

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁵
G01N 33/574

(45) 공고일자 1991년06월24일
(11) 공고번호 91-004250

(21) 출원번호	특1987-0000101	(65) 공개번호	특1987-0007427
(22) 출원일자	1987년01월09일	(43) 공개일자	1987년08월19일
(30) 우선권주장	818, 127 1986년01월10일 미국(US) 934, 955 1986년11월26일 미국(US) 935, 581 1986년11월26일 미국(US)		
(71) 출원인	세투스 코포레이션 알버트 피. 할루인 미합중국 캘리포니아 94608 에머리빌 53번 스트리트 1400		
(72) 발명자	존 요셉 스닌스키 미합중국 캘리포니아 94803 엘 소브란트 던더헤드 코오트 4924 데이비드 헨리 맥크 미합중국 캘리포니아 94702 버클레이 훔킨스 스트리트 #1 1458 서레이 이 콕 미합중국 캘리포니아 94563 산 라몬 로몬드 서어클 611		
(74) 대리인	이병호		

심사관 : 이정우 (책자공보 제2341호)

(54) 증폭 및 하이브리드화로 바이러스를 검출하는 방법

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

증폭 및 하이브리드화로 바이러스를 검출하는 방법

[도면의 간단한 설명]

제 1 도는 긴 말단 반복(LTR) 비코드화 영역 및 gag·pol·env·Q(또는 sor) 및 F(또는 3'ORF) 코드화 영역으로 이루어진 완전 AIDS 제놈을 도식적으로 나타낸 것이다.

제 2 도는 함께 연결되어, 증폭된 생성물을 검출하기 위한 반점 분석에 사용될 하이브리드화 프로브에 대한 180bp DNA 단편을 형성하는 AIDS 서열의 10개의 올리고뉴클레오타이드를 도식적으로 나타낸 것이다.

제 3 도는 뉴클레오타이드 서열 변화를 함유하는 2개의 클론 M13mp10W:C7과 M13mp10W:D6을 처리하여 AIDS 바이러스와 동일한 서열을 수득하는 방법을 도식적으로 나타낸 흐름도이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 바이러스의 보존된 동정(同定)용 뉴클레오타이드 서열의 존재 또는 부재를 검출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 프라이머 및 표지된 하이브리드화 프로브를 갖는 검출용 키트(kit)에 관한 것이다.

후천성 면역 결핍증(AIDS)은 종종 치명적인 일화견(opportunistic)감염 또는 종양을 일으키는 세포 면역계의 전염성 질환이다. 또한, AIDS는 종종 중추 신경계 기능장애에 의해 악화된다. 이 질병에 대한 병인성 요인(들)은 인간의 레트로바이러스(retrovirus)로서 확인되었으며 인간의 T세포 백혈병 바이러스III(HTLV III), 임파선증 관련 바이러스(LAV 또는 LAVA) 및 AIDS-관련 바이러스(ARV-2)로 표기되었다. 더욱 최근에, 이들 바이러스를 총괄적으로 인간의 면역결핍 바이러스(HIV)로 명명하게 되었다. 여러 실험실로부터의 분리물은 여러가지 기준(즉, 형태학, 외피 및 뉴클레오텍시드 단백질의 면역학적가교-반응성, 뉴클레오타이드 서열, 및 T4 항원을 사용하여 헬퍼 T세포 내로의 이입)에 의해 동일하거나 밀접하게 관련된 바이러스로 나타났다. 인간에게서의 AIDS와 구별할 수 없는 증상을 알고있는 침팬지 및 짧은꼬리원숭이(macaque)로 부터 분리된 원숭이 바이러스 또한 이들과 동일

한 기준에 의해 밀접하게 관련되어 있다[참조:P·J·Kanki et al., Science, 230:951-954 (1985)].

AIDS관련 바이러스에 관한 더욱 흥미있는 관찰중의 하나는 아족(subfamily)인 렌티바이러스과(Lentiviridae)의 성숙 바이러스(virion)와 모양이 유사하다는 점이다. 병원성이지만 비발암성인 이러한 바이러스 그룹의 일원으로는 비스나 바이러스(visna virus) 및 말의 전염성 빈혈 바이러스(equine infectious anemia virus)가 포함된다. AIDS- 관련 바이러스와 렌티바이러스 사이의 유사점에는 바이러스 형태학, 면역학적 가교-반응성, 뉴클레오타이드 서열, 뇌 위치, 복제, 및 뚜렷한 이질성이 포함된다.

AIDS- 관련 바이러스(들)에 대한 항체를 사용하여 혈청을 동정하는 통상의 면역진단 시험[참조:갈로(Gallo)등의 미합중국 특허 제 4,520,113호]을 혈액 뱅크에서 사용하여 잠재 전염성 혈액을 제거한다. HTLV족에서 레트로바이러스를 검출하기 위한 모노클로날 항체 제조시 유용한 레트로바이러스의 폴리펩타이드에 대해서는 1986년 3월 27일자로 공고된 W0 제86/01834호(유니버시티 오브 캘리포니아)참조. AIDS-관련 바이러스와 (일반적인) 렌티바이러스 또는 (특히) 비스나 바이러스와의 유사성이 상당한 양의 바이러스성 입자를 생산하지 않고서도 DNA 복사체로서 존재할 수 있는 바이러스(들)의 능력을 확장시킬 수 있으므로, AIDS-관련 바이러스를 검출하기 위한 직접적인 면역학적 접근은 영구적으로 감염된 무증후성 개체의 중요한 분획에서 비성공적이라고 입증될 수 있다. 감염된 조직 및 혈액중의 바이러스 입자의 수는 적을 수 있으므로(바이러스 활동의 정지로 인해), 바이러스 입자 또는 RNA/DNA의 직접적인 검출은, 불가능하지 않다면, 감염된 세포와 허용 T세포 라인을 함께 배양하지 않고서는, 어려울 수 있다. 함께 배양하더라도, 바이러스 분리에 의해 지시된 바대로 HIV에 의해 감염된 개체의 수는 감염된 개체의 진정한 수의 과소평가치이다; 단지 50% AIDS 환자, 85% ARC, 및 AIDS에 걸릴 위험성이 있는 건강한 개체 30%로 부터 바이러스를 분리한다[참조:Salahuddin et al., PNAS USA, 82,5530-4(1985)].

사이키 등의 문헌[참조:Saiki et al, Science, 230, 1350-1354 (1985)]에는 표지된 RNA 또는 DNA 하이브리드화 프로브를 사용함으로써, 핵산 서열의 검출을 용이하게 하기 위해 핵산 서열을 증폭시키는 방법이 기술되어 있다. 이 방법에서 프라이머는, 뉴클레오타이드의 존재하에 추가의 상보성 본체를 합성하기 위한 주형으로서 사용되는 프라이머 연장 생성물을 수득하기 위해 사용한다. 사이키 등의 상기 문헌에는 또한 프로브를 목적으로 하는 서열로 하이브리드화시킨후, 제한 효소를 가하여 목적하는 서열내의 위치에서 하이브리드를 절단한 다음 제한 분해물을 표지된 단편에 대해 분석하는 기법이 기술되어 있다. 사이키 등의 문헌[참조:Saiki et al., Biotechnology, 3:1008-1012 (1985)]에는 상기 후자의 기법이 더욱 상세히 기술되어 있다.

랜드리 등의 보고서[참조:Landry et al., Clin. Lab. Med. (1985) 5,513-519]에는 바이러스 검출에 적용되는 것으로 핵산 하이브리드화 분야가 기술되어 있다. 1986. 3월 13일자로 공고된 W0 제 86/01535호 및 1986년 3월 5일자로 공고된 EP 제 173,529호에는 HTLV III의 분자 클로닝, 및 AIDS를 검출하기 위한 프로브로서의 클론의 사용이 기술되어 있다. 또한, 1986년 3월 5일자로 공고된 EP 특허 공보 제173,339호에는 외래 미생물에 의한 감염을 검출하기 위해 DNA 프로브를 사용하는 유전자 분석방법이 기술되어 있다. 1986년 6월 25일자로 공고된 EP 제185,444호에는 세포 용해물에서 HTLV III 바이러스를 검출하기 위한 프로브로서 사용되는 재조합 펩타이드가 기술되어 있다. 온코 인코포레이티드(Oncor Inc)사는 1986년 9월에 AIDS 바이러스를 검출하기 위한 방사성 혈액 시험방법이 개발되었다고 발표했다. 미합중국 특허 제4,591,552호에는 시료, 특히 B형 간염 시료에서 항원의 존재를 검출하기 위한 표지된 펩타이드의 용도가 기술되어 있다.

AIDS 및 다른 바이러스 등의 잠복성 바이러스를 검출하기 위해 하이브리드화프로브를 사용하여 영구 감염되었지만 음성 항체이고 양성 배양물인 바이러스 또는 개체를 생성하지 않는 개체를 동정할 수 있고, 하이브리드화프로브를 사용하여 바이러스를 배양할 필요없이 감염된 세포를 검출할 수 있다. 증폭에 의해 바이러스의 바이러스성 핵산 복제체 수를 증가시킴으로써 감염된 개체에서 바이러스성 핵산의 동정이 용이해진다.

본 발명은 하기 단계들로 이루어짐을 특징으로 하여, 바이러스에서 핵산중의 거의 보존되어 있고 이러한 바이러스에서의 핵산에 대해 특이적인 핵산 서열(이 핵산 서열은 시료에 함유되어 있는 것으로 예상된다)의 존재 또는 부재를 검출하거나 모니터링(monitoring)하는 방법을 제공한다.

(a) 시료를 하이브리드화 조건하에서, 핵산 서열의 각 본체에 대한 올리고뉴클레오타이드 프라이머, 4개의 상이한 뉴클레오사이드 트리포스페이트 및 중합체로, 함께 또는 별도로 처리하여 핵산 서열의 각 본체에 대해 각 프라이머의 연장 생성물이 각 핵산 본체에 대해 상보적으로 합성되도록 하고 [여기에서, 상기 프라이머(들)는 검출하거나 모니터링할 핵산 서열의 각 본체에 대해 거의 상보적이어서 1개의 프라이머로부터 합성된 연장 생성물이 이의 보체(complement)로 부터 분리되는 경우, 다른 프라이머의 연장 생성물을 합성하기 위한 주형으로서 제공될 수 있다]; (b) 시료를 변성 조건하에서 처리하여; (c) 단계(b)에서 생성된 일본체 각각을 주형으로서 사용하여 프라이머 연장 생성물을 합성하여, 특정의 핵산 서열 또는 서열들이 존재하는 경우 증폭되도록, 단계(b)의 생성물을 올리고뉴클레오타이드프라이머로 처리한 다음; (d) 검출하고자 하는 서열이 시료에 존재하는지 측정한다.

서열이 HIV(AIDS) 및 B형 간염 바이러스의 서열인 경우 바람직하다.

생성물을 검출하는 한가지 방법은 단계(c)의 생성물에 증폭된 핵산 서열로 하이브리드화 가능한 표지된 프로브를 가하여; 핵산 시료에서 프로브가 증폭된 서열에 대해 하이브리드화 되었는지를 측정하는 것이다. 하나의 실시형태에서, 이 측정은 (1) 하이브리드화 혼합물을 프로브중의 서열내의 위치를 인식하는 제한 효소로 분해한 다음; (2) 제한 분해물이 검출하고자 하는 바이러스 서열의 존재와 관련이 있는 제한 단편을 함유하는지를 검출함으로써 수행한다.

단계(a)전에 핵산을 환자 시료에서, 처리될 시료가 실제로 추출된 핵산 서열의 혼합물이 되도록 추출할 수 있다. 또한, 단계(a)에서 처리될 시료를 사전에, 시료중의 바이러스를 배양하는 과정을

거치도록 할 필요는 없다.

