



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년10월17일
(11) 등록번호 10-1192561
(24) 등록일자 2012년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7014993(분할)
(22) 출원일자(국제) 2006년12월08일
 심사청구일자 2011년12월08일
(85) 번역문제출일자 2011년06월29일
(65) 공개번호 10-2011-0093917
(43) 공개일자 2011년08월18일
(62) 원출원 특허 10-2008-7013741
 원출원일자(국제) 2006년12월08일
 심사청구일자 2008년06월05일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2006/325010
(87) 국제공개번호 WO 2007/066831
 국제공개일자 2007년06월14일
(30) 우선권주장
 JP-P-2005-354826 2005년12월08일 일본(JP)
 (뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
 J. Virol. Methods, Vol. 123, No. 1, pp. 81-87
 (2004. 10. 28.)

전체 청구항 수 : 총 18 항

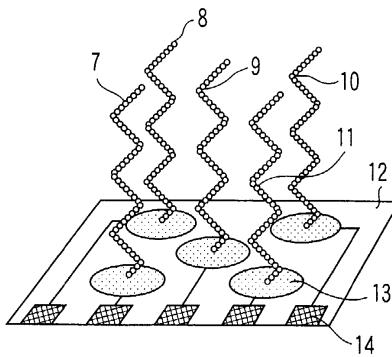
심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 **핵산 증폭법을 이용한 인간 유두종 바이러스의 검출 방법 및 핵산쇄 고정화 담체**

(57) 요약

본 발명은 인간 유두종 바이러스의 검출 및 유전자형의 분류에 사용되는 LAMP 증폭용 핵산 프라이머를 제공한다. 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 프라이머로부터 선택되는 1종 이상의 프라이머를 포함하는 복수의 프라이머를 이용하여, LAMP 반응에 의해 검체 시료 중의 핵산쇄를 증폭시키는 공정과, 상기 증폭 반응 후에 증폭 산물의 존재를 검출하고 유전자형을 분류하는 공정을 포함하는, 인간 유두종 바이러스의 검출 및 유전자형의 분류 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도6



(72) 발명자

나까무라, 나오코

일본 105-8001 도쿄도 미나토구 시바우라 1 쪽메 1
방 1 고 가부시끼가이샤 도시바 지적재산권 부서 내

호리우찌, 히데끼

일본 105-8001 도쿄도 미나토구 시바우라 1 쪽메 1
방 1 고 가부시끼가이샤 도시바 지적재산권 부서 내

하시모토, 미찌에

일본 105-8001 도쿄도 미나토구 시바우라 1 쪽메 1
방 1 고 가부시끼가이샤 도시바 지적재산권 부서 내

사또, 오사무

일본 103-0027 도쿄도 츠오쿠 니혼바시 3쵸메 13-5
세키스이메디칼 가부시키가이샤 내

(30) 우선권주장

JP-P-2006-187871 2006년07월07일 일본(JP)

PCT/JP06/323261 2006년11월15일 세계지적재산권
기구(WIPO)(WO)

특허청구의 범위

청구항 1

서열 번호 164, 167, 162, 166 및 170의 서열로 각각 이루어진 5종의 핵산 프라이머로 이루어진 세트인, 인간 유두종 바이러스의 유전자형 검출에 사용되는 LAMP 증폭용 핵산 프라이머의 세트.

청구항 2

(i) 제1항에 따른 핵산 프라이머의 세트, 및

(ii) 서열 번호 278, 276, 277, 281 및 280의 서열로 각각 이루어진 5종의 핵산 프라이머로 이루어진 세트 2,

서열 번호 527, 524, 526, 523 및 529의 서열로 각각 이루어진 5종의 핵산 프라이머로 이루어진 세트 3,

서열 번호 320, 327, 319, 324 및 328의 서열로 각각 이루어진 5종의 핵산 프라이머로 이루어진 세트 5,

서열 번호 454, 457, 453, 456 및 458의 서열로 각각 이루어진 5종의 핵산 프라이머로 이루어진 세트 6,

서열 번호 363, 359, 366, 361 및 370의 서열로 각각 이루어진 5종의 핵산 프라이머로 이루어진 세트 7,

서열 번호 399, 391, 395, 388 및 402의 서열로 각각 이루어진 5종의 핵산 프라이머로 이루어진 세트 8,

서열 번호 474, 476, 477, 475 및 480의 서열로 각각 이루어진 5종의 핵산 프라이머로 이루어진 세트 9,

서열 번호 549, 547, 548, 546 및 572의 서열로 각각 이루어진 5종의 핵산 프라이머로 이루어진 세트 10,

서열 번호 208, 203, 210, 205 및 214의 서열로 각각 이루어진 5종의 핵산 프라이머로 이루어진 세트 11,

서열 번호 251, 244, 248, 242 및 255의 서열로 각각 이루어진 5종의 핵산 프라이머로 이루어진 세트 12, 및

서열 번호 422, 425, 420, 429 및 431의 서열로 각각 이루어진 5종의 핵산 프라이머로 이루어진 세트 13으로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상의 세트를 포함하는,

인간 유두종 바이러스의 유전자형 검출에 사용되는 LAMP 멀티 증폭용 프라이머 세트의 혼합물.

청구항 3

제1항에 따른 핵산 프라이머의 세트 및 서열 번호 623의 서열로 이루어진 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 4를 포함하는, 인간 유두종 바이러스의 유전자형 검출에 사용되는 검출 키트.

청구항 4

제3항에 있어서,

서열 번호 136, 132, 126, 128 및 138의 서열로 각각 이루어진 5종의 핵산 프라이머로 이루어진 세트 1, 및 서열 번호 600 및 597의 서열로 각각 이루어진 1종 이상의 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 1;

제2항에 따른 세트 2 및 서열 번호 654의 서열로 이루어진 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 2;

제2항에 따른 세트 3 및 서열 번호 771 및 768의 서열로 각각 이루어진 1종 이상의 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 3;

제2항에 따른 세트 5 및 서열 번호 673 및 667의 서열로 각각 이루어진 1종 이상의 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 5;

제2항에 따른 세트 6 및 서열 번호 750 및 741의 서열로 각각 이루어진 1종 이상의 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 6;

제2항에 따른 세트 7 및 서열 번호 676의 서열로 이루어진 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 7;

제2항에 따른 세트 8 및 서열 번호 699 및 684의 서열로 각각 이루어진 1종 이상의 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 8;

제2항에 따른 세트 9 및 서열 번호 752의 서열로 이루어진 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 9;
 제2항에 따른 세트 10 및 서열 번호 783의 서열로 이루어진 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 10;
 제2항에 따른 세트 11 및 서열 번호 630의 서열로 이루어진 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 11;
 제2항에 따른 세트 12 및 서열 번호 641의 서열로 이루어진 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 12;
 및

제2항에 따른 세트 13 및 서열 번호 725 및 713의 서열로 각각 이루어진 1종 이상의 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 13

으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 프라이머-프로브 세트를 추가로 포함하는 검출 키트.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 핵산 프로브가 지지체 표면에 고정화된 것인 키트.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 지지체 표면이 전극인 키트.

청구항 7

핵산 프라이머를 사용하여, 시료 중의 핵산체의 LAMP 증폭에 의한 증폭 산물을 얻는 공정;

상기 증폭 산물을 핵산 프로브와 혼성화시키는 공정; 및

상기 혼성화에 의하여 형성된 이중체를 검출하여 유전자형을 분류하는 공정을 포함하며,

상기 핵산 프라이머 및 상기 핵산 프로브는

제1항에 따른 핵산 프라이머의 세트 및 서열 번호 623의 서열로 이루어진 1종 이상의 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 4를 포함하는 것인,

인간 유두종 바이러스의 유전자형 검출 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 핵산 프라이머 및 상기 핵산 프로브는

(i) 제7항에 따른 프라이머-프로브 세트 4, 및

(ii)

서열 번호 136, 132, 126, 128 및 138의 서열로 각각 이루어진 5종의 핵산 프라이머로 이루어진 세트 1, 및 서열 번호 600 및 597의 서열로 각각 이루어진 1종 이상의 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 1;

제2항에 따른 세트 2 및 서열 번호 654의 서열로 이루어진 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 2;

제2항에 따른 세트 3 및 서열 번호 771 및 768의 서열로 각각 이루어진 1종 이상의 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 3;

제2항에 따른 세트 5 및 서열 번호 673 및 667의 서열로 각각 이루어진 1종 이상의 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 5;

제2항에 따른 세트 6 및 서열 번호 750 및 741의 서열로 각각 이루어진 1종 이상의 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 6;

제2항에 따른 세트 7 및 서열 번호 676의 서열로 이루어진 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 7;

제2항에 따른 세트 8 및 서열 번호 699 및 684의 서열로 각각 이루어진 1종 이상의 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 8;

제2항에 따른 세트 9 및 서열 번호 752의 서열로 이루어진 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 9;

제2항에 따른 세트 10 및 서열 번호 783의 서열로 이루어진 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 10;
 제2항에 따른 세트 11 및 서열 번호 630의 서열로 이루어진 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 11;
 제2항에 따른 세트 12 및 서열 번호 641의 서열로 이루어진 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 12;
 및
 제2항에 따른 세트 13 및 서열 번호 725 및 713의 서열로 각각 이루어진 1종 이상의 핵산 프로브로 이루어진 프라이머-프로브 세트 13

으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 프라이머-프로브 세트를 포함하는 것인, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 핵산 프로브가 지지체 표면에 고정화된 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 지지체 표면이 전극 재료로 구성된 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 이중쇄 검출 공정에서 전기화학적으로 활성인 핵산쇄 인식체를 사용하는 방법.

청구항 12

제2항에 따른 프라이머 세트의 혼합물 및 DNA 칩을 포함하는 것을 특징을 하며,

상기 DNA 칩은

서열 번호 600 및 597 중 하나;

서열 번호 654;

서열 번호 771 및 768 중 하나;

서열 번호 623;

서열 번호 673 및 667 중 하나;

서열 번호 750 및 741 중 하나;

서열 번호 676;

서열 번호 699 및 684 중 하나;

서열 번호 752;

서열 번호 783;

서열 번호 630;

서열 번호 641; 및

서열 번호 725 및 713 중 하나

의 서열로 각각 이루어진 핵산 프로브를 포함하며, 상기 핵산 프로브는 지지체 표면에 고정화된 것인,
 인간 유두종 바이러스의 유전자형 검출에 사용되는 검출 키트.

청구항 13

제2항에 따른 프라이머 세트의 혼합물 및 DNA 칩을 포함하는 것을 특징을 하며,

상기 DNA 칩은

서열 번호 654;

서열 번호 771 및 768 중 하나;

서열 번호 623;

서열 번호 673 및 667 중 하나;

서열 번호 750 및 741 중 하나;

서열 번호 676;

서열 번호 699 및 684 중 하나;

서열 번호 752;

서열 번호 783;

서열 번호 630;

서열 번호 641; 및

서열 번호 725 및 713 중 하나

의 서열로 각각 이루어진 핵산 프로브를 포함하며, 상기 핵산 프로브는 지지체 표면에 고정화된 것인,
인간 유두종 바이러스의 유전자형 검출에 사용되는 검출 키트.

청구항 14

제4항에 있어서, 상기 핵산 프로브가 지지체 표면에 고정화된 것인 키트.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 지지체 표면이 전극인 키트.

청구항 16

제8항에 있어서, 상기 핵산 프로브가 지지체 표면에 고정화된 것인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 지지체 표면이 전극 재료로 구성된 것인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 이중쇄 검출 공정에서 전기화학적으로 활성인 핵산쇄 인식체를 사용하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 인간 유두종 바이러스의 검출 및 유전자형을 분류하기 위한 핵산 프라이머 서열, 키트 및 핵산쇄 고정화 담체, 및 핵산 증폭법을 이용한 인간 유두종 바이러스의 검출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

1980년대, 자궁경부암의 원인으로서 인간 유두종 바이러스(HPV)의 감염이 보고되었고, 특히 악성도와 HPV의 유전자형의 관계가 주목받고 있다. HPV는 자궁경부암 이외에도, 성기나 구강점막 등에 생기는 암의 원인이라고도 생각되고 있고, 신속하고 정확한 HPV의 검출이 요구되어 왔다. 지금까지, DNA/RNA 인식 항체를 사용하여 악성 또는 양성의 유전자형을 검출하는 방법이나, 유전자형에 특징적인 서열을 포함하는 영역을 중합효소 연쇄 반응(PCR)으로 증폭한 뒤 마지막으로 유전자형 특이적인 프로브로 분류하는 방법이 알려져 있었다. 그러나, 전자의 방법으로는 유전자형을 특정할 수 없기 때문에, 현재 개발이 진행되어 있는 백신 투여를 위한 검사에는 대응할 수 없다. 또한, 후자의 PCR법을 이용하는 방법은, 핵산 추출 등의 전처리가 번잡하고, 씨밀 사이클러와 같은 복잡한 온도 제어 장치가 필요한 것, 반응 시간이 2시간 이상 걸리는 점 등의 불리점이 있다. 또한 PCR법으로서는, 만일 잘못 상보쇄 합성이 행하여진 경우에는 그 생성물이 주형으로서 증폭되어, 잘못된 판정을 하게 될

가능성이 있다. 실제로, 프라이머의 말단의 1염기 차이만으로는 특이적인 증폭을 제어하기 어렵다.

[0003] DNA 칩에 의해 검출하는 경우, PCR법으로 증폭한 목적 유전자 산물은 일반적으로 이중쇄이다. 따라서, 프로브와 혼성화 반응시키는 경우에, 상보쇄가 프로브에 대한 경쟁자가 되어 혼성 효율 및 검출 감도를 저하시키는 문제점이 발생하였다. 따라서, 표적 유전자 산물을 단일쇄로 만들기 위해 상보쇄를 분해하거나 또는 분리하는 방법이 취해지고 있다. 그러나, 이를 방법은 효소 및 자기 비드의 사용 등에 의한 고가격화와 조작에 있어서의 번잡성이 과제로서 남겨져 있고, 이러한 종래 방법을 대체할 새로운 수법이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 간편하고 신속한 핵산 검출을 가능하게 하는 LAMP법의 원리를 응용하여, LAMP 증폭 산물 내에 존재하는 HPV 핵산 서열을 검출하기 위한 핵산 프라이머, 및 상기 핵산 프라이머를 이용한 HPV 검출 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명에서는 HPV의 유전자형을 특정하기 위해, PCR법과는 상이한 방법인 LAMP법을 채용하였다. 따라서, 유전자형을 용이하게 특정할 수 있다. 그러나, LAMP 산물의 복잡한 고차 구조가, 혼성화 시에 프로브가 결합한 지지체와 물리적인 장해를 일으키고, 그 결과 혼성화 효율의 약화로 이어진다 (예를 들면, 일본 특허 공개 제2005-095043호 참조). 따라서, 본 발명에서 프로브는 종래와는 달리, LAMP 산물의 단일쇄인 루프 부분에 인간 유두종 바이러스 유래의 표적 서열이 위치하도록 설계된다.

[0006] 본 발명의 한 국면에 따르면, 이하의 (a) 내지 (f)에서 선택되는, 인간 유두종 바이러스의 검출 및 유전자형의 분류에 사용되는 LAMP 증폭용 핵산 프라이머가 제공된다: (a) 표 1에 기재된 제1 서열군에서 선택되는 서열과 상보적인 서열, 및 표 2에 기재된 제2 서열군에서 선택되는 서열을 동일쇄 상에 포함하는 핵산 프라이머; (b) 제1 서열군에서 선택되는 서열과 상보적인 서열, 및 표 3에 기재된 제3 서열군에서 선택되는 서열을 동일쇄 상에 포함하는 핵산 프라이머; (c) 제2 서열군에서 선택되는 서열과 상보적인 서열, 및 제3 서열군에서 선택되는 서열을 동일쇄 상에 포함하는 핵산 프라이머; (d) 핵산 프라이머 (a), (b) 및 (c) 중 선택된 하나의 서열과, 하나 이상의 염기의 삽입, 결실 또는 치환으로 인하여 서로 다른 서열을 포함하고, 핵산 프라이머 (a), (b) 및 (c) 중 선택된 하나의 상기 서열에 상보적인 서열을 갖는 핵산쇄와 혼성화할 수 있는 핵산 프라이머; (e) 표 4에 기재된 제4 서열군에서 선택되는 서열 또는 그것에 상보적인 서열을 포함하는 핵산 프라이머; 및 (f) 핵산 프라이머 (e)의 선택된 서열과, 하나 이상의 염기의 삽입, 결실 또는 치환으로 인하여 서로 다른 서열을 포함하고, 핵산 프라이머 (e)의 상기 선택된 서열에 상보적인 서열을 갖는 핵산쇄와 혼성화할 수 있는 핵산 프라이머.

[0007] 본 발명의 다른 국면에 따르면, 상기 기재의 핵산 프라이머 중에서 선택되는 1종 이상의 프라이머를 포함하는 복수의 프라이머를 사용하여, LAMP 반응에 의해 검체 시료 중의 핵산쇄를 증폭시키는 공정, 및 상기 증폭 반응 후에 증폭 산물의 유무를 검출하고 유전자형을 분류하는 공정을 포함하는, 인간 유두종 바이러스의 검출 및 유전자형의 분류 방법이 제공된다.

