(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12P 19/34
C12Q 1/68

(45) 공고일자 2001년06월01일
(11) 등록번호 10-0290332
(24) 등록일자 2001년03월02일

(21) 출원번호	10-1998-0708392	(65) 공개번호	특2000-0005557
(22) 출원일자	1998년10월15일	(43) 공개일자	2000년01월25일
번역문제출일자	1998년10월15일		
(86) 국제출원번호	PCT/US 97/06293	(87) 국제공개번호	WO 97/39138
(86) 국제출원일자	1997년04월15일	(87) 국제공개일자	1997년10월23일
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 가나 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 케냐 EA 유라시아특허 : 아르메니아 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 스웨덴 오스트리아 스위스 독일 덴마크 스페인 핀랜드 영국 국내특허 : 아일랜드 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 체코 에스토니아 그루지야 헝가리 아이슬란드 일본 북한 대한민국		
(30) 우선권주장	8/632,575 1996년04월15일 미국(US)		

(73) 특허권자 프로메가 코포레이션 랜들 엘. 다이어몬드
미국 53711-5399 위스콘신주 매디슨 우즈 할로우 로드 2800
(72) 발명자 슘 제임스 더블유
미국 위스콘신주 53711 메디슨 팀버 리지 트레일 5843
미카 캐써린 에이
미국 위스콘신주 53575 오레곤 패덕 플레이스 1842
래박 돈 알
미국 위스콘신주 53532 드포리스트 웬델 웨이 6649
(74) 대리인 이병호

심사관 : 이처영

(54) 짧은 반복 배열 좌위의 복합 증폭 방법

요약

본 발명은 PCR 또는 기타의 증폭 시스템을 이용하여 다중의 상이한 유전자 좌위를 동시에 증폭시켜, 1회의 복합 반응을 통해 이 복합 반응에 함유되어 있는 각 좌위의 대립 형질을 측정하는 방법에 관한 것이다. 분석 대상의 좌위에는 하기의 유전자 좌위들이 포함된다: HUM$_V$WFA31, HUMLIPOL, HUMBFXIII, HUMF13A01, HUMFESFPS, HUMTH01, HUMTPOX, HUMCSF1PO, D22S683, D20S481, D19S253, D17S1299, D17S1298, D16S753, D16S539, D16S490, D14S562, D14S548, D14S118, D13S317, D10S1239, D9S930, D7S820, D5S818, D4S2368, D3S1539.

대표도

도1

명세서

본 출원은 1994년 9월 30일자 출원된 미국 특허 출원 No.08/316,544의 계속 출원(continuation-in-part)이다. 모출원(parent application)에 개시되어 있는 모든 내용은 여기에서 인용하고 있는 문헌에 포함되어 있다.

배경기술

일반적으로, 본 발명은 게놈 시스템에서의 지표 인자(genetic marker)를 검 출하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 다중 시스템(multiplex system)내에 함유되어 있는 각 유전자 좌위(genetic loci)의 대립 형질을 한번의 반응으로 측정하기 위해, 폴리머라제 연쇄 반응법 또는 기타 증폭 시스템을 사용하여 다중의 상이한 다형성 유전자 좌위를 동시에 증폭시키는 방법에 관한 것이다.

최근에, 지표 인자로서의 다형성의 짧은 반복 배열(Short Tandem Repeat, STR)의 발견 및 개발을 통해, 연관 지도(linkage map)의 개발, 비정상적인 유전자의 동정 및 특성 확인, DNA 유형화(DNA typing)의 간소화 및 정확성에 있어서 급격한 향상이 있어 왔다.

적어도 인간의 게놈에 있어서는, 많은 유전자 좌위에서 다형성의 STR 부위를 함유하고 있다 [참조: Adamson, D., 등 (1995) ″ A collection of ordered tetranucleotide-repeat markers from the human genome,″ Am.J.Hum.Genet.57: 619-628 ; Murray,J.C., 등(1994) ″ A comprehensive human linkage map with centimorgan density,″ Science 265: 2049-2054; Hudson,T.J.,Engelstein,M., Lee, M.K., Ho,E.C., Rubenfield,M.J., Adams,C.P., Housman,D.E., 및 Dracopoli,N.C.(1992) ″ Isolation and chromosomal assignment of 100 highly informative human simple sequence repeat polymorphisms,″ Genomics 13: 622-629]. STR 좌위는 길이가 3 내지 7개의 염기쌍인 짧은 반복 서열 요소로 구성되어 있다. 인간의 게놈에는 매 15 kb마다 한번씩, 2,000,000 개의 트리머 및 테트라머 STR이 존재하는 것으로 추정된다 [참조: Edwards 등 (1991) ″ DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats.″ Am.J.Genet.49: 746-756; Beckman,J.S., 및 Weber,J.L.(1992) ″ Survey of human and rat microsatellites,″ Genomics 12: 627-631]. Edwards 등(1991)에 의해 연구된 STR 좌위의 거의 절반이 지표 인자를 풍부하게 제공해주는 다형성이었다.

특정 좌위에서의 짧은 반복 배열 단위의 수가 변함에 따라, 이 좌위에서의 DNA 길이가 각 대립 형질(allele) 및 각 개인에 따라 변하게 된다. 이러한 길이의 다형성(length polymorphism)은 STR 좌위보다 상당히 긴 반복 배열 단위를 함유하는 다양한 수의 반복 배열(variable number of tandem repeat, VNTR) 좌위 [참조: Nakamura,Y. 등(1987) ″ Variable number of tandem repeat(VNTR) markers for human gene mapping,″ Science 235: 1616-1622] 및 소위성(minisatellite) 좌위 [참조: Jeffreys, A.J. 등(1985) ″ Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA,″ Nature 314: 67-73]에서 볼 수 있으며, STR 좌위보다 더 짧은 반복 배열 단위를 갖는 미소위성 좌위 형태인 디뉴클레오티드 반복 배열 형태의 미소위성(microsatellite) 좌위 [참조: Litt,M. 및 Luty,J.A.(1989) ″ A hypervariable microsatellite revealed by in-vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene,″ Am.J.Hum. Genet. 44: 397-401; Tautz,D. 등(1986) ″ Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation,″ Nature 322: 652-656; Weber,J.L. 및 May,P.E.(1989) ″ Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction,″ Am.J.Hum.Genet. 44: 388-396; Beckmann 및 Weber(1992)]에서도 볼 수 있다.

다형성 STR 좌위는 인간 동정, 친자 감정 및 유전자 지도 작성에 매우 유용한 지표 인자이다. STR 좌위는 이 반복 배열의 측부에 동정되어 있는 특정 프라이머 서열을 이용하여 폴리머라제 연쇄 반응법(PCR)을 통해 증폭시킬 수 있다.

이러한 유전자 좌위의 대립 형질들은 증폭된 부위내에 함유되어 있는 반복 서열의 복제수(the number of copy)에 따라 구분되며, 전기 영동법으로 분리한 후, 방사성, 형광, 실버 스테인 및 색채 등 적당한 검출 방법을 사용하여 식별한다.

수고, 재료 및 분석 시간을 최소화하기 위해, 다중성 좌위 및/또는 많은 표본을 동시에 분석하는 것이 바람직하다. 이를 위해, 한번의 반응으로 다중성 좌위를 동시에 증폭시키는 방법이 있다. 소위, 이러한 ″ 복합(multiplex)″ 증폭 방법은 문헌에 상세히 기술되어 있다. 복합 증폭 세트는 뒤센형 근 위축증(Duchenne Muscular Dystrophy) [참조: Chamberlain,J.S. 등(1988) ″ Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplication,″ Nucleic Acid Res.16: 11141-11156; Chamberlain,J.S. 등(1989) ″ Multiple PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy, ″ in PCR Protocols, A Guide to Methods and Application (ed.Gelfand,D.H. 등) pp.272-281. Academic Press,San Diego,CA; Beggs,A.H.등(1990) ″ Detection of 98% DMD/BMD gene deletions by PCR,″ Hum.Genet.86: 45-48; Clemens,P.R 등(1991) ″ Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms,″ Am.J.Hum.Genet. 49: 951-960; Schwartz,J.S. 등(1992) ″ Fluorescent multiple linkage analysis and carrier detection for Duchenne/Becker's muscular dystrophy,″ Am.J.Hum.Genet.51:721-729; Covone,A.E. 등 (1992) ″ Screening Duchenne and Becker muscular dystophy patients for deletions in 30 exons of the dystrophin gene by three-multiplex PCR,″ Am.J.Hum.Genet.51: 675-677], 레쉬-나이한 증후군(Lesch-Nyhan Syndrome) [참조: Gibbs,R.A. 등(1990) ″ Multiple DNA deletion detection and exon sequencing of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene in Lesch-Nyhan families,″ Genomics 7: 235-244], 낭포성 섬유증 [참조: Estivill,X. 등(1991) ″ Prenatal diagnosis of cystic fibrosis by multiplex PCR of mutation and microsatellite alleles,″ Lancet 338: 458; Fortina,P.등(1992) ″ Non-radioactive detection of the most common mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene by multiplex polymerase chain reaction,″ Hum.Genet.90: 375-378; Ferrie,R.M. 등(1992) ″ Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene,″ Am.J.Hum.Genet.51: 251-262; Morral,N. 및 Estivill,X.(1992) ″ Multiplex PCR amplification of three microsatellites within the CFTR gene,″ Genomics 51: 1362-1364], 및 망막아종(retinoblasma) [참조: Lohmann,D. 등(1992) ″ Detection of small RB1 gene deletions in retinoblastoma by multiplex PCR and high-resolution gel electrophoresis,″ Hum.Genet.89: 49-53]과 같은 인간의 유전성 질환과 관련된 유전자의 분석을 위해 널리 개발되어 왔다. 다형성 미소위성 마커 [참조: Clemens 등(1991); Schwartz 등(1992); Huang,T.H.-M. 등(1992) ″ Genetic mapping of four dinucleotide repeat loci DXS435, DXS45, DXS454, DXS424, on the X chromosome using the multiplex polymerase chain reaction,″ Genomics 13:375-380] 및 STR 마커 [참조: Edwards,A.등(1992) ″ Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups,″ Genomics 12:241-253; Kimpton,C.P.등(1993) ″ Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci,″ PCR Methods and Applications 3: 13-22; Hammond,H.A. 등(1994) ″ Evaluation of 13 STR loci for use in personal identification applications,″ Am.J.Hum.Genet. 55:175-189; Schumm,J.W. 등(1994) ″ Development of nonisitopic multiplex amplification sets for analysis of polymorphic STR loci,″ in ″ The Fourth International Symposium on Human Identification 1993,″ pp.177-187; Oldroyd,N.J. 등 (1995) ″ A highly discriminating octoplex short tandem repeat polymerase chain reaction system suitable for human individual

identification," Electrophoresis 16: 334-337]의 복합 증폭에 대해서는 이미 문헌에 기술되어 있다.

일반적으로, 이렇게 증폭된 생성물은 당해 기술분야에서의 숙련자들에게 이미 공지되어 있는 몇가지의 전기 영동법중에서 하나를 사용하여 분리한다. 증폭 생성물을 검출하는 몇 가지 널리 공지된 방법도 이미 문헌에 기술되어 있다. 증폭된 단편에 대해서 에티디움 브로마이드 또는 실버 스테이닝 방법을 사용하는 경우도 있고, 증폭된 물질의 이본쇄중에서 하나에 대해서만 표지화하는 방법을 사용하는 것이 바람직한 경우도 있다. 이러한 예로는 특정의 좌위를 증폭시키기 이전에 2개의 프라이머중에서 하나만을 표지화하는 방사성 또는 형광성 표지 방법등이 있다. 더 정교하게 검출하는 방법중의 하나로는, 상이한 좌위를 나타내지만 전기 영동이후에 동일한 위치에 존재하는 증폭 물질을 검출하기 위해, 상이한 형광 표지를 사용하는 것이다. 이러한 상이한 좌위의 생성물은 한번에 하나의 형광 표지를 시각화할 수 있는 필터 또는 기타의 식별용 검출기를 사용하여 구별할 수 있다.

대립 형질-특이성 복합 폴리머라제 연쇄 반응 시스템을 이용하여, 각각 낭포성 섬유증 및 β-탈라세미아(thalassemia)와 같은 질환을 진단하는 데 사용하기 위한 방법 및 키트에 관한 Fortina 등의 국제 공개 공보 WO 93/18177 및 WO 93/18178을 인용 참조하고 있다. Fortina 등에 의하면, 복합 PCR은 다중의 표적으로하는 서열을 동시에 증폭시키는데에도 사용되어 왔는데, 아가로스 겔에 있는 2개의 레인을 사용하여 돌연변이 대립 형질의 스캐닝도 가능하다고 한다.

문헌에서는 F508 낭포성 섬유증 돌연변이를 검출하기 위해 2개의 상이한 염색으로 표지화한 형광 프라이머를 사용하는, 단일 튜브의 복합 대립 형질-특이성 PCR 테스트에 대해 기술하고 있다 [참조: Ballabio,A. 등(1991) " PCR Tests for Cystic Fibrosis Deletion," Nature, 343:220].

특정 좌위에 대해서는 복합 증폭 공정이 있는 반면, 특정 STR 좌위와 같은 기타 유형의 좌위에서의 대립 형질를 검출하기 위해서는 복합 증폭 공정을 사용하는 것이 매우 바람직하다. 또한, 이러한 좌위를 복합 증폭시킬 수 있도록 하는 프라이머를 동정하는 것도 바람직하다.

발명의 요약

따라서, 본 발명의 목적은 복합체내에 함유되어 있는 각각의 좌위의 대립 형질을 한번의 반응으로 측정하기 위해, PCR 또는 기타의 증폭 시스템을 이용하여 다중의 상이한 다형성 짧은 반복 배열(STR) 좌위를 동시에 증폭시키기 위한 방법 및 물질을 제공하는 것이다. 여기에 개시되어 있는 특정 STR 좌위 세트의 복합 분석에 대해서는 기존의 공지 기술에서는 설명하고 있지 않다. 또한, 이러한 STR 좌위의 복합 증폭에 유용한 것으로 보이는, 여기에서 개시하고 있는 여러 종류의 프라이머의 서열에 대해서도 이전에 기술된 바 없다.

본 발명의 또다른 목적은 특정 좌위를 포함하는 복합 증폭을 위한 방법, 키트 및 프라이머를 제공하는 것이다.

각 복합체의 개개의 좌위에 존재하는 대립 형질을 동시에 분석 또는 측정하는 데에 사용하는 방법 및 물질에 관한 본 발명에 따른 여러 목적들이 제시되어 있다. 일반적으로, 본 발명의 방법에는 (a) 분석할 하나 이상의 DNA 표본을 수득하고 [여기서, 이 DNA 표본은 공-증폭시킬수 있는 2 이상의 좌위를 갖는다]; (b) DNA 표본내의 STR 서열을 증폭시키고; (c) 사용된 시스템의 다형성이 드러나도록 증폭된 물질을 검출하는 것이 포함된다.

더 구체적으로는, 본 발명에서의 방법은

(a) 분석할 하나 이상의 DNA 표본을 수득하고 [여기서, 이 DNA 표본은 공-증폭시킬 수 있는 3 이상의 좌위를 갖는 좌위 세트를 가지며, 이 좌위 세트는 특정 그룹 또는 여기에 개시되어 있는 좌위 세트로부터 선택된다];

(b) 복합 증폭 반응에서 이 좌위 세트를 공-증폭시킴에 있어서, 반응 생성물은 이 좌위 세트에서 공-증폭된 각 좌위로부터의 증폭된 대립 형질의 혼합물이고;

(c) 상기 DNA 표본내에서 좌위 세트중의 각각의 좌위에 존재하는 분석할 대립 형질을 측정하기 위해 이 혼합물중의 증폭된 대립 형질을 평가하는; 하나 이상의 DNA 표본으로부터 3 이상의 반복 배열 좌위에 존재하는 대립 형질을 동시에 측정하는 방법이다.

본 발명의 한 양태에 있어서, 3개의 STR 좌위가 공-증폭되고, 이 3개의 공-증폭된 좌위를 갖는 좌위 세트는 하기로 이루어지는 그룹에서 선택된다:

D3S1539, D19S253, D13S317;

D10S1239, D9S930, D20S481;

D10S1239, D4S2368, D20S481;

D10S1239, D9S930, D4S2368;

D16S539, D7S820, D13S317; 및

D10S1239, D9S930, D13S317.

본 발명의 방법중에서 더 바람직한 양태에서는, DNA 표본이 공-증폭가능한 4 이상의 STR 좌위를 가지며, 공-증폭된 좌위 세트는 하기로 이루어지는 그룹에서 선택된다:

D3S1539, D4S2368, D5S818, D7S820, D9S930, D10S1239, D13S317, D14S118, D14S548, D14S562, D16S490, D16S539, D16S753, D17S1298, D17S1299, D19S253, D20S481, D22S683, HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01, HUMFESFPS, HUMF13A01, HUMBFXIII, HUMLIPOL, HUM$_{\gamma}$WFA31.

공-증폭된 4 이상의 STR 좌위를 갖는 좌위 세트는 하기의 4개의 좌위를 갖는 좌위 세트로부터 선택된 것

이 더욱 바람직하다.

D3S1539, D7S820, D13S317, D5S818;

D17S1298, D7S820, D13S317, D5S818;

D20S481, D7S820, D13S317, D5S818;

D9S930, D7S820, D13S317, D5S818;

D10S1239, D7S820, D13S317, D5S818;

D14S118, D7S820, D13S317, D5S818;

D14S562, D7S820, D13S317, D5S818;

D14S548, D7S820, D13S317, D5S818;

D16S490, D7S820, D13S317, D5S818;

D17S1299, D7S820, D13S317, D5S818;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818;

D22S683, D7S820, D13S317, D5S818;

D16S753, D7S820, D13S317, D5S818;

D3S1539, D19S253, D13S317, D20S481;

D3S1539, D19S253, D4S2368, D20S481;

D10S1239, D9S930, D4S2368, D20S481; 및

D16S539, D7S820, D13S317, HUM$_V$WFA31.

공-증폭되는 STR 좌위 세트가 하기의 좌위 세트로부터 선택되는 6개의 좌위를 갖는 좌위 세트인 경우가 더욱 바람직하다:

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX; 및

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS.

