

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2016년 8월 18일 (18.08.2016)



(10) 국제공개번호  
WO 2016/129941 A1

- (51) 국제특허분류:  
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/001411
- (22) 국제출원일: 2016년 2월 11일 (11.02.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2015-0019784 2015년 2월 9일 (09.02.2015) KR
- (71) 출원인: 주식회사 하이바이오텍 (HEIMBIOTEK INC.) [KR/KR]; 18384 경기도 화성시 반월길 78, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 이재훈 (LEE, Jae Hun); 11935 경기도 구리시 안골로 30번길 14, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 한윤호 (HAN, Yun Ho); 06651 서울시 서초구 사임당로 28 나이스빌딩 2층 올민국제특허법률사무소, 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, 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, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

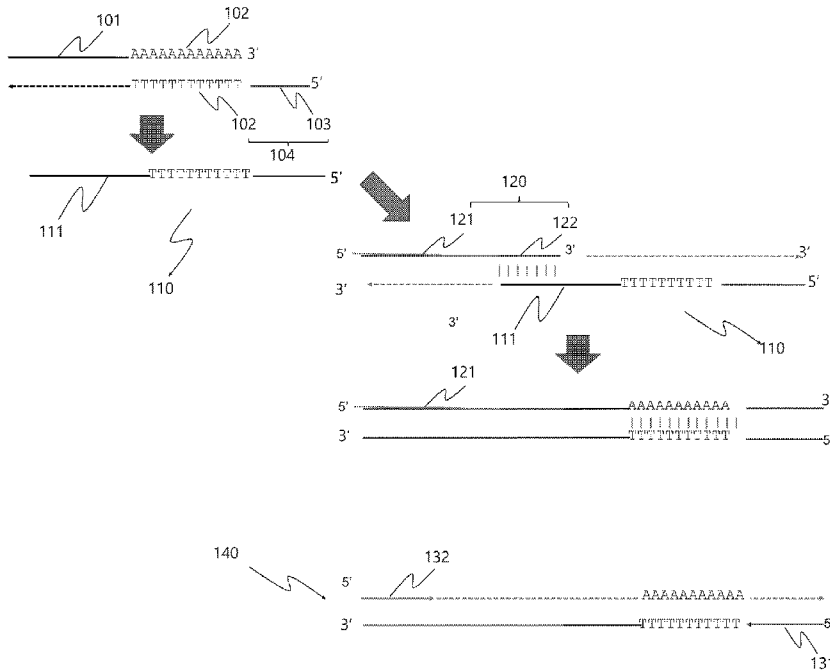
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

[다음 쪽 계속]

(54) Title: KIT AND METHOD FOR DETECTION OF MICRORNA

(54) 발명의 명칭 : 마이크로알앤에이 검출용 키트 및 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a kit and a method for detection of an miRNA and, more specifically, to an miRNA detection kit and an miRNA detection method using the kit, the kit comprising: a primer for reverse transcription, which consists of a first hybridization oligonucleotide comprising a nucleic acid sequence which hybridizes specifically to the 3'-end of an miRNA or a poly A tailed miRNA to which poly A is linked via a poly A polymerase, and a first adaptor oligonucleotide comprising any nucleic acid sequence which does not hybridize to a target miRNA; a primer for extension, which consists of a second hybridization oligonucleotide capable of hybridizing specifically to a cDNA reverse transcribed from the miRNA or the poly A tailed miRNA excluding a portion corresponding to the 3'-end of the miRNA

[다음 쪽 계속]



WO 2016/129941 A1



- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

or the poly A tailed miRNA hybridized to the first hybridization oligonucleotide, and a second adaptor oligonucleotide comprising any nucleic acid sequence which does not hybridize to the cDNA; and a forward primer selected within the second adaptor oligonucleotide.

**(57) 요약서:** 본 발명은 miRNA 검출 키트 및 방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 miRNA 또는 poly A 폴리머라제에 의해 poly A 가 연결된 poly A 꼬리연결 miRNA 의 3'-말단과 특이적으로 혼성화하는 핵산서열로 구성된 제 1 혼성화 올리고뉴클레오티드 및 표적 miRNA 와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제 1 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 역전사용 프라이머; 상기 제 1 혼성화 올리고뉴클레오티드와 혼성화되는 miRNA 또는 poly A 꼬리연결 miRNA 의 3'-말단에 상응하는 부분을 제외한 상기 miRNA 또는 poly A 꼬리연결 miRNA 로부터 역전사된 cDNA 와 특이적으로 혼성화 가능한 제 2 혼성화 올리고뉴클레오티드 및 상기 cDNA 와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제 2 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 연장용 프라이머; 및 상기 제 2 어댑터 올리고뉴클레오티드 내에서 선택되는 포워드 프라이머를 포함하는 miRNA 검출용 키트 및 상기 키트를 이용한 miRNA 검출방법에 관한 것이다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 마이크로알앤에이 검출용 키트 및 방법

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 핵산 검출용 키트 및 방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 마이크로알앤에이 검출용 키트 및 방법에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 마이크로RNA(microRNA 또는 miRNA, 이하, 'miRNA'로 약칭함)은 22개 정도의 리보뉴클레오티드로 구성된 비번역 RNA로, 전사단계에서 RNA 침묵(RNA silencing) 그리고 전사 후 단계에서 유전자의 발현을 조절하는 기능을 수행하며, 이러한 miRNA의 기능은 mRNA 내의 상보서열과의 염기쌍의 형성을 통해 수행되는 것으로 알려지고 있다(Bartel, D.P., *Cell*, 136(2): 215-233, 2009).
- [3] 최초로 예쁜 꼬마선충(*C. elegans*)에서 발견된 이후, 동물, 식물 및 바이러스에 유전자 발현의 조절기구로 활용되고 있음이 알려지면서 다양한 종류의 miRNA들이 속속 보고되고 있는 실정이다. 뿐만 아니라, miRNA 유전자의 돌연변이 등에 기인하는 기능의 부조화에 의해 암 등 특정 질병이 발생할 수 있음이 알려지고 있어(Mraz, M. and Pospisilova, S., *Expert Rev. Hematol.*, 5(6): 579-581, 2012; Hughes *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 89: 628-633, 2011; Pontual *et al.*, *Nat. Genet.*, 43(10): 1026-1030, 2011; Lu *et al.*, *Nature* 435(9): 834-838, 2005), 그 중요성이 더욱 부각되고 있다.
- [4] miRNA는 그 크기가 매우 작고(~22 nt) mRNA보다 더 쉽게 분해되는 것으로 알려져 있기 때문에, 이를 분리하거나 검출하는데 큰 어려움이 있다. 이를 검출하기 위한 통상적인 방법으로는 노던 블랏 분석과 마이크로어레이를 이용한 교잡에 기반한 검출, 특정 miRNA와 특이적으로 상보결합을 하는 스탬프 구조의 프라이머를 이용한 RT-PCR과 그에 수반되는 정량적 PCR의 두 단계에 걸친 공정으로 검출 및 정량을 하는 방법(Chen *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 33(20): e179, 2005), 폴리 A polymerase로 miRNA의 3'-말단에 폴리 A 꼬리를 연결하고, Poly(T) 어댑터를 프라이머로 사용하여 cDNA를 합성한 후, miRNA 특이적 포워드 프라이머와 poly(T) 어댑터에 기반한 리버스 프라이머를 이용하여 miRNA를 증폭하는 방법(Shi, R. and Chiang, V.L., *BioTechniques*, 39: 519-525, 2005) 등이 알려져 있다.
- [5] 그러나, 상기 방법들은 제한된 상보서열을 이용하기 때문에 비특이적 증폭이 가능할 수 있고, 통상적으로 실시간 PCR 기술에 기반하고 있기 때문에, 고가의 실시간 PCR 장비가 필요하며, 생성된 PCR 산물의 크기가 비슷하기 때문에 다양한 miRNA를 동시에 검출하는 멀티플렉스 분석이 제한적이라는 단점을 가지고 있다.

#### 발명의 상세한 설명

## 기술적 과제

- [6] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 보다 용이하고 경제적인 miRNA 검출 키트 및 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

## 과제 해결 수단

- [7] 본 발명의 일 관점에 따르면, miRNA 또는 poly A 폴리머라제에 의해 poly A가 연결된 poly A 꼬리연결 miRNA의 3'-말단과 특이적으로 혼성화하는 핵산서열로 구성된 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드 및 표적 miRNA와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 역전사용 프라이머; 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드와 혼성화되는 miRNA 또는 poly A 꼬리연결 miRNA의 3'-말단에 상응하는 부분을 제외한 상기 miRNA 또는 poly A 꼬리연결 miRNA로부터 역전사된 cDNA와 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드 및 상기 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 연장용 프라이머; 및 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드 내에서 선택되는 포워드 프라이머를 포함하는 miRNA 검출용 키트가 제공된다.
- [8] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 증폭대상 miRNA를 상기 miRNA의 3'-말단과 특이적으로 혼성화하는 핵산서열로 구성된 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드 및 표적 miRNA와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 역전사용 프라이머로 역전사하는 역전사반응단계; 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드와 혼성화되는 miRNA의 3'-말단에 상응하는 부분을 제외한 상기 miRNA로부터 역전사된 cDNA와 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드 및 상기 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 연장용 프라이머로 상기 cDNA를 연장하는 연장반응단계; 및 상기 연장된 cDNA를 주형으로 상기 역전사용 프라이머 또는 상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드와 동일한 핵산서열로 구성되는 리버스 프라이머 및 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드 내에서 선택되는 포워드 프라이머를 이용하여 증폭하는 PCR 단계를 포함하는, miRNA의 검출방법이 제공된다.
- [9] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 폴리 A 폴리머라아제를 이용하여 증폭 대상 miRNA에 poly A 꼬리를 연결하는 poly A 꼬리연결 miRNA 제조단계;
- [10] 상기 poly A 꼬리연결 miRNA의 poly A 꼬리와 특이적으로 혼성화하는 poly dT로 구성된 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드 및 표적 miRNA와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 역전사용 프라이머로 역전사하는 역전사반응단계; 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드와 혼성화되는 poly A 꼬리연결 miRNA의 3'-말단에

상응하는 부분을 제외한 상기 poly A 꼬리연결 miRNA로부터 역전사된 cDNA와 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드 및 상기 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 연장용 프라이머로 상기 cDNA를 연장하는 연장반응단계; 및 상기 연장된 cDNA를 주형으로 상기 역전사용 프라이머 또는 상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드와 동일한 핵산서열로 구성되는 리버스 프라이머 및 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드 내에서 선택되는 포워드 프라이머를 이용하여 증폭하는 PCR 단계를 포함하는, miRNA의 검출방법이 제공된다.

