



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월11일  
(11) 등록번호 10-1517493  
(24) 등록일자 2015년04월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)  
G01N 33/58 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2012-0138864  
(22) 출원일자 2012년12월03일  
심사청구일자 2012년12월03일  
(65) 공개번호 10-2014-0072356  
(43) 공개일자 2014년06월13일  
(56) 선행기술조사문헌  
US20090197254 A1\*  
JP2002538839 A\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
(주)에스엘에스  
경기 수원시 영통구 이의동 중소기업지원센터  
실험연구동 1층  
(72) 발명자  
문해란  
서울 광진구 아차산로 262, D동 4402호 (자양동,  
더샵스타시티)  
(74) 대리인  
이종우

전체 청구항 수 : 총 1 항

심사관 : 이준혁

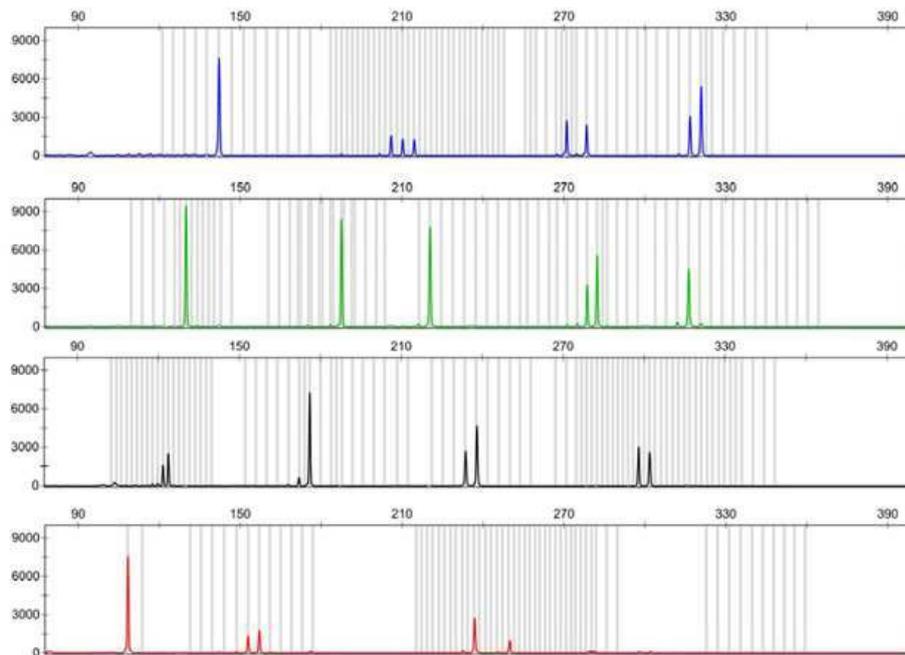
(54) 발명의 명칭 **형광표지물질 및 이동성 표지자를 사용한 효율적인 다중 PCR 방법**

(57) 요약

본 발명은 형광표지물질 및 이동성 표지자를 사용한 효율적인 다중 PCR 방법에 관한 것으로, 구체적으로 하나의 반응액에서 표적이 다른 둘 이상의 PCR을 시도하기 위해 둘 이상의 프라이머 세트를 사용하며, 각 프라이머 세트에 속하는 하나 이상의 프라이머를 각 프라이머 세트에 따라 다른 표지물질로 표지함으로써 표적에 따른 PCR 증

(뒷면에 계속)

대표도 - 도8



폭산물을 구분하는 다중 PCR에 있어서, 프라이머 세트에 따른 표지물질의 조합으로 6-FAM, JOE, ALEXA 546 및 ALEXA 568로 이루어진 조합을 사용하는 것을 특징으로 하는 다중 PCR 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 4가지 이상 다수의 표적에 대한 다중 PCR에서도 각 표적에 대한 PCR 증폭산물을 명확하게 식별할 수 있어, 유전자 검사, 샘플 내의 생물체 동정, 미생물 또는 바이러스의 감염 여부 진단과 같이 다수의 표적 DNA 또는 RNA의 존재여부 확인이 필요한 경우, 빠르고 간편한 방법으로 정확한 결과를 확인할 수 있다. 특히, 짧은 반복 서열을 표적으로 하는 경우에도 효과적으로 증폭여부를 확인할 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	S2057497
부처명	중소기업청
연구관리전문기관	한국산업기술평가관리원
연구사업명	중소기업청 기술개발지원사업 투자연계과제
연구과제명	유전자감식용 16개 STR 다중증폭 PCR 키트의 개발
기여율	1/1
주관기관	주식회사 에스엘에스
연구기간	2012.07.01 ~ 2014.06.30

