

(11) 공개번호 10-2022-0102129
(43) 공개일자 2022년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6827 (2018.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6827 (2018.05)
C12Q 2525/107 (2013.01)

(21) 출원번호 **10-2022-0004807**

(22) 출원일자 **2022년01월12일**
심사청구일자 **2022년01월12일**

(30) 우선권주장
1020210003912 2021년01월12일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자
나성수
서울특별시 영등포구 당산로42길 13, 106동 802호(당산동5가, 당산동1차 효성아파트)

유준석
서울특별시 서대문구 충정로6안길 13, 301호(미군동)

(74) 대리인
박상열, 최내윤

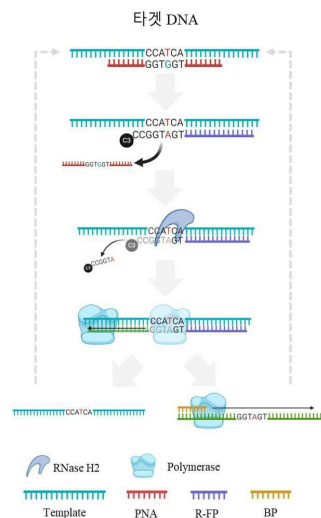
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 단일 염기 서열 변이 검출 방법, 및 이를 이용한 단일 염기 서열 변이 검출용 시약

(57) 요약

단일 염기 서열 변이 검출 방법이 제공된다. 상기 단일 염기 서열 변이 검출 방법은, 기준 염기 서열 또는 상기 기준 염기 서열과 다른 변이 염기 서열을 갖는 DNA를 포함하는 샘플을 준비하는 단계, 상기 기준 염기 서열에 상보 결합하는 염기 서열을 갖는 기준 PNA를 준비하는 단계, 상기 변이 염기 서열과 상보 결합하는 염기 서열을 갖는 기준 R-FP(RNA forward primer)를 준비하는 단계, 및 상기 샘플에 상기 기준 PNA, 상기 기준 R-FP, 및 RNase 효소를 제공하는 단계를 포함할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/156 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711104111
과제번호	2016R1A5A1010148
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	나노-생체유체 검사 연구단
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

기준 염기 서열 또는 상기 기준 염기 서열과 다른 변이 염기 서열을 갖는 DNA를 포함하는 샘플을 준비하는 단계;

상기 기준 염기 서열에 상보 결합하는 염기 서열을 갖는 기준 PNA를 준비하는 단계;

상기 변이 염기 서열과 상보 결합하는 염기 서열을 갖는 기준 R-FP(RNA forward primer)를 준비하는 단계; 및

상기 샘플에 상기 기준 PNA, 상기 기준 R-FP, 및 RNase 효소를 제공하는 단계를 포함하는 단일 염기 서열 변이 검출 방법.

청구항 2

제1 항에 있어서,

상기 샘플은 상기 변이 염기 서열을 갖는 타겟 DNA를 포함하고,

상기 기준 PNA는 상기 변이 염기 서열을 갖는 상기 타겟 DNA와 비상보 결합하고,

상기 기준 R-FP에 의해, 비상보 결합된 상기 기준 PNA와 상기 타겟 DNA는 분리된 후, 상기 기준 R-FP와 상기 타겟 DNA가 상보 결합하고,

상기 RNase 효소에 의해, 상기 타겟 DNA의 상기 변이 염기 서열의 변이 염기에 대응하는 상기 기준 R-FP의 염기가 절단되어 분리된 후, 상기 타겟 DNA가 중합효소 연쇄반응으로 복제되는 것을 포함하는 단일 염기 서열 변이 검출 방법.

청구항 3

제2 항에 있어서,

상기 타겟 DNA는 64.5℃ 초과 65.5℃ 미만의 온도 조건에서 복제되는 것을 포함하는 단일 염기 서열 변이 검출 방법.

청구항 4

제1 항에 있어서,

상기 샘플은 상기 기준 염기 서열을 갖는 비타겟 DNA를 포함하고,

상기 기준 PNA는 상기 기준 염기 서열을 갖는 상기 비타겟 DNA와 상보 결합하여, 상기 기준 R-FP에 의해 상보 결합된 상기 기준 PNA 및 상기 비타겟 DNA가 분리되지 않는 것을 포함하는 단일 염기 서열 변이 검출 방법.

청구항 5

제1 항에 있어서,

상기 비타겟 DNA는, 상기 RNase 효소에 의한 중합효소 연쇄반응이 발생하지 않는 것을 포함하는 단일 염기 서열 변이 검출 방법.

청구항 6

제1 항에 있어서,

상기 기준 PNA는 12 bp의 길이를 갖는 것을 포함하는 단일 염기 서열 변이 검출 방법.

청구항 7

제1 항에 있어서,

상기 샘플, 상기 기준, PNA, 상기 기준 R-FP, 및 상기 RNase 효소는 BP(backward primer)와 함께 순수에 혼합되는 것을 포함하는 단일 염기 서열 변이 검출 방법.

청구항 8

제1 항에 있어서,

상기 RNase 효소는 RNase H2 효소인 것을 포함하는 단일 염기 서열 변이 검출 방법.

청구항 9

제1 항에 따른 상기 단일 염기 서열 변이 검출 방법을 이용한 혈중 순환 암의 검출 방법.

청구항 10

기준 PNA, 기준 R-FP, 및 RNase 효소를 포함하는 단일 염기 서열 변이 검출용 시약에 있어서,

상기 기준 PNA는 기준 염기 서열에 상보 결합하는 염기 서열을 갖고,

상기 기준 R-FP는 상기 기준 염기 서열과 다른 변이 염기 서열에 상보 결합하는 염기 서열을 갖고,

상기 시약에 상기 변이 염기 서열을 갖는 타겟 DNA를 포함하는 샘플이 주입되는 경우,

상기 기준 PNA는 상기 변이 염기 서열을 갖는 상기 타겟 DNA와 비상보 결합하고,

상기 기준 R-FP에 의해, 비상보 결합된 상기 기준 PNA와 상기 타겟 DNA는 분리된 후, 상기 기준 R-FP와 상기 기준 DNA가 상보 결합하고,

상기 RNase 효소에 의해, 상기 타겟 DNA의 상기 변이 염기 서열의 변이 염기에 대응하는 상기 기준 R-FP의 염기가 절단되어 분리된 후, 상기 타겟 DNA가 증합효소 연쇄반응으로 복제되는 것을 포함하는 단일 염기 서열 변이 검출용 시약.

청구항 11

제1 항에 있어서,

상기 샘플이 주입된 상기 시약을 64.5℃ 초과 65.5℃ 미만의 온도 조건에서 반응시키는 것을 포함하는 단일 염기 서열 변이 검출용 시약.

청구항 12

제1 항에 있어서,

상기 단일 염기 서열 변이 검출용 시약은,

상기 기준 R-FP 및 상기 기준 PNA를 포함하는 제1 베이스 시약, 및 상기 RNase 효소를 포함하는 제2 베이스 시약으로 분리되어 보관되고, 단일 염기 서열 변이 검출을 위한 사용 과정에서 상기 제1 베이스 시약 및 상기 제2 베이스 시약을 혼합하여 제조되는 것을 포함하는 단일 염기 서열 변이 검출용 시약.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 단일 염기 서열 변이 검출 방법, 및 이를 이용한 단일 염기 서열 변이 검출용 시약에 관련된 것으로, 보다 상세하게는, PNA 및 RNase 효소를 이용한 단일 염기 서열 변이 검출 방법, 및 이를 이용한 단일 염기 서열 변이 검출용 시약에 관련된 것이다.

배경 기술

[0002] 암을 진단하기 위한 방법 중 하나는 암 환자의 혈액 내 있는 다양한 정보들을 바탕으로 진단하는 것이다. 대표적으로 혈중 순환 암 이종 핵산 염기(circulating tumor DNA)의 염기 서열을 분석하여 해당 혈액의 암 환자가 어떤 종류의 암을 가지고 있는지, 어떤 변이를 일으켰는지에 대한 정보를 파악하는 것이다. 혈중 순환 암 이종 핵산 염기의 변이 중에서도 단일 염기 서열 변이(single nucleotide polymorphism)가 가장 흔한 변이이면서, 가장 어려운 과제이다.

[0003] 단일 염기서열 변이란 이종 핵산의 염기서열 중에선 단 하나의 염기만 다른 종류의 염기쪽으로 변이되는 것을 말한다. 예를 들면, 혈중 순환 암 이종핵산 염기(circulating tumor DNA) 중 Guanine이라는 염기가 Cytosine, Adenine, Thymine 등 다른 염기로 바뀌는 것을 의미한다.

[0004] 이런 단일 염기 서열 변이(single nucleotide polymorphism)가 가장 흔히 발현되는 염기 부분이 KRAS(Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) Exon 2, codon 34~38 구역이다. 그 중에서도 가장 많이 발현되는 구역은 KRAS Exon2, codon 35의 Guanine 이 다른 염기로 변이되는 것이다. 이 부분에서 발생할 수 있는 각각의 변이를 의학 약어로 KRAS G12D(G>A), G12V(G>T), G12A(G>C)라고 표현한다.

