



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년05월31일  
(11) 등록번호 10-1984700  
(24) 등록일자 2019년05월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2018.01)  
(21) 출원번호 10-2012-0131026  
(22) 출원일자 2012년11월19일  
심사청구일자 2017년03월24일  
(65) 공개번호 10-2014-0064094  
(43) 공개일자 2014년05월28일  
(56) 선행기술조사문헌  
W02010120803 A2\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
삼성전자주식회사  
경기도 수원시 영통구 삼성로 129 (매탄동)  
(72) 발명자  
박동현  
강원 춘천시 춘주로 174, 104동 1205호 (퇴계동, 그린타운아파트)  
홍성우  
경기 광명시 하안로 284, 1212동 1308호 (하안동, 하안주공12단지아파트)  
(74) 대리인  
리앤목특허법인  
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 6 항

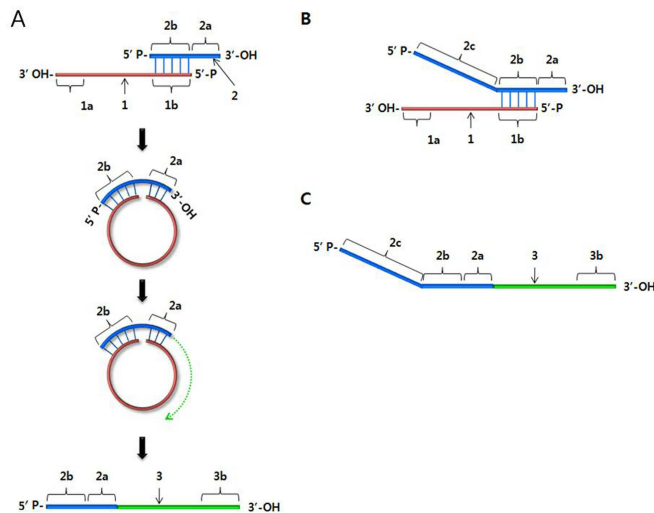
심사관 : 김지윤

(54) 발명의 명칭 폴리뉴클레오티드 및 그의 용도

(57) 요약

표적 핵산에 대하여 표적 핵산의 3' 말단 및 5' 말단에 상보적인 상보 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 이를 포함하는 조성물 또는 키트, 이를 사용하는 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 생성하는 방법을 제공한다. 이에 의하면, 표적 핵산의 3' 말단에 결합하는 영역을 줄이고, 표적 핵산을 특이도가 우수하게 증폭하는데 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**박경희**

서울 강남구 삼성로63길 32-7, (대치동)

**이표용**

경기 수원시 영통구 영통로 111, 306동 1102호 (매향동, 엘지동수원자이아파트)

---

**명세서**

**청구범위**

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

표적 핵산과 표적 핵산 증폭용 프라이머를 혼성화시키는 단계로서,

상기 프라이머는 표적 핵산의 3'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 제1 상보 영역, 표적 핵산의 5'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 제2 상보 영역; 및 제2 상보 영역의 5'-말단 방향에 표적 핵산에 상보적이지 않은 제3 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고,

상기 제1 상보 영역은 제2 상보영역의 3' 방향에 위치하고,

제1 상보 영역은 길이가 2개 내지 4개 뉴클레오티드이고,

제2 상보 영역은 길이가 6개 내지 12개 뉴클레오티드이고,

상기 표적 핵산은 선형의 폴리뉴클레오티드인 것인 단계;

상기 혼성화된 시료를 핵산 폴리머라제의 존재하에서 인큐베이션시켜, 상기 프라이머의 3'-말단으로부터 상기 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 생성하는 단계를 포함하는, 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 생성하는 방법.

**청구항 16**

청구항 15에 있어서, 핵산 폴리머라제는 가닥 치환 핵산 폴리머라제인 것인 방법.

**청구항 17**

청구항 16에 있어서, 가닥 치환 핵산 폴리머라제는 역전사 효소인 것인 방법.

**청구항 18**

청구항 17에 있어서, 역전사 효소는 HIV, MMLV, 또는 AMV로부터 유래된 역전사 효소인 것인 방법.

**청구항 19**

청구항 15에 있어서, 표적 핵산은 RNA인 것인 방법.

**청구항 20**

청구항 15에 있어서, 표적 핵산은 비암호화(non-coding)RNA, 마이크로 RNA(micro RNA; miRNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA), tRNA 또는 디캡핑(decapping)되어진 mRNA인 것인 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 표적 핵산에 대하여 표적 핵산의 3' 말단 및 5' 말단에 상보적인 상보 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 그의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 핵산의 증폭은 핵산 폴리머라제의 존재하에서 프라이머의 3'-말단으로부터 뉴클레오티드 서열을 연장하는 것을 포함한다. 상기 프라이머는 표적 핵산과 상보적인 서열을 포함한다. 서열의 연장을 위하여, 프라이머가 표적 핵산과 특이적으로 안정적으로 혼성화될 것을 필요로 한다. 길이가 짧은 핵산은 프라이머의 디자인에 어려움이 있다. 핵산 혼성화 산물의 안정성은 상보적 서열의 길이에 비례하는 것으로 알려져 있다. 반면, 프라이머의 길이가 길어지면, 증폭되는 표적 핵산의 길이 짧아진다.

[0003] 종래 기술에 의하더라도, 표적 핵산에 대하여 프라이머가 특이적으로 안정적으로 결합하면서도 증폭되는 핵산의 특이도를 증가시킬 수 있는 폴리뉴클레오티드가 요구되고 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0004] 표적 핵산에 대하여 표적 핵산의 3' 말단 및 5' 말단에 상보적인 상보 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제

공한다.

- [0005] 표적 핵산에 대하여 표적 핵산의 3' 말단 및 5' 말단에 상보적인 상보 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 표적 핵산을 증폭하기 위한 조성물을 제공한다.
- [0006] 표적 핵산에 대하여 표적 핵산의 3' 말단 및 5' 말단에 상보적인 상보 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 표적 핵산을 증폭하기 위한 키트를 제공한다.
- [0007] 표적 핵산에 대하여 표적 핵산의 3' 말단 및 5' 말단에 상보적인 상보 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 사용하는 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 생성하는 방법을 제공한다.

**과제의 해결 수단**

- [0008] 표적 핵산의 3'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 제1 상보 영역; 및
- [0009] 표적 핵산의 5'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 제2 상보 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서,
- [0010] 상기 제1 상보 영역은 제2 상보영역의 3' 방향에 위치하는 것인 폴리뉴클레오티드가 제공된다.
- [0011] 상기 폴리뉴클레오티드의 제1 상보 영역은 표적 핵산의 3'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적일 수 있다. 예를 들면, 3'-말단의 뉴클레오티드로부터 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 또는 7개의 연속적인 뉴클레오티드와 상보적인 것인 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 예를 들면, 제1 상보 영역은 길이가 2개 내지 7개 뉴클레오티드일 수 있다. 제1 상보영역은 DNA, RNA, 펩티드 핵산(Peptide Nucleic Acid; PNA), 잠금 핵산(Locked Nucleic Acid; LNA) 또는 뉴클레오티드 유사체(nucleotide analogue)를 포함하는 것일 수 있다.
- [0012] 상기 폴리뉴클레오티드의 제2 상보 영역은 표적 핵산의 5'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적일 수 있다. 예를 들면, 5'-말단의 뉴클레오티드로부터 3 nt, 4 nt, 5 nt, 6 nt, 7 nt, 8 nt, 9 nt, 10 nt, 11 nt, 12 nt, 13 nt, 14 nt, 15 nt, 16 nt, 17 nt, 18 nt, 19 nt 또는 20 nt의 연속적인 뉴클레오티드와 상보적인 것인 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 예를 들면, 제2 상보 영역은 길이가 3 nt 내지 20 nt의 뉴클레오티드인 것인 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 제2 상보영역은 DNA, RNA, 펩티드 핵산(Peptide Nucleic Acid; PNA), 잠금 핵산(Locked Nucleic Acid; LNA) 또는 뉴클레오티드 유사체를 포함하는 것일 수 있다.
- [0013] 상기 폴리뉴클레오티드의 제1 상보 영역은 제2 상보영역의 3' 방향에 위치하는 것일 수 있다. 상기 제1 상보영역과 제2 상보영역은 이격되지 않은 것이거나 또는 하나 이상의 뉴클레오티드에 의하여 이격된 것일 수 있다.
- [0014] 상기 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드 유사체, 예를 들면, PNA (Peptide Nucleic Acid) 및 LNA (Locked Nucleic Acid)를 포함하는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, 제2 상보영역에 뉴클레오티드 유사체, 예를 들면, PNA 및 LNA를 포함하는 것일 수 있다. 그러나, 상기 뉴클레오티드 유사체, 예를 들면, PNA 및 LNA는 제2 상보영역뿐만 아니라 제1 상보영역에 포함될 수도 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 단일가닥인 것일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 길이가 7 nt 내지 200 nt, 7 nt 내지 180 nt, 7 nt 내지 150 nt, 7 nt 내지 130 nt, 7 nt 내지 100 nt, 7 nt 내지 80 nt, 7 nt 내지 50 nt, 7 nt 내지 30 nt, 7 nt 내지 20 nt, 7 nt 내지 15 nt, 또는 10 nt 내지 40 nt인 것일 수 있다.
- [0015] 상기 표적 핵산은 DNA, RNA 또는 DNA와 RNA의 키메라일 수 있다. 상기 표적핵산은 단일가닥 또는 이중가닥인 것일 수 있다. 상기 표적 핵산은 길이가 15 nt 내지 200 nt, 15 nt 내지 180 nt, 15 nt 내지 150 nt, 15 nt 내지 130 nt, 15 nt 내지 100 nt, 15 nt 내지 80 nt, 15 nt 내지 50 nt, 15 nt 내지 40 nt, 또는 15 nt 내지 30 nt 인 것일 수 있다. 상기 표적 핵산은 길이가 작은 RNA일 수 있다. 길이가 작은 RNA는 예를 들면, 비암호화(non-coding)RNA, 마이크로RNA (micro RNA; miRNA)작은 간섭 RNA (small interfering RNA; siRNA), tRNA 또는 디캡핑(decapping)되어진 mRNA일 수 있다. 진핵 세포의 천연 mRNA는 5'-캡 구조를 갖는다. 그러나, 생물학적 시료 또는 그로부터 분리된 mRNA의 보관 또는 처리 중에서 mRNA는 분해될 수 있다. 이 경우, 분리된 산물은 천연 mRNA 구조의 5'-캡 구조를 갖지 않을 수 있다. 5'-캡 구조 (cap)는 7-메틸구아닐레이트가 5'-말단의 당의 5'-OH에 트리포스페이트 연결에 의하여 연결된 구조 또는 이의 분해산물로서 구아닐레이트가 5'-말단의 당의 5'-OH에 트리포스페이트 연결에 의하여 연결된 구조를 포함한다. 또한, 상기 표적 핵산은 200 nt 이상의 뉴클레오티드를 갖는 RNA로서, 연속적인 30 nt 서열의 GC 함유량이 30%이만이거나 80%이상인 영역이 존재하는 RNA, 분자 내에서 서로 상보적인 염기서열이 5 nt 이상 연속적으로 존재하여 분자내 2차 구조 (secondary structure)를 형성할 수 있는 RNA, 동일한 nt가 연속적으로 5개 이상 존재하는 RNA 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다.

