

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2018년 10월 11일 (11.10.2018) WIPO PCT

WO 2018/186680 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/6886 (2018.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/003979
- (22) 국제출원일: 2018년 4월 4일 (04.04.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2017-0044237 2017년 4월 5일 (05.04.2017) KR
- (71) 출원인: 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 44610 울산시 남구 대학로 93, Ulsan (KR). 재단법인 아산사회복지재단 (THE ASAN FOUNDATION) [KR/KR]; 05505 서울시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 유한욱 (YOO, Han-Wook); 06005 서울시 강남구 압구정로29길 57, 204동 1002호, Seoul (KR). 김구

환 (KIM, Gu-Hwan); 02065 서울시 중랑구 망우로75길 19, 105동 803호, Seoul (KR). 이범희 (LEE, Beom Hee); 05530 서울시 송파구 올림픽로 525, 104동 1605호, Seoul (KR). 김재민 (KIM, Jae-Min); 05240 서울시 강동구 상암로3길 77, 102동 1204호, Seoul (KR).

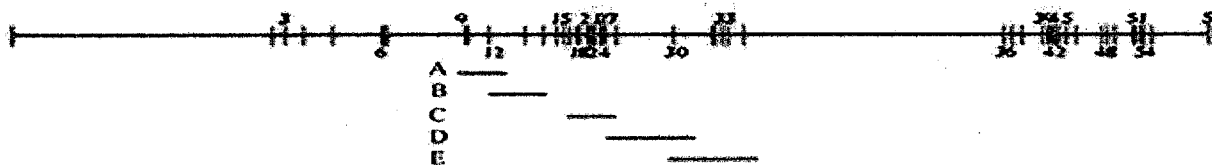
(74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08506 서울시 금천구 가산디지털1로151 이노플렉스1차 601호, Seoul (KR).

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

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING GENOMIC DNA-BASED LONG PCR PRIMER SET FOR DIAGNOSING NEUROFIBROMATOSIS

(54) 발명의 명칭: 게놈 DNA 기반의 장 PCR 프라이머 세트를 포함하는 신경섬유종증 진단용 조성물

	Forward	Reverse	Size (bp)	Target exon
A	NF1_9F gtttagaggctgtaattgc	NF1_12R tctctaaaataaccaagcagc	6,138	Exon 9, 11
B	NF1_12F cgacaaaaggataaaacttaaa	NF1_14R tactcacagaaaccaacacc	13,067	Exon 13
C	NF1_17F aggagagctcaaacaggaa	NF1_22R ccagtatcagtggttagaggt	5,045	Exon 18, 19, 21
D	NF1_28F gctactcttagctctctacc	NF1_30R atagttaccacacaccatcag	13,685	Exon 29
E	NF1_30F gcacttggttaagtctgtat	NF1_32R acctagagcaggaaagaaa	10,369	Exon 31



(57) Abstract: The present invention relates to a composition comprising a genomic DNA-based long PCR primer set for diagnosing neurofibromatosis and a method for diagnosing neurofibromatosis using the same. The present inventors designed primers that are based on genomic DNA and do not allow the concomitant amplification of a pseudo-homologous sequence and conducted a long PCR, followed by re-amplifying the fragment into short fragments in the presence of multiple primers and then base sequencing the fragments. Through the genomic DNA-based gene assay, a diagnostic yield of 94 % could be secured in 88 patients. Therefore, the primer sets are predicted to be usefully applied to the diagnosis of neurofibromatosis.

(57) 요약서: 본 발명은 게놈 DNA 기반의 장(long) PCR 프라이머 세트 포함하는 신경섬유종증 진단용 조성물 및 이를 이용한 신경섬유종증 진단방법에 관한 것으로서, 본 발명자들은 게놈 DNA에 기반하되 거짓 상동 염기서열이 동시에 증폭되지 않도록 프라이머를 고안하여, 장 PCR을 한 후 이 절편을 다중 프라이머로 작은 절편으로 재증폭한 후 이 절편들의 염기서열을 분석하였다. 이 게놈 DNA에 기반한 유전자 분석법을 통하여 88명의 환자를 대상으로 94%의 진단율을 확보할 수 있었다. 따라서, 상기 프라이머 세트들은 신경섬유종증 진단에 있어 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

[다음 쪽 계속]

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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 게놈 DNA 기반의 장 PCR 프라이머 세트를 포함하는 신경섬유종증 진단용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 게놈 DNA 기반의 장(long) PCR 프라이머 세트 포함하는 신경섬유종증 진단용 조성물 및 이를 이용한 신경섬유종증 진단방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 신경섬유종증 1형 [Neurofibromatosis type I (NF1); OMIM #162220]은 다발성 커피 반점 및 다발성 섬유종이 신체의 다양한 부위에 생기는 유전질환이다. 본 질환은 인구 3천 명당 한 명의 꼴로 발생하는 질환으로 가장 흔한 유전 질환 중 하나이고, 17번 염색체에 존재하는 NF1 유전자의 이형접합자 돌연변이에 의해 발생한다. 그러나 NF1 유전자는 57개의 엑손으로 구성되어 2818 아미노산을 전사하는 매우 큰 유전자이다. 한편 NF1 유전자는 cystein-serine rich domain (CSD), GTPase related domain (GRD), homologous to Saccharomyces protein (Sep14p)와 andadenylated kinase pseudogene (AK3)의 거짓 상동 염기서열(pseudo-homologous sequence) 부위들이 존재하는데, 이 거짓 상동 염기서열은 게놈 DNA의 염기서열을 단순 분석할 경우 NF1 유전자와 같이 증폭되어 유전자 검사 시 오류를 일으킨다(Cell 1990;62:193-201)(도 1). 이 거짓 상동 염기서열은 2번, 12번, 14번, 15번, 18번, 21번, 22번 염색체에 분포되어 있다. CSD는 NF1의 12-16번 엑손, GRD는 21-27번 엑손, Sep14p는 NF1의 27-28번 엑손, AK3는 NF1의 39-41번 엑손과 겹친다. 따라서, 현재까지 게놈 DNA를 이용한 분석으로는 진단률이 61% 밖에 이르지 못하고 있다 (Friedman JM. Neurofibromatosis 1. 1998 Oct 2 [Updated 2014 Sep 4]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. GeneReviews® [Internet]). 한편 RNA를 이용한 상보적 DNA (complementary DNA)를 이용하면 거짓 상동 염기서열을 배제할 수 있어 유전 검사의 정확성을 높힐 수 있다. 이 상보적 DNA의 염기서열 분석과 엑손 결실을 진단하기 위한 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 분석법을 통하여 돌연변이 진단률이 95%에 이르는 것으로 알려져 있다. 따라서, 현재 NF1의 유전자 진단법은 상보적 DNA에 기반한 유전진단법을 시행할 것을 권유하고 있다(GeneReviews®). 그러나, 상보적 유전자 진단을 위해서는 환자에서 채혈 후 신선한 혈액에서 RNA를 뽑아야 하는 시간적 제한점이 있으며, RNA 분리 과정에서 오염을 방지하기 위한 주의가 필요하다. 또한 NF1 유전자의 RNA는 다양한 대체 유전자 접합(alternate splicing)이 발생하여 유전자 검사에 혼돈을 일으킬 수 있어, 상대적으로 높은 실패율을 보일 수 있다. 따라서, 많은 검체를 단기간에 처리해야 하는 검사실에서 노동과 시간 집약적인 상보적

DNA에 기반한 유전자 검사법은 일반 검사로 진행하기에 많은 제한점을 내포한다. 따라서 게놈 DNA에 기반한 좀 더 실용화할 수 있는 유전자 진단법 개발이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [3] 본 발명은 게놈 DNA 기반의 장(long) PCR 프라이머 세트 포함하는 신경섬유종종 진단용 조성물 및 이를 이용한 신경섬유종종 진단방법을 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

- [4] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 제 1 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 제 2 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 제 3 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 제 4 프라이머 세트 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 제 5 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는 신경섬유종종 진단용 조성물을 제공한다.
- [5] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 신경섬유종종 진단 키트를 제공한다.
- [6] 또한, 본 발명은 (1) 신경섬유종종 환자로부터 분리된 게놈 DNA 시료를 주형으로 하여, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및 (2) 상기 PCR 증폭 산물을 염기서열 분석하는 단계를 포함하는 신경섬유종종 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [7] 또한, 본 발명은 (1) 신경섬유종종 환자로부터 분리된 시료를 주형으로 하여, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및 (2) 상기 PCR 증폭 산물을 염기서열 분석하는 단계를 포함하는 신경섬유종종 진단 방법을 제공한다.
- [8] 또한, 본 발명은 신경섬유종종 진단을 위한, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트의

용도를 제공한다.

