

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 4월 30일 (30.04.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/060609 A2

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) C12M 1/36 (2006.01)
C12N 15/115 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/009870
- (22) 국제출원일: 2014년 10월 21일 (21.10.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0125087 2013년 10월 21일 (21.10.2013) KR
10-2013-0143495 2013년 11월 25일 (25.11.2013) KR
- (71) 출원인: 주식회사 바이오이즈 (BIOIS CORP.)
[KR/KR]; 152-777 서울시 구로구 디지털로 32길 30,
703호, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김성천 (KIM, Sung-Chun); 120-080 서울시 서
대문구 독립문공원길 17, 110동 202호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 137-873 서울시
서초구 반포대로 26길 21, 소소헌빌딩 1층, 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:

- 조약 제 17조(2)(a)에 의한 선언서와 함께; 요약서 없이
공개함; 발명의 명칭에 대하여 국제조사기관의 검토가
없었음



WO 2015/060609 A2

(54) Title: METHOD AND APPARATUS FOR ANALYZING BIOMOLECULES BY USING OLIGONUCLEOTIDE

(54) 발명의 명칭 : 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치

(57) Abstract:

(57) 요약서:

명세서

발명의 명칭: 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치

기술분야

- [1] 본 발명은 일반적으로 생체분자 분석 방법에 관한 것이며, 더 구체적으로는 생체분자들의 생물학적 의미 분석을 위한 다양한 표적분자에 결합하는 분석리간드 및 핵산 등의 표적핵산이 포함된 핵산에서 표적핵산의 특정영역에 완전하게 상보적 결합을 하는 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 한 번의 검사로 생체시료에서 생체분자를 분석하는 방법 및 장치에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 생체분자는 생체시료를 구성하는 수많은 단백질, 핵산, 지질 및 탄소화물 등의 물질이며 이런 생체분자들을 분석하는 기술 그리고 생체시료에서 생체분자들의 양적인 상태를 종합화한 정보, 즉 생체분자의 프로파일(profile)을 생산하는 기술은 물리학, 생화학 및 생물정보학의 발달로 널리 개발되었으나, 기존 방법이나 기기의 사용 및 유지비, 용이성, 정확도, 민감도, 검사시간 및 과정의 자동화 등에 대한 문제로 효율적인 새로운 방법 및 기기에 대한 필요성이 매우 높다.
- [3] 생체분자 분석 및 프로파일 생산하는 기술은 그 자체가 궁극적인 목표가 아니라 목표를 이루기 위한 하나의 수단이지만, 미생물, 세포, 조직 등에 유용하게 사용할 수 있어 의학, 수의학, 환경공학, 식품공학, 농업 등에 광범위하게 응용되고 있다
- [4] 생체시료인 조직, 세포덩어리, 세포 및 미생물 등을 구성하는 핵산, 단백질 및 유기물질 등을 포함한 생체분자들의 프로파일은, 물리, 화학적인 성질을 이용하여 여러 가지 방법으로 만들어지고 있다.
- [5] 생체시료에 있는 생체분자들의 프로파일을 이용한 생물학적 의미를 분석하기 위한 임상 의사 결정 지원 시스템(Clinical Decision Support System)는 환자 진료에서 의사가 진단과 치료에 관한 의사 결정(Decision Making)을 하는 과정을 지원하는 시스템이다. 임상 의사 결정 지원 시스템은 크게 사례 기반 기계학습 추론 시스템(Case Based Machine Learning Inference System)과 전문가 시스템(Expert System)으로 나뉘어진다. 사례 기반 기계학습 추론 시스템은 질환이 판정된 환자들의 임상 정보(Clinical Information) 및 생물학적 정보 즉 생체분자 프로파일데이터들을 수집한 후 기계학습을 이용하여 주어진 임상 정보와 생물학적 정보 등으로 질환을 추론 또는 판별할 수 있도록 하는 시스템이다. 전문가 시스템은 의학 전문가에 의해 사전에 정해진 규칙(Rule)을 사용하여 질병을 진단하는 시스템이다.
- [6] 가장 대표적인 생체분자인 유전물질인 핵산 및 단백질에 대해 살펴보면,

유전정보는 염색체를 구성하는 데옥시리보 핵산 (DNA)의 매우 긴 분자 형태로 저장되고 상기 염색체는 인간 게놈을 형성하는 약 30억 개의 뉴클레오티드를 포함한다. 염색체에서 뉴클레오티드의 서열은 각 개체의 특성을 결정하는 데 있어 주요한 역할을 한다. 다수의 일반적인 질병은 개체들 사이의 인간 게놈의 뉴클레오티드 서열에서의 변형에 근거한다. 동종에 속하는 생물체 개체의 게놈에 포함된 유전자 코드는 서로 일치하지 않고, 다형성(polymorphism)으로 불리는 염기서열상의 차이가 존재한다. 다형성에는 1개 이상의 염기가 결실되거나(deletion) 삽입된 것(insertion), 특정 염기 서열이 중복된(repeat) 것 등이 알려져 있다. 하나의 염기가 또 다른 염기로 치환된 것은 단일염기 다형성(Single nucleotide polymorphism, 이하 "SNP"라 약칭함)으로 명명된다.

- [7] 많은 SNP의 유전자형 분석 화학(genotyping chemistries)으로는 PCR-제한된 절편 길이 다형성 분석(PCR-restriction fragment length polymorphism analysis), 단일가닥 형성 다형성 검출(single-strand conformation polymorphism detection), 다이데옥시 미니 염기서열 결정(dideoxy minisequencing), 올리고뉴클레오타이드 라이게이션 분석(oligonucleotide ligation assays), 대립형질 특이 핵산증폭(allele-specific polymerase chain reaction, 이하 "AS PCR"이라 약칭함), 라이게이즈 연결 반응(ligase chain reaction), 프라이머-요구된 뉴클레오타이드 결합 분석(primer-required nucleotide incorporation assays) 및 형광 에너지 전달-기초된 분석(fluorescence energy transfer-based assays) 등이 제시되었다(Landegren, U., et al., 1998, *Genome Res*, 8:769-776; Gut, I.G., 2001, *Hum Mutat*, 17:475-492; Shi, M.M., 2001, *Clin Chem*, 47:164-172). 상기 목록 이외에 최근에 첨가된 것으로는 짧은 단일 DNA 절편의 질량을 정확하게 직접적으로 결정할 수 있는 질량 분광법(mass spectrometry)(Ross P et al., 2000, *BioTechniques*, 29:620-629)과 올리고뉴클레오타이드 마이크로어레이-기초 분석(Oligonucleotide microarray-based analysis)(Wang, D.G. et al., 1998, *Science*, 280:1077-1082)이 있다.

- [8] 대립형질특이 혼성화(allelic specific hybridization)은 Affymetrix whole genome SNP array (Komura D., et al., 2006, *Genome Res*. 2006; 16: 1575-84. 6), Idaho Hi-Res Melting curve analysis system (Graham R., et al., 2005, *Clin Chem*. 51: 1295-8), dynamic allele-specific hybridization(DASH) (Prince J.A., et al., 2001, *Genome Res*. 11: 152-62), 및 Illumina Golden Gate SNP Genotyping Arrays (Gunderson K.L., et al., 2005, *Nat Genet*. 37: 549-54), 형광 에너지 전달(fluorescence resonance energy transfer (FRET))은 TaqMan (Holloway J.W., et al., 1999, *Hum Mutat*. 14: 340-7), 분자비콘분석(Molecular beacons assays)은 (Barreiro L.B., et al., 2009, *Methods Mol Biol*. 578: 255-76), 및 AS PCR을 활용한 연장(extension)기술은 Illumina Infinium bead array (Oliphant A., et al., 2002, *Biotechniques*. Suppl: 56-8, 60-1), Beckman GenomeLab SNPstream system (Bell P.A., et al., 2002, *Biotechniques*. 2002; Suppl: 70-2, 74, 76-7) 및 Sequenom MassARRAY SNP system (Hayes B.J., et al. 2007,

Bioinformatics. 2007; 23: 1692-3) 등이 있다.

- [9] SNP 동정을 하기 위한 상기 방법들은 특정 목적에 따라 상대적인 장점과 단점을 가지고 있기 때문에 어떠한 방법이 다른 방법보다 더 우월한지에 대해서는 단정적으로 말할 수 없다. 한편, DNA-기반 마이크로어레이 기술은 특정 유전자 또는 유전자군의 존재, 양 또는 발현패턴을 분석할 수 있는 간단한 방법으로서 큰 각광을 받고 있다(Schena et al., 1995, Science, 270:467-470; DeRisi et al., 1996, Nature Genetics 14:457-460).
- [10] 각각의 세포에는 5만 내지 10만 개 정도의 유전자가 있지만, 세포는 선택적으로 유전자를 사용한다. 그 중 상당수는 세포 자신의 생명유지활동이나 일상적인 활동을 하기 위한 유전자이다. 이러한 유전자를 유지 유전자(housekeeping gene; 이하 HKG)라고 부른다. 또한, 내인성 표준 발현 유전자는, 특정 유전자의 기능을 밝히거나, 특정 기능의 유전자를 탐색하거나, 특정 조건의 생물체의 발현 양상 작성 및 그 외의 다양한 분자생물학적 목적에 의해, 특정 혹은 다수의 유전자 발현량의 비교를 위해 개발된 전령 RNA(messenger RNA; 이하 mRNA)의 정량분석을 이용하는 다양한 유전자발현 측정법은 전통적인 역전사중합효소연쇄반응법(reverse transcriptase polymerase chain reaction: 이하 RT-PCR)에서 최근 개발된 정량적 실시간 중합효소연쇄반응법(quantitative real time PCR: 이하 qRT-PCR), 유전자발현계열분석(serial analysis of gene expression: 이하 SAGE) 및 마이크로어레이(Microarray) 등이 있다.
- [11] 그러나, 종래의 DNA 마이크로어레이는 단지 혼성화 방식에 의해서 표적 서열을 검출하기 때문에 교차반응(cross reaction)에 의한 false positives 문제가 발생되어, 혼성화 시그널의 신뢰도를 개선하여야 하는 문제점이 있다. 또한, 종래의 마이크로어레이의 경우 혼성화 방식에 의해서 검출을 하기 때문에 혼성화 후 까다로운 세척 과정이 요구되는 문제점이 있으며, 혼성화 전에 표적서열을 단일가닥으로 만드는 과정이 필수적으로 요구된다. 한편, 최근에 발표된 on-chip PCR은 혼성화 또는 probe extension 방식에 의해 검출하기 때문에, 기존 마이크로 어레이와 같이 heterogenous assay system이며, 실시간 검출이 불가능 하고 정확한 정량이 어렵다는 문제점이 있다.
- [12] 또한 최근에는 단백질에 대한 병렬고속분석(High Throughput Screening) 기법으로 단백질칩(Protein chip) 혹은 압타머칩(Aptamer chip)(Smith et al., Mol Cell Protomics, 11-18. 2003; and McCauley et al., Anal Biochem, 319(2), 244-250. 2003)이 개발되어 사용되고 있다. 이런 병렬고속분석에는 사용되는 지지체로 유리슬라이드, 바이오센서의 감지표면, 비드, 나노입자 등이 있다.
- [13] 또한 프로파일을 분석하여 유용한 생체분자를 결정하고 이를 분리한후, MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight) 등으로 이들의 구성성분을 확인하는 방법 등이 수행되고 있다. 최근에는 SELDI-TOFMS(Surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry)에 의해 단백질 프로파일에 대한 많은 연구가 진행되고 있다(Adam

et al., *Cancer Research*, 62, 3609-3614. 2002; Li et al., *Clinical Chemistry*, 48, 1296-1304. 2002; and Petricoin et al., *The Lancet*, 359,572-577. 2002). 또 다른 접근 방법으로 DNA와 핵산 중합효소(polymerase)를 이용하여 신호를 증폭하는 기술인 immuno-PCR(IPCR) 방법이 개발되었다(Sano et al., *Science* 258, 120-122. 1992).

- [14] 상기와 같이 면역분석법은 검출감도의 향상 및 다중분석능의 향상에 있어서 발전을 거듭했지만, 여전히 분석비용절감, 분석시간의 단축, 민감도 향상 및 재현성 증대라는 기술적 과제에 직면해 있다.
- [15] 본 발명자는 단백질에 대한 프로파일을 생산하는 reverse-SELEX(대한민국 특허등록 10-0670799호 참조), 압타머기반 핵산칩 (대한민국 v허등록 제10-0464225 참조), 압타머기반 핵산칩을 이용한 생물학적 의미 분석 기술(대한민국 특허등록 제10-0923048호 참조) 및 유전자 변이 분석방법(대한민국 특허출원 제10-2013-0118222호) 등을 제안하였으나, 생체시료에서 단백질과 핵산을 한 번의 검사로 분석할 수 없는 문제점이 있어 본 발명은 이를 해결하기 위해 제안되었다.
- [16] 생체시료의 생체분자를 총체적으로 분석하는 연구는, 의학적으로 질병에 관련된 생체분자의 프로파일을 분석함으로써, 질병을 진단할 수 있는 생체분자, 치료성적을 분석할 수 있는 생체분자, 질병 발병 및 진행에 중요한 역할을 하는 생체분자, 질병에 대한 감수성 관련된 생체분자, 및 신약개발의 표적분자를 구명하는 것에 사용할 있을 것이다.
- [17] 상술한 종래의 생체분자들을 각각 독립적으로 분석하는 기술들의 문제점을 극복하여, 생체분자들을 보다 개선된 효율성 및 민감도로 실시간 분석할 수 있는 기술을 개발하기 위하여 연구한 결과, 본원 발명과 같이 다양한 종류의 생체분자들을 한 번의 검사로 분석할 수 있는 방법을 개발함으로써 본 발명의 목적을 달성하였다.
- [18] 궁극적으로 생체시료의 생체분자를 총체적으로 분석하는 연구는, 의학적으로 질병에 관련된 생체분자의 프로파일을 분석함으로써, 질병을 진단할 수 있는 생체분자, 치료성적을 분석할 수 있는 생체분자, 질병 발병 및 진행에 중요한 역할을 하는 생체분자, 질병에 대한 감수성 관련된 생체분자, 및 신약개발의 표적분자를 구명하는 것에 사용할 있을 것이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [19] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 분석하고자하는 시료에 있는 단백질을 포함하는 두 개 혹은 그 이상의 생체분자들을 핵산분석방법으로 분석하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자 분석 방법 및 장치를 제공한다.
- [20] 또한, 본 발명은 상기 시료를 구성하는 상기 생체분자에서 리셉터 및 핵산을

준비하는 단계; 상기 리셉터와 분석리간드를 반응시켜 리셉터-분석리간드 복합체를 형성하는 단계; 상기 분석하고자하는 핵산인 표적핵산과 상기 리셉터-분석리간드 복합체의 올리고뉴클레오타이드인 표적핵산에서 표적핵산DNA을 제조하는 단계; 및 상기 표적핵산DNA을 분석하는 단계;를 포함하는 방법으로 생체시료에 포함된 생체분자의 생물학적 의미를 분석하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치를 제공한다.

- [21] 또한, 본 발명은 생체시료에 포함된 리셉터 및 핵산들의 생물학적 의미를 분석하기 위한, 생체시료에 있는 생체분자들을 한 번의 검사로 분석하는 핵산칩을 제공한다.
- [22] 또한 본 발명은 생체시료는 세균, 진균류, 바이러스, 세포주, 조직으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치를 제공한다.
- [23] 본 발명의 목적은, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치가 제공되며, 이들을 이용하여 효율적으로 생성한 결합정보로부터 생체분자들이 관련된 질병 정보를 포함한 각종 생물학적 의미를 분석할 수 있도록 하고자 하는 것이다.

과제 해결 수단

- [24] 본 발명에서 용어 생체분자는 생체를 구성하고 기능을 담당하는 특수 분자로 가장 주된 것은 단백질, 핵산, 다당류 및 지질과 같은 크기가 큰 거대 분자들과 저분자물질로 아미노산, 뉴클레오타이드, 단당류, 비타민 등의 유기물질, 철, 구리 등의 금속, 무기이온 등이다.
- [25] 리간드는 리셉터와 결합하는 물질로 대표적으로 항체, 펩타이드, 핵산 및 압타머 등이 있다. 리셉터는 단백질, 펩티드, 핵산, 탄수화물, 지질(lipid), 다당류, 당단백질, 호르몬, 수용체, 항원, 항체, 바이러스, 병원균, 독성 물질, 기질, 대사 산물, 전이 상태 유사체(transition state analog), 보조 인자(cofactor), 저해제, 약, 염료, 영양분, 성장 인자, 세포, 조직 등일 수 있고, 제한이 없으며 거의 모든 화학적 또는 생물학적 작동체(effector)가 될 것이며 어떤 크기의 분자들이든 사용될 수 있는 표적분자 등을 의미한다.
- [26] 리셉터는 리간드(들)과 리셉터를 결합하고, 상호 작용 또는 그렇지 않으면 리셉터와 연합하여 리셉터의 기능에 작용하고, 변화시키고 또는 무효화하는 하나 또는 그 이상의 리간드에 특이적인 분자 또는 분자의 클러스터를 포함하는 구조를 언급한다.
- [27] 항체는 항원과 특이적 결합을 하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질이다. 압타머(aptamer)는 저분자 화합물로부터 단백질까지 다양한 종류의 리셉터에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특성을 가지는 작은 (20~60 뉴클레오타이드) 단일가닥핵산 (DNA 혹은 RNA) 조각을 뜻한다.

- [28] 분석리간드는 특정리간드에 디자인된 올리고뉴클레오타이드가 연결된 구조체이다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 리간드에 결합하는 리셉터인 생체분자를 핵산분석방법으로 분석하는 용도로 사용할 수 있다. 분석리간드의 올리고뉴클레오타이드의 구성은 다음의 일반식(I)로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법:
- [29] 5'-P1 α -T-P3 β -3' (I)
- [30] 상기 일반식(I)에서, P1는 신호프라이머 쌍에서 정방향 프라이머와 완전하게 상보적 결합하는 영역이고 T는 포착프로브와 완전하게 상보적 결합하는 영역으로 표적 단일가닥핵산을 식별하기 위해서 이용되며 혼성화반응에서 사용하는 프로브로 적합하도록 설계할 수 있다. P3는 신호프라이머 쌍에서 정방향 프라이머와 완전하게 상보적 결합하는 영역이다. α 및 β 는 뉴클레오타이드의 개수를 나타내며, α 및 β 는 8-30의 정수이다.
- [31] 표적핵산은 상기 분석하고자하는 시료에서 분리되는 핵산 및 상기 분석하고자하는 시료에서 분리되는 리셉터에 결합하는 압타머를 의미하며 상류 올리고뉴클레오타이드의 적어도 한 부분과 상보적 결합을 하는 영역 및 하류 올리고뉴클레오타이드의 적어도 한 부분과 상보적 결합을 하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 언급한다. 몇몇 양태에서, 당해 표적핵산은 두 올리고뉴클레오타이드와 완전하게 상보적 결합을 하는 영역사이에 신장영역 혹은 닉(nick)을 가질 수도 있다. 표적 핵산은 단일가닥핵산 또는 이중가닥핵산 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 또한, 표적핵산DNA는 상류올리고뉴클레오타이드 및 하류올리고뉴클레오타이드가 직접 결합하는 주형 DNA를 지칭한다.
- [32] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 분석하고자하는 시료에 있는 단백질을 포함하는 두 개 혹은 그 이상의 생체분자들을 핵산분석방법으로 분석하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자 분석 방법 및 장치를 제공한다.
- [33] 시료에는 리간드와 결합하는 단백질을 포함하는 수많은 생체분자들이 존재하고 있다. 이러한 점에서, 생체분자는 생체분자-리간드 복합체를 형성함으로써 리간드 신호를 검출하는 기능을 갖으며 이를 기초하여 생체분자 분석기술이 개발되었다.
- [34] 본 발명은 상기 시료를 구성하는 상기 생체분자에서 리셉터 및 핵산을 준비하는 단계; 상기 리셉터와 분석리간드를 반응시켜 리셉터-분석리간드 복합체를 형성하는 단계; 상기 분석하고자하는 핵산인 표적핵산과 상기 리셉터-분석리간드 복합체의 올리고뉴클레오타이드인 표적핵산에서 표적핵산DNA을 제조하는 단계; 및 상기 표적핵산DNA을 분석하는 단계; 를 포함하는 방법으로 생체시료에 포함된 압타머의 리셉터 및 핵산의 생물학적 의미를 분석하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치를 제공한다.

