



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0079394

(43) 공개일자 2015년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0141492
(22) 출원일자 2014년10월20일
심사청구일자 2014년10월20일
(30) 우선권주장
1020130166366 2013년12월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
주식회사 바이오이즈
서울시 구로구 디지털로 32길 30 703호(구로동,
코오롱빌란트1차)
(72) 발명자
김성천
서울특별시 서대문구 독립문공원길 17, 110동 20
2호(현저동, 독립문극동아파트)

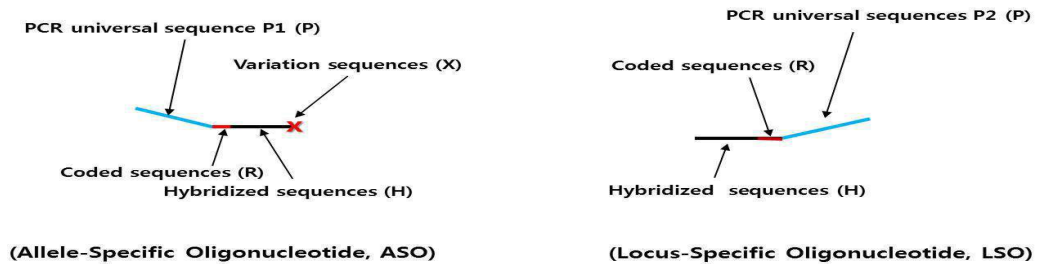
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 표적 핵산의 유전자변이 분석 방법 및 키트

(57) 요약

본 발명은 프로브를 이용한 유전자 변이 분석방법으로, 구체적으로 분석하고자하는 유전자변이의 특정영역에 완전하게 상보적 결합하는 프로브들을 제조하여, 생체시료에 포함된 유전자변이를 다중 검사로 분석함으로써 생체 시료에서 유전자변이의 생물학적 의미를 결정하는 방법 및 키트를 제공한다.

대표도



명세서

청구범위

청구항 1

표적 핵산에 존재하는 유전자 변이 및 이에 인접한 5'방향에 있는 상기 유전자의 상보적 염기서열들을 포함하는 변이유형 특이적 올리고뉴클레오타이드(ASO) 프로브와 상기 유전자 변이에서 3'방향으로 일정한 거리에 있는 상기 유전자의 상보적 염기서열들을 포함하는 변이위치 특이적 올리고뉴클레오타이드(LSO) 프로브;

상기 ASO 프로브와 상기 LSO 프로브에 유전자 변이를 지시하는 염기서열을 포함하는 부위 및 유니버설 PCR 프라이머의 상보적 염기서열들을 포함하는 부위; 및

상기 표적 핵산, 상기 ASO 프로브, LSO 프로브 및 유니버설 PCR 프라이머 등으로 신장 및/또는 연결 반응한 후, PCR하여 확보한 증폭산물을 분석한 결과로 상기 유전자 변이를 분석하는 것을 특징으로 하는, 프로브를 이용한 유전자 분석 방법 및 키트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 표적 핵산에 하나 또는 그 이상인 유전자 변이를 한 반응으로 분석하는 것을 특징으로 하는, 프로브를 이용한 유전자 분석방법 및 키트.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 유전자 변이를 지시하는 염기서열을 포함하는 부위는 상기 부위를 구성하는 염기들의 순서이거나 상기 염기서열 부위의 길이인 것을 특징으로 하는, 프로브를 이용한 유전자 분석방법 및 키트.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 유전자 변이를 지시하는 염기서열 부위를 구성하는 염기의 순서는 zip code로 하는 것을 특징으로 하는, 프로브를 이용한 유전자 분석방법 및 키트.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 PCR로 확보된 증폭산물의 분석은 상기 ASO 프로브 또는 상기 LSO 프로브로 결정되는 상기 PCR 증폭산물에 있는 유전자 변이 지시 염기서열 부위를 구성하는 염기의 순서로 하는 것을 특징으로 하는, 프로브를 이용한 유전자 분석방법 및 키트.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 PCR로 확보된 증폭산물의 분석은 상기 ASO 프로브 또는 상기 LSO 프로브로 결정되는 상기 PCR 증폭산물의 길이로 하는 것을 특징으로 하는, 프로브를 이용한 유전자 분석방법 및 키트.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 PCR로 확보된 증폭산물의 분석은 상기 유전자 변이를 지시하는 염기서열을 포함하는 부위의 존재에 상관없이 상기 ASO 프로브와 LSO 프로브로 결정되는 상기 PCR 증폭산물에 있는 상기 표적 핵산의 염기서열 부위에 상보적으로 결합하도록 설계된 검출용 프로브로 하는 것을 특징으로 하는, 프로브를 이용한 유전자 분석 방법 및 키트.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 검출용 프로브는 ASO 프로브와 LSO 프로브가 표적 핵산에 결합하는 위치 사이의 염기서열 부위를 포함하는 염기서열이며, 상기 ASO 프로브와 LSO 프로브 사이의 부위의 염기 서열 또는 상기 염기 서열에 상보적인 염기 서열을 갖고, 5' 말단에 형광 물질이, 3' 말단에 소광 물질이 부가되는 프로브를 사용하는 것을 특징으로 하는, 프로브를 이용한 유전자 분석 방법 및 키트.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 유전자 변이의 결정을 유전자 변이를 지시하는 염기서열 부위를 구성하는 염기들의 순서로 하는 경우에 상기 유전자 변이의 야생형 및 변이형을 한 반응으로 분석하는 것을 특징으로 하는, 프로브를 이용한 유전자 분석방법 및 키트.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 유전자 변이의 결정을 상기 증폭산물의 길이 또는 상기 검출용 프로브로 하는 경우에는 야생형과 변이형 반응구로 나누어 분석하는 것을 특징으로 하는, 프로브를 이용한 유전자 분석방법 및 키트.

청구항 11

제1항 내지 제10항에 있어서, 상기 ASO 프로브와 상기 LSO 프로브를 제조하는 단계;

상기 유전자 변이를 포함하는 핵산, 상기 ASO 프로브와 상기 LSO 프로브를 혼성화 반응시켜 부분적 이중가닥 핵산을 형성하는 단계;

상기 부분적 이중가닥 핵산을 완전한 이중가닥 핵산으로 제조하는 단계;

상기 유니버설 PCR 프라이머로 상기 완전한 이중가닥핵산을 PCR하여 증폭산물을 제조하는 단계; 및

상기 증폭산물을 분석하여 상기 유전자 변이를 결정하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는, 프로브를 이용한 유전자 분석방법 및 키트.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 유전자 변이를 포함하는 핵산, 상기 ASO 프로브와 상기 LSO 프로브를 혼성화 반응시켜 부분적 이중가닥 핵산을 형성하는 단계; 및

상기 부분적 이중가닥 핵산을 완전한 이중가닥 핵산으로 제조하는 단계;

를 한 번 또는 그 이상을 수행하는 것을 특징으로 하는, 프로브를 이용한 유전자 분석방법 및 키트.

청구항 13

상기 유전자 변이를 분석하여 상기 유전자 변이를 포함하는 생체시료에서 상기 유전자 변이의 야생형 및 변이형에 대한 발생빈도를 분석하는 방법을 특징으로 하는, 프로브를 이용한 유전자 분석 방법 및 키트.

청구항 14

PCR용 시약;

ASO 프로브와 LSO 프로브의 연결용 시약; 및

상기 ASO 프로브와 LSO 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는, 프로브를 이용한 유전자 분석키트.

청구항 15

프로브를 이용한 유전자 분석방법을 통해 실시하는 것을 특징으로 하고, 상기 유전자를 포함하는 시료에서 핵산을 준비하는 시료처리장치, 상기 ASO 프로브, LSO 프로브와 상기 핵산을 혼성화시켜 형성된 부분적 이중가닥핵산에서 완전한 이중가닥을 제조하고 이를 주형으로 증폭하는 모듈 및 상기 증폭된 산물을 분석하는 모듈로 구성된 유전자 분석 시스템을 특징으로 하는, 프로브를 이용한 유전자 분석장치.

청구항 16

상기 표적 핵산을 에볼라바이러스로 하여 상기 에볼라바이러스의 유전자 변이를 분석하기 위해 상기 ASO 프로브 및 상기 LSO 프로브를 포함하는 프로브 세트를 특징으로 하는, 프로브를 이용한 유전자 분석 방법, 키트 및 장치.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은, 표적 핵산에서의 유전자 변이의 종류를 판별하기 위해 사용되는 프로브 세트 및 유전자 변이의 판별 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은, 에볼라바이러스 등을 포함한 표적 핵산을 판별하기 위한 프로브 세트 및 변이의 판별 방법 및 키트에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 유전자 변이(Gene Variation)는 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)와 구조변이(Structural Variation) 등이 있다. 유전자 변이는 표현형(phenotype)의 변화, 질병에 대한 민감성, 그리고 치료 약제에 대한 반응의 차이 등 개체 간의 차이를 결정짓는다고 알려졌으며, 특히 질환 발생과 진행과정에 관여하는 변이들을 질환연관 유전적 변이(Disease-associated Genetic Variants)라고 칭한다.

[0003] 유전자 변이(염기 다형을 포함함)는 생물의 표현형에 큰 영향을 주는 인자이며, 변이의 종류를 조사함으로써 그 표현형을 예측하거나, 약제의 효과를 예측하는 것이 빈번히 행해지고 있다. 변이 염기의 종류를 판별하는 방법으로서, 직접 시퀀스법, 인베터법, 다형 특이적 프로브를 고정화한 DNA 칩을 사용하는 방법, 대립 유전자(allele) 특이적 PCR법 등이 알려져 있지만, 판별에 걸리는 시간이나 검출 감도의 면에서 충분하지 않기 때문에, 보다 간편하며 고감도로 유전자 변이의 종류를 판별할 수 있는 방법의 개발이 요망되고 있다.

[0004] 에볼라 바이러스는 급성 열성감염을 일으키는 바이러스로 에볼라 바이러스 감염에 의한 열성 질환은 갑작스러운 두통과 근육통, 발열이 발생한 후 전신 무력감과 허탈, 피부 발진, 저혈압, 그리고 흔히 전신성 출혈로 진행되는 것이 특징으로 사망률이 약 60%에 이르는 중증 감염병이다. 2014년 3월 기니에서 발열, 구토, 심한 설사 환자에서 에볼라 바이러스병이 확인되었다. 과거 에볼라바이러스병은 대개 아프리카 중심부에서 발생하였고, 서아프리카에서는 1994년 Ivory Coast에서 단 한 명 만이 발병한 적이 있다. 2014년 서아프리카 에볼라바이러스병 유행은 2014년 10월 20일 현재 9,02000명 이상이 발병하였으며 기니, 시에라리온, 라이베리아, 나이지리아의 라고스, 미국 및 스페인까지 확산되었으며 이번 유행을 일으킨 에볼라 바이러스는 과거 아프리카 중심부에서 유행하였던 Zaire 에볼라 바이러스로 확인되었다.