---

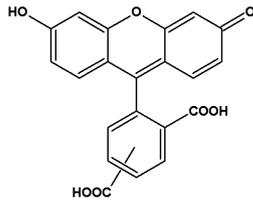
**명세서**

**청구범위**

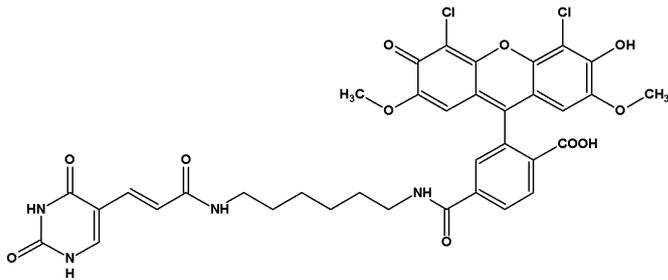
**청구항 1**

하나의 반응액에서 표적이 다른 둘 이상의 PCR을 시도하는 다중 PCR 방법에 있어서,  
 프라이머로 서열번호 1 내지 32의 프라이머를 사용하고,  
 서열번호 1 및 서열번호 2 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머,  
 서열번호 3 및 서열번호 4 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머,  
 서열번호 5 및 서열번호 6 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머 및  
 서열번호 7 및 서열번호 8 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머는 화학식 1의 6-카르복시플루오레신으로 표지된 것이며,  
 서열번호 9 및 서열번호 10 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머,  
 서열번호 11 및 서열번호 12 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머,  
 서열번호 13 및 서열번호 14 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머,  
 서열번호 15 및 서열번호 16 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머 및  
 서열번호 17 및 서열번호 18 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머를 화학식 2의 6-카르복시-2',7'-디메톡시-4',5'-디클로로플루오레신으로 표지된 것이고,  
 서열번호 19 및 서열번호 20 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머,  
 서열번호 21 및 서열번호 22 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머,  
 서열번호 23 및 서열번호 24 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머 및  
 서열번호 25 및 서열번호 26 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머를 화학식 3의 6-[2-카르복시-5-[[2-[(5-카르복시펜틸)아미노]-2-옥소에틸]티오]-3,4,6-트리클로로페닐]-1,2,3,4,8,9,10,11-옥타히드로-2,2,4,8,10,10-헥사메틸-12,14-디술포-파이라노[3,2-g:5,6-g]디퀴놀린-13-이움으로 표지된 것이며,  
 서열번호 27 및 서열번호 28 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머,  
 서열번호 29 및 서열번호 30 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머 및  
 서열번호 31 및 서열번호 32 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머를 화학식 4의 [1,10-디히드로-2,2,10,10-테트라메틸-4,8-비스(술포메틸)-2H-파이라노[3,2-g:5,6-g]디퀴놀린-6-일]-벤젠디카르복실산으로 표지된 것이고,  
 상기 서열번호 7 및 서열번호 8 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머,  
 상기 서열번호 13 및 서열번호 14 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머,  
 상기 서열번호 15 및 서열번호 16 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머,  
 상기 서열번호 17 및 서열번호 18 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머 및  
 상기 서열번호 23 및 서열번호 24 중에서 선택된 어느 하나의 프라이머는 헥사 에틸렌 옥사이드를 단위체로 하는 링커가 프라이머와 표지물질 사이에 포함된 것임을 특징으로 하는 다중 PCR 방법.

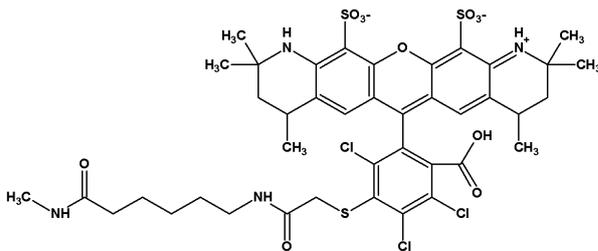
< 화학식 1 >



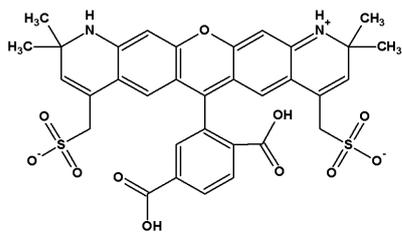
< 화학식 2 >



< 화학식 3 >



< 화학식 4 >



**청구항 2**

삭제

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001]