[0005] 단일 염기 서열 변이 검출이 어려운 이유는 DNA를 검출하기 위한 방법이 해당 검출 DNA에 맞게 염기서열을 설계하는데 있다. 예를 들어 5'TGATCACAT~3'을 검출하기 위해 각각의 위치의 염기와 상보 결합하는 염기를 다음과 같이 설계한다. 3'ACTAGTGTA~5' 위와 같이 특정 DNA를 검출하기 위해 상보결합을 이용하는 것이 필수여야 다른 종류의 DNA의 검출을 배제할 수 있다. 그러나, 다른 종류의 DNA가 단일 염기서열만 다르다면 기존의 설계된 DNA 염기는 전혀 쓸모가 없어진다. DNA의 결합력에서 단일 염기서열로 인한 결합력의 차이는 거의 없기 때문이다.

[0006] 이러한 문제점을 해결하기 위해, 검출해야 하는 DNA만을 복제하고, 단일 염기 서열 변이가 있는 DNA는 복제하지 못하게 하는 선택적 증폭 방법이 개발되었다. DNA를 증폭하기 위해서는 기존에 연구되던 PCR(polymerase chain reaction)이 대표적인 기술이다. PCR만을 사용하면 단일 염기 변이된 DNA도 같이 복제되어 구별하지 못하는 한계가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 출원이 해결하고자 하는 일 기술적 과제는, 고신뢰성의 단일 염기 서열 변이 검출 방법, 및 이를 이용한 단일 염기 서열 변이 검출용 시약을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 출원이 해결하고자 하는 다른 기술적 과제는, 혈액에서 암을 용이하게 진단할 수 있는 단일 염기 서열 변이 검출 방법, 및 이를 이용한 단일 염기 서열 변이 검출용 시약을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 출원이 해결하고자 하는 또 다른 기술적 과제는, 1:1000이상 비율로 존재하는 타겟 DNA와 비타겟 DNA에서의 구별할 수 있는 단일 염기 서열 변이 검출 방법, 및 이를 이용한 단일 염기 서열 변이 검출용 시약을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 출원이 해결하고자 하는 또 다른 기술적 과제는, 타겟 DNA가 fM 이하 수준의 극저농도에서 용이하게 활용할

수 있는 단일 염기 서열 변이 검출 방법, 및 이를 이용한 단일 염기 서열 변이 검출용 시약을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 출원이 해결하고자 하는 또 다른 기술적 과제는, PNA 및 RNase 효소에 의해 기능이 서로 보장되어 높은 선별 증폭을 할 수 있는 단일 염기 서열 변이 검출 방법, 및 이를 이용한 단일 염기 서열 변이 검출용 시약을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 출원은 단일 염기 서열 변이 검출 방법을 제공한다.

[0013] 일 실시 예에 따르면, 상기 단일 염기 서열 변이 검출 방법은, 기준 염기 서열 또는 상기 기준 염기 서열과 다른 변이 염기 서열을 갖는 DNA를 포함하는 샘플을 준비하는 단계, 상기 기준 염기 서열에 상보 결합하는 염기 서열을 갖는 기준 PNA를 준비하는 단계, 상기 변이 염기 서열과 상보 결합하는 염기 서열을 갖는 기준 R-FP(RNA forward primer)를 준비하는 단계, 및 상기 샘플에 상기 기준 PNA, 상기 기준 R-FP, 및 RNase 효소를 제공하는 단계를 포함할 수 있다.

[0014] 일 실시 예에 따르면, 상기 샘플은 상기 변이 염기 서열을 갖는 타겟 DNA를 포함하고, 상기 기준 PNA는 상기 변이 염기 서열을 갖는 상기 타겟 DNA와 비상보 결합하고, 상기 기준 R-FP에 의해, 비상보 결합된 상기 기준 PNA와 상기 타겟 DNA는 분리된 후, 상기 기준 R-FP와 상기 기준 DNA가 상보 결합하고, 상기 RNase 효소에 의해, 상기 타겟 DNA의 상기 변이 염기 서열의 변이 염기에 대응하는 상기 기준 R-FP의 염기가 절단되어 분리된 후, 상기 타겟 DNA가 중합효소 연쇄반응으로 복제될 수 있다.

[0015] 일 실시 예에 따르면, 상기 타겟 DNA는 64.5℃ 초과 65.5℃ 미만의 온도 조건에서 복제될 수 있다.

[0016] 일 실시 예에 따르면, 상기 샘플은 상기 기준 염기 서열을 갖는 비타겟 DNA를 포함하고, 상기 기준 PNA는 상기 기준 염기 서열을 갖는 상기 비타겟 DNA와 상보 결합하여, 상기 기준 R-FP에 의해 상보 결합된 상기 기준 PNA 및 상기 비타겟 DNA가 분리되지 않을 수 있다.

[0017] 일 실시 예에 따르면, 상기 비타겟 DNA는, 상기 RNase 효소에 의한 중합효소 연쇄반응이 발생하지 않을 수 있다.

[0018] 일 실시 예에 따르면, 상기 기준 PNA는 12 bp의 길이를 가질 수 있다.

[0019] 일 실시 예에 따르면, 상기 샘플, 상기 기준, PNA, 상기 기준 R-FP, 및 상기 RNase 효소는 BP(backward primer)와 함께 순수에 혼합될 수 있다.

[0020] 일 실시 예에 따르면, 상기 RNase 효소는 RNase H2 효소일 수 있다.

[0021] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 출원은 혈중 순환 암의 검출 방법을 제공한다.

[0022] 일 실시 예에 따르면, 상기 혈중 순환 암의 검출 방법은, 상술된 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법을 이용할 수 있다.

[0023] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 출원은 단일 염기 서열 변이 검출용 시약을 제공한다.

[0024] 일 실시 예에 따르면, 기준 PNA, 기준 R-FP, 및 RNase 효소를 포함하는 상기 단일 염기 서열 변이 검출용 시약에 있어서, 상기 기준 PNA는 기준 염기 서열에 상보 결합하는 염기 서열을 갖고, 상기 기준 R-FP는 상기 기준 염기 서열과 다른 변이 염기 서열에 상보 결합하는 염기 서열을 갖고, 상기 시약에 상기 변이 염기 서열을 갖는 타겟 DNA를 포함하는 샘플이 주입되는 경우, 상기 기준 PNA는 상기 변이 염기 서열을 갖는 상기 타겟 DNA와 비상보 결합하고, 상기 기준 R-FP에 의해, 비상보 결합된 상기 기준 PNA와 상기 타겟 DNA는 분리된 후, 상기 기준 R-FP와 상기 기준 DNA가 상보 결합하고, 상기 RNase 효소에 의해, 상기 타겟 DNA의 상기 변이 염기 서열의 변이 염기에 대응하는 상기 기준 R-FP의 염기가 절단되어 분리된 후, 상기 타겟 DNA가 중합효소 연쇄반응으로 복제될 수 있다.

[0025] 일 실시 예에 따르면, 상기 샘플이 주입된 상기 시약을 64.5℃ 초과 65.5℃ 미만의 온도 조건에서 반응될 수 있다.

[0026] 일 실시 예에 따르면, 상기 단일 염기 서열 변이 검출용 시약은, 상기 기준 R-FP 및 상기 기준 PNA를 포함하는 제1 베이스 시약, 및 상기 RNase 효소를 포함하는 제2 베이스 시약으로 분리되어 보관되고, 단일 염기 서열 변

이 검출을 위한 사용 과정에서 상기 제1 베이스 시약 및 상기 제2 베이스 시약을 혼합하여 제조될 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법은, 기준 염기 서열 또는 상기 기준 염기 서열과 다른 변이 염기 서열을 갖는 DNA를 포함하는 샘플을 준비하는 단계, 상기 기준 염기 서열에 상보 결합하는 염기 서열을 갖는 기준 PNA를 준비하는 단계, 상기 변이 염기 서열과 상보 결합하는 염기 서열을 갖는 기준 R-FP(RNA forward primer)를 준비하는 단계, 및, 상기 샘플에 상기 기준 PNA, 상기 기준 R-FP, 및 RNase 효소를 제공하는 단계를 포함할 수 있다.

[0028] 혈중 내 존재하는 단일 염기 서열 변이된 혈중 순환 암 이중 핵산을 극 저농도의 환경과 비타겟 DNA들이 수없이 많이 존재하는 환경에서 타겟 DNA만을 선택적으로 증폭하여 검출될 수 있다. 이에 따라, 기존 암 진단을 위한 경제적, 시간적 부담이 경감될 수 있고, 용이하게 혈액에서 암을 진단하는 기술이 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법을 설명하기 위한 순서도이다.

도 2는 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에서 타겟 DNA 복제 과정을 설명하기 위한 도면이다.

도 3은 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에서 비타겟 DNA의 반응 과정을 설명하기 위한 도면이다.

