

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
C12Q 1/68
C12N 15/10

(45) 공고일자 1996년02월 13일
(11) 공고번호 특1996-0002235

(21) 출원번호	특 1995-0032005(분할)
(22) 출원일자	1995년09월27일
(62) 원출원	특허 특1991-0001251 원출원일자 : 1991년01월09일
(30) 우선권 주장	470,674 1990년01월26일 미국(US) 634,771 1991년01월09일 미국(US)
(71) 출원인	1996년02월13일 찰스 엠. 브룩 미합중국 일리노이 60064-3500 애보트 파크 원 애보트 파크 로오드바이 오테크니카 인터내셔널, 인코포레이티드 케이스 씨. 백크만 미합중국 메사츄세츠 02140 케임브리지 볼튼 스트리트 85
(72) 발명자	케이스 씨. 백크만 미합중국 메사츄세츠 01730 베드포드 칼리슬 로오드 200 샤일라 비. 본드 미합중국 일리노이 60045 레이크 포리스트 리틀 멜로디 레인 96 존 제이. 카리노 미합중국 일리노이 60031 구니 콘스티튜션 4774 토마스 지. 라플러 미합중국 일리노이 60048 리버티빌 파인허스트 코오트 1964
(74) 대리인	이병호, 최달용

심사관 : 김형준 (책자공보 제4334호)

(54) 폴리머라제 연쇄 반응에 적용가능한 표적 핵산의 증폭 방법

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

폴리머라제연쇄 반응에 적용가능한 표적 핵산의 증폭 방법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 선행분야에서 공지된 리가제연쇄 반응의 프로세스를 나타내는 도식적 개요도이다.

제2a 및 b도는, ROI 차단장기를 나타내며 "rBrBrB"가 리보뉴클레오타이드 연장 서열을 나타내는, 돌출된 양태를 나타내는 도식적 개요도이다.

제3도는 두번째 양태의 단일 갭 변이를 나타내는 도식적 개요도이다.

제4도는 두번째 양태의 일반화된, 이중 갭 변이를 나타내는 도식적 개요도.

제5도는 갭을 충전하기 위해 추가의 프로브를 이용하는 두번째 양태의 제3변이를 나타내는 도식적 개요도.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은, 표적 핵산 증폭 방법 및 특히, 효소 촉매 반응에 대한 기질이 되지 않도록 적어도 하나의 프로브 또는 프라이머를 반응개시부위에서 가역적으로 변형시켜, 리가제또는 폴리머라제연쇄 반응 증폭을 수행하기 위한 방법에 관한 것이다. 변형의 예로서는 반응성 그룹의 화학적 차단, "돌출

부분(overhang)"을 형성하기 위한 하나 또는 그 이상의 핵산 염기의 첨가 또는 "리세스(recess)"를 형성하기 위한 하나 또는 그 이상의 핵산 염기의 제거 등이 있다. 변형된 말단은 표적 독립적 의사(擬似) 시그널 발생을 방지 또는 감소시키며 이는 후에 표적 의존적 방식으로 교정되어 증폭가능하게 한다.

다수의 경우, 핵산에 기초한 진단검정의 가능성은, 단지 소수의 표적 분자로부터 생성된 시그널을 증폭할 수 있는 능력에 달려 있다. 물론 시그널 증폭이 하나의 가능성있는 해결책이지만, 종종 표적 증폭이 핵산에 기초한 검정에 바람직한 해결방안이다. 표적 증폭은, 표적으로서 지정된 핵산 부분의 반복된 복사(copy) 또는 복제(duplication)를 포함한다.

폴리머라제연쇄 반응(polymerase chain reaction ; PCR)으로 공지된 표적 증폭 기술중에서, 한쌍의 프라이머(하나의 1차 프라이머와 하나의 2차 프라이머)를 과량으로 사용하여 표적 핵산의 상보성쇄의 외측 말단에서 하이브리드화시킨다. 프라이머들은 표적 핵산을 주형으로 하여 폴리머라제에 의해 각각 연장되게 한다. 연장된 생성물은 점차 표적 서열로 되며 최초의 표적 본쇄로부터 분리하게 된다. 이후 새로운 프라이머가 하이브리드화되고 폴리머라제에 의해 연장되게 되며 이 주기는 반복되어 기하학적으로 표적 서열 분자를 증가시킨다. PCR은 미합중국 특허 제4,683,195호 및 제4,683,202호에 더 기술되어 있다.

표적 증폭에 대한 또다른 기작이 리가제연쇄 반응(ligase chain reaction ; LCR)으로 공지되어 있다. 이 LCR에서는 두개의 1차(제1 및 제2프로브) 및 두개의 2차(제3 및 제4) 프로브가 과량으로 사용된다. 제1프로브는 표적 본쇄의 제1단편에 하이브리드화되고 제2프로브는 표적 본쇄의 제2단편에 하이브리드화되며, 제1 및 제2단편은 인접하여 1차 프로브가 5' 포스페이트-3' 하이드록실 관계에서 서로 인접하여, 리가제가 이들 두개의 프로브를 공유결합적으로 융합 또는 연결시켜 융합된 생성물로 만들게 된다. 또한, 제3(2차)프로브는 제1프로브와 하이브리드화될 수 있고 제4차(2차)프로브는 유사한 인접 양상으로 제2프로브와 하이브리드화될 수 있다. 물론 표적이 처음부터 이본쇄인 경우, 2차 프로브는 먼저 표적 상보체에 하이브리드화될 것이다. 1차 프로브의 융합된 본쇄가 표적 본쇄로부터 일단 분리되면, 이는 상보성의 2차 융합 생성물을 형성하도록 연결될 수 있는 제3 및 제4프로브와 하이브리드화될 것이다. 본원에서 기술된 LCR 및 개선점을 이해하기 위해, 융합된 생성물이 기능상 표적 또는 이의 상보체와 동등함을 이해하는 것이 중요하다. 하이브리드화와 연결의 반복된 주기에 의해, 표적 서열의 증폭이 달성된다. 이 기술은 EP-A-320308에 보다 완전하게 기술되어 있으며 전체 내용은 본원에서 참고로 인용되고 있다.

증폭반응의 커다란 강점중의 하나는 대단히 미소한 수의 표적 분자도 검출할 수 있다는 점이다. 그러나, 시그널과 함께 비표적화된 서열의 증폭이 증폭방법의 신뢰성에 잠재적인 손상을 가할 수 있으므로 이 증폭 방법은 고도로 특이적이어야 함이 중요하다. PCR 및 LCR 모두는 비-특이적 또는 유사한 배경 시그널을 생성하고 심지어는 증폭시킬 수 있다. PCR 및 LCR의 기본원리가 상이하기 때문에, 각각의 경우에 대해 배경 시그널원이 상이하며, 별도로 논의될 것이다.

리가제연쇄반응과 관련된 잠재적 문제점은 프로브의 표적독립성 연결에 의해 유발된 배경 시그널이다. 제3프로브가 제1프로브와 하이브리드화되고 제4프로브가 제2프로브와 하이브리드화되기 때문에, 과량으로 가해지는 프로브는 그들 자신들 사이에서 용이하게 이본체(duplex)를 형성할 수 있다. 이들 이본체들은 표적의 존재와는 독립적으로 연결되어 융합 생성물을 형성하여, 목적하는 증폭된 표적과 식별불가능해지나, 여전히 또다른 증폭을 지원할 수 있다. 물론 이들 이본체의 표적 독립성 평형-말단 연결이 비교적 드물게 일어나지만, 이는 진단검정에 있어서 바람직하지 않은 만큼의 높은 배경 시그널을 유발시키기에 충분히 통상적인 것이다.

PCR에서 의사 배경 시그널의 통상의 인지된 근원은, 증폭시키고자 하지 않았던 DNA 분자의 영역에 프라이머 서열의 하이브리드화이다. 일반적으로, 이들 하이브리드화는 표적 샘플이, 표적서열 자체 이외에 추가로 표적서열과 약간의 유사성을 갖는 다른 서열을 갖기 때문에 발생한다. 비록 이들 유사한 서열에 대한 프라이머의 하이브리드화가, 표적서열만큼 있음직하지는 않지만 몇몇 하이브리드화가 발생할 수 있다. 이처럼 의도하지 않았던 비-특이적 하이브리드화가 일어날 때, 만일 프라이머 분자의 3' 말단 뉴클레오타이드가 성공적으로 표적 분자의 상보적 뉴클레오타이드에 하이브리드화된다면, 프라이머 연장이 폴리머라제효소에 의해 성공적으로 개시되어 표적서열과 상이한 올리고뉴클레오타이드를 발생시키게 될 것이다. 어떤 경우에는, 이 뉴클레오타이드가 대수적 증폭을 나타낼 것이다. 증폭에 관계없이, 의사 뉴클레오타이드 서열은, 몇몇 분석조건하에서 표적서열을 나타내는 것으로 간주되어 결과에 오류를 날게 한다.

비록 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 프라이머가 각각 LCR 및 PCR에서 실질적으로 상이한 역할을 제공하지만, 일반적인 논의가 두가지 모두에 적용가능할 때 "개시제" 및 "프로브/프라이머"라는 용어가 본원에서 사용된다. 의사 시그널 생성의 발생을 감소시켜, 핵산에 기원한 검정의 정밀도를 개선시키는 것이 본 발명의 주요 목적이다. 이 목적은 본 발명에서, 적어도 하나의 프로브/프라이머 말단을 변형시켜 프로브/프라이머의 의사 시그널 발생가능성을 현저히 감소시킴으로써 달성할 수 있다. 변형된 프로브/프라이머와 표적의 특이적 하이브리드화 이후에만, 변형된 말단이 표적 의존성 양상으로 "교정되어", 프로브/프라이머가 효소적 증폭반응에 참여하게 된다.

LCR 또는 PCR에 유용한, 본 발명의 한 특징은, 증폭반응의 효소촉매 단계에 필수적으로 관련되는 그룹을 차단 또는 차폐(mask)시키는 화학적 잔기를 갖는 핵산 프로브/프라이머를 제공한다. 이 효소단계는 LCR에서의 연결(ligation) 및 PCR에서의 연장 또는 연신이다. 어느 경우에서나, 프로브/프라이머는 표적과 하이브리드화 할 수 있고 효소반응을 개시하며(따라서, "개시제"란 용어가 사용됨), 연결되거나 또는 연장된 생성물을 "증폭 생성물"로 칭한다. 차단 그룹은 프로브/프라이머가 표적에 하이브리드화 될 때만 실질적으로 효소에 의해 제거될 수 있도록 선택한다. 다른 측면에서, 프로브/프라이머는 한쪽 말단에 돌출된 추가의 염기를 함유하도록 변형시킨다. 그후 이 염기를 증폭반응이 일어나도록 표적 의존성 방식으로 절단한다.

LCR에 특이적인 다른 특징에 따르면, 프로브는 표적과 하이브리드화 되었을 때 갭을 만들게 되는,

연결점에 대한 리세스(recesses)를 갖고 있다. 이 갭은 그 후 프로브가 연결성이 있도록 하기 위해 표적 의존성 방식으로 충전된다. 갭 충전은 하나 또는 그 이상의 프로브를 연장하거나 추가의 제5 및 제6프로브를 사용한 후 연결시켜 수행할 수 있다.

본 발명의 다른 목적은, 제1서열이 제2서열과 표적영역 중에서 단 하나의 염기만이 상이한, 제1서열과 제2서열을 구별하는 개선된 방법을 제공하는 것이다. 제1서열은 표적으로 볼 수 있으며, 제2서열은 구별될 수 있는 잠재적인 교차반응 본체로서 보여질 수도 있다.

간단하게, 본 발명은 효소가, 핵산 개시제; 핵산 개시제가 주형으로서 하이브리드화되는 표적 서열 또는 증폭 생성물; 및 표적에 상보적인 증폭 생성물(증폭 생성물은 그 자체가 추가의 주형으로서 작용한다)을 효소적으로 집합(assemble)시키기 위해 빌딩 블록으로서 적어도 하나의 부가적인 뉴클레오타이드-함유 반응물을 사용하여, 효소적으로 표적 핵산 서열을 증폭시켜 증폭 생성물을 수득하는 방법에 있어서, (a) 개시제가 하이브리드화될 때, 효소가 개시제를 그의 기질로서 실질적으로 작용할 수 없어서 생성물이 집합되지 않도록 하나 이상의 개시제를 변형시킨, 표적과 하이브리드화할 수 있는 필수적인 개시제를 제공하고; (b) 존재하는 경우, 개시제를 표적에 하이브리드화하여 개시제-주형 복합체를 형성시키며; (c) 표적 의존성 방식으로 변형을 교정하여 개시제-주형 복합체가 효소에 의해 작용하도록 하고; (d) 증폭 생성물을 효소적으로 집합시키며; (e) 표적으로부터 증폭 생성물을 분리시키고 하이브리드화, 교정 및 집합단계를 반복하여 목적하는 표적 서열을 증폭시킴을 특징으로 하는 개선된 방법에 관한 것이다.

따라서, "개시제"란 용어는 PCR 중에 사용된 프라이머 또는 LCR에 사용된 하나 또는 그 이상의 프로브를 말한다. 연장/연신 맥락에서 사용될 때, 뉴클레오사이드-함유 반응물은 뉴클레오사이드 트리포스페이트 또는 이의 동족체를 포함한다. 연결 맥락에서 사용될 때, 개시제는 파트너 프로브 한쌍중 단지 하나의 프로브(다시말해서, 하나의 1차 프로브 및/또는 하나의 2차 프로브)를 포함하지만, 뉴클레오사이드-함유 반응물은 제2올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함한다(즉, 한쌍중의 다른 파트너, 이는 궁극적으로 개시제와 연결된다).

변형의 교정은 변형 양상에 의해 결정된다. 그러나, 본 발명의 장점을 충분히 깨닫기 위해서는, 교정이 실질적으로 단지 변형된 개시제가 표적 또는 효소적 집합으로부터 생성되는 증폭 생성물(둘중 어느 하나가 적절한 주형으로 작용한다)에 하이브리드화되는 경우에만 이루어져야 한다. 따라서 교정은 "주형 의존성"이다. 교정 및 집합 시약은 이하에서 상세히 기술된다.

