



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0100415
(43) 공개일자 2016년08월23일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12Q 1/6834 (2013.01)
C12Q 1/6813 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-7022204(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2012년09월28일
심사청구일자 2016년08월16일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2014-7011120
원출원일자(국제) 2012년09월28일
심사청구일자 2014년09월11일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2016년08월12일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2012/057985</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2013/049613
국제공개일자 2013년04월04일</p> <p>(30) 우선권주장
61/540,868 2011년09월29일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
루미넥스 코퍼레이션
미합중국 텍사스주 78727-6115 오스틴시 테크놀로지 불리버드가 12212</p> <p>(72) 발명자
슈레이더, 브라이언
미합중국, 78727 텍사스, 오스틴, 트랜짓 12705
휘트먼, 더글러스, 에프.
미합중국, 78681 텍사스, 라운드 락, 레이스 오크 루프 1204</p> <p>(74) 대리인
특허법인오리진</p> |
|--|---|

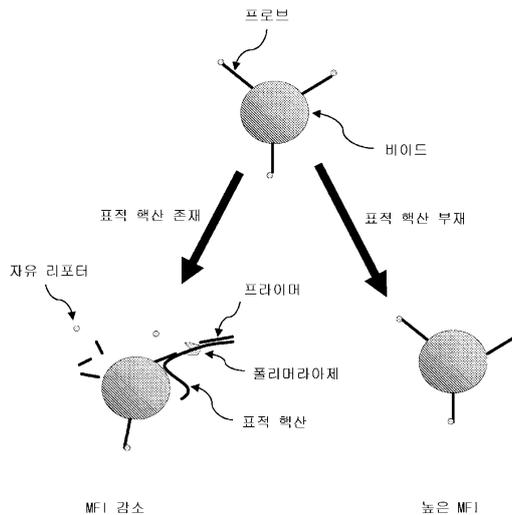
전체 청구항 수 : 총 118 항

(54) 발명의 명칭 **가수분해 프로브**

(57) 요약

핵산의 검출 및 정량을 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 하나의 구현예에서, 샘플을, 표적 핵산의 첫번째 영역에 상보적인 프라이머 및 첫번째 영역의 표적 핵산 다운스트림의 두번째 영역에 상보적인 프로브와, 표적 핵산과 프라이머 및 프로브와의 혼성화에 적합한 조건 하에서 접촉시킨다. 본 구현예에서 프로브는 형광단을 포함하고 고체 지지체에 부착되어 있다. 혼성화된 프로브를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 절단시켜 고체 지지체로부터 리포터를 방출시킨다. 이후 표적 핵산의 존재를 고체 지지체 상의 리포터로부터의 신호 감소를 감지함으로써 검출하고 임의로 정량한다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는, 샘플에서의 표적 핵산의 검출 방법:

(a) 샘플을, 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 첫번째 표적-특이적 프라이머, 및 첫번째 영역의 표적 핵산 다운스트림의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 상보적인 표적-특이적 프로브와, 표적 핵산과 첫번째 표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브와의 혼성화에 적합한 조건 하에서 접촉시키는 단계, 이때 상기 표적-특이적 프로브는 리포터를 포함하며 고체 지지체에 부착되어 있음;

(b) 혼성화된 표적-특이적 프로브를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 절단하여, 상기 리포터를 고체 지지체로부터 방출시키는 단계; 및

(c) 고체 지지체 상의 상기 리포터로부터의 신호 변화를 감지하여, 표적 핵산을 검출하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서,

첫번째 표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브가 표적 핵산 상의 인접 서열에 혼성화하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

첫번째 표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브가 표적 핵산 상의 비-인접 서열에 혼성화하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

첫번째 표적-특이적 프라이머를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 신장시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

고체 지지체가 코드화된 비이드인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

리포터가 형광단인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

형광단이 표적-특이적 프로브의 5' 말단에 부착되어 있는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

신호 변화가 형광 신호의 감소인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,
리포터가 형광단 및 소광제 쌍인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,
신호 변화가 형광 신호의 증가인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,
고체 지지체에 부착되어 있는 비-혼성화 프로브 상의 리포터로부터 참조 신호를 감지하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,
비-혼성화 프로브가, 상기 표적-특이적 프로브가 부착되어 있는 동일한 고체 지지체 상에 공간적으로 별개의 장소에 부착되어 있는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,
비-혼성화 프로브가, 상기 표적-특이적 프로브가 부착되어 있는 지지체와 상이한 고체 지지체에 부착되어 있는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,
상이한 고체 지지체가 상이한 코드화된 비이드인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서,
상기 표적 핵산이 첫번째 표적 핵산이고, 상기 리포터가 첫번째 리포터이고, 상기 고체 지지체가 첫번째 고체 지지체이며,

상기 방법은 하기 단계를 추가로 포함하는 방법:

- (a) 샘플을, 두번째 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 두번째 표적-특이적 프라이머, 및 첫번째 영역의 두번째 표적 핵산 다운스트림의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 상보적인 두번째 표적-특이적 프로브와, 두번째 표적 핵산과 두번째 표적-특이적 프라이머 및 두번째 표적-특이적 프로브와의 혼성화에 적합한 조건 하에서 접촉시키는 단계, 이때 상기 두번째 표적-특이적 프로브는 두번째 리포터를 포함하며 두번째 고체 지지체에 부착되어 있음;
- (b) 두번째 혼성화된 표적-특이적 프로브를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 절단하여, 상기 두번째 리포터를 두번째 고체 지지체로부터 방출시키는 단계; 및
- (c) 두번째 고체 지지체 상의 상기 두번째 리포터로부터의 신호 변화를 감지하여, 두번째 표적 핵산을 검출하는 단계.

청구항 16

제15항에 있어서,
첫번째 고체 지지체 및 두번째 고체 지지체가 하나의 고체 지지체 상에 공간적으로 별개의 장소에 있는 방법.

청구항 17

제15항에 있어서,
첫번째 고체 지지체가 두번째 고체 지지체로부터 물리적으로 분리되어 있는 방법.

청구항 18

제15항에 있어서,
첫번째 리포터 및 두번째 리포터가 동일한 방법.

청구항 19

제15항에 있어서,
첫번째 리포터 및 두번째 리포터가 상이한 방법.

청구항 20

제11항에 있어서,
시간에 따른 형광의 변화를 정규화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 21

제1항에 있어서,
샘플을 표적 핵산의 두번째 가닥 상의 영역에 상보적인 두번째 표적-특이적 프라이머와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서,
복합 폴리머리아제 연쇄 반응 사이클을 수행하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서,
복합 폴리머리아제 연쇄 반응 사이클이, 사이클 사이에 자유-부유 형광단을 제거하기 위한 세정 단계 없이 수행되는 방법.

청구항 24

제22항에 있어서,
고체 지지체 상의 리포터로부터의 신호 변화를 감지하는 단계가 복합 폴리머리아제 연쇄 반응 사이클을 수행하기 전·후의 신호를 감지하는 것을 포함하는 방법.

청구항 25

제22항에 있어서,
고체 지지체 상의 리포터로부터의 신호 변화를 감지하는 단계가 복합 폴리머리아제 연쇄 반응 사이클을 수행한 후의 신호만을 감지하는 것을 포함하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서,
고체 지지체 상의 리포터로부터 감지된 신호를 고체 지지체 상의 리포터의 신호의 미리 결정된 비로 고체 지지체에 부착된 비-혼성화 프로브 상의 리포터로부터의 참조 신호와 비교하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 27

제22항에 있어서,
 샘플 내 표적 핵산의 양을 정량하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서,
 샘플 내 핵산 표적의 양을 정량하는 단계가 표준 곡선을 사용하는 것을 포함하는 방법.

청구항 29

제27항에 있어서,
 샘플 내 핵산 표적의 양을 정량하는 단계가 핵산 표적의 상대적 양을 측정하는 것을 포함하는 방법.

청구항 30

제27항에 있어서,
 샘플 내 핵산 표적의 양을 정량하는 단계가 종료시점 정량화를 사용하는 것을 포함하는 방법.

청구항 31

제27항에 있어서,
 샘플 내 핵산 표적의 양을 정량하는 단계가 배경을 넘어 신호가 감지가능한 PCR 사이클 횟수를 존재하는 표적의 양과 연관시킴으로써 핵산 표적의 양을 측정하는 것을 포함하는 방법.

청구항 32

제1항에 있어서,
 혼성화된 표적-특이적 프로브를 절단하기 전에 고체 지지체 상의 리포터로부터 신호를 감지하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 33

제1항에 있어서,
 표적-특이적 프로브와 고체 지지체 사이에 연결자를 추가로 포함하는 방법.

청구항 34

하기 단계를 포함하는, 샘플에서의 표적 핵산의 검출 방법:

- (a) 샘플을, 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 첫번째 표적-특이적 프라이머, 및 첫번째 영역의 표적 핵산 다운스트림의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 상보적인 표적-특이적 프로브와, 표적 핵산과 첫번째 표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브와의 혼성화에 적합한 조건 하에서 접촉시키는 단계, 이때 상기 표적-특이적 프로브는 그의 5' 또는 3' 말단에 태그, 및 리포터를 포함함;
- (b) 혼성화된 표적-특이적 프로브를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 절단하여 상기 리포터를 태그로부터 방출시키는 단계;
- (c) 상기 태그를 고체 지지체 상에 부동화된 상보적인 안티-태그에 혼성화시키는 단계; 및
- (d) 고체 지지체 상의 상기 리포터로부터의 신호 감소를 감지함으로써 표적 핵산을 검출하는 단계.

청구항 35

제34항에 있어서,
 첫번째 표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브가 표적 핵산 상의 인접 서열에 혼성화하는 방법.

청구항 36

제34항에 있어서,

첫번째 표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브가 표적 핵산 상의 비-인접 서열에 혼성화되는 방법.

청구항 37

제34항에 있어서,

첫번째 표적-특이적 프라이머를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 신장시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 38

제34항에 있어서,

혼성화된 표적-특이적 프로브를 절단하여 상기 리포터 분자를 태그로부터 방출시키기 전에 표적-특이적 프로브를 고체 지지체 상에 부동화된 안티-태그에 혼성화시키는 단계; 및 고체 지지체 상의 리포터로부터의 신호를 감지하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 39

제34항에 있어서,

리포터가 비오틴 또는 형광단인 방법.

청구항 40

제34항에 있어서,

고체 지지체가 코드화된 비이드인 방법.

청구항 41

제34항에 있어서,

상기 표적 핵산이 첫번째 표적 핵산이고, 상기 리포터가 첫번째 리포터이고, 상기 태그가 첫번째 태그이고, 상기 고체 지지체가 첫번째 고체 지지체이며,

상기 방법이 하기 단계를 추가로 포함하는 방법:

- (a) 샘플을, 두번째 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 두번째 표적-특이적 프라이머, 및 첫번째 영역의 두번째 표적 핵산 다운스트림의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 상보적인 두번째 표적-특이적 프로브와, 두번째 표적 핵산과 두번째 표적-특이적 프라이머 및 두번째 표적-특이적 프로브와의 혼성화에 적합한 조건 하에서 접촉시키는 단계, 이때 상기 두번째 표적-특이적 프로브는 그의 5' 또는 3' 말단에 두번째 태그, 및 두번째 리포터를 포함함;
- (b) 두번째 혼성화된 표적-특이적 프로브를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 절단하여 상기 두번째 리포터를 두번째 태그로부터 방출시키는 단계;
- (c) 상기 두번째 태그를 두번째 고체 지지체 상에 부동화된 상보적인 두번째 안티-태그에 혼성화시키는 단계; 및
- (c) 두번째 고체 지지체 상의 상기 두번째 리포터로부터의 신호 감소를 감지함으로써 두번째 표적 핵산을 검출하는 단계.

청구항 42

제41항에 있어서,

첫번째 고체 지지체 및 두번째 고체 지지체가 하나의 고체 지지체 상에 공간적으로 별개의 장소에 있는 방법.

청구항 43

제41항에 있어서,
첫번째 고체 지지체가 두번째 고체 지지체로부터 물리적으로 분리되어 있는 방법.

청구항 44

제41항에 있어서,
첫번째 리포터 및 두번째 리포터가 동일한 방법.

청구항 45

제41항에 있어서,
첫번째 리포터 및 두번째 리포터가 상이한 방법.

청구항 46

제34항에 있어서,
샘플을 표적 핵산의 두번째 가닥 상의 영역에 상보적인 두번째 표적-특이적 프라이머와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 47

제46항에 있어서,
복합 폴리머라아제 연쇄 반응 사이클을 수행하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 48

제47항에 있어서,
복합 폴리머라아제 연쇄 반응 사이클이, 사이클 사이에 자유-부유 형광단을 제거하기 위한 세정 단계 없이 수행되는 방법.

청구항 49

제47항에 있어서,
고체 지지체 상의 리포터로부터의 신호 감소를 감지하는 단계가 복합 폴리머라아제 연쇄 반응 사이클을 수행하기 전·후의 신호를 감지하는 것을 포함하는 방법.

청구항 50

제47항에 있어서,
고체 지지체 상의 리포터로부터의 신호 감소를 감지하는 단계가 복합 폴리머라아제 연쇄 반응 사이클을 수행한 후의 신호만을 감지하는 것을 포함하는 방법.

청구항 51

제47항에 있어서,
샘플 내 표적 핵산의 양을 정량하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 52

제51항에 있어서,
샘플 내 핵산 표적의 양을 정량하는 단계가 표준 곡선을 사용하는 것을 포함하는 방법.

청구항 53

제51항에 있어서,

샘플 내 핵산 표적의 양을 정량하는 단계가 종료시점 정량화를 사용하는 것을 포함하는 방법.

청구항 54

제51항에 있어서,

샘플 내 핵산 표적의 양을 정량하는 단계가 배경을 넘어 신호가 감지가능한 PCR 사이클 횟수를 존재하는 표적의 양과 연관시킴으로써 핵산 표적의 양을 측정하는 것을 포함하는 방법.

청구항 55

제51항에 있어서,

샘플 내 핵산 표적의 양을 정량하는 단계가 핵산 표적의 상대적 양을 측정하는 것을 포함하는 방법.

청구항 56

제34항에 있어서,

안티-태그와 고체 지지체 사이에 연결자를 추가로 포함하는 방법.

청구항 57

하기 단계를 포함하는, 샘플에서의 표적 핵산의 검출 방법:

(a) 샘플을, 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 첫번째 표적-특이적 프라이머, 및 첫번째 영역의 표적 핵산 다운스트림의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 상보적인 표적-특이적 프로브와, 표적 핵산과 첫번째 표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브와의 혼성화에 적합한 조건 하에서 접촉시키는 단계, 이때 상기 표적-특이적 프로브는 그의 5' 또는 3' 말단에 태그 서열에 연결된 형광단을, 상기 형광단 및 태그 서열의 반대 말단에 비오틴을 포함함;

(b) 혼성화된 표적-특이적 프로브를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 절단하여, 형광단을 비오틴으로부터 분리하도록 하는 단계;

(c) 샘플로부터 비오틴을 제거하는 단계; 및

(d) 형광단으로부터의 신호를 감지함으로써 표적 핵산을 검출하는 단계.

청구항 58

제57항에 있어서,

표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브가 표적 핵산 상의 인접 서열에 혼성화되는 방법.

청구항 59

제57항에 있어서,

표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브가 표적 핵산 상의 비-인접 서열에 혼성화되는 방법.

청구항 60

제57항에 있어서,

표적-특이적 프라이머를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 신장시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 61

제57항에 있어서,

샘플로부터 비오틴을 제거하는 단계가, 샘플을 자성 아비딘 코팅된 비이드와 접촉시켜 비오틴을 결합시키고, 비

오티-결합된 자성 아비딘 코팅된 비이드를 제거하는 것을 포함하는 방법.

청구항 62

제57항에 있어서,

샘플을 표적 핵산의 두번째 가닥 상의 영역에 상보적인 두번째 표적-특이적 프라이머와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 63

제62항에 있어서,

샘플로부터 비오틴을 제거하기 전에 복합 폴리머라아제 연쇄 반응 사이클을 수행하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 64

하기 단계를 포함하는, 샘플에서의 표적 핵산의 양의 정량 방법:

(a) 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제, 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 첫번째 프라이머 및 표적 핵산의 두번째 가닥 상의 영역에 상보적인 두번째 프라이머를 포함하는 표적-특이적 프라이머 쌍, 및 첫번째 영역의 표적 핵산 다운스트림의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 상보적인 표적-특이적 프로브의 존재 하에서, 표적 핵산을 증폭시키는 단계로서, 상기 표적-특이적 프로브는 리포터를 포함하고 고체 지지체에 부착되어 있고, 추가로 표적 핵산의 첫번째 가닥을 따라 첫번째 프라이머를 신장시킬 때 핵산 폴리머라아제가 표적-특이적 프로브를 절단시켜 고체 지지체로부터 리포터를 방출시키는 단계;

(c) 첫번째에 고체 지지체 상의 리포터로부터 첫번째 신호 및 두번째에 고체 지지체 상의 리포터로부터 두번째 신호를 감지하는 단계; 및

(d) 신호 변화를 샘플 내 표적 핵산의 양과 연관시키는 단계.

청구항 65

제64항에 있어서,

샘플 내 표적 핵산의 양을 정량하는 단계가 표준 곡선을 사용하는 것을 포함하는 방법.

