(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0044097
(43) 공개일자 2011년04월28일

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0100929
(22) 출원일자 2009년10월22일
심사청구일자 2009년10월22일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
백승필
대전광역시 유성구 하기동 송림마을아파트 602동 1604호
(74) 대리인
구현서

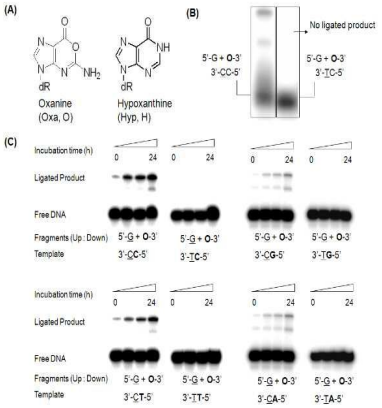
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 손상된 또는 변형 염기를 포함한 라이게이션 단편서열을 이용한 리가제 기반 단일염기다형성 분석방법 및 그 단편서열을 포함하는 단일염기다형성 분석용 시스템

(57) 요 약

본 발명은 a) 표적 핵산을 포함하는 샘플로부터 얻은 DNA 주형에 손상된 또는 변형 염기를 함유한 라이게이션 단편서열 및 DNA 리가제를 처리하는 단계; 및 b) 상기 처리 산물의 라이게이션 반응 산물을 분석하는 단계를 포함하는 단일염기다형성(SNP) 분석 방법 및 손상된 염기를 함유한 라이게이션 단편서열을 포함하는 단일염기다형성(SNP) 분석용 칩, 파티클 또는 키트에 관한 발명이다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 R0811021
부처명 한국학술진흥재단
연구관리전문기관
연구사업명 기초과학 『하반기_단독』
연구과제명 자체반응성 DNA올리고머를 이용한 새로운 이중 프로브 기능형 DNA 어레이 시스템의 개발
기여율
주관기관 한국학술진흥재단
연구기간 2008년 11월 01일 ~ 2009년 10월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

a) 표적 핵산을 포함하는 샘플로부터 얻은 DNA 주형에 손상된 또는 변형된 염기를 함유한 라이게이션 단편서열 및 DNA 리가제를 처리하는 단계; 및

b) 상기 처리 산물의 라이게이션 반응 산물을 분석하는 단계를 포함하는 단일염기다형성(SNP) 분석 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 방법은 손상된 또는 변형된 염기를 함유한 라이게이션 단편을 다운스트림 서열로 이용한 것을 특징으로 하는 SNP 분석방법

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 다운스트림 서열은 동위원소 표지된 것을 특징으로 하는 SNP 분석방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 DNA 리가제는 T4 DNA 리가제인 것을 특징으로 하는 SNP 분석방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 손상된 또는 변형된 염기는 옥사닌인 것을 특징으로 하는 SNP 분석방법.

청구항 6

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 분석방법은 그 결과를 통하여 업스트림의 G:T 와 G:C 구별하는 것을 특징으로 하는 SNP 분석방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 라이게이션 단편 서열은 서열번호 4에 기재된 단편인 SNP 분석방법.

청구항 8

제 1항 또는 제 6항에 있어서, 상기 손상된 또는 변형된 염기를 함유한 라이게이션 단편 서열을 칩 또는 파티클 상에 고정화하는 것을 특징으로 하는 SNP 분석 방법.

청구항 9

손상된 또는 변형된 염기서열을 함유한 라이게이션 단편이 고정된 SNP 분석용 칩.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 손상된 또는 변형된 염기서열은 옥사닌인 것을 특징으로 하는 SNP 분석용 칩.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 라이게이션 단편 서열은 서열번호 4에 기재된 단편인 SNP 분석용 칩.

청구항 12

제 9항에 있어서, 상기 라이게이션 단편은 동위원소 표지된 단편인 SNP 분석용 칩.

청구항 13

손상된 또는 변형된 염기서열을 함유한 라이게이션 단편이 고정된 SNP 분석용 파티클.

청구항 14

제 13에 있어서, 상기 손상된 또는 변형된 염기서열은 옥사닌인 것을 특징으로 하는 SNP 분석용 파티클.

청구항 15

제 13항에 있어서, 상기 라이게이션 단편 서열은 서열번호 4에 기재된 단편인 SNP 분석용 파티클.

청구항 16

제 13항에 있어서, 상기 라이게이션 단편은 동위원소 표지된 단편인 SNP 분석용 파티클.