[0005] 에볼라 바이러스(Ebolavirus)는 마버그 바이러스(Marburgvirus)와 함께 필로 바이러스과에 속하는 단일가닥 RNA 바이러스이다. 에볼라 바이러스는 처음 발견된 장소에 따라 이름 붙여진 4개의 아종이 있다(Zaire, Sudan, Cote d'Ivoire, Reston). 필리핀에서 기원한 Reston 아형을 제외하고는 모두 아프리카 기원의 바이러스이다. 에볼라 바이러스 출혈열 유행은 대개의 경우, 한 명의 초발 환자가 자연환경에서 숙주로부터 바이러스를 옮긴 뒤 주위의 사람들에게 바이러스를 전파하여 발생한다. 이 질환의 숙주는 아직 확인되지 않았으나, 박쥐, 설치류, 유인원 등이 바이러스의 숙주일 가능성이 보고되어 있다. 2014년 대유행의 원인 숙주 역시 불분명하나, 박쥐가 원인일 것으로 추측되고 있다.

[0006] 에볼라 바이러스병 감염 초기에 발생하는 증상들은 장티푸스, 말라리아, 라싸열 등의 다른 감염병 등과 구분하기 어려운 비특이적인 증상들이다. 임상적으로 명확한 출혈 증상은 전체 환자의 3분의 1정도에서만 나타나는 것으로 알려져 있다. 현재까지는 바이러스에 대한 특이치료가 존재하지 않고, 쇼크 및 혈량 저하, 출혈경향에 대한 보존적 치료 밖에 할 수 없다. 2014년 서아프리카 에볼라바이러스병에 대하여, ZMapp 등의 인간화 단일클론항체(humanized monoclonal antibody)가 실험적으로 사용되었으나, 효과 및 안전성은 불분명한 상황이다.

[0007] 기존의 에볼라바이러스 진단 기술은 항원-항체 검사를 통해 의심되는 혈액검체에서 역전사 증합효소 연쇄반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 이용하여 상기 바이러스 핵산을 증폭함으로써 핵산 양성 유무를 확인하는 것이다.

[0008] 최근에 RNA 핵산인 에볼라바이러스는 유전자 변이 발생빈도가 매우 높으며 에볼라바이러스에서 잘 보존된 위치의 8개를 포함한 50개 고정 nonsynonymous 변화를 비롯한 395 유전자 변이를 보고하였다(Gire, SK, Goba, A, et al. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. Science, 2014 DOI: 10.1126/science.1259657). 물론 이들 유전자 변이가 생물학 및 의학적 의미는 거의 보고된 것이 없으나 일반적으로 유전자 변이는 학문적으로 그리고 의학적으로 매우 중요한 의미를 갖는다.

[0009] 향후 에볼라바이러스 유전자 변이는 에볼라바이러스 진단, 백신 및 치료 등에 주요한 요인으로 작용할 것이다. 현재 바이러스의 치료약 등이 개발되고 있지만, 바이러스의 유전자 변이에 따라서는 항바이러스제제가 듣지 않는 변이 바이러스의 존재가 많이 보고되어 있으며, 치료를 유효하게 진행시키기 위해서는 유전자 변이를 미리 검출하고, 그 결과에 기초하여 투약 방침을 결정하는 것이 중요하다. 따라서 본 발명에서는 에볼라바이러스의

유전자 변이를 효율적으로 분석하는 방법을 제공하고자한다.

[0010] 유전자 변이를 정확하게 그리고 보다 편리하게 검출할 수 있는 많은 방법들이 개발되어 있다. 바이러스의 유전자 변이를 검출하기 위하여, PCR 뒤에 직접적으로 유전자 염기 서열 분석을 하거나, 제한효소 처리 후 전기영동, 제한효소 처리 후 질량분석법(PCR-RFMP법), LightCycler probe hybridization, primer-specific real-time PCR법 등이 있으나, 종래의 검사 방법에서는 낮은 카피수의 바이러스를 검출하는 것은 곤란하며, 보다 정확하게 고감도로 검출할 수 있는 방법이 요구되고 있다. 바이러스 유전변이를 분석하는 방법으로서 택맨 미스매치 증폭 돌연변이 분석 (TaqMan Mismatch Amplification Mutation Assay) 법이 보고되어 있지만, 이 방법은 프라이머에 미스매치를 넣어 목적 서열 변이의 경우에만 증폭 시그널이 검출되는 방법이며, 음성인 경우에는 상기 부위의 변이의 동정에는 별도의 분석이 필요 하는 등의 문제가 있다.

[0011] 본 발명자는 이런 문제를 근본적으로 극복하고 qPCR보다 더 우수한 최소검출한계를 갖고 있는 올리고뉴클레오타이드 리가제 검사(Oligonucleotide Ligase Assay:OLA) 방법으로 표적 핵산 유전자 변이를 검사하는 방법을 개발하였다. 본 발명은 OLA 및 유니버설 PCR 프라이머(Universal PCR primer)를 이용하여 표적 핵산의 유전자 변이를 검사하기 위한 방법, 및 이를 이용한 유전자 변이 진단 키트에 관한 것으로, 혈액 또는 조직에 존재하는 표적 핵산 유전자 변이를 높은 특이성으로 검사할 수 있으며, 기존의 검사 방법으로는 여러 단계에 걸쳐 시험하여 확인했던 검사 방법을 한 번의 검사 방법으로 표적 핵산의 유전자 변이를 신속하고 저렴하게 진단할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은, 유전자 변이를 보다 간편하며 고감도로 관별할 수 있는 방법을 제공하는 것 및 그를 위한 시약을 제공하는 데 있다. 또한, 본 발명은, 에볼라바이러스 핵산을 포함하는 표적 핵산에서 유전자 변이를 관별하기 위한 방법 및 그에 사용하는 시약을 제공하는 것, 보다 구체적으로는 개체의 유전자 변이를 결정하기 위한 방법, 및 그에 사용하는 시약을 제공하는 것을 목적으로 하고 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 분석하고자하는 에볼라바이러스를 포함하는 표적 핵산 유전자 변이 및 이에 인접한 5'방향에 있는 상기 핵산 핵산 가닥의 상보적 염기서열들을 포함하는 변이유형 특이적 올리고뉴클레오타이드(Allele -Specific Oligonucleotide: ASO)인 프로브와 상기 유전자 변이에서 3'방향으로 일정한 거리에 있는 상기 핵산 핵산 단일가닥의 상보적 염기 서열들을 포함하는 변이위치 특이적 올리고뉴클레오타이드(Locus-Specific Oligonucleotide: LSO)인 프로브, 그리고 유전자 변이를 지시하는 염기서열들을 포함하는 부위 및 유니버설 PCR 프라이머(Universal PCR primer)의 상보적 염기서열들을 포함하는 부위가 있으며, 상기 표적 핵산, 프로브 세트 및 유니버설 PCR 프라이머 등으로 확보한 PCR 증폭산물을 분석하는 유전자 변이 분석 방법 및 키트를 제공한다.

[0014] 발명은 또한, 상기 ASO 프로브를 야생형 또는 변이형으로 나누어 제작하여 상기 유전자 변이를 분석하는 것을 특징으로 하는 프로브 세트를 이용한 유전자 변이 분석방법 및 키트를 제공한다.

[0015] 본 발명은 상기 ASO 프로브와 LSO 프로브가 결합하는 위치 사이에 있는 표적 핵산의 염기서열을 바탕으로 검출용 프로브를 설계하여 유전자 변이를 분석할 수 도 있다. 상기 검출용 프로브는 핵산에서 ASO 프로브와 LSO 프로브가 상보적 결합하는 염기서열들 사이의 염기서열 부위를 포함하는 염기서열이며, 상기 ASO 프로브와 LSO 프로브 사이의 염기서열 부위에 목적의 염기를 포함하는 염기 서열 또는 상기 염기 서열에 상보적인 염기 서열을 갖고, 5' 말단에 형광 물질이, 3' 말단에 소광 물질이 부가되고, 프로브의 용해 온도가 PCR 프라이머의 용해온도보다 3 이상 높아지는 수식이 도입된 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 검출용 프로브를 포함하는 프로브를 사용하여 리얼 타임 PCR을 행함으로써, 간편하면서도 고감도로 목적 변이를 관별하는 것을 특징으로 하는 프로브를 이용한 유전자변이 분석방법 및 키트를 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한, 상기 ASO 프로브와 상기 LSO 프로브를 제조하는 단계, 상기 유전자 변이를 포함하는 핵산, 상기 ASO 프로브와 상기 LSO 프로브를 혼성화 반응시켜 부분적 이중가닥 핵산을 형성하는 단계, 상기 부분적 이중가닥 핵산을 완전한 이중가닥 핵산으로 제조하는 단계, 상기 완전한 이중가닥핵산을 유니버설 PCR 프라이머로 PCR하여 증폭산물을 제조하는 단계 및 상기 증폭산물을 분석하여 상기 유전자 변이를 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 프로브를 이용한 유전자 분석방법 및 키트를 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, 상기 PCR 증폭산물을 분석하여 상기 유전자 변이를 포함하는 생체시료에서 상기 유전자 변이의 야생형 및 변이형에 대한 발생빈도를 분석하는 방법을 특징으로 하는 프로브를 이용한 유전자 분석 방법 및 키트를 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한, 프로브를 이용한 유전자 분석방법을 통해 실시하는 것을 특징으로 하고, 상기 핵산 핵산을 포함하는 시료에서 핵산을 준비하는 시료처리장치, 상기 ASO 프로브, 상기 LSQ 프로브와 상기 핵산을 혼성화시켜 형성된 부분적 이중가닥핵산을 완전한 이중가닥으로 제조하고 이를 증폭하는 모듈 및 상기 증폭된 산물을 분석하는 모듈로 구성된 유전자 분석 시스템을 특징으로 하는 프로브를 이용한 유전자 분석장치를 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명은 프로브를 이용하여 에볼라바이러스를 포함하는 표적핵산 유전자 변이를 간편하고 높은 감도로 분석함으로써 생체시료에서 유전자 변이의 생물학적 의미를 확인할 수 있다. 더욱이, 한 번의 검사로 다양한 유전자 변이들을 분석함으로써 생체시료에서 표현형의 변화, 질병에 대한 민감성 그리고 치료 약제에 대한 반응의 차이 등 개인 간의 차이를 효율적으로 결정하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 ASO 프로브 및 LSQ 프로브의 구조이고,
 도 2는 ASO 프로브 및 LSQ 프로브에 유전자변이를 지시하는 염기서열 부위를 이용하여 증폭산물을 분석하여 유전자 변이를 분석하는 흐름도로 a는 야생형, b는 변이형을 검사하는 내용으로 두 종류의 변이를 동시에 검사하는 방법이고,
 도 3은 ASO 프로브 및 LSQ 프로브를 이용하여 유전자변이가 있는 부위를 확보한 후 qPCR 및 검출용 프로브로 유전자 변이를 분석하는 흐름도이며,
 도 4는 에볼라바이러스 유전자의 변이위치 6175, 6909 및 7044의 SNP를 증폭산물의 크기로 분석한 결과 도면

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명은 에볼라바이러스를 포함하는 표적 핵산 유전자 변이를 프로브 세트 및 유니버설 PCR 프라이머를 이용하여 분석하고자한다.