다른 실시형태에서, 본 발명은 (a) 검출하고자 하는 핵산 서열의 각 본쇄에 대한 1개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머[여기에서, 프라이머 또는 프라이머들은, 1개의 프라이머로부터 합성된 연장 생성물이 이의 보체로 부터 분리되는 경우, 다른 프라이머의 연장 생성물을 합성하기 위한 주형으로서 제공될 수 있도록 각각의 특정 핵산 서열의 각 본쇄에 대해 거의 상보적이다]; 및 (b) 핵산 서열과 하이브리드화 가능한 표지된 프로브로 이루어짐을 특징으로 하여, 바이러스에서 핵산중에 거의 보존되어 있고 이러한 바이러스에서 핵산에 대해 특이적인 핵산 서열(이 핵산 서열은 시료에 함유되어 있는 것으로 예상된다)의 존재 또는 부재를 검출하거나 모니터링하는 키트(kit)에 관한 것이다.

바람직하게는, 키트는 또한 중합화제, 4개의 상이한 뉴클레오타이드, 및 프로브와 서열과의 하이브리드를 검출하는 수단도 포함한다.

본 명세서에서의 시험 키트는 연구 시험, 임상 시험 및 다른 진단 적용에 사용될 수 있다. 또한, 이 시험 키트는 바이러스를 배양하지 않고서도 감염된 세포를 검출하는데 사용할 수 있는데, 이는 감염을 해소시킬 여러가지 치료제로 처리된 환자를 모니터링하는데 유용하다.

제 1 도는 긴 말단 반복(LTR) 비코드화 영역 및 gag·pol·env·Q(또는 sor) 및 F(또는 3'ORF)코드화 영역으로 이루어진 완전 AIDS 제놈을 도식적으로 나타낸 것이며, 하기 실시예를 위한 프라이머를 어느 영역으로 부터 선택할 지를 보여준다.

제 2 도는 함께 연결되어, 증폭된 생성물을 검출하기 위한 반점 분석에 사용될 하이브리드화 프로브에 대한 180bp DNA 단편을 형성하는 AIDS 서열의 10개의 올리고뉴클레오타이드를 도식적으로 나타낸 것이다.

제 3 도는 뉴클레오타이드 서열 변화를 함유하는 2개의 클론 M13mp10W:C7과 M13mp10W:D6을 처리하여 AIDS 바이러스와 동일한 서열을 수득하는 방법을 도식적으로 나타낸 흐름도이다. 생성된 클론인 M-13-GAG는 반점 분석에서 하이브리드화 프로브로서 사용되는 180bp 삽입물을 함유한다. 도면에서, X는 유전자에서의 돌연변이를 나타낸다.

본 명세서에서 사용된 "바이러스"란 용어는 바이러스(들)에서 핵산중에 거의 보존되고 핵산에 대해 특이적인 서열을 갖는 특성의 분리물 또는 일련의 연관된 분리물을 의미한다. 이러한 바이러스의 예로는 HIV, B형 간염 바이러스, 포진바이러스, A형 간염 바이러스, 라이노바이러스, 유두종바이러스, 엡스타인-바아(Epstein-Barr)바이러스 등이 포함된다. 본 명세서에서 바람직한 바이러스는 AIDS 바이러스 및 B형 간염 바이러스이다.

본 발명은 서열을 함유하리라고 예상되는 핵산(들)시료에서 바이러스에 관련된 핵산 서열을 검출하고 모니터링하는 방법, 및 검출 및 모니터링용 키트에 관한 것이다. 하기 설명은 특히 HIV 및 B형 간염 바이러스에 관한 것이나, 본 명세서에서 정의된 바와같은 어떠한 바이러스에나 적용될 수 있다.

HIV는 매우 변하기 쉬우므로, AIDS 관련 바이러스의 상당한 분획을 검출하기 위해 사용할 바이러스의 변종들 사이에서 공통 요소(본 명세서에서 기술한 바대로 특이성 프라이머의 중합화 개시를 허용하는 길이를 갖는 보존된 영역)를 찾는 것이 필요하다. 상당한 분획을 진단적으로 또는 상업적으로 실행가능한 시험을 수행하는데 충분한 개체의 수를 의미한다. 일반적으로 4개의 HIV, ARV, HTLV III, LAV 및 LAVA는 서열화되었으며, 5개의 인간 B형 간염 바이러스 뿐만 아니라, 마뚝류(woodchuck), 캘리포니아산 다람쥐 및 오리를 감염시키는 관련 바이러스도 서열화되었다. 초기 4개의 HIV 및 이의 관련 변종을 본 명세서에서는 "AIDS 바이러스"로 표기하고 5개의 B형 간염 바이러스, 및 마뚝류, 캘리포니아산 다람쥐 및 오리를 감염시키는 B형 간염-관련 바이러스를 본 명세서에서는 "헤파드나바이러스(Hepadnavirus)"로 표기한다. 증폭될 서열은 또한 AIDS 바이러스 또는 헤파드나바이러스에 대해 특이적이어야 하며, 다시 말해서, 각각, HTLV I 또는 HTLV II 또는 다른 비-AIDS 바이러스와 반응하지 않거나, 비-헤파드나바이러스와 반응하지 않아야 한다.

4개의 HIV 분비물 및 이들 변종의 완전 제놈은 하기 문헌에 기술되어 있다[참조:ARV의 경우 Sanchez-Pescador et al., Science, 227, 484-492 (1985); HTLV III의 Starcich et al., 경우 Science, 227, 538-540 (1985); LAV의 경우 Wain-Hobson et al., Cell, 40, 9-17 (1985); 및 LAVA의 경우 Muesing et al., Nature, 313, 450-458 (1985)]. 이들 바이러스가 모두 동일한 균주의 변종이라는 일반적인 일치점이 있다. 이들은 종내에서 완전하게 보존되는데, 즉, 이들은 변종을 갖지 않는다.

오리의 B형 간염 바이러스의 완전 제놈은 문헌[참조:J. Virol., 49 : 782-792 (1984)]에 기술되어 있고, 인간 및 마뚝류의 바이러스 제놈은 상기 인용한 문헌[J. Virol.]에 기술되어 있다. 캘리포니아산 다람쥐의 B형 간염 바이러스의 완전 제놈은 문헌[참조:J. Virol., 41:51-65 (1982)]에 기술되어 있다.

검출하고자 하는 서열에 대해 적용되는 "거의 보존된(substantially conserved)"이란 용어는 서열이, 중합화제 및 4개의 뉴클레오사이드 트리포스페이트 존재하에 적어도 실온에서 중합반응을 개시시키도록, 검출하고자 하는 바이러스에서 핵산에 대해 충분히 상보적이어야 한다는 것을 의미한다.

사용되는 프라이머는 바이러스중의 상당한 수의 핵산에 대한 중합반응의 특이적 개시를 제공하도록 특정길이 및 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 특히, 본 명세서의 사용되는 용어 "프라이머"는 2개 이상, 바람직하게는 3개 이상의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드로 이루어지며, 핵산 본쇄에 대해 거의 상보적인 프라이머 연장 생성물의 합성이 유도되는 조건하, 즉 뉴클레오사이드 트리포스페이트 및 중합화제(예:DNA 폴리머라제) 존재하 및 적합한 온도 및 pH에서 놓여지는 경우 합성의 개시점으로서 작용할 수 있는 분자를 의미한다. 프라이머는 증폭시 최대효율을 수득하기 위해 바람직하게는 일본쇄이지만, 또한 이본쇄일 수도 있다. 이본쇄인 경우에는, 프라

이머는 우선, 연장 생성물을 제조하는데 사용하기 전에 이는 본체들로 분리되도록 처리한다. 바람직하게는, 프라이머는 올리고데옥시리보뉴클레오타이드이다. 프라이머는 중합반응 유도제의 존재하에서 연장 생성물의 합성을 유도하기에 충분할 정도로 길어야 한다. 프라이머의 정확한 길이는 온도, 완충액, 뉴클레오타이드 조성 및 프라이머 공급원을 포함한 여러 인자에 따라 달라진다. 본 발명의 목적을 위해서는, 올리고뉴클레오타이드 프라이머는, 비록 보다 더 적은 수의 뉴클레오타이드를 함유할 수도 있지만, 전형적으로는 15 내지 25개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드를 함유한다. 바이러스가 AIDS 바이러스를 구성하는 경우, 바람직하게는 프라이머는 gag 영역으로 부터이다. 바이러스가 헤파드나바이러스를 구성하는 경우, 바람직하게는 프라이머는 이러한 바이러스의 폴리머라제 또는 오피 유전자로부터 선택한다.

본 발명에서 프라이머는 증폭될 특정 서열의 각 본체에 대해 "거의" 상보적이 되도록 선택된다. 이것은, 프라이머가 중합화제의 작용을 허용하는 조건하에서 이들의 각 본체와 하이브리드화하기에 충분이상보적이어서 함을 의미하며, 다시 말해서 프라이머가 이것과 하이브리드화하는 증폭될 본체의 서열과 충분히 상보적이어서 다른 프라이머의 연장 생성물의 합성을 위한 주형을 형성함을 의미한다. 바람직하게는, 프라이머는 본체와 정확한 상보성을 갖는다.

흥미있는 관련 바이러스 사이에 거의 보존된 영역들 중에서 증폭될 서열을 선택할 수 있다. 그러므로, 프라이머 및 프로브는 특정의 적합한 수단에 의해 동정할 수 있다. 이것은 해당 바이러스 제논의 공지된 핵산서열의 영역들, 예를들면 4개의 AIDS 바이러스 제논과 4개의 B형 간염 바이러스 제논을 비교함으로써 수동적으로 수행할 수 있다.

또 다른 더욱 편리한 방법은 컴퓨터 프로그램을 사용하여 서열들을 비교하는 것이다. 이 목적을 위해, 반점 매트릭스(dot matrix)를 사용하는, 기초가 되는 컴퓨터 연산을 갖는 시판 프로그램 (National Biomedical Research Foundation사 제품)을 편리하게 사용할 수 있다. 이 프로그램은 흥미있는 여러가지 관련 바이러스의 핵산 서열들을 주입하여 영기쌍 동질성에 대한 윈도우 크기 (Window size)를 한정하는 것을 포함한다. 이 프로그램은 그래프를 사용하여 상이한 축상에서 서열들을 비교하는데, 반점은 적어도 거의 동질인 위치에서 나타난다. 바람직하게는, 윈도우 크기는 6염기쌍 이상이다.

AIDS 바이러스의 경우, 반점 매트릭스 프로그램으로, 뉴클레오타이드 유전자로 또한 알려진 제논의 gag 영역(제 1 도 참조)이 4개의 변종에서 코드화 영역 사이에 가장 많이 보존되어 있음이 밝혀졌다. 그 다음으로 많이 보존된 코드화 영역은 제논의 pol 영역이고, 다음이 제논의 env 영역이다. gag 영역이 코드화 영역사이에 가장 많이 보존되어 있으므로, 이 영역이 서열을 검출하기 위한 프라이머 및 프로브를 선택하기에 바람직한 영역이다.

단백질을 코드화하지 않는 바이러스 제논의 영역을 사용하여 사용될 프라이머에 대한 서열을 측정할 수도 있다. 본 발명의 감수성 및 특이성을 최대로 하기 위한 목적을 위해, 검출될 서열은 관련된 바이러스 사이에 거의 보존된, 특이성 프라이밍을 허용하기에 충분한 길이를 갖는 서열과, 특히 프로브 및 제한 효소가 사용되는 경우 제한 절단 부위에서, 동질이다.