청구항 17

손상된 또는 변형된 염기를 함유한 라이게이션 단편서열 및 DNA 리가제를 유효성분으로 함유하는 SNP 분석용 키트.

청구항 18

제 17항에 있어서 상기 손상된 또는 변형된 염기는 옥사닌인 것을 특징으로 하는 SNP 분석용 키트.

청구항 19

제 17항에 있어서, 상기 라이게이션 단편 서열은 서열번호 4에 기재된 단편인 SNP 분석용 키트.

청구항 20

제 17항에 있어서, 상기 DNA 리가제는 T4 DNA 리가제인 SNP 분석용 키트.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 a) 표적 핵산을 포함하는 샘플로부터 얻은 DNA 주형에 손상된 또는 변형 염기를 함유한 라이게이션 단편서열 및 DNA 리가제를 처리하는 단계; 및 b) 상기 처리 산물의 라이게이션 반응 산물을 분석하는 단계를 포함하는 단일염기다형성(SNP) 분석 방법 및 손상된 또는 변형 염기를 함유한 라이게이션 단편서열을 포함하는 단일염기다형성(SNP) 분석용 칩, 파티클 또는 키트에 관한 발명이다.

배 경 기 술

[0002] 동종에 속하는 생물학적 개체의 게놈에 포함된 유전자 코드는 서로 일치하지 않고, 다형성(polymorphisms)으로 불리는 뉴클레오티드 서열상의 차이는 공지되어 있다. 1 내지 10개의 뉴클레오티드(들)가 결실 또는 삽입된 것, 특정 뉴클레오티드 서열이 이중으로 중복된 것 등이 다형으로서 공지되어 있다. 단일 뉴클레오티드가 또다른 뉴클레오티드에 의해 대체된 것을 단일 뉴클레오티드(염기) 다형성(single nucleotide polymorphisms;SNP)이라 명명한다.

[0003] SNPs를 검출하는 통상의 방법은 혼성화에 기초한 것, 프라이머 신장에 기초한 것 및 효조의 기질 특이성을 이용한 것으로 통상 분류된다.

[0004] 염기 치환의 존재는 혼성화 방법에 따라 프로브를 핵산 샘플에 혼성화시켜 검출한다. 이 방법에 따르면, 혼성화가 단일 뉴클레오티드상의 차이에 의해 영향을 받도록 프로브 및 혼성화 조건을 찾는 것이 필요하다. 따라서, 고도의 재현가능한 검출 시스템을 구축하는 것은 어렵다.

[0005] 사이클 프로브 반응을 사용한 돌연변이 검출 방법(참조, 예:United States Patent No. 5,660,988)은 통상의 방법을 예시하다. taqMan 방법을 사용한 돌연변이 검출 방법(참조, 예:United States Patent Nos. 5,210,015 및 5,487,972)은 또 다른 방법을 예시한다. 추가의 예는 하기와 같다:프라이머의 3'말단이 염기 치환이 그에 대하여 검출되는 뉴클레오티드 부분에 어닐링되는 상기 프라이머를 사용하는 프라이머 신장 반응의 존재에 기초하여 염기 치환을 검출하는 방법(참조, 예, United States Patent No. 5,137,806); 검출되는 염기 치환 부위가 3' 말단으로부터 두번째 뉴클레오티드에 위치하는 프라이머를 사용하는 프라이머 신장 반응의 존재에 기초하여 염기 치환을 검출하는 방법(참조, 예, WO 01/42498); 및 프라이머의 3'말단이 염기 치환이 그에 대하여 검출되는 뉴클레오티드에 대하여 3'측상에 근접하게 위치하는 뉴클레오티드에 어닐링하는 프라이머를 사용하여 프라이머

로 혼입된 뉴클레오티드를 식별하여 관심의 대상이 되는 부위의 돌연변이의 존재 및 그 부위의 뉴클레오티드를 결정하는 방법. 추가로, DNA 리가제를 사용하는 방법이 공지되어 있다. 이 방법에 따르면, 염기 치환은 프로브의 말단 부분은 뉴클레오티드 치환인 검출되는 뉴클레오티드 부분과 일치하는 프로브의 인접한 프로브와의 결찰의 존재 여부에 기초하여 검출한다. 추가로, 더블-스트랜드 핵산의 특이 구조를 인지하고 절단하는 활성을 갖는 효소를 사용하는 방법, 예로서 인베이터(invader) 방법 (참조, 예, United States Patent No. 5,846,717)을 포함한다.기 언급한 방법들은 하기와 같은 문제점들을 갖고 있다: 상기 방법은 미량의 표적 핵산 검출에는 사용될 수 없고; 엄격한 온도 이력 조건하에서 수행되어야 하며; 표적 핵산을 어닐링하는 엄격한 조절을 필요로 하고; 검출에 대한 특별한 성질을 갖는 효소를 필요로 한다.

