



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0091361
(43) 공개일자 2014년07월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-0003536
- (22) 출원일자 2013년01월11일
심사청구일자 2013년10월22일
기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도
- (71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
- (72) 발명자
박건
전라남도 보성군 보성읍 중앙로 7, 103동 702호
(우산 주공아파트)
- (74) 대리인
특허법인 에이치엠펜

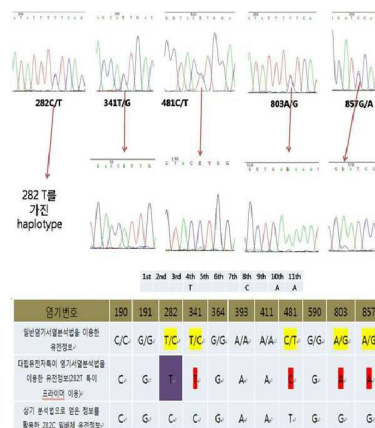
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 대립유전자-특이적 프라이머를 이용한 일배체형 서열분석 방법

(57) 요약

본 발명은 대립유전자-특이적 프라이머(allele-specific primers)를 이용한 일배체형(haplotype) 서열분석 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따라 이형접합 유전적 변이(heterozygous genetic variation)를 갖는 표적 유전자를 대상으로 대립유전자-특이적 프라이머를 사용하여 생거 서열분석(Sanger sequencing)을 수행하는 단계를 포함하는 일배체형 서열분석 방법은 기존에 일배체 서열분석이 곤란했던 2개 이상의 이형접합 유전적 변이를 포함하는 표적 유전자를 대상으로 하는 경우에도 용이한 공정을 통해 신속하고 정확하게 일배체형 서열정보를 획득할 수 있도록 하므로 건강, 질병, 약물반응 또는 환경요인 등과 관련된 유전적 변이에 대한 연구 등에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0006735

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업

연구과제명 자발성 기흉 환자에서 FLCN 유전자 변이 검출 시스템의 개발

기 여 율 1/1

주관기관 교육과학기술부

연구기간 2010.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

이형접합 유전적 변이(heterozygous genetic variation)를 갖는 표적 유전자를 대상으로 대립유전자-특이적 프라이머(allele-specific primer)를 사용하여 생거 서열분석(Sanger sequencing)을 수행하는 단계를 포함하는, 일배체형 서열분석(haploid genotyping or haplotyping) 방법.

청구항 2

- 1) 표적 유전자에 대한 서열분석을 수행하는 단계;
- 2) 표적 유전자에 포함된 이형접합 유전적 변이(heterozygous genetic variation)의 개수와 위치를 확인하는 단계;
- 3) 상기 단계 2)에서 확인된 결과를 토대로 표적 유전자에 대한 대립유전자-특이적 프라이머(allele-specific primers)를 제작하는 단계; 및
- 4) 표적 유전자를 대상으로 상기 단계 3)에서 제작된 대립유전자-특이적 프라이머를 사용하여 생거 서열분석(Sanger sequencing)을 수행하는 단계를 포함하는, 일배체형 서열분석(haploid genotyping or haplotyping) 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 표적 유전자는 2 배체(diploid) 생물의 유전체(genome)로부터 유래된 것임을 특징으로 하는 일배체형 서열분석(haploid genotyping or haplotyping) 방법.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 표적 유전자는 2개 이상의 이형접합 유전적 변이를 포함하는 대립유전자의 전체 또는 일부 서열인 것을 특징으로 하는 일배체형 서열분석(haploid genotyping or haplotyping) 방법.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 이형접합 유전적 변이는 이형접합(heterozygous) 단일염기다형성(single nucleotide polymorphisms, SNPs)인 것을 특징으로 하는 일배체형 서열분석(haploid genotyping or haplotyping) 방법.

청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 대립유전자-특이적 프라이머는 표적 유전자에 포함된 이형접합 유전적 변이들 중에서 선택된 하나 이상의 변이에 특이적으로 결합하는 프라이머인 것을 특징으로 하는 일배체형 서열분석(haploid genotyping or haplotyping) 방법.

청구항 7

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 대립유전자-특이적 프라이머는 전방향(forward) 또는 역방향(reverse) 프라이머인 것을 특징으로 하는 일배체형 서열분석(haploid genotyping or haplotyping) 방법.

청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 대립유전자-특이적 프라이머는 인위적으로 변조시킨 염기 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 일배체형 서열분석(haploid genotyping or haplotyping) 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 대립유전자-특이적 프라이머(allele-specific primer)를 이용한 일배체형(haplotype) 서열분석 방법에 관한 것으로, 구체적으로 대립유전자-특이적 프라이머를 사용하여 2개 이상, 즉 복수개의 이형접합 유전적 변이(heterozygote genetic variation)를 갖는 표적 유전자의 일배체형 서열을 용이한 공정을 통해 신속하게 분석할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인간 게놈 프로젝트의 경이적인 진행에 따라 유전적 질환의 진단, 치료 및 예방 등에 활용될 수 있는 막대한 양의 유전 정보가 수립되고 있으며, 최근에는 인간 염색체 한 가닥의 유전정보, 즉 일배체형(haplotype) 유전정보를 지도화(mapping)하는 해맵 프로젝트(international HapMap project)를 통해 유전적 변이의 공통된 패턴을 분석함으로써 건강, 질병, 약물반응 또는 환경요인 등과 관련된 유전적 변이를 확인하는 연구가 활발히 이루어지고 있다.

[0003] 이러한 일배체형 유전정보를 분석하기 위해서는 전체 인구 집단에 대한 통계학적 분석을 수행하거나 개인에 대한 서열분석을 수행할 수 있는데, 통계학적 기법을 이용하는 경우 이를 근거로 개인에 대한 유전 정보를 유추 또는 분석할 수는 있으나 개인의 특정 대립유전자 유무에 대한 정확한 정보를 확인하기는 어려우므로, 임상적으로 환자 개인의 일배체형 유전정보를 직접적으로 확인할 수 있는 기법이 당 분야에 요구되고 있다.

[0004] 기존 생거 서열분석(Sanger sequencing)을 통한 일배체형 서열분석 방법은 통상적으로 부모 등의 가족 구성원에 대한 다수의 유전정보를 수집해야 할 뿐 아니라 재조합된 염색체의 경우 정확한 일배체형 서열을 분석하기 어려운 단점이 있었다. 이 외에도 미국특허등록 제7,041,447호, 문헌 [Nature Methods (2010), 7: 299301], 문헌 [Xiao M 등, HUMAN MUTATION (2007), 28: 913-921], 문헌 [Najafi M 등, Biomolecular Engineering (2007), 24: 609-612] 및 문헌 [Chang FM 등, American journal of medical genetics (1997), 74: 91-94] 등에서 다양한 일배체형 서열분석 방법이 제시되었으나 특수 장비, 고도의 숙련도 또는 장시간의 분석을 요구하는 등의 문제가 있었다.