[0008] 본 발명의 또 다른 국면에 따르면, 고정화된 인간 유두종 바이러스 특이적 또는 유전자형 특이적인 핵산쇄를 가지는, 인간 유두종 바이러스의 LAMP 증폭 산물을 검출하기 위한 핵산쇄 고정화 지지체가 제공된다. 바람직하게, 고정화된 핵산쇄는 (g) 표 5에 기재된 제5 서열군에서 선택되는 서열 또는 그것에 상보적인 서열을 포함하는 핵산 프로브; 또는 (h) 핵산 프로브 (g) 중 하나의 선택된 서열과, 하나 이상의 염기의 삽입, 결실 또는 치환으로 인하여 서로 다른 서열을 포함하고, 핵산 프로브 (g) 중 하나의 상기 선택된 서열에 상보적인 서열을 갖는 핵산쇄와 혼성화할 수 있는 핵산 프로브이다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 종래의 LAMP법에서의 증폭 방법을 나타낸 모식도이다.

도 2는 종래의 LAMP법을 이용하여 얻어지는 증폭 산물을 나타낸 모식도이다.

도 3은 본 발명의 측정용 핵산의 제조를 위한 증폭 방법을 나타낸 모식도이다.

도 4는 본 발명의 측정용 핵산을 나타낸 모식도이다.

도 5는 HPV 유전자형 분류용 DNA 칩의 일례를 도시한 모식도이다.

도 6은 HPV 유전자형 분류용 DNA 칩의 다른 예를 도시한 모식도이다.

도 7은 LAMP 증폭 후 전기 영동 사진의 일례를 나타낸 도면이다.

도 8은 LAMP 증폭 후 전기 영동 사진의 일례를 나타낸 도면이다.

도 9는 전류 검출형 DNA 칩에 의한 검출 결과의 일례를 나타낸 도면이다.

도 10은 LAMP 증폭 후 전기 영동 사진의 일례를 나타낸 도면이다.

도 11은 HPV 서열 및 본 발명의 프라이머 또는 프로브로서 사용할 수 있는 부분을 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010]

<발명을 실시하기 위한 최선의 형태>

[0011]

본 발명에서 이용하는 증폭법 "LAMP법"은 등온 종합효소 연쇄 반응의 일종이고, 4종 또는 6종의 프라이머를 이용한다. LAMP법은 PCR법에 비해 증폭 효율이 우수함과 동시에, 샘플 내의 불순물의 영향도 덜 받는다고 보고되어 있다. 이 때문에, 간단한 샘플의 전처리로 미량의 인간 유두종 바이러스를 검출할 수 있다.

[0012]

LAMP법에 있어서의 프라이머 설계 및 얻어지는 증폭 산물에 관해서, 도 1 및 도 2를 참조하여 설명한다. 도 1은 검출하고자 하는 이중쇄 DNA를 도시한다. 종래, LAMP 증폭 산물에 있어서는, 표적 서열이 증폭 산물의 스템 앤드 루프(stem-and-loop) 구조의 중앙에 위치했다 (도 2). 표적 서열을 증폭?검출하고자 하는 경우에는, 표적 서열의 양측에 위치하는 서열로부터 총 4종의 프라이머 서열(FIP 프라이머, F3 프라이머, BIP 프라이머 및 B3 프라이머)을 결정한다. FIP 프라이머 및 BIP 프라이머는, 각각 두개의 영역 (FIP = F1c + F2, BIP = B2 + B1c)을 포함하고 있다. 이들 프라이머에 이용되는 총 6개의 영역을, 이하에서는 프라이머 영역으로 칭한다. 상기 4종의 프라이머를 이용하여 LAMP 증폭을 행하면, 도 1에 도시된 DNA의 각각의 사슬에 상보적인, 도 2에 도시한 바와 같은 덤벨형의 스템 앤드 루프 구조의 증폭 산물이 얻어진다. 그 증폭 기작에 관해서는 설명을 생략하지만, 예를 들면 일본 특허 공개 제2002-186781호 공보를 참조할 수 있다.

[0013]

한편, 본 발명에서는, 도 2에 도시된 종래의 표적 서열의 위치와는 달리, 단일쇄의 루프 부분에 표적 서열이 위치하도록 프라이머를 설계한다. 도 3에 구체적으로 도시된 바와 같이, 본 발명에서는 표적을 서열 (도 3에서는 FPc, FP, BP 및 BPc 중의 어느 하나)가, 프라이머 영역 F1과 F2의 사이 (F2 영역 포함함), 프라이머 영역 F2 c 와 F1c의 사이 (F2c 영역 포함함), 프라이머 영역 B1과 B2의 사이 (B2 영역 포함함), 및/또는 프라이머 영역 B2c와 B1c의 사이 (B2c 영역 포함함)에 위치하도록 6개의 프라이머 영역을 위치시킨다. 표적 서열은 상기 각각의 영역 사이에 형성되는 단일쇄의 루프 부분의 어느 쪽에 위치하도록 설계되어 있어도 되고, 따라서, 프라이머 영역 F1과 F2의 사이의 루프 부분에는 F2 영역 자체도 포함된다. 이렇게 해서 설정된 6개의 프라이머 영역에 기초하여 4종의 프라이머를 제조하고, 이들 프라이머를 이용하여 LAMP 증폭을 행함으로써 도 4에 도시한 바와 같은 LAMP 증폭 산물의 일부를 얻는다. 이 LAMP 증폭 산물 내에서는, 표적 서열 FPc, FP, BP 및 BPc가 증폭 산물의 덤벨 구조에 있어서의 단일쇄 루프 내에 위치하게 된다. 한편, 프라이머 영역 F1c과 F1, 및 B1c과 B1은 서로 상보적인 서열을 가지기 때문에, 서로 자기 혼성화를 일으켜서 이중쇄를 형성하게 된다. 증폭 산물 내에 포함되는 표적 서열 중 일부는 도 4에 도시한 바와 같은 단일쇄의 상태이다. 이 때문에, 변성 조작을 행하지 않고, 도시한 바와 같이 각 표적 서열에 대하여 상보적인 프로브 핵산(FP, FPc, BP 및 BPc)과의 특이적 혼성화에 의해 검출할 수 있다. 용어 "특이적 혼성화"란, 일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphisms; SNP) 또는 돌연변이에 의해 유발되는 근소한 차이도 검출할 수 있는 것을 의미한다.

[0014]

본 발명은 이러한 프라이머의 구조를 HPV 바이러스에 적용하여 HPV 바이러스의 유전자형을 검출한다.

[0015]

도 11에 도시된 서열은 HPV 바이러스의 서열이다. 도면 내의 서열 번호 1, 2 및 3을 포함하는 영역은, 많은 HPV 바이러스 사이에서 보존되어 있는 것으로 알려져 있다. 반면, 서열 번호 4는 악성 종양과 양성 종양의 사이에 다형성이 존재하는 것이 알려져 있는 영역이다. HPV 바이러스의 유전자형을 검출하기 위해서는, 예를 들면 서열 번호 4에 대응하는 영역의 서열을 표적 서열로 이용하여 다형성을 검출하게 된다. 이 경우, 상기 프라이머 영역 F1과 F2에 대응하는 서열로서, 예를 들면 제1 서열군 (표 1)과 제2 서열군 (표 2)에서 선택되는 서열, 또는 예를 들면 제1 서열군과 제3 서열군 (표 3)에서 선택되는 서열을 사용한다. 여기서, 제1 서열군, 제2 서열군 및 제3 서열군은 이하의 표 1 내지 3에 나타낸 서열군이고, 각각 도 11의 서열 번호 1, 2 및 3의 영역에 대응한다. 이들 영역의 서열은 바이러스형마다 다르기 때문에, 반드시 도 11의 서열과 동일한 것은 아니

다. 또한, 실제의 LAMP 증폭에서는 BIP 프라이머 및 B3 프라이머로 구성되는 프라이머 세트도 필요하게 된다. 도 11에서는 서열 번호 5 및 6의 서열 또는 그의 상보 서열을 사용할 수 있다. 본 발명의 프라이머는 5'→3'의 방향으로, 동일쇄 상에, 제1 서열군에서 선택되는 서열의 상보 서열과 제2 서열군에서 선택되는 서열이 서로 결합된 서열, 또한 제2 서열군에서 선택되는 서열과 제1 서열군에서 선택되는 서열의 상보 서열이 서로 결합된 서열, 제1 서열군에서 선택되는 서열의 상보 서열과 제3 서열군에서 선택되는 서열이 서로 결합된 서열, 제2 서열군에서 선택되는 서열과 제3 서열군에서 선택되는 서열이 서로 결합된 서열, 제3 서열군에서 선택되는 서열과 제2 서열군에서 선택되는 서열의 상보 서열이 서로 결합된 서열, 제4 서열군에서 선택되는 서열, 또는 제4 서열군에서 선택되는 서열의 상보 서열을 이용하는 것이 바람직하다. 상보 서열로서는 염밀히 상보적인 서열뿐만 아니라, 상기 서열군에 대하여 염격한 조건 하에서 혼성화할 수 있는 서열도 포함된다. 이러한 조건 하에서는 통상적으로, 90 내지 95%의 서열 상동성다면 반응의 진행에 충분한 것으로 보인다. 이러한 염격한 조건은 당업자에게 자명할 것이며, 예를 들면 20°C 내지 65°C의 범위의 온도에서 2×SSC 완충액, 0.1% w/v SDS이다. 특히 바람직하게는 65°C 이상의 온도에서 0.1×SSC 완충액, 0.1% w/v SDS인 높은 염격도의 조건이다. 한편, 서열은 1개 또는 수개의 뉴클레오티드(예를 들면, 1 내지 5개의 뉴클레오티드)가 치환, 결실 또는 삽입된, 서열 번호 1, 2 및 3, 및 그 상보쇄의 사슬 중 하나 이상의 서열일 수 있다. 그러나, 이들 치환, 결실 또는 삽입된 서열은, 치환, 결실 또는 삽입되지 않은 서열의 상보쇄에 대하여 염격한 조건 하에서 혼성화할 수 있는 서열이다. 또한, 서열 번호 1, 2 및 3, 및 그 상보쇄 중의 하나 이상이, 1 내지 5개의 뉴클레오티드의 혼합 뉴클레오티드 서열일 수 있거나, 또는 서열 번호 1, 2 및 3, 및 그 상보쇄 중의 하나 이상이 1 내지 5개의 뉴클레오티드로 유니버설(universal) 뉴클레오티드를 포함하는 서열일 수도 있다. 사용되는 유니버설 뉴클레오티드의 예로는, 테옥시이노신(dI), 및 그렌 리서치(Gren Research)사로부터 입수 가능한 3-니트로피롤, 5-니트로인돌, 테옥시리보푸라노실(dP), 테옥시-5'-디메톡시트리틸-D-리보푸라노실(dK)이 포함된다. 본 발명의 프라이머에서는 이들 프라이머 영역이 서로 직접 연결될 수도 있고, 또는 스페이서를 통해 연결되어 있을 수도 있다는 것이 당업자에게 자명할 것이다. 프라이머의 각 서열 간 또는 말단측에는 약 1 내지 100 뉴클레오티드, 바람직하게는 2 내지 30 뉴클레오티드의 서열(스페이서)가 존재할 수 있다. 핵산 프라이머의 길이는 약 15 내지 200 뉴클레오티드, 바람직하게는 20 내지 100 뉴클레오티드, 더욱 바람직하게는 40 내지 60 뉴클레오티드이다.

[0016]

본 발명에 따른 HPV 바이러스의 유전자형을 검출하기 위한 프라이머에 있어서는, 프라이머 영역 F1과 F2 또는 B1과 B2에 대응하는 서열로서 상기 제1 내지 제3 서열군의 조합 또는 제4 서열군의 서열을 사용함으로써 다형성 영역만을 증폭할 수 있다. 그리고, 프로브를 사용하여 LAMP 증폭 산물에 포함된 서열 번호 4에 존재하는 다형성을 검출할 수 있다. 따라서, LAMP 프라이머에 의한 증폭 산물의 덤벨 구조에 있어서의 단일쇄 루프 내에 위치하는 표적 서열 FPc, FP, BP 또는 BPc은 서열 번호 4의 서열에 대응하게 된다.

[0017]

상기한 바와 같은 프라이머 영역 F1과 F2를 갖는 구조의 프로브를 사용하여, HPV 함유 검체 시료에 대하여 LAMP 법에 의한 증폭을 행하면, 도 4에서 설명한 바와 같이, 스템 앤드 루프 구조를 갖는 증폭 산물의 단일쇄 루프 구조 내에 포함되는 HPV 유래의 표적 서열(즉, 서열 번호 4에 대응하는 영역의 서열)이 얻어진다.

[0018]

상기 증폭 반응은, 투브당 1 프라이머 세트, 또는 투브 당 다양한 유전자형을 위한 복수의 프라이머 세트를 이용하여 행할 수 있다. 복수의 유전자형을 동시에 분류할 필요가 있는 경우에는, 후자의 방법을 이용하는 것이 효율적이다.

[0019]

이 증폭 산물을, 예를 들면 서열 번호 4와 상보적인 서열을 갖는 프로브 핵산(FP, FPc, BP 및 BPc)을 이용하여 검출한다. 형광물질(fluorochrome) (플루오레세인, 로다민, FITC, FAM, TET, JOE, VIC, MAX, ROX, HEX, TAMRA, Cy3, Cy5, 텍사스레드(TexasRed) 등), 퀸쳐(quencher) (TAMRA, 이클립스(Eclipse), 다브실(Dabcyl), Au 콜로이드 등), 전자 스핀 물질 및 금속 착물 (루테늄, 코발트, 철 등)에 의해 표지된 핵산 프로브를 이용하여 균일 혼성화가 달성된다. 예를 들어, 분자 표지(molecular beacon), 형광 공명 에너지 전이 (FRET) 및 전자 스핀 공명 (ESR) 기술 등이 표지된 프로프를 이용한 균일 혼성화를 위해 종종 사용된다. 표지를 이용하지 않은 균일 혼성화에는 인베이더(invader) 및 파이로시퀀싱(pyrosequencing) 기술도 사용된다. LAMP 산물에 대한 균일 혼성화 검정은 특별히 한정되지 않는다. 프로브 핵산은 불균일 혼성화를 위해 고상 지지체 표면에 고정화될 수 있고, 전형적으로는 DNA 칩이 사용되지만, 다른 마이크로 어레이 상의 프로브를 이용할 수도 있다. 상술한 바와 같이, 서열 번호 4의 영역은 다형성 영역이기 때문에, 증폭 산물을 검출하기 위한 프로브 핵산은 검출할 다형성에 따라서 변경될 수 있다.

[0020]

본 발명에서 이용하는 핵산 프로브 서열은, 제5 서열군 (표 5)에서 선택되는 서열 또는 제5 서열군에서 선택되는 서열의 상보 서열, 또는 제5 서열군에서 선택되는 서열 또는 그 상보 서열의 1개 또는 수개의 염기가 치환,

결실 또는 삽입된 서열을 포함하는 서열을 가지는 핵산 프로브가 바람직하다. 또한, 문헌[Kleter et al., J. Clin. Microbiol., 37, 2508-17(1999)], [Vernon et al., BMC Infectious Diseases, 3:12 (2003)], 일본 특허 공개 (평)09-509062 등에 기재된 서열을 이용할 수도 있다. 핵산 프로브의 구조는 특별히 한정되는 것은 아니고, DNA, RNA, PNA, LNA, 메틸포스포네이트 골격의 핵산, 그 밖의 인공 핵산쇄를 이용할 수도 있다. 또한, 이들의 키메라 핵산도 사용할 수 있다. 핵산 프로브를 고상 지지체 상에 고정화하는 경우에는 아미노기, 티올기 또는 비오틴과 같은 관능기를 도입할 수도 있고, 또한 관능기와 뉴클레오티드 사이에 스페이서를 추가적으로 도입할 수도 있다. 여기서 이용되는 스페이서의 종류는 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 알칸 또는 에틸렌글리콜 골격을 사용할 수 있다. 또한, 본 발명에서 사용되는 유니버설 뉴클레오티드로는, 데옥시이노신(dI), 및 그렌 리서치사로부터 입수 가능한 3-니트로페롤, 5-니트로인돌, 데옥시리보푸라노실 (dP), 데옥시-5'-디메톡시트리틸-D-리보푸라노실 (dK) 등이 포함된다.

[0021] 본 발명에서 사용하는 검출법은 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예로는 탁도, 가시광, 형광, 화학 발광, 전기화학 발광, 화학 형광, 형광 에너지 전이법, ESR 등의 광학적인 수법이나, 전류, 전압, 주파수, 전도도, 저항 등의 전기적인 성질을 이용한 발명이 포함된다.

[0022] 본 발명에서 이용하는 핵산 프로브를 고정화하기 위한 지지체는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예로는 입자 (예를 들면, 수지 비드, 자기 비드, 금속 미립자, 금 콜로이드 등), 기판(예를 들면, 마이크로타이터 플레이트, 유리 기판, 실리콘 기판, 수지제 기판, 전극 기판, 막 등) 등이 포함된다.