본 발명의 목적상, 표적서열은 일본체로 기술된다. 그러나, 이 점은 표적이 실질적으로는 이본체지만, 프로브/프라이머와 하이브리드화 되기 전에 이의 상보체로부터 용이하게 분리될 수 있는 경우를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 이본체 표적의 경우, 2차 프로브(들)(LCR에서, 제3 및 제4프로브들 A' 및 B'; PCR에서, 추가의 프라이머 B) 또한 표적 상보체에 하이브리드화되어 개시단계에 참여한다. 일본체 표적의 경우, 2차 프로브 또는 프라이머는 최초의 하이브리드화 단계에 참여하지 않고 후속 하이브리드화 단계에 참여할 것이다. 표적 서열은 DNA 또는 RNA를 포함한다.

본 출원의 전반에 걸쳐, "프라이머(')" 표시는 상보적 염기 또는 서열을 나타내는데 사용된다. 프로브 또는 프라이머는 다른 서열과 하이브리드화 할 경우 이에 "상보성"이며, 실질적으로 하이브리드화 영역 중에서 상보적 염기쌍을 갖는다. 따라서, 프로브 A는 비록 말단이 동일하게 끝나지 않았더라도 A'와 상보적일 수 있다. 이는 B와 B'에 대해서도 마찬가지이다. 마찬가지로, 짧은 서열 X_n 및 Y_m은 각각 X'_n 및 Y'_m으로 나타낸 상보적 서열을 갖는다. 최종적으로, 단일염기(예, Q)에 대한 상보체(complement)는 Q'로 나타낸다. 본원에서 서열에 대해 사용된 "상보성"이란, 만일 검정조건하에서 하이브리드화 시킬 수 있다면, 하이브리드화 가능한 영역 중에 부정합 염기쌍을 갖는 서열을 포함한다.

또한, "4개의 염기"는 DNA의 경우 구아닌(G), 시토신(C), 아데닌(A) 및 티민(T)을 나타내며, RNA의 경우에는 구아닌(G), 시토신(C), 아데닌(A) 및 우라실(U)을 나타내는 것으로 이해할 수 있다. 이 용어는 또한 상기 명명된 염기의 동족체 또는 유도체도 포함한다. 물론, 본 발명 중에서 변성 염기 이노신(I)도 사용될 수 있으나, 본 발명에 따른 프로브의 변형된 부분내에서 I를 사용하는 것은 바람직하지 않다.

[1. LCR]

LCR에 대해, 평활-말단 이본체를 형성할 수 있는 두쌍의 프로브를 사용하는 대신에, 프로브쌍의 적어도 하나의 프로브가, 생성된 이본체가 "비평활"이 되게 하고/하거나 두 프로브 이본체의 리가제촉매화된 융합을 위해 적합하지 않은 기질로 되게 하는 "변형된" 말단을 처음부터 포함한다는 점이 본 발명의 중요한 특징이다. "변형된 말단"이란 상보적 프로브 보다는 연결점에 대해 정의된다. "변형된 말단"은, (1) 통상의 LCR 조건하에서 반드시 리가제촉매화된 융합에 참여하는 그룹(예 : 5' 포스페이트 또는 3' 하이드록실)상에서 차단 잔기(또는 추가의 염기 잔기)를 갖거나(참조 : 제2a 및 b도의 프로브 A) 또는 (2) 하나의 프로브 말단과 다음 프로브 말단 사이에 "갭"을 형성하기 위해 결실된 염기를 갖는다(참조: 제3도의 프로브 B, 제4도의 프로브 A' 및 B 및 제5도의 프로브 D 및 E).

본 출원의 편의상, 첫번째 유형의 변형된 말단을 "돌출부(overhang)"으로 칭하며, 이 돌출된 것은, 표적 서열과 하이브리드화 될 때 연결점 너머까지 연장되는, 추가의 차단 잔기 또는 추가의 염기 잔기이다. 용어 "돌출부"는 상보적인 프로브에 대해 돌출한 하나의 프로브 연장과 혼동할 필요는 없다. 왜냐하면 이들 공동 말단(coterminal)닝 필요가 없기 때문이다. 두번째 유형의 변형된 말단은 본원에서 "리세스"로 칭하며, 이 리세스는 표적과 하이브리드화한 후 두개의 1차 또는 2차 프로브 사이의 갭을 나타낸다. 이들 변형된 말단의 존재는, 표적의 부재하에 상보적 프로브 이본체가 서로 평활-말단 연결되어 생성된 가양성(falsely positive) 시그널을 감소시킨다.

변형의 "교정"은 프로브에 연결성을 부여하기 위해 연이어 수행한다. 본원에서 사용된 "교정"은, 표적 의존성 방법으로, 두개의 1차 프로브 또는 두개의 2차 프로브가 이들의 파트너에 연결될 수 있도록 하는 과정을 나타낸다. 따라서, 표적, 표적 상보체 또는 이로부터 생성된 폴리뉴클레오타이드 서

열과 하이브리드화되는 프로브만이 "교정"된다. "교정"은 사용된 변형 말단의 유형에 따라서 여러가지 방법으로 수행할 수 있다.

본원에서 사용된 "연결점(point of ligation)" 또는 "연결의도점(intended point of ligation)"은 주형-의존성 방식으로 연결된 두개의 프로브 파트너 사이의 특정 위치를 나타낸다. 이는 "교정된" 프로브가 그의 파트너와 5'-포스페이트-3' 하이드록실의 관계로 인접해 있는 위치를 나타낸다. 4개의 각 LCR 프로브 세트에 대해, 두개의 "연결점"이 존재하는데, 하나는 1차 프로브 파트너, 다른 하나는 2차 프로브 파트너에 대한 것이다. 통상적인 LCR에 있어서, 두개의 연결점은 서로 반대방향이어서 프로브쌍이 서로 하이브리드화 될 때 평활말단 이본체를 형성하게 된다. 본 발명에서, 연결점은 "돌출부분" 양태에서만 서로 상반되어 있다. 이들 "리세스" 양태에서 갭에 의한 하나 이상의 염기에 의해 서로로부터 대치된다. 정확한 연결점(들)은 양태에 따라서 다양하며, 따라서, 이 용어는 각 양태의 맥락에서 좀더 정의된다.

각각의 프로브는 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 통상적인 뉴클레오타이드 포스포르아미다이트 화학방법 및 어플라이드 바이오시스템스 인코포레이티드(캘리포니아 포스터시 소재), 듀폰(말이웨어 윌밍턴) 또는 밀리겐(마이애미 베드포드)사에서 시판하는 기구를 사용하여 목적하는 프로브를 제조하는 것이 통상적이다. 리가제에 의한 연결에 필요한, 프로브의 5' 말단 인산화는 당해 분야에 공지된 키나제에 의해 성취될 수 있다.

본 출원 전반에 걸쳐, 염기 X,Y 및 Q와 이들의 상보체는 특정한 4가지 염기의 서브세트(N 또는 M)로부터 선택된 것으로 기술한다. 실제로, 서열은 전혀 "선택되지" 않고, 다만 표적 본체의 서열로 명시된다. 여기에서 "선택된"이란 용어는 목적하는 특징을 가지는 표적 서열이 위치해 있고 프로브가 적절한 표적 서열의 단편(들) 주위에서 작제된다는 것을 의미한다.

일반적으로, 본 발명의 방법은 (a) 표적에 변형된 프로브를 하이브리드화(및 이본쇄여서 표적 상보체가 존재하는 경우 표적 상보체에 대해)시키고; (b) 의존성 방식으로 변형을 교정하여 프로브에 연결성을 부여하며; (c) 교정된 프로브를 이의 파트너에 연결시켜 융합 또는 연결된 생성물을 형성시키고; (d) 융합된 생성물을 표적으로부터 분리시킨 후, 하이브리드화, 교정 및 연결 단계를 반복하여, 목적하는 표적 서열을 증폭시키는 단계들을 반복함을 포함한다. 단계(a), (c) 및 (d)는 필수적으로 모든 양태에 대해 동일하며 함께 논의될 수 있다. 이들은 일반적으로 동일한 단계로서 통상적인 LCR 중에 사용된다. 단계 (b)는 사용된 변형의 유형에 따라 다양하며 각각의 상이한 유형은 별도로 논의한다.

표적(및 임의로 표적 상보체)에 대한 변형된 프로브의 하이브리드화는 EP-320 308호에서 적절하게 설명되었다. 프로브 길이, 프로브 농도 및 조건의 엄격성은 모두 하이브리드화가 발생하는 정도 및 속도에 영향을 준다. 프로브는 목적하는 특이성을 제공하기에 충분히 긴 것이 바람직하다(즉, 샘플 중에서 무작위 서열과 하이브리드화하는 것을 피하기 위함). 전형적으로, 15 내지 100 염기의 프로브가 이런 목적에 사용된다. 현재 바람직한 것은 약 15 내지 약 40 염기 길이를 갖는 프로브이다.

프로브는 대략 등몰농도를 가하는데 이는 프로브가 화학양론적 양으로 반응할 것으로 기대되기 때문이다. 각각의 프로브는 약 5나노몰(nM) 내지 약 90nM, 바람직하게는 약 10nM 내지 약 30nM 범위로 존재한다. 각 반응에 사용된 프로브의 최적량은 반드시 수행해야할 주기 수에 따라서 다양하다. 최적의 농도는 당해분야의 통상적 기술로서 결정할 수 있다.

조건의 엄격성은 당해분야에서 일반적으로 온도, 용매 및 다른 파라메타에 의존하는 것으로 공지되어 있다. 이들 파라메타중 가장 용이하게 조절가능한 것은 아마도 온도이며 따라서, 일반적으로 이것이 LCR을 수행하는데 변화되는 엄격한 파라메타이다. 본 발명을 수행하는데 요구되는 엄격성 조건이 보통의 LCR과는 상이하지 않기 때문에, 더 상세한 것은 그리 필요하지 않으며, 통상의 실행자는 하기의 실시예로 안내받을 수 있다.

일반적인 방법중 다음 단계에 특정의 교정단계가 따르며, 하나의 프로브와 이의 인접한 파트너와의 연결도 포함한다. 따라서, 각 1차 프로브는 이의 관련된 1차 프로브와 연결되며 각 2차 프로브는 이의 관련된 2차 프로브와 연결된다. "인접한" 프로브는 인접한 배향으로 표적과 하이브리드화할 수 있는 두개의 프로브 중 어느 하나를 나타내며, 이중의 하나는 이의 인산화된 5' 말단이 파트너 프로브의 3' 하이드록실 말단과 함께 인접하여 있다. "인접한" 프로브는 표적 의존성 방식으로 변형된 말단(들)의 보정에 의해 생겨난다. 효소적 연결은 두 이웃한 프로브를 공유적으로 부착시키는 바람직한 방법이므로, "연결"이란 용어를 본 출원 전반에 걸쳐 사용한다. 그러나, "연결"은 일반적인 용어이며, 두개의 프로브를 공유 부착시키는 어떤 방법을 포함하는 것으로 이해할 필요가 있다. 효소적 연결에 대한 다른 방법으로서 EP-A-324 616에 기술된 바와 같은 광-연결이다.

바람직한 효소적 연결단계를 가능하게 해주는 조건 및 시약들은 당해분야의 기술자에게 일반적으로 공지되어 있으며 배경중에 언급된 참고문헌 중에 기술되어 있다. 본 발명에 유용한 연결 시약에는 EP-320 308에 나타낸 바와 같은 이. 콜라이 리가제, T4 리가제 및 써무스 써모필루스(Thermus thermophilus) 리가제(예:ATCC 27634) 같은 원핵성 리가제를 포함한다. 이중 후자의 리가제가 LCR의 열적 순환중 활성도를 유지시킬 수 있는 능력 때문에 바람직하다. 열에 대해 안정한 리가제가 없을 경우, 리가제는 사이클이 반복될 때마다 매번 가해주어야만 한다. 또한 바람직한 것은 진핵성 리가제로서 라빈 등이 보고한 드로소필라의 DNA 리가제가 있다[참조 : Rabin, et al., J. Biol. Chem. 261 : 10637-10647(1986)].

일단 연결되면, 융합된 프로브는 표적으로부터 분리(디시 말해서 용융됨)되고, 통상적인 LCR과 같이, 이 과정은 수회 주기로 반복된다. 현재 약 15 내지 약 70회가 바람직하나, 반복주기의 수는 1회 내지 100회일 수 있다.

프로브가 이의 상보적(2차) 프로브와 하이브리드화 할 때, 의도된 연결점으로부터 떨어진 말단이, 다른 원하지 않는 연결반응에 가담하도록 유리상태로 되지 않게 디자인하는 것이 바람직하다. 그러므로, 연결성 정착성 또는 평활 말단이 배제되어야 한다. 만일 이런 말단이 사용되어야만 하는 경우,

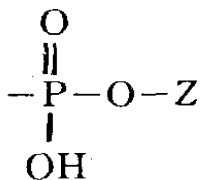
유리 5' 말단의 포스페이트는 회피되거나 제거되어야 한다. 이는 말단 포스페이트를 제거하기 위해 (예 : DNA의 제한 분해를 통해 형성된 올리고뉴클레오타이드로부터) 올리고뉴클레오타이드 프로브의 합성(이는 보통 5' 말단 포스페이트 그룹을 함유하지 않음) 또는 포스파타제효소의 이용을 통해 수행할 수 있다. 또 달리, 프로브의 "잘못된" 외측 말단의 연결은 프로브의 적어도 한쪽 말단을, 다음에 상세하게 기술할 "후크" 또는 마커 잔기로 차단하여 방지할 수 있다.