도 4는 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에서 annealing/extension 온도 조건에 따른 타겟 DNA와 비타겟 DNA의 Ct 값이 차이를 나타내는 그래프이다.

도 5는 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에 따른 증폭 후 전기 영동 이미지 및 증폭 결과를 도시한 도면이다.

도 6은 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에서 PNA 와 RNase를 사용하여 100 fM to 1 aM의 KRAS c.35G>A을 증폭한 결과와 negative contro (회색)을 나타내는 도면이다.

도 7은 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에서 PNA 와 RNase를 사용하여 100 fM to 1 aM의 KRAS c.35G>A을 비타겟 DNA 100fM이 존재하는 상황에서 증폭한 결과 와 negative control (비타겟 DNA 100fM, 분홍색)을 나타내는 도면이다.

도 8은 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에서 PNA 와 RNase를 사용하여 KRAS 단일 염기 변이 검출 결과 및 전기 영도 이미지를 나타내는 도면이다.

도 9는 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에서 KRAS 단일 염기 서열을 검출한 실시간 증폭 그래프 및 대조군과 비교한 상대적 ΔCt 값을 나타내는 도면이다.

도 10은 본 출원의 실험 예들에서 사용된 DNA 염기 서열을 나타내는 도면이다.

도 11은 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에서 PNA 결합을 간접적으로 확인한 그래프이다.

도 12는 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에서 Tm과 design에 따른 성능의 차이를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시 예를 상세히 설명할 것이다. 그러나 본 발명의 기술적 사상은 여기서 설명되는 실시 예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화 될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 실시 예는 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다.

[0031] 본 명세서에서, 어떤 구성요소가 다른 구성요소 상에 있다고 언급되는 경우에 그것은 다른 구성요소 상에 직접 형성될 수 있거나 또는 그들 사이에 제 3의 구성요소가 개재될 수도 있다는 것을 의미한다. 또한, 도면들에 있

어서, 막 및 영역들의 두께는 기술적 내용의 효과적인 설명을 위해 과장된 것이다.

- [0032] 또한, 본 명세서의 다양한 실시 예들에서 제1, 제2, 제3 등의 용어가 다양한 구성요소들을 기술하기 위해서 사용되었지만, 이들 구성요소들이 이 같은 용어들에 의해서 한정되어서는 안 된다. 이들 용어들은 단지 어느 구성요소를 다른 구성요소와 구별시키기 위해서 사용되었을 뿐이다. 따라서, 어느 한 실시 예에 제 1 구성요소로 언급된 것이 다른 실시 예에서는 제 2 구성요소로 언급될 수도 있다. 여기에 설명되고 예시되는 각 실시 예는 그것의 상보적인 실시 예도 포함한다. 또한, 본 명세서에서 '및/또는'은 전후에 나열한 구성요소들 중 적어도 하나를 포함하는 의미로 사용되었다.
- [0033] 명세서에서 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한 복수의 표현을 포함한다. 또한, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 구성요소 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징이나 숫자, 단계, 구성요소 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 배제하는 것으로 이해되어서는 안 된다. 또한, 본 명세서에서 "연결"은 복수의 구성요소를 간접적으로 연결하는 것, 및 직접적으로 연결하는 것을 모두 포함하는 의미로 사용된다.
- [0034] 또한, 하기에서 본 발명을 설명함에 있어 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명은 생략할 것이다.
- [0036] 도 1은 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법을 설명하기 위한 순서도이고, 도 2는 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에서 타겟 DNA 복제 과정을 설명하기 위한 도면이고, 도 3은 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에서 비타겟 DNA의 반응 과정을 설명하기 위한 도면이다.
- [0037] 도 1 내지 도 3을 참조하면, 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법은, 기준 염기 서열 또는 상기 기준 염기 서열과 다른 변이 염기 서열을 갖는 DNA를 포함하는 샘플을 준비하는 단계(S110), 상기 기준 염기 서열에 상보 결합하는 염기 서열을 갖는 기준 PNA를 준비하는 단계(S120), 상기 변이 염기 서열과 상보 결합하는 염기 서열을 갖는 기준 R-FP(RNA forward primer)를 준비하는 단계(S130), 및 상기 샘플에 상기 기준 PNA, 상기 기준 R-FP, 및 RNase 효소를 제공하는 단계(S140)를 포함할 수 있다.
- [0038] PNA는 DNA와 유사하지만 핵산 구조 중 backbone의 구조가 phosphate 가 아닌 peptide 로 이루어진 구조체이다. DNA는 phosphate 구조체를 backbone으로 가지기 때문에 음전하를 띠 수밖에 없지만 peptide 구조체로 구성된 PNA는 극성이 없다. 따라서, DNA와 DNA가 상보 결합을 하더라도, 서로의 backbone charge 때문에 결합력이 강하지 않은 반면, PNA와 DNA가 상보 결합하면 PNA에서는 음전하로 인한 반발력이 없어서 DNA와 DNA의 결합에 비해 강한 결합력을 가질 수 있다.
- [0039] 또한, PNA와 DNA에서 발생하는 결합에서의 단일 염기 서열 비대응(single mis-match)는 완전 대응(full match) 결합과 비교하여 결합력의 차이가 크게 나타날 수 있다. 이 결합력의 차이는 melting temperature로 측정될 수 있으며, 단일 염기 서열 비대응 결합(비상보 결합)과 완전 대응 상보 결합 사이에서, 약 15° C 정도의 온도차이가 발생할 수 있다. 반면, DNA와 DNA사이에서의 단일 염기 비대응으로 인한 온도 차이는 약 1° C 미만에 불과하다.
- [0040] 위와 같은 차이로 PNA를 이용하여, 단일 염기 서열 변이(single nucleotide polymorphism)를 검출할 수 있으나, 실질적으로 단일 염기 서열 변이가 없는 비 타겟 DNA와 단일 염기 서열 변이가 있는 타겟 DNA를 구별하기 위한 선별성은 1:1000에 불과하다. 또한, PNA의 염기 서열의 구조나 길이 또는 타겟 DNA에 결합하는 부분에 따라 조건들이 까다롭기 때문에 PNA하나만으로는 단일 염기 서열 변이를 모두 검출하기가 어려운 한계가 있다.
- [0041] RNase H2는 RNA-DNA 염기쌍 상보 결합이 발생하면 RNase H2 가 RNA염기 앞에 있는 chain을 끊어주는 기능을 수행할 수 있다. RNA-DNA 염기쌍 상보 결합이 맞지 않으면, 즉 RNA 및 DNA가 비상보 결합을 하는 경우 RNase H2는 작동하지 않는다. primer DNA의 서열에 RNA 염기 하나를 섞어 넣고, 3' 말단에는 증폭이 되지 않도록 inhibitor를 설계하고, primer DNA 가 타겟 DNA와 결합할 때 RNase H2가 RNA를 잘라주면, 3' 에서 증폭효소 연쇄반응으로 증폭이 일어나지만 비타겟 DNA와 결합했을 때는 RNA-DNA 결합이 상보결합이 아니기 때문에, RNase H2가 작동하지 못하고, 기존 3'에 있던 inhibitor로 인해 핵산 증폭이 발생되지 않는다. 이와 같이, RNase H2를 이용한 방법 또한 1:1000정도의 수준의 선택성을 가질 수 있다.
- [0042] 본 출원의 실시 예에 따르면, 상술된 PNA 및 RNase H2를 동시에 이용하여, 단일 염기 서열 변이가 효과적으로

검출될 수 있다.

