



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. (11) 공개번호 10-2007-0011354
C12Q 1/68 (2006.01) (43) 공개일자 2007년01월24일

(21) 출원번호	10-2006-7020635	(87) 국제공개번호	WO 2005/085476
(22) 출원일자	2006년10월02일	(43) 공개일자	2007년01월24일
심사청구일자	없음		
번역문 제출일자	2006년10월02일		
(86) 국제출원번호	PCT/US2005/007049	(87) 국제공개번호	WO 2005/085476
국제출원일자	2005년02월28일	국제공개일자	2005년09월15일

(30) 우선권주장 10/791,209 2004년03월01일 미국(US)

(71) 출원인 바이오셉트 인코포레이티드
미국 캘리포니아 92121 샌 디에고 낸시 리지 드라이브 5810

(72) 발명자 한 순갑
미국 캘리포니아 92672 산 클레멘트 비아 델핀 511

(74) 대리인 차윤근

전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) **취약 X염색체 증후군과 같은 STRP의 검출 방법**

(57) 요약

취약 X염색체 증후군과 같은 단기일렬반복 다형성(STRP)을 검출하는 방법으로서, 모든 당해 STRs 및 이 STRs에 인접한 핵산의 실질적인 인접 단편을 포함하는 게놈 DNA 내의 크로모솜을 따라 위치하는 핵산을 증폭시키기 위해 PCR이 이용된다. 이후, 단일-가닥 생성물이 수득되고, (i) STRs 및(ii) 인접 DNA 단편을 표적으로 하는 비색적으로 표지된 올리고뉴클레오티드가 이러한 단일-가닥 생성물과 부합되며, 이후 고체상에 결합되고, 잔류하는 표적 물질과 분리된다. 표지된 올리고뉴클레오티드 표적 물질은 염기로 처리하여 회수되고, 그 다음 이에 상보적인 적절한 올리고뉴클레오티드 프로브를 함유하는 복수의 지점을 보유하는 마이크로어레이에 부합화된다. 부합화에 이어서, 부합화된, 표지된 표적 물질이 마이크로어레이 상의 특정 지점에서 나타내는 비색적 강도가 측정되어 알려진 대조구 시료의 결과와 비교되는 개별적인 수치를 수득하여, 분석되는 당해 DNA의 부위 내 STRs의 개수를 정확하게 정량한다.

특허청구의 범위

청구항 1.

(a) 시험할 게놈 DNA를 수득하는 단계,

- (b) PCR을 이용하여 FRAXA 유전자의 비해독 부분(portion)의 모든 CGG 반복서열 및 상기 CGG 반복서열에 인접하는 핵산의 실질적인 인접 단편을 포함하는 게놈 DNA 내의 X-크로모솜을 따라 위치하는 핵산을 증폭하는 단계,
- (c) 단계 (b)의 증폭된 핵산에서 단일-가닥 생성물을 수득하는 단계,
- (d) (i) (CGG) 반복서열 및 (ii) 상기 인접 핵산 단편을 표적으로 하는 비색적으로 표지된 올리고뉴클레오티드를 단계 (c)의 단일-가닥 생성물과 부합화(hybridization)하는 단계,
- (e) 단계(c)의 상기 단일-가닥 생성물을 고체상에 결합하는 단계,
- (f) 단계 (d)의 상기 부합화된 생성물을 잔류하는 표적 물질과 분리시키는 단계,
- (g) 표지된 표적 물질을 단계 (f)의 분리된 생성물에서 회수하는 단계,
- (h) 이후, 단계 (g)의 회수된, 표지된 표적 물질을 이에 상보적인 적절한 올리고뉴클레오티드 프로브를 함유하는 복수의 지점을 보유하는 마이크로어레이에 부합화하는 단계,
- (i) 마이크로어레이에 부합화한 후, 마이크로어레이 상의 특정 지점에 존재하는 부합화된, 표지된 표적 물질의 비색적 강도를 측정하여 이들에 대한 개별적인 값을 수득하는 단계, 및
- (j) 단계 (i)의 결과를, 미리 알고 있는 대조 시료의 결과와 비교하여 수득한 게놈 DNA의 FRAXA 유전자 내 CGG 반복서열의 수를 정확하게 정량하는 단계를 포함하는 취약 X염색체 증후군을 나타내는 돌연변이의 검출방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 CGG 반복서열의 수는 하기의 방정식을 이용하여 결정되는 것이 특징인, 취약 X염색체 증후군을 나타내는 돌연변이의 검출방법:

$N = 30 + (A - 1.03)66.4$, 이 식에서 N은 반복서열의 수이고 A는 CGG 프로브와 부합화된 표적의 CI 대 인접 핵산 단편에 대한 프로브에 부합화된 표적의 CI의 비율이다.

청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 증폭된 핵산에는 X-크로모솜 상의 CGG 반복서열 구역 및 적어도 상당 부분의 FRAXA 유전자의 3' 해독 단편이 포함되는 것이 특징인, 취약 X염색체 증후군을 나타내는 돌연변이의 검출방법.

청구항 4.

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, CGG 반복서열에 대한 상기 부합화 표적은 3 내지 7개의 트리플렛(triplet)을 함유하고, CGG 반복서열 프로브는 6 내지 20 트리플렛 및 상기 반복서열 표적의 적어도 2배에 해당하는 트리플렛을 함유하는 것이 특징인, 취약 X염색체 증후군을 나타내는 돌연변이의 검출방법.

청구항 5.

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표지된 표적은 이의 5' 말단에 형광 염료를 운반하는 것이 특징인, 검출방법.

청구항 6.

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)에서 전체 CGG 반복서열 구역 및 적어도 30 뉴클레오티드를 함유하는 핵산의 상기 인접 단편을 포함하는 DNA 부위의 3' 경계에 상보적인 한쌍의 포워드 및 리버스 프라이머를 이용하는 것이 특징인, 취약 X염색체 증후군을 나타내는 돌연변이의 검출방법.

청구항 7.

제6항에 있어서, 상기 인접 단편은 CGG 반복서열 구역의 3'이고, FRAXA 유전자의 해독된 단편 중 적어도 상당 부분을 함유하는 것이 특징인, 취약 X염색체 증후군을 나타내는 돌연변이의 검출방법.

청구항 8.

제6항에 있어서, 단계 (b)에서 이용된, DNA 부위의 안티센스 가닥의 3' 경계에 상보적인 포워드 프라이머가 그 5' 말단에 고정 반족(anchoring moiety)을 보유하는 것이 특징인, 취약 X염색체 증후군을 나타내는 돌연변이의 검출방법.

청구항 9.

제8항에 있어서, 상기 리버스 프라이머가 그 5' 말단에 포스페이트를 보유하고, 단계 (c)에서 수득한 상기 단일-가닥 생성물은 엑소뉴클레아제로 이중-가닥 PCR 생성물의 안티센스 가닥을 분해하여 수득하는 것이 특징인, 취약 X염색체 증후군을 나타내는 돌연변이의 검출방법.

청구항 10.

제9항에 있어서, 상기 고정 반족은 비오틴이고, 단계 (e) 및 단계 (f)는 단계 (d)에 이어서 수행되며, 상기 부합화된 생성물이 고체상(solid phase)에 부착된 아비딘(avidin)에 결합 및 세척에 의하여 분리되는 것이 특징인, 취약 X염색체 증후군을 나타내는 돌연변이의 검출방법.

청구항 11.

제10항에 있어서, 단계 (d)에서 부합화된 상기 표지된 표적 물질이, 단계 (d)의 부합화된 생성물을 처리하여 상기 가닥을 변성시키고 그 상청액을 수집함으로써 단계 (g)에서 회수되는 것이 특징인, 취약 X염색체 증후군을 나타내는 돌연변이의 검출방법.

청구항 12.

제9항에 있어서, 단계 (b)에 이어서, 엑소뉴클레아제로 처리하기 이전에 비결합 프라이머를 제거하기 위해 증폭된 핵산 생성물을 정제하여, 단일-가닥 표적 물질을 수득하는 것이 특징인, 취약 X염색체 증후군을 나타내는 돌연변이의 검출방법.

청구항 13.

제6항 내지 제12항에 있어서, 상기 포워드 프라이머에는 SEQ ID NO:1이 포함되고, 상기 리버스 프라이머에는 SEQ ID NO:2가 포함되는 것이 특징인, 검출방법.

청구항 14.

- (a) 시험할 게놈 DNA를 수득하는 단계,
- (b) PCR, 및 포워드 프라이머 및 리버스 프라이머를 이용하여 모든 CGG 반복서열 및 해독된 FRAXA 유전자의 인접 부분을 포함하는 게놈 DNA 내의 X-크로모솜을 따라 위치하는 핵산을 증폭하는 단계(여기서 상기 포워드 프라이머는 이의 5' 말단에 고정 반쪽을 보유한다),
- (c) 단계 (b)의 이중 가닥 생성물을 정제하는 단계,
- (d) 엑소뉴클레아제로 단계 (c)의 이중 가닥 생성물의 안티센스 가닥을 분해시켜 단계 (c)의 생성물에서 단일 가닥 생성물을 수득하는 단계,
- (e) 단계 (d)의 생성물을 (CGG) 반복서열 및 FRAXA 유전자의 인접 부위에 대한 형광-표지 안티센스 표적과 부합화하는 단계,
- (f) 상기 포워드 프라이머의 5' 말단에서 상기 고정 반쪽을 통해 고체상과 결합시켜 상기 단계 (d)의 부합화화된 생성물과 부합화되지 않은 표적의 잔류물을 분리시키는 단계,
- (g) 단계 (f)의 생성물을 적절한 프로브를 함유하는 마이크로어레이에 부합화하고, 상기 마이크로어레이에 부합화한 후, 존재하는 형광-표지 표적 물질이 나타내는 형광 강도를 측정하여 이들의 개별적인 값을 수득하는 단계, 및
- (h) 수득된 DNA의 FRAXA 유전자 내 CGG 반복서열의 수를 정확하게 정량하기 위한 하기의 공식을 이용하여, 단계 (g)의 결과와 알려진 대조 시료의 결과를 비교하는 단계를 포함하는 취약 X염색체 증후군을 나타내는 돌연변이의 검출방법:

$$N = 30 + (A - 1.03)66.4$$
 이 식에서 N은 반복서열의 수이고 A는 CGG 프로브와 부합화된 표적의 FI 대 인접 단편에 대한 프로브에 부합화된 표적의 FI의 비율이다.

청구항 15.

