

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 12월 28일 (28.12.2017) **WIPO | PCT**



(10) 국제공개번호
WO 2017/222164 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) *G06F 19/20* (2011.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/004749

(22) 국제출원일: 2017년 5월 8일 (08.05.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2016-0076308 2016년 6월 20일 (20.06.2016) KR

(71) 출원인: 한국표준과학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF STANDARDS AND SCIENCE) [KR/KR]; 34113 대전시 유성구 가정로 267(가정동), Daejeon (KR).

(72) 발명자: 김세일 (KIM, Seil); 34113 대전시 유성구 가정로 267(가정동), Daejeon (KR).

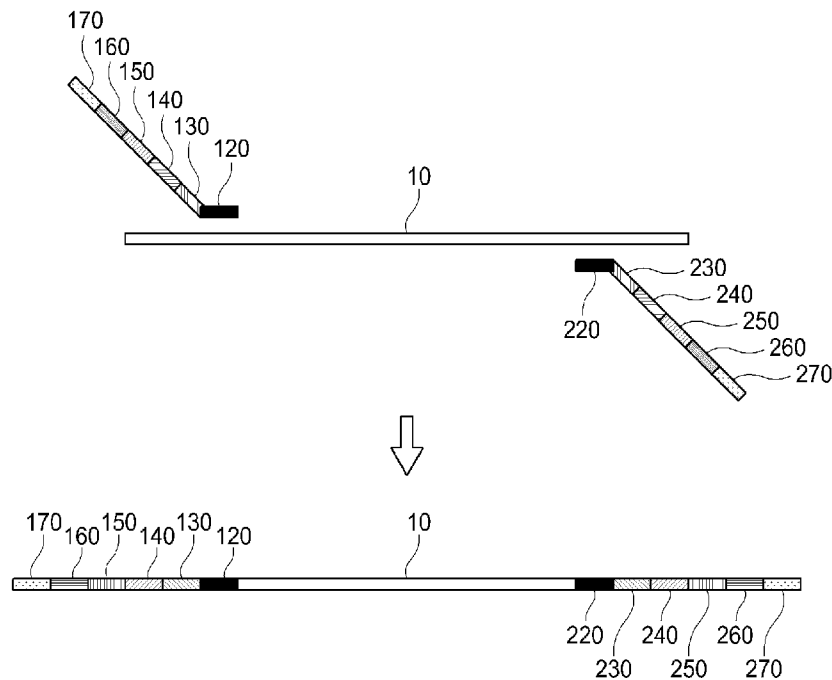
(74) 대리인: 특허법인 주원 (B&IP-JOOWON PATENT AND LAW FIRM); 06050 서울시 강남구 언주로 711, 건설회관 9층 (논현동), Seoul (KR).

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

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

(54) Title: LIBRARY PRIMER SET FOR SEQUENCING AND METHOD FOR PREPARING LIBRARY

(54) 발명의 명칭: 염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트 및 라이브러리 제조방법



(57) Abstract: The present invention relates to: a library primer set for sequencing, comprising fusion primers for amplifying genes; and a method for preparing a library, and more particularly, to: a primer set used in preparing, through a simplified process at high-speed, a sequencing library of target genes to be analyzed through next generation sequencing; and a method for preparing a library by using the same.

[다음 쪽 계속]



WO 2017/222164 A1

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 염기서열분석을 위한 유전자 증폭용 융합 프라이머를 포함하는 라이브러리용 프라이머 세트 및 상기 라이브러리의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 차세대 염기서열 분석을 통해 분석하고자 하는 목표 유전자의 시퀀싱 라이브러리를 고속으로 간소화된 과정을 통해 제조하는 데 사용되는 프라이머 세트 및 이를 이용한 라이브러리 제조방법에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트 및 라이브러리 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 염기서열분석을 위한 유전자 증폭용 융합 프라이머를 포함하는 라이브러리용 프라이머 세트 및 상기 라이브러리의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 차세대 염기서열 분석을 통해 분석하고자 하는 목표 유전자의 시퀀싱 라이브러리를 고속으로 간소화된 과정을 통해 제조하는 데 사용되는 프라이머 세트 및 이를 이용한 라이브러리 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 차세대 염기서열 분석기술(next generation sequencing: NGS)은 수백만에서 수천만 이상의 대량의 염기서열을 한 번에 획득하는 기술로서 유전체 연구, 미생물 다양성 연구 등 여러 분야에서 사용되고 있다.
- [3] 현재 일루미나(Illumina)사의 마이섹(Miseq), 하이섹(Hiseq), 넥스트섹(Nextseq)등의 차세대 염기서열 분석기와 퍼시픽바이오사이언스(Pacific bioscience)사의 시퀀(Sequel) 차세대 염기서열 분석기 및 라이프테크놀로지스(Life technologies)사의 아이온 피규엠(Ion PGM), 아이온 프로톤(Ion Proton)등 차세대 염기서열 분석기가 개발되어 사용되고 있다.
- [4] 이러한 차세대 염기서열 분석을 통해 염기서열정보를 획득하기 위해서는 유전체, 전사체 혹은 목표 유전자가 차세대 염기서열 분석기에 사용될 수 있도록 일련의 과정을 거쳐야 하는데 이러한 과정을 시퀀싱 라이브러리 준비(sequencing library preparation)라고 한다.
- [5] 일루미나사의 염기서열 분석기의 시퀀싱 라이브러리는 특정 목표 유전자의 염기서열을 얻고자 하는 경우 연쇄중합효소반응(polymerase chain reaction: PCR)을 통한 특정 목표 유전자의 증폭, 증폭된 유전자(amplicon)의 정제, 정제된 유전자에 특정 시료에서 증폭된 것임을 표지할 수 표지염기서열과 플로우셀(flow cell)에 결합되어 있는 프라이머에 상보적으로 결합하는 제 1 어댑터 및 차세대 염기서열 분석기용 시퀀싱 프라이머와 상보적으로 결합하는 제 2 어댑터 염기서열을 붙여주는 과정, 표지염기서열 및 어댑터 염기서열이 결합된 유전자의 정제과정을 거치게 된다(16S Metagenomic Sequencing Library Preparation, Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System, Part # 15044223 Rev. B). 일루미나사의 설명에 의하면 이러한 과정은 자동화를 통할 경우 6.5 시간에서 10 시간 혹은 하루 이내의 시간이 소요된다. 또한 각 과정을 진행하는 동안 목표 유전자의 손실 및 왜곡이 발생하므로 가능한 이를 최소화하는 것이 정확한 염기서열정보를 얻는데 필요하다.
- [6] 바이우 사이언티픽(BIOO scientific)에서 출시한 시퀀싱 라이브러리 제조법은

일루미나사의 제조법보다 상대적으로 적은 시간이 소모되나 두 번의 연쇄증합효소반응과 두 번의 정제과정이 필요하다 (NEXTflex™ Metagenomics Application for Sciclone NGS Workstation, (Compatible with NEXTflex™ 16S V1-V3 Amplicon-Seq Kit, NEXTflex™ 16S V4 Amplicon-Seq Kit 2.0, and NEXTflex™ 18S ITS Amplicon-Seq Kit) ©Bioo Scientific Corp. 2016 V16.02).

