

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2017/188669 A2

2017년 11월 2일 (02.11.2017)

(43) 국제공개일

(51) 국제특허분류:  
미분류

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/004297

(22) 국제출원일: 2017년 4월 21일 (21.04.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:  
10-2016-0050313 2016년 4월 25일 (25.04.2016) KR

(71) 출원인: (주)진매트릭스 (GENEMATRIX INC.) [KR/KR]; 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로 700, 7층, 8층 (삼평동, 코리아바이오파크 B동), Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 김수옥 (KIM, Soo Ok); 05794 서울시 송파구 문정로 83, 114동 1702호 (문정동, 문정래미안아파트), Seoul (KR). 김석준 (KIM, Suk Joon); 13532 경기도 성남시 분당구 판교역로 98, 704-902 (백현동, 백현 마을 7단지아파트), Gyeonggi-do (KR). 홍선표 (HONG, Sun Pyo); 06715 서울시 서초구 방배로 14, 5-505호 (방배동, 임광아파트), Seoul (KR). 정현재 (CHUNG, Hyun Jae); 15876 경기도 군포시 용호2로 36, 주공4단지아파

트 404동 1003호, Gyeonggi-do (KR). 조우재 (CHO, Woo Jae); 14120 경기도 안양시 동안구 흥안대로 84-5, 베네치아 708호, Gyeonggi-do (KR). 김재일 (KIM, Jae Il); 04774 서울시 성동구 돌레1길 12-6, 2층, Seoul (KR). 양승민 (YANG, Seung Min); 12816 경기도 광주시 도척면 도척윗로 427-25, Gyeonggi-do (KR). 조애리 (CHO, Ae Ri); 13509 경기도 성남시 분당구 판교로743번길 7 목련마을 SK아파트 603동 402호, Gyeonggi-do (KR). 홍성수 (HONG, Seong Soo); 05786 서울시 송파구 송이로31길 56 문정시영아파트 10동 601호, Seoul (KR). 김정우 (KIM, Jeong Woo); 16827 경기도 용인시 수지구 신수로 767, B동 2030호(동천동), Gyeonggi-do (KR). 정선영 (JEONG, Sun Young); 18420 경기도 화성시 동탄숲속로 19 숲속마을풍성신미주아파트 896동 703호, Gyeonggi-do (KR).

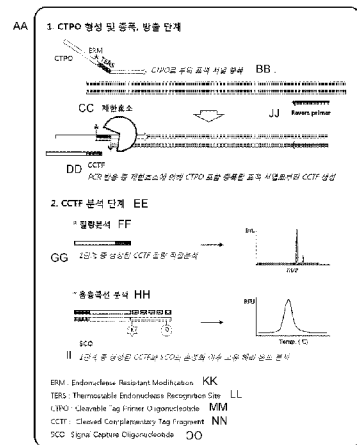
(74) 대리인: 특허법인 피너클 (PINNACLE IP & LAW FIRM); 06221 서울시 강남구 테헤란로 238, 8층, Seoul (KR).

(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,

(54) Title: METHOD FOR DETECTING TARGET NUCLEIC ACID SEQUENCE USING CLEAVED COMPLEMENTARY TAG FRAGMENT AND COMPOSITION THEREOF

(54) 발명의 명칭: 절단된 상보적인 태그 절편을 이용한 표적 핵산 서열 검출 방법 및 그 조성물

(57) Abstract: The present invention relates to a method and a composition for detecting a target nucleic acid sequence using a cleaved complementary tag fragment. Specifically, the present invention relates to a method for linking a complementary tag sequence to a PCR primer so that a marking can be produced by a restriction enzyme during a PCR reaction, diversifying the complementary tag sequence to be linked to each primer by utilizing factors such as length and nucleic acid combination, etc., and distinguishing the target sequence using the same. According to the present invention, a cleaved complementary tag fragment (CCTF) under stringent conditions is a complementary sequence to any sequence at the 5' end linked to the primer and cannot be formed unless a PCR reaction and a restriction enzyme reaction occur, and the cleaved single strand is formed only when hybridization to the target sequence occurs and a primer extension product complementary to the target sequence is formed, so as to have a higher degree of accuracy secured by reading the cleaved single strand. In addition, the CCTF can be used to identify a plurality of target nucleic acid sequences by selecting various analytical techniques and analysis equipment according to a user's intention. For example, a result can be confirmed rapidly and accurately in genetic testing, identification of organisms in a sample, diagnosis of microbial or viral infection, etc.



AA ... 1. Step of forming, proliferating and releasing CTPO  
BB ... Proliferation of target sequence from CTPO  
CC ... Restriction enzyme  
DD ... Producing CCTF from proliferated target sequence comprising CTPO by restriction enzyme during PCR reaction  
EE ... 2. Step of CCTA analysis  
FF ... Mass spectrometry  
GG ... Direct mass spectrometry of CCTF produced in first step  
HH ... Analysis of melting curve  
II ... Analysis of dissociation temperature after hybridization of SCO with CCTF produced in first step  
JJ ... Reverse primer  
KK ... EMR: Endonuclease resistant modification  
LL ... TERS: Thermostable endonuclease recognition site  
MM ... CIPO: Cleavable tag primer oligonucleotide  
NN ... CCTF: Cleaved complementary tag fragment  
OO ... SCO: Signal capture oligonucleotide



WO 2017/188669 A2

ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, 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).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

---

(57) 요약서: 본 발명은 절단된 상보적인 태그 절편을 이용한 표적 핵산 서열 검출 방법 및 그 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 PCR 프라이머에 표지 상보적 서열을 연결하여 PCR 반응 중 제한효소에 의해 표식이 생성되도록 하며, 각 프라이머에 연결하는 표지 상보적 서열을 길이 및 핵산의 조합등의 요소를 활용하여 다양화하고, 이를 이용해 표적 서열을 구분하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 엄격한 조건하에서 Cleaved Complementary Tag Fragment (CCTF)는 프라이머에 연결된 5' 말단의 임의 서열과 상보적 서열로서 PCR 반응과 제한효소 반응이 일어나지 않으면 형성되지 않으며 표적 서열에 혼성화 및 표적 서열과 상보적인 프라이머 신장 산물을 형성한 경우에서만 절단된 단일가닥이 형성되어 이를 판독함으로써 보다 높은 정확성을 확보할 수 있다. 또한 CCTF는 다양한 분석기법 및 분석장비를 사용자 의도에 맞게 선택하여 다수의 표적 핵산 서열을 동정하는데 활용 할 수 있다. 이를테면 유전자 검사, 샘플 내의 생체 동정, 미생물 또는 바이러스의 감염 여부 진단 등에서 신속하고 정확하게 결과를 확인할 수 있다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 절단된 상보적인 태그 절편을 이용한 표적 핵산 서열 검출 방법 및 그 조성물

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 절단된 상보적인 태그 절편을 이용한 표적 핵산 서열 검출 방법 및 그 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 표적 서열과 특이적으로 반응하는 프라이머에 표식물질을 생성할 수 있는 표식의 주형을 연결함으로써 PCR 반응 중 제한효소 활성화에 의해 표식이 합성, 방출되어 반응액에 유입되도록 하여 증폭산물을 식별하는 방법에 관한 것이다. 또한 하나의 표적 서열에는 한 종류의 표식 주형 서열만을 사용하며 반응 중 생성된 표식을 다양한 분석장치에서 분석하여 표식을 식별하는 것을 특징으로 하는 표식 생성 및 표식 동정 방법 및 그 방법에 사용되는 조성물에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR)은 저농도의 핵산을 검출하고 분석하는데 있어서 매우 유용하게 활용되고 있는 기법 중 하나이다. 핵산의 검출은 두 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열의 상보성 및 각 DNA 중합효소의 연장 반응에 기인하는 것으로 이를 이용하여 표적 핵산 서열을 검출할 수 있다. (Barry et al., Current Opinion in Biotechnology, 12:21, 2001).
- [3] 다중 PCR은 여러 표적 서열의 핵산을 동시에 증폭할 수 있는 방법으로 다른 방법에 비해 비교적 빠르고 간편하여 유전자 검사, 샘플 내의 생물체 동정, 미생물 또는 바이러스 감염 여부 등의 진단분야에서 매우 큰 역할을 하고 있다.
- [4] 이러한 다중 PCR의 결과를 확인하는 가장 보편적인 방법은 PCR 중 목적하는 표적서열의 증폭산물 크기를 다양화하여 프라이머를 설계하고, PCR 결과물을 전기영동을 통해 증폭산물의 크기를 분석, 해당 표적 서열의 증폭여부를 확인하는 것이다. 이 경우 한 번에 증폭시킬 수 있는 유전자의 개수가 실험적으로 3~4개에 한정되는데, 이는 PCR 반응 중 생성할 수 있는 증폭산물의 크기에 따라 증폭효율이 달라지게 되어 균일한 증폭 효율을 보장할 수 없기 때문에 증폭산물의 크기를 좁은 범위에서 한정해야 하는 제약이 있기 때문이다. 이 때, 원하는 유전자 증폭산물의 크기가 겹치는 경우도 발생하는데, 이렇듯 크기에 의존하여 다중 PCR을 분석하는 경우 검출 방법의 해석에 대한 한계점이 존재하게 된다.
- [5] PCR 결과를 확인함에 있어 실시간중합효소연쇄반응 (Real-time PCR)은 신속한 결과 확인을 보장하는데, PCR 중 형광물질을 표지하여 증폭산물의 크기와 관계없이 증폭 여부를 확인 할 수 있다. Real-time PCR을 수행하고 검출하는 방식은 인터칼레이팅 방식과, 프로브 방식으로 나뉘 수 있는데, 인터칼레이팅 방식은 이중가닥의 염기서열 사이에 형광물질이 삽입되어 형광 강도를

확인하는 방법을 일컫는다. 이러한 방법은 이중가닥을 형성하는 증폭산물을 구분하지 못하고 모두 동일한 파장의 형광으로 관찰할 수 있어 표적 서열별 증폭산물을 식별하여 한가지 이상의 증폭물을 동시에 검출, 확인하는데 한계를 갖고 있다. 프로브 (Probe) 방식은 표적 서열 별로 지정되어 있는 프로브의 형광값을 읽어 증폭산물을 검출하는 방법으로 이 방식을 이용할 경우 사용되는 기기의 분석 가능 형광 채널 개수에 한정적으로 증폭물을 검출할 수 있으므로 형광 채널 개수 이상의 다중 분석 적합하지 않다.

- [6] 따라서 최대한 많은 개수의 다중 분석이 가능하게끔 PCR 중에 표지를 삽입하고자 하는 연구가 지속적으로 진행되었다.
- [7] Luminex 사의 xTAG 기술의 경우 핵산을 이루는 티민 (T), 아데닌 (A), 구아닌 (G) 의 무작위 배열로 구성된 일정 염기서열을 설정하고 이를 xTAG이라 명명하였다. 관찰하고자 하는 표적 서열의 증폭 시 말단에 xTAG 서열이 위치하도록 프라이머에 xTAG의 서열을 삽입하여 PCR 과정 중 xTAG이 증폭산물에 삽입되게 하였고, xTAG와 상보적인 서열이 부착되어 있는 비드와 이차적으로 결합하게 하여 두 염기서열의 상보적인 결합을 형성하게 하고, 이를 이용해 타겟을 감지하고 비드의 형광으로 표적 서열을 분석하는 방법이다. 위 방법은 xTAG이 증폭에 참여하지 않아도 증폭 후의 프라이머가 완벽히 제거되지 않으면 비드의 상보적 xTAG과 결합하여 표식을 인지할 가능성이 있고, xTAG의 상보적 서열이 PCR에 의해 비특이 반응을 형성, 비특이 타겟을 검출하는 오류가 생길 수도 있는 문제점을 갖고 있다. (U.S. patent no. 7,645,868 및 8,624,014)
- [8] 이를 해결하고자 PCR 반응 중 표식을 구축하고, 표식이 PCR 반응에 영향을 주지 않으며, 최대한 많은 개수의 다중검출이 가능한 기법에 대한 연구가 지속적으로 이뤄지고 있다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [9] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 PCR과 같은 증폭 반응을 이용한 표적 서열 증폭 및 분석 수행 시 생성산물의 길이에 의존하여 결과를 판단할 때 생길 수 있는 결과의 불확실성을 해결하고, 다중 검출함에 있어 증폭 확인 가능한 최대 개수에 대한 제약을 해결하는 방법을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 또한 표식을 형성하여 표적 서열 증폭을 확인하는데 있어 인위의 서열을 표식 그 자체로 사용함으로써 야기될 수 있는 비특이적 증폭으로 인한 오류를 해결하여 정확도를 높이는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제 해결 수단

- [11] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 표적 서열과 비상보적인 무작위 핵산 서열을 포함하고, 제한효소 인지서열 및 표적 서열과 상보적인 핵산 서열을 순차적으로 포함하는 구조를 갖는 프라이머를 제공한다.

- [12] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 제한 효소 인지 서열은 Pho I, PspGI, BstNI, TfiI, ApeKI, TspMI, BstBI, BstEII, BstNI, BstUI, BssKI, BstYI, TaqI, MwoI, TseI, Tsp45I, Tsp509I, TspRI, Tth111I, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nt.BspQI, Nt.BstNBI 제한효소 및 Nick 제한효소로 구성된 군으로부터 선택된 제한 효소에 대한 인지서열인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [13] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 프라이머는 절단된 상보적인 태그 절편 이외의 절단 부산물이 반응에 참여하지 않는 것을 목적으로, 상기 프라이머의 제한효소 인지서열 중 절단부위에 변형된 dNTP가 삽입되어 있는 것이 바람직하고, 상기 절단부위에 삽입되는 변형된 dNTP는 포스포로티오에이트된(Phosphorothioated) dNTP, 7-데아자퓨린(Deazapurine)을 함유한 dNTP, 또는 DNA 주형 중 2'-O-메틸 뉴클레오타이드(methyl nucleotide;2'-OMeN)을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [14] 본 발명은 다른 구현예에 있어서, 상기 프라이머는 생성되는 절단된 상보적인 태그 절편의 길이가 5 mer 이상 50mer 이하인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [15] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 1, 3, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 151, 153, 155, 156, 159, 161, 163, 164, 166, 168, 170, 204, 205, 207, 218, 220 및 222 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 프라이머인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [16] 또 본 발명은 a) 절단된 상보적인 태그 절편인 표식을 생성하기 위한 표식의 주형을 포함하는 상기 본 발명의 프라이머와 표적 서열을 혼성화 시키는 단계;b) 상기 a) 단계 혼성화로 인해 증폭 과정이 진행될 때, 제한효소의 활성화에 의해 상기 프라이머로부터 절단된 상보적인 태그 절편이 생성되어 반응액으로 유입되는 단계;및 c) 상기 생성된 절단된 상보적인 태그 절편을 분석장비를 통해 동정하여 표적 핵산서열의 존재를 확인하는 단계를 포함하는 종합효소 연쇄 반응 중 증폭된 표적 서열의 종류를 구분하고 분석하는데 사용되는 표식을 형성하고, 동정하는 방법을 제공한다.
- [17] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 절단된 상보적인 태그 절편의 질량을 분석하여 절단된 상보적인 태그 절편을 동정하는 것이 바람직하고, 상기 질량 분석에 사용되는 기기는 말디토프 질량분석기(MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption-ionization-time-of-flight mass spectrometer), 액체크로마토그래피 질량분석기(Liquid Chromatography Mass Spectrometry), 또는 고성능액체크로마토그래피 질량분석기(High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [18] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 질량 분석에 사용되는 절단된 태그 절편의 단위 전하당 질량( $m/z$ )은 0 초과 10000 Da 이하인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

- [19] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 증폭 과정 중 질량 분석에 사용되는 절단된 상보적인 태그 절편의 질량을 보존하기 위해 핵산 중합효소의 고유 성질인 3' 말단의 아데닌 추가연장 효과(A 테일링) 기능이 억제되어 있는 DNA 중합효소를 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [20] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 절단된 상보적인 태그 절편의 동정 방법으로 형광 및 퀸처(Quencher)가 표지되어 있고 절단된 상보적인 태그 절편의 상보적 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 형광 시그널을 분석하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [21] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 올리고뉴클레오타이드와 절단된 상보적인 태그 절편의 이중 가닥이 단일 가닥으로 해리되는 고유 해리 온도를 다양화하여 해리 온도 및 용융 피크를 분석하고, 절단된 상보적인 태그 절편을 동정하여 표적서열의 존재를 확인하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [22] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서 상기 올리고뉴클레오타이드의 길이는 5개 이상의 올리고뉴클레오타이드인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [23] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 방법은 올리고뉴클레오타이드로부터 염기서열 신장 되는 것을 방지하기 위해 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단의 뉴클레오타이드에 퀸처를 부착하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [24] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 방법은 올리고뉴클레오타이드의 형광 시그널의 Cycle threshold(Ct) 값을 분석해 절단된 상보적인 태그 절편을 동정하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다..
- [25] 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 상기 방법은 성매개 질환 원인균을 동정하는 것이 바람직하고, 상기 성매개 질환 원인균은 *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria*, *Gonorrhea*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Herpes simplex virus 1*, *Herpes simplex virus 2*, *Treponema pallidum* 으로 구성된 균으로부터 선택된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [26] 또 본 발명은 상기 본 발명의 프라이머를 유효성분으로 포함하는 성매개 질환 진단용 조성물을 제공한다.
- [27] 본 발명의 또 다른 실시예에 있어서, 상기 방법은 위장관 질환 원인체를 동정하는 것이 바람직하고, 상기 위장관 질환 원인체는 *Rotavirus A*, *Astrovirus*, *Adenovirus F40*, *Adenovirus F41*, *Norovirus GI*, *Norovirus GII*로 구성된 균으로부터 선택된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [28] 또 본 발명은 상기 본 발명의 프라이머를 유효성분으로 포함하는 위장관 질환 원인체 진단용 조성물을 제공한다.
- [29] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시예에 있어서, 상기 방법은 인유두종 바이러스를 동정하는 것이 바람직하고, 상기 인유두종 바이러스의 아형은 16형,

- 18형, 33형, 35형, 51형, 53형, 59형, 68a형, 82형으로 구성된 군으로부터 선택된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [30] 또 본 발명은 상기 본 발명의 프라이머를 유효성분으로 포함하는 인유두종 바이러스 진단용 조성물을 제공한다.
- [31] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시예에 있어서, 상기 방법은 호흡기 질환 원인체를 동정하는 것이 바람직하고, 상기 호흡기 질환 원인체는 Influenza A/H1N1, Influenza A/H3N2, Influenza A/H1N1/2009pdm, Influenza B, Parainfluenza 1, Parainfluenza 3, Respiratory syncytial virus A, Respiratory syncytial virus B, Human metapneumovirus, Adenovirus로 구성된 군으로부터 선택된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [32] 또 본 발명은 상기 본 발명의 프라이머를 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환 진단용 조성물을 제공한다.
- [33] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시예에 있어서, 상기 방법은 단일염기다형성(SNP, Single nucleotide polymorphism) 것이 바람직하고, 상기 단일염기변이는 BDNF 유전자(Brain-derived neurotrophic factor gene)의 r6265으로 구성된 군으로부터 선택된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [34] 또 본 발명은 상기 본 발명의 프라이머를 유효성분으로 포함하는 BDNF 유전자 rs6265 유전자 분석용 조성물을 제공한다.
- [35] 이하 본 발명을 설명한다.
- [36] 본 발명자는 증폭 반응을 수행하고 결과를 해석하는데 있어 보다 쉽고 빠르며 효율적인 방법을 통해 각 증폭산물을 명확하게 구분할 수 있도록 함으로서 한번에 많은 표적을 대상으로 다중 증폭 반응을 수행, 결과를 해석할 수 있는 방법을 개발하기 위해 예의 연구 노력하였다.
- [37] 그 결과, 표식으로서 사용될 수 있는 핵산 서열을 증폭 반응 중 생성할 수 있도록 표식의 주형이 되는 서열을 프라이머에 삽입하고, 제한효소를 이용해 표식만을 절단하였을 때, 생성된 표식이 표적 서열을 검출하기 위한 표식으로서 역할을 수행할 수 있음을 확인하였으며, 이를 여러 분석법에 적용하여 다중 증폭 반응 분석에서 기존의 다른 방법에 비해 효율적이고 신속하게 증폭여부를 식별할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.
- [38] 본 발명은 PCR 반응 중 증폭된 표적 서열의 종류를 구분하고 분석하는데 사용되는 표식을 형성하는 방법에 관계한다.
- [39] 특히 본 발명에서는 (1) 표식을 생성하기 위한 표식의 주형을 포함하는 프라이머와 표적 서열의 혼성화 단계, (2) PCR 반응 중 제한효소를 이용하여 표식의 주형으로부터 표식을 생성하는 단계 및 (3) 생성된 표식을 다양한 분석장비로 분석하여 표식을 식별하는 단계를 갖는 것을 특징으로 한다.
- [40] (1) 표식 (CCTF-Cleaved Complementary Tag Fragment, 이하 CCTF)을 생성하기 위한 표식의 주형을 포함하는 프라이머 (CTPO-Cleavable Tag Primer Oligonucleotide, 이하 CTPO)와 표적 서열을 혼성화 시키는 단계로서; CTPO는

표적 서열과 비-상보적인 핵산 서열을 포함하고 (CCTF의 주형), 제한효소 인지서열 및 표적 서열과 상보적인 핵산 서열을 순차적으로 포함하며, 3'말단에 위치한 표적 서열과 상보적인 핵산 서열 부위가 표적 서열과 혼성화 됨으로써 PCR 반응 중 프라이머로의 역할을 수행하고,

[41] (2) 증폭 과정 중 제한효소의 활성화에 의해 CTPO로부터 CCTF가 생성되어 방출되는 단계로서; 상기 서술된 CTPO로부터 신장된 증폭산물에는 제한효소 인지서열이 삽입되게 되고, 이를 인지한 열 안정성 제한효소의 활성화에 의해 CCTF가 생성되어 반응액으로 유입되고,

[42] (3) 상기 생성된 CCTF를 다양한 분석장비를 통해 분석, 동정하여 표적핵산서열의 존재를 확인하는 단계로서; 생성된 CCTF의 질량을 측정하여 CCTF의 종류를 파악, 증폭된 물질을 구분하여 표적 핵산 서열의 존재를 확인하거나, 생성된 CCTF와 상보적 서열로 구성되어 있고 형광 및 퀀처가 표지되어 있는 올리고뉴클레오타이드 (SCO-Signal Capture Oligonucleotide, 이하 SCO)와 CCTF가 혼성화하여 이중가닥을 형성하고 다시 단일가닥으로 해리되는 과정에서 형광의 발광이 이뤄지고, 이 고유 해리 온도를 분석하여 CCTF의 종류를 확인, 표적 핵산 서열의 증폭 여부를 확인한다.