[0022] 본 명세서에서 사용되는 프로브 세트 및 유니버설 PCR 프라이머를 이용한 유전자 분석방법 및 키트는 상기 유전자 변이 및 이에 인접한 5'방향에 있는상기 유전자의 상보적 염기서열들을 포함하는 변이유형 특이적 올리고뉴클레오타이드(ASO) 프로브와 상기 유전자 변이에서 3'방향으로 일정한 거리에 있는 상기 유전자의 상보적 염기서열들을 포함하는 변이위치 특이적 올리고뉴클레오타이드(LSQ) 프로브, 그리고 상기 유전자 변이를 지시하는 염기서열 또는 이에 상보적인 염기서열을 포함하는 부위 및 유니버설 PCR 프라이머의 상보적 염기서열들을 포함하는 부위가 있으며, 상기 표적핵산, 프로브 세트 및 유니버설 PCR 프라이머를 사용하여 확보한 PCR 증폭산물을 분석하여 상기 유전자 변이를 분석할 수 있다.

[0023] 본 발명에서, 핵산의 핵산은 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자 등을 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체도 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman and Peyman,1990, Chemical Reviews, 90:543-584).

[0024] 상기 유전자는 특정 샘플에 포함된 유전자 중 관심이 있는 유전자를 의미한다. 표적 유전자는 인위적으로 만들어진 인공 서열을 갖는 DNA나 RNA 등이 될 수 있으며, 자연으로부터 얻은 바이러스, 미생물을 비롯한 동식물의 세포에서 얻어지는 모든 유전자를 의미한다.

[0025] 상기 유전자 변이로 SNP, 구조변이, CNV 및 메틸화 등을 의미한다. 유전자 변이들이 표현형의 변화, 질병에 대한 민감성, 그리고 치료 약제에 대한 반응의 차이 등 개인 간의 차이를 결정짓는다고 알려졌으며, 특히 질환 발생과 진행과정에 관여하는 변이들을 질환연관 유전자변이라고 칭한다.

[0026] 상기 변이위치(Locus)는 유전자상에 있는 특정 변이의 위치, 그리고 상기 변이유형 Allele)은 특정변이의 야생형 또는 변이형을 의미한다.

[0027] 바람직하게, 본 발명은 상기 유전자 변이를 지시하는 염기서열 또는 표적 핵산에 ASO 프로브 및 LSQ 프로브가

결합하는 사이의 염기서열을 이용한 유전자 변이 분석을 위해 ASO 프로브와 LSO 프로브를 제공한다.

- [0028] 상기 ASO 프로브의 구성은, (i) 상기 변이가 있는 표적유전자를 포함하는 부위를 증폭하기 위해 유니버설 PCR 프라이머 쌍의 정방향 프라이머(Forward primer)가 완전하게 상보적 결합하는 구역(P), (ii) 유전자 변이를 지시하기 위한 염기서열로 구성된 구역 (R), (iii) 표적유전자와 실질적으로 상보적 염기서열을 가지는 변이인접 특이적 구역(H), 및 (iv) 변이부위에 해당하는 변이 특이적 구역(X) 등으로 구성된 ASO 프로브를 제공한다(도 1).
- [0029] 상기에서, 상기 ASO 프로브는 다음의 일반식 I로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법:
- [0030] $5'-P\alpha-R\beta-H\gamma-X\delta-3'$ (I)
- [0031] 상기 일반식(I)에서, 상기 P는 유니버설 PCR프라이머 쌍에서 정방향 프라이머가 완전하게 상보적 결합하는 구역이며, 상기 R는 유전자 변이를 지시하기 위한 염기서열로 임의 서열로 구성할 수 있으며, 증폭산물을 염기서열로 구분할 경우는 zip-code (Gerry, NP., et al., 1999. Journal of Molecular Biology. 292: 251-262.) 또는 PCR 산물의 크기로 할 경우는 바람직하게 poly A를 사용할 수도 있다.
- [0032] 상기 H는 혼성화하는 표적핵산과 실질적으로 상보적 혼성화 서열을 가지는 변이인접 특이적 구역이고 V은 변이에 해당하는 변이특이적 구역이다. α , β , γ 및 δ 는 뉴클레오타이드의 개수를 나타내며, α 및 γ 는 8-30의 정수이고 β 는 0-40의 정수이고, δ 는 1-3의 정수이며 바람직하게, δ 는 1이다.
- [0033] 상기 ASO 프로브로서, 상기 변이를 포함하는 서열에 완전하게(perfectly) 상보적 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적 서열이 이용될 수도 있다. 바람직하게는, 상기 ASO 프로브는 변이를 포함하는 10~30개의 연속 뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 서열에 혼성화될 수 있는 서열을 포함한다. 보다 바람직하게는, 상기 ASO 프로브의 3'-말단은 상기 변이 염기에 상보적 염기를 갖는다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 3'-말단에 변이 염기에 상보적 염기를 갖는 ASO 프로브에서 말단 구역이 혼성화되지 않으면, 이러한 듀플렉스는 엄격한 조건에서 해체될 수 있다.
- [0034] 바람직하게, 상기 ASO 프로브는 변이정보를 갖는 변이 특이적 구역(X)에 따라 야생형 및 변이형 등으로 두 종류 이상의 프로브들로 구성될 수 있다.
- [0035] 상기 LSO 프로브의 구성은 (i) 상기 표적핵산에 상기 ASO 프로브의 3' 말단에서 일정한 거리에 있는 염기부터 완전하게 상보적 결합을 하는 염기서열 구역(H), (ii) 유전자 변이를 지시하기 위한 염기서열로 구성된 구역 (R), 및 (iii) 유니버설 PCR 프라이머 쌍 중에서 역방향 프라이머가 상보적 결합을 하는 염기서열 구역(P)등이다(도 1).
- [0036] 상기에서, 상기 LSO 프로브는 다음의 일반식II로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법:
- [0037] $5'-H\alpha-R\beta-P\gamma-3'$ (II)
- [0038] 상기 일반식(II)에 있어서, H는 상기 표적핵산에 상기 LSO 프로브의 3'말단에서 일정한 거리에 있는 염기부터 완전하게 상보적 결합을 하는 구역이고 R는 유전자 변이를 지시하기 위한 염기서열로 임의 서열로 구성할 수 있으며, 증폭산물을 염기서열로 구분할 경우는 zip-code 또는 PCR 산물의 크기로 할 경우는 바람직하게 poly A를 사용할 수 있다. P는 유니버설 PCR 프라이머 쌍에서 역방향 프라이머가 완전하게 상보적 결합을 하는 구역이다. α , β 및 γ 는 뉴클레오타이드의 개수로, α 및 γ 는 8 ~ 30의 정수이고 β 는 0 ~ 40의 정수이다.
- [0039] 바람직하게, 상기 핵산, 상기 ASO 프로브와 LSO 프로브를 혼성화, 신장 및 연결 반응을 한 후 혹은 ASO 프로브와 LSO 프로브가 바로 인접한 경우는 혼성화, 연결반응을 한 후, 유니버설 PCR 프라이머 쌍을 이용하여 PCR를 수행하여 PCR 증폭산물에서 유전자변이를 지시하는 염기서열을 분석한 결과로 변이유형 및 변이위치를 분석한다.
- [0040] 본 발명에 이용되는 상기 ASO 프로브 및 상기 LSO 프로브는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중가닥을 형성한다. 이러한 이중가닥 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B.D., 등, Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시되어 있다.
- [0041] 바람직하게, 상기 ASO 프로브 및 상기 LSO 프로브의 melting temperature(T_m)은 50~ 55°C이다.

- [0042] 바람직하게, 상기 유전자와 상보적 결합을 하는 상기 ASO 프로브의 일정한 위치와 상기 유전자와 상보적인 결합을 하는 상기 LSO 프로브 위치 사이의 거리는 0 ~ 1,000 bp이다.
- [0043] 상기 유전자변이를 지시하는 염기서열은 zip code일 수도 있다(Gerry, N. P., et al., 1999. Journal of Molecular Biology. 292: 251-262.). 상기 PCR 산물에 있는 zip code 염기서열의 분석은 일반적으로 상보적인 염기서열로 분석하는 혼성화 방법을 사용할 수 있다.
- [0044] 또는 제한효소 인식부위를 포함하는 부위로 혼성화 또는 제한효소 등을 이용하는 방법으로 분석할 수 있다.
- [0045] 바람직하게, 변이위치에 따라 상기 유전자와 각각 상기 프로브인 ASO 프로브 및 LSO 프로브의 상보적 결합하는 위치들 사이의 거리를 결정하고 변이유형에 따라 상기 프로브인 ASO 프로브 및 LSO 프로브의 길이를 결정하면 상기 증폭산물의 길이로 하나 또는 그 이상의 상기 유전자의 변이위치 및 유형을 동시에 알 수 있다(도 1).
- [0046] 상기 증폭산물의 크기를 젤 전기영동 혹은 모세관 전기영동(capillary electrophoresis)방법을 사용하여 결정한 후, 상기 유전자의 변이 위치 및 유형을 분석할 수 있다(도 2).
- [0047] 바람직하게, 상기 ASO 프로브와 LSO 프로브의 R부위는 어느 한 쪽에만 둘 수도 있으며 상기 R을 사용하지 않은 경우도 있으며 이런 모든 경우에도 상기 ASO 프로브와 LSO 프로브가 결합하는 위치사이에 있는 염기서열을 바탕으로 검출용 프로브를 설계하여 유전자 변이를 분석할 수도 있다(도 3).
- [0048] 상기 검출용 프로브는 ASO 프로브와 LSO 프로브 사이의 염기서열 부위를 포함하는 염기서열이며, 상기 ASO 프로브와 LSO 프로브 사이의 부위의 염기 서열 또는 상기 염기 서열에 상보적인 염기 서열을 갖고, 5' 말단에 형광 물질(Fluorophore)이, 3' 말단에 소광 물질(Quencher)이 부가되고, 프로브의 용해 온도가 PCR 프라이머의 용해 온도보다 3 이상 높아지는 수식이 도입된 검출용 프로브를 사용하여 리얼 타임 PCR을 행함으로써, 간편하면서도 고감도로 목적 변이를 판별할 수 있다.
- [0049] 본 발명에서 검출용 프로브를 이용한 유전자변이 분석은 형광 리얼 타임 PCR로 5' 말단을 형광 물질로, 3' 말단을 소광 물질로 표지한 프로브를 표적으로 하는 주형 핵산 서열에 혼성화시키고, 열 안정성 DNA 폴리메라아제의 작용에 의해 프라이머로부터 상보체가 신장될 때, 상기 프로브가 분해되어 형광을 발하고, 그 형광 강도에 기초하여 목적 서열을 검출, 정량하는 방법이다. 즉, 상기 프로브는 어닐링 스텝에서 주형 DNA에 특이적으로 혼성화되며, 프로브 상에 소광 물질이 존재하기 때문에 통상 여기광을 조사하여도 형광의 발생은 억제되어 있지만 (FRET(형광 공명 에너지 전이) 현상), 그 후의 신장 반응 스텝에서 DNA 폴리메라아제가 갖는 5'3' 엑소뉴클레아제 활성에 의해 주형에 혼성화한 프로브가 분해되면, 형광 색소가 프로브로부터 유리되고, 소광 물질에 의한 억제가 해제되어 형광을 발하게 된다. 이러한 프로브로서, 예를 들면 택텐(등록 상표) 프로브가 사용되고 있다.
- [0050] 본 발명의 프로브 세트에 포함되는 검출용 프로브에 있어서, 5' 및 3' 말단의 표지는 플루오레세인 패밀리의 색소와 같은 음의 전하를 갖는 형광 색소, 또는 로다민 패밀리의 색소와 같은 중성의 전하를 갖는 형광 색소, 또는 시아닌 패밀리의 색소와 같은 양의 전하를 갖는 형광 색소를 사용하여 행할 수 있다. 플루오레세인 패밀리의 색소에는, 예를 들면 FAM, HEX, TET, JOE, NAN 및 ZOE가 포함된다. 로다민 패밀리의 색소에는, 텍사스 레드(Texas Red), ROX, R110, R6G 및 TAMRA가 포함된다. FAM, HEX, TET, JOE, NAN, ZOE, ROX, R110, R6G 및 TAMRA는, 퍼킨 엘머(Perkin-Elmer)(Foster City, Calif.)로부터 시판되어 있으며, 텍사스 레드(Molecular Probes, Inc.)(Eugene, OR)로부터 시판되어 있다. 시아닌 패밀리의 색소에는 Cy2, Cy3, Cy5 및 Cy7이 포함되고, 이들은 아마삼(Amersham)(Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, England)로 부터 시판되어 있다. 또한, Iwoa, DABCYL 및 EDANS 등도 사용할 수 있다.
- [0051] 이러한 물질 중으로부터, FRET를 일으킬 수 있는 형광 물질과 소광 물질의 조합을 적절하게 선택하여 사용할 수 있다. 예를 들면, FAM은 488 nm의 파장을 갖는 빛에 의해 가장 효율적으로 여기되고, 500 내지 650 nm의 스펙트럼 및 525 nm의 방사 극대를 갖는 빛을 방사한다. FAM은, 예를 들면 여기 극대 514 nm를 갖는 소광제로서의 TAMRA와 함께 사용하기 위한 적당한 도너 표지이다. 또한, FAM과 Iowa의 조합도 사용할 수 있다.
- [0052] 검출용 프로브는 변이 부위를 포함하는 염기 서열이며, 상기 변이 부위에 목적의 염기를 포함하는 염기 서열, 또는 상기 염기 서열에 상보적인 염기 서열을 갖는다. 여기서 목적의 변이란 검출하고자 하는 염기를 말하며, 예를 들면 변이 개소의 염기의 종류가 A 또는 G일 때에 A를 특이적으로 검출하고자 하는 경우, 검출용 프로브는 이 변이 개소의 염기가 A인(상보체인 경우에는 T) 것을 의미한다. 검출용 프로브의 길이는 표적 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 길이일 수 있지만, 15 내지 18 염기의 서열인 것이 바람직하다.
- [0053] 검출용 프로브의 Tm 예측값은 70 내지 80℃가 적합하며, 특히 70 내지 76℃, 보다 바람직하게는 74 내지 76℃이