[0005] 따라서 이러한 문제들을 해소하여 용이한 공정을 통해 일배체형 유전정보를 획득할 수 있는 신규 분석 방법을 개발하기 위한 연구가 당 분야에 지속되고 있다. 예를 들면 미국특허등록 제5,780,233호에는 3'-말단 뉴클레오타이드를 각각 A, G, C 또는 T로 서로 다르게 제작시킨 4가지 프라이머를 사용하여 변이(mutation)를 포함하는 변이체 샘플(variant)들을 변이가 없는 정상샘플(control)들로부터 식별하는 방법이 제시된바 있으며, 이로부터 파생된 일배체형 서열분석 기법의 하나로 대립유전자-특이적 프라이머를 이용한 대립유전자-특이적 중합효소 연쇄 반응(allele-specific polymerase chain reaction, AS-PCR, ASP)을 수행하여 일배체형 서열을 증폭시킨 후 이를 대상으로 생거 반응 등의 서열분석을 수행하는 일배체형 서열분석 방법이 제시된 바 있다. 그러나 이러한 기법은 단일염기다형성(single nucleotide polymorphisms, SNPs) 등의 이형접합 유전적 변이(heterozygous genetic variations)가 적을 때는 유용할 수 있지만 많은 수의 변이가 산발적으로 조밀하게 포함되는 경우에는 그에 맞는 각각의 전방향(forward) 및 역방향(reverse) 대립유전자-특이적 프라이머를 제작 및 사용하여 최적화된 PCR 반응을 여러 번 진행하여야 하며, 이렇게 증폭된 산물에 대한 서열분석 역시 반복하여 실시되어야 하는 번거로움이 있었다.

[0006] 이에 본 발명자들은 2개 이상, 즉 복수개의 이형접합 유전적 변이(heterozygote genetic variations)를 포함하는 표적 유전자의 일배체형 서열을 용이한 공정을 통해 신속하게 분석할 수 있는 방법을 개발하기 위해 예의 연구한 결과, 이형접합 유전적 변이를 갖는 표적 유전자를 대상으로 대립유전자-특이적 프라이머(allele-specific primer)를 사용하여 생거 서열분석(Sanger sequencing)을 수행하는 일배체형 서열분석 방법이 복수개의 이형 접합 유전적 변이를 갖는 표적 유전자의 일배체형 서열을 용이한 공정을 통해 신속하고 정확하게 분석할 수 있음

을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 복수개의 이형접합 유전적 변이(heterozygote genetic variations)를 갖는 표적 유전자의 일배체형(haplotype) 염기서열을 용이한 공정을 통해 신속하게 분석할 수 있는 신규 일배체형 서열분석 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 이형접합 유전적 변이(heterozygous genetic variation)를 갖는 표적 유전자를 대상으로 대립유전자-특이적 프라이머(allele-specific primer)를 사용하여 생거 서열분석(Sanger sequencing)을 수행하는 단계를 포함하는, 일배체형 서열분석(haploid genotyping or haplotyping) 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은

[0010] 1) 표적 유전자에 대한 서열분석을 수행하는 단계;

[0011] 2) 표적 유전자에 포함된 이형접합 유전적 변이(heterozygous genetic variation)의 개수와 위치를 확인하는 단계;

[0012] 3) 상기 단계 2)에서 확인된 결과를 토대로 표적 유전자의 특정 이형접합 유전변이 중 하나의 대립유전자에 대한 대립유전자-특이적 프라이머(allele-specific primers)를 제작하는 단계; 및

[0013] 4) 표적 유전자를 대상으로 상기 단계 3)에서 제작된 대립유전자-특이적 프라이머를 사용하여 특정 대립유전자를 가지는 한 가닥의 염기서열을 생거 서열분석(Sanger sequencing)을 수행하는 단계를 포함하는, 일배체형 서열분석(haploid genotyping or haplotyping) 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일실시예에서, 상기 표적 유전자는 2 배체(diploid) 생물의 유전체(genome)로부터 유래된 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에서, 상기 표적 유전자는 2개 이상의 이형접합 유전변이를 포함하는 대립유전자의 전체 또는 일부 서열일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에서, 상기 이형접합 유전변이는 이형접합(heterozygous) 단일염기다형성(single nucleotide polymorphisms, SNPs)일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에서, 상기 대립유전자-특이적 프라이머는 표적 유전자에 포함된 이형접합 유전적 변이들 중에서 선택된 하나 이상의 특정 대립유전자(염기서열)에 특이적으로 결합하는 프라이머일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에서, 상기 대립유전자-특이적 프라이머는 전방향(forward) 또는 역방향(reverse) 프라이머일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에서, 상기 대립유전자-특이적 프라이머는 인위적으로 변조시킨 염기 서열을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0020] 본 발명은 대립유전자-특이적 프라이머(allele-specific primers)를 이용한 일배체형(haplotype) 서열분석 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따라 이형접합 유전변이(heterozygous genetic variation)를 갖는 표적 유전자를 대상으로 대립유전자-특이적 프라이머를 사용하여 생거 서열분석(Sanger sequencing)을 수행하는 단계를 포함하는 일배체형 서열분석 방법은, i) 2개 이상의 이형접합 유전적 변이를 갖는 표적 유전자에 대하여 일배체 염기서열 분석에 필요한 주형(template)를 수득하기 위해 수행되는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 외의 추가의 PCR 과정이 필요 없을 뿐 아니라, ii) 이형접합 변이로 인한 이중 피크 등을 노이즈와 분별하기 위해 전방향 및 역방향의 프라이머를 사용하여 양방향으로 서열분석을 수행하던 기존 서열분석 방법과는 달리, 서열분석이 대립유전자 특이적으로 이루어지므로 단일 프라이머를 사용하는 단 1회의 생거 서열분석만으로도 대립

유전자의 약 800~1200 bp 범위에 포함되는 다수의 이형접합 유전적 변이를 확인할 수 있다.

[0021] 따라서 본 발명에 따른 일배체형 서열분석 방법은 일배체형의 유전정보를 수득하기 곤란한 2개 이상의 이형접합 유전적 변이를 갖는 표적 유전자를 대상으로 하는 경우에도 용이한 공정을 통해 신속하고 정확하게 일배체형 서열정보를 수득할 수 있도록 하므로 건강, 질병, 약물반응 또는 환경요인 등과 관련된 유전적 변이에 대한 연구 등에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 NAT2 유전자의 엑손 2에 5개의 이형접합 유전적 변이(SNPs)를 포함하는 검체 유전자를 대상으로 본 발명의 일실시예에 따라 대립유전자-특이적 프라이머를 사용하여 일배체형 서열분석을 수행한 결과이다.

도 2는 B0형 혈액형 검체 유전자의 ABO 유전자 엑손 6을 대상으로 기존 방법에 따라 표적 유전자에 특이적인 통상의 프라이머를 사용하여 서열분석을 수행한 결과로서, A는 일반 염기서열분석용 프라이머를 이용한 서열분석 결과를, 그리고 B는 A의 결과에 나타난 이중 피크들을 설명하기 위해 공지된 B형 및 O형 대립유전자의 261번째 서열의 이형접합 유전적 변이(B형은 G, O형은 결실)를 나타내는 도면이다.

