



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호
(43) 공개일자

특2002-0086057
2002년11월18일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제분류코드
C12Q 1/68 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호
10-2001-0025741</p> <p>(22) 출원일자
2001년05월11일</p> | <p>(71) 출원인
과학기술진흥사업단
332-0012 일본국 사이타마켄 가와구찌시 혼쥬오 4쥬오메 1반 8고오, 일본</p> <p>(72) 발명자
나카타니카즈히코
611-0013 일본국 도쿄도 우지시 토도타니사가리 8-10-605, 일본
사이토이사오
607-8242 일본국 도쿄도 토시야마시 나쿠칸슈지시 바야마 1-21, 일본
산도신쓰케
606-8163 일본국 도쿄도 토시야마시 사쿠쿠이찌지 나카노타마치 13코포미야비 101, 일본</p> <p>(74) 대리인
이병현</p> <p>(77) 심사관
있음</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 미스매치 인식분자

(57) 요약

대표도 - 도 2

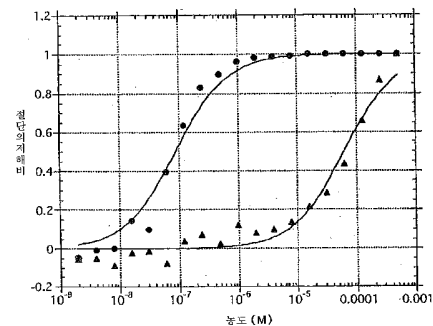
본 발명은 DNA나 RNA 등의 핵산에 있어서의 염기쌍의 미스매치를 간편하고 또한 고감도로 검출할 수 있는 방법 및 그를 위한 검출시약을 제공하는 것이다.

본 발명은 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 있어서, 다음의 일반식(I),



(식중, A는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍의 한 쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조부분, B는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍의 또 한 쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조부분, L은 화학구조부분 A 및 B를 결합하는 링커구조를 나타낸다.)로 나타나는 미스매치 인식분자를 이용하여, 해당 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 유사적으로 염기쌍을 형성시켜, 해당 유사적인 염기쌍의 형성을 측정하는 것으로 이루어지는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 검출, 동정(同定)하는 방법, 그를 위한 키트, 미스매치의 검출용 시약 및 유전자의 염기배열의 이상을 검출하는 방법에 관한 것이다.

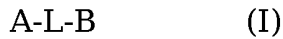
키워드 : 미스매치, 염기쌍, 시약, 키트, 염기배열



청구의 범위

청구항 1

정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 있어서, 다음 일반식 (I),



(식중, A는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍의 한 쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조부분, B는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍의 또 하나의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조부분, L은 화학구조부분 A 및 B를 결합하는 링커 구조를 나타낸다.)로 나타나는, 그 각각의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조부분 A 및 화학구조부분 B, 그리고 해당 화학구조부분 A 및 B를 결합하는 링커부분 L을 가지는 화합물을 이용하여, 해당 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 유사적으로 염기쌍을 형성시켜, 해당 유사적인 염기쌍의 형성을 측정하는 것으로 이루어지는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 검출, 동정하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 일반식(I)로 나타나는 화합물의 화학구조부분 A 및 B가 염기와 수소결합을 형성하고, 또한 주위의 염기와 스택효과에 의해 안정화되는 것에 의해 염기와 쌍을 형성하는 화합물인 것을 특징으로 하는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 검출, 동정하는 방법.

청구항 3

제 1항 또는 2항에 있어서, 일반식 (I)로 나타나는 화합물의 화학구조부분 A 및 B가 염기와 수소결합이 가능한 2개이상 화학구조부분을 함유하는 복소환식방향족기를 갖는 화합물인 것을 특징으로 하는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 검출, 동정하는 방법.

청구항 4

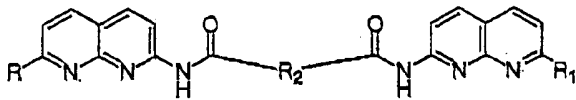
제 3항에 있어서, 일반식(I)로 나타나는 화합물의 화학구조부분 A 및 B의 적어도 하나가, 나프티리딘 또는 그 유도체인 것을 특징으로 하는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 검출, 동정하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 일반식(I)로 나타나는 화합물에 있어서의 화학구조부분 A 및 B와 링커부분 L과의 결합이, 카르본산 아미드결합인 것을 특징으로 하는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 검출, 동정하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 일반식(I)로 나타나는 화합물이 다음 일반식(II),



(II)

식중, R, R₁은 수소원자, 탄소수1~15의 알킬기이고 해당 알킬기중의 1개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되어도 좋은 알킬기, 탄소수1~15의 알콕시기이고 해당 알콕시기중의 1개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되어도 좋은 알콕시기, 또는, 탄소수1~15의 모노 또는 디알킬아미노기이고 해당 알킬아미노기중의 1개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되어도 좋은 모노 또는 디알킬아미노기를 나타내고, R₂는 탄소수1~20의 알킬기이고 해당 알킬기중의 1개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자, 질소원자 또는 카르보닐기로 치환되어도 좋은 알킬기를 나타낸다.)로 나타나는 화합물인 것을 특징으로 하는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 검출, 동정하는 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 일반식(I)로 나타나는 화합물이 담체에 고정화되어 있는 것을 특징으로 하는 정상 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 검출, 동정하는 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 일반식(I)로 나타나는 화합물이 표식화되어 있는 것을 특징으로 하는 정상 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 검출, 동정하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 8항의 어느 한 항에 기재의 정상 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 유사적으로 염기쌍을 형성시켜, 해당 유사적인 염기쌍의 형성을 측정하는 것으로 이루어지는 정상 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 검출, 동정하는 방법에 있어서, 정상 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 유사적으로 염기쌍을 형성시키기 위한 다음 일반식(I),



(식중, A는 정상 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍의 한 쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조부분, B는 정상 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍의 또 하나의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조부분, L은 화학구조부분 A 및 B를 결합하는 링커구조를 나타낸다.)로 나타나는 화합물을 포함하는 시약.