다. 반응 온도 및 어닐링 온도는 60-65℃이고, 프라이머 DNA의 Tm은 그 중간에 위치(+5℃, 65-70℃)하는 것이 바람직하다.

[0054] 프라이머는, 표적 핵산에 있어서 프로브가 혼성화되는 영역의 5'측에 혼성화되는 5'측 프라이머(센스 프라이머)와 3'측에 혼성화되는 3'측 프라이머(안티센스 프라이머)의 2종이 사용된다. 한쪽이 표적 유전자의 센스 단일가닥핵산에, 다른쪽이 안티센스 단일가닥핵산에 혼성화되고, PCR에 의해 양 프라이머간의 영역을 증폭할 수 있는 것이다. 프라이머는 표적 핵산에 있어서 보존되어 있는 영역에 설정하는 것이 바람직하다. 또한, 100 내지 250 뉴클레오타이드 길이의 영역을 증폭할 수 있는 위치에 설정하는 것이 바람직하다.

[0055] 프라이머의 길이는 15 내지 25 염기가 바람직하고, 상기한 올리고뉴클레오타이드, DNA 올리고뉴클레오타이드의 계산식을 이용하여 예측되는 Tm은 검출용 프로브의 Tm보다 낮고, 카운터 프로브의 Tm 예측값보다 높게 하는 것이 실용적이며, 구체적인 Tm 예측값으로서는 60 내지 69℃가 바람직하고, 특히 65 내지 69℃가 바람직하다. 목적으로 하는 Tm 예측값의 프라이머는 프라이머 익스프레스(어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems)) 등의 소프트웨어를 사용하여 설계할 수 있다.

[0056] 본 발명의 프로브를 사용한 리얼 타임 PCR은 상기 프로브와, 프라이머와, 주형인 표적 핵산과, 디옥시리보뉴클레오타이드 혼합물(dNTP)과, 열 안정성 DNA 폴리메라아제를 포함하는 완충액 중에서 통상의 PCR에 준한 조건에 의해 행할 수 있다.

[0057] 본 발명의 효과를 발휘하기 위해 PCR 반응에서의 어닐링 온도는 60 내지 69℃가 바람직하며, 프로브의 Tm보다 낮은 것이 바람직하다. 통상 신장 반응은 어닐링 온도보다 높은 온도에서 행하지만, 어닐링과 신장 반응을 동일한 온도에서 행할 수도 있다.

[0058] PCR의 온도 사이클을 목적 서열을 검출할 수 있는 데 충분한 사이클 수 반복하고, 형광 검출기로 증폭에 기초한 형광을 검출함으로써, 목적 변이의 존재를 검출할 수 있다.

[0059] 본 명세서에서 사용되는 프로브를 이용한 유전자 분석방법 및 키트는 상기 ASO 프로브와 상기 LSO 프로브를 제조하는 단계, 상기 유전자 변이를 포함하는 핵산, 상기 ASO 프로브와 상기 LSO 프로브를 혼성화 반응시켜 부분적 이중가닥 핵산을 형성하는 단계, 상기 부분적 이중가닥 핵산을 완전한 이중가닥 핵산으로 제조하는 단계, 상기 완전한 이중가닥핵산을 유니버설 PCR 프라이머로 PCR하여 증폭산물을 제조하는 단계 및 상기 증폭산물을 분석하여 상기 유전자 변이를 결정하는 단계 등으로 구성된다.

[0060] 본 발명에 있어서, 상기 핵산, 상기 ASO 프로브 와 상기 LSO 프로브가 혼성화 반응을 하여 형성된 부분적 이중가닥핵산에서 상기 ASO 프로브 와 상기 LSO 프로브의 사이에 신장영역이 있는 경우 신장반응하고 연결반응하여 완전한 이중가닥핵산을 형성하는 것을 특징으로 하는 프로브를 이용하여 유전자의 분석방법 및 키트를 제공한다.

[0061] 본 명세서에서 사용되는 프로브를 이용한 유전자 분석방법 및 키트는 표적유전자를 포함하는 핵산, 상기 ASO 프로브와 상기 LSO 프로브를 혼성화 반응시켜 부분적 이중가닥 핵산을 형성하는 단계 및 상기 부분적 이중가닥 핵산을 완전한 이중가닥 핵산으로 제조하는 단계를 한 번 또는 그 이상을 수행하는 것으로 할 수 도 있다.

[0062] 상기 유전자 변이를 분석하는 방법으로 상기 유전자 변이를 포함하는 생체시료에서 유전자 변이의 야생형 및 변이형에 대한 발생빈도를 분석할 수 있다.

[0063] 본 발명에 사용된 바와 같이, "신장 영역"은 핵산 중합화 활성을 통해 프로브의 신장을 허용하기에 충분한 길이의 뉴클레오타이드를 언급한다. "신장 영역"은 표적 및 주형 핵산의 몇몇 양태에 존재한다. 존재하는 경우 "신장 영역"은 표적 또는 주형 핵산의 상류 프로브 및 하류 프로브 사이에 있다. "신장 영역"은 길이가 약 1개 뉴클레오타이드 내지 약 1000개 뉴클레오타이드이고 바람직한 범위는 약 1 내지 100개 뉴클레오타이드이고 보다 바람직한 범위는 3개 내지 50개 및 최적으로 길이가 3개 내지 10개의 뉴클레오타이드 범위이다.

[0064] 상기 신장반응(extension reaction)은 DNA 폴리머라제(polymerase)에 의해 프라이머의 3'말단에 염기서열이 첨가되는 반응을 촉매할 수 있는 반응을 말한다. 특정 길이의 프로브를 표적서열에 상보적 결합하도록 한 후, 이 때 형성되는 부분적인 이중가닥의 3'말단에 DNA 폴리머라제에 의하여 통상의 염기의 첨가 원리에 입각한 통상적인 신장반응으로 표적서열에 대한 상보적 염기가 첨가되어 단일가닥이 합성되는 반응이다. 따라서 핵산의 연결을 유도하는 DNA 폴리머라제로서 당업계에서 통상적으로 사용되는 효소를 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 신장반응에 사용하는 효소는 일반적인 DNA 폴리머라제가 갖는 5'→3' exonuclease 활성이 없는 DNA 폴리머라제 로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0065] 상기 연결반응은 리가제(ligase)에 의한 뉴클레오티드 서열의 연결을 촉매할 수 있는 반응을 말한다. 특정 길이의 2종의 프로브를 표적서열에 나란히 혼성화되도록 한 후, 이 때 형성되는 이중 나선의 틈(nick) 부위를 DNA ligase에 의하여 통상의 핵산의 연결 원리에 입각한 통상적인 연결반응을 통해 2종의 프로브를 단일가닥상태로 연결하는 반응이다. 따라서 핵산의 연결을 유도하는 리가제로서 당업계에서 통상적으로 사용되는 효소를 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0066] 상기 연결반응에 사용하는 효소는 E.coli DNA 리가제, Taq DNA 리가제, T4 DNA 리가제 및 Ampligase 리가제 등으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 이에 한정되지 않고, DNA 결합 활성을 가지는 리가제라면 어떤 것이든 사용할 수 있다.
- [0067] 또한 상기 신장 및 연결 반응은 단일의 표적 유전자 또는 돌연변이 분석이 가능할 뿐만 아니라, 복수의 표적을 인지하는 복수의 프로브를 사용하여, 한 번의 반응으로 수행할 수 있다. 이 경우에는 각각의 프로브 염기서열 중 표적 유전자와 혼성화되는 부분의 Tm 값의 오차를 5 이내로 되도록 각각의 돌연변이 위치에 맞는 프로브를 선정하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0068] 상기 PCR 프라이머 쌍에서 정방향 프라이머(P1 또는 P2)는 상기 ASO 프로브의 구성에서 PCR 프라이머가 결합하는 영역의 염기서열에 완전하게 상보적으로 결합하는 염기서열로 구성되며 바람직하게는 유니버설 PCR 프라이머일 수도 있고 표적유전자의 변이에 따라 상기 PCR 프라이머의 길이가 결정될 수 있으며 혼성화반응을 종결하고 상기 변이를 결정할 때 증폭산물의 크기를 사용한다. 유니버설 PCR 프라이머는 일반적으로 염기서열 결정이나 PCR 등에 많이 사용되는 염기서열인 프로브로 상업적인 클로닝 벡터에 많이 있다.
- [0069] 상기 유니버설 PCR 프라이머는 14머 에서 40머 사이의 올리고뉴클레오티드를 의미하는 것으로, 주형에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 폴리머라제의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있다. 바람직하게는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드이며 단일가닥핵산이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [0070] 상기 프라이머는 표적 핵산에 어닐링 되어 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 표적 핵산에 상보적인 서열을 형성하는 신장 프라이머(extension primer)일 수 있으며, 이는 고정화 프로브가 어닐링 되어 있는 위치까지 신장되어 프로브가 어닐링 되어 있는 부위를 차지한다.
- [0071] 상기 신장 프라이머는 3말단에서 표적유전자에 상보적 염기서열을 포함한다. 용어 상보적은 소정의 혼성화 조건 하에서 프라이머가 표적유전자 염기서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다.
- [0072] 본 명세서에서, 프라이머 서열과 관련하여 사용되는 용어, 실질적으로 상보적 염기서열은 완전히 일치되는 염기서열뿐만 아니라, 특정 염기서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교대상의 염기서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.
- [0073] 상기 유니버설 PCR 프라이머는, 부분적 이중가닥의 존재 하에서 신장산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, 응용분야에 따라 결정되지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성화복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다. 혼성화 또는 프라이밍은 주형 핵산에 프로브가 상보적 결합하는 것을 의미하며, 상기 상보적 결합은 폴리머라제가 프로브를 중합시켜 주형 핵산 또는 상보적 핵산 분자를 형성하게 한다.
- [0074] "증폭반응(Polymerase chain reaction)" 또는 "PCR"은 타겟 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들 당 업계에 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(PCR)(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001))의 방법, 멀티플렉스 PCR(McPherson and Moller, 2000), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction; LCR)(Stemmer, W.P., et al., 1995, Gene, 164, 49-53; CarLSO, B., 2008, Genet Eng Biotechn N, 28, 12-12), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭 (transcription-mediated amplification; TMA)(SantaLucia, J., 1998, Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 1460-1465.) 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication), 타겟 폴리