- [35] 도 1은 생체시료에서 핵산 및 단백질을 분리하여 단백질은 분석리간드와 반응시켜 단백질-분석리간드 복합체를 제조하고 핵산에서 RNA 및 DNA를 분리한 후, 분석하고자하는 표적핵산이 포함된 표적핵산DNA를 제조하여 이들 표적핵산의 특정영역과 완전하게 상보적인 결합을 하는 올리고뉴클레오타이드로 생체분자를 분석을 하고 생체시료에서 생체분자의 생물학 의미를 결정하는 전체적인 흐름도를 보여주고 있다.
- [36] 도 2는 생체시료에서 분리된 리셉터와 분석리간드의 구조체이며 분석리간드는 리간드와 리간드를 지시하는 염기서열 및 유니버설 PCR 프라이머로 구성되어 있음을 보여주고 있다
- [37] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 바람직하게는 세포로 구성된 생체시료에서 세포를 가용화시켜 리셉터인 생체분자들을 제조하고 추가적인 단계를 수행하여 DNA 및 RNA 등의 핵산을 공지된 방법으로 분리할 수 있다. 준비된 상기 생체분자와 압타머를 반응시켜 생체분자-분석리간드 복합체를 제조하여 다양한 방법으로 제조된 복합체를 분리할 수 있다. 바람직하게는 제조된 생체분자-분석리간드 복합체의 분리방법은 먼저, 생체분자를 지지체에 결합시킨 후, 분석리간드를 반응시켜 생체분자-분석리간드 복합체를 형성하고 세척단계를 수행하여 미결합 분석리간드를 제거하여 정제된 복합체를 준비할 수 있다. 상기 분리된 RNA, DNA 및 상기 생체분자-분석리간드 복합체 등의 핵산들을 분석하고자하는 표적핵산으로 하여 일반적인 핵산분석방법으로 표적핵산의 정량분석 및 변이분석을 할 수 있다. 그리고 분석된 결과로부터 생체분자가 포함된 생체시료에서 생체분자의 생물학적 의미를 결정할 수도 있다.
- [38] 본 발명은 상기 특정 핵산의 정량분석, 변이 분석 및 메틸화 유무 분석하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치를 제공한다.
- [39] 상기 특정 핵산 변이는 유전자 변이로 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)와 구조변이(Structural Variation) 등이 있다. 유전자 변이들이 표현형(phenotype)의 변화, 질병에 대한 민감성, 그리고 치료 약제에 대한 반응의 차이 등 개인 간의 차이를 결정짓는다고 알려졌으며, 특히 질환 발생과 진행과정에 관여하는 변이들을 질환연관 유전자변이(Disease-associated Genetic Variants)라고 칭한다. SNP은 DNA 염기서열에서 하나의 염기서열 (A, T, G, C)의 차이를 보이는 유전적 변화 또는 변이를 의미한다. 구조변이는 결실, 역위, 첨가, 복제 등과 같은 DNA 구조변이를 의미한다.
- [40] 또한 본 발명에 있어서, 세포내 핵산의 메틸화여부분석은 핵산에 바이설파이트(bisulfite)를 처리하여 발생하는 핵산의 뉴클레오타이드 변형을 포함할 수도 있다. 상기 핵산에 바이설파이트(bisulfite)를 처리하여 메틸화되지 않은 시토신(cytosine) 잔기는 우라실(uracil) 잔기로 변형되고 메틸화 시토신 잔기는 변형이 없는 상태로 존재한다. 이런 바이설파이트(bisulfite)의 처리

전후의 뉴클레오타이드 변화를 분석할 수 있으며 이 결과로 핵산의 메틸화 유무를 확인할 수 있다.

- [41] 본 발명에 있어서, 압타머 리셉터 정량분석의 내부 정도관리는 분석하고자하는 생체시료에 포함되지 않는 물질을 이용하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자 분석 방법 및 장치를 제공한다.
- [42] 바람직하게는, 일반적으로 정성정량분석의 경우 각종 시험, 검사시 비교를 위해 분석하고자하는 생체시료에 포함된 생체분자들로 내부정도관리를 한다. 상기 정도관리용 물질은 분석하고자하는 시료에 항상 일정량으로 존재하는 물질이 이상적이나 그렇지 못한 경우 시료에 포함되지 않는 물질인 외래물질을 사용할 수 있으며 바람직하게 분석하고자하는 시료가 생체시료인 경우 상기 생체시료에 포함되지 않는 외래생체분자들로 구성될 수 있다. 정도관리는 관리용 시료와 같은 외적기준을 사용하지 않고, 매회의 측정으로 얻을 수 있는 일군의 검사결과를 분석하여 측정치의 정밀도를 관리해 나가는 내부정도관리를 의미한다.
- [43] 바람직하며, 본 발명에서 내부정도관리용 물질은 인간유래 생체시료를 분석하는 경우 인간유래 생체시료에 포함되지 않는 생체분자로 식물특이생체분자를 사용할 수 있다. 현재 인간 게놈 프로젝트 및 식물의 일종인 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 게놈 프로젝트가 종결되어 식물특이단백질들이 보고되어 있다. 본 발명에서는 인간유래 생체시료를 분석하기 위해, 기준물질로 식물특이단백질을 사용할 수 있다.
- [44] 본 발명에 있어서, 표적핵산을 정량분석을 하거나 표적핵산의 염기서열을 분석하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치를 제공한다.
- [45] 상기 표적핵산을 분석하는 방법은 PCR(polymerase chain reaction), LCR(ligase chain reaction), SDA(strand displacement amplification), TMA(transcription-mediated amplification), bDNA(branched DNA), Invader 방법 및 RCA(rolling circle amplification) 등으로 할 수 있다. 바람직하게는 상기 표적핵산에 대해 LCR로 형성된 이중가닥핵산을 주형으로 PCR하여 생성된 증폭산물을 분석하는 할 수 있다.
- [46] 본 발명에 있어서, 상기 표적핵산과 같은 방향으로 완전하게 상보적 결합하는 상류 올리고뉴클레오타이드 및 하류 올리고뉴클레오타이드를 제조하는 단계; 상기 표적핵산, 상기 상류 올리고뉴클레오타이드와 하류 올리고뉴클레오타이드를 반응시켜 완전한 이중가닥핵산을 제조하는 단계; 상기 완전한 이중가닥핵산을 주형으로 신호프라이머를 이용하여 표지 및 증폭하여 타깃프로브를 제조하는 단계; 및 상기 타깃프로브와 포착프로브를 혼성화반응시켜 형성된 산물에서 발생하는 신호를 분석하는 단계; 를 포함하는 상기 표적핵산을 제조하고 분석하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치를 제공한다.

- [47] 본 발명에 사용된 바와 같이, 표적핵산을 언급할 때의 "상보적 결합 염기서열"은 올리고뉴클레오타이드의 혼성화를 허용하기에 충분한 길이의 뉴클레오타이드를 의미하고 상보적인 염기서열은 길이가 약 6개 뉴클레오타이드 내지 약 1,000개의 뉴클레오타이드 범위에 있고 바람직한 범위는 약 8개 내지 30개 뉴클레오타이드이고 최적으로 10개 내지 25개 뉴클레오타이드 범위이다.
- [48] 본 발명에서는 상기 표적핵산과 같은 방향으로 완전하게 상보적 결합하는 올리고뉴클레오타이드들 중에서 상류에 있는 위치하는 올리고뉴클레오타이드를 상류 올리고뉴클레오타이드, 하류에 있는 위치하는 것을 하류 올리고뉴클레오타이드라고 지칭한다.
- [49] 본 발명에 따른 "상류 올리고뉴클레오타이드"는 바람직하게 길이가 6개 내지 100개, 보다 바람직하게는 8개 내지 30개 및 가장 바람직하게는 20개인 뉴클레오타이드이다.
- [50] 본 발명에 따른 "하류 올리고뉴클레오타이드"의 3' 영역은 표적 핵산에 적어도 부분적으로 상보적이고 바람직하게 8개 내지 80개 및 가장 바람직하게 10개 내지 20개 뉴클레오타이드이다.
- [51] "포착프로브"는 반응에서 폴리뉴클레오티드를 확인 및/또는 폴리뉴클레오티드의 원천을 추적하는데 이용되는 독특한 뉴클레오티드 서열들을 말한다. 포착프로브 서열은 신호프라이머의 5말단 또는 3말단에 있을 수 있다. 포착프로브 염기서열들은 크기 및 조성에서 광범위하게 다변할 수 있다; 다음의 참고자료들은 특정 구체예들에 적합한 일련의 포착프로브 염기서열들을 선택하는 지침을 제시한다(미국 특허 제5,635,400호; Brenner et al, 2000, PNAS., 97: 1665-1670; Shoemaker et al, 1996, Nature Genetics, 14: 450-456; 유럽 특허공개 0799897A1; 미국 특허 제 5,981,179호). 그리고 이와 유사한 것들. 특정 구체예들에서, 포착프로브 염기서열은 4 내지 36개의 뉴클레오티드들, 또는 6 내지 30개의 뉴클레오티드들, 또는 8 내지 20개의 뉴클레오티드들 범위의 길이를 보유할 수 있다.
- [52] 또한 본 발명에서 포착프로브의 염기서열은 표적핵산의 특이 염기서열일 수도 있다.
- [53] 본 발명에 있어서, 상기 표적핵산 정량분석을 위해 상기 상류 올리고뉴클레오타이드는 정방향 신호프라이머와 완전하게 상보적 결합을 하는 염기서열인 영역과 상기 표적핵산과 완전하게 상보적 결합하는 염기서열인 영역 등으로 구성되고 하류 올리고뉴클레오타이드는 상기 표적핵산과 완전하게 상보적 결합하는 염기서열인 영역, 상기 포착프로브와 완전하게 상보적 결합하는 염기서열인 영역, 역방향 신호프라이머와 완전하게 상보적 결합을 하는 염기서열인 영역 등으로 구성된 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치를 제공한다.
- [54] 도 3는 생체시료에서 분리된 RNA를 역전사하여 형성된 핵산에

상류올리고뉴클레오이드와 하류올리고뉴클레오타이드로 이중가닥핵산을 형성한 후 정량분석하는 방법을 보여주는 도면이다.

- [55] 또한, 본 발명은 상기 표적핵산 정량분석을 위해 상기 상류 올리고뉴클레오타이드 및 하류 올리고뉴클레오타이드를 제작하는 단계에 있어서, 상기 상류 올리고뉴클레오타이드의 구성은 (i) 신호프라이머 쌍에서 정방향 프라이머가 완전하게 상보적 결합하는 영역 및 (ii) 혼성화되는 표적핵산과 실질적으로 상보적 혼성화 서열 영역 등으로 구성된 올리고뉴클레오타이드이다.
- [56] 상기에서, 상기 상류 올리고뉴클레오타이드 다음의 일반식(II)로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법:
- [57] 5'-P1 α -H β -3' (II)
- [58] 상기 일반식(II)에서, P1는 신호프라이머 쌍에서 정방향 프라이머와 완전하게 상보적 결합하는 영역이고 H는 혼성화되는 표적핵산과 실질적으로 상보적 혼성화 서열 영역이다. α 및 β 는 뉴클레오타이드의 개수를 나타내며, α 및 β 는 8-30의 정수이다.
- [59] 상기 상류 올리고뉴클레오타이드로서, 상기 특정 표적핵산에 완전하게(perfectly)상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 바람직하게는, 상기 상류 올리고뉴클레오타이드는 본 발명의 특정 표적핵산의 10-30개의 연속 뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 서열에 혼성화될 수 있는 서열을 포함한다.
- [60] 하류 올리고뉴클레오타이드의 구성은 (i) 상기 표적핵산과 상기 상류 올리고뉴클레오타이드와 같은 방향으로 완전하게 상보적 결합을 하는 영역, (ii) 상기 포착프로브와 완전하게 상보적 결합하는 영역 및 (iii) 신호프라이머 쌍에서 역방향프라이머와 완전하게 상보적 결합하는 영역 등이다.
- [61] 상기에서, 상기 하류 올리고뉴클레오타이드 다음의 일반식(III)로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법:
- [62] 5'-H α -T β -P3 γ -3' (III)
- [63] 상기 일반식(III)에 있어서, H는 상기 표적핵산에 상기 상류 올리고뉴클레오타이드의 3'말단이 결합하는 위치다음의 염기서열부터 완전하게 상보적 결합을 하는 변이인적특이 영역이고 T은 포착프로브와 완전하게 상보적 결합하는 영역으로 표적 단일가닥핵산을 식별하기 위해서 이용되며 혼성화반응에서 사용하는 프로브로 적합하도록 설계할 수 있다. P3는 신호프라이머쌍에서 역방향 프라이머와 완전하게 상보적 결합을 하는 영역이다. α , β 및 γ 는 뉴클레오타이드의 개수로 8-30의 정수이다.
- [64] 본 발명에 있어서, 상기 표적핵산 변이를 분석하기 위해 상기 상류 올리고뉴클레오타이드는 정방향 신호프라이머와 완전하게 상보적 결합을 하는 염기서열인 영역, 상기 표적핵산과 완전하게 상보적 결합을 하는 염기서열 및

3'말단에 상기 표적핵산의 뉴클레오타이드를 구분할 수 있는 염기서열인 영역 등으로 구성되고, 하류 올리고뉴클레오타이드는 상기 표적핵산과 완전하게 상보적 결합하는 염기서열인 영역, 상기 포착프로브와 완전하게 상보적 결합하는 염기서열인 영역, 역방향 신호프라이머와 완전하게 상보적 결합을 하는 염기서열인 영역 등으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 생체분자의 분석방법 및 장치를 제공한다.

[65] 도 4은 생체시료에서 핵산 및 리셉터를 분리하여 핵산 및 리셉터-분석리간드 복합체 등의 핵산에서 표적핵산을 제조하여 이들 표적핵산의 특정영역에 완전하게 상보적인 결합을 하는 올리고뉴클레오타이드로 표적핵산 변이분석을 하는 전체적인 흐름도를 보여주고 있다.

[66] 도 5는 생체시료에서 분리한 핵산에 바이설파이트(bisulfite)를 처리하여 표적핵산DNA를 제조한 후 이들 표적핵산의 특정영역에 완전하게 상보적인 결합을 하는 올리고뉴클레오타이드로 핵산 메틸화유무 분석을 하는 전체적인 흐름도를 보여주고 있다.

[67] 또한, 본 발명은 표적핵산 변이 분석을 위해 상기 상류 올리고뉴클레오타이드 및 하류 올리고뉴클레오타이드를 제작하는 단계에 있어서, 상기 상류 올리고뉴클레오타이드의 구성은 (i) 신호프라이머 쌍에서 정방향 프라이머와 완전하게 상보적 결합하는 영역(P1), (ii) 표적핵산과 완전하게 상보적 혼성화 서열을 가지는 변이인접 영역(H), 및 (iii) 뉴클레오타이드 변이에 해당하는 변이 영역(V)이며, 뉴클레오타이드 변이정보를 갖는 상류 올리고뉴클레오타이드는 두 종류 또는 그 이상의 올리고뉴클레오타이드들 등이다.

[68] 상기에서, 상기 상류 올리고뉴클레오타이드 다음의 일반식(IV)로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법:

[69] 5'-P1 α -H β -V γ -3' (IV)

[70] 상기 일반식(IV)에서, P1는 신호프라이머 쌍에서 정방향 프라이머가 완전하게 상보적 결합하는 영역이고 H는 혼성화되는 표적핵산과 완전하게 상보적 혼성화 서열을 가지는 변이인접 특이 영역이고 V은 뉴클레오타이드 변이에 해당하는 변이 특이 영역이다. α , β 및 γ 는 뉴클레오타이드의 개수를 나타내며, α 및 β 는 8~30의 정수이고, γ 는 1~3의 정수이다.

[71] 상기 상류 올리고뉴클레오타이드로서, 상기 SNP를 포함하는 서열에 완전하게(perfectly)상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 바람직하게는, 상기 상류 올리고뉴클레오타이드는 본 발명의 SNP를 포함하는 10-30개의 연속 뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 서열에 혼성화될 수 있는 서열을 포함한다. 보다 바람직하게는, 상기 상류 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단은 상기 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 3'-말단에 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는 상류

올리고뉴클레오타이드에서 말단 영역이 혼성화되지 않으면, 이러한 듀플렉스는 엄격한 조건에서 해체될 수 있다.

- [72] 하류 올리고뉴클레오타이드의 구성은 (i) 상기 표적핵산과 상류 올리고뉴클레오타이드와 같은 방향으로 완전하게 상보적 결합을 하는 영역(H), (ii) 상기 포착프로브와 완전하게 상보적 결합하는 영역(T) 및 (iii) 신호프라이머쌍에서 역방향프라이머와 완전하게 상보적 결합하는 영역(P3) 등이다.
- [73] 상기에서, 상기 하류 올리고뉴클레오타이드 다음의 일반식(V)로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법:
- [74] 5'-H α -T β -P3 γ -3' (V)
- [75] 상기 일반식(IV)에 있어서, H는 상기 표적핵산과 완전하게 상보적 결합을 하는 변이인적특이 영역이고 T은 포착프로브와 완전하게 상보적 결합하는 영역으로 변이관련 뉴클레오타이드가 있는 단일가닥핵산을 식별하기 위해서 이용되며 혼성화반응에서 사용하는 프로브로 적합하도록 설계할 수 있다. P3는 신호프라이머쌍에서 역방향 프라이머와 완전하게 상보적 결합을 하는 영역이다. α , β 및 γ 는 뉴클레오타이드의 개수로 8-30의 정수이다.,
- [76] 상기 상류 올리고뉴클레오타이드 및 하류 올리고뉴클레오타이드는 당해 기술분야에 공지된 (화학적 합성과 같은) 임의의 적합한 방법에 의해 합성 및 제조된다. 상기 상류 올리고뉴클레오타이드 및 하류 올리고뉴클레오타이드는 또한 상업적 공급처를 통해 편리하게 이용가능하다.
- [77] 본 발명에 이용되는 상류 올리고뉴클레오타이드 및 하류 올리고뉴클레오타이드는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중가닥 구조를 형성한다. 이러한 이중가닥 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B.D., 등, Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시되어 있다.
- [78] 본 발명에 있어서 어닐링은 표적 뉴클레오타이드 서열과 신호프라이머 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 엄격조건 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 엄격조건은 서열-의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다. 이렇게 증폭된 표적핵산은 하나의 분자 상에 다중 표적위치를 포함하는 표적핵산분자이며, 이를 이용하여 동시에 다중 표적위치를 분석할 수 있다.
- [79] 본 발명에 있어서, 상기 표적핵산, 상기 상류 올리고뉴클레오타이드와 하류 올리고뉴클레오타이드가 혼성화 반응을 하여 형성된 부분적 이중가닥핵산에서 두 올리고뉴클레오타이드 사이에 신장영역이 있는 경우 신장반응하고 연결반응하여 완전한 이중가닥핵산을 형성하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 생체분자의 분석방법 및 장치를 제공한다.
- [80] 본 발명에 사용된 바와 같이, "신장 영역"은 핵산 중합화 활성을 통해 올리고뉴클레오타이드의 신장을 허용하기에 충분한 길이의 뉴클레오타이드를

언급한다. "신장 영역"은 표적 및 주형 핵산의 몇몇 양태에 존재한다. 존재하는 경우 "신장 영역"은 표적 또는 주형 핵산의 상류 올리고뉴클레오타이드 및 하류 올리고뉴클레오타이드 사이에 있다. "신장 영역"은 길이가 약 1개 뉴클레오타이드 내지 약 1000개 뉴클레오타이드이고 바람직한 범위는 약 1 내지 100개 뉴클레오타이드이고 보다 바람직한 범위는 3개 내지 50개 및 최적으로 길이가 3개 내지 10개의 뉴클레오타이드 범위이다.