증폭에 이어, 증폭된 서열은 당해분야에 공지된 여러가지 통상적인 방법에 의해 검출할 수 있다. 특히 바람직한 방법에서, 후크가 적어도 두개의 프로브의 이용가능한 외부 말단(융합된 생성물의 반대쪽 말단) 및 바람직하게는 모두 4개의 프로브의 외측 말단에 부착한다. "후크"는 특이적 리간드-수용제친화성을 갖는 모든 잔기를 나타낸다. 전형적으로 융합된 생성물의 한쪽 말단(다시말해서 A의 5' 말단, A'의 3' 말단)에 있는 후크(들)는, 고체상에 피복된 시약(항체 또는 아비딘)에 의해 고정화될 수 있는 항원 또는 합텐(hapten)을 포함한다. 다른 말단(다시말해서, B의 3' 말단 및 5' 말단)에 있는 후크(들)는, 항체-효소 접합체와 같은 표지 또는 표지 시스템에 의해 인지될 수 있는 상이한 항원 또는 합텐을 함유한다. 후크의 예로는 당해분야에 공지된 많은 것중 바이오틴, 플루오레신 및 디곡신이 있다. 그후 효소에 의해 검출가능한 생성물로 전환되는 기질을 가한다. 엔조(Enzo)의 EP-A-330 221은 한쪽 말단에 바이오틴 분자가 부착된 올리고뉴클레오타이드를 기술하고 있다.

A. 돌출 변형된 말단

언급한 바와 같이, 첫번째 양태는, 차단 잔기 또는 추가의 염기가 의도된 연결점을 지나 적어도 하나의 프로브에 가해진 변형된 말단과 관련된다. 차단 잔기 또는 추가의 염기들은 "돌출부분(overhang)"을 포함하여 평활-말단 연결이 가능하지 못한데 대한 원인이 된다. 첫번째 변이에서, 돌출부분은 화학적 차단제R을 포함한다.

표준 DNA 리가제반응은 연결점에서 기질 본쇄가 3' 하이드록실 및 5' 포스페이트를 제공하는 것을 필요로 한다는 것은 널리 공지된 것이다. 다수의 변형, 특히 3' 하이드록실 그룹에서의 변형은, 변형된 말단이 리가제반응에 참여할 수 없도록 하지만 변형된 본쇄가 이본쇄 구조의 일부일 경우 제거할 수 있는 R 그룹을 도입하는 것으로 공지되어 있으며, 이런 변형은 수소원자 대신에 3'-하이드록실 산소에 부착되는 다음의 예로 든 R 그룹을 포함할 수 있다 :



상기식에서, Z는 -H ; $-(\text{CH}_2)_n\text{CHO}$ (여기에서 n은 1 내지 약 3, 바람직하게 1 또는 2이다), -데옥시리보오스 및 -디데옥시리보오스로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

R 그룹으로 적당하게 변형된 말단을 갖는 프로브의 합성이 본 분야에 잘 공지되어 있다. 예를 들어, 3' 포스페이트 그룹을 함유하는 올리고뉴클레오타이드의 화학적 합성이 문헌에 기술되어 있다[참조:Markiewicz and Wyrzykiewicz, Nucl. Acids Res. 17:7149-7158(1989)]. 몇몇 샘플에 존재할 수 있는 비-특이적 포스파타제에게 3' 포스페이트를 은폐하는 잇점을 가질 수 있는 보다 큰 차단 그룹은 말단 트랜스퍼라제 및 dUTP 또는 ddUTP를 사용하여 올리고뉴클레오타이드 프로브를 만들고 이어서 우라실 글리코실라제로 처리함에 의해 편리하게 제조된다. 우라실 글리코실라제의 정제는 문헌으로부터 습득한다[참조:Lindahl, et al., J.B.C. 252:3286-3924(1977)]. dUTP 첨가의 경우에서, 우라실 글리코실라제처리에 이은 강한 염기의 처리가 글리코알데하이드 유도체를 제조하기 위해 작용될 수 있다. 상기에 주어진 R 그룹의 실례는 단지 예시적인 것에 불과하며, 통상의 전문가가 동등하게 잘 작용할 수 있는 많은 변이체를 합성할 수 있다고 이해된다.

효소 엔도뉴클레아제 IV[참조:Siwek, et al., Nucl. Acids Res. 16:5031-5038(1988)]는, 차단 그룹을 함유하는 본쇄가 상보적 본쇄에 하이브리드화 하는 경우 및 실질적으로 하이브리드화 하는 경우에만 그러한 차단 그룹을 제거하여 3' 하이드록실 그룹을 노출시킨다. AA' 또는 BB' 이본체에 대한 엔도뉴클레아제 IV의 활성 때문에 변형된 말단의 표적 독립적 교정이 드물게 일어날지라도 필요한 경우, 하나 이상의 뉴클레오타이드에 의해 리세스되도록, 변형된 말단을 갖는 것과 상보성 프로브를 고안함에 의해 추가로 최소화 될 수 있다.

돌출부분 말단의 또다른 변이에서, 돌출부분은 프로브가 표적에 일단 하이브리드화 되면 절단될 수 있는 추가의 핵산 염기들로 구성된다. 돌출부분은 벌키하기 때문에 의도된 연결점에서 연결을 방지하고 리가제반응에 반드시 참여하는 그룹(들)을 입체화학적으로 차단하거나 차폐시킨다(차단된 말단에 대해 기술한 바와 같이). 이것과 상기의 단순한 화학적 차단을 구별하는 것은 "차단 그룹"(즉, 돌출부분)의 성질 및 크기이다. 이것은 본래 프로브 분자와 동일 직선의 핵산 잔기로 구성된다. 그러나, 그룹의 크기가 너무 커서 표적에 하이브리드화 되는 경우 분자의 변형된 말단이 연결점의 근처에 남아 있을 수 없다. 더우기, 돌출부분은 제거될 것이므로, 리가제촉매화된 반응(예 : 5'포스페이트 그룹을 결여시킴에 의해)에 전혀 참여할 수 없도록 고안될 수 있다.

선별이 단지 실례를 의미하는 것임에도 불구하고, 돌출부분의 3부류가 기술되어 있다. 본 분야의 전문가는 돌출부분을 유사하게 제거할 수 있는 다른 효소가 완전히 유사한 방법에서 사용될 수 있음을 인지할 것이다. 예의 경우는 하기를 포함한다.

1. 필수적으로 리보뉴클레오타이드로 구성되는 돌출부분(표적이 DNA로 구성되는 경우);
2. 비염기(abasic)성 부위를 함유하는 돌출부분, 및;
3. 표적에 있는 염기와 부정합된 염기쌍을 초래하는 염기를 함유하는 돌출부분.

일반적으로, 그러나 돌출부분은 표적에 상보적으로서, 그것의 제거는 하기와 같이 주형 의존적일 수 있다. 돌출부분은 길이에서 1 내지 10개의 염기, 바람직하게는 1 내지 5개의 염기일 수 있다.

1. 리보뉴클레오타이드 변형.

리보뉴클레오타이드를 함유하는 DNA 올리고뉴클레오타이드의 합성이 문헌에 기술되어 있다[참조: Atabekov, et al., FEBS Let 232:96-98(1988)]. 리보뉴클레오타이드 잔기 연장부로 이루어진 변형된 말단을 갖는 DNA 프로브가 본 발명에서 사용될 수 있다. 리보뉴클레오타이드는 리가제에 대한 적당한 기질로 제공될 수 없으며 변형된 프로브는 연결되거나 증폭되지 않는다. 원칙적으로 이들 연장부는 선별된 프로브의 5' 또는 3' 말단에서 존재할 수 있다.

"교정"은 리보뉴클레오타이드의 제거에 의해 이루어진다. 일반적으로 리보뉴클레아제라고 불리는 효소가 천연적으로 널리 분포하는 것으로 공지되어 있다. 하나의 그러한 리보뉴클레아제는 시그마 케미칼즈(Cat # R 6501)로부터 구입할 수 있다. 이러한 효소들은, 이들이 존재하는 핵산 분쇄기 DNA의 분쇄에 하이브리드화 되는 경우와 실질적인 경우에만 핵산 분쇄로부터 리보뉴클레오타이드를 선별적으로 제거한다. 특정 리보뉴클레아제(RNase)가 분쇄로부터 모든 리보뉴클레오타이드를 제거하는지 또는 하나의 리보뉴클레오타이드를 제외한 모든 리보뉴클레오타이드를 제거하는지에 관한 어떤 논쟁이 있음에도 불구하고, 적어도 몇몇 리가제(예: T4 리가제)가 리보뉴클레오타이드를 데옥시리보뉴클레오타이드에 연결시킬 수 있다는 것이 공지되어 있으므로, 일반적으로 우리의 관심을 끌지 못한다. 어떤 특수한 RNase H에 있어서, 이것이 0 또는 하나의 리보뉴클레오타이드 잔기를 남기는지에 대한 여부를 LCR의 의도로 결정하는 것은 충분히 단순하다. 사람들은 효소가 모든 리보뉴클레오타이드 또는 하나의 리보뉴클레오타이드를 제외한 모든 리보뉴클레오타이드를 제거한다는 것에 근거하여 고안된, 2개의 리보변형된 LCR 프로브 세트를 단지 만들고 각 경우에서 LCR 반응의 성능을 결정한다. 일단 달성되지만 하면, 효소 행동은 주어진대로 이후에 획득될 수 있다. 실제적으로, 다른 RNase H 종은 3' 또는 5' 변형을 교정하는 점에서 다소 간편할 수 있다. 이것은 어떤 주어진 RNase H 종을 위해 실험적으로 용이하게 결정된다.

이러한 리보뉴클레오타이드 변형된 프로브가 LCR 반응에서 사용된다. 2개의 프로브 파트너가 표적상의 인접 영역으로 하이브리드화 하는 경우, 이들은 RNase H가 "교정"-즉, 변형된 프로브로부터 리보뉴클레오타이드를 제거하지 않는한 그리고 제거할 때까지 리가제에 의해 연결될 수 없다. 리보뉴클레오타이드가 프로브의 5' 말단에 있는 경우, 내부 포스페이트 그룹은 리가제반응에서 기질로서 작용하도록 노출된다. 이것은 이러한 5' 포스페이트를 첨가하기 위해 프로브의 제조시 특별한 단계의 필요성을 제거하게 한다.

연결 동안, 융합된 프로브들은 표준 LCR에서와 같이 새로운 표적으로서 작용한다.

2. 비염기 부위 절단.

다양한 널리 분포하는 효소들(예: 엔도뉴클레아제 IV; Siwek, et al., supra)은 실질적으로 DNA의 본체가 상보체와 하이브리드화된 이본체 형태로 존재하는 경우에만 비염기 부위에 위치에서 DNA의 일본체를 절단한다. 비염기 부위가 있는 올리고뉴클레오타이드의 합성은 본 분야에 기술되어 있다[참조: Take shita, et al., J.B.C. 262 : 10171-10179(1987)]. 변형된 올리고뉴클레오타이드 프로브는 비염기 부위를, 5' 말단을 공여하도록 의도된 프로브상의 연결점에 대해 5'를 즉시 위치하거나 3' 말단을 공여하도록 의도된 프로브상의 연결점에 대해 3'로 즉시 위치하도록 합성될 수 있다. 각 경우에서, 상보성 프로브는 함께 하이브리드화 되는 경우, 2개의 프로브가 사용되는 효소에 의해 비염기 부위에서 표적 독립성 절단을 허용하지 않도록 고안되어야만 한다. 프로브 세트는 프로브가 진정한 표적에 하이브리드화되는 경우를 제외하고는 비염기 부위의 바로 근처에서 이본체 구조가 일어나지 않도록 2개의 연결 지점의 짧은 오프셋을 갖도록 고안될 수 있다. 이런 식으로, 교정은 표적 의도적이다.

표적에 하이브리드화 하는 경우, 비염기 부위에서의 절단은 리가제에 의해 인접한 프로브로 연결될 수 있는(그것의 위치 및 화학적 성질에 의해) 말단을 노출할 것이다. 연결 동안, 융합된 분자는 표준 LCR에서처럼, 새로운 표적으로 작용한다.

3. 부정합 수선.

아마도 모든 "변형된" 올리고뉴클레오타이드중 가장 용이한 것은 하이브리드화된 상태의 외측에 어떤 이상한 특징도 함유하지 않는 것들이다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 표준 시판 시약들을 사용하여 표준 합성기술에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 그러나 표적에 하이브리드화 되는 경우, 이러한 프로브의 독특한 변형은 부정합 염기쌍이 이본체로 존재함을 증명한다. 이러한 부정합 염기쌍을 교정하거나 수선할 수 있는 공지된 많은 생물학적 시스템이 있다. 원칙적으로 어떤 시스템이 LCR 프로브 세트에서 변형을 보정하는데 적용될 수 있음에도 불구하고, 우리는 일반적 접근의 예로서 더 한층 깊이있게 한가지 시스템에 대해 논의할 것이다.

A 대 G의 부정합을 특이적으로 인지할 수 있는 효소(또는 효소 복합체)가 문헌에 보고되어 있다[참조: Karin, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8877-8881(1989)]. 이러한 "A/D 부정합"에서, 효소는 쇠에서 A와 다른 잔기 사이에 있는 A를 함유하는 본체를 절단한다. 그리하여, 프로브는 돌출부분이 A 잔기에 의해 프로브의 나머지로 분리되도록 고안될 수 있고, A 잔기는 프로브가 진정한 표적과 하이브리드화 되는 경우 상대편의 G 잔기가 떨어지는 위치에서 발생된다. 진정한 표적에 하이브리드화 하는 동안, 부정합 A 잔기를 포함하고, 위치 및 화학적 성질에 의해 인접하게 위치한 또다른 프로브로 리가제에 의해 연결될 수 있는 말단을 노출시키고 있는 돌출부분이 프로브의 나머지 부분으로부터 절단된다. 연결 동안, 결과로 생성된 융합된 분자는 LCR의 후속의 라운드에서 표적으로서 작용할 수 있다.

