



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2019년02월20일  
 (11) 등록번호 10-1922126  
 (24) 등록일자 2018년11월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12Q 1/68* (2018.01) *C12N 15/11* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2012-0049776  
 (22) 출원일자 2012년05월10일  
 심사청구일자 2017년05월10일  
 (65) 공개번호 10-2013-0007961  
 (43) 공개일자 2013년01월21일  
 (30) 우선권주장  
 1020110068556 2011년07월11일 대한민국(KR)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 US20100297630 A1\*  
 Wang et al., BMC Genomics, vol.12., No.154.,  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/154>  
 pp.1-10.(2011.05.)\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
**삼성전자주식회사**  
 경기도 수원시 영통구 삼성로 129 (매탄동)  
 (72) 발명자  
**홍성우**  
 경기 광명시 하안로 284, 1212동 1308호 (하안동,  
 하안주공12단지아파트)  
 (74) 대리인  
**리엔목록특허법인**

전체 청구항 수 : 총 18 항

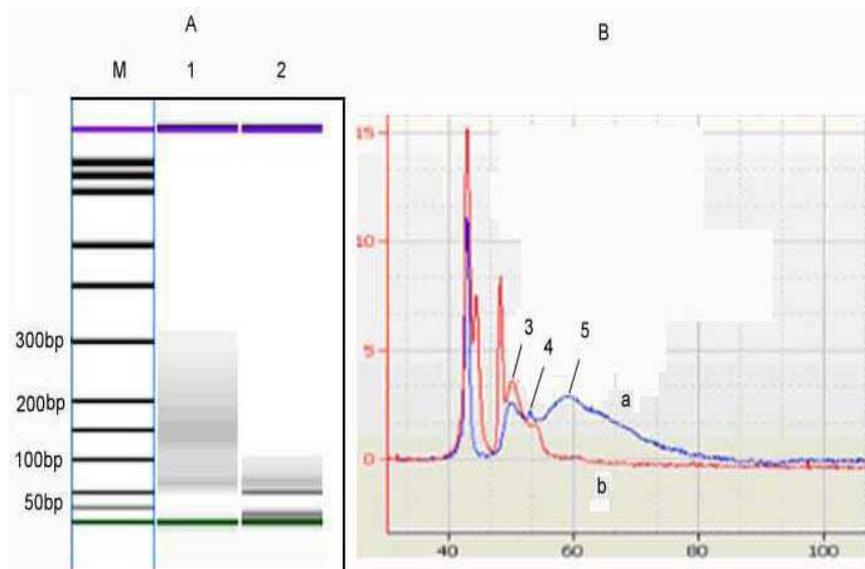
심사관 : 최수형

(54) 발명의 명칭 **바이어스가 감소된 표적 핵산을 증폭하는 방법 및 시료 중 표적 핵산의 상대적인 양을 결정하는 방법**

**(57) 요약**

바이어스가 감소된 표적 핵산을 증폭하는 방법 및 시료 중 표적 핵산의 상대적인 양을 결정하는 방법을 제공한다.

**대표도** - 도1



**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

복수 종류의 표적 핵산을 포함하는 생물학적 시료를 제공하는 단계로서, 상기 표적 핵산은 miRNA인 것인 단계;  
 상기 생물학적 시료로부터의 상기 표적 핵산 중 2 이상의 종류, 또는 그로부터 합성된 cDNA를 연결하여 연결된 산물을 얻는 단계; 및  
 연결된 산물을 증폭하는 단계;를 포함하는, 표적 핵산을 증폭하는 방법.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 연결은 RNA 리가제 및 DNA 리가제 중 하나 이상의 존재하에서 이루어지는 것인 방법.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 연결은 표적 핵산과 표적 핵산 사이에 아답터 서열을 매개하여 연결하는 것인 방법.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 연결은 표적 핵산의 3' 말단에는 3' 말단에 특이적인 아답터 서열이 연결되고, 표적 핵산의 5' 말단에는 5' 말단에 특이적인 아답터 서열이 연결된 표적 핵산 사이를 연결하는 것인 방법.

**청구항 6**

제1항에 있어서, 상기 연결된 산물의 3' 말단 및 5' 말단 중 하나 이상의 말단에 프라이머 서열 또는 프라이머 결합 서열을 연결하는 것인 방법.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 상기 프라이머 서열 및 프라이머 결합 서열 중 하나 이상은 3' 말단 및 5' 말단 중 어느 하나에 특이적으로 연결되는 것인 방법.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 상기 표적 핵산은 길이가 200nt 이하인 것인 방법.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 상기 표적 핵산은 길이가 18 내지 30nt인 것인 방법.

**청구항 10**

제1항에 있어서, 상기 증폭은 상기 연결된 산물을 하나의 증폭 산물로서 증폭하는 것인 방법.

**청구항 11**

제6항에 있어서, 상기 증폭은 상기 프라이머 서열 및 상기 프라이머 결합 서열에 상보적인 서열 중 하나 이상을 프라이머로 사용하여 이루어지는 것인 방법.

**청구항 12**

제1항에 있어서, 복수 종류의 상기 표적핵산 miRNA를 역전사하여 상기 표적 핵산에 상보적인 DNA (cDNA)를 생성

하는 단계를 포함하는 것인 방법.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 상기 역전사는 상기 연결하는 단계 전 또는 후에 수행되는 것인 방법.

**청구항 14**

제12항에 있어서, 상기 역전사 전에 상기 표적 핵산에 3' 말단 및 5' 말단 중 하나 이상의 위치에 아답터 서열을 연결하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 아답터 서열은 3' 말단 및 5' 말단 중 하나 이상의 위치에 특이적으로 연결되는 것인 방법.

**청구항 16**

제12항에 있어서, 상기 역전사 후에 상기 표적 핵산에 상보적인 cDNA에 3' 말단 및 5' 말단 중 하나 이상의 위치에 아답터 서열을 연결하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 상기 아답터 서열은 3' 말단 및 5' 말단 중 하나 이상의 위치에 특이적으로 연결되는 것인 방법.

**청구항 18**

제1항에 있어서, 상기 증폭은 PCR이고, 포워드 및 리버스 프라이머는 표적 핵산 이외의 영역에 특이적으로 결합하는 것인 방법.

**청구항 19**

제1항, 제3항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 방법에 따라 생물학적 시료 중 표적핵산을 증폭하는 단계;

얻어진 증폭된 산물로부터 표적 핵산의 양을 결정하는 단계; 및

상기 표적 핵산의 양으로부터 생물학적 시료 중의 표적 핵산의 상대적인 양을 결정하는 단계를 포함하는, 생물학적 시료 중 표적 핵산의 상대적인 양을 결정하는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 일 이상의 구체예들은 표적 핵산을 증폭하는 방법 및 시료 중 표적 핵산의 상대적인 양을 결정하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 핵산 증폭 (nucleic acid amplification)은 표적 서열 또는 그의 상보적인 서열의 카피 수를 증가시키는 것을 나타낸다. 핵산 증폭은 당업계에 알려져 있다. 핵산의 증폭은 증폭 동안 복수의 사이클을 필요로 하는 방법 또는 단일 온도에서 수행되는 방법을 포함한다. 순환 방법 (cycling techniques)의 예는 열 순환을 필요로 하는 방법을 포함한다. 열 순환을 필요로 하는 방법은 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 포함한다. PCR은 당업계에 알려져 있다. PCR은 보통 열변성에 의하여 이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA으로 변성시키는 단계, 프라이머를 상기 단일가닥 DNA에 어닐링하는 단계; 및 상기 프라이머로부터 상보적 가닥을 합성하는 단계를 포함한다.