[0006] 이어서, 스트랜드 치환-형 핵산 증폭 방법 예를 들면, ICAN 방법 (참조, 예, WO 00/56877 및 WO 02/16639)이 등온 조건하에서 표적 핵산을 증폭시키는 방법으로서 개발되었다. 추가로 UCAN 방법 (참조, 예, WO 02/64833)은 DNA-RNA-DNA-형 키메라 올리고뉴클레오티드를 사용하여 유전자의 다형성을 타이핑하는 방법으로서 개발되었다.

[0007] 또한 단일 뉴클레오티드 다형성(SNPs)은 한 개의 DNA 염기서열의 변화로서 수많은 유전적 질병에 관여된다. 인간 유전자의 SNP를 검출하기 위한 효과적인 방법을 찾으려는 요구가 급격히 증가하고 있는데, 이 방법들은 부분적으로 분자 진단 테스트의 의학적인 용도와도 호환된다. 수많은 SNP 검별 방법이 이미 개발되어 졌다. 대표적인 것으로, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) assay, single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis, allele-specific priming of the polymerase chain reaction (allele-specific PCR), 리가제 amplification reaction 등이 있다.

[0008] 지난 20년간, 알려지지 않은 DNA의 유전자형 변화를 감지하기 위한 방법으로서 전문가들의 이목은 라이게이션 assay에 초점이 맞춰져 왔다 (도 1A). 이 방법은 아주 매혹적인데 특이성, 속도, 진단 시험의 자동화, PCR과의 호환성 등이 그 이유가 될 수 있다. 주로 열안정적인 DNA 리가제가 라이게이션 assay에 널리 사용된다. 이 방법의 원리는 DNA 리가제가 서로 맞지 않는 비 상보적 염기쌍을 포함한 DNA 서열을 잘 봉합하지 못하는 점에 착안한다.

[0009] 전통적이고 가장 널리 쓰이고 있는 DNA 리가제는 T4 DNA 리가제이다. 이것은 기존에 알려진 다른 리가제 보다 더 빠르게 pentamer의 라이게이션을 촉매 할 수 있다. 따라서, 빠르고 간편한 리가제 기반 SNP 검별에서 T4 DNA 리가제는 이상적인 후보가 될 수 있다. 그러나, T4 리가제를 비롯한 다른 DNA 리가제들의 mismatch 변별력이 높지 못하다는 단점이 있다. 특히 G:T mismatch일 때, 불가피하게 잘못된 양성 결과가 따르는 점이 있고, SNP 분별력을 위해선 그러한 결과가 나오면 안된다. (도면 1B).

[0010] Deng 연구팀은 최근 oligonucleotide 라이게이션 assay의 사용법을 발표했는데, 이것은 T4 DNA 리가제를 이용한 DNA chip 방법을 기반으로 한다(Biosens. Bioelectron, 19 (2004) 1277-1283). 그러나, 여기에서도 G:T mismatch 결과가 나타났고, 정확한 C/T 타입 분석이 어렵기 때문에 여전히 가장 다루기 힘든 문제점으로 남아 있다. 따라서, G:T mismatch를 정확하게 검출해내는 것은 SNP의 C/T 타입 분석을 위한 T4 DNA 리가제 기반 검별 전략에서의 장애물이며 해결해야할 과제이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0011] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 새로운 DNA의 유전자형 변화를 감지하기 위한 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 새로운 DNA의 유전자형 변화를 감지하기 위한 시스템을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 새로운 DNA의 유전자형 변화를 감지하기 위한 키트를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0014] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 a) 표적 핵산을 포함하는 샘플로부터 얻은 DNA 주형에 손상된 또는 변형된 염기를 함유한 라이게이션 단편서열 및 DNA 리가제를 처리하는 단계; 및 b) 상기 처리 산물의 라이게이션 반응 산물을 분석하는 단계를 포함하는 단일염기다형성(SNP) 분석 방법을 제공한다.