추가로 특징으로서, 이러한 도식은 대립성을 나타낼 수 있는 특이적 염기 위치의 동일성을 결정하는데 사용될 수 있다. 특이적 AG 부정합 예에서, 예를 들어, 이러한 변화의 약 5/6가 직접적으로 검정

될 수 있다. 특이적 위치의 초기의 동일성은 A,T,G 또는 C임에 틀림없다. 만약 G라면, 돌연변이체는 G 이외의 것이고; 유사하게 C라면, 그것의 상보체의 G이고 돌연변이체의 상보체는 G가 아니다. 만약 A 또는 T라면, 이러한 돌연변이체의 2/3는 G 또는 C이다. 그리하여 단일 염기 돌연변이체 대립형질의 1/2은 특이적 G의 손실로 초래되고 나머지의 2/3는 특이적 G 잔기의 출현을 초래한다. 각 경우에, LCR 프로브 세트의 멤버중 하나에 통계학적으로 위치하는 A 잔기는 융합된 프로브 분자의 출현 속도에 강하게 영향을 줄 수 있다. G 잔기의 손실의 경우에, A 함유 프로브의 절단되지 못하여 LCR 반응의 진행이 심하게 손상될 것이다. 새로운 G가 출현하는 경우에, A 함유 프로브의 절단이 가능해지고 LCR 반응의 속도가 크게 향상된다. 본 분야의 숙련가는 다른 특이성을 갖는 기타의 부정합 수선 시스템이 기술된 AG 부정합 수선 시스템과 유사한 방법으로 특이적 위치에서 다른 단일 염기 변화를 동정하는데 용이하게 적용될 수 있다는 것을 쉽게 인지할 것이다.

B. 리세스에 의해 변형된 말단

두번째 양태에서, 변형된 말단은 하나 이상의 프로브로부터 짧은 서열의 염기들을 제거함에 의해 만들어져서, 표적(또는 표적 상보체, 또는 이로부터 생성된 폴리뉴클레오타이드)에 양 프로브가 하이브리드화 되는 경우, 한 프로브의 5' 말단과 다른 프로브의 3' 말단 사이에 리세스 또는 갭을 남기게 된다. LCR로 표적을 증폭시키기 위해서, 프로브들 사이의 갭은 충전되어야만 한다(즉, 변형은 "교정"되어야만 한다). 첫번째 입장에서, 이것을 폴리머라제 또는 역전사효소 및 갭 맞은편의 표적 본쇄에 상보적인 과량의 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트를 사용하여 수행될 수 있다. 다른 방법으로, 이것은 표적에 상보적인 제5프로브 및 제5프로브에 상보적인 제6프로브를 공급함에 의해 수행될 수 있다. 이러한 대안적 입장이 별도로 하기에 기재되어 있다.

그러나, 이러한 양태를 자세히 논의하기 전에, 세트 용어에 관한 짧은 여담이 도움을 줄 수 있을 것이다. 세트 A(예:S)는 세트 S내에 포함된 모든 원소들로 구성된다. 그 다음에 "S가 아닌" 세트는 S에서 발견되지 않는 "전체"의 남은 모든 원소들로 구성된다. 본원의 의도를 위한 "전체"는 상기에 기재된 바와 같이, 4개의 염기 G,C,A 및 T 또는 G,C,A 및 U로 구성된다. 세트 S 및 다른 세트(예: R)의 교구간은 S 및 R 모두에서 발견되는 원소들로만 구성된다. 그리하여, 본원에서 사용된 것처럼, "N이 아니고 M이 아닌" 세트는 갭 Xn 또는 갭 Ym중 어느 것에도 존재하지 않는 염기로 구성된다. 본 발명에 따라, "N도 아니고 M도 아닌" 세트는 공 세트일 수 없다; 즉 적어도 하나의 염기가 "정지 염기"를 암호화하기 위해 이 세트에 남게 되어야만 한다.

1. 연장에 의한 갭(Gap) 충전

이 첫번째 설명과 관련하여, 본 발명은 (a) 프로브를 표적에 하이브리드화(및, 이본쇄로서 표적 상보체가 존재하는 경우는 표적 상보체와 하이브리드화)하고; (b) Xn으로 지칭된 하나 이상의 갭 부위를 충전시키기 위한 하나 이상의 프로브를 연장시키며; (c) 연장된 프로브를 인접한 프로브에 연결시켜 융합되거나 연결된 생성물을 수득하고; (d) 표적으로부터 융합된 생성물을 분리하고 하이브리드화, 연장 및 연결 단계를 반복하여 목적하는 표적서열을 증폭시키는 반복단계를 포함한다.

이러한 양상에서, "변형된 말단"을 제공하는 "갭" Xn은 폴리머라제 또는 역전사효소를 사용하여 하나 이상의 프로브를 연장시킴으로서 "교정"된다. 일반적으로, DNA 표적에 하이브리드화된 프로브의 연장은 DNA 폴리머라제 또는 당해 분야에 공지된 클레노우 단편에 의해 이룬다. RNA 표적의 경우, 연장은 역전사효소로서 달성한다. 대표적인 역전사 효소는 당해 분야에서 시판중인 조류의 골수아구종증 바이러스(avian myeloblastosis virus; AMV) 및 몰로니 쥐과의 백혈병 바이러스(Moloney murine leukemia virus; M-MuLV)로부터 유래된 것을 포함한다. 물론, Taq 폴리머라제와 같은 연장 시약을 사용하는 것이 바람직하며, 이것은 열에 안정하므로 LCR시 요구되는 고온에서의 잘 견딘다. 연장 시약이 열에 안정하지 않으면 통상적으로 LCR 주기때마다 연장 시약을 다시 가해야 한다.

이러한 방식으로 연장에 의한 교정은 갭 영역(들)에서 표적의 염기에 상보적인 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트(dNTP)를 반응 혼합물중에 존재시켜야 함을 필요로 한다. 더욱 특이하게는, 서열 Xn을 가지는 갭에 있어서, 채워되어야 하는 dNTP는 dx'TP로 지정되어야 한다(여기에서 X'는 갭 Xn에서 각 염기의 상보체를 나타낸다). dNTP는 Pharmacia(Piscataway, NJ) 및 Bethesda Research Laboratories(Gaithersburg, MD)를 포함하여 많은 판매원에서 시판된다.

연장은 연결점에서 정확히 종결됨으로써 연장된 프로브가 인접한 프로브와 접촉하여 이에 연결될 수 있어야 한다. 이 목적을 위해 "정지 염기"를 사용한다(참조:제3도 및 제4도). Q'로 지정된 "정지 염기"는 이의 상보체, Q의 관점에서 정의되며, 반응 혼합물로부터 Q에 상보적인 dNTP를 제거함으로써, 즉 반응 혼합물로부터 dQ'TP를 제거함으로써 수득한다. 따라서 갭 서열을 위한 염기들을 4개의 염기들중 단지 세개의 염기로 구성된 세트, 즉 N으로부터 어떻게 선택되는가를 알 수 있으므로, 네개의 dNTP중 상보적인 3개를 반응 혼합물에 가할 수 있다. 네번째의 dNTP, dQTP가 반응 혼합물에 부재시 연장은 목적하는 연결점에서 종결된다. Q'는 인접한 프로브 서열에서 첫번째 염기이고, 정지 염기를 암호화하고 있는 표적상의 염기는 갭(제3도에서 이의 5' 말단상)에 인접한 첫번째 염기이다. 정지 염기 Q' 자체(상보체 Q는 아님)는 Xn갭의 3' 말단 근처에 위치해야 한다. 왜냐하면 Q' 정지 염기는 프로브 B'의 목적하지 않은 3' 말단 연장을 방지하기 위해서 존재해야 하기 때문이다(제3도).

본 개념은 이의 보다 단순한 특징 경우에 파악되기가 용이하므로, 단일 갭 방법을 먼저 기술한다. 하지만 단일 갭 변이는 단순히 후술할 이중 갭 변이의 특정한 경우임을 이해해야 한다. 제3도는 프로브중 하나(B로 표기된)만이 이의 5' 말단에 갭을 가지기 때문에 단일 갭으로서 언급된 양태를 나타낸다. 제1프로브, A는 표적 본쇄 T의 첫번째 단편에 하이브리드화 된다. 제2프로브 B는 첫번째 단편의 5' 말단과 두번째 단편의 3'말단 사이에 하나 이상의 염기 갭을 남겨놓으면서 표적 본쇄의 두번째 단편에 하이브리드화 한다. 이 갭을 Xn으로 명명한다. 제3프로브 A'는 제1프로브 A에 하이브리드화될 수 있고 제4프로브 B'는 제2프로브 B에 하이브리드화될 수 있다. 제3도에 도시된 바와같이, 표적 본쇄 T는 이본쇄로서 표적 상보체 T'를 갖는다. 이 경우, 프로브 A' 및 B'는 표적 상보체의 첫번째 및 두번째 단편에 하이브리드화 함으로써 초기 하이브리드화에 개입하게 된다.

폴리머라제 또는 전사 효소에 의한 연장은 5'에서 3' 방향으로 진행된다. 결과적으로, A 및 B' 모두

의 3' 말단은 연장을 저해하는 어떠한 것도 부재하는 한 폴리머라제에 의해 연장되어질 수 있다. 만일 프로브 A'가 표적 상보체 상에서 하이브리드화된다면 이것은 입체적으로 B'의 연장을 저해하게 된다. 하지만, 만일 A'가 표적 상보체에서 하이브리드화 되지 않는다면, B'의 연장에 요구되어지는 다음 염기(Q')가 반응 혼합물에 없는 경우에 연장은 또한 종결될 것이다. 반대로, 표적 본쇄를 따라 프로브 B 또는 종결 염기 상보체(Q)가 직면하게 될 때까지 프로브 A는 연장할 것이다. A'는 A의 연장을 위한 주형으로서 작용하지 않기 때문에, 프로브 A는 표적에 하이브리드화 될때만 연장한다.

상기 단연한 바와 같이, 갭의 말단(즉 연결점)에서 A의 연장을 종결시켜 연장된 프로브가 인접 프로브 B의 5' 말단에 연결되어지도록 함이 중요하다. 따라서, 반응 혼합물에는 갭 X_n의 5' 말단에 바로 인접한 염기에 상보적인 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트가 없게 된다. 따라서, X_n은 어떠한 길이의 염기수가 될 수 있고, 즉 n은 1 이상의 어떠한 정수도 될 수 있다. 염기 X상에서의 유일한 제한은 이들이 4개 염기중 1 내지 3개로 구성된 세트 N중에서 선별되어야 하는 점이다. 하나 이상의 염기가 종결 염기 Q'를 암호화하기 위해 보유되어야 한다. X_n 서열중 3개 이하의 염기가 사용될 때, 잔존 염기중 어떠한 것도 종결 염기로서 작용할 수 있음을 이해해야 한다. 따라서, Q는 세트 N중 함유된 어떠한 요소보다 적은 4개 염기로 구성된 "N 아닌" 세트 중에서 선별된다.

이러한 양태에서 연결점은 항상 프로브 A' 및 B의 5' 말단임이 분명하다. 또한 이들이 정지 염기 Q'의 위치라는 것이 단순한 우연이 아니다.

보다 상세한 실시예가 본 명세서의 말미에 제시되었으나, 하기에서는 일반적 실시예를 기술할 것이다. 제3도에서 갭 X_n은 서열 GA를 나타낸다고 가정하면, 염기는 4개 염기중 둘씩으로 이루어진 한 세트의 N(N={G,A}) 중에서 선택된다. 프로브를 연장시키는 동안 가해야 하는 dNTP는 dCTP 및 dTTP이다. 이 실시예에서 정지 염기 Q'는 G 또는 A일 수 있으며, 이의 상보체 Q는 C 또는 T이어야 한다. 따라서, Q가 "N이 아닌" 세트 중에서 선택되는 요구조건을 충족시키는 방법을 알 수 있다.

적합한 폴리머라제의 존재하에서, 프로브 A는 표적 본쇄를 주형으로 사용하여 3' 말단에 C 및 T를 가하여 연장시킨다. 그러나, 폴리머라제가 주형의 Q 위치에서 C 또는 T와 직면하는 경우, G 또는 A 이 dNTP로서 반응 혼합물에 공급되지 않으므로 프로브 A를 더이상 연장시킬 수 없다. 연장은 프로브 B의 5' 말단에 인접한 프로브 A의 연장된 3' 말단과의 연결점에서 정확히 종료된다.

다음, 리가제를 사용하여 프로브 B의 5' 포스페이트 말단에 연장된 프로브 A의 3' 하이드록실 말단을 연결시켜, 융합되거나 연결된 1차 프로브와 표적 본쇄의 이본쇄 복합체를 형성한다. 표적이 이본쇄이고 상보체 T'를 갖는 경우, 프로브 A' 및 B'가 표적 상보체 하이브리드화 되는 한 리가제는 또한 처음 주기에서 이들을 연결시킨다. 프로브 A' 및 B'가 표적 상보체보다 과량의 프로브 A 및 B에 하이브리드화 되는 경우, 말단은 평활하거나 정착성이 없고 연결을 위한 기질이 없으므로 연결이 억제된다.

이어서, 이본쇄 복합체는 분리되어, 새로운 프로브 A,A',B 및 B'가 제1주기로부터 표적, 표적 상보체, 및 융합된 폴리뉴클레오타이드 모두에 하이브리드화된다. 이전과 같이 연장되고 연결되며, 그 과정이 반복될 수 있다.

X_n,Q 및 Q'에 대한 염기의 조합의 예가 표 1에 나타나 있다. 이는 많은 가능한 조합을 설명하기 위한 것으로서, 본 발명을 이러한 특수한 조합으로 제한되지 않음을 이해해야 한다. 표 1은 또한 Q가 N이 아닌 세트에 나타나는 염기 중에서 선택되어야 하는 필요조건을 나타낸다. 이는 정지 염기 Q'가 이의 상보체로서 X_n 서열에서는 나타나지 않는 염기를 가져야 한다는 것을 의미한다.

[표 1]

단일 갭 변이에서 예시적 갭 서열, 필요한 dNTP 및 Q 및 Q'에 대한 가능한 조합

X _n /N	XTPs	N이 아님*	정지 염기 Q
A	T	T, C, G	A, C, G
GT	C, A	C, A	G, T
GC	G, C	A, T	A, T
AA	T	T, G, C	A, C, G
GCA	C, G, T	T	A
GCAG	C, G, T	T	A
AAATT	T, A	G, C	C, G
GCAGCA	C, G, T	T	A
GA CT	모두	정지 염기가 없으므로 존재하지 않음	

* N이 아닌 세트는 정지 염기 Q'에 대한 가능한 상보체를 제공한다. 실제의 가능한 정지 염기(Q')는 다음 컬럼에 나타나 있다.