- [0043] 구체적으로, 도 2에 도시된 바와 같이, 상기 기준 염기 서열(CCACCA)과 다른 상기 변이 염기 서열(CCATCA)을 갖는 타겟 DNA가 준비될 수 있다. 다시 말하면, 상기 타겟 DNA는 상기 샘플 내에서 검출하고자 하는 객체일 수 있다.
- [0044] 상기 기준 PNA는, 상기 기준 염기 서열(CCACCA)을 갖는 상기 타겟 DNA와 상보 결합하는 염기 서열(GGTGGT)를 가질 수 있고, 상기 변이 염기 서열(CCATCA)과 비상보 결합하는 염기 서열(GGTGGT)를 가질 수 있다.
- [0045] 상기 기준 PNA가 상기 타겟 DNA에 결합할 수 있다. 하지만, 상기 기준 PNA와 상기 타겟 DNA는 T와 G가 만나기 때문에 mismatch가 있는 상황으로 비상보 결합할 수 있다. 이로 인해, 상기 기준 R-FP(RNA forward primer)에 의해, 상기 기준 PNA가 상기 타겟 DNA로부터 쉽게 분리되고, 상기 기준 R-FP가 상기 타겟 DNA와 결합할 수 있다. 즉, 상기 타겟 DNA와 상기 기준 PNA는 비상보 결합되어 용이하게 서로 분리되고, 상기 타겟 DNA의 상기 변이 염기 서열(CCATCA)과 상보 결합하는 염기 서열(GGTAGT)을 갖는 상기 기준 R-FP가 상기 타겟 DNA와 상보 결합할 수 있다. 다시 말하면, 상기 기준 R-FP와 상기 타겟 DNA가 결합하면, T와 rA(RNA adenine)이 결합하여 RNA-DNA 상보 결합될 수 있다. 이 경우, 상기 RNase H2가 상기 RNA-DNA 상보 결합을 인식하여 상기 기준 R-FP의 rA 부분을 잘라주고, 이로 인해 polymerase가 이후 부분부터 복제하여 상기 타겟 DNA가 복제될 수 있다.
- [0046] 반면, 도 3에 도시된 바와 같이, 상기 기준 염기 서열(CCACCA)을 갖는 상기 비타겟 DNA는 처음 상기 기준 PNA와 결합할 때 full match로 상보 결합할 수 있다. 이로 인해, 상기 기준 PNA 및 상기 비타겟 DNA의 결합력은 약 Tm $81^{\circ}C$ 이상이 되어 실질적으로 떨어지지 않을 수 있다. 따라서, 상기 기준 R-FP가 상기 비타겟 DNA와 일부 결합할 수 있지만, 상기 RNase H2가 작동할 수 있는 염기는 결합하지 못한다. 이로 인해, 증합효소 연쇄반응이 일어날 수 없다. 만일, 상기 비기준 DNA가 상기 기준 PNA와 결합하지 못하거나 상기 기준 PNA가 떨어졌다고 하더라도 상기 R-FP와 상기 비기준 DNA는 서로 RNA-DNA 결합이 상보결합을 하지 못하기 때문에, 상기 RNase H2가 기능하지 못한다. 따라서, 확률적으로 상기 기준 PNA가 상기 비타겟 DNA에 상보 결합하지 못하는 상황에서도, 상기 RNase H2가 선별적으로 상기 비타겟 DNA를 증폭하지 못할 수 있다.
- [0048] 이하, 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법의 구체적인 실험 예 및 특성 평가 결과가 설명된다.
- [0049] 실험 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법
- [0050] PNA는 (주)파나진(PANAGENE, 대전)에서 의뢰하여 주문 제작 하였고, 각종 타겟 DNA, 비타겟 DNA, R-FP, BP(backward primer), RNase H2 kit 는 IDT(Integrated DNA technology, CA, USA)에서 주문 제작되었다. PCR 증폭에 사용된 용액은 biorad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에서 구매되었다. Tris-ethylenediaminetetraacetic acid (Tris-EDTA) buffer, Tris-Borate EDTA buffer, 10X concentrate, and citrated plasma는 sigma aldrich에서 구매되었다.
- [0051] 모든 DNA들은 Tris-ethylenediaminetetraacetic acid (Tris-EDTA) buffer에 의해 $100\mu M$ 농도로 희석된 뒤, 각각 DI water 로 추가적으로 희석되었다. $5.2\text{ mU}/\mu L$ 농도의 RNase 효소와 $1\mu L$, $1\mu M$ 농도의 R-FP, BP 각각 $2\mu L$, $1\mu M$ 의 PNA $2\mu L$, target DNA $2\mu L$, iQTM SYBR® Green Supermix $10\mu L$ 를 넣고 총 용액이 $20\mu L$ 가 되도록 DI water를 채워주었다.
- [0052] 이후, CFX96TM/Dx real-time System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 PCR증폭을 실시하였고, 온도 구배는 다음과 같이 설정하였다. preconditioning으로 $95^{\circ}C$ 3분, step 1에서 $95^{\circ}C$ 10초, step 2에서 $65^{\circ}C$ 30초 진행하고 다시 step 1로 돌아가는 cycle을 설정하여 총 40 cycle을 시행하였다. 실험이 끝나면 그 결과를 CFX Maestro software를 사용하여 분석하였다.
- [0053] 또한, 전기영동 실험 진행을 위해, 전기영도 장비로 WSE-1710 Submerge-Mini (ATTO, Daejeon, Korea)를 사용하였다. TBE buffer에 agarose gel 6%농도로 주조하여 gel을 만들었고, 전기 영동 장치에서 150 V, 20분동안 전압을 가해준 뒤, Gel Doc(Gel Doc XR+ Gel Documentation System, BIORAD, Laboratories, Hercules, CA, USA)로 촬영하였다.
- [0054] 타겟 DNA가 존재하는 혈장샘플은 혈장(citrated plasma)에 타겟 DNA를 인위적을 넣어서 준비하였다. 그리고, Qiagen circulating nucleic acid kit를 사용하여 혈장에서 다시 타겟 DNA를 추출한 뒤에 PNA + RNase H2 검출

기법에 활용하였다.

[0056] PNA 길이별 선별 증폭 실험

[0057] PNA의 길이에 따라 선별 증폭의 효율이 달라질 수 있다. 이에 따라, PNA의 염기서열 수를 11개부터 14개로 제어 하면서, 증폭 과정을 수행하였다. 성능 평가는 실시간 PCR증폭을 했을 때 측정되는 Ct 값으로부터 대조군의 Ct 값과의 차이 값으로 ΔCt 를 산출하여 ΔCt 값이 가장 큰 것으로 선택하였다. 아래의 <표 1>에, PNA의 길이에 따른 염기서열과 PCR 증폭시, 나타난 ΔCt 값을 도시하였다.

표 1

[0058]

Name	Sequence	ΔCt
PNA 1	AGC TGG TGG CG /3SpC3/	0.3
PNA 2	GAG CTG GTG GCG /3SpC3/	8.4
PNA 3	GAG CTG GTG GCG T /3SpC3/	5.9
PNA 4	GGA GCT GGT GGC GT /3SpC3/	5.0
PNA 5	GGA GCT GGT GGC GTA /3SpC3/	0.8

[0060] <표 1>과 같이 PNA의 길이에 따라 PCR 증폭 시 선별적 증폭의 상대적 ΔCt 이 차이가 나타나는 것을 확인할 수 있다. 길이가 너무 짧을 경우 녹는점(T_m)이 낮아서 PNA가 제대로 타겟 DNA, 비타겟 DNA와 결합하지 못하고, 이로 인해, 타겟 DNA가 그대로 증폭이 된다. 또한, 너무 긴 PNA는 타겟 DNA와의 분리가 잘되지 않아서 타겟 DNA의 증폭 효율이 낮아서 비타겟 DNA대비 선별 증폭 효율이 낮은 것을 확인할 수 있다. 따라서 12bp의 길이의 PNA가 가장 적합한 길이와 T_m 을 가지는 것을 확인할 수 있다.

[0062] Annealing/extention 온도별 선별 증폭 실험

[0063] PNA가 타겟 DNA에서 분리되는 평균온도인 녹는점(melting temperature, T_m)는 65℃ 수준이고, 비타겟 DNA와 분리되는 T_m 은 80℃ 수준이다. PNA길이에 따라 차이가 있지만 두 DNA간의 온도차는 약 15℃이다. PCR 증폭 시, denaturing, annealing, extention 이렇게 세가지 단계로 구분될 수 있으며, denaturing 은 95° C에서 DNA를 모두 분리하는 작업이며, annealing 은 primer DNA와 증폭하고자 하는 DNA들이 서로 결합하는 구간으로 대개 55° C정도로 설정된다. 이 온도는 primer DNA들의 T_m 에 따라 설정이 변화될 수 있다. extention 온도는 일반적으로 72° C이지만, 사용하는 증폭 효소에 따라 조건이 바뀔 수 있다.

[0064] PCR에서 PNA를 사용하기 위해, 우선 annealing과 extention구간에서 타겟 DNA와 PNA는 용이하게 분리될 수 있지만 비타겟 DNA와 PNA는 용이하게 분리되지 않아야 한다. 이를 위해, annealing 온도를 65° C에서 설정하고, 또한 extention온도를 72° C로 설정하면 PNA와 타겟 DNA가 분리될 수 있어 extention온도가 65° C에서도 가능한 효소를 사용하였다. 그 예로 QTM SYBR® Green Supermix를 사용할 수 있고 이외 Ssoadvanced supermix 도 사용 가능하다.

[0065] 또한, 최적화를 위해 실험의 annealing/extention 온도를 65° C부터 변경해보면서 실험을 진행하였다. 실험군은 타겟 DNA의 증폭, 비타겟 DNA의 증폭, negative control 군으로 구성했고, 타겟 DNA의 증폭 신호와 비타겟 DNA의 증폭 신호 간의 차이가 극대화되는 실험을 최적화 조건으로 설정하였다.

[0066] 도 4는 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에서 annealing/extention 온도 조건에 따른 타겟 DNA와 비타겟 DNA의 Ct값이 차이를 나타내는 그래프이다.

[0067] 도 4를 참조하면, 65° C일 때 차이가 증폭 신호가 극대화되었고, 온도가 낮아지면, 증폭의 효율이 떨어지고, 온도가 높아지면 PNA가 비타겟 DNA로부터 분리되어 그 차이가 줄어드는 것을 확인할 수 있다.

