

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0061138 (43) 공개일자 2014년05월21일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)	(71) 출원인 삼성전자주식회사 경기도 수원시 영통구 삼성로 129 (매탄동)	
(21) 출원번호 10-2012-0128369 (22) 출원일자 2012년11월13일 심사청구일자 없음	(72) 발명자 박동현 강원 춘천시 춘주로 174, 104동 1205호 (퇴계동, 그린타운아파트) 홍성우 경기 광명시 하안로 284, 1212동 1308호 (하안동, 하안주공12단지아파트) 이묘용 경기 수원시 영통구 영통로 111, 306동 1102호 (망포동, 엘지동수원자이아파트)	
	(74) 대리인 리엔목특허법인	

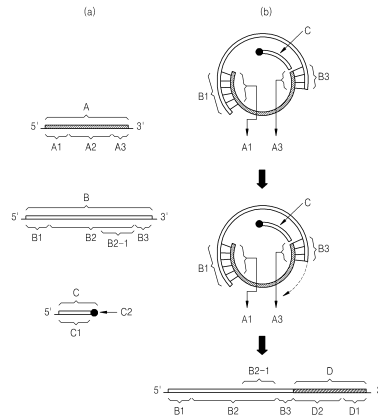
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 폴리뉴클레오티드 및 그의 용도

(57) 요약

표적 핵산에 상보적이고 역배열(reverse configuration)인 2 이상의 상보영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 대하여 상보적인 폴리뉴클레오티드 및 그의 용도를 제공한다. 이에 의하면, 표적 핵산의 3' 말단에 결합하는 영역을 줄이고, 표적 핵산을 효율적이고 특이도가 우수하게 증폭하는데 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

제2 폴리뉴클레오타이드에 상보적인 제1 상보영역을 포함하는 제1 폴리뉴클레오타이드로서, 제2 폴리뉴클레오타이드는 3'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드가 표적 핵산과 상보적인 제2 상보영역 및 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드가 표적 핵산과 상보적인 하나 이상의 제3 상보영역을 포함하고 제2 상보영역은 표적 핵산의 뉴클레오타이드 순서를 기준으로 제3 상보영역의 3' 방향 쪽에 혼성화하는 것이고,

제1 폴리뉴클레오타이드의 제1 상보영역은 제2 폴리뉴클레오타이드의 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드와 상보적인 것인 제1 폴리뉴클레오타이드.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 제1 폴리뉴클레오타이드의 제1 상보영역은 제2 폴리뉴클레오타이드의 제2 상보영역으로부터 0 내지 20 뉴클레오타이드에 의하여 이격된 위치로부터 시작하는 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드와 상보적인 것인 제1 폴리뉴클레오타이드.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 길이가 2 내지 100 뉴클레오타이드인 것인 제1 폴리뉴클레오타이드.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 제1 폴리뉴클레오타이드는 DNA, RNA, 펩티드 핵산(Peptide Nucleic Acid; PNA), 잠금 핵산(Locked Nucleic Acid; LNA), 뉴클레오타이드 유사체 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 제1 폴리뉴클레오타이드.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 제1 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단이 변형된 것인 제1 폴리뉴클레오타이드.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 제1 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단은 역 뉴클레오타이드(inverted nucleotide), 디데옥시뉴클레오타이드, 아민기, 알킬 사슬 모이어티 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 제1 폴리뉴클레오타이드.

청구항 7

제2 폴리뉴클레오타이드에 상보적인 제1 상보영역을 포함하는 제1 폴리뉴클레오타이드;

3'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드가 표적 핵산과 상보적인 제2 상보영역 및 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드가 표적 핵산과 상보적인 하나 이상의 제3 상보영역을 포함하고 제2 상보영역은 표적 핵산의 뉴클레오타이드 순서를 기준으로 제3 상보영역의 3' 방향 쪽에 혼성화하는 것인 제2 폴리뉴클레오타이드; 및

표적 핵산을 포함하고,

제1 폴리뉴클레오타이드의 제1 상보영역은 제2 폴리뉴클레오타이드의 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드와 상보적인 것인, 표적 핵산을 증폭하기 위한 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 제1 폴리뉴클레오타이드의 제1 상보영역은 제2 폴리뉴클레오타이드의 제2 상보영역으로부터 0 내지 20 뉴클레오타이드에 의하여 이격된 위치로부터 시작하는 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드와 상보적인 것인 조성물.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 제1 폴리뉴클레오타이드의 길이가 2 뉴클레오타이드 내지 100 뉴클레오타이드인 것인 조성물.

청구항 10

청구항 7에 있어서, 제1 폴리뉴클레오티드는 DNA, RNA, PNA, LNA, 뉴클레오티드 유사체 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 조성물.

청구항 11

제2 폴리뉴클레오티드에 상보적인 제1 상보영역을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드;

3'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드가 표적 핵산과 상보적인 제2 상보영역 및 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오티드가 표적 핵산과 상보적인 하나 이상의 제3 상보영역을 포함하고 제2 상보영역은 표적 핵산의 뉴클레오티드 순서를 기준으로 제3 상보영역의 3' 방향 쪽에 혼성화하는 것인 제2 폴리뉴클레오티드; 및

표적 핵산을 포함하고,

제1 폴리뉴클레오티드의 제1 상보영역은 제2 폴리뉴클레오티드의 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 것인, 표적 핵산을 증폭하기 위한 키트.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 제1 폴리뉴클레오티드의 제1 상보영역은 제2 폴리뉴클레오티드의 제2 상보영역으로부터 0 내지 20 뉴클레오티드에 의하여 이격된 위치로부터 시작하는 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 것인 키트.

청구항 13

청구항 11에 있어서, 제1 폴리뉴클레오티드의 길이가 2 뉴클레오티드 내지 100 뉴클레오티드인 것인 키트.

청구항 14

청구항 11에 있어서, 제1 폴리뉴클레오티드는 DNA, RNA, PNA, LNA, 뉴클레오티드 유사체 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 키트.

청구항 15

표적 핵산에 상보적인 제2 상보영역 및 하나 이상의 제3 상보영역을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드로서, 제2 상보영역은 3'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드가 표적 핵산과 상보적인 것이고, 하나 이상의 제3 상보영역은 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오티드가 표적 핵산과 상보적인 것이고, 제2 상보영역은 표적 핵산의 뉴클레오티드 순서를 기준으로 제3 상보영역의 3' 방향 쪽에 혼성화하는 것인 제2 폴리뉴클레오티드와 표적 핵산을 혼성화시키는 단계;

상기 혼성화 산물을 제1 폴리뉴클레오티드와 혼성화시키는 단계로서, 제1 폴리뉴클레오티드는 제2 폴리뉴클레오티드에 상보적이고, 제2 폴리뉴클레오티드의 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 제1 상보영역을 포함하는 것인 단계; 및

상기 혼성화 산물을 핵산 폴리머라제의 존재하에서 인큐베이션시켜, 상기 폴리뉴클레오티드의 3'-말단으로부터 상기 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 연장시키는 단계를 포함하는, 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 생산하는 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 제2 폴리뉴클레오티드와 표적 핵산을 혼성화시키는 단계 및 혼성화 산물을 제1 폴리뉴클레오티드와 혼성화시키는 단계는 동시 또는 순차적으로 수행되는 것인 방법.

청구항 17

청구항 15에 있어서, 핵산 폴리머라제는 가닥 치환 핵산 폴리머라제인 것인 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 가닥 치환 핵산 폴리머라제는 HIV(Human Immunodeficiency Virus), MMLV(Moloney Murine Leukemia Virus), 또는 AMV(Avian Myeloblastosis Virus)로부터 유래된 하나 이상의 역전사 효소인 것인 방법.

청구항 19

청구항 15에 있어서, 상기 표적 핵산은 RNA인 것인 방법.

청구항 20

청구항 15에 있어서, 상기 표적 핵산은 마이크로RNA(microRNA; miRNA), 짧은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA) 또는 tRNA인 것이 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 표적 핵산에 상보적이고 역배열(reverse configuration)인 2 이상의 상보영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 대하여 상보적인 폴리뉴클레오티드 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 핵산의 증폭은 핵산 폴리머라제의 존재하에서 프라이머의 3'-말단으로부터 뉴클레오티드 서열을 연장하는 것을 포함한다. 상기 프라이머는 표적 핵산과 상보적인 서열을 포함한다. 서열의 연장을 위하여, 프라이머가 표적 핵산과 특이적으로 안정적으로 혼성화될 것을 필요로 한다. 핵산 혼성화 산물의 안정성은 상보적 서열의 길이에 비례하는 것으로 알려져 있다. 반면, 프라이머의 길이가 길어지면, 증폭되는 표적 핵산의 길이 짧아진다.

[0003] 종래 기술에 의하더라도, 표적 핵산에 대하여 특이적으로 안정적으로 결합하면서도 증폭되는 표적 핵산의 길이를 증가시킬 수 있는 폴리뉴클레오티드가 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 표적 핵산을 효율적으로 증폭하기 위한 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0005] 표적 핵산을 효율적으로 증폭하기 위한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0006] 표적 핵산을 효율적으로 증폭하기 위한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 키트를 제공한다.