### 발명의 효과

- [11] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 특정 miRNA를 고가의 장비 없이도 정확하고 신속하게 검출하는 것이 가능하며, 복수의 miRNA를 동시에 검출할 수 있는 멀티플렉스 분석 역시 가능하다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 miRNA 검출용 키트 및 방법은 암을 비롯한 각종 질병의 진단 및 예후 판정 등에 매우 유용하게 사용될 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

### 도면의 간단한 설명

- [12] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리 A 폴리머라아제를 이용한 miRNA 검출방법을 개략적으로 나타낸 개요도이다.
- [13] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 miRNA 특이적 역전사용 프라이머를 이용한 miRNA 검출방법을 개략적으로 나타낸 개요도이다.
- [14] 도 3 내지 도 10은 각각 본 발명의 일 실시예에 따른 poly A polymerase 및 oligo dT 프라이머를 이용한 miRNA 검출 키트 및 방법에 의해 miR-532, miR-196b, miR-362, miR-29c, miR-106b, miR-200c, miR-127 및 miR-145를 증폭한 결과를 나타낸다. 각각의 도에 있어서 상단은 증폭 사이클 수에 따른 형광 값의 변화를 나타내고, 중단은 온도에 따른 형광방출 속도의 변화를 나타내는 그래프이고, 하단의 왼쪽 표는 샘플의 종류 및 형광검출 기준값 및 녹는점을 나타내며, 하단의 오른쪽은 1.5% 아가로스 겔 전기영동 결과를 나타내는 사진이다.
- [15] 도 11 내지 도 18은 각각 본 발명의 일 실시예에 따른 miRNA 특이적 포워드 프라이머를 이용한 miRNA 검출키트 및 방법에 의해 miR-532, miR-196b, miR-362, miR-29c, miR-106b, miR-200c, miR-127 및 miR-145를 증폭한 결과를 나타낸다. 각각의 도에 있어서 왼쪽 중단은 증폭 사이클 수에 따른 형광 값의 변화를 나타내고, 왼쪽중단은 온도에 따른 형광방출 속도의 변화를 나타내는 그래프이고, 왼쪽하단의 왼쪽 표는 샘플의 종류 및 형광검출 기준값 및 녹는점을 나타내며, 오른쪽은 1.5% 아가로스 겔 전기영동 결과를 나타내는 사진이다.
- [16] 도 19 내지 도 26은 비교예로서 각각 Qiagen사의 miRNA 검출키트를 이용하여 miR-532, miR-196b, miR-362, miR-29c, miR-106b, miR-200c, miR-127 및 miR-145를 증폭한 결과를 나타낸다. 각각의 도에 있어서 중단은 증폭 사이클

수에 따른 형광 값의 변화를 나타내고, 중단은 온도에 따른 형광방출 속도의 변화를 나타내는 그래프이고, 하단의 왼쪽 표는 샘플의 종류 및 형광검출 기준값 및 녹는점을 나타내며, 하단의 오른쪽은 1.5% 아가로즈 겔 전기영동 결과를 나타내는 사진이다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

[17] **용어의 정의:**

[18] 이하 본 문서에서 사용되는 용어를 정의한다:

[19] 본 문서에서 사용되는 용어 "뉴클레오티드(nucleotide)"는 핵산을 구성하는 단위체 분자로 염기, 오탄당 및 인산으로 구성되어 있으며, 상기 염기는 DNA의 경우 아데닌(adenine), 구아닌(guanine), 시토신(cytosine), 및 티민(thymine)의 네 가지가 존재하고, RNA의 경우에는 상기 티민 대신 우라실(uracil)이 사용된다. 상기 오탄당은 DNA의 경우 2'-디옥시리보스(2'-deoxyribose), RNA의 경우 리보스(ribose)가 사용된다.

[20] 본 문서에서 사용되는 용어 "올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)"는 상기 뉴클레오티드 단위체 분자의 중합체로서 일반적으로 13 내지 25개까지의 뉴클레오티드로 구성된 짧은 단일쇄 핵산 사슬을 의미하는데, 경우에 따라서는 6-mer, 7-mer, 8-mer, 9-mer, 10-mer, 11-mer 및 12-mer 등 13개 미만의 뉴클레오티드로 구성되거나 25개 초과 뉴클레오티드로 구성된 핵산 사슬을 지칭할 수 있다.

[21] 본 문서에서 사용되는 용어 "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)"는 통상적으로 상기 올리고뉴클레오티드 보다 더 긴 뉴클레오티드 단위체의 중합체 사슬을 의미하나, 상기 올리고뉴클레오티드와 혼용되어 사용되기도 한다. 폴리뉴클레오티드는 단일가닥 또는 이중가닥 핵산사슬 모두를 포함한다.

[22] 본 문서에서 사용되는 용어 "센스 가닥"은 이중가닥 DNA 분자 중 유전자의 코드의 진행방향과 동일한 방향의 단일가닥 핵산분자를 의미하고, "안티센스 가닥"은 상기 센스 가닥과 상보결합을 하는 다른 단일가닥 핵산분자를 의미하나, 유전자의 코드 진행방향과 무관하게, 최초로 핵산서열이 규명된 가닥을 "센스 가닥"으로 정의하고 그의 상보가닥을 "안티센스 가닥"으로 정의하는 것도 무방하다.

[23] 본 문서에서 사용되는 용어 "PCR(polymerase chain reaction)" 또는 "핵산증폭반응"은 열안정성 DNA 중합효소를 이용하여 특정 표적 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. PCR에는 DNA 중합효소 외에 표적 핵산 특이적으로 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드인 프라이머(포워드 프라이머, 리버스 프라이머), 디옥시뉴클레오티드 혼합물(dNTP mixture), Mg<sup>2+</sup> 등의 2가 이온을 포함하는 반응 완충액 등이 사용된다. 상기 PCR 반응에 의해 생성된 DNA 분자를 본 문서에서는 "증폭산물"이라고 지칭하였다.

[24] 본 문서에서 사용되는 용어 "프라이머 연장반응(primer extension)"은 DNA

중합효소가 제한된 길이의 주형 핵산에 상보적으로 혼성화된 프라이머를 연장시켜 상기 주형 핵산의 5'-말단에서 종료가 되는 비연쇄반응을 의미한다. 상기 프라이머 연장반응에 의해 생성된 DNA 분자를 본 문서에서는 "연장산물"이라고 지칭하였다.

- [25] 본 문서에서 사용되는 용어 "프라이머(primer)"는 PCR 반응 또는 프라이머 연장반응(primer extension) 반응의 개시를 위해 사용되는, 주형 DNA에 상보적으로 혼성화는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. PCR 반응을 위한 프라이머는 증폭되는 핵산분자의 유전자 코드 진행방향과 동일한 센스 가닥으로부터 선택되는 포워드 프라이머(또는 센스 프라이머) 및 상기 센스 가닥에 상보적인 안티센스 가닥으로부터 선택되는 리버스 프라이머(또는 안티센스 프라이머)의 쌍이 사용되고, 프라이머 연장반응의 경우 통상적으로 단일한 연장용 프라이머가 사용된다.
- [26] 본 문서에서 사용되는 용어 "어댑터(adaptor)"는 특정 miRNA를 특이적으로 구분하기 위해 miRNA에 상응하는 센스 DNA의 5'-말단에 부가되는 올리고뉴클레오티드 또는 miRNA의 역전사를 위한 역전사용 프라이머의 5'-말단에 부가되는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 이 경우 이들 어댑터는 연장된 cDNA를 증폭하는데 사용되는 프라이머 서열로 사용될 수 있고, 후자의 경우 miRNA와 혼성화 가능한 핵산서열로만 프라이머를 구성할 경우 낮은 T<sub>m</sub> 값을 보정할 목적으로 사용될 수 있다. 상기 어댑터는 증폭 대상 주형핵산과 연장용 올리고뉴클레오티드를 제외한 다른 프라이머와 상동성이 존재하지 아니하여 비특이적 증폭반응을 최소화하도록 고안될 수 있다.
- [27] 본 문서에서 사용되는 용어 "혼성화 올리고뉴클레오티드"는 miRNA 또는 상기 miRNA로부터 역전사된 cDNA와 상보결합에 의해 혼성화가능한 핵산분자를 의미한다.
- [28] 본 문서에서 사용되는 용어 "유니버설 프라이머"는 증폭하고자 하는 대상 핵산분자의 종류에 무관하게 증폭이 가능한 프라이머로서 역전사 및 프라이머 연장 반응에 의해 추가된 어댑터 올리고뉴클레오티드의 핵산서열을 이용하여 제조가 가능하다. 이 경우 단일한 프라이머 세트를 활용함으로써 키트의 제조원가를 낮출 수 있는 장점이 있다.
- [29] 본 문서에서 사용되는 용어 "포워드 프라이머"는 해당 프라이머의 방향(5' → 3')이 유전자의 방향과 일치하는 경우의 프라이머를 의미한다. 반대로 "리버스 프라이머"는 해당 프라이머의 방향이 유전자의 방향과 반대로 되는 프라이머를 의미한다.
- [30] **발명의 상세한 설명**
- [31] 본 발명의 일 관점에 따르면, miRNA 또는 poly A 폴리머라제에 의해 poly A가 연결된 poly A 꼬리연결 miRNA의 3'-말단과 특이적으로 혼성화하는 핵산서열로 구성된 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드 및 표적 miRNA와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 역전사용

프라이머; 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드와 혼성화되는 miRNA 또는 poly A 꼬리연결 miRNA의 3'-말단에 상응하는 부분을 제외한 상기 miRNA 또는 poly A 꼬리연결 miRNA로부터 역전사된 cDNA와 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드 및 상기 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 연장용 프라이머; 및 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드 내에서 선택되는 포워드 프라이머를 포함하는 miRNA 검출용 키트가 제공된다.

- [32] 상기 키트는 상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드와 동일한 핵산서열로 구성되는 리버스 프라이머를 추가로 포함할 수 있고, 상기 리버스 프라이머는 miRNA의 종류와 무관하게 동일한 핵산서열로 구성되는 유니버설 리버스 프라이머일 수 있다.
- [33] 상기 키트에 있어서, 상기 포워드 프라이머는 miRNA의 종류와 무관하게 동일한 핵산서열로 구성된 유니버설 포워드 프라이머일 수 있다.
- [34] 상기 키트에 있어서, 상기 miRNA의 3'-말단과 특이적으로 혼성화하는 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드는 3 내지 12 nt의 길이를 가질 수 있다.
- [35] 상기 키트에 있어서, 상기 poly A 꼬리연결 miRNA의 3'-말단과 특이적으로 혼성화하는 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드는 15 내지 30 nt의 길이를 가질 수 있다.
- [36] 상기 키트에 있어서, 상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드는 3 내지 30 nt의 길이를 가질 수 있다.
- [37] 상기 키트는 역전사 효소, 열안정성 DNA 중합효소 및 dNTP 혼합물을 추가적으로 포함할 수 있고, 폴리 A 폴리머라아제 및 ATP를 더 추가적으로 포함할 수 있다.
- [38] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 증폭대상 miRNA를 상기 miRNA의 3'-말단과 특이적으로 혼성화하는 핵산서열로 구성된 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드 및 표적 miRNA와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 역전사용 프라이머로 역전사하는 역전사반응단계; 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드와 혼성화되는 miRNA의 3'-말단에 상응하는 부분을 제외한 상기 miRNA로부터 역전사된 cDNA와 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드 및 상기 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 연장용 프라이머로 상기 cDNA를 연장하는 연장반응단계; 및 상기 연장된 cDNA를 주형으로 상기 역전사용 프라이머 또는 상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드와 동일한 핵산서열로 구성되는 리버스 프라이머 및 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드 내에서 선택되는 포워드 프라이머를 이용하여 증폭하는 PCR 단계를 포함하는, miRNA의 검출방법이 제공된다.
- [39] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 폴리 A 폴리머라아제를 이용하여 증폭 대상 miRNA에 poly A 꼬리를 연결하는 poly A 꼬리연결 miRNA 제조단계;