- [81] 신장반응(extension)은 중합효소를 이용하여 상기 신장영역에 뉴클레오타이드들을 추가함으로써 프라이머를 연장시키는 것을 말한다. 핵산에 완전하게 상보적 결합된 올리고뉴클레오타이드를 연장시킨다면, 이 핵산은 연장 반응을 위한 주형으로 작용한다. 본 발명에 있어서, 상기 DNA 중합효소는 Taq DNA 중합효소 및 Pfu DNA 중합효소로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 이에 한정되지 않고, thermostable DNA 중합효소라면 어떤 것이든 사용할 수 있다.
- [82] 연결반응(ligation)은 상류 올리고뉴클레오타이드의 3말단 또는 신장된 상류 올리고뉴클레오타이드의 3말단과 하류 올리고뉴클레오타이드에 효소 촉매적으로 연결시키는 것을 말한다. 본 발명에 있어서, 상기 리가제는 E. coli DNA 리가제, Taq DNA 리가제, T4 DNA 리가제 및 Ampligase 리가제로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [83] 본 발명에 있어서, 상기 표적핵산과 상기 상류 올리고뉴클레오타이드와 하류 올리고뉴클레오타이드가 혼성화반응을 하여 형성된 부분적 이중가닥핵산이 두 올리고뉴클레오타이드사이에 닉(nick)이 있는 경우 연결반응하여 완전한 이중가닥핵산을 형성하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 생체분자의 분석방법 및 장치를 제공한다.
- [84] 상기 연결반응은 리가제(ligase)에 의한 뉴클레오타이드 서열의 연결을 촉매할 수 있는 반응을 말한다. 특정 길이의 2종의 올리고뉴클레오타이드를 표적핵산에 나란히 완전하게 상보적 결합하도록 한 후, 이 때 형성되는 이중 나선의 닉(nick) 부위를 DNA ligase에 의하여 통상의 핵산의 연결 원리에 입각한 통상적인 연결반응을 통해 2종의 올리고뉴클레오타이드를 단일가닥상태로 연결하는 반응이다. 따라서 핵산의 연결을 유도하는 리가제로서 당업계에서 통상적으로 사용되는 효소를 제한 없이 사용할 수 있다.
- [85] 상기 연결반응에 사용하는 효소는 E.coli DNA 리가제, Taq DNA 리가제, T4 DNA 리가제 및 Ampligase 리가제 등으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 이에 한정되지 않고, DNA 결합 활성을 가지는 리가제라면 어떤 것이든 사용할 수 있다.
- [86] 또한 상기 리가제 반응은 단일의 표적 유전자 또는 변이 검출이 가능할 뿐만 아니라, 복수의 표적을 인지하는 복수의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여, 한 번의 반응으로 수행할 수 있다. 이 경우에는 각각의 리가제 올리고뉴클레오타이드 염기서열 중 표적핵산과 혼성화되는 부분의 melting

temperature(Tm)값의 오차를 5이내로 되도록 각각의 변이 위치에 맞는 리가제와 올리고뉴클레오타이드를 선정하는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [87] 본 발명에 있어서, 상기 표적핵산, 상기 상류 올리고뉴클레오타이드와 하류 올리고뉴클레오타이드를 혼성화 반응하고 형성된 상기 부분적 이중가닥 핵산을 연결반응하여 상기 완전한 이중가닥핵산을 형성하는 반응을 두 번 또는 그 이상 반복적으로 수행하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 생체분자의 분석방법을 제공한다.
- [88] 본 발명에 있어서, 상기 신호프라이머는 표지물질이 있는 유니버설 PCR 프라이머인 정방향 프라이머와 유니버설 PCR 프라이머 등으로 구성된 역방향 프라이머로 구성하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 생체분자의 분석방법 및 장치를 제공한다.
- [89] 상기에서, 상기 신호프라이머(signal primers)는 다음의 일반식(VI) 및 (VII)으로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법:
- [90] 정방향 프라이머 : 5'-X-P-3' (VI) ; 역방향 프라이머: 5'-P-3' (VII)
- [91] 일반식(VI) 및 (VII)에 있어서, X는 검출가능한 표지물질로 생체분자의 정량분석을 위해 대조구 시료에서 제조되는 타깃프로브와 실험구 시료에서 제조되는 타깃프로브에 사용되는 표지물질은 상이할 수 있으며, 바람직하게는 전자는 Cy3, 후자는 Cy5 일 수도 있다.
- [92] 또한 핵산의 변이 분석을 위해 상기 프라이머의 5'최종말단에 형광 리포터 분자 혹은 물리적인 특징이 있는 리포터 분자 등인 표지물질로 변이관련 뉴클레오타이드의 종류 즉, 변이 유형을 식별하기 위해서 사용하고, 바람직하게, 형광분석은 뉴클레오타이드 변이에 따라 야생형(wild type)은 Cy3, 돌연변이형(mutation type)은 Cy5로 표지할 수 있다. P는 상류 올리고뉴클레오타이드 및 하류 올리고뉴클레오타이드의 신호프라이머가 완전하게 상보적 결합을 하는 영역의 염기서열에 완전하게 상보적인 염기서열로 구성된다.
- [93] 상기 신호프라이머 쌍에서 정방향 프라이머(P1 또는 P2)는 상기 상류 올리고뉴클레오타이드의 구성에서 신호프라이머가 결합하는 영역의 염기서열에 완전하게 상보적으로 결합하는 염기서열로 구성되며 바람직하게는 유니버설 PCR 프라이머(universal PCR primer)일 수도 있고 표적핵산의 뉴클레오타이드 변이에 따라 상기 신호프라이머의 5'말단에 형광 리포터 분자 혹은 물리적인 특징이 있는 리포터 분자 등인 표지물질(X)이 선정되며 혼성화반응을 종결하고 뉴클레오타이드 변이를 결정할 때 표지물질에서 발생하는 신호를 사용한다.
- [94] 또한 상기 신호프라이머 쌍에서 역방향 프라이머(P3)는 상기 상류 올리고뉴클레오타이드의 구성에서 신호프라이머가 결합하는 영역의 염기서열에 완전하게 상보적으로 결합하는 염기서열로 구성되며 바람직하게는 유니버설 PCR 프라이머(universal PCR primer)일 수도 있다. 유니버설 PCR

프라이머는 일반적으로 염기서열 결정이나 PCR 등에 많이 사용되는 염기서열인 올리고뉴클레오타이드로 상업적인 클로닝 벡터에 많이 있다.

- [95] 본 발명에 있어서, 상기 포착프로브는 상기 타깃프로브의 표지물질이 있는 단일가닥핵산과 완전하게 상보적 결합하는 염기서열을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 생체분자의 분석방법 및 장치를 제공한다.
- [96] 본 발명에 있어서, 상기 포착프로브는 타깃프로브의 표지물질이 있는 단일가닥핵산에 존재하는 역방향 하류 올리고뉴클레오타이드의 특이 염기서열과 완전하게 상보적 결합하는 염기서열을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 생체분자의 분석방법을 제공한다.
- [97] 상기의 포착프로브(capture probes)는 상기 포착프로브는 상기 증폭산물에 결합하여 이들을 식별하는 역할을 하며, 상기 표적핵산을 주형으로 신호프라이머로 증폭반응을 하여 만들어진 증폭산물에서 프라이머 결합영역(T)을 기초하여 표지물질이 있는 단일가닥핵산과 상보적인 염기서열을 갖는 단일가닥핵산, 올리고뉴클레오타이드 및 PNA(peptide nucleic acid) 등으로 제조할 수 있다.
- [98] 본 발명에 있어서, 상기 타깃프로브는 대조구 시료에서 제조하는 대조타깃프로브 및 실험구 시료에서 제조하는 분석타깃프로브로 구성되는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 생체분자의 분석방법을 제공한다.
- [99] 본 발명에 따른, 대조구와 실험구 시료에서 생체분자를 분리하여 정량분석을 하고자 할 경우 대조구 시료에서 분리된 생체분자로부터 표적핵산DNA를 제조한 후, 이를 주형으로 신호프라이머로 PCR하여 제조된 대조타깃프로브 및 실험구시료에서 제조된 표적핵산 DNA를 주형으로 PCR하여 분석타깃프로브를 제조한다. 이들 제조된 대조타깃프로브와 분석타깃프로브를 혼합하여 타깃프로브를 준비한다. 대조타깃프로브의 제조에 사용하는 신호프라이머의 표지물질과 대조타깃프로브의 제조에 사용하는 신호프라이머의 표지물질을 서로 상이하게 할 수 있다. 바람직하게 전자는 Cy3, 후자는 Cy5 형광물질을 사용할 수 있다.
- [100] 본 발명에 있어서, 상기 포착프로브는 지지체에 결합하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 생체분자의 분석방법을 제공한다.
- [101] 본 발명에 있어서, 상기 지지체는 유리슬라이드, 바이오센서의 감지표면, 비드, 나노입자 등을 포함하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 생체분자의 분석방법을 제공한다.
- [102] 도 5는 유리슬라이드 기판에 고정된 상기 포착프로브와 표지물질이 있는 타깃프로브를 혼성화시켜 세척한 후 발생하는 신호를 분석하여 생체분자를 분석하는 것에 관한 도면이다.
- [103] 바람직하게는 포착프로브는 유리슬라이드 혹은 바이오센서의 감지표면 등에 결합될 수 있는데, 결합이 가능하도록 변형될 수 있으며, 이러한 변형은

올리고뉴클레오티드의 5'의 최종 말단에 C1~C20 알킬기가 결합될 수 있으며, 유리슬라이드 혹은 감지표면과의 결합을 용이하게 하기 위하여, 티올과 같은 물질이 부가될 수 있다. 그러나, 이러한 변형은 목적에 따라 적절히 변화가 가능하다.

- [104] 이와 같이 포착프로브가 고정된 지지대는 마이크로어레이의 일종이며 바이오센서 감지표면을 의미할 수 있으며 목표 물질이 결합하여 발생하는 변화를 측정하여 목표 물질을 감지할 수 있는 것이면 모두 가능하다. 특히, 형광 변화는 포착프로브에 결합한 표지물질의 형광물질을 분석하여 측정될 수 있다. 여기서 이용할 수 있는 것은 종래의 고체지지대인 유리슬라이드가 바람직하다.
- [105] 상기에서, 상기 혼성화 반응에서 혼성화(어닐링) 온도는 40°C 내지 70°C이고 보다 바람직하게는 45°C 내지 68°C이고, 보다 더 바람직하게는 50°C 내지 65°C이며, 가장 바람직하게는 60°C 내지 65°C이다. 혼성화 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다. 혼성화에 이용되는 엄격조건(stringent condition)은 온도, 이온세기(완충액 농도) 및 유기 용매와 같은 화합물의 존재 등을 조절하여 결정될 수 있다. 이러한 엄격한 조건은 혼성화되는 서열에 따라 다르게 결정될 수 있다. 예를 들어, 상기 엄격조건 중에서 고 엄격조건은 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1 mM EDTA에서 65°C조건으로 혼성화하고, 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 또는, 고 엄격조건은 6 x SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트에서 48°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 저 엄격조건은 예를 들어, 0.2 x SSC/0.1% SDS에서 42°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다.
- [106] 상기 마이크로어레이에 있어서, 상기한 포착프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기체(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기체는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함한다. 상기한 포착프로브는 상기의 기체 상에 배열되고 고정화 된다. 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 실시된다. 예를 들어, 상기 포착프로브는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기체에 결합될 수 있다.
- [107] 상기에서, 상기 포착프로브에 결합한 증폭산물의 표지물질과 변이관련 뉴클레오타이드가 있는 단일가닥핵산부터 발생하는 신호를 계측하는 기기는 신호의 종류에 따라 결정되며, 혼성화 반응 이후에, 혼성화 반응을 통하여

나오는 혼성화 시그널을 검출한다. 혼성화 시그널은 예컨대, 포착프로브에 결합된 표지의 종류에 따라 다양한 방법으로 실시할 수 있다.

- [108] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 포착프로브와 혼성화된다. 혼성화 조건은 다양하게 할 수 있다. 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.
- [109] 상기 포착프로브에 결합한 표지물질은 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신 (fluorescein), 피코에리트린 (phycoerythrin), 로다민, 리사민 (lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5 (Pharmacia)), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P32 및 S35), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스래디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 중금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 헵텐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, 닉 트랜스레이션 (nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법(Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법 (Maxam & Gilbert, 1989, Methods in Enzymology, 65:499)을 통해 실시될 수 있다. 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.
- [110] 상기에서, 상기 마이크로어레이의 제작방법은 당해 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 합성 및 제조된다. 또한 마이크로어레이 제작기기는 상업적 공급처를 통해 편리하게 이용가능하다. 기존에 공지된 다양한 방법(M. schena, 1999, DNA microarray; a practical approach, Oxford)으로 포착 프로브들이 규칙적으로 핵산칩을 제작할 수 있다.
- [111] 본 발명에 있어서, 상기 표지물질은 비오틴(Biotin), Cy2, GFP, YO-PRO-1, YOYO-1, Calcein, FITC, FlourX, ALEXA 488, Rhodamine 110, ABI 5-FAM, Oregon Green 500, Oregon green 488, RiboGreen, Rhodamine Green, Rhodamine 123, Magnesium Green, Calcium Green, TO-PRO-1, TOTO-1, ABI JOE, BODIPY 530/550, Dil, BODIPY TMR, BODIPY558/568, BODIPY564/570, Alexa 546, TRITC, Magnesium Orange, Phycoerythrin R & B, Rhodamine Phalloidin, Calcium Orange, Pyronin Y, Rhodamine B, ABI TAMRA, Rhodamine Red, Cy3.5, ABI ROX, Calcium Crimson, Alexa 594, Texas Red, Nile Red, YO-PRO-3, YOYO-3, R-phycocyanin, C-phycocyanin, TO-PRO-3, TOTO-3, DiD DilC(5), Thiadicarbocyanine, Cy5.5, Cy5 또는 Cy3에서 선택되는 형광색소를 사용하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 생체분자의 분석방법 및 장치를 제공한다.
- [112] 본 발명에 있어서, 상기 포착프로브가 스폿팅(spotting)된 칩(chip)을 제작하는

단계; 상기 타깃프로브와 칩 표면에 고정화된 프로브간 혼성화(hybridization) 반응을 수행하고 세척(washing)하는 단계; 형광색소에 특이적인 파장의 레이저(laser)로 칩을 스캐닝(scanning)하고 혼성화 반응 결과에 따른 형광강도를 측정함으로써 표적핵산 양 및 변이를 동시에 분석하는 단계; 를 포함한 상기 포착프로브를 고착한 기관에 상기 표지된 증폭산물을 혼성화 반응하여 신호를 분석하는 방법을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 생체분자의 분석방법 및 장치를 제공한다.

- [113] 본 발명은 생체시료에 포함된 리셉터 및 핵산들의 생물학적 의미를 분석하기 위한, 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 생체시료에 있는 리셉터 및 핵산을 분석하는 키트를 제공한다.
- [114] 본 발명에 있어서, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자 분석방법을 통해 실시하는 것을 특징으로 하고, 상기 생체분자를 포함하는 시료에서 리셉터 및 핵산을 준비하는 시료처리장치, 상기 표적핵산을 제조하고 이를 증폭하는 모듈 및 상기 증폭된 산물을 분석하는 모듈로 구성된 증폭장치를 포함하는 생체분자 분석하는 시스템을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자 분석장치를 제공한다.
- [115] 본 발명의 생체분자 분석 방법을 보다 효율적으로 측정하기 위하여, 생체분자를 포함하는 시료에서 압타머 리셉터와 핵산을 분리하는 시료처리장치 그리고 상기 표적핵산을 제조하고 이를 증폭하는 모듈 및 상기 증폭된 산물을 분석하는 모듈로 구성된 증폭장치를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자 분석 장치에 있어서, 본 발명의 시스템은 혼합챔버, 용해챔버 및 반응챔버으로 구성된 시료처리장치 및 증폭장치로 구성되고 이들이 통합되어 운영될 수도 있다.
- [116] 관심 대상의 생체분자를 함유하고 있는 것으로 여겨지는 샘플의 분석은 일련의 샘플 준비 단계를 수반하며, 혼합챔버와 용해챔버로 구성된 시료처리장치에서 이루어진다. 이들 단계에는 여과, 세포 용해, RNA, DNA 및 리셉터 정제, 리셉터-분석리간드 복합체 제조 및 시약과의 혼합을 포함할 수 있다. 생체분자 분석 결과에 대한 확신을 갖기 위해서는 샘플 준비 과정의 오염에 대한 제어가 유용할 것이다. 핵산 증폭 반응을 위해 샘플을 조제하고, 샘플 조제의 유효성을 검증하는 방법을 제공한다.
- [117] 샘플은 세포, 포자, 미생물, 및 바이러스로 이루어진 균으로부터 선택되는 표적 실체를 함유하는 것으로 여겨지며, 이 표적 실체는 적어도 하나의 표적 생체분자를 포함한다. 상기 방법은, 샘플과 샘플 조제 대조군과 혼합하는 혼합챔버를 갖는 장치 안으로 샘플을 도입하는 단계를 포함한다. 샘플 조제 대조군은 세포, 포자, 미생물 및 바이러스로 이루어진 균으로부터 선택되며, 이 샘플 조제 대조군은 정도관리 물질을 포함한다. 상기 장치는 또한 용해 챔버와 반응 챔버를 구비한다. 샘플은 혼합 챔버에서 샘플 조제 대조군과 혼합된다.
- [118] 상기 방법은 또한 샘플 조제 대조군 및 샘플 내에 존재하는 경우의 표적 실체를

용해 챔버에서 용해 처리하여 생체분자를 정제하는 단계, 리셉터-분석리간드 복합체 형성하는 단계, 용해챔버 내에 유리된 RNA, DNA 및 리셉터-분석리간드 복합체를 반응 챔버 내에서 핵산 증폭 조건에 노출시키는 단계와, 적어도 하나의 정도관리 물질의 존재 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 정도관리 물질의 긍정적 검출은 샘플 조제 과정이 만족스러웠음을 나타내는 반면, 정도관리 물질을 검출할 수 없으면 샘플이 부적절하게 조제되었음을 나타낸다.