[0007] 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 효율적으로 생산하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 제2 폴리뉴클레오티드에 상보적인 제1 상보영역을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드로서, 제2 폴리뉴클레오티드는 3'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드가 표적 핵산과 상보적인 제2 상보영역 및 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오티드가 표적 핵산과 상보적인 하나 이상의 제3 상보영역을 포함하고 제2 상보영역은 표적 핵산의 뉴클레오티드 순서를 기준으로 제3 상보영역의 3' 방향 쪽에 혼성화하는 것이고, 제1 폴리뉴클레오티드의 제1 상보영역은 제2 폴리뉴클레오티드의 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 것인 제1 폴리뉴클레오티드가 제공된다.

[0009] 제1 폴리뉴클레오티드는 제2 폴리뉴클레오티드에 상보적인 제1 상보영역을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 또한, 제1 폴리뉴클레오티드의 제1 상보영역은 제2 폴리뉴클레오티드의 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 것일 수 있다.

[0010] 제1 폴리뉴클레오티드에 있어서, 제1 상보영역은 제2 폴리뉴클레오티드에 상보적이고, 제2 폴리뉴클레오티드의 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 것일 수 있다. 또한, 제1 상보영역은 제2 폴리뉴클레오티드의 제2 상보영역으로부터 0 내지 20 뉴클레오티드(nucleotide; nt)에 의하여 이격된 위치로부터 시작하는 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 것일 수 있다. 예를 들면, 제1 상보영역은 제2 폴리뉴클레오티드의 제2 상보영역으로부터 0 nt, 1 nt, 2 nt, 3 nt, 4 nt, 5 nt, 6 nt, 7 nt, 8 nt, 9 nt, 10 nt, 11

내지 15 nt, 또는 11 내지 20 nt에 의하여 이격된 위치로부터 시작하는 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드와 상보적인 것일 수 있다.

[0011] 제1 폴리뉴클레오타이드는 길이가 2 내지 100 nt인 것일 수 있다. 예를 들면, 제1 폴리뉴클레오타이드는 길이가 2 내지 80 nt, 2 내지 60 nt, 2 내지 40 nt, 2 내지 20 nt, 4 내지 18 nt, 6 내지 16 nt, 또는 8 내지 14 nt인 것일 수 있다.

[0012] 제1 폴리뉴클레오타이드는 DNA, RNA, 펩티드 핵산(Peptide Nucleic Acid; PNA), 잠금 핵산(Locked Nucleic Acid; LNA), 뉴클레오타이드 유사체 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 제1 폴리뉴클레오타이드의 제1 상보영역은 A, RNA, 펩티드 핵산(Peptide Nucleic Acid; PNA), 잠금 핵산(Locked Nucleic Acid; LNA), 뉴클레오타이드 유사체 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 제1 폴리뉴클레오타이드는 단일가닥인 것일 수 있다.

[0013] 제1 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단은 변형된 것일 수 있다. 제1 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단은 예를 들면, 역 뉴클레오타이드(inverted nucleotide), 디테옥시뉴클레오타이드, 아민기, 알킬 사슬 모이어티 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다. 제1 폴리뉴클레오타이드의 변형된 3' 말단은 표적 핵산이 프라이머로 작용하는 것을 제한할 수 있다.

[0014] 제2 폴리뉴클레오타이드는 3'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드가 표적 핵산과 상보적인 제2 상보영역 및 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드가 표적 핵산과 상보적인 하나 이상의 제3 상보영역을 포함하는 것일 수 있다.

[0015] 제2 폴리뉴클레오타이드에 있어서, 제2 상보영역은 2 이상의 연속 뉴클레오타이드가 표적 핵산과 상보적인 것일 수 있다. 예를 들면, 2 내지 50 nt, 2 내지 40 nt, 2 내지 30 nt, 2 내지 20 nt, 2 내지 10 nt, 3 내지 50 nt, 4 내지 40 nt, 3 내지 30 nt, 3 내지 20 nt, 3 내지 10 nt, 또는 3 내지 16 nt의 연속 뉴클레오타이드가 표적 핵산과 상보적인 것일 수 있다. 또한, 제2 상보영역은 표적 핵산의 3'-말단으로부터 3'-말단 뉴클레오타이드를 포함한 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드와 상보적인 것일 수 있다. 예를 들면, 표적 핵산의 3'-말단으로부터 3'-말단 뉴클레오타이드를 포함한 2 이상의 연속 뉴클레오타이드가 표적 핵산과 상보적인 것일 수 있다. 예를 들면, 2 내지 50 nt, 2 내지 40 nt, 2 내지 30 nt, 2 내지 20 nt, 2 내지 10 nt, 3 내지 50 nt, 4 내지 40 nt, 3 내지 30 nt, 3 내지 20 nt, 3 내지 10 nt, 또는 3 내지 16 nt의 연속 뉴클레오타이드가 표적 핵산과 상보적인 것일 수 있다.

[0016] 제2 폴리뉴클레오타이드에 있어서, 제3 상보영역은 1 내지 3 nt일 수 있다. 예를 들면, 1, 2, 또는 3 nt일 수 있다. 또한, 제3 상보영역은 5' 말단으로부터 5' 말단 뉴클레오타이드를 포함한 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드가 표적 핵산과 상보적인 것일 수 있다. 예를 들면, 1 내지 50 nt, 예를 들면, 1 내지 40 nt, 1 내지 30 nt, 1 내지 20 nt, 1 내지 10 nt, 2 내지 40 nt, 2 내지 30 nt, 2 내지 20 nt, 2 내지 10 nt, 3 내지 40 nt, 3 내지 30 nt, 3 내지 20 nt, 또는 3 내지 10 nt일 수 있다. 제3 상보영역은 3 이상의 연속 뉴클레오타이드가 표적 핵산과 상보적인 것일 수 있다. 예를 들면, 3 내지 50 nt, 3 내지 40 nt, 3 내지 30 nt, 3 내지 20 nt, 3 내지 10 nt, 또는 4 내지 16 nt의 연속 뉴클레오타이드가 표적 핵산과 상보적인 것일 수 있다. 또한, 제3 상보영역은 표적 핵산의 5'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드와 상보적인 것일 수 있다. 예를 들면, 제3 상보영역은 표적 핵산의 5'-말단으로부터 5'-말단 뉴클레오타이드를 포함한 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드와 상보적인 것일 수 있다. 이 경우, 제3 상보영역은 2 이상의 연속 뉴클레오타이드와 상보적인 것일 수 있다. 예를 들면, 2 내지 50 nt, 2 내지 40 nt, 2 내지 30 nt, 2 내지 20 nt, 2 내지 10 nt, 3 내지 50 nt, 4 내지 40 nt, 3 내지 30 nt, 3 내지 20 nt, 3 내지 10 nt, 또는 3 내지 16 nt의 연속 뉴클레오타이드가 표적 핵산과 상보적인 것일 수 있다.

[0017] 제2 폴리뉴클레오타이드에 있어서, 제2 상보영역과 제3 상보영역은 하나 이상의 뉴클레오타이드에 의하여 이격되어 있는 것일 수 있다. 제2 상보영역과 제3 상보영역은 링커에 의하여 이격되어 있는 것일 수 있다. 상기 링커는 핵산, 핵산 변형체, 단백질, 당, 또는 지질 분자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 핵산 변형체는 PNA, 또는 LNA를 포함하는 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 링커는 0 내지 50 nt를 포함하는 핵산을 포함하는 것일 수 있다. 상기 링커의 길이는 예를 들면, 2 내지 50 nt, 2 내지 40 nt, 2 내지 30 nt, 2 내지 20 nt, 2 내지 10 nt, 3 내지 50 nt, 4 내지 40 nt, 3 내지 30 nt, 3 내지 20 nt, 3 내지 10 nt, 또는 4 내지 10 nt일 수 있다. 이 경우, 상기 링커는 프라이머 결합 부위, 제한효소 인식부위, 또는 프로브 결합 부위를 포함하는 것일 수 있다.

[0018] 제2 폴리뉴클레오타이드는 DNA, RNA, 펩티드 핵산(Peptide Nucleic Acid; PNA), 잠금 핵산(Locked Nucleic Acid; LNA), 뉴클레오타이드 유사체 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 제2 폴리뉴클레오타이드의 제2 상

보영역 또는 제3 상보영역은 A, RNA, 펩티드 핵산(Peptide Nucleic Acid; PNA), 잠금 핵산(Locked Nucleic Acid; LNA), 뉴클레오타이드 유사체 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다. 상기 제2 폴리뉴클레오타이드는 단일가닥인 것일 수 있다. 제2 폴리뉴클레오타이드는 길이가 7 내지 200 nt, 7 내지 180 nt, 7 내지 150 nt, 7 내지 130 nt, 7 내지 100 nt, 7 내지 80 nt, 7 내지 50 nt, 7 내지 30 nt, 7 내지 20 nt, 7 내지 15 nt, 또는 10 내지 40 nt인 것일 수 있다.

[0019] 표적 핵산은 DNA, RNA 또는 DNA와 RNA의 키메라일 수 있다. 상기 표적 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥인 것일 수 있다. 표적 핵산은 길이가 20 내지 200 nt, 20 내지 180 nt, 20 내지 150 nt, 20 내지 130 nt, 20 내지 100 nt, 20 내지 80 nt, 20 내지 50 nt, 20 내지 30 nt, 또는 20 내지 40 nt인 것일 수 있다. 표적 핵산은 짧은 RNA(small RNA)일 수 있다. 짧은 RNA는 예를 들면, 마이크로RNA(microRNA; miRNA), 짧은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA) 또는 tRNA인 것일 수 있다. 또한, 표적 핵산은 200 뉴클레오타이드 이상의 뉴클레오타이드를 갖는 RNA로서, 연속적인 30 뉴클레오타이드 서열의 GC 함유량이 30% 미만이거나 80% 이상인 영역이 존재하는 RNA, 분자 내에서 서로 상보적인 염기서열이 5 뉴클레오타이드 이상 연속적으로 존재하여 분자내 2차 구조(secondary structure)를 형성할 수 있는 RNA, 동일한 뉴클레오타이드가 연속적으로 5개 이상 존재하는 RNA 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다.