- (a) 시험할 게놈 DNA를 수득하는 단계,
- (b) PCR을 이용하여 모든 당해 SRTs 및 상기 STRs에 인접하는 핵산의 실질적인 인접 단편을 포함하는 게놈 DNA 내의 크로모솜을 따라 위치하는 핵산을 증폭하는 단계,
- (c) 단계 (b)의 증폭된 DNA에서 단일-가닥 생성물을 수득하는 단계,
- (d) (i) STRs 및 (ii) 상기 인접 핵산 단편을 표적으로 하는 비색적으로 표지된 올리고뉴클레오티드를 단계 (c)의 상기 단일-가닥 생성물과 부합화하는 단계,
- (e) 단계 (c)의 상기 단일-가닥 생성물을 고체상에 결합하는 단계,
- (f) 단계 (d)의 상기 부합화된 생성물을 표지된 표적 물질의 잔류물과 분리시키는 단계,
- (g) 표지된 표적 물질을 단계 (f)의 생성물에서 회수하는 단계,
- (h) 이후, 단계 (g)의 회수된, 표지된 표적 물질을 이에 상보적인 적절한 올리고뉴클레오티드 프로브를 함유하는 복수의 지점을 보유하는 마이크로어레이에 부합화하는 단계,
- (i) 마이크로어레이에 부합화한 후, 마이크로어레이 상의 특정 지점에 존재하는 부합화된, 표지된 표적 물질의 비색적 강도를 측정하여 이들에 대한 개별적인 값을 수득하는 단계, 및

(j) 단계 (i)의 결과를 알려진 대조 시료의 결과와 비교하여 수득한 DNA의 당해 부위 내 STRs의 개수를 정확하게 정량하는 단계를 포함하는, 단기일렬반복 다형성(STRP)의 검출방법.

청구항 16.

제15항에 있어서, STRs에 대한 부합화 표적은 3 내지 7개의 반복서열을 함유하고, STR 프로브는 6 내지 20개의 반복서열 및 상기 STR 표적의 적어도 2배에 해당하는 반복서열을 함유하는 것이 특징인, 단기일렬반복 다형성의 검출방법.

청구항 17.

제15항 또는 제16항에 있어서, 단계 (b)에서 전체 STR 구역 및 적어도 30 뉴클레오티드를 함유하는 핵산의 상기 인접 단편을 포함하는 DNA 부위의 3' 경계에 상보적인 한 쌍의 포워드 및 리버스 프라이머를 이용하고, 단계 (b)에서 이용되는 포워드 프라이머는 DNA 부위의 안티센스 가닥의 3' 경계에 상보적이고, 그 5' 말단에 고정 반쪽을 보유하며, 리버스 프라이머는 그 5' 말단에 포스페이트를 보유하고, 여기서 상기 표지된 표적 물질이 그것의 5' 말단에 형광 염료를 운반하며, 상기 단일-가닥 생성물은 이중-가닥 PCR 생성물의 안티센스 가닥을 엑소뉴클레아제로 분해하여 단계 (c)에서 수득되는 것이 특징인, 단기일렬반복 다형성의 검출방법.

청구항 18.

(a) 포유류의 게놈 DNA를 증폭하기 위한 중합효소 연쇄반응(PCR)에서 포워드 프라이머 및 리버스 프라이머로서 기능할 수 있는 DNA 올리고뉴클레오티드(여기서, 포워드 프라이머는 FRAXA 유전자의 비해독 부위의 5'인 위치에서 X-크로모솜의 안티센스 가닥의 3' 뉴클레오티드 서열에 상보적이고, 리버스 프라이머는 FRAXA 유전자 또는 이의 3' 내 위치에 상보적이며, 상기 포워드 프라이머는 이의 5' 말단과 공유적으로 결합된 고정 반쪽을 보유하고, 상기 리버스 프라이머는 그 5' 말단에 포스페이트를 보유하며, 상기 한 쌍의 프라이머 올리고뉴클레오티드는 모든 CGG 반복서열 및 내부 대조구로서 역할을 할 실질적인 인접 단편을 함유하는 게놈 DNA의 부위를 증폭하는데 특이적이다),

(b) 상기 CGG 반복서열 부위 및 상기 내부 대조구 단편을 개별적으로 표적으로 하는 표지된 올리고뉴클레오티드,

(c) (i) PCR, (ii) 안티센스 가닥의 분해, (iii) DNA-DNA 부합화 및 세척, (iv) 부합화된, 표지된 올리고뉴클레오티드 표적의 해리, 및 (v) 비색적 정량을 수행하기 위한 완충액(buffer) 및 효소,

(d) 각 지점이 상기 표지된 올리고뉴클레오티드 표적 중 하나에 상보적인 DNA 프로브를 부착하고 있는 것인, 복수의 지점을 보유하는 1 이상의 마이크로어레이; 및

(e) 상기 마이크로어레이의 비색적 스캐닝 및 대조 시료에서 미리 수득한 데이터의 결과를 이용하여 CGG 반복서열의 수에 대한 진단을 수행하기 위한 도구를 포함하는, 취약 X염색체 증후군을 나타내는 돌연변이의 검출 키트(kit).

청구항 19.

제 18항에 있어서, 상기 부합화 표적은 3 내지 7 CGG 반복서열을 함유하고, 상기 CGG 프로브는 6 내지 20 반복서열 및 상기 상보적인 표적에 적어도 2배에 해당하는 반복서열을 함유하며, 여기서 상기 포워드 및 리버스 프라이머는 전체 CGG 반복서열 구역 및 이의 3' 이고, 적어도 30 뉴클레오티드를 함유하는 핵산의 상기 인접 단편을 포함하는 DNA 부위의 3' 경계에 상보적이며, 포워드 프라이머는 안티센스 가닥의 3' 경계에 상보적이고, 그 5' 말단에 비오틴을 보유하며, 리버스 프라이머는 그의 5' 말단에 포스페이트를 보유하고, 상기 표지된 표적 올리고뉴클레오티드는 5' 말단에 형광 염료를 운반하고, 여기서 STR 부위 표적의 양은 내부 대조구 부위 표적의 양에 적어도 약 10배로 제공되며, 이중-가닥 PCR 생성물의 안티센스 가닥을 분해하여 단일-가닥의 PCR 생성물을 수득하기 위하여 엑소뉴클레아제가 제공되는 것이 특징인, 취약 X염색체 증후군을 나타내는 돌연변이의 검출 키트.

청구항 20.

- (a) 포유류의 게놈 DNA를 증폭하기 위한 증합효소 연쇄반응(PCR)에서 포워드 프라이머 및 리버스 프라이머로서 기능할 한 쌍의 DNA 올리고뉴클레오티드로서, 상기 한 쌍의 프라이머 올리고뉴클레오티드는 모든 STRs 및 내부 대조구로서 작용하는 실질적인 인접 단편을 함유하는 게놈 DNA의 부위를 증폭하는데 특이적이고, 여기서 포워드 프라이머는 상기 크로모솜의 선택된 부위의 안티센스 가닥 중 3' 뉴클레오티드 서열에 상보적이고, 리버스 프라이머는 상기 선택된 부위의 센스 가닥 중 3' 말단에 상보적이며, 상기 포워드 프라이머는 이의 5' 말단과 공유적으로 결합된 고정 반쪽을 보유하고, 상기 리버스 프라이머는 그 5' 말단이 신장 차단되어 있는 것이 특징인, 한 쌍의 DNA 올리고뉴클레오티드,
- (b) 상기 STR 부위 및 상기 내부 대조구 단편을 개별적으로 표적으로 하는 표지된 올리고뉴클레오티드,
- (c) (i) PCR, (ii) 안티센스 가닥의 분해, (iii) DNA-DNA 부합화 및 세척, (iv) 부합화된, 표지된 올리고뉴클레오티드 표적의 해리, 및 (v) 비색적 정량을 수행할 수 있는 완충액(buffer) 및 효소,
- (d) 각 지점이 상기 표지된 올리고뉴클레오티드 표적 중 하나에 상보적인 DNA 프로브가 부착된 것인, 복수의 지점을 보유하는 1 이상의 마이크로어레이; 및
- (e) 상기 마이크로어레이의 비색적 스캐닝 결과 및 대조 시료에서 획득한 이전의 데이터를 이용하여 STRs의 개수에 대한 진단을 수행하기 위한 도구를 포함하는, STRP를 나타내는 돌연변이의 검출 키트.

청구항 21.

제20항에 있어서, 상기 고정 반쪽에 상보적인 결합체를 보유하는 고체상 물질을 함유하는 것이 특징인, STRP를 나타내는 돌연변이의 검출 키트.

명세서**기술분야**

본 발명은 일반적으로 선천적 또는 산발성 유전 결함에 대한 진단 분석법, 보다 구체적으로는 단기일렬반복(STRs)에 의해 유발되는 질병 또는 결함에 대한 분석법, 보다 더 구체적으로는 사람, 태아 및 배아에 있어서 취약 X염색체 증후군을 유발시키는 유전적 결함에 대한 분석법에 관한 것이다. STRPs의 이러한 분석법은 증합효소 연쇄 반응(PCR)에 이어서 마이크로어레이에 부합화(hybridization) 및 분석을 이용한다.

배경기술

진핵세포의 DNA는 단기일렬반복 다형성(short tandem repeat polymorphisms)(STRPs)이라고 불리는 매우 짧고 단순한 서열의 일렬반복을 가진다. 반복 다형성에는 디뉴클레오티드(dinucleotide), 트리뉴클레오티드 및 테트라뉴클레오티드 반복이 포함된다. 트리뉴클레오티드 및 테트라뉴클레오티드 반복은 3 및 4개의 뉴클레오티드의 반복이다. 트리뉴클레오티드 STRs의 확대(expansion)에 연관된 질병의 수가 증가하는 것으로 알려져 있다(문헌[Trottier, Y. et al., Current Biology 3:783-786(1993); Bates, G. et al., Bioassays 16:277-284(1994); Kawaguchi, Y. et al., Nature Genetics 8:221-227(1994)]). 이러한 질병에서, 반복 블록의 크기가 일반적으로 상호관련되어 있고, 이에 의해 심각성 및 질병의 발병 연령이 표시된다. 어떤 질병은 반복 블록 크기의 소폭의 증가와 관련되어 있는데, 이러한 예에는 헌팅턴 병, 척수소뇌 조화운동불능 I형(spino-cerebella ataxia type I), 척수- 및 연수- 근육 위축증, 마카도-조셉(Machado-Joseph)병 및 덴타토루브랄팔리돌루이시안(dentatorubralpallidoluyisian) 위축증이 있다. 기타 질병은 취약 X염색체 A형, 취약 X염색체 E형 및 근육긴장퇴행위축과 같은 정상 STR의 100배 확대까지 포함할 수도 있다.

인간 게놈(genome)에 존재하는 매우 다형성인 집단 또는 반복성 DNA의 증폭 및 검출에 기초한 특정한 진단 분석법 및 법의학 분석법이, 예컨대 문헌[Craig et al., J. Forensic Sci., Vol. 33, pgs. 1111-1126(1988); Edwards et al., Genomics, Vol. 12, pgs. 241-253(1992); Boerwinkle et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 86, pgs. 212-216(1989);

Tautz, *Nucleic Acids Research*, Vol. 17, pgs. 6463-6471(1989)] 및 이와 유사한 문헌에서 제안되어 왔다. 전형적으로, 반복 서열을 함유한 DNA의 단편은 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 증폭되고, 그 다음 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 크기별로 분류된다.