[0003] 등은 증폭 방법은 단일 온도 또는 증폭 과정의 주요 양상이 단일 온도에서 수행되는 방법이다. 이중가닥을 분리하기 위하여 반응 산물을 가열하여 추가적 프라이머가 결합할 수 있도록 하는 PCR과는 대조적으로, 등은 방법은 이중가닥을 분리하고 주형을 재카피하기 위하여 가닥 치환 폴리머라제 (strand displacing polymerase)에 의존한다. 등은 방법은 반복 주형 카피 (reiterative template copying)를 개시하기 위하여 프라이머의 치환에 의존

하는 방법과 단일 프라이머 분자의 연속된 재사용 또는 신규 합성에 의존하는 방법으로 구분할 수 있다. 프라이머의 치환에 의존하는 방법은 헬리카제 의존적 증폭 (helicase dependant amplification: HDA), 엑소뉴클레아제 의존적 증폭 (exonuclease dependant amplification), 리콤비나제 중합효소증폭 (recombinase polymerase amplification: RPA) 및 루프 매개된 증폭 (loop mediated amplification: LAMP)로 구성된 군으로부터 선택된 방법을 포함한다. 단일 프라이머 분자의 연속된 재사용 또는 신규 합성에 의존하는 방법은 가닥치환증폭 (strand displacement amplification: SDA) 및 핵산 기반 증폭 (nucleic acid based amplification: NASBA 및 TMA)로 구성된 군으로부터 선택된 방법을 포함한다.

[0004] 한편, 짧은 표적 핵산 서열을 증폭하는데 있어서, 표적 핵산의 종류에 따라 증폭 바이어스가 생길 수 있다. 증폭 바이어스는 표적 핵산의 카피 수 또는 염기 서열, 예를 들면 AT 함량 또는 GC 함량에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면, 복수 개의 마이크로RNA (microRNA: miRNA)를 포함하는 시료 즉, miRNA 라이브러리를 포함하는 시료에서 각각 miRNA를 증폭하는 경우, miRNA의 서열 및 카피 수에 따라 그 증폭의 정도가 달라질 수 있다. miRNA는 일반적으로 약 18 내지 25nt, 보통은 약 21 내지 24nt의 길이를 갖고 1000종 이상의 다른 서열을 갖는 것이 알려져 있다.

[0005] 따라서, miRNA 라이브러리와 같이 복수 개의 표적 핵산을 포함하는 시료로부터 표적 핵산을 증폭 바이어스가 없거나 감소된 상태로서 표적 핵산을 증폭하는 방법이 여전히 요구되고 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0006] 일 구체에는 표적 핵산 사이에 감소된 증폭 바이어스를 갖는, 표적 핵산을 증폭하는 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 다른 구체에는 시료 중 표적 핵산의 상대적인 양을 결정하는 방법을 제공한다.

**과제의 해결 수단**

[0008] 일 양상은 복수 종류의 표적 핵산을 포함하는 시료를 제공하는 단계; 상기 표적 핵산 중 2 이상의 종류를 연결하는 단계; 및 연결된 산물을 증폭하는 단계;를 포함하는, 표적 핵산을 증폭하는 방법을 제공한다.

[0009] 상기 방법은 복수 종류의 표적 핵산을 포함하는 시료를 제공하는 단계를 포함한다. 상기 시료는 표적 핵산을 포함하는 것이면 임의의 형태의 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 시료는 표적 핵산을 포함하는 생물학적 시료 또는 화학적 시료를 포함한다. 상기 생물학적 시료는 생물체로부터 유래된 것으로서, 분리된 생물체 자체 뿐만 아니라 생물체 자체로부터 분리, 정제 및 증폭과 같은, 임의의 추가적인 과정을 거친 시료일 수 있다. 분리된 생물체는 예를 들면, 생체로부터 분리된 혈액, 뇨, 타액, 림프액, 조직 및 세포로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함한다. 또한, 추가적인 과정을 거친 시료는 예를 들면, 혈청, 분리된 생물체로부터 분리된 핵산, 또는 증폭된 핵산을 포함하는 시료일 수 있다. 화학적 시료는 화학적으로 합성된 표적 핵산을 포함하는 것일 수 있다. 상기 시료는 RNA 또는 DNA를 포함하는 것일 수 있다. 상기 시료는 miRNA를 포함하는 시료일 수 있다. 용어 "miRNA"는 진핵 세포에서 발견된 짧은 RNA일 수 있다. miRNA는 세포 생리에서 중요한 기능을 가지고 있으며, 유전자 발현의 번역후 조절자로서 작용할 수 있다. miRNA는 TRizol/TRI-시약 용액에 근거한 방법에 의하여 분리된 것일 수 있다. miRNA는 알려진 분리 키트 예를 들면, mirVana isolation kit (Ambion) 및 RNeasy kit (Qiagen)에 따라 분리된 것일 수 있다.

[0010] 상기 표적 핵산은 길이가 200nt 이하인 것일 수 있다. 상기 표적 핵산은 예를 들면, 약 15 내지 약 200nt, 약 15 내지 약 170nt, 약 15 내지 약 150nt, 약 15 내지 약 120nt, 약 15 내지 약 100nt, 약 15 내지 약 80nt, 약 15 내지 약 75nt, 약 15 내지 약 70nt, 약 18 내지 약 200nt, 약 18 내지 약 170nt, 약 18 내지 약 150nt, 약 18 내지 약 120nt, 약 18 내지 약 100nt, 약 18 내지 약 80nt, 약 18 내지 약 75nt, 약 18 내지 약 70nt, 약 18 내지 약 50nt, 약 18 내지 약 30nt, 약 18 내지 약 27nt, 약 8 내지 약 25nt, 약 18 내지 약 25nt 또는 약 21 내지 약 25nt인 것일 수 있다. 상기 표적 핵산은 예를 들면, pre-miRNA 및 miRNA에 해당하는 크기를 포함하는 것일 수 있다. 상기 표적 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있다. 상기 RNA는 tRNA, rRNA, mRNA 및 miRNA로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 DNA는 게놈 DNA 단편 또는 RNA로부터 제조된 cDNA일 수 있다.