[0020] 제2 폴리뉴클레오타이드는 주형 의존적 핵산 합성에서 프라이머로서 작용할 수 있다. 따라서, 제2 폴리뉴클레오타이드는 프라이머로 사용되는 것일 수 있다. 제2 폴리뉴클레오타이드는 시료 중의 표적 핵산의 존재를 확인하기 위한 프로브로서 사용될 수 있다. 제1 폴리뉴클레오타이드는 주형 의존적 핵산 합성에서 역전사 효율 및 특이도를 향상시키기 위한 클램프로 사용되는 것일 수 있다.

[0021] 제2 폴리뉴클레오타이드에 상보적인 제1 상보영역을 포함하는 제1 폴리뉴클레오타이드; 3'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드가 표적 핵산과 상보적인 제2 상보영역 및 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드가 표적 핵산과 상보적인 하나 이상의 제3 상보영역을 포함하고 제2 상보영역은 표적 핵산의 뉴클레오타이드 순서를 기준으로 제3 상보영역의 3' 방향 쪽에 혼성화하는 것인 제2 폴리뉴클레오타이드; 및 표적 핵산을 포함하고, 제1 폴리뉴클레오타이드의 제1 상보영역은 제2 폴리뉴클레오타이드의 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드와 상보적인 것인, 표적 핵산을 증폭하기 위한 조성물이 제공된다.

[0022] 상기 조성물에 있어서, 제1 폴리뉴클레오타이드, 제2 폴리뉴클레오타이드 또는 표적 핵산에 대하여는 상기한 바와 같다.

[0023] 상기 조성물은 표적 핵산을 증폭하기 위한 조성물이다. 증폭은 핵산 증폭을 위하여 알려진 방법일 수 있다. 증폭은 예를 들면, DNA 증폭 또는 RNA 증폭일 수 있다. 증폭 방법은 열순환(thermal cycling)을 필요로 하는 것 또는 등온(isothermal)에서 수행되는 것일 수 있다. 증폭 방법은 폴리머라제 연쇄 반응(polymerase chain reaction; PCR), 핵산 서열-기초 증폭(Nucleic acid sequence based amplification; NASBA), 리가제 연쇄반응(Ligase Chain Reaction; LCR), 가닥치환 증폭(strand displacement amplification; SDA), 롤링 서클 증폭(rolling circle amplification; RCA) 등을 포함할 수 있다. 증폭 방법은 또한, RNA 증폭 방법을 포함할 수 있다. 예를 들면, 역전사(reverse transcription; RT) 또는 역전사-PCR을 포함할 수 있다. 증폭이란 표적 핵산 서열 또는 그에 상보적인 서열의 카피 수를 증가시키는 것일 수 있다. "PCR"은 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법일 수 있다.

[0024] 따라서, 상기 조성물은 표적 핵산의 증폭에 요구되는 알려진 물질을 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 조성물은 핵산 폴리머라제, 그의 활성화에 필요한 완충액, 보조인자, 및/또는 기질을 더 포함할 수 있다. 핵산 폴리머라제는 DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제, 역전사 효소(reverse transcriptase) 및 이들의 조합일 수 있다. 역전사(reverse transcription)란 RNA를 주형으로 하여 RNA 서열에 상보적인 DNA 가닥을 합성하는 것일 수 있다. 핵산 폴리머라제는 가닥 치환 활성을 갖는 것일 수 있다. 역전사 효소는 예를 들면, 레트로바이러스로부터 유래된 하나 이상의 역전사 효소일 수 있다. 레트로바이러스는 예를 들면, HIV(Human Immunodeficiency Virus), MMLV(Moloney Murine Leukemia Virus), 또는 AMV(Avian Myeloblastosis Virus)일 수 있다. 핵산 폴리머라제는 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성(exonuclease activity)을 갖지 않는 것일 수 있다. 조성물은 역전사 또는 PCR 증폭에 필요한 물질을 포함하는 것일 수 있다.

[0025] 제2 폴리뉴클레오타이드에 상보적인 제1 상보영역을 포함하는 제1 폴리뉴클레오타이드; 3'-말단으로부터 하나 이상

의 연속 뉴클레오티드가 표적 핵산과 상보적인 제2 상보영역 및 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오티드가 표적 핵산과 상보적인 하나 이상의 제3 상보영역을 포함하고 제2 상보영역은 표적 핵산의 뉴클레오티드 순서를 기준으로 제3 상보영역의 3' 방향 쪽에 혼성화하는 것인 제2 폴리뉴클레오티드; 및 표적 핵산을 포함하고, 제1 폴리뉴클레오티드의 제1 상보영역은 제2 폴리뉴클레오티드의 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 것인, 표적 핵산을 증폭하기 위한 키트가 제공된다.

[0026] 상기 키트에 있어서, 제1 폴리뉴클레오티드, 제2 폴리뉴클레오티드 또는 표적 핵산에 대하여는 상기한 바와 같다.

[0027] 상기 키트는 표적 핵산을 증폭하기 위한 것이다. 증폭은 핵산 증폭을 위하여 알려진 방법일 수 있다. 증폭은 예를 들면, DNA 증폭 또는 RNA 증폭일 수 있다. 증폭 방법은 열순환(thermal cycling)을 필요로 하는 것 또는 등온(isothermal)에서 수행되는 것일 수 있다. 증폭 방법은 폴리머라제 연쇄 반응(polymerase chain reaction; PCR), 핵산 서열-기초 증폭(Nucleic acid sequence based amplification; NASBA), 리가제 연쇄반응(Ligase Chain Reaction; LCR), 가닥치환 증폭(strand displacement amplification; SDA), 롤링 서클 증폭(rolling circle amplification; RCA) 등을 포함할 수 있다. 증폭 방법은 또한, RNA 증폭 방법을 포함할 수 있다. 예를 들면, 역전사(reverse transcription; RT) 또는 역전사-PCR을 포함할 수 있다. 증폭이란 표적 핵산 서열 또는 그에 상보적인 서열의 카피 수를 증가시키는 것일 수 있다. "PCR"은 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법일 수 있다.

[0028] 따라서, 상기 키트는 표적 핵산의 증폭에 요구되는 알려진 물질을 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 키트는 핵산 폴리머라제, 그의 활성에 필요한 완충액, 보조인자, 및/또는 기질을 더 포함할 수 있다. 핵산 폴리머라제는 DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제, 역전사 효소(reverse transcriptase) 및 이들의 조합일 수 있다. 역전사(reverse transcription)란 RNA를 주형으로 하여 RNA 서열에 상보적인 DNA 가닥을 합성하는 것일 수 있다. 핵산 폴리머라제는 가닥 치환 활성을 갖는 것일 수 있다. 역전사 효소는 예를 들면, 레트로바이러스로부터 유래된 하나 이상의 역전사 효소일 수 있다. 레트로바이러스는 예를 들면, HIV(Human Immunodeficiency Virus), MMLV(Moloney Murine Leukemia Virus), 또는 AMV(Avian Myeloblastosis Virus)일 수 있다. 핵산 폴리머라제는 3'→5' 엑소 뉴클레아제 활성(exonuclease activity)을 갖지 않는 것일 수 있다. 키트는 역전사 또는 PCR 증폭에 필요한 물질을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 키트는 표적 핵산을 증폭하기 위하여 사용하기 위한 설명서를 더 포함할 수 있다.

[0029] 표적 핵산에 상보적인 제2 상보영역 및 하나 이상의 제3 상보영역을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드로서, 제2 상보영역은 3'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드가 표적 핵산과 상보적인 것이고, 하나 이상의 제3 상보영역은 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오티드가 표적 핵산과 상보적인 것이고, 제2 상보영역은 표적 핵산의 뉴클레오티드 순서를 기준으로 제3 상보영역의 3' 방향 쪽에 혼성화하는 것인 제2 폴리뉴클레오티드와 표적 핵산을 혼성화시키는 단계; 상기 혼성화 산물을 제1 폴리뉴클레오티드와 혼성화시키는 단계로서, 제1 폴리뉴클레오티드는 제2 폴리뉴클레오티드에 상보적이고, 제2 폴리뉴클레오티드의 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 제1 상보영역을 포함하는 것인 단계; 및 상기 혼성화 산물을 핵산 폴리머라제의 존재하에서 인큐베이션시켜, 상기 폴리뉴클레오티드의 3'-말단으로부터 상기 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 연장시키는 단계를 포함하는, 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 생산하는 방법이 제공된다.

[0030] 상기 방법에 있어서, 제1 폴리뉴클레오티드, 제2 폴리뉴클레오티드 또는 표적 핵산에 대하여는 상기한 바와 같다.

[0031] 상기 방법은 표적 핵산에 상보적인 제2 상보영역 및 하나 이상의 제3 상보영역을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드로서, 제2 상보영역은 3'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오티드가 표적 핵산과 상보적인 것이고, 하나 이상의 제3 상보영역은 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오티드가 표적 핵산과 상보적인 것이고, 제2 상보영역은 표적 핵산의 뉴클레오티드 순서를 기준으로 제3 상보영역의 3' 방향 쪽에 혼성화하는 것인 제2 폴리뉴클레오티드와 표적 핵산을 혼성화시키는 단계를 포함한다.