상술한 바와 같이, 단일 갭 변이는 m이 0인 보다 일반적인 이중 갭 변이의 특수한 경우이다. 이중 갭 변이 또한 4개의 프로브(A,A',B 및 B')를 사용한다. 이러한 변이에서는, 이전의 변이에서와 같이, 프로브 B'가 이의 5' 말단에서 단축되어 1차 프로브 A 및 B가 하이브리드화되는 표적의 제1 및 제2단편 사이에 X_n 염기의 갭을 형성한다. 갭 X_n의 염기는 단일 갭 변이에서와 같이 제한된다.

또한, 제3프로브 A'도 표적 상보체 및 제1프로브 A 모두에 대해 이의 5' 말단에서 단축되어(제4도 참조) 2차(제3 및 제4) 프로브 사이에 Ym 염기의 제2갭을 형성한다. 갭 Ym은 다양한 염기 길이를 가질 수 있으며, Xn과 같은 길이일 필요가 없다(즉 m은 n과 동일하지 않을 수 있다). 실제로, m은 0일 수 있으며, 이 경우 이중 갭 변이는 단일 갭의 특수한 경우로 리세스된다.

본 발명의 바람직한 경우에서, 제4프로브 B'는 표적에서 Xn 서열 갭과 동일한, Xn의 3' 말단 서열을 함유한다. 프로브 사이에 갭이 형성되어야 하므로 이러한 배열이 본 발명에 필수적이지는 않다. 따라서, 제2프로브 B에 대해 3' 리세스된 말단이 없는 한, 제4프로브 B'의 3' 말단은 서열 Xn의 3' 말단의 단편을 정지시킬 수 있다. 5'에서 3' 방향으로 연장이 이루어지고 dx'TP는 반드시 공급되어야 하므로, 제1프로브 A가 Xn 갭을 통해 연장되는 것과 같이, 프로브 B'는 갭(Xn 및 Ym 둘다)을 통해 연장된다.

이중 갭 양태를 이용하는 본 발명의 방법은 단일 갭 양태를 이용하는 방법과 매우 유사하다. 하이브리드화, 연장, 및 연결 단계는 본질적으로 동일하다. 연장을 촉진시키는 조건하에서, A 및 B' 프로브는 모두 이의 3' 말단으로부터 연장되어 각각 갭(Xn 및 Ym)을 충전한다. 정지 염기 Q'는 연결점에서 두 프로브 모두의 연장을 종결시키고, 프로브는 이의 바로 인접한 연관된 프로브에 연결된다.

그러나, Ym 서열을 포함할 수 있는 염기 잔기에는 몇몇 제한이 있다. 하나 이상의 정지 염기 Q'는 유지되어야 하므로, 각각 X 및 Y에 대한 가능한 염기를 나타내는 조합된 세트 N과 M은 4개의 염기중 3개 이하를 함유해야 한다. 따라서, 하나 이상의 염기가 N도 아니고 M도 아닌 세트에 잔류하는 한, Y는 4개의 염기중 0 내지 3개의 염기일 수 있다. 세트 N이 4개의 염기중 3개 이하로 구성되는 경우, 하나 이상의 염기가 잔류하는 한 Y는 N에 존재하지 않는 염기일 수 있으며, 이의 상보체는 프로브 연장을 종결시키기 위한 정지 염기 Q'로서 사용될 수 있다. 단일 정지 염기는 Xn 및 Ym 갭 모두에서 연장을 종결시키는데 사용될 수 있다.

m이 n과 같은 경우, 서열 Ym에 대한 두번째 제한이 있게 된다. 갭이 동일한 길이인 경우, 서열 Ym은 서열 Xn에 대해 상보적이어서는 안되거나, 프로브 A 및 B'의 3' 말단은 정착 말단을 구성한다. 정착 말단은 표적 독립적인 이분쇄 복합체가 형성되게 하는데 이때 연결 및 증폭이 진행되도록 프로브 A가 프로브 B'에 하이브리드화 된다. 오히려, m이 n과 동일한 경우, Ym이 Xn과 상보적이지 않은 것이 바람직하다.

달리말하면, 프로브 A 및 B'의 말단은 동일한 길이일 수는 있으나 상보적이지는 않은 미끄러운(slippery) 말단이어야 한다.

그럼에도 불구하고, 표적 독립적 연결 및 증폭이 예를 들어 정착 말단(또는 가능성이 약하게는 미끄러운 말단)으로 일어나더라도, 이들 융합 생성물은 증폭된 표적과 구별된다. m이 n과 동일한 경우, A : A'의 이분쇄 복합체가 표적-독립적으로 B : B'의 이분쇄 복합체에 연결하는 적지만 제한된 기회가 있다. 이들 복합체가 목적하는 표적 서열보다 m(또는 n) 염기만큼 짧을 수 있고, 길이에 근거하여 구별될 수 있다. 또한, 말단이 미끄러운 경우, 염기의 부정합은 염기의 부정합을 검출 및/또는 파괴할 수 있는 많은 시약에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 염기의 부정합은 문헌[참조:Cotton, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:4397-4401(1988)]에 기술된 하이드록실아민-오소름 테트라옥사이드 기술로 화학적으로 측정할 수 있으며, S1 뉴클레아제 및 녹두 뉴클레아제와 같은 제제로 효소적으로 측정할 수 있다.

X' 및 Y'의 몇몇 예시적 조합, 이의 dNTP 상대물 및 Q 및 Q'에 대한 가능한 조합을 표 II에 나타내었다.

[표 2]

이중 갭 변이에서 예시적 갭 서열, 필요한 dNTPs 및 Q 및 Q'에 대한 가능한 조합

Xn/N	Ym/M	X'TPs	Y'TPs	N도 아니고 M도 아님*	정지 염기 Q'
A	A	T	T	T, C, G	A, C, G
G	T	C	A	C, A	G, T
AT	AT	T, A	T, A	C, G	C, G
AC	GA	T, G	CT	T	A
ATG	AAA	T, A, C	T	C	G
GGCC	AAACG	C, G	T, G, C	T	A
ATTGA	AGGT	T, A, C	T, C, A	C	G
CGC	GCG	상호체 허용되지 않음			

* N도 아니고 M도 아닌 세트는 정지 염기 Q'에 대한 가능한 상보체(Q)를 제공한다. 실제의 가능한 정지염기(Q')는 다음 컬럼에 나타나 있다.

갭 Xn 및 Ym의 길이는 0(단지 Ym의 경우), 1 또는 10이상의 정수일 수 있다. 예를 들어, 1 내지 20염기의 갭이 가능하다. 그러나, 실제적으로는 보다 짧은 길이의 갭이 바람직하다(예 : 1 내지 3 또는 5개의 염기). 단지 단일 염기의 갭이 가장 바람직하다. 단일 염기의 갭이 실지 시그널대 배경의 비를 크게 증가시키고 정지 염기 및 dx'TP에 대한 다수의 선택을 가능하게 한다는 것이 밝혀졌다. 프로브는 선택적정지 염기보다는 존재하는 표적 주위에서 실제로 디자인되므로, 단일 염기 갭이 대부

분의 경우에서 보다 유용하다.

추가 특성

리세스된 태양의 변형에서 갭을 충전하는데 사용되는 데옥시큐클레오타이드 트리포스페이트는 마커 잔기를 함유하도록 변형될 수 있다. 마커의 예는 직접적 라벨(예: 방사성 동위 원소), 또는 후크, 예를 들어 바이오틴, 디곡신 또는 고체상 또는 라벨 생성 시스템에 의해 인지될 수 있는 다른 합텐)를 포함한다. 동위 원소 라벨은 32P 및 중수소를 포함한다.

dNTP에 마커의 혼입은 일반적으로 통상의 유기 화합분야이다. 링커 또는 스페이서를 사용할 수 있으나 필수적인 것은 아니다. 변형된 dNTP는 표적 본쇄상의 이의 상보체의 반대편 갭에 혼입되고 인접한 염기에 공유적으로 연결될 수 있다는 것만이 중요하다.

또한, 염기가 두번째 본쇄의 2개의 위치중 어느 하나에서 다르다면, 어떠한 양태도 사용하여 단일 염기 Z가 다른 제2(또는 비표적) 서열로부터 제1(또는 표적) 서열을 구별할 수 있다. 이 두 경우 모두에서, 단지 하나의 염기(구성상, 길이가 아닌)만을 갖는 갭을 사용하여 단일 염기 차이를 구별한다.

먼저, 비표적인 갭 영역에서 나타나는 상이한 염기 Z는 반응 혼합물로부터 dZTP를 빼냄으로서 구별될 수 있다. 따라서, Z는 또한 N도 아니고 M도 아닌 세트에도 속한다고 말할 수 있다. 적합한 뉴클레오타이드 트리포스페이트가 공급되지 않으므로, 상이한 본쇄는 폴리머라제에 의해 연장되지 않을 것이다. 단일 갭이 단지 하나의 염기 길이인 경우, 상이한 염기 Z를 구별하는 능력이 최대로 발휘되고 긴 N이 아니고 M이 아닌 가능한 세트가 잔류된다.

두번째로, 상이한 염기 Z가 Q의 위치에 존재하는 경우, 연장이 적절히 종료되지 않기 때문에 본쇄를 구별할 수 있고 생성된 연장된 생성물은 길이가 너무 길므로 표적 본쇄를 따라 이의 연관된 프로브에 연결되지 못한다. 이러한 변이에서, 정지염기에 대해 단지 하나의 가능성만이 있는 경우, 구별 능력이 최대로 발휘되고, 모든 다른 것들은 생성물이 더욱 길다.

이와 유사하게, 이중 갭 양태는 하나 또는 다른 하나의 갭에서 단일 염기 차이를 갖는 서열을 구별하는데 유용하다. 또한 이는 정지 염기 또는 Q' 위치에서 상이한 염기를 갖는 서열을 구별하는데도 사용될 수 있다.

2. 추가의 프로브에 의한 갭 충전

리세스된 양태의 이와 같은 측면에 따라 본 발명은, (a) 변형된 프로브를 표적과 하이브리드화하고 (이본쇄인 경우 표적 상보체가 존재하므로 표적 상보체와 하이브리드화시키며), (b) 제5 및 제6갭-충진 프로브를 제공하여 1차 및 2차 프로브간의 갭을 충전시키며, (c) 갭-충진 프로브의 양쪽 말단을 인접한 프로브와 연결시켜 융합 또는 연결 생성물을 형성시키며, (d) 표적으로부터 융합 생성물을 분리시키고, 하이브리드화, 갭-충진 및 연결 단계를 반복하여 목적하는 표적 서열을 증폭시키는 반복단계를 포함한다. 당해 양태에서 4종류의 프로브, A, A', B 및 B' 대신에 프로브 D, D', E 및 E'를 사용한다(제5도 참조). 제5 및 제6 갭-충진 프로브 F 및 F'를 폴리머라제 및 dNTP 대신 사용하여 다른 프로브 간의 리세스 또는 갭을 충전시킨다.

당해 양태에서는 3쌍의 프로브가 사용된다. 제1 및 2프로브 D 및 D'는 각각 제3 및 4프로브 E 및 E'와 마찬가지로 상호간에 하이브리드화될 것이다(당해 양태에서의 프로브의 명명은 선행의 양태에서 사용된 명명과 상이하다; 즉, 여기에서 제2프로브는 이의 파트너가 아니라 제1프로브의 상보체이다. 즉, 제1 및 제3프로브가 1차 프로브가 된다). 1차 프로브 D 및 E를 표적 본쇄와 하이브리드화시킬 경우, D의 3' 하이드록실 말단과 E의 5' 포스페이트 말단간에는 적어도 하나의 염기, 바람직하게는 수개의 염기 갭이 존재한다. 이와 마찬가지로, 프로브 D' 및 E'가 표적 상보체 T'와 하이브리드화되는 경우에도, 비록 갭이 정렬되지 않더라도 이들 사이에도 하나 내지 수개의 염기 갭이 존재한다. 즉, 프로브 D 및 E, 및 프로브 D' 및 E'는 (이의 상보체와 이본체와 되는 경우) 평할 말단화되지 않을 뿐만 아니라 서로 인접되지도 않도록 변형된다. 이러한 관점에서 갭은, 두개의 1차 프로브 및 두개의 2차 프로브 사이에 표적 및 표적 상보체와(및 상호간에) 각 하이브리드화하여 갭을 충전시키는 제5 및 6프로브 F 및 F'를 제공함으로써 교정된다.

제5도에서 알 수 있는 바와 같이, 갭-충진 프로브중 하나는 양쪽 말단에서 다른 갭-충진 프로브보다 좀더 짧다. 다시 말해서, 두개의 2차 프로브 D' 및 E'는 각각의 1차 프로브 모두를 지나 연장되어 있거나, 이와는 달리, 두개의 1차 프로브가 이들의 각 2차 프로브를 지나 연장되어 있다. 이와는 달리, 실시예 13에서 설명하는 바와 같이, 하나의 1차 프로브(D)를 지나 연장되어 있을 수 있고 반면에 다른 1차 (E)는 이의 상보체(E') 보다 짧은 곳에서 멈출 수 있다. 그러나, 이러한 다른 구조에서 변형된 말단이 잘못된 프로브에 대해 정착성이 아니어야 함이 중요하다. 예를 들면, D' 이상으로 연장되어 있는 D의 3' 말단은 F 이상으로 연장되어 있는 F'의 3' 말단과만 상보적이어야 한다. F' 이상으로 연장되어 있는 F의 3' 말단 또는 E 이상으로 연장되어 있는 E'의 3' 말단과는 상보적이지 않아야 한다. 이러한 주의 사항이 지켜지지 않을 경우, 프로브 이본체는 진정한 표적의 부재하에서 높은 백그라운드 시그널을 생성하도록 재조직화될 수 있다.

본 양태에 따른 프로브는 선행 양태에 대한 프로브에서와 같은 동일한 방법으로 제조할 수 있다. 전형적으로, 프로브는 선행 양태에서와 같이 필적할 만한 길이가 될 것이다. 최종적으로, 상기 양태에 유용한 반응 조건은 당해 양태에서 연장 및 폴리머라제가 불필요한 것을 제외하고는 당해 양태에도 유용하다.