발명의 효과

- [9] 본 발명은 게놈 DNA 기반의 장(long) PCR 프라이머 세트 포함하는 신경섬유종증 진단용 조성물 및 이를 이용한 신경섬유종증 진단방법에 관한 것으로서, 본 발명자들은 게놈 DNA에 기반하되 거짓 상동 염기서열이 동시에 증폭되지 않도록 프라이머를 고안하여, 장 PCR을 한 후 이 절편을 다중 프라이머로 작은 절편으로 재증폭한 후 이 절편들의 염기서열을 분석하였다. 이 게놈 DNA에 기반한 유전자 분석법을 통하여, 88명의 환자를 대상으로 94%의 진단률을 확보할 수 있었다. 따라서, 상기 프라이머 세트들은 신경섬유종증 진단에 있어 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

- [10] 도 1은 NF1 유전자의 게놈 지도를 나타낸다. cystein-serine rich domain (CSD), GTPase related domain (GRD), homologous to Saccharomyces protein (Sep14p) 및 andadenylated kinase pseudogene (AK3)
- [11] 도 2는 거짓 상동 염기서열 부위의 증폭을 피하기 위하여 디자인한 5종의 프라이머 세트를 나타낸다.
- [12] 도 3은 게놈 DNA에서 장 PCR을 통한 유전자 진단의 실패를 나타낸다(환자 1).
- [13] 도 4는 게놈 DNA에서 장 PCR을 통한 유전자 진단의 실패를 나타낸다(환자 2).
- [14] 도 5는 게놈 DNA의 장 PCR 방법을 통해 발견된 NF1 유전자 돌연변이를 상보적 DNA 염기서열분석을 통해 검증한 실패를 나타낸다(IVS29-2A>G).
- [15] 도 6은 게놈 DNA의 장 PCR 방법을 통해 발견된 NF1 유전자 돌연변이를 상보적 DNA 염기서열분석을 통해 검증한 실패를 나타낸다(엑손 29번과 엑손 30번 사이에 GTTAGA의 염기가 비정상적으로 삽입).
- [16] 도 7은 게놈 DNA의 장 PCR 방법을 통해 발견된 NF1 유전자 돌연변이를 상보적 DNA 염기서열분석을 통해 검증한 실패를 나타낸다(6037 염기의 중복).
- [17] 도 8은 게놈 DNA 장 PCR을 통해서 유전진단 결과, 발견된 돌연변이의 분포 양상을 나타낸다.
- [18] 도 9는 2017년 12월까지 검사한 환자에 대한 유전자 검사 양성률을 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [19] 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 제 1 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 제 2 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 제 3 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 제 4 프라이머 세트 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 제 5 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는 신경섬유종증 진단용 조성물을 제공한다.
- [20] 바람직하게는, 상기 프라이머 세트는 게놈 DNA 기반의 장(long)-PCR 용 프라이머 세트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [21] 바람직하게는, 상기 신경섬유종증은 신경섬유종증 1형일 수 있다.
- [22] 바람직하게는, 상기 제 1 프라이머 세트는 신경섬유종증 1형(Neurofibromatosis type I; NF1) 유전자의 엑손 9 및 엑손 11을 표적으로 하고, 상기 제 2 프라이머 세트는 NF1 유전자의 엑손 13을 표적으로 하고, 상기 제 3 프라이머 세트는 NF1 유전자의 엑손 18, 엑손 19 및 엑손 21을 표적으로 하고, 상기 제 4 프라이머 세트는 NF1 유전자의 엑손 29를 표적으로 하고, 상기 제 5 프라이머 세트는 NF1 유전자의 엑손 31을 표적으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [23]
- [24] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 짧은 자유 3'-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [25] 본 발명에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 포함할 수 있다.
- [26]
- [27] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 신경섬유종증 진단 키트를 제공한다.
- [28] 본 발명의 키트에는 상기의 프라이머 세트 이외에, PCR 키트에 포함되는 통상적인 구성성분을 포함할 수 있다. 상기 키트에 포함되는 통상적인 구성성분은 반응완충액, 중합효소, dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP) 및 Mg^{2+} 와 같은 조인자 등일 수 있다. 다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 증폭 단계에 이용될 수 있으며, *E. coli* DNA 중합효소 I의 클레나우 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는, 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이다. 상기 중합효소 대부분은 박테리아 그 자체로부터 분리될 수 있고 또는 상업적으로 구입할 수 있다.
- [29] 또한, PCR이란 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법이다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.
- [30]
- [31] 또한, 본 발명은 (1) 신경섬유종증 환자로부터 분리된 시료를 주형으로 하여, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호

4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트에 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및 (2) 상기 PCR 증폭 산물을 염기서열 분석하는 단계를 포함하는 신경섬유종종 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[32] 상세하게는, 상기 PCR을 수행하는 단계는 상기 PCR 증폭 산물을 주형으로 포획 PCR(nested PCR)을 추가적으로 수행하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[33] 보다 상세하게는, 상기 포획 PCR을 추가적으로 수행하는 단계는 서열번호 1 및 서열번호 11로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 12 및 서열번호 13으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 14 및 서열번호 15로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 16 및 서열번호 17로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 18 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 19로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 20 및 서열번호 21로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 22 및 서열번호 23으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 24 및 서열번호 25로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 26 및 서열번호 27로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 28 및 서열번호 29로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 30 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 31로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 32 및 서열번호 33으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 9 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 34 및 서열번호 35로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 36 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트에 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 이용하여 포획 PCR을 수행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[34] 바람직하게는, 상기 시료는 게놈 DNA일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[35] 바람직하게는, 상기 신경섬유종종은 신경섬유종종 1형일 수 있다.

[36]

[37] 상기 분리된 게놈 DNA 시료는 대상의 혈액, 피부세포, 점막 세포 및 모발 등 모든 세포로부터 분리될 수 있다. 해당 세포로부터 DNA를 추출하는 방법은 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 기술 또는 시판되고 있는 DNA 추출용 키트를 사용할 수 있다.

[38]

[39] 본 발명의 방법은 상기 증폭 산물을 분석하는 단계를 포함한다. 상기 증폭 산물의 검출은 모세관 전기영동, DNA 칩, 젤 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 모세관 전기영동을 수행할 수 있다. 모세관 전기영동은 예를 들면, ABI Sequencer를 이용할 수 있다. 또한, 젤 전기영동을 수행할 수 있으며, 젤

전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 젤 전기영동 또는 아크릴아미드 젤 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출 가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행 시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.

