



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월18일

(11) 등록번호 10-2720023

(24) 등록일자 2024년10월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6851 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6851 (2018.05)

C12Q 2527/146 (2019.08)

(21) 출원번호 10-2021-0123216

(22) 출원일자 2021년09월15일

심사청구일자 2021년09월15일

(65) 공개번호 10-2023-0040069

(43) 공개일자 2023년03월22일

(56) 선행기술조사문헌

BioTechniques. vol. 55, no. 4, 181-197
(2013)*

PloS one. vol. 13, no. 6, e0199091 (2018)*

Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification

Kits. USER Guide, Publication Number

4485354(2017.04.04)

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

신경진

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 본관 221호

홍새롬

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 본관 222호

(74) 대리인

특허법인인벤싱크

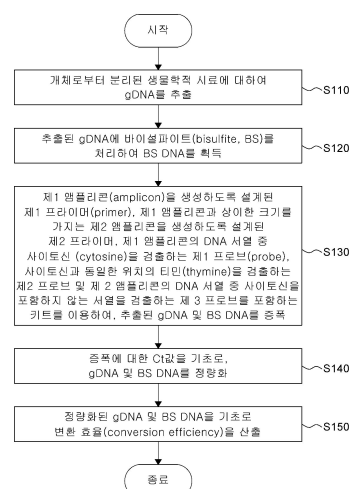
전체 청구항 수 : 총 28 항

심사관 : 최지다

(54) 발명의 명칭 바이설파이트 변환 평가용 키트 및 이를 이용한 평가 방법

(57) 요약

본 명세서에서는, 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대하여 gDNA를 추출하는 단계, 추출된 gDNA에 바이설파이트(bisulfite, BS)를 처리하여 BS DNA를 획득하는 단계, 제 1 앰플리콘(amplicon)을 생성하도록 설계된 제 1 프라이머(primer), 제 1 앰플리콘과 상이한 크기를 가지는 제 2 앰플리콘을 생성하도록 설계된 제 2 프라이머, 제 1 앰플리콘의 DNA 서열 중 사이토신(cytosine)을 검출하는 제 1 프로브(probe), 사이토신과 동일한 위치의 티민(thymine)을 검출하는 제 2 프로브 및 사이토신을 포함하지 않는 제 3 프로브를 포함하는 키트를 이용하여, 추출된 gDNA 및 BS DNA를 증폭하는 단계, 증폭에 대한 Ct값을 기초로, 증폭된 gDNA 및 BS-DNA를 정량화하는 단계, 및 정량화된 gDNA 및 BS DNA를 기초로 변환 효율(conversion efficiency)을 산출하는 단계를 포함하는, 바이설파이트 변환 평가 방법을 제공한다.

대표도 - 도1

(52) CPC특허분류
C12Q 2545/101 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711107168
과제번호	2019R1F1A1063827
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	바이설파이트 변환된 DNA의 질 평가와 범용 분석 시스템을 이용한 연령 추정 모델
구축	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28
공지예외적용	: 있음

명세서

청구범위

청구항 1

개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대하여 gDNA를 추출하는 단계;

상기 gDNA에 바이설파이트(bisulfite, BS)를 처리하여 BS DNA를 획득하는 단계;

제 1 앰플리콘(amplicon)을 생성하도록 설계된 제 1 프라이머(primer), 상기 제 1 앰플리콘과 상이한 크기를 가지는 제 2 앰플리콘을 생성하도록 설계된 제 2 프라이머, 상기 제 1 앰플리콘의 DNA 서열 중 사이토신(cytosine)을 검출하는 제 1 프로브(probe), 상기 사이토신과 동일한 위치의 티민(thymine)을 검출하는 제 2 프로브 및 제2앰플리콘의 DNA 서열 중 사이토신을 포함하지 않는 제 3 프로브를 포함하는 키트를 이용하여, 추출된 상기 gDNA 및 상기 BS DNA를 증폭하는 단계;

상기 증폭에 대한 Ct값을 기초로, 증폭된 상기 gDNA 및 BS-DNA를 정량화하는 단계, 및

정량화된 상기 gDNA 및 BS DNA을 기초로 변환 효율(conversion efficiency)을 산출하는 단계를 포함하며,

상기 제 1 앰플리콘 및 제 2 앰플리콘은 상이한 증폭 크기의 두 영역을 동시에 정량하기 위한 것인,

바이설파이트 변환 평가 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 제 1 프라이머는,

서열번호 1 또는 2의 연속적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 바이설파이트 변환 평가 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 제 1 프라이머는,

서열번호 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 29, 30, 33, 34 및 44 중 적어도 하나의 연속적인 뉴클레오티드 서열을 더 포함하는, 바이설파이트 변환 평가 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 제 2 프라이머는,

서열번호 3 또는 4의 연속적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 바이설파이트 변환 평가 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 제 2 프라이머는,

서열번호 11, 12, 13, 14, 15, 16, 27, 28, 31, 32, 35, 36, 39, 40, 41, 42 및 43 중 적어도 하나의 연속적인 뉴클레오티드 서열을 더 포함하는, 바이설파이트 변환 평가 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 제 1 프로브는,

서열번호 7의 연속적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 바이선펜아이트 변환 평가 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 제 2 프로브는,

서열번호 8의 연속적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 바이선펜아이트 변환 평가 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 제 1 프라이머 및 제 2 프라이머는,

CCDC29, FLJ39739, WASH2P, CROCCL1, MSTP2, AMY1A, PDE4DIP, NBPF14, NCF1, LOC645166, GOLGA6L10, GIYD1, LRRC37A4, C2orf78, MGC13005, RPL23AP53, LOC728323, POM121L4P, ZNF595, DRD5, LOC100272216, GUSBL1, LOC100170939, C6orf41, STAG3L1, GTF2IP1, SPDYE5, AQP7, KGFLP1, FAM95B1 및 LOC642929 중 적어도 하나를 표적하는, 바이선펜아이트 변환 평가 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 키트는,

IPC(internal positive control)를 더 포함하는, 바이선펜아이트 변환 평가 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 IPC는,

서열번호 5 또는 6의 연속적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제 3 프라이머, 및

서열번호 10의 연속적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제 4 프로브를 포함하는, 바이선펜아이트 변환 평가 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 제 1 프로브, 제 2 프로브, 제 3 프로브 및 제 4 프로브는,

각각 서로 다른 과장에서 검출할 수 있는 표지물질을 포함하는, 바이선펜아이트 변환 평가 방법.

청구항 12

제 1항에 있어서,

상기 변환 효율은,

하기의 수학적 식 1에 의하여 산출되는, 바이선펜아이트 변환 평가 방법.

[수학적 식 1]

$$\text{변환효율} = \frac{\text{shortT}}{(\text{shortC} + \text{shortT})} * 100$$

상기 수학적 식 1에서, short T는 BS DNA 중 제 2 프로브에 의하여 정량화된 제 1 앰플리콘의 함량이고, short C는 BS DNA 중 제 1 프로브에 의하여 정량화된 제 1 앰플리콘의 함량임.

청구항 13

제 1항에 있어서,

상기 산출하는 단계는,

분해 수준(degradation level) 및 회수율(recovery)을 산출하는 단계를 더 포함하는, 바이설파이트 변환 평가 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 분해 수준은,

하기의 수학적 식 2에 의하여 산출되는, 바이설파이트 변환 평가 방법.

[수학적 식 2]

$$\text{분해수준} = BS-DNA(\text{short/long})/gDNA(\text{short/long})$$

상기 수학적 식 2에서, short는 제 1 프로브 및 제 2 프로브에 의하여 정량화된 제 1 앰플리콘의 함량이고, long은 제 3 프로브에 의하여 정량화된 제 2 앰플리콘의 함량임.

청구항 15

제 13항에 있어서,

상기 회수율은,

하기의 수학적 식 3에 의하여 산출되는, 바이설파이트 변환 평가 방법.

[수학적 식 3]

$$\text{회수율} = (2 * BS-DNA)/gDNA * 100$$

상기 수학적 식 3에서, BS DNA는 제 1 프로브 및 제 2 프로브에 의하여 정량화된 BS DNA에 대한 제 1 앰플리콘의 함량이고, gDNA는 제 1 프로브 및/또는 제 2 프로브에 의하여 정량화된 gDNA에 대한 제 1 앰플리콘의 함량임.

청구항 16

제 1항에 있어서,

상기 생물학적 시료는,

체액, 모근, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 조직, 세포, 소변, 림프액 및 기관 세척액 중 적어도 하나를 포함하는, 바이설파이트 변환 평가 방법.

청구항 17

제 1항에 있어서,

상기 증폭은,

PCR에 의하여 수행되며,

상기 PCR은,

역전사(reverse transcription) 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 멀티플렉스(multiplex) PCR, 실시간(real-time) PCR, 어셈블리(Assembly) PCR, 퓨전(Fusion) PCR, 리가아제 연쇄 반응(Ligase chain reaction; LCR) 및 ddPCR(Droplet-digital PCR) 중 적어도 하나인, 바이설파이트 변환 평가 방법.

청구항 18

제 1 앰플리콘(amplicon)을 생성하도록 설계된 제 1 프라이머(primer);

상기 제 1 앰플리콘과 상이한 크기를 가지는 제 2 앰플리콘을 생성하도록 설계된 제 2 프라이머;

상기 제 1 앰플리콘의 DNA 서열 중 사이토신(cytosine)을 검출하는 제 1 프로브(probe);

상기 사이토신과 동일한 위치의 티민(thymine)을 검출하는 제 2 프로브, 및
제 2 앰플리콘의 DNA 서열 중 사이토신을 포함하지 않는 서열을 검출하는 제 3 프로브를 포함하며,
상기 제 1 앰플리콘 및 제 2 앰플리콘은 상이한 증폭 크기의 두 영역을 동시에 정량하기 위한 것인,
바이선폴라이트 변환 평가용 키트.

청구항 19

제 18항에 있어서,

상기 제 1 프라이머 및 제 2 프라이머는,

CCDC29, FLJ39739, WASH2P, CROCCL1, MSTP2, AMY1A, PDE4DIP, NBPF14, NCF1, LOC645166, GOLGA6L10, GIYD1, LRRC37A4, C2orf78, MGC13005, RPL23AP53, LOC728323, POM121L4P, ZNF595, DRD5, LOC100272216, GUSBL1, LOC100170939, C6orf41, STAG3L1, GTF2IP1, SPDYE5, AQP7, KGFLP1, FAM95B1 및 LOC642929 중 적어도 하나를 표적하는, 바이선폴라이트 변환 평가용 키트.

청구항 20

제 18항에 있어서,

상기 제 1 프라이머는,

서열번호 1 또는 2의 연속적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 바이선폴라이트 변환 평가용 키트.

청구항 21

제 20항에 있어서,

상기 제 1 프라이머는,

서열번호 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 29, 30, 33, 34 및 44 중 적어도 하나의 연속적인 뉴클레오티드 서열을 더 포함하는, 바이선폴라이트 변환 평가용 키트.

청구항 22

제 18항에 있어서,

상기 제 2 프라이머는,

서열번호 3 또는 4의 연속적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 바이선폴라이트 변환 평가용 키트.

청구항 23

제 22항에 있어서,

상기 제 2 프라이머는,

서열번호 11, 12, 13, 14, 15, 16, 27, 28, 31, 32, 35, 36, 39, 40, 41, 42 및 43 중 적어도 하나의 연속적인 뉴클레오티드 서열을 더 포함하는, 바이선폴라이트 변환 평가용 키트.

청구항 24

제 18항에 있어서,

상기 제 1 프로브는,

서열번호 7의 연속적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 바이선폴라이트 변환 평가용 키트.

