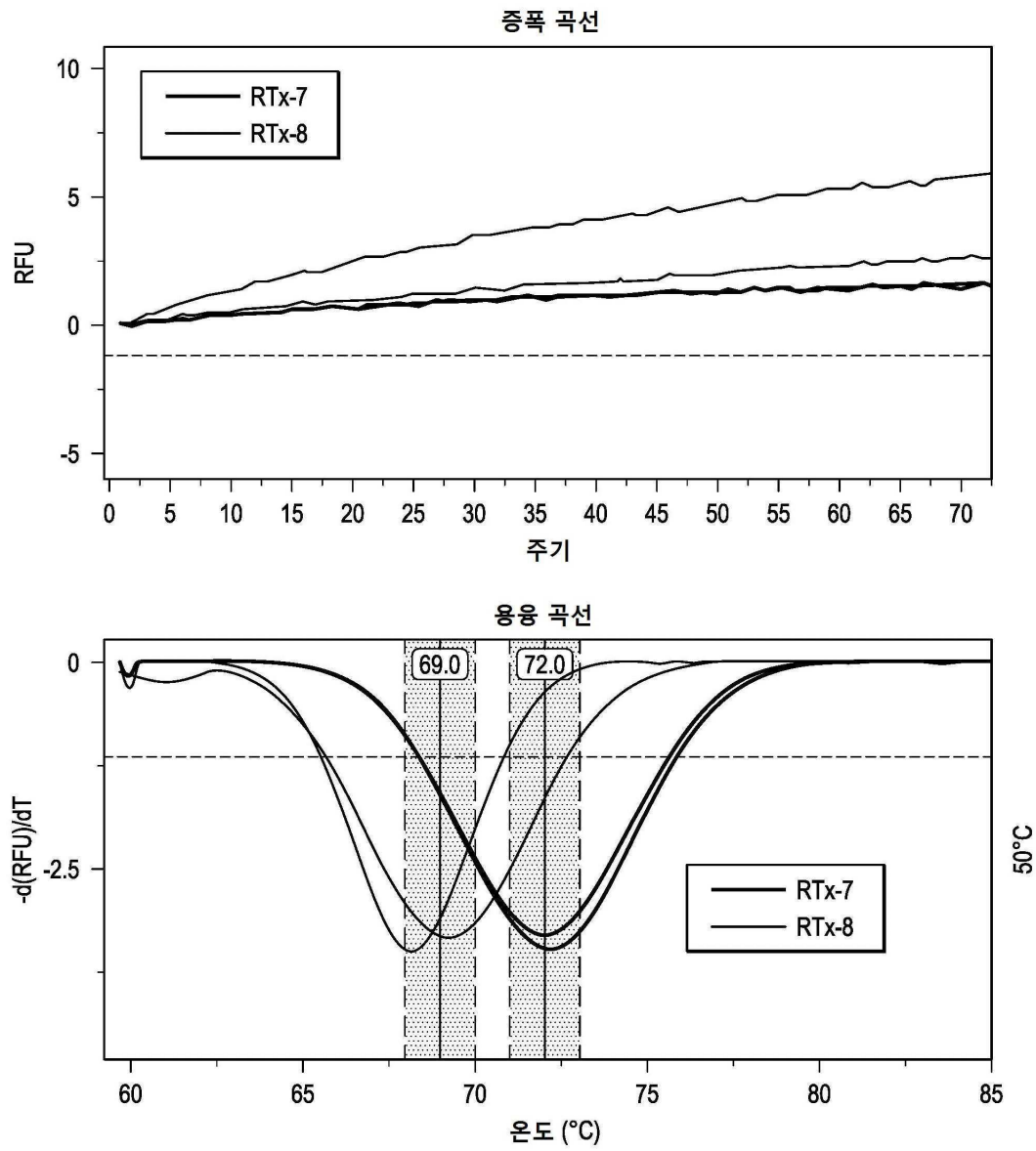
도면 8b



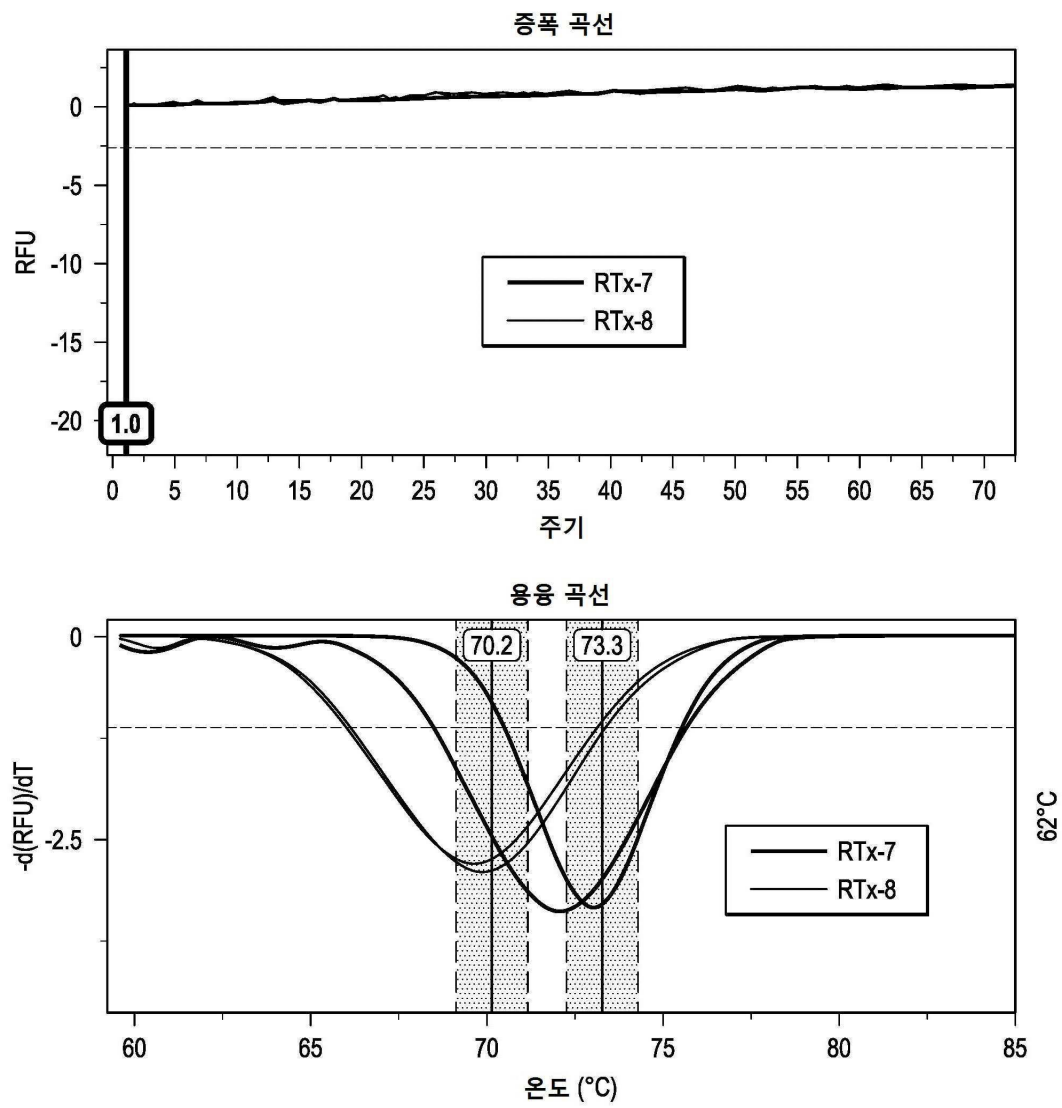
도면8c



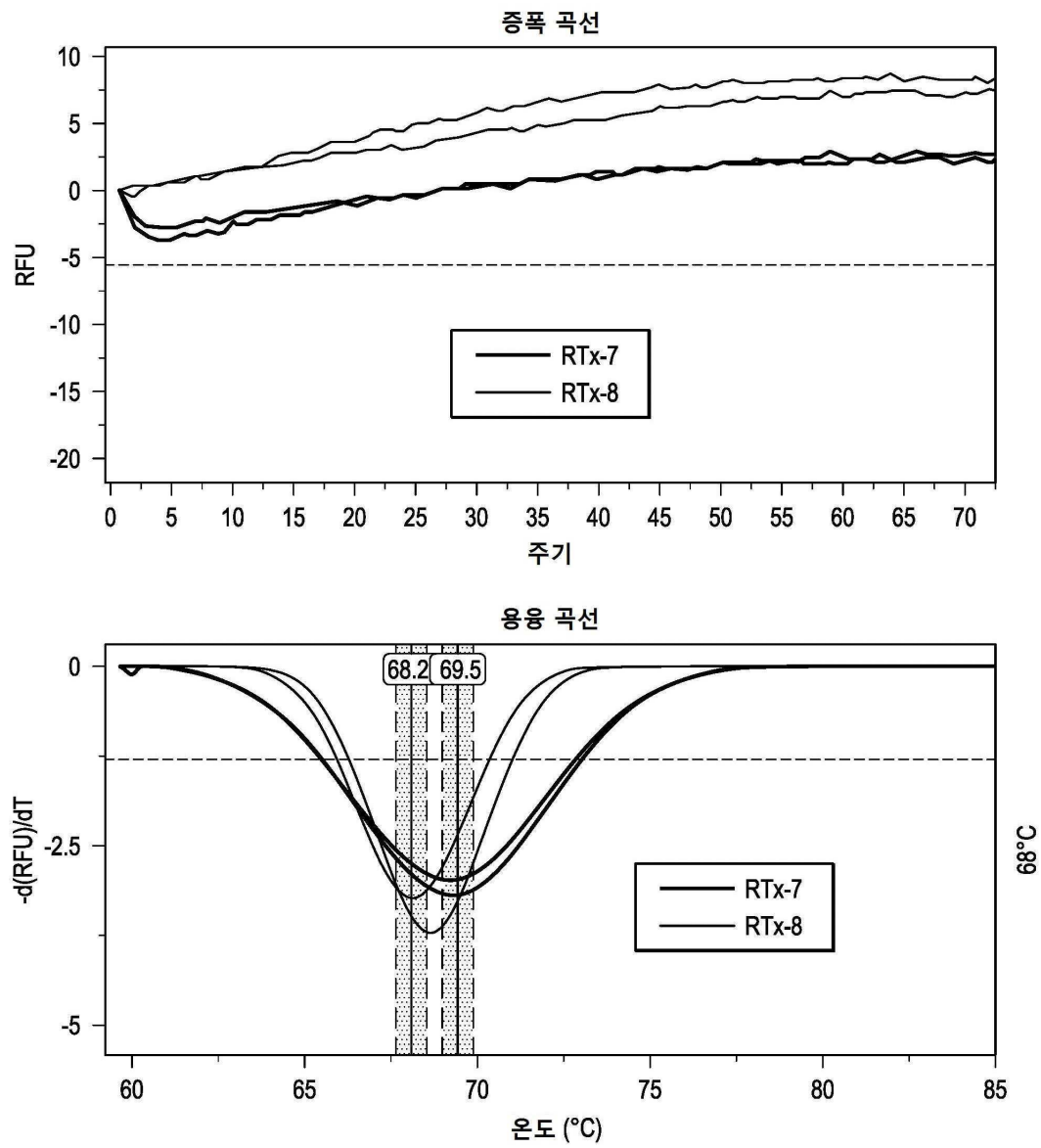
도면9a



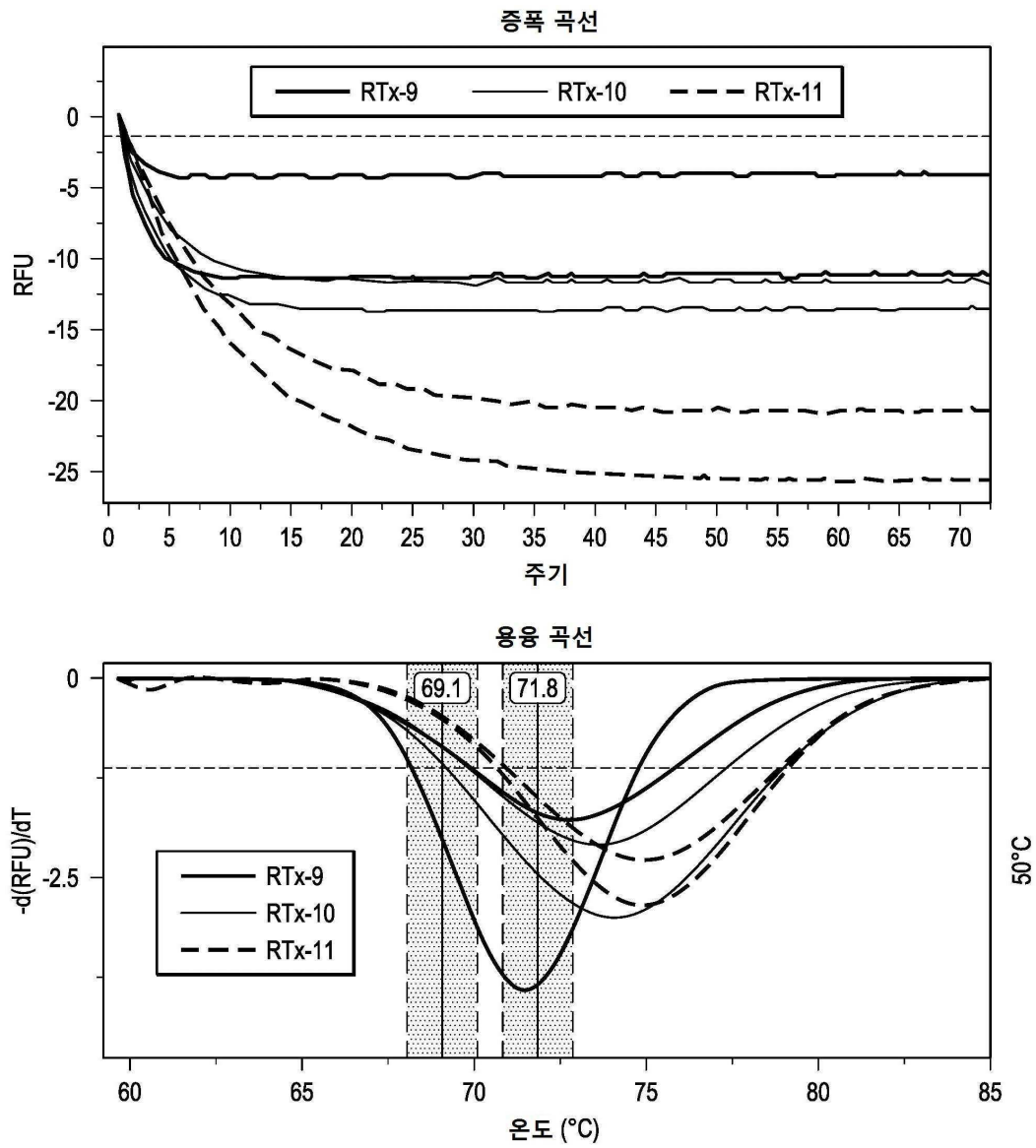
도면9b



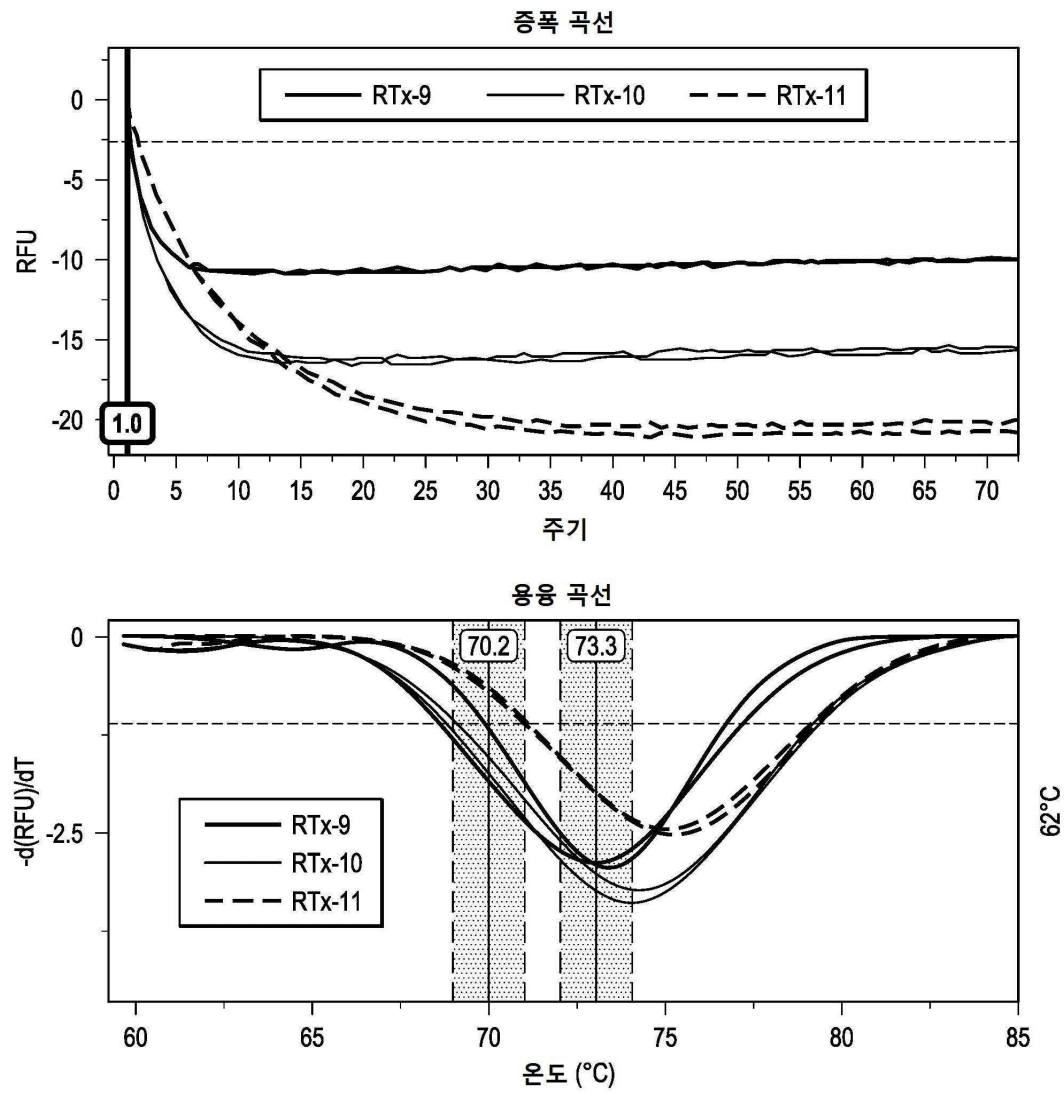
도면9c



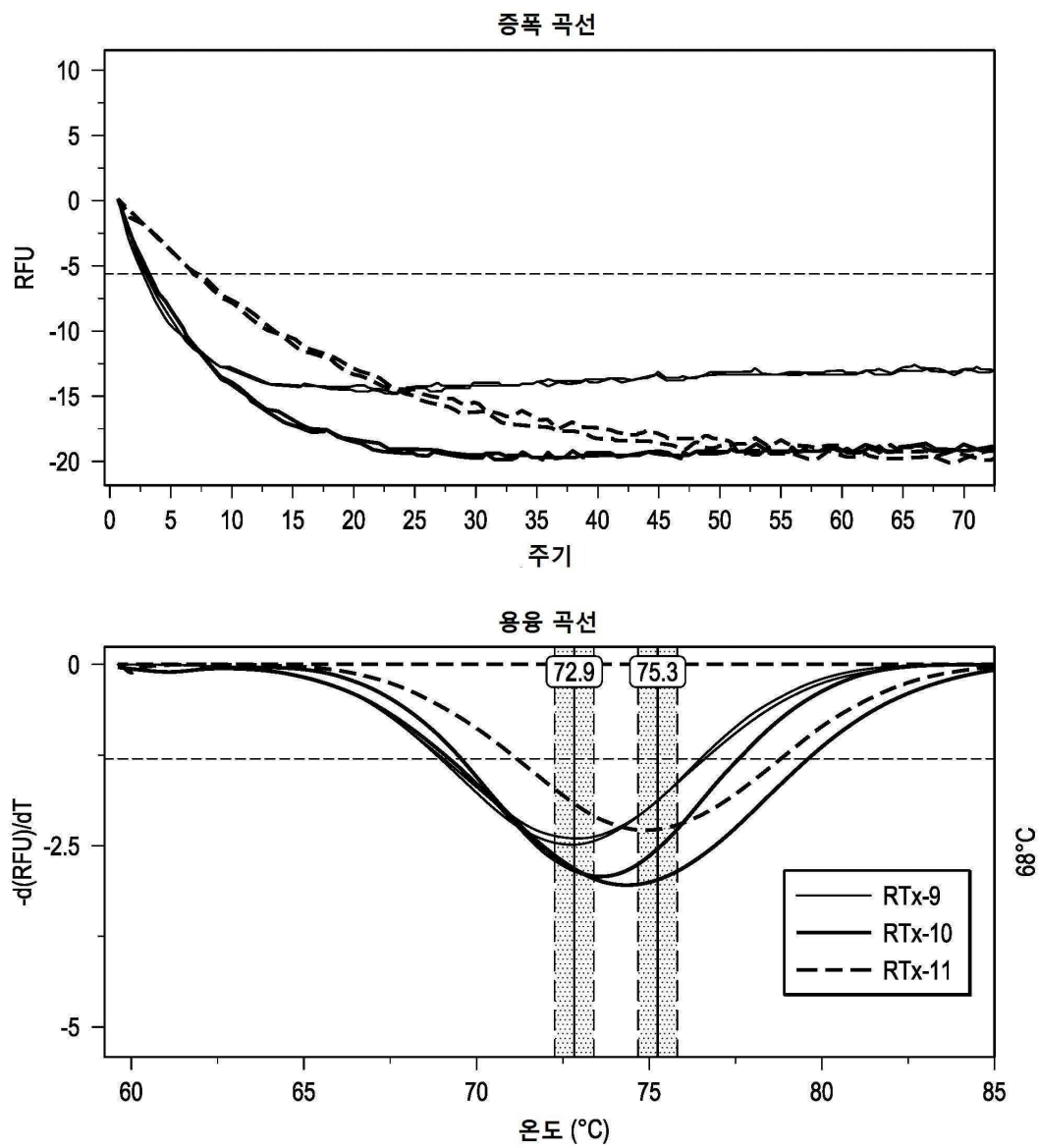
도면10a



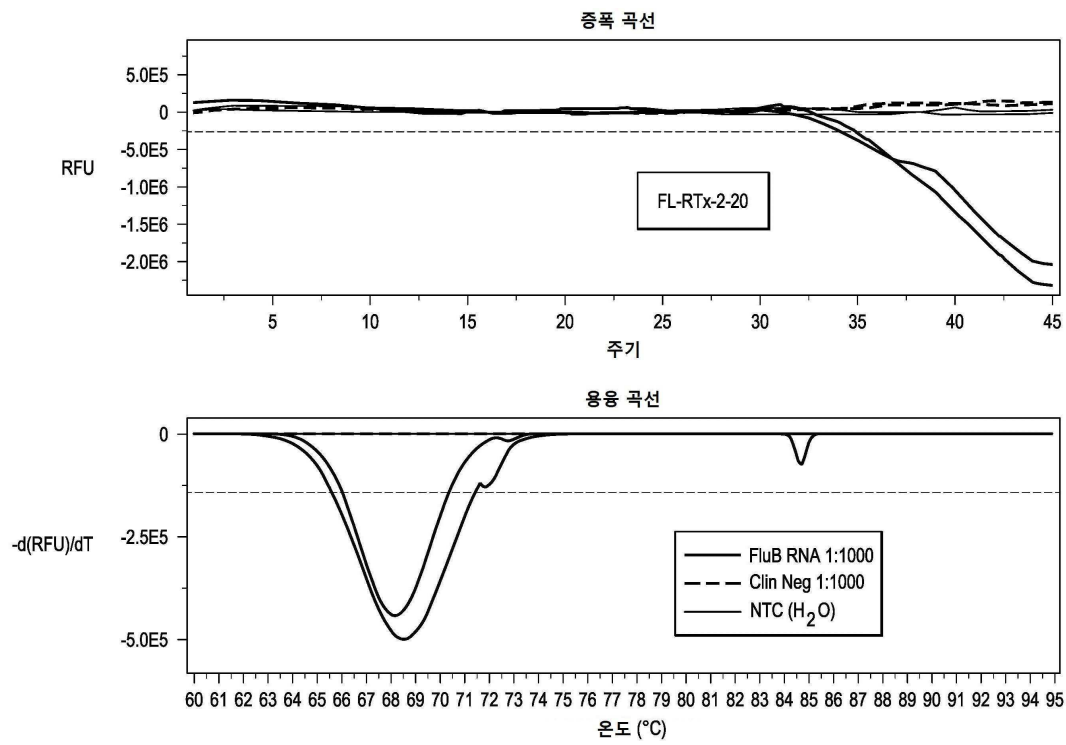
도면10b



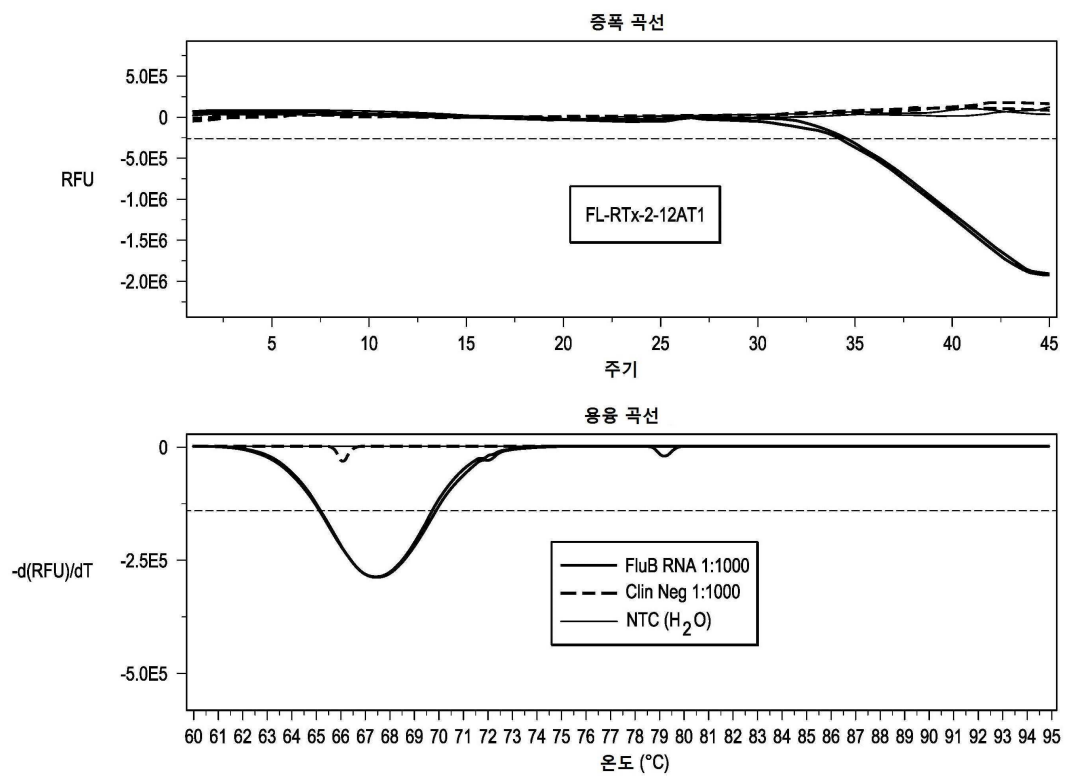
도면10c



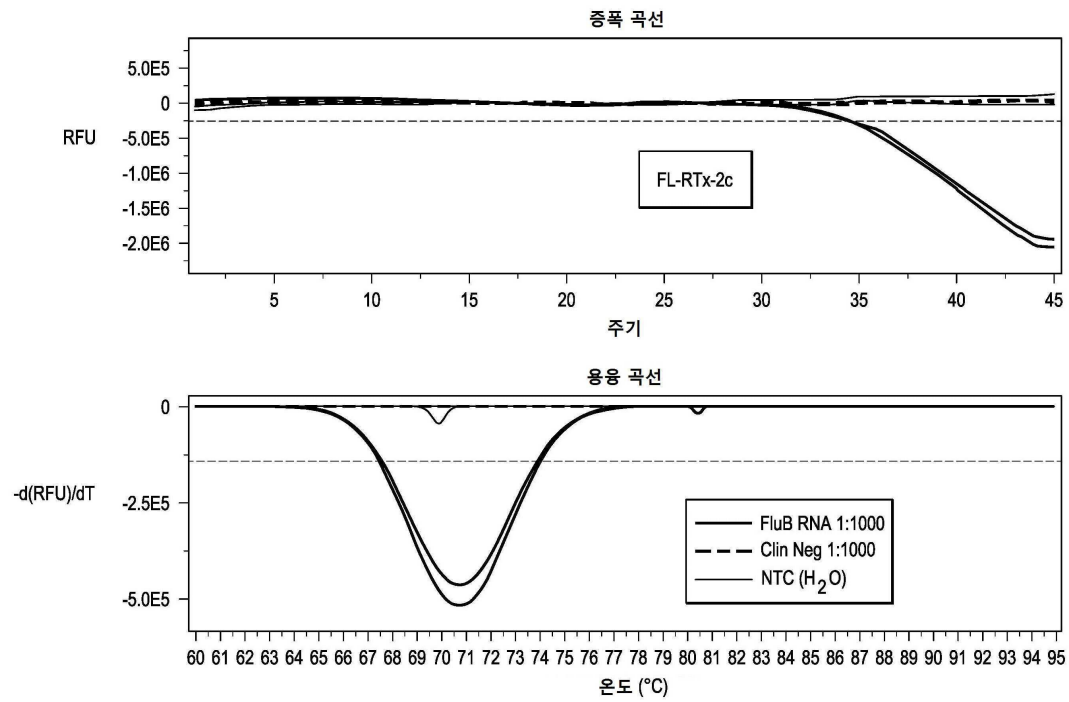
도면11a



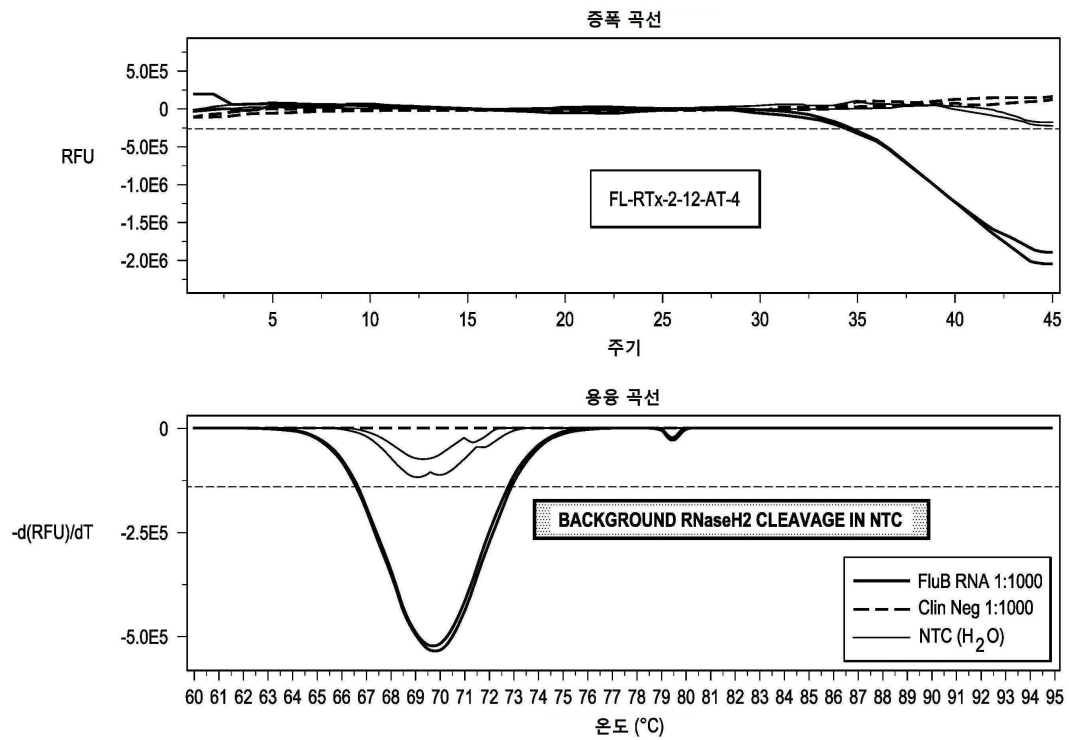
도면11b



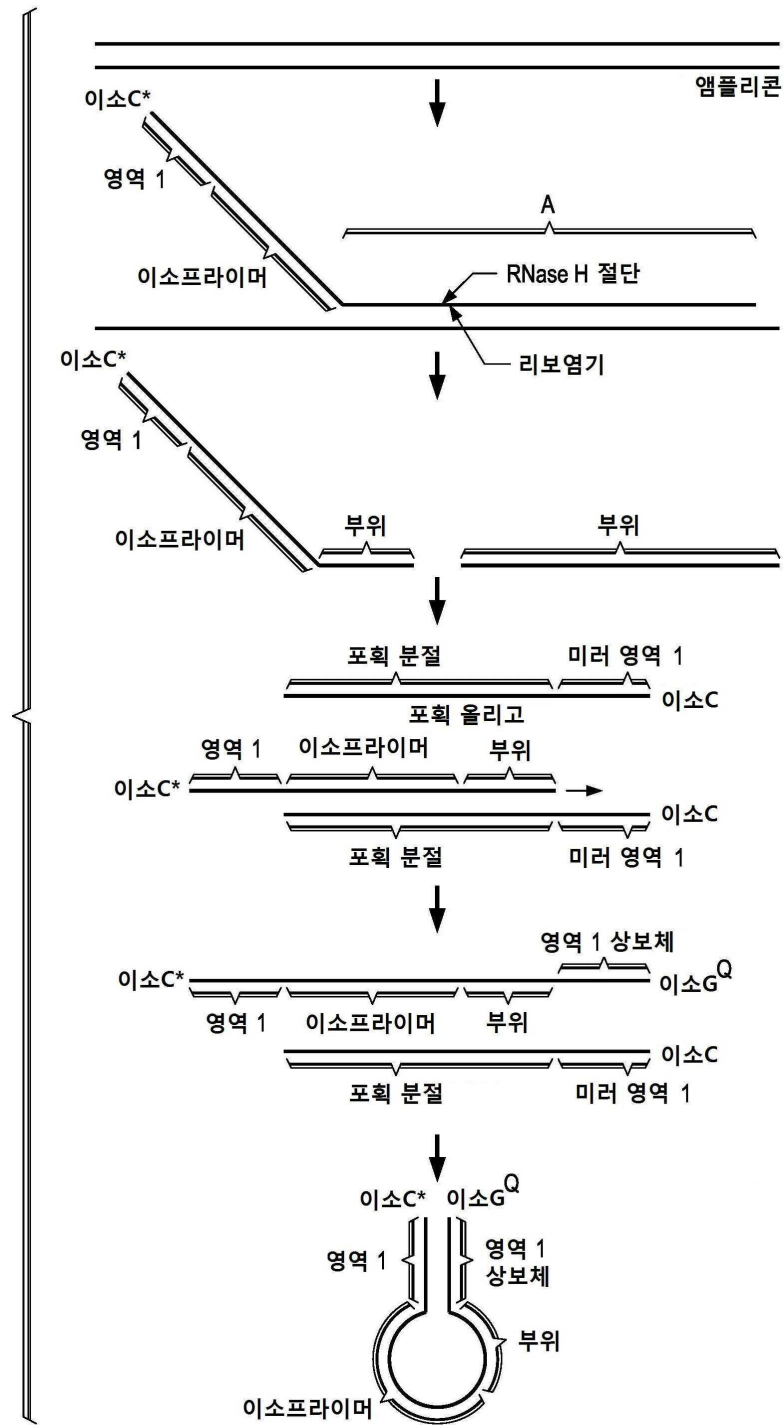
도면11c



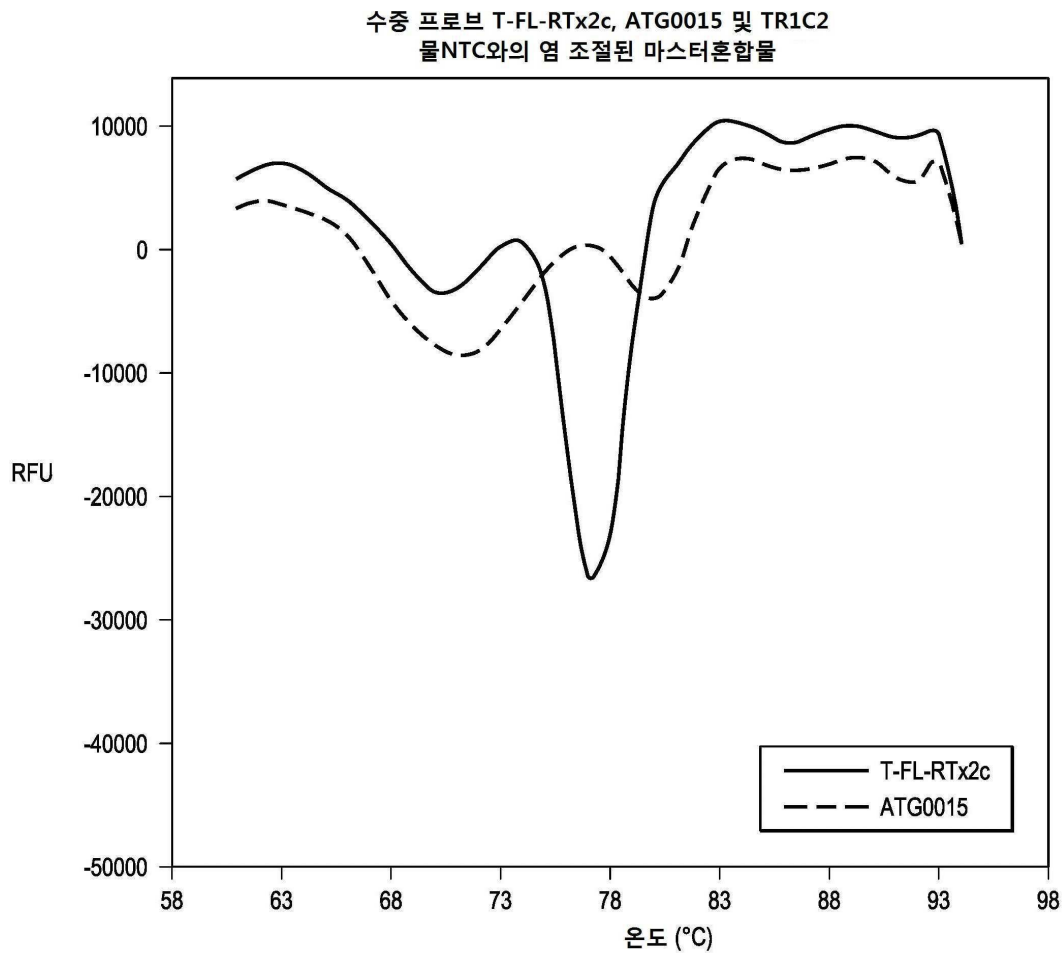
도면11d



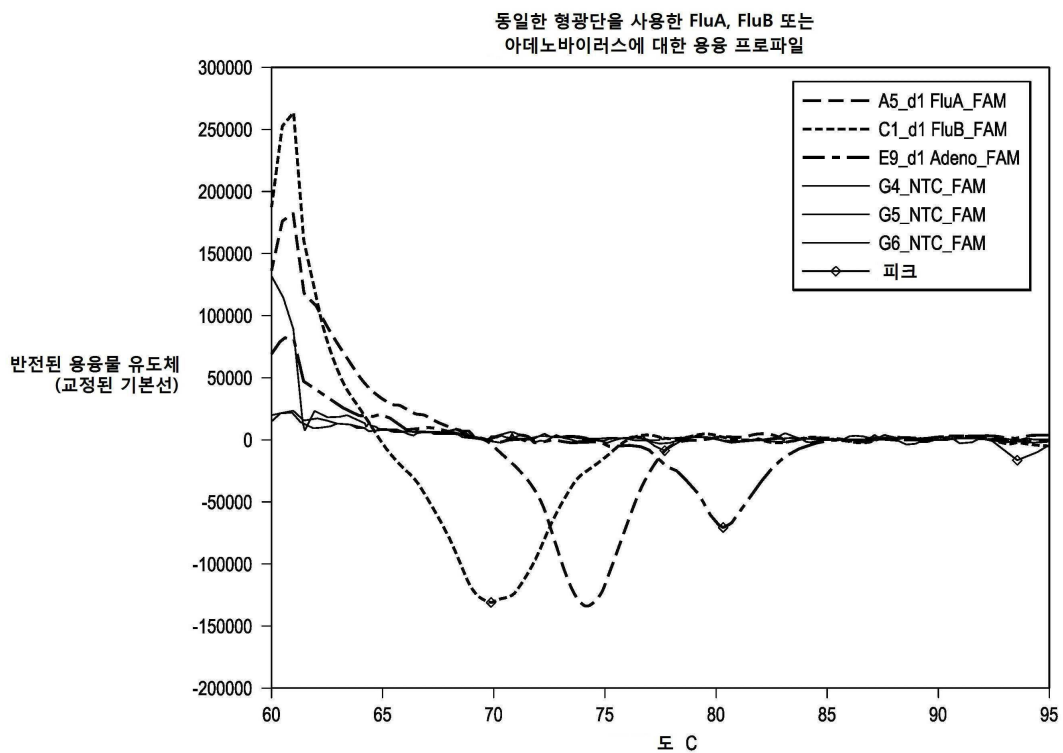
도면12



도면13

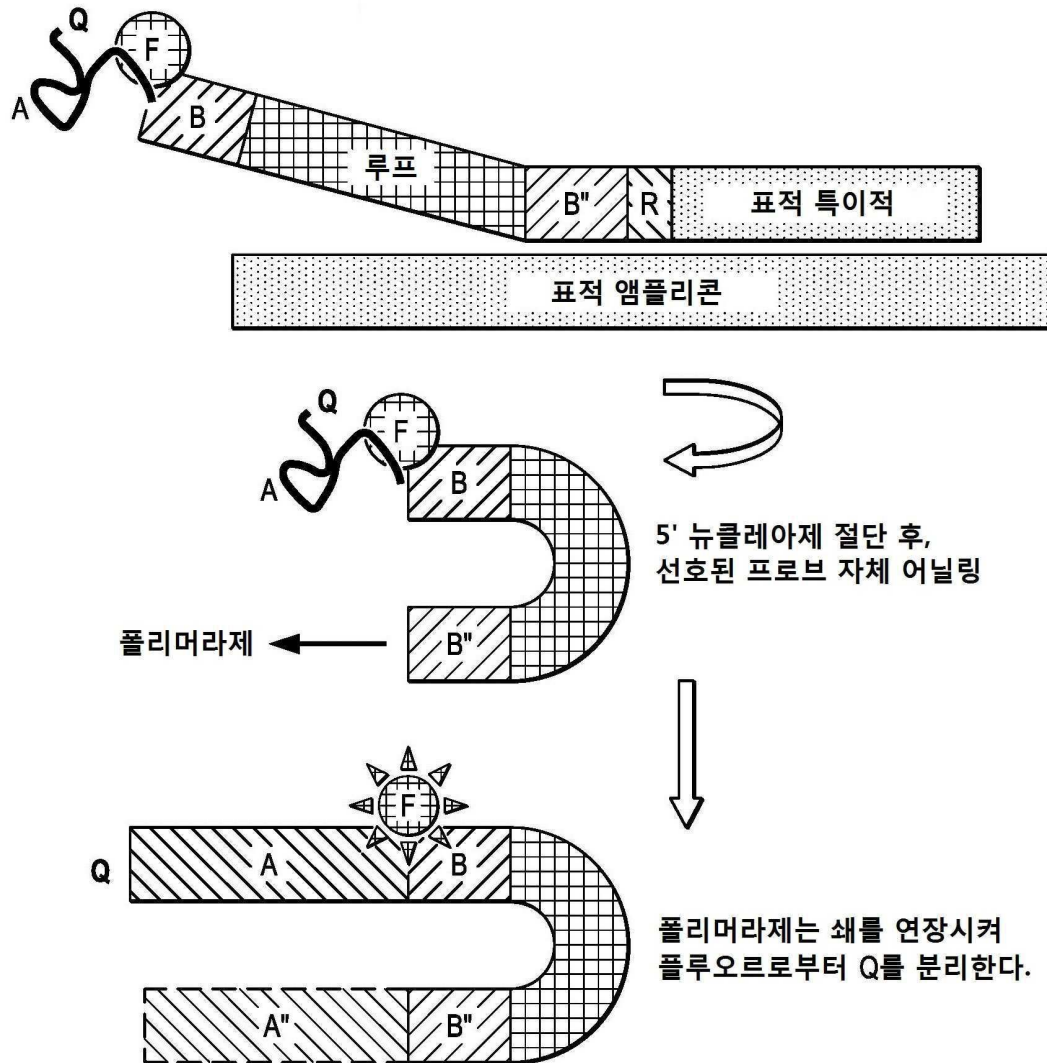


도면14

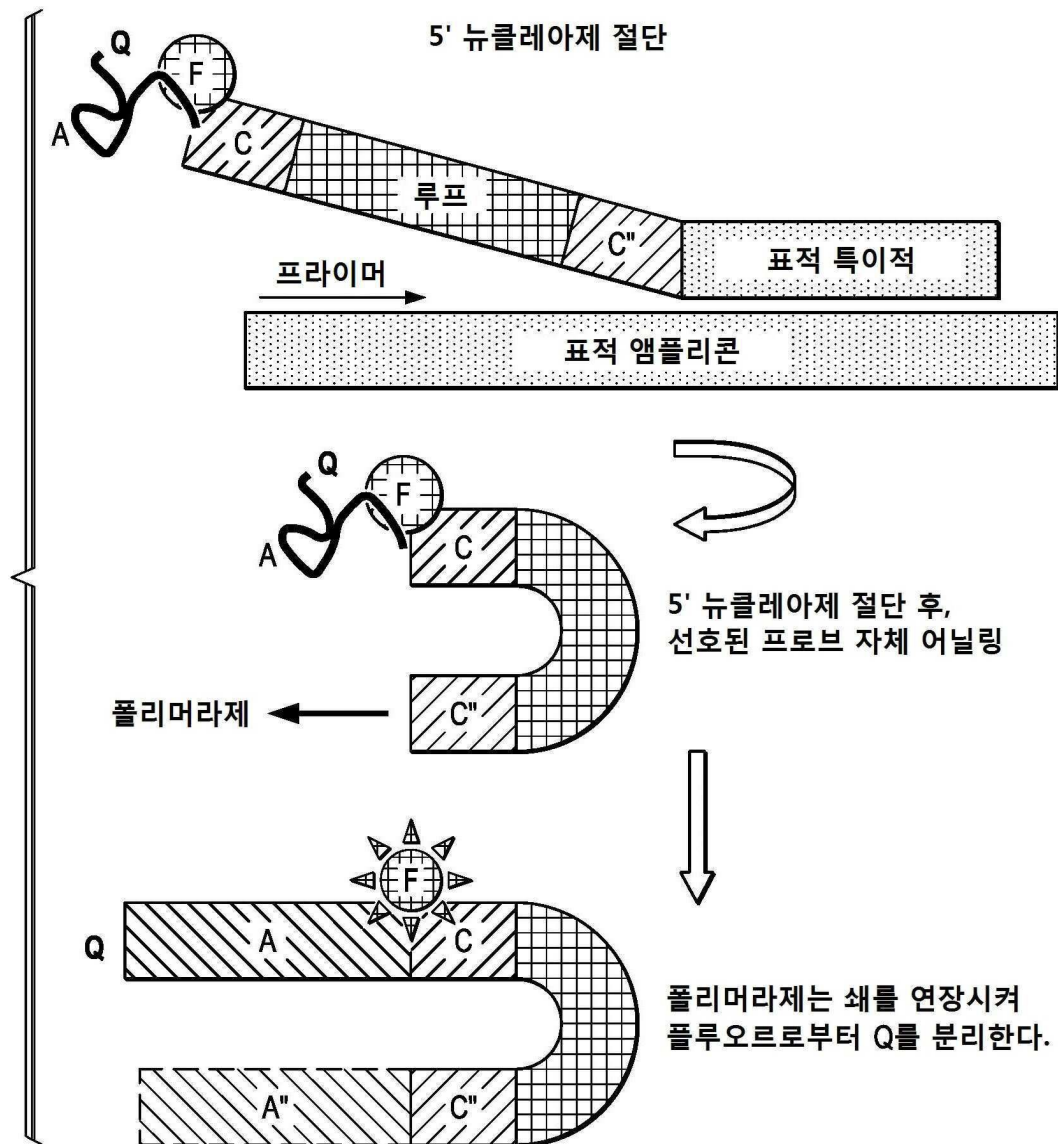