도 3은 B0형 혈액형 검체 유전자의 ABO 유전자 엑손 6을 대상으로 본 발명의 일실시예에 따라 B형 또는 O형의 대립유전자-특이적 프라이머를 사용하여 일배체형 서열분석을 수행한 결과로서, A는 대립유전자특이 일배체형 서열분석 결과를, 그리고 B는 A에 제시된 염기서열 중 B형 또는 O형 특이적 297번째 서열의 이형접합 유전적 변이(SNPs)인 297G 및 297A를 확대하여 표시한 서열분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 명세서에서, 용어 "대립유전자(allele)"는 한 쌍의 상동염색체(homologous chromosome)의 좌위(locus)에 서로 대립(짝)을 이루어 위치하는 염기 서열로서 서로 다른 대립유전자는 때때로 서로 다른 특성(형질)을 나타낼 수도 있다.

[0024] 본 명세서에서, 용어 "일배체형(haplotype)"은 상동 염색체 중 한 염색체를 구성하는 대립유전자(alleles)들의 유전적(서열) 특징을 의미한다.

[0025] 본 명세서에서, 용어 "이형접합 유전적 변이(heterozygous genetic variation)"는 상동 염색체의 각 일배체형의 특정 대립유전자들이 서로 다른 유전적(서열) 변화 또는 변이를 갖는 것을 의미한다.

[0026] 본 명세서에서, 용어 "단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNPs)"은 유전자 염기서열에서 하나의 염기서열(A, T, G 또는 C)의 차이를 보이는 유전적 변화 또는 변이를 의미한다.

[0027] 본 명세서에서, 용어 "(숫자)(A, T, G 또는 C)"는 어느 한 유전자 서열의 (숫자)번째 염기가 (A, T, G 또는 C)인 것을 의미하며, 예를 들면 "282C"는 282번째 염기가 C인 것을 의미한다.

[0028] 본 명세서에서, 용어 "(숫자)(A, T, G 또는 C)>(A, T, G 또는 C)"는 상동 염색체의 각 일배체형의 특정 대립유전자 서열에서 (숫자)번째 염기가 한쪽은 부등호 왼쪽의 (A, T, G 또는 C)이고 다른 한쪽은 부등호 오른쪽의 (A, T, G 또는 C)인 이형접합 유전적 변이를 의미하며, 예를 들면 "282C>T"는 상동 염색체의 각 일배체형의 특정 대립유전자 서열에서 282번째 염기가 한쪽은 C이고 다른 한쪽은 T인 이형접합 유전적 변이를 의미한다. 이때, 부등호는 이러한 유전적 변이의 발생 빈도 우열을 의미한다.

[0029] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0030] 본 발명에 따른 일배체형 서열분석(haploid genotyping or haplotyping) 방법은 이형접합 유전적 변이(heterozygous genetic variation)를 갖는 표적 유전자를 대상으로 대립유전자-특이적 프라이머(allele-specific primer)를 사용하여 생거 서열분석(Sanger sequencing)을 수행하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0031] 또한, 본 발명에 따른 일배체형 서열분석 방법은, 필요에 따라

[0032] 1) 표적 유전자에 대한 서열분석을 수행하는 단계;

[0033] 2) 표적 유전자에 포함된 이형접합 유전적 변이(heterozygous genetic variation)의 개수와 위치를 확인하는 단계;

- [0034] 3) 상기 단계 2)에서 확인된 결과를 토대로 표적 유전자에 대한 대립유전자-특이적 프라이머(allele-specific primers)를 제작하는 단계; 및
- [0035] 4) 표적 유전자를 대상으로 상기 단계 3)에서 제작된 대립유전자-특이적 프라이머를 사용하여 생거 서열분석(Sanger sequencing)을 수행하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서, 상기 표적 유전자는 2배체(diploid) 이상의 생물, 바람직하게는 2배체 생물의 유전체(genome)로부터 유래된 것일 수 있으며, 인간을 비롯한 대부분의 진핵생물(eukaryotes)이 2배체 생물에 포함될 수 있다. 3배체 이상의 생물의 유전자에 대해서도 본 발명의 서열분석 방법으로 일배체형 서열정보를 수득하는 것이 불가능한 것은 아니나, 대립유전자-특이적 프라이머를 사용한 일배체형 서열분석을 1회만 수행하여도 한쪽의 일배체형 서열 정보를 통해 나머지 일배체형 서열을 용이하게 유추할 수 있는 2배체 생물과는 달리, 대립유전자-특이적 프라이머를 사용하는 일배체형 서열분석을 배체수에 따라 2회 이상 여러 번 수행해야 하는 번거로움이 있을 수 있다. 그러나 3배체 이상의 생물 유전자에 대해서도 본 발명의 방법을 이용하는 경우 기존 방법보다는 훨씬 더 용이하게 일배체형 서열을 확인할 수 있으므로 상기 표적 유전자가 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 또한, 상기 표적 유전자는 2개 이상의 이형접합 유전적 변이를 포함하는 대립유전자의 전체 또는 일부 서열일 수 있다. 이는 2배체 대립유전자의 경우 이형접합 유전적 변이가 하나(예를 들면, A/a)일 때는 일배체형 서열의 경우의 수가 2개(예를 들면, A 또는 a)뿐이므로 통계적 방법이나 기존 서열분석만으로도 용이하게 일배체형 서열 정보를 유추할 수 있으나, 이형접합 유전적 변이가 2개(예를 들면, A/a 와 B/b) 이상 포함되는 경우에는 일배체형 서열의 경우의 수가 4개(예를 들면, AB, Ab, aB 또는 ab) 이상 늘어남으로 인해 통계적인 방법이나 기존 서열분석 방법으로 일배체형 서열 정보를 확인하는 것이 어려워지기 때문이다. 이러한 이유로 기존의 일배체형 서열분석 방법들은 복잡한 공정, 고가의 장비, 오랜 시간 등의 비효율적 문제들이 있어왔다. 그러나 본 발명에 따라 대립유전자-특이적 프라이머를 사용하여 일배체형 서열분석을 수행하는 경우에는 서열분석이 대립유전자 특이적으로(예를 들면, A 특이적으로) 이루어지므로 1회의 생거 서열분석(Sanger sequencing)만으로도 양쪽의 일배체형 서열정보를 용이하게 수득할 수 있다(예를 들면, A 특이적 서열분석으로 한쪽이 Ab인 것을 알면 다른 쪽은 aB임을 유추).
- [0038] 또한 본 발명에서, 상기 이형접합 유전적 변이는 이형접합적인 하나 이상의 염기의 결실, 삽입 또는 치환 변이일 수 있으며, 바람직하게는 이형접합(heterozygous) 단일염기다형성(single nucleotide polymorphisms, SNPs)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 또한 본 발명의 일배체 서열분석 방법에서, 상기 대립유전자-특이적 프라이머는 표적 유전자에 포함된 이형접합 유전적 변이들 중에서 선택된 하나 이상의 변이에 특이적으로 결합하는 프라이머일 수 있으며, 결합하는 변이 서열의 위치에 따라 전방향(forward) 또는 역방향(reverse) 프라이머일 수 있다. 보다 구체적으로 설명하면, 본 발명에서 대립유전자-특이적 프라이머를 이용한 생거 서열분석을 수행하는 경우, 최대한 많은 이형접합 유전적 변이의 정보를 수득하기 위해서는 5' 기준으로 가장 앞에 있는 이형접합 유전적 변이에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 전방향 프라이머를 사용하거나 가장 뒤에 있는 이형접합 유전적 변이에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 역방향 프라이머를 사용하는 것이 바람직하다. 그러나 프라이머 제작은 통상적으로 결합 서열에 대한 특이성(결합력), 결합 서열의 적합성, 2차 구조의 최소화 등을 함께 고려하여 이루어지므로, 프라이머의 위치 및 방향은 이에 제한되는 것은 아니며 1회의 일배체형 서열분석으로 확인될 수 있는 800~1200 bp 서열범위 내에 표적 유전자의 이형접합 유전적 변이가 최대한 많이 포함될 수 있도록 적절히 조절하여 결정할 수 있다.
- [0040] 또한, 상기 대립유전자-특이적 프라이머는 대응서열에 대한 결합력을 향상시키기 위해 필요한 경우 통상의 프라이머 제작 방법[Saiki RK 등, Nature (1986), 324(6093): 163-6; Newton CR 등, Nucleic Acids Res. (1989), 17(7): 2503-16; Lee SH. 등, Korean J Lab Med. (2009), 29(3): 231-7; Liu J. 등, Plant Methods. (2012), 8(1): 34]에 따라 인위적으로 변조시킨 염기 서열을 하나 이상 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 따라서 본 발명에 따라 이형접합 유전적 변이(heterozygous genetic variation)를 갖는 표적 유전자를 대상으로 대립유전자-특이적 프라이머를 사용하여 생거 서열분석(Sanger sequencing)을 수행하는 단계를 포함하는 일배체형 서열분석 방법은, 2개 이상의 이형접합 유전적 변이를 포함하는 표적 유전자에 대해서도 서열분석에 필요한 프로브(probe)를 수득하기 위해 수행되는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 외에 추가의 PCR 과정이 필요 없을 뿐 아니라, 기존 방법에서 이형접합 유전적 변이로 인한 이중 피크 등의 노이즈를 분별하기 위해 전방향 및 역방향의 양방향으로 반복적으로 서열분석을 수행하던 것과는 달리, 생거 서열분석이 대립유전자 특이적으로 이루어지므로 단일 프라이머를 사용한 1회의 서열분석만으로도 일배체형 서열의 약 800~1200 bp

