



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0046018
 (43) 공개일자 2012년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2011-0100028
 (22) 출원일자 2011년09월30일
 심사청구일자 없음
 (30) 우선권주장
 13/158,593 2011년06월13일 미국(US)
 (뒷면에 계속)

(71) 출원인
삼성테크윈 주식회사
 경상남도 창원시 성산구 창원대로 1204 (성주동)
 (72) 발명자
옵디케 제이슨
 미국 메릴랜드 20901, 실버 스프링, 사우스 던무르 드라이브, 10615
하비 존
 미국 메릴랜드 21075, 엘크리지, 오아크 그로브웨이, 7065
 (74) 대리인
리엔목특허법인

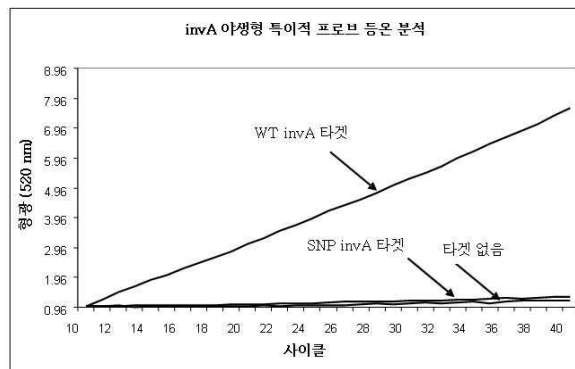
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 **단일 뉴클레오티드 다형성의 실시간 PCR 검출**

(57) 요약

실시간 PCR(real-time PCR) 동안 다형성의 검출을 위한 방법 및 키트가 개시된다. 타겟 핵산 서열의 실시간 PCR 증폭은 목적 단일 뉴클레오티드 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)의 옆에 배치된 서열에 어닐링하는 PCR 프라이머를 사용하여 수행된다. 실시간 PCR 반응은 SNP 위치의 DNA 서열에 어닐링하도록 고안된, RNA 서열을 포함하는 표지된 프로브를 포함한다. 그 다음, PCR 단편(fragment)의 SNP와, 상기 SNP에 상보적인 상기 프로브의 RNA 서열 간에 RNA:DNA 이형이중가닥(heteroduplex)이 형성될 수 있다. 상기 RNA:DNA 이형이중가닥 내 RNA 서열의 RNase H 절단은, 타겟 핵산 내 SNP의 존재를 나타내는, 상기 표지로부터 발생하는 신호 강도의 증가를 야기한다.

대표도 - 도1



(30) 우선권주장

61/389,412 2010년10월04일 미국(US)

61/390,701 2010년10월07일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

- a) 다형성(polymorphism)을 갖는 타겟 DNA의 존재에 대해 시험될 샘플을 제공하는 단계;
- b) 상기 타겟 DNA에 어닐링(anneal)할 수 있는 증폭 프라이머(amplification primer) 쌍을 제공하는 단계로, 제1 증폭 프라이머는 다형성 위치(location of polymorphism)의 상류(upstream)에 어닐링하고, 제2 증폭 프라이머는 다형성 위치의 하류(downstream)에 어닐링하는 것인 단계;
- c) 검출가능한 표지(label), 및 DNA 및 RNA 핵산 서열을 포함하는 프로브를 제공하는 단계로, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 상기 다형성을 포함하는 타겟 DNA 서열의 선택된 영역에 완전히 상보적이고(entirely complementary), 상기 프로브의 DNA 핵산 서열은 상기 타겟 DNA 서열의 선택된 영역에 인접한 DNA 서열에 실질적으로 상보적인(substantially complimentary) 것인 단계;
- d) 상기 프로브 내의 RNA 서열이, 상기 다형성을 포함하는 PCR 단편 내의 상보적인 DNA 서열과 RNA:DNA 이형이 증가닥(heteroduplex)을 형성할 수 있는 조건 하에서, 증폭 폴리머라제(amplifying polymerase) 활성화, 증폭 완충액(amplification buffer); RNase H 활성화 및 프로브의 존재 하에, 상기 제1 및 제2 증폭 프라이머 간의 PCR 단편(fragment)을 증폭시키는 단계; 및
- e) 상기 프로브 상의 표지로부터의 신호 방출의 실시간 증가(real-time increase)를 검출하는 단계를 포함하고, 상기 신호의 증가는 타겟 DNA 내 다형성의 존재를 나타내는 것인, 타겟 DNA 내 다형성의 실시간 검출 방법.

청구항 2

- a) 다형성을 갖는 타겟 DNA의 존재에 대해 시험될 샘플을 제공하는 단계;
- b) 상기 타겟 DNA에 어닐링할 수 있는 증폭 프라이머 쌍을 제공하는 단계로, 제1 증폭 프라이머는 다형성 위치의 상류에 어닐링하고, 제2 증폭 프라이머는 상기 다형성 위치의 하류에 어닐링하는 것인 단계;
- c) 검출가능한 표지 및 DNA 및 RNA 핵산 서열을 포함하는 프로브를 제공하는 단계로서, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 상기 다형성 위치에서 야생형 DNA 서열을 포함하는 타겟 DNA 서열의 선택된 부위에 완전히 상보적이고, 상기 프로브의 DNA 핵산 서열은 상기 타겟 DNA 서열의 선택된 부위에 인접한 DNA 서열에 실질적으로 상보적인 것인 단계;
- d) 상기 프로브 내의 RNA 서열이 상기 다형성을 포함하는 PCR 단편 내의 상보적인 DNA 서열과 RNA:DNA 이형이 증가닥을 형성할 수 있는 조건 하에서, 증폭 폴리머라제 활성화, 증폭 완충액; RNase H 활성화 및 프로브의 존재 하에, 상기 제1 및 제2 증폭 프라이머 간의 PCR 단편을 증폭시키는 단계; 및
- e) 상기 프로브 상의 표지로부터의 신호 방출의 실시간 감소를 검출하는 단계를 포함하고, 상기 신호의 감소는 상기 타겟 DNA 내의 다형성의 존재를 나타내는 것인, 타겟 DNA 내 다형성의 실시간 검출 방법.

청구항 3

- a) 다형성을 갖는 타겟 RNA의 존재에 대해 시험될 샘플을 제공하는 단계;
- b) 상기 RNA 타겟의 cDNA에 어닐링할 수 있는 증폭 프라이머 쌍을 제공하는 단계로, 제1 증폭 프라이머는 다형성 위치의 상류에 어닐링하고, 제2 증폭 프라이머는 상기 다형성 위치의 하류에 어닐링하는 것인 단계;
- c) 검출가능한 표지 및 DNA 및 RNA 핵산 서열을 포함하는 프로브를 제공하는 단계로서, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 다형성을 포함하는 cDNA 서열의 선택된 부위에 완전히 상보적이고, 상기 프로브의 DNA 핵산 서열은 상기 cDNA 서열의 선택된 부위에 인접한 DNA 서열에 실질적으로 상보적인 것인 단계;
- d) 역전사 효소(reverse transcriptase) 활성화, 증폭 폴리머라제 활성화, 역전사 효소-PCR 완충액; RNase H 활성화 및 프로브의 존재 하에, 및 상기 프로브 내의 RNA 서열이, 상기 다형성을 포함하는 RT-PCR DNA 단편 내의 상보적인 서열과 RNA:DNA 이형이 증가닥을 형성할 수 있는 조건 하에서, 상기 제1 및 제2 증폭 프라이머 간의 역전사

효소-PCR 단편을 증폭시키는 단계; 및

e) 상기 프로브 상의 표지로부터의 신호 방출의 실시간 증가를 검출하는 단계를 포함하고,

상기 신호의 증가는 상기 RNA 타겟 내의 다형성의 존재를 나타내는 것인, RNA 타겟 내 다형성의 실시간 검출 방법.

청구항 4

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 프로브 상의 표지로부터의 신호 방출의 실시간 증가는 상기 RNA:DNA 이형이중가닥 내 프로브의 RNA 서열의 RNase H 절단으로부터 야기되는 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 상기 타겟 DNA 내의 다형성에 상보적인 것인 방법.

청구항 6

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 다형성은 단일 뉴클레오티드 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)인 것인 방법.

청구항 7

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 프로브의 DNA 및 RNA 서열은 공유 결합되어(covalently linked) 있는 것인 방법.

청구항 8

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 프로브 상의 검출가능한 표지는 형광 표지(fluorescent label)인 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 형광 표지는 FRET 쌍을 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 PCR 단편은 고체 지지체에 결합되어 있는 것인 방법.

청구항 11

제3항에 있어서, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 상기 타겟 RNA 내의 다형성 위치의 cDNA에 상보적인 RNA 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제3항에 있어서, 상기 RNA 타겟은 mRNA 전사체(transcript)인 것인 방법.

청구항 13

제3항에 있어서, 상기 RNase H 활성은 핫 스타트(hot start), 열안정성(thermostable RNase H)의 활성인 것인 방법.

청구항 14

a) 다형성을 갖는 RNA 타겟의 존재에 대해 시험될 샘플을 제공하는 단계;

b) 상기 RNA 타겟의 cDNA에 어닐링할 수 있는 증폭 프라이머 쌍을 제공하는 단계로, 제1 증폭 프라이머는 다형성 위치의 상류에 어닐링하고, 제2 증폭 프라이머는 상기 다형성 위치의 하류에 어닐링하는 것인 단계;

c) 검출가능한 표지 및 DNA 및 RNA 핵산 서열을 포함하는 프로브를 제공하는 단계로서, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 상기 다형성 위치에서 야생형 DNA 서열을 포함하는 cDNA의 선택된 부위에 완전히 상보적이고, 상기 프로브의 DNA 핵산 서열은 상기 cDNA의 선택된 부위에 인접한 DNA 서열에 실질적으로 상보적인 것인 단계;

d) 역전사 효소 활성화, 증폭 폴리머라제 활성화, 역전사 효소-PCR 완충액; RNase H 활성화 및 프로브의 존재 하에, 및 상기 프로브 내의 RNA 서열이, 상기 다형성을 포함하는 RT-PCR DNA 단편 내의 상보적인 서열과 RNA:DNA 이형 이중가닥을 형성할 수 있는 조건 하에서, 상기 제1 및 제2 증폭 프라이머 간의 역전사 효소-PCR 단편을 증폭시키는 단계; 및

e) 상기 프로브 상의 표지로부터의 신호 방출의 실시간 감소를 검출하는 단계를 포함하고,

상기 신호의 감소는 상기 RNA 타겟 내의 다형성의 존재를 나타내는 것인, RNA 타겟 내 다형성의 실시간 검출 방법.

청구항 15

a) 제1 증폭 프라이머는 다형성 위치의 상류에 어닐링하고, 제2 증폭 프라이머는 다형성 위치의 하류에 어닐링하는 것인, 타겟 DNA에 어닐링할 수 있는 증폭 프라이머 쌍;

b) 검출가능한 표지 및 DNA 및 RNA 핵산 서열을 포함하는 프로브로, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 다형성을 포함하는 타겟 DNA 서열의 선택된 부위에 완전히 상보적이고, 상기 프로브의 DNA 핵산 서열은 상기 타겟 DNA 서열의 선택된 부위에 인접한 DNA 서열에 실질적으로 상보적인 것인 프로브;

c) 증폭 폴리머라제 활성화, 증폭 완충액; 및 RNase H 활성을 포함하는, 타겟 DNA 내 다형성의 실시간 검출을 위한 키트.

청구항 16

a) 제1 증폭 프라이머는 다형성 위치의 상류에 어닐링하고, 제2 증폭 프라이머는 다형성 위치의 하류에 어닐링하는 것인, 타겟 DNA에 어닐링할 수 있는 증폭 프라이머 쌍;

b) 검출가능한 표지 및 DNA 및 RNA 핵산 서열을 포함하는 프로브로, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 다형성 위치에서 야생형 DNA 서열을 포함하는 타겟 DNA 서열의 선택된 부위에 완전히 상보적이고, 상기 프로브의 DNA 핵산 서열은 상기 타겟 DNA 서열의 선택된 부위에 인접한 DNA 서열에 실질적으로 상보적인 것인 프로브;

c) 증폭 폴리머라제 활성화, 증폭 완충액; 및 RNase H 활성을 포함하는, 타겟 DNA 내 다형성의 실시간 검출을 위한 키트.

청구항 17

a) 제1 증폭 프라이머는 다형성 서열(polymorphic sequence) 위치의 상류에 어닐링하고, 제2 증폭 프라이머는 다형성 서열 위치의 하류에 어닐링하는 것인, RNA 타겟의 cDNA에 어닐링할 수 있는 증폭 프라이머 쌍;

b) 검출가능한 표지 및 DNA 및 RNA 핵산 서열을 포함하는 프로브로, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 다형성을 포함하는 cDNA의 선택된 부위에 완전히 상보적이고, 상기 프로브의 DNA 핵산 서열은 상기 cDNA의 선택된 부위에 인접한 DNA 서열에 실질적으로 상보적인 것인 프로브; 및

c) 역전사 효소 활성화, 증폭 폴리머라제 활성화, 역전사 효소-PCR 완충액; 및 RNase H 활성을 포함하는, RNA 타겟 내 다형성의 실시간 검출을 위한 키트.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 상기 타겟 DNA 내 다형성에 상보적인 서열을 포함하는 것인 키트.

청구항 19

제15항 또는 제17항에 있어서, 상기 다형성은 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)인 것인 키트.

청구항 20

제15항 또는 제17항에 있어서, 상기 프로브의 DNA 및 RNA 서열은 공유 결합되어 있는 것인 키트.

청구항 21

제15항 또는 제17항에 있어서, 상기 프로브 상의 검출가능한 표지는 형광 표지인 것인 키트.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 형광 표지는 FRET 쌍인 것인 키트.

청구항 23

제15항에 있어서, 상기 프로브 또는 PCR 단편은 고체 지지체에 결합된 것인 키트.

청구항 24

제17항에 있어서, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 상기 타겟 RNA 내의 다형성 위치의 cDNA에 상보적인 서열을 포함하는 것인 키트.

청구항 25

제17항에 있어서, 상기 프로브 또는 역전사 효소-PCR 단편은 고체 지지체에 결합된 것인 키트.

청구항 26

제17항에 있어서, 상기 역전사 효소 활성 및 증폭 폴리머라제 활성은 동일한 분자에서 발견되는 것인 키트.

청구항 27

- a) 제1 증폭 프라이머는 다형성 서열 위치의 상류에 어닐링하고, 제2 증폭 프라이머는 다형성 서열 위치의 하류에 어닐링하는 것인, RNA 타겟의 cDNA에 어닐링할 수 있는 증폭 프라이머 쌍;
- b) 검출가능한 표지 및 DNA 및 RNA 핵산 서열을 포함하는 프로브로, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 다형성 위치에서 야생형 DNA 서열을 포함하는 cDNA의 선택된 부위에 완전히 상보적이고, 상기 프로브의 DNA 핵산 서열은 상기 cDNA의 선택된 부위에 인접한 DNA 서열에 실질적으로 상보적인 것인 프로브; 및
- c) 역전사 효소 활성, 증폭 폴리머라제 활성, 역전사 효소-PCR 완충액; 및 RNase H 활성을 포함하는, RNA 타겟 내 다형성의 실시간 검출을 위한 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 특허출원은 2010년 10월 7일자로 제출된, 미국 가특허출원 제61/390,701호 및 2011년 6월 13일자로 제출된, 미국 특허출원 제13/158,593호에 대한 우선권을 주장하며, 그의 내용은 참조에 의해 전체로서 본 명세서에 삽입된다.

[0002] 본 개시는 SNP-특이적 CataCleave™ 프로브를 사용한 단일 뉴클레오티드 다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)의 실시간 PCR 검출을 기술한다.

배경기술

[0003] 인간 게놈 프로젝트(Human Genome Project, HGP)의 완성은 특정한 인간 개체군 내에서의 유전적 다양성, 및 다양성이 유전적 질환(genetic disease)의 발병 또는 소인(predisposition)과 어떻게 관련되는지에 대한 보다 우수한 이해를 가능하게 하였다. 예를 들면, 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP)로 지칭되는, 개체들 간의 단일 뉴클레오티드 차이는, 일부 상황에서는 누가 특정한 질환을 앓을 것인지, 또는 누가 상기 질환에 대한 특별한 치료에 반응할 것인지를 예측할 수 있는, 표현형에 있어서의 극적인 차이에 대한 원인일 수 있다. 약물유전체학(pharmacogenomics)의 범위는 의학적 치료가 환자의 유전적 구성(genetic make-up)에 맞춤화되는 신속한 접근방법이다. 환자의 DNA에서 유전적 돌연변이의 신속하고 신뢰할 만한 검출은, 의사의 임상적 진단 및 의학적 치료의 선택의 지침을 제공할 수 있다. 이는 발암 유전자(oncogene)의 코딩 영역(coding region) 내의 분리 돌연변이(discrete mutation)의 존재가 암 감수성(susceptibility) 및 예후의 강력한 예측자일 수 있는, 종양학(oncology)에서 특히 사실이다.

[0004] 예를 들면, BRCA 종양 억제 유전자(tumor suppressor gene) 내 유해한 돌연변이의 존재에 대한 유전자 검사는,

이제 대부분의 의료 행위에 있어서 통상적이다. 유해한 BRCA-1 돌연변이는, 낮은 연령에서는 (폐경 전) 여성의 유방암 및/또는 난소암의 발병 위험, 및 자궁경부암, 자궁암, 췌장암, 및 대장암의 발병 위험을 크게 증가시킬 수 있다. 유해한 BRCA2 돌연변이는 추가적으로 췌장암, 위암, 담낭암 및 담도암, 및 흑색종의 위험을 증가시킬 수 있다. TP53, PTEN, STK11/LKB1, CDH1, CHEK2, ATM, MLH1, 및 MSH2를 포함하는, 여러 다른 유전자들의 돌연변이가 유전성(hereditary) 유방 종양 및/또는 난소 종양과 관련이 있었다.

[0005] 핵산 증폭의 출현으로, 임의의 DNA 서열 중 단일 분자만큼 작은 것이라도, SNP 서열 분석을 가능하게 하기에 충분한 횟수로 복제될 수 있다. SNP는 DNA 서열분석(DNA sequencing), 형광 프로브 검출(fluorescent probe detection), 질량 분광분석(mass spectrometry) 또는 DNA 마이크로어레이 혼성화(DNA microarray hybridization) (예를 들면, 미국 등록특허 제5,885,775호; 제6,368,799호)와 같은, 다양한 기법들에 의해 검출될 수 있다. 이 방법들 중 다수가, 전반적인 불량한 민감도(sensitivity), 비용, 시간 지출 또는 후-PCR 처리(post-PCR processing)의 필요성으로 인해, 높은 출원 처리량에도 불구하고 불충분한 상태이다. 현존하는 SNP 검출 방법은 또한, 허용할 수 없는 높은 수준의 위양성(false positive) 및/또는 위음성(false negative) 결과를 나타낸다.

[0006] 전술한 이유들로 인해, DNA 증폭과 동시에 수행되는, SNP의 정확한 실시간 검출에 대한 충족되지 않은 요구가 당해 기술분야에 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] DNA 및 RNA 서열을 포함하는 특이적 프로브를 사용하는, 실시간 PCR 동안 SNP의 신속한 검출을 위한 방법 및 키트가 개시된다. 상기 방법은 비용 효율이 높고 신뢰할만한 방법으로, 단일 PCR 단편 상의 하나 이상의 SNP의 고 처리율 검출(high throughput detection)을 촉진하도록 보장한다.

과제의 해결 수단

[0008] 일 구체예에서, 다형성을 갖는 타겟 DNA의 존부에 대해 시험할 샘플을 제공하는 단계, 제1 증폭 프라이머가 상기 다형성 위치(position of the polymorphism)의 상류에 어닐링하고, 제2 증폭 프라이머는 상기 다형성 위치의 하류에 어닐링하는 것인, 상기 타겟 DNA에 어닐링할 수 있는 증폭 프라이머(amplification primer) 쌍을 제공하는 단계, 검출가능한 표지(label), 및 DNA 및 RNA 핵산 서열을 포함하는 프로브를 제공하는 단계로, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 다형성을 포함하는 타겟 DNA서열의 선택된 부위에 완전히 상보적이고(entirely complementary), 상기 프로브의 DNA 핵산 서열은 상기 타겟 DNA 서열의 선택된 부위에 인접한 DNA 서열에 실질적으로 상보적인(substantially complementary) 것인 단계, 상기 프로브 내의 RNA 서열이, 다형성을 포함하는 PCR 단편 내의 상보적인 DNA 서열과 RNA:DNA 이형이중가닥(heteroduplex)을 형성할 수 있는 조건 하에서, 증폭 폴리머라제(amplifying polymerase) 활성, 증폭 완충액(amplification buffer); RNase H 활성 및 프로브의 존재 하에, 상기 제1 및 제2 증폭 프라이머 사이의 PCR 단편을 증폭시키는 단계, 및 상기 프로브 상의 표지로부터의 신호 방출의 실시간 증가를 검출하는 단계를 포함하고, 상기 신호의 증가는 타겟 DNA 내의 다형성의 존재를 나타내는 것인, 타겟 DNA 내 다형성의 실시간 검출을 위한 방법이 개시된다.

[0009] 일 양태에서, 상기 프로브 상의 표지로부터의 신호 방출의 실시간 증가는 상기 RNA:DNA 이형이중가닥 내의, 프로브의 RNA 서열의 RNase H 절단에 기인한다.

[0010] 또다른 구체예에서, 다형성을 갖는 타겟 DNA의 존부에 대해 시험할 샘플을 제공하는 단계, 제1 증폭 프라이머가 상기 다형성 위치의 상류에 어닐링하고, 제2 증폭 프라이머는 상기 다형성 위치의 하류에 어닐링하는 것인, 상기 타겟 DNA에 어닐링할 수 있는 증폭 프라이머 쌍을 제공하는 단계, 검출가능한 표지, 및 DNA 및 RNA 핵산 서열을 포함하는 프로브를 제공하는 단계로, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 상기 다형성 위치에서 야생형(wild type) DNA 서열을 포함하는 타겟 DNA 서열의 선택된 부위에 완전히 상보적이고, 상기 프로브의 DNA 핵산 서열은 상기 타겟 DNA 서열의 선택된 부위에 인접한 DNA 서열에 실질적으로 상보적인 것인 단계, 상기 프로브 내의 RNA 서열이, 다형성을 포함하는 PCR 단편 내의 상보적인 DNA 서열과 RNA:DNA 이형이중가닥을 형성할 수 있는 조건 하에서, 증폭 폴리머라제 활성, 증폭 완충액; RNase H 활성 및 프로브의 존재 하에, 상기 제1 및 제2 증폭 프라이머 사이의 PCR 단편을 증폭시키는 단계, 및 상기 프로브 상의 표지로부터의 신호 방출의 실시간 감소를 검출하는 단계를 포함하고, 상기 신호의 감소는 타겟 DNA 내의 다형성의 존재를 나타내는 것인, 타겟 DNA 내 다형성의 실시간 검출을 위한 방법이 개시된다.

