



(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.)

(73) 특허권자
세키스이 메디칼 가부시기가이샤
일본국 도쿄도 츄오구 니혼바시 3쵸메 13-5
가부시기가이샤 도시바
일본국 도쿄도 미나토꾸 시바우라 1쵸메 1방 1고
(72) 발명자
하시모토, 고지
일본 105-8001 도쿄도 미나토꾸 시바우라 1쵸메
1방 1고 가부시기가이샤 도시바 지적재산권 부서
내
이토, 게이코
일본 105-8001 도쿄도 미나토꾸 시바우라 1쵸메
1방 1고 가부시기가이샤 도시바 지적재산권 부서
내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이석재, 장수길

전체 청구항 수 : 총 18 항

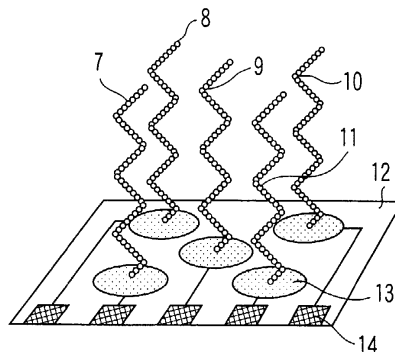
심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 **핵산 증폭법을 이용한 인간 유두종 바이러스의 검출 방법 및 핵산채 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 핵산채를 증폭시키는 공정과, 상기 증폭 반응 후에 증폭 산물의 존재를 검출하고 유전자형을 분류하는 공정을 포함하는, 인간 유두종 바이러스의 검출 및 유전자형의 분류 방법을 제공한다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

나카무라, 나오키

일본 105-8001 도쿄도 미나토꾸 시바우라 1쵸메 1
방 1 고 가부시끼가이샤 도시바 지적재산권 부서 내

호리우찌, 히데끼

일본 105-8001 도쿄도 미나토꾸 시바우라 1쵸메 1
방 1 고 가부시끼가이샤 도시바 지적재산권 부서 내

하시모토, 미찌에

일본 105-8001 도쿄도 미나토꾸 시바우라 1쵸메 1
방 1 고 가부시끼가이샤 도시바 지적재산권 부서 내

사토, 오사무

일본 103-0027 도쿄도 츄오쿠 니혼바시 3쵸메 13-5
세키스이메디칼 가부시끼가이샤 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 핵산쇄의 LAMP 증폭에 의한 증폭 산물을 얻는 공정;
상기 증폭 산물을 핵산 프로브와 혼성화시키는 공정; 및
상기 혼성화에 의하여 형성된 이중쇄를 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

기술분야

[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.

배경기술

[0002] 1980년대, 자궁경부암의 원인으로 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 양성 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, 써멀 사이클러와 같은 복잡한 온도 제어 장치가 필요한 것, 반응 시간이 2시간 이상 걸리는 점 등의 불리점이 있다. 또한 PCR법으로 서는, 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, 이들 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 장애를 일으키고, 그 결과 혼성화 효율의 악화로 이어진다 (예를 들면, 일본 특허 공개 제 2005-095043호 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 또다른 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 등은 중합효소 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 F2c와 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 BPc이 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 나타난 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, 제3 서열군에서 선택되는 서열과 제1 서열군에서 선택되는 서열의 상보 서열이 서로 결합된 서열, 제2 서열군에서 선택되는 서열의 상보 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 엄밀히 상보적인 서열뿐만 아니라, 상기 서열군에 대하여 엄격한 조건 하에서 혼성화할 수 있는 서열도 포함된다. 이러한 조건 하에서는 통상적으로, 90 내지 95%의 서열 상동성이면 반응의 진행에 충분한 것으로 보인다. 이러한 엄격한 조건은 당업자에게 자명할 것이며, 예를 들면 20℃ 내지 65℃의 범위의 온도에서 2×SSC 완충액, 0.1% w/v SDS이다. 특히 바람직하게는 65℃ 이상의 온도에서 0.1×SSC 완충액, 0.1% w/v SDS인 높은 엄격도의 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 엄격한 조건 하에서 혼성화할 수 있는 서열이다. 또한, 서열 번호 1, 2 및 3, 및 그 상보쇄 중의 하나 이상은, 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, 데옥시이노신(dI), 및 그렌 리서치(Gren Research)사로부터 입수가 가능한 3-니트로피콜, 5-니트로인돌, 데옥시리보푸라노실(dP), 데옥시-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)이 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 BPC는 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, 튜브당 1 프라이머 세트, 또는 튜브 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), 퀸처(quencher) (TAMRA, 이클립스(Eclipse), 다브실(Dabcyl), Au 콜로이드 등), 전자 스핀 물질 및 금속 착물 (루테튬, 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 프로브를 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 입수가능한 3-니트로피콜, 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, 전기 화학 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), 기관(예를 들면, 마이크로타이터 플레이트, 유리 기관, 실리콘 기관, 수지계 기관, 전극 기관, 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, 알루미늄, 사파이어, 포스테라이트(forsterite), 탄화규소, 산화규소, 질화규소 등의 무기 절연 재료, 및 폴리 에틸렌, 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, 페놀 수지, 우레아 수지, 에폭시 수지, 멜라민 수지, 스티렌-아크릴로니트릴 공중합체, 아크릴로니트릴 부타디엔 스티렌 공 중합체, 실리콘 수지, 폴리페닐렌옥사이드, 폴리술폰, 폴리에틸렌글리콜, 아가로스, 아크릴아미드, 니트로셀룰로 오스, 나일론, 라텍스 등의 유기 재료가 포함된다.