[0023] 본 발명에서 사용하는 지지체의 재료는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 투과성 재료, 예를 들면 다공질체나 막, 및 불투과성 재료, 예를 들면 유리나 수지가 포함된다. 지지체 재료의 전형적인 예로는 유리, 석영 유리, 알루미나, 사파이어, 포스테라이트(forsterite), 탄화규소, 산화규소, 질화규소 등의 무기 절연 재료, 및 폴리에틸렌, 에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리이소부틸렌, 폴리메틸 메타크릴레이트, 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 불포화 폴리에스테르, 불소 함유 수지, 폴리염화비닐, 폴리염화비닐리덴, 폴리아세트산비닐, 폴리비닐알코올, 폴리비닐 아세탈, 아크릴 수지, 폴리아크릴로니트릴, 폴리스티렌, 아세탈 수지, 폴리카보네이트, 폴리아미드, 폐놀 수지, 우레아 수지, 에폭시 수지, 멜라민 수지, 스티렌-아크릴로니트릴 공중합체, 아크릴로니트릴 부타디엔 스티렌 공중합체, 실리콘 수지, 폴리페닐렌옥시드, 폴리술폰, 폴리에틸렌글리콜, 아가로스, 아크릴아미드, 니트로셀룰로오스, 나일론, 라텍스 등의 유기 재료가 포함된다.

[0024] 핵산쇄가 고정화되는 지지체 표면은, 예를 들면 전극 재료로 구성될 수 있다. 전극 재료는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 금, 금의 합금, 은, 백금, 수은, 니켈, 팔라듐, 실리콘, 게르마늄, 갈륨, 텅스텐 등의 순금속 및 이들의 합; 흑연, 글래시 카본 등의 탄소 재료; 및 이들의 산화물 및 화합물이 포함된다. 다른 예로는, 산화규소 등의 반도체 화합물이나, CCD, FET, CMOS 등 각종 반도체 디바이스를 포함한다. 전극은 도금, 인쇄, 스팍터링, 증착 등에 의해 제조할 수 있다. 증착을 행하는 경우에는, 저항 가열법, 고주파 가열법 또는 전자빔 가열법에 의해 전극막을 형성할 수 있다. 또한, 스팍터링을 행하는 경우에는 직류 2극 스팍터링, 바이어스 스팍터링, 비대칭 교류 스팍터링, 계터 스팍터링 또는 고주파 스팍터링으로 전극막을 형성할 수 있다. 또한, 폴리피를 또는 폴리아닐린의 전해 중합막이나 도전성 고분자도 사용할 수 있다. 전극 이외의 부분을 절연하기 위한 재료는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 광중합체 또는 포토레지스트 재료인 것이 바람직하다. 레지스트 재료로서는, 광노광용 포토레지스트, 원자외선용 포토레지스트, X선용 포토레지스트 및 전자선용 포토레지스트가 이용된다. 광노광용 포토레지스트의 예로는, 주원료로 환화고무, 폴리신남산 또는 노블락 수지를 함유하는 포토레지스트를 들 수 있다. 원자외선용 포토레지스트에는 환화고무, 폐놀 수지, 폴리메틸이소프로페닐 케톤(PMIPK), 폴리메틸 메타크릴레이트(PMMA) 등이 이용된다. 또한, X선용 레지스트에는, COP, 메탈아크릴레이트 외에 박막 핸드북(오옴사)에 기재된 물질을 사용할 수 있다. 또한 전자선용 레지스트에는, PMMA 등 상기 문헌에 기재된 물질을 이용할 수 있다. 사용되는 레지스트의 두께는 100 Å 이상 1 μ m 이하인 것이 바람직하다. 포토레지스트로 전극을 피복하여 리소그래피를 행함으로 면적을 일정하게 할 수 있다. 이에 따라, DNA 프로브의 고정화량이 각각의 전극 사이에서 균일하게 되어, 재현성이 우수한 측정이 가능해진다. 레지스트 재료는 최종적으로 제거하는 것이 일반적이지만, 유전자 검출용 전극으로서는 레지스트 재료를 제거하지 않고 전극의 일부로서 이용할 수도 있다. 이 경우에는, 레지스트 재료로서 내수성이 높은 물질을 사용할 필요가 있다. 전극 상부에 형성하는 절연층에는 포트레지스트 재료 외의 재료도 이용할 수 있다. 예를 들면, Si, Ti, Al, Zn, Pb, Cd, W, Mo, Cr, Ta, Ni 등의 산화물, 질화물 및 탄화물, 및 이들의 합금을 이용할 수도 있다. 이들 재료 상에 예를 들어, 스팍터링, 증착 또는 CVD 등을 이용하여 박막을 형성한 후, 포토리소그래피로 전극 노출부의 패터닝을 행하여, 면적을 일정한 값으로 조정한다. 1개의 칩 상에 여러 개의 전극부를 구성하고 서로 다른 프로브를 고정화함으로써, 수 종류의 표적에 대하여 검사를 행할 수 있는 전극을 제조할 수 있다. 또한, 1개의 칩 상에

여러 개의 전극부를 구성하고 동일 프로브를 고정화함으로써, 한번에 다수의 검체의 검사를 행할 수도 있다. 이 경우, 포트리소그래피를 이용하여, 미리 기판 상에 복수의 전극을 패터닝하여 둔다. 이때, 이웃한 전극이 접촉하지 않도록, 개별 전극들을 분리하는 절연막으로 구획을 형성하는 것이 효과적이다. 절연막의 두께는 0.1 마이크로미터 내지 100 마이크로미터 정도가 바람직하다.

[0025] 본 발명이 대상으로 하는 검체는 특별히 한정되는 것은 아니고, 예를 들면, 혈액, 혈청, 백혈구, 소변, 변, 정액, 타액, 질액, 조직, 생검 검체, 구강내 점막, 배양된 세포, 가래 등이 포함된다. 이를 검체 시료로부터 핵산 성분의 추출을 행한다. 추출 방법은 특별히 한정되는 것은 아니고, 페놀-클로로포름법 등의 액체-액체 추출법이나 담체를 이용하는 고체-액체 추출법이 포함된다. 또한, 시판되고 있는 핵산 추출 키트, 예컨대, QIAamp(QIAGEN사 제조), 수마이(Sumai) 테스트(스미또모 긴조꾸사 제조) 등을 대신 이용할 수도 있다. 추출한 핵산 성분을 LAMP 법에 의해 증폭시키고, 증폭 산물을 유전자 검출용 전극에 고정화된 프로브와 혼성화시킨다. 반응은 이온 강도 0.01 내지 5의 범위, pH 5 내지 10의 범위의 완충액 내에서 행한다. 이 용액에 혼성화 촉진제인 황산덱스트란이나, 연어 정자 DNA, 소 흥선 DNA, EDTA 및 계면활성제를 첨가할 수 있다. 여기에 추출한 핵산 성분을 첨가한다. 또한, 기판 상에 용액을 적하함으로써 혼성화 반응을 행할 수도 있다. 반응 중 교반 또는 진탕 등의 조작으로 반응 속도를 높이는 것도 가능하다. 반응 온도는 바람직하게는 10°C 내지 90°C의 범위이며, 반응 시간은 약 1분 이상 하룻밤 정도 행한다. 혼성화 반응 후, 전극을 취출하여 세정한다. 세정에는, 이온 강도 0.01 내지 5의 범위, pH 5 내지 10의 범위의 완충액을 이용한다.

[0026] 추출한 샘플 핵산은 FITC, Cy3, Cy5 또는 로다민 등의 형광 색소, 바이오텐, 햅텐, 옥시다아제나 포스파타제 등의 효소, 또는 페로센 또는 퀴논 등의 전기 화학적으로 활성인 물질로 표지하거나, 또는 상술한 물질로 미리 표지한 제2 프로브를 이용함으로써 검출할 수 있다.

[0027] 예를 들어, 전기 화학적으로 활성인 DNA 결합 물질을 이용하는 경우에는, 이하와 같은 절차로 핵산 성분들을 분석한다. 먼저 기판을 세정한 후, 전극 표면에 형성된 이중쇄 부분에 선택적으로 결합하는 DNA 결합 물질을 반응시켜, 전기 화학적으로 분석한다. 이용되는 DNA 결합 물질은 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 흑스트(Hoechst) 33258, 아크리딘 오렌지, 퀴나크린, 다우노마이신, 메탈로인터칼레이터, 비스아크리딘 등의 비스인터칼레이터, 트리스인터칼레이터, 폴리인터칼레이터 등을 이용할 수 있다. 또한, 이를 인터칼레이터를 전기 화학적으로 활성인 금속 캐체, 예를 들면, 페로센 또는 바이올로겐으로 수식할 수도 있다. DNA 결합 물질의 농도는 그 종류에 따라서 다르지만, 일반적으로는 1 ng/ml 내지 1 mg/ml의 범위이다. 이 때, 이온 강도 0.001 내지 5의 범위, pH 5 내지 10의 범위의 완충액을 이용한다. 전극을 DNA 결합 물질과 반응시킨 후, 세정하여, 전기 화학적으로 분석한다. 전기 화학적인 측정은 참조 전극, 대극 및 작용극을 포함하는 3 전극 분석기, 또는 대극 및 작용극을 포함하는 2 전극 분석기에서 행한다. 측정시에는, DNA 결합 물질이 전기 화학적으로 반응하도록 하기에 충분한 전위를 인가하여, DNA 결합 물질에서 유래되는 반응 전류치를 측정한다. 전위는 선형적으로 변경시키거나, 또는 펄스로 또는 정전위로 인가할 수 있다. 측정시에는 포텐셔스탯(potentiostat), 디지털 멀티미터, 평선 제너레이터(function generator) 등의 장치를 이용하여 전류 및 전압을 제어한다. 측정된 전류치를 기초로, 검량선으로부터 표적 유전자의 농도를 산출한다. 유전자 검출용 전극을 이용한 유전자 검출 장치는 유전자 추출부, 유전자 반응부, DNA 결합 물질 반응부, 전기 화학 측정부, 세정부 등을 포함한다.

[0028] 본 발명에 따른 방법을 사용함으로써, 인간 유두종 바이러스의 감염을 진단할 수 있다.

[0029] 즉, 인간으로부터 검체 시료를 얻는 것과,

[0030] 검체 시료로부터 핵산 성분을 추출하는 것과,

[0031] 상기 기재의 핵산 프라이머 중에서 선택되는 1종 이상의 프라이머를 포함하는 복수의 프라이머를 사용하여, LAMP 반응에 의해 검체 시료 중의 핵산쇄를 증폭시키는 공정과,

[0032] 상기 증폭 반응 후에 증폭 산물의 존재 여부를 검지하는 공정

[0033] 을 포함하고, 여기서 증폭 산물의 존재는 인간 유두종 바이러스에 의한 감염을 나타내는 것인, 인간 유두종 바이러스의 감염을 진단하는 방법이 제공된다.

[0034] 또한, 인간으로부터 검체 시료를 얻는 것과,

[0035] 검체 시료로부터 핵산 성분을 추출하는 것과,

[0036] 상기 기재의 핵산 프라이머 중에서 선택되는 1종 이상의 프라이머를 포함하는 복수의 프라이머를 사용하여,

LAMP 반응에 의해 검체 시료 중의 핵산쇄를 증폭시키는 공정과,

[0037] 상기 증폭 반응 후에 증폭 산물의 존재 여부를 검지하거나, 또는 바이러스의 유전자형을 분류하는 공정

[0038] 을 포함하고, 여기서 증폭 산물의 존재는 인간 유두종 바이러스에 의한 감염을 나타내는 것인, 인간 유두종 바이러스의 감염을 진단하는 방법이 제공된다.

[0039] 또한, 본 발명은 인간 유두종 바이러스의 검출 및 유전자형의 분류에 사용되는 LAMP 증폭용 키트를 제공한다. 이 LAMP 증폭용 키트는 이하의 (a) 내지 (f) 중에서 선택되는 핵산 프라이머, 및 추가로, LAMP 증폭 반응에 필 요한 임의의 다른 성분, 예컨대, 폴리머라제, dNTP, 베타인, 베피, 포지티브 컨트롤 DNA 및 멸균수 를 포함한다:

[0040] (a) 표 1에 기재된 제1 서열군에서 선택되는 서열과 상보적인 서열, 및 표 2에 기재된 제2 서열군에서 선택되는 서열을 동일쇄 상에 포함하는 핵산 프라이머;

[0041] (b) 제1 서열군에서 선택되는 서열과 상보적인 서열, 및 표 3에 기재된 제3 서열군에서 선택되는 서열을 동일쇄 상에 포함하는 핵산 프라이머;

[0042] (c) 제2 서열군에서 선택되는 서열과 상보적인 서열, 및 제3 서열군에서 선택되는 서열을 동일쇄 상에 포함하는 핵산 프라이머;

[0043] (d) 핵산 프라이머 (a), (b) 및 (c) 중 선택된 하나의 서열과, 하나 이상의 염기의 삽입, 결실 또는 치환으로 인하여 서로 다른 서열을 포함하고, 핵산 프라이머 (a), (b) 및 (c) 중 선택된 하나의 상기 서열에 상보적인 서열을 갖는 핵산쇄와 혼성화할 수 있는 핵산 프라이머;

[0044] (e) 표 4에 기재된 제4 서열군에서 선택되는 서열 또는 그것에 상보적인 서열을 포함하는 핵산 프라이머; 및

[0045] (f) 핵산 프라이머 (e)의 선택된 서열과, 하나 이상의 염기의 삽입, 결실 또는 치환으로 인하여 서로 다른 서열을 포함하고, 핵산 프라이머 (e)의 상기 선택된 서열에 상보적인 서열을 갖는 핵산쇄와 혼성화할 수 있는 핵산 프라이머.

[0046] 또한, 본 발명은 인간 유두종 바이러스의 검출 및 유전자형의 분류에 사용되는 검출용 키트를 제공한다. 이 검 출용 키트는, 상기 LAMP 증폭용 키트, 및 상기 LAMP 증폭용 키트를 이용하여 증폭된 인간 유두종 바이러스의 LAMP 증폭 산물을 검출하기 위한 핵산쇄가 고정화된 지지체를 포함한다. 여기서, 상기 고정화된 핵산쇄는 하기 (g) 또는 (h)이다:

[0047] (g) 표 5에 기재된 제5 서열군에서 선택되는 서열 또는 그것에 상보적인 서열을 포함하는 핵산 프로브, 또는

[0048] (h) 핵산 프로브 (g)의 선택된 서열과, 하나 이상의 염기의 삽입, 결실 또는 치환으로 인하여 서로 다른 서열을 포함하고, 핵산 프로브 (g)의 상기 선택된 서열에 상보적인 서열을 갖는 핵산쇄와 혼성화할 수 있는 핵산 프로 브.

[0049] 이 핵산 프로브는, 지지체 표면에 고정화되고, 지지체 및 지지체 표면은 상기한 바와 같은 재료로 구성된다.

[0050] <실시예>

[0051] 이하, 프라이머 영역에 대응하는 서열인, 제1 서열군, 제2 서열군, 제3 서열군, 제4 서열군의 구체예를 표에 나 타내었다.

표 1

표 1 대표적인 핵산 프라이머 서열

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 1 서열군	16	TGATTTACAGTTATTTTC
	17	GAATATGATTTACAGTTATTTTC
	18	GAAGAATATGATTTACAGTTATTTTC
	19	GAGGAATATGATTTACAGTTATTTTC
	20	GAGTATGATTTACAATTATTTTC
	21	GAGTTGATTTACAGTTATTTTC
	22	GAATTTGATTTACAATTATTTTC
	23	GAATATGATTTACAGTTATTTTC
	24	GAATATGATTTGCAGTTATTTTC
	25	GAATATGAATTACAGTTGIGITTC
	26	GAATTTGATTTACAATTATTTTC
	27	GAATATGATATAACAGTTATTTTC
	28	GAATATGATCTACAGTTGIGITTC
	29	GAGTATGACCTGCAGTTGIGITTC
	30	GAATATGATTTACAGTTATTTTC
	31	GAGTATGATTTACAATTATTTTC
	32	GAGTTGATTTGCAGTTATTTTC
	33	GAATATGATGTCACATTATTTTC
	34	GAATATGATTTACAGTTATTTTC
	35	GAGTATGAATTGCAATTATTTTC
	36	GAATTTGATTTACAATTATTTTC
	37	GAATATGAATTACAATTGIGITTC
	38	GAATATGAATTACAATTGIGITTC
	39	GAATATGACITACAGTTGIGITTC
	40	GAGTTGATTTGCAATTATTTTC
	41	GAATATGAACTACAGTTGIGITTC
	42	GAATATGATTTGCAATTATTTTC
	43	GAAAATAAAYTGYAADTCATAYTC

[0052]

표 2

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 2 서열군	44	TTTGTACTGTGGTAGATAC
	45	TTTGTACTGTGGTAGATACTAC
	46	TTTGTACTGTGGTAGATACACCAC
	47	TTTGTACTGTGGTAGATACACCAC
	48	TTTGTACTGTAGTTGATACTAC
	49	TTTGTACTGTGGTAGATACACCAC
	50	TTTGTACTGTGGTAGATACACCAC
	51	TTTGTACTGTGGACACCCAC
	52	TTTGTACTGTGGTAGATACACCAC
	53	TTTCTAACGTGTGGATACTAC
	54	TTTGTACTGTGGTAGATACACCAC
	55	TTTTAACGTGTGGATACTAC
	56	TTTGTACTGTAGTTGATAACAC
	57	TTTCTTACTGTGTGGACACTAC
	58	TTTGTACAGTTGTAGACACCCAC
	59	TTTTAACGTGGTTGATACTAC
	60	TTTGTACTGTAGTGGACACTAC
	61	TTTATTACCTGTGTGATACTAC
	62	TTTGTACAGTTGTGGATAACCCAC
	63	TTTGTAACTGTGTGGATAACCCAC
	64	TTTGTACTGTAGTAGATACTAC
	65	TTTGTACCGTGGTTGATAACCCAC
	66	TTTGTAAACCGTGTGGATAACCCAC
	67	TTTGTACTGTGTGGATACTAC
	68	TTTCTTACTGTGTGGATAACCCAC
	69	TTTKTACHGKGTGTDGATACYAC