공-증폭되는 STR 좌위 세트가 하기의 좌위 세트로부터 선택되는 7 개의 좌위를 갖는 좌위 세트인 경우가 더욱 더 바람직하다:

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01; 및

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS, HUMBFXIII.

공-증폭되는 STR 좌위 세트가 하기의 좌위 세트로부터 선택되는 8 개의 좌위를 갖는 좌위 세트인 경우가 더 더욱 바람직하다:

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01, HUM$_V$WFA31; 및

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS, HUMBFXIII, HUMLIPOL.

본 방법에서의 복합 증폭 반응은 이 반응에서 공-증폭되는 좌위 세트중의 각 좌위의 측부에 위치하는 1쌍의 프라이머를 이용하여 수행하는 것이 바람직하다. 더 바람직하게는, 겔 전기영동법에 의해 대립 형질을 분리하는 경우, 공-증폭되는 세트중의 다른 좌위의 대립 형질과는 중복되지 않는 각 좌위로부터의 대립 형질을 생산하는 복합 증폭 반응용 프라이머 쌍을 선별한다. 복합 증폭 반응에서 사용되는 각 프라이머 쌍중의 하나의 프라이머의 서열은 하기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 경우가 더 더욱 바람직하다:

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D7S820인 경우, 서열 번호 1 및 2 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D13S317인 경우, 서열 번호 3 및 4 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D5S818인 경우, 서열 번호 5 및 6 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D3S1539인 경우, 서열 번호 7 및 8 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D17S1298인 경우, 서열 번호 9 및 10 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D20S481인 경우, 서열 번호 11, 12, 52 및 53 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D9S930인 경우, 서열 번호 13, 14, 55 및 61 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D10S1239인 경우, 서열 번호 15, 16 및 54 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D14S118인 경우, 서열 번호 17 및 18 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D14S562인 경우, 서열 번호 19 및 20 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D14S548인 경우, 서열 번호 21 및 22 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D16S490인 경우, 서열 번호 23 및 24 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D16S753인 경우, 서열 번호 25 및 26 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D17S1299인 경우, 서열 번호 27 및 28 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D16S539인 경우, 서열 번호 29, 30 및 58 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D22S683인 경우, 서열 번호 31 및 32 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMCSF1PO인 경우, 서열 번호 33 및 34 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMTPOX인 경우, 서열 번호 35 및 36 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMTH01인 경우, 서열 번호 37 및 38 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUM$_{V}$WFA31인 경우, 서열 번호 39, 40, 59 및 60 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMF13A01인 경우, 서열 번호 41 및 42 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMFESFPS인 경우, 서열 번호 43 및 44 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMBFXIII인 경우, 서열 번호 45 및 46 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMLIPOL인 경우, 서열 번호 47 및 48 ;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D19S253인 경우, 서열 번호 50 및 51 ; 및

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D4S2368인 경우, 서열 번호 56 및 57.

본 발명의 방법에 있어서, 증폭된 대립 형질은 크기 표준(size marker)과 비교하여 평가하는 것이 바람직하다 [여기서, 이 크기 표준은 DNA 마커 및 좌위-특이성 대립 형질 사다리(ladder)로 이루어지는 그룹에서 선택된다]. 대립 형질의 평가 단계는 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법을 사용하여 대립 형질을 분리하고, 이에 인해 분리된 대립 형질의 폴리아크릴아미드 겔을 형성하여 수행한다. 폴리아크릴아미드 겔에서의 분리된 대립 형질는 실버 스테이닝과 같은 적절한 기법을 사용하여 이 대립 형질를 시각화시킴으로써 측정하는 것이 바람직하며, 형광 분석법을 이용하는 것이 더 바람직하다.

형광 분석법은 복합 증폭 반응에 사용되는 각 프라이머 쌍중의 하나의 프라이머를 복합 증폭 반응이전에 형광 표지로 표지화시켜 수행하는 것이 바람직하다. 이러한 각 프라이머를 표지화하는데에 사용되는 형광 표지로는, 플루오레세인(fluorescein) 또는 테트라메틸 로다민 표지를 사용하는 것이 바람직하다. 2 이상의 상이한 표지를 사용하여 복합 증폭 반응에 사용되는 상이한 프라이머를 표지화하는 것이 가장 바람직하다.

인간의 조직, 바람직하게는 혈액, 정액, 질 세포, 모발, 타액, 오줌, 골, 구강 표본, 태반 또는 태아 세포를 함유한 양수액 및 이의 혼합물로 이루어지는 그룹에서 선택되는 조직으로부터 본 발명의 방법을 사용하여 분석할 하나 이상의 DNA 표본을 분리하는 것이 바람직하다.

본 발명의 다른 양태에서는, 3 이상의 좌위에서의 STR 서열을 동시에 분석하는 데에 사용되는 키트로서, 이는 3 이상의 짧은 반복 배열 좌위 세트를 공-증폭시키기 위한 올리고뉴클레오티드 프라이머 쌍을 갖는 용기를 포함하는 키트이다. 여기서, 좌위 세트는 하기로 이루어지는 좌위 세트로부터 선택된다:

D3S1539, D19S253, D13S317;

D10S1239, D9S930, D20S481;

D10S1239, D4S2368, D20S481;

D10S1239, D9S930, D4S2368;

D16S539, D7S820, D13S317;

D10S1239, D9S930, D13S317;

D3S1539, D7S820, D13S317, D5S818;

D17S1298, D7S820, D13S317, D5S818;

D20S481, D7S820, D13S317, D5S818;

D9S930, D7S820, D13S317, D5S818;

D10S1239, D7S820, D13S317, D5S818;

D14S118, D7S820, D13S317, D5S818;

D14S562, D7S820, D13S317, D5S818;

D14S548, D7S820, D13S317, D5S818;

D16S490, D7S820, D13S317, D5S818;

D17S1299, D7S820, D13S317, D5S818;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818;

D22S683, D7S820, D13S317, D5S818;

D16S753, D7S820, D13S317, D5S818;

D3S1539, D19S253, D13S317, D20S481;

D3S1539, D19S253, D4S2368, D20S481;

D10S1239, D9S930, D4S2368, D20S481;

D16S539, D7S820, D13S317, HUM$_V$WFA31;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS, HUMBFXIII;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01, HUM$_V$WFA31; 및

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS, HUMBFXIII, HUMLIPOL.

키트에 포함되어 있는 각 프라이머 쌍중의 하나 이상의 프라이머의 서열은 상기의 본 발명의 방법에서 나열되어 있는 서열 그룹으로부터 선택된다.

본 발명의 3번째 양태는, 인간 DNA의 특정 STR 좌위를 증폭시키는 데에 사용되는 프라이머 서열 및 프라이머 쌍이다. 인간 DNA의 복합 분석에 사용하기 위한 본 발명의 프라이머 및 프라이머 쌍의 용도에 대해서는 아래에 기술되어 있다. 본 발명의 프라이머는 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 데, 이 프라이머는 본 방법의 평가 단계에서 증폭된 대립 형질을 어떻게 측정할 것인지에 따라, 표지된 또는 표지되지 않은 형태로 사용될 수 있다.

상기 약술한 모든 양태의 본 발명에서는, 특정 좌위의 조합 및 조건을 사용하여, 다형성 지표 인자를 검출 및 분석하기에 높은 처리능력을 갖는 방법 및 물질을 제공한다. 평가 단계에 사용할 적합한 검출 기법을 선택하여, 전원과 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법에 사용할 표준 장치만을 구비한 실험실 또는 최신의 형광 겔 스캐닝 장치 [예를 들면, FluorImager™ 575 (Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA) 또는 Hitachi FMBIO™ (San Bruno,CA) 형광 스캐너이거나 ABI373 및 ABI Prism™ 377 DNA 서열기(Applied Biosystems Division,Perkin Elmer,Foster City,CA)]를 구비한 실험실에서 본 발명의 물질 및 방법을 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 다양한 용도로, 그리고 여러 실험실에서 사용할 수 있다.

본 발명에서 특정하는 방법을 사용함으로써, 복합체내에 함유되어 있는 좌위을 분석하는 데에 드는 시간, 노력 및 재료를 아낄 수 있다. 본 발명의 방법을 사용함으로써, 각각 별개의 튜브내에서 독립적으로 각 좌위를 증폭시키는 대신에, 하나의 튜브내에서 단일 증폭 반응을 사용하여 3 이상, 심지어 8 이상의 좌위를 공-증폭시킬 수 있다.

본 발명은 법정 분석(forensic analysis), 부계 확인, 골수 이식 감시, 연관 지도 작성 및 유전병과 암 검출 분야에서 특별한 용도로 사용된다. 동시에 3 이상의 좌위를 증폭 및 분석할 수 있게 되어, 본 발명의 물질 및 방법을 통해 각기 다른 두 개체의 혈액 및 기타 조직으로부터 분리된 DNA를 정합(match)시킬 수 있는 확실성이 크게 증가된다. 소량의 상이한 개체의 조직을 정확히 구별할 필요성은 특히 법정 분야에서 요구되어 왔던 것으로서, 많은 유죄 (및 무죄) 선언이 STR 좌위 분석 등의 DNA 유형 분석에 의해 이루어지고 있다.

과학자들, 특히 법의학자들은 두 조직 표본간의 정합이 통계적으로 중요하다는 것을 확신시키기 위해, 오래전부터 복합 다형성 DNA 좌위를 분석할 필요성을 느껴왔었다 [참조: Presley,L.A. 등(1993) ″The implementation of the polymerase chain reaction (PCR) HLA DQ alpha typing by the FBI laboratory,″ in ″The Third International Symposium on Human Identification 1992,″ pp.245-269; Bever,R.A 등 (1992) ″Characterization of five VNTR loci by Hae III RFLP analysis: application to paternity testing,″ in ″The Second International Symposium on Human Identification 1991,″ pp.103-128]. 반면에, 본 발명이 이루어지기 이전에는 단일 반응으로 3 이상의 STR 좌위를 동시에 분석할 수 있는 방법은 거의 없었다. 이러한 복합 분석력의 중요성을 인식하기 위해서는, DNA 유형화 분석에 사용되는 몇가지의 수학적인 방법을 이해하는 것이 도움이 된다.

이에 대한 설명을 위해, 모든 STR 좌위가 1/10의 인자형 빈도(예를 들면, 2 대립 형질형)를 갖는다고 가정을 하자. 다시 말하자면, 임의적으로 선택된 2 개체가 갖는 각 STR에 대한 정합 유형의 확률이 1/10이라고 가정하자. 2개의 상이한 STR 좌위를 분석하는 경우, 2 시스템의 임의 정합의 확률은 1/100이 된다. 3개의 STR 좌위를 분석하는 경우, 3 시스템의 임의 정합의 확률은 1/1,000이 된다는 식이다. 따라서, 분석할 STR 좌위 수가 3 이상으로 증가하게 되면, 일반적인 개체군내에서 임의 정합의 개연성은 급감하게 되는 데, 이로 인해 범죄 현장에서 채취한 증거와 혐의자의 유형을 대조해봄으로써 범죄 혐의자의 혐의를 정확하게 확인(또는 부인)할 수 있는 확률이 증가한다는 것을 쉽게 알 수 있다. 이와 유사하게, 본 발명의 방법을 통해 친부확인 사건에서 부친을 정확히 확인한다거나, 골수 조직을 정확히 정합시킨다거나, 연관 지도작성 연구로부터 중요한 결과를 얻는다든지, 유전병 및 암을 검출하는 데에 있어서 그 개연성이 증가된다고 결론지을 수 있다.

본 발명의 기타 다른 목적, 특징 및 잇점에 대해서는 하기의 상세한 설명 및 도면을 통해 분명해질 것이다.

발명의 상세한 설명

A. 정의

용어가 갖는 범위 및 상세한 내용을 분명하고 일관되게 이해하는 데에 도움을 주고자, 이들 용어에 대한 정의를 아래에 기술하였다:

대립형질 사다리(allelic ladder) : 좌위로부터의 증폭된 대립 형질로 구성된 표준 크기 마커.

대립 형질 : DNA 단편과 관련된 유전적 변형, 즉 동일한 좌위를 차지하는 DNA 서열의 2 이상의 대체 형태 중의 하나.

생화학적 명칭법 : 여기서 사용되는 생화학적 표준 명칭법에서, 뉴클레오티드 염기는 아데닌(A); 티민(T); 구아닌(G); 및 사이토신(C)으로 지칭된다. 이에 대응하는 뉴클레오티드로는 예를 들면, 데옥시구아노신-5'-트리포스페이트(dGTP)가 있다.

DNA 다형성 (polymorphism) : DNA 서열중에서 2 이상의 상이한 뉴클레오티드 서열이 동일한 이종간 교배 개체군(interbreeding population)에 공존하는 상태.

좌위 (또는 유전자 좌위) : 염색체상의 특정 위치. 특정 좌위의 대립 형질은 상동 염색체상의 동일한 부위에 위치한다.

좌위-특이성 프라이머 : 적어도 특정 좌위의 하나의 대립 형질을 위해, 좌위의 일부분 또는 이의 상보적인 쇄와 특이적으로 혼성화하나, 증폭 방법에서 사용되는 조건하에서 기타의 DNA와는 효과적으로 혼성화하지 않는 프라이머.

폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) : 변성, 프라이머와의 어닐링 및 DNA 폴리머라제를 이용한 신장으로 이루어지는 사이클을 통해, 표적으로하는 DNA 서열의 대립 형질수를 약 10^6 배이상으로 증폭시키는 기법. 핵산을 증폭시키는 데에 사용되는 폴리머라제 연쇄 반응법은 U.S.Patent Nos.4,683,195 및 4,683,202에 기술되어 있는 데, 이는 본 발명의 방법에 관한 인용 문헌에 포함되어 있다.

다형성 짧은 반복 배열 좌위(polymorphic short tandem repeat loci) : 게놈 DNA의 특정 부위에서의 반복 서열 요소수가 대립 형질 및 개체에 따라 다른 STR 좌위.

다형성 정보 내용 (PIC) : 특정 좌위에 존재하는 다형성의 정도를 나타내는 지수 (Botstein 등, 1980). PIC 수치는 0부터 1.0까지의 값을 가지며, 수치가 높을수록 다형성의 정도가 크다. 일반적으로, 이 지수는 이형 접합성(heterozygosity)과 같은 통상 사용되는 기타의 지수보다는 작은 수치를 나타낸다. 정보가 많은 마커의 경우(이형 접합성이 약 70% 이상), 이형 접합성과 PIC의 차이는 작다.

1차 반응 : 정제한 인간의 게놈 DNA를 PCR에서의 모형(template)으로 사용하는 초기 반응.

프라이머 : 3' 말단 부위가 가장 근접해 있는 좌위의 대응 쇄(opposing strand)와 혼성화하는 2개의 일본쇄 올리고뉴클레오티드 또는 DNA 단편. 프라이머쌍 : 증폭시킬 DNA 서열의 한 말단에 있는 단일 쇄에 혼성화하는 제 1 프라이머와 증폭시킬 DNA 서열의 상보 쇄상에 있는 다른 말단과 혼성화하는 제 2 프라이머를 포함하는 두 개의 프라이머.

프라이머 부위 : 프라이머가 혼성화하는 표적 DNA의 부위.

2차 반응 : 1차 반응의 희석물을 PCR에서의 모형(template)으로 사용하여, 동일한 또는 상이한 프라이머쌍을 이용한 재증폭 반응.

짧은 반복 배열 좌위(STR 좌위) : 길이 3 내지 7 염기쌍의 짧은 반복 서열 요소를 함유하는 인간의 게놈 부위.

B. 복합 반응 성분의 선별

본 발명의 방법에서는 크기상으로 중복되지 않거나, 크기상 중복되나 어떤 식으로든 증폭된 대립 형질 상호간에 식별되도록 표지화된 복합 공-증폭된 좌위로부터 증폭된 대립 형질을 수득하기위한 적절한 좌위 세트, 프라이머 및 증폭 프로토콜을 선별하는 방법에 대해 고찰하였다. 게다가, 본 발명에서는 단일 증폭 반응의 프로토콜과 병행하여 사용할 수 있는 짧은 반복 배열 좌위의 선별 방법에 대해서도 고찰하였다. 여기에 기술되어 있는 특정의 조합은 본 출원에 특유한 것이다. 좌위의 조합은 상기한 2가지 이유로, 또는 하나 이상의 좌위가 적합한 생산 수득율을 갖지 못하거나 진정한 대립 형질을 나타내지 않는 단편이 본 반응에서 생성되기 때문에 받아들여지지 않을 수 있다.

여기에 기술되어 있는 것이외의 성공적인 조합은 시행 착오를 통한 좌위의 조합, 프라이머 쌍의 선별 및 포함된 모든 좌위를 증폭시킬 수 있는 평형을 확인하기 위한 프라이머 농도의 조정에 의해 수득할 수 있다. 본 발명의 방법 및 재료가 개시되는 경우, 본 발명의 방법 및 키트에 사용되는 다양한 좌위, 프라이머 쌍 및 증폭 기법의 선별방법은 해당 기술 분야의 기술자에게는 용이하게 인식될 수 있을 것이다. 이러한 모든 방법들은 특허청구범위내에 포함되는 것으로 간주된다.

본 발명의 방법을 실행함에 있어서 특히 중요한 점은, 복합 증폭 반응 단계에서 공-증폭되는 각 좌위로부터 생성되는 증폭된 대립 형질의 크기 범위이다. 현재의 기술로는 500 염기이하의 단편을 증폭시켜서 검출할 수 있는 시스템이 분석하기에 가장 바람직하다. 좌위, 프라이머 및 증폭 기법으로 이루어진 가장 바람직한 조합은 상기한 발명의 요약 부분에 기술되어 있다.

프라이머를 부적절하게 선별하는 경우, 증폭 부족, 여러 부위에서의 증폭, 프라이머의 다이머 형성, 상이한 좌위로부터의 프라이머 서열의 부적절한 상호 작용, 다른 좌위의 대립 형질과 중복되는 좌위로부터의 대립 형질의 생성 또는 복합체에서 병행할 수 없는 상이한 좌위를 위한 증폭 조건 또는 프로토콜의 필요성과 같은 부적합한 결과가 몇가지 발생한다. 본 발명의 방법에 사용되는 프라이머의 합성은 해당 기술 분야의 숙련자들에게 공지된 올리고뉴클레오티드 표준 합성 공정을 사용하여 수행할 수 있다.