- [40] 상기 poly A 꼬리연결 miRNA의 poly A 꼬리와 특이적으로 혼성화하는 poly dT로 구성된 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드 및 표적 miRNA와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 역전사용 프라이머로 역전사하는 역전사반응단계; 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드와 혼성화되는 poly A 꼬리연결 miRNA의 3'-말단에 상응하는 부분을 제외한 상기 poly A 꼬리연결 miRNA로부터 역전사된 cDNA와 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드 및 상기 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 연장용 프라이머로 상기 cDNA를 연장하는 연장반응단계; 및 상기 연장된 cDNA를 주형으로 상기 역전사용 프라이머 또는 상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드와 동일한 핵산서열로 구성되는 리버스 프라이머 및 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드 내에서 선택되는 포워드 프라이머를 이용하여 증폭하는 PCR 단계를 포함하는, miRNA의 검출방법이 제공된다.
- [41] 상기 검출방법에 있어서, 상기 포워드 프라이머는 miRNA의 종류와 무관하게 동일한 핵산서열로 구성되는 유니버설 포워드 프라이머일 수 있고, 상기 리버스 프라이머는 miRNA의 종류와 무관하게 동일한 핵산서열로 구성된 유니버설 리버스 프라이머일 수 있다.
- [42] 상기 검출방법에 있어서, 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드는 3 내지 12 nt 또는 15 내지 30 nt의 길이를 가질 수 있다.
- [43] 상기 검출방법에 있어서, 상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드는 3 내지 30 nt의 길이를 가질 수 있다.
- [44] 상기 검출방법에 있어서, 상기 PCR 단계는 실시간 PCR 반응에 의해 수행될 수 있다.
- [45] 본 발명에서 특별히 언급되지 않은 한, 복수의 올리고뉴클레오티드 및/또는 폴리뉴클레오티드로 구성된 핵산분자는 5'-말단에서 3'-말단의 순서로 설명된다.
- [46] 이하 본 발명의 일 실시예에 따른 키트 및 방법을 첨부된 도면을 통해 보다 상세히 설명한다.
- [47] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리 A 폴리머라아제를 이용한 miRNA 검출방법을 개략적으로 나타낸 개요도이다. 도 1에 도시된 바와 같이, miRNA(101)는 약 22 nt 정도의 매우 짧은 핵산분자이다. miRNA(101)는 mRNA와는 달리 폴리 A 꼬리가 없기 때문에, miRNA(101)가 포함된 시료에 폴리 A 폴리머라제와 ATP를 혼합하여 반응을 시키면, miRNA(101)에 폴리 A 꼬리(102)가 부착되어 폴리 A 꼬리화 miRNA(110)이 생성된다. 여기에 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드(102)인 poly dT와 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드(103)로 구성된 역전사용 프라이머(104)을 혼합하면 폴리 A 꼬리(102)와 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드(102)가 상보결합을 하게 되고, 여기에 역전사효소와 dNTP 혼합물을 첨가하여 역전사반응을 수행하면, 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드-제1 혼성화

올리고뉴클레오티드(102)-안티센스가닥 cDNA(111)로 구성된 표적 miRNA의 역전사 산물(106)이 생성된다. 상기 역전사 산물(106)에 대하여 안티센스가닥 cDNA에 상보적인 서열을 갖는 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드(122)을 3'-말단으로 갖고 miRNA(110) 및 안티센스 cDNA(111)와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드(121)를 5'-말단으로 갖는 연장용 프라이머(120)와 혼성화시킨 후, DNA 중합효소로 프라이머 연장반응을 수행하면, 연장된 이중가닥 cDNA(130)가 생성된다. 연장된 이중가닥 cDNA(130)을 주형으로 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드와 동일한 핵산서열을 갖는 리버스 프라이머(133)과 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드의 5'-말단의 핵산서열을 갖는 포워드 프라이머(132)로 PCR 반응을 수행하면 연장된 이중가닥 cDNA(130) 지수적으로 증폭되게 된다.

- [48] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 miRNA 특이적 포워드 프라이머를 이용한 miRNA 검출방법을 개략적으로 나타낸 개요도이다. 도 5에 도시된 바와 같이, miRNA(101)의 3'-말단의 5-7 nt 바람직하게는 6 nt의 부분과 특이적으로 상보결합할 수 있는 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드(134) 및 이와 연결되어 있으며, 표적 miRNA와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드(135)로 구성된 miRNA 특이적 리버스 프라이머(136)가 혼성화한 후, 역전사효소에 의해 역전사 반응이 일어나면 안티센스 가닥 cDNA(137)이 생성된다. 안티센스 가닥 cDNA(137)에 상술한 6 nt를 제외한 miRNA 부분(즉, 16 nt 정도)과 특이적으로 상보결합할 수 있는 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드(138) 및 이에 연결된 임의의 올리고뉴클레오티드로서 안티센스 가닥 cDNA(137)이나 miRNA(101) 모두에 대하여 상보결합하지 않는 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드(142)로 구성된 연장용 프라이머(143)로 연장반응을 수행하면, 양방향으로 연장이 이루어져, miRNA 특이적 프라이머(136) 부분 및 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드(142) 부분의 상보적인 가닥을 포함한 연장 산물이 생성된다. 이때, 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드(142)는 모든 miRNA 검출 키트에서 공통으로 사용되는 유니버설 리버스 프라이머 부분인 5'-영역(141)을 5'-말단에 포함하고 있고, 그 외의 부분인 3'-영역(139)은 miRNA 종류에 따라 서열 및/또는 길이를 달리함으로써 multiplex 분석시 동시에 다양한 miRNA를 검출할 수 있게 한다. 연장반응이 완료되면 동일 튜브에서 miRNA 특이적 프라이머(136)과 5'-영역(141)에 상응하는 포워드 프라이머(144)를 이용한 PCR을 통해 PCR 산물(145)이 생성된다. 상기 포워드 프라이머(144)의 경우 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드의 5'-말단의 핵산서열로부터 선택되는데, 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드의 5'-말단 서열을 miRNA의 종류와 무관하게 동일한 서열로 고안할 경우, 유니버설 포워드 프라이머가 되게 된다. PCR 산물(145)는 실시간 PCR에 의해 반응과정에서 검출될 수 있고, 반응이 완결된 후, 아가로스 겔 전기영동 등에 의해 확인이 가능하다. 상기 miRNA 특이적 프라이머의 경우, 제1

어댑터 올리고뉴클레오티드의 길이가 충분히 길 경우, 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드의 전부 또는 일부 서열로 구성된 리버스 프라이머가 사용될 수 있고, 이 경우 miRNA의 종류와 무관하게 동일한 핵산서열을 사용할 수 있는데, 이를 유니버설 리버스 프라이머라고 한다.

- [49] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명하고자 한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

### 발명의 실시를 위한 형태

#### [50] 실시예:

- [51] 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따른, miRNA에 poly A 연결 후 oligo dT 프라이머를 이용한 역전사 이후, miRNA 특이적 서열을 포함한 연장용 프라이머를 이용한 양방향 연장반응 후, PCR을 이용하여 다양한 miRNA를 검출하였다. 아울러, 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따른, oligo dT 프라이머 사용 없이, miRNA의 3'-말단의 특이적인 6 nt의 핵산서열을 5'-말단으로 갖는 miRNA 특이적 포워드 프라이머와 상기 6 nt의 핵산서열 외의 miRNA 특이적 서열을 갖는 연장용 프라이머를 이용하여 다양한 miRNA를 검출하였다. 검출하고자 한 miRNA는 하기와 표 1과 같다.

- [52] 폴리 A 폴리머라아제를 사용한 방법의 경우, 42°C에서 60분간 poly A 꼬리연결 및 역전사 반응을 수행한 후, 70°C에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화시켰고, 프라이머 연장반응 및 PCR은 95°C에서 15분간 DNA를 녹인 후, 94°C에서 15초, 55°C에서 30초, 70°C에서 30초를 40 사이클 돌린 후, 녹는점곡선(melting curve)은 95°C 10초 가열 후 65°C에서 95°C까지 5초당 0.5°C씩 상승하게 함으로써 측정하였다.

- [53] miRNA 특이적 프라이머를 사용한 방법의 경우, 42°C에서 60분간 역전사 반응을 수행한 후, 70°C에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화시켰고, 프라이머 연장반응 및 PCR은 95°C에서 15분간 DNA를 녹인 후, 95°C에서 10초, 60°C에서 40초를 40 사이클 돌린 후, 녹는점곡선(melting curve)은 95°C 10초 가열 후 65°C에서 95°C까지 5초당 0.5°C씩 상승하게 함으로써 측정하였다.

- [54] PCR 반응은 ABI사의 실시간 PCR 장치를 이용하여 수행하였으며, 실제 PCR 반응이 제대로 이루어졌는지 확인하기 위하여, 1.5% 아가로즈 겔 전기영동을 통해 밴드패턴을 확인하였다.

[55] [표1]  
본 발명의 실시예

실시예	증폭 대상 miRNA	폴리 A 폴리머라아 제 사용 여부	역전사용 프라이머( 서열번호)	연장용 프라이머(서 열번호)	포워드 프라이머	리버스 프라이 머	
1	miR-532	Y	1	10	18	19	
2	miR-196b	Y		11			
3	miR-362	Y		12			
4	miR-29c	Y		13			
5	miR-106b	Y		14			
6	miR-200c	Y		15			
7	miR-127	Y		16			
8	miR-145	Y		17			
9	miR-532	N	2	10			2
10	miR-196b	N	3	11			3
11	miR-362	N	4	12			4
12	miR-29c	N	5	13			5
13	miR-106b	N	6	14			6
14	miR-200c	N	7	15			7
15	miR-127	N	8	16			8
16	miR-145	N	9	17			9

[56] 비교예:

[57] 본 발명자들은 비교예로 Qiagen 사에서 판매되는 miRNA 검출키트를 사용하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 miRNA 검출 키트와 성능을 비교하였다.

[58] [표2]  
비교예

비교예	증폭 대상 miRNA	검출방식
1	miR-532	앵커 올리고 dT 어댑터 사용
2	miR-196b	앵커 올리고 dT 어댑터 사용
3	miR-362	앵커 올리고 dT 어댑터 사용
4	miR-29c	앵커 올리고 dT 어댑터 사용
5	miR-106b	앵커 올리고 dT 어댑터 사용
6	miR-200c	앵커 올리고 dT 어댑터 사용
7	miR-127	앵커 올리고 dT 어댑터 사용
8	miR-145	앵커 올리고 dT 어댑터 사용

[59] 상술한 분석 결과, 도 3 내지 25에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 miRNA 검출 키트 및 방법에 따르면, Qiagen사의 상용 miRNA 검출키트보다 더 선명하고 정확한 miRNA 검출이 가능함을 확인할 수 있었다.

[60] 본 발명은 상술한 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구 범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

**산업상 이용가능성**

[61] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 특정 miRNA를 고가의 장비 없이도 정확하고 신속하게 검출하는 것이 가능하며, 복수의 miRNA를 동시에 검출할 수 있는 멀티플렉스 분석 역시 가능하다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 miRNA 검출용 키트 및 방법은 암을 비롯한 각종 질병의 진단 및 예후 판정 등에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

**서열목록 Free Text**

[62] 서열번호 1 내지 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 miRNA 검출 키트에 사용되는 각종 프라이머들의 핵산서열이다.

## 청구범위

- [청구항 1] miRNA 또는 poly A 폴리머라제에 의해 poly A가 연결된 poly A 꼬리연결 miRNA의 3'-말단과 특이적으로 혼성화하는 핵산서열로 구성된 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드 및 표적 miRNA와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 역전사용 프라이머; 상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드와 혼성화되는 miRNA 또는 poly A 꼬리연결 miRNA의 3'-말단에 상응하는 부분을 제외한 상기 miRNA 또는 poly A 꼬리연결 miRNA로부터 역전사된 cDNA와 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드 및 상기 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된 연장용 프라이머; 및 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드 내에서 선택되는 포워드 프라이머를 포함하는 miRNA 검출용 키트.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드와 동일한 핵산서열로 구성되는 리버스 프라이머를 추가로 포함하는, miRNA 검출용 키트.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 리버스 프라이머는 miRNA의 종류와 무관하게 동일한 핵산서열로 구성되는 유니버설 리버스 프라이머인, miRNA 검출용 키트.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 포워드 프라이머는 miRNA의 종류와 무관하게 동일한 핵산서열로 구성된 유니버설 포워드 프라이머인, miRNA 검출용 키트.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 miRNA의 3'-말단과 특이적으로 혼성화하는 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드는 3 내지 12 nt의 길이를 갖는, miRNA 검출용 키트.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 poly A 꼬리연결 miRNA의 3'-말단과 특이적으로 혼성화하는 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드는 15 내지 30 nt의 길이를 갖는, miRNA 검출용 키트.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드는 3 내지 30 nt의 길이를 갖는, miRNA 검출용 키트.