[0053]

표 3

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 3 서열군	70	GCACAGGGCCACAATAATGG
	71	GCACAGGGACATAACAATGG
	72	GCGCAGGGCCACAATAATGG
	73	GCACAGGGACATAATAATGG
	74	GCCCAGGGCCACAACAATGG
	75	GCTCAGGGTTAACAAATGG
	76	GCTCAGGGTTAACAAATGG
	77	GCCCAGGGACATAACAATGG
	78	GCTCAGGGACATAACAATGG
	79	GCCCAGGGACACAATAATGG
	80	GCACAGGGTCATAACAATGG
	81	GCACAGGGTCATAATAATGG
	82	GCACAGGGACACAATAATGG
	83	GCTCAGGGACACAATAATGG
	84	GCACAGGGTCATAATAATGG
	85	GCCCAGGGACAAAACAATGG
	86	GCACAAAGGCCATAATAATGG
	87	GCCCAGGGCCACAACAATGG
	88	GCCCAGGGCCATAACAATGG
	89	GCACAAAGGACACAATAATGG
	90	GGACATAATAATGG
	91	GCCCAGGGCCACAATAATGG
	92	GCCCAGGGCCATAACAATGG
	93	GCGCAGGGTCACAATAATGG
	94	GCGCAGGGCCACAATAATGG
	95	GCCCAGGGACATAATAATGG
	96	GCCCAGGGTCAAACATAATGG
	97	GCCCAGGGCCACAATAATGG
	98	GCCCAGGGCCATAATAATGG
	99	GCACAAAGGTCTACAATAATGG
	100	GCTCAGGGTTAACAAATGG
	101	GCCCAGGGCCACAACAATGG
	102	GCACAGGGTCATAATAATGG
	103	GCACAGGGACATAACAATGG
	104	GCACAGGGTCATAATAATGG
	105	GCCCAGGGACATAACAATGG
	106	GCACAGGGACACAACAATGG
	107	GCACAGGGACATAACAATGG
	108	GCCCAGGGACTAATAATGG
	109	GCCCAGGGTCATAATAATGG
	110	GCACAGGGTCATAATAATGG
	111	GCGCAAGGCCACAATAATGG
	112	GCACAGGGACATAATAATGG
	113	GCCCAGGGACATAATAATGG
	114	GCGCGGGGTCTACAATAATGG
	115	GCMCAGGGWCATAAYAATGG
	103	GCACAGGGACATAACAATGG
	104	GCACAGGGTCATAATAATGG
	105	GCCCAGGGACATAACAATGG
	106	GCACAGGGACACAACAATGG
	107	GCACAGGGACATAACAATGG

[0054]

표 4

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군		
	115	GCGTGTAGTATCAACACAGT
	117	CCTTATGGTTACAAACGAGCACAAATAAGTGTGGTTACCCCA
	118	GGTGAATAATGTACCAAGAGGAT
	119	AGAGGTAACCATAGAACCTAGGGTCTACTGCAAATTAGCCA
	120	AGTAGATATGGCAGCAGAT
	121	ACAGGGCCACAATAATGGCATGACATATTGTACTGCGTGT
	122	CATTAAAGGCTCTGGTCTA
	123	GCATCAGAGGTAACCATAGAACCTAGCCAGTTCA
	124	TTCCAGTCTCCAAATAAGTGG
	125	ATACTACACGCACTACAAATAATGTCATAGCTGCAGTTAACG
	126	CAAATTATTTCCTACACCTAGTGG
	127	GTTGGTTACCCCAACAAATGCCCTATGGTTACCTCTGATGCC
	128	GTCATAACGTCGCACTTAAGG
	129	GTCGTTAGGTACTCCCTAAAGTTAG
	130	ATACTACACGGCACTACAAATAATGTCACCCCATGTCGTAGGTACTCC
	131	CTACACGCACTACAAATAATGTCACCCCATGTCGTAGGTACTCC
	132	CACGGCACTACAAATAATGTCACCCCATGTCGTAGGTACTCC
	133	CTACACGGCACTACAAATAATGTCGTAGTTCTCAAGTATGGCA
	134	CTACACGCACTACAAATAATGTCGTAGTTCTGAAGTAGATATG
	135	GTGGCCCTGTGCTCGTTCTATGGTTACTCTGATGCC
	136	GTGGCCCTGTGCTCGTTCTATGGTTACTCTGATGCC
	137	GTGCTGCCATATCTACTCTCAGAAC

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	138	GCTGCCATATCTACTTCAGAACTACA
	139	AACCAATAAGGTTTATTCGAATATT
	140	CCATAAGGTTTATTCGAATATT
	141	TATGCAGCAATGCACGCTGCGCCCTATAGCTGTTTGCAACC
	142	CCCTATAGGTGGTTTGCAAC
	143	GTACATGGGGATCCTTGCC
	144	ACAGAAAATGCTAGTCCTATGCAGCCAATTGCTTTGTTGTAATCCATAG
	145	CACAGAAAATGCTAGTCCTATGCAGCCAATTGCTTTGTTGTAATCCATAG
	146	ATAAAGGATGGCCACTATGCCCGTGTAGGTTGAGGTAGGTCG
	147	CCTGACACCTCTATTTATAATCCAG
	148	ATCCAGATACACAGCGGCTG
	149	CCACACCTAATGCCACACCTAATGACACAGCGGCTGTTG
	150	GCCACTAATGCCACACCTAATGACACAGCGGCTGTTG
	151	CCAACAGTACGCCCTAT
	152	TGGTGTCAAGAACCTATGGCGACAAACATTGTTCCCTCG
	153	CACAGTTATTCAGGATGCTGAT
	154	GGAACTTCACTTTGTTAGCTGTGTTGCTAATGGCTTGG
	155	CCCTATAGGTGGTTTGCAAC
	156	ACAGAAAATGCTAGTCCTATGCAGCCAATTGCTTTGTTGTAATCCATAG
	157	CCTGACACCTCTATTTATAATCCAG
	158	CCACACCTAATGGCTGACCCACACACAGCGGCTGTTG
	159	GCCACTAATGCCACACCTAATGACACAGCGGCTGTTG

(기속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	160	AAGTTCCAACTCTCTAAATACTGCG
	161	ACCACTCGCAGGTACCAATTAACTGAAATAGGACATAAACATCTGGCAG
	162	TGTATTCCTCCCTCTCCAAAGTG
	163	TAATTGATTATGCCAGCAACACCCCTATGTTACCTCTGACTCCC
	164	GCGAGCAAAACCCATTTGTTACTCTPATGTTAACCTCTGACTCCC
	165	GCCAGGAAACCCATGTTATGCTCTATGTTACCTCTGACTCCC
	166	GAATA TAGGAA CATAACATCTGCAG
	167	ACCACTCGCAGGTACCAATTAAACCTCTAACATGTCATGCTGACTGC
	168	CCACTCTGGAGTACCAATTAAACCTCTAACATGTCATGCTGACTGC
	169	CCACTCGCAGTACCAATTAAACCTCTAACATGTCATGCTGACTGC
	170	ACCCCTGIGCTTATGTAAC
	171	GATGACACATGAAAGTTCCCATGGGCCAAATAACATAACTCTGTCCTG
	172	GATGACACATGAAAGTTCCCATGGCCCAAATAACATAACTCTGTCCTG
	173	AGTGTTCCTTAA TAGCAGG
	174	CAGTGTTCCTTAA TAGCAGG
	175	GACACTGAAAGTTCCCATGGCCCTGTCCTGCTTATAATCTACAGACAC
	176	TAAATGGATGCCACTAAGGCCCTGTCCTGGAGTGGAATTGGCCG
	177	CCTGAAACACACAGTTAGTG
	178	CACAAACGTTTGTGTGGCC
	179	ACCTGATACTAGTATTATAATCTCGA
	180	GATGCCCACTAAGGCCAACGCGCTGCTGGAGTGGA
	181	CACTAAGGCCAACACTAAAGGCCAACACAAAGTTAGTGCGG

(계속)

[0057]

시열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 시열군	182	AGTGTTCCTTCAATAGGAGG
	183	GACACTGAAAGTTCCCATGCCGCTGTGTCGTATAATCTACAGACAC
	184	CCTGAAACACAAACGGTTAGTG
	185	ACCTGATACTAGTATTATAATCCCTGA
	186	GATGCCCACTAAGGCCAACACGCCCTGTGCTGGAGTCGA
	187	CACTAAGGCCAACACCTAAAGGCCAACACAACGTTAGTGIGGG
	188	CCAATCTCCAAAATAGCAGGATT
	189	ACCACTACGTTAGTACCAATATGTCCTGTGAATAATATGTCATTATGTCAG
	190	CATACTTCTTACACCTAGGG
	191	AACTGATGCCCCAACAAATACCCCTCATGGTTACTTCAGATGCAC
	192	CCATTATGTTGTCCTGTGAGCACCTCCATGGTTACTTCAGATGCAC
	193	CTGATGCCAACAAATACCTCCATGGTTACTTCAGATGC
	194	CTGATGCCAACAAATACCCATGGTTACTTCAGATGCAC
	195	GTGAATATATGTCATTATGTCAG
	196	ACCACTACGTTAGTACCAATATGTCCTGCCTACCAATGCTTAATAC
	197	ACGACACGTTAGTACCAATATGTCATTCTCACCAGTCCTTAATAC
	198	CACACGTTAGTACCAATATGTCATTCTCACCAGTCCTTAATAC
	199	CCACACGTTAGTACCAATATGTCCTCACCAGTCCTTAATAC
	200	CCACACGTTAGTACCAATATGTCCTCACCAGTCCTTAATAC
	201	CACGTTGCATCCAAATATGG
	202	CACGTTGCATCCAAATATGG
	203	CACTGAAACTCTAATAGATATGCCGGTGCAACCAAGTAAACACAGTTGTC

TGTG
(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	204	CCAAATAGGTGGTTTGCAC
	205	CCTTTACCCCAATGCTCTCC
	206	CACTGAAAACCTTAATAGATATGCCGGAGTTGTTGTTATAATCCATTG
	207	CTGAAAACCTTAATAGATATGCCGTGTTGTTATAATCCATTG
	208	GGATGACCACTTAATACCTACACCCCTGTTGGTTAGAGGTAGTC
	209	TCCTGATACATCTTTATAATCCCTG
	210	AACTCAACGCTTAGTTGGC
	211	CCACTAATAACCTAACCTTAATGGCTGCAACTCAACGCTTAGTTGGC
	212	CACTAATAACCTAACCTTAATGGCCCTCAACGCTTAGTTGGG
	213	GACCTACCTCTAACCAACACAG
	214	TATGGCTGCCCGCGA
	215	CCAATAGGTGGTTTGCAC
	216	CACTGAAAACCTTAATAGATATGCCGGAGTTGTTATAATCCATTG
	217	TCTGTATACCTCTTTTTATAATCCTG
	218	CCACTAATAACCTAACCTTAATGGCTGCAACTCAACGCTTAGTTGGC
	219	GGAGGGTAAACCAATTGCC
	220	ACCACTCGCAACTAATAGACTATCTCAACTCTGCAGTTAAGGTAACCTTGC
	221	ACCACTCGCAACTAATAGACTATCTGCAGTTAAGGTAACCTTGC
	222	GCTTTTTCCACTCTAGTG
	223	CCTGATTGCCAACAAATACCGATCAATGGTTACTTCCGAATCTC
	224	CCTGATTGCCAACAAATACCGACATATTGGCTACAAACGTC
	225	ATGTCAATAACTCTGGAGTAAAGG

(계속)

[0059]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	226	ACCACTCGCAGTACTAATATGACTTCTTCAACATGTTTATATTC
	227	ATTAACCTCGCAGTACTAATATGTTCTTCAACATGTTTATATTC
	228	ACCACTCGCAGTACTAATATGACATCTCAACATGTTTATATTC
	229	ATTAACCTCGCAGTACTAATATGATTCATGTTTATATTC
	230	CCTCGACAACGGGTGCTTGGAGGCTACATCCAG
	231	TATTCCTGGACACACCGGGTGTCTGTGAGGCTTACATCCAAG
	232	GGAAGCTTACATCCAAGTAAAC
	233	GTAAAGCAACACCTTACCCC
	234	GACACTGAAACCGGTAAACAGTATCCACTTGTGTTGTTATAATCCATGG
	235	GGATGACCACTATGCCAACGCCAACGATTAGTATGGCATGT
	236	CCTGACACCTCTTTATAACCC
	237	CCTGACACCTCTTTATAACCC
	238	CACTTATGCCAACGCCCTAAATGGGATACACAAACGATTAGTATGGGC
	239	GGATGACCACTTATGCCAACGCCAACGATTAGTATGGCATG
	240	GCTGCCCTCTACCTTATTCAGG
	241	CACTTATACCCCAATGTTCC
	242	GTCATATTAGTACTGGAGTGG
	243	CCGGCTGCTGATAATAGGGACCTGTTGGAGGCTTACATCC
	244	CCATATTGGCTACAAACGTTGCTTACATGCCCCAACAA
	245	CCATATTGGCTACAAACGTTGCAACAAATACTGATTGGCCC
	246	GTCACAAAGGTCTATAATATG
	247	AGTATGGCATGTGAGG

(개별)

[0060]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	248	AGGGCTGGTACATTAGGAGA
	249	TGTTCCCGATGACCTGTAC
	250	C'TTGTTACCGTTCAGTGTACAGGCCATTAGGCTTG
	251	GCACGTGTTGAATAGAGGCACTGTTCGGATGACCTG
	252	GTAACCATGATCCACTAGGAGTGAAGGTTCGGAACTACTGCC
	253	GTAGTTCTGAACTTAATGTACAG
	254	GCACCTGCTTGAATAGAGGCA
	255	CAGTAGTTCTGAAACCTTAATGTACAG
	256	GGAGGCTTACATCCAAAGTAAAC
	257	GACACTGAAACCGGTAACAGTATCCACTGTGTTGTTATAATCCATGG
	258	CTGACACCTCTTTTATAACCT
	259	CACTTATGCCAACGCTTAATGGATAACAAACGATTAATGGGC
	260	CAAATCCTGTCTTACCATG
	261	GGCATACTTGTAAATGCTAACTCCCGTCTTGAGACAGTG
	262	AIGTTGGTAACTCTGGTAAC
	263	GGAGGCTTACACCTTAAACAGGTACAGATAACAGGAATG
	264	ATTGTGTTGTTATAATCCATAG
	265	TGCACCAATCTGTGTC
	266	GCTAACCGGTTAAAGCAGGATACCATGTCGGTCTTG
	267	AACCTCTGTTACTCTGGTACAG
	268	GGAGGCTTACACCTTAAACACAGGAAATGCATTCTATGG
	269	CAATTTGTTGTTATAATCCATAG

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	270	GATATTGCAATGGAACTG
	271	GACGGGGACATGGTAGACACATAATCTAGGGAAACATCAC
	272	GTGTTTAATAGGGTGTAGGCC
	273	CTCCCTGCTTTACCTGGTTAGCTCTATAGGTGAACATTCGG
	274	ATTAAGGTGTGCCTTTC
	275	GGATATTGCAATGGAACTG
	276	GGGACATGGTAGACACAGGACATATATCTAGGGAAACATCAC
	277	CCTATAGGTGACATGGG
	278	GTTTAACTTCAAGGAGCAAGGCACACCTTGTAAATGC
	279	ATTCCTCTGCTTACCTGG
	280	CATTCCTCTGCTTTACCTGGT
	281	ATCCCTCTAAATGGACGGGTC
	282	CAACCCGTAGTACAATATGCTGATATGTCATAACATCTGCTGTAGTG
	283	CTAGTTTTCTACTCCTAGTG
	284	CAATTGGTTACTCCAAACAAATACCCCTCATGGTAACCTCCGATGCAC
	285	CCATTATTATGGCCTTGTGCAACGCTCTATGGTAACCTCCGATGCAC
	286	ATGGCCCTCTGCACTGCAACCTCTATGGTAACCTCCGATGCAC
	287	GGCTTGTGCAACGTTGCCTATGGTAACCTCCGATGCAC
	288	GCTTGTGCAACGTTGCACTATGGTAACCTCCGATGCAC
	289	ATGTCAATACATCTGCTGTAGTG
	290	ATGTCAATACATCTGCTGTAGTG
	291	CAACCCGTAGTACAATATGCTGCTCACATGCTTAAATATTCC

(제4)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	292	CCCGTAGTACAAATATGTCCTGCACCATGCCCTAAATATTCC
	293	CCCGTAGTACAAATATGTCCTGCCTAACCATGCCCTAAATATTCC
	294	CCCGTAGTACAAATATGTCCTGCCTAACCATGCCCTAAATATTCC
	295	CCAATATGGTTTATTAATATTG
	296	CAATATGGTTTATTAATATTG
	297	CAATATGGTTTATTAATATTG
	298	GTGGTAACCTGGTAACCTCTGGTAACCTCTGGGAGGCCCTACAAACCTTAAACAC
	299	GTGGTAACCTGGTAACCTCTGGTAACTCTGGGAGGCCCTACAAACCTTAAACAC
	300	CCCAATGGTCACCTATAGGAGG
	301	GCTTTTCCCCAAATGTTCAAC
	302	TGGTAACCTGGTAACCTCTGGTAACTCTGGGAGGCCCTACAAACCTTAAACAC
	303	GGATGACCACTAATACCTACTCCGTTGGGCTGACAGG
	304	GGATGACCACTAATACCTACTCCGTTGGGCTGACAGG
	305	CCAGACACATCATTTATGATCC
	306	TTATGATCCCTGCCCTCCAGC
	307	GACCACTAAATCTACTCCTAATGGCCTGCCAGCGTTGG
	308	AGCATTACAGGGTGTGCC
	309	CAGATAACAGGAATGCAATTCAATGTTACCTATAGGAGGCC
	310	AAGTAGGGTCTGGTCAGC
	311	CCAGAGTTACAGAGTTACCAACGGAGTAGGTATTAGGAGGCC
	312	GATTTCACTATCATCCATTAT
	313	CCAAATGGTCACCTATAGGAGG