C. 3 이상의 좌위를 이용한 복합체의 수득에 사용되는 3개 좌위의 복합체의 용도

본 발명의 방법을 이용하여, 여러 상이한 기법을 통해 분석할 STR 좌위 세트를 선택할 수 있다. 이러한

분석 방법에서 사용하기에 유용한 좌위 세트를 수득하는 데에 바람직한 기법중의 하나에 대해 아래에 기술하였다. 일단 3개의 좌위를 함유하는 복합체를 수득한 경우, 이를 코어(core)로 사용하여 3 이상의 좌위를 함유하는 복합체를 만들 수 있다. 첫 3개의 좌위를 포함하는 새로운 조합체가 생성된다. 예를 들면, 좌위 D7S820, D13S317 및 D5S818을 함유하는 코어 복합체를 사용하여, 복합 유도체 D16S539, D7S820, D13S317 및 D5S818; HUMCSF1PO, HUMTPOX, D16S539, D7S820, D13S317 및 D5S818; HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01, D16S539, D7S820, D13S317 및 D5S818; 및 HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01, HUM$_V$WFA31, D16S539, D7S820, D13S317 및 D5S818를 수득하였다.

좌위 코어 세트를 사용하여, 본 발명의 방법을 사용한 복합체 분석을 위한 기타의 적합한 STR 좌위 유도체 세트를 수득할 수 있다. 본 발명의 방법을 사용하여 분석할 좌위를 어떠한 방법으로 선택한 것인지에 상관없이, 복합체 분석을 위해 선택된 모든 좌위는 하기의 특징들을 가져야 한다:

(1) 오차(slippage)는 최소이어야 한다[예를 들면, 증폭 단계에서 반복 서열을 착오 해독(misreading)함으로부터 유래하는].

(2) 복합 증폭 단계에서, 증폭된 대립 형질에 염기의 첨가 또는 결실에 기인한 아티팩트(artifact)가 적어야 한다.

(3) 폴리머라제에 의한 증폭 반응의 조기 종결에 따른 아티팩트가 적어야 한다.

(4) 주어진 진정한 증폭 대립 형질아래의 보존적인 단일 염기 결실로부터의 저분자량의 " 트레일링" 밴드가 없어야 한다.

문헌[Schumm 등, " Development of Nonisotopic Multiplex Amplication Sets for Analysis of Polymorphic STR Loci," Fourth International Symposium of Human Identification 1993, pp.177-187(Promega Corp.에서 간행, 1993)]을 참고하기 바란다.

D. DNA 표본의 제조 방법

본 발명의 방법에 사용할 인간 게놈 DNA 표본은 단일 좌위의 증폭 방법과 양립할 수 있는 DNA 제조 방법이라면 어느 방법이라도 사용하여 제조할 수 있다. 이러한 많은 방법들은 본 발명의 방법에 사용할 게놈 DNA 표본의 제조에 적합한 데, 이는 문헌에 기술되어 있는 DNA 표본 제조 방법 등이 있으며 이에 한정되지는 않는다 [참조: Patel,P.I. 등, (1984) " Organization of the HPRT gene and related sequences in the human genome," Somat Cell Mol Genet 10: 483-493 및 Gill,P. 등 (1985) " Forensic application of DNA 'fingerprints'," Nature 318: 577-579].

DNA 표준 검출 방법을 사용하여, 본 발명의 방법에 사용하기 이전에 DNA 농도를 측정할 수 있다. 그러나, 문헌에 기술되어 있는 측정 방법과 같은 방법을 사용하여, 형광 검출법으로 측정하는 것이 바람직하다 [참조: Brunk C.F. 등 4 (1979) " Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates," Anal Biochem 92: 497-500]. DNA 농도는 문헌에 기술된 것과 같은 인간-특이성 프로브를 이용하여, DNA 표준 혼성화량과 비교하여 측정하는 것이 더욱 바람직하다 [참조: Waye 등 (1979) Waye,J.S. 등 (1991) " Sensitive and specific quantification of human genomic deoxyribonucleic acid(DNA) in forensic science specimens: casework examples," J.Forensic Sci.,36:1198-1203]. 증폭 반응에서 모형(template) DNA를 너무 많이 사용하는 경우, 진정한 대립 형질을 나타내지않는 추가 밴드 형태로 나타나는 아티팩트가 생길 수 있다.

E. DNA의 증폭 방법

인간 게놈 DNA 표본을 분리한 후 상기한 바와 같이 이의 농도를 측정한 경우, 본 방법의 복합 증폭 단계에서 표적으로하는 좌위를 공-증폭시킬 수 있다. 좌위를 증폭시키는 데에 사용될 수 있는 증폭 방법에는 여러 가지가 있는 데, 이에는 폴리머라제 연쇄 반응법(PCR) [참조: Saiki,R.K. 등 (1985) " Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia," Science 230: 1350-1354], 전사(transcription)에 기초한 증폭 방법 [참조: Kwoh,D.Y. 및 Kwoh,T.J. (1990) " Target amplification systems in nucleic acid-based diagnostic approaches," American Biotechnology Laboratory, 1990년 10월] 및 쇄 교체 증폭 방법(strand displacement amplification, SDA) [참조: Walker,G.T. 등 (1992) " Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme-DNA Polymerase system," Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A. 89: 392-396] 등이 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 이 DNA 표본을 좌위 세트중의 각 좌위에 특이한 프라이머쌍 및 열순환 조건을 사용하여 PCR 증폭 반응시키는 것이 바람직하다. 실시예에서 사용된 프라이머의 서열에 대한 상세한 내용은 본 명세서의 말미에 있는 서열 목록을 참조하면 되고, 이들 서열중의 몇몇 서열들은 본 발명의 기타의 대체 양태이다.

본 발명의 방법에 사용되는 가장 바람직한 좌위의 조합에 대한 가장 바람직한 증폭 프로토콜에 대해서는 실시예에 상세히 기술되어 있다. 또한, 실시예를 참고하면, 각 복합체에 관련된 특정 공정에 대한 상세한 내용을 추가로 얻을 수 있다. 실시예에서 사용된 좌위-특이성 프라이머의 서열에는 혼성화 반응에 사용되는 조건하에서 증폭시킬 좌위의 대립 형질과는 혼성화하나, 기타 좌위의 대립 형질은 증폭시키지 않는 수많은 뉴클레오티드가 포함된다. Simons의 U.S. 특허 5,192,659를 참조하였는 데, 이는 좌위-특이성 프라이머에 대한 더 상세한 설명을 위해 인용 문헌에 포함되어 있다.

F. DNA 단편의 분리 및 검출 방법

본 방법의 복합 증폭 단계로부터 증폭된 대립 형질 세트를 수득한 경우, 이러한 증폭된 대립 형질을 평가한다. 본 방법의 평가 단계는 상이한 여러 방법으로 수행할 수 있는 데, 가장 바람직한 것은 하기와 같다.

복합 증폭 반응의 생성물을 분리하기 위해서는 전기 영동법을 사용하는 것이 바람직하며, 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법을 사용하는 것이 더욱 바람직하다 [참조: Sambrook,J. 등 (1989) In

Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.13.45-13.57]. 본 발명의 방법의 평가 단계에서 사용하기에 가장 바람직한 겔 제조 방법과 전기 영동 공정 및 조건에 대해서는 실시예 1에 기술되어 있다. 변성화 폴리아크릴아미드 겔에서의 DNA 단편의 분리는 단편의 크기에 따라 이루어진다.

증폭시킨 대립 형질을 폴리아크릴아미드 겔에서 분리시킨 후, 이 대립 형질 및 겔내의 기타의 다른 DNA (예를 들면, DNA 마커 또는 대립 형질 사다리)를 시각화 및 분석가능하다. 겔내에서의 DNA의 시각화는 많은 선행 기술을 사용하여 수행할 수 있는 데, 여기에는 실버 스테이닝과 방사성 동위원소, 형광체, 화학 발광체 및 탐지가능한 기질과 결합된 효소와 같은 리포터(reporter) 등이 있다. 실버 스테이닝 (silver staining)은 겔내에서 대립 형질을 시각화시키기에 바람직한 방법이다 [참조: Bassam,B.J. (1991) ″Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels,″ Anal.Biochem.196:80-83]. 더 바람직한 방법은, 복합 반응에서 각 좌위에 대해 방사성 표지된 프라이머 [참조: Hammond 등 (1994)] 또는 형광 표지된 프라이머 [참조: Schumm 등 (1994)]를 사용한 후, 각각 방사성 사진 또는 형광 검출기를 사용하여 표지화된 생성물을 검출하는 것이다. 대립 형질을 시각화하는 데 사용되는 선행 기술을 설명하고 있는 상기에서 인용된 3가지의 참조 문헌은 여기에서 인용 문헌에 포함되어 있다.

DNA 표본중에 존재하는 대립 형질은 이 표본내의 각 좌위에 존재하는 대립 형질을 측정하기 위해, DNA 마커 또는 좌위-특이성 대립 형질 사다리와 같은 크기 표준(size standard)과 비교하여 측정하는 것이 바람직하다. 2 이상의 다형성 STR 좌위를 함유하는 복합 증폭 방법의 평가 단계에 사용되는 크기 마커는 평가할 각 좌위에 대한 대립 형질 사다리의 조합으로 구성되는 것이 가장 바람직하다[참조: 예를 들면, 상기한 Schumm 등의 p.178에 기술되어 있는 대립 형질 사다리 및 사다리 작제 방법].

각 좌위에 대한 형광-표지된 프라이머를 사용하여 수득된 2 이상의 다형성 STR 좌위를 함유하는 복합 증폭 반응의 평가를 위한 크기 마커(size marker)는, 평가할 좌위에 대한 형광-표지된 대립 형질 사다리의 조합으로 구성되는 것이 바람직하다.

각 좌위에 대한 대립 형질 사다리를 작제한 후, 증폭된 표본을 부하시킴과 동시에 이를 혼합 및 겔 전기 영동법을 수행하기 위해 부하시킨다. 각 대립 형질 사다리는 표본중의 이에 대응하는 좌위로부터의 대립 형질과 함께 이동한다.

자동 프로세서 적합성(Automatic Processor Compatible, APC) 필름 (STR 시스템 교본 #TMD004, Promega Corporation,Madison,WI으로부터 입수 가능) 또는 형광 검출기 (STR 시스템 교본 #TMD006, Promega Corporation,Madison,WI으로부터 입수 가능)를 사용하여, 이에 대한 데이터를 영구적으로 기록해 둘 수 있다.

G. 바람직한 검출 기법: 형광 검출법

본 발명의 방법중에서 가장 바람직한 양태중의 하나는, 형광 검출법을 사용하여 복합 증폭 반응에서 생성된 혼합물중에서 증폭된 대립 형질을 평가하는 것이다. 아래에서는 이러한 검출 방법이 어떻게 바람직하게 수행되는 가에 대해 요약하였다.

자동화된 형광 영상화 방법을 이용하여, 복합 증폭 생성물을 더 빨리 검출 및 분석할 수 있다. 형광 분석법의 경우, 형광화된 프라이머 하나가 각 좌위의 증폭 반응에 포함될 수 있다. 2 종류의 바람직한 형광 표지된 프라이머인, 형광으로 표지된(FL) 및 테트라메틸 로다민으로 표지된(TMR) 프라이머의 사용에 대해서는 실시예에서 설명하고 있다. 실버 스테인 검출법과 동일한 방식으로, 이렇게 표지된 프라이머를 사용하여 생성된 단편을 정확하게 분리할 수 있다. 그리고나서, 겔을 스캔한 후, 데이터를 아주 짧은 시간내에(예를 들면, 3 내지 20분) 계수화하는 FluorImager™ 분석기 (Molecular Dynamics, Sunnyvale,CA로부터 입수 가능) 또는 FMBIL™ (Hitachi Corporation,San Bruno,CA로부터 입수 가능)를 사용하여, 이 겔을 분석할 수 있다.

요약하면, 본 발명의 방법은 평가 단계에서 형광 검출법을 사용하여 수행하는 것이 가장 바람직하다. 바람직한 검출법의 경우에는, 복합 증폭 반응에서 사용하는 각 프라이머쌍중의 하나에는 형광 표지를 하여, 증폭 반응으로부터 생성되는 증폭된 대립 형질을 형광 표지화한다. 본 발명의 가장 바람직한 양태의 경우에는, 증폭된 대립 형질을 폴리아크릴아미드 겔상에서 분리시킨 후, 형광 영상 분석기를 사용하여 분리된 대립 형질을 시각화 및 분석한다.

형광 검출법이 방사성 표지 및 검출법에 비해 더 바람직한 데, 이는 형광 검출법에서는 방사성 물질을 사용할 필요가 없고, 이러한 방사성 물질을 사용함에 따라 수반되는 모든 통제 및 안전 문제가 발생하지 않기 때문이다.

형광 검출법은 실버 스테이닝과 같은 기타의 비-방사성 방법에 비해서도 더 바람직한 데, 이는 형광 검출법을 사용하는 경우에 일반적으로 스테이닝에 비해 겔 아티팩트가 적다. 형광 검출법에서 겔 아티팩트가 적은 것은, 대체적으로 형광 검출법에서는 표지화된 증폭 DNA 단편만이 검출되는 반면, 실버 스테이닝 방법에서는 복합 증폭 반응에서 생성되는 모든 DNA 단편이 염색 및 검출되기 때문이다. 실버 스테인으로 염색시킨 폴리아크릴아미드 겔은, 실버 스테인이 겔에 비-특이적으로 결합하여, 겔 내에서 각 DNA 밴드가 검출될 수 있게 하는 민감도를 감소시켜, 일반적인 배후방사량(general background)이 상당히 크다. 하기의 두 실시예 세트에서 실버 스테이닝 및 형광 검출법을 상호 비교하였다.

H. 키트

또한, 본 발명은 상기한 방법을 사용하는 키트에 관한 것이다. 기본적인 키트는 각 좌위에 대한 하나 이상의 좌위-특이성 프라이머를 함유하는 용기를 포함하고 있다. 이러한 키트에는 사용 여부에 대한 지시사항이 포함되어 있을 것이다.

기타의 임의적인 키트의 구성 요소로는 각 특정 좌위에 대한 대립 형질 사다리, 증폭을 위한 충분한 양의 효소, 증폭 반응을 용이하게 하기 위한 증폭용 버퍼, 겔 전기 영동법을 위한 증폭 물질 제조용 부하

용액, 모형 대조군으로서의 인간 게놈 DNA, 겔내에서 물질 이동이 예측한 대로 이루어지도록 하기 위한 크기 마커 및 사용자 교육용 및 사용상 실수를 줄이기 위한 프로토콜 및 교본이 포함된다. 키트내의 각 시약의 양은 최적 민감도와 같은 여러 인자에 따라 달라질 수 있다. 본 발명의 범위내에는, 수동으로 사용하는 테스트 키트나 자동 검출기 또는 분석기와 함께 사용하는 테스트 키트를 제공하는 것이 포함된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 실시예 1에서 FluorImager™ 형광 스캐너 (Molecular Dynamics, Sunnyvale,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D3S1539, D7S820, D13S317 및 D5S818의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 2는 실시예 2에서 FluorImager™ 형광 스캐너 (Molecular Dynamics, Sunnyvale,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D17S1298, D7S820, D13S317 및 D5S818의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 3은 실시예 3에서 FluorImager™ 형광 스캐너 (Molecular Dynamics, Sunnyvale,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D17S1298, D7S820, D13S317 및 D5S818의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 4는 실시예 4에서 FluorImager™ 형광 스캐너 (Molecular Dynamics, Sunnyvale,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D20S481, D7S820, D13S317 및 D5S818의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 5는 실시예 5에서 FluorImager™ 형광 스캐너 (Molecular Dynamics, Sunnyvale,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D20S481, D7S820, D13S317 및 D5S818의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 6는 실시예 6에서 FluorImager™ 형광 스캐너 (Molecular Dynamics, Sunnyvale,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D9S930, D7S820, D13S317 및 D5S818의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 7는 실시예 7에서 FluorImager™ 형광 스캐너 (Molecular Dynamics, Sunnyvale,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D10S1239, D7S820, D13S317 및 D5S818의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 8는 실시예 8에서 FluorImager™ 형광 스캐너 (Molecular Dynamics, Sunnyvale,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D10S1239, D7S820, D13S317 및 D5S818의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 9는 실시예 9에서 FluorImager™ 형광 스캐너 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D14S118, D7S820, D13S317 및 D5S818의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 10는 실시예 10에서 FluorImager™ 형광 스캐너 (Molecular Dynamics, Sunnyvale,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D14S562, D7S820, D13S317 및 D5S818의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 11는 실시예 11에서 FluorImager™ 형광 스캐너 (Molecular Dynamics, Sunnyvale,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D14S548, D7S820, D13S317 및 D5S818의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 12는 실시예 12에서 FluorImager™ 형광 스캐너 (Molecular Dynamics, Sunnyvale,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D16S490, D7S820, D13S317 및 D5S818의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 13는 실시예 13에서 FluorImager™ 형광 스캐너 (Molecular Dynamics, Sunnyvale,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D16S753, D7S820, D13S317 및 D5S818의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 14는 실시예 14에서 FluorImager™ 형광 스캐너 (Molecular Dynamics, Sunnyvale,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D17S1299, D7S820, D13S317 및 D5S818의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 15는 실시예 15에서 FluorImager™ 형광 스캐너 (Molecular Dynamics, Sunnyvale,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D16S539, D7S820, D13S317 및 D5S818의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 16는 실시예 16에서 FluorImager™ 형광 스캐너 (Molecular Dynamics, Sunnyvale,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D22S683, D7S820, D13S317 및 D5S818의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 17는 실시예 17에서 FMBIO™ 형광 스캐너™ (Hitachi Software Engineering,San Bruno,CA)를 이용하여

검출한 바와 같이, 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO(" CSF1PO ") 및 HUMTPOX(" TPOX ")의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 18는 실시예 18에서 FMBIO™ 형광 스캐너™ (Hitachi Software Engineering,San Bruno,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO(" CSF1PO "), HUMTPOX(" TPOX ") 및 HUMTH01(" TH01 ")의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 19는 실시예 19에서 FMBIO™ 형광 스캐너™ (Hitachi Software Engineering,San Bruno,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO(" CSF1PO "), HUMTPOX(" TPOX "), HUMTH01(" TH01 ") 및 HUM$_V$WFA31(" $_V$WA ")의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 20는 실시예 20에서 FMBIO™ 형광 스캐너™ (Hitachi Software Engineering,San Bruno,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01(" F13A01 ") 및 HUMFESFPS(" FESFPS ")의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 21는 실시예 21에서 FMBIO™ 형광 스캐너™ (Hitachi Software Engineering,San Bruno,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01(" F13A01 "), HUMFESFPS(" FESFPS ") 및 HUMBFXIII(" F13B ")의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 22는 실시예 22에서 FMBIO™ 형광 스캐너™ (Hitachi Software Engineering,San Bruno,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01(" F13A01 "), HUMFESFPS(" FESFPS "), HUMBFXIII(" F13B ") 및 HUMLIPOL(" LPL ")의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 23는 실시예 23에서 FMBIO™ 형광 스캐너™ (Hitachi Software Engineering,San Bruno,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO(" CSF1PO "), HUMTPOX(" TPOX "), HUMTH01(" TH01 ") 및 HUM$_V$WFA31(" $_V$WA ")의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 24는 실시예 24에서 FluorImager™ 형광 스캐너 (Molecular Dynamics, Sunnyvale,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D3S1539, D19S253, D13S317 및 D20S481의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 25는 실시예 25에서 FluorImager™ 형광 스캐너 (Molecular Dynamics, Sunnyvale,CA)를 이용하여 검출한 바와 같이, 좌위 D10S1239, D9S930, D4S2368 및 D20S481의 공-증폭 생성물을 형광 검출한 것을 보여주는 레이저로 프린트한 영상이다.

