

명세서

발명의 명칭: 메틸화 DNA 다중 검출방법

기술분야

- [1] 본 발명은 타겟 DNA의 메틸화를 다중으로 검출하는 방법 및 타겟 DNA의 메틸화 검출을 위한 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 타겟 DNA와 상보적으로 결합할 수 있는 타겟 특이적 서열 및 타겟 DNA에 상보적으로 결합하지 않는 인공적인 프라이머를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 제작하여, 이를 1차 프라이머로 사용함으로써 타겟 DNA를 선형 증폭 (Linear Target Enrichment: 이하, LTE)하고, 선형 증폭된 타겟 DNA에 상보적으로 결합할 수 있는 또 다른 올리고뉴클레오타이드, 유니버설 프라이머를 이용하여 증폭하고, 증폭산물의 유무를 검출할 수 있는 프로브를 이용함으로써, 타겟 DNA의 메틸화 유무를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 포유류 세포의 게놈 DNA에는 A, C, G, T 외에 5번째 염기가 존재하며, 이는 시토신 환의 5번째 탄소에 메틸기가 붙은 5-메틸시토신(5-mC)이다. 5-mC는 항상 CG 다이뉴클레오타이드의 C에만 오며(5'-mCG-3'), 이러한 CG를 흔히 CpG라고 표시한다. CpG의 C는 대부분이 메틸기가 붙어서 메틸화되어 있다. 이러한 CpG의 메틸화는 알루(alu)나 전이인자(transposon)와 같이 게놈내에 반복되는 염기서열(repetitive sequence)이 발현되지 못하도록 억제하며, 포유류 세포에서 유전자 외 변화가 가장 흔히 나타나는 부위이다. 이러한 CpG의 5-mC는 자연히 탈아미노화(deamination)되어 T로 바뀌며, 이에 따라 포유류 게놈내 CpG는 정상적으로 나타나야 할 빈도($1/4 \times 1/4 = 6.25\%$)보다 훨씬 낮은 1%의 빈도만을 나타낸다.
- [4] CpG 중에 예외적으로 밀집되어 나타나는 것들이 있으며, 이를 CpG 부위 (CpG 섬)라고 한다. CpG 부위는 길이가 0.2~3kb이고, C 및 G염기의 분포백분율이 50%를 넘으며, CpG의 분포백분율이 3.75%이상으로 높게 집중되어 나타나는 부위를 가리킨다. CpG 부위는 전체 인체 유전체에 약 45,000개가 나타나며, 특히 유전자의 발현을 조절하는 프로모터 부위에 집중되어 나타난다. 실제로 인체 유전자 중 약 절반을 차지하는 중요 유전자(housekeeping genes)의 프로모터에는 CpG 부위가 나타난다 (Cross, S. *et al.*, Curr. Opin. Gene Develop., 5:309, 1995). 비정상적인 DNA 메틸화는 주로 해당 유전자의 5' 발현조절 부위 (5' regulatory region)에서 일어나 해당 유전자의 발현을 감소시키는 것으로 알려져 있다.
- [5] 여기서 유전자의 5' 발현조절부위는 프로모터 (promoter), 인핸서 (enhancer) 그리고 5' 비번역 영역 (5' untranslated region) 등이 해당된다. 이에 실제 혈액이나 객담, 침, 대변, 소변 등에서 종양관련 유전자의 프로모터 메틸화를 조사하여

각종 암 진료에 사용하려는 시도가 최근 활발하게 이루어지고 있다.

- [6] 세포사멸 (apoptosis) 또는 세포괴사 (necrosis) 등의 과정에 의해 유출된 DNA들이 혈액 내로 흘러나와 혈청 (serum)이나 혈장 (plasma)내에 종양세포 유리 (cell-free tumor) DNA에도 메틸화된 DNA 조각이 함께 존재한다고 잘 알려져 있으며 이러한 비정상적 DNA 메틸화 존재를 암을 진단하는 타겟으로 활용하고 있다.
- [7] 한편, 통상 유전자의 메틸화 분석방법은 PCR의 적정성과 인풋 DNA의 존재유무를 확인하기 위하여 메틸화와 상관없는 대조군 유전자를 PCR로 검출하고, 이와 병행하여 타겟 DNA에 대한 메틸화 검출 PCR을 실시함으로써 수행된다.
- [8] 특히, 실시간 PCR을 통한 메틸화 분석 방법은 i) 실시간 PCR을 위한 프라이머로 타겟 DNA의 메틸화와 비의존적 (independent) 프라이머를 사용하고, PCR 증폭산물 검출시 메틸화된 타겟 DNA와 혼성화할 수 있는 메틸화 특이적 검출 프로브를 사용하는 방법, ii) 실시간 PCR을 위한 프라이머로 타겟 DNA의 메틸화 특이적 프라이머를 사용하고, PCR 증폭 산물 내에는 메틸화와 비의존적 서열을 포함하며, 이 서열과 혼성화할 수 있는 검출 프로브를 사용하는 방법 및 iii) 실시간 PCR을 위한 프라이머로 타겟 DNA의 메틸화 특이적 프라이머를 사용하고, PCR 증폭산물 검출시 메틸화된 타겟 DNA와 혼성화할 수 있는 메틸화 특이적 검출 프로브를 사용하는 방법을 고려할 수 있다.
- [9] 그러나, 이들 방법은 모두 풍부화되지 않은 DNA를 직접 주형으로 사용하고, 타겟 DNA를 증폭하기 위한 정방향과 역방향 프라이머 2개를 필수적으로 동시에 사용한다. 이에 따라, 하나의 튜브 (단일 반응기)에서 증폭해야 하는 타겟이 증가할 때마다 한 번에 2개의 프라이머가 더 필요하다는 문제점이 있다.
- [10] 다중 PCR을 위한 프라이머의 설계는 단일 튜브에서 서로 다른 프라이머들이 유사한 혼성화 특성을 가질 수 있도록 설계하게 된다. 어닐링 (annealing) 온도와 프라이머 농도를 어느 정도 까지는 계산하여 사용할 수도 있고 경험적으로 사용할 수도 있다. 프라이머쌍이 추가될 때 마다 비특이적 혼성화가 증가하기 때문에 각 프라이머쌍이 추가될 때 마다 반응조건을 변형시켜야만 한다. 또한, 프라이머쌍의 고갈 등으로 가공의 결과 (artifact)가 발생할 수 있다. Weighardt 등 (PCR Meth App, 1993, 3: 77)은 5'에 태그된 올리고뉴클레오타이드를 PCR 반응에 사용하는 것으로 기술한 바 있다. 그러나 이러한 증폭방법의 주요 특징은 각 프라이머의 어닐링과 프라이머 연장 반응을 분리하는 단계를 포함하고 있어 실제 다중 PCR 개념에는 적합하지 않다. 따라서 다중 PCR을 위한 완벽한 조건을 만드는 것은 매우 어려운 일이며, 비용이 많이 들어가는 과정이다. 따라서 서로 다른 프라이머들의 다양한 특성에 상관없이 동일조건에서 여러 개의 타겟을 동시에 동일한 정도로 증폭할 수 있는 다중 PCR 방법의 개발이 필요하다.
- [11] 이러한 기술적 배경하에서, 본 출원의 발명자들은 상기 문제점들을 해결하고 높은 검출한도와 정확도를 가지는 메틸화 타겟 DNA의 검출방법을 개발하고자

예의 노력한 결과, 유니버설 프라이머가 결합된 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 타겟 DNA를 한쪽 방향으로 (asymmetric) 선형 증폭하고, 풍부화된 이들 타겟 DNA를 주형으로 사용하여 타겟 DNA를 검출하며, 타겟 특이적 올리고뉴클레오타이드에 유니버설 프라이머를 연결하는 경우 종래와 달리 다중 타겟 DNA 검출시 하나의 프라이머만을 추가하여도 목적하는 정도의 높은 민감도와 정확도로 메틸화 DNA를 검출할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[12]

[13] **발명의 요약**

[14] 본 발명의 목적은 유니버설 프라이머를 이용하여 메틸화 DNA를 다중으로 (multiple) 검출하는 방법을 제공하는데 있다.

[15] 본 발명의 목적은 유니버설 프라이머를 포함하는 메틸화 DNA 다중 검출용 조성물을 제공하는데 있다.