청구항 25

제 18항에 있어서,

상기 제 2 프로브는,

서열번호 8의 연속적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 바이설파이트 변환 평가용 키트.

청구항 26

제 18항에 있어서,

상기 키트는,

IPC(internal positive control)를 더 포함하는, 바이설파이트 변환 평가용 키트.

청구항 27

제 26항에 있어서,

상기 IPC는,

서열번호 5 또는 6의 연속적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제 3 프라이머, 및

서열번호 10의 연속적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제 4 프로브를 포함하는, 바이설파이트 변환 평가용 키트.

청구항 28

제 27항에 있어서,

상기 제 1 프로브, 제 2 프로브, 제 3 프로브, 및 제 4 프로브는,

각각 서로 다른 파장에서 검출할 수 있는 표지물질을 포함하는, 바이설파이트 변환 평가용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이설파이트 변환 평가용 키트 및 이를 이용한 평가 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 후성유전학(Epigenetics)이란, DNA 염기서열 변화는 수반하지 않고, DNA의 메틸화(methylation) 및 히스톤(histone) 단백질의 아세틸화(acetylation) 등의 후천적인 수식에 의해 유전자 발현이 제어되고, 그 현상이 후대에까지 유지되는 현상을 의미한다.

[0003] 이 중, DNA 메틸화는 유전자 발현의 억제에 관여한다. 보다 구체적으로, 인간 유전체에는 CpG라는 이중 염기서열이 다량으로 존재하고, 이 중 약 70 %에 이르는 CpG의 사이토신(cytosine) 염기에는 메틸기(-CH₃)가 결합되어 있으며, 이러한 메틸기가 결합된 형태를 DNA 메틸화라고 한다.

[0004] 이러한 DNA 메틸화 현상은 유전체의 각종 반복 서열 등에서 흔히 관찰되며, 이는 유전체의 안정성 유지 등에 중요한 역할을 하고 있다. 한편, 각종 유전자의 상단 5' 조절부위에 CpG가 밀집된 독특한 영역이 존재하는데, 이를 CpG 섬(island)이라 하며, CpG 섬을 포함하는 다양한 CpG 영역의 사이토신은 대부분 메틸기가 결합되어 있지 않다. 그러나, 후천적인 다양한 영향으로 인하여 사이토신에 메틸기가 결합(메틸화)되어, 뉴클레오솜 히스톤(nucleosome histone) 분자들과의 교감을 통해 크로마틴의 구조에 변화를 이끌어, 결국, 유전자 발현에 영향을 주게 된다.

[0005] 이러한, DNA 메틸화는 전술한 바와 같이 기본적인 DNA 염기서열의 변화 없이 유전자 발현 조절에 영향을 미치며, 조직이나 세포에 따라 서로 다른 패턴을 가지고 있으며, 연령과 생활 습관에 따라서 그 패턴이 달라지는 양상을 보인다. 즉, DNA 메틸화는 개인 별 차별화되어 나타나는 특징임에 따라, 이를 통하여, 각 개인의 연령 및 생활 습관 등을 추정할 수 있다.

[0006] 이에, DNA 메틸화의 측정은 범죄현장에서 발견되는 다양한 증거물의 기원 및 범인의 신체 특징을 추정하기 위하여, 법의학 분야에서 많이 사용되고 있으며, 대부분의 DNA 메틸화 측정법은 바이설파이트(Bisulfite)를 이용한 변환법이 필수적이다.

[0007] 그러나, 바이설파이트 변환법은 변환 과정 중 화학적인 탈아미노화(chemical deamination)를 초래함에 따라,

DNA의 구조적 손상 즉, 분해 및 손실을 야기시켜 동일 시료의 추가적인 다운스트림 분석(downstream analysis)을 방해할 수 있다는 한계가 있다.

[0008] 또한, 바이설파이트 변환법은 DNA 메틸화 수준의 과장을 유발시켜, 신뢰도 낮은 결과를 초래할 수 있다. 이에, 신뢰도 높은 DNA 메틸화 측정을 위하여, 바이설파이트 변환법을 보정하거나, 변환 효율, 복구 수준 및 저하 수준을 측정할 수 있는 새로운 방법이 요구되고 있는 실정이다.

[0009] 발명의 배경이 되는 기술은 본 발명에 대한 이해를 보다 용이하게 하기 위해 작성되었다. 발명의 배경이 되는 기술에 기재된 사항들이 선행기술로 존재한다고 인정하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 종래에는 바이설파이트 변화 정도, 분해도, 수율을 정량하기 위하여 두 개 이상의 방법이 사용되었으며, 일부 방법은 정량적인 평가가 어려웠다.

[0011] 한편, 본 발명의 발명자들은 상이한 증폭 크기의 두 영역(타겟 부위)를 동시에 정량할 경우, 특정 바이설파이트 변환 영역을 정량화할 수 있음을 인지하였다. 예를 들어, 각각 110 bp 이하의 크기를 갖는 앰플리콘과 170 bp 이상의 크기를 갖는 앰플리콘에 기초하여 바이설파이트 변환법을 수행하였을 경우, 2회 이상의 번거로운 과정없이 한 번에 바이설파이트 변환된 DNA의 정량과 바이설파이트 변환 정도의 확인할 수 있음은 물론이거니와, 바이설파이트 변환 과정의 효율, 분해도, 수율을 모두 확인할 수 있다는 것을 발견하였다.

[0012] 결국, 본 발명의 발명자들은 DNA 메틸화 측정에 대한 바이설파이트 변환 효율성, 수율 및 분해도를 정량적으로 측정할 수 있는 2가지 이상의 프라이머 및 프로브를 포함하는 키트와 이에 기초하여 바이설파이트 변환을 평가할 수 있는 방법을 제공하고자 하였다.

[0013] 본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명은 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대하여 genomic DNA(gDNA)를 추출하는 단계; 추출된 gDNA에 바이설파이트(bisulfite, BS)를 처리하여 BS DNA를 획득하는 단계; 제 1 앰플리콘(amplicon)을 생성하도록 설계된 제 1 프라이머(primer), 제 1 앰플리콘과 상이한 크기를 가지는 제 2 앰플리콘을 생성하도록 설계된 제 2 프라이머, 제 1 앰플리콘의 DNA 서열 중 사이토신(cytosine)을 검출하는 제 1 프로브(probe), 사이토신과 동일한 위치의 티민(thymine)을 검출하는 제 2 프로브 및 제 2 앰플리콘의 DNA 서열 중 사이토신을 포함하지 않는 서열을 검출하는 제 3 프로브를 포함하는 키트를 이용하여, 추출된 gDNA 및 BS DNA를 증폭하는 단계; 증폭에 대한 Ct 값을 기초로, gDNA 및 BS-DNA를 정량화하는 단계, 및 정량화된 gDNA 및 BS DNA를 기초로 변환 효율(conversion efficiency), 분해 수준(degradation level) 및 회수율(recovery)을 산출하는 단계를 포함하는, 바이설파이트 변환 평가 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명의 특징에 따르면, 제 1 프라이머는, 서열번호 1 또는 2의 연속적인 뉴클레오타이드 서열과 50 % 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 서열번호 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 29, 30, 33, 34 및 44 중 적어도 하나의 연속적인 뉴클레오타이드 서열과 50 % 이상의 상동성을 가지는 서열을 더 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 특징에 따르면, 제 2 프라이머는, 서열번호 3 또는 4의 연속적인 뉴클레오타이드 서열과 50 % 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 서열번호 11, 12, 13, 14, 15, 16, 27, 28, 31, 32, 35, 36, 39, 40, 41, 42 및 43 중 적어도 하나의 연속적인 뉴클레오타이드 서열과 50 % 이상의 상동성을 가지는 서열을 더 포함할 수 있다.

[0017] 한편, 제 1 프라이머 및 제 2 프라이머는 전술한 서열번호 이외에 다양한 유전자를 기초로 당업자에 의하여 자유롭게 설계(design)될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 제 1 프라이머 및 제 2 프라이머는, CCDC29, FLJ39739, WASH2P, CROCCL1, MSTP2, AMY1A, PDE4DIP, NBPF14, NCF1, LOC645166, GOLGA6L10, GIYD1, LRRC37A4, C2orf78, MGC13005, RPL23AP53, LOC728323, POM121L4P, ZNF595, DRD5, LOC100272216, GUSBL1, LOC100170939, C6orf41, STAG3L1, GTF2IP1, SPDYE5, AQP7, KGFLP1, FAM95B1 및 LOC642929 중 적어도

하나를 표적할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 전술한 유전자 중 적어도 하나에 기초하여 자유롭게 설계될 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 제 1 프로브는, 서열번호 7의 연속적인 뉴클레오타이드 서열과 50 % 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 제 1 프라이머가 표적하는 DNA 서열 중 사이토신을 포함하고 있는 서열을 모두 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 제 2 프로브는, 서열번호 8의 연속적인 뉴클레오타이드 서열과 50 % 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 제 2 프라이머가 표적하는 DNA 서열 중 사이토신을 포함하고 있는 서열을 모두 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 키트는, IPC(internal positive control)를 더 포함할 수 있으며, 이때, IPC는 서열번호 5 또는 6의 연속적인 뉴클레오타이드 서열과 50 % 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 제 3 프라이머, 및 서열번호 10의 연속적인 뉴클레오타이드 서열과 50 % 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 제 4 프로브를 포함할 수 있다.

[0021] 이때, IPC의 제 3 프라이머 및 제 4 프로브의 서열은, 인간의 유전자 내에 존재하지 않는 서열이 바람직할 수 있다.

[0022] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 제 1 프로브, 제 2 프로브, 제 3 프로브 및 제 4 프로브는, 각각 서로 다른 과정에서 검출할 수 있는 표지물질을 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 변환 효율은, 하기의 수학적 식 1에 의하여 산출될 수 있다.

수학적 식 1

[0024] 변환효율 = $\frac{shortT}{(shortC + shortT)} * 100$

[0025] 이때, 수학적 식 1에서, short T는 BS DNA 중 제 2 프로브에 의하여 정량화된 제 1 앰플리콘의 함량이고, short C는 BS DNA 중 제 1 프로브에 의하여 정량화된 제 1 앰플리콘의 함량을 의미한다.

[0026] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 산출하는 단계는, 분해 수준(degradation level) 및 회수율(recovery)을 산출하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 분해 수준은, 하기의 수학적 식 2에 의하여 산출될 수 있다.

수학적 식 2

[0028] 분해수준 = $\frac{BS-DNA(short/long)}{gDNA(short/long)}$

[0029] 이때, 수학적 식 2에서, short는 제 1 프로브 및/또는 제 2 프로브에 의하여 정량화된 제 1 앰플리콘의 함량이고, long은 제 3 프로브에 의하여 정량화된 제 2 앰플리콘의 함량을 의미한다.

[0030] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 회수율은, 하기의 수학적 식 3에 의하여 산출될 수 있다.

수학적 식 3

[0031] 회수율 = $\frac{(2 * BS-DNA)}{gDNA} * 100$

[0032] 이때, 수학적 식 3에서, BS DNA는 제 1 프로브 및/또는 제 2 프로브에 의하여 정량화된 BS DNA에 대한 제 1 앰플리콘의 함량이고, gDNA는 제 1 프로브 및/또는 제 2 프로브에 의하여 정량화된 gDNA에 대한 제 1 앰플리콘의 함량을 의미할 수 있다.

[0033] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 생물학적 시료는, 체액, 모근, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 조직, 세포, 소변, 림프액 및 기관 세척액 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 생물로부터 유래될 수

있는 다양한 시료를 모두 포함할 수 있다.