청구항 66

제64항에 있어서,

샘플 내 표적 핵산의 양을 정량하는 단계가 표적 핵산의 상대적 양을 측정하는 것을 포함하는 방법.

청구항 67

제64항에 있어서,

세번째에 고체 지지체 상의 리포터로부터 적어도 세번째 신호를 감지하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 68

제64항에 있어서,

혼성화된 표적-특이적 프로브를 절단시켜 고체 지지체로부터 리포터를 방출시키기 위해 표적-특이적 프라이머를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 신장시키기 전에 고체 지지체 상의 리포터로부터 신호를 감지하는 것을 포함하는 방법.

청구항 69

제64항에 있어서,

고체 지지체가 코드화된 비이드인 방법.

청구항 70

제64항에 있어서,
 샘플 내 다수의 상이한 표적 핵산의 양을 정량하는 것을 포함하는 방법.

청구항 71

제64항에 있어서,
 리포터가 형광단인 방법.

청구항 72

제71항에 있어서,
 형광단이 표적-특이적 프로브의 5' 말단에 부착되어 있는 방법.

청구항 73

제71항에 있어서,
 신호 변화가 형광 신호의 감소인 방법.

청구항 74

제64항에 있어서,
 리포터가 형광단 및 소광제 쌍인 방법.

청구항 75

제74항에 있어서,
 신호 변화가 형광 신호의 증가인 방법.

청구항 76

하기 단계를 포함하는, 샘플에서의 표적 핵산의 양의 정량 방법:

- (a) 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제, 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 첫번째 프라이머 및 표적 핵산의 두번째 가닥 상의 영역에 상보적인 두번째 프라이머를 포함하는 표적-특이적 프라이머 쌍, 및 첫번째 영역의 표적 핵산 다운스트림의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 상보적인 표적-특이적 프로브의 존재 하에서, 표적 핵산과 표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브와의 혼성화에 적합한 조건 하에 표적 핵산을 증폭시키는 단계로서, 상기 표적-특이적 프로브는 그의 5' 또는 3' 말단에 태그, 및 리포터를 포함하고, 추가로 표적 핵산의 첫번째 가닥을 따라 첫번째 프라이머를 신장시킬 때 핵산 폴리머라아제가 표적-특이적 프로브를 절단시켜 고체 지지체로부터 리포터를 방출시키는 단계;
- (b) 첫번째에 고체 지지체 상의 리포터로부터 첫번째 신호를 감지하고, 두번째에 고체 지지체 상의 리포터로부터 두번째 신호를 감지하는 단계; 및
- (c) 신호 변화를 샘플 내 표적 핵산의 양과 연관시키는 단계.

청구항 77

제76항에 있어서,
 샘플 내 표적 핵산의 양을 정량하는 단계가 표준 곡선을 사용하는 것을 포함하는 방법.

청구항 78

제76항에 있어서,
 샘플 내 표적 핵산의 양을 정량하는 단계가 표적 핵산의 상대적 양을 측정하는 것을 포함하는 방법.

청구항 79

제76항에 있어서,
세번째에 고체 지지체 상의 리포터로부터 적어도 세번째 신호를 감지하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 80

제76항에 있어서,
혼성화된 표적-특이적 프로브를 절단시켜 고체 지지체로부터 리포터를 방출시키기 위해 첫번째 프라이머를 엑소 뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 신장시키기 전에 고체 지지체 상의 리포터로부터 신호를 감지하는 것을 포함하는 방법.

청구항 81

제76항에 있어서,
고체 지지체가 코드화된 비이드인 방법.

청구항 82

제76항에 있어서,
샘플 내 다수의 상이한 표적 핵산의 양을 정량하는 것을 포함하는 방법.

청구항 83

제76항에 있어서,
리포터가 형광단인 방법.

청구항 84

제83항에 있어서,
형광단이 표적-특이적 프로브의 5' 말단에 부착되어 있는 방법.

청구항 85

제83항에 있어서,
신호 변화가 형광 신호의 감소인 방법.

청구항 86

제76항에 있어서,
리포터가 형광단 및 소광제 쌍인 방법.

청구항 87

제86항에 있어서,
신호 변화가 형광 신호의 증가인 방법.

청구항 88

하기 단계를 포함하는, 샘플에서의 표적 핵산의 양의 정량 방법:

(a) 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제, 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 첫번째 프라이머 및 표적 핵산의 두번째 가닥 상의 영역에 상보적인 두번째 프라이머를 포함하는 표적-특이적 프라이머 쌍, 및 첫번째 영역의 표적 핵산 다운스트림의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 상보적인 표적-특이적 프로브의 존재 하에서, 표적 핵산과 표적-특이적 프라이머 쌍 및 표적-특이적 프로브와의 혼성화에 적합한 조건 하에 표적 핵산을 증폭시키는 단계로서, 상기 표적-특이적 프로브는 그의 5' 또는 3' 말단에 태그 및 형광단을,

상기 태그 및 형광단의 반대 말단에 비오틴을 포함하고, 추가로 표적 핵산을 따라 표적-특이적 프라이머를 신장시킬 때 핵산 폴리머라아제가 혼성화된 표적-특이적 프로브를 절단시켜 비오틴으로부터 형광단을 분리하는 단계;

- (b) 샘플로부터 비오틴을 제거하는 단계;
- (c) 태그 서열을 고체 지지체 상의 상보적인 안티-태그 서열에 혼성화시키는 단계;
- (d) 고체 지지체 상의 형광단으로부터 형광 신호를 감지하는 단계; 및
- (e) 형광 신호를 샘플 내 핵산의 양과 연관시키는 단계.

청구항 89

제88항에 있어서,
 샘플 내 표적 핵산의 양을 정량하는 단계가 표준 곡선을 사용하는 것을 포함하는 방법.

청구항 90

제88항에 있어서,
 샘플 내 표적 핵산의 양을 정량하는 단계가 표적 핵산의 상대적 양을 측정하는 것을 포함하는 방법.

청구항 91

제88항에 있어서,
 샘플 내 다수의 상이한 표적 핵산의 양을 정량하는 것을 포함하는 방법.

청구항 92

하기 구성요소를 포함하는 조성물:

- (a) 2개 이상의 상이한 프라이머-프로브 세트, 여기서 각각의 프라이머-프로브 세트는 하기 구성요소를 포함함:
 - (i) 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 첫번째 프라이머,
 - (ii) 표적 핵산의 두번째 가닥 상의 영역에 상보적인 두번째 프라이머; 및
 - (iii) 구별되게 코드화된 입자에 공유적으로 부착되어 있는 표지된 표적-특이적 프로브, 여기서 상기 표지된 표적-특이적 프로브는 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 특이적으로 혼성화될 수 있고, 두번째 영역은 첫번째 영역의 다운스트림임.

청구항 93

제92항에 있어서,
 5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 폴리머라아제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 94

제92항에 있어서,
 구별되게 코드화된 입자에 공유적으로 부착되어 있는 수동적 참조 프로브를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 95

제92항에 있어서,
 8개 이상의 상이한 프라이머-프로브 세트를 포함하는 조성물.

청구항 96

하기 구성요소를 포함하는 키트:

- (a) 2개 이상의 상이한 프라이머-프로브 세트, 여기서 각각의 프라이머-프로브 세트는 하기 구성요소를 포함함:
 - (i) 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 첫번째 프라이머,
 - (ii) 표적 핵산의 두번째 가닥 상의 영역에 상보적인 두번째 프라이머; 및
 - (iii) 구별되게 코드화된 입자에 공유적으로 부착되어 있는 표지된 표적-특이적 프로브, 여기서 상기 표지된 표적-특이적 프로브는 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 특이적으로 혼성화될 수 있고, 두번째 영역은 첫번째 영역의 다운스트림임.

청구항 97

제96항에 있어서,
엑소뉴클레아제 활성을 갖는 폴리머라아제를 추가로 포함하는 키트.

청구항 98

제96항에 있어서,
구별되게 코드화된 입자에 공유적으로 부착되어 있는 수동적 참조 프로브를 추가로 포함하는 키트.

청구항 99

제96항에 있어서,
8개 이상의 상이한 프라이머-프로브 세트를 포함하는 키트.

청구항 100

하기 단계를 포함하는, 샘플에서의 다수의 표적 핵산의 존재 또는 부재의 복합적 검출 방법:

- (a) 샘플을 다수의 프라이머/프로브 쌍과, 표적 핵산과 첫번째 표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브와의 혼성화에 적합한 조건하에서 접촉시키는 단계로서, 각각의 프라이머/프로브 쌍은 다수의 표적 핵산 중 하나의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 표적-특이적 프라이머, 및 첫번째 영역의 다수의 표적 핵산 다운스트림 중 하나의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 상보적인 표적-특이적 프로브를 포함하는 단계, 이때 상기 표적-특이적 프로브는 리포터를 포함하며 고체 지지체에 부착되어 있음;
- (b) 혼성화된 표적-특이적 프로브를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 절단하여, 상기 리포터를 고체 지지체로부터 방출시키는 단계; 및
- (c) 고체 지지체 상의 리포터로부터 신호를 감지하는 단계로서, 신호 변화가 표적 핵산의 존재를 나타내는 단계.

청구항 101

제100항에 있어서,
고체 지지체가 코드화된 비이드인 방법.

청구항 102

제100항에 있어서,
리포터가 형광단인 방법.

청구항 103

제102항에 있어서,
신호 변화가 형광 신호의 감소인 방법.

청구항 104

제3항에 있어서,
리포터가 형광단 및 소광제 쌍인 방법.

청구항 105

제104항에 있어서,
신호 변화가 형광 신호의 증가인 방법.

청구항 106

제100항에 있어서,
다수의 프라이머/프로브 쌍의 각각의 상이한 표적-특이적 프로브가 하나의 고체 상에 공간적으로 별개의 장소에 부착되어 있는 방법.

청구항 107

제100항에 있어서,
다수의 프라이머/프로브 쌍의 각각의 상이한 표적-특이적 프로브가 상이한 고체 지지체에 부착되어 있는 방법.

청구항 108

제100항에 있어서,
고체 지지체에 부착된 비-혼성화 프로브 상의 리포터로부터 참조 신호를 감지하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 109

제108항에 있어서,
비-혼성화 프로브가, 표적-특이적 프로브가 부착되어 있는 동일한 고체 지지체 상의 공간적으로 별개의 장소에 부착되어 있는 방법.

청구항 110

제108항에 있어서,
비-혼성화 프로브가, 표적-특이적 프로브가 부착되어 있는 지지체와 상이한 고체 지지체에 부착되어 있는 방법.

청구항 111

제100항에 있어서,
다수의 프라이머/프로브 쌍의 각각의 상이한 표적-특이적 프로브가 동일한 리포터를 포함하는 방법.

청구항 112

제100항에 있어서,
다수의 프라이머/프로브 쌍의 각각의 상이한 표적-특이적 프로브가 상이한 리포터를 포함하는 방법.

청구항 113

제100항에 있어서,
샘플을 다수의 표적 핵산의 두번째 가닥 상의 영역에 상보적인 다수의 상이한 두번째 표적-특이적 프라이머와 접촉시키는 단계, 및 복합 폴리머라아제 연쇄 반응 사이클을 수행하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 114

제113항에 있어서,
복합 폴리머라아제 연쇄 반응 사이클이, 사이클 사이에 자유-부유 리포터를 제거하기 위한 세정 단계 없이 수행

되는 방법.

청구항 115

제113항에 있어서,

고체 지지체 상의 리포터로부터의 신호 변화를 감지하는 단계가 복합 폴리머라아제 연쇄 반응 사이클을 수행하기 전·후의 신호를 감지하는 것을 포함하는 방법.

청구항 116

제113항에 있어서,

고체 지지체 상의 리포터로부터의 신호 변화를 감지하는 단계가 복합 폴리머라아제 연쇄 반응 사이클을 수행한 후의 신호만을 감지하는 것을 포함하는 방법.

청구항 117

제113항에 있어서,

고체 지지체 상의 리포터로부터 감지된 신호를 고체 지지체 상의 리포터의 신호의 미리 결정된 비로 고체 지지체에 부착된 비-혼성화 프로브 상의 리포터로부터의 참조 신호와 비교하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 118

제113항에 있어서,

샘플 내 표적 핵산의 양을 정량하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2011년 9월 29일에 출원된 미국 가특허출원 일련번호 61/540,868의 우선권을 주장한다. 상기 언급된 문헌의 전체가 참조로서 인용된다.

[0002] 본 발명은 일반적으로는 분자 생물학 분야에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 핵산의 검출 및 정량화에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 폴리머라아제 연쇄 반응(PCR)은 유전성 질환의 검출, 유전자 지문의 확인, 감염성 질환의 진단, 유전자 클로닝, 친자확인 검사, 및 DNA 전산화와 같은 다양한 작업을 위해 의료 및 생물학 연구에서 흔히 사용되는 분자 생물학 기법이다. PCR은 이의 독보적인 증폭 및 정확성 때문에 핵산 검출을 위해 선택되는 방법으로서 분자 생물학자로부터 받아들여져 왔다. DNA 검출은 전형적으로는 PCR 반응의 종료시에, 또는 고조기에 수행되는데, 이는 출발 주형의 정량을 어렵게 한다. 실시간 PCR 또는 동역학 PCR은 반응이 진행됨에 따른 앰플리콘(amplicon) 농도를 기록함으로써 종료시점 PCR 분석의 능력을 향상시킨다. 앰플리콘 농도는 증폭된 표적과 연관된 형광 신호 변화를 통해 가장 자주 기록된다. 실시간 PCR은 또한 이것이 폐쇄계에서 수행될 수 있기 때문에 오염이 제한된다는 점에서 종료시점 검출에 비해 유리하다. 다른 장점에는 큰 감수성, 동적 범위, 속도 및 요구되는 과정이 적다는 것이 포함된다.

[0004] 여러 어세이 화학이 실시간 PCR 검출 방법에 사용되어 왔다. 상기 어세이 화학에는 이중-가닥 DNA 결합 염료, 이중-표지화 올리고뉴클레오티드, 예컨대 헤어핀 프라이머, 및 헤어핀 프로브를 사용하는 것이 포함된다. 다른 화학에는 가수분해 프로브와 같은 엑소뉴클레아제 기반 프로브가 포함된다. 다양한 PCR 및 실시간 PCR 방법은 본원에 참조로서 인용된 미국 특허 번호 5,656,493; 5,994,056; 6,174,670; 5,716,784; 6,030,787; 6,174,670, 및 7,955,802에 기재되어 있다.

[0005] 많은 실시간 PCR 기술의 단점은 복합화 능력이 제한된다는 것이다. 용액 내에서 유동적인 리포터 형광색소를 사용하는 실시간 PCR 기술은 복합 반응 내의 각각의 어세이에 대해 스펙트럼 상으로 구별되는 형광색소를 필요로 한다. 예를 들어, 4개의 표적 서열을 검출하기 위해 디자인된 복합 반응은 대조군 외에도, 스펙트럼 분화에 의

해 4개의 상이한 자유 유동 형광색소의 구별이 가능한 장비를 필요로 할 것이다. 상기 필요성은 실질적인 복합화 능력을 제한하는 것뿐 아니라, 이러한 장비가 전형적으로 복합 레이저 및 필터를 필요로 하기 때문에 비용을 증가시킨다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 하기 참조는, 예시적인 절차를 제공하는 범위 또는 본원에 언급된 것을 보충하는 다른 설명까지 참조로서 본원에 구체적으로 인용된다.
- (특허문헌 0002) 미국 특허 4,284,412
- (특허문헌 0003) 미국 특허 4,498,766
- (특허문헌 0004) 미국 특허 4,661,913
- (특허문헌 0005) 미국 특허 4,714,682
- (특허문헌 0006) 미국 특허 4,767,206
- (특허문헌 0007) 미국 특허 4,774,189
- (특허문헌 0008) 미국 특허 4,857,451
- (특허문헌 0009) 미국 특허 4,942,124
- (특허문헌 0010) 미국 특허 4,989,977
- (특허문헌 0011) 미국 특허 5,160,974
- (특허문헌 0012) 미국 특허 5,210,015
- (특허문헌 0013) 미국 특허 5,478,722
- (특허문헌 0014) 미국 특허 5,487,972
- (특허문헌 0015) 미국 특허 5,538,848
- (특허문헌 0016) 미국 특허 5,654,413
- (특허문헌 0017) 미국 특허 5,656,493
- (특허문헌 0018) 미국 특허 5,716,784
- (특허문헌 0019) 미국 특허 5,736,330
- (특허문헌 0020) 미국 특허 5,736,330
- (특허문헌 0021) 미국 특허 5,736,330
- (특허문헌 0022) 미국 특허 5,837,832
- (특허문헌 0023) 미국 특허 5,837,860
- (특허문헌 0024) 미국 특허 5,981,180
- (특허문헌 0025) 미국 특허 5,981,180
- (특허문헌 0026) 미국 특허 5,981,180
- (특허문헌 0027) 미국 특허 5,981,180
- (특허문헌 0028) 미국 특허 5,981,180
- (특허문헌 0029) 미국 특허 5,994,056
- (특허문헌 0030) 미국 특허 6,030,787

- (특허문헌 0031) 미국 특허 6,046,807
- (특허문헌 0032) 미국 특허 6,057,107
- (특허문헌 0033) 미국 특허 6,057,107
- (특허문헌 0034) 미국 특허 6,103,463
- (특허문헌 0035) 미국 특허 6,139,800
- (특허문헌 0036) 미국 특허 6,174,670
- (특허문헌 0037) 미국 특허 6,174,670
- (특허문헌 0038) 미국 특허 6,268,222
- (특허문헌 0039) 미국 특허 6,322,971,
- (특허문헌 0040) 미국 특허 6,366,354
- (특허문헌 0041) 미국 특허 6,411,904
- (특허문헌 0042) 미국 특허 6,449,562
- (특허문헌 0043) 미국 특허 6,449,562
- (특허문헌 0044) 미국 특허 6,514,295
- (특허문헌 0045) 미국 특허 6,524,793
- (특허문헌 0046) 미국 특허 6,524,793
- (특허문헌 0047) 미국 특허 6,528,165
- (특허문헌 0048) 미국 특허 6,592,822
- (특허문헌 0049) 미국 특허 6,939,720
- (특허문헌 0050) 미국 특허 7,205,105
- (특허문헌 0051) 미국 특허 7,226,737
- (특허문헌 0052) 미국 특허 7,226,737
- (특허문헌 0053) 미국 특허 7,645,868
- (특허문헌 0054) 미국 특허 7,955,802
- (특허문헌 0055) 미국 공개 2005/0191625
- (특허문헌 0056) 미국 공개 2009/0148849
- (특허문헌 0057) PCT 출원 WO 93/17126
- (특허문헌 0058) PCT 출원 WO 97/31256

비특허문헌

[0007]

- (비특허문헌 0001) Fodor et al., Science, 251:767-773, 1991.
- (비특허문헌 0002) Holmstrom et al., Anal. Biochem. 209:278-283, 1993.
- (비특허문헌 0003) Mueller et al., Current Protocols in Mol. Biol.; 15:5, :1993.
- (비특허문헌 0004) Newton et al., Nucl. Acids Res. 21:1155-1162, 1993.
- (비특허문헌 0005) Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:5022-5026, 1994.