본 발명은 형광표지물질 및 이동성 표지자를 사용한 효율적인 다중 PCR 방법에 관한 것으로, 구체적으로 프라이머를 표지물질로 표지함으로써 PCR 반응으로 생성된 증폭산물을 표지물질로 식별하는 방법을 사용하며, 하나의 표적에는 한 종류의 표지물질 만을 사용하고, 한 표적의 증폭을 위해 사용되는 프라이머 중 하나 이상의 프라이머를 표지물질로 표지하며, 표지물질로 6-FAM, JOE, ALEXA 546 및 ALEXA 568을 사용하는 것을 특징으로 하는 다중 PCR 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0002] 다중 PCR(중합효소연쇄반응, polymerase chain reaction)은 한 번의 반응을 통해 여러 표적 DNA 혹은 RNA를 동시에 증폭할 수 있는 방법으로 다른 방법에 비해 비교적 빠르고 간편하게 수행할 수 있으므로 주로 유전자 검사, 샘플 내의 생물체 동정, 미생물 또는 바이러스의 감염 여부를 진단하기 위해 사용된다.
- [0003] 다중 PCR 방법에서 가장 보편적으로 사용하는 방법은 표적에 따라 PCR 증폭산물의 크기가 다르게 나타나도록 프라이머를 설계함으로써 증폭산물의 크기를 분석하여 해당 표적의 증폭여부를 구분하는 방법인데, 이 경우 한 번에 증폭시킬 수 있는 유전자의 수가 일반적으로 3 ~ 4개에 불과하다. 이는 프라이머들 서로 간의 경쟁이나 간섭 효과 때문이기도 하지만, 일반적인 DNA 중합효소가 1kb 이내의 중합에서 최적의 증폭효율을 보이므로 이 범위 내에서 증폭산물의 크기를 구분할 수 있도록 하기 위해서는 그 선택범위가 매우 한정적이며, 프라이머들 간의 최적의 온도조건, 반응 물질들의 농도 등을 고려했을 때 원하는 유전자 증폭산물의 크기가 겹치는 경우가 발생하기 때문이다.
- [0004] 유전자 검사나 미생물 또는 바이러스 감염 진단을 위해서는 대부분 많은 수의 표적을 대상으로 하여 PCR을 수행하여야 하는데, 한 번의 PCR 반응을 통해 적은 수의 표적만을 식별할 수 밖에 없다면 표적을 바꾸면서 수차례 반복하여 PCR을 수행하여야 하기 때문에 시간과 비용, 인력 등이 많이 소요되는 문제가 있다. 특히 감염 진단의 경우에는 결과를 신속하게 확인하여야 하기 때문에 이는 매우 큰 단점이 될 수 있다.
- [0005] 이를 해결하기 위해 은염색이나, 방사성, 색소 등을 이용하여 다중 PCR의 표적 수를 확대하고자 하는 방법(대한민국 등록특허 제10-0277289호)이 있으나, 이러한 방법들은 일반적인 아가로즈 전기영동에 비해 결과분석에 많은 시간과 숙련성이 요구되고, 실질적으로 표적 수를 증가시키고자 하는 면에서는 크게 개선되지는 못하는 실정이다.
- [0006] 또한, 특히 짧은 반복 서열(STR, short tandem repeat)을 표적으로 하여 다중 PCR을 실시하는 경우, PCR 증폭산물이 단일크기로만 생성되는 것이 아니라 다양한 크기로 생성되기 때문에 각 표적에 따른 증폭여부를 확인하는 것이 매우 어려워진다.
- [0007] 이에 본 발명자는 다중 PCR을 수행하는데 있어서 보다 쉽고 빠르며 효율적인 방법을 통해 각 PCR 증폭산물을 보다 명확하게 구분할 수 있도록 함으로써 한 번에 많은 표적을 대상으로 다중 PCR을 수행할 수 있는 방법을 개발하기 위해 예의 연구 노력하였다.
- [0008] 이의 결과, 기존에 DNA, RNA 또는 단백질 등의 표지를 위해 사용되는 형광물질을 프라이머에 적용하되, 표적에 따른 프라이머에 적용하는 각 형광물질로 6-FAM, JOE, ALEXA 546, ALEXA 568을 사용하여 다중 PCR을 수행하면 PCR 산물의 크기가 동일하거나 유사하더라도 적어도 4종류의 표적 증폭을 명확하게 구분할 수 있으며, 여기에 이동성 표지자 즉 PCR 산물의 분자량을 조절할 수 있고 PCR 반응에는 거의 영향을 미치지 않는 헥사 에틸렌 옥사이드를 프라이머와 형광물질의 링커로 적용하는 경우 보다 많은 종류의 표적 증폭을 명확하게 식별할 수 있고, 특히 이러한 방법을 짧은 반복 서열을 표적으로 하는 다중 PCR에 도입하는 경우 기존의 다른 방법에 비해 매우 효율적으로 증폭 여부를 식별할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

- [0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0277289호

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0010] 따라서 본 발명의 주된 목적은 한 번에 많은 종류의 표적을 대상으로 다중 PCR을 수행하여 이 결과를 명확하게

분석하기 위한 방법을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 이를 위해 프라이머에 표지하는 형광물질의 조합 중 최적의 조합을 제공하는데 있다.

**과제의 해결 수단**

[0012] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 하나의 반응액에서 표적이 다른 둘 이상의 PCR을 시도하는 다중 PCR에 있어서, 프라이머를 표지물질로 표지함으로써 PCR 반응으로 생성된 증폭산물을 표지물질로 식별하는 방법을 사용하며, 하나의 표적에는 한 종류의 표지물질 만을 사용하고, 한 표적의 증폭을 위해 사용되는 프라이머 중 하나 이상의 프라이머를 표지물질로 표지하며,

[0013] 상기 표지물질로

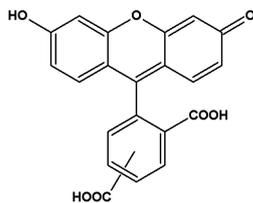
[0014] 화학식 1의 6-카르복시플루오레신(6-carboxyfluorescein);

[0015] 화학식 2의 6-카르복시-2',7'-디메톡시-4', 5'-디클로로플루오레신(6-carboxy-2',7'-dimethoxy-4',5'-dichlorofluorescein);

[0016] 화학식 3의 6-[2-카르복시-5-[[2-[(5-카르복시펜틸)아미노]-2-옥소에틸]티오]-3,4,6-트리클로로페닐]-1,2,3,4,8,9,10,11-옥타히드로-2,2,4,8,10,10-헥사메틸-12,14-디술포-피라노[3,2-g:5,6-g]디퀴놀린-13-이움 {6-[2-carboxy-5-[[2-[(5-carboxypentyl)amino]-2-oxoethyl]thio]-3,4,6-trichlorophenyl]-1,2,3,4,8,9,10,11-octahydro-2,2,4,8,10,10-hexamethyl-12,14-disulfo-Pyrano[3,2-g:5,6-g]diquinolin-13-ium); 및

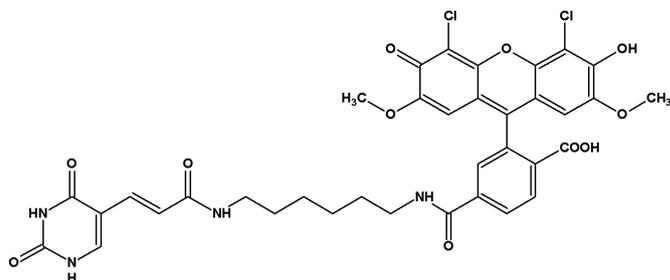
[0017] 화학식 4의 [1,10-디히드로-2,2,10,10-테트라메틸-4,8-비스(술포메틸)-2H-피라노[3,2-g:5,6-g]디퀴놀린-6-일]-벤젠디카르복실산 {[1,10-dihydro-2,2,10,10-tetramethyl-4,8-bis(sulfomethyl)-2H-pyrano[3,2-g:5,6-g]diquinolin-6-yl]-Benzenedicarboxylic acid};을 모두 사용하는 것을 특징으로 하는 다중 PCR 방법을 제공한다.