- [0034] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 증폭은, PCR에 의하여 수행되며, PCR은, 역전사(reverse transcription) 중 합효소 연쇄반응(RT-PCR), 멀티플렉스(multiplex) PCR, 실시간(real-time) PCR, 어셈블리(Assembly) PCR, 퓨전(Fusion) PCR, 리가아제 연쇄 반응(Ligase chain reaction; LCR) 및 ddPCR(Droplet-digital PCR) 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, DNA를 증폭할 수 있는 다양한 방법이 모두 포함될 수 있다.
- [0035] 진술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명은 제 1 앰플리콘(amplicon)을 생성하도록 설계된 제 1 프라이머(primer); 제 1 앰플리콘과 상이한 크기를 가지는 제 2 앰플리콘을 생성하도록 설계된 제 2 프라이머; 제 1 앰플리콘의 DNA 서열 중 사이토신(cytosine)을 검출하는 제 1 프로브(probe); 사이토신과 동일한 위치의 티민(thymine)을 검출하는 제 2 프로브, 및 제 2 앰플리콘의 DNA 서열 중 사이토신을 포함하지 않는 서열을 검출하는 제 3 프로브를 포함하는, 바이설파이트 변환 평가용 키트를 제공한다.
- [0036] 본 발명의 특징에 따르면, 제 1 프라이머 및 제 2 프라이머는, CCDC29, FLJ39739, WASH2P, CROCCL1, MSTP2, AMY1A, PDE4DIP, NBP14, NCF1, LOC645166, GOLGA6L10, GIYD1, LRRC37A4, C2orf78, MGC13005, RPL23AP53, LOC728323, POM121L4P, ZNF595, DRD5, LOC100272216, GUSBL1, LOC100170939, C6orf41, STAG3L1, GTF2IP1, SPDYE5, AQP7, KGFLP1, FAM95B1 및 LOC642929 중 적어도 하나를 표적할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 다른 특징에 따르면, 제 1 프라이머는, 서열번호 1 또는 2의 연속적인 뉴클레오티드 서열과 50 % 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 서열번호 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 29, 30, 33, 34 및 44 중 적어도 하나의 연속적인 뉴클레오티드 서열과 50 % 이상의 상동성을 가지는 서열을 더 포함할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 제 2 프라이머는, 서열번호 3 또는 4의 연속적인 뉴클레오티드 서열과 50 % 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 서열번호 11, 12, 13, 14, 15, 16, 27, 28, 31, 32, 35, 36, 39, 40, 41, 42 및 43 중 적어도 하나의 연속적인 뉴클레오티드 서열과 50 % 이상의 상동성을 가지는 서열을 더 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 제 1 프로브는, 서열번호 7 의 연속적인 뉴클레오티드 서열과 50 % 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 제 2 프로브는, 서열번호 8 의 연속적인 뉴클레오티드 서열과 50 % 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 키트는, IPC(internal positive control)를 더 포함할 수 있으며, 이때, IPC는 서열번호 5 또는 6의 연속적인 뉴클레오티드 서열과 50 % 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 제 3 프라이머, 및 서열번호 10의 연속적인 뉴클레오티드 서열과 50 % 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 제 4 프로브를 포함할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 제 1 프로브, 제 2 프로브, 제 3 프로브 제 4 프로브는, 각각 서로 다른 과정에서 검출할 수 있는 표지물질을 포함할 수 있다.
- [0043] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 다만, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것에 불과하므로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것으로 해석되어서는 아니된다.

발명의 효과

- [0044] 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법은 본 발명의 해당 분야에서 상업적으로 이용되는 바이설파이트 변환 키트에 대하여, 한번의 PCR 증폭 과정으로 변환 효율, 분해 수준 및 수율을 모두 확인할 수 있으며, 각각의 gDNA 및 BS DNA의 양을 정량화할 수 있다.
- [0045] 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법은 5ng/μl의 매우 소량의 시료로도 분석이 가능함에 따라, 범의학을 포함하는 다양한 분야에서 분석 시료의 양에 대한 한계를 극복할 수 있다.
- [0046] 본 발명에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

- [0047] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설과이트 변환 평가 방법에 대한 순서도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설과이트 변환 평가 방법에서 이용되는 표적 유전자에 대한 개략도이다.
- 도 3a는 전술한 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설과이트 변환 평가 방법에서 이용되는 CCDC29 및 FLJ39739에 기초한 키트의 구성에 대한 개략도이다.
- 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설과이트 변환 평가 방법에서 이용되는 C-T 지표(C-T indicator)에 대한 개략도이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설과이트 변환 평가 방법에서 이용되는 수확식에 대한 개략도이다.
- 도 5a 내지 5c는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설과이트 변환 평가 방법에 대한 검증 과정에 대한 개략도이다.
- 도 6a은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설과이트 변환 평가 방법에 대한 검증 과정에서 표준 DNA(standard DNA)의 표준 곡선(curve) 및 이의 Ct 값에 대한 결과에 대한 개략도이다.
- 도 6b는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설과이트 변환 평가 방법에 대한 검증 과정에서 C-T 지표에 대한 PCR 분석 결과를 도시한 것이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설과이트 변환 평가 방법에 대한 검증 과정에서 내부 양성 대조군(Internal Positive Control, IPC)에 대한 PCR 분석 결과를 도시한 것이다.
- 도 8은 바이설과이트 변환 키트에 따른 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설과이트 변환 평가 방법에 대한 검증 결과를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0048] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [0049] 본 명세서에서 사용되는 용어 "핵산"은 유기 염기(사이토신, 티미딘 및 우라실과 같은 치환된 피리미딘이거나, 아덴 및 구아닌과 같은 치환된 퓨린)에 연결된 당으로 이루어지는 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 의미할 수 있다. 보다 구체적으로, 핵산은 리보핵산(RNA), 디옥시리보핵산(DNA), 메틸포스포네이트 핵산, S-올리고, cDNA, miRNA 및 aptamer(aptamer) 등을 포함할 수 있으며, 천연적으로 발생하거나 인공적으로 합성된 것 모두를 포함할 수 있다. 그러나, 바람직하게는 RNA 및 DNA일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 명세서에서 사용되는 용어 "표적 유전자서열"은 표적 유전자 또는 핵산 내에 존재하는 뉴클레오타이드로, 구체적으로는 표적 유전자 또는 핵산 내에 표적 영역의 일부 뉴클레오타이드 서열이며, 이 때 "표적 영역"은 표적 유전자 또는 핵산 내에 가이드핵산-에디터 단백질에 의해 변형될 수 있는 부위이다.
- [0051] 본 명세서에서 사용되는 용어 "증폭"은 타겟 핵산 서열을 증폭하는 반응을 의미하며, 역전사(reverse transcription) 증합효소 연쇄반응(RT-PCR), 멀티플렉스(multiplex) PCR, 실시간(real-time) PCR, 어셈블리(Assembly) PCR, 퓨전(Fusion) PCR, 리가아제 연쇄 반응(Ligase chain reaction; LCR) 및 ddPCR(Droplet-digital PCR) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프라이머(primer)"은 단일가닥의 올리고뉴클레오타이드 중 하나로, 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있으며 바람직하게는 디옥시리보뉴클레오타이드 일 수 있다. 프라이머는 주형(template)의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중가닥 구조를 형성한다. 본 발명에서 프라이머는 NGS 시퀀싱 아답터 서열에 혼성화(hybridization) 또는 어닐링(annealing)될 수 있다. 어닐링(annealing)은 주형 핵산에 올리고뉴클레오타이드 또는 핵산이 병치(apposition)되는 것을 의미하며, 병치는 증합효소(polymerase)가 뉴클레오타이드를 증합시켜 주형 핵산 또는 그의 일부분에 상보적인 핵산 분자를 형성하게 한다. 혼성화(hybridization)는 2개의 단일

가닥 핵산이 상보적인 염기서열들의 페어링(pairing)에 의하여 이합체 구조(duplex structure)를 형성하는 것을 의미한다. 프라이머는 주형에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 사용되는 용어 "진단"은 병리 상태의 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 암(종양)의 종류, 발병 여부 및 발병 원인을 확인하는 것을 의미할 수 있으며, 나아가, 표적 유전자 즉, 바이오 마커의 발현 유무 및 발현 정도를 확인하여 종양의 치료 전략, 발전 및 경감 등을 판단하는 것도 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 특정 질병 또는 질환에 대한 한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함할 수 있다.

[0054] 바이설파이트 변환 평가 방법

[0055] 이하에서는 도 1 내지 7을 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가용 키트 및 이를 이용한 평가 방법에 대하여 구체적으로 설명하도록 한다.

[0056] 먼저, 도 1을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에 대한 순서도가 도시된다. 이때, 설명의 편의를 위하여, 도 2 내지 4b를 참조하여 설명하도록 한다.

[0057] 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법(바이설파이트 변환 평가)은 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대하여 gDNA를 추출하는 단계(S110), 추출된 gDNA에 바이설파이트(bisulfite, BS)를 처리하여 BS DNA를 획득하는 단계(S120), 제 1 앰플리콘(amplicon)을 생성하도록 설계된 제 1 프라이머(primer), 제 1 앰플리콘과 상이한 크기를 가지는 제 2 앰플리콘을 생성하도록 설계된 제 2 프라이머, 제 1 앰플리콘의 DNA 서열 중 사이토신(cytosine)을 검출하는 제 1 프로브(probe), 사이토신과 동일한 위치의 티민(thymine)을 검출하는 제 2 프로브 및 제 2 앰플리콘의 DNA 서열 중 사이토신을 포함하지 않는 서열을 검출하는 제 3 프로브를 포함하는 키트를 이용하여, 추출된 gDNA 및 BS DNA를 증폭하는 단계(S130), 증폭에 대한 Ct값을 기초로, gDNA 및 BS-DNA를 정량화하는 단계(S140), 및 정량화된 gDNA 및 BS DNA를 기초로 변환 효율(conversion efficiency)을 산출하는 단계(S150)를 포함한다.

[0058] 먼저, gDNA를 추출하는 단계(S110)에서 생물학적 시료는 체액, 모근, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 조직, 세포, 소변, 림프액 및 기관 세척액 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 생물로부터 유래될 수 있는 다양한 시료를 모두 포함할 수 있다.

[0059] 그 다음, BS DNA를 획득하는 단계(S120)에서 바이설파이트의 처리는 본 발명이 속하는 분야의 통상의 기술자가 상업적으로 이용되고 있는 바이설파이트 변환용 키트를 자유롭게 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에서 사용된 바이설파이트 변환용 키트는 EZ DNA Methylation-Lightning Kit(Zymo Research), Premium Bisulfite kit(Diagenode), MethylEdge Bisulfite Conversion System(Promega), EpiJET Bisulfite Conversion Kit(Thermo Fisher Scientific), EpiTect Fast Bisulfite kit(Qiagen) 및 NEBNext Enzymatic Methyl-seq Conversion Module(New England Biolabs)임에 따라, BS DNA를 획득하는 단계(S120)의 바이설파이트의 처리 방법은 전술한 키트 중 적어도 하나가 선택되어 사용될 수 있다.

[0060] 그 다음, gDNA 및 BS DNA를 증폭하는 단계(S130)에서 이용되는 키트의 프라이머는 특정 유전자에 기초하여 설계될 수 있다.