뉴클레오티드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences)(미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction; CPPCR)(미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction; AP-PCR)(미국 특허 제5,413,909호 및 제5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification; NASBA)(미국 특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호, 및 제6,063,603호) 및 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification)을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

- [0075] "증폭산물"은 폴리뉴클레오티드 증폭 반응의 산물을 의미한다. 즉, 이것은 일반적으로 이중 가닥이고 하나 이상의 출발 서열로부터 복제되는 폴리뉴클레오티드 집단이다. 하나 이상의 출발 서열은 동일 서열의 하나 이상의 카피일 수도 있거나, 이것은 상이한 서열의 혼합물일 수도 있다. 증폭 산물은 다양한 증폭반응에 의해 생성될 수 있는데, 상기 증폭 반응의 산물은 하나 이상의 표적 핵산의 다수의 복제물이다. 일반적으로, 증폭 산물이 생성되는 증폭 반응은 뉴클레오티드이거나 올리고뉴클레오티드인 반응물의 염기쌍 형성이 반응 산물의 생성에 필요한 주형 폴리뉴클레오티드에서 상보체(complement)를 갖는다는 점에서 "주형-의존"된다. 주형의존형 반응은 핵산 폴리머라제를 이용한 프라이머 연장 또는 핵산 리가제를 이용한 올리고뉴클레오티드 연결반응이다.
- [0076] "표적 핵산"은 PCR 반응으로 증폭시킬 수 있으며, 1개 또는 복수개의 염기 변이 부위를 함유하고 있는 DNA나 RNA 등의 핵산을 말한다. 인간 또는 비인간 포유 동물, 세균, 효모, 바이러스, 비로이드, 곰팡이, 진균, 식물, 또는 기타 임의의 생물에서 유래하는 것일 수도 있고, 또는 임의의 재조합 기원에서 유래할 수도 있고, 시험관 내에서 또는 화학 합성에 의해 합성된 것일 수도 있다. 또한, 표적 핵산을 포함하는 시료를 사용하여 반응을 행할 수도 있다.
- [0077] 여기서 "시료"란, 개체로부터 단리된 조직 또는 체액 등의 시료를 말하며, 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 조직 생검 재료, 혈장, 혈청, 전혈, 수액, 림프액, 피부의 외측 절편, 기도, 장관, 비뇨 생식관, 눈물, 타액, 유즙, 혈액 세포, 종양, 기관 등을 포함한다. 또한, 토양이나 배수 등으로부터 얻어지는 시료를 사용할 수도 있다.
- [0078] 바이러스의 변이를 검출하는 경우에는, 바이러스의 RNA 핵산을 바탕으로 역전사 효소를 사용하여 cDNA를 합성하고, 얻어진 cDNA 또는 cDNA의 증폭 산물을 표적 핵산으로서 사용할 수 있다.
- [0079] 프로브를 이용한 유전자 분석장치는 프로브를 이용한 유전자 분석방법을 통해 실시하는 것을 특징으로 하고, 상기 유전자를 포함하는 시료에서 핵산을 준비하는 시료처리장치, 상기 ASO 프로브, 상기 LSO 프로브와 상기 핵산을 혼성화시켜 형성된 부분적 이중가닥핵산에서 완전한 이중가닥을 제조하고 이를 증폭하는 모듈 및 상기 증폭된 산물을 분석하는 모듈로 구성된 유전자 분석 시스템이다.
- [0080] 본 발명의 유전자 분석 방법을 보다 효율적으로 측정하기 위하여, 유전자를 포함하는 시료에서 핵산을 분리하는 시료처리장치 그리고 상기 핵산, 상기 ASO 프로브 및 상기 LSO 프로브를 혼성화시켜 형성된 부분적 이중가닥핵산의 신장 및 연결 반응으로 이중가닥핵산을 제조하고 이를 증폭하는 모듈 및 상기 증폭산물을 분석하는 모듈을 포함하는 프로브를 이용한 유전자분석 장치에 있어서, 본 발명의 시스템은 혼합챔버, 용해챔버 및 반응챔버으로 구성된 시료처리장치 및 증폭 장치로 구성되고 이들이 통합되어 운영될 수도 있다.
- [0081] 관심 대상의 유전자를 함유하고 있는 것으로 여겨지는 샘플의 분석은 일련의 샘플 준비 단계를 수반하며, 혼합과 용해를 하는 시료처리장치에서 이루어진다. 이들 단계에는 여과, 세포 용해, 핵산 그리고 시약과의 혼합을 포함할 수 있다.
- [0082] 유전자분석 결과에 대한 확신을 갖기 위해서는 샘플 준비 과정의 오염에 대한 제어가 유용할 것이다. 핵산 증폭 반응을 위해 샘플을 조제하고, 샘플 조제의 유효성을 검증하는 방법을 제공한다.
- [0083] 상기 방법은 또한 샘플 조제 대조군 및 샘플 내에 존재하는 경우의 표적 실체를 용해 챔버에서 용해 처리하여 핵산을 정제하는 단계, 용해챔버 내에 유리된 핵산을 반응 챔버 내에서 혼성화, 신장 및 연결반응 조건에 노출시키는 단계와, 적어도 하나의 정도관리용 핵산마커의 존재 여부를 분석하는 단계를 포함한다. 핵산마커의 긍정적 분석은 샘플 조제 과정이 만족스러웠음을 나타내는 반면, 핵산마커를 분석할 수 없으면 샘플이 부적절하게 조제되었음을 나타낸다.
- [0084] 본 발명은 유전자 변이 분석을 위해 샘플을 조제하고, 그 샘플 조제의 유효성을 검증하는 증폭장치를 제공한다. 샘플은 세포, 포자, 미생물, 및 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적 실체를 함유하는 것으로 여겨지며, 이 표적실체는 적어도 하나의 유전자를 포함한다. 상기 장치는, 샘플과 혼합될 샘플 조제 대조군을 수용하

는 제1 챔버가 있는 본체를 포함한다. 샘플 조제 대조군은 세포, 포자, 미생물, 및 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되며, 이 샘플 조제 대조군은 정도관리용 핵산마커를 포함한다.

- [0085] 상기 장치는 용해챔버에 조음과를 제공하기 위해 용해 챔버의 벽에 결합된 조음과 트랜스듀서를 더 포함한다. 상기 장치는 샘플 조제 대조군 및 표적실체를 파열시키기 위해 용해챔버내에 비드를 더 포함할 수도 있다.
- [0086] 정도관리 물질의 긍정적 분석은 샘플 조제 과정이 만족스럽다는 것을 나타내는 반면, 핵산마커를 분석할 수 없으면 샘플이 부적절하게 조제되었음을 나타낸다.
- [0087] 상기 방법은 용해 처리 전에, 샘플 조제 대조군 및 샘플 내에 존재하는 경우의 표적 실체를 고상 물질에 의해 포획하기 위해, 샘플조제 대조군과 혼합된 샘플이 고상 물질을 수용하는 챔버를 통해 흐르게 하는 단계를 포함한다.
- [0088] 샘플은 샘플과 샘플 조제 대조군을 혼합하기 전에 예비 여과될 수 있다. 용해 처리는 샘플 조제 대조군 및 표적 실체를 조음과 에너지에 노출시키는 것을 포함한다. 용해 처리는 또한 샘플 조제 대조군 및 표적 실체를 파열시키기 위해 비드를 교반시키는 것을 포함한다. 샘플 조제 대조군은 포자이다. 혼합단계는 샘플 조제 대조군을 함유하는 건조 비드를 분해하는 것을 포함한다.
- [0089] 용해 처리는 화학적 용해제와 접촉시키는 것을 포함한다. 핵산마커 서열은 핵산마커 서열을 증폭시키고, 증폭된 핵산마커 서열을 분석함으로써 분석된다. 핵산마커 서열은 핵산마커 서열의 신호가 한계값을 초과하는 지를 결정함으로써 분석할 수 있다.
- [0090] 증폭장치의 반응용기의 반응챔버내의 반응 혼합물은 핵산 증폭조건에 노출된다. 반응을 이용한 RNA 또는 DNA 주형의 증폭은 공지되어 있다[미국 특허 제4,683,195호; 미국 특허 제4,683,202호; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications(Innis et. al., 1990)]. DNA의 핵산증폭은 DNA를 열변성시키고, 증폭될 DNA 분절에 상보적 결합하는 서열에 2개의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 어닐링하며, 어닐링된 프라이머를 DNA 폴리머라제에 의해 연장시키는 것으로 이루어진 사이클의 반복을 수반한다. 프라이머는 표적 서열의 대향하는 가닥(strand)에 결합하는 한편, 폴리머라제에 의한 DNA 합성이 프라이머 사이의 영역에 걸쳐 진행되도록 배향되어, DNA 분절의 양을 효과적으로 두 배로 만든다. 또한, 확장 생성물은 또한 보완적이며 프라이머를 결합할 수 있기 때문에, 개개의 연속적인 사이클은 이전 사이클에서 합성된 DNA의 양을 실질적으로 두배로 만든다. 이는 사이클 당 $2n$ (여기서, n 은 사이클 수)의 비율로 특정 표적 분절의 지수적 증가를 가져온다.
- [0091] 증폭반응 및 리가제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR)과 같은 방법이 mRNA, cDNA, 핵산 라이브러리 또는 cDNA 라이브러리로부터 직접 표적 DNA 서열의 핵산 서열을 직접 증폭시키는 데에 사용될 수 있다. 등은 증폭 반응이 또한 공지되어 있으며, 본 발명의 방법에 따라 사용될 수 있다.
- [0092] 증폭 반응은 바람직하게는 반응용기내의 반응 혼합물을 증폭반응에 필요한 온도로 가열 및/또는 냉각시키는 열처리장비를 사용하여 수행한다. 그러한 열처리 장비는 또한 샘플 조제 대조군의 핵산마커 서열 및 샘플에서 테스트하기 위해 하나 이상의 표적 핵산 서열을 분석하는 하나 이상의 분석 기구를 포함할 수 있다. 반응용기 내의 핵산 서열을 증폭 및 분석하기 위한 증폭산물의 크기를 검사할 수 있는 광학적 분석기가 내장된 바람직한 열처리 장비(미국 특허 제6,369,893호; 미국 특허 제6,391,541호)를 사용할 수 있다. 또한, 반응 혼합물의 온도를 제어하고, 이 반응 혼합물에서 핵산 서열을 분석하기 위해 본 발명에 적합한 많은 기타 공지의 방법이 있다.
- [0093] 유체제어 장치는 원하는 프로토콜에 따라 컴퓨터로 제어될 수 있다.
- [0094] 단일 밸브를 사용하면 단지 하나의 실패 요소로 인해 높은 제조 수율을 생성할 수 있다. 유체 제어 및 처리 구성 부재의 통합은 컴팩트한 장치(예를 들면, 소형 카트리지 형태)를 얻을 수 있고, 성형 및 조립의 자동화를 용이하게 한다. 전술한 바와 같이, 그러한 시스템은 유리하게는 희석 및 혼합 능력, 중간 세척 능력 및 확실한 가압 능력을 포함할 수 있다. 시스템 내의 유체 경로는 시스템 내의 유체의 오염을 최소화하고 또 그러한 유체의 수용 및 제어를 용이하게 하도록 통상 폐쇄된다. 반응 용기는 편리하게는 분리 및 교환 가능하며, 몇몇 실시예에서는 폐기 가능하다.
- [0095] 변이형 바이러스를 검출하는 경우 바이러스로서는, 에볼라바이러스, 인간 면역 부전 바이러스(HIV), 인플루엔자 바이러스, C형 간염 바이러스(HCV), B형 간염 바이러스(HBV) 등이 예시된다.
- [0096] 염기 변이가 질환이 되기 쉬운 변이인 경우, 본 발명의 방법에 의해 해당 염기 변이를 관별함으로써 질환으로의 이환성의 예측을 행할 수 있다. 또한, 염기 변이가 약제의 부작용에 관계된 변이인 경우, 본 발명의 방법에 의