(제4)

[0063]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	314	TGGTAACCTGGTAACCTCTGGTACAGCCTACAAACCTTAAACACATTGTC
	315	CCAGACACATCTTATGATTC
	316	GACCACTAATACCTACTCTTAATGGCCTGCTCCAGCGTTGG
	317	CCAAATGTCATATAGCGAAATTC
	318	ACTTACCGTAGTACCAACTTACGACACATAACATCAGTGTAAATGTGAC
	319	GTCTCTGTTACGTGCCCTCTC
	320	AAATATACCATGTTGTCGCCTCCATGGTAACCTCTGATTCC
	321	GCCTTATGTTAGCCAATAAGGCCAGCGGTTCCATGGTAACC
	322	GCCTTATGTTAGCCAATAAGGCCAGCGGTTCCATGGTAACCTCTG
	323	GCCAAACATATACCATGTTGTCATGGTAACTCTGATCCC
	324	GAAATACATACATGTTAATGTGAC
	325	ACTTACCGTAGTACCAACTTACTCCACCGTGCCTGGTATATTCC
	326	ACTTACCGTAGTACCAACTTACTCCACCGTGCCTGGTATATTCC
	327	CTTACCCGTAGTACCAACTTACCCACCGTGCCTGGTATATTCC
	328	CCTTATGTTAGCCAATAAGGC
	329	GGCCTTATGTTAGCCAATAAGGC
	330	CAGTAGGATAATGTTGTCGTGGATGCCCTTCCTTACCCAGTG
	331	AATGGGGAACACAGC
	332	CCGTTAGATACATTATGGGTTG
	333	CTGAAACACTCACCATTTCATCAACCCACAACTGTTGCTGTTATAATCCAC
	334	GGTGAGTTTCACTATCATCTGTCCTCATGGGTTGGTATTAGTG
	335	CCAGATGCATCCTTATAAAATCCA

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	336	GTTAGTATGGCTTGTAGG
	337	ATGGGTGTTCACTAATACCAACACCGTTAGTATGGCTTGTGCTAGGG
	338	AATGGGGAACACAGC
	339	CTGAAAACTCACCATTTCATCAACCCACAACGTGTGTCGTTATAATCCAC
	340	CCAGATGGCATCTTATAATCCA
	341	ATGGGTGTTCACTAATACCAACACGGTTAGTATGGCTTGTGCTAGGG
	342	TGTTGGGGACACCAAATTC
	343	TTCCAATTTCTTAACTATACCTATTC
	344	CACTACCCGGTACTAATTAACTGACATAACCTCTCGAGTTAAG
	345	CACTACCCGGTACTAATTAACTGACATAACCTCTCGAGCTTCAG
	346	CACTACCCGGTACTAATTAACTGACATAACCTCTCGAGCTTCAG
	347	CACTACCCGGTACTAATTAACTGACATAACCTCTCGAGCTTCAG
	348	TGTATTCCCTCTCCAG
	349	GTGAAACCCCTGGCAGTG
	350	AATACCATGTTATGGCCCTGGGGCTCTTATTACTCTGATTC
	351	ATACCATGTTATGGCCCTGGGGCTCTGATTCCTCTCCAG
	352	ATACCATGTTATGGCCCTGGGGCTCTTATTACTCTGATTC
	353	ATACCATGTTATGGCCCTGGGGCTCTTATTACTCTGATTC
	354	CAACTGATTATGCCAACAAATACCGCCATATTGGTTACATAAGGCC
	355	TATGACATAACCTCTGCAAG
	356	CACTACCCGGTACTAATTAACTCCTCCACATGTCCTACTATACG
	357	CACTACCCGGTACTAATTAACTCCTACTGCTTAACTTAGTAGGG

(제 4)

[0065]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	358	GGATGATACAGAAAGTGCTCATGCCCTAAATACACAGCTGTGTTGC
	359	GGATGATACAGAAAGTGCTCAAATAACAGCTGTGTTGC
	360	CACCAATAGGAGTACACAAACC
	361	GTCGCTCACCAATAGCAGGTAC
	362	GGATGATACAGAAAGTGCTCATGCAGCTGTGCTTATAATCAACTGACACA
	363	TAAATGGATGGCCACTTAGGCCCGTTATGAAATTGGTCGGSC
	364	CCACTTAGGCCAATACCTAAGTGTAGGTATGAAATTGGTCG
	365	CCTGAAACACAACTGTTGTT
	366	GAACACACACCGTTGGC
	367	GCCACTTAGGCCAATACCTAAGGCACTGTAGGTATGAAATTGG
	368	GCCACTTAGGCCAATACCTAAAGTGGCACTGTAGGTATGAA
	369	AGGCTGCCACGCC
	370	CAATACCTAACGGCTGCC
	371	CACCAATAGCAGGTACACAAACC
	372	GGATGATACAGAAAGTGCTCATGCAGCTGTGCTTATAATCAACTGACACA
	373	CCTGAAACACACCGTTGGT
	374	GCCACTTAGGCCAATACCTAAGGCACTGTAGGTATGAAATTGG
	375	GCCACTTAGGCCAATACCTAAAGTGGCACTGTAGGTATGAA
	376	CTGTTCAAGAATGGTAGATCC
	377	TCCACTGTTCAAGAATGGTAGG
	378	TAACTATTAGCACTGCCACTGCGTGTAAAGCCATTACCTCTGTAGTTAAG
	379	TAACTATTAGCACTGCCACTGCGTGTAAAGCCATTACCTCTGTAGTTAAG

(계속)

[0066]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	380	ATATACTCTGCTACTCCCCAGTG
	381	GGCCGGTGACCCCTATAGAAAG
	382	GCTGATTTGTTCCAGCAATGCCGGTCTATGATAAACATCTGATTTC
	383	ATTAATTTGTTGACCCCTGCGCACGGATACTCTGCTACTCTCCAGTGGG
	384	TAAGCCATTACCTCTGTTAAG
	385	TAACATTAGCACTGCCACTGCCCTTCCCCATGCCATTATATTGCG
	386	ATACTTACCGAGAAGTACAATTAACTTACCTCCATGCCATTATATTGCG
	387	GCACACACAGAGTTAGAGATAACACCCCAATAGGGAGCACAGCCT
	388	TTCCATGTAGTGCCAAATACCC
	389	GCATGCTAGTGCCAAATACCC
	390	TGCAACACAAAGATGTTAGAGATAACACAAATAGGTGGAGCACAGCCT
	391	GCACACACAAAGATGTTAGAGATAACAAATAGGTGGAGCACAGCC
	392	GCACACACAAAGATGTTAGAGATAACAAATAGGTGGAGCACAGCC
	393	GCACACACAAAGATGTTAGAGATAACAAATAGGTGGAGCACAGCC
	394	TGCTATGCGGIGAATTTCTGTCCTGTTGGCTTAGGGTCA
	395	GTTGAGGGGGCAGAGGAC
	396	CCAGACACAGATAGGTTGGTG
	397	C ^T ATGCGGTGAAATTTCCTGTCATCCCTTGTTGGCTTAGT
	398	CTATGCGGTGAAATTTCCTGTCCTGGCTTGTTGGCTTAG
	399	GCTATGCGGTGAAATTTCCTGTCCTGGCTTGTTGGCTTAG
	400	CAATGATTTTAAATAAGGGATG
	401	TTTATTAATAAGGGATGACCA

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	402	CAATTATTAATAAGGGATGACCC
	403	TGGCATGTAGTGCCAAATACCC
	404	TGACACAAAGATGTTAGAGATAACACAAATAGGTGGAGCACAGCT
	405	GTGAGGGGGCAGAGAC
	406	CTATGGGTGAAATTCTCTGTCATCCCTTGCTGTTGGCCTTAGT
	407	CCTCAGCACATAAAGTCATG
	408	GTACTGGTTACAACGTCGCA GTGGTATCCACAACTGTGAC
	409	GGGTCTAACTCTGGCAAT
	410	GGATTCTGAGGTTACCATAGAACCT ACTGCCACTGTACAAAGC
	411	CCTCAGCACATAAAGTCATG
	412	CAGGGCCACATAATGGCAAT ACGAGGGTATCCACAAAC
	413	GGGTCTAACTCTGGCAAT
	414	GGATTCTGAGGTTACCATAGAACCTGTACAAAGC
	415	GTCTCTAAATAGTGGCATCC
	416	GGGTAAAGGCCAAATTGCC
	417	CACTCGTAGCACTAACATGACGTATGTCAAAACATCAGCTGTTAATG
	418	CCACTCGTAGCACTAACATGACGTATGTCAAAATAGTGGCATCC
	419	GGTTTTTCTACTCCTGTGG
	420	GCCACTGTACAAAGCAGTC
	421	ACTGATGTGGCCCTGCGCAGCTCTATGGTAACCTCAGAATCCC
	422	ATTTATGTGGCCCTGCGCAGCTCTATGGTAACCTCAGAATCCC
	423	CCCTGCCACCTGTTACATGGTAACCTCAGAATCCC

(계속)

[0068]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	424	CCAAACATATGCCATTATTGGCTATGGTAACCTCAGAATCCC
	425	ACCACTCGTAGCACTAACATGACTGCGCATGACGGAAGGTATTCCT
	426	CCACTCGTAGCACTAACATGGCCATGACGGAAGGTATTC
	427	CCACTCGTAGCACTAACATGACGCCATGACGGAAGGTATTC
	428	GTATGTCATACATCAGCTGTTAATG
	429	TGAATGTAATGTCATAACATCAGCTG
	430	CCACTCGTAGCACTAACATGACTCGCCATGACGGAAGGTATTC
	431	GCTGAGGTTAAAAGGAAGCACA
	432	GACTTTATGCTGAGGTTAAAAG
	433	CTTATGCTGAGGTTAAAAG
	434	CCAGTACGGTTATTAATAATT
	435	GCGCACGGTCAACAGTAC
	436	GTGTGTAACCAAGTACGGTTATTAATA
	437	CGTTGTAACCGTAGCGTTATTAAT
	438	CACCTATAGGGAGGTTGCATCC
	439	TGATACGTAAACCAAGTACCAAATATGCTTAACGTGAGTCGCTTATATCCATAG
	440	CCAGATACATCTTTTATAACCCAG
	441	AAAGGATGCCACTAATACCCACAAACCCAAAGGTGGTGTG
	442	CCTCAGCACATAAAGTCATG
	443	CAGGCCACAAATAATGGCAT AGTGTATCCACAACTGTGA
	444	GCCACTGTACAAAGCAGT
	445	CACTGTTGAAACCAAGTACGGTTTCCATCTACTCCTAGGGTTCT

(기속)

[0069]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	446	CACCTATAGGAGGTTTGATCC
	447	TGATACTGAAACCGTAGAAATATGCTAACTGAGTCTGCTTATAATCCATAG
	448	CCAGATACATCTTTATACCCAG
	449	AAAGGATGCCACTAAVACCCACAAAACCCAAGGTTGGTGTG
	450	GTCTCCAGTAGGTTAGCATC
	451	AGTACTAACATGACTATTAGTACTGCTGCCATAACCTCTGCAGACAAAG
	452	ATACTACTAGAAGTACTAACATGACTGCCATAACCTCTGCAGACAAAG
	453	GTTATATGTTGCTACGCCCTAGT
	454	ATTGATATTACCCAGCAATTGCCGCTATGATTACGTCAGGGCAC
	455	CCCCAGCAATTGCCATTATCTATGATTACGTCAGGGCAC
	456	GCGATAACCTCTGCAGACAAAG
	457	ATACTACTAGAAGTACTAACATGACCCACATGCTAAGGTACG
	458	GCACGTTGCAACCAATTAGG
	459	GGCTGGATGATFACTGAAAGTCCCACACTGTTGCTGCCATC
	460	TCCAATGTTCAACCAATTAGC
	461	CCAATGTTCAACCAATTAGCGG
	462	GGATGATACTGAAAGTCCCACATTAGCACAACACTGTTGCTGCC
	463	AAACAAATGGATGCGCCTAATAGCCATCTGAGGTGTTGGAGGTAGGC
	464	TTATAATCCGGACCCAGGAAAG
	465	ATAATCCGGACCCAGGAAAG
	466	ACAAATGGATGCCACTTAGCC GCATGCTTAGGTTGGAGGTAGG
	467	GAATGATACTGAAAGTCCAAATTAGCCACAACTGTTGCTTGCC

(계속)

[0070]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	468	TTATAATCCGGGACCAAGGAACG
	469	ACAAATCGATGGCCACTTAGCCGATGTGTAGGTTGGAGGTTAGG
	470	TCCAATGTTACCCATAGC
	471	CAAAGTCATGCATCCAAAC
	472	GCTCTTAACAAATAATGCAGCTGACCCATGTCACCCTCA
	473	AACAGATATCCCGCACAG
	474	GTCGGAGGTTTACGCCATTAGCTCTGATAACAGGGAAATGC
	475	CCATTGTTATGACCTTGTC
	476	TCCAACCTCTAGTGGCTCTATAGCGCTGTAGCCAATAAGGC
	477	GACGTGAGCAGATGGTTG
	478	GGATAACTGCAGTATTACGGGACCTAGGGCTGGAAAACCTGG
	479	GTAACTTCAGAATCACAAATTATTAAAGCC
	480	CCTCAGAATCACAAATTATTAAAGCC
	481	CAGTCCCTCCAAATATTGGAATCC
	482	AACCAAATGCGCAGTCCTCC
	483	TACCACTCGTAGCCTAAATGACATATGTCATTATCTCTCGCAGTTAGTG
	484	ACCACTCGTAGCCTAAATGACATATGTCATTATCTCTCGCAGTTAGTG
	485	ACCACTCGTAGCCTAAATGACATATGTCATTATCTCTCGCAGTTAGTG
	486	ACCACTCGTAGCCTAAATGACATATGTCATTATCTCTCGCAGTTAGTG
	487	TACCACTCGTAGCCTAAATGACATATGTCATTATCTCTCGCAGTTAGTG
	488	GTAGTCCTTTCCAACTCTAG
	489	CTGCACTTATCCAAAGTAGTC

(계속)

[0071]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	490	CTGATTCGCCCCAGCAATGCCGCTCTATAGTTACCTCAGAACATCAC
	491	CTGATTGCCCCAGCAATGCCGCTTGCTACAGCGTGACAGG
	492	CTGATTCGCCCCAGCAATGCCGCTCTATAGTTACCTCAGAACATCA
	493	ATGTCATTATCTCTGCAGTTAGTG
	494	ACCACTCGTAGCACTAATATGACTCTTCAACATGACACTACATATCC
	495	CTCACCCAGTGGGAGGTTAC
	496	CTGAAACCAAGTAAACAGATATCCGGCCATTAAACATATAATTGTGTTG
	497	TGAACCCAGTAACAGATAATCCGGCCATTAGATAACGATTCCCTG
	498	TGAACCCAGTAACAGATAATCCGGCAATCATAGATAACGATTCCC
	499	TAACCTGATACACAAACGTTG
	500	AGGATGACCACTTACGCCAACACTCTGGCATGTTAGGCCTT
	501	CAATGCGCTGTCGCCCTACCTA
	502	ATGGCTGTCCTACCTATTTC
	503	CCCTTACCCCATGCTCAC
	504	AGCCGAGGGTCTGATAACAGGGGAGGTTACGCCAATT
	505	AATAGGTAGGGGACAGCC
	506	GCGCGATATCTGTACTGGTTTCAGCGTAAGTGGTCATCCTT
	507	CTCACCCAGTGGGAGGTTAC
	508	CTGAAACCAAGTAAACAGATAATCCGGCCATTAAACATATAATTGTGTTG
	509	TAACCCCTGATACACAAACGTTG
	510	AGGATGACCACTTACGCCAACACTCTGGCATGTTAGGCCTT
	511	CCAAATCCTCCAAATAAGTGGGTTAC

(제 4)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	512	CTACTCGCAGGCCAACTTTCGTATGACATTACCTCTGTAGTTAATG
	513	CTACTCGCAGGCCAACTTTCGTATGACATTACCTCTGTAG
	514	CTACTCGCAGGCCAACTTTCGTATGACATTACCTCTGTAG
	515	ACAATTGATTTGCCAACATATAACCGGTCTGGTTACTTCTGATTCAC
	516	TATATTCCCTTCCCCAAGTG
	517	CATTGATTGTCACATATAACGGTCTGGTTACTCTGTGATTAC
	518	TTAACCCCTGAGCTTGTGAGGGTCGGTTACTCTGTGATTAC
	519	GTATGACATTAACCTCTGTAGTTAATG
	520	GAATGTTGATGAAATTACCTCTGTAG
	521	TGAATGTTGATGACATTACCTCTGTAG
	522	CTACTCGCAGGCCAACTTCCCTCCACATGTCGGCATATT
	523	GCAGGGTACACAGGCCAAATAAC
	524	GATGAA CACTGAAACTCTCATGTAGCGCTGAGTTGTTATAATCCACAG
	525	GATGACACTGAAACTCTCATGTAGCGCTGAGTTGTTATAATCCACAG
	526	CCAGATAACACAGTATATGATCTAAC
	527	CACTGAGTCCTACCCCTAAAGGTGTCACGCTTGGTCGG
	528	CACTGAGTCCTACCCCTAAAGGTCTCAACGCTTGGTCGG
	529	GCTGTTGATACCAAAAGATAACCGTG
	530	CTGTTGATACCAAAAGATAACCGTGATA
	531	GATACCAAAAGATAACGTGATAATG
	532	GCATCTGCTGTTGATACCAAAAGATA
	533	GATTCAACACCTACACAGC