- [청구항 8] 제1항에 있어서,  
역전사 효소, 열안정성 DNA 중합효소 및 dNTP 혼합물을  
추가적으로 포함하는, miRNA 검출용 키트.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,  
폴리 A 폴리머라아제 및 ATP를 추가적으로 포함하는, miRNA  
검출용 키트.
- [청구항 10] 증폭대상 miRNA를 상기 miRNA의 3'-말단과 특이적으로  
혼성화하는 핵산서열로 구성된 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드  
및 표적 miRNA와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1 어댑터  
올리고뉴클레오티드로 구성된 역전사용 프라이머로 역전사하는  
역전사반응단계;  
상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드와 혼성화되는 miRNA의  
3'-말단에 상응하는 부분을 제외한 상기 miRNA로부터 역전사된  
cDNA와 특이적으로 혼성화 가능한 제2 혼성화  
올리고뉴클레오티드 및 상기 cDNA와 혼성화되지 않는 임의의  
핵산서열로 구성된 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드로 구성된  
연장용 프라이머로 상기 cDNA를 연장하는 연장반응단계; 및  
상기 연장된 cDNA를 주형으로 상기 역전사용 프라이머 또는 상기  
제1 어댑터 올리고뉴클레오티드와 동일한 핵산서열로 구성되는  
리버스 프라이머 및 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드 내에서  
선택되는 포워드 프라이머를 이용하여 증폭하는 PCR 단계를  
포함하는, miRNA의 검출방법.
- [청구항 11] 폴리 A 폴리머라아제를 이용하여 증폭 대상 miRNA에 poly A  
꼬리를 연결하는 poly A 꼬리연결 miRNA 제조단계;  
상기 poly A 꼬리연결 miRNA의 poly A 꼬리와 특이적으로  
혼성화하는 poly dT로 구성된 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드 및  
표적 miRNA와 혼성화하지 않는 임의의 핵산서열인 제1 어댑터  
올리고뉴클레오티드로 구성된 역전사용 프라이머로 역전사하는  
역전사반응단계;  
상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드와 혼성화되는 poly A  
꼬리연결 miRNA의 3'-말단에 상응하는 부분을 제외한 상기 poly A  
꼬리연결 miRNA로부터 역전사된 cDNA와 특이적으로 혼성화  
가능한 제2 혼성화 올리고뉴클레오티드 및 상기 cDNA와  
혼성화되지 않는 임의의 핵산서열로 구성된 제2 어댑터  
올리고뉴클레오티드로 구성된 연장용 프라이머로 상기 cDNA를  
연장하는 연장반응단계; 및  
상기 연장된 cDNA를 주형으로 상기 역전사용 프라이머 또는 상기  
제1 어댑터 올리고뉴클레오티드와 동일한 핵산서열로 구성되는

리버스 프라이머 및 상기 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드 내에서 선택되는 포워드 프라이머를 이용하여 증폭하는 PCR 단계를 포함하는, miRNA의 검출방법.

[청구항 12]

제10항 또는 제11항에 있어서,  
상기 포워드 프라이머는 miRNA의 종류와 무관하게 동일한 핵산서열로 구성되는 유니버설 포워드 프라이머인, miRNA 검출방법.

[청구항 13]

제10항 또는 제11항에 있어서,  
상기 리버스 프라이머는 miRNA의 종류와 무관하게 동일한 핵산서열로 구성된 유니버설 리버스 프라이머인, miRNA 검출용 키트.

[청구항 14]

제10항에 있어서,  
상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드는 3 내지 12 nt의 길이를 갖는, miRNA 검출방법.

[청구항 15]

제11항에 있어서,  
상기 제1 혼성화 올리고뉴클레오티드는 15 내지 30 nt의 길이를 갖는, miRNA 검출방법.

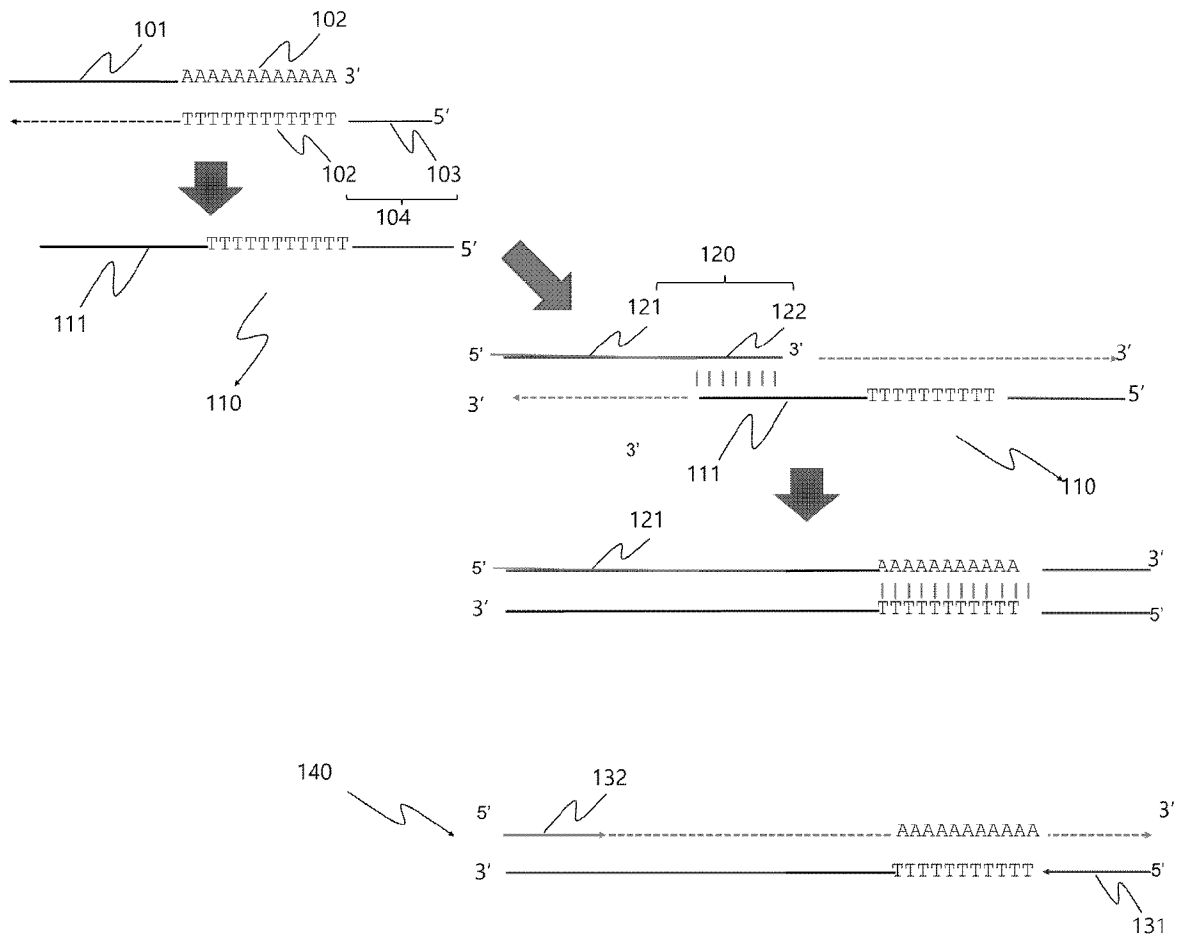
[청구항 16]

제10항 또는 제11항에 있어서,  
상기 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드는 3 내지 30 nt의 길이를 갖는, miRNA 검출방법.

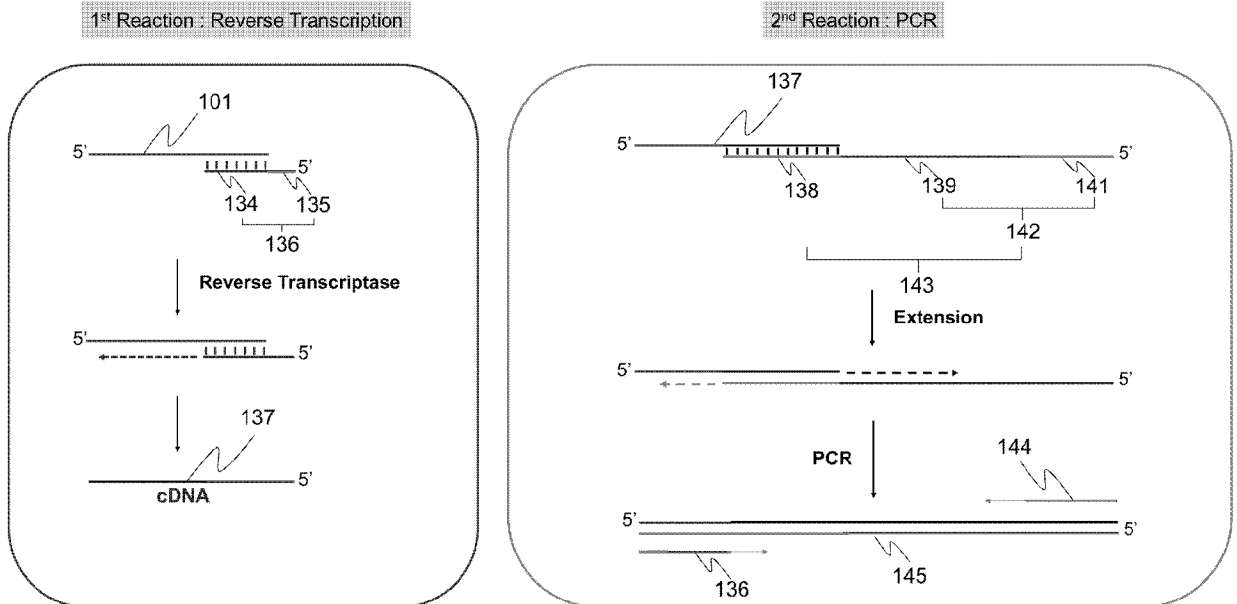
[청구항 17]

제10항 또는 제11항에 있어서,  
상기 PCR 단계는 실시간 PCR 반응에 의해 수행되는, 검출방법.