도면15

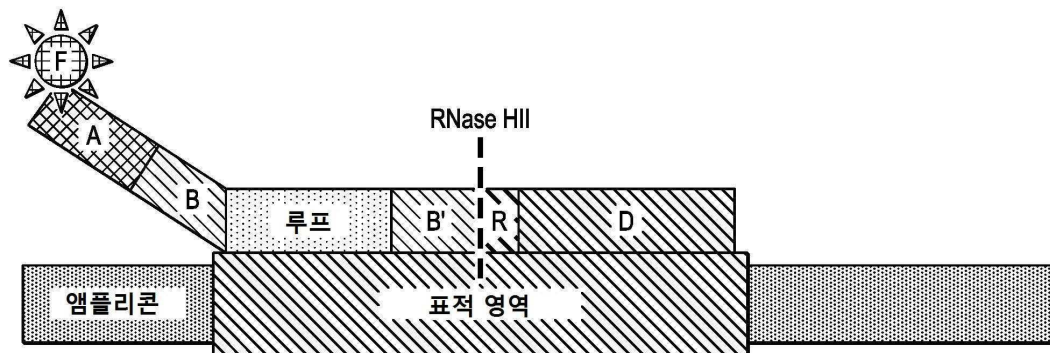
퀀처를 사용한 리보절단/연장에 의한 플루오르 분리



도면16



도면17



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> LUMINEX CORPORATION

<120> PROBES FOR IMPROVED MELT DISCRIMINATION AND MULTIPLEXING IN
NUCLEIC ACID ASSAYS

<130> IP20224222US

<150> US 62/035,783

<151> 2014-08-11

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic probe

<400> 1

atatcagtca ttgcccaaac cgcaatgac 29

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic probe

<400> 2

atatcagtca ttgcccaaaa aaaaccgcaa tgac 34

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic probe

<400> 3

atatcagtct tgcccaaacc gcaagac 27

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic probe

<400> 4

atatcagtct tgcccaaaaa aaaccgcaag ac	32