청구항 10

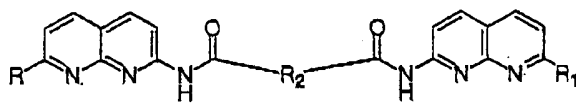
제 9항에 있어서, 시약이, 정상 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 유사적으로 염기쌍을 형성시키기 위한 염기쌍 생성제인 것을 특징으로 하는 시약.

청구항 11

제 9항에 기재의 시약 및 검출, 동정용의 자재로 이루어지는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 유사적으로 염기쌍을 형성시키고, 해당 유사적인 염기쌍의 형성을 측정하는 것으로 이루어지는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 검출, 동정하기 위한 키트.

청구항 12

다음 일반식(II),

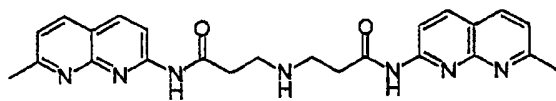


(II)

(식중, R, R₁은 수소원자, 탄소수1~15의 알킬기이고 해당 알킬기중의 1개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되더라도 좋은 알킬기, 탄소수1~15의 알콕시기이고 해당 알콕시기중의 1개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되더라도 좋은 알콕시기, 또는, 탄소수 1~15의 모노 또는 디알킬아미노기이고 해당 알킬아미노기중의 1개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되더라도 좋은 모노 또는 디알킬아미노기를 나타내고, R₂는 탄소수 1~20의 알킬기이고 해당 알킬기중의 1개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되어도 좋은 알킬기를 나타낸다.)로 나타나는 화합물 또는 그 고정화물.

청구항 13

제 12항에 있어서, 일반식(II)으로 나타나는 화합물이 다음 일반식(III),



(III)

인 화합물 또는 그 고정화물.

청구항 14

검체가 되는 한개의 사슬의 DNA 또는 RNA와, 그것에 대응하는 정상의 염기배열을 갖는 DNA 또는 RNA를 하이브리다이즈시키고, 이어서 해당 하이브리다이즈한 DNA 또는 RNA 에서의 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 다음 일반식(I),

A-L-B (I)

(식중, A는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍의 한 쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조부분, B는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍의 또 하나의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조부분, L은 화학구조부분 A 및 B를 결합하는 링커구조를 나타낸다.)로 나타나는, 그 각각의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조부분 A 및 화학구조부분 B, 그리고 해당 화학구조부분 A 및 B를 결합하는 링커부분 L을 갖는 화합물을 이용하여, 해당 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 유사적으로 염기쌍을 형성시켜, 해당 유사적인 염기쌍의 형성을 측정하는 것으로 이루어지는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 검출, 동정하여 DNA 또는 RNA에서의 염기배열의 이상을 검출하는 방법.

명세서

발명의 명칭

미스매치인식분자{A molecule to recognize a mismatch base pair}

도면의 간단한 설명

- [0001] 도 1는 본 발명의 미스매치인식분자에 의한 미스매치부위의, DNaseI에 의한 절단의 저해 효과를 도시한 도면 대응 사진이다.
- [0002] 도 2는 본 발명의 미스매치인식분자를 이용한 경우의 DNaseI에 의한 절단의 저해효과를 도시한 그래프이다.
- [0003] 도 3는 본 발명의 미스매치인식분자의 미스매치부분에 있어서의 작용을 모식적으로 도시한 것이다.

발명의 상세한 설명

- [0004] 본 발명은 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 있어서, 해당 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 유사적으로 염기쌍을 형성시켜, 해당 유사적인 염기쌍의 형성을 측정하는 것으로 이루어지는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 검출, 동정(同定)하는 방법, 그를 위한 시약, 그것을 함유하는 키트, 그 화합물 및 그 방법을 이용한 DNA 또는 RNA의 염기배열의 이상을 검출하는 방법에 관한 것이다.
- [0005] DNA나 RNA 등의 핵산이 하이브리다이즈하여 두개의 사슬로 되는 경우에는, 쌍을 이루는 염기가 결정되어 있다. 예를 들면, 구아닌(G)에는 시토신(C), 아데닌(A)에는 티민(T)이라는 구조로 되어 있다. 그리고, 보통은 모든 염기가 이러한 쌍을 형성하여 하이브리다이즈하고 있는 것이지만, 때로는 염기배열 중의 일부에 이러한 쌍을 형성할 수 없는 경우가 있다.
- [0006] 예를 들면, 어떤 DNA와 다른 DNA를 하이브리다이즈할 수 있는 조건하에 둔 경우에, 대부분의 염기는 이러한 쌍을 형성할 수 있지만, 1개 또는 수개의 일부의 염기는 이러한 쌍을 형성할 수 없는 경우가 있다. 이러한 보통의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기쌍을, 이하, 본 명세서에서는 미스매치(mismatch)라고 한다.
- [0007] 한편, 최근 1개 또는 2개이상의 염기가 다른 것에 기인하는 각종의 유전병에 관해서 연구가 행하여 지고 있다. 예를 들면, 1개의 염기가 보통의 것과는 다른 유전자(SNP(Single Nucleotide Polymorphism))를 갖는 유전병 등이 있고, 이러한 유전병의 해명이 주목받고 있다. 이러한 유전자를 정상의 유전자와 하이브리다이즈시키면, 대부분의 염기는 정상의 염기쌍을 형성할 수 있기 때문에 하이브리다이즈하는 것은 하지만, 1개의 염기쌍에 관해서 미스매치가 발생하게 된다.
- [0008] 현재, 이러한 미스매치를 검출하는 방법은, 두개의 사슬 DNA의 하이브리다이제이션 효율을 비교하는 수법이 일반적이다. 그러나, 이 방법을 이용하기 위해서는 미스매치를 포함하는 DNA의 염기배열을 미리 알아두어야 하기 때문에 막대한 노력이 필요하고, 많은 검체를 처리하는 방법으로서 부적당하다. 또한, MutS 등의 DNA의 수복 단백질이 유전자 손상개소에 선택적으로 결합하는 것을 이용하는 수법도 있지만, 단백질의 활성을 유지하는 것이 어렵다.
- [0009] 이와 같이, 하이브리다이즈한 DNA 등에 있어서의 일부의 미스매치를 검출하는 방법은 대단히 어렵고, 또한 그 감도도 불충분한 것이고, 이것을 간편하고 또한 고감도로 검출할 수 있는 방법의 확립이 요청되고 있다.