(비특허문헌 0006) Rasmussen et al., Anal. Biochem, 198:138-142, 1991.

(비특허문헌 0007) Running et al., BioTechniques 8:276-277, 1990.

(비특허문헌 0008) Santalucia et al., Biochemistry; 38:3468-3477, 1999.

발명의 내용

과제의 해결 수단

- [0008] 특정 구현예에서, 핵산 검출 방법이 제공된다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 샘플에서의 표적 핵산의 검출 방법을 제공한다: (a) 샘플을, 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 첫번째 표적-특이적 프라이머, 및 첫번째 영역의 표적 핵산 다운스트림의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 상보적인 표적-특이적 프로브와, 표적 핵산과 표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브와의 혼성화에 적합한 조건 하에서 접촉시키는 단계, 상기 표적-특이적 프로브는 리포터를 포함하고 고체 지지체에 부착되어 있음; (b) 혼성화된 표적-특이적 프로브를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 절단하여 상기 리포터를 고체 지지체로부터 방출시키는 단계; 및 (c) 고체 지지체 상의 상기 리포터로부터의 신호 변화를 감지함으로써 표적 핵산을 검출하는 단계. 본 방법은 단일 표적을 검출하기 위해 수행될 수 있거나, 복합 어세이에서 복합의 상이한 표적 핵산을 검출하기 위해 부가적인 프라이머 및 프로브가 포함될 수 있다. 예를 들어, 하나의 구현예에서, 본 방법은 추가로 하기 단계를 포함한다: (a) 샘플을, 적어도 두번째 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 두번째 표적-특이적 프라이머, 및 적어도 첫번째 영역의 두번째 표적 핵산 다운스트림의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 상보적인 두번째 표적-특이적 프로브와, 두번째 표적 핵산과 두번째 표적-특이적 프라이머 및 두번째 표적-특이적 프로브와의 혼성화에 적합한 조건 하에서 접촉시키는 단계, 상기 두번째 표적-특이적 프로브는 두번째 리포터를 포함하고 두번째 고체 지지체에 부착되어 있음; (b) 두번째 혼성화된 표적-특이적 프로브를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 절단하여 상기 두번째 리포터를 두번째 고체 지지체로부터 방출시키는 단계; 및 (c) 두번째 고체 지지체 상의 상기 두번째 리포터로부터의 신호 변화를 감지함으로써 두번째 표적 핵산을 검출하는 단계.
- [0009] 첫번째 고체 지지체 및 두번째 고체 지지체는 동일한 고체 지지체 상에 공간적으로 별개의 장소에 있을 수 있거나(예컨대, 평면 어레이 상의 공간적으로 별개의 장소), 또는 첫번째 고체 지지체는 두번째 고체 지지체(예컨대, 비이드 어레이)로부터 물리적으로 분리될 수 있다. 복합화된 방법에서, 상이한 표적-특이적 프로브에 부착되어 있는 리포터는 상이한 표적-특이적 프로브가 그들이 부착되어 있는 고체 지지체(들)에 의해 구별될 수 있기 때문에 동일할 수 있다. 그러나 일부 구현예에서는, 2개 이상의 상이한 리포터가 사용된다.
- [0010] 또다른 구현예는 하기 단계를 포함하는, 샘플 내 다수의 표적 핵산의 존재 또는 부재의 복합적 검출 방법을 제공한다: (a) 샘플을 다수의 프라이머/프로브 쌍과, 표적 핵산과 첫번째 표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브와의 혼성화에 적합한 조건하에서 접촉시키는 단계로서, 각각의 프라이머/프로브 쌍은 다수의 표적 핵산 중 하나의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 표적-특이적 프라이머, 및 첫번째 영역의 다수의 표적 핵산 다운스트림 중 하나의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 상보적인 표적-특이적 프로브를 포함하는 단계, 상기 표적-특이적 프로브는 리포터를 포함하고 고체 지지체에 부착되어 있음; (b) 혼성화된 표적-특이적 프로브를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 절단하여 상기 리포터를 고체 지지체로부터 방출시키는 단계; 및 (c) 고체 지지체 상의 리포터로부터 신호를 감지하는 단계로서 신호 변화가 표적 핵산의 존재를 나타내는 단계. 특정한 양상에서, 다수의 프라이머/프로브 쌍의 각각의 상이한 표적-특이적 프로브는 하나의 고체 상에 공간적으로 별개의 장소에 부착된다. 다른 양상에서, 다수의 프라이머/프로브 쌍의 각각의 상이한 표적-특이적 프로브는 상이한 고체 지지체에 부착된다. 일부 구현예에서, 본 방법은 샘플을 다수의 표적 핵산의 두번째 가닥 상의 영역에 상보적인 다수의 상이한 두번째 표적-특이적 프라이머와 접촉시키는 단계, 및 복합 폴리머라아제 연쇄 반응 사이클을 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 복합 폴리머라아제 연쇄 반응 사이클 사이에 자유-부유 리포터를 제거하기 위한 세정 단계와 함께 또는 상기 단계 없이 수행될 수 있다.
- [0011] 신호 변화는 사용되는 리포터의 유형에 따라 신호의 감소 또는 증가가 될 수 있다. 예를 들어, 리포터가 형광단인 경우, 표적 핵산의 존재 하에서 관찰될 신호 변화는 형광 신호의 감소이다. 반면, 리포터가 형광단과 소광제 쌍인 경우, 소광제로부터의 형광단의 분리는 표적 핵산이 존재하는 경우 형광 신호의 증가를 야기한다.
- [0012] 용어 "업스트림" 및 "다운스트림"은 표적-특이적 프라이머에 의해 시작되는 발생 가닥의 합성과 관련하여 본원

에서 사용된다. 그러므로, 예를 들어, 프라이머가 혼성화되는 표적 핵산의 영역의 "다운스트림"인 표적 핵산의 영역에 혼성화된 표적-특이적 프로브는 프라이머의 3'에 위치하고 프라이머를 5'에서 3' 방향으로 신장시키는 폴리머라아제의 경로에 있을 것이다.

[0013] 특정한 양상에서, 본 방법은 샘플을 표적 핵산의 두번째 가닥 상의 영역에 상보적인 두번째 표적-특이적 프라이머와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 첫번째 표적-특이적 프라이머 및 두번째 표적-특이적 프라이머는 표적 핵산의 반대 가닥으로 향하여 표적 핵산의 영역이 PCR에 의해 증폭될 수 있도록 한다. 특정한 양상에서, 본 방법은 복합 증폭 사이클을 수행하는 것을 포함한다. 전형적인 증폭 사이클은 하기의 3개의 상을 갖는다: 변성 상, 프라이머 어닐링 상, 및 프라이머 신장 상(각각의 상은 상이한 온도에서 실시됨). 또한 각각의 사이클에 대해 오직 2가지 온도만이 사용되는(예를 들어, 95°C 및 60°C) 2단계 PCR이 수행될 수 있다. 그러므로, 특정한 양상에서 본 방법은 표적 핵산을 표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브로 반복적으로 혼성화시키는 단계, 표적-특이적 프라이머를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 신장시키는 단계(첫번째 표적-특이적 프라이머의 신장은 혼성화된 표적-특이적 프로브의 절단 및 고체 지지체로부터의 리포터의 방출을 산출함), 및 고체 지지체 상에 리포터로부터의 신호 변화를 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 특정한 구현예에서, 증폭 사이클은 적어도 신호 변화가 배경 노이즈로부터 구별가능할 때까지 반복된다. 특정 표적 핵산이 샘플에 존재하지 않는다면, 신호 변화는 수행된 사이클의 횟수와 관계없이 배경 노이즈로부터 구별될 수 없어야만 한다. 반응에 적합한 양성 및 음성 대조군을 도입하는 것은 특정 표적 핵산이 샘플에 존재하지 않는다는 것을 결정하는 것을 도와줄 수 있다. 당업자는 특정 어세이를 위해 적합한 양성 및 음성 대조군을 선택하는 방법을 알 것이다.

[0014] 일부 구현예에서, 고체 지지체 상의 리포터로부터의 신호는 표적-특이적 프라이머를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 신장시켜 혼성화된 표적-특이적 프로브를 절단하고 고체 지지체로부터 리포터를 방출시키기 전에 감지된다. 일부 구현예에서, 고체 지지체 상의 리포터로부터의 신호 변화는 복합 폴리머라아제 연쇄 반응 사이클을 수행하기 전·후의 신호를 감지하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 고체 지지체 상의 리포터로부터의 신호 변화는 2개 이상의 증폭 사이클 사이의 신호를 감지하는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, 고체 지지체 상의 리포터로부터의 신호 변화는 오로지 복합 폴리머라아제 연쇄 반응 사이클을 수행한 후의 신호만을 감지하는 것을 포함한다.

[0015] 하나의 구현예에서, 본원에 기재된 방법은 고체 지지체 상의 리포터로부터의 신호 변화를 고체 지지체에 부착된 비-혼성화 프로브 상의 리포터로부터의 참조 신호와 연관지음으로써 표적 핵산의 존재 또는 부재의 종료시점에서의 검출을 제공한다. 특정 구현예에서, 고체 지지체 상의 리포터로부터 감지된 신호를 고체 지지체 상의 리포터의 신호의 미리 결정된 비로 고체 지지체에 부착된 비-혼성화 프로브 상의 리포터로부터의 참조 신호와 비교한다. 변화한 비를 측정하는 것은 어세이 내의 표적 핵산의 존재를 나타낼 것이다. 상기 접근법의 장점은 이것이 복합 영상(예를 들어, 증폭 전에 하나의 영상 및 증폭 후에 하나의 영상)의 필요성 없이 수행될 수 있다는 것이다. 특정한 양상에서, 미리 결정된 비는 컴퓨터-관독가능 매체에 저장되어 리포터 분자로부터의 신호와 관련된 데이터를 분석하는 소프트웨어에 의해 접근된다. "비-혼성화 프로브"는 어세이 조건 하에서 어세이에 존재하는 임의의 다른 핵산에 혼성화되는 것으로 예상되지 않는 서열을 갖는 프로브이다.

[0016] 또다른 구현예에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 샘플에서의 표적 핵산의 검출 방법을 제공한다: (a) 샘플을, 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 첫번째 표적-특이적 프라이머, 및 첫번째 영역의 표적 핵산 다운스트림의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 상보적인 표적-특이적 프로브와, 표적 핵산과 표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브와의 혼성화에 적합한 조건 하에서 접촉시키는 단계, 상기 표적-특이적 프로브는 그의 5' 또는 3' 말단에 태그, 및 리포터를 포함함; (b) 혼성화된 표적-특이적 프로브를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 절단하여 상기 리포터를 태그로부터 방출시키는 단계; (c) 상기 태그를 고체 지지체 상에 부동화된 그의 상보적인 안티-태그에 혼성화시키는 단계; 및 (d) 고체 지지체 상의 상기 리포터로부터의 신호 감소를 감지함으로써 표적 핵산을 검출하는 단계. 특정한 양상에서, 본 방법은 혼성화된 표적-특이적 프로브를 절단하여 상기 리포터 분자를 태그로부터 방출시키기 전에 표적-특이적 프로브를 고체 지지체 상에 부동화된 안티-태그에 혼성화시키는 단계; 및 고체 지지체 상의 리포터로부터의 신호 감소를 감지하는 단계를 추가로 포함한다. 본 방법은 단일 표적을 검출하기 위해 수행될 수 있거나, 복합 어세이에서 복합의 상이한 표적 핵산을 검출하기 위해 부가적인 프라이머 및 프로브가 포함될 수 있다. 예를 들어, 하나의 구현예에서 본 방법은 하기 단계를 추가로 포함한다: (a) 샘플을, 두번째 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 두번째 표적-특이적 프라이머, 및 첫번째 영역의 두번째 표적 핵산 다운스트림의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 상보적인 두번째 표적-특이적 프로브와, 두번째 표적 핵산과 두번째 표적-특이적 프라이머 및 두번째 표적-특이적 프로브와의 혼성화에 적합한 조건 하에서 접촉시키는 단계, 상기 두번째 표적-특이적 프로브는 그의 5'

또는 3' 말단에 두번째 태그, 및 두번째 리포터를 포함함; (b) 두번째 혼성화된 표적-특이적 프로브를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 절단하여 상기 두번째 리포터를 두번째 태그로부터 방출시키는 단계; (c) 상기 두번째 태그를 두번째 고체 지지체 상에 부동화된 상보적인 두번째 안티-태그에 혼성화시키는 단계; 및 (c) 두번째 고체 지지체 상의 상기 두번째 리포터로부터의 신호 감소를 감지함으로써 두번째 표적 핵산을 검출하는 단계. 첫번째 고체 지지체 및 두번째 고체 지지체는 동일한 고체 지지체 상에 공간적으로 별개의 장소에 있을 수 있거나(예컨대, 평면 어레이 상의 공간적으로 별개의 장소), 또는 첫번째 고체 지지체는 두번째 고체 지지체(예컨대, 비이드 어레이)로부터 물리적으로 분리될 수 있다. 복합화된 방법에서, 상이한 표적-특이적 프로브에 부착되어 있는 리포터는 상이한 표적-특이적 프로브가 그들이 부착되어 있는 고체 지지체(들)에 의해 구별될 수 있기 때문에 동일할 수 있다. 그러나 일부 구현예에서는, 2개 이상의 상이한 리포터가 사용된다.

[0017] 일부 구현예에서, 본 방법은 샘플을 표적 핵산의 두번째 가닥 상의 영역에 상보적인 두번째 표적-특이적 프라이머와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 첫번째 표적-특이적 프라이머 및 두번째 표적-특이적 프라이머는 표적 핵산의 반대 가닥으로 향하여 표적 핵산의 영역이 PCR에 의해 증폭될 수 있도록 한다. 특정한 양상에서, 본 방법은 복합 증폭 사이클을 수행하는 것을 포함한다. 그러므로, 특정한 양상에서 본 방법은 표적 핵산을 표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브로 반복적으로 혼성화하는 단계, 표적-특이적 프라이머를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 신장시키는 단계(첫번째 표적-특이적 프라이머의 신장은 혼성화된 표적-특이적 프로브의 절단 및 리포터의 방출을 산출함), 및 적어도 신호 변화가 배경 노이즈로부터 구별가능할 때까지 고체 지지체 상의 리포터로부터 신호 감소를 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 특정한 양상에서, 하나 이상의 증폭 사이클 후 고체 지지체 상의 리포터로부터의 신호 변화는 샘플 내 표적 핵산의 양을 정량하는데 사용된다. 태그는 이소염기(isobase) 및/또는 핵산 상동체를 포함할 수 있다.

[0018] 표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브는 표적 핵산 상의 인접 또는 비-인접 서열에 혼성화될 수 있다. 표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브가 인접 서열에 혼성화되는 경우, 폴리머라아제는 반드시 표적-특이적 프라이머를 신장할 필요 없이 표적-특이적 프로브를 절단할 수 있다. 그러므로, 특정한 양상에서 본 방법은 표적-특이적 프라이머를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 신장시키는 것을 포함할 수도 또는 포함하지 않을 수도 있다.