- [7] 준비된 시퀀싱 라이브러리는 정량과정을 통하여 그 양이 측정되며 염기서열 분석에 필요한 최적의 양으로 차세대 염기서열 분석기의 분석대상이 된다.
- [8] 한편, 특정 목표 유전자를 대상으로 차세대 염기서열 분석을 하는 대표적인 분야 중 하나는 미생물 생태학으로써 최근에 다양한 질병과 관련이 있는 것으로 밝혀진 인간 미생물군집체 분석이나 자연환경이나 미생물 이용 하수처리장 등의 미생물군집 구조 분석등 여러 분야에서 해당 기술이 활용되고 있다. 비만과 같은 영양성분과 관련된 질환을 포함하여 당뇨병, 자가면역질환 등 미생물과 직접 관계가 없을 것이라고 여겨졌던 질병들도 미생물 군집과 연관이 있음이 알려지게 되었고 이러한 중요성에 주목한 선진국에서는 인간 미생물 군집체 프로젝트 (Human Microbiome Project) 등 다양한 연구를 진행하고 있다. 이러한 미생물 생태 연구 시 주로 분류학적 지표 유전자인 16S rRNA 유전자를 활용하게 되는데 기존에는 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 주 원리로 하는 로슈사의 차세대 염기서열 분석기를 주로 활용하였으나 해당 분석기는 2016년에 단종이 예정되어 있어 현재는 대부분 디엔에이 클러스터 (DNA cluster) 혹은 디엔에이 콜로니 (DNA colony)를 주 원리로 하는 일루미나사의 마이썸 기종으로 분석이 진행되고 있다. 이러한 미생물 군집 분석은 지표 유전자의 염기서열을 획득하여 전체 획득 염기서열 숫자 대비 특정 미생물 유래 지표 유전자 염기서열을 비교하여 시료 내의 특정 미생물의 구성 비율을 추정하는 것이다. 이는 실제 시료 내의 미생물 구성 비율과 연쇄증합효소반응을 통한 증폭된 미생물 유래 지표 유전자의 구성비 사이가 동일하거나 유사하다는 것을 전제로 분석이 진행되는 것이기 때문에 시료내 실제 미생물과 증폭된 미생물의 지표 유전자간의 왜곡이 최소화되어야 한다. 이러한 왜곡은 연쇄증합효소반응, 시료의 정제과정 등에서 발생하는 것으로 알려져 있다. 과거에는 이러한 왜곡을 최소화하고 간편하고 고속으로 시퀀싱 라이브러리를 제조하기 위하여 로슈사 분석기용 융합프라이머를 제조하여 사용하였으나 로슈사 분석기의 시퀀싱 라이브러리는 에멀전 연쇄증합효소반응(emulsion-PCR: em-PCR)을 통해 증폭되는 반면 일루미나의 분석기는 플로우셀에 양쪽 프라이머가 고정되어 있어서 브릿지 연쇄증합효소반응으로 증폭되며 염기서열 분석원리도 다르기 때문에 로슈의 차세대 염기서열 분석기용 융합 프라이머를 일루미나의 차세대 염기서열 분석기에 적용할 수 없다. 따라서 전술한 바와 같이 현재는 일루미나의 차세대분석기용으로 증폭된 유전자의 시퀀싱 라이브러리를 제조하기 위해서는 증폭된 유전자에 추가적으로 플로우셀에 고정된 프라이머와 상보적으로 결합할 수 있는 어댑터를 붙여주는 과정이 필수적으로 필요하다. 이 때문에 현재

사용되고 있는 시퀀싱 라이브러리 제조방법은 많은 시간이 소모되고
중간과정이 많아 비숙련자의 시행이 어려울 뿐만 아니라 시료의 왜곡이나 손실
위험이 커, 이에 대한 해결이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서,
중간과정을 최소화하여 시료의 손실과 왜곡을 최소화하고 간단하고 빠르게
시퀀싱 라이브러리를 제조할 수 있도록, 염기서열분석을 위한 유전자 증폭용
융합 프라이머를 포함하는 라이브러리용 프라이머 세트를 제공하는 것을 그
목적으로 한다.
- [10] 또한, 본 발명은 차세대 염기서열 분석을 통해 분석하고자 하는 목표 유전자의
시퀀싱 라이브러리를 고속으로 간소화된 과정을 통해 제조하는 제조방법을
제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [11] 상술한 바와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 염기서열분석을 위한
라이브러리용 프라이머 세트는
- [12] 플로우셀 (flow cell)에 고정된 전방 올리고(oligo)와 결합하는 제 1 전방 어댑터,
전방 시퀀싱 프라이머와 결합하는 제 2 전방 어댑터, 및 목표 유전자의 전방
유전자와 결합하는 전방 유전자 특이적 서열을 나열된 순으로 포함하는 전방
프라이머; 및
- [13] 플로우셀 (flow cell)에 고정된 후방 올리고(oligo)와 결합하는 제 1 후방 어댑터,
후방 시퀀싱 프라이머와 결합하는 제 2 후방 어댑터, 및 목표 유전자의 후방
유전자와 결합하는 후방 유전자 특이적 서열을 나열된 순으로 포함하는 후방
프라이머를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [14] 또한, 본 발명의 염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트는 제 2 전방
어댑터와 전방 유전자 특이적 서열 사이에 서열 다양성 향상을 위한 전방
혼합공간서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [15] 또한, 본 발명의 염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트는 제 2 후방
어댑터와 후방 유전자 특이적 서열 사이에 서열 다양성 향상을 위한 후방
혼합공간서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [16] 또한, 본 발명의 염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트는 제 1 전방
어댑터와 전방 유전자 특이적 서열 사이, 구체적으로 제 1 전방 어댑터와 제 2
전방 어댑터 사이, 제 2 전방 어댑터와 전방 혼합공간서열 사이, 및 전방
혼합공간서열과 전방 유전자 특이적 서열 사이로 이루어진 군에서 선택된
위치에, 샘플의 유래 확인을 용이하게 하는 전방 표지인식서열을 추가로 포함할
수 있다.
- [17] 또한, 본 발명의 염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트는 제 1 후방

어댑터와 후방 유전자 특이적 서열 사이, 구체적으로 제 1 후방 어댑터와 제 2 후방 어댑터 사이, 제 2 후방 어댑터와 후방 혼합공간서열 사이, 및 후방 혼합공간서열과 후방 유전자 특이적 서열 사이로 이루어진 군에서 선택된 위치에, 샘플의 유래 확인을 용이하게 하는 후방 표지인식서열을 추가로 포함할 수 있다.

[18] 또한, 본 발명의 염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트는 전방 혼합공간서열과 전방 유전자 특이적 서열 사이에 전방 링커를 추가로 포함할 수 있다.

[19] 또한, 본 발명의 염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트는 후방 혼합공간서열과 후방 유전자 특이적 서열 사이에 후방 링커를 추가로 포함할 수 있다.

[20] 또한, 제 1 전방 어댑터는 서열번호 1의 서열일 수 있다.

[21] 또한, 제 1 후방 어댑터는 서열번호 2의 서열일 수 있다.

[22] 또한, 전방 표지인식서열은 서열번호 3 내지 10 중 어느 한 서열일 수 있다.

[23] 또한, 후방 표지인식서열은 서열번호 11 내지 22 중 어느 한 서열일 수 있다.

[24] 또한, 전방 혼합공간서열 또는 후방 혼합공간서열을 구성하는 염기는

[25] (조건 1) 전방 혼합공간서열을 구성하는 염기는 부재하거나 1 내지 23개이고, 후방 혼합공간서열을 구성하는 염기는 부재하거나 1 내지 15임, 또는

[26] (조건 2) 전방 혼합공간서열을 구성하는 염기는 부재하거나 1 내지 15개이고, 후방 혼합공간서열을 구성하는 염기는 부재하거나 1 내지 23임을 만족할 수 있다.

