



등록특허 10-2240332



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월14일  
(11) 등록번호 10-2240332  
(24) 등록일자 2021년04월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12Q 1/68* (2018.01) *C12N 15/10* (2017.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12Q 1/6806* (2018.05)  
*C12N 15/1003* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7029290
- (22) 출원일자(국제) 2014년03월14일  
심사청구일자 2019년03월14일
- (85) 번역문제출일자 2015년10월14일
- (65) 공개번호 10-2015-0131271
- (43) 공개일자 2015년11월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/029466
- (87) 국제공개번호 WO 2014/144874  
국제공개일자 2014년09월18일
- (30) 우선권주장  
61/852,358 2013년03월15일 미국(US)  
61/852,357 2013년03월15일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
Profiles in DNA, Vol 2, No. 3, 페이지 7-9  
(1999)  
W02015073978 A2

- (73) 특허권자  
아벨리노 랩 유에스에이, 인크.  
미국, 캘리포니아 94025, 멘로 파크, 스위트  
비-2, 아담스 드라이브 1505
- (72) 발명자  
카오-쉐른 코니에  
미국 94025 캘리포니아주 멘로 파크 아담스 드라이브 1505 스위트 비-2
- (74) 대리인  
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 20 항

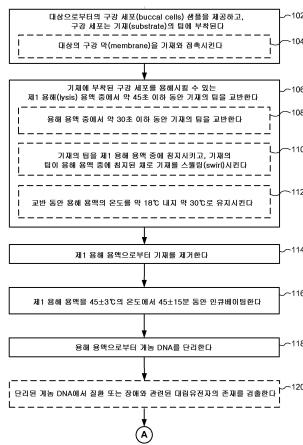
심사관 : 김현태

## (54) 발명의 명칭 대립유전자 검출을 위한 게놈 DNA 주형의 개선된 단리 방법

## (57) 요약

본 발명은 게놈 물질의 분리 및 단일 뉴클레오티드 다형성 관련 질환의 검출의 개선된 방법에 관한 것이다. 일부 측면에서, 이들 방법은 세포 용해 조건을 개선시킴으로써 구강 세포 샘플로부터 게놈 DNA의 총 회수를 증가시킨다. 다른 측면에서, 이들 방법은 환자 구강 면봉 샘플의 재사용을 가능하게 하고, 이는 재시험을 위한 추가의 환자 샘플을 수집해야 할 가능성은 감소시킨다. 최종적으로, 일부 측면에서, 이들 방법은 개선된 실시간 PCR 검정 프로토콜을 사용하여 SNP 검출의 민감성을 증가시킨다.

## 대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류

*C12Q 1/6883* (2018.05)

*C12Q 2600/156* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

단일 뉴클레오티드 다형성(polymorphism)의 검출을 위한 게놈 DNA(gDNA) 샘플의 제조 방법으로서,

(A) 대상으로부터의 구강 상피 세포(buccal epithelial cells)의 샘플을 제공하는 단계로서, 구강 상피 세포가 기재의 텁에 부착된 것인 단계;

(B) 부착된 상피 세포를 갖는 기재의 텁을, 기재에 부착된 구강 세포를 45초 이하 동안 용해시킬 수 있는 제1 용해 용액에서 45초 이하 동안 교반하는 단계;

(C) 제1 용해 용액에서 기재의 텁의 교반 단계(B)의 완료시에 기재를 제1 용해 용액으로부터 제거하는 단계; 및

(D) 기재를 제1 용해 용액으로부터 제거하는 단계(C) 후 제1 용해 용액을  $45\pm3^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서  $45\pm15$ 분 동안 인큐베이팅하여 제1 gDNA 샘플을 제공하는 단계

를 포함하고,

(E) 기재를 제1 용해 용액으로부터 제거하는 단계(C) 후, 기재에 부착된 구강 세포를 용해시킬 수 있는 제2 용해 용액에서 기재를 교반하는 단계;

(F) 기재를 제2 용해 용액으로부터 제거하는 단계; 및

(G) 기재를 제2 용해 용액으로부터 제거하는 단계(F) 후, 제2 용해 용액을  $45\pm3^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서  $45\pm15$ 분 동안 인큐베이팅하여 제2 gDNA 샘플을 제공하는 단계

에 의해 단일 뉴클레오티드 다형성의 검출을 위한 제2 DNA 샘플을 제조하는 단계를 더 포함하는, 단일 뉴클레오티드 다형성의 검출을 위한 gDNA 샘플의 제조 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

기재를 제1 용해 용액으로부터 제거하는 단계(C) 후, 기재를 냉동시키는 단계(I); 및

기재를 교반하는 단계(E) 이전에, 기재를 해동시키는 단계(J)

를 더 포함하는 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 기재의 텁에 부착된 대상의 구강 상피 세포의 제공 단계(A)가 대상의 구강 막(buccal membrane)을 기재와 접촉시키는 것을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 기재가 레이온-팁 면봉(rayon-tipped swab) 또는 코튼-팁 면봉(cotton-tipped swab)인 방법.

#### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 기재의 텁의 교반 단계(B)가 기재의 텁을 제1 용해 용액에 침지시키고 기재의 텁이 용해 용액에 침지된 채로 있는 동안 기재를 스월링(swirling)하는 것을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 용해 용액의 온도가 기재의 텁의 교반 단계(B) 동안  $15^{\circ}\text{C}$  내지  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 유지되는 것인 방법.

### 청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 용해 용액의 온도가 기재의 텁의 교반 단계(B) 동안 18°C 내지 25°C에서 유지되는 것인 방법.

### 청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 기재의 텁이 제1 용해 용액에서 30초 이하 동안 교반(B)되는 것인 방법.

### 청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 용해 용액이 100 $\mu$ l 내지 200 $\mu$ l의 부피를 갖는 것인 방법.

### 청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 기재의 텁의 교반 단계(E)가 기재의 텁을 제2 용해 용액에 침지시키고 기재의 텁이 용해 용액에 침지된 채로 있는 동안 기재를 스월링하는 것을 포함하는 것인 방법.

### 청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 용해 용액의 온도가 기재의 텁의 교반 단계(E) 동안 15°C 내지 30°C로 유지되는 것인 방법.

### 청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 용해 용액의 온도가 기재의 텁의 교반 단계(E) 동안 18°C 내지 25°C로 유지되는 것인 방법.

### 청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 기재의 텁이 제2 용해 용액에서 45초 이하 동안 교반(E)되는 것인 방법.

### 청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 제2 용해 용액이 100 $\mu$ l 내지 200 $\mu$ l의 부피를 갖는 것인 방법.

### 청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서,

(K) 45±3°C의 온도에서 45±15분 동안 각각의 인큐베이팅 단계 (D), (G), 또는 (D) 및 (G) 후에, 제1 용해 용액, 제2 용해 용액, 또는 제1 용해 용액과 제2 용해 용액 둘 모두로부터 각각의 제1 gDNA 용액, 제2 gDNA 용액, 또는 제1 gDNA 용액과 제2 gDNA 용액으로 게놈 DNA를 단리하는 단계

를 더 포함하는 방법.

### 청구항 16

제15항에 있어서, 제1 gDNA 용액, 제2 gDNA 용액, 또는 제1 gDNA 용액과 제2 gDNA 용액이 각각 10 $\mu$ l 내지 200 $\mu$ l의 각각의 부피를 갖는 것인 방법.

### 청구항 17

제15항에 있어서,

(L) 제1 gDNA 용액의 샘플, 제2 gDNA 용액의 샘플, 또는 제1 gDNA 용액의 샘플과 제2 gDNA 용액의 샘플의 실시간 PCR 분석에 의해 대상의 DNA에서 대립유전자의 존재를 검출하는 단계

를 더 포함하는 방법.

### 청구항 18

제17항에 있어서, 실시간 PCR 분석에 사용되는 제1 gDNA 용액의 샘플, 제2 gDNA 용액의 샘플, 또는 제1 gDNA 용

액의 샘플과 제2 gDNA 용액의 샘플이 각각  $2\mu\ell$  이하의 각각의 부피를 갖는 것인 방법.

### 청구항 19

제17항에 있어서, 실시간 PCR 분석이

- (1) 이중-가닥 핵산을 변성시키는 단계;
  - (2) 정방향 프라이머, 역방향 프라이머, 및 검출 프로브를 각각의 gDNA 용액으로부터의 게놈 DNA에 어닐링하는 단계; 및
  - (3) 어닐링된 정방향 프라이머 및 어닐링된 역방향 프라이머로부터 제2-가닥 DNA를 합성하는 단계
- 를 포함하는 방법의 40회 사이클을 수행하는 것을 포함하는 것인 방법.

### 청구항 20

제19항에 있어서, 이중-가닥 핵산의 변성 단계(1)가 95°C에서 3초 동안의 인큐베이션을 포함하는 것인 방법.

### 청구항 21

삭제

### 청구항 22

삭제

### 청구항 23

삭제

### 청구항 24

삭제

### 청구항 25

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 출원은 일반적으로 질환-관련 유전적 대립유전자의 분리 및 검출 방법에 관한 것이다. 특히, 본 출원은 아벨리노(Avellino) 각막 이상증 관련 대립유전자의 개선된 검출 방법에 관한 것이다.

### 관련 출원의 교차 참조

[0003] 본 출원은 2013년 3월 15일자로 출원된 미국 가특허 출원 제61/852,357호, 및 2013년 3월 15일자로 출원된 미국 가특허 출원 제61/852,358호에 대한 우선권을 청구하고, 이들은 그 전문이 본원에 참조로서 인용된다.

### 배경 기술

[0004] 실시간 PCR은 실질적으로 동일한 서열을 갖는 핵산 서열 사이의 차이를 검출하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 하나는 야생형 서열에 결합하고 하나는 돌연변이형 서열에 결합하는, 상이하게 표지된 형광 핵산 프로브의 사용을 통해, 인간 게놈에서 단일 뉴클레오티드 변화를 빠르고 신뢰할 수 있게 검출할 수 있다. 이러한 분해능은 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP: single nucleotide polymorphism), 즉, 단백질의 코딩 및/또는 비코딩 서열 사이에서 발견된 단일 염기 변화가 인간 질환하고 연관성이 있는 의학적 진단에 적용되어 왔다.

[0005] 그러나, 실시간 PCR 분석은 고품질 샘플의 수집 및 분리에 매우 의존적이다. 불량한 샘플 수집 및/또는 분리는 더 긴 검정 조건 및 더 많은 양의 실시간 PCR 시약의 사용을 필요로 하고, 이들 둘 다는 증가된 비용 및 감소된 생산성을 야기한다. 추가로, 실시간 PCR 단일 뉴클레오티드 다형성 검출 검정의 실패는 추가의 샘플 수집 필요

성을 야기할 수 있고, 이는 심지어 시간과 자원의 훨씬 큰 손실을 유발한다.

[0006] 따라서, 검정의 전반적인 성공률을 개선시키고, 검정에 필요한 시약을 감소시키고, 나중에 추가의 샘플 수집 필요성을 감소시키는, 개선된 샘플 수집 및 분리를 야기하는 방법이 매우 바람직하다. 추가로, 더 적은 양의 샘플 물질로 실시간 PCR SNP 검출 검정을 수행하는 방법이 또한 고품질 샘플의 수집 및 분리와 관련된 문제를 감소시킬 것이다.

[0007] 각막 이상증은 상염색체 우성 유전병일 수 있고, 이는 초기에 환자의 각막 중심에 흐린 시야로 나타난다. 흐린 시야는 각막 주위를 향해 점진적으로 넓어지고, 나이가 들어감에 따라 환자의 시력을 악화시킨다. 아벨리노 각막 이상증(또한 과립 각막 이상증, 2형으로도 알려짐), 과립 각막 이상증(1형), 티엘-벵크(Thiel-Behnke) 각막 이상증, 라티스(Lattice) 각막 이상증, 및 레이스-버클러스(Reis-bucklers) 각막 이상증을 포함하여 특성화된 몇몇 유형의 각막 이상증이 존재한다. 각막 이상증은, 적어도 일부 경우,  $\beta$ IG-H3 단백질(또한 TGFB1 단백질, TGFB1p 및 케라토에피텔린으로도 알려짐)을 인코딩하는 형질전환 성장 인자 베타 유도(TGFB1, 또한 TGF $\beta$ I로도 약칭됨) 유전자에서 돌연변이에 의해 유발되는 것으로 알려져 있다.

[0008] 아벨리노 각막 이상증을 앓는 이형접합 환자는 나이가 들어감에 따라 시력 상실이 증가하고, 인생의 말년에는 심각해진다. 동형접합 환자는, 대조적으로, 6세에 심각한 또는 완전한 시력 상실을 나타낼 수 있다. 아벨리노 각막 이상증은 1988년 즈음에 각막 이상증의 분명한 유형으로서 처음 인식되었다. 그 전에는, 과립 각막 이상증으로서 잘못 분류되었을 가능성이 크다. 오늘날, 아벨리노 각막 이상증은 전세계적으로 간질 각막 이상증의 가장 흔한 형태로 알려져 있다. 대한민국에서, 아벨리노 각막 이상증은 870명 중 약 1명의 유병률을 갖는 것으로 간주된다(문헌 [Lee, J. H. et al., *Ophthalmic Epidemiol*, 17:160, 2010]; 또한 문헌[Holland, E. J. et al., *Ophthalmology*, 99:1564, 1992]; [Kennedy, S. M. et al., *Br. J. Ophthalmol*, 80:489, 1996]; [Dolmetsch, A. M. et al., *Can. J. Ophthalmol*, 31:29, 1996]; [Afshari, N. A. et al., *Arch. Ophthalmol*, 119:16, 2001]; [Stewart, H. S. *Hum. Mutat*, 14:126, 1999] 참조).

[0009] 이전에, 이형접합 개체(예를 들면, 하나의 야생형 TGFB1 대립유전자 및 하나의 돌연변이형 TGFB1 대립유전자를 갖는다)는 라식(LASIK) 수술에 따른 시력 상실의 가속화에 매우 취약한 것으로 발견되었다. 특히, 수술 후 2년은 증가된 각막 혼탁이 침입성 증가와 함께 이들 환자에서 관찰되고, 이는 결국 완전한 시력 상실을 야기한다 (Jun, R. M. et al., *Ophthalmology*, 111:463, 2004). 이전에, 눈 수술은 라식 또는 엑시머(Excimer) 레이저 수술이 각막 이상증을 앓는 환자의 시야 흐림을 제거할 것이라는 예상과 함께 수행되었다. 아벨리노 각막 이상증을 앓는 이형접합 환자의 최소 추정치의 1/1000를 기반으로, 라식 수술 300,000 건의 가능성인 숫자에 있어서 300명의 사람들이 시력을 상실할 것이다. 라식 수술을 겪은 환자는 주로 생산 활동을 수행하는 20대 및 30대이고, 따라서 이들의 시력 상실은 사회 및 경제 둘 다에서 심각한 문제를 야기한다.

[0010] 추가로, 미국에서 2000년에 라식 수술 승인 후, 라식 수술을 겪은 아벨리노 각막 이상증을 앓고 있는 아프리카 계 미국인이 시력을 상실한 것으로 확인되었고, 이로서 많은 유사 사례가 전세계적으로 발생하고 있을 수 있다는 것이 추론된다.

[0011] 따라서, 라식 수술에 의한 아벨리노 각막 이상증의 진행을 예방하기 위하여 아벨리노 각막 이상증의 정확한 진단이 필요함에도 불구하고, 아벨리노 각막 이상증의 진단은 단지 각막 혼탁의 현미경 관찰(예를 들면, 세극등 검사)에 의해서 수행되고, 따라서 종종 의사는 라식 수술 수행에 있어서 환자의 잠복성 증상을 놓치고, 이는 시력 상실을 야기한다. 따라서, 각막 이상증의 신속하고 정밀한 유전자 진단이 바람직하다.

[0012] 아벨리노 각막 이상증의 원인이 되는 TGFB1 유전자에서 돌연변이를 검출하기 위한 DNA 칩이 개발되었다(대한민국 특허 공개 공보 제10-2007-0076532호). 그러나, 상기 DNA 칩을 사용하는 아벨리노 각막 이상증의 진단은 불리하게, 샘플 중에서 DNA를 증폭시키는 단계, 증폭된 DNA를 DNA 칩과 혼성화하는 단계, 혼성화된 DNA 칩을 세척하는 단계, 및 양성 반응을 검출하는 단계를 포함하여 몇 단계를 필요로 하고, 이는 느릴 수 있고 실수를 유발할 수 있다.

[0013] 상기 배경을 고려하여, 당해 분야에서 요구되는 것은 환자로부터의 생물학적 샘플 수집, 이들 샘플로부터의 계놈 DNA 추출, 및 그것으로부터의 아벨리노 각막 이상증-관련 SNP 검출의 개선된 방법이다.

### 발명의 내용

[0014] 유리하게, 본 발명은 생물학적 샘플 수집, 이들 샘플로부터의 계놈 DNA 추출, 및 그것으로부터의 아벨리노 각막 이상증-관련 SNP 검출의 개선된 방법을 제공한다. 이들 방법은 처리량을 개선시키고, 검정 시간을 감소시키며,

아벨리노 각막 이상증-관련 SNP을 포함하는 질환-관련 SNP의 검출과 관련된 비용을 감소시킨다.

[0015] 일부 측면에서, 본 발명은 인간 질환과 관련된 대립유전자의 개선된 검출 방법을 제공한다. 하기 기재된 방법은 대상에 관한 의학적 정보를 수득하는 검정 수행과 관련된 시간 및 비용을 감소시킨다. 예를 들면, 일부 양태에서, 개선된 방법은 환자에게 감소된 비용으로, 아벨리노 각막 이상증과 관련된 게놈 마커의 당일 검출을 가능하게 한다.

[0016] 일부 양태에서, 이들 장점은 대립유전자 검출에 사용된 게놈 샘플의 분리 방법을 개선시킴으로써 제공된다. 이들 개선된 방법은 환자로부터 취득한 구강 세포 샘플로부터의 게놈 DNA의 총 회수율을 증가시킨다. 일부 양태에서, 이들 개선된 수율은 환자로부터의 구강 세포가 용해되는 온도를 증가시킴으로써 실현된다.

[0017] 일부 양태에서, 하기 기재된 방법은 환자 샘플의 재사용을 가능하게 하고, 이는 게놈 시험이 반복될 필요가 있을 때 추가의 샘플 수집 필요성을 감소시킨다. 전통적으로, 게놈 시험이 실패하면, 대상은 재시험을 위한 추가의 샘플을 제공할 필요가 있다. 이는 수일 내지 수주 동안 중요한 시험 결과의 지연을 야기할 수 있다. 유리하게, 본원에 제공된 방법이 게놈 핵산의 효율을 개선시키기 때문에, 환자 샘플을 재사용할 수 있고, 이는 잠재적으로 추가의 환자 샘플 수집과 관련된 가치있는 시간과 비용을 절약할 수 있다.

[0018] 일부 양태에서, 하기 기재된 방법은 검출 검정의 민감성을 증가시키고, 이는 시험에 필요한 샘플의 양을 감소시킨다. 반응 당 필요한 샘플의 양의 감소는 환자로부터 분리된 단일 샘플 상에 수행될 수 있는 검정의 수를 증가시키고, 이는 다시, 재시험이 필요한 경우, 추가의 샘플이 환자로부터 수집될 필요가 있을 가능성을 감소시킨다. 샘플의 필요량 감소는 또한 각각의 검정을 수행하는데 필요한 시약의 양의 감소를 야기한다.

### 도면의 간단한 설명

[0019] 도 1a-1b는 일부 양태에 따라, 질환과 관련된 게놈 대립유전자의 개선된 검출 방법(100)을 설명한다.

도 2는 일부 양태에 따라, 아벨리노 각막 이상증과 관련된 단일 뉴클레오티드 다형성의 실시간 PCR 검출에 유용한 정방향 및 역방향 PCR 프라이머 쌍(서열 번호: 1-24)에 대한 서열 목록을 제공한다.

도 3은 일부 양태에 따라 아벨리노 각막 이상증과 관련된 단일 뉴클레오티드 다형성의 실시간 PCR 검출에 유용한 야생형 및 돌연변이형 검출 프로브 쌍(서열 번호: 25-42)에 대한 서열 목록을 제공한다.

도 4는 마커와 관련된 아벨리노 각막 이상증의 검출을 위한 개선된 실시간 PCR 검정 조건을 확인하기 위하여 수행된 실험 결과를 나타낸다.

도 5는 실시예 7의 표 32에 나타낸 NN(로트 # ALU012-006)에 대한 대조군 안정성 결과의 그래프를 제공한다.

도 6은 실시예 7의 표 33에 나타낸 HN(로트 # ALU912-007)에 대한 대조군 안정성 결과의 그래프를 제공한다.

도 7은 실시예 7의 표 34에 나타낸 HH(로트 # ALU912-008)에 대한 대조군 안정성 결과의 그래프를 제공한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### I. 도입부

[0020] 질환-관련 SNP의 검출은 다양한 의학적 조건의 진단 및 예후를 위하여 점점 중요해지고 있는 도구이다. 예를 들면, TGFBI 유전자의 엑손 4의 단일 뉴클레오티드 변화의 존재는 아벨리노 각막 이상증과 높은 연관성이 있다. 이러한 SNP에 대한 이형접합 개체는 라식 수술 후 시력 상실의 높은 위험성을 갖는 것으로 확인되었다. 라식은 많은 사람들의 삶의 질을 크게 개선시키는 의학적 시술이지만, G/A TGFBI SNP를 보유한 개체에 있어서, 이는 통상적으로 4 내지 18개월 기간 동안 점진적인 시력 손상을 유발하고, 시력 상실을 야기할 수 있다. 시력 손상은 더 길거나 짧은 시간 기간 동안 발생할 수 있다. 다행히도, 라식 시술을 받는 것을 피해야 하는, 돌연변이 보유 개체를 식별하는 스크리닝이 수행될 수 있다.

[0021] 본 발명은 적어도 부분적으로 샘플 분리, 제조, 및 분석을 개선시키는 방법의 발견을 기반으로 한다. 일부 양태에서, 예를 들면, 검정 실패 또는 추가의 후속적인 시험이 수행될 필요가 있는 경우, 환자 샘플의 재사용을 가능하게 하는 방법이 제공된다. 일부 양태에서, 이들 개선된 방법은 환자의 구강 막을 벗겨낸 세포를 보유하는 기재(substrate)(예를 들면, 레이온-팁 또는 코튼-팁 어플리케이터)를 용해(lysis) 용액 중에 실온에서 30-45초 동안(상승된 온도에서 20분 동안 연장된 인큐베이션 대신에) 부드럽게 스월링(swirling)하는 것을 포함한다. 그 다음, 용해 용액을 45°C에서 30분 동안 인큐베이팅하여 용해를 개선시키고 게놈 샘플의 수율을 증가시킨다. 유

리하게, 그 다음, 레이온-팁 또는 코튼-팁 어플리케이터를 재시험에 사용되는 게놈 DNA의 재분리를 위하여 저장(예를 들면, 냉동 또는 냉장)할 수 있다.

[0023] 일부 양태에서, 본원에 제공된 개선은 실시간 PCR 검출 검정을 위한 게놈 DNA 주형의 적은 양의 사용을 통해 제공된다. 일부 양태에서, 이는 수행된 실시간 PCR 사이클의 수(예를 들면, 약 40 사이클)를 증가시키고/증가시키거나 95°C에서 3초 변성 사이클 시간을 사용함으로써 달성된다. 유리하게, 필요한 샘플의 양이 이를 방법에 의해 감소되기 때문에, 실시간 PCR 시약에 대한 필요도 마찬가지로 감소된다. 진단 검정에서 사용되는 많은 시약이 전매되기 때문에, 시약은 비쌀 수 있다. 사용되는 시약의 양의 감소는 또한 시약과 관련된 비용을 상당히 감소시킬 수 있다.

[0024] 각각의 이들 개별적인 단계의 수행을 위한 특정한 조건(예를 들면, 샘플 취급, 인큐베이션 온도, 반응 용적(부피), 반응 사이클 수, 반응 사이클 시간, 반응 사이클 온도)의 모든 조합은 TGFBI 유전자의 엑손 4에서 확인된 아벨리노 각막 이상증-관련 SNP와 같은 질환-관련 SNP의 검출을 위한 본원에 기재된 방법을 수행하는데 사용될 수 있는 것으로 간주된다.

## II. 정의 선택

[0025] 본원에서 사용되는 용어 "발명" 또는 "본 발명"은 본 발명의 임의의 하나의 특정한 양태로 제한함을 의도하지 않고, 청구범위 및 명세서에 기재된 바와 같은 본 발명의 임의의 및 모든 양태에 일반적으로 적용된다.

[0026] 본원에서 사용되는 단수형 "a", "an", 및 "the"는 내용에서 달리 분명하게 지시되지 않는 한, 복수형 언급대상을 포함한다. 따라서, 예를 들면, "방법"에 대한 언급은 본원에 기재된 하나 이상의 방법 및/또는 유형의 단계를 포함하고, 이는 본원을 이해한 당해 분야의 숙련가에게 명백해질 것이다.

[0027] 본원에서 사용되는 용어 "다형성" 및 이의 변형은 상이한 게놈 또는 개체 사이에서 또는 그 중에서 둘 이상의 대안적인 게놈 서열 또는 대립유전자의 발생을 의미한다. 용어 "유전적(자) 돌연변이" 또는 "유전적(자) 변이" 및 이의 변형은 다형성을 포함한다.

[0028] 본원에서 사용되는 용어 "단일 뉴클레오티드 다형성"("SNP") 및 이의 변형은 하나의 뉴클레오티드 부위가 대립유전자 사이에서 다양한 것을 의미한다. 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP)은 단일 염기 변화 또는 점 돌연변이지만, 또한 개체 사이에 유전적 변이를 야기하는 소위 "삽입결실(indel)" 돌연변이(뉴클레오티드의 삽입 또는 결실)를 포함한다. 모든 인간 유전적 변이의 약 90%를 이루는 SNP는 30억-염기 인간 게놈을 따라 100 내지 300 염기 마다 발생한다. 그러나, SNP는 바이러스와 같은 다른 유기체에서 훨씬 큰 빈도로 발생할 수 있다. SNP는 게놈의 코딩 또는 비코딩 영역에서 발생할 수 있다. 코딩 영역에서 SNP는 단백질 생성물의 아미노산 서열을 변화시키거나 변화시키지 않을 수 있다. 비코딩 영역에서 SNP는 프로모터 또는 가공 부위를 변경할 수 있고, 유전자 전사 및/또는 가공에 영향을 미칠 수 있다. 개체가 흥미있는 게놈 영역에서 특정한 SNP를 갖는지 여부에 대한 지식은 다양한 질환에 대한 진단적, 예방적 및 치료적 적용을 개발하는데 충분한 정보를 제공할 수 있다. 일부 양태에서, 본 발명은 아벨리노 각막 이상증과 관련된 TGFBI 유전자의 엑손 4에 위치한 구아닌-투-아데닌(guanine-to adenine) SNP의 검출에 관한 것이다.

[0029] 용어 "프라이머" 및 이의 변형은 PCR 반응에서 DNA 합성의 개시점으로서 작용하는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 프라이머는 일반적으로 길이가 약 15 내지 약 35 뉴클레오티드이고, 표적 서열에 상보적 영역을 혼성화한다.

[0030] 용어 "프로브" 및 이의 변형(예를 들면, 검출 프로브)은 PCR 반응에서 표적 핵산에 혼성화하는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 표적 서열은 분석되는 핵산의 영역을 의미하고, 흥미있는 다형성 부위를 포함한다.

[0031] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명과 관련된 분야의 숙련가에게 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것들과 유사하거나 동일한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있음에도 불구하고, 방법 및 물질의 다양한 양태가 본원에 특정하게 기재된다.

## III. 샘플 제조

[0032] 일부 양태에서, 본 발명은 실시간 PCR 단일 뉴클레오티드 다형성 검출 검정에서 사용되는 게놈 샘플을 단리(분리)하는 개선된 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 개선된 방법(100)은 도 1a-1b에 도시된 단계들의 조합을 사용한다.