[16] 본 발명의 목적은 상기 조성물을 포함하는 메틸화 DNA 다중 검출용 키트를 제공하는 데 있다.

[17] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 메틸화 DNA를 검출하는 방법을 제공한다: (a) 메틸화된 DNA 부위와 비메틸화된 DNA 부위를 서로 다르게 변형시키는 하나 이상의 시약으로 타겟 DNA가 포함되어 있는 샘플을 처리하는 단계; (b) 상기 시약으로 처리된 타겟 DNA 서열에 상보적으로 결합할 수 있도록 디자인된 타겟 특이적 서열 및 타겟 DNA에 상보적으로 결합하지 않는 유니버설 프라이머를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 제작하는 단계; (c) 상기 (b) 단계에서 제작된 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 사용하여 상기 (a) 단계에서 시약으로 처리된 타겟 DNA를 주형으로 하여 한쪽 방향으로 (asymmetric) 선형 증폭하는 단계; (d) 상기 (c) 단계에서 선형 증폭된 DNA에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 및 유니버설 프라이머를 사용하여 타겟 DNA를 증폭하는 단계; 및 (e) 상기 (d) 단계에서 증폭된 타겟 DNA 서열에 상보적으로 혼성화 할 수 있는 프로브를 이용하여 타겟 DNA의 메틸화를 검출하는 단계.

[18] 본 발명은 또한, 타겟 DNA를 포함하는 샘플에 처리되는 메틸화된 DNA와 비메틸화된 DNA를 서로 다르게 변형시키는 하나 이상의 시약; 상기 시약으로 처리된 타겟 DNA 서열에 상보적으로 결합할 수 있는 타겟 특이적 서열 및 타겟 DNA에 혼성화 하지 않는 유니버설 프라이머를 포함하는 올리고뉴클레오타이드; 상기 선형 증폭된 DNA에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 및 유니버설 프라이머; 및 상기 증폭된 타겟 DNA 서열에 상보적으로 혼성화 할 수 있는 프로브를 포함하는 메틸화 DNA 검출용 조성물을 제공한다.

[19] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 포함하는 메틸화 DNA 검출용 키트를 제공한다.

[20]

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1은 본 발명의 타겟 메틸화 DNA 다중검출방법을 도식화한 개념도이다.
- [22] 도 2는 본 발명의 방법과 일반적인 방법으로 검출한 메틸화 DNA에 대한 검출 민감도를 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- [23] 도 3은 본 발명의 방법 사용되는 타겟 DNA에 대한 프라이머 및 프로브를 설계하는 과정을 도식화한 것이다.
- [24] 도 4는 타겟 DNA에 대한 프라이머 및 프로브를 이용하여 본 발명의 방법과 일반적인 방법으로 검출한 메틸화 DNA에 대한 검출 민감도를 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- [25]
- [26] **발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예**
- [27] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [28] 일 관점에서, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 메틸화 DNA를 검출하는 방법에 관한 것이다: (a) 메틸화된 DNA 부위와 비메틸화된 DNA 부위를 서로 다르게 변형시키는 하나 이상의 시약으로 타겟 DNA가 포함되어 있는 샘플을 처리하는 단계; (b) 상기 시약으로 처리된 타겟 DNA 서열에 상보적으로 결합할 수 있도록 디자인된 타겟 특이적 서열 및 타겟 DNA에 상보적으로 결합하지 않는 유니버설 프라이머를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 제작하는 단계; (c) 상기 (b) 단계에서 제작된 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 사용하여 상기 (a) 단계에서 시약으로 처리된 타겟 DNA를 주형으로 하여 한쪽 방향으로 (asymmetric) 선형 증폭하는 단계; (d) 상기 (c) 단계에서 선형 증폭된 DNA에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 및 유니버설 프라이머를 사용하여 타겟 DNA를 증폭하는 단계; 및 (e) 상기 (d) 단계에서 증폭된 타겟 DNA 서열에 상보적으로 혼성화 할 수 있는 프로브를 이용하여 타겟 DNA의 메틸화를 검출하는 단계.
- [29] 본 발명에서는 높은 민감도로 메틸화 DNA를 검출하여 질병을 조기 진단할 수 있는 방법을 개발하여 그 성능을 확인하고자 하였다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 타겟 DNA와 상보적으로 결합할 수 있는 타겟 특이적 서열 및 상기 타겟 특이적 서열에 결합된 타겟 DNA에 상보적으로 결합하지 않는 유니버설 프라이머를 이용하여 내부 컨트롤 유전자와 타겟 DNA를 1차적으로 선형 증폭한 다음, 타겟 DNA와 상보적인 서열에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드, 타겟 DNA 서열에 상보적으로 혼성화 할 수 있는 프로브 및 유니버설 프라이머를 이용하여 실시간 PCR을 통하여 메틸화 DNA를 분석하였다. 그 결과, 본 발명의 방법이 기존 방법에 비해 높은 민감도와

정확도를 가지고, 메틸화 DNA를 검출할 수 있음을 확인하였다.

- [30] 구체적으로, 정상인 유래 대변 DNA와 각 단계별 대장암 환자 유래 대변 DNA에 바이설파이트(bisulfite)를 처리하여 비메틸화된 시토신은 유라실로 모두 변화시킨 다음, 메틸화된 SDC2(타겟 DNA) 또는 COL2A1(내부 컨트롤)에 각각 특이적으로 결합하고, 유니버설 프라이머가 융합된 타겟 DNA와 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 선형 증폭한 뒤, 각 타겟 DNA와 혼성화 할 수 있는 특이적 프로브, 타겟 DNA와 상보적인 서열에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 및 유니버설 프라이머를 이용하여 실시간 PCR을 수행하였다(도 1). 그 결과, 유니버설 프라이머를 포함하지 않은 프라이머를 사용한 기존의 qMSP(quantitative methylation specific PCR)에 비하여 높은 민감도와 정확도로 메틸화 DNA를 검출할 수 있음을 확인할 수 있었다(도 2 및 도 4).
- [31] 본 발명에서 단계 (a)는 메틸화된 DNA 부위와 비메틸화된 DNA 부위를 서로 다르게 변형시키는 하나 이상의 시약으로 타겟 DNA가 포함되어 있는 샘플을 처리하는 단계이다.
- [32] 본 발명의 "메틸화"는 사이토신(cytocine) 염기환의 5번째 탄소에 메틸기가 붙어 5-메틸사이토신(5-mC)으로 변형된 것을 의미하며, 5-메틸사이토신은 항상 CG 다이뉴클레오타이드의 C에만 오며(5'-mCG-3'), 이러한 CG를 흔히 CpG라고 표시한다. 이러한 CpG의 메틸화는 알루(alu)나 전이인자(transposon)와 같이 게놈내에 반복되는 염기서열이 발현되지 못하도록 억제하며, 포유류 세포에서 유전자외 변화가 가장 흔히 나타나는 부위이다. 이러한 CpG의 5-mC는 자연히 탈아미노화되어 T로 바뀌며, 이에 따라 포유류 게놈내 CpG는 정상적으로 나타나야 할 빈도 ($1/4 \times 1/4 = 6.25\%$)보다 훨씬 낮은 1%의 빈도만을 나타낸다.
- [33] CpG 중에 예외적으로 밀집되어 나타나는 것들이 있으며, 이를 CpG 섬이라고 한다. CpG 섬은 길이가 0.2~3kb이고, C 및 G염기의 분포백분율이 50%를 넘으며, CpG의 분포백분율이 3.75%이상으로 높게 집중되어 나타나는 부위를 가리킨다. CpG 섬은 전체 인체 유전체에 약 45,000개가 나타나며, 특히 유전자의 발현을 조절하는 프로모터 부위에 집중되어 나타난다. 실제로 인체 유전자 중 약 절반을 차지하는 중요 유전자(housekeeping genes)의 프로모터에는 CpG 섬이 나타난다.
- [34] 상기 타겟 DNA 중 CpG 메틸화의 존재가 질병의 지표일 수 있으며, 예를 들어 타겟 DNA의 프로모터, 5' 비번역 영역 및 인트론 중 어느 한 부위의 CpG 메틸화를 측정할 수 있다.
- [35] CpG-함유 유전자는 통상적으로 DNA이다. 그러나, 본 발명의 방법은 예를 들면, DNA 또는 DNA와 mRNA를 포함하는 RNA를 함유하는 시료를 적용할 수 있고, 여기서 DNA 또는 RNA는 단일가닥 또는 이중가닥일 수 있으며, 또는 DNA-RNA 하이브리드를 함유한 시료인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [36] 핵산 혼합물 또한 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 "다중"은 일종의 유전자 내 검출될 특이적인 핵산 서열 부위가 복수개인 경우와 하나의 튜브

(단일 반응기) 내 복수의 타겟 DNA를 포함하는 경우를 모두 포함하는 것이다. 검출될 특이적인 핵산 서열은 큰 분자의 분획일 수 있고, 처음부터 특이 서열이 전체 핵산 서열을 구성하는 분리된 분자 형태로 존재할 수 있다. 상기 핵산 서열은 순수한 형태로 존재하는 핵산일 필요는 없으며, 핵산은 전체 인간 DNA가 포함되어 있는 것과 같이 복잡한 혼합물 내의 적은 분획일 수도 있다.