[0024] 핵산쇄가 고정화되는 지지체 표면은, 예를 들면 전극 재료로 구성될 수 있다. 전극 재료는 특별히 한정되는 것 은 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 예로 는, 산화규소 등의 반도체 화합물이나, CCD, FET, CMOS 등 각종 반도체 디바이스를 포함한다. 전극은 도금, 인 쇄, 스퍼터링, 증착 등에 의해 제조할 수 있다. 증착을 행하는 경우에는, 저항 가열법, 고주파 가열법 또는 전 자빔 가열법에 의해 전극막을 형성할 수 있다. 또한, 스퍼터링을 행하는 경우에는 직류 2극 스퍼터링, 바이어 스 스퍼터링, 비대칭 교류 스퍼터링, 게터 스퍼터링 또는 고주파 스퍼터링으로 전극막을 형성할 수 있다. 또한, 폴리피롤 또는 폴리아닐린의 전해 중합막이나 도전성 고분자도 사용할 수 있다. 전극 이외의 부분을 절 연하기 위한 재료는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 광중합체 또는 포토레지스트 재료인 것이 바람직하다. 레 지스트 재료로서는, 광노광용 포토레지스트, 원자의선용 포토레지스트, X선용 포토레지스트 및 전자선용 포토레 지스트가 이용된다. 광노광용 포토레지스트의 예로는, 주원료로 환화고무, 폴리신남산 또는 노볼락 수지를 함 유하는 포토레지스트를 들 수 있다. 원자의선용 포토레지스트에는 환화고무, 페놀 수지, 폴리메틸이소프로페닐 케톤(PMIPK), 폴리메틸 메타크릴레이트(PMMA) 등이 이용된다. 또한, X선용 레지스트에는, COP, 메탈아크릴레이 트 외에 박막 핸드북(오움사)에 기재된 물질을 사용할 수 있다. 또한 전자선용 레지스트에는, PMMA 등 상기 문 헌에 기재된 물질을 이용할 수 있다. 사용되는 레지스트의 두께는 100 Å 이상 1 mm 이하인 것이 바람직하다. 포토레지스트로 전극을 피복하여 리소그래피를 행함으로 면적을 일정하게 할 수 있다. 이에 따라, DNA 프로브 의 고정화량이 각각의 전극 사이에서 균일하게 되어, 재현성이 우수한 측정이 가능해진다. 레지스트 재료는 최 종적으로 제거하는 것이 일반적이지만, 유전자 검출용 전극으로서는 레지스트 재료를 제거하지 않고 전극의 일 부로서 이용할 수도 있다. 이 경우에는, 레지스트 재료로서 내수성이 높은 물질을 사용할 필요가 있다. 전극 상부에 형성하는 절연층에는 포토레지스트 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, 스퍼터링, 증착 또는 CVD 등을 이용하여 박막을 형성한 후, 포토리소그래피로 전극 노출부의 패터닝 을 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, 포트리스로그래피를 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. 이들 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 황산텍스트라이나, 연어 정자 DNA, 소 흡선 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℃ 내지 90℃의 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, 바이오틴, 헵텐, 옥시디아제나 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 이중층 부분에 선택적으로 결합하는 DNA 결합 물질을 반응시켜, 전기 화학적으로 분석한다. 이용되는 DNA 결합 물질은 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 획스트(Hoechst) 33258, 아크리딘 오렌지, 퀴나크린, 다우노마이신, 메탈로인터칼레이터, 비스아크리딘 등의 비스인터칼레이터, 트리스인터칼레이터, 폴리인터칼레이터등을 이용할 수 있다. 또한, 이들 인터칼레이터를 전기 화학적으로 활성인 금속 착체, 예를 들면, 페로센 또는 바이올로젠으로 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 필요한 임의의 다른 성분, 예컨대, 폴리머라제, dNTP, 베타인, 버퍼, 포지티브 컨트롤 DNA 및 멸균수를 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 검출용 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 프로브.
- [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 나타내었다.