[0032] 상기 방법은 혼성화 산물을 제1 폴리뉴클레오티드와 혼성화시키는 단계로서, 제1 폴리뉴클레오티드는 제2 폴리뉴클레오티드에 상보적이고, 제2 폴리뉴클레오티드의 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오티드와 상보적인 제1 상보영역을 포함하는 것인 단계를 포함한다.

- [0033] 상기 방법에 있어서, 혼성화는 알려진 방법에 의하여 수행되는 것일 수 있다. 예를 들면, 핵산의 혼성화에 적절한 것으로 알려진 완충액 중에서 제2 폴리뉴클레오티드와 표적 핵산을 인큐베이션함으로써 수행될 수 있다. 혼성화는 적절한 온도 예를 들면, 0℃ 내지 25℃, 또는 4℃에서 수행될 수 있다. 온도는 선택되는 폴리뉴클레오티드와 표적 핵산의 서열 및 길이에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 혼성화는 적절한 시간 예를 들면, 1 시간 내지 12시간 (밤새) 동안일 수 있다.
- [0034] 상기 방법에 있어서, 제2 폴리뉴클레오티드와 표적 핵산을 혼성화시키는 단계 및 혼성화 산물을 제1 폴리뉴클레오티드와 혼성화시키는 단계는 동시 또는 순차적으로 수행될 수 있다. 예를 들면, 제2 폴리뉴클레오티드와 표적 핵산을 혼성화시키는 단계 후에 혼성화 산물과 제1 폴리뉴클레오티드를 혼성화시키는 단계를 수행하거나, 제1 폴리뉴클레오티드와 제2 폴리뉴클레오티드를 혼성화시키는 단계 후에 혼성화 산물과 표적 핵산을 혼성화시키는 단계를 수행하거나, 또는 제1 폴리뉴클레오티드, 제2 폴리뉴클레오티드와 표적 핵산을 동시에 혼성화시키는 단계를 수행할 수 있다.
- [0035] 제2 폴리뉴클레오티드의 제2 상보영역 및 제3 상보영역은 표적 핵산에 대하여 혼성화된 경우, 1 뉴클레오티드 이상 서로 이격되어 표적 핵산에 혼성화되는 것일 수 있다. 예를 들면, 1 내지 20 nt, 1 내지 10 nt, 1 내지 5 nt, 2 뉴클레오티드, 3 nt, 4 nt, 5 nt, 6 nt, 7 nt, 8 nt, 9 nt, 10 nt 또는 11 nt가 이격된 것일 수 있다. 제1 폴리뉴클레오티드의 제1 상보영역이 제2 폴리뉴클레오티드에 대하여 혼성화된 경우, 제2 폴리뉴클레오티드의 제2 상보영역으로부터 0 내지 20 nt에 의하여 이격된 위치로부터 시작하는 하나 이상의 연속 뉴클레오티드에 혼성화되는 것일 수 있다. 예를 들면, 제1 상보영역은 제2 폴리뉴클레오티드의 제2 상보영역으로부터 0 nt, 1 nt, 2 nt, 3 nt, 4 nt, 5 nt, 6 nt, 7 nt, 8 nt, 9 nt, 10 nt, 11 내지 15 nt, 또는 11 내지 20 nt에 의하여 이격된 위치로부터 시작하는 하나 이상의 연속 뉴클레오티드에 혼성화할 수 있다. 제1 폴리뉴클레오티드, 제2 폴리뉴클레오티드 및 표적 핵산이 혼성화된 경우, 제1 폴리뉴클레오티드는 표적 핵산과 0 내지 20 nt에 의하여 이격된 위치에 존재할 수 있다. 예를 들면, 제1 상보영역은 제2 폴리뉴클레오티드의 제2 상보영역으로부터 0 nt, 1 nt, 2 nt, 3 nt, 4 nt, 5 nt, 6 nt, 7 nt, 8 nt, 9 nt, 10 nt, 11 내지 15 nt, 또는 11 내지 20 nt에 의하여 이격된 위치에 존재할 수 있다.
- [0036] 상기 방법은 혼성화 산물을 핵산 폴리머라제의 존재하에서 인큐베이션시켜, 상기 폴리뉴클레오티드의 3'-말단으로부터 상기 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 연장시키는 단계를 포함한다.
- [0037] 상기 방법에 있어서, 인큐베이션은 상기 핵산 폴리머라제의 활성화에 적절한 조건에서 수행될 수 있다. 인큐베이션은 핵산 폴리머라제, 그의 활성화에 필요한 완충액, 보조인자, 및 기질의 존재하에서 수행될 수 있다. 핵산 폴리머라제는 DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제, 역전사 효소(reverse transcriptase) 및 이들의 조합일 수 있다. 역전사(reverse transcription)란 RNA를 주형으로 하여 RNA 서열에 상보적인 DNA 가닥을 합성하는 것일 수 있다. 핵산 폴리머라제는 가닥 치환 활성을 갖는 것일 수 있다. 역전사 효소는 예를 들면, 레트로바이러스로부터 유래된 하나 이상의 역전사 효소일 수 있다. 레트로바이러스는 예를 들면, HIV(Human Immunodeficiency Virus), MMLV(Moloney Murine Leukemia Viruse), 또는 AMV(Avian Myeloblastosis Virus)일 수 있다. 핵산 폴리머라제는 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성(exonuclease activity)을 갖지 않는 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 인큐베이션은 역전사 또는 PCR 증폭에 필요한 물질을 포함하는 조건에서 수행하는 것을 포함할 수 있다.
- [0038] 인큐베이션에 의하여, 제2 폴리뉴클레오티드의 3'-말단으로부터 상기 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 연장시킬 수 있다. 연장은 핵산 폴리머라제가 제2 폴리뉴클레오티드의 3'-말단으로부터, 표적 핵산과 혼성화된 제2 폴리뉴클레오티드의 5'-말단을 치환시키면서 연장하는 것을 포함한다.
- [0039] 상기 방법은 생산된 산물 즉, 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열의 존재 여부를 결정하는 단계를 더 포함할 수 있다. 결정 결과, 상기 생산된 산물이 존재하는 경우, 시료 중에 상기 표적 핵산이 존재하는 것으로 결정하고, 상기 생산된 산물이 존재하지 않는 경우, 시료 중에 상기 표적 핵산이 존재하지 않는 것으로 결정하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0040] 또한, 상기 방법은 생산된 산물 즉, 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 주형으로 하여, 핵산을 증폭하는 단계를 더 포함할 수 있다. 증폭은 알려진 방법에 의하여 수행될 수 있다. 증폭 방법에 대하여는 상기한 바와 같다.
- [0041] 아울러, 상기 방법은 증폭된 결과 생산된 산물 즉, 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열의 존재 여부를 결정하는 단계를 더 포함할 수 있다. 결정 결과, 증폭 산물이 존재하는 경우, 시료 중에 표적 핵산이 존재하는 것으로 결정하고, 증폭 산물이 존재하지 않는 경우, 시료 중에 표적 핵산이 존재하지 않는 것으로 결정하는 단계

를 더 포함할 수 있다.

[0042] 도 1은 일 양상에 따른 제1 폴리뉴클레오타이드, 제2 폴리뉴클레오타이드 및 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 생산하는 방법을 나타낸 도면이다. 도 1에 나타난 바와 같이, 표적 핵산(A)은 5' 말단 영역(A1), 가운데 영역(A2) 및 3' 말단 영역(A3)으로 이루어진다. 제2 폴리뉴클레오타이드(B)는 표적 핵산의 3' 말단 영역(A3)에 상보적인 제2 상보 영역(B3), 표적 핵산에 상보적이지 않은 영역(B2) 및 표적 핵산의 5' 말단 영역(A1)에 상보적인 제3 상보 영역(B1)으로 이루어진다. 표적 핵산에 상보적이지 않은 영역(B2)은 제1 폴리뉴클레오타이드(C)의 제1 상보 영역(C1)과 상보적인 영역(B2-1)을 포함한다. 제1 폴리뉴클레오타이드(C)는 제1 상보 영역(C1)을 포함하고 3' 말단은 변형된 뉴클레오타이드(C2)일 수 있다. 제1 폴리뉴클레오타이드의 제1 상보영역(C1)은 제2 폴리뉴클레오타이드를 기준으로 표적 핵산에 상보적이지 않은 영역(B2)의 3' 방향쪽에 1 뉴클레오타이드 이상의 뉴클레오타이드에 의하여 이격되어 위치할 수 있다. 제1 폴리뉴클레오타이드, 제2 폴리뉴클레오타이드 및 표적 핵산이 혼성화되면, 제1 폴리뉴클레오타이드의 제1 상보영역(C1)은 표적 핵산(A)의 방향을 기준으로 3' 말단 방향에 배열되기 때문에 역전사 효소가 효율적으로 역전사하도록 기여한다. 또한, 제1 폴리뉴클레오타이드는 프라이밍에 필요한 제2 상보 영역의 길이를 줄여 줌으로써 역전사되는 산물(D)의 길이를 늘려주고, PCR 프라이머의 디자인이 용이해지며, 역전사의 특이도를 높일 수 있다.