[0019] 특정한 구현예에서, 반응에 하나 이상의 대조군이 포함될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 샘플 내 표적 핵산 검출 방법은 고체 지지체에 부착되어 있는 비-혼성화(즉, 음성 대조군) 프로브 상의 리포터로부터의 신호를 감지하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 비-혼성화 프로브는, 상기 표적-특이적 프로브가 부착되어 있는 동일한 고체 지지체 상에 공간적으로 별개의 장소에 부착되어 있거나, 상기 표적-특이적 프로브가 부착되어 있는 것과 상이한 고체 지지체 상에 부착되어 있거나, 또는 그렇지 않으면 표적-특이적 프로브와 구별가능할 수 있다. 특정한 구현예에서, 상이한 고체 지지체는 상이한 코드화된 비이드(bead)이다.

[0020] 표적 핵산은 관심의 임의의 서열일 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산은 DNA이다. 일부 구현예에서, 핵산은 RNA이다. 표적 핵산을 함유하는 샘플은 핵산을 함유하는 임의의 샘플일 수 있다. 본 발명의 특정한 양상에서, 예를 들어 샘플은, 하나 이상의 유전적 변이 또는 다형의 존재 또는 부재에 대해 스크리닝 중인 대상으로부터의 것일 수 있다. 본 발명의 또다른 양상에서, 샘플은 병원의 존재 또는 부재에 대해 시험 중인 대상으로부터의 것일 수 있다. 샘플이 대상으로부터 수득되는 경우, 이것은 당업계에 공지된 방법, 예컨대 흡인, 생검, 면봉채취, 정맥채혈, 요추 천자법, 대변 샘플 또는 소변 샘플에 의해 수득될 수 있다. 본 발명의 일부 양상에서, 샘플은 환경적 샘플, 예컨대 물, 토양 또는 공기 샘플이다. 본 발명의 다른 양상에서, 샘플은 식물, 박테리아, 바이러스, 진균, 원생동물 또는 후생동물 유래이다. 용어 표적 핵산은 비증폭된 서열 및 이의 앰플리콘 모두를 포함한다.

[0022] *프라이머는 주형-의존적 과정에서 발생 핵산의 합성을 개시할 수 있는 핵산이다. 표적-특이적 프라이머는 특정 표적 핵산의 합성을 개시하도록 디자인된 프라이머를 말한다. 프라이머 쌍은 주형 핵산 분자 상의 2개의 프라이머의 결합 부위 사이에서 표적 서열을 증폭시키도록 디자인된, 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로서 또는 업스트림 프라이머 및 다운스트림 프라이머로서 통상 알려져 있는 2개의 프라이머를 말한다. 특정한 구현예에서, 프라이머는 길이가 10-40개, 15-30개, 또는 18-26개의 뉴클레오티드인 표적-특이적 서열을 갖는다. 프로브는 상보적인 핵산에 혼성화될 수 있는 핵산이다. 표적-특이적 프로브는 특정 표적 핵산에 혼성화되도록 디자인된 프로브를 말한다. 반응에 존재하는 프로브는 폴리머라아제에 의한 프로브의 신장을 방지하기 위해 차단된 3' 히드록실기를 포함할 수 있다. 3' 히드록실기는 예를 들어, 포스페이트 기, 3' 반전형 dT, 또는 리포터로 차단될 수 있다. 고 엄격성 혼성화 조건은 완전하게 상보적인 서열 사이의 혼성화만을 가능하게 할 것으로

선택될 수 있다.

[0023]

본 발명의 다양한 양상은 상보적인 태그 및 안티-태그 서열의 세트를 사용한다. 상보적인 쌍 중에 어떠한 서열은 "태그(tag)"로 불리고 어떠한 것은 "안티-태그"로 불리지는 임의적이다. 태그 및 안티-태그는 바람직하게는 비-교차 혼성화, 즉, 각각의 태그 및 안티-태그는 동일한 반응 내에서 다른 태그 또는 안티-태그가 아닌 오직 그의 상보적인 파트너에게만 혼성화되어야만 한다. 바람직하게는, 태그 및 안티-태그는 또한 반응 동안 샘플 내의 다른 핵산에는 혼성화되지 않을 것이다. 태그 및 안티-태그 서열은 또한 바람직하게는 등온, 즉, 유사한 최적의 혼성화 온도의 것으로 디자인되어, 복합 반응 중의 모든 태그 및 안티-태그 서열이 대략 동일한 Tm을 가질 것이다. 비-교차 혼성화 태그 및 안티-태그 서열의 적합한 선택은 어세이에서, 특히 엄격한 비-교차 혼성화 거동을 필요로 하는 고도로 평행한 혼성화 환경에서의 어세이에서 유용하다. 특정한 구현예에서, 태그 및 안티-태그 서열은 길이가 6 내지 60개, 8 내지 50개, 10 내지 40개, 10 내지 20개, 12 내지 24개, 또는 20 내지 30개의 뉴클레오타이드이다. 일부 구현예에서, 태그 및 안티-태그 서열은 길이가 12, 14, 16, 또는 24개의 뉴클레오타이드이다. 다수의 태그 및 태그 보완체(즉, 안티-태그) 서열이 당업계에서 알려져 있고 본 발명에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 참조로서 본원에 인용된 미국 특허 7,226,737호에는 210개 세트의 비-교차 혼성화 태그 및 안티-태그가 기재되어 있다. 또한, 참조로서 본원에 인용된 미국 특허 7,645,868호에는 최소 교차 혼성화로 그들의 상보적 서열에 올바르게 혼성화될 수 있는 입증된 능력을 가진 1168개의 태그 서열 계열이 기재되어 있다. "보편적(universal)" 태그 또는 안티-태그는 복합 반응에서 모든 반응에 대해 동일한 서열을 갖는 태그 또는 안티-태그를 말한다.

[0024]

표지화제로서 언급될 수도 있는 리포터는 그것이 부착되어 있는 또다른 분자(예를 들어, 핵산)의 검출을 용이하게 하는 분자이다. 핵산을 표지하는데 사용될 수 있는 다양한 리포터 분자가 알려져 있다. 직접 리포터 분자에는 형광단, 발색단, 및 라디오포어(radiophore)가 포함된다. 형광단의 비-제한적인 예에는 적색 형광 스쿠아린 염료, 예컨대 2,4-비스[1,3,3-트리메틸-2-인돌리닐리덴메틸]시클로부텐디일리움-1,3-디옥솔레이트, 적외선 염료, 예컨대 2,4-비스[3,3-디메틸-2-(1H-벤즈[e]인돌리닐리덴메틸)]시클로부텐디일리움-1,3-디옥솔레이트, 또는 오렌지색 형광 스쿠아린 염료, 예컨대 2,4-비스[3,5-디메틸-2-피롤릴]시클로부텐디일리움-1,3-디올로레이트가 포함된다. 형광단의 부가적인 비-제한적인 예에는 양자점, Alexa Fluor® 염료, AMCA, BODIPY® 630/650, BODIPY® 650/665, BODIPY®-FL, BODIPY®-R6G, BODIPY®-TMR, BODIPY®-TRX, Cascade Blue®, CyDye™(Cy2™, Cy3™, 및 Cy5™를 포함하나 이에 제한되지 않음), DNA 삽입 염료, 6-FAM™, 플루오레세인, HEX™, 6-JOE, Oregon Green® 488, Oregon Green® 500, Oregon Green® 514, Pacific Blue™, REG, 피코빌리단백질(phycobilliprotein)(피코에리트린(phycoerythrin) 및 알로피코시아닌(allophycocyanin)을 포함하나 이에 제한되지 않음), Rhodamine Green™, Rhodamine Red™, ROX™, TAMRA™, TET™, 테트라메틸로다민, 또는 Texas Red®가 포함된다. 신호 증폭 시약, 예컨대 티라미드(PerkinElmer)가 형광 신호를 향상시키기 위해 사용될 수 있다. 간접 리포터 분자에는 비오틴이 포함되는데, 이것은 검출을 위해서 스트렙타비딘-피코에리트린과 같은 또다른 분자에 결합해야만 한다. 형광 공명 에너지 전이 쌍 또는 염료-소광제 쌍과 같은 표지의 쌍이 또한 사용될 수 있다.

[0025]

일부 구현예에서, 수소 결합 패턴이 자연 발생적 염기(A, T, C, G, 및 U)와 상이한 비-천연 염기가 본원에 기재된 프라이머 및 프로브 내에 도입될 수 있다. 하나의 예는 서로는 수소 결합하지만 천연 염기와는 하지 않는 isoC 및 isoG 염기이다. 프라이머 및/또는 프로브 내로의 상기 비-천연 염기의 도입은 비-특이적 혼성화를 감소시키는데 유용하다. 표적 핵산을 어세이하기 위해 이러한 비-천연 염기를 사용하는 방법은 본원에 참조로서 인용된 미국 특허 제6,977,161호에 기재되어 있다. 하나의 구현예에서, 표적 핵산을 증폭시키는데 사용되는 2개의 표적-특이적 프라이머 중 하나 이상에는 1, 2, 3, 또는 4개 이상의 비-천연 염기가 포함되고, 상보적인 비-천연 염기는 비-천연 염기(들)이 증폭 생성물에 포함되어 있는 식으로 증폭 반응에 포함된다. 이러한 구현예에서, 상보적인 비-천연 염기(들)이 프로브에 혼입된다. 프로브 및 표적 서열 내에 상보적인 비-천연 염기, 예컨대 isoC 및 isoG의 존재는 상기 서열 사이의 혼성화를 허용하나 다른 서열과의 비-특이적 혼성화를 감소시킬 것이다. 본 발명의 특정한 양상에서, 고체 지지체가 사용된다. 생분자의 부동화를 위한 다양한 고체 지지체가 알려져 있다. 예를 들어, 고체 지지체는 니트로셀룰로오스, 나일론 멤브레인, 유리, 활성화 석영, 활성화 유리, 폴리비닐리덴 디플루오라이드(PVDF) 멤브레인, 폴리스티렌 기질, 폴리아크릴아미드계 기질, 다른 중합체, 공중합체 또는 가교 중합체, 예컨대 폴리(염화비닐), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(디메틸 실록산), 광중합체(표적 분자와 공유 결합을 형성할 수 있는 광반응성 중, 예컨대 니트렌, 카르벤 및 케틸 라디칼을 함유함)일 수 있다. 고체 지지체는 예를 들어, 비이드(마이크로스피어), 컬럼, 또는 칩의 형태일 수 있다. 평면 고체 지지체 상에 부동화된 분자는 전형적으로 지지체 상의 이들의 공간적 위치에 의해 식별된다. 입자 또는 비이드와 같이 비-평면 고체 지지체 상에 부동화된 분자는 종종, 하기에 논의되는 바와 같은 지지체의 코드화의 일부 형태에 의해 식별된다.

일부 구현예에서, 연결자(linker)는 표적-특이적 프로브 또는 안티-태그와 그것이 부착되어 있는 고체 지지체 사이에 위치한다.

[0026] 비이드 및 입자는 비이드 또는 입자의 하나의 서브집단이 또다른 서브집단과 구별될 수 있는 식으로 코드화될 수 있다. 코드화는 다양한 기법에 의한 것일 수 있다. 예를 들어, 비이드는 상이한 방출 스펙트럼 및/또는 상이한 신호 강도를 갖는 형광 염료로 형광적으로 표지될 수 있다. 특정한 구현예에서, 비이드는 Luminex MagPlex® 마이크로스피어 또는 Luminex xMAP® 마이크로스피어이다. 서브집단 내의 비이드의 크기는 또한 하나의 서브집단과 또다른 것을 구별하기 위해 사용될 수 있다. 비이드의 또다른 개질 방법은 Fe_3O_4 와 같은 자기적으로 반응성인 물질을 구조 내에 도입하는 것이다. 상자성 및 초상자성 마이크로스피어는 자기장의 부재 하에서는 자성이 무시할만한 수준이지만, 자기장의 적용이 마이크로스피어에 있는 자성 도메인의 정렬을 유도하여, 장 공급원으로 마이크로스피어의 이끌림을 산출한다. 형광 염료, 비이드 크기, 및/또는 자기적으로 반응성인 물질을 비이드 내로 조합하는 것은 생성될 수 있는 비이드의 상이한 서브집단의 수를 추가로 증가시킬 수 있다.

[0027] 표적 핵산의 검출은 다양한 기법에 의해 이뤄질 수 있다. 본 발명의 하나의 양상에서, 증폭된 표적 핵산은 유세포 분석기를 사용하여 검출된다. 유세포 분석기는 포획 복합체의 고체 지지체가 비이드 또는 다른 입자일 때 특히 적합하다. 본 발명의 다른 양상에서, 증폭된 표적 핵산을 검출하는 것은 비이드 어레이 플랫폼 또는 칩 어레이 플랫폼과 같은 정지 영상화 시스템에서의 포획 복합체에 결합된 증폭된 표적 핵산 서열을 영상화하는 것을 포함한다.

[0028] 본 발명의 방법은 복합 어레이에서 사용될 수 있다. 이러한 복합 어레이에서, 샘플은 전형적으로 적어도 두번째 표적 핵산 서열을 포함할 것이다. 본 발명의 특정한 양상에서, 샘플에는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000개, 또는 그 속에서 유도 가능한 임의의 범위의 수의 표적 핵산 서열이 있다. 상기 언급된 바와 같이, 표적 핵산 서열은 관심의 임의의 서열일 수 있다. 하나의 표적 핵산 서열은 또다른 표적 핵산 서열과 동일한 유전자 또는 상이한 유전자에 있을 수 있고, 표적 핵산 서열은 중복되거나 중복되지 않을 수 있다. 물론, 표적 핵산 서열은 유전자 내에 있을 필요는 없으나, 예를 들어, DNA의 비-코딩 영역 내에 있을 수 있다. 증폭시키고자 하는 두번째 표적 핵산이 적어도 샘플에 존재하는 복합 어레이에서, 적어도 두번째 차별적인 프라이머 또는 프라이머 쌍이 반응에 포함된다.

[0029] 핵산의 검출 방법은 서열을 증폭시키기 위한 주형 핵산을 따라 프라이머를 반복적으로 신장시키는 단계를 포함할 수 있다. 증폭은 정성적, 반-정량적, 또는 정량적일 수 있다. 특정한 구현예에서, 증폭은 실시간으로 모니터링될 수 있다(예를 들어, 실시간 PCR). 증폭 사이클은 원하는 양의 증폭 생성물이 생성될 때까지 반복될 수 있다. 전형적으로, 증폭 사이클은 약 10 내지 40회 반복된다. 실시간 PCR의 경우, 증폭 생성물의 검출은 전형적으로 각각의 증폭 사이클 후에 수행될 것이다. 본 발명의 특정한 양상에서, 증폭 생성물의 검출은 오직 증폭 사이클의 서브세트 후에, 예컨대 모든 두번째, 세번째, 네번째, 또는 다섯번째 증폭 사이클 후에 수행될 수 있다. 검출은 또한 2회 이상의 증폭 사이클이 분석되거나 검출되는 정도로 짧게 수행될 수 있다.

[0030] 또다른 구현예에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 샘플에서의 표적 핵산의 검출 방법을 제공한다: (a) 샘플을, 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 첫번째 표적-특이적 프라이머, 및 첫번째 영역의 표적 핵산 다운스트림의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 상보적인 표적-특이적 프로브와, 표적 핵산과 표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브와의 혼성화에 적합한 조건 하에서 접촉시키는 단계, 상기 표적-특이적 프로브는 그의 5' 또는 3' 말단에 형광단을, 상기 형광단의 반대 말단에 비오틴을 포함함; (b) 표적-특이적 프라이머를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 신장시켜 혼성화된 표적-특이적 프로브를 절단하고 비오틴으로부터 형광단을 분리시키는 단계; (c) 샘플로부터 비오틴을 제거하는 단계; 및 (d) 형광단으로부터의 신호를 감지함으로써 표적 핵산을 검출하는 단계. 일부 구현예에서, 샘플로부터 비오틴을 제거하는 단계는 샘플을 자성 아비딘 코팅된 비이드와 접촉시켜 비오틴을 결합시키고, 비오틴-결합된 자성 아비딘 코팅된 비이드를 제거하는 것을 포함한다. 특정한 양상에서, 방법은 표적 핵산의 두번째 가닥 상의 영역에 상보적인 두번째 표적-특이적 프라이머와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 방법은 샘플로부터 비오틴을 제거하기 전에 복합 폴리머라아제 연쇄 반응 사이클을 수행하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0031] 특정한 구현예에서, 핵산의 양을 정량하는 방법이 제공된다. 하나의 구현예에서, 샘플에서의 표적 핵산의 양의 정량 방법은 하기 단계를 포함하여 제공된다: (a) 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제, 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 첫번째 프라이머 및 표적 핵산의 두번째 가닥 상의 영역에 상보적인

두번째 프라이머를 포함하는 표적-특이적 프라이머 쌍, 및 첫번째 영역의 표적 핵산 다운스트림의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 상보적인 표적-특이적 프로브의 존재 하에서, 표적 핵산을 증폭시키는 단계로서, 상기 표적-특이적 프로브는 리포터를 포함하고 고체 지지체에 부착되어 있고, 추가로 표적 핵산을 따라 첫번째 표적-특이적 프라이머를 신장시킬 때 핵산 폴리머라아제가 표적-특이적 프로브를 절단시켜 고체 지지체로부터 리포터를 방출시키는 단계; (c) 첫번째에 고체 지지체 상의 리포터로부터 첫번째 신호 및 두번째에 고체 지지체 상의 리포터로부터 두번째 신호를 감지하는 단계; 및 (d) 신호 변화를 샘플 내 표적 핵산의 양과 연관짓는 단계. 일부 구현예에서, 본 방법은 고체 지지체 상의 리포터로부터 적어도 3번째, 4번째, 5번째, 6번째, 7번째, 8번째, 9번째, 10번째, 11번째, 12번째, 13번째, 14번째, 15번째, 16번째, 17번째, 18번째, 19번째, 20번째, 21번째, 22번째, 23번째, 24번째, 25번째, 26번째, 27번째, 28번째, 29번째, 30번째, 31번째, 32번째, 33번째, 34번째, 35번째, 36번째, 37번째, 38번째, 39번째, 또는 40번째 신호를 3번째, 4번째, 5번째, 6번째, 7번째, 8번째, 9번째, 10번째, 11번째, 12번째, 13번째, 14번째, 15번째, 16번째, 17번째, 18번째, 19번째, 20번째, 21번째, 22번째, 23번째, 24번째, 25번째, 26번째, 27번째, 28번째, 29번째, 30번째, 31번째, 32번째, 33번째, 34번째, 35번째, 36번째, 37번째, 38번째, 39번째, 또는 40번째 감지하는 것을 추가로 포함한다. 특정한 양상에서, 본 방법은 혼성화된 표적-특이적 프로브를 절단시켜 고체 지지체로부터 리포터를 방출시키기 위해 표적-특이적 프라이머를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 신장시키기 전에 고체 지지체 상의 리포터로부터 신호를 감지하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법은 샘플 내 다수의 상이한 표적 핵산의 양을 정량하는 것을 포함한다.