- [0011] 또다른 구체예에서, RNA 타겟을 제공하는 단계, 상기 RNA 타겟의 cDNA에 어닐링할 수 있는 증폭 프라이머 쌍을 제공하는 단계로, 제1 증폭 프라이머는 다형성 서열 위치의 상류에 어닐링하고, 제2 증폭 프라이머는 다형성 서열 위치의 하류에 어닐링하는 것인 단계; 검출가능한 표지, 및 상기 RNA 타겟의 cDNA에 실질적으로 상보적인 DNA 및 RNA 핵산 서열을 포함하는 프로브를 제공하는 단계로, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 예상(suspected) SNP 서열 위치의 상응하는 cDNA 서열에 완전히 상보적인 것인 단계; 역전사 효소(reverse transcriptase) 활성화, 증폭 폴리머라제 활성화, 역전사 효소-PCR 완충액, 부위-특이적(site-specific) RNase H 활성화 및 프로브의 존재 하에, 및 상기 프로브 내의 RNA 서열이, RT-PCR DNA 단편 내의 상보적인 DNA 서열과 RNA:DNA 이형이중가닥을 형성할 수 있는 조건 하에서, 상기 제1 및 제2 증폭 프라이머 사이의 역전사 효소-PCR 단편을 증폭시키는 단계; 및 상기 프로브 상의 표지로부터의 신호 방출의 실시간 증가를 검출하는 단계를 포함하고, 상기 신호의 증가는 RNA 타겟의 cDNA 내의 다형성의 존재를 나타내는 것인, RNA 타겟 내 다형성의 실시간 검출을 위한 방법이 개시된다.
- [0012] 일 양태에서, 상기 프로브 상의 표지로부터의 신호 방출의 실시간 증가는, 상기 RNA:DNA 이형이중가닥 내의, 프로브의 RNA 서열의 RNase H 절단에 기인한다.
- [0013] 또다른 구체예에서, 다형성을 갖는 RNA 타겟에 대해 시험될 샘플을 제공하는 단계, 상기 RNA 타겟의 cDNA에 어닐링할 수 있는 증폭 프라이머 쌍을 제공하는 단계로, 제1 증폭 프라이머는 다형성 위치의 상류에 어닐링하고, 제2 증폭 프라이머는 다형성 위치의 하류에 어닐링하는 것인 단계, 검출가능한 표지, 및 DNA 및 RNA 핵산 서열을 포함하는 프로브를 제공하는 단계로, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 다형성 위치에서 야생형 DNA 서열을 포함하는 cDNA의 선택된 부위에 완전히 상보적이고, 상기 프로브의 DNA 핵산 서열은 상기 cDNA의 선택된 부위에 인접한 DNA 서열에 실질적으로 상보적인 것인 단계, 역전사 효소 활성화, 증폭 폴리머라제 활성화, 역전사 효소-PCR 완충액, RNase H 활성화 및 프로브의 존재 하에, 및 상기 프로브 내의 RNA 서열이, 다형성 위치에서 야생형 DNA 서열을 포함하는 RT-PCR DNA 단편 내의 상보적인 서열과 RNA:DNA 이형이중가닥을 형성할 수 있는 조건 하에서, 상기 제1 및 제2 증폭 프라이머 사이의 역전사 효소-PCR 단편을 증폭시키는 단계, 및 상기 프로브 상의 표지로부터의 신호 방출의 실시간 감소를 검출하는 단계를 포함하고, 상기 신호의 감소는 RNA 타겟 내의 다형성의 존재를 나타내는 것인, RNA 타겟 내 다형성의 실시간 검출을 위한 방법이 개시된다.
- [0014] 또다른 구체예에서, 제1 증폭 프라이머는 다형성 위치의 상류에 어닐링하고, 제2 증폭 프라이머는 다형성 위치의 하류에 어닐링하는 것인, 타겟 DNA에 어닐링할 수 있는 증폭 프라이머 쌍, 검출가능한 표지 및 DNA 및 RNA 핵산 서열을 포함하는 프로브로, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 다형성을 포함하는 타겟 DNA 서열의 선택된 부위에 완전히 상보적이고, 상기 프로브의 DNA 핵산 서열은 상기 타겟 DNA 서열의 선택된 부위에 인접한 DNA 서열에 실질적으로 상보적인 것인 프로브, 및 증폭 폴리머라제 활성화, 증폭 완충액; 및 RNase H 활성을 포함하는, 타겟 DNA 내 다형성의 실시간 검출을 위한 키트(kit)가 개시된다.
- [0015] 또다른 구체예에서, 제1 증폭 프라이머는 다형성 위치의 상류에 어닐링하고, 제2 증폭 프라이머는 다형성 위치의 하류에 어닐링하는 것인, 타겟 DNA에 어닐링할 수 있는 증폭 프라이머 쌍, 검출가능한 표지 및 DNA 및 RNA 핵산 서열을 포함하는 프로브로, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 다형성 위치에서 야생형 DNA 서열을 포함하는 타겟 DNA 서열의 선택된 부위에 완전히 상보적이고, 상기 프로브의 DNA 핵산 서열은 상기 타겟 DNA 서열의 선택된 부위에 인접한 DNA 서열에 실질적으로 상보적인 것인 프로브, 및 증폭 폴리머라제 활성화, 증폭 완충액; 및 RNase H 활성을 포함하는, 타겟 DNA 내 다형성의 실시간 검출을 위한 키트가 개시된다.
- [0016] 또다른 구체예에서, 제1 증폭 프라이머는 다형성 서열(polymorphic sequence) 위치의 상류에 어닐링하고, 제2 증폭 프라이머는 다형성 서열 위치의 하류에 어닐링하는 것인, RNA 타겟의 cDNA에 어닐링할 수 있는 증폭 프라이머 쌍, 검출가능한 표지 및 DNA 및 RNA 핵산 서열을 포함하는 프로브로, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 다형성을 포함하는 cDNA의 선택된 부위에 완전히 상보적이고, 상기 프로브의 DNA 핵산 서열은 상기 cDNA의 선택된 부위에 인접한 DNA 서열에 실질적으로 상보적인 것인 프로브, 및 역전사 효소 활성화, 증폭 폴리머라제 활성화, 역전사 효소-PCR 완충액; 및 RNase H 활성을 포함하는, RNA 타겟 내의 다형성의 실시간 검출을 위한 키트가 개시된다.
- [0017] 또다른 구체예에서, 제1 증폭 프라이머는 다형성 서열 위치의 상류에 어닐링하고, 제2 증폭 프라이머는 다형성 서열 위치의 하류에 어닐링하는 것인, RNA 타겟의 cDNA에 어닐링할 수 있는 증폭 프라이머 쌍, 검출가능한 표지 및 DNA 및 RNA 핵산 서열을 포함하는 프로브로, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 다형성 위치에서 야생형 DNA 서열을 포함하는 cDNA의 선택된 부위에 완전히 상보적이고, 상기 프로브의 DNA 핵산 서열은 상기 cDNA의 선택된 부위에 인접한 DNA 서열에 실질적으로 상보적인 것인 프로브, 및 역전사 효소 활성화, 증폭 폴리머라제 활성화, 역

전사 효소-PCR 완충액; 및 RNase H 활성을 포함하는, RNA 타겟 내의 다형성의 실시간 검출을 위한 키트가 개시된다.

- [0018] 상기 다형성은 단일 뉴클레오티드 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)일 수 있다.
- [0019] 상기 타겟 DNA는 게놈 DNA(genomic DNA)일 수 있다. 상기 타겟 RNA는 게놈 RNA 또는 mRNA 전사체(transcript)일 수 있다.
- [0020] 상기 프로브의 DNA 및 RNA 서열은 공유 결합될 수 있다.
- [0021] 상기 프로브 상의 검출가능한 표지는 FRET 쌍과 같은, 형광 표지(fluorescent label)일 수 있다. 상기 PCR 단편 또는 프로브는 고체 지지체(solid support) 상에 결합된 것일 수 있다.
- [0022] 상기 증폭 폴리머라제 활성은, 열안정성 DNA 폴리머라제일 수 있고, 상기 부위-특이적 RNase H 활성은 열안정성 RNase H의 활성 또는 핫 스타트(hot start) 열안정성 RNase H 활성일 수 있다.
- [0023] 특정한 구체예에서, 상기 역전사 효소 및 증폭 폴리머라제 활성은 동일한 분자에서 발견된다.

발명의 효과

- [0024] 진술된 구체예들은, 타겟 핵산에서 실시간으로 SNP의 존재를 검출하는 능력을 포함한, 다수의 이점을 갖는다. 상기 검출 방법은 신속하고, 정확하며, 고처리율(high throughput) 적용에 적합하다. 상이한 유전자좌(genetic loci)에서의 SNP 검출을 위한, 편리하고, 사용하기 쉽고, 신뢰할만한 진단 키트(diagnostic kit)가 또한 개시된다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 숙련된 기술자는 하기 설명된 도면들은 단지 예시의 목적이라는 것을 이해할 것이다. 상기 도면들은 어떠한 방식으로든지 본 교시의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

도 1은 *살모넬라(Salmonella) invA* 유전자에서 야생형 타겟의 등온적 검출(isothermal detection)을 도시한다. 정확하게 짝지어진 경우 (야생형 프로브 : 야생형 타겟) 형광 강도의 증가가 관찰되나, 부정확하게 짝지어진 경우 (야생형 프로브 : SNP 포함 타겟) 형광 강도의 증가는 관찰되지 않는다.

도 2는 *살모넬라 invA* 유전자에서 SNP 타겟 (T에서 G 염기로의 변화)의 등온적 검출을 도시한다. 정확하게 짝지어진 경우 (SNP 프로브 : SNP 타겟) 형광 강도의 증가가 관찰되나, 부정확하게 짝지어진 경우 (SNP 프로브 : 야생형 타겟) 형광 강도의 증가는 관찰되지 않는다.

도 3은 *살모넬라 invA* 유전자에서 야생형 타겟의 멀티플렉스 실시간 검출(multiplex real time detection)을 도시한다. 동형접합(homozygous) 야생형 타겟 또는 이형접합(heterozygous) 야생형-SNP 타겟의 존재시 형광 강도의 증가가 관찰된다. 동형접합 SNP 타겟의 존재시, 형광 강도의 증가는 관찰되지 않는다.

도 4는 SNP 감지용 프로브(SNP sensing probe)를 사용한, *살모넬라 invA* 유전자에서 SNP 타겟의 멀티플렉스 실시간 검출을 도시한다. 동형접합 SNP 타겟 또는 이형접합 SNP-야생형 타겟의 존재시, 형광 강도의 증가가 관찰된다. 동형접합 야생형 타겟의 존재시, 형광 강도의 증가는 관찰되지 않는다.

도 5는 A1 b 카제인(casein)의 등온적 검출을 도시한다. 정확하게 짝지어진 경우 (A1 프로브 : A1 타겟) 형광 강도의 증가가 관찰되나, 부정확하게 짝지어진 경우 (A1 프로브 : A2 타겟) 형광 강도의 증가는 관찰되지 않는다.

도 6은 A2 b 카제인의 등온적 검출을 도시한다. 정확하게 짝지어진 A2 프로브 : A2 타겟에서 형광 강도의 증가가 관찰되나, 부정확하게 짝지어진 A2 프로브 : A1 타겟의 경우 형광 강도의 증가가 관찰되지 않는다.

도 7은 A1 감지용 프로브를 사용한, A1 b 카제인의 멀티플렉스 실시간 검출을 도시한다. 동형접합 A1 타겟 또는 이형접합 A1-A2 타겟의 존재시 형광 강도의 증가가 관찰된다. 형광 강도의 증가는 동형접합 A2 타겟의 존재시에는 관찰되지 않는다.

도 8은 A2 감지용 프로브를 사용한, A2 b 카제인의 멀티플렉스 실시간 검출을 도시한다. 동형접합 A2 타겟 또는 이형접합 A1-A2 타겟의 존재시 형광 강도의 증가가 관찰된다. 형광 강도의 증가는 동형접합 A1 타겟의 존재시에는 관찰되지 않는다.

도 9는 도면 및 실시예에서 사용된, 모든 PCR 프라이머, 프로브, 및 타겟을 기술한 표이다. SNP의 위치들이 밑줄로 표시되어 있다.

도 10은 파이로코커스 푸리오시스(*Pyrococcus furiosus*), 파이로코커스 호리코시(*Pyrococcus horikoshi*), 썬모코커스 코다카렌시스(*Thermococcus kodakarensis*), 아르케오글로부스 프로퐁두스(*Archeoglobus profundus*), 아르케오글로부스 풀기디스(*Archeoglobus fulgidis*), 썬모코커스 셀레르(*Thermococcus celer*) 및 썬모코커스 리토랄리스(*Thermococcus litoralis*) RNase HII 폴리펩티드 서열들 간의 서열 배치(sequence alignment)를 도시한다.

도 11은 해모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 썬머스 썬모필러스(*Thermus thermophilis*), 썬머스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*) 및 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) RNase HI 폴리펩티드 서열들 간의 서열 배치를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명의 실시는, 달리 명시되지 않는 경우, 당해 기술분야 내의 통상의 분자 생물학적 기법을 사용한다. 그와 같은 기법들은 숙련된 기술자에게 잘 알려져 있으며, 문헌에 충분히 설명되어 있다. 예를 들면, Ausubel 등에 의한, 모든 보조자료(supplement)를 포함한, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2008); Sambrook 등에 의한, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)을 참조한다.
- [0027] 달리 정의되지 않는 경우, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어들은 당해 기술분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서는 또한 본 출원의 개시내용 및 청구 범위의 해석을 돕기 위한, 용어들의 정의를 제공한다. 이 정의가 다른 곳에서의 정의와 일치하지 않는 경우, 본 출원에서 제시된 정의가 우선할 것이다.
- [0028] 용어 "다형성(polymorphism)"은 서로 다른 게놈(genome) 또는 개체 간에, 또는 상기 개놈 또는 개체들 중에서, 둘 이상의 대안적 게놈 서열(genomic sequence) 또는 대립 유전자(allele)의 존재를 지칭한다.
- [0029] 용어 "다형성의(polymorphic)"는 개체군 내에서 특정한 게놈 서열의 둘 이상의 변이체(variant)가 발견되는 상태를 지칭한다.
- [0030] 용어 "다형성 부위(polymorphic site)"는 상기 변이가 발생하는 좌위(locus)를 의미한다. 다형성 부위는 일반적으로 둘 이상의 대립 유전자를 가지며, 각각은 선택된 개체군 내에서 유의한 빈도로 발생한다. 다형성 좌위(polymorphic locus)는 하나의 염기쌍만큼 작을 수 있으며, 이 경우 단일 뉴클레오티드 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)으로 지칭된다. 최초로 동정된 대립유전자 형태가 임의로 기준(reference), 야생형(wild-type), 일반(common) 또는 다수(major) 형태로 명명되고, 다른 대립유전자 형태들은 대안적(alternative), 소수(minor), 희귀(rare) 또는 변이체(variant) 대립유전자로 명명된다.
- [0031] 용어 "유전자형(genotype)"은 개체 또는 샘플 중에 포함된 유전자의 대립유전자(allele)들에 대한 기술을 지칭한다.
- [0032] 용어 "단일 뉴클레오티드 다형성(single nucleotide polymorphism)" ("SNP")은 대립유전자들 간에 달리하는 하나의 뉴클레오티드 부위를 지칭한다. 단일 뉴클레오티드는 변화되거나 (치환), 폴리뉴클레오티드 서열에 제거(결실) 또는 부가(삽입)될 수 있다. 삽입 또는 결실 SNP는 번역 프레임시프트(translational frameshift)를 야기할 수 있다. 단일 뉴클레오티드 다형성은 유전자의 코딩 서열(coding sequence), 유전자의 비-코딩 영역(non-coding region), 또는 유전자 사이의 유전자간 영역(intergenic region)에 속할 수 있다. 코딩 서열 내의 SNP는, 유전자 코드의 축퇴성(degeneracy)으로 인해, 생산되는 단백질의 아미노산 서열을 반드시 변화시키지는 않을 것이다. 두 형태가 모두 동일한 폴리펩티드 서열을 야기하는 SNP는, 동의적(synonymous) (때때로, 침묵 돌연변이로 지칭됨)으로 명명되나, 상이한 폴리펩티드 서열이 생산되는 경우, 이들은 비동의적(nonsynonymous)이다. 비동의적 변화는 미스센스(missense) 또는 논센스(nonsense)일 수 있고, 미스센스 변화는 상이한 아미노산을 생성시키는 반면, 논센스 변화는 조기 스톱 코돈(premature stop codon)을 야기한다. "기능적 SNP(functional SNP)"는 유전자 발현, 또는 유전자 산물의 발현 또는 기능에 변화를 유발하는 SNP이며, 따라서 가능한 임상적 표현형에 대해 대부분 예측성이 있다. 기능적 SNP에 의한 유전자 기능의 변화는 코딩된 폴리펩티드의 변화, mRNA 안정성, DNA 또는 RNA에 대한 전사 인자 또는 번역 인자 결합성의 변화 등을 포함할 수 있다. 단백질-코딩 영역에 있지 않은 SNP는, 유전자 스플라이싱(splicing), 전사 인자 결합, 또는 비-코딩 RNA의 서열에 대해 결과

를 나타낼 수 있다.

[0033] 일 구체예에 따르면, 숙련된 기술자는 SNP가, 각각 염색체 내에 존재할 수 있는 뉴클레오티드에 해당하는, 두개의 대안적 대립 유전자를 갖는다는 것을 이해할 것이다. 따라서, SNP는 4개의 뉴클레오티드 (A, C, G, T) 중 2개의 뉴클레오티드에 의해 특징지워진다. 그의 예는 각각의 염색체 상의 주어진 위치에서, 대립형질(allele) C 또는 대립형질 T를 갖는 SNP일 것이다. 이는 C>T 또는 C/T로 표시된다. 보다 흔하게 발생하는 대립형질이 처음에 표시되고 (이 경우, C), 다수, 일반 또는 야생형 대립형질이라고 부른다. 보다 덜 흔하게 발생하는 대안적 대립형질 (이 경우, T)을 소수, 희귀 또는 변이체 대립형질이라 부른다. 야생형 및 변이체 대립형질은 각각 일반 대립형질 및 희귀 대립형질로 지칭될 수 있다. 사람은 각각의 염색체가 2개의 사본으로 존재하는 것을 의미하는, 이배체 유기체이기 때문에, 각각의 개체는 하나의 SNP에서 두 개의 대립형질을 갖는다. 이 대립형질들은 동일한 대립형질의 2개의 사본일 (CC 또는 TT)이거나, 또는 서로 다른 대립형질(CT)일 수 있다. 상기 CC, CT 및 TT를 유전자형이라고 부른다. 이들 중에서, CC 및 TT는 동일한 대립형질의 2개의 사본을 갖는 것을 특징으로 하며, 동형접합성(homozygous) 유전자형으로 지칭된다. 유전자형 CT는 각각의 염색체 상에 상이한 대립형질을 가지며, 이형접합성 유전자형이다. 동형접합체 또는 이형접합체 유전자형을 갖는 개체들은 각각, 동형접합성 및 이형접합성으로 지칭된다.

[0034] *SNP의 선택*

[0035] 일 구체예는 임의의 표적 핵산 서열 내의 하나 이상의 SNP를 검출하기 위한, 신규한 방법을 제공한다. 목적 유전자 중 SNP의 위치의 결정은 SNP에 대한 생물정보 데이터베이스를 참고함으로써 매우 용이하게 수행된다. dbSNP는 생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)로부터 제공되는 SNP 데이터베이스이다. SNPedia는 병합 조직으로부터 제공되는 위키-양식(wiki-style) 데이터베이스이다. OMIM 데이터베이스는 다형성과, 예를 들면, 질병 간의 관련성을 문서 형태로 게시하는 반면, HGvbaseG2P는 실질적인 요약-수준의 관련 데이터를 시각적으로 질의할 수 있게 한다.

[0036] SNP에 대한 유용한 정보는 인간 게놈 전체에 걸쳐, 약 5 kb 마다 하나의 정보성 SNP의 유전자형을 규명하기 위한 국제 하프맵 프로젝트(International HapMap Project)에서도 찾을 수 있다. 인간 DNA 서열 변이 (단상형(haplotype))의 일반적인 패턴을 결정하고, 이러한 정보를 공중 영역에서 자유롭게 이용가능하도록 하기 위해, 나이지리아, 유럽 및 중국/일본에서 유래한 조상을 갖는 개체군들의 유전자형을 분석하였다. 이 정보는 흔한 질병 및 약학적 반응에 영향을 미치는 서열 변이체들의 발견을 용이하게 할 것이다. 인간 반상평 지도의 제작은 맞춤형 의학(personalized medicine)을 위한 중요한 단계이다.

[0037] *유전자형 분석을 위한 프라이머의 선택*

[0038] 유전자 및 관련 SNP가 선택되면, 타겟 핵산 서열의 유전자형 분석(genotyping)을 위한 프라이머 올리고뉴클레오티드 및 프로브를 준비한다.

[0039] "타겟 DNA 또는 타겟 RNA(target DNA or target RNA)" 또는 "타겟 핵산(target nucleic acid)" 또는 "타겟 핵산 서열(target nucleic acid sequence)"은 분석되어야 할, 및 관심있는 다형성 부위를 포함하는, 핵산의 영역을 지칭한다. 타겟 핵산 서열은 PCR 반응 및 역전사 효소-PCR 반응에서 증폭을 위한 주형으로서 사용된다. 타겟 핵산 서열은 천연 및 합성 분자를 모두 포함할 수 있다. 예시적인 핵산 서열은, 게놈 DNA 또는 게놈 RNA를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0040] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "핵산(nucleic acid)"은 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 지칭하며, 상기 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드는 변형될 수 있거나, 또는 변형된 염기를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 2개 내지 60개의 뉴클레오티드를 포함하는, 단일 가닥 뉴클레오티드 중합체이다. 폴리뉴클레오티드는 2개 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드 중합체이다. 폴리뉴클레오티드는, 제2 가닥이 제1 올리고뉴클레오티드의 역방향 상보 서열(reverse complement sequence)를 갖는 올리고뉴클레오티드인 것인, 어닐링된 올리고뉴클레오티드를 포함한 이중가닥 DNA, 데옥시티민을 포함하는 단일가닥 핵산 중합체, 단일가닥 RNA, 이중가닥 RNA 또는 RNA/DNA 이형이중가닥(heteroduplex)일 수 있다. 핵산은, 게놈 DNA, cDNA, hnRNA, snRNA, mRNA, rRNA, tRNA, 핵산 단편(fragmented nucleic acid), 미토콘드리아 또는 염색체와 같은 세포외소기관(subcellular organelle)으로부터 얻어지는 핵산, 및 생물학적 샘플 중에 존재할 수 있는 미생물, DNA 또는 RNA 바이러스로부터 얻어지는 핵산을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 핵산은 예를 들면, RNA 및 DNA의 경

우에서와 같은, 단일 형태의 당 모이어티, 또는 예를 들면, RNA/DNA 키메라(chimera)의 경우에서와 같은, 상이한 당 모이어티의 혼합물로 구성될 수 있다.