도 26은 실시예 26에서 3개의 좌위 D16S539, D7S820 및 D13S317의 공-증폭 생성물을 실버 스테인으로 검출한 것을 보여주는 사진이다.

도 27은 실시예 27에서 4개의 좌위 D16S539, D7S820, D13S317 및 HUM$_V$WFA31(" $_V$WA ")의 공-증폭 생성물을 실버 스테인으로 검출한 것을 보여주는 사진이다.

도 28은 실시예 28에서 3개의 좌위 D10S1239, D9S930 및 D13S317의 공-증폭 생성물을 실버 스테인으로 검출한 것을 보여주는 사진이다.

도 29은 실시예 29에서 3개의 좌위 D10S1239, D9S930 및 D4S2368의 공-증폭 생성물을 실버 스테인으로 검출한 것을 보여주는 사진이다.

도 30은 실시예 30에서 4개의 좌위 D10S1239, D9S930, D4S2368 및 D20S481의 공-증폭 생성물을 실버 스테인으로 검출한 것을 보여주는 사진이다.

도 31은 실시예 31에서 3개의 좌위 D3S1539, D19S253 및 D13S317의 공-증폭 생성물을 실버 스테인으로 검출한 것을 보여주는 사진이다.

도 32은 실시예 32에서 4개의 좌위 D3S1539, D19S253, D4S2368 및 D20S481의 공-증폭 생성물을 실버 스테인으로 검출한 것을 보여주는 사진이다.

도 33은 실시예 33에서 4개의 좌위 D3S1539, D19S253, D13S317 및 D20S481의 공-증폭 생성물을 실버 스테인으로 검출한 것을 보여주는 사진이다.

도 34은 실시예 34에서 3개의 좌위 D10S1239, D9S930 및 D20S481의 공-증폭 생성물을 실버 스테인으로 검출한 것을 보여주는 사진이다.

도 35은 실시예 35에서 3개의 좌위 D10S1239, D4S2368 및 D20S481의 공-증폭 생성물을 실버 스테인으로 검출한 것을 보여주는 사진이다.

실시예

본 발명이 갖는 잇점들을 보여주고, 통상의 기술자들이 본 발명과 동일하게 생산하고 사용하는 것을 도와주기 위해, 아래에 실시예들을 기술하였다. 하지만, 이 실시예에 의해 결코 특허에 의해 부여되는 개시 또는 보호 범위가 한정되는 것은 아니다.

문헌에 개시된 바와 같이, 게놈 DNA 분리 및 정량화 반응은 반드시 수행하였다 [참조: Puers,C. 등

(1993) ″ Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTH01[AATG]$_n$ and reassignment of alleles in population analysis by using a locus-specific allelic ladder,″ Am.J.Hum.Genet. 53: 953-958]. 본 방법은 당해 기술분야의 숙련자들에게는 일반적으로 공지되어 있는 것이며, 본 출원 발명을 위해서는 바람직하지만, 반드시 요구되어지는 것은 아니다.

증폭반응의 생성물은 7M 요소를 함유하고[참조: Sambrook 등, (1989)], 실버 스테인 분석과 관련된 경우에는 유리 플레이트에 화학적으로 교차-결합된[참조: Kobayashi,Y. (1988) ″ A method to cast thin sequencing gels,″ BRL Focus 10:73-74], 두께 0.4㎜의 4% 변성화 폴리아크릴아미드 겔(아크릴아미드:비스-아크릴아미드 = 19:1)을 통한 전기 영동법으로 분리하였다. 이러한 교차-결합(cross-linking)은 형광 분석법과 관련된 경우에는 사용하지 않았다. DNA 표본을 부하 용액(10mM NaOH, 95% 포름아미드, 0.05% 브로모페놀 블루, 0.05% 크실렌 시아놀) 2.5㎕와 혼합한 후, 95℃ 에서 2분동안 변성화시키고나서, 부하시키기전에 얼음위에서 냉각시켰다.

폴리아크릴아미드 겔 전기영동법으로 분리시킨 후, 증폭 반응의 생성물 및 DNA 크기 마커 대조군을 실버 스테이닝, 형광 검출법, 방사성 검출법 또는 이러한 검출법들을 혼합하여 검출하였다. 몇몇 실시예에서는, 겔 내의 반응 생성물 및 크기 마커를 선행 기술에서 기재하고 있는 표준 염색법 및 검출법을 이용한 실버 스테이닝에 의해 검출하였다 [참조: 예를 들면, Bassam 등 (1991)]. 자동 프로세서 적합성 필름(APC Film,Promega Corporation,Cat.No.DQ4411)에 노출시켜, 염색된 겔의 영구적인 영상을 수득하였다. 다른 실시예에서는, 선행 기술에서 기재하고 있는 방법을 사용하여 형광 스캐닝으로 검출하였다 [참조: Schumm 등, (1994)].

하기의 각 실시예들은 본 발명의 방법의 사용에 관한 실시예이고, 몇몇 실시예에서는 하나 이상의 DNA 표본으로부터 3 이상의 짧은 반복 배열의 좌위에 존재하는 대립 형질을 동시에 측정하기 위해 본 발명의 프라이머를 하나 이상 사용한다. 표 1 및 2에서는 하기의 각 실시예에서 기술하고 있는 복합 증폭 반응에서 공-증폭되는 좌위 세트를 요약하였다. 또한, 이 두 개의 표에서는 어떤 프라이머 쌍이 각 복합 반응에서 각각의 좌위를 증폭시키는 데에 사용되었는가를 보여준다. 표 1에서는 여기에서 기술하고 있는 복합 반응에 의해 증폭된 대립 형질을 검출하는 데에 형광 스캐닝을 사용한 실시예 모두를 나열하고 있으며, 표 2에서는 실버 스테이닝을 사용한 실시예들을 나열하고 있다.

표 1에 나열되어 있는 각 프라이머 쌍중의 하나의 프라이머를 복합 증폭 반응에 사용하기 이전에 형광으로 표지한다. 하기의 실시예에서 사용되는 형광 스캐너로 스캐닝하는 몇몇 경우, 상이한 표지를 사용하여 상이한 좌위에 대한 프라이머를 표지화하기 위해, 상이한 프라이머를 사용하여 생성된 대립 형질을 상호간에 식별할 수 있다. 하기의 실시예에서는 2개의 상이한 형광 표지를 사용하였는 데, 표 1에서 ″ FL ″ 은 플루오레세인으로 표지된 것을 의미하고, ″ TMR″ 은 테트라메틸 로다민으로 표지된 것을 의미한다. 또한, 표 1에서는 각 실시예에서 복합 증폭 반응에 사용된 각 프라이머 쌍중의 어느 프라이머가 표지화되었는가를 보여준다 (예를 들면, ″ FL-2″ 는 복합 증폭 반응이전에 서열 2의 프라이머의 5' 말단을 플루오레세인으로 표지화한 것을 의미한다).

하기의 실시예에서, FL 및 TMR 약어는 동일하게 사용하고 있다. 그러나, 표지에 관한 약어는 증폭 반응에 사용된 표지된 프라이머의 서열번호 바로 앞에 위치한다(예를 들면, ″ FL-2″ 대신에 ″ FL-서열 2″).

하기의 4쌍의 실시예(실시예 2와 3, 4와 5, 7과 8 및 19와 23)에서는, 동일한 프라이머 세트 및 분석할 각 STR 좌위에 대한 각 프라이머 쌍중의 하나의 프라이머에 공유 결합된 동일한 형광 물질을 사용하여 동일한 좌위 세트를 분석하였다. 그러나, 하기의 각 실시예에서는 상이한 프라이머 세트를 표지화하였다. 이러한 실시예쌍들을 통해, 검출법으로서 형광 표지법을 사용하여 동일한 프라이머 세트의 배후방사량(background)은 동일하게 작은 값을 가지며, 대립 형질의 측정 결과도 동일하다는 것을 알 수 있는 데, 이는 본 발명의 방법의 복합 증폭 반응에 사용하기 이전에 프라이머 쌍중에 어느 프라이머를 표지화하였는가에는 상관없다.

[표 1]

실시예	증폭된 좌위	프라이머 쌍: 서열번호	사용된 형광 표지
1	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
2	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
3	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
4	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6

5	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
6	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
7	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
8	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
9	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
10	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
11	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6

12	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
13	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
14	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
15	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
16	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
17	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
	D16S539	29, 30	FL-30
	HUMCSF1	33, 34	TMR-33

18	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
	D16S539	29, 30	FL-30
	HUMCSF1	33, 34	TMR-33
	P0	35, 36	TMR-36
19	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
	D16S539	29, 30	FL-30
	HUMCSF1	33, 34	TMR-33
	P0	35, 36	TMR-36
20	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
	D16S539	29, 30	FL-30
	HUMF13A	41, 42	TMR-41

21	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
	D16S539	29, 30	FL-30
	HUMF13A	41, 42	TMR-41
	1	43, 44	TMR-43
22	D7S820	1, 2	FL-2
	D13S317	3, 4	FL-4
	D5S818	5, 6	FL-6
	D16S539	29, 30	FL-30
	HUMF13A	41, 42	TMR-41
	1	43, 44	TMR-43
23	D7S820	1, 2	TMR-2
	D13S317	3, 4	TMR-4
	D5S818	5, 6	TMR-6
24	D3S1539	7, 49	FL-49
	D19S253	50, 51	FL-50
	D13S317	3, 4	FL-4
25	D10S1239	15, 54	FL-15
	D9S930	55, 14	FL-14
	D4S2368	56, 57	FL-57

표 1 및 2에서 몇몇 경우에, 동일한 좌위 세트 및 동일한 프라이머 쌍 세트가 보인다는 것에 주목하기를 바란다. 이러한 경우에는, 동일한 대립 형질 세트를 각각 형광 검출법 및 실버 스테이닝을 사용하여 분석한 것이다. 이러한 경우로는 실시예 24와 33 및 실시예 25와 30의 2가지가 있다. 이러한 실시예를 통해, 둘중의 어떤 방법을 사용하여도 동일한 결과를 얻을 수 있다는 것을 분명히 알 수 있다.

[표 2]

실시예	증폭된 좌위	프라이머쌍: 서열번호
26	D16S539 D7S820	29, 58 1, 2
27	D16S539 D7S820 D13S317	29, 30 1, 2 3, 4
28	D10S1239 D9S930	15, 54 55, 61
29	D10S1239 D9S930	15, 54 55, 61
30	D10S1239 D9S930 D4S2368	15, 54 55, 14 56, 57
31	D3S1539 D19S253	7, 49 50, 51
32	D3S1539 D19S253 D4S2368	7, 49 50, 51 56, 57
33	D3S1539 D19S253 D13S317	7, 49 50, 51 3, 4
34	D10S1239 D9S930	15, 54 55, 14
35	D10S1239 D4S2368	15, 54 56, 57

실시예 1

좌위 D3S1539, D7S820, D13S317 및 D5S818의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D3S1539, D7S820, D13S317 및 D5S818에서 DNA 모형(template)을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.04 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]를 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D3S1539 프라이머 1(서열 7) 및 2(FL-서열 8) 각각 0.25μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(FL-서열 2) 각각 0.325μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.219μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(FL-서열 6) 각각 0.375μM을 포함한, 8개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 45분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FluorImager™ 형광 스캐너(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 1을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D3S1539, D7S820, D13S317 및 D5S818을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 2

좌위 D17S1298, D7S820, D13S317 및 D5S818의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D17S1298, D7S820, D13S317 및 D5S818에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.04 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1

분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D17S1298 프라이머 1(서열 9) 및 2(FL-서열 10) 각각 0.25μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(FL-서열 2) 각각 0.325μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.219μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(FL-서열 6) 각각 0.375μM을 포함한, 8개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 45분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FluorImager™ 형광 스캐너(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 2를 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D17S1298, D7S820, D13S317 및 D5S818을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 3

좌위 D17S1298, D7S820, D13S317 및 D5S818의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

서열 9를 FL-서열 9로 대체하고, FL-서열 10을 서열 10으로 대체하는 것을 제외하고는, 실시예 2에서 기술한 바와 동일하게 좌위 D17S1298, D7S820, D13S317 및 D5S818를 증폭시킨다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 45분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FluorImager™ 형광 스캐너(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 3을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D17S1298, D7S820, D13S317 및 D5S818을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 4

좌위 D20S481, D7S820, D13S317 및 D5S818의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D20S481, D7S820, D13S317 및 D5S818에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.04 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D20S481 프라이머 1(서열 11) 및 2(FL-서열 12) 각각 0.25μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(FL-서열 2) 각각 0.325μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.219μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(FL-서열 6) 각각 0.375μM을 포함한, 8개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 45분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FluorImager™ 형광 스캐너(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 4를 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D20S481, D7S820, D13S317 및 D5S818을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 5

좌위 D20S481, D7S820, D13S317 및 D5S818의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

서열 11을 FL-서열 11로 대체하고, FL-서열 12를 서열 12로 대체하는 것을 제외하고는, 실시예 4에서 기술한 바와 동일하게 좌위 D20S481, D7S820, D13S317 및 D5S818를 증폭시킨다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 45분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FluorImager™ 형광 스캐너(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 5를 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D20S481, D7S820, D13S317 및 D5S818을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 6

좌위 D9S930, D7S820, D13S317 및 D5S818의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D9S930, D7S820, D13S317 및 D5S818에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.04 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D9S930 프라이머 1(서열 13) 및 2(FL-서열 14) 각각 0.70μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(FL-서열 2) 각각 0.325μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.22μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(FL-서열 6) 각각 0.375μM을 포함한, 8개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 45분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FluorImager™ 형광 스캐너(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 6을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D9S930, D7S820, D13S317 및 D5S818을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 7

좌위 D10S1239, D7S820, D13S317 및 D5S818의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D10S1239, D7S820, D13S317 및 D5S818에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.04 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D10S1239 프라이머 1(서열 15) 및 2(FL-서열 16) 각각 0.75μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(FL-서열 2) 각각 0.325μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.22μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(FL-서열 6) 각각 0.375μM을 포함한, 8개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 45분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FluorImager™ 형광 스캐너(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 7을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D10S1239, D7S820, D13S317 및 D5S818을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 8

좌위 D10S1239, D7S820, D13S317 및 D5S818의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

서열 15를 FL-서열 15로 대체하고, FL-서열 16을 서열 16으로 대체하는 것을 제외하고는, 실시예 4에서 기술한 바와 동일하게 좌위 D10S1239, D7S820, D13S317 및 D5S818을 증폭시킨다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 45분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FluorImager™ 형광 스캐너(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 8을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D10S1239, D7S820, D13S317 및 D5S818를 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 9

좌위 D14S118, D7S820, D13S317 및 D5S818의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D14S118, D7S820, D13S317 및 D5S818에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.04 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D14S118 프라이머 1(서열 17) 및 2(FL-서열 18) 각각 0.50μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(FL-서열 2) 각각 0.325μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.22μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(FL-서열 6) 각각 0.375μM을 포함한, 8개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 45분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FluorImager™ 형광 스캐너(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 9를 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D14S118, D7S820, D13S317 및 D5S818을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 10

좌위 D14S562, D7S820, D13S317 및 D5S818의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D14S562, D7S820, D13S317 및 D5S818에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.04 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1

분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D14S562 프라이머 1(FL-서열 19) 및 2(서열 20) 각각 0.50μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(FL-서열 2) 각각 0.325μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.22μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(FL-서열 6) 각각 0.375μM을 포함한, 8개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 45분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FluorImager™ 형광 스캐너(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 10을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D14S562, D7S820, D13S317 및 D5S818을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 11

좌위 D14S548, D7S820, D13S317 및 D5S818의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D14S548, D7S820, D13S317 및 D5S818에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.04 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D14S548 프라이머 1(서열 21) 및 2(FL-서열 22) 각각 0.50μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(FL-서열 2) 각각 0.325μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.22μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(FL-서열 6) 각각 0.375μM을 포함한, 8개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 45분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FluorImager™ 형광 스캐너(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 11을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D14S548, D7S820, D13S317 및 D5S818을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 12