- [0011] 용어 "복수 종류의 표적 핵산"이란 1차 서열이 다른 2이상의 핵산 분자가 하나의 시료 중에 존재하는 것을 나타낸다. 예를 들면, 서열이 다른 2 이상의 miRNA 분자가 하나의 시료 중에 존재하는 것을 포함한다.
- [0012] 상기 방법은 상기 표적 핵산 중 2 이상의 종류를 연결하는 단계를 포함한다. 상기 연결은 당업계에 알려진 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 예를 들면, 상기 연결은 RNA 리가제 및 DNA 리가제 중 하나 이상의 존재하에서 이루어지는 것일 수 있다. RNA 리가제 및 DNA 리가제 중 하나 이상의 존재하에서의 연결 반응 조건은 당업자에게 알려져 있다. 상기 반응 조건은 예를 들면, 5'-인산화된 말단을 갖는 핵산, 3'-히드록실 말단을 핵산, 및 ATP를 포함하는 용액을 포함할 수 있다. RNA 리가제는 예를 들면, T4 RNA 리가제 1 또는 2를 포함한다. DNA 리가제는 T4 DNA 리가제를 포함한다. 상기 반응은 리가제 반응에 적합한 버퍼 중에서 이루어질 수 있다. 반응 온도는 35 °C 내지 40 °C, 예를 들면, 37 °C 일 수 있다.
- [0013] 상기 연결은 표적 핵산과 표적 핵산 사이에 아답터 서열을 매개하여 연결하는 것일 수 있다. 상기 연결은 표적 핵산의 3' 말단에는 3' 말단에 특이적인 아답터 서열이 연결되고, 표적 핵산의 5' 말단에는 5' 말단에 특이적인 아답터 서열이 연결된 표적 핵산 사이를 연결하는 것일 수 있다. 용어 "아답터 서열 (adaptor sequence)"은 표적 핵산의 3' 말단 또는 5' 말단에 연결하기 위한 핵산 서열을 나타낸다. 아답터 서열은 DNA 또는 RNA일 수 있다. 아답터 서열은 단일 가닥 또는 이중가닥 서열일 수 있다. 아답터 서열은 GC 함량이 20% 내지 80%, 예를 들면, 30% 내지 80%, 40% 내지 80%, 50% 내지 80%, 60% 내지 80%, 70% 내지 80%, 60% 내지 70%, 30% 내지 70%, 30% 내지 60%, 30% 내지 50%, 30% 내지 40%, 40% 내지 50%, 또는 40% 내지 70%인 것일 수 있다. 아답터 서열은 길이가 약 3 nt 내지 약 100nt일 수 있다. 아답터 서열은 길이가 예를 들면, 약 3 nt 내지 약 70nt, 약 3 nt 내지 약 50nt, 약 3 nt 내지 약 30nt, 약 3 nt 내지 약 20nt, 약 3 nt 내지 약 10nt, 약 3 nt 내지 약 7nt, 약 4 nt 내지 약 20nt, 약 4 nt 내지 약 10nt, 또는 약 4 nt 내지 약 7nt일 수 있다.
- [0014] '3' 말단 또는 5' 말단에 특이적인 아답터 서열'이란 3' 말단 및 5' 말단에 각각 다른 아답터 서열이 연결되는 것을 나타낸다. 이는 표적 핵산 및 아답터 서열의 5' 말단 및 3' 말단의 반응성을 선택적으로 차단하거나 활성화시킴으로써 이루어질 수 있다. 예를 들면, 표적 핵산 (예, miRNA 또는 그에 상보적인 서열을 가진 cDNA)의 5'-말단은 인산화시키고, 3'-말단은 차단 (예를 들면, 키나제를 사용하여 3'-말단 -OH 기를 -포스포릴 기로 전환하는 것에 의한 차단)시키고, 여기에 3'-말단에 -OH 기를 가진 5' 말단 아답터 서열 (A5)을 DNA 또는 RNA 리가제 존재하에서 반응시켜 표적 핵산의 5' 말단에만 5' 말단 아답터 서열을 연결할 수 있다. 여기서, 5' 말단 아답터 서열의 5' 말단은 선택적으로 인산화되거나 되지 않은 것일 수 있다. 얻어진 연결 산물은 5'-말단이 인산화된 3' 말단 아답터 서열 (A3)을 DNA 또는 RNA 리가제 존재하에서 반응시켜 연결 산물의 3' 말단에만 3' 말단 아답터 서열을 연결할 수 있다. 여기서, 3' 말단 아답터 서열의 3' 말단은 선택적으로 인산화되거나 되지 않은 것일 수 있다. 3' 말단 및 5' 말단에 특이적인 아답터 서열은 상기한 바와 같이, 5' 말단에 먼저 도입되고 다음으로 3' 말단에 도입되거나, 3' 말단에 먼저 도입되고 다음으로 5' 말단에 도입되거나, 또는 5' 말단 및 3' 말단에 동일한 반응 중에서 도입되는 것일 수 있다. 5' 말단에 특이적인 아답터 서열과 3' 말단에 특이적인 아답터 서열은 서열 다르거나 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [0015] 5' 말단 및 3' 말단에 동일한 반응 중에서 도입되는 것의 예는, 5' 말단은 인산화되고 3' 말단은 -OH기인 표적 핵산, 5' 말단은 인산화되어 있지 않고 3' 말단은 -OH인 5' 말단 아답터 서열, 및 5' 말단은 인산화되어 있고 3' 말단은 차단된 3' 말단 아답터 서열을 동일 반응 용액 중에서 DNA 또는 RNA 리가제 존재하에서 반응시켜 표적 핵산의 5' 말단과 3' 말단에 각각 특이적 아답터 서열을 연결할 수 있다.
- [0016] 이렇게 5' 말단과 3' 말단 중 하나 이상의 위치에 각각 특이적 아답터 서열이 연결된 표적 서열은 또한, 상기한 바와 같이, 서로 연결될 수 있다.
- [0017] 상기 방법은 표적 핵산과 표적 핵산이 연결된 상기 연결된 산물의 3' 말단 및 5' 말단 중 하나 이상의 말단에 프라이머 서열 또는 프라이머 결합 서열을 연결하는 것을 포함한다. 프라이머 서열 또는 프라이머 결합 서열의 연결은 상기 아답터 서열의 연결과 동일한 방식으로 이루어질 수 있다. 상기 프라이머 서열 및 프라이머 결합 서열 중 하나 이상은 3' 말단 및 5' 말단 중 어느 하나에 특이적으로 연결되는 것일 수 있다. 용어 "프라이머

결합 서열"이란 프라이머에 상보적인 서열을 포함한다.

- [0018] 용어 "프라이머 서열 (primer sequence)"은 핵산 중합의 시작점으로서 작용하는 핵산 서열을 나타낸다. 프라이머 서열은 표적 핵산에 결합할 수 있고 3'-OH를 갖는 것일 수 있다. 프라이머 서열은 DNA 또는 RNA일 수 있다. 프라이머 서열은 단일 가닥일 수 있다. 프라이머 서열은 GC 함량이 20% 내지 80%, 예를 들면, 30% 내지 80%, 40% 내지 80%, 50% 내지 80%, 60% 내지 80%, 70% 내지 80%, 60% 내지 70%, 30% 내지 70%, 30% 내지 60%, 30% 내지 50%, 30% 내지 40%, 40% 내지 50%, 또는 40% 내지 70%인 것일 수 있다. 프라이머 서열은 길이가 약 10 nt 내지 약 100nt일 수 있다. 프라이머 서열은 길이가 예를 들면, 약 10 nt 내지 약 70nt, 약 10 nt 내지 약 50nt, 약 10 nt 내지 약 30nt, 약 10 nt 내지 약 20nt, 약 15 nt 내지 약 100nt, 약 15 nt 내지 약 70nt, 약 15 nt 내지 약 50nt, 약 15 nt 내지 약 40nt, 또는 약 15 nt 내지 약 30nt일 수 있다.
  