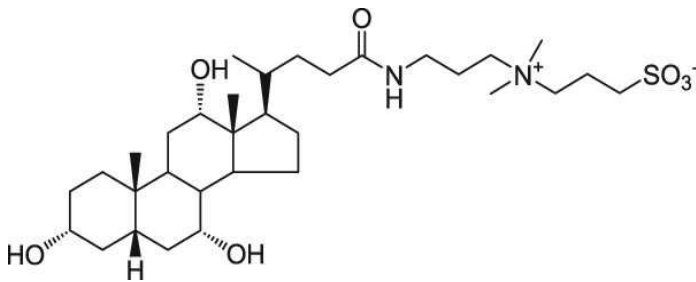
- [0041] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)"는 "프라이머(primer)" 또는 "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)"와 호환적으로 사용된다. 상기 용어 "프라이머"는 PCR 반응에서 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 프라이머는 통상적으로, 약 14 내지 약 35 뉴클레오티드의 길이이고, 타겟 서열의 상보적인 영역에 혼성화한다.
- [0042] 올리고뉴클레오티드는 당해 기술분야에 공지된 (화학적 합성과 같은) 임의의 적합한 방법에 의해 합성 및 제조된다. 올리고뉴클레오티드는 또한 상업적 공급처를 통해 편리하게 이용가능하다. 숙련된 기술자는 PCR 반응에서 목적 다형성 부위의 측면에 배치되는(flank) 프라이머를 용이하게 최적화하고 식별할 수 있을 것이다. 상업적으로 이용가능한 프라이머가 특정한 SNP에 대해 특정한 목적 유전자를 증폭시키는데 사용될 수 있다. 다수의 컴퓨터 프로그램 (예를 들면, Primer-Express)이 최적의 프라이머 세트를 디자인하기 위해 용이하게 사용될 수 있다. 제공된 (또는 등록 번호로 공중에 의해 이용가능한) 핵산 정보에 기초한 프라이머 및 프로브가 그에 따라 제조될 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이다.
- [0043] 용어 "어닐링(annealing)" 및 "혼성화(hybridization)"는 호환적으로 사용되며, 이중가닥, 삼중가닥, 또는 기타 고차 구조의 형태를 초래하는, 핵산과 또다른 핵산의 염기쌍 상호작용을 의미한다. 특정한 구체예에서, 일차적 상호작용은 왓슨/크릭(Watson/Crick) 및 후그스틴형 수소 결합(Hoogsteen-type hydrogen bonding)에 의한, 염기 특이적 상호작용, 예를 들면 A/T 및 G/C이다. 특정한 구체예에서, 염기-중첩(base-stacking) 및 소수성 상호작용이 이중가닥 안정성에 또한 기여할 수 있다. "실질적으로 상보적인(substantially complimentary)"은 어닐링하여 안정한 이중가닥을 형성하기에 충분히 상보적인 서열의 두 핵산 가닥을 지칭한다.
- [0044] 당업자는 목적 다형성 부위의 측면에 배치되는 PCR 프라이머를 어떻게 디자인하는지 알 것이다. 합성 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 약 55도의 녹는점 (T_m)을 갖는, 20 내지 26 염기쌍의 길이이다. 프라이머 디자인을 위한 측면 서열(flanking sequence)은 국제 하프맵 프로젝트에 의해 제작된 배치 파일(allocation file)에서 찾아볼 수 있다. 이 파일은 관찰된 대립형질 및 각각의 측면 핵산 주형 제조를 위한, 100 bp의 NCBI에 의해 감춰진(NCBI-masked) 서열을 포함하는, 각각의 SNP에 대한 풍부한 정보를 포함한다.
- [0045] 일부 구체예에서, 샘플은 정제된 핵산 주형 (예를 들면, mRNA, rRNA, 및 이들의 혼합물)을 포함한다. 샘플로부터의 RNA 추출 및 정제 과정은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들면, RNA는 TRIzol™ 시약(Invitrogen) 추출법을 사용하여 세포로부터 분리할 수 있다. 그 다음, 예를 들면, Nanodrop™ 분광광도계(spectrophotometer) 및 Agilent 2100 바이오애널라이저(bioanalyzer)를 사용하여, RNA의 양과 질을 결정한다.
- [0046] 다른 구체예에서, 상기 샘플은 pH 약 6 내지 약 9의 용해 완충액(lysis buffer), 약 0.125% 내지 약 2%의 농도를 갖는 양쪽성이온 세제(zwitterionic detergent), 약 0.3 내지 약 2.5 mg/mL의 농도를 갖는 아자이드(azide) 및 프로티나아제 K(proteinase K)와 같은 프로테아제(약 1 mg/mL)를 사용하여 세포를 용해시켜 제조된 세포 용해물(cell lysate)이다. 55 °C에서 15분 동안 인큐베이션한 후에, 95 °C에서 10분 동안 상기 프로티나아제 K를 불활성화시켜, 고효율 PCR(high efficiency PCR) 또는 역전사 PCR(reverse transcription PCR) 분석과 상용성이 있는, 단백질이 실질적으로 제거된 용해물을 얻는다.
- [0047] 일 구체예에서, 1 x 용해 시약은 12.5 mM 트리스(tris) 아세테이트 또는 트리스-HCl 또는 HEPES (4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술포산) (pH=7-8), 0.25% (w/v) CHAPS, 0.3125 mg/ml 소듐 아자이드 및 1 mg/mL의 프로티나아제 K를 함유한다.
- [0048] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "용해물(lysate)"은, 용해된 세포 잔해물 및 핵산을 포함하는 액체 상을 지칭한다.
- [0049] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "단백질이 실질적으로 제거된(substantially protein free)"은 대부분의 단백질이 프로테아제(protease)에 의한 단백질 분해에 의해 불활성화된 용해물을 지칭한다. 프로테아제는 프로티나아제 K를 포함할 수 있다. 세포 용해 중 프로티나아제 K의 첨가는, 불활성화되지 않을 경우 표적 핵산을 분해할 수 있는, 뉴클레아제(nuclease)를 신속하게 불활성화시킨다. 용어 "단백질이 실질적으로 제거된"은 불활성화된 단백질을 제거하기 위한 처리를 받거나, 또는 받지 않을 수 있다.
- [0050] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "세포(cell)"는 원핵 또는 진핵 세포를 지칭한다.
- [0051] 일 구체예에서, 상기 용어 "세포"는 그람 양성 박테리아, 그람 음성 박테리아, 항산성(acid-fast) 박테리 등을

포함하나, 이에 제한되지 않는 미생물을 지칭한다. 특정한 구체예에서, 상기 시험될 "세포"는 표면의 스왑 샘플 채취(swap sampling)을 사용하여 수집할 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 "세포"는 병원성 유기체들을 지칭한다./

[0052] 다른 구체예에서, 샘플은 바이러스 핵산, 예를 들면 레트로바이러스 핵산을 포함한다. 특정한 구체예에서, 상기 샘플은 HIV-1 또는 HIV-2와 같은, 렌티바이러스 핵산을 함유할 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 사용되는, "양쪽성이온 세제(zwitterionic detergent)"는 CHAPS, CHAPSO 및 바인 유도체(bine derivative), 예를 들면, 바람직하게는 상품명 Zwittergent® (Calbiochem, San Diego, CA) 및 Anzergent® (Anatrace, Inc. Maumee, OH) 하에 시판되는, 술포바인(sulfobine)을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 양쪽성이온 특성을 나타내는 (예를 들면, 순 전하를 갖지 않고, 전기전도성(conductivity) 및 전기영동성(electrophoretic mobility)을 갖지 않으며, 이온 교환 수지에 결합하지 않고, 단백질-단백질 상호 작용을 파괴하는) 세제를 지칭한다.

[0054] 일 구체예에서, 상기 양쪽성이온 세제는 하기 구조:



[0055] 를 갖는, 3-[(3-콜라미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판술포네이트의 약어인, CHAPS (CAS 번호: 75621-03-3; SIGMA-ALDRICH에서 입수가 가능, 상품번호 C3023-1G) (미국 등록특허 제4,372,888호에 보다 상세하게 기술됨)이다.

[0057] 추가적인 구체예에서, CHAPS는 총 조성물 중 약 0.125% 내지 약 2% 중량/부피 (w/v)의 농도로 존재한다. 추가적인 구체예에서, CHAPS는 총 조성물 중 약 0.25% 내지 약 1% w/v의 농도로 존재한다. 또다른 구체예에서, CHAPS는 총 조성물 중 약 0.4% 내지 약 0.7% w/v의 농도로 존재한다.

[0058] 다른 구체예에서, 상기 용해 완충액은 노니덱(Nonidet), 트윈(Tween) 또는 트리톤 X-100(Triton X-100)와 같은, 다른 비-이온성 세제를 포함할 수 있다.

[0059] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "용해 완충액"은 25 °C에서 약 6 내지 약 9의 pKa를 갖는, pH 값을 6 내지 9로 효과적으로 유지시킬 수 있는 조성물을 지칭한다. 본 명세서에서 기술되는 완충액은 일반적으로, 효소 활성의 기능과 양립가능하고, 생물학적 거대분자들이 그의 본래의 물리적 및 생화학적 기능을 유지할 수 있도록 하는, 생리학적으로 적합한(physiologically compatible) 완충액이다.

[0060] 용해 완충액에 첨가되는 완충액의 예는, HEPES ((4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술포산), MOPS (3-(N-모르폴리노)-프로판술포산), N-트리스(히드록시메틸)메틸글리신 산 (트리신(Tricine)), 트리스(히드록시메틸)메틸아민산 (트리스(Tris)), 피페라진-N,N'-비스(2-에탄술포산) (PIPES) 및 아세테이트 또는 포스페이트 함유 완충액 (K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄) 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0061] 본 명세서에서 사용되는 용어 "아자이드(azide)"는 화학식 -N₃으로 대표된다. 일 구체예에서, 상기 아자이드는 일반적인 살균제로 작용하는, 소듐 아자이드 NaN₃ (CAS 번호 26628-22-8; SIGMA-ALDRICH에서 구입 가능, 제품번호: S2002-25G)이다.

[0062] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "프로테아제(protease)"는 펩티드 결합을 가수분해하는 (프로테아제 활성을 갖는) 효소이다. 프로테아제는 또한, 예를 들면, 펩티다아제(peptidase), 프로티나아제(proteinase), 펩티드 가수분해효소(peptide hydrolase), 또는 단백질 분해 효소(proteolytic enzyme)로도 지칭된다. 본 발명에 따른 용도를 위한 프로테아제는 폴리펩티드 사슬에 내부적으로 작용하는 엔도-형(endo-type) (엔도펩티다아제(endopeptidase))일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 프로테아제는 세린 프로테아제인, 프로티나아제 K(proteinase K) (EC 3.4.21.64; Roche Applied Sciences에서 입수 가능, 제조함 프로티나아제 K 50 U/ml (*Pichia pastoris*에서 유래) Cat. No. 03 115 887 001)일 수 있다.

- [0063] 프로티나아제 K는 단백질을 소화시키고, 핵산 제제(nucleic acid preparation)로부터 오염물질을 제거하는데 사용된다. 핵산 제제로의 프로티나아제 K의 첨가는, 불활성화되지 않는 경우 정제 중에 DNA 또는 RNA를 분해할 수 있는, 뉴클레아제를 신속하게 불활성화시킨다. 상기 효소는 단백질을 변성시키는 화학물질의 존재 하에서도 활성을 나타내고, 약 95 °C의 온도에서 약 10분 동안 처리시 불활성화될 수 있으므로, 본 출원에 매우 적합하다.
- [0064] 일 구체예에서, 리스테리아(*Listeria*) 살모넬라(*Salmonella*) 및 대장균(*E. Coli*)과 같은, 그람 양성 및 그람 음성 박테리아의 용해도 프로티나아제 K(1 mg/ml)를 포함하는 용해 시약(lysis reagent)을 필요로 한다. 세포 용해물 중의 단백질은 55 °C에서 15분 동안 프로티나아제 K를 처리하고, 뒤이어 95 °C에서 10분 동안 프로티나아제 K를 불활성화시킴으로써 소화시킬 수 있다. 냉각 후에, 단백질이 실질적으로 제거된 용해물은 고효율 PCR 증폭에 적합하다.
- [0065] 프로티나아제 K와 함께, 또는 상기 효소 대신에, 용해 시약은 트립신(trypsin), 카이모트립신(chymotrypsin), 엘라스타아제(elastase), 섭틸리신(subtilisin), 스트렙토그리신(streptogrisin), 테르미타아제(thermitase), 아쿠아라이신(aqualysin), 플라스민(plasmin), 쿠쿠미신(cucumisin), 또는 카르복시펩티다아제(carboxypeptidase) A, D, C, 또는 Y와 같은, 세린 프로테아제를 포함할 수 있다. 세린 프로테아제 외에, 상기 용해 용액은 파파인(papain), 칼파인(calpain), 또는 클로스트리파인(clostripain)과 같은 시스테인 프로테아제; 펩신, 카이모신(chymosin), 또는 카텡신(cathepsin)과 같은 산 프로테아제; 또는 프로나아제(pronase), 테르모라이신(thermolysin), 콜라게나아제(collagenase), 디스파아제(dispace), 아미노펩티다아제(aminopeptidase) 또는 카르복시펩티다아제(carboxypeptidase) A, B, E/H, M, T, 또는 U와 같은, 메탈로프로테아제(metalloprotease)를 포함할 수 있다. 프로티나아제 K는 광범위한 pH에 걸쳐서(pH 4.0 - 10.0) 안정하고, 양쪽성이온 세제를 포함하는 완충액에서 안정하다.
- [0066] *타겟 핵산 서열의 PCR 증폭*
- [0067] 프라이머가 제조된 후, 핵산 증폭은 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR), 핵산 서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification, NASBA), 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction, LCR), 및 롤링 서클 증폭(rolling circle amplification, RCA)을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 다양한 방법에 의해 이루어질 수 있다. 중합효소 연쇄 반응(PCR)은 특이적인 타겟 DNA 서열의 증폭에 가장 흔히 사용되는 방법이다.
- [0068] 중합효소 연쇄 반응 또는 PCR은, 일반적으로 원하는 뉴클레오티드 서열을 인 비트로(in vitro)에서 증폭시키는 방법을 지칭한다. 일반적으로, PCR방법은 원하는 타겟 서열(들)을 포함하는 반응 혼합물에, 2 이상의 신장가능한 올리고뉴클레오티드 프라이머의 몰 과량을 도입하는 것으로 이루어지며, 상기 프라이머들은 이중가닥 타겟 서열의 반대 가닥에 상보적이다. 상기 반응 혼합물을 대상으로, DNA 폴리머라제의 존재 하에 열주기(thermal cycling) 프로그램을 실시하여, DNA 프라이머가 측면에 부착된 원하는 타겟 서열을 증폭시킨다.
- [0069] PCR 기법은 PCR: A Practical Approach, M. J. McPherson 등, IRL Press (1991), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis 등, Academic Press (1990), 및 PCR Technology: Principals and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich, Stockton Press (1989)을 포함한, 다수의 문헌에 개시되어 있다. PCR은 또한, 미국 등록특허 제4,683,195호; 제4,683,202호; 제4,800,159호; 제4,965,188호; 제4,889,818호; 제5,075,216호; 제5,079,352호; 제5,104,792호; 제5,023,171호; 제5,091,310호; 및 제5,066,584호를 포함한 다수의 미국 특허에서도 개시되며, 이들 각각은 참조에 의해 본 명세서에 삽입된다.
- [0070] 용어 "샘플(sample)"은 핵산 물질을 포함하는 임의의 물질을 지칭한다.
- [0071] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "PCR 단편(PCR fragment)" 또는 "역전사 효소-PCR 단편(reverse transcriptase-PCR fragment)" 또는 "앰플리콘(amplicon)"은 특정한 타겟 핵산의 증폭 결과 생산되는 폴리뉴클레오티드 분자(또는 총칭하여 복수의 분자들)를 지칭한다. PCR 단편은 항상은 아니나 통상적으로, DNA PCR 단편이다. PCR 단편은 단일가닥 또는 이중가닥일 수 있고, 또는 임의의 농도 비율을 갖는 이들의 혼합물일 수 있다. PCR 단편 또는 RT-PCT는 약 100 내지 약 500 nt 또는 그 이상의 길이일 수 있다.
- [0072] "완충액(buffer)"은 증폭 반응의 pH를 조절함으로써 증폭 반응의 하나 이상의 성분들의 안정성, 활성, 및/또는 지속성(longevity)을 변화시키는, 증폭 반응에 첨가되는 화합물이다. 본 발명의 완충제(buffering agent)는 PCR 증폭 및 부위-특이적 RNase H 절단 활성(site-specific RNase H cleavage activity)과 양립가능하다. 일부 완충제들이 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며, 트리스, 트리신, MOPS (3-(N-모르폴리노)프로판술폰산), 및

HEPES (4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 또한, PCR 완충액은 일반적으로 최대 약 70 mM KCl 및 약 1.5 mM 이상의 MgCl₂, 약 50-200 mM의 각각의 뉴클레오티드 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 포함한다. 본 발명의 완충액은 효율적인 역전사 효소-PCR 또는 PCR 반응을 최적화하기 위한 첨가물들을 포함할 수 있다.

[0073] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "뉴클레오티드(nucleotide)"는 리보오스(ribose), 아라비노오스(arabinose), 자일로오스(xylose) 및 피라노오스(pyranose)와 같은 당, 및 이들의 당 유사체의, C-1' 탄소에 결합된 뉴클레오티드 염기를 포함하는 화합물을 지칭한다. 용어 뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 유사체를 포함한다. 상기 당은 치환 또는 비치환된 것일 수 있다. 치환된 리보오스 당은, 탄소 원자들 중 하나 이상, 예를 들면, 2'-탄소 원자가 동일하거나 상이한, C1, F, -R, -OR, -NR₂ (상기 각각의 R은 독립적으로 H, C₁-C₆ 알킬 또는 C₅-C₁₄ 아릴이다) 또는 할로젠 기 중 하나 이상으로 치환된 것인 리보오스를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 리보오스는, 2'-(C1-C6)알콕시리보오스, 2'-(C5-C14)아릴옥시리보오스, 2',3'-디데하이드로리보오스, 2'-데옥시-3'-할로리보오스, 2'-데옥시-3'-플루오로리보오스, 2'-데옥시-3'-클로로리보오스, 2'-데옥시-3'-아미노리보오스, 2'-데옥시-3'-(C1-C6)알킬리보오스, 2'-데옥시-3'-(C1-C6)알콕시리보오스 및 2'-데옥시-3'-(C5-C14)아릴옥시리보오스, 리보오스, 2'-데옥시리보오스, 2',3'-디데옥시리보오스, 2'-할로리보오스, 2'-플루오로리보오스, 2'-클로로리보오스, 및 2'-알킬리보오스, 예를 들면, 2'-O-메틸, 4'-α-아노머(anomeric) 뉴클레오티드, 1'-α-아노머 뉴클레오티드, 2'-4'- 및 3'-4'-결합된(linked) 및 기타 "고정된(locked)" 또는 "LNA", 이환식 당 변형체(bicyclic sugar modification)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다 (예를 들면, PCT 공개 출원 WO 98/22489, WO 98/39352 및 WO 99/14226; 및 미국 등록특허 제6,268,490호 및 제 6,794,499호를 참조한다).

[0074] 첨가물들은 조성물 중 하나 이상의 성분의 안정성, 활성, 및/또는 지속성을 변화시키는, 조성물에 첨가되는 화합물이다. 특정한 구체예에서, 상기 조성물은 증폭 반응 조성물이다. 특정한 구체예에서, 첨가물들은 오염성 효소를 불활성화시키고, 단백질 접힘(protein folding)을 안정화하고, 및/또는 응집을 감소시킨다. 증폭 반응에 포함될 수 있는 예시적인 첨가물들은, 바인(bine), 포름아미드, KCl, CaCl₂, MgOAc, MgCl₂, NaCl, NH₄OAc, NaI, Na(CO₃)₂, LiCl, MnOAc, NMP, 트레할로오스(trehalose), 데미에틸술폰옥시드(demiethylsulfoxide, "DMSO"), 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 디티오프레itol(dithiothreitol, "DTT"), (테르모플라스마 아시도필럼(*Thermoplasma acidophilum*) 무기 파이로포스파타아제("TAP")를 포함하나, 이에 제한되지 않는) 파이로포스파타아제(pyrophosphatase), 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, "BSA"), 프로필렌 글리콜, 글리신아미드(glycinamide), CHES, PercollTM, 아우린트리카르복시산(aurintricarboxylic acid), 트윈(Tween) 20, 트윈 21, 트윈 40, 트윈 60, 트윈 85, Brij 30, NP-40, 트리톤 X-100, CHAPS, CHAPSO, 매킨늄(Mackernium), LDAO (N-도데실-N,N-디메틸아민-N-옥시드), Zwittergent 3-10, Xwittergent 3-14, Xwittergent SB 3-16, Empigen, NDSB-20, T4G32, 대장균 SSB, RecA, 니킹 엔도뉴클레아제(nicking endonuclease), 7-데아자 G, dUTP, UNG, 음이온성 세제, 양이온성 세제, 비이온성 세제, 양극성이온 세제(zwittergent), 스테롤, 삼투물질(osmolyte), 양이온, 및 증폭 효율을 변화시킬 수 있는, 임의의 다른 화학 물질, 단백질 또는 보조인자를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 특정한 구체예에서, 둘 이상의 첨가물들이 증폭 반응에 포함된다. 본 발명에 따르면, 첨가물들은 RNase H의 활성을 간섭하지 않는 경우, 프라이머 어닐리의 선택성을 개선할 목적으로 첨가될 수 있다.