<210> 5	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic probe	
<400> 5	
atatcagtca attgcccaaa ccgcaattga c	31
<210> 6	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic probe	
<400> 6	
atatcagtca attgcccaaa aaaaaccgca attgac	36
<210> 7	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic probe	
<400> 7	
atatcagtca agtgccaaac ccacttgac	29
<210> 8	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic probe	
<400> 8	
atatcagtca agtgccaaaa aaaaccact tgac	34
<210> 9	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic probe
 <400> 9
 atatcaggtc agccaaaccc tgacc 25
 <210> 10
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic probe
 <400> 10
 atatcagtct gcccaaaccg cagac 25
 <210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic probe
 <400> 11
 atatcagtcg cccaaaccgc gac 23
 <210> 12
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic probe
 <220><221> modified_base
 <222> (42)..(42)
 <223> ribocytosine
 <400> 12
 atatcagtca ttgcccaaaa aaaaaaaaaa aaccgcaatg accatgagac agtatagtag 60
 cgctga 66
 <210> 13
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic probe

<220><221> modified_base
 <222> (35)..(35)
 <223> ribocytosine
 <400> 13
 atatcagtca ttgcccaaaa aaaaccgcaa tgaccatgag acagtatagt agcgctga 58
 <210> 14
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic probe
 <220><221> modified_base
 <222> (37)..(37)
 <223> ribocytosine
 <400> 14
 atatcagtca tgtgcccaaaa aaaaaccgca catgaccatg agacagtata gtagcgctga 60
 <210>