[0018] < 화학식 1 >



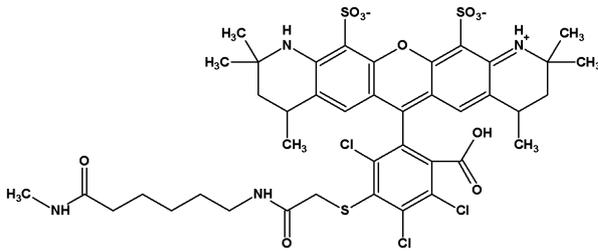
[0019]

[0020] < 화학식 2 >



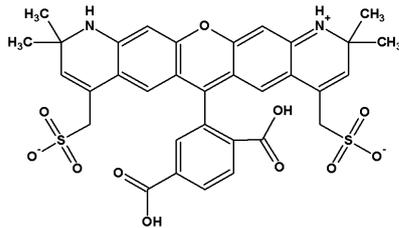
[0021]

[0022] < 화학식 3 >



[0023]

[0024] < 화학식 4 >



[0025]

[0026] 본 발명의 다중 PCR 방법에 있어서, 하나의 표지물질을 둘 이상의 표적에 사용하는 경우, 프라이머와 표지물질 사이에 링커를 포함시켜 PCR 증폭산물의 분자량을 조절하며, 이때 링커로 헥사 에틸렌 옥사이드를 사용하는 것이 바람직하다. 헥사 에틸렌 옥사이드를 하나의 단위체로 하여 이 단위체가 1개 또는 2개 이상 반복되도록 구성하여 PCR 산물의 분자량을 조절할 수 있다. 헥사 에틸렌 옥사이드의 단위체 당 약 2.5bp의 DNA에 상응하는 분자량 차이를 나타낸다.

[0027] 상기 화학식 1의 표지물질은 6-FAM, 화학식 2의 표지물질은 JOE, 화학식 3의 표지물질은 ALEXA 546, 화학식 4의 표지물질은 ALEXA 568의 이름으로도 알려져 있으며 관련 제조사에 의해 제조 및 판매되고 있다. 이들 각 표지물질을 프라이머에 표지하는 방법은 공지의 기술이며, 이 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 제조사에서 제공하는 메뉴얼 등을 통해 용이하게 실시할 수 있으므로 자세한 설명은 생략하기로 한다.

[0028] 표적 DNA 또는 RNA를 증폭하기 위해서는 통상 서열이 다른 2종류의 프라이머를 사용하는데, 표적이 PCR을 통해 증폭되면 프라이머가 증폭산물에 포함되기 때문에, 2개의 프라이머 중 하나의 프라이머에만 표지를 하여도 최종 증폭산물에 표지가 된다. 따라서 표적 당 하나의 프라이머에만 표지를 하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 2개의 프라이머 모두에 표지를 하여 사용할 수도 있다.

[0029] 다중 PCR은 다수의 표적을 대상으로 하기 때문에, 4가지 또는 그 이상의 서로 다른 표적을 대상으로 하는 경우가 많다. 표적이 4가지일 경우, 각 표적에 해당하는 프라이머에 각각 6-FAM, JOE, ALEXA 546, ALEXA 568를 표지하면 되는데, 표적이 이보다 많을 경우에는 4가지 그룹으로 나누어 여기에 해당하는 프라이머를 각각의 표지물질로 표지할 수 있다.

[0030] 이 경우 같은 그룹에 속하는 표적이 증폭되면 증폭산물이 같은 표지물질로 표지된 상태가 되어 표지물질의 식별만으로는 해당표적의 증폭여부를 확실하게 구분하기 어렵기 때문에(도 5 참조), 증폭산물의 크기를 달리하는 방법 등 별도의 증폭산물 구분방법을 사용하여 증폭여부가 구분되도록 할 수 있다. 이를 위해 증폭산물의 크기를 달리하기 위하여 표적부위를 보다 좁거나 넓게 설정하여 프라이머를 제작하는 방법을 사용할 수 있으나, 프라이머의 서열을 변경해야 하고 성공적인 PCR의 조건 등 고려해야 할 것이 많기 때문에 제약이 따른다. 따라서 본 발명에서는 이 경우 프라이머와 표지물질 사이에 링커(이동성 표지자)를 포함시키는 것이 바람직하다. 이때 링커는 증폭산물의 전기영동 시 이동성을 다르게 하기 위해 사용되는 것으로, 본 발명에서는 이 링커로써 헥사 에틸렌 옥사이드를 사용하는 것이 바람직하다. 이 헥사 에틸렌 옥사이드 하나의 분자는 약 2.5bp DNA의 이동성과 같기 때문에 프라이머에 포함시키는 헥사 에틸렌 옥사이드 분자의 개수를 조절함으로써 증폭산물의 크기를 조절할

수 있으며, 최종 증폭산물의 이동성 또한 예측할 수 있게 된다(도 5 참조).

[0031] 본 발명의 다중 PCR 방법을 수행하기 위한 프라이머는 도 6과 같은 형태로 제조할 수 있다. 이때 도 6은 프라이머에 형광표지물질이 표지되고 링커가 포함된 형태이다.

[0032] 다중 PCR 중에서도 특히 짧은 반복 서열(STR, short tandem repeat)을 표적으로 하는 경우, PCR 증폭산물이 단일크기로만 생성되는 것이 아니라 다양한 크기로 생성되기 때문에 표적이 둘 이상이면 각 증폭산물의 식별 범위가 겹쳐져 구분이 어려운 경우가 많은데, 이때 본 발명의 다중 PCR 방법을 사용하면 다수의 STR을 표적으로 하더라도 각 STR의 증폭여부를 명확하게 구분할 수 있게 된다.