[0015] 본 명세서에서 사용되는 "유전자 다형성"은 동종의 유기체 군집에서 개체 사이의 유전자의 뉴클레오티드 서열상

의 차이를 언급한다. 유전자 다형성을 구성하는 뉴클레오티드 서열상의 차이는 특정 형태로 제한하지 않는다. 하기 기술하는 바, "염기 치환", "결실 돌연변이" 및 "삽입 돌연변이"와 같은 다양한 타입을 포함한다. 유전자 정보상의 차이를 또한 변이로 명명한다.

[0016] 본 명세서에서 사용되는 "염기 치환"은 핵산의 특정 부위에서 뉴클레오티드가 또다른 뉴클레오티드로 대체된 것을 언급한다. 본 발명에 따른 "염기 치환"과 관련하여 특별한 제한은 없다. 하나 이상의 뉴클레오티드(들)이 치환될 수 있다. 뉴클레오티드 서열에서 단일 뉴클레오티드에 대하여 관찰되는 치환은 "단일 뉴클레오티드 다형성(SNP)"으로 명명된다. 본 발명에 따른 "염기 치환"은 또한 핵산 내로 인공적으로 도입된 염기 치환을 포함한다.

[0017] 본 발명은 유전자상의 게놈 다형 또는 변이, 특히, 염기 치환 (예로서, SNP) 검출 또는 유전자 특정 부위에서의 삽입 돌연변이 및/또는 결실 돌연변이의 검출에 적절하다.

[0018] 단일-스트랜드 또는 더블-스트랜드 핵산 (RNA 또는 DNA)을 본 발명의 유전자 다형성 타이핑 방법에서 타이핑에 대한 대상으로서 작용하는 유전자를 포함하는 핵산(표적 핵산)으로서 사용할 수 있다. 사용하는 뉴클레아제에 따라, 표적 핵산으로서 RNA를 사용하는 것은 어려울 수 있다. 이러한 경우, RNA의 염기 치환은 주형으로서 RNA를 사용하여 cDNA를 제조하고 표적 핵산으로서 cDNA를 사용하여 검출될 수 있다.

[0019] 본 발명에 따라, 표적 핵산을 포함하는 샘플을 타이핑 반응에 사용할 수 있다. 세포, 조직(생검 샘플 등), 전체 혈액, 혈청, 뇌척수액, 정액, 침, 가래, 소변, 대변, 모발 및 세포 배양액과 같은 표적 핵을 포함할 수 있는 어느 샘플을 제한하지 않고 사용할 수 있다. 상기 본 발명의 방법은 세포 용해 및 샘플로부터 핵산의 추출 및 정제를 포함한다.

[0020] 본 발명에서 '손상된 또는 변형된 염기를 함유한 라이게이션 단편서열'이란 손상된 염기 또는 변형된 염기가 들어있는 올리고 뉴클레오티드로 구성된 프로브로 DNA 주형에 어닐링되어 라이게이션 반응에 참여하는 프로브를 의미한다.

[0021] 본 발명에서 '업스트림 서열'이란 DNA 주형에 어닐링되어 라이게이션 반응에 참여하는 프로브 2개 중 3'말단에서 5'말단 방향의 DNA 주형에 대해 왼쪽에 위치하는 프로브를 의미한다.

[0022] 본 발명에서 '다운스트림 서열'이란 DNA 주형에 어닐링되어 라이게이션 반응에 참여하는 프로브 2개 중 3'말단에서 5'말단 방향의 DNA 주형에 대해 오른쪽에 위치하는 프로브를 의미한다.

[0023] 또한 본 발명의 다운스트림 서열은 동위원소 표지된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0024] 본 발명의 단편의 라이게이션 반응 산물을 분석하여 염기 치환의 존재 여부를 확인하는 방법은 라이게이션 후 라이게이트된 단편의 존재에 기초하여 결정된다. 결정 방법과 관련하여 특별한 제한은 없고 핵산 분석의 공지된 기술을 사용할 수 있다. 라이게이트된 단편의 존재 여부를 결정하는 방법의 예로서 하기를 포함한다: 겔 전기영동 (아가로스 겔, 폴리아크릴아미드 겔 등) 또는 모세관 전기영동을 사용하여 생성된 라이게이트된 산물이 분리되었는지를 확인하는 방법; 및 질량 분석법을 사용하여 라이게이트되어 전체 단편 산물의 길이가 증가하였는지를 측정하는 방법을 포함하나 이에 한정되지 아니한다.

[0025] 본 발명의 바람직한 구체예에 있어서, 상기 본 발명의 분석 방법은 손상된 또는 변형된 염기를 함유한 라이게이션 단편을 다운스트림 서열로 이용한 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니하며, 상기 본 발명의 DNA 리가제는 T4 DNA 리가제인 것이 바람직하나 두 단편 사이의 연결 활성을 가진 모든 효소가 본 발명의 DNA 리가제에 포함된다.

