

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 1월 25일 (25.01.2018)



(10) 국제공개번호
WO 2018/016885 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/007804

(22) 국제출원일: 2017년 7월 20일 (20.07.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
PCT/KR2016/007971
2016년 7월 21일 (21.07.2016) KR

(71) 출원인: 주식회사 하임바이오텍 (HEIMBIOTEK INC.)
[KR/KR]; 18384 경기도 화성시 반월길 78, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 이재훈 (LEE, Jae Hoon); 11935 경기도 구리시 안골로30번길 14, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 이동기 (LEE, Dong-Ki); 07997 서울시 양천구 목동동로 293, 14층 1415호, Seoul (KR).

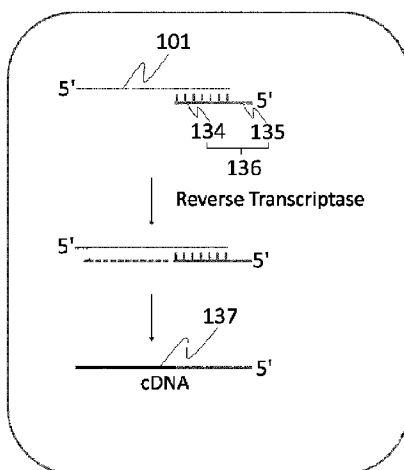
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

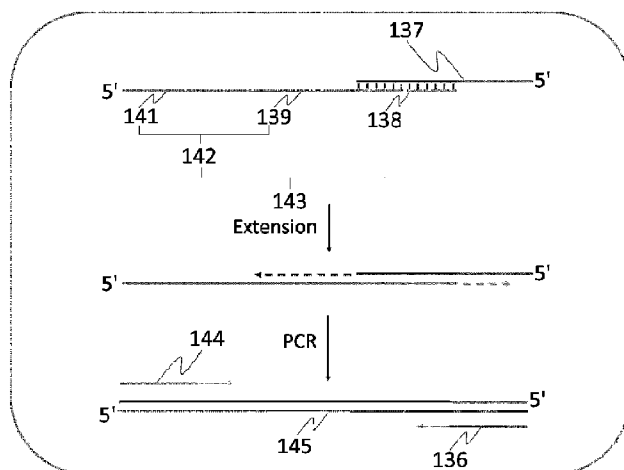
(54) Title: RNA DETECTING KIT AND METHOD

(54) 발명의 명칭: 알앤에이 검출용 키트 및 방법

1st Reaction: Reverse Transcription



2nd Reaction: PCR



(57) Abstract: The present invention relates to a kit and a method for detecting an RNA molecule, particularly, a small-size RNA molecule such as miRNA. The present invention provides an RNA detecting kit and method in which short primers for reverse transcription are used in a reverse transcription process with the aim of rapidly diffusing the primers in a reverse-transcription reaction solution and thus reducing the reverse-transcription reaction time, enabling the overall PCR reaction rate to be increased and RNA to be detected stably and rapidly. In addition, the present invention provides an RNA detecting kit and method in which, after a reverse transcription process, extension is performed on a single-stranded cDNA by use of a primer for extension, far longer than a primer for reverse transcription, and thus a template long enough to conduct PCR amplification can be obtained.



WO 2018/016885 A1

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 RNA 분자, 특히 miRNA 와 같은 작은 크기를 갖는 RNA 분자 검출용 키트 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 역전사 과정에서 짧은 역전사용 프라이머를 사용함으로써 역전사 반응용액에서의 프라이머 확산이 빨라지고, 이에 따라 역전사 반응시간이 짧아져 전체 PCR 반응속도를 높이고 안정적이고 빠르게 RNA 를 검출할 수 있는 RNA 검출용 키트 및 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 역전사 과정 후 단일가닥 cDNA에 대해 역전사용 프라이머 보다 훨씬 긴 연장용 프라이머를 사용하여 연장 반응을 수행함으로써 PCR 증폭 반응을 위한 충분한 주형 길이를 확보할 수 있는 RNA 검출용 키트 및 방법을 제공한다.

명세서

발명의 명칭: 알앤에이 검출용 키트 및 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 핵산 검출용 키트 및 방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 알앤에이 검출용 키트 및 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 마이크로 RNA(microRNA 또는 miRNA, 이하, 'miRNA'로 약칭함)는 22개 정도의 리보뉴클레오티드로 구성된 비번역 RNA로, 전사단계에서 RNA 침묵(RNA silencing) 그리고 전사 후 단계에서 유전자의 발현을 조절하는 기능을 수행하며, 이러한 miRNA의 기능은 mRNA 내의 상보서열과의 염기쌍의 형성을 통해 수행되는 것으로 알려지고 있다. 최초로 예쁜 꼬마선충(*C. elegans*)에서 발견된 이후, 동물, 식물 및 바이러스에 유전자 발현의 조절기구로 활용되고 있음이 알려지면서 다양한 종류의 miRNA들이 속속 보고되고 있는 실정이다. 뿐만 아니라, miRNA 유전자의 돌연변이 등에 기인하는 기능의 부조화에 의해 암 등 특정 질병이 발생할 수 있음이 알려지고 있어, 그 중요성이 더욱 부각되고 있다.
- [3] miRNA는 그 크기가 매우 작고(~22 nt) mRNA보다 더 쉽게 분해되는 것으로 알려져 있기 때문에, 이를 분리하거나 검출하는데 큰 어려움이 있다. 이를 검출하기 위한 통상적인 방법으로는 노던 블랏 분석과 마이크로어레이를 이용한 교잡에 기반한 검출, 특정 miRNA와 특이적으로 상보결합을 하는 스템루프 구조의 프라이머를 이용한 RT-PCR과 그에 수반되는 정량적 PCR의 두 단계에 걸친 공정으로 검출 및 정량을 하는 방법과, 폴리 A 폴리머라아제로 miRNA의 3'-말단에 폴리 A 꼬리를 연결하고, 폴리(T) 어댑터를 프라이머로 사용하여 cDNA를 합성한 후, miRNA 특이적 포워드 프라이머와 폴리(T) 어댑터에 기반한 리버스 프라이머를 이용하여 miRNA를 증폭하는 방법 등이 알려져 있다.
- [4] 그러나, 상기 방법들은 제한된 상보서열을 이용하기 때문에 비특이적 증폭이 가능할 수 있고, 통상적으로 실시간 PCR 기술에 기반하고 있기 때문에, 고가의 실시간 PCR 장비가 필요하며, 생성된 PCR 산물의 크기가 비슷하기 때문에 다양한 miRNA를 동시에 검출하는 멀티플렉스 분석이 제한적이라는 단점을 가지고 있다.
- [5] 또한, 종래의 miRNA 검출방법은 miRNA 길이가 짧기 때문에 PCR 증폭을 위한 주형 길이 확보를 위해 역전사용 프라이머를 대략 70 내지 80 mer 정도로 길게 하는 방식을 채택하고 있다. 그러나, 이러한 종래의 검출방법의 경우 역전사용 프라이머가 길기 때문에 반응용액에서의 확산이 늦어지고 이에 따라 역전사 반응시간이 길어져서 전체 반응시간이 길어진다. 따라서, 종래의 검출방법은

실시간 PCR에서 Ct 값이 커지고 반응성이 떨어지는 문제점이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 보다 효율적이고 경제적인 miRNA를 포함하는 작은 크기의 RNA 분자 검출용 키트 및 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제 해결 수단

- [7] 본 발명의 일 관점에 따르면, 증폭대상 RNA 분자의 폴리 A(poly A) 꼬리와 혼성화하는 올리고 dT로 구성되는 제1 혼성화 올리고뉴클레오타이드, 및 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 부가되고 상기 증폭대상 RNA 분자와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1 어댑터 올리고뉴클레오타이드로 구성된 짧은 역전사용 프라이머; 상기 증폭대상 RNA 분자로부터 역전사된 단일가닥 cDNA 중 상기 올리고 dT 부분을 제외한 3'-말단 부분과 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오타이드, 및 상기 제2 혼성화 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 부가되고 상기 단일가닥 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오타이드로 구성되고, 상기 역전사용 프라이머 보다 길이가 긴 연장용 프라이머; 및 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오타이드 내에서 선택되는 포워드 프라이머를 포함하는 증폭대상 RNA 분자 검출용 키트가 제공된다.
- [8] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 증폭대상 RNA 분자의 3'-말단의 5 내지 9 nt의 핵산으로 구성된 3'-말단 부분과 혼성화하는 핵산서열로 구성된 제1 혼성화 올리고뉴클레오타이드, 및 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 부가되고 상기 증폭대상 RNA 분자와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1 어댑터 올리고뉴클레오타이드로 구성된 짧은 역전사용 리버스 프라이머; 상기 증폭대상 RNA 분자로부터 역전사된 단일가닥 cDNA 중 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오타이드와 혼성화되는 상기 증폭대상 RNA 분자의 3'-말단 부분에 상응하는 부분을 제외한 부분과 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오타이드, 및 상기 제2 혼성화 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 부가되고 상기 단일가닥 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오타이드로 구성되고, 상기 역전사용 프라이머 보다 길이가 긴 연장용 프라이머; 및 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오타이드 내에서 선택되는 포워드 프라이머를 포함하는 증폭대상 RNA의 검출용 키트가 제공된다.
- [9] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 폴리 A 폴리머라아제를 이용하여 검출 대상으로부터 분리된 시료 내의 RNA 분자에 폴리 A 꼬리를 연결하는 폴리 A 꼬리연결 RNA 분자 제조단계;

- [10] 폴리 A 꼬리연결 RNA 분자를, 상기 폴리 A 꼬리연결 RNA 분자의 폴리 A(poly A) 꼬리와 혼성화하는 올리고 dT로 구성되는 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드, 및 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드의 5'-말단에 부가되고 상기 폴리 A 꼬리연결 RNA 분자와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 짧은 역전사용 프라이머와, 역전사 효소에 의해, 역전사하는 역전사반응단계; 상기 역전사 효소를 불활성화시키고, 상기 역전사에 의해 생성된 DNA를 녹여, 상기 폴리 A 꼬리연결 RNA 분자로부터 역전사된 단일가닥 cDNA를 준비하는 단계; 및
- [11] 상기 역전사반응 산물의 전부 또는 일부를, 상기 역전사된 단일가닥 cDNA 중 상기 올리고 dT 부분을 제외한 3'-말단 부분과 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드, 및 상기 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드의 5'-말단에 부가되고 상기 단일가닥 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성되고, 상기 역전사용 프라이머보다 길이가 긴 연장용 프라이머, 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드 내에서 선택되는 포워드 프라이머 및 열안정성 DNA 중합효소를 포함하는 프라이머 연장 및 PCR 반응용 용기로 옮긴 후, 프라이머 연장 및 PCR 반응을 동시에 수행하는 PCR 반응단계를 포함하는 증폭대상 RNA 분자의 검출방법이 제공된다.
- [12] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 증폭대상 RNA 분자를, 상기 증폭대상 RNA 분자의 3'-말단의 5 내지 9 nt의 핵산으로 구성된 3'-말단 부분과 혼성화하는 핵산서열로 구성된 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드, 및 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드의 5'-말단에 부가되고 상기 증폭대상 RNA 분자와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 짧은 역전사용 리버스 프라이머와, 역전사 효소를 이용하여 역전사하는 역전사반응단계; 상기 역전사 효소를 불활성화시키고, 상기 역전사에 의해 생성된 DNA를 녹여, 상기 증폭대상 RNA 분자로부터 역전사된 단일가닥 cDNA를 준비하는 단계; 및
- [13] 상기 역전사반응 산물의 전부 또는 일부를, 상기 역전사된 단일가닥 cDNA 중 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드와 혼성화되는 상기 증폭대상 RNA 분자의 3'-말단 부분에 상응하는 부분을 제외한 부분과 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드, 및 상기 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드의 5'-말단에 부가되고 상기 단일가닥 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성되고, 상기 역전사용 프라이머보다 길이가 긴 연장용 프라이머, 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드 내에서 선택되는 포워드 프라이머 및 열안정 DNA 중합효소를 포함하는 프라이머 연장 및 PCR 반응용 용기로 옮긴 후 프라이머 연장 반응 및 PCR 반응을 동시에 수행하는 PCR 반응 단계를 포함하는, 증폭대상 RNA 분자의 검출방법이 제공된다.

발명의 효과

- [14] 본 발명의 일 실시예에 따른 RNA 검출용 키트 및 방법은, 짧은 역전사용 프라이머 사용에 의해 역전사 반응시간이 짧아져 전체 PCR 반응속도를 높일 수 있어 빠르게 RNA를 검출할 수 있고, 연장반응단계에서는 역전사용 프라이머보다 훨씬 긴 연장용 프라이머를 사용함으로써 PCR 증폭 반응을 위해 충분한 길이의 주형을 만들 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 RNA 검출용 키트 및 방법은, 역전사 과정에서 짧은 역전사용 프라이머를 사용함으로써 역전사 반응용액에서의 프라이머 확산이 빨라지고 이에 따라 역전사 반응시간이 짧아져 전체 PCR 반응속도를 높이고 Ct 값을 낮출 수 있어 안정적이고 빠르게 RNA를 검출할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트 및 방법은 역전사 과정 후 단일가닥 cDNA에 대해 역전사용 프라이머 보다 훨씬 긴 연장용 프라이머를 사용하여 연장 반응을 수행함으로써 PCR 증폭 반응을 위한 충분한 주형 길이를 확보할 수 있다.
- [15] 뿐만 아니라, 본 발명의 키트 및 방법은 역전사 단계에서 생성된 cDNA를 실시간 PCR 단계에서 다시 한번 검증하여 최종 증폭산물을 합성함으로써 높은 정확도를 나타내고, 긴 연장용 프라이머의 길이 조절에 의해 각 표적 RNA 별로 레이블이 가능하여 여러 RNA의 동시다중분석(Multiplex)이 가능한 임상진단 제품으로 높은 경쟁력을 갖는다. 따라서, 본 발명의 키트 및 방법은 특정 RNA를 고가의 장비 없이도 정확하고 신속하게 검출하는 것이 가능하며, 복수의 RNA를 동시에 검출할 수 있는 멀티플렉스 분석 역시 가능하다. 예를 들어, 본 발명의 키트 및 방법은 암을 비롯한 각종 질병의 진단 및 예후 판정 등에 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [16] 물론, 전술한 바와 같은 효과들에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

- [17] 본 발명의 상기 및 다른 기술적 과제와 특징은 다음과 같은 도면을 참조하여 이루어지는 본 발명의 실시예에 대한 설명을 통하여 당업자에게 명확해 질 수 있을 것이다.
- [18] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리 A 폴리머라아제를 이용한 miRNA 검출방법을 개략적으로 나타낸 개요도이다.
- [19] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 miRNA 특이적 역전사용 프라이머를 이용한 miRNA 검출방법을 개략적으로 나타낸 개요도이다.
- [20] 도 3 내지 도 10은 각각 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리 A 폴리머라아제(poly A polymerase) 및 올리고 dT(oligo dT) 프라이머를 이용한 miRNA 검출 키트 및 방법에 의해 miR-532, miR-196b, miR-362, miR-29c, miR-106b, miR-200c, miR-127 및 miR-145를 증폭한 결과를 나타낸다. 각각의 도에 있어서 상단은 증폭 사이클 수에 따른 형광 값의 변화를 나타내고, 중단은 온도에 따른 형광방출 속도의 변화를 나타내는 그래프이고, 하단의 왼쪽 표는 샘플의 종류, 형광검출 기준값

및 녹는점을 나타내며, 하단의 오른쪽은 1.5% 아가로스 겔 전기영동 결과를 나타내는 사진이다.

[21] 도 11 내지 도 18은 각각 본 발명의 일 실시예에 따른 miRNA 특이적 역전사용 프라이머를 이용한 miRNA 검출키트 및 방법에 의해 miR-532, miR-196b, miR-362, miR-29c, miR-106b, miR-200c, miR-127 및 miR-145를 증폭한 결과를 나타낸다. 각각의 도에 있어서 왼쪽 상단은 증폭 사이클 수에 따른 형광 값의 변화를 나타내고, 왼쪽 중단은 온도에 따른 형광방출 속도의 변화를 나타내는 그래프이고, 왼쪽 하단의 표는 샘플의 종류, 형광검출 기준값 및 녹는점을 나타내며, 오른쪽은 1.5% 아가로스 겔 전기영동 결과를 나타내는 사진이다.

[22] 도 19 내지 도 26은 비교예로서 각각 Qiagen사의 miRNA 검출키트를 이용하여 miR-532, miR-196b, miR-362, miR-29c, miR-106b, miR-200c, miR-127 및 miR-145를 증폭한 결과를 나타낸다. 각각의 도에 있어서 상단은 증폭 사이클 수에 따른 형광 값의 변화를 나타내고, 중단은 온도에 따른 형광방출 속도의 변화를 나타내는 그래프이고, 하단의 왼쪽 표는 샘플의 종류, 형광검출 기준값 및 녹는점을 나타내며, 하단의 오른쪽은 1.5% 아가로스 겔 전기영동 결과를 나타내는 사진이다.

[23] 도 27은 본 발명의 일 실시예에 따른 miRNA 검출 키트와 시중에서 판매되는 miRNA 키트(Qiagen사 제품)을 이용한 miRNA let-7e에 대한 실시간 PCR 증폭 결과를 나타내는 그래프이다.

[24] 도 28은 본 발명의 일 실시예에 따른 miRNA 검출 키트와 시중에서 판매되는 miRNA 키트(Qiagen사 제품)을 이용한 miRNA has-let-7e에 대한 실시간 PCR 증폭 결과물에 대한 시퀀싱 결과를 나타내는 도면이다.

[25] 도 29는 본 발명의 일 실시예에 따른 miRNA 검출 키트로 순차적으로 희석된 miRNA를 주형으로 하여 실시간 PCR을 수행한 결과 주형의 카피(copy) 수와 검출한계(Cq) 사이클 사이의 상관관계를 나타내는 그래프이다.

[26] 도 30은 본 발명의 일 실시예에 따른 miRNA 검출키트로 CAL27 세포 및 HSC3 세포에서의 miR-200의 세 서브타입인 miR-200a, miR-200b 및 miR-200c의 발현정도를 정량적으로 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

[27] 도 31은 본 발명의 일 실시예에 따른 miRNA 검출 키트에서 역전사용 프라이머를 제2단계 반응인 프라이머 연장 및 실시간 PCR 반응시 첨가 여부에 따른 실시간 PCR 결과를 나타내는 그래프이다.

[28] 도 32는 일 실시예에 따른 miRNA 검출 키트를 사용하여 얻은 Ct값과 Qiagen사의 상용 miRNA 검출키트를 사용하여 얻은 Ct값을 비교한 그래프이다.
발명의 실시를 위한 형태

[29] 용어의 정의

[30] 본 문서에서 사용되는 용어 "올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)"는 상기 뉴클레오티드 단위체 분자의 중합체로서 일반적으로 13 내지 25개까지의

뉴클레오티드로 구성된 짧은 단일쇄 핵산 사슬을 의미하는데, 경우에 따라서는 6-mer, 7-mer, 8-mer, 9-mer, 10-mer, 11-mer 및 12-mer 등 13개 미만의 뉴클레오티드로 구성되거나 25개 초과 뉴클레오티드로 구성된 핵산 사슬을 지칭할 수 있다. 본 문서에서 사용되는 용어 "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)"는 통상적으로 상기 올리고뉴클레오티드보다 더 긴 뉴클레오티드 단위체의 중합체 사슬을 의미하나, 상기 올리고뉴클레오티드와 혼용되어 사용되기도 한다. 폴리뉴클레오티드는 단일가닥 또는 이중가닥 핵산사슬 모두를 포함한다.

- [31] 본 문서에서 사용되는 용어 "RNA 분자"는 유전자의 암호화, 탈암호화, 조절 및 발현에 있어서 다양한 역할을 수행하는 다량체성 분자로서, 단일가닥을 형성하고 구성단위인 핵산의 구성성분 중 5탄당인 리보오스의 2'-탄소에 히드록시기가 부착되어 있고, 염기에 티민(thymine) 대신 우라실(uracil)이 포함된다는 점에서 통상적으로 이중가닥으로 구성되는 DNA와 구분된다. RNA 분자에는 단백질을 암호화하는 mRNA, 리보솜의 구성 성분인 rRNA, 단백질의 번역에 관여하는 tRNA, 진핵세포의 세포핵의 스플라이싱 반점(splicing speckle) 및 카잘체(Cajal bodies) 내에서 발견되는 작은 RNA 분자로서 주로 전구성 전령 RNA(hnRNA)를 가공하는 역할을 수행하는 snRNA(small nuclear RNA), rRNA, tRNA, 상기 snRNA와 같은 다른 RNA의 수식을 가이드하는 역할을 수행하는 snoRNA(small nucleolar RNA), 특정 유전자의 발현을 억제하기 위해 합성된 인공 RNA 분자인 siRNA(small interfering RNA), 세포 밖으로 분비되는 엑소솜(exosome) 내에 존재하는 exRNA(extracellular RNA 또는 exosomal RNA), 레트로트랜스포존(retrotransposon) 및 생식계열 세포에서의 다른 유전학적 인자의 후생유전적(epigenetic) 및 전사후 유전자 침묵과 연관된 piwi 단백질과 상호작용하여 RNA-단백질 복합체를 형성하는 piRNA, 및 특정 유전자의 발현을 조절하는 기능을 담당하는 약 22 nt로 구성된 작은 RNA 분자인 microRNA(또는 miRNA)를 포함한다.

- [32] 본 문서에서 사용되는 "증폭대상 RNA 분자"는 검출 대상으로부터 수득된 시료 내에 존재하는 다양한 RNA 분자 중 PCR 반응에 의해 증폭하고자 하는 검출 대상이 되는 RNA 분자를 의미한다. 이러한 증폭대상 RNA 분자는 그 증폭 및 검출에 의해 특정 질환의 유무 및 정도, 특정 치료제에 대한 감수성 또는 내성의 여부를 판정하는 표지인자로 사용될 수 있다. 본 문서에서 사용되는 용어 "센스 가닥"은 이중가닥 DNA 분자 중 유전자의 코드의 진행방향과 동일한 방향의 단일가닥 핵산분자를 의미하고, "안티센스 가닥"은 상기 센스 가닥과 상보결합을 하는 다른 단일가닥 핵산분자를 의미하나, 유전자의 코드 진행방향과 무관하게, 최초로 핵산서열이 규명된 가닥을 "센스 가닥"으로 정의하고 그의 상보가닥을 "안티센스 가닥"으로 정의하는 것도 무방하다.