[40]

[41] 본 발명의 방법은 염기 서열 분석이 수행될 수 있다. 서열분석은 당업계에 공지된 방법을 모두 이용할 수 있으며, 구체적으로는 이에 제한되는 것은 아니나, 자동염기서열분석기를 사용하거나, 파이로시퀀싱(pyrosequencing), PCR-RELP법(restriction fragment length polymorphism), PCRSSCP법(single strand conformation polymorphism), PCR-SSO법(sequence specific oligonucleotide), PCR-SSO법과 도트 하이브리드화법을 조합한 ASO(allele specific oligonucleotide) 하이브리드화법, TaqMan-PCR법, MALDI-TOF/MS법, RCA법(rolling circle amplification), HRM(high resolution melting)법, 프라이머 신장법, 서던 블롯 하이브리드화법 및 도트 하이브리드화법 등의 공지의 방법 중 선택된 어느 하나 이상을 사용할 수 있다.

[42]

[43] 또한, 본 발명은 (1) 신경섬유종증 환자로부터 분리된 시료를 주형으로 하여, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및 (2) 상기 PCR 증폭 산물을 염기서열 분석하는 단계를 포함하는 신경섬유종증 진단 방법을 제공한다.

[44]

[45] 또한, 본 발명은 신경섬유종증 진단을 위한, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트의 용도를 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

[46] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[47]

[48] <실험예>

[49] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[50]

[51] 1. 장-중합효소연쇄반응(Long-PCR) 조건[52] 주형으로 사용되는 게놈 DNA 50ng에, 정방향과 역방향의 개시체를 각각 5 pmole 농도로 추가하고, 중합효소 GoTaq® long PCR master (Promega, USA)를 포함하여 전체 용량을 10 μ l로 반응 용액을 만든다. 중합효소연쇄반응기기 Thermocycler (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여, 95°C에서 5분간 전-변성을 한 후에 95°C에서 30초 동안 변성시키고, 60°C에서 30초간 교잡반응을 거친 후, 그리고 68°C에서 13분 동안 신장반응을 한다. 이것을 1번의 cycle로 하여 30번 cycle을 반복한 후 마지막 신장반응으로 72°C에서 5분 동안 반응하여 중합효소연쇄반응 생성물을 얻는다.

[53] 거짓 상동 염기서열이 동시에 증폭되지 않도록 고안하여, 장(long)-PCR에 사용된 프라이머 세트는 표 1 및 도 2에 나타냈다.

[54]

[55] [표1]

#	정방향	역방향	크기(bp)	표적 엑손
A	NF1_9F gttttagaggctgttaatttgc(서열 번호 1)	NF1_12Rtctctaaaataaccaa agcagc(서열번호 2)	6,138	엑손 9, 11
B	NF1_12Fcgacaaaaggataaaa cttaaaa(서열번호 3)	NF1_14Rtactcacagaaacca cacacc(서열번호 4)	13,067	엑손 13
C	NF1_17Faggagagtctcaaaca ggaa(서열번호 5)	NF1_22Rccagtatcagtggtga agagggtt(서열번호 6)	5,045	엑손 18, 19, 21
D	NF1_28Fgctactcttagcttcta cc(서열번호 7)	NF1_30Ratagttaaccacacac catcag(서열번호 8)	13,685	엑손 29
E	NF1_30Fgcacttggttaattgtct gtat(서열번호 9)	NF1_32Racctagagcaggaa aagaaaa(서열번호 10)	10,369	엑손 31

[56]

[57] 2. 포획중합효소연쇄반응(nested PCR) 조건

- [58] 장-중합효소연쇄반응으로 얻어진 생성물을 사용하여 각 해당되는 엑손의 개시체를 사용하여 포획중합효소연쇄반응(nested PCR)을 수행한다. 포획중합효소연쇄반응의 조건은 장중합효소연쇄반응 생성물의 1/20을 주형으로 사용하고, 5 pmole의 정방향 역방향 개시체, 중합효소 GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, USA)를 포함하여 전체 용량을 10 μ l를 만들어 중합효소연쇄반응기기 Thermocycler에서 전-변성 95°C에서 5분을 한 후에 95°C에서 30초 동안 변성, 60°C에서 30초간 교잡, 그리고 72°C에서 45초 동안 신장 반응을 하고, 이것을 30 cycles 반복한 후 마지막 신장반응으로 72°C에서 5분동안 반응한다.
- [59] 포획중합효소연쇄반응(nested PCR)에 사용된 프라이머 세트는 표 2에 나타냈다.
- [60]

[61] [표2]

NF1_9F&R (359bp)- Sequence상에서 pseudogene sequence가 함께 나타나는 엑손	
LEFT PRIMER	gttttagaggctgttaatttgc (서열번호 1)
RIGHT PRIMER	aatgtagcaattatctttgaca (서열번호 11)
NF1_10F&R (331bp)	
LEFT PRIMER	gattttactgccatttgtgtg (서열번호 12)
RIGHT PRIMER	gaaataccgataaaagtgaacc (서열번호 13)
NF1_11F&R (280bp)- UCSC in silico PCR 상에서 chr.18 pseudogene 증폭	
LEFT PRIMER	tttttaaactttctatttgcgtt (서열번호 14)
RIGHT PRIMER	attcagaaccttttgaaaacc (서열번호 15)
NF1_12F&R (325bp)	
LEFT PRIMER	cgacaaaaggataaaacttaaaa (서열번호 3)
RIGHT PRIMER	tctctaaaataaccaagcagc (서열번호 2)
NF1_13F&R (295bp)- Sequence상에서 pseudogene sequence가 함께 나타나는 엑손	
LEFT PRIMER	ttttaaagggttgtagctattat (서열번호 16)
RIGHT PRIMER	agctaaaaattatcctcaaggtct (서열번호 17)
NF1_14F&R (284bp)	
LEFT PRIMER	tcactgtctatttcttctctct (서열번호 18)
RIGHT PRIMER	tactcacagaaaccacacacc (서열번호 4)
NF1_17F&R (320bp)	
LEFT PRIMER	aggagagtctcaaacaggaa (서열번호 5)
RIGHT PRIMER	ttaccaaatttcattcagaaaa (서열번호 19)
NF1_18F&R (402bp)- Sequence상에서 pseudogene sequence가 함께 나타나는 엑손	
LEFT PRIMER	acacacagtttattgcattgtt (서열번호 20)
RIGHT PRIMER	tacattctcaaaatcagatgcc (서열번호 21)
NF1_19F&R (286bp)- Sequence상에서 pseudogene sequence가 함께 나타나는 엑손	
LEFT PRIMER	atttgctctgcttcttact (서열번호 22)
RIGHT PRIMER	atcttggttacttcaaaagc (서열번호 23)