[27] 한편, 본 발명의 염기서열분석용 라이브러리의 제조방법은

[28] (A) 플로우셀 (flow cell)에 고정된 전방 올리고(oligo)와 결합하는 제 1 전방 어댑터, 전방 시퀀싱 프라이머와 결합하는 제 2 전방 어댑터, 및 목표 유전자의 전방 유전자와 결합하는 전방 유전자 특이적 서열을 나열된 순으로 포함하는 전방 프라이머; 및 플로우셀 (flow cell)에 고정된 후방 올리고(oligo)와 결합하는 제 1 후방 어댑터, 후방 시퀀싱 프라이머와 결합하는 제 2 후방 어댑터, 및 목표 유전자의 후방 유전자와 결합하는 후방 유전자 특이적 서열을 나열된 순으로 포함하는 후방 프라이머를 분석하고자 하는 염기서열의 양단에 결합시키는 단계,

[29] (B) 상기 전방 프라이머 및 후방 프라이머가 양단에 결합된 염기서열을 연쇄증합효소반응으로 증폭시키는 단계, 및

[30] (C) 상기 증폭된 염기서열을 정제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[31] 또한, 본 발명의 염기서열분석용 라이브러리의 제조방법은 제 2 전방 어댑터와 전방 유전자 특이적 서열 사이에 서열 다양성 향상을 위한 전방 혼합공간서열을 추가로 포함할 수 있다.

[32] 또한, 본 발명의 염기서열분석용 라이브러리의 제조방법은 제 2 후방 어댑터와 후방 유전자 특이적 서열 사이에 서열 다양성 향상을 위한 후방 혼합공간서열을

추가로 포함할 수 있다.

- [33] 또한, 본 발명의 염기서열분석용 라이브러리의 제조방법은 제 1 전방 어댑터와 전방 유전자 특이적 서열 사이, 구체적으로 제 1 전방 어댑터와 제 2 전방 어댑터 사이, 제 2 전방 어댑터와 전방 혼합공간서열 사이, 및 전방 혼합공간서열과 전방 유전자 특이적 서열 사이로 이루어진 군에서 선택된 위치에, 샘플의 유래 확인을 용이하게 하는 전방 표지인식서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [34] 또한, 본 발명의 염기서열분석용 라이브러리의 제조방법은 제 1 후방 어댑터와 후방 유전자 특이적 서열 사이, 구체적으로 제 1 후방 어댑터와 제 2 후방 어댑터 사이, 제 2 후방 어댑터와 후방 혼합공간서열 사이, 및 후방 혼합공간서열과 후방 유전자 특이적 서열 사이로 이루어진 군에서 선택된 위치에, 샘플의 유래 확인을 용이하게 하는 후방 표지인식서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [35] 또한, 본 발명의 염기서열분석용 라이브러리의 제조방법은 상기 증폭시키는 단계 및 정제하는 단계를 각각 1 회씩만 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [36] 본 발명의 시퀀싱 라이브러리 제조방법을 이용할 경우 종래 두 번 이상 수행해야 했던 연쇄중합효소반응과 핵산정제과정을 각각 한 번씩만 수행하는 것이 가능해졌다. 그 결과 주형을 증폭하는 시간까지 포함하여 약 2 시간 내외로 라이브러리를 제조할 수 있게 되었다.
- [37] 또한, 본 발명으로 제조한 시퀀싱 라이브러리는 일루미나사의 차세대 염기서열 분석기 뿐만 아니라 그와 동일한 원리를 이용하는 분석기에도 사용할 수 있다.
- [38] 또한 공정을 최소화하여 염기서열 분석결과의 왜곡 발생 가능성을 최소화하였으며 기존 제조방법보다 간단하게 시퀀싱 라이브러리를 제조하는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [39] 도 1은 종래 프라이머를 활용한 시퀀싱 라이브러리의 제조공정을 나타내는 개념도이다.
- [40] 도 2는 본 발명의 융합 프라이머를 활용한 시퀀싱 라이브러리의 제조공정의 일 실시예를 나타내는 개념도이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [41] 이하, 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 또한, 하기의 설명에서는 구체적인 구성요소 등과 같은 많은 특정사항들이 설명되어 있는데, 이는 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐 이러한 특정사항들 없이도 본 발명이 실시될 수 있음은 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명하다 할 것이다. 그리고, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 혹은 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [42] 본 발명에서는 상술한 바와 같은 목적을 달성하기 위하여, 융합 프라이머를

이용하여 한번의 연쇄중합효소반응과 한번의 정제과정을 거쳐 시퀀싱 라이브러리를 제조한다. 융합 프라이머는 전방 프라이머와 후방 프라이머로 이루어져 있으며, 각각의 프라이머는 다시 플로우셀 (flow cell)에 고정된 올리고(oligo)와 결합하는 제 1 어댑터 (170, 270), 샘플의 유래 확인을 용이하게 하는 표지인식서열 (160, 260), 시퀀싱 프라이머와 결합하는 제 2 어댑터 (150, 250), 서열 다양성 향상을 위한 혼합공간서열 (140, 240), 주형 (10)과 결합하는 유전자 특이 염기서열 (120, 220), 유전자 특이 염기서열 (120, 220)을 나머지 서열과 연결하는 링커 (130, 230)를 포함한다. 표지 인식이 필요하지 않을 경우 표지인식서열 (160, 260)은 제외될 수 있으며 자체 제작 시퀀싱 프라이머를 사용할 경우 제 2 어댑터 (150, 250)는 변경될 수 있다. 링커 (130, 230)는 목표 유전자 특이 염기서열과 그외의 부분을 연결시켜 주는 염기서열로써 염기서열의 구성이나 길이는 다양하게 구성할 수 있다.

- [43] 구체적으로, 본 발명의 염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트는 전방 프라이머 및 후방 프라이머를 포함하는데, 각각의 프라이머는 제 1 어댑터 (170, 270), 제 2 어댑터 (150, 250), 및 유전자 특이적 서열 (120, 220)을 나열된 순으로 포함한다.
- [44] 그리고, 상기 각각의 프라이머는 제 2 어댑터 (150, 250)와 유전자 특이적 서열 (120, 220) 사이에 혼합공간서열 (140, 240)을, 그리고 제 1 어댑터 (170, 270)와 유전자 특이적 서열 (120, 220) 사이에 표지인식서열 (160, 260)을, 또한 유전자 특이적 서열 (120, 220)과 나머지 서열 사이에 링커 (130, 230)를 추가로 포함할 수 있다.
- [45] 이처럼 하나의 프라이머에 상이한 역할을 가진 서열들을 서로 모아서 융합시킨 다음 이를 주형 (10) 양 말단에 결합시킴으로써 연쇄중합효소반응 및 정제과정의 반복 횟수를 줄이는 것이 본 발명의 가장 큰 특징이다. 이러한 반복 횟수의 저감은 우선 시퀀싱 라이브러리 제작에 소요되는 시간을 단축시킬 뿐만 아니라 시료의 왜곡이나 손실 등을 방지하고 비숙련자도 능숙하게 라이브러리를 제작할 수 있게 한다.
- [46] 본 발명의 융합 프라이머를 구성하는 서열들 중 제 1 어댑터 (170, 270)는 증폭을 위한 플로우셀 (flow cell)에 고정된 올리고(oligo), 즉 올리고뉴클레오타이드와 결합함으로써 전술한 브릿지 연쇄중합효소반응을 가능하게 한다. 본 발명은 이러한 제 1 어댑터 (170, 270)로서 주형 (10)의 전방에 위치하는 제 1 전방 어댑터 (170)와 주형 (10)의 후방에 위치하는 제 1 후방 어댑터 (270)를 포함한다. 그리고, 본 발명의 제 1 전방 어댑터 (170)는 서열번호 1의 서열일 수 있고, 제 1 후방 어댑터 (270)는 서열번호 2의 서열일 수 있다.
- [47] 제 2 어댑터 (150, 250)는 염기서열 분석을 위한 시퀀싱 프라이머와 결합하는 역할을 수행하며, 따라서 사용하는 시퀀싱 프라이머에 맞게 상보적인 서열을 갖도록 변경될 수 있다. 본 발명의 제 2 전방 어댑터 (150)는 전방 시퀀싱 프라이머와 결합하고, 제 2 후방 어댑터 (250)는 후방 시퀀싱 프라이머와

결합한다.