[0010] 그런데, 본 발명자들은 두개의 사슬 DNA 중에 생성하는 불대염기(벌지염기)를 가지는 DNA(벌지DNA)에 특이적으로 결합하여, 안정화하는 분자인 벌지 DNA 인식분자를 개발하여 왔다(일본국 특원평 11-262205호). 이 벌지인식분자는 불대염기(不對鹽基)와 수소결합을 할 뿐 아니라, 벌지염기(bulged base)의 존재에 의해 생기는 공간에, 방향환과 벌지근방의 염기와의 스택킹 상호작용을 이용하여 인터카레이션(intercalation)하여, 안정화되어 있는 것이다.

[0011] 본 발명자들은 이러한 주변의 염기의 존재에 의한 스택킹효과를 이용한 불대염기에 대한 작용에 관해서 더욱 연구를 하여 온 바, 염기쌍의 미스매치가 생기고 있는 개소에 있어서도, 염기와 쌍을 형성할 수 있는 분자종을 2개 갖는 화합물이 이러한 스택킹 효과에 의해 비교적 안정적으로 받아들일 수 있는 것을 발견하였다.

[0012] 본 발명은 이러한 염기쌍의 미스매치를 간편하고 더군다나 고감도로 검출할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 보다 상세하게는, 두개의 사슬 DNA 사슬중에 존재하는 미스매치를 고감도로 더욱이 간편하게 검출할 수 있는 방법 및 그를 위한 검출시약을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명은 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 있어서, 다음 일반식(I),

[0015] A-L-B (I)

[0016] (식중, A는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍의 한 쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조부분, B는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍의 또 하나의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조부분, L은 화학구조부분 A 및 B 를 결합하는 링커구조를 나타낸다.)로 나타나는, 그 각각의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조부분 A 및 화학구조부분 B, 및 해당 화학구조부분 A 및 B를 결합하는 링커부분 L을 갖는 화합물을 이용하여, 해당 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 유사적으로 염기쌍을 형성시켜, 해당 유사적인 염기쌍의 형성을 측정하는 것으로 이루어지는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 검출, 동정하는 방법에 관한 것이다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기의 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 유사적으로 염기쌍을 형성시켜, 해당 유사적인 염기쌍의 형성을 측정하는 것으로 이루어지는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 검출, 동정하는 방법에 있어서, 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 유사적인 염기쌍을 형성시키기 위한 다음 일반식(I),

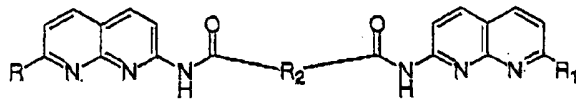
[0018] A-L-B (I)

[0019] (식중, A는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍의 한 쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조부분, B는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍의 또 한 쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조부분, L은 화학구조부분 A 및 B 를 결합하는 링커구조를 나타낸다.)로 나타나는 화합물로 이루어지는, 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 유사적으로 염기쌍을 형성시키기 위한 시약에 관한 것이다.

[0020] 본 발명은 상기한 본 발명의 시약 및 검출, 동정용(同定用)의 자재로 이루어지는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 유사적으로 염기쌍을 형성시켜, 해당 유사적인 염기쌍의 형성을 측정하는 것으로 이루어지는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 검출, 동정하기 위한 키트에 관한 것이다.

[0021] 또한, 본 발명은 다음의 일반식(II),

[0022]



(II)

[0023] (식중, R, R₁는, 수소원자, 탄소수1~15의 알킬기이고 해당 알킬기중의 1개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되어도 좋은 알킬기, 탄소수 1~15의 알콕시기이고 해당 알콕시기중의 1개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되더라도 좋은 알콕시기, 또는, 탄소수 1~15의 모노 또는 디알킬아미노기이고 해당 알킬아미노기중의 1개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되더라도 좋은 모노 또는 디알킬아미노기를 나타내고,

[0024] R₂는, 탄소수 1~20의 알킬기이고 해당 알킬기중의 1개 또는 그 이상의 탄소 원자가 산소원자, 질소원자 또는 카르보닐기로 치환되더라도 좋은 알킬기를 나타낸다.)로 나타나는 화합물 또는 해당 화합물이 플레이트나 기기분석용의 검출장치 등에 고정화될 수 있는 화학구조에 수식된 고정화물에 관한 것이다.

[0025] 더욱이, 본 발명은 검체가 되는 한개의 사슬의 DNA 또는 RNA와, 그것에 대응하는 정상의 염기배열을 갖는 DNA 또는 RNA를 하이브리다이징시키고, 이어서 해당 하이브리다이징한 DNA 또는 RNA에서의 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 다음 일반식(I),



[0027] (식중, A는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍의 한쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조부분, B는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍의 또 한쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조부분, L은 화학구조부분 A 및 B를 결합하는 링커구조를 나타낸다.)로 표시되는, 그 각각의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조부분 A 및 화학구조부분 B, 및 해당 화학구조부분 A 및 B를 결합하는 링커부분 L을 갖는 화합물을 이용하여, 해당 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 유사적으로 염기쌍을 형성시켜, 해당 유사적인 염기쌍의 형성을 측정하는 것으로 이루어지는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 검출, 동정하는 것으로 이루어지는 DNA 또는 RNA에 있어서의 염기배열의 이상을 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0028] 또한, 이하의 설명에 있어서는, 상기한 「정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍의 한쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조부분(일반식(I)에 있어서의 A 및 B의 부분)」의 것을 단지 「염기인식부위」라고 할 수도 있다.