- [37] 구체적으로, 본 발명은 단일 반응기 내 샘플 중 복수의 타겟 DNA의 메틸화를 검출하기 위한 것으로, 상기 샘플은 복수의 다중 타겟 DNA를 포함할 수 있으며, 타겟 DNA는 대조군 유전자 뿐 아니라, 비정상적으로 메틸화되어 발현이 억제될 억제될 경우, 암의 발생 또는 진행에 영향을 주는 유전자라면 제한없이 이용 가능하다.
- [38] 본 발명에 있어서, 상기 샘플은 인체로부터 유래한 것을 특징으로 할 수 있고, 예를 들어 간암, 교세포종, 난소암, 대장암, 두경부암, 방광암, 신장세포암, 위암, 유방암, 전이암, 전립선암, 췌장암 또는 폐암 환자 유래일 수 있으며, 상기 샘플은 고체 또는 액체 조직, 세포, 대변, 소변, 혈액, 혈청 또는 플라즈마를 사용할 수 있다.
- [39] 상기 메틸화된 DNA와 비메틸화된 DNA를 서로 다르게 변형시키는 하나 이상의 시약은 비메틸화된 사이토신 염기와 메틸화된 사이토신 염기를 구별할 수 있는 것이면 제한없이 사용 가능하나, 예를 들어 바이설파이트, 하이드로젠 설파이트, 다이설파이트 및 이들의 조합일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 시약에 의하여 메틸화된 사이토신 염기는 변환되지 않고, 비메틸화된 사이토신 염기는 우라실 또는 사이토신 이외의 염기로 변환될 수 있다.
- [40] 본 발명에서 단계 (b)는 상기 시약으로 처리된 타겟 DNA 서열에 상보적으로 결합할 수 있도록 디자인된 타겟 특이적 서열 및 타겟 DNA에 상보적으로 결합하지 않는 유니버설 프라이머를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 제작하는 단계이다.
- [41] 일반 다중 PCR은 검출하고자 하는 타겟 (target) 숫자만큼 정방향 및 역방향 프라이머를 쌍으로 만들어서 동시에 사용해야 하는데 비해, 본 발명의 방법은 여러 개의 다중 메틸화 DNA를 동시에 검출하는 실시간 PCR 과정에서 유니버설 프라이머에 의해 타겟 DNA 서열에 상보적으로 결합할 수 있는 타겟 특이적 서열 (역방향 프라이머)을 1개만 사용해도 되고, 선형 증폭된 DNA에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 (정방향 프라이머)만 검출하고자 하는 타겟 숫자만큼 사용하게 됨으로써, 여러 타겟의 메틸화를 동시에 검출하고자 할 때 작은 수의 프라이머만을 사용해도 되기 때문에 PCR의 복잡성 및 PCR 효율의 편차가 감소된다.
- [42] 상기 타겟 특이적 서열은 타겟 DNA와 상보적으로 결합할 수 있는 서열로, 타겟 DNA의 메틸화 부위에 상보적으로 결합할 수 있는 서열 뿐 아니라, 타겟 DNA의 비메틸화 부위에 상보적으로 결합할 수 있는 서열 역시 선택적으로 사용될 수

- 있다.
- [43] 상기 타겟 특이적 서열은 예를 들어, 하나 이상의 CpG 다이뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 타겟 특이적 서열은 예를 들어, 서열번호 2, 5, 9, 14, 17, 21 및 26으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 서열과 50% 이상의 상동성을 가지는 서열, 예를 들어, 55% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있다.
- [44] 상기 유니버설 프라이머는 타겟 DNA 서열에 상보적으로 결합할 수 있는 타겟 특이적 서열 (역방향 프라이머) 또는 선형 증폭된 DNA에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 (정방향 프라이머) 중 어느 하나, 또는 역방향 프라이머 및 정방향 프라이머 둘 다에 연결되어 사용될 수 있다.
- [45] 상기 유니버설 프라이머는 타겟 DNA와 상관없이 증폭 가능한 타겟 DNA에 상보적으로 결합하지 않는 염기서열이면 제한없이 이용 가능하나, 예를 들어 인간 유전체에 존재하지 않는 염기서열을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 유니버설 프라이머는 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 서열과 50% 이상의 상동성을 가지는 서열, 예를 들어, 55% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 유니버설 서열은 T7, SP6, M13 등의 서열을 포함할 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다.
- [46] 또한, 상기 유니버설 서열은 예를 들어 서열번호 35 내지 서열번호 41로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다. 상기 유니버설 서열은 예를 들어
 5'-TAATACGACTCACTATAGG-3' (서열번호 35)의 T7 서열,
 5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3' (서열번호 36)의 SP6 서열, 또는
 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' (서열번호 37: -20F),
 5'-GTTTTCCTCCAGTCACGAC-3' (서열번호 38: -40F),
 5'-CGCCAGGGTTTTCCTCCAGTCACGAC-3' (서열번호 39: -47F),
 5'-GAAACAGCTATGACCATG-3' (서열번호 40: R) 또는
 5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3' (서열번호 41: -48R)의 M13 서열일 수 있다.
- [47] 본 발명은 (c) 상기 (b) 단계에서 제작된 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 사용하여 상기 (a) 단계에서 시약으로 처리된 타겟 DNA를 주형으로 하여 한쪽 방향으로 (asymmetric) 선형 증폭하는 단계를 포함한다.
- [48] 상기 (c) 단계를 통해 실시간 PCR 과정에서 바이선폴라이트 처리된 DNA를 바로 사용하지 않고, 선형 증폭된 DNA를 사용하였기 때문에 검출률 및 검출 민감도가 탁월하다(도 2, 도 4).
- [49] 본 발명에서는 메틸화된 타겟 DNA만을 일방으로 선형 증폭하며, 이를 통해 풍부화 (enrichment)가 일어난다. 하나의 실시예에서, 타겟 특이적 서열의 5'말단에 유니버설 프라이머가 결합된 구조를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 사용하고, 단일방향 PCR (unidirectional PCR)을 통해 메틸화된 타겟 DNA를 풍부화하기 위한 선형 증폭을 수행할 수

있다.