- [48] 그리고, 유전자 특이적 서열 (120, 220)은 주형 (10)의 양 말단 유전자와 결합할 수 있도록 하는 것으로서 주형 (10)에 따라 그 서열이 변경될 수 있다.
- [49] 본 발명은 이들 제 1 어댑터 (170, 270), 제 2 어댑터 (150, 250) 및 유전자 특이적 서열 (120, 220)이 서로 융합되어 하나의 프라이머에 존재함으로써, 염기서열을 중간중간 끊어서 분석하지 않고 죽 이어서 한번에 분석하는 것이 가능하다.
- [50] 본 발명은 또한 상기 제 2 어댑터 (150, 250)와 유전자 특이적 서열 (120, 220) 사이에 혼합공간서열 (140, 240)을 추가로 구비할 수 있다. 이 혼합공간서열 (140, 240)은 분석하고자 하는 서열들이 서로 유사하여 다양성(diversity)이 낮은 경우 분석의 정확도가 급감하는 것을 방지하는 역할을 한다.
- [51] 상기 전방 혼합공간서열 (140) 또는 후방 혼합공간서열 (240)을 구성하는 염기는 (조건 1) 전방 혼합공간서열 (140)을 구성하는 염기는 부재하거나 1 내지 23개이고, 후방 혼합공간서열 (240)을 구성하는 염기는 부재하거나 1 내지 15임, 또는 (조건 2) 전방 혼합공간서열 (140)을 구성하는 염기는 부재하거나 1 내지 15개이고, 후방 혼합공간서열 (240)을 구성하는 염기는 부재하거나 1 내지 23임을 만족하는 것을 특징으로 한다. 이러한 혼합공간서열 (140, 240)의 존재로 인해 전술한 미생물 군집체와 같이 서열 간 다양성이 낮은 경우 분석의 정확도를 현저히 상승시킬 수 있다. 본 발명에서는 제 2 전방 어댑터 (150)와 전방 유전자 특이적 서열 (120) 사이에 전방 혼합공간서열 (140)을, 제 2 후방 어댑터 (250)와 후방 유전자 특이적 서열 (220) 사이에 후방 혼합공간서열 (240)을 추가로 포함할 수 있다.
- [52] 본 발명은 제 1 어댑터 (170, 270)와 유전자 특이적 서열 (120, 220) 사이에 표지인식서열 (160, 260)을 추가로 구비할 수 있는데, 상기 표지인식서열 (160, 260)은 분석되고 있는 서열이 어느 샘플에서 유래하였는지 확인을 용이하게 하는 역할을 한다. 본 발명에서는 제 1 전방 어댑터 (170)와 전방 유전자 특이적 서열 (120) 사이, 구체적으로 제 1 전방 어댑터 (170)와 제 2 전방 어댑터 (150) 사이, 제 2 전방 어댑터 (150)와 전방 혼합공간서열 (140) 사이, 및 전방 혼합공간서열 (140)과 전방 유전자 특이적 서열 (120) 사이로 이루어진 군에서 선택된 위치에 전방 표지인식서열 (160)을 추가로 포함할 수 있고, 제 1 후방 어댑터 (270)와 후방 유전자 특이적 서열 (220) 사이, 구체적으로 제 1 후방 어댑터 (270)와 제 2 후방 어댑터 (250) 사이, 제 2 후방 어댑터 (250)와 후방 혼합공간서열 (240) 사이, 및 후방 혼합공간서열 (240)과 후방 유전자 특이적 서열 (220) 사이로 이루어진 군에서 선택된 위치에 후방 표지인식서열 (260)을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 상기 전방 표지인식서열 (160)은 서열번호 3 내지 10 중 어느 한 서열일 수 있고, 후방 표지인식서열 (260)은 서열번호 11 내지 22 중 어느 한 서열일 수 있다.
- [53] 본 발명은 나아가 유전자 특이적 서열 (120, 220)을 링커 (130, 230)를 통해 나머지 서열들과 연결시킬 수도 있다. 본 발명에서는 전방 혼합공간서열 (140)과

전방 유전자 특이적 서열 (120) 사이에 전방 링커 (130)를, 후방 혼합공간서열 (240)과 후방 유전자 특이적 서열 (220) 사이에 후방 링커 (230)를 추가로 포함할 수 있다.

- [54] 한편, 본 발명의 염기서열분석용 라이브러리의 제조방법은
- [55] (A) 전술한 전방 프라이머와 후방 프라이머를 분석하고자 하는 염기서열 즉 주형 (10)의 양단에 결합시키는 단계,
- [56] (B) 상기 전방 프라이머 및 후방 프라이머가 양단에 결합된 염기서열을 연쇄중합효소반응으로 증폭시키는 단계, 및
- [57] (C) 상기 증폭된 염기서열을 정제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [58] 특히, 본 발명의 염기서열분석용 라이브러리의 제조방법은 종래기술들과 달리 상기 증폭시키는 단계 및 정제하는 단계를 각각 1 회씩만 포함할 수 있다. 즉, 본 발명은 전술한 융합 프라이머를 사용함으로써 염기서열 분석을 중간중간 끊어서 수회 반복하지 않고 한번에 즉 이어서 1 회에 완료하는 것이 가능하다.
- [59]
- [60] 이하에서 설명되는 실시예는 미생물 군집 유전체에서 16S rRNA 유전자 기반 군집 분석을 통하여 군집 조성비를 구하였다.
- [61] 실시예
- [62] 제조예 : 16S rRNA 유전자의 확보 및 인공군집체(mock community)구성
- [63] 채취한 환경시료에서 토양미생물유전체 추출키트(MO BIO, 미국)를 사용하여 시료내의 미생물 염색체를 추출하였다. 추출된 염색체를 주형(template)로 하여 연쇄효소중합반응(PCR)을 통해 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. 16S rRNA 특이적 프라이머로 다양한 분류군에서 공통적으로 쓰이는 bac27f(AGAGTTTGATCMTGGCTCAG), bac1492r(GGTTACCTTGTTACGACTT)를 사용하여 16S rRNA 유전자를 증폭했다. 증폭된 유전자는 pGEM-T easy 벡터(Promega, 미국)에 접합시켜 대장균을 형질전환하여 클로닝을 수행했다. 플라스미드 DNA는 클로닝을 통해 확보한 재조합 대장균에서 Qiagen plasmid mini kit (Qiagen, 독일)를 활용하여 추출하였다. 확보된 플라스미드는 pGEM-T easy 벡터 특이적 프라이머를 이용, Sybr Green qPCR을 통하여 정량하였다.
- [64]
- [65] 실시예 : 융합 프라이머를 이용한 16S rRNA 유전자의 증폭 및 시퀀싱 라이브러리의 준비
- [66] 상기 제조예에서 확보된 16S rRNA 유전자를 주형으로 하여 융합 프라이머로 연쇄중합반응을 진행, 연쇄중합반응 조건은 표 1과 같다. 융합 프라이머의 서열정보는 표 2, 표 3, 표 4와 같다. 기존 프라이머를 이용한 시퀀싱 라이브러리 제조공정과 차이점은 도 1 및 도 2로부터 확인할 수 있다.
- [67] 표 1

[표1]

PCR 반응조건

PCR 반응조건			
초기 변성	94°C	5분	1회
변성	94°C	30초	25회
어닐링	55°C	30초	
연장	72°C	90초	
최종 연장	72°C	5분	1회

[68]

[69] 확보된 증폭산물(amplicon)은 AMPure XP beads (Agencourt, 프랑스)를 사용하여 정제한 후 qPCR로 정량하고 각각의 정제산물을 pooling하여 시퀀싱 라이브러리로 사용하였다.