생성물을 증폭시키고, 그후에 검출하기 위해 사용되는 기술은 하기 문헌들에 상세히 기술되어 있다 [참조:Saiki et al., Biotechnology, 상기 참조 및 Saiki et al., Science, 상기 참조]. 일반적으로, 증폭 방법은, 필요한 서열의 말단이 이들에 대해 하이브리드화될 올리고뉴클레오타이드 프라이머가 합성될 수 있도록 충분히 상세히 알려져 있고 연쇄 반응을 개시하는데 소량의 서열이 이용될 수 있다면, 관련된 반응 단계의 수에 관한 지수량으로 특정의 핵산 서열을 제조하기 위해 효소 연쇄 반응을 포함한다. 하나의 프라이머는 음성(-) 본체에 대해 상보적이고 다른 프라이머는 양성(+) 본체에 대해 상보적이다. 변성된 핵산에 프라이머를 아닐링한 다음 DND 폴리머라제 1의 큰 단편 (클레노우)과 같은 효소와 뉴클레오타이드로 연장시키면 표적 서열을 함유하는 (+) 및 (-) 본체가 새로이 합성된다. 이들 새로이 합성된 서열 또한 프라이머를 위한 주형이 되므로, 변성, 프라이머 아닐링 및 연장 사이클을 반복 수행하면, 프라이머에 의해 한정되는 영역이 지수량적으로 축적된다. 연쇄 반응의 생성물은 사용되는 특정 프라이머의 말단에 상응하는 말단을 갖는 분리된 핵산 이본체 구조물이다.

증폭 과정은 상보성 본체[S+] 및 [S-]로 이루어진 목적 서열[S]를 함유하는 이본체 DNA를 핵산으로 사용하여 하기에 도식적으로 설명한다. 첫번째 및 매 후속반응 사이클동안 원래의 주형상에서 각 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 연장시켜 단지 1개의 프라이머로 종결되는 무한한 길이의 새로운 ssDNA 분자 생성물 하나를 생성시킨다. 이 생성물을 하기에서는 "긴(long) 생성물"이라 명명하는데, 이는 선상으로 축적될 것이다; 즉, 어느 사이클수 이후에 존재하는 양은 사이클 수에 비례한다.

이렇게 하여 생성된 긴 생성물은 후속 사이클 동안에 하나의 또는 다른 올리고뉴클레오타이드 프라이머용 주형으로 작용하여 목적하는 서열 [S+] 또는 [S-] 분자를 생성한다. 이 분자들은 또는 하나의 또는 다른 올리고뉴클레오타이드 프라이머용 주형으로 작용하여 추가의 [S+] 및 [S-]를 생성하므로, 연쇄 반응이 유지될 수 있고, 이 결과 사이클 수와 비교해서 지수적 비율로 [S]가 축적된다.

의도한 것들외에 올리고뉴클레오타이드 하이브리드화에 의해 형성된 부산물은 자기-축매적이지 못하므로 선상 비율로 축적된다.

증폭시킬 특정 서열 [S]는 다음과 같이 도식적으로 나타낼 수 있다:

```
[S']  5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXXXXCCCCCCCCCC 3'
[S]   3' TTTTTTTTTTYYYYYYYYYYYYCCCCCCCCCC 5'
```

적당한 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 다음과 같다:

프라이머 1: 3' GGGGGGGCCC 5'

프라이머 2: 5' AAAAAAAAAA 3'

따라서 [S]를 함유하는 DNA

.....ZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZAAAAAAAAAXXXXXXXXXXXXXXXXXXCCCCCCCCCZZZZZZZZZZZZZZ...

.....ZZZZZZZZZZZZZZZZZZTTTTTTTTTTTTYYYYYYYYYYYGGGGGGGGZZZZZZZZZZZZZZZZZZ...

로 분리되고 이의 일본쇄가 프라이머 1과 2에 하이브리드화되면, 하기의 연장 반응이 4개의 ^가 일본쇄 ^데 옥시 리보뉴클레오사이드 트리포스페이트 존재하에서 DNA 폴리머라제에 의해 촉진될 수 있



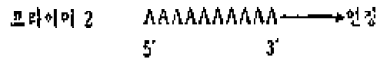
다:

.....ZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZAAAAAAAAAXXXXXXXXXXXXXXXXXXCCCCCCCCCZZZZZZZZZZZZZZZZ...

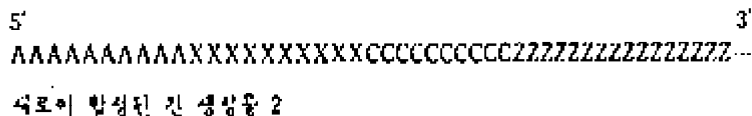
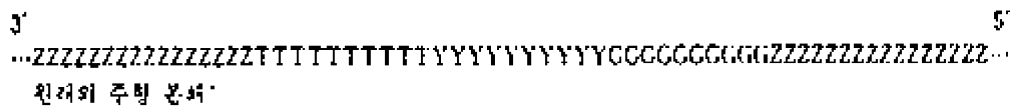
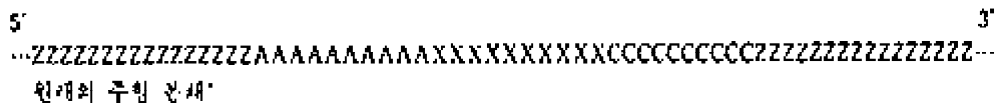
원래의 주형 본쇄

원래의 주형 본쇄

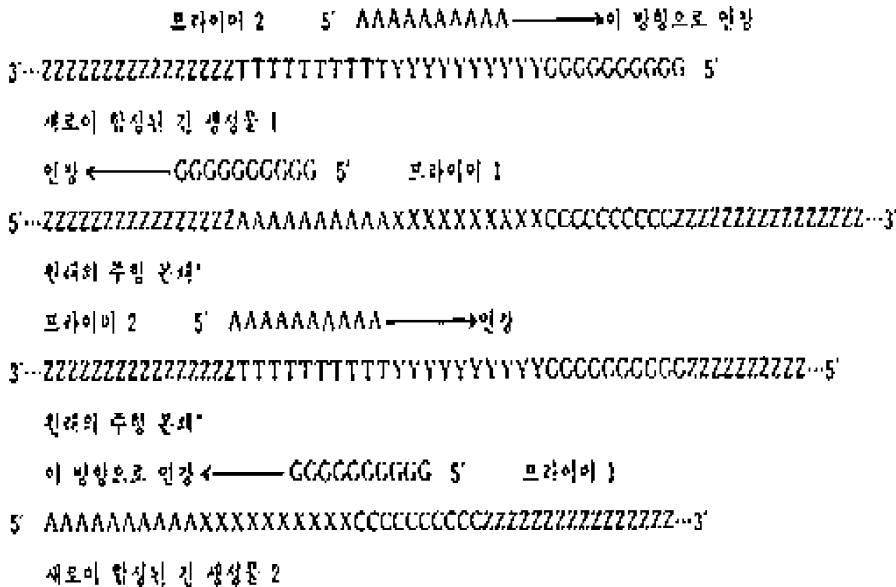
.....ZZZZZZZZZZZZZZZZZZTTTTTTTTTTTTYYYYYYYYYYYGGGGGGGGZZZZZZZZZZZZZZZZZZ...



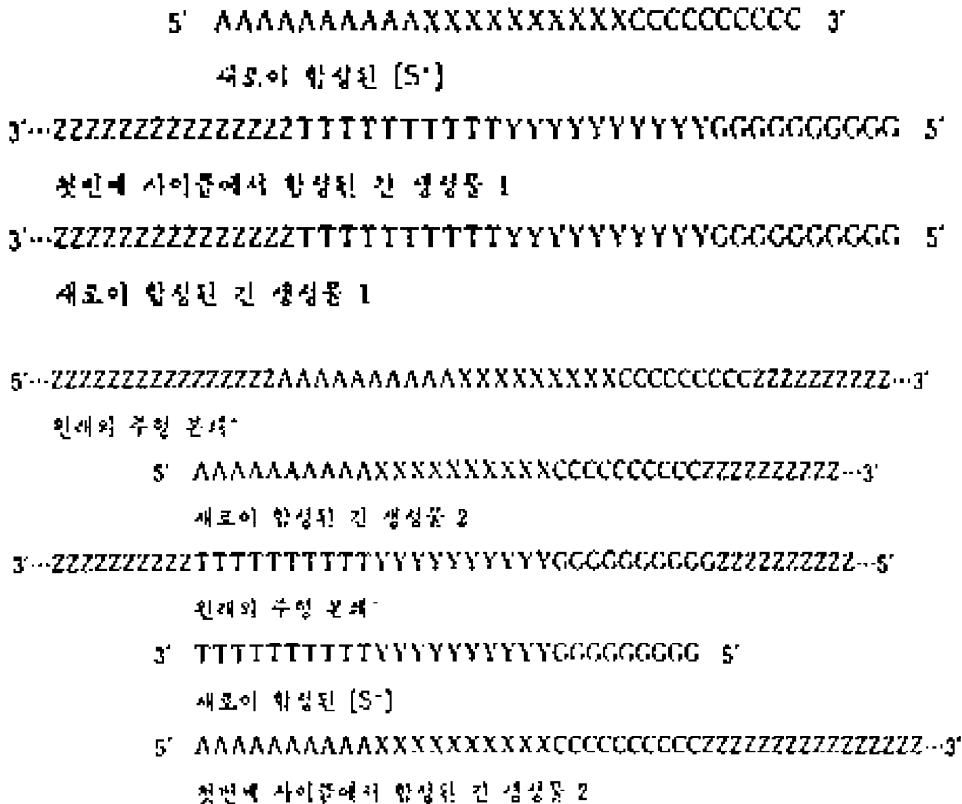
형성된 2개의 이본쇄 구조물의 변성시, 생성물은 다음과 같다:



이들 4개의 본쇄를 다음 사이클에서 프라이머 1 및 2와 하이브리드화시킬 경우, 중합화제는 하기 반응을 촉진한다:



상기 4개의 이분체 구조물이 분리되면, 하기의 분체들이 확인된다:



하나의 프라이머의 올리고뉴클레오타이드 서열 및 다른 프라이머의 상보성 서열로 종결되는 각 분체는 생성시키기를 목적하는 특정 핵산 서열[S]임을 알 수 있다.

이 방법의 단계는 존재하는 프라이머 1 및 2, 유도제(inducing agent) 및 뉴클레오타이드의 양에 의해서만 제한받을뿐, 무한하게 반복할 수 있다. 원래의 핵산의 양은 전 방법에서 일정하게 남아 있는데 이것은 복제되지 않았기 때문이다. 긴 생성물의 양은, 이들이 단지 원래의 핵산으로부터만 제조되기 때문에 선형으로 증가한다. 특정 서열의 양은 지수적으로 증가한다. 따라서, 특이성 서열이 우세한 종으로 된다. 이것은 하기 표에 설명되어 있는데, 표에는 각 사이클에서의 효율을 100%로 가정하여 n사이클후 이론적으로 존재하는 종들의 상대량을 나타낸다:

0 내지 n사이클 후 이본쇄의 수

사이클 수	주형	긴 생성물	특정서열 (S)
0	1	-	-
1	1	1	0
2	1	2	1
3	1	3	4
5	1	5	26
10	1	10	1013
15	1	15	32,752
20	1	20	1,048,555
n	1	n	$(2^n - 1)$

일본쇄 핵산을 주형으로 사용하는 경우, 사이클당 단지 하나의 긴 생성물이 형성된다.

본 명세서에 사용된 용어 "제한 엔도뉴클레아제" 및 "제한 효소"는 특정 뉴클레오타이드 서열에서 또는 이 서열 근처에서 일본쇄 DNA를 절단하는 세균 효소를 의미한다.

본 발명에서 프라이머(들)는 하기 기준에 의해 선택될 수 있으며, 이들 인자는 고려 대상이지, 독점적이거나 결정적인 것은 아니다. 첫째로, 프라이머는 바이러스 제놈의 보존된 영역으로부터 선택한다. AIDS 제놈의 경우, gag 영역(뉴클레오타이드 유전자)이 코드화 영역중에 가장 많이 보존된 영역이고, 다음이 pol 및 env 영역이다. 따라서, gag 영역을 초기 연구용으로 선택한다. B형 간염 제놈의 경우, 제놈의 완전 코드화 영역은 단일종 내에 보존된다.