[43] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[44] (1) 단계에 있어서, CTPO와 표적 서열을 혼성화 시키기에 앞서 CTPO의 구조는 아래 구조식 1과 같이 CCTF의 주형이 되는 부분과 제한효소인지서열, 그리고 표적과 상보적인 서열 부분으로 나뉘어 있다.

[45] 구조식 1

[46] 5'- A-B-C-3'

[47] 구조식 1의 A 부위는 CCTF의 주형이 되는 부분으로 무작위 서열로 이루어져 있고, 표적 서열과 어닐링 후 증폭하여 CCTF의 주형의 상보적 서열, 즉 CCTF 부분을 신장한 뒤, 증폭 중 제한효소에 의해 CCTF 부분이 방출된다. 방출된 CCTF는 표식으로서 표적 서열 특이적으로 분석 가능토록 5개 올리고뉴클레오타이드 이상의 길이를 갖는 무작위 서열인 것을 특징으로 한다. 무작위 서열은 PCR 반응 중 부산물을 만들지 않는 범위에서 어떤 서열이든 사용할 수 있다. CCTF의 주형으로 사용되는 뉴클레오타이드 서열은 증폭 반응 중 혼성화반응을 일으키지 않는 그 어떠한 서열이라도 문제가 없다.

[48] B는 제한효소 인지서열로서 증폭 과정 중 사용할 수 있는 열 안정성을 갖는 제한효소 및 Nick 제한효소의 특이적 인지서열을 의미한다. 그 예로 Pho I, PspGI, BstNI, TfiI, ApeKI, TspMI, BstBI, BstEII, BstNI, BstUI, BssKI, BstYI, TaqI, MwoI, TseI, Tsp45I, Tsp509I, TspRI, Tth111I, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nt.BspQI, Nt.BstNBI 등이 있다.

[49] 그 중 가장 바람직하게는 PspGI 을 사용할 수 있고 본 발명의 실시예에서 사용된 제한효소는 PspGI 이다.

[50] CCTF 이외의 절단 부산물이 반응에 존재, 참여하지 않도록 CTPO의

제한효소인지서열 중 제한효소에 의해 절단되는 부위에 변형된 dNTP를 삽입시킨다. 그 종류로는 포스포로티오에이트된(Phosphorothioated) dNTP, 7-데아자퓨린(Deazapurine)을 함유한 dNTP, 또는 DNA 주형 중 2'-O-메틸 뉴클레오타이드(methyl nucleotide; 2'-OMeN) 등이 있다. 종래 기술로서 논문 PNAS 89(1992) 392-396 및 Nucleic Acids Research 20(1) 1991 55-61 등은 본 발명에 응용될 수 있다. 가장 바람직하게는 phosphothiolated bond를 인지서열 중 절단 부위에 삽입하여 제한효소에 의한 CCTF의 주형의 절단을 막아 CCTF를 생성할 수 있는 주형을 확보하고 CCTF의 주형이 반응액에 유입되어 생길 수 있는 부산물을 막아 반응의 효율을 증대시킬 수 있다. CCTF를 생성하고 그 주형이 반응액에 유입되는 것을 방지한다는 점에 있어 종래 기술인 SDA (Strand Displacement Amplification) 방법(미국특허92-819,358)과는 상이한 발명의 효과를 보인다.

- [51] 구조식 1에 나타난 C부위는 제한효소 인지서열 이후 3' 말단까지를 의미하는데, 표적 특이적 서열로 구성되어 증폭 시 표적 특이적으로 결합하여 프라이머로서의 역할을 유지할 수 있도록 한다.
- [52] (2) 단계에 있어서, CTPO에 의한 증폭산물이 형성되고, 이중가닥으로 존재하는 증폭산물로부터 제한효소에 의해 CCTF로 절단되어 반응액 중으로 방출될 때 사용되는 제한효소의 적정 농도는 사용 목적에 따라 다양해 질 수 있다. 또한 사용되는 중합효소의 종류에 따라 결과에 차이를 보이는데, 이 역시 사용 목적에 따라 다양해 질 수 있다. 예를 들면, 질량분석을 목적으로 CCTF를 형성 할 경우 CCTF의 무게가 증폭 과정과 무관하게 일정 질량을 유지하여야 하며, 핵산 중합효소의 고유 성질을 반영하지 않는 것이 바람직하다. 따라서 핵산 중합효소의 고유 성질인 3' 말단의 아데닌 추가연장 효과(A 테일링)가 없는 핵산 중합효소를 선정하여 사용하여야 한다. 핵산 중합효소 중 A 테일링을 하지 않는 효소로는 Phusion polymerase, Vent polymerase, Deep Vent polymerase, Bst polymerase 등이 있다.
- [53] 그러나 질량 분석이 아닌 다른 기법을 이용한 CCTF의 분석법을 적용할 경우 A 테일링 효과에 의한 결과에 변동이 없으므로 그 어떤 중합효소를 이용하여도 무방하다.
- [54] 제한효소의 효율을 증대시켜 CCTF의 생성 및 반응액으로 유입을 촉진하여 효과를 극대화하기 위해 PCR 과정 중 제한효소 반응 시간을 추가로 수행할 수 있다. 반응 시간 및 반응 온도 등은 구체적인 제한효소의 종류, 반응 의도에 따라 다르게 적용될 수 있다.
- [55] (3) 단계에 있어서, 생성된 CCTF를 다양한 분석장비를 통해 분석하여 표적핵산서열을 동정하는 단계로서 생성된 CCTF의 질량을 직접 분석할 경우 CCTF의 종류를 길이 및 서열의 재조합을 통해 다양화 하고, 이들의 질량을 MALDI-TOF MS, LC MS, HPLC MS 등의 질량분석기를 이용해 분석하면 생성된 CCTF의 고유질량을 관찰 할 수 있고, 이를 이용해 증폭된 표적 서열의 구분 및

확인이 가능하다. 바람직하게는 MALDI-TOF MS를 통해 관찰하는데, 관찰에 용이한 CCTF의 질량의 범위는 1200 Da 이상이다. 위 범위의 질량에서 다양한 CCTF을 형성하여 증폭산물을 관찰 할 수 있다.

- [56] CCTF의 형광 시그널을 관찰하여 증폭된 표적 서열의 식별도 가능한데, 생성된 CCTF가 고유해리 온도에서 형광 시그널을 제공할 수 있도록 형광 및 퀀처가 표지되어 있고, 고유해리온도를 갖는 CCTF와 상보적인 서열인 SCO와 혼성화하여 고유해리온도에서 형광 시그널을 분석, CCTF의 생성여부를 확인, 이를 통해 표적 핵산 서열의 존재를 동정하는 방법이다.
- [57] CCTF의 방출을 위해서는 앞서 설명한 바와 같이 사용 목적에 따른 제한효소의 사용 농도를 지정하며, 중합효소의 종류는 질량분석과 다르게 A 테일링과 관계가 없다. 증폭산물로부터 반응액으로 방출, 유입된 CCTF는 반응액에 존재하고 있던 SCO와 반응하게 되는데, SCO의 구성은 다음과 같다.
- [58] 5' 말단 방향에서 3' 말단 방향으로 CCTF와 혼성화가 가능하도록 CCTF의 상보적 서열이 존재하는데 SCO의 서열은 CCTF에 의존적으로 CCTF의 길이, 서열 제조합에 의해 결정된다. 앞서 (1) 단계에서 표식의 종류를 다양화 하기 위해 CCTF의 길이 및 서열 제조합 등의 방법을 사용한 바와 같이 CCTF 및 SCO의 고유해리온도를 부여하기 위해 길이 및 서열의 조합을 다르게 디자인할 수 있다. 이때, SCO는 CCTF의 상보적 서열로 구성되어 있고, 서열 중에 형광물질을 함유하는데 형광물질의 위치는 퀀처와 일정 길이 이상 떨어져 존재하는 어디라도 무방하다. SCO의 3' 말단에는 Blocker가 위치하여 SCO가 반응 중 프라이머로서 역할 하여 염기서열이 신장되는 것을 방지한다. Blocker로는 Spacer C3, Phosphat, ddC, Inverted END와 퀀처등을 사용할 수 있으나 이에 한정하진 않는다. 특히 SCO의 3' 말단에 퀀처가 위치하면 SCO가 반응 중 프라이머로서 역할 하여 염기서열이 신장되는 것을 방지하는 동시에 CCTF와 혼성화되어 이중가닥을 형성하기 전에는 FRET 현상에 의해 형광물질의 발광을 억제하는 기능을 갖게 한다. 퀀처를 염기서열 신장 방지 물질로 혼용하여 사용함으로써 SCO 제조 시 불필요한 modification 반응을 축약시켜 제조 반응의 수율을 높일 수 있고, 더 나아가 제조 비용을 절약할 수 있다. 반응 중 포함되어 있는 SCO와 반응 중 생성되는 CCTF의 혼성화를 이용해 지정된 온도에서 혼성화된 이중가닥의 해리가 관찰되는지를 형광으로 확인하여 분석함으로써 표적서열로 인한 CCTF의 생성 여부를 확인하고, 이를 이용해 표적 서열을 동정할 수 있다. 위 SCO의 고유 해리온도로 지정할 수 있는 온도의 범위는 ~95°C이며, 각각의 이중가닥의 해리 온도의 간섭이 없다면 형광 물질 마다 고유 해리 온도를 지정하는데 개수의 상한 제한은 없다.
- [59] SCO의 형광물질과 퀀처의 조합은 Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 514, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 635, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor

700, Alexa Fluor 750, Alexa Fluor 790, ATTO 390, ATTO 425, ATTO 465, ATTO 488, ATTO 495, ATTO 514, ATTO 520, ATTO 532, ATTO Rho6G, ATTO 540Q, ATTO 550, ATTO 565, ATTO Rho3B, ATTO Rho11, ATTO Rho12, ATTO Thio12, ATTO 580Q, ATTO Rho101, ATTO 590, ATTO Rho13, ATTO 594, ATTO 610, ATTO 612Q, ATTO 620, ATTO Rho14, ATTO 633, ATTO 647, ATTO 647N, ATTO 655, ATTO Oxa12, ATTO 665, ATTO 680, ATTO 700, ATTO 725, ATTO 740, ATTO MB2, AMCA, AMCA-S, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY 530/550, BODIPY TMR, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY TR, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, Biosearch Blue, CAL Fluor Gold 540, CAL Fluor Orange 560, CAL Fluor Red 590, CAL Fluor Red 610, CAL Fluor Red 635, Pulsar 650, Quasar 570, Quasar 670, Quasar 705. FAM, Fluorescein, Fluorescein-C3, Calcein, Carboxyrhodamine 6G, Carboxy-X-rhodamine (ROX), Cascade Blue, Cascade Yellow, Cy2, Cy3, Cy5, Cy3.5, Cy5.5, Cy7, Dansyl, Dapoxyl, Dialkylaminocoumarin, 4',5'- Dichloro-2',7'-dimethoxy-fluorescein, DM-NERF, Eosin, Erythrosin, HEX, Hydroxycoumarin, IRD40, IRD 700, IRD 800, JOE, Lissamine rhodamine B, LC Red 610, LC Red 640, Marina Blue, Methoxycoumarin, Naphthofluorescein, NED, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, PyMPO, Pyrene, Phycoerythrin, Rhodamine 6G, Rhodamine Green, Rhodamine Red, Rhodol Green, 2',4',5',7'-Tetra-bromosulfonefluorescein, Tetramethyl-rhodamine (TMR), Carboxytetramethylrhodamine (TAMRA), Texas Red, Texas Red-X. TET, VIC, Yakima Yellow, BMN-Q460, DDQ-I, Dabcyl, BMN-Q530, BMN-Q535, Eclipse, Iowa Black FQ, BHQ-1, TQ2, IQ4, QSY-7, BHQ-2, TQ3, DDQ-II, BBQ-650, Iowa Black RQ, QSY-21, BHQ-3 등이 있을 수 있으며 위 나열에 한정하지 않고 어떠한 형광 물질과 퀀처도 포함할 수 있다.

[60] 또한 SCO와 CCTF의 반응이 증폭반응 및 CCTF 형성 반응과 동시에 일어나게 되는데, SCO의 이중가닥 형성 비율이 표적 서열의 증폭 양과 비슷한 효율로 나타남을 활용하여 고유해리 온도를 갖는 SCO의 Ct 그래프를 작성할 수 있고, 이를 이용해 고유 해리 온도 분석 방법과 다른 방식으로 표적서열의 동정이 가능하다.

[61] 본 발명의 해결 수단으로 작성된 상기의 내용은 본 발명의 실시예를 통해 가장 바람직한 구현예로써 보다 상세히 서술될 것이다.

### 발명의 효과

[62] 본 발명은 증폭반응 중 제한효소에 의해 임의의 표식 (CCTF)이 생성 및 절단되므로 표식을 형성하기 위해 첨가한 인위 서열 (CTPO)이 증폭 반응이 일어나기 전 제한효소 인지서열의 이중가닥이 형성되지 않아 무작위로 절단될 가능성이 없고, PCR 중 표적 서열 특이적으로 생성된 반응 산물에 의해서만

표식이 생성되므로 CCTF를 형성하는데 정확도가 높고, PCR 증폭 산물의 길이 또는 특정 서열의 특이도에 의존하던 기존 PCR 결과 분석 방법보다 정교한 분석 결과를 얻을 수 있으며, 다양한 종류의 증폭 산물을 동일한 길이로 생산하더라도 특이적으로 증폭산물의 구분 및 해석이 가능하다. 또한 이렇게 생성된 CCTF의 해석은 염기서열을 활용한 분석법에 대부분 적용이 가능하므로 해석을 위한 장치를 범용적으로 선택, 적용할 수 있다. 특히 이는 증폭반응을 이용한 신속한 다중분석이 필요한 진단 등의 분야에서 활용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [63] 도면 1은 CCTF 형성 모식도로서 PCR 반응 중 사용되는 CTPO 및 CCTF의 생성 과정, CCTF의 분석을 위한 예시를 모식화한 대표도이다.
- [64] 도면 2는 듀얼 타겟 PCR에서 CCTF의 형성 및 MALDI 분석 결과이다. 표적 서열마다 각기 다른 CCTF를 형성할 수 있도록 CTPO를 디자인하고, 증폭반응을 거쳐 MALDI로 분석한 결과 *Neisseria gonorrhoeae* (NG)를 증폭하여 절단된 CCTF 1과 *Mycoplasma hominis* (MH)를 증폭하여 절단된 CCTF 2의 질량에 해당하는 피크가 관찰되었다.
- [65] 도면 3은 성매개 질환의 원인체에 대한 Real-time PCR 용융 피크(Melting Peak) 분석 결과이다. *Chlamydia trachomatis*(CT), *Neisseria gonorrhoea* (NG) *Mycoplasma hominis*(MH), *Mycoplasma genitalium*(MG), *Trichomonas vaginalis*(TV), *Ureaplasma urealyticum*(UU), *Ureaplasma parvum*(UP), *Candida albicans*(CA), *Gardnerella vaginalis*(GV), *Herpes simplex virus 1*(HSV 1), *Herpes simplex virus 2*(HSV 2), *Treponema pallidum*(TP) 및 내부대조물질 (Internal Control, IC)의 타겟 별 다중 고유해리온도 측정을 나타낸 결과로 각각의 SCO가 갖는 고유해리온도 (CT : FAM 80 °C, NG : HEX 76.5 °C, MH : HEX 68 °C, MG : CalRed610 67.5 °C, TV : Quasar670 71.5 °C, UU : CalRed610 77 °C, UP : FAM 77 °C, CA : FAM 65 °C, GV : Quasar670 78.5 °C, HSV 1 : Quasar705 73.5 °C, HSV 2 : Quasar705 79 °C, TP : Quasar705 66 °C, IC : Quasar670 63.5 °C)에서 피크가 관찰되었고 (a)(b)(c)(d)(e)(f), 동일한 조성에서 표적 서열이 투입되지 않았을 경우에는 CCTF를 가시화하는 SCO의 피크가 관찰되지 않았다(g).
- [66] 도면 4는 위장관질환 원인체에 대한 Real-time PCR 용융 피크(Melting Peak) 분석 결과이다. *Rotavirus A*(RVA), *Astrovirus*(AstV), *Adenovirus F40*(AdV 40), *Adenovirus F41*(AdV 41), *Norovirus GI*(NoV GI), *Norovirus GII*(NoV GII) 및 외부정도물질 (External control) 의 타겟별 다중 고유해리온도 측정을 나타낸 결과로 각각의 SCO가 갖는 고유해리온도 (RVA: HEX 78°C, AstV: CalRed610 78°C, AdV 40: CalRed610 67°C, AdV 41: CalRed610 67°C, NoV GI: FAM 68°C, NoV GII: FAM 84°C, EC: HEX 69°C)에서 피크가 관찰되었고 (a)(b)(c)(d), 동일한 조성에서 표적 서열이 투입되지 않았을 경우에는 CCTF를 가시화하는 SCO의 피크가 관찰되지 않았다(e).