(계속)

[0073]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	534	GCAGGGTACACGCCAATAATACAC
	535	GATGA CACTGAAAAC TCTCATGTT CGCTGAGTTGTTATAATCCACAG
	536	CCAGATAACACAGTATATGATCCTAAC
	537	CACTGAGTCTACCCCTAAAGGTTGTCACGCTTGGTCTGG
	538	GTGCCTTGTGAGCCAA
	539	GTAGTTATGTTATGCCCCCTCGCCGCTTGTAAATACTGGGAGCTGCA
	540	ACGTAGGGAAACAGTTATTGCTAG
	541	TGTCACTGTTATGCTAGTGCCCTTAATGGAATAGAGGGCATGGT
	542	AATGGCAGGAACACAGCC
	543	TGAAATTCCCCTTTCCCAACGCCCTGTTATAGTCCACTGAAAC
	544	TGATACGGCAGGATGGTATG
	545	TGCCCACTAAGGCCAACACCGGCCCTGTTGGTTGGAA
	546	GTAAATAACTGGAGTCTGAGGAT
	547	TAAGGGCACTACATACGGTACAGCCATAGACCCACTAGGGCGAG
	548	CTGCAGATGTTATGGAGACAGTA
	549	AGTGTCCCCAACATGCCAACGGAACAGTTATTGCT
	550	TGTGTCCCTGTGCTCTGT
	551	GTAGTTATGTTATGCCCTCTGCCAGCCAATAGGGCTTGT
	552	CGCAGTACCAATTACTTGTCTACTACTACCTAACATGCCAATATATTCC
	553	ACTGACATACGTGACAGTCTAG
	554	GATTATGCCAACAAATACCATGTTGTTCCAGTTAACAGCCC
	555	CAGTAAGAAATATTGATTATGCCAACAAACAGCCATTGGCTGC

(제 4)

[0074]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	556	CCACTCGCAGTACCAATTACTTTGCCAACATGCCAAATATTTCC
	557	ATACCACTCGCAGTACCAATTACCTCAACATGCCAAATATTTCC
	558	TCACTGGACATGTTAGTACAC
	559	CCACTCGCAGTACCAAAATTACTTTGCCAACATGCCAAATATTTCC
	560	ATACCACTCGCAGTACCAAAATTACCTCAACATGCCAAATATTTCC
	561	CATCAGTGGATAATGTTAGTACAC
	562	GCGCAGTACTAATTACATTGTCCCTAACATGCCAACATATTC
	563	ATACAACGCCGAGTACATAATTACCCCTAACATGCCAACATATTC
	564	GATTTACCTTGGCCAGTG
	565	TAGATGATGACTGAAAATTCCCGTTGCCCTATAATACATAGTTCGTTG
	566	CCTGAGTCATGATTATAACCCCTGA
	567	CCCACTAAGGCCAACACCTATGTTACGCCAGCGATTTGATGG
	568	CAGCTGATTCACTAGTAGTACAA
	569	GGCACACGGGACACAAACATGGTAATTGTACTGCCAGTGGTA
	570	TGACATACGTGACAGTCCTAGT
	571	TTGTGCAGCCATAGGGCTGTTAACATATGCCCTCGCTA
	572	CTCTATTCCAAAAATGCCTAGCA
	573	CCTAGTAGTTATGCCCCCTC
	574	TACAACTCACTAGGTATAGTGTCCCT
	575	GTGGGTCTATGTATCTCAGACTC
	576	CCACTCGCAGTACCAATTACTTTGCCATCGGGACAAATGTTAGTACAC
	577	TACCACTCGCAGTACCAATTACTTTACCATCGGGACAAATGTTAGTACAC

(제 4)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	578	CCATTTGTTGTCCTGCTCTATGGTATCCTCAGACTCCC
	579	CAACAAATACCATTTGGTGTCCCTCTATGGTATCCTCAGACTCCC
	580	CCTCCAAACAAATCCTTAAGGACAGCCATATGGCAGGAACACAGCC
	581	CTTCCAAACAAATCCTTAAGGACAGCCATGGCAGGAACACAGCC
	582	GATTTACCTTTGGCCAGTC
	583	TATAATGGATGCCCACTTAAGGCCCTGTTGTTGAAATAGG
	584	ACCCCTGATACGCAGCGATTG
	585	GTTATGTTATGCCCTCG
	586	CAAGGGCAGTACTAATTACATGGCATCAGGATAATGTTATGTTACAC
	587	TACAAACGGCAGTACTAATTACATGGATAATGTTATGTTACAC
	588	GTTATGTTATGCCCTCG
	589	CAACAAATACCATTTGGTGTCCCTCTATGGTGTCCCTGACTCCC
	590	CCATCATCCAAATAGCGAGTC
	591	TAGATGATACGAAATCCCGTGTGCTATAATACATAGTTGCGTTG
	592	CCTGAGTCTACATTATACCTGTA
	593	CCCACTAAGGCCAACCTTAATGTCAGGCGATTGGTATGG
	594	GATTTACCTTTGGCCAGTC

[0076]

[0077]

또한, 핵산 프로브에 대응하는 서열인, 제5 서열군의 구체예를 하기에 나타낸다.

표 5

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	595	ATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTAC
	596	AACCAATAAGGTTATTGAATATTTGGGCATC
	597	ACCAATAAGGTTATTGAATATTTGGGCATCAGA
	598	CAATAAGGTTATTGAATATTTGGGCATCAG
	599	ATAAGGTTATTGAATATTTGGGCATCAGAG
	600	AAGGTTATTGAATATTTGGGCATCAGAGG
	601	AAATGCAGGTGTGGATAATAGAGAATGTAT
	602	AAATGCAGGTGTGGATAATAGAGAATGTA
	603	ATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTAC
	604	GTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACAT
	605	TATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATA
	606	ACTTCAGAAACTACATATAAAAACACTAACTTAA
	607	TTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACT
	608	CTACTTCAGAAACTACATATAAAAACACTAACTT
	609	TCAGAAACTACATATAAAAACACTAACTTAAAGGAG
	610	AACTACATATAAAAACACTAACTTAAAGGAGTACCTA

(계속)

[0078]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	611	ATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAA
	612	TGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAAATCT
	613	TCTACACAGTCTCCTGTACCTGGCAATATG
	614	AATATGTGCTCTACACAGTCTCCTGTACCT
	615	CTCCTGTACCTGGCAATATGATGCTACCAA
	616	CACGTCTAATGTTCTGAGGACGTTAGGGA
	617	GTCTAATGTTCTGAGGACGTTAGGGA
	618	TAATGTTCTGAGGACGTTAGGGA
	619	TAATGTTCTGAGGACGTTAGGGACAATGTG
	620	TAATGTTCTGAGGACGTTAGGGACAATG
	621	AATGTTCTGAGGACGTTAGGGACAATGTG
	622	AATATGTGCTCTACACAGTCTCCTGTAC
	623	TGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGCA
	624	TGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGCA
	625	ACCTGGCAATATGATGCTACCAAATTAA
	626	CCTGTACCTGGCAATATGATGCTACCAAATTAA
	627	TGGTCCTGGCACTGATAATAGGAATGTATATCAATGG

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	628	ATAATAGGAATGTATATCAATGGATTATAACAAACAC
	629	GGCACTGATAATAGGAATGTATATCAATGGATTATAAA
	630	TGGTCCTGGCACTGATAATAGGAATGTAT
	631	ATAATAGGAATGTATATCAATGGATTATAAA
	632	ATAATAGGAATGTATATCAATGGATTATAAAC
	633	ATAATAGGAATGTATATCAATGGATTATAACAAAC
	634	TGCTGCAATTGCAAACAGTGATACTACATT
	635	AACAGTGATACTACATTAAAAGTAGTAATTAA
	636	TTATCCATGGATTATAAACAAACACAGTTATGTTT
	637	TTATCCATGGATTATAAACAAACACAGTTATGTTTAC
	638	TTATCCATGGATTATAAACAAACACAGTTATGTTTACTGGA
	639	ACAAGGTATAATGGTATTGTTGGG
	640	GTAGTTCCGTAAACCTTTAATGTACAGGTCA
	641	CAAGGTATAATGGTATTGTTGGGC
	642	ATGTTTATCCATGGATTATAAACAAACACAGTTAT
	643	TTATCCATGGATTATAAACAAACACAGTTA
	644	TTATCCATGGATTATAAACAAACACAGTTATGT

(계속)

[0079]

[0080]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	645	TGGACAACCGGTGCTGATAATAGGAATG
	646	TGGACAACGGGTGCTGATAATA
	647	GATAATAGGAATGTTATCCATGGATTATAACAA
	648	AGGAAATGTTATCCATGGATTATAACAAACAC
	649	AGGAAATGTTATCCATGGATTATAACAA
	650	AATGTTATCCATGGATTATAACAAACAGT
	651	ACTTTATGCACACAAGTAACTAGTGACAGT
	652	ACTAGTGACAGTACATATAAAATGAAAATTTAA
	653	ATGGATTTACTACATTACAAGCTAATAAAA
	654	TTGGTGCAATGGATTTACTACATTACAAGCTA
	655	GTGCAATGGATTTACTACATTACAAGCTAATA
	656	ATAACAGGAATGCATTTCTATGGATTAT
	657	TTCTGCTGTCTTCTAGTGACAGTACATA
	658	TCTAGTGACAGTACATATAAAATGACAATTTAA
	659	TCTATAGAGTCTCCATACCTCTACATATGATCCT
	660	TGGGCCTTATGTAGCCAATAAGGCTTATTAATAACTG
	661	GCCAATAAGGTTATTAATAACTGGGAATCAGAG

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	662	CAATAAGGCTTATTAATAACTGGGAATCA
	663	AATAAGGCTTATTAATAACTGGGAATCAGA
	664	TCTTCCATACCTCTACATATGATCCTCTAA
	665	TCCATACCTCTACATATGATCCTCTAAAGTTAAGGAAT
	666	TTATCTACCTCTATAGAGTCTTCCATACCTCTACA
	667	ATACCTCTACATATGATCCTCTAAAGTTAAG
	668	TTCTACATATGATCCTCTAAAGTTAAGGAATATACC
	669	TATGTAGCCAATAAGGCTTATTAATAACTGGGA
	670	ACCAATAAGGACAGTAGGGATAATGTGTCT
	671	ACCAATAAGGACAGTAGGGATAATGTGT
	672	ACCAATAAGGACAGTAGGGATAATGTG
	673	CCTCTATAGAGTCTTCCATACCTCTACAT
	674	TCCATACCTCTACATATGATCCTCTAAAGTTAA
	675	GTTATTACGCAGGATGTTAGGGATAATGTG
	676	AGCTACAGCTGTTATTACGCAGGATGTTAGG
	677	ACGCAGGATGTTAGGGATAATGTGTCAGTTGAT
	678	CTACAGCTGTTATTACGCAGGATGTTAGGGATAATGTGTC

(계속)

[0081]

[0082]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	679	ACAGCTGTTATTACGCAGGATGTTAGGGAT
	680	TGTTATTACGCAGGATGTTAGGGATAATGT
	681	TTACGCAGGATGTTAGGGATAATGTGTCAG
	682	TACACAAAATCCTGTGCCAAGTACATATGA
	683	CCTGTGCCAAGTACATATGACCCCTACTAAGTTAA
	684	GACAACAAACAGACTCAGTTATGTATAATAGGCTGTGC
	685	TCATCATATTATTAAATAAGGGATGACCACT
	686	ACATCTGTTGACAACAAACAGACTCAGTTATGTA
	687	ATCATATTATTAAATAAGGGATGACCACTAAGG
	688	TGTTGACAACAAACAGACTCAGTTATGTATAAT
	689	TATTATTAAATAAGGGATGACCACTAAGGCCA
	690	TTGACAACAAACAGACTCAGTTATGTATAATAGGCT
	691	GCGGTTCCCCAACATTACTCCAAGTAACCTTAAAGC
	692	TCCCCAACATTACTCCAAGTAACCTTAAAGC
	693	AAACAGACTCAGTTATGTATAATAGGCTGTG
694	CAGACTCAGTTATGTATAATAGGCTGTG	
695	TCTGTTGACAACAAACAGACTCAGTTATGTATAATAGG	

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	696	TCTGTTGACAACAAACAGACTCAGTTATGTATAAT
	697	GTTGACAACAAACAGACTCAGTTATGTATAATAGG
	698	TGTTGACAACAAACAGACTCAGTTATGTATAATAGG
	699	TCTGTTGACAACAAACAGACTCAGTTATGTATAATAGGCT
	700	GCTGCGGTTCCCCAACATTACTCCAAGT
	701	GCGGTTCCCCAACATTACTCCAAGTAAC
	702	GCGGTTCCCCAACATTACTCCAAGTAACTTAA
	703	TAATGGCATATGTTGGGCAATCAGTTGTTGTACAG
	704	ACTAGGAGTAGGAAAAAAAGCACTGCTTTG
	705	GGGCCACAATAATGGCATATGTTGGGCAATCAGTTGTT
	706	TATGTTGGGCAATCAGTTGTTGTACAGTT
	707	TAGGAGTAGGAAAAAAAGCACTGCTTTGTA
	708	CACAATAATGGCATATGTTGGGCAATCAGT
	709	ACAATAATGGCATATGTTGGGCAATCAGTTGTTGT
	710	TACGGTTATTAAATAATTGGGATTCTGAG
711	GAGGTTAAAAGGAAAGCACATATAAAAATGAAAATTTA	
712	TTTATGTGCTGAGGTTAAAAGGAAAGCACA	

(계속)

[0083]

[0084]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	713	TTGTAACCAAGTACGGTTATTAAATAATTGGGA
	714	GTAAAAAGGAAAGCACATATAAAAATGAAAAT
	715	AAAAAAGGAAAGCACATATAAAAATGAAAATTTAAGGAA
	716	GGAAAGCACATATAAAAATGAAAATTTAAGGAATACCTT
	717	TGTAACCAAGTACGGTTATTAAATAATTGGGATTCTGA
	718	TGTGCTGAGGTTAAAAGGAAAGCACATATAAAAATGAAA
	719	CCAGTACGGTTATTAAATAATTGGGATTC
	720	CTGAGGTTAAAAGGAAAGCACATATAAAAAT
	721	TTAAAAAGGAAAGCACATATAAAAATGAAAAT
	722	CTGAGGTTAAAAGGAAAGCACATATAAAAAT
	723	TGCTGAGGTTAAAAGGAAAGCACATATAAAAAT
	724	AAAAAGGAAAGCACATATAAAAATGAAAATTTAAGGA
	725	TGCTGAGGTTAAAAGGAAAGCACATATAAAAATGAAAAT
	726	TGCTGAGGTTAAAAGGAAAGCACATATAAAAAT
	727	TTTATGTGCTGAGGTTAAAAGGAAAGCACATATAAAAATGAAAAT
	728	TTTATGTGCTGAGGTTAAAAGGAAAGCACATATAAAAAT
	729	TTTATGTGCTGAGGTTAAAAGGAAAGCACATATA

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	730	GGTAAACCTGGTATAGATAATAGGGAATGT
	731	TGGTAAACCTGGTATAGATAATAGGGAATGT
	732	TTTATGTGCTGAGGTTAAAAGGAAAGCAC
	733	CCTTGGGCACGGTGCAACCAATAAGGTTATTAAATAACT
	734	TTAGTACTGCTACAGAACAGTTAAGTAAATATGATGCACG
	735	GGCACGTTGCAACCAATAAGGTTATTAAATAACTGTGCC
	736	CGTTGCAACCAATAAGGTTATTAAATAACTGTGCC
	737	GCTACAGAACAGTTAAGTAAATATGATGCACGAAAAAT
	738	TTATTATGGCCTTGGGCACGGTGCAACCAATAAGGTT
	739	ACAGAACAGTTAAGTAAATATGATGCACGAAAA
	740	ACCAAATAAGGTTATTAAATAACTGTGCCCTCAGAC
	741	AGAACAGTTAAGTAAATATGATGCACGAAAAATTAAATCAG
	742	TAACATGACTATTAGTACTGCTACAGAACAGTTAAGTAA
	743	GTAAATATGATGCACGAAAAATTAAATCAGTACCTTAG
	744	TGACTATTAGTACTGCTACAGAACAGTTAAGTAAATATGA
	745	GAACAGTTAAGTAAATATGATGCACGAAAA