- [0016] 상기 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드의 제2 상보 영역의 5'-말단 방향에 표적 핵산에 상보적이지 않은 제3 영역을 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 제3 영역은 제2 상보 영역의 5'-말단 방향에 위치할 수 있다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 5'-제3 영역-제2 상보 영역-제1 상보 영역-3'일 수 있다. 예를 들면, 제3 영역은 길이가 3 nt 내지 200 nt의 뉴클레오티드인 것인 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 예를 들면, 3 nt 내지 200 nt, 3 nt 내지 180 nt, 3 nt 내지 150 nt, 3 nt 내지 130 nt, 3 nt 내지 100 nt, 3 nt 내지 80 nt, 3 nt 내지 50 nt, 3 nt 내지 40 nt, 또는 3 nt 내지 30 nt일 수 있다. 제3 영역은 프라이머 서열, 제한 효소 인식 부위, 또는 프로브 결합 부위를 포함할 수 있다. 제3 영역은 DNA, RNA, 펩티드 핵산(Peptide Nucleic Acid; PNA), 잠금 핵산(Locked Nucleic Acid; LNA) 또는 뉴클레오티드 유사체를 포함하는 것일 수 있다. 제3 영역과 제2 상보 영역 이격되지 않은 것이거나 또는 하나 이상의 뉴클레오티드에 의하여 이격된 것일 수 있다. 이 경우, 상기 링커는 프라이머 결합 부위, 제한효소 인식부위, 또는 프로브 결합 부위를 포함하는 것일 수 있다.
- [0017] 상기 폴리뉴클레오티드는 주형 의존적 핵산 합성에서 프라이머로서 작용할 수 있다. 따라서, 상기 폴리뉴클레오티드는 프라이머로 사용되는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 시료 중의 표적 핵산의 존재를 확인하기 위한 프로브로서 사용될 수 있다.
- [0018] 상기 폴리뉴클레오티드는 제1 상보 영역과 제3 영역 사이에 제2 상보영역을 위치시킴으로써 제1 상보 영역의 길이를 줄일 수 있고, 역전사에 의하여 생성된 DNA의 길이를 증가시킬 수 있다. 상기 DNA의 길이가 증가됨으로써 RNA 특이적 PCR 프라이머의 디자인이 용이해 질 수 있다. 아울러, 제2 상보 영역이 존재함으로써 표적 핵산의 검출에 있어서 민감도 및 특이도를 향상시킬 수 있다.
- [0019] 표적 핵산의 3'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 제1 상보 영역; 및
- [0020] 표적 핵산의 5'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 제2 상보 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서,
- [0021] 상기 제1 상보 영역은 제2 상보영역의 3' 방향에 위치하는 것인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 표적 핵산을 증폭하기 위한 조성물이 제공된다.
- [0022] 상기 조성물에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 전술한 바와 같다. 또한, 표적 핵산은 전술한 바와 같다.
- [0023] 상기 조성물은 표적 핵산을 증폭하기 위한 조성물이다. 상기 증폭은 핵산 증폭을 위하여 알려진 방법일 수 있다. 증폭은 예를 들면, DNA 증폭 또는 RNA 증폭일 수 있다. 증폭 방법은 열순환 (thermal cycling)을 필요로 하는 것 또는 등온 (isothermal)에서 수행되는 것일 수 있다. 증폭 방법은 폴리머라제 연쇄 반응 (polymerase chain reaction; PCR), NASBA (핵산 서열-기초 증폭), LCR (리가제 연쇄반응), 가닥 치환 증폭 (strand displacement amplification; SDA), 롤링 서클 증폭(rolling circle amplification; RCA) 등을 포함할 수 있다. 상기 증폭방법은 또한, RNA 증폭 방법을 포함할 수 있다. 예를 들면, 역전사 (reverse transcription; RT) 또는 역전사-PCR을 포함할 수 있다. 증폭이란 표적핵산 서열 또는 그에 상보적인 서열의 카피 수를 증가시키는 것일 수 있다. "PCR"은 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법일 수 있다.
- [0024] 따라서, 상기 조성물은 표적 핵산의 증폭에 요구되는 알려진 물질을 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 조성물은 핵산 폴리머라제, 그의 활성에 필요한 버퍼, 보조인자, 및/또는 기질을 더 포함할 수 있다. 상기 핵산 폴리머라제는 DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제, 역전사 효소 (reverse transcriptase) 및 이들의 조합일 수 있다. 역전사 (reverse transcription)란 RNA를 주형으로 하여 RNA 서열에 상보적인 DNA 가닥을 합성하는 것일 수 있다. 상기 핵산 폴리머라제는 가닥치환활성을 갖는 것일 수 있다. 예를 들면, 레트로바이러스, 예를 들면, HIV, MMLV, 및 AMV로부터 유래된 하나이상의 역전사 효소일 수 있다. 상기 핵산 폴리머라제는 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성 (exonuclease activity)을 갖지 않는 것일 수 있다. 상기 조성물은 역전사 또는 PCR 증폭에 필요한 물질을 포함하는 것일 수 있다.
- [0025] 표적 핵산의 3'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 제1 상보 영역; 및
- [0026] 표적 핵산의 5'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 제2 상보 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서,

- [0027] 상기 제1 상보 영역은 제2 상보영역의 3' 방향에 위치하는 것인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 표적 핵산을 증폭하기 위한 키트가 제공된다.
- [0028] 상기 키트에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 전술한 바와 같다. 또한, 표적 핵산은 전술한 바와 같다.
- [0029] 상기 키트는 표적 핵산을 증폭하기 위한 것이다. 상기 증폭은 핵산 증폭을 위하여 알려진 방법일 수 있다. 상기 증폭은 예를 들면, DNA 증폭 또는 RNA 증폭일 수 있다. 상기 증폭 방법은 열순환 (thermal cycling)을 필요로 하는 것 또는 등온 (isothermal)에서 수행되는 것일 수 있다. 상기 증폭방법은 폴리머라제 연쇄 반응 (polymerase chain reaction; PCR), NASBA (핵산 서열-기초 증폭), LCR (리가제 연쇄반응), 가닥 치환 증폭 (strand displacement amplification; SDA), 롤링서클증폭(rolling circle amplification; RCA) 등을 포함할 수 있다. 상기 증폭방법은 또한, RNA 증폭 방법을 포함할 수 있다. 예를 들면, 역전사 (reverse transcription; RT) 또는 역전사-PCR을 포함할 수 있다. 증폭이란 표적핵산 서열 또는 그에 상보적인 서열의 카피 수를 증가시키는 것일 수 있다. "PCR"은 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법일 수 있다.
- [0030] 따라서, 상기 키트는 표적 핵산의 증폭에 요구되는 알려진 물질을 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 키트는 핵산 폴리머라제, 그의 활성화에 필요한 버퍼, 보조인자, 및/또는 기질을 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 키트는 표적 핵산을 더 포함할 수 있다. 상기 핵산 폴리머라제는 DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제, 역전사 효소 (reverse transcriptase) 및 이들의 조합일 수 있다. 역전사 (reverse transcription)란 RNA를 주형으로 하여 RNA 서열에 상보적인 DNA 가닥을 합성하는 것일 수 있다. 상기 핵산 폴리머라제는 가닥치환 활성을 갖는 것일 수 있다. 예를 들면, 레트로바이러스, 예를 들면, HIV, MMLV, 및 AMV로부터 유래된 역전사 효소일 수 있다. 상기 핵산 폴리머라제는 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성 (exonuclease activity)을 갖지 않는 것일 수 있다. 상기 키트는 역전사 또는 PCR 증폭에 필요한 물질을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 키트는 표적핵산을 증폭하기 위하여 사용하기 위한 설명서를 더 포함할 수 있다.
- [0031] 표적 핵산의 3'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 제1 상보 영역, 및 표적 핵산의 5'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 제2 상보 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서, 상기 제1 상보 영역은 제2 상보영역의 3' 방향에 위치하는 것인 폴리뉴클레오티드와 표적 핵산을 혼성화시키는 단계;
- [0032] 상기 혼성화된 시료를 핵산 폴리머라제의 존재하에서 인큐베이션시켜, 상기 폴리뉴클레오티드의 3'-말단으로부터 상기 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 생성하는 단계를 포함하는, 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 생성하는 방법이 제공된다.
- [0033] 상기 방법은 표적 핵산의 3'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 제1 상보 영역, 및 표적 핵산의 5'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 제2 상보 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서, 상기 제1 상보 영역은 제2 상보영역의 3' 방향에 위치하는 것인 폴리뉴클레오티드와 표적 핵산을 혼성화시키는 단계를 포함한다.
- [0034] 상기 방법에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 전술한 바와 같다. 또한, 표적 핵산은 전술한 바와 같다.
- [0035] 상기 혼성화는 알려진 방법에 의하여 수행되는 것일 수 있다. 예를 들면, 핵산의 혼성화에 적절한 것으로 알려진 버퍼 중에서 상기 폴리뉴클레오티드와 표적 핵산을 인큐베이션함으로써 수행될 수 있다. 혼성화는 적절한 온도 예를 들면, 0℃ 내지 25℃, 또는 4℃에서 수행될 수 있다. 온도는 선택되는 폴리뉴클레오티드와 표적핵산의 서열 및 길이에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 혼성화는 적절한 시간 예를 들면, 1 시간 내지 12시간 (밤새) 동안일 수 있다.
- [0036] 상기 방법은 혼성화된 시료를 핵산 폴리머라제의 존재하에서 인큐베이션시켜, 상기 폴리뉴클레오티드의 3'-말단으로부터 상기 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 생성하는 단계를 포함한다.
- [0037] 상기 핵산 폴리머라제는 DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제, 역전사 효소 (reverse transcriptase) 및 이들의 조합일 수 있다. 용어 "역전사 (reverse transcription)"란 RNA를 주형으로 하여 RNA 서열에 상보적인 DNA 가닥을 합성하는 것을 의미한다. 상기 핵산 폴리머라제는 가닥 치환 활성을 갖는 것일 수 있다. 예를 들면, 레트로바이러스, 예를 들면, HIV (human immunodeficiency virus), MMLV (murine leukemia virus), 또는 AMV (avian myeloblastosis virus)로부터 유래된 역전사 효소일 수 있다. 상기 핵산 폴리머라제는 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성 (exonuclease activity)을 갖지 않는 것일 수 있다.