- [50] 상기 선형 증폭은 이중가닥의 변형(denaturation), 프라이머와 어닐링 및 핵산 합성을 포함하는 증폭 사이클의 수에 대하여 증폭 산물이 선형적으로 생산됨을 의미하고, 증폭 사이클 수에 대하여 증폭 산물을 대수적 (exponential)으로 생산하는 연쇄 반응 (PCR)과 구별된다.
- [51] 본 발명은 다음으로, (d) 상기 (c) 단계에서 선형 증폭된 DNA에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 및 유니버설 프라이머를 사용하여 타겟 DNA를 증폭하는 단계를 포함한다.
- [52] 경우에 따라서, 상기 (d) 단계에서 자가 리포팅 (self-reporting) 기능을 가지거나 또는 에너지 전이 표지된 프라이머 (energy transfer labeled primer)를 사용하여 타겟 DNA의 메틸화를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [53] 본 명세서에서 사용된 용어 “자가 리포팅”은 종종 “에너지 전이 표지 (energy transfer label)”로도 명명되며, 본 명세서에서 혼용하여 사용될 수 있다. 본 명세서에서 자가 리포팅 (self-reporting) 기능을 지닌 유니버설 프라이머는 에너지 전이 표지 프라이머 (energy transfer labeled primer)와 혼용될 수 있다.
- [54] 자가 리포팅 (self-reporting) 기능 또는 에너지 전이 표지 기능은 증폭이 일어나지 않는 단계에서는 자가 퀀칭 (self-quenching)에 의해 형광을 발하지 않지만 증폭이 일어나면 퀀칭이 해제되어 형광을 발하는 자가 퀀칭 또는 자가 프로빙 (self-probing)할 수 있도록 하는 것을 의미한다 (Nazarenko IA *et al.*, Nucleic Acid Res, 1997, 25(12):2516-2521; Whitcombe D *et al.*, Nat Biotechnol, 1999, 17(8):804-807; Myakishev MV *et al.*, Genome Res, 2001, 11:163-169; Nazarenko IA *et al.*, Nucleic Acid Res, 2002, 30(9):2089-2195; Bengra C *et al.*, Clin Chem, 2002, 48(12):2131-2140; Murray JL *et al.*, J Mol Diag, 2014, 16(6):627-638; Gao L *et al.*, Mol Cell Probes, 2015, 29(6):438-441). 자가 리포팅 기능을 가지는 물질 또는 에너지 전이 표지 기능을 가지는 물질로는 택맨 (TaqMan) 프로브, 플루오로포어 (fluorophore) 또는 분자 비콘 (Molecular beacon) 등이 해당될 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다.
- [55] 하나의 실시예에서, 상기 선형 증폭된 DNA에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 (정방향 프라이머)는 단계 (c)에서 제작된 타겟 DNA와 상보적으로 결합하여 증폭할 수 있는 서열로, 예를 들어 하나 이상의 CpG 다이뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [56] 구체적으로, 상기 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어 서열번호 1, 4, 8, 10-13, 15, 16, 18-20, 22-25, 27 및 28로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 서열과 50% 이상의 상동성을 가지는 서열, 예를 들어, 55% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있다.
- [57] 상기 유니버설 프라이머에 대한 설명은 앞서 언급된 단계 (b)에서와 동일하게 적용된다.
- [58] 본 발명은 상기 (d) 단계에서 증폭된 타겟 DNA 서열에 상보적으로 혼성화 할

수 있는 프로브를 이용하여 타겟 DNA의 메틸화를 검출하는 (e) 단계를 포함한다.

- [59] 하나의 실시예에서, 상기 메틸화 검출은 PCR, 메틸화 특이 PCR (methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR (real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 메틸화 DNA 특이적 결합 항체를 이용한 PCR, 정량 PCR, 유전자 칩, 시퀀싱, 시퀀싱 바이 신세스 및 시퀀싱 바이 라이게이션으로 구성된 군에서 선택되는 방법에 의하여 수행될 수 있다.
- [60] (1) 메틸화 특이 PCR (methylation specific PCR): 상기 메틸화 특이 PCR로 검출하는 경우, 바이설파이트를 처리하면 5'-CpG-3' 부위의 시토신이 메틸화된 경우에는 그대로 시토신으로 남아 있고, 비메틸화된 경우에는 우라실로 변하게 된다. 따라서, 바이설파이트 처리 후 변환된 염기서열을 대상으로 5'-CpG-3' 염기서열이 존재하는 부위에 해당하는 프라이머를 제작할 수 있다. 프라이머를 이용하여 PCR을 하면 메틸화된 경우에는 메틸화된 염기서열에 해당되는 프라이머를 사용한 것에서 PCR 산물이 만들어지게 되고, 아가로즈 겔 전기영동방법으로 메틸화 여부를 확인할 수 있다. 여기서, 상기 메틸화 검출 프로브는 TaqMan, Molecular Beacon, 자가 리포팅 (self-reporting) 기능을 가지거나 또는 에너지 전이 표지 기능을 가지는 프로브일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [61] (2) 실시간 메틸화 특이 PCR (real time methylation specific PCR): 상기 실시간 메틸화 특이 PCR은 메틸화 특이 PCR 방법을 실시간 측정방법으로 전환한 것으로, 지노믹 DNA에 바이설파이트를 처리한 후, 메틸화된 경우에 해당하는 PCR 프라이머를 디자인하고, 이들 프라이머를 이용하여 실시간 PCR을 수행하는 것이다. 이때, 증폭된 염기서열과 상보적인 TaqMan 프로브를 이용하여 검출하는 방법과 Sybergreen을 이용하여 검출하는 두 가지 방법이 있다. 따라서, 실시간 메틸화 특이 PCR은 메틸화된 DNA만을 선택적으로 정량 분석할 수 있다. 이때, *in vitro* 메틸화 DNA 샘플을 이용하여 표준곡선을 작성하고, 표준화를 위하여 염기 서열 내에 5'-CpG-3' 서열이 없는 유전자를 음성 대조군으로 함께 증폭하여 메틸화 정도를 정량 분석할 수 있다.
- [62] (3) 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR 또는 정량 PCR 및 DNA 칩: 상기 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR 또는 DNA 칩 방법은 메틸화 DNA에만 특이적으로 결합하는 단백질을 DNA와 섞어주게 되면, 메틸화 DNA에만 특이적으로 단백질이 결합하기 때문에 메틸화 DNA만을 선택적으로 분리할 수 있다.
- [63] 또한, 정량 PCR 방법으로도 메틸화 여부를 측정할 수 있으며, 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질로 분리한 메틸화 DNA는 형광 염료로 표지하여 상보적인 프로브가 집적된 DNA칩에 하이브리다이제이션시킴으로써 메틸화 여부를 측정할 수 있다.

- [64] (4) 차별적 메틸화의 검출-바이선폴라이트 시퀀싱 방법: 메틸화 CpG를 함유한 핵산을 검출하는 다른 방법은 핵산을 함유한 시료를 비메틸화 시토신을 변형시키는 제제와 접촉시키는 단계 및 CpG-특이적 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 시료의 CpG-함유 핵산을 증폭시키는 단계를 포함한다. 여기서, 상기 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 변형된 메틸화 및 비메틸화 핵산을 구별하여 메틸화 핵산을 검출하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 증폭 단계는 선택적이고, 바람직하지만 필수적인 것은 아니다. 상기 방법은 변형된(예를 들면, 화학적으로 변형된) 메틸화 및 비메틸화 DNA를 구별하는 PCR 반응에 의존하는 것이다.
- [65] (5) 바이선폴라이트 시퀀싱 방법: 메틸화 CpG를 함유한 핵산을 검출하는 다른 방법은 핵산을 함유한 시료를 비메틸화 시토신을 변형시키는 제제와 접촉시키는 단계 및 메틸화-비의존적 (Methylation independent) 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 시료의 CpG-함유 핵산을 증폭시키는 단계를 포함한다. 여기서, 상기 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 변형된 메틸화 및 비메틸화 핵산을 구별하지 않고 핵산을 증폭하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 증폭된 산물을 시퀀싱 프라이머를 이용하여 Sanger 방법으로 시퀀싱하거나 차세대 시퀀싱 (next generation sequencing) 방법으로 메틸화 핵산의 검출을 위한 바이선폴라이트 (bisulfite) 시퀀싱과 관련하여 기재되어 있다.
- [66] (6) 여기서 차세대 시퀀싱 방법은 Sequencing by synthesis와 Sequencing by ligation 방법으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 이 방법의 특징은 bacterial clone을 만드는 대신 단일 DNA 단편을 공간적으로 분리하여 in situ로 증폭하고 (clonal amplification), 시퀀싱을 해낸다는 것이다. 이때, 수십 만개의 단편을 동시에 읽어내기 때문에 매시브 페러럴 시퀀싱(massively parallel sequencing) 방법으로 불리기도 한다.
- [67] 기본적으로는 시퀀싱 바이 신세스(sequencing by synthesis) 방법이며, 모노 혹은 디뉴클레오타이드를 순차적으로 붙여가면서 시그널을 얻는 방법을 사용하는데 파이로시퀀싱, ion torrent, Solexa 방법들이 여기에 해당한다.
- [68] 시퀀싱 바이 신세스에 기반하는 NGS 장비로는 로슈(Roche)사의 454 플랫폼, 일루미나(Illumina)사의 HiSeq 플랫폼, 라이프테크놀로지(Life Technology)사의 Ion PGM 플랫폼, 마지막으로 퍼시픽바이오사이언스(Pacific BioSciences)상의 PacBio 플랫폼이 있다. 454와 Ion PGM은 클로날증폭(clonal amplification)방법으로 emersion PCR을 사용하며, HiSeq은 브릿지 증폭(Bridge amplification)을 사용한다. 시퀀싱 바이 신세스 방법은 한 개의 뉴클레오타이드를 순차적으로 붙여가며 DNA를 합성시켜 나갈 때 발생하는 인산(phosphate), 수소이온, 혹은 미리 붙여 놓은 형광을 검출하여 서열을 읽어 나간다. 서열을 검출하는 방법에 있어, 454는 인산을 이용하는 파이로시퀀싱(pyrosequencing) 방법을 사용하며, Ion PGM은 수소이온 검출을 이용한다. HiSeq과 PacBio는 형광을 검출하여 서열을 해독한다.