- [33] 본 문서에서 사용되는 용어 "PCR(polymerase chain reaction)" 또는 "핵산증폭반응"은 열안정성 DNA 중합효소를 이용하여 특정 표적 핵산 분자를

증폭하는 반응을 의미한다. PCR에는 DNA 중합효소 외에 표적 핵산에 특이적으로 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드인 프라이머(포워드 프라이머, 리버스 프라이머), 디옥시뉴클레오티드 혼합물(dNTP mixture), Mg^{2+} 등의 2가 이온을 포함하는 반응 완충액 등이 사용된다. 상기 PCR 반응에 의해 생성된 DNA 분자를 본 문서에서는 "증폭산물"이라고 지칭하였다. 본 문서에서 사용되는 용어 "프라이머 연장반응(primer extension)"은 DNA 중합효소가 제한된 길이의 주형 핵산에 상보적으로 혼성화된 프라이머를 연장시켜 상기 주형 핵산의 5'-말단에서 종료가 되는 비연쇄반응을 의미한다. 상기 프라이머 연장반응에 의해 생성된 DNA 분자를 본 문서에서는 "연장산물"이라고 지칭하였다. 본 문서에서 사용되는 용어 "프라이머(primer)"는 PCR 반응 또는 프라이머 연장반응(primer extension) 반응의 개시를 위해 사용되는, 주형 핵산분자에 상보적으로 혼성화는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. PCR 반응을 위한 프라이머는 증폭되는 핵산분자의 유전자 코드 진행방향과 동일한 센스 가닥으로부터 선택되는 포워드 프라이머(또는 센스 프라이머) 및 상기 센스 가닥에 상보적인 안티센스 가닥으로부터 선택되는 리버스 프라이머(또는 안티센스 프라이머)의 쌍이 사용되고, 프라이머 연장반응의 경우 통상적으로 단일한 연장용 프라이머가 사용된다.

- [34] 본 문서에서 사용되는 용어 "어댑터(adaptor)"는 특정 RNA를 특이적으로 구분하기 위해 RNA에 상응하는 센스 DNA의 5'-말단에 부가되는 올리고뉴클레오티드 또는 RNA의 역전사를 위한 역전사용 프라이머의 5'-말단에 부가되는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 이 경우 이들 어댑터는 연장된 cDNA를 증폭하는데 사용되는 프라이머 서열로 사용될 수 있고, 후자의 경우 RNA와 혼성화 가능한 핵산서열로만 프라이머를 구성할 경우 나타나는 낮은 T_m 값을 보정할 목적으로 사용될 수 있다. 상기 어댑터는 증폭 대상 주형핵산과, 연장용 올리고뉴클레오티드를 제외한 다른 프라이머와 상동성이 존재하지 아니하여 비특이적 증폭반응을 최소화하도록 고안될 수 있다. 본 문서에서 사용되는 용어 "혼성화 올리고뉴클레오티드"는 증폭대상 RNA 분자 또는 상기 증폭대상 RNA 분자로부터 역전사된 cDNA와 상보결합에 의해 혼성화가능한 핵산분자를 의미한다. 본 문서에서 사용되는 용어 "유니버설 프라이머"는 증폭하고자 하는 대상 핵산분자의 종류에 무관하게 증폭이 가능한 프라이머로서 역전사 및 프라이머 연장 반응에 의해 추가된 어댑터 올리고뉴클레오티드의 핵산서열을 이용하여 제조가 가능하다. 이 경우 단일한 프라이머 세트를 활용함으로써 키트의 제조원가를 낮출 수 있는 장점이 있다. 본 문서에서 사용되는 용어 "포워드 프라이머"는 해당 프라이머의 방향(5' → 3')이 유전자의 방향과 일치하는 경우의 프라이머를 의미한다. 반대로 "리버스 프라이머"는 해당 프라이머의 방향이 유전자의 방향과 반대로 되는 프라이머를 의미한다.

- [35] 본 문서에서 사용되는 용어 "Ct 값(threshold cycle)"은 지수 증가기(exponential phase) 범위 내에서 실시간으로 증폭산물을 측정하는 실시간 PCR에 있어서 측정된 형광의 세기가 기본값(baseline level)을 넘어서 감지될 수 있을 정도로 두드러지게 증가하는 시점의 주기수이며, 이는 표적 RNA의 초기 주형량을 반영한다.
- [36] **발명의 상세한 설명**
- [37] 본 발명은 역전사 과정에서 짧은 역전사용 프라이머를 사용함으로써 역전사 반응용액에서의 프라이머 확산이 빨라지고, 이에 따라 역전사 반응시간이 짧아져 전체 PCR 반응속도를 높이고 안정적이고 빠르게 RNA를 검출할 수 있는 RNA 검출용 키트 및 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 역전사 과정 후 단일가닥 cDNA에 대해 역전사용 프라이머 보다 훨씬 긴 연장용 프라이머를 사용하여 연장 반응을 수행함으로써 PCR 증폭 반응을 위한 충분한 주형 길이를 확보할 수 있는 RNA 검출용 키트 및 방법을 제공한다.
- [38] 본 발명의 일 관점에 따르면, 시료 내의 증폭대상 RNA 분자의 폴리 A(poly A) 꼬리와 혼성화하는 올리고 dT로 구성되는 제1 혼성화 올리고뉴클레오타이드, 및 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 부가되고 상기 증폭대상 RNA 분자와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1 어댑터 올리고뉴클레오타이드로 구성된 짧은 역전사용 프라이머; 상기 증폭대상 RNA 분자로부터 역전사된 단일가닥 cDNA 중 상기 올리고 dT 부분을 제외한 3'-말단 부분과 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오타이드, 및 상기 제2 혼성화 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 부가되고 상기 단일가닥 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오타이드로 구성되고, 상기 역전사용 프라이머 보다 길이가 긴 연장용 프라이머; 및 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오타이드 내에서 선택되는 포워드 프라이머를 포함하는 증폭대상 RNA 분자 검출용 키트가 제공된다.
- [39] 상기 키트에 있어서, 상기 증폭대상 RNA 분자는 길이 18 내지 180 nt, 20 내지 90 nt, 20 내지 70 nt, 20 내지 50 nt, 또는 20 내지 30 nt로 구성된 작은 크기의 RNA 분자일 수 있고, tRNA, snRNA, siRNA, exRNA, piRNA, scaRNA 또는 miRNA일 수 있다. 상기 키트에 있어서, 상기 시료는 상피, 모발, 생검(biopsy), 부검(autopsy), 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 소변, 대변, 땀, 가래, 콧물, 또는 눈물일 수 있다.
- [40] 상기 키트는 상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오타이드 내에서 선택되는 핵산서열로 구성되는 리버스 프라이머를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 리버스 프라이머는 증폭대상 RNA 분자의 종류에 무관하게 동일한 핵산서열로 구성되는 유니버설 리버스 프라이머일 수 있다. 그러나, 바람직한 실시태양에서는 상기 추가적인 리버스 프라이머가 포함되지 않으며, 이 경우 역전사 반응에 사용되었던 역전사용 프라이머가 PCR 반응에서의 리버스 프라이머 역할까지 겸하게 되며, PCR 반응시 상기 역전사용 프라이머를 추가하지 않더라도 역전사 반응물 내에 포함되어 있던 상기 역전사용

프라이머가 PCR 반응에도 그대로 사용될 수 있다.

- [41] 상기 키트에 있어서, 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오타이드는 증폭대상 RNA 분자 종류에 따른 증폭대상 RNA 표식(tagging) 올리고뉴클레오타이드, 또는 상기 증폭대상 RNA 표식 올리고뉴클레오타이드 및 증폭대상 RNA 종류와 무관한 공통의 핵산서열로 구성되는 공통 올리고뉴클레오타이드로 구성될 수 있으며, 상기 포워드 프라이머는 상기 공통 올리고뉴클레오타이드로부터 선택되는 유니버설 포워드 프라이머일 수 있다.
- [42] 상기 키트에 있어서, 상기 짧은 역전사용 프라이머는 대략 29 내지 34 nt의 길이를 가질 수 있고, 상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오타이드는 대략 17 내지 22 nt의 길이를 가질 수 있다. 상기 키트에 있어서, 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오타이드는 대략 32 내지 61 nt 또는 대략 56 내지 63 nt의 길이를 가질 수 있으며, 증폭대상 RNA의 종류에 따라 길이를 달리할 수 있다. 이 경우 2 이상의 증폭대상 RNA를 하나의 반응에 의해 다중으로(multiplex) 검출하는 것이 가능하다. 상기 키트에 있어서, 상기 제2 혼성화 올리고뉴클레오타이드는 12 내지 22 nt, 13 내지 22 nt, 또는 14 내지 22 nt로 구성될 수 있으며 상기 역전사용 프라이머와 혼성화하지 않는다.
- [43] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 증폭대상 RNA 분자의 3'-말단의 5 내지 9 nt의 핵산으로 구성된 3'-말단 부분과 혼성화하는 핵산서열로 구성된 제1 혼성화 올리고뉴클레오타이드, 및 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 부가되고 상기 증폭대상 RNA 분자와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1 어댑터 올리고뉴클레오타이드로 구성된 짧은 역전사용 리버스 프라이머; 상기 증폭대상 RNA 분자로부터 역전사된 단일가닥 cDNA 중 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오타이드와 혼성화되는 상기 증폭대상 RNA 분자의 3'-말단 부분에 상응하는 부분을 제외한 부분과 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오타이드, 및 상기 제2 혼성화 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 부가되고 상기 단일가닥 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오타이드로 구성되고, 상기 역전사용 프라이머 보다 길이가 긴 연장용 프라이머; 및 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오타이드 내에서 선택되는 포워드 프라이머를 포함하는 증폭대상 RNA의 검출용 키트가 제공된다.
- [44] 상기 키트에 있어서, 상기 증폭대상 RNA 분자는 길이 18 내지 180 nt, 20 내지 90 nt, 20 내지 70 nt, 20 내지 50 nt, 또는 20 내지 30 nt로 구성된 작은 크기의 RNA 분자일 수 있고, tRNA, snRNA, siRNA, exRNA, piRNA, scaRNA 또는 miRNA일 수 있다.
- [45] 상기 키트는 상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오타이드 내에서 선택되는 핵산서열로 구성되는 리버스 프라이머를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 리버스 프라이머는 증폭대상 RNA 분자의 종류에 무관하게 동일한 핵산서열로 구성되는 유니버설 리버스 프라이머일 수 있다. 그러나, 바람직한

실시태양에서는 상기 추가적인 리버스 프라이머가 포함되지 않으며, 이 경우 역전사 반응에 사용되었던 역전사용 프라이머가 PCR 반응에서의 리버스 프라이머 역할까지 겸하게 되며, PCR 반응시 상기 역전사용 프라이머를 추가하지 않더라도 역전사 반응물 내에 포함되어 있던 상기 역전사용 프라이머가 PCR 반응에도 그대로 사용될 수 있다.

- [46] 상기 키트에 있어서, 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드는 증폭대상 RNA 분자 종류에 따른 증폭대상 RNA 표식(tagging) 올리고뉴클레오티드, 또는 상기 증폭대상 RNA 표식 올리고뉴클레오티드 및 증폭대상 RNA 종류와 무관한 공통의 핵산서열로 구성되는 공통 올리고뉴클레오티드로 구성될 수 있으며, 상기 포워드 프라이머는 상기 공통 올리고뉴클레오티드로부터 선택되는 유니버설 포워드 프라이머일 수 있다.
- [47] 상기 키트에 있어서, 상기 짧은 역전사용 프라이머는 대략 26 내지 28 nt, 23 내지 28 nt, 또는 18 내지 28 nt의 길이를 가질 수 있고, 상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드는 대략 20 내지 22 nt, 17 내지 22 nt, 또는 12 내지 22 nt의 길이를 가질 수 있다. 상기 키트에 있어서, 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드는 대략 32 내지 61 nt 또는 대략 56 내지 63 nt의 길이를 가질 수 있으며, 증폭대상 RNA의 종류에 따라 길이를 달리할 수 있다. 이 경우 2 이상의 증폭대상 RNA를 하나의 반응에 의해 다중으로(multiplex) 검출하는 것이 가능하다.
- [48] 상기 키트에 있어서, 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드는 6 내지 8 nt로 구성될 수 있고, 더욱 바람직하게는 6 내지 7 nt로 구성될 수 있으며, 가장 바람직하게는 6 nt로 구성될 수 있다. 상기 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드는 12 내지 16 nt, 13 내지 16 nt, 또는 14 내지 16 nt로 구성될 수 있으며 상기 역전사용 프라이머와 혼성화하지 않는다.
- [49] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 폴리 A 폴리머라아제를 이용하여, 검출 대상으로부터 분리된 시료 내의 RNA 분자에 폴리 A 꼬리를 연결하는 폴리 A 꼬리연결 RNA 분자 제조단계;
- [50] 폴리 A 꼬리연결 RNA 분자를, 상기 폴리 A 꼬리연결 RNA 분자의 폴리 A(poly A) 꼬리와 혼성화하는 올리고 dT로 구성되는 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드, 및 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드의 5'-말단에 부가되고 상기 폴리 A 꼬리연결 RNA 분자와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 짧은 역전사용 프라이머와, 역전사 효소에 의해, 역전사하는 역전사반응단계; 상기 역전사 효소를 불활성화시키고, 상기 역전사에 의해 생성된 DNA를 녹여, 상기 폴리 A 꼬리연결 RNA 분자로부터 역전사된 단일가닥 cDNA를 준비하는 단계; 및
- [51] 상기 역전사반응 산물의 전부 또는 일부를, 상기 역전사된 단일가닥 cDNA 중 상기 올리고 dT 부분을 제외한 3'-말단 부분과 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드, 및 상기 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드의

5'-말단에 부가되고 상기 단일가닥 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성되고, 상기 역전사용 프라이머보다 길이가 긴 연장용 프라이머, 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드 내에서 선택되는 포워드 프라이머 및 열안정성 DNA 중합효소를 포함하는 프라이머 연장 및 PCR 반응용 용기로 옮긴 후, 프라이머 연장 및 PCR 반응을 동시에 수행하는 PCR 반응단계를 포함하는 증폭대상 RNA 분자의 검출방법이 제공된다.

- [52] 상기 검출방법에 있어서, 상기 증폭대상 RNA 분자는 길이 18 내지 180 nt, 20 내지 90 nt, 20 내지 70 nt, 20 내지 50 nt, 또는 20 내지 30 nt로 구성된 작은 크기의 RNA 분자일 수 있고, tRNA, snRNA, siRNA, exRNA, piRNA, scaRNA 또는 miRNA일 수 있다. 상기 검출방법에 있어서, 상기 시료는 상피, 모발, 생검(biopsy), 부검(autopsy), 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 소변, 대변, 땀, 가래, 콧물, 또는 눈물일 수 있다.
- [53] 상기 검출방법에 있어서, 상기 PCR 반응단계에서 상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드 내에서 선택되는 핵산서열로 구성되는 리버스 프라이머가 추가로 사용될 수 있고, 상기 리버스 프라이머는 상기 증폭대상 RNA 분자의 종류에 무관하게 동일한 핵산서열로 구성되는 유니버설 리버스 프라이머일 수 있다. 그러나, 바람직한 실시태양에서는 상기 추가적인 리버스 프라이머가 포함되지 않으며, 이 경우 역전사 반응에 사용되었던 역전사용 프라이머가 PCR 반응에서의 리버스 프라이머 역할까지 겸하게 되며, 상기 PCR 반응단계에서 상기 역전사용 프라이머를 추가하지 않더라도 역전사 반응물 내에 포함되어 있던 상기 역전사용 프라이머가 상기 PCR 반응 단계에서도 그대로 사용될 수 있다. 본 발명자들은 상기 PCR 반응단계에서 상기 역전사용 프라이머를 추가적으로 첨가할 경우, 비특이적인 밴드가 나타나는 등 바람직하지 않은 결과가 도출되고, 오히려 상기 역전사용 프라이머를 추가하지 않을 경우 보다 바람직한 결과가 도출됨을 확인하였다.
- [54] 상기 검출방법에 있어서, 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드는 증폭대상 RNA 분자 종류에 따른 증폭대상 RNA 표식(tagging) 올리고뉴클레오티드, 또는 상기 증폭대상 RNA 표식 올리고뉴클레오티드 및 증폭대상 RNA 종류와 무관한 공통의 핵산서열로 구성되는 공통 올리고뉴클레오티드로 구성될 수 있으며, 상기 포워드 프라이머는 상기 공통 올리고뉴클레오티드로부터 선택되는 유니버설 포워드 프라이머일 수 있다.
- [55] 상기 검출방법에 있어서, 상기 짧은 역전사용 프라이머는 대략 29 내지 34 nt의 길이를 가질 수 있고, 상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드는 대략 17 내지 22 nt의 길이를 가질 수 있다. 상기 검출방법에 있어서, 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드는 대략 32 내지 61 nt 또는 대략 56 내지 63 nt의 길이를 가질 수 있으며, 증폭대상 RNA의 종류에 따라 길이를 달리할 수 있다. 이 경우 2 이상의 증폭대상 RNA를 하나의 반응에 의해 다중으로(multiplex) 검출하는 것이

가능하다. 상기 검출방법에 있어서, 상기 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드는 12 내지 22 nt, 13 내지 22 nt, 또는 14 내지 22 nt로 구성될 수 있으며 상기 역전사용 프라이머와 혼성화하지 않는다.

- [56] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 시료 내의 증폭대상 RNA 분자를, 상기 증폭대상 RNA 분자의 3'-말단의 5 내지 9 nt의 핵산으로 구성된 3'-말단 부분과 혼성화하는 핵산서열로 구성된 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드, 및 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드의 5'-말단에 부가되고 상기 증폭대상 RNA 분자와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 짧은 역전사용 리버스 프라이머와, 역전사 효소를 이용하여 역전사하는 역전사반응단계; 상기 역전사 효소를 불활성화시키고, 상기 역전사에 의해 생성된 DNA를 녹여, 상기 증폭대상 RNA 분자로부터 역전사된 단일가닥 cDNA를 준비하는 단계; 및
- [57] 상기 역전사반응 산물의 전부 또는 일부를, 상기 역전사된 단일가닥 cDNA 중 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드와 혼성화되는 상기 증폭대상 RNA 분자의 3'-말단 부분에 상응하는 부분을 제외한 부분과 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드, 및 상기 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드의 5'-말단에 부가되고 상기 단일가닥 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성되고, 상기 역전사용 프라이머보다 길이가 긴 연장용 프라이머, 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드 내에서 선택되는 포워드 프라이머 및 열안정 DNA 중합효소를 포함하는 프라이머 연장 및 PCR 반응용 용기로 옮긴 후 프라이머 연장 반응 및 PCR 반응을 동시에 수행하는 PCR 반응 단계를 포함하는, 증폭대상 RNA 분자의 검출방법이 제공된다.
- [58] 상기 검출방법에 있어서, 상기 증폭대상 RNA 분자는 길이 18 내지 180 nt, 20 내지 90 nt, 20 내지 70 nt, 20 내지 50 nt, 또는 20 내지 30 nt로 구성된 작은 크기의 RNA 분자일 수 있고, tRNA, snRNA, siRNA, exRNA, piRNA, scaRNA 또는 miRNA일 수 있다. 상기 검출방법에 있어서, 상기 시료는 상피, 모발, 생검(biopsy), 부검(autopsy), 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 소변, 대변, 땀, 가래, 콧물, 또는 눈물일 수 있다.
- [59] 상기 검출방법에 있어서, 상기 PCR 반응단계에서 상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드 내에서 선택되는 핵산서열로 구성되는 리버스 프라이머가 추가로 사용될 수 있고, 상기 리버스 프라이머는 상기 증폭대상 RNA 분자의 종류에 무관하게 동일한 핵산서열로 구성되는 유니버설 리버스 프라이머일 수 있다. 그러나, 바람직한 실시태양에서는 상기 추가적인 리버스 프라이머가 포함되지 않으며, 이 경우 역전사 반응에 사용되었던 역전사용 프라이머가 PCR 반응에서의 리버스 프라이머 역할까지 겸하게 되며, 상기 PCR 반응단계에서 상기 역전사용 프라이머를 추가하지 않더라도 역전사 반응물 내에 포함되어 있던 상기 역전사용 프라이머가 상기 PCR 반응 단계에서도 그대로 사용될 수

있다. 본 발명자들은 상기 PCR 반응단계에서 상기 역전사용 프라이머를 추가적으로 첨가할 경우, 비특이적인 밴드가 나타나는 등 바람직하지 않은 결과가 도출되고, 오히려 상기 역전사용 프라이머를 추가하지 않을 경우 보다 바람직한 결과가 도출됨을 확인하였다.

- [60] 상기 검출방법에 있어서, 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드는 증폭대상 RNA 분자 종류에 따른 증폭대상 RNA 표식(tagging) 올리고뉴클레오티드, 또는 상기 증폭대상 RNA 표식 올리고뉴클레오티드 및 증폭대상 RNA 종류와 무관한 공통의 핵산서열로 구성되는 공통 올리고뉴클레오티드로 구성될 수 있으며, 상기 포워드 프라이머는 상기 공통 올리고뉴클레오티드로부터 선택되는 유니버설 포워드 프라이머일 수 있다.
- [61] 상기 검출방법에 있어서, 상기 짧은 역전사용 프라이머는 대략 26 내지 28 nt, 23 내지 28 nt, 또는 18 내지 28 nt의 길이를 가질 수 있고, 상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드는 대략 20 내지 22 nt, 17 내지 22 nt, 또는 12 내지 22 nt의 길이를 가질 수 있다. 상기 검출방법에 있어서, 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드는 대략 32 내지 61 nt 또는 대략 56 내지 63 nt의 길이를 가질 수 있으며, 증폭대상 RNA의 종류에 따라 길이를 달리할 수 있다. 이 경우 2 이상의 증폭대상 RNA를 하나의 반응에 의해 다중으로(multiplex) 검출하는 것이 가능하다.
- [62] 상기 검출방법에 있어서, 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 6 내지 8 nt로 구성될 수 있고, 더욱 바람직하게는 6 내지 7 nt로 구성될 수 있으며, 가장 바람직하게는 6 nt로 구성될 수 있다. 상기 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드는 12 내지 16 nt, 13 내지 16 nt, 또는 14 내지 16 nt로 구성될 수 있으며 상기 역전사용 프라이머와 혼성화하지 않는다.
- [63] 본 발명에서 특별히 언급되지 않은 한, 복수의 올리고뉴클레오티드 및/또는 폴리뉴클레오티드로 구성된 핵산분자는 5'-말단에서 3'-말단의 순서로 설명된다.
- [64] 이하 본 발명의 일 실시예에 따른 키트 및 방법을 첨부된 도면을 통해 보다 상세히 설명한다.
- [65] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리 A 폴리머라아제를 이용한 작은 크기의 RNA 검출방법을 개략적으로 나타낸 개요도이다. 도 1에 도시된 바와 같이, RNA 분자(101)는 miRNA와 같이 20 내지 30 nt 정도의 매우 짧은 핵산분자를 예시적으로 도시하였다. miRNA(101)는 mRNA와는 달리 폴리 A 꼬리가 없기 때문에, miRNA(101)가 포함된 시료에 폴리 A 폴리머라아제와 ATP를 혼합하여 반응을 시키면, miRNA(101)에 폴리 A 꼬리(102)가 부착되어 폴리 A 꼬리화 miRNA가 생성된다(제1반응). 여기에 증폭대상 RNA 분자와 혼성화되지 않는 핵산서열로 구성된 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드(104) 및 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드(103)인 폴리 dT로 구성된 역전사용 프라이머(105)을 혼합하면 폴리 A 꼬리(102)와 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드(103)가 상보결합을 하게 되고, 여기에 역전사효소와 dNTP 혼합물을 첨가하여

역전사반응을 수행하면, 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드(104)-제1 혼성화 올리고뉴클레오티드(103)-안티센스 가닥 cDNA(111)로 구성된 표적 miRNA의 역전사 산물(110)이 생성된다(제2반응).