- [0038] 상기 인큐베이션은 상기 핵산 폴리머라제의 활성화에 적절한 조건에서 수행될 수 있다. 상기 인큐베이션은 핵산 폴리머라제, 그의 활성화에 필요한 버퍼, 보조인자, 및 기질의 존재하에서 수행될 수 있다. 예를 들면, 상기 인큐베이션은 역전사 또는 PCR 증폭에 필요한 물질을 포함하는 조건에서 수행하는 것을 포함할 수 있다.
- [0039] 상기 인큐베이션에 의하여, 상기 폴리뉴클레오티드의 3'-말단으로부터 상기 표적핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 생성시킬 수 있다. 상기 생성은 상기 핵산 폴리머라제가 상기 폴리뉴클레오티드의 3'-말단으로부터, 표적핵산과 혼성화된 상기 폴리뉴클레오티드의 5'-말단을 치환시키면서 연장하는 것을 포함한다.
- [0040] 상기 방법은 생산된 산물 즉, 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열의 존재 여부를 결정하는 단계를 더 포함할 수 있다. 결정 결과, 상기 생산된 산물이 존재하는 경우, 시료 중에 상기 표적핵산이 존재하는 것으로 결정하고, 상기 생산된 산물이 존재하지 않는 경우, 시료 중에 상기 표적핵산이 존재하지 않는 것으로 결정하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0041] 또한, 상기 방법은 생산된 산물 즉, 표적핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 주형으로 하여, 핵산을 증폭하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 증폭은 알려진 방법에 의하여 수행될 수 있다. 증폭 방법에 대하여는 전술한 바와 같다.

**발명의 효과**

- [0042] 폴리뉴클레오티드에 의하면, 표적 핵산의 3' 말단에 결합하는 영역을 줄이고, 표적 핵산을 특이도가 우수하게 증폭하는데 사용될 수 있다.
- [0043] 조성물 및 키트에 의하면, 표적 핵산을 특이도가 우수하게 증폭하는데 사용될 수 있다.
- [0044] 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 생성하는 방법에 의하면, 표적 산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 특이도가 우수하게 생성할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0045] 도 1은 일 구체예에 따른 폴리뉴클레오티드 및 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 생성하는 방법을 나타낸다.
- 도 2는 일 구체예에 따른 폴리뉴클레오티드에 의한 프라이밍 효과를 나타낸다.
- 도 3은 제1 상보 영역 및 제2 상보 영역의 길이에 따른 프라이밍 효과를 나타낸다.
- 도 4는 일 구체예에 따른 폴리뉴클레오티드의 사용에 따른 검출 민감도를 나타낸다.
- 도 5a는 표적 핵산인 miR-16에 대한 검출 민감도, 도 5b는 표적 핵산인 miR-21에 대한 검출 민감도, 및 도 5c는 표적 핵산인 miR-206에 대한 검출 민감도를 나타낸다.
- 도 6a는 표적 핵산인 miR-16에 대한 특이도, 및 도 6b는 표적 핵산인 miR-210에 대한 특이도를 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0046] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

**[0047] 실시예 1. 이중 혼성화 역전사 프라이머의 제조**

- [0048] 본 실시예에서는 표적 핵산의 3'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 제1 상보 영역; 및 표적 핵산의 5'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 제2 상보 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서, 상기 제1 상보 영역은 제2 상보영역의 3' 방향에 위치하는 것인 폴리뉴클레오티드 (이하 "이중 혼성화 프라이머 (dual hybridization primer)", 또는 "이중 혼성화 역전사 프라이머 역전사 프라이머(dual hybridization reverse transcription primer)", 또는 라고 함)를 사용하여 이중 혼성화 역전사 프라이머의 3'-말단으로부터 표적 핵산에 상보적인 서열을 생성시켰다. 대조군으로서, 제2 상보 영역이 없는 통상적인 프라이머 (이하 "선형 프라이머(linear primer)" 또는 "3' 프라이밍 역전사 프라이머(3' priming reverse transcription primer)"라 함)를 사용하였다. 또한, 이중 혼성화 역전사 프라이머는 제1 상보 영역의 5'-말단 방향에 표적 핵산에 상보적이지 않은 영역을 포함한다. 표적 핵산에 상보적이지 않은 영역은 유니버설 PCR 프라



이머 서열을 포함한다.

[0049] 도 1에 있어서, "1"은 표적 핵산을 나타낸다. "1a"는 표적 핵산의 3' 말단 영역을 나타내는 것으로서, 2a 부분과 상보적인 핵산 서열을 갖는다. "1b"는 표적 핵산의 5' 말단 영역을 나타내는 것으로서, 2b 부분과 상보적인 핵산 서열을 갖는다. "2"는 역전사 프라이머를 나타낸다. "2a"는 역전사 프라이머의 3' 말단 부분을 나타내고, 1a 부분과 상보적인 핵산 서열을 갖는다 (제1 상보 영역). "2b"는 역전사 프라이머의 5' 말단 부분을 나타내고, 1b 부분과 상보적인 핵산 서열을 갖는다 (제2 상보 영역). "2c"는 PCR 프라이머 서열을 포함하고, 표적 핵산에 상보적이지 않은 서열을 갖는다 (제3 영역). "3"은 역전사 효소에 의하여 합성된 DNA를 나타낸다. "3b"는 1b와 동일한 핵산 서열로서, 역전사 효소가 1b에 혼성화된 2b 부분을 치환시키면서 생성한 부분을 나타낸다.

[0050] 실시예 2. 이중 혼성화 역전사 프라이머에 의한 표적 핵산의 검출 효과

[0051] 이중 혼성화 역전사 프라이머와 3' 프라이밍 역전사 프라이머의 표적 검출 효과를 비교하였다.

[0052] 표적 핵산으로서 miRNA, 3' 프라이밍 프라이머, 이중 혼성화 역전사 프라이머, 및 miRNA 특이적 PCR 프라이머의 서열은 표 1에 나타내었다.

표 1

[0053]

microRNA ID	RNA 서열	3' 프라이밍 역전사 프라이머	이중 혼성화 역전사 프라이머	miRNA 특이적 PCR 프라이머
let-7b-5p	5'-UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU-3' (서열 번호 1)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATAACCAC-3' (서열 번호 2)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATCTACCTCAAACC-3' (서열 번호 3)	5'-CGCTGAGGTAGTAGGTTGTG-3' (서열 번호 4)
let-7d-5p	5'-AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU-3' (서열 번호 5)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATAACTAT-3' (서열 번호 6)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATCTACCTCTAACT-3' (서열 번호 7)	5'-CGCAGAGGTAGTAGGTTGC-3' (서열 번호 8)
miR-100-5p	5'-AACCGUAGAUCCGAACUUGUG-3' (서열 번호 9)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATCAACAAG-3' (서열 번호 10)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATCGGGTTCACA-3' (서열 번호 11)	5'-CAACCCGTAGATCCGAA-3' (서열 번호 12)
miR-10a-5p	5'-UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG-3' (서열 번호 13)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATCAAAA-3' (서열 번호 14)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATAGGGTACACA-3' (서열 번호 15)	5'-CGTACCCTGTAGATCCGA-3' (서열 번호 16)
miR-122-5p	5'-UGGAGUGGACAAUGGUGUUUG-3' (서열 번호 17)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATCAACA-3' (서열 번호 18)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATACACTCCACAAA-3' (서열 번호 19)	5'-CGTGGAGTGTGACAATGG-3' (서열 번호 20)
miR-125b-5p	5'-UCCUGAGACCUAACUUGUGA-3' (서열 번호 21)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATTACACA-3' (서열 번호 22)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATCTCAGGGATCAC-3' (서열 번호 23)	5'-CGTCCCTGAGACCCCTAAC-3' (서열 번호 24)
miR-130a-3p	5'-CAGUGCAAUGUAAAAGGGCAU-3' (서열 번호 25)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATATGCC-3' (서열 번호 26)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATGCACTGATGC-3' (서열 번호 27)	5'-GCGCAGTGCATGTTAAA-3' (서열 번호 28)
miR-135a-5p	5'-UAUGGCUUUUAUCCUAUGUGA-3' (서열 번호 29)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATTACAT-3' (서열 번호 30)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATAAGCCATATCAC-3' (서열 번호 31)	5'-CGCTATGGCTTTTATTCT-3' (서열 번호 32)
miR-135b-5p	5'-UAUGGCUUUUAUCCUAUGUGA-3' (서열 번호 33)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATTACAT-3' (서열 번호 34)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATGCCATATCAC-3' (서열 번호 35)	5'-CGTATGGCTTTTCATTCT-3' (서열 번호 36)
miR-15b-5p	5'-UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA-3' (서열 번호 37)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATTGTA-3' (서열 번호 38)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATCTGCTATGTA-3' (서열 번호 39)	5'-CGTAGCAGCACATCATGG-3' (서열 번호 40)
miR-20a-5p	5'-UAAAGUGCUUUAUAGUGCAGGUAG-3' (서열 번호 41)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATCTACCT-3' (서열 번호 42)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATGCACTTTACTAC-3' (서열 번호 43)	5'-CCGCTAAAGTGCTTATAGTGC-3' (서열 번호 44)
miR-214-3p	5'-ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU-3' (서열 번호 45)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATACTGCC-3' (서열 번호 46)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATCCTGCTGACTG-3' (서열 번호 47)	5'-CACAGCAGGCACAGACA-3' (서열 번호 48)

miR-29a-3p	5'-UAGCACCAUCUGAAAUC GGUUA-3' (서열 번호 49)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTC ATTAACCG-3' (서열 번호 50)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTC ATTGGTGCTATAAC-3' (서열 번호 51)	5'-CGCTAGCACCATCTGAAA T-3' (서열 번호 52)
miR-34a-5p	5'-UGGCAGUGUCUUAGCUG GUUGU-3' (서열 번호 53)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTC ATACAACC-3' (서열 번호 54)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTC ATCACTGCCAACAA-3' (서열 번호 55)	5'-GCCTGGCAGTGTCTTAGC -3' (서열 번호 56)
miR-517c-3p	5'-AUCGUGCAUCCUUUAG AGUGU-3' (서열 번호 57)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTC ATACACTC-3' (서열 번호 58)	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTC ATTGCACGATACAC-3' (서열 번호 59)	5'-CGATCGTCATCCTTTTA -3' (서열 번호 60)