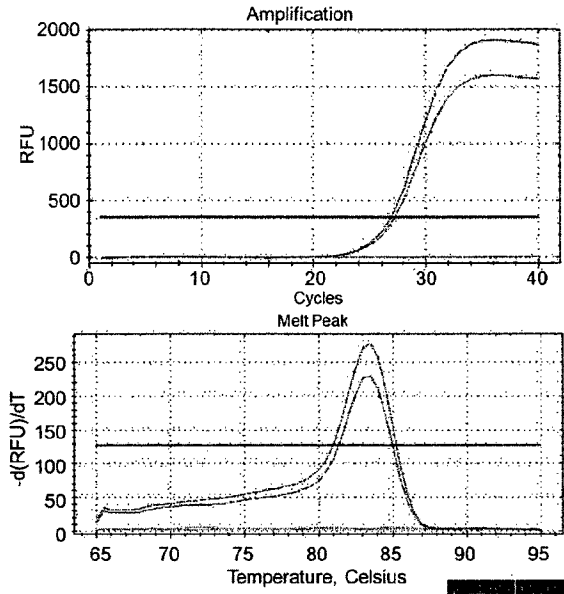
[도1]



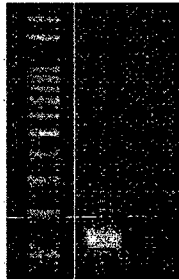
[도2]



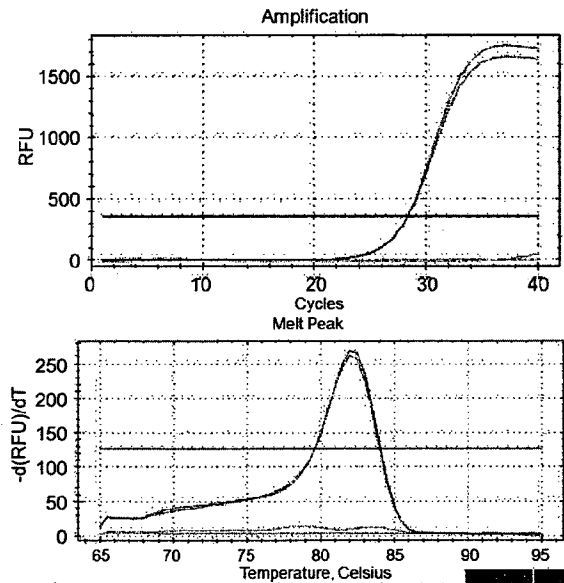
[도3]



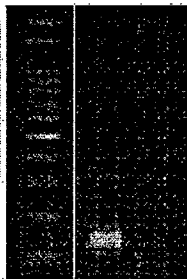
Sample	Cq	Melt Tem
miR-532(12T) Unkn	26.89	83.5
miR-532(12T) Unkn	27.2	83.5
miR-532(12T) NTC	N/A	None
miR-532(12T) NTC	N/A	None



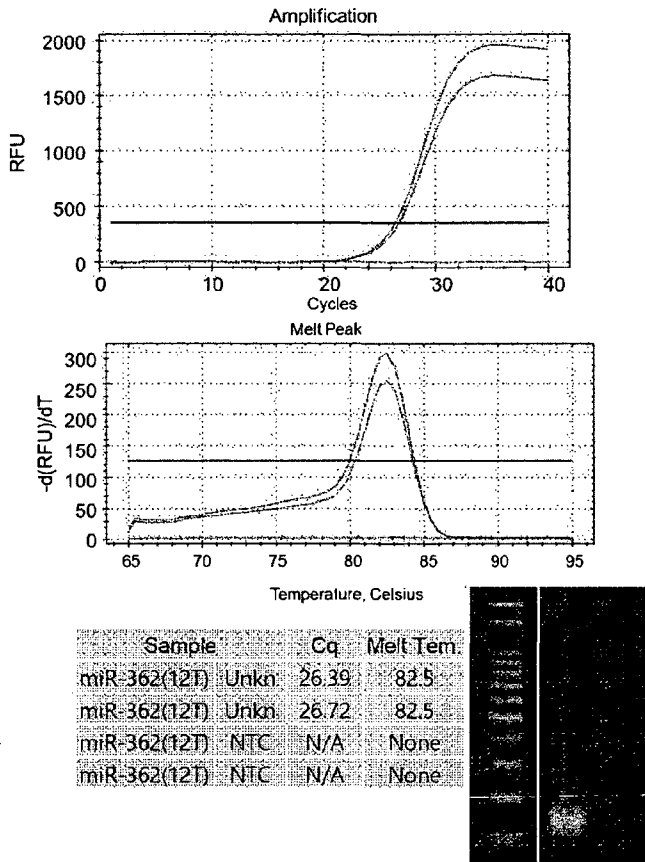
[도4]



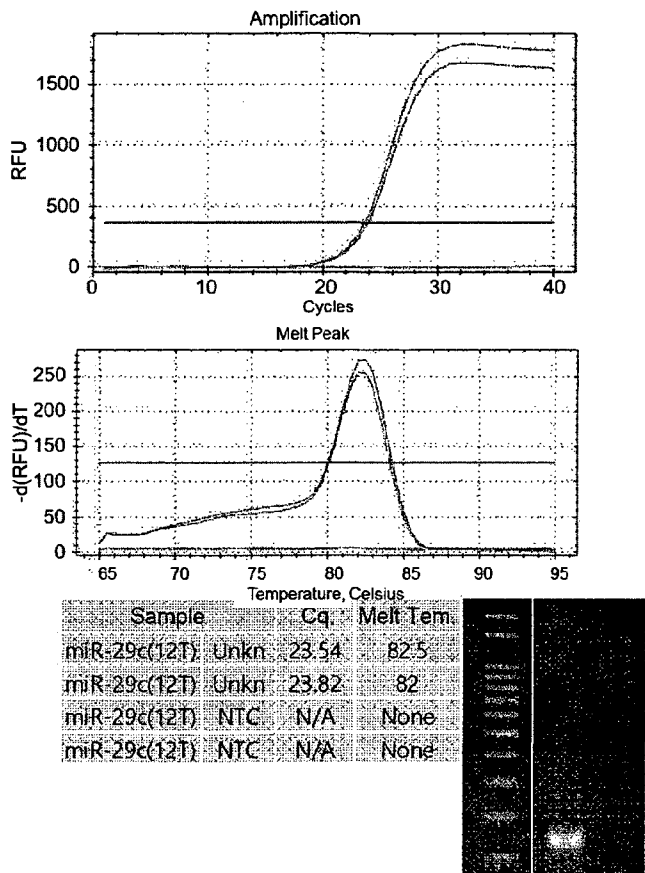
Sample	Cq	Melt Tem
miR-196b(12T) Unkn	28.3	82
miR-196b(12T) Unkn	28.33	82
miR-196b(12T) NTC	N/A	None
miR-196b(12T) NTC	N/A	None



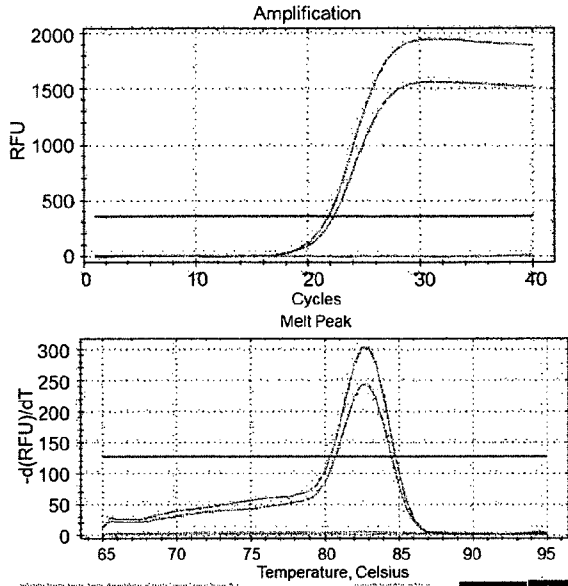
[도5]



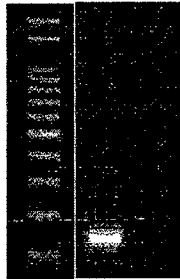
[도6]



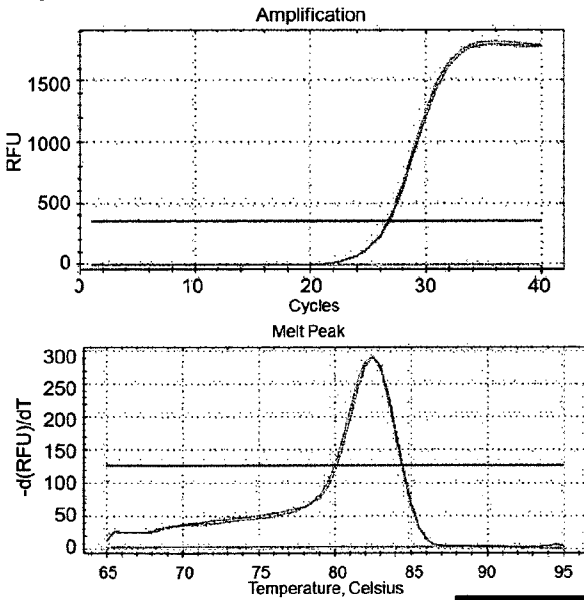
[도7]



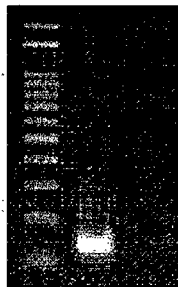
Sample	Cq	Melt Tem.
miR-106b(12T) Unkn	21.76	83
miR-106b(12T) Unkn	22.23	82.5
miR-106b(12T) NTC	N/A	None
miR-106b(12T) NTC	N/A	None



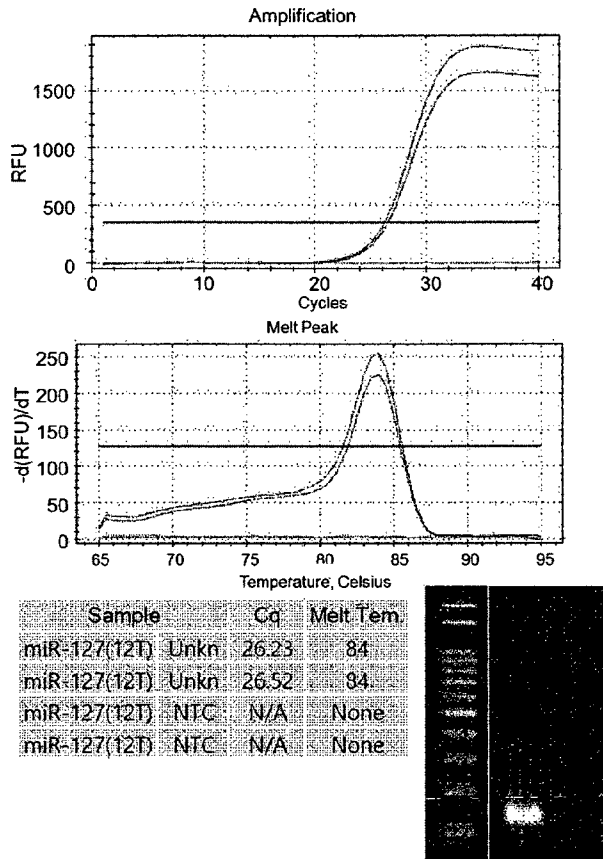
[도8]



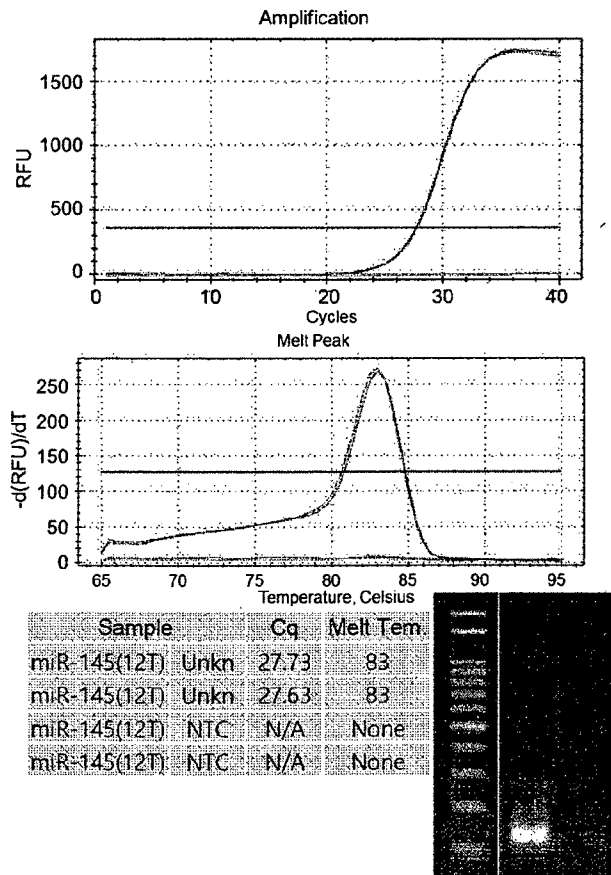
Sample	Cq	Melt Tem.
miR-200c(12T) Unkn	26.68	82.5
miR-200c(12T) Unkn	26.84	82.5
miR-200c(12T) NTC	N/A	None
miR-200c(12T) NTC	N/A	None