- [66] 그리고 역전사 효소를 불활성화시키고 DNA를 녹여, 역전사 과정을 확실히 종료한 후 단일가닥 cDNA를 준비한다. PCR 증폭 반응을 위한 충분한 주형 길이를 확보하기 위해 역전사용 프라이머 보다 훨씬 긴 연장용 프라이머를 사용하여 연장 반응을 수행하지만, 반응성이 떨어지는 것을 방지하기 위해 헤테로듀플렉스가 아닌 단일가닥 cDNA에 대해 역전사용 프라이머 보다 훨씬 긴 연장용 프라이머를 사용하여 연장 반응을 수행한다.
- [67] 상기 역전사 산물(110)의 전부 또는 일부를 제2반응용기로 옮긴 후 여기에 안티센스 가닥 cDNA에 상보적인 서열을 갖는 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드(122)를 3'-말단으로 갖고 miRNA(101) 및 안티센스 cDNA(111)와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드(121)를 5'-말단으로 갖는 연장용 프라이머(120)(역전사용 프라이머보다 긴 연장용 프라이머)와 혼성화시킨 후, DNA 중합효소로 프라이머 연장반응을 수행하면, 연장된 이중가닥 cDNA(140)가 생성된다(제3반응). 이때, 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드(121)의 길이를 조절하면 각 표적 RNA 별로 레이블이 가능하여 여러 RNA의 동시다중분석(Multiplex)이 가능하다.
- [68] 연장된 이중가닥 cDNA(140)를 주형으로 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드와 동일한 핵산서열을 갖는 리버스 프라이머(131)와 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드의 5'-말단의 핵산서열을 갖는 포워드 프라이머(132)로 PCR 반응을 수행하면 연장된 이중가닥 cDNA(140)가 지수적으로 증폭되게 된다(제4반응). 상기 프라이머 연장반응(제3반응)과 PCR 반응(제4반응)은 순차적으로 수행되지 않고, 하나의 반응으로 수행될 수 있다. 아울러, 이 경우 리버스 프라이머(131) 대신 상기 제2반응에 사용된 역전사용 프라이머(105)가 리버스 프라이머로 사용될 수 있고, 이 경우 제4반응에서 별도로 역전사용 프라이머(105)를 추가하는 것보다 제2반응 산물의 일부 또는 전부를 프라이머 연장 및 PCR 반응용 용기에 옮기는 과정에서 제2반응 산물에 포함되어 있던 역전사용 프라이머(105)가 제4반응에서 재활용될 수 있다.
- [69] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 RNA 특이적 프라이머(역전사용 프라이머)를 이용한 짧은 크기의 RNA 검출방법을 개략적으로 나타낸 개요도이다. 도 2에 도시된 바와 같이, RNA(101)의 3'-말단의 5-7 nt 바람직하게는 6 nt의 부분과 특이적으로 상보결합할 수 있는 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드(134)를 3'-말단으로 하고, 이와 연결되어 있으며 표적 RNA와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드(135)를 5'-말단으로 함으로써 구성된 RNA 특이적 리버스 프라이머(136)(짧은 역전사용 프라이머)가 혼성화된 후, 역전사효소에 의해 역전사 반응이 일어나면 안티센스 가닥 cDNA(137)가 생성된다(제1단계 반응).

- [70] 그리고 역전사 효소를 불활성화시키고 DNA를 녹여, 역전사 과정을 확실히 종료한 후 단일가닥 cDNA를 준비한다. PCR 증폭 반응을 위한 충분한 주형 길이를 확보하기 위해 역전사용 프라이머 보다 훨씬 긴 연장용 프라이머를 사용하여 연장 반응을 수행하지만, 반응성이 떨어지는 것을 방지하기 위해 헤테로듀플렉스가 아닌 단일가닥 cDNA에 대해 역전사용 프라이머 보다 훨씬 긴 연장용 프라이머를 사용하여 연장 반응을 수행한다.
- [71] 안티센스 가닥 cDNA(137)에 상술한 6 nt를 제외한 RNA 부분(즉, 16 nt 정도)과 특이적으로 상보결합할 수 있는 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드(138)를 3'-말단으로 하고, 이에 연결된 임의의 올리고뉴클레오티드로서 안티센스 가닥 cDNA(137)나 RNA(101) 모두에 대하여 상보결합하지 않는 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드(142)를 5'-말단으로 포함하는 연장용 프라이머(143)로 연장반응을 수행하면, 양방향으로 연장이 이루어져, RNA 특이적 프라이머(136) 부분 및 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드(142) 부분의 상보적인 가닥을 포함한 연장 산물이 생성된다. 이때, 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드(142)는 모든 RNA 검출 키트에서 공통으로 사용되는 유니버설 포워드 프라이머 부분인 5'-영역(141)을 5'-말단에 포함하고 있고, 그 외의 부분인 3'-영역(139)은 RNA 종류에 따라 서열 및/또는 길이를 달리함으로써 멀티플렉스(multiplex) 분석시 동시에 다양한 RNA를 검출할 수 있게 한다. 연장반응이 완료되면 동일 튜브에서 RNA 특이적 프라이머(136)와 5'-영역(141)에 상응하는 포워드 프라이머(144)를 이용한 PCR을 통해 PCR 산물(145)이 생성된다(제2단계 반응).
- [72] 상기 포워드 프라이머(144)의 경우 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드의 5'-말단의 핵산서열로부터 선택되는데, 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드의 5'-말단 서열을 RNA의 종류와 무관하게 동일한 서열로 고안할 경우, 유니버설 포워드 프라이머가 되게 된다. 상기 RNA 특이적 프라이머(136)는 역전사 반응에서 사용된 역전사용 프라이머가 그대로 사용될 수 있으며, 이 경우 제2단계 반응에서 추가로 상기 역전사용 프라이머를 첨가할 수도 있고, 추가적인 첨가 없이 제1단계 반응물에 포함되어 있었던 역전사용 프라이머를 제2단계 반응에서 그대로 활용할 수도 있다. PCR 산물(145)은 실시간 PCR에 의해 반응과정에서 검출될 수 있고, 반응이 완결된 후, 아가로스 겔 전기영동 등에 의해 확인이 가능하다.
- [73] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 상세히 설명하고자 한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다. 따라서 본 발명의 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 본 발명의 상세한 설명, 실시예 및 실험예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는

것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다. 본 발명에 인용된 참고문헌들은 본 발명에 참고로서 통합된다.

[74]

[75] 실시예: 본 발명의 키트에 의한 RNA의 검출

[76] 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따라, miRNA에 폴리 A를 연결한 후 올리고 dT(oligo dT) 프라이머를 이용한 역전사를 수행하고, 역전사된 cDNA를 포함한 역전사 산물에 대하여 miRNA 특이적 서열을 포함한 연장용 프라이머를 이용한 양방향 연장반응과 동시에 실시간 PCR을 수행함으로써 이용하여 다양한 miRNA를 검출하였다. 아울러, 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따라, 올리고 dT 프라이머 사용 없이, miRNA의 3'-말단의 특이적인 6 nt의 핵산서열을 갖는 miRNA 특이적 프라이머(짧은 역전사용 프라이머)와 상기 6 nt의 핵산서열 외의 miRNA 특이적 서열을 갖는 연장용 프라이머(역전사용 프라이머 보다 긴 연장용 프라이머)를 이용하여 다양한 miRNA를 검출하였다. 검출하고자 한 miRNA는 하기의 표 1과 같다.

[77] 폴리 A 폴리머라아제를 사용한 방법의 경우, 42°C에서 60분간 폴리 A 꼬리연결 및 역전사 반응을 수행한 후, 70°C에서 10분간 가열하여 역전사 효소를 불활성화시켰고, 프라이머 연장반응 및 PCR은 95°C에서 15분간 DNA를 녹인 후, 94°C에서 15초, 55°C에서 30초, 70°C에서 30초로 40 사이클을 반복하여 수행하였다. 녹는점 곡선(melting curve)은 95°C에서 10초 가열 후 65°C에서 95°C까지 5초당 0.5°C씩 상승하게 함으로써 측정하였다.

[78] miRNA 특이적 프라이머를 사용한 방법의 경우, 42°C에서 60분간 역전사 반응을 수행한 후, 70°C에서 10분간 가열하여 역전사 효소를 불활성화시켰고, 프라이머 연장반응 및 PCR은 95°C에서 15분간 DNA를 녹인 후, 95°C에서 10초, 60°C에서 40초로 40 사이클을 반복하여 수행하였다. 녹는점 곡선(melting curve)은 95°C에서 10초 가열 후 65°C에서 95°C까지 5초당 0.5°C씩 상승하게 함으로써 측정하였다.

[79] 아울러, 역전사 반응과 실시간 PCR 반응에 각각 사용한 시약들의 사용량은 표 2 및 3과 같다.

[80] PCR 반응은 BIO-RAD사의 실시간 PCR 장치(Bio-Rad CFX96 Touch Real-time PCR 시스템)를 이용하여 수행하였으며, 실제 PCR 반응이 제대로 이루어졌는지 확인하기 위하여, 1.5% 아가로스 겔 전기영동을 통해 밴드패턴을 확인하였다.

[81] [표1]

본 발명의 실시예들

실시예	증폭 대상miRNA	폴리 A 폴리머라 아제 사용 여부	역전사용 프라이머(서 열번호)	연장용 프라이머(서 열번호)	포워드 프라이 머	리버스 프라이 머
1	miR-532	Y	1	10	18	19
2	miR-196b	Y		11		
3	miR-362	Y		12		
4	miR-29c	Y		13		
5	miR-106b	Y		14		
6	miR-200c	Y		15		
7	miR-127	Y		16		
8	miR-145	Y		17		
9	miR-532	N	2	10		2
10	miR-196b	N	3	11		3
11	miR-362	N	4	12		4
12	miR-29c	N	5	13		5
13	miR-106b	N	6	14		6
14	miR-200c	N	7	15		7
15	miR-127	N	8	16		8
16	miR-145	N	9	17		9

- [82] [표2]
역전사 반응 시약 사용량

시료	부피	최종 농도
2X 반응 완충액	10 μ l	
역전사 효소(AddScript)	1 μ l	1 U
dNTP mix (10 mM)	2 μ l	1 mM
역전사용 프라이머 (80 μ M)	1 μ l	4 μ M
주형 (A549 세포의 total RNA, 1 μ g/ μ l)	1 μ l	1 μ g
증류수	5 μ l	
총 부피	20 μ l	

- [83] [표3]
실시간 PCR 반응 시약 사용량

시료	부피	최종 농도
2X SYBR Green PCR Master Mix	10 μ l	1X
연장용 프라이머 (200 nM)	1 μ l	10 nM
포워드 프라이머 (2 μ M)	1 μ l	100 nM
역전사 반응물	1 μ l	
증류수	7 μ l	
총 부피	20 μ l	

- [84] **비교예:**

- [85] 본 발명자들은 비교예로 Qiagen 사에서 판매되는 miRNA 검출키트를 사용하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 RNA 검출 키트와 성능을 비교하였다.

[86] [표4]
비교예

비교예	증폭 대상 miRNA	검출방식
1	miR-532	앵커 올리고 dT 어댑터 사용
2	miR-196b	앵커 올리고 dT 어댑터 사용
3	miR-362	앵커 올리고 dT 어댑터 사용
4	miR-29c	앵커 올리고 dT 어댑터 사용
5	miR-106b	앵커 올리고 dT 어댑터 사용
6	miR-200c	앵커 올리고 dT 어댑터 사용
7	miR-127	앵커 올리고 dT 어댑터 사용
8	miR-145	앵커 올리고 dT 어댑터 사용

[87] 상술한 분석 결과, 도 3 내지 도 26에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 RNA 검출 키트 및 방법에 따르면(도 3 내지 도 18), Qiagen사의 상용 miRNA 검출키트(도 19 내지 도 26)보다 더 선명하고 정확한 miRNA 검출이 가능함을 확인할 수 있었다.

[88]

[89] **실험예 1: 증폭된 PCR 산물의 염기서열 결정**

[90] 본 발명자들은 상기 실시예의 방법 중 폴리 A 폴리머라아제를 사용하지 않는 방법 및 비교예로 Qiagen사에서 판매하고 있는 miRNA 검출키트를 사용하여, A549 세포에 대하여 miRNA hsa let-7e를 증폭하였으며, 증폭된 PCR 산물에 대한 염기서열을 결정하였다.

[91] 구체적으로 서열번호 20으로 기재되는 핵산서열로 구성되는 역전사용 프라이머, 서열번호 21로 기재되는 핵산서열로 구성되는 연장용 프라이머 및 서열번호 22로 기재되는 포워드 프라이머를 사용하였으며, 역전사 조건 및 실시간 PCR 조건은 상기 실시예들과 동일하게 설정하였다.

[92] 그 결과, 도 27에 도시된 바와 같이 비교예인 Qiagen사의 키트를 이용한 실시간 PCR 키트 사용에는 음성대조군에서 비특이적인 증폭 산물이 관찰된 반면, 본 발명의 일 실시예에 따른 miRNA 검출키트의 경우 비특이적인 증폭이 전혀 나타나지 않았다. 아울러, 증폭된 PCR 산물에 대하여 시퀀싱을 수행한 결과, 도 28에 도시된 바와 같이, Qiagen사의 miRNA 검출키트로 증폭된 증폭산물은 염기서열을 제대로 확인할 수 없어 표적 miRNA를 제대로 증폭한 것인지 확인하기 어려웠으나, 본 발명의 일 실시예에 따른 RNA 검출키트의 경우 염기서열을 정확하게 결정할 수 있었다.

[93]

[94] **실험예 2: 증폭된 PCR 산물의 검량곡선 확인**

- [95] 이어 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따른 RNA 검출 키트를 이용하여 시료 내에 포함된 miRNA의 수준을 정확하게 정량할 수 있는지 확인하기 위해 순차 희석한 미리 결정된 농도의 miRNA 샘플을 대상으로 실시간 PCR 반응을 수행한 후, 검출 한계 사이클(Cq)을 측정하였다.
- [96] 구체적으로 표적 miRNA는 miR-145를 사용하였으며, 역전사 및 PCR 조건은 상기 실시예들에 기재된 조건을 그대로 사용하였다.
- [97] 그 결과 도 29에 나타난 바와 같이, 매우 낮은 농도부터 Cq 값이 정확한 지수관계를 나타내는 것으로 확인되었으며, miRNA의 카피수의 로그값과 Cq와의 상관관계는 R2값이 0.9979에 이를 정도로 매우 높게 나타났다. 따라서, 상기 결과로부터 본원발명의 키트 및 방법은 miRNA의 검출은 물론 정확한 정량을 위해서도 사용이 가능함을 확인할 수 있었다.
- [98] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 RNA 검출 키트에 의한 Ct값과 Qiagen사의 상용 miRNA 검출키트에 의한 Ct값을 비교하면 도 32의 그래프와 같다(인간의 A549 폐암종 세포주에 대한 실시간 PCR 결과). 도 32의 그래프에서 확인되는 바와 같이, Qiagen사의 상용 miRNA 검출키트의 Ct값은 빠른 시간 내에 안정되지 않고 변하고 있어 실시간 PCR 반응시간이 길어져서 반응성이 떨어지는 반면에(도 32의 (a) 참조), 본 발명의 일 실시예에 따른 RNA 검출 키트의 Ct값은 10분 이후부터 안정되어 실시간 PCR 반응시간이 짧아져서 반응성이 향상되는 것을 알 수 있다(도 32의 (b) 참조).
- [99] 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 RNA 검출 키트 및 방법에 따르면, 짧은 역전사용 프라이머 사용에 의해 역전사 반응시간이 짧아져 전체 PCR 반응속도를 높일 수 있어 빠르게 RNA를 검출할 수 있고, 연장반응단계에서 역전사용 프라이머보다 훨씬 긴 연장용 프라이머를 사용하여 PCR 반응을 위해 충분한 길이의 주형을 만들 수 있다.

[100]

[101] **실험예 3: miRNA의 서브타입 구분**

- [102] miRNA의 경우 개체 또는 세포에 따라 동일한 miRNA라도 약간 서열이 상이한 서브타입의 차이를 보인다. 이에, 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따른 miRNA 검출 키트가 miRNA의 서브타입을 구분할 수 있는지 조사하였다.

- [103] 구체적으로, CAL27 세포(ATCC CRL-2095) 및 HSC-3 세포로부터 총 RNA를 Trizol 시약으로 분리한 후, miR-200a, miR-200b 및 miR-200c의 3'-말단 6 nt와 각각 상보결합하는 3'-말단의 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드 및 5'-말단의 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 역전사용 프라이머(서열번호 23 내지 25)를 이용하여 42°C에서 60분간 역전사 반응을 수행하였다. 그런 다음 상기 역전사 반응 산물 1 µl를 상기 표 3에 기재된 실시간 PCR 반응액이 담긴 용기로 옮긴 후 70°C에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화시켰다. BioRad CFX96 Touch Real-Time PCR 기기를 이용한 프라이머 연장반응 및 PCR은 95°C에서 15분간 DNA를 녹인 후, 95°C에서 10초, 60°C에서 40초로 40 사이클을 반복하여

수행하였다. 녹는점 곡선(melting curve)은 95°C에서 10초 가열 후 65°C에서 95°C까지 5초당 0.5°C씩 상승하게 함으로써 측정하였다. 상기 실시간 PCR 반응에서는 각각의 miRNA에 특이적인 연장용 프라이머(서열번호 26 내지 28) 및 상기 연장용 프라이머의 5'-말단의 공통적인 서열에 해당되는 유니버설 포워드 프라이머(서열번호 22)를 사용하였다. 그 결과, 도 30에 나타난 바와 같이, CAL27 세포 및 HSC3 세포 모두 miR-200a 및 miR-200b는 발현이 되는 것을 확인하였으나, miR-200c는 양 세포 모두에서 검출이 되지 않았다. 상기 결과는 ABI TaqMan® MicroRNA Assay 키트를 이용한 결과와 매우 유사한 것으로서, 본원발명의 일 실시예에 따른 키트가 신뢰성이 있는 결과를 도출할 수 있음을 알 수 있다.

[104]

[105] **실험예 4: 실시간 PCR 반응시 역전사 프라이머의 추가 유무에 따른 결과**

[106] 또한, 본 발명자들은 프라이머 연장 및 실시간 PCR 반응을 구분하여 수행하지 않고 단일 단계로 수행하였다. 실시간 PCR 반응을 위한 프라이머쌍으로는 연장용 프라이머의 5'-말단의 고유의 핵산서열을 이용한 포워드 프라이머와 역전사 반응시 사용된 역전사용 프라이머를 리버스 프라이머로 사용하였다. 그런데 상기 리버스 프라이머는 이미 1단계 역전사 반응에 사용되었고, 2단계 프라이머 연장 및 실시간 PCR 반응에 참가된 1단계 역전사 반응물 내에 포함되어 있기 때문에, 2단계 프라이머 연장 및 실시간 PCR 반응에 리버스 프라이머를 별도로 추가하지 않더라도 2단계 반응이 정상적으로 수행될 것이라고 판단하였다. 이에, 역전사용 프라이머를 추가하지 않는 경우와 2단계 반응에서 역전사용 프라이머를 추가로 첨가하는 경우 두 가지 조건이 실시간 PCR 반응에 미치는 영향을 조사하였다.

[107] 구체적으로 증폭 대상 RNA로는 miR-16을 사용하였고, 세포로는 A549 폐암종 세포주를 사용하였으며, 역전사용 프라이머를 추가로 첨가하지 않은 경우에는 상기 표 2 및 3에 기재된 조건을 사용하여 역전사 반응과, 프라이머 연장 및 실시간 PCR 반응을 수행하였으며, 역전사용 프라이머를 추가로 첨가하는 경우에는 역전사용 프라이머(2 μ M) 1 μ l를 추가적으로 첨가하고 해당 부피만큼 증류수를 적게 첨가하는 조건으로 제2단계 반응을 수행하였다. 역전사용 프라이머로는 서열번호 29으로 기재되는 핵산서열로 구성된 올리고뉴클레오티드를 사용하였고, 프라이머 연장 및 실시간 PCR 반응을 위한 miR-16 특이적 연장 프라이머로는 서열번호 30로 기재되는 핵산서열로 구성된 올리고뉴클레오티드, 그리고 포워드 프라이머로는 서열번호 22로 기재되는 핵산서열로 구성된 유니버설 포워드 프라이머를 사용하였다. 역전사 반응 단계와, 프라이머 연장 및 실시간 PCR 반응 단계의 조건은 상기 실험예 2와 동일하였다.

[108] 그 결과, 도 31에 나타난 바와 같이, 제2단계 반응에서 역전사용 프라이머를 추가한 경우에는 음성대조군에서도 비특이적인 반응산물이 산출되는 것으로

나타난 반면, 역전사용 프라이머를 추가하지 않은 경우에는 그러한 비특이적 반응산물이 전혀 검출되지 않았다. 따라서, 오히려 제2단계 반응시 역전사용 프라이머를 추가로 넣지 않는 것이 보다 바람직한 결과를 도출할 수 있음을 알 수 있었다.

- [109] 이상, 본 발명을 상기 실시예를 들어 설명하였으나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니다. 당업자라면 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 수정, 변경을 할 수 있으며 이러한 수정과 변경 또한 본 발명에 속하는 것임을 알 수 있을 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 증폭대상 RNA 분자의 폴리 A(poly A) 꼬리와 혼성화하는 올리고 dT로 구성되는 제1 혼성화 올리고뉴클레오타이드, 및 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 부가되고 상기 증폭대상 RNA 분자와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1 어댑터 올리고뉴클레오타이드로 구성된 짧은 역전사용 프라이머;
상기 증폭대상 RNA 분자로부터 역전사된 단일가닥 cDNA 중 상기 올리고 dT 부분을 제외한 3'-말단 부분과 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오타이드, 및 상기 제2 혼성화 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 부가되고 상기 단일가닥 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오타이드로 구성되고, 상기 역전사용 프라이머 보다 길이가 긴 연장용 프라이머; 및
상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오타이드 내에서 선택되는 포워드 프라이머를 포함하는 RNA 분자 검출용 키트.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 증폭대상 RNA 분자는 길이 18 내지 180 nt로 구성된 작은 크기의 RNA 분자인, RNA 분자 검출용 키트.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 작은 크기의 RNA 분자는 tRNA, snRNA, siRNA, exRNA, piRNA, scaRNA 또는 miRNA인, RNA 분자 검출용 키트.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오타이드는 증폭대상 RNA 분자 종류에 따른 증폭대상 RNA 표식(tagging) 올리고뉴클레오타이드, 또는 상기 증폭대상 RNA 표식 올리고뉴클레오타이드 및 증폭대상 RNA 종류와 무관한 공통의 핵산서열로 구성되는 공통 올리고뉴클레오타이드로 구성되는, RNA 분자 검출용 키트.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 짧은 역전사용 프라이머는 29 내지 34 nt로 구성되는, RNA 분자 검출용 키트.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오타이드는 17 내지 22 nt로 구성되는, RNA 분자 검출용 키트.
- [청구항 7] 증폭대상 RNA 분자의 3'-말단의 5 내지 9 nt의 핵산으로 구성된 3'-말단 부분과 혼성화하는 핵산서열로 구성된 제1 혼성화 올리고뉴클레오타이드, 및 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 부가되고 상기 증폭대상 RNA 분자와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1 어댑터 올리고뉴클레오타이드로 구성된 짧은 역전사용 리버스 프라이머;

상기 증폭대상 RNA 분자로부터 역전사된 단일가닥 cDNA 중 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드와 혼성화되는 상기 증폭대상 RNA 분자의 3'-말단 부분에 상응하는 부분을 제외한 부분과 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드, 및 상기 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드의 5'-말단에 부가되고 상기 단일가닥 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성되고, 상기 역전사용 프라이머 보다 길이가 긴 연장용 프라이머; 및
상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드 내에서 선택되는 포워드 프라이머를 포함하는 RNA 분자 검출용 키트.

- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 증폭대상 RNA 분자는 길이 18 내지 180 nt로 구성된 작은 크기의 RNA 분자인, RNA 분자 검출용 키트.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 작은 크기의 RNA 분자는 tRNA, snRNA, siRNA, exRNA, piRNA, scaRNA 또는 miRNA인, RNA 분자 검출용 키트.
- [청구항 10] 제7항에 있어서,
상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드는 증폭대상 RNA 분자 종류에 따른 증폭대상 RNA 표식(tagging) 올리고뉴클레오티드, 또는 상기 증폭대상 RNA 표식 올리고뉴클레오티드 및 증폭대상 RNA 종류와 무관한 공통의 핵산서열로 구성되는 공통 올리고뉴클레오티드로 구성되는, RNA 분자 검출용 키트.
- [청구항 11] 제7항에 있어서,
상기 짧은 역전사용 프라이머는 26 내지 28 nt, 23 내지 28 nt, 또는 18 내지 28 nt의 길이를 갖는, RNA 분자 검출용 키트.
- [청구항 12] 제7항에 있어서,
상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드는 20 내지 22 nt, 17 내지 22 nt, 또는 12 내지 22 nt의 길이를 갖는, RNA 분자 검출용 키트.
- [청구항 13] 폴리 A 폴리머라아제를 이용하여, RNA 분자에 폴리 A 꼬리를 연결하는 폴리 A 꼬리연결 RNA 분자 제조단계;
폴리 A 꼬리연결 RNA 분자를, 상기 폴리 A 꼬리연결 RNA 분자의 폴리 A(poly A) 꼬리와 혼성화하는 올리고 dT로 구성되는 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드, 및 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드의 5'-말단에 부가되고 상기 폴리 A 꼬리연결 RNA 분자와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 짧은 역전사용 프라이머와, 역전사 효소에 의해, 역전사하는 역전사반응단계;
상기 역전사 효소를 불활성화시키고, 상기 역전사에 의해 생성된 DNA를 녹여, 상기 폴리 A 꼬리연결 RNA 분자로부터 역전사된 단일가닥

cDNA를 준비하는 단계; 및

상기 역전사반응 산물의 전부 또는 일부를, 상기 역전사된 단일가닥 cDNA 중 상기 올리고 dT 부분을 제외한 3'-말단 부분과 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오타이드, 및 상기 제2 혼성화 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 부가되고 상기 단일가닥 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오타이드로 구성되고, 상기 역전사용 프라이머 보다 길이가 긴 연장용 프라이머, 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오타이드 내에서 선택되는 포워드 프라이머 및 열안정성 DNA 중합효소를 포함하는 프라이머 연장 및 PCR 반응용 용기로 옮긴 후, 프라이머 연장 및 PCR 반응을 동시에 수행하는 PCR 반응단계를 포함하는 증폭대상 RNA 분자의 검출방법.

- [청구항 14] 증폭대상 RNA 분자를, 상기 증폭대상 RNA 분자의 3'-말단의 5 내지 9 nt의 핵산으로 구성된 3'-말단 부분과 혼성화하는 핵산서열로 구성된 제1 혼성화 올리고뉴클레오타이드, 및 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 부가되고 상기 증폭대상 RNA 분자와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1 어댑터 올리고뉴클레오타이드로 구성된 짧은 역전사용 리버스 프라이머와, 역전사 효소를 이용하여 역전사하는 역전사반응단계;
- 상기 역전사 효소를 불활성화시키고, 상기 역전사에 의해 생성된 DNA를 녹여, 상기 증폭대상 RNA 분자로부터 역전사된 단일가닥 cDNA를 준비하는 단계; 및
- 상기 역전사반응 산물의 전부 또는 일부를, 상기 역전사된 단일가닥 cDNA 중 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오타이드와 혼성화되는 상기 증폭대상 RNA 분자의 3'-말단 부분에 상응하는 부분을 제외한 부분과 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오타이드, 및 상기 제2 혼성화 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 부가되고 상기 단일가닥 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오타이드로 구성되고, 상기 역전사용 프라이머 보다 길이가 긴 연장용 프라이머, 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오타이드 내에서 선택되는 포워드 프라이머 및 열안정 DNA 중합효소를 포함하는 프라이머 연장 및 PCR 반응용 용기로 옮긴 후 프라이머 연장 반응 및 PCR 반응을 동시에 수행하는 PCR 반응 단계를 포함하는, 증폭대상 RNA 분자의 검출방법.

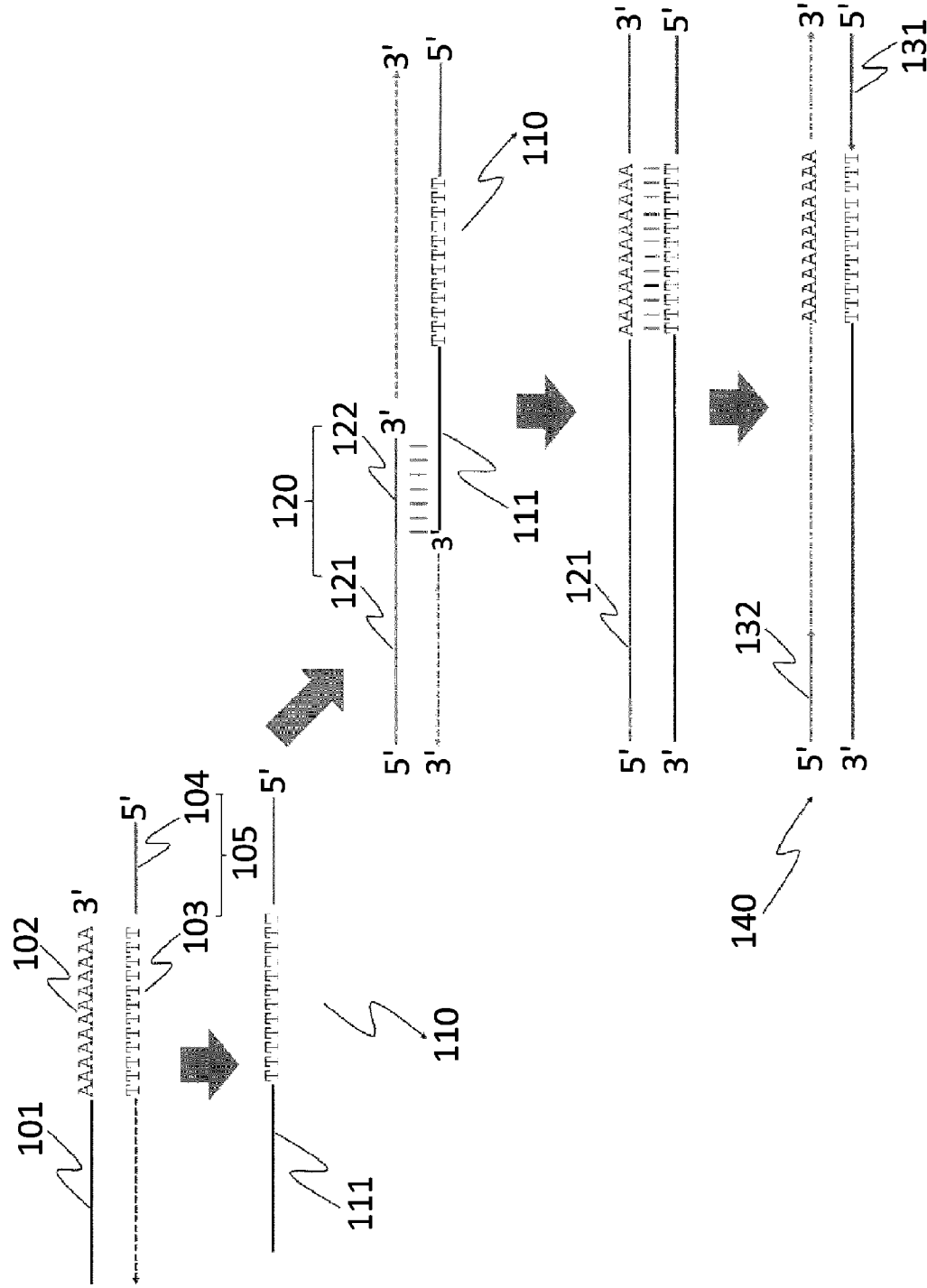
- [청구항 15] 제13항 또는 제14항에 있어서,
상기 증폭대상 RNA 분자는 길이 18 내지 180 nt로 구성되는 작은 크기의 RNA 분자인, 검출방법.

- [청구항 16] 제15항에 있어서,

상기 작은 크기의 RNA 분자는 tRNA, snRNA, siRNA, exRNA, piRNA, scaRNA 또는 miRNA인, 검출방법.

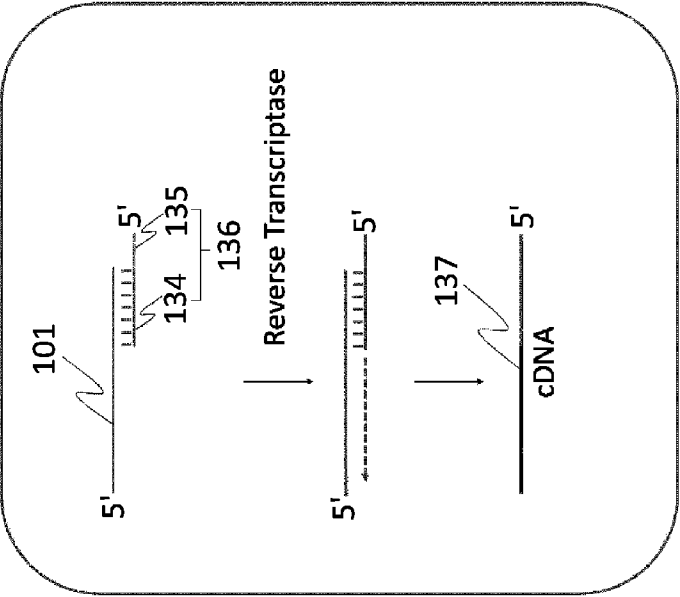
- [청구항 17] 제13항 또는 제14항에 있어서,
상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오타드는 증폭대상 RNA 분자 종류에 따른 증폭대상 RNA 표식(tagging) 올리고뉴클레오타드, 또는 상기 증폭대상 RNA 표식 올리고뉴클레오타드 및 증폭대상 RNA 종류와 무관한 공통의 핵산서열로 구성되는 공통 올리고뉴클레오타드로 구성되는, 검출방법.
- [청구항 18] 제13항에 있어서,
상기 짧은 역전사용 프라이머는 29 내지 34 nt로 구성되는, 검출방법.
- [청구항 19] 제13항에 있어서,
상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오타드는 17 내지 22 nt로 구성되는, 검출방법.
- [청구항 20] 제14항에 있어서,
상기 짧은 역전사용 프라이머는 26 내지 28 nt, 23 내지 28 nt, 또는 18 내지 28 nt의 길이를 갖는, 검출방법.
- [청구항 21] 제14항에 있어서,
상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오타드는 20 내지 22 nt, 17 내지 22 nt, 또는 12 내지 22 nt의 길이를 갖는, 검출방법.

[51]

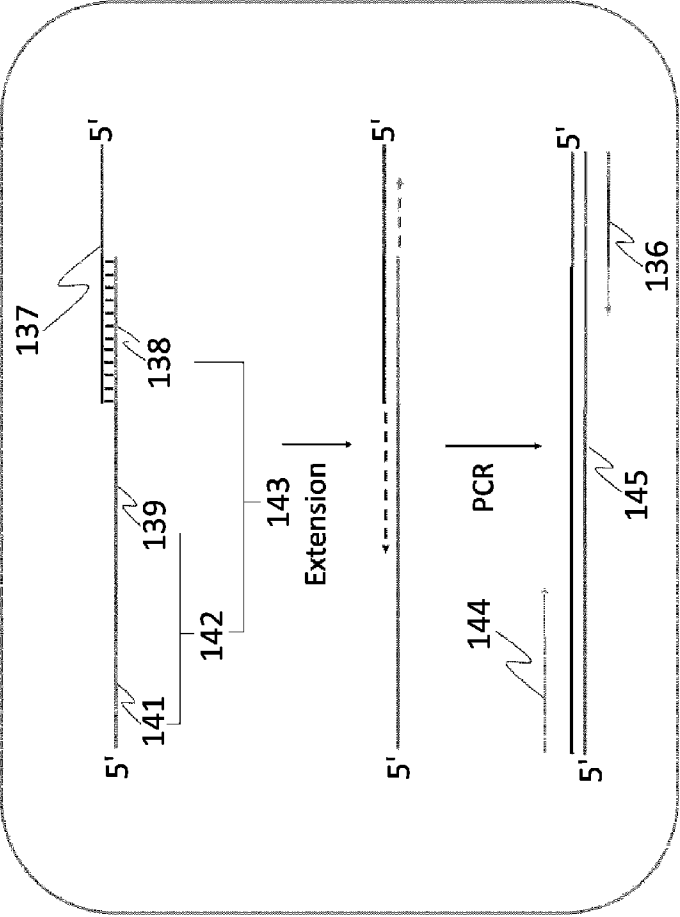


[도2]

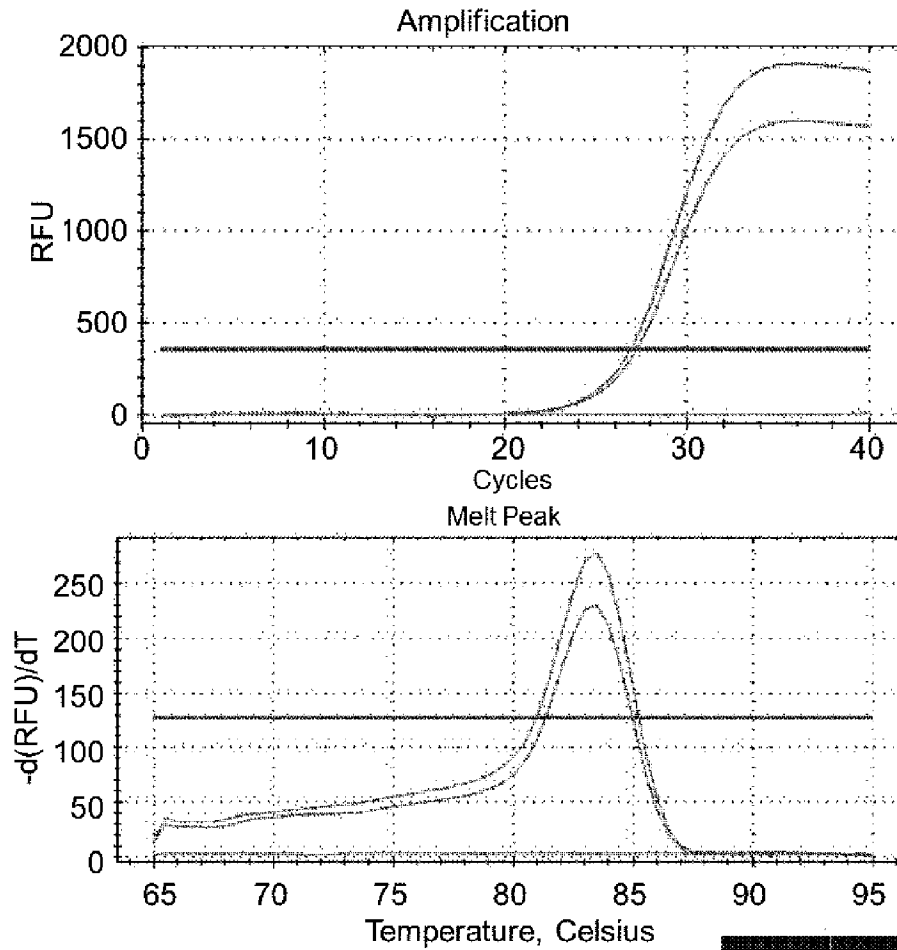
1st Reaction: Reverse Transcription



2nd Reaction: PCR



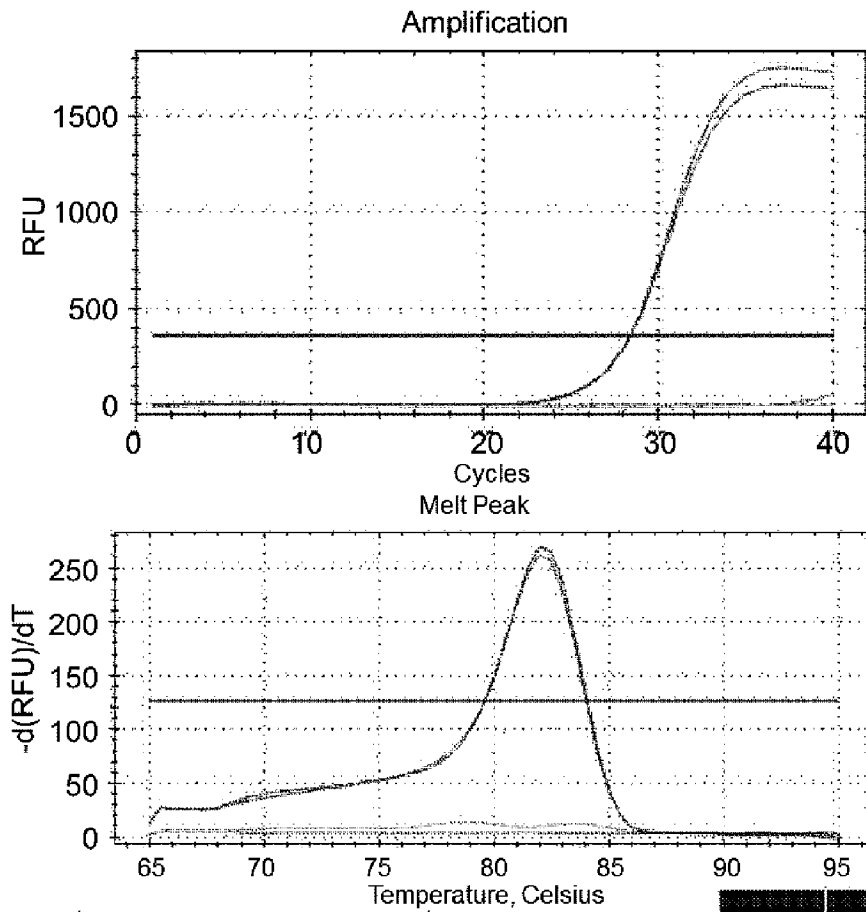
[도3]



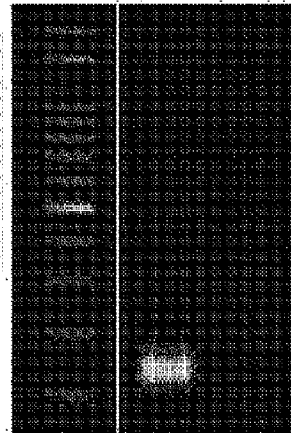
Sample	Cq	Melt Tem.
miR-532(12T) A549	26.89	83.5
miR-532(12T) A549	27.2	83.5
miR-532(12T) NTC	N/A	None
miR-532(12T) NTC	N/A	None



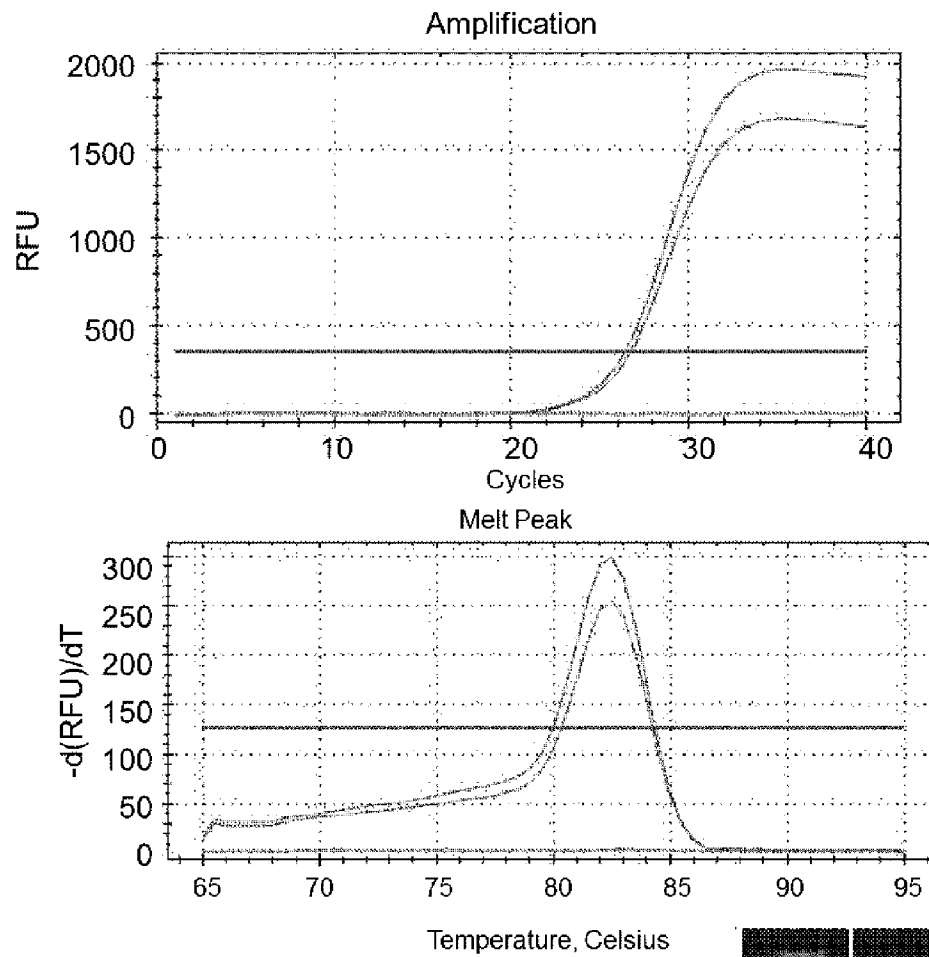
[도4]



Sample	Cq	Melt Tem.
miR-196b(12T) A549	28.3	82
miR-196b(12T) A549	28.33	82
miR-196b(12T) NTC	N/A	None
miR-196b(12T) NTC	N/A	None