- [67] 도면 5는 인유두종 바이러스 검출을 위한 Real-time PCR 용융 피크(Melting Peak) 분석 결과이다. 16형, 18형, 33형, 35형, 51형, 53형, 59형, 68a형, 82형 및 IC의 타깃별 다중 고유해리온도 측정을 나타낸 결과로 각각의 SCO가 갖는 고유해리 온도 (16형: HEX 76.5°C, 18형: FAM 78°C, 33형: Quasar670 71°C, 35형: Quasar670 71°C, 51형: Quasar670 71°C, 53형: Quasar670 71°C, 59형: Quasar670 71°C, 68형a: Quasar670 71°C, 82형: Quasar670 71°C, IC: Quasar670 67.5°C)에서 피크가 관찰되었고 (a)(b)(c)(d), 동일한 조성에서 표적 서열이 투입되지 않았을 경우에는 CCTF를 가시화하는 SCO의 피크가 관찰되지 않았다(e).
- [68] 도면 6은 호흡기 질환 유발 바이러스 검출을 위한 Real-time PCR 용융 피크(Melting Peak) 분석 결과이다. Influenza A/H1N1(H1), Influenza A/H3N2(H3), Influenza A/H1N1/2009pdm(2009pdm), Influenza B(Flu B), Parainfluenza 1(PIV 1), Parainfluenza 3(PIV 3), Respiratory syncytial virus A(RSV A), Respiratory syncytial virus B(RSV B), Human metapneumovirus(MPV), Adenovirus(AdV), 외부 정도물질(EC, External control)의 타깃 별 다중 고유해리온도 측정을 나타낸 결과로 각각의 SCO가 갖는 고유해리 온도 (H1: FAM 67.5°C, H3: FAM 76.5°C, 2009pdm: FAM 86.5°C, Flu B: CalRed610 83.5°C, PIV 1: Quasar670 66°C, PIV 3: Quasar670 74°C, RSV A: HEX 63.5°C, RSV B: CalRed610 72°C, MPV: HEX 86°C, ADV: Quasar670 85°C, EC: CalRed610 68.5)에서 피크가 관찰되었고 (a)(b)(c)(d)(e), 동일한 조성에서 표적 서열이 투입되지 않았을 경우에는 CCTF를 가시화하는 SCO의 피크가 관찰되지 않았다(f).
- [69] 도면 7은 BDNF gene의 단일염기다형성인 rs6265의 유전자형을 분석하기 위한 Real-time PCR 용융 피크(Melting Peak) 분석 결과이다. 돌연변이형인 A/A, 야생형인 G/G 및 이형접합체인 A/G의 타깃 별 다중 고유해리온도 측정을 나타낸 결과로 각각의 SCO가 갖는 고유해리 온도 (A/A: 76.5°C, A/G: 76.5°C와 75°C, G/G 75°C, IC: 66°C)에서 피크가 관찰되었고 (a)(b)(c)(d), 동일한 조성에서 표적 서열이 투입되지 않았을 경우에는 CCTF를 가시화하는 SCO의 피크가 관찰되지 않았다(e).
- [70] 도면 8은 Real-time PCR Ct 그래프 결과이다. 각 원인균별 genomic DNA를 100pg/ul 농도부터 10배씩 희석한 *Neisseria. gonorrhoea* (NG), *Mycoplasma. hominis* (MH), *Ureaplasma. parvum* (UP)의 다중 실시간 중합연쇄반응 실험 조건에서 나타난 SCO의 형광 증폭곡선 (fluorescent amplification curves) 및 표준곡선 (standard curves)을 나타낸 결과로, (a) 그래프는 세 표적 서열이 농도 별로 동시 존재할 경우 그려지는 형광증폭곡선을 가리키고, (b) 그래프는 세가지 표적 서열 모두 포함되지 않을 경우 그려지는 음성 결과이다. (a) 그래프 중 NG에 해당하는 그래프를 단일 형광 증폭곡선으로 나타내어 표준곡선을 나타내면 (c) 및 (d)로 나타낼 수 있고, MG 해당 그래프는 (e) 및 (f)로 나타낼 수 있으며, UP 해당 곡선은 (g) 및 (h)로 나타낼 수 있다.

## 발명의 실시를 위한 형태

- [71] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- [72] 실시예 1. 듀얼 타겟 PCR에서 CCTF의 형성 및 MALDI 분석
- [73] 다중 표적 서열 검출을 위한 PCR 반응 중 형성된 CCTF를 MALDI-TOF MS를 이용해 질량 분석하여 표적 특이적으로 검출이 가능함을 증명하기 위해 본 실험을 진행하였다. 본 실시예 1에서는 성매개 질환의 원인체인 *Neisseria gonorrhoeae* (NG) 및 *Mycoplasma hominis* (MH)의 DNA를 대상으로 실시하였다.
- [74] 1. 표적 주형 DNA 및 서열 특이적으로 제작된 프라이머
- [75] 본 실시예에서 표적하는 NG 및 MH의 정방향 프라이머는 CTPO로서 발명의 상세한 설명에 기술된 방법에 기초하여 제작되었다. 정방향 프라이머의 5' 말단은 CCTF의 주형으로서 사용될 수 있도록 NG 및 MH의 DNA와 비-상보적인 서열로 구성된 임의의 염기서열이며, 바로 연속하여 제한효소 인지서열이 위치하도록 하였다. 제한효소 인지서열 이후부터 3' 말단까지는 NG 및 MH의 DNA의 표적 부위와 상보적인 서열로 구성되어 있어 프라이머로서 역할을 수행한다. 또한, 정방향 프라이머 5' 말단은 각기 다른 개수의 뉴클레오타이드로 구성하여 생성되는 CCTF 마다 상이한 질량값을 갖도록 하였으며, 이는 CCTF가 형성되었을 때 질량으로서 증폭물을 구분해 낼 수 있도록 설계 하기 위함이다. 역방향 프라이머는 NG 및 MH의 DNA의 표적 부위와 상보적인 서열로 구성되어 있다.
- [76] 프라이머 정보 및 증폭되어 생성되는 표적 서열 정보는 다음과 같다.
- [77] 프라이머 1: 5'-TGAACTAT\***CCTGG**  
TCCGACGTTTCGGTTGTGTTGAAACACCGCCCGG-3' (서열번호 1)
- [78] 프라이머 2: 5'-GCTCCTTATTCGGTTTGACCGG-3' (서열번호 2)
- [79] 프라이머 3: 5'-ATCTATGATA\***CCTGG**  
TTTAGCTCCTATTGCCAACGTATTGG-3' (서열번호 3)
- [80] 프라이머 4: 5'-TGTGTGGAGCATCTTGTAATCTTTGGTC-3' (서열번호 4)
- [81] 증폭물 1: GenBank: CP012028.1 / Position (start-end): 251416 - 251506
- [82] 5'TGAACTAT\***CCTGG**TCCGACGTTTCGGTTGTGTTGAAACACCGCCCGGA  
ACCCGATATAATCCGCCCTTCAACATCAGTGAAAATCTTTTTTTTAACCGGT  
CAAACCGAATAAGGAGC-3' (서열번호 5)
- [83] 증폭물 2: GenBank: AJ243692.1 / Position (start-end): 835 - 944
- [84] 5' ATCTATGATA\***CCTGG**  
TTTAGCTCCTATTGCCAACGTATTGGAAAAAACTTTGGTATTGAAAAAGG  
ATT
- [85] TATGACAACAGTCCACTCATATACAGCAGACCAAAGATTACAAGATGCTC

## CACACA-3' (서열번호 6)

[86] 상기 프라이머 서열 중 굵고 기울어진 글씨체는 제한효소 인지서열을 의미하며 밑줄은 이로 인해 생성되는 CCTF의 상보적인 서열이다. 본 발명의 실시예에서 \*로 표시된 부분은 PspGI 제한효소가 절단하는 부위를 blocking 하기 위해 인지서열 중 C에 modified dCTP가 삽입되었다는 표식이다.

[87] 증폭물에서 생성되는 CCTF의 서열 및 질량은 다음과 같다.

[88] CCTF 1: 5'-CCAGGATAGTTCA-3' / 4038.6 Da (서열번호 7)

[89] CCTF 2: 5'-CCAGGTATCATAGAT-3' / 4351.8 Da (서열번호 8)

## [90] 2. PCR 증폭

[91] 정방향 프라이머로서 프라이머 1, 프라이머 3를, 역방향 프라이머로서 프라이머 2, 프라이머 4를 투입하여 동시에 PCR 반응을 진행하고 CCTF의 형성 여부를 파악하였다. 각각 프라이머를 3  $\mu$ M, PspGI (NEB, USA) 2U, PCR 버퍼 (PCR buffer, 1x), MgSO<sub>4</sub> 3 mM, dNTP 400  $\mu$ M, Vent 폴리머라아제(Vent Polymerase) (NEB, USA) 1 U 및 NG, MH 주형 DNA 100 pg/ul 가 포함된 총 반응액 20  $\mu$ l를 다음의 조건으로 C1000 PCR (Bio-Rad, USA)를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다.

[92] 94°C 10분,

[93] 94°C 30초, 62°C 30초 72°C 30초 (35 cycles),

[94] 85°C 2.5시간

## [95] 3. PCR 반응 중 절단된 절편의 정제 및 탈염

[96] PCR 반응 중 제한효소로 처리되어 절단된 DNA 절편을 상기 용액으로부터 분리하기 위하여 Oasis (Waters) C18 이온 수지 교환 컬럼 (C18 reverse phase column chromatography)을 이용하였다. 상기 제한효소로 처리한 용액에 0.15 M 트리에틸암모늄아세테이트 (TEAA, pH 7.6) 70  $\mu$ l를 넣어 1분간 둔다. 컬럼에 100% 아세토니트릴 (ACN; Sigma, USA)과 0.1 M TEAA 1 ml을 통과시켜 레진 (Resin)을 활성화시킨 후, 상기 제한효소로 처리한 용액과 0.15 M TEAA와의 혼합액 100  $\mu$ l, 0.1 M TEAA 2 ml 및 3차 증류수 1 ml를 차례로 완전히 통과시킨다. 수집 플레이트 (Collection Plate) 위에 상기 컬럼을 위치시키고, 70% ACN 100  $\mu$ l을 넣어 통과시킨다. 용출액이 수집 플레이트에 모아지면, 상기 수집 플레이트를 120°C에서 60분간 건조시킨다.

## [97] 4. MALDI-TOF MS 분석

[98] 말디 매트릭스(MALDI matrix)[22.8 mg 암모늄 시트레이트, 148.5 mg 히드록시피콜린산(hydroxypicolinic acid), 1.12 ml 아세토니트릴, 7.8 ml H<sub>2</sub>O] 4  $\mu$ l를 말디-토프 메스 스펙트로메트리(Biflex IV, Bruker)의 앵커 칩 플레이트 (Anchor chip plate)에 미리 점적 (dotting)한 후, 37°C에서 30분 동안 건조시킨다. 정제 및 탈염 과정을 거친 수집 플레이트의 샘플에 3차 증류수를 10  $\mu$ l을 넣어 녹여낸 후, 건조된 말디 매트릭스 위에 2  $\mu$ l 점적하고, 말디 매트릭스를 다시 37°C에서 30분 동안 건조시킨 후, 말디-토프 메스 스펙트로메트리로 분석한다.

분석방법은 말디-토프 매스 스펙트로메트리의 매뉴얼을 따른다.

- [99] 상기 반응에 의해 생성된 CCTF를 질량분석기로 분석한 결과는 도 2에 도시되는 바와 같다. 도 2의 결과 프라이머 1과 프라이머 2의 조합으로 PCR을 수행하였을 때 형성될 수 있는 CCTF 1의 질량인 4083 Da과, 프라이머 3과 프라이머 4의 조합으로 PCR 수행하였을 때 형성되는 CCTF 2의 질량인 4351 Da의 피크를 확인할 수 있었다(a). 이를 통해 CTPO에 의해 형성된 CCTF를 이용해 PCR 증폭 산물을 분석할 수 있음을 입증하였고, 여러 가지 프라이머가 혼입되어 있는 반응물에서도 표적 서열을 정확히 증폭하고 구분하는데 CCTF을 활용할 수 있음을 검증하였다.
- [100] 따라서 CCTF의 표식화 기법을 이용하여 PCR을 수행하고, PCR 수행 이후 MALDI-TOF MS를 활용한 질량분석법을 통해 다양한 길이의 표식 절편을 감별하여 기존의 PCR 방식보다 정교하게 표적 핵산 서열의 검출이 가능함을 증명하였다.
- [101] 실시에 2. 다중 타겟 PCR에서 CCTF의 형성 및 CCTF의 고유 해리온도 피크 분석
- [102] PCR 반응 중 생성된 CCTF는 고유 해리온도에서 형광 시그널을 낼 수 있는 SCO과 결합하여 고유 해리 온도 피크를 형성하게 되는데, 이를 Real-time PCR 기기를 이용해 PCR 과정 후 직접 관찰이 가능토록 하였다. PCR 반응 중 CCTF가 형성됨과 동시에 반응 용기 안에 함께 투입되어 있는 SCO의 CCTF 상보적 서열 부위와 혼성화를 이루게 되고, 이중 가닥을 형성하게 된다. 이 이중 가닥을 단일 가닥으로 해리시킬 때 보여지는 SCO의 고유 해리 온도를 측정하여 CCTF의 종류를 Real-time PCR 기기를 통해 PCR과 동시에 구분 및 분석할 수 있다. 본 실시예에서 사용된 SCO은 각기 다른 형광리포터를 사용하고 고유해리온도를 조절하여 CCTF의 구분이 가능하도록 하였다.
- [103] 본 실시예에서는 성매개 질환의 원인체 12종, 위장관질환 원인체 5종, 인유두종 바이러스 아형 9종, 호흡기 질환 원인체 10종, BDNF 유전자의 단일염기변이 rs6265 핵산을 Real-time PCR 기기를 이용하여 CCTF 분석을 실시하였다.
- [104] 1. 성매개 질환 원인체 다중 타겟 PCR에서 CCTF의 형성 및 CCTF의 고유 해리온도피크 분석
- [105] 성매개 질환의 원인체인 Chlamydia trachomatis(CT), Neisseria. gonorrhoea (NG) Mycoplasma hominis(MH), Mycoplasma genitalium(MG), Trichomonas vaginalis(TV), Ureaplasma urealyticum(UU), Ureaplasma parvum(UP), Candida albicans(CA), Gardnerella vaginalis(GV), Herpes simplex virus 1(HSV 1), Herpes simplex virus 2(HSV 2), Treponema pallidum(TP) 및 내부대조물질 (Internal Control, IC)의 DNA의 Real-time PCR 기기를 이용한 CCTF 분석을 실시하였다.
- [106] 1) 표적 서열 주형 DNA의 서열 특이적으로 제작된 프라이머
- [107] 본 실시예에서 사용된 정방향 프라이머는 CTPO로 앞선 실시예 1과 동일한 원리로 제작되었다. CTPO의 5' 말단은 19 ~ 20mer의 뉴클레오타이드 서열로

구성되었으며, CCTF를 형성할 수 있도록 표적 서열의 DNA와 비-상보적인 서열로 구성된다. 이후 제한효소 인지서열이 위치하였고, 이후부터 3' 말단까지는 각각의 표적 부위와 상보적인 서열로 구성되어 있어 프라이머로서 역할을 수행한다. 역방향 프라이머는 각각의 증폭하고자 하는 표적 부위와 상보적인 서열로 구성되어 있다.

- [108] 또한 CCTF와 상보적 결합을 형성하여 이중가닥의 주형이 되는 SCO는 3' 말단의 형광상쇄분자(BHQ-1 또는 BHQ-2)를 위치시키고, 형광리포터 분자를 일정거리를 갖도록 위치시켰다.
- [109] 프라이머 정보 및 증폭되어 생성되는 표적 서열 정보는 다음과 같다.
- [110] 프라이머 5 :  
5'-CCACTCCAGCCGGCTGACA\*CCAGGACTTGGTGTGACGCTATCAGCAT-3'  
(서열번호 9)
- [111] 프라이머 6 : 5'-GTTTTCAAACACGGTCGAAAACAAAGTC-3' (서열번호 10)
- [112] 프라이머 7 :  
5'-CATCGCCACGAGCCGGTTAA\*CCAGGTTGAAACACCGCCCGGAACCC-3'  
(서열번호 11)
- [113] 프라이머 8 : 5'-GTCCTTATTCGGTTTGACCGGT-3' (서열번호 12)
- [114] 프라이머 9 :  
5'-ACTCACGCTAATGGAGCGCA\*CCAGGTTTAGCTCCTATTGCCAACGTATT  
GG-3' (서열번호 13)
- [115] 프라이머 10 : 5'-TGTGTGGAGCATCTTGTAATCTTTGGTC-3' (서열번호 14)
- [116] 프라이머 11 :  
5'-GCTACCCAGCCGGCTACAAG\*CCAGGCTTTATGGTGCTTATATTGGTGGC  
ATG-3' (서열번호 15)
- [117] 프라이머 12 : 5'-CTGTATAACGTTGTGCAGCAGGTC-3' (서열번호 16)
- [118] 프라이머 13 :  
5'-TGCCGCGTGATTCGATCCCA\*CCAGGTATGTCCGGCACAACATGCGCT-3'  
(서열번호 17)
- [119] 프라이머 14 : 5'-GAGCTTACGAAGGTCGGAGTTGA-3' (서열번호 18)
- [120] 프라이머 15 :  
5'-TTCATAGCTGGGCCGCTG\*CCAGGAAGTAGCATATGATGAAGCACACA  
ACA-3' (서열번호 19)
- [121] 프라이머 16 : 5'-TAATGCAACGTGCATTTGCTTCAAC-3' (서열번호 20)
- [122] 프라이머 17 :  
5'-CAGATCGTTGGCACTCTGCGA\*CCAGGTTAAAGTAGCATATGATCAAGCT  
CATTCA-3' (서열번호 21)
- [123] 프라이머 18 : 5'-TTGTAATGATACAACGAGCATCATTAAT-3' (서열번호 22)

- [124] 프라이머 19 :  
5'-GCTCGTATGCCGCTCCATATA\*CCAGGCCAAATCTGGATCTTCCTCTGCA  
TC-3' (서열번호 23)
- [125] 프라이머 20 : 5'-GAGCTTGAGCTGGACCCAGAG-3' (서열번호 24)
- [126] 프라이머 21 :  
5'-ACGTGCCGTGCATCGTTGCA\*CCAGGCAACCGGCTCCATTTTGGTGGAG-3'  
' (서열번호 25)
- [127] 프라이머 22 : 5'-CGTCACGTCCTTCATCGGTCC-3' (서열번호 26)
- [128] 프라이머 23 :  
5'-TCGCAGTCCCGTCGAGGAA\*CCAGGAGGCCTGGCTATCCGGAGAAAC-3'  
(서열번호 27)
- [129] 프라이머 24 : 5'-CGTTGTGTTGGCCGCAGGTC-3' (서열번호 28)
- [130] 프라이머 25 :  
5'-CTCATAGCTAGGCGCCTG\*CCAGGGCTGCACGTGGGTCTGTTGTG-3'  
(서열번호 29)
- [131] 프라이머 26 : 5'-GGAAACGCAGGCCACGAAACC-3' (서열번호 30)
- [132] 프라이머 27 :  
5'-GCTTCGCGTCTCAGGCCTGT\*CCAGGGGGCATTACAGTTTTGCGTCATGA  
C-3' (서열번호 31)
- [133] 프라이머 28 : 5'-CAAGTCTGAGCACTTGCACCG-3' (서열번호 32)
- [134] 프라이머 29 :  
5'-CTGTTAGCTCTGCGAGCT\*CCAGGGGAGCGACACTTGTGGTGTGAC-3'  
(서열번호 33)
- [135] 프라이머 30 : 5'-TGATGAAATGAAGCCACCCGTGC-3' (서열번호 34)
- [136] SCO 1 :  
TCGGAGCCAGCGCGGCGTAAAC[T(FAM)]CCACTCCAGCCGGCTGACA[BHQ  
1] (서열번호 35)
- [137] SCO 2 :  
TACAACAGCAGTACGGAGACGAC[T(HEX)]CATCGCCACGAGCCGGTTAA[B  
HQ1] (서열번호 36)
- [138] SCO 3 :  
ATTTATTCTTACTCGATGTAAA[T(HEX)]ACTCACGCTAATGGAGCGCA[BH  
Q1] (서열번호 37)
- [139] SCO 4 :  
TATATATATATATTATTATAAAA[T(CalRed610)]GCTACCCAGCCGGCTACAAG  
[BHQ2] (서열번호 38)
- [140] SCO 5 :  
AAGAATAACTACTACAATCTACT[T(Quasar670)]TGCCGCGTGATTCGATCCC

- A[BHQ2] (서열번호 39)
- [141] SCO 6 :  
TTATTATTATTATTATTATATA[T(CalRed610)]TCTCATAGCTGGGCCGCTG[BHQ2] (서열번호 40)
- [142] SCO 7 :  
AATCTTCAATGCTTACCGTA[T(FAM)]CAGATCGTTGGCACTCTGCGA[BHQ1] (서열번호 41)
- [143] SCO 8 :  
AAAATAAATAATATAATATA[T(FAM)]GCTCGTATGCCGCTCCATATA[BHQ1] (서열번호 42)
- [144] SCO 9 :  
TCGGAGCCAGCGCGGCGTAACG[T(Quasar670)]ACGTGCCGTGCATCGTTGCA[BHQ2] (서열번호 43)
- [145] SCO 10 :  
AAGAATAACTACTACAATCTAC[T(Quasar705)]TTCGCAGTCCCGTCGAGGAA[BHQ2] (서열번호 44)
- [146] SCO 11 :  
TCGGAGCCAGCGCGGCGTAA[T(Quasar705)]CTCTCATAGCTAGGCGCCTG[BHQ2] (서열번호 45)
- [147] SCO 12 :  
AAAATAAATAATATAATATAG[T(Quasar705)]CTTCGCGTCTCAGGCCTGT[BHQ2] (서열번호 46)
- [148] SCO 13 :  
AAAATAAATAATATAATATA[T(Quasar670)]TCTGTTAGCTCTGCGAGCT[BHQ2] (서열번호 47)
- [149] 증폭물 3 : GenBank : X52557.1 / Position (start-end) : 157- 227
- [150] CCACTCCAGCCGGCTGACA\***CCAGG**ACTTGGTGTGACGCTATCAGCATGC  
GTATGGGTTACTATGGTGACTTTGTTTTTCGACCGTGTTTTGAAAAC  
(서열번호 48)
- [151] 증폭물 4 : GenBank : X52364.1 / Position (start-end) : 375 - 459
- [152] CGCCCACCGCATCCCGCGCCCCCTCCCTCAGCA\***CCAGG**TGAAACACCGC  
CCGAACCCGATATAATCCGCCCTTCAACATCAGTGAAAATCTTTTTTTAA  
CCGGTCAAACCGAATAAGGAGC (서열번호 49)
- [153] 증폭물 5 : GenBank : AJ243692.1 / Position (start-end) : 835 - 944
- [154] ACTCACGCTAATGGAGCGCA\***CCAGG**TTTAGCTCCTATTGCCAACGTATT  
GGAAAAAACTTTGGTATTGAAAAAGGATTTATGACAACAGTCCACTCATA  
TACAGCAGACCAAAGATTACAAGATGCTCCACACA (서열번호 50)
- [155] 증폭물 6 : GenBank : U09251.1 / Position (start-end) : 3462 - 3687