[0032] 또다른 구현예에서, 하기 단계를 포함하는, 샘플에서의 표적 핵산의 양의 정량 방법이 제공된다: (a) 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제, 표적 핵산의 첫번째 영역에 상보적인 표적-특이적 프라이머, 및 첫번째 영역의 표적 핵산 다운스트림의 두번째 영역에 상보적인 표적-특이적 프로브의 존재 하에서, 표적 핵산과 표적-특이적 프라이머 및 표적-특이적 프로브와의 혼성화에 적합한 조건 하에 표적 핵산을 증폭시키는 단계로서, 상기 표적-특이적 프로브는 그의 5' 또는 3' 말단에 태그, 및 리포터를 포함하고, 추가로 표적 핵산을 따라 표적-특이적 프라이머를 신장시킬 때 핵산 폴리머라아제가 표적-특이적 프로브를 절단시켜 고체 지지체로부터 리포터를 방출시키는 단계; (c) 첫번째에 고체 지지체 상의 리포터로부터 첫번째 신호 및 두번째에 고체 지지체 상의 리포터로부터 두번째 신호를 감지하는 단계; 및 (d) 첫번째 신호 및 두번째 신호 사이의 변화를 샘플 내 핵산의 양과 연관짓는 단계. 일부 구현예에서, 본 방법은 고체 지지체 상의 리포터로부터 적어도 3번째, 4번째, 5번째, 6번째, 7번째, 8번째, 9번째, 10번째, 11번째, 12번째, 13번째, 14번째, 15번째, 16번째, 17번째, 18번째, 19번째, 20번째, 21번째, 22번째, 23번째, 24번째, 25번째, 26번째, 27번째, 28번째, 29번째, 30번째, 31번째, 32번째, 33번째, 34번째, 35번째, 36번째, 37번째, 38번째, 39번째, 또는 40번째 신호를 3번째, 4번째, 5번째, 6번째, 7번째, 8번째, 9번째, 10번째, 11번째, 12번째, 13번째, 14번째, 15번째, 16번째, 17번째, 18번째, 19번째, 20번째, 21번째, 22번째, 23번째, 24번째, 25번째, 26번째, 27번째, 28번째, 29번째, 30번째, 31번째, 32번째, 33번째, 34번째, 35번째, 36번째, 37번째, 38번째, 39번째, 또는 40번째 감지하는 것을 추가로 포함한다. 특정한 양상에서, 본 방법은 혼성화된 표적-특이적 프로브를 절단시켜 고체 지지체로부터 리포터를 방출시키기 위해 표적-특이적 프라이머를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 신장시키기 전에 고체 지지체 상의 리포터로부터 신호를 감지하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법은 샘플 내 다수의 상이한 표적 핵산의 양을 정량하는 것을 포함한다.

[0033] 하나의 구현예에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 샘플에서의 표적 핵산의 양의 정량 방법을 제공한다: (a) 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제, 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 첫번째 프라이머 및 표적 핵산의 두번째 가닥 상의 영역에 상보적인 두번째 프라이머를 포함하는 표적-특이적 프라이머 쌍, 및 첫번째 영역의 표적 핵산 다운스트림의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 상보적인 표적-특이적 프로브의 존재 하에서, 표적 핵산과 표적-특이적 프라이머 쌍 및 표적-특이적 프로브와의 혼성화에 적합한 조건 하에 표적 핵산을 증폭시키는 단계로서, 상기 표적-특이적 프로브는 그의 5' 또는 3' 말단에 형광단을, 상기 형광단의 반대 말단에 비오틴을 포함하고, 추가로 표적 핵산을 따라 첫번째 프라이머를 신장시킬 때 주형-의존적 핵산 폴리머라아제가 혼성화된 표적-특이적 프로브를 절단시켜 비오틴으로부터 형광단을 분리하는 단계; (c) 샘플로부터 비오틴을 제거하는 단계; (d) 첫번째에 고체 지지체 상의 형광단으로부터 첫번째 신호 및 두번째에 형광단으로부터 두번째 신호를 감지하는 단계; (e) 신호 변화를 샘플 내 핵산의 양과 연관짓는 단계. 일부 구현예에서, 본 방법은 고체 지지체 상의 형광단으로부터 적어도 3번째, 4번째, 5번째, 6번째, 7번째, 8번째, 9번째, 10번째, 11번째, 12번째, 13번째, 14번째, 15번째, 16번째, 17번째, 18번째, 19번째, 20번째, 21번째, 22번째, 23번째, 24번째, 25번째, 26번째, 27번째, 28번째, 29번째, 30번째, 31번째, 32번째, 33번째, 34번째, 35번째, 36번째, 37번째, 38번째, 39번째, 또는 40번째 신호를 3번째, 4번째, 5번째, 6번째, 7번째, 8번째, 9번째, 10번째

제, 11번째, 12번째, 13번째, 14번째, 15번째, 16번째, 17번째, 18번째, 19번째, 20번째, 21번째, 22번째, 23번째, 24번째, 25번째, 26번째, 27번째, 28번째, 29번째, 30번째, 31번째, 32번째, 33번째, 34번째, 35번째, 36번째, 37번째, 38번째, 39번째, 또는 40번째 감지하는 것을 추가로 포함한다. 특정한 양상에서, 본 방법은 표적-특이적 프라이머를 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제로 신장시키기 전에 형광단으로부터 신호를 감지하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법은 샘플 내 다수의 상이한 표적 핵산의 양을 정량하는 것을 포함한다.

[0034] 또다른 구현예에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 샘플에서의 표적 핵산의 양의 정량 방법을 제공한다: (a) 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제, 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 첫번째 프라이머 및 표적 핵산의 두번째 가닥 상의 영역에 상보적인 두번째 프라이머를 포함하는 표적-특이적 프라이머 쌍, 및 첫번째 영역의 표적 핵산 다운스트림의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 상보적인 표적-특이적 프로브의 존재 하에서, 표적 핵산과 표적-특이적 프라이머 쌍 및 표적-특이적 프로브와의 혼성화에 적합한 조건 하에 표적 핵산을 증폭시키는 단계로서, 상기 표적-특이적 프로브는 그의 5' 또는 3' 말단에 태그 및 형광단을, 상기 태그 및 형광단의 반대 말단에 비오틴을 포함하고, 추가로 표적 핵산을 따라 표적-특이적 프라이머를 신장시킬 때 핵산 폴리머라아제가 혼성화된 표적-특이적 프로브를 절단시켜 비오틴으로부터 형광단을 분리하는 단계; (b) 샘플로부터 비오틴을 제거하는 단계; (c) 태그 서열을 고체 지지체 상의 상보적인 안티-태그 서열에 혼성화시키는 단계; (d) 고체 지지체 상의 형광단으로부터 형광 신호를 감지하는 단계; 및 (e) 형광 신호를 샘플 내 핵산의 양과 연관시키는 단계.

[0035] 정량적 PCR에서, 역치 사이클(Ct)은 반응 내에서 발생된 형광이 역치를 넘어서는 사이클 횟수를 반영한다. 이것은 초기 카피수의 로그값에 반비례한다. 각각의 반응에 대한 Ct 값의 측정은 소프트웨어에 의해 설정된 기준선, 배경 및 역치와 연관된다. 일부 qPCR 방법에서, 수동 참조 염료가 사용되고 형광 리포터로부터의 신호를 반응 매질에서의 변이를 설명하기 위해 참조 염료로부터의 신호로 나눈다. 상기 계산은 정규화된 리포터 신호(Rn)를 산출한다. 기준선은 형광 신호에서 기대되는 변화가 거의 없을 때의 PCR에서의 초기 사이클을 말한다(통상 사이클 3 내지 15). 상기 기준선은 각각의 반응에 대한 배경을 측정하는데 사용될 수 있다. 복합웰 반응 플레이트에서, 복합 웰로부터 여러 개의 기준선이 플레이트에 걸쳐 '기준선 형광'을 측정하는데 사용될 수 있다. 표적 증폭이 배경 신호를 초과(역치를 넘음)하는 때를 측정하기 위해 데이터 분석을 사용하는 것에는 많은 방식이 있다. Rn에서 배경 신호를 빼서 ΔRn 을 산출할 수 있다. qPCR에 전형적으로 사용되는 데이터 분석을 위한 다른 보충물이 본 발명에 적용될 수 있다. 즉, 내생 및 외생 대조군, 하우스키핑 유전자, 표준 곡선, 내부 양성 대조군, 증폭없는 대조군, 역전사 대조군, 미처리 대조군, 추출 대조군, 0 시점, 건강한 개체 대조군, 및 음성 및 양성 대조군의 사용. 이들은 비교 Ct 분석("상대적 정량화") 또는 표준 곡선 분석("절대적 정량화"), Pfaffl 방법, 종료시점 정량화, 정성적 결과, 대립유전자 식별 등을 수행하기 위해 본 발명에서 사용될 수 있다. 증폭 효율 또는 증폭 속도를 설명하는 것은 회석법, 대수 증식기에서의 형광 증가, S자형 또는 로지스틱 곡선 피트 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 다수의 방법에 의해 수행될 수 있다. 역치는 2차 유도 최대 방법을 포함하나 이에 제한되지 않는 다수의 방법에 의해, 또는 배경을 넘어서는 복합 표준 편차 등에 의해 측정될 수 있다. 종료시점 정량 분석은 상대적, 절대적, 경쟁적 및 비교적 분석을 포함하나 이에 제한되지 않는 다수의 방법에 의해 수행될 수 있을 것이다.

[0036] 본원에 기재된 방법에서, 웰과 웰 사이의 신호 변이는 통상의 벌크 형광 측정 qPCR에서만큼 높지 않다. 벌크 형광 PCR에서, 신호에서의 일부 변화가 각각의 웰에서의 부피 차이와 연관될 수 있다. 본 발명의 특정한 구현예에서, 부피 차이는 고체 지지체 상에 부착되어 있는 형광을 변화시키지 않을 것이며, 수동 벌크 유체 참조 염료를 필요로 하지 않는다. 복합 이미지는 스펙트럼상으로 식별할 수 있는 입자를 찍기 때문에, 영상 챔버 내 또는 사이에 초점 및 광도의 변화가 신호에서의 변이를 야기할 수 있다. 이것은 교정 입자 또는 수동 참조 입자에 의해 정규화될 수 있다. 교정 입자는 반응의 분석 전에 각각의 영상화 챔버에 대해 광도 또는 검출기 세팅에 초점을 맞추고 최적화하는데 사용될 수 있다. 이들은 또한 영상과 영상 사이의 신호를 정규화하기 위해 각각의 반응과 혼합될 수 있다. 교정 입자는 일반적으로 공지된 양의 분류화 염료 뿐 아니라 리포터 염료로 내부적으로 염색된다. 수동 참조 입자는 표적 특이적 프로브로부터 빠져나 나뉘서 신호를 정규화하는데 사용될 수 있다. 수동 참조 입자는 일반적으로 반응 내 표적 핵산의 임의의 다른 부분과 혼성화되거나 상호작용하지 않도록 디자인된 프로브로 외부적으로 염색된다. 다른 입자는 리포터 염료가 없는 것들을 포함할 수 있고, 내부 또는 외부가 반응 내 각각의 입자에 대해 측정된 신호에 영향을 줄 수 있는 벌크 형광 변화에 대해 정규화되는데 사용될 수 있다. 비이드를 함유하지 않는 영상화 챔버의 구획은 또한 신호를 정규화하는데 사용될 수 있다.

[0037] 데이터 분석을 수행할 수 있는 많은 방식이 있다. 하기는 mRNA의 상대 정량화를 위해 데이터 분석을 수행하기

위한 하나의 방법의 예시이다. 교정 입자로의 영상 챔버의 교정 후, 수동 참조 입자의 하나 이상의 영역 및 표적 특이적 입자의 하나 이상의 영역 뿐 아니라 내생 대조군 또는 하우스키핑 유전자에 특이적인 하나 이상의 영역이 열 사이클링이 가능한 영상화 챔버에 포함된다. 각각의 입자 유형은 이들을 영역 내로 나누는 내부 분류화 염료에 의해 스펙트럼상으로 식별가능하다. 각각의 영역의 적어도 30개 입자가 반응에 포함된다. 반응의 첫번째 10 사이클이 PCR 사이클의 어닐링 또는 확장 상 동안 영상화된다. 중간 형광 강도(MFI) 값은 각각의 영역의 적어도 30개 입자의 중간값을 취해서 측정된다. 상기 첫번째 10 사이클이 기준선을 나타낸다. 표적 특이적 및 내생 대조군 입자의 MFI를 수동 참조 입자(Rn)의 MFI로 나눈다. 반응이 진행되면서 기준선으로부터의 평균 Rn을 후속 영상으로부터 제하는데 사용한다(ΔRn). 역치는 각각의 영역에 대해 Rn의 표준 편차(SD)를 취하고 여기에 10을 곱해서 측정한다. ΔRn 이 기준선의 10 SD를 초과하는 경우, Ct가 각각의 입자 영역에 대해 기록된다. 상기 Ct 값은 이후 표적 특이적 영역을 하우스키핑 또는 내생 대조군 영역에 정규화함으로써 분석될 수 있다. 상기 정규화는 전형적으로 내생 대조군의 것에 의해 표적 특이적 영역의 Ct의 차이를 구해 수행된다(ΔCt). 이후, 2개의 샘플을 비교하는 경우(시험 샘플 대 대조군 샘플, 또는 질병 대 건강한 샘플), '델타-델타 Ct' 방법이 효율에 대해 교정하지 않고 사용될 수 있을 것이다($R = 2^{-[\Delta Ct_{\text{샘플}} - \Delta Ct_{\text{대조군}}]}$).

[0038] 증폭 효율은 당업자에게 공지된 직접 또는 간접 방법에 의해 측정될 수 있고, 정량 데이터를 교정하기 위해 사용될 수 있다. 직접 방법에는 희석 방법에 의해 또는 지수 상에서 상대적 형광의 측정에 의해 증폭 효율을 측정하는 것이 포함될 수 있다. 다른 간접 방법에는 증폭 곡선을 수학적 모델에 피팅하는 것, 예컨대 S자, 로지스틱 또는 지수 곡선 피팅이 포함될 수 있다. 특정한 구현예에서, 표적 핵산의 정량화는 디지털 PCR(dPCR)을 사용하여 달성된다. 상기 접근법에서, 샘플을 구획화하여 샘플에 함유된 개별 핵산 분자가 많은 분리된 영역에, 예컨대 마이크로웰 플레이트 중의 개별 웰에, 에멀전의 분산된 상에, 또는 핵산 결합 분자의 어레이에 위치하도록 한다. 각각의 분획은 0 또는 1개의 분자를 함유하여 각각 음성 또는 양성 반응을 제공할 것이다. 통상의 PCR과는 달리, dPCR은 샘플 내 표적 핵산의 초기 양을 측정하기 위한 증폭 사이클의 수에 의존하지 않는다. 따라서, dPCR은 표적 핵산을 정량하기 위한 지수 데이터에 대한 의존성을 제거하여 절대 정량화를 제공한다.

[0039] 본 발명은 또한 기재된 방법 중 임의의 것에 사용하기 위한 조성물 및 키트를 제공한다. 예를 들어, 하나의 구현예에서 조성물은 (a) 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000개, 또는 그 속에서 유도가능한 임의의 범위의 수의, 상이한 프라이머-프로브 세트를 포함할 수 있고, 각각의 프라이머-프로브 세트는 하기 구성요소를 포함한다: (i) 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 첫번째 프라이머, (ii) 표적 핵산의 두번째 가닥 상의 영역에 상보적인 두번째 프라이머; 및 (iii) 구별되게 코드화된 입자에 공유적으로 부착되어 있는 표지된 표적-특이적 프로브, 상기 표지된 표적-특이적 프로브는 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 특이적으로 혼성화될 수 있고, 두번째 영역은 첫번째 영역의 다운스트림임. 조성물은 5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 폴리머라아제를 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 구별되게 코드화된 입자에 공유적으로 부착되어 있는 하나 이상의 음성-대조군 (즉, 수동 참조) 프로브를 추가로 포함한다. 음성-대조군 프로브는 제시된 샘플에 존재하는 것으로 예상되는 임의의 핵산에 특이적으로 혼성화되지 않도록 디자인된 프로브이다. 일부 구현예에서, 조성물은 구별되게 코드화된 입자에 공유적으로 부착되어 있는 하나 이상의 양성-대조군 프로브를 추가로 포함한다. 양성-대조군 프로브는 제시된 샘플에 존재하는 것으로 예상되는 핵산에 특이적으로 혼성화되도록 디자인된 프로브이다.