[0029] 실시예

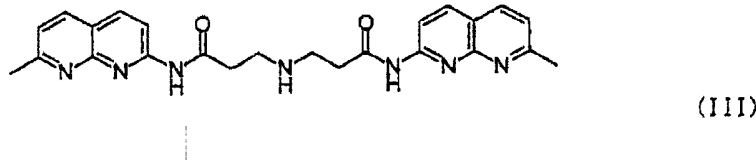
[0030] <발명을 실시하기 위한 최선의 형태>

[0031] 본 발명자들은 두개의 사슬 DNA 중에 생성하는 불대염기(벌지염기)를 가지는 DNA(벌지 DNA)에 특이적으로 결합하여, 안정화하는 분자인 벌지 DNA 인식분자를 개발하여 왔다(일본국 특원평 11-262205호). 이 벌지인식분자는 벌지염기의 존재에 의해 생기는 공간에, 방향 환과 벌지근방의 염기와 스택킹상호작용을 이용하여 인터카레이션하여, 안정화되어 있는 것이지만, 본 발명자들은 이와 같은 벌지인식분자를 2분자, 링커와 같은 결합 사슬로 결합시키는 것에 의해 각각의 벌지인식분자가, 염기쌍의 미스매치부분에 있어서 벌지염기와 마찬가지로 염기쌍을 형성하고, 더구나 이것들의 벌지인식분자의 양자가 두개의 사슬을 형성하고 있는

DNA나 RNA의 사슬의 중에 비교적 안정적으로 받아들여 지는 것을 발견하였다. 이러한 비교적 큰 분자종이 DNA나 RNA의 사슬 중에 비교적 안정적으로 받아들여지는 것은 놀랄만한 일이며, 또한 이와 같은 특성을 이용하는 것에 의해, 하이브리다이징하고 있는 핵산중에서 염기쌍이 미스매치를 발생시키고 있는 개소를 간편하게 특정할 수 있는 것을 발견하였다.

[0032] 예를 들면, 구아닌과 수소결합을 형성하고, 또한 주위의 염기와 스택킹효과에 의해 안정화된 1, 8-나프티리딘 유도체를 이용하여, 이것을 링커에 의해 결합시킨 다음식(III)로 표시되는 이량체를 합성했다.

[0033]



[0034] 이 화합물은 1, 8-나프티리딘 부분에 있어서 구아닌과 쌍을 형성한다. 구아닌이 벌지염기로 되어 있는 경우에는, 해당 구아닌과 1,8-나프티리딘유도체가 쌍을 형성하기 위한 공간이 충분하게 있기 때문에, 이 1,8-나프티리딘유도체와 벌지염기와의 쌍의 형성은 양자의 안정성을 검토하면 충분하지만, 미스매치의 경우에는 쌍을 형성하기 위한 장소에 다른 염기가 이미 존재하고 있는 것에서 공간적인 여유가 충분하지 않고, 염기와 인접하는 염기와의 미세한 공간에 이러한 비교적 큰 분자종이 안정적으로 들어갈 수 있는가의 여부가 큰 문제가 된다.

[0035] 따라서, 핵산의 두개의 사슬중에 있어서 구아닌-구아닌의 미스매치가 존재하고 있는 경우에 있어서, 이와 같은 1, 8-나프티리딘부분을 2개 갖는 화합물이 미스매치하고 있는 각각의 구아닌과 쌍을 형성하여 핵산의 사슬중에 받아들여지는가의 여부를 검토했다.

[0036] 두개의 사슬의 DNA 중에 GC 염기쌍, GA 미스매치 염기쌍 및 GG 미스매치 염기쌍을 갖는 5'-³²P에서 라벨한 52머(mer)의 두개의 사슬 DNA를 조제했다. 그 해당하는 부분의 부분 배열을 다음에 나타낸다.

[0037] * 1 * 2 * 3

[0038] □□□□ACCGT□□□□ ACAGT□□□□TCGGA

[0039] □□□□ TGGCA□□□□ TGGCA□□□□AGGCT

[0040] 상기의 두개의 사슬 DNA에 있어서, *1로 나타낸 부분은 정상의 G-C의 염기쌍이고, *2로 나타낸 부분은 G-A의 미스매치부분이며, *3의 부분은 G-G의 미스매치의 부분이다.

[0041] 이 두개의 사슬의 DNA를 이용하여, 여러가지의 농도에 있어서의 식(III)의 화합물의 존재하에 있어서의, DNaseI(DNA 가수분해효소) 풋프린팅 적정에 의하여, DNaseI에 의한 DNA의 절단의 저해장소를 조사하였다.

[0042] 이 결과를 도 1에 도시한다. 도 1은 전기영동의 결과를 도시한 도면 대응 사진이다.

[0043] 도 1의 왼쪽으로부터 오른쪽으로 감에 따라서, 식(III)의 화합물의 농도가 0에서부터 500μM 까지 서서히 높아지고 있다. DNaseI(DNA 가수분해효소)에 의하여 절단된 경우에는 검게 나타나고, DNaseI에 의한 절단이 저해된 곳이 하얗게 보이고 있다.