[0061] 보다 구체적으로, 도 2를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에서 이용되는 표적 유전자에 대한 개략도가 도시되며, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에서 이용되는 제 1 프라이머 및 제 2 프라이머는 CCDC29, FLJ39739, WASH2P, CROCCL1, MSTP2, AMY1A, PDE4DIP, NBPF14, NCF1, LOC645166, GOLGA6L10, GIYD1, LRRC37A4, C2orf78, MGC13005, RPL23AP53, LOC728323, POM121L4P, ZNF595, DRD5, LOC100272216, GUSBL1, LOC100170939, C6orf41, STAG3L1, GTF2IP1, SPDYE5, AQP7, KGFLP1, FAM95B1 및 LOC642929 중 적어도 하나를 표적할 수 있다.

[0062] 전술한 유전자는, 인간을 포함하는 영장류 혈통에서 복제되고, 특히, 인간의 혈통을 따라 지속적으로 확장되고, 증가된 복제수를 가지는 유전자이다. 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에서 이용되는 표적 유전자는 전술한 유전자에 한정되는 것이 아니라, 인간의 혈통에서 증가된 복제수를 가지는 유전자를 모두 포함할 수 있다.

- [0063] 그러나, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에서 이용될 수 있는 가장 바람직한 표적 유전자는 FLJ39739 및/또는 CCDC29일 수 있으며, FLJ39739 및 CCDC29에 대한 서열정보는 하기와 같다.
- [0064] FLJ39739의 DNA 서열 (239bp): 5'-
AGGGAAAATGAGGAAGTGATGAATAGAAATATTTTYYATTYYAYYYAGYTAYAAATGTGTYGATTAYAAATGTTGTATGTTATTTGGYAYTTGTATTG
GTTTTAATTTYATAGTYTYTYAAGATAGGAAYTTGGYATYAGATGAGYAGGTGAAYTAGYAAAYAGGGTTTTTTTGTGTATYTTTTYAAAAAYYAGYY
YTGGATTYATTGATTTTTTGAAGGGTTTTTTGTGT-3' (서열번호 11)
- [0065] CCDC29의 DNA 서열 (104bp): 5'-
GAAATGGTTAAGAGAAAGGAAAAAYTGAAAYTTGGGGTGAATAYTTAGAATGAYAGTATTTAGYTYAGYYTGAAGAYAGATGAGGATGAAAAATGTAATG
GG-3' (서열번호 12)
- [0066] 나아가, 도 3a를 참조하면, 전술한 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에서 이용되는 CCDC29 및 FLJ39739에 기초한 키트의 구성에 대한 개략도가 도시된다.
- [0067] 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에서 이용되는 키트의 제 1 프라이머 및 제 2 프라이머는 CCDC29 및 FLJ39739 유전자에 기초하여 설계될 수 있으며, 이때, 제 1 프라이머 및 제 2 프라이머는 각각 상이한 크기의 앰플리콘(amplicon)을 생성하도록 설계될 수 있다.
- [0068] 예를 들어, 제 1 프라이머는 110 bp 이하의 제 1 앰플리콘을 생성하도록 설계될 수 있으며, 제 2 프라이머는 제 1 앰플리콘과 상이한 크기 즉, 170 bp 이상의 제 2 앰플리콘을 생성하도록 설계될 수 있다. 이때, 제 2 앰플리콘의 최대 크기는 300 bp 이하가 바람직할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 보다 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에서 이용되는 제 1 프라이머는 CCDC29에 기초하여 설계되며, 이의 서열은 서열번호 1 또는 2일 수 있으며, 제 1 프라이머를 통하여 생성된 제 1 앰플리콘의 크기는 104 bp일 수 있다.
- [0070] 또한, 제 2 프라이머는, FLJ39739에 기초하여 설계되며, 이의 서열은 서열번호 3 또는 4일 수 있으며, 제 2 프라이머를 통하여 생성된 제 2 앰플리콘의 크기는 238 bp일 수 있다.
- [0071] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에서 이용되는 키트는 제 1 프라이머 및 제 2 프라이머를 통하여 생성된 제 1 앰플리콘 및 제 2 앰플리콘을 확인하기 위하여, 제 1 내지 제 3 프로브를 포함할 수 있다.
- [0072] 보다 구체적으로, 제 1 프라이머에 대한 제 1 프로브 및 제 2 프로브는 각각 제 1 프라이머를 통하여 생성된 제 1 앰플리콘 내의 사이토신(cytosine, C)과 티민(thymine, T)을 검출하기 위한 프로브로서, 제 1 앰플리콘의 서열에 기초하여 설계될 수 있다.
- [0073] 이때, 제 1 프로브는 제 1 앰플리콘 내의 사이토신 즉, 메틸화되어 바이설파이트에 우라실(urasil, U)로 변환되지 않은 사이토신을 검출하기 위한 프로브로서, 제 1 앰플리콘 내의 메틸화된 특정 사이토신(methylated cytosine)을 검출하도록 설계될 수 있다. 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에서의 제 1 프로브는 서열번호 7일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 제 1 프로브는 제 1 앰플리콘 내에서 사이토신을 포함하는 다양한 서열에 기초하여 설계될 수 있다.
- [0074] 나아가, 제 2 프로브는 전술한 제 1 프로브가 검출하고자 하는 특정 사이토신과 동일한 위치의 티민을 검출하기 위한 프로브이며, 티민은 바이설파이트에 의하여 우라실로 변환되고, PCR 증폭(amplification)에 의하여 티민으로 변환된 서열 즉, 메틸화가 되지 않은 사이토신(unmethylated cytosine)을 의미함에 따라, 제 2 프로브는 제 1 앰플리콘 내의 바이설파이트에 의하여 변환된 티민(메틸화되지 않아 우라실로 변환된 사이토신)을 검출하도록 설계될 수 있다. 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에서의 제 2 프로브는 서열번호 8일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 전술한 제 1 프로브에 따라 다양하게 설계될 수 있다.
- [0075] 한편, 제 2 프라이머에 대한 제 3 프로브는 제 2 프라이머를 통하여 생성된 제 2 앰플리콘을 검출할 수 있다. 즉, 제 3 프로브는 사이토신 프리(cytosine free)로 설계되어 변환된 DNA와 gDNA(genomic DNA)를 모두 검출하여 정량화할 수 있다. 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에서의 제 3 프로브는 서열번호 9일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 제 2 앰플리콘 내에서 사이토신을 포함하지 않는 다양한 서열에 기초하여 설계될 수 있다.
- [0076] 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에서 이용되는 키트는 전술한 제 1 프라이머,

제 2 프라이머, 제 1 프로브, 제 2 프로브 및 제 3 프로브 이외에, 내부 양성 대조군(internal positive control, IPC)를 더 포함할 수 있다.

[0077] IPC는 전술한 제 1 프라이머, 제 2 프라이머, 제 1 프로브, 제 2 프로브 및 제 3 프로브와 달리, CCDC29 및 FLJ39739에 기초하여 설계되지 않는다. 보다 구체적으로, IPC는 바이선폴라이트 변환에 의한 PCR 저해 효과 여부를 확인하기 위한 대조군으로서, 인간을 포함하는 포유류에는 없는 인공 서열로 설계될 수 있다.

[0078] 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이선폴라이트 변환 평가 방법에서 이용되는 IPC에 대한 제 3 프라이머의 서열은 서열번호 5 또는 6일 수 있으며, IPC에 대한 제 4 프로브는 서열번호 10일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 인간을 포함하는 포유류에는 존재하지 않는 서열을 기초로 당업자가 자유롭게 설계할 수 있다.

[0079] 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이선폴라이트 변환 평가 방법에서 이용되는 IPC는 전술한 제 1 프라이머, 제 2 프라이머, 제 1 프로브, 제 2 프로브 및 제 3 프로브와의 상호 작용을 피하기 위하여, 인간을 포함하는 포유류에는 존재하지 않는 DNA 서열인 하기의 서열번호 45의 dsDNA(double-stranded DNA)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0080] IPC의 dsDNA 서열 (450bp): 5'-CTCTAACTAGTATGGATAACCGTGTTCCTACTGTGCTGCGGTTACCCATCGCCTGAAATCCAGTGTGGTGTCAAGCCATTCCTGTCTAGGACGCCGCATGTAGTAAACATATACATTGCTCGGGTTCCTCCGGTCCGTTCTGAGTCGACCAAGGACACAATCGAGCTCCGATCTGTATTGTCGAGAACTTGTATCCAACCCCGCAGCTTGCCAGCTCTTCGGGTATCATGGAGCCTATGGTTGAACAAGGCCATACGCGAGATAAACTGCTAGAAAACCGCGTCTTTACGACTGGTGCTTAATTTAATTCGCTGACGTGATGACATCCAGGCAGTGCGTCTGTGTCGGGTCCTCTCGTGATTGGGTAGTTGGACATGCCCTTGAAAAACATAGCAAGAGCCTGCCTCTCTATTGATGTCACGGCGAATGTCGGGGAGACAG-3' (서열번호 45)

[0081] 나아가, 도 3b를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이선폴라이트 변환 평가 방법에서 이용되는 키트는 프라이머, 프로브 및 IPC 뿐만 아니라 서열번호 46의 C-T 지표(C-T indicator)를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이선폴라이트 변환 평가 방법은 C-T 지표를 포함함으로써, 변환된 DNA의 양을 간접적으로 산출할 수 있다. C-T 지표는 도시된 바와 같이 동량의 사이토신과 티민(C= 50%, T=50%)을 포함하는 degenerate base Y를 포함하고 있으며, PCR 증폭 시 연속적으로 10배씩 희석되어(serial dilution) 투입됨으로, 사이토신 및 티민에 대한 관계식이 산출될 수 있다. 이에, C-T 지표로부터 도출된 관계식은 BS DNA에서의 티민을 포함하는 제 1 앰플리콘의 양으로부터 BS DNA에서의 사이토신을 포함하는 제 2 앰플리콘의 양을 추정 및 환산할 수 있다.

[0082] 보다 구체적으로, 제 2 프로브의 표준 곡선(standard curve)은 Real-time PCR에서 standard를 human gDNA로 사용하고 있어 제 2 프로브의 표준 곡선을 구할 수가 없다. 이에, C-T 지표는 제 2 프로브의 표준 곡선 즉, 제 2 프로브의 양을 확인하는 데에 필요한 표준 재료(standard material)를 대신하여, 간접적으로 제 1 프로브의 표준 곡선에 대입하고 사용되는 필수적인 조성물이다.

[0083] 따라서, C-T 지표는 C : T = 50 : 50인 degenerate base Y를 포함하는 서열을 포함하고 있음에 따라, 제 1 프로브 및 제 2 프로브를 모두 검출할 수 있으며, 나아가, 제 1 프로브(short-C)와 제 2 프로브(short-T) 간의 관계식을 도출하기 위해 사용될 수 있다.

[0084] 먼저, C-T 지표를 연속적으로 10배씩 희석하여 PCR 증폭을 한 뒤, 이들 간의 결과값을 통하여 제 1 프로브 및 제 2 프로브 간의 관계식(일종의 매개변수 식)을 산출할 수 있다. 예를 들어, 도 3b에 도시된 바와 같이, C(short-T의 $T_{\Delta C}$)는 관계식을 통해, short-T(제 2 프로브)의 Ct 값으로 변환된 값으로, C를 제 1 프로브(short-C)의 표준 곡선에 적용해 제 1 앰플리콘의 양을 획득할 수 있다.

[0085] 이에, 본 발명은, 전술한 C-T 지표를 포함함에 따라, 제 2 프로브의 표준 곡선을 간접적으로 산출하여, 제 1 앰플리콘의 양을 도출할 수 있다.

[0086] 다시 도 3a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이선폴라이트 변환 평가 방법에서 이용되는 제 1 내지 제 4 프로브는 각각 상이한 표적을 검출하기 위하여, 각각 서로 다른 파장에서 검출할 수 있는 표지물질질을 포함할 수 있다.