둘째로, 프라이머는 시험하고자 하는 바이러스 제놈의 특정 서열과는 동질성이 결여되어 있다. 예를 들어, HTLV 1에 대한 서열[참조 : Seiki M. et al., PNAS(USA) 80:3618-3622(1983)]로 AIDS에 대한 시험을 수행할 수 있다.

세째로, 프라이머는 바람직하게는 이. 콜라이 DNA 폴리머라제, 바람직하게는 클레노우(Klenow) 단편으로 명명되는 DNA 폴리머라제의 부분과 같은 증폭 효소에 의해 증폭된 핵산에서 연장을 방해할 수 있는 2차 구조 형성이 부족하다. 이것은 증폭 배지에서 디메틸 설폭사이드(DMSO)를 약 15중량%, 바람직하게는 5 내지 10중량% 까지 사용하고/하거나 증폭 온도를 30 내지 40°C, 바람직하게는 35 내지 40°C까지 증가시킴으로써 수행할 수 있다.

네째로, 프라이머는 바람직하게는 구아닌 및 시토신을 약 50% 함량으로 함유하고, 프라이머의 3'의 말단에서는 덜 안정한 하이브리드를 야기시킬 수 있는 다중 연속 아데닌 및 티민 잔기를 함유하지 않는다.

마지막으로, 증폭된 생성물이 제한 효소의 사용으로 검출될 경우, 프로브는 내부(비-말단) 제한 부위를 가져야만 한다.

올리고뉴클레오타이드 프라이머는 적합한 방법, 예를들어 상기 기술한 포스포트리에스테르 및 포스포디에스테르 방법, 또는 이의 자동조작 형태를 사용하여 제조할 수 있다. 이러한 자동조작 형태중 하나에서는 디에틸포스포르아미다이트를 출발 물질로 사용하고 하기 문헌에 기술된 바대로 합성할 수 있다[참조:Beaucage et al., Tetrahedron Letters(1981), 22:1859-1862]. 변형된 고체 지지체 상에서 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 한가지 방법은 미합중국 특허 제4,458,066호에 기술되어 있다. 생물학적 공급원(예:제한 엔도뉴클레아제 분해물)으로부터 분리된 프라이머를 사용할 수도 있다.

정제되거나 비정제된 형태의 어떠한 핵산 공급원이라도, 이것이 검출된 바이러스와 관련된 특정 핵산 서열을 함유하거나 함유하리라고 생각된다면, 출발 핵산 또는 핵산들로서 사용될 수 있다. 그러므로, 이 방법에서는 예를들어 일본쇄 또는 이본쇄일 수 있는 DNA 또는 RNA(전령 RNA 포함)를 사용할 수 있다. RNA가 주형으로서 사용되는 경우, 주형을 DNA로 역전사시키는데 최적의 효소 및/또는 조건을 사용해야만 한다. 또한, 각각의 일본쇄를 함유하는 DNA-RNA 하이브리드를 사용할 수 있다. 이들 핵산 서열의 어떠한 혼합물도 사용될 수 있거나, 동일하거나 상이한 프라이머를 사용하여, 본 명세서에서 상기 기술한 증폭반응으로부터 생성된 핵산도 사용할 수 있다. 증폭시킬 특정 핵산 서열은 단지 큰 분자의 분획일 수 있거나 초기에는 분리된 분자로서 존재할 수 있으므로, 특정 서열은 완전 핵산 서열을 구성한다. 증폭될 핵산 서열이 초기에 정제된 형태로 존재해야할 필요는 없다:증폭시킬 핵산 서열은 전체 인간 DNA에 함유되어 있는 바이러스-코드화 유전자의 일부분과 같은 복합체 혼합물의 소분획일 수 있다. 출발핵산은 동일하거나 상이할 수 있는 목적하는 특정 핵산 서열하나 이상을 함유할 수 있다. 그러므로, 본 발명의 방법은 하나의 특정 핵산 서열을 다량으로 생산하는 데 뿐만 아니라, 동일하거나 상이한 핵산 분자상에 위치한 상이한 특정 핵산 서열 하나 이상을 동시에 증폭시키는 데에도 유용하다.

핵산(들)은 예를들어 동물과 같은 고등 유기체로부터의 천연 DNA 또는 RNA와 같은 공급원으로부터 수득할 수 있다. DNA 또는 RNA는 체시료(예:혈액), 조직 물질(예:응모), 또는 양막 세포로부터 하기 문헌에 기술된 것과 같은 여러가지 방법에 의해 추출할 수 있다[참조 : Maniatis et al., Molecular

Cloning (1982), 280-281].

시료가 혈장, 혈청, 또는 혈액과 같이 불순한 경우, 증폭시키기 전에 유효량의 시약으로 처리하여, 시료의 세포, 유체, 조직, 바이러스 캡시드 또는 동물 세포막을 열고, 핵산(들)의 본쇄(들)를 노출시키고/시키거나 분리할 수 있다. 이러한 용해 및 핵산 변성 단계로 본쇄가 노출 및 분리되어 증폭이 훨씬 용이하게 일어날 수 있다. 또한, AIDS 바이러스는 시료를 증폭 시약으로 처리하기 전에 시료중에서 배양할 필요는 없다. 시료를 원심분리하여 연중을 수득한 다음, 이를 컬럼에 통과시켜 백혈구를 수득할 수 있다. 이어서 백혈구를 처리하여 이로부터 증폭시킬 시료로 사용할 수 있는 핵산을 추출한다.

모든 특정의 핵산 서열은 본 발명의 방법으로 제조할 수 있다. 서열의 양 말단에서 충분한 수의 염기가 충분히 상세히 알려져 목적하는 서열의 상이한 본쇄로 하이브리드화될 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 제조할 수 있고 서열을 따라 적합한 위치에서, 하나의 프라이머로부터 연장 생성물이, 이의 주형(보체)으로부터 분리되는 경우, 한정된 길이의 핵산으로 다른 프라이머를 연장시키기 위한 주형으로 제공될 수 있는 것만이 필요하다. 서열의 양 말단에서 염기에 관한 정보를 많이 알면 알수록, 표적핵산 서열에 대한 특이성이 더 높아질 수 있으므로, 방법의 효율이 높아진다. 하기에서 사용되는 용어 프라이머는, 특히 증폭시킬 단편의 말단 서열(들)에 관한 정보가 약간 불명료한 경우, 하나 이상의 프라이머로 언급될 수 있는 것으로 이해할 수 있다. 예를들어, 핵산 서열이 단백질 서열 정보로부터 추론되는 경우, 유전자 코드의 축퇴를 기본으로 하여 모든 가능한 코돈 변이를 나타내는 서열을 함유하는 프라이머의 집합물을 각 본쇄에 대해 사용할 수 있다. 이 집합물로부터 하나의 프라이머는 증폭시킬 목적하는 서열의 말단에 거의 보존된다.

특정의 핵산 서열은 주형으로서 상기 서열을 함유하는 핵산을 사용하여 제조한다. 시료의 표적 핵산 서열이 2개의 본쇄를 함유하는 경우, 이것을 주형으로서 사용하기 전에, 분리 단계로서 또는 동시에 프라이머 연장 생성물을 합성함으로써 핵산의 본쇄들을 분리해야만 한다. 이러한 본쇄 분리는 물리적, 화학적 또는 효소적 수단을 포함한 적절한 변성(본 명세서에서 "변성"이란 용어는 모든 이러한 수단을 포함한다) 조건을 사용하여 수행할 수 있다. 핵산의 본쇄를 분리하는 하나의 물리적 방법은 핵산이 변성될 때까지 핵산을 가열하는 것을 포함한다. 전형적인 가열 변성은 약 80 내지 105°C에서 약 1 내지 10분 동안 가열하는 것을 포함할 수 있다. 본쇄 분리는 또한 헬리카제(helicase)로 알려진 효소의 부유 또는 효소 RecA(이 효소는 헬리카제 활성을 가지며 riboATP 존재하에 DNA를 변성시킨다고 알려졌다)에 의해 유도할 수 있다. 헬리카제를 사용하여 핵산의 본쇄를 분리하는데 적합한

반응 조건은 문헌[참조:Kuhn Hoffmann-Berling, CSH-Quantitative Biology, ¹³:63(1978)]에 기술되어 있고, RecA를 사용하는 기술은 문헌[참조:C. Radding, Ann. Rev. Genetics, ¹⁶:405-37(1982)]에 보고되어 있다.

증폭시킬 서열을 함유하고 있는 원래의 핵산이 일본쇄인 경우, 이의 보체는 원래의 핵산에 하나 또는 두개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 가하여 합성한다. 적절한 단일 프라이머를 가하는 경우, 프라이머 연장 생성물은 프라이머, 중합화제, 및 하기 기술하는 4개의 뉴클레오사이드 트리포스페이트 존재하에 합성한다. 생성물은 일본쇄 핵산에 대해 부분 상보적이며 핵산 본쇄와 하이브리드화하여 길이가 같지 않은 본쇄들의 이본쇄 구조물을 형성시킨 다음, 이를 상기 기술한 바와 같이 일본쇄들로 분리하여 2개의 단일 분리된 상보성 본쇄를 생성시킬 수 있다. 또한, 2개의 적절한 프라이머를 일본쇄 핵산에 가하여 반응을 수행할 수도 있다.

원래의 핵산이 증폭시킬 서열을 구성하는 경우, 생성된 프라이머 연장 생성물(들)은 원래의 핵산 본쇄에 대해 완전히 또는 거의 상보적이며 원래의 핵산 본쇄와 하이브리드화하여 길이가 동일한 본쇄의 이본쇄 구조물을 형성한 다음 이를 일본쇄 본쇄로 분리한다.

핵산 또는 핵산들의 상보성 본쇄를 분리하는 경우, 핵산이 원래 일본쇄이든 이본쇄이든, 본쇄를 추가의 핵산 본쇄를 합성하기 위한 주형으로서 즉시 사용한다. 이 합성은 프라이머의 주형으로서의 하이브리드화가 발생할 수 있는 조건하에서 수행한다. 일반적으로, 이 합성은 완충 수용액중, 바람직하게는 pH 7 내지 9에서 가장 바람직하게는 약 pH 8에서 발생한다. 바람직하게는, 과량(제논 핵산의 경우, 일반적으로 약 10⁸:1 프라이머 : 주형)의 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 분리된 주형 본쇄를 함유하는 완충액에 가한다. 그러나, 본 발명의 방법을 진단적응에 사용하는 경우 상보성 본쇄의 양을 알 수 없으므로, 상보성 본쇄의 양에 대한 프라이머의 양을 확실하게 측정할 수 없다고 생각된다. 그러나, 실질적인 문제로서, 증폭시킬 서열이 복잡한 장쇄 핵산 본쇄의 혼합물에 함유되어 있는 경우, 첨가되는 프라이머의 양은 일반적으로 상보성 본쇄(주형)의 양에 비해 몰과량이다. 큰 몰과량이 방법의 효율을 향상시키는데 바람직하다.

데옥시리보뉴클레오사이드 트리포스페이트 dATP, dCTP, dGTP 및 TTP를 적절한 양으로, 별도로 또는 프라이머와 함께 합성 혼합물에 가하여 생성된 용액을 약 90 내지 100°C로 약 1 내지 10분 동안 바람직하게는 1 내지 4분 동안 가열한다. 이 가열기간후에 용액을 실온으로 냉각시키는데, 이것이 프라이머 하이브리드화에 바람직하다. 냉각된 혼합물에 프라이머 연장 반응을 수행하는데 적절한 제제(본 발명에서는 "중합화제"라 칭함)를 가하고, 반응을 본 분야에서 공지된 조건하에서 발생하도록 한다. 중합화제는 또한, 열에 안정한 경우 다른 제제와 함께 가할 수도 있다. 이 합성 반응은 실온 내지, 중합화제가 더 이상 작용하지 않는 온도까지에서 발생할 수 있다. 즉, 예를들어, DNA 폴리머라제를 중합화제로서 사용하는 경우, 온도는 일반적으로 약 40°C 이하이다. 가장 유리하게는 반응을 실온에서 수행한다.