- [156] GCTACCCAGCCGGCTACAAG\***CCAGG**C TTTATGGTGCTTATATTGGTGGC  
 ATGCACCATGATCGTCCTTTTAAAAAGTCTGCGAGGATTGTTGGTGATGTA  
 ATGAGTAAATTCCACCCTCATGGTGATATGGCAATATATGACACCATGTCA  
 AGAATGGCTCAAGACTTTTCATTAAGATACCTTTTAATTGATGGTCATGGT  
 AATTTTGGTTCTATAGATGGTGATAGACCTGCTGCACAACGTTATAACAG  
 (서열번호 51)
- [157] 증폭물 7 : GenBank : XM\_001582993.1 / Position (start-end) : 705 - 768
- [158] TGCCGCGTGATTTCGATCCCA\***CCAGG**TATGTCCGGCACAACATGCGCTTA  
 TGTCCGGCACAACATGCGCTCTCCGCTTCCCAGGTCAGCTCAACTCCGACC  
 TTCGTAAGCTC (서열번호 52)
- [159] 증폭물 8 : GenBank : AF085700.2 / Position (start-end) : 4673 - 4873
- [160] TCTCATAGCTGGGCCGCTG\***CCAGG**AAGTAGCATATGATGAAGCACACA  
 ACAAATGGCGCATACTGTGTATTTCACTAATTTCTATCGTTCATCAAAACC  
 ACTATTTTATAGATGAAGAAGACCCAATTAATCCCTGTTTTCAAACATATTAGT  
 ATGGGTGGGGGTTATGTATCTGGTGAAGTGTATCGTTCTGATTTTGAAGTT  
 GAAGCAAATGCACGTTGCATTA (서열번호 53)
- [161] 증폭물 9 : GenBank : AF085733.2 / Position (start-end) : 4677 - 4886
- [162] CAGATCGTTGGCACTCTGCGA\***CCAGG**TAAAGTAGCATATGATCAAGCT  
 CATTCAAAAATGGCACATACTGTCTATTTTACGAATTTTATCGTTCATCTA  
 AACCTTTATTTTATAGATGAAGAAGATCCAATCAACCCCTGTTTTCAAACAA  
 TTAGTATGGGTGGTGGATATGTTTCAGGTGAAATTTATCGTTCTGATTTTGA  
 AATTAATGATGATGCTCGTTGTATCATTACAA (서열번호 54)
- [163] 증폭물 10 : GenBank : M90812.1 / Position (start-end) : 1736 - 1811
- [164] GCTCGTATGCCGCTCCATATA\***CCAGG**C CAAATCTGGATCTTCCTCTGCA  
 TCTGCTTCTGGATCATCAAGCAGCAGCACCAGCTCTGGGTCCAGCTCAAGC  
 TC (서열번호 55)
- [165] 증폭물 11 : GenBank : L08167.1 / Position (start-end) : 273 - 434
- [166] ACGTGCCGTGCATCGTTGCA\***CCAGG**CAACCGGCTCCATTTTGGTGGAGT  
 CGCTTGATCGTTTTGTGATCGTTTAGTGTGATGATTTATTATGTCTAGAGAG  
 TTAAGCGATAGGCTTTTACTGGTGTATCACTGTAAGGGCGTATTGGTTGGA  
 TGCCTTGGTAGACAGGACCGATGAAGGACGTGACG (서열번호 56)
- [167] 증폭물 12 : DQ889502.1 / Position (start-end) : 123860 - 124007
- [168] TCGCAGTCCCGTTCGAGGAA\***CCAGG**AGGCCTGGCTATCCGGAGAAACAG  
 CACACGACTTGGCGTTCTGTGTGTCGCGATGTCTCTGCGCGCAGTCTGGCA  
 TCTGGGGCTTTTGGGAAGCCTCGTGGGGGCTGTTCTTGCCGCCACCCATCG  
 GGGACCTGCGGCCAACACAACG (서열번호 57)
- [169] 증폭물 13 : GenBank : EU018100.1 / Position (start-end) : 561 - 746
- [170] CTCATAGCTAGGCGCCTG\***CCAGG**GCTGCACGTGGGTCTGTTGTGGGTAG

AGGTGGGCGGGGAGGGCCCCGGCCCCACCGCCCCCCCCACAGGCGGCGCG  
 TGCGGAGGGCGGCCCGTGCCTCCCCCGGTCCCCGCGGGCCGCCCGTGGCG  
 CTCGGTGCCCCCGGTATGGTATTCCGCCCCCAACCCCGGGTTTCGTGGCCT  
 GCGTTTCC (서열번호 58)

[171] 증폭물 14 : GenBank : U57757.1 / Position (start-end) : 910 - 1067

[172] GCTTCGCGTCTCAGGCCTGT\***CCAGGGGGCATTACAGTTTTGCGTCATGA**  
 CGGCTTTGAAGCTGACGACCTCATTGCAACCCTAGCAAAACGAGTTGCGGC  
 TGAGCACTGTCATGTTGTGATTATCTCCTCAGATAAAGATGTACTTCAGCTT  
 GTGTGTGATACGGTGCAAGTGCTCAGACTTG (서열번호 59)

[173] 증폭물 15 : GenBank : NM\_001035551.2 / Position (start-end) : 214 - 369

[174] CTGTTAGCTCTGCGAGCT\***CCAGGGGAGCGACACTTGTGGTGTGACAA**  
 GTTCGGTAACAAATACTACCAGAAGCTAGGCGATACTCAATACGGTATGCA  
 CAGATGGGTAGAGTATGCTTCAAAGGATCGTTACAACGCATCTCAAGTACC  
 AGCTGAATGGCACGGGTGGCTTCATTTTCATCA (서열번호 60)

[175] 상기 프라이머 서열 중 굵고 기울어진 글씨체는 제한효소 인지서열을 의미하며  
 밑줄은 이로 인해 생성되는 CCTF의 상보적인 서열이다. \*로 표시된 부분은  
 PspGI 제한효소가 절단하는 부위를 blocking 하기 위해 인지서열 중 C에 modified  
 dCTP가 삽입되었다는 표식이다. SCO에서 괄호는 형광상쇄분자와  
 형광리포터가 위치한 염기서열의 위치를 의미한다. 증폭물로부터 생성되는  
 CCTF의 서열은 다음과 같다.

[176] CCTF 3 : 5'- CCTGGTGTGAGCCGGCTGGAGTGG -3' (서열번호 61)

[177] CCTF 4 : 5'- CCTGGTAAACCGGCTCGTGGCGATG -3' (서열번호 62)

[178] CCTF 5 : 5'- CCTGGTGCGCTCCATTAGCGTGAGT -3' (서열번호 63)

[179] CCTF 6 : 5'- CCTGGCTTGTAGCCGGCTGGGTAGC -3' (서열번호 64)

[180] CCTF 7 : 5'- CCTGGTGGGATCGAATCACGCGGCA -3' (서열번호 65)

[181] CCTF 8 : 5'- CCTGGCAGCGGCCAGCTATGAGA -3' (서열번호 66)

[182] CCTF 9 : 5'- CCTGGTCGCAGAGTGCCAACGATCTG -3' (서열번호 67)

[183] CCTF 10 : 5'- CCTGGTATATGGAGCGGCATACGAGC -3' (서열번호 68)

[184] CCTF 11 : 5'- CCTGGTGCAACGATGCACGGCACGT -3' (서열번호 69)

[185] CCTF 12 : 5'- CCTGGTTCCTCGACGGGACTGCGA -3' (서열번호 70)

[186] CCTF 13 : 5'- CCTGGCAGGCGCCTAGCTATGAG -3' (서열번호 71)

[187] CCTF 14 : 5'- CCTGGACAGGCCTGAGACGCGAAGC -3' (서열번호 72)

[188] CCTF 15 : 5'- CCTGGAGCTCGCAGAGCTAACAG -3' (서열번호 73)

[189] 2) PCR 증폭 및 SCO 고유해리온도 측정

[190] 각각 프라이머 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,  
 25, 26, 27, 28, 29, 30과 SCO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 을 각각 0.15  $\mu$ M,  
 PspGI (NEB, USA) 5U, PCR 버퍼(PCR buffer, 1x), MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTP 200  $\mu$ M,  
 h-Taq DNA polymerase (Solgent, Korea) 1.6 U 및 CT, NG, MH, MG, TV, UU, UP,

CA, GV, HSV1, HSV2, TP 및 IC의 genomic DNA 100 pg/rxn의 template DNA를 첨가하여 총 반응액 20  $\mu$ l로 CFX96 Real-time PCR (Bio-Rad, USA)를 이용하여 다음의 PCR 반응을 수행하였다.

[191] 95°C 15 분,

[192] 95°C 30 초, 63°C 1 분 (50 cycles),

[193] 변성 온도 95°C에서 15분 동안 1회 수행하고, 변성 온도 95°C에서 30초, 어닐링 온도 63°C에서 1분인 사이클을 50회 반복하여 수행하였다. 반응 후, 동일 기기 내에서 반응 혼합물을 50°C로 냉각시키고, 50°C에서 30 초간 유지시킨 다음, 50°C에서 95°C로 천천히 가열시킴으로써 고유해리온도 분석곡선을 얻었다. 데이터 분석은 Bio-Rad CFX Manager 1.6을 이용하였다.

[194] 도면 3의 (a)는 CT, NG, MH, MG, TV, UU, UP, CA, GV, HSV1, HSV2, TP, IC의 원인균별 다중 고유해리온도 측정을 나타낸 결과로 각각의 SCO가 갖는 고유해리온도 (CT : FAM 80 °C, NG : HEX 76.5 °C, MH : HEX 68 °C, MG : CalRed610 67.5 °C, TV : Quasar670 71.5 °C, UU : CalRed610 77 °C, UP : FAM 77 °C, CA : FAM 65 °C, GV : Quasar670 78.5 °C, HSV 1 : Quasar705 73.5 °C, HSV 2 : Quasar705 79 °C, TP : Quasar705 66 °C, IC : Quasar670 63.5 °C)에서 피크 관찰되었고(a)(b)(c)(d)(e)(f), 동일한 조성에서 표적 서열이 투입되지 않았을 경우에는 CCTF를 가식화하는 SCO의 피크가 관찰되지 않았다(g).

[195] 따라서 CCTF의 표식화 기법을 이용하여 PCR 수행과 동시에 SCO의 형광을 Real-time PCR 기기를 활용하여 분석 함으로서 기존의 PCR 방식보다 신속하고 간단하게 표적 핵산 서열의 검출이 가능함을 증명하였다.

[196] 2. 위장관질환질환 원인체 다중 타겟 PCR에서 CCTF의 형성 및 CCTF의 고유해리온도피크 분석

[197] 위장관 질환의 원인체인 Rotavirus A(RVA), Astrovirus(AstV), Adenovirus F40(AdV 40), Adenovirus F41(AdV 41), Norovirus GI(NoV GI), Norovirus GII(NoV GII) 및 내부대조물질 (External control, EC)의 DNA의 Real-time PCR 기기를 이용한 CCTF 분석을 실시하였다.

[198] 1) 표적 서열 주형 DNA의 서열 특이적으로 제작된 프라이머

[199] 본 실시예에서 사용된 정방향 프라이머는 CTPO로 앞선 실시예 1과 동일한 원리로 제작되었다. CTPO의 5' 말단은 19 ~ 20mer의 뉴클레오타이드 서열로 구성되었으며, CCTF를 형성할 수 있도록 표적 서열의 DNA와 비-상보적인 서열로 구성된다. 이후 제한효소 인지서열이 위치하였고, 이후부터 3' 말단까지는 각각의 표적 부위와 상보적인 서열로 구성되어 있어 프라이머로서 역할을 수행한다. 역방향 프라이머는 각각의 증폭하고자 하는 표적 부위와 상보적인 서열로 구성되어 있다.

[200] 또한 CCTF와 상보적 결합을 형성하여 이중가닥의 주형이 되는 SCO는 3' 말단의 형광상쇄분자(BHQ-1 또는 BHQ-2)를 위치시키고, 형광리포터 분자를 일정거리를 갖도록 위치시켰다.

- [201] 프라이머 정보 및 증폭되어 생성되는 표적 서열 정보는 다음과 같다.
- [202] 프라이머 31 :  
5'-GCAGGAGCCTCTCATCTCG\*CCAGGCTCATTATAGACARCTTCTCACTA  
ATTC-3' (서열번호 74)
- [203] 프라이머 32 : 5'-AGTTTTTCTGATCCAATYTGYTCTATTTTC-3' (서열번호 75)
- [204] 프라이머 33 :  
5'-TCAGACGGTTCGAGGCTCC\*CCAGGARGATYAAGCGTGGAGTATAYATG  
G-3' (서열번호 76)
- [205] 프라이머 34 : 5'-TTTGC GTG CYTCTTCACACGC-3' (서열번호 77)
- [206] 프라이머 35 :  
5'-AACGCGAATCGACCGGAT\*CCAGGCGCGATGTGTTTGCCGATAAAAC-3'  
(서열번호 78)
- [207] 프라이머 37 : 5'-CATTGCGTCTGCCCCACTTG-3' (서열번호 79)
- [208] 프라이머 38 :  
5'-AACGCGAATCGACCGGAT\*CCAGGAAACAAGAACACCTATGCCTACATG  
AAC-3' (서열번호 80)
- [209] 프라이머 39 : 5'-ATGTTAACGTCCTTCTGAAGTTCCAC-3 (서열번호 81)
- [210] 프라이머 40 :  
5'-TAGATCGGACTGCGAATCG\*CCAGGGAGATCGCRATCTYCTGCCCCGA-3  
(서열번호 82)
- [211] 프라이머 41 : 5'-RGC GTCCTTAGACGCCATCATC-3 (서열번호 83)
- [212] 프라이머 42 :  
5'-ATCTACAGCGTCGCATCACG\*CCAGGCGCAATCTGGCTCCCARTTTTGTG-  
3 (서열번호 84)
- [213] 프라이머 43 : 5'-GCGTCA YTCGACGCCATCYTCA-3 (서열번호 85)
- [214] 프라이머 44 :  
5'-CATAGGTCGAGGTCCTCAC\*CCAGGGCAA ACTCCGGCATCTACTAATAG  
ACG-3 (서열번호 86)
- [215] 프라이머 45 : 5'-AAGCGGTGATCCGCACAGTG-3 (서열번호 87)
- [216]
- [217] SCO 14 :  
TCGGCCGATCGTCCATAGAGTCAAGC[T(HEX)]CGCAGGAGCCTCTCATC  
TCG[BHQ1] (서열번호 88)
- [218] SCO 15 : TCACGATGAGCGAGTTGAGCTACG[T(Calred  
610)]ATCAGACGGTTCGAGGCTCC[BHQ2] (서열번호 89)
- [219] SCO 16 :  
TGTTCAATATATAATGATAATATG[T(Calred610)]AACGCGAATCGACCGG  
AT[BHQ2] (서열번호 90)

- [220] SCO 17 :  
TGTTCAATATATAATGATAATATG[T(Calred610)]AACGCGAATCGACCGG  
AT[BHQ2] (서열번호 91)
- [221] SCO 18 :  
ACATTTATAATACAGTATTTTA[T(FAM)]TAGATCGGACTGCGAATCG[BHQ1]  
(서열번호 92)
- [222] SCO 19 :  
AGCTCCTGCCAGTACTGCCATCCA[T(FAM)]ATCTACAGCGTCGCATCACG[B  
HQ1] (서열번호 93)
- [223] SCO 20 :  
TAGTTATAATGAATAACTATTAT[T(HEX)]CATAGGTCGAGGTCCTCAC[BHQ  
1] (서열번호 94)
- [224] 증폭물 16 : GenBank : KT694942.1 / Position (start-end) : 19-99
- [225] GCAGGAGCCTCTCATCTCG\*CCAGGGCTCATTTATAGACARCTTCTCACTA  
ATTCATATTCAGTAGATTTACATGATGAAATAGARCARATTGGATCAGAAA  
AAACT (서열번호 95)
- [226] 증폭물 17 : GenBank : AB000287.1 / Position (start-end) : 2232-2321
- [227] TCAGACGGTTCGAGGCTCC\*CCAGGARGATYAAGCGTGGAGTATAYATG  
GACCTGCTTGTCTCGGGGGCAAGCCCAGGCAATGCATGGTCCCATGCGTGT  
GAAGARGCACGCAA (서열번호 96)
- [228] 증폭물 18 : GenBank : KM274923.1 / Position (start-end) : 121-179
- [229] AACGCGAATCGACCGGAT\*CCAGGCGCGATGTGTTTGCCGATAAAACGT  
ACCAACCGGAGCCCCAAGTGGGGCAGACGCAATG (서열번호 97)
- [230] 증폭물 19 : GenBank : AB330122.1 / Position (start-end) : 1407-1691
- [231] AACGCGAATCGACCGGAT\*CCAGGAAACAAGAACACCTATGCCTACATG  
AACGGTCGGGTGGCGGTTCCCTAGCGCCCTCGATACCTACGTAAACATCGGG  
GCACGGTGGTCTCCAGATCCCATGGACAATGTTAACCCCTTCAATCACCAC  
CGTAACGCCGGTCTGCGCTATCGATCCATGCTCTTGGGCAACGGGCGTTAC  
GTACCCTTCCACATTCAAGTCCCCCAGAAGTTTTTTGCCATTA AAAATCTCC  
TCCTCTTACCGGGTTCCTACACCTACGAGTGGA ACTTCAGGAAGGACGTTA  
ACAT (서열번호 98)
- [232] 증폭물 20 : GenBank : LN854564.1 / Position (start-end) : 5325-5378
- [233] TAGATCGGACTGCGAATCG\*CCAGGGAGATCGCRATCTYCTGCCCGAATT  
CGTAAATGATGATGGCGTCTAAGGACGCY (서열번호 99)
- [234] 증폭물 21 : GenBank : KT202798.1 / Position (start-end) : 5060-5107
- [235] ATCTACAGCGTCGCATCACG\*CCAGGCGCAATCTGGCTCCARTTTTGTG  
AATGARGATGGCGTCGARTGACGC (서열번호 100)
- [236] 증폭물 22 : GenBank : EF204940.1 / Position (start-end) : 1707-1878

- [237] CATAGGTCGAGGTCCTCAC\***CCAGGGCAA**ACTCCGGCATCTACTAATAGA  
CGCCGGCCATTCAAACATGAGGATTACCCATGTCGAAGACAACAAAGAAG  
TTCAACTCTTTATGTATTGATCTTCCTCGCGATCTTTCTCTCGAAATTTACCA  
ATCAATTGCTTCTGTGCTACTGGAAGCGGTGATCCGCACAGTG (서열번호  
101)
- [238] 상기 프라이머 서열 중 굵고 기울어진 글씨체는 제한효소 인지서열을 의미하며  
밑줄은 이로 인해 생성되는 CCTF의 상보적인 서열이다. \*로 표시된 부분은  
PspGI 제한효소가 절단하는 부위를 blocking 하기 위해 인지서열 중 C에 modified  
dCTP가 삽입되었다는 표식이다. SCO에서 괄호는 형광상쇄분자와  
형광리포터가 위치한 염기서열의 위치를 의미한다. 증폭물로부터 생성되는  
CCTF의 서열은 다음과 같다.
- [239] CCTF 16 : 5'- CCTGGTGTGTCAGCCGGCTGGAGTGG -3' (서열번호 102)
- [240] CCTF 17 : 5'- CCTGGTTAACCGGCTCGTGGCGATG -3' (서열번호 103)
- [241] CCTF 18 : 5'- CCTGGTGCCTCCATTAGCGTGAGT -3' (서열번호 104)
- [242] CCTF 19 : 5'- CCTGGCTTGTAGCCGGCTGGGTAGC -3' (서열번호 105)
- [243] CCTF 20 : 5'- CCTGGTGGGATCGAATCACGCGGCA -3' (서열번호 106)
- [244] CCTF 21 : 5'- CCTGGCAGCGGCCAGCTATGAGA -3' (서열번호 107)
- [245] CCTF 22 : 5'- CCTGGTCGCAGAGTGCCAACGATCTG -3' (서열번호 108)
- [246] CCTF 23 : 5'- CCTGGTATATGGAGCGGCATACGAGC -3' (서열번호 109)
- [247] CCTF 24 : 5'- CCTGGTGCAACGATGCACGGCACGT -3' (서열번호 110)
- [248] CCTF 25 : 5'- CCTGGTTCCTCGACGGGACTGCGA -3' (서열번호 111)
- [249] CCTF 26 : 5'- CCTGGCAGGCGCCTAGCTATGAG -3' (서열번호 112)
- [250] CCTF 27 : 5'- CCTGGACAGGCCTGAGACGCGAAGC -3' (서열번호 113)
- [251] CCTF 28 : 5'- CCTGGAGCTCGCAGAGCTAACAG -3' (서열번호 114)
- [252]
- [253] 2) PCR 증폭 및 SCO 고유해리온도 측정
- [254] 각각 프라이머 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 와 SCO 14,  
15, 16, 17, 18, 19, 20 을 각각 0.15  $\mu$ M, PspGI (NEB, USA) 1U, PCR 버퍼(PCR  
buffer, 1x), MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTP 200  $\mu$ M, DTT 0.1mM, RNase Inhibitor 1U,  
SuperiorScript III (Enzymomics, Korea) 1U 및 RVA, AstV, AdV 40, AdV41, NoV GI,  
NoV GII 및 EC(MS2 phage)의 genomic RNA 1x10<sup>4</sup> pg/rxn의 핵산을 첨가하여 총  
반응액 20  $\mu$ l로 CFX96 Real-time PCR (Bio-Rad, USA)를 이용하여 다음의 PCR  
반응을 수행하였다.
- [255] 55°C 20 분, 95°C 10 분
- [256] 95°C 30 초, 63°C 1 분 (50 cycles),
- [257] 역전사 반응 온도 55°C에서 20분 동안 1회 및 변성 온도 95°C에서 10분 동안 1회  
수행하고, 변성 온도 95°C에서 30초, 어닐링 온도 63°C에서 1분인 사이클을 50회  
반복하여 수행하였다. 반응 후, 동일 기기 내에서 반응 혼합물을 50°C로

냉각시키고, 50°C에서 30 초간 유지시킨 다음, 50°C에서 95°C로 천천히 가열시킴으로써 고유해리온도 분석곡선을 얻었다. 데이터 분석은 Bio-Rad CFX Manager 1.6을 이용하였다.