- [0054] 유니버설 PCR 프라이머의 핵산 서열은 5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCAT-3' (서열 번호 61)이다.
- [0055] 이중 혼성화 역전사 프라이머의 제1 상보 영역의 길이는 4bp이고, 제2 상보 영역의 길이는 4 bp 내지 8bp이다.
- [0056] 이중 혼성화 역전사 프라이머의 사용에 따른 표적 핵산의 검출을 PCR 방법으로 확인하였다. SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen)을 사용하여 마이크로 RNA를 cDNA로 전환하였다. 역전사 반응을 위해, 12  $\mu$ l의 RT 마스터 믹스 (5  $\mu$ l의 물, 2  $\mu$ l의 5 $\times$ 완충액, 2  $\mu$ l의 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l의 0.1 M DTT, 1  $\mu$ l의 10 mM dNTPs, 1  $\mu$ l의 RNaseOUT (Invitrogen) 및 1  $\mu$ l의 SuperScript III 효소)를 96-웰 플레이트에서 2  $\mu$ l의 10 uM DH-RT 프라이머 및 5  $\mu$ l의 주형을 혼합하였다. 역전사 반응은 16 $^{\circ}$ C에서 30분, 42 $^{\circ}$ C에서 1시간, 70 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 인큐베이션 시키고, 80  $\mu$ l의 TE (pH7.6에서 10mM Tris, 0.1 mM EDTA)로 5-배 희석하였다. 역전사 반응 다음에, 5  $\mu$ l의 희석된 cDNA를 20  $\mu$ l의 최종 반응 부피로 만들어서 LC480 PCR 장치 (Roche)를 사용하여 96-웰 옵티컬 PCR 플레이트에서 정량적 PCR (quantitative PCR;qPCR)을 3회 반복 측정하였다. PCR 반응 혼합물은 10  $\mu$ l의 2 $\times$ SYBR 그린 PCR 마스터 믹스 (Exiqon), 0.1  $\mu$ l의 10 uM 유니버설 프라이머, 0.1  $\mu$ l의 10 uM miRNA 특이적 프라이머, 4.8  $\mu$ l의 물, 및 5  $\mu$ l의 시료를 포함한다. 정량적 PCR은 제조사가 제안한 조건을 사용하여 수행하였고 해리 용해 곡선을 앰플리콘 종류의 분석을 위해 각 수행 후에 생성하였다.
- [0057] 도 2는 이중 혼성화 역전사 프라이머의 사용에 따른 프라이밍 효과를 나타내는 그림이다. 도 2에 나타난 바와 같이, 3' 프라이밍 역전사 프라이머를 사용한 경우에 비하여 이중 혼성화 역전사 프라이머를 사용한 경우 Cp 값이 현저하게 감소하였다.
- [0058] 실시예 3. 제1 상보 영역 및 제2 상보 영역의 길이에 따른 표적 핵산의 검출 효과
- [0059] 제1 상보 영역과 제2 상보 영역의 길이에 따른 표적 핵산의 검출 효과를 확인하였다.
- [0060] 표적 핵산인 miRNA : 5'-CGGUGAGGUCUUUGGUUCAUAGCAGCACGUAAAAUUGGCG-3'(서열 번호 62)
- [0061] miRNA 특이적 PCR 프라이머 : 5'-CGCGCTAGCAGCACGTAAAT-3' (서열 번호 63)
- [0062] 유니버설 PCR 프라이머 : 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (서열 번호 64)
- [0063] 3' 프라이밍 역전사 프라이머, 및 이중 혼성화 역전사 프라이머의 서열은 표 2에 나타내었다. 핵산 서열에 밀접한 표적 핵산의 3'-말단과 상보적인 제1 상보 영역을 나타낸 것이다.

**표 2**

[0064] 역전사 프라이머 ID	핵산 서열
--------------------	-------

이중 혼성화 역전사 프라이머	C12 RT2	GTGCAGGGTCCGAGGT AAGACCTCACCG CG (서열 번호 65)
	C12 RT3	GTGCAGGGTCCGAGGT AAGACCTCACCG CGC (서열 번호 66)
	C12 RT4	GTGCAGGGTCCGAGGT AAGACCTCACCG CGCC (서열 번호 67)
	C12RT5	GTGCAGGGTCCGAGGT AAGACCTCACCG CGCCA (서열 번호 68)
	C12RT6	GTGCAGGGTCCGAGGT AAGACCTCACCG CGCAA (서열 번호 69)
	C10RT2	GTGCAGGGTCCGAGGT GACCTCACCG CG (서열 번호 70)
	C10RT3	GTGCAGGGTCCGAGGT GACCTCACCG CGC (서열 번호 71)
	C10RT4	GTGCAGGGTCCGAGGT GACCTCACCG CGCC (서열 번호 72)
	C10RT5	GTGCAGGGTCCGAGGT GACCTCACCG CGCCA (서열 번호 73)
	C10RT6	GTGCAGGGTCCGAGGT GACCTCACCG CGCAA (서열 번호 74)
	C8RT2	GTGCAGGGTCCGAGGT CCTCACCG CG (서열 번호 75)
	C8RT3	GTGCAGGGTCCGAGGT CCTCACCG CGC (서열 번호 76)
	C8RT4	GTGCAGGGTCCGAGGT CCTCACCG CGCC (서열 번호 77)
	C8RT5	GTGCAGGGTCCGAGGT CCTCACCG CGCCA (서열 번호 78)
	C8RT6	GTGCAGGGTCCGAGGT CCTCACCG CGCAA (서열 번호 79)
	C6RT2	GTGCAGGGTCCGAGGT TCACCG CG (서열 번호 80)
	C6RT3	GTGCAGGGTCCGAGGT TCACCG CGC (서열 번호 81)
	C6RT4	GTGCAGGGTCCGAGGT TCACCG CGCC (서열 번호 82)
	C6RT5	GTGCAGGGTCCGAGGT TCACCG CGCCA (서열 번호 83)
	C6RT6	GTGCAGGGTCCGAGGT TCACCG CGCAA (서열 번호 84)
3' 프라이밍 역전사 프라이머	C4RT2	GTGCAGGGTCCGAGGT ACCG CG (서열 번호 85)
	C4RT3	GTGCAGGGTCCGAGGT ACCG CGC (서열 번호 86)
	C4RT4	GTGCAGGGTCCGAGGT ACCG CGCC (서열 번호 87)
	C4RT5	GTGCAGGGTCCGAGGT ACCG CGCCA (서열 번호 88)
	C4RT6	GTGCAGGGTCCGAGGT ACCG CGCAA (서열 번호 89)
	선형 RT2	GTGCAGGGTCCGAGGT CG (서열 번호 90)
	선형 RT3	GTGCAGGGTCCGAGGT CGC (서열 번호 91)
	선형 RT4	GTGCAGGGTCCGAGGT CGCC (서열 번호 92)
	선형 RT5	GTGCAGGGTCCGAGGT CGCCA (서열 번호 93)
	선형 RT6	GTGCAGGGTCCGAGGT CGCAA (서열 번호 94)

[0065] 제1 상보 영역 및 제2 상보 영역의 길이에 따른 표적 핵산의 검출을 실시예 2에 기재된 정량적 PCR 방법으로 확인하였다.

[0066] 도 3은 제1 상보 영역 및 제2 상보 영역의 길이에 따른 프라이밍 효과를 나타내는 그림이다. 도 3에 나타난 바와 같이, 표적 핵산의 5' 말단 특이적인 서열을 역전사 프라이머에 포함하면, 역전사 프라이머의 3' 말단 특이적 부분을 축소시킬 수 있다.

[0067] 실시예 4. 표적 핵산 miR-210에 대한 검출 민감도의 확인

[0068] 표적 핵산인 miR-210에 대하여 이중 혼성화 역전사 프라이머와 3' 프라이밍 역전사 프라이머의 표적 검출 민감도를 비교하였다.

[0069] 표적 핵산으로서 miR-210, 3' 프라이밍 프라이머, 이중 혼성화 역전사 프라이머, miRNA 특이적 PCR 프라이머의 서열 및 유니버설 PCR 프라이머는 표 3에 나타내었다.

표 3

	핵산 서열
miRNA-210	5'-CUGUGCGUGUGACAGCGGCUA-3' (서열 번호 95)
이중 혼성화 역전사 프라이머	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCAT ACGCACAG TCAGC-3' (서열 번호 96)
3' 프라이밍 역전사 프라이머	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATTCAGCC-3' (서열 번호 97)
3' 말단 PCR 프라이머	5'-CGCTGGAATGTAAGGAAGT-3' (서열 번호 98)
5' 말단 PCR 프라이머	5'-GTGCGTGTGACAGCGG-3' (서열 번호 99)
유니버설 PCR 프라이머	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCAT-3' (서열 번호 100)

[0071] 이중 혼성화 역전사 프라이머의 사용에 따른 표적 핵산의 검출을 실시예 2에 기재된 정량적 PCR 방법으로 확인하였다.