[0087] 이에, 제 1 프로브(서열번호 7), 제 2 프로브(서열번호 8), 제 3 프로브(서열번호 9) 및 제 4 프로브(서열번호 10)은 표지물질로서, 각각 5' 말단에 FAM, VIC, NED 및 CY5를 포함하고 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 해당 분야에서 상업적으로 프로브에 이용될 수 있는 다양한 표지물질이 모두 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이선폴라이트 변환 평가 방법의 프로브에 이용되는 표지물질은, FAM,

VIC, NED, CY5, Fluorescein-Dt, TET, HEX, TAMRA, CY3, CY3.5, CY5.5, JOE, ROX, TEXAS RED, Rhodamine 6G, DABCYL, BHQ-1, EBQ 및 BHQ-2 중 적어도 하나가 선택되어 이용될 수 있다.

[0088] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설과이트 변환 평가 방법에서 이용되는 키트의 구성에서 제 1 프라이머 및 제 2 프라이머는 전술한 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 4 및 서열번호 5에 한정되는 것은 아니며, 도 2에서 전술한 유전자를 기초로 당업자에 의하여 하기와 표 1과 같이 다양하게 설계될 수 있다.

표 1

[0089]

gene	Primer seauence(5'>3')		amplicon size(bp)	no
CCDC29	F	gaa atg gtt aag aga aag gga aa	104	서열번호 1
	R	ccc att aca ttt ttc atc ctc a		서열번호 2
	F	tag aag ggg aga gat tgg g	226	서열번호 13
	R	tca cac cct tca aac tat caa a		서열번호 14
FLJ39739	F	ggg aaa atg agg aag tga tga	238	서열번호 3
	R	aca caa aaa acc att caa aaa a		서열번호 4
	F	agg gaa aat gag gaa atg atg	239	서열번호 15
	R	aca caa aaa acc ctt caa aaa a		서열번호 16
	F	gga aaa tgt ggg aaa gtt tga	182	서열번호 17
	R	cct ctc ctc aac cac cat ct		서열번호 18
	F	gag ttt ggg gat ggg tag g	89	서열번호 19
	R	ccc atc att aca tta tta cca a		서열번호 20
	F	tga ggt agg aag tat gtg aga aaa	99	서열번호 21
	R	tca ttc cca tta ccc aat ca		서열번호 22
	F	tga gtg gat gtg ggt gta gag	88	서열번호 23
	R	tcc ctt tta caa cca aac tct c		서열번호 24
	F	aaa gaa aag aaa aga taa tta ggg a	81	서열번호 25
	R	cat att ttt tcc cca aaa ctc a		서열번호 26
RPL23AP53	F	gga atg tta ttt ttg gat tgt aag g	81	서열번호 27
	R	att ttt cct ccc cta tta caa		서열번호 28
	F	ttg taa tag ggg agg aaa aat	227	서열번호 29
	R	cac ctc aaa tct tct ttc ttt		서열번호 30
ANKRD20A1	F	aaa ttt gaa gtg tat ggg a	82	서열번호 31
	R	cca aac ata tta aat tcc aaa ac		서열번호 32
	F	tga gat tga ttt aaa gaa att gat t	223	서열번호 33
	R	tct tcc cac ctc aac ttc ct		서열번호 34
STAG3L1	F	ttt ttg taa ggt ggt aag ga	98	서열번호 35
	R	ttc acc cca taa tct tat ctt tct		서열번호 36
	F	ggg agg aag aaa tga aag g	192	서열번호 37
	R	cca aca ccc aat ttc ctc aa		서열번호 38
LSP1P5	F	gaa aag gga agg aag aaa aga aa	211	서열번호 39
	F	gag gga ggg aga gag gga g	176	서열번호 40
	R	ttt acc ttc cta aat ttt cac tca		서열번호 41
	F	aga aag aag aag aga ggg agg g	193	서열번호 42
	R	ttt acc ttc cta aat ttt cac tca		서열번호 43
NCF1	F	tga gaa agg tat gag gtt tg	96	서열번호 44

[0090] 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설과이트 변환 평가 방법에서 이용되는 제 1 프라이머는 서열번호 1 및 2 뿐만 아니라, 서열번호 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 29, 30, 33, 34 및 44 중 적어도 하나의 연속적인 뉴클레오티드 서열과 50 % 이상의 상동성을 가지는 서열을 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0091] 또한, 제 2 프라이머는 서열번호 3 및 4 뿐만 아니라, 서열번호 11, 12, 13, 14, 15, 16, 27, 28, 31, 32, 35, 36, 39, 40, 41, 42 및 43 중 적어도 하나의 연속적인 뉴클레오티드 서열과 50 % 이상의 상동성을 가지는 서열을 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0092] 다시 도 1을 참조하면, gDNA 및 BS DNA를 증폭하는 단계(S130)에서 증폭은 PCR에 의하여 수행되며, PCR은 역전

사(reverse transcription) 증합효소 연쇄반응(RT-PCR), 멀티플렉스(multiplex) PCR, 실시간(real-time) PCR, 어셈블리(Assembly) PCR, 퓨전(Fusion) PCR, 리가아제 연쇄 반응(Ligase chain reaction; LCR) 및 ddPCR(Droplet-digital PCR) 중 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 다양한 방법이 모두 이용될 수 있다.

[0093] 그 다음, gDNA 및 BS-DNA를 정량화하는 단계(S140)에서의 증폭에 대한 Ct 값은 각각의 프로브 및 C-T 지표로부터 산출될 수 있다. 보다 구체적으로, 제 1 앰플리콘 및 제 2 앰플리콘의 함량은 각각 제 1 프로브에 의한 Ct 값 및 제 3 프로브에 의한 Ct 값으로 산출될 수 있다.

[0094] 나아가, 제 2 프로브에 의한 Ct 값은 C-T 지표로부터 산출된 관계식이 적용되어, 산출될 수 있다. 이때, C-T 지표는 사이토신과 티민의 비율이 각각 50 : 50이며 degenerate base Y를 포함하고 있음에 따라, 제 1 프로브 및 제 2 프로브를 모두 검출할 수 있으며, 나아가, 제 1 프로브(short-C)와 제 2 프로브(short-T) 간의 관계식을 도출하기 위해 사용될 수 있다. 그 다음, 산출하는 단계(S150)에서는 변환 효율(conversion efficiency)뿐만 아니라, 분해 수준(degradation level) 및 회수율(recovery)을 산출하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0095] 보다 구체적으로, 도 4를 참조하면, 변환 효율은 하기의 [수학식 1]에 의하여 산출될 수 있다.

[0096] [수학식 1]

[0097]
$$\text{변환효율} = \frac{\text{shortT}}{(\text{shortC} + \text{shortT})} * 100$$

[0098] 상기 수학식 1에서, short T는 BS DNA 중 제 2 프로브(C-T 지표로부터 산출된 관계식이 적용된, 이하 동일)에 의하여 정량화된 제 1 앰플리콘의 함량이고, short C는 BS DNA 중 제 1 프로브에 의하여 정량화된 제 1 앰플리콘의 함량임.

[0099] 또한, 분해 수준은, 하기의 [수학식 2]에 의하여 산출될 수 있다.

[0100] [수학식 2]

[0101]
$$\text{분해수준} = \frac{\text{BS-DNA}(\text{short/long})}{\text{gDNA}(\text{short/long})}$$

[0102] 상기 수학식 2에서, short는 제 1 프로브 및/또는 제 2 프로브에 의하여 정량화된 제 1 앰플리콘의 함량이고, long은 제 3 프로브에 의하여 정량화된 제 2 앰플리콘의 함량임.

[0103] 또한, 회수율은, 하기의 [수학식 3]에 의하여 산출될 수 있다.

[0104] [수학식 3]

[0105]
$$\text{회수율} = \frac{(2 * \text{BS-DNA})}{\text{gDNA}} * 100$$

[0106] 상기 수학식 3에서, BS DNA는 제 1 프로브 및/또는 제 2 프로브에 의하여 정량화된 BS DNA에 대한 제 1 앰플리콘의 함량이고, gDNA는 제 1 프로브 및/또는 제 2 프로브에 의하여 정량화된 gDNA에 대한 제 1 앰플리콘의 함량임.

[0107] 이상의 과정에 따라, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법은 한번의 증폭 과정을 통하여, 변환된 DNA의 정량 및 이의 변환 정도를 확인할 수 있다.

[0108] **본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에 대한 검증**

[0109] 이하에서는, 도 5a 내지 8을 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에 대한 검증 및 이의 과정에 대하여 설명하도록 한다.

[0110] 먼저, 도 5a 내지 5c는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에 대한 검증 과정에 대한 개략도이다.

[0111] 도 5a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에 대한 검증 과정은 gDNA와 다양한 종류의 바이설파이트 키트에 따른 바이설파이트 변환 과정을 통하여 gDNA로부터 획득된 BS DNA를 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가용 키트를 이용하여 증폭한 뒤(BisQuE), 이의 산물에 기초하여 각각의 바이설파이트 키트에 대한 변환 효율, 분해 수준 및 회수율을 평가하도록 구성된다.

[0112] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에 대한 검증은 바이설파이트(Bisulfite, BS)

처리를 통하여 변환된 사이토신의 배열 및 이의 효율(분해 및 회수 포함)확인하는 방법으로서, 바이설펜아이트의 처리가 수행되어 gDNA로부터 BS DNA를 획득할 수 있다.