[258] 도면 4는 RVA, AstV, AdV 40, AdV 41, NoV GI, NoV GII 및 의 원인균별 다중 고유해리온도 측정을 나타낸 결과로 각각의 SCO가 갖는 고유해리 온도 RVA: HEX 78°C, AstV: CalRed610 78°C, AdV 40: CalRed610 67°C, AdV 41: CalRed610 67°C, NoV GI: FAM 68°C, NoV GII: FAM 84°C, EC: HEX 69°C에서 피크 관찰되었고(a)(b)(c)(d), 동일한 조성에서 표적 서열이 투입되지 않았을 경우에는 CCTF를 가식화하는 SCO의 피크가 관찰되지 않음을 확인하였다(e).

[259] 따라서 CCTF의 표식화 기법을 이용하여 PCR 수행과 동시에 SCO의 형광을 Real-time PCR 기기를 활용하여 분석 함으로서 기존의 PCR 방식보다 신속하고 간단하게 표적 핵산 서열의 검출이 가능함을 증명하였다.

[260] 3. 인유두종 바이러스 검출을 위한 다중 타겟 PCR에서 CCTF의 형성 및 CCTF의 고유 해리온도피크 분석

[261] 인유두종 바이러스(HPV: Human Papillomavirus)의 아형인 16형, 18형, 33형, 35형, 51형, 53형, 59형, 68a형, 82형 및 내부대조물질 (Internal Control, IC)의 DNA를 이용하여 Real-time PCR 기기를 이용한 CCTF 분석을 실시하였다

[262]

[263] 1) 표적 서열 주형 DNA의 서열 특이적으로 제작된 프라이머

[264] 본 실시예에서 사용된 정방향 프라이머는 CTPO로 앞선 실시예 1과 동일한 원리로 제작되었다. CTPO의 5' 말단은 19 ~ 20mer의 뉴클레오타이드 서열로 구성되었으며, CCTF를 형성할 수 있도록 표적 서열의 DNA와 비-상보적인 서열로 구성된다. 이후 제한효소 인지서열이 위치하였고, 이후부터 3' 말단까지는 각각의 표적 부위와 상보적인 서열로 구성되어 있어 프라이머로서 역할을 수행한다. 역방향 프라이머는 각각의 증폭하고자 하는 표적 부위와 상보적인 서열로 구성되어 있다.

[265] 또한 CCTF와 상보적 결합을 형성하여 이중가닥의 주형이 되는 SCO는 3' 말단의 형광상쇄분자(BHQ-1 또는 BHQ-2)를 위치시키고, 형광리포터 분자를 일정거리를 갖도록 위치시켰다.

[266] 프라이머 정보 및 증폭되어 생성되는 표적 서열 정보는 다음과 같다.

[267]

[268] 프라이머 46 :

5'-CTCTGATAGCGACTGCTCGCA\*CCAGGATAATATAAGGGGTCGGTGGAC CGG-3' (서열번호 115)

[269] 프라이머 47 : 5'-CTCCATGCATGATTACAGCTGGGTT-3' (서열번호 116)

[270] 프라이머 48 :

5'-ATCGGTCTCCTGAAAGCTGCG\*CCAGGCAGAAGGTACAGACGGGGAGGG C-3' (서열번호 117)

- [271] 프라이머 49 : 5'-CACCTCCAGCCGCTCCCCTAAT-3' (서열번호 118)
- [272] 프라이머 50 :  
5'-CTGGCGTAGAGCACTTACGCT\*CCAGGCAACGATAACCGACCACCACAA  
GCA-3' (서열번호 119)
- [273] 프라이머 51 : 5'-CGGGGTCTGCACAGAACAGCTTT-3' (서열번호 120)
- [274] 프라이머 52 :  
5'-CTGGCGTAGAGCACTTACGCT\*CCAGGAGGACCCAGCTGAACGACCTTA  
CAA-3' (서열번호 121)
- [275] 프라이머 53 : 5'-CTGTCCACCGTCCACCGATGTTATG-3' (서열번호 122)
- [276] 프라이머 54 :  
5'-CTGGCGTAGAGCACTTACGCT\*CCAGGGCTGGCAACGTACACGACAACG-  
3' (서열번호 123)
- [277] 프라이머 55 : 5'-GCTGTACAACGCGAAGGGTGTC-3' (서열번호 124)
- [278] 프라이머 56 :  
5'-CTGGCGTAGAGCACTTACGCT\*CCAGGTCCACCTATGCACCGAAACCTCC  
AA -3' (서열번호 125)
- [279] 프라이머 57 : 5'-TGCAGTGACGAGTCCCCGTGTAGTA-3' (서열번호 126)
- [280] 프라이머 58 :  
5'-CTGGCGTAGAGCACTTACGCT\*CCAGGGACTGTACACCGTATGCAGCGTG  
-3' (서열번호 127)
- [281] 프라이머 59 : 5'-GCGTATCAGCAGCTCATGTAA-3' (서열번호 128)
- [282] 프라이머 60 :  
5'-CTGGCGTAGAGCACTTACGCT\*CCAGGACAAACTCGACGTCGTCTCGGA  
A-3' (서열번호 129)
- [283] 프라이머 61 : 5'-CAGGTCACCACAACAAAGGCTCCGT-3' (서열번호 130)
- [284] 프라이머 62 :  
5'-ATCAGGACGCAGCCGGTTCT\*CCAGGCCAAGGACAGGTACGGCTGTCAT  
C-3' (서열번호 131)
- [285] 프라이머 63 : 5'-GGTGCCCTTGAGGTTGTCCAGGTG-3' (서열번호 132)
- [286] SCO 21 :  
GAGACGTTTAAGTCCGCGACCGCTC[T(HEX)]CTGATAGCGACTGCTCGCA[B  
HQ 1] (서열번호 133)
- [287] SCO 22 :  
CAGGCGACGTCCATATGGTGCGCTA[T(FAM)]CGGTCTCCTGAAAGCTGCG[  
BHQ 1] (서열번호 134)
- [288] SCO 23 : CCCTTAGGTAACGTCTGGC[T(Qusar  
670)]GGCGTAGAGCACTTACGCT[BHQ 2] (서열번호 135)
- [289] SCO 24 :

AAACTTTAATTATTGTATA[T(FAM)]CAGGACGCAGCCGGTTCT[BHQ 1]  
(서열번호 136)

[290] 증폭물 23 : GenBank : LC193821.1 / Position (start-end) : 480-571

[291] CTCTGATAGCGACTGCTCGCA\***CCAGG**GATAATATAAGGGGTCGGTGGAC  
CGGTCGATGTATGTCTTGTTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCA  
GCTGTAATCATGCATGGAG (서열번호 137)

[292] 증폭물 24 : GenBank : KC470209.1 / Position (start-end) : 538-747

[293] ATCGGTCTCCTGAAAGCTGCG\***CCAGG**CACGACAGGAACGACTCCAACG  
ACGCAGAGAAACACAAGTATAATATTAAGTATGCATGGACCTAAGGCAAC  
ATTGCAAGACATTGTATTGCATTTAGAGCCCCAAAATGAAATTCCGGTTGA  
CCTTCTATGTCACGAGCAATTAAGCGACTCAGAGGAAGAAAACGATGAAA  
TAGATGGAGTTAATCATCAACATTTACCAGCCCGACG (서열번호 138)

[294] 증폭물 25 : GenBank : KU298894.1 / Position (start-end) : 535-860

[295] CTGGCGTAGAGCACTTACGCT\***CCAGG**ACGCCATGAGAGGACACAAGCC  
AACGTTAAAGGAATATGTTTTAGATTTATATCCTGAACCAACTGACCTATA  
CTGCTATGAGCAATTAAGTGACAGCTCAGATGAGGATGAAGGCTTGGACC  
GGCCAGATGGACAAGCACAACCAGCCACAGCTGATTACTACATTGTAACCT  
GTTGTCACACTTGTAACACCACAGTTCGTTTATGTGTCAACAGTACAGCAA  
GTGACCTACGAACCATACAGCAACTACTTATGGGCACAGTGAATATTGTGT  
GCCCTACCTGTGCACAACAATAAACATCATCTACAATGGCCGATCCTGAA  
(서열번호 139)

[296] 증폭물 26 : GenBank : M74117.1 / Position (start-end) : 117-509

[297] CTGGCGTAGAGCACTTACGCT\***CCAGG**AGGACCCAGCTGAACGACCTTA  
CAAACCTGCATGATTTGTGCAACGAGGTAGAAGAAAGCATCCATGAAATTT  
GTTTGAATTGTGTATACTGCAAACAAGAATTACAGCGGAGTGAGGTATATG  
ACTTTGCATGCTATGATTTGTGTATAGTATATAGAGAAGGCCAGCCATATG  
GAGTATGCATGAAATGTTTAAAATTTTATTCAAAAATAAGTGAATATAGAT  
GGTATAGATATAGTGTGTATGGAGAAACGTTAGAAAAACAATGCAACAAA  
CAGTTATGTCATTTATTAATTAGGTGTATTACATGTCAAAAACCGCTGTGTC  
CAGTTGAAAAGCAAAGACATTTAGAAGAAAAAAAACGATTCCATAACATC  
GGTGGACGGTGGACAG (서열번호 140)

[298] 증폭물 27 : GenBank : KU298905.1 / Position (start-end) : 512-812

[299] CTGGCGTAGAGCACTTACGCT\***CCAGG**GCTGGCAACGTACACGACAACG  
TAACGAAACCCAAGTGTAATAAAGCCATGCGTGGTAATGTACCACAATTA  
AAAGATGTAGTATTGCATTTAACACCACAGACTGAAATTGACTTGCAATGC  
TACGAGCAATTTGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAGTAGATAATATGCG  
TGACCAGCTACCAGAAAGACGGGCTGGACAGGCTACGTGTTACAGAATTG  
AAGCTCCGTGTTGCAGGTGTTCAAGTGTAGTACAACCTGGCAGTGGAAAGCA

GTGGAGACACCCTTCGCGTTGTACAGC (서열번호 141)

[300] 증폭물 28 : GenBank : KU298906.1 / Position (start-end) : 3374-3558

[301] CTGGCGTAGAGCACTTACGCT\***CCAGGT**CCACCTATGCACCGAAACCTCC  
AAGACCTCCGCATTGTCCGTGGGTGCCAAAGACACACACCTACAACCACCA  
CAGAAACGACGACGACCAGACGTCACAGACTCCAGAAACACCAAGTACCC  
CAACAACCTTTTGCGGGGACAACAATCCGTGGACAGTACTACACGGGGAC  
TCGTCACTGCA (서열번호 142)

[302] 증폭물 29 : GenBank : KU298922.1 / Position (start-end) : 226-366

[303] CTGGCGTAGAGCACTTACGCT\***CCAGGG**TTAAGACCGAAAACGGTGCAT  
ATAAAGGTAGTTAGAAAGAAAAGGGCAACGGCATGGCACGCTTTGAGGAT  
CCTACACAACGACCATACAAACCTGCCTGACTTGAGCACAACATTGAATATT  
CCTCTGCATGATATTCGC (서열번호 143)

[304] 증폭물 30 : GenBank : KC470271.1 / Position (start-end) : 3389-3541

[305] CTGGCGTAGAGCACTTACGCT\***CCAGG**ATGGCGCTATTTACAAACCCTGA  
GGAACGGCCATACAAATTGCCAGACCTGTGCAGGACATTGGACACTACATT  
GCATGACGTTACAATAGAGTGTGTCTATTGCAGAAGGCAACTACAACGGA  
CAGAGGTATATGAATTTGCCTTTAGTGAC (서열번호 144)

[306] 증폭물 31 : GenBank : EF450778.1 / Position (start-end) : 431-681

[307] GCTCATATGCGGCGCCATTTA\***CCAGGG**CAGGTTGCTATCAAGGTTACAA  
GACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGA  
CTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTATTTCCC  
ACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCT  
TTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAAGG  
CTCATGGCAAGAAAGTGCTCGG (서열번호 145)

[308] 상기 프라이머 서열 중 굵고 기울어진 글씨체는 제한효소 인지서열을 의미하며  
밑줄은 이로 인해 생성되는 CCTF의 상보적인 서열이다. \*로 표시된 부분은  
PspGI 제한효소가 절단하는 부위를 blocking 하기 위해 인지서열 중 C에 modified  
dCTP가 삽입되었다는 표식이다. SCO에서 팔호는 형광상쇄분자와  
형광리포터가 위치한 염기서열의 위치를 의미한다. 증폭물로부터 생성되는  
CCTF의 서열은 다음과 같다.

[309]

[310] CCTF 29 : 5'- TGCGAGCAGTCGCTATCAGAG -3' (서열번호 146)

[311] CCTF 30 : 5'- CGCAGCTTTCAGGAGACCGAT -3' (서열번호 147)

[312] CCTF 31 : 5'- AGCGTAAGTGCTCTACGCCAG -3' (서열번호 148)

[313] CCTF 32 : 5'- AGAACCGGCTGCGTCCTGAT -3' (서열번호 149)

[314] 2) PCR 증폭 및 SCO 고유해리온도 측정

[315] 각각 프라이머 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63과  
SCO 21, 22, 23, 24 을 각각 0.15  $\mu$ M, PspGI (NEB, USA) 5U, PCR 버퍼(PCR buffer,

1x), MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTP 200 μM, h-Taq DNA polymerase (Solgent, Korea) 1.6 U 및 HPV 16형, 18형, 33형, 35형, 51형, 53형, 59형, 68a형, 82형 및 IC의 genomic DNA 100 pg/rxn의 template DNA를 첨가하여 총 반응액 20 μl로 CFX96 Real-time PCR (Bio-Rad, USA)를 이용하여 다음의 PCR 반응을 수행하였다.

[316] 95°C 15 분,

[317] 95°C 30 초, 63°C 1 분 (50 cycles),

[318] 변성 온도 95°C에서 15분 동안 1회 수행하고, 변성 온도 95°C에서 30초, 어닐링 온도 63°C에서 1분인 사이클을 50회 반복하여 수행하였다. 반응 후, 동일 기기 내에서 반응 혼합물을 50°C로 냉각시키고, 50°C에서 30 초간 유지시킨 다음, 50°C에서 95°C로 천천히 가열시킴으로써 고유해리온도 분석곡선을 얻었다. 데이터 분석은 Bio-Rad CFX Manager 1.6을 이용하였다.

[319] 도면 5는 16형, 18형, 33형, 35형, 51형, 53형, 59형, 68a형, 82형, IC의 타겟 별 다중 고유해리온도 측정을 나타낸 결과로 각각의 SCO가 갖는 고유해리 온도 (16형: HEX 76.5°C, 18형: FAM 78°C, 33형: Quasar670 71°C, 35형: Quasar670 71°C, 51형: Quasar670 71°C, 53형: Quasar670 71°C, 59형: Quasar670 71°C, 68형a: Quasar670 71°C, 82형: Quasar670 71°C, IC: Quasar670 67.5°C)에서 피크 관찰되었고(a)(b)(c)(d), 동일한 조성에서 표적 서열이 투입되지 않았을 경우에는 CCTF를 가식화하는 SCO의 피크가 관찰되지 않음을 확인하였다(e).

[320] 따라서 CCTF의 표식화 기법을 이용하여 PCR 수행과 동시에 SCO의 형광을 Real-time PCR 기기를 활용하여 분석 함으로서 기존의 PCR 방식보다 신속하고 간단하게 표적 핵산 서열의 검출이 가능함을 증명하였다.

[321] 4. 호흡기 질환 원인체 검출을 위한 다중 타겟 PCR에서 CCTF의 형성 및 CCTF의 고유 해리온도 피크 분석

[322] 호흡기 질환의 원인체인 Influenza A/H1N1(Flu A/H1N1), Influenza A/H3N2(Flu A/H3N2), Influenza A/H1N1/2009pdm(Flu A/H1N1/2009pdm), Influenza B(Flu B), Parainfluenza 1(PIV1), Parainfluenza 3(PIV3), Respiratory syncytial virus A(RSV A), Respiratory syncytial virus B(RSV B), Human metapneumovirus(MPV), Adenovirus(AdV) 및 외부대조물질 (Extraction Control, EC)의 핵산의 Real-time PCR 기기를 이용한 CCTF 분석을 실시하였다.

[323]

[324] 1) 표적 서열 주형 DNA의 서열 특이적으로 제작된 프라이머

[325] 본 실시예에서 사용된 정방향 프라이머는 CTPO로 앞선 실시예 1과 동일한 원리로 제작되었다. CTPO의 5' 말단은 19 ~ 20mer의 뉴클레오타이드 서열로 구성되었으며, CCTF를 형성할 수 있도록 표적 서열의 DNA와 비-상보적인 서열로 구성된다. 이후 제한효소 인지서열이 위치하였고, 이후부터 3' 말단까지는 각각의 표적 부위와 상보적인 서열로 구성되어 있어 프라이머로서 역할을 수행한다. 역방향 프라이머는 각각의 증폭하고자 하는 표적 부위와 상보적인 서열로 구성되어 있다.