**발명의 효과**

[0033] 본 발명에 따르면 4가지 이상 다수의 표적에 대한 다중 PCR에서도 각 표적에 대한 PCR 증폭산물을 명확하게 식별할 수 있어, 유전자 검사, 샘플 내의 생물체 동정, 미생물 또는 바이러스의 감염 여부 진단과 같이 다수의 표적 DNA 또는 RNA의 존재여부 확인이 필요한 경우, 빠르고 간편한 방법으로 정확한 결과를 확인할 수 있다. 특히, 짧은 반복 서열을 표적으로 하는 경우에도 효과적으로 증폭여부를 확인할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0034] 도 1은 본 발명에서 프라이머의 표지를 위해 사용되는 6-카르복시플루오레신(6-carboxyfluorescein), 즉 6-FAM의 화학구조이다.

도 2는 본 발명에서 프라이머의 표지를 위해 사용되는 6-카르복시-2',7'-디메톡시-4',5'-디클로로플루오레신(6-carboxy-2',7'-dimethoxy-4',5'-dichlorofluorescein), 즉 JOE의 화학구조이다.

도 3은 본 발명에서 프라이머의 표지를 위해 사용되는 6-[2-카르복시-5-[[2-[(5-카르복시펜틸)아미노]-2-옥소에틸]티오]-3,4,6-트리클로로페닐]-1,2,3,4,8,9,10,11-옥타히드로-2,2,4,8,10,10-헥사메틸-12,14-디설포-피라노[3,2-g:5,6-g]디퀴놀린-13-이움{6-[2-carboxy-5-[[2-[(5-carboxypentyl)amino]-2-oxoethyl]thio]-3,4,6-trichlorophenyl]-1,2,3,4,8,9,10,11-octahydro-2,2,4,8,10,10-hexamethyl-12,14-disulfo-Pyrano[3,2-g:5,6-g]diquinolin-13-ium}, 즉 ALEXA 546의 화학구조이다.

도 4는 본 발명에서 프라이머의 표지를 위해 사용되는 [1,10-디히드로-2,2,10,10-테트라메틸-4,8-비스(술포메틸)-2H-피라노[3,2-g:5,6-g]디퀴놀린-6-일]-벤젠디카르복실산{[1,10-dihydro-2,2,10,10-tetramethyl-4,8-bis(sulfomethyl)-2H-pyrano[3,2-g:5,6-g]diquinolin-6-yl]-Benzenedicarboxylic acid}, 즉 ALEXA 568의 화학구조이다.

도 5는 프라이머에 링커를 포함시키지 않고 다중 PCR을 실시한 일실시예(A) 및 링커를 포함시켜 다중 PCR을 실시한 일실시예(B)의 분석결과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 본 발명의 일실시예에 따라 형광물질 및 링커가 표지된 프라이머를 나타내는 개요도이다.

도 7은 6-FAM, JOE, TAMRA, ALEXA 568를 형광물질로 사용한 다중 PCR의 분석결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 6-FAM, JOE, ALEXA 546, ALEXA 568를 형광물질로 사용한 다중 PCR(본 발명의 일실시예)의 분석결과를 나타낸 그래프이다.

도 9는 6-FAM, HEX, TAMRA, ALEXA 568를 형광물질로 사용한 다중 PCR의 분석결과를 나타낸 그래프이다.

도 10은 6-FAM, HEX, ALEXA 546, ALEXA 568를 형광물질로 사용한 다중 PCR의 분석결과를 나타낸 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0035] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0036] < 실시예 >

[0037]

1. 프라이머 준비

[0038]

16가지의 표적 DNA를 대상으로 하는 다중 PCR을 실시하였다.

[0039]

16가지의 표적 DNA는 특별한 형질을 암호하지 않는 STR 부위를 대상으로 선별하였으며, 각 표적에 따른 프라이머는 표 1과 같다.

[0040]

16가지 표적을 4가지 그룹으로 나누어 각 그룹의 표적을 증폭하기 위한 프라이머를 표 2의 조합에 따라 각 형광물질로 표지하였다.

[0041]

각 형광물질은 Invitrogen 사(미국)의 제품을 사용하였으며, IDT 사에 합성을 의뢰하여 형광물질이 표지된 프라이머를 제조하였다.

[0042]

각 프라이머 세트 중 한쪽의 프라이머에만 5' 말단에 형광물질을 표지하였고, 나머지 프라이머는 표지하지 않았다.

표 1

[0043]