- [0035] 일부 양태에서, 방법은 대상으로부터의 세포의 샘플을 제공함을 포함한다. 일부 양태에서, 세포는 기재 상에 세포를 가역적으로 고정화할 수 있는 기재와 환자의 세포 표면을 접촉시킴으로써 수집된다.
- [0036] 기재된 방법은 다양한 세포 유형에 적용가능하다. 일부 양태에서, 기재된 방법에 사용하기 위한 세포 유형은 상피 세포, 내피 세포, 결합 조직 세포, 골격근 세포, 내분비 세포, 심장 세포, 비뇨기 세포, 멜라노사이트 및 케라티노사이트를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 양태에서, 세포는 상피 세포이다. 일부 양태에서, 세포는 백혈구이다. 일부 양태에서, 세포는 혈액, 연막, 및 타액 중 하나 이상으로부터 수득된다. 일부 양태에서, 세포는 피막하-혈관주위 세포(상피 유형 1); 담염 세포(상피 유형 2); 중간 세포(상피 유형 3); 어두운 세포(상피 유형 4); 미분화 세포(상피 유형 5); 및 대-수질 세포(상피 유형 6)이다. 일부 양태에서, 세포는 구강 상피 세포(예를 들면, 구강 면봉을 사용하여 수집된 상피 세포)이다. 일부 양태에서, 기재된 방법에서 사용되는 세포의 샘플은 상기 확인된 세포 유형의 임의의 조합을 포함한다.
- [0037] 일부 양태에서, 방법은 대상으로부터의 세포의 샘플 제공(102, 도 1a)을 포함한다. 일부 양태에서, 제공된 세포는 구강 상피 세포이다.
- [0038] 세포 샘플은 기재에 대한 대상 세포의 가역적 결합을 가능하게 하는 다양한 임의의 방법에 의해 수집된다. 일부 양태에서, 기재는 기재에 대한 세포의 가역적 결합을 위하여 대상 세포를 함유하는 샘플과의 물리적 상호작용 하에 사용된다. 일부 양태에서, 기재는 기재에 대한 세포의 가역적 결합을 위하여 직접적으로 대상의 신체와 물리적 상호작용 하에 사용된다. 일부 양태에서, 샘플은 구강 세포 샘플이고, 구강 세포의 샘플은 막으로부터 제거된 세포를 가역적으로 고정화할 수 있는 기재와 대상의 구강 막(예를 들면, 이들의 뺨 내부)을 접촉시킴으로써(104, 도 1a) 수집된다. 이러한 양태에서, 면봉을 한 사람의 양치질과 동일한 힘(예를 들면, 힘 또는 압력의 가벼운 양)으로 대상의 뺨 내부를 문지른다. 대상의 세포가 기재에 가역적으로 결합되도록 하는 임의의 방법은 기재된 방법과의 사용에 고려된다.
- [0039] 일부 양태에서, 샘플은 비침습성 방식으로 유리하게 수집되고, 이러한 샘플 수집은 거의 모든 장소 및 거의 모든 사람에 의해 완수된다. 예를 들면, 일부 양태에서 샘플은 전문의 사무실, 대상의 집, 또는 라식 수술이 수행되거나 수행될 시설에서 수집된다. 일부 양태에서 환자, 환자의 의사, 간호사 또는 의료 보조자 또는 기타 임상 인원이 샘플을 수집한다.
- [0040] 일부 양태에서 기재는 세포가 가역적으로 결합된 다양한 임의의 물질로 구성된다. 예시적인 기재는 레이온, 코튼, 실리카, 엘라스토머, 셀락, 호박, 천연 또는 합성 고무, 셀룰로스, 베이클라이트(BAKELITE), 나일론(NYLON), 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리아크릴로니트릴, 또는 기타 물질 또는 이의 조합으로 이루어진 것들을 포함한다. 일부 양태에서, 기재는 레이온 팁 또는 코튼 팁을 갖는 면봉이다.
- [0041] 그 다음, 기재의 팁(예를 들면, 레이온 면봉 또는 코튼 면봉의 팁)을 용해 용액 중에서 교반한다(106, 도 1a). 일부 양태에서, 기재의 팁을 용해 용액 중에서 약 10초 내지 60초(1분), 또는 약 20초 내지 60초, 약 20초 내지 약 45초, 또는 약 20초 내지 약 30초, 약 15초 내지 약 60초, 약 15초 내지 약 45초, 또는 약 15초 내지 약 30초, 약 10초 내지 약 60초, 약 10초 내지 약 45초, 또는 약 10초 내지 약 30초, 약 10초 내지 약 15초 또는 약 10초 내지 약 20초 동안 교반한다. 일부 양태에서, 교반은 약 60초 또는 약 1분 동안 발생한다. 일부 양태에서, 교반은 1분 미만(예를 들면, 60초 미만) 동안 발생한다. 일부 양태에서, 교반은 15초, 20초, 30초(108, 도 1a), 45초 또는 60초 이하 동안 발생한다. 일부 양태에서, 교반은 45초 이하 동안 발생한다. 일부 양태에서, 교반은 30초 이하 동안 발생한다. 일부 양태에서, 교반은 20초 이하 동안 발생한다. 일부 양태에서, 교반은 15초 이하 동안 발생한다. 그러나, 교반은 60초 이상(예를 들면, 약 120초, 180초, 240초, 300초, 600초 등) 동안 수행될 수 있다.
- [0042] 일부 양태에서, 교반은 용해 용액 중에서 기재의 임의의 움직임을 포함한다. 일부 양태에서, 교반은 기재의 팁을 용해 용액 중에 침지(immersing)시키고, 기재의 팁이 용해 용액 중에 침지된 채로 기재를 스웨팅시키는 것을 포함한다(110, 도 1a). 일부 양태에서, 복수의 구강 세포가 나중 분리 및/또는 후속적인 시간에 기재에 부착된 채로 남아 있도록, 기재의 팁(예를 들면, 레이온 면봉 또는 코튼 면봉의 팁)을 용해 용액 중에서 부드럽게 움직인다. 용해 용액 중의 이러한 움직임은 스월링 움직임, 좌우 움직임, 상하 움직임 및/또는 딥핑 움직임, 또는 일부 구강 세포를 용해 용액 중에 분산시키면서 복수의 구강 세포를 팁에 부착된 채로 남기는 용해 용액 중의 기재의 임의의 기타 움직임을 포함한다.
- [0043] 일부 양태에서, 교반 단계는 실온에서, 예를 들면, 약 15°C 내지 약 30°C(112, 도 1a), 약 18°C 내지 약 28°C, 약 18°C 내지 약 25°C 또는 약 20°C 내지 약 25°C의 온도에서 수행된다.

[0044]

교반 후, 기재(예를 들면, 레이온 텁 또는 코튼 텁이 있는 면봉)를 제거하고(114, 도 1a), 일부 양태에서, 재시험 또는 추가로(예를 들면, 상이한 또는 추가의) 시험이 필요한 경우, 나중 사용을 위하여 저장된다. 일부 양태에서, 기재(예를 들면, 레이온 텁 또는 코튼 텁이 있는 구강 면봉)는 컨테이너에 넣고 냉동 저장된다. 일부 양태에서, 기재(예를 들면, 레이온 텁 또는 코튼 텁이 있는 구강 면봉)는 냉장된다. 일부 양태에서, 기재는 하나 이상의 추가의 추출에 여전히 유용한 채로 남아 있는 다양한 임의의 온도에서 다양한 임의의 시간 동안 저장된다.

[0045]

일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 0주, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주 또는 12주 또는 그 이상 동안 저장된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 0주 내지 12주, 1주 내지 12주, 2주 내지 12주, 3주 내지 12주, 4주 내지 12주, 5주 내지 12주, 6주 내지 12주, 7주 내지 12주, 8주 내지 12주, 9주, 10주 내지 12주, 또는 11주 내지 12주 동안 저장되고/저장되거나 저장이 가능하다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 30, 또는 36개월 또는 그 이상 동안 저장된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 1개월 내지 36개월, 2개월 내지 36개월, 3개월 내지 36개월, 4개월 내지 36개월, 5개월 내지 36개월, 6개월 내지 36개월, 7개월 내지 36개월, 8개월 내지 36개월, 9개월 내지 36개월, 10개월 내지 36개월, 12개월 내지 36개월, 14개월 내지 36개월, 16개월 내지 36개월, 18개월 내지 36개월 동안 저장된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 1개월 내지 30개월, 2개월 내지 30개월, 3개월 내지 30개월, 4개월 내지 30개월, 5개월 내지 30개월, 6개월 내지 30개월, 7개월 내지 30개월, 8개월 내지 30개월, 9개월 내지 30개월, 10개월 내지 30개월, 12개월 내지 30개월, 14개월 내지 30개월, 16개월 내지 30개월 또는 18개월 내지 30개월 동안 저장된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 1개월 내지 24개월, 2개월 내지 24개월, 3개월 내지 24개월, 4개월 내지 24개월, 5개월 내지 24개월, 6개월 내지 24개월, 7개월 내지 24개월, 8개월 내지 24개월, 9개월 내지 24개월, 10개월 내지 24개월, 12개월 내지 24개월, 14개월 내지 24개월, 16개월 내지 24개월, 18개월 내지 24개월 동안 저장된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 1개월 내지 22개월, 2개월 내지 22개월, 3개월 내지 22개월, 4개월 내지 22개월, 5개월 내지 22개월, 6개월 내지 22개월, 7개월 내지 22개월, 8개월 내지 22개월, 9개월 내지 22개월, 10개월 내지 22개월, 12개월 내지 22개월, 14개월 내지 22개월, 16개월 내지 22개월, 18개월 내지 22개월 동안 저장된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 1개월 내지 20개월, 2개월 내지 20개월, 3개월 내지 20개월, 4개월 내지 20개월, 5개월 내지 20개월, 6개월 내지 20개월, 7개월 내지 20개월, 8개월 내지 20개월, 9개월 내지 20개월, 10개월 내지 20개월, 12개월 내지 20개월, 14개월 내지 20개월, 16개월 내지 20개월, 18개월 내지 20개월 동안 저장된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 1개월 내지 18개월, 2개월 내지 18개월, 3개월 내지 18개월, 4개월 내지 18개월, 5개월 내지 18개월, 6개월 내지 18개월, 7개월 내지 18개월, 8개월 내지 18개월, 9개월 내지 18개월, 10개월 내지 18개월, 12개월 내지 18개월, 14개월 내지 18개월, 16개월 내지 18개월, 18개월 내지 18개월 동안 저장된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 1개월 내지 12개월, 2개월 내지 12개월, 3개월 내지 12개월, 4개월 내지 12개월, 5개월 내지 12개월, 6개월 내지 12개월, 7개월 내지 12개월, 8개월 내지 12개월, 9개월 내지 12개월, 10개월 내지 12개월 또는 11개월 내지 12개월 동안 저장된다.

[0046]

일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 2°C, 약 3°C, 약 4°C, 약 5°C, 약 6°C, 약 7°C, 또는 약 8°C에서 저장된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 2°C 내지 약 8°C, 약 3°C 내지 약 8°C, 약 4°C 내지 약 8°C, 약 5°C 내지 약 8°C, 약 6°C 내지 약 8°C 또는 약 7°C 내지 약 8°C에서 저장된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 -25°C, 약 -24°C, 약 -23°C, 약 -22°C, 약 -21°C, 약 -20°C, 약 -19°C, 약 -18°C, 약 -17°C, 약 -16°C 또는 약 -15°C에서 저장된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 -25°C 내지 약 -15°C, 약 -22°C 내지 약 -17°C, 약 -20°C 내지 약 -15°C 또는 약 -25°C 내지 약 -20°C에서 저장된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 -90°C, 약 -89°C, 약 -88°C, 약 -87°C, 약 -86°C, 약 -85°C, 약 -84°C, 약 -83°C, 약 -82°C, 약 -81°C, 약 -80°C, 약 -79°C, 약 -78°C, 약 -77°C, 약 -76°C, 약 -75°C, 약 -74°C, 약 -73°C, 약 -72°C, 약 -71°C, 약 -70°C, 약 -69°C, 약 -68°C, 약 -67°C, 약 -66°C 또는 약 -65°C에서 저장된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 -90°C 내지 약 -65°C, 약 -85°C 내지 약 -65°C, 약 -80°C 내지 약 -65°C, 약 -75°C 내지 약 -65°C 또는 약 -70°C 내지 약 -65°C에서 저장된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 -90°C 내지 -65°C에서 저장된다.

[0047]

일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 1회 이상 냉동-해동되고(예를 들면, 냉동된 후, 샘플을 함유하는 기재는 해동되고, 본 발명에 따라 사용되고 재냉동된다), 본 발명에 따라 사용된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20회 또는 그 이상 냉동-해동된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 본 발명의 방법에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,

13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20회 또는 그 이상 사용된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 1 내지 20회, 2 내지 20회, 3 내지 20회, 4 내지 30회, 5 내지 20회, 6 내지 20회, 7 내지 20회, 8 내지 20회, 9 내지 20회, 10 내지 20회, 11 내지 20회, 12 내지 20회, 13 내지 20회, 14 내지 20회, 15 내지 20회, 16 내지 20회, 17 내지 20회, 18 내지 20회, 19 내지 20회, 5 내지 15회, 5 내지 10회, 1 내지 10회 또는 1 내지 5회 냉동-해동된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 본 발명의 방법에서 1 내지 20회, 2 내지 20회, 3 내지 20회, 4 내지 30회, 5 내지 20회, 6 내지 20회, 7 내지 20회, 8 내지 20회, 9 내지 20회, 10 내지 20회, 11 내지 20회, 12 내지 20회, 13 내지 20회, 14 내지 20회, 15 내지 20회, 16 내지 20회, 17 내지 20회, 18 내지 20회, 19 내지 20회, 5 내지 15회, 5 내지 10회, 1 내지 10회 또는 1 내지 5회 사용된다. 따라서, 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 수회(예를 들면, 3회) 냉동-해동되고 본 발명의 방법에서 사용된다.

[0048] 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 1주 동안 실온 또는 약 15°C 내지 약 30°C에서 저장된다. 일부 양태에서, 샘플은 약 1, 2 또는 3주 동안 약 2°C 내지 약 8°C 또는 약 4°C에서 저장된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개월 동안 약 -25°C 내지 약 -15°C 또는 약 -20°C에서 저장된다. 일부 양태에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개월 동안 약 -90°C 내지 약 -65°C 또는 약 -80°C에서 저장된다.

[0049] 일부 양태에서, 기재의 텁은 기재에 부착된 구강 세포를 용해시킬 수 있는 제2 용해 용액 중에서 교반된다(122, 도 1b). 일부 양태에서, 제2 용해 용액은 제1 용해 용액과 동일하다. 일부 양태에서, 제2 용해 용액은 제1 용해 용액과 상이하다. 일부 양태에서, 기재의 텁은 기재가 냉동 저장되고 해동된 후, 기재에 부착된 구강 세포를 용해시킬 수 있는 제2 용해 용액 중에서 교반된다. 일부 양태에서, 교반은 용해 용액 중에서 약 45초 이하 동안 기재의 텁의 교반을 포함한다(124, 도 1b). 일부 양태에서, 교반은 기재의 텁을 제2 용해 용액 중에 침지시키고, 기재의 텁이 용해 용액 중에 침지된 채로 기재를 스윙링시키는 것을 포함한다(126, 도 1b). 일부 양태에서, 용해 용액의 온도는 교반 동안 약 18°C 내지 30°C로 유지된다(128, 도 1b).

[0050] 일부 양태에서, 기재는 제2 용해 용액으로부터 제거된다(130, 도 1b). 일부 양태에서, 제2 용해 용액은 인큐베이팅된다. 일부 양태에서, 제2 용해 용액은  $45\pm3^\circ\text{C}$ 의 온도에서  $45\pm15$ 분 동안 인큐베이팅된다(132, 도 1b). 일부 양태에서, 게놈 DNA는 제2 용해 용액으로부터 분리된다(134, 도 1b). 일부 양태에서, 질환 또는 장애와 관련된 대립유전자의 존재는 분리된 게놈 DNA에서 검출된다.

[0051] 도 1a에 설명된 공정의 몇몇 특징은 도 1b에 설명된 공정에 적용될 수 있다. 예를 들면, 도 1a에 관하여 상기 기재된 다양한 공정 조건은 도 1b에 설명된 공정에 사용될 수 있다. 간결하게 하기 위하여, 이들 세부사항은 본원에서 반복되지 않는다.

[0052] 유리하게, 놀랍게도, 기재로부터 추출된 세포의 감소된 수는 개별적인 세포로부터의 핵산의 증가된 추출에 반대되는 것이 확인되었다. 일부 양태에서, 증가된 추출은 표준 관행에 비해 긴 시간 동안 세포를 배양하거나, 표준 관행에 비해 상승된 온도에서 세포를 배양하거나, 이 둘의 조합에 의해 달성된다.

[0053] 일부 양태에서, 세포의 핵산의 증가된 추출은 표준 관행에 비해 증가된 또는 긴 시간 기간 동안 추출 배양을 수행함으로써 달성된다. 일부 양태에서, 추출 배양은 약 45분, 예를 들면,  $45\pm5$ ,  $45\pm10$ ,  $45\pm15$ , 또는  $45\pm20$ 분 동안 수행된다(116, 도 1a). 일부 양태에서, 추출 배양은 약 25분 내지 약 65분, 약 30분 내지 약 60분, 약 35분 내지 약 55분, 약 45분 내지 약 65분, 약 45분 내지 약 55분, 또는 약 40분 내지 약 50분 동안 수행된다. 일부 양태에서, 본 발명에 따른 추출 배양 시간은 약 25분, 약 30분, 약 35분, 약 40분, 약 45분, 약 50분, 약 55분, 약 60분 또는 약 65분이다.

[0054] 일부 양태에서, 세포의 핵산의 증가된 추출은 표준 관행에 비해 증가된 또는 높은 온도에서 추출 배양을 수행함으로써 달성된다. 일부 양태에서, 추출 배양은 약  $45^\circ\text{C}$ , 예를 들면,  $45\pm2^\circ\text{C}$ ,  $45\pm5^\circ\text{C}$ , 또는  $45\pm10^\circ\text{C}$ 에서 수행된다(116, 도 1a). 일부 양태에서, 추출 배양 온도는 약  $35^\circ\text{C}$  내지 약  $55^\circ\text{C}$ , 약  $40^\circ\text{C}$  내지 약  $50^\circ\text{C}$  또는 약  $43^\circ\text{C}$  내지 약  $47^\circ\text{C}$ 이다. 일부 양태에서, 추출 온도는 약  $43^\circ\text{C}$ , 약  $44^\circ\text{C}$ , 약  $45^\circ\text{C}$ , 약  $46^\circ\text{C}$ , 약  $47^\circ\text{C}$ , 약  $48^\circ\text{C}$ , 약  $49^\circ\text{C}$ , 약  $50^\circ\text{C}$ , 약  $51^\circ\text{C}$ , 약  $52^\circ\text{C}$ , 약  $53^\circ\text{C}$ , 약  $54^\circ\text{C}$  또는 약  $55^\circ\text{C}$ 이다.

[0055] 일부 양태에서, 실질적으로 적은 수의 세포가 본 발명의 방법에 따른 후속적인 용해를 위하여 기재로부터 방출된다. 일부 양태에서, 1개 이상의 세포, 2개 이상의 세포, 5개 이상의 세포, 10개 이상의 세포, 15개 이상의 세포, 20개 이상의 세포, 50개 이상의 세포, 75개 이상의 세포, 100개 이상의 세포, 125개 이상의 세포, 150개 이상의 세포, 175개 이상의 세포, 200개 이상의 세포, 250개 이상의 세포, 300개 이상의 세포, 350개 이상의 세포, 400개 이상의 세포, 450개 이상의 세포, 500개 이상의 세포 또는 그 이상이 교반 동안 기재로부터 방출된

다.

[0056] 일부 양태에서, 약 0.55 내지 2.00, 약 0.6 내지 약 2.00, 약 0.7 내지 약 2.00, 약 0.8 내지 약 2.00, 약 0.9 내지 약 2.00, 약 1.0 내지 약 2.00, 약 1.1 내지 약 2.00, 약 1.2 내지 약 2.00, 약 1.3 내지 약 2.00, 약 1.4 내지 약 2.00, 약 1.5 내지 약 2.00, 약 1.6 내지 약 2.00, 약 1.7 내지 약 2.00, 약 1.8 내지 약 2.00 또는 약 1.9 내지 약 2.00 순도의 핵산 약 1ng/ $\mu$ l 내지 약 50ng/ $\mu$ l, 약 1ng/ $\mu$ l 내지 약 40ng/ $\mu$ l, 약 1ng/ $\mu$ l 내지 약 30ng/ $\mu$ l, 약 1ng/ $\mu$ l 내지 약 20ng/ $\mu$ l, 약 1ng/ $\mu$ l 내지 약 10ng/ $\mu$ l, 약 1ng/ $\mu$ l 내지 약 5ng/ $\mu$ l, 약 1ng/ $\mu$ l 내지 약 4ng/ $\mu$ l, 약 1ng/ $\mu$ l 내지 약 3ng/ $\mu$ l 또는 약 1ng/ $\mu$ l 내지 약 2ng/ $\mu$ l가 기재된 방법에 사용된다. 일부 양태에서, 약 0.55 내지 2.00 순도의 약 1ng/ $\mu$ l 내지 50ng/ $\mu$ l이 기재된 방법에 사용된다. 일부 양태에서, 약 0.55 내지 2.00 순도의 약 1ng/ $\mu$ l 내지 40ng/ $\mu$ l가 기재된 방법에 사용된다. 일부 양태에서, 약 0.55 내지 2.00 순도의 1ng/ $\mu$ l 내지 20ng/ $\mu$ l가 기재된 방법에 사용된다. 일부 양태에서, 약 0.55 내지 2.00 순도의 1ng/ $\mu$ l 내지 10ng/ $\mu$ l가 기재된 방법에 사용된다. 일부 양태에서, 약 0.55 내지 2.00 순도의 1ng/ $\mu$ l 내지 5ng/ $\mu$ l가 기재된 방법에 사용된다. 일부 양태에서, 약 0.55 내지 2.00 순도의 1ng/ $\mu$ l 내지 4ng/ $\mu$ l가 기재된 방법에 사용된다. 일부 양태에서, 약 0.55 내지 2.00 순도의 1ng/ $\mu$ l 내지 3ng/ $\mu$ l가 기재된 방법에 사용된다. 일부 양태에서, 약 0.55 내지 2.00 순도의 1ng/ $\mu$ l 내지 2ng/ $\mu$ l가 기재된 방법에 사용된다. 일부 양태에서, 약 0.55 내지 2.00 순도의 약 1ng/ $\mu$ l 이상이 기재된 방법에 사용된다.

#### IV. 용해 용액

[0057] 다양한 용해 용액이 기재되어 있고 당해 분야의 숙련가에게 알려져 있다. 임의의 이들 잘 알려진 용해 용액은 샘플로부터 핵산을 분리하기 위하여 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 예시적인 용해 용액은 상업적으로 이용 가능한 것들, 예를 들면, 인비트로젠(INVITROGEN), 퀴아젠(QIAGEN), 라이프 테크놀로지스(LIFE TECHNOLOGIES) 및 기타 제조업자로부터 판매되는 것들 뿐만 아니라 실험실 세팅에서 숙련가에 의해 발생될 수 있는 것들을 포함한다. 용해 버퍼가 또한 잘 기재되어 있고, 다양한 용해 버퍼는, 예를 들면, 문헌 [Molecular Cloning(three volume set, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012)] 및 [Current Protocols(Genetics and Genomics; Molecular Biology; 2003-2013)]에 기재된 것들을 포함하는 공지된 방법과 사용될 수 있는 것이 확인되고, 이들은 모든 면에서 본원에 참조로서 인용된다.

[0058] 세포 용해는 세포 내로부터의 핵산의 회수를 위하여 흔하게 실시되는 방법이다. 많은 경우, 세포는 용해 용액, 통상적으로 세제를 포함한 알칼리성 용액, 또는 용해 효소 용액과 접촉한다. 이러한 용해 용액은 전형적으로 염, 세제 및 완충제, 뿐만 아니라 숙련가가 사용을 이해하는 기타 제제를 함유한다. 완전한 및/또는 부분적인 용해 후, 핵산은 용해 용액으로부터 회수된다.

[0059] 일부 양태에서, 세포는 약 pH 4 내지 약 10, 약 5 내지 약 9, 약 6 내지 약 8 또는 약 7 내지 약 9 범위의 pH로 수성 버퍼 중에 재현된다.

[0060] 일부 양태에서, 버퍼 염 농도는 약 10mM 내지 약 200mM, 약 10mM 내지 약 100mM 또는 약 20mM 내지 약 80mM이다.

[0061] 일부 양태에서, 버퍼는 추가로 칼레이트화제, 예를 들면, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 또는 에틸렌 글리콜 테트라아세트산(EGTA)을 포함한다.

[0062] 일부 양태에서, 용해 용액은 추가로 세포로부터 핵산 방출을 보조하는 기타 화합물, 예를 들면, 수크로스를 포함하지만 이에 한정되지 않는 폴리올, 뿐만 아니라 당 알코올, 예를 들면, 말티톨, 소르비톨, 크실리톨, 에리트리톨, 및/또는 이소말트를 포함한다. 일부 양태에서, 폴리올은 약 2% 내지 약 15%(w/w), 또는 약 5% 내지 약 15%(w/w) 또는 약 5% 내지 약 10%(w/w) 범위이다.

[0063] 일부 양태에서, 용해 용액은 추가로 계면활성제, 예를 들면, 이에 한정되지 않지만, 트리تون(Triton) X-100, SDS, CTAB, X-114, CHAPS, DOC, 및/또는 NP-40를 포함한다. 일부 양태에서 이러한 계면활성제는 약 1% 내지 약 5%(w/w), 약 1% 내지 약 4%(w/w), 또는 약 1% 내지 약 3%(w/w) 범위이다.

[0064] 일부 양태에서, 용해 용액은 추가로 카오트로프, 예를 들면, 우레아, 나트륨 도데실 살페이트 및/또는 티오우레아를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 양태에서, 카오트로프는 약 0.5M 내지 8M, 약 1M 내지 약 6M, 약 2M 내지 약 6M 또는 약 1M 내지 3M 범위의 농도로 사용된다.

[0065] 일부 양태에서, 용해 용액은 추가로 하나 이상의 추가의 용해 시약을 포함하고, 이러한 용해 시약은 당해 분야

에 잘 알려져 있다. 일부 양태에서, 이러한 용해 시약은 세포벽 용해 효소, 예를 들면, 리소자임을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 양태에서, 용해 시약은 알칼리성 세제 용액, 예를 들면, 0.5% 나트륨 도데실 설피아이트를 함유하는 0.1 수성 수산화나트륨을 포함한다.

[0067] 일부 양태에서, 용해 용액은 추가로 수성 당 용액, 예를 들면, 수크로스 용액 및 킬레이트화제, 예를 들면, EDTA, 예를 들면, STET 버퍼를 포함한다. 특정한 양태에서, 용해 시약은 세포 혼탁액을 목적하는 농도의 2배(예를 들면, 0.2 수산화나트륨, 1.0% 나트륨 도데실 설피아이트)의 동일 용적의 용해 용액과 혼합함으로써 제조된다.

[0068] 일부 양태에서, 목적하는 정도의 용해가 달성된 후, 용해 용액 및 용해된 세포를 포함하는 혼합물을 중화 또는 퀘칭(quenching) 시약과 접촉시켜, 용해 시약이 목적하는 생성물에 불리한 영향을 가하지 않도록 조건을 조절한다. 일부 양태에서, pH는 pH 약 5 내지 약 9, 약 6 내지 약 8, 약 5 내지 약 7, 약 6 내지 약 7 또는 약 6.5 내지 7.5로 조절되어, 예를 들면, 핵산을 포함하지만 이에 한정되지 않는 세포 내용물의 분해를 최소화하고/최소화하거나 방지한다. 일부 양태에서, 용해 시약이 알칼리성 용액을 포함하는 경우, 중화 시약은 산성 버퍼, 예를 들면, 알칼리 금속 아세테이트/아세트산 버퍼를 포함한다. 일부 양태에서, 용해 조건, 예를 들면, 온도 및 용해 시약의 조성은, 예를 들면, 핵산을 포함하지만 이에 한정되지 않는 목적하는 생성물의 분해를 최소화하면서 용해가 실질적으로 완료되도록 선택되었다.