일단 1차 프로브 및 2차 프로브간의 갭이 갭-충진 프로브로 충전되면, 갭-충진 프로브는 양쪽 말단에서 각각의 2차 프로브 또는 1차 프로브와 연결되어 연속상의 폴리뉴클레오타이드 본쇄를 형성한다. 1차 프로브 및 제1갭-충진 프로브 F가 표적 본쇄에 상보적인 1차 폴리뉴클레오타이드 본쇄를 형성하는 반면에 2차 프로브와 제2갭-충진 프로브 F'은 표적 상보 본쇄와 상보적인 2차 폴리뉴클레오타이드 본쇄를 형성한다. 물론, 1차 폴리뉴클레오타이드 및 2차 폴리뉴클레오타이드는 또한

서로 상보적이다. 결론적으로, 하이브리드화 및 연결 과정의 주기를 반복함으로써 통상적인 LCR에서와 같이 표적 서열의 증폭이 이루어진다. 그러나, 이와 달리, 평활 말단 연결로부터 발생하는 가양성 시그널은 이본쇄 복합체 D 및 D'가 이본쇄 복합체 E 및 E'과 평활 말단 연결될 수 없으므로 당해 양태에 의하여 현저히 감소된다. 이러한 현상은 두 2차 프로브로부터 또는 이와는 달리 두 1차 프로브로부터 제거된 하나 이상의 염기에 기인하는 것이다.

물론, 목적하는 폴리뉴클레오타이드 뿐만 아니라 다른 생성물도 생성될 것임을 주지해야 한다. 예를 들면, D : F 및 D' : F' 또는 F : E 및 F' : E'를 포함하는 좀더 짧은 단편(이량체)이 형성될 것이 라는 것이 예상된다. 아울러, 이들 부산물 또는 불완전 산물이 바람직한 시약을 이용하는 경향이 있음을 이해해야 한다. 그러나, 과량의 시약을 가하고 불완전 산물로부터 목적하는 폴리뉴클레오타이드를 깨끗하게 분리해냄으로써 현재로서는 바람직하게는 않더라도 당해 양태가 유용하다.

이러한 측면에 따라 연결된 프로브의 분리 및 검출과정은 당해 분야의 공지된 어떠한 방법으로도 달성할 수 있다. 바람직한 검출 방법은 1차 또는 2차 프로브에 부착된 마커를 사용하는 것이다. 바람직하게는, 고체상에 의해 포획될 수 있는 후크를 프로브 D의 5' 말단에 부착시키는 한편 라벨 또는 라벨을 포획할 수 있는 후크는 프로브 E'의 5' 말단에 부착한다. 이어서, 목적하는 폴리뉴클레오타이드 본쇄는 제1후크를 고체상으로 포획하고 용액으로부터 고체상을 분리한 다음 고체상과 연결된 라벨을 검출해냄으로써 탐지할 수 있다. 반응도중에 형성된 불안전 산물은 고체상 포획 또는 라벨 검출, 또는 둘다 수행할 수 없을 것이다. 즉, 분리 및 검출시, 표적물의 부재하에서는 평활 말단 연결 반응으로 포획 후크를 라벨 후크와 연결시킬 수 없으므로 시그널이 경미하게 생성되거나 전혀 생성되지 않는다.

II. PCR

PCR의 원리는 문헌[참조 : 미합중국 특허 제4,683,195호 및 제4,683,202호]중 자세히 기술되어 있다; 추가의 세부 사항은 본원중 필요하지 않다. 기본적으로, 프라이머는 표적에 하이브리드화하고 폴리머라제는 빌딩 블록으로서 뉴클레오타이드 트리포스페이트를 사용하여 프라이머를 연장시키거나 신장시킨다. 연장 생성물(및 이의 상보체)은 하이브리드화를 위한 추가의 주형으로서 작용한다. 일반적으로, 연장 반응이 발생하기 위해, 프라이머의 3' 말단은 표적에 완전히 상보적이어야 한다. 열 안정성 폴리머라제를 포함하여 많은 폴리머라제가 공지되어 있다.

본 발명에 따라, PCR 프라이머의 3' 말단은 변형되어 프라이머는 폴리머라제효소에 의해 더 이상 연장될 수 없게 된다. 이러한 변형은 주형 의존적 방식으로 제거될 수 있는 경우, 또다른 제한(stringency)이 폴리머라제효소에 의해 프라이머 연장을 위한 하이브리드화 필요성에 첨가될 수 있다. 특히 1차 및 2차 프라이머 모두가 변형된 말단을 가질때 이와같이 가해진 제한은 PCR중의 의사 시그널 생성을 효과적으로 저하시킨다.

LCR에 유용한 차단 그룹의 선택 및 교정 방법에 관한 많은 동일한 일반 방법이 또한 PCR에 사용될 수 있다. LCR에서는 변형이 의사 연결을 차단해야 하지만, PCR에서 변형은 의사 연장(신장)을 차단해야 한다. 따라서, 변형되거나 차단된 3' 말단은 표적 서열과 하이브리드화될 때 폴리머라제에 의한 연장을 지지해서는 안된다. 상기 LCR 변형된 말단의 양태에 관한 기술을 적용하기 위해, 용어 연결점 또는 연결 의도점은 신장 개시점으로 대체되어야 한다.

A. 돌출 변형된 말단

상기 돌출 말단은 LCR 상태하에서 상보성 프로브와의 관계에서 언급되었다. PCR의 경우, 용어 돌출 말단은 비견될 만한 의미를 갖지 않는다. PCR에서, 이들 변형된 말단은 보다 적절히 주형 의존성 차단 그룹으로서 기술된다. 그럼에도 불구하고, LCR로부터의 돌출 말단 변형 및 교정이 PCR에도 일반적으로 적용될 수 있다.

화학적 차단 변형에 있어서, LCR에 유용한 R 그룹에 대한 모든 가능한 Z 잔기(가능한한-데옥시리보스 제외) 또한 PCR에 사용될 수 있다. 추가로, 엔도뉴클레아제Ⅳ를 사용하는 동일한 교정 메카니즘 또한 PCR에 사용될 수 있다.

LCR에서의 돌출 부분 변형(의도된 지점을 지나 추가의 핵산으로 구성)은 상기에 제시되어 있다. 이들은

1. 실질적인 리보뉴클레오타이드 돌출부분,
2. 비염기 부위 돌출부분, 및
3. 부정합 염기로 인한 돌출 부분.

이러한 변형이 PCR에서는 비바람직하지만, 교정될(절단될) 돌출 부분이 연장 효소(즉, 폴리머라제)의 기질로서 자체적으로 불활성이 부여된다면, 변형된 말단의 돌출부분 각각은 PCR중에 동일 방식으로 사용될 수 있다. 만일 돌출 부분이 불활성화 되지 않는다면, 절단되어질 때 계속적인 비바람직한 연장의 프라이머로서 작용할 수 있다. 돌출부분을 불활성화시키는 전형적인 방법은 3' 말단이 연장 효소에 의해 인지되기에 부적합하도록 하는 것이다. 일반적으로 프라이머와 관련해 상기 언급된 변형은 또한 돌출 부분의 3' 말단을 불활성화시킬 것이다. 하지만, 프라이머에 대한 변형되는 달리, 돌출부분 3' 말단의 변형은 프라이머 변형을 교정하는데 사용된 동일한 메카니즘에 의해 교정되어서는 안된다. 그렇지 않다면 두개가 동시에 교정되어야 할 것이다. 용이하게 교정되지 않는 적합한 변형은, 3' 말단으로부터 프라이머 연장을 비교적 영구히 방지할 것으로 공지되거나 발견된 말단 디데옥시뉴클레오타이드, 코르데세핀 또는 이외의 다른 화학적 변형을 포함한다.

LCR인 경우, 이들 변형은 주형 의존적 방식으로 교정된다. 교정 방법 및 시약은 LCR인 경우와 동일하다.

B. 리세스에 의해 변형된 말단

리세스된 말단 변형이 PCR에서의 의사 시그널 발생을 저하시키는지의 여부 및 그 기작은 현재까지 공지되지 않았다.

변형법을 선별한 후, 변형 말단을 갖는 적합한 프라이머를 제조한다. 표적 DNA로의 프라이머의 하이브리드화를 위한 조건은 표준 PCR에서와 동일하며 이는 문헌중 기술되어 있다. 표적 의존적 방식으로 변형 말단을 교정하기 위한 효소 또는 기타 제제를 포함하는 점 이외에는, 연장, 변형 및 재하이브리드화의 연속적 주기는 표준 PCR에서와 동일하다.

[실시예]

본 발명은 실시예를 통해 좀더 기술될 것이다. 실시예는 본 발명의 예시로서 어떤 식으로도 이를 제한하고자 함이 아니다. 달리 명시하지 않는 한, 실시예중의 프로브 및 표적 서열은 좌향 5' 말단으로 기술한다.

[실시예1]

하기 이본체 표적 DNA 서열은 단순화를 위해 일본체로서만 나타내고 있다. 서열중 -은 CLR 프로브의 연결 의도점을 나타낸다.

3'...TTAAGCTCGAGCCATGGG-CCCCTAGGAGATCTCAGCTGGACGT...-5'

하기 프로브 세트는 저하된 백그라운드 수준으로 LCR에 의한 상기 표적 서열을 검출하도록 고안되었다.

A 5'-AATTCGAGCTCGGTACCC_p

A' 3'-GCTCGAGCCATGGG

B 5'-GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCA

B' 3'-pCCCCTAGGAGATCTCAGCTG

프로브 세트는 3' 말단 포스페이트 차단 그룹(밑줄)을 함유하는 두개의 프로브(A B')으로 특징지어진다.

LCR 반응은 다양한 양의 표적(pUC19)을 사용하여 수행된다(EP-A-제320 308호에 기술된 바와 같다). 각각의 주기의 하이브리드화 단계 이후, 이·콜라이로부터 정제된 엔도뉴클레아제Ⅳ를 반응물로 가한다. 이·콜라이 엔도뉴클레아제Ⅳ가 다소 열안정성을 갖기 때문에 이것은 표준 LCR 상태에서 수행될 수 있다. 대조용으로서, LCR은 엔도뉴클레아제Ⅳ를 첨가하지 않은 동일 수의 표적 분자를 사용하여 수행된다. 이러한 대조에는 3' 말단 뉴클레오타이드(3' 포스페이트를 함유)가 프로브 A 및 B'에 포함되지 않는점 이외에는 상기의 것과 유사한 프로브 세트가 사용된다.

실험 및 대조 반응 모두에 있어, 연결된 생성물의 출현율은 가해지 표적 분자의 초기 수와 상호 관련된다. 두 프로토콜을 구분짓는 것은, 두번째인 경우 표적 분자를 함유하지 않는 "블랭크" 튜브는 1000개 표적 분자를 함유하는 튜브에서와 동일한 속도로 시그널을 발생시키는 반면, 변형된 프로브 및 엔도뉴클레아제Ⅳ가 사용되는 경우, 표적 분자를 함유하지 않는 "블랭크" 튜브는 1000개 표적 분자를 함유하는 튜브에서 보다 매우 서서히 시그널을 발생시킨다. 백그라운드의 억제는 검정의 민감성의 유용한 범위를 증가시키는데 있어 이점을 제공한다.

당해 분야의 전문가가 고도의 열 안정성 리가제 및 폴리머라제가 각각 LCR 및 PCR에 유용한 바와 동일한 이유로 고도의 열안정성 엔도뉴클레아제Ⅳ를 사용하는 바람직성을 즉시 이해할 것이다. 당해 분야의 전문가는 또한 공지되거나 비공지된 다른 효소로서, 미리 차단된 5' 포스페이트 또는 3' 하이드록실을 완전히 잔류시키면서 주형 의존적 방식으로 DNA 본체의 5' 또는 3' 말단에서의 변형을 제거할 수 있는 효소가 상술한 엔도뉴클레아제Ⅳ와 완전히 동일한 방식으로 사용될 수 있음을 즉시 이해할 것이다.

[실시예2]

하기 프로브 세트가 감소된 백그라운드로 실시예 1의 표적 DNA 검출에 사용될 수 있다.

A 5'-AATTCGAGCTCGGTACC

A' 3'-GCTCGAGCCATGGGrCrCCC

B 5'-TACrCrCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCA

B' 3'-CCCCTAGGAGATCTCAGCTG

프로브 A' 및 B는 키메릭 리보/데옥시리보뉴클레오타이드 연장부(보울드 활자, 밑줄)를 함유한다. 리보뉴클레오타이드 염기는 소문자 "r"로 선행한다. LCR 반응은 엔도뉴클레아제Ⅳ에 대해 리보뉴클레아제H로 치환하여 실시예 1에서와 같이 수행된다. 대조용으로서 동일한 대조 프로브 세트가 실시예 1에서와 같이 사용될 수 있다.

결과 및 이의 해석은 실시예 1에서와 동일하다.

[실시예3]

하기 프로브 세트 또한 저하된 백그라운드로 실시예 1의 표적 DNA 검출에 사용될 수 있다.

A 5'—AATTCGAGCTCGGTACCCJG

A' 3'—GCTCGAGCCATGGG

B 5'—GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCA

B' 3'—GJCCCCTAGGAGATCTCAGCTG

프로브 A 및 B'는 비염기 부위("J") 이후 표준 뉴클레오타이드로 특징지워지는 연장부위(밀줄, 보올드 활자)를 함유한다. LCR 반응을 실시예 1에서와 같이 수행한다. 결과 및 이의 해석은 실시예 1에서와 동일하다.

[실시예4]

하기 프로브 세트도 저하된 백그라운드로 실시예 1의 표적 DNA 검출에 사용될 수 있다.

A 5'—AATTCGAGCTCGGTACCC

A' 3'—GCTCGAGCCATGGGAC

B 5'—CAGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCA

B' 3'—CCCCTAGGAGATCTCAGCTG

프로브 A 및 B'는 이뉴클레오타이드 연장부(밀줄, 보올드형 활자)를 함유하는데 이것은 주형 DNA에 하이브리드화 될때 첫번째 뉴클레오타이드 A/G 부정합 및 하이브리드화될 수 있는 제2뉴클레오타이드로 특징지워진다. LCR 반응은 엔도뉴클레아제 IV에 대해 A/G 부정합 수선 효소(복합체)로 치환시켜 실시예 1에서와 같이 수행된다. 결과 및 이의 해석은 실시예 1에서와 동일하다.