표 1

표 1 대표적인 핵산 프라이머 서열

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 1 서열군	16	TGATTTACAGTTTATTTTC
	17	GAATATGATTACAGTTTATTTTC
	18	GAACAATATGATTACAGTTTATTTTC
	19	GAGGAATATGATTACAGTTTATTTTC
	20	GAGTATGATTACAATTTATTTTC
	21	GAGTTTGATTACAGTTTATTTTC
	22	GAATTGATTACAATTTATTTTC
	23	GAATATGATTACAGTTTATTTTC
	24	GAATATGATTGCAGTTTATTTTC
	25	GAATATGAATTACAGTTTGTTTC
	26	GAATTGATTACAATTTATTTTC
	27	GAATATGATATACAGTTTATTTTC
	28	GAATATGATCTACAGTTTGTTTC
	29	GAGTATGACCTGCAGTTTGTTTC
	30	GAATATGATTACAGTTTATTTTC
	31	GAGTATGATTACAATTTATTTTC
	32	GAGTTGATTGCAGTTTATTTTC
	33	GAATATGATGCAATTTATTTTC
	34	GAATATGATTACAGTTTATTTTC
	35	GAGTATGAATTGCAATTTATTTTC
	36	GAATTGATTACAATTTATTTTC
	37	GAATATGAATTACAATTTGTTTC
	38	GAATATGAATTACAATTTGTTTC
	39	GAATATGACTTACAGTTTGTTTC
	40	GAGTTGATTGCAATTTATTTTC
	41	GAATATGAACCTACAGTTTGTTTC
	42	GAATATGATTGCAATTTATTTTC
	43	GAAAHATAAAYTGYAADTCATAYTC

[0052]

표 2

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 2 서열군	44	TTTGTTACTGIGGTAGATAC
	45	TTTGTTACTGIGGTAGATACTAC
	46	TTTGTTACTGIGGTAGATACCAC
	47	TTTGTTACTGIGGTAGATACCAC
	48	TTTGTTACTGTAGTTGATACTAC
	49	TTTGTTACTGTTGTGATACTAC
	50	TTTGTTACTGIGGTAGATACCAC
	51	TTTGTTACTGTTGTGGACACCAC
	52	TTTGTTACTGIGGTAGATACCAC
	53	TTTCTAAGTGTGGATACTAC
	54	TTTGTTACTGIGGTAGATACCAC
	55	TTTTTAAGTGTGATACTAC
	56	TTTGTTACTGTAGTTGATACAAC
	57	TTTCTTACTGTTGGGACACTAC
	58	TTTGTTACAGTTGTAGACACCAC
	59	TTTTTAAGTGGTTGATACTAC
	60	TTTGTTACTGTAGTGGACACTAC
	61	TTTATTACCTGTGTGATACTAC
	62	TTTGTCACAGTTGTGGATACCAC
	63	TTTGTAAGTGTGGATACCAC
	64	TTTGTTACTGTAGTAGATACTAC
	65	TTTGTTACCGTGGTTGATACCAC
	66	TTTGTAACCGTTGGGATACCAC
	67	TTTGTTACTGTTGGGATACTAC
	68	TTTCTTACTGTTGGGATACCAC
	69	TTTKTTACHGTTGTDGATACVAC

[0053]