- [0044] 예를 들면, G-C의 정상 염기쌍인 경우에는, 식(III)의 화합물의 농도를 높게 하여도 검은 채로, 즉 DNaseI에 의해서 절단이 발생되고 있는 것이 도시된다. 그런데, G-G와 같은 미스매치의 사이트에서는, 식(III)의 나프티리딘 유도체의 농도를 높게 하여 간 경우에, 점차 하얗고, 즉 그 절단이 저해되어 있는 것을 알 수 있다. 이러한 변화는 G-A 미스매치의 사이트에 있어서도 고농도의 부분에 있어서 발생하고 있는 것도 알 수 있다.
- [0045] 이러한 DNA 가수분해효소에 대한 DNA의 절단저해작용은 식(III)의 화합물의 존재(농도를 포함하여)에 의존하고 있고, 식(III)의 화합물에 의한 특이적인 작용이라고 생각된다.
- [0046] 도 1에 있어서의 절단밴드의 강도와 추가한 나프티리딘의 농도와의 관계를 그래프로 한 것이 도 2이다. 도 2의 세로축은 절단밴드의 강도로부터 얻어진 절단의 저해비이며, 「0.0」은 거의 완전히 절단되어 있는 상황이며, 「1.0」은 거의 완전히 절단이 저해된 상황을 도시하고 있다. 도 2의 가로축은 추가된 식(III)의 화합물의 농도(M)을 도시하고 있다. 도 2의 그래프중의 검은 동그라미표시(●)는 G-G의 미스매치사이트의 것이며, 검은 삼각표시(▲)는 G-A의 미스매치사이트의 것이다.
- [0047] 이 도 2의 그래프로부터도 분명한 바와 같이, 식(III)의 화합물에 의한 G-G의 미스매치 사이트에 대한 절단 저해 작용은 비교적 저온도에서 발생하고, 약 $10^{-5}M$ 의 농도 이상에서 거의 완전하게 G-G 미스매치에 대한 절단이 저해되어 있는 것을 알 수 있다. 또한, G-A 미스매치 사이트에 있어서도, 약 $10^{-6}M$ 의 농도 부근에서 절단의 저해작용이 시작되고, $5 \times 10^{-3}M(500\mu M)$ 부근에서는 약90%의 절단저해가 발생하고 있는 것을 알 수 있다.
- [0048] 이 결과, 식(III)의 화합물의 G-G의 미스매치에의 결합상수($K_a(GGmis)$)는 $1.13 \times 10^7 M^{-1}$ 로 구해지고, 마찬가지로 G-A의 미스매치에의 결합상수($K_a(GAmis)$)는 $1.63 \times 10^4 M^{-1}$ 로 구하여졌다.
- [0049] 양자의 결합상수의 비($(K_a(GGmis))/(K_a(GAmis))$)는 696이며, 식(III)이 G-G 미스매치에 대하여 특이적으로 작용하고 있는 것을 알 수 있다. 또한, 식(III)의 화합물의 G-G 미스매치염기쌍에 대한 결합상수가 10^7 의 오더로 비교적 크다는 것은, 식(III)의 화합물이 상상 이상으로 안정적으로 G-G 미스매치염기쌍 부분에 받아들여지고 있는 것을 도시하고 있다.
- [0050] 그리고, DNA의 두개의 사슬에 받아들여진 본 발명의 미스매치 염기인식분자는 비교적 안정적인 쌍을 형성하고, 이러한 쌍의 형성에 의해 천연의 효소가 인식할 수 없는 염기의 배열을 새롭게 형성하고 있다고 생각된다.
- [0051] 본 발명의 일반식(I)에서 도시되는 화합물(미스매치 인식분자)이 비교적 안정적으로 염기의 미스매치부분에 받아들여지는 모양을 모식적으로 나타낸 것이 도 3이다.
- [0052] 도 3의 좌측은 두개의 사슬의 DNA에 있어서 G-A의 미스매치가 있는 부분을 도시하고 있다. 다른 개소에서는 정상 염기쌍이 형성되어 있고, G-A의 부분에 있어서 미스매치가 있음에도 불구하고 전체로서는 하이프리다이즈하고 있는 DNA이다. 이것에, N_A-N_G 로 도시되는 본 발명의 미스매치 인식분자가 추가되면, 도 3의 오른쪽과 같은 상태로 되는 것으로 생각된다. 즉, 미스매치하고 있는 염기의 구아닌(G)은 미스매치 인식분자의 구아닌 인식부위(N_G)와 쌍을 형성하고, 미스매치하고 있는 다른쪽의 염기의 아데닌(A)은 미스매치 인식분자의 아데닌 인식부위(N_A)와 쌍을 형성

하고, 그리고 미스매치인식분자의 구아닌 인식부위(N_G)와 아데닌 인식부위(N_A)와는, 적당한 길이로 또한 적당한 자유도가 있는 링커(-)로 결합되어 있고, 두개의 사슬의 DNA의 사슬중에 거의 다른 정상의 염기쌍과 같은 모양으로 받아들여 진다고 생각된다(도 3의 오른쪽참조).

- [0053] 그리고, 본 발명의 미스매치 인식분자가 두개의 사슬의 DNA의 사슬중에 비교적 안정적으로 받아들여지는 또 하나의 큰 이유는 미스매치 인식분자의 염기인식부위(예를 들면, 전술한 예에 있어서의 구아닌 인식부위(N_G)나 아데닌 인식부위(N_A))가, 전후의 염기에 의한 스택킹 효과(염기끼리간의 분자간의 힘과 같은 것)에 의해 안정화되어 있다는 것이다. 도 3의 오른쪽에서의 점선은 이러한 염기에 의한 스택킹 효과를 도시하고 있다. 이러한 스택킹효과가 발생하는 요인의 하나로서, π 전자계의 상호작용(파이 π 스택킹효과)을 생각할 수 있는 것으로부터, 전후의 염기의 종류에 의해 스택킹의 효과에는 정도의 차이가 발생하는 것도 있지만, 본 발명의 분자와 미스매치사이트의 결합을 극단적으로 저하시키는 것은 없다.
- [0054] 따라서, 본 발명의 미스매치 인식분자의 염기인식부위(일반식(I)에 있어서 A 및 B의 화학구조부분)은, 단지 원하는 염기와 수소결합을 할 수 있다는 것만이 아니라, 전후 또는 주위의 염기에 의한 스택킹효과가 얻어지는 화학구조인 것이 필요하다.
- [0055] 이와 같이, 본 발명은 2개의 염기인식부위를 적당한 길이로 또한 적당한 자유도를 갖는 링커로 결합시킨 화합물이 두개의 사슬의 핵산에 있어서 염기쌍의 미스매치 부분에 특이적으로 또한 안정적으로 쌍을 형성한다는 것을 발견한 것을 기본적인 컨셉트로 하는 것이며, 상기한 G-G 미스매치에 한정되는 것이 아니다.
- [0056] 상기한 예에서는, 구아닌(G)-구아닌(G)의 미스매치를 예로 하여, 구아닌염기와 안전한 수소결합을 형성하는 1, 8-나프티리딘유도체를 염기인식부위에 이용한 미스매치 인식분자를 도시하였지만, 미스매치의 인식은 G-G 미스매치에 한정되는 것이 아니다. 본 발명에 미스매치 인식분자에 있어서 염기인식부위는 미스매치의 염기의 한 쪽을 인식하여 해당 염기와 와트슨-클릭(Watson-Crick)형의 염기쌍을 형성할 수 있고, 주위의 염기에 의한 스택킹 효과를 얻을 수 있는 분자종을 선택하는 것에 의해, 예시한 구아닌에 한하지 않고, 각종의 염기와 염기쌍을 형성할 수 있는 것이면 된다.
- [0057] 예를 들면, 미스매치의 염기가 시토신의 경우에는 염기인식부위로서 2-아미노나프티리딘-4-온 또는 그 유도체 등이 미스매치의 염기가 아데닌의 경우에는, 2-퀴놀론 유도체, 예를 들면 3-(2-아미노에틸)-2-퀴놀론 또는 그 유도체 등이, 또한 미스매치의 염기가 티민의 경우에는, 2-아미노나프티리딘-7-온 또는 그 유도체 등이 이용된다.
- [0058] 특정의 미스매치의 염기에 특이적으로 인식되는 본 발명의 미스매치 인식분자에 있어서 염기인식부위는, 수소결합을 형성하기 위한 수소결합부위와, 근방의 염기에 스택킹되기 위한 평면구조를 가지고 있는 복소환식 방향족기를 갖는 것이 바람직하지만, 더욱이, 염기에 대한 선택성을 증강하기 위해서 어느 정도의 입체 장애를 갖는 치환기를 갖는 복소환식 방향족기가 바람직하다.
- [0059] 이러한 치환기로서는 예를 들면, 탄소수 1 \square 15, 바람직하게는 1 \square 10, 보다 바람직하게는 1 \square 7의 직쇄형상 또는 분지(分枝)형상의 알킬기, 탄소수 1 \square 15, 바람직하게는 1 \square 10, 보다 바람직하게는 1 \square 7의 직쇄형상 또는 분지형상의 알킬기로 이루어지는 알콕시기, 탄소수 1 \square 15, 바람직하게는 1 \square 10, 보다 바람직하게는 1 \square 7의 직쇄형상 또는 분지형상의 알킬기로 모노 또는 디치환되어 있는 모노 또는 디알킬 아미노기 등을 들수있다.
- [0060] 이것들의 알킬기, 알콕시기 또는 모노 또는 디알킬아미노기에 있어서 1개 또는 그 이상의 탄소원자는 산소원자 또는 질소원자로 치환되어 있어도 좋다.