[0075] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "열안정성(thermostable)"은 효소에 적용되는 경우, 승온 조건 (예를 들면 55 °C 또는 그 이상)에서, 그의 생물학적 활성을 유지하거나, 또는 가열 및 냉각의 반복된 주기 후에 그의 생물학적 활성을 유지하는 효소를 지칭한다. 열안정성 폴리뉴클레오티드 폴리머라제는 PCR 증폭 반응에서 특히 유용하다.

[0076] 본 명세서에서 사용되는 "증폭 폴리머라제 활성(amplifying polymerase activity)"은 데옥시리보뉴클레오티드의 중합화를 촉매하는 효소 활성을 지칭한다. 일반적으로, 상기 효소는 핵산 주형 서열에 어닐링된 프라이머의 3'-말단에서 합성을 개시할 것이며, 상기 주형 가닥의 5'-말단 방향으로 진행할 것이다. 특정한 구체예에서, "증폭 폴리머라제 활성"은 열안정성 DNA 폴리머라제이다.

[0077] 본 명세서에서 사용되는, 열안정성 폴리머라제는 열에 비교적 안정한 효소이며, 각각의 PCR 사이클 전에 효소를 첨가할 필요성을 제거한다.

[0078] 열안정성 DNA 폴리머라제의 비제한적인 예는, 호열성 박테리아 썬머스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*) (Taq 폴리머라제), 썬머스 썬모필러스(*Thermus thermophilus*) (Tth 폴리머라제), 썬모코쿠스 리토랄리스

(*Thermococcus litoralis*) (Tli 또는 VENT™ 폴리머라제), 파이로코커스 푸리오우스(*Pyrococcus furiosus*)(Pfu 또는 DEEPVENT™ 폴리머라제), 파이로코커스 우시이(*Pyrococcus woosii*)(Pwo 폴리머라제) 및 기타 파이로코커스 종들, 바실러스 스테아로써모필러스(*Bacillus stearothermophilus*)(Bst 폴리머라제), 술폴로부스 아시도칼다리우스(*Sulfolobus acidocaldarius*)(Sac 폴리머라제), 썬모플라스마 아시도필룸(*Thermoplasma acidophilum*)(Tac 폴리머라제), 썬머스 러버(*Thermus rubber*)(Tru 폴리머라제), 썬머스 브로키아누스(*Thermus brockianus*)(DYNAZYME™ 폴리머라제)i(Tne 폴리머라제), 썬모토가 마리툼(*Thermotoga maritime*)(Tma) 및 썬모토가(*Thermotoga*) 속의 기타 종들(Tsp 폴리머라제), 및 메타노박테리움 썬모오토트로피쿰(*Methanobacterium thermoautotrophicum*)(Mth 폴리머라제)로부터 분리된 폴리머라제들을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. PCR 반응은 타겟 서열의 보다 효율적인 증폭을 야기하는, 상호보완적인 특성을 갖는 하나 이상의 열안정성 폴리머라제 효소를 포함할 수 있다. 예를 들면, 높은 진행도(processivity) (큰 뉴클레오티드 단편을 복제하는 능력)를 갖는 뉴클레오티드 폴리머라제를, 교정(proofreading) 능력 (타겟 핵산 서열의 신장 중 오류를 교정하는 능력)을 갖는 또다른 뉴클레오티드 폴리머라제로 보완시킴으로써, 긴 타겟 서열을 높은 정확도(fidelity)로 복제할 수 있는 PCR 반응을 제작할 수 있다. 상기 열안정성 폴리머라제는 그의 야생형 형태로 사용될 수 있다. 대안적으로, PCR 반응을 촉진시키기 위해, 상기 폴리머라제를 효소의 단편을 포함하거나, 또는 유익한 특성을 제공하는 돌연변이를 포함하도록 변형시킬 수 있다. 일 구체예에서, 상기 열안정성 폴리머라제는 Taq 폴리머라제일 수 있다. 향상된 특성을 갖는 다수의 Taq 폴리머라제 변이체들이 공지되어 있으며, AmpliTaq™, AmpliTaq™, 스토펠(Stoffel) 단편, SuperTaq™, SuperTaq plus, LA Taq™, LApro Taq™ 및 EX Taq™을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 또다른 구체예에서, 본 발명의 멀티플렉스 증폭 반응에 사용되는 열안정성 폴리머라제는 AmpliTaq 스토펠 단편이다.

- [0079] RNA 타겟 핵산 서열의 역전사 효소-PCR 증폭
- [0080] 유전자 발현 연구를 위해 가장 널리 사용되는 기법들 중 하나는, PCR에 의한 증폭용 주형으로서 mRNA 서열(들)에 대한 제1-가닥 cDNA(first-strand cDNA)를 사용한다.
- [0081] 용어 "역전사 효소 활성(reverse transcriptase activity)" 및 "역전사(reverse transcription)"는 주형으로서 RNA 가닥을 사용하여, DNA 가닥 (즉, 상보적 DNA, cDNA)을 합성할 수 있는, RNA-의존적 DNA 폴리머라제로서의 특성을 갖는 폴리머라제 종류의 효소 활성을 지칭한다.
- [0082] "역전사 효소-PCR(reverse transcriptase-PCR)" 또는 "RNA PCR"은 DNA-의존적 DNA 폴리머라제 프라이머 신장의 다중 사이클 전에, 우선 단일가닥 DNA 분자를 생산하기 위해, RNA 주형 및 역전사 효소, 또는 역전사 효소 활성을 갖는 효소를 사용하는 PCR 반응이다. 멀티플렉스 PCR은 통상적으로 단일 반응 내에 2개 이상의 프라이머를 포함시켜, 단일 반응에서 한 종류 이상의 증폭 산물을 생성하는 PCR 반응을 지칭한다.
- [0083] 예시적인 역전사 효소는, 미국 등록특허 제4,943,531호에 개시된, 몰로니 설치류 백혈병 바이러스(Moloney murine leukemia virus, M-MLV) RT, 미국 등록특허 제5,405,776호에 개시된, M-MLV-RT의 돌연변이 형태, 소 백혈병 바이러스(bovine leukemia virus, BLV) RT, 라우스 육종 바이러스(Rous sarcoma virus, RSV) RT, 조류 골수아구증 바이러스(Avian Myeloblastosis Virus, AMV) RT 및 미국 등록특허 제7,883,871호에 개시된 역전사 효소들을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0084] 종점(end-point) 또는 실시간(real-time) 분석에 의해 수행되는, 역전사 효소-PCR 과정은 두 가지 별개의 분자 합성을 포함한다: (i) RNA 주형으로부터 cDNA의 합성; 및 (ii) PCR 증폭을 통한, 상기 새로 합성된 cDNA의 복제. 역전사 효소-PCR과 종종 관련된 기술적 문제들을 처리하기 위한 시도로서, 상기 과정의 3가지 기본적인 단계를 고려한, 다수의 프로토콜이 개발되었다: (a) RNA의 변성 및 역방향 프라이머의 혼성화; (b) cDNA의 합성; 및 (c) PCR 증폭. 소위 "커플링되지 않은(uncoupled)" 역전사 효소-PCR 과정 (예를 들면, 2단계 역전사 효소-PCR)에서, 역전사는 역전사 효소 활성을 위한 최적의 완충 조건을 사용한 독립적인 단계로서 수행된다. cDNA 합성에 뒤이어, 반응물을 희석시켜 Taq DNA 폴리머라제 활성에 최적인 조건으로 MgCl₂ 및 데옥시리보뉴클레오티드 트리포스페이트(dNTP) 농도를 감소시키고, 표준 조건에 따라 PCR을 수행한다 (미국 등록특허 제 4,683,195호 및 제4,683,202호를 참조한다). 반대로, "커플링된(coupled)" RT PCR 방법은 역전사 효소 및 Taq DNA 폴리머라제 활성에 최적화된 통상의 완충액을 사용한다. 일 태양에서, 역방향 프라이머의 어닐링은 효소의 첨가 전에 수행되는 독립된 단계이고, 그 다음 단일 반응 용기로 첨가된다. 또다른 태양에서, 상기 역전사 효소

활성은 열안정성 Tth DNA 폴리머라제의 한 성분이다. 어닐링 및 cDNA 합성은 Mn^{2+} 존재 하에서 수행되고, 그 다음 PCR은 킬레이트화제(chelating agent)에 의해 Mn^{2+} 를 제거한 뒤, Mg^{2+} 의 존재 하에서 수행된다. 마지막으로 "연속적(continuous)" 방법 (예를 들면, 1단계 역전사 효소-PCR)은 상기 3개의 역전사 효소-PCR 단계를 하나의 연속적 반응으로 통합하여 구성성분 또는 효소의 첨가를 위해 반응 용기를 여는 것을 피할 수 있게 한다. 연속적 역전사 효소-PCR은 열안정성 Taq DNA 폴리머라제 및 Tth 폴리머라제의 역전사 효소 활성을 사용하는 단일 효소 시스템, 및 초기 온도가 65 °C인, AMV RT 및 Taq DNA 폴리머라제를 사용하는 2 효소 시스템으로 기술되어 왔다. RNA 변성 단계는 생략할 수 있다.

[0085] 특정한 구체예에서, 하나 이상의 프라이머를 표지화할 수 있다. 본 명세서에서 호환가능하게 사용되는, 용어 "표지(label)", "검출가능한 표지(detectable label)", 또는 "마커(marker)" 또는 "검출가능한 마커(detectable marker)"는 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 폴리머, 또는 핵산 결합 인자(nucleic acid binding factor)에 부착하는 임의의 화학적 모이어티를 지칭하며, 상기 부착은 공유적 또는 비공유적 결합에 의한 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 표지는 검출가능하고, 본 발명의 실시자로 하여금 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 폴리머를 검출가능하게 한다. 검출가능한 표지는 발광(luminescent) 분자, 화학발광(chemiluminescent) 분자, 형광 색소, 유색 분자, 방사성 동위원소 또는 섬광체(scintillant)를 포함한다. 검출가능한 표지는 또한, (바이오틴, 아비딘, 스트렙타비딘, HRP, 단백질 A(protein A), 단백질 G, 항체 또는 그의 단편, Grb2, 폴리히스티딘, Ni^{2+} , FLAG 태그, myc 태그와 같은) 임의의 유용한 링커 분자, 증금속, 효소(예로서, 알칼라인 포스파타아제, 퍼옥시다아제 및 루시페라아제를 포함한다), 전자 공여체/수용체, 아크리디늄 에스테르(acridinium ester), 색소 및 비색 기질(calorimetric substrate)을 포함한다. 또한, 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance)의 경우에서와 같이, 질량의 변화가 검출가능한 표지로서 고려될 수 있을 것으로 예상된다. 숙련된 기술자는 본 발명의 실시예에 사용될 수 있는, 상기 언급되지 않은 유용한 검출가능한 표지들을 용이하게 인식할 것이다.

[0086] 1단계 역전사 효소-PCR은 커플링되지 않은 역전사 효소-PCR에 비해 여러 이점을 제공한다. 1단계 역전사 효소-PCR은 커플링되지 않은 역전사 효소-PCR에 비해 반응 혼합물 시약 및 핵산 산물의 취급을 덜 필요로 하고 (예를 들면, 두 반응 단계 사이에 구성성분 또는 효소의 첨가를 위해 반응 용기를 여는 것), 따라서 보다 덜 노동집약적이며, 공수 요구량(required number of person hour)을 감소시킨다. 1단계 역전사 효소-PCR은 또한 보다 적은 시료를 필요로 하고, 오염 위험을 감소시킨다. 1단계 역전사 효소-PCR의 민감성 및 특이성은, 주어진 샘플 중 하나 내지 여러 유전자들의 발현 수준 연구, 또는 병원성 RNA의 검출에 매우 적합한 것으로 나타났다. 통상적으로, 이 과정은 cDNA 합성을 개시하기 위한 유전자-특이적 프라이머의 사용에 제한되었다.

[0087] 이러한 역전사 효소-PCR 기법과 조합된, 온-라인 검출에 의한 PCR 반응의 동력학 측정 능력은, 높은 민감도로 RNA 사본수의 정확하고 정밀한 정량화를 가능하게 하였다. 이는 하기에서 논의되는, 5' 형광 뉴클레아제 분석(fluorogenic nuclease assay) ("TaqManTM") 또는 엔도뉴클레아제 분석(endonuclease assay) ("CataCleaveTM") 과 같은 형광 이중-표지 혼성화 프로브(fluorescent dual-labeled hybridization probe) 기술에 의한, 증폭 과정 중의 형광 모니터링 및 PCR 산물의 측정을 통하여 역전사 효소-PCR 산물을 검출함으로써 가능해졌다.

[0088] *CataCleaveTM 프로브를 사용한 실시간 PCR*

[0089] 증폭 후 앰플리콘 검출은 힘들고 장시간이 소요된다. PCR 과정 중에 증폭을 모니터링하기 위해 실시간 방법이 개발되었다. 이 방법들은 일반적으로, 새롭게 합성된 DNA에 결합하는 형광 표지된 프로브, 또는 이중 가닥 DNA 사이에 삽입되는 경우 형광 방출이 증가하는 색소를 사용한다. 실시간 검출 방법은 게놈 DNA 또는 게놈 RNA 중 SNP의 PCR 검출에 적용가능하다.

[0090] 상기 프로브는 일반적으로, 두 발색단 사이의 형광 공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET)에 의해 타겟의 부재시 공여자(donor) 방출이 소광되도록 디자인된다. 공여 발색단은, 여기 상태에서, 수용 발색단과 가까운 거리에 있는 경우 수용 발색단에 에너지를 전이시킬 수 있다. 이러한 전이는 항상 비-방사성이고, 쌍극자-쌍극자 커플링을 통해 발생한다. 두 발색단 사이의 거리를 충분히 증가시키는 모든 과정은, FRET 효율을 감소시켜 공여 발색단 방출이 방사에 의해(radiatively) 검출될 수 있도록 할 것이다. 통상적인 공여 발색단은, FAM, TAMRA, VIC, JOE, Cy3, Cy5, 및 텍사스 레드(Texas Red.)를 포함한다. 수용 발색단은 그의 여기 스펙트럼이 공여자의 방출 스펙트럼과 중첩되도록 선택된다. 그와 같은 쌍의 예는 FAM-TAMRA이다. 또한, 다양한 공여자를 소광시킬 수 있는 비 형광성 수용자들이 존재한다. 공여자-수용자 FRET 쌍의 다른

적절한 예들이 당업자에게 공지되어 있을 것이다.

[0091] PCR의 실시간 검출에 사용될 수 있는 통상적인 FRET 프로브의 예는 분자 비콘(molecular beacon) (예를 들면, 미국 등록특허 제5,925,517호), TaqMan™ 프로브 (예를 들면, 미국 등록특허 제5,210,015호 및 제5,487,972호), 및 CataCleave™ 프로브 (예를 들면, 미국 등록특허 제5,763,181호)를 포함한다. 상기 분자 비콘은 비결합 상태에서는 프로브가, 공여자 및 수용자 발색단이 근접한 거리에 있고 공여자 방출이 감소하는 2차 구조를 형성하도록 디자인된 것인, 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이다. 적절한 반응 온도에서, 상기 비콘은 펼쳐지며, 앰플리콘에 특이적으로 결합한다. 펼쳐진 후에는, 공여자 및 수용자 발색단 사이의 거리가 증가하여 FRET이 반전되고, 특수 기기를 사용하여 공여자 방출을 모니터링할 수 있다. TaqMan™ 및 CataCleave™ 기술은, 공여자 및 수용자 발색단이 FRET을 반전시킬 정도로 충분히 분리되도록 하기 위해, 사용되는 FRET 프로브가 절단된다는 점에서 분자 비콘과 다르다.

[0092] TaqMan™ 기술은 5' 말단이 공여 발색단으로 표시되고, 3' 말단이 수용 발색단으로 표시된, 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용한다. 증폭에 사용되는 DNA 폴리머라제는 5' → 3' 엑소뉴클레아제 활성을 가져야 한다. TaqMan™ 프로브는 프라이머가 결합하는 것과 동시에 앰플리콘의 한 가닥에 결합한다. DNA 폴리머라제가 프라이머를 신장시키면서, 상기 폴리머라제는 결국 결합되어 있는 TaqMan™ 프로브와 마주칠 것이다. 이 시점에, 폴리머라제의 엑소뉴클레아제 활성은 5' 말단에서부터 순차적으로 TaqMan™ 프로브를 분해할 것이다. 프로브가 분해되면, 상기 프로브를 포함하는 모노뉴클레오티드는 반응 완충액 내로 방출된다. 공여자는 수용자로부터 멀어지고, FRET은 반전된다. 프로브 절단을 확인하기 위해 공여자로부터의 방출을 모니터링한다. TaqMan™이 작용하는 방식 때문에, 특정한 앰플리콘은 PCR의 매 사이클에 대해 단 1회만 검출될 수 있다. TaqMan™ 타겟 부위를 통한 프라이머의 신장은 이중가닥 산물을 생성시켜, 앰플리콘이 후속 PCR 주기에서 변성될 때까지 TaqMan™ 프로브의 추가적인 결합을 막는다.

[0093] 그의 내용이 참조에 의해 본 명세서에 삽입되는, 미국 등록특허 제5,763,181호는, ("CataCleave™"으로 지칭되는) 또다른 실시간 검출 방법을 개시한다. CataCleave™ 기술은 프로브의 절단이 폴리머라제 활성을 갖지 않는 제2 효소에 의해 달성된다는 점에서 TaqMan™와 구별된다. CataCleave™ 프로브는 예를 들면, 제한 효소 또는 RNase와 같은, 엔도뉴클레아제의 타겟인 분자 내 서열을 갖는다. 한 예에서, CataCleave™ 프로브는 상기 프로브의 5' 및 3' 말단이 DNA로 구성되고, 절단 부위는 RNA를 포함하는 키메라(chimeric) 구조를 갖는다. 상기 프로브의 DNA 서열 부분은 양 말단 또는 내부가, FRET 쌍으로 표시된다. PCR 반응은 RNA-DNA 이중가닥의 RNA 서열 부분을 특이적으로 절단시킬, RNase H 효소를 포함한다. 절단 후에, 상기 프로브의 2개의 절반은 반응 온도에서 타겟 앰플리콘으로부터 해리되고, 반응 완충액으로 확산된다. 공여자 및 수용자가 분리됨에 따라, FRET은 TaqMan™ 프로브와 마찬가지로의 방식으로 반전되고, 공여자 방출을 모니터링할 수 있다. 절단 및 해리는 추가적인 CataCleave™ 결합을 위한 부위를 재생시킨다. 이러한 방법으로 단일 앰플리콘은, 프라이머가 CataCleave™ 프로브 결합 부위를 통해 신장될 때까지 타겟으로서, 또는 다수회 프로브 절단을 위해 사용될 수 있다.

[0094] *CataCleave™ 프로브의 표시화*

[0095] 용어 "프로브(probe)"는 특이적 핵산 서열, 예를 들면, 타겟 핵산 서열의 상보적인 영역에 서열 특이적으로 혼성화하도록 고안된, 특이적인 부분을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일 구체예에서, 올리고뉴클레오티드 프로브는 15 내지 60 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 보다 바람직하게는, 상기 올리고뉴클레오티드 프로브는 18 내지 30 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드 프로브의 구체적인 서열 및 길이는 그가 결합하는 타겟 폴리뉴클레오티드의 성질에 부분적으로 의존한다. 결합 위치 및 길이는 특별한 구체예에 있어서 적절한 어닐링 및 용융 특성을 달성하도록 변화시킬 수 있다. 그와 같은 디자인 선택을 위한 지침은, 그의 내용이 참조에 의해 본 명세서에 삽입되는, 미국 등록특허 제5,763,181호, 제6,787,304호, 및 제7,112,422호에 개시된 TaqMan™ 분석 또는 CataCleave™을 설명하는 다수의 참조문헌에서 찾아볼 수 있다.