이러한 접근법은 소위 "단기일렬반복" 또는 "STR"로 불리는 반복성 DNA를 표적으로 하는데, 이는 그 크기 및 계층 분포 때문에 진단 및 지도화(mapping) 용도에 특히 중요하다. 이러한 집단(class)의 DNA에서 반복되는 단위의 길이는 이들을 PCR 증폭 및 전기영동적 분리에 용이한 표적으로 만드는, 전형적으로 2 내지 6개의 뉴클레오티드이다. 국제출원 WO 94/03638은 증폭된 STRs를 크기별로 전기영동적으로 분리하기 위해서 및 존재하는 증폭된 STR DNA의 각각의 양을 측정하기 위해서, 동시에 1 이상의 크로모솜-특이성 STRs를 증폭시키는 방법을 개시하고 있는데; 이 방법은 선택된 크로모솜의 이수성(aneuploidy)을 측정하는데 이용된다. 미국특허 출원 제2003/0224380호는 이러한 반복의 플래킹 부위(flanking region)에 상응하는 올리고뉴클레오티드가 소량의 DNA 시료 상에서 중합효소 연쇄반응(PCR)을 위한 프라이머(primer)로 이용될 수 있다는 것을 문헌[*Saiki, Science* 239:484-491(1988)]을 인용하여 제안하고 있다. 예를 들어 방사능 또는 형광물질로 표지된 DNA를 증폭시킴에 의해, 시료는 염기서열분석용 겔 상에서 용해 및 예컨대, 방사능 사진촬영(autoradiography) 또는 형광물질 검출법과 같은 공지된 방법에 의해 시각화 될 수 있다. 이러한 다형성은 단지 소수의 염기쌍에 의해 길이가 차이 나는 대립유전자로 구성되므로, 이들은 일반적으로 전통적인 RFLP 분석에서 이용되는 바와 같은 종래의 써던블롯(Southern blotting)에 의해 검출되지 않을 수 있다. 국제출원 번호 WO 94/03638호는 적어도 3개의 뉴클레오티드의 증폭된 STRs를 이용하여 이수성이 검출될 수 있다고 주장한다. 이 증폭된 DNA는 전기영동적으로 크기별로 분리되고, 스펙트럼적으로 용해될 수 있는 형광표지를 이용하여 상대 농도가 측정된다.

STRPs의 카테고리에 포함되는 상당한 수의 유전적 질병이 있다. 이러한 질병에는: 근육긴장도행위축 - CTG 반복서열:헌팅턴병 및 척수소뇌 조화운동불능 - CAG 반복서열; 및 취약 X염색체 - CGG 반복서열이 포함된다. 감소된 침투도(penetrance)를 가진 X염색체-연관(X-linked) 우성 질환인, 취약 X염색체 증후군은 선천성 정신지체의 가장 흔한 형태 중 하나이다. 이러한 상태는 대략 남성 1250명 중 1명 및 여성 2000명 중 1명이 앓는다. 인식, 행동 및 신체적 표현형이 성에 의해 다양화되며, 돌연변이의 X염색체-연관 유전 때문에 남성에게 보다 심각하게 영향을 미친다.

그 명칭이 함축하는 바와 같이, 취약 X염색체는 X 크로모솜-연관 상태이다. 취약 X염색체 표현형은 X 크로모솜의 말단 가 사이의 유전자 자리 q27.3에 가시적인 협착(constriction)에 그 특징이 있으며, 세포 배양에 있어 일정 조건 하에서 X 크로모솜의 말단이 파손되는 경향이 있다. 연구자들은 이러한 상태와 연관된 계층 부위를 확인했고, 취약 X염색체 증후군(FRAXA 유전자)에 관련된 DNA 서열이 미국특허 제6,197,500호에 설명되어 있다. 이 질환 유발 돌연변이는 Xq27.3에 위치한 FRAXA의 5' 비해독 부위(untranslated region)에 CGG 반복서열의 증폭을 초래한다. 이 취약 X염색체-CGG 반복서열은 4개의 형태를 갖는다: 보통(반복서열의 수 6-40), 중간(반복서열의 수 41-60), 전돌연변이(pre-mutation)(반복서열의 수 61-200), 및 완전 돌연변이(반복서열의 수 > 230). 궁극적으로 취약 X염색체 표현형을 나타내는 돌연변이는 일반적으로 단계별로 일어난다. 초기 단계에서, 유전자는 완전히 결손되어 있지 않고, 오히려 "전-돌연변이"가 존재하며, 퍼뮤테이션(permutation)의 보인자(carrier)는 정상 표현형을 가질 수 있다. 그러나, 돌연변이가 그 자손에서 표현형이 발현될 수 있는 보인자 여성에게서 일어날 수 있다. 증가된 CGG 반복서열의 수의 결과는 비정상 행동 내지 정신지체까지 아우른다. 정상 범위(6 내지 40) 이상의 CGG 반복서열의 수는 증후군의 심각성을 결정한다.

다년간 취약 X염색체 증후군을 진단하는 유일한 방법은 조직 배양에 있어서 세포 성장 및 처리 후에 질병을 앓는 개인의 크로모솜을 현미경 검사하는 것이었다. 그러한 검사방법에 있어서, 실험실에서는 X 크로모솜이 파손된 말단을 보유하는가를 확정하는 실험을 할 것이다. 계층 수준에서 CGG 반복서열을 직접 확인하려는 PCR-기반의 방법을 개발하려는 초기의 몇몇 시도는 성공적이지 못했다(문헌[E.J. Kremer, "Mapping of DNA Instability at the Fragile X to a Trinucleotide Repeat Sequence p(CGG)n", *Science*, vol. 252, Jun. 21, 1991, pp. 1711-1714] 참조).

보다 최근의 진단 방법은 분자량에 기초한 동정(identification)을 달성하기 위해 PCR 및 겔 전기영동 분리를 이용하였다. 예를 들어 번(Bunn) 외의 미국특허 제5,213,961호는 경쟁적 방법론에 의한 정량적 PCR 방법을 개시하고 있는데, 여기에서는 DNA 증폭에 영향을 미치는 매개변수 및 모체(template)(실험구 및 대조구 모두) 비율 및 복제수(copy number)에 있어서 차이를 구별하기 위한 메커니즘이 논의되어 있다. 상기 특허에는 이 방법이 체세포 돌연변이를 검출하는데 이용될 수 있다는 것도 언급되어 있다. 번 및 다수는 DNA 프라이머 및 그들 각자의 프라이머 결합 부위의 성질에서 주로 비롯되는 증폭 과정 상의 다양한 매개변수의 효과에 역점을 두고 있으나; 이 시스템은 PCR에 의해 표적 및 시료가 동일한 속도로 증폭되는 표적에 충분히 근접한 표준의 이용에만 제한되어 있다. 게다가, 이 표준은 표적의 길이가 효소적 작용에 의해 나중에 변형될 수 있고, 이로써 표준 및 표적이 전기 영동에 의해 분리되고 정량화될 수 있도록 표적과 구별되어야만 한다.

캐스키(Caskey)에게 허여된 미국특허 제6,180,337호에는 정상 및 비감염 개인에서 FMR-1 유전자의 발현(expression)을 측정 및 비교하는 방법을 기술하고 있는데, 여기에서 정상 개인에서와 비교하여 감염된 개인에서의 발현에 대한 다양성

은 취약 X염색체 증후군에 대한 돌연변이를 나타낸다. 이 방법은 안정한 게놈 DNA 대신 불안정한 mRNA를 정량하려는 시도를 하고 있는데, 이는 종종 부정확한 진단을 초래한다. 다스(Das)에게 허여된 미국특허 제6,143,504호는 취약 X염색체 증후군을 보유하는 남성을 확인하기 위해서 메틸화-특이성 PCR을 이용한다. 그러나, 이 방법은 실제로 200 이상의 반복서열의 수를 보유하는 완전 돌연변이를 진단하는 데에만 제한되어 있다. 인간 취약 X염색체 유전자 자리(locus)를 함유하는 정제 및 단리된 DNA 분자를 기술하고 있는, 서더랜드(Sutherland)에게 허여된 미국특허 제6,197,500호는 게놈 DNA를 특징짓기 위해 이용된, 증폭된 생성물에 상보적인 프로브(probe)와 부합화하여 CGG 반복서열의 PCR-증폭된 생성물을 검출하는 것을 교시하고 있다. 그러나, 이 특허는 차후의 적절한 진단을 달성하기에 필수적인 방법에서 반복서열의 수를 특이적으로 정량하는 방법에 대하여 교시하고 있지는 않고; 단지 적절한 엄격함(stringency) 하에서 비정상 서열에 부합화할 프로브를 사용하는 것을 제안하고 있을 뿐이다. 미국특허 제5,658,764호 및 제6,200,747호는 dGTP의 유사체를 이용한 PCR 후에 궁극적으로 겔 전기영동을 이용하는 취약 X염색체 증후군의 검출방법을 개시하고 있다.

그러나, 이러한 방법은 단지 CGG 반복서열의 수를 측정하고 이로써 정확한 진단을 제공하는 능력에만 제한된다. 이는 일반적으로 CGG 반복서열의 부위를 증폭하는 PCR에 대한 어려움에 기인하며; 종종, 검출을 위해 상당한 양을 요구하는 정확한 겔 전기영동 분석을 가능하게 하기에 불충분한 PCR 생성물을 생성한다.

따라서, STRPs 유래의 질병 및 결함, 특히 취약 X염색체 증후군에 대한 직접적이고도 신뢰할 만한 정확한 분석법이 계속하여 연구되어 왔다.

발명의 상세한 설명

발명의 개요

이제, 게놈 DNA에 존재하는 STRs, 예컨대 FRAXA 유전자의 5'-비해독 부위 내 CGG 반복서열의 복제수(copy number)를 정확하게 측정 가능한, 매우 민감한 비색적(colorimetric) 검출을 이용하는 방법이 개발되었다. STRs 및 인접하는 부위 또는 단편이 PCR을 이용하여 게놈 DNA 시료에서 공증폭되도록, STRs 및 내부 대조구의 역할을 하는 인접 부위 또는 단편을 함유하는 DNA 부위가 선택된다. 취약 X염색체 증후군에 대하여, 내부 대조구를 암호화하는 DNA 부위가 X-크로모솜 상에 CGG 반복서열 부위의 5' 또는 3' 중 하나에 위치하도록 선택되고; CGG 반복서열 부위 및 이러한 내부 표준 단편이 인접하는 한, 이들은 항상 공증폭될 것이다. 시료의 PCR 증폭에 이어서, 단일-가닥 생성물을 수득하기 위해 적절한 단계가 취해진다. 그 다음, 표지된 CGG 표적 및 표지된 내부 표준 표적 모두를 제공하고, 이러한 표지된 표적을 단일-가닥, PCR-증폭 생성물에 부합화한다. 비-부합화된 표적을 제거하기 위해 세척한 후, PCR 생성물에 부합화된, 잔류하는 표지된 올리고뉴클레오티드 표적이 수득되며, 이들은 CGG 프로브 및 내부 대조구 프로브를 포함하는 마이크로어레이(microarray)에의 순차적인 부합화에 의해 정량된다. 이어서, 그러한 미지 시료의 CGG 반복서열의 복제수는 CGG 반복서열 부위 프로브에서의 신호 강도 대 내부 대조구 프로브에서의 신호 강도의 비율을 측정하고, 그러한 비율을 알려진 대조 시료에서 미리 산출된 값과 비교하여 정확하게 측정된다. 다른 STRPs에 대한 유사한 분석법은 내부 대조구로서 이용되는 관련된 크로모솜의 인접한 단편을 적절하게 선택하고, 그 단편 및 STR 부위를 공증폭함으로써 수행된다.