[70] 표 2

[표2]

전방 프라이머 (Bac27f)

제 1 전방 어댑터	전방 표지인식 서열	제 2 전방 어댑터	전방 혼합공간서 열	전방 링커
AATGATACGGCGAC CACCGAGATCTACA C	TAGATC GC	TCGTCGGCAGCGTCAG ATGTGTATAAGAGACA G		AC
AATGATACGGCGAC CACCGAGATCTACA C	CTCTCTA T	TCGTCGGCAGCGTCAG ATGTGTATAAGAGACA G	C	AC
AATGATACGGCGAC CACCGAGATCTACA C	TATCCTC T	TCGTCGGCAGCGTCAG ATGTGTATAAGAGACA G	GT	AC
AATGATACGGCGAC CACCGAGATCTACA C	AGAGTA GA	TCGTCGGCAGCGTCAG ATGTGTATAAGAGACA G	TCG	AC
AATGATACGGCGAC CACCGAGATCTACA C	GTAAGG AG	TCGTCGGCAGCGTCAG ATGTGTATAAGAGACA G	TGTC	AC
AATGATACGGCGAC CACCGAGATCTACA C	ACTGCA TA	TCGTCGGCAGCGTCAG ATGTGTATAAGAGACA G	ATCTT	AC
AATGATACGGCGAC CACCGAGATCTACA C	AAGGAG TA	TCGTCGGCAGCGTCAG ATGTGTATAAGAGACA G	GATGTC	AC
AATGATACGGCGAC CACCGAGATCTACA C	CTAAGC CT	TCGTCGGCAGCGTCAG ATGTGTATAAGAGACA G	CGATCTC	AC

[71]

[72] 표 3

[표3]

전방 프라이머 (Bfi27f)

제 1 전방 어댑터	전방 표지인식 서열	제 2 전방 어댑터	전방 혼합공간 서열	전방 링커
AATGATACGGCGAC CACCGAGATCTACA C	TAGATC GC	TCGTCGGCAGCGTCAG ATGTGTATAAGAGACA G		AC
AATGATACGGCGAC CACCGAGATCTACA C	CTCTCT AT	TCGTCGGCAGCGTCAG ATGTGTATAAGAGACA G	C	AC
AATGATACGGCGAC CACCGAGATCTACA C	TATCCT CT	TCGTCGGCAGCGTCAG ATGTGTATAAGAGACA G	GT	AC
AATGATACGGCGAC CACCGAGATCTACA C	AGAGTA GA	TCGTCGGCAGCGTCAG ATGTGTATAAGAGACA G	TCG	AC
AATGATACGGCGAC CACCGAGATCTACA C	GTAAGG AG	TCGTCGGCAGCGTCAG ATGTGTATAAGAGACA G	TGTC	AC
AATGATACGGCGAC CACCGAGATCTACA C	ACTGCA TA	TCGTCGGCAGCGTCAG ATGTGTATAAGAGACA G	ATCTT	AC
AATGATACGGCGAC CACCGAGATCTACA C	AAGGAG TA	TCGTCGGCAGCGTCAG ATGTGTATAAGAGACA G	GATGTC	AC
AATGATACGGCGAC CACCGAGATCTACA C	CTAAGC CT	TCGTCGGCAGCGTCAG ATGTGTATAAGAGACA G	CGATCTC	AC

[73]

[74] 표 4

[표4]

후방 프라이머 (Bac516r)

제 1 후방 어댑터	후방 표지인식 서열	제 2 후방 어댑터	후방 혼합공간 서열	후방 링커
CAAGCAGAAGACG GCATACGAGAT	TCGCCTT A	GTCTCGTGGGCTCGGAG ATGTGTATAAGAGACAG		AC
CAAGCAGAAGACG GCATACGAGAT	CTAGTA CG	GTCTCGTGGGCTCGGAG ATGTGTATAAGAGACAG	G	AC
CAAGCAGAAGACG GCATACGAGAT	TTCTGCC T	GTCTCGTGGGCTCGGAG ATGTGTATAAGAGACAG	CG	AC
CAAGCAGAAGACG GCATACGAGAT	GCTCAG GA	GTCTCGTGGGCTCGGAG ATGTGTATAAGAGACAG	TCG	AC
CAAGCAGAAGACG GCATACGAGAT	AGGAGT CC	GTCTCGTGGGCTCGGAG ATGTGTATAAGAGACAG	ATCG	AC
CAAGCAGAAGACG GCATACGAGAT	CATGCCT A	GTCTCGTGGGCTCGGAG ATGTGTATAAGAGACAG	GATCG	AC
CAAGCAGAAGACG GCATACGAGAT	GTAGAG AG	GTCTCGTGGGCTCGGAG ATGTGTATAAGAGACAG	CGATCG	AC
CAAGCAGAAGACG GCATACGAGAT	CCTCTCT G	GTCTCGTGGGCTCGGAG ATGTGTATAAGAGACAG	TCGAGC G	AC
CAAGCAGAAGACG GCATACGAGAT	AGCGTA GC	GTCTCGTGGGCTCGGAG ATGTGTATAAGAGACAG	GTCGATC G	AC
CAAGCAGAAGACG GCATACGAGAT	CAGCCT CG	GTCTCGTGGGCTCGGAG ATGTGTATAAGAGACAG	AGTCGA TCG	AC
CAAGCAGAAGACG GCATACGAGAT	TGCCTCT T	GTCTCGTGGGCTCGGAG ATGTGTATAAGAGACAG	TAGTCG ATCG	AC
CAAGCAGAAGACG GCATACGAGAT	TCCTCTA C	GTCTCGTGGGCTCGGAG ATGTGTATAAGAGACAG	CTAGTCG ATTG	AC

[75]

[76] 시험예 : 차세대 염기서열분석을 통한 염기서열 확보 및 분석

[77] 상기 실시예에서 확보된 시퀀싱 라이브러리는 마이썸 (Illumina, 미국)에 300bp PE (v3) 시퀀싱 키트를 사용하여 염기서열정보를 확보하였다.

[78] 확보된 염기서열은 PANDAseq, MOTHUR를 통하여 분류군별로 분석되었으며

그 결과는 표 5와 같다.
[79] 표 5

[표5]