[0072] 도 4는 이중 혼성화 역전사 프라이머의 사용에 따른 검출 민감도를 나타낸다(◆; 이중 혼성화 프라이밍, ◇; 3'-말단 프라이밍). 도 4에 나타난 바와 같이, 3' 프라이밍 역전사 프라이머를 사용한 경우에 비하여 이중 혼성화 역전사 프라이머를 사용한 경우 Cp 값이 현저하게 감소하였다.

[0073] 실시예 5. 표적 핵산 miR-16, miR-21 및 miR-206에 대한 검출 민감도의 확인

[0074] 표적 핵산인 miR-16, miR-21 및 miR-206 각각에 대하여 이중 혼성화 역전사 프라이머의 표적 검출 민감도를 비교하였다.

[0075] 표적 핵산으로서 miR-16, miR-21 및 miR-206, 이중 혼성화 역전사 프라이머, miRNA 특이적 PCR 프라이머의 서열 및 유니버설 PCR 프라이머는 표 4에 나타내었다.

표 4

		핵산 서열
miR-16 검출	miR-16	5'-UAGCAGCACGUAATAUUGGCG-3' (서열 번호 101)
	이중 혼성화 역전사 프라이머	5'-GTGCAGGGTCCGAGGTGCTACGCC-3' (서열 번호 102)
	miR-16 특이적 PCR 프라이머	5'-CGCGCTAGCAGCACGTAAT-3' (서열 번호 103)
	유니버설 PCR 프라이머	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (서열 번호 104)
miR-21 검출	miR-21	5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3' (서열 번호 105)
	이중 혼성화 역전사 프라이머	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATaagctatcaac -3' (서열 번호 106)
	miR-21 특이적 PCR 프라이머	5'-CGGTAGCTTATCAGACTGATGT-3' (서열 번호 107)
	유니버설 PCR 프라이머	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCAT-3' (서열 번호 108)
miR-206 검출	miR-206	5'-UGGAAUGUAAGGAAGUGUGG-3' (서열 번호 109)
	이중 혼성화 역전사 프라이머	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCATATCCACCAC-3' (서열 번호 110)
	miR-206 특이적 PCR 프라이머	5'-CGCTGGAATGTAAGGAAGT-3' (서열 번호 111)
	유니버설 PCR 프라이머	5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCAT-3' (서열 번호 112)

[0077] 이중 혼성화 역전사 프라이머의 사용에 따른 표적 핵산의 검출을 실시예 2에 기재된 정량적 PCR 방법으로 확인하였다.

[0078] 도 5A는 miR-16에 대한 검출 민감도, 도 5B는 miR-21에 대한 검출 민감도, 및 도 5C는 miR-206에 대한 검출 민감도를 나타낸다. 도 5A 내지 도 5C에 나타난 바와 같이, 이중 혼성화 역전사 프라이머를 사용한 경우 Cp 값이 현저하게 낮았다.

[0079] 실시예 6. 표적 핵산 miR-16 및 miR-210에 대한 검출 특이도의 확인

[0080] 표적 핵산인 miR-16 및 miR-210 각각에 대하여 이중 혼성화 역전사 프라이머의 표적 검출 특이도를 확인하였다.

[0081] 표적 핵산인 miR-21 및 miR-206, 이중 혼성화 역전사 프라이머, miRNA 특이적 PCR 프라이머의 서열 및 유니버설 PCR 프라이머는 표 5에 나타내었다. 진한 글씨의 핵산은 치환된 핵산을 나타낸다. 예를 들면, miR16-M1A은 miR16의 핵산 서열 중 5' 말단으로부터 첫번째 핵산이 아데노신(A)임을 나타낸다.

표 5

	핵산 서열
--	-------

miR-16 검출	miR-16	5'-UAGCAGCACGUAATAUUGGCG-3' (서열 번호 113)
	miR16-M1A	5'- <b>A</b> AGCAGCACGUAUUUUAUUGGCG-3' (서열 번호 114)
	miR16-M2U	5'- <b>U</b> UGCAGCACGUAUUUUAUUGGCG-3' (서열 번호 115)
	miR16-M3U	5'- <b>U</b> AUGCAGCACGUAUUUUAUUGGCG-3' (서열 번호 116)
	miR16-M4A	5'- <b>U</b> AG <b>A</b> GCAGCACGUAUUUUAUUGGCG-3' (서열 번호 117)
	miR16-M19U	5'-UAGCAGCACGUAUUUUAUUGGCG-3' (서열 번호 118)
	miR16-M20C	5'-UAGCAGCACGUAUUUUAUUG <b>C</b> CG-3' (서열 번호 119)
	miR16-M21A	5'-UAGCAGCACGUAUUUUAUUG <b>G</b> AG-3' (서열 번호 120)
	miR16-M22U	5'-UAGCAGCACGUAUUUUAUUGGCU-3' (서열 번호 121)
	이중 혼성화 역전사 프라이머	5'-GTGCAGGGTCCGAGGTCTACGCC-3' (서열 번호 122)
	3' 프라이밍 프라이머	5'-GTGCAGGGTCCGAGGTCGCCAA-3' (서열 번호 123)
	miR-16 특이적 PCR 프라이머	5'-CGCGCTAGCAGCACGTAAT-3' (서열 번호 124)
유니버설 PCR 프라이머	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (서열 번호 125)	
miR-210 검출	miR-210	5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3' (서열 번호 126)
	miR-210-M1A	5'- <b>A</b> UGUGCGUGUGACAGCGGCUGA-3' (서열 번호 127)
	miR-210-M2A	5'- <b>C</b> AGUGCGUGUGACAGCGGCUGA-3' (서열 번호 128)
	miR-210-M3A	5'- <b>C</b> U <b>A</b> UGUGCGUGUGACAGCGGCUGA-3' (서열 번호 129)
	miR-210-M4C	5'- <b>C</b> UG <b>C</b> GUGUGUGACAGCGGCUGA-3' (서열 번호 130)
	miR-210-M6A	5'- <b>C</b> UGUGAGUGUGACAGCGGCUGA-3' (서열 번호 131)
	miR-210-M19U	5'- <b>C</b> UGUGCGUGUGACAGCGGUUGA-3' (서열 번호 132)
	miR-210-M20G	5'- <b>C</b> UGUGCGUGUGACAGCG <b>G</b> GGA-3' (서열 번호 133)
	miR-210-M21A	5'- <b>C</b> UGUGCGUGUGACAGCGCU <b>A</b> A-3' (서열 번호 134)
	miR-210-M22G	5'- <b>C</b> UGUGCGUGUGACAGCGG <b>C</b> UGG-3' (서열 번호 135)
	이중 혼성화 역전사 프라이머	5'-CCGGTGAGGTCTTTGGTTCATACGCACAGTCAGC-3' (서열 번호 136)
	3' 프라이밍 프라이머	5'-CCGGTGAGGTCTTTGGTTCATCAGCC-3' (서열 번호 137)
	miR-210 특이적 PCR 프라이머	5'-CTGTGCGTGTGACAGC-3' (서열 번호 138)
	유니버설 PCR 프라이머	5'-CCGGTGAGGTCTTTGGTTCAT-3' (서열 번호 139)

[0083] 핵산 서열이 치환된 표적 핵산에 대한 이중 혼성화 역전사 프라이머의 특이도를 실시예 2에 기재된 정량적 PCR 방법으로 확인하였다.

[0084] 도 6(a)는 miR-16에 대한 특이도, 및 도 6(b)는 miR-210에 대한 특이도를 나타낸다(◆; 이중 혼성 프라이밍, ▲; 3'-말단 프라이밍). 도 6(a) 내지 도 5(b)에 나타난 바와 같이, 5' 말단 및 3' 말단에서 3'프라이밍 프라이머에 비하여 이중 혼성화 역전사 프라이머에서 향상된 특이도가 나타났다.

[0085] 실시예 7. Let-7 패밀리 간의 교차-반응성의 확인

[0086] Let-7 패밀리에 대하여 이중 혼성화 역전사 프라이머의 표적 검출 특이도를 확인하였다.

[0087] 표적 핵산, 이중 혼성화 역전사 프라이머 및 miRNA 특이적 PCR 프라이머의 서열은 표 6에 나타내었다. 진한 글씨의 핵산은 치환된 핵산을 나타낸다.

표 6

		핵산 서열
표적 서열	let-7a	5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-3' (서열 번호 140)
	let-7b	5'-UGAGGUAGUAGGUUGUGUGUU-3' (서열 번호 141)
	let-7c	5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUGUU-3' (서열 번호 142)
	let-7d	5'- <b>A</b> GAGGUAGUAGGUUG <b>C</b> AUAGUU-3' (서열 번호 143)
	let-7e	5'-UGAGGUAG <b>G</b> AGGUUGUAUAGUU-3' (서열 번호 144)

이중 혼성화 역전사 프라이머	let-7a	5'-GTGCAGGGTCCGAGGTACCTCAAACCT-3' (서열 번호 145)
	let-7b	5'-GTGCAGGGTCCGAGGTACCTCAAACC-3' (서열 번호 146)
	let-7c	5'-GTGCAGGGTCCGAGGTACCTCAAACC-3' (서열 번호 147)
	let-7d	5'-GTGCAGGGTCCGAGGTACCTCTAACT-3' (서열 번호 148)
	let-7e	5'-GTGCAGGGTCCGAGGTACCTCAAACCT-3' (서열 번호 149)
miRNA 특이적 PCR 프라이머	let-7a	5'-GCCGCTGAGGTAGTAGGTTGTA-3' (서열 번호 150)
	let-7b-1	5'-CGCTGAGGTAGTAGGTTGTG-3' (서열 번호 151)
	let-7c	5'-GCCGCTGAGGTAGTAGGTTGTA-3' (서열 번호 152)
	let-7d	5'-GCCGCAGAGGTAGTAGGTTGC-3' (서열 번호 153)
	let-7e	5'-TGCCGGTGAGGTAGGAGG-3' (서열 번호 154)

[0089] Let-7 패밀리에 대한 이중 혼성화 역전사 프라이머의 교차 반응성(%)을 실시예 2에 기재된 정량적 PCR 방법으로 확인하였다.