[0026] 또한 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 손상된 또는 변형된 염기로는 옥사닌이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0027] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 본 발명의 분석방법은 그 결과를 통하여 업스트림의 G:T 와 G:C 구별하는 것을 특징으로 한다.

[0028] 또한 일 구체예에 있어서, 본 발명의 상기 손상된 또는 변형된 염기를 함유한 라이게이션 단편 서열은 예를 들어 서열번호 4에 기재된 단편인 것이 바람직하나 SNP 분석방법에 사용될 수 있는 모든 손상된 또는 변형된 염기를 가진 단편은 본 발명의 라이게이션 단편에 포함된다.

[0029] 본 발명의 서열번호 4의 염기서열은 OCCAT TCCG ATTCT AAGTG을 가지고 있으나, 서열목록 작성기에서 옥사닌에 해당하는 "O"에 대한 기호가 없어서 서열목록 상의 서열번호 4의 "O"란에 "N"으로 대체하였다.

[0030] 본 발명의 검출 방법을 사용하여 게놈 수준으로 염기 치환을 분석하는 경우,대량의 뉴클레오티드 서열을 분석하기 위하여 반응 시스템을 미량화시킬 수 있고, 집적도를 높이기 위한 수단을 통합하여 사용할 수 있을 것이다. 마이크로칩, 마이크로-모세관 전기영동 (CE) 칩 또는 나노칩과 같은 시스템이 본 발명에 사용될 수 있다. 따라서 본 발명은 손상된 또는 변형된 염기서열을 함유한 라이게이션 단편이 고정된 SNP 분석용 칩을 제공한다.

[0031] 또한 본 발명은 손상된 또는 변형된 염기서열을 함유한 라이게이션 단편이 고정된 SNP 분석용 파티클을 제공한다.

[0032] 본 발명과 같이 고체 표면 상에 핵산을 고정화하여 칩 또는 파티클을 제조하는 방법에 대해서는 미국특허 5215882호 등에 자세하게 기재된다, 요약하면 그 고정화 방법은 다양한(variable) 부분을 포함하는 변형된 핵산 가닥과 앵커 부분을 반응 하고, 여기서 다양한 부분은 일차 아민 기능을 가지는 변형된 적어도 하나의 뉴크레오타이드 염기 서열 또는 일차 아민 기능을 가지는 균등한 뉴크레오타이드 염기를 포함하는 선택된 염기 서열 및 앵커 부분을 가지고 환원제 존재하에서 고체 표면의 자유 알데히드 기와 상기 변형된 핵산 가닥과 반응하여 고체 표면 상의 자유 알데히드 기의 적어도 일부분과 변형된 핵산 가닥의 복합체를 형성한다.

[0033] 또한 본 발명은 손상된 또는 변형된 염기를 함유한 라이게이션 단편서열 및 DNA 리가제를 유효성분으로 함유하는 SNP 분석용 키트를 제공한다.

[0034] 본 발명은 상기 언급한 유전자 다형성 분석용 키트는 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 라이게이션 단편을 포함한다. 단편과 관련하여 특별히 제한하지 않지만, 예를 들면 서열번호:4를 가지는 단편이 바람직하다. 사용하여 염기 치환 존재 여부 및 치환된 뉴클레오티드의 타입을 동시에 결정할 수 있는, 각각 4 가지 타입의 뉴클레오티드 중 하나를 포함하는 뉴클레오티드 세트를 포함할 수 있다.

[0035] 추가로, 본 발명의 키트는 라이게이션에 적합한 DNA 리가제, 반응에 적절한 완충액 등을 포함할 수 있다. 또한 본 키트는 라이게이션 산물 검출을 위한 시약을 포함할 수 있다.

[0036] 본 발명의 키트는 내부기준을 검출하기 위한 프로브 또는 프라이머를 포함할 수 있다. 추가로, 키트는 시험 샘플에 첨가되는 내부기준으로서의 핵산을 포함할 수 있다.