- [119] 본 발명은 핵산 증폭 반응을 위해 샘플을 조제하고, 그 샘플 조제의 유효성을 검증하는 증폭장치를 제공한다. 샘플은 세포, 포자, 미생물, 및 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적 실체를 함유하는 것으로 여겨지며, 이 표적 실체는 적어도 하나의 표적 생체분자를 포함한다. 상기 장치는, 샘플과 혼합될 샘플 조제 대조군을 수용하는 제1 챔버가 있는 본체를 포함한다. 샘플 조제 대조군은 세포, 포자, 미생물, 및 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되며, 이 샘플 조제 대조군은 정도관리 물질을 포함한다.
- [120] 상기 본체는 또한 샘플 내에 존재하는 경우의 표적 실체 및 샘플 조제 대조군을 용해 처리하여 이들로부터 생체분자를 유리시키고 RNA, DNA과 리셉터를 분리하는 용해 챔버를 포함한다. 상기 본체는 또한 유리된 압타머리셉터와 압타머를 반응시켜 리셉터-압타머 복합체를 형성하는 분석리간드 반응 챔버를 포함한다. 상기 본체는 또한 증폭 및 검출을 위해 핵산을 유지하는 반응 챔버를 포함한다. 상기 장치는 샘플 조제 대조군과 혼합된 샘플을 제1 챔버에서 용해 챔버 안으로 흐르도록 안내하며, 용해 챔버에서 유리된 생체분자를 반응 챔버 안으로 흐르도록 안내하는 적어도 하나의 흐름 제어기를 더 포함한다.
- [121] 몇몇 실시예에서, 용해 챔버는 샘플이 용해 챔버를 통해 흐를 때에, 샘플 내에 존재하는 경우의 표적 실체 및 샘플 조제 대조군을 포획하는 효소, 적어도 하나의 필터 및 고상 물질을 수용하며, 상기 장치는 용해 챔버를 통해 흐른 사용된 샘플 유체를 수용하는 적어도 하나의 폐기 챔버를 더 포함하며, 상기 적어도 하나의 흐름 제어기는 또한 용해 챔버를 통해 흐른 사용된 샘플 유체를 폐기 챔버로 흐르도록 안내할 수 있다.
- [122] 몇몇 실시예에서, 상기 장치는 용해 챔버에 초음파를 제공하기 위해 용해 챔버의 벽에 결합된 초음파 트랜스듀서를 더 포함한다. 몇몇 실시예에서, 상기 장치는 샘플 조제 대조군 및 표적 실체를 파열시키기 위해 용해 챔버 내에 비드를 더 포함한다.
- [123] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 용해 과정의 유효성을 결정하는 방법을 제공한다. 이 방법은 세포, 포자, 미생물 및 바이러스로부터 이루어진 군으로부터 선택된 표적 실체를 함유하는 것으로 여겨지는 샘플을 샘플 조제 대조군과 혼합하는 단계를 포함한다. 표적 실체는 적어도 하나의 정도관리 물질을 포함한다. 샘플 조제 대조군은 세포, 포자, 미생물 및 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되며, 이 샘플 조제 대조군은 정도관리 물질을 포함한다. 샘플 조제 대조군과 샘플 내에 존재하는 경우의 표적 실체의 혼합물은

용해 처리된다. 상기 방법은 또한 용해 처리 중에 샘플 조제 대조군으로부터 생체분자가 유리되었는지를 결정하도록 정도관리 물질의 존재 여부를 검출하는 단계를 더 포함한다. 정도관리 물질의 긍정적 검출은 샘플 조제 과정이 만족스럽다는 것을 나타내는 반면, 정도관리 물질을 검출할 수 없으면 샘플이 부적절하게 조제되었음을 나타낸다.

- [124] 몇몇 실시예에서, 상기 방법은 용해 처리 전에, 샘플 조제 대조군 및 샘플 내에 존재하는 경우의 표적 실체를 고상 물질에 의해 포획하기 위해, 샘플 조제 대조군과 혼합된 샘플이 고상 물질을 수용하는 챔버를 통해 흐르게 하는 단계를 포함한다.
- [125] 몇몇 실시예에서, 샘플은 샘플과 샘플 조제 대조군을 혼합하기 전에 예비 여과될 수 있다. 몇몇 실시예에서, 용해 처리는 샘플 조제 대조군 및 표적 실체를 초음파와 에너지에 노출시키는 것을 포함한다. 몇몇 실시예에서, 용해 처리는 또한 샘플 조제 대조군 및 표적 실체를 파열시키기 위해 비드를 교반시키는 것을 포함한다. 몇몇 실시예에서, 샘플 조제 대조군은 포자이다. 몇몇 실시예에서, 혼합 단계는 샘플 조제 대조군을 함유하는 건조 비드를 분해하는 것을 포함한다.
- [126] 몇몇 실시예에서, 용해 처리는 화학적 용해제와 접촉시키는 것을 포함한다. 몇몇 실시예에서, 마커 핵산 서열은 마커 핵산서열을 (예를 들면, PCB에 의해) 증폭시키고, 증폭된 마커 핵산 서열을 검출함으로써 검출된다. 몇몇 실시예에서, 마커 핵산 서열은 마커 핵산 서열에 결합될 수 있는 프로브로부터의 신호가 한계값을 초과하는지를 결정함으로써 검출된다.
- [127] 증폭장치의 반응 용기의 반응 챔버 내의 반응 혼합물은 핵산 증폭 조건에 노출된다. 반응을 이용한 RNA 또는 DNA 주형의 증폭은 공지되어 있다[미국 특허 제4,683,195호; 미국 특허 제4,683,202호; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications(Innis et. al., 1990)]. DNA의 핵산증폭은 DNA를 열변성시키고, 증폭될 DNA 분절에 측접하는 서열에 2개의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 어닐링하며, 어닐링된 프라이머를 DNA 중합효소에 의해 연장시키는 것으로 이루어진 사이클의 반복을 수반한다. 프라이머는 표적 서열의 대향하는 가닥(strand)에 교배되는 한편, 중합 효소에 의한 DNA 합성이 프라이머 사이의 영역에 걸쳐 진행되도록 배향되어, DNA 분절의 양을 효과적으로 두배로 만든다. 또한, 확장 생성물은 또한 보완적이며 프라이머를 결합할 수 있기 때문에, 개개의 연속적인 사이클은 이전 사이클에서 합성된 DNA의 양을 실질적으로 두배로 만든다. 이는 사이클 당 $2n$ (여기서, n 은 사이클 수)의 비율로 특정 표적 분절의 지수적 축적을 가져온다. 증폭반응 및 리가제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR)과 같은 방법이 mRNA, cDNA, 게놈 라이브러리 또는 cDNA 라이브러리로부터 직접 표적 DNA 서열의 핵산 서열을 직접 증폭시키는 데에 사용될 수 있다. 등은 증폭 반응이 또한 공지되어 있으며, 본 발명의 방법에 따라 사용될 수 있다.
- [128] 핵산 증폭 반응은 바람직하게는 반응용기내의 반응 혼합물을 증폭반응에

필요한 온도로 가열 및/또는 냉각시키는 열처리장비를 사용하여 수행한다. 그러한 열처리 장비는 또한 샘플 조제 대조군의 마커 핵산 서열 및 샘플에서 테스트하기 위한 하나 이상의 표적 핵산 서열을 검출하는 하나 이상의 검출 기구를 포함할 수 있다. 반응용기 내의 핵산 서열을 증폭 및 검출하기 위한 광학적 검출기가 내장된 바람직한 열처리 장비(미국 특허 제6,369,893호; 미국 특허 제6,391,541호)를 사용할 수 있다. 또한, 반응 혼합물의 온도를 제어하고, 이 반응 혼합물에서 핵산 서열을 검출하기 위해 본 발명에 적합한 많은 기타 공지의 방법이 있다.

- [129] 또한 샘플 조제 대조군의 정도관리 물질 및 샘플에서 테스트하기 위한 하나 이상의 정도관리물질의 검출은 프로브를 사용하여 수행하는 것이 바람직하다. 반응 용기는 광학적으로 검출될 수 있는 프로브로부터의 신호가 통과하는 하나 이상의 투명 또는 광투과성 벽을 갖는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 포착프로브가 핵산 서열을 검출 및 정량화하는 데에 사용될 수 있다. 핵산 포착프로브를 채용하는 다양한 수많은 분석법이 있다. 이들 포착프로브 중 일부는 다른 분자 또는 반쪽(moiety)과의 상호 작용에서 변화로 인해 형광원의 형광 발광에서의 변화를 갖는 신호를 생성한다.
- [130] 증폭 생성물의 검출을 위한 다른 바람직한 방법으로, 형광 프로브는 형광 리포터 염료(fluorescent reporter dye) 모두에 의해 표지화된 올리고뉴클레오티드로 이루어진다. 포착프로브의 분열은 리포터 염료의 형광 강도의 증가를 발생시킨다.
- [131] 샘플 내에 표적 생체분자의 검출 또는 그것의 결여를 확신하기 위해, 샘플 조제의 오염을 제어해야 한다. 이는 샘플 조제 대조군이 샘플 내의 표적 실체(예를 들면, 생체분자를 함유하고 있는 표적 세포, 포자, 바이러스 또는 미생물)와 동일한 처리를 받아야 하는 이유이다. 샘플 조제 대조군의 정도관리 물질이 검출된다면, 샘플 조제는 만족스러운 것으로 간주된다. 정도관리 물질의 존재가 검출될 수 없다면, 샘플 조제는 부적절한 것으로 간주되며, 표적 핵산서열에 대한 테스트의 결과는 "미정"인 것으로 간주된다. 바람직하게는 정도관리 물질의 존재 여부는 타깃프로브에 결합할 수 있는 포착프로브로부터의 신호가 한계값, 예를 들면 분석법에 대해 유효한 것으로 간주되도록 만족하거나 초과해야 하는 미리 정해진 형광 발광의 한계값을 초과하는지를 결정함으로써 검출된다.
- [132] 유체제어 장치는 원하는 프로토콜에 따라 컴퓨터로 제어될 수 있다. 단일 밸브를 사용하면 단지 하나의 실패 요소로 인해 높은 제조 수율을 생성할 수 있다. 유체 제어 및 처리 구성 부재의 통합은 컴팩트한 장치(예를 들면, 소형 카트리지 형태)를 얻을 수 있고, 성형 및 조립의 자동화를 용이하게 한다. 전술한 바와 같이, 그러한 시스템은 유리하게는 희석 및 혼합 능력, 중간 세척 능력 및 확실한 가압 능력을 포함할 수 있다. 시스템 내의 유체 경로는 시스템 내의 유체의 오염을 최소화하고 또 그러한 유체의 수용 및 제어를 용이하게 하도록 통상

폐쇄된다. 반응 용기는 편리하게는 분리 및 교환 가능하며, 몇몇 실시예에서는 폐기 가능하다.

- [133] 본 발명은 생체시료에 포함된 압타머의 리셉터 및 핵산들의 생물학적 의미를 분석하기 위한, 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 생체시료에 있는 압타머의 리셉터 및 핵산을 분석하는 핵산칩을 제공한다.
- [134] 본 발명에서는 상기 생체분자 정보 데이터를 이용한 생물적인 의미 분석을 위한 구성은 환자군의 상기 생체분자 정보와 대조군의 상기 생체분자 정보 데이터를 입력 받고 데이터베이스를 구축하는 모듈; 상기 입력된 정보 데이터를 이용하여 분석 시스템에서 전 처리를 수행하는 모듈; 상기 전 처리된 결과를 가지고 환자의 모델을 생성하는 모듈; 상기 생성된 모델을 로딩하여 내원한 환자에 적용하여 블라인드 테스트(Blind test)인 진단을 수행하는 모듈; 및 교차검정을 통해 시스템의 성능을 평가하는 모듈; 을 포함하는 것을 특징으로 하는 생체분자 분석방법 및 장치를 제공한다.
- [135] 본 발명에서 상기 생체분자 정보데이터를 이용한 생물적인 의미 예측시스템은 예시적으로 진단이지만 이에만 국한된 것이 아니다.
- [136] 본 발명으로 생성되는 많은 생체분자 정보 데이터는 고차원의 특성을 갖는 방대한 양의 정보로 세포, 조직이나 질병에 관련된 다양한 정보를 생산할 수 있다. 상기 입력된 데이터를 이용하여 분석 시스템에서 전 처리를 수행하는 모듈은 환자의 상태에 영향을 미치는 특징들을 찾아내고 분류 성능을 향상시키기 위한 다변량 분석방법은 정확한 치료와 진단을 위해 중요 변수를 찾아 차원을 축소하거나 특성의 변형을 통해 주요 특질들을 찾아내는 특징 추출(Feature Selection) 절차이다.
- [137] 특질 추출은 세부적으로 클래스 정보를 학습에 사용하는 지 여부에 따라 무감독 학습(Unsupervised Learning) 또는 감독 학습방식(Supervised Learning) 방식이 있다. 무감독 학습 방식에 주로 활용되고 있는 PCA(Principal Component Analysis) 또는 ICA(Independent Component Analysis)는 변수들의 특성을 고려하여 특질을 추출할 수 있다. 감독방식은 클래스 정보와 변수간의 통계적인 유의성이나 변수들 간의 상관관계를 활용하여 변수를 선택하는 방식이다. 이 방식은 주어진 특질 집합에서 전 방향(Forward) 또는 후 방향(Backward)으로 특질들을 순차적으로 추가하거나 제거해가면서 분류기에 적용시킨 성능을 통하여 주요 특질을 산출할 수 있다.
- [138] 상기 전 처리된 결과를 가지고 학습을 수행하여 환자의 모델을 생성하는 모듈은 선택된 특질들을 적합한 분류기(Classifier)를 통해 각 클래스별로 분류하는 절차이다.
- [139] 본 발명에서 인공신경망(Artificial Neural Network)을 사용하였는데, 입력과 출력에 따라 행동을 결정하는 특성 때문에 패턴인식, 함수근사, 분류기법 등 다양한 분야에서 응용되고 있다. 인공신경망은 그 구조는 여러 개의 층(layers), 노드(nodes), 신경망간 연결 가중치로 구성된다. 본 발명에 사용하는 신경망 층간

연결방식은 전향(Feed-forward)방식이다. 입력패턴에 따라 각 노드에 대한 신경망 연결 가중치와 활성화 함수를 이용하여 출력값을 산출하였다. 생성된 결합정보를 통하여 어떤 일을 처리했을 때 추정된 값과 실제 결과 값이 상이한 경우, 산출된 값을 실제 결과 값과 비교하면서 오차를 줄이는 과정을 반복해서 찾아내는 방식이다.

- [140] 상기 환자의 모델을 생성하는 방법은 선형 모델(linear models), 지지 벡터 기계(support vector machines), 신경망(neural networks), 분류 및 회귀 트리(classification and regression trees), 앙상블 학습법(ensemble learning methods), 판별식 분석(discriminant analysis), 근접 네이버 방법(nearest neighbor method), 베이지 네트워크(Bayesian networks), 독립 성분 분석(independent components analysis)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 생체분자 분석방법 및 장치를 제공한다.
- [141] 정확하고 종합적인 메커니즘(Mechanism)이 밝혀지지 않은 대다수의 질환들에 대해서는 사례를 기반으로 하는 진단의 중요성이 매우 크다고 할 수 있다. 그러나 특정 기계학습 기법에 국한하여 고안된 기존의 사례 기반 기계학습 추론 시스템은 정확도가 낮아 개선된 시스템의 개발이 지속적으로 요구되고 있다. 또한, 기존의 시스템은 학습된 임상 검사 항목 모두를 이용한 질환 판별기로만 고안되어 있으며 각 질환별 임상 검사 항목의 중요도나 우선순위를 활용할 수 있는 방법을 제공하고 있지 않다.
- [142] 본 발명은 의사의 정확한 질환 진단을 지원하기 위한 사례 기반 기계학습 추론을 이용한 질환 진단 및 검사항목 선정 시스템에 관한 것으로, 환자들의 사례 데이터베이스(Database)를 통해 훈련된 인공신경망(Neural Network)로 한 기계학습기인 질환 판별기를 통해 새로운 환자의 검사 정보를 분석하여 질환을 판별하고 예비진단에 의한 각 질환의 최종 판별을 위한 최소의 중요 검사 항목을 선정하여 제공하는 시스템에 관한 것이다. 기계학습 추론을 통한 질환 진단 기법은 기계학습 기법을 개별적으로 적용하여 구성하고 있다. 상기 환자의 모델을 생성하는 방법은 선형 모델(linear models), 지지 벡터 기계(support vector machines), 신경망(neural networks), 분류 및 회귀 트리(classification and regression trees), 앙상블 학습법(ensemble learning methods), 판별식 분석(discriminant analysis), 근접 네이버 방법(nearest neighbor method), 베이지 네트워크(Bayesian networks), 독립 성분 분석(independent components analysis) 등이 있다.
- [143] 본 시스템의 구성 및 실무에서의 응용은 2가지로 나누어서 구성할 수 있는데 진단만을 위한 독립된(stand alone) 형태의 진단시스템과 기존의 병원정보시스템 즉 OCS, PACS, LIS 등과 연계된 통합된 시스템으로 구성할 수 있다. 통합된 시스템과의 연동을 위해서는 HL7, 및 DICOM 규약에 의거하여 시스템을 구성하여야 한다. 본 시스템은 초기모델로 PMS(Patient Monitoring System) 와 연동하여 진단의 정확도를 높게 하였다. 또한 PMS 뿐만 아니라 OCS, EMR, PACS 등 다양한 의료정보시스템과 연동된 시스템으로 개발하여 다양한

질환인자를 포함하고 있는 보다 정확한 진단시스템으로 개발할 수 있다.

- [144] 본 발명은 상기 생체시료는 세균, 진균류, 바이러스, 세포주, 조직으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 생체분자의 분석방법 및 장치를 제공한다.

발명의 효과

- [145] 본 발명은 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 생체분자를 분석함으로써 생체시료에서 생체분자의 생물학적 의미를 확인할 수 있으며, 형광학적으로 높은 감도로 검출할 수 있다. 더욱이, 한 번의 검사로 다양한 생체분자들을 분석함으로써 생체시료에서 표현형의 변화, 질병에 대한 민감성 그리고 치료 약제에 대한 반응의 차이 등 개인 간의 차이를 효율적으로 결정하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [146] 도 1은 생체시료에서 핵산 및 단백질을 분리한 후, 단백질과 분석리간드를 반응시켜 제조된 단백질-분석리간드 복합체 및 핵산에서 분리된 RNA 그리고 DNA 등의 표적핵산을 포함하는 핵산에서 분석하고자하는 표적핵산DNA를 제조하고 표적핵산의 특정영역에 완전하게 상보적인 결합을 하는 올리고뉴클레오타이드로 생체분자 분석하고 생물적 의미를 분석하는 전체적인 흐름도이다.
- [147] 도 2는 생체시료에서 분리된 리셉터와 분석리간드 복합체이다.
- [148] 도 3은 생체시료에서 분리된 RNA를 역전사한 후 cDNA를 대상으로 RNA 정량 분석하는 도면이다.
- [149] 도 4는 생체시료에서 분리된 표적핵산의 특정영역에 완전하게 상보적인 결합을 하는 올리고뉴클레오타이드로 표적핵산 변이분석을 하는 전체적인 흐름도이다.
- [150] 도 5는 생체시료에서 분리된 표적핵산 메틸화유무 분석을 하는 전체적인 흐름도이다.
- [151] 도 6는 표지물질이 있는 타깃프로브를 어레이상의 포착프로브와 혼성화하여 발생하는 신호를 분석하여 생체분자를 분석하는 것에 관한 도면이다.
- [152] 도 7는 어레이상에 IL17 및 IL17RA에 반응하는 압타머, mRNA, DNA 변이 및 메틸화유무에 반응하는 포착프로브들의 배치도이다.
- [153] 도 8는 IL17 및 IL17RA에 반응하는 단백질, mRNA, DNA 변이 및 메틸화유무를 분석하기 위해 올리고뉴클레오타이드들을 이용하여 부분적 이중가닥핵산 및 완전한 이중가닥핵산을 제작한 후, 이들을 주형으로 하고 신호프라이머로 PCR하여 표지 및 증폭하여 획득한 타깃프로브를 어레이에 고착된 상기 포착프로브에 혼성화하여 형성된 이미지이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [154] 이하, 첨부도면과 실시예를 참조하여 본 발명에 따른 기준물질 및 핵산칩의

제조방법, 및 이들을 이용한 돌 또는 그 이상의 생체분자로 구성된 생체시료에 있는 생체분자 분석방법을 상세히 설명한다. 이하의 구체예는 본 발명을 예시적으로 설명하는 것일 뿐 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 아니한다.