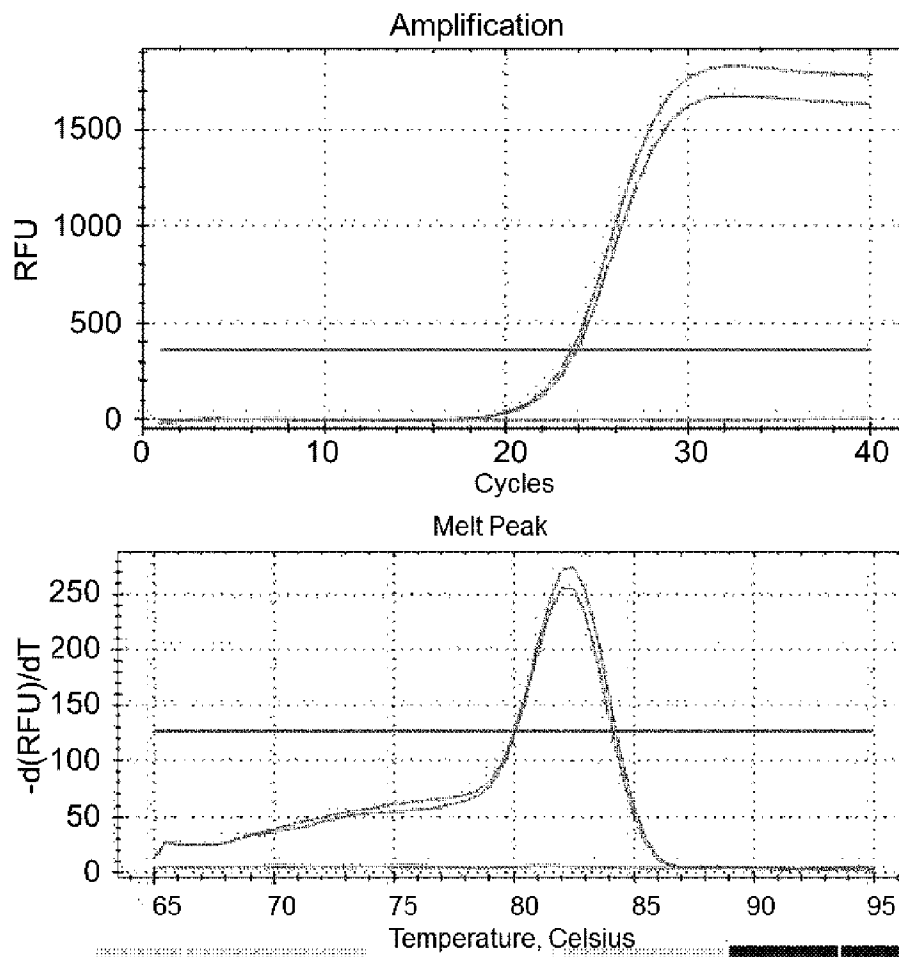
[도5]



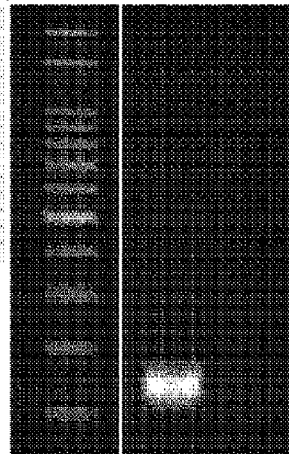
Sample	Cq	Melt Tem.
miR-362(12T) A549	26.39	82.5
miR-362(12T) A549	26.72	82.5
miR-362(12T) NTC	N/A	None
miR-362(12T) NTC	N/A	None



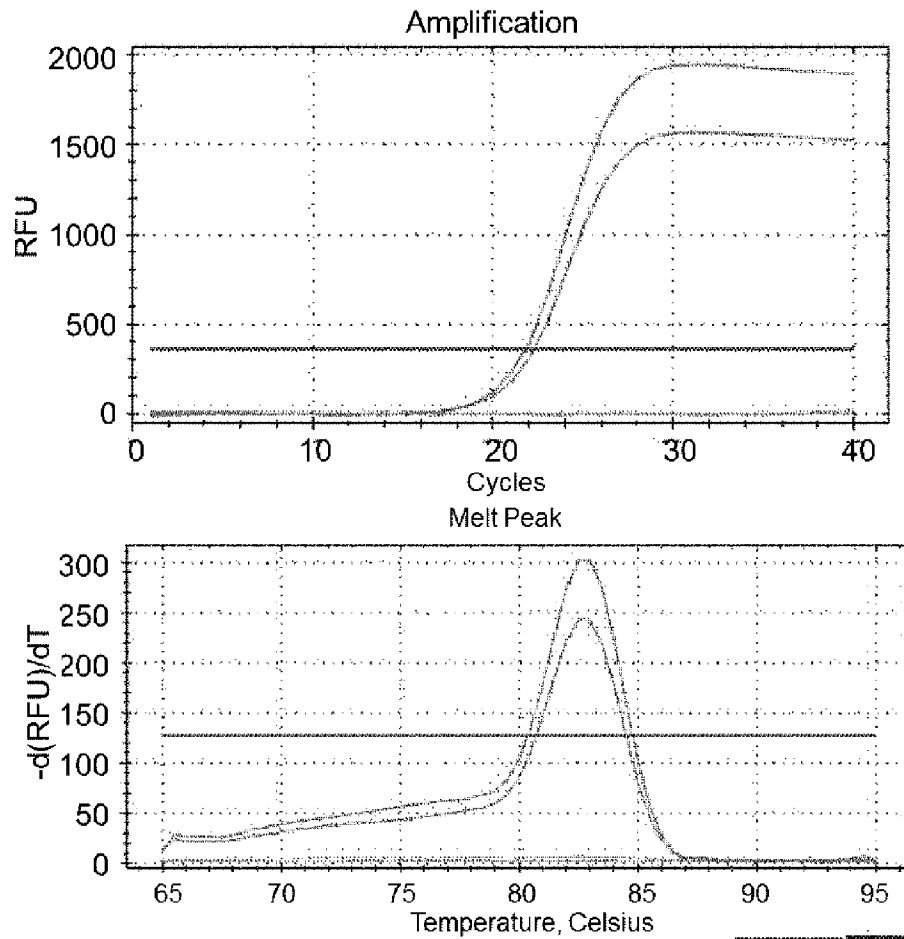
[도6]



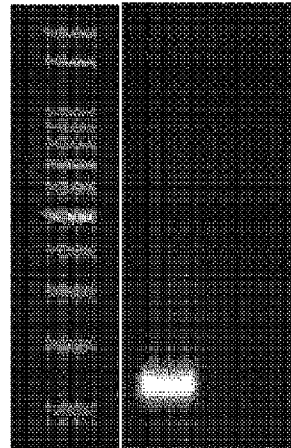
Sample		Cq	Melt Tem.
miR-29c(12T)	A549	23.54	82.5
miR-29c(12T)	A549	23.82	82
miR-29c(12T)	NTC	N/A	None
miR-29c(12T)	NTC	N/A	None



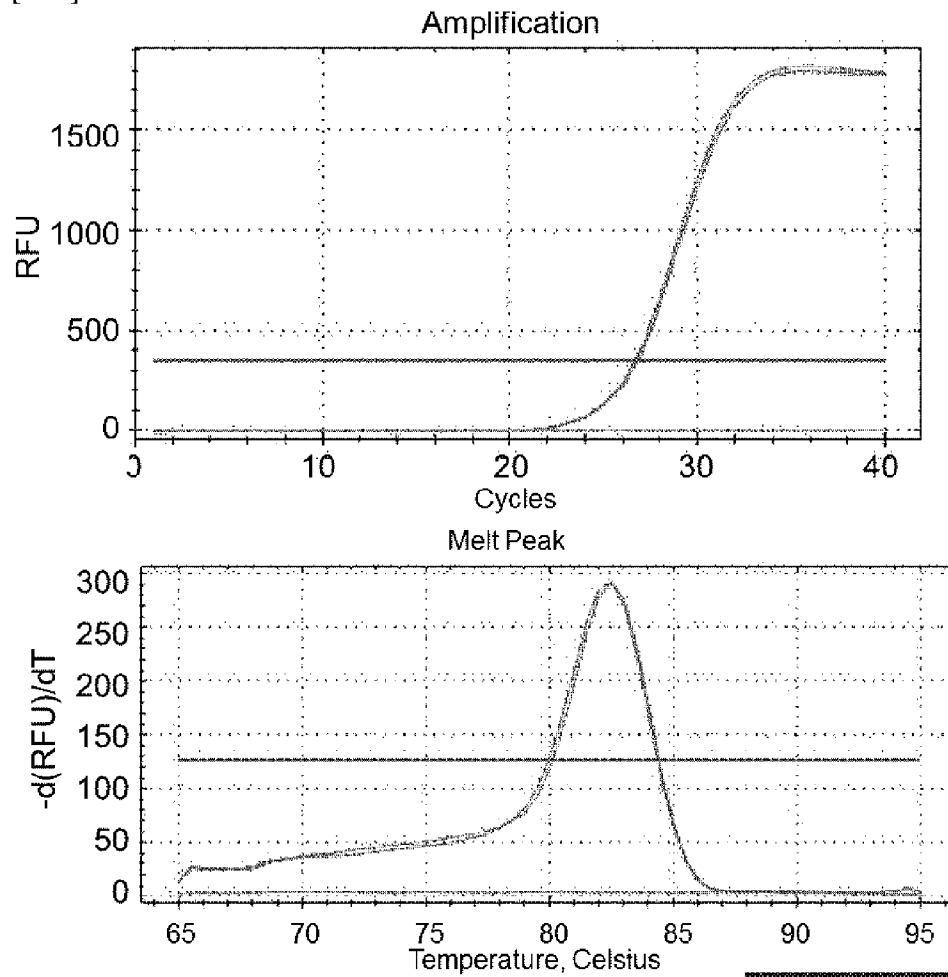
[도7]



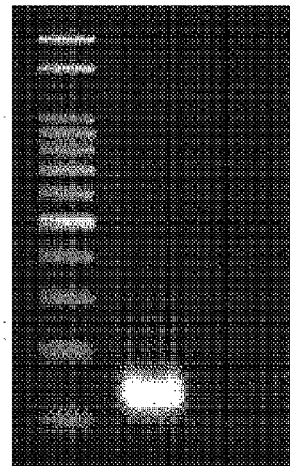
Sample		Cq	Melt. Temp
miR-106b(12T)	A549	21.76	83
miR-106b(12T)	A549	22.23	82.5
miR-106b(12T)	NTC	N/A	None
miR-106b(12T)	NTC	N/A	None



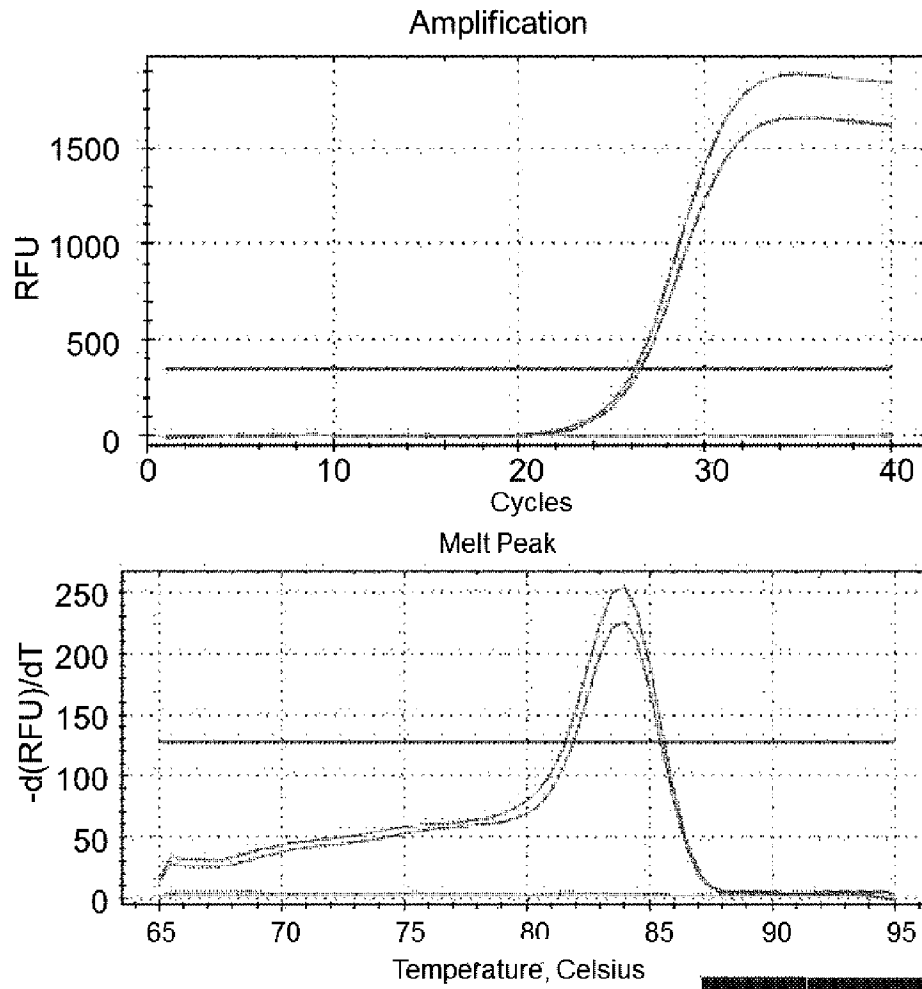
[도8]



Sample	Cq	Melt Tem.
miR-200c(12T) A549	26.68	82.5
miR-200c(12T) A549	26.84	82.5
miR-200c(12T) NTC	N/A	None
miR-200c(12T) NTC	N/A	None



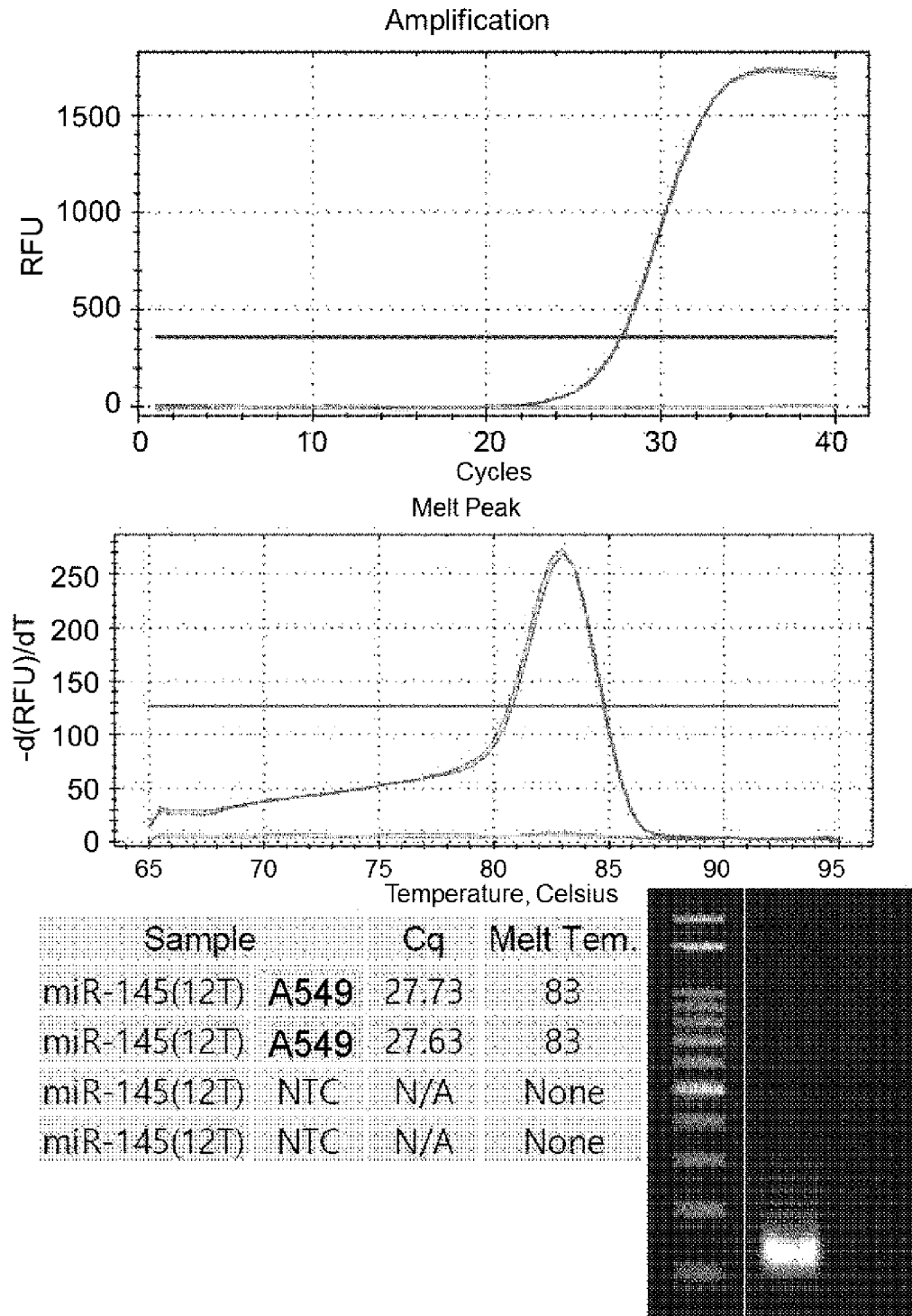
[도9]



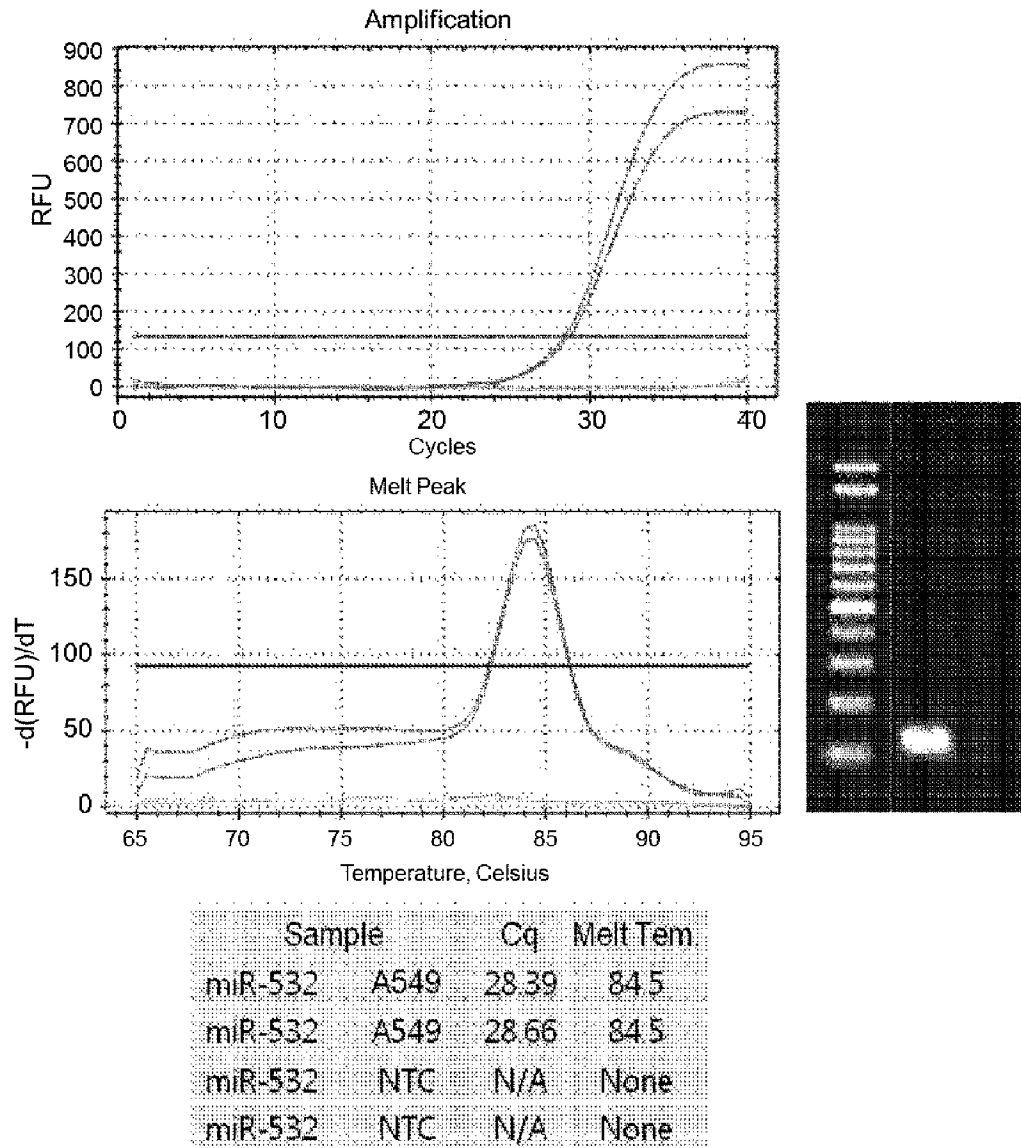
Sample		Cq	Melt Tem
miR-127(12T)	A549	26.23	84
miR-127(12T)	A549	26.52	84
miR-127(12T)	NTC	N/A	None
miR-127(12T)	NTC	N/A	None



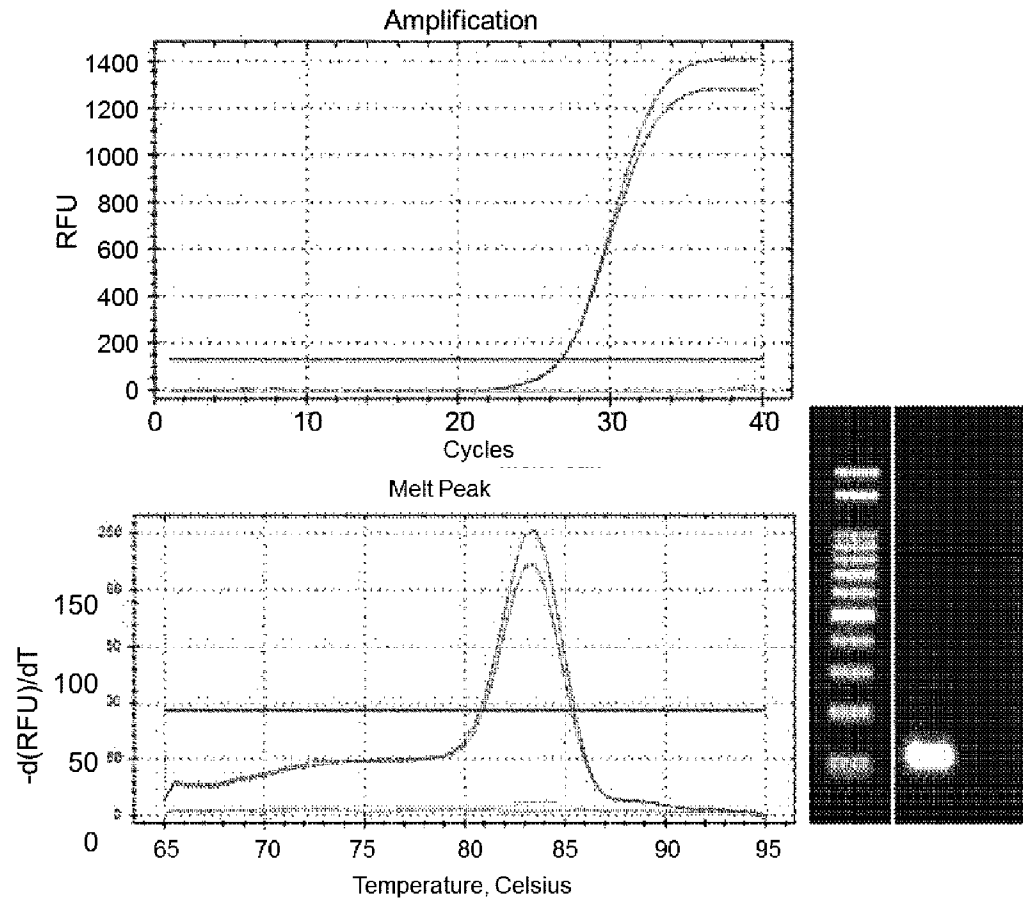
[도10]