발명의 효과

[0043] 제1 폴리뉴클레오타이드에 의하면, 표적 핵산의 3' 말단에 결합하는 영역을 줄이고, 증폭되는 표적 핵산의 길이를 증가시키고, 특이도가 우수하게 표적핵산을 증폭하는데 사용될 수 있다. 또한, 표적 핵산의 증폭을 위한 PCR 프라이머의 디자인이 용이해질 수 있다.

[0044] 조성물 및 키트에 의하면, 표적 핵산을 효율적이고 특이도가 우수하게 증폭하는데 사용될 수 있다.

[0045] 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 생산하는 방법에 의하면, 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 효율적이고 특이도가 우수하게 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1a는 제1 폴리뉴클레오타이드, 제2 폴리뉴클레오타이드 및 표적 핵산의 모식도이고, 도 1b는 제1 폴리뉴클레오타이드, 제2 폴리뉴클레오타이드 및 표적 핵산에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 생산하는 방법을 예시한다.

도 2a 및 도 2b는 각각 클램프의 존재 및 클램프의 길이에 따른 역전사 효율에 미치는 영향을 나타낸다.

도 3a내지 도 3e는 각각 표적 핵산이 miR-16, miR-21, miR210, miR-122-5p, 및 miR-200c인 경우, 클램프의 존재가 역전사 효율에 미치는 영향을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 실시예 1. 역전사 프라이머 및 클램프의 제조

[0049] 제2 폴리뉴클레오타이드(이하 "역전사 프라이머(reverse transcription primer)" 또는 "RT 프라이머"라고 한다)에 상보적인 제1 상보영역을 포함하는 제1 폴리뉴클레오타이드(이하 "클램프" 또는 "클램프 올리고뉴클레오타이드"라고 한다)로서, 역전사 프라이머는 3'-말단으로부터 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드가 표적 핵산과 상보적인 제2 상보영역 및 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드가 표적 핵산과 상보적인 하나 이상의 제3 상보영역을 포함하고 제2 상보영역은 표적 핵산의 뉴클레오타이드 순서를 기준으로 제3 상보영역의 3' 방향 쪽에 혼성화하는 것을 제조하였다. 역전사 프라이머는 역배열 프라이머(reverse configuration primer)라고도 한다. 역전사 프라이머에 있어서, 제2 상보 영역은 "프라이밍 영역(priming region)", 제3 상보영역은 "아답터 영역(adaptor region)" 또는 "아답터"라고도 한다. 역전사 프라이머의 대조군으로서, 역배열이 없는 통상적인 프라이머(이하 "선형(linear) 프라이머"라 한다)를 제조하였다. 클램프의 제1 상보영역이 역전사 프라이머의 제2 상보영역의 5' 방향의 하나 이상의 연속 뉴클레오타이드와 상보적인 클램프를 제조하였다.

[0050] 도 1에 있어서, "A"는 표적 핵산을 나타내고, "A1"은 표적 핵산의 5' 말단 영역을 나타내고, "A2"는 표적 핵산

의 가운데 영역을 나타내고, 그리고 "A3"은 표적 핵산의 3' 말단 영역을 나타낸다. "B"는 역전사 프라이머를 나타내고, "B1"은 표적 핵산의 5' 말단 영역(A1)에 상보적인 영역(제3 상보 영역)을 나타내고, "B2"는 표적 핵산에 상보적이지 않은 영역을 나타내고, "B2-1"은 클램프의 제1 상보 영역에 상보적인 영역을 나타내고, 그리고 "B3"은 표적 핵산의 3' 말단 영역(A3)에 상보적인 영역(제2 상보 영역)을 나타낸다. "C"는 클램프를 나타내고, "C1"은 역전사 프라이머에 상보적인 영역(제1 상보 영역)을 나타내고, 그리고 "C2"는 클램프의 3' 말단으로서 변형된 뉴클레오티드를 나타낸다. "D"는 생성된 cDNA(complementary DNA)를 나타내고, "D1"은 표적 핵산의 5' 말단 영역(A1)에 대한 cDNA를 나타내고, 그리고 "D2"는 표적 핵산의 가운데 영역(A2)에 대한 cDNA를 나타낸다.

실시예 2. 클램프의 존재 및 클램프의 길이가 역전사 효율에 미치는 영향

클램프를 첨가하거나 클램프의 길이를 6 mer 내지 16 mer로 변화시키면서 역전사 반응을 수행하였다.

역전사 효소(reverse transcriptase)로서, Superscript III™(Invitrogen)를 사용하였다. 역전사는 역전사 프라이머와 RNA 주형을 37.5 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 및 10 mM DTT를 함유한 50 mM Tris-HCl(실온에서 pH8.3) 중에서 42℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. RNA 주형은 miR-16 RNA(서열번호 1)를 사용하였다. Superscript III™ 역전사 효소는 RNase H 활성이 감소되고 증가된 열안정성을 제공하도록 조작된 M-MLV(Maloney murine leukemia virus) 역전사 효소의 변이체이다.

그 결과 얻어진 역전사 산물을 PCR에 의하여 증폭하였다. PCR은 2x SYBR RT-PCR 마스터 혼합물(Exiqon)에 프라이머 각 50 nM 및 연장 산물을 첨가하고 열순환시킴으로써 수행되었다. 열순환은 95℃에서 10분, 95℃에서 15초 및 60℃에서 1분을 45회 수행하였다. 다음으로, 용해 곡선 분석(melting curve analysis)을 5 측정/℃에 의하여 수행하였다. 표 1은 사용된 주형, PCR 프라이머, 역전사 프라이머 및 클램프의 염기 서열을 나타낸다. 표 1에서 'A0'는 선형 프라이머를 나타낸다.

표 1

구분	이름	서열
주형	miR16	5'-UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG-3' (서열번호 1)
PCR 프라이머	정방향 프라이머	5'-CGCGCTAGCAGCACGTAAAT-3' (서열번호 2)
	역방향 프라이머	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (서열번호 3)
역전사 프라이머	A12 RT0	5'-TACGTGCTGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGAC-3' (서열번호 4)
	A12 RT1	5'-TACGTGCTGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGAC C-3' (서열번호 5)
	A12 RT2	5'-TACGTGCTGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGAC CG-3' (서열번호 6)
	A12 RT3	5'-TACGTGCTGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGAC CGC-3' (서열번호 7)
	A12 RT4	5'-TACGTGCTGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGAC CGCC-3' (서열번호 8)
	A12 RT6	5'-TACGTGCTGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGAC CGCCAA-3' (서열번호 9)
	A0 RT0	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGAC-3' (서열번호 10)
	A0 RT1	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGAC C-3' (서열번호 11)
	A0 RT2	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGAC CG-3' (서열번호 12)
	A0 RT3	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGAC CGC-3' (서열번호 13)
	A0 RT4	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGAC CGCC-3' (서열번호 14)
	A0 RT6	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGAC CGCCAA-3' (서열번호 15)
클램프	C16	5'-GTCGTATCCAGTGC-3' (서열번호 16)
	C14	5'-GTCGTATCCAGTGC-3' (서열번호 17)
	C12	5'-GTCGTATCCAGT-3' (서열번호 18)
	C10	5'-GTCGTATCCA-3' (서열번호 19)
	C8	5'-GTCGTATC-3' (서열번호 20)
	C6	5'-GTCGTA-3' (서열번호 21)

[0056] 도 2a는 클램프가 역전사 효율에 미치는 영향을 나타내고, 도 2b는 클램프의 길이가 역전사 효율에 미치는 영향을 나타낸다. 도 2a에 나타난 바와 같이, 선형 프라이머에 비하여 역전사 프라이머를 사용한 경우 Cp 값이 감소하고, 클램프를 사용한 경우 Cp 값이 현저하게 감소하였다. 도 2b에 나타난 바와 같이, 클램프의 길이가 증가함에 따라 Cp 값이 감소하였다. 역전사 반응시 클램프를 사용함에 따라 역전사 프라이머의 3' 말단 프라이밍 영역의 길이를 줄일 수 있음을 확인하였다.

[0057] 실시예 3. 역전사 프라이머의 3' 말단 프라이밍 영역의 길이와 클램프가 역전사 효율에 미치는 영향

[0058] 역전사 프라이머의 3' 말단 프라이밍 영역의 길이를 줄이면서 역전사 반응을 수행하였다.

[0059] 역전사 및 PCR을 수행하기 위한 반응 조성물 및 반응 조건은 실시예 2에 기재된 바와 같다.

[0060] 표 2 내지 6은 사용된 주형(각각 miR16, miR21, miR210, miR122-5p 및 miR200c), PCR 프라이머, 및 역전사 프라이머의 염기서열을 나타낸다. 클램프는 실시예 2에 기재된 클램프 C10(서열번호 19)를 사용하였다.