범위에 포함되는 다수의 이형접합 유전적 변이를 정확하게 확인할 수 있다.

- [0042] 본 발명의 일실시예에 따르면, 약물 대사 및 독성 등에 관여하는 것으로 알려진 N-아세틸트랜스퍼레이스 2(N-acetyltransferase 2, NAT2) 유전자의 이형접합(heterozygous) 단일염기다형성(single nucleotide polymorphisms, SNPs)에 대하여 본 발명에 따라 대립유전자-특이적 프라이머를 사용한 일배체형 서열분석을 수행한 결과, 2개 이상의 이형접합 SNPs를 포함하는 검체 유전자에 대해서도 용이한 공정을 통해 신속하고 정확하게 서열정보를 획득할 수 있음을 확인하였다.
- [0043] 구체적으로, 본 발명의 일실시예에 따르면, 정상인 200명의 정맥혈로부터 수득한 NAT2 엑손 2(exon 2) 검체 유전자들을 대상으로 통상적인 서열분석을 수행하여 각 검체 유전자 내 포함된 이형접합 SNPs의 위치 및 개수를 확인하였으며, 그 결과를 토대로 2개 이상의 이형접합 SNPs를 포함하는 것으로 확인된 101개의 검체 유전자를 대상으로 이형접합 SNP에 대립유전자 특이적으로 결합할 수 있는 전방향 또는 역방향 대립유전자-특이적 프라이머를 제작하고, 이를 이용한 일배체형 서열분석을 수행하였다. 그 결과, 검체 유전자 모두에서 단일 프라이머를 사용한 1회의 서열분석만으로도 성공적으로 일배체형 유전정보를 수득할 수 있음을 확인할 수 있었으며, 일례로 NAT2 유전자 엑손 2 서열 내 5개의 이형접합 유전적 변이가 확인된 1개의 검체 유전자를 대상으로 282T 변이에 대해 대립유전자 특이적으로 결합하도록 제작된 전방향 프라이머(서열번호 5)를 사용하여 일배체형 서열분석을 수행한 결과, 단 1회의 서열분석만으로도 282T, 341T, 481C, 803A 및 857A의 단일염기다형성(SNPs) 변이를 포함하는 한쪽의 일배체형의 서열정보뿐 아니라, 이로부터 282A 변이를 갖는 다른쪽 일배체형의 서열이 282A, 341G, 481T, 803G 및 857G의 SNPs 변이 서열을 포함하는 것을 용이하게 유추하여 확인할 수 있었다.
- [0044] 또한, 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 결과를 재확인하기 위해 통상적인 클로닝 서열분석 방법에 따라 일배체형 유전자를 클로닝하여 서열분석을 수행한 결과, 본 발명에 따른 일배체형 서열분석 결과와 100% 동일한 것을 확인하였으며, 이로써 본 발명에 따른 대립유전자-특이적 프라이머를 사용하는 일배체형 서열분석 방법은 용이한 공정을 통해 신속하고 정확하게 일배체형 서열을 분석할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0045] 본 발명의 일실시예에 따르면, 2개 이상의 이형접합 SNPs를 포함하는 것으로 공지된 B0형 정상인의 정맥혈로부터 수득한 ABO 유전자의 엑손 2 내지 7 서열 검체를 대상으로 본 발명에 따라 B형 특이적 SNP인 261G에 대해 대립유전자 특이적으로 결합할 수 있는 전방향 프라이머 또는 O형 특이적 SNP인 261A에 대해 대립유전자 특이적으로 결합할 수 있는 전방향 프라이머를 사용하여 일배체형 서열분석을 수행한 경우에도, 분석 범위 내에 포함된 다른 이형접합 SNP인 B형 특이적 297G 및 O형 특이적 297A 변이의 서열정보를 용이한 공정을 통해 신속하고 정확하게 확인할 수 있었다.
- [0046] 따라서 본 발명에 따른 일배체형 서열분석 방법은 기존 서열분석 방법으로 일배체형 유전정보를 수득하기 곤란했던 2개 이상의 이형접합 유전적 변이를 갖는 표적 유전자를 대상으로 하는 경우에도 용이한 공정을 통해 약 800~1200 bp 범위내 일배체형 서열정보를 5시간 이내의 짧은 시간 안에 정확하게 수득할 수 있으므로 건강, 질병, 약물반응 또는 환경요인 등과 관련된 유전적 변이에 대한 연구 등에 유용하게 활용될 수 있다.
- [0047] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0048] 실시예 1: NAT2 유전자의 이형접합 유전적 변이에 대한 일배체형 서열분석

[0049] 단계 1) 표적 유전자에 대한 서열분석

[0050] 1-1> 유전체 DNA(genomic DNA) 추출

[0051] 유전체 핵산추출키트(QIAamp Blood Mini Kit; QIAGEN, USA)를 사용하여 제조사 설명서에 따라 정상인 200인의 정맥혈로부터 유전체 DNA(genomic DNA)를 각각 다음과 같이 추출하였다.