[0069] PNA clamping + RNase H2 선별 증폭

[0070] 도 5는 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에 따른 증폭 후 전기 영동 이미지 및 증폭 결

과를 도시한 도면이다. 구체적으로, 도 5의 (a)는 전기 영동 이미지로 M은 marker DNA, 1번은 타겟 DNA, 2번은 타겟 DNA, PNA, 및 R-FP가 결합한 것이고, 3번은 타겟 DNA, PNA, 및 R-FP가 존재하는 상태에서 타겟 DNA의 PCR 증폭 후 결과이고, 4번은 타겟 DNA를 대신하여 비타겟 DNA를 제공한 결과이고, 5번은 타겟 DNA 없이 PNA 및 R-FP가 존재하는 조건에서 PCR 증폭 후의 결과이다.

[0071] 또한 도 5의 (b)는 도 5의 (a)의 3번, 4번, 5번의 실험의 실시간 PCR 증폭 결과이다. 빨간색은 타겟 DNA(3번 실험), 초록색은 비타겟 DNA(4번 실험), 검은색은 5번 실험에 대응된다.

[0072] 타겟 DNA는 빠르게 증폭되어 신호를 내지만, 비타겟 DNA는 신호가 현저하게 늦게 확인되며, 타겟 DNA 및 비타겟 DNA없는 5번의 실험은 신호가 거의 없는 것을 확인할 수 있다. 이를 통해, PNA와 R-FP를 이용하여, 타겟 DNA만 선별적으로 증폭할 수 있다는 것을 알 수 있다.

[0074] PNA clamping + RNase H2 기법의 검출한계 (limit of detection)

[0075] 도 6은 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에서 PNA 와 RNase를 사용하여 100 fM to 1 aM 의 KRAS c.35G>A을 증폭한 결과와 negative control(회색)을 나타내는 도면이다.

[0076] 도 6을 참조하면, 타겟 DNA를 농도별로 제작하여 각각의 농도에서 PNA + RNase H2 검출 기법으로 타겟 DNA의 증폭 신호를 관찰하였다. 타겟 DNA는 100fM에서 1aM까지 순차적으로 실험하였고, negative control 은 타겟 DNA를 0M 로 실험한 것이다.

[0077] 도 6의 (a)는 PCR장비에서의 실시간 형광 신호이며 도 6의 (b)는 도 6의 (a)에서의 negative control 대비 Ct 값의 상대값을 bar 그래프로 나타낸 것이다.

[0078] 도 6에서 확인할 수 있듯이, 1 aM 수준의 극 저농도에서도 타겟 DNA의 신호를 감지할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0080] 도 7은 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에서 PNA 와 RNase를 사용하여 100 fM to 1 aM 의 KRAS c.35G>A을 wtDNA 100fM이 존재하는 상황에서 증폭한 결과 와 negative control (wtDNA 100fM, 분홍색)을 나타내는 도면이다.

[0081] 도 7을 참조하면, 타겟 DNA를 검출할 때 비타겟 DNA가 일정농도 존재하면, 타겟 DNA의 검출을 방해하고, 또한 비타겟 DNA의 오류 증폭의 효과가 얼마나 영향을 미치는지 분석하였다.

[0082] 비타겟 DNA는 모든 실험에서 100fM 농도로 유지하며, 타겟 DNA는 100fM에서 1aM까지 순차적으로 실험하였다. 도 7의 (a)는 타겟 DNA의 농도별 실시간 PCR 형광 신호를 나타낸 것이며, 도 7의 (b)는 negative control 대비 상대적 Ct 값을 bar graph 로 나타낸 것이다. 본 실험에서 negative control은 100fM의 비타겟 DNA만 들어있는 경우이다.

[0083] 실험 결과, 타겟 DNA가 10aM 농도가 있을 때까지 비타겟 DNA 100 fM의 신호는 구별이 가능했다. 따라서 타겟 DNA 10aM 과 비타겟 DNA 100fM은 1:10000의 비율을 가짐으로, 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법이 0.01%의 선택적 검출을 할 수 있음을 알 수 있다.

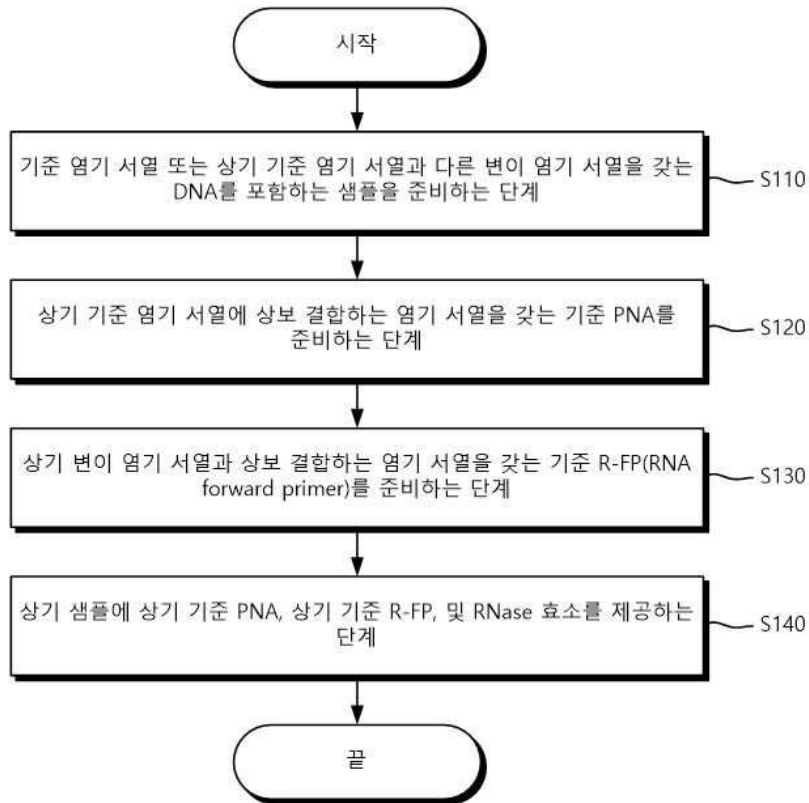
[0085] 도 8은 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에서 PNA 와 RNase를 사용하여 KRAS 단일염기 변이 검출 결과 및 전기 영동 이미지를 나타내는 도면이다.

[0086] 도 8을 참조하면, 타겟 DNA의 종류 중, KRAS co.35 G12D(G>A), KRAS co.35 G12V(G>T), KRAS co.35 G12A(G>C)를 각각 증폭한 결과를 도시하였다. KRAS co.35 G12D(G>A)는 도 5 및 도 6에서 사용되었던 타겟 DNA이다. KRAS co.35 G12V(G>T), KRAS co.35 G12A(G>C)도 마찬가지로 각각의 R-FP를 사용하면 선별적으로 증폭할 수 있음을 확인할 수 있다. KRAS co.35 G12V(G>T)에는 R-FP(2), KRAS co.35 G12A(G>C)에는 R-FP(3)이 사용되었다. 결론적으로, 본 출원의 실시 예에 따라 PNA 및 RNase를 이용한 단일 염기 서열 변이 검출 방법은 R-FP의 타입에 따라 각각의 타겟 DNA의 종류까지 구별할 수 있음을 확인할 수 있다.