- [326] 또한 CCTF와 상보적 결합을 형성하여 이중가닥의 주형이 되는 SCO는 3' 말단의 형광상쇄분자(BHQ-1 또는 BHQ-2)를 위치시키고, 형광리포터 분자를 일정거리를 갖도록 위치시켰다.
- [327] 프라이머 정보 및 증폭되어 생성되는 표적 서열 정보는 다음과 같다.
- [328] 프라이머 64: 5'-TTGCTATGGCTGACGGGGAAGAATGG-3' (서열번호 150)
- [329] 프라이머 65:  
5'-GCCCCGTTGAGAGCACGAAT\*CCAGGGGGGTGAATCTTCTGCTTAATGTG AAGACA C-3' (서열번호 151)
- [330] 프라이머 66: 5'-GGGCACCATGCAGTACCAAACGGAAC-3' (서열번호 152)
- [331] 프라이머 67 :  
5'-CCGTGGCGCGAACTTATCGA\*CCAGGATCACACTGAGGGTCTCCCAATA GAGC-3' (서열번호 153)
- [332] 프라이머 68 : 5'-TCAAAGACTAAGTGGTGCCATGGATGAAC-3' (서열번호 154)
- [333] 프라이머 69 :  
5'-AAGTGACCTGCCATTGCGCG\*CCAGGTATGTCTACAGCAGAGGGACCCCA GC-3' (서열번호 155)
- [334] 프라이머 70:  
5'-GGCTTAGAGCACCGCGTCATT\*CCAGGTGTCGCTACTGGAAGCGGTGATC -3' (서열번호 156)
- [335] 프라이머 71 : 5'-GCGATAGCTAAGGTACGACGGGTC-3' (서열번호 157)
- [336] 프라이머 72 : 5'-GTAGATTCGATCCATGCTCCTCTACTACC-3' (서열번호 158)
- [337] 프라이머 73 :  
5'-CGTCTTACATGCGCAAGCGG\*CCAGGTGATATTGAGTTCGGTAATGCAAG ATCTGC-3' (서열번호 159)
- [338] 프라이머 74 : 5'-CCATAGAGATGGCAATAGATGAAGAGC-3' (서열번호 160)
- [339] 프라이머 75 :  
5'-AGGCGTTCCGCTTCAACGAG\*CCAGGTTGTCAGATTCTGTAGCTTGCTCA GTC-3' (서열번호 161)
- [340] 프라이머 76 : 5'-GGTGGTGATCCCAACTTGTTATATCGAAG-3' (서열번호 162)
- [341] 프라이머 77 :  
5'-TCCGTCTGCGAAGATCTGAGC\*CCAGGTTCAATCTATCRTCTGACAGATC TTGAAGT-3' (서열번호 163)
- [342] 프라이머 78 :  
5'-GTGTCACGACGCGCGAATCT\*CCAGGAGATCGTGACCAGTATAATAGCT CAACAC-3' (서열번호 164)
- [343] 프라이머 79 : 5'-TTTCAGACAATGCAGGGATAACACCAGC-3' (서열번호 165)

- [344] 프라이머 80 :  
5'-CCCAGAACGATTTGCGGCGT\*CCAGGCTTGGTCCTCTCTTAGGAGGCAAG  
C-3' (서열번호 166)
- [345] 프라이머 81 : 5'-AGGATGCTTCGGAGTACCTGAG-3' (서열번호 167)
- [346] 프라이머 82 :  
5'-TGCATTGCCGTCGCAGAGAC\*CCAGGCAACGGGCACGAAGCGCATC -3'  
(서열번호 168)
- [347] 프라이머 83: GCCCTAATGATAAGACAGGCAGTTGTGG (서열번호 169)
- [348] 프라이머 84 :  
5'-ATGCGCTTGGATTGCCGATG\*CCAGGAGCCCTGTTAGTTCTGGATGCTGA  
ACA-3' (서열번호 170)
- [349] SCO 33 :  
CTTATAGATTATA[T(FAM)]TGCCCCGTTGAGAGCACGAAT[BHQ1]  
(서열번호 171)
- [350] SCO 34 :  
CTAAGTAAGCCTATATCGAAT[T(FAM)]CCGTGGCGCGAACTTATCGA[BHQ1]  
(서열번호 172)
- [351] SCO 35 : CGTACTGCACTCGCCTACGAC[T(Cal Fluor Red  
610)]AAGTGACCTGCCATTGCGCG[BHQ2] (서열번호 173)
- [352] SCO 36 : CTTATAAGTTACA[T(Cal Fluor Red  
610)]GGCTTAGAGCACCGCGTCATT[BHQ2] (서열번호 174)
- [353] SCO 37 : CTAATTGTAATAC[T(Quasar  
670)]CGTCTTACATGCGCAAGCGG[BHQ2] (서열번호 175)
- [354] SCO 38 : CTAATCGTATGAGATCTATGA[T(Quasar  
670)]AGGCGTTCCGCTTCAACGAG[BHQ2] (서열번호 176)
- [355] SCO 39 : TCATAGACATTTA[T(Cal Fluor Gold  
540)]TCCGTCTGCGAAGATCTGAGC[BHQ1] (서열번호 177)
- [356] SCO 40 : TACGAATCTGACCTAGTAAGA[T(Cal Fluor Gold  
540)]GTGTCACGACGCGCGAATCT[BHQ1] (서열번호 178)
- [357] SCO 41 : TGCCACTAACAGGCCGCTAGA[T(Cal Fluor Gold  
540)]CCCAGAACGATTTGCGGCGT[BHQ1] (서열번호 179)
- [358] SCO 42 : TCGAGCGTGCGCCAGATCCA[T(Quasar 670)]  
TGCATTGCCGTCGCAGAGAC[BHQ2] (서열번호 180)
- [359] SCO 43 :  
TCGACTGTGCCTGCGTCCGTA[T(FAM)]ATGCGCTTGGATTGCCGATG[BHQ1]  
(서열번호 181)
- [360] 증폭물 32 : GenBank : KU558787.1 / Position (start-end) : 428-621
- [361] TTGCTATGGCTGACGGGAAGAATGGTTTGTACCCAAACCTGAGCATGTC

CTATGTAAACAACAAAGAGAAAGAAGTCCTTGTGCTATGGGGTGTTCATCA  
 CCCACCTAACATAGGGAACCAAAGGGCCCTCTACCATACAGAAAATGCTT  
 ATGTCTCTGTAGTGTCTTCACATTATAGCAGAAGATTCACCCC\*CCTGGATT  
CGTGCTCTCAACGGGGC (서열번호 182)

[362] 증폭물 33 : GenBank : CY221934.1 / Position (start-end) : 111-296

[363] GGGCACCATGCAGTACCAAACGGAACGATAGTGAAAACAATCACAAATG  
 ACCAAATTGAAGTTACTAATGCTACTGAGTTGGTTCAGAATTCCTCAATAG  
 GTGAAATATGCGACAGTCCTCATCAGATCCTTGATGGAGAGAACTGCACAC  
 TAATAGATGCTCTATTGGGAGACCCTCAGTGTGAT\*CCTGGTCGATAAGTT  
CGCGCCACGG (서열번호 183)

[364] 증폭물 34 : GenBank : CY221750.1 / Position (start-end) : 1291-1501

[365] TCAAAGACTAAGTGGTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTCGAG  
 CTGGATGAAAAAGTGGATGACCTCAGAGCTGACACTATAAGCTCACAAAT  
 AGAACTTGCAGTCTTGCTTTCCAACGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATG  
 AGCATCTATTGGCACTTGAGAGAAAATAAGAAAATGCTGGGTCCCTCTG  
 CTGTAGACATA\*CCTGGCGCGCAATGGCAGGTCATT (서열번호 184)

[366] 증폭물 35 : GenBank : JF719743.1 / Position (start-end) : 1816-1950

[367] GGCTTAGAGCACCGGTCATT\*CCAGGTGTCGCTACTGGAAGCGGTGATC  
 CGCACAGTGACGACTTTACAGCAATTGCTTACTTAAGGGACGAATTGCTCG  
 CAAAGCATCCGACCTTAGGTTCTGGTAATGACGAGGCGACCCGTCGTACCT  
 TAGCTATCGC (서열번호 185)

[368] 증폭물 36 : GenBank : KX639498.1 z/ Position (start-end) : 4035-4253

[369] GTAGATTCGATCCATGCTCCTCTACTACCATGGTCCAGCCGACTGAGACA  
 AGGGATGATATATAATGCCAATAAAGTAGCTCTGGCACCCCAATGTCTCCC  
 AGTCGACAAAGATATCAGATTCAGAGTTGTATTTGTCAACGGAACATCACT  
 GGGTACAATCACAATTGCCAAGGTCCCAAAAACCTCTTGCGAGATCTTGCAAT  
 ACCGAACTCAATATCA\*CCTGGCCGCTTGCGCATGTAAGACG (서열번호  
 186)

[370] 증폭물 37 : GenBank : KY369876.1 / Position (start-end) : 1310-1463

[371] CCATAGAGATGGCAATAGATGAAGAGCCAGAACAATTCGAACATAGAGC  
 AGACCAAGAACAAGATGGGGAACCTCAATCATCTATAATCCAATATGCTTG  
 GGCAGAAGGAAACAGAAGCGATGACCGGACTGAGCAAGCTACAGAATCTG  
 ACAA\*CCTGGCTCGTTGAAGCGGAACGCCT (서열번호 187)

[372] 증폭물 38 : GenBank : KX894800.1 / Position (start-end) : 11378-11529

[373] GGTGGTGATCCCAACTTGTTATATCGAAGTTTCTATAGAAGAACTCCTGA  
 TTTCTCACAGAGGCTATAGTTCACTCTGTGTTTCATACTTAGTTATTATACA  
 AACCATGATTTAAAGGATAAACTTCAAGATCTGTCAGAYGATAGATTGAA\*  
CCTGGGCTCAGATCTTCGCAGACGGA (서열번호 188)

- [374] 증폭물 39 : GenBank : KY249683.1 / Position (start-end) : 11465-11577
- [375] GGTGGTGATCCTAATTTGTTATATCGAAGCTTTTATAGGAGAACTCCAGA  
CTTCCTTACAGAAGCTATAGTACATTCAGTGTTTCGTGTTGAGCTATTATACT  
GGTCACGATCT\*CCTGGAGATTCGCGCGTCGTGACAC (서열번호 189)
- [376] 증폭물 40 : GenBank : KJ627391.1 / Position (start-end) : 3631-3933
- [377] TTTTCAGACAATGCAGGGATAACACCAGCAATATCATTGGACCTAATGACT  
GATGCTGAACTGGCCAGAGCTGTATCATAACATGCCAACATCTGCAGGGCAG  
ATAAAGCTGATGTTGGAGAACCGCGCAATGGTAAGGAGAAAAGGATTTGG  
AATCCTAATAGGGGTCTACGGAAGCTCTGTGATTTACATGGTTCAATTGCC  
GATCTTTGGTGTTCATAGATACACCTTGTGGATAATCAAGGCAGCTCCCTCT  
TGCTCAGAAAAAACGGGAATTATGCTTGCCTCCTAAGAGAGGACCAAG\*  
CCTGGACGCCGCAAATCGTTCTGGG (서열번호 190)
- [378] 증폭물 41 : GenBank : KT963081.1 / Position (start-end) : 18437-18598
- [379] AGGATGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGGTGCAGTTCGCCCGTGCA  
ACAGACACCTACTTCAGTATGGGGAACAAGTTTAGAAACCCACAGTGGC  
GCCACCCACGATGTGACCACCGACCGTAGCCAGCGACTGATGCTGCGCTT  
CGTGCCCGTTG\*CCTGGGTCTCTGCGACGGCAATGCA (서열번호 191)
- [380] 증폭물 42 : GenBank : CY221624.1 / Position (start-end) : 988-1252
- [381] GCCCTAATGATAAGACAGGCAGTTGTGGTCCAGTATCGTCTAATGGAGCA  
AATGGAGTAAAAGGATTTTCATTCAAATACGGCAATGGTGTGTTGGATAGGG  
AGAACTAAAAGCATTAGTTCAAGAAAAGGTTTTGAGATGATTTGGGATCCG  
AATGGATGGACTGGGACTGACAATAAATTCTCAATAAAGCAAGATATCGT  
AGGAATAAATGAGTGGTCAGGGTATAGCGGGAGTTTTGTTTCAGCATCCAG  
AACTAACAGGGCT\*CCTGGCATCGGCAATCCAAGCGCAT (서열번호 192)
- [382] 상기 프라이머 서열 중 굵고 기울어진 글씨체는 제한효소 인지서열을 의미하며  
밑줄은 이로 인해 생성되는 CCTF의 상보적인 서열이다. \*로 표시된 부분은  
PspGI 제한효소가 절단하는 부위를 blocking 하기 위해 인지서열 중 C에 modified  
dCTP가 삽입되었다는 표식이다. SCO에서 괄호는 형광상쇄분자와  
형광리포터가 위치한 염기서열의 위치를 의미한다. 증폭물로부터 생성되는  
CCTF의 서열은 다음과 같다.
- [383] CCTF 33 : 5'- ATTCGTGCTCTCAACGGGGC -3' (서열번호 193)
- [384] CCTF 34 : 5'- TCGATAAGTTCGCGCCACGG -3' (서열번호 194)
- [385] CCTF 35 : 5'- CGCGCAATGGCAGGTCACCTT -3' (서열번호 195)
- [386] CCTF 36 : 5'- AATGACGCGGTGCTCTAAGCC -3' (서열번호 196)
- [387] CCTF 37 : 5'- CCGCTTGCGCATGTAAGACG -3' (서열번호 197)
- [388] CCTF 38 : 5'- CTCGTTGAAGCGGAACGCCT -3' (서열번호 198)
- [389] CCTF 39 : 5'- GCTCAGATCTTCGCAGACGGA -3' (서열번호 199)
- [390] CCTF 40 : 5'- AGATTCGCGCGTCGTGACAC -3' (서열번호 200)

- [391] CCTF 41 : 5'- ACGCCGCAAATCGTTCTGGG -3' (서열번호 201)
- [392] CCTF 42 : 5'- GTCTCTGCGACGGCAATGCA -3' (서열번호 202)
- [393] CCTF 43 : 5'- CATCGGCAATCCAAGCGCAT -3' (서열번호 203)
- [394] 2) PCR 증폭 및 SCO 고유해리온도 측정
- [395] 각각 프라이머 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84와 SCO 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 을 각각 0.15  $\mu$ M, PspGI (NEB, USA) 1U, PCR 버퍼(PCR buffer, 1x),  $MgCl_2$  2.5 mM, dNTP 200  $\mu$ M, DTT 0.1mM, RNase Inhibitor 1U, SuperiorScript III (Enzymomics, Korea) 1U Flu A/H1N1, Flu A/H3N2, Flu A/H1N1/2009pdm, Flu B, PIV1, PIV3, RSV A, RSV B, hMPV, ADV 및 MS2 phage의 genomic RNA  $1 \times 10^4$  copies/rxn의 template 핵산을 첨가하여 총 반응액 20  $\mu$ l로 CFX96 Real-time PCR (Bio-Rad, USA)를 이용하여 다음의 PCR 반응을 수행하였다.
- [396] 55°C 20 분, 95°C 10 분
- [397] 95°C 30 초, 63°C 1 분 (50 cycles),
- [398] 역전사 반응 온도 55°C에서 20분 동안 1회 및 변성 온도 95°C에서 10분 동안 1회 수행하고, 변성 온도 95°C에서 30초, 어닐링 온도 63°C에서 1분인 사이클을 50회 반복하여 수행하였다. 반응 후, 동일 기기 내에서 반응 혼합물을 50°C로 냉각시키고, 50°C에서 30 초간 유지시킨 다음, 50°C에서 95°C로 천천히 가열시킴으로써 고유해리온도 분석곡선을 얻었다. 데이터 분석은 Bio-Rad CFX Manager 1.6을 이용하였다.
- [399] 도면 6은 Flu A/H1N1, Flu A/H3N2, Flu A/H1N1/2009pdm, Flu B, PIV1, PIV3, RSV A, RSV B, hMPV, ADV, EC(Ms2 phage) 의 원인균별 다중 고유해리온도 측정을 나타낸 결과로 각각의 SCO가 갖는 고유해리 온도 (Flu A/H1N1: 67.5°C, Flu A/H3N2: 76.5°C, Flu A/H1N1/2009pdm: 86.5°C, Flu B: 83.5°C, PIV1: 66°C, PIV3: 74°C, RSV A: 63.5°C, RSV B: 72°C, hMPV: 86°C, ADV: 85°C)에서 피크 관찰되었고(a)(b)(c)(d)(e), 동일한 조성에서 표적 서열이 투입되지 않았을 경우에는 CCTF를 가식화하는 SCO의 피크가 관찰되지 않음을 확인하였다(f).
- [400] 따라서 CCTF의 표식화 기법을 이용하여 PCR 수행과 동시에 SCO의 형광을 Real-time PCR 기기를 활용하여 분석 함으로서 기존의 PCR 방식보다 신속하고 간단하게 표적 핵산 서열의 검출이 가능함을 증명하였다.
- [401] 5. BDNF 유전자의 단일염기변이 유전자형 분석을 위한 다중 타겟 PCR에서 CCTF의 형성 및 CCTF의 고유 해리온도 피크 분석
- [402] BDNF 유전자 단일염기변이인 rs6265의 유전자형을 분석하기 위하여 Real-time PCR 기기를 이용한 CCTF 분석을 실시하였다.
- [403] 1) 표적 서열 주형 DNA의 서열 특이적으로 제작된 프라이머
- [404] 본 실시예에서 사용된 정방향 프라이머는 CTPO로 앞선 실시예 1과 동일한 원리로 제작되었다. CTPO의 5' 말단은 19 ~ 20mer의 뉴클레오타이드 서열로 구성되었으며, CCTF를 형성할 수 있도록 표적 서열의 DNA와 비-상보적인

서열로 구성된다. 이후 제한효소 인지서열이 위치하였고, 이후부터 3' 말단까지는 각각의 표적 부위와 상보적인 서열로 구성되어 있어 프라이머로서 역할을 수행한다. 역방향 프라이머는 각각의 증폭하고자 하는 표적 부위와 상보적인 서열로 구성되어 있다.

- [405] 또한 CCTF와 상보적 결합을 형성하여 이중가닥의 주형이 되는 SCO는 3' 말단의 형광상쇄분자(BHQ-1 또는 BHQ-2)를 위치시키고, 형광리포터 분자를 일정거리를 갖도록 위치시켰다.
- [406] 프라이머 정보 및 증폭되어 생성되는 표적 서열 정보는 다음과 같다.
- [407] 프라이머 85 :  
5'-ACGAGGCTGTCCGCTTACTAG\*CCAGGCTGGTCCTCATCCAACAGCTCTTCTATCGC-3' (서열번호 204)
- [408] 프라이머 86 :  
5'-CCGGGTACGCTAAGTCCGCTAT\*CCAGGTTCTGGTCCTCATCCAACAGCTCTTCTATCGT-3' (서열번호 205)
- [409] 프라이머 87 : 5'-GACCCATGGGACTCTGGAGAGCGTGAA-3' (서열번호 206)
- [410] 프라이머 88 :  
5'-GCTCATATGCGGCGCCATTTA\*CCAGGGCAGGTTGCTATCAAGGTTACAA GACAG-3' (서열번호 207)
- [411] 프라이머 89 : 5'-CCGAGCACTTTCTTGCCATGAGCC-3' (서열번호 208)
- [412] SCO 44 :  
GTAGCACGCTTCGAATGGC[T(HEX)]ATACGAGGCCTGTCCGCTTACTAG[BH Q1] (서열번호 209)
- [413] SCO 45 :  
GATACGGAGGTCCGAAGGCAG[T(FAM)]GTTGGTTACCCTAACGCGCCGGA[ BHQ1] (서열번호 210)
- [414] SCO 46 :  
ATTAGTTTAACTATTATATT[T(FAM)]TATGCTCATATGCGGCGCCATTTA[B HQ1] (서열번호 211)
- [415] 증폭물 43 : GenBank : NT\_009237.19 / Position (start-end) : 27598340-27598451
- [416] ACGAGGCTGTCCGCTTACTAG\*CCAGGCTGGTCCTCATCCAACAGCTCTTCTATCACGTGTTTCGAAAGTGTTCAGCCAATGATGTCAAGCCTCTTGAACCTGCCTTGGGCCATTACGCTCTCCAGAGTCCCATGGGTC (서열번호 212)
- [417] 증폭물 44 : GenBank : NT\_009237.19 / Position (start-end) : 27598338-27598451
- [418] CCGGGTACGCTAAGTCCGCTAT\*CCAGGTTCTGGTCCTCATCCAACAGCTCTTCTATCACGTGTTTCGAAAGTGTTCAGCCAATGATGTCAAGCCTCTTGAACCTGCCTTGGGCCATTACGCTCTCCAGAGTCCCATGGGTC (서열번호 213)
- [419] 증폭물 45: GenBank : EF450778.1 / Position (start-end) : 431-681
- [420] GCTCATATGCGGCGCCATTTA\*CCAGGGCAGGTTGCTATCAAGGTTACAA

GACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGA  
 CTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTATTTTCCC  
 ACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCT  
 TTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAAGG  
 CTCATGGCAAGAAAGTGCTCGG (서열번호 214)

[421] 상기 프라이머 서열 중 굵고 기울어진 글씨체는 제한효소 인지서열을 의미하며 밑줄은 이로 인해 생성되는 CCTF의 상보적인 서열이다. \*로 표시된 부분은 PspGI 제한효소가 절단하는 부위를 blocking 하기 위해 인지서열 중 C에 modified dCTP가 삽입되었다는 표식이다. SCO에서 괄호는 형광상쇄분자와 형광리포터가 위치한 염기서열의 위치를 의미한다. 증폭물로부터 생성되는 CCTF의 서열은 다음과 같다.