일 특정 양태에서, 본 발명은 취약 X염색체 증후군을 나타내는 돌연변이를 검출하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 (a) 시험할 게놈 DNA를 수득하는 단계, (b) PCR을 이용하여 FRAXA 유전자의 비해독 부분(portion)의 모든 CGG 반복서열 및 상기 CGG 반복서열에 인접하는 핵산의 실질적인 인접 단편을 포함하는 게놈 DNA 내의 X-크로모솜을 따라 위치하는 핵산을 증폭하는 단계, (c) 단계 (b)의 증폭된 핵산에서 단일-가닥 생성물을 수득하는 단계, (d) (i) (CGG) 반복서열 및 (ii) 상기 인접 핵산 단편을 표적으로 하는 비색적으로 표지된 올리고뉴클레오티드를 단계 (c)의 단일-가닥 생성물과 부합화(hybridization)하는 단계, (e) 단계(c)의 상기 단일-가닥 생성물을 고체상에 결합하는 단계, (f) 단계 (d)의 상기 부합화된 생성물을 잔류하는 표적 물질과 분리시키는 단계, (g) 표지된 표적 물질을 단계 (f)의 분리된 생성물에서 회수하는 단계, (h) 이후, 단계 (g)의 회수된, 표지된 표적 물질을 이에 상보적인 적절한 올리고뉴클레오티드 프로브를 함유하는 복수의 지점을 보유하는 마이크로어레이에 부합화하는 단계, (i) 마이크로어레이에 부합화한 후, 마이크로어레이 상의 특정 지점에 존재하는 부합화된, 표지된 표적 물질의 비색적 강도를 측정하여 이들에 대한 개별적인 값을 수득하는 단계 및 (j) 단계 (i)의 결과를, 미리 알고 있는 대조 시료의 결과와 비교하여 수득한 게놈 DNA의 FRAXA 유전자 내 CGG 반복서열의 수를 정확하게 정량하는 단계를 포함한다.

또 다른 특정 양태에서, 본 발명은 취약 X염색체 증후군을 나타내는 돌연변이를 검출하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 (a) 시험할 게놈 DNA를 수득하는 단계, (b) PCR, 및 포워드(forward) 프라이머 및 리버스(reverse) 프라이머를 이용하여 모든 CGG 반복서열 및 해독된 FRAXA 유전자의 인접 부분을 포함하는 게놈 DNA 내의 X-크로모솜을 따라 위치하는 핵산을 증폭하는 단계(여기서 상기 포워드 프라이머는 이의 5' 말단에 고정 반족(moiety)을 보유한다), (c) 단계 (b)의 이중 가

닥 생성물을 정제하는 단계, (d) 엑소뉴클레아제(exonuclease)로 단계 (c)의 이중 가닥 생성물의 안티센스(antisense) 가닥을 분해시켜 단계 (c)의 생성물에서 단일 가닥 생성물을 획득하는 단계, (e) 단계 (d)의 생성물을 (CGG) 반복서열 및 FRAXA 유전자의 인접 부위에 대한 형광-표지 안티센스 표적과 부합화하는 단계, (f) 상기 포워드 프라이머의 5' 말단에서 상기 고정 반쪽을 통해 고체상과 결합시켜 상기 단계 (d)의 부합화화된 생성물과 부합되지 않은 표적의 잔류물을 분리시키는 단계, (g) 단계 (f)의 생성물을 적절한 프로브를 함유하는 마이크로어레이에 부합화하고, 상기 마이크로어레이에 부합화한 후, 존재하는 형광-표지 표적 물질이 나타내는 형광 강도를 측정하여 이들의 개별적인 값을 획득하는 단계, 및 (h) 획득된 DNA의 FRAXA 유전자 내 CGG 반복서열의 수를 정확하게 정량하기 위한 하기의 공식을 이용하여, 단계 (g)의 결과와 알려진 대조 시료의 결과를 비교하는 단계를 포함하는데:

$N = 30 + (A - 1.03)66.4$, 이 식에서 N은 반복서열의 수이고 A는 CGG 프로브와 부합화된 표적의 FI 대 인접 단편에 대한 프로브에 부합화된 표적의 FI의 비율이다.

추가적인 특정 양태에서, 본 발명은 단기일렬반복 다형성(STRP)의 검출방법을 제공하는데, 이 방법은 (a) 시험할 게놈 DNA를 획득하는 단계, (b) PCR을 이용하여 모든 당해 STRs 및 상기 STRs에 인접하는 핵산의 실질적인 인접 단편을 포함하는 게놈 DNA 내의 크로모솜을 따라 위치하는 핵산을 증폭하는 단계, (c) 단계 (b)의 증폭된 DNA에서 단일-가닥 생성물을 획득하는 단계, (d) (i) STRs 및 (ii) 상기 인접 핵산 단편을 표적으로 하는 비색적으로 표지된 올리고뉴클레오티드를 단계 (c)의 상기 단일-가닥 생성물과 부합화하는 단계, (e) 단계 (c)의 상기 단일-가닥 생성물을 고체상에 결합하는 단계, (f) 단계 (d)의 상기 부합화된 생성물을 표지된 표적 물질의 잔류물과 분리시키는 단계, (g) 표지된 표적 물질을 단계 (f)의 생성물에서 회수하는 단계, (h) 이후, 단계 (g)의 회수된, 표지된 표적 물질을 이에 상보적인 적절한 올리고뉴클레오티드 프로브를 함유하는 복수의 지점을 보유하는 마이크로어레이에 부합화하는 단계, (i) 마이크로어레이에 부합화한 후, 마이크로어레이 상의 특정 지점에 존재하는 부합화된, 표지된 표적 물질의 비색적 강도를 측정하여 이들에 대한 개별적인 값을 획득하는 단계 및 (j) 단계 (i)의 결과를 알려진 대조 시료의 결과와 비교하여 획득한 게놈 DNA의 당해 부위 내 STRs의 개수를 정확하게 정량하는 단계를 포함한다.

또 다른 특정 양태에서, 본 발명은 취약 X염색체 증후군을 나타내는 돌연변이를 검출하기 위한 키트(kit)를 제공하는데, 이 키트는 (a) 포유류의 게놈 DNA를 증폭하기 위한 중합효소 연쇄반응(PCR)에서 포워드 프라이머 및 리버스 프라이머로서 기능할 한 쌍의 DNA 올리고뉴클레오티드(여기서, 포워드 프라이머는 FRAXA 유전자의 비해독 부위의 5'인 위치에서 X-크로모솜의 안티센스 가닥의 3' 뉴클레오티드 서열에 상보적이고, 리버스 프라이머는 FRAXA 유전자 또는 이의 3' 내 위치에 상보적이며, 상기 포워드 프라이머는 이의 5' 말단과 공유적으로 결합된 고정 반쪽을 보유하고, 상기 리버스 프라이머는 그 5' 말단에 포스페이트를 보유하며, 상기 한 쌍의 프라이머 올리고뉴클레오티드는 모든 CGG 반복서열 및 내부 대조구조로서 역할을 할 실질적인 인접 단편을 함유하는 게놈 DNA의 부위를 증폭하는데 특이적이다), (b) 상기 CGG 반복서열 부위 및 상기 내부 대조구조 단편을 개별적으로 표적으로 하는 표지된 올리고뉴클레오티드, (c) (i) PCR, (ii) 안티센스 가닥의 분해, (iii) DNA-DNA 부합화 및 세척, (iv) 부합화된, 표지된 올리고뉴클레오티드 표적의 해리, 및 (v) 비색적 정량을 수행하기 위한 완충액(buffer) 및 효소, (d) 각 지점이 상기 표지된 올리고뉴클레오티드 표적 중 하나에 상보적인 DNA 프로브를 부착하고 있는, 복수의 지점을 보유하는 1 이상의 마이크로어레이; 및 (e) 상기 마이크로어레이의 비색적 스캐닝 및 대조 시료에서 미리 획득한 데이터의 결과를 이용하여 CGG 반복서열의 수에 대한 진단을 수행하기 위한 도구를 포함한다.

추가적인 또 다른 특정 양태에서, 본 발명은 STRP를 나타내는 돌연변이를 검출하는 키트를 제공하는데, 이 키트는 (a) 포유류의 게놈 DNA를 증폭하기 위한 중합효소 연쇄반응(PCR)에서 포워드 프라이머 및 리버스 프라이머로서 기능할 한 쌍의 DNA 올리고뉴클레오티드로서, 상기 한 쌍의 프라이머 올리고뉴클레오티드는 모든 STRs 및 내부 대조구조로서 작용하는 실질적인 인접 단편을 함유하는 게놈 DNA의 선택된 부위를 증폭하는데 특이적이고, 여기서 포워드 프라이머는 상기 크로모솜의 선택된 부위의 안티센스 가닥 중 3' 뉴클레오티드 서열에 상보적이고, 리버스 프라이머는 상기 선택된 부위의 센스 가닥 중 3' 말단에 상보적이며, 상기 포워드 프라이머는 이의 5' 말단과 공유적으로 결합된 고정 반쪽을 보유하고, 상기 리버스 프라이머는 그 5' 말단이 신장 차단되어 있는 것이 특징인, 한 쌍의 DNA 올리고뉴클레오티드, (b) 상기 STR 부위 및 상기 내부 대조구조 단편을 개별적으로 표적으로 하는 표지된 올리고뉴클레오티드, (c) (i) PCR, (ii) 안티센스 가닥의 분해, (iii) DNA-DNA 부합화 및 세척, (iv) 부합화된, 표지된 올리고뉴클레오티드 표적의 해리, 및 (v) 비색적 정량을 수행할 수 있는 완충액(buffer) 및 효소, (d) 각 지점이 상기 표지된 올리고뉴클레오티드 표적 중 하나에 상보적인 DNA 프로브가 부착된 것인, 복수의 지점을 보유하는 1 이상의 마이크로어레이; 및 (e) 상기 마이크로어레이의 비색적 스캐닝 결과 및 대조 시료에서 획득한 이전의 데이터를 이용하여 STRs의 개수에 대한 진단을 수행하기 위한 도구를 함유한다.

바람직한 구체예의 상세한 설명

용어 및 약어에 대한 하기의 정의는 이하 설명되는 상세한 설명을 보다 잘 이해하도록 제공되는 것이다.

부합화(hybridization)는 용액 또는 고체상 중 하나에서 수행되는 DNA의 상보적 가닥 사이에 이중 구조의 형성을 나타내기 위해 사용되는데, 여기서 2개의 가닥 중 하나는 고체 표면 또는 매트릭스 상에 고정되어 있다.

어닐링(Annealing)은 본원에서, 프로브 또는 프라이머가 분석대상 핵산 내의 그것에 상보적인 서열에 결합할 수 있도록 하는 조건 하에, 서서히 감소하는 온도 또는 단일 온도 중 하나에서 단일-가닥 또는 열-변성 이중 핵산 분석대상물을 올리고 뉴클레오티드 프로브 또는 프라이머와 함께 배양하는 것을 의미하기 위해 사용된다.

분석대상물(analyte) 또는 분석대상 핵산은 분석의 목적이 되는 DNA 시료 내 화합물을 나타내기 위해 사용된다.