[0052] 정맥혈 200 μ l에 용해 버퍼 및 단백질 분해효소를 첨가하여 65 $^{\circ}$ C에서 20분간 방치한 후 이를 스핀 컬럼에 넣어 컬럼 내 실리카 막에 DNA가 결합하도록 하였다. 상기 컬럼을 2회 세척한 후 100 μ l 용출버퍼를 가하여 유전체 DNA를 용출시켰으며, 수득한 각 유전체 DNA는 분광광도계(Optizen 3220 spectrophotometer, Mecasys)를 통해 농도를 측정한 후 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)에 사용하기 위해 농도가 50ng/ μ l가 되도록

록 조절하였다.

[0053] 1-2> NAT2 유전자의 엑손 2(exon 2) 서열 증폭

[0054] 상기에서 수득한 각 유전체 DNA로부터 NAT2 유전자의 엑손 2 서열을 증폭하기 위해 다음과 같이 PCR을 수행하였다.

[0055] 상기에서 수득한 각 유전체 DNA 50ng, 2X phusion flash high fidelity master mix(Finnzymes, Finland) 10 μ l, 그리고 NAT2 유전자의 엑손 2 서열에 대한 전방향(forward) 및 역방향(reward) 프라이머(서열번호 1 및 2) 각 10pmol을 포함하는 반응액 25 μ l를 대상으로 변성(98 $^{\circ}$ C, 5초), 어닐링(60 $^{\circ}$ C, 10초) 및 연장(72 $^{\circ}$ C, 1분) 반응이 35회(35 cycles) 실시되도록 Biorad C1000 PCR 장비를 통해 PCR을 수행하였으며, 이때 PCR 수행 전 예비변성(pre-denaturation) 및 수행 사이클 마지막의 최종연장(last-extension) 반응을 각각 98 $^{\circ}$ C에서 30초 및 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 수행하였다.

[0056] 상기에서 증폭된 PCR 산물을 QIAquick PCR Purification Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 정제하여 25 μ l의 용출액으로 수득하였다.

[0057] 1-3> NAT2 유전자 엑손 2의 서열 분석

[0058] 상기에서 증폭된 200개 검체에 대한 각 PCR 산물을 대상으로 Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 제조사 설명에 따라 생거 서열분석(Sanger sequencing)을 수행하였다. 이때, 생거 서열분석은 이형접합 유전적 변이 등에 의한 노이즈를 고려하여 서열번호 3 및 4의 전방향 및 역방향 프라이머를 각각 사용하여 양방향으로 수행되었으며, ABI 3730XL Genetic analyser(Applied Biosystems, 모세관 길이 50cm, 액상폴리머 POP7) 서열분석 장비를 통해 이루어졌다.

[0059] 단계 2) 표적 유전자 서열 내 이형접합 유전적 변이(heterozygous genetic variation)의 개수와 위치 확인

[0060] 상기에서 얻어진 200개 검체의 NAT2 유전자 엑손 2에 대한 각 서열분석 결과를 토대로 Sequencher 4.1.4 프로그램(Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, USA)을 이용하여 기존 연구에서 보고된 11개의 유전변이[Kang TS 등, J Clin Pharm Ther (2009), 34(6): 709-718]를 중심으로 이형접합 유전적 변이의 위치 및 개수를 확인하였다.

[0061] 그 결과, 하기 표 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 이형접합 유전적 변이가 2개 이상 확인된 검체는 대상 검체 200개 중 101개였으며, 이들 중 가장 흔한 것으로 확인된 이형접합 유전적 변이는 85개 검체에서 확인된 282C>T 이형접합 SNP였다. 또한, NAT2 유전자 엑손 2의 염기서열에서 590G>A 및 857G>A 이형접합 SNPs를 포함하는 검체 12개와 341T>G, 481C>T 및 803A>G 이형접합 SNPs를 포함하는 검체 4개를 발견하였으며, 282C>T 변이가 확인된 85개의 검체 중 NAT2 유전자 엑손 2의 염기서열 내 총 5개의 이형접합 SNPs를 포함하는 검체 1개를 발견하였다.

표 1

[0062]

이형접합 유전적 변이의 종류	검체수
282C>T - 590G>A	50
282C>T - 857G>A	32
590G>A - 857G>A	12
282C>T - 590G>A - 857G>A	2
341T>G - 481C>T - 803A>G	4
282C>T - 341T>G - 481C>T - 803A>G - 857G>A	1

[0063] 단계 3) 일배체형 서열분석을 위한 대립유전자-특이적 프라이머 제작

[0064] 상기 단계 2)에서의 분석 결과를 토대로, 일배체형 서열분석을 위해 대립유전자 특이적인 282T, 857A 또는 803G 변이에 결합 가능하도록 각각 서열번호 5, 6 또는 7의 염기서열을 갖는 대립유전자-특이적 프라이머를 제작하였다.

[0065] 이때, 제작된 세 프라이머는 모두 DNA 중합효소에 의해 합성이 시작되는 3' 말단에 변이 서열에 특이적으로 결

합할 수 있는 염기서열이 포함되도록 제작되었으며, 프라이머의 2차 구조 발생 가능성을 최소화하고 NAT2 유전자 엑손 2 서열 내 포함된 이형접합 유전적 변이 서열이 모두 확인될 수 있도록 고려하여, 이들 중 282T 변이 특이적 프라이머의 경우 전방향, 그리고 857A 및 803G 변이 특이적 프라이머의 경우 역방향 프라이머로 제작하였다. 또한, 서열번호 5의 282T 변이 특이적 프라이머의 경우 대립유전자 특이적 결합력을 높이기 위해 통상의 방법[Saiki RK 등, Nature (1986), 324(6093): 163-6; Newton CR 등, Nucleic Acids Res. (1989), 17(7): 2503-16; Lee SH. 등, Korean J Lab Med. (2009), 29(3): 231-7; Liu J. 등, Plant Methods. (2012), 8(1): 34]에 따라 3' 말단에서부터 5번째 서열을 인위적으로 G로 변조시켜 제작하였다.

[0066] 단계 4) 대립유전자 특이적 일배체형 서열분석

[0067] 상기 단계 2)에서 이형접합 유전적 변이가 2개 이상 확인된 101개의 검체 유전자들을 대상으로 단계 3)에서 제작된 대립유전자-특이적 프라이머를 사용하여 각 NAT2 유전자의 엑손 2 서열에 대한 일배체형 서열분석을 다음과 같이 수행하였다.