- [0096] 특정한 구체예에서, 상기 프로브는 타겟 핵산 서열에 대해 "실질적으로 상보적"이다.
- [0097] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "실질적으로 상보적인(substantially complementary)"은, 어닐링하여 안정한 이중가닥을 형성할 수 있을 정도로 서열에 있어서 충분히 상보적인, 두 핵산 가닥을 지칭한다. 상보성은 완전할 필요는 없다; 예를 들면, 두 핵산 사이에, 임의의 수의 매칭되지 않는 염기쌍이 존재할 수 있다. 그러나, 미스매치의 수가 너무 많아서 가장 스트린전시가 낮은(the least stringent) 혼성화 조건에서조차 혼성화가 이루어지지 않는 경우, 상기 서열은 실질적으로 상보적인 서열이 아니다. 본 명세서에서, 두 서열이 "실질적으로 상보적인" 것으로 지칭되는 경우, 이는 상기 서열들이 선택된 반응 조건 하에서 혼성화하기에 상호 간 충분히 상보적이라는 것을 의미한다. 핵산 상보성, 및 특이도 달성에 충분한 혼성화의 스트린전시(stringency) 간의 관계는 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 실질적으로 상보적인 두 가닥은, 예를 들면, 완전히 상보적이거나, 또는 혼성화 조건이 예를 들면, 쌍합(pairing) 서열 및 비쌍합(non-pairing) 서열의 구별을 가능하게 하기에 충분한 한, 하나 내지 다수의 미스매치를 포함할 수 있다. 따라서, "실질적으로 상보적인" 서열은 이중가닥 영역에서, 100, 95, 90, 80, 75, 70, 60, 50 % 또는 그 미만, 또는 상기 범위 사이의 임의의 %의 염기쌍 상보성을 갖는 서열을 지칭할 수 있다.
- [0098] 본 명세서에서 사용되는 "선택된 영역(selected region)"은 프로브의 RNA 서열에 어닐링하는 타겟 DNA 또는 cDNA의 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 일 구체예에서, 타겟 DNA 또는 cDNA의 "선택된 영역"은 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 또는 그 이상의 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다.
- [0099] 본 명세서에서 사용되는, 부위-특이적 RNase H 절단은 타겟 DNA 서열에 완전히(entirely) 상보적이며, 그와 혼성화하여 RNA:DNA 이형이중가닥을 형성하는, Catacleave™ 프로브 중 RNA 모이어티의 절단을 지칭한다.
- [0100] 상기 Catacleave™ 프로브 중 RNA 모이어티가 단일 뉴클레오티드 다형성을 포함하고, 표적 DNA 서열이 상기 다형성의 위치에 야생형 서열을 포함하는 경우, Catacleave™ 프로브와 야생형 타겟 DNA 서열 간 RNA:DNA 이형이중가닥의 형성은 상기 다형성 위치에서 단일 뉴클레오티드 미스매치를 초래하며, 이는 RNase H에 의한 Catacleave™ 프로브 중 RNA 모이어티의 절단을 막는다.
- [0101] 마찬가지로, 타겟 DNA 서열이 SNP 서열을 포함하고, Catacleave™ 프로브의 RNA 모이어티가 다형성 위치에 야생형 서열을 포함하는 경우, Catacleave™ 프로브와 SNP 서열을 포함하는 야생형 타겟 DNA 서열 간의 RNA:DNA 이형이중가닥의 형성은 상기 다형성 위치에서 단일 뉴클레오티드 미스매치를 초래하며, 이는 RNase H에 의한 Catacleave™ 프로브 중 RNA 모이어티의 절단을 막는다.
- [0102] 본 명세서에서 사용되는, Catacleave™ 프로브의 "표지(label)" 또는 "검출가능한 표지(detectable label)"는 상기 프로브에 공유적 또는 비공유적 수단에 의해 부착된 형광색소(fluorochrome) 화합물을 포함하는 임의의 표지를 지칭한다.
- [0103] 본 명세서에서 사용되는, "형광색소(fluorochrome)"는 방출되는 빛보다 더 짧은 파장의 빛에 의해 여기된 후 빛을 방출하는, 형광 화합물을 지칭한다. 용어 "형광 공여자(fluorescent donor 또는 fluorescence donor)"는, 본 발명에서 기술되는 분석시험에서 측정되는 빛을 방출하는 형광색소를 지칭한다. 보다 특별하게는, 상기 형광 공여자는 형광 수용자에 의해 흡수되는 빛을 제공한다. 용어 "형광 수용자(fluorescent acceptor 또는 fluorescence acceptor)"는 형광 공여자로부터 방출되는 빛을 흡수하는 제2 형광색소 또는 켄처(quencher) 분자를 지칭한다. 제2 형광색소는 형광 공여자로부터 방출되는 빛을 흡수하고, 상기 형광 공여자로부터 방출되는 빛보다 더 긴 파장의 빛을 방출한다. 켄처 분자는 형광 공여자로부터 방출되는 빛을 흡수한다.
- [0104] Alexa Fluor™ 350, Alexa Fluor™ 430, Alexa Fluor™ 488, Alexa Fluor™ 532, Alexa Fluor™ 546, Alexa Fluor™ 568, Alexa Fluor™ 594, Alexa Fluor™ 633, Alexa Fluor™ 647, Alexa Fluor™ 660, Alexa Fluor™ 680, 7-디에틸아미노쿠마린-3-카르복시산, 플루오레세인(Fluorescein), 오레곤 그린(Oregon Green) 488, 오레곤 그린 514, 테트라메틸로다민(Tetramethylrhodamine), 로다민 X, 텍사스 레드 색소(Texas Red dye), QSY 7, QSY33, Dabcyl, BODIPY FL, BODIPY 630/650, BODIPY 6501665, BODIPY TMR-X, BODIPY TR-X, 디알킬아미노쿠마린, Cy5.5, Cy5, Cy3.5, Cy3, DTPA(Eu³⁺)-AMCA 및 TTHA(Eu³⁺)AMCA를 포함한, 임의의 발광 분자, 바람직하게는 형광색

소 및/또는 형광 켄처(fluorescent quencher)가 본 발명의 실시예에 사용될 수 있다.

- [0105] 일 구체예에서, 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브의 3' 말단 뉴클레오타이드는 블로킹되거나, 또는 핵산 폴리머라제에 의한 신장이 불가능하도록 처리된다. 그와 같은 블로킹은 편리하게는, 프로브의 말단 3' 위치에 리포터 또는 켄처 분자를 부착시킴으로써 수행된다.
- [0106] 일 구체예에서, 리포터 분자는 연결 모이어티(linking moiety)에 의해 프로브의 말단 3' 또는 말단 5'에 부착하도록 유도된 형광 유기 색소이다. 바람직하게는, 켄처 분자들은 또한, 본 발명의 구체예에 따라 형광성 또는 비형광성인 유기 색소이다. 예를 들면, 본 발명의 바람직한 구체예에서, 켄처 분자는 형광성이다. 일반적으로, 켄처 분자가 형광성인지 또는 비-방사 붕괴(non-radiative decay)에 의해 리포터로부터 전이된 에너지를 단순히 방출하는지 여부와 무관하게, 켄처의 흡수 밴드는 리포터 분자의 형광 방출 밴드와 실질적으로 중첩되어야 한다. 여기된 리포터 분자로부터 에너지를 흡수하나, 에너지를 방사적으로 방출하지 않는 비-형광 켄처 분자는 본 출원에서 발색 분자(chromogenic molecule)로 지칭한다.
- [0107] 예시적인 리포터-켄처 쌍은 플루오레세인을 포함한, 잔틴(xanthene) 색소 및 로다민(rhodamine) 색소로부터 선택될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드에 부착하기 위한 결합 부위 또는 결합 작용기로서 사용될 수 있는, 그의 페닐 모이어티 상에 치환체를 갖는, 상기 화합물들의 다수의 적합한 형태들이 널리 시판되고 있다. 또다른 형광 화합물의 군은, 알파 또는 β 위치에 아미노기를 갖는, 나프틸아민(naphthylamine)이다. 그와 같은 나프틸아미노 화합물에 포함되는 것으로는 1-디메틸아미노나프틸-5-술포네이트, 1-아닐리노-8-나프탈렌 술포네이트 및 2-p-투이디닐-6-나프탈렌 술포네이트가 있다. 기타 색소들은, 3-페닐-7-이소시아나토쿠마린, 9-이소티오시아나토아크리딘 및 아크리딘 오렌지와 같은, 아크리딘(acridine), N-(p-(2-벤조자졸릴)페닐)말레이미드, 벤조자디아졸(benzoxadiazole), 스틸벤(stylbene), 파이렌(pyrene) 등을 포함한다.
- [0108] 일 구체예에서, 리포터 및 켄처 분자는 플루오로세인 및 로다민 색소로부터 선택된다.
- [0109] 하기 참조문헌에 의해 예시되는, 상기 리포터 또는 켄처 분자들을 올리고뉴클레오타이드의 5' 또는 3' 말단에 부착시키기 위한 다수의 연결 모이어티 및 방법들이 존재한다: Eckstein 편집, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991); Zuckerman 등에 의한, *Nucleic Acids Research*, 15: 5305-5321 (1987) (올리고뉴클레오타이드상의 3' 티올기); Sharma 등에 의한, *Nucleic Acids Research*, 19: 3019 (1991) (3' 술폰드릴(sulfhydryl)); Giusti 등에 의한, *PCR Methods and Applications*, 2: 223-227 (1993) 및 Fung 등에 의한, 미국 등록특허 제4,757,141호 (Applied Biosystems, Foster City, Calif.에서 입수가능한, Aminolink.TM. II에 의한 5' 포스포아미노기) Stabinsky에 의한, 미국 등록특허 제4,739,044호 (3' 아미노알킬 포스포릴기); Agrawal 등에 의한, *Tetrahedron Letters*, 31: 1543-1546 (1990) (포스포라미데이트 연결에 의한 부착); Sproat 등에 의한, *Nucleic Acids Research*, 15: 4837 (1987) (5' 머캡토기); Nelson 등, *Nucleic Acids Research*, 17: 7187-7194 (1989) (3' 아미노기) 등.
- [0110] 로다민 및 플루오로세인 색소는 또한 편리하게는, 포스포라미다이트 모이어티를 포함하는 색소 유도체에 의한 고체상 합성, 예를 들면, Woo 등에 의한, 미국 등록특허 제5,231,191호; 및 Hobbs, Jr.에 의한, 미국 등록특허 제 4,997,928호의 마지막 단계에서, 올리고뉴클레오타이드의 5' 히드록시기에 부착된다.
- [0111] *고체 지지체로의 CataCleaveTM 프로브의 부착*
- [0112] 일 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드 프로브는 고체 지지체에 부착될 수 있다. 상이한 프로브들이 상기 고체 지지체에 부착될 수 있으며, 샘플 중에 존재하는 상이한 타겟 서열의 동시 검출에 사용될 수 있다. 상이한 형광 파장을 갖는 리포터 분자가 상기 상이한 프로브에 사용될 수 있고, 그에 따라 독립적으로 검출될 상이한 프로브와의 혼성화를 가능하게 한다.
- [0113] 올리고뉴클레오타이드 프로브의 고정화를 위한 바람직한 고체 지지체 종류의 예는, 제어된 다공성 유리, 유리 플레이트, 폴리스티렌, 아비딘이 코팅된 폴리스티렌 비드 셀룰로오스, 나일론, 아크릴아미드 겔 및 활성화된 텍스트란, 제어된 다공성 유리(controlled pore glass, CPG), 유리 플레이트 및 고도 가교 폴리스티렌(high cross-linked polystyrene)을 포함한다. 이 고체 지지체들은 그의 화학적 안정성, 작용기화의 용이성, 및 잘 정의된 표면적으로 인해, 혼성화 및 진단 연구에 바람직하다. 제어된 다공성 유리(500 Å, 1000 Å) 및 비팽윤성(non-swelling) 고도 가교 폴리스티렌 (1000 Å)과 같은 고체 지지체들이, 그의 올리고뉴클레오타이드 합성과의 상용성에 비추어 특히 바람직하다.

- [0114] 올리고뉴클레오타이드 프로브는 다양한 방식으로 고체 지지체에 부착될 수 있다. 예를 들면, 프로브는, 프로브의 3' 또는 5' 말단 뉴클레오타이드가 상기 고체 지지체에 부착함으로써 고체 지지체에 부착될 수 있다. 그러나 프로브는, 상기 프로브를 고체 지지체로부터 거리를 두게 하는 링커(linker)에 의해 고체 지지체에 부착될 수 있다. 상기 링커는 30 원자 이상의 길이를 갖는 것이 가장 바람직하며, 보다 바람직하게는 50 원자 이상의 길이를 갖는 것이 바람직하다.
- [0115] 고체 지지체에 고정화되는 프로브의 혼성화는, 일반적으로 상기 프로브가 고체 지지체로부터 30 원자 이상, 보다 바람직하게는 50원자 이상 분리되어 있을 것을 필요로 한다. 이러한 분리를 달성하기 위해, 링커는 바람직하게는 상기 링커와 3' 뉴클레오타이드 사이에 배치된, 스페이서(spacer)를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드 합성을 위해, 상기 올리고뉴클레오타이드를 고체 지지체로부터 해리시키기 위해, 링커 팔(arm)은 염기성 시약으로 분해될 수 있는 에스테르 결합에 의해 상기 3' 뉴클레오타이드의 3'-OH에 부착된다.
- [0116] 올리고뉴클레오타이드를 고체 지지체에 부착시키기 위해 사용되는 다양한 링커들이 당해 기술분야에 공지되어 있다. 상기 링커는, 고체 지지체에 부착된 프로브와 표적 서열의 혼성화를 현저하게 간섭하지 않는, 임의의 화합물로 구성될 수 있다. 링커는 자동화된 합성에 의해 상기 링커에 용이하게 부가될 수 있는 호모폴리머 올리고뉴클레오타이드로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 작용기화 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리머들이 링커로서 사용될 수 있다. 그와 같은 폴리머는, 프로브와 타겟 올리고뉴클레오타이드의 혼성화를 현저하게 간섭하지 않기 때문에, 호모폴리머 올리고뉴클레오타이드에 비해 바람직하다. 폴리에틸렌 글리콜은 상업적으로 이용가능하고, 유기성 및 수성 매질 모두에 용해가능하며, 작용기화가 용이하고, 올리고뉴클레오타이드 합성 및 합성-후 조건에서 완전히 안정하기 때문에 특히 바람직하다.
- [0117] 고체 지지체, 링커 및 프로브 간의 결합은 바람직하게는, 고온의 염기성 조건 하에서 염기 보호기를 제거하는 동안, 절단되지 않는다. 바람직한 결합의 예는, 카르바메이트(carbamate) 및 아마이드 결합을 포함한다. 프로브의 고정화는 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며, 당업자는 고정화 조건을 결정할 수 있다.
- [0118] 상기 방법의 일 구체예에 따르면, CataCleave™ 프로브를 고체 지지체에 고정화시킨다. 상기 CataCleave™ 프로브는 검출가능한 표지, 및 DNA 및 RNA 핵산 서열을 포함하며, 상기 프로브의 RNA 핵산 서열은 다형성을 포함하는 타겟 DNA 서열의 선택된 부위에 완전히 상보적이고, 상기 프로브의 DNA 핵산 서열은 상기 타겟 DNA 서열의 선택된 부위에 인접한 DNA 서열에 실질적으로 상보적이다. 그 다음, 상기 프로브를, 프로브 내의 RNA 서열이 상기 다형성을 포함하는 PCR 단편 내의 상보적인 DNA 서열과 RNA:DNA 이형이중가닥을 형성할 수 있는 조건 하에서, RNase H의 존재 하에 핵산 샘플과 접촉시킨다. 상기 RNA:DNA 이형이중가닥 내 RNA 서열의 RNase H 절단은, 프로브 상의 표지로부터 방출되는 신호의 실시간 증가를 야기하며, 상기 신호의 증가는 타겟 DNA 내의 다형성의 존재를 나타낸다.
- [0119] 상기 방법의 또다른 구체예에 따르면, 고체 지지체에 고정화된 CataCleave™ 프로브는, 검출가능한 표지, 및 DNA 및 RNA 핵산 서열을 포함하고, 상기 프로브의 RNA ogrtks서열은 다형성 위치에 야생형 DNA 서열을 포함하는 타겟 DNA 서열의 선택된 부위에 완전히 상보적이고, 상기 프로브의 DNA핵산 서열은 상기 타겟 DNA 서열의 선택된 부위에 인접한 DNA 서열에 실질적으로 상보적이다. 그 다음, 상기 프로브를, 프로브 내의 RNA 서열이 상기 다형성을 포함하는 PCR 단편 내의 상보적인 DNA 서열과 RNA:DNA 이형이중가닥을 형성할 수 있는 조건 하에서, RNase H의 존재 하에 핵산 샘플과 접촉시킨다. 상기 타겟 DNA 서열이 다형성을 포함하는 경우, 상기 RNA:DNA 이중가닥 내의 다형성 위치에서의 미스매치는 상기 RNA:DNA 이형이중가닥 내의 RNA 서열의 RNase H 절단을 저해하고, 이는 상기 프로브 상의 표지로부터 방출되는 신호의 실시간 감소를 야기하며, 상기 신호의 감소는 타겟 DNA 내의 다형성의 존재를 나타낸다.
- [0120] 프로브의 고체 지지체로의 고정화는, 상기 프로브에 혼성화된 타겟 서열이 샘플로부터 용이하게 분리될 수 있게 한다. 후기 단계에서, 상기 분리된 타겟 서열을 고체 지지체로부터 분리하고, 연구자의 구체적인 필요에 따라 당해 기술분야에 잘 알려진 방법에 따라 가공 (예를 들면, 정제, 증폭)할 수 있다.
- [0121] *Catacleave™ 프로브의 RNase H 절단*
- [0122] RNase H는 RNA-DNA 혼성체 내의 RNA를 가수분해한다. 송아지 흉선에서 최초로 동정된, RNase H는 뒤이어 다양한 유기체에서 발견되었다. 정말로, RNase H 활성은 진핵생물 및 박테리아에서 보편적으로 나타난다. RNase H는 다양한 분자량 및 핵산분해(nucleolytic) 활성을 갖는 단백질 과(family)를 구성함에도 불구하고, 기질 요건은 다

양한 이소타입(isotype)에 있어서 유사하게 나타난다. 예를 들면, 지금까지 연구된 대부분의 RNase H는, 엔도뉴클레아제로서 기능하고, 5' 포스페이트 및 3' 히드록시 말단을 갖는 분해 산물을 생성하기 위해 2가 양이온 (예를 들면, Mg^{2+} , Mn^{2+})를 필요로 한다.

[0123] 원핵 생물에서, RNase H는 클로닝되었으며, 널리 그 특성이 규명되었다 (Crooke 등, (1995) *Biochem J*, 312 (Pt 2), 599-608; Lima 등, (1997) *J Biol Chem*, 272, 27513-27516; Lima 등, (1997) *Biochemistry*, 36, 390-398; Lima 등, (1997) *J Biol Chem*, 272, 18191-18199; Lima 등, (2007) *Mol Pharmacol*, 71, 83-91; Lima 등, (2007) *Mol Pharmacol*, 71, 73-82; Lima 등, (2003) *J Biol Chem*, 278, 14906-14912; Lima 등, (2003) *J Biol Chem*, 278, 49860-49867; Itaya, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, 8587-8591을 참조한다). 예를 들면, 대장균 RNase HII는 213 아미노산의 길이를 가지며, RNase HI은 155 아미노산 길이를 갖는다. 대장균 RNase HII는 대장균 RNase HI와 단지 17%만의 상동성을 갖는다. *S. 타이피무리움(S. typhimurium)*으로부터 클로닝된 RNase H는 대장균 RNase HI와 단지 11개 위치만이 다르며, 155 아미노산의 길이를 가졌다 (Itaya, M. 및 Kondo K., *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, 4443-4449).

[0124] 다수의 바이러스, 기타 박테리아 및 효모로부터, RNase H 활성을 나타내는 단백질이 또한 클로닝 및 정제되었다 (Wintersberger, U. *Pharmac. Ther.*, 1990, 48, 259-280). 다수의 경우에서, RNase H 활성을 갖는 단백질들은 RNase H가 또다른 효소, 흔히 DNA 또는 RNA 폴리머라제의 아미노 또는 카르복시 말단에 융합된, 융합 단백질인 것으로 나타났다. 상기 RNase H 도메인은 대장균 RNase HI와 높은 수준의 상동성을 갖는 것으로 일관되게 밝혀졌으나, 다른 도메인들이 상당히 다양하기 때문에, 융합 단백질의 분자량 및 다른 특성들은 광범위하게 달라진다.

[0125] 고차 진핵생물에서, 분자량, 2가 양이온의 효과, 술피드릴 작용제(sulfhydryl agent) 및 면역학적 교차-반응성의 차이에 기반하여 두 종류의 RNase H가 정의되었다 (Busen 등, *Eur. J. Biochem.*, 1977, 74, 203-208). RNase HI 효소는 68-90 kDa 범위의 분자량을 가지며, Mn^{2+} 또는 Mg^{2+} 에 의해 활성화되고, 술피드릴 작용제에 둔감한 것으로 보고되었다. 대조적으로, RNase HII 효소는 31-45 kDa 범위의 분자량을 갖고, Mg^{2+} 를 필요로 하며, 술피드릴 작용제에 매우 민감하고, Mn^{2+} 에 의해 억제되는 것으로 보고되었다 (Busen, W., 및 Hausen, P., *Eur. J. Biochem.*, 1975, 52, 179-190; Kane, C. M., *Biochemistry*, 1988, 27, 3187-3196; Busen, W., *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 7106-7108).

[0126] RNase HII 특성을 갖는 효소들은 또한, 사람 태반으로부터, 가까운 동종성으로 정제되었다 (Frank 등, *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22, 5247-5254). 이 단백질은 약 33 kDa의 분자량을 가지며, pH 6.5-10의 범위, 최적 pH 8.5-9에서 활성을 갖는다. 이 효소는 Mg^{2+} 를 필요로 하며, Mn^{2+} 및 n-에틸 말레이미드에 의해 억제된다. 절단 반응의 산물은 3' 히드록시 및 5' 포스페이트 말단을 갖는다.

[0127] 다양한 종에서 분리된 RNase의 상세한 비교는 Ohtani N, Haruki M, Morikawa M, Kanaya S. *J Biosci Bioeng.* 1999;88(1):12-9에 보고되어 있다.

[0128] 본 구체예에서 사용될 수 있는 RNase H 효소의 예는, 파이로코커스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*), 파이로코커스 호리코시(*Pyrococcus horikoshi*), 써모코커스 리토랄리스(*Thermococcus litoralis*) 또는 써머스 써모필러스(*Thermus thermophilus*)와 같은, 호열성 유기체로부터 분리된 열안정성 RNase H 효소들을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0129] 본 구체예에서 사용될 수 있는 다른 RNase H 효소들이 예를 들면, Uemori에 의한 미국 등록특허 제7,422,888호 또는 Walder에 의한, 미국 특허출원 공개 제2009/0325169호에 개시되어 있으며, 그의 내용은 참조에 의해 본 명세서에 삽입된다.

[0130] 일 구체예에서, 상기 RNase H 효소는 하기 표시된, Pfu RNase HII (서열번호 13)의 아미노산 서열과 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 상동성을 갖는, 열안정성 RNase H이다.