- [69] 시퀀싱 바이 라이게이션(Sequencing by ligation)은 DNA ligase를 이용하는 시퀀싱 기술로 DNA 염기서열에 존재하는 특정위치의 뉴클레오티드를 확인하는 기술이다. 대부분의 시퀀싱 기술이 중합효소를 사용하는 것과 달리 중합효소를 사용하지 않으며 DNA ligase가 미스매치 서열을 ligation하지 않는 특징을 이용한다. SOLiD 시스템이 여기에 해당한다. 이 기법에서는 간격을 두면서 두 개씩 염기를 읽는데, 프라이머 리셋(primer reset)을 통해 독립적으로 다섯 번을 반복하기 때문에, 최종적으로는 각 염기를 두 번씩 중복하여 읽어서 정확도를 높인다.
- [70] 시퀀싱 바이 라이게이션(Sequencing by ligation)의 경우, 16개 조합으로 만들어진 디뉴클레오티드 프라이머 세트 중, 해당 염기서열에 대응되는 디뉴클레오티드 프라이머가 순차적으로 라이게이션되며, 이 라이게이션들의 조합을 최종적으로 분석하여 해당 DNA의 염기서열이 완성된다.
- [71] 여기서 차세대 시퀀싱 방법은 시퀀싱 바이 신테시스 (Sequencing by synthesis) 또는 시퀀싱 바이 라이게이션 (Sequencing by ligation) 방법으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 여기서 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질은 MBD2bt에 제한되지 않으며, 항체는 5'-메틸-시토신 (5'-methyl-cytosine) 항체로 이에 제한되지 않는다.
- [72] 본 발명에서 사용되는 프라이머와 관련하여, 상기 단계 (a)에 따라 시약 예를 들어, 바이설파이트를 처리하면 5'-CpG'-3 부위의 시토신이 메틸화된 경우에는 그대로 시토신으로 남아 있고, 비메틸화된 경우에는 우라실로 변하게 된다. 따라서, 시약 예를 들어, 바이설파이트 처리 후 변환된 염기서열을 대상으로 5'-CpG-3' 염기서열이 존재하는 부위에 해당하는 프라이머를 제작할 수 있다.
- [73] 상기 프라이머는 타겟 DNA 중 증폭될 로커스의 각 가닥과 "대체적으로" 상보성을 가지도록 제작될 수 있다. 이는 중합반응을 수행하는 조건에서 프라이머가 대응하는 핵산 가닥과 하이브리다이제이션 되기에 충분한 상보성을 가지는 것을 의미한다.
- [74] 상기 단계 (d)에서 선형 증폭된 DNA에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 및 유니버설 프라이머에 의해 증폭된 산물은 타겟 DNA와 혼성화할 수 있는 프로브를 사용하여 메틸화 여부를 검출하고, 상기 프로브는 타겟 DNA와 혼성화하여 메틸화 검출할 수 있는 것이라면 제한없이 사용 가능하나, 예를 들어 하나 이상의 CpG 다이뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 올리고뉴클레오타이드 또는 유니버설 프라이머에 자가 리포팅 (self-reporting) 기능을 가진 형광물질 또는 에너지 전이 표지 프라이머를 이용하여 검출하는 방법이 있다.
- [75] 구체적으로, 상기 프로브는 예를 들어 서열번호 3, 6, 29, 30, 31-34로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 서열과 50% 이상의 상동성을 가지는 서열 예를 들어, 55% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있다.

- [76] 경우에 따라서, 상기 프로브는 양말단에 리포터(reporter) 또는 소광자(quencher)가 결합되어 있는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 리포터는 FAM(6-carboxyfluorescein), Texas red, HEX(2', 4', 5', 7'-tetrachloro-6-carboxy-4, 7-dichlorofluorescein), JOE, CY3 및 CY5로 구성되는 군에서 선택되는 1개 이상인 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 소광자는 TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), BHQ1, BHQ2 및 Dabcyl으로 구성되는 군에서 선택되는 1개 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [77] 본 발명은 다른 관점에서, 타겟 DNA를 포함하는 샘플에 처리되는 메틸화된 DNA와 비메틸화된 DNA를 서로 다르게 변형시키는 하나 이상의 시약;
- [78] 상기 시약으로 처리된 타겟 DNA 서열에 상보적으로 결합할 수 있는 타겟 특이적 서열 및 타겟 DNA에 혼성화 하지 않는 유니버설 프라이머를 포함하는 올리고뉴클레오타이드; 상기 선형 증폭된 DNA에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 및 유니버설 프라이머; 및 상기 증폭된 타겟 DNA 서열에 상보적으로 혼성화 할 수 있는 프로브를 포함하는 메틸화 DNA 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [79] 본 발명에 따른 조성물은 메틸화된 DNA와 비메틸화된 DNA를 서로 다르게 변형시키는 하나 이상의 시약 처리 및 시약으로 처리된 타겟 DNA를 증폭하는 타겟 DNA 서열에 상보적으로 결합할 수 있는 타겟 특이적 서열 및 타겟 DNA에 혼성화 하지 않는 유니버설 프라이머를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 선형 증폭 및 선형 증폭된 DNA에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드, 유니버설 프라이머 및 프로브를 사용하여 메틸화 DNA를 검출하는 것을 포함하며, 앞서 설명된 구성과 중첩되므로, 이에 대한 설명은 동일하게 적용된다.
- [80] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 조성물을 포함하는 타겟 DNA의 메틸화 검출용 키트에 관한 것이다.
- [81] 하나의 실시예에서, 상기 키트는 샘플을 담는 구획된 캐리어 수단, 시약을 포함하는 용기, 타겟 DNA 5'-CpG-3'를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 용기 및 상기 증폭 산물을 검출하기 위한 프로브를 포함하는 용기를 포함할 수 있다.
- [82] 상기 캐리어 수단은 병, 튜브와 같은 하나 이상의 용기를 함유하기에 적합하고, 각 용기는 본 발명의 방법에 사용되는 독립적 구성요소들을 함유한다. 본 발명의 명세서에서, 당해 분야의 통상의 지식을 가진 자는 용기 중의 필요한 제제를 손쉽게 분배할 수 있다.
- [83]
- [84] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [85]

- [86] 실시예 1: 세포주 유래 메틸화 DNA를 이용한 검출한계 도출
- [87] 인간 대장암 세포주인 HCT116, SW480 및 HT-29 세포주는 한국 세포주 은행(서울, 한국)에서 구입하였고, 10% 우태아혈청 (JBI, Seoul, South Korea), 페니실린 및 스트렙토마이신이 포함된 RPMI 1640 배지(JBI, Seoul, South Korea)와 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다.
- [88] QiaAmp DNA Mini kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 지노믹 DNA를 추출하였고, EZ DNA Methylation-Gold kit(ZYMO Research, Irvine, USA)를 이용하여 소듐 바이설파이트 (sodium bisulfite)를 처리하였다. 요약하자면, 바이설파이트를 65°C에서 2.5시간 동안 처리한 다음, 20분간 상온에 방치하여 술폰화 탈반응 (desulfonation)을 수행한 다음, Zymo-Spin IC 컬럼 (Zymo Research, Irvine, USA)에 결합시킨 뒤, 10 μ l의 증류수로 추출하여 20°C에 보관하였다.
- [89] 본 발명의 방법에 대한 검출한계를 도출하고, LTE 과정을 포함하지 않은 meSDC2-qMSP 분석법과 비교하기 위하여, HCT116 세포주 유래 메틸화 DNA를 200-10pg 단위로 분주한 다음, Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare, Cleveland, USA)를 이용하여 증폭한 비메틸화 인간 백혈구 지노믹 DNA(BioChain Institute Inc., Hayward, CA)로 20ng과 혼합하여 단계적으로 희석하였다.
- [90] 이후, 서열번호 2의 SDC2 특이적 서열과 결합된 서열번호 7의 유니버설 프라이머를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 및 서열번호 5의 COL2A1 특이적 서열과 결합된 서열번호 7의 유니버설 프라이머를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 이용하여 95°C 5분; 95°C 15초, 60°C 1분, 35 사이클로 선형 증폭한 다음, 서열번호 3의 프로브; 서열번호 1의 선형 증폭된 DNA에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드; 서열번호 6의 프로브; 서열번호 4의 선형 증폭된 DNA에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드; 및 서열번호 7의 유니버설 프라이머를 이용하여 95°C 5분; 95°C 15초, 60°C 1분, 40 사이클로 실시간 PCR을 수행하였다 (24회 반복 실험) (표 1 및 도 1). 이후 Ct(cycle threshold) 값을 Rotor Gene Q 소프트웨어로 분석하였다.
- [91]