[0068] 먼저, 각 검체 유전자의 상기 단계 1)에서 수득한 NAT2 유전자 엑손 2 서열에 대한 PCR 산물을 주형(template)으로, 그리고 상기 단계 3)에서 제작된 서열번호 5 내지 7의 프라이머 중 이형접합 SNPs 종류에 따라 선택된 하나를 프라이머로 사용하여 Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용한 생거 서열분석(Sanger sequencing)을 수행하였다. 이때, 생거 서열분석은 대립유전자 특이적으로 이루어지므로 선택된 프라이머의 방향에 따라 전방향 또는 역방향으로 1회만 수행되었으며, ABI 3730XL Genetic analyser(Applied Biosystems, 모세관 길이 50cm, 액상폴리머 POP7) 서열분석 장비를 통해 이루어졌다.

[0069] 그 결과, 이형접합 유전적 변이가 2개 이상 확인된 101개 검체 모두에서 성공적으로 일배체형 유전정보를 수득할 수 있었다. 일례로, 상기 단계 2)에서 NAT2 유전자 엑손 2 서열 내 5개의 이형접합 SNPs가 확인된 1개의 검체를 대상으로 서열번호 5의 282T 변이에 대해 대립유전자 특이적으로 결합하는 전방향 프라이머를 사용하여 일배체형 서열분석을 수행한 결과, 도 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 대립유전자 특이적인 1회의 서열분석으로 282T, 341T, 481C, 803A 및 857A의 SNPs를 포함하는 일배체형의 서열정보를 확인할 수 있었으며, 이로부터 282A 변이를 갖는 다른 일배체형의 서열이 282A, 341G, 481T, 803G 및 857G의 SNPs를 포함하는 것을 용이하게 유추할 수 있었다.

[0070] **시험예: 대립유전자 특이적 서열분석의 정확성 확인**

[0071] 상기 실시예 1의 일배체형 서열분석의 정확성을 확인하기 위해, 통상적인 방법에 따라 상기 실시예 1의 단계 1)의 1-2>에서 증폭된 NAT2 유전자의 엑손 2에 대한 1.2 kb의 PCR 산물들을 각각 겔 정제 키트(Gel purification kit, Solgent, Daejeon, Korea)를 사용하여 정제한 후 T-블런트 클로닝 키트(T-blunt cloning kit, Solgent, Daejeon, Korea)를 사용하여 클로닝을 실시하였다. LB 평판배지에서 배양된 각 일배체형 유전자의 대장균 클론을 LB 현탁액에 접종 및 증식시켜 플라스미드 추출 키트(plasmid extraction kit, Elpisbio, Seoul, Korea)를 이용해 플라스미드 DNA를 추출하였으며, 추출된 플라스미드 DNA를 사용하여 상기 실시예 1의 단계 1)에서와 동일하게 PCR 및 서열분석을 수행하였다.

[0072] 그 결과, 상기 통상적인 방법에 따라 일배체형 유전자를 클로닝하여 서열분석을 수행하였을 때에도 실시예 1의 일배체형 서열분석 결과와 100% 동일한 것을 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 대립유전자-특이적 프라이머를 사용하는 일배체형 서열분석 방법은 용이한 공정을 통해 신속하고 정확하게 일배체형 서열을 분석할 수 있음을 알 수 있다.