좌위 D16S490, D7S820, D13S317 및 D5S818의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D16S490, D7S820, D13S317 및 D5S818에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.04 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D16S490 프라이머 1(FL-서열 23) 및 2(서열 24) 각각 0.50μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(FL-서열 2) 각각 0.325μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.22μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(FL-서열 6) 각각 0.375μM을 포함한, 8개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 45분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FluorImager™ 형광 스캐너(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 12를 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D16S490, D7S820, D13S317 및 D5S818을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 13

좌위 D16S753, D7S820, D13S317 및 D5S818의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D16S753, D7S820, D13S317 및 D5S818에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.04 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D16S753 프라이머 1(서열 25) 및 2(FL-서열 26) 각각 0.50μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(FL-서열 2) 각각 0.325μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.22μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(FL-서열 6) 각각 0.375μM을 포함한, 8개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 45분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FluorImager™ 형광 스캐너(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)를 이용한 형광

신호 검출법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 13을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D16S753, D7S820, D13S317 및 D5S818을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 14

좌위 D17S1299, D7S820, D13S317 및 D5S818의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D17S1299, D7S820, D13S317 및 D5S818에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.04 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D17S1299 프라이머 1(서열 27) 및 2(FL-서열 28) 각각 0.50μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(FL-서열 2) 각각 0.325μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.22μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(FL-서열 6) 각각 0.375μM을 포함한, 8개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 45분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FluorImager™ 형광 스캐너(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 14를 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D17S1299, D7S820, D13S317 및 D5S818을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 15

좌위 D16S539, D7S820, D13S317 및 D5S818의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D16S539, D7S820, D13S317 및 D5S818에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.04 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D16S539 프라이머 1(서열 29) 및 2(FL-서열 30) 각각 0.60μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(FL-서열 2) 각각 0.325μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.22μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(FL-서열 6) 각각 0.50μM을 포함한, 8개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 50분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FluorImager™ 형광 스캐너(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 15를 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D16S539, D7S820, D13S317 및 D5S818을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 16

좌위 D22S683, D7S820, D13S317 및 D5S818의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D22S683, D7S820, D13S317 및 D5S818에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.04 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D22S683 프라이머 1(서열 31) 및 2(FL-서열 32) 각각 0.50μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(FL-서열 2) 각각 0.325μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.22μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(FL-서열 6) 각각 0.50μM을 포함한, 8개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 55분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FluorImager™ 형광 스캐너(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 16을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D22S683, D7S820, D13S317 및 D5S818을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 17

좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO 및 HUMTPOX의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO 및

HUMTPOX에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕ 내에서 모형(template) 5ng 과 0.06 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D16S539 프라이머 1(서열 29) 및 2(FL-서열 30) 각각 0.65μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(FL-서열 2) 각각 0.325μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.22μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(FL-서열 6) 각각 0.55μM, HUMCSF1PO 프라이머 1(TMR-서열 33) 및 2(서열 34) 각각 0.40μM, HUMTPOX 프라이머 1(서열 35) 및 2(TMR-서열 36) 각각 0.40μM을 포함한, 12개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 50분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FMBIOFluorImager™ (Hitachi Software Engineering,San Bruno,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각각 플루오레세인(fluorescein)으로 표지된 물질 및 테트라메틸-로다민으로 표지된 물질을 나타내는 동일한 겔의 505nm 및 625nm의 개별적인 스캔에서의 각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 17을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 4에서는 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO(″CSF1PO″) 및 HUMTPOX(″TPOX″)를 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 18

좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX 및 HUMTH01의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX 및 HUMTH01에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.07 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D16S539 프라이머 1(서열 29) 및 2(FL-서열 30) 각각 0.75μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(FL-서열 2) 각각 0.40μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.30μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(FL-서열 6) 각각 0.60μM, HUMCSF1PO 프라이머 1(TMR-서열 33) 및 2(서열 34) 각각 0.30μM, HUMTPOX 프라이머 1(서열 35) 및 2(TMR-서열 35) 각각 0.40μM, HUMTH01 프라이머 1(서열 37) 및 2(TMR-서열 38) 각각 0.40μM을 포함한, 14개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 50분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FMBIOFluorImager™ (Hitachi Software Engineering,San Bruno,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각각 플루오레세인으로 표지된 물질 및 테트라메틸-로다민으로 표지된 물질을 나타내는 동일한 겔의 505nm 및 625nm의 개별적인 스캔에서의 각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 18을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO(″CSF1PO″), HUMTPOX(″TPOX″) 및 HUMTH01(″TH01″)을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 19

좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01 및 HUM_VWFA31의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01 및 HUM_VWFA31에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.08 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D16S539 프라이머 1(서열 29) 및 2(FL-서열 30) 각각 0.75μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(FL-서열 2) 각각 0.40μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.30μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(FL-서열 6) 각각 0.60μM, HUMCSF1PO 프라이머 1(TMR-서열 33) 및 2(서열 34) 각각 0.30μM, HUMTPOX 프라이머 1(서열 35) 및 2(TMR-서열 36) 각각 0.40μM, HUMTH01 프라이머 1(서열 37) 및 2(TMR-서열 38) 각각 0.40μM, HUM_VWFA31 프라이머 1(서열 39) 및 2(TMR-서열 40) 각각 0.40μM을 포함한, 16개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 50분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FMBIOFluorImager™ (Hitachi Software Engineering,San Bruno,CA)를 이용한

형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각각 플루오레세인으로 표지된 물질 및 테트라메틸-로다민으로 표지된 물질을 나타내는 동일한 겔의 505nm 및 625nm의 개별적인 스캔에서의 각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 19를 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO(" CSF1PO"), HUMTPOX(" TPOX"), HUMTH01(" TH01") 및 HUMγWFA31(" γWA")을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 20

좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01 및 HUMFESFPS의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01 및 HUMFESFPS에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕ 내에서 모형(template) 5ng 과 0.06 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D16S539 프라이머 1(서열 29) 및 2(FL-서열 30) 각각 0.75μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(FL-서열 2) 각각 0.40μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.30μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(FL-서열 6) 각각 0.60μM, HUMF13A01 프라이머 1(TMR-서열 41) 및 2(서열 42) 각각 0.10μM, HUMFESFPS 프라이머 1(TMR-서열 43) 및 2(서열 44) 각각 1.0μM을 포함한, 12개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 50분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FMBIOFluorImager™ (Hitachi Software Engineering,San Bruno,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각각 플루오레세인으로 표지된 물질 및 테트라메틸-로다민으로 표지된 물질을 나타내는 동일한 겔의 505nm 및 625nm의 개별적인 스캔에서의 각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 20을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01(" F13A01") 및 HUMFESFPS(" FESFPS")를 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 21

좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS 및 HUMBFXIII의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS 및 HUMBFXIII에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.07 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D16S539 프라이머 1(서열 29) 및 2(FL-서열 30) 각각 0.75μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(FL-서열 2) 각각 0.40μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.30μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(FL-서열 6) 각각 0.60μM, HUMF13A01 프라이머 1(TMR-서열 41) 및 2(서열 42) 각각 0.10μM, HUMFESFPS 프라이머 1(TMR-서열 43) 및 2(서열 44) 각각 1.0μM, HUMBFXIII 프라이머 1(TMR-서열 45) 및 2(서열 46) 각각 0.50μM을 포함한, 14개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 50분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FMBIOFluorImager™ (Hitachi Software Engineering,San Bruno,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각각 플루오레세인으로 표지된 물질 및 테트라메틸-로다민으로 표지된 물질을 나타내는 동일한 겔의 505nm 및 625nm의 개별적인 스캔에서의 각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 21을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01(" F13A01"), HUMFESFPS(" FESFPS") 및 HUMBFXIII(" F13B")를 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 22

좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS, HUMBFXIII 및 HUMLIPOL의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS, HUMBFXIII 및 HUMLIPOL에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.08 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에

서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D16S539 프라이머 1(서열 29) 및 2(FL-서열 30) 각각 0.75μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(FL-서열 2) 각각 0.40μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.30μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(FL-서열 6) 각각 0.60μM, HUMF13A01 프라이머 1(TMR-서열 41) 및 2(서열 42) 각각 0.10μM, HUMFESFPS 프라이머 1(TMR-서열 43) 및 2(서열 44) 각각 1.0μM, HUMBFXIII 프라이머 1(TMR-서열 45) 및 2(서열 46) 각각 0.50μM, HUMLIPOL 프라이머 1(TMR-서열 47) 및 2(서열 48) 각각 0.20μM을 포함한, 16개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 50분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FMBIOFluorImager™ (Hitachi Software Engineering,San Bruno,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각각 플루오레세인으로 표지된 물질 및 테트라메틸-로다민으로 표지된 물질을 나타내는 동일한 겔의 505nm 및 625nm의 개별적인 스캔에서의 각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 22을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01(" F13A01"), HUMFESFPS(" FESFPS "), HUMBFXIII(" F13B") 및 HUMLIPOL(" LPL")를 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 23

좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01 및 HUM_{V}WFA31의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01 및 HUM_{V}WFA31에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.08 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D16S539 프라이머 1(서열 29) 및 2(TMR-서열 30) 각각 0.75μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(TMR-서열 2) 각각 0.40μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(TMR-서열 4) 각각 0.30μM, D5S818 프라이머 1(서열 5) 및 2(TMR-서열 6) 각각 0.60μM, HUMCSF1PO 프라이머 1(FL-서열 33) 및 2(서열 34) 각각 0.40μM, HUMTPOX 프라이머 1(서열 35) 및 2(FL-서열 36) 각각 0.50μM, HUMTH01 프라이머 1(서열 37) 및 2(FL-서열 38) 각각 0.20μM, HUM_{V}WFA31 프라이머 1(서열 39) 및 2(FL-서열 40) 각각 0.55μM을 포함한, 16개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 50분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FMBIOFluorImager™ (Hitachi Software Engineering,San Bruno,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각각 플루오레세인으로 표지된 물질 및 테트라메틸-로다민으로 표지된 물질을 나타내는 동일한 겔의 505nm 및 625nm의 개별적인 스캔에서의 각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 23을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 3에서는 좌위 D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO(" CSF1PO"), HUMTPOX(" TPOX"), HUMTH01(" TH01") 및 HUM_{V}WFA31(" $_{V}$WA")를 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 24

좌위 D3S1539, D19S253, D13S317 및 D20S481의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D3S1539, D19S253, D13S317 및 D20S481에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.04 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D3S1539 프라이머 1(서열 7) 및 2(FL-서열 49) 각각 0.75μM, D19S253 프라이머 1(FL-서열 50) 및 2(서열 51) 각각 0.75μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(FL-서열 4) 각각 0.50μM, D20S481 프라이머 1(서열 52) 및 2(FL-서열 53) 각각 0.50μM을 포함한, 8개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 50분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FluorImager™ 형광 스캐너(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 24를 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D3S1539, D19S253, D13S317 및 D20S481을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 25

좌위 D10S1239, D9S930, D4S2368 및 D20S481의 복합 증폭에 대한 형광 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D10S1239, D9S930, D4S2368 및 D20S481에서 DNA 모

형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.04 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D10S1239 프라이머 1(FL-서열 15) 및 2(서열 54) 각각 0.30μM, D9S930 프라이머 1(서열 55) 및 2(FL-서열 14) 각각 0.40μM, D4S2368 프라이머 1(서열 56) 및 2(FL-서열 57) 각각 0.50μM, D20S481 프라이머 1(서열 52) 및 2(FL-서열 53) 각각 0.50μM을 포함한, 8개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 50분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 FluorImager™ 형광 스캐너(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)를 이용한 형광 신호 검출법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 25를 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D10S1239, D9S930, D4S2368 및 D20S481을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 26

좌위 D16S539, D7S820 및 D13S317의 복합 증폭에 대한 실버(silver) 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D16S539, D7S820 및 D13S317에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5 내지 25ng 과 0.03 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D16S539 프라이머 1(서열 29) 및 2(서열 58) 각각 0.5μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(서열 2) 각각 0.5μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(서열 4) 각각 0.5μM을 포함한, 6개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 50분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 Bassam 등(1991)의 프로토콜에 따른 실버 스테인 분석법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 26을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 4에서는 좌위 D16S539, D7S820 및 D13S317을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있으며, 레인 5에서는 동일한 공정을 거치는 DNA 모형이 없는 표본(즉, 네가티브 컨트롤)을 보여준다.

실시예 27

좌위 D16S539, D7S820, D13S317 및 HUM_VWFA31의 복합 증폭에 대한 실버 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D16S539, D7S820, D13S317 및 HUM_VWFA31에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 모형(template) 5ng 과 0.04 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D16S539 프라이머 1(서열 29) 및 2(서열 30) 각각 0.3μM, D7S820 프라이머 1(서열 1) 및 2(서열 2) 각각 0.3μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(서열 4) 각각 0.5μM, HUM_VWFA31 프라이머 1(서열 59) 및 2(서열 60) 각각 0.5μM을 포함한, 8개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 32㎝의 겔상에서 50분간 40W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 Bassam 등(1991)의 프로토콜에 따른 실버 스테인 분석법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 27을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 3에서는 좌위 D16S539, D7S820, D13S317 및 HUM_VWFA31(" $_V$WA")을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 28

좌위 D10S1239, D9S930 및 D13S317의 복합 증폭에 대한 실버 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D10S1239, D9S930 및 D13S317에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 정해지지 않은 양의 모형(template)과 0.03 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클을 수행한다.

D10S1239 프라이머 1(서열 15) 및 2(서열 54) 각각 1.0μM, D9S930 프라이머 1(서열 55) 및 2(서열 61) 각각 0.3μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(서열 4) 각각 0.5μM을 포함한, 6개의 증폭 프라이머를

조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 40㎝의 겔상에서 60분간 60W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 Bassam 등(1991)의 프로토콜에 따른 실버 스테인 분석법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 28을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 3에서는 좌위 D10S1239, D9S930 및 D13S317을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 29

좌위 D10S1239, D9S930 및 D4S2368의 복합 증폭에 대한 실버 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D10S1239, D9S930 및 D4S2368에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 정해지지 않은 양의 모형(template)과 0.03 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D10S1239 프라이머 1(서열 15) 및 2(서열 54) 각각 1.0μM, D9S930 프라이머 1(서열 55) 및 2(서열 61) 각각 0.3μM, D4S2368 프라이머 1(서열 56) 및 2(서열 57) 각각 0.15μM을 포함한, 6개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 40㎝의 겔상에서 60분간 60W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 Bassam 등(1991)의 프로토콜에 따른 실버 스테인 분석법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 29를 참조하길 바란다. 레인 1 내지 6에서는 좌위 D10S1239, D9S930 및 D4S2368을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 30

좌위 D10S1239, D9S930, D4S2368 및 D20S481의 복합 증폭에 대한 실버 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D10S1239, D9S930, D4S2368 및 D20S481에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 정해지지 않은 양의 모형(template)과 0.04 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클; 그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D10S1239 프라이머 1(서열 15) 및 2(서열 54) 각각 1.0μM, D9S930 프라이머 1(서열 55) 및 2(서열 14) 각각 4.0μM, D4S2368 프라이머 1(서열 56) 및 2(서열 57) 각각 0.2μM, D20S481 프라이머 1(서열 52) 및 2(서열 53) 각각 0.2μM을 포함한, 8개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 40㎝의 겔상에서 67분간 60W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 Bassam 등(1991)의 프로토콜에 따른 실버 스테인 분석법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 30을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 4에서는 좌위 D10S1239, D9S930, D4S2368 및 D20S481을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있다.

실시예 31

좌위 D3S1539, D19S253 및 D13S317의 복합 증폭에 대한 실버 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D3S1539, D19S253 및 D13S317에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 5.0ng의 모형(template)과 0.03 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클을 수행한다.

D3S1539 프라이머 1(서열 7) 및 2(서열 49) 각각 1.0μM, D19S253 프라이머 1(서열 50) 및 2(서열 51) 각각 1.0μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(서열 4) 각각 0.5μM을 포함한, 6개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 40㎝의 겔상에서 65분간 60W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 Bassam 등(1991)의 프로토콜에 따른 실버 스테인 분석법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 31을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 4에서는 좌위 D3S1539, D19S253 및 D13S317을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있고, 레인 5에서는 동일한 공정을 거치는 DNA 모형이 없는 표본(즉, 네가티브 컨트롤)을 보여준다.

실시예 32

좌위 D3S1539, D19S253, D4S2368 및 D20S481의 복합 증폭에 대한 실버 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D3S1539, D19S253, D4S2368 및 D20S481에서 DNA 모

형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 5ng의 모형(template)과 0.04 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클을 수행한다.

D3S1539 프라이머 1(서열 7) 및 2(서열 49) 각각 1.0μM, D19S253 프라이머 1(서열 50) 및 2(서열 51) 각각 0.5μM, D4S2368 프라이머 1(서열 56) 및 2(서열 57) 각각 0.1μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(서열 4) 각각 0.1μM을 포함한, 8개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 40㎝의 겔상에서 65분간 60W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 Bassam 등(1991)의 프로토콜에 따른 실버 스테인 분석법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 32을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 4에서는 좌위 D3S1539, D19S253, D4S2368 및 D20S481을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있고, 레인 5에서는 동일한 공정을 거치는 DNA 모형이 없는 표본(즉, 네가티브 컨트롤)을 보여준다.

실시예 33

좌위 D3S1539, D19S253, D13S317 및 D20S481의 복합 증폭에 대한 실버 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D3S1539, D19S253, D13S317 및 D20S481에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 0.5 내지 250ng의 모형(template)과 0.04 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클;그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D3S1539 프라이머 1(서열 7) 및 2(서열 49) 각각 0.5μM, D19S253 프라이머 1(서열 50) 및 2(서열 51) 각각 0.5μM, D13S317 프라이머 1(서열 3) 및 2(서열 4) 각각 0.5μM, D20S481 프라이머 1(서열 52) 및 2(서열 53) 각각 0.2μM을 포함한, 8개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 40㎝의 겔상에서 68분간 60W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 Bassam 등(1991)의 프로토콜에 따른 실버 스테인 분석법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 33을 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D3S1539, D19S253, D13S317 및 D20S481을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있고, 레인 6에서는 동일한 공정을 거치는 DNA 모형이 없는 표본(즉, 네가티브 컨트롤)을 보여준다.