- [0019] 상기 방법은 상기 연결된 산물을 증폭하는 단계를 포함한다. 용어 "증폭 (amplification)"은 표적 서열 또는 그의 상보적인 서열의 카피 수를 증가시키는 것을 나타낸다. 증폭은 당업계에 알려진 임의의 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 핵산의 증폭은 증폭 동안 복수의 사이클을 필요로 하는 방법 또는 단일 온도에서 수행되는 방법을 포함한다. 순환 방법 (cycling techniques)의 예는 열 순환을 필요로 하는 방법을 포함한다. 열 순환을 필요로 하는 방법은 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 포함한다. PCR은 당업계에 알려져 있다. PCR은 보통 열변성에 의하여 이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA으로 변성시키는 단계, 프라이머를 상기 단일가닥 DNA에 어닐링하는 단계; 및 상기 프라이머로부터 상보적 가닥을 합성하는 단계를 포함한다. 등은 증폭 방법은 단일 온도 또는 증폭 과정의 주요 양상이 단일 온도에서 수행되는 방법이다. 이중가닥을 분리하기 위하여 반응 산물을 가열하여 추가적 프라이머가 결합할 수 있도록 하는 PCR과는 대조적으로, 등은 방법은 이중가닥을 분리하고 주형을 재카피하기 위하여 가닥 치환 폴리머라제 (strand displacing polymerase)에 의존한다. 등은 방법은 반복 주형 카피 (reiterative template copying)를 개시하기 위하여 프라이머의 치환에 의존하는 방법과 단일 프라이머 분자의 연속된 재사용 또는 신규 합성에 의존하는 방법으로 구분할 수 있다. 프라이머의 치환에 의존하는 방법은 헬리카제 의존적 증폭 (helicase dependant amplification: HDA), 엑소뉴클레아제 의존적 증폭 (exonuclease dependant amplification), 리콤비나제 중합효소증폭 (recombinase polymerase amplification: RPA) 및 루프 매개된 증폭 (loop mediated amplification: LAMP)으로 구성된 군으로부터 선택된 방법을 포함한다. 단일 프라이머 분자의 연속된 재사용 또는 신규 합성에 의존하는 방법은 가닥치환증폭 (strand displacement amplification: SDA) 및 핵산 기반 증폭 (nucleic acid based amplification: NASBA 및 TMA)으로 구성된 군으로부터 선택된 방법을 포함한다.
  
- [0020] 상기 증폭은 상기 연결된 산물을 하나의 증폭 산물로서 증폭하는 것일 수 있다. 즉, 하나의 연결 산물에 포함된 표적 핵산을 모두 하나의 증폭 산물 중에 포함되도록 프라이머를 선택할 수 있다. 예를 들면, PCR의 경우, 포워드 프라이머는 가장 상류에 있는 표적 핵산의 5' 말단 또는 그 상류에 해당하는 것이고, 리버스 프라이머는 가장 하류에 있는 표적 핵산의 3' 말단 또는 그 하류에 상보적인 것일 수 있다. 상기 증폭은 상기 프라이머 서열 및 상기 프라이머 결합 서열에 상보적인 서열 중 하나 이상을 프라이머로 사용하여 이루어지는 것일 수 있다.
  
- [0021] 일 구체예에서 상기 프라이머는 표적 핵산, 예를 들면, miRNA 또는 그의 상보적 cDNA에 상보적인 서열을 포함하지 않는 것일 수 있다. PCR의 경우, 포워드 프라이머는 가장 상류에 있는 표적 핵산의 5' 말단의 상류에 해당하여, 표적 핵산 또는 그에 상보적인 서열을 포함하고 있지 않으며, 리버스 프라이머는 가장 하류에 있는 표적 핵산의 3' 말단의 하류에 상보적인 것이어서, 표적 핵산 또는 그에 상보적인 서열을 포함하고 있지 않을 수 있다.
  
- [0022] 상기 방법은 상기 표적 핵산이 RNA인 경우, 상기 표적핵산을 역전사하여 상기 표적 핵산에 상보적인 DNA (cDNA)를 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 역전사는 상기 연결하는 단계 전 또는 후에 수행되는 것일 수 있다. 역전사는 역전사 효소 (reverse transcriptase)를 사용하여 RNA 가닥을 DNA 상보체를 생성하는 것으로 당업계에 알려져 있다.
  
- [0023] 상기 방법은 상기 역전사 전에 상기 표적 핵산에 3' 말단 및 5' 말단 중 하나 이상의 위치에 아답터 서열을 연결하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 아답터 서열은 3' 말단 및 5' 말단 중 하나 이상의 위치에 특이적으로 연결되는 것일 수 있다.
  
- [0024] 상기 방법은 상기 역전사 후에 상기 표적 핵산에 상보적인 cDNA에 3' 말단 및 5' 말단 중 하나 이상의 위치에

아답터 서열을 연결하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 아답터 서열은 3' 말단 및 5' 말단 중 하나 이상의 위치에 특이적으로 연결되는 것일 수 있다. 상기 아답터 서열을 연결하는 것에 대하여는 상기한 바와 같다.

[0025] 다른 양상은 상기한 방법에 따라 시료 중 표적핵산을 증폭하는 단계; 얻어진 증폭된 산물로부터 표적 핵산의 양을 결정하는 단계; 및 상기 표적 핵산의 양으로부터 시료 중의 표적 핵산의 상대적인 양을 결정하는 단계를 포함하는, 시료 중 표적 핵산의 상대적인 양을 결정하는 방법을 제공한다.

[0026] 상기 방법은 상기한 방법에 따라 시료 중 표적핵산을 증폭하는 단계를 포함한다. 이에 대하여는 상기한 바와 같다.

[0027] 상기 방법은 얻어진 증폭된 산물로부터 표적 핵산의 양을 결정하는 단계를 포함한다. 표적 핵산의 양은 당업계에 알려진 방법에 의하여 결정할 수 있다. 표적 핵산의 양은 실시간(real time) 증폭 방법에 의하여 결정할 수 있다. 실시간 증폭 방법은, 형광 염료와 형광 억제자 (quencher) 물질을 사용하는 Taqman 방식과 이중가닥 DNA에 결합하는 형광 물질을 사용하는 방식을 포함한다. Taqman 방식은 예를 들면 형광 리포터 물질이 5' 말단에 결합되어 있고 3' 말단에 형광 억제자가 결합되어 있고 각 표적 핵산에 특이적 서열을 포함하는 Taqman 프로브를 사용함으로써 증폭 중에 검출되는 형광량에 따라 표적핵산의 양을 실시간으로 결정할 수 있다. 증폭 중 5'→3' 엑소뉴클레아제 활성을 가진 DNA 폴리머라제에 의하여 프라이머가 연장되어 새로운 가닥이 합성되어 감에 따라, 5'→3' 엑소뉴클레아제 활성은 주형에 어닐링되어 있는 프로브를 분해하게 된다. 프로브의 분해에 따라 형광 염료를 방출시키고 그에 따라 형광 억제자에 의한 억제가 해제되어 형광을 발광할 수 있다. 여기에서 상기 형광 리포터 물질은 표적 핵산에 따라 다른 것을 사용할 수 있다. Taqman 프로브를 사용한 실시간 증폭 방법은 알려져 있으며, 알려진 임의의 방법이 사용될 수 있다.