[실시예5]

만수체형 3 페닐케토우리아(PKU)는 하나의 덴마크인 연구 그룹에서 총 PKU 대립형질의 약 38%의 비율을 차지한다. 이것은 페닐알라닌 하이드록실라제(PAH)를 암호화하는 유전자 서열중 인트론 12의 5' 스플라이스 공여체 부위에서 단일 염기 돌연변이(G>A)에 의해 야기된다.

실시예 4중 약술된 바와 같이 백그라운드 감소에 부정합 수선의 방법론은 또한 이러한 특성을 보유하고 짐작되는 개체로부터 혈액 또는 다른 체액 샘플중 이러한 유전적 결함의 유무를 측정하는 민감한 검정법으로서 기여한다.

하기 명시된 말단 부위를 갖는 프로브는 PAH 유전자의 인트론 12로부터 하기 표적 DNA에 상보적으로 제조된다.

3'—...TTTAATGAATGACAATTACCT...5' 정상 PAH DNA

3'—...TTTAATGAATAACAATTACCT...5' RKU DNA

A 5—.....AAATTACTTA

A' 3—.....TTTAATGAATAAC

B 5—CTGTTAATGGA.....

B' 3—GACAATTACCT.....

프로브는 B 및 B' 상에 단일 뉴클레오타이드 연장부를 가하여 표준 LCR을 고려하여(즉, 15-30량체) 제조된다. 이들 연장부는(표적 DNA에 대해) 첫번째 부정합 뉴클레오타이드 다음으로 두개의 하이브리드화될 수 있는 뉴클레오타이드로 구성된다.

사람 DNA는 PKU의 존재에 대한 시험 대상의 혈액으로부터 정제된다. 평균≤10kb 크기로 DNA를 절단함이 바람직하다. 각 주기의 하이브리드화 단계후 샘플을 AG 부정합 수선계 효소(들)을 가하고 상기

프로브로 LCR 반응시킨다(실시에 4참조). 만일 샘플이 야생형 대립 형질을 함유하지 않는다면, LCR 반응 생성물의 출현은 비변형 프로브를 사용하는 표준 CLR 반응에 비해 크게 지연될 것이다. 한편, 만일 야생형 대립 형질이 존재한다면 LCR 반응으로부터 융합된 프로브가 신속하게 출현하게 될 것이다.

[실시에6]

단일 겹 LCR 연장 반응은 80주기로 수행되는데, 각 주기는 코이 열순환기(Coy thermocycler:Key Scientific)를 사용해 85°C에서 30초간 및 50°C에서 20초간 배양하게된다. 주기수는 평균 말단 연결 배경을 최대화하도록 선별된다. 반응은 0 또는 10⁶ 개 표적 DNA 분자로 개시된다. 표적 DNA는 pGEM 벡터로 클론된 ScrF1 분해된 HPV16 게놈 DNA이다. 각각의 반응은 또한 10ng 사람 태반 배경 DNA를 함유한다. 두 반응은 표준 평할 말단 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 수행되고 두개는 단일 겹 올리고뉴클레오타이드 세트를 사용하여 수행된다. 표준 평할 말단 LCR 반응은 50mM EPPS pH 7.8, 100mM KCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 10mM NH₄Cl, 100uM NAD, 10ug/ml BSA, 올리고뉴클레오타이드 A 및 B' 각각 5×10¹¹ 분자(표 6a), 올리고뉴클레오타이드 B 및 A" 각각 7.5×10¹¹ 분자(표 6a) 및 1X 써무스 써모필루스(Thermus thermophilus) DNA 리가제를 함유하는 완충액 중에서 수행한다. 겹 LCR 반응은 올리고뉴클레오타이드 A" 대신 A' 및 25mM 2'-데옥시아데노신 5'-트리포스페이트 및 1.25단위의 Taq DNA 폴리머라제가 가해지는 점 이외에는 동일한 완충액 중에서 수행된다. 올리고뉴클레오타이드는 HPV 16게놈상의 지도 5695-5744지점에 특이적이다. 모든 경우, 반응물 용적은 50ul이고 반응물은 사이클링 이전 광유 25ul로 씌어진다.

[표 6a]

올리고뉴클레오타이드

```

A      FL-  AAGTTGTAAGCACGGATGAATATGT
A'     CATATTCATCCGTGCTTACAAC
A"    ACATATTCATCCGTGCTTACAAC
B      TGCACGCACAAACATATATTATCA-BIO
B'     BIO- ATGATAATATATGTTTGTGCGTGCA
C      FL-  ATTTATACATTAAAGGCTCTGGGTC
C'     ACCCAGAGCCTTTAATGTATAAA-FL
D      ACTGCAAATTTAGCCAGTTCAA-BIO
D'     BIO- TTTGAACTGGCTAAATTTGCAGTA
    
```

증폭후, 반응물을 멸균 증류수로 1:1 희석시키고, 이중 라벨된 LCR 증폭 생성물을 애보트(Abbott) 1Mx 시스템의 원형(prototype) 상에서 샌드위치 면적 검정을 통해 검출하여 하기 결과를 수득한다.

분자수	속도(c/s/s)
0 표준 LCR	911.3
10 ⁶ 표준 LCR	925.9
0 변형된 LCR	62.0
10 ⁶ 표준 LCR	985.4

[실시에7]

이중 겹 LCR 연장 반응을 코이(COY) 열 순환기(Key Scientific)를 사용하여 35주기 동안 수행한다. 배양 시간은 상기한 바와 같다. 반응을 0, 10³ 또는 10⁶ 표적 분자로 개시한다. 표적 DNA는 pGEM 벡터로 클론된 ScrF1 분해된 HPV 16 게놈 DNA이다. 각각의 반응물은 또한 사람 태반 배경 DNA 10ng을

함유한다. 반응 조건은, 각각의 반응물이 각각의 올리고뉴클레오타이드 C 및 D' 5×10^{11} 분자(참조 : 상기 표 6a), 각각의 올리고뉴클레오타이드 D 및 C' 7.5×10^{11} 및 25mM 각각의 2'-데옥시티미딘 5'-트리포스페이트 및 2'-데옥시구아노신 5'-트리포스페이트를 함유하는 점 외에는 상기 실시예 6에 개술한 단일 갭 연장 실험에서와 동일하다. 올리고뉴클레오타이드는 HPV 16 게놈상에서 지도상 6457-6505 지점에 특이적이다.

증폭후, 반응 생성물을 멸균 증류수로 1:1 희석시키고, 이중 라벨링된 LCR 증폭생성물을 애보트 1Mx 시스템의 원형상에서 수행한 샌드위치 면적 검정을 통해 검출하여 하기 결과를 수득한다.

분자수	속도(c/s/s)
0	15.44
10^3	42.47
10^6	1375.19

[실시예8]

염기 1개 이상의 갭(Gap)을 LCR 연장에 사용할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드 TATTGCATCGGTGCTTACAACCT(본원에서 올리고 E로 기술)를 실시예 6에서 기술된 HPV 서열의 증폭에 사용되는 LCR 세트(A,A',B 및 B')중 표 6a의 HPV 16 특이적 올리고뉴클레오타이드 A'를 교체할 수 있다. 적절한 일본쇄 HPV 16 표적 서열에 하이브리드화 시켰을 때, 올리고뉴클레오타이드 B 및 E는 3개 뉴클레오타이드 갭에 의해 분리된다. 증폭 반응 조건은 3개의 뉴클레오타이드 갭을 완전히 충전시키는 데 dATP외에 2'-데옥시티미딘 5'-트리포스페이트가 필요하다는 것외에는 기술한 것과 동일하다. 상이한 크기의 갭을 또한 단일 또는 이중의 갭 포맷(Gap format) 모두에서 동일한 방법으로 실험할 수 있다.

[실시예9]

낭포성 섬유증 유전자의 돌연변이체 대립 형질 약 70%가 엑손 10에서 한개의 트리뉴클레오타이드 결실을 나타낸다(참조 : Riordan, J.R. et al Science 245 : 1066 1989 ; Kerem, B. et al Science 245 : 1073 1989). 표 9a에서 나열한 올리고뉴클레오타이드를 CF 유전자의 정상(올리고뉴클레오타이드 A, A', B 및 B') 및 돌연변이체(올리고뉴클레오타이드 C, C', B 및 B') 대립 형질 모두의 단일 갭 LCR 증폭을 위해 사용할 수 있다.

[표 9a]

A	FI-CACCATTAAAGAAAATATCATCTT
A'	AAGATGATATTTTCTTTAATGGTGC-FI
B	GGTGTTTCCTATGATGAATATAGA-BIO
B'	BIO-CTATATTCATCATAGGAAACACCA
C	FL-TGGCACCATTAAAGAAAATATCAT
C'	ATGATATTTTCTTTAATGGTGCCAG-FL

LCR 올리고뉴클레오타이드 A, A', B 및 B'를 사람 태반 DNA로부터 낭포성 섬유증 유전자의 야생형 서열의 증폭에 사용한다. 반응은 표적/백그라운드 DNA를 가하지 않거나 사람의 태반 DNA 1.5ug을 가하여 고정시킨다. 이중의 반응을, 올리고뉴클레오타이드 A 및 B' 각각 5×10^{11} 분자, 올리고뉴클레오타이드 A' 및 B 각각 7.5×10^{11} 분자, 2'-데옥시티미딘 5'-트리포스페이트 25mM, 및 Tag DNA 폴리머라아제 1.25단위를 함유하는 실시예 6에서 기술한 것과 동일한 완충 용액 중에서 30주기 동안 수행한다. 이중 라벨링된 증폭 생성물은 기술한 것과 같이 검출된다.

표적	속도(c/s/s)
표적 없음	9.3
태반 DNA	738.5

[실시예 10]

올리고뉴클레오타이드 A, A', B 및 B'(표 6a)를 17 내지 35 뉴클레오타이드로부터 길이를 변형시킬 수 있다. 초기 실험은 표 10a에 나열한 19-량체(mer) 및 30-량체 올리고뉴클레오타이드 세트에 집중된다. 올리고뉴클레오타이드 크기의 실제적인 상한 및 하한 범위는 실험적으로 측정할 수 있다. 실험 6의 방법을 단일 갭 LCR 연장을 위해 표 10a의 프로브를 사용하여 반복한다. 유사한 연구를 이중의 갭 올리고뉴클레오타이드 세트로 수행할 수 있다.

[표 10a]

10-량체 세트 :

A : F 1 - T A A G C A C G G A T G A A T A T G T

A' : C A T A T T C A T C C G T G C T T A C

B : T G C A C G C A C A A A C A T A T A T - B I O

B' : B I O - A T A T A T G T T T T G T G C G T G C A

30-량체 세트 :

A : F 1 - T A T C T A A G T T G T A A G C A C G G A T G A A T A T G T

A' : C A T A T T C A T C C G T G C T T A C A A C T T A G A T A C

B : T G C A C G C A C A A A C A T A T A T T A T C A T G C A G G - B I O

B' : B i O - C C T G C A T G A T A A T A T A T G T T T T G T G C G T G C A

[실시예 11]

단일 및 이중의 갭 LCR 연장은 평활 말단 배경이 크게 감소되므로 증가된 주기수의 사용을 가져온다. 추가적인 LCR 주기의 사용외에 배경의 감소로 LCR 기술의 민감성을 크게 증가시킬 수 있으리라 기대된다. 올리고뉴클레오타이드 A, A', A, B 및 B'(표 6a)를 민감성 향상 정도를 측정하기 위해 다양한 주기수에 대한 평활 말단 및 단일 갭 LCR을 위해 사용할 수 있다. 반응 조건은 복제양성 및 음성 반응을 20, 25, 30, 35, 40, 45 및 50주기 후 실험하는 것을 제외하고는 실시예 6에서 기술한 것과 동일하다. 경우에 따라, 유사한 실험을 훨씬 많은 주기 및/또는 실시예 7에서 기술한 이중 갭 LCR 연장 세트를 사용하여 수행할 수 있다.

[실시예 12]

단일 염기의 부정함을 구별하기 위한 단일 갭 LCR 연장능을 합성된 HPV 16 올리고뉴클레오타이드 표적 서열을 사용하여 실험한다. 증폭에 사용된 올리고뉴클레오타이드 (A, A', B 및 B')를 실시예 6의 표 6a에 나열한다. 표적 서열 A(표 12a)는 HPV 16 게놈상에 5695 내지 5744 지도 위치에 특이적인 야생형의 HPV 서열을 나타낸다. 표적 서열 B는 갭을 dATP로 충전하기 위해 주형으로 작용하는 염기 위치 25에서 티미딘이 아데닌으로 바뀌는 것을 제외하고는 서열 A와 동일하다. 따라서, 올리고뉴클레오타이드 B'(표 6a, 실시예 6)는 이러한 표적 서열로 하이브리드화시킬때 실시예 6에서 기술한 조건하에서 연장될 수 없다. 표적 서열 C는 정지 염기(표적 염기 24위치)에서 단일의 염기 G가 T로 바뀐 것을 제외하고는 서열 A와 동일 하다. 이 표적 서열로 하이브리드화되는 경우, 올리고뉴클레오타이드 B'는 염기 3개까지 연장될 것이다. 따라서, 연장은 갭 영역을 지나 발생하게 된다.

합성 표적

A AAGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCA

B AAGTTGTAAGCACGGATGAATATGATGCACGCACAAACATATATTATCA

C AAGTTGTAAGCACGGATGAATATTTTGCACGCACAAACATATATTATCA

반응을 사람 태반 배경 DNA(표적 대조 없음) 및 주어진 합성 표적 10⁶ 분자를 함유하는 태반 DNA를 사용하여 3회 실시한다. 반응 조건은 실시예 6에서 기술한 것과 동일하다. 단일 갭 LCR 연장을 50주기 동안에 수행한다. 증폭후, 반응 생성물을 멸균 증류수로 1:1로 희석시키고, 이중으로 라벨링된 LCR 반응 생성물을 애보트 IMx 시스템의 원형 상에서 수행하는 샌드위치 면역 검정을 통하여 검출하여 하기 결과를 수득한다.