표지 또는 검출 표지(또는 "태그(tag)")는 핵산 서열의 검출 및/또는 정량을 가능하게 하는 핵산 서열에 부착될 수 있는 치환체를 말한다. 그 예에는 ^{32}P , ^{33}P , 및 ^{35}S 와 같은 방사성표지; 형광물질, 화학적발광물질 또는 착색 화합물과 같은 비색적 지시약(indicator); 비오틴과 같은 리간드; 및 질량 또는 기타 분광학적 특성에 의해 구별가능한 화학적 그룹이 포함된다. 적절한 표지의 보다 특정한 예에는 크산틴(xanthine) 염료, 로다민(rhodamine) 염료, 나프틸아민, 벤즈옥사디아졸, 스틸벤, 피렌(pyrene), 아크리딘, 시아닌(Cyanine) 3 및 시아닌 5가 포함된다. 표지는 다양한 방법에 의해 분석대상 핵산으로 주입될 수 있는데, 이 방법에는 화학 반응, 표지된 뉴클레오티드의 효소적 반응(중합효소, 키나아제 또는 리가아제), 또는 표지된 프로브를 분석대상 핵산과 부합화 또는 어닐링함에 의한 혼합이 포함된다.

프로브는 부합화 반응을 통해 분석대상 핵산에 의해 결정되는 핵산 서열의 상보적인 서열을 결합하는 시약으로서 이용되는 핵산 서열을 말한다.

서열은 특정한 순서 및 사슬 길이로 함께 연결되어 있는, DNA 내 A, G, C, T 잔기를 함유하는 핵산 내에 염기의 선(string)을 의미한다.

보체 또는 상보적 서열은 2-가닥(이중) 구조를 형성할 수 있는 두 개의 서열을 말한다.

표지된 프로브(labeled probe)는 본원에서, 올리고뉴클레오티드의 검출 및/또는 정량을 가능하게 하는, 핵산 분석대상물 내에 그것의 상보적인 서열에 결합 가능한 1 이상의 검출 가능 표지 또는 태그를 함유하는 올리고뉴클레오티드를 의미하기 위해 사용된다.

포획 프로브(capture probe)는 본원에서, 부합화 반응에서 고체 표면 상에 상보적 서열을 함유하는 핵산 또는 올리고뉴클레오티드의 포획을 가능하게 하는, 고체 표면에 대하여 일 말단에 결합된(즉, 구속된) 특정 서열의 올리고뉴클레오티드를 의미하기 위해 사용된다.

표적, 표적 서열, 표적 가닥 또는 표적 핵산은 본원에서, 예를 들어 특정 DNA 프로브와의 부합화를 통해 그 존재가 검출의 목적인 핵산 서열을 언급하기 위해 사용된다. 용어 "표적 서열"은 때때로 DNA 프로브에 결합된 핵산 분자 또는 파편(fragment)을 의미하는 광적인 의미로, 또는 상보적인 염기쌍을 통해 DNA 프로브에 결합한 표적 핵산 유래의 특정 핵산 서열을 의미하는 협소한 의미로 사용된다.

구속된, 또는 표면-구속(surface-tethered)은 본원에서, 표면상의 작용기와 DNA 프로브의 일 말단에서의 작용기 사이에 형성되는 공유결합 또는 이외의 강한 결합을 통해, 어떤 표면과 함께 일 말단에 결합된 올리고뉴클레오티드 DNA 프로브를 언급하기 위해 사용된다.

고체상 부합화는 이중 구조의 형성에 참여하는 2개의 "반응물 가닥" 중 하나가 고체 지지체 상에 고정화된 상태에서 수행되는 부합화 반응을 의미한다.

경계(bordering) 또는 플래킹(flanking) 서열은 선택된 DNA 서열 및 크로모솜의 말단에 근접, 인접하고/인접하거나 그 말단을 포함하는 핵산 단편을 언급하기 위해 사용된다.

올리고뉴클레오티드는 화학적으로 합성될 수 있는, 전형적으로 약 100 뉴클레오티드까지의 길이를 갖는 짧은 DNA 가닥을 의미한다.

유전자는 유전 기능의 단위로서, 단백질을 암호화하는 서열, 유전자 내에 산재된 인트론(비암호(noncoding)) 서열, 및 유전자 조절에 기능적인 추가적인 서열이 포함된다.

게놈은 유기체 또는 자율 복제 엔티티(entity)를 함유하는, 유전자, 유전자간(intergenic) 서열 및 기타 유전적 성분의 전체 보체(complement)를 의미한다.

마이크로어레이 또는 DNA 칩은 전형적으로 축소화된 포맷(format)에서, 1mm 미만의 중심-대-중심 간격으로 배열된 개별적인 DNA 프로브와의 복수의 혼화 반응에 대한 동시적인 분석을 가능하게 하는, 표면 상에 형성된 표면-구속 DNA 프로브의 2차원적인 배열을 의미한다.

프라이머는 유리 3'-OH 말단을 보유하는 올리고뉴클레오티드로서, "모체(template) 가닥"과 함께 하는 염기쌍이 될 것이며, 이로써 중합효소에 의해 신장될 수 있다. 예를 들어, DNA 모체로 어닐링된 올리고뉴클레오티드 프라이머는 DNA 중합효소를 위한 기질(데옥시뉴클레오시드 5'-트리포스페이트와 함께)로서 역할을 가질 수 있으며, 이 결과가 PCR 반응에서 "프라이머 익스텐션(primer extension)"이다.

프라이머 쌍은 핵산 단편의 반대 가닥에 결합한 2개의 프라이머를 의미한다.

PCR 파편은 중합효소 연쇄반응에 의해 형성된 한정된 길이(모체 상의 시발(priming) 부위 사이의 간격에 의해 한정되는)의 DNA 파편을 의미한다.

변성 또는 변성된이란 것은 가장 일반적으로, 온도의 상승("열-변성")으로 이중 나선을 불안정화 시키는 조건 하에서 이중 핵산 분자의 2개 가닥의 분리(해리)를 의미한다.

반복서열 또는 반복성 서열은 단기 반복 서열, 특히 CGGCGGCGG의 서열을 의미한다.

5'-말단/종말은 뉴클레오티드의 데옥시리보스 상에 에스테르화 되지 않은 탄소-5를 갖는 뉴클레오티드를 함유하는 핵산 사슬의 말단을 의미한다.

3'-말단/종말은 뉴클레오티드의 데옥시리보스 상에 에스테르화 되지 않은 탄소-3을 갖는 뉴클레오티드를 함유하는 핵산 사슬의 말단을 의미한다.

CCD - 전하 결합 소자(charge coupled device).

CI - 비색 강도(colorimetric intensity)

FI - 형광 강도(fluorescence intensity)

PCR - 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reation).

SSC - 표준 염류 시트레이트(standard saline citrate), 150mM 염화나트륨 및 15mM 시트르산 나트륨을 함유하는 용액.

STR - 단기일렬반복(short tandem repeat).

STRP - 단기일렬반복 다형성(short tandem repeat polymorphism).

본 출원인의 진단 방법은 PCR을 이용하여 초기에 총 게놈 DNA에 비하여 적은 양으로 존재하는 특정 DNA 서열을 증폭시킨다. PCR을 이용함으로써, 특정 DNA 서열이 100000배 이상 증폭될 수 있어 개시 DNA에 존재하는 특정 DNA의 검출을 용이하게 한다.

그 공개문헌이 본원에 참고인용된 미국특허 제4,683,202호, 제4,683,195호, 제4,800,159호 및 제4,965,188호는 본 발명에 의해 이용되는, 지금은 잘 알려진 PCR 방법의 세부설명을 제공한다. PCR은, 반대 방향 및 겹치기 방향으로 프라이머-유도 DNA 합성을 달성하기 위해 당해 특정 부위를 플랭킹(flanking)하는 서열에 상보적인 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 수 시간에 수 배로 DNA 서열을 증폭하는 것이다. 고온 모체 변성, 올리고뉴클레오티드 프라이머 리어닐링

(reannealing), 및 중합효소-매개 신장(extention)의 반복된 사이클을 이용하여, DNA 서열이 충실하게 수십만 배 증폭될 수 있다. 일반적으로 PCR에는 각 모체의 2가지 다른 프라이머 중 하나는 센스 가닥을 발생하는 포워드 프라이머로 다른 하나는 안테센스 가닥을 발생하는 리버스 프라이머로 고안될 수 있도록 증폭될 모체의 양 5' 말단 및 3' 말단의 서열에 대한 지식이 요구된다.

본 발명에서 PCR 방법은 바람직하게도, 원하는 DNA 합성의 개시점으로서 작용 가능한 올리고뉴클레오티드를 포함하는 한쌍의 프라이머를 이용한다. 이 올리고데옥시뉴클레오티드 프라이머는 각각, 핵산 모체에 부합화할 때, 원하는 모체의 3' 말단에 비하여 움푹 들어간 유리 3' OH기를 보유하고, 이로써 (a) 데옥시리보뉴클레오티드 기질, (b) DNA 복제를 달성할 수 있는 적절한 효소, 및 (c) 적절한 온도 및 원하는 pH를 제공하는 완충액의 존재 하에, 핵산 중합체의 중합화 합성의 개시 부위로서 작용하며, 이의 서열은 모체 가닥에 상보적인 서열이다. PCR은 전형적으로 선택된 핵산 모체에 결합한 2개의 프라이머를 이용하는데, 이들 각각은 증폭될 이중 단편의 2개의 3' 말단 또는 경계 중 하나에 상보적이다. 이들은 일반적으로 포워드 및 리버스 프라이머로 불린다. 이 프라이머들은 프라이머 신장(extension)을 유발하는 다른 PCR 시약, 즉 4가지 상이한 뉴클레오시드 트리포스페이트(또는 이들의 유사체), 적절한 중합효소 및 적절한 완충액("완충액"에는 pH 및 이온 강도를 결정하는 제제, 공동인자 등이 포함된다)과 적절한 온도에서 화합된다. 중합효소가 Taq 중합효소일 경우의 PCR 방법에서, 완충액은 마그네슘염, 바람직하게는 $MgCl_2$ 1.5-2 mM, 각 뉴클레오시드 트리포스페이트 15-200 μ M, 각 프라이머 1 μ M 및 예컨대 50mM KCl, pH8.4에서 10mM 트리스 완충액 및 100 μ g/ml 젤라틴을 함유할 수 있다. PCR 증폭을 수행하기 위한 그러한 키트는 다수의 공급자로부터 상업적으로 입수 가능하다.

각각의 프라이머는 적절한 중합효소 및 상기 언급한 바와 같은 기타 시약의 존재 하에 신장 DNA 생성물의 합성을 개시 또는 시동하기 위해 충분히 길어야 한다. 적절한 프라이머의 길이는 잘 알려진 바와 같이 많은 요소에 따라 좌우되는데; 전형적으로 출원인의 방법의 실시에 있어서는, 15-30 뉴클레오티드 잔기를 함유하는 프라이머가 이용될 것이다. 짧은 프라이머 분자는 일반적으로 사슬 신장반응(chian extension reaction)을 지지하는 프라이머-모체 복합물(complexes)을 형성 및 유지하기 위해 충분히 낮은 온도를 요구한다.