[0028] 이중가닥 DNA에 결합하는 형광 물질을 사용하는 방식에서, DNA-결합 형광물질은 PCR 중 모든 이중가닥 DNA에 결합한다. PCR 중 DNA 산물의 증가는 형광강도가 증가되게 하고, 각 사이클에서 측정되어 DNA 농도를 정량할 수 있도록 한다. DNA-결합 형광물질은 SYBR Green I일 수 있다. 표적 핵산의 양은 또한, 증폭 후 증폭 산물을 혼성화 방법 또는 전기영동 등을 통하여 결정할 수 있다.

[0029] 상기 방법은 상기 표적 핵산의 양으로부터 시료 중의 표적 핵산의 상대적인 양을 결정하는 단계를 포함한다. 표적 핵산의 상대적인 양을 결정하는 단계는 표적 핵산의 양을 특정한 값, 예를 들면 배경 값에 대하여 표준화하거나, 다른 표준 값과 비교하여 상대적인 값을 결정함으로써 이루어질 수 있다.

[0030] 결정된 표적 핵산의 상대적인 양은 표적 핵산과 여러 생리학적 조건, 예를 들면, 질병과의 연관성을 판단하는데 사용될 수 있다.

[0031] 일 구체예에 따른 표적 핵산을 증폭하는 방법에 의하면, 복수 개의 표적핵산을 포함하는 시료로부터, 표적 핵산 사이에 감소된 증폭 바이스로 표적 핵산을 증폭할 수 있다. 따라서, 증폭 산물의 양으로부터 시료 중의 표적 핵산의 프로파일을 더 정확하게 추정할 수 있다.

[0032] 다른 구체예에 따른 시료 중 표적 핵산의 상대적인 양을 결정하는 방법에 의하면, 시료 중의 표적 핵산의 상대적인 양을 효율적으로 결정할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0033] 도 1은 증폭 산물을 전기영동하고 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0034] 이하 일 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

**[0035] 실시예1: 증폭 바이스가 감소된 표적 핵산의 증폭 방법**

**[0036] 1. 개별 miRNA에 상보적인 cDNA에 아답터 서열 및 프라이머 서열이 연결된 제1 연결 산물의 제조**

- [0037] 증폭하고자 하는 표적핵산으로 GC 함량이 다른 15 종류의 miRNA를 선택하였다. 이들 표적핵산에 3' 말단과 5' 말단에 각각 아답터 서열과 프라이머 서열이 순서대로 결합된 연결체를 모사하기 위하여, 각 miRNA의 cDNA에 3' 말단과 5' 말단에 각각 아답터 서열과 프라이머 서열이 순서대로 결합된 단일가닥 DNA (이하 '제1 연결 산물'이라 함)를 합성하였다.
- [0038] 구체적으로, 각 miRNA에 상보적인 DNA (cDNA)의 3' 말단에 3' 말단 아답터 서열 (이하 'A3'이라 함)을 부착시키고 5' 말단에 5' 말단 아답터 서열 (이하 'A5'이라 함)을 부착시키고, 다시 3' 말단 아답터 서열에 3' 프라이머 서열 (P3)을 부착시키고 5' 말단 아답터 서열에 5' 프라이머 서열 (P5)을 부착시킨 제1 연결 산물을 합성하였다 (Bioneer 사, 한국). 이렇게 합성된 각 제1 연결 산물의 일반적 구조는 P5-A5-miRNA의 cDNA-A3-P3이다. 여기서, P5와 P3는 프라이머 결합 부위이다. P5-A5 및 A3-P3의 서열은 다음과 같다.
- [0039] P5-A5: 5'-TGAGTTCTACGGTACCTCTAAGC-3' (서열번호 16)
- [0040] A3-P3: 5'-AGGCATAAGCTGTTAGCTCAGAAT-3' (서열번호 17)
- [0041] 증폭 프라이머로서는 P5-A5 서열과 A3-P3에 상보적인 리버스 프라이머 (reverse primer) 5'-ATTCTGAGCTAACAGCTTATGCCT-3' (서열번호 18)를 사용하였다.
- [0042] 상기 아답터 서열 및 프라이머 서열은 GC 함량이 20% 내지 80%에 속하는 것이어서, 이들을 cDNA에 연결하여 얻어지는 연결 산물은 전체 GC 함량이 20% 내지 80% 범위에 가까워지는 방향으로 변화하도록 한다.
- [0043] 사용된 15 miRNA의 서열은 표 1과 같다.

**표 1**

순번	명칭	서열번호	GC 함량	Tm	길이
1	hsa-mir-95	서열번호1	36.4	60	22
2	hsa-mir-7	서열번호2	34.8	62	23
3	hsa-mir-1	서열번호3	27.3	56	22
4	hsa-mir-9	서열번호4	34.8	62	23
5	hsa-mir-16	서열번호5	45.5	64	22
6	hsa-mir-17	서열번호6	47.8	68	23
7	hsa-mir-25	서열번호7	50	66	22
8	hsa-mir-31	서열번호8	52.4	64	21
9	hsa-mir-1203	서열번호9	71.4	72	21
10	hsa-mir-1307	서열번호10	72.7	76	22
11	hsa-mir-3141	서열번호11	73.7	66	19
12	hsa-mir-1915	서열번호12	90	76	20
13	hsa-mir-2861	서열번호13	89.5	72	19
14	hsa-mir-3196	서열번호14	88.9	68	18
15	hsa-mir-3665	서열번호15	83.3	66	18

[0045] **2. 복수의 개별 miRNA에 상보적인 cDNA에 아답터 서열 및 프라이머 서열이 연결된 제2 연결 산물의 제조**

- [0046] 서열번호 1 내지 15에 상보적인 cDNA로부터 임의적으로 선택된 4개 cDNA를 아답터 서열을 통하여 연결시키고, 연결된 산물의 양말단에 다시 프라이머 서열을 연결시킨 제2 연결 산물을 합성하였다. 그 결과 얻어진 각 제2 연결 산물은 다음의 구조를 갖는다.
- [0047] P5-A5-cDNA1-A3-A5-cDNA2-A3-A5-cDNA3-A3-A5-cDNA4-A3-P3
- [0048] 식 중 A3, A5, P3 및 P5는 상기한 바와 같으며, cDNA1, cDNA2, cDNA3 및 cDNA4는 서열번호 1 내지 15에 상보적인 cDNA 중 하나를 나타낸다.
- [0049] 이들에 상보적인 DNA (cDNA) 4종이 연결된 제1 연결 산물을 합성하였다 (Bioneer 사, 한국). 제2 연결 산물은 8

종류를 준비하였으며, 그들의 cDNA 1 내지 4의 구성은 다음과 같다.