[0040] 또다른 구현예에서, (a) 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000개, 또는 그 속에서 유도가능한 임의의 범위의 수의, 상이한 프라이머-프로브 세트를 포함할 수 있고, 각각의 프라이머-프로브 세트는 하기 구성요소를 포함하는 키트가 제공된다: (i) 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 첫번째 영역에 상보적인 첫번째 프라이머, (ii) 표적 핵산의 두번째 가닥 상의 영역에 상보적인 두번째 프라이머; 및 (iii) 구별되게 코드화된 입자에 공유적으로 부착되어 있는 표지된 표적-특이적 프로브, 상기 표지된 표적-특이적 프로브는 표적 핵산의 첫번째 가닥 상의 두번째 영역에 특이적으로 혼성화될 수 있고, 두번째 영역은 첫번째 영역의 다운스트림임. 키트는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 폴리머라아제를 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 키트는 구별되게 코드화된 입자에 공유적으로 부착되어 있는 하나 이상의 음성-대조군 프로브를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 구별되게 코드화된 입자에 공유적으로

로 부착되어 있는 하나 이상의 양성-대조군 프로브를 추가로 포함한다. 키트의 구성요소는 동일한 용기에 또는 함께 포장되어 있는 분리된 용기에 제공될 수 있다. 특정 구현예에서, 키트는 감염성 질환 키트이고, 프라이머-프로브 쌍은 병원체(예를 들어, 박테리아, 바이러스)로부터 표적 서열을 증폭시키기 위해 디자인된다. 다른 구현예에서, 키트는 유전자 발현 프로파일링 키트이고, 프라이머-프로브 쌍은 다양한 발현된 유전자 서열로부터 표적 서열을 증폭시키기 위해 디자인된다.

[0041] 본원에서 사용된 바와 같은, "혼성화," "혼성화되다" 또는 "혼성화 가능한"은 이중 또는 삼중 가닥 분자 또는 부분적인 이중 또는 삼중 가닥 특성을 갖는 분자를 형성하는 것을 의미하는 것으로 이해된다. 본원에서 사용된 바와 같은, 용어 "어닐링"은 "혼성화"와 동의어이다. 본원에서 사용되는 "엄격한 조건" 또는 "높은 엄격성"은 상보적인 서열을 함유하는 하나 이상의 핵산 가닥 사이의 또는 그 내부의 혼성화는 허용하나, 비-상보적 서열의 혼성화는 허용하지 않는 조건이다. 이러한 조건은 당업자에게 잘 알려져 있고 높은 선택성을 필요로 하는 적용에 바람직하다. 엄격한 조건은 저염 및/또는 고온 조건을 포함할 수 있다. 원하는 엄격함의 온도 및 이온 강도는 특정 핵산의 길이, 표적 서열의 길이 및 핵염기 함량, 핵산의 전하 조성, 및 혼성화 혼합물 내의 폼아미드, 염화테트라메틸암모늄 또는 다른 용매의 존재 또는 농도에 의해 일부분 결정되는 것으로 이해된다.

[0042] 본원에 기재된 임의의 방법 또는 조성물은 본원에 기재된 임의의 다른 방법 또는 조성물과 관련되어 실행될 수 있다는 것으로 이해된다.

[0043] 용어 "포함하다" (및 포함하도의 임의의 형태, 예컨대 "포함함" 및 "포함하는"), "갖다" (및 갖다의 임의의 형태, 예컨대 "가짐" 및 "갖는"), "함유하다" (및 함유하도의 임의의 형태, 예컨대 "함유함" 및 "함유하는"), 및 "포함되다" (및 포함되다의 임의의 형태, 예컨대 "포함됨" 및 "포함되는")는 열린 결말의 연결형 동사이다. 그 결과 하나 이상의 언급된 단계 또는 요소를 "포함하는", "갖는", "함유하는" 또는 "포함되는" 방법, 조성물, 키트 또는 시스템이 언급된 단계 또는 요소를 소유하고 있으나, 오직 상기 단계 또는 요소만을 소유하고 있는 것에 제한되지 않으므로; 언급되지 않은 요소 또는 단계를 소유(즉, 포괄)하고 있을 수 있다. 마찬가지로, 하나 이상의 언급된 특징을 "포함하는", "갖는", "함유하는" 또는 "포함되는" 방법, 조성물, 키트 또는 시스템의 요소가 상기 특징을 소유하나, 오직 상기 특징만을 소유하고 있는 것에 제한되지 않으므로; 이것은 언급되지 않은 특징을 소유하고 있을 수 있다.

[0044] 임의의 본 발명의 방법, 조성물, 키트 및 시스템의 임의의 구현예는 기재된 단계 및/또는 특징을 '포함하고/포함되고/함유하고/갖는다'기보다는 이것으로 이루어지거나 이것으로 본질적으로 이루어질 수 있다. 그러므로, 임의의 청구항에서, "~로 이루어지는" 또는 "~로 본질적으로 이루어지는"이라는 용어는 다르게는 열린 결말의 연결형 동사를 사용하는 것으로부터 제시된 청구항의 범위를 변화시키기 위해, 상기 언급된 열린 결말의 연결형 동사 중 임의의 것으로 대체될 수 있다.

[0045] 청구항에서의 용어 "또는"의 사용은, 본 명세서가 오직 대안 및 "및/또는"을 언급하는 정의를 지지하더라도, 오직 대안 또는 대안이 상호 배타적인 것으로 언급되는 것으로 명백하게 표시되지 않는 경우 "및/또는"을 의미하는 것으로 사용된다.

[0046] 본 출원을 통틀어, 용어 "약"은 어떠한 값이 그 값을 측정하기 위해 사용되는 장치 또는 방법에 대한 오차의 표준 편차를 포함하는 것을 나타내는데 사용된다.

[0047] 다년간의 특허법에 따라, 단수형 표현은 청구항 또는 명세서에서 단어 "포함하는"과 함께 사용되는 경우, 구체적으로 언급이 없다면 복수형 표현을 나타낸다.

[0048] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 장점은 하기 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나 상세한 설명 및 구체적인 예들이, 본 발명의 구체적인 구현예를 나타내면서도 본 발명의 취지 및 범주 내에서 다양한 변형 및 개질이 상기 상세한 설명으로부터 당업자에게 있어 명백해질 것이므로, 오직 예시로서만 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0049] 하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고, 본 발명의 특정한 양상을 추가로 나타내기 위해 포함된다. 본 발명은 본원에 제시된 특이적 구현예의 상세한 설명과 함께 하나 이상의 상기 도면을 참조로 하여 더욱 잘 이해될 수 있다.

도 1은 하나의 말단에 스펙트럼상으로 식별할 수 있는 비이드에 부착되어 있고 그들의 반대 말단에 형광단을 갖는 다수의 표적-특이적 프로브를 보여준다.

도 2A-2D. 도 2A는 하나의 말단에 비오틴 및 다른 말단에 태그 서열을 갖는 표적-특이적 프로브 및 프라이머가 혼성화되는 표적 핵산(앰플리콘)을 보여준다. 도 2B에서, 폴리머라아제는 프라이머로부터 시작되는 신규 가닥을 합성하고 있다. 폴리머라아제가 만나고 표적-특이적 프로브를 절단하여 태그로부터 비오틴을 분리시킨다(도 2B). 도 2C는 스펙트럼상으로 코드화된 비이드에 부착되어 있는 상보적인 태그에 혼성화된 표적-특이적 프로브로부터 절단된 태그를 보여준다. 도 2D는 태그가 스펙트럼상으로 코드화된 비이드에 부착되어 있는 상보적인 태그에 혼성화된 비절단된 표적-특이적 프로브를 보여준다.

도 3은 주형의 존재 또는 부재 하에서 표적-특이적 비이드 세트 및 대조군 비이드 세트를 사용하는 PCR에 대한 MFI를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

A. 가수분해 프로브

[0050]

본 발명의 특징한 양상은 핵산의 검출을 위해 가수분해 프로브를 사용한다. 가수분해 프로브는 일부 폴리머라아제의 5' 엑소뉴클레아제 활성을 이용한다. PCR 반응의 확장 또는 신장 상 동안, 폴리머라아제, 예컨대 Taq 폴리머라아제는 업스트림 프라이머를 결합 부위로서 사용하고 이후 신장된다. 가수분해 프로브는 이후 폴리머라아제의 5'-엑소뉴클레아제 활성에 의해 그의 5' 말단에서 폴리머라아제 신장 동안 절단된다.

[0051]

[0052]

그러나, 프로브의 5' 말단을 절단하는 과정은 표적 서열의 증폭 또는 신장을 필요로 하지 않는다(예를 들어, 본원에 참조로서 인용된 미국 특허 5,487,972호 참조). 이것은 프로브를 표적 서열 상의 업스트림 프라이머에 가까이 두어 프라이머의 3' 말단에 대한 핵산 폴리머라아제의 결합이 자동적으로 폴리머라아제를 프로브의 5' 말단과 접촉되도록 하게 함으로써 달성된다. 프로브를 절단하기 위해 폴리머라아제를 위치 내로 불러들이기 위해 중합이 필요하지 않기 때문에, 이것은 "중합-독립적 절단"으로서 언급될 수 있다. 상기 방식에서, 어닐링 및 후속 프로브 가수분해의 연속 회차가 발생할 수 있어, 중합의 부재 하에 유의한 양의 신호 발생을 야기한다.

[0053]

TaqMan® 어세이(예를 들어 본원에 참조로서 인용된 미국 특허 5,210,015호 참조)는 가수분해-프로브 기재 어세이의 예이다. TaqMan® 어세이에서, 가수분해 프로브는 전형적으로 5' 말단 상의 리포터 및 3' 말단 상의 소광제로 표지된다. 리포터 및 소광제가 동일한 프로브 상에 고정되는 경우, 이들은 가까운 거리로 남아있도록 강요된다. 상기 근접성은 심지어 프로브가 표적 서열에 혼성화되는 경우에도, 리포터 신호를 효과적으로 소광시킨다. 가수분해 프로브는 폴리머라아제 확장 동안 Taq의 5'-엑소뉴클레아제 활성에 의해 그들의 5' 말단에서 절단된다. 이것이 일어날 때, 리포터 형광단은 프로브로부터 방출되고, 이어서 더이상 소광제에 가까이 있지 않다. 이것은 PCR 반응이 사이클링을 지속하면서 각각의 확장 상으로의 리포터 신호의 끊임없는 증가를 산출한다. 각각의 사이클로 최대 신호를 달성하기 위해, 가수분해 프로브는 종종 반응에서 프라이머보다 대략 10°C 높은 T_m을 갖는 것으로 디자인된다. 실시간 가수분해 프로브 반응의 사용은 또한 둘다 본원에 참조로서 인용된 미국 특허 5,538,848호 및 7,205,105호에 기재된다.

[0054]

도 1은 본 발명의 하나의 구현예를 예증한다. 표적 특이적 프로브는 하나의 말단에는 스펙트럼상으로 식별할 수 있는 비이드 및 반대 말단에는 형광단에 부착되어 있다. 형광단은 또 다른 증폭된 서열이 프로브/형광/비이드 복합체의 업스트림 표적 가닥에 결합된 경우 폴리머라아제의 엑소뉴클레아제 활성으로 인해 절단될 것이다. 상기 방법에서, 신호 감소는 표적 핵산이 반응에 존재하는 때에 관찰될 것이다. 비-혼성화되는 것으로 디자인된 다른 비이드는 형광단 상의 온도의 영향으로 인해 시간에 따라 변할 수 있는 배경 신호를 측정하는데 사용될 수 있다. 상기 특정한 방법은, 반응이 시작될 때 형광은 오직 비이드 상에만 있고 용액에는 없기 때문에 실시간 정량 어세이에 대해 유리하다. 용액에 마지막에 남아 있는 총 형광은 복합에 존재하는 앰플리콘의 수, 및 용액에 있는 비이드의 수에 의해 조절될 수 있다. 상기 방법은 또한 종료시점 혼성화 단계 또는 후속적인 비이드의 표지화를 필요로 하지 않기 때문에 유리하다. 부가적으로는, 각각의 데이터 지점 습득 전 비이드 상의 혼성화 사건을 기다릴 필요가 없다. 상기 방법은 상기 기재된 TaqMan® 어세이에 비해 여러 가지 장점을 제공한다. 예를 들어, 벌크-형광 측정이 수행될 필요가 없기 때문에 소광 분자가 필요하지 않다. 게다가, 스펙트럼상으로 식별할 수 있는 비이드는 고도의 복합 실시간 PCR 반응을 포함하여, 고도로 복합화된 반응을 수행할 수 있게 한다. 상기 구현예가 형광단 및 스펙트럼상으로 코드화된 비이드를 사용하여 기재되어 있지만, 다른 표지 및 고체 지지체가 사용될 수 있을 것이다.

[0055]

도 2A-2D는 본 발명의 또다른 구현예를 예증한다. 도 2A에서, 하나의 말단에는 비오틴 및 다른 말단에는 태그 서열을 갖는 표적-특이적 프로브 및 프라이머가 표적 핵산에 혼성화된다. 비오틴 및 태그는 역방향성이 되어 태그가 프로브의 3' 또는 5' 말단에 있을 수 있다. 프라이머는 폴리머라아제에 의해 신규 가닥의 합성을 개시한다.

폴리머라아제가 표적-특이적 프로브를 만나는 경우, 이것은 프로브를 절단시켜 태그로부터 비오틴을 분리시킨다 (도 2B). 도 2C 및 2D는 스펙트럼상으로 코드화된 비이드 상의 상보적인 태그에 혼성화된 태그를 보여준다. 도 2C에서, 태그는 폴리머라아제에 의해 표적-특이적 프로브로부터 절단된다. 그러나 도 2D에서, 표적-특이적 프로브는 절단되지 않았다. 따라서, 비오틴-PE 복합체가 형성되어 검출가능한 신호가 산출될 수 있다. 그러므로, 반응에 표적 핵산이 존재하는 경우 신호 감소가 관찰될 것이다. 본 구현예에서, 비오틴은 임의의 형광색으로 치환될 수 있다.

[0056] 또다른 구현예에서, 형광단은 프로브의 3' 말단 또는 5' 말단에 부착될 수 있고, 비오틴은 반대 말단에 부착될 수 있다. 상기 배열에서, 비오틴은 폴리머라아제의 엑소뉴클레아제 활성에 의해 프로브로부터 절단될 것이다. 이후, 과량의 자성 아비딘 코팅된 비이드로의 비오틴 제거 단계가 사용된다. 표적의 결핍으로 인해 프로브/형광/비오틴 복합체가 절단되지 않는 경우, 제거 단계에서의 반응으로부터 전체 복합체가 제거될 것이다. 절단이 일어나는 경우, 비오틴이 태그/형광단으로부터 방출될 것이고 제거 단계 동안 반응으로부터 오직 비오틴이 제거될 것이다. 그러므로, 증폭 동안 표적 핵산이 존재한 경우 혼성화 비이드 상의 신호 증가가 관찰된다.

[0057] **B.PCR**

[0058] 폴리머라아제 연쇄 반응(PCR)은 인 비트로 효소 복제에 의해 DNA 조각을 증폭시키기 위해 분자 생물학에서 널리 사용되는 기법이다. 전형적으로, PCR 적용은 열-안정성 DNA 폴리머라아제, 예컨대 Taq 폴리머라아제를 사용한다. 상기 DNA 폴리머라아제는 DNA 합성을 개시하기 위해 주형으로서 단일-가닥 DNA 및 DNA 프라이머를 사용하여 뉴클레오티드(dNTP)로부터 신규 DNA 가닥을 효소적으로 조립한다. 기본 PCR 반응은 하기를 포함하는 여러 성분 및 시약을 필요로 한다: 증폭시키고자 하는 표적 서열을 함유하는 DNA 주형; 표적 서열의 5' 및 3' 말단에서 DNA 영역에 상보적인 하나 이상의 프라이머; 바람직하게는 약 70°C에서 최적 온도를 갖는 DNA 폴리머라아제 (예를 들어, Taq 폴리머라아제); 디옥시뉴클레오티드 트리포스페이트(dNTP); DNA 폴리머라아제의 최적 활성 및 안정성을 위해 적합한 화학적 환경을 제공하는 완충액; 2가 양이온, 전형적으로는 마그네슘 이온(Mg²⁺); 및 1가 칼륨 양이온.