[92] [표1]

프라이머 및 프로브 서열

번호	설명	서열
서열번호 1	<i>SDC2</i> 에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클 레오타이드	5'-GTAGAAATTAATAAGTGAGAGGGC-3'
서열번호 2	<i>SDC2</i> 특이적 서열	5'- <u>AAAGATTCGGCGACCACCGA</u> <u>ACGACTCAAACTCGAAAACTCG</u> -3'
서열번호 3	<i>SDC2</i> 프로브	5'-FAM-TTCGGGGCGTAGTTGCGGGCGG-3'
서열번호 4	<i>COL2A1</i> 에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클 레오타이드	5'-GTAATGTTAGGAGTATTTTGTGGTA-3'

[93]

서열번호 5	<i>COL2A1</i> 특이적 서열	5'- <u>AAAGATTCGGCGACCACCGA</u> CTAICCCAAAAAACC CAATCCTA-3'
서열번호 6	<i>COL2A1</i> 프로브	5'-Cy5-AGAAGAAGGGAGGGGTGTTAGGAGAGG- 3'
서열번호 7	유니버설 프라이머	5'- <u>AAAGATTCGGCGACCACCGA</u> -3'

[94] 밑줄: CpG 다이뉴클레오타이드. 기울임체: 유니버설 프라이머

[95] I: inosine nucleotide

[96] * 서열번호 2 및 서열번호 5의 서열 각각은 *SDC2* 및 *COL2A1* 타겟 특이적 서열로 서열번호 7의 유니버설 서열을 제외한 나머지 서열에 해당하며, 타겟 특이적 서열 및 타겟 DNA에 혼성화 하지 않는 유니버설 프라이머를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 사용함.

[97]

[98] 그 결과, 기존의 방법은 200pg의 DNA에서는 100% 검출률을 나타내나, 20pg에서는 37.5% 및 10pg에서는 0%의 검출률을 나타내는 반면, 본 발명의 방법은 200pg-20pg 까지는 모두 100%의 검출률을 나타내고, 10pg에서도 33.3%의 검출률을 나타내는 것을 확인하였다(도 2 및 표 2).

[99]

[100] [표2]

기존 방법(qMSP)과 본 발명의 방법(LTE-qMSP) 검출률 비교

DNA 농도 (pg)	LTE-qMSP를		qMSP를	
	이용한 메틸화 DNA 검출수	검출률	이용한 메틸화 DNA 검출수	검출률
10	8 out of 24	33.3	0 out of 24	N.D
20	24 out of 24	100	9 out of 24	37.5
50	24 out of 24	100	19 out of 24	79.2
100	24 out of 24	100	23 out of 24	95.8
200	24 out of 24	100	24 out of 24	100
Negative control	0 out of 24	N.D	0 out of 24	N.D

[101]

[102] 실시예 2: LTE-qMSP와 qMSP 비교

[103] *SDC2* 유전자의 대장암 진단능력을 평가하기 위하여 *SDC2* 유전자의 CpG섬 전체를 대변할 수 있는 18 세트의 메틸화 특이적 검출 프라이머 및 프로브를 설계하고 (표 3), LTE-qMSP를 수행하였다. 이를 위하여 정상인 25명 및 대장암 환자 25명의 대변으로부터 게놈 DNA를 분리 (QIAamp DNA Stool Mini kit, Qiagen)하고 상기 게놈 DNA에 EZ DNA methylation-Gold kit (Zymo Research, USA)를 이용하여 바이설파이트를 처리한 다음, 멸균 증류수 10 μ l로 용출하여 LTE-qMSP (Linear Target Enrichment-Methylation-specific real time PCR)에 사용하였다. 바이설파이트로 처리된 게놈 DNA를 주형으로 하여 표 3에서 설계한 메틸화 타겟 특이적 서열 (R)를 사용하여 한쪽 방향으로 선형 증폭 (LTE)을 수행하였다 (도 3). LTE 반응은 Rotor-Gene Q PCR 장비 (Qiagen)를 사용하여 총 20 μ l PCR 반응 용액 (주형 DNA, 10 μ l; 5X AptaTaq DNA Master (Roche Diagnostics), 4 μ l; *COL2A1* 타겟 특이적 서열, 1 μ l (1 pmole); *SDC2* 타겟

특이적 서열, 1 μl (1 pmole); D.W. 4 μl)을 준비하고 PCR 조건은 95°C, 5분 처리한 후 95°C에서 15초, 60°C에서 1분으로 총 35회 수행하였다.

- [104] qMSP는 Rotor-Gene Q PCR 장비 (Qiagen)를 이용하였다. 총 40 μl PCR 반응 용액 (1차 LTE 산물 20 μl ; 5X AptaTaq DNA Master (Roche Diagnostics) 8 μl ; DNA에 상보적으로 결합할 수 있는 PCR 프라이머 1 μl (10 pmole); *SDC2*에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 1 μl (10 pmole); *COL2A1*에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 1 μl (5 pmole); 유니버설 프라이머 (서열번호 7) 1 μl (10 pmole); *SDC2* TaqMan 프로브, 1 μl (5 pmole); *COL2A1* TaqMan 프로브, 1 μl (2.5 pmole); D.W. 6 μl)을 준비하고 PCR 조건은 95°C, 5분 처리한 후 95°C에서 15초, 적절한 어닐링 온도 (58°C~61°C)에서 1분으로 총 40회 수행하였다. PCR 산물의 증폭여부는 cycle threshold (Ct) 값을 측정하여 확인하였다. 메틸화 및 비메틸화 대조 DNA는 EpiTect PCR 대조 DNA 세트 (Qiagen, cat. no. 59695)를 사용하여 샘플 DNA와 함께 시험하였다. 내부 대조 유전자로는 *COL2A1* 유전자 (Kristensen et al., 2008)를 사용하였다.

[105]

[106] [표3]

SDC2 유전자 LTE-qMSP용 프라이머 및 프로브 서열

Set	프라이머	서열 (5' → 3')	증폭 산물 크기 (bp)	서열 번호
1	F1	AAGAAAAGGATTGAGAAAAC	155	8
	R1	<u>AAAGATTTCGGCGACCACCGACG</u> AAAAAAAA TTCCTACAAAATTACACG		9
	Probe 1	CGTGTAATTTTGTAGGAATTTTTTTCG		29
2	F2	GGTTTGTCTGGTGAGTAGAGTCGGC	124	10
	R1	<u>AAAGATTTCGGCGACCACCGACG</u> AAAAAAAA TTCCTACAAAATTACACG		9
	Probe 1	CGTGTAATTTTGTAGGAATTTTTTTCG		29
3	F3	GTTATAGCGCGGAGTCGCGGC	97	11
	R1	<u>AAAGATTTCGGCGACCACCGACG</u> AAAAAAAA TTCCTACAAAATTACACG		9
	Probe 1	CGTGTAATTTTGTAGGAATTTTTTTCG		29
4	F4	GGTTTTCTGGAGTTGTTAATC	69	12
	R1	<u>AAAGATTTCGGCGACCACCGACG</u> AAAAAAAA TTCCTACAAAATTACACG		9
	Probe 1	CGTGTAATTTTGTAGGAATTTTTTTCG		29

[107]