혼합공간서열을 설정한 융합 프라이머로 증폭한 결과

Taxon	Mock6(%)	Mock7(%)	Mock8(%)	Mock9(%)	Mock10(%)
Burkholderia_phytotfirmans	2.14±0.40	0.02±0.00	3.59±0.81	0.01±0.01	0.05±0.02
EU150278_s	1.60±0.48	0.02±0.01	2.64±0.48	0.01±0.01	0.03±0.01
EU335310_s	6.37±1.00	0.14±0.04	7.79±1.39	0.05±0.02	0.07±0.04
Mycobacterium_fluoranthenivora ns	3.64±1.00	4.49±0.53	0.06±0.03	0.09±0.05	0.05±0.03
DQ136121_s	1.22±0.23	0.00±0.00	0.01±0.00	0.55±0.03	0.01±0.01
EF520485_s	1.79±0.55	0.03±0.01	2.09±0.40	0.02±0.01	0.06±0.02
FJ889215_s	0.66±0.12	0.77±0.06	0.02±0.02	0.78±0.07	0.01±0.01
EU335343_s	2.93±1.07	0.12±0.05	4.68±1.29	0.04±0.02	6.84±0.56
HM748719_s	2.06±0.18	4.86±0.45	0.16±0.09	4.39±0.60	0.02±0.01
Paenibacillus_pabuli	0.45±0.04	1.09±0.12	1.00±0.07	0.01±0.01	0.01±0.00
Merismopedia	0.01±0.01	0.00±0.00	0.00±0.00	0.05±0.02	0.02±0.00
DQ404777_s	0.37±0.10	0.01±0.01	0.88±0.20	0.01±0.01	0.01±0.00
AJ617867_s	1.45±0.39	0.04±0.02	0.09±0.04	2.45±0.65	0.05±0.02
EU979093_s	4.74±0.60	0.07±0.02	0.13±0.07	12.28±1.89	11.11±0.79
EU335174_s	0.78±0.19	1.97±0.85	0.05±0.03	1.61±0.37	0.01±0.00
EU331380_s	2.30±0.10	4.32±0.81	0.21±0.15	5.51±1.14	5.92±0.45
DQ404764_s	0.98±0.47	0.05±0.02	0.08±0.04	2.30±1.11	2.68±1.68
AY921508_s	5.66±2.41	0.13±0.04	0.14±0.05	14.06±3.72	0.25±0.07
AM991247_s	2.51±0.64	5.55±0.95	0.11±0.07	0.08±0.03	5.04±0.81
JN023782_s	1.95±0.42	3.92±0.87	0.04±0.02	0.02±0.01	4.90±0.77
EF492921_s	5.89±1.11	11.96±2.06	12.37±1.82	11.95±1.17	0.31±0.12
EU305673_s	2.60±0.34	4.05±0.46	2.57±0.24	0.04±0.03	3.70±0.54
EU386125_s	0.88±0.09	0.01±0.00	1.54±0.16	0.01±0.01	0.01±0.01
Methylocystis_rorsea	0.19±0.07	0.01±0.01	0.21±0.10	0.00±0.00	0.00±0.00

DQ404639_s	0.49±0.21	0.84±0.29	0.03±0.01	1.07±0.33	0.59±0.27
EF516883_s	4.76±0.79	10.86±0.99	10.28±0.69	13.14±0.19	0.07±0.03
4P002353_s	3.96±1.80	5.80±1.36	0.17±0.13	0.03±0.02	0.07±0.04
AB240240_s	2.08±0.27	0.03±0.02	3.45±0.58	0.02±0.01	4.33±0.52
AY921992_s	1.65±0.30	0.02±0.01	2.67±0.53	0.02±0.02	0.02±0.01
AM696938_s	5.64±0.85	0.08±0.04	9.40±1.49	0.05±0.03	15.67±2.19
FJ810576_s	2.41±0.82	0.05±0.03	3.51±0.82	0.01±0.01	5.80±1.00
AB672115_s	4.57±0.29	6.62±0.47	4.13±0.36	7.18±0.66	5.69±0.33
EF492955_s	0.80±0.13	1.59±0.19	0.05±0.03	1.37±0.19	1.73±0.27
Clostridium_sacc haroperbutylacet onicum	5.34±0.32	9.98±0.82	9.62±0.84	0.13±0.06	0.13±0.05
AB240328_s	1.65±0.36	3.78±0.57	3.53±0.48	3.82±0.42	3.85±0.90
FJ936969_s	0.91±0.26	0.01±0.01	1.43±0.41	0.02±0.01	0.01±0.00
AY221607_s	1.23±0.30	2.45±0.78	2.01±0.65	2.33±0.63	0.03±0.01
FJ793157_s	6.24±0.54	8.53±0.38	8.01±0.28	9.64±1.37	15.72±0.92
AB672259_s	0.96±0.19	2.35±0.16	0.02±0.02	0.01±0.00	0.02±0.01
AY921885_s	2.03±0.48	0.10±0.05	0.07±0.02	4.41±1.25	4.53±0.90
unclassified	2.11±0.67	3.31±0.55	1.20±0.77	0.44±0.25	0.60±0.28

[80]

[81] 상기 표 5로부터 혼합공간서열을 포함한 프라이머를 사용하는 것이 미생물 군집체 분석에 유용함을 확인할 수 있다.

[82]

[83] 이상에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대해서 설명하였으나, 본 발명은 상술한 특징의 실시예에 한정되지 아니하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본원 발명의 요지를 벗어남이 없이 다양한 변형 실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 범위는 위의 실시예에 국한해서 해석되어서는 안되며, 후술하는 특허청구범위 뿐만 아니라 이 특허청구범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 할 것이다.

산업상 이용가능성

[84] 본 융합 프라이머를 활용하여 미생물 군집 분석을 이용한 학술 조사나 품질 관리에 활용하거나 시료내 특정 유전자의 상대적인 양을 측정하는데 사용될 수 있다.

서열목록 Free Text

- [85] 서열번호 01 : AATGATACGGCGACCAACCGAGATCTACAC
- [86] 서열번호 02 : CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT
- [87] 서열번호 03 : AGAGTAGA
- [88] 서열번호 04 : AAGGAGTA
- [89] 서열번호 05 : CTCCTCTAT
- [90] 서열번호 06 : CTAAGCCT
- [91] 서열번호 07 : GTAAGGAG
- [92] 서열번호 08 : TATCCTCT
- [93] 서열번호 09 : TAGATCGC
- [94] 서열번호 10 : TATCCTCT
- [95] 서열번호 11 : CAGCCTCG
- [96] 서열번호 12 : TTCTGCCT
- [97] 서열번호 13 : CCTCTCTG
- [98] 서열번호 14 : TCCTCTAC
- [99] 서열번호 15 : CATGCCTA
- [100] 서열번호 16 : TGCCTCTT
- [101] 서열번호 17 : TCGCCTTA
- [102] 서열번호 18 : AGCGTAGC
- [103] 서열번호 19 : GTAGAGAG
- [104] 서열번호 20 : CTAGTACG
- [105] 서열번호 21 : AGGAGTCC
- [106] 서열번호 22 : GCTCAGGA
- [107]