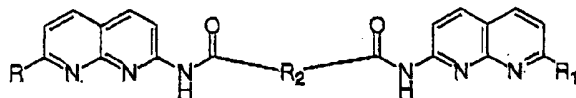
[0061] 또한, 본 발명의 일반식(I)으로 나타나는 화합물에 있어서의 링커부 L로서는, 2개의 염기 인식부위를 적당한 길이로 적당한 자유도를 부여하는 것으로 특별히 제한되는 것은 아니지만, 예를 들면, 탄소수 1~20, 바람직하게는 1~15, 보다 바람직하게는 1~12의 직쇄형상 또는 분지형상의 포화 또는 불포화의 알킬기이고, 해당 알킬기중의 1개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자, 질소원자 또는 카르보닐기로 치환되어도 좋은 알킬기를 들 수 있다. 바람직한 링커로서는 상기한 식(III)의 화합물과 같이 양단이 아미드결합 부분을 가지고, 중앙부에 질소원자를 갖는 것을 들 수 있다.

[0062] 이 링커부분은 2개의 염기인식부위를 결합시키는 것 뿐만 아니라, 이 링커부분으로부터 담체에 고정화하기 위한 가지를 결합시킬 수 있다. 예를 들면, 링커 중앙부 부근의 질소원자의 개소로부터 더욱 말단에 담체와 결합하기 위한 관능기 등을 갖는 알킬렌기와 같은 가지를 연장시켜, 필요에 따라서 담체에 고정화할 수도 있다.

[0063] 본 발명의 일반식(I)에 있어서의 염기인식부위 A 또는 B와 링커부 L과의 결합은 탄소-탄소 결합이라도 좋지만 합성의 간편함에서 관능기에 의한 결합이 바람직하다. 관능기에 의한 결합으로서는, 에테르결합, 에스테르결합, 아미드결합, 인산에 의한 결합 등 여러가지의 타입의 것을 선택할 수 있지만, 아미드결합이 바람직하다.

[0064] 본 발명의 미스매치 염기인식분자에 있어서, G-G 미스매치에 대한 바람직한 일반식(I)의 화합물로서, 다음 일반식(II),

[0065]



(II)

[0066] (식중, R, R₁ 는 수소원자, 탄소수 1~15의 알킬기이고 해당 알킬기중의 1개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되어도 좋은 알킬기, 탄소수1~15의 알콕시기이고 해당 알콕시기중의 1개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되어도 좋은 알콕시기, 또는 탄소수 1~15의 모노 또는 디알킬아미노기이고 해당 알킬아미노기중의 1개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되어도 좋은 모노 또는 디알킬아미노기를 나타내고,

[0067] R₂는 탄소수 1~20의 알킬기이고 해당 알킬기중의 1개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자, 질소원자 또는 카르보닐기로 치환되어도 좋은 알킬기를 나타낸다.)로 나타나는 화합물 또는 그 고정화물을 들 수 있다. 여기에 있어서 「고정화물」이란, 상기한 화합물이 담체에 고정화되어 있는 상태의 것 또는 고정화될 수 있도록 상기한 「가지」를 연장한 상태의 화합물을 말한다.

[0068] 또한, R₂에 있어서의 알킬기는 일반식(II)에 도시되어 있는 바와 같이 2개의 알킬기이다.

[0069] 또한, 본 발명의 미스매치 염기인식분자는 이것을 단독으로 사용할 수 있지만, 분자중의 적당한 위치에 예를 들면 링커부분이나 링커로부터 고정화 등을 위한 연장되어진 가지 등에, 방사성 원소를 도입하거나, 화학발광 또는 형광을 발하는 분자종을 도입하는 등을 하여, 표식화

하여 사용할 수도 있다. 또한, 측정수단으로서의 표식화는 검출대상의 DNA나 RNA 등의 핵산부분의 표식화에 의한 것도 가능하다.