표 2

순번	cDNA 구성				GC 함량
	cDNA1	cDNA2	cDNA3	cDNA4	
1	hsa-mir-16	hsa-mir-3665	hsa-mir-3196	hsa-mir-1915	58.1
2	hsa-mir-1307	hsa-mir-1203	hsa-mir-25	hsa-mir-1	49.4
3	hsa-mir-17	hsa-mir-25	hsa-mir-1307	hsa-mir-1203	51.8
4	hsa-mir-31	hsa-mir-3141	hsa-mir-25	hsa-mir-16	49.1
5	hsa-mir-2861	hsa-mir-25	hsa-mir-1307	hsa-mir-95	52.1
6	hsa-mir-1307	hsa-mir-1203	hsa-mir-7	hsa-mir-9	48.4
7	hsa-mir-1307	hsa-mir-16	hsa-mir-3196	hsa-mir-31	53.2
8	hsa-mir-1307	hsa-mir-2861	hsa-mir-31	hsa-mir-3196	58.0

3. 표적 핵산의 증폭

상기 1과 2에서 준비된 제1 연결 산물과 제2 연결 산물을 주형으로 하여 PCR을 수행하여 표적 핵산을 증폭하였다. 포워드 프라이머로서 서열번호 16의 올리고뉴클레오티드를 사용하고, 리버스 프라이머로서 서열번호 18의 올리고뉴클레오티드를 사용하였다. PCR은 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR)을 수행하였으며, 증폭 산물의 실시간 확인은 SYBR GREENI을 사용하였다.

qRT-PCR은 Roche LC480 기기를 사용하고, 95℃ 10분, (95℃ 15초/55℃ 1분) 40회 수행하였으며 램프 속도 (ramping rate)는 3.3℃/sec이었다. 제1 연결 산물을 증폭하기 위한 PCR 반응 혼합물은 각 주형 cDNA 0.5nM, 포워드 및 리버스 프라이머 각각 500nM, SYBR GREEN master mix (Universal RT, Exiqon 사 제품 #203450)을 포함하였다. SYBR GREEN master mix는 제조사에서 제공하는 DNA 폴리머라제, 버퍼, dNTP 및 SYBR GREENI을 포함하는 혼합물이다.

제2 연결 산물을 증폭하기 위한 PCR 반응 혼합물은 각 주형 cDNA 0.5nM, 포워드 및 리버스 프라이머 각각 500nM, SYBR GREEN master mix (Universal RT, Exiqon 사 제품 #203450)을 포함하였다. SYBR GREEN master mix는 제조사에서 제공하는 DNA 폴리머라제, 버퍼, dNTP 및 SYBR GREENI을 포함하는 혼합물이다.

증폭된 miRNA는 역치 사이클 Ct (threshold cycle) 값을 측정하여 결정하였다.

4. 증폭 결과

제1 연결 산물의 증폭 결과는 평균 Ct 값에 대한 분산 (CV)(%) 값은 표 3에 기재되어 있다.

표 3

15종 miRNA 전체	평균 Ct	21.43
	CV(%)	10.92
GC 함량 20~80% miRNA	평균 Ct	20.73
	CV(%)	5.83
GC 함량 80% 초과 miRNA	평균 Ct	23.37
	CV(%)	16.03

표 3에 나타낸 바와 같이, 표적핵산의 GC 함량에 따라 Ct 값은 달라진다. GC 함량이 20~80%에 속하는 11 종의 miRNA는 평균 Ct 값이 20.73이고 분산 값이 5.83% 인 반면, 동일한 실험 조건에서 GC 함량이 80% 초과에 속하는 4 종의 miRNA (hsa-mir-1915, 2861, 3195 및 3196)는 평균 Ct값이 23.37이고 분산 값이 16.03%이었다. 이는 GC 함량이 높아짐에 따라, 분산 값이 높아지는 것을 나타낸다. 즉, 표적 핵산의 서열, 즉 GC 함량에 따라 증폭 바이어스 (amplification bias)가 존재한다는 것을 나타낸다.

[0061] 제2 연결 산물의 증폭 결과는 표 4에 기재되어 있다.

**표 4**

[0062]

순번	GC 함량	Ct
1	58.1	20.23
2	49.4	18.40
3	51.8	20.67
4	49.1	21.57
5	52.1	19.08
6	48.4	20.56
7	53.2	21.25
8	58	21.81

[0063] 제2 연결 산물을 증폭하는 경우, miRNA는 평균 Ct 값이 20.44이고 분산 값이 5.83%로 제1 연결 산물의 GC 함량 20~80%의 증폭 결과와 유사한 값을 얻을 수 있었다. 이는 제2 연결 산물을 증폭하는 경우, GC 함량을 비롯한 염기 서열의 차이에서 발생하는 각각 miRNA의 증폭 바이어스 (amplification bias)가 상쇄될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0064] **실시예2: miRNA의 연결 및 증폭**

[0065] 증폭하고자 하는 표적핵산으로 GC 함량이 다른 8 종류의 miRNA를 선택하였다. 선택된 8종의 miRNA는 표 2에 나타낸 바와 같다.

**표 5**

[0066]

순번	miRNA 명칭	서열번호	GC 함량	Tm	길이
1	hsa-mir-95	1	36.4	60	22
2	hsa-mir-1307	10	72.7	76	22
3	hsa-mir-1203	9	71.4	71.4	21
4	hsa-mir-4271	19	63.2	62.0	19
5	hsa-mir-1915	12	90	76	20
6	hsa-mir-3141	11	73.7	66	19
7	hsa-mir-2861	13	89.5	72	19
8	hsa-mir-3665	15	83.3	66	18
		평균	72.48		
		표준편차	17.28		

[0067] 표 5의 miRNA는 합성한 miRNA (바이오나라, 한국)를 사용하였으며, 농도는 약 1pmole/u1이었으며, 5'-인산화, 3'-OH를 가진 것으로 -20℃에서 보관한 것을 사용하였다. miRNA에 아답터 서열 및/또는 프라이머 서열을 연결하고, 증폭 반응을 수행하였다. 연결 및 증폭에 사용된 서열은 다음과 같다.

[0068] P5-A5: 5'-CGGUGAGGUCUUUGGUUCAUCGAUCG-3' (서열번호 20)

[0069] A3-P3: 5'-CGAUCGUGUCCUCAAGGCUACCACCU-3' (서열번호 21)

[0070] 역전사 프라이머 서열: 5'-ATCGCGAGAATTCCA-3' (서열번호 22)

[0071] PCR 포워드 프라이머: 5'-CGGTGAGGTCTTTGGTTCAT-3' (서열번호 23)

[0072] PCR 리버스 프라이머: 5'-AGGTGGTAGCCTTGAGGACA-3' (서열번호 24)