[도11]

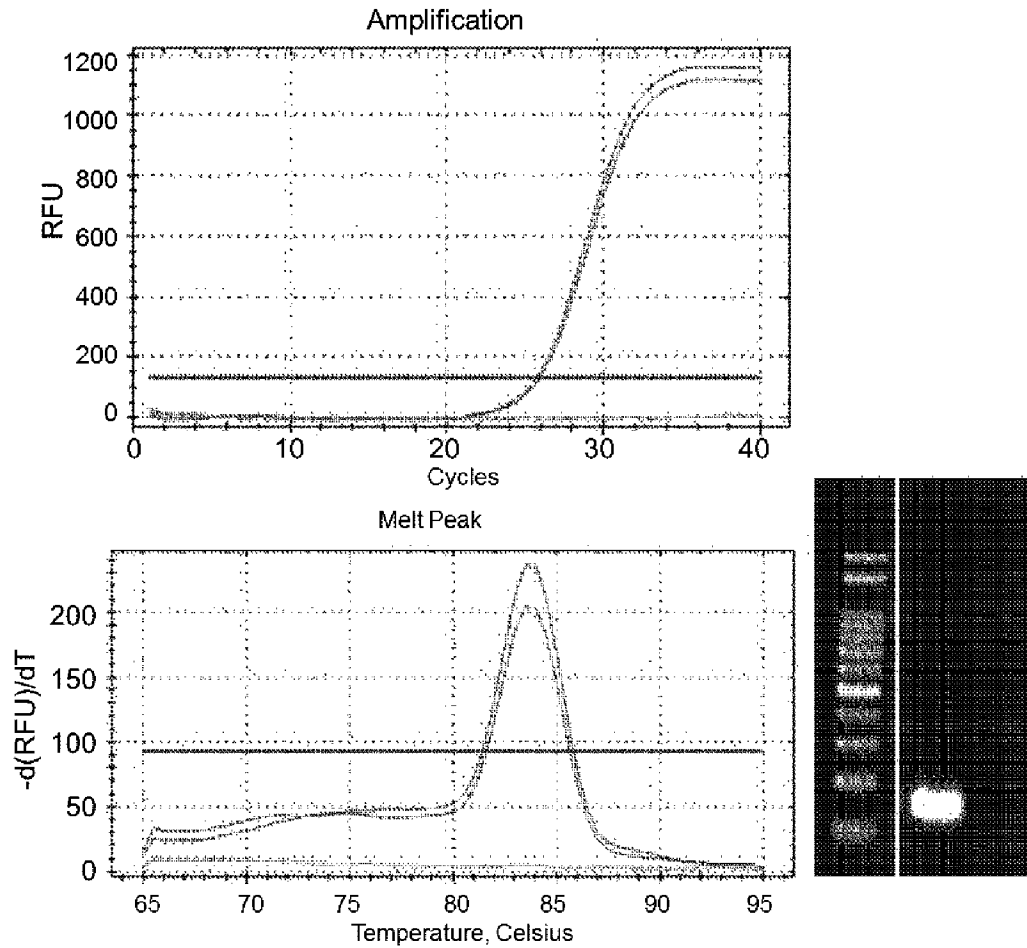


[도12]



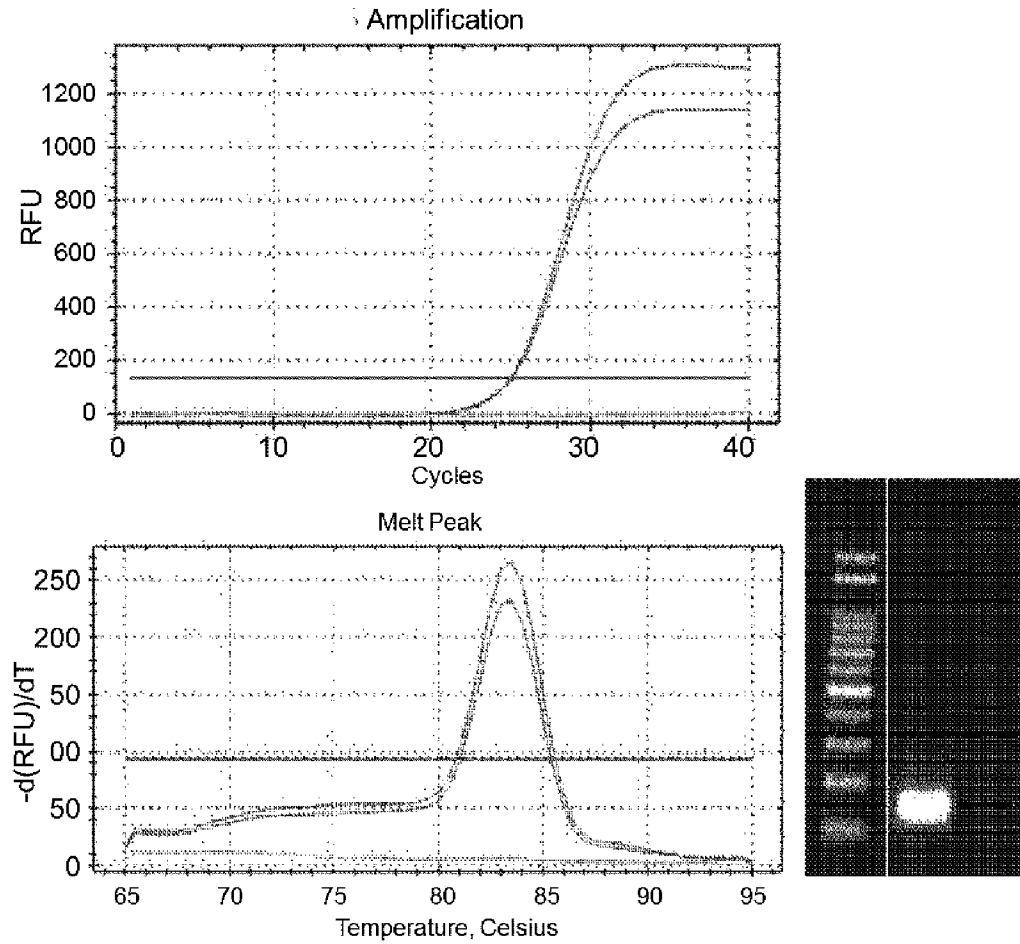
Sample		Cq	Melt Tem.
miR-196b	A549	26.69	83.5
miR-196b	A549	26.73	83.5
miR-196b	NTC	N/A	None
miR-196b	NTC	N/A	None

[도13]



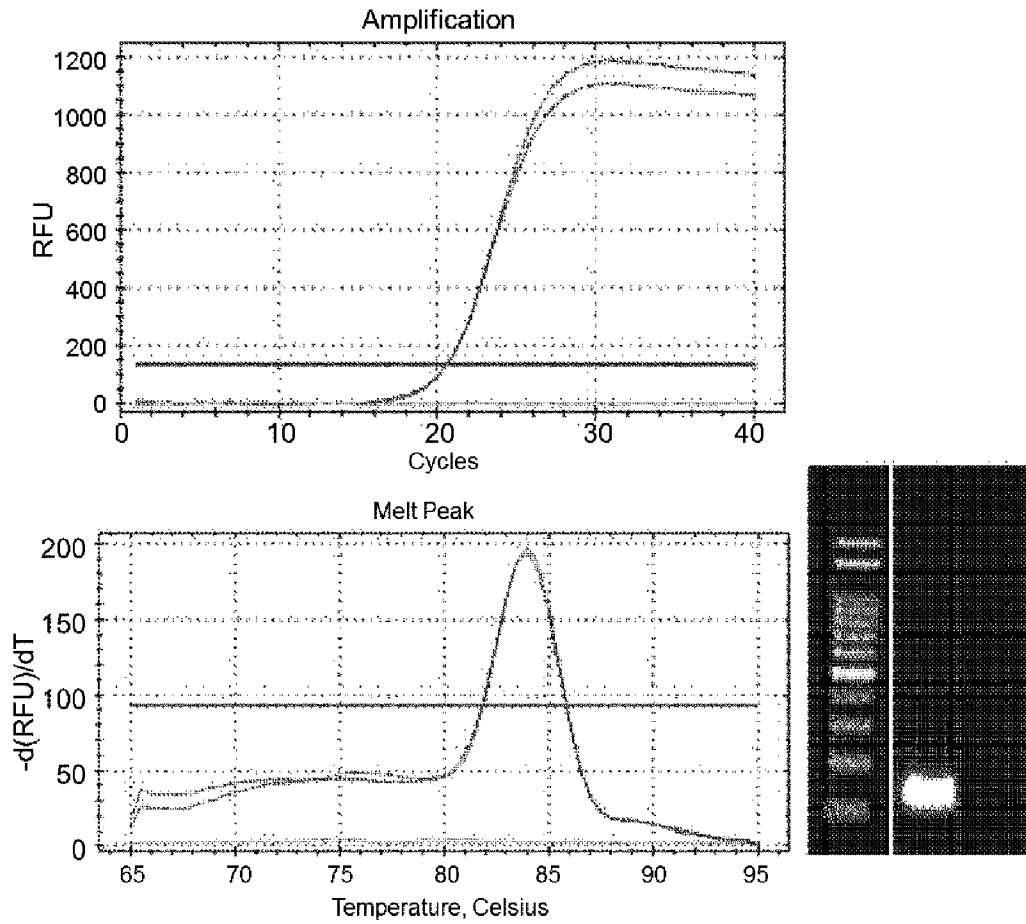
Sample		Cq	Melt Tem
miR-362	A549	25.73	83.5
miR-362	A549	25.98	83.5
miR-362	NTC	N/A	None
miR-362	NTC	N/A	None

[도14]



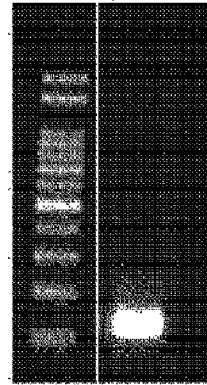
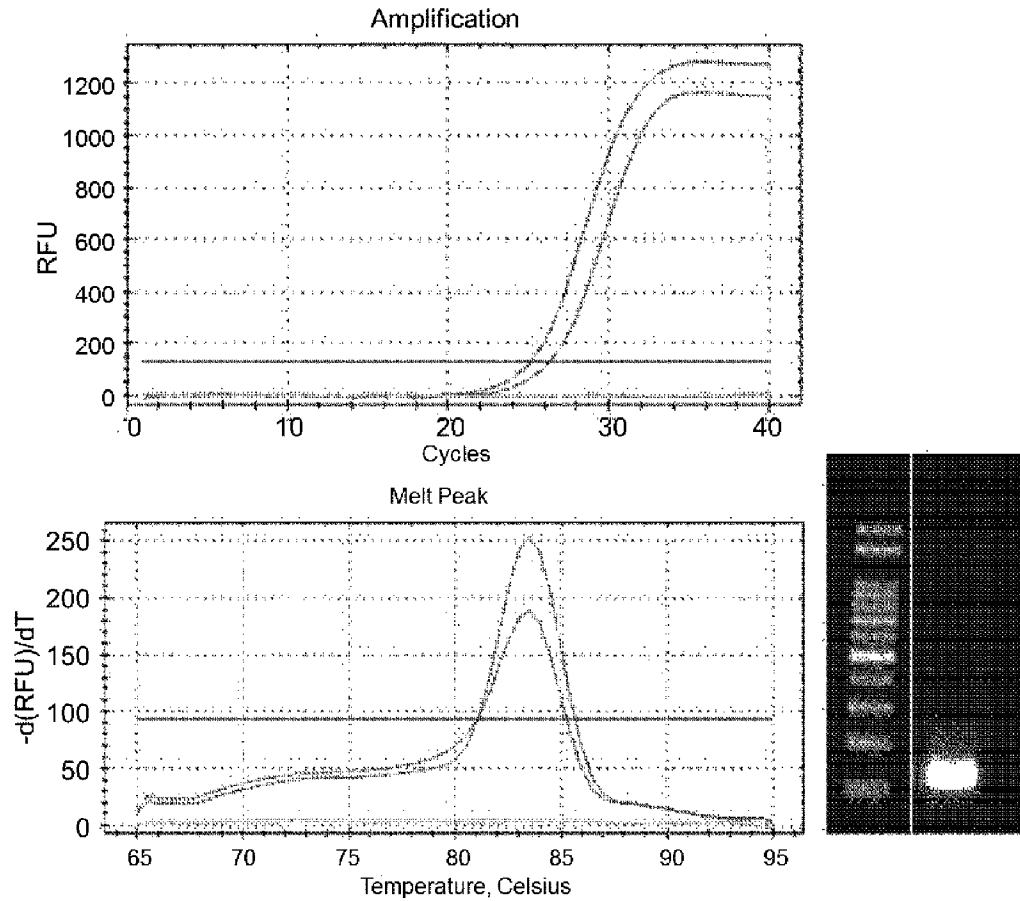
	Sample	Cq	Melt Tem.
miR-29c	A549	24.98	83.5
miR-29c	A549	25.07	83.5
miR-29c	NTC	N/A	None
miR-29c	NTC	N/A	None

[도15]



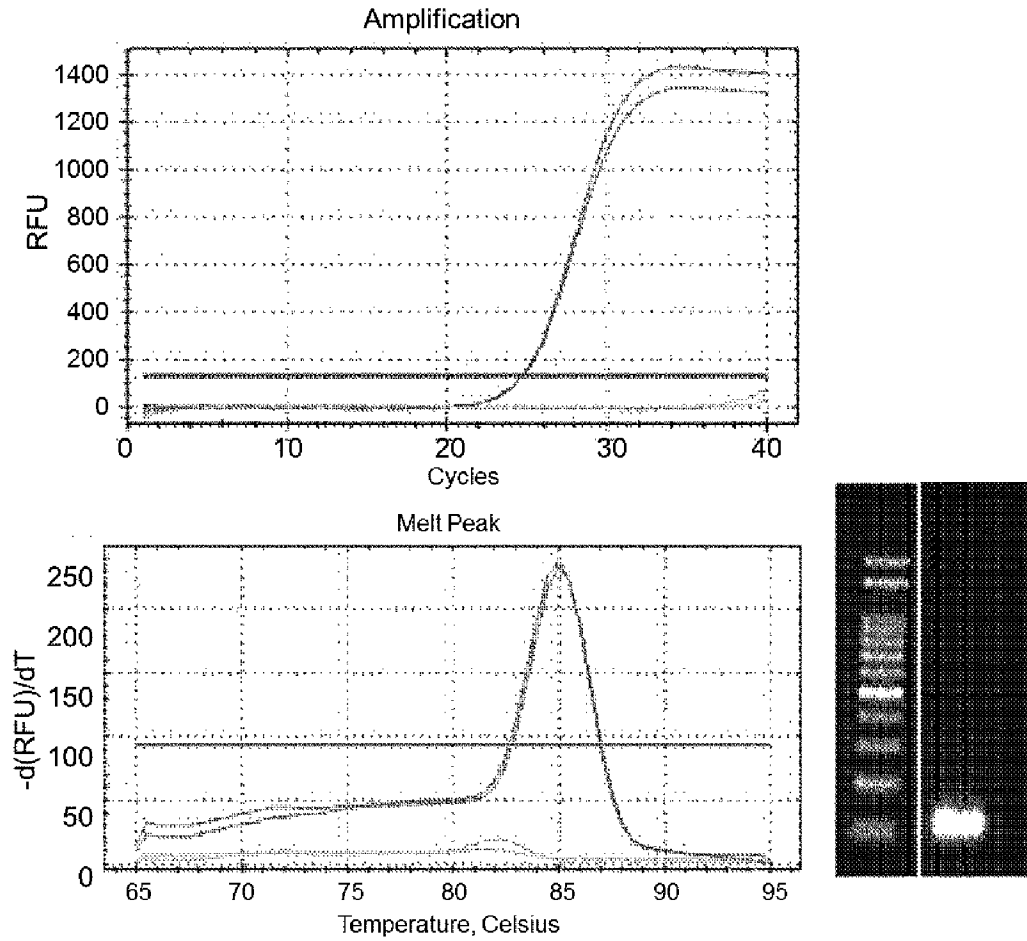
	Sample	Cq	Melt Tem.
miR-106b	A549	20.57	84
miR-106b	A549	20.48	84
miR-106b	NTC	N/A	None
miR-106b	NTC	N/A	None

[도16]



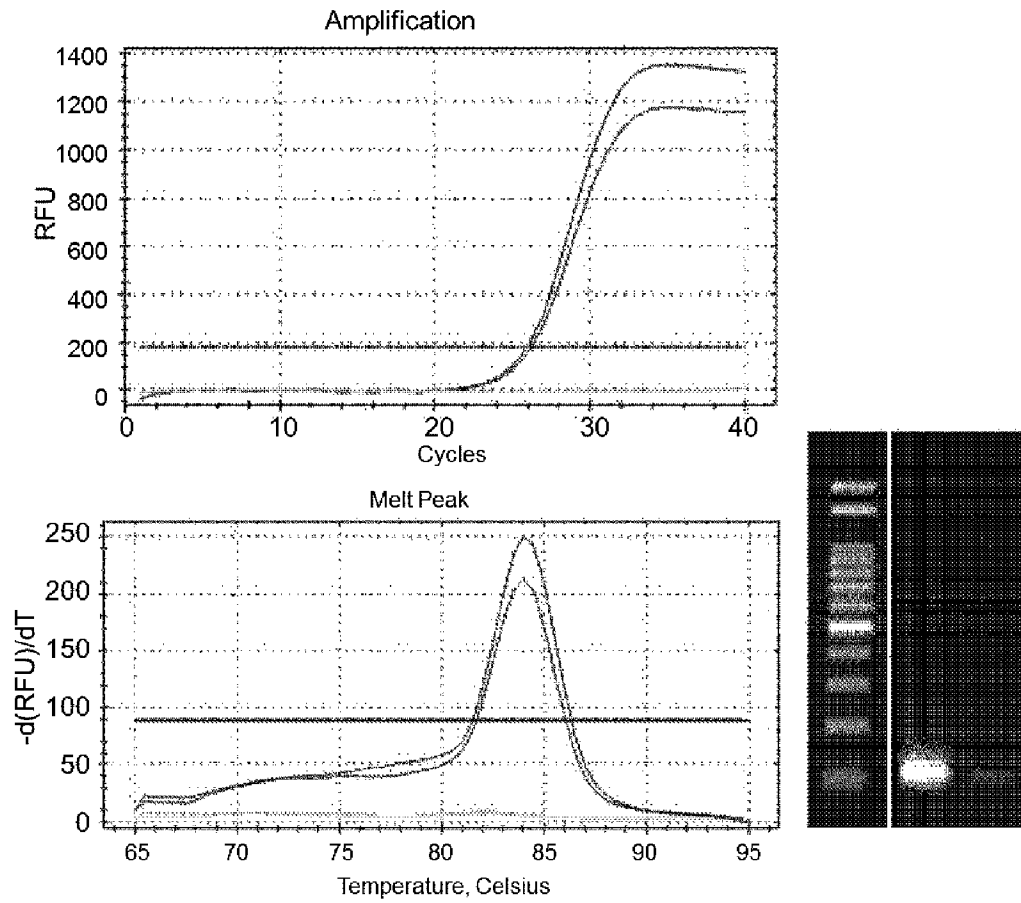
Sample	Cq	Melt Tem.
miR-200c A549	26.33	83.5
miR-200c A549	25.15	83.5
miR-200c NTC	N/A	None
miR-200c NTC	N/A	None

[도17]



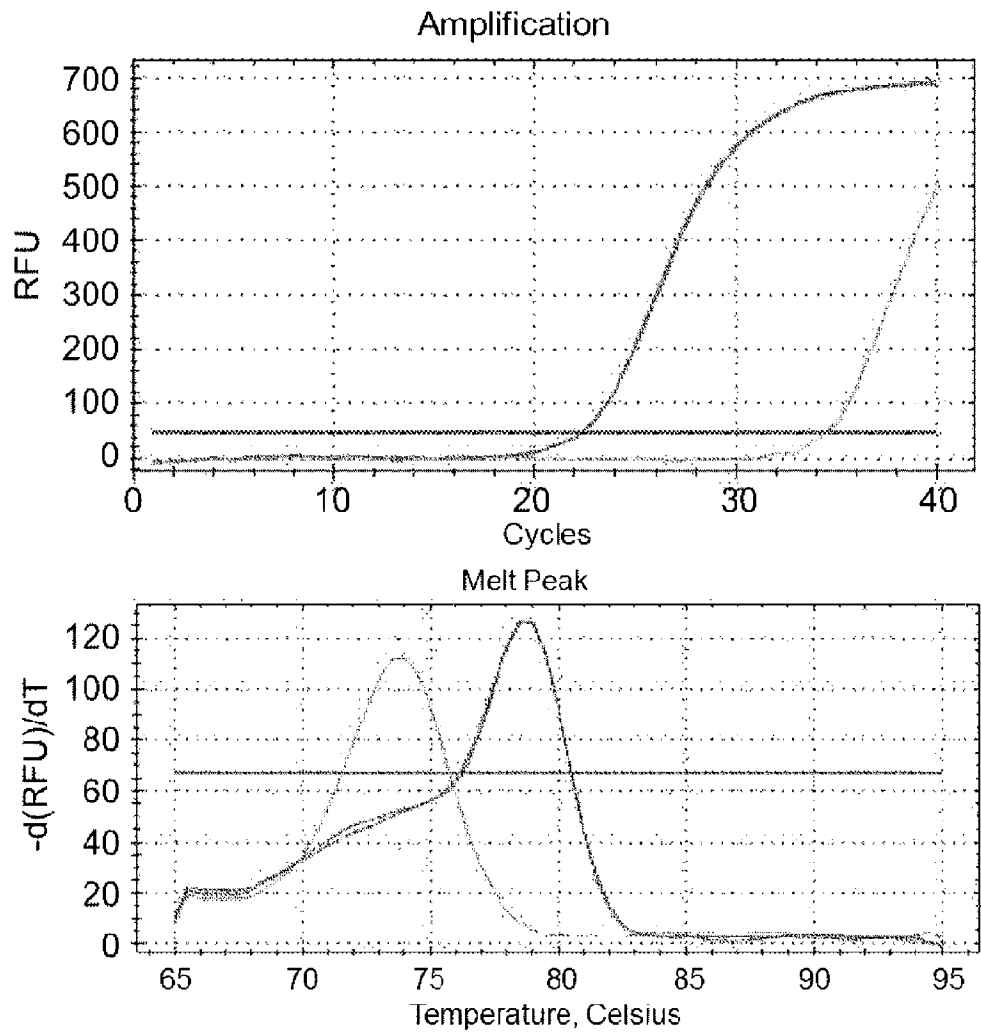
Sample		Cq	Melt Tem.
miR-127	A549	24.67	85
miR-127	A549	24.73	85
miR-127	NTC	N/A	None
miR-127	NTC	N/A	None

[도18]