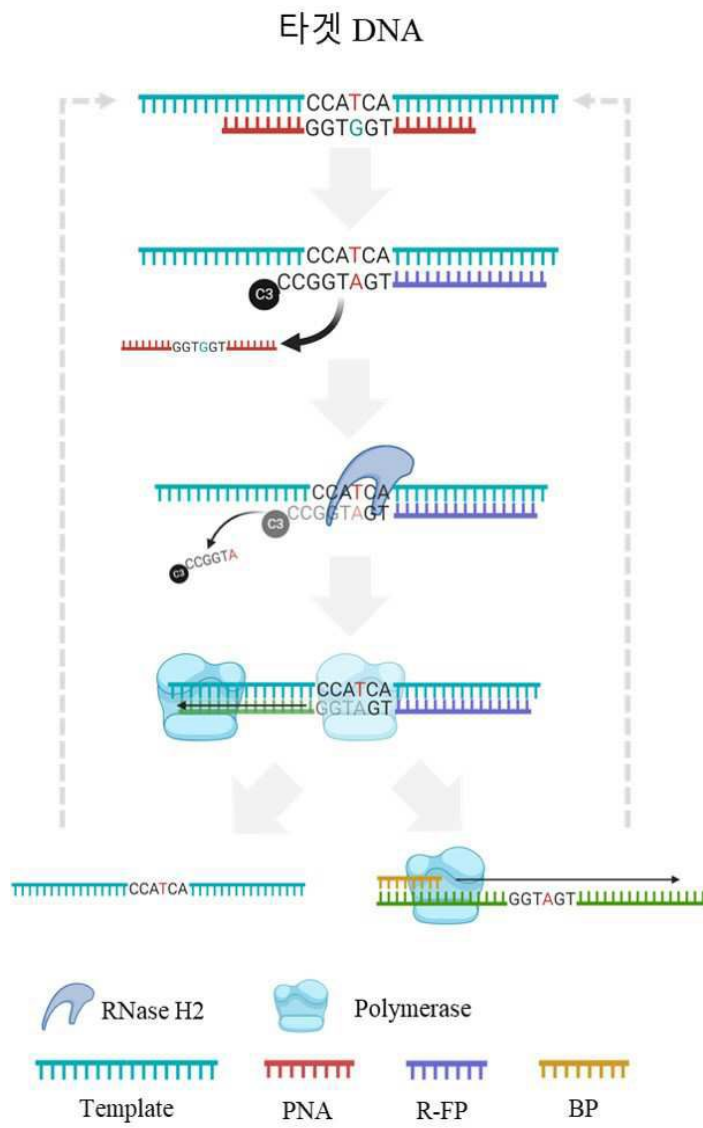
- [0088] 도 9는 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에서 KRAS 단일 염기 서열을 검출한 실시간 증폭 그래프 및 대조군과 비교한 상대적 ΔCt 값을 나타내는 도면이다.
- [0089] 도 9를 참조하면, citrated plasma(혈장)에 타겟 DNA를 제공하고, 다시 혈장을 Qiagen circulating nucleic acid kit로 분리하고 타겟 DNA를 추출한 용액에서 PNA 및 RNase H기법으로 증폭하였다. 도 9의 (a)의 보라색이 혈장샘플로 실험한 것이고, 붉은색과 회색은 각각 동일 농도의 순수 타겟 DNA 증폭 실험과 타겟 DNA 0 M에 대해서 실험 후 비교한 것이다. 도 9의 (b)는 도 9의 (a)의 negative control 실험과 상대적 Ct 값을 bar graph로 표현한 것이다.
- [0090] 도 9에서 알 수 있듯이, 혈장샘플로 실험한 결과, 순수 타겟 DNA 실험 결과와 비교하여 비슷하지만, 결과 값에 차이가 일부 발생하였으며, 이는 DNA추출 과정에서 발생하는 약간의 DNA 손실 때문인 것으로 파악된다. 하지만, 추정된 농도에 상응하는 타겟 DNA 0M 실험 대비 상대적 Ct 값이 농도 범위안에 들어오는 것으로 보아 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법이 혈장 샘플에서도 정상적으로 작동할 수 있음을 알 수 있다.
- [0092] 도 10은 본 출원의 실험 예들에서 사용된 DNA 염기 서열을 나타내는 도면이다.
- [0094] 도 11은 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에서 PNA 결합을 간접적으로 확인한 그래프이다.
- [0095] 도 11을 참조하면, 도 11의 (a)는 PNA가 존재하는 경우이고, 도 11의 (b)는 PNA가 존재하지 않는 경우이다.
- [0096] PNA가 비타겟 DNA와 결합했을때, PNA와 DNA사이에는 sybr 형광분자가 발광을 못하게 된다. 이에 따라, 온도가 점점 증가하는 경우, DNA-DNA사이의 sybr 형광분자의 신호가 서서히 줄어들면서 도 11에 도시된 바와 같이, peak 가 증가하며, 비타겟 DNA의 경우 PNA가 존재하는 조건에서 더 빠르게 상승이 시작되는 것을 확인할 수 있다. 즉, PNA가 비타겟 DNA와 결합되는 경우, sybr 형광분자의 소멸이 더 빨리 시작되는 것을 알 수 있다.
- [0098] 도 12는 본 출원의 실시 예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에서 Tm과 design에 따른 성능의 차이를 나타내는 그래프이다.
- [0099] 도 12를 참조하면, PNA의 Tm(Melting temperature)는 비타겟 DNA와 타겟 DNA간의 차이가 약 15℃인 것을 감안하여, primer DNA의 Tm을 타겟 DNA-PNA간의 Tm과 유사한 온도로 설정해야 한다. 만일 PNA의 Tm이 너무 낮으면, 비타겟 DNA와 타겟 DNA모두 PNA와 분리되어 선별적 증폭이 안될 수 있다. 또한, Tm이 너무 높으면 타겟 DNA 및 비타겟 DNA 모두 증폭을 억제하여 증폭이 되지 않는다.
- [0100] RNase의 경우, 온도에 따라 크게 성능의 차이가 나지는 않지만, 높은 온도일수록 효율이 증가할 수 있으며, 너무 낮은 온도에서는 R-FP의 RNA와 비타겟 DNA의 염기가 mismatch임에도 불구하고 결합할 가능성이 있다. 이 경우, DNA결합은 수소 결합이고, 수소결합은 온도, pH에 따라 바뀔 수 있으므로, RNase 가 오작동하여 비타겟 DNA도 증폭할 수 있다. 따라서, 적당히 높은 온도가 있어야 RNA-DNA의 mismatch가 확실해지고, RNase 역시 오작동하지 않게 된다.
- [0101] 또한 너무 높은 온도에서 RNase를 작동시키면, primer 들의 결합력이 떨어져서 증폭의 효율이 굉장히 저하된다. 따라서 RNase가 용이하게 작동하는 온도를 최적화할 필요가 있다.
- [0103] 이상, 본 발명을 바람직한 실시 예를 사용하여 상세히 설명하였으나, 본 발명의 범위는 특정 실시 예에 한정되는 것은 아니며, 첨부된 특허청구범위에 의하여 해석되어야 할 것이다. 또한, 이 기술분야에서 통상의 지식을 습득한 자라면, 본 발명의 범위에서 벗어나지 않으면서도 많은 수정과 변형이 가능함을 이해하여야 할 것이다.