- [0073] P5-A5, A3-P3, 역전사 및 PCR 프라이머는 바이오니아 (한국)으로부터 구입하였다.
- [0074] **(1) 3' 말단에 A3-P3 서열의 연결**
- [0075] 표 5에 나타낸 8종의 miRNA를 각각 1pmole/ul의 농도로 혼합한 후 이중 1ul와 상기 A3-P3 (160 fmole/ul) 1ul 혼합하였다. 다음으로, 상기 혼합물을 T4 RNA ligase 10 유닛을 포함하는 반응 버퍼 (NEB, 1xT4 RNA ligase reaction buffer supplemented with 1mM ATP)에 첨가하고, 37°C에서 2시간 동안 RNA 연결 반응을 수행하였다.
- [0076] 여기서, 3' 말단에 A3-P3가 연결된 상태에서 5' 방향으로 4개 정도의 miRNA가 무작위 연결될 수 있는 비율로 전체 miRNA 질량 대비 일정 비율의 A3-P3를 사용하였다 (총 miRNA 대비 1/6의 아답터를 사용). 이렇게 만들어진 제1 연결 산물은 miRNA-miRNA-A3-P3, miRNA-miRNA-miRNA-A3-P3, miRNA-miRNA-miRNA-miRNA-A3-P3, miRNA-miRNA-miRNA-miRNA-miRNA-A3-P3, miRNA-miRNA-miRNA-miRNA-miRNA-miRNA-A3-P3 등의 형태가 될 수 있다. -A3-P3의 3' 말단은 3'-ddC (Dideoxycytidine)로 차단되어 있다.
- [0077] **(2) 5' 말단에 P5-A5 서열의 연결**
- [0078] (1)에서 얻어진 반응물에 10pmole/ul의 P5-A5 1ul를 첨가하고, (1)과 동일한 반응 조건에서 5' 말단에 P5-A5-서열을 연결시켰다. 그 결과, P5-A5-miRNA-miRNA-A3-P3, P5-A5-miRNA-miRNA-miRNA-A3-P3, P5-A5-miRNA-miRNA-miRNA-miRNA-A3-P3, P5-A5-miRNA-miRNA-miRNA-miRNA-miRNA-A3-P3, P5-A5-miRNA-miRNA-miRNA-miRNA-miRNA-miRNA-A3-P3 등의 서열(이하 제1 연결산물)을 생성시켰다.
- [0079] 또한, 대조군으로서 8종 miRNA에 각각에 대하여, (1), (2)에 따라 -A3-P3, 및 P5-A5-을 3' 말단과 5' 말단에 연결하여, P5-A5-miRNA-A3-P3의 형태의 서열을 얻었다.
- [0080] **(3) 역전사 반응**
- [0081] (2)에서 얻어진 실험군의 제1 연결산물과 대조군의 연결산물에 대하여, 서열번호 22의 역전사 프라이머를 사용하여 역전사 반응을 수행하였다.
- [0082] 역전사 반응은 실험군 및 대조군 시료 1ul (1pmole/ul)를 TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit(MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50U/ul, Applied Bioscience; 4366596)의 프로토콜에 따라 16°C에서 30분, 42°C에서 30분, 85°C에서 5분 동안 인큐베이션시켰다. 그 결과, cDNA 산물을 얻었다.
- [0083] **(4) 증폭 및 결과**
- [0084] (3)에서 얻어진 cDNA 산물을 주형으로 하고, 서열번호 23 및 24의 서열을 각각 포워드 및 리버스 프라이머 (각 900nM)로 하여 정량적 RT-PCR (qRT-PCR)을 수행하였다. qRT-PCR은 Applied Biosystems Taqman™ Universal PCR Master Mix II, No UNG (part number:#4440043) 키트와, Taqman probe 250nM(Applied Biosystems로부터 custome 제작된)를 사용하여 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 10분 변성, 95°C에서 10초 동안 변성, 60°C에서 10초 동안 어닐링 및 증합을 45회 수행하였다. 증폭된 산물을 Agilent 사의 BioAnalyzer 2100을 사용하여 전기영동하였다.
- [0085] 도 1은 증폭 산물을 전기영동하고 분석한 결과를 나타낸 도면이다. 도 1A는 전기영동 사진이며, 도 1B는 1A의 electropherogram을 나타낸다. 도 1B에서 a는 실험군, b는 대조군에 대한 결과이고, 3, 4, 5는 각각 1개의 miRNA의 연결 산물 (약 74bp), 2개의 miRNA의 연결산물 (약 94bp) 및 5개의 miRNA의 연결 산물 (약 154bp)를 나타낸다. 도 1B에 나타낸 바와 같이, 실험군에서는, 대조군과는 달리, -A3-P3를 과량으로 사용하지 않았기 때문에, 부산물의 생성이 감소되었다.
- [0086] 따라서, 도 2에 나타낸 바와 같이, 실험군의 경우 평균적으로 4개 내지 5개의 miRNA가 연결된 제1 연결 산물이 얻어짐을 확인하였다. 실시예2의 경우, 4개 내지 5개의 miRNA가 연결될 수 있는 조건에서 수행되었다.

[0087] -A3-P3 또는 P5-A5-의 길이가 각 26nt이며, miRNA의 길이가 18~22nt이므로 1개의 miRNA만이 -A3-P3 또는 P5-A5-와 연결되는 경우, 약 70~74nt, 2개의 miRNA가 연결된 경우는 약 88~96nt, 3개의 miRNA가 연결된 경우는 약 106~118nt, 4개의 miRNA가 연결된 경우는 약 124~140nt, 5개의 miRNA가 연결된 경우는 약 142~162nt 등의 길이를 갖는 연결 산물이 생성될 것으로 예상된다.

[0088] 연결 반응은 무작위 연결이므로, 위의 길이를 갖는 연결 산물은 다양하게 만들어 질 수 있으나, 초기에 -A3-P3 양에 의존적인 크기 분포를 갖게 된다. 예를 들면, miRNA와 -A3-P3이 함께 라이게이션 반응에 참여하므로 전체 miRNA의 양과 -A3-P3의 양이 1:1의 비를 갖는 경우, miRNA와 -A3-P3이 1:1의 비율로 라이게이션될 것으로 예상되는데, -A3-P3의 양을 총 miRNA 양의 1/6만 넣어줌으로서 무작위 선택된 miRNA 5~6개가 라이게이션될 때 마다 1개의 -A3-P3가 함께 라이게이션될 수 있다. 또한, -A3-P3는 3' 말단이 디데옥시시티딘 (dideoxycytidine: 3'-ddC)으로 차단 (blocking)되어 있기 때문에 -A3-P3의 3' 말단으로는 라이게이션될 수 없으므로 3' 말단의 반응이 종결된다. 따라서, -A3-P3가 모두 라이게이션에 참여하게 되면 더 이상 miRNA의 5'-P와 라이게이션할 3'-OH가 없기 때문에 라이게이션이 일어나지 않게 된다. 그러나, 특정한 기작에 한정되는 것은 아니다.

[0089] 표 6은 실험군과 대조군에 대한 qRT-PCR의 결과를  $\Delta Ct$  값으로 나타낸 것이다.