[0059] 대다수의 PCR 방법은 PCR 샘플을 정의된 일련의 온도 단계에 적용시키는 열 사이클링을 사용한다. 각각의 사이클은 전형적으로 2 또는 3개의 분리된 온도 단계를 갖는다. 사이클링은 종종 고온(>90°C)에서의 단일 온도 단계 ("개시") 후, 최종 생성물 확장("최종 확장") 또는 간략한 저장("최종 유지")을 위해 마지막에 1 또는 2개의 온도 단계로 진행된다. 각각의 사이클에 사용된 온도 및 적용한 시간 길이는 다양한 파라미터에 따라 다르다. 여기에는 DNA 합성에 사용된 효소, 반응 내 2가 이온 및 dNTP의 농도, 및 프라이머의 용융 온도(T_m)가 포함된다. PCR 방법에서의 다양한 단계에 대해 통상 사용되는 온도는, 개시 단계 - 94-96°C; 변성 단계 - 94-98°C; 어닐링 단계 - 50-65°C; 확장/신장 단계 - 70-74°C; 최종 신장 - 70-74°C; 최종 유지 - 4-10°C이다.

[0060] 실시간 폴리머라아제 연쇄 반응(또한 정량적 실시간 폴리머라아제 연쇄 반응 (qPCR) 또는 동적 폴리머라아제 연쇄 반응이라고도 불림)은, 표적 DNA 분자를 증폭시키고 동시에 정량화하는데 사용된다. 이것은 DNA 샘플 내 특이적 서열의 검출 및 정량화(절대 카피수 또는 DNA 입력량 또는 부가적인 정규화 유전자에 대해 정규화되는 경우 상대적인 양으로서) 모두를 가능하게 한다. 실시간 PCR은 저 빈도 RNA를 정량화하기 위해 역전사 폴리머라아제 연쇄 반응과 조합될 수 있다. 실시간 PCR의 지수 상 동안 존재하는 DNA의 상대적인 농도는 형광을 로그 스케일로 사이클 수에 대해 플롯팅함으로써 측정된다. 이후 DNA의 양은 결과를 공지된 양의 DNA의 연속 희석물의 실시간 PCR에 의해 생성된 표준 곡선과 비교하여 측정될 수 있다.

[0061] 디지털 PCR(dPCR)은 샘플을 구획화하는 것을 포함하여 샘플에 함유된 개별 핵산 분자가 많은 분리된 영역에, 예컨대 마이크로웰 플레이트 중의 개별 웰에, 예멸전의 분산된 상에, 또는 핵산 결합 분자의 어레이에 위치하도록 한다. 각각의 분획은 0 또는 1개의 분자를 함유하여 각각 음성 또는 양성 반응을 제공할 것이다. 통상의 PCR과는 달리, dPCR은 샘플 내 표적 핵산의 초기 양을 측정하기 위한 증폭 사이클의 수에 의존하지 않는다. 따라서, dPCR은 표적 핵산을 정량하기 위한 지수 데이터에 대한 의존성을 제거하여 절대 정량화를 제공한다.

[0062] 복합-PCR 및 복합 실시간 PCR은 상이한 DNA 서열의 앰플리콘을 생성하기 위해 단일 PCR 반응 내에서 복합의, 독특한 프라이머 세트를 사용한다. 복합 유전자를 일시에 표적함으로써 단일 시험 실행으로부터 부가적인 정보를 수득할 수 있다(그렇지 않으면 수행하는데 여러 회의 시약 및 더 많은 시간을 필요로 할 것임). 각각의 프라이머 세트에 대한 어닐링 온도는 단일 반응 내에서 작업하기에 최적화되어야만 한다.

[0063] **C.상보적 태그**

[0064] 본 발명의 일부 구현예에서는 프라이머 및/또는 프로브 내에 상보적 태그 서열(즉, 태그 및 안티-태그)을 사용

한다. 비-혼성화 태그 및 안티-태그 서열의 적합한 선택은 어세이, 특히 엄격한 비-교차 혼성화 거동을 필요로 하는 고도로 평행인 혼성화 환경에서의 어세이에서 유용하다.

[0065] 핵산 혼성물 형성의 특정한 열동학적 특성은 태그 및 안티-태그 서열의 디자인에서 고려된다. 올리고뉴클레오티드가 T_m (핵산 이중체의 50%가 해리되는 온도)으로서 알려진 이들의 상보적 서열과 이중체를 형성하는 온도는 정규적 쌍 A-T 및 G-C(GC 또는 염기 조성에 반영됨)의 수소 결합 에너지, 적층 자유 에너지 및, 좀더 좁은 범위까지는, 가장 근접한 이웃 상호작용을 비롯한 다수의 서열 의존적 특성에 따라 다르다. 상기 에너지는 혼성화 어세이에 전형적으로 사용되는 올리고뉴클레오티드 사이에서 매우 다양하다. 예를 들어, 표준 조건 하에서 그의 상보적 표적과의, 하나는 40% GC 함량을 갖고 다른 것은 60% GC 함량을 갖는, 24개의 뉴클레오티드로 구성된 2개의 프로브 서열의 혼성화는 이론상 용융 온도에서 10°C 차이가 날 수 있다(Mueller et al., 1993). 세트의 모든 올리고뉴클레오티드 서열의 올바른 혼성화에 최적이지 아닌 단일 혼성화 온도를 포함하는 혼성화 조건하에서 혼성물이 형성되도록 허용될 때 혼성화에서의 문제가 발생한다. 비-상보적 프로브의 미스매치 혼성화가 일어나서, 측정가능한 미스매치 안정성을 갖는 이중체가 형성될 수 있다(Santalucia et al., 1999). 특정한 세트의 올리고뉴클레오티드 중의 이중체의 미스매치는 미스매치가 상기 특정한 세트의 최소한 안정한 올바른 이중체보다 높은 T_m 을 산출하는 이중체 안정성의 감소를 야기하는 혼성화 조건 하에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 혼성화가 AT-풍부 완벽 매치 이중체 서열을 선호하는 조건 하에서 수행되는 경우, 가능성은 여전히 올바르게 형성된 AT-풍부 이중체를 넘어서는 용융 온도를 갖는 미스매치 염기를 함유하는 GC-풍부 이중체 서열을 혼성화하기 위해 존재한다. 그러므로, 복합 혼성화 반응에 사용될 수 있는 올리고뉴클레오티드 서열 계열의 디자인에는 디자인된 올리고뉴클레오티드 세트 내의 교차 혼성화 거동을 감소시키거나 제거할 올리고뉴클레오티드 및 이중체 형성의 열역학적 특성에 대한 고려가 포함되어야만 한다.

[0066] 복합 혼성화 어세이에서 사용하기 위해 태그 및 안티-태그 서열을 선택하기 위한 다수의 상이한 접근법이 있다. 관독가능한 어레이에서 우편 번호 또는 태그로서 사용될 수 있는 서열의 선택은 Brenner 및 그의 동료(본원에 참조로서 인용된 미국 특허 5,654,413호)에 의한 접근법으로 특허 문헌에 기재되어 있다. 문헌 Chetverin et al.(본원에 참조로서 인용된 WO 93/17126, 미국 특허 6,103,463호 및 6,322,971호)에는 핵산을 분류하고 조사하기 위한 구획화된, 2진법 올리고뉴클레오티드 어레이가 기재되어 있다. 상기 어레이는 둘다 공유 연결 부분에 의해 고체 지지체에 결합된 인접 가변 뉴클레오티드 서열에 부착되어 있는 일정한 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 서브유닛에 기반한 태그의 디자인에 사용되는 파라미터는 문헌 Barany et al.(본원에 참조로서 인용된 WO 9731256)에서 논의된다. 복합 서열분석 방법은 본원에 참조로서 인용된 미국 특허 4,942,124호에 기재되어 있다. 상기 방법은 태그 서열이 서로 상이한 2개 이상의 벡터를 사용한다.

[0067] 본원에 참조로서 인용된 미국 특허 7,226,737호에는 210개의 비-교차 혼성화 태그 및 안티-태그의 세트가 기재되어 있다. 본원에 참조로서 인용된 미국 공개 출원 2005/0191625호에는 최소 교차 혼성화로 이들의 상동적 서열에 올바르게 혼성화되는 입증된 능력을 가진 1168개의 태그 서열 계열이 기재되어 있다. 본원에 참조로서 인용된 미국 공개 번호 2009/0148849에는 핵산 서열의 증폭에서의 태그, 안티-태그, 및 포획 복합체의 사용이 기재되어 있다.

[0068] 올리고뉴클레오티드 태그 또는 안티-태그 서열의 집단은 직접적인 화학적 합성, 화학적 커플링, 라이게이션, 증폭 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 여러 상이한 방식으로 프라이머 또는 다른 폴리뉴클레오티드 서열의 집단에 공액될 수 있다. 표적 특이적 프라이머 서열로 합성되는 서열 태그는 예를 들어 PCR 증폭에서 표적 상의 프라이머의 효소적 확장에 사용될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 태그 또는 안티-태그 서열의 집단은 지지체의 표면 상에 예를 들어, 표면 화학에 의해 고체 지지체에 공액될 수 있다.

[0069] **D. 고체 지지체**

[0070] 특정한 구현예에서, 프로브 및/또는 프라이머는 고체 지지체에 부착될 수 있다. 이러한 고체 지지체는 예를 들어, 마이크로스피어(즉, 비이드) 또는 다른 입자, 예컨대 미세입자, 금 또는 기타 금속 나노입자, 양자점, 또는 나노점일 수 있다. 특정한 양상에서, 입자는 자성, 상자성 또는 초상자성일 수 있다. 마이크로스피어, 비이드 및 입자의 예는 본원에 참조로서 인용된 미국 특허 5,736,330호(Fulton), 5,981,180호(Chandler et al.), 6,057,107호(Fulton), 6,268,222호(Chandler et al.), 6,449,562호(Chandler et al.), 6,514,295호(Chandler et al.), 6,524,793호(Chandler et al.), 및 6,528,165호(Chandler)에 예시되어 있다.

[0071] 입자는 표지로 코드화될 수 있다. 특정한 구현예에서, 본 발명은 Luminex® xMAP® 및 MagPlex™ 기법과 함께 사용된다. Luminex xMAP 기술은 형광으로 코드화된 마이크로스피어 상에 부동화된 핵산 생성물의 검출을 가능하게 한다. 마이크로스피어를 10개의 상이한 강도의 각각의 2개의 스펙트럼상으로 구별되는 형광색소로 염색함으

로써, 100개의 형광이 구별되는 집단의 마이크로스피어를 제조한다. 상기 개별적인 집단(세트)는 개별적인 검출 서열을 나타낼 수 있고, 각각의 세트에 대한 혼성화의 규모는 개별적으로 검출될 수 있다. 혼성화 반응의 규모는 전형적으로는 세번째의 스펙트럼상으로 구별되는 형광단인 세번째 리포터를 사용하여 측정된다. 표지된 가수분해 프로브가 마이크로스피어에 부착되어 있는 구현예에서, 프로브의 혼성화 및 가수분해는 세번째 리포터로부터의 신호 감소를 산출한다. 마이크로스피어 및 리포터 분자 모두가 표지되어 있으므로, 디지털 신호 처리작업은 각각의 반응에 대해 실시간의, 정량적 데이터로의 신호의 해석을 가능하게 한다. Luminex 기술은 예를 들어, 모두 참조로서 구체적으로 인용된 미국 특허 5,736,330, 5,981,180, 및 6,057,107호에 기재되어 있다. Luminex® MagPlex™ 마이크로스피어는 상기 논의된 xMAP® 기술을 사용하여 형광으로 코드화된 초상장성 마이크로스피어이다. 마이크로스피어는 리간드(또는 생분자)의 공유 부착을 위해 표면 카르복실기를 함유한다.

[0072] 대안적으로는, 고체 지지체는 평면 어레이, 예컨대 유전자 칩 또는 마이크로어레이일 수 있다(예를 들어, Pease et al., 1994; Fodor et al., 1991 참조). 평면 어레이 상의 핵산의 확인은 전형적으로는 어레이 상의 이의 공간적 위치에 의해 측정된다. 마이크로스피어 기반 어레이는 또한 비이드 어레이 플랫폼 상에서 분석될 수 있다. 일반적으로, 비이드 어레이 플랫폼 영상 비이드 및 분석물은 실질적으로 평면 어레이 상에 분배된다. 이러한 방식으로, 비이드 어레이의 영상화는 상기 논의된 유전자 칩과 유사하다. 그러나, 분석물이 전형적으로 어레이 상의 그의 공간적 위치에 의해 확인되는 유전자 칩과는 반대로, 비이드 어레이는 전형적으로 그것이 결합되어 있는 코드화된 마이크로스피어에 의해 분석물을 확인한다.

[0073] 고체 기질에 폴리뉴클레오티드 프로브를 부착시키거나 그 상에서 직접적으로 합성하는 능력은 당업계에 잘 알려져 있다. 둘다 참조로서 인용된 미국 특허 5,837,832호 및 5,837,860호를 참조한다. 프로브를 기질에 영구적으로 또는 제거가능하게 부착시키는데 다양한 방법이 사용되어 왔다. 예시적인 방법에는 아비딘/스트렙타비딘 코팅된 지지체에 대한 비오틴화된 핵산 분자의 부동화(Holmstrom, 1993), 짧은, 5'-인산화 프라이머의 화학적으로 개질된 폴리스티렌 플레이트로의 직접적 공유 부착(Rasmussen et al., 1991), 또는 폴리스티렌 또는 유리 고체 상의 폴리-L-Lys 또는 폴리 L-Lys, Phe로의 예비코팅 후, 이작용성 가교 시약을 사용하는 아미노- 또는 술폰히드릴-개질된 올리고뉴클레오티드의 공유 부착(Running et al., 1990; Newton et al., 1993)이 포함된다. 강화 니트로셀룰로오스 멤브레인, 활성화 석영, 활성화 유리, 폴리비닐리덴 디플루오라이드(PVDF) 멤브레인, 폴리스티렌 기질, 폴리아크릴아미드계 기질, 다른 중합체, 예컨대 폴리(염화비닐), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(디메틸 실록산), 광중합체(표적 분자와 공유 결합을 형성할 수 있는 광반응성 중, 예컨대 니트렌, 카르벤 및 케틸 라디칼을 함유함)를 포함하여 수많은 물질이 고체 지지체로서 사용될 수 있다.

[0074] **E. 검출**

[0075] 본 발명의 다양한 양상은 신호의 증가 또는 감소를 감지함에 의한 하나 이상의 표적 핵산의 직접 또는 간접 검출에 관한 것이다. 사용되는 검출 기법은 리포터 및 플랫폼(예를 들어, 스펙트럼상으로 코드화된 비이드, 마이크로어레이 등)의 유형에 따라 다를 것이다. 예를 들어, 유세포 분석은 마이크로스피어 기반 어레이의 분석에 특히 유용하다. 유세포 분석은 액체 샘플 중의 세포 또는 다른 입자, 예컨대 마이크로스피어의 분리에 관여한다. 일반적으로, 유세포 분석의 목적은 하나 이상의 특성에 대해 분리된 입자를 분석하는 것이다. 유세포 분석의 기본 단계는 장치를 통해 유체 샘플을 통과시켜, 액체 스트림이 감지 영역을 통과하게 하는 것을 수반한다. 입자는 센서에 의해 하나씩 차례로 통과해야만 하고, 크기, 굴절률, 광산란, 탁도, 조도, 형상, 형광, 등에 근거하여 분류된다.

[0076] Luminex xMAP® 시스템의 문맥에서, 유세포 분석은 동시 서열 확인 및 혼성화 정량화에 사용될 수 있다. 마이크로스피어 내의 내부 염료는 유세포 분석에 의해 검출되며, 마이크로스피어가 커플링되는 특이적인 핵산 서열을 확인하는데 사용된다. 표적 핵산 분자 또는 프로브 상의 표지는 또한 유세포 분석에 의해 검출되며 마이크로스피어에 대한 혼성화를 측정하는데 사용된다.

[0077] 유세포 분석 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어 모두 참조로서 구체적으로 인용된 미국 특허에 기재되어 있다(미국 특허 5,981,180, 4,284,412; 4,989,977; 4,498,766; 5,478,722; 4,857,451; 4,774,189; 4,767,206; 4,714,682; 5,160,974; 및 4,661,913). 본원에 기재된 측정값에는 복합 검출 과정에서 입자의 형광 방출 규모를 나타내는 수 값과 같은 입자의 하나 이상의 특징을 측정하기 위한 입자의 하나 이상의 영상을 분석하기 위한 영상 처리작업이 포함될 수 있다. 입자의 하나 이상의 특징의 후속 처리작업, 예컨대 입자가 속하는 복합 서브세트를 나타내는 상징 ID 및/또는 입자의 표면에 결합된 분석물의 존재 및/또는 양을 나타내는 리포터 값을 측정하기 위해 하나 이상의 수치 값을 사용하는 것은 본원에 참조로서 인용된 미국 특허 5,736,330호(Fulton), 5,981,180호(Chandler et al.), 6,449,562호(Chandler et al.), 6,524,793호(Chandler et al.),

6,592,822호(Chandler), 및 6,939,720호(Chandler et al.)에 기재된 방법에 따라 수행될 수 있다.