이용되는 프라이머는 증폭되기 위하여 선택된 서열을 함유하는 핵산에 실질적으로 상보적일 필요가 있는데, 다시 말해서, 프라이머는 선택된 서열(또는 그의 보체)을 함유하는 핵산과 결합, 즉 혼화되어야만 한다. 프라이머 서열은 그 전부가 모체의 정확한 보체일 필요는 없는데; 예를 들어, 비-상보적인 뉴클레오티드 파편 또는 기타 반쪽이 프라이머의 5' 말단에 부착될 수 있으며, 이와 동시에 프라이머 서열의 잔류물은 선택된 핵산 서열에 상보적이 된다. 선택된 핵산 서열에 완벽하게 상보적인 프라이머가 바람직하며, 전형적으로 이용된다.

일반적으로, 핵산 서열을 따라 원하는 상대적 위치에 위치하고 있는 원하는 서열의 상이한 가닥에 부합화 될 2 개의 올리고뉴클레오티드 프라이머가 제조될 수 있도록, 서열의 양 말단에 충분한 수의 염기가 충분히 자세하게 알려져 있는 한, 임의의 특정한 핵산 서열이 PCR 방법으로 증폭될 수 있다. 결과적으로, 프라이머의 모체(보체)에서 프라이머를 분리 한 후, 하나의 프라이머로 부터 합성된 신장 생성물은 다음 사이클에서 한정된 길이의 핵산으로 다른 프라이머의 신장을 위한 모체로서 역할을 할 것이다.

STRP를 진단하기 위한 본 발명의 바람직한 구체예에서, 한쌍의 프라이머가 이용된다. 이 프라이머 중 하나, 즉 포워드 프라이머는 선택된 DNA 부위의 안테센스의 3' 말단에 인접, 근접하고/하거나 이 말단을 포함하는 서열에 상보적이다. 나머지 프라이머, 즉 리버스 프라이머는 선택된 DNA 부위의 3' 말단에서 서열의 보체와 인접, 근접하고/하거나 이 말단을 포함하는 서열의 보체를 함유한다.

STRP에 대한 어떠한 분석법이 시행될 것인가에 따라, 증폭될 관련 크로모솜 상의 핵산의 길이가 최초로 결정된다. 인간 게놈을 완벽하게 시퀀싱한 결과, 이제 이러한 STRPs의 부위가 알려져 있고, 따라서 그러한 부위가 나타나는 유전자 자리로 주의가 집중된다. 이후, 모든 STR 단편을 포함하는 플래킹 서열 및 내부 대조구로서 역할할 것인 STR 단편의 3' 또는 5'에 인접하는 단편을 선택함에 있어서 판단이 이루어진다. 취약 X염색체 증후군에 대하여는, 비록 대안적 부위인 5'이 이용될 수 있으나, STR 부위의 3'에 인접하는 서열을 선택하는 것이 바람직하다. 일단 증폭될 핵산 단편의 길이를 선택하게 되면, 모든 STR 부위 및 내부 대조구로서 이용될 선택된 인접 단편의 공증폭을 달성할 적절한 올리고뉴클레오티드 프라이머 쌍이 고안된다. 이 프라이머들은 그 부위가 선택된 핵산 단편의 특정 말단에 인접, 근접하고/하거나 이 특정 말단을 포함하는 각각의 핵산 가닥의 3' 부위에 상보적이도록 고안될 것이다.

일반적으로, 프라이머는 약 15 내지 30 뉴클레오티드 길이, 바람직하게는 약 18 내지 27 뉴클레오티드 길이일 것이다. 이들은 바람직하게는, 원하는 위치에서 일어나게 될 부합화를 최대화하기 위해서 게놈 내의 유일한 DNA 서열에 부합화 되도록 선택된다.

증폭될 문제의 크로모솜을 따라 위치하는 핵산의 길이는 물론 어떠한 분석이 시행될 것인가에 따른 길이에 있어서의 다양성이 존재하는 것과 같이 STR 부위의 길이에 의해 결정될 것이다. 일반적으로, 핵산 길이는 정상의 인간 크로모솜 내에서 약 350 뉴클레오티드 내지 2000 뉴클레오티드가 되도록 선택되고, 보다 바람직하게는 약 500 뉴클레오티드 내지 1000 뉴클레오티드의 핵산 길이가 선택된다.

분석을 용이하게 하기 위해서, 모든 필요한 도구가 포함된 키트가 제공된다. 예를 들어 취약 X염색체 증후군을 나타내는 돌연변이를 검출하기 위한 키트는 포유류의 게놈 DNA를 증폭시키기 위한 중합효소 연쇄반응(PCR)에서 포워드 프라이머 및 리버스 프라이머로 역할할 것인 한 쌍의 DNA 올리고뉴클레오티드를 포함해야 하며, 여기서 포워드 프라이머는 CGG 반복서열이 위치한 FRAXA 유전자의 비해독 부위의 5'인 위치에서 X-크로모솜의 안티센스 가닥의 3' 뉴클레오티드 서열에 상보적이고, 리버스 프라이머는 FRAXA 유전자 내에 위치, 즉 반복서열 부위의 3'에 상보적이다. 포워드 프라이머는, 리버스 프라이머가 그 5' 말단에 포스페이트를 가지고 있을 경우, 포워드 프라이머의 5' 말단에 공유적으로 결합된 고정 반쪽을 가져야만 한다. 원한다면 이러한 배열은 서로 역전될 수 있다. 그러한 쌍의 올리고뉴클레오티드는 따라서 모든 CGG 반복서열 및 내부 대조구조로 역할할 실질적 인접 단편을 함유하는 게놈 DNA 부위를 증폭하는데 특이적이다. CGG 반복서열 부위 및 내부 대조구조 부위를 개별적으로 표적으로 하는 표지된 올리고뉴클레오티드가, (i) PCR, (ii) 안티센스 가닥의 분해, (iii) DNA-DNA 부합화 및 세척, (iv) 부합화된, 표지 올리고뉴클레오티드 표적의 해리; 및 (v) 비색적 정량을 수행하기 위한 버퍼 및 효소와 함께 제공된다. 이 키트는 복수의 지점을 보유하는 마이크로어레이를 포함할 것인데, 이 지점은 각각 표지된 올리고뉴클레오티드 표적 중 하나에 상보적인 DNA 프로브가 부착되어 있다. 추가적으로 스캐닝, 예를 들어 마이크로어레이의 비색적 스캐닝의 결과를 이용하여 CGG 반복서열의 수에 대한 진단을 수행하는 도구가 포함되는데, 진단은 대조 시료에서 미리 산출된 데이터를 기초로 한다.

이용되는 한 쌍의 프라이머 중 포워드 프라이머는 각 프라이머의 5' 말단에 공유적으로 결합된 고정 반쪽을 보유한다. 리버스 프라이머는 5' 말단에 포스페이트로 유도체화 된다. 이하 설명되는 바와 같이 분석에 있어서 분리된 단계에서 이러한 고정 반쪽을 이용하는 것이 유리하다. 일반적으로, 어떠한 고정 반쪽도 고체 표면 또는 고체상으로 올리고뉴클레오티드를 결합시키도록 이용될 수 있다.

당해 기술분야에서 잘 알려진 바와 같이, 다양한 고체상 물질이 이용될 수 있는데; 예를 들어, 고체 지지체 물질은 아머삼 바이오사이언스(Amersham Bioscience), 바이오라드(BioRad), 및 시그마(Sigma)에서 상업적으로 입수 가능한 것과 같이 일반적으로 이용되는 광범위한 물질 중 임의의 것에서 선택될 수 있다. 이는 입자, 플레이트(plate), 매트리스, 섬유 또는 유사체의 형태로 존재할 수 있고, 이는 실리카, 셀룰로오스, 아가로스 비드(bead), 조절된-발포 유리, 중합체 비드, 젤 비드, 또는 자기 비드(magnetic beads)로 제조될 수 있다. 그러한 자기 비드의 이용이 자기장의 똑바른(straightforward) 적용에 의해 이에 수반하는 상층액의 분리를 용이하게 하므로 자기 비드가 바람직하다. 그러한 자기 비드는, 예를 들어 다이날(Dynal) 비드에서 판매되는 자기 비드 또는 어드밴스드 매그네틱스에서 판매되는 자기 비드는 생물학적 시료의 잔여물 및 PCR 물질에서 증폭된 DNA 및 세척에 의한 반응 생성물을 분리하는데 이용될 수 있다. 이러한 동일한 특성이 또한, 분석 절차의 나중 단계에서 분해된 표적 물질을 분리하는데 유리하게 이용될 수 있다. 비드 형태의 입자가 시설 및 조작에 바람직하다고 할 지라도, 기타 성형된 입자 또는 물질이 선택적으로 이용될 수 있다. 상업적으로 입수 가능한 그러한 자기 비드는 일반적으로 원하는 자기적 특성을 부여하기 위해 자기 층으로 코팅되고, 이후 외부 코팅으로 코팅된 소형의 비공극 구이다. 이러한 목적을 위해 상업적으로 입수 가능한 자기 비드는 다양한 방법으로 생산되는데; 종종 금속 산화물과 같은 상사성의 금속을 적절한 코팅 물질, 예컨대 중합체 또는 실리케이트로 뒤덮어, 약 $1\mu\text{m}$ ~ $100\mu\text{m}$ 직경의 코팅된 비드를 생산한다.

서로 상보적이고, 서로 결합하는 고정 반쪽 및 결합제(coupling agent)가 그러한 고체 지지체에 증폭된 DNA를 부착시키기 위한 결합(linkage)으로서 이용된다. 많은 다양한 결합 쌍이 당해 기술분야에 잘 알려져 있고 적절하게 이용될 수 있다. 고정 반쪽은 고체상에 직접 결합할 수 있거나, 보다 일반적으로는 고체상에 의해 운반된 상보적인 결합제에 직접 결합할 수 있다. 바람직한 결합 시스템은 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin) 및 비오틴(biotin)을 이용한다. 예를 들어, 스트렙타비딘은 고체 지지체, 예컨대 자기 비드의 겔표면에 공유적으로 결합되어 있고, 차례로 비오틴닐화된(biotinylated) DNA와 강하게 결합한다. 관심의 대상인 용도에 적합한 그러한 비드는 다수의 공급자로부터 상업적으로 입수 가능하다. 비드의 표면에 스트렙타비딘이 결합되어 있고, 약 $1\mu\text{m}$ 직경의 공칭 크기를 갖는 비드는 캘리포니아 소재 액티브 모티프 오브 칼스배드(Active Motif Carlsbad)사에서 판매한다. 다른 결합쌍, 예컨대 항체-항원 및 이들의 유사체는 선택적으로 중간 결합과 같은 것이 이용될 수 있다. 그렇게 유도된 비드는 상기 (iii)번 항목에서 설명된 바와 같이 세척을 용이하게 하는 완충액과 함께 키트의 선택적 부품으로서 공급될 수 있다.

키트의 카테고리화된 부분의 부품으로서 공급되는 기타 아이템(item)도 임의의 PCR 키트의 부품으로서 상업적으로 입수 가능하고 일반적으로 포함되는 잘 알려진 물질이다. 이들은 지금은 잘 알려진 PCR 방법의 상세 설명을 제공하는 4개의 미국 참고문헌에서 자세히 설명되고 있다.