NF1_20F&R (274bp)	
LEFT PRIMER	gaaacttggctgtagctgatt (서열번호 24)
RIGHT PRIMER	cagtcttcacacagctatatgtt (서열번호 25)
NF1_21-1F&R (350bp)- Sequence상에서 pseudogene sequence가 함께 나타나는 엑손	
LEFT PRIMER	tttgacttttgcacatggaaga (서열번호 26)
RIGHT PRIMER	tttcctctgaagacatcac (서열번호 27)
NF1_21-2F&R (382bp)- Sequence상에서 pseudogene sequence가 함께 나타나는 엑손	
LEFT PRIMER	ctccagcagagaagcaattc (서열번호 28)
RIGHT PRIMER	atttaaataatctgaaagaaaaagg (서열번호 29)
NF1_22F&R (300bp)	
LEFT PRIMER	tgtgttagatcagtcagttca (서열번호 30)
RIGHT PRIMER	ccagtatcagtgtaagagggt (서열번호 6)
NF1_28F&R (332bp)	
LEFT PRIMER	gctactcttagcttcctacc (서열번호 7)
RIGHT PRIMER	acctaaaagaagacaatcagc (서열번호 31)
NF1_29F&R (282bp)- Sequence상에서 pseudogene sequence가 함께 나타나는 엑손	
LEFT PRIMER	gctgattgtctcttttaagggt (서열번호 32)
RIGHT PRIMER	ttaatgatcaaggggagaag (서열번호 33)
NF1_30F&R (338bp)	
LEFT PRIMER	gcacttgacctaatgtctgtat (서열번호 9)
RIGHT PRIMER	atagttaaccacacaccatcag (서열번호 8)
NF1_31 F&R (308bp)	
LEFT PRIMER	cctttgaactcttgtttcat (서열번호 34)
RIGHT PRIMER	ggaagtactgtaagaaaagctga (서열번호 35)
NF1_32 F&R (354bp)	
LEFT PRIMER	gaggaatgttgatttttaagt (서열번호 36)
RIGHT PRIMER	acctagagcaggaaaagaaaa (서열번호 10)

[63] 3. 돌연변이 검증

[64] 포획중합효소연쇄반응 방법 등으로 통해 게놈 DNA에서 확인된 돌연변이를 검증하기 위하여, 같은 환자의 말초혈액에서 RNA 분리시약, PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen/BD company)을 사용하여 Total RNA를 추출한다. 추출된 RNA로부터 상보적 DNA를 합성하기 위하여, 역전사 중합효소연쇄반응 AMV reverse transcriptase (Promega, USA)를 1ug의 total RNA를 주형으로 하여, 4ul의 25mM MgCl₂, 2ul의 10mM dNTP 용액, 0.5ug의 oligo (dT)15를 첨가하여 최종용적 20ul로 하여 42°C에서 15분~60분간 반응시켜 상보적 DNA를 합성한다.

[65] 합성된 상보적 DNA 1ul를 이용하여 NF1 유전자의 mRNA 염기서열에 적합하게 고안된 개시체를 이용하여 중합효소연쇄반응으로 NF1 상보적 DNA에 대한 산물을 얻고, 이를 염기서열 분석하여 돌연변이를 확인한다. 상보적 DNA에서 확인된 돌연변이를 동일한 대상자의 게놈 DNA에서 확인한 돌연변이와 비교하여 일치 여부를 확인한다.

[66] 돌연변이 검증을 위해 사용된 프라이머 세트는 표 3에 나타냈다.

[67]

[68] [표3]

cNF1_1 F&R (530bp)	
LEFT PRIMER	tcctcacctcagcctcc (서열번호 37)
RIGHT PRIMER	agctgagagaaaataaaacccc (서열번호 38)
cNF1_2 F&R (503bp)	
LEFT PRIMER	aaatctgccattttcttcacac (서열번호 39)
RIGHT PRIMER	atcctggattatttctggacac (서열번호 40)
cNF1_3 F&R (505bp)	
LEFT PRIMER	gacttggtggatggttttg (서열번호 41)
RIGHT PRIMER	gatgattcgaaggagtgaattt (서열번호 42)
cNF1_4 F&R (513bp)	
LEFT PRIMER	ggctcagaattcaccttctac (서열번호 43)
RIGHT PRIMER	tttctacaggagcatcaggatt (서열번호 44)
cNF1_5 F&R (511bp)	
LEFT PRIMER	agtcacacatgccagagattg (서열번호 45)
RIGHT PRIMER	accagaacagcttcagtgtca (서열번호 46)
cNF1_6 F&R (505bp)	
LEFT PRIMER	aagcccagaccaaactagaagt (서열번호 47)
RIGHT PRIMER	actcctccaagggcacaaa (서열번호 48)
cNF1_7 F&R (527bp)	
LEFT PRIMER	ttgtaagaggcgaatgtcc (서열번호 49)
RIGHT PRIMER	ctagcttgcctagatgttcag (서열번호 50)
cNF1_8 F&R (501bp)	
LEFT PRIMER	tcaatttgtagaacaacatagc (서열번호 51)
RIGHT PRIMER	gcactttcatcttcaacttcaact (서열번호 52)
cNF1_9 F&R (503bp)	
LEFT PRIMER	gatggaagccaaatcacagtta (서열번호 53)
RIGHT PRIMER	tagaaaacatgttccagagcag (서열번호 54)
cNF1_10 F&R (523bp)	
LEFT PRIMER	gttctcagtgggatgaactagc (서열번호 55)
RIGHT PRIMER	tctaaaatccctgcttcatacg (서열번호 56)

cNF1_11 F&R (515bp)	
LEFT PRIMER	gtttccctcagaacagcatc (서열번호 57)
RIGHT PRIMER	tgaactggtaaggtaaggctg (서열번호 58)
cNF1_12 F&R (528bp)	
LEFT PRIMER	gaccttttgataagatggcaac (서열번호 59)
RIGHT PRIMER	ctatgaaaacaagccttttgc (서열번호 60)
cNF1_13 F&R (533bp)	
LEFT PRIMER	acgtctccgcagtctatatct (서열번호 61)
RIGHT PRIMER	acatctttggccgaatctt (서열번호 62)
cNF1_14 F&R (521bp)	
LEFT PRIMER	gtgaagccattgtccagtctat (서열번호 63)
RIGHT PRIMER	tgggtacatctgttttcattg (서열번호 64)
cNF1_15 F&R (532bp)	
LEFT PRIMER	tggctgtcaaactagttcgt (서열번호 65)
RIGHT PRIMER	attaatgaccagtccatgtgtg (서열번호 66)
c.NF1_16 F&R (505bp)	
LEFT PRIMER	agctcatcttcctacctcttc (서열번호 67)
RIGHT PRIMER	ctttatctgcccatgagacact (서열번호 68)
cNF1_17 F&R (511bp)	
LEFT PRIMER	tagctcaaagatttgcatcc (서열번호 69)
RIGHT PRIMER	aaggatgcctgtacccttta (서열번호 70)
cNF1_18 F&R (514bp)	
LEFT PRIMER	ggatcattttgttgactcaat (서열번호 71)
RIGHT PRIMER	atcaaaacttttcctgttcca (서열번호 72)
cNF1_19 F&R (502bp)	
LEFT PRIMER	gagccaggaaatccatgag (서열번호 73)
RIGHT PRIMER	attccatggattggatttaaca (서열번호 74)
cNF1_20 F&R (386bp)	
LEFT PRIMER	tgtgcataattgttgactc (서열번호 75)
RIGHT PRIMER	tgaggtcatggaattagaaagg (서열번호 76)
cNF1_21 F&R (381bp)	

LEFT PRIMER	ctgactcccacatctccttacc (서열번호 77)
RIGHT PRIMER	cggatgggttcattataaaaca (서열번호 78)

[69]

[70] <실시예>

[71] 게놈 DNA에 기반하되 거짓 상동 염기서열이 동시에 증폭되지 않도록 프라이머를 고안하여, 장(long) PCR을 한 후, 이 절편을 다중 프라이머로 작은 절편으로 재증폭한 후 이 절편들의 염기서열을 분석하였다.

[72] 거짓 상동 염기서열이 동시에 증폭되지 않도록, 표 1의 프라이머를 고안하였다(NF1_9F + NF1_12R, NF1_12F + NF1_14R, NF1_17F + NF1_22R, NF1_28F + NF1_30R, NF1_30F + NF1_32R). 엑손 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 28, 29 및 30에 거짓 상동 염기서열이 존재한다.

[73] 이후 증폭된 게놈 DNA 절편에 대하여 각각 엑손 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하고 분석하였다.