- [155] 본 발명에 사용되는 특정 생체분자는 IL17 및 IL17RA이며 어레이를 이용한 한번의 검사로 이들의 단백질, mRNA 및 DNA 변이를 분석하고자한다.
- [156] IL-17은 CD4+ T세포인 Th17세포가 생산하는 사이토카인으로, 예를 들면 Accession code AAH67505나 NP002181로 나타내는 아미노산 서열을 갖는 단백질이다. IL-17은 IL-17A 또는 CTLA-8로 불려지는 것도 있다. IL-17수용체는 IL-17이 결합하는 세포 표면 단백질을 의미한다. IL-17수용체 패밀리로 IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD, IL-17RE가 알려져 있다.
- [157] 본 발명에서 'IL-17 매개 염증질환'은 Th17 세포뿐만 아니라 감마/델타 T 세포, NK 세포, 대식세포, 호중구 등의 면역 또는 염증세포에서 분비되는 IL-17에 의해 발생 또는 악화되는 호흡기질환; 소화기질환; 피부질환 혈관 또는 대사질환; 골관절질환 및 뇌신경질환 등을 포함한다.
- [158] 구체적으로 상기 호흡기질환은 비염, 비염종, 부비동염, 천식, 기관지염, 만성폐쇄성폐질환, 기관지확장증, 세기관지염, 폐렴, 폐섬유증, 폐암 등을 포함하며, 상기 소화기질환은 구강염, 식도염, 위염, 위궤양, 염증성장염, 과민성장증후군, 담도염, 췌장염, 구강암, 식도암, 위암, 대장암, 담도암, 담낭암, 췌장암 등을 포함한다.
- [159] 또한 상기 혈관 또는 대사질환은 동맥경화증, 당뇨, 통풍 등을 포함하며, 상기 골관절질환은 류마티스관절염, 골관절염, 골다공증 등을 포함한다. 상기 뇌신경질환은 혈관성치매, 알츠하이머병, 퇴행성뇌질환 등을 포함한다.
- [160] 정량 분석하는 단백질 및 RNA 정량분석의 대상은 IL17 및 IL17RA 이며 진뱅크 (GenBank) 데이터 시스템 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 얻을 수 있는 IL17 및 IL17RA 유전자의 염기서열 정보 (IL17의 Accession number는 NM_002190, 및 IL17RA의 Accession number: NM_014339)이다.
- [161] DNA 변이 분석은 IL17 및 IL17RA의 SNP를 대상으로 하였으며 이에 대한 정보는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>에서 수집하였다.
- [162] 핵산 메틸화 여부 분석은 IL17 프로모터-144 위치(Thomas, R.M., et al., 2012, J Biol Chem. 287(30):25049-59.)를 수행하였다.
- [163]
- [164] 표 1

[Table 1]

표적핵산 특정영역(H)의 염기서열

종 류	상류올리고뉴클레오타이드(5'→3')	하류올리고뉴클레오타이드(5'→3')	일련번호
β-actin mRNA	gggcgacgaggcccagagcaagaga	ggcaccctcaccctgaagtaccca	1
	cagatcatgtttgagacctcaaca	ccccagccatgtacgttctatcca	2
IL17 mRNA	ccctcaggaacctcaccctcaaa	gacagcctcatttcggactaaactc	3
	taaccggaataccaataccaatccc	aaaaggtcctcagattactacaacc	4
IL17RA mRNA	ggagcagaagcctcccagccactag	ccttttgggctcagtctctccaata	5
	gagtacaggataccacaatgcactc	ttcctgcgtagagcacatgttccca	6
IL17 SNP			
rs10484879	AAACTCATCGTGAAGTC AAACATTCAA	ATTGGAAGAAAGAGCT ATAGAAAAT	7
	AAACTCATCGTGAAGTC AAACATTCAC		
rs8193038	GGAATACTGTATATGTA GGATAGGAAA	TGAAAGCTTTGGTAGG TATTTAAGT	8
	GGAATACTGTATATGTA GGATAGGAAG		
rs8193037	TGTCACCCCTGAACCCA CTGCGACACA	CCACGTAAGTGACCAC AGAAGGAGA	9
	TGTCACCCCTGAACCCA CTGCGACACG		
rs8193036	CCCCCTGCCCCCCTTTT CTCCATCTC	CATCACCTTTGTCCAGT CTCTATCC	10
	CCCCCTGCCCCCCTTTT CTCCATCTT		
rs4711998	TGTATTCCTGAGAAGGA ACTATTCTCA	AGGACCTGAGTCCAAG TTCATCTTA	11
	TGTATTCCTGAGAAGGA ACTATTCTCG		

rs3819025	TCATTGGTGGTGAGTCC TGCACTAACA	TGCGATGCTCTTGCTG ATTTGGACC	12
	TCATTGGTGGTGAGTCC TGCACTAACG		
rs3819024	AACACCTGGCCAAGGAA TCTGTGAGGA	AAAGAAAGATCAAATG GAAAATCAA	13
	AACACCTGGCCAAGGAA TCTGTGAGGG		
rs3804513	CAAATGTATTTTGATCA TTGACTTCA	TACAAATAAGTCTCTG TTCTGTGGA	14
	CAAATGTATTTTGATCA TTGACTTCT		
rs3748067	TGGGCTGAACTTTTCTC ATACTTAAAA	TTCGTTCTGCCCCATCA GCTCCTTT	15
	TGGGCTGAACTTTTCTC ATACTTAAAG		
rs2275913	CTGCCCTTCCCATTTTCC TTCAGAAGA	AGAGATTCTTCTATGA CCTCATTGG	16
	CTGCCCTTCCCATTTTCC TTCAGAAGG		
rs1974226	CTGAACTTTTCTCATACT TAAAGTTCA	TTCTGCCCCATCAGCTC CTTTCTGG	17
	CTGAACTTTTCTCATACT TAAAGTTCTG		
IL17RA SNP			
rs151315255	GATGGCCTGCCTGCGGC TGACCTGATC	CCCCACCGCTGAAGC CCAGGAAGG	18
	GATGGCCTGCCTGCGGC TGACCTGATT		
rs139412425	TGGATCATCTACTCAGC CGACCACCCC	CTCTACGTGGACGTGG TCCTGAAAT	19
	TGGATCATCTACTCAGC CGACCACCK		

rs6518661	CTGTCACTAAGGAGTTA ACCCCCGCAA	AGCAGTTTTTTCATCAC ATCTCTGA	20
	CTGTCACTAAGGAGTTA ACCCCCGCAG		
rs6518660	CATAGTAGATAGCAATC TATTCAACCA	TTTCTAGTTTGATGGAC ATTTAGAT	21
	CATAGTAGATAGCAATC TATTCAACCG		
rs5748864	gcaagttaggattagagggtgggac A	tttagccccaccccttaccatca	22
	gcaagttaggattagagggtgggac G		
rs4819554	TGGGAAGTAACGACTCT CTTAGGTGCA	GCTGGGACACAGTCTC ACAGACCAG	23
	TGGGAAGTAACGACTCT CTTAGGTGCG		
rs2241049	GCATGGGAGGACCTATG GGAGGTCCA	ATAACATTCAGTAGCA TCTCGGCCA	24
	GCATGGGAGGACCTATG GGAGGTCCG		
rs2241046	ATGCTATTTCCCTTTTT CCTCTGTTC	TCATTGCAGAACCAAT TCCGGGTAA	25
	ATGCTATTTCCCTTTTT CCTCTGTTT		
rs2229151	CACCCCCTCTACGTGGA CGTGGTCCTA	AAATTCGCCCAGTTCC TGCTCACCG	26
	CACCCCCTCTACGTGGA CGTGGTCCTG		
rs882643	ACGCTTTCCCAACCAC AATCCTTCAC	CTCAGGCATCTCCTCG GGGATCCCC	27
	ACGCTTTCCCAACCAC AATCCTTCAG		

rs879577	TCAGCGGTGGGGGGATC AGGTCAGCCA	CAGGCAGGCCATCTAA GGAAACAAG]	28
	TCAGCGGTGGGGGGATC AGGTCAGCCG		
rs879576	TGGTCGGCTGAGTAGAT GATCCAGACC	TTCCTGGGCTTCAGCG GTGGGGGGA	29
	TGGTCGGCTGAGTAGAT GATCCAGACT		
rs879576	TGGTCGGCTGAGTAGAT GATCCAGACC	TTCCTGGGCTTCAGCG GTGGGGGGA	30
	TGGTCGGCTGAGTAGAT GATCCAGACT		
rs721930	GTTCTGAGGGGTGATTA GGGAGGAGAC	TTTAGTTTAACTTGGA GTCCTTCAG	31
	GTTCTGAGGGGTGATTA GGGAGGAGAG		
IL17 압타머	ggucuagccggaggaguc	aguaaucgguagacc	32
IL17RA 압타머	ACGCGCTAGGATCAA	AGCTGCACTGAAGTG	33
IL17 메틸화(프로 모터 144 위치)	tcaaatcaattttaacattatctacaacaa g	gtcatactgtgggctgga gacccaaaagcc	34
	tcaaatcaattttaacattatctacaacaa a		

[165]

[166] 표 2

[Table 2]

포착프로브 및 포착프로브의 상보적 염기서열(리간드를 지시하는 zip-code 염기서열)

종 류	포착프로브(5'→3')(53)	포착프로브의 상보적 염기서열(5'→3')
1	GATTTGTATTGATTGAGATTAAG	CTTTAATCTCAATCAATACAAATC
2	TGATTGTAGTATGTATTGATAAG	CTTTATCAATACATACTACAATCA
3	GATTGTAAGATTTGATAAAGTGT	TACACTTTATCAAATCTTACAAATC
4	GATTTGAAGATTATTGGTAATGTA	TACATTACCAATAATCTTCAAAATC
5	GATTGATTATTGTGATTTGAATTG	CAATTCAAATCACAATAATCAAATC
6	GATTTGATTGTAAAAGATTGTTGA	TCAACAATCTTTTACAATCAAAATC
7	ATTGGTAAATTGGTAAATGAATTG	CAATTCATTTACCAATTTACCAAT
8	GTAAGTAATGAATGTAAAAGGATTT	AATCCTTTTACATTCATTAATCTT
9	GTAAGATGTTGATATAGAAGATTA	TAATCTTCTATATCAACATCTTAC
10	TGTAGATTTGTATGTATGTATGAT	ATCATAACATACATAACAAATCTCA
11	GATTAAAGTGATTGATGATTTGTA	TACAAATCATCATCACTTTTAAATC
12	AAAGAAAGAAAGAAAGAAAGTGT	TACACTTTCTTTCTTTCTTTCTTT
13	TTAGTGAAGAAGTATAGTTTATTG	CAATAAACTATACTTCTTCACTAA
14	AAAGTAAGTTAAGATGTATAGTAG	CTACTATAACATCTTACTATACTTT
15	TGAATTGATGAATGAATGAAGTAG	ATACTTCATTCATTCATCAATTA

	AT	CA
16	TGATGATTTGAATGAAGATTGA TT	AATCAATCTTCATTCAAATCAT CA
17	TGATAAAGTGATAAAGGATTAA AG	CTTTAATCCTTTATCACTTTATC A
18	TGATTTGAGTATTTGAGATTTTG A	TCAAATCTCAAATACTCAAAT CA
19	GTATTTGAGTAAGTAATTGATTG A	TCAATCAATTACTIONACTCAAAT AG
20	GATTGTATTGAAGTATTGTAAA AG	CTTTTACAATACTTCAATACAA TC
21	TGATTTGAGATTAAGAAAGGA TT	AATCCTTTCTTTAATCTCAAAT CA
22	TGATTGAATTGAGTAAAAAGGA TT	AATCCTTTTTACTCAATTCAAT CA
23	AAAGTTGAGATTTGAATGATTG AA	TTCAATCATTCAAATCTCAACT TT
24	GTATTGTATTGAAAAGGTAATT GA	TCAATTACCTTTTCAATACAAT AC
25	TGAAGATTTGAAGTAATTGAAA AG	CTTTTCAATTACTIONACTCAAATCTTC A
26	TGAAAAAGTG TAGATTTTGAGT AA	T TACTCAAATCTACACTTTTT CA
27	AAAGTTGAGTATTGATTTGAAA AG	CTTTTCAAATCAATACTIONACTCAACT TT
28	TTGATAATGTTTGTTTGTTTGTA G	CTACAAACAAACAAACATTAT CAA
29	AAAGAAAGGATTTGTAGTAAGA TT	AATCTTACTACAAATCCTTTCT TT
30	GTAAAAAGAAAGGTATAAAGGT AA	TTACCTTTATACCTTTTCTTTTT AC
31	GATTAAAGTTGATTGAAAAGTG AA	T TCACTTTTCAATCAACTTTAA TC
32	G TAGATTAGTTTGAAGTGAATA	ATTATTCACTTCAAAC TAACT

	AT	AC
33	AAAGGATTAAAGTGAAGTAATT GA	TCAATTACTTCACTTTAATCCTT T
34	TGAAATGAATGAATGATGAAAT TG	CAATTCATCATTTCATTTC A

[167]

[168] 표 3

[Table 3]

유니버설 PCR 프라이머의 염기서열

정방향프라이머(5'→3')	역방향프라이머(5'→3')
P1: 5-ACTTCGTCAGTAACGGAC-3	P3: 5-GTCTGCCTATAGTGAGTC-3
P2: 5-GAGTCGAGGTCATATCGT-3	

[169]

[170] 실시예 1. 생체분자 준비

[171] 세포 혹은 세포로 이루어진 조직 시료에서 AllPrep DNA/RNA/Protein Mini kit (Qiagen사, 미국)로 생체분자를 분리하였다. 본 발명에서는 사람의 연골조직(Promocell 사, 독일)을 생체시료로 사용하였다. 연골조직을 제조사에 제공된 버퍼로 용해시킨 후 용해된 시료를 컬럼에 처리한 후, 원심분리하여 DNA를 컬럼막에 결합시키고 여과된 용액을 수확하였다. 컬럼막에 있는 DNA분리는 DNA가 있는 컬럼을 세척하고 막에서 DNA를 추출한 후, 원심분리하여 DNA를 수확하였다. 상기 수확된 여과용액을 제조사에서 제공하는 컬럼에 처리하여 여과된 용액에서 단백질을 침전 및 원심분리하여 수확하였다. 또한 컬럼에서 있는 RNA를 세척하고 막에 있는 RNA를 추출한 후 원심분리하여 수확하였다.

[172] 실시예 2. 분석리간드 제조

[173] 2-1. 항체 및 압타머 분석리간드

[174] 상기 연골조직에서 특정 단백질의 정량분석을 하기 위해 상기 단백질-항체 분석리간드 복합체는 제조하기 위해 IL17(카탈로그 번호 BAF317) 및 IL17RA(카탈로그 번호 BAF177) 바이오틴-항체를 구입하였다(R&D Systems사, 미국).

[175] 상기 연골조직에서 특정 단백질의 정량분석을 하기 위해 상기 단백질-압타머 복합체는 제조하기 위해 사용되는 압타머는 IL17(대한민국 특허 제10-1276519-0000호) 및 IL17RA(Chen, L., et al., 2011, Osteoarthritis and Cartilage 19; 711~718)에 특이적으로 결합하는 단일가닥핵산으로 염기서열은 [표 4]에 제시되었다. IL17 및 IL17RA 바이오틴-압타머를 유기합성하여

준비하였다(바이오니아, 대한민국).

[176]

[177] 표 4

[Table 4]

IL17 및 IL17RA 압타머의 염기서열

종류	염기서열(5'→3')	비고
IL17	GGUCUAGCCGGAGGAGUCAGUAAUCGGUAGACC	
IL17RA	ACGCGCTAGGATCAAAGCTGCACTGAAGTG	

[178] 단백질 정량분석을 위한 항체 분석리간드의 바이오틴-올리고뉴클레오타이드의 구성은 다음의 일반식(I)로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법:

[179] 5'-바이오틴-P1-T-P3-3' (I)

[180] 상기 일반식(I)에서, P1는 신호프라이머 쌍에서 정방향 프라이머와 완전하게 상보적 결합하는 영역이고 T은 포착프로브와 완전하게 상보적 결합하는 영역으로 표적 단일가닥핵산을 식별하기 위해서 이용되며 혼성화반응에서 사용하는 프로브로 적합하도록 설계할 수 있다. P3는 신호프라이머 쌍에서 정방향 프라이머와 완전하게 상보적 결합하는 영역이다.

[181] 상기 준비된 바이오틴-항체 및 바이오틴-압타머를 아비딘으로 바이오틴-올리고뉴클레오타이드와 연결하여 구조체를 제조하였으며 전자를 항체 분석리간드 또는 후자를 압타머 분석리간드라 지칭하였다.

[182] **2-2. 상류 및 하류 올리고뉴클레오타이드**

[183] 2-2-1. 핵산 정량분석

[184] 핵산 정량분석을 하기 위해 상기 상류 올리고뉴클레오타이드의 구성은 다음의 일반식(II)로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법:

[185] 5'-P1-H-3' (II)

[186] 상기 일반식(II)에서, P1는 신호프라이머 쌍에서 정방향 프라이머와 완전하게 상보적 결합하는 영역이고 H는 혼성화되는 표적핵산과 실질적으로 상보적 혼성화 서열 영역이다.

[187] 상기 하류 올리고뉴클레오타이드의 구성은 다음의 일반식(III)로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법:

[188] 5'-H-T-P3-3' (III)

[189] 상기 일반식(III)에 있어서, H는 상기 표적핵산에 상기 상류 올리고뉴클레오타이드의 3'말단이 결합하는 위치다음의 염기서열부터 완전하게 상보적 결합을 하는 변이인적특이 영역이고 T은 포착프로브와 완전하게 상보적 결합하는 영역으로 표적 단일가닥핵산을 식별하기 위해서 이용되며

혼성화반응에서 사용하는 프로브로 적합하도록 설계할 수 있다. P3는 신호프라이머쌍에서 역방향 프라이머와 완전하게 상보적 결합을 하는 영역이다.

[190] 상기 일반식(II)와 일반식(III)의 H는 [표 1]의 β -actin, IL17 및 IL17R mRNA의 특이적인 염기서열 및 T는 [표 2], P는 [표3]을 참조하여 유기합성하였다(바이오니아. 한국)

[191] 2-2-2. 핵산 변이분석

[192] 표적핵산 변이 분석을 위해 상기 상류 올리고뉴클레오타이드의 굿성은 다음의 일반식(IV)로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법:

[193] 5'-P1-H-V-3' (IV)

[194] 상기 일반식(IV)에서, P1는 신호프라이머 쌍에서 정방향 프라이머가 완전하게 상보적 결합하는 영역이고 H는 혼성화되는 표적핵산과 완전하게 상보적 혼성화서열을 가지는 변이인접 특이 영역이고 V는 뉴클레오타이드 변이에 해당하는 변이 특이 영역으로 상류 올리고뉴클레오타이드는 2개 또는 그 이상이다.