[0037] 이하 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[0038] 본 발명에서 업스트림 서열과 다운스트림 서열의 라이게이션에서 5'말단 다운스트림 서열을 Oxa로 치환한 형태 즉, O:C 형태를 T4 DNA 리가제로 처리하였다. 만약, Oxa base pairing을 하지 않고 일반적인 Watson과 Crick 페어링을 사용한다면 3'말단 업스트림의 염기서열 일치 여부에 관계없이 잘못된 양성결과가 나오게 된다. SNP 부위의 C/T 타입을 구별할 수 없게 되는 것이다 (도 1B). 반면, Oxanine을 사용하였을 때 SNP 부위가 G:T base pairing일 경우 라이게이션이 일어나지 않고 있다 (도 2B).

[0039] Oxanine을 사용한 C/T 타입 분석법이 신빙성을 갖기 위해서 Oxanine과 염기쌍을 이루는 template 서열의 염기도 고려하지 않으면 안된다. C, T, G, or A 중 어떠한 염기도 위치할 수 있다. 그래서 우리는 O:C, O:T, O:G, or O:A 네 가지 경우에 따른 라이게이션 실험을 하였다. 도 2C의 결과로 볼 때, G:C에서 라이게이션이 일어나지만 G:T에서는 일어나지 않는다는 것을 알 수 있다. Oxa 포함 DNA 서열을 라이게이션 fragment로 사용하였을 때, Oxanine의 base pairing에 관계없이 앞 서열이 G:C 일 경우만 특이적으로 라이게이션 가능케 함으로써 성공적인 C/T 타입 분석이 가능하다.

효 과

[0040] 상기에서 알 수 있는 바와 같이 손상된 또는 변형된 염기, 예를 들어서 Oxa 포함 DNA 서열을 라이게이션 fragment로 사용하였을 때, Oxanine의 base pairing에 관계없이 앞 서열이 G:C 일 경우만 특이적으로 라이게이션 가능케 함으로써 성공적인 C/T 타입 분석이 가능하여 손상된 염기를 함유한 단편을 이용하여 새로운 리가제 기반 SNP 분석에 사용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0041] 앞서 기술한 문제점을 해결하기 위해, 본 발명자들은 손상된 뉴클레오티드를 사용하는 방식을 개발하였다. guanine의 손상된 형태인 oxanine (Oxa, O; 도 2A 왼편) 염기를 포함하는 단편 서열을 T4 DNA 리가제에 기질로 제공하는 것이다. 그 결과 T4 DNA 리가제는 3'말단 업스트림 서열의 match 여부 또는 5'말단 다운스트림 서열의

match 여부에 민감하게 반응하는 것으로 나타났다. 우리는 5'말단 다운스트림 서열의 손상된 염기가 SNP 부위(3'말단 upsteam)의 연결에 영향을 줄 것이라는 가설을 세웠다. 그리고 라이게이션 성공 여부는 SNP의 타입이 어떠한지 알려줄 것이다.

[0042] 우선, 본 발명자들은 20-mer DNA 라이게이션 서열 두 가닥 (5'-N: 5'-CTCAG GTCGA CAGTC TGCG N-3'(서열번호 1), N-3': 5'-NCCAT TCCG ATTCT AAGTG-3'(서열번호 2), N = G, A, T, C, O)과 주형 가닥 40mer 서열 (3'N_aN_b-5': 3'-GAGTC CAGCT GTCAG ACGC N_aN_b GGTA AGGAC TAAGA TTCAC-5'(서열번호 3), N_aN_b = CC, TC, CT, TT, CG, TG, CA, TA)을 solid-phase 합성과 RP-HPLC 정제를 거쳐 준비하였다. Oxa 포함 라이게이션 서열 (5'-O 및 O-3')도 위의 방법으로 준비되었다.

[0043] 다음으로, 라이게이션 여부를 확인할 수 있게 하기 위해 3' 말단 다운스트림 서열에 표지를 하였다. 다운스트림 서열 (800nM)을 T4 polynucleotid kinase (40 unit), [r-^{32}P]ATP (4.5 MBq)와 함께 50㎕ 반응액 (50mM Tris-HCl [pH 8.0], 10mM $MgCl_2$, 5mM DTT)에서 37℃, 30분간 반응시켰다. 반응은 85℃ 10분간 가열함으로써 종결시켰으며 CENTRI-SEP 컬럼으로 정제하였다.

[0044] 마지막으로, 20-mer 업스트림 서열 (600nM)과 동위원소 표지된 다운스트림 (600nM), 40-mer 주형 DNA 서열 (600nM)을 T4 DNA 리가제 (5unit)과 함께 60㎕ 반응용액 (50mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM $MgCl_2$, 10mM DTT, 1mM ATP, 25㎍/ml BSA)에서 16℃으로 반응시킨다. 마찬가지로 반응 종결은 85℃, 10분 가열처리를 하였고, 반응물은 6M urea 20% denaturing PAGE에서 분리하였다. PAGE 결과는 STORM 820 phosphor-이미징 스캔너를 이용해서 관찰하였다.