이 키트의 주요한 아이템은, CGG 반복서열 부위 및 내부 대조구조로서 선택된 부위를 개별적으로 표적으로 하도록 고안된, 표지된 일군의 올리고뉴클레오티드이다. 이용되는 표지는, 표시 염료, 방사성핵종(radionuclide), 항체, 효소 및 이들의 유사체를 포함하는, 핵산 표지를 위해 상업적으로 입수 가능한 광범위한 물질에서 선택된, 일반적으로 이용되는 아이템 중 임의의 것이 될 수 있다. 바람직하게는, 표지는 비색적 표지자이고, 보다 바람직하게는 최종 분석의 단순화를 위한 형광 염료인데; 그러나, 알칼리 포스페이트, 퍼옥시드(peroxide), β -갈락토시다아제(베타-갈락토시다아제) 및 합텐(hapten), 화학적형광 반쪽과 같은 아이템뿐만 아니라 디곡신(digoxin) 및 디곡시제닌(digoxygenin)과 같은 아이템도 이용될 수 있다. 당해 기술 분야에 잘 알려진 바와 같이 표지가 표적의 부합화를 방해하지 않도록 짧은 링커(linker)가 이용될 수 있으나, 일반적으로 표지는 표적에 직접 연결된다. 바람직한 비색적 표지자는 Cy-3 형광 염료이다.

2개의 분리된, 표지된 올리고뉴클레오티드 표적 중, 하나의 표적은 STR 구역(section)에 부합화되도록 고안되어 있다. 이러한 올리고뉴클레오티드는 약 3 내지 7 트리플렛(triplet) 및 바람직하게는 약 4 내지 6 트리플렛을 포함해야만 하는데, 즉, 약 12 내지 18 뉴클레오티드의 길이여야 한다는 것이다. 내부 대조구조에 대하여 표지된 표적 물질은 21 내지 54 뉴클레오티드의 길이, 바람직하게는 약 30 내지 45 뉴클레오티드의 길이이다. 내부 대조구조에 대하여 표지된 표적 물질은 단순하게도 선택된 단편, 예컨대 해독된 FRAXA 유전자의 단편에 인접한 핵산의 센스 가닥에 상보적이도록 선택된다. 표지된 STR 표적의 양은 바람직하게는 내부 대조구조 표적의 약 5배 이상, 바람직하게는 10배 이상, 가장 바람직하게는 20배 이상이다.

이 키트는 또한, 선택된 DNA 프로브가 부착된 복수의 마이크로스팟(microspot)을 보유하는 마이크로어레이를 포함하는데; 이 프로브는 표지된 표적 중 하나에 상보적이다. 표적을 위한 프로브가 플랫 기재 또는 마이크로티터(microtiter) 플레이트에 직접적으로 결합하는 2차원 분석법을 포함하여, 표지된 DNA 표적을 위해 개발된 무수한 어레이 중 임의의 것이 이용될 수 있다고 할 지라도; 발명의 명칭이 "3차원 형태의 바이오칩(Three Dimensional Format Biochips)"인 미국특허 제 6,174,683호 및 공개된 국제출원 WO 02/059372호에 설명된 것과 같은 3차원 바이오칩을 제공하는 것이 바람직하다. 그러한 3차원 어레이에서, 프로브는 플레이트 내 웰(well)의 고체 표면 또는 유리슬라이드 또는 기타 플레이트에 연결되어 있지 않으나, 이들은 대신에 중합화된 하이드로겔(hydrogel)의 마이크로스팟에 부착되어 3차원 어레이에 존재하게 된다. 이러한 배열은 프로브를 고체 기재와 단리시키고, 프로브의 제시(presentation) 및 표지된 표적 분자의 제한된 포획을 위해 확대된 표면적을 제공한다. 바람직하게는, 그러한 복수의 3-D 마이크로스팟은 분석에 이용된 각각의 상이한 표적을 위해, 각 유리 슬라이드 또는 마이크로웰(microwell) 플레이트의 각 웰 내에 제공된다.

고정 반쪽이, 이후 센스 가닥과 결합될 것인 포워드 프라이머에 공유적으로 결합된, 바람직한 구체예에서, 프로브는 단순히 본래 선택된 핵산 센스 가닥의 구역이며; 이들은 마이크로어레이 플레이트 또는 바람직한 배열에 있어서, 마이크로어레이 플레이트에 접착될 하이드로겔 지점에 결합되도록 유도체화된다. 임의의 적절한 링커가 이용될 수 있으며, 바람직하게는 C-6 아미노 링커가 일반적으로 당해 기술분야에 알려진 바와 같이 이용될 수 있다. STR 구역에 대한 프로브는 복수의 CGG 트리플렛, 바람직하게는 약 6 내지 20개의 트리플렛 및 보다 바람직하게는 약 8 내지 15개의 트리플렛을 함유하는데; 바람직하게는 표적 물질 내에 존재하는 것 보다 프로브 내에 적어도 약 2배의 트리플렛이 존재하여야 한다. 내부 대조구조 표적 물질을 위한 올리고뉴클레오티드 프로브는 마찬가지로 단순히, 적절한 길이의 선택된 인접 부위 유래의 핵산 센스 가닥의 단편이다. 이것은 바람직하게는 적어도 표적 물질만큼 길어야 하며, 바람직하게는 내부 대조구조 표적 물질에 대하여 본원에 나타낸 바와 같이 대략 동일한 길이를 갖는다.

상기 언급한 바와 같이, 키트는 부합화 반응을 용이하게 할 적절한 화학물질을 포함한다. 슬라이드 또는 웰로 부합화 용액의 배양 후에, 결합되지 않은 표지된 표적 물질을 제거하기 위해 세척이 수행된다. 수득한 슬라이드는 임의의 적절한 방법으로 관찰될 수 있는데, 형광 염료가 사용되었을 경우에는 형광 검출기를 이용하여 관찰될 수 있다. 표적에 부착하기 위해 선택된 특정 표지의 성질에 따라, 기타 적절한 검출기가 물론 선택적으로 이용될 수 있다. 이후, 키트에 제공되는 적절한 알고리즘 또는 기타 방법이 마이크로어레이의 비색적 스캐닝의 결과를 해독하기 위해 이용되며; 그러한 해독은 대조 시료에서 미리 산출된 데이터를 기초로 전개된다.

STRP의 존재를 검출하기 위한 분석 절차의 예로서, 소량의 미지의 게놈 DNA를 우선 수득하는데; 예를 들어, 약 10ng이 충분하다고 생각된다. 이러한 미지의 시료로 50 μ l의 부피를 보유하는 반응 챔버에서 PCR을 수행한다. STR 구역 및 핵산의 선택된 인접 단편을 포함하는 선택된 핵산 단편에 대한 포워드 및 리버스 프라이머가 각각 약 1 μ M씩 적절한 데옥시리보뉴클레오티드 기질, 적절한 효소 및 완충액을 함유하는 상업적으로 입수 가능한 PCR 시스템의 성분과 함께 첨가된다.

일반적으로, PCR 복제 과정의 약 5 내지 약 40번의 온도 사이클이 수행되어 원하는 양의 증폭된, 선택된 핵산 서열을 만들어 낸다. PCR 증폭의 종료 시에, 반응되지 않은 프라이머 및 뉴클레오티드 기질 및 이의 유사체를 제거하기 위한 표준 방법을 사용하여, 이중-가닥 생성물이 정제된다. 그러한 정제 키트는 상업적으로 입수 가능하며, 용리(elution)는 적절한 양의 탈이온수(DI water)로 수행된다.

이후, 정제된 DNA의 안티센스 가닥은 람다 엑소뉴클레아제(NEB)와 같은 적절한 뉴클레아제로 분해된다. 그러한 분해 이후에, 본래 선택된 핵산의 센스 가닥의 뉴클레오티드 서열을 보유하는 비오틴화된 단일 가닥 DNA가 잔류한다. 이어서, 비오틴화된 단일 가닥 DNA는 양 STR 구역 및 내부 대조구 단편을 위한 표지된 표적 물질과 혼합되며; STR 구역에 대하여 약 200nM의 표지된 표적 올리고뉴클레오티드 및 내부 대조구 구역에 대하여 약 10nM가 상업적으로 입수 가능한 적절한 완충액 시스템과 함께 사용된다. 이 혼합물은 약 10분 동안 약 95°C의 변성온도에 적용되고, 이어서 적절한 길이의 시간 동안, 예컨대 약 35°C 내지 40°C의 온도에서 약 2 내지 5시간 동안, 연속 진동 또는 부합화를 촉진하기 위한 유사체를 이용하여 배양된다.

배양 후에, 부합화된 시료 물질은 증폭된 DNA 가닥의 비오틴 고정 반쪽을 통해 스트렙타비딘 비드 또는 다른 적절한 고체 기재에 고정화된다. 고정화는 진동 또는 유사한 것으로 약 15분 간 실온에서 적절한 완충액 내에서 배양을 함으로써 달성된다. 비드와 비오틴화된 DNA 사의 결합이 완료되기 위한 시간을 제공한 후에, 비드는 특별히 부합화되지 않은 표지된 표적을 포함하는 기타 성분 모두를 제거하기 위해 세척된다. 일반적으로, 선택적으로 강도를 증가시키는 다중 세척이 이용될 것이다.

이러한 세척 후에, 표지된 표적은 0.1M NaOH 또는 이와 상응하는 염기로 처리하여 고체 지지체에 결합하는 가닥에서 용리되고, 약 5분간 실온에서 배양된다. 용리 후에, 액체 상청액은 자기 인력에 의해 고정화되는 비드에서 분리되며, 상청액은 수집되고 중화된다. 표지된 표적을 함유하는 액체 용액은 이후, 직접 적절한 마이크로어레이로 적용된다.

마이크로어레이에의 부합화는 적절한 온도, 예컨대 40°C 내지 50°C의 온도에서 일반적으로 적어도 약 12시간의 기간 동안 적절한 완충액을 함유하는 용액에서 수행된다. 부합화 이후, 마이크로어레이는 적절한 완충액-함유 용액을 이용하여 여러 번 세척되고, 이후, 비색적 분석이 수행된다. 표지가 바람직한 형광표지일 경우, 증폭된 핵산과 부합화된 상이한 표적 물질에 특이적인 프로브에 의해 주어지는 형광 신호의 강도가 기록되며; 이러한 값은 이하, 자세하게 설명되는 바와 같이, 증폭된 PCR 생성물 내에서 공증폭된 것으로 밝혀진 내부 표준량과 비교하여 특정 STR 단편의 상대적인 길이의 정량적 표시를 제공한다.

분석법의 초기 부분에서 어떤 단계는 원하는 바의 다양한 서열로 수행될 수 있다. 예를 들어, 비오틴화된, 증폭된 이중-가닥 DNA는 안티센스 가닥이 분해되기 전에, 우선 스트렙타비딘-운반 자기 비드와 결합될 수 있거나, 또는 대안적으로 표지된 표적이 혼합물에 첨가되기 이전에 그렇게 결합될 수 있다. 그러나, 분석을 수행하는 바람직한 방법은 상기 나타난 바와 같은데, 여기서 이중-가닥 생성물은 우선 표지된 표적, 즉 형광 표지를 운반하는 DNA 올리고뉴클레오티드가 첨가되기 전에 안티센스 가닥을 분해하기 위해 처리되고, 이후 혼합물은 스트렙타비딘-운반 자기 비드 또는 이와 유사한 것에 부착되기 전에 단일 가닥 DNA 표적이 증폭된 DNA의 상보적인 서열로 부합화되도록 하는 부합화의 수행 조건 하에서 유지된다. 일단 비드가 세척되며, 이들은 알칼리, 예컨대 수산화나트륨 용액으로 실온에서 처리되어 형광-표지된 합성 표적과 유리될 수 있다. 이후, 수득된 수용액은 증폭된 DNA 시료와 부합화 되나, 이제 그러한 알칼리 처리의 결과로 유리된 2개의 표적에 대한 적절한 분석법에 직접 이용될 수 있으며; 그러나 바람직하게는 우선 중화된다.