[0069] 일부 양태에서, 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 제12, 제13, 제14, 제15 또는 제20 용해 용액이 방법에 사용된다. 일부 양태에서, 사용되는 용해 버퍼의 용적은 약 10 $\mu$ l, 약 20 $\mu$ l, 약 30 $\mu$ l, 약 40 $\mu$ l, 약 50 $\mu$ l, 약 60 $\mu$ l, 약 70 $\mu$ l, 약 80 $\mu$ l, 약 90 $\mu$ l, 약 100 $\mu$ l, 약 120 $\mu$ l, 약 130 $\mu$ l, 약 140 $\mu$ l, 약 150 $\mu$ l, 160 $\mu$ l, 약 170 $\mu$ l, 약 180 $\mu$ l, 약 190 $\mu$ l, 약 200 $\mu$ l, 약 220 $\mu$ l, 약 230 $\mu$ l, 약 240 $\mu$ l, 약 250 $\mu$ l, 약 260 $\mu$ l, 약 270 $\mu$ l, 약 280 $\mu$ l, 약 290 $\mu$ l, 약 300 $\mu$ l, 약 320 $\mu$ l, 약 330 $\mu$ l, 약 340 $\mu$ l, 약 350 $\mu$ l, 약 360 $\mu$ l, 약 370 $\mu$ l, 약 380 $\mu$ l, 약 390 $\mu$ l, 약 400 $\mu$ l, 약 500 $\mu$ l, 약 600 $\mu$ l, 약 700 $\mu$ l, 약 800 $\mu$ l, 약 900 $\mu$ l 또는 약 1000 $\mu$ l이다. 일부 양태에서, 용해 버퍼는 약 10 $\mu$ l 내지 약 400 $\mu$ l, 약 20 $\mu$ l 내지 약 400 $\mu$ l, 약 50 $\mu$ l 내지 약 300 $\mu$ l, 약 50 $\mu$ l 내지 약 200 $\mu$ l, 약 50 $\mu$ l 내지 약 400 $\mu$ l, 약 100 $\mu$ l 내지 약 400 $\mu$ l, 약 10 $\mu$ l, 약 300 $\mu$ l, 약 100 $\mu$ l 내지 약 200 $\mu$ l, 약 200 $\mu$ l 내지 약 500 $\mu$ l, 약 100 $\mu$ l 내지 약 1000 $\mu$ l, 약 200 $\mu$ l 내지 약 1000 $\mu$ l, 약 300 $\mu$ l 내지 약 200 $\mu$ l, 약 500 $\mu$ l 내지 약 600 $\mu$ l 내지 약 1000 $\mu$ l이다.

[0070] 상기 임의의 조합 뿐만 아니라 기타 공지되거나 일상적인 방법과 조합되어 숙련가에 의해 사용될 수 있고, 이러한 조합은 본 발명으로 고려된다.

## V. 용해 버퍼로부터의 핵산 정제

[0072] 일부 양태에서, 예를 들면, 게놈 DNA를 포함하지만 이에 한정되지 않는 핵산은 후속적인 분석을 수행하기 전에 용해 버퍼로부터 분리된다(118, 도 1a). 일부 양태에서, 핵산은 추가의 분석, 예를 들면, 이에 한정되지 않지만, 실시간 PCR 분석의 수행 전에 용해 버퍼로부터 분리된다. 소량의 핵산의 분리에 유용한 다양한 임의의 방법이 기재된 방법의 다양한 양태에서 사용된다. 이들은 침전, 겔 여과, 밀도 구배 및 고체상 결합을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 이러한 방법은 또한 문헌 [Molecular Cloning(three volume set, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012)] 및 [Current Protocols(Genetics and Genomics; Molecular Biology; 2003-2013)]에 기재되었고, 이들은 모든 면에서 본원에 참조로서 인용된다.

[0073] 핵산 침전은 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 분리 방법이다. 이에 한정되지 않지만 고체상을 비드(예를 들면, 실리카, 자석), 컬럼, 막 형태 또는 당해 분야에 공지된 임의의 다양한 기타 물리적 형태로 사용하는 고체상 결합 방법을 포함하여 다양한 고체상 결합 방법이 또한 당해 분야에 알려져 있다. 일부 양태에서, 기재된 방법에서 사용된 고체상은 핵산에 가역적으로 결합한다. 이러한 고체상의 예는 둘 이상의 고체상의 혼합물이며 각각은 상이한 용액 조건하에 핵산에 대한 수용력, 및 상이한 조건하에 핵산을 방출하는 능력 및/또는 수용력을 갖는 소위 "혼상(mixed-bed)" 고체상; 예를 들면, 미국 특허 출원 제2002/0001812호에 기재된 것들을 포함하고, 이는 모든 면에서 그 전문이 본원에 참조로서 인용된다. 기재된 방법에 따른 핵산에 대한 고체상 친화력은 전형적으로 용질을 기재에 결합시키는데 사용되는 다수의 수단 중 임의의 하나를 통할 수 있다. 이러한 수단의 예는 이온 상호작용(예를 들면, 음이온-교환 크로마토그래피) 및 소수성 상호작용(예를 들면, 역상 크로마토그래피), pH 분별 및 변화, 염 분별 및 변화(예를 들면, 농도 변화, 카오트로프 염/제제의 사용)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 예시적인 pH 기반 고체상은 낮은 pH(<6.5)에서 핵산에 결합하고 높은 pH(>8.5)에서 핵산을 방출하는 인비트로젠 차지스위치 노멀라이즈드 베컬 키트(ChargeSwitch Normalized Buccal Kit) 자석 비드에서 사용되는 것들 및 7.5 미만의 pH에서 핵산에 결합하고 8 초과의 pH에서 핵산을 방출하는 모노-아미노-N-아미노에틸(MANAE)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 예시적인 이온 교환 기반 기재는 파마시아(PHARMACIA,

Piscataway, N.J.)로부터의 DEAE-SEPHAROSE™, Q-SEPHAROSE™, 및 DEAE-SEPHADEX™, 다음 케미칼 컴퍼니(Dow Chemical Company, Midland, Mich.)로부터의 DOWEX® I, 롬앤하스(Rohm & Haas, Philadelphia, Pa.)로부터의 AMBERLITE®, 듀오라이트 인터내셔널 인(Duolite International, In., Cleveland, Ohio)으로부터의 DUOLITE®; DIALON TI 및 DIALON TIL를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

- [0074] 임의의 개별적인 방법은 단독으로 또는 다른 방법과 조합으로 사용되는 것이 고려되고, 이러한 유용한 조합은 잘 알려져 있고 당해 분야의 숙련가에게 인식된다.

## VI. 핵산 분석

- [0075] 기재된 방법은 계놈 분석을 포함한 다양한 핵산 분석을 위하여 핵산, 예를 들면, 계놈 DNA(gDNA)를 분리하는데 사용된다. 일부 양태에서, 방법은 분리된 계놈 DNA에서 질환 또는 질병과 관련된 대립유전자의 존재를 검출하는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 이러한 분석은 하나 이상의 결절, 삽입, 전이 및 전좌를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 유전적 돌연변이의 검출을 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이는 단일-뉴클레오티드 다형성(SNP)이다.

- [0077] 이러한 분리된 핵산, 예를 들면, 이에 한정되지 않지만, 계놈 DNA(gDNA)를 분석하는 다양한 방법이 당해 분야에 알려져 있고, PCR 방법, 예를 들면, 실시간 PCR 분석, 마이크로어레이 분석, 혼성화 분석 및 핵산 서열 분석, 뿐만 아니라 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 핵산 조성물이 분석되는 다양한 기타 방법을 포함한다. 예를 들면, 문헌 [Molecular Cloning(three volume set, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012)] 및 [Current Protocols(Genetics and Genomics; Molecular Biology; 2003-2013)]을 참조한다.

### a. 실시간 PCR

- [0079] 실시간 PCR 검정의 디자인을 위하여, 앰플리콘(amplicon)으로도 종종 언급되는, 2개의 프라이머 측면에 있고 후속적으로 증폭되는 DNA 단편, 2개의 프라이머 및 사용되는 검출 프로브 또는 프로브들을 포함하는 몇몇 부분들이 조정된다.

- [0080] 실시간 PCR은 서열-특이적 방식으로 계놈 대립유전자와 관련된 짧은 폴리뉴클레오티드("검출 프로브"로 지칭됨)에 컨쥬게이션(conjugation)된 형광 염료의 가시적 방사에 의존한다. 단일 뉴클레오티드와 상이한 실시간 PCR 프로브는 상이한 파장에서 형광을 방출하는 프로브의 컨쥬게이션 및 검출에 의하여 실시간 PCR 검정과 구별될 수 있다. 실시간 PCR은 검출 적용(진단적 적용), 정량적 적용 및 유전형 적용에서 사용될 수 있다.

- [0081] 실시간 PCR을 수행하기 위한 몇몇 관련 방법이 당해 분야에 기재되어 있고, TaqMan 프로브(미국 특허 제5,210,015호 및 제5,487,972호, 및 [Lee et al., *Nucleic Acids Res.* 21:3761-6, 1993]), 분자 비콘 프로브(미국 특허 제5,925,517호 및 제6,103,476호, 및 [Tyagi and Kramer, *Nat. Biotechnol.* 14:303-8, 1996]), 셀프-프로빙(self-probing) 앰플리콘(스코피온)(미국 특허 제6,326,145호, 및 [Whitcombe et al., *Nat. Biotechnol.* 17:804-7, 1999]), 앰플리센서(Amplisensor)(Chen et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4210-6, 1998), 앰플리피우오르(AMPLifiuor)(미국 특허 제6,117,635호, 및 [Nazarenko et al., *Nucleic Acids Res.* 25:2516-21, 1997]), 변위 혼성화(치환 혼성화) 프로브(Li et al., *Nucleic Acids Res.* 30:E5, 2002), DzyNA-PCR(Todd et al., *Clin. Chem.* 46:625-30, 2000), 형광 제한 효소 검출(Cairns et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318:684-90, 2004) 및 인접 혼성화 프로브(미국 특허 제6,174,670호 및 [Wittwer et al., *Biotechniques* 22:130-1, 134-8, 1997]).

- [0082] 일부 예에서, 실시간 PCR은 예를 들면, SNP를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 유전자 돌연변이의 검출을 야기할 수 있다. 일부 양태에서, 특이적인 유전자 후보에서 SNP의 검출은 둑인 퀘enching 잔기의 사용에 의해 형광 분자의 분자내 퀘enching의 사용을 기반으로 한 실시간 PCR을 사용하여 수행된다. 따라서, 예시적인 양태에 따라, 실시간 PCR 방법은 또한 분자 비콘 기술의 사용을 포함한다. 분자 비콘 기술은 흥미있는 DNA 표적에 결합함으로써 형광성이 복원되는 내부-퀘enching된 형광단을 갖는 헤파린형 분자를 이용한다(예를 들면, 문헌 [Kramer, R. et al. *Nat. Biotechnol.* 14:303-308, 1996] 참조). 일부 양태에서, 분자 비콘 프로브의 축척되는 PCR 생성물에 대한 증가된 결합은 계놈 DNA에 존재하는 SNP를 특이적으로 검출하는데 사용된다.

- [0083] 많은 적합한 유전자형분석 방법 중 하나는 TaqMan 대립유전자 식별 검정이다. 당해 검정의 일부 예에서, 프로브의 5' 말단에서 형광 리포터 염료 및 프로브의 3' 말단에서 퀘처(quencher) 염료에 의해 표지된 올리고뉴클레오티드 프로브가 이용된다. 온전한 프로브에 대한 퀘처의 근접성은 리포터의 낮은 형광성을 유지한다. PCR 반응 동안, DNA 폴리머라제의 5' 뉴클레아제 활성을 프로브를 절단하고 염료와 퀘처를 나눈다. 이는 리포터의 형광성 증가를 야기한다. PCR 생성물의 축척은 리포터 염료의 형광성 증가를 모니터링함으로써 직접적으로 검출된다.

DNA 폴리머라제의 5' 뉴클레아제 활성은 프로브가 표적에 혼성화하는 경우에만 리포터와 펜처 사이의 프로브를 절단하고, PCR 동안 증폭된다. 프로브는 표적 SNP 위치에 걸치고, 특정 SNP 대립유전자가 존재하는 경우에만, 핵산 분자에 혼성화되도록 설계된다.

[0084] 예의 방식으로, TGFBI 유전자의 엑손 4에 위치한 아벨리노 각막 이상증 관련 SNP를 증폭하기 위하여, 정방향 및 역방향 PCR 프라이머 쌍(도 2에서 서열 번호: 1 내지 24)을 미국 특허 출원 제2012/0077200호에 기재된 바와 같이 구성하였다. 일부 양태에서, 그 안에 기재된 임의의 정방향 및 역방향 프라이머 쌍은 본원에 기재된 개선된 방법에서 사용된다. 바람직한 양태에서, 서열 번호: 1(정방향) 및 서열 번호: 2(역방향)의 정방향 및 역방향 프라이머 쌍은 본원에 제공된 개선된 방법에서 사용된다.

[0085] TGFBI 유전자의 엑손 4에서 구아닌-투-아데닌 돌연변이를 검출하기 위하여, 도 3에 도시된 서열 번호: 25 내지 42에 따른 뉴클레오티드 서열을 갖는, 야생형("G") 및 아벨리노 각막 이상증-관련 돌연변이형("A") 대립유전자의 검출을 위한 형광 표지된 실시간 PCR 프로브 쌍을 미국 특허 출원 제2012/0077200호에 기재된 바와 같이 구성하였다. 일부 양태에서, 임의의 야생형 및 돌연변이형 프로브는 본원에 기재된 개선된 방법에서 사용된다. 바람직한 양태에서, 서열 번호: 25(야생형) 및 서열 번호: 26(돌연변이형)의 야생형 및 돌연변이형 프로브 쌍은 본원에 제공된 개선된 방법에서 사용된다. 질환-관련 대립유전자로부터 야생형 대립유전자를 구별하기 위하여, 야생형 프로브를 VIC로 표지하고, 돌연변이형 프로브를 FAM으로 표지한다. 마이너 그루브 바인더(MGB: minor groove binder)는 프로브에 부착되어 상보적인 유전자 단편에 대한 결합을 촉진하였다.

#### b. 실시간 PCR 사이클

[0086] 실시간 PCR 방법은 증폭을 위한 방법의 부분으로서 다양한 단계 또는 사이클을 포함한다. 이들 사이클은 이중-가닥 핵산의 변성, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 표적 계놈 DNA 서열에 대한 검출 프로브의 어닐링(annealing) 및 어닐링된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로부터의 제2-가닥 DNA의 합성(즉, 복제)를 포함한다. 이러한 세 단계 과정은 본원에서 하나의 사이클로서 언급된다.

[0087] 일부 양태에서, 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60 사이클이 사용된다. 일부 양태에서, 약 10 내지 약 60 사이클, 약 20 내지 약 50 또는 약 30 내지 약 40 사이클이 사용된다. 일부 양태에서, 40 사이클이 사용된다.

[0088] 일부 양태에서, 이중-가닥 핵산의 변성 단계는 약 80°C 내지 100°C, 약 85°C 내지 약 99°C, 약 90°C 내지 약 95°C의 온도에서 약 1초 내지 약 5초, 약 2초 내지 약 5초 또는 약 3초 내지 약 4초 동안 발생한다. 일부 양태에서, 이중-가닥 핵산의 변성 단계는 95°C의 온도에서 약 3초 동안 발생한다.

[0089] 일부 양태에서, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 표적 계놈 DNA 서열에 대한 검출 프로브의 어닐링 단계는 약 40°C 내지 약 80°C, 약 50°C 내지 약 70°C, 약 55°C 내지 약 65°C에서 약 15초 내지 약 45초, 약 20초 내지 약 40초, 약 25초 내지 약 35초 동안 발생한다. 일부 양태에서, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 표적 계놈 DNA 서열에 대한 검출 프로브의 어닐링 단계는 약 60°C에서 약 30초 동안 발생한다.

[0090] 일부 양태에서, 어닐링된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로부터의 제2-가닥 DNA의 합성(즉, 복제) 단계는 약 40°C 내지 약 80°C, 약 50°C 내지 약 70°C, 약 55°C 내지 약 65°C에서 약 15초 내지 약 45초, 약 20초 내지 약 40초, 약 25초 내지 약 35초 동안 발생한다. 일부 양태에서, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 표적 계놈 DNA 서열에 대한 검출 프로브의 어닐링 단계는 약 60°C에서 약 30초 동안 발생한다.

[0091] 일부 양태에서, 어닐링된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로부터의 제2-가닥 DNA의 합성(즉, 복제) 단계는 약 40°C 내지 약 80°C, 약 50°C 내지 약 70°C, 약 55°C 내지 약 65°C에서 약 15초 내지 약 45초, 약 20초 내지 약 40초, 약 25초 내지 약 35초 동안 발생한다. 일부 양태에서, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 표적 계놈 DNA 서열에 대한 검출 프로브의 어닐링 단계는 약 60°C에서 약 30초 동안 발생한다.

[0092] 일부 양태에서, 본원에 기재된 본 발명의 방법에 따라 제조된 계놈 DNA 샘플 약 1 $\mu$ l, 약 2 $\mu$ l, 약 3 $\mu$ l, 약 4 $\mu$ l 또는 약 5 $\mu$ l는 겨우 30X, 35X, 40X, 45X, 50X 또는 100X 실시간 PCR 마스터 믹스(master mix) 약 0.05 $\mu$ l, 약 0.10 $\mu$ l, 약 0.15 $\mu$ l, 약 0.20 $\mu$ l, 약 0.25 $\mu$ l, 또는 약 0.25 $\mu$ l와 조합되는 것으로 확인되었다. 일부 양태에서, 상기 기재된 바와 같이 제조된 계놈 DNA 샘플 2 $\mu$ l는 겨우 40X 맞춤 유전자형분석 검정 약 0.15 $\mu$ l와 조합되는 것으로 확인되었다.

[0093] 예시적인 반응이 본원에 기재되지만, 숙련가는 프로브 디자인을 기반으로 온도 및 시간을 조절하는 방법을 이해할 것이다. 게다가, 본 발명의 방법은 상기 시간 및 온도의 임의의 조합을 고려한다.

#### c. PCR 프라이머 및 프라이머 디자인

[0094] 일부 양태에서, 프라이머는 실험실 세팅에서 시험되고 설계된다. 일부 양태에서, 프라이머는 컴퓨터 기반 인 실리코(*in silico*) 방법에 의해 설계된다. 프라이머 서열은 앰플리콘 서열 또는 증폭되는 표적 핵산 서열을 기반으로 한다. 긴 앰플리콘에 비해 짧은 앰플리콘이 전형적으로 더 효율적으로 복제되고 더 효율적인 증폭을 야기

한다.

[0096] 프라이머 설계에서, 숙련가는 설계되는 프라이머의 GC 및 AT 함량 뿐만 아니라 이차 구조 고려사항(증가된 GC 함량은 증가된 이차 구조를 야기할 수 있다)을 기반으로 하여, 용융 온도( $T_m$ ; 프라이머-표적 듀플렉스의 반이 해리되고 단일 가닥이 되며 듀플렉스 안정성의 지표인 온도; 증가된  $T_m$ 은 증가된 안정성을 나타낸다)를 고려할 필요가 있다.  $T_m$ 은 당해 분야에 알려진 다양한 방법을 사용하여 계산할 수 있고 숙련가는  $T_m$ 을 계산하는 이러한 다양한 방법을 용이하게 이해할 것이고; 이러한 방법은 월드 와이드 웹 [promga.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm](http://promga.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm)에서 이용할 수 있는  $T_m$  계산기와 같은 온라인 도구에서 이용 가능한 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 프라이머 특이성은 Taq 폴리머라제에 의해 신장된 부분인 3' 말단 서열과 조합으로 이의 완전한 서열에 의해 정의된다. 일부 양태에서, 3' 말단은 프라이밍-실패 및 부정확한 증폭 생성물의 생성을 감소시키는 것을 돋기 위하여, 표적 서열 이외에는 어느 곳에서 찾을 수 없는 5 내지 7개 이상의 고유한 뉴클레오티드를 가져야 한다. 정방향 및 역방향 프라이머는 전형적으로 표적에 유사한 효율로 결합한다. 일부 예에서, NCBI BLAST(월드 와이드 웹 [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)에 위치함)와 같은 도구를 정렬을 수행하고 프라이머 디자인을 보조하기 위하여 사용한다.

[0097] 당해 분야의 숙련가는 표적 핵산 서열을 위한 프라이머 디자인에 관한 기초를 잘 알 것이고, 예를 들면, 문헌 [Molecular Cloning(three volume set, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012)] 및 [Current Protocols(Genetics and Genomics; Molecular Biology; 2003-2013)] 및 [Real-time PCR in Microbiology: From Diagnostics to Characterization(Ian M. MacKay, Calster Academic Press; 2007)]; [월드 와이드 웹 [primerdigital.com/tools/PrimerAnalyser.html](http://primerdigital.com/tools/PrimerAnalyser.html)에서 이용가능한 프라이머아날라이저 자바 툴] 및 [Kalendor R, et al., (*Genomics*, 98(2): 137-144(2011))]를 포함하는 다양한 참조 매뉴얼 및 참고서에 이러한 방법에 대한 광범위한 교시가 기재되고, 이를 모두는 모든 면에서 그 전문이 본원에서 참조로서 인용된다.

[0098] 프라이머 디자인의 추가의 측면은 프라이머 복합도 또는 언어적 서열 복합도이다(문헌 [Kalendor R, et al., (*Genomics*, 98(2): 137-144(2011)) 참조). 더 큰 언어적 서열 복합도(예를 들면, 뉴클레오티드 배열 및 조성)를 갖는 프라이머가 전형적으로 더 효율적이다. 일부 양태에서, 언어적 서열 복합도 계산 방법은 단순 서열 반복, 불완전한 직접 또는 역전된 반복, 폴리퓨린 및 폴리피리미딘 삼중-가닥 cDNA 구조, 및 사중-가닥 구조(예를 들면, G-콰드로플렉스)를 포함하는 저-복합도 영역의 검출을 위하여 비교된 서열 사이에서 보존된 영역을 검색하는데 사용된다. 일부 양태에서, 언어적 복합도(LC) 측정은 전체 서열 길이에 따라 알파벳-용량 L-그램 방법(문헌 [A. Gabrielian, A. Bolshoy, *Computer & Chemistry* 23:263-274(1999)] 및 [Y.L. Orlov, V.N. Potapov, Complexity: an internet resource for analysis of DNA sequence complexity, *Nucleic Acids Res.* 32: W628-W633(2004)] 참조)을 사용하여 수행되고, 서열에서 1부터 L까지의 크기의 관찰된 범위( $x_i$ )의 합을 당해 서열 길이에 대한 예상(E) 값의 합으로 나눔으로써 계산된다. 일부 G-풍부(및 C-풍부) 핵산 서열은 G-사중의 스택을 함유하는 사중-가닥 DNA 구조으로 폴딩된다(월드 와이드 웹 [quadruplex.org](http://quadruplex.org) 참조). 일부 예에서, 이들 콰드로플렉스는 2 또는 4개의 DNA 문자의 문자간 연합, 2개의 G-염기를 함유하는 서열의 이합체화, 또는 4개 블록의 구아닌을 함유하는 단일 가닥의 문자간 폴딩에 의해 형성되고(문헌 [P.S. Ho, *PNAS*, 91:9549-9553(1994)]; [I.A. Il'icheva, V.L. Florent'ev, *Russian Journal of Molecular Biology* 26:512-531(1992)]; [D. Sen, W. Gilbert, *Methods Enzymol.* 211:191-199(1992)]; [P.A. Rachwal, K.R. Fox, *Methods* 43:291-301(2007)]; [S. Burge, G.N. Parkinson, P. Hazel, A.K. Todd, K. Neidle, *Nucleic Acids Res.* 34:5402-5415(2006)]; [A. Guédin, J. Gros, P. Alberti, J. Mergny, *Nucleic Acids Res.* 38:7858-7868(2010)]; [O. Stegle, L. Payet, J.L. Mergny, D.J. MacKay, J.H. Leon, *Bioinformatics* 25:i374-i382(2009)] 참조); 일부 예에서, 이들은 이들의 낮은 언어적 복합도,  $(TTAGGG)_4$ 에 대한 LC=32%, 때문에 프라이머 디자인으로부터 제외된다.

[0099] 이들 방법은 GC 스큐(skew),  $(G-C)/(G+C)$ , AT 스큐,  $(A-T)/(A+T)$ , CG-AT 스큐,  $(S-W)/(S+W)$ , 또는 CG 함량에 대한 퓨린-피리미딘( $R-Y)/(R+Y$ ) 스큐를 갖는 서열에서 패턴 분석 및 용융 온도에 대한 다양한 생물정보 도구를 포함하고, 언어적 서열 복합도 프로파일을 측정하기 위한 도구를 제공한다. 예를 들면, n의 슬라이딩 창에서 GC 스큐에 있어서, 여기서 n은 양의 정수이고, 염기는 식  $(G-C)/(G+C)$ 에 따라 하나의 염기의 하나의 단계로서 계산되고, 여기서 창의 모든 서열에 있어서 G는 구아닌의 총 수이고 C는 시토신의 총 수이다(Y. Benita, et al., *Nucleic Acids Res.* 31:e99(2003)). 양 GC-스큐 값은 G 염기의 과잉을 나타내는 반면, 음 GC-스큐 값은 C 염기의 과잉을 나타낸다. 유사하게, 기타 스큐는 서열에서 계산된다. 이러한 방법 뿐만 아니라 기타 방법이 일부 양태에서 프라이머 복합도를 측정하는데 사용된다.

[0100]

비제한적 예시적 양태에 따라, 실시간 PCR은 엑소뉴클레아제 프라이머(TAQMAN® 프로브)를 사용하여 수행된다. 이러한 양태에서, 프라이머는 Taq와 같은 내열성 폴리머라제의 5' 엑소뉴클레아제 활성을 이용하여 증폭 반응에 존재하는 이중-표지된 프로브를 절단한다(예를 들면, 문헌 [Wittwer, C. et al. Biotechniques 22: 130-138, 1997] 참조). PCR 생성물과 상보적으로, 당해 검정에서 사용되는 프라이머 프로브는 PCR 프라이머와 구별되고, 형광일 수 있는 분자 및 형광을 훤칭할 수 있는 분자 둘 다에 의해 이중-표지된다. 프로브가 온전한 경우, DNA 프로브 사이의 형광 신호의 문자내 훤칭은 작은 신호를 야기한다. 형광성 문자가 증폭 동안 Taq의 엑소뉴클레아제 활성에 의해 유리되는 경우, 훤칭은 증가된 형광 신호의 유발을 크게 감소시킨다. 비제한적인 예시적 형광성 프로브는 6-카르복시-풀루오레세인 잔기 등을 포함한다. 예시적인 훤처는 블랙 홀 훤처 1(Black Hole Quencher 1) 잔기 등을 포함한다.

[0101]

다양한 PCR 프라이머는 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 예시적인 프라이머는 본원에 기재된 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 기재된 방법에 사용하기 위한 프라이머는 또한 미국 특허 출원 제20120077200호에서 찾을 수 있고, 이는 모든 면에서 본원에 참조로서 인용된다. 일부 양태에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 PCR 프라이머는 하기 표 1에 열거된 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, TGFBI 유전자의 검출에 사용될 수 있다. 표 2 및 3은 월드 와이드 웹 [primerdigital.com/tools/PrimerAnalyser.html](http://primerdigital.com/tools/PrimerAnalyser.html)를 사용하여 계산된 바와 같은, 각각의 프라이머에 대한 생물리학 파라미터를 제공한다.