도면의 간단한 설명

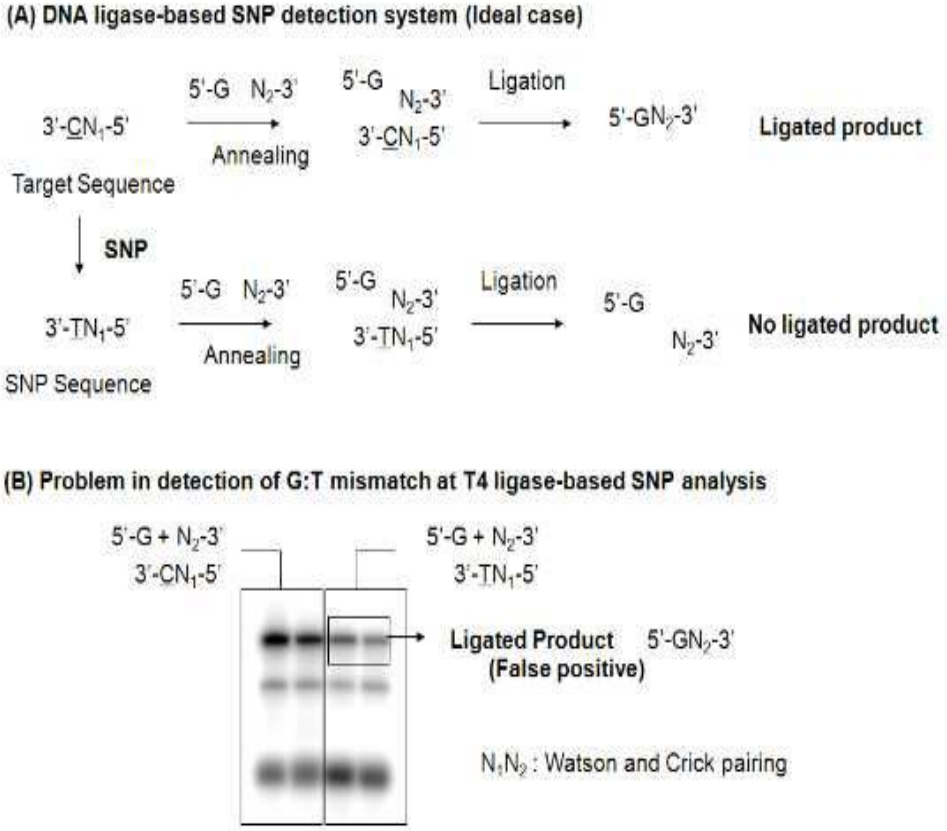
[0045] 도 1의 (A)는 DNA 리가제-based SNP 검출 시스템을 설명하는 그림이다. SNP의 타입이 3'-CN1-5'(C 타입)인지 3'-TN1-5'(T 타입)인지 모를 경우 라이게이션 방법으로 판단할 수 있다. 3'말단이 G인 업스트림을 사용했을 때 라이게이션 되었다면 타겟 서열의 SNP는 C 타입이다.

[0046] 도 1의 (B)는 T4 리가제-기반 SNP 분석에서 G:T 미스매치의 검출의 문제를 나타낸 그림. 기존의 방식으로 라이게이션 검별하였을 때, 밑줄 친 T와 G가 서로 mismatch 상태인데도 false positive 반응이 나온다. 이럴 경우 SNP의 타입 분석이 어렵다.