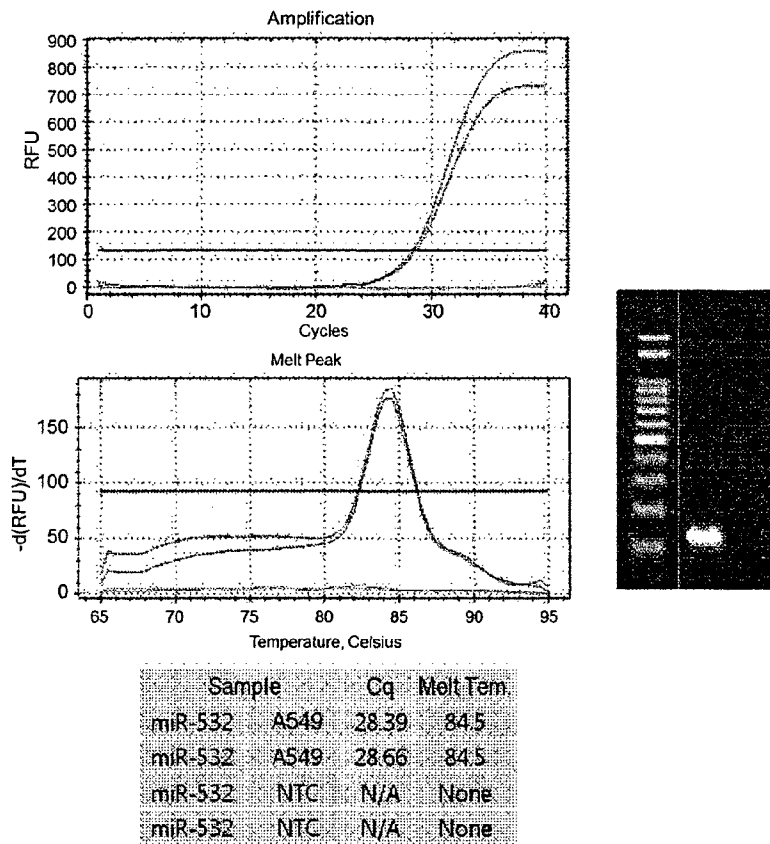
[도9]



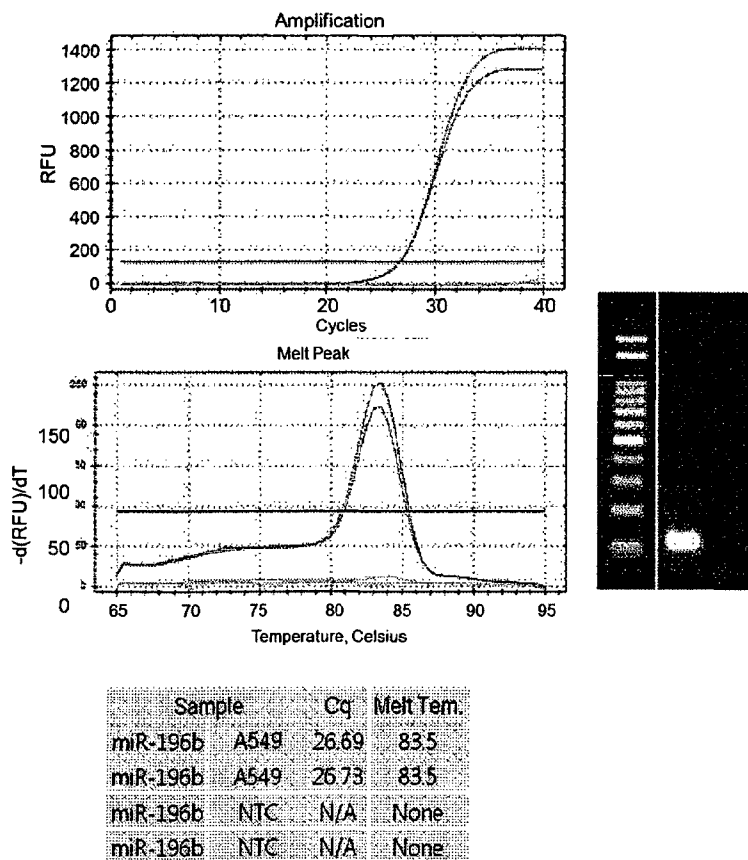
[도10]



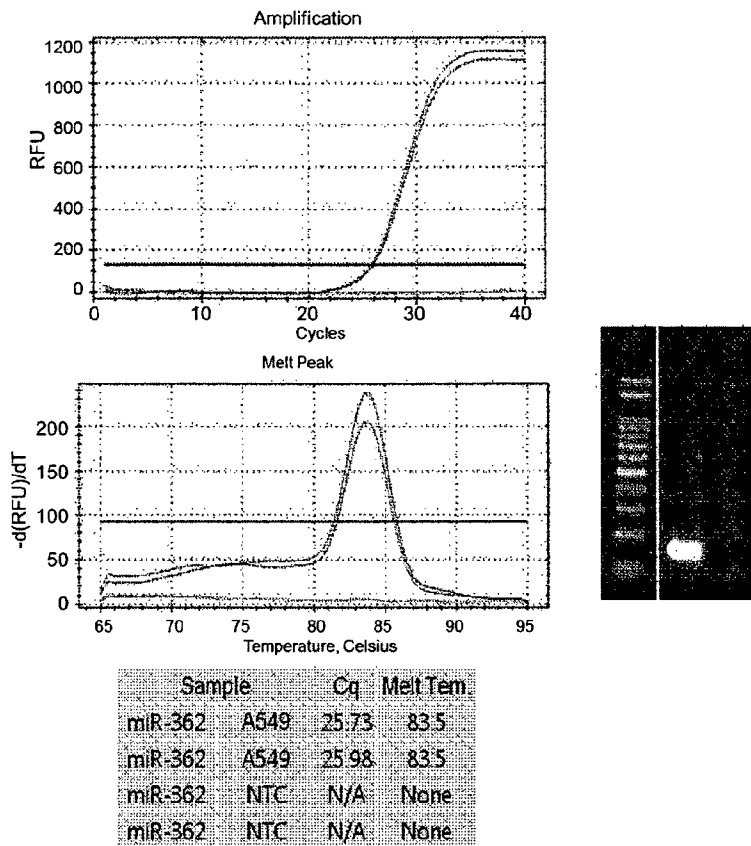
[도 11]



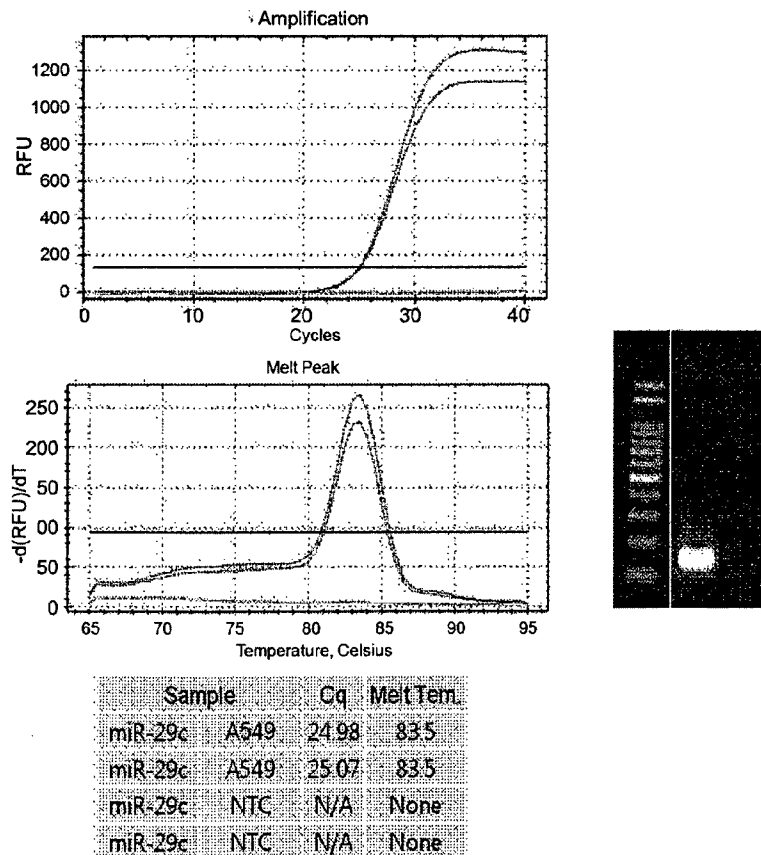
[도 12]



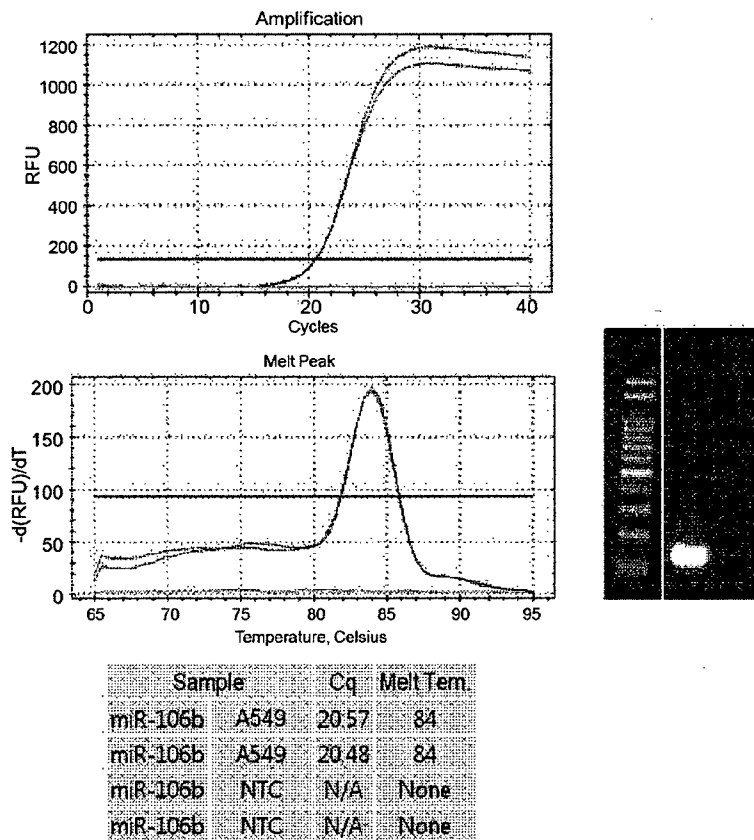
[도 13]



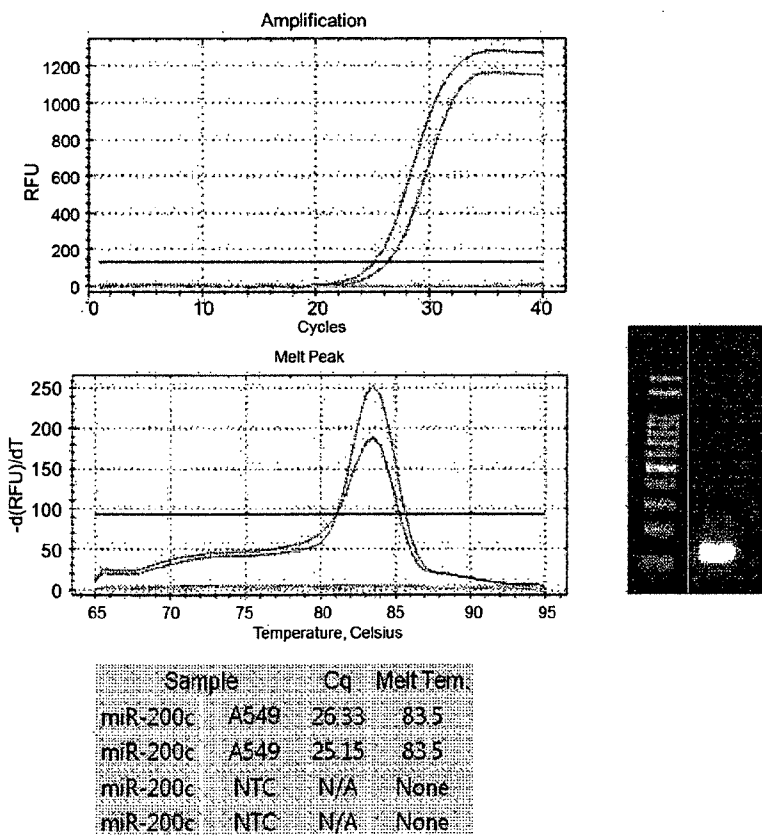
[도 14]