해 해당 염기 변이를 판별함으로써 약제의 부작용의 예측을 행할 수 있다.

[0097] 유전자 변이가 종(種) 또는 주(株)에 특이적인 변이인 경우, 본 발명의 방법에 의해 해당 유전자 변이를 판별함으로써 종이나 주의 특정을 행할 수 있다. 또한, 특정하고자 하는 종이나 주가 병원을 갖는 종이나 주, 또는 약제 내성을 갖는 종이나 주이면, 병원균, 병원 바이러스의 검출이나 약제 내성주의 검출을 행할 수 있다.

[0098] 에볼라바이러스는 SNP가 예시되어 있으며, 그 중에서도 본 발명은 표 1에 예시된 변이의 검출에 바람직하게 사용된다.

[0099] 이하에 제시되는 본 발명의 실시예는 예시를 위해서만 제공되며, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다. 첨부된 특허청구범위에 포함되는 다수의 본 발명의 양태는, 이상의 본문 및 이하의 실시례를 참조함으로써 당업자에게 분명하다고 생각된다.

[0100] **실시례 1. 에볼라바이러스 핵산의 준비**

[0101] 에볼라바이러스의 핵산은 에볼라바이러스 핵산(NCBI Reference Sequence: KM233116)을 기초하여 분석하고자하는 SNPs를 포함하는 5,500 위치에서 7,500 위치까지 2,000nt 단일가닥핵산을 DNA2.0사 (미국)에서 유기합성하여 준비하였다.

[0102] **실시예 2. ASO 프로브 및 LSO 프로브 제조**

[0103] 에볼라바이러스 SNP를 분석하기 위한 프로브인 ASO 프로브 및 LSO 프로브 구성은 상기 일반식 I 및 II을 참조하였다.

[0104] RNA 핵산인 에볼라바이러스는 유전자 변이 발생빈도가 매우 높으며 최근에 에볼라바이러스에서 잘 보존된 위치의 8개를 포함한 50개 고정 nonsynonymous 변화를 비롯한 395 SNPs를 표1과 보고하였다(Gire, SK., Goba, A., et al., Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. Science, 2014 DOI: 10.1126/science.1259657).

표 1

[0105] 2014년도 발병 에볼라바이러스 균주와 기존 균주간의 395개 SNPs

Position	Ancestral_nuc	2014_nuc	Gene	Type	AA_pos	Ancestral_AA	2014_AA
127	C	T	NP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
155	A	C	NP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
182	A	G	NP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
187	A	G	NP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
236	T	C	NP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
257	A	G	NP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
261	C	T	NP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
263	G	A	NP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
295	A	C	NP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
356	C	T	NP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
369	T	C	NP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
378	T	C	NP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
385	T	C	NP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
392	T	C	NP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
409	T	C	NP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
424	G	A	NP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
434	A	T	NP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
572	A	G	NP	nonsynonymous	35	Ile	Val
655	A	T	NP	synonymous	62	Ala	Ala
800	C	T	NP	nonsynonymous	111	Arg	Cys
850	A	G	NP	synonymous	127	Gly	Gly
852	A	G	NP	nonsynonymous	128	Lys	Arg
919	T	C	NP	synonymous	150	Phe	Phe
1024	A	C	NP	synonymous	185	Ile	Ile
1108	C	T	NP	synonymous	213	Leu	Leu
1141	G	A	NP	synonymous	224	Gly	Gly

1199	T	C	NP	synonymous	244	Leu	Leu
1288	A	T	NP	synonymous	273	Val	Val
1309	T	C	NP	synonymous	280	Phe	Phe
1417	A	G	NP	synonymous	316	Leu	Leu
1447	A	C	NP	synonymous	326	Ala	Ala
1492	A	G	NP	synonymous	341	Gln	Gln
1507	T	A	NP	synonymous	346	Ala	Ala
1543	A	G	NP	synonymous	358	Ala	Ala
1552	C	T	NP	synonymous	361	Arg	Arg
1648	T	G	NP	synonymous	393	Ala	Ala
1849	T	C	NP	synonymous	460	Asp	Asp
1862	A	G	NP	nonsynonymous	465	Ser	Gly
1879	G	A	NP	synonymous	470	Gln	Gln
1902	A	G	NP	nonsynonymous	478	Asn	Ser
1954	T	C	NP	synonymous	495	Thr	Thr
2043	G	C	NP	nonsynonymous	525	Arg	Thr
2056	T	C	NP	synonymous	529	Asn	Asn
2060	C	A	NP	nonsynonymous	531	Pro	Thr
2122	T	C	NP	synonymous	551	Asn	Asn
2124	A	G	NP	nonsynonymous	552	Glu	Gly
2158	A	C	NP	synonymous	563	Thr	Thr
2185	G	A	NP	synonymous	572	Leu	Leu
2224	G	A	NP	synonymous	585	Leu	Leu
2263	C	T	NP	synonymous	598	Ser	Ser
2314	T	C	NP	synonymous	615	Ser	Ser
2341	G	A	NP	synonymous	624	Glu	Glu
2361	C	T	NP	nonsynonymous	631	Thr	Ile
2364	A	G	NP	nonsynonymous	632	Gln	Arg
2380	G	A	NP	synonymous	637	Gln	Gln
2407	C	T	NP	synonymous	646	His	His
2461	T	C	NP	synonymous	664	Ala	Ala
2497	A	G	NP	synonymous	676	Val	Val
2518	C	T	NP	synonymous	683	Gly	Gly
2593	A	T	NP	nonsynonymous	708	Glu	Asp
2612	T	C	NP	synonymous	715	Leu	Leu
2638	G	A	NP	synonymous	723	Pro	Pro
2652	A	G	NP	nonsynonymous	728	Lys	Arg
2699	G	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
2718	C	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
2815	T	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
2886	G	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
2914	T	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
2933	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
3084	C	A	VP35	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
3116	C	G	VP35	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
3120	T	C	VP35	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
3239	A	G	VP35	synonymous	37	Arg	Arg
3250	G	A	VP35	nonsynonymous	41	Ser	Asn
3388	T	G	VP35	nonsynonymous	87	Val	Gly
3638	A	G	VP35	synonymous	170	Pro	Pro
3701	C	T	VP35	synonymous	191	Thr	Thr
3890	C	T	VP35	synonymous	254	Asn	Asn
3902	C	T	VP35	synonymous	258	Ile	Ile
3944	T	C	VP35	synonymous	272	Ser	Ser
4161	C	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
4162	C	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
4180	G	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
4219	C	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding

4277	G	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
4314	A	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
4318	T	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
4340	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
4359	C	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
4505	T	C	VP40	synonymous	9	Ala	Ala
4537	T	C	VP40	nonsynonymous	20	Val	Ala
4703	T	C	VP40	synonymous	75	Leu	Leu
4709	T	C	VP40	synonymous	77	Ala	Ala
4759	T	C	VP40	nonsynonymous	94	Ile	Thr
4871	A	G	VP40	synonymous	131	Pro	Pro
4970	G	A	VP40	synonymous	164	Pro	Pro
4976	C	A	VP40	synonymous	166	Val	Val
5027	C	T	VP40	synonymous	183	Thr	Thr
5069	A	T	VP40	synonymous	197	Thr	Thr
5312	T	C	VP40	synonymous	278	Ser	Ser
5448	A	G	VP40	nonsynonymous	324	Ile	Val
5461	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
5520	A	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
5525	G	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
5537	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
5542	G	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
5552	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
5614	A	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
5639	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
5690	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
5725	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
5753	C	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
5792	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
5824	A	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
5835	A	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
5846	G	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
5860	C	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
5876	C	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
5988	C	T	GP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
5990	T	G	GP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
6004	A	G	GP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
6030	A	G	GP	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
6140	A	G	GP	synonymous	34	Pro	Pro
6149	C	T	GP	synonymous	37	Val	Val
6161	C	T	GP	synonymous	41	Ser	Ser
6175	G	A	GP	nonsynonymous	46	Ser	Asn
6251	A	G	GP	synonymous	71	Glu	Glu
6283	C	T	GP	nonsynonymous	82	Ala	Val
6284	A	G	GP	synonymous	82	Val	Val
6476	G	A	GP	synonymous	146	Pro	Pro
6668	T	G	GP	synonymous	210	Ser	Ser
6677	C	T	GP	synonymous	213	Tyr	Tyr
6719	C	T	GP	synonymous	227	Thr	Thr
6833	A	G	GP	synonymous	265	Lys	Lys
6909	T	A	GP	nonsynonymous	291	Trp	Arg
6980	G	C	GP	nonsynonymous	315	Ala	Pro
7044	C	A	GP	nonsynonymous	336	Thr	Asn
7112	G	A	GP	nonsynonymous	359	Glu	Lys
7168	C	T	GP	synonymous	377	Pro	Pro
7181	C	A	GP	nonsynonymous	382	Pro	Thr
7251	A	G	GP	nonsynonymous	405	Glu	Gly
7264	C	T	GP	synonymous	409	Arg	Arg