도면

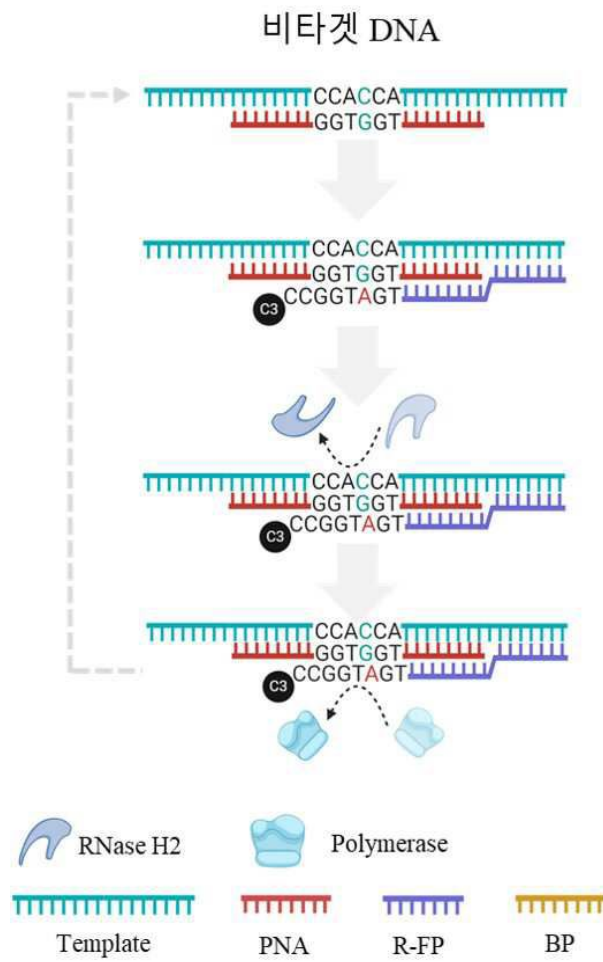
도면1



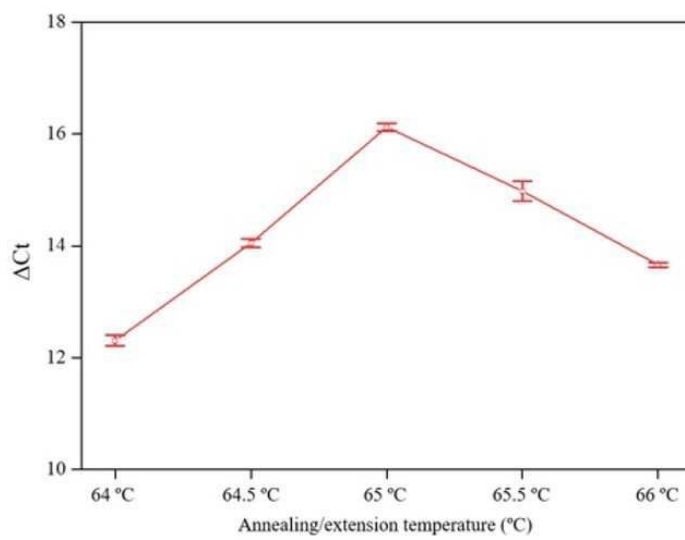
도면2



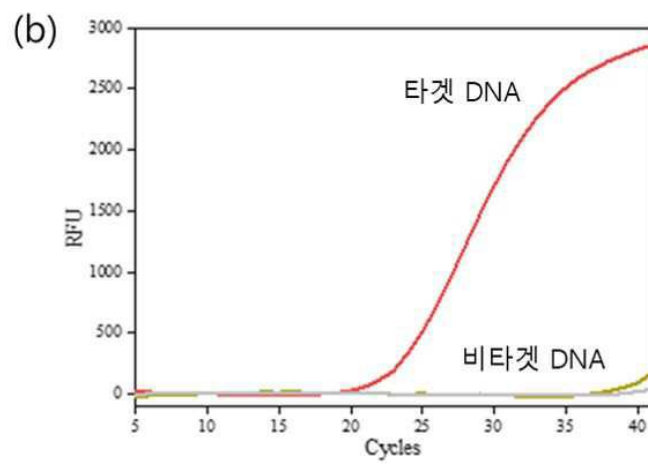
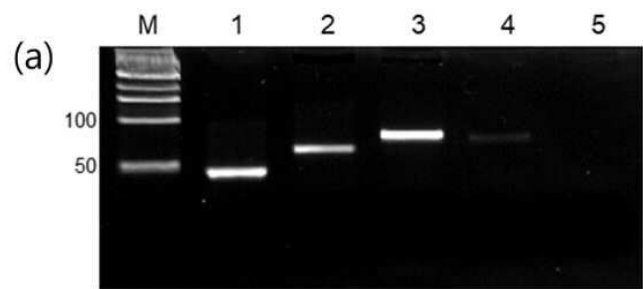
도면3