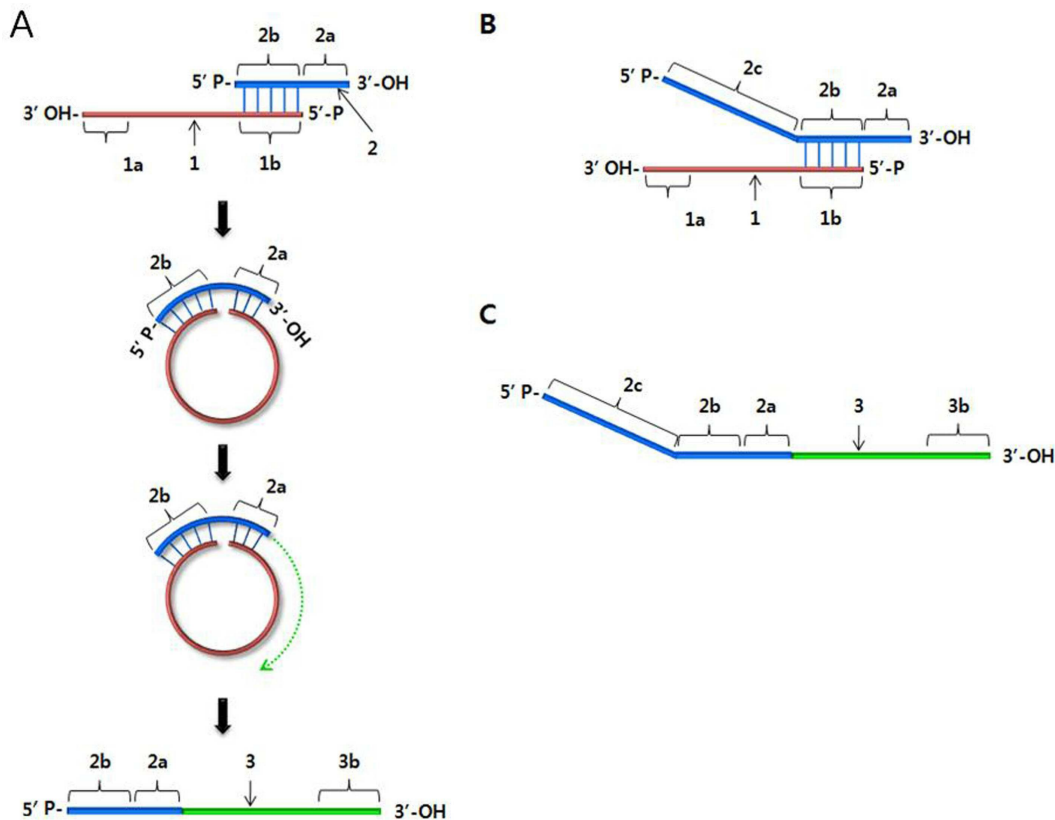
표 7

	let-7a	let-7b	let-7c	let-7d	let-7e
let-7a		0.06	1.28	0.07	0.21
let-7b	4.07		3.18	0.06	0.03
let-7c	1.72	0.22		0.06	0.03
let-7d	0.18	0.00	0.03		0.00

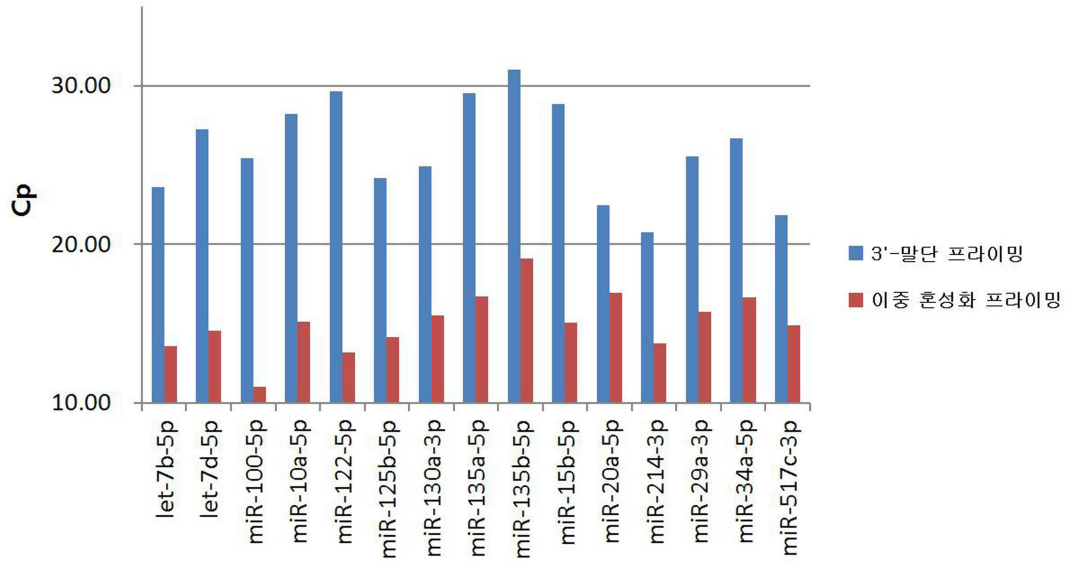
[0091] 표 7은 Let-7 패밀리에 대한 이중 혼성화 역전사 프라이머의 교차 반응성(%)을 나타낸다. 표 7에 나타난 바와 같이, Let-7 패밀리에 대한 이중 혼성화 역전사 프라이머의 교차 반응성은 5% 미만으로 확인되었다.