7268	A	G	GP	nonsynonymous	411	Thr	Ala
7325	C	T	GP	synonymous	430	Leu	Leu
7351	C	T	GP	synonymous	438	Ser	Ser
7374	C	T	GP	nonsynonymous	446	Pro	Leu
7390	T	C	GP	synonymous	451	Ser	Ser
7411	C	T	GP	synonymous	458	Thr	Thr
7504	C	A	GP	synonymous	489	Val	Val
7531	A	G	GP	synonymous	498	Arg	Arg
7545	C	T	GP	nonsynonymous	503	Ala	Val
7657	G	A	GP	synonymous	540	Glu	Glu
7687	T	C	GP	synonymous	550	Asn	Asn
7729	G	A	GP	synonymous	564	Glu	Glu
7744	T	C	GP	synonymous	569	Leu	Leu
7774	A	G	GP	synonymous	579	Leu	Leu
7777	C	A	GP	synonymous	580	Arg	Arg
7810	T	C	GP	synonymous	591	Asp	Asp
7814	T	C	GP	synonymous	593	Leu	Leu
7831	C	T	GP	synonymous	598	Gly	Gly
8017	C	T	GP	synonymous	660	Gly	Gly
8070	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8084	C	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8089	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8096	G	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8101	G	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8136	G	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8172	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8263	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8273	G	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8280	A	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8368	G	A	VP30	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8372	C	A	VP30	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8375	G	A	VP30	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8381	G	A	VP30	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8417	G	A	VP30	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8428	G	A	VP30	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8437	C	T	VP30	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8451	T	C	VP30	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8463	C	A	VP30	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8495	G	C	VP30	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8504	T	C	VP30	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
8775	T	C	VP30	synonymous	89	Asp	Asp
8784	G	A	VP30	synonymous	92	Leu	Leu
8928	A	C	VP30	synonymous	140	Pro	Pro
8986	A	C	VP30	synonymous	160	Arg	Arg
9003	A	C	VP30	synonymous	165	Ser	Ser
9012	A	G	VP30	synonymous	168	Arg	Arg
9021	G	A	VP30	synonymous	171	Leu	Leu
9075	A	G	VP30	synonymous	189	Leu	Leu
9099	G	A	VP30	synonymous	197	Glu	Glu
9390	A	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
9495	G	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
9505	A	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
9535	G	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
9536	A	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
9549	C	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
9555	T	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
9560	G	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
9594	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding

9654	T	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
9708	C	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
9787	T	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
9795	G	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
9851	A	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
9858	G	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
9911	A	G	VP24	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
9923	T	C	VP24	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
9973	G	A	VP24	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
9986	G	A	VP24	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
9994	A	G	VP24	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
9995	T	C	VP24	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
10005	G	A	VP24	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
10026	C	T	VP24	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
10057	A	G	VP24	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
10065	T	G	VP24	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
10125	G	A	VP24	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
10208	C	T	VP24	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
10218	G	A	VP24	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
10238	G	A	VP24	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
10252	A	G	VP24	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
10268	T	C	VP24	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
10270	T	A	VP24	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
10350	T	C	VP24	synonymous	2	Ala	Ala
10461	G	A	VP24	synonymous	39	Lys	Lys
10509	C	T	VP24	synonymous	55	Ala	Ala
10566	T	C	VP24	synonymous	74	Asn	Asn
10575	T	C	VP24	synonymous	77	Pro	Pro
10602	A	T	VP24	synonymous	86	Thr	Thr
10624	T	C	VP24	synonymous	94	Leu	Leu
10660	C	T	VP24	synonymous	106	Leu	Leu
10662	G	A	VP24	synonymous	106	Leu	Leu
10743	T	C	VP24	synonymous	133	His	His
10801	A	G	VP24	nonsynonymous	153	Ile	Val
10863	C	T	VP24	synonymous	173	Asn	Asn
10869	G	A	VP24	synonymous	175	Leu	Leu
11067	G	A	VP24	synonymous	241	Leu	Leu
11079	T	C	VP24	synonymous	245	Phe	Phe
11124	A	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
11142	G	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
11155	T	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
11170	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
11350	G	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
11368	C	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
11384	T	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
11403	G	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
11417	C	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
11435	G	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
11467	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
11485	A	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
11652	A	T	L	synonymous	24	Leu	Leu
11673	A	G	L	synonymous	31	Leu	Leu
11730	C	A	L	synonymous	50	Ile	Ile
11811	C	T	L	synonymous	77	Val	Val
11832	G	A	L	synonymous	84	Leu	Leu
11889	C	T	L	synonymous	103	Ile	Ile
11943	G	A	L	synonymous	121	Val	Val
11982	G	A	L	synonymous	134	Glu	Glu

12096	A	G	L	synonymous	172	Thr	Thr
12169	A	C	L	nonsynonymous	197	Met	Leu
12223	G	A	L	nonsynonymous	215	Ala	Thr
12285	C	T	L	synonymous	235	Asp	Asp
12363	T	C	L	synonymous	261	Asp	Asp
12372	T	C	L	synonymous	264	Cys	Cys
12462	T	C	L	synonymous	294	Ile	Ile
12471	C	T	L	synonymous	297	Phe	Phe
12492	C	T	L	synonymous	304	Ala	Ala
12504	A	G	L	synonymous	308	Leu	Leu
12591	G	A	L	nonsynonymous	337	Met	Ile
12618	A	C	L	nonsynonymous	346	Gln	His
12693	T	A	L	synonymous	371	Ile	Ile
12786	A	C	L	synonymous	402	Ile	Ile
12822	T	C	L	synonymous	414	Ser	Ser
12870	T	C	L	synonymous	430	Thr	Thr
12878	G	A	L	nonsynonymous	433	Arg	Lys
12879	G	A	L	synonymous	433	Arg	Arg
12885	A	C	L	synonymous	435	Leu	Leu
12951	A	G	L	synonymous	457	Leu	Leu
13089	A	G	L	synonymous	503	Leu	Leu
13119	T	C	L	synonymous	513	Thr	Thr
13380	G	A	L	synonymous	600	Glu	Glu
13434	T	C	L	synonymous	618	Phe	Phe
13503	A	G	L	synonymous	641	Arg	Arg
13654	G	A	L	nonsynonymous	692	Asp	Asn
13665	C	T	L	synonymous	695	Pro	Pro
13785	A	G	L	synonymous	735	Leu	Leu
13851	C	T	L	synonymous	757	Asp	Asp
13856	G	A	L	nonsynonymous	759	Gly	Asp
13878	A	G	L	synonymous	766	Glu	Glu
13923	T	C	L	synonymous	781	Ser	Ser
14019	T	C	L	synonymous	813	Pro	Pro
14103	C	T	L	synonymous	841	Gly	Gly
14154	G	A	L	synonymous	858	Arg	Arg
14178	T	C	L	synonymous	866	Phe	Phe
14217	C	T	L	synonymous	879	Phe	Phe
14232	C	T	L	synonymous	884	Asp	Asp
14502	C	T	L	synonymous	974	Val	Val
14601	G	A	L	synonymous	1007	Ala	Ala
14634	A	G	L	synonymous	1018	Lys	Lys
14640	A	C	L	synonymous	1020	Leu	Leu
14670	T	C	L	synonymous	1030	Phe	Phe
14682	C	A	L	synonymous	1034	Ile	Ile
14728	C	T	L	synonymous	1050	Leu	Leu
14784	A	G	L	synonymous	1068	Thr	Thr
14808	A	G	L	synonymous	1076	Lys	Lys
15048	A	C	L	synonymous	1156	Ala	Ala
15081	G	A	L	synonymous	1167	Val	Val
15114	G	A	L	synonymous	1178	Pro	Pro
15117	C	T	L	synonymous	1179	Asn	Asn
15189	A	G	L	synonymous	1203	Gly	Gly
15372	A	G	L	synonymous	1264	Ser	Ser
15387	C	T	L	synonymous	1269	His	His
15441	T	C	L	synonymous	1287	Asn	Asn
15501	G	A	L	synonymous	1307	Gln	Gln
15504	T	G	L	synonymous	1308	Ser	Ser
15599	A	G	L	nonsynonymous	1340	Arg	Gln

15600	A	G	L	synonymous	1340	Arg	Arg
15645	A	G	L	synonymous	1355	Glu	Glu
15660	T	C	L	synonymous	1360	Tyr	Tyr
15711	C	T	L	synonymous	1377	Asn	Asn
15768	C	T	L	synonymous	1396	Phe	Phe
15789	T	C	L	synonymous	1403	Gly	Gly
15816	T	C	L	synonymous	1412	Asp	Asp
15855	C	T	L	synonymous	1425	Ala	Ala
15891	C	T	L	synonymous	1437	Asn	Asn
15963	G	A	L	synonymous	1461	Lys	Lys
16054	T	A	L	nonsynonymous	1492	Leu	Ile
16146	G	A	L	synonymous	1522	Arg	Arg
16164	T	C	L	synonymous	1528	Pro	Pro
16269	A	G	L	synonymous	1563	Lys	Lys
16320	G	A	L	synonymous	1580	Pro	Pro
16321	C	T	L	synonymous	1581	Leu	Leu
16335	C	T	L	synonymous	1585	Asn	Asn
16401	A	C	L	nonsynonymous	1607	Gln	His
16424	G	A	L	nonsynonymous	1615	Ser	Asn
16455	T	C	L	synonymous	1625	Val	Val
16540	T	G	L	nonsynonymous	1654	Tyr	Asp
16546	G	A	L	nonsynonymous	1656	Ala	Thr
16552	G	A	L	nonsynonymous	1658	Asp	Asn
16597	G	A	L	nonsynonymous	1673	Glu	Lys
16649	A	G	L	nonsynonymous	1690	Asn	Ser
16659	A	G	L	synonymous	1693	Leu	Leu
16701	A	G	L	synonymous	1707	Glu	Glu
16750	T	C	L	nonsynonymous	1724	Cys	Arg
16752	T	C	L	synonymous	1724	Cys	Cys
16764	T	C	L	synonymous	1728	Asn	Asn
16857	C	T	L	synonymous	1759	His	His
16935	C	T	L	synonymous	1785	Asp	Asp
17057	G	A	L	nonsynonymous	1826	Ser	Asn
17079	A	G	L	synonymous	1833	Leu	Leu
17142	T	C	L	synonymous	1854	Phe	Phe
17410	T	C	L	nonsynonymous	1944	Tyr	His
17431	A	G	L	nonsynonymous	1951	Ile	Val
17484	T	C	L	synonymous	1968	Thr	Thr
17512	T	C	L	synonymous	1978	Leu	Leu
17535	T	G	L	synonymous	1985	Gly	Gly
17565	T	C	L	synonymous	1995	Ala	Ala
17568	A	G	L	synonymous	1996	Arg	Arg
17649	A	G	L	synonymous	2023	Lys	Lys
17745	T	C	L	synonymous	2055	Ser	Ser
17802	C	T	L	synonymous	2074	Leu	Leu
17833	A	G	L	nonsynonymous	2085	Ile	Val
17859	A	G	L	synonymous	2093	Arg	Arg
17880	T	C	L	synonymous	2100	Thr	Thr
17985	T	C	L	synonymous	2135	Phe	Phe
17994	G	A	L	synonymous	2138	Val	Val
18090	C	T	L	synonymous	2170	Cys	Cys
18195	G	A	L	synonymous	2205	Pro	Pro
18213	T	C	L	synonymous	2211	Phe	Phe
18222	T	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18237	C	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18238	C	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18308	A	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18338	A	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding

18358	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18375	A	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18412	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18413	G	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18437	C	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18445	A	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18468	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18496	A	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18526	A	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18545	C	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18548	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18563	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18596	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18626	A	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18632	A	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18734	T	C	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18738	A	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18764	G	A	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18842	A	G	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18871	C	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding
18895	C	T	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding	noncoding

[0106]

염기서열 위치의 기준은 Zaire ebolavirus 분리균주(H.sapiens-wt/SLE/2014/ManoRiver-NM042.1)의 전체 핵산 18,926 bp (NCBI Reference Sequence: KM233116)으로 하였다. 에볼라바이러스의 GP(Glycoprotein) 관련된 유전자의 변이위치는 전체 핵산 위치 6175, 6909 및 7044의 SNP(표 2)를 분석을 위한 ASO 프로브 및 LSO 프로브는 표 3과 같이 제작하여 사용하였다.