청구범위

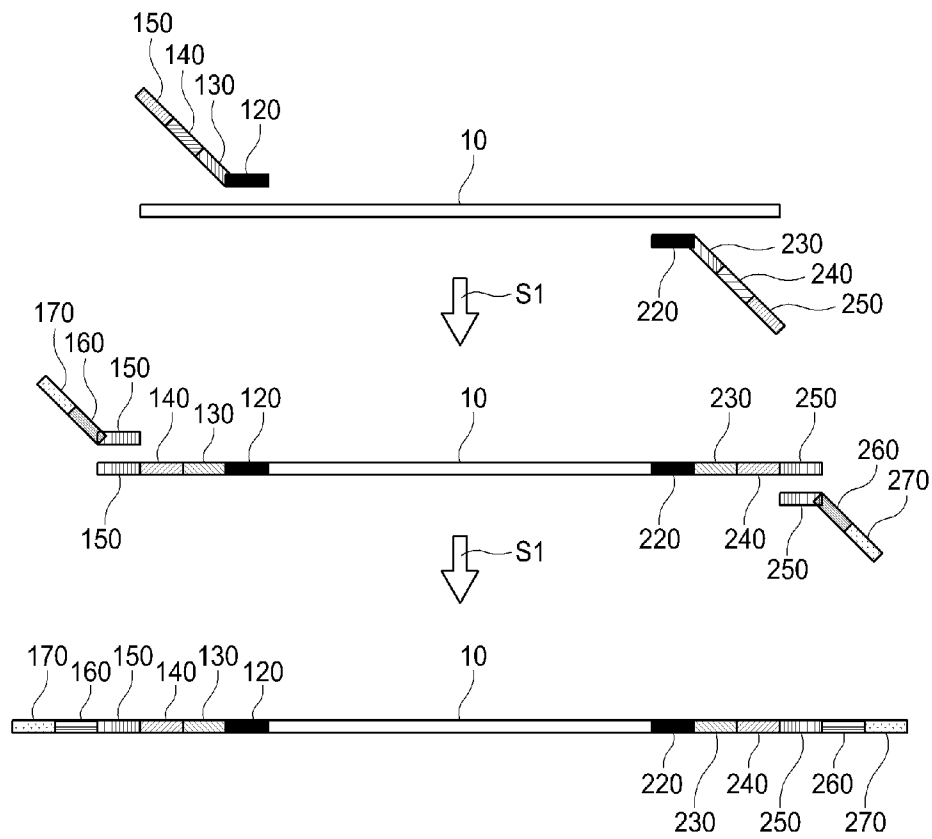
- [청구항 1] 플로우셀 (flow cell)에 고정된 전방 올리고(oligo)와 결합하는 제 1 전방 어댑터, 전방 시퀀싱 프라이머와 결합하는 제 2 전방 어댑터, 및 목표 유전자의 전방 유전자와 결합하는 전방 유전자 특이적 서열을 나열된 순으로 포함하는 전방 프라이머; 및
플로우셀 (flow cell)에 고정된 후방 올리고(oligo)와 결합하는 제 1 후방 어댑터, 후방 시퀀싱 프라이머와 결합하는 제 2 후방 어댑터, 및 목표 유전자의 후방 유전자와 결합하는 후방 유전자 특이적 서열을 나열된 순으로 포함하는 후방 프라이머를 포함하는, 염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 제 2 전방 어댑터와 전방 유전자 특이적 서열 사이에 서열 다양성 향상을 위한 전방 혼합공간서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,
상기 제 2 후방 어댑터와 후방 유전자 특이적 서열 사이에 서열 다양성 향상을 위한 후방 혼합공간서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서,
상기 제 1 전방 어댑터와 전방 유전자 특이적 서열 사이에, 샘플의 유래 확인을 용이하게 하는 전방 표지인식서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서,
상기 제 1 후방 어댑터와 후방 유전자 특이적 서열 사이에, 샘플의 유래 확인을 용이하게 하는 후방 표지인식서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트.
- [청구항 6] 청구항 2에 있어서,
상기 전방 혼합공간서열과 전방 유전자 특이적 서열 사이에 전방 링커를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트.
- [청구항 7] 청구항 3에 있어서,
상기 후방 혼합공간서열과 후방 유전자 특이적 서열 사이에 후방 링커를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서,
상기 제 1 전방 어댑터는 서열번호 1의 서열인 것을 특징으로 하는, 염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트.

- [청구항 9] 청구항 1에 있어서,
상기 제 1 후방 어댑터는 서열번호 2의 서열인 것을 특징으로 하는,
염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트.
- [청구항 10] 청구항 1에 있어서,
상기 전방 표지인식서열은 서열번호 3 내지 10 중 어느 한 서열인 것을
특징으로 하는, 염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트.
- [청구항 11] 청구항 1에 있어서,
상기 후방 표지인식서열은 서열번호 11 내지 22 중 어느 한 서열인 것을
특징으로 하는, 염기서열분석을 위한 라이브러리용 프라이머 세트.
- [청구항 12] 청구항 2 또는 청구항 4에 있어서,
상기 상기 전방 혼합공간서열 또는 후방 혼합공간서열을 구성하는
염기는
(조건 1) 전방 혼합공간서열을 구성하는 염기는 부재하거나 1 내지
23개이고, 후방 혼합공간서열을 구성하는 염기는 부재하거나 1 내지
15임, 또는
(조건 2) 전방 혼합공간서열을 구성하는 염기는 부재하거나 1 내지
15개이고, 후방 혼합공간서열을 구성하는 염기는 부재하거나 1 내지
23임을 만족하는 것을 특징으로 하는, 염기서열분석을 위한
라이브러리용 프라이머 세트.
- [청구항 13] (A) 플로우셀 (flow cell)에 고정된 전방 올리고(oligo)와 결합하는 제 1
전방 어댑터, 전방 시퀀싱 프라이머와 결합하는 제 2 전방 어댑터, 및 목표
유전자의 전방 유전자와 결합하는 전방 유전자 특이적 서열을 나열된
순으로 포함하는 전방 프라이머; 및 플로우셀 (flow cell)에 고정된 후방
올리고(oligo)와 결합하는 제 1 후방 어댑터, 후방 시퀀싱 프라이머와
결합하는 제 2 후방 어댑터, 및 목표 유전자의 후방 유전자와 결합하는
후방 유전자 특이적 서열을 나열된 순으로 포함하는 후방 프라이머를
분석하고자 하는 염기서열의 양단에 결합시키는 단계,
(B) 상기 전방 프라이머 및 후방 프라이머가 양단에 결합된 염기서열을
연쇄중합효소반응으로 증폭시키는 단계, 및
(C) 상기 증폭된 염기서열을 정제하는 단계를 포함하는, 염기서열분석용
라이브러리의 제조방법.
- [청구항 14] 청구항 13에 있어서,
상기 제 2 전방 어댑터와 전방 유전자 특이적 서열 사이에 서열 다양성
향상을 위한 전방 혼합공간서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는,
염기서열분석용 라이브러리의 제조방법.
- [청구항 15] 청구항 13에 있어서,
상기 제 2 후방 어댑터와 후방 유전자 특이적 서열 사이에 서열 다양성
향상을 위한 후방 혼합공간서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는,

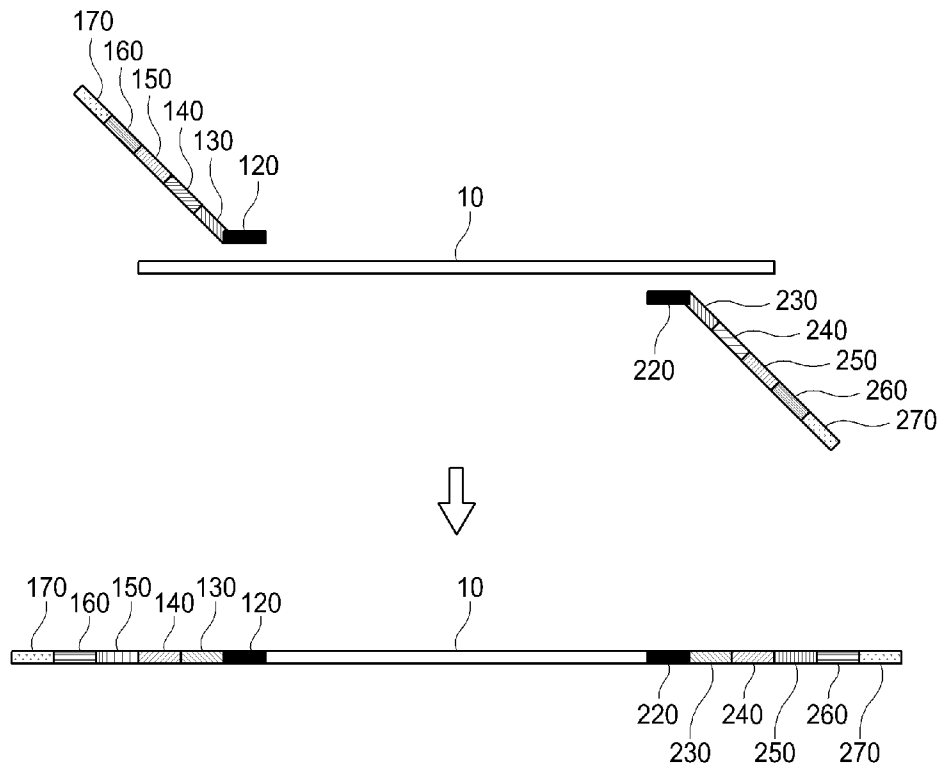
염기서열분석용 라이브러리의 제조방법.