[422] CCTF 44 : 5'- CTAGTAAGCGGACAGGCCTCGT -3' (서열번호 215)

[423] CCTF 45 : 5'- ATAGCGGACTTAGCGTACCCGG -3' (서열번호 216)

[424] CCTF 46 : 5'- TAAATGGCGCCGCATATGAG -3' (서열번호 217)

[425] 2) PCR 증폭 및 SCO 고유해리온도 측정

[426] 각각 프라이머 85, 86, 87, 88, 89와 SCO 44, 45, 46을 각각 0.15  $\mu$ M, PspGI (NEB, USA) 5U, PCR 버퍼(PCR buffer, 1x),  $MgCl_2$  2.5 mM, dNTP 200  $\mu$ M, h-Taq DNA polymerase (Solgent, Korea) 1.6 U 및 Flu A/H1N1, Flu A/H3N2, Flu A/H1N1/2009pdm, Flu B, PIV1, PIV3, RSV A, RSV B, hMPV, ADV 및 MS2 phage의 genomic RNA  $1 \times 10^{14}$  copies/rxn의 template 핵산을 첨가하여 총 반응액 20  $\mu$ l로 CFX96 Real-time PCR (Bio-Rad, USA)를 이용하여 다음의 PCR 반응을 수행하였다.

[427] 95°C 15 분,

[428] 95°C 30 초, 65°C 1 분 (50 cycles),

[429] 변성 온도 95°C에서 15분 동안 1회 수행하고, 변성 온도 95°C에서 30초, 어닐링 온도 65°C에서 1분인 사이클을 50회 반복하여 수행하였다. 반응 후, 동일 기기 내에서 반응 혼합물을 50°C로 냉각시키고, 50°C에서 30 초간 유지시킨 다음, 50°C에서 95°C로 천천히 가열시킴으로써 고유해리온도 분석곡선을 얻었다. 데이터 분석은 Bio-Rad CFX Manager 1.6을 이용하였다.

[430] 도면 7의 (a)는 rs6265의 돌연변이형 A/A, 야생형 G/G 및 이형접합체 A/G의 유전자형과 내부정도물질(IC)의 다중 고유해리온도 측정을 나타낸 결과로 각각의 SCO가 갖는 고유해리 온도 (A/A: 76.5°C, A/G: 76.5°C와 75°C, G/G 75°C, IC: 66°C)에서 피크 관찰되었고(a)(b)(c)(d), 동일한 조성에서 표적 서열이 투입되지 않았을 경우에는 CCTF를 가식화하는 SCO의 피크가 관찰되지 않음을 확인하였다(e).

[431] 따라서 CCTF의 표식화 기법을 이용하여 PCR 수행과 동시에 SCO의 형광을 Real-time PCR 기기를 활용하여 분석 함으로서 기존의 PCR 방식보다 신속하고 간단하게 표적 핵산 서열의 검출이 가능함을 증명하였다.

- [432] 실시에 3. 다중 타겟 PCR에서 CCTF의 형성 및 CCTF의 Ct 그래프 분석
- [433] SCO을 활용하여 Real-time PCR 기기로 CCTF의 생성 유무를 확인 가능함을 실시예 2에서 증명한 바 있다. 위 방법 중 사용되는 SCO는 PCR 증폭 과정 중 표적 서열이 생성되는 반응 중에 동시에 형성되어 실시간 형광 분석이 가능하여 생성되는 CCTF의 동정이 가능하다. 이에 근거하여 본 실시예 에서는 다중 표적 서열을 갖는 PCR의 경우 CCTF의 형성을 SCO로 분석할 때 표준곡선 형성이 가능함을 증명하고자 하였다.
- [434] 본 실시예를 수행하기 위해 성매개 감염증(STI)의 원인균 *Neisseria. gonorrhoea* (NG), *Mycoplasma. hominis* (MH), *Ureaplasma. parvum* (UP)을 선별하였다.
- [435] 1. 표적 주형 DNA의 특이적 프라이머 제작
- [436] 본 실시예에서 사용된 정방향프라이머는 CPTO로서 위 발명의 상세한 설명에 기술된 방법에 기초하여 제작되었다. 정방향프라이머의 5' 말단은 19mer 또는 21mer의 뉴클레오타이드 서열로 구성되며, CCTF를 형성 할 수 있도록 각 원인균별 DNA와 비-상보적인 서열로 구성된다. 이후 제한효소 인지서열이 위치하게 된다. 제한효소 인지서열 이후부터 3' 말단까지는 각 원인균별 DNA의 타겟부위와 상보적인 서열로 구성되어 있어 프라이머로서 역할을 수행한다. 역방향 프라이머는 각 원인균별 DNA의 타겟부위와 상보적인 서열로 구성되어 있다.
- [437] 또한 CCTF와 이합체를 형성하는 SCO은 이중 표지를 갖도록 디자인 하였으며, 각 원인균별로 각각 디자인하였다. SCO은 3' 말단의 퀀처 (BHQ1 또는 BHQ2) 분자 및 리포터 (각 FAM, HEX, CAL Fluor Red 610) 분자를 일정 거리를 갖도록 하여 디자인하였으며 서열은 분석하고자 하는 CCTF의 서열과 상보적이다.
- [438] 프라이머 정보 및 증폭되어 생성되는 표적 서열 정보는 다음과 같다.
- [439] 프라이머 90: 5'-CTCATCGCCACGAGCCGGTTAA\*CCAGG  
TTGAAACACCGCCCGGAACCC-3'(서열번호 218)
- [440] 프라이머 91: 5'-GCTCCTTATTCGGTTTGACCGGT-3' (서열번호 219)
- [441] 프라이머 92: 5'-GCTCGCAGGTACGGCACCATTCA\*CCAGG  
CAGAAGGTATGATAACAACGGTAGAGC-3'(서열번호 220)
- [442] 프라이머 93: 5'-CCCCTTTGCACCGTTGAGGGG-3' (서열번호 221)
- [443] 프라이머 94: 5'-AGTCGATTATGTCTGAGGCCGCG\*CCAGG  
TTAAAGTAGCATATGATCAAGCTCATTCA-3'(서열번호 222)
- [444] 프라이머 95: 5'-GATCCTGACATATAATCATTATCTCCTTTTATAAA-3'  
(서열번호 223)
- [445] SCO 47: TC[T(HEX)]CATCGCCACGAGCCGGTTAA[BHQ] (서열번호 224)
- [446] SCO 48: TG[T(CAL Fluor Red 610)]CGCAGGTACGGCACCATTCA[BHQ2]  
(서열번호 225)
- [447] SCO 49: TAG[T(FAM)]CGATTATGTCTGAGGCCGCG[BHQ] (서열번호 226)
- [448] 증폭물 46: GenBank : X52364.1 / Position (start-end) : 375 - 459

- [449] CTCATCGCCACGAGCCGGTTAA\*CCAGGTTGAAACACCCGCCCGGAACCC  
GATATAATCCGCCCTTCAACATCAGTGAAAATCTTTTTTTAACCGGTCAA  
CCGAATAAGGAGC (서열번호 227)
- [450] 증폭물 47: GenBank : M31431.1 / Position (start-end) : 1455 - 1535
- [451] GCTCGCAGGTACGGCACCATTCA\*CCAGGCAGAAGGTATGATAACAACG  
GTAGAGCTTTATATGATATTAACCTTAGCAAAAATGGAAAACCCCTCAACGG  
TGCAAAGGGG (서열번호 228)
- [452] 증폭물 48: GenBank : AF085733.2 / Position (start-end) : 416 - 502
- [453] AGTCGATTATGTCTGAGGCCGCG\*CCAGGGTTTCTGTACACGATCCAATT[  
T/c]ACAAATAACATTTACAATTCGTAAAATTTTTTTATAAAAGGAGATAATG  
ATTATATGTCAGGATC (서열번호 229)
- [454] 상기 프라이머 서열 중 굵고 기울어진 글씨체는 제한효소 인지서열을 의미하며  
밑줄은 이로 인해 생성되는 CCTF의 상보적인 서열이다. \*로 표시된 부분은  
PspGI 제한효소가 절단하는 부위를 blocking 하기 위해 인지서열 중 C에 modified  
dCTP가 삽입되었다는 표식이다. SCO에서 발효는 형광상쇄분자와  
형광리포터가 위치한 염기서열의 위치를 의미한다. 프라이머 및 SCO 중 NG 에  
해당하는 프라이머는 실시예 2에서 사용한 것과 동일하다. 증폭물로부터  
생성되는 CCTF의 서열은 다음과 같다.
- [455] CCTF 47: 5'-CCTGGTTAACCGGCTCGTGGCGATGAG -3' (서열번호 230)
- [456] CCTF 48: 5'-CCTGGTGAATGGTGCCGTACCTGCGAGC -3' (서열번호 231)
- [457] CCTF 49: 5'-CCTGGCGCGGCCTCAGACATAATCGACT -3' (서열번호 232)
- [458]
- [459] 2. PCR 증폭 및 SCO 고유해리온도 측정
- [460] 위 프라이머 설계에서 언급한 각각의 표적 서열의 특이적인 정방향 프라이머  
3종 및 역방향 프라이머 3종, SCO 3종을 각각 0.15 uM이 되도록 투입하고, PspGI  
(NEB, USA) 2 U, PCR 버퍼(PCR buffer, 1x), MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTP 200 μM, h-Taq  
DNA polymerase (Solgent, Korea) 1.6 U 및 각 원인균별 기준의 정량 방법으로  
증명된 100 pg/μl의 genomic DNA를 10배씩 희석한 주형 DNA 가 포함된 총  
반응액 20 μl를 다음의 조건으로 CFX96 Real-time PCR (Bio-Rad Inc., USA)  
기기를 이용하여 수행하였다.
- [461] 95°C 15 분,
- [462] 95°C 30 초, 63°C 1 분 (50 cycles),
- [463] 변성 온도 95°C에서 15분 동안 1회 수행하고, 변성 온도 95°C에서 30초, 어닐링  
온도 63°C에서 1분인 사이클을 50회 반복하여 수행하였다. 또한 어닐링 단계에서  
형광 시그널을 수집 하였으며, 데이터 분석은 Bio-Rad CFX Manager 1.6을  
이용하였다. Cycle threshold (Ct)는 알려진 숫자의 DNA 농도의 대수증폭기로  
시작하여 균주에 대한 표준곡선을 작성하였다.
- [464] 도면 8의 (a)에서 보여주는 바와 같이, 예상했던 SCO의 형광 증폭곡선을

주형의 농도에 따라 각기 다른 그래프로 관찰할 수 있었다. 또한 주형 DNA를 투입하지 않을 경우 어떠한 피크도 관찰되지 않았다(b). 각 원인균별 genomic DNA를 100 pg 농도부터 10배씩 희석한 NG (실선), MG (점선), UP (원형)의 다중 실시간 증합연쇄반응 실험 조건에서 나타난 SCO의 형광 증폭곡선(fluorescent amplification curves) 및 표준곡선 (standard curve)을 나타낸 결과로, (a) 그래프는 세 표적 서열이 농도 별로 동시 존재할 경우 그려지는 형광증폭곡선을 가리키고, (b) 그래프는 세 가지 표적 서열이 모두 포함되지 않을 경우 그려지는 음성 결과이다. (a) 그래프 중 NG에 해당하는 그래프를 단일 형광 증폭곡선으로 나타내어 표준곡선을 나타내면 (c) 및 (d)로 나타낼 수 있고, MG 해당 그래프는 (e) 및 (f)로 나타낼 수 있으며, UP 해당 곡선은 (g) 및 (h)로 나타낼 수 있다.

- [465] 표준곡선의 선형 회귀분석에서 Regression coefficient ( $r^2$ )는 각각 NG 0.9982, MG 0.999, UP 0.9992로 나타났다. Regression plot의 기울기는 NG -3.85, MG -3.89, UP -3.66 이었다. 각각의 증폭 효율은 ( $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$ ) 각각 NG 81.8%, MG 80.7%, UP 87.6%로 나타나 80~120% 사이 적정 범위 안에 나열되는 것을 확인할 수 있었다.
- [466] 본 실시예를 통해 각 원인균별 서로 다른 CCTF를 Real-time PCR 기기로 판독함에 있어 SCO의 실시간 형광 정도를 측정 함으로서 생성되는 CCTF의 상대량을 파악하고, 이를 이용하여 표식 형성 방법으로 Ct 벨류를 확인하므로써 표적서열의 동정이 가능함을 증명하였다.

## 청구범위

- [청구항 1] 표적 서열과 비상보적인 무작위 핵산 서열을 포함하고, 제한효소 인지서열 및 표적 서열과 상보적인 핵산 서열을 순차적으로 포함하는 구조를 갖는 프라이머.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 제한 효소 인지 서열은 Pho I, PspGI, BstNI, TfiI, ApeKI, TspMI, BstBI, BstEII, BstNI, BstUI, BssKI, BstYI, TaqI, MwoI, TseI, Tsp45I, Tsp509I, TspRI, Tth111I, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nt.BspQI, Nt.BstNBI 제한효소 및 Nick 제한효소로 구성된 군으로부터 선택된 제한 효소에 대한 인지서열인 것을 특징으로 하는 프라이머.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 프라이머는 절단된 상보적인 태그 절편 이외의 절단 부산물이 반응에 참여하지 않는 것을 목적으로, 상기 프라이머 중 제한효소에 의해 절단되는 부위에 변형된 dNTP가 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 프라이머.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 절단부위에 삽입되는 변형된 dNTP는 포스포로티오에이트된(Phosphorothioated) dNTP, 7-데아자퓨린(Deazapurine)을 함유한 dNTP, 또는 DNA 주형 중 2'-O-메틸 뉴클레오타이드(methyl nucleotide; 2'-OMeN)을 포함하는 것을 특징으로 하는 프라이머.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 프라이머는 생성되는 절단된 상보적인 태그 절편의 길이가 5 mer 이상 50mer 이하인 것을 특징으로 하는 프라이머.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 1, 3, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 151, 153, 155, 156, 159, 161, 163, 164, 166, 168, 170, 204, 205, 207, 218, 220 및 222 로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 프라이머.
- [청구항 7] a) 절단된 상보적인 태그 절편인 표식을 생성하기 위한 표식의 주형을 포함하는 청구항 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 프라이머와 표적 서열을 혼성화 시키는 단계;  
 b) 상기 a) 단계 혼성화로 인해 증폭 과정이 진행될 때, 제한효소의 활성화에 의해 상기 프라이머로부터 절단된 상보적인 태그 절편이 생성되어 반응액으로 방출 및 유입되는 단계; 및  
 c) 상기 생성된 절단된 상보적인 태그 절편을 분석장비를 통해 동정하여 표적 핵산서열의 존재를 확인하는 단계를 포함하는 중합효소 연쇄 반응 중 증폭된 표적 서열의 종류를 구분하고 분석하는데 사용되는 표식을 형성하고, 동정하는 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 방법은 절단된 상보적인 태그 절편의 질량을 분석하여 절단된 상보적인 태그 절편을 동정하는 것을 특징으로 하는 방법.

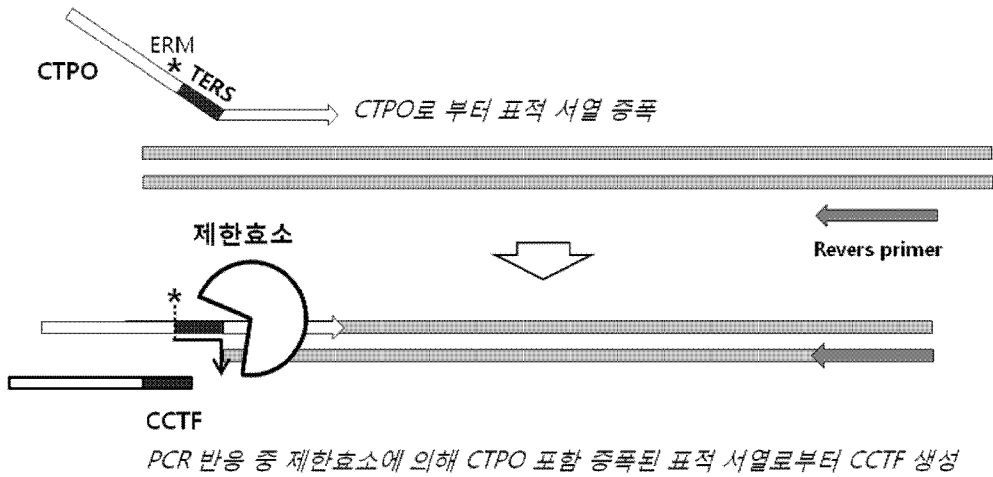
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 질량 분석에 사용되는 기기는 말디토프 질량분석기(MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption-ionization-time-of-flight mass spectrometer), 액체크로마토그래피 질량분석기(Liquid Chromatography Mass Spectrometry), 또는 고성능액체크로마토그래피 질량분석기(High Performance Liquid Chromatography)인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 10] 제7항에 있어서, 질량 분석에 사용되는 절단된 상보적인 태그 절편의 단위 전하당 질량( $m/z$ )은 0 초과 10000 Da 이하 사이에 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 11] 제7항에 있어서, 상기 증폭 과정 중 질량 분석에 사용되는 절단된 상보적인 태그 절편의 질량을 보존하기 위해 중합효소의 특성인 3' 말단 아데닌 추가연장 기능이 억제되어 있는 DNA 중합효소를 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 12] 제8항에 있어서, 상기 절단된 상보적인 태그 절편의 동정 방법으로 형광 및 퀸처(Quencher)가 표지되어 있고 절단된 상보적인 태그 절편의 상보적 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 형광 시그널을 분석하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 13] 제7항에 있어서, 상기 방법은 올리고뉴클레오타이드와 절단된 상보적인 태그 절편의 이중 가닥이 단일 가닥으로 해리되는 고유 해리 온도를 다양화하여 해리 온도 및 용융 피크를 분석하고, 절단된 상보적인 태그 절편을 동정하여 표적서열의 존재를 확인하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 방법은 2개 이상의 타깃을 검출하는 경우 다른 해리온도를 가지게 하여 용융피크 분석을 통해 2종이상의 타깃을 동시에 분석하게 하는 방법.
- [청구항 15] 제12항에 있어서 상기 올리고뉴클레오타이드의 길이는 5개 이상에서 50개 이하 사이의 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 16] 제 12항에 있어서, 상기 방법은 올리고뉴클레오타이드로부터 염기서열 신장 되는 것을 방지하기 위해 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단의 뉴클레오타이드를 블록킹하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기방법은 올리고뉴클레오타이드로부터 염기서열 신장 되는 것을 방지하기 위해 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단의 뉴클레오타이드에 Spacer C3, Phosphat, ddC, Inverted END 를 부착하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 18] 제16항에 있어서, 상기 방법은 올리고뉴클레오타이드로부터 염기서열 신장 되는 것을 방지하기 위해 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단의 뉴클레오타이드에 퀸처를 부착하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 19] 제7항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 성매개 질환 원인균을 동정하는 방법.