[0073] **실시예 2: ABO 유전적 혈액형에 대한 일배체형 실험**

[0074] 단계 1) 표적 유전자에 대한 서열분석

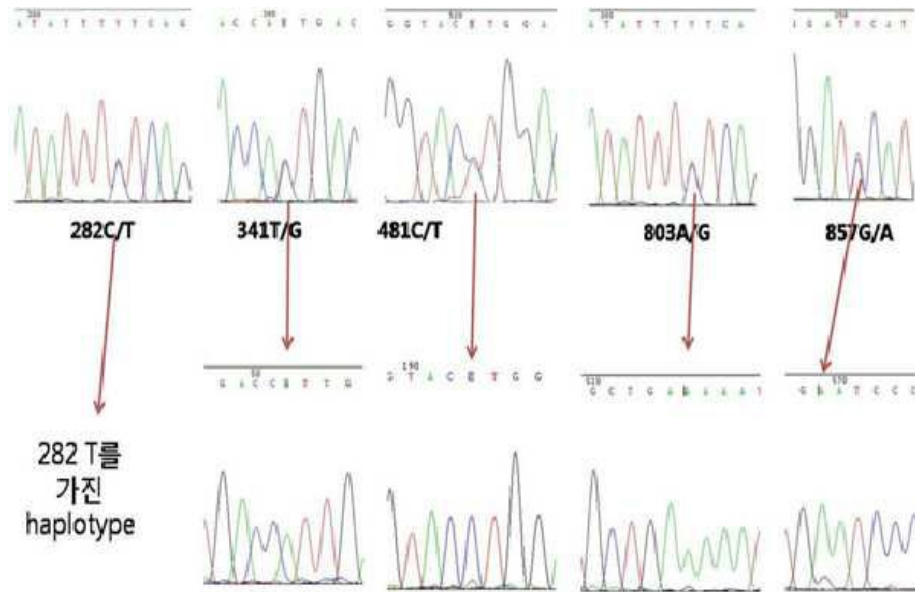
[0075] 1-1> 유전체 DNA(genomic DNA) 추출

- [0076] 유전체 핵산추출키트(QIAamp Blood Mini Kit; QIAGEN, USA)를 사용하여 제조사 설명서에 따라 B형 정상인의 정맥혈로부터 유전체 DNA(genomic DNA)를 다음과 같이 추출하였다.
- [0077] 정맥혈 200 μ l에 용해 버퍼 및 단백질 분해효소를 첨가하여 65 $^{\circ}$ C에서 20분간 방치한 후 이를 스핀 컬럼에 넣어 컬럼 내 실리카 막에 DNA가 결합하도록 하였다. 상기 컬럼을 2회 세척한 후 100 μ l 용출버퍼를 가하여 유전체 DNA를 용출시켰으며, 수득한 각 유전체 DNA는 분광광도계(Optizen 3220 spectrophotometer, Mecasys)를 통해 농도를 측정한 후 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)에 사용하기 위해 농도가 50ng/ μ l가 되도록 조절하였다.
- [0078] 1-2> ABO 유전자의 엑손 2 내지 7 서열 증폭
- [0079] 상기에서 수득한 유전체 DNA로부터 ABO 유전자의 엑손 2 내지 7 서열을 증폭하기 위해 다음과 같이 PCR을 수행하였다.
- [0080] 상기에서 수득한 유전체 DNA 100 ng, 2X phusion flash high fidelity master mix(Finnzymes, Finland) 25 μ l, 그리고 ABO 유전자의 엑손 2 내지 7 서열에 대한 전방향(forward) 및 역방향(reward) 프라이머(서열번호 8 및 9) 각 10pmol을 포함하는 반응액 25 μ l를 대상으로 변성 반응(98 $^{\circ}$ C, 10초)과 어닐링 및 연장 반응(72 $^{\circ}$ C, 2분)이 35회(35 cycles) 실시되도록 Eppendorf Mastercycler PCR 장비(Eppendorf Scientific, Hamburg, Germany)를 통해 셔틀 PCR(shuttle PCR)을 수행하였으며, 이때 PCR 수행 전 예비변성(pre-denaturation) 및 수행 사이클 마지막의 최종연장(last-extension) 반응을 각각 98 $^{\circ}$ C에서 30초 및 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 수행하였다.
- [0081] 상기에서 증폭된 PCR 산물을 QIAquick PCR Purification Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 정제하여 25 μ l의 용출액으로 수득하였다.
- [0082] 1-3> ABO 유전자의 엑손 2 내지 7 서열 분석
- [0083] 상기에서 증폭된 PCR 산물을 대상으로 Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 제조사 설명에 따라 생거 서열분석(Sanger sequencing)을 수행하였다. 이때, 생거 서열분석은 ABO 유전자의 엑손 6 내 261번 염기의 결실여부를 확인하기 위해 서열번호 10의 역방향 프라이머를 사용하여 수행되었으며, ABI 3730XL Genetic analyser(Applied Biosystems, 모세관 길이 50cm, 액상 폴리머 POP7) 서열분석 장비를 통해 이루어졌다.
- [0084] 단계 2) 표적 유전자 서열 내 이형접합 유전적 변이(heterozygous genetic variation)의 개수와 위치 확인
- [0085] 상기에서 얻어진 서열분석 결과를 토대로 Sequencher 4.1.4 프로그램(Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, USA)을 이용하여 ABO 유전형 데이터베이스(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/rbc/xslcgi.fcgi?cmd=bgmot/systems_info&system=abo 참조)를 토대로 이형접합 유전적 변이를 확인하였다.
- [0086] 그 결과, 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이, B형 검체의 ABO 유전자의 엑손 6 서열은 BO 형의 이형접합 유전적 변이를 갖는 것을 확인하였다. 즉, 도 2의 A에서 볼 수 있는 바와 같이, ABO 유전자의 엑손 6 서열 내 261번 염기 위치에서부터 서로 다른 염기서열 피크 두 개가 겹쳐 이중 피크로 나타나는 양상을 볼 수 있는데, 이는 도 2의 B에서 볼 수 있는 바와 같이, ABO 유전자에 대한 두 일배체형 상의 대립유전자 중 하나는 261번 염기가 결실되지 않고 G인 B형 특이적 SNP를 갖는 반면 다른 하나는 261번 염기가 결실된 O형 특이적 SNP를 가지므로 결실된 261번 위치 이후부터 O형 서열을 갖는 일배체형 대립유전자의 염기서열이 하나씩 앞으로 밀려 이중 피크로 나타나기 때문인 것을 알 수 있다.
- [0087] 단계 3) 일배체형 서열분석을 위한 대립유전자-특이적 프라이머 제작
- [0088] 상기 단계 2)에서의 분석 결과를 토대로, ABO 유전자 엑손 6의 일배체형 서열분석을 위해 261A(O형 특이적 SNP) 및 261G(B형 특이적 SNP)에 각각 특이적으로 결합 가능한 서열번호 11 및 12의 염기서열을 갖는 대립유전자-특이적 프라이머들을 제작하였다.

- [0089] 이때, 제작된 프라이머는 모두 DNA 중합효소에 의해 합성이 시작되는 3' 말단에 261번 SNP 서열에 특이적으로 결합할 수 있는 염기서열이 포함되도록 하여 전방향 프라이머로 제작되었으며, 대립유전자 특이적 결합력을 높이기 위해 통상의 방법[Saiki RK 등, Nature (1986), 324(6093): 163-6; Newton CR 등, Nucleic Acids Res. (1989), 17(7): 2503-16; Lee SH. 등, Korean J Lab Med. (2009), 29(3): 231-7; Liu J. 등, Plant Methods. (2012), 8(1): 34]에 따라 3' 말단에서부터 3번째 서열을 인위적으로 T로 변조시켜 제작하였다.
- [0090] 단계 4) 대립유전자 특이적 일배체형 서열분석
- [0091] 서열분석용 프라이머로서 상기 단계 3)에서 제작된 서열번호 11 및 12의 프라이머들 중 하나를 사용하고, 프로브로서 상기 단계 1)에서 수득한 ABO 유전자의 엑손 2 내지 7 서열에 대한 PCR 산물을 사용하여 Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용한 생거 서열분석(Sanger sequencing)을 수행하였다. 이때, 생거 서열분석은 대립유전자 특이적으로 이루어지므로 선택된 프라이머에 따라 전방향으로 1회만 수행되었으며, ABI 3730XL Genetic analyser(Applied Biosystems, 모세관 길이 50cm, 액상폴리머 POP7) 서열분석 장비를 통해 이루어졌다.
- [0092] 그 결과, 도 3의 A에서 볼 수 있는 바와 같이, O형 또는 B형 특이적 SNPs를 포함하는 ABO 엑손 6 유전자의 일배체형 서열정보를 용이하고 신속하게 수득할 수 있었으며, 도 3의 B에서 볼 수 있는 바와 같이, ABO 유전자의 엑손 6 내 공지된 또 다른 이형접합 SNP인 O형 특이적 297A 또는 B형 특이적 287G 변이도 확인할 수 있었다.
- [0093] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