- [청구항 16] 청구항 13에 있어서,
상기 제 1 전방 어댑터와 전방 유전자 특이적 서열 사이에, 샘플의 유래 확인을 용이하게 하는 전방 표지인식서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 염기서열분석용 라이브러리의 제조방법.
- [청구항 17] 청구항 13에 있어서,
상기 제 1 후방 어댑터와 후방 유전자 특이적 서열 사이에, 샘플의 유래 확인을 용이하게 하는 후방 표지인식서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 염기서열분석용 라이브러리의 제조방법.
- [청구항 18] 청구항 13에 있어서,
상기 증폭시키는 단계 및 정제하는 단계는 각각 1 회씩만 포함되는, 염기서열분석용 라이브러리의 제조방법.

[도1]



[도2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/004749

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i, G06F 19/20(2011.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/68; G06F 19/10; C40B 30/04; G06F 19/20

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: base sequence, library, primer, front adapter, rear adapter, target gene

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2013-0142523 A (GENOCHECK CO., LTD.) 30 December 2013 See paragraph [0068]; claims 1-2, 7; figures 1-2.	1-18
Y	Internet Academic Journal Material, "Chemical Applications of Next Generation Sequencing", Bell Symposium and MSP seminar, <URL:https://www.slideshare.net/lampweb/clinical-applications-of-next-generation-sequencing>, 11 October 2013 See 16th slide.	1-18
Y	WO 2016-022833 A1 (NUGEN TECHNOLOGIES, INC.) 11 February 2016 See paragraph [00101]; figure 1.	2-3,6-7,12,14-15
A	WO 2009-049889 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH. et al.) 23 April 2009 See the entire document.	1-18
A	WO 2016-040524 A1 (IGENOMX INTERNATIONAL GENOMICS CORPORATION) 17 March 2016 See the entire document.	1-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 AUGUST 2017 (31.08.2017)

Date of mailing of the international search report

31 AUGUST 2017 (31.08.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

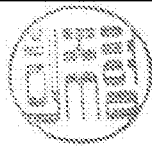
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/004749

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0142523 A	30/12/2013	KR 10-1406720 B1 WO 2013-191400 A1	13/06/2014 27/12/2013
WO 2016-022833 A1	11/02/2016	CA 2957633 A1 EP 3177740 A1 SG 11201700891 A US 2016-0203259 A1	11/02/2016 14/06/2017 30/03/2017 14/07/2016
WO 2009-049889 A1	23/04/2009	AT 509123 T CA 2701411 A1 CA 2758753 A1 CN 102124125 A CN 102459634 A EP 2203567 A1 EP 2203567 B1 EP 2419530 A1 JP 2011-500041 A JP 2012-523824 A US 2010-0086914 A1 US 2010-0261189 A1 US 2014-0141436 A1 WO 2010-118865 A1	15/05/2011 23/04/2009 21/10/2010 13/07/2011 16/05/2012 07/07/2010 11/05/2011 22/02/2012 06/01/2011 11/10/2012 08/04/2010 14/10/2010 22/05/2014 21/10/2010
WO 2016-040524 A1	17/03/2016	AU 2015-315103 A1 CA 2960821 A1 EP 3191604 A1	27/04/2017 17/03/2016 19/07/2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/68(2006.01)i, G06F 19/20(2011.01)i																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/68; G06F 19/10; C40B 30/04; G06F 19/20 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 염기서열, 라이브러리, 프라이머, 전방 어댑터, 후방 어댑터, 목표 유전자																				
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>KR 10-2013-0142523 A ((주)지노ček) 2013.12.30 단락 [0068]; 청구항 1-2, 7; 도면 1-2 참조.</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>인터넷 학술발표 자료, 'Chemical applications of next generation sequencing', Bell Symposium and MSP seminar, <URL: https://www.slideshare.net/lampweb/clinical-applications-of-next-generation-sequencing>, 2013.10.11 열 여섯번째 슬라이드 참조.</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2016-022833 A1 (NUGEN TECHNOLOGIES, INC.) 2016.02.11 단락 [00101]; 도면 1 참조.</td> <td>2-3, 6-7, 12, 14-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2009-049889 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH 등) 2009.04.23 전체 문헌 참조.</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2016-040524 A1 (IGENOMX INTERNATIONAL GENOMICS CORPORATION) 2016.03.17 전체 문헌 참조.</td> <td>1-18</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	Y	KR 10-2013-0142523 A ((주)지노ček) 2013.12.30 단락 [0068]; 청구항 1-2, 7; 도면 1-2 참조.	1-18	Y	인터넷 학술발표 자료, 'Chemical applications of next generation sequencing', Bell Symposium and MSP seminar, <URL: https://www.slideshare.net/lampweb/clinical-applications-of-next-generation-sequencing>, 2013.10.11 열 여섯번째 슬라이드 참조.	1-18	Y	WO 2016-022833 A1 (NUGEN TECHNOLOGIES, INC.) 2016.02.11 단락 [00101]; 도면 1 참조.	2-3, 6-7, 12, 14-15	A	WO 2009-049889 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH 등) 2009.04.23 전체 문헌 참조.	1-18	A	WO 2016-040524 A1 (IGENOMX INTERNATIONAL GENOMICS CORPORATION) 2016.03.17 전체 문헌 참조.	1-18
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
Y	KR 10-2013-0142523 A ((주)지노ček) 2013.12.30 단락 [0068]; 청구항 1-2, 7; 도면 1-2 참조.	1-18																		
Y	인터넷 학술발표 자료, 'Chemical applications of next generation sequencing', Bell Symposium and MSP seminar, <URL: https://www.slideshare.net/lampweb/clinical-applications-of-next-generation-sequencing>, 2013.10.11 열 여섯번째 슬라이드 참조.	1-18																		
Y	WO 2016-022833 A1 (NUGEN TECHNOLOGIES, INC.) 2016.02.11 단락 [00101]; 도면 1 참조.	2-3, 6-7, 12, 14-15																		
A	WO 2009-049889 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH 등) 2009.04.23 전체 문헌 참조.	1-18																		
A	WO 2016-040524 A1 (IGENOMX INTERNATIONAL GENOMICS CORPORATION) 2016.03.17 전체 문헌 참조.	1-18																		
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																				
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																				
국제조사의 실제 완료일 2017년 08월 31일 (31.08.2017)		국제조사보고서 발송일 2017년 08월 31일 (31.08.2017)																		
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150 																		

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2017/004749

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0142523 A	2013/12/30	KR 10-1406720 B1 WO 2013-191400 A1	2014/06/13 2013/12/27
WO 2016-022833 A1	2016/02/11	CA 2957633 A1 EP 3177740 A1 SG 11201700891 A US 2016-0203259 A1	2016/02/11 2017/06/14 2017/03/30 2016/07/14
WO 2009-049889 A1	2009/04/23	AT 509123 T CA 2701411 A1 CA 2758753 A1 CN 102124125 A CN 102459634 A EP 2203567 A1 EP 2203567 B1 EP 2419530 A1 JP 2011-500041 A JP 2012-523824 A US 2010-0086914 A1 US 2010-0261189 A1 US 2014-0141436 A1 WO 2010-118865 A1	2011/05/15 2009/04/23 2010/10/21 2011/07/13 2012/05/16 2010/07/07 2011/05/11 2012/02/22 2011/01/06 2012/10/11 2010/04/08 2010/10/14 2014/05/22 2010/10/21
WO 2016-040524 A1	2016/03/17	AU 2015-315103 A1 CA 2960821 A1 EP 3191604 A1	2017/04/27 2016/03/17 2017/07/19