중합화제는 효소를 포함한 프라이머 연장 생성물의 합성을 수행하는 작용을 하는 특정의 화합물 또는 계열 수 있다. 이 목적에 적합한 효소에는 예를들어 이.콜라이 DNA 폴리머라제 I, 이. 콜라이 DNA 폴리머라제 I의 클레노우 단편, T4 DNA 폴리머라제, 다른 이용가능한 DNA 폴리머라제, 폴리머라제 유데인, 역전사효소, 및 열에 안정한 효소(즉, 변성을 야기시키기에 충분하도록 상승된 온도에 적용시킨 후에 프라이머 연장을 수행하는 효소)를 포함한 다른 효소가 포함되며, 이들은 뉴클레오타

이드의 조합을 적절한 방식으로 용이하게 하여 각 핵산 본쇄에 대해 상보적인 프라이머 연장 생성물을 형성한다. 일반적으로, 합성은 각 프라이머의 3' 말단에서 시작하여 합성이 종결될 때까지 주형 본쇄를 따라 5' 방향으로 진행되어, 상이한 길이의 분자를 생성한다. 그러나, 상기 기술한 바와 동일한 방법을 사용하여 합성을 5' 말단에서 개시하여 다른 방향으로 진행시키는 중합화제도 있을 수 있다.

새로이 합성된 본쇄 및 이의 상보성 핵산 본쇄는, 표적 서열이 존재하는 경우, 상기 기술한 하이브리드화 조건하에서 이본쇄 분자를 형성하고, 이 하이브리드를 이방법의 후속 단계에서 사용한다. 다음 단계에서, 표적 서열이 존재하는 경우, 하이브리드화 조건하에서 처리한 시료를 상기 기술한 방법중 하나를 사용하여 변성시켜 일본쇄 분자를 제공한다.

신규 핵산을 일본쇄 분자상에서 합성한다. 추가의 중합화제, 뉴클레오타이드 및 프라이머를 반응에 필요한 경우 가하여 상기 기술한 조건하에서 진행시킬 수 있다. 다시, 합성을 올리고뉴클레오타이드 프라이머 각각의 하나의 말단에서 시작하여 주형의 일본쇄를 따라 진행시켜 추가의 핵산을 생성한다. 이 단계 후에, 연장 생성물의 반은 2개의 프라이머에 의해 한정된 특성의 핵산 서열로 이루어진다.

변성 및 연장 생성물 합성 단계는 검출에 필요한 정도로 표적 핵산 서열을 증폭시킬 필요가 있는 경우마다 반복할 수 있다. 하기에 상세히 기술하는 바대로, 생성된 특정 핵산 서열의 양은 지수 형태로 축적된다.

첫번째 핵산 또는 핵산의 혼합물로부터 하나이상의 특정 핵산 서열을 생성하는 것이 바람직한 경우, 전술한 수의 상이한 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용한다. 예를들어, 2개의 상이한 특정 핵산 서열을 생성할 경우, 4개의 프라이머를 사용한다. 프라이머중 2개는 하나의 특정 핵산 서열에 특이적이고 다른 2개의 프라이머는 두번째 특정 핵산 서열에 대해 특이적이다. 이러한 방식으로, 2개의 상이한 특정 서열 각각을 본 발명의 방법에 의해 지수적으로 생성할 수 있다.

본 발명은 각 단계후에 새로운 시약을 가하는 단계적 형태, 또는 모든 시약을 초기 단계에 가하는 동시적 형태, 또는 새로운 시약을 일정수의 단계후에 가하는 부분 단계적 및 부분 공시적 형태로 수행할 수 있다. 중합화제를 실활성화시키는 변성 방법(예:가열)을 열에 불안정한 효소에서 사용하는 경우, 모든 본쇄 분리단계후에 중합화제를 재충진시키는 것이 필요하다. 효소적 수단을 본쇄 분리 단계에 사용하는 경우 동시적 방법을 사용할 수 있다. 동시적 방법에서, 반응 혼합물은 목적하는 서열을 함유하는 핵산 본쇄(들) 외에, 본쇄-분리 효소(예 : 헬리카제), 본쇄-분리 효소를 위한 적절한 에너지 공급원(예 : rATP), 4개의 뉴클레오사이드 트리포스페이트, 몰과량의 올리고뉴클레오타이드 프라이머, 및 중합화제(예 : 이.콜라이 DNA 폴리머라제 I의 클레노우 단편)을 함유할 수 있다.

동시적 방법에서 변성을 위해 가열 방법을 사용하는 경우에는, 승온, 바람직하게는 중합화제에 따라 50 내지 105°C(이 온도에서 핵산은 일본쇄와 이본쇄가 평형상태로 구성된다)에서 작용하는 열에 안정한 중합화제(예:열안정성 폴리머라제)를 사용할 수 있다. 더 작은 길이의 핵산의 경우에는, 약 40 내지 50°C의 더 낮은 온도가 사용된다. 더 높은 온도는 효소가 분해되는 온도 또는 프라이머 하이브리드화가 불충분한 수준으로 발생하는 이상의 온도에 따라 달라진다. 이러한 열에 안정한 효소는 문헌[참조:A.S. Kaledin et al., Biokhimiya, 45, 644-651(1980)]에 기술되어 있다. 이러한 항온 반응을 계속 유지시키기 위해서는, 프라이머가 각각의 6 내지 8개의 염기쌍 내에 이들의 3' 말단을 가져야만 한다. 이 반응의 각 단계는 초기에 모든 시약이 존재함에도 불구하고 순서대로 발생한다. 필요한 경우 추가의 물질을 가할 수 있다. 적당한 시간이 지나 목적하는 양으로 특정 핵산 서열이 생성된 후, 공지의 방식으로 효소를 실활시키거나 반응의 성분들을 분리함으로써 반응을 중지시킬 수 있다.

증폭은 또한 온도를 연속적으로 90 내지 105°C로 증가시켜 변성시킨 다음 35 내지 65°C 이상으로 감소시켜 열에 안정한 효소를 사용하여 연장 및 아닐링시키는 온도-사이클 반응을 사용하여 수행할 수 있다. 실질적으로 온도를 간단히 약 95°C로 상승시킨 다음 약 65°C로 또는 37°C정도로 낮게 감소시키고 다시 약 95°C로 상승시키고, 사이클은 목적하는 기간동안 계속한다.

자동조작 방법의 또다른 형태에서, 본 발명의 방법은 변성 영역, 시약 첨가 영역 및 반응 영역을 통해 반응을 사이클링시킴으로써 연속적으로 수행할 수 있다. 또다른 형태에서는, 프라이머 연장 생성물의 합성에 사용되는 효소를 컬럼에 고정화시킬 수 있다. 다른 반응 성분들은 컬럼을 통한 펄프 및 일련의 가열 코일에 의해 계속 순환시킬 수 있으며, 이렇게 하여 수득된 핵산을, 효소를 실활시키지 않고서 반복적으로 변성시킬 수 있다.

증폭된 생성물은 방사능 프로브를 사용하지 않고서, 서던 블롯(Southern blots)에 의해 분석함으로써 검출할 수 있다. 이러한 방법에서, 예를들어, AIDS와 관련된 서열을 매우 적은 수준으로 함유하는 말초혈액 임파구로부터의 DNA의 소량의 시료를 증폭시킨 다음, 서던 블롯 기술로 분석한다. 고수준의 증폭된 시그널에 의해 비-방사능 프로브의 사용은 용이해진다.

또다른 검출 방법은 증폭된 핵산 서열과 하이브리드화 가능한 표지된 프로브를 사용하여 프로브가 하이브리드화된 경우 측정하는 검출방법을 포함한다. 이러한 프로브는 필수적으로 바이러스(예:AIDS 바이러스, HTLV III, ARV, LAV, LAVA, 또는 이의 변종)의 제놈으로부터 거의 보존된 핵산 서열을 함유하고 프라이머 및 증폭된 서열에 대해 상기 기술한 바대로 선별한다. AIDS의 경우, 바람직하게는 프로브는 AIDS 제놈의 gag 영역으로부터 선택한다.

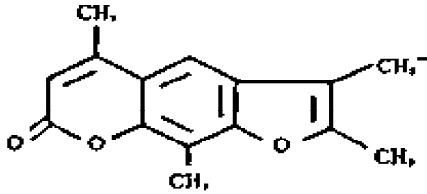
이러한 프로브 방법중 하나는 1985년 12월 11일자로 공고된 유럽 특허 공보 제164,054호에 기술된 올리고머 제한 기술을 포함한다. 이 방법에서는, 증폭된 핵산을 변성시킨 다음, 용액중에서, 표적 서열에 특이적으로 하이브리드화하고(프라이머에 의해 함유된 특성의 보존된 영역에 걸려 있다) 적어도 하나의 중요한 제한 부위에 걸려 있는 표지된 올리고뉴클레오타이드 프로브에 대해 하이브리드화시킨다. 표적과 프로브 사이에 형성된 이본쇄 구조물은 제한 부위를 재구성하며, 예를들어 Bst N I, Pvu II, Dde I 또는 Dra I 등의 제한 효소로 절단하는 경우, 겔 전기영동에 의해 완전 길이 프로

브로부터 용해될 수 있는 표지된 프로브 단편을 방출한다. 이어서, 생성된 겔을 오오토라디오그래피한다. 이 방법에 의한 증폭된 생성물의 분석은 신속하고, 따라서, 수시간내에 결과를 얻을 수 있다. 바람직하게는, 프로브는 30 내지 50염기쌍 길이이고 표지한다. 또한, 바람직하게는 제한 효소는, 검출할 서열이 AIDS 바이러스로부터 생성된 경우에는 Bst N I 또는 Pvu II이고, 검출할 서열이 헤파드나 바이러스로부터 생성된 경우에는 Dde I이다.

증폭된 생성물을 분석하는데 사용할 수 있는 또다른 방법은 반점 블롯 방법이다. 이 방법에서는, 증폭된 시료를 막상에 직접 스포팅한 다음, 표지된 프로브와 하이브리드화한다. 표지물은 분광분석, 광화학에 의해 또는 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 검출할 수 있다. 예로는 알칼리성 포스파타제와 같은 효소, ³²P와 같은 방사능 표지물, 형광 표지물, 또는 바이오틴이 포함된다. 하나의 형태에서, 프로브는, 바이오틴이 하기 일반식을 갖는 공간 팔(spacer arm)에 부착된, 바이오티닐화 프로브이다.



상기식에서, Y는 산소, NH 또는 N-CH₂O이고, x는 1 내지 4의 수이며, y는 2 내지 4의 수이다. 공간 팔은 다시 하기 구조식을 갖는 프소라렌(psoralen) 잔기에 부착된



다: 프소라렌 잔기는 삽입되어 하기 문헌[참조:Courage-Tebbe et al., Biochim. Biophys. Acta., 697 (1982) 1-5]에 기술되어 있는 바대로 "갭이 있는 환(gapped circle)" 프로브를 가공결합시킨다[여기에서, 갭이 있는 환의 일본쇄 하이브리드화 영역은 프라이머들 사이에 함유되어 있는 영역에 걸쳐있다]. 이 바이오티닐화 및 반점 블롯 방법의 설명은 미합중국 특허 제4,582,789호 및 제4,617,261호에 더욱 상세히 기술되어 있다. 바이오티닐화된 프로브는 방사성 동위원소를 필요로 하지 않는다.

또한, 프로브를 먼저, 필요한 경우 예비 하이브리드화 조건하에서 막상에 스포팅할 수 있으며, 그 후에 증폭된 생성물을 미리-처리된 막에 하이브리드화 조건하에서 "역(in a reverse)" 반점 블롯형으로 가한다.