표 6

[0090]

순번	miRNA 명칭	대조군( $\Delta Ct$ )	실험군( $\Delta Ct$ )
1	hsa-mir-95	2.912	0.995
2	hsa-mir-1203	-1.218	0.245
3	hsa-mir-1307	1.812	0.695
4	hsa-mir-1915	-0.198	-0.035
5	hsa-mir-2861	-2.128	-0.765
6	hsa-mir-3141	1.422	-0.205
7	hsa-mir-3665	-1.998	-0.945
8	hsa-mir-4271	-0.608	0.015
	$\Delta Ct$ 의 max-min	5.04	1.94

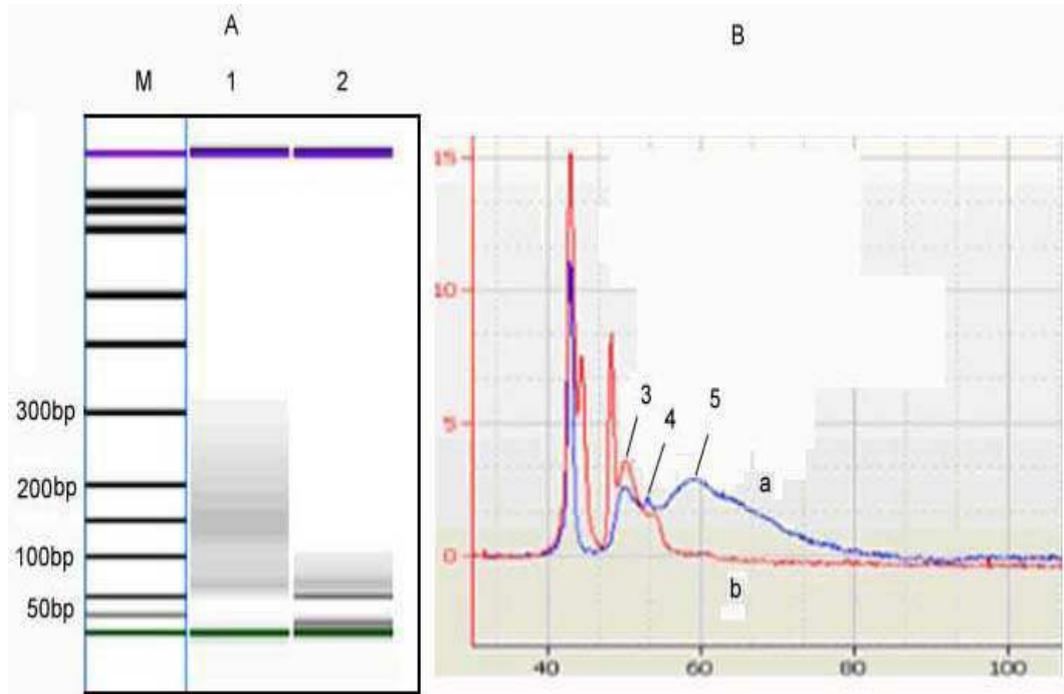
[0091]  $\Delta Ct$ 는 최대값-최소값을 나타낸다. 각 실험군의 Ct는 장비에서 측정된 값이며,  $\Delta Ct$ 는 개별 miRNA의 평균 Ct-개별 miRNA의 Ct로 계산한 것이다. 따라서 대조군의 경우는 모든 대조군의 Ct를 평균한 뒤, 여기서 각 대조군의 Ct를 뺀 값이며, 실험군 역시 모든 실험군의 Ct평균으로부터 각 실험군의 Ct를 뺀 값으로 평균에 비해 deviation이 얼마나 큰지를 보여준다.  $\Delta Ct$ 의 max-min는 대조군과 실험군 각각에서 가장 Ct값이 큰 miRNA와 작은 miRNA간의 Ct차이인데, 이론적으로는 이 값이 0이 되어야 miRNA간 증폭효율의 차이가 없다고 볼 수 있으며 이 차이가 3.3이 날때마다 증폭량의 차이는 10배가 난다고 볼 수 있다.

[0092] 표 6에 나타난 바와 같이, 대조군의 경우, 동일한 양의 miRNA를 사용하였는데도 불구하고,  $\Delta Ct$ 는 5.04이며, 이는 개별 miRNA 사이의 발현량의 차이가 32.9배나 된다는 것을 나타낸다. 반면, 실험군의 경우,  $\Delta Ct$ 는 1.94이며, 이는 개별 miRNA 사이의 발현량의 차이가 3.8배이었다. 즉, 실험군은 대조군에 비하여 증폭 변이 (bias)가 1/10로 감소하였다.

[0093] 이상의 실험 결과로부터, 복수 개의 miRNA를 연결한 후에 증폭함으로써, 증폭 바이어스를 감소시킬 수 있었다.

도면

도면1



서열목록

- <110> Samsung Electronics Co., Ltd.
  - <120> Method for amplifying a target nucleic acid with reduced amplification bias and method for determining relative amount of a target nucleic acid in a sample
  - <130> PN093126
  - <160> 24
  - <170> Kopatent In 1.71
  - <210> 1
  - <211> 22
  - <212> RNA
  - <213> Homo sapiens
  - <400> 1
- uucaacgggu auuuauugag ca
- <210> 2
  - <211> 23
  - <212> RNA

<213>	Homo sapiens	
<400>	2	
	uggaagacua gugauuuugu ugu	23
<210>	3	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	3	
	uggaauguaa agaaguaugu au	22
<210>	4	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	4	
	ucuuugguua ucuagcugua uga	23
<210>	5	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	5	
	uagcagcacg uaaauuugg cg	22
<210>	6	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	6	
	caaagugcuu acagucagg uag	23
<210>	7	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	7	
	cauugcacuu gucucggucu ga	22

<210> 8  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8  
 aggcaagaug cuggcauagc u 21  
 <210> 9  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 9  
 cccggagcca ggaugcagcu c 21  
 <210> 10  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 10  
 acucggcgug gcgucggucg ug 22  
 <210> 11  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 11  
 gagggcgggu ggaggagga 19  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 12  
 ccccaggcg acgcgcgagg 20  
 <210> 13  
 <211> 19  
 <212> RNA

<213> Homo sapiens  
 <400> 13  
 ggggccuggc ggugggcgg 19  
 <210> 14  
 <211> 18  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 14  
 cggggcggca ggggccuc 18  
 <210> 15  
 <211> 18  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 15  
 agcaggugcg gggcggcg 18  
  
 <210> 16  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> P5-A5: 5' terminal primer-5' terminal adapter sequence  
 <400> 16  
 tgagttctac ggtacctcta agc 23  
 <210> 17  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> A3-P3: 3' terminal adaper-3' terminal primer sequence  
 <400> 17  
 aggcataagc tgtagctca gaa 23  
 <210> 18  
 <211> 24  
 <212> DNA  
  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer : sequence complementary to P3-A3 sequence

<400> 18

attctgagct aacagcttat gcct 24

<210> 19

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

gggggaagaa aaggugggg 19

<210> 20

<211> 26

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P5-A5: primer or primer binding sequence linked to 5 terminus adaptor sequence

<400> 20

cggugagguc uuugguucau cgaucg 26

<210> 21

<211> 26

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> A3-P3: 3 terminus adaptor sequence linked to a primer or a primer binding sequence

<400> 21

cgaucguguc cucaaggcua ccaccu 26

<210> 22

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse transcription primer

<400> 22

atcgcgagaa ttcca 15

<210> 23

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> forward primer  
 <400> 23  
 cggtgaggtc tttggttcat 20  
 <210> 24  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reverse primer  
 <400> 24  
 aggtgtagc cttgaggaca 20

**【심사관 직권보정사항】**

**【직권보정 1】**

**【보정항목】** 청구범위

**【보정세부항목】** 제19항

**【변경전】**

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에

**【변경후】**

제1항, 제3항 내지 제19항 중 어느 한 항에