실시예 34

좌위 D10S1239, D9S930 및 D20S481의 복합 증폭에 대한 실버 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D10S1239, D9S930 및 D20S481에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 0.5 내지 250ng의 모형(template)과 0.03 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클;그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D10S1239 프라이머 1(서열 15) 및 2(서열 54) 각각 1.0μM, D9S930 프라이머 1(서열 55) 및 2(서열 14) 각각 4.0μM, D20S481 프라이머 1(서열 52) 및 2(서열 53) 각각 0.2μM을 포함한, 6개의 증폭 프라이머를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 40㎝의 겔상에서 68분간 60W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 Bassam 등(1991)의 프로토콜에 따른 실버 스테인 분석법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 34를 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D10S1239, D9S930 및 D20S481을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있고, 레인 6에서는 동일한 공정을 거치는 DNA 모형이 없는 표본(즉, 네가티브 컨트롤)을 보여준다.

실시예 35

좌위 D10S1239, D4S2368 및 D20S481의 복합 증폭에 대한 실버 검출법

본 실시예에서는, 단일 반응 용기내에서 각각의 좌위 D10S1239, D4S2368 및 D20S481에서 DNA 모형을 동시에 증폭시킨다. PCR 증폭 반응은 1×STR 완충액[50mM KCl, 10mM Tris-HCl(25℃에서 pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 과 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 200μM] 25㎕내에서 0.5 내지 250ng의 모형(template)과 0.03 U Taq DNA Polymerase/㎕를 사용하여 수행한다. 하기의 증폭 반응의 프로토콜을 이용하여 열 순환기(Thermal Cycler) 480 [Perkin Elmer,Foster City,CA]을 사용한다: 96℃에서 2분동안; 그리고나서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 및 70℃에서 1.5분으로 10 사이클; 그리고나서 90℃에서 1분, 60℃에서 1분, 70℃에서 1.5분으로 20 사이클;그리고나서 60℃에서 30분간 1 사이클을 수행한다.

D10S1239 프라이머 1(서열 15) 및 2(서열 54) 각각 1.0μM, D4S2368 프라이머 1(서열 56) 및 2(서열 57) 각각 0.2μM, D20S481 프라이머 1(서열 52) 및 2(서열 53) 각각 0.2μM을 포함한, 6개의 증폭 프라이머

를 조합하여 사용한다.

증폭 반응의 생성물을 40㎝의 겔상에서 68분간 60W에서 변성화 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법을 사용하여 분리한 후, 이 생성물을 Bassam 등(1991)의 프로토콜에 따른 실버 스테인 분석법으로 시각화시킨다.

각 좌위의 증폭된 단편을 보여주는 도 35를 참조하길 바란다. 레인 1 내지 5에서는 좌위 D10S1239, D4S2368 및 D20S481을 위해 동시에 공-증폭시킨 DNA 표본을 함유하고 있고, 레인 6에서는 동일한 공정을 거치는 DNA 모형이 없는 표본(즉, 네가티브 컨트롤)을 보여준다.

서열 목록

(1) 일반적 정보

(i) 출원인: 슘 제임스 더블유.

(ii) 발명의 명칭: 짧은 반복 배열 좌위의 복합 증폭 방법

(iii) 서열수: 61

(iv) 연락 주소:

(A) 수신인: 프로메가 코포레이션

(B) 거리: 우즈 할로우 로드 2800

(C) 시: 메디슨

(D) 주: 위스콘신

(E) 국가: 미국

(F) 우편번호: 53711-5399

(v) 컴퓨터 판독형:

(A) 매체 유형: 디스켓-3.5 인치, 1.44Mb

(B) 컴퓨터: IBM PC 호환기종

(C) 운영 체계: DOS, version 6.0

(D) 소프트웨어: WordPerfect 5.1 (DOS 텍스트 포멧)

(vi) 현재의 출원 정보:

(A) 출원 번호: 08/632,575

(B) 출원일: 1996년 4월 15일

(C) 분류: 435

(vii) 선행 출원 정보:

(A) 출원 번호: 08/316,544

(B) 출원일: 1994년 9월 30일

(2) 서열 1에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: 인간의 게놈 DNA

(iii) 가정: 무

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D7S820

(xi) 서열 기술:

서열 1

GAACACTTGT CATAGTTTAG AACG 24

(2) 서열 2에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 23

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D7S820

(xi) 서열 기술:

서열 2

CTGAGGTATC AAAAACTCAG AGG 23

(2) 서열 3에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 20

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D13S317

(xi) 서열 기술:

서열 3

ACAGAAGTCT GGGATGTGGA 20

(2) 서열 4에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 20

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D13S317

(xi) 서열 기술:

서열 4

GCCCAAAAAG ACAGACAGAA 20

(2) 서열 5에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 20

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D5S818

(xi) 서열 기술:

서열 5

GGGTGATTTT CCTCTTTGGT 20

(2) 서열 6에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 20

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D5S818

(xi) 서열 기술:

서열 6

TGATTCCAAT CATAGCCACA 20

(2) 서열 7에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 26

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D3S1539

(xi) 서열 기술:

서열 7

TCTCTTTCCA TTACTCTCTC CATAGC 26

(2) 서열 8에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 22

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D3S1539

(xi) 서열 기술:

서열 8

AGTGCTGTTT TAGCTTCCAG GA 22

(2) 서열 9에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D17S1298

(xi) 서열 기술:

서열 9

GTAGGTCTTT TGGTTGCCAG TATG 24

(2) 서열 10에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D17S1298

(xi) 서열 기술:

서열 10

TGTCAGTAAA CCTGTGACCT GAGT 24

(2) 서열 11에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 26

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D20S481

(xi) 서열 기술:

서열 11

AATGGTGAGA AATGGGTTAT GAGTGC 26

(2) 서열 12에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 25

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D20S481

(xi) 서열 기술:

서열 12

TTTCCGGCTT TGTGTCATAA AACAG 25

(2) 서열 13에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 20

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D9S930

(xi) 서열 기술:

서열 13

TGGACAACAG AGTGAGATGC 20

(2) 서열 14에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 23

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D9S930

(xi) 서열 기술:

서열 14

GCTATGGGAA TTACAAGCAG GAA 23

(2) 서열 15에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 26

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D10S1239

(xi) 서열 기술:

서열 15

CTTTGAAATG GACCCCTAGC TAATGT 26

(2) 서열 16에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 21

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D10S1239

(xi) 서열 기술:

서열 16

CACCCTGTCC CCAGCTATCT G 21

(2) 서열 17에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 19

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D14S118

(xi) 서열 기술:

서열 17

CAGCTTGGGC AACATAGGG 19

(2) 서열 18에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D14S118

(xi) 서열 기술:

서열 18

CAAACTCCTG AGGTCAAACA ATCC 24

(2) 서열 19에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 21

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D14S562

(xi) 서열 기술:

서열 19

CTTGGAGGGT GGGGTGGCTA A 21

(2) 서열 20에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D14S562

(xi) 서열 기술:

서열 20

CGAAATTTTG TTGCCTTGCT CTGG 24

(2) 서열 21에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 21

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D14S548

(xi) 서열 기술:

서열 21

CCTGGGCAAC AGAGTGAGAC T 21

(2) 서열 22에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D14S548

(xi) 서열 기술:

서열 22

ACCCAGCTTT AACAGTTTGT GCTT 24

(2) 서열 23에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 23

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D16S490

(xi) 서열 기술:

서열 23

GGGCGGACAC AGAATGTAAA ATC 23

(2) 서열 24에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D16S490

(xi) 서열 기술:

서열 24

AAACCCAAAT AGATGACAGG CACA 24

(2) 서열 25에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D16S753

(xi) 서열 기술:

서열 25

GCACTCCAGG CTGAATGACA GAAC 24

(2) 서열 26에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D16S753

(xi) 서열 기술:

서열 26

GCAGTGCCGC CTATTTTTGT GAAT 24

(2) 서열 27에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D17S1299

(xi) 서열 기술:

서열 27

ACCCTGATGA GATAGCACTT GAGC 24

(2) 서열 28에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D17S1299

(xi) 서열 기술:

서열 28

CACTGTGTGG AGGTGTAGCA GAGA 24

(2) 서열 29에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D16S539

(xi) 서열 기술:

서열 29

GGGGGTCTAA GAGCTTGTAA AAAG 24

(2) 서열 30에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 26

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D16S539

(xi) 서열 기술:

서열 30

TGTGCATCTG TAAGCATGTA TCTATC 26

(2) 서열 31에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 23

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D22S683

(xi) 서열 기술:

서열 31

CGAAGGTTGC ATTGAGCCAA GAT 23

(2) 서열 32에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D22S683

(xi) 서열 기술:

서열 32

TGGTGGAAAT GCCTCATGTA GAAA 24

(2) 서열 33에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: HUMCSF1PO

(xi) 서열 기술:

서열 33

AACCTGAGTC TGCCAAGGAC TAGC 24

(2) 서열 34에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: HUMCSF1PO

(xi) 서열 기술:

서열 34

TTCCACACAC CACTGGCCAT CTTC 24

(2) 서열 35에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: HUMTPOX

(xi) 서열 기술:

서열 35

ACTGGCACAG AACAGGCACT TAGG 24

(2) 서열 36에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: HUMTPOX

(xi) 서열 기술:

서열 36

GGAGGAACTG GGAACCACAC AGGT 24

(2) 서열 37에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: HUMTH01

(xi) 서열 기술:

서열 37

ATTCAAAGGG TATCTGGGCT CTGG 24

(2) 서열 38에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: HUMTH01

(xi) 서열 기술:

서열 38

GTGGGCTGAA AAGCTCCCGA TTAT 24

(2) 서열 39에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 29

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: HUMvWFA31

(xi) 서열 기술:

서열 39

GAAAGCCCTA GTGGATGATA AGAATAATC 29

(2) 서열 40에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 30

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: HUMvWFA31

(xi) 서열 기술:

서열 40

GGACAGATGA TAAATACATA GGATGGATGG 30

(2) 서열 41에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: HUMF13A01

(xi) 서열 기술:

서열 41

GAGGTTGCAC TCCAGCCTTT GCAA 24

(2) 서열 42에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: HUMF13A01

(xi) 서열 기술:

서열 42

TTCCTGAATC ATCCCAGAGC CACA 24

(2) 서열 43에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 23

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: HUMFESFPS

(xi) 서열 기술:

서열 43

GCTGTTAATT CATGTAGGGA AGG 23

(2) 서열 44에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: HUMFESFPS

(xi) 서열 기술:

서열 44

GTAGTCCCAG CTACTTGGCT ACTC 24

(2) 서열 45에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 20

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: HUMBFXIII

(xi) 서열 기술:

서열 45

TGAGGTGGTG TACTACCATA 20

(2) 서열 46에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 20

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: HUMBFXIII

(xi) 서열 기술:

서열 46

GATCATGCCA TTGCACTCTA 20

(2) 서열 47에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: HUMLIPOL

(xi) 서열 기술:

서열 47

CTGACCAAGG ATAGTGGGAT ATAG 24

(2) 서열 48에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 23

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: HUMLIPOL

(xi) 서열 기술:

서열 48

GGTAACTGAG CGAGACTGTG TCT 23

(2) 서열 49에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 18

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D3S1539

(xi) 서열 기술:

서열 49

CCACCCTTTC AGCACCAG 18

(2) 서열 50에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 20

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D19S253

(xi) 서열 기술:

서열 50

ATAGACAGAC AGACGGACTG 20

(2) 서열 51에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 19

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D19S253

(xi) 서열 기술:

서열 51

GGGAGTGGAG ATTACCCCT 19

(2) 서열 52에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 21

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D20S481

(xi) 서열 기술:

서열 52

AAAGCTCTCT GAAGCAGGTG T 21

(2) 서열 53에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D20S481

(xi) 서열 기술:

서열 53

CAGATTGCAC TAGAAAGAGA GGAA 24

(2) 서열 54에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 23

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D10S1239

(xi) 서열 기술:

서열 54

CACCCTGTCC CCAGCTATCT GGA 23

(2) 서열 55에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 27

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D9S930

(xi) 서열 기술:

서열 55

AGTTGAATCT TGAGTCTCTC AGAGTCA 27

(2) 서열 56에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D4S2368

(xi) 서열 기술:

서열 56

TGTACTCATT TTCCCGCAAT GATG 24

(2) 서열 57에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D4S2368

(xi) 서열 기술:

서열 57

TCAGAAAGTA GGGTCTGGGC TCTT 24

(2) 서열 58에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 28

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D16S539

(xi) 서열 기술:

서열 58

TGTGCATCTG TAAGCATGTA TCTATCAT 28

(2) 서열 59에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 32

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: HUMvWFA31

(xi) 서열 기술:

서열 59

GAAAGCCCTA GTGGATGATA AGAATAATCA GT 32

(2) 서열 60에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 33

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: HUMvWFA31

(xi) 서열 기술:

서열 60

GGACAGATGA TAAATACATA GGATGGATGG ATA 33

(2) 서열 61에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 25

(B) 유형: 핵산

(C) 쇄: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(viii) 게놈에서의 위치:

(B) 유전자 지도에서의 위치: D9S930

(xi) 서열 기술:

서열 61

GCTATGGGAA TTACAAGCAG GAAAC 25

(57) 청구의 범위

청구항 1

(1) 분석할 하나 이상의 DNA 표본을 수득하고;

(2) 분석할 DNA 표본의 공-증폭가능한 4 이상의 짧은 반복 배열 좌위(short tandem repeat loci)를 갖는 좌위 세트를 선별함에 있어서, 이 세트중의 4 이상의 좌위는 하기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되고:

D3S1539, D4S2368, D5S818, D7S820, D9S930, D10S1239, D13S317, D14S118, D14S548, D14S562, D16S490, D16S539, D16S753, D17S1298, D17S1299, D19S253, D20S481, D22S683, HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01, HUMFESFPS, HUMF13A01, HUMBFXIII, HUMLIPOL, HUM$_V$WFA31 ;

(3) 복합 증폭 반응에서 이 좌위 세트를 공-증폭시킴에 있어서, 이 반응 생성물은 이 좌위 세트에서 공-증폭된 각 좌위로부터의 증폭된 대립 형질의 혼합물이고;

(4) 상기 DNA 표본내에서 좌위 세트중의 각 좌위에 존재하는 분석할 대립 형질을 측정하기 위해 혼합물중의 증폭되는 대립 형질을 평가하는; 하나 이상의 DNA 표본으로부터 4 이상의 짧은 반복 배열 좌위에 존재하는 대립 형질을 동시에 측정하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 공-증폭되는 4 이상의 좌위를 갖는 좌위 세트는 4개의 좌위를 갖는 좌위 세트가 4개의 좌위를 갖는 좌위 세트는 하기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 방법:

D3S1539, D7S820, D13S317, D5S818;

D17S1298, D7S820, D13S317, D5S818;

D20S481, D7S820, D13S317, D5S818;

D9S930, D7S820, D13S317, D5S818;

D10S1239, D7S820, D13S317, D5S818;

D14S118, D7S820, D13S317, D5S818;

D14S562, D7S820, D13S317, D5S818;

D14S548, D7S820, D13S317, D5S818;

D16S490, D7S820, D13S317, D5S818;

D17S1299, D7S820, D13S317, D5S818;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818;

D22S683, D7S820, D13S317, D5S818;

D16S753, D7S820, D13S317, D5S818;

D3S1539, D19S253, D13S317, D20S481;

D3S1539, D19S253, D4S2368, D20S481;

D10S1239, D9S930, D4S2368, D20S481; 및

D16S539, D7S820, D13S317, HUM$_V$WFA31.

청구항 3

제1항에 있어서, 공-증폭되는 4 이상의 좌위를 갖는 좌위 세트가 6개의 좌위를 갖는 좌위 세트이고, 이 6개의 좌위를 갖는 좌위 세트는 하기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 방법:

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX; 및

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS.

청구항 4

제1항에 있어서, 공-증폭되는 4 이상의 좌위를 갖는 좌위 세트가 7개의 좌위를 갖는 좌위 세트이고, 이 7개의 좌위를 갖는 좌위 세트는 하기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 방법:

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01; 및

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS, HUMBFXIII.

청구항 5

제1항에 있어서, 공-증폭되는 4 이상의 좌위를 갖는 좌위 세트가 8 이상의 좌위를 갖는 좌위 세트이고, 이 8 이상의 좌위를 갖는 좌위 세트는 하기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 방법:

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01, HUM$_V$WFA31; 및

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS, HUMBFXIII, HUMLIPOL.

청구항 6

제1항에 있어서, 분석할 4 이상의 좌위의 측부에 존재하는 4 이상의 프라이머쌍을 사용하여 복합 증폭 반응을 수행하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 겔 전기영동법에 의해 대립 형질을 분리하는 경우, 공-증폭되는 좌위 세트중의 다른 좌위의 대립 형질과는 중복되지 않는 대립 형질을 각 좌위로부터 생성하는 복합 증폭 반응용 프라이머쌍을 선별하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 복합 증폭 반응에 사용되는 하나 이상의 각 프라이머쌍이 하기로 이루어지는 서열 그룹중의 하나로부터 선택되는 서열을 갖는 방법:

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D7S820인 경우, 서열 1 및 2;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D13S317인 경우, 서열 3 및 4;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D5S818인 경우, 서열 5 및 6;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D3S1539인 경우, 서열 7, 8 및 49;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D17S1298인 경우, 서열 9 , 10;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D20S481인 경우, 서열 11, 12, 52, 53;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D9S930인 경우, 서열 13, 14, 55, 61;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D10S1239인 경우, 서열 15, 16, 54;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D14S118인 경우, 서열 17, 18;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D14S562인 경우, 서열 19, 20;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D14S548인 경우, 서열 21, 22;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D16S490인 경우, 서열 23, 24;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D16S753인 경우, 서열 25, 26;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D17S1299인 경우, 서열 27, 28;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D16S539인 경우, 서열 29, 30, 58;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D22S683인 경우, 서열 31, 32;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMCSF1PO인 경우, 서열 33, 34;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMTPOX인 경우, 서열 35, 36;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMTH01인 경우, 서열 37, 38;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUM$_V$WFA31인 경우, 서열 39, 40, 59, 60;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMF13A01인 경우, 서열 41, 42;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMFESFPS인 경우, 서열 43, 44;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HHUMBFXIII인 경우, 서열 45, 46;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMLIPOL인 경우, 서열 47, 48;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D19S253인 경우, 서열 50, 51; 및

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D4S2368인 경우, 서열 56, 57.