표 2

[0107]

선정된 에볼라 바이러스의 SNP

Position	Ancestral_nuc	2014_nuc	Gene	Type	AA_pos	Ancestral_AA	2014_AA
6175	G	A	GP	nonsynonymous	46	Ser	Asn
6909	T	A	GP	nonsynonymous	291	Trp	Arg
7044	C	A	GP	nonsynonymous	336	Thr	Asn

[0108]

에볼라바이러스의 GP에 관련된 6175 위치, 6909 위치 및 7044 위치의 SNP이 분석용 ASO 프로브 및 LSO 프로브 그리고 표적유전자가 있는 핵산, 상기 ASO 프로브 및 LSO 프로브를 혼성화, 신장 및 연결반응을 수행한 후 PCR 하여 합성한 증폭산물의 크기 상기 ASO 프로브 및 LSO 프로브는 바이오니아(한국)에서 제조하여 실험에 사용하였다.

표 3

[0109]

선정된 에볼라바이러스 SNP의 분석에 사용되는 프로브의 염기서열

Position	ASO 프로브의 표적핵산 결합부위의 염기서열		LSO 프로브의 표적핵산 결합부위의 염기서열
6175	KM233116	gtcgacaaactagt ttgtcgtgacaa	ggcttcaggtccggtgtcccacc
	SNP	gtcgacaaactagt ttgtcgtgacag	
6909	KM233116	ggaaactaaaaaacctcactagaaaaat	ccgaccagagaccaaacac
	SNP	ggaaactaaaaaacctcactagaaaaaa	
7044	KM233116	ccacaaaatcatggcttcagaaaa	cagcaccataatacaccctg
	SNP	ccacaaaatcatggcttcagaaaac	

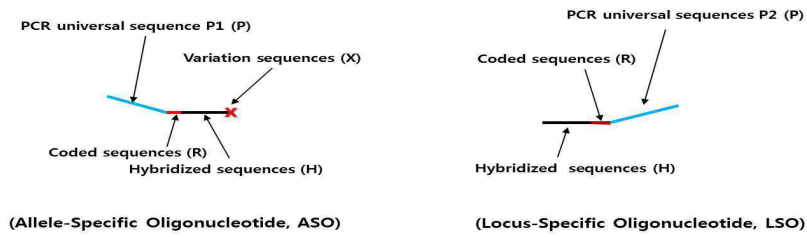
[0110]

실시예 3. 신장반응 및 연결반응

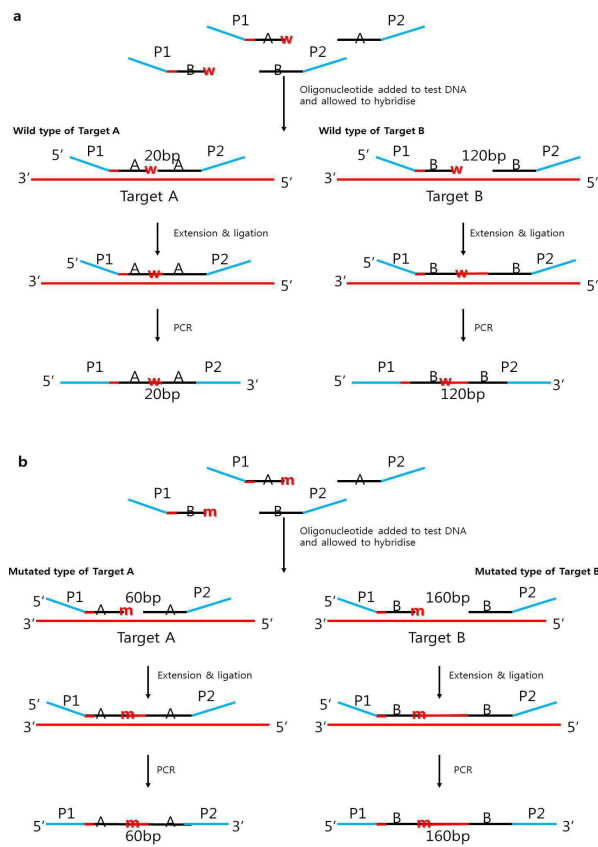
- [0111] 본 실시예에 있어서, 0.5 ng의 실시예1에서 확보한 상기 PCR 산물을 0.5 pmole ASO 프로브 와 LSO 프로브 (바이오니아, 한국), 0.5 U AmpLigase (Epicentre, 미국), 2 U Platinum Tfi Exo(-) DNA Polymerase (Invitrogen, 미국), 1 mM dNTP, 및 1x AmpLigase buffer로 구성된 20 μ l 반응용액에 넣은 후, 95 $^{\circ}$ C에서 5분, 60 $^{\circ}$ C 에서 5분 반응을 5회 실시하였다. 상기 반응물을 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 변성시킨 후 37 $^{\circ}$ C에 보관하였다.
- [0112] 즉, 분석하고자하는 유전자가 포함된 핵산, 상기 ASO 프로브 및 상기 LSO 프로브를 혼성화반응으로 형성된 부분적 이중가닥 핵산에 신장반응을 수행한 후 연결반응을 하여 상기 ASO 프로브 및 상기 LSO 프로브를 결합시킴으로써 완전한 이중가닥핵산을 형성한 후, 이를 주형으로 PCR 증폭시켰다.
- [0113] **실시예 4. 모세관 전기영동을 이용한 PCR 증폭산물 분석**
- [0114] 주형으로 4 의 실시예 3에서 형성된 완전한 이중가닥핵산, 0.08 μ l의 유니버설 PCR 정방향 프라이머 (P1 5'-ACTTCGTCAGTAACGGAC-3'; 50 μ M), 0.08 μ l의 유니버설 PCR 역방향 프라이머 (P2 5'-Cy5-GACTCACTATAGGCAGAC-3'; 50 μ M) 와 10 μ l의 2x pfu-PCR 프리믹스(바이오니아, 한국)에 3차 증류수를 사용하여 20 μ l로 조절한 반응용액을 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초를 35회 수행하여 완전한 이중가닥핵산을 증폭시켰다.
- [0115] 모세관 전기영동은 ABI 3130XL Genetic Analyzer (36-cm capillary array and POP7 polymer; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 제공된 프로토콜을 따라 수행하였다. 0.7 μ l의 PCR 반응물을 9 μ l의 Hi-Di formamide 및 0.3 μ l의 GeneScan 500 ROX Size Standard (Applied Biosystems) 와 혼합하고, 80에서 2 분간 반응시킨 후, 얼음에 넣었다. 샘플들을 모세관에 주입하고 1.6 kV의 전압에서 15초간 적용한 후, 10 kV 의 전기영동 전압 및 60 $^{\circ}$ C에서 전기영동하였다.
- [0116] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 의한 에볼라바이러스 분석용 프로브를 동시에 사용하여 혼성화, 신장 및 연결반응을 한 후 PCR를 수행하고, 증폭산물을 CE-SSCP를 이용하여 분석한 결과를 나타낸 도면이다. 본 발명에 따른 에볼라바이러스 분석용 프로브는 유전자의 변이위치 6175, 6909 및 7044에 대해 모두 단일 피크를 나타냈다. 위치 6175 SNP는 146bp, 위치 6909 SNP는 128bp이고 위치 7044 SNP는 165bp로 표적핵산은 Zaire ebolavirus isolate Ebola virus인 H.sapiens-wt/SLE/2014/ManoRiver-NM042.1,의 전체 핵산 18926 bp (NCBI Reference Sequence: KM233116)의 일부 염기서열로 제작된 것임을 알 수 있다.
- [0117] **실시예 5. qPCR 및 검출용 프로브를 이용한 PCR 증폭산물 분석**
- [0118] 주형으로 4 의 실시예 3에서 형성된 완전한 이중가닥핵산, 0.08 μ l의 유니버설 PCR 정방향 프라이머 (P1 5'-ACTTCGTCAGTAACGGAC-3'; 50 μ M), 0.08 μ l의 유니버설 PCR 역방향 프라이머 (P2 5'-Cy5-GACTCACTATAGGCAGAC-3'; 50 μ M), 0.1 μ l의 FAM 프로브 6175(50 μ M) 및 10 μ l 의 2x pfu-PCR 프리믹스(바이오니아, 한국)에 3차 증류수를 사용하여 20 $^{\circ}$ C로 조절한 반응용액을 50 $^{\circ}$ C에 2분, 95 $^{\circ}$ C에 10분의 초기 가열 후, 95 $^{\circ}$ C에 15초, 65 $^{\circ}$ C에 1분의 사이클(2 스텝)을 50 사이클 반복하였다. 검출용 프로브는 아래와 같이 5' 말단에는 FAM을 형광 색소로서, 3' 말단에는 Iowa를 소광제로서 결합시켜 제작하였다(인테그레이티드 DNA 테크놀로지스사의 수탁 합성 서비스를 이용함).
- [0119] FAM 프로브 6175
- [0120] 5'(FAM)-CCACAAA TCAATTGAGA TCAGTTGG-3'(Iowa)
- [0121] 반응 장치는 프리즘 7900HT(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하였다. 6175위치의 SNP를 특이적으로 검출할 수 있다는 것을 알 수 있다.
- [0122] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항 들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

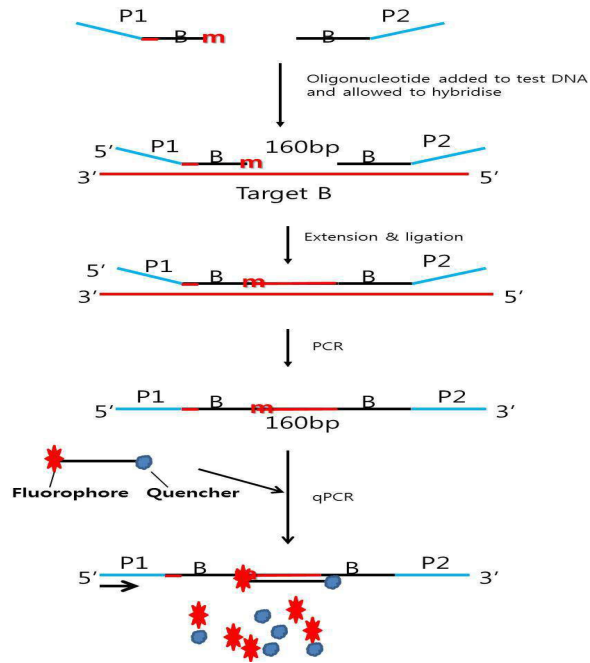
도면1



도면2



도면3



도면4