- [0113] 이에, 도 5b를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설펜아이트 변환 평가 방법에 대한 검증 과정에서 사용된 바이설펜아이트 변환 키트에 대한 개략도가 도시되며, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설펜아이트 변환 평가 방법에 대한 검증은 EZ DNA Methylation-Lightning Kit(Zymo Research), Premium Bisulfite kit(Diagenode), MethylEdge Bisulfite Conversion System(Promega), EpiJET Bisulfite Conversion Kit(Thermo Fisher Scientific), EpiTect Fast Bisulfite kit(Qiagen) 및 NEBNext Enzymatic Methyl-seq Conversion Module(New England Biolabs)의 총 6가지의 바이설펜아이트 변환 키트를 기초로 수행되었다.
- [0114] 보다 구체적으로, 총 20명의 말초혈액시료가 연세대학교 세브란스 병원 기관윤리위원회에 승인을 받아, Asian Sample Network의 바이오뱅크(biobank)에서 채취되었다(4-2019-0707). 그 다음, 200 μ l의 전혈 시료에서 QIAamp®DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여, gDNA를 추출하였으며, 추출된 gDNA는 Quantifiler™ Duo Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States)를 사용하여 정량화한 뒤, 20° C에서 보관되었다.
- [0115] 그 다음, 50ng의 gDNA에 바이설펜아이트를 처리(각 키트 사용)하여, BS-DNA가 획득되었다.
- [0116] 그 다음, 획득된 gDNA 및 BS DNA는 전술한 Quantifiler™ Duo Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States)에 대한 결과를 기반으로 각각 5 ng/ μ l로 희석되어 증폭 과정(BisQuE)에 사용되었다.
- [0117] 예를 들어, 도 5b를 참조하면, 증폭 과정(BisQuE)에서 각각의 시료의 플레이트 내 배치 및 이의 함량은 도시된 바와 같이 수행되었으며, BS DNA 또한 gDNA와 마찬가지로 5ng/ μ l로 희석되어 투입되었다. 이때, Z-EZ는 EZ DNA Methylation-Lightning Kit(Zymo Research)이고, D-PB는 Premium Bisulfite kit(Diagenode)이고, P-ME는 MethylEdge Bisulfite Conversion System(Promega)이고, T-EJ는 EpiJET Bisulfite Conversion Kit(Thermo Fisher Scientific)이고, Q-EF는 EpiTect Fast Bisulfite kit(Qiagen)이고, N-NE는 NEBNext Enzymatic Methyl-seq Conversion Module(New England Biolabs)이다
- [0118] 도 6a는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설펜아이트 변환 평가 방법에 대한 검증 과정에서 표준 DNA(standard DNA)의 표준 곡선(curve) 및 이의 Ct 값에 대한 결과에 대한 개략도이다.
- [0119] 도 6a를 참조하면, 표준 DNA에 대한 결과는 일관된 분석 감도(assay sensitivity) 및 재현성(reproducibility)을 가지는 것으로 나타난다. 보다 구체적으로, 10ng 내지 0.016 ng(16 pg)의 표준 DNA에 대한 평균 Ct 값은 Short-C에서 각각 21.247, 23.510, 25.742, 27.932 및 29.899로 균일한 결과를 가지는 것으로 나타나며, Long-Cfree에서도 마찬가지로 각각 22.595, 24.850, 27.059, 29.182 및 31.077로 균일한 결과를 가지는 것으로 나타난다.
- [0120] 나아가, 분석에 대한 각각의 R-squared의 값은 0.99 이상이고, PCR 효율(efficiency) 기울기(slope) 및 y 절편(intercept)에 대한 값이 모두 일정한 것으로 나타남에 따라, PCR 증폭에 대한 결과값이 신뢰도 높은 재현성 및 일관성을 가진다는 것을 의미할 수 있다.
- [0121] 나아가, 이러한 결과를 통하여, Short-C 및 Long-Cfree에 대한 표준 곡선(standard curve)를 산출할 수 있으며, 산출된 표준 곡선을 이용하여, 제 1 프로브에 의한 제 1 앰플리콘(gDNA 또는 unconverted DNA) 및 제 2 앰플리콘의 양을 정량화할 수 있다.
- [0122] 도 6b는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설펜아이트 변환 평가 방법에 대한 검증 과정에서 C-T 지표에 대한 PCR 분석 결과가 도시된다.
- [0123] 도 6b를 참조하면, C-T 지표에 대한 평균 Ct 값은 Short-C에서 각각 23.093, 26.292, 29.414, 및 31.974로 균일한 결과를 가지는 것으로 나타나며, Short-T에서도 마찬가지로 각각 24.600, 27.786, 30.796 및 33.637로 균일한 결과를 가지는 것으로 나타난다.
- [0124] 나아가, 분석에 대한 각각의 R-squared의 값은 0.99 이상이고, 기울기(slope) 및 y 절편(intercept)에 대한 값이 모두 일정한 것으로 나타남에 따라, PCR 증폭에 대한 결과값이 신뢰도 높은 재현성 및 일관성을 가진다는 것을 의미할 수 있으며, 앞서 전술한 도 6a에서의 결과와 유사한 것으로 나타난다.
- [0125] 나아가, 4가지의 희석 양(10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6)을 가지는 C-T 지표의 결과를 통하여, Short-C 및 Short-T 사이의 Ct 값의 상대적인 비율을 산출할 수 있으며, 산출된 비율을 통하여 Short-T에 대한 Ct 값을 Short-C의 Ct 값으로

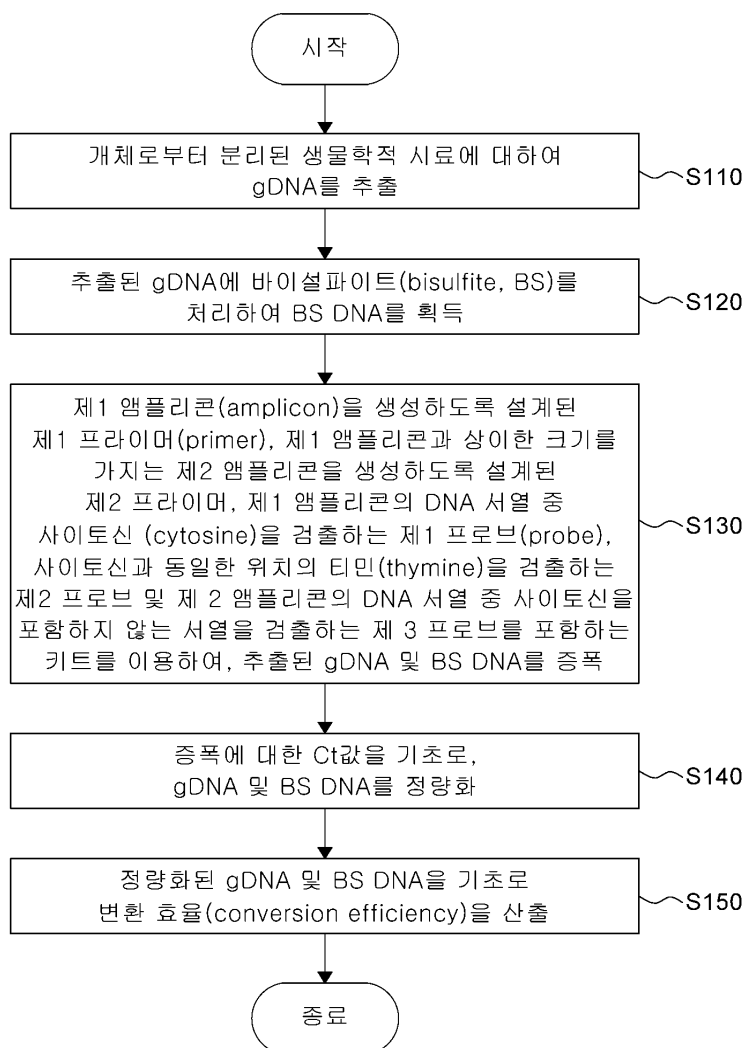
변환할 수 있다.

- [0126] 즉, Short-T에 대한 결과 값은 표준 곡선에 이용될 수 없음에 따라, 전술한 C-T 지표에 의한 관계식을 이용하여, Short-T에 대한 Ct 값을 Short-C의 표준 곡선으로 간접적으로 정량화할 수 있다.
- [0127] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이선폴라이트 변환 평가 방법에 대한 검증 과정에서 내부 양성 대조군 (Internal Positive Control, IPC)에 대한 PCR 분석 결과가 도시된다.
- [0128] 도 7을 참조하면, IPC에 대한 평균 Ct 값은 약 27로 샘플(assay)간에 매우 일정한 것으로 나타나며, 이는 샘플 내에 PCR 억제제가 존재하지 않거나, 이의 영향이 없다는 것을 의미할 수 있다.
- [0129] 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이선폴라이트 변환 평가 방법에서 사용되는 IPC는 기타 프라이머 및 프로브에 간섭하지 않고, 시료의 오염 여부를 검출할 수 있다.
- [0130] 도 8은 바이선폴라이트 변환 키트에 따른 본 발명의 일 실시예에 따른 바이선폴라이트 변환 평가 방법에 대한 검증 결과가 도시된다. 이때, 도 7의 (a) 내지 (c)는 본 발명의 qPCR 시스템에 기초하여 측정되었다.
- [0131] 보다 구체적으로, 먼저, 도 8의 (a)를 참조하면, 바이선폴라이트 변환 키트에 따른 본 발명의 일 실시예에 따른 바이선폴라이트 변환 평가 방법에 대한 변환 효율 결과가 도시되며, 대부분의 바이선폴라이트 변환 키트에 의한 BS-DNA는 95 % 이상의 전환 효율을 갖는 것으로 나타난다.
- [0132] 보다 구체적으로, Z-EZ, Q-EF, P-ME, D-PB, T-EJ 및 N-NE 키트 순으로 BS 변환 효율이 높은 것으로 나타나며, N-NE 키트에 대한 샘플 중 7 샘플은 90 % 미만의 변환 효율을 갖는 것으로 나타나며, N-NE 키트에 대한 변환 효율은 다른 키트들과 유의한 차이를 갖는 것으로 나타난다(P<0.001).
- [0133] 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이선폴라이트 변환 평가 방법을 통하여, N-NE 키트를 통한 바이선폴라이트 변환 효율이 가장 낮다는 것을 확인할 수 있다.
- [0134] 그 다음, 도 8의 (b)를 참조하면, 바이선폴라이트 변환 키트에 따른 본 발명의 일 실시예에 따른 바이선폴라이트 변환 평가 방법에 대한 분해 수준 결과가 도시된다. 이때, 분해 수준은 하기의 수학적 식 2와 같이, gDNA에 BS DNA의 비율로 산출됨에 따라, gDNA 및 BS DNA의 비율이 같을 경우, 분해 수준은 1이다. 나아가, BS DNA에서 long 즉, 제 2 앰플리콘의 함량이 적은 경우, 분해 수준이 1 이상(>1)으로 나타남에 따라, 분해 수준이 1 이상인 경우는 바이선폴라이트 변환 과정(BS conversion step)에서 BS DNA가 분해(degradation)되었음을 의미할 수 있다.
- [0135] [수학적 식 2]
- [0136]
$$\text{분해수준} = \frac{BS-DNA(short/long)}{gDNA(short/long)}$$
- [0137] 상기 수학적 식 2에서, short는 제 1 프로브 및/또는 제 2 프로브에 의하여 정량화된 제 1 앰플리콘의 함량이고, long은 제 3 프로브에 의하여 정량화된 제 2 앰플리콘의 함량임.
- [0138] 분해 수준은 N-NE 키트가 1.0 이하로 가장 낮은 분해 수준을 갖는 것으로 나타나며, N-NE를 제외한 나머지 키트는 1.279 내지 1.577의 분해 수준으로 1.0 이상의 분해 수준을 갖는 것으로 나타난다.
- [0139] 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이선폴라이트 변환 평가 방법을 통하여, N-NE 키트를 통한 바이선폴라이트 분해 수준이 가장 낮다는 것을 확인할 수 있다.
- [0140] 그 다음, 도 8의 (c)를 참조하면, 바이선폴라이트 변환 키트에 따른 본 발명의 일 실시예에 따른 바이선폴라이트 변환 평가 방법에 대한 회수율 결과가 도시되며, Z-EZ 키트는 평균 50.58 %의 가장 높은 회수율을 갖는 것으로 나타나며, N-NE 키트는 평균 18.24 %의 가장 낮은 회수율을 갖는 것으로 나타난다. 나아가, 나머지 키트는 평균 43.79 내지 48.39 %로 유사한 수준의 회수율을 갖는 것으로 나타난다.
- [0141] 나아가, Z-EZ 및 Q-EF 키트의 회수율은 유의하게 차이를 가지는 것으로 나타나며(P<0.05), N-NE 키트는 회수율에 있어 다른 키트들과 유의하게 차이를 갖는 것으로 나타난다(P<0.05).
- [0142] 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이선폴라이트 변환 평가 방법을 통하여, Z-EZ 키트가 가장 높은 회수율을 가진다는 것과 N-NE 키트가 가장 낮은 회수율을 갖는다는 것을 확인할 수 있다.
- [0143] 그 다음, 도 8의 (d)를 참조하면, Qubit ssDNA assay에 기초한 측정된 바이선폴라이트 변환 키트에 따른 회수율 결과가 도시되며, 도 8의 (c)와 마찬가지로 N-NE 키트가 가장 낮은 회수율을 갖는 것으로 나타난다.

- [0144] 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법에 따른 회수율 검증은 종래의 검증 방법과 유사한 경향성을 갖는 것을 의미할 수 있다.
- [0145] 이상의 결과에 따라, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법은 본 발명의 해당 분야에서 상업적으로 이용되는 바이설파이트 변환 키트에 대하여, 한번의 PCR 증폭 과정으로 변환 효율, 분해 수준 및 수율을 모두 확인할 수 있으며, 각각의 gDNA 및 BS DNA의 양을 정량화할 수 있다.
- [0146] 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이설파이트 변환 평가 방법은 5ng/μl의 매우 소량의 시료로도 분석이 가능함에 따라, 범의학을 포함하는 다양한 분야에서 분석 시료의 양에 대한 한계를 극복할 수 있다.
- [0147] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시 예들을 더욱 상세하게 설명하였으나, 본 발명은 반드시 이러한 실시 예로 국한되는 것은 아니고, 본 발명의 기술사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양하게 변형 실시될 수 있다. 따라서, 본 발명에 개시된 실시 예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시 예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 보호 범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



도면2

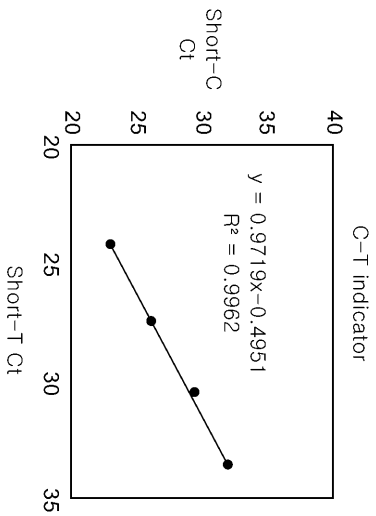
gene name*	location	variance	median copy number	Vst
WASH2P	chr2:114057699-1104073081	3.97	20.81	0.04
CROCC1	chr1: 16817339-16829988	2.57	10.23	0.25
MSTP2	chr1: 16844655-16849501	6.45	13.85	0.06
AMY1A	chr1: 103999663-104008696	7.74	9.91	0.1
<u>FLJ39739</u>	chr1: 142510035-143706379	0.61	11.83	0.39
PDE4DIP	chr1: 143663117-143706379	0.52	7.2	0.44
NBPF14	chr1: 146470265-146492472	521.77	244.66	0.11
NCF1	chr7: 73826244-73841595	0.18	6.43	0
LOC645166	chr1: 147194909-147218219	0.56	12.5	0.02
GOLGA6L10	chr15: 80420179-80428761	3.91	29.81	0.04
GIYD1	chr16: 29373375-29377041	1.83	6.9	0.07
LRR37A4	chr17: 40939892-40948305	9.3	16.22	0.24
C2orf78	chr2: 73864823-73897782	14.03	10.88	0.39
MGC13005	chr2: 114073074-114075623	5.51	24.27	0.01
RPL23AP53	chr8: 148346-172318	3.15	27.08	0.09
LOC728323	chr2: 242679516-242751142	4	19.18	0.09
POM121L4P	chr22: 19373842-19376009	33.18	50.71	0.3
ZNF595	chr4: 43226-78099	1.27	10.63	0.18
DRD5	chr4: 9392355-9394731	2.13	11.34	0.04
LOC100272216	chr5: 686962735-68964784	82.32	63.64	0.13
GUSBL1	chr6: 26947244-27032312	2.62	13.2	0.23
LOC100170939	chr5: 69459044-69557378	2.1	9.73	0.22
C6orf41	chr6: 27032750-27099731	2.99	11.48	0.15
STAG3L1	chr7: 74826382-74834926	0.34	8.61	0.05
GTF2IP1	chr7: 72206961-72259270	0.09	6.81	0
SPDYE5	chr7: 74962234-74971564	12.4	37.77	0.25
AQP7	chr9: 33374947-33392517	1.19	11.7	0.04
KGFLP1	chr9: 44185511-44246438	1.16	11.29	0.03
FAM95B1	chr9: 42458584-42464233	2.26	16.19	0.02
LOC642929	chr9: 43130534-43135480	1.94	14.62	0.07

도면3a

target	PCR amplification				Probe			
	Primer sequences(5'>3')	Conc. (μ M)	Amplicon size(bp)	No.	Primer sequences(5'>3')	Conc. (μ M)	Length (nt)	No.
Short (ANKRD20A20P)	F gaa atg att aag aga aag gga aa	0.6	104	서열번호 1	C FAM-tgg gta aat acf tag aat g-MFQ MGB	0.1	19	서열번호 7
	R ccc att aca ttg atc ctc a	0.6		서열번호 2	T VIC-tgg gta aat att tag aat g-NFQ MGB	0.1	19	서열번호 8
	F ggg aaa atg aag aag tga tga	1		서열번호 3	Cfree NED-aat gtt gta tgt tat ttg	0.15	21	서열번호 9
Long FLJ39793**	R aca caa aaa acc att caa aaa a	1	238	서열번호 4	Cfree tgg-NFQ MGB	0.15	21	서열번호 9
	F aac tgc tag aaa acc ggc tc	0.8	147	서열번호 5				
	R gag gca ggc tat tgc tat gt	0.8		서열번호 6				
IPC	F aac tgc tag aaa acc ggc tc	0.8	147	서열번호 5	Cfree tgg-NFQ MGB	0.15	21	서열번호 9
	R gag gca ggc tat tgc tat gt	0.8		서열번호 6				
	F aac tgc tag aaa acc ggc tc	0.8		서열번호 5				

*chr9:67907355-67907458 and 8 other loci (GRCh38, UCSC in silico PCR).
**chr11:49482287 + 149482524 and 10 loci (GRCh38, UCSC in silico PCR).

C-T indicator (single strand) 104 nt	GAA ATG GTT AAG AGA AAG GGA AAA ACT GAA ACC TGT GGG TGA ATA YTT AGA ATG ACA GTA TTT AGC TCA GCC TGA AGA CAG ATG AGG ATG AAA AAT GTA ATG GG (서열번호 46)
--	--



Sample	Ct value		
	Short-C	Short-T (T->C)	Long-Cfree
gDNA	22.426		23.738
BS-DNA	28.784	25.537->24.324	26.175

Sample	Amount (ng)		
	Short-C	Short-T (T->C)	Long-Cfree
gDNA	4.421		4.731
BS-DNA	0.044	1.103	0.762

도면3b

도면4

1. Conversion efficiency

$$\frac{\text{short} - \text{T}}{\text{short} - \text{C} + \text{short} - \text{T}} \times 100(\%)$$

- ✓ Short-C: unconverted strand
- ✓ Short-T: converted strand

Sample	Amount (ng)		
	Short-C	Short-T (T-★->C)	Long-Cfree
gDNA	4.421		4.731
BS-DNA	0.044	1.103	0.762

$$\frac{1.103}{0.044 + 1.103} \times 100(\%) = 96.18(\%)$$

2. Degradation level

$$\frac{\text{BS} - \text{DNA}(\text{short/long})}{\text{gDNA}(\text{short/long})}$$

- ✓ Multicopy
- ✓ compensating variance

Sample	Amount (ng)		
	Short-C	Short-T (T-★->C)	Long-Cfree
gDNA	4.421		4.731
BS-DNA	0.044	1.103	0.762

$$\frac{(0.044 + 1.103)/0.762}{4.421/4.731} = 1.610$$

3. recovery

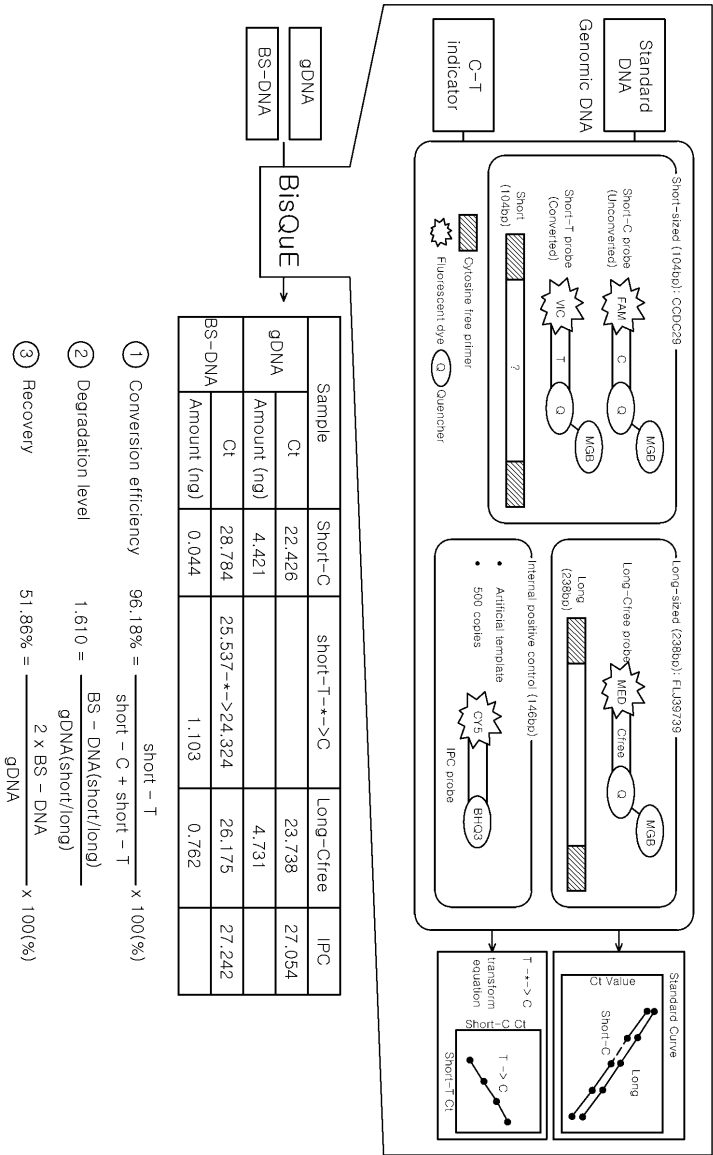
$$\frac{2 \times \text{BS} - \text{DNA}}{\text{gDNA}} \times 100(\%)$$

- ✓ gDNA: sense and antisense strand
- ✓ BS-DNA: sense strand
- ✓ Short amplicon
- ✓ x2 for N-NE (20ul elution)

Sample	Amount (ng)		
	Short-C	Short-T (T-★->C)	Long-Cfree
gDNA	4.421		4.731
BS-DNA	0.044	1.103	0.762

$$\frac{2 \times (0.044 + 1.103)}{4.421} \times 100(\%) = 51.86(\%)$$

도면5a



도면5b

NO.	Manufacturer	Kit	DNA Input	Input vol. (μl)	Elution vol. (μl)
1	Zymo Research	EZ DNA Methylation–Lightning Kit	100 pg – 2 μg	20	10
2	Diagenode	Premium Bisulfite kit	100 pg – 2 μg	20	10
3	Promega	MethylEdge Bisulfite Conversion System	100 pg – 2 μg	20	10–20
4	Thermo Fisher Scientific	EpiJET Bisulfite Conversion Kit	50 pg – 2 μg	20	10–20
5	Qiagen	EpiTect Fast Bisulfite kit	1 ng – 2 μg	40	10–15
6	New England Biolabs	NEBNext Enzymatic Methyl–seq Conversion Module	10 ng – 200 ng	29	20

도면5c

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B				gDNA		BS-DNA	BS-DNA	BS-DNA	BS-DNA			
C		Standard				D-PB		T-EJ		N-NE		
D												
E												
F		NTC		BS-DNA		BS-DNA		BS-DNA		C-T		
G		Control		Z-EZ		P-ME		Q-EF		indicator		
H		DNA										
Probe												
Dye												
Quencher												
Short-C												
EMA												
NFI-MGB												
Short-T												
VIC												
NFQ-MGB												
Long-Cfree												
NED												
NFQ-MGB												
IPC												
CY5												
BHQ3(None)												
Passive Reference Dye												
ROX												
-												