청구항 9

제6항에 있어서, 복합 증폭 반응이 폴리머라제 연쇄 반응인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, DNA 마커 및 좌위-특이성 대립 형질 사다리로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 크기 표준과 증폭되는 대립 형질과의 비교를 통해, 증폭되는 대립 형질을 평가하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법을 사용하여 대립 형질을 분리하고, 이로 인해 분리된 대립 형질의 폴리아크릴아미드 겔의 형성을 통해, 증폭되는 대립 형질을 평가하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 실버 스테인 분석법을 이용한 대립 형질의 시각화를 통해, 폴리아크릴아미드 겔내의 분리된 대립 형질을 측정하는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 좌위 세트중의 각 좌위의 측부에 결합할 수 있는 프라이머를 좌위의 공-증폭 반응에 사용하고; 각 좌위의 공-증폭 반응에 사용되는 하나 이상의 프라이머가 이에 공유 결합하는 형광 표지를 가짐으로써, 이로부터 수득되는 증폭된 대립 형질을 형광 표지화하며; 형광 분석법을 이용한 대립 형질의 시각화를 통해, 폴리아크릴아미드 겔내의 분리된 대립 형질을 측정하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 형광 표지가 플루오레세인 및 테트라메틸 로다민으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 인간의 조직으로부터 분석할 하나 이상의 DNA 표본을 분리하고, 이 인간의 조직은 혈액, 정액, 질 세포, 모발, 타액, 오줌, 태반 세포 및 배 세포를 함유한 양수액 및 이러한 조직의 혼합물로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 16

(1) 분석할 하나 이상의 DNA 표본을 수득하고;

(2) 분석할 DNA 표본의 공-증폭가능한 3개의 짧은 반복 배열 좌위를 갖는 좌위 세트를 선별함에 있어서, 이 3개의 좌위를 갖는 좌위 세트는 하기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되고:

D3S1539, D19S253, D13S317;

D10S1239, D9S930, D20S481;

D10S1239, D4S2368, D20S481;

D10S1239, D9S930, D4S2368;

D16S539, D7S820, D13S317; 및

D10S1239, D9S930, D13S317 ;

(3) 복합 증폭 반응에서 3개의 좌위를 갖는 이 좌위 세트를 공-증폭시킴에 있어서, 반응 생성물은 좌위 세트에서 공-증폭된 각 좌위로부터의 증폭된 대립 형질의 혼합물이고;

(4) 상기 DNA 표본내에서 좌위 세트중의 각 좌위에 존재하는 분석할 대립 형질을 측정하기 위해 혼합물중의 증폭되는 대립 형질을 평가하는; 하나 이상의 DNA 표본으로부터 3개의 짧은 반복 배열 좌위에 존재하는 대립 형질을 동시에 측정하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 복합 증폭 반응이 3쌍의 프라이머를 사용하여 수행되고, 각 프라이머쌍은 이 반응에서 공-증폭된 좌위 세트중의 3개의 짧은 반복 배열 좌위중에서 하나의 좌위의 측부에 위치하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 복합 증폭 반응에 사용되는 3쌍의 프라이머가 각각 이 반응에서 공-증폭된 좌위 세트중의 각 좌위의 대립 형질과 혼성화하도록 설계함에 있어서,

공-증폭된 좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D7S820인 경우, 하나 이상의 프 라이머가 서열 1 및 2로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

공-증폭된 좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D13S317인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 3 및 4로 이루

어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

공-증폭된 좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D20S481인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 11, 12, 52, 53으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

공-증폭된 좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D9S930인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 13, 14, 55 및 61로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

공-증폭된 좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D10S1239인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 15, 16 및 44로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

공-증폭된 좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D16S539인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 29 및 30으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

공-증폭된 좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D4S2368인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 56 및 57로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖는 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 복합 증폭 반응이 폴리머라제 연쇄 반응인 방법.

청구항 20

제16항에 있어서, DNA 마커 및 좌위-특이성 대립 형질 사다리로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 크기 표준과 증폭되는 대립 형질과의 비교를 통해, 증폭되는 대립 형질을 평가하는 방법.

청구항 21

제16항에 있어서, 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법을 사용하여 대립 형질을 분리하고, 이로 인해 분리된 대립 형질의 폴리아크릴아미드 겔의 형성을 통해, 증폭되는 대립 형질을 평가하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 폴리아크릴아미드 겔내의 분리된 대립 형질이 실버 스테인 분석법을 이용한 대립 형질의 시각화를 통해 측정되는 방법.

청구항 23

제21항에 있어서, 폴리아크릴아미드 겔내의 분리된 대립 형질이 형광 분석법을 이용한 대립 형질의 시각화를 통해 측정되는 방법.

청구항 24

제16항에 있어서, 인간의 조직으로부터 분석할 하나 이상의 DNA 표본을 분리하고, 이 인간의 조직은 혈액, 정액, 질 세포, 모발, 타액, 오줌, 골, 구강 표본, 태반 세포 및 배 세포를 함유한 양수액 및 이러한 조직의 혼합물로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 25

3 이상의 짧은 반복 배열의 좌위를 갖는 좌위 세트를 공-증폭시키기 위해 사용하는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 갖는 용기를 포함하는, 3 이상의 좌위에서의 짧은 반복 배열의 서열을 동시에 분석하는 데에 사용하며, 이 좌위 세트가 하기로 이루어지는 좌위 세트로부터 선택되는 키트:

D3S1539, D19S253, D13S317;

D10S1239, D9S930, D20S481;

D10S1239, D4S2368, D20S481;

D10S1239, D9S930, D4S2368;

D16S539, D7S820, D13S317;

D10S1239, D9S930, D13S317;

D3S1539, D7S820, D13S317, D5S818;

D17S1298, D7S820, D13S317, D5S818;

D20S481, D7S820, D13S317, D5S818;

D9S930, D7S820, D13S317, D5S818;

D10S1239, D7S820, D13S317, D5S818;

D14S118, D7S820, D13S317, D5S818;

D14S562, D7S820, D13S317, D5S818;

D14S548, D7S820, D13S317, D5S818;

D16S490, D7S820, D13S317, D5S818;

D17S1299, D7S820, D13S317, D5S818;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818;

D22S683, D7S820, D13S317, D5S818;

D16S753, D7S820, D13S317, D5S818;

D3S1539, D19S253, D13S317, D20S481;

D3S1539, D19S253, D4S2368, D20S481;

D10S1239, D9S930, D4S2368, D20S481;

D16S539, D7S820, D13S317, HUM$_V$WFA31;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS, HUMBFXIII;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01, HUM$_V$WFA31; 및

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS, HUMBFXIII, HUMLIPOL.

청구항 26

제25항에 있어서, 선택된 좌위 세트중에서 3개의 좌위중의 하나의 좌위의 대립 형질과 혼성화하도록 각 올리고뉴클레오티드 프라이머를 설계함에 있어서, 좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D7S820인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 1 및 2로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D13S317인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 3 및 4로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D5S818인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 7, 8 및 49로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D17S1298인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 9 및 10으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D20S481인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 11, 12, 52, 53으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D9S930인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 13, 14, 55, 61로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D10S1239인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 15, 16, 54로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D14S118인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 17, 18로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D14S562인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 19, 20으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D14S548인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 21, 22로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D16S490인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 23, 24로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D16S753인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 25, 26으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D17S1299인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 27, 28로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D16S539인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 29, 30, 58로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D22S683인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 31, 32로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMCSF1PO인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 33, 34로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMTPOX인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 35, 36으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMTH01인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 37, 38로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUM$_V$WFA31인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 39, 40, 60으로 이루어지

는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMF13A01인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 41, 42로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMFESFPS인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 43, 44로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMBFXIII인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 45, 46으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 HUMLIPOL인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 47, 48로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D19S253인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 50, 51로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖고;

좌위 세트중에서 하나의 좌위가 D4S2368인 경우, 하나 이상의 프라이머가 서열 56, 57로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖는 키트.

청구항 27

제25항에 있어서, 하나 이상의 복합 증폭 반응용 시약을 갖는 용기를 추가로 포함하는 키트.

청구항 28

제25항에 있어서, 대립 형질 사다리를 갖는 용기를 추가로 포함하는 키트.

청구항 29

제28항에 있어서, 각 대립 형질 사다리의 단 및 좌위 세트중의 각 좌위에 대한 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머가 이에 공유 결합하는 표지를 갖는 키트.

청구항 30

제29항에 있어서, 표지가 형광 표지인 키트.

청구항 31

제30항에 있어서, 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머가 용기내의 기타의 몇몇 프라이머쌍에 비해 이에 공유 결합된 상이한 형광 표지를 갖는 키트.

청구항 32

하나의 프라이머의 서열은 서열 7이고, 다른 하나의 프라이머의 서열은 서열 8 및 49로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열인, 인간의 DNA내의 좌위 D3S1539의 측부에 위치하는 올리고뉴클레오티드 프라이머쌍.

청구항 33

하나의 프라이머의 서열은 서열 9이고, 다른 하나의 프라이머의 서열은 서열 10인, 인간의 DNA내의 좌위 D17S1298의 측부에 위치하는 올리고뉴클레오티드 프라이머쌍.

청구항 34

하나의 프라이머의 서열은 서열 11 및 52로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열이고, 다른 하나의 프라이머의 서열은 서열 12 및 53으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열인, 인간의 DNA내의 좌위 D20S481의 측부에 위치하는 올리고뉴클레오티드 프라이머쌍.

청구항 35

하나의 프라이머의 서열은 서열 55이고, 다른 하나의 프라이머의 서열은 서열 14 및 61로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 서열인, 인간의 DNA내의 좌위 D9S930의 측부에 위치하는 올리고뉴클레오티드 프라이머쌍.

청구항 36

하나의 프라이머의 서열은 서열 56이고, 다른 하나의 프라이머의 서열은 서열 57인, 인간의 DNA내의 좌위 D4S2368의 측부에 위치하는 올리고뉴클레오티드 프라이머쌍.

청구항 37

(1) 분석할 하나 이상의 DNA 표본을 수득하고;

(2) 분석할 DNA 표본의 공-증폭가능한 4 이상의 짧은 반복 배열 좌위를 갖는 좌위 세트를 선별함에 있어서, 이 세트중의 3개의 좌위는 D7S820, D13S317 및 D5S818이고;

(3) 복합 증폭 반응에서 이 좌위 세트를 공-증폭시킴에 있어서, 반응 생성물은 이 좌위 세트에서 공-증폭된 각 좌위로부터의 증폭된 대립 형질의 혼합물이고;

(4) 상기 DNA 표본내에서 좌위 세트중의 각 좌위에 존재하는 분석할 대립 형질을 측정하기 위해 혼합물중의 증폭되는 대립 형질을 평가하는; 하나 이상의 DNA 표본으로부터 4 이상의 짧은 반복 배열 좌위에 존재

하는 대립 형질을 동시에 측정하는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 분석할 4 이상의 좌위의 측부에 위치하는 4 이상의 프라이머쌍을 사용하여 복합 증폭 반응을 수행하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 겔 전기영동법에 의해 대립 형질을 분리하는 경우, 각 좌위로부터 공-증폭된 좌위 세트중의 다른 좌위의 대립 형질과는 중복되지 않는 각 좌위로부터의 대립 형질을 생성하는 복합 증폭 반응용 프라이머쌍을 선별하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 40

제37항에 있어서, 복합 증폭 반응이 폴리머라제 연쇄 반응인 방법.

청구항 41

제37항에 있어서, DNA 마커 및 좌위-특이성 대립 형질 사다리로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 크기 표준과 증폭되는 대립 형질과의 비교를 통해, 증폭되는 대립 형질을 평가하는 방법.

청구항 42

제37항에 있어서, 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법을 사용하여 대립 형질을 분리하고, 이로 인해 분리된 대립 형질의 폴리아크릴아미드 겔의 형성을 통해, 증폭되는 대립 형질을 평가하는 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 폴리아크릴아미드 겔내의 분리된 대립 형질이 실버 스테인 분석법을 이용한 대립 형질의 시각화를 통해 측정되는 방법.

청구항 44

제42항에 있어서, 좌위 세트중의 각 좌위의 측부에 결합할 수 있는 프라이머를 좌위의 공-증폭 반응에 사용하고; 각 좌위의 공-증폭 반응에 사용되는 하나 이상의 프라이머가 이에 공유 결합하는 형광 표지를 가짐으로써, 이로부터 수득되는 증폭된 대립 형질을 형광 표지화하고; 형광 분석법을 이용한 대립 형질의 시각화를 통해, 폴리아크릴아미드 겔내의 분리된 대립 형질을 측정하는 방법.

청구항 45

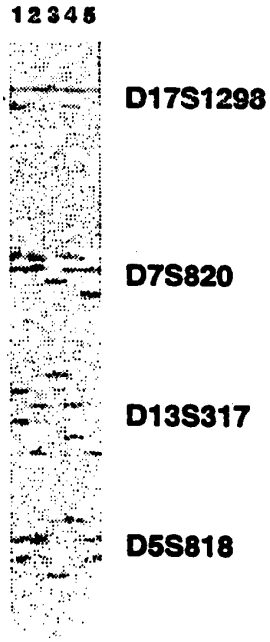
제44항에 있어서, 형광 표지가 플루오레세인 및 테트라메틸 로다민으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 방법.