5	F5	TTATTTGGGAGTTATATTGTC	156	13
	R2	<u>AAAGATT</u> CGGCGACCACCGACGCGCCGCG CCTCCCTCCCCG		14
	Probe 2	CGGGGAGGGAGGCGCGGCGCG		30
6	F6	TTTAGTCGTTTAGGGGAGTTC	126	15
	R2	<u>AAAGATT</u> CGGCGACCACCGACGCGCCGCG CCTCCCTCCCCG		14
	Probe2	CGGGGAGGGAGGCGCGGCGCG		30
7	F7	CGTAGTCGCGGAGTTAGTGGTTTC	152	16
	R3	<u>AAAGATT</u> CGGCGACCACCGACGCTAACTTA AAAAAAAACACTACG		17
	Probe 3	CGTAGTTTTTTTTTAAGTTAGCG		31
8	F8	CGCGTTGTTTTTTAGATATTTTC	121	18
	R3	<u>AAAGATT</u> CGGCGACCACCGACGCTAACTTA AAAAAAAACACTACG		17
	Probe 3	CGTAGTTTTTTTTTAAGTTAGCG		31
9	F9	CGCGCGGATCGCGGTTTTTCGTC	87	19
	R3	<u>AAAGATT</u> CGGCGACCACCGACGCTAACTTA AAAAAAAACACTACG		17
	Probe 3	CGTAGTTTTTTTTTAAGTTAGCG		31

[108]

10	F10	CGGTACGGGAAAGGAGTTCGCG	113	20
	R4	<u>AAAGATTTCGGCGACCACCGA</u> ACGACACGAA ATTAATACTCCG		21
	Probe 4	CGGAGTATTAATTTCTGTGTCG		32
11	F11	GTAGAAATTAATAAGTGAGAGGGC	144	1
	R5	<u>AAAGATTTCGGCGACCACCGA</u> ACGACTCAA ACTCGAAAACTCG		2
	Probe5	CGAGTTTTTCGAGTTTGAGTCGT		33
12	F11	GTAGAAATTAATAAGTGAGAGGGC	144	1
	R5	<u>AAAGATTTCGGCGACCACCGA</u> ACGACTCAA ACTCGAAAACTCG		2
	Probe 5-1	TTCGGGGCGTAGTTGCGGGCGG		3
13	F12	TCGCGTTTTTCGGGGCGTAGTTGC	119	22
	R5	<u>AAAGATTTCGGCGACCACCGA</u> ACGACTCAA ACTCGAAAACTCG		2
	Probe5	CGAGTTTTTCGAGTTTGAGTCGT		33
14	F13	CGGCGGGAGTAGGCGTAGGAGGAGGAA GC	93	23
	R5	<u>AAAGATTTCGGCGACCACCGA</u> ACGACTCAA ACTCGAAAACTCG		2
	Probe 5	CGAGTTTTTCGAGTTTGAGTCGT		33

[109]

14	F13	CGGCGGGAGTAGGCGTAGGAGGAGGAA GC	93	23
	R5	<u>AAAGATTTCGGCGACCACCGAACGACTCAA</u> ACTCGAAAACTCG		2
	Probe 5	CGAGTTTTTCGAGTTTGAGTCGT		33
15	F14	AGGAAGCGAGCGTTTTTCGAGTTTC	71	24
	R5	<u>AAAGATTTCGGCGACCACCGAACGACTCAA</u> ACTCGAAAACTCG		2
	Probe 5	CGAGTTTTTCGAGTTTGAGTCGT		33
16	F15	AATCGTTGCGGTATTTTGTTC	133	25
	R6	<u>AAAGATTTCGGCGACCACCGACCAAAAACC</u> GACTACTCCCAACCG		26
	Probe 6	CGGTTGGGAGTAGTCGGTTTTTGG		34
17	F16	GATTCGTGTGCGCGGGTTGC	110	27
	R6	<u>AAAGATTTCGGCGACCACCGACCAAAAACC</u> GACTACTCCCAACCG		26
	Probe 6	CGGTTGGGAGTAGTCGGTTTTTGG		34
18	F17	CGAGCGTTGGGTAGGAGGTTTC	88	28
	R6	<u>AAAGATTTCGGCGACCACCGACCAAAAACC</u> GACTACTCCCAACCG		26
	Probe 6	CGGTTGGGAGTAGTCGGTTTTTGG		34

[110] * 기울임체: 유니버설 서열 (서열번호 7)

[111] * R1 내지 R6의 서열은 타겟 특이적 서열로 서열번호 7의 유니버설 서열을 제외한 나머지 서열에 해당함.

[112] * F1 내지 F17은 선형 증폭된 타겟 DNA에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드에 해당함

[113]

[114] A. 세트 6에 대한 LTE-qMSP와 qMSP 비교 결과

[115] 실시예 1에 기술된 방법으로 세트 6의 LTE-qMSP 방법과 qMSP 방법의 검출 민감도를 비교하였다. 그 결과, 기존의 방법은 200pg의 DNA에서는 100% 검출률을 나타내나, 20pg에서는 37.5% 및 10pg에서는 0%의 검출률을 나타내는 반면, 본 발명의 방법은 200pg-20pg 까지는 모두 100%의 검출률을 나타내고, 10pg에서도 33.3%의 검출률을 나타내는 것을 확인하였다 (도 4a 및 표 4).

[116]

[117] [표4]

기존 방법(qMSP)과 본 발명의 방법(LTE-qMSP) 검출률 비교

DNA 농도 (pg)	LTE-qMSP를 이용한 메틸화 DNA 검출수		qMSP를 이용한 메틸화 DNA 검출수	
	검출률		검출률	
10	8 out of 24	33.3	0 out of 24	N.D
20	24 out of 24	100	9 out of 24	37.5
50	24 out of 24	100	19 out of 24	79.2
100	24 out of 24	100	23 out of 24	95.8
200	24 out of 24	100	24 out of 24	100
Negative control	0 out of 24	N.D	0 out of 24	N.D

[118]

[119] B. 세트 17 LTE-qMSP와 qMSP 비교 결과

[120] 실시예 1에 기술된 방법으로 세트 17의 LTE-qMSP 방법과 qMSP 방법의 검출민감도를 비교하였다. 그 결과, qMSP 방법은 200pg의 DNA에서는 100% 검출률을 나타내나, 20pg에서는 45.0% 및 10pg에서는 0%의 검출률을 나타내는 반면, 본 발명의 방법은 200pg-100pg까지는 모두 100%의 검출률을 나타내고, 20pg에서 91.7% 그리고 10pg에서도 29.2%의 검출률을 나타내는 것을 확인하였다(도 4b 및 표 5).

[121]

[122] [표5]

기존 방법(qMSP)과 본 발명의 방법(LTE-qMSP) 검출률 비교

DNA 농도 (pg)	LTE-qMSP를 이용한 메틸화 DNA 검출수		qMSP를 이용한 메틸화 DNA 검출수	
	검출률		검출률	
10	7 out of 24	29.2	0 out of 24	N.D
20	22 out of 24	91.7	11 out of 24	45.0
50	23 out of 24	95.8	18 out of 24	75.0
100	24 out of 24	100	23 out of 24	95.8
200	24 out of 24	100	24 out of 24	100
Negative control	0 out of 24	N.D	0 out of 24	N.D

- [123]
- [124] 실시예 3: 대변에서 LTE-qMSP를 이용한 *SDC2* 유전자 대장암 진단능력 평가
- [125] 실시예 2 표 3의 각 샘플의 메틸화 정도는 Ct 값으로 측정하였으며, ROC curve 분석 (MedCalc 프로그램, 벨기에)을 통하여 각 프라이머 및 프로브 세트의 민감도 및 특이도를 계산하였다 (표 6).
- [126]
- [127] 정상인 및 대장암 환자의 대변 DNA를 이용한 *SDC2* 유전자 메틸화 검증결과, 대장암 진단에 대한 민감도는 76% (19/25) ~ 88.0% (22/25) 그리고 특이도는 88.0% (3/25) ~ 100% (0/25)로 우수함을 확인하였다. 따라서, *SDC2* 유전자 메틸화를 이용하여 대장암 진단의 유용성이 높음을 확인하였다.
- [128]

[129] [표6]

SDC2 유전자의 대장암 진단능력 평가

프라이머 및 프로브 세트	Cut-off (Ct)	P value	민감도 (%), n = 25	특이도 (%), n = 25
1	<32.1	< 0.001	76.0	92.0
2	<32.0	< 0.001	80.0	96.0
3	<32.3	< 0.001	76.0	88.0
4	<32.1	< 0.001	80.0	92.0
5	<32.0	< 0.001	84.0	96.0
6	<32.5	< 0.001	88.0	92.0
7	<32.5	< 0.001	76.0	96.0
8	<32.2	< 0.001	80.0	88.0
9	<32.3	< 0.001	88.0	100
10	<32.5	< 0.001	76.0	92.0
11	<32.0	< 0.001	80.0	100
12	<32.0	< 0.001	88.0	92.0
13	<32.1	< 0.001	88.0	88.0
14	<32.0	< 0.001	84.0	92.0
15	<32.2	< 0.001	80.0	96.0
16	<32.3	< 0.001	76.0	100
17	<32.5	< 0.001	84.0	100
18	<32.0	< 0.001	88.0	96.0

[130]

[131] LTE-qMSP 방법의 메틸화 다중 검출 능력을 재확인하기 위하여 상기 Set 1과 Set 12를 조합하여 하나의 튜브에서 대변 DNA를 이용한 대장암 진단능력을 평가하였다.