 > 15
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic probe
 <220><221> modified_base
 <222> (37)..(37)
 <223> ribocytosine
 <400> 15
 atatcagtca tttgcccaaaa aaaaaccgca aatgaccatg agacagtata gtagcgctga 60
 <210> 16
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic probe
 <220><221> modified_base
 <222> (37)..(37)
 <223> ribocytosine
 <400> 16

atatcagtca attgcccaaa aaaaaccgca attgacatg agacagtata gtagcgctga 60
 <210> 17

<211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic probe
 <220><221> modified_base
 <222> (35)..(35)
 <223> ribocytosine
 <400> 17

atatcagtca ttgaccaaaa aaaacctcaa tgaccatgag acagtatagt agcgctga 58
 <210> 18
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic probe
 <220><221> modified_base
 <222> (35)..(35)
 <223> ribocytosine
 <400> 18

atatcagtca ttacccaaaa aaaaccgtaa tgaccatgag acagtatagt agcgctga 58
 <210> 19
 <211>
 > 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic probe
 <220><221> modified_base
 <222> (37)..(37)
 <223> ribocytosine
 <400> 19

atatcagtca tgtaccaaaa aaaaaccgta catgacatg agacagtata gtagcgctga 60
 <210> 20
 <211> 62

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic probe
 <220><221> modified_base
 <222> (39)..(39)
 <223> ribocytosine
 <400> 20
 atatcagtca ttgtacccaa aaaaaaccgt acaatgacca tgagacagta tagtagcgct 60
 ga 62

<210> 21
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic probe
 <220><221> modified_base
 <222> (47)..(47)
 <223> ribocytosine
 <400> 21