표 2

구분	이름	서열
주형	miR16	5'-UAGCAGCACGUAAAAUUGGCG-3' (서열번호 1)
PCR 프라이머	정방향 프라이머	5'-CGCGCTAGCAGCACGTAAT-3' (서열번호 2)
	역방향 프라이머	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (서열번호 3)
역전사 프라이머	V1-RT0	5'-TACGTGCTGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC-3' (서열번호 22)
	V1-RT1	5'-TACGTGCTGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC C-3' (서열번호 23)
	V1-RT2	5'-TACGTGCTGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC CG-3' (서열번호 24)
	V1-RT3	5'-TACGTGCTGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC CGC-3' (서열번호 25)
	V1-RT4	5'-TACGTGCTGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC CGCC-3' (서열번호 26)
	V1-RT5	5'-TACGTGCTGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC CGCCA-3' (서열번호 27)
	V1-RT6	5'-TACGTGCTGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC CGCCAA-3' (서열번호 28)
	V1-RT7	5'-TACGTGCTGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC CGCCAAT-3' (서열번호 29)
	V1-RT8	5'-TACGTGCTGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC CGCCAATA-3' (서열번호 30)
	선형-RT0	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (서열번호 31)
	선형-RT1	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT C-3' (서열번호 32)
	선형-RT2	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT CG-3' (서열번호 33)
	선형-RT3	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT CGC-3' (서열번호 34)
	선형-RT4	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT CGCC-3' (서열번호 35)
	선형-RT5	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT CGCCA-3' (서열번호 36)
	선형-RT6	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT CGCCAA-3' (서열번호 37)
	선형-RT7	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT CGCCAAT-3' (서열번호 38)
	선형-RT8	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT CGCCAATA-3' (서열번호 39)

표 3

구분	이름	서열
주형	miR21	5'-uagcuuaucaagacugauguuga-3' (서열번호 40)
PCR 프라이머	정방향 프라이머	5'-cgg tagcttatcagactgatgt-3' (서열번호 41)
	역방향 프라이머	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (서열번호 42)

역전사 프라이머	V1-RT0	5'-TCTGATAAGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC-3' (서열번호 43)
	V1-RT1	5'-TCTGATAAGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC T-3' (서열번호 44)
	V1-RT2	5'-TCTGATAAGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TC-3' (서열번호 45)
	V1-RT3	5'-TCTGATAAGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TCA-3' (서열번호 46)
	V1-RT4	5'-TCTGATAAGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TCAA-3' (서열번호 47)
	V1-RT5	5'-TCTGATAAGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TCAAC-3' (서열번호 48)
	V1-RT6	5'-TCTGATAAGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TCAACA-3' (서열번호 49)
	V1-RT7	5'-TCTGATAAGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TCAACAT-3' (서열번호 50)
	V1-RT8	5'-TCTGATAAGCTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TCAACATC-3' (서열번호 51)
	선형-RT0	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (서열번호 52)
	선형-RT1	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT T-3' (서열번호 53)
	선형-RT2	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TC-3' (서열번호 54)
	선형-RT3	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TCA-3' (서열번호 55)
	선형-RT4	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TCAA-3' (서열번호 56)
	선형-RT5	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TCAAC-3' (서열번호 57)
	선형-RT6	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TCAACA-3' (서열번호 58)
	선형-RT7	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TCAACAT-3' (서열번호 59)
	선형-RT8	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TCAACATC-3' (서열번호 60)

표 4

구분	이름	서열
주형	miR210	5'-CUGUGCGUGUGACAGCGGUGA-3' (서열번호 61)
PCR 프라이머	정방향 프라이머	5'-CTGTGCGTGTGACAGC-3' (서열번호 62)
	역방향 프라이머	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (서열번호 63)

[0063]

역전사 프라이머	V1-RT0	5'-TCACACGCACAG GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC-3' (서열번호 64)
	V1-RT1	5'-TCACACGCACAG GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC T-3' (서열번호 65)
	V1-RT2	5'-TCACACGCACAG GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TC-3' (서열번호 66)
	V1-RT3	5'-TCACACGCACAG GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TCA-3' (서열번호 67)
	V1-RT4	5'-TCACACGCACAG GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TCAG-3' (서열번호 68)
	V1-RT5	5'-TCACACGCACAG GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TCAGC-3' (서열번호 69)
	V1-RT6	5'-TCACACGCACAG GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TCAGCC-3' (서열번호 70)
	V1-RT7	5'-TCACACGCACAG GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TCAGCCG-3' (서열번호 71)
	V1-RT8	5'-TCACACGCACAG GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TCAGCCGC-3' (서열번호 72)
	선형-RT0	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (서열번호 73)
	선형-RT1	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT T-3' (서열번호 74)
	선형-RT2	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TC-3' (서열번호 75)
	선형-RT3	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TCA-3' (서열번호 76)
	선형-RT4	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TCAG-3' (서열번호 77)
	선형-RT5	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TCAGC-3' (서열번호 78)
	선형-RT6	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TCAGCC-3' (서열번호 79)
	선형-RT7	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TCAGCCG-3' (서열번호 80)
	선형-RT8	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TCAGCCGC-3' (서열번호 81)

표 5

구분	이름	서열
주형	miR122-5p	5'-UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG-3' (서열번호 82)
PCR 프라이머	정방향 프라이머	5'-CGTGGAGTGTGACAATGG-3' (서열번호 83)
	역방향 프라이머	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (서열번호 84)

[0064]

역전사 프라이머	V1-RT0	5'-TGTCACACTCCA	GTGCAGGGTCCGAGGT	ACTGGATACGAC-3' (서열번호 85)
	V1-RT1	5'-TGTCACACTCCA	GTGCAGGGTCCGAGGT	ACTGGATACGAC C-3' (서열번호 86)
	V1-RT2	5'-TGTCACACTCCA	GTGCAGGGTCCGAGGT	ACTGGATACGAC CA-3' (서열번호 87)
	V1-RT3	5'-TGTCACACTCCA	GTGCAGGGTCCGAGGT	ACTGGATACGAC CAA-3' (서열번호 88)
	V1-RT4	5'-TGTCACACTCCA	GTGCAGGGTCCGAGGT	ACTGGATACGAC CAAA-3' (서열번호 89)
	V1-RT5	5'-TGTCACACTCCA	GTGCAGGGTCCGAGGT	ACTGGATACGAC CAAAC-3' (서열번호 90)
	V1-RT6	5'-TGTCACACTCCA	GTGCAGGGTCCGAGGT	ACTGGATACGAC CAAACA-3' (서열번호 91)
	V1-RT7	5'-TGTCACACTCCA	GTGCAGGGTCCGAGGT	ACTGGATACGAC CAAACAC-3' (서열번호 92)
	V1-RT8	5'-TGTCACACTCCA	GTGCAGGGTCCGAGGT	ACTGGATACGAC CAAACACC-3' (서열번호 93)
	선형-RT0	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'		(서열번호 94)
	선형-RT1	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT	C-3'	(서열번호 95)
	선형-RT2	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT	CA-3'	(서열번호 96)
	선형-RT3	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT	CAA-3'	(서열번호 97)
	선형-RT4	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT	CAAA-3'	(서열번호 98)
	선형-RT5	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT	CAAAC-3'	(서열번호 99)
	선형-RT6	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT	CAAACA-3'	(서열번호 100)
	선형-RT7	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT	CAAACAC-3'	(서열번호 101)
	선형-RT8	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT	CAAACACC-3'	(서열번호 102)

표 6

구분	이름	서열
주형	miR200c	5'-UAAUACUGCCGGUAAUGAUGGA-3' (서열번호 103)
PCR 프라이머	정방향 프라이머	5'-GGTAATACTGCCGGTAATGA-3' (서열번호 104)
	역방향 프라이머	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (서열번호 105)

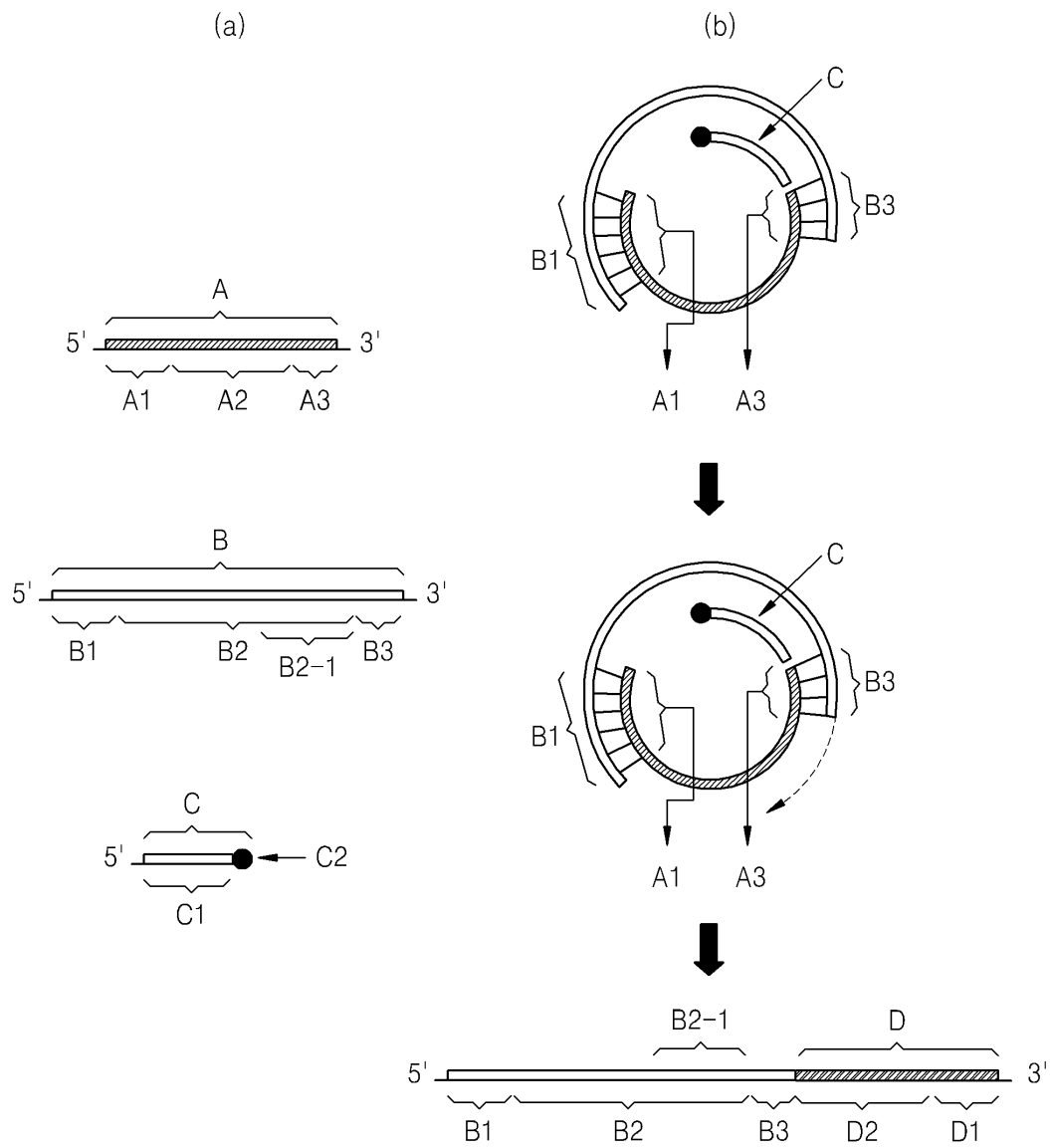
[0065]