[195] 상기 하류 올리고뉴클레오타이드의 구성은 다음의 일반식(V)로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법:

[196] 5'-H-T-P2-3' (V)

[197] 상기 일반식(V)에 있어서, H는 상기 표적핵산과 완전하게 상보적 결합을 하는 변이인접특이 영역이고 T는 포착프로브와 완전하게 상보적 결합하는 영역으로 변이관련 뉴클레오타이드가 있는 단일가닥핵산을 식별하기 위해서 이용되며 혼성화반응에서 사용하는 프로브로 적합하도록 설계할 수 있다. P2는 신호프라이머쌍에서 역방향 프라이머와 완전하게 상보적 결합을 하는 영역이다.

[198] 상기 일반식(IV)와 일반식(V)의 H는 [표 1]의 IL17의 SNP, IL17R의 SNP 및 IL17 메틸화여부의 특이적인 염기서열 및 T는 [표 2], P는 [표3]을 참조하여 유기합성하였다(바이오니아. 한국)

[199] 실시예 3. 정도관리 단일가닥핵산의 제조

[200] 기준물질은 http://genomics.msu.edu/plant_specific/에서 확보한 A, B, C, D 및 E 등 5개 종류 식물특이단백질로 구성되어 있다[표 5 참조].

[201]

[202] 표 5

[Table 5]

식물특이단백질

종류	Locus	내 용	Accession number
A	At1g65390.1	defense/immunity protein	GO:0003793
B	At5g39310.1	cell elongation	GO:0009826
C	At4g15910.1	Drought-Induced Protein (Di21)	GO:0009414
D	At1g12860.1	Bhlh Protein	GO:0003677
E	At4g02530.1	Chloroplast Thylakoid Lumen Protein	GO:0009543

- [203] 선정된 5개 식물특이단백질은 대장균 발현시스템을 사용하여 상응하는 단백질을 발현시킨 후, 발현된 단백질을 분리하여 표준 SELEX 방법(Ellington, A.D. and J.W. Szostak. 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature 346: 818-822; Gold, L., P.Allen, J. Binkley, D. Brown, D. Schneider, S.R. Eddy, C. Tuerk, L. Green, S. Macdougall, and D. Tasset. 1993. RNA: the shape of things to come, pp. 497-510. In: R.F. Gestelend and J.F. Atkins (eds.). The RNA World, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)으로 기준물질에 결합하는 단일가닥핵산을 확보하였다.
- [204] 이를 정도관리 단일가닥핵산이라고 명명하였으며 이들의 염기서열로 정도관리 단일가닥핵산에 상응하는 바이오틴-정도관리 단일가닥핵산 및 <실시례 2>의 일반식1로 바이오틴-올리고뉴클레오타이드를 제조하였다. 바이오틴-정도관리 단일가닥핵산을 아비딘으로 바이오틴-올리고뉴클레오타이드를 연결하여 제조한 구조체를 정도관리 리간드라 지칭하였다.
- [205] 실시례 4. 표적핵산의 제조
- [206] 4-1. 단백질
- [207] 4-1-1. 항체 분석리간드
- [208] 상기에 준비된 연골조직에서 분리한 단백질용액 100 μ l를 넣은 microtiter well을 4 $^{\circ}$ C에서 밤샘 혹은 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 0.05M 카보네이트 완충용액(pH 9.6)으로 코팅시켰다.
- [209] 바이오틴-항체 (10 μ g/ml) 100 μ l에 아비딘(7.2 μ g/ml)을 첨가한 채로 30분간 실온에 두었다가 상기 바이오틴-올리고뉴클레오타이드를 첨가하여 항체-아비딘-올리고뉴클레오타이드 구조체를 제조하였으며 이를 항체 분석리간드라 지칭하였다..
- [210] Well들을 인산염 완충 생리식염수에서 3% 탈지분유, 0.1mM 에틸렌다이아민 테트라아세트산, 0.02% 소듐 아자이드로 블록(180 μ l/well) 하고 인산염 완충 생리식염수-트윈 20으로 두 번 세척한 후, 항체 분석리간드 (10 μ g/ml) 100 μ l를

첨가하여 2시간 동안 37°C에서 배양하였다. 이 well들을 5분간 5번 트윈-인산염 완충 생리식염수로 세척한 후 비특이적으로 결합된 바이오틴-올리고뉴클레오타이드를 제거하기 위하여 증류수로 5분간 4번 씻어내었다. 이 well에 PCR 반응액 약 50 μ l를 첨가한 후, 결합된 바이오틴-올리고뉴클레오타이드를 분리하기 위하여 96°C에서 3분간 predenaturation 하였다. 각 well에 있는 내용물을 500 μ l Eppendorf 튜브로 옮겨서, 보관하였으며 단백질 정량분석을 위한 표적핵산DNA로 사용하였다.

[211] 4-1-2. 압타머 분석리간드

[212] 상기 준비된 바이오틴-IL17 압타머(10/100 및 바이오틴-IL17RA 압타머(10/100)에 각각 아비딘(7.2)를 첨가한 채로 30분간 실온에 두었다가 상기 준비된 바이오틴-올리고뉴클레오타이드(10)를 첨가하여 압타머-아비딘-올리고뉴클레오타이드 구조체를 제조하였으며 이를 압타머 분석리간드라 지칭하였다..

[213] 상기에 준비된 연골조직에서 분리한 단백질용액을 나이트로셀룰로즈(nitrocellulose) 디스크에 처리하여 고정시킨 후, 셀렉스버퍼에서 상기 단백질이 부착된 디스크와 IL17 및 IL17RA 압타머 분석리간드를 30분간 처리하여 단백질-압타머 분석리간드 복합체를 형성시켰고 세척을 수행하여 비특이적으로 결합한 압타머를 제거하여 정제된 단백질-압타머 분석리간드 복합체를 준비하였으며 단백질의 정량분석을 위해 이를 표적핵산DNA로 사용하였다.

[214] 표적단백질에 독립적인 두 항원결정부(epitope)에 결합하는 두 개의 항체(리간드)를 확보하여 한 항체(리간드)에는 자성비드를 결합시켜 자성비드 항체(리간드)라고 하며 다른 항체(리간드)에는 표적핵산을 결합시켜 표적핵산 항체(리간드)라고 명명하였다. Well속에서 표적단백질을 포함하는 시료와 상기 자성비드 항체와 표적핵산 항체를 반응시켜 자석으로 자성비드 항체-표적단백질-표적핵산 항체 복합체를 수확하였다. 상기 수확된 복합체를 새로운 튜브에 옮겨서 보관하였으며 단백질 정량분석을 위한 표적핵산DNA로 사용하였다.

[215] **4-2. RNA**

[216] 특정 RNA의 정량분석 및 변이를 분석하기 위해 연골조직에서 정제한 총 RNA 10ng, dT₂₀ 프라이머((주)바이오니아 100pmoles/20 μ l 반응액), MMLV 역전사효소((주)바이오니아 200U/20 μ l 반응액), 10x 반응 완충용액 2 μ l, RNasin(프로메가(Promega); 15U/20 μ l 반응액) 및 베타인(시그마(Sigma); 500mM/20 μ l 반응액)을 혼합하여 역전사 반응액을 제조하였다. 제조된 역전사 반응액을 이용하여 기존의 단일 온도 조건인 42°C 및 52°C에서, 10분, 20분, 40분, 60분반응과 37°C에서 2분, 50°C에서 3분을 한 주기로 하여 2회, 4회, 8회, 12회 순환 반응, 37°C에서 1분, 47°C에서 3분, 55°C에서 1분을 한 주기로 하여 2회, 4회, 8회, 12회 순환 반응으로 역전사 반응을 수행하였다. 생성된 cDNA를 하기

표적핵산으로 사용하였다.

[217] **4-3. DNA 변이**

[218] 상기 연골조직에서 특정 DNA의 메틸화 유무를 분석하기 위해 키트를 이용하여, 연골조직에서 지노믹 DNA를 추출하고 Nano Drop을 이용하여 그 농도를 측정하여 DNA 변이분석을 위한 표적핵산으로 사용하였다.

[219] **4-4. 메틸화**

[220] 상기 연골조직에서 특정 DNA의 메틸화 유무를 분석하기 위해 키트를 이용하여, 연골조직에서 지노믹 DNA를 추출하고 Nano Drop을 이용하여 그 농도를 측정하였다. 이후, 추출한 DNA 약 1~2 μ g 정도를 0.5 N 농도의 수산화나트륨과 섞어 16°C로 만들어 37°C에서 15분간 반응시켜 DNA가 단일가닥 형태가 되도록 변형시켰다. 이후, 3.5M 농도의 소듐 바이설파이트와 (Sodium bisulfate) 0.01M 농도의 하이드로퀴논 (Hydroquinone) 시약을 첨가하고 56°C에서 16시간 화학 반응시켰다. 이후 에탄올을 이용한 침전반응을 수행하여 변환된 DNA만을 농축시켜 순수 분리하여 50°C의 3차 증류수로 녹인 후, 0.1M 농도가 되도록 수산화나트륨을 첨가하고 상온에서 15분간 반응함으로써 사이토신의 탈황산화 반응을 수행하고 다시 한 번 에탄올 침전반응으로 농축시키고, 최종적으로 30°C의 3차 증류수에 녹여서 20°C에 보관하였으며 메틸화유무를 분석하기 위한 표적핵산으로 사용하였다.

[221] **실시례 5. 표적핵산 DNA 제조**

[222] 상기 연골조직에서 분리된 RNA, DNA 및 단백질-분석리간드 복합체 등에서 분석하고자하는 표적핵산이 포함된 핵산에서 표적핵산DNA를 제조하는 방법은 다음과 같다.

[223] <실시례 4>에서 단백질 정량분석을 위해 수확한 단백질-분석리간드 복합체의 올리고뉴클레오타이드를 표적핵산 DNA로 사용하였다.

[224] <실시례 4>에서 RNA 정량분석을 위해 분리된 RNA를 역전사반응으로 전환된 DNA, DNA 변이분석을 위해 분리된 지노믹 DNA 그리고 메틸화유무 분석을 위해 지노믹 DNA의 메틸화정보를 반영한 염기서열의 변화가 생긴 DNA으로부터 표적핵산 DNA를 제조하였다.

[225] 상기 DNA와 상기 두 개의 올리고뉴클레오타이드를 혼성화 반응하여 부분적 이중가닥핵산을 제조하고, 이어서 부분적 이중가닥핵산을 완전한 이중가닥핵산으로 전환시키는 연결반응을 수행하여 상기 표적핵산DNA를 제조하였다.

[226] 아래 반응용액에서 PCR기기를 사용하여 95에서 5분 동안 변성한 후, 95에서 1분, 70에서 1분, 68에서 1분, 66에서 1분 그리고 64에서 3분 사이클을 10회하는 단계로 진행하였다.

[227] 10-ml 반응용액은 20mM TrisHCl (pH 7.6), 25mM sodium acetate, 10mM magnesium acetate, 1mM dithiothreitol, 1mM NAD⁺, 0.1% Triton X-100, 실시예2에서 준비된 상류 올리고뉴클레오타이드와 하류올리고뉴클레오타이드

(500 pM each), 1 unit Taq DNA ligase (New England Biolabs, MA, USA), 상기에서 준비된 100 μ g DNA으로 구성되었다.

[228] 실시례 6. 증폭반응

[229] 상기 증폭반응은 아래 반응용액에서 PCR 기기를 사용하여 95°C에서 3분동안 변성한 후, 95°C에서 10초, 56°C에서 10초 및 72°C에서 20초 사이클을 42회 진행하였다. 상기 25-ml 반응용액은 10mM TrisHCl (pH 8.6), 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 5% (V/V) glycerin, 1U Taq DNA polymerase, 1 pmol 정방향 신호프라이머(정량분석의 경우 P1만, 변이분석은 P1과 P2), 20 pmol 역방향 신호프라이머(P3) 및 2 ml 실시례3의 반응용액 등으로 구성되었다.

[230] 정량분석을 위한 신호프라이머는 표적핵산에 상응하는 염기서열이 있는 단일가닥핵산에 완전하게 상보적인 결합을 하는 신호프라이머로 Cy3 표지물질가 표지된 정방향프라이머(P1) 및 표적핵산 역방향 프라이머(P3) 등으로 구성한다.

[231] 변이분석을 위한 신호프라이머는, 정방향 신호프라이머는 표적핵산의 변이에 상응하는 유니버설 PCR 프라이머로 Cy3(P1 프라이머) 혹은 Cy5(P2프라이머) 표지물질로 표지되어 있고 2개 또는 그 이상이며, 상기 하류프라이머는 유니버설 PCR 프라이머(P3)로 구성한다. 유니버설 PCR 프라이머의 염기서열은 [표2]에 제시되어 있다.

[232] 실시예 7. 어레이의 제조

[233] 상기의 포착프로브는 표적핵산들을 식별하기 위해 표적핵산에 상응하는 염기서열을 갖는 올리고머(표 3)을 제시하였고 유기 합성하여(바이오니아사) 제조된 포착프로브를 도4에 준하여 어레이에 고정하였다.

[234] 상기 하류올리고뉴클레오타이드를 디자인할 때, [표3]에 있는 포착프로브는 [표4]에 있는 하류 올리고뉴클레오타이드와 완전하게 상보적 결합하는 표적핵산의 특정영역을 지시하도록 하였다.

[235] 이를 구체적으로 살펴보면, [표 1]의 종류 1번 포착프로브는 [표2]의 일렬번호 1인 β -actin mRNA의 하류 올리고뉴클레오타이드가 완전하게 상보적 결합하는 영역, [표 1]의 종류 3번 포착프로브는 [표2]의 일렬번호 3인 IL17 mRNA의 하류 올리고뉴클레오타이드가 완전하게 상보적 결합하는 영역을 지시하도록 하였다.

[236] GAPS(Gamma Amino Propyl Silane)이 코팅된 유리 슬라이드인 UltraGAPSTM Coated Slide(Corning 사)를 사용하여 포착 단일가닥핵산이 일정 규칙으로 고착된 핵산칩을 제작하였다. 핵산칩의 제작은 핀(pin) 방식인 어레이어 시스템(Microarrayer system, GenPak사)을 사용하였고, 스폿 간격(spot spacing)은 스폿 중심 사이(center-to-center)가 150 μ m가 되도록 하였다. 각각의 포착 단일가닥핵산들을 표준용액에 녹여 농도를 조절하였다. 이때 어레이어 안의 습도는 70%로 유지하여 스폿팅(spotting)을 수행하였다. 스폿팅된 슬라이드들은 습도유지챔버(humidified chamber)에서 24 ~ 48 시간 방치한 후, UV crosslinker에서 굽는(baking)과정을 수행하였다. 널리 알려진 방법으로 포착

단일가닥핵산들을 유리 슬라이드에 고정시킨 후, 슬라이드를 바로 원심분리하여 건조시킨 다음, 빛이 차단된 상태로 보관을 하였다. 상기 어레이의 제작방법에서의 기판은 유리로 제작된 슬라이드 글라스이다. 이때, 기판은 아민기 또는 알데히드기 등으로 코팅된 것을 사용할 수 있다. 예를 들어 GAPS(Gamma Amino Propyl Silane)이 코팅된 유리 슬라이드인 UltraGAPSTM Coated Slide(Corning 사)를 사용하여 상기 포착프로브들을 일정 규칙으로 배열 고착시켜 어레이를 제작한다.

- [237] 상기에 따른 어레이의 제조는, 어레이어 시스템(Microarrayer system)을 사용할 수 있고, 각각의 포착프로브를 완충액에 녹여 농도를 조절하고, 이때 어레이어 안의 습도는 70°C 내지 80%로 유지하여 스폿팅(spotting)을 수행한다.
- [238] 스폿팅된 슬라이드들은 습도 유지챔버(humidified chamber)에서 방치한 후, UV crosslinker 에서 굽는(baking)과정을 수행한다.
- [239] 이와 같이 본 발명에 따른 어레이는, 관련 기술분야에 널리 알려진 방법으로 포착 단일가닥핵산들을 유리 슬라이드에 고정시킨 후, 슬라이드를 바로 원심 분리하여 건조시킨 다음, 사용 전까지 빛이 차단된 상태로 보관을 한다.
- [240] 실시예 8. 어레이 혼성화 및 분석
- [241] 상기 [표 1]에 있는 표적핵산 특정영역의 염기서열과 포착프로브와 완전하게 상보적 결합을 하는 영역을 포함하는 타깃프로브들을 본 발명의 어레이의 포착프로브에 처리하여 60°C에서 4 ~ 12 시간 혼성화하고 42°C에서 0.1 x SSC 용액으로 세척하였다.
- [242] 이때 혼성화 용액은 1 M 염화나트륨, 0.3 M sodium citrate, 0.5% SDS 또는 100/살몬스뎀 DNA, 0.2% 우혈청알부민 또는 단일가닥핵산을 포함한다. 혼성화(Hybridization)를 수행한 후, 어레이를 세척용액으로 세척하였다.
- [243] 이때, 세척용액의 조성은 예로 들면, 1X SSC + 0.2% SDS, 1X SSC + 0.2% SDS, 0.5XSSC + 0.2% SDS, 0.01X SSC + 0.2% SDS 순의 단계이며 각각 단계마다 42°C에서 30분간 수행하였다.
- [244] 실시예 9. 핵산칩의 스폿 탐색 및 분석
- [245] 상기 실시예6의 세척이 종료된 후, 유리 슬라이드를 원심분리로 건조한 후, 사용한 형광염료를 여기(excitation)하기 위한 적절한 파장의 레이저(Cy5, 635 nm)를 갖는 레이저 스캐너(laser scanner, GenePix4000, Axon사)를 이용하여 탐색하였다. 형광이미지는 다중-이미지-태그된 이미지 파일(multi-image Taged image file, TIFF) 포맷으로 저장한 후, 적절한 화상분석(image analysis) 소프트웨어(GenePix Pro 3.0, Axon사)로 분석하였다.
- [246] 스폿(spot)당 시그널 강도(signal intensity, 단위: quanta)는 주위 배경의 기본 시그널을 뺀 것을 사용하는데, 여기서 배경 시그널은 특정 스폿의 주위에 있는 4개 스폿의 주변 시그널로 구성된 지역적 배경(local background)을 의미한다. 스폿이 가지고 있는 화소(pixel)의 90% 이상이 배경 시그널 + 2 표준편차(S.D.; standard deviation)를 초과하는 시그널 강도를 보일 때 데이터 분석에 포함시키며,

위 조건을 충족시키지 못하면 데이터에 포함시키지 않는 스폿(bad spot)으로 분류하고, 분석에 포함하지 않는 것이 일반적이다.