표 3

서열군	서열 번호	서열 (5' - 3')
제 3 서열군	70	GCACAGGGCCACAATAATGG
	71	GCACAGGGACATAACAATGG
	72	GCGCAGGGCCACAATAATGG
	73	GCACAGGGACATAATAATGG
	74	GCCCAGGGCCACAACAATGG
	75	GCTCAGGGTTTAAACAATGG
	76	GCTCAGGGTTTAAACAATGG
	77	GCCCAGGGACATAACAATGG
	78	GCTCAGGGACATAACAATGG
	79	GCCCAGGGACACAATAATGG
	80	GCACAGGGTCATAACAATGG
	81	GCACAGGGTCATAATAATGG
	82	GCACAGGGACACAATAATGG
	83	GCTCAGGGACACAATAATGG
	84	GCACAAGGTCATAATAATGG
	85	GCCCAGGGCAAAAACAATGG
	86	GCACAAGGCCATAATAATGG
	87	GCCCAGGGCCACAACAATGG
	88	GCCCAGGGCCATAACAATGG
	89	GCACAAGGACACAATAATGG
	90	GGACATAATAATGG
	91	GCGCAGGGCCACAATAATGG
	92	GCCCAGGGCCATAACAATGG
	93	GCGCAGGGTCACAATAATGG
	94	GCGCAGGGCCACAATAATGG
	95	GCCCAGGGACATAATAATGG
	96	GCCCAGGGTCAAAAACAATGG
	97	GCGCAGGGCCACAATAATGG
	98	GCCCAAGGCCATAATAATGG
	99	GCACAAGGTCATAACAATGG
	100	GCTCAGGGTTTAAACAATGG
	101	GCCCAGGGCCACAACAATGG
	102	GCACAGGGTCATAATAATGG
	103	GCACAGGGACATAACAATGG
	104	GCACAGGGTCATAATAATGG
	105	GCCCAGGGACATAACAATGG
	106	GCACAGGGACACAACAATGG
	107	GCACAGGGACATAACAATGG
	108	GCCCAGGGAACTAATAATGG
	109	GCCCAGGGTCATAATAATGG
	110	GCACAGGGTCATAATAATGG
	111	GCGCAAGGCCACAATAATGG
	112	GCACAGGGACATAATAATGG
	113	GCCCAGGGACATAATAATGG
	114	GCGCGGGGTCATAACAATGG
	115	GCMCAGGGWCATAAAYAATGG
	103	GCACAGGGACATAACAATGG
	104	GCACAGGGTCATAATAATGG
	105	GCCCAGGGACATAACAATGG
	106	GCACAGGGACACAACAATGG
	107	GCACAGGGACATAACAATGG

[0054]

표 4

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	116	GCCTGTAGTATCAACAACAGT
	117	CCTTATTGGTTACAAAGAGCAACAACAATAGTTGGTTACCCCA
	118	GGTGAATAATGTACCAGACGAT
	119	AGAGGTAAACCATAGAACCACTAGGGTCTACTGCAAAATTAGCCA
	120	AGTAGATATGGCAGACAT
	121	ACAGGGCCACAATAATGGCATGACATATTGTACTGGGTGT
	122	CATTAAAGGCTCTGGGTCTA
	123	GCATCAGAGGTAACCATAGAACCACTGCAAATTAGCCAGTTCA
	124	TTCCAGTCCTCCAAATAGTGG
	125	ATACTACACGACGTACAATAATGTCTGTCAATACGTCGCAGTTAAGG
	126	CAATTAATTTCTTACACCTAGTGG
	127	GTTGGTTACCCCAACAATGCCCTCTATGTTACCTCTGATGCCC
	128	GTGATAACGCTCGCAGTTAAGG
	129	GTGTAAGTACTCTTAAAGTTAG
	130	ATACTACACGACGTACAATAATGTCTCCCAATGTCGTAGGTACTCC
	131	CTACACGCAGTACAATAATGTCTCCCAATGTCGTAGGTACTCC
	132	CACGCAGTACAATAATGTCACCCCAATGTCGTAGGTACTCC
	133	CTACACGCAGTACAATAATGTCTGAGTTTCTGAAGTAGATAATGCA
	134	CTACACGCAGTACAATAATGTCTATGTAGTTTCTGAAGTAGATATG
	135	GTGGCCCTGTGCTCGTTGTCTATGTAGTTACCTCTGATGCCC
	136	GTGGCCCTGTGCTCGTTGTCTATGTAGTTACCTCTGATGCC
	137	GTGCTGCCATATCTACTTCAGAAAC

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	138	GCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACA
	139	AACCAATAAGGTTTATTGAATATTT
	140	CCAATAAGTTTATTGAATATTGG
	141	TTATGCAGCAATGCAGGTGTGCCCCCTATAGGTGTTTGCAACC
	142	CCCTATAGTGTGTTGCAAC
	143	GTACATGGGATCCTTGCC
	144	ACAGAAATGCTAGTGTCTTAAGCAGCCAAATTGTGTTTGTGTAATCCATAG
	145	CACAGAAATGCTAGTGTCTTAATGTGTGTTGTTGTAATCCATAG
	146	ATAAGGATGGCCACTAATGCCCGTGTAGGTGTGAGGTAGTCTG
	147	CCTGACACCTCATTTTATTAATCCAG
	148	ATCCAGATACACAGCGCTG
	149	CCACACCTAATGCTGACCAACACACAGCGGCTGTTTTG
	150	GCCACTAATGCCACACCTAATGACACAGCGGCTGTTTTG
	151	CCAACAGTACGAGCCCTAT
	152	TGTTGTGAGAACCATATGCGCAAAACATTTGTTCCCTTGG
	153	CACAGTTATTCAGATGTGAT
	154	GGAACCTTCATTