



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년08월07일

(11) 등록번호 10-1543214

(24) 등록일자 2015년08월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2013.01)

C12Q 1/6827 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7006582(분할)

(22) 출원일자(국제) 2008년09월29일

심사청구일자 2015년03월13일

(85) 번역문제출일자 2015년03월13일

(65) 공개번호 10-2015-0038659

(43) 공개일자 2015년04월08일

(62) 원출원 특허 10-2010-7009180

원출원일자(국제) 2008년09월29일

심사청구일자 2013년08월07일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2008/003306

(87) 국제공개번호 WO 2009/040557

국제공개일자 2009년04월02일

(30) 우선권주장

0719034.1 2007년09월28일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌

Lung Cancer, Vol. 54, No. 2, pp. 209-215(2006.08.22.)

(73) 특허권자

퀴아젠 맨체스터 리미티드

영국 엠15 6에스에이취 맨체스터 로이드 스트리트
노쓰 스켈톤 하우스

(72) 발명자

보드, 루스

영국 에스케이10 4티지 체셔 맨클리스필드 앤더리
파크 아스트라 제니카 파마수티칼스 디스커버리
메디신

퍼구손, 제니퍼

영국 엠엑스13 9엑스엑스 맨체스터 그래프톤 스트
리트 48 디엑스에스 리미티드
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 양영환

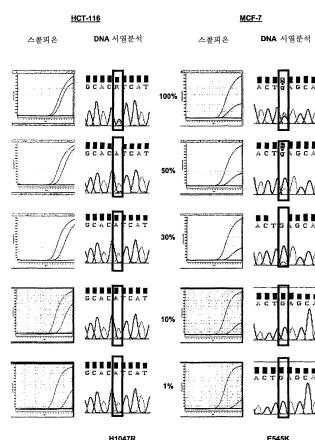
전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 PIK3CA 돌연변이를 검출하기 위한 폴리뉴클레오티드 프라이머

(57) 요약

본 발명은 서열 3 내지 16, 18, 20 내지 33, 35 또는 37 내지 39의 프라이머 서열 또는 그에 상보적인 서열 중 하나의 적어도 마지막 6개의 뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 개시한다. 또한, PIK3CA 유전자에서 돌연변이의 존부를 검출하는 방법을 개시하며, 돌연변이는 H1047R, H1047L, E542K 및 E545K 중 하나이고, 바람직하게는 ARMS 프라이머는 스콜피온 프라이머와 함께 조합된다.

대 표 도 - 도1

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2013.01)

C12Q 2600/156 (2013.01)

C12Q 2600/16 (2013.01)

(72) 발명자

라베토, 폴, 프란시스

영국 엠엑스13 9엑스엑스 맨체스터 그래프톤 스트리트 48 디엑스에스 리미티드

텔웰, 니콜라, 조

영국 엠엑스13 9엑스엑스 맨체스터 그래프톤 스트리트 48 디엑스에스 리미티드

휘트콤, 레이비드

영국 엠엑스13 9엑스엑스 맨체스터 그래프톤 스트리트 48 디엑스에스 리미티드

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 적어도 PIK3CA 유전자의 단편을 포함하는 핵산 샘플을, 프라이머로 이용되는 서열 14로 구성된 폴리뉴클레오티드 프라이머 서열, 및 상기 폴리뉴클레오티드와 상보적인 영역의 PIK3CA 서열 하류 단편의 영역에 상응하는 제2 프라이머와 혼합하고, 혼합물에 대해 PCR을 수행하는 단계;
 - b) 상기 폴리뉴클레오티드의 핵산 샘플에 대한 혼성화를 검출하는 단계 (이때의 혼성화는 돌연변이의 존재를 나타냄)
- 를 포함하는, PIK3CA 유전자에서 돌연변이의 존부를 검출하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 제2 프라이머가 서열 18에 따른 서열을 갖는 것인 방법.

청구항 3

서열 14로 구성된 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

서열 14로 구성된 제1 프라이머가 전방향 프라이머이고, 제2 프라이머가 제1 프라이머와 상보적인 영역의 PIK3CA 서열 하류 단편의 영역에 상응하는 역방향 프라이머인, 2 개 이상의 폴리뉴클레오티드 프라이머를 포함하는 키트.

청구항 5

제4항에 있어서, 제2 프라이머의 서열이 서열 18로 구성된 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 폴리뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 키트, 및 유전자에서 돌연변이의 존부를 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 포스파티딜이노시톨 3-키나제 (PI3K)는 세포 신호전달에 관여하는 지질 키나제의 큰 무리이다. PI3K-AKT 경로는 다수의 종양 유형에서 활성화되어, 세포 성장, 증식 및 생존에 있어서의 이상을 야기한다 (최근에 검토된 참조문헌 1 추가). 최근, 인간 암에서 클래스 1A PI3K (PIK3CA)의 촉매 소단위체에서의 돌연변이가 동정되었다^[1]. 다수의 표적화된 PI3K 억제제가 계속해서 개발되고 있지만, 발암현상에서의 이들 돌연변이의 정확한 역할은 계속해서 명확하게 규명되어야 하고, 돌연변이의 검출은 환자의 선정에 있어서 매우 중요해질 것이다. 그러한 돌연변이의 검출에 있어서의 기술적 도전은 돌연변이된 서열을 단지 소량만 함유할 수 있는 종양 생검의 한계로 인해 야기되었다. 또한, 파라핀 포매 조직으로부터 추출된 DNA는 종종 분해되었고, 양이 적었다. 서열분석에 의한 검출에 요구되는 돌연변이 DNA의 최소 수준은 15 내지 25%로, 따라서 비균질 샘플에서 돌연변이된 소량의 대립유전자를 검출할 수 있는 민감한 검정법 및 그러한 검정법을 수행하는데 필요한 제품의 개발에 대한 무시할 수 없는 요구가 존재한다.

[0003] 본 발명은 그러한 요구를 다루고자 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 종양-보유 PIK3CA 돌연변이에 대한 민감하고 강력한 시험법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 일 측면에 따르면, 서열 3 내지 16, 18, 20 내지 33, 35 또는 37 내지 39의 프라이머 서열 또는 그에 상보적인 서열 중 하나의 적어도 마지막 6개의 뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 즉, 폴리뉴클레오티드는 서열 3 내지 16, 18, 20 내지 33, 35 또는 37 내지 39의 프라이머 서열 또는 그에 상보적인 서열 중 하나의 3' 말단의 적어도 6개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0006] 바람직하게는, 폴리뉴클레오티드는 서열 3 내지 16, 18, 20 내지 33, 35 또는 37 내지 39의 프라이머 서열, 그에 상보적인 서열, 또는 그와 80%, 90%, 95% 또는 99%의 서열 상동성을 갖는 서열 중 하나의 전체 서열, 또는 그의 3' 말단의 8개, 10개, 12개, 14개, 16개, 17개, 18개 또는 20개의 뉴클레오티드 중 적어도 75%를 포함한다.

[0007] 본 발명의 일부 실시양태에서는, 서열 3 내지 16, 18, 20 내지 33, 35 또는 37 내지 39의 프라이머 서열 또는 그에 상보적인 서열 중 하나의 3' 말단의 10개의 뉴클레오티드 중 적어도 75%를 포함하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.

[0008] 적절하게는, 폴리뉴클레오티드는 길이가 100 뉴클레오티드 미만, 바람직하게는 길이가 80 뉴클레오티드 미만, 보다 바람직하게는 길이가 60 뉴클레오티드 미만, 보다 바람직하게는 길이가 40 뉴클레오티드 미만, 보다 바람직하게는 길이가 30 뉴클레오티드 미만이다.

[0009] 유익하게는, 폴리뉴클레오티드는 켄칭기 (quencher group) 및 형광기 (fluorophore group)를 더 포함한다.

[0010] 적절하게는, 켄칭기 및 형광기는 제1 및 제2 영역을 포함하는 뉴클레오티드 꼬리 서열에 의해 분리되고, 제1 영역의 뉴클레오티드는 제2 영역의 뉴클레오티드와 상보적이지만 역순이어서, 제1 영역의 제2 영역에 대한 혼성화는 켄칭기를 형광기에 충분히 근접시켜 형광기를 켄칭시킨다.

[0011] 바람직하게는, 꼬리 서열은 PIK3CA 유전자의 영역에 상보적인 서열을 갖는 제3 영역을 더 포함한다.

[0012] 유익하게는, 폴리뉴클레오티드는 서열 18의 3' 말단의 적어도 6개의 뉴클레오티드를 포함하고, 꼬리 서열은 서열 17을 포함한다.

[0013] 이와 달리, 폴리뉴클레오티드는 서열 35의 3' 말단의 적어도 마지막 뉴클레오티드를 포함하고, 꼬리 서열은 서열 34를 포함한다.

[0014] 이와 달리, 폴리뉴클레오티드는 서열 39의 3' 말단의 적어도 마지막 뉴클레오티드를 포함하고, 꼬리 서열은 서열 38을 포함한다.

[0015] 적절하게는, 켄칭기는 Dabcyl을 포함한다.

[0016] 바람직하게는, 형광기는 Hex, Fam 또는 Rox를 포함한다.

[0017] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명의 적어도 2개의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 키트가 제공된다.

[0018] 유익하게는, 키트는 서열 18을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 서열 3 내지 16 중 어느 하나를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나; 또는 서열 35를 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 서열 20 내지 33 중 어느 하나를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나; 또는 서열 39를 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 서열 37을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0019] 적절하게는, 키트는 뉴클레오티드 트리포스페이트, 중합 효소 및/또는 완충 용액을 더 포함한다.

[0020] 본 발명의 추가의 측면에 따르면, 적어도 PIK3CA 유전자의 단편을 함유하는 핵산 샘플에서 돌연변이를 검출하기 위한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 키트, 또는 서열 3 내지 16, 18, 20 내지 33 또는 35 또는 그에 상보적인 서열의 3' 말단의 6개의 뉴클레오티드 중 4개 또는 5개를 포함하는 폴리뉴클레오티드의 용도가 제공된다.

[0021] 유익하게는, 핵산 샘플 중의 PIK3CA 유전자의 단편은 길이가 10 뉴클레오티드 이상, 바람직하게는 길이가 20 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 길이가 30 뉴클레오티드 및 보다 바람직하게는 길이가 40 뉴클레오티드이다.

- [0022] 본 발명의 또다른 측면에 따르면,
- [0023] a) 적어도 PIK3CA 유전자의 단편을 포함하는 핵산 샘플을, 서열 3 내지 16 또는 20 내지 33의 프라이머 서열 또는 그에 상보적인 서열 중 하나의 3' 말단의 적어도 6개의 뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드와 혼합하는 단계; 및
- [0024] b) 상기 폴리뉴클레오티드의 핵산 샘플에 대한 혼성화를 검출하는 단계 (이때의 혼성화는 돌연변이의 존재를 나타냄)
- [0025] 를 포함하는, PIK3CA 유전자에서 돌연변이의 존부를 검출하는 방법이 제공된다.
- [0026] 적절하게는, 폴리뉴클레오티드는 서열 3 내지 16 또는 20 내지 33의 프라이머 서열 중 하나를 포함한다.
- [0027] 바람직하게는, 상기 방법은 a) 단계 이전에, 열 주기 핵산 증폭법, 바람직하게는 PCR을 이용하여 PIK3CA 유전자의 단편의 카피수를 증폭시키는 단계를 더 포함한다.
- [0028] 유익하게는, 단계 b)는 제1 프라이머로서 폴리뉴클레오티드를 이용하여 DNA 중합을 행하고, 중합의 연장 산물을 검출하는 것을 포함한다.
- [0029] 적절하게는, 단계 b)는 핵산 샘플 및 폴리뉴클레오티드를, 폴리뉴클레오티드와 상보적인 영역인 PIK3CA 서열 하류 단편 영역에 상응하는 제 2 프라이머와 혼합하는 단계, 및 혼합물에 대해 PCR을 수행하는 단계를 포함한다.
- [0030] 바람직하게는, 제2 프라이머는 서열 18을 포함하고, 폴리뉴클레오티드는 서열 3 내지 16의 3' 말단의 6개의 뉴클레오티드 중 적어도 4개 또는 5개를 포함하거나; 또는 제2 프라이머는 서열 35를 포함하고, 폴리뉴클레오티드는 서열 20 내지 33의 3' 말단의 6개의 뉴클레오티드 중 적어도 4개 또는 5개를 포함한다.
- [0031] 이와 달리, 상기 방법은 대조군 프라이머를 이용하여 샘플에 대해 PCR을 행하는 단계, 및 PIK3CA 유전자의 증폭을 폴리뉴클레오티드 및 제2 프라이머를 이용한 증폭과 비교하는 단계를 더 포함한다.
- [0032] 유익하게는, 대조군 프라이머는 서열 37 및 39를 포함한다.
- [0033] 적절하게는, 폴리뉴클레오티드는 켄칭기 및 형광기를 포함하고, 단계 b)는 형광체가 켄칭기의 부재하에 반응하는 파장의 빛에 혼합물을 노출시키고, 켄칭기의 부재하에 형광기에 의해 방출되는 파장에서 빛을 검출하는 것을 포함한다.
- [0034] PIK3CA 유전자는 젠뱅크 (GenBank) 등록 번호 NM_006218 버전 no. NM_006218.2 GI:54792081로 이용가능한 서열이 바람직하며, 이는 본원에 참고로 포함된다.
- [0035] 명세서에서 참고 서열의 "3' 말단의 6개의 뉴클레오티드 중 적어도 4개 또는 5개"를 언급하는 경우, 이는 참고 서열의 6개의 뉴클레오티드 중 1개 또는 2개의 뉴클레오티드가 생략되거나 다른 뉴클레오티드로 대체될 수 있음을 의미한다. 물론, 일부 실시양태에서, 서열은 참고 서열의 모든 6개의 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0036] 본 명세서에서, "ARMS"는, 예를 들어 EP-A-0332435에 개시되어 있는 증폭 내화성 돌연변이 시스템이다.
- [0037] 본 명세서에서 참고 폴리뉴클레오티드와 비교하여 폴리뉴클레오티드의 백분율을 언급하는 경우, 이는 당업자에게 공지되어 있는 알고리즘에 의해 판단될 수 있다.
- [0038] 예를 들어, 두 서열 간의 백분율 상동성은 디폴트 매개변수를 이용하는 BLASTP 알고리즘 버전 2.2.2 (문현 [Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997)], "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402))를 이용하여 판단할 수 있다.

발명의 효과

[0039] 실시예들은 본 발명이 PIK3CA 유전자에서 가장 혼한 4개의 돌연변이를 검출하는데 있어서의 민감하고 처리율이 높은 검정법을 제공함을 보여준다. 이러한 검정법은 소량의 DNA에도 적용될 수 있으며, 샘플 내의 낮은 수준의 돌연변이 PIK3CA를 검출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 돌연변이 PIK3CA 유전자를 함유하는 샘플에 대해 스콜피온 검출 (Scorpions detection)을 수행하고 서열 분석한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 본 발명의 실시양태는 핵산을 함유하는 샘플 중에서 PIK3CA 유전자의 돌연변이를 검출하기 위한 검정에 사용될 수 있는 폴리뉴클레오티드 프라이머를 제공한다.

[0042] 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 프라이머는 PIK3CA 유전자와 혼성화되어 PCR 증폭 반응을 일으킬 수 있는 전방향 및 역방향 프라이머이다. 이에, 전방향 프라이머는 역방향 프라이머의 반대쪽 가닥의 상류에서 혼성화되고, 전방향 및 역방향 프라이머는 함께 PCR 동안에 증폭되는 앰플리콘 (amplicon) 서열을 한정한다. 전방향 프라이머의 서열은 야생형 서열에는 상보적이지 않지만 돌연변이 PIK3CA 서열과는 혼성화될 수 있도록 선택된다.

[0043] 샘플 중에서 돌연변이 PIK3CA 유전자의 존재를 검출하기 위해, 프라이머를 샘플과 혼합한다. 이어서, PCR에 필요한 작용제 (적절한 뉴클레오티드 트리포스페이트, DNA 중합 효소 및 완충 용액)를 샘플에 첨가하고, PCR을 행한다. 샘플이 전방향 프라이머가 혼성화될 수 있는 돌연변이 서열을 함유한 경우, 이어서 PCR 동안 앰플리콘이 증폭되고, 샘플 중의 돌연변이 서열의 존재가 밝혀진다. 샘플이 돌연변이 서열을 함유하고 있지 않은 경우에는, 이어서 전방향 프라이머가 낮은 효율로 PIK3CA 서열에 결합되어, 앰플리콘 서열이 거의 또는 전혀 증폭되지 않는다.

[0044] 돌연변이 E542K를 검출하기 위해, 전방향 프라이머 서열은 서열 3 내지 9 중 어느 하나, 바람직하게는 서열 5일 수 있다. 돌연변이 E545K를 검출하기 위해, 전방향 프라이머 서열은 서열 10 내지 16 중 어느 하나, 바람직하게는 서열 14일 수 있다. 돌연변이 H1047R을 검출하기 위해, 전방향 프라이머 서열은 서열 20 내지 26 중 어느 하나, 바람직하게는 21일 수 있다. 돌연변이 H1047L을 검출하기 위해, 전방향 프라이머 서열은 서열 27 내지 33 중 어느 하나, 바람직하게는 28일 수 있다. 그러나, 전방향 프라이머의 정확한 서열이 이러한 서열과 동일 할 필요는 없으나, 단 전방향 프라이머는 야생형 서열에 비해 돌연변이 서열에 보다 용이하게 혼성화되어야 하는 것임을 인식한다. 상기에서 언급한 서열 중에서, 그것은 결합 특이성을 제공하는 프라이머의 마지막 6개의 뉴클레오티드 (즉, 3' 말단의 뉴클레오티드)로, 따라서 이를 뉴클레오티드는 주어진 서열과 반드시 동일해야 한다.

[0045] 샘플 중에 형성된 앰플리콘의 존재를 검출하기 위한 역방향 프라이머를, 본 발명의 실시양태에서는 소위 "스콜피온 (Scorpions)" 프라이머라 부른다. 스콜피온 프라이머에 대한 상세한 사항은 WO-A-99/066071에 제공되어 있으며, 이는 본원에 참고로 포함된다. 스콜피온 프라이머는 유전자 (본 발명에서 PIK3CA)의 제1 표적 서열에 상보적인 프라이머 서열을 포함하며, 꼬리 서열은 2개의 상호 상보적인 서열의 측면에 배치된 프로브 서열을 포함한다. DNA 폴리머라제 차단 잔기 (예컨대 헥스에틸렌 글리콜 (HEG) 단량체)는 프라이머 서열과 꼬리 서열 사이에 제공된다. 형광기는 꼬리 서열의 한쪽 말단에 제공되고, 켄칭기는 꼬리 서열의 다른쪽 말단에 제공된다. 사용시, 스콜피온 프라이머의 프라이머 서열은 PCR 동안 정상적인 방식으로 역방향 프라이머로서 작용하고, 따라서 꼬리 서열을 비롯한 전체 스콜피온 프라이머는 각 앰플리콘에 도입되기 시작한다. DNA 폴리머라제 차단 잔기는 꼬리 서열이 복제되는 것을 방지한다. 따라서, 꼬리 서열 내의 상호 상보적인 서열은 서로 혼성화되어 형광기 및 켄칭기를 근접시키고, 형광기로부터의 방출을 방지하는 경향을 갖는다. 그러나, 앰플리콘이 프로브 서열에 상보적인 제2 표적 서열을 함유하는 경우, 프로브 서열은 제2 표적 서열에 우세하게 결합하여 상호 상보적인 서열들을 분리시킨다. 그 결과, 형광기 및 켄칭기가 공간적으로 분리되어 형광기가 한 과장의 입사빛에 감응하여 다른 과장의 빛을 방출하게 된다. 따라서, 스콜피온 프라이머는 앰플리콘의 검출을 용이하게 할 수 있고, 게다가 신호는 앰플리콘이 제2 표적 서열을 함유하는 경우에만 생성되기 때문에 (예를 들어, 프라이머 이량체에 의해 야기되는) 위양성 결과를 막는다.

[0046] 형광기는 Hex (4,7,2',4',5',7'-헥사클로로-(3',6'-디피발로일플루오레세닐)-6-카르복사미도헥실]-1-0-(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)-포스포라미디트), Fam ([3',6'-디피발로일플루오레세닐]-6-카르복사미도헥실]-1-0-(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)-포스포라미디트) 또는 Rox (5,6-카르복시-X-로다민)일 수 있다. 켄칭기는 Dabcyl (5'-디메톡시트리틸옥시-5-[(N-4'-카르복시-4-(디메틸아미노)-아조벤젠)-아미노헥실-3-아크릴이미도]-2'-데옥시우리딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포라미디트)일 수 있다.

[0047] 본 발명의 실시양태에서, 스콜피온 프라이머는 E542K 및 E545K 돌연변이의 검출에 제공되며, 이때 프라이머 서열은 서열 18이고, 프로브 서열은 서열 17이다. 스콜피온 프라이머는 H1047R 및 H1047L 돌연변이의 검출에 제

공되고, 이때 프라이머 서열은 서열 35이고, 프로브 서열은 서열 34이다.

[0048] 그러나, 스콜피온 프라이머의 이용은 본 발명에서 필수적인 것이 아니며, 앰플리콘의 합성을 검출하는 다른 방법, 예컨대 특허 제US-A-5487972호 및 제US-A-5210015호에 기재되어 있는 바와 같은 TaqMan™ 생성물 검출법을 채용할 수 있음을 인식한다.

[0049] 일부 실시양태에서는, 샘플 중의 PIK3CA 유전자의 총 농도를 검출하기 위해 대조군 검정을 또한 수행한다. 이는 PIK3CA 유전자의 다른 영역에서 앰플리콘을 한정하는 대조군 전방향 및 역방향 프라이머를 이용하여 별개의 PCR 반응을 수행하는 것에 의해 달성된다. 전방향 프라이머는 서열 37이고, 역방향 프라이머는 프라이머 서열이 서열 39이고, 프로브 서열이 서열 38인 스콜피온 프라이머인 것이 바람직하다. 이어서, 샘플 중의 PIK3CA 유전자의 돌연변이 카페의 비율을 평가하기 위해, 대조군 앰플리콘의 역치값을 생성하는데 요구되는 PCR 주기의 횟수를 돌연변이 서열을 함유하는 앰플리콘의 역치값을 생성하는데 요구되는 PCR 주기의 횟수와 비교한다. 이러한 대조군 검정은 일반적으로 시험 검정과는 별개로 행한다.

[0050] PCR 검정은 바람직하게는 복합화된 실시간 PCR 검정으로 행한다.

[0051] 핵산의 시험 샘플은 적절하게는 개개인으로부터 수득한 혈액, 대변, 가래, 장 세척액, 기관지 세척액 또는 기타 체액 샘플 또는 조직이다. 개개인은 적절하게는 인간이고, 바람직하게는 호모 사피엔스이다. 시험 샘플은 시험 샘플 중의 서열에 상응하는 핵산 서열과 동일할 수 있음이 인식될 것이다. 다시 말해서, 샘플 핵산 중의 전체 또는 일부 영역은 본 발명의 방법에서 사용하기 이전에 열 주기 핵산 증폭법, 특히 PCR, 또는 전체 게놈 증폭법 (WGA)과 같은 임의의 통상적인 기술을 이용하여 먼저 증폭시킬 수 있다.

[0052] 중합을 위해 임의의 통상적인 효소를 사용할 수 있지만, 단 DNA 폴리머라제가 정상 및 돌연변이 주형 서열을 임의의 유의한 정도로 식별할 수 있는 능력에 영향을 주는 것이어서는 안된다. 통상적인 효소의 예로는, 어떤 유의한 3'-5' 엑소뉴클레아제 활성도 갖지 않는 열안정성 효소, 예를 들어 Taq DNA 폴리머라제, 특히 "Ampli Taq Gold"™ DNA 폴리머라제 (PE 어플라이드 바이오시스템즈 (PE Applied Biosystems)), 스토펠 (Stoffel) 단편, 또는 기타 적절하게 N-말단이 결실된 Taq 또는 Tth (테르무스 테르모필루스 (*Thermus thermophilus*)) DNA 폴리머라제의 변형체가 있다.

[0053] 본 발명의 추가의 실시양태에서는, 본 발명의 하나 이상의 폴리뉴클레오티드, 및 PCR 반응을 수행하는데 요구되는 뉴클레오티드 트리포스페이트, DNA 폴리머라제 효소, 및 완충 용액을 포함하는 키트가 제공된다. 바람직한 키트는 특정 돌연변이를 검출하기 위한 전방향 및 역방향 프라이머 및 전방향 및 역방향 대조군 프라이머를 포함한다.

재료 및 방법

[0055] PIK3CA 유전자 (등록 번호: NM_006218)에서 가장 흔한 4개의 돌연변이에 대한 프라이머를 설계하였다. ARMS 프라이머는 엑손 20에서의 2개의 돌연변이: H1047R 및 H1047L; 및 엑손 9에서의 2개의 돌연변이: E452K 및 E454K를 검출하기 위해 설계하였다. 대조군 프라이머는 PIK3CA 유전자 내의 cDNA 위치 2450에 대해 설계하였다.

[0056] 또한, 스콜피온도 설계하였다. 각 반응 당 다수의 검정을 복합적으로 하기 위해, 세 개의 스콜피온 프라이머를 상이한 형광체들로 표지하였다.

프라이머 설계

[0058] 각 표적 영역에 대해 특이적으로 다수의 ARMS 프라이머를 설계하였다. E542K 및 E545K 돌연변이에 대한 표적 영역을 서열 1 및 서열 2로서 아래에 각각 나타내었다 (돌연변이 염기는 괄호 내에 정상 변이체 (첫번째)와 함께 나타내었다). 돌연변이에 대한 전방향 프라이머 또한 아래에 나타내었다 (서열 3 내지 16). 이 반응의 특이성을 향상시키기 위해, 3'-말단 가까이에서 추가의 프라이머 미스매치를 이용하였다 (프라이머 서열에서 밑줄로 나타냄). 최적의 프라이머 (E542K-2 및 E545K-4)를 기술한 실험에서 사용하였다. 프라이머 서열과 함께 이 용가능한 스콜피온 프라이머는 서열 17 및 18로 나타내었다. 스콜피온 프라이머와 표적 영역 간에 상응하는 영역은 동일한 강조표시 또는 밑줄로 나타내었다.

예손 9 영역

AACAGAGAATCTCCATTTAGCACTTACCTGTGACTCCATAGAAAATCTTCTCC
TGCTCAGTGATTT(C/T)AGAGAGAGGATCTCGTGTAGAAATGCTTGTGAGCTGTT
CTTTGTCATTTCCCTTAATTCAATTGCTCTAGCTAGTCTGTTACTCTGTAAAATA
AAATAATATCTTATATA (서열 1)

AACAGAGAATCTCCATTTAGCACTTACCTGTGACTCCATAGAAAATCTTCTCC
TGCT(C/T)AGTGATTTCAAGAGAGGATCTCGTGTAGAAATGCTTGTGAGCTGTT
CTTTGTCATTTCCCTTAATTGCTCTAGCTAGTCTGTTACTCTGTAAAATA
AAATAATATCTTATATA (서열 2)

돌연변이	프라이머 서열	서열 번호
E542K-0	5'-CTTTCTCCTGCTCAGTGATTT-3'	3
E542K-1	5'-CTTTCTCCTGCTCAGTGATTAT-3'	4
E542K-2	5'-CTTTCTCCTGCTCAGTGATTCT-3'	5
E542K-3	5'-CTTTCTCCTGCTCAGTGATTGT-3'	6
E542K-4	5'-CTTTCTCCTGCTCAGTGATATI-3'	7
E542K-5	5'-CTTTCTCCTGCTCAGTGATCTI-3'	8
E542K-6	5'-CTTTCTCCTGCTCAGTGATGTI-3'	9
E545K-0	5'-ACTCCATAGAAAATCTTCTCCTGCTT-3'	10
E545K-1	5'-ACTCCATAGAAAATCTTCTCCTGCAT-3'	11
E545K-2	5'-ACTCCATAGAAAATCTTCTCCTGCCT-3'	12
E545K-3	5'-ACTCCATAGAAAATCTTCTCCTGCGT-3'	13
E545K-4	5'-ACTCCATAGAAAATCTTCTCCTGATT-3'	14
E545K-5	5'-ACTCCATAGAAAATCTTCTCCTGGTT-3'	15
E545K-6	5'-ACTCCATAGAAAATCTTCTCCTGTTT-3'	16
예손 9 스콜피온	Hex-CGCGCTCGTGTAGAAATTGCTTGAGCGCG- que-heg-CAATGAATTAAAGGGAAAATGACA	17 및 18

[0060]

예손 20 영역

[0061]

H1047R 및 H1047L 돌연변이에 대한 표적 영역은 서열 19로서 아래에 나타내었다 (돌연변이 염기는 괄호 내에 정상 변이체 (첫번째)와 함께 나타내었다). 돌연변이에 대한 전방향 프라이머 또한 아래에 나타내었다 (서열 20 내지 33). 이 반응의 특이성을 향상시키기 위해, 3'-말단 가까이에서 추가의 프라이머 미스매치를 이용하였다 (프라이머 서열에서 밑줄로 나타냄). 최적의 프라이머 (H1047R-1 및 H1047L-1)를 기술한 실험에서 사용하였다. 프라이머 서열과 함께 이용가능한 스콜피온 프라이머는 서열 34 및 35로 나타내었다. 스콜피온 프라이머와 표적 영역 간에 상응하는 영역은 동일한 강조표시 또는 밑줄로 나타내었다.

AGTGCAGTGTGGAATCCAGAGTGAGCTTCATTTCTCAGTTATCTTTCAGTTC
 AATGCATGCTTTAATTGTGTGGAAGATCCAATCCATTGTTGTGTCAGCCAC
CATGA(T/C/A)GTGCATCAATTGTTCATGAAATACTCAAAGCCTCITGCTC
AGTTTATCTAAGGCTAGGGTCTTTCGAATGTATGCAATGTCAATCAAAGATTG
 AGTTCTGGCATTCCAGAGCCAAGCATCATTGAGAAAAGTTATGAAGAGATTG
 GCATGCTGTCGAATAGCTAGATAAGCCTT (서열 19)

[0063]

돌연변이	프라이머 서열	서열 번호
H1047R-0	5'-TGTTGCCAGCCACCAT <u>GAC</u> -3'	20
H1047R-1	5'-TGTTGCCAGCCACCAT <u>GC</u> -3'	21
H1047R-2	5'-TGTTGCCAGCCACCAT <u>GC</u> -3'	22
H1047R-3	5'-TGTTGCCAGCCACCAT <u>GTC</u> -3'	23
H1047R-4	5'-TGTTGCCAGCCACCAT <u>AA</u> -3'	24
H1047R-5	5'-TGTTGCCAGCCACCAT <u>AC</u> -3'	25
H1047R-6	5'-TGTTGCCAGCCACCAT <u>AC</u> -3'	26
H1047L-0	5'-TGTTGCCAGCCACCAT <u>GAA</u> -3'	27
H1047L-1	5'-TGTTGCCAGCCACCAT <u>GCA</u> -3'	28
H1047L-2	5'-TGTTGCCAGCCACCAT <u>GGA</u> -3'	29
H1047L-3	5'-TGTTGCCAGCCACCAT <u>GTA</u> -3'	30
H1047L-4	5'-TGTTGCCAGCCACCAT <u>AA</u> -3'	31
H1047L-5	5'-TGTTGCCAGCCACCAT <u>CA</u> -3'	32
H1047L-6	5'-TGTTGCCAGCCACCAT <u>AA</u> -3'	33
예손 20 스콜피온	Fam-CGGGCATGAAAT <u>ACT</u> CCAA <u>AGCCGCG</u> -que- heg- <u>CCCTAGGGCTT</u> AGATA <u>AAACTGACCAA</u>	34 및 35

대조국 프랑스의

대조군 프라이머를 아래에 나타내었다. 스콜피온 프라이머와 표적 영역 간에 상응하는 영역은 동일한 강조표시 또는 밑줄로 나타내었다.

AGGCTTGAAGAGTGTCCAATTATGTCTCTGCAAAAAAGGCCACTGTGGTGAAT
TGGGAGAACCCAGACATCATGTCAGAGTTACTGTTTCAGAACAATGAGATCATC
TTTTAAATGGGGATGG (서열 36)

돌연변이	프라이머 서열	서열 번호
대조군 프라이머	5'-AGATGATCTCATTGTTCTGAAACAG-3'	37
대조군 스콜피온	Rox-CCGGCCAATTCAACCAACAGTGGCCGG- que-heg- CCGTTCAAGAGCTCTGGAATTA	38 및 39

모든 프라이머는 인비트로젠 (Invitrogen)이 합성하여 공급한 것이다. PCR 완충액, Taq 및 마그네슘은 유로젠 텍 (Eurogentec)이 공급한 것이며, dNTPS는 압젠 Ltd. (Abgene Ltd.)에서 구입하였다. 스콜피온은 에이티디바이오 (ATDBio)에서 합성하여 공급한 것이다.

검정은 대조군 검정 및 2 ARMS 검정을 포함한 2개의 반응으로 복합적으로 행하였다 ($1\times$ 엑손 9 및 $1\times$ 엑손 20). 검정은 $1\times$ PCR 완충액, 4.0 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP 혼합물, 각 프라이머 (대조군 프라이머 및 2 ARMS 프라이머) 0.25 μ M 및 각 스콜피온 (대조군 스콜피온 (서열 38 및 39), 엑손 20 스콜피온 (서열 34 및 35) 및 엑손 9 스콜피온 (서열 17 및 18)) 0.25 μ M을 함유하는 25 μ l의 반응 부피에서 수행하였다. DNA 주형 2.5 μ l를 각 반응에 첨가하였다. H1047R 및 E542K 프라이머는 반응 당 2.5 단위의 Taq 폴리머라제와 함께 복합화하였다. H1047L 및 E545K 프라이머는 반응 당 3.0 단위의 Taq 폴리머라제와 함께 복합화하였다. 사용된 E542K 프라이머는 E542K-2 (서열 5)였다. 사용된 E545K 프라이머는 E545K-4 (서열 14)였다. 사용된 H1047R 프라이머는 H1047R-1 (서열 21)이었다. 사용된 H1047L 프라이머는 H1047L-1 (서열 28)이었다.

모든 경우에서, 반응은 스트라타젠 (Stratagene) Mx3000P 상에서 다음과 같은 조건 하에 증폭시켰다: 95°C에서 10분, 이어서 90°C에서 30초 및 60°C에서 1분의 45번 주기.

양성 대조군으로서 사용하기 위한 점 돌연변이를 함유하는 DNA 카세트를 히구치 등 (Higuchi et al.)의 문헌^[2]에 기재된 방법에 기초하여 구축하였다. 요약하면, 상응하는 외부 돌연변이 유발 프라이머를 사용하여 상보적인 말단을 갖는 1/2 카세트들을 생성하였고, 이때 각각의 1/2 카세트는 돌연변이 염기를 함유하였다. 이러한 PCR 산물들을 내부의 내포된 프라이머와 혼합하여 이것으로 증폭시켰다. 상보적인 1/2 카세트의 자체 프라이밍 및 후속 증폭은 돌연변이된 염기를 갖는 최종 산물을 생성하였다. 산물들의 서열을 분석하여 올바른 서열이 생성되었음을 확인하였다. 이러한 과정은 각 관심 돌연변이에 대해 반복하였다. DNA 카세트를 게놈 DNA와 동일한 양으로 혼합하여 100% 양성 대조군을 생성하였다.

[0073] 실시예 1

반응 및 프라이머의 특이성을 판단하기 위해, 반응 당 게놈 DNA 5 내지 50 ng으로 각 검정을 수행하여, 미스매치된 프라이머의 연장에 의해 유발되는 브레이크스루 신호를 평가하였다. 각 반응에 대하여, ΔCt 값 (대조군 Ct-돌연변이 Ct)을 규정하였다 (Ct = 역치 주기). 반응은 각 DNA 농도에 대해 6회 행하고, 별개 경우마다 3회 반복하여, 임의의 증폭이 돌연변이 서열의 존재로 인한 것이고, 브레이크스루 신호로 인한 것이 아니라고 말할 수 있는 값 미만인 컷 오프 ΔCt 값을 규정하였다. 컷 오프 ΔCt 값은 각 검정에 대하여 모든 반응에서 관찰되는 가장 낮은 ΔCt 값 미만인 1 Ct인 것으로 결정하였다. H1047R 및 H1047L 검정에서, 컷 오프 ΔCt 는 12로 규정되었고, E542K 검정에서 컷 오프 ΔCt 는 9로, E545K 검정에서 컷 오프 ΔCt 는 8로 규정되었다.

[0075] 실시예 2

검정의 민감도를 평가하기 위해, 돌연변이 DNA 5 카피를 다양한 농도의 게놈 DNA 중에 희석시켜, 야생형에 대한 5, 2, 1, 0.5 및 0.1%의 돌연변이 DNA 최종 농도를 수득하였다. 표 1은 4 ARMS 검정의 민감도를 나타낸다. 표는 야생형 DNA 배경 내에서 감소되는 돌연변이 DNA 농도에 대한 ΔCt 값을 보여준다. 미리 규정해 둔 컷 오프 ΔCt 는 마지막 행에 나타내었다. 엑손 20 검정은 돌연변이 DNA가 총 DNA의 0.1% 만을 구성하는 경우에 (미리 규정해 둔 컷 오프 ΔCt 이내임) 돌연변이 DNA 5 카피를 검출할 수 있었다. 엑손 9 검정은 미리 규정해 둔 컷 오프 값 이내의 ΔCt 를 갖는 1% 농도에서 DNA 5 카피를 검출할 수 있었다 (표 1).

표 1

WT DNA /반응 (카피수)	MUT DNA /반응 (카피수)	MUT 대립 유전자의 상대적%	ΔCt				컷 오프 ΔCt
			H1047L	H1047R	E542K	E545K	
100	5	5%	5.9	4.3	5.1	5.8	
250	5	2%	7.2	6.7	7.2	6.4	H1047L 12
500	5	1%	8.3	7.6	8.4	7.0	H1047R 12
1000	5	0.5%	9.3	9.0	10.2	8.1	E542K 9
5000	5	0.1%	11.5	10.5	12.1	10.1	E545K 8

[0077]

[0078] 실시예 3

돌연변이 H1047R (HCT-116) 및 E545K (MCF-7)를 함유하는 세포주의 혼합물을 사용하여, 서열분석과 비교하여 ARMS 검정의 상대적인 민감도를 비교하였다. 세포주 둘 모두는 돌연변이에 대해 이형이다. 서열분석은 사무엘 등 (Samuels et al.)의 문헌^[1]에 기재되어 있는 프라이머 및 PCR 주기 조건을 이용하여 수행하였다. ARMS 검정 및 서열분석은 총 혼합물 중 돌연변이 유전자 100%, 50%, 30%, 10% 및 1% 농도에서 수행하였다. 결과를 도 1에 도시하며, 여기서 "스콜피온" 제목하의 결과는 PCR 연속 라운드 이후의 앰플리콘 카피 수의 증가를 보여준다 (대조군 프라이머 및 돌연변이 프라이머를 이용한 결과는 별개의 선으로 나타내었다). "DNA 서열분석" 제목하에서는 혼합물 내 유전자의 역방향 가닥을 서열분석한 결과를 나타낸다. 서열분석은 H1047R 돌연변이가 총 혼합물의 50% 미만으로 존재하는 경우에는 그의 존재를 검출할 수 없었고, E545K 돌연변이가 총 혼합물의 30% 미만으로 존재하는 경우에도 그의 존재를 검출할 수 없었다. 이와 대조적으로, 본 발명의 프라이머를 이용한 검정은 돌연변이의 존재를 1% 농도에서 검출할 수 있었다.

[0080] 실시예 4

본 검정은 ARMS/스콜피온 검정에 의해 PIK3CA 돌연변이의 존재가 평가된 다양한 종양 유형의 신선한 동결 조직으로부터 추출한 DNA에 적용하였다. 총 DNA 중에서 279개의 종양 샘플이 이용가능하였다. 검정은 49개 중 5개 (10.2%)의 결장암 샘플, 49개 중 19개 (38.7%)의 유방암 샘플, 51개 중 1개 (1.9%)의 폐암 샘플, 및 34개 중 1개 (2.9%)의 흑색종 샘플에서 돌연변이를 보고하였다. 50개의 전립선암 샘플 또는 46개의 난소암 샘플에서는 어떤 돌연변이도 검출되지 않았다. PIK3CA 돌연변이에 대해 양성인 결장암 샘플 중에서 3개는 H1047R, 1

개는 H1047L, 및 1개는 E542K였고; PIK3CA에 대해 양성인 유방암 샘플 중에서 15개는 H1047R, 1개는 H1047L 및 3개는 E545K였으며; PIK3CA 돌연변이에 대해 양성인 폐암 샘플 및 흑색종 샘플 중의 돌연변이는 둘 모두 H1047R 이었다. 서열분석은 검출된 총 26개 중 14개의 돌연변이 만을 식별하였다 (53%). 서열분석은 검출을 위한 ARMS 검정이 설계되지 않은 1개의 유방암 표본에서 돌연변이를 검출하였다 (c.1634 A>G; p E545G). 이것은 신규한 돌연변이가 아니며, 유방암 및 직장암에서 이미 기재되어 있던 것이다^[3-5].

[0082] 분석된 샘플 중 PIK3CA 돌연변이의 발생정도는 난소암을 제외하고 기존의 연구와 일치하였다^[1, 3-9]. PIK3CA 돌연변이는 난소암에서도 이미 기재되어 있었지만, 자궁내막양 및 클리어 셀 암과 관련이 있을 수 있음이 제시되어 왔다^[8, 10]. 본 연구에서 실험된 모든 난소암은 장액선 선암종 (serous adenocarcinomas)으로, 임의의 PIK3CA 돌연변이가 존재하지 않았던 것을 설명할 수 있다.

[0083] ARMS 검정은 임상 샘플에서 직접 서열분석에 의해 관찰되는 것 보다 유의하게 많은 돌연변이를 식별하였다. 세포주 혼합물은 본 검정이 관심 PI3KCA 돌연변이를 검출하는데 서열분석보다 더 민감함을 확인시켜준다. 이는 종양 및 정상 조직을 둘 모두 함유할 것인 임상 샘플의 이종성으로 인해, 일부 경우에는 돌연변이의 발생정도가 서열분석법에 의해 검출될 수 있는 것보다 낮을 것이어서, ARMS 검정이 임상적으로 적용하는데 있어서 더 적합함을 의미하는 것일 수 있다. 결점이라면 특정 ARMS 특이적 돌연변이만이 검출될 것이라는 것이다. 그러나, 이러한 일련의 279개의 샘플 중 PI3KCA 유전자의 엑손 9 또는 20에서, 검출을 위한 ARMS 검정이 설계되지 않은 단지 하나의 돌연변이가 검출되었을 뿐이다.

[0084] 요약하면, 실시예들은 본 발명이 PIK3CA 유전자에서 가장 흔한 4개의 돌연변이를 검출하는데 있어서의 민감하고 처리율이 높은 검정법을 제공함을 보여준다. 이러한 검정법은 소량의 DNA에도 적용될 수 있으며, 샘플 내의 낮은 수준의 돌연변이 PIK3CA를 검출할 수 있다.

서열목록 자유형 텍스트

<210> 1
<223> E542K target region

<210> 2
<223> E545K target region

<210> 3
<223> E542K-0 fwd primer

<210> 4
<223> E542K-1 fwd primer

<210> 5
<223> E542K-2 fwd primer

<210> 6
<223> E542K-3 fwd primer

<210> 7
<223> E542K-4 fwd primer

<210> 8
<223> E542K-5 fwd primer

<210> 9
<223> E542K-6 fwd primer

<210> 10
<223> E545K-0 fwd primer

<210> 11
<223> E545K-1 fwd primer

<210> 12
<223> E545K-2 fwd primer

<210> 13
<223> E545K-3 fwd primer

<210> 14
<223> E454K-4 fwd primer

<210> 15
<223> E545K-5 fwd primer

<210> 16
<223> E545K-6 fwd primer

<210> 17
<223> Exon 9 Scorpion

<210> 18
<223> Exon 9 Scorpion 2

<210> 19
<223> H1047R and H1047L target regions

<210> 20
<223> H1047R-0 fwd primer

<210> 21
<223> H1047R-1 fwd primer

<210> 22
<223> H1047R-2 fwd primer

<210> 23
<223> H1047R-3 fwd primer

<210> 24
<223> H1047R-4 fwd primer

<210> 25
<223> H1047R-5 fwd primer

<210> 26
<223> H1047R-6 fwd primer

<210> 27
<223> H1047L-0 fwd primer

<210> 28
<223> H1047L-1 fwd primer

<210> 29
<223> H1047L-3 fwd primer

<210> 30
<223> H1047-3 fwd primer

[0086]

<210> 31
<223> H1047L-4 fwd primer

<210> 32
<223> H1047L-5 fwd primer

<210> 33
<223> H1047L-6 fwd primer

<210> 34
<223> Exon 20 Scorpion

<210> 35
<223> Exon 20 Scorpion 2

<210> 36
<223> Control target region

<210> 37
<223> Control primer

<210> 38
<223> Control Scorpion

<210> 39
<223> Control Scorpion 2

[0087]

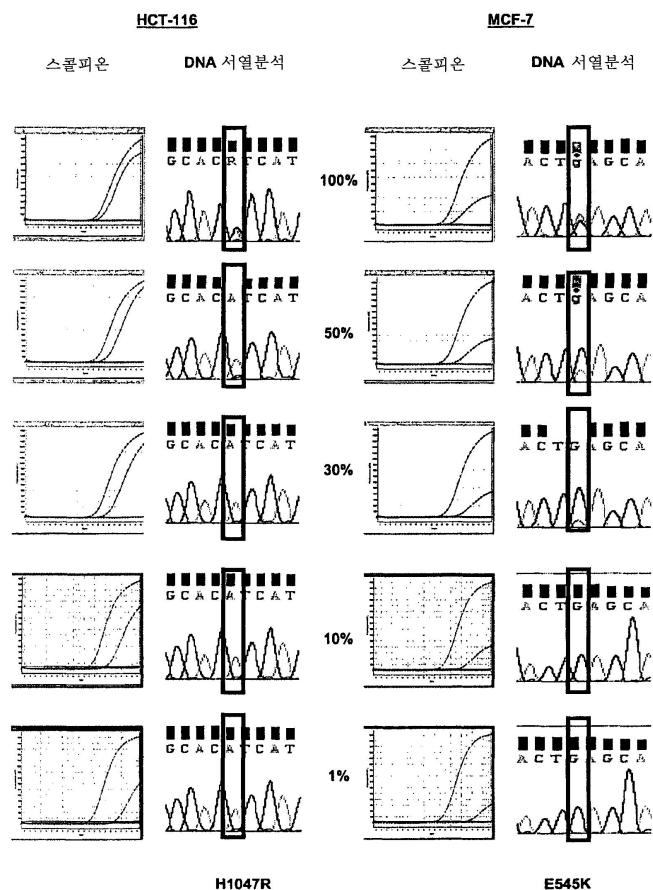
참고문헌:

1. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004;304(5670):554.
2. Higuchi R, Krummel B, Saiki RK. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 1988;16(15):7351-67.
3. Wu G, Xing M, Mambo E, et al. Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005;7(5):R609-16.
4. Levine DA, Bogomolniy F, Yee CJ, et al. Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. *Clin Cancer Res* 2005;11(8):2875-8.
5. Velho S, Oliveira C, Ferreira A, et al. The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. *Eur J Cancer* 2005;41(11):1649-54.
6. Lee JW, Soungh YH, Kim SY, et al. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2005;24(8):1477-80.
7. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, et al. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2004;3(8):772-5.
8. Campbell IG, Russell SE, Choong DY, et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 2004;64(21):7678-81.
9. Omholt K, Krockel D, Ringborg U, Hansson J. Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 2006;16(2):197-200.
10. Wang Y, Helland A, Holm R, Kristensen GB, Borresen-Dale AL. PIK3CA mutations in advanced ovarian carcinomas. *Hum Mutat* 2005;25(3):322.

[0088]

도면

도면1



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> DxS Limited

- <120> Polynucleotide Primers
- <130> MWPP102416
- <150> GB0719034.1
- <151> 2007-09-28
- <160> 39
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 180
- <212> DNA

<213> Artificial

<220><223> E542K target region

<400> 1

aacagagaat ctccatTTTA gcacttacct gtgactccat agaaaatctt tctcctgctc	60
agtgatttca gagagaggat ctcgtgtaga aattgcttgc agctgttctt tgtcattttc	120
ccttaattca ttgtctctag ctgtctgtt actctgtaaa ataaaataat atcttatata	180

<210> 2

<211> 180

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> E545K target region

<400> 2

aacagagaat ctccatTTTA gcacttacct gtgactccat agaaaatctt tctcctgcty	60
agtgatttca gagagaggat ctcgtgtaga aattgcttgc agctgttctt tgtcattttc	120
ccttaattca ttgtctctag ctgtctgtt actctgtaaa ataaaataat atcttatata	180

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> E542K-0 fwd primer

<400> 3

ctttctcctg ctcagtgatt tt	22
--------------------------	----

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> E542K-1 fwd primer

<400> 4

ctttctcctg ctcagtgatt at	22
--------------------------	----

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> E542K-2 fwd primer

<400> 5

ctttctcctg ctcagtgatt ct

22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> E542K-3 fwd primer

<400> 6

ctttctcctg ctcagtgatt gt

22

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> E542K-4 fwd primer

<400> 7

ctttctcctg ctcagtgata tt

22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> E542K-5 fwd primer

<400> 8

ctttctcctg ctcagtgatc tt

22

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> E542K-6 fwd primer

<400> 9

ctttctcctg ctcagtgatg tt

22

<210> 10

<211> 27

<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> E545K-0 fwd primer	
<400> 10	
actccataga aaatcttct cctgctt	27
<210> 11	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> E545K-1 fwd primer	
<400> 11	
actccataga aaatcttct cctgcat	27
<210> 12	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> E545K-2 fwd primer	
<400> 12	
actccataga aaatcttct cctgcct	27
<210> 13	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> E545K-3 fwd primer	
<400> 13	
actccataga aaatcttct cctgcgt	27
<210> 14	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> E454K-4 fwd primer	
<400> 14	
actccataga aaatcttct cctgatt	27
<210> 15	

<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> E545K-5 fwd primer	
<400> 15	
actccataga aaatcttct cctggtt	27
<210> 16	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> E545K-6 fwd primer	
<400> 16	
actccataga aaatcttct cctgttt	27
<210> 17	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Exon 9 Scorpion	
<400> 17	
cgcgcctcgtagaaattgc tttgagcgcg	30
<210> 18	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Exon 9 Scorpion 2	
<400> 18	
caatgaatttta agggaaaatg aca	23
<210> 19	
<211> 300	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> H1047R and H1047L target regions	
<400> 19	

agtgcagtgt ggaatccaga gtgagcttc atttctcg ttatctttc agttcaatgc 60
 atgctgttta attgtgtgga agatccaaatc cattttgtt gtccagccac catgahgtgc 120
 atcattcatt tgtttcatga aataactccaa agccttgc tcagtttat ctaaggctag 180
 ggtcttcga atgtatgcaa tgtcatcaa agattgtagt tctggcattc cagagccaag 240
 catcatttagg aaaagattt tgaagagattt ggcatgctgt cgaatagcta gataaggcct 300
 <210> 20
 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> H1047R-0 fwd primer

<400> 20

tgttgtccag ccaccatgac 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> H1047R-1 fwd primer

<400> 21

tgttgtccag ccaccatgcc 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> H1047R-2 fwd primer

<400> 22

tgttgtccag ccaccatggc 20

<210>

> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> H1047R-3 fwd primer

<400> 23

tgttgtccag ccaccatgtc 20

<210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> H1047R-4 fwd primer
 <400> 24
 tgttgtccag ccaccataac 20
 <210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> H1047R-5 fwd primer
 <400> 25
 tgttgtccag ccaccatcac 20

 <210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> H1047R-6 fwd primer
 <400> 26
 tgttgtccag ccaccattac 20
 <210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> H1047L-0 fwd primer
 <400> 27
 tgttgtccag ccaccatcaa 20
 <210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> H1047L-1 fwd primer
 <400> 28

tgttgtccag ccaccatgca 20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> H1047L-3 fwd primer

<400> 29

tgttgtccag ccaccatgga 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> H1047-3 fwd primer

<400> 30

tgttgtccag ccaccatgta 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> H1047L-4 fwd primer

<400> 31

tgttgtccag ccaccataaa 20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> H1047L-5 fwd primer

<400> 32

tgttgtccag ccaccatcaa 20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> H1047L-6 fwd primer
<400> 33
tgggtccag ccaccattaa 20
<210> 34
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Exon 20 Scorpion
<400> 34
cgccgcatga aatactccaa agccgca 27

<210> 35
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Exon 20 Scorpion 2
<400> 35
ccctagcct agataaaact gagcaa 26
<210> 36
<211> 125
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Control target region
<400> 36
aggcttgaag agtgtcgaat tatgtcctc gcaaaaaggc cactgtgggtt gaattgggag 60
aacccagaca tcatgtcaga gttactgttt cagaacaatg agatcatctt taaaaatggg 120
gatgg 125
<210>
37
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Control primer
<400> 37
agatgatctc attgttctga aacag 25

<210>	38		
<211>	26		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220><223>	Control Scorpion		
<400>	38		
ccggccaatt	caaccacagt	ggccgg	26
<210>	39		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220><223>	Control Scorpion 2		
<400>	39		
ggcttgaaga	gtgtcgaatt	a	21