표적	속도 (c/s/s)
표적 없음	15.2
표적 A	167.7
표적 B	8.2
표적 C	12.5

[실시에 13]

갭 충전 기술의 다른 실시 양태에서, dATP 및 DNA 폴리머라제의 사용을 교체시키며 추가의 프로브를 사용하여 갭을 충전시킨다. 사용된 프로브를 하기 표 13a에 나열하며 이들은 HPV 16 게놈상에 지도 위치 5670 내지 5743에 대해 특이적이다. 올리고뉴클레오타이드 명칭은 본문에 따른다.

[표 13a]

D	F I T A C C T G C C T C C T G T A C C T G T A T C T A
D'	A G A T A C A G G T A C A G G A G G C A G G T A - F I
F	A A G T T G T A A G C A C G G A T G A A T A T G
F'	A T A T T C A T C C G T G C T T A C A A C T T T
E	T T G C A C G C A C A A C A T A T A T T A T C A - B i O
E'	B i O - T G A T A A T A T A T G T T T G T G C G T C G A A C

LCR을 dNTP 및 DNA 폴리머라제를 더 이상 필요로 하지 않는다는 점을 제외하고는 실시예 6에서 기술한 것과 동일한 배양 시간 및 반응 조건을 사용하여 다양한 주기 수로 수행시킨다. 상이한 길이(예: 17 내지 35개의 뉴클레오타이드)의 올리고뉴클레오타이드 또한 사용될 수 있음을 주목하라. 모든 올리고뉴클레오타이드는 각각 5.0 내지 7.5×10^{11} 개로 반응물내에 존재한다. 증폭시킨 후, 반응 생성물을 앞서의 실시예에서 기술한 것과 같이 희석시키고 검출한다.

[실시에 14]

하기의 합성 올리고뉴클레오타이드를 제조하고 의도된 표적 DNA에 pUC18과 함께, PCR 반응의 프라이머로서 사용한다.

프라이머

pUC18(nt)*에 상보적인 서열

A 5'-AATTCGAGCTCGGTACCC

498-481

B 5'-CTGAGAATAGTGTATGC

2239-2255

추가로, 비염기 부위를 포함하는, 변형된 프라이머 Amod 및 Bmod를 제조한다. 이 프라이머를 프라이머 A 및 B 각각을 교체시키는데 사용한다. 변형된 프라이머 서열 및 pUC18 DNA에 대한 상보적 서열 부위는 하기와 같다:

프라이머

pUC18(nt)*에 상보적인 서열

A_{mod} 5'-AATTCGAGCTCGGTACCCJGGGATCCX

498-473

B_{mod} 5'-CTGAGAATAGTGTATGCJGCGX

2239-2255

* 뉴클레오타이드 넘버링 시스템(numbering system)은 DNA Star Inc, (Madison, WI)에 의해 공개된 것을 언급한다.

실험상의 올리고뉴클레오타이드는 단일의 비염기 잔기(J) 및 pUC18 표적 서열에 상보적인 추가의 뉴클레오타이드를 포함하도록 변형시킨 최초 서열(상기 A 또는 B)로 구성된다. 비염기 잔기를 함유하는 올리고뉴클레오타이드 제조방법은 문헌[Takeshita, et al., supra]에 의해 제시된다. 변형의 3' 말단[일명 "돌출 부분"]을 문헌[참조 : Berger, et al., Guide to Molecular Cloning Techniques, p. 104(1987)]에 기술된 말단 트랜스퍼라제와 같은 것으로서, 디데옥시 아데노신(X) 잔기를 포함시킴에 의해 불활성화 시킨다.

PCR을 뉴클레오타이드 혼합물 중의 ³²P-dCTP 존재에 대해, 문헌(Mullis, et al : (미합중국 특허 제 4,683,195호 및 제4,683,202호)의 방법에 따라 수행한다. 하기 기술될, 효소 엔도뉴클레아제 IV(Endo

IV)를 각 주기의 하이브리드화 단계를 수행후 반응 혼합물에 가한다.

PCR 후, 증폭 생성물을 트리클로로아세트산(TCA)를 침전시키고, 세척하여, 시그널을 측정한다. 하기 표는 다양한 반응 계획에 따라 기대되어지는 상대적 시그널 강도를 제시한 것이다.

프라이머 혼합물	표적 DNA와 함께	표적 DNA 없음
A+B	+++	++
A _{mod} +B _{mod} +Endo IV	+++	-
A _{mod} +B _{mod} +Endo IV	-	-
A+B, 폴리머라제 없음	-	-

(57) 청구의 범위

청구항 1

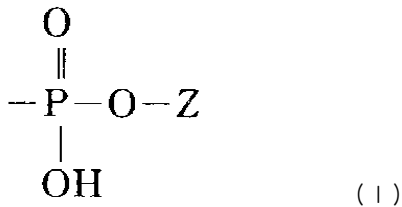
효소가, 핵산 개시제; 이 개시제가 하이브리드화되는 주형으로서의 표적 서열 또는 증폭 생성물; 및 효소적으로 집합되어 표적에 상보적인 증폭 생성물(이러한 증폭 생성물은 그 자체가 추가의 주형으로서 작용하게 된다)을 형성시킬 수 있는 하나 이상의 부가적인 뉴클레오사이드-함유 반응물을 사용하여, 표적 핵산 서열을 효소적으로 증폭시켜 증폭 생성물을 수득하는 방법에 있어서, (a) 개시제가 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하고, 개시제가 하이브리드화되는 경우, 효소가 그의 기질로서 개시제상에 실질적으로 작용할 수 없어 증폭 생성물이 집합되지 않도록 하는 방식으로 하나 이상의 개시제를 변형시켜, 표적과 하이브리드화할 수 있는 필수적인 개시제를 제공하는 단계; (b) 존재하는 경우, 개시제를 표적에 하이브리드화하여 개시제-주형 복합체를 형성시키는 단계; (c) 표적의 존재 방식으로 변형을 교정하여 개시제-주형 복합체가 효소에 의해 작용받도록 하는 단계; (d) 폴리머라제효소를 사용하여 증폭 생성물을 효소적으로 집합하는 단계; 및 (e) 표적으로부터 증폭 생성물을 분리시킨 후 하이브리드화, 교정 및 집합 단계를 반복하여 목적하는 표적 서열을 증폭시키는 단계들을 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 하나 이상의 개시제의 변형 단계(단계 a)가, 단계(d)의 효소적 집합에 요구되는 화학적 그룹을 차단하도록 상기 개시제에 차단 잔기를 부착시킴을 포함하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 차단 잔기가 하기 일반식(1)의 형태인 방법.



상기식에서, Z는 -H; -(CH₂ nCHO(여기서, n은 1 내지 3이다); 및 -디데옥시리리보스로 구성된 그룹 중에서 선택된다.

청구항 4

제2항에 있어서, 차단잔기가 핵산 돌출부분(overhang)이고 돌출부분은 연장될 수 없는 3' 말단을 포함하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 돌출부분이, a. 개시제가 데옥시리리보뉴클레오타이드를 포함하는 경우 리보뉴클레오타이드; b. 하나 이상의 비염기성(abasic) 잔기를 갖는 올리고뉴클레오타이드; 및 c. 변형된 개시제와 표적 본쇄와의 하이브리드화 동안, 염기쌍 부정합이 초래되도록 선택된 잔기를 갖는 올리고뉴클레오타이드 중에서 선택되는 방법.

청구항 6

제2항 또는 제4항에 있어서, 변형의 교정이, a. RNase H 효소; b. 실질적으로 본쇄가 상보성 본쇄에 하이브리드화되는 경우에만 비염기성 부위에서 핵산 본쇄를 절단하는 엔도뉴클레아제; c. 엔도큐클레아제 IV; 및 d. 부정합 수선 효소 중에서 선택된 제제의 사용을 포함하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 뉴클레오사이드-함유 반응물이 개별적인 뉴클레오사이드 트리포스페이트를 포함하고, 증폭 생성물이 프라이머 및 뉴클레오사이드 트리포스페이트로부터 제조된 연장 생성물을 포함하

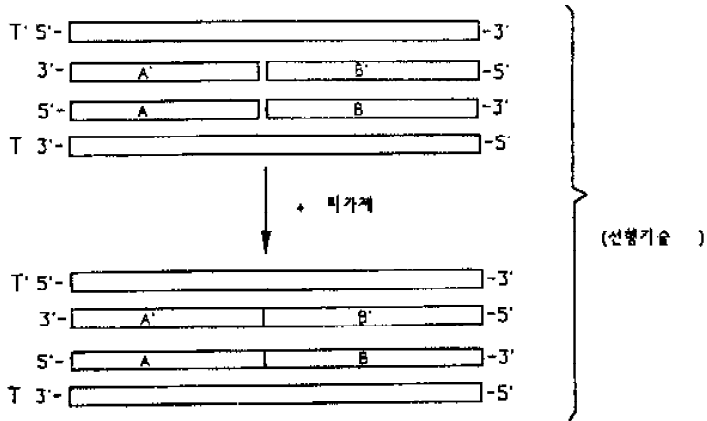
는 방법.

청구항 8

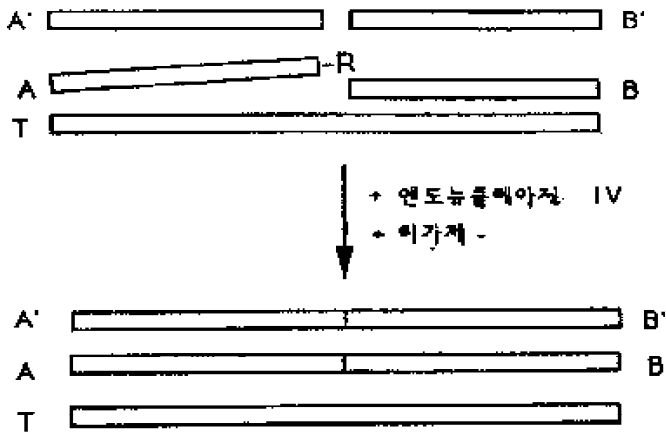
하나 이상의 프라이머가, 개시제가 하이브리드화되는 경우, 폴리머라제가 그의 기질로서 개시제상에 실질적으로 작용할 수 없도록 변형된, PCR을 개시할 수 있도록 표적과 하이브리드화될 수 있는 프라이머쌍을 포함하는 개시제; (b) 증폭 생성물을 집합하기 위한 폴리머라제효소를 포함하는 집합 시약; 및 (c) 프라이머-주형 복합체가 폴리머라제에 의해 작용받도록 표적 의존적 방식으로 변형된 프로브를 교정할 수 있는 교정 시약의 배합물을 포함하는 진단 키트.

도면

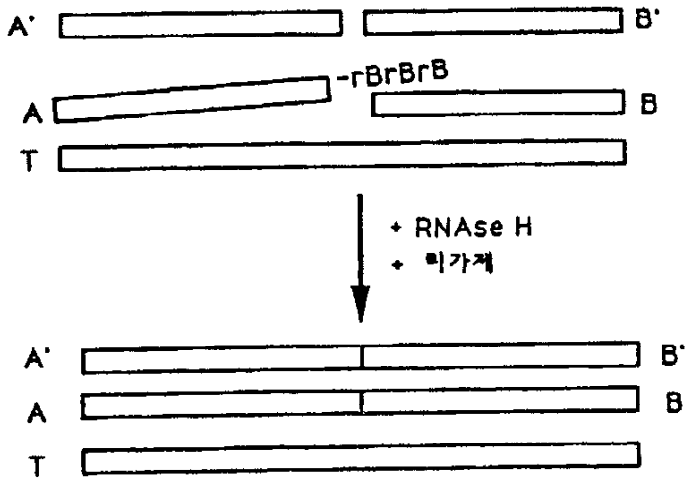
도면1



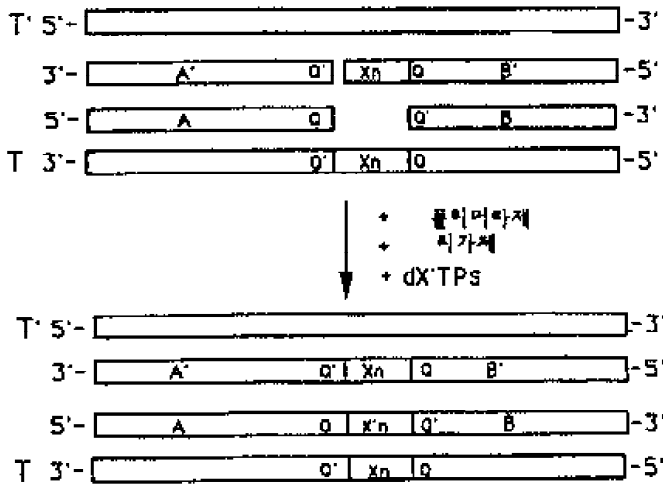
도면2A



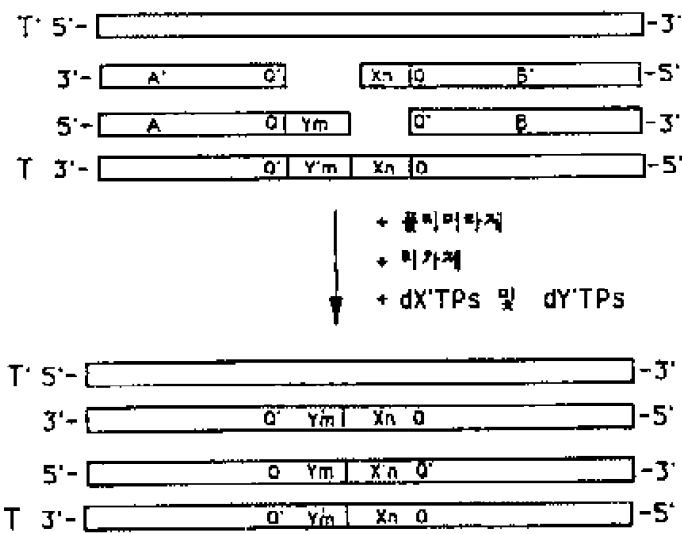
도면2B



도면3



도면4



도면5