[0102]

표 1: TGFBI 유전자에 대한 예시적인 프라이머

프라이머 명칭	서열 번호:	프라이머 서열
ACD Fw 프라이머	서열 번호: 1	5'-TCC ACC ACC ACT CAG CTG TA
ACD Re 프라이머	서열 번호: 2	5'-CCA TCT CAG GCC TCA GCT T (60 bp)
AV Fw 프라이머	서열 번호: 3	5'-TGC AGC CCT ACC ACT CTC AA
AV Re 프라이머	서열 번호: 4	5'-AGG CCT CGT TGC TAG G (150 bp)
리얼 Fw 프라이머	서열 번호: 5	5'-TAG TCT CTT ATT CTA ATA GA
리얼 Re 프라이머	서열 번호: 6	5'-GCT GCA GAC TCT GTG TTT AA (860 bp)
ACD Fw2 프라이머	서열 번호: 7	5'-CCA TCC CTC CTT CTG TCT TCT G
ACD Re2 프라이머	서열 번호: 8	5'-CGG GCC CCT CCA TCT C (140 bp)
ACD Fw3 프라이머	서열 번호: 9	5'-CAG AGA AGG GAG GGT GTG GTT
ACD Re3 프라이머	서열 번호: 10	5'-GGG CGA AGA TGG TGA AGC T (190 bp)
ACD Fw4 프라이머	서열 번호: 11	5'-TCC TCG TCC TCT CCA CCT GTA
ACD Re4 프라이머	서열 번호: 12	5'-AGC TGG CAA GGA GGC CC
ACD Fw5 프라이머	서열 번호: 13	5'-TTT GGG CTT TCC CAC ATG C
ACD Re5 프라이머	서열 번호: 14	5'-GGC AGA CGG AGG TCA TCT CA
ACD Fw6 프라이머	서열 번호: 15	5'-GTA GTA CCG TGC TCT CTG
ACD Re6 프라이머	서열 번호: 16	5'-AGT TCC CCA TAA GAA TCC CCC
ACD Fw7 프라이머	서열 번호: 17	5'-GGC TGG ACC CCC AGA GG
ACD Re7 프라이머	서열 번호: 18	5'-ACC CCT CGG GGA AGT AAG G
ACD Fw8 프라이머	서열 번호: 19	5'-AAC CTT TAC GAG ACC CTG GGA
ACD Re8 프라이머	서열 번호: 20	5'-GAC TCC CAT CCA TCA TGC CC
ACD Fw9 프라이머	서열 번호: 21	5'-AGT CGT TGG ATC CAC CAC CA
ACD Re9 프라이머	서열 번호: 22	5'-GAC GTC ATT TCC TAC TGT TTC AGG
ACD Fw10 프라이머	서열 번호: 23	5'-CCC CCC AGA AAC AGC CTG
ACD Re10 프라이머	서열 번호: 24	5'-TTC TAA GGG GTT AAG GAG AAA GCT T

[0103]

[0104]

표 2: 정방향 프라이머에 대한 생물리학 파라미터

정방향 프라이머	길이	Tm1	Tm2	GC 함량	% 복합도	PCR 효율
서열 번호: 1	19	55.4	57.8	57.9	70	70
서열 번호: 3	20	57.1	58	55	81	66
서열 번호: 5	20	40.2	45.7	25	73	38
서열 번호: 7	22	55.9	60.2	54.5	62	43
서열 번호: 9	21	57.5	60.2	57.1	64	40
서열 번호: 11	21	57.6	60.2	57.1	66	57
서열 번호: 13	19	55.4	55.7	52.6	81	80
서열 번호: 15	18	50.6	55.3	55.6	75	66
서열 번호: 17	17	57.8	62.2	76.5	74	60
서열 번호: 19	21	56.6	58.2	52.4	82	73
서열 번호: 21	20	57.4	58	55	78	46
서열 번호: 23	18	56.5	59.9	66.7	69	69
평균	19.67	54.96	57.80	56.05	72.69	59.85
중간값	20	56.55	58.1	55.3	73.5	63
표준 편차	1.50	5.00	4.24	11.78	6.84	14.10

[0105]

표 3: 역방향 프라이머에 대한 생물리학 파라미터

역방향 프라이머	길이	Tm1	Tm2	GC 함량	% 복합도	PCR 효율
서열 번호: 2	19	55.5	57.8	57.9	72	52
서열 번호: 4	16	52.1	54.5	62.5	78	78
서열 번호: 6	20	52.4	53.9	45	84	41
서열 번호: 8	16	55.2	59.6	75	63	53
서열 번호: 10	19	56.5	57.8	57.9	78	69
서열 번호: 12	17	58.5	59.8	70.6	74	66
서열 번호: 14	20	57.6	60.1	60	84	74
서열 번호: 16	21	54.9	58.2	52.4	71	51
서열 번호: 18	19	56.6	60	63.2	78	60
서열 번호: 20	20	56.5	60.1	60	65	65
서열 번호: 22	24	55.5	58.7	45.8	88	67
서열 번호: 24	25	55.3	57.2	40	74	40
평균	19.69	55.61	58.13	57.33	76.54	60.69
중간값	19.5	55.5	58.45	58.95	76	62.5
표준 편차	2.77	1.86	2.10	10.33	7.52	12.30

[0107]

일부 양태에서, 기재된 방법에 사용하기 위한 실시간 PCR 프라이머는 70% 이상, 72% 이상, 75% 이상, 77% 이상, 80% 이상, 82% 이상, 85% 이상, 88% 이상, 90% 이상, 92% 이상, 95% 이상, 97% 이상 또는 99% 이상의 언어적 서열 복합도를 갖는다.

[0108]

#### d. 검출 프로브 디자인 및 검출 프로브

다양한 검출 프로브는 기재된 방법에 사용될 수 있고, 유전자형분석 및/또는 정량화에 사용된다. 가수분해 프로브(Taq-Man 프로브, 5' 뉴클레아제 프로브 또는 이중-표지된 프로브로도 알려짐), 혼성화 프로브, 및 스코피온 프라이머(한 문자 내에 프라이머 및 검출 프로브가 조합됨)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 검출 프로브는 통상적으로 당해 분야의 숙련가에 의해 사용된다. 일부 양태에서, 검출 프로브 디자인은 목적하는 프로브 표적을 기반으로 당해 분야의 숙련가에 의해, 프로브가 사용된 PCR 프라이머와 혼화성이 되도록(예를 들면, 프라이머 및 프로브는 실시간 PCR 검정에서 서로의 기능을 방해하지 말아야 한다) 결정된다. 일부 양태에서, 프로브는 효율적인 신호 생성을 촉진하기 위하여 프라이머 보다 높은  $T_m$ 을 갖도록 설계된다.  $T_m$ 은 당해 분야에 공지된 다양한 임의의 방법을 사용하여 계산되고, 숙련가는 이러한 다양한  $T_m$  계산 방법을 용이하게 이해할 것이고; 이러한

방법은, 예를 들면, 월드 와이드 웹 [promga.com/techserv/tools/biomath/calcl1.htm](http://promga.com/techserv/tools/biomath/calcl1.htm)에서 이용가능한 계산기와 같은 온라인 도구에서 이용가능한 것들을 포함한다. 일부 양태에서, 검출 프로브의 증가된  $T_m$ 은 프라이머가 폴리머라제에 의해 신장되기 전에 검출 프로브가 결합되는 것을 제공한다.

[0111] 일부 양태에서, 검출 프로브는 다양한 개질(변형)을 포함한다. 일부 양태에서, 검출 프로브는 개질된 핵산 잔여물, 예를 들면, 이에 한정되지 않지만, 2'-0-메틸 리보뉴클레오티드 개질, 포스포로티오에이트 골격 개질, 포스포로디티오에이트 골격 개질, 포스포라미데이트 골격 개질, 메틸포스포네이트 골격 개질, 3' 말단 포스페이트 개질 및 3' 알킬 치환을 포함한다.

[0112] 일부 양태에서, 검출 프로브는 개질로 인하여 표적 서열에 증가된 친화력을 갖는다. 이러한 검출 프로브는 증가된 길이의 검출 프로브 뿐만 아니라 화학적 개질을 포함하는 검출 프로브를 포함한다. 이러한 개질은 2'-플루오로(2'-데옥시-2'-플루오로-뉴클레오시드) 개질, LNA(잠금 핵산), PNA(펩티드 핵산), ZNA(집(zip) 핵산), 모르폴리노, 메틸포스포네이트, 포스포라미데이트, 다양이온성 컨쥬게이트 및 2'-파렌 개질을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 양태에서, 검출 프로브는 2'플루오로 개질(2'-데옥시-2'-플루오로-뉴클레오시드로도 알려짐), LNA(잠금 핵산), PNA(펩티드 핵산), ZNA(집 핵산), 모르풀리노, 메틸포스포네이트, 포스포라미데이트, 및/또는 다양이온성 컨쥬게이트를 포함하는 하나 이상의 개질을 포함한다.

[0113] 일부 양태에서, 검출 프로브는 검출가능 잔기, 예를 들면, 본원에 기재된 것들 뿐만 아니라 당해 분야의 숙련가에게 알려진 임의의 검출가능 잔기를 포함한다. 이러한 검출가능 잔기는, 예를 들면, 형광성 표지 및 화학발광 표지를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 이러한 검출가능 잔기의 예는 또한 FRET 쌍의 멤버를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 검출 프로브는 검출가능 독립체를 포함한다.

[0114] 형광성 표지의 예는 AMCA, DEAC(7-디에틸아미노쿠마린-3-카르복실산); 7-하이드록시-4-메틸쿠마린-3; 7-하이드록시쿠마린-3; MCA(7-메톡시쿠마린-4-아세트산); 7-메톡시쿠마린-3; AMF(4'-(아미노메틸)플루오레세인); 5-DTAF(5-(4,6-디클로로트리아지닐)아미노플루오레세인); 6-DTAF(6-(4,6-디클로로트리아지닐)아미노플루오레세인); 6-FAM(6-카르복시플루오레세인), 5(6)-FAM 카다베린; 5-FAM 카다베린; 5(6)-FAM 에틸렌디아민; 5-FAM 에틸렌디아민; 5-FITC(FITC 이성체 I; 플루오레세인-5-이소티오시아네이트); 5-FITC 카다베린; 플루오레세인-5-말레이미드; 5-IAF(5-요오도아세트아미도플루오레세인); 6-JOE(6-카르복시-4',5'-디클로로-2',7'-디메톡시플루오레세인); 5-CR110(5-카르복시로다민 110); 6-CR110(6-카르복시로다민 110); 5-CR6G(5-카르복시로다민 6G); 6-CR6G(6-카르복시로다민 6G); 5(6)-카록시로다민 6G 카다베린; 5(6)-카록시로다민 6G 에틸렌디아민; 5-ROX(5-카르복시-X-로다민); 6-ROX(6-카르복시-X-로다민); 5-TAMRA(5-카르복시테트라메틸로다민); 6-TAMRA(6-카르복시테트라메틸로다민); 5-TAMRA 카다베린; 6-TAMRA 카다베린; 5-TAMRA 에틸렌디아민; 6-TAMRA 에틸렌디아민; 5-TMR C6 말레이미드; 6-TMR C6 말레이미드; TR C2 말레이미드; TR 카다베린; 5-TRITC; G 이성체(테트라메틸로다민-5-이소티오시아네이트); 6-TRITC; R 이성체(테트라메틸로다민-6-이소티오시아네이트); 단실 카다베린(5-디메틸아미노나프탈렌-1-(N-(5-아미노펜틸))설폰아미드); EDANS C2 말레이미드; 플루오레스카민; NBD; 및 피로메텐 및 이의 유도체를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0115] 화학발광 표지의 예는 서던 블롯(Southern Blot) 및 웨스턴 블롯(Western Blot) 프로토콜과 사용되는 표지를 포함하지만 이에 한정되지 않는다(예를 들면, 본원에 그 전문이 참조로서 인용되는 문헌 [Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (3rd ed.) (2001)] 참조). 예는 -(2'-스피로아다만탄)-4-메톡시-4-(3"-포스포릴옥시)페닐-1,2-디옥세탄(AMPPD); 아크리디늄 에스테르 및 아다만틸-안정화된 1,2-디옥세탄, 및 이의 유도체를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0116] 프로브의 표지화는 당해 분야에 알려져 있다. 표지된 프로브는 증폭 동안 증폭된 영역 사이에서 혼성화에 사용된다. 프로브는 증폭을 위하여 프라이머로서 작용하는 것을 회피하게 하기 위하여 개질된다. 검출 프로브는 2개의 형광성 염료로 표지되고, 하나는 기타 염료의 형광을 훈칭할 수 있다. 하나의 염료는 프로브의 5' 말단에 부착되고, 다른 하나는 내부 부위에 부착되어 프로브가 비-혼성화 상태일 때 훈칭이 발생한다.

[0117] 전형적으로, 실시간 PCR 프로브는 형광 공명 에너지 전이(FRET)에 포함된 한 쌍의 염료(리포터 염료 및 수용체 염료)로 이루어지고, 이로써 수용체 염료는 리포터 염료의 방사를 훈칭시킨다. 일반적으로, 형광-표지된 프로브는 앰플리콘 정량화의 특이성을 증가시킨다.

[0118] 기재된 방법의 일부 양태에서 사용되는 실시간 PCR은 또한 본 출원의 관점에서, 당해 분야의 숙련가에게 결정되는 바와 같은, 하나 이상의 혼성화 프로브(즉, 검출 프로브)의 사용을 포함한다. 비제한적인 예로서, 이러한 혼성화 프로브는 기재된 방법에 제공된 것들 중 하나 이상을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 예시적인 프로브,

예를 들면, HEX 채널 및/또는 FAM 채널 프로브가 당해 분야의 숙련가에게 이해된다.

[0119] 예시적인 양태에 따라, 검출 프로브 및 프라이머는, 예를 들면, 프라이머 디자인 소프트웨어를 사용하는 인 실리코 분석 및 국립생물공학정보센터(NCBI: National Center for Biotechnology Information)에 있는 유전자 및 게놈의 이용 가능한 뉴클레오티드 데이터베이스에 대한 상호-참조를 사용하여 편리하게 선택된다. 일부 추가의 지침이 일부 양태에서 프라이머 및/또는 프로브의 선택을 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 일부 양태에서, 프라이머 및 프로브는 겹치지는 않지만 서로 근접하게 선택된다. 일부 양태에서, 프라이머는 동일한(또는 근접한)  $T_m$ (예를 들면, 약 58°C 내지 약 60°C)을 갖을 수 있다. 일부 양태에서, 프로브의  $T_m$ 은 프라이머의  $T_m$ 에 대해 선택된 것보다 약 10°C 높다. 일부 양태에서, 프로브 및 프라이머의 길이는 약 17 내지 39 염기 쌍 등으로 선택된다. 이를 및 기타 지침은 적절한 프라이머 및/또는 프로브의 선택에서 당해 분야의 숙련가에 의해 일부 예에서 사용된다.

[0120] 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 프로브는 표 4에 열거된 하기 예시적인 프로브를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

**표 4: TGFBI 유전자를 위한 예시적인 프로브**

프로브 명칭	서열 번호:	프로브 서열 :
정상 프로브 1	서열 번호:25	VIC-CAC GGA CCG CAC GGA-NFQ (15 bp)
돌연변이형 프로브1	서열 번호: 26	FAM-CAC GGA CCA CAC GGA-NFQ
정상 프로브 2	서열 번호:27	VIC-ACA CGG ACC GCA CG-NFQ
돌연변이형 프로브2	서열 번호:28	FAM-ACA CGG ACC ACA CG-NFQ (14 bp)
정상 프로브 3	서열 번호:29	VIC-TAC ACG GAC CGC A-NFQ
돌연변이형 프로브3	서열 번호:30	FAM-TAC ACG GAC CAC A-NFQ (13 bp)
정상 프로브 4	서열 번호:31	VIC-CTG TAC ACG GAC CGC ACG-NFQ
돌연변이형 프로브4	서열 번호:32	FAM-CTG TAC ACG GAC CAC ACG-NFQ (18 bp)
정상 프로브 5	서열 번호:33	VIC-CTG TAC ACG GAC CGC ACG GAG-NFQ
돌연변이형 프로브5	서열 번호:34	FAM-CTG TAC ACG GAC CAC ACG GAG-NFQ (21 bp)
정상 프로브 6	서열 번호:35	VIC-GCT GTA CAC GGA CCG CAC GGA GAA-NFQ
돌연변이형 프로브6	서열 번호:36	FAM-GCT GTA CAC GGA CCA CAC GGA GAA-NFQ
정상 프로브 7	서열 번호:37	VIC-ACC GCA CGG AGA AGC-NFQ
돌연변이형 프로브7	서열 번호:38	FAM-ACC ACA CGG AGA AGC-NFQ
정상 프로브 8	서열 번호:39	VIC-ACC GCA CGG AGA AGC TGA GGC-NFQ
돌연변이형 프로브8	서열 번호:40	FAM-ACC ACA CGG AGA AGC TGA GGC-NFQ
정상 프로브 9	서열 번호:41	VIC-ACC GCA CGG AGA AGC TGA GGC CTG-NFQ
돌연변이형 프로브9	서열 번호:42	FAM-ACC ACA CGG AGA AGC TGA GGC CTG-NFQ

[0122]

## VII. 진단 시험

[0123] 일부 양태에서, 진단 시험은 다양한 임의의 돌연변이의 검출에 의해 하나 이상의 유전적 조건을 측정하는데 사용된다. 일부 양태에서, 진단 시험은, 예를 들면, 신체적 소견, 징후 및/또는 증상 뿐만 아니라 가족병력 정보를 기반으로 특정 병태가 의심되는 경우에 진단을 확정하는데 사용된다. 일부 양태에서, 진단 시험의 결과는 주어진 환자를 위한 적절한 치료 계획을 결정함에 있어서 의학 분야의 숙련가를 보조하고, 더 개인화되고 더 효과적인 치료 계획을 가능하게 한다. 일부 양태에서, 치료 계획은 당해 분야의 숙련가에게 결정되는 바와 같이 임의의 다양한 약제학적 치료, 수술적 치료, 생활방식 변화 또는 이의 조합을 포함한다.

- [0125] 기재된 방법에 의해 수득된 혈산은 결실, 삽입, 전좌 및 전이와 같은 돌연변이를 검출하기 위한 시험을 포함하는 다양한 진단 시험에 유용하다. 일부 양태에서, 이러한 진단은 질환이 발현되는데 2개의 카페가 필요한 질환에 대하여 하나의 유전자 카페를 보유하는 영향을 받지 않은 개체의 확인, 치료 계획의 개발에 정보를 사용할 수 있는 질환에 대한 하나의 카페를 보유하는 영향을 받지 않은 개체의 확인, 착상전 유전자 진단, 태아기 진단 시험, 신생아 선별, 계보 DNA 시험(유전자 계보 목적을 위하여), 헌팅턴 무도병과 같은 성인-발병 질병을 예측하는 증상전 시험, 성인-발병 암 및 알츠하이머병의 발달 위험을 평가하기 위한 증상전 시험, 증상을 보이는 개체의 확정 진단, 및/또는 법의학적/동정 시험에 유용하다. 일부 양태에서, 본 발명의 방법은, 예를 들면, 아벨리노 각막 이상증-관련 SNP, 예를 들면, TGFBI 유전자에 R124 돌연변이(예를 들면, C(G/A)C SNP로도 언급되는 TGFBI 유전자의 뉴클레오티드 418에서 G에서 A로의 전이에 의해 유발된 R124H 돌연변이를 포함하지만 이에 한정되지 않음)를 야기하는 것들의 검출을 통해, 각막 이상증의 검출에 사용할 수 있다.
- [0126] 일부 양태에서, 신생아 선별은 유전적 질병을 확인하기 위하여 출산 직후 사용되는 임의의 유전자 선별을 포함한다. 일부 양태에서, 신생아 선별은 치료 계획이 인생 초기에 결정되도록 유전적 질병의 확인에 사용될 수 있다. 이러한 시험은 페닐케톤뇨증 및 선천성 갑상선기능저하증에 대한 유아 시험을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0127] 일부 양태에서, 캐리어 시험이 유전자 돌연변이의 단일 카페를 보유하는 사람들을 확인하는데 사용된다. 일부 경우, 2개의 카페가 존재하는 경우, 돌연변이는 유전적 질병을 야기할 수 있다. 일부 경우, 하나의 카페는 유전적 질병을 야기하는데 충분하다. 일부 경우, 2개의 카페의 존재는 주어진 환자에서 적절한 치료 계획의 추적을 보장하기 위하여, 특정한 치료 계획, 예를 들면, 수술적 시술 수행 전 아벨리노 돌연변이의 존재 및 예비-선별에 사용이 금지된다. 일부 양태에서, 이러한 정보는 또한 개별적인 출산 고려에 유용하거나 정보를 근거로 한 결정을 보조할 뿐만 아니라 의학 분야의 숙련자가 개별적인 환자에게 중요한 조언을 제공하는 것을 보조한다.
- [0128] 일부 양태에서, 예상 및 증상전 유형의 시험은 다양한 질병과 관련된 유전자 돌연변이를 검출하는데 사용된다. 일부 경우, 이를 시험은 유전적 질병이 있는 가족원을 갖지만 시험 시간에 질병의 특징을 나타내지 않을 수 있는 사람들에게 유용하다. 일부 양태에서, 예상 시험은, 예를 들면, 특정한 유형의 암을 포함하지만 이에 한정되지 않는 유전자를 기반으로 한, 한 사람의 질병 발달 기회를 증가시키는 돌연변이를 확인한다. 일부 양태에서, 증상전 시험은 임의의 신체적 징후 또는 증상이 나타나기 전에 한 사람이 유전적 질병을 발달시키는지 여부를 측정하는데 유용하다. 예상 및 증상전 시험의 결과는 한 사람의 특정 질병의 발달 위험에 대한 정보를 제공하고 적절한 의학적 치료 계획에 대한 결정을 할 수 있도록 돋는다. 예상 시험은 또한, 일부 양태에서, 레이저 눈 수술, 예를 들면, 굴절교정 수술(예를 들면, 라식, 라섹(LASEK), PTK, 및 PRK)과 함께 사용이 금지된 아벨리노 돌연변이의 존재와 같은, 특정한 치료 계획과 사용이 금지된 돌연변이를 검출하는데 사용된다. 예를 들면, 아벨리노 돌연변이를 나타내는 환자는 굴절교정 수술(라식, 라섹, PTK, 및 PRK)을 받지 말아야 한다.
- [0129] 일부 양태에서, 진단 시험은 또한 약물 반응에 대한 유전적 변이의 영향을 측정하는 유전자 시험을 포함하는 약물유전체학을 포함한다. 이러한 약물유전체학 분석으로부터의 정보는 적절한 치료 계획을 결정하고 개발하는데 사용될 수 있다. 의학 분야의 숙련가는 적절한 치료 계획을 설계하는데 유전적 변이의 존재 및/또는 부재에 관한 정보를 사용한다.
- [0130] 일부 양태에서, 본 발명의 방법을 사용하여 유전자 프로파일이 측정되는 질환은 각막 이상증, 암, 당뇨병, 고혈압, 정신분열증, 및 가장 흔한 선천성 기형, 예를 들면, 구순구개열, 구개 파열, 신경관 결손, 연골무형성증, 알파-1 항트립신 결핍, 항인지질 증후군, 자폐증, 상염색체 우성 다낭성 신종, 샤르코-마리-투스병, 결장암, 묘성증후군, 크론병, 낭포성 섬유증, 텔컴병, 다운 증후군, 듀안 증후군, 뒤시엔느 근위축증, 인자 V 라이덴 혈전성향증, 가족성 고콜레스테롤혈증, 가족성 지중해열, 취약 X 증후군, 고세병, 혈색소침착증, 혈우병, 완전전뇌증, 헌팅턴 무도병, 클라인펠터 증후군, 마르판 증후군, 근긴장성 이영양증, 신경 섬유종증, 누난 증후군, 불완전 골형성증, 파킨슨병, 페닐케톤뇨증, 폴란드 기형, 포르피린증, 선천성 조로증, 색소성 망막염, 중증 복합형 면역 부전증(SCID), 겹상적혈구병, 척수성근위축, 테이색스병, 지중해 빈혈, 트리메틸아민뇨증, 터너 증후군, 구개심장안면증후군, WAGR 증후군, 월슨병, 뿐만 아니라 유전적 요소를 갖는 임의의 기타 질환을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 각막 이상증은 아벨리노 각막 이상증, 과립 각막 이상증(유형 2), 티엘-뱅크 각막 이상증, 라티스 각막 이상증, 및 레이스-버클러스 각막 이상증을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 암은 암종, 육종, 아세포종, 럼프종, 백혈병 및 생식 세포 종양을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 양태에서, 암은 두경부암, 피부암, 결장암, 구강암, 교아세포종, 유방암, 후두암, 식도암, 내피암, 자궁내막암, 난소암, 폐암, 비뇨생식기암, 직장암, 전립선암, 신장암, 흑색종, 신암, 췌장암, 위장암, 혈액암, 간암, 자궁암 및 뇌암 뿐만 아니라

바이러스 유도된 암, 예를 들면, 유두종 바이러스-유도된 암을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0131] 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 개체의 유전자 프로파일을 측정하는데 사용되는 게놈 DNA를 제공함으로써 개인화된 의학적 치료 계획의 개발에 사용될 수 있다. 일부 양태에서, 이러한 유전자 프로파일 정보는 치료 계획의 결정 및/또는 개발을 위하여 당해 분야의 숙련가에 의해 사용된다. 일부 양태에서, 기재된 방법에 의해 분리된 핵산에서 확인된 다양한 유전적 변이 및 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 개인화된 의학적 치료 계획 또는 계획안의 부분으로서 당해 분야의 숙련가에 의해 사용된다. 예를 들면, 일부 양태에서, 기재된 방법을 사용하는 정보는 특이적인 질환의 진단의 측정 및/또는 치료 계획의 결정을 위하여 데이터베이스 또는 기타 확립된 정보와 비교된다. 일부 경우, 특정 환자에서 유전자 돌연변이의 존재 또는 부재에 관한 정보는 제안된 치료 계획에 관한 측정을 하기 위하여 데이터베이스 또는 기타 표준 정보 공급원과 비교된다. 일부 경우, 유전자 돌연변이의 존재는 특정한 치료 계획의 추척을 나타낸다. 일부 경우, 유전자 돌연변이의 부재는 특정한 치료 계획의 비추적을 나타낸다.

[0132] 일부 양태에서, 특정한 유전자 돌연변이의 존재 및/또는 부재에 관한 정보는 치료학적 독립체에 의한 치료의 치료 효능을 측정하는 것 뿐만 아니라 치료학적 독립체에 의한 치료를 위하여 치료 계획을 조정하는데 사용된다. 일부 양태에서, 유전자 돌연변이의 존재 및/또는 부재에 관한 정보는 치료 계획을 추적할지 여부를 결정하는데 사용된다. 일부 양태에서, 유전자 돌연변이의 존재 및/또는 부재에 관한 정보는 치료 계획을 계속할지 여부를 결정하는데 사용된다. 일부 양태에서, 유전자 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 치료 계획을 중단할지 여부를 결정하는데 사용된다. 다른 양태에서, 유전자 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 치료 계획을 개질할지 여부를 결정하기 위하여 사용된다. 일부 양태에서 유전자 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 치료 계획의 부분으로서 투여되는 치료의 투여량을 증가시킬지 감소시킬지 여부를 결정하기 위하여 사용된다. 다른 양태에서, 유전자 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 치료 계획의 부분으로서 투여된 치료의 투여 빈도를 변경할지 여부를 결정하기 위하여 사용된다. 일부 양태에서, 유전자 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 일 당, 주 당 투여 횟수, 치료 일 당 시간을 변경할지 여부를 결정하기 위하여 사용된다. 일부 양태에서 유전자 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 치료 투여량을 변경할지 여부를 결정하기 위하여 사용된다. 일부 양태에서, 유전자 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 치료 계획의 개시 전 및/또는 치료 계획이 시작된 후 측정된다. 일부 양태에서, 유전자 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 측정되고, 유전자 돌연변이의 부재 또는 존재에 관한 미리 측정된 표준 정보와 비교된다.

[0133] 일부 양태에서, 하나 이상의 유전자 돌연변이의 존재 및/또는 부재의 조합물이 기재된 방법을 사용하여 발생되고, 이러한 조합물은 하나 이상의 유전자 돌연변이의 존재 및/또는 부재에 관한 정보의 임의의 수집을 포함한다. 일부 양태에서, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 20개 이상, 30개 이상 또는 40개 이상의 유전자 돌연변이의 존재 또는 부재가 시험되고, 조합물의 발생에 사용된다. 예시적인 정보는 일부 양태에서 핵산 또는 단백질 정보, 또는 핵산 및/또는 단백질 유전자 돌연변이 둘 다에 관한 정보의 조합을 포함한다. 일반적으로, 조합물은 유전자 돌연변이의 존재 및/또는 부재에 관한 정보를 포함한다. 일부 양태에서, 이들 조합물은 치료 계획을 추적하고 유지하고 중단하기 위하여 미리 측정된 표준 정보와 비교에 사용된다.