- [0070] 더욱이, 본 발명의 미스매치 염기인식분자가 적당한 위치에 있어서 폴리스티렌 등의 고분자 재료와 직접 또는 알킬렌기 등을 이용하여 결합시켜, 이것을 고정화하여 사용할 수도 있다.
- [0071] 본 발명의 미스매치 염기인식분자는 저분자 유기화합물이며, 보통의 유기합성법에 의해 적절하게 제조할 수 있다. 예를 들면, 상기한 1, 8-나프티리딘유도체는 2-아미노-1, 8-나프티리딘 또는 2-아미노-7-메틸-1, 8-나프티리딘을 N-보호-4-아미노-낙산의 반응성유도체, 예를 들면 산염화물을 반응시켜, 2위의 아미노기를 아실화한 후, 아미노기를 보호기를 탈보호하여 제조할 수 있다. 이 때의 보호기로서는 염산염이나 아실기나 알콕시 카르보닐기 등의 펩티드 합성에 있어서 사용되는 아미노보호기를 사용할 수 있다.
- [0072] 이렇게 하여 얻어진 염기인식부위를, 양말단에 카르복실기 또는 그 반응성유도체기를 갖는 링커용의 화합물과 반응시키는 것에 의해 원하는 미스매치 염기인식분자를 얻을 수 있다. 이 때에, 링커용 화합물의 분자중에 질소원자 등의 반응성 기가 존재하고 있는 경우에는, 상기한 보호기 등으로 적절하게 보호하여 사용할 수 있다.
- [0073] 본 발명의 미스매치 염기인식분자는 이것을 미스매치의 염기의 쌍을 검출하기 위한 시약 또는 검출제로서 사용할 수 있고, 또한, 적당한 담체와 조합시키는 것에 의해 미스매치 염기의 쌍을 검출하기 위한 조성물로 할 수 있다. 또한, 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 유사적으로 염기쌍을 형성시키기 위한 염기쌍 생성제로서 사용할 수도 있다. 여기에, 「유사적인 염기쌍」이라는 것은, 천연에 존재하는 염기의 쌍과는 다른 염기의 쌍이라는 의미이며, 염기쌍의 강도를 의미하는 것이 아니다. 또한, 본 명세서에 있어서 사용되는 「정상의 염기쌍」이란 천연에 존재하는 염기의 쌍이고, G-C, A-T, 또는 A-U의 염기쌍을 말한다.
- [0074] 본 발명은 더욱이 상기한 본 발명의 미스매치 염기인식분자 및 검출, 동정용의 자재, 예를 들면 화학발광이나 형광을 위한 시약이나 완충액등의 자재로 이루어지는, 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 유사적으로 염기쌍을 형성시켜, 해당 유사적인 염기쌍의 형성을 측정하는 것으로 이루어지는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 검출, 동정하기 위한 키트를 제공하는 것이다.
- [0075] 더욱이, 본 발명은 본 발명의 미스매치 염기인식분자 또는 표식화 또는 고정화된 본 발명의 미스매치 염기인식분자를 사용하여, DNA중의 미스매치하고 있는 염기의 쌍을 검출, 동정 또는 정량하기 위한 방법을 제공하는 것이다.
- [0076] 본 발명의 미스매치 인식분자의 염기인식부위를 이용하는 것에 의해, 1개 또는 2개 이상의 미스매치의 염기의 쌍을 갖는 DNA에서, 특정한 미스매치의 염기의 쌍, 예를 들면, G-G 미스매치, G-A 미스매치 등의 특정한 미스매치를 하고 있는 염기와 수소결합을 형성시켜 이것을 안정화시킬 뿐만 아니라, 근방, 바람직하게는 인접하는 염기쌍에 스택되어, 미스매치의 염기의 쌍이 존재하고 있음에도 불구하고 비교적 안정된 DNA를 얻을 수 있다.
- [0077] 따라서, 본 발명은 본 발명의 미스매치 인식분자의 염기인식부위가 특정한 미스매치의 염기의 쌍에 있어서의 해당 염기의 각각과 수소결합을 형성하고, 해당 염기의 근처에 존재하는 염기쌍에 스택되는 것에 의해 미스매치의 염기의 쌍이 안정화된 미스매치 염기쌍을 함유하는 DNA를 제공하는 것이다.
- [0078] 본 발명의 이 DNA는 미스매치의 염기의 쌍이 본 발명의 미스매치 인식분자의 염기인식부위와 수소결합에 의해 염기쌍과 마찬가지로의 「쌍」(유사적인 염기쌍)을 형성하고, 또한 미스매

치의 염기와「쌍」을 형성하고 있는 본 발명의 미스매치 인식분자의 염기인식부위가 근방, 바람직하게는 인접의 염기쌍을 형성하고 있는 염기에 샌드위치형상으로 끼워져 선택되어 있는 것을 특징으로 하는 것이다.