반점 블롯 방법은 막을 먼저 예비 하이브리드화한 다음 프로브와 하이브리드화하여야 하므로, 상기 기술한 올리고머 제한 방법보다 시간이 훨씬 많이 소요된다. 그러나, 신속하게 돌연변이하는 바이러스를 사용하는 경우, 제한된 잘못 짝지어진 염기쌍을 함유하는 서열이 적절한 하이브리드화 조건하에서 여전히 검출되는 잇점을 가지며, 이에 반해 올리고머 제한 방법을 사용하는 경우, 제한 부위를 없애는 돌연변이를 갖는 바이러스는 바이러스의 변이로 인해 검출될 수 없다.

본 발명은 또한 사용되는 각 프라이머 및 프로브의 용기를 갖는 포장된 다용기 단위로 이루어진 키트형에 관한 것이다. 키트는 또한 프라이머 연장 생성물(예:효소)을 합성하는 중합화제를 함유하는 용기, 각각 4개의 뉴클레오사이드 트리포스페이트를 함유하는 용기, 및 표지물을 검출하는 수단(예를 들면, 표지물이 바이오틴인 경우 아비딘-효소 복합체)을 함유하는 용기를 가질 수도 있다. 또한 키트는 중요한 바이러스 제능(예:AIDS)의 서열을 갖는 핵산 하나이상을 함유하는 양성 대조물을 포함하는 용기 및/또는 이러한 핵산없이 음성 대조물을 함유하는 용기를 가질 수 있다. 더우기, 키트는 프로브에서 표적 서열을 함유하는 핵산을 서열내에 함유되어 있는 부위에서 절단할 수 있는 제한 효소 각각에 대한 용기를 가질 수 있다.

하기 실시예는 본 발명의 여러가지 형태를 설명하며 어떠한 관점으로든 제한하려고 의도된 것은 아니다. 실시예에서, 달리 지적하지 않는한, 모든 부 및 퍼센테지는 고체인 경우 중량 기준이고 액체인 경우 용적 기준이며 모든 온도는 섭씨 온도이다.

[실시예 1]

증폭시킬 목적하는 서열은 하기 기관[the Regional Oncology Center, SUNY Upstate Medical Center, Syracuse, New York 13210]의 닥터 버나드 포이즈(Dr. Bernard Poesz)로부터 수득한 11개의 코드화 DNA 시료 194BK, 342, 367, 361, 368H, 207, 307, 308b, 323, 326 및 340에 함유되어 있다. 증폭시킬 서열, 프라이머, 및 프로브는 상기 기술한 바대로 반점 매트릭스 프로그램으로 확인하는데, 여기에서 선택된 서열 원도우는 적어도 20염기쌍 길이이므로, 서열은 AIDS 바이러스의 보존된 영역내에서 선택한다.

코드화 시료는 먼저 닥터 포이즈로부터 수득한 인터로이킨-2 존재하에서 배양하여 바이러스 존재에 대해 시험한다. 이어서, 하기 절차에 따라 DNA를 시료로부터 추출한다.

1. $1-2 \times 10^8$ 의 배양세포를 20ml의 나트륨 도데실 설페이트 용액 완충액(1% SDS, 150mM NaCl, 25mM Na₂ EDTA)을 함유하는 튜브에서 용해시킨다.
2. 튜브당 단백질 분해효소 K 5mg/ μ l 용액 400 μ l를 가하고 37°C에서 밤새 배양한다.
3. DNA를 페놀 및 CHCl₃:이소아밀 알콜로 연속적으로 추출한 다음 에탄올로 침전시킨다.
4. DNA를 유리 막대상에 스푼(spool)하고 1×TE 완충액(10mM 트리스, 1mM Na₂ EDTA, pH 7.5)에 재

현탁시킨 다음 1×TE 완충액에 대해 충분히 투석한다.

I. 프라이머의 합성

하기 2개의 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 프라이머 SK01 및 SK02를 각각 하기에서 기술하는 방법으로 제조한다:

5'-CAGGGAGCTAGAACGAT-3' (SK01)

5'-CTTCTGATCCTGTCTGA-3' (SK02)

(SK01 및 SK02는 HTLV III-분리 BH10의 뉴클레오타이드 900과 1006 사이에서 107 염기쌍을 증폭시키는데 제공되도록 선택한다)

A. 자동 조작 합성 방법: 하기 분헌[참조: Beaucage 및 Caruthers; Tetrahedron Letters(1981) 22: 1859-1862]에 기술된 방법에 따라 합성한 디에틸포스포르아미다이트들을 바이오서치(Biosearch) SAM-1을 사용하여 뉴클레오사이드 유도체된 조절 다공성 유리 지지체에 연쇄적으로 축합시킨다. 이 방법에는, 디클로로메탄 중에서 트리클로로아세트산을 사용하여 탈트리틸화시키는 반응 (detritylation), 활성 양성자 공여체로 벤조트리아졸을 사용하는 축합반응, 및 테트라하이드로푸란 및 피리딘 중에서 무수 아세트산 및 디메틸아미노피리딘을 사용하여 캡핑시키는 반응(capping)이 포함된다. 사이클을 1회 수행하는 시간은 약 30분이다. 각 단계에서의 수율은 필요한 양이며 이것은 탈트리틸화 반응 동안에 방출된 디메톡시트리틸 알콜을 회수하여 분광분석하여 측정한다.

B. 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 보호해제 및 정제방법 : 고체 지지체를 컬럼으로부터 제거하여 밀폐튜브내 실온에서 4시간 동안 농 수산화암모늄 1ml에 노출시킨다. 지지체를 여과하여 제거한 다음 부분적으로 보호된 올리고데옥시뉴클레오타이드를 함유하는 용액을 5시간 동안 55°C로 되게 한다. 암모니아를 제거하고 잔류물을 예비 폴리아크릴아미드 겔에 적재한다. 30volts/cm에서 90분 동안 전기영동시킨 다음 생성물을 함유하는 밴드를 형광판의 UV사진으로 확인한다. 밴드를 절단하여 4°C에서 밤새 증류수 1ml로 용출시킨다. 이 용액을 Altech RP18 컬럼에 적재하고 1% 암모늄 아세테이트 완충액(pH 6.0) 중의 아세토니트릴 7 내지 13%로 용출시킨다. 용출액을 260nm에서 UV 흡광도로 모니터링하고 적절한 분획을 회수하여 고정 용적에서 UV 흡광도로 정량 분석하고 진공 원심분리기내 실온에서 증발 건조시킨다.

C. 올리고데옥시리보뉴클레오타이드의 특성화 : 정제된 올리고뉴클레오타이드 시험 분취량을 폴리뉴클레오타이드 키나제 및 r-³²P-ATP를 사용하여 ³²P로 표지한다. 표지한 화합물을 50volts/cm에서 45분 동안 전기영동시킨 다음 14 내지 20% 폴리아크릴아미드 겔의 사진으로 검사한다. 이 방법으로 분자량을 입증한다. 염기 조성물은, 독액 디에스테라제(Venom diesterase) 및 세균 알칼리성 포스파타제를 사용하여 올리고데옥시리보뉴클레오타이드를 뉴클레오사이드들로 분해시킨 다음, 분리하고, 역상 HPLC 컬럼 및 10% 아세토니트릴, 1% 암모늄 아세테이트 이동상을 사용하여, 유도체된 뉴클레오사이드들을 정량 분석하여 측정한다.

II. 증폭 반응

닥터 포이즈로부터 수득한 11개의 코드화 DNA 시료 각각으로부터의 1μg을 10mM 트리스-HCl, pH 7.5, 50mM 염화나트륨 및 10mM 염화마그네슘으로 이루어지고 프라이머 SK01 100pmol, 프라이머 SK02 100pmole, 및 dATP, dCTP, dGTP 및 TTP 각각 150nmole을 함유하는 완충액 100μl에 가한다.

생성된 용액을 10분 동안 100°C로 가열한 다음 2분동안 실온으로 냉각시키고, 이 동안에 이.콜라이 DNA폴리머라제의 클레노우 단편 1단위를 함유하는 2μl를 가한다. 반응을 실온에서 2분동안 진행되게 한 다음, 95°C에서 2분동안 가열함으로써 효소를 실활성화 시킨다. 변성, 프라이머 아닐링, 및 클레노우를 사용한 연장(단계당 2분씩), 및 폴리머라제 첨가를 19회 반복한다.

III. 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 프로브의 합성 및 인산화

하기 서열을 갖는, 표지한 DNA 프로브 SK03: 5-*AATCCTGGCCTGTAGAAACATCAGAAG-3' (여기에서, *는 표지를 나타낸다)을 단락 I에 기술된 방법에 따라 합성한다. 프로브는 이 프로브 10pmole을, 70mM 트리스 완충액(pH 7.6), 10mM MgCl₂, 1.5mM 스페르민 및 2.5mM 디티오트레이톨을 함유하는 반응 용

적 40μl중 37°C에서 90분 동안 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제 4단위 및 r-³²P-ATP(약 7200 Ci/mole)50pmole과 접촉시켜 표지한다. 전체 용적을 25mM EDTA를 사용하여 100μl로 조정된 다음, TCA 침전법으로 비활성을 측정하기 위해 분취량을 회수한다. 표지한 프로브를 진공장치를 사용하여 농축한 다음 트리스-붕산-EDTA(TBE) 완충액(89mM 트리스, 89mM 붕산, 2.5mM EDTA, pH 8.3)중의 18% 폴리아크릴아미드 겔 상에서 500vhr 동안 전기영동시켜 정제한다. 오오토라디오그래피로 위치를 측정 후, 표지된 프로브를 함유하는 겔의 부위를 절단하여, 분쇄하고 TE 완충액 0.2ml내로 40°C에서 밤새 용출시킨다. 반응 생성물을 TCA로 침전시킨 결과 비활성은 2 Ci/mole이고 최종 농도는 20pmole/ml이다.

IV. 증폭된 제놈 DNA를 프로브 및 Bst NI을 사용하여 하이브리드화/분해시키는 반응

증폭된 DNA(제놈 DNA 71ng의 증폭전 등가물 함유) 10μl를 1.5ml 마이크로퓨지 튜브와 TE 완충액 20μl에 분배하여 최종 용적이 30μl가 되게 한다. 시료를 95°C에서 10분 동안 변성시킨다. SK03 프로브 0.02pmole을 함유하는 0.6M NaCl 10μl를 튜브에 가하여, 부드럽게 혼합하고, 광유를 바른 다음, 즉시 56°C로 고정시킨 열 차단 세트에 옮겨 1시간 동안 보관한다. 10μl의 50mM MgCl₂ 및 1μl의 Bst NI(10단위)를 가하고 재아닐링된 DNA를 56°C에서 30분 동안 분해시킨다. 반응은, 75mM EDTA 4μl 및 추적 염료 6μl를 가하여 최종 용적이 60μl가 되면 중지된다.

광유를 클로로포름 0.2ml로 추출하고, 반응 혼합물(~15ng 제놈 DNA) 13μl를 전기영동 장치내 30% 폴리아크릴아미드 미니-겔 상에 적재한다. 겔을 약 300volts에서 1시간 동안, 브로모페놀 블루 염료

가 원점에서 3.0cm 이동할 때까지, 전기영동시킨다. 겔의 상부 1.5cm를 제거하고 남아있는 겔을 -70°C에서 적어도 밤새 2개의 보력 스크린(intensification screen)을 사용하여 노출시킨다.

V. 결과 설명

오오토라디오그래프로, AIDS DNA 서열은 시료 368H(이는 후에 단지 HTLV III 양성 DNA로만 밝혀졌다)에서만 존재함을 알 수 있다. 나머지 10개의 시료는 다음과 같다:(a) 194BK=백혈병 환자(바이러스 분리아됨)로부터의 DNA (b) 342=HTLV I, (c) 367=HTLV I, (d) 361=HTLV I, (e) 207=공격성 백혈병(피부 병발) 환자, (f) 307=HTLV I 원형 세포 라인(현재까지 고도의 바이러스 DNA), (g) 308B=HTLV I, (h) 323=HTLV II, (i) 326=HTLV I, 및 (j) 340=공격성 백혈병((e)와는 다름) 환자.