## VIII. 실시예

### 실시예 1: 소량의 DNA의 신호 개선을 위한 실시간 PCR 조건

[0134] 소량의 분리된 게놈 DNA 및 PCR 시약을 사용하여 개선된 신호를 제공하는 실시간 PCR 조건을 확인하기 위하여, 변성 시간 및 수행된 실시간 PCR 사이클 수를 다르게 하여 실험을 수행하였다. 간단하게, 표준 수집 실시에 따라 구강 면봉으로 수집된 인간 세포를 용해시킴으로써 게놈 샘플을 제조하였다. 구강 면봉을 간단하게 용해 용액 중에서 스월링하고(예를 들면, 약 30초 동안), 나중에 재사용을 위하여 냉동하였다. 그 다음, 구강 면봉으로부터 회수된 세포를 함유하는 용해 용액을 45°C에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후, 게놈 DNA를 제조사의 지시에 따라 차지스위치® 자석 비드-기반 핵산 정제(라이프 테크놀로지스)를 사용하여 회수하였다. 상업적으로 이용 가능한 오메가 E.Z.N.A.® 티슈(Omega E.Z.N.A.® Tissue) DNA를 사용하여 구강 면봉 상에 수집된 구강 상피 세포로부터의 게놈 DNA를 회수하였다. 오메가 E.Z.N.A.® 티슈 DNA 키트는 수집된 세포로부터 게놈 DNA를 정제하기 위하여 특성화된 버퍼 시스템에 의해 달성된 실리카 막 기술을 사용한다.

[0135] 아벨리노 각막 이상증과 관련된, TGFBI 유전자에서 C(G/A)C 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP)의 검출을 위하여 설계된 실시간 PCR 검정은 구강 세포로부터 분리된 게놈 물질의 감소된 용적( $2\mu\ell$ ) 및 TGFBI 유전자의 아벨리노 각막 이상증 SNP-함유 영역을 증폭시키도록 설계된 정방향(서열 번호: 1) 및 역방향(서열 번호: 2) 프라이머 및 형광 표지된 야생형(서열 번호:25) 및 돌연변이형(서열 번호:26) 실시간 PCR 프로브를 함유하는 40X 농축된 맞

축 유전자형분석 검정의 감소된 양( $0.1\mu\text{l}$  내지  $0.2\mu\text{l}$ )을 사용하여 수행하였다.

[0138] 실시간 PCR 검정은 36 내지 40 PCR 사이클로 단일수행으로 ABI 7500 패스트 리얼-타임(Fast Real-Time) PCR 시스템(Applied Biosystems(어플라이드 바이오시스템스)) 또는 스텝원플러스(StepOnePlus) 실시간 PCR 시스템(어플라이드 바이오시스템스)을 사용하여 수행하였다. 각각의 사이클은 3 또는 5초의 변성 시간을 포함하였다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 반응에서 40 PCR 사이클의 사용은 소량의 출발 물질을 더 많이 보상하였다. 놀랍게도, 표준 5초 단계보다 더 우수하지는 않더라도 더 짧은 3초 변성 시간도 또한 작동한다. 종합하면, 결과는 본원에 기재된 방법이 적은 수의 세포, 감소된 수준의 게놈 DNA 및 감소된 실시간 PCR 시약을 사용하여 아벨리노 각막 이상증-관련 SNP의 효율적인 검출을 가능하게 함을 입증한다.

[0139] 감소된 양의 게놈 물질(예를 들면, DNA)은 실시간 PCR 검정을 변경함으로써 사용될 수 있음이 밝혀졌다. 예를 들면, 상기 기재된 바와 같이 제조된 게놈 DNA 샘플  $2\mu\text{l}$ 는 겨우 40X 커스텀 유전자형분석 검정 약  $0.15\mu\text{l}$ 와 조합될 수 있음이 밝혀졌다. 일부 경우, 이는 검정에서 수행된 PCR 사이클 수를 약 40으로 증가시킴으로써 달성되었다. 추가의 PCR 사이클을 수행하는데 필요한 증가된 시간은 PCR 사이클의 변성 시간을 약 3초로 감소시킴으로써 대응하였다. PCR 반응의 변성 사이클은 95°C에서 수행된다. 서열 번호: 1의 뉴클레오티드 서열을 갖는 정방향 PCR 프라이머 및 서열 번호: 2의 뉴클레오티드 서열을 갖는 역방향 PCR 프라이머를 사용하여 실시간 PCR 검정을 수행하였다. 검정에 사용된 야생형 검출 프로브는 서열 번호: 25의 뉴클레오티드 서열을 갖고, 검정에 사용된 돌연변이형 검출 프로브는 서열 번호: 26의 뉴클레오티드 서열을 가졌다.

[0140] 단일 뉴클레오티드 다형성을 검출하기 위한 표준 과정과 비교하여, 이들 방법은 의학적 진단과 관련된 시간 및 비용을 감소시켰다.

#### 실시예 2: 안정성 연구 프로토콜

[0142] 당해 안정성 연구 프로토콜을 개발하였고, 시약 안정성 및 냉동 해동 사이클을 위한 시험 요건을 포함하였다.

[0143] 아벨리노 랩 유에스에이(Avellino Lab USA, Inc.)(아벨리노)에서 시험(DNA 추출 및 실시간 PCR)에 사용된 시약을 당해 안정성 연구에서 시험하여 생성물 안정성을 확립하였다. 실시예 5-10에 나타낸 바와 같은 다양한 온도 조건에서 안정성 시험을 통해 적절한 시약 유효 기간을 측정하였다.

[0144] 시약 이외에, 안정성 시험을 상업적인 구강 면봉 샘플 상에 수행하고, 구강 면봉으로부터 DNA를 추출하였다. 냉동 해동 사이클의 적절한 저장 조건에 따른 구강 면봉 및 DNA의 안정성 및 성능을 확립하는 실험을 수행하였다.

[0145] 하기 실시예는 시약, 구강 면봉, 및 구강 면봉으로부터 추출된 DNA의 안정성을 시험하는 과정을 기재하고, 실시예 5-10에 사용된 프로토콜이었다.

#### 시약

[0147] 오메가 E.Z.N.A. 티슈 DNA 키트, TaqMan 게노타이핑 마스터 믹스(TaqMan Genotyping Master Mix) 및 커스텀 TaqMan SNP 게노타이핑 어세이(Custom TaqMan SNP Genotyping Assay)를 포함하는 하기 시약을 실시예 5-10에서 사용하였다.

#### 샘플

[0149] 구강 면봉 및 구강 면봉으로부터 추출된 DNA를 포함하는 하기 샘플을 실시예 5-10에서 시험하였다.

[0150] 실시예 5-10에 사용된 용어의 정의는 하기를 포함한다:

[0151] RT = 15°C 내지 30°C로 설정된 실온

[0152] 4°C 냉장고 = 2°C 내지 8°C로 설정된 온도

[0153] -20°C 냉동고 = -25°C 내지 -15°C로 설정된 온도

[0154] -80°C 냉동고 = -90°C 내지 -65°C로 설정된 온도

[0155] 구강 면봉 = 구강 상피 세포를 수집하는데 사용된 면봉(예를 들면, 레이온, 나일론, 코튼 등)

[0156] 추출된 DNA = 구강 상피 세포로부터 추출된 DNA

[0157] 과정은 하기 시약 및 샘플을 사용하였다. 사용된 시약은 오메가 E.Z.N.A. 티슈 DNA 키트, TaqMan 게노타이핑 마스터 믹스 및 커스텀 TaqMan SNP 게노타이핑 어세이를 포함하였다. 사용된 샘플은 구강 면봉 및 구강 면봉으로

부터 추출된 DNA를 포함하였다. 대안적으로, 코판 디아그노스틱스 인크(Copan Diagnostics, Inc.)에 의해 제조된 수송 면봉을 사용할 수 있다.

[0158] 표 5: 시약 및 물질 정보

명칭	판매사	부품 번호	저장 조건
오메가 E.AZ.N.A. 티 슈 DNA 키트	오메가	101319-018	실온
TaqMan 게노타이핑 마스터 믹스	어플라이드 바이오시 스템스	4371355	2°C 내지 8°C
커스텀 TaqMan SNP 게노타이핑 어세이	어플라이드 바이오시 스템스	4332072	-15°C 내지 -25°C
구강 면봉	굿 비스타 메디컬 앤 드 헬스 프로덕츠 코 엘티디 (Good Vista Medical and Health Products Co., Ltd)	NA	실온 2°C 내지 8°C -25°C 내지 -15°C -90°C 내지 -65°C
추출된 DNA	NA	NA	2°C 내지 8°C -25°C 내지 -15°C -90°C 내지 -65°C

[0159]

#### 과정

##### 구강 면봉 및 추출된 DNA의 안정성 시험

[0160] 표본을 안정성에 대하여 시험하여 결과 유전자형이 절충될 때 시간 및 조건을 측정하였다. 이를 연구는 종방향으로(longitudinally) 수행되었다.

[0161] 새롭게 수집된 공여체 면봉을 당해 연구에 사용하였다. 각각의 조건에 대하여 이를 상이한 샘플 면봉을 시험하였다.

[0162] 정확도 연구로부터 DNA를 폴링(pooling)하였다. 면봉 안정성 DNA 샘플 이외에 70 NN 정상 유전자형 DNA 샘플이 존재하였다. 웨л 당 DNA 100μl로, 플레이트 당 20개의 웨로 플레이트 5개를 만들었다.

[0163] 하나의 플레이트를 4°C 냉장고에 저장하였다. 하나의 플레이트를 -20°C 냉동고에 냉동 저장하였다. 3개월의 기간에 걸쳐 냉동 해동 사이클의 총 수는 8이었다. 하나의 플레이트를 -80°C 냉동고에 냉동 저장하였다. 1년의 기간에 걸쳐 냉동 해동 사이클의 총 수는 10이었다. 2개의 플레이트를 6개월 및 1년 데이터점 동안 -80°C 냉동고에 냉동 저장하였다. 이를 플레이트를 냉동 해동된 플레이트와 함께 시험하여 DNA에 대한 냉동 해동 효과를 평가하였다.

[0164] 0일 후, 샘플을 하기 표에 기재된 다양한 온도에서 저장하였다. 각각의 샘플을 하기 표에 지시된 데이터 수집일에 작동시키고, 냉동 해동 사이클을 기록하였다.

[0165] 표 6: 구강 면봉

저장	데이터 수집일
4°C 냉장고	0, 1주, 2주, 3주, 4주, 6주, 8주, 10주, 12주
실온	0, 1주, 2주, 3주, 4주, 6주, 8주, 10주, 12주
-20°C 냉동고	0, 1주, 2주, 3주, 4주, 6주, 8주, 10주, 12주, 6개월, 8개월, 10개월, 12개월
-80°C 냉동고	0, 1주, 2주, 3주, 4주, 6주, 8주, 10주, 12주, 6개월, 8개월, 10개월, 12개월

[0166]

[0169] 표 7: 96-웰 플레이트 중의 추출된 DNA 샘플

저장	냉동 해동 사이클	데이터 수집일
4°C 냉장고	N/A	0, 1주, 2주, 3주, 4주, 6주, 8주, 10주, 12주
-20°C 냉동고	사이클 1 내지 8	0, 1주, 2주, 3주, 4주, 6주, 8주, 10주, 12주, 6개월, 8개월, 10개월, 12개월
-80°C 냉동고	사이클 1 내지 10	0, 1주, 2주, 3주, 4주, 6주, 8주, 10주, 12주, 6개월, 8개월, 10개월, 12개월

[0170]

시약 안정성 연구

[0172]

각각의 하기 시약에 대하여 하나의 로트(lot)를 격리한다: 오메가 티슈 DNA 키트, TaqMan 게노타이핑 마스터 믹스 및 커스텀 TaqMan SNP 게노타이핑 어세이.

[0173]

구강 면봉 및 추출된 DNA 안정성 시험에 동일한 시약을 사용하였다.

[0174]

**해석**

[0175]

각각의 대립유전자의 실시간 PCR 결과 평가

[0176]

각각의 대립유전자에 대한 결과는 확립된 샘플 범위 내에 속해야 한다. 임의의 결과가 샘플 범위 밖에 속하는 경우, 연구의 특정 부분은 중단될 것이고 안정성은 데이터점에 의해 결정될 것이다.

[0177]

**표 8: 격리된 시약 정보**

시약	로트 번호	저장	용적
오메가 티슈 DNA 키트 -C2719	D33960205241210CN50312	15°C 내지 30°C	1 키트
TaqMan 게노타이핑 마스터 믹스	1204073	2°C 내지 8°C	3 키트
커스텀 TaqMan SNP 게노타이핑 어세이	P120727-004 D07 P120814-006 H01	-25°C 내지 -15°C	1 키트 1 키트

[0178]

**표 9: 대조군 시약 정보**

시약	로트 번호	예상된 유전자 형	TaqMan에 의한 확인
NN 대조군 {추출부터 PCR 분석까지의 공정 대조군으로서 사용되는 정상 개체의 구강 면봉으로부터 분리된 정제된 DNA; <i>TGFB1</i> R124R 정상}	ALU-0912-006	NN 정상	예
HN 대조군 {공지된 이형접합 개체의 전체 혈액 샘플로부터 분리된 정제된 DNA; <i>TGFB1</i> R124R 이형접합}	ALU-0912-007	HN 이형접합	예
HH 대조군 {대한민국, 서울의 바이오 닉스 코 엘티디(Bionics Co., Ltd) (ISO0911)로부터 클로닝되고 정제되고 특성화된 DNA; <i>TGFB1</i> R124H 동형접합}	ALU-0912-008	HH 동형접합	예

[0180]

**실시예 3:**

[0182]

당해 실시예는 실시예 5-10에서 구강 상피 면봉으로부터 DNA 추출이 수행되는 방법에 관한 과정을 제공한다.

[0183]

**과정**

[0184]

시험 과정

[0185]

**전처리.** 12.5ml 주사기의 리피터 피펫을 사용하여 1.0ml PBS를 1.5ml 마이크로 원심분리 튜브로 가하였다. 면봉을 PBS 중에서 스월링하고 면봉이 건조시켰다. 튜브를 13,000 RPM에서 2분 동안 원심분리하였다. 원심분리 동안, 컬럼을 표식하고 2세트의 용리 튜브 및 1세트의 1.5ml 마이크로 원심분리 튜브를 제조하였다. 펠렛을 확

인하였다. 피펫으로 상청액을 제거하고, 펠렛이 손실되지 않도록 주의하였다.

**[0186] DNA 추출.** 5.0ml 주사기의 리피터 피펫을 사용하여 TL 벼파 200 $\mu$ l를 가하였다. 재구성된 OB 프로테아제 25 $\mu$ l를 가하고 보택싱하여 혼합하였다. 가열 블록에서 56°C(허용가능 온도 범위 50-60°C)에서 7분 동안 배양하였다. 튜브를 약 3분 동안 혼합하였다. 12.5ml 주사기의 리피터 피펫을 사용하여 BL 벼파 250 $\mu$ l를 가하였다. 12.5ml 주사기의 리피터 피펫을 사용하여 에탄올 250 $\mu$ l를 가하였다. 플라스틱 훌딩 블록에서 튜브를 15회 뒤집었다. 혼합 동안 용적을 확인하였다. 250 RPM 이하에서 빠르게 회전시켰다. 내용물을 튜브로부터 컬럼으로 피펫팅하였다. 튜브 확인 번호가 맞는지 확실히 하였다. 컬럼을 13,000 RPM에서 1분 동안 원심분리하였다. 수집 튜브를 제거하고, 컬럼을 새로운 2ml 수집 튜브에 삽입하였다. 12.5ml 주사기의 리피터 피펫을 사용하여 HB 벼파 500 $\mu$ l를 가하였다. 13,000 RPM에서 1분 동안 원심분리하였다. 수집 튜브를 제거하고, 새로운 수집 튜브에 삽입하였다. 12.5ml 주사기의 리피터 피펫을 사용하여 DNA 세척 벼파 700 $\mu$ l를 가하였다. 13,000 RPM에서 1분 동안 원심분리하고, 액체를 제거하고, 다시 동일한 수집 튜브에 넣었다. 12.5ml 주사기의 리피터 피펫을 사용하여 두번째 DNA 세척 벼파 700 $\mu$ l를 가하였다. 13,000 RPM에서 1분 동안 원심분리하였다. 액체를 제거하고 튜브를 다시 수집 튜브에 놓았다.

**[0187] 건조 단계.** 튜브를 13,000 RPM에서 2분 동안 원심분리하였다. 수집 튜브를 제거하고, 컬럼을 1.5ml 마이크로 원심분리 튜브에 캡을 개봉한 채로 넣었다. 가열 블록에서 56°C(허용가능 온도 범위 50-60°C)에서 1분 동안 배양하였다. 1분의 끝에 냄새를 맡아 에탄올이 남아 있는지 여부를 결정하였다. 필요한 경우 더 배양하였다. 5ml 주사기의 리피터 피펫을 사용하여 증류수 100 $\mu$ l를 가하여 가열 블록에서 용리시켰다(다이얼 1). 캡을 닫았다. 56°C(허용가능 온도 범위 50-60°C)에서 2분 동안 배양하였다. 컬럼 캡을 닫고 1.5ml 리드는 개방한 채로 13,000 RPM에서 1분 동안 회전시켰다. 컬럼을 제거하고, 튜브 랙에 수직으로 6개의 마이크로 원심분리 튜브 군을 수평으로 놓았다.

**[0188] TECAN 나노퀀트 인피니트(NanoQuant Infinite) M200 PRO에 의한 DNA 정량화.**

적절하게 표식된 투명 96-웰 UV 플레이트에 용리액 100 $\mu$ l를 피펫팅하였다. TECAN 시스템에 의해 제공된 "마젤란(Magellan)" 프로그램을 정량화 측정을 수득하기 위하여 사용하였다. TECAN 시스템은 상업적으로 입수할 수 있었다(월드 와이드 웹 tecan.com 참조; Tecan Trading AG, Switzerland).

**[0189] DNA 농도 및 순도 한계.** 농도 및 순도 한계를 확립하였다. 정확한 결과를 수득할 수 있는 적절한 농도 범위는 1ng/ $\mu$ l 내지 50ng/ $\mu$ l이고, 순도 범위는 0.55 내지 2.00이다. 이러한 한계 밖에 속하는 임의의 샘플은 추출 공정으로부터 반복될 필요가 있다.

#### 실시예 4: PCR 과정

**[0190]** 당해 실시예는 실시예 5 내지 10에서 사용되는 실시간 PCR 과정을 제공한다. 이를 실시예는 어플라이드 바이오 시스템스 7500/7500 패스트 리얼-타임 PCR 시스템 및 어플라이드 바이오시스템스 스텝원(StepOne) 및 스텝원 플러스 실시간 PCR 시스템을 사용하였고, 이들은 둘 다 어플라이드 바이오스시스템스(Life Technologies Corporation, USA)으로부터 상업적으로 입수 가능하다.

#### 과정

**[0191] 마스터 믹스(MM) 제조.** 1.5ml 마이크로 원심분리 튜브 내에 MM을 제조하였다. 특정한 양의 Taq 게노타이핑 마스터 믹스를 가하였다. 특정한 양의 물을 가하였다. 특정한 양의 프라이머(40X Assay Mix)를 가하였다. 가볍게 치고 빠르게 회전시켜 MM을 혼합하였다.

**[0192] 플레이트 제조.** 96-웰 PCR 플레이트(적절하게 표식됨)를 지지 베이스 상에 놓았다. 자동 피펫 또는 라이닌(Rainin) 수동 피펫을 사용하여 MM 8.0 $\mu$ l를 각각의 웰에 가하였다. 10 $\mu$ l 12 채널 멀티채널 피펫을 사용하여 샘플 2.0 $\mu$ l를 적절한 웰에 가하였다. 적절한 대조군 시약을 가하였다. 이들의 혼합을 확실히 하고 회전을 감소시켰다. 정상(NN)→음성(NTC)→이형 접합(HN)→동형 접합(HH)→음성(NTC) 순으로 놓았다. PCR 플레이트를 ABI 광학 접착막으로 덮고, 웰의 주위가 안전하도록 확실히 하였다. 플레이트를 1000 RPM에서 1분 동안 회전시키고, 거품을 확인하였다. 거품이 존재하는 경우, 가볍게 치고 재회전시켰다.

#### 기구 작동.

**[0193]** 사용되는 PCR 기구, 7500 패스트 또는 스텝원 플러스를 켜고 사용할 준비를 하였다. 샘플을 작동시켰다: NN(양성 대조군 대립유전자1/대립유전자1); NTC(음성 대조군); HN(양성 대조군 대립유전자1/대립유전자2); HH(대립유전자2/대립유전자2); 및 NTC(음성 대조군). 하기 사이클링 단계를 작동하도록 설정하였다: PCR-전 판독(홀딩

단계)→30초 동안 60°C; 훌딩 단계→10분 동안 95°C; 사이클링 단계→3초 동안 95°C 및 30초 동안 60°C에서 36 사이클; 및 PCR-후 판독(훌딩 단계)→30초 동안 60°C. PCR 플레이트를 기구에 로딩하고 작동을 개시하였다.

**[0198] 실시예 5: 0 내지 6주 시점에서 면봉 안정성**

당해 실시예는 예시적인 안정성 연구 데이터를 제공한다. 연구는 상업적인 구강 면봉, 구강 면봉으로부터 추출된 DNA 및 시험에 사용된 다양한 시약의 허용가능한 안정성을 측정하도록 설계되었다.

**구강 면봉**

표 10에 지시된 바와 같이, 당해 실시예 과정 동안 구강 면봉을 다양한 온도에서 저장하였다.

**표 10: 구강 저장 조건**

저장	데이터 수집일
4°C 냉장고	0, 1주, 2주, 3주, 4주, 6주
실온	0, 1주, 2주, 3주, 4주, 6주
-20°C 냉동고	0, 1주, 2주, 3주, 4주, 6주
-80°C 냉동고	0, 1주, 2주, 3주, 4주, 6주

[0203]

그 다음, 구강 면봉을 DNA 추출 전 하기 표 11에 지시된 바와 같은 다양한 온도 및 시점에서 저장하고 해동하였다. 지시된 온도에서 적절한 시간 후, 구강 면봉을 해동시키고, DNA를 구강 면봉으로부터 96-웰 플레이트 형식으로 추출하였다.

[0204]

**표 11: 96-웰 플레이트 중의 추출된 DNA 샘플**

저장	냉동 해동 사이클	데이터 수집일
4°C 냉장고	N/A	0, 1주, 2주, 3주, 4주, 6주
-20°C 냉동고	사이클 1 내지 8	0, 1주, 2주, 3주, 4주, 6주
-80°C 냉동고	사이클 1 내지 10	0, 1주, 2주, 3주, 4주, 6주

[0205]

**결과**

처음 7개의 데이터점으로부터 수집된 결과를 하기 표에 요약한다.

**1주 시점**

[0210]

표 12: 0 시점 PCR 결과

샘플 유형	저장 조건	기구 (7500 패스트 또는 스텝원플러스)	평균 대립유전자 1 (범위=0.44 내지 1.81)	평균 대립유전자 2 (범위=0.027 내지 0.249)	냉동 해동 사이클	통과/실패
추출된 DNA	4°C	7500 패스트	1.636	0.247	N/A	통과
추출된 DNA	4°C	스텝원플러스	0.985	0.079	N/A	통과
추출된 DNA	-20°C	7500 패스트	1.508	0.216	N/A	통과
추출된 DNA	-20°C	스텝원플러스	0.935	0.077	N/A	통과
추출된 DNA	-80°C	7500 패스트	1.530	0.218	N/A	통과
추출된 DNA	-80°C	스텝원플러스	0.925	0.079	N/A	통과
추출된 DNA	-80°C (6 mo)	7500 패스트	1.479	0.197	N/A	통과
추출된 DNA	-80°C (6 mo)	스텝원플러스	0.872	0.065	N/A	통과
추출된 DNA	-80°C (1 yr)	7500 패스트	1.433	0.180	N/A	통과
추출된 DNA	-80°C (1 yr)	스텝원플러스	0.793	0.050	N/A	통과
구강 면봉	모든 저장 조건	7500 패스트	1.582	0.226	N/A	통과
구강 면봉	모든 저장 조건	스텝원플러스	0.910	0.087	N/A	통과

[0211]

표 13: 1주 시점 PCR 결과

샘플 유형	저장 조건	기구 (7500 패스트 또는 스텝원플러스)	평균 대립유전자 1 (범위=0.44 내지 1.81)	평균 대립유전자 2 (범위=0.027 내지 0.249)	냉동 해동 사이클	통과/실패
추출된 DNA	4°C	7500 패스트	1.329	0.177	N/A	통과
추출된 DNA	4°C	스텝원플러스	0.881	0.066	N/A	통과
추출된 DNA	-20°C	7500 패스트	1.329	0.186	1	통과
추출된 DNA	-20°C	스텝원플러스	0.852	0.082	1	통과
추출된 DNA	-80°C	7500 패스트	1.515	0.226	1	통과
추출된 DNA	-80°C	스텝원플러스	0.914	0.094	1	통과
구강 면봉	RT	7500 패스트	1.240	0.167	N/A	통과
구강 면봉	RT	스텝원플러스	0.725	0.055	N/A	통과
구강 면봉	4°C	7500 패스트	1.236	0.182	N/A	통과
구강 면봉	4°C	스텝원플러스	0.687	0.052	N/A	통과
구강 면봉	-20°C	7500 패스트	1.040	0.160	N/A	통과
구강 면봉	-20°C	스텝원플러스	0.648	0.040	N/A	통과
구강 면봉	-80°C	7500 패스트	1.407	0.233	N/A	통과
구강 면봉	-80°C	스텝원플러스	0.762	0.066	N/A	통과

[0213]

1주 시점 결론

[0214]

모든 추출된 DNA, 구강 면봉, 및 시약은 1주 동안 다양한 저장 조건에서 신뢰성 있는 결과를 수득하였다. 따라서, 다양한 온도에서 1주 동안 모두 안정하다.

[0215]

2주 시점

[0217]

표 14: 2주 시점 PCR 결과

샘플 유형	저장 조건	기구 (7500 패스트 또는 스텝원플러스)	평균 대립유전자 1 (범위=0.44 내지 1.81)	평균 대립유전자 2 (범위=0.027 내지 0.249)	냉동 해동 사이클	통과/실패
추출된 DNA	4°C	7500 패스트	1.167	0.186	N/A	통과
추출된 DNA	4°C	스텝원플러스	0.877	0.066	N/A	통과
추출된 DNA	-20°C	7500 패스트	1.046	0.154	2	통과
추출된 DNA	-20°C	스텝원플러스	0.789	0.068	2	통과
추출된 DNA	-80°C	7500 패스트	1.165	0.173	2	통과
추출된 DNA	-80°C	스텝원플러스	0.862	0.078	2	통과
구강 면봉	RT	7500 패스트	0.379	0.063	N/A	실패
구강 면봉	RT	스텝원플러스	0.247	0.010	N/A	실패
구강 면봉	4°C	7500 패스트	1.424	0.209	N/A	통과
구강 면봉	4°C	스텝원플러스	0.783	0.062	N/A	통과
구강 면봉	-20°C	7500 패스트	1.346	0.189	N/A	통과
구강 면봉	-20°C	스텝원플러스	0.826	0.060	N/A	통과
구강 면봉	-80°C	7500 패스트	1.658	0.247	N/A	통과
구강 면봉	-80°C	스텝원플러스	0.910	0.088	N/A	통과

[0218]

**2주 시점 결론**

[0220]

실온 면봉은 더 낮은 온도에서 저장된 것들 보다 신뢰성이 낮은 결과가 나타냈다. 따라서, 실온에서 저장된 구강 면봉의 안정성은 1주였다. 실온에서 저장된 구강 면봉에 대한 추가의 시점은 취하지 않았다.

[0221]

모든 추출된 DNA, 구강 면봉(실온 면봉 제외), 및 시약은 2주 시점에 다양한 저장 조건에서 신뢰성 있는 결과를 수득하였다.

[0222]

따라서, 안정성은 다양한 냉장 및 더 차가운 온도에서 2주인 것으로 측정되었다.