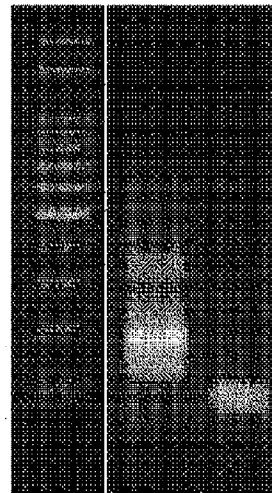


Sample		Cq	Melt Tem.
miR-145	A549	25.9	84
miR-145	A549	26.18	84
miR-145	NTC	N/A	None
miR-145	NTC	N/A	None

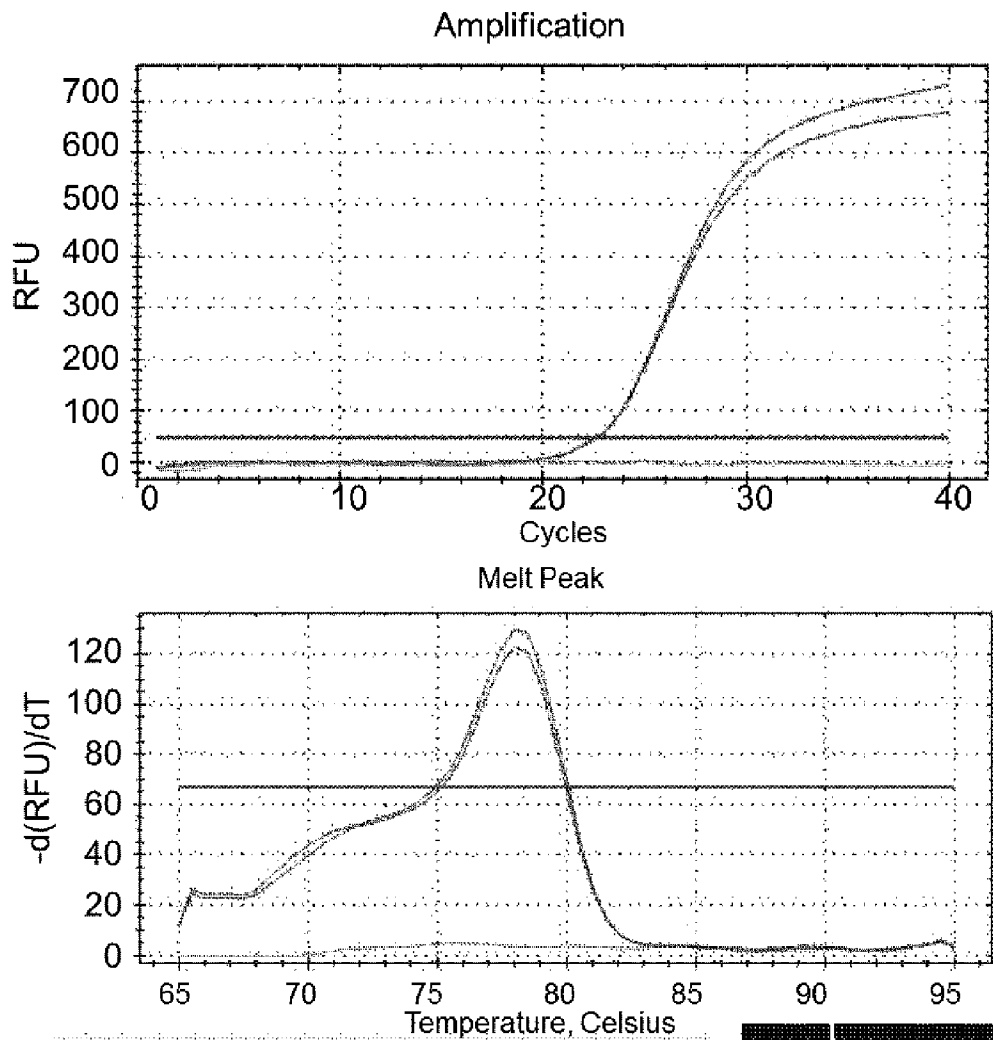
[도19]



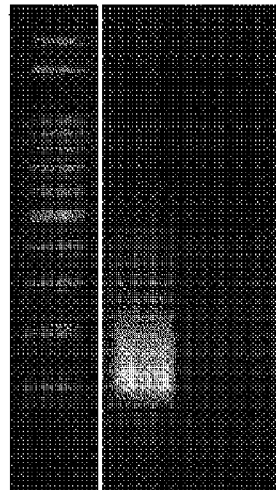
Sample		Cq	Melt Tem.
miR-532	A549	22.3	79
miR-532	A549	22.3	78.5
miR-532	NTC	34.45	74



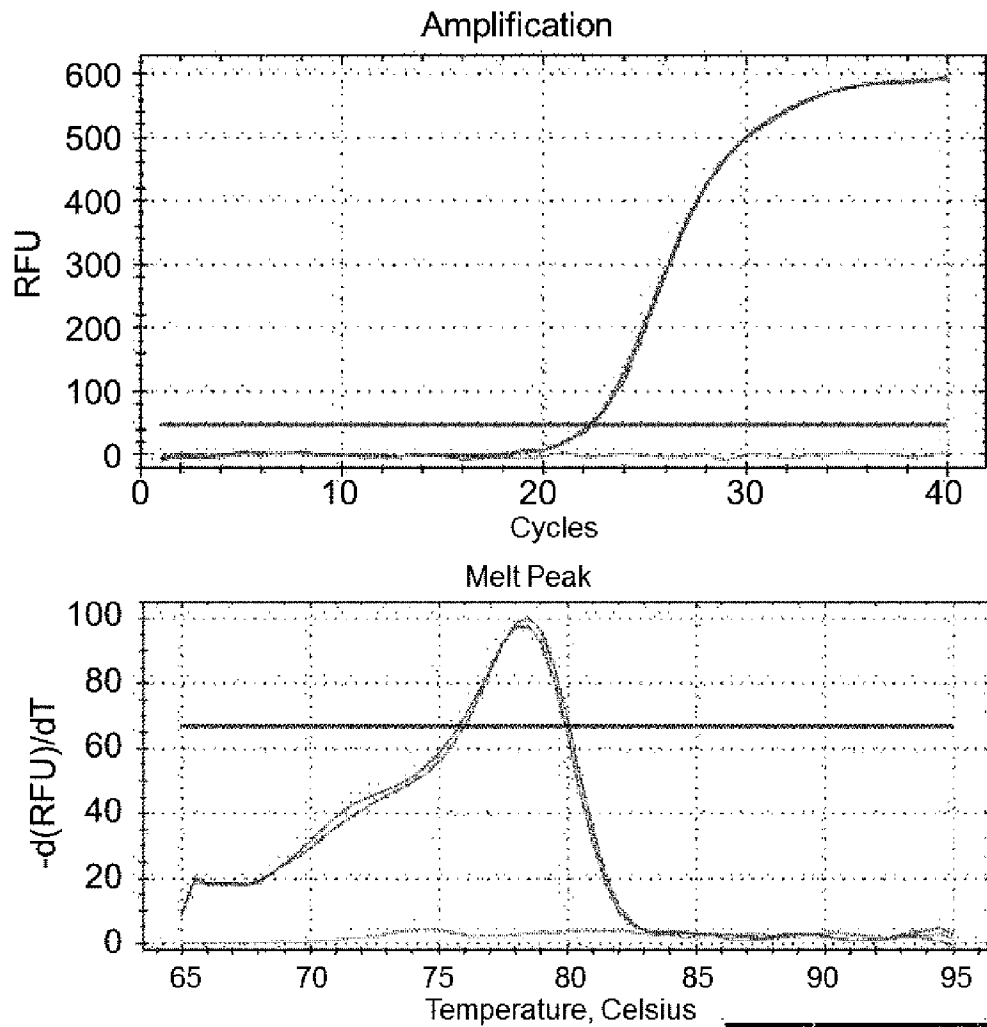
[도20]



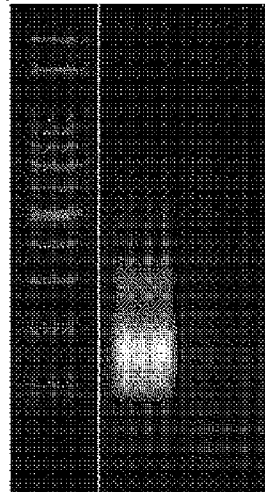
	Sample	Cq	Melt Tem.
miR-196b	A549	22.6	78
miR-196b	A549	22.49	78
miR-196b	NTC	N/A	None



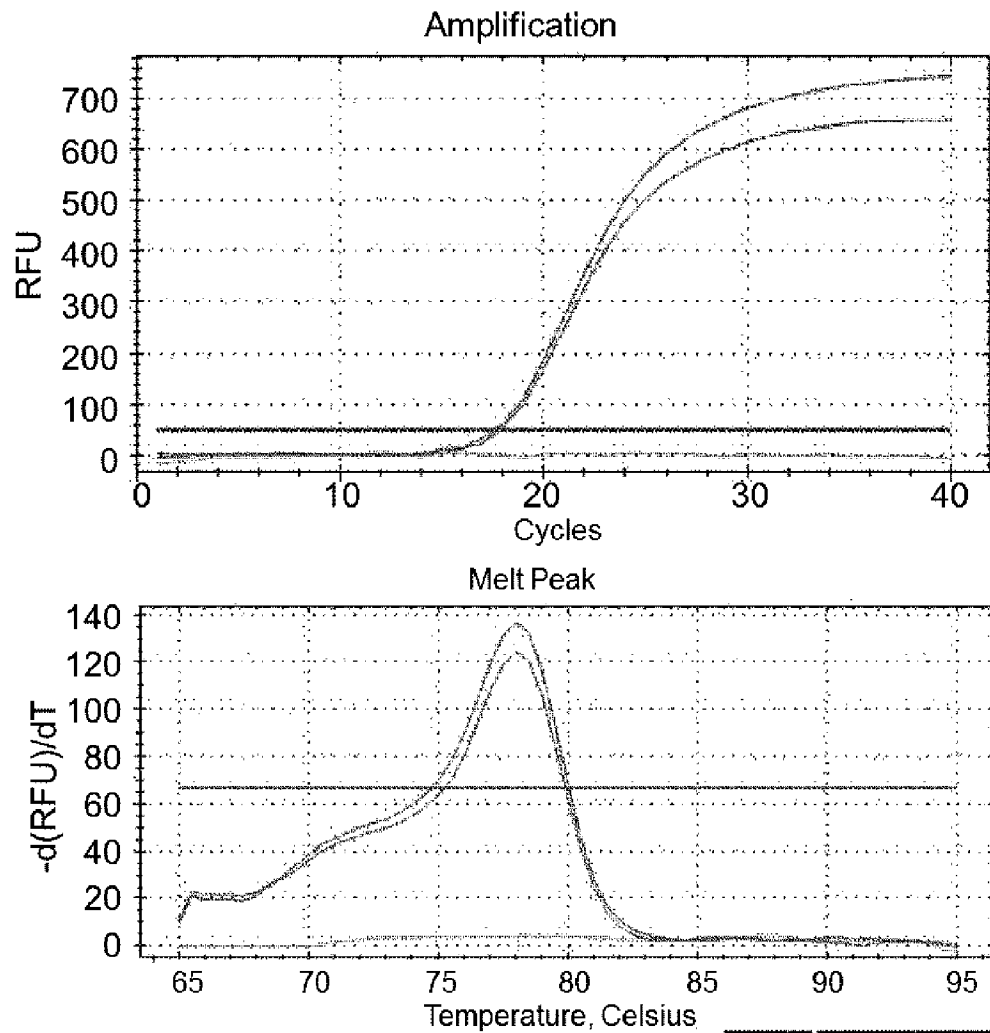
[도21]



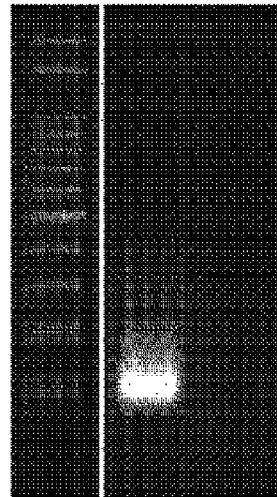
Sample		Cq	Melt Tem.
miR-362	A549	22.21	78.5
miR-362	A549	22.35	78.5
miR-362	NTC	N/A	None



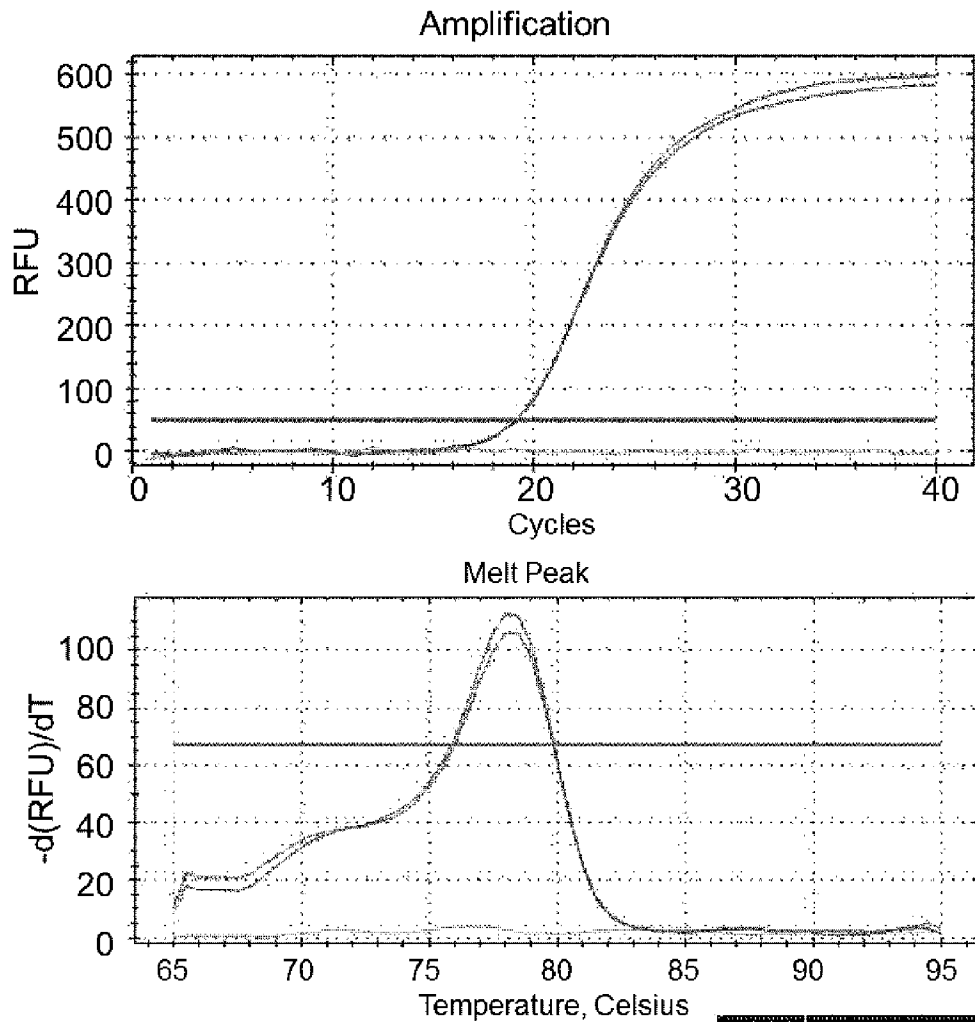
[도22]



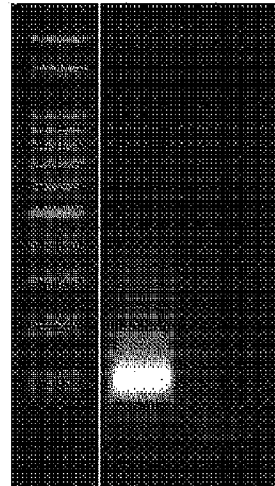
Sample		Cq	Melt Tem.
miR-29c	A549	17.49	78
miR-29c	A549	17.8	78
miR-29c	NTC	N/A	None



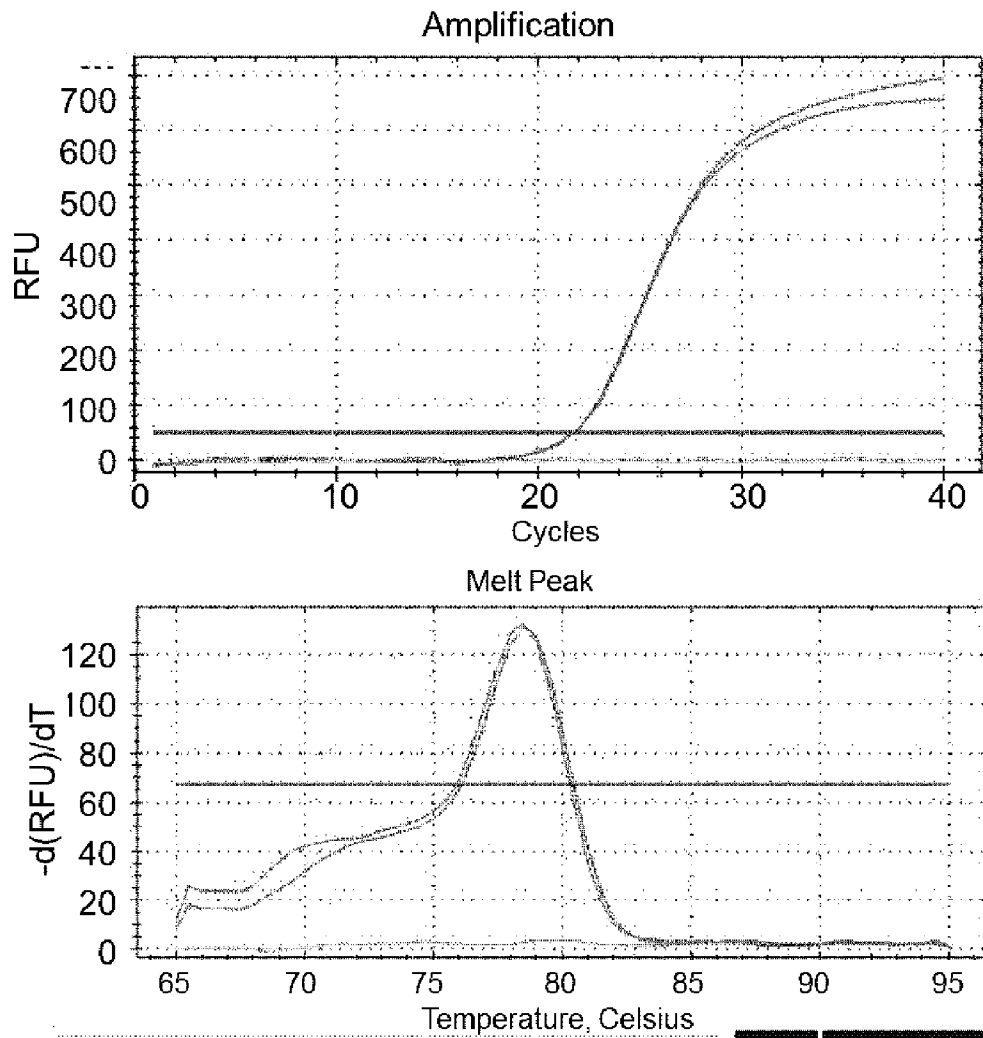
[도23]



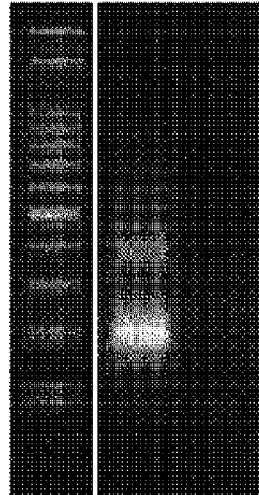
Sample	Cq	Melt Tem.
miR-106b A549	19.04	78
miR-106b A549	19.03	78
miR-106b NTC	N/A	None



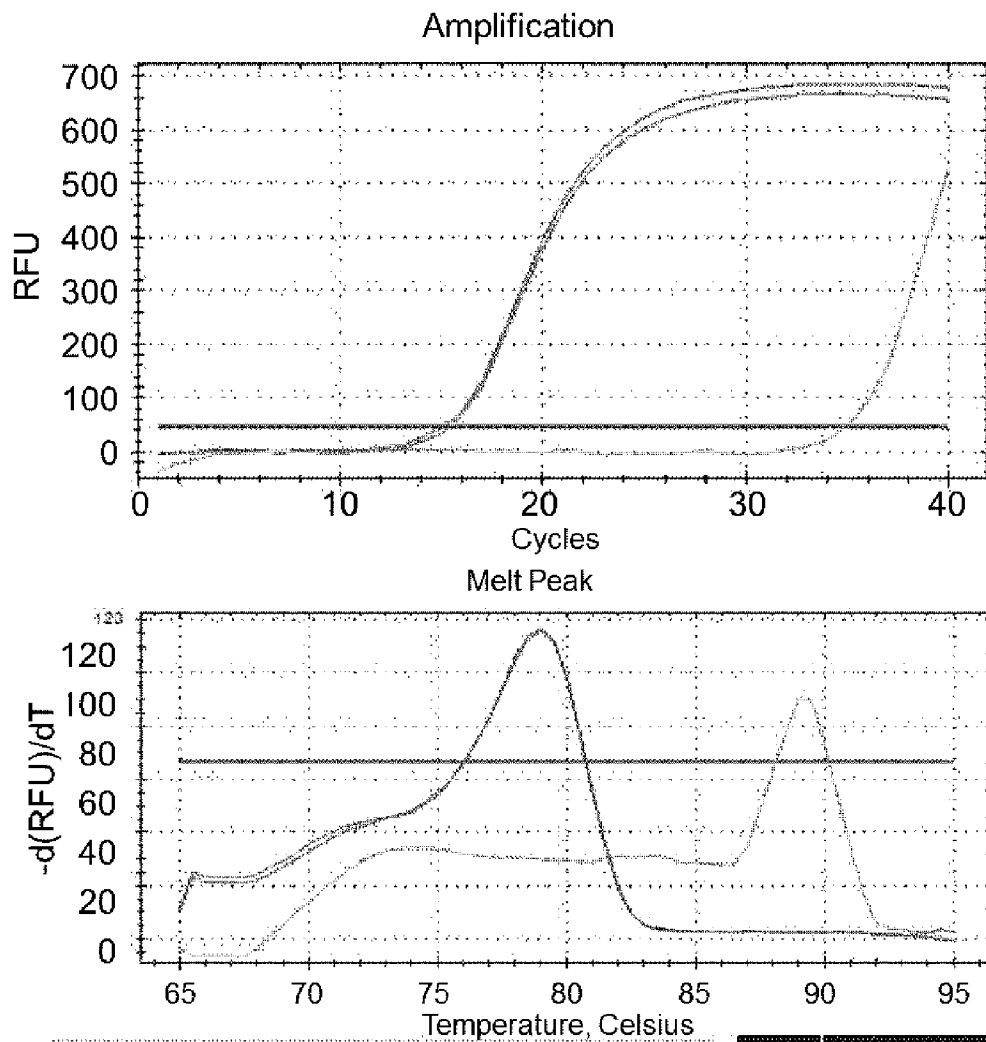
[도24]