Thermal		Cycling	
94°C		2 min	
94°C		15 sec	x40 cycle
60°C		45 sec	

- Standard DNA (human gDNA)
 - Quantifier Duo Kit (Thermo Fisher Scientific)
 - Serial dilution: 10 ng, 2 ng, 400 pg, 80 pg, and 16 pg
- Control DNA
 - 1 ng of EpiTect Control DNA (Qiagen)
- gDNA
 - 5 ng of genomic DNA
- BS-DNA
 - Bisulfite-converted DNA using six different kits
- C-T indicator
 - Serial dilution: 10⁶, 10⁵, 10⁴, and 10³ copies

Short-C					Long-Cfree				
Standard DNA (ng/well)	Min	Max	Average	SD*	Min	Max	Average	SD*	
10	21.034	21.427	21.247	0.145	22.479	22.738	22.555	0.083	
2	23.209	23.697	23.510	0.173	24.728	24.953	24.850	0.071	
0.4	25.390	25.975	25.742	0.218	26.990	27.140	27.059	0.061	
0.08	27.662	28.143	27.932	0.176	28.897	29.408	29.182	0.146	
0.016	29.423	30.167	29.899	0.240	30.838	31.350	31.077	0.157	
Assay	Slope**	Y-intercept	R-squared	PCR Efficiency (%)	Slope**	Y-intercept	R-squared	PCR Efficiency (%)	
1	-2.2005	24.458	0.9985	107.8	-2.1478	25.812	0.9982	111.56	
2	-2.2141	24.511	0.9983	106.87	-2.1241	25.676	0.9989	113.34	
3	-2.1606	24.493	0.9992	110.62	-2.1429	25.704	0.9989	111.92	
4	-2.1235	24.513	0.9975	113.38	-2.1185	25.742	0.9986	113.76	
5	-2.1642	24.170	0.9996	110.36	-2.115	25.767	0.9992	114.03	

*SD denotes of standard deviation.
**log 5 scale

도면6a

도면6b

Standard DNA (ng/well)	Shot-C					Shot-T				
	Min	Max	Average	SD*		Min	Max	Average	SD*	
10 ⁶	23.853	23.360	23.093	0.154		24.228	24.936	24.600	0.262	
10 ⁵	26.182	26.395	26.292	0.086		27.447	28.211	27.786	0.231	
10 ⁴	29.209	29.645	29.414	0.146		30.464	31.235	30.796	0.276	
10 ³	31.586	32.268	31.974	0.241		32.903	34.492	33.637	0.505	
Assay	Slope**	Y-intercept	R-squared							
1	0.9719	-0.4951	0.9962							
2	0.9700	-0.4548	0.9991							
3	1.0092	-1.9415	0.9996							
4	0.9891	-1.5536	0.9988							
5	1.0033	-1.4724	0.9997							

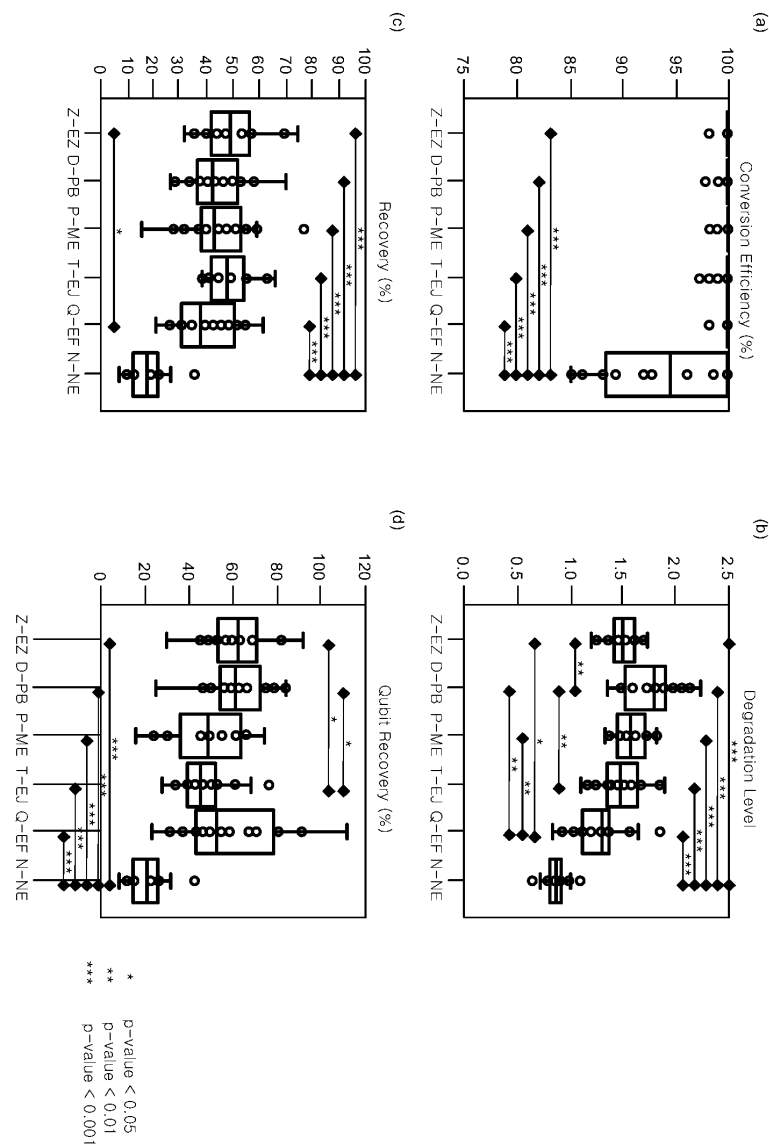
*SD denotes of standard deviation.

도면7

Assay	Genomic DNA				Bisulfite converted DNA			
	Min	Max	Average	SD*	Min	Max	Average	SD*
1	26.681	28.001	27.339	0.395	27.083	27.800	27.408	0.188
2	27.028	28.275	27.517	0.387	27.212	28.031	27.646	0.218
3	27.075	28.307	27.465	0.371	27.178	27.976	27.541	0.178
4	26.961	28.194	27.401	0.406	27.088	28.047	27.435	0.189
5	27.013	28.297	27.568	0.321	27.233	27.972	27.561	0.161

*SD denotes of standard deviation.
**log 5 scale

도면8



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation foundation Yonsei University
- <120> KIT FOR EVALUATION OF BISULFITE CONVERSION AND METHOD FOR EVALUATION USING THE SAME
- <130> DP-2021-1092
- <160> 46
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer
 <400> 1
 gaaatggtta agagaaaggg aaa 23
 <210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> reverse primer
 <400> 2
 cccattacat ttttcacct ca 22
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 3
 gggaaaatga ggaagtgatg a 21
 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 4
 acacaaaaaa ccattcaaaa aa 22
 <210>
 > 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 5
 aactgctaga aaaccgctc 20
 <210> 6
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 6
 gaggcaggct cttgctatgt 20
 <210> 7
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C probe
 <400> 7
 tgggtgaata cttagaatg 19

 <210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T probe
 <400> 8
 tgggtgaata tttagaatg 19

 <210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cytosine free probe
 <400> 9
 aatgttgat gttatttg g 21
 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 10
 tccaggcagt gcgtctgctg t 21

<210> 11
 <211> 239
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 agggaaaatg aggaagtgat gaatagaayt atttyttyya ttyayyyagy tayaaattgt 60
 gytgatttay aatgttgtat gttatttggt gyayttgtat tggttttaat ttyatagtyy 120
 tytyaagata ggaayttggy atyagatgag yyaggtgaay tagyyaaaya gggtttityt 180
 gttgatytty tyaaaaaayy agyytggat tyattgattt tttgaagggt tttttgtgt 239
 <210> 12
 <211> 104
 <212> DNA
 <213> homo sapiens
 <400> 12
 gaaatgggta agagaaaggg aaaaaytgaa ayytgtgggt gaatayttag aatgayagta 60
 tttagytyag yytgaagaya gatgaggatg aaaaatgtaa tggg 104
 <210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 13
 tagaagggga gagattggg 19
 <210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 14
 tcacaccctt caaactatca aa 22
 <210> 15
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 15
 agggaaaatg aggaaatgat g 21
 <210> 16
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 16
 acacaaaaaa cccttcaaaa aa 22
 <210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 17
 ggaaaatgtg ggaaagtttg a 21
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 18
 cctctcctca accaccatct 20
 <210> 19
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 19
 gagtttgggg atgggtagg 19
 <210> 20
 <211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 20

 cccatcatta cattattacc aa 22
 <210> 21
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 21
 tgaggtagga agtatgtgag aaaa 24
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 22
 tcattcccat tacccaatca 20
 <210> 23
 <211> 21
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 23
 tgagtggatg tgggtgtaga g 21
 <210> 24
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 24
 tcccttttac aaccaaactc tc 22

<210> 25
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 25
 aaagaaaaga aaagataatt aggga 25

<210> 26
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 26
 catatttttt ccccaaaact ca 22

<210> 27
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 27
 ggaatgttat ttttggattg taagg 25

<210> 28
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 28

atttttcttc ccctattaca a 21
 <210> 29
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer

<400>	29	
ttgtaatagg ggaggaaaaa t		21
<210>	30	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	30	
cacctcaaat cttctttctt t		21
<210>	31	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	31	
aaatttgaag tgtatggga		19
<210>	32	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	32	
ccaaacatat taaattccaa aac		23
<210>	33	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	33	
tgagattgat ttaaagaat tgatt		25
<210>	34	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 34
 tcttcccacc tcaacttcct 20
 <210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 35
 tttttgtaag gtggaagga 20
 <210> 36
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 36

 ttcaccccat aatcttatct ttct 24
 <210> 37
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 37
 gggaggaaga aatgaaagg 19
 <210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 38
 ccaacacca atttcctcaa 20
 <210> 39
 <211> 23

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	39	
	gaaaaggga ggaagaaaag aaa	23
<210>	40	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	40	
	gaggaggga gagaggag	19
<210>	41	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	41	
	tttaccttc taaatttca ctca	24
<210>	42	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	42	
	agaaagaaga agagaggag gg	22
<210>	43	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	43	
	tttaccttc taaatttca ctca	24

<210> 44
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 44

tgagaaaggt atgaggtttg 20

<210> 45
 <211> 450
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> internal positive control
 <400> 45

ctctaactag tatggataac cgtgttttca ctgtgctgcg gttaccatc gcctgaaatc 60
 cagttgggtg caagccattc cctgtctagg acgccgcatg tagtaaaaca tatacattgc 120
 tcgggttcac tccgggtccg tctgagtcga ccaaggacac aatcgagctc cgatctgtat 180
 tgtcgagaaa cttgtatcca acccccgag cttgccagct cttcgggtat catggagcct 240

atggttgaac aaggcccata cgcgagataa actgctagaa aaccgcgtct ttacgactgg 300
 tgcttaattt aatttcgctg acgtgatgac attccaggca gtgcgtctgc tgcgggtcc 360
 ctctcgtgat tgggtagttg gacatgccct tgaaaaacat agcaagagcc tgcctctcta 420
 ttgatgtcac ggcgaatgtc ggggagacag 450

<210> 46
 <211> 104
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> internal positive control (contained a degenerate base Y-46 bp)
 <400> 46

gaaatggtta agagaaaggg aaaaactgaa acctgtgggt gaatayttag aatgacagta 60

tttagctcag cctgaagaca gatgaggatg aaaaatgtaa tggg 104