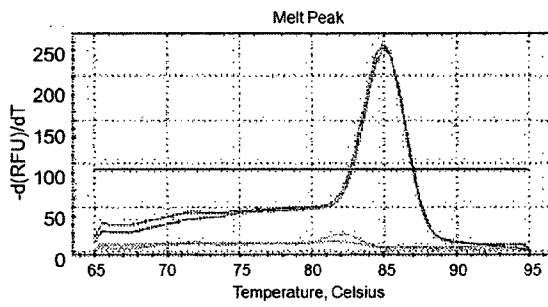
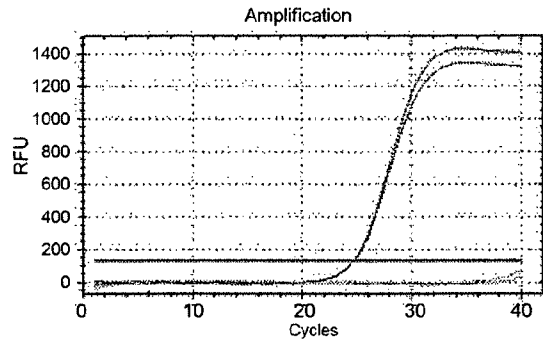
[E15]



[E16]

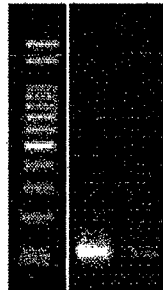
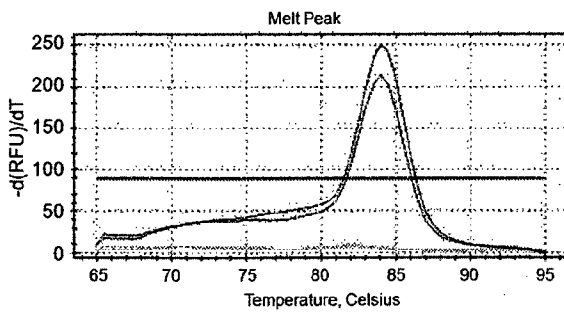
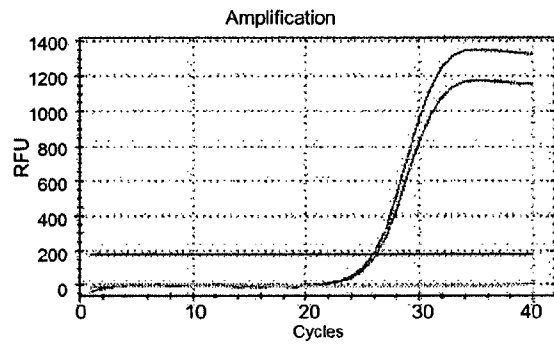


[도 17]



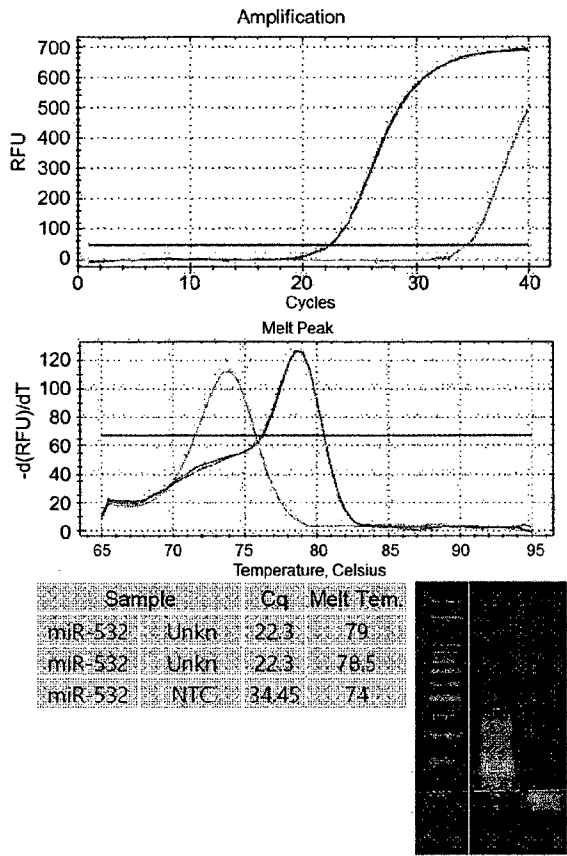
Sample	Cq	Melt Tem.
miR-127 A549	24.67	85
miR-127 A549	24.73	85
miR-127 NTC	N/A	None
miR-127 NTC	N/A	None

[도 18]

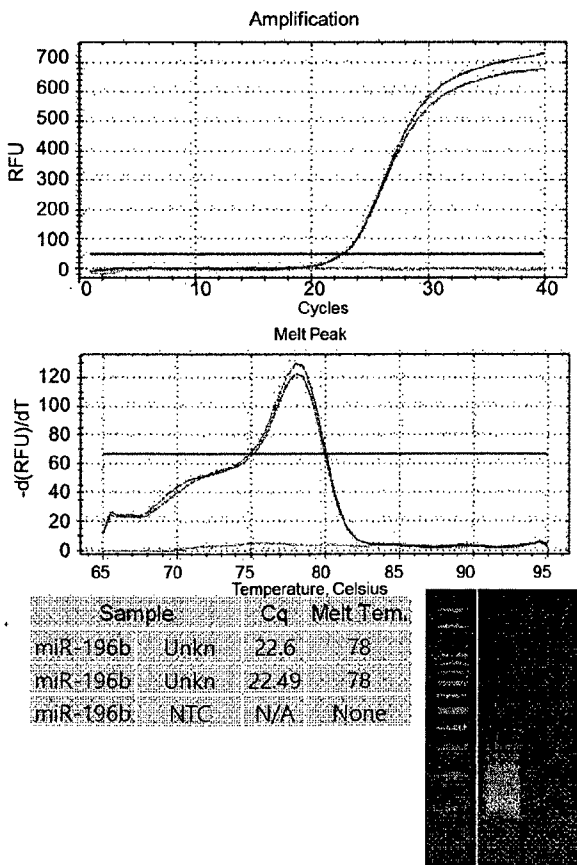


Sample	Cq	Melt Tem.
miR-145 A549	25.9	84
miR-145 A549	26.18	84
miR-145 NTC	N/A	None
miR-145 NTC	N/A	None

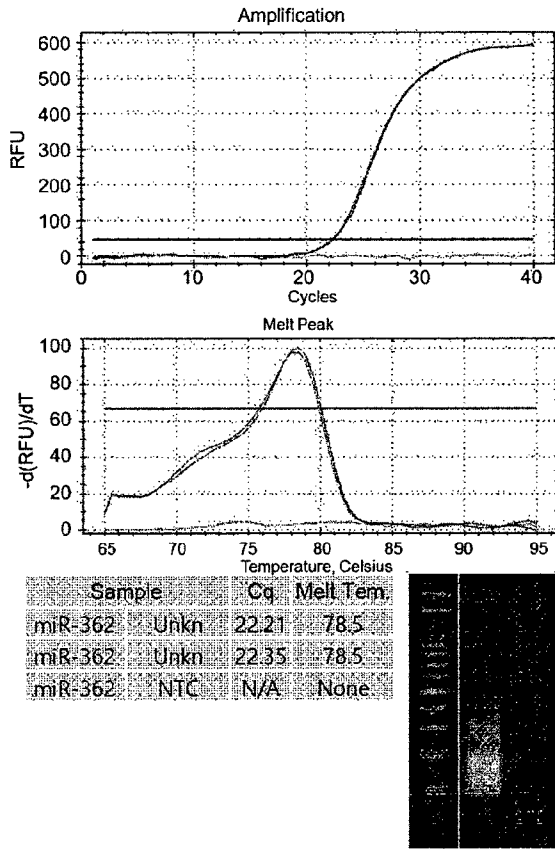
[도19]



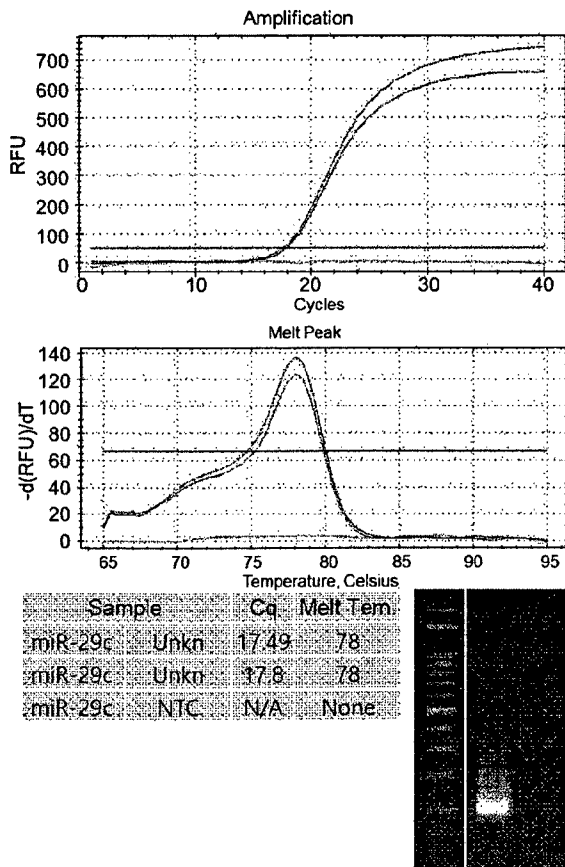
[도20]



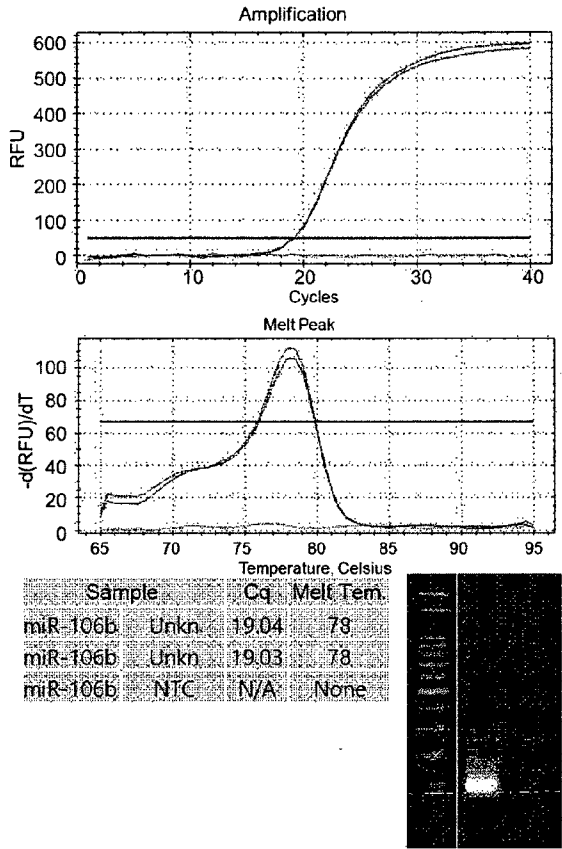
[도21]