그러므로, 사용된 프라이머는 DNA를 증폭시켜 프로브로 서열을 정확하게 검출할 수 있게 한다. 다른 시료는 10회의 추가의 증폭 사이클 동안에도 음성으로 남아 있다. 37°C에서 10% DMSO(2차 구조 형성을 최소화한다)하의 증폭은 또한 HTLV III 시료만이 유일한 양성 시료라는 것을 나타낸다.

[실시예2]

이 실시예에서는, 하기 서열을 갖는 프라이머 SK24 및 SK18을 사용하는 것을 제외하고는 실시예1에서 기술한 바와 동일한 방법을 사용한다:

5'-ATCCAGTAGGAGAA-3' (SK24)

5'-TTATGTCCAGAATGC-3' (SK18)

SK24의 대안은 하기 서열을 갖는 프라이머 SK25이다:

5'-ATAATCCACCTATCCCAG-3' (SK25)

사용된 프로브 SK19는 하기 서열을 갖는다: 5'→*ATCCTGGGATTAATAATAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTAC-3' (여기에서, *는 표지를 나타낸다). 프로브를 단락 III에서 기술한 바대로 표지한다. SK24 및 SK18은 HTLV III의 뉴클레오타이드 1552 내지 1642로부터의 gag 친수성 영역을 증폭시키는데 제공되도록 선택한다. SK25 및 SK18은 HTLV III 뉴클레오타이드 1541 내지 1642로부터의 gag 친수성 영역을 증폭시키는데 제공되도록 선택한다. SK19는, 증폭된 DNA에 아닐링되는 경우, Bst N I 부위를 재구성한다. 이 효소로 분해시키면 4-mer가 방출된다.

53°C에서 하이브리드화 및 제한에 대한 오오토라디오그래프로, 실시예1에서 밝혀진 HTLV III 시료만이 양성임을 알 수 있다. 모든 시료에서 나타나는 바탕 밴드는 하이브리드화 및 제한의 온도가 53°C로부터 60°C로 상승하면 사라진다. 상승된 온도는 프로브의 비-특이성 하이브리드화를 최소화한다고 간주된다.

[실시예 3]

Bam H I 말단을 포함한 186 염기쌍을 가지며, gag의 친수성 영역(HTLV III-분리 BH 10의 뉴클레오타이드 1470-1649)을 코드화하는 180bp DNA 단편은, 먼저 10개의 중복 올리고머를 T4 DNA 리가제를 사용하여 연결시킴으로써 작제한다. 올리고머는 제 2 도에 나타내었다. 생성된 단편을 시판되고 있는 M 13mp 10W의 Bam H I 부위에 클로닝시킨다. 서열화된 클론 어느것도 정확한 목적하는 서열을 갖지 않는다. 그러나, 제 3 도에서 나타난 2개의 클론(여기에서 X는 유전자에서의 돌연변이를 나타낸다)을 사용하여, 클론 M 13mp 10W:C7의 Spe I/Bst XI 단편 대신에 클론 M 13mp 10W:D6의 Spe I/Bst XI 단편으로 대체하여 정확한 서열을 갖는 클론을 작제한다. M 13mp 10W:C7로부터의 DNA를 Spe I 및 Bst XI로 분해시키고, 알칼리성 포스파타제로 처리한 다음 큰 벡터 함유 단편을 아가로오즈 겔로부터 정제한다. 클론 M 13mp 10W:D6로부터의 Spe I/Bst XI DNA 단편을 동일한 효소로 2회 분해시킨 후 폴리아크릴아미드 겔로부터 정제한다. M 13mp 10W:C7 및 M 13mp 10W:D6로부터의 정제된 단편을 연결하여, 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)으로부터 입수 가능한 이.콜라이 균주 DG 98을 형질 전환시킨다. 생성된 클론 M-13-GAG는 정확한 서열을 함유하며 1986년 1월 8일자로 ATCC 제40,218호 하에 ATCC에 기탁되어 있다.

이 M-13-GAG를 사용하여 상기 기술한 바대로 갭이 있는 환 프로브를 작제하여 비-동위원소 반점 블롯 형에서 증폭된 시료를 평가할 수 있다.

증폭된 생성물은, M-13-GAG에서 전체 180mer를 함유하고 하기 서열을 갖는 2개의 프라이머 SK23 및 SK28로부터 제조할 수 있다:

5'-ATGAGAGAACCAAGG-3' (SK23)

5'-CCTGTCTTATGTCCAG-3' (SK28)

뉴클레오타이드 1468과 1649 사이에서 증폭시키도록 선택한 이들 프라이머는 이미 프로브 SK19를 사용하여 시험한 결과 HTLV III 시료를 충분히 검출한다고 밝혀졌다.

[실시예4]

71개의 코드화 시료(이들 시료의 DNA는 실시예2에 기술한 방법을 사용하여 닥터 포이츠가 추출)를, HTLV III의 뉴클레오타이드 1555 내지 1642로부터의 gag 친수성 영역을 증폭시키도록 선택한, 실시예 1의 SK01 및 SK02, 또는 SK17 및 SK18(여기에서 SK18은 실시예2에서 정의한 바와 같고 SK17은 하기 서열을 갖는다:5'-CCAGTAGGAGAAAT-3'의 프라이머 쌍을 사용하여 이들의 DNA로 초기에 분석한다. 프라이머 쌍 SK17 및 SK18을 사용한 증폭은 37°C에서 중량당 10% DMSO 존재하에서, 다른 사항은 실시예 1의 방법에 따라, 수행한다. 증폭시킨 후, 실시예 1의 방법으로 프로브 SK03(실시예 1) 또는 SK19(실시예 2)를 사용하여 DNA를 탐지한다. 불명확한 시료중 일부는 실온에서 실시예 2의 프라이머 쌍 SK24 및 SK18, 및 프로브 SK19를 사용하여 더 분석한다.

이 결과, 본 발명의 시험으로 양성이라고 확인된 모든 시료는 HTLV III 분리물, LAV 분리물 및 닥터 포이즈로부터 확인된 AIDS-관련 바이러스(AAV)를 포함한 AIDS 또는 ARC 환자로부터 분리된 DNA임을 알 수 있다. 또한, AIDS 환자와 여러번 접촉한, 항체 양성이며 역 전사효소 음성인 건강한 동성연애 자도 프라이머 쌍의 양 세트에 의해 양성이라고 확인되었다. SK17-SK18 및 SK24-SK18 프라이머 쌍은 SK01-SK02 프라이머 쌍보다 더욱 양성을 검출한다고 나타났다.

음성 대조물 시료(정상적인 T세포, 감염되지 않은 세포라인 또는 HTLV II)어느것도 본 발명의 검증에서 양성으로 나타나지 않았다. 본 발명의 시험으로, 역 전사효소에 의해 음성으로 나타난 10개의 감염된 시료가 양성으로 확인되었다 한편, 역 전사효소에 의해 양성으로 나타난 5개의 시료(5개중 3개는 ±)는 본 발명의 시험으로 음성으로 나타났다. 모든 71개의 시료가 ELISA 양성으로 나타났는데, 이 결과 ELISA는 AIDS 바이러스에 대해서는 매우 판별력이 있거나 특이한 시험이 아님을 알 수 있다.

상기 실시예로 AIDS 바이러스 DNA 서열은 AIDS 또는 ARC 환자의 혈액, 정액 단핵 세포 및 정액 상등액으로 감염된 세포 라인에서 확인될 수 있음을 알 수 있다.

[실시예 5]

이 실시예는 바이러스를 먼저 배양하지 않고서도 신선한 혈액의 말초 단핵 세포에서 AIDS 바이러스 DNA 서열을 확인하는데 본 발명의 기술을 직접 적용할 수 있음을 설명해 준다.

AIDS 환자로부터의 코드화 혈액 시료를 닥터 포이즈가 다음과 같이 처리하였다: 먼저, 저-속도 원심 분리(약 3000×g)로 원심분리하여 모든 시료를 펠렛화하여 연충을 수득한다. 연충을 피콜-히페이그 밀도 칼럼(Ficoll-Hypaque density column)에 통과시키고 칼럼으로부터 백혈구를 수거한다. 실시예 1에서 기술된 방법으로 백혈구로부터 DNA를 추출한다.

DNA를 실시예 2 및 4에서 기술한 프라이머 쌍 SK17 및 SK18을 사용하고, 각각, 37°C에서 중량당 10% DMSO 존재하에 클레노우 단편 1단위, 2단위 및 4단위를 사용하여 실시예 1에서 기술한 방법으로 증폭시킨다. 증폭시킨 후, 실시예 1의 방법에 따라, 사용한 프로브는 SK03(실시예 1) 또는 SK19(실시예 2)이다. 불명확한 시료중 일부는 실온에서 실시예 2의 프라이머 쌍 SK24 및 SK18, 및 프로브 SK19를 사용하여 더 분석한다.

방사 노출시킨 결과, 일부의 AIDS 또는 ARC 환자로부터 분리한 DNA가 양성으로 확인됨을 알 수 있다.

프라이머 쌍 SK23 및 SK28(실시예 3에서 기술), 및 프로브 SK19(실시예 2)를 사용하여 실험을 반복한다. 하기 서열을 갖는 프라이머 쌍 SK32 및 SK33, 및 하기 서열을 갖는 프로브 SK34를 사용하여 실험을 다시 반복한다.

5'-ACCTGCCACCTGTAGTAG-3' (SK32)

5'-GCCATATTCCTGGACTACAG-3' (SK33)

5'-TAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGAGAAGCC-3' (SK34) 제한효소 Pvu II를 사용하여 SK34의 제한 부위를 절단한다.

6일동안 노출시킨 후 양 실험으로부터의 결과로 일부의 AIDS 또는 ARC 환자로부터 분리한 DNA가 양성으로 확인됨을 알 수 있다.

[실시예 6]

증폭시킬 목적하는 서열은 하기 기관[참조: Chuck Rogler of Albert Einstein College of Medicine]으로부터 입수한 마뮷류 간염 바이러스 분자 클론, 및 스탠포드 유니버시티로부터 수득한 pBR322에서 삽입물 pHBV1을 갖는 adw2 아형의 인간 B형 간염 클론에 함유되어 있으며 하기 문헌[참조: Sninsky et al., Nature 279:346-348(1979)]에 기술되어 있다.

증폭시킬 서열, 프라이머, 및 프로브는 상기에서 기술한 바대로 반점 매트릭스 프로그램으로 확인하는데, 여기에서 선택된 서열 윈도우는 적어도 20 염기쌍 길이이므로, 서열은 헤파드나바이러스의 보존된 영역내에서 선택된다. 서열화된 바이러스 제놈 및 이의 변종을 쌍별로 비교한 후 인접한 동종 염기 20개의 영역의 위치를 찾아낸다.

I. 프라이머의 합성

하기 서열을 갖는, 2개의 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 프라이머 MD03 및 MD06을 각각 실시예 1의 단락 1에서 기술한 방법으로 제조한다:

5'-CTCAAGTTCATCATCCATATA-3' (MD03)

5'-CTTGGATCCTATGGGAGTGG-3' (MD06)

이들 프라이머는 헤파드나바이러스의 폴리머라제 유전자로부터 선택한다.

II. 증폭반응

각각의 플라스미드 10pmole을 10mM 트리스-HCl, pH 7.5, 50mM 염화나트륨 및 10mM 염화마그네슘으로 이루어지고 프라이머 MC03 100pmole, 프라이머 MD06 100pmole, DMSO 10중량%, dATP, dCTP, dGTP 및 TTP 각각 150nmole을 함유하는 완충액 100 μl에 가한다.

생성된 용액을 실온 대신 37°C에서 행하는 것을 제외하고는, 실시예 1의 단락 11에서 기술한 바대로, 25회 처리한다.

III. 프로브의 합성 및 인산화

하기 서열을 갖는, 표지한 DNA 프로브 MD09

5'-*GGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTCCATTTGTTTC-3' (여기에서, *는 표지를 나타낸다)를 실시예 1의 단락 I에서 기술한 방법에 따라 합성한다. 프로브는 실시예 1의 단락 III에서 기술한 바대로 표지한다.