지금까지, 취약 X염색체 증후군이라 불리는 STRP의 검출에 초점을 맞추어 고안된 분석법에 관한 실시예의 견지에서 본 발명의 특이점이 설명되었다. 취약 X염색체 증후군에 대하여 분석될 미지의 시료로부터 수득된 결과를 해독하기 위한 도구를 제공하기 위해, 상기 기술된 방법은 각각 30개의 CGG 반복서열 및 117개의 CGG 반복서열을 보유하는 것으로 알려진 2개의 대조 시료를 시험하는데 우선 이용된다. 이용되는 표지는 형광표지이고; 따라서, 마이크로어레이 상의 각각 개별적인 프로브에서 측정된 비색적 강도는 형광 강도(FI)이다. 하기의 결과가 수득되었다:

1. 30개의 반복서열을 보유한 것으로 알려진 대조 시료:

CGG 프로브의 FI = 17,598

내부 대조구 프로브의 FI = 17,008

(CGG의 FI)/(내부 대조구의 FI) = 1.03

2. 117개의 반복서열을 보유한 것으로 알려진 대조 시료:

CGG 프로브의 FI = 11,005

내부 대조구 프로브의 FI = 4,708

(CGG의 FI)/(내부 대조구의 FI) = 2.34

이러한 대조 시료에서 수득된 결과는 비례적이고, 이들은 이러한 결과에서 유도된 방정식을 이용하여 임의의 미지 시료에서 반복서열의 수를 측정하는데 이용될 수 있는 수단을 제공한다. 보다 특정하게는, 이러한 2개의 대조 시료에서 수득한 결과가, 미지 시료로부터 나중에 수득될 FI 또는 기타 상응하는 비색적 수치를 이용하여 그러한 미지 시료에서 반복서열의 개수를 계산하는 것을 가능하게 하는 알고리즘을 만들어 내는데 이용될 수 있다는 것이 밝혀졌다.

하기의 알고리즘이 특정 유전자, 예컨대 취약 X염색체(FRAXA) 유전자에서 STRs에 대한 시험 데이터를 기반으로 개발되었으며, 여기에서 단순화된 방정식이 이러한 특정 STRP에 대해 유도되었다:

$$N = K + \frac{(A - B) \times Q}{(C - B)}$$

N = 미지 시료 내 STRs의 계산된 수.

K = 작은 수의 반복서열을 가진 대조 시료 내 STRs의 수.

CI = 비색적 강도.

A = STR 프로브의 CI를 미지 시료의 내부 대조구 프로브의 CI로 나눈 비율.

B = K 반복서열을 가진 대조 시료에 대한 CI의 비율

Q = 큰 수의 반복서열을 가진 대조 시료와 작은 수의 반복서열을 가진 대조 시료 사이의 반복서열 개수의 차이.

C = STR 프로브의 CI를 큰 수의 반복서열을 가진 대조 시료에 대한 내부 대조구 프로브의 CI로 나눈 비율.

이러한 알고리즘은 취약 X염색체 증후군으로 의심되는 것의 분석에 대한 특정 방정식을 유도하는데 이용된다. 30 반복서열 및 117 반복서열을 가지는 2개의 대조 시료의 시험 결과, 이제 K, B, C 및 Q의 값은 밝혀졌고; 따라서, 이 알고리즘은 취약 X염색체에 대하여 하기의 방정식으로 단순화 될 수 있다:

$$N = 30 + (A - 1.03)66.4.$$

이러한 분석의 유효성을 시험하기 위해서, 미지의 시료가 시험된다. 그러한 미지 시료의 분석의 자세한 설명은 이하 첨부된 실시예에서 설명되지만; 이들은 예증적인 것이며, 첨부된 청구의 범위에 정의된 발명 및 발명의 범주를 제한하는 것이 아님이 고려되어야 한다.

실시예

계놈 DNA 10ng 및 FRAXA 유전자 서열의 유전자 자리 내에 X-크로모솜의 선택된 핵산 단편에 대한 각각의 프라이머를 1 μ l 함유하는 총 부피 50 μ l에서 PCR을 수행했다. 선택된 단편에는 전체 CGG 반복서열 구역 및 이에 인접한 3' 내부 대조구 단편이 포함되었다. 로체(Roche)에서 제조된 GC-풍부 PCR 시스템을 이용했다. 이용된 FRAXA 포워드 및 리버스 프라이머는 뉴클레오티드 염기서열 SEQ ID NOS: 1 및 2(표 참조)를 보유하는 올리고뉴클레오티드였다. 포워드 프라이머는 21 뉴클레오티드 길이였고, 리버스 프라이머는 27 뉴클레오티드 길이였다. 이들은 "정상" X-크로모솜에 적어도 254 뉴클

레오티드 길이인 총 유전자 단편을 거쳐 천천히 나아갔다. 포워드 PCR 프라이머는 5' 비오티닐화했고, 리버스 프라이머는 5' 포스포릴화 했다. 이용된 PCR 온도 사이클 조건은: 95°C에서 2분간, 이어서 95°C에서 1.5분간, 56°C에서 1분간, 및 72°C에서 1분간, 25 사이클이었다. 최종 신장은 72°C에서 7분간 수행했다.

증폭된 DNA를 QIAquick PCR 정제 키트(퀴아젠(Qiagen)사)로 정제했고, 이어서 50µl 탈이온수로 용리했다. 이후, 정제된 DNA의 안티센스 가닥은 람다 엑소뉴클레아제(NEB)로 분해했다.

잔류하는 비오티닐화된 단일-가닥 DNA를 2개의 상이한 5'-Cy3-표지의 표적 올리고뉴클레오티드:(CGG)_n을 포함하는 Biocept #3584 (SEQ ID NO: 3) 및 선택된 3' FRAXA 내부 대조구에 상보적인 Biocept #3595(SEQ ID NO: 4)에 부합화 했다. 부합화는 1x B&W 완충액(5mM 트리스-HCl, pH 8, 0.5 mM EDTA, 1M NaCl)에서 수행했다. 시료는 95°C에서 10분간 변성했으며, 이어서 셰이커(shaker)에서 37°C에서 3시간 동안 배양했다.

이후, 부합화된 표적 물질은 셰이커 상에서, 실온에서 15분간, 1x B&W 완충액에서 배양함으로써 비오티닐화 된 센스 가닥을 스트렙타비딘 비드(액티브 모티프)에 결합하여 고정화했다. DNA/비드 복합물을 1x B&W로 3회 세척했으며, 이후 0.1 M NaOH를 첨가하고 실온에서 5분간 배양하여 표지된 표적 올리고뉴클레오티드를 결합된 단일-가닥 DNA에서 분리했다. 방출된, 표지된 표적 올리고뉴클레오티드를 함유하는 상청액은 수집 및 중화했다.

그 다음, 표지된 표적 올리고뉴클레오티드를 하기의 2개의 프로브를 함유하는 HydroArray 마이크로어레이에 부합화 했다: Biocept #3594(SEQ ID NO: 5) 및 Biocept #3686(SEQ ID NO: 6). 이러한 프로브는 FRAXA 내부 대조구 및 CGG 반복서열(표 참조)에 대한 표지된 표적에 대해, 각각 상보적이었다. 마이크로어레이에서 부합화는 3x SSC 및 0.1% Triton X-100을 함유하는 용액에서, 45°C에서 14시간 동안 수행했다. 이 어레이를 2x SSC 및 0.1% Triton X-100을 함유하는 용액에서, 각각 37°C에서 15분간 3회 세척했다. 여기서, 비색적 표지는 형광 표지였으며, 따라서 형광 이미지를 레이저 스캐너(ScanArray®Lite, 퍼킨 엘머(Perkin Elmer))로 수득했다.

[표]

Biocept	유전자	액세션	개시 부위	서열	5 모드
3470	FRAXA	L29074	13705	gtcaggggct cagctccgt t (SEQ ID NO: 1)	비오티닐
3558	FRAXA	L29074	13867	ctctccatc ttctctccg cctgct (SEQ ID NO: 2)	포스페이트
3686	FRAXA	L29074	13833	cgagcggcgc ggcagcggcg gcaacgscga (SEQ ID NO: 6)	C-6 아미노 링크
3584	FRAXA	L29074	13803	cgcccgccgc gccgc (SEQ ID NO: 3)	CY-3
3594	FRAXA	L29074	13932	gtctccggcg ctgcagggc tgaagag aag atg (SEQ ID NO: 5)	C-6 아미노 링크
3595	FRAXA	L29074	13864	catctctct tcaagcctgc tagcgcggg ago (SEQ ID NO: 4)	CY-3

공증폭된 내부 대조구로서 역할을 한, FRAXA 프로브(#3594)에서 비색적 강도, 여기서는 형광 강도(FI)도 또한 PCR의 효율성의 표시를 제공했다. 프로브 #3568 및 #3594에 형광 강도는 수득한 원하는 비율과 비교했다. FI들, 즉 STR 프로브의 FI를 내부 대조구 프로브의 FI로 나눈 비율은 1.78인 것으로 밝혀졌다. 1.78을 상기 설명된 유도 방정식에 대입하면 STRs의 수에 대한 하기의 계산이 나온다:

$$\text{반복서열의 개수} = 30 + (1.78 - 1.03)66.4 = 80$$

따라서, 결과는 미지 시료에서 CGG 반복서열의 개수에 대하여 80의 값이 계산된다는 것이었다.

시험을 확증하기 위해서, PCR 및 서열 분석을, CGG 반복서열의 개수를 직접 측정하기 위해 매우 많이 이용했으며; 결과는 약 80 내지 85인 것으로 밝혀졌다. 따라서 시험 절차는 완벽히 정확한 것으로 여겨졌다.

본 발명이 발명자의 발명을 수행하기 위해 이번에는 발명자에게 알려진 가장 최상의 양태를 구성하는 몇몇 바람직한 구체예에 관련하여 기술되었지만, 본원에 첨부된 청구의 범위에 설명된 발명의 범주를 벗어남이 없이 다양한 변화 및 변형이 만들어질 수 있다는 것이 이해되어야만 한다.

서열목록

<110> Hahn, Soonkap

<120> DETECTION OF STRP, SUCH AS FRAGILE X SYNDROME

<130> 81671

<140> 10/791,209

<141> 2004-03-01

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1
 gtcaggcgct cagctccggt t 21

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2
 ctcttccatc ttctttcag ccctgct 27

<210> 3

<211> 15

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3
 cgccgccgcc gccgc 15

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4
 catcttctct tcagccctgc tagcgccggg agc 33

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5
gctcccggcg ctagcagggc tgaagagaag atg 33

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
cggcggcggc ggcggcggcg gcggcggcgg 30