[74]

[75] **1. 게놈 DNA에서 장 PCR을 통한 유전자 진단의 실패**

[76] 환자 1의 경우, 일반적 PCR 방법으로 엑손 18번에서 거짓 상동 염기서열이 증폭되어, 도 3에 나타낸 붉은 화살표와 같은 거짓 염기서열이 증폭된다. 그러나 게놈 DNA에 기반한 장 PCR을 이용한 염기서열 상에서는 거짓 염기서열이 증폭되지 않으면서, NF1 유전자의 엑손 18번에서 c.2072T>C (p.Leu691Pro) 돌연변이가 발견되었다(청색 화살표)(도 3).

[77]

[78] 환자 2의 경우, 상보적 DNA 검사로 엑손 20번의 결실이 발견된 환자에서 장PCR 방법을 이용한 게놈 디엔에이 검사를 통해 엑손 20번 및 인트론 20번의 경계의 첫째 염기 G가 A로 치환됨을 발견하였다(도 4).

[79]

[80] **2. 게놈 DNA의 장 PCR 방법을 통해 발견된 NF1 유전자 돌연변이를 상보적 DNA 염기서열분석을 통해 검증한 실패**

[81] 게놈 DNA 분석에서 IVS29-2A>G의 이전에 발견되지 않았던 돌연변이를 발굴하였고(도 5), 상보적 DNA에서 엑손 29번과 엑손 30번 사이에 GTTAGA의 염기가 비정상적으로 삽입됨을 확인하였다(도 6).

[82] 또한, 게놈 DNA 분석을 통해서 이전에 보고된 바 없던 6037 염기의 중복을 발견하였고, 상보적 DNA 분석을 통해서 같은 부위인 6037 염기의 중복이 있음을 검증하였다(도 7).

[83]

[84] 한편, 2017년 12월까지 게놈 DNA 장 PCR을 통해서 유전진단한 결과, 이전에 보고된 적 없는 돌연변이로 총 132개의 새로운 돌연변이를 발견할 수 있었다. 상기 돌연변이의 분포 양상은 도 8과 같다.

[85] 또한, 2017년 12월까지 검사한 환자에 대한 유전자 검사 양성률은 표 4 및 도 9와 같다.

[86]

[87] [표4]

게놈 DNA 장PCR 분석	271명 (81%)
MLPA	25명 (8%)

[88]

[89] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[90]

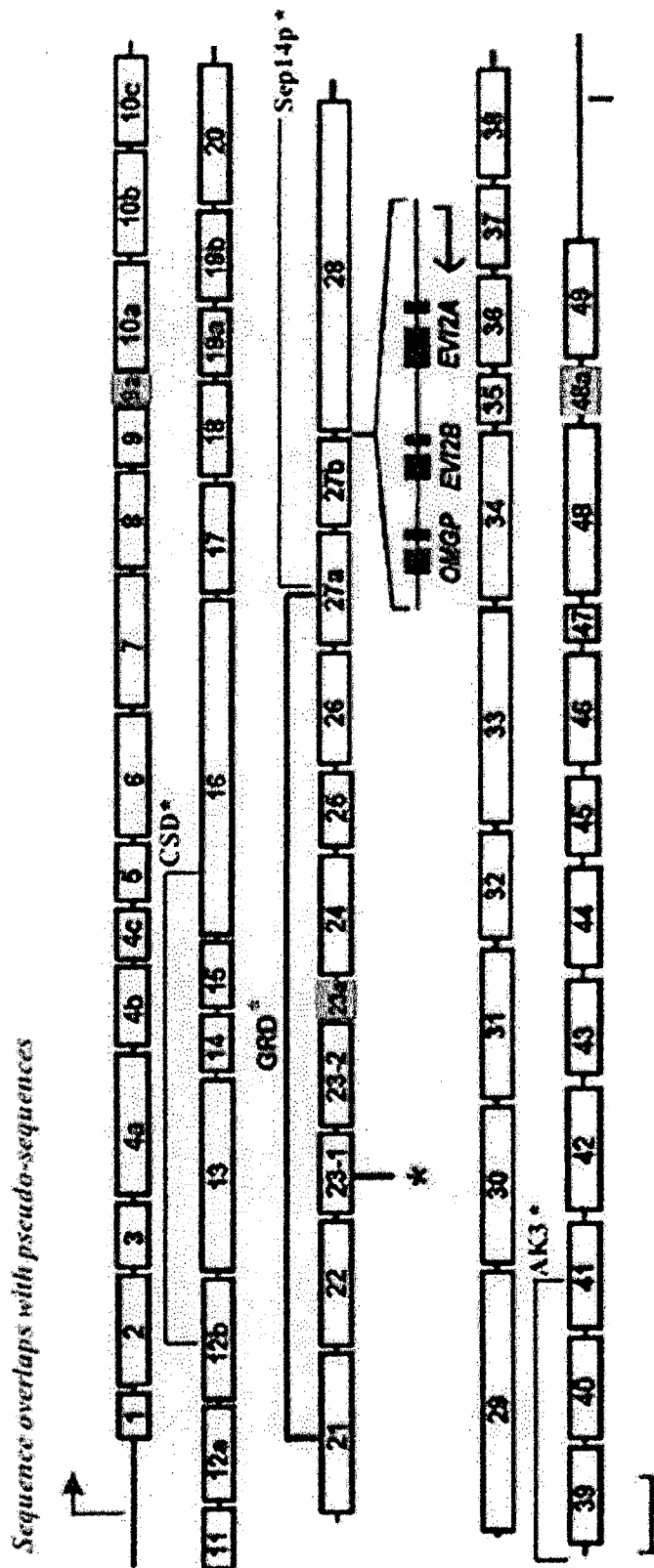
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 제 1 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 제 2 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 제 3 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 제 4 프라이머 세트 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 제 5 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는 신경섬유종증 진단용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 프라이머 세트는 게놈 DNA 기반의 장(long)-PCR 용 프라이머 세트인 것을 특징으로 하는 신경섬유종증 진단용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 신경섬유종증은 신경섬유종증 1형인 것을 특징으로 하는 신경섬유종증 진단용 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 제 1 프라이머 세트는 신경섬유종증 1형(Neurofibromatosis type I; NF1) 유전자의 엑손 9 및 엑손 11을 표적으로 하고, 상기 제 2 프라이머 세트는 NF1 유전자의 엑손 13을 표적으로 하고, 상기 제 3 프라이머 세트는 NF1 유전자의 엑손 18, 엑손 19 및 엑손 21을 표적으로 하고, 상기 제 4 프라이머 세트는 NF1 유전자의 엑손 29를 표적으로 하고, 상기 제 5 프라이머 세트는 NF1 유전자의 엑손 31을 표적으로 하는 것을 특징으로 하는 신경섬유종증 진단용 조성물.
- [청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 신경섬유종증 진단 키트.
- [청구항 6] (1) 신경섬유종증 환자로부터 분리된 시료를 주형으로 하여, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및
(2) 상기 PCR 증폭 산물을 염기서열 분석하는 단계를 포함하는 신경섬유종증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 PCR을 수행하는 단계는 상기 PCR 증폭 산물을 주형으로 포획 PCR(nested PCR)을 추가적으로 수행하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 신경섬유종증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 포획 PCR을 추가적으로 수행하는 단계는 서열번호 1 및 서열번호 11로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 12 및 서열번호 13으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 14 및 서열번호 15로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트,