표적부위	정방향/ 역방향/ [형광 라벨링]
8S1179	5'-TAACACAAGTTGGGGAAGCAT-3' 5'-[제1형광물질]-GATAGCAAGAAGGGCTTCC-3'
21S11	5'-[제1형광물질]-AGCAAACCTCATCCACTTGG-3' 5'-TTCCTGTCCTCTAATGTAACCTACC-3'
7S820	5'-[제1형광물질]-AACAGGATCAATGGATGCAT-3' 5'-TGGCTTTTAGACCTGGACTG-3'
CSF1PO	5'-CCTTGGGGATATAGCCTAA-3' 5'-[제1형광물질]-TGAGTGACAGAGTGATACCATG-3'
D3S1358	5'-[제2형광물질]-CAAGGATGGGTGGATCAATA-3' 5'-TTGTATGAGCCACTTCCCAT-3'
TH01	5'-[제2형광물질]-TGTGAGCCAAGCCTTATAG-3' 5'-GTCTGGTTCTCCAAGAAA-3'
13S317	5'-[제2형광물질]-ACAAAACCCCAAGTACGTGA-3' 5'-TATGACAGGCATCTGGGAGT-3'
16S539	5'-[제2형광물질]-GAGCCAGACCTTGTCTCAA-3' 5'-AAGGGATTTTAGGAAGTACG-3'
D2S1338	5'-[제2형광물질]-GGGTGATTTTCTCTTTGGT-3' 5'-TGATTCCAATCATAGCCACA-3'
D19S433	5'-[제3형광물질]-ACAGAAGTCTGGGATGTGA-3' 5'-GCCAAAAAGACAGACAGAA3'
vWA	5'-[제3형광물질]-ATAGACAGACAGCGGACTG-3' 5'-GGGAGTGGAGATTACCCCT-3'
TPOX	5'-[제3형광물질]-AGATAGCCTTACAGTCACA-3' 5'-AAGTCAGTCACCATGCAAAAAGTA-3'
D8S51	5'-[제3형광물질]-TCCCATGCCAAAATTCTTAG-3' 5'-GAAAGAAAGAGAAAGAAGGAAGG-3'
Amelogenin	5'-[제4형광물질]-GTGGATAGACACATGACAGATAGG-3' 5'-TATTTGGCAAGGATAGATACAGG-3'
D5S818	5'-[제4형광물질]-CATCATCTGCACTCCACAAA-3' 5'-TGTCATCGACAGATGAATG-3'
FGA	5'-[제4형광물질]-TGGTCTCTCTCATAACGAC-3' 5'-TGGGGAGTCTTTGTGTGATT-3'

표 2

[0044]

	조합1	조합2	조합3	조합4
제1형광물질	6-FAM	6-FAM	6-FAM	6-FAM
제2형광물질	JOE	JOE	HEX	HEX
제3형광물질	TAMRA	ALEXA 546	TAMRA	ALEXA 546

제4형광물질	ALEXA 568	ALEXA 568	ALEXA 568	ALEXA 568
--------	-----------	-----------	-----------	-----------

[0045] 2. PCR

[0046] 인간의 유전체 DNA(Human genomic DNA)를 주형으로 하고 상기 1에서 준비한 각 조합에 따른 프라이머로 다중 PCR을 수행하였다. 하나의 반응혼합물의 조성은 표 3과 같이 하였으며, PCR 조건은 표 4와 같이 하였다.

표 3

반응 혼합물의 조성	농도
Tris Cl, pH 8.3	10mM
KCl	50mM
MgCl2	1.5mM
BSA	60µg/ml
dNTP	200 µM
Sodium Azide	0.05%
Primers	각 프라이머 당 0.4 µM

표 4

Thermal cycler 온도	시간	반복수
95℃	11분	1회
94℃	30초	30회
58℃	1분	
72℃	30초	
60℃	45분	1회

[0049] 3. PCR 산물 분석

[0050] 상기 2의 다중 PCR 반응을 통해 증폭된 산물을 전기영동을 통하여 분리하여 검출함으로써 증폭된 유전자들을 평가하였다.

[0051] 분석 장비는 3130x1 Genetic Analyzer 16-capillary(어플라이드 바이오시스템즈)를 사용하였고, 장비의 매뉴얼에 따라 증폭산물 2µl와 Fluorescent loading buffer mixture(Formamide : LIZ500, 24 : 1) 15µl을 혼합하여 95℃에서 3분 가열한 다음 얼음에서 3분간 방치한 후 전기영동을 실시하여 분석하였다.

[0052] 이의 결과 5가지 표적은 각 증폭산물의 크기 범위가 다른 표적의 증폭산물과 겹치는 것으로 나타났다.

[0053] 4. 형광물질 및 링커가 포함된 프라이머를 이용한 다중 PCR

[0054] 상기 3의 결과에 따라 증폭산물의 크기가 겹치는 문제를 해결하기 위해, 표 5와 같이 해당 프라이머에 헥사 에틸렌 옥사이드(HEO) 링커를 포함시켜 프라이머를 준비하였다. 링커는 형광물질이 표지된 프라이머에 포함시켰으며, 형광물질과 프라이머의 사이에 위치하도록 하였다(도 6 참조).

[0055] 링커로 사용한 헥사 에틸렌 옥사이드는 1분자씩 표지할 때마다 평균 2.5bp DNA가 증가한 것과 동일한 전기영동상의 크기가 관찰되므로 원하는 이동간격 만큼 표지하였다.

표 5

표적부위	이동간격	프라이머에 포함된 HEO 분자수
CSF1PO	25bp	10
16S539	20bp	8
2S1338	15bp	6
13S317	12bp	5
TPOX	7bp	3

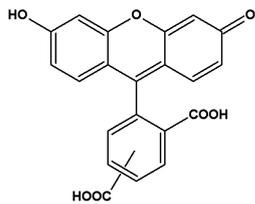
[0057] 준비된 프라이머를 이용하여 상기 2에서와 동일한 방법으로 다중 PCR을 실시하였으며, 상기 3에서와 같은 방법으로 분석한 결과를 도 7 내지 10에 나타내었다.

[0058] 이 결과에서 알 수 있듯이, 표지물질의 조합1, 3 및 4에서는 형광물질 사이에 간섭현상이 발생하기 때문에, 해당 형광물질의 피크가 실제로 어떤 표적에 대한 증폭산물인지 구분하기 어렵다는 문제가 있는 반면, 조합2의 경우에는 형광물질 서로 간에 간섭현상이 전혀 나타나지 않기 때문에 각 표적에 대한 증폭산물을 명확하게 구분할 수 있다.