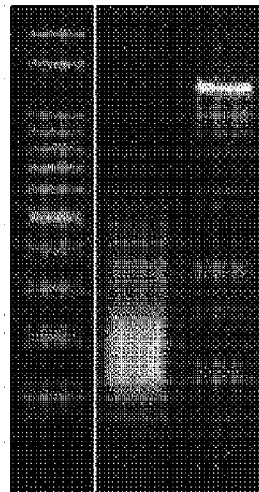
	Sample	Cq	Melt Tem.
miR-200c	A549	21.63	78.5
miR-200c	A549	21.63	78.5
miR-200c	NTC	N/A	None



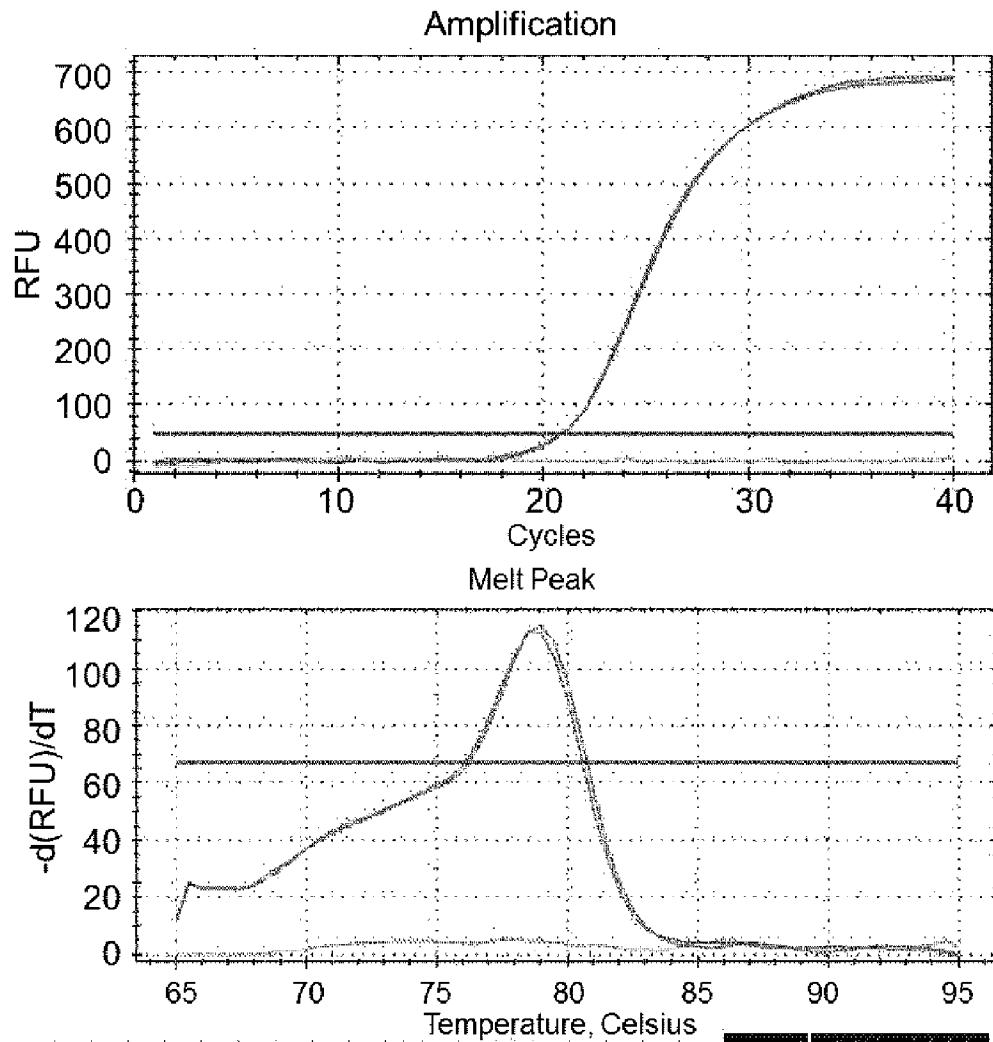
[도25]



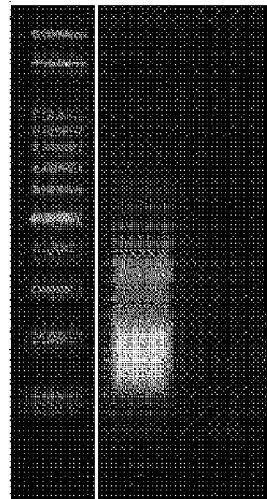
Sample		Temperature, Celsius	
		Cq	Melt Tem.
miR-127	A549	15.39	79
miR-127	A549	15.13	79
miR-127	NTC	35.03	89



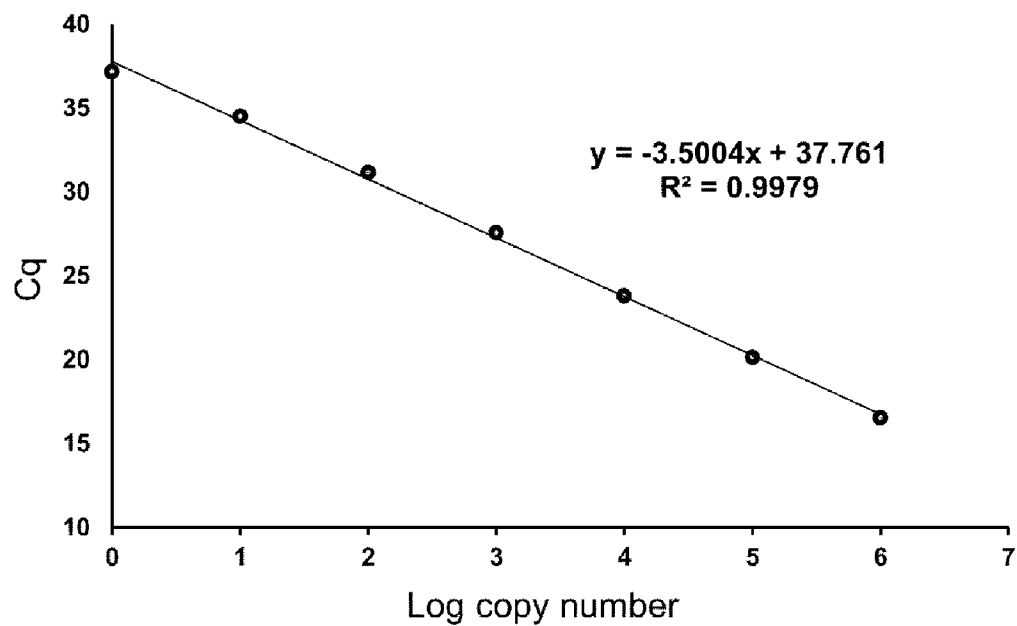
[도26]



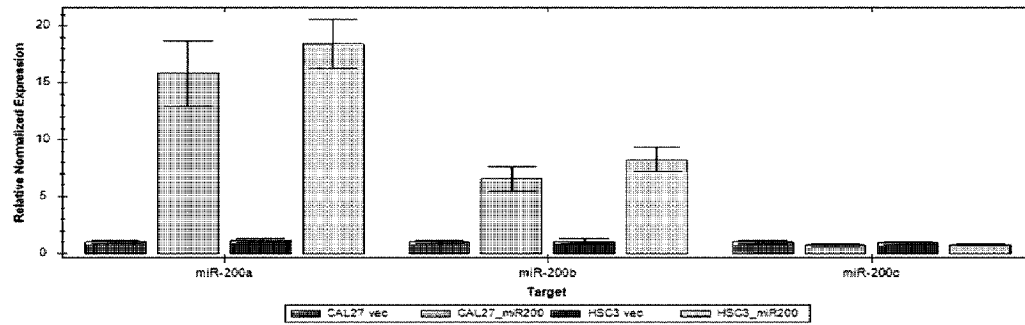
Sample		Cq	Melt Tem.
miR-145	A549	20.93	78.5
miR-145	A549	20.91	79
miR-145	NTC	N/A	None



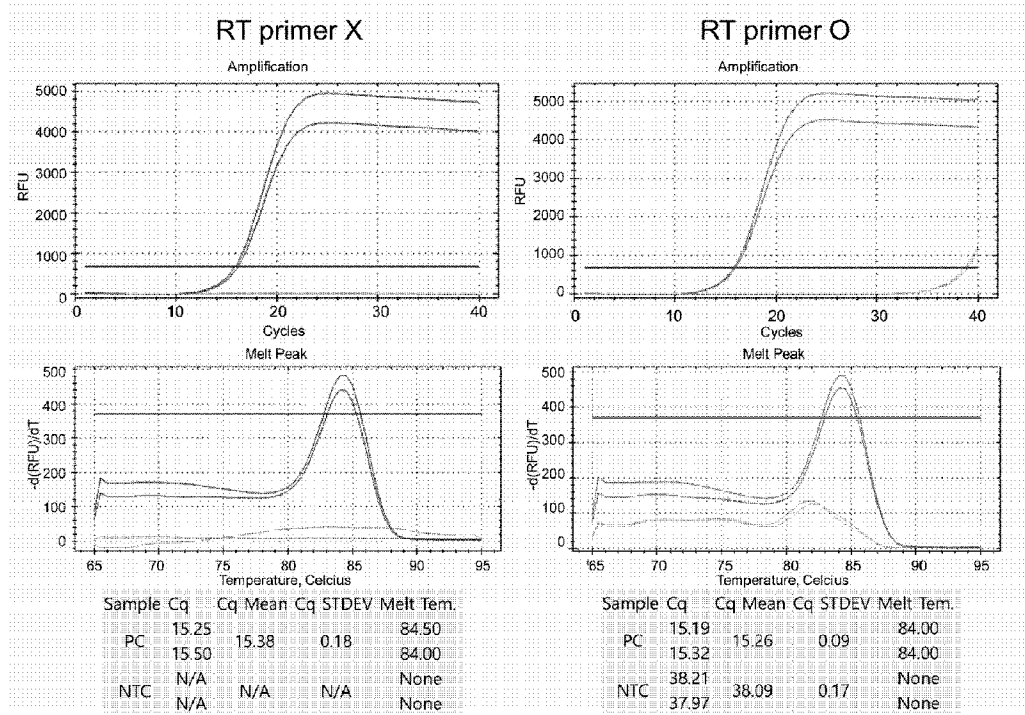
Company Q miR Multi Assay Kit™



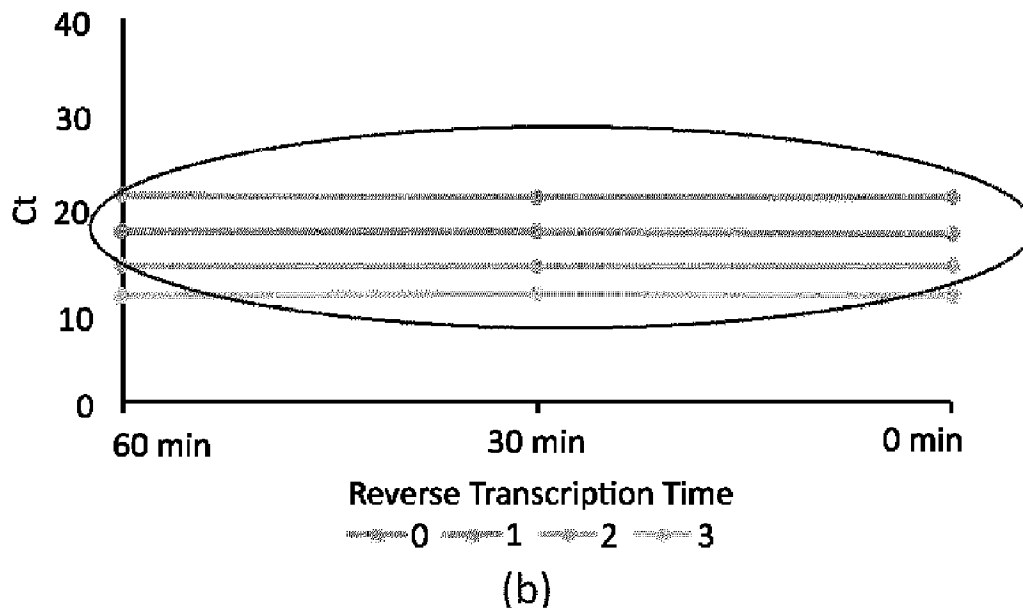
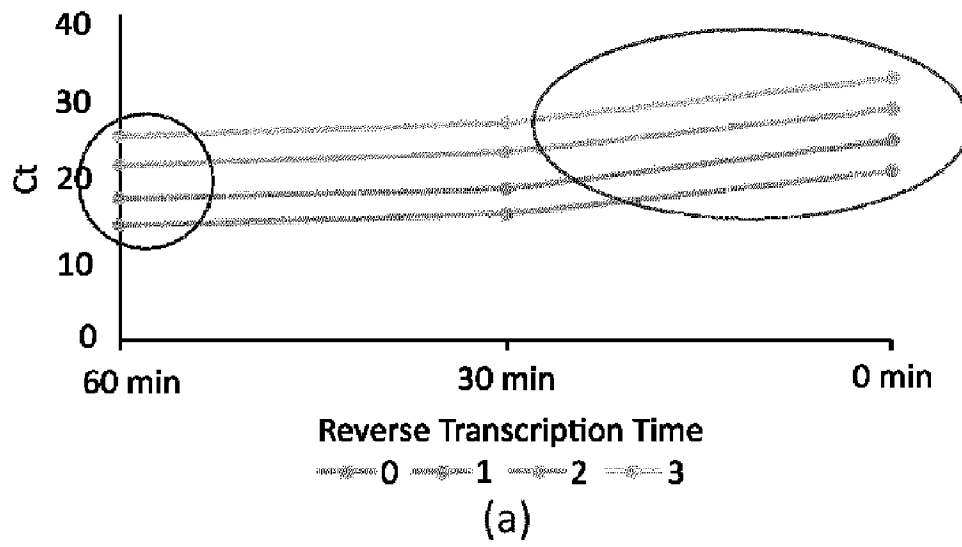
[도30]



[도31]



[도32]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/007804

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/68; C07H 21/04; C40B 30/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: miRNA detection, adapter, hybridization, reverse primer, poly A polymerase, extension primer, forward primer, reverse primer, PCR

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 8383344 B2 (JACOBSEN, Nana et al.) 26 February 2013 See claims 1, 8-10, 17, 19-21; columns 30-31, 34, 38, 40; and figures 11, 37.	1-21
Y	US 2014-0295434 A1 (WU, Hongfei et al.) 02 October 2014 See claims 11, 14; and figure 1.	1-21
A	EP 2198059 B1 (KUTYAVIN, Igor Vassily) 03 December 2014 See the entire document.	1-21
A	US 2013-0045885 A1 (MOHAPATRA, Shyam S. et al.) 21 February 2013 See the entire document.	1-21
A	KR 10-2009-0017670 A (THIRD WAVE TECHNOLOGIES, INC.) 18 February 2009 See the entire document.	1-21
PX	KR 10-2016-0098097 A (HEIMBIOTEK, INC.) 18 August 2016 See abstract; claims 1-17; and figures 1-2.	1-21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 NOVEMBER 2017 (23.11.2017)

Date of mailing of the international search report

23 NOVEMBER 2017 (23.11.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/007804

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 8383344 B2	26/02/2013	US 2005-0272075 A1	08/12/2005
		US 2011-0076675 A1	31/03/2011
		US 2014-0227689 A1	14/08/2014
		US 8192937 B2	05/06/2012
US 2014-0295434 A1	02/10/2014	CN 102676637 A	19/09/2012
		CN 102676637 B	03/02/2016
		US 2016-0177376 A1	23/06/2016
		US 9290801 B2	22/03/2016
		WO 2012-119471 A1	13/09/2012
EP 2198059 B1	03/12/2014	AU 2008-310955 A1	16/04/2009
		AU 2008-310955 B2	29/01/2015
		CA 2702584 A1	16/04/2009
		EP 2198059 A1	23/06/2010
		JP 2011-501663 A	13/01/2011
		JP 5486501 B2	07/05/2014
		US 2010-0304442 A1	02/12/2010
		US 2014-0170666 A1	19/06/2014
		US 8637276 B2	28/01/2014
		US 8980558 B2	17/03/2015
		WO 2009-048928 A1	16/04/2009
US 2013-0045885 A1	21/02/2013	WO 2011-103502 A2	25/08/2011
		WO 2011-103502 A3	12/01/2012
KR 10-2009-0017670 A	18/02/2009	AU 2003-297541 A1	14/07/2004
		AU 2007-254852 A1	13/12/2007
		AU 2007-254852 B2	08/03/2012
		AU 2012-203393 A1	28/06/2012
		AU 2012-203393 B2	24/07/2014
		AU 2012-203393 B9	11/12/2014
		CA 2510381 A1	08/07/2004
		CA 2510381 C	08/07/2014
		CA 2586246 A1	11/05/2006
		CA 2654016 A1	13/12/2007
		CA 2654016 C	05/01/2016
		CA 2847588 A1	08/07/2004
		CN 101341258 A	07/01/2009
		CN 101541975 A	23/09/2009
		CN 101541975 B	03/04/2013
		CN 103146825 A	12/06/2013
		CN 103146825 B	25/08/2017
		CN 1753993 A	29/03/2006
		EP 1573009 A2	14/09/2005
		EP 1573009 B1	21/09/2011
		EP 1812604 A2	01/08/2007
		EP 2029774 A1	04/03/2009
		EP 2029774 B1	01/04/2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/007804

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		EP 2361991 A1	31/08/2011
		EP 2522751 A1	14/11/2012
		HK 1133044 A1	06/12/2013
		JP 2006-510372 A	30/03/2006
		JP 2008-518621 A	05/06/2008
		JP 2009-538627 A	12/11/2009
		JP 2013-176378 A	09/09/2013
		JP 4230457 B2	25/02/2009
		JP 5260503 B2	14/08/2013
		JP 5792223 B2	07/10/2015
		KR 10-1105564 B1	17/01/2012
		SG 172652 A1	28/07/2011
		US 2005-0074788 A1	07/04/2005
		US 2006-0147955 A1	06/07/2006
		US 2008-0131890 A1	05/06/2008
		US 2008-0187926 A1	07/08/2008
		US 2012-0149018 A1	14/06/2012
		US 2012-0231461 A1	13/09/2012
		US 7851150 B2	14/12/2010
		US 8206904 B2	26/06/2012
		US 8609336 B2	17/12/2013
		US 9133503 B2	15/09/2015
		WO 2004-057017 A2	08/07/2004
		WO 2004-057017 A3	10/03/2005
		WO 2006-050499 A2	11/05/2006
		WO 2006-050499 A3	30/09/2010
		WO 2007-143097 A1	13/12/2007
KR 10-2016-0098097 A	18/08/2016	WO 2016-129941 A1	18/08/2016

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68; C07H 21/04; C40B 30/04

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: miRNA 검출, 어댑터, 혼성화, 역전사용 프라이머, poly A 폴리머라제, 연장용 프라이머, 포워드 프라이머, 리버스 프라이머, PCR

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	US 8383344 B2 (JACOBSEN, NANA 등) 2013.02.26 청구항 1, 8-10, 17, 19-21; 컬럼 30-31, 34, 38, 40; 및 도면 11, 37 참조.	1-21
Y	US 2014-0295434 A1 (WU, HONGFEI 등) 2014.10.02 청구항 11, 14; 및 도면 1 참조.	1-21
A	EP 2198059 B1 (KUTYAVIN, IGOR VASSILY) 2014.12.03 전체 문헌 참조.	1-21
A	US 2013-0045885 A1 (MOHAPATRA, SHYAM S. 등) 2013.02.21 전체 문헌 참조.	1-21
A	KR 10-2009-0017670 A (씨드 웨이브 테크놀로지스, 아이앤씨.) 2009.02.18 전체 문헌 참조.	1-21
PX	KR 10-2016-0098097 A ((주) 하임바이오텍) 2016.08.18 요약; 청구항 1-17; 및 도면 1-2 참조.	1-21

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 11월 23일 (23.11.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 11월 23일 (23.11.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



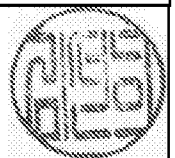
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김선희

전화번호 +82-42-481-5405



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 8383344 B2	2013/02/26	US 2005-0272075 A1 US 2011-0076675 A1 US 2014-0227689 A1 US 8192937 B2	2005/12/08 2011/03/31 2014/08/14 2012/06/05
US 2014-0295434 A1	2014/10/02	CN 102676637 A CN 102676637 B US 2016-0177376 A1 US 9290801 B2 WO 2012-119471 A1	2012/09/19 2016/02/03 2016/06/23 2016/03/22 2012/09/13
EP 2198059 B1	2014/12/03	AU 2008-310955 A1 AU 2008-310955 B2 CA 2702584 A1 EP 2198059 A1 JP 2011-501663 A JP 5486501 B2 US 2010-0304442 A1 US 2014-0170666 A1 US 8637276 B2 US 8980558 B2 WO 2009-048928 A1	2009/04/16 2015/01/29 2009/04/16 2010/06/23 2011/01/13 2014/05/07 2010/12/02 2014/06/19 2014/01/28 2015/03/17 2009/04/16
US 2013-0045885 A1	2013/02/21	WO 2011-103502 A2 WO 2011-103502 A3	2011/08/25 2012/01/12
KR 10-2009-0017670 A	2009/02/18	AU 2003-297541 A1 AU 2007-254852 A1 AU 2007-254852 B2 AU 2012-203393 A1 AU 2012-203393 B2 AU 2012-203393 B9 CA 2510381 A1 CA 2510381 C CA 2586246 A1 CA 2654016 A1 CA 2654016 C CA 2847588 A1 CN 101341258 A CN 101541975 A CN 101541975 B CN 103146825 A CN 103146825 B CN 1753993 A EP 1573009 A2 EP 1573009 B1 EP 1812604 A2 EP 2029774 A1 EP 2029774 B1	2004/07/14 2007/12/13 2012/03/08 2012/06/28 2014/07/24 2014/12/11 2004/07/08 2014/07/08 2006/05/11 2007/12/13 2016/01/05 2004/07/08 2009/01/07 2009/09/23 2013/04/03 2013/06/12 2017/08/25 2006/03/29 2005/09/14 2011/09/21 2007/08/01 2009/03/04 2015/04/01

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

EP 2361991 A1 2011/08/31
EP 2522751 A1 2012/11/14
HK 1133044 A1 2013/12/06
JP 2006-510372 A 2006/03/30
JP 2008-518621 A 2008/06/05
JP 2009-538627 A 2009/11/12
JP 2013-176378 A 2013/09/09
JP 4230457 B2 2009/02/25
JP 5260503 B2 2013/08/14
JP 5792223 B2 2015/10/07
KR 10-1105564 B1 2012/01/17
SG 172652 A1 2011/07/28
US 2005-0074788 A1 2005/04/07
US 2006-0147955 A1 2006/07/06
US 2008-0131890 A1 2008/06/05
US 2008-0187926 A1 2008/08/07
US 2012-0149018 A1 2012/06/14
US 2012-0231461 A1 2012/09/13
US 7851150 B2 2010/12/14
US 8206904 B2 2012/06/26
US 8609336 B2 2013/12/17
US 9133503 B2 2015/09/15
WO 2004-057017 A2 2004/07/08
WO 2004-057017 A3 2005/03/10
WO 2006-050499 A2 2006/05/11
WO 2006-050499 A3 2010/09/30
WO 2007-143097 A1 2007/12/13

KR 10-2016-0098097 A

2016/08/18

WO 2016-129941 A1

2016/08/18