도면

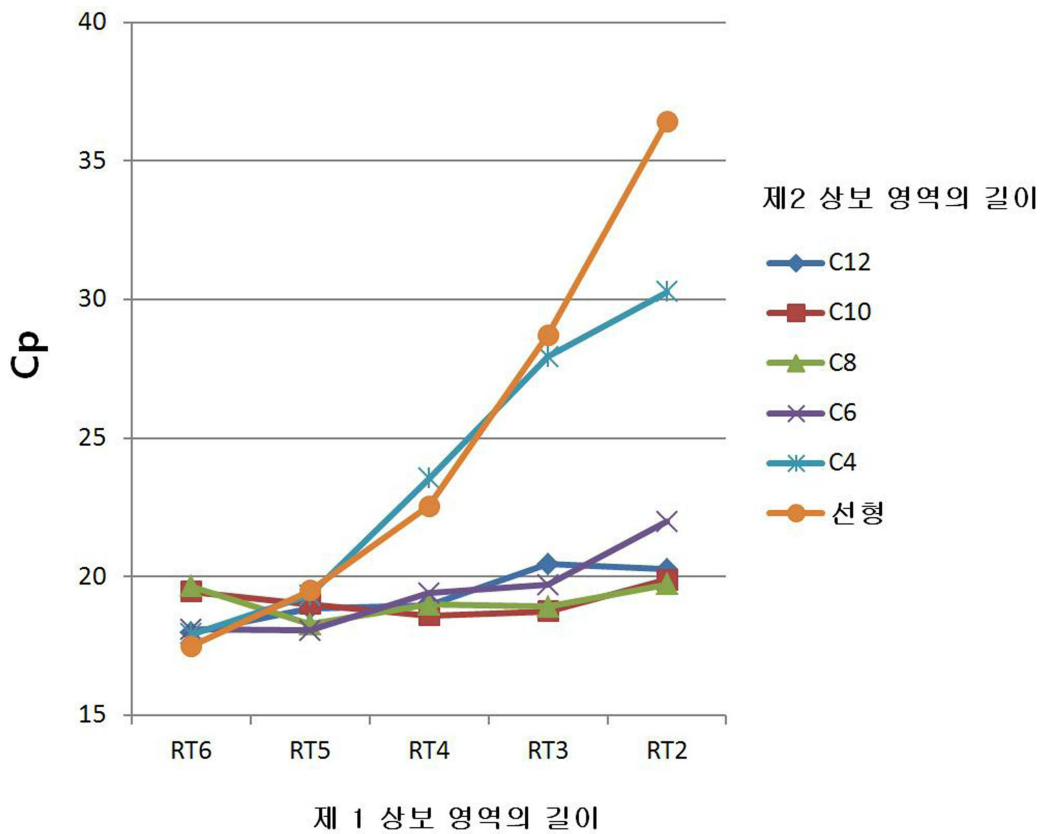
도면1



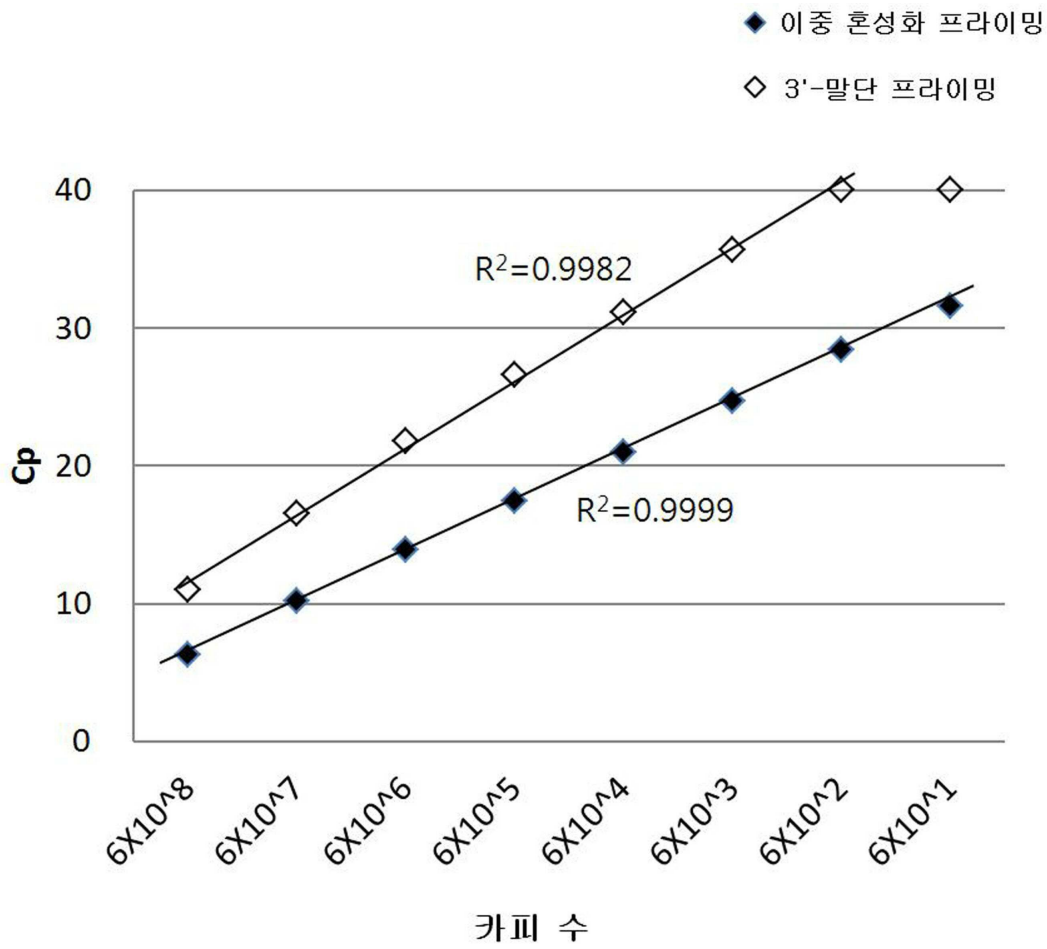
도면2



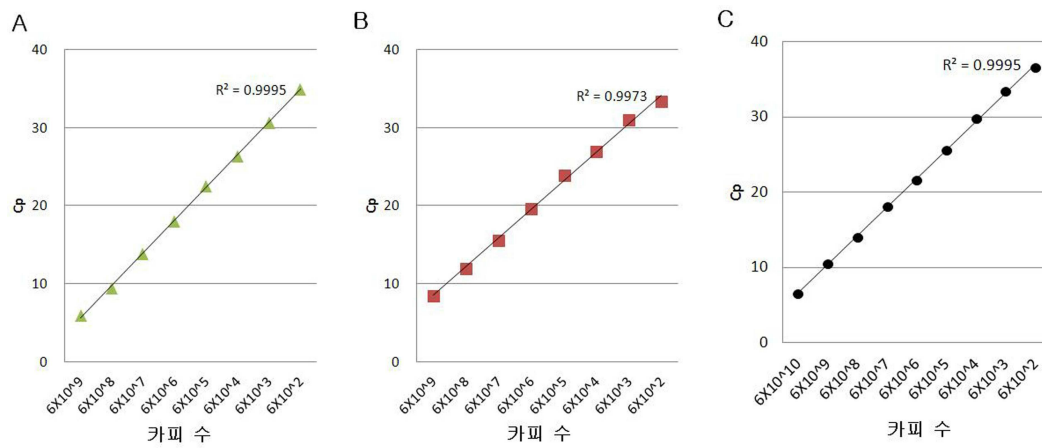
도면3



도면4

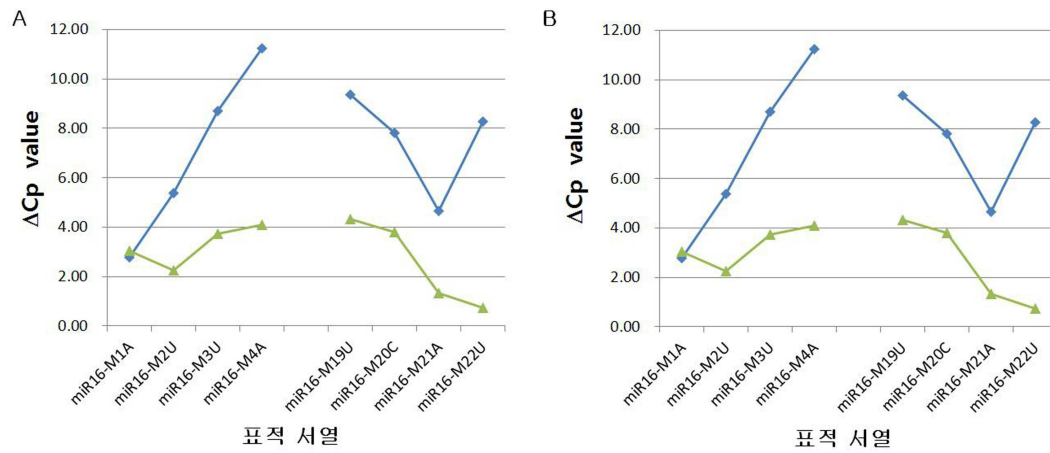


도면5





도면6



서열 목록

<110> SAM SUNG ELECTRONICS

<120> Polynucleotide and use thereof

<130> PN097724

<160> 154

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> microRNA

<400> 1

ugagguagua gguugugugg uu

22

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3' priming reverse transcription primer

<400> 2

cggtagggtc tttggttcat aaccac

26

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 3  
 cggtgaggtc tttggttcat ctacctcaaa cc 32  
 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miRNA specific PCR primer  
 <400> 4  
 cgctgaggta gtaggttg 20  
 <210> 5  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 ><223> microRNA  
 <400> 5  
 agagguagua gguugcauag uu 22  
 <210> 6  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 3' priming reverse transcription primer  
 <400> 6  
 cggtgaggtc tttggttcat aactat 26  
 <210> 7  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 7  
 cggtgaggtc tttggttcat ctacctctaa ct 32  
 <210> 8  
 <211> 19

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miRNA specific PCR primer  
 <400> 8  
 cgcagaggta gtaggttgc 19  
 <210> 9  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 9  
 aacccguaga uccgaacuug ug 22  
 <210> 10  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 3' priming reverse transcription primer  
 <400> 10  
 cggtgaggtc tttggttcat cacaag 26  
 <210> 11  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 11  
 cggtgaggtc tttggttcat cgggttcaca 30  
 <210> 12  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miRNA specific PCR primer  
 <400> 12  
 caaccgtag atccgaa 17

<210>	13	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	microRNA	
<400>	13	
uaccucuag auccgaauu gug		23
<210>	14	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	3' priming reverse transcription primer	
<400>	14	
cggtgaggtc ttggttcat cacaaa		26
<210>	15	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Dual hybridization reverse transcription primer	
<400>	15	
cggtgaggtc ttggttcat agggtacaca		30
<210>	16	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miRNA specific PCR primer	
<400>	16	
cgtaccctgt agatccgaa		19
<210>	17	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	microRNA	
<400>	17	

uggaguguga caaugguguu ug	22
<210> 18	
<211>	
26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 3' priming reverse transcription primer	
<400> 18	
cggtgaggtc tttggttcat caaaca	26
<210> 19	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer	
<400> 19	
cggtgaggtc tttggttcat acactccaca aa	32
<210> 20	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
><223> miRNA specific PCR primer	
<400> 20	
cgtggagtgt gacaatgg	18
<210> 21	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> microRNA	
<400> 21	
ucccugagac ccuaacuugu ga	22
<210> 22	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> 3' priming reverse transcription primer  
 <400> 22  
 cggtgaggtc tttggttcat tcacaa 26

<210> 23  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 23  
 cggtgaggtc tttggttcat ctcaggatc ac 32  
 <210> 24  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> miRNA specific PCR primer  
 <400> 24  
 cgtccctgag acctaac 18  
 <210> 25  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> microRNA  
 <400> 25  
 cagugcaaug uaaaaaggc au 22  
 <210> 26  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 3' priming reverse transcription primer  
 <400> 26  
 cggtgaggtc tttggttcat atgccc 26  
 <210> 27  
 <211> 30

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 27  
 cggtgaggtc tttggttcat gcactgatgc 30

<210> 28  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miRNA specific PCR primer  
 <400> 28  
 ggcagtgca atgttaa 18

<210> 29  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 29  
 uauggcuuuu uauuccuaug uga 23

<210> 30  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 3' priming reverse transcription primer  
 <400> 30  
 cggtgaggtc tttggttcat tcacat 26

<210> 31  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 31  
 cggtgaggtc tttggttcat aagccatatac ac 32

<210>	32	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miRNA specific PCR primer	
<400>	32	
	cgctatggct tttattcct	20
<210>	33	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	microRNA	
<400>	33	
	uauggcuuuu cauuccuaug uga	23
<210>	34	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	3' priming reverse transcription primer	
<400>	34	
	cggtgaggtc ttggttcat tcacat	26
<210>	35	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Dual hybridization reverse transcription primer	
<400>	35	
	cggtgaggtc ttggttcat gccatatcac	30
<210>	36	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miRNA specific PCR primer	



<400> 36  
 cgtatggctt ttcattcct 19

<210> 37  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 37  
 uagcagcaca ucaugguuuu ca 22

<210> 38  
 <211>  
 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 3' priming reverse transcription primer  
 <400> 38  
 cggtgaggtc tttggttcat tgtaaa 26

<210> 39  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 39  
 cggtgaggtc tttggttcat ctgctatgta 30

<210> 40  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 ><223> miRNA specific PCR primer  
 <400> 40  
 cgtagcagca catcatgg 18

<210> 41  
 <211> 23  
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence	
<220><223> microRNA	
<400> 41	
uaaagugcuu auagugcagg uag	23
<210> 42	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 3' priming reverse transcription primer	
<400> 42	
cggtgaggtc tttggttcat ctacct	26
<210> 43	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer	
<400> 43	
cggtgaggtc tttggttcat gcactttact ac	32
<210> 44	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miRNA specific PCR primer	
<400> 44	
ccgctaaagt gcttatagtg c	21
<210> 45	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> microRNA	
<400> 45	
acagcaggca cagacaggca gu	22
<210> 46	

<211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 3' priming reverse transcription primer  
 <400> 46  
 cggtgaggtc ttggttcat actgcc 26  
 <210> 47  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 47  
 cggtgaggtc ttggttcat cctgctgtac tg 32  
  
 <210> 48  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miRNA specific PCR primer  
 <400> 48  
 cacagcagge acagaca 17  
 <210> 49  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 49  
 uagcaccauc ugaaaucggu ua 22  
 <210> 50  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 3' priming reverse transcription primer  
 <400> 50

cggtgaggtc tttggttcat taaccg	26
<210> 51	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer	
<400> 51	
cggtgaggtc tttggttcat tgggtctata ac	32
<210> 52	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miRNA specific PCR primer	
<400> 52	
cgctagcacc atctgaaat	19
<210> 53	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> microRNA	
<400> 53	
uggcaguguc uuagcugguu gu	22
<210> 54	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 3' priming reverse transcription primer	
<400> 54	
cggtgaggtc tttggttcat acaacc	26
<210> 55	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer

<400> 55  
 cggtgaggtc tttggttcat cactgccaac aa 32

<210> 56  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> miRNA specific PCR primer