도면

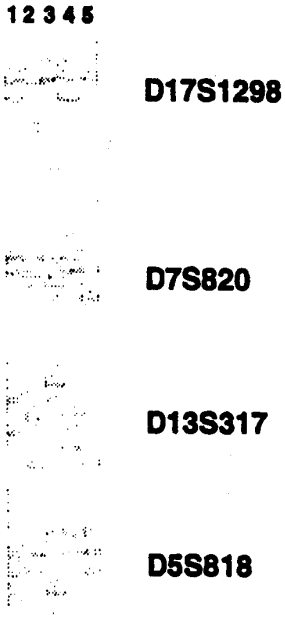
도면1



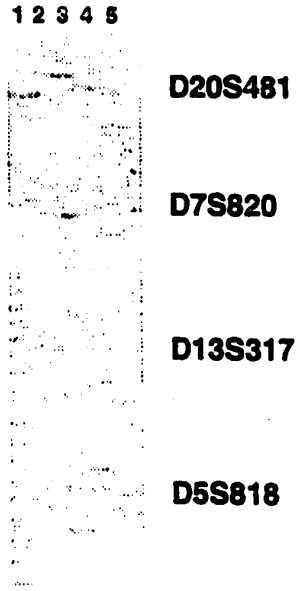
도면2


1 2 3 4 5
D17S1298
D7S820
D13S317
D5S818

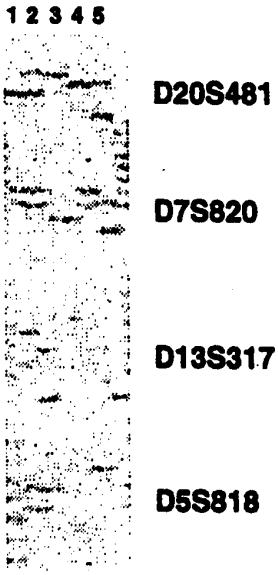
도면3


1 2 3 4 5
D17S1298
D7S820
D13S317
D5S818

도면4


1 2 3 4 5
D20S481
D7S820
D13S317
D5S818

도면5


1 2 3 4 5
D20S481
D7S820
D13S317
D5S818

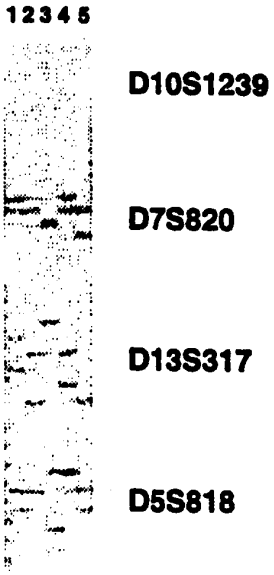
도면6


1 2 3 4 5
D9S930
D7S820
D13S317
D5S818

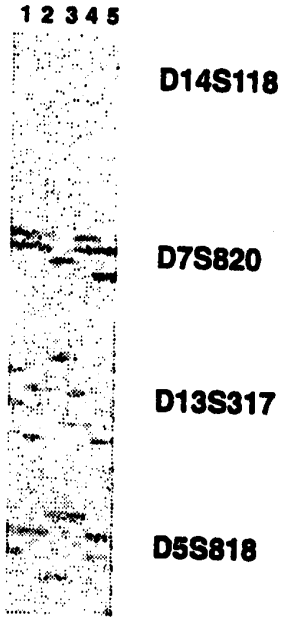
도면7


1 2 3 4 5
D10S1239
D7S820
D13S317
D5S818

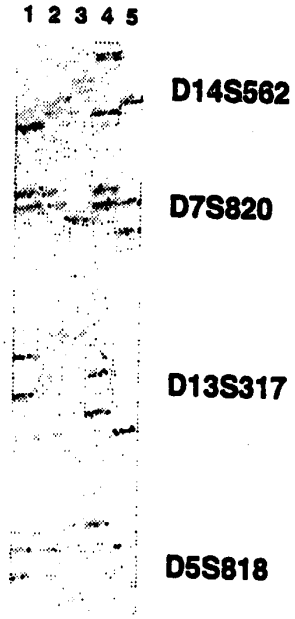
도면8


1 2 3 4 5
D10S1239
D7S820
D13S317
D5S818

도면9


1 2 3 4 5
D14S118
D7S820
D13S317
D5S818

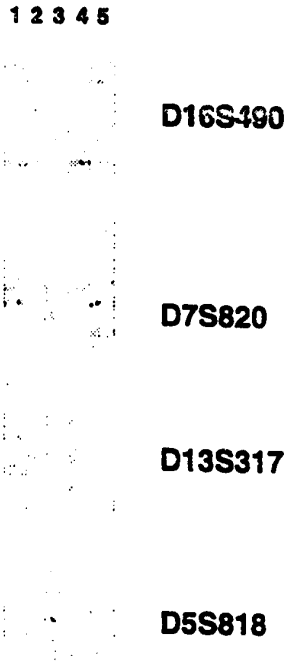
도면10


1 2 3 4 5
D14S562
D7S820
D13S317
D5S818

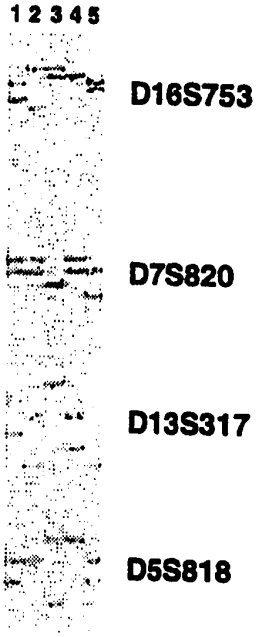
도면11


1 2 3 4 5
D14S548
D7S820
D13S317
D5S818

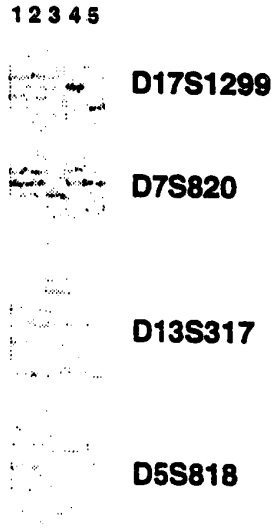
도면12


1 2 3 4 5
D16S490
D7S820
D13S317
D5S818

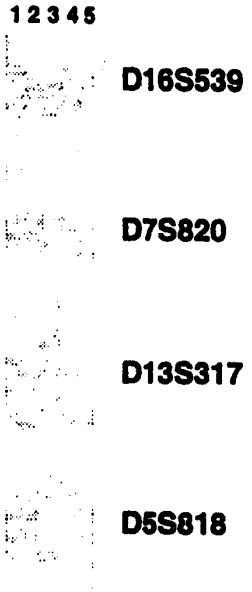
도면13


1 2 3 4 5
D16S753
D7S820
D13S317
D5S818

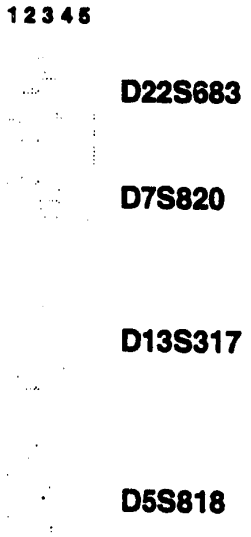
도면14


1 2 3 4 5
D17S1299
D7S820
D13S317
D5S818

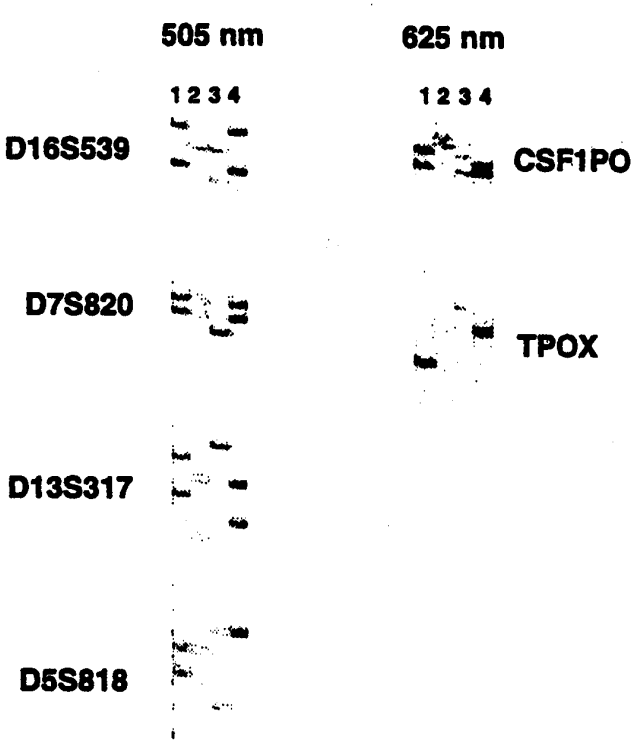
도면15


1 2 3 4 5
D16S539
D7S820
D13S317
D5S818

도면16


1 2 3 4 5
D22S683
D7S820
D13S317
D5S818

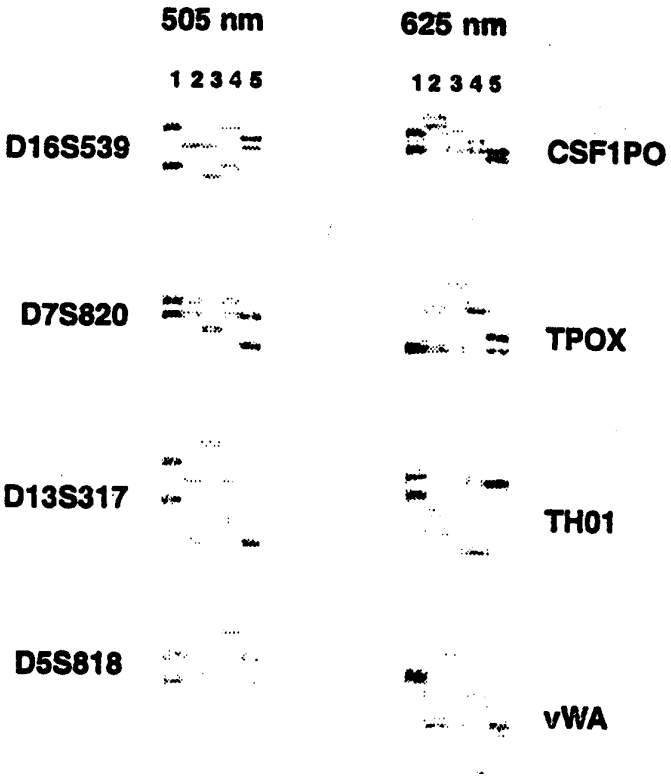
도면17


505 nm
625 nm
1 2 3 4
1 2 3 4
D16S539
CSF1PO
D7S820
TPOX
D13S317
D5S818

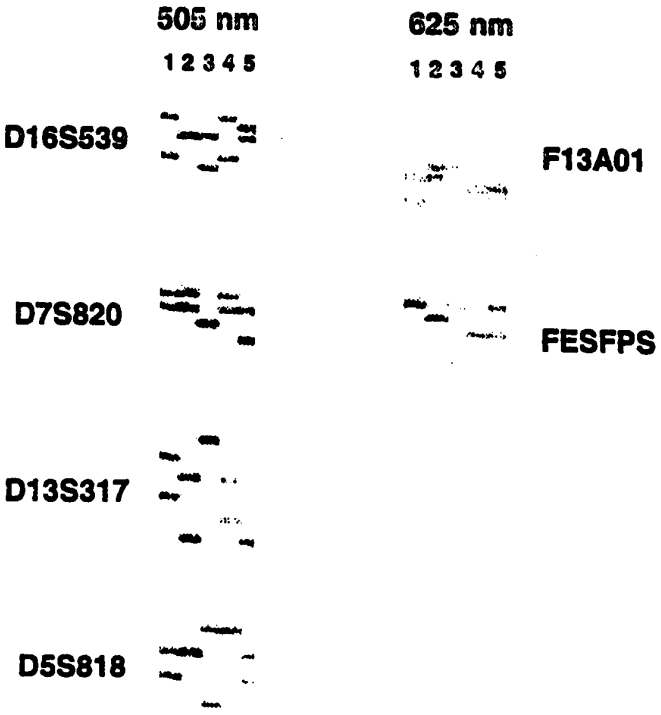
도면18


505 nm
625 nm
1 2 3 4 5
1 2 3 4 5
D16S539
CSF1PO
D7S820
TPOX
D13S317
TH01
D5S818

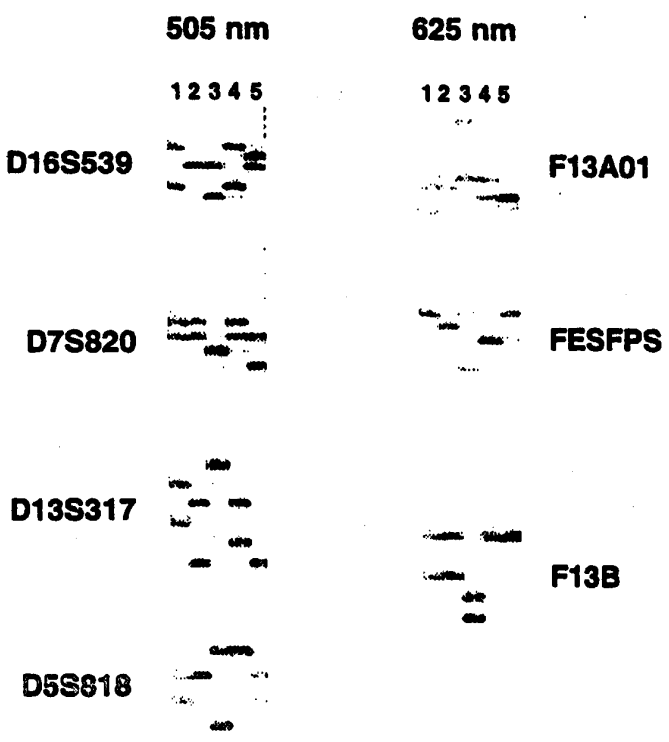
도면19


505 nm
625 nm
1 2 3 4 5
1 2 3 4 5
D16S539
CSF1PO
D7S820
TPOX
D13S317
TH01
D5S818
vWA

도면20


505 nm
1 2 3 4 5
625 nm
1 2 3 4 5
D16S539
F13A01
D7S820
FESFPS
D13S317
D5S818

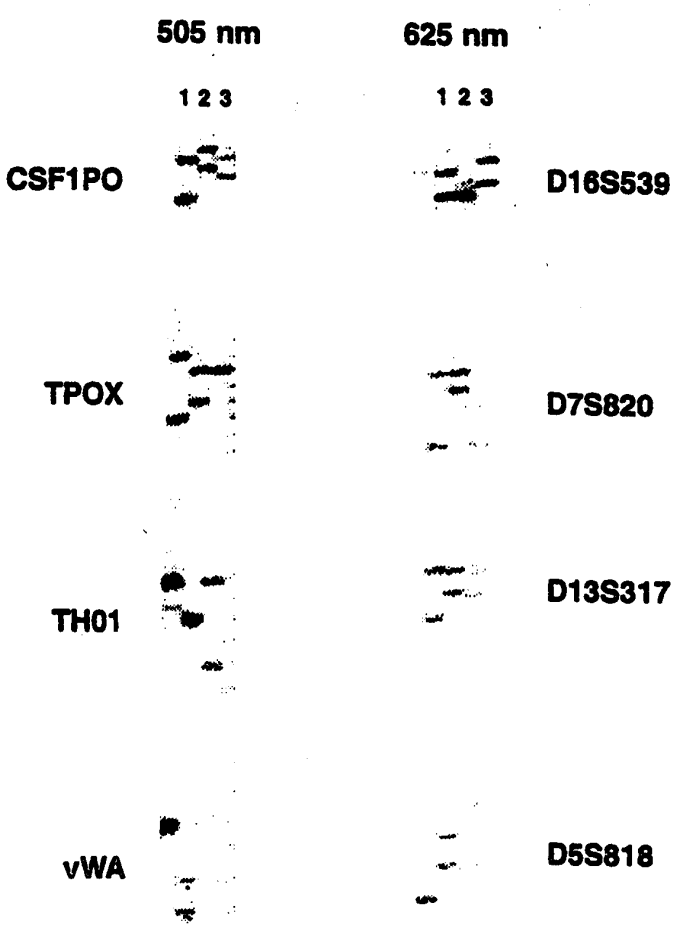
도면21


505 nm
1 2 3 4 5
625 nm
1 2 3 4 5
D16S539
F13A01
D7S820
FESFPS
D13S317
F13B
D5S818

도면22


505 nm
625 nm
1 2 3 4 5
1 2 3 4 5
D16S539
F13A01
D7S820
FESFPS
D13S317
F13B
D5S818
LPL

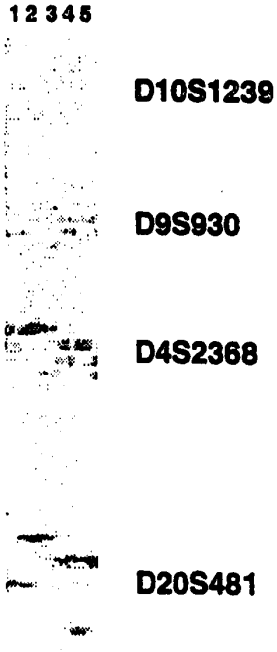
도면23


505 nm
625 nm
1 2 3
1 2 3
CSF1PO
D16S539
TPOX
D7S820
TH01
D13S317
vWA
D5S818

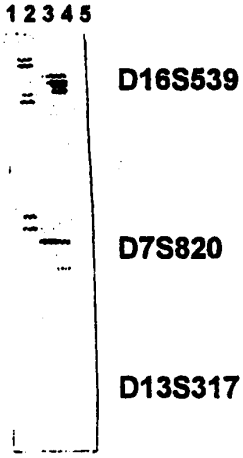
도면24


1 2 3 4 5
D3S1539
D19S253
D13S317
D20S481

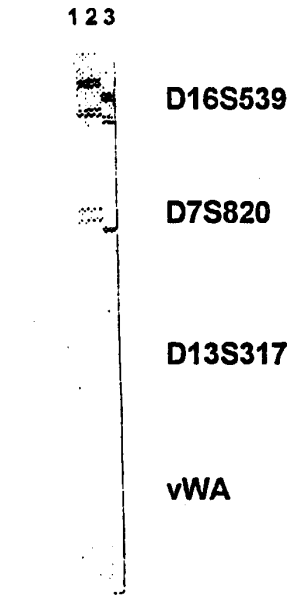
도면25


1 2 3 4 5
D10S1239
D9S930
D4S2368
D20S481

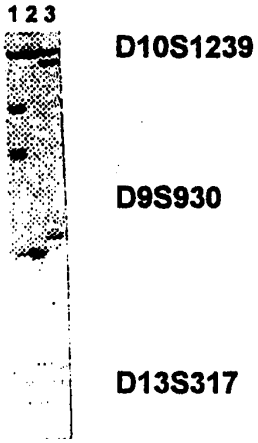
도면26


1 2 3 4 5
D16S539
D7S820
D13S317

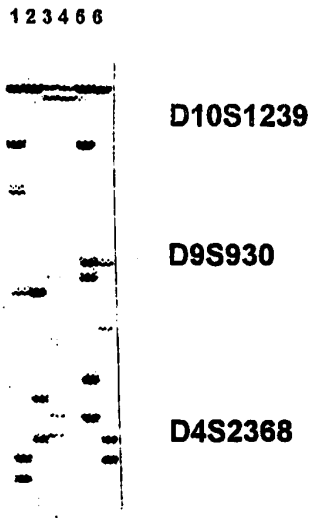
도면27



도면28



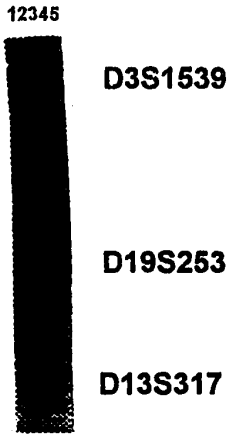
도면29



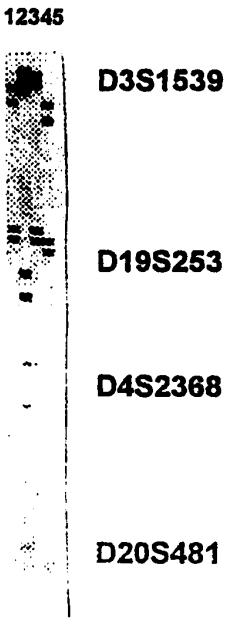
도면30


1234
D10S1239
D9S930
D4S2368
D20S481

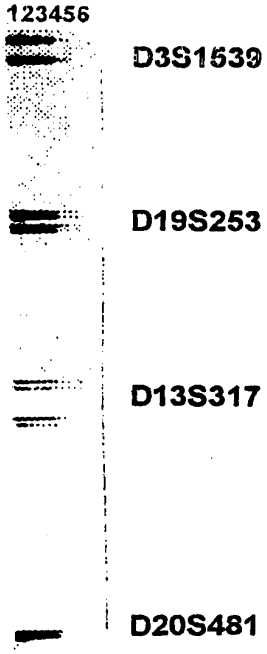
도면31


12345
D3S1539
D19S253
D13S317

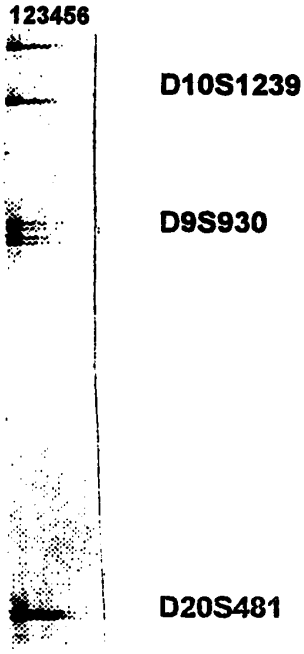
도면32


12345
D3S1539
D19S253
D4S2368
D20S481

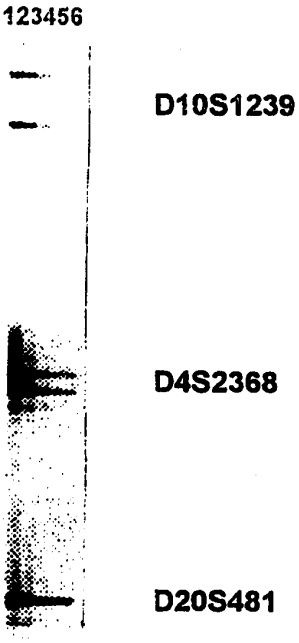
도면33


123456
D3S1539
D19S253
D13S317
D20S481

도면34


123456
D10S1239
D9S930
D20S481

도면35


123456
D10S1239
D4S2368
D20S481