[132]

[133] [표7]

Set 1과 set 12를 조합한 경우의 대장암 진단능력 평가

프라이머 및 프로브 세트	Cut-off (Ct)	P value	민감도 (%), n = 25	특이도 (%), n = 25
1 + 12	<32.2	< 0.001	88.0	92.0

[134]

[135] Set 1과 Set 12를 조합하여 임상 검증을 수행한 결과, 민감도는 88% 그리고 특이도는 92%로 매우 우수하였다. 따라서 하나의 튜브에서 여러 개의 메틸화 표적을 동시에 증폭하는 LTE-qMSP 방법을 이용한 메틸화 검출이 가능함을 재확인 하였다.

[136]

산업상 이용가능성

[137] 본 발명에 따른 메틸화 DNA를 검출하는 방법은 유니버설 프라이머를 사용하기 때문에, 샘플에 포함된 다양한 종류의 유전자에도 불구하고, 하나의 프라이머만을 추가로 사용하더라도 다중 타겟 DNA의 효율적 증폭이 가능하다. 또한, 선형 증폭에 의해 메틸화 검출시 사용되는 PCR (실시간 PCR)에서 복잡성이 감소하고, PCR 효율의 편차를 줄일 수 있으므로, 검출 민감도가 탁월하여 유용하다. 또한, 타겟 DNA를 선형 증폭하는 단계 (LTE 단계)에서 메틸화된 타겟 DNA를 보다 높은 특이도로 풍부화 (enrichment)할 수 있는 장점이 있다.

[138]

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

[140]

서열목록 Free Text

[141] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

- [청구항 1] 다음의 단계를 포함하는 DNA 메틸화 상태를 검출하는 방법:
 (a) 메틸화된 DNA 부위와 비메틸화된 DNA 부위를 서로 다르게 변형시키는 하나 이상의 시약으로 타겟 DNA가 포함되어 있는 샘플을 처리하는 단계;
 (b) 상기 시약으로 처리된 타겟 DNA 서열에 상보적으로 결합할 수 있도록 디자인된 타겟 특이적 서열 및 타겟 DNA에 상보적으로 결합하지 않는 유니버설 프라이머를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 제작하는 단계;
 (c) 상기 (b) 단계에서 제작된 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 사용하여 상기 (a) 단계에서 시약으로 처리된 타겟 DNA를 주형으로 하여 한쪽 방향으로 (asymmetric) 선형 증폭하는 단계;
 (d) 상기 (c) 단계에서 선형 증폭된 DNA에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 및 유니버설 프라이머를 사용하여 타겟 DNA를 증폭하는 단계; 및
 (e) 상기 (d) 단계에서 증폭된 타겟 DNA 서열에 상보적으로 혼성화 할 수 있는 프로브를 이용하여 타겟 DNA의 메틸화를 검출하는 단계.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 시약은 바이설파이트, 하이드로젠 설파이트, 다이설파이트 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 시약 처리에 의해 적어도 하나의 사이토신 염기가 우라실 또는 사이토신과 상이한 염기로 변환되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 단일 반응기 내 샘플 중 복수의 타겟 DNA의 메틸화를 검출하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 유니버설 프라이머는 서열번호 7, 35 내지 41로 구성된 군에서 선택된 염기서열로 표시되는 하나 이상의 서열과 50% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 타겟 특이적 서열은 타겟 DNA의 메틸화 부위 및/또는 비메틸화 부위에 상보적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 타겟 특이적 서열은 하나 이상의 CpG 다이뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 타겟 특이적 서열은 서열번호 2, 5, 9, 14, 17, 21 및 26으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 서열과 50% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 메틸화 검출은 PCR, 메틸화 특이 PCR (methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR (real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 메틸화 DNA 특이적

- 결합 항체를 이용한 PCR, 정량 PCR, 유전자 칩, 시퀀싱, 시퀀싱 바이 신세스 및 시퀀싱 바이 라이게이션으로 구성된 군에서 선택되는 방법에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 단계 (d)의 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 CpG 다이뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 단계 (d)의 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 1, 4, 8, 10-13, 15, 16, 18-20, 22-25, 27 및 28로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 서열과 50% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 단계 (e)의 프로브는 하나 이상의 CpG 다이뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 단계 (e)의 프로브는 서열번호 3, 6, 29, 30, 31-34로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 서열과 50% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 14] 제1항에 있어서, 상기 단계 (e)의 프로브는 리포터(reporter) 또는 소광자(quencher)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 15] 제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 및 유니버설 프라이머는 자가 리포팅 (self reporting) 기능을 가지거나, 에너지 전이 표지된 (energy transfer label) 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 16] 제14항에 있어서,
상기 리포터는 FAM(6-carboxyfluorescein), Texas red, HEX(2',4',5',7',-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), JOE, CY3 및 CY5로 구성되는 군에서 선택되는 1개 이상인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 17] 제14항에 있어서,
상기 소광자는 TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), BHQ1, BHQ2 및 Dabcyl로 구성되는 군에서 선택되는 1개 이상인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 18] 제1항에 있어서, 상기 타겟 유전자는 SDC2인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 19] 타겟 DNA를 포함하는 샘플에 처리되는 메틸화된 DNA와 비메틸화된 DNA를 서로 다르게 변형시키는 하나 이상의 시약;
상기 시약으로 처리된 타겟 DNA 서열에 상보적으로 결합할 수 있는 타겟 특이적 서열 및 타겟 DNA에 혼성화 하지 않는 유니버설 프라이머를 포함하는 올리고뉴클레오타이드;
선형 증폭된 DNA에 상보적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 및 유니버설 프라이머; 및
증폭된 타겟 DNA 서열에 상보적으로 혼성화 할 수 있는 프로브를 포함하는 메틸화 DNA 검출용 조성물.
- [청구항 20] 제19항에 있어서, 상기 시약은 바이설파이트, 하이드로젠 설파이트,

- 다이설파이트 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 21] 제19항에 있어서, 단일 반응기 내 샘플 중 복수의 타겟 DNA의 메틸화를 검출하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 22] 제19항에 있어서, 상기 유니버설 프라이머는 서열번호 7, 35 내지 41로 구성된 군에서 선택된 염기서열로 표시되는 하나 이상의 서열과 50% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 23] 제19항에 있어서, 상기 타겟 특이적 서열은 타겟 DNA의 메틸화 부위 및/또는 비메틸화 부위에 상보적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 24] 제19항에 있어서, 상기 타겟 특이적 서열은 하나 이상의 CpG 다이뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 25] 제19항에 있어서, 상기 타겟 특이적 서열은 서열번호 2, 5, 9, 14, 17, 21 및 26로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 서열과 50% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 26] 제19항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 CpG 다이뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 27] 제19항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 1, 4, 8, 10-13, 15, 16, 18-20, 22-25, 27 및 28로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 서열과 50% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 28] 제19항에 있어서, 상기 프로브는 하나 이상의 CpG 다이뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 29] 제19항에 있어서, 상기 프로브는 서열번호 3, 6, 29, 30, 31-34로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 서열과 50% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 30] 제19항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 메틸화 DNA 검출용 키트.