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	746	TAATGCTACAGAACAGTTAAGTAAATATGATGCACG
	747	AATAATAATGTTATAGAACAGATAGTAGGGAC
	748	ATAGTAGGGACAATATATCAGTTGATGGCA
	749	TATTAGTACTGCTACAGAACAGTTAAGTAA
	750	ACAGAACAGTTAAGTAAATATGATGCACGA
	751	GAACAGTTAAGTAAATATGATGCACGAAAAATTAA
	752	AGGTCATCCGGGACAGCCTGCCAAGTTT
	753	TTACCTCAGAACATCACAAATTATTAAATAAGCCT
	754	CTTTAATATAAAGGTCTACGGGACAGCCTCG
	755	CAGAACATCACAAATTATTAAATAAGCCTTATT
	756	CCAATGGCTGCCCCACCTATTCAAGGC
	757	CACAGCCAGGGCTGATAACAGGGAAATGCTT
	758	TGGCTGTCCCCACCTATTCAAGGCCTAC
	759	GGGTCTGATAACAGGGAAATGCTTATCTATG
	760	CACAGCCAGGGCTGATAACAGGGAAATGCT

(계속)

[0085]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	761	CAGGGAATGCTTATCTATGGATTATAAACA
	762	CACTGAAGTAACTAAGGAAGGTACATATAA
	763	ATTATGCACTGAAGTAACTAAGGAAGGTAC
	764	ACTAAGGAAGGTACATATAAAATGATAATTTAA
	765	TGATACCAAAAGATACACGTGATAATGTATCTG
	766	ATCTGCTGTTGATACCAAAAGATACACGTGA
	767	GCCCCGACCGATTCAACACCTACACAGGCCAGACCA
	768	GCCCCGACCGATTCAACACCTACACAGGCCAGACCA
	769	ACCAAAGATAACGTGATAATGTATCTGGATTATA
	770	CCCGACCGATTCAACACCTACACAGGCCAGAC
	771	CTGTTGATACCAAAAGATACACGTGATAATGTG
	772	GTTGATACCAAAAGATACACGTGATAATGTATCTGTGGA
	773	CGATTTCAACACCTACACAGGCCAGACCA
	774	ATCTGCTGTTGATACCAAAAGATACACGTGA
	775	CTGCTGTTGATACCAAAAGATACACGTGA
	776	TCTGCTGTTGATACCAAAAGATACACGTGAT

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	777	ATCTGCTGTTGATACCAAAAGATACACGTGATAATG
	778	GTTGATACCAAAAGATACACGTGATAATGTATCTGTGG
	779	TCTGCTGTTGATACCAAAAGATACACGTGATAATGTATCTG
	780	TCTATTCCAATGTATAACACACCTACCACTACCACT
	781	TCTATTCCAATGTATAACACACCTACCACTACCACT
	782	TCCTAGTAGTTATGTATATGCCCTCGCCT
	783	AGTAGTTATGTATATGCCCTCGCCTAGT
	784	AGTAGTTATGTGTATGCCCTCGCCTAGC
	785	TGAATCAGCTGTACCAAATATTATGATCCT
	786	AGACTCTACTGTACCAAGCTGTATGATTCT
	787	TTCCTCCAACAAAATCTAACAGCAGTAG
	788	TTCCTCCAACAAAATCTAACAGCAGTAG
	789	TCCTAAGGACAGTAGGAAATATGTTCACT
	790	TCAGTGGACTATAACAAACGCAACTATG
	791	TCCACTACTACAGACTCTACTGTACCACT
	792	GCTGTACCAAATATTATGATCCTAACAAATTAA
	793	TTTGTCTACTACTGAATCAGCTGTACCAA
	794	ACTGTACCAAGCTGTATGATTCTAACAAATTAA

[0089]

[0090] 이하에, 본 발명에 의한 핵산 검출 방법을 실시예를 참조하여 구체적으로 설명한다.

[0091] (1) 합성 올리고뉴클레오티드

[0092] 상기 표 1에 기재된 서열을 조합하여, 인간 유두종 바이러스의 검출 및 유전자형의 분류에 사용되는 핵산 프라이머를 제조한다. 구체적으로, 제1 서열군과 제2 서열군의 서열, 제1 서열군과 제3 서열군의 서열, 또는 제2 서열군의 서열의 상보쇄와 제3 서열군의 서열을 서로 직접 연결하거나 또는 스페이서를 통해 연결한다. 또한, 제4 서열군의 서열 또는 이들의 상보 서열을 제조한다. 프라이머의 합성 시, 당업자에게 공지된 임의의 방법을 사용할 수 있다.

[0093] (2) LAMP 반응 용액

[0094] LAMP 반응 용액은 이하의 표 6의 조성을 가진다. 사용된 주형으로는 HPV16이 클로닝된 플라스미드 DNA를 사용하였다.

표 6

시약	부피
멸균 초순수	1.5 μ L
Bst DNA 폴리미라제	1 μ L
완충액	12.5 μ L
Tris HCl (pH8.0)	40 mM
KCl	20 mM
MgSO ₄	16 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 mM
트윈(Tween) 20	0.2 %
베타인	1.6 M
dNTP	2.8 mM
F3-프라이머 (10 μ M)	0.5 μ L
B3- 프라이머 (10 μ M)	0.5 μ L
FIP- 프라이머 (10 μ M)	4 μ L
BIP- 프라이머 (10 μ M)	4 μ L
주형 (클론된 HPV16)	1 μ L
합계	25 μ L

[0095]

또한, 이하의 표 7에 나타낸 LAMP 증폭 반응용 핵산 프라이머 서열을 동시에 사용한다.

표 7

표 7 LAMP 증폭 반응용 핵산 프라이머 서열

명칭	서열번호	서열 (5' → 3')
FIP 프라이머	12	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTCTTGTACTGTGGTAGATACTAC
F3 프라이머	13	GCACAGGGCCACAATAATGG
BIP 프라이머	14	TTTTTGGAAGTAAATTAAAGGACGTCTAAAGGAAACTGATC
B3 프라이머	15	CCTGCTTGTAGTAAAATTT

[0097]

(3) LAMP법에 의한 핵산 증폭

[0099]

온도는 58°C, 시간은 1시간으로 하여 핵산 증폭을 행한다. 주형 대신에 멸균수을 첨가한 것을 네거티브 컨트롤로 한다. 증폭된 LAMP 산물을 아가로스 젤 전기 영동으로 분석한 결과, LAMP 산물에 전형적인 래더형 패턴이 나타났다. 한편, 주형 DNA가 포함되어 있지 않은 경우에는 증폭이 전혀 보이지 않았다. 따라서, 선택된 프라이머 세트를 이용하여 유두종 바이러스의 서열 특이적 증폭을 행할 수 있었다.

[0100]

(4) 핵산 프로브 고정화 슬라이드 유리의 제조 (도 5)

[0101]

DNA 프로브 (1) 내지 (5)를 슬라이드 (6) 상에 고정화시켰다. 이들의 핵산 서열을 하기 표 8a에 나타냈다.

[0102]

[표 8a]

표 8a 프로브 서열

명칭	서열 번호	상보 서열 (5' → 3')
HPV16	7	TCTGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGAC
HPV18	8	TGCCAGGTACAGGAGACTGTGTAGAAGCA
HPV26	9	AGTGGATGCAGATGCTGCAGATAATGTACT
HPV31	10	GTATCACTGTTGCAATTGCAGCACAAACA
rDNA	11	CTGGACGAAGACTGACGCTC

* 말단은 아미노기 수식.

[0103]

[0104]

HPV 16 내지 31는 HPV의 서브타입에 대하여 특이적인 서열로 사용하였고, rDNA는 네거티브 컨트롤로서 사용하였다. 각각의 프로브는 말단이 아미노기로 수식되어 있고, 카르보디이미드 처리한 슬라이드 유리 기판에 프로브 용액을 스포팅(spotting)함으로써 고정화시켰다. 최종적으로는 초순수로 세정하고 공기건조하여 DNA 칩을 제조하였다.

[0105]

(5) 핵산 프로브에의 LAMP 산물의 혼성화

[0106]

핵산 시료로는 상기 (3)에서 증폭한 LAMP 산물을 이용하였다. (4)에서 제조한 DNA 칩을 2×SSC의 염을 첨가한 LAMP 산물 용액에 침지시키고, 35°C에서 60분간 정치함으로써 혼성화시켰다. 계속해서, Cy5 표지한 서열 번호 7의 핵산을 첨가하여 35°C, 15분 정치한 후, 초순수로 가볍게 세정하였다. 형광 강도는 아머샴(Amersham) 사 제조 타이훈(Typhoon)을 이용하여 검출하였다.

[0107]

(6) 결과

[0108]

형광 측정의 결과, HPV16의 프로브를 고정화한 스포트으로부터만 유의한 발광이 검출되었으며, 이는 LAMP 반응에 의해 증폭한 핵산을 서열 특이적으로 검출할 수 있음을 나타낸다.

[0109]

(7) 핵산 프로브 고정화 전극의 제조 (도 6)

[0110]

DNA 프로브 (7) 내지 (11)을 지지체 (12) 상에 위치시킨 전극 (13) 상에 고정화시켰다. 이들의 핵산 서열을 하기 표 8b에 나타냈다. 접속부 (14)는 지지체 (12) 상에 위치할 수 있다.

[0111]

[표 8b]

표 8b 프로브 서열

명칭	서열 번호	상보 서열 (5' → 3')
HPV16	7	TCTGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGAC
HPV18	8	TGCCAGGTACAGGAGACTGTGTAGAAGCA
HPV26	9	AGTGGATGCAGATGCTGCAGATAATGTACT
HPV31	10	GTATCACTGTTGCAATTGCAGCACAAACA
rDNA	11	CTGGACGAAGACTGACGCTC

* 말단은 티울기 수식.

[0112]

HPV 16 내지 31는 HPV의 서브타입에 대하여 특이적인 서열로 사용하였고, rDNA는 네거티브 컨트롤로서 사용하였다. 각각의 프로브는 말단을 티울기로 수식되어 있고, 금 전극에 프로브 용액을 스포팅함으로써 고정화시켰다. 최종적으로는 초순수로 세정하고 공기건조하여 DNA 칩을 제조한다.

[0113]

(8) 핵산 프로브에의 LAMP 산물의 혼성화

[0114]

(7)에서 제조한 DNA 칩을 2×SSC의 염을 첨가한 LAMP 산물 용액에 침지시키고, 35°C에서 60분간 정치함으로써 혼성화시켰다. 이 전극을 삽입제 (intercalating agent)인 퀘스트 33258을 50 μM 함유하는 인산 완충액 중에 15분간 침지시킨 후, 퀘스트 33258 분자의 산화 전류 반응을 측정한다.

[0115]

(9) 결과

[0116]

전류 측정 결과는 HPV16의 프로브를 고정화한 스포트으로부터만 유의한 전류 신호가 검출가능했음을 나타냈다. 따라서, LAMP 반응으로 증폭한 핵산을 서열 특이적으로 검출할 수 있는 것이 명백해졌다.

[0117]

(10) LAMP법에 의한 멀티 증폭 1

[0119] 표 9에 나타낸 프라이머를 이용하여 1종의 주형에 대한 증폭을 행하였다. 그 결과, LAMP 증폭에 특징적인 래더형 밴드가 관찰되어, 유전자형 특이적인 증폭이 확인되었다 (도 7). 그후, 복수의 프라이머, 즉, 각 A 내지 D의 4그룹의 복수의 혼합 프라이머 세트를 이용하여 1종의 주형에 대한 증폭을 행하였고, 그 결과 유전자형 특이적인 증폭이 확인되었다 (도 8).

표 9

그룹	유형	서열 번호
A	16	116
		117
		210
		211
B	18	120
		121
		212
		213
C	58	125
		128
		230
		231
C	35	136
		137
		232
		233
B	56	142
		143
		234
		235
A	31	147
		148
		214
		217
A	45	152
		158
		218
		220
B	33	165
		167
		222
		225
A	52	171
		174
		226
		228
D	59	179
		180
		236
		237
D	39	187
		188
		240
		242
C	51	194
		196
		244
		245
D	68	202
		203
		247
		253

[0120]

[0121] (11) LAMP 멀티 증폭 산물의 검출 1

[0122]

도 8에 나타낸 증폭 산물을, 서열 번호 605, 623, 635, 652, 683, 763 및 793로 나타낸 프로브를 동일 칩 상에 고정화시킨 전류 검출형 DNA 칩을 이용하여 검출하였다. 이들 프로브는 각각 서열 번호 16, 18, 31, 33, 45, 58 및 68의 핵산에 특이적으로 반응하도록 설계되었다. 주형 16과 18만을 이용하여 증폭을 행한 샘플을 반응시킨 결과, 주형에 대응하는 전극으로부터만 전류의 증가가 나타나, 유전자형 특이적인 검출이 확인되었다 (도 9).

[0123]

(12) LAMP법에 의한 멀티 증폭 2

[0124]

표 10에 나타낸 프라이머 세트 A 내지 D 그룹을 각각 혼합하여 복수의 프라이머 세트를 얻었다. 복수의 프라이머 세트를 이용하여 1종의 주형에 대한 증폭을 행하였다. 주형 농도 10^3 카피/반응, 증폭 온도 65°C 에서 2시간 동안 증폭을 행하였다. 그 결과, 유전자형 특이적인 증폭이 확인되었다 (도 10).

표 10

그룹	유형	서열 번호
A	16	254 255 257 258
	18	120 121 212 213
	35	125 128 230 231
	56	136 139 232 233
A	31	142 143 234 235
	45	147 148 214 217
C	33	281 388 284 285
	52	379 380 381 382
A	59	171 174 404 403
	39	302 303 304 305
D	51	187 188 240 242
	68	286 287 288 289
	68	202 411 250 253

[0125]

[0126] (13) LAMP 멀티 증폭 산물의 검출 2

도 10에 나타낸 증폭 산물을, 서열 번호 602, 623, 635, 647, 657, 681, 694, 750, 762, 774 및 793으로 나타낸 프로브를 동일칩 상에 고정화시킨 전류 검출형 DNA 칩을 이용하여 검출하였다. 이들 프로브는 각각 서열 번호 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 56, 58, 59 및 68의 핵산에 특이적으로 반응하도록 설계되었다. 11종 각각을 주형으로 이용하여 증폭을 행하여 얻은 샘플을 반응시킨 결과, 주형에 대응하는 전극으로부터만 전류의 증가가 나타나, 11종의 유전자형 특이적인 검출이 확인되었다.

[0128] (14) LAMP법에 의한 멀티 증폭 3

표 11에 나타낸 A 내지 D 그룹의 프라이머 세트를 혼합하여 복수의 프라이머 세트를 얻었다. 구체적으로, 투브 A는 프라이머 16, 35 및 59의 프라이머 세트를 함유하고, 투브 B는 프라이머 18, 39 및 56의 프라이머 세트를 함유하고, 투브 C는 프라이머 45, 51, 58 및 68의 프라이머 세트를 함유하고, 투브 D는 프라이머 31, 33 및 52의 프라이머 세트를 함유하였다. 또한, 투브 E는 인간의 β -글로빈 유전자를 증폭하기 위한 프라이머로서 서열 번호 801, 802, 803, 804의 프라이머를 함유하였다 (표 12). 복수의 프라이머 세트를 이용하여 1종의 주형에 대한 증폭을 각각 행하였다. 주형으로는 각 HPV 형에 대응하는 플라스미드를 이용하고, 10^3 카피/반응의 농도 및 63°C에서 1.5시간 동안 혼성화시켰고, 그 결과, 유전자형 특이적인 증폭이 확인되었다.

표 11

그룹	유형	서열 번호
A	16	126
		128
		132
		136
		138
	35	277
		281
		278
		276
		280
	59	526
		527
		524
		523
		529
B	18	162
		164
		167
		166
		170
	39	319
		320
		327
		324
		328
	56	453
		454
		457
		456
		458

(계속)

[0130]

그룹	유형	서열 번호
C	45	366
		363
		361
		359
		370
	51	395
		388
		399
		391
		402
	58	477
		475
		474
		476
		480
	68	548
		546
		549
		547
		572
D	31	210
		208
		203
		205
		214
	33	248
		251
		242
		244
		255
	52	420
		422
		425
		429
		431

[0131]

표 12

그룹	서열 번호	서열 (5' → 3')
β-글로빈	795	TGATGGTTATGGGGCCAAGAG
	796	GAGGTCAGTGTGATGACAGCCGTTAGGGTTGAAGTCCTAACCTCC
	797	AATCTACTCCAGGAGCAGGGCTACTGAAACACAGTGTGTCAGAAG
	798	GAGTCAGATGCCACCATGGT
	799	TGAGGTCTAAGTGATGACAGCCGCTGAGGGTTGAAGTCCAACTCC
	800	AATCTACTCCAGGAGCAGGGAACTGAAACACAGTTGTGTCAGAAGC
	801	AGGGCTGAGGGTTGAAGTC
	802	TGAGGTCTAAGTGATGACAGCCGCTACTCCTAAGCCAGTGCCAGA
	803	CTAGGGTTGCCAACTCTCCAAATGATGGCTCTGCCCTGAC
	804	TGAACACAGTTGTCAGAAGC

[0132]

(15) LAMP 멀티 증폭 산물의 검출 3

[0134]

상술한 증폭 산물을, 서열 번호 600, 623, 630, 641, 654, 673, 676, 699, 725, 750, 752, 771 및 783으로 나타낸 프로브를 동일칩 상에 고정화시킨 전류 검출형 DNA 칩을 이용하여 검출하였다. 이들 프로브는 각각 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 및 68의 서열에 특이적으로 반응하도록 설계되었다. 또한, 반응의 포지티브 컨트롤로서, β -글로빈 유전자를 검출하기 위한 프로브로서 서열 번호 813을, 그리고 네거티브 컨트롤로서 서열 번호 814도 동일 기판 상에 고정화시켰다 (표 13). 13종의 각각을 주형으로 하여 증폭을 행하여 얻은 샘플을 반응시킨 결과, 주형에 대응하는 전극으로부터만 전류의 증가가 나타나, 13종의 유전자형 특이적인 검출이 확인되었다.