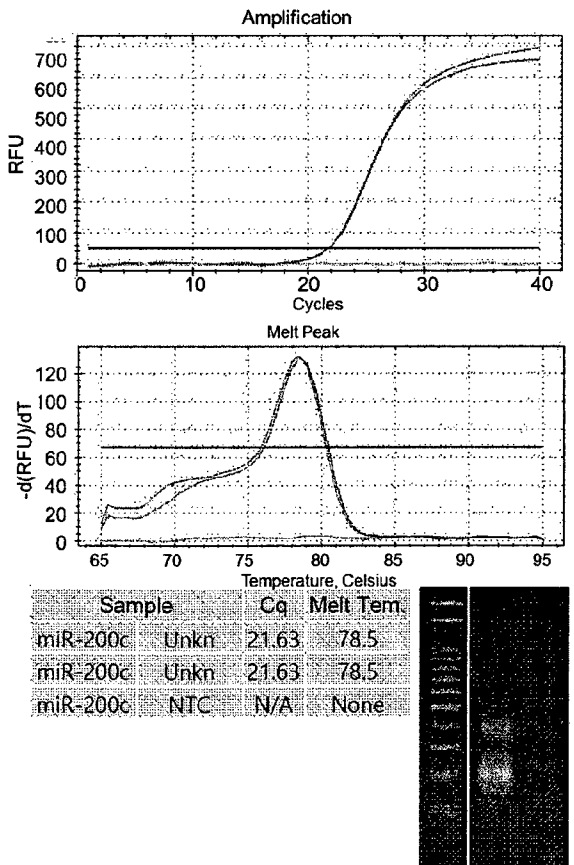
[도22]



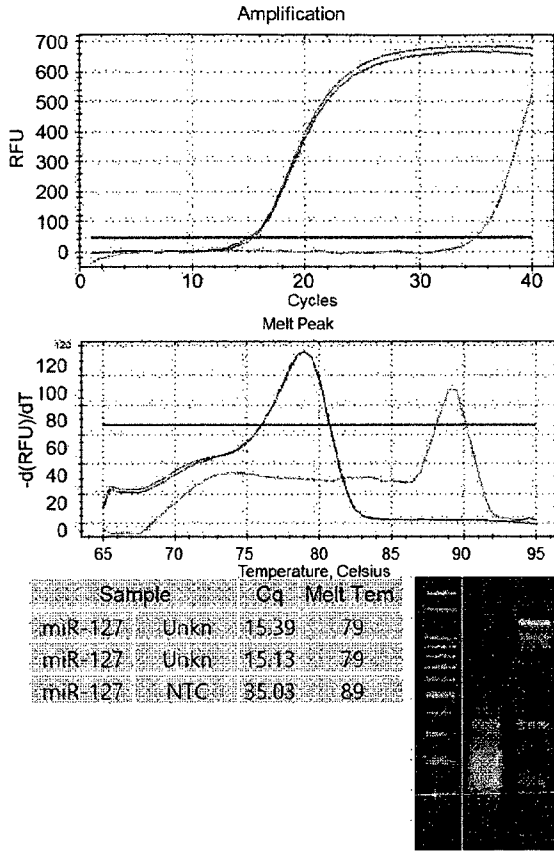
[도 23]



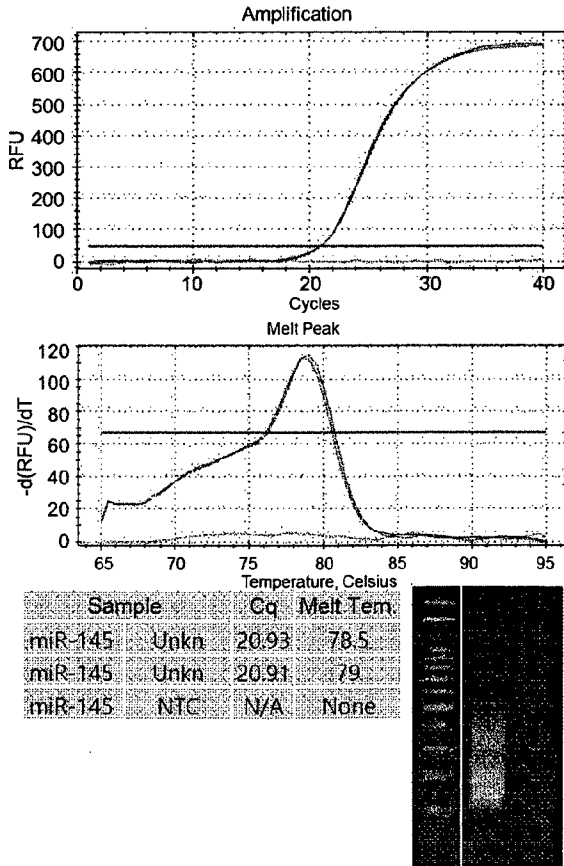
[도 24]



[E25]



[E26]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/001411

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/113(2010.01)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; C07H 21/04; C40B 30/04; C12N 15/113

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) &amp; Keywords: miRNA, reverse transcription, reverse primer, cDNA, extending primer, forward primer, reverse primer

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 8383344 B2 (JACOBSEN et al.) 26 February 2013 See column 30, line 40-column 31, line 39; column 34, lines 42-52, 61-67; column 38, lines 7-10; column 40, lines 6-29; claims 1, 8-10, 17, 19-21 and figures 11, 37.	1-17
Y	US 2014-0295434 A1 (WU et al.) 02 October 2014 See claims 11, 14 and figure 1.	1-17
A	EP 2198059 B1 (KUTYAVIN) 03 December 2014 See paragraphs [0019], [0093]-[0105] and claims 1, 6.	1-17
A	US 2013-0045885 A1 (MOHAPATRA et al.) 21 February 2013 See claims 1-3, 13, 15, 17, 20-21 and figure 1.	1-17
A	KR 10-2009-0017670 A (THIRD WAVE TECHNOLOGIES, INC.) 18 February 2009 See claims 1, 3, 9-10, 19 and figure 1.	1-17

 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

"I" 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 JUNE 2016 (22.06.2016)

Date of mailing of the international search report

22 JUNE 2016 (22.06.2016)

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. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2016/001411**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 8383344 B2	26/02/2013	US 2005-0272075 A1	08/12/2005
		US 2011-0076675 A1	31/03/2011
		US 2014-0227689 A1	14/08/2014
		US 8192937 B2	05/06/2012
US 2014-0295434 A1	02/10/2014	CN 102676637 A	19/09/2012
		CN 102676637 B	03/02/2016
		US 9290801 B2	22/03/2016
		WO 2012-119471 A1	13/09/2012
EP 2198059 B1	03/12/2014	AU 2008-310955 A1	16/04/2009
		AU 2008-310955 B2	29/01/2015
		CA 2702584 A1	16/04/2009
		EP 2198059 A1	23/06/2010
		ES 2526925 T3	16/01/2015
		JP 2011-501663 A	13/01/2011
		JP 5486501 B2	07/05/2014
		US 2010-0304442 A1	02/12/2010
		US 2014-0170666 A1	19/06/2014
		US 8637276 B2	28/01/2014
		US 8980558 B2	17/03/2015
		WO 2009-048928 A1	16/04/2009
		US 2013-0045885 A1	21/02/2013
WO 2011-103502 A3	12/01/2012		
KR 10-2009-0017670 A	18/02/2009	AU 2007-254852 A1	13/12/2007
		AU 2007-254852 B2	08/03/2012
		CA 2654016 A1	13/12/2007
		CA 2654016 C	05/01/2016
		CN 101541975 A	23/09/2009
		CN 101541975 B	03/04/2013
		CN 103146825 A	12/06/2013
		EP 2029774 A1	04/03/2009
		EP 2029774 B1	01/04/2015
		EP 2522751 A1	14/11/2012
		JP 2009-538627 A	12/11/2009
		JP 2013-176378 A	09/09/2013
		JP 5260503 B2	14/08/2013
		JP 5792223 B2	07/10/2015
		KR 10-1105564 B1	17/01/2012
WO 2007-143097 A1	13/12/2007		

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**  
C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/113(2010.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)  
C12Q 1/68; C07H 21/04; C40B 30/04; C12N 15/113

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: miRNA, 역전사, 역전사용 프라이머, cDNA, 연장용 프라이머, 포워드 프라이머, 리버스 프라이머

**C. 관련 문헌**

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	US 8383344 B2 (JACOBSEN 등) 2013.02.26 컬럼 30, 라인 40 - 컬럼 31, 라인 39; 컬럼 34, 라인 42-52, 61-67; 컬럼 38, 라인 7-10; 컬럼 40, 라인 6-29; 청구항 1, 8-10, 17, 19-21 및 도면 11, 37 참조.	1-17
Y	US 2014-0295434 A1 (WU 등) 2014.10.02 청구항 11, 14 및 도면 1 참조.	1-17
A	EP 2198059 B1 (KUTYAVIN) 2014.12.03 문단 [0019], [0093]-[0105] 및 청구항 1, 6 참조.	1-17
A	US 2013-0045885 A1 (MOHAPATRA 등) 2013.02.21 청구항 1-3, 13, 15, 17, 20-21 및 도면 1 참조.	1-17
A	KR 10-2009-0017670 A (씨드 웨이브 테크놀로지스, 아이앤씨.) 2009.02.18 청구항 1, 3, 9-10, 19 및 도면 1 참조.	1-17

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 2016년 06월 22일 (22.06.2016)	국제조사보고서 발송일 2016년 06월 22일 (22.06.2016)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371
---	------------------------------------

## 제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 게시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 아래에 기초하여 수행되었습니다.

a.  아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

부록 C/ST.25 텍스트 파일

서면 혹은 이미지 파일

b.  PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

c.  국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713)

2.  추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 8383344 B2	2013/02/26	US 2005-0272075 A1 US 2011-0076675 A1 US 2014-0227689 A1 US 8192937 B2	2005/12/08 2011/03/31 2014/08/14 2012/06/05
US 2014-0295434 A1	2014/10/02	CN 102676637 A CN 102676637 B US 9290801 B2 WO 2012-119471 A1	2012/09/19 2016/02/03 2016/03/22 2012/09/13
EP 2198059 B1	2014/12/03	AU 2008-310955 A1 AU 2008-310955 B2 CA 2702584 A1 EP 2198059 A1 ES 2526925 T3 JP 2011-501663 A JP 5486501 B2 US 2010-0304442 A1 US 2014-0170666 A1 US 8637276 B2 US 8980558 B2 WO 2009-048928 A1	2009/04/16 2015/01/29 2009/04/16 2010/06/23 2015/01/16 2011/01/13 2014/05/07 2010/12/02 2014/06/19 2014/01/28 2015/03/17 2009/04/16
US 2013-0045885 A1	2013/02/21	WO 2011-103502 A2 WO 2011-103502 A3	2011/08/25 2012/01/12
KR 10-2009-0017670 A	2009/02/18	AU 2007-254852 A1 AU 2007-254852 B2 CA 2654016 A1 CA 2654016 C CN 101541975 A CN 101541975 B CN 103146825 A EP 2029774 A1 EP 2029774 B1 EP 2522751 A1 JP 2009-538627 A JP 2013-176378 A JP 5260503 B2 JP 5792223 B2 KR 10-1105564 B1 WO 2007-143097 A1	2007/12/13 2012/03/08 2007/12/13 2016/01/05 2009/09/23 2013/04/03 2013/06/12 2009/03/04 2015/04/01 2012/11/14 2009/11/12 2013/09/09 2013/08/14 2015/10/07 2012/01/17 2007/12/13