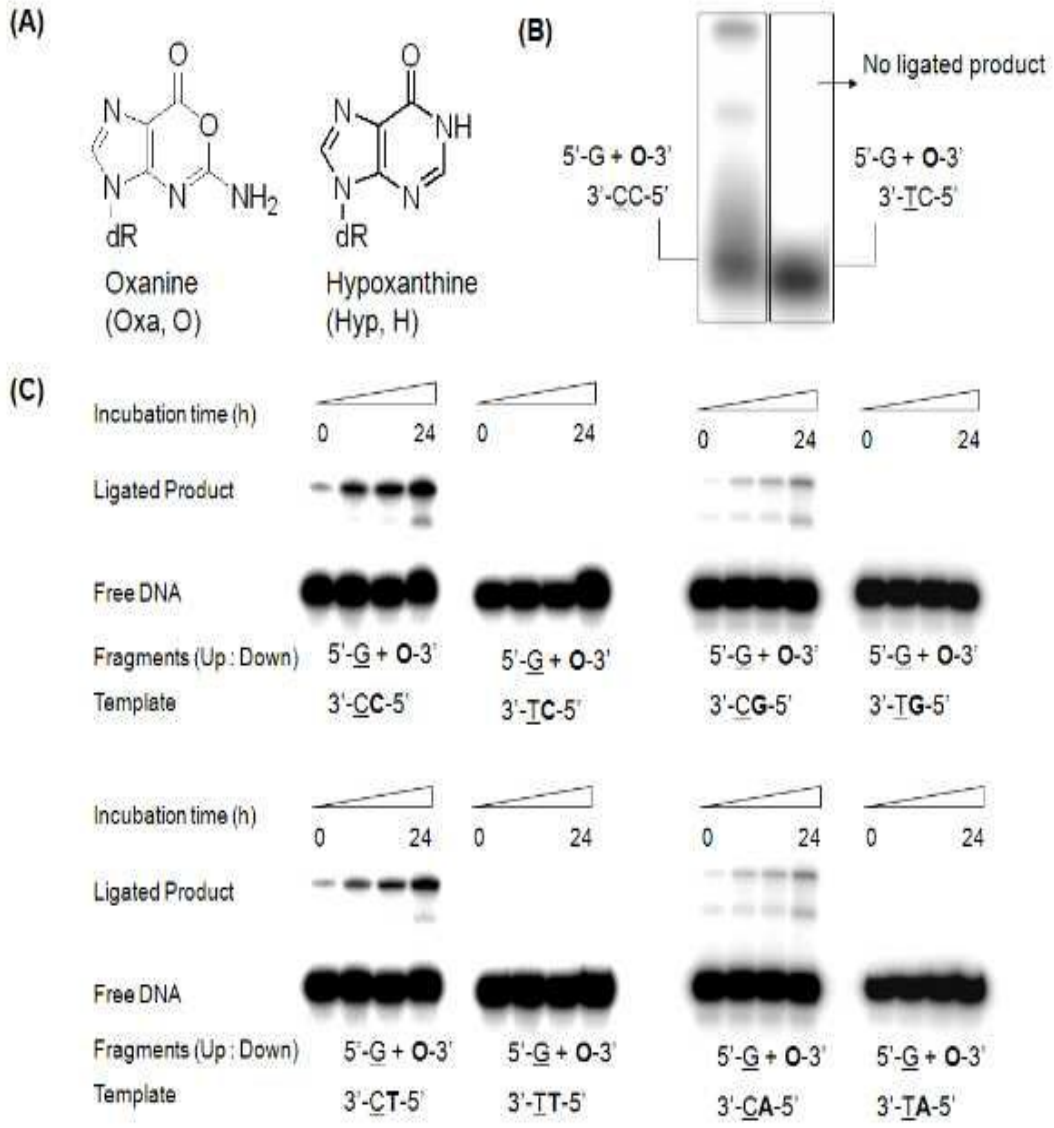
[0047] 도 2의 (A)는 손상된 염기를 나타내고, (B)는 Oxa-함유된 절편의 효율성을 나타내며, (C)는 정상 뉴크레오베이스와 옥사닌 염기 쌍의 라이게이션 영향을 나타낸다.

도면

도면1


(A) DNA ligase-based SNP detection system (Ideal case)
5'-G N2-3'
3'-CN1-5'
Annealing
5'-G
N2-3'
3'-CN1-5'
Ligation
5'-GN2-3'
Ligated product
Target Sequence
SNP
5'-G N2-3'
3'-TN1-5'
Annealing
5'-G
N2-3'
3'-TN1-5'
Ligation
5'-G
N2-3'
No ligated product
SNP Sequence
(B) Problem in detection of G:T mismatch at T4 ligase-based SNP analysis
5'-G + N2-3'
3'-CN1-5'
5'-G + N2-3'
3'-TN1-5'
Ligated Product 5'-GN2-3'
(False positive)
N1N2 : Watson and Crick pairing

도면2



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> A ligase-based SNP analysis method using a damaged or modified base-containing ligation fragment and a system for analyzing SNP comprising the fragment

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 1
ctcaggtcga cagtctgcgn 20

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 2
nccattccga ttctaagtg 19

<210> 3
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 3
gagtccagct gtcagacgcn nggtaaggac taagattcac 40

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 4
nccattccga ttctaagtg 19