표 13

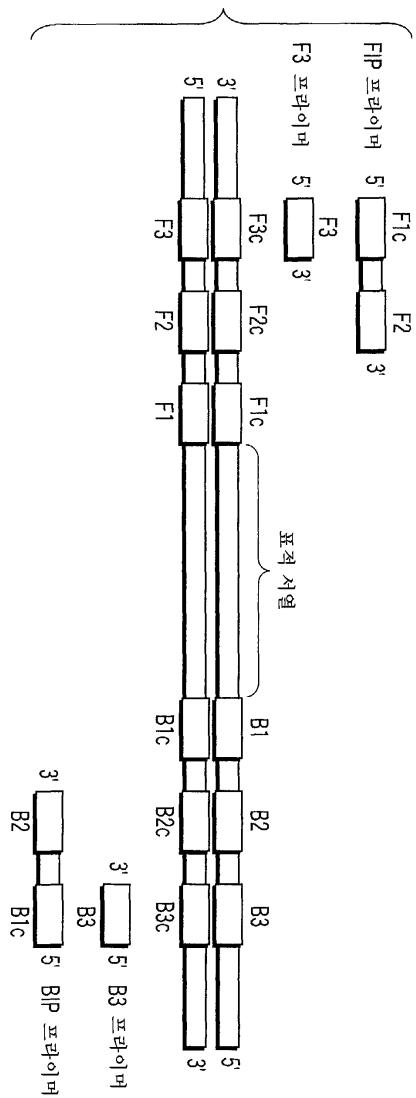
그룹	서열 번호	서열 (5' → 3')
	805	ATAAAGTCAGGGAGGCCATCTATTGCTTAC
	806	TCAAGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATT
	807	GTCAGGGCAGGCCATCTATTGCTTACATTGCTT
포지티브 컨트롤	808	AGGCAGGGCAGGCCATCTATTGCTTACAGG
	809	AAAGTCAGGGCAGGCCATCTATTGCTTACATTG
	810	TGGCATAAAGTCAGGGCAGGCCATC
	811	CAAGGAGGGAGGCCAGGGCTGGCAT
	812	CAAGGAGGGCAGGCCAGGGCTGGCAT
	813	CAAGGAGGGAGGCCAGGGCTGGCAT
네거티브 컨트롤	814	GACTATAACATGCTTTCGGTGGCA

[0135]

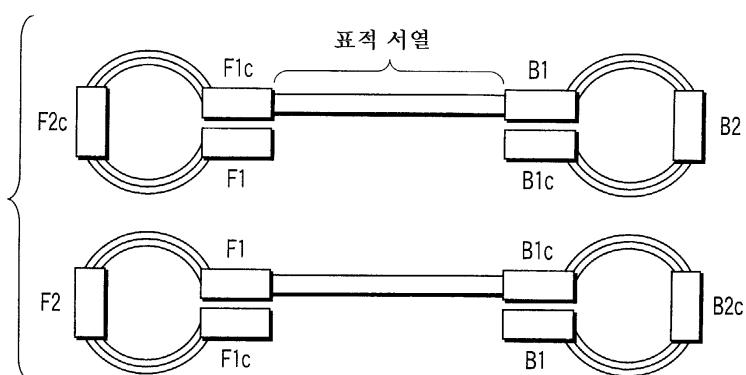
추가적인 장점 및 변형은 당업자가 쉽게 떠오를 것이다. 따라서, 본 발명의 넓은 국면은 본 명세서에 도시 및 설명된 특정 세부사항 및 대표적인 실시태양에 한정되지 않는다. 즉, 첨부된 청구범위 및 그 균등물에 의해 정의된 발명의 일반적 사상의 본지 또는 범위를 벗어나지 않고 다양한 변형이 이루어질 수 있다.

도면

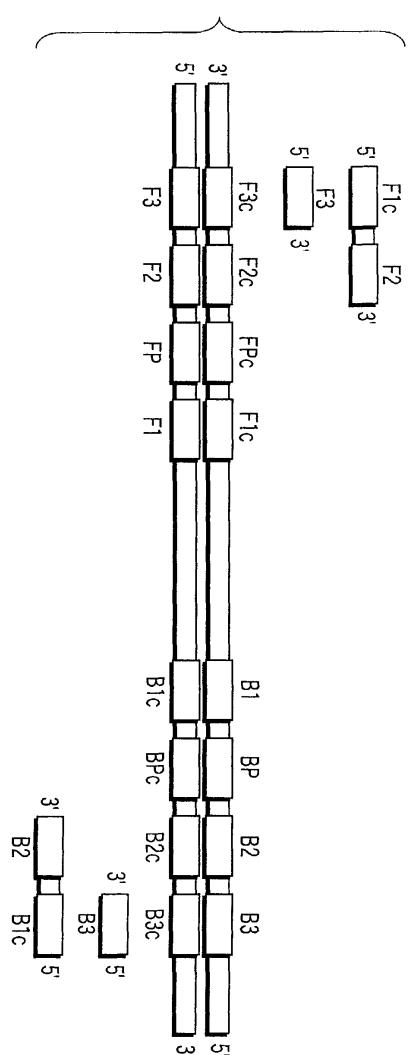
도면1



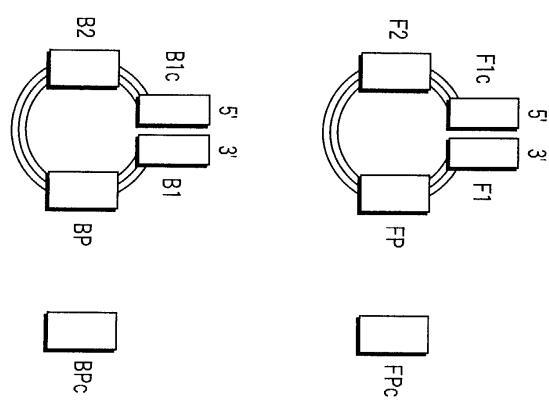
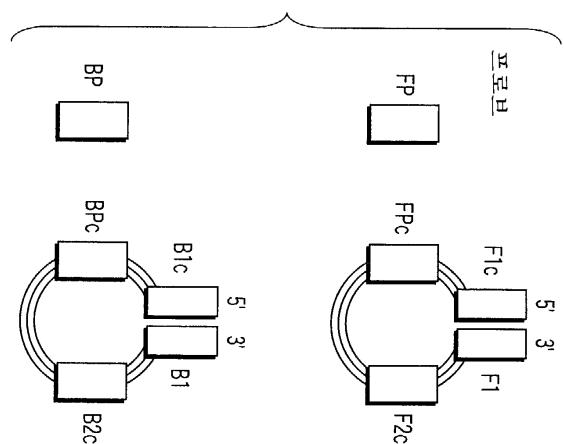
도면2



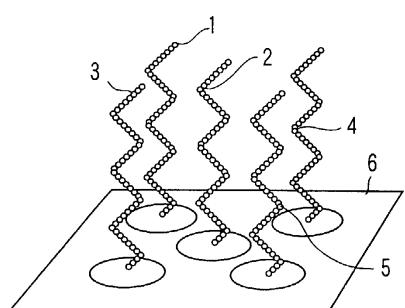
도면3



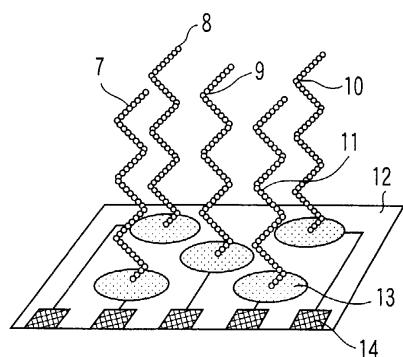
도면4



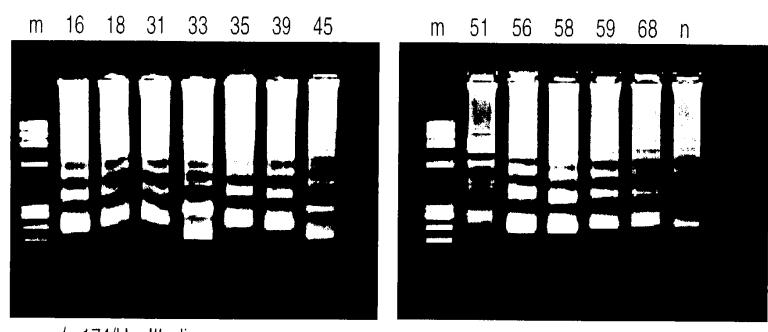
도면5



도면6

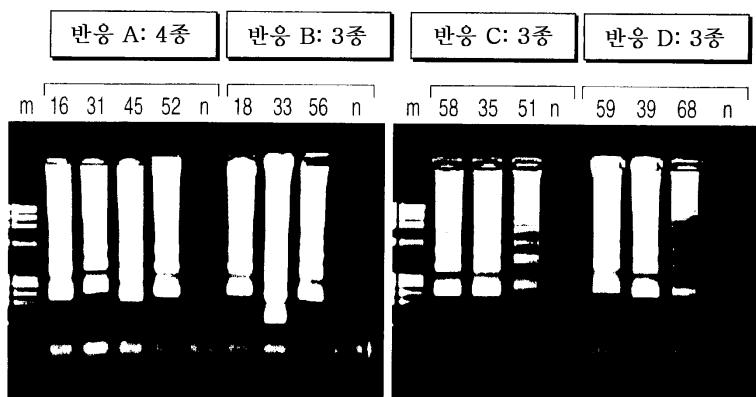


도면7



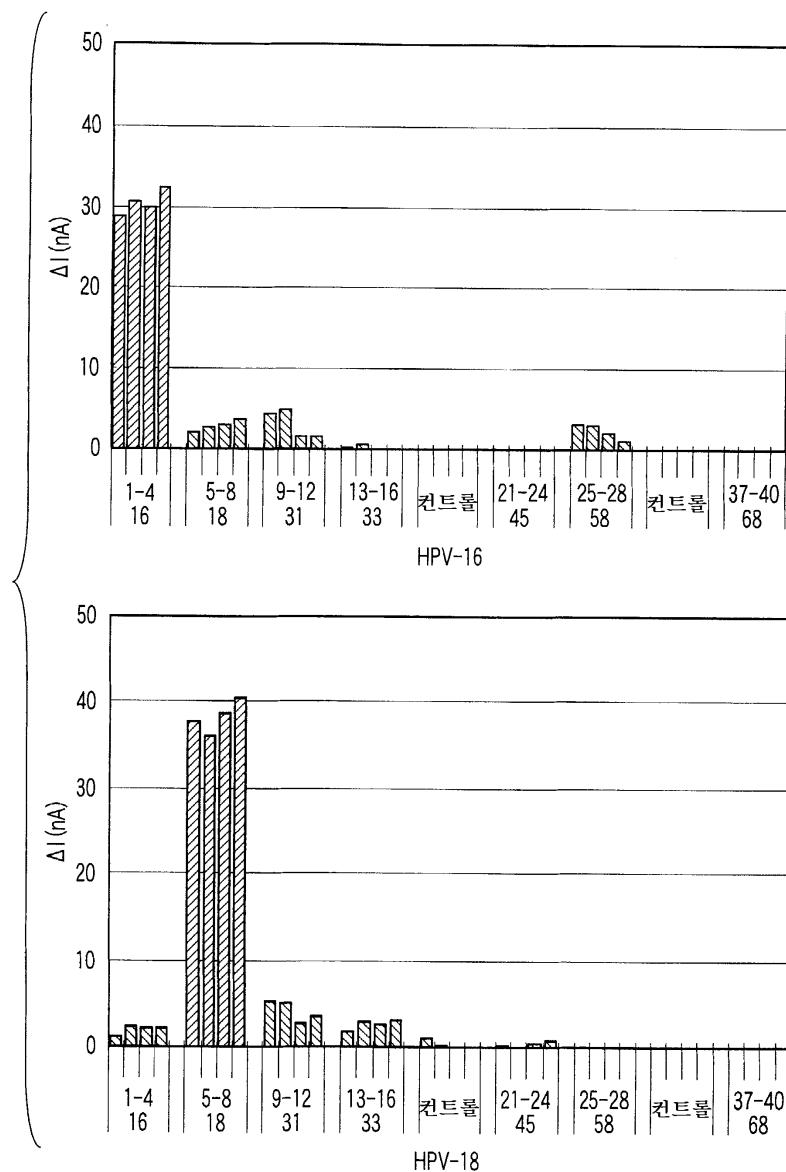
m: ϕ X174/HaeIII dig.
n: ddH₂O

도면8



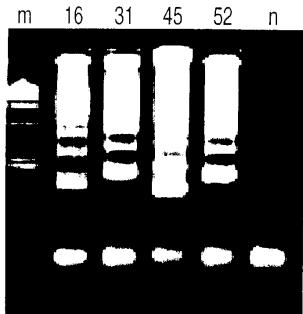
m: ϕ X174/HaeIII dig.
n: ddH₂O

도면9



도면10

반응 A



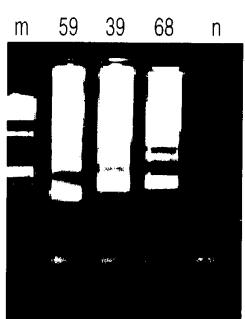
반응 B



반응 C



반응 D



도면11

5821 ttctctaaagt atcaggatta caatacaggg tatttagaat acatttaccc gaccccaata
 5881 agttttgtt toctgacacc toattttata atccagatac acagccgtcg gtttggcct
 5941 gtgttaggtg tgaggtaggt cgtggcgcg cattagggt gggcattgtt ggcacatcc
 6001 tattaaataa attggatgac acagaaaatg ctatgtctta tgcagcaat gcagatgtg
 6061 ataatacaga atgtatatac atggattaca aacaaacaca atttgttta attgttgca
 6121 aaccacat aggggaacac tggggaaag gatccccatg taccatgtt gcagtaatc
 6181 cagggtattt tccaccatia gagtaataa acacagttat tcaaggatgtt gatatggtc
 6241 atactggctt tgggtctatg gactttacta cattacaggc taacaaaatg gaagtccac
 6301 tggatattt tacatctt tgcaaaatatac cagattataa taaaatggtg tcagaaccat
 6361 atggcagac cttatttttt tatttacaa gggaaaaat gtttggtaga cattttttta
 6421 ataggcgtt tactgttgtt gaaaatgtac cagacgattt atacattaaa ggctotgg
 6481 ctactgcaa tttagccatg tcaaatattt ttctctacacc tagtggttt atgttaccc
 6541 ctgtatccaa aatattcaat aaacccattt ggttacaaacg agcacaggc cacaatata
 6601 gcattttgtt gggtaactaa ctatttgtt ctgttgttga tactacacgc agtacaataa
 6661 tgtcattatg tgttgttgcata tctacttcag aaactacata taaaatatac aactttaagg
 6721 agtacccatg acatggggg gaatatgtt tacagttat ttttcaactg tgccaaaataa
 6781 ctttaacttc acgacgttagt acatacatac attctatgaa ttccactatt ttggaggact
 6841 ggaattttgg tctacaaccc ccccccaggag gcacactaga agataactt atgttggaa
 6901 cccaggcaat tgctgtcaaa acacatcaccc ttccacccatc taagaagat gatccctta
 6961 aaaaatcac tttttggaa gtaaattttaa agggaaaatgtt totgcaagac ctagatcgt
 7021 ttccctttagg acgcaaaat tttactacaa ccggattgaa ggccaaacca aaattttacat
 7081 tagggaaaacg aaaaatcata cccacccactc caatgtaccc tacaactgtt aaacggaaaa
 7141 aacgttaatgtt gtaagtattt tattgtatgtt gatattgtt gttttttgtt gtatgttt
 7201 gtatgtgtt gtatgtgtt gtaatattt aattgtatgtt gttttttgtt gtatgtata
 7261 ataaacacgt gtgtatgtt tttaatgtc ttgttaactt atgtgtat gcaataaaaa
 7321 taaaacttattt tttaacacac ctactatgtt tttttttttt attttttttt tataaaactat
 7381 atttgttaca ttctgtttttt gttttttata tactatattt tgtagccca ggccatttt
 7441 gtatgttcaaa cccaaatggg ttgtatgtt ttggccaaat aatgttttttt tttaatagt
 7501 ttatgttcc tgaccctgca tggcttgcac ccattccatt gttttttata ctgcactatg
 7561 cctgttttcc tgaccctgca tggcttgcac ccattccatt gttttttata ctgcactatg
 7621 tgcaactact gaatcactat gtacattgtt tcaatataaaa taaatcacta tgcccaacg
 7681 ctttacatac cgtgtttagg cacatattt tggcttgggtt taactaactt aattgtat
 7741 ttggcataag gtttaaactt ctaaggccaa cttaaatgtca ccctagttca tacatgaact
 7801 gtgttaaaggt tagtcalaca ttgttgcattt gtaaaaatgc acatgggtgt gtccaaaccc
 7861 atttttgggtt acacattac aagcaacttata tataataata ctaa

서열 4

서열 2

서열 3

서열 1

서열 5

서열 6

서열 목록

서열목록 전자파일 첨부