[0223]

**3주 시점**

[0224]

표 15: 3주 시점 PCR 결과

샘플 유형	저장 조건	기구 (7500 패스트 또는 스텝원플러스)	평균 대립유전자 1 (범위=0.44 내지 1.81)	평균 대립유전자 2 (범위=0.027 내지 0.249)	냉동 해동 사이클	통과/실패
추출된 DNA	4°C	7500 패스트	1.507	0.217	N/A	통과
추출된 DNA	4°C	스텝원플러스	0.816	0.051	N/A	통과
추출된 DNA	-20°C	7500 패스트	1.461	0.204	3	통과
추출된 DNA	-20°C	스텝원플러스	0.840	0.075	3	통과
추출된 DNA	-80°C	7500 패스트	1.502	0.204	3	통과
추출된 DNA	-80°C	스텝원플러스	0.851	0.079	3	통과
구강 면봉	4°C	7500 패스트	1.514	0.233	N/A	통과
구강 면봉	4°C	스텝원플러스	0.847	0.060	N/A	통과
구강 면봉	-20°C	7500 패스트	1.525	0.235	N/A	통과
구강 면봉	-20°C	스텝원플러스	0.943	0.065	N/A	통과
구강 면봉	-80°C	7500 패스트	1.674	0.243	N/A	통과
구강 면봉	-80°C	스텝원플러스	0.967	0.076	N/A	통과

[0225]

**3주 시점 결론:**

[0226]

모든 추출된 DNA, 구강 면봉(실온 면봉 제외), 및 시약은 3주 동안 다양한 저장 조건에서 신뢰성 있는 결과를 수득하였다. 따라서, 안정성은 다양한 냉장 및 더 차가운 온도에서 3주인 것으로 측정되었다.

[0227]

**4주 시점**

[0229]

표 16: 4주 시점 PCR 결과

샘플 유형	저장 조건	기구 (7500 패스트 또는 스텝원플러스)	평균 대립유전자 1 (범위=0.44 내지 1.81)	평균 대립유전자 2 (범위=0.027 내지 0.249)	냉동 해동 사이클	통과/실패
추출된 DNA	4°C	7500 패스트	1.590	0.225	N/A	통과
추출된 DNA	4°C	스텝원플러스	0.914	0.065	N/A	통과
추출된 DNA	-20°C	7500 패스트	1.526	0.206	4	통과
추출된 DNA	-20°C	스텝원플러스	0.894	0.085	4	통과
추출된 DNA	-80°C	7500 패스트	1.551	0.200	4	통과
추출된 DNA	-80°C	스텝원플러스	0.884	0.080	4	통과
구강 면봉	4°C	7500 패스트	1.358	0.202	N/A	통과
구강 면봉	4°C	스텝원플러스	0.713	0.060	N/A	실패
구강 면봉	-20°C	7500 패스트	1.445	0.199	N/A	통과
구강 면봉	-20°C	스텝원플러스	0.810	0.065	N/A	통과
구강 면봉	-80°C	7500 패스트	1.845	0.290	N/A	통과
구강 면봉	-80°C	스텝원플러스	0.963	0.092	N/A	통과

[0230]

4주 시점 결론:

[0232]

4°C 온도의 면봉 1개는 신뢰하지 못할 결과를 나타냈다(대립유전자 1은 0.33이었다). 따라서, 4°C 온도에서 냉장 저장된 구강 면봉의 안정성은 3주인 것으로 측정되었다. 이 부분의 연구는 중단되었다.

[0233]

모든 추출된 DNA, 구강 면봉(4°C 온도 면봉 제외), 및 시약은 4주 동안 다양한 저장 조건에서 신뢰성 있는 결과를 수득하였다. 따라서, 안정성은 추출된 DNA에 있어서 모든 시험 온도에서, 구강 면봉에 있어서 -20°C 및 -80°C에서 4주인 것으로 측정되었다.

[0234]

6주 시점

[0235]

표 17: 6주 시점 PCR 결과

샘플 유형	저장 조건	기구 (7500 패스트 또는 스텝원플러스)	평균 대립유전자 1 (범위=0.44 내지 1.81)	평균 대립유전자 2 (범위=0.027 내지 0.249)	냉동 해동 사이클	통과/실패
추출된 DNA	4°C	7500 패스트	1.664	0.229	N/A	통과
추출된 DNA	4°C	스텝원플러스	0.957	0.085	N/A	통과
추출된 DNA	-20°C	7500 패스트	1.407	0.188	5	통과
추출된 DNA	-20°C	스텝원플러스	0.806	0.069	5	통과
추출된 DNA	-80°C	7500 패스트	1.473	0.220	5	통과
추출된 DNA	-80°C	스텝원플러스	0.878	0.073	5	통과
구강 면봉	-20°C	7500 패스트	1.341	0.179	N/A	통과
구강 면봉	-20°C	스텝원플러스	0.732	0.046	N/A	통과
구강 면봉	-80°C	7500 패스트	1.590	0.227	N/A	통과
구강 면봉	-80°C	스텝원플러스	0.913	0.072	N/A	통과

[0236]

6주 시점 결론:

[0238]

모든 추출된 DNA, 구강 면봉(실온 및 4°C 온도 면봉 제외), 및 시약은 6주 동안 다양한 저장 조건에서 신뢰성 있는 결과를 수득하였다. 따라서, 안정성은 5 냉동/해동 사이클의 DNA 추출물에 있어서 모든 시험 온도에서, 구강 면봉에 있어서 -20°C 및 -80°C에서 6주인 것으로 측정되었다.

[0239]

**요약 결론**

[0240]

주요 허용 기준은 검증 연구로부터 확립된 대립유전자 1 및 대립유전자 2 범위였다. 대립유전자 1 및 대립유전자 2에 대한 평균 결과를 다양한 저장 온도에서 계산하였다. 데이터는 하기 안정성 주장을 확인하였다.

[0241]

**표 18: 안정성 정보의 요약**

물질 및 저장 조건	안정성	냉동/해동 사이클
4°C에서 추출된 DNA	6주	N/A
-20°C에서 추출된 DNA	6주	5
-80°C에서 추출된 DNA	6주	5
실온에서 오메가 티슈 DNA 키트	6주	N/A
2°C 내지 8°C에서 TaqMan 게노타이핑 마스터 믹스	6주	N/A
-25°C 내지 -15°C에서 커스텀 TaqMan SNP 게노타이핑 어세이	6주	N/A
실온에서 구강 면봉	1주	N/A
4°C에서 구강면봉	3주	N/A
-20°C에서 구강면봉	6주	N/A
-80°C에서 구강면봉	6주	N/A

[0242]

[0243]

**실시예 6: 8주, 10주 및 12주에서의 안정성 연구**

[0244]

당해 실시예는 실시예 5의 연구로부터 계속된 예시적인 안정성 연구 데이터를 제공한다. 연구는 상업적인 구강 면봉, 구강 면봉으로부터 추출된 DNA 및 시험에 사용된 다양한 시약의 허용가능한 안정성을 측정하도록 설계되었다. 당해 실시예는 수행된 안정성 연구의 8주, 10주, 및 12주 동안 발생된 데이터의 요약을 포함한다.

[0245]

**구강 면봉**

[0246]

표 19에 지시된 바와 같이, 당해 실시예 과정 동안 구강 면봉을 다양한 온도에서 저장하였다.

[0247]

**표 19: 저장 조건 및 데이터 수집일**

저장	데이터 수집일
4°C 냉장고	8주, 10주, 12주
실온	8주, 10주, 12주
-20°C 냉동고	8주, 10주, 12주
-80°C 냉동고	8주, 10주, 12주

[0248]

그 다음, 구강 면봉을 DNA 추출 전 하기 표 20에 지시된 바와 같은 다양한 온도 및 시점에서 저장하고 해동하였다. 지시된 온도에서 적절한 시간 후, 구강 면봉을 해동시키고, DNA를 구강 면봉으로부터 96-웰 플레이트 형식으로 추출하였다.

[0250]

**표 20: 저장, 냉동 해동 사이클 및 데이터 수집일**

저장	냉동 해동 사이클	데이터 수집일
4°C 냉장고	N/A	8주, 10주, 12주
-20°C 냉동고	사이클 1 내지 8	8주, 10주, 12주
-80°C 냉동고	사이클 1 내지 10	8주, 10주, 12주

[0251]

**결과**

[0253]

8주, 10주, 및 12주 데이터점으로부터의 결과를 하기 표에 요약한다.

[0254]

**8주 시점**

[0255]

표 21: 8주 시점 PCR 결과

샘플 유형	저장 조건	기구 (7500 패스트 또는 스텝원플러스)	평균 대립유전자 1 (범위 $\geq -2SD$ 0.44)	평균 대립유전자 2 (범위 $\geq -2SD$ 0.027)	냉동 해동 사이클	통과/실패
추출된 DNA	4°C	7500 패스트	1.728	0.232	N/A	통과
추출된 DNA	4°C	스텝원플러스	0.888	0.117	N/A	통과
추출된 DNA	-20°C	7500 패스트	1.486	0.234	6	통과
추출된 DNA	-20°C	스텝원플러스	0.668	0.085	6	통과
추출된 DNA	-80°C	7500 패스트	1.721	0.264	6	통과
추출된 DNA	-80°C	스텝원플러스	0.881	0.126	6	통과
구강 면봉	-20°C	7500 패스트	1.277	0.188	N/A	통과
구강 면봉	-20°C	스텝원플러스	0.706	0.041	N/A	통과
구강 면봉	-80°C	7500 패스트	1.296	0.212	N/A	통과
구강 면봉	-80°C	스텝원플러스	0.821	0.036	N/A	통과

[0256]

**8주 시점 결론:**

[0258]

모든 추출된 DNA, 구강 면봉(실온 및 4°C 온도 면봉 제외), 및 시약은 8주 동안 다양한 저장 조건에서 신뢰성 있는 결과를 수득하였다. 따라서, 안정성은 6 냉동/해동 사이클의 DNA 추출물에 있어서 모든 시험 온도에서, 구강 면봉에 있어서 -20°C 및 -80°C에서 8주인 것으로 측정되었다.

[0259]

**10주 시점**

[0260]

표 22: 10주 시점 PCR 결과

샘플 유형	저장 조건	기구 (7500 패스트 또는 스텝원플러스)	평균 대립유전자 1 (범위 $\geq -2SD$ 0.44)	평균 대립유전자 2 (범위 $\geq -2SD$ 0.027)	냉동 해동 사이클	통과/실패
추출된 DNA	4°C	7500 패스트	1.650	0.248	N/A	통과
추출된 DNA	4°C	스텝원플러스	0.958	0.079	N/A	통과
추출된 DNA	-20°C	7500 패스트	1.603	0.237	7	통과
추출된 DNA	-20°C	스텝원플러스	0.915	0.104	7	통과
추출된 DNA	-80°C	7500 패스트	1.650	0.248	7	통과
추출된 DNA	-80°C	스텝원플러스	0.957	0.104	7	통과
구강 면봉	-20°C	7500 패스트	1.546	0.254	N/A	통과
구강 면봉	-20°C	스텝원플러스	0.858	0.066	N/A	통과
구강 면봉	-80°C	7500 패스트	1.447	0.233	N/A	통과
구강 면봉	-80°C	스텝원플러스	0.880	0.067	N/A	통과

[0261]

**10주 시점 결론:**

[0263]

모든 추출된 DNA, 구강 면봉(실온 및 4°C 온도 면봉 제외), 및 시약은 10주동안 다양한 저장 조건에서 신뢰성 있는 결과를 수득하였다. 따라서, 안정성은 7 냉동/해동 사이클의 DNA 추출물에 있어서 모든 시험 온도에서, 구강 면봉에 있어서 -20°C 및 -80°C에서 10주인 것으로 측정되었다.

[0264]

**12주 시점**

[0265]

표 23: 12주 시점 PCR 결과

샘플 유형	저장 조건	기구 (7500 패스트 또는 스텝원플러스)	평균 대립유전자 1 (범위 $\geq -2SD$ 0.44)	평균 대립유전자 2 (범위 $\geq -2SD$ 0.027)	냉동/해동 사이클	통과/실패
추출된 DNA	4°C	7500 패스트	1.681	0.246	N/A	통과
추출된 DNA	4°C	스텝원플러스	0.981	0.089	N/A	통과
추출된 DNA	-20°C	7500 패스트	1.623	0.243	8	통과
추출된 DNA	-20°C	스텝원플러스	0.949	0.094	8	통과
추출된 DNA	-80°C	7500 패스트	1.724	0.246	8	통과
추출된 DNA	-80°C	스텝원플러스	1.015	0.107	8	통과
구강 면봉	-20°C	7500 패스트	1.218	0.154	N/A	통과
구강 면봉	-20°C	스텝원플러스	0.721	0.053	N/A	통과
구강 면봉	-80°C	7500 패스트	1.456	0.185	N/A	통과
구강 면봉	-80°C	스텝원플러스	0.918	0.075	N/A	통과

[0266]

## 12주 시점 결론:

[0268]

모든 추출된 DNA, 구강 면봉(실온 및 4°C 온도 면봉 제외), 및 시약은 12주동안 다양한 저장 조건에서 신뢰성 있는 결과를 수득하였다. 따라서, 안정성은 8 냉동/해동 사이클의 DNA 추출물에 있어서 모든 시험 온도에서, 구강 면봉에 있어서 -20°C 및 -80°C에서 12주인 것으로 측정되었다.

[0269]

## 결론

[0270]

대립유전자 1 및 대립유전자 2에 대한 평균 결과를 다양한 저장 온도에서 계산하였다. 데이터는 하기 안정성 주장을 확인하였다:

[0271]

## 표 24: 물질 및 저장 조건

물질 및 저장 조건	안정성	냉동/해동 사이클
4°C에서 추출된 DNA	12주	N/A
-20°C에서 추출된 DNA	12주	8
-80°C에서 추출된 DNA	12주	8
실온에서 오메가 티슈 DNA 키트	12주	N/A
2°C 내지 8°C에서 TaqMan 게노타이핑 마스터 믹스	12주	N/A
-25°C 내지 -15°C에서 커스텀 TaqMan SNP 게노타이핑 어세이	12주	N/A
실온에서 구강 면봉	1주	N/A
4°C에서 구강면봉	3주	N/A
-20°C에서 구강면봉	12주	N/A
-80°C에서 구강면봉	12주	N/A

[0272]

실시예 7: 6개월에서 안정성 연구; 0개월 및 6개월에서의 대조군

[0274]

실시예에 기재된 연구는 상업적인 구강 면봉, 구강 면봉으로부터 추출된 DNA, 다양한 시약, 및 시험에 사용된 대조군의 허용가능한 안정성을 측정하도록 설계되었다. 당해 실시예는 실시예 5 및 6으로부터 계속된, 6개월에 발생된 안정성 데이터의 요약을 포함한다. 당해 리포트는 또한 0일 내지 6개월에 발생된 대조군 안정성 데이터의 요약을 포함한다.

[0275]

## 구강 면봉

[0276]

표 25: 저장 조건 및 수집일

저장	데이터 수집일
4°C 냉장고	6개월
실온	6개월
-20°C 냉동고	6개월
-80°C 냉동고	6개월

[0277]

표 26: 96-웰 플레이트 중의 추출된 DNA 샘플

저장	냉동 해동 사이클	데이터 수집일
4°C 냉장고	N/A	6개월
-20°C 냉동고	사이클 1 내지 10	6개월
-80°C 냉동고	사이클 1 내지 10	6개월

[0279]

격리된 시약을 구강 면봉 및 추출된 DNA 안정성 시험에 사용하였다. 연구의 종점에서, 열거된 시약의 사용 유효 기간을 확립하였다.

[0281]

**결과**

[0282]

6개월 데이터점으로부터의 결과를 하기 표에 요약한다.

[0283]

**6개월 시점**

[0284]

표 27: 개월 시점 시약 로트 정보

시약	로트 #
오메가 E.Z.N.A. 티슈 DNA 키트	D33960205241210CN50312
TaqMan 게노타이핑 마스터 믹스	1204073
커스텀 TaqMan SNP 게노타이핑 어세이	P120814-006 H01
NN 대조군 {추출부터 PCR 분석까지의 공정 대조군으로서 사용되는 정상 개체의 구강 면봉으로부터 분리된 정제된 DNA}	ALU-0912-006
HN 대조군 {공지된 이형접합 개체의 전체 혈액 샘플로부터 분리된 정제된 DNA}	ALU-0912-007
HH 대조군 {대한민국, 서울의 바이오닉스 코 엘티디(ISO0911)로부터 클로닝되고 정제되고 특성화된 DNA}	ALU-0912-008

[0285]

표 28: 6개월 시점 PCR 결과

샘플 유형	저장 조건	기구 (7500 패스트 또는 스텝원플러스)	평균 대립유전자 1 (범위 $\geq$ -2SD 0.44)	평균 대립유전자 2 (범위 $\geq$ -2SD 0.027)	냉동 해동 사이클	통과/실패
추출된 DNA	4°C	7500 패스트	N/A	N/A	N/A	N/A
추출된 DNA	4°C	스텝원플러스	N/A	N/A	N/A	N/A
추출된 DNA	-20°C	7500 패스트	1.496	0.217	9	통과
추출된 DNA	-20°C	스텝원플러스	0.783	0.054	9	실패
추출된 DNA	-80°C	7500 패스트	1.642	0.245	9	통과
추출된 DNA	-80°C	스텝원플러스	0.811	0.069	9	실패
구강 면봉	-20°C	7500 패스트	N/A	N/A	N/A	N/A
구강 면봉	-20°C	스텝원플러스	N/A	N/A	N/A	N/A
구강 면봉	-80°C	7500 패스트	1.654	0.274	N/A	통과
구강 면봉	-80°C	스텝원플러스	0.881	0.067	N/A	실패

[0287]

6개월 시점 결론:

[0289] 추출된 DNA(-20°C 및 -80°C에서 저장됨), 구강 면봉(-80°C에서 저장됨), 및 시약을 포함하는 7500 PCR 기구에서 작동된 모든 샘플은 6개월 동안 다양한 저장 조건에서 신뢰성 있는 결과를 수득하였다. 7500 PCR 기구에 대한 안정성은 9 냉동/해동 사이클의 -20°C 및 -80°C에서 저장된 DNA 추출물에 있어서, -80°C에서 저장된 구강 면봉에 있어서 6개월인 것으로 측정되었다. 스텝원플러스 PCR 기구에 대한 안정성은 여전히 8 냉동/해동 사이클의 4 °C, -20°C 및 -80°C에서 저장된 모든 DNA 추출물에 있어서, -80°C에서 저장된 구강 면봉에 있어서 12주인 것으로 측정되었다.

[0290] 대조군에 대한 0 및 6개월 시점

[0291] 0일 내지 6개월 데이터점에서 결과를 하기 표 및 하기 그래프에 요약한다:

표 29: NN 대조군 - ALU0912-006

데이터 수집일	DNA 샘플 유형	샘플 저장 조건	기구 (7500 패스트 또는 스텝원플러스)	평균 대립 유전자1 범위: <b>0.71-1.91 (<math>\pm 2\text{sd}</math>)</b> <b>0.21-2.21 (<math>\pm 3\text{sd}</math>)</b>	평균 대립 유전자2 범위: <b>0.05-0.27 (<math>\pm 2\text{sd}</math>)</b> <b>0.00-0.34 (<math>\pm 3\text{sd}</math>)</b>	통과/실패
0일	추출됨	4°C	7500 패스트	1.94	0.33	통과
	추출됨	4°C	스텝원플러스	1.11	0.13	통과
	추출됨	-20°C	7500 패스트	1.80	0.26	통과
	추출됨	-20°C	스텝원플러스	1.05	0.09	통과
	추출됨	-80°C	7500 패스트	1.88	0.28	통과
	추출됨	-80°C	스텝원플러스	1.07	0.12	통과
1주	추출됨	4°C, -20°C, -	7500 패스트	1.60	0.23	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	스텝원플러스	1.03	0.10	통과
2주	추출됨	4°C, -20°C, -	7500 패스트	0.69	0.09	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.82	0.10	통과
3주	추출됨	4°C, -20°C, -	7500 패스트	1.44	0.20	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.99	0.08	통과
4주	추출됨	4°C, -20°C, -	7500 패스트	1.32	0.17	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.91	0.10	통과
6주	추출됨	4°C, -20°C, -	7500 패스트	0.95	0.09	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.68	0.03	통과
8주	추출됨	4°C, -20°C, -	7500 패스트	1.28	0.18	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.66	0.09	통과
10주	추출됨	4°C, -20°C, -	7500 패스트	1.20	0.16	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.81	0.07	통과
12주	추출됨	4°C, -20°C, -	7500 패스트	1.31	0.150	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.92	0.07	통과
6개월	추출된 DNA	4°C, -20°C, -80°C	7500 패스트	1.46	0.21	통과

[0293]

[0294]

표 30: HN 대조군 - ALU0912-007

테이타 수집일	샘플 유형	샘플 저장 조건	기구 (7500 패스트 또는 스텝원플러스)	평균 대립 유전자1 범위: <b>0.46-1.25 (<math>\pm 2\text{sd}</math>)</b> <b>0.25-1.45 (<math>\pm 3\text{sd}</math>)</b>	평균 대립 유전자2 범위: <b>0.32-1.85 (<math>\pm 2\text{sd}</math>)</b> <b>0.00-2.23 (<math>\pm 3\text{sd}</math>)</b>	통과/실패
0일	추출됨	4°C	7500 패스트	1.23	1.74	통과
	추출됨	4°C	스텝원플러스	0.85	1.23	통과
	추출됨	-20°C	7500 패스트	1.27	1.78	통과
	추출됨	-20°C	스텝원플러스	0.69	0.90	통과
	추출됨	-80°C	7500 패스트	1.26	1.77	통과
	추출됨	-80°C	스텝원플러스	0.71	0.96	통과
	구강	RT, 4°C, -20°C, -	7500 패스트	1.32	1.96	통과
1주	구강	RT, 4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.72	1.00	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -80°C	7500 패스트	0.90	1.28	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -80°C	스텝원플러스	0.61	0.83	통과
	구강	RT, 4°C, -20°C, -	7500 패스트	1.00	1.43	통과
2주	구강	RT, 4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.57	0.79	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -80°C	7500 패스트	0.84	1.11	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -80°C	스텝원플러스	0.48	0.69	통과
	구강	RT, 4°C, -20°C, -	7500 패스트	0.97	1.35	통과
3주	구강	RT, 4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.56	0.79	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -80°C	7500 패스트	0.92	1.35	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -80°C	스텝원플러스	0.51	0.67	통과
	구강	4°C, -20°C, -80°C	7500 패스트	0.95	1.36	통과
4주	구강	4°C, -20°C, -80°C	스텝원플러스	0.62	0.80	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -80°C	7500 패스트	0.90	1.22	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -80°C	스텝원플러스	0.55	0.78	통과
	구강	4°C, -20°C, -80°C	7500 패스트	1.05	1.46	통과
6주	구강	4°C, -20°C, -80°C	스텝원플러스	0.65	0.83	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -80°C	7500 패스트	0.86	1.14	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -80°C	스텝원플러스	0.53	0.69	통과
	구강	-20°C, -80°C	7500 패스트	0.91	1.36	통과
8주	구강	-20°C, -80°C	스텝원플러스	0.52	0.70	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -80°C	7500 패스트	0.84	1.02	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -80°C	스텝원플러스	0.46	0.58	통과
	구강	-20°C, -80°C	7500 패스트	0.93	1.22	통과
10주	구강	-20°C, -80°C	스텝원플러스	0.56	0.77	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -80°C	7500 패스트	1.02	1.38	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -80°C	스텝원플러스	0.53	0.71	통과
	구강	-20°C, -80°C	7500 패스트	0.96	1.28	통과
12주	구강	-20°C, -80°C	스텝원플러스	0.56	0.78	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -80°C	7500 패스트	0.93	1.27	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -80°C	스텝원플러스	0.45	0.57	통과
	구강	-20°C, -80°C	7500 패스트	0.93	1.27	통과
6개월	구강	-20°C, -80°C	스텝원플러스	0.45	0.57	통과
	추출됨	-20°C, -80°C	7500 패스트	0.98	1.32	통과
	구강	-80°C	7500 패스트	0.77	0.98	통과

[0295]

[0296]

표 31: HH 대조군 - ALU0912-008

테이타 수집일	샘플 유형	샘플 저장 조건	기구 (7500 페스트 또는 스텝원플러스)	평균 대립 유전자1 범위: <b>0.12-0.25 (<math>\pm 2\text{sd}</math>)</b> <b>0.09-0.27 (<math>\pm 3\text{sd}</math>)</b>	평균 대립 유전자2 범위: <b>0.50-3.12 (<math>\pm 2\text{sd}</math>)</b> <b>0.00-3.79 (<math>\pm 3\text{sd}</math>)</b>	통과/실패
0일	추출됨	4°C	7500 페스트	0.23	2.61	통과
	추출됨	4°C	스텝원플러스	0.16	1.52	통과
	추출됨	-20°C	7500 페스트	0.24	2.64	통과
	추출됨	-20°C	스텝원플러스	0.14	1.33	통과
	추출됨	-80°C	7500 페스트	0.24	2.62	통과
	추출됨	-80°C	스텝원플러스	0.15	1.44	통과
	구강	RT, 4°C, -20°C, -	7500 페스트	0.26	2.70	통과
1주	구강	RT, 4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.13	1.45	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	7500 페스트	0.18	1.87	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.13	1.36	통과
	구강	RT, 4°C, -20°C, -	7500 페스트	0.20	2.47	통과
2주	구강	RT, 4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.13	1.33	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	7500 페스트	0.15	1.55	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.093	1.00	통과
	구강	RT, 4°C, -20°C, -	7500 페스트	0.16	1.90	통과
3주	구강	RT, 4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.12	1.22	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	7500 페스트	0.18	1.94	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.11	1.13	통과
	구강	4°C, -20°C, -	7500 페스트	0.17	2.00	통과
4주	구강	4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.13	1.21	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	7500 페스트	0.14	1.49	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.10	1.10	통과
	구강	4°C, -20°C, -	7500 페스트	0.16	1.86	통과
6주	구강	4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.111	1.08	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	7500 페스트	0.14	1.54	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.080	0.86	실패
	구강	-20°C, -80°C	7500 페스트	0.16	1.84	통과
8주	구강	-20°C, -80°C	스텝원플러스	0.10	0.96	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	7500 페스트	0.14	1.41	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.13	0.84	통과
	구강	-20°C, -80°C	7500 페스트	0.20	2.46	통과
10주	구강	-20°C, -80°C	스텝원플러스	0.10	1.02	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	7500 페스트	0.16	1.61	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.083	0.72	실패
	구강	-20°C, -80°C	7500 페스트	0.14	1.69	통과
12주	구강	-20°C, -80°C	스텝원플러스	0.11	1.04	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	7500 페스트	0.21	2.11	통과
	추출됨	4°C, -20°C, -	스텝원플러스	0.12	1.25	통과
	구강	-20°C, -80°C	7500 페스트	0.21	2.11	통과
6개월	구강	-20°C, -80°C	스텝원플러스	0.12	1.24	통과
	추출됨	-20°C, -80°C	7500 페스트	0.21	1.92	통과
	구강	-80°C	7500 페스트	0.13	1.52	통과

[0297]

[0298]

표 32: NN(로트 # ALU012-006) - 도 5

번호	배치 번호	NN (ALU-0912-006)		기구	허용됨 (A) 경고 (W) 거부 (R)
		대립유전자 1 (x)	대립유전자 2 (y)		
1	0일	1.940	0.330	7500	W
2	0일	1.800	0.260	7500	A
3	0일	1.880	0.280	7500	A
4	0일	1.110	0.130	스텝원플러스	A
5	0일	1.050	0.090	스텝원플러스	A
6	0일	1.070	0.120	스텝원플러스	A
7	1주	1.600	0.230	7500	A
8	1주	1.030	0.100	스텝원플러스	A
9	2주	0.690	0.090	7500	A
10	2주	0.820	0.100	스텝원플러스	A
11	3주	1.440	0.200	7500	A
12	3주	0.990	0.080	스텝원플러스	A
13	4주	1.320	0.170	7500	A
14	4주	0.910	0.100	스텝원플러스	A
15	6주	0.950	0.090	7500	A
16	6주	0.680	0.030	스텝원플러스	A
17	8주	1.280	0.180	7500	A
18	8주	0.660	0.090	스텝원플러스	A
19	10주	1.200	0.160	7500	A
20	10주	0.810	0.070	스텝원플러스	A
21	12주	1.310	0.150	7500	A
22	12주	0.920	0.070	스텝원플러스	A
23	6개월	1.460	0.210	7500	A
(+3sd)		2.28	0.37		
(+2sd)		1.91	0.30		
(+1sd)		1.54	0.22		
평균		1.17	0.14		