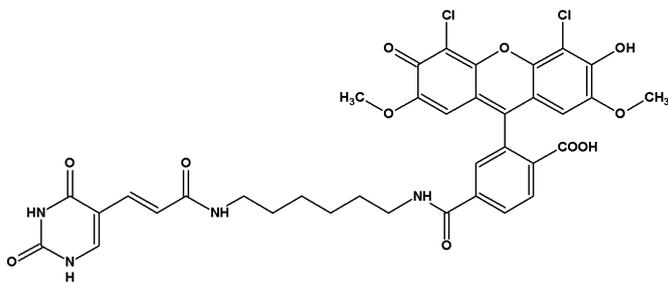
[0059] 또한, 링커를 사용함으로써 증폭산물의 크기 범위가 겹쳐 구분이 어려웠던 것 또한 명확하게 구분할 수 있음을 확인하였다.

**도면**

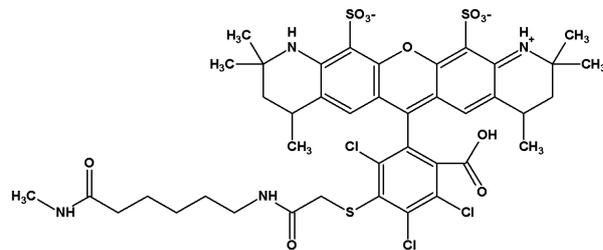
**도면1**



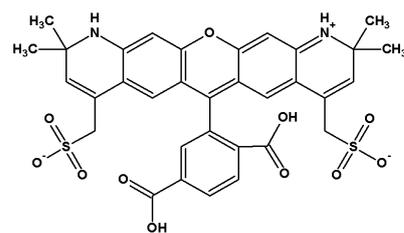
**도면2**



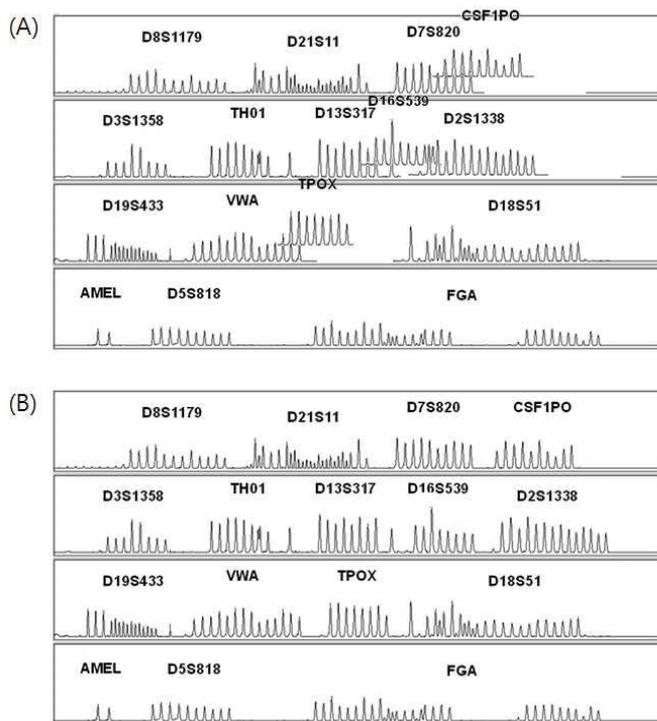
**도면3**



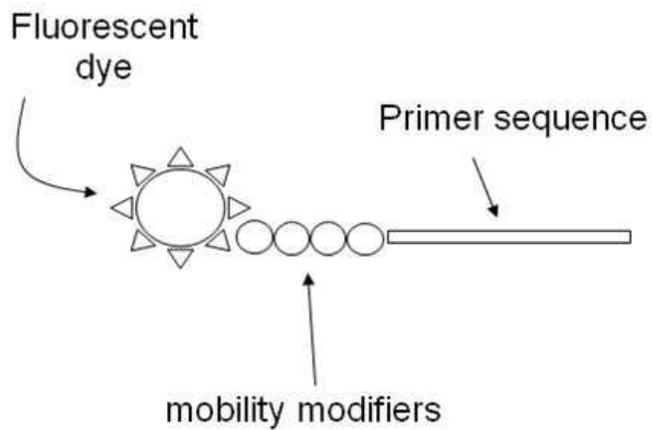
**도면4**



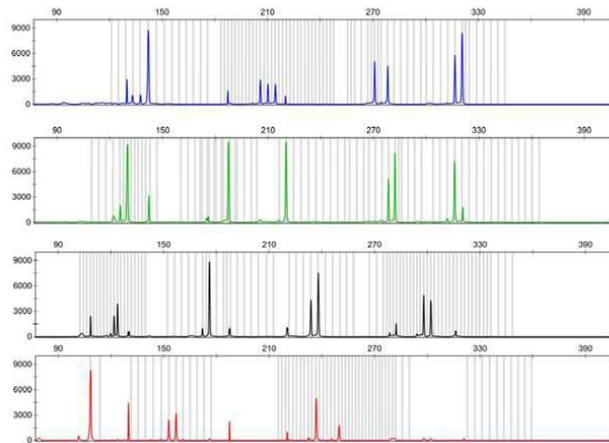
도면5



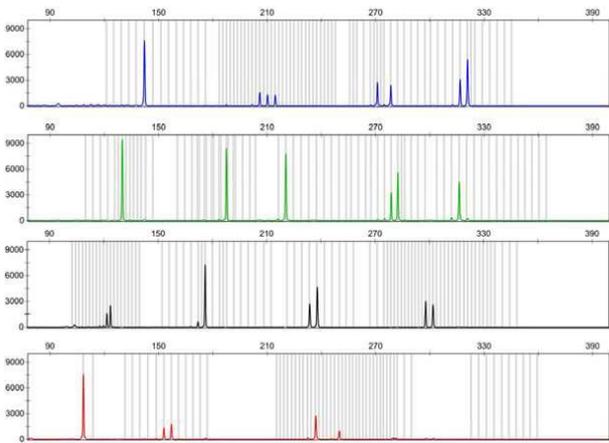
도면6



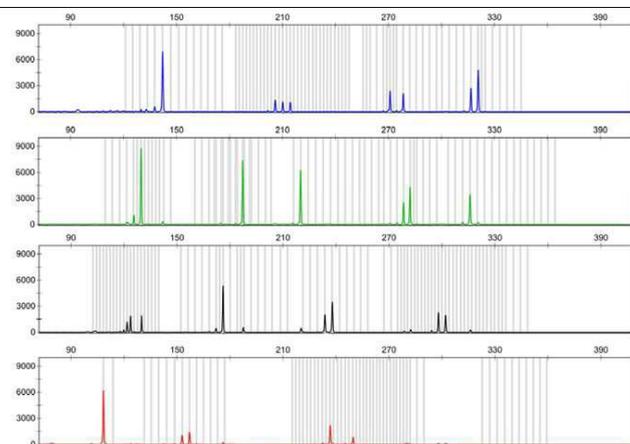
도면7



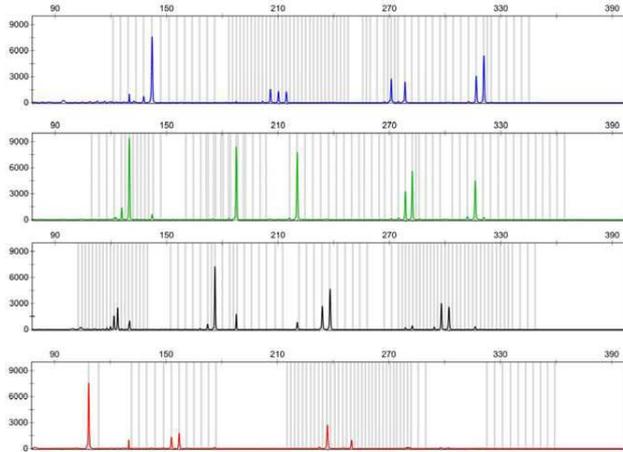
도면8



도면9



도면10



서열목록

<110> Specialty Lab Solution Co., Ltd.

<120> Efficient Multiplex PCR method using fluorescent markers and mobility markers

<130> PA120918-C01

<160> 32

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 8s1179

<400> 1

taacacaagt tgggggaagc at

22

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 8s1179

<400> 2

gatagcaaga agggctttcc

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer for 21S11  
 <400> 3  
 agcaaacttc atccacttgg 20  
 <210> 4  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer for 21S11  
 <400> 4  
 ttctgtcct ctaatgtaac ttacc 25  
 <210> 5  
 <211> 20  
  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer for 7S820  
 <400> 5  
 aacaggatca atggatgcat 20  
 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer for 7S820  
 <400> 6  
 tgcttttag acctggactg 20  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer for CSF1P0  
 <400> 7  
 ccttggggga tatagcctaa 20

<210> 8  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer for CSF1PO  
 <400> 8  
 tgagtgacag agtgatacca tg 22  
 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer for D3S1358  
 <400> 9  
 caaggatggg tggatcaata 20  
 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer for D3S1358  
 <400>  
 10  
 ttgtatgagc cacttcccat 20  
 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer for TH01  
 <400> 11  
 tgtgagccaa ggccttatag 20  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer for TH01  
 <400> 12

gtctgggttc tccaaagaaa	20
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer for 13S317	
<400> 13	
acaaaacccc aagtacgtga	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer for 13S317	