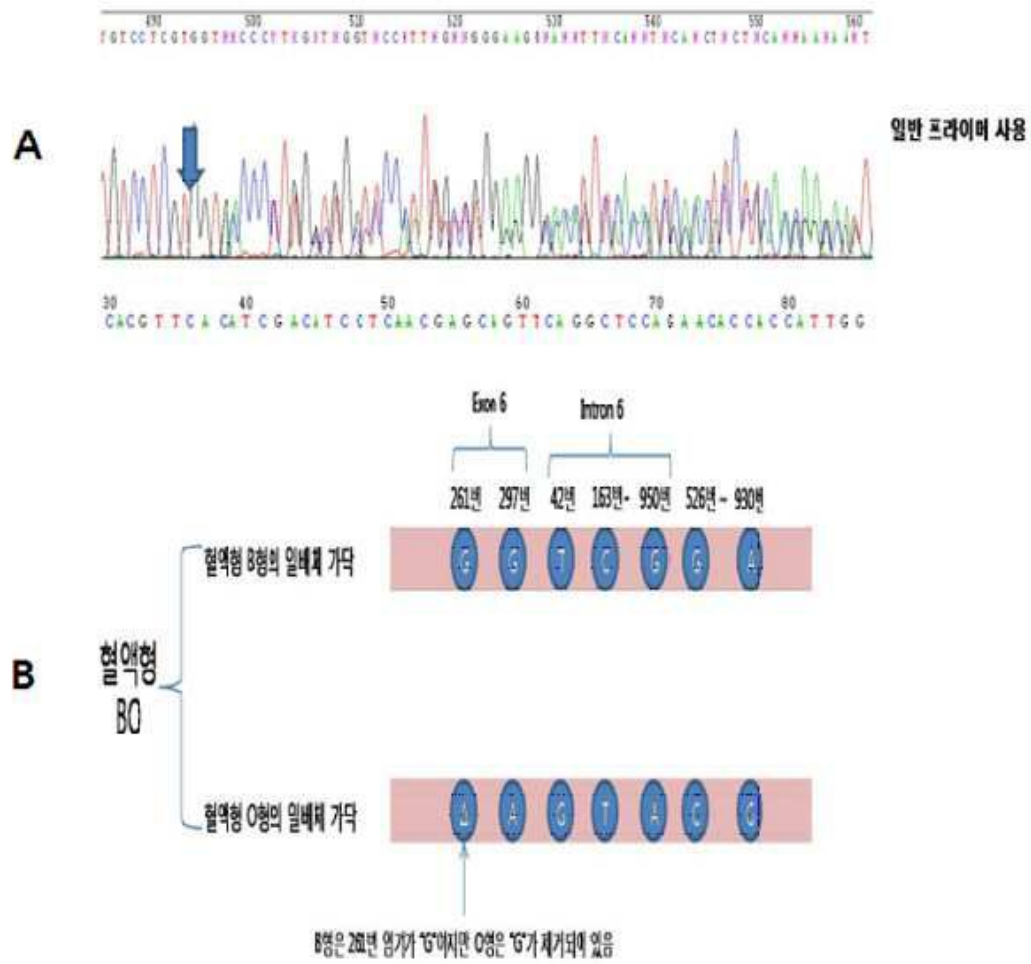
도면

도면1

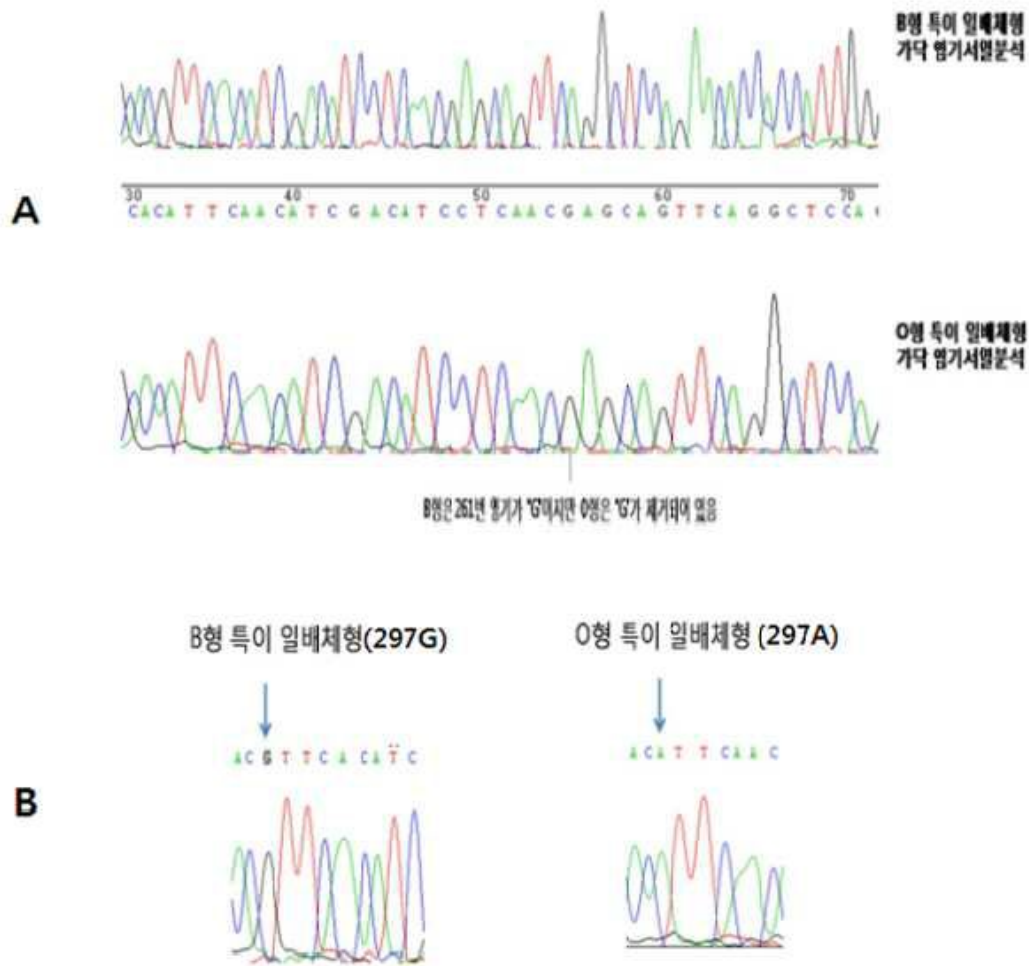


	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th	8th	9th	10th	11th
				T				C		A	A
염기번호	190	191	282	341	364	393	411	481	590	803	857
일반염기서열분석법을 이용한 유전정보	C/C	G/G	T/C	T/C	G/G	A/A	A/A	C/T	G/G	A/G	A/G
대립유전자특이 염기서열분석법을 이용한 유전정보(282T 특이 프라이머 이용)	C	G	T		G	A	A		G		
상기 분석법으로 얻은 정보를 활용한 282C 일배체 유전정보	C	G	C	C	G	A	A	T	G	G	G

도면2



도면3



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION CHOSUN UNIVERSITY
- <120> Method for haplotype genotyping using allele-specific primer
- <130> NP11-1253
- <160> 12
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 22
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> forward primer for PCR of NAT2 exon2
- <400> 1
- gtcacacgag gaaatcaaat gc
- <210> 2
- <211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reward primer for PCR of NAT2 exon2

<400> 2

gttttctagc atgaatcact ctgc 24

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for sequencing of NAT2 exon2

<400> 3

aactgacatt ctgagcacc a 21

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reward primer for sequencing of NAT2 exon2

<400> 4

tttgatgttt aggattttct tca 23

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 282T forward primer for sequencing of NAT2 exon2

<220><221> misc_feature

<222> (17)

<223> artificial modification

<220><221> misc_feature

<222> (21)

<223> specific for heterozygous SNP

<400> 5

gttttctagc atgaatcact ctgc 24

<210> 6

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 857A reward primer for sequencing of NAT2 exon2

 <220><221> misc_feature
 <222> (25)
 <223> specific for heterozygous SNP
 <400> 6
 tccttattct aaatagtaag tgatt 25
 <210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 803G reward primer for sequencing of NAT2 exon2
 <220><221> misc_feature
 <222> (23)
 <223> specific for heterozygous SNP
 <400> 7
 caaggaaatc ttaaatatag ttc 23
 <210> 8
 <211> 26

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for PCR of ABO exon2-7
 <400> 8
 tactcaccta ttattgcct ttggtt 26
 <210> 9
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reward primer for PCR of ABO exon2-7
 <400> 9
 taggcttcag ttactcaca caggac 26

<210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reward primer for PCR of ABO exon2-7

 <400> 10
 catctggagc cttgtattga g 21
 <210> 11
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 261A forward primer for sequencing of ABO exon6
 <220><221> misc_feature
 <222> (24)
 <223> artificial modification
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)
 <223> specific for O type SNP
 <400> 11
 gcagtaggaa ggatgtcctc gtgtta 26
 <210> 12
 <211> 26
 <
 212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 261G forward primer for sequencing of ABO exon6
 <220><221> misc_feature
 <222> (24)
 <223> artificial modification
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)
 <223> specific for B type SNP
 <400> 12
 gcagtaggaa ggatgtcctc gtgttg 26