[0299]

SD	0.37	0.08
(-)1sd	0.80	0.07
(-)2sd	0.43	-0.01
(-)3sd	0.06	-0.08

[0300]

[0301]

표 33: HN(로트 # ALU0912-007) - 도 6

번호	배치 번호	HN (ALU-0912-007)		기구	허용됨 (A) 경고 (W) 거부 (R)
		대립유전자 1 (x)	대립유전자 2 (y)		
1	0일	1.230	1.740	7500	A
2	0일	1.270	1.780	7500	W
3	0일	1.260	1.770	7500	W
4	0일	1.320	1.960	7500	W
5	0일	0.850	1.230	스텝원플러스	A
6	0일	0.690	0.900	스텝원플러스	A
7	0일	0.710	0.960	스텝원플러스	A
8	0일	0.720	1.000	스텝원플러스	A
9	1주	0.900	1.280	7500	A
10	1주	1.000	1.430	7500	A
11	1주	0.610	0.830	스텝원플러스	A
12	1주	0.570	0.790	스텝원플러스	A
13	2주	0.840	1.110	7500	A
14	2주	0.970	1.350	7500	A
15	2주	0.480	0.690	스텝원플러스	A
16	2주	0.560	0.790	스텝원플러스	A
17	3주	0.920	1.350	7500	A
18	3주	0.950	1.360	7500	A
19	3주	0.510	0.670	스텝원플러스	A
20	3주	0.620	0.800	스텝원플러스	A
21	4주	0.900	1.220	7500	A
22	4주	1.050	1.460	7500	A

[0302]

23	4주	0.550	0.780	스텝원플러스	A
24	4주	0.650	0.830	스텝원플러스	A
25	6주	0.860	1.140	7500	A
26	6주	0.910	1.360	7500	A
27	6주	0.530	0.690	스텝원플러스	A
28	6주	0.520	0.700	스텝원플러스	A
29	8주	0.840	1.020	7500	A
30	8주	0.930	1.220	7500	A
31	8주	0.460	0.580	스텝원플러스	A
32	8주	0.560	0.770	스텝원플러스	A
33	10주	1.020	1.380	7500	A
34	10주	0.960	1.280	7500	A
35	10주	0.530	0.710	스텝원플러스	A
36	10주	0.560	0.780	스텝원플러스	A
37	12주	0.930	1.270	7500	A
38	12주	0.930	1.270	7500	A
39	12주	0.450	0.570	스텝원플러스	A
40	12주	0.450	0.570	스텝원플러스	A
41	6개월	0.980	1.320	7500	A
42	6개월	0.770	0.980	7500	A

(+3sd	1.52	2.16
(+2sd	1.27	1.80
(+1sd	1.03	1.44
평균	0.79	1.09
SD	0.24	0.36
(-1sd	0.55	0.73
(-2sd	0.31	0.37
(-3sd	0.07	0.02

[0303]

[0304]

표 34: HH(로트 # ALU0912-008) - 도 7

번호	배치 번호	HH (ALU-0912-008)		기구	허용됨 (A) 경고 (W) 거부 (R)
		대립유전자 1 (x)	대립유전자 2 (y)		
1	0일	0.230	2.610	7500	A
2	0일	0.240	2.640	7500	A
3	0일	0.240	2.620	7500	A
4	0일	0.260	2.700	7500	W
5	0일	0.160	1.520	스텝원플러스	A
6	0일	0.140	1.330	스텝원플러스	A
7	0일	0.150	1.440	스텝원플러스	A
8	0일	0.130	1.450	스텝원플러스	A
9	1주	0.180	1.870	7500	A
10	1주	0.200	2.470	7500	A
11	1주	0.130	1.360	스텝원플러스	A
12	1주	0.130	1.330	스텝원플러스	A
13	2주	0.150	1.550	7500	A
14	2주	0.160	1.900	7500	A
15	2주	0.093	1.000	스텝원플러스	A
16	2주	0.100	1.220	스텝원플러스	A
17	3주	0.180	1.940	스텝원플러스	A
18	3주	0.170	1.950	7500	A
19	3주	0.110	1.130	스텝원플러스	A
20	3주	0.130	1.210	스텝원플러스	A
21	4주	0.140	1.490	7500	A
22	4주	0.160	1.860	7500	A
23	4주	0.100	1.100	스텝원플러스	A
24	4주	0.110	1.080	스텝원플러스	A
25	6주	0.140	1.540	7500	A
26	6주	0.160	1.840	7500	A
27	6주	0.080	0.860	스텝원플러스	W
28	6주	0.097	0.960	스텝원플러스	A
29	8주	0.140	1.410	7500	A
30	8주	0.200	2.460	7500	A

[0305]

31	8주	0.130	0.840	스텝원플러스	A
32	8주	0.100	1.017	스텝원플러스	A
33	10주	0.160	1.610	7500	A
34	10주	0.140	1.690	7500	A
35	10주	0.083	0.720	스텝원플러스	W
36	10주	0.110	1.040	스텝원플러스	n/a
37	12주	0.210	2.110	7500	n/a
38	12주	0.210	2.110	7500	n/a
39	12주	0.120	1.250	스텝원플러스	n/a
40	12주	0.120	1.250	스텝원플러스	n/a
41	6개월	0.210	1.920	7500	n/a
42	6개월	0.130	1.520	7500	n/a
(+)	3sd	0.29	3.19		
(+)	2sd	0.24	2.66		
(+)	1sd	0.20	2.13		
평균		0.15	1.59		
SD		0.05	0.53		
(-)	1sd	0.11	1.06		
(-)	2sd	0.06	0.53		
(-)	3sd	0.02	-0.01		

[0306]

[0307] 모든 대조군, NN(로트 # ALU-0912-006), HN(로트 # ALU-0912-007), 및 HH(로트 # ALU-0912-008)는 각각의 시점에서 모든 허용가능 대립유전자 범위를 통과하였다. 대조군 안정성은 6개월인 것으로 측정되었다.

[0308]

### 결론

[0309]

대립유전자 1 및 대립유전자 2에 대한 평균 결과를 다양한 저장 온도에서 계산하였다. 데이터는 사용된 각각의 기구에 대하여 하기 안정성 주장을 확인하였다:

[0310]

표 35: 7500 PCR 기구

물질 및 저장 조건	안정성	냉동/해동 사이클
4°C에서 추출된 DNA	12주	N/A
-20°C에서 추출된 DNA	6개월	9
-80°C에서 추출된 DNA	6개월	9
실온에서 오메가 티슈 DNA 키트	6개월	N/A
2°C 내지 8°C에서 TaqMan 게노타이핑 마스터 믹스	6개월	N/A
-25°C 내지 -15°C에서 커스텀 TaqMan SNP 게노타이핑 어세이	6개월	N/A
실온에서 구강 면봉	1주	N/A
4°C에서 구강면봉	3주	N/A
-20°C에서 구강면봉	12주	N/A
-80°C에서 구강면봉	6개월	N/A

[0311]

[0312]

표 36: 스텝원플러스 PCR 기구

물질 및 저장 조건	안정성	냉동/해동 사이클
4°C에서 추출된 DNA	12주	N/A
-20°C에서 추출된 DNA	12주	8
-80°C에서 추출된 DNA	12주	8
실온에서 오메가 티슈 DNA 키트	12주	N/A
2°C 내지 8°C에서 TaqMan 게노타이핑 마스터 믹스	12주	N/A
-25°C 내지 -15°C에서 커스텀 TaqMan SNP 게노타이핑 어세이	12주	N/A
실온에서 구강 면봉	1주	N/A
4°C에서 구강면봉	3주	N/A
-20°C에서 구강면봉	12주	N/A
-80°C에서 구강면봉	12주	N/A

[0313]

하기 표에서 데이터는 사용된 각각의 기구에 대하여 하기 안정성 주장을 확인하였다:

[0315]

표 37: 대조군에 대한 6개월 안정성

대조군	안정성	대조군 저장 조건
NN (로트# ALU0912-06)	6개월	-90°C 내지 -65°C
HN (로트# ALU0912-07)	6개월	-90°C 내지 -65°C
HH (로트# ALU0912-08)	6개월	-90°C 내지 -65°C

[0316]

#### 실시예 8: 8개월에서 안정성 연구

[0318]

실시예에 기재된 연구는 상업적인 구강 면봉, 구강 면봉으로부터 추출된 DNA, 다양한 시약, 및 시험에 사용된 대조군의 허용가능한 안정성을 측정하도록 설계되었다. 당해 실시예는 실시예 5, 6 및 7로부터 계속된, 8개월에 발생된 안정성 데이터의 요약을 포함한다. 당해 실시예는 또한 8개월에 발생된 대조군 안정성 데이터의 요약을 포함한다.

[0319]

#### 구강 면봉

[0320]

표 38: 저장 조건 및 수집일

저장	데이터 수집일
-20°C 냉동고	8개월
-80°C 냉동고	8개월

[0321]

표 39: 96-웰 플레이트 중의 추출된 DNA 샘플

저장	냉동 해동 사이클	데이터 수집일
-20°C 냉동고	물질이 사용될 때 까지 또는 실패할 때까지 사이클 1	8개월
-80°C 냉동고	물질이 사용될 때 까지 또는 실패할 때까지 사이클 1	8개월

[0323]

격리된 시약을 구강 면봉 및 추출된 DNA 안정성 시험에 사용하였다. 연구의 종점에서, 열거된 시약의 조합된 사용에 대한 유효 기간을 확립될 것이다.

[0325]

#### 결과

[0326]

8개월 데이터점으로부터의 결과를 하기 표에 요약한다.

[0327]

#### 8개월 시점

[0328]

표 40: 8개월 시점 PCR 결과

샘플 유형	저장 조건	기구 (7500 패스트 또는 스텝원플러스)	평균 대립유전자 1 (범위 $\geq$ -2SD 0.44)	평균 대립유전자 2 (범위 $\geq$ -2SD 0.027)	냉동 해동 사이클	통과 /실패
추출된 DNA	4°C	7500 패스트	N/A	N/A	N/A	N/A
추출된 DNA	4°C	스텝원플러스	N/A	N/A	N/A	N/A
추출된 DNA	-20°C	7500 패스트	1.423	0.279	10	통과
추출된 DNA	-20°C	스텝원플러스	N/A	N/A	N/A	N/A
추출된 DNA	-80°C	7500 패스트	1.516	0.269	10	통과
추출된 DNA	-80°C	스텝원플러스	N/A	N/A	N/A	N/A
구강 면봉	-20°C	7500 패스트	1.122	0.229	N/A	통과
구강 면봉	-20°C	스텝원플러스	N/A	N/A	N/A	N/A
구강 면봉	-80°C	7500 패스트	1.113	0.246	N/A	통과
구강 면봉	-80°C	스텝원플러스	N/A	N/A	N/A	N/A

[0329]

8개월 시점 결론:

[0331]

추출된 DNA(-20°C 및 -80°C에서 저장됨), 구강 면봉(-20°C 및 -80°C에서 저장됨), 및 시약을 포함하는 7500 PCR 기구에서 작동된 모든 샘플은 8개월 동안 다양한 저장 조건에서 신뢰성 있는 결과를 수득하였다. 따라서, 7500 PCR 기구에 대한 안정성은 10 냉동/해동 사이클의 -20°C 및 -80°C에서 저장된 DNA 추출물에 있어서, -20°C 및 -80°C에서 저장된 구강 면봉에 있어서 8개월인 것으로 측정되었다.

[0332]

## 대조군 안정성

[0333]

8개월 데이터점에서 7500 패스트 리얼-타임 PCR 시스템에 대한 결과를 하기 표에 요약한다.

[0334]

표 41: NN 대조군 - ALU0912-006

데이터 수집일	샘플 유형	저장 조건	기구 7500 패스트	평균 대립 유전자 1 범위: 0.71-1.91( $\pm 2\text{sd}$ ) 0.41-2.21( $\pm 3\text{sd}$ )	평균 대립 유전자 2 범위: 0.05-0.27( $\pm 2\text{sd}$ ) 0.00-0.34( $\pm 3\text{sd}$ )	통과/ 실패
8개월	추출된 DNA	-20°C, -80°C	7500 패스트	1.38	0.27	통과

[0335]

표 42: HN 대조군 - ALU0912-007

데이터 수집일	샘플 유형	저장 조건	기구 7500 패스트	평균 대립 유전자 1 범위: 0.46-1.25( $\pm 2\text{sd}$ ) 0.25-1.45( $\pm 3\text{sd}$ )	평균 대립 유전자 2 범위: 0.32-1.85( $\pm 2\text{sd}$ ) 0.00-2.23( $\pm 3\text{sd}$ )	통과/ 실패
8개월	추출된 DNA	-20°C, -80°C	7500 패스트	0.76	1.07	통과
	구강 면봉	-20°C, -80°C	7500 패스트	0.74	1.11	통과

[0337]

표 43: HH 대조군 - ALU-0912-008

데이터 수집일	샘플 유형	저장 조건	기구 7500 패스트	평균 대립 유전자 1 범위: 0.12-0.25( $\pm 2\text{sd}$ ) 0.09-0.27( $\pm 3\text{sd}$ )	평균 대립 유전자 2 범위: 0.50-3.12( $\pm 2\text{sd}$ ) 0.00-3.79( $\pm 3\text{sd}$ )	통과/ 실패
8개월	추출된 DNA	-20°C, -80°C	7500 패스트	0.17	1.64	통과
	구강 면봉	-20°C, -80°C	7500 패스트	0.14	1.79	통과

[0339]

[0340] 모든 대조군, NN(로트 # ALU-0912-006), HN(로트 # ALU-0912-007), 및 HH(로트 # ALU-0912-008)는 8개월 시점에서 모든 허용가능 대립유전자 범위를 통과하였다. 7500 패스트 PCR 기구에 대한 대조군 안정성은 8개월인 것으로 측정되었다.

### 결론

[0342] 대립유전자 1 및 대립유전자 2에 대한 평균 결과를 다양한 저장 온도에서 계산하였다. 데이터는 사용된 각각의 기구에 대하여 하기 안정성 주장을 확인하였다:

**표 44: 7500 실시간 PCR 시스템**

물질 및 저장 조건	안정성	냉동/해동 사이클
4°C에서 추출된 DNA	12주	N/A
-20°C에서 추출된 DNA	8개월	10
-80°C에서 추출된 DNA	8개월	10
실온에서 오메가 티슈 DNA 키트	8개월	N/A
2°C 내지 8°C에서 TaqMan 게노타이핑 마스터 믹스	8개월	N/A
-25°C 내지 -15°C에서 커스텀 TaqMan SNP 게노타이핑 어세이	8개월	N/A
실온에서 구강 면봉	1주	N/A
4°C에서 구강면봉	3주	N/A
-20°C에서 구강면봉	8개월	N/A
-80°C에서 구강면봉	8개월	N/A

[0344]

**표 45: 스텝원플러스 실시간 PCR 시스템**

물질 및 저장 조건	안정성	냉동/해동 사이클
4°C에서 추출된 DNA	12주	N/A
-20°C에서 추출된 DNA	12주	8
-80°C에서 추출된 DNA	12주	8
실온에서 오메가 티슈 DNA 키트	12주	N/A
2°C 내지 8°C에서 TaqMan 게노타이핑 마스터 믹스	12주	N/A
-25°C 내지 -15°C에서 커스텀 TaqMan SNP 게노타이핑 어세이	12주	N/A
실온에서 구강 면봉	1주	N/A
4°C에서 구강면봉	3주	N/A
-20°C에서 구강면봉	12주	N/A
-80°C에서 구강면봉	12주	N/A

[0346]

[0347] 하기 7500 기구 데이터는 하기 표 46에 나타낸 바와 같이, 각각의 대조군에 대하여 하기 안정성 주장을 확인하였다:

**표 46: 대조군 및 안정성 데이터**

대조군	안정성
NN (로트# ALU0912-06)	7500에 있어서 8개월
HN (로트# ALU0912-07)	7500에 있어서 8개월
HH (로트# ALU0912-08)	7500에 있어서 8개월

[0349]

### 실시예 9: 10개월에서 안정성 연구

[0350] 실시예에 기재된 연구는 상업적인 구강 면봉, 구강 면봉으로부터 추출된 DNA, 다양한 시약, 및 시험에 사용된 대조군의 허용가능한 안정성을 측정하도록 설계되었다. 당해 실시예는 실시예 5, 6, 7 및 8로부터 계속된, 10개월에 발생된 안정성 데이터의 요약을 포함한다. 당해 리포트는 또한 10개월에 발생된 대조군 안정성 데이터의 요약을 포함한다.

[0352] 구강 면봉

[0353] 표 47: 저장 조건 및 수집일

저장	데이터 수집일
-20°C 냉동고	10개월
-80°C 냉동고	10개월

[0354]

[0355] 표 48: 96-웰 플레이트 중의 추출된 DNA 샘플

저장	냉동 해동 사이클	데이터 수집일
-20°C 냉동고	물질이 사용될 때 까지 또는 실패할 때까지 사이클 1	10개월
-80°C 냉동고	물질이 사용될 때 까지 또는 실패할 때까지 사이클 1	10개월

[0356]

[0357] 시약

[0358] 격리된 시약을 구강 면봉 및 추출된 DNA 안정성 시험에 사용하였다. 당해 연구의 종점에서, 열거된 시약의 조합된 사용에 대하여 할당된 유효 기간을 확립하였다.

[0359] 결과

[0360] 10개월 데이터점으로부터의 결과를 하기 표에 요약한다.

[0361] 10개월 시점

[0362] 표 49: 10개월 시점 PCR 결과

샘플 유형	저장 조건	기구 (7500 패스트 또는 스텝원플러스)	평균 대립유전자 1 (범위 $\geq -2SD$ 0.44)	평균 대립유전자 2 (범위 $\geq -2SD$ 0.027)	냉동 해동 사이클	통과 /실패
추출된 DNA	4°C	7500 패스트	N/A	N/A	N/A	N/A
추출된 DNA	4°C	스텝원플러스	N/A	N/A	N/A	N/A
추출된 DNA	-20°C	7500 패스트	1.41	0.24	11	통과
추출된 DNA	-20°C	스텝원플러스	N/A	N/A	N/A	N/A
추출된 DNA	-80°C	7500 패스트	1.48	0.23	11	통과
추출된 DNA	-80°C	스텝원플러스	N/A	N/A	N/A	N/A
구강 면봉	-20°C	7500 패스트	0.72	0.19	N/A	통과
구강 면봉	-20°C	스텝원플러스	N/A	N/A	N/A	N/A
구강 면봉	-80°C	7500 패스트	0.74	0.16	N/A	통과
구강 면봉	-80°C	스텝원플러스	N/A	N/A	N/A	N/A

[0363]

[0364] 10개월 시점 결론:

[0365] 추출된 DNA(-20°C 및 -80°C에서 저장됨), 구강 면봉(-20°C 및 -80°C에서 저장됨), 및 시약을 포함하는 패스트 리얼-타임 PCR 기구에서 작동된 모든 샘플은 10개월 동안 다양한 저장 조건에서 신뢰성 있는 결과를 수득하였다. 따라서, 7500 패스트 리얼-타임 PCR 기구에 대한 안정성은 11 냉동/해동 사이클의 -20°C 및 -80°C에서 저장된 DNA 추출물에 있어서, -20°C 및 -80°C에서 저장된 구강 면봉에 있어서 10개월인 것으로 측정되었다.

[0366]

10개월 대조군 안정성

7500 패스트 리얼-타임 PCR 시스템에 대한 10개월 데이터점에서의 결과를 하기 표에 요약한다.

[0368]

표 50: NN 대조군 - ALU0912-006

데이터 수집일	샘플 유형	저장 조건	기구 7500 패스트	평균 대립 유전자 1 범위: 0.71-1.91(±2sd) 0.41-2.21(±3sd)	평균 대립 유전자 2 범위: 0.05-0.27(±2sd) 0.00-0.34(±3sd)	통과/ 실패
10개월	추출된 DNA	-20°C, -80°C	7500 패스트	1.51	0.24	통과

[0369]

표 51: HN 대조군 - ALU0912-007

데이터 수집일	샘플 유형	저장 조건	기구 7500 패스트	평균 대립 유전자 1 범위: 0.46-1.25(±2sd) 0.25-1.45(±3sd)	평균 대립 유전자 2 범위: 0.32-1.85(±2sd) 0.00-2.23(±3sd)	통과/ 실패
10개월	추출된 DNA	-20°C, -80°C	7500 패스트	0.89	1.22	통과
	구강 면봉	-20°C, -80°C	7500 패스트	0.70	0.95	통과

[0371]

표 52: HH 대조군 - ALU-0912-008

데이터 수집일	샘플 유형	저장 조건	기구 7500 패스트	평균 대립 유전자 1 범위: 0.12-0.25(±2sd) 0.09-0.27(±3sd)	평균 대립 유전자 2 범위: 0.50-3.12(±2sd) 0.00-3.79(±3sd)	통과/ 실패
10개월	추출된 DNA	-20°C, -80°C	7500 패스트	0.17	1.63	통과
	구강 면봉	-20°C, -80°C	7500 패스트	0.14	1.20	통과

[0373]

모든 대조군, NN(로트 # ALU-0912-006), HN(로트 # ALU-0912-007), 및 HH(로트 # ALU-0912-008)는 10개월 시점에서 모든 허용가능 대립유전자 범위를 통과하였다. 7500 패스트 PCR 시스템에 대한 대조군 안정성은 10개월인 것으로 측정되었다.

[0375]

## 결론

[0376]

대립유전자 1 및 대립유전자 2에 대한 평균 결과를 다양한 저장 온도에서 계산하였다. 데이터는 사용된 각각의 기구에 대하여 하기 안정성 주장을 확인하였다:

[0377]

표 53: 7500 PCR 기구

물질 및 저장 조건	안정성	냉동/해동 사이클
4°C에서 추출된 DNA	12주	N/A
-20°C에서 추출된 DNA	10개월	11
-80°C에서 추출된 DNA	10개월	11
실온에서 오메가 티슈 DNA 키트	10개월	N/A
2°C 내지 8°C에서 TaqMan 게노타이핑 마스터 믹스	10개월	N/A
-25°C 내지 -15°C에서 커스텀 TaqMan SNP 게노타이핑 어세이	8개월	N/A
실온에서 구강 면봉	1주	N/A
4°C에서 구강면봉	3주	N/A
-20°C에서 구강면봉	10개월	N/A
-80°C에서 구강면봉	10개월	N/A

[0378]

[0379]

표 54: 스텝원플러스 PCR 기구

물질 및 저장 조건	안정성	냉동/해동 사이클
4°C에서 추출된 DNA	12주	N/A
-20°C에서 추출된 DNA	12주	8
-80°C에서 추출된 DNA	12주	8
실온에서 오메가 티슈 DNA 키트	12주	N/A
2°C 내지 8°C에서 TaqMan 게노타이핑 마스터 믹스	12주	N/A
-25°C 내지 -15°C에서 커스텀 TaqMan SNP 게노타이핑 어세이	12주	N/A
실온에서 구강 면봉	1주	N/A
4°C에서 구강면봉	3주	N/A
-20°C에서 구강면봉	12주	N/A
-80°C에서 구강면봉	12주	N/A

[0380]

하기 7500 패스트 리얼-타임 기구 데이터는 각각의 대조군에 대하여 하기 안정성 주장을 확인하였다:

[0382]

표 55: 대조군 및 안정성 시간

대조군	안정성
NN (로트# ALU0912-06)	7500에 있어서 10개월
HN (로트# ALU0912-07)	7500에 있어서 10개월
HH (로트# ALU0912-08)	7500에 있어서 10개월

[0383]

#### 실시예 10: 12개월에서 안정성 연구

[0385]

실시예에 기재된 연구는 상업적인 구강 면봉, 구강 면봉으로부터 추출된 DNA, 다양한 시약, 및 시험에 사용된 대조군의 허용가능한 안정성을 측정하도록 설계되었다. 당해 실시예는 실시예 5, 6, 7, 8 및 9로부터 계속된, 12개월에 발생된 안정성 데이터의 요약을 포함한다. 당해 리포트는 또한 10개월에 발생된 대조군 안정성 데이터의 요약을 포함한다.

[0386]

12개월 데이터점으로부터의 결과를 하기 표에 요약한다.

[0387]

#### 12개월 시점

[0388]

표 56: 12개월 시점 PCR 결과

샘플 유형	저장 조건	기구 (7500 패스트 또는 스텝원플러스)	평균 대립유전자 1 (범위 $\geq -2SD$ 0.44)	평균 대립유전자 2 (범위 $\geq -2SD$ 0.027)	냉동 해동 사이클	통과 /실패
추출된 DNA	4°C	7500 패스트	N/A	N/A	N/A	N/A
추출된 DNA	4°C	스텝원플러스	N/A	N/A	N/A	N/A
추출된 DNA	-20°C	7500 패스트	1.37	0.21	12	통과
추출된 DNA	-20°C	스텝원플러스	N/A	N/A	N/A	N/A
추출된 DNA	-80°C	7500 패스트	1.40	0.19	12	통과
추출된 DNA	-80°C	스텝원플러스	N/A	N/A	N/A	N/A
구강 면봉	-20°C	7500 패스트	0.64	0.12	3	통과
구강 면봉	-20°C	스텝원플러스	N/A	N/A	N/A	N/A
구강 면봉	-80°C	7500 패스트	0.94	0.23	3	통과
구강 면봉	-80°C	스텝원플러스	N/A	N/A	N/A	N/A

[0389]

#### 12개월 시간점 결론

[0390]

추출된 DNA(-20°C 및 -80°C에서 저장됨), 구강 면봉(-20°C 및 -80°C에서 저장됨), 및 시약을 포함하는 패스트 리얼-타임 PCR 기구에서 작동된 모든 샘플은 12개월 동안 다양한 저장 조건에서 신뢰성 있는 결과를 수득하였다. 따라서, 7500 패스트 리얼-타임 PCR 기구에 대한 안정성은 12 냉동/해동 사이클의 -20°C 및 -80°C에서 저장된 DNA 추출물에 있어서, 3 냉동/해동 사이클의 -20°C 및 -80°C에서 저장된 구강 면봉에 있어서 12개

월인 것으로 측정되었다.

12개월 대조군 안정성

7500 패스트 리얼-타임 PCR 시스템에 대한 12개월 데이터점에서의 결과를 하기 표에 요약한다.

표 57: NN 대조군 - ALU0912-006

데이터 수집일	샘플 유형	저장 조건	기구	평균 대립 유전자 1 범위: 0.71-1.91(±2sd) 0.41-2.21(±3sd)	평균 대립 유전자 2 범위: 0.05-0.27(±2sd) 0.00-0.34(±3sd)	통과/ 실패
12개월	추출된 DNA	-20°C, -80°C	7500 패스트	1.12	0.21	통과

[0395]

표 58: HN 대조군 - ALU0912-007

데이터 수집일	샘플 유형	저장 조건	기구	평균 대립 유전자 1 범위: 0.46-1.25(±2sd) 0.25-1.45(±3sd)	평균 대립 유전자 2 범위: 0.32-1.85(±2sd) 0.00-2.23(±3sd)	통과/ 실패
12개월	추출된 DNA	-20°C, -80°C	7500 패스트	0.66	0.90	통과
	구강 면봉	-20°C, -80°C	7500 패스트	0.70	1.03	통과

[0397]

표 59: HH 대조군 - ALU-0912-008

데이터 수집일	샘플 유형	저장 조건	기구	평균 대립 유전자 1 범위: 0.12-0.25(±2sd) 0.09-0.27(±3sd)	평균 대립 유전자 2 범위: 0.50-3.12(±2sd) 0.00-3.79(±3sd)	통과/ 실패
12월	추출된 DNA	-20°C, -80°C	7500 패스트	0.10	0.95	통과
	구강 면봉	-20°C, -80°C	7500 패스트	0.08	1.24	통과

[0399]

모든 대조군, NN(로트 # ALU-0912-006), HN(로트 # ALU-0912-007), 및 HH(로트 # ALU-0912-008)는 12개월 시점에서 모든 허용가능 대립유전자 범위를 통과하였다. 7500 패스트 PCR 시스템에 대한 대조군 안정성은 10개월인 것으로 측정되었다.