- [청구항 20] 제19항에 있어서, 상기 성매개 질환 원인균은 *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Herpes simplex virus 1*, *Herpes simplex virus 2*, 및 *Treponema pallidum*으로 구성된 균으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 21] 제7항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 위장관질환 원인체를 동정하는 방법.
- [청구항 22] 제21항에 있어서, 상기 위장관 질환 원인체는 *Rotavirus A*, *Astrovirus*, *Adenovirus F40*, *Adenovirus F41*, *Norovirus GI*, 및 *Norovirus GII*로 구성된 균으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 23] 제7항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 사람 인유두종 바이러스를 동정하는 방법.
- [청구항 24] 제23항에 있어서, 상기 인유두종 바이러스는 16형, 18형, 33형, 35형, 51형, 53형, 59형, 68a형, 및 82형으로 구성된 균으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 25] 제7항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 호흡기질환 원인체를 동정하는 방법.
- [청구항 26] 제25항에 있어서, 상기 호흡기 질환 원인체는 *Influenza A/H1N1*, *Influenza A/H3N2*, *Influenza A/H1N1/2009pdm*, *Influenza B*, *Parainfluenza 1*, *Parainfluenza 3*, *Respiratory syncytial virus A*, *Respiratory syncytial virus B*, *Human metapneumovirus*, 및 *Adenovirus*로 구성된 균으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 27] 제7항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 단일염기다형성(SNP)의 유전자형을 분석할 수 있는 방법.
- [청구항 28] 제27항에 있어서, 상기 단일염기다형성은 *BDNF* 유전자의 단일염기다형성인 rs6265의 돌연변이형인 A/A, 야생형인 G/G 또는 이형접합체인 A/G의 유전자형을 분석할 수 있는 방법.
- [청구항 29] 제7항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 올리고뉴클레오타이드의 형광 시그널의 Ct 값을 분석해 절단된 상보적인 태그 절편을 동정하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 30] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 프라이머를 유효성분으로 포함하는 성매개 질환 진단용 조성물.
- [청구항 31] 제 30항에 있어서, 상기 성 매개 질환은 *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Herpes simplex virus 1*, *Herpes simplex virus 2*, 및 *Treponema pallidum* 으로 구성된 균으로부터 선택된 균에 의하여

- 유발되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 32] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 프라이머를 유효성분으로 포함하는 위장관 질환 진단용 조성물.
- [청구항 33] 제32항에 있어서, 상기 위장관 질환은 Rotavirus A, Astrovirus, Adenovirus F40, Adenovirus F41, Norovirus GI, 및 Norovirus GII 으로 구성된 군으로부터 선택된 군에 의하여 유발되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 34] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 프라이머를 유효성분으로 포함하는 인유두종 바이러스 진단용 조성물.
- [청구항 35] 제34항에 있어서, 상기 인유두종 바이러스 아형은 16형, 18형, 33형, 35형, 51형, 53형, 59형, 68a형, 또는 82형을 진단하는 조성물.
- [청구항 36] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 프라이머를 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환 원인체 진단용 조성물.
- [청구항 37] 제36항에 있어서, 상기 호흡기 질환은 Influenza A/H1N1, Influenza A/H3N2, Influenza A/H1N1/2009pdm, Influenza B, Parainfluenza 1, Parainfluenza 3, Respiratory syncytial virus A, Respiratory syncytial virus B, Human metapneumovirus, 및 Adenovirus로 구성된 군으로부터 선택된 군에 의하여 유발되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 38] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 프라이머를 유효성분으로 포함하는 단일염기변이 분석용 조성물.
- [청구항 39] 제38항에 있어서, 상기 단일염기변이는 BDNF 유전자의 단일염기다형성인 rs6265의 돌연변이형 A/A, 야생형 G/G 또는 이형접합체 A/G 유전자형을 분석할 수 있는 조성물.

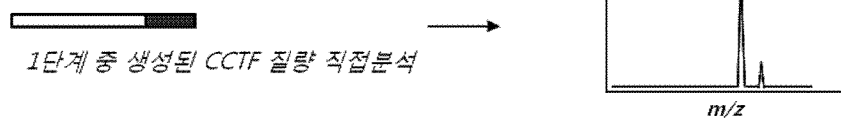
[도1]

**1. CTPO 형성 및 증폭, 방출 단계**

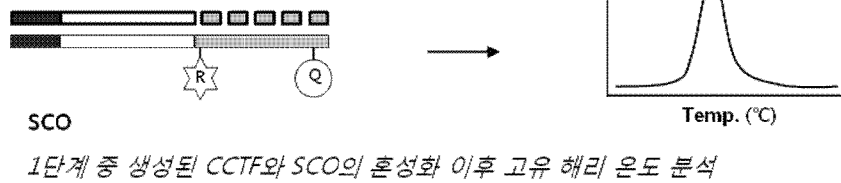


**2. CCTF 분석 단계**

**\* 질량분석**

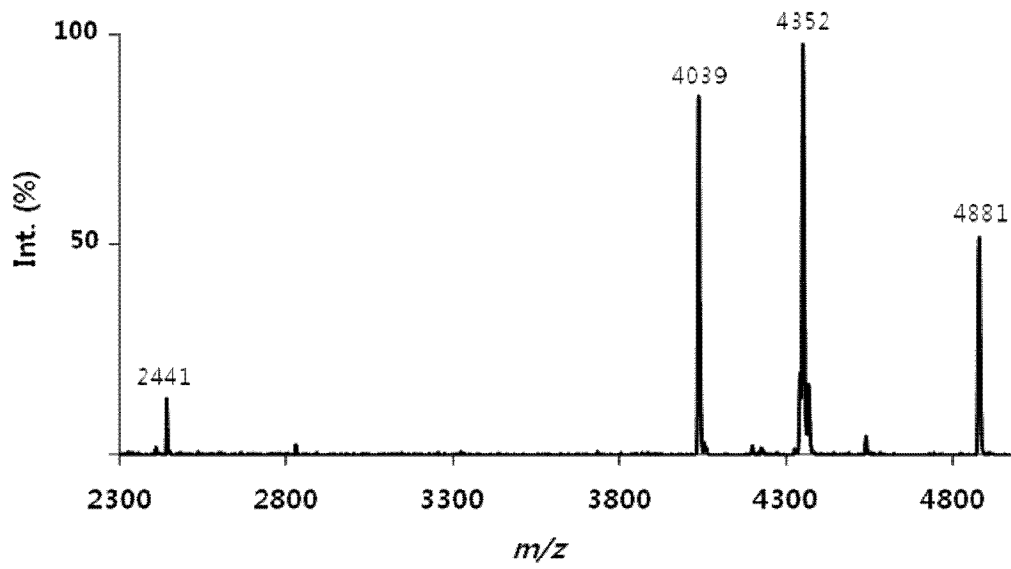


**\* 용융곡선 분석**

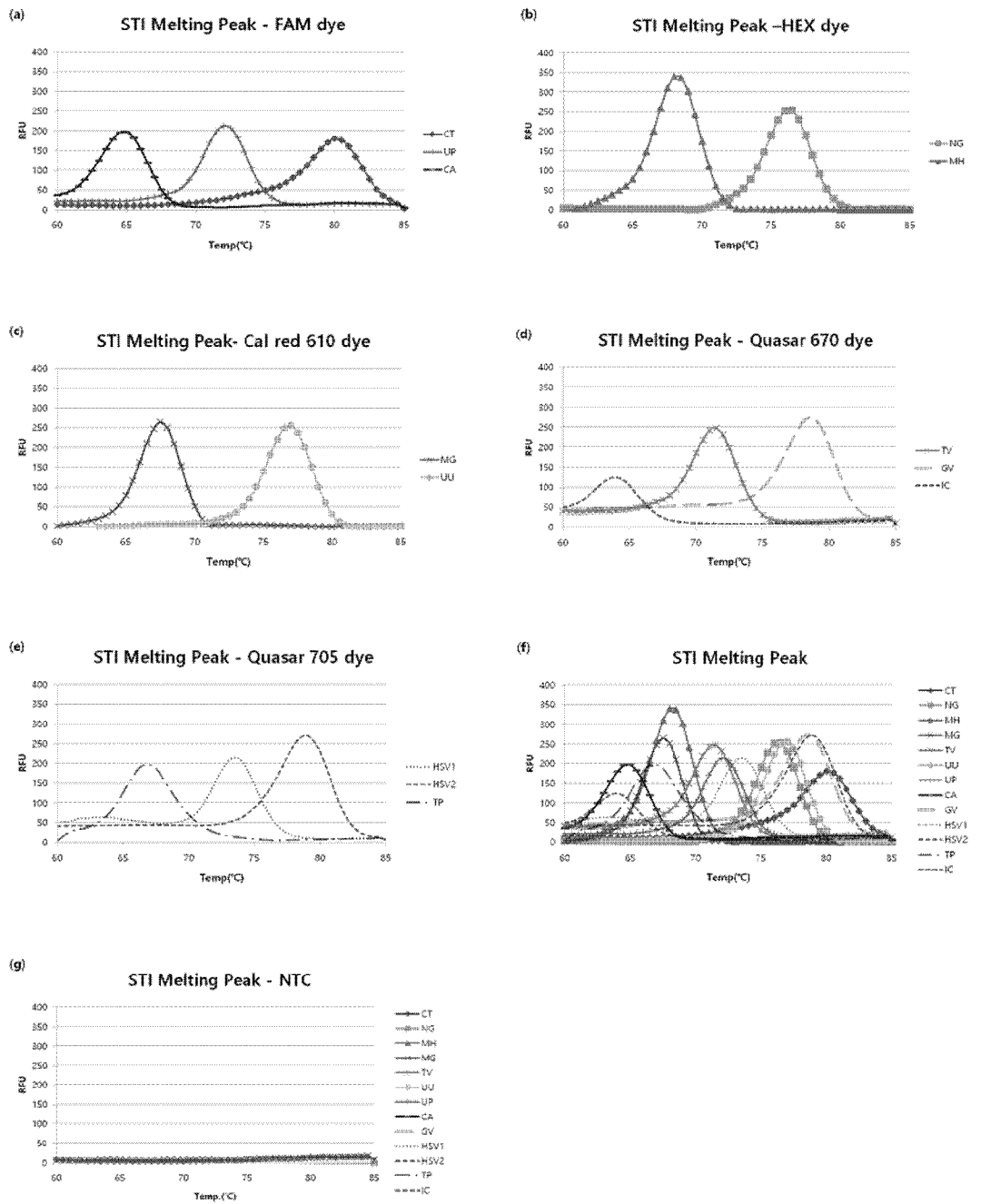


- ERM : Endonuclease Resistant Modification
- TERS : Thermostable Endonuclease Recognition Site
- CTPO : Cleavable Tag Primer Oligonucleotide
- CCTF : Cleaved Complementary Tag Fragment
- SCO : Signal Capture Oligonucleotide

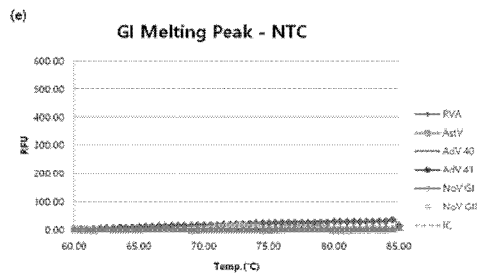
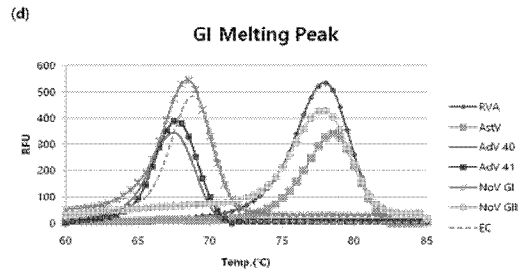
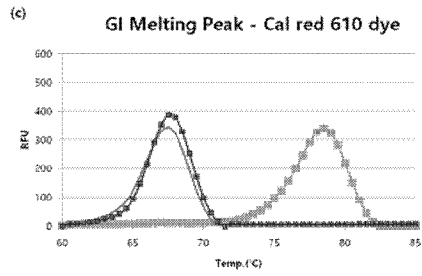
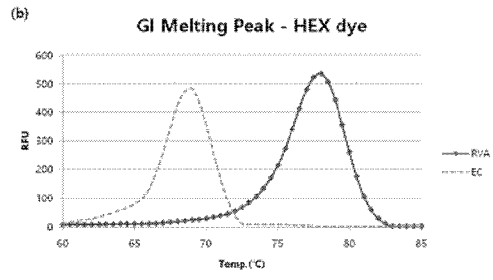
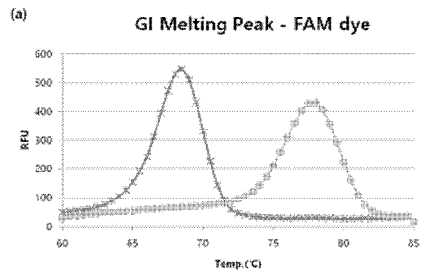
[도2]



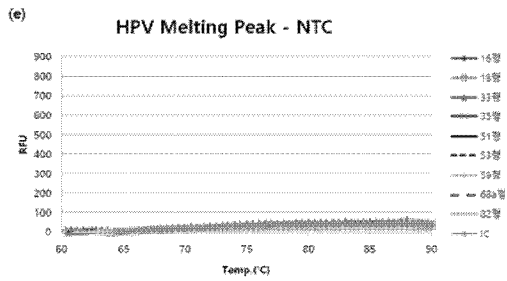
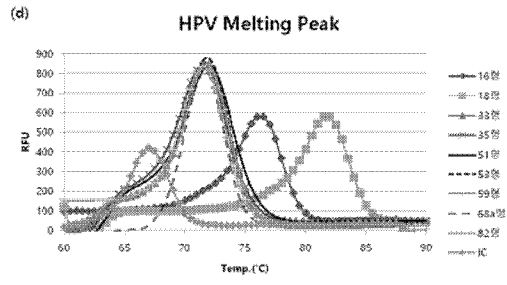
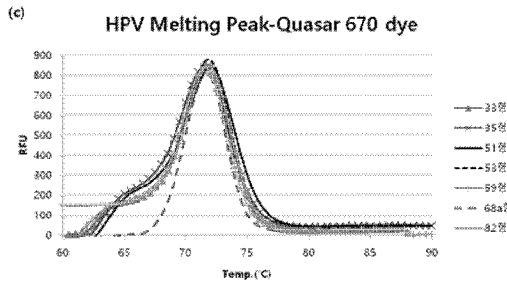
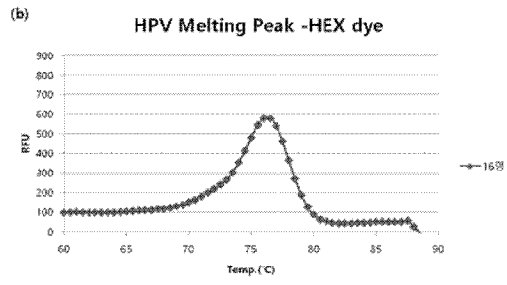
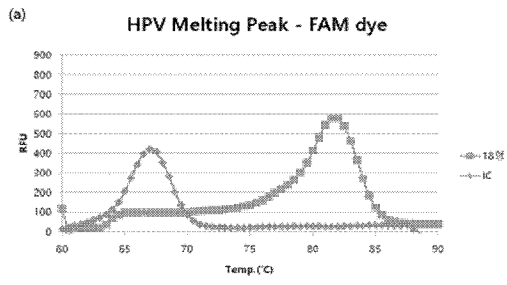
[도3]



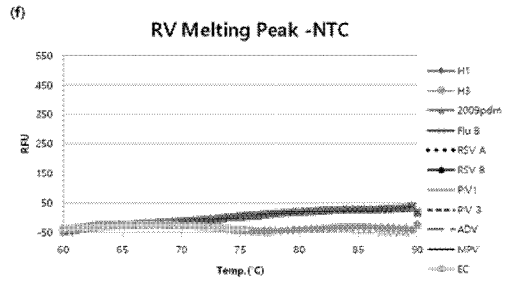
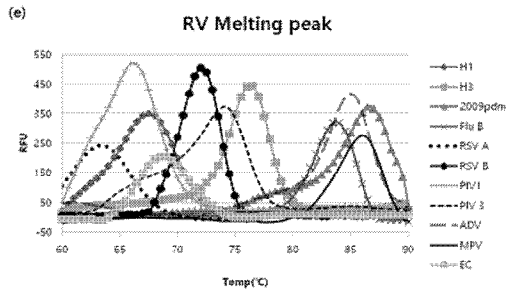
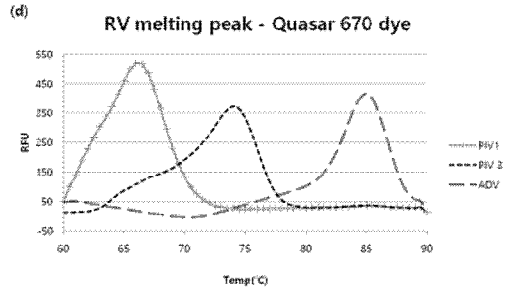
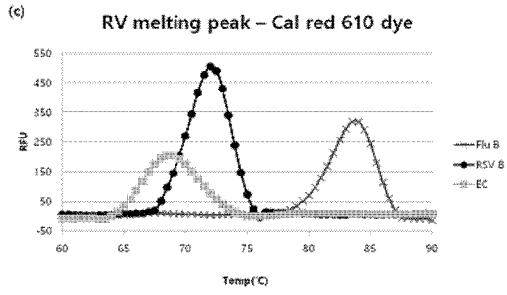
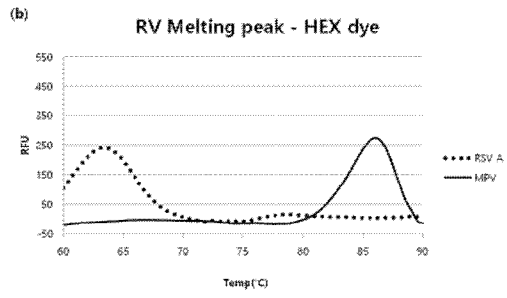
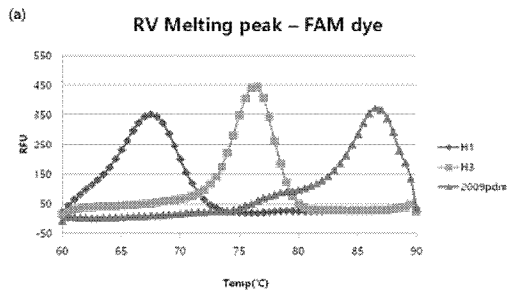
[도4]



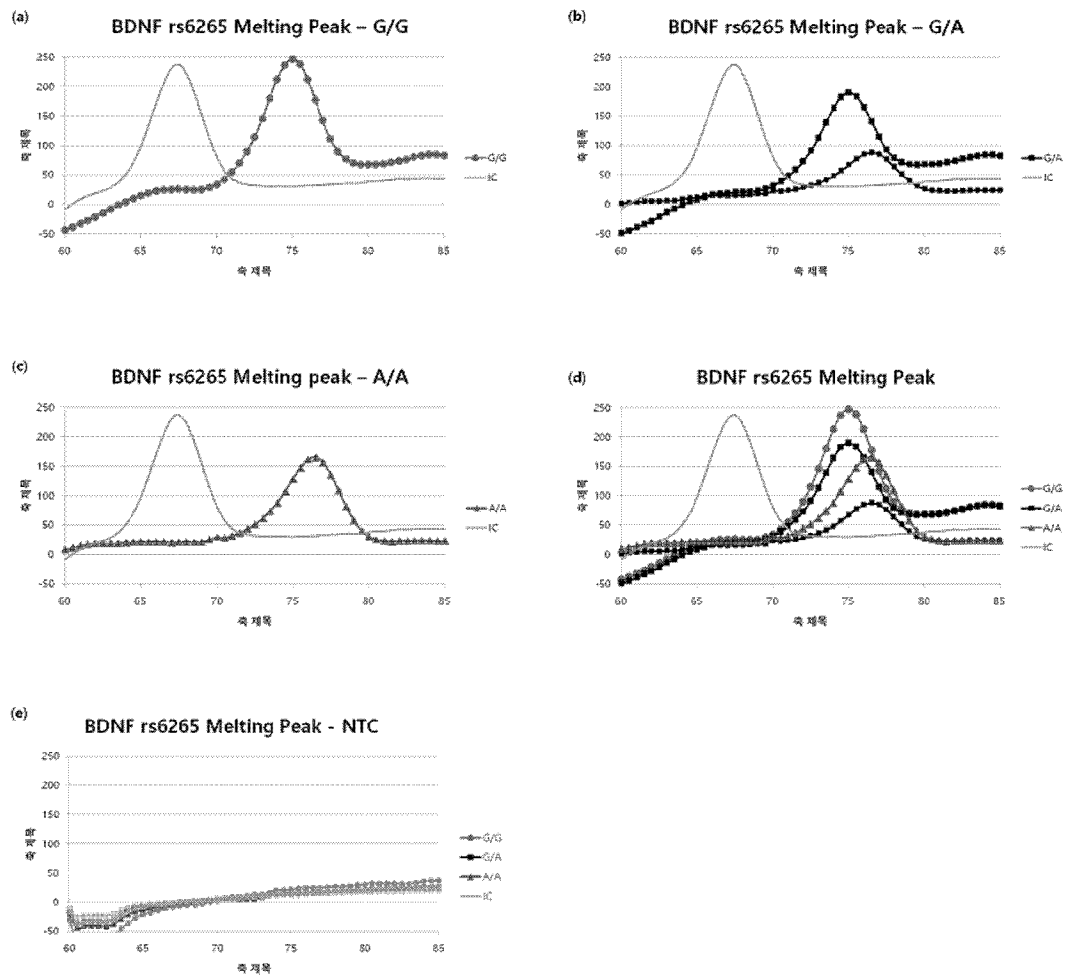
[도5]



[도6]



[도7]



[도8]