IV. 프로브를 사용하여 하이브리드화/분해시키는 반응

Dde I을 제한 효소로 사용하여 프로브를 절단하는 것을 제외하고는, 실시예 1의 단락 IV에 기술된 방법에 따라 하이브리드화 및 분해시킨다.

[V. 결과]

오오토라이오그램으로, 증폭이 발생되지 않는 대조물(SC-1, 이는 1985년 3월 19일자로 ATCC에 기탁되어 있으며 간염 제논이 없는 검상 적혈구 대립 형질에 대해 동질 접합성인 EBV-형질 전환된 B 세포 라인이다)과 비교해 볼 때 본 발명의 프라이머를 사용하는 경우 시그널이 생성됨을 알 수 있다. 그러므로, 헤파드나바이러스의 증폭은 본 발명의 기술을 사용하는 경우 가능하다.

상기 실험을, 프라이머 MD06 및 MD03 대신에 하기 서열을 갖는 프라이머 MD14 및 MD13을 사용하여 수행하는 경우에도 결과는 동일하다:

5'-GCGGGATCCCATCTTCTTATTGGTCTTCTGG-3' (MD14)

5'-GCGAAGCTTGTAGGGTTAAATGTATACCC-3' (MD13)

이들 프라이머는 헤파드나바이러스의 외피 유전자로부터 선택한다.

하기 기탁은 하기 기재한 날짜에 행했다:

균주	기탁일	기탁번호
M13-GAG	1986년 1월 8일	제40,218호

이 기탁은 특허 절차의 진행을 목적으로 부다페스트 조약(Budapest Treaty)의 규정 및 이에 따른 규칙하에서 공인된 국제 미생물 기탁 기관에서 행한 것이다. 이것은 기탁일로부터 30년동안 생배양물로 보존된다. 유기체는 부다페스트 조약의 약정하에 ATCC로부터 입수 가능하고, 출원인과 ATCC 사이의 계약에 따르며, 이는 해당 미합중국 특허의 허여시, 또는 미합중국 또는 외국 특허원의 공개시 어느 것이 먼저든 이 배양물의 후손을 영구적이고 비제한적으로 이용할 수 있음을 보장하고, 35 USC § 122 및 이에 의한 청장 규정(특히 886 OG 638에 관한 37 CFR § 1.14 포함)에 따라 미합중국 특허 상표청장에 의해 권한을 받은 자가 자손을 이용할 수 있음을 보장한다. 본 출원의 양수인은 만약 기탁된 배양물이 적당한 조건하에서 배양할 때 사멸하거나 분실 또는 파괴될 경우, 통지시 즉시 동일 배양물의 생존 표본으로 대체해다 한다. 기탁된 균주의 이용은 특허법에 따라 정부의 권한하에 인정된 권리에 위배하여 발명을 시행하는데 대한 허가로 해석되지는 않는다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

(a) 시료를 하이브리드화 조건하에서, 핵산 서열 각 본쇄에 대한 올리고뉴클레오타이드 프라이머, 4개의 상이한 뉴클레오사이드 트리포스페이트 및 중합화제로 함께 또는 별도로 처리하여, 1개의 프라이머로부터 합성된 연장 생성물이 이의 보체로부터 분리되는 경우에 다른 프라이머의 연장 생성물을 합성하기 위한 주형으로서 제공될 수 있도록, 핵산 서열의 각 본쇄에 대하여 검출되거나 모니터링될 핵산의 서열의 각 본쇄에 대해 거의 상보적인 각 프라이머의 연장 생성물을 합성하고; (b) 시료를 변성 조건하에서 처리하여, 검출하고자 하는 서열이 존재하는 경우, 프라이머 연장 생성물을 이들의 주형으로부터 분리시키고; (c) 단계(b)에서 생성된 일본쇄 각각을 주형으로서 사용하여 프라이머 연장 생성물을 합성하여, 검출하고자 하는 서열이 존재하는 경우 증폭되도록, 단계(b)의 생성물을 올리고뉴클레오타이드 프라이머로 처리한 다음; (d) 검출하고자 하는 서열이 시료에 존재하는지를 측정함을 특징으로 하여, 바이러스 분리물 중에 거의 보존되어 있고 상기 바이러스에서 핵산에 대해 특이적이며 시료에 함유되어 있을 것으로 예상되는 핵산 서열의 존재 또는 부재를 검출하거나 모니터링하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 단계(d)가 (1) 단계(c)의 생성물에 증폭된 핵산 서열과 하이브리드화 가능한 표지된 프로브를 가한 다음; (2) 핵산 시료중에서 프로브가 증폭된 서열에 하이브리드화 되었는지를 측정하는 단계로 이루어지는 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 2 항에 있어서, 단계(a)에서 시료를, 시료중의 바이러스를 먼저 배양하지 않고서 처리하는 방법.

청구항 4

제 1 또는 2 항에 있어서, 바이러스가 AIDS 바이러스, 헤파드나바이러스 또는 포진 바이러스인 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 단계(b)와 (c)를 적어도 1회 반복하고, 프라이머를 AIDS 제놈의 gag 영역, 및 헤파드나바이러스의 폴리머라제 및 외피 유전자로부터 선택하는 방법.

청구항 6

제 1 또는 2 항에 있어서, 상기 핵산이 DNA인 방법.

청구항 7

제 1 또는 2 항에 있어서, 상기 핵산이 RNA인 방법.

청구항 8

제 1 또는 2 항에 있어서, 상기 중합화제가 이.콜라이 DNA 폴리머라제 I, 이.콜라이 DNA 폴리머라제 I의 클레노우 단편, 역전사 효소, 및 핵산을 변성시키기에 충분한 온도를 노출시킨 후에도 이의 효소활성을 유지하고 있어 단계(a) 및 (c) 동안의 반응 온도에서 상기 연장 생성물을 형성시키는 효소로 이루어진 그룹중에서 선택된 효소인 방법.

청구항 9

제 2 항에 있어서, 단계(2)가 (1) 단계(d)로부터의 하이브리드화 혼합물을, 프로브중에서 서열내의 위치를 인식하는 제한 효소로 분해한 다음, (2) 제한 분해물이 검출하고자 하는 바이러스 서열의 존재와 관련이 있는 제한 단편을 함유하는지를 검출하는 단계로 이루어지는 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 바이러스가 AIDS 바이러스이고, 단계(1) 및 (2)에서, AIDS 바이러스 제놈의 서열을 갖는 핵산 하나 이상을 함유하는 양성 대조물(control) 및/또는 AIDS 분리물중으로부터의 서열을 갖는 핵산(들)을 하나로 함유하지 않는 음성 대조물을 사용하는 방법.

청구항 11

제 2 항에 있어서, 단계(1)이 (1) 단계(c)의 생성물을 막상에 스포팅(spotting)한 다음; (2) 프로브를 스포팅한 막에 가하는 단계로 이루어지는 방법.

청구항 12

제 2 항에 있어서, 단계(1)이 (1) 프로브를 막상에 스포팅한 다음; (2) 단계(c)의 생성물을 스포팅한 막에 가하는 단계로 이루어지는 방법.

청구항 13

(a) 증폭되지 않은 형태의 핵산 서열을 함유하는 시료를 하이브리드화 조건하에서, 핵산 서열 각 본체에 대한 올리고뉴클레오타이드 프라이머, 4개의 상이한 뉴클레오사이드 트리포스페이트 및 중합화제로 함께 또는 별도로 처리하여, 1개의 프라이머로부터 합성된 연장 생성물이 이의 보체로부터 분리되는 경우에 다른 프라이머의 연장 생성물을 합성하기 위한 주형으로서 제공될 수 있도록, 핵산 서열의 각 본체에 대하여 검출되거나 모니터링할 핵산 서열의 각 본체에 거의 상보적인 프라이머 연장 생성물을 합성하고; (b) 프라이머 연장 생성물을 이들이 합성된 주형으로부터 분리하여 일본쇄 분자를 수득한 다음; (c) 단계(b)에서 생성된 일본쇄 각각을 주형으로 사용하여 프라이머 연장 생성물을 합성함으로써 핵산 서열이 증폭되도록, 단계(b)의 생성물을 올리고뉴클레오타이드 프라이머로 처리하여 생성된, 바이러스 분리물중에 거의 보존되어 있고 바이러스에서 핵산에 대해 특이적인 증폭된 핵산 서열을 함유하는 조성물.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 바이러스가 AIDS 바이러스 또는 헤파드나바이러스인 조성물.

청구항 15

(a) 검출하고자 하는 핵산 서열의 각 본체에 대한 올리고뉴클레오타이드 프라이머[여기에서, 프라이머 또는 프라이머들은, 1개의 프라이머로부터 합성된 연장 생성물이 이의 보체로부터 분리되는 경우에 다른 프라이머의 연장 생성물을 합성하기 위한 주형으로서 제공될 수 있도록 각각의 특정 핵산 서열의 각 본체에 대해 거의 상보적이다]; 및 (b) 핵산 서열과 하이브리드화 가능한 표지된 프로브로 이루어짐을 특징으로 하여, 바이러스에서 핵산중에 거의 보존되어 있고 바이러스에서 핵산에 대해 특이적이고 시료에 함유되어 있을 것으로 예상되는 핵산 서열의 존재 또는 부재를 검출하거나 모니터링하기 위한 키트.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 바이러스가 AIDS 바이러스 또는 헤파드나바이러스인 키트.

청구항 17

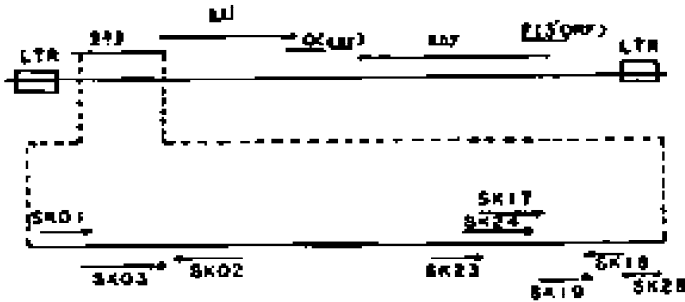
제 15 또는 16 항에 있어서, 중합화제, 4개의 상이한 뉴클레오사이드 트리포스페이트 각각, 및 상기 프로브와 상기 서열과의 하이브리드를 검출하는 수단을 추가로 함유하는 키트.

청구항 18

제15 또는 16항에 있어서, 바이러스가 AIDS 바이러스이고, 키트가 AIDS 바이러스 제능의 서열을 갖는 핵산 하나 이상을 함유하는 양성 대조물 및/또는 AIDS 바이러스중으로부터의 서열을 갖는 핵산(들)을 하나도 함유하지 않는 음성 대조물, 및 프로브중에서 서열내에 함유되어 있는 특정 제한 부위에서 예상되는 서열을 함유하는 핵산을 절단할 수 있는 하나의 제한 효소를 추가로 함유하는 키트.

도면

도면1



*- LTR

도면2

5' GATCCGAGAGAACCAAGGGGAGTGACATAGCAGGAAGTAACTAGTACC
 GCTCTCTTGGTCCCECTCACTGTATCGTCCCTGATGATCAATGG
 SK07 SK16

CTTCAGGAGCAAAATAGGATGCGATGACAAATATCCAGCTATCCAGT
 GAAATCCCTGTTTATECTALCCTALGTTTATTAGGTGGATAGGGTCA
 SK08 SK13

AGGAGAAATCTATAAAGATGGATAATCCTGGGATTAAATAAATA
 TCCCTTTAGATATTTTCTACCTATTAGGACCTAATTTATTTAAE
 SK09 SK14

GTANGAATGTATAGCCCTACCAGCATTTCTGGACATAGACAGGG 3'
 CATTCTACATATCCGATGCTGGAGACCTGTATTGTGTCCTAG
 SK10 SK11 SK12 SK13

도면3