- [0079] 본 발명의 미스매치인식분자를 이용하는 것에 의해, 종래의 기술에서는 달성할 수 없었던 미스매치의 염기의 쌍을 고감도로 또한 간편하게 검출, 동정 또는 정량하는 것이 가능하고, 미스매치의 염기의 쌍에 특이적이고 또한 안정적인 DNA를 형성하는 것으로부터, DNA 손상에 따른 각종질환의 치료, 예방 또는 진단에 응용하는 것도 가능하다.
- [0080] 또한, 본 발명의 DNA는 미스매치의 염기의 쌍을 갖은 상태에서 비교적 안정적으로 존재할 수 있는 것에서, 미스매치의 염기의 쌍을 함유하는 DNA의 안정화나, 미스매치의 발생원인이거나 미스매치의 수복기구의 해명 등의 연구재료로서 이용하는 것도 가능하다.
- [0081] 또한, 본 발명은, 검체가 되는 한개의 사슬의 DNA 또는 RNA와, 그것에 대응하는 정상의 염기배열을 갖는 DNA 또는 RNA를 하이브리다이즈시키고, 이어서 해당 하이브리다이즈한 DNA 또는 RNA에서의 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 상기한 본 발명의 미스매치인식분자를 이용하여, 해당 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍에 유사적으로 염기쌍을 형성시켜, 해당 유사적인 염기쌍의 형성을 측정하는 것으로 이루어지는 정상의 염기쌍을 형성할 수 없는 염기의 쌍을 검출, 동정하는 것으로 된 DNA 또는 RNA에서의 염기배열의 이상을 검출하는 방법을 제공하는 것이기도 한다. 이 방법은, 유전자의 이상의 유무를 조사하고 싶을 때 등에 이용할 수 있다.
- [0082] 예를 들면, 이상의 가능성이 있는 DNA 또는 그 전사산물인 RNA를 채취하여, 이것과 정상의 염기배열을 갖는 상보적(相補的)인 DNA 또는 RNA와 하이브리다이즈시켜 두개의 사슬의 핵산을 생성시킨다. 만약 채취한 유전자의 염기배열에 이상이 있으면, 당해 이상의 개소의 염기에 있어서 염기의 쌍에 미스매치가 발생하게 된다. 이 미스매치가 발생하는 두개의 사슬의 핵산에 본 발명의 미스매치 인식분자를 추가하는 것에 의해 상기한 유사적인 염기의 쌍이 형성되고, 이 새로운 쌍이 형성된 분자의 유무를 측정하는 것에 의해 채취된 유전자의 이상을 간편하고 또한 고감도로 검출, 동정할 수 있다.
- [0083] 상기한 새로운 쌍(본 발명의 미스매치 인식분자와 미스매치의 염기와의 쌍)을 측정하기 위한 수단으로서, 화학발광이나 형광, 방사성 동위체 등의 표식화에 의하여도 행할 수 있다. 본 발명의 미스매치 인식분자는 저분자 유기화합물이며, 새로운 쌍을 형성한 경우에는 이 분자가 핵산중에 받아들여지기 때문에, 미반응의 본 발명의 미스매치 인식분자와 핵산류의 양자를 비교적 간편하게 분리할 수 있다.
- [0084] 또한, 상기한 바와 같이 본 발명의 미스매치 인식분자를 담체에 고정화하여 사용할 수도 있다. 예를 들면, 본 발명의 각종의 미스매치에 특이적인 미스매치 인식분자를 타이타플레이트 등의 플레이트에 고정화하고, 이것에 상기의 두개의 사슬의 핵산, 바람직하게는 표식화된 핵산을 가하여, 수분간 인큐베이트 한 후, 핵산류를 제거하면 본 발명의 미스매치 인식분자와 특이적으로 반응한 핵산은 고정화된 본 발명의 미스매치 인식분자에 트랩되고, 표식에 의해 검출, 동정할 수 있게 된다.
- [0085] 또한, 본 발명의 미스매치 인식분자를 표면플라즈몬공명(SPR)의 검출용 칩의 금속 박막상에 고정화하는 것도 가능하다. 이 SPR에 의한 경우에는, 상기의 두개의 사슬의 핵산을 함유하는 시료액을 검출용 칩의 표면에 흘리는 것만으로, 미스매치의 유무를 특이적으로 검출하는 것이 가능해진다.

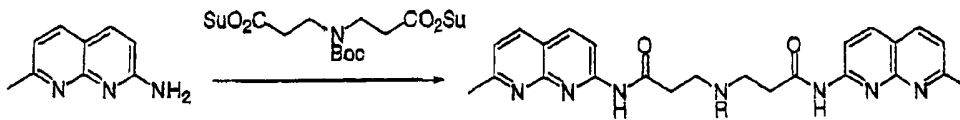
[0086] 더욱이, 다른 많은 검출수단에 본 발명의 미스매치 인식분자를 응용하는 것도 가능하고, 본 발명은 이것들의 특정한 검출수단에 한정되는 것이 아니다.

[0087] 이하에, 구체적인 실시예에 의하여 본 발명을 상세히 설명하지만, 본 발명은 이것들의 구체예에 한정되는 것이 아니다.

[0088] 실시예 1 : 식(III)의 화합물의 합성

[0089] 다음식에 나타내는 화학반응에 따라 표기의 화합물을 합성했다.

[0090]



[0091] (식 중의 Boc는 t-부톡시카르보닐기를 나타낸다.)

[0092] N-Boc화 디카르본산의 썩신이미딜에스테르(313 mg, 0.74mmol)를 클로로포름 (15 mL)에 녹여, 2-아미노-7-메틸-1, 8-나프티리딘(294mg, 1, 85 mmol)를 가했다. 실온에서 48시간 반응후, 후처리에 의해 Boc화 디나프티리딘아미드를 얻었다. 이것을 4N의 염산을 함유하는 초산에틸에 용해하여, 실온으로 2시간반응하면, 표기의 디나프티리딘아미드가 통산수율 13%로 얻어졌다.

[0093] $^1\text{H NMR}(\text{CD}_3\text{OD}, 400\text{MHz}) \delta$:

[0094] 8.26(d, 2H, J=8.8 Hz), 8.14(d, 2H, J=8.8Hz), 8.11(d, 2H, J=8.0Hz),

[0095] 7.34(d, 2H, J=8.0 Hz), 3.20(t, 4H, J=6.0Hz), 2.84(t, 4H, J=6.0Hz),

[0096] 2.68(s, 6H);

[0097] FABMS(NBA), m/e(%): 444[(M+H)⁺, 10),

[0098] 246(40), 154(100);

[0099] HRMS 계산값: C₂₄H₂₆O₂N₇ [(M+ H)+]444.2146,

[0100] 실측값: 444.2148.

[0101] 실시예 2

[0102] 5'말단을 ^{32}P 에서 라벨한 52염기의 DNA를 G-G 및 G-A의 미스매치가 발생하도록 하이프리다이저시켜 두개의 사슬 DNA로 하였다(도 1의 오른쪽참조).

- [0103] 이 두개의 사슬의 DNA에 각종의 농도의 실시예 1에서 얻어진 화합물을 가하여, DNaseI 풋프린팅적정에 의해 조사했다.
- [0104] 즉, 이 두개의 사슬의 DNA(<4 nM 스트랜드농도)를 NaCl(100mM) 및 MgCl₂(5mM)을 포함하는 트리스 염산완충액(10mM, pH7.6)으로 여러가지의 농도로 조정된 실시예1에서 얻어진 화합물과 함께, 4°C에서 12시간 인큐베이트했다. 이것에, 0.2U의 DNaseI(DNA 가수분해효소)를 가하여, 25°C에서 8분간 인큐베이트하였다. 그 후, 에탄올 침전에 의하여 DNA를 회수하고, 이것을 12% 폴리아크릴아미드 및 7M 요소를 함유하는 겔을 이용하여 전기영동했다.
- [0105] 이 결과를 도 1에 도시한다.
- [0106] 본 발명의 미스매치 인식분자를 이용하는 것에 의해, 종래의 기술에서는 달성할 수 없었던 구아닌-구아닌미스매치 등의 미스매치하고 있는 염기의 쌍을 고감도로 또한 간편하게 검출할 수 있다.