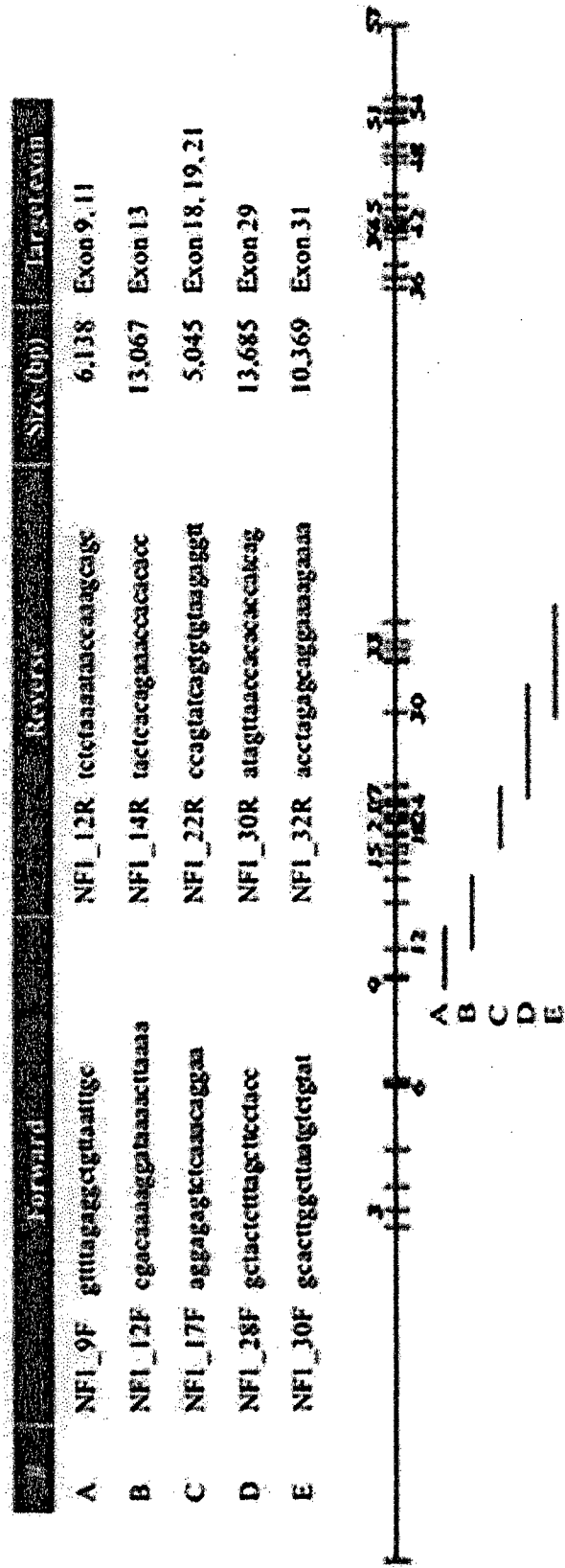
서열번호 16 및 서열번호 17로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 18 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 19로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 20 및 서열번호 21로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 22 및 서열번호 23으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 24 및 서열번호 25로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 26 및 서열번호 27로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 28 및 서열번호 29로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 30 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 31로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 32 및 서열번호 33으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 9 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 34 및 서열번호 35로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 36 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트에 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 이용하여 포획 PCR을 수행하는 것을 특징으로 하는 신경섬유종증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

- [청구항 9] 제6항에 있어서, 상기 시료는 게놈 DNA인 것을 특징으로 하는 신경섬유종증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 10] 제6항에 있어서, 상기 신경섬유종증은 신경섬유종증 1형인 것을 특징으로 하는 신경섬유종증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 11] (1) 신경섬유종증 환자로부터 분리된 시료를 주형으로 하여, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트에 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및
(2) 상기 PCR 증폭 산물을 염기서열 분석하는 단계를 포함하는 신경섬유종증 진단 방법.
- [청구항 12] 신경섬유종증 진단을 위한, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트에 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트의 용도.

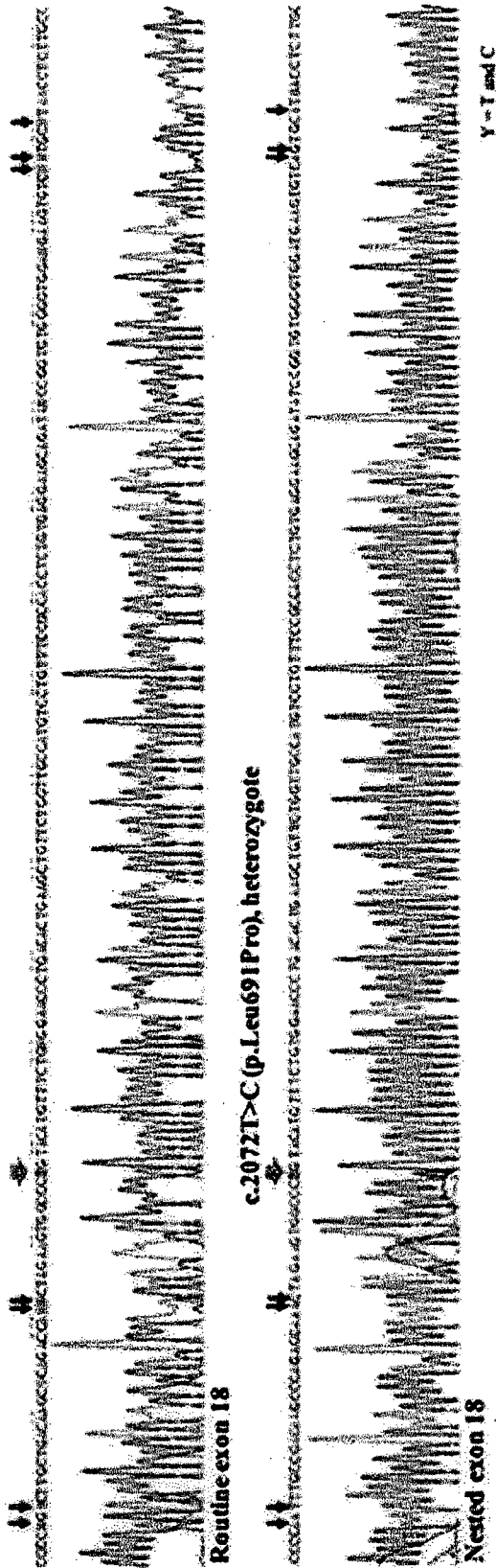
[도 1]