 atatcagtca atgtgcccaa aaaaaaaaaa aaaaccgcac attgaccatg agacagtata 60
 gtagcgctga 70

<210> 22
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer
 <400> 22
 gaagcatttg aaatagcaga agg 23

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

cacagagcgt tcctagtttt act	23
<210> 24	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic probe	
<400> 24	
atatcagtca ttgccc aaa a	21
<210> 25	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic probe	
<220><221> modified_base	
<222> (15)..(15)	
<223> ribocytosine	
<400> 25	
aaaccgcaaa tgacatgag acagtatagt agcgctga	38
<210> 26	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic probe	
<400> 26	
caaaaaaaag tcatgttacc aaaa	24
<210> 27	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic probe	
<220><221> modified_base	
<222> (15)..(15)	
<223> ribocytosine	
<400> 27	

aaacctaaca tgaccatgag acagtatagt agcg 34

<210> 28

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic probe

<400> 28

catatcatca tcatttcatt ttaggcccaa aa 32

<210> 29

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic probe

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> ribocytosine

<400> 29

aaaccgccta aaatcccctt agtcagaggt gac 33

<210> 30

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Synthetic probe

<400> 30

ctccatcttc ctctctctct ctcttcgaga ccaaaa 36

<210> 31

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic probe

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> ribocytosine

<400> 31

aaacctctcg aagcgtcctg tccggc

26