[0131] MKIGGIDEAG RGPAGPLVV ATVVVDEKNI EKLRNIGVKD SKQLTPHERK NLFSQITSIA 60

[0132] DDYKIVIVSP EEIDNRSGTM NELEVEKFAL ALNSLQIKPA LIYADAADVD ANRFASLIER 120

[0133] RLNYKAKIIA EHKADAKYPV VSAASILAKV VRDEEIEKLK KQYGDFGSGY PSDPKTKKWL 180

- [0134] EEYKHKHNSF PPIVRRWTET VRKIEESIKA KKSQTLDKF FKKP (서열번호 13)
- [0135] 상동성은 예를 들면, 컴퓨터 프로그램 DNASIS-Mac (Takara Shuzo), 컴퓨터 알고리즘 FASTA (version 3.0; Pearson, W. R. 등, Pro. Natl. Acad. Sci., 85:2444-2448, 1988) 또는 컴퓨터 알고리즘 BLAST (version 2.0, Altschul 등, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997)을 사용하여 결정할 수 있다.
- [0136] 또다른 구체예에서, RNase H 효소는 서열번호 13의 5-20, 33-44, 132-150, 및 158-173 위치에 해당하는, 하나 이상의 상동성 부위(homology region) 1-4를 갖는, 열안정성 RNase H이다. 이 상동성 부위는 파이로코커스 푸리오시스(*Pyrococcus furiosus*), 파이로코커스 호리코시(*Pyrococcus horikoshi*), 썬모코커스 코다카렌시스(*Thermococcus kodakarensis*), 아르케오글로부스 프로푼두스(*Archeoglobus profundus*), 아르케오글로부스 풀기디스(*Archeoglobus fulgidis*), 썬모코커스 셀레르(*Thermococcus celer*) 및 썬모코커스 리토랄리스(*Thermococcus litoralis*) RNase HII 폴리펩티드 서열의 서열 배치에 의해 정의된다 (도 10을 참조한다).
- [0137] 상동성 부위 1: GIDEAG RGAIGPLVV (서열번호 20; 서열번호 13의 5-20 위치에 해당)
- [0138] 상동성 부위 2: LRNIGVKD SKQL (서열번호 21; 서열번호 13의 33-44 위치에 해당)
- [0139] 상동성 부위 3: HKADAKYPV VSAASILAKV (서열번호 22; 서열번호 13의 132-150 위치에 해당)
- [0140] 상동성 부위 4: KLK KQYGFSGSY PSD (서열번호 23; 서열번호 13의 158-173 위치에 해당)
- [0141] 일 구체예에서, RNase H 효소는 서열번호 20, 21, 22 또는 23의 폴리펩티드 서열과 50%, 60%, 70%, 80%, 90%의 서열 동일성(sequence identity)을 갖는 상동성 부위 중 하나 이상을 포함하는, 열안정성 RNase H이다.
- [0142] 또다른 구체예에서, RNase H 효소는 하기 표시된, 썬머스 썬모필리스 RNase HI의 아미노산 서열 (서열번호 25)과 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 상동성을 갖는 열안정성 RNase H이다.
- [0143] MNPSPRKRV LFTDGACLG NPGPGWAALL RFHAHEKLLS GGEACTTNR MELKAAIEGL
- [0144] KALKEPCEVD LYTDSHYLKK AFTEGWLEGW RKRGWRTAEG KPVKNRDLWE ALLLAMAPHR
- [0145] VRFHFVKGHT GHPENERVDR EARRQAQSQ KTPCPPRAPT LFHEEA (서열번호 25)
- [0146] 또다른 구체예에서, RNase H 효소는 상기 서열번호 25의 23-48, 62-69, 117-121 및 141-152 위치에 해당하는 상동성 부위 5 내지 8 중 하나 이상을 포함하는 열안정성 RNase H이다. 이 상동성 부위들은 서열 배치에 의해 정의된다.
- [0147] 해모필리스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 썬머스 썬모필리스 (*Thermus thermophilis*), 썬머스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*) 및 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) RNase HI 폴리펩티드 서열의 서열 배치에 의해 정의된다 (도 11을 참조한다).
- [0148]
- [0149] 상동성 부위 5: K*V*LFTDG*C*GNPG*GG*ALLRY (서열번호 29; 서열번호 25의 23-48 위치에 해당)
- [0150] 상동성 부위 6: TTNRMEL (서열번호 30; 서열번호 25의 62-69 위치에 해당)
- [0151] 상동성 부위 7: KPVK (서열번호 31; 서열번호 25의 117-121 위치에 해당)
- [0152] 상동성 부위 8: FVKGH*GH*ENE (서열번호 32; 서열번호 25의 141-152 위치에 해당)
- [0153] 또다른 구체예에서, 상기 RNase H 효소는 서열번호 29, 30, 31 또는 32의 폴리펩티드 서열과 50%, 60%, 70%, 80%, 90%의 서열 동일성을 갖는 상동성 부위 4 내지 8 중 하나 이상을 포함하는, 열안정성 RNase H이다.

- [0154] 본 명세서에서 사용되는 "서열 동일성(sequence identity)"은 비교 범위에 걸쳐 아미노산 대 아미노산을 기준으로, 동일하거나 또는 기능적 또는 구조적으로 유사한 서열의 범위를 지칭한다. 따라서, "서열 동일성의 백분율(percentage of sequence identity)"은, 예를 들면, 비교 범위에 걸쳐 최적으로 배열된 두 서열을 비교하는 단계, 양 서열에서 동일한 아미노산이 존재하는 위치의 수를 결정하여 매치되는 위치의 수를 얻는 단계, 매치되는 위치의 수를 비교 범위 내의 전체 위치 수 (즉, 범위 크기)로 나누는 단계, 및 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출하는 단계에 의해 계산될 수 있다.
- [0155] 특정한 구체예에서, RNase H를 변형시켜 핫 스타트 "유도성(inducible)" RNase H를 제조할 수 있다.
- [0156] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "변형된 RNase H(modified RNase H)"는 RNase H의 엔도뉴클레아제 활성의 상실을 초래하는 억제 인자에 역으로 커플링하거나 또는 역으로 결합하는 RNase H일 수 있다. 상기 RNase H로부터 억제 인자의 방출 또는 탈커플링(decoupling)은 상기 RNase H의 엔도뉴클레아제 활성을 완전히 또는 적어도 부분적으로 회복시킨다. 순수 RNase H의 엔도뉴클레아제 활성 중 약 30 내지 100%이면 충분할 수 있다. 상기 억제 인자는 리간드 또는 화학적 변형체일 수 있다. 상기 리간드는 항체, 앵타머(aptamer), 수용체, 보조인자(cofactor), 또는 킬레이트화제일 수 있다. 상기 리간드는 RNase H 효소의 활성 부위에 결합하여, 그에 의해 효소 활성을 억제하거나, 또는 상기 RNase의 활성 부위로부터 멀리 떨어진 부위에 결합할 수 있다. 일부 구체예에서, 리간드는 구조적 변화를 유도할 수 있다. 상기 화학적 변형은 (예를 들면, 포름알데히드에 의한) 가교화 또는 아실화일 수 있다. RNase H로부터 억제 인자의 방출 또는 탈커플링은 샘플 또는 커플링된 RNase H(불활성)를 약 65 °C 내지 약 95 °C 이상의 온도로 가열하는 단계 및/또는 상기 혼합물 또는 샘플의 pH를 약 7.0 이하로 낮추는 단계에 의해 달성될 수 있다.
- [0157] 본 명세서에서 사용되는 핫 스타트 "유도성(inducible)" RNase H 활성은 리간드와의 연관에 의해 조절될 수 있는 엔도뉴클레아제 효소 활성을 갖는, 본 명세서에서 기술되는 변형된 RNase H를 지칭한다. 완화된 조건에서, RNase H 엔도뉴클레아제 효소 활성은 활성화되는 반면, 복제가 허용되지 않는(non-permissive) 조건에서, 이 효소 활성은 억제된다. 일부 구체예에서, 변형된 RNase H의 효소 활성은 역전사를 수행할 수 있는 온도, 즉 약 42 °C에서 억제될 수 있고, PCR 반응에서 관찰되는 보다 상승된 온도, 즉 약 65 °C 내지 95 °C에서는 활성화될 수 있다. 이러한 특성들을 갖는 변형된 RNase H는 "열 유도성(heat inducible)"인 것으로 불린다.
- [0158] 다른 구체예에서, 변형된 RNase H의 효소 활성은 상기 효소를 함유하는 용액의 pH를 변화시킴으로써 조절될 수 있다.
- [0159] 본 명세서에서 사용되는, "핫 스타트(hot start)" 효소 조성물은 복제가 허용되지 않는 온도, 즉 약 25 °C 내지 약 45 °C에서 억제되고, PCR 반응에 적합한 온도, 예를 들면 약 55 °C 내지 약 95 °C에서 활성화된다. 특정한 구체예에서, "핫 스타트" 효소 조성물은 당해 기술분야에 공지된, '핫 스타트' RNase H 및/또는 '핫 스타트' 열 안정성 DNA 폴리머라제를 가질 수 있다.
- [0160] RNase H 효소의 가교화는 예를 들면, 포름알데히드를 사용하여 수행될 수 있다. 일 구체예에서, 열안정성 RNase H는 포름알데히드를 사용한, 제어되고 제한된 가교화를 거칠 수 있다. 활성 상태인 변형된 RNase H를 포함하는, 증폭 반응 조성물을 연장된 시간, 예를 들면 약 15분 동안 약 95 °C 또는 그 이상으로 가열함으로써, 가교화는 반전되고 RNase H 활성이 회복된다.
- [0161] 일반적으로, 가교화도(degree of crosslinking)가 낮을수록, 가교화 반전 후에 상기 효소의 엔도뉴클레아제 활성이 높다. 가교화도는 포름알데히드의 농도 및 가교화 반응의 지속시간을 변화시킴으로써 제어할 수 있다. 예를 들면, RNase H 효소를 가교시키기 위해 약 0.2% (w/v), 약 0.4% (w/v), 약 0.6% (w/v), 또는 약 0.8% (w/v)의 포름알데히드를 사용할 수 있다. 0.6% 포름알데히드를 사용한 약 10분의 가교화 반응이, 파이로코커스 푸리오수스에서 유래한 RNase HII를 불활성화시키기에 충분할 수 있다.
- [0162] 가교화된 RNase H는 약 37 °C에서, 측정가능한 엔도뉴클레아제 활성을 나타내지 않는다. 일부 경우에, 가교화된 RNase H의 측정가능한 부분적 재활성화가, PCR 열변성 온도보다 낮은, 약 50 °C의 온도에서 발생할 수 있다. 그와 같은 효소의 의도치 않은 재활성화를 막기 위해, 변형된 RNase H를 재활성화 전까지, 50 °C 미만의 온도에서 보관 및 유지하는 것이 요구될 수 있다.
- [0163] 일반적으로, PCR은 이중가닥 타겟 서열을 열변성시키기 위해, 각 사이클마다 증폭 조성물을 약 95 °C까지 가열해야 하며, 이는 또한 RNase H로부터 불활성화 인자(inactivating factor)를 방출시켜, 효소의 활성을 부분적으로, 또는 완전히 회복시킬 것이다.

- [0164] RNase H는 또한 상기 효소를 아실화제, 예를 들면, 디카르복시산에 의해 라이신 잔기를 아실화시켜 변형시킬 수 있다. RNase H의 아실화는, 아실화 완충액 중 RNase H의 용액에 시스-아코니트산 무수물(cis-aconitic anhydride)을 첨가하고, 및 얻어진 혼합물을 약 1 내지 20 °C에서 5 내지 30 시간 동안 인큐베이션시키는 것에 의해 수행될 수 있다. 일 구체예에서, 상기 아실화는 약 3 내지 8 °C에서 18 내지 24시간 동안 실시될 수 있다. 아실화 완충액의 종류는 특별히 제한되지 않는다. 일 구체예에서, 상기 아실화 완충액은 pH 약 7.5 내지 약 9.0을 갖는다.
- [0165] 아실화된 RNase H의 활성은 증폭 조성물의 pH를 약 7.0 미만으로 저하시킴으로써 회복시킬 수 있다. 예를 들면, 완충제로서 트리스 완충액이 사용되는 경우, 상기 조성물을 약 95 °C까지 가열하여, pH를 약 8.7 (25 °C)에서 약 6.5 (95 °C)로 낮출 수 있다.
- [0166] 증폭 반응 조성물에서 가열 단계의 지속시간은 변형된 RNase H, PCR에서 사용된 완충액 등에 따라 달라질 수 있다. 그러나, 일반적으로는, 증폭 조성물을 95 °C에서 약 30초 내지 4분 동안 가열하면 RNase H 활성의 회복에 충분할 수 있다. 일 구체예에서, 상업적으로 이용가능한 완충액 및 하나 이상의 비이온성 세제는 사용했을 때, 2분의 가열 후에 파이로코커스 푸리오수스 RNase HII의 완전한 활성이 회복된다.
- [0167] RNase H 활성은 당해 기술분야에 잘 알려진 방법들을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들면, 제1 방법에 따르면, 단위 활성(unit activity)은 정해진 분석 조건에서, 몰당량의 폴리타이미딜산(polythymidylic acid)의 존재 하에, 일정한 물수의 방사성 표지된 폴리아데닐산의 산-가용화로서 정의된다 (Epicentre Hybridase thermostable RNase HI를 참조한다). 제2 방법에서, 상기 단위 활성은 몰당량의 프로브 및 상보적 주형 DNA를 함유하는 반응물의 상대 형광 강도의 특이적 증가로서 정의된다.
- [0168] *SNP의 실시간 검출*
- [0169] 타겟 핵산 중 SNP의 실시간 검출을 위한 프로브로서, 표지된 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용할 수 있다.
- [0170] CataCleave™ 올리고뉴클레오티드 프로브는, 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP)을 포함하는 PCR 앰플리콘 내에서 발견되는 서열에 상보적인, DNA 및 RNA 서열을 사용하여 최초로 합성되었다. 상기 프로브는, 예를 들면, FRET 쌍, 예를 들면 프로브의 한 말단에 플루오레세인(fluorescein) 및 다른 말단에 로다민(rhodamine) 켄처 분자를 사용하여 합성될 수 있다. 상기 프로브는, 선택된 SNP의 위치를 포함하는 타겟 핵산 서열에 실질적으로 상보적이 되도록 합성될 수 있다.
- [0171] 특정한 구체예에서, 상기 프로브의 RNA 서열은 야생형 서열에 상보적인 서열을 갖도록 조작할 수 있다.
- [0172] 다른 구체예에서, 상기 프로브의 RNA 서열은 SNP 서열에 상보적인 서열을 갖도록 조작할 수 있다.
- [0173] 일 구체예에서, 실시간 핵산 증폭은 열안정성 핵산 폴리머라제, RNase H 활성, SNP를 포함하는 타겟 폴리뉴클레오티드에 혼성화할 수 있는 PCR 증폭 프라이머 쌍, 및 표지된 CataCleave™ 올리고뉴클레오티드 프로브의 존재 하에, 타겟 폴리뉴클레오티드에 대해 수행된다. 실시간 PCR 반응 동안, CataCleave™ 올리고뉴클레오티드 프로브와 PCR 앰플리콘 내에 존재하는 SNP 간에 형성된, RNA:DNA 이형이증가당 프로브의 RNase H 절단은 형광 켄처로부터 형광 공여자를 분리시키며, PCR 앰플리콘, 및 그에 따른 타겟 DNA 중 SNP의 실시간 검출에 상응하는, 프로브 형광의 실시간 증가를 초래한다.
- [0174] 특정한 구체예에서, 상기 프로브의 RNA 모이어티는, 타겟 DNA 서열 내 SNP 위치에 야생형 서열을 포함한다. 따라서, SNP를 포함하는 PCR 앰플리콘과 프로브의 혼성화 후에, SNP 위치에서 단일 뉴클레오티드 미스매치를 갖는, RNA:DNA 이형이증가당 형태는 RNase H에 의해 절단될 수 없다.
- [0175] 다른 구체예에서, 상기 프로브의 RNA 모이어티는 타겟 DNA 서열 내 SNP의 위치에서 상보적인 SNP 서열을 포함한다. 따라서, 상기 SNP를 포함하는 PCR 앰플리콘과 상기 프로브의 혼성화 후에, RNase H 활성에 의해 절단될 수 있는 SNP 위치에서 미스매치를 갖지 않는, RNA:DNA 이형이증가당이 형성된다.
- [0176] *키트*
- [0177] 본 명세서의 개시는 또한, 타겟 핵산 내 SNP의 실시간 검출을 위한 하나 이상의 시약을 갖는 패키지 단위를 포

합하는 키트 형태를 제공한다. 상기 키트는 또한 하기 아이템 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 완충액, 사용설명서 및 양성 또는 음성 대조물질. 키트는 본 명세서에 기술된 방법을 실시하기에 적합한 비율로 혼합된 시약들이 담긴 용기를 포함할 수 있다. 시약 용기는 바람직하게는, 대상 방법을 실시할 때, 측정 단계를 생략하기 위한 단위 함량(unit quantity)으로 상기 시약들을 포함한다.

[0178] 또한, 키트는 열안정성 폴리머라제, RNase H, SNP 위치를 포함하는 부위를 증폭하기 위해 선택된 프라이머, 및 실시간 PCR 산물에 어닐링하여 본 명세서에 기술된 방법에 따라 SNP를 검출할 수 있도록 하는, 표지된 CataCleave™ 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 실시간 PCR용 시약들을 포함할 수 있다. 키트는 단일 유전자 내의 SNP 또는 2 이상의 유전자 가운데 SNP의 좌위를 검출하기 위한 시약들을 포함할 수 있다. 또다른 구체예에서, 상기 키트 시약들은 생물학적 샘플로부터 게놈 DNA 또는 RNA를 추출하기 위한 시약을 추가적으로 포함한다. 키트 시약은 또한, 적용가능한 경우, 역전사 효소-PCR 분석을 위한 시약들을 포함할 수 있다.

[0179] 본 명세서에서 명시된, 임의의 특허, 특허 출원, 문헌 또는 기타 개시 내용은 참조에 의해 전체로서 본 명세서에 삽입된다. 참조에 의해 본 명세서에 삽입되는 것으로 지시되었으나, 본 명세서에서 제시된 기존의 정의, 설명, 또는 기타 개시 내용과 상충되는 임의의 내용 또는 그의 일부는 상기 통합되는 내용과 본 개시 내용 간에 상충이 발생하지 않는 범위로만 통합된다.

[0180] 실시예

[0181] 하기 실시예들은 본 발명에 따른, RNase H 효소 조성물을 사용하는 방법을 제시한다. 이 실시예들에서 기술된 방법의 단계들은 제한적인 것으로 의도되지 않는다. 상기 언급된 것들 외의 본 발명의 추가적인 목적 및 이점들은, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는 하기 실시예들로부터 자명해질 것이다.

실시예 1

[0182] **살모넬라 invA 유전자에서 합성 SNP의 등온적 검출**

[0183] 타겟 DNA 서열 내에서 단일 뉴클레오타이드 서열 차이를 구별하는 CataCleave™ 프로브의 능력을 검증하기 위해, 살모넬라의 *invA* 유전자 (서열번호 33) 내에 합성 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)을 제조하였다. 상기 단일 뉴클레오타이드 변화는 살모넬라 *invA* 코딩 서열 (서열번호 33)의 116번 위치에서 T를 G로 전환시켰다. FRET 쌍을 생성하기 위해 각각 이중 표지화한, 두 개의 유사한 19 뉴클레오타이드 CataCleave™ 프로브를, 상기 SNP 뉴클레오타이드를 포함하는 *invA* 부위를 가로질러 염기쌍을 형성하도록 디자인하였다. 야생형 특이적 프로브 inv-CCProbe2 (서열번호 1)은 *invA*의 야생형에 대해 완벽한 상보성을 가졌으며, SNP 특이적 프로브 inv-CCProbe2-2C (서열번호 2)는 *invA*의 돌연변이 형태와 완벽한 상보성을 가졌다. 상기 프로브들을, CataCleave™ 프로브의 4개의 RNA 염기들 중 2번째 (프로브의 5' 말단 기준으로)가 SNP 뉴클레오타이드 위치에서 염기쌍을 형성하도록 디자인하였다. 2가지 DNA 올리고뉴클레오타이드, 야생형 특이적 *invA* 프로브에 상보적인 inv2-Target1 (서열번호 3), 및 SNP 특이적 *invA* 프로브에 상보적인 inv2-Target8 (서열번호 4)를 합성하였다. 상기 두 프로브의, 단일 뉴클레오타이드 미스매치를 식별하는 능력을 평가하기 위해, 등온적 처리 반응(isothermal processing reaction)을 수행하였다. 반응에서 각 구성성분들의 최종 농도는, 200 nM 프로브, 0.4 nM 타겟 올리고뉴클레오타이드, 10 mM 트리스 아세테이트 pH 8.6, 50 mM 포타슘 아세테이트, 2.5 mM 마그네슘 아세테이트, 1 mM DTT 및 2.5 u 하이브리다아제 열안정성 RNase GI(Hybridase thermostable RNase HI)(Epicentre)와 같았다. 상기 반응물을 55 °C에서 60분 동안 인큐베이션하면서, 매분 형광 데이터를 수집하였다. 도 1은 inv-CCProbe2 (서열번호 1)가 inv2-Target1 (서열번호 3) 또는 inv2-Target8 (서열번호 4)와 반응했을 때 생성되는 형광 신호를 보여준다. inv-CCProbe2를 inv2-Target1과 인큐베이션시킨 경우, 형광 신호는 직선형으로 증가하여, RNase HI가 올리고뉴클레오타이드와 완벽하게 쌍을 형성한 프로브를 인식 및 절단했다는 것을 나타냈다. inv-CCProbe2를 inv2-Target8과 인큐베이션시킨 경우, 형광 신호는 거의 생성되지 않았으며, 이는 미스매치된 올리고뉴클레오타이드가 RNase HI에 대해 거의 타겟으로 작용하지 않았다는 것을 시사한다.

[0184] 도 2는 inv-CCProbe2-2C (서열번호 2)를 inv2-Target1 (서열번호 3) 또는 inv2-Target8 (서열번호 4)와 반응시켰을 때 생성된 형광 신호를 보여준다. 형광의 증가로 나타한, 완벽하게 짝지어진 inv2-Target8과 인큐베이션시

켰을 때, RNase HI에 의해 Inv-CCProbe2-2C이 절단되었다. 야생형 invA 타겟과 인큐베이션했을 때 형광 신호는 거의 관찰되지 않았으며, 이는 미스매치된 쌍에 대한 불량한 프로브 절단을 나타낸다.

[0185]

실시예 2

[0186]

살모넬라 invA 유전자 중 합성 SNP의 실시간 PCR 검출

[0187]

야생형 또는 (전술된) 돌연변이형 염기를 포함하는, 267 뉴클레오티드의 invA 서열을 함유하는 플라스미드 DNA를 합성하였다. 40 pg의 야생형 플라스미드, 돌연변이체 플라스미드, 또는 상기 두 플라스미드의 혼합체를, 야생형 서열 또는 돌연변이 서열에 상보적인, 다르게 표지화된 프로브들을 포함한 멀티플렉스 실시간 PCR 반응의 주형으로서 사용하였다. 각각의 구성성분들의 최종 농도는 800 nM 순방향 프라이머 살모넬라-F1 (서열번호 5), 800 nM 역방향 프라이머 sal-invR2 (서열번호 6), 200 nM 야생형 특이적 프로브 inv-CCProbe2 (서열번호 1), 200 nM SNP 특이적 프로브 inv-CCProbe2-2C (서열번호 2), 80 uM 각각의 dNTP, 10 mM 트리스 아세테이트 pH 8.6, 50 mM 포타슘 아세테이트, 2.5 mM 마그네슘 아세테이트, 1 mM DTT, 2.5 u 플라티늄 Taq DNA 폴리머라제 (Life Technologies) 및 2.5 u 하이브리다아제 열안정성 RNase HI(Epicentre)와 같았다. 상기 PCR 반응물을 95 °C에서 2분 동안 인큐베이션시켜 핫 스타트 DNA 폴리머라제를 활성화시킨 후에, 95 °C에서 10초, 및 60 °C에서 20초의 사이클을 40회 수행하였다. 도 3은 FAM 표지된 inv-CCProbe2 (서열번호 1)로부터 PCR 동안 생성된 형광 신호를 보여주며, 도 4는 TYE665 표지된 inv-CCProbe2-2C (서열번호 2)로부터 PCR 동안 생성된 형광 신호를 나타낸다. 이 PCR 반응에 대한 형광 곡선은 각각의 프로브가, 완전하게 상보적인 타겟의 증폭을 검출할 수 있고, 하나의 미스매치를 포함하는 타겟의 증폭은 검출하지 않았다는 것을 나타낸다.