<400> 14	
tatgacaggc atctgggagt	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer for 16S539	
<400> 15	
gagccagacc ttgtctcaaa	20
<210> 16	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer for 16S539	
<400> 16	
aagggatttt aggaactgat acg	23
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Primer for D2S1338  
 <400> 17  
 gggtgatttt cctctttggt 20  
 <210> 18  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer for D2S1338  
 <  
 400> 18  
 tgattccaat catagccaca 20  
 <210> 19  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer for D19S433  
 <400> 19  
 acagaagtct gggatgtgga 20  
 <210> 20  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer for D19S433  
 <400> 20  
 gcccaaaaag acagacagaa 20  
 <210> 21  
 <211  
 > 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer for vWA  
 <400> 21  
 atagacagac agacggactg 20  
 <210> 22  
 <211> 19

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer for vWA	
<400>	22	
	gggagtggag attaccct	19
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer for TPOX	
<400>	23	
	agatagcctt tacagtcaca	20
<210>	24	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer for TPOX	
<400>	24	
	aagtcagtca ccatgcaaaa agta	24
<210>	25	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer for D8S51	
<400>	25	
	tcccatgcca aaattcttag	20
<210>	26	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer for D8S51	
<400>	26	
	gaaagaaaga gaaagaagga agg	23

<210>	27	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer for Amelogenin	
<400>	27	
	gtggatagac acatgacaga tagg	24
<210>	28	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer for Amelogenin	
<400>	28	
	tatttggcaa ggatagatac agg	23
<210>	29	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer for D5S818	
<400>	29	
	catcatctgc actccacaaa	20
<210>	30	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer for D5S818	
<400>	30	
	tgtccatcga cagatgaatg	20
<210>	31	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer for FGA	
<400>	31	

tggtctcttc ctcataacga c

21

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for FGA

<400> 32

tgggggagtc tttgtgtgat t

21