역전사 프라이머	V1-RT0	5'-CCGGCAGTATTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC-3' (서열번호 106)
	V1-RT1	5'-CCGGCAGTATTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC T-3' (서열번호 107)
	V1-RT2	5'-CCGGCAGTATTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TC-3' (서열번호 108)
	V1-RT3	5'-CCGGCAGTATTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TCC-3' (서열번호 109)
	V1-RT4	5'-CCGGCAGTATTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TCCA-3' (서열번호 110)
	V1-RT5	5'-CCGGCAGTATTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TCCAT-3' (서열번호 111)
	V1-RT6	5'-CCGGCAGTATTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TCCATC-3' (서열번호 112)
	V1-RT7	5'-CCGGCAGTATTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TCCATCA-3' (서열번호 113)
	V1-RT8	5'-CCGGCAGTATTA GTGCAGGGTCCGAGGT ACTGGATACGAC TCCATCAT-3' (서열번호 114)
	선형-RT0	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (서열번호 115)
	선형-RT1	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT T-3' (서열번호 116)
	선형-RT2	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TC-3' (서열번호 117)
	선형-RT3	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TCC-3' (서열번호 118)
	선형-RT4	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TCCA-3' (서열번호 119)
	선형-RT5	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TCCAT-3' (서열번호 120)
	선형-RT6	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TCCATC-3' (서열번호 121)
	선형-RT7	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TCCATCA-3' (서열번호 122)
	선형-RT8	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT TCCATCAT-3' (서열번호 123)

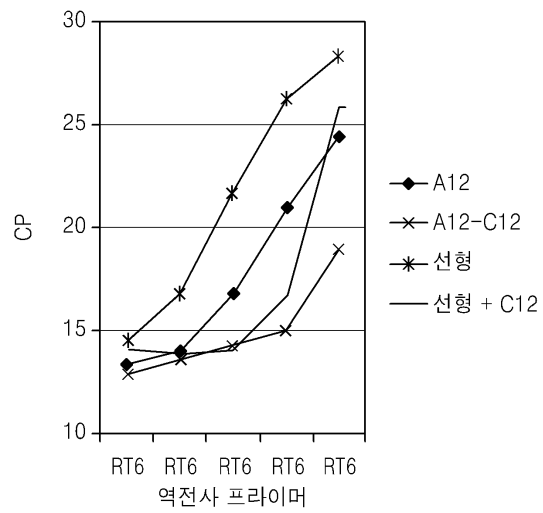
[0066] 도 3a 내지 도 3e는 역전사 프라이머의 3' 말단 프라이밍 영역의 길이를 줄이는 경우 클램프에 따른 역전사 효율에 미치는 영향을 나타낸다(도 3a: miR-16, 도 3b: miR-21, 도 3c: miR-210, 도 3d: miR-122-5p, 도 3e: miR-200c). 도 3a 내지 도 3e에 나타난 바와 같이, 역전사 반응시 클램프를 사용함에 따라 역전사 프라이머의 3' 말단 프라이밍 영역의 길이를 줄일 수 있음을 확인하였다.

도면

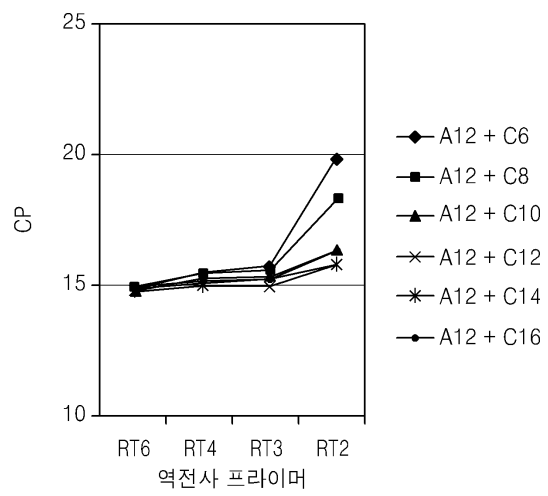
도면1



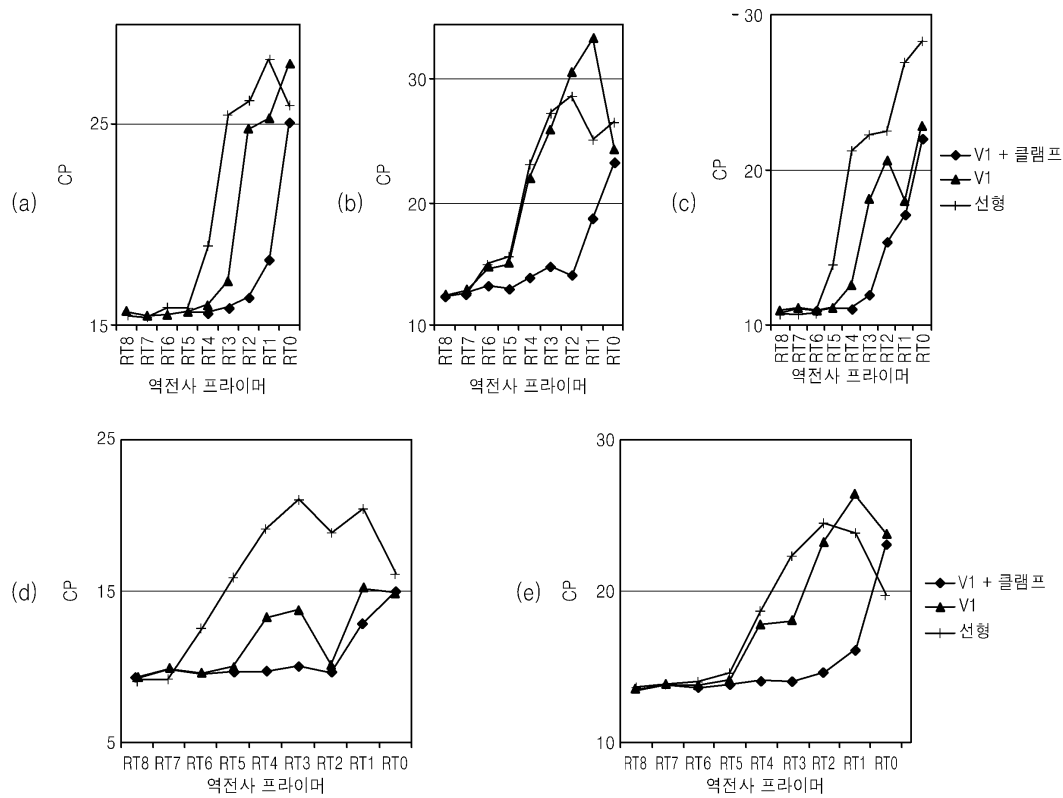
도면2a



도면2b



도면3



서열 목록

- <110> SAM SUNG ELECTRONICS
- <120> Polynucleotide and use thereof
- <130> PN098457
- <160> 123
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 22
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> miR-16
- <400> 1
- uagcagcacg uaaaauuugg cg
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Forward primer for miR-16

<400>	2	
cgcgctagca gcacgtaaat		20
<210>	3	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse primer for miR-16	
<400>	3	
gtgcagggtc cgaggt		16
<210>	4	
<211>	46	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	4	
tacgtgctgc tagtgcaggg tccgaggtat tcgcactgga tacgac		46
<210>	5	
<211>	47	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	5	
tacgtgctgc tagtgcaggg tccgaggtat tcgcactgga tacgacc		47
<210>	6	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	6	
tacgtgctgc tagtgcaggg tccgaggtat tcgcactgga tacgaccg		48
<210>	7	
<211>	49	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 7

tacgtgctgc tagtgcaggg tccgaggtat tcgcactgga tacgaccgc 49

<

210> 8

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 8

tacgtgctgc tagtgcaggg tccgaggtat tcgcactgga tacgaccgcc 50

<210> 9

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 9

tacgtgctgc tagtgcaggg tccgaggtat tcgcactgga tacgaccgcc aa 52

<210> 10

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 10

gtgcagggtc cgaggtattc gcactggata cgac 34

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 11

gtgcagggtc cgaggtattc gcactggata cgacc 35

<210> 12

<211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 12
 gtgcagggtc cgaggtattc gactggata cgaccg 36