<400> 56  
 gcctggcagt gtcttagc 18

<210> 57  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> microRNA

<400> 57  
 aucgugcauc cuuuuagagu gu 22

<210> 58  
 <211>  
 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 3' priming reverse transcription primer

<400> 58  
 cggtgaggtc tttggttcat acactc 26

<210> 59  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer

<400> 59  
 cggtgaggtc tttggttcat tgcacgatac ac 32

<210> 60  
 <211> 18

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220  
 ><223> miRNA specific PCR primer  
 <400> 60  
 cgatcgtgca tcctttta 18  
 <210> 61  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> universal PCR primer  
 <400> 61  
 cggtgaggtc ttggttcat 20  
 <210> 62  
 <211> 42  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 62  
 cggugagguc uuugguucau uagcagcacg uaaauauugg cg 42  
  
 <210> 63  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miRNA specific PCR primer  
 <400> 63  
 cgcgctagca gcacgtaaat 20  
 <210> 64  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> universal PCR primer  
 <400> 64  
 gtcagggtc cgaggt 16

<210> 65  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer

<400> 65  
 gtgcagggtc cgaggtaaga cctcaccgcg 30

<210> 66  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer

<400> 66  
 gtgcagggtc cgaggtaaga cctcaccgcg c 31

<210> 67  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer

<400> 67  
 gtgcagggtc cgaggtaaga cctcaccgcg cc 32

<210> 68  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer

<400> 68  
 gtgcagggtc cgaggtaaga cctcaccgcg cca 33

<210> 69  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer

<400> 69  
 gtgcagggtc cgaggtaaga cctcaccgcg ccaa 34

<210> 70  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 70  
 gtgcagggtc cgaggtgacc tcaccgcg 28

<210> 71  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 71  
 gtgcagggtc cgaggtgacc tcaccgcg 29

<210> 72  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 72  
 gtgcagggtc cgaggtgacc tcaccgcgcc 30

<210> 73  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 73  
 gtgcagggtc cgaggtgacc tcaccgcgcc a 31

<210> 74  
 <211> 32  
 <212> DNA



<213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 74  
 gtgcagggtc cgaggtgacc tcaccgccc aa 32

<210> 75  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 75  
 gtgcagggtc cgaggtcctc accgcg 26

<210> 76  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 76  
 gtgcagggtc cgaggtcctc accgcg 27

<210> 77  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 77  
 gtgcagggtc cgaggtcctc accgcgcc 28

<210> 78  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 78  
 gtgcagggtc cgaggtcctc accgcgcca 29

<210> 79

<211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer

<400> 79  
 gtgcagggtc cgaggtcctc accgcgccaa 30

<210> 80  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer

<400> 80  
 gtgcagggtc cgaggttcac cgcg 24

<210> 81  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer

<400> 81  
 gtgcagggtc cgaggttcac cgcgc 25

<210> 82  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer

<400> 82  
 gtgcagggtc cgaggttcac cgcgcc 26

<210> 83  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer

<400> 83

gtgcagggtc cgaggttcac cgcgcca	27
<210> 84	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer	
<400> 84	
gtgcagggtc cgaggttcac cgcgcca	28
<210> 85	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer	
<400> 85	
gtgcagggtc cgaggtaccg cg	22
<210> 86	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer	
<400> 86	
gtgcagggtc cgaggtaccg cgc	23
<210> 87	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer	
<400> 87	
gtgcagggtc cgaggtaccg cgcc	24
<210> 88	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 88  
 gtgcagggtc cgaggtaccg cgcca 25

<210> 89  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 89  
 gtgcagggtc cgaggtaccg cgccaa 26

<210> 90  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 3' priming reverse transcription primer  
 <400> 90  
 gtgcagggtc cgaggtcgc 18

<210> 91  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 3' priming reverse transcription primer  
 <400> 91  
 gtgcagggtc cgaggtcgc 19

<210> 92  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 3' priming reverse transcription primer  
 <400> 92  
 gtgcagggtc cgaggtcgcc 20

<210> 93  
 <211> 21

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 3' priming reverse transcription primer  
 <400> 93  
  
 gtgcagggtc cgaggtcgcc a 21  
 <210> 94  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 3' priming reverse transcription primer  
 <400> 94  
 gtgcagggtc cgaggtcgcc aa 22  
 <210> 95  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 95  
 cugugcgugu gacagcggcu ga 22  
 <210> 96  
 <211>  
 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 96  
 cggtgaggtc ttggttcat acgcacagtc agc 33  
 <210> 97  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> 3' priming reverse transcription primer  
 <400> 97  
 cggtgaggtc ttggttcat tcagcc 26

<210>	98	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
><223>	3' end PCR primer	
<400>	98	
	cgctggaatg taaggaagt	19
<210>	99	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	5' end PCR primer	
<400>	99	
	gtgcgtgtga cagcgg	16
<210>	100	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	universal PCR primer	
<400>	100	
	cggtgaggtc tttggtcat	20
<210>	101	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	microRNA	
<400>	101	
	uagcagcacg uaaatauugg cg	22
<210>	102	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Dual hybridization reverse transcription primer	

<400> 102  
 gtgcagggtc cgaggtgcta cgcc 24  
 <210> 103  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miRNA specific PCR primer  
  
 <400> 103  
 cgcgctagca gcacgtaaat 20  
 <210> 104  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> universal PCR primer  
 <400> 104  
 gtgcagggtc cgaggt 16  
 <210> 105  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 105  
 uagcuuauca gacugauguu ga 22  
 <210> 106  
 <211  
 > 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 106  
 cggtaggtc tttggtcat aagctatcaa c 31  
 <210> 107  
 <211> 22  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence	
<220><223> miRNA specific PCR primer	
<400> 107	
cggtagctta tcagactgat gt	22
<210> 108	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> universal PCR primer	
<400> 108	
cggtgaggtc tttggttcat	20
<210> 109	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> microRNA	
<400> 109	
uggaauguaa ggaagugugu gg	22
<210> 110	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer	
<400> 110	
cggtgaggtc tttggttcat attccaccac	30
<210> 111	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miRNA specific PCR primer	
<400> 111	
cgctggaatg taaggaagt	19
<210> 112	



<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> universal PCR primer  
 <400> 112  
 cggtgaggtc tttggttcat 20  
 <210> 113  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
  
 <400> 113  
 uagcagcacg uaaatauugg cg 22  
 <210> 114  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 114  
 aagcagcacg uaaaauuugg cg 22  
 <210> 115  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 115  
 uugcagcacg uaaaauuugg cg 22  
 <210> 116  
 <211> 22  
 <212>  
 > RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 116

uaucagcacg uaaauauugg cg	22
<210> 117	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> microRNA	
<400> 117	
uagaagcacg uaaauauugg cg	22
<210> 118	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> microRNA	
<400> 118	
uagcagcacg uaaauauuug cg	22
<210> 119	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> microRNA	
<400> 119	
uagcagcacg uaaauauuugc cg	22
<210> 120	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> microRNA	
<400> 120	
uagcagcacg uaaauauugg ag	22
<210> 121	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> microRNA	

<400> 121	
uagcagcacg uaaauauugg cu	22
<210> 122	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer	
<400> 122	
gtgcagggtc cgaggtgcta cgcc	24
<210> 123	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 3' priming reverse transcription primer	
<400> 123	
gtgcagggtc cgaggtcgcc aa	22
<210> 124	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miRNA specific PCR primer	
<400> 124	
cgcgctagca gcacgtaaat	20
<210> 125	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> universal PCR primer	
<400> 125	
gtgcagggtc cgaggt	16
<210> 126	
<211> 22	
<212> RNA	

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 126  
 uagcuuauca gacugauguu ga 22

<210> 127  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 127  
 augugcgugu gacagcggcu ga 22

<210> 128  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 128  
 cagugcgugu gacagcggcu ga 22

<210> 129  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 129  
 cuaugcgugu gacagcggcu ga 22

<210> 130  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 130  
 cugcgugugu gacagcggcu ga 22

<210> 131

<211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 131  
 cugugagugu gacagcggcu ga 22  
 <210> 132  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 132  
 cugugcgugu gacagcgguu ga 22  
  
 <210> 133  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 133  
 cugugcgugu gacagcggcg ga 22  
 <210> 134  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 134  
 cugugcgugu gacagcggcu aa 22  
 <210> 135  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 135

cugugcgugu gacagcggcu gg	22
<210> 136	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Dual hybridization reverse transcription primer	
<400> 136	
ccggtgaggt ctttggttca tacgcacagt cagc	34
<210> 137	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 3' priming reverse transcription primer	
<400> 137	
cggtgaggtc ttgtttcat tcagcc	26
<210> 138	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miRNA specific PCR primer	
<400> 138	
ctgtgcgtgt gacagc	16
<210> 139	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> universal PCR primer	
<400> 139	
cggtgaggtc ttgtttcat	20
<210> 140	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> microRNA  
 <400> 140  
 ugagguagua gguuguauag uu 22  
  
 <210> 141  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 141  
 ugagguagua gguugugugg uu 22  
 <210> 142  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 142  
 ugagguagua gguuguauagg uu 22  
 <210> 143  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 143  
 agagguagua gguugcauag uu 22  
  
 <210> 144  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> microRNA  
 <400> 144  
 ugagguagga gguuguauag uu 22  
 <210> 145  
 <211> 26

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 145  
 gtgcagggtc cgaggtacct caaact 26  
 <210> 146  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 146  
 gtgcagggtc cgaggtacct caaacc 26  
 <210> 147  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 147  
 gtgcagggtc cgaggtacct caaacc 26  
 <210> 148  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 148  
 gtgcagggtc cgaggtacct ctaact 26  
 <210> 149  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Dual hybridization reverse transcription primer  
 <400> 149  
 gtgcagggtc cgaggtacct caaact 26



<210> 150  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miRNA specific PCR primer  
 <400> 150  
 gccgctgagg tagtaggtg ta 22  
 <210> 151  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220><223> miRNA specific PCR primer  
 <400> 151  
 cgctgaggta gtaggttg 20  
 <210> 152  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miRNA specific PCR primer  
 <400> 152  
 gccgctgagg tagtaggtg ta 22  
 <210> 153  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miRNA specific PCR primer  
 <400> 153  
 gccgcagagg tagtaggtg c 21  
  
 <210> 154  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miRNA specific PCR primer

<400> 154

tgccggtgag gtaggagg

18