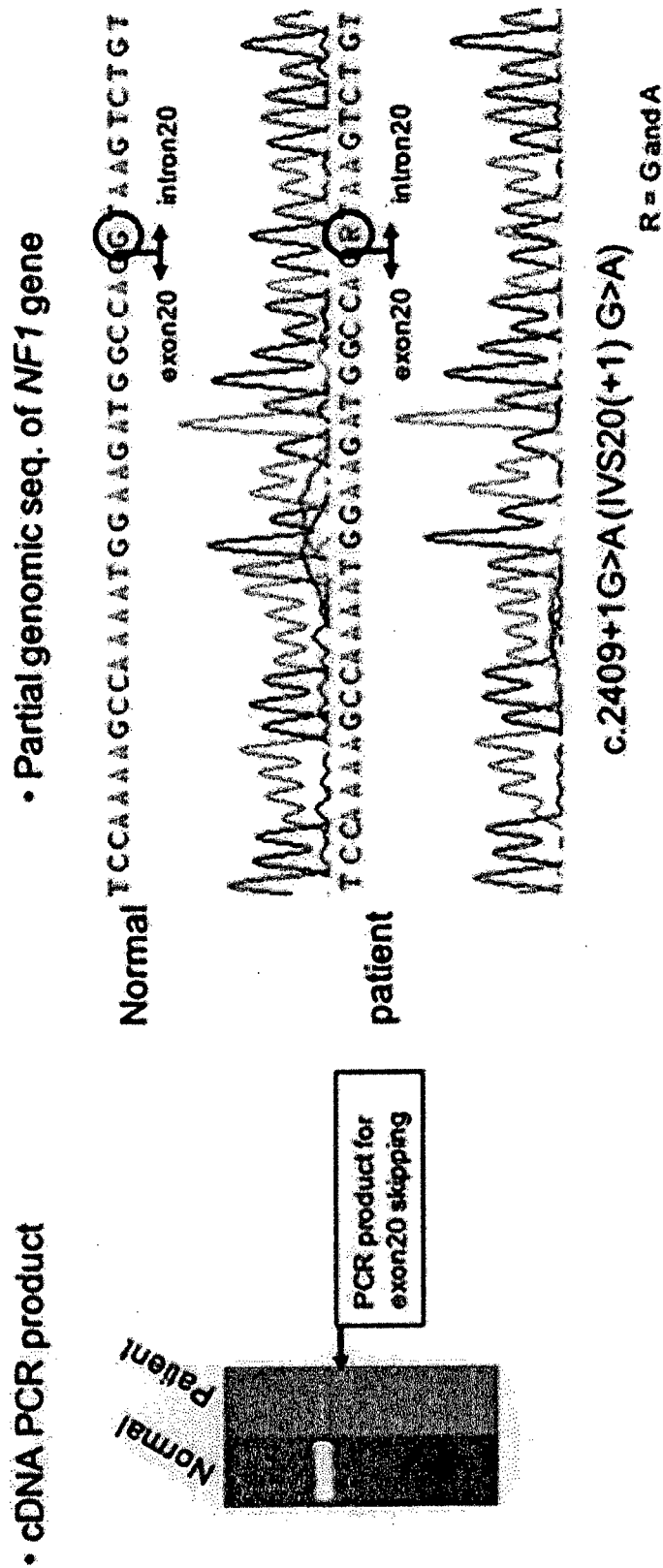
[도 2]



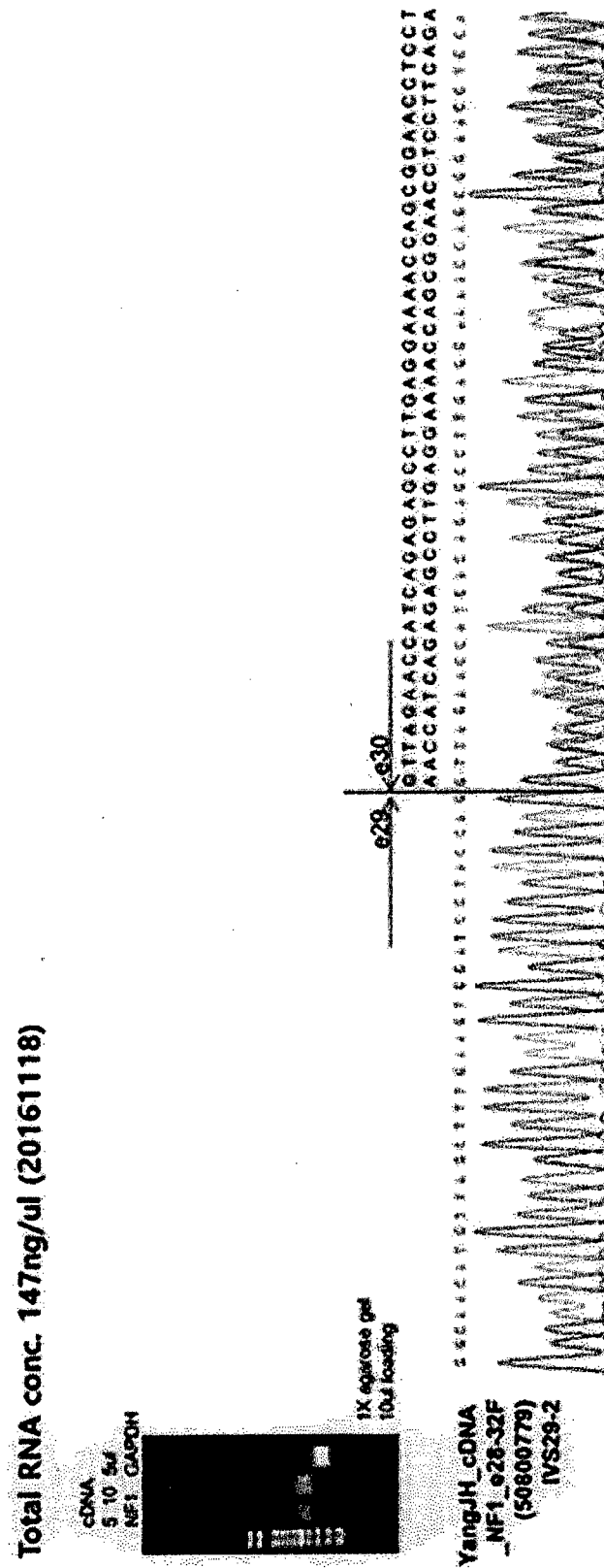
[도 3]



[도 4]



[도 6]



[도 7]

c. 6037dup (p.T2013N fs*26)

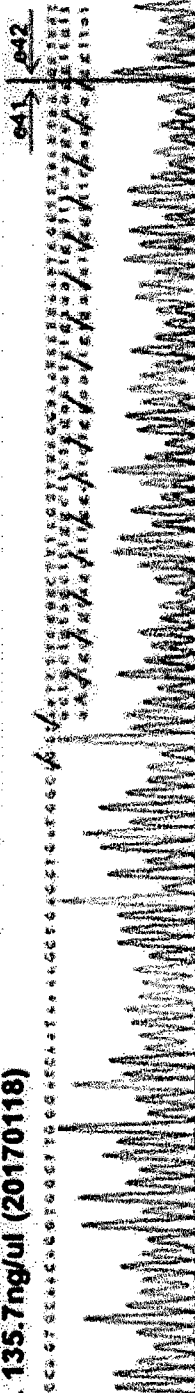
Normal
G A T C A A T A A A G C C T G A G C T G A T G C C A G A T A C T G C T G T A G C C T T T G C C T T C T G G A A A T G T G A A A



c.6037dup (p.Thr2013Asnfs*26), Novel heterozygote

Total RNA conc. 135.7ng/ul (20170118)

JeongYW_cNF1_15F
(S2034105)
c.6037dup
(p.T2013N fs*26)