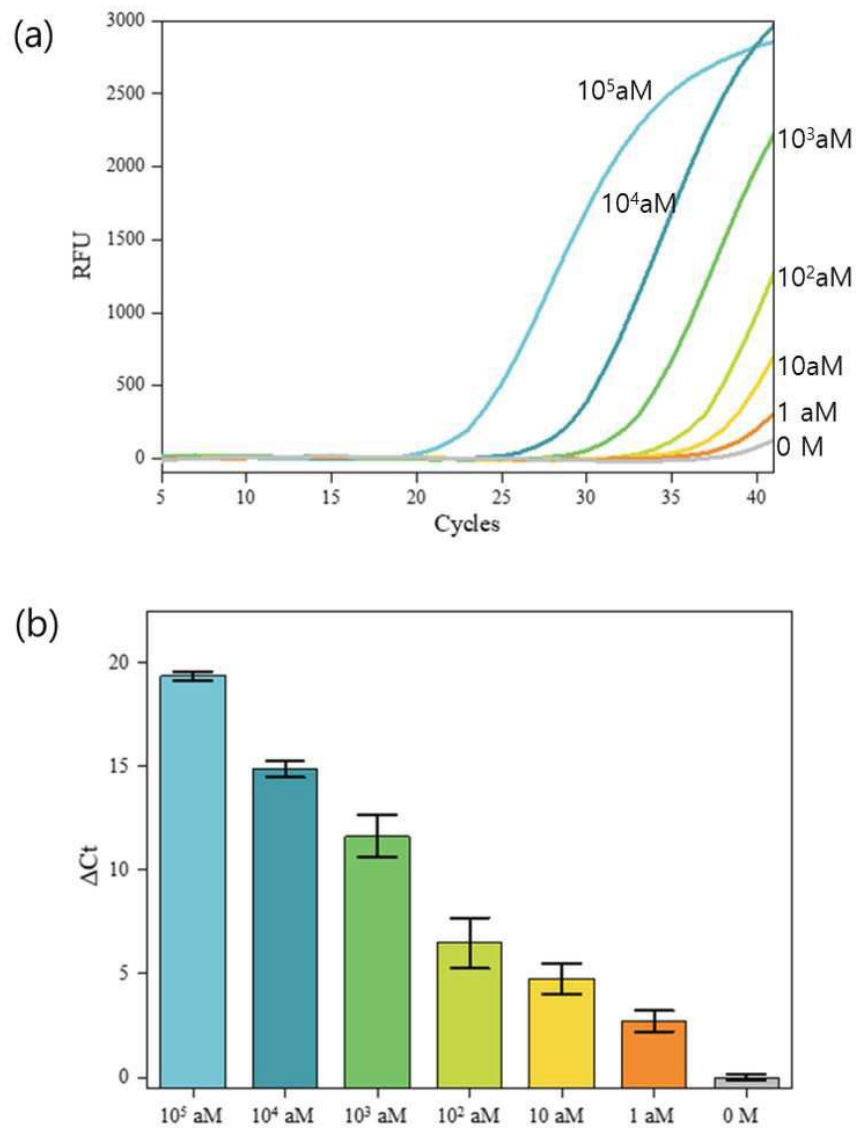
도면4



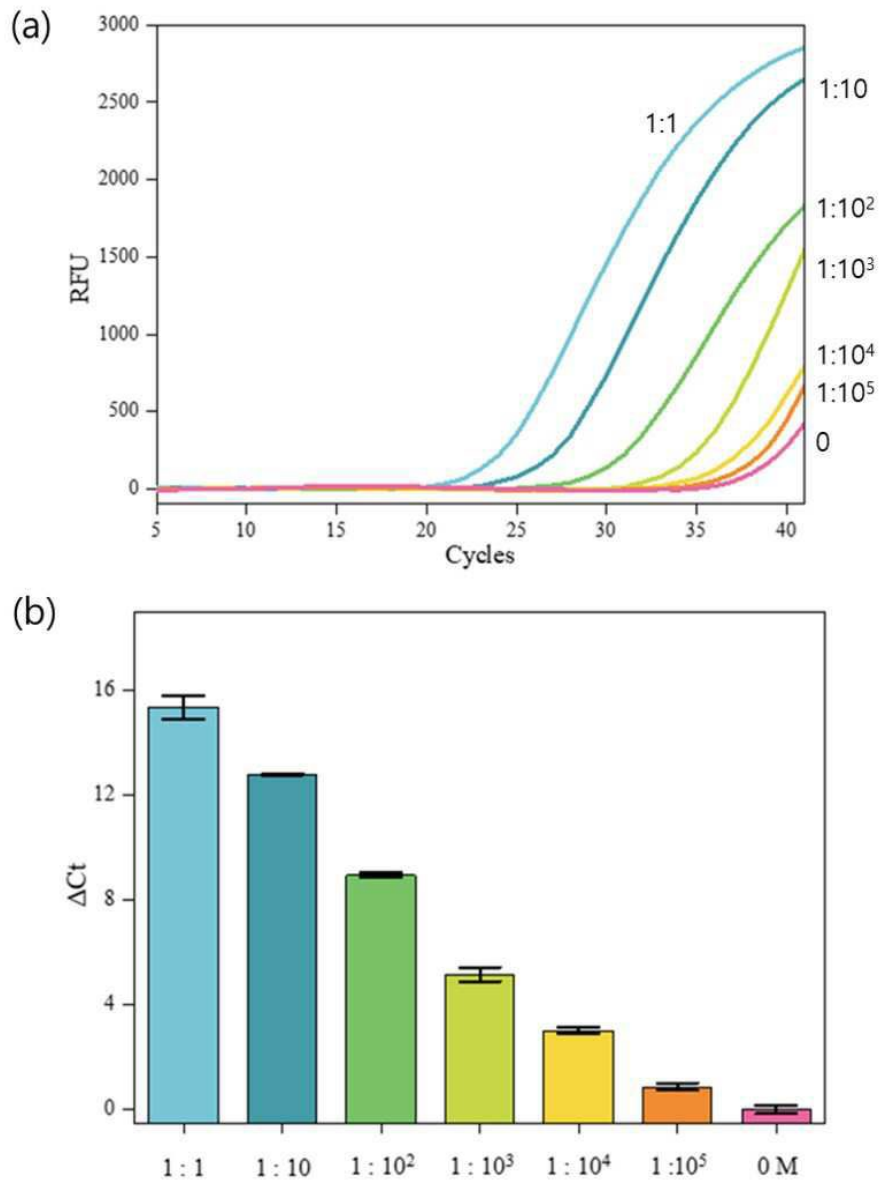
도면5



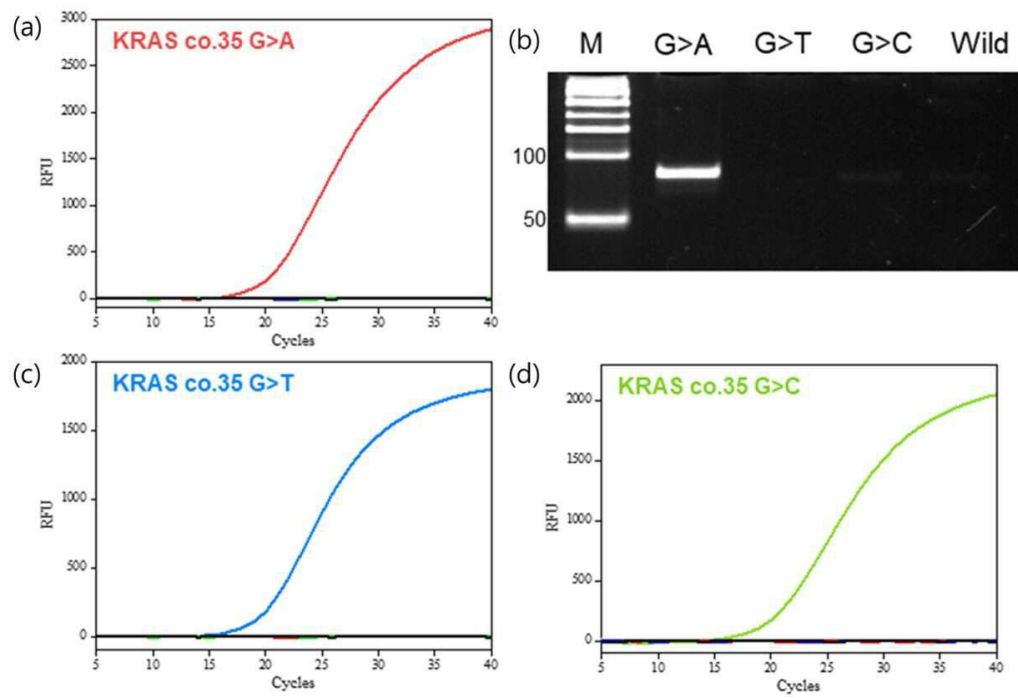
도면6



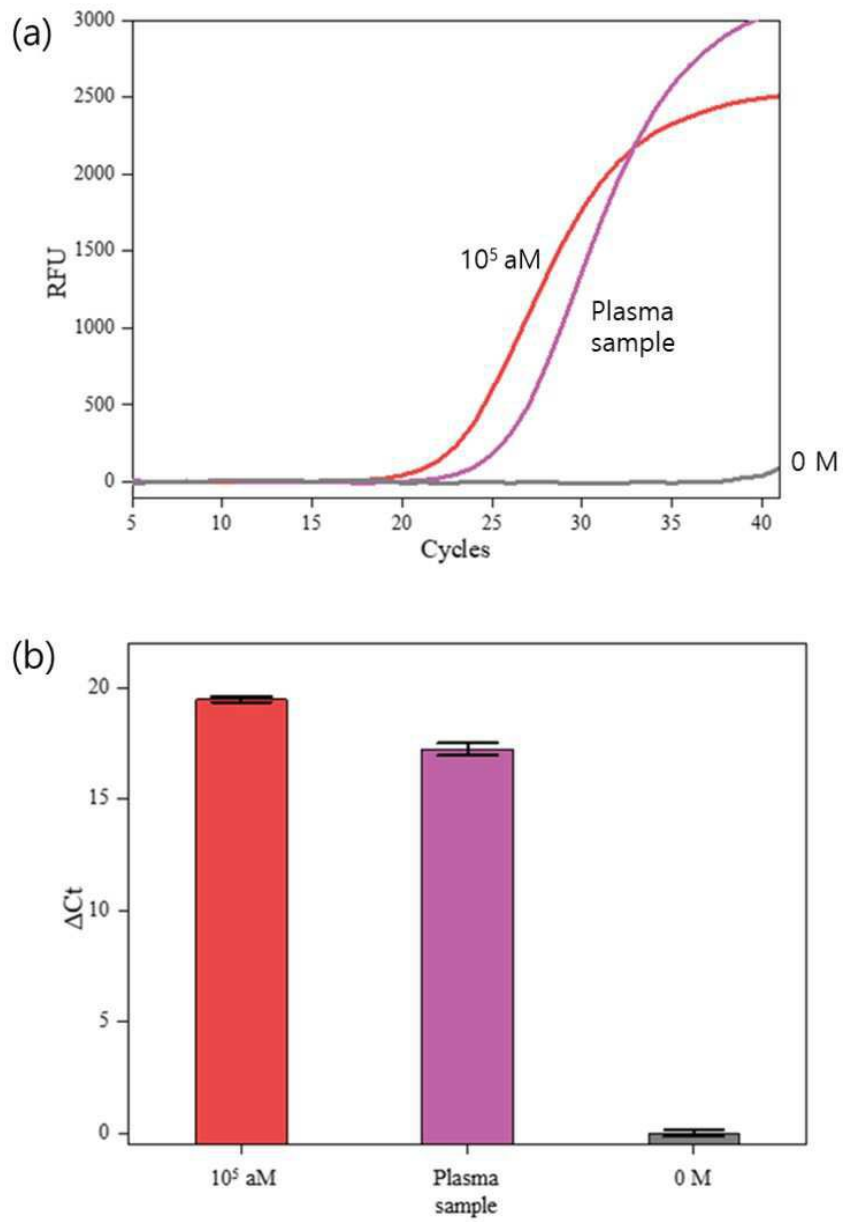
도면7



도면8



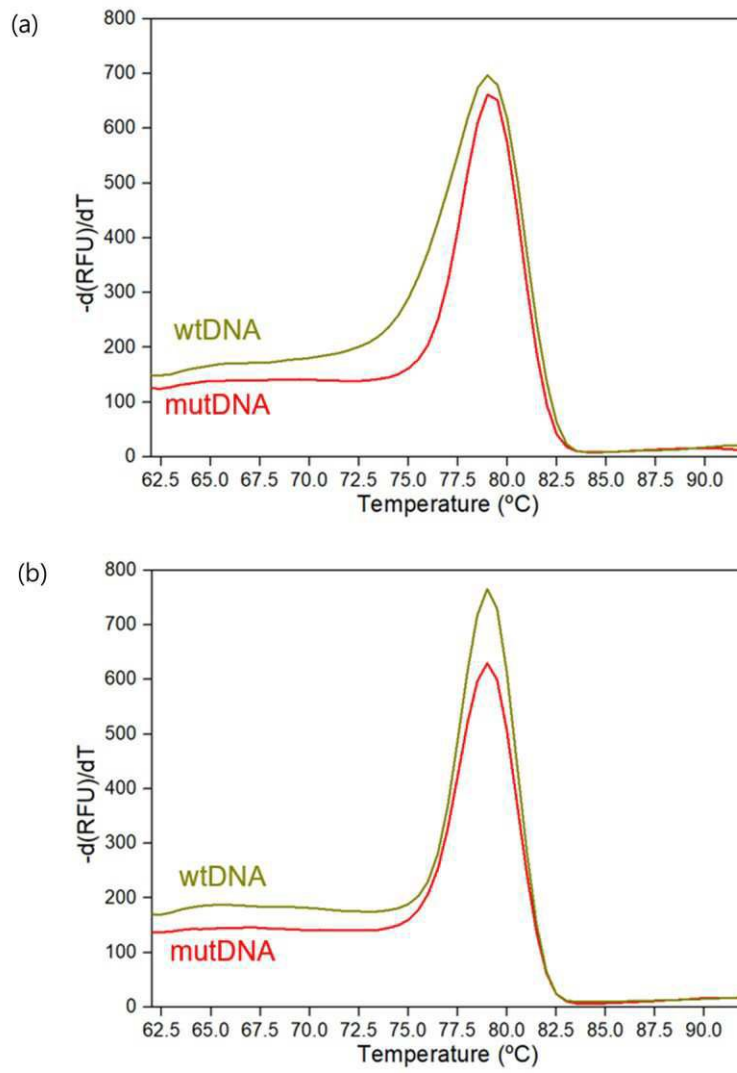
도면9



도면10

Name	Sequences (5' → 3')
KRAS C.35 G>A (mmdNA), G11D	ACT TGT GGT AGT TGG AGC TGA TGG TGG CGT AGG CAA GAG TGC CTT GAC GAT ACA GGT AAT TCA GAA TCA TTT TGT GGA C
KRAS C.35 G>T (mmdNA), G12V	ACT TGT GGT AGT TGG AGC TGT TGG TGG CGT AGG CAA GAG TGC CTT GAC GAT ACA GGT AAT TCA GAA TCA TTT TGT GGA C
KRAS C.35 G>C (mmdNA), G12A	ACT TGT GGT AGT TGG AGC TGC TGG TGG CGT AGG CAA GAG TGC CTT GAC GAT ACA GGT AAT TCA GAA TCA TTT TGT GGA C
KRAS C.35 G (wtDNA)	ACT TGT GGT AGT TGG AGC TGG TGG TGG CGT AGG CAA GAG TGC CTT GAC GAT ACA GGT AAT TCA GAA TCA TTT TGT GGA C
Backward Primer (BP)	GTC CAC AAA ATG ATT CTG AATTAG C
RNA Forward Primer 1 (R-FP1)	ACT TGT GGT AGT TGG AGC TG TA TGG CC / 35pc3/
RNA Forward Primer 2 (R-FP2)	ACT TGT GGT AGT TGG AGC TG AT TGG CC / 35pc3/
RNA Forward Primer 3 (R-FP3)	ACT TGT GGT AGT TGG AGC TG TC TGG CC / 35pc3/
PNA clamp ²	GAG CTG GTG GCG / 35pc3/

도면11



도면12