[0188]

실시예 3

[0189]

소 b 카제인 유전자의 A1 및 A2 대립유전자의 등온적 검출

[0190]

젖소의 우유 중에는, A2 및 A1 b 카제인으로 불리는, b 카제인 단백질의 2가지 완전한 천연 변이체 또는 형태가 존재한다. A1과 A2 b 카제인 간의 차이는 67번 위치에 있는 단일 아미노산이다. A1 변이체에서, 염기는 T이고, A2 변이체에서 상기 염기는 G이다. 우유 중의 A1 변이체 b 카제인은, 상기 위치에서 히스티딘 아미노산을 갖는다는 점에서 모든 포유동물의 b 카제인 중에서 유일하다. 다른 종들의 젖은, 그의 b 카제인 사슬의 동일한 위치에서 프롤린 아미노산을 갖는 점에서, A2 유사체로 생각될 수 있는 b 카제인을 함유한다. 물소, 야크, 염소 및 사람의 젖은 모두, A2 유사 형태의 b 카제인을 함유한다.

[0191]

본 실시예에서는, 각각 FRET 쌍을 생성하기 위해 이중으로 표지된 2가지 유사한 19 뉴클레오티드 CataCleaveTM 프로브를, 소 b 카제인 유전자의 A1/A2 SNP 뉴클레오티드 위치를 가로질러 염기쌍을 형성하도록 디자인하였다. A1-CCProbe2-RC (서열번호7)는 A1 대립유전자와 완전하게 염기쌍을 형성하고, A2-CCProbe1-RC (서열번호 8)는 A2 대립유전자와 완전하게 염기쌍을 형성한다. A1-CCProbe2-RC은 상기 CataCleaveTM 프로브의 4개의 RNA 염기 중 첫번째 (프로브의 5' 말단 기준으로)가 SNP 뉴클레오티드 위치에서 염기쌍을 형성하도록 디자인되었다. A1 대립유전자를 나타내는, A1-Target-RC (서열번호 9) 및 A2 대립유전자를 나타내는 A2-Target-RC (서열번호 10)의 2가지 DNA 올리고뉴클레오티드를 합성하였다. 상기 두 프로브의, 단일 뉴클레오티드 차이를 식별하는 능력을 평가하기 위해, RNase HI를 사용하여 등온 처리 반응을 수행하였다. 반응물 중 각각의 구성 성분들의 최종 농도는 200 nM 프로브, 0.4 nM 타겟 올리고뉴클레오티드, 10 mM 트리스 아세테이트 pH 8.6, 50 mM 포타슘 아세테이트, 2.5 mM 마그네슘 아세테이트, 1 mM DTT 및 2.5 u 하이브리다아제 열안정성 RNase HI (Epicentre)와 같았다. 상기 반응물을 55 °C에서 60분 동안 인큐베이션하면서, 매 분마다 형광 데이터를 수집하였다. 도 5는 A1-CCProbe2-RC (서열번호 7)가 A1-Target-RC (서열번호 9) 또는 A2-Target-RC (서열번호 10)와 반응했을 때 생성되는 형광 신호를 보여준다. A1-CCProbe2-RC를 A1-Target-RC와 인큐베이션시켰을 때 형광 신호는 직선형으로 증가하여, RNase HI가 완전하게 쌍을 형성한 올리고뉴클레오티드를 인식하고 절단하였다는 것을 나타냈다. A1-CCProbe2-RC를 A2-Target-RC와 인큐베이션시킨 경우, 형광 신호는 거의 생성되지 않았으며, 이는 미스매치된 올리고뉴클레오티드가 RNase HI에 대한 불량한 타겟이라는 것을 시사한다. 도 6은 A2-CCProbe1-RC (서열번호 8)를 A1-Target-RC (서열번호 9) 또는 A2-Target-RC (서열번호 10)과 반응시켰을 때 발생하는 형광 신호를 보여준다. RNase HI에 의한 A2-CCProbe1-RC 절단은, A2-CCProbe1-RC를 A2-Target-RC와 인큐베이션시켰을 때

이루어졌으나, A1-Target-RC와 인큐베이션시켰을 경우 절단은 발생하지 않았다.

실시예 4

소 b 카제인 유전자의 A1 및 A2 대립유전자의 실시간 PCR 검출

CataCleave™ 기반 SNP 검출을 이용한 유전자형 분석을 위해, 3가지 세트의 젖소(dairy bull) DNA를 사용하였다. 상기 3가지 DNA는 사전에 서열분석에 의해 유전자형을 분석하였으며, b 카제인 유전자의 3가지 가능한 유전자형, A1/A1, A2/A2 및 A1/A2를 나타내는 것으로 알려졌다. Heyen 등에 의해 사전에 개시된 바에 따라, 황소 정액으로부터 DNA를 추출하였다. 200 ng의 A1/A2 유전자형, A2/A2 유전자형 또는 A1/A2 유전자형의 게놈 DNA를, 다르게 표지한 A1-CCProbe2-RC (서열번호 7) 및 A2-CCProbe1-RC (서열번호 8)을 모두 함유하는, 멀티플렉스 실시간 PCR 반응물의 주형으로서 사용하였다. 각각의 구성성분의 최종 농도는, 800 nM 순방향 프라이머 A2D-F (서열번호 11), 800 nM 역방향 프라이머 A2D-R-150 (서열번호 12), 200 nM A1-CCProbe2-RC (서열번호 7), 200 nM A2-CCProbe1-RC (서열번호 8), 80 uM 각각의 dNTP, 10 mM 트리스 아세테이트 pH 8.6, 50 mM 포타슘 아세테이트, 2.5 mM 마그네슘 아세테이트, 1 mM DTT, 2.5 u 플래티넘 Taq DNA 폴리머라제 (Life Technologies) 및 2.5 u 하이브리다제 열안정성 RNase HI (Epicentre)와 같았다. 상기 PCR 반응물을 95 C에서 2분 동안 인큐베이션시켜, 핫 스타트 DNA 폴리머라제를 활성화한 뒤에, 95 °C에서 10초 및 60 °C에서 30초의 사이클을 40회 수행하였다. 도 7은 TYE563 표지된 A1-CCProbe2-RC (서열번호 7)로부터 PCR 동안 발생한 형광 신호를 나타내고, 도 8은 TYE665 표지된 A2-CCProbe1-RC (서열번호 8)로부터 PCR 동안 발생한 신호를 나타낸다. 상기 PCR 반응에 대한 형광 곡선은, 각각의 프로브가 완벽하게 상보적인 타겟의 증폭을 검출할 수 있고, 단일 미스매치를 포함하는 타겟의 증폭은 검출하지 않는다는 것을 시사한다.

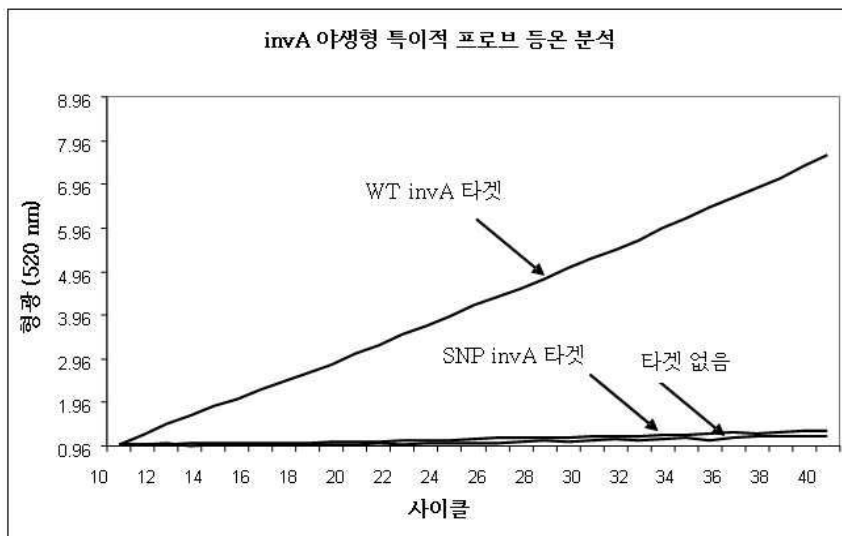
본 명세서에서 명시된 임의의 특허, 특허 출원, 문헌 또는 기타 개시 내용은 참조에 의해 전체로서 본 명세서에 삽입된다. 본 명세서에 참조에 의해 통합되나 본 명세서에서 제시된 기존의 정의, 설명 또는 기타 개시내용과 상충되는 임의의 내용, 또는 그의 일부는, 통합된 내용 및 본 개시 내용 간에 상충이 발생하지 않는 범위에서만 통합된다.

서열목록 자유텍스트

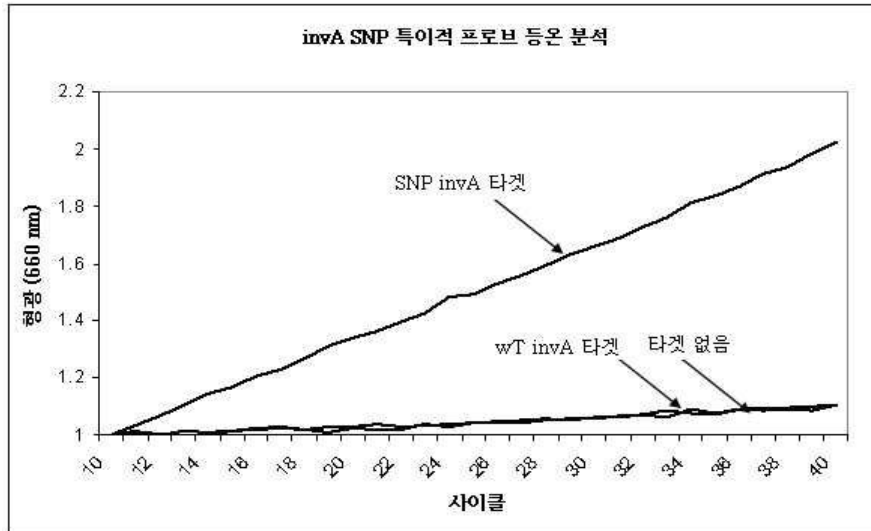
첨부된 서열목록(서열번호 1 내지 33)을 참조한다.

도면

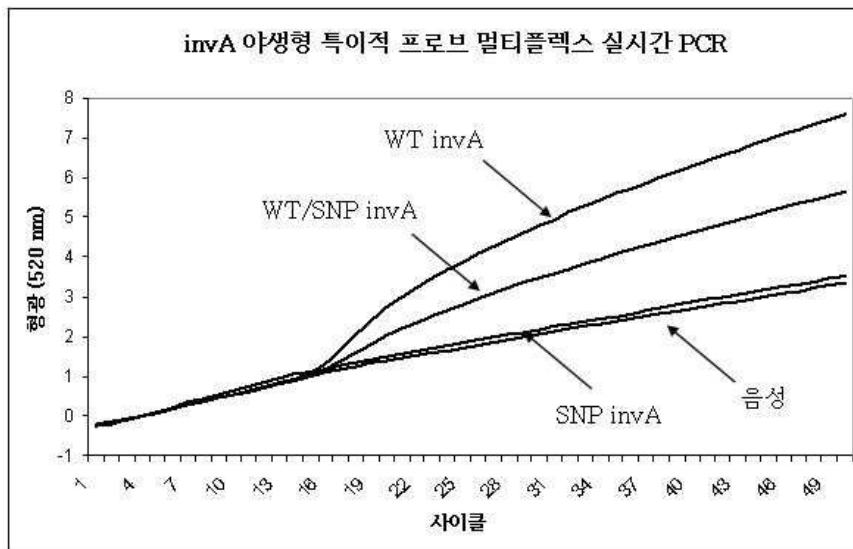
도면1



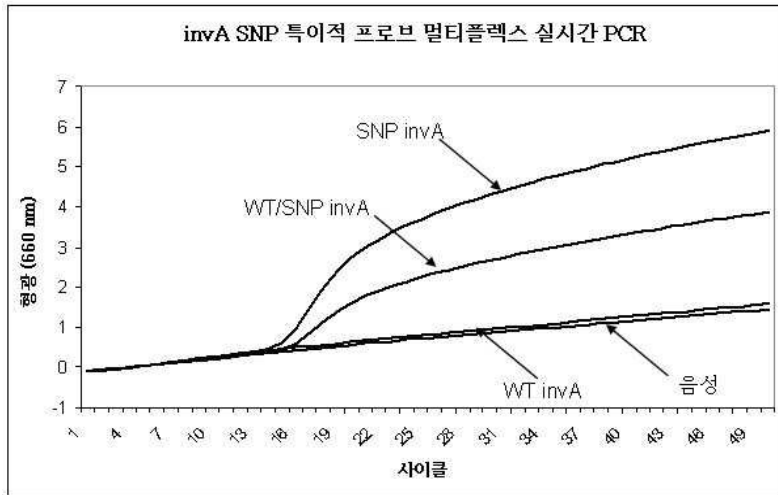
도면2



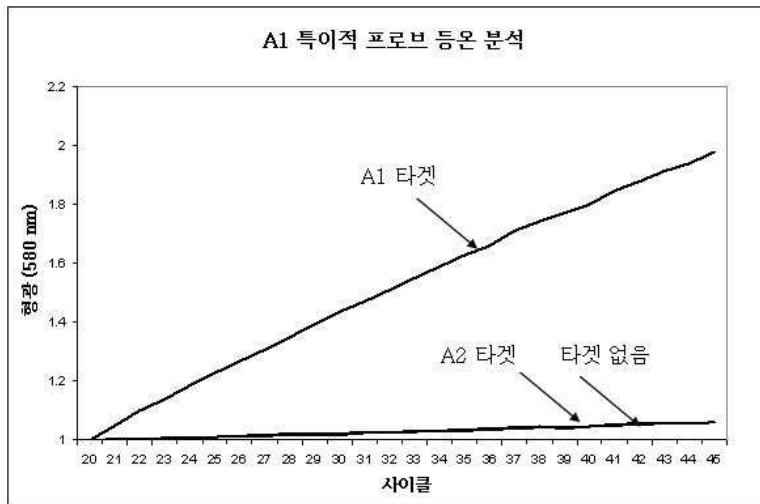
도면3



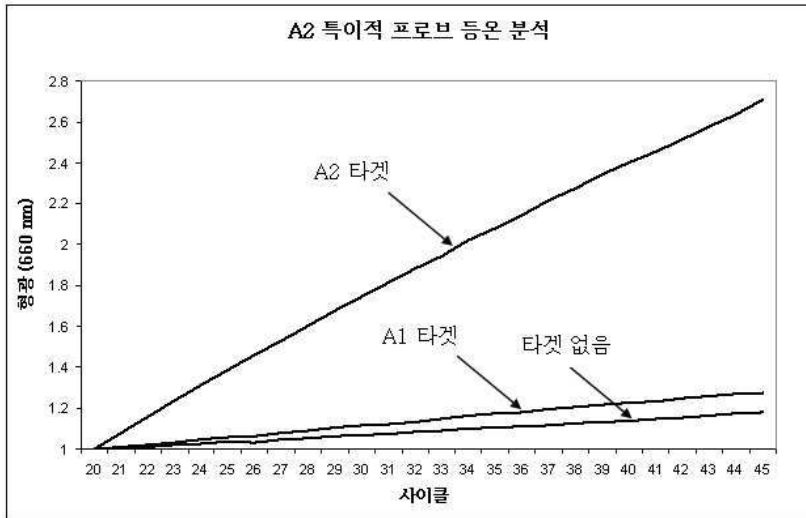
도면4



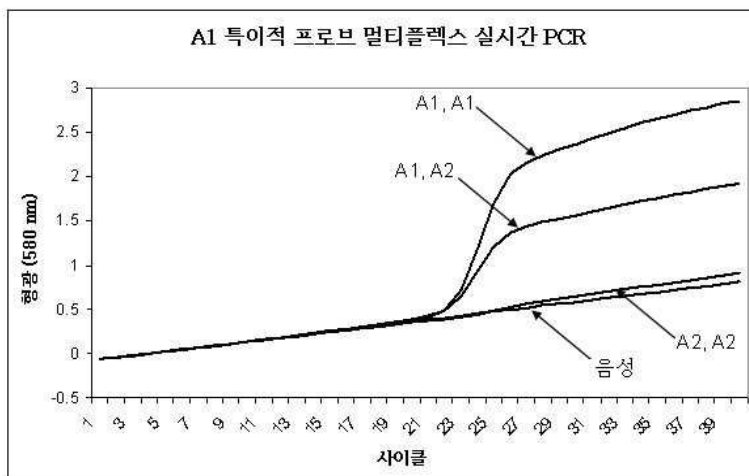
도면5



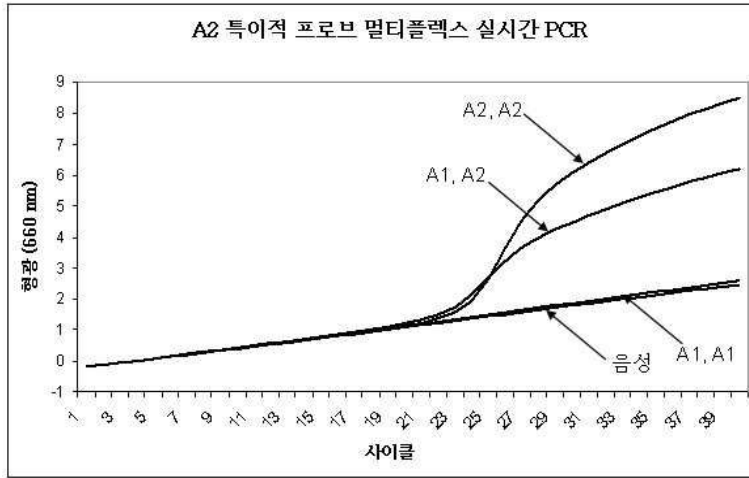
도면6



도면7



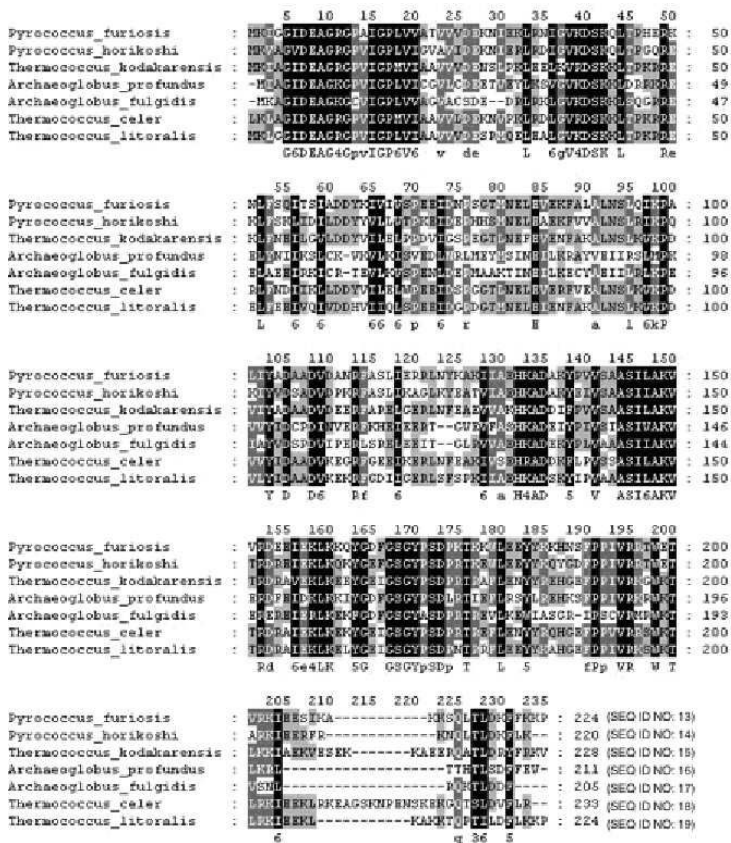
도면8



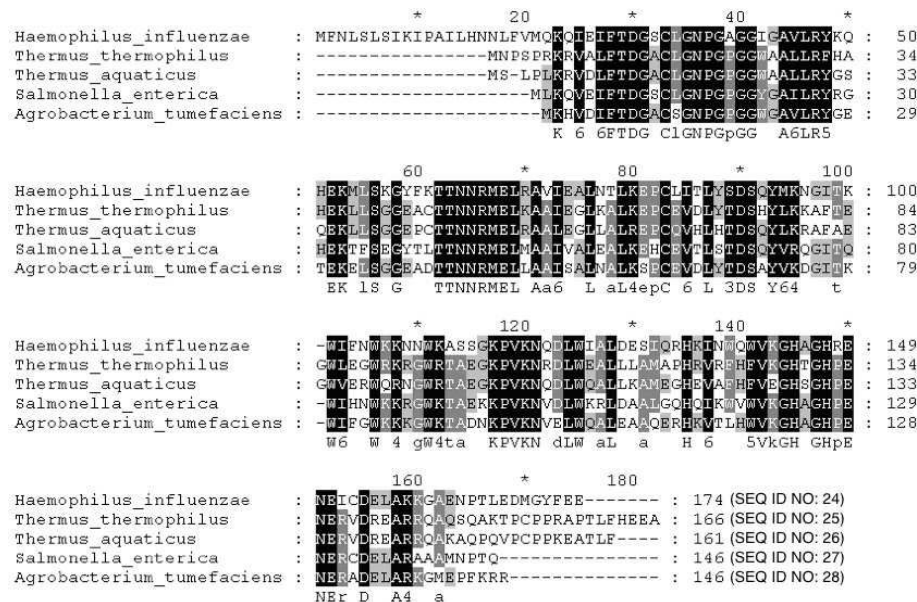
도면9

서열번호	프라이머/프로브	서열 (5'-3')
1	inv-CCProbe2	/56-FAM/CGATCAGrGrArArATCAACCAG/3IABlk_FQ/
2	inv-CCProbe2-2C	/TYE563/CGATCAGrGrCrArArATCAACCAG/3IABlkFQ/
3	inv2-Target1	CACACTGGTIGATTTCCTGATCGCACA
4	inv2-Target8	CACACTGGTIGATTTCCTGATCGCACA
5	Salmonella-F1	TGGTCATTCCATTACCTIACC
6	Sal-invR2	TACTGATCGATAATGCCAGACGAA
7	A1-CCProbe2-RC	/5TYE563/GGCCCATCrCrArUrAACAGCC/3IABRQSp/
8	A2-CCProbe1-RC	/5TYE665/GGCCCATCCrCrUrArACAGCC/3IABRQSp/
9	A1-Target-RC	GAGAGGCTGTTATGGATGGGCCGAGA
10	A2-Target-RC	GAGAGGCTGTTAGGGATGGGCCGAGA
11	A2D-F	GATGAACTCCAGGATAAAAATCCACC
12	A2D-R-150	TACTTCAGGCTGAAGGAAAGG