JeongYW_cNF1_15R



NF1 mRNA

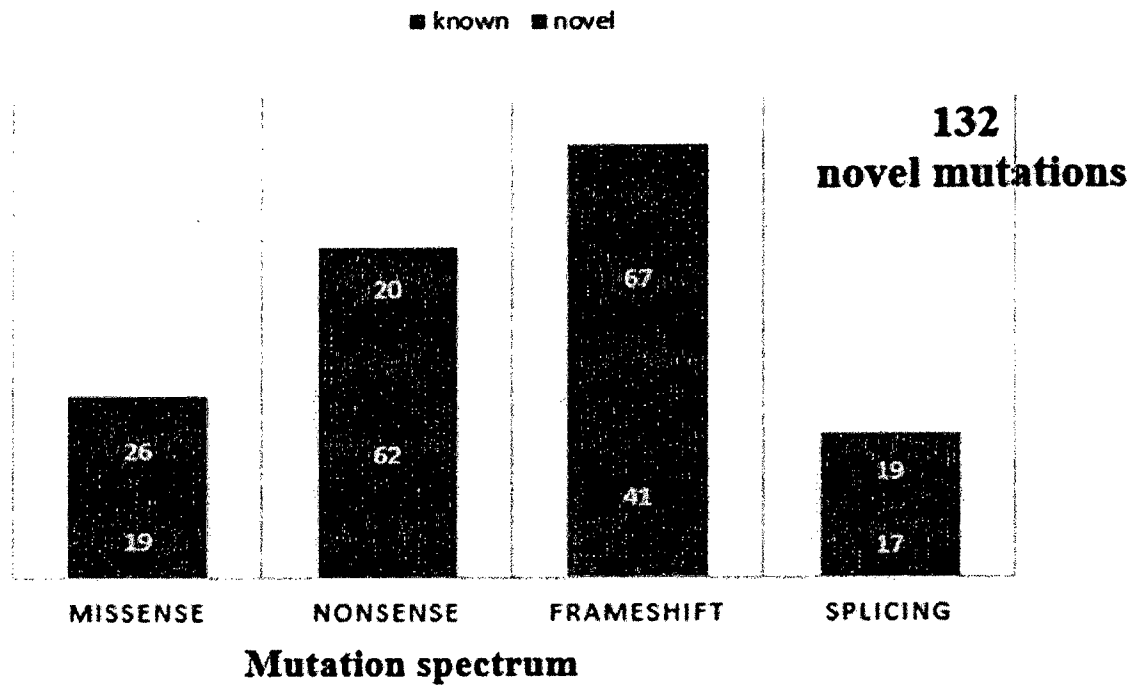
1986 ACC AGT GCA ACA GGT GGC TTG GAT TCA ATA AAA GGT GAG GTG ATG TGG
Thr Ser Ile Thr Gly Ile Leu Gly Ser Ile Tyr Ala Gly Val Met
2011 GCA GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
Ala Asp Thr Ala Val Ala Leu Ala Ser Gly Asp Val Leu Val
2036 TGA GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
Ter Ser Lys Val Ile Gly Ala Met Cys Lys Ile Ile Lys Thr
2041 TGC TTA TCT GCA ACT GCT ACT TTA GAA GAA GAT CTT ATG TGG GAT TGG
Cys Leu Ser Pro Thr Pro Thr Leu Glu Glu Ala Met Lys Asp

CNA (10x)
CNF1 15

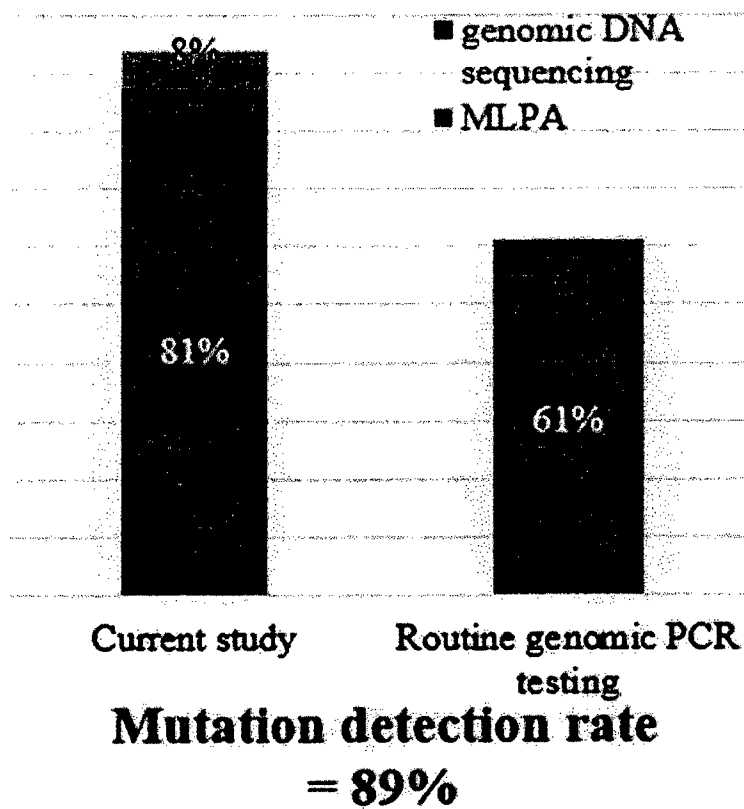


IX separate gel
10x loading

[도 8]



[도 9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/003979

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6886(2018.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/6886; C07H 21/04; C12Q 1/70; C12Q 1/68

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: neurofibromatosis, primer set, long-PCR, NF1 gene, nested-PCR, sequencing

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHU, Lude et al., "Clinical and Molecular Characterization of NF1 Patients: Single-center Experience of 32 Patients From China", Medicine, 2016, vol. 95, no. 10, inner pages 1-10 See abstract; inner page 2; and tables 1, 2.	1-12
A	CN 104450885 A (BESTNOVO (BEIJING) MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 25 March 2015 See abstract; and claims 1-11.	1-12
A	WO 2014-134790 A1 (BESTHEAL MEDICAL TREATMENT CO., LTD. et al.) 12 September 2014 See the entire document.	1-12
A	US 2003-0134272 A1 (MESSIAEN, Ludwine et al.) 17 July 2003 See the entire document.	1-12
A	US 5605799 A (WHITE, Raymond L. et al.) 25 February 1997 See the entire document.	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 JULY 2018 (26.07.2018)

Date of mailing of the international search report

26 JULY 2018 (26.07.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/003979

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 104450885 A	25/03/2015	NONE	
WO 2014-134790 A1	12/09/2014	NONE	
US 2003-0134272 A1	17/07/2003	AU 1140101 A	30/04/2001
		EP 1255858 A2	13/11/2002
		IL 149211 A	10/11/2002
		JP 2003-529335 A	07/10/2003
		WO 01-29251 A2	26/04/2001
		WO 01-29251 A3	01/08/2002
		WO 01-29251 A8	06/02/2003
US 5605799 A	25/02/1997	US 5227292 A	13/07/1993

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/6886(2018.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/6886; C07H 21/04; C12Q 1/70; C12Q 1/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 신경섬유종증, 프라이머 세트, long-PCR, NF1 유전자, nested-PCR, 시퀀싱

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	ZHU, LUDE 등, 'Clinical and molecular characterization of NF1 patients: single-center experience of 32 patients from China', Medicine, 2016, 95권, 10호, 내부페이지 1-10 요약; 내부페이지 2; 및 표 1, 2 참조.	1-12
A	CN 104450885 A (BESTNOVO (BEIJING) MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 2015.03.25 요약; 및 청구항 1-11 참조.	1-12
A	WO 2014-134790 A1 (BESTHEAL MEDICAL TREATMENT CO., LTD. 등) 2014.09.12 전체 문헌 참조.	1-12
A	US 2003-0134272 A1 (MESSIAEN, LUDWINE 등) 2003.07.17 전체 문헌 참조.	1-12
A	US 5605799 A (WHITE, RAYMOND L. 등) 1997.02.25 전체 문헌 참조.	1-12

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 07월 26일 (26.07.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 07월 26일 (26.07.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

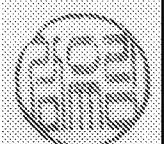
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 104450885 A	2015/03/25	없음	
WO 2014-134790 A1	2014/09/12	없음	
US 2003-0134272 A1	2003/07/17	AU 1140101 A EP 1255858 A2 IL 149211 A JP 2003-529335 A WO 01-29251 A2 WO 01-29251 A3 WO 01-29251 A8	2001/04/30 2002/11/13 2002/11/10 2003/10/07 2001/04/26 2002/08/01 2003/02/06
US 5605799 A	1997/02/25	US 5227292 A	1993/07/13