[0078] 하나의 예에서, 미국 특허 5,981,180호(Chandler et al.)에 기재된 기법은 단일 샘플 내의 복합 분석물의 분석을 위해 입자를 서브세트로 분류하는 복합화 계획에서 본원에 기재된 형광 측정값과 함께 사용될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이 설정될 수 있는 시스템의 부가적인 예(예를 들어, 본원에 기재된 조명 서브시스템의 구현예의 포함에 의해)는 본원에 참조로서 인용된 미국 특허 5,981,180호(Chandler et al.), 6,046,807호(Chandler), 6,139,800호(Chandler), 6,366,354호(Chandler), 6,411,904호(Chandler), 6,449,562호(Chandler et al.), 및 6,524,793호(Chandler et al.)에 예시되어 있다.

[0079] 마이크로스피어는 또한 영상 비이드 및 분석물이 실질적으로 평면인 어레이 상에 분배된 어레이 플랫폼 상에서 분석될 수 있다. 상기 방식으로, 비이드 어레이의 영상화는 유전자 칩의 영상화와 유사하다. 하지만, 분석물이 어레이 상의 그의 공간적 위치(즉, x, y 좌표)에 의해 확인되는 유전자 칩과는 반대로, 비이드 어레이는 전형적으로 그것이 결합되어 있는 코드화된 마이크로스피어에 의해 분석물을 확인한다. 시판되는 비이드 어레이 시스템의 예에는 Luminex의 MAGPIX®, 및 Illumina의 BeadXpress™ Reader 및 BeadStation 500™가 포함된다. 일단 비이드가 평면 층에 있으면, 이들은 이들의 "코드화"(포함된 염료의 형태로, 또는 각각의 비이드 유형에 대해 독특한 신호를 생성하는 다른 방법으로)에 의해 확인될 수 있다. 비이드의 "코드"의 도출 후 또는 이를 진행하면서, 신호가 측정될 수 있고, 상기 2개의 측정값을 비이드에 대한 특정 핵산의 혼성화를 측정하기 위해 커플링한다.

[0080] **F. 키트**

[0081] 본 발명은 또한 본원에 기재된 증폭 및 검출 방법과 함께 사용하기 위한 구성요소를 함유하는 키트를 제공한다. 본원에 기재된 구성요소 중 임의의 것은 키트에서 조합될 수 있다. 특정한 구현예에서, 키트는 다수의 핵산 표적의 증폭을 개시하기 위한 다수의 프라이머, 및 상기 다수의 핵산 표적에 상보적인 다수의 프로브를 포함한다. 일부 구현예에서, 프로브는 고체 지지체(들) 상에 부동화된다. 하나의 구현예에서, 다수의 프로브는 다수의 코드화된 자성 비이드에 부착되어, 프로브가 부동화되어 있는 코드화된 자성 비이드로부터 각각의 프로브의 정체가 알려지도록 한다. 특정한 구현예에서, 키트는 또한 표지화제를 포함한다. 특정한 구현예에서, 키트는 고체 지지체에 부착되어 있지 않은 프로브를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 영상화 시스템에 사용하기 위한, 영상화 챔버(일회용 영상화 챔버일 수 있음)를 포함한다.

[0082] 키트는 일반적으로 구성요소가 위치할 수 있을, 바람직하게는 배분되어 있을 하나 이상의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 다른 용기를 포함할 것이다. 키트 내에 하나 초과인 구성요소가 있는 경우, 키트는 또한 일반적으로 부가적인 구성요소가 별도로 위치할 수 있을 제2의, 제3의 또는 다른 부가적인 용기를 함유할 것이다. 그러나, 다양한 구성요소의 조합이 용기에 포함될 수 있다. 본 발명의 키트는 또한 전형적으로는 시판을 위해 밀폐된 상태의 다양한 용기를 함유하기 위한 포장을 포함할 것이다. 이러한 포장은 원하는 용기를 내부에 담은 판지 또는 사출 또는 취입 성형 플라스틱 포장을 포함할 수 있다.

[0083] 키트는 또한 키트 구성요소를 사용하기 위한 지침을 포함할 수 있다. 지침에는 실행될 수 있는 변형이 포함될 수 있다.

[0084] **G. 실시예**

[0085] 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 입증하기 위해 포함된다. 당업자는 하기 실시예에 기재된 기술이 본 발명의 실시예에 잘 기능하도록 발명자에 의해 발견된 기술을 나타내고, 그러므로 실시를 위해 바람직한 방식을 구성하는 것으로 고려될 수 있다는 것을 인지해야만 한다. 그러나, 당업자는 본 출원의 견지에서, 기재된 특이적 구현예에 많은 변화가 이루어질 수 있으며, 본 발명의 취지 및 범주로부터 벗어남 없이 여전히 유사한 결과를 수득할 수 있다는 것을 인지해야만 한다.

[0086] Luminex MagPlex® 마이크로스피어는 제조자의 지침에 따라 아민-개질된 올리고뉴클레오티드 프로브에 커플링되었다.

[0087] 마이크로스피어 영역 25를 스태필로코쿠스 에피더미디스(Staphylococcus Epidermidis)에 특이적인 프로브에 커플링시켰다:

[0088] 5'- /5AmMC12/CAG CTG TTC GTA ATA ATG GCG GTG GTC/3Cy3Sp/-3' (SEQ ID NO: 1)

[0089] 마이크로스피어 영역 54를 스태필로코쿠스 에피더미디스에 혼성화되지 않도록 디자인되었던 프로브에 커플링시

켰다:

- [0090] 5'-/5AmMC12/GAT TGT AAG ATT TGA TAA AGT GTA/3Cy3Sp/-3' (SEQ ID NO: 2)
- [0091] 이후 하기를 포함하는 PCR Master Mix를 각각의 반응에 대해 제조하였다:
- [0092] 2x TaqMan® Master Mix (Applied Biosystems)..... 12.5 μ l
- [0093] 물..... 5.7 μ l
- [0094] 50 mM MgCl₂..... 2.0 μ l
- [0095] 20x Primer Mix..... 1.3 μ l
- [0096] 영역 당 2500 비이드/ μ l..... 1.0 μ l
- [0097] 20x Primer Mix는 1 μ l 당 하기 비율로 함유하였다:
- [0098] TE pH8.0 0.64 μ l
- [0099] 100 μ M 정방향 프라이머..... 0.18 μ l
- [0100] 100 μ M 역방향 프라이머..... 0.18 μ l
- [0101] 정방향 프라이머는 하기 올리고뉴클레오티드 서열을 가졌다:
- [0102] 5'- TCA GCA GTT GAA GGG ACA GAT-3' (SEQ ID NO: 3)
- [0103] 역방향 프라이머는 하기 올리고뉴클레오티드 서열을 가졌다:
- [0104] 5'- CCA GAA CAA TGA ATG GTT AAG G-3' (SEQ ID NO: 4)
- [0105] 주형을 ATCC # 12228D-5(S. 에피더미디스(S. Epidermidis) 정제된 DNA)로부터 구입하였다. 물 중의 2.5 μ l의 주형을 각각의 "주형" PCR 반응(반응 당 2ng)에 첨가하고, 2.5uL 물 단독을 "주형 없음" PCR 반응에 첨가하였다.
- [0106] 하기 열 사이클링 프로토콜을 ABI Step One Plus ThermalCycler에 대해 사용하였다:
- [0107] 50°C, 2분.
- [0108] 95°C, 10분
- [0109] 이후 2단계 PCR의 35회 사이클
- [0110] 95°C, 15초.
- [0111] 60°C, 1분.
- [0112] PCR 후, 반응 혼합물을 저 PMT 세팅으로 Luminex FLEXMAP 3D 기구에 직접 취하고, MFI 데이터 지점 당 100개의 마이크로스피어를 사용하여 중앙 형광 강도(Median Fluorescent Intensity:MFI) 값에 대해 분석하였다.
- [0113] 하기 원(raw) MFI 결과를 획득하였다:

표 1

원 MFI

샘플	영역 54	영역 25
	비-특이적	특이적
주형	4251	3854
주형	4350	3876
주형	4342	3804
주형	4375	3870
주형 없음	4320.5	4278.5
주형 없음	4268	4215
주형 없음	4301	4315
주형 없음	4301.5	4237

[0115] 상기 결과를 표 2에 평균으로 나타내었다:

표 2
평균 MFI

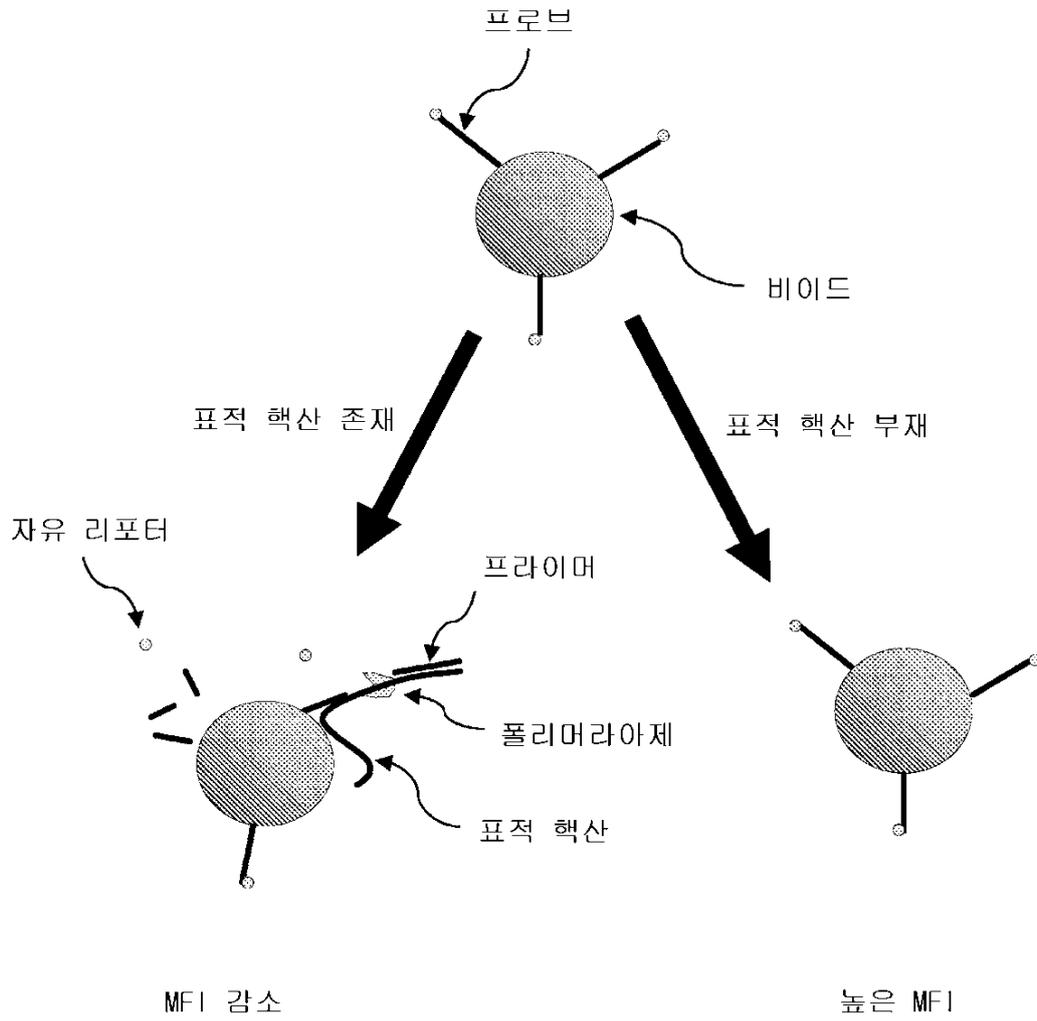
	영역 54	영역 25
	비-특이적 프로브	특이적 프로브
주형 (ave)	4330	3851
주형 없음 (ave)	4298	4261

[0117] 32 MFI의 차이가 비-특이적 프로브(즉, 비-혼성화 프로브)에 대해 보여져, 엑소뉴클레아제 활성으로 인한 유의한 변화가 없음을 증명하였다. 특이적 프로브에 대해서는, 410 MFI의 차이가 PCR 반응 동안 주형의 존재 하에서 특이적 엑소뉴클레아제 활성을 보여준다. 도 3은 상기 차이를 그래프로 나타낸다.

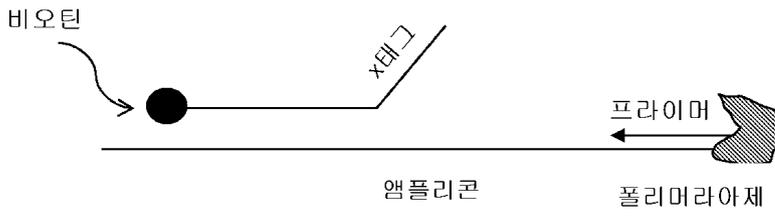
[0118] 본원에 기재되고 청구된 모든 조성물 및 방법은 본 명세서의 견지에서 과도한 실험 없이 제조되고 실행될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법이 특정한 구현예와 관련하여 기재되는 반면, 당업자에게는 본 발명의 개념, 취지 및 범주로부터 벗어남 없이 조성물 및 방법 및 본원에 기재된 방법의 단계 또는 단계의 순서에 변형을 가할 수 있다는 것이 명백할 것이다. 더욱 구체적으로는, 화학적으로 그리고 생리학적으로도 관련된 특정한 작용제는 동일한 또는 유사한 결과가 달성된다면 본원에 기재된 작용제를 대체할 수 있다는 것이 명백할 것이다. 당업자에게 명백한 이러한 유사한 대체물 및 변형 모두는 첨부된 청구항에 의해 정의되는 바와 같이 본 발명의 취지, 범위 및 개념 내에 있는 것으로 간주된다.

도면

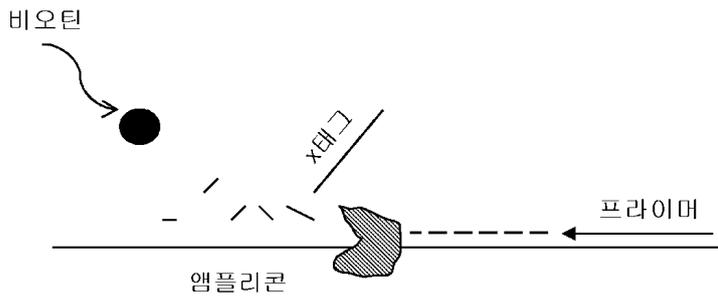
도면1



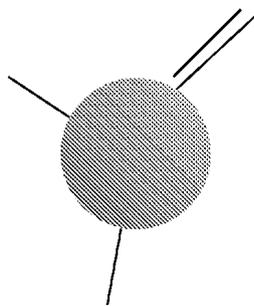
도면2



도 2A

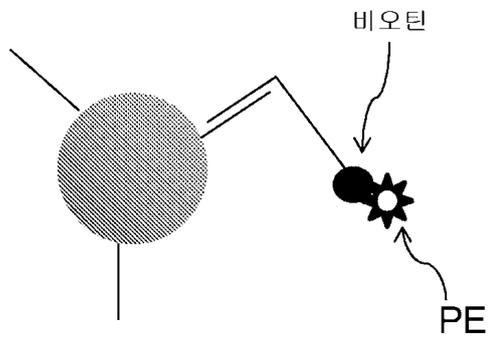


도 2B



주형/증폭
= MFI 감소

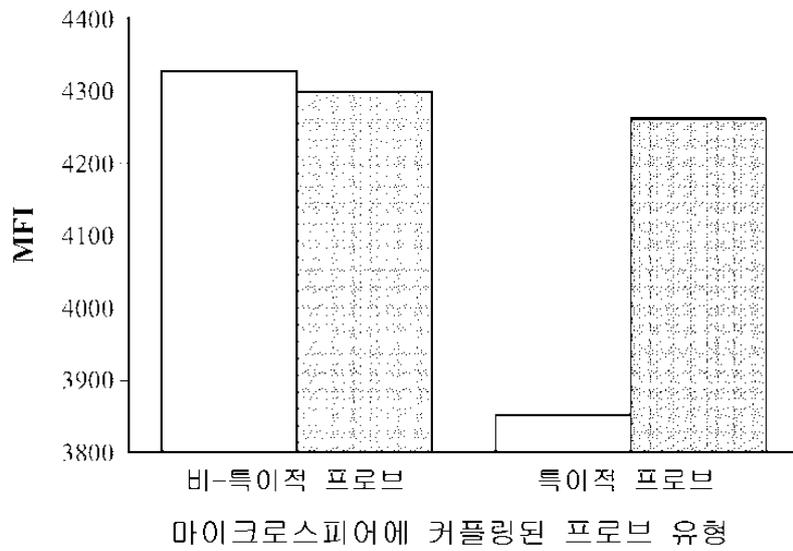
도 2C



주형없음/증폭없음
= 높은 MFI

도 2D

도면3



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> LUMINEX CORPORATION

- <120> HYDROLYSIS PROBES
- <130> IP20142436US
- <150> 61/540,868
- <151> 2011-09-29
- <160> 4
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 27
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Synthetic primer
- <220><221> 5AmMC12
- <222> (1)..(1)
- <220><221> 3Cy3Sp
- <222> (27)..(27)
- <400> 1
- cagctgttcg taataatggc ggtggtc

- <210> 2
- <211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic primer
 <220><221> 5AmMC12
 <222> (1)..(1)
 <220><221> 3Cy3Sp
 <222> (24)..(24)
 <400> 2
 gattgtaaga ttgataaag tgta 24
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer
 <400> 3
 tcagcagttg aaggacaga t 21
 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer
 <400> 4
 ccagaacaat gaatggtaa gg 22