도면10



도면11



서열목록

- <110> Samsung Techwin Co. Ltd.
- <120> REAL TIME PCR DETECTION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS
- <130> PN089052
- <150> US61/390,701

<151> 2010-10-07
 <150> US13/158,593
 <151> 2011-06-13
 <160> 33
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)
 <223> 5' 6-carboxyfluorescein donor chromophore
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)

 <223> 56-FAM: 5' 6-carboxyfluorescein donor chromophore
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(7)
 <223> DNA sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(11)
 <223> RNA sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(19)
 <223> DNA sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)
 <223> 3IABlkFQ: 3' Iowa Black FQ Quencher
 <400> 1
 cgatcaggaa atcaaccag
 <210> 2
 <211> 19
 <212> DNA
 <213>

19

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)

<223> 5' TYE563 fluorescent dye

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(7)

<223> DNA sequence

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(11)

<223> RNA sequence

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(19)

<223> DNA sequence

<220><221> misc_feature

<222> (19)

<223> 3' IABlkFQ: 3" Iowa Black FQ quencher

<400> 2

cgatcaggca atcaaccag

19

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 3

cacactggtt gatttctga tcgcaca

27

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 4

cacactggtt gattgcctga tcgcaca

27

<210> 5

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide

 <400> 5
 tcgtcattcc attacctacc 20
 <210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 6
 tactgatcga taatgccaga cgaa 24
 <210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)
 <223> 5TYE563; 5: TYE 563 fluorescent dye
 <220><221
 > misc_feature
 <222> (1)..(8)
 <223> DNA sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(12)
 <223> RNA sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(18)
 <223> DNA sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)
 <223> 3IAbrQSp: 3' Iowa Black RQ-Sp Dark Quecher

<220><221> misc_RNA

<222> (11)

<223> n is uracil

<400> 7

ggcccatcca naacagcc

18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)

<223> 5TYE665: 5' TYE665 fluorescent dye

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(9)

<223> DNA sequence

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(13)

<223> RNA sequence

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(18)

<223> DNA sequence

<220><221> misc_feature

<222> (18)

<223> 3IAbRQSp: 3' Iowa Black RQ-Sp Dark Quencher

<220><221> misc_RNA

<222> (11)

<223> n is uracil

<400> 8

ggcccatccc naacagcc

18

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 9
 gagaggctgt tatggatggg ccgaga 26

<210> 10
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 10
 gagaggctgt tagggatggg ccgaga 26

<210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 11
 gatgaactcc aggataaaat ccacc 25

<210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 12
 tacttcaggc tgaaggaaag g 21

<210> 13
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Pyrococcus furiosus
 <400> 13

Met Lys Ile Gly Gly Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Ala Ile Gly

1 5 10 15
 Pro Leu Val Val Ala Thr Val Val Val Asp Glu Lys Asn Ile Glu Lys

Pro Leu Val Ile Gly Val Ala Val Ile Asp Glu Lys Asn Ile Glu Arg
 20 25 30
 Leu Arg Asp Ile Gly Val Lys Asp Ser Lys Gln Leu Thr Pro Gly Gln
 35 40 45
 Arg Glu Lys Leu Phe Ser Lys Leu Ile Asp Ile Leu Asp Asp Tyr Tyr
 50 55 60
 Val Leu Leu Val Thr Pro Lys Glu Ile Asp Glu Arg His His Ser Met
 65 70 75 80
 Asn Glu Leu Glu Ala Glu Lys Phe Val Val Ala Leu Asn Ser Leu Arg
 85 90 95
 Ile Lys Pro Gln Lys Ile Tyr Val Asp Ser Ala Asp Val Asp Pro Lys
 100 105 110
 Arg Phe Ala Ser Leu Ile Lys Ala Gly Leu Lys Tyr Glu Ala Thr Val
 115 120 125

 Ile Ala Glu His Lys Ala Asp Ala Lys Tyr Glu Ile Val Ser Ala Ala
 130 135 140
 Ser Ile Ile Ala Lys Val Thr Arg Asp Arg Glu Ile Glu Lys Leu Lys
 145 150 155 160
 Gln Lys Tyr Gly Glu Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr
 165 170 175
 Lys Glu Trp Leu Glu Glu Tyr Tyr Lys Gln Tyr Gly Asp Phe Pro Pro
 180 185 190
 Ile Val Arg Arg Thr Trp Glu Thr Ala Arg Lys Ile Glu Glu Arg Phe
 195 200 205
 Arg Lys Asn Gln Leu Thr Leu Asp Lys Phe Leu Lys
 210 215 220
 <210> 15
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Thermococcus kodakarensis
 <400> 15
 Met Lys Ile Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Val Ile Gly

1 5 10 15
 Pro Met Val Ile Ala Ala Val Val Val Asp Glu Asn Ser Leu Pro Lys
 20 25 30
 Leu Glu Glu Leu Lys Val Arg Asp Ser Lys Lys Leu Thr Pro Lys Arg
 35 40 45
 Arg Glu Lys Leu Phe Asn Glu Ile Leu Gly Val Leu Asp Asp Tyr Val
 50 55 60
 Ile Leu Glu Leu Pro Pro Asp Val Ile Gly Ser Arg Glu Gly Thr Leu
 65 70 75 80
 Asn Glu Phe Glu Val Glu Asn Phe Ala Lys Ala Leu Asn Ser Leu Lys
 85 90 95
 Val Lys Pro Asp Val Ile Tyr Ala Asp Ala Ala Asp Val Asp Glu Glu
 100 105 110

 Arg Phe Ala Arg Glu Leu Gly Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Glu Val
 115 120 125
 Val Ala Lys His Lys Ala Asp Asp Ile Phe Pro Val Val Ser Ala Ala
 130 135 140
 Ser Ile Leu Ala Lys Val Thr Arg Asp Arg Ala Val Glu Lys Leu Lys
 145 150 155 160
 Glu Glu Tyr Gly Glu Ile Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr
 165 170 175
 Arg Ala Phe Leu Glu Asn Tyr Tyr Arg Glu His Gly Glu Phe Pro Pro
 180 185 190
 Ile Val Arg Lys Gly Trp Lys Thr Leu Lys Lys Ile Ala Glu Lys Val
 195 200 205
 Glu Ser Glu Lys Lys Ala Glu Glu Arg Gln Ala Thr Leu Asp Arg Tyr
 210 215 220
 Phe Arg Lys Val
 225
 <210> 16
 <211> 211
 <212> PRT

<213> Archaeoglobus profundus

<400> 16

Met Ile Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gly Lys Gly Pro Val Ile Gly Pro
 1 5 10 15

Leu Val Ile Cys Gly Val Leu Cys Asp Glu Glu Thr Val Glu Tyr Leu
 20 25 30

Lys Ser Val Gly Val Lys Asp Ser Lys Lys Leu Asp Arg Arg Lys Arg
 35 40 45

Glu Glu Leu Tyr Asn Ile Ile Lys Ser Leu Cys Lys Val Lys Val Leu
 50 55 60

Lys Ile Ser Val Glu Asp Leu Asn Arg Leu Met Glu Tyr Met Ser Ile
 65 70 75 80

Asn Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Val Glu Ile Ile Arg Ser Leu Met
 85 90 95

Pro Lys Val Val Tyr Ile Asp Cys Pro Asp Ile Asn Val Glu Arg Phe
 100 105 110

Lys His Glu Ile Glu Glu Arg Thr Gly Val Glu Val Phe Ala Ser His
 115 120 125

Lys Ala Asp Glu Ile Tyr Pro Ile Val Ser Ile Ala Ser Ile Val Ala
 130 135 140

Lys Val Glu Arg Asp Phe Glu Ile Asp Lys Leu Lys Lys Ile Tyr Gly
 145 150 155 160

Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Leu Arg Thr Ile Glu Phe Leu
 165 170 175

Arg Ser Tyr Leu Arg Glu His Lys Ser Phe Pro Pro Ile Val Arg Lys
 180 185 190

Arg Trp Lys Thr Leu Lys Arg Leu Thr Thr His Thr Leu Ser Asp Phe
 195 200 205

Phe Glu Val
 210

<210> 17

<211> 205

<212> PRT

<213> *Archaeoglobus fulgidis*

<400> 17

Met Lys Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gly Lys Gly Cys Val Ile Gly Pro

1 5 10 15
Leu Val Val Ala Gly Val Ala Cys Ser Asp Glu Asp Arg Leu Arg Lys

20 25 30
Leu Gly Val Lys Asp Ser Lys Lys Leu Ser Gln Gly Arg Arg Glu Glu

35 40 45
Leu Ala Glu Glu Ile Arg Lys Ile Cys Arg Thr Glu Val Leu Lys Val

50 55 60
Ser Pro Glu Asn Leu Asp Glu Arg Met Ala Ala Lys Thr Ile Asn Glu

65 70 75 80

Ile Leu Lys Glu Cys Tyr Ala Glu Ile Ile Leu Arg Leu Lys Pro Glu
85 90 95

Ile Ala Tyr Val Asp Ser Pro Asp Val Ile Pro Glu Arg Leu Ser Arg
100 105 110

Glu Leu Glu Glu Ile Thr Gly Leu Arg Val Val Ala Glu His Lys Ala
115 120 125

Asp Glu Lys Tyr Pro Leu Val Ala Ala Ala Ser Ile Ile Ala Lys Val
130 135 140

Glu Arg Glu Arg Glu Ile Glu Arg Leu Lys Glu Lys Phe Gly Asp Phe

145 150 155 160
Gly Ser Gly Tyr Ala Ser Asp Pro Arg Thr Arg Glu Val Leu Lys Glu

165 170 175
Trp Ile Ala Ser Gly Arg Ile Pro Ser Cys Val Arg Met Arg Trp Lys

180 185 190
Thr Val Ser Asn Leu Arg Gln Lys Thr Leu Asp Asp Phe

195 200 205

<210> 18

<211> 233

<212> PRT

<213> Thermococcus celer

<400> 18

Leu Lys Leu Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Val Ile Gly
 1 5 10 15
 Pro Met Val Ile Ala Ala Val Val Leu Asp Glu Lys Asn Val Pro Lys
 20 25 30
 Leu Arg Asp Leu Gly Val Arg Asp Ser Lys Lys Leu Thr Pro Lys Arg
 35 40 45
 Arg Glu Arg Leu Phe Asn Asp Ile Ile Lys Leu Leu Asp Asp Tyr Val
 50 55 60
 Ile Leu Glu Leu Trp Pro Glu Glu Ile Asp Ser Arg Gly Gly Thr Leu

 65 70 75 80
 Asn Glu Leu Glu Val Glu Arg Phe Val Glu Ala Leu Asn Ser Leu Lys
 85 90 95
 Val Lys Pro Asp Val Val Tyr Ile Asp Ala Ala Asp Val Lys Glu Gly
 100 105 110
 Arg Phe Gly Glu Glu Ile Lys Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Lys Ile
 115 120 125
 Val Ser Glu His Arg Ala Asp Asp Lys Phe Leu Pro Val Ser Ser Ala
 130 135 140

 Ser Ile Leu Ala Lys Val Thr Arg Asp Arg Ala Ile Glu Lys Leu Lys
 145 150 155 160
 Glu Lys Tyr Gly Glu Ile Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr
 165 170 175
 Arg Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Tyr Arg Gln His Gly Glu Phe Pro Pro
 180 185 190
 Val Val Arg Arg Ser Trp Lys Thr Leu Arg Lys Ile Glu Glu Lys Leu
 195 200 205
 Arg Lys Glu Ala Gly Ser Lys Asn Pro Glu Asn Ser Lys Glu Lys Gly

 210 215 220
 Gln Thr Ser Leu Asp Val Phe Leu Arg

Lys Ala Lys Lys Thr Gln Pro Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Lys Pro

210 215 220

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> Pyrococcus furiosus

<400> 20

Gly Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Ala Ile Gly Pro Leu Val Val

1 5 10 15

<210

> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Pyrococcus furiosus

<400> 21

Leu Arg Asn Ile Gly Val Lys Asp Ser Lys Gln Leu

1 5 10

<210> 22

<211> 19

<212> PRT

<213> Pyrococcus furiosus

<400> 22

His Lys Ala Asp Ala Lys Tyr Pro Val Val Ser Ala Ala Ser Ile Leu

1 5 10 15

Ala Lys Val

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Pyrococcus furiosus

<400> 23

Lys Leu Lys Lys Gln Tyr Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp

1 5 10 15

<210> 24

<211> 174
 <212> PRT
 <213> Haemophilus influenzae
 <400> 24

Met Phe Asn Leu Ser Leu Ser Ile Lys Ile Pro Ala Ile Leu His Asn
 1 5 10 15
 Asn Leu Phe Val Met Gln Lys Gln Ile Glu Ile Phe Thr Asp Gly Ser
 20 25 30
 Cys Leu Gly Asn Pro Gly Ala Gly Gly Ile Gly Ala Val Leu Arg Tyr
 35 40 45
 Lys Gln His Glu Lys Met Leu Ser Lys Gly Tyr Phe Lys Thr Thr Asn
 50 55 60
 Asn Arg Met Glu Leu Arg Ala Val Ile Glu Ala Leu Asn Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Glu Pro Cys Leu Ile Thr Leu Tyr Ser Asp Ser Gln Tyr Met Lys Asn
 85 90 95
 Gly Ile Thr Lys Trp Ile Phe Asn Trp Lys Lys Asn Asn Trp Lys Ala
 100 105 110
 Ser Ser Gly Lys Pro Val Lys Asn Gln Asp Leu Trp Ile Ala Leu Asp
 115 120 125
 Glu Ser Ile Gln Arg His Lys Ile Asn Trp Gln Trp Val Lys Gly His
 130 135 140
 Ala Gly His Arg Glu Asn Glu Ile Cys Asp Glu Leu Ala Lys Lys Gly
 145 150 155 160
 Ala Glu Asn Pro Thr Leu Glu Asp Met Gly Tyr Phe Glu Glu
 165 170

<210> 25

<211> 166

<212> PRT

<213> Thermus thermophilus

<400> 25

Met Asn Pro Ser Pro Arg Lys Arg Val Ala Leu Phe Thr Asp Gly Ala

1 5 10 15
 Cys Leu Gly Asn Pro Gly Pro Gly Gly Trp Ala Ala Leu Leu Arg Phe
 20 25 30
 His Ala His Glu Lys Leu Leu Ser Gly Gly Glu Ala Cys Thr Thr Asn
 35 40 45
 Asn Arg Met Glu Leu Lys Ala Ala Ile Glu Gly Leu Lys Ala Leu Lys
 50 55 60

Glu Pro Cys Glu Val Asp Leu Tyr Thr Asp Ser His Tyr Leu Lys Lys
 65 70 75 80
 Ala Phe Thr Glu Gly Trp Leu Glu Gly Trp Arg Lys Arg Gly Trp Arg
 85 90 95
 Thr Ala Glu Gly Lys Pro Val Lys Asn Arg Asp Leu Trp Glu Ala Leu
 100 105 110
 Leu Leu Ala Met Ala Pro His Arg Val Arg Phe His Phe Val Lys Gly
 115 120 125
 His Thr Gly His Pro Glu Asn Glu Arg Val Asp Arg Glu Ala Arg Arg

130 135 140
 Gln Ala Gln Ser Gln Ala Lys Thr Pro Cys Pro Pro Arg Ala Pro Thr
 145 150 155 160
 Leu Phe His Glu Glu Ala
 165

- <210> 26
- <211> 161
- <212> PRT
- <213> Thermus aquaticus
- <400> 26

Met Ser Leu Pro Leu Lys Arg Val Asp Leu Phe Thr Asp Gly Ala Cys
 1 5 10 15
 Leu Gly Asn Pro Gly Pro Gly Gly Trp Ala Ala Leu Leu Arg Tyr Gly
 20 25 30
 Ser Gln Glu Lys Leu Leu Ser Gly Gly Glu Pro Cys Thr Thr Asn Asn
 35 40 45

Arg Met Glu Leu Arg Ala Ala Leu Glu Gly Leu Leu Ala Leu Arg Glu
 50 55 60
 Pro Cys Gln Val His Leu His Thr Asp Ser Gln Tyr Leu Lys Arg Ala
 65 70 75 80
 Phe Ala Glu Gly Trp Val Glu Arg Trp Gln Arg Asn Gly Trp Arg Thr
 85 90 95
 Ala Glu Gly Lys Pro Val Lys Asn Gln Asp Leu Trp Gln Ala Leu Leu
 100 105 110
 Lys Ala Met Glu Gly His Glu Val Ala Phe His Phe Val Glu Gly His
 115 120 125
 Ser Gly His Pro Glu Asn Glu Arg Val Asp Arg Glu Ala Arg Arg Gln
 130 135 140
 Ala Lys Ala Gln Pro Gln Val Pro Cys Pro Pro Lys Glu Ala Thr Leu
 145 150 155 160
 Phe

<210> 27

<211> 146

<212> PRT

<213> Salmonella enterica

<400> 27

Met Leu Lys Gln Val Glu Ile Phe Thr Asp Gly Ser Cys Leu Gly Asn
 1 5 10 15
 Pro Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Ala Ile Leu Arg Tyr Arg Gly His Glu
 20 25 30
 Lys Thr Phe Ser Glu Gly Tyr Thr Leu Thr Thr Asn Asn Arg Met Glu
 35 40 45
 Leu Met Ala Ala Ile Val Ala Leu Glu Ala Leu Lys Glu His Cys Glu
 50 55 60
 Val Thr Leu Ser Thr Asp Ser Gln Tyr Val Arg Gln Gly Ile Thr Gln
 65 70 75 80
 Trp Ile His Asn Trp Lys Lys Arg Gly Trp Lys Thr Ala Glu Lys Lys

Arg Arg

145

<210> 29

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 29

Lys Xaa Val Xaa Leu Phe Thr Asp Gly Xaa Cys Xaa Gly Xaa Pro Gly

1 5 10 15

Xaa Gly Gly Xaa Ala Leu Leu Arg Tyr

20 25

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 30

Thr Thr Asn Asn Arg Met Glu Leu

1 5

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 31

Lys Pro Val Lys Asn

1 5

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<

400> 32

Phe Val Lys Gly His Xaa Gly His Xaa Glu Asn Glu

1 5 10

<210> 33

<211> 1950

<212> DNA

<213> Salmonella enterica

<400> 33

```

aacagtgctc gtttacgacc tgaattactg attctggtac taatggtgat gatcatttct      60
atgttcgtca ttccattacc tacctatctg gttgatttcc tgatcgcaact gaatatcgta      120
ctggcgatata tgggtgttat ggggtcgttc tacattgaca gaatcctcag tttttcaacg      180
tttctcgcgg tactgttaat taccacgctc tttcgtctgg cattatcgat cagtaccagc      240

cgtcttatct tgattgaagc cgatgccggt gaaattatcg ccacgttcgg gcaattcgtt      300
attggcgata gcctggcggg ggggttttgt gtcttctcta ttgtcaccgt ggtccagttt      360
atcgttatta ccaaagggtc agaacgcgtc gcggaagtgc cggcccgatt ttctctggat      420
ggatgcccc gtaaacagat gagtattgat gccgatttga aggccggtat tattgatgcg      480
gatgctgcgc gcgaacggcg aagcgtactg gaaagggaaa gccagcttta cggttccttt      540
gacggtgcga tgaagttat caaaggtagc gctattgccg gcatcattat tatctttgtg      600
aactttattg gcggtatttc ggtggggatg acccgccatg gtatggattt gtctctcgct      660

ctgtctactt ataccatgct gaccattggt gatggtcttg tcgccagat ccccgcattg      720
ttgattgcga ttagtgccgg ttttatcgtg actcgcgtaa atggcgatag cgataatag      780
gggcggaata tcatgacgca gctgttgaac aaccatttg tattggttgt tacggtatt      840
ttgaccattt caatgggaac tctgccggga ttcccgtgc cggattttgt tattttatcg      900
gtggttttaa gcgtactctt ctattttaaa ttccgtgaag caaacgtag cgcgccaaa      960
cctaaaacca gcaaaggcga gcagccgctt agtattgagg aaaaagaagg gtcgtcgttg      1020
ggactgattg gcgatctga taaagtctct acagagaccg taccgttgat attacttgtg      1080

ccgaagagcc ggcgtgaaga tctggaaaaa gctcaacttg cggagcgtct acgtagtcag      1140
ttctttattg attatggcgt gcgcctgccg gaagtattgt tacgcgatgg cgagggcctg      1200
gacgataaca gcatcgtatt gttgattaat gagatccgtg ttgaacaatt tacggtctat      1260
tttgatttga tgcgagtggg aaattattcc gatgaagtgc tgtcctttgg tattaatcca      1320
acaatccatc agcaaggtag cagtcagtat ttctgggtaa cgcatgaaga gggggagaaa      1380
ctccgggagc ttggctatgt gttgcggaac gcgcttgatg agctttacca ctgtctggcg      1440

```

gtgaccgtgg cgcgcaacgt caatgaatat ttcggtattc aggaaacaaa acatatgctg	1500
gaccaactgg aagcgaatt tcctgattta cttaaagaag tgctcagaca tgccacgta	1560
caacgtatat ctgaagtttt gcagcgttta ttaagcgaac gtgtttccgt gcgtaatatg	1620
aaattaatta tggaagcgt cgcatgtgg gcgccaagag aaaaagatgt cattaacctt	1680
gtagagcata ttcgtggagc aatggcgcgt tatattgtc ataaattcgc caatggcggc	1740
gaattacgag cagtaatggt atctgctgaa gttgaggatg ttattcgcaa agggatccgt	1800
cagacctctg gcagtacctt cctcagcctt gacccggaag cctccgctaa tttgatggat	1860
ctcattacac ttaagttgga tgatttattg attgcacata aagatcttgt cctccttacg	1920
tctgtcgatg tccgtcgatt tattaagaaa	1950