**결론**

대립유전자 1 및 대립유전자 2에 대한 평균 결과를 다양한 저장 온도에서 계산하였다. 데이터는 하기 안정성을 확인하였다:

[0403]

표 60: 7500 PCR 기구

물질 및 저장 조건	안정성	냉동/해동 사이클
4°C에서 추출된 DNA	12주	N/A
-20°C에서 추출된 DNA	12개월	12
-80°C에서 추출된 DNA	12개월	12
실온에서 오메가 티슈 DNA 키트	12개월	N/A
2°C 내지 8°C에서 TaqMan 게노타이핑 마스터 믹스	12개월	N/A
-25°C 내지 -15°C에서 커스텀 TaqMan SNP 게노타이핑 어세이	12개월	N/A
실온에서 구강 면봉	1주	N/A
4°C에서 구강면봉	3주	N/A
-20°C에서 구강면봉	12개월	N/A
-80°C에서 구강면봉	12개월	N/A

[0404]

표 61: 스텝원플러스 PCR 기구

물질 및 저장 조건	안정성	냉동/해동 사이클
4°C에서 추출된 DNA	12주	N/A
-20°C에서 추출된 DNA	12주	8
-80°C에서 추출된 DNA	12주	8
실온에서 오메가 티슈 DNA 키트	12주	N/A
2°C 내지 8°C에서 TaqMan 게노타이핑 마스터 믹스	12주	N/A
-25°C 내지 -15°C에서 커스텀 TaqMan SNP 게노타이핑 어세이	12주	N/A
실온에서 구강 면봉	1주	N/A
4°C에서 구강면봉	3주	N/A
-20°C에서 구강면봉	12주	N/A
-80°C에서 구강면봉	12주	N/A

[0406]

하기 7500 패스트 리얼-타임 기구 데이터는 각각의 대조군에 대하여 하기 안정성 주장을 확인하였다:

[0408]

표 62: 대조군 및 안정성 시간

대조군	안정성
NN (로트# ALU0912-06)	7500에 있어서 12개월
HN (로트# ALU0912-07)	7500에 있어서 12개월
HH (로트# ALU0912-08)	7500에 있어서 12개월

[0409]

#### 참조

[0411]

모든 제목 및 부문 명칭은 명백함 및 참조 목적만을 위하여 사용되고, 어떠한 방식으로도 제한으로 간주되지 않는다. 예를 들면, 당해 분야의 숙련가는 본원에 기재된 본 발명의 취지 및 범위에 따라 적절하게 상이한 제목으로부터 다양한 측면을 조합하는 것의 유용성을 인식할 것이다.

[0412]

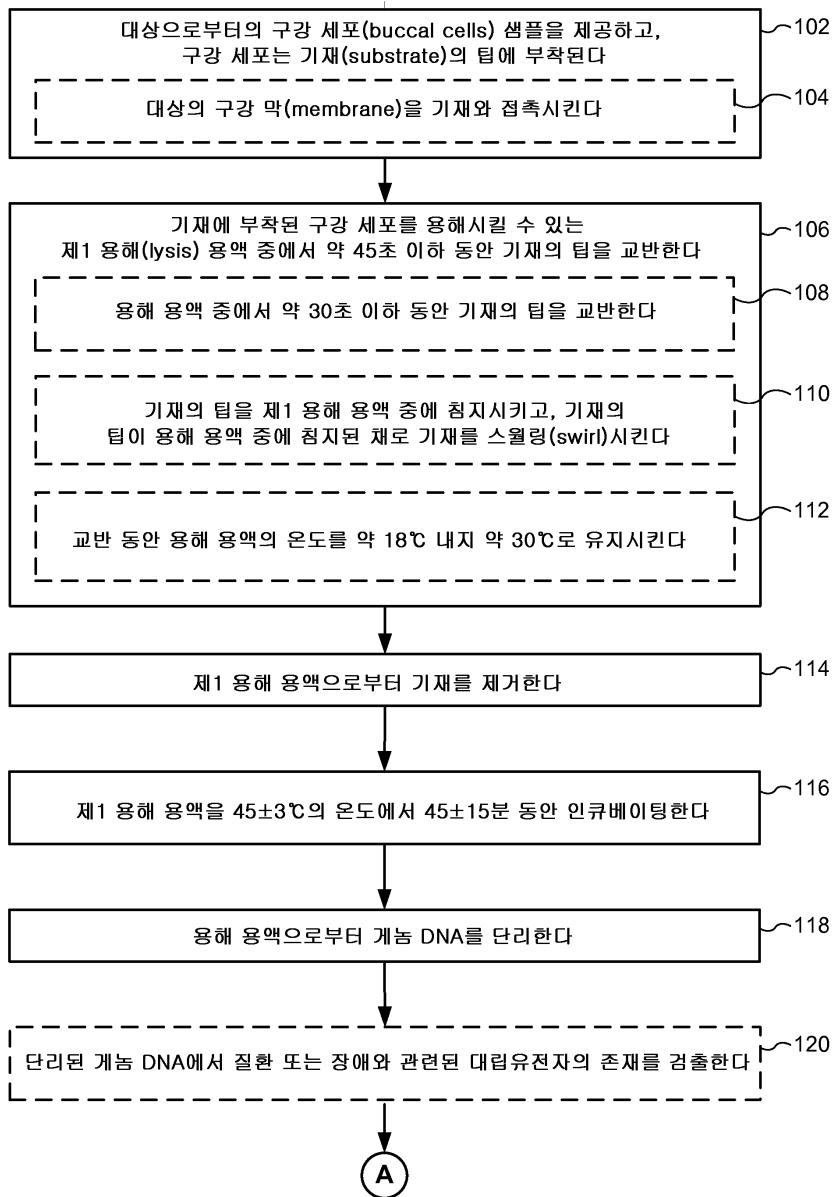
본원에 기재된 모든 참조는 각각의 개별적인 문헌 또는 특허 또는 특허 출원이 특정하게 개별적으로 모든 면에서 그 전문이 참조로서 인용되는 것과 동일한 정도로 모든 면에서 그 전문이 본원에 참조로서 인용된다.

[0413]

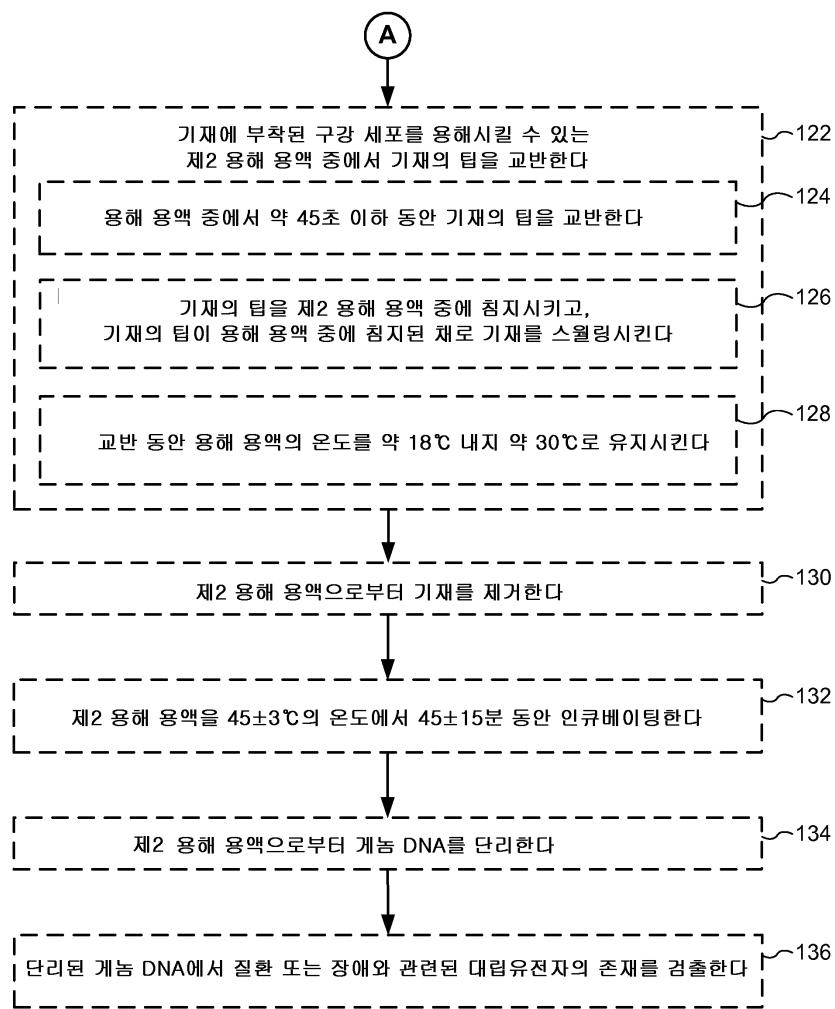
본 출원의 많은 개질 및 변형은 당해 분야의 숙련가에게 명백할 것인 바, 이의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 만들어질 수 있다. 본원에 기재된 특정한 양태 및 실시예는 오직 예의 방식으로만 제공되고, 출원은 청구범위에 의해 권리가 부여되는 등가물의 완전한 범위에 따라 첨부된 청구범위에 의해서만 제한된다.

## 도면

## 도면 1a



## 도면 1b



## 도면2

ACD Fw프라이머:  
(서열 번호 1)  
5'-TCC ACC ACC ACT CAG CTG TA

ACD Re프라이머:  
(서열 번호 2)  
5'-CCA TCT CAG GCC TCA GCT T  
(60 bp)

AV Fw 프라이머:  
(서열 번호 3)  
5'-TGC AGC CCT ACC ACT CTC AA

AV Re 프라이머:  
(서열 번호 4)  
5'-AGG CCT CGT TGC TAG G  
(150 bp)

Real Fw프라이머:  
(서열 번호 5)  
5'-TAG TCT CTT ATT CTA ATA GA

Real Re프라이머:  
(서열 번호 6)  
5'-GCT GCA GAC TCT GTG TTT AA  
(860 bp)

ACD Fw2프라이머:  
(서열 번호 7)  
5'-CCA TCC CTC CTT CTG TCT TCT G

ACD Re2프라이머:  
(서열 번호 8)  
5'-CGG GCC CCT CCA TCT C  
(140 bp)

ACD Fw3프라이머:  
(서열 번호 9)  
5'-CAG AGA AGG GAG GGT GTG GTT

ACD Re3프라이머:  
(서열 번호 10)  
5'-GGG CGA AGA TGG TGA AGC T  
(190 bp)

ACD Fw4프라이머:  
(서열 번호 11)  
5'-TCC TCG TCC TCT CCA CCT GTA

ACD Re4프라이머:  
(서열 번호 12)  
5'-AGC TGG CAA GGA GGC CC

ACD Fw5 프라이머:  
(서열 번호 13)  
5'-TTT GGG CTT TCC CAC ATG C

ACD Re5 프라이머:  
(서열 번호 14)  
5'-GGC AGA CGG AGG TCA TCT CA

ACD Fw6 프라이머:  
(서열 번호 15)  
5'-GTA GTA CCG TGC TCT CTG

ACD Re6 프라이머:  
(서열 번호 16)  
5'-AGT TCC CCA TAA GAA TCC CCC

ACD Fw7 프라이머:  
(서열 번호 17)  
5'-GGC TGG ACC CCC AGA GG

ACD Re7 프라이머:  
(서열 번호 18)  
5'-ACC CCT CGG GGA AGT AAG G

ACD Fw8 프라이머:  
(서열 번호 19)  
5'-AAC CTT TAC GAG ACC CTG GGA

ACD Re8 프라이머:  
(서열 번호 20)  
5'-GAC TCC CAT CCA TCA TGC CC

ACD Fw9 프라이머:  
(서열 번호 21)  
5'-AGT CGT TGG ATC CAC CAC CA

ACD Re9 프라이머:  
(서열 번호 22)  
5'-GAC GTC ATT TCC TAC TGT TTC AGG

ACD Fw10 프라이머:  
(서열 번호 23)  
5'-CCC CCC AGA AAC AGC CTG

ACD Re10 프라이머:  
(서열 번호 24)  
5'-TTC TAA GGG GTT AAG GAG AAA GCT T

## 도면3

정상 프로브 1:  
(서열 번호 25)  
VIC-CAC GGA CCG CAC GGA-NFQ  
(15 bp)

돌연변이형 프로브 1:  
(서열 번호 26)  
FAM-CAC GGA CCA CAC GGA-NFQ

정상 프로브 2:  
(서열 번호 27)  
VIC-ACA CGG ACC GCA CG-NFQ

돌연변이형 프로브 2:  
(서열 번호 28)  
FAM-ACA CGG ACC ACA CG-NFQ  
(14 bp)

정상 프로브 3:  
(서열 번호 29)  
VIC-TAC ACG GAC CGC A-NFQ

돌연변이형 프로브 3:  
(서열 번호 30)  
FAM-TAC ACG GAC CAC A-NFQ  
(13 bp)

정상 프로브 4:  
(서열 번호 31)  
VIC-CTG TAC ACG GAC CGC ACG-NFQ

돌연변이형 프로브 4:  
(서열 번호 32)  
FAM-CTG TAC ACG GAC CAC ACG-NFQ  
(18 bp)

정상 프로브 5:  
(서열 번호 33)  
VIC-CTG TAC ACG GAC CGC ACG GAG-NFQ

돌연변이형 프로브 5:  
(서열 번호 34)  
FAM-CTG TAC ACG GAC CAC ACG GAG-NFQ  
(21 bp)

정상 프로브 6:  
(서열 번호 35)  
VIC-GCT GTA CAC GGA CCG CAC GGA GAA-NFQ

돌연변이형 프로브 6:  
(서열 번호 36)  
FAM-GCT GTA CAC GGA CCA CAC GGA GAA-NFQ

정상 프로브 7:  
(서열 번호 37)  
VIC-ACC GCA CGG AGA AGC-NFQ

돌연변이형 프로브 7:  
(서열 번호 38)  
FAM-ACC ACA CGG AGA AGC-NFQ

정상 프로브 8:  
(서열 번호 39)  
VIC-ACC GCA CGG AGA AGC TGA GGC-NFQ

돌연변이형 프로브 8:  
(서열 번호 40)  
FAM-ACC ACA CGG AGA AGC TGA GGC-NFQ

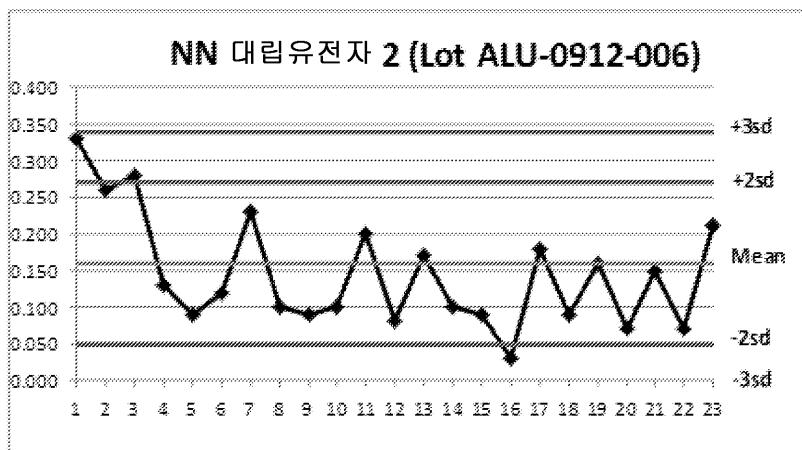
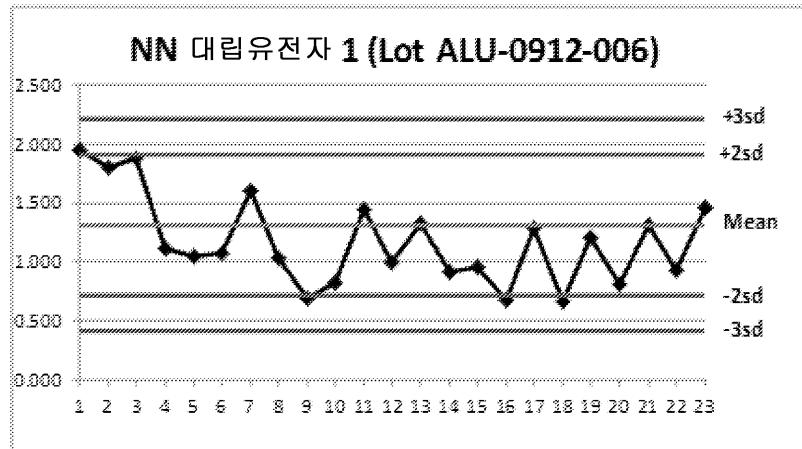
정상 프로브 8:  
(서열 번호 41)  
VIC-ACC GCA CGG AGA AGC TGA GGC CTG-NFQ

돌연변이형 프로브 8:  
(서열 번호 42)  
FAM-ACC ACA CGG AGA AGC TGA GGC CTG-NFQ

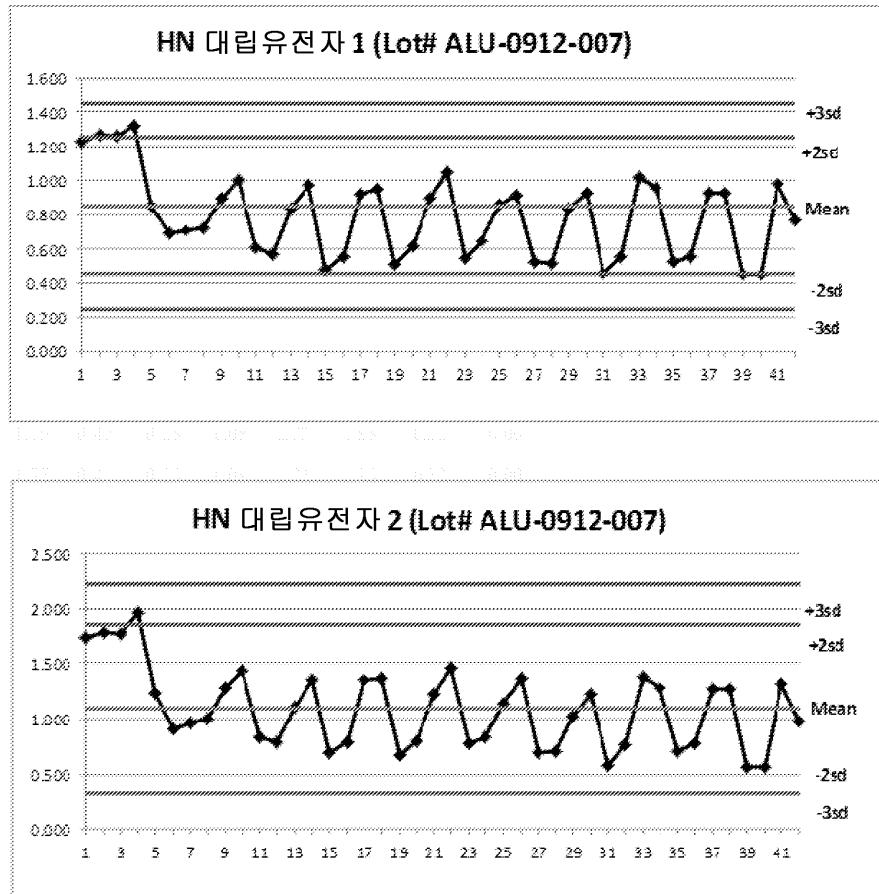
## 도면4

	시간	40X 용적	7500 결과	StepOnePlus 결과	결과 품질/신뢰성		
36시01분 3 초 @ 95°C	60 분	0.2 μL	R1: 0.582 R2: 0.347 R3: 0.326	R1: 0.123 R2: 0.099 R3: 0.099	대립유전자1 대립유전자2 대립유전자1 대립유전자2 대립유전자1 대립유전자2		
40시01분 3 초 @ 95°C	83 분	0.15 μL	R1: 1.293 R2: 1.065 R3: 1.070	R1: 0.223 R2: 0.260 R3: 0.176	0.786 R1: 0.786 R2: 0.719 R3: 0.617	허용가능함 실패함	
36시01분 5 초 @ 95°C	75 분	0.15 μL	R1: 0.724 R2: 0.386 R3: 0.415	R1: 0.164 R2: 0.153 R3: 0.155	R1: 0.343 R2: 0.229 R3: 0.202	매우 우수함 우수함	
37시01분 5 초 @ 95°C	78 분	0.15 μL	R1: 0.893 R2: 0.614 R3: 0.592	R1: 0.187 R2: 0.163 R3: 0.155	R1: 0.511 R2: 0.325 R3: 0.300	허용가능함 허용가능함 허용가능함	
38시01분 5 초 @ 95°C	80 분	0.15 μL	R1: 0.951 R2: 0.572 R3: 0.710	R1: 0.181 R2: 0.119 R3: 0.164	R1: 0.604 R2: 0.429 R3: 0.403	0.066 R1: 0.066 R3: 0.037	우수함 허용가능함
39시01분 5 초 @ 95°C	82 분	0.15 μL	R1: 1.167 R2: 0.806 R3: 0.812	R1: 0.250 R2: 0.190 R3: 0.170	R1: 0.698 R2: 0.546 R3: 0.528	0.084 R1: 0.052 R2: 0.056	우수함 허용가능함
40시01분 5 초 @ 95°C	85 분	0.15 μL	R1: 1.235 R2: 1.018 R3: 1.038	R1: 0.238 R2: 0.221 R3: 0.216	R1: 0.781 R2: 0.559 R3: 0.565	0.092 R1: 0.050 R3: 0.057	매우 우수함 우수함

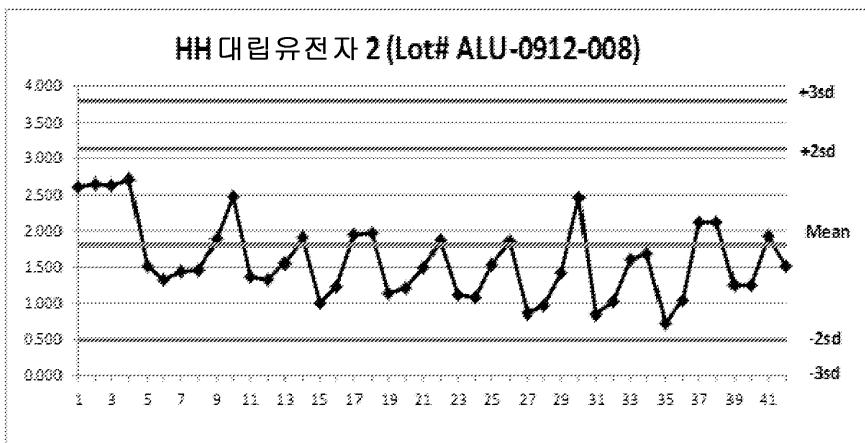
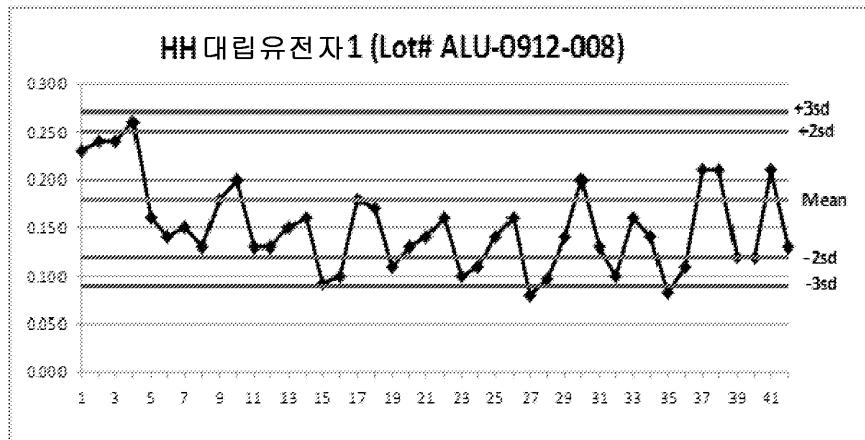
## 도면5



## 도면6



## 도면7



## 서 열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Avellino Lab USA, Inc.

&lt;120&gt; METHODS FOR IMPROVED ISOLATION OF GENOMIC DNA TEMPLATES FOR ALLELE DETECTION

&lt;130&gt; 070335-5006-WO

&lt;140&gt; PCT/US2014/029466

&lt;141&gt; 2014-03-14

&lt;150&gt; 61/852,358

&lt;151&gt; 2013-03-15

&lt;150&gt; 61/852,357

&lt;151&gt; 2013-03-15

&lt;160&gt; 42

&lt;170&gt; Patent in version 3.2

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial  
<220><223> primer  
<400> 1  
tccaccacca ctcagctgta 20  
<210> 2  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer  
<400> 2  
ccatctcagg cctcagctt 19  
  
<210> 3  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer  
<400> 3  
tgcagcccta ccactctcaa 20  
<210> 4  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer  
<400> 4  
aggcctcggt gctagg 16  
<210> 5  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer  
<400> 5  
tagtctttt ttctaataga 20  
<210> 6  
<211> 20  
<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 6

gctgcagact ctgtgttaa 20

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 7

ccatccctcc ttctgtcttc tg 22

<210> 8

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 8

cggccccctc catctc 16

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 9

cagagaaggg agggtgtgg t 21

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 10

ggcgaaagat ggtgaagct 19

<210> 11

<211> 21

<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer  
<400> 11  
tcctcggtcct ctccacacctgt a 21

<210> 12  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220><223> primer  
<400> 12  
agctggcaag gaggccc 17

<210> 13  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer  
<400> 13

tttgggctt cccacatgc 19  
<210> 14  
<211> 20

<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer  
<400> 14

ggcagacgga ggtcatctca 20  
<210> 15  
<211> 18

<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer  
<400> 15

gttagtaccgt gctctctg 18  
<210> 16

<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer  
<400> 16  
agtccccat aagaatcccc c 21  
<210> 17  
<211>  
> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer  
<400> 17  
ggctggaccc ccagagg 17  
<210> 18  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer  
<400> 18  
accctcgaa gaagtaagg 19  
<210> 19  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer  
<400> 19  
aaccttacg agaccctggg a 21  
<210> 20  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer  
<400> 20  
gactcccatc catcatgcc 20

<210> 21  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer  
<400> 21  
agtcgttgga tccaccacca 20

<210> 22  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer  
<400> 22

gacgtcattt cctactgttt cagg 24  
<210> 23  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer  
<400> 23

ccccccagaa acaggctg 18  
<210> 24  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer  
<400> 24

ttctaagggg ttaaggagaa agctt 25  
<210> 25  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> probe  
<400> 25

cacggaccgc acgga 15

<210> 26

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> probe

<400> 26

cacgaccac acgga 15

<210> 27

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> probe

<400> 27

acacggaccg cacg 14

<210> 28

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> probe

<400> 28

acacggacca cacg 14

<210> 29

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> probe

<400> 29

tacacggacc gca 13

<210> 30

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> probe

<400> 30  
tacacggacc aca 13  
<210> 31  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> probe

<400> 31  
ctgtacacgg accgcacg 18  
<210> 32  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> probe  
<400> 32  
ctgtacacgg accacacg 18  
<210> 33  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> probe  
<400> 33  
ctgtacacgg accgcacgga g 21  
<210> 34  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> probe  
<400> 34  
ctgtacacgg accacacgga g 21  
<210> 35  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220><223> probe  
<400> 35  
gctgtacacg gaccgcacgg agaa 24  
<210> 36  
<211> 24  
<212> DNA

<213> Artificial  
<220><223> probe  
<400> 36  
gctgtacacg gaccacacgg agaa 24

<210> 37  
<211> 15  
<212> DNA

<213> Artificial  
<220><223> probe  
<400> 37

accgcacgga gaagc 15  
<210> 38

<211> 15  
<212> DNA

<213> Artificial  
<220><223> probe  
<400> 38

accacacgga gaagc 15  
<210> 39

<211> 21  
<212> DNA

<213> Artificial  
<220><223> probe  
<400> 39

accgcacgga gaagctgagg c 21  
<210> 40  
<211> 21  
<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> probe

<400> 40

accacacgga gaagctgagg c 21

<210> 41

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> probe

<400> 41

accgcacgga gaagctgagg cctg 24

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> probe

<400> 42

accacacgga gaagctgagg cctg 24