<210> 13
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 13
 gtgcagggtc cgaggtattc gactggata cgaccgc 37

<210> 14
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 14
 gtgcagggtc cgaggtattc gactggata cgaccgcc 38

<210> 15
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 15
 gtgcagggtc cgaggtattc gactggata cgaccgcaa 40

<210> 16
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Clamp oligonucleotide
 <400> 16

gtcgtatcca gtgcga	16
<210> 17	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Clamp oligonucleotide	
<400> 17	
gtcgtatcca gtgc	14
<210> 18	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Clamp oligonucleotide	
<400> 18	
gtcgtatcca gt	12
<210> 19	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Clamp oligonucleotide	
<400> 19	
gtcgtatcca	10
<210> 20	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Clamp oligonucleotide	
<400> 20	
gtcgtatc	8
<210> 21	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Clamp oligonucleotide

<400> 21

gtcgta 6

<210> 22

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 22

tacgtgctgc tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac 40

<210> 23

<211

> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 23

tacgtgctgc tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac c 41

<210> 24

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 24

tacgtgctgc tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac cg 42

<210> 25

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 25

tacgtgctgc tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac cgc 43

<210> 26

<211> 44

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 26
 tacgtgctgc tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac cgcc 44
 <210> 27
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 27
 tacgtgctgc tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac cgcca 45
 <210> 28
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 28
 tacgtgctgc tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac cgccaa 46
 <210> 29
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 29
 tacgtgctgc tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac cgccaat 47
 <210> 30
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 30
 tacgtgctgc tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac cgccaata 48

<210>	31	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	31	
	gtgcagggtc cgaggt	16
<210>	32	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	32	
	gtgcagggtc cgaggtc	17
<210>	33	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	33	
	gtgcagggtc cgaggtcg	18
<210>	34	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	34	
	gtgcagggtc cgaggtcgc	19
<210>	35	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	

<400>	35	
gtgcagggtc cgaggtcgcc		20
<210>	36	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	36	
gtgcagggtc cgaggtcgcc a		21
<210>	37	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	37	
gtgcagggtc cgaggtcgcc aa		22
<210>	38	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	38	
gtgcagggtc cgaggtcgcc aat		23
<210>	39	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	39	
gtgcagggtc cgaggtcgcc aata		24
<210>	40	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> miR-21

<400> 40

uagcuuauca gacugauguu ga

22

<210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for miR-21

<400> 41

cggtagctta tcagactgat gt

22

<210> 42

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for miR-21

<400> 42

gtgcagggtc cgaggt

16

<210>

> 43

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 43

tctgataagc tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac

40

<210> 44

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 44

tctgataagc tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac t

41

<210> 45

<211> 42

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer

<400> 45
 tctgataagc tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tc 42

<210> 46
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer

<400> 46
 tctgataagc tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tca 43

<210> 47
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer

<400> 47
 tctgataagc tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tcaa 44

<210> 48
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer

<400> 48
 tctgataagc tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tcaac 45

<210> 49
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer

<400> 49
 tctgataagc tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tcaaca 46

<210> 50
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer

<400> 50
 tctgataagc tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tcaacat 47

<210> 51
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer

<400> 51
 tctgataagc tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tcaacatc 48

<210> 52
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer

<400> 52
 gtgcagggtc cgaggt 16

<210> 53
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer

<400> 53
 gtgcagggtc cgaggtt 17

<210> 54
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer

<400>	54	
gtgcagggtc cgaggttc		18
<210>	55	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	55	
gtgcagggtc cgaggttca		19
<210>	56	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	56	
gtgcagggtc cgaggttcaa		20
<210>	57	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	57	
gtgcagggtc cgaggttcaa c		21
<210>	58	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	58	
gtgcagggtc cgaggttcaa ca		22
<210>	59	
<211>	23	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 59

gtgcagggtc cgaggttcaa cat 23

<210> 60

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 60

gtgcagggtc cgaggttcaa catc 24

<210> 61

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-210

<400> 61

cugugcgugu gacagcggcu ga 22

<210> 62

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for miR-210

<400> 62

ctgtgcgtgt gacagc 16

<210> 63

<211>

16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for miR-210

<400> 63

gtgcagggtc cgaggt 16

<210> 64

<211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 64
 tcacacgcac aggtgcaggg tccgaggtac tggatacgac 40
 <210> 65
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer

 <400> 65
 tcacacgcac aggtgcaggg tccgaggtac tggatacgac t 41
 <210> 66
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 66
 tcacacgcac aggtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tc 42
 <210> 67
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 67
 tcacacgcac aggtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tca 43

 <210> 68
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 68

tcacacgcac aggtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tcag	44
<210> 69	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse transcription primer	
<400> 69	
tcacacgcac aggtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tcagc	45
<210> 70	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse transcription primer	
<400> 70	
tcacacgcac aggtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tcagcc	46
<210> 71	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse transcription primer	
<400> 71	
tcacacgcac aggtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tcagccg	47
<210> 72	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse transcription primer	
<400> 72	
tcacacgcac aggtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tcagccgc	48
<210> 73	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	73	
gtgcagggtc	cgaggt	16
<210>	74	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	74	
gtgcagggtc	cgaggtt	17
<210>	75	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	75	
gtgcagggtc	cgaggttc	18
<210>	76	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	76	
gtgcagggtc	cgaggttca	19
<210>	77	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	77	
gtgcagggtc	cgaggttcag	20
<210>	78	
<211>	21	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	78	
gtgcagggtc cgaggttcag c		21
<210>	79	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	79	
gtgcagggtc cgaggttcag cc		22
<210>	80	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	80	
gtgcagggtc cgaggttcag ccg		23
<210>	81	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	81	
gtgcagggtc cgaggttcag ccgc		24
<210>	82	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miR-122-5p	
<400>	82	
uggaguguga caaugguguu ug		22

<210> 83

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for miR-122-5p

<400> 83

cgtggagtgt gacaatgg 18

<210> 84

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for miR-122-5p

<400> 84

gtgcagggtc cgaggt 16

<210> 85

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 85

tgtcacactc cagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac 40

<210> 86

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 86

tgtcacactc cagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac c 41

<210> 87

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400>	87	
tgtcacactc cagtcgaggg tccgaggtac tggatacgac ca		42
<210>	88	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	88	
tgtcacactc cagtcgaggg tccgaggtac tggatacgac caa		43
<210>	89	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	89	
tgtcacactc cagtcgaggg tccgaggtac tggatacgac caaa		44
<210>	90	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	90	
tgtcacactc cagtcgaggg tccgaggtac tggatacgac caaac		45
<210>	91	
<211>	46	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	91	
tgtcacactc cagtcgaggg tccgaggtac tggatacgac caaaca		46
<210>	92	
<211>	47	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 92

tgtcacactc cagtcgaggg tccgaggtac tggatacgac caaacac 47

<210> 93

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 93

tgtcacactc cagtcgaggg tccgaggtac tggatacgac caaacacc 48

<210> 94

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 94

gtgcagggtc cgaggt 16

<210> 95

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 95

gtgcagggtc cgaggtc 17

<210> 96

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 96

gtgcagggtc cgaggtca 18

<210> 97

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 97
 gtgcagggtc cgaggtcaa 19

<210> 98
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 98
 gtgcagggtc cgaggtcaaa 20

<210> 99
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 99
 gtgcagggtc cgaggtcaaa c 21

<210> 100
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 100
 gtgcagggtc cgaggtcaaa ca 22

<210> 101
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 101

gtgcagggtc cgaggtcaaa cac	23
<210> 102	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse transcription primer	
<400> 102	
gtgcagggtc cgaggtcaaa cacc	24
<210> 103	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miR-200c	
<400> 103	
uaauacugcc ggguaaugau gga	23
<210> 104	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Forward primer for miR-200c	
<400> 104	
ggtaatactg ccgggtaatg a	21
<210> 105	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse primer for miR-200c	
<400> 105	
gtgcagggtc cgaggt	16
<210> 106	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Reverse transcription primer
 <400> 106
 ccggcagtat tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac 40
 <210> 107
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 107
 ccggcagtat tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac t 41
 <210> 108
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 108
 ccggcagtat tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tc 42
 <210> 109
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse transcription primer
 <400> 109
 ccggcagtat tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tcc 43
 <210> 110
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 Reverse transcription primer
 <400> 110
 ccggcagtat tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tcca 44
 <210> 111
 <211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 111

ccggcagtat tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tccat 45

<210> 112

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 112

ccggcagtat tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tccatc 46

<210> 113

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 113

ccggcagtat tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tccatca 47

<210> 114

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse transcription primer

<400> 114

ccggcagtat tagtgcaggg tccgaggtac tggatacgac tccatcat 48

<210> 115

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Reverse transcription primer

<400> 115

gtgcagggtc cgaggt 16

<210>	116	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	116	
	gtgcagggtc cgaggtt	17
<210>	117	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	117	
	gtgcagggtc cgaggttc	18
<210>	118	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	118	
	gtgcagggtc cgaggttcc	19
<210>	119	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	119	
	gtgcagggtc cgaggttcca	20
<210>	120	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	

<400>	120	
gtgcagggtc cgaggttcca t		21
<210>	121	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	121	
gtgcagggtc cgaggttcca tc		22
<210>	122	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	122	
gtgcagggtc cgaggttcca tca		23
<210>	123	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse transcription primer	
<400>	123	
gtgcagggtc cgaggttcca tcat		24