- [247] 표지 효율(Labeling efficient)에 따른 편차(variation)는 내부표준(internal standard, IS)의 시그널을 이용하여 평준화(e.g., Normalized Intensity = Probe Intensity / IS intensity)하며, 단일표지(monolabeling)를 한 경우에는 Cy5 채널의 시그널 강도(signal intensity)로 그 결과를 기록하며 스폿팅(spotting)이 두 배 이상으로 된 경우는 평균값을 사용한다. 타겟 단일가닥핵산의 시그널 강도(signal intensity, S)는 스폿이 갖는 픽셀(pixel)들에 대해서 각각의 시그널 강도를 구한 다음 이들의 중심값(median)을 사용한다(median value of pixel-by-pixel). 시그널 강도(S)는 내부표준(IS)을 이용해서 표지효율에 따른 편차를 평준화한다.
- [248] $S'(\text{normalized value}) = S (\text{Cy5-reference}) \times (\text{Cy5-IS})$.
- [249] 이상의 방법으로 픽셀 밀도의 분석 결과와 실제 시료량 사이의 관계를 규명하여 그 상관관계를 확인할 수 있다.
- [250] 상기 실험으로 획득할 수 있는 일레인 도 6를 살펴보면, 어레이상의 스폿 형광정도로 생체시료에서 단백질 정량분석, mRNA 정량분석, DNA 변이 분석 및 DNA 메틸화 유무 분석 등을 할 수 있다.
- [251] 도 7은 IL17 및 IL17RA에 반응하는 단백질, mRNA 및 DNA 변이를 분석하기 위해 올리고뉴클레오타이드들을 이용하여 부분적 이중가닥핵산 및 완전한 이중가닥핵산을 제작한 후, 이를 주형으로 신호프라이머로 PCR하여 표지 및 증폭하여 획득한 타겟프로브를 어레이에 고착된 상기 포착프로브에 혼성화하여 형성된 이미지이다.
- [252] 도 8에서 스폿의 형광정도는 포착프로브와 표지물질이 있는 타겟프로브가 형성하는 이중가닥의 성질에 따라 다양하게 나타나며, 단일 포착프로브로 구성된 스폿에서 표지물질이 있는 타겟프로브의 신호에 따라 결정된다.
- [253] 생체분자에서 표적핵산으로 PCR하여 획득한 증폭산물에서 기원하는 표지물질이 있는 타겟프로브와 어레이 포착프로브의 염기서열은 단일가닥핵산-포착프로브의 이중가닥 안정성에, 어레이의 스폿에 있는 표지물질이 있는 타겟프로브의 양은 형광정도에 영향을 준다.
- [254] 따라서, 생체분자의 정량분석은 도 8에서 형광정도는 표지물질이 있는 타겟프로브의 양을 표현하고, 상기 표지물질이 있는 타겟프로브의 양은 생체시료에 있는 표적핵산에 반응하는 생체분자의 양을 나타낸다.
- [255] 그리고, 대조구 시료와 실험구 시료에서 분리되는 표적핵산을 서로 상이한 표지물질로 바람직하게는 전자는 Cy3, 후자는 Cy5로 표지한 신호프라이머로 타겟프로브를 준비한 경우, 즉, 형성되는 스폿들이 파랑-노랑-빨강색의 칼라 스펙트럼은 보이는 것은 포착프로브에 결합한 Cy-3이 표지된 타겟프로브와 Cy-5가 표지된 타겟프로브의 비율이 다양하여 나타나는 현상이며 특정 스폿의 컬러스펙트럼의 정도는 대조구 시료와 실험구 시료에서 특정 생체분자 존재하는 양상에 해당한다.

[256] 핵산 변이의 분석 경우는 스폿의 칼라 스펙트럼으로부터 스폿에 상응하는 표적핵산을 포함하는 생체시료에서 표적핵산에 상응하는 특정유전자 변이를 확인할 수 있다. 표적핵산의 특정영역의 변이 뉴클레오타이드와 완전하게 상보적 결합을 하는 경우에만 증폭산물이 생성되고 이를 주형으로 한 타겟프로브가 만들어지기 때문에 결국 형성된 스폿의 칼라 스펙트럼을 분석하여 어레이의 모든 스폿들의 정도를 확인함으로써 생체시료에서 특정유전자들의 변이를 확인할 수 있다. 즉, 도면 7에서 빨간 스폿은 Cy5 표지물질에 의해 발생한 것이고 이는 변이에 관련 신호프라이머 P2에 상응하여 생체시료에서 어레이상의 포착프로브에 상응하는 SNP이 존재함을 알 수 있다.

[257] 메틸화 유무는 메틸화 특이 상류 올리고뉴클레오타이드에 상응하는 신호프라이머 P1이 Cy3 그리고 비메틸화 상류 올리고뉴클레오타이드에 상응하는 신호프라이머 P2는 Cy5로 표지되어 있어 도면7에서 IL17 메틸화 스폿이 파란색임으로 본 실험에 사용된 시료의 IL17 프로모터 144 위치 사이토신은 메틸화됨을 알 수 있다.

[258] 실시예 10. 대장균의 세포외분자를 포함한 생체분자 분석

[259] 11-1. Amp^R 유전자 분석을 하는 올리고뉴클레오타이드 제조

[260] 플라스미드 pUC19에 있는 Amp^R 유전자를 분석하기 위한

올리고뉴클레오타이드의 구성은 상기 일반식(IV)와 일반식(V)에 따라 상기 상류 올리고뉴클레오타이드 및 하류 올리고뉴클레오타이드를 [표 6]처럼 디자인하여 유기합성하였다(바이오니아.한국).

[261]

[262] 표 6

[Table 6]

Amp^R 유전자를 분석하기 위한 올리고뉴클레오타이드

항목	염기서열(5'→3')
상류올리고뉴클레오타이드(야생형)	5-GCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCA TG-3
상류올리고뉴클레오타이드(변이형)	5-GCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCA TA-3
하류 올리고뉴클레오타이드	5-CCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTG GT-3

[263] 10-2. 세포표면분자 분석리간드 제작

[264] 본 발명자에 의해 제안된 대장균 결합 단일가닥핵산(대한민국 특허 제10-0730359 호 참조)의 염기서열은 [표 7]와 같으며 이를 기초하여 바이오틴-단일가닥핵산 리간드 그리고 바이오틴-올리고뉴클레오타이드는 일반식(I)에 따라 [표 2] 및 [표 3]을 참조하여 디자인하여

유기합성하였다(바이오니아, 대한민국)

[265]

[266] 표 7

[Table 7]

대장균표면분자에 결합하는 압타머의 염기서열

일련번호	염기서열(5'→3')
1	cgcaguuugc gcgcguucca aguucucuca ucacggaaua
2	acacugcgug cuuacgacuu cuggucccau cauucggcua
3	aguucgauga gggugacacc gccaggagug uuugcuagac
4	acccgucgau aaugacugaa cuuccucuau cuuaaagggg
5	ggguaagggg auguuucugg gauucaagcg ccugauucug
6	ucuguauuug uacgcaccga agauaagaga gggaguggau
7	caugggcggg ccgcggucua uucgggauua uugcggaucc
8	ucagggugug aaguucucc gcgcuagugg cuuguauguu
8	gucggggguug caaggcgucg uagcguguau uugugauggu
10	gcguaugggc gggucauuag gacaauuuua ccacucgcga
11	auugucugug ugacuagucg gucuagugug ggggagaaga
12	uuaccacuga guuaauuugu acggucugcg guguacuuua
13	gcuaucaaua uuauagaggc ggucggggua gugucaucgu
14	uaggagagcg ggagcugaga acuuagaggc gccgauacac
15	gacguauuac aguuuaguug gcgccauucg auuucugauc
16	auaccagcuu auucauuau accagcuuau ucauuuuugu
17	ccguaagucc ggucuuuccu gcugagucgc ccuuucaggu
18	uuggugggga gggccaguua ggucuaauuu ccgacgcgca

[267] 상기 준비된 바이오틴-대장균 압타머($10\mu\text{g}/\mu\text{l}$) $100\mu\text{l}$ 각각 아비딘($7.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 첨가한 채로 30분간 실온에 두었다가 상기 준비 바이오틴-올리고뉴클레오타이드($10\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 첨가하여 압타머-아비딘-올리고뉴클레오타이드 구조체를 제조하였으며 이를 압타머 분석리간드라 지칭하였다.

[268] 10-3. 대장균-분석리간드 복합체에서 생체분자 분리 및 분석

[269] 대장균과 압타머 분석리간드풀을 반응시킨 다음 대장균-압타머 분석리간드 복합체를 세척 및 분리하였다. 상기에서 수확한 대장균-분석리간드 복합체에서 pUC19 플라스미드 및 대장균표면에 결합한 단일가닥핵산 등을 포함하는 총

핵산을 분리하였다. 분리된 총 핵산을 표적핵산으로 <실시예 5>의 방법으로 표적핵산 DNA을 제조하였다. <실시예 6>의 방법으로 표지 및 증폭하여 <실시예 7>에서 제작된 어레이를 분석하였다. 대장균의 표면 생체분자의 프로파일 및 Amp^R 유전자를 확인하였다.

산업상 이용가능성

- [270] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 생체시료에 있는 생체분자들을 한 번의 검사로 분석함으로써 생체시료의 생체분자들의 생물학적 의미를 확인할 수 있으며, 형광학적으로 높은 감도로 검출할 수 있다. 따라서, 본 발명은 한 번의 검사로 다양한 생체분자들을 분석함으로써 생체시료에서 표현형의 변화, 질병에 대한 민감성 그리고 치료 약제에 대한 반응의 차이 등 개인 간의 차이를 효율적으로 결정하는 방법을 제공하는 것이 가능함으로써 인간 질병 극복에 크게 기여하며, 경제적 차원에서 의료 산업상 매우 유용한 효과가 있다.

청구범위

- [청구항 1] 분석하고자하는 시료에 있는 단백질을 포함하는 두 개 또는 그 이상의 생체분자들을 핵산분석방법으로 분석하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자 분석 방법 및 장치.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 시료를 구성하는 상기 생체분자에서 리셉터 및 핵산을 준비하는 단계;
 상기 준비된 리셉터와 분석리간드를 반응시켜 리셉터-분석리간드 복합체를 형성하는 단계;
 상기 분석하고자하는 핵산인 표적핵산과 상기 리셉터-분석리간드 복합체의 올리고뉴클레오타이드인 표적핵산에서 표적핵산DNA를 제조하는 단계; 및
 상기 표적핵산DNA를 분석하는 단계;
 를 포함하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서,
 상기 리셉터는 단백질, 펩티드, 핵산, 탄수화물, 지질(lipid), 다당류, 당단백질, 호르몬, 수용체, 항원, 항체, 바이러스, 병원균, 독성 물질, 기질, 대사산물, 전이 상태 유사체(transition state analog), 보조인자(cofactor), 저해제, 약, 염료, 영양분, 성장 인자, 세포, 조직 등의 표적분자에서 선택되는 것을 특징하는,
 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.
- [청구항 4] 제2항에 있어서,
 상기 핵산은 RNA 및 DNA를 특징으로 하는,
 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.
- [청구항 5] 제2항에 있어서,
 상기 특정 단백질의 정량분석을 하는 것을 특징으로 하는,
 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.
- [청구항 6] 제 2 항에 있어서,
 상기 분석리간드는 정방향 유니버설 PCR 프라이머,
 분석하고자하는 상기 리셉터에 대한 특정 리간드를 지시하는 염기서열로 구성된 영역 및 역방향 유니버설 PCR 프라이머 등으로 구성된 올리고뉴클레오타이드가 연결된 리간드인 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.
- [청구항 7] 제2항에 있어서,

- 상기 분석하고자하는 핵산을 정량분석, 변이분석 및 메틸화유무 분석 등에서 선택하는 하나 이상을 분석하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.
- [청구항 8] 제2항에 있어서,
상기 리셉터 정량분석의 내부 정도관리 물질은 분석하고자하는 생체시료에 포함되지 않는 물질을 이용하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자 분석 방법 및 장치.
- [청구항 9] 제2항에 있어서,
상기 특정 바이러스, 세균 및 세포 등 시료에 있는 세포표면분자를 포함한 생체분자를 분석하기 위해 상기 리셉터와 핵산을 준비하는 방법은
상기 세포표면분자가 붙어있는 시료와 상기 분석리간드를 반응시켜 상기 시료-분석리간드 복합체를 분리하는 단계; 및
상기 분리된 복합체를 구성하는 상기 생체분자에서 상기 리셉터 및 상기 핵산을 준비하는 단계;
를 포함하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.
- [청구항 10] 제2항에 있어서,
분석하고자하는 상기 리셉터의 정량분석을 위해, 상기 리셉터-분석리간드복합체에서 분리하여 수확한 상기 분석리간드인 표적핵산DNA를 제조하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.
- [청구항 11] 제2항에 있어서, 분석하고자하는 상기 표적핵산의 분석을 위해 표적핵산에서 표적핵산DNA를 제조하는 방법은,
상기 표적핵산과 완전하게 상보적 결합하는 상류 올리고뉴클레오타이드 및 하류 올리고뉴클레오타이드를 제조하는 단계;
상기 표적핵산, 상기 상류 올리고뉴클레오타이드와 하류 올리고뉴클레오타이드를 반응시켜 완전한 이중가닥핵산을 제조하는 표적핵산DNA를 제조하는 단계;
를 포함하고 하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 표적핵산 정량분석을 하기 위해 상기 상류 올리고뉴클레오타이드는 정방향 신호프라이머와 완전하게 상보적 결합을 하는 염기서열인 영역과 상기 표적핵산과 완전하게 상보적 결합하는 염기서열인 영역 등으로 구성하며; 하류 올리고뉴클레오타이드는 상기 표적핵산과 완전하게 상보적

결합하는 염기서열인 영역, 포착프로브와 완전하게 상보적 결합하는 염기서열인 영역, 역방향 신호프라이머와 완전하게 상보적 결합을 하는 염기서열인 영역 등으로 구성된 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.

[청구항 13]

제11항에 있어서,

상기 표적핵산 변이를 분석하기 위해 상기 상류

올리뉴클레오타이드는 정방향 신호프라이머와 완전하게 상보적 결합을 하는 염기서열인 영역, 상기 표적핵산과 완전하게 상보적 결합을 하는 염기서열 및 3'말단에 상기 표적핵산의 뉴클레오타이드를 구분할 수 있는 염기서열인 영역 등으로 구성되고, 하류 올리고뉴클레오타이드는 상기 표적핵산과 완전하게 상보적 결합하는 염기서열인 영역, 상기 포착프로브와 완전하게 상보적 결합하는 염기서열인 영역, 역방향 신호프라이머와 완전하게 상보적 결합을 하는 염기서열인 영역 등으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.

[청구항 14]

제11항에 있어서,

상기 상류 올리고뉴클레오타이드와 하류

올리고뉴클레오타이드사이 신장영역이 있는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.

[청구항 15]

제14항에 있어서,

상기 이중가닥핵산을 제조하는 방법은 상기 표적핵산, 상기 상류 올리고뉴클레오타이드와 하류 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 반응으로 형성된 부분적 이중가닥핵산을 신장반응 및 연결반응하여 완전한 이중가닥핵산을 형성하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.

[청구항 16]

제11항에 있어서,

상기 상류 올리고뉴클레오타이드와 하류

올리고뉴클레오타이드사이 닉(nick)이 있는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.

[청구항 17]

제16항에 있어서,

상기 이중가닥핵산을 제조하는 방법은 상기 표적핵산, 상기 상류 올리고뉴클레오타이드와 하류 올리고뉴클레오타이드를 혼성화 반응하고 형성된 부분적 이중가닥 핵산을 연결반응하여 완전한 이중가닥핵산을 형성하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.

- [청구항 18] 제17항에 있어서,
 상기 표적핵산, 상기 상류 올리고뉴클레오타이드와 하류 올리고뉴클레오타이드를 혼성화 반응하고 형성된 상기 부분적 이중가닥 핵산을 연결반응하여 상기 완전한 이중가닥핵산을 형성하는 반응을 두 번 또는 그 이상 반복적으로 수행하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.
- [청구항 19] 제2항에 있어서, 상기 표적핵산DNA를 분석하는 방법은,
 완전한 이중가닥핵산을 제조된 상기 표적핵산DNA를 주형으로 신호프라이머를 이용하여 표지 및 증폭한 타깃프로브를 제조하는 단계; 및
 상기 타깃프로브와 상기 포착프로브를 혼성화 반응시켜 형성된 산물에서 발생하는 신호를 분석하는 단계;
 를 포함하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.
- [청구항 20] 제19항에 있어서,
 상기 신호프라이머는 표지물질이 있는 유니버설 PCR 프라이머인 정방향 프라이머와 유니버설 PCR 프라이머로 구성된 역방향 프라이머로 구성하는 것을 특징으로 하는,
 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.
- [청구항 21] 제19항에 있어서,
 상기 포착프로브는 상기 타깃프로브의 표지물질이 있는 단일가닥핵산과 완전하게 상보적 결합하는 염기서열로 구성된 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.
- [청구항 22] 제21항에 있어서,
 상기 포착프로브는 타깃프로브의 표지물질이 있는 단일가닥핵산에 존재하는 리간드를 지시하는 특이 염기서열 혹은 하류 올리고뉴클레오타이드의 특이 염기서열과 완전하게 상보적 결합하는 염기서열로 구성하는 것을 특징으로 하는,
 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.
- [청구항 23] 제19항에 있어서,
 상기 타깃프로브는 대조구 시료에서 제조하는 대조타깃프로브 및 실험구 시료에서 제조하는 분석타깃프로브로 구성되는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.
- [청구항 24] 제19항에 있어서,
 상기 포착프로브는 유리슬라이드, 바이오센서의 감지표면, 비드,

[청구항 25]

나노입자 등의 지지체에 고정하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치. 제19항에 있어서, 상기 표지물질은 비오틴(Biotin), Cy2, GFP, YO-PRO-1, YOYO-1, Calcein, FITC, FlourX, ALEXA 488, Rhodamine 110, ABI 5-FAM, Oregon Green 500, Oregon green 488, RiboGreen, Rhodamine Green, Rhodamine 123, Magnesium Green, Calcium Green, TO-PRO-1, TOTO-1, ABI JOE, BODIPY 530/550, DiI, BODIPY TMR, BODIPY558/568, BODIPY564/570, Alexa 546, TRITC, Magnesium Orange, Phycoerythrin R & B, Rhodamine Phalloidin, Calcium Orange, Pyronin Y, Rhodamine B, ABI TAMRA, Rhodamine Red, Cy3.5, ABI ROX, Calcium Crimson, Alexa 594, Texas Red, Nile Red, YO-PRO-3, YOYO-3, R-phycoerythrin, C-phycoerythrin, TOPRO-3, TOTO-3, DiD DiI(5), Thiacarbocyanine, Cy5.5, Cy5 또는 Cy3에서 선택되는 형광색소를 사용하는 것을 특징으로 하는,

[청구항 26]

올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치. 제19항에 있어서, 상기 생체분자의 정보 데이터를 이용한 생물적인 의미 분석을 위한 구성은, 환자군의 상기 생체분자의 정보와 대조군의 상기 생체분자의 정보 데이터를 입력 받고 데이터베이스를 구축하는 모듈; 상기 입력된 정보 데이터를 이용하여 분석 시스템에서 전 처리를 수행하는 모듈; 상기 전 처리된 결과를 가지고 환자의 모델을 생성하는 모듈; 상기 생성된 모델을 로딩하여 내원한 환자에 적용하여 블라인드 테스트(Blind test)인 진단을 수행하는 모듈; 및 교차검정을 통해 시스템의 성능을 평가하는 모듈; 을 포함하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자 분석방법 및 장치.

[청구항 27]

제26항에 있어서, 상기 표적핵산을 분석한 결과로부터 생물학적 의미를 생성하는 방법은, 선형 모델(linear models), 지지 벡터 기계(support vector machines), 신경망(neural networks), 분류 및 회귀 트리(classification and regression trees), 앙상블 학습법(ensemble learning methods), 판별식 분석(discriminant analysis), 근접 네이버 방법(nearest neighbor method), 베이즈 네트워크(Bayesian networks), 독립 성분 분석(independent components analysis)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자

분석방법 및 장치.

[청구항 28]

제26항의 생체분자 분석방법을 통해 실시하는 것을 특징으로 하고, 상기 생체분자를 포함하는 시료에서 상기 리셉터 및 핵산을 준비하고 표적핵산을 제조하는 시료처리장치, 상기 표적핵산에서 상기 표적핵산DNA을 제조하고 이를 증폭하는 모듈 및 상기 증폭된 산물을 분석하는 모듈로 구성된 증폭장치를 포함하는 생체분자 분석하는 시스템을 특징으로 하는,

올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자 분석장치.

[청구항 29]

상기 생체시료는 세균, 진균류, 바이러스, 세포주, 조직으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나 이상인 것을 특징으로 하는,

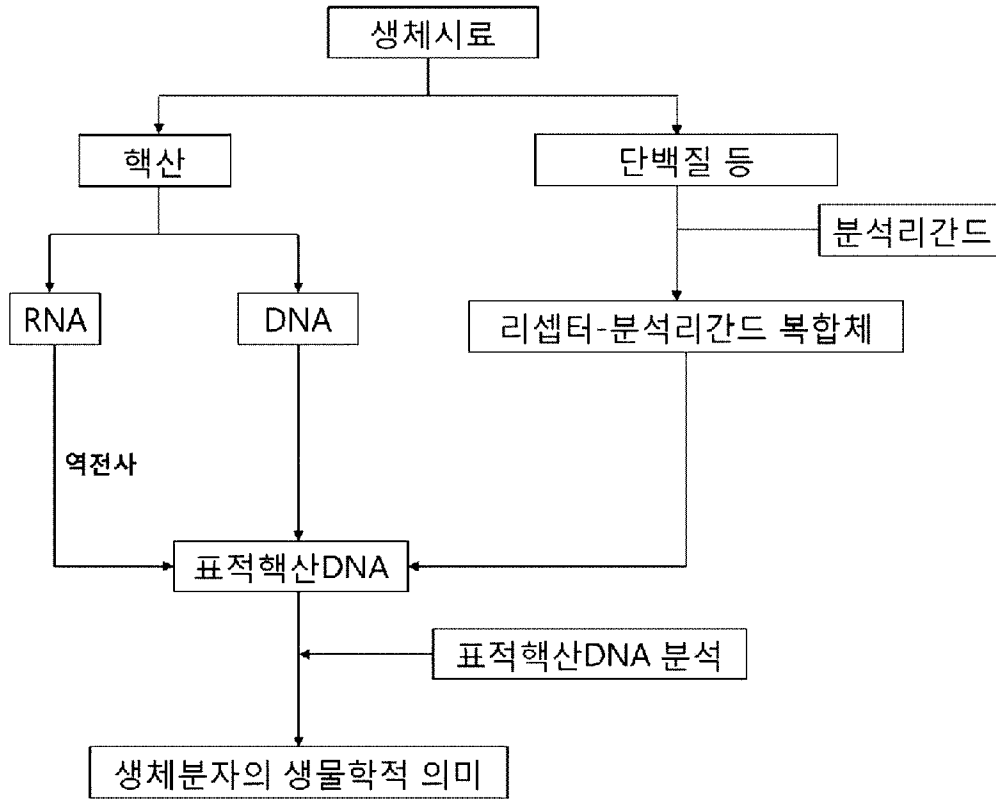
올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 분석방법 및 장치.

[청구항 30]

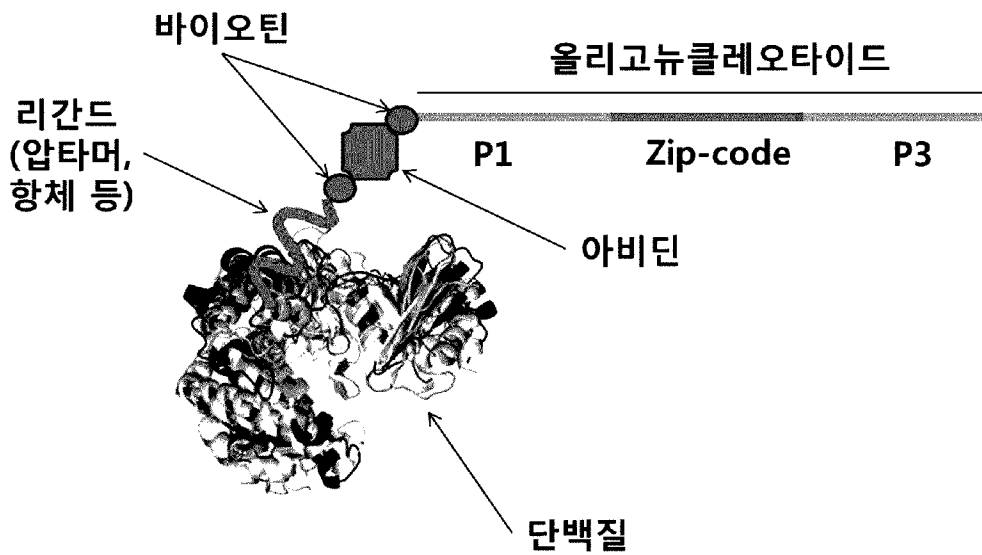
상기 생체시료는 세균, 진균류, 바이러스, 세포주, 조직으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나 이상인 것을 특징으로 하는,

올리고뉴클레오타이드를 이용한 생체분자의 핵산칩 및 분석키트.

[Fig. 1]

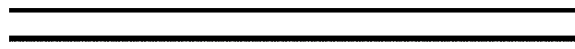


[Fig. 2]

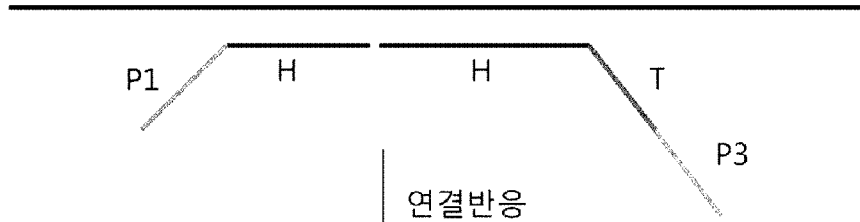


[Fig. 3]

표적핵산



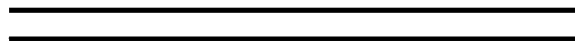
혼성화반응



연결반응



표적핵산 DNA



신호프라이머

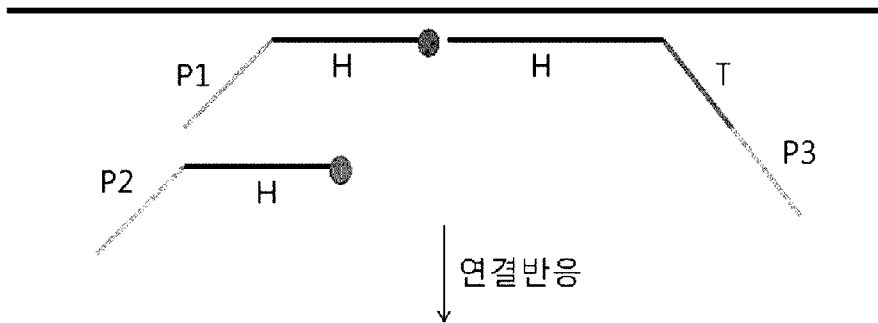


[Fig. 4]

표적핵산



혼성화반응



연결반응



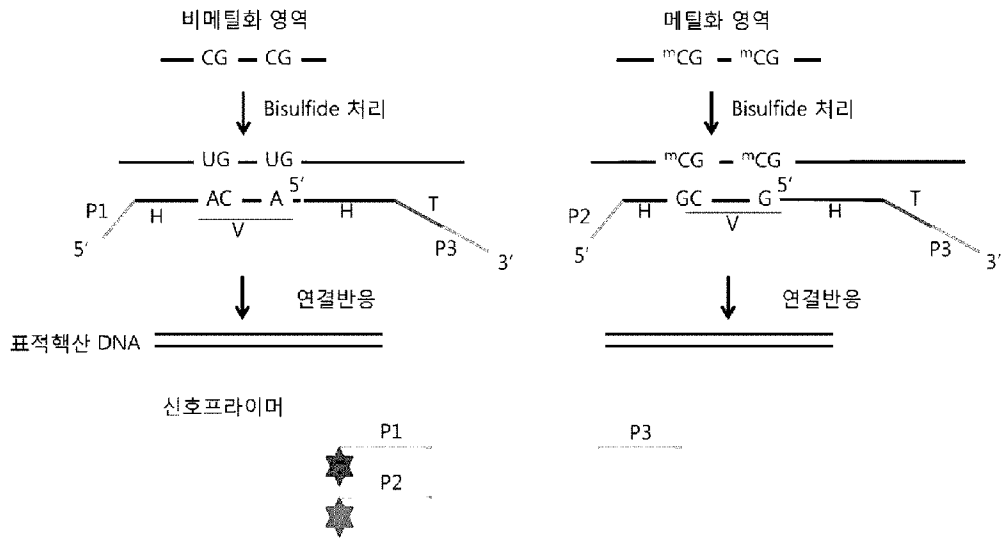
표적핵산 DNA



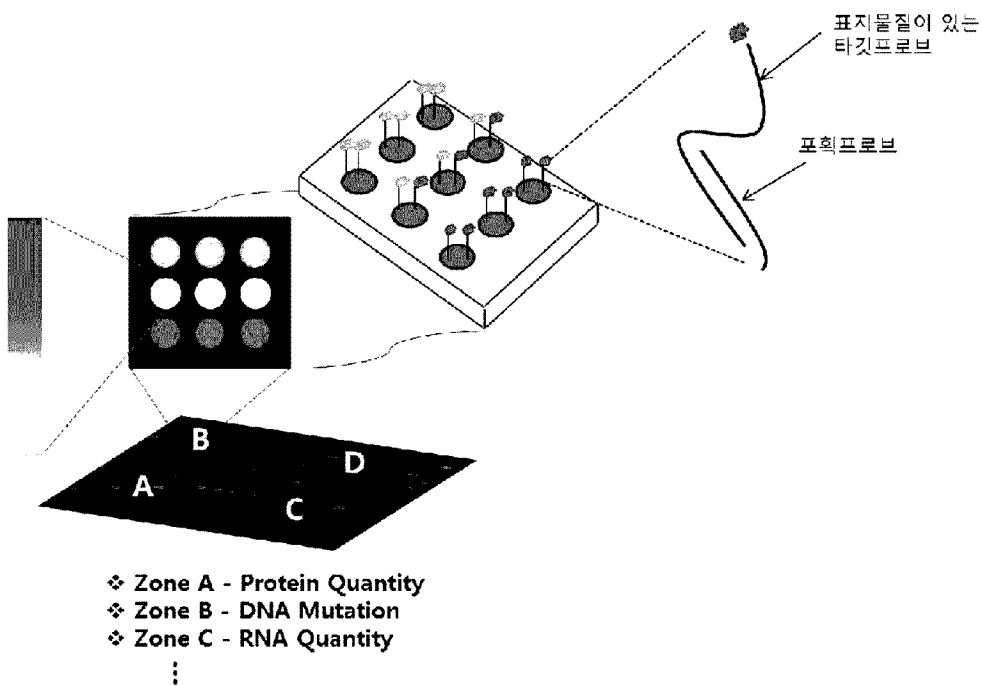
신호프라이머



[Fig. 5]



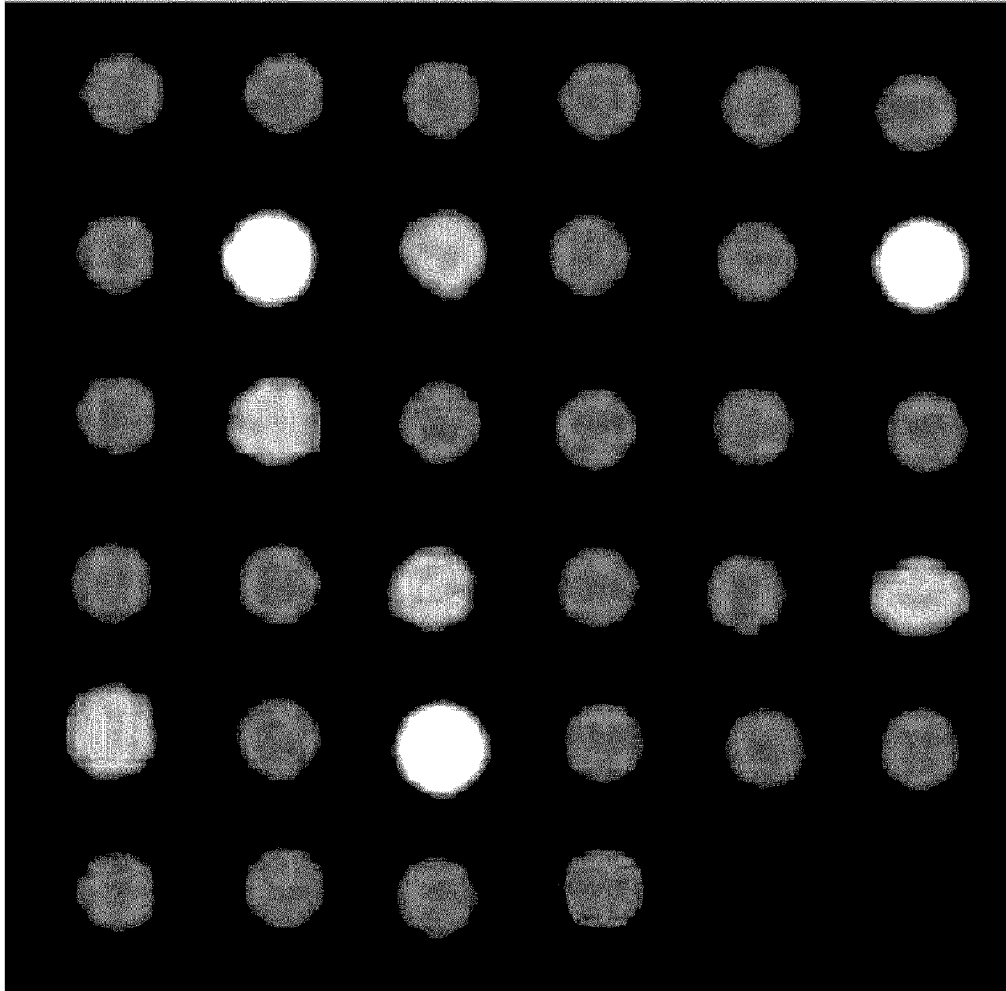
[Fig. 6]



[Fig. 7]

β -actin mRNA_1	β -actin mRNA_2	IL17 mRNA_1	IL17 mRNA_2	IL17RA mRNA_1	IL17RA mRNA_2
IL17 SNP_1	IL17 SNP_2	IL17 SNP_3	IL17 SNP_4	IL17 SNP_5	IL17 SNP_6
IL17 SNP_7	IL17 SNP_8	IL17 SNP_9	IL17 SNP_10	IL17 SNP_11	IL17RA SNP_1
IL17RA SNP_2	IL17RA SNP_3	IL17RA SNP_4	IL17RA SNP_5	IL17RA SNP_6	IL17RA SNP_7
IL17RA SNP_8	IL17RA SNP_9	IL17RA SNP_10	IL17RA SNP_11	IL17RA SNP_12	IL17RA SNP_13
IL17RA SNP_14	IL17 압타머	IL17RA 압타머	IL17 메틸화	-	-

[Fig. 8]



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

DECLARATION OF NON-ESTABLISHMENT OF INTERNATIONAL SEARCH REPORT


(PCT Article 17(2)(a), Rules 13ter.1(c) and (d) and 39)

Applicant's or agent's file reference PO1410-029	IMPORTANT DECLARATION	Date of mailing (<i>day/month/year</i>) 05 FEBRUARY 2015 (05.02.2015)
International application No. PCT/KR2014/009870	International filing date (<i>day/month/year</i>) 21 OCTOBER 2014 (21.10.2014)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 21 OCTOBER 2013 (21.10.2013)
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC <i>C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/115(2006.01)i, C12M 1/36(2006.01)i</i>		
Applicant BIOIS CORP		

This International Searching Authority hereby declares, according to Article 17(2)(a), that **no international search report will be established** on the international application for the reasons indicated below.

1. The subject matter of the international application relates to:
 - a. scientific theories
 - b. mathematical theories
 - c. plant varieties
 - d. animal varieties
 - e. essentially biological processes for the production of plants and animals, other than microbiological processes and the products of such processes
 - f. schemes, rules or methods of doing business
 - g. schemes, rules or methods of performing purely mental acts
 - h. schemes, rules or methods of playing games
 - i. methods for treatment of the human body by surgery or therapy
 - j. methods for treatment of the animal body by surgery or therapy
 - k. diagnostic methods practised on the human or animal body
 - l. mere presentations of information
 - m. computer programs for which this International Searching Authority is not equipped to search prior art
2. The failure of the following parts of the international application to comply with prescribed requirements prevents a meaningful search from being carried out:

<input checked="" type="checkbox"/> the description	<input checked="" type="checkbox"/> the claims	<input type="checkbox"/> the drawings
---	--	---------------------------------------
3. A meaningful search could not be carried out without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
 - furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
 - furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
 - pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13ter.1(a) or (b).
4. Further comments:

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.
---	---

특허협력조약

PCT

국제조사보고서 부작성 선언서

(PCT 제17조(2)(a), PCT규칙 13의3.1(c) 및 (d) 및 39)

출원인 또는 대리인의 서류참조기호 PO1410-029	중요 선언	발송일 (일/월/년) 2015년 02월 05일 (05.02.2015)
국제출원번호 PCT/KR2014/009870	국제출원일 (일/월/년) 2014년 10월 21일 (21.10.2014)	(최) 우선일 (일/월/년) 2013년 10월 21일 (21.10.2013)
국제특허분류(IPC) C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/115(2010.01)i, C12M 1/36(2006.01)i		
출원인 주식회사 바이오이즈		

본 국제조사기관은 PCT 제17조(2)(a)에 따라 아래와 같은 이유로 이 국제출원의 국제조사보고서가 작성되지 않을 것을 선언합니다.

1. 국제출원의 대상이 아래 해당 항목에 관련됩니다.
 - a. 과학 이론
 - b. 수학 이론
 - c. 식물 품종
 - d. 동물 품종
 - e. 동식물의 생산에 관한 생물학적인 방법. 단, 미생물학적 방법 및 미생물학적 방법에 의한 생산물은 제외
 - f. 사업활동에 관한 계획, 규칙 또는 방법
 - g. 순수한 정신적 행위에 관한 계획, 규칙 또는 방법
 - h. 게임에 관한 계획, 규칙 또는 방법
 - i. 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치 방법
 - j. 수술 또는 치료에 의한 동물의 처치 방법
 - k. 인체 또는 동물의 진단 방법
 - l. 정보의 단순한 제시
 - m. 국제조사기관이 선행기술을 조사할 수 없는 컴퓨터프로그램
2. 국제출원의 다음 부분이 소정의 요건을 충족하지 아니하여 유효한 국제조사를 할 수 없습니다.

명세서 청구범위 도면
3. 서열목록이 없이 유효한 국제조사를 할 수 없었습니다. 출원인은 소정의 기간내에
 - 서열목록을 부록 C/ST.25 텍스트 파일 형태로 제출하지 아니하였으며, 국제조사기관은 허용 가능한 형태 및 방법으로 그 서열목록을 이용할 수 없었습니다; 혹은 제출된 서열목록이 시행세칙 부록 C에서 규정하는 표준과 부합하지 않습니다.
 - 서열목록을 시행세칙 부록 C에 규정된 표준과 부합하는 서면 혹은 이미지 파일의 형태로 제출하지 아니하였으며, 국제조사기관은 허용 가능한 형태 및 방법으로 그 서열목록을 이용할 수 없었습니다; 혹은 제출된 서열목록이 시행세칙 부록 C에서 규정하는 표준과 부합하지 않습니다.
 - PCT규칙 13의3.1(a) 또는 (b)의 규정에 따른 서열목록 제출요구에 대응하여 서열목록 제출에 필요한 가산료를 납부하지 아니하였습니다.
4. 추가 의견:

<p>ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스번호 ++82 42 472 3473</p>	<p>심사관 이준혁 전화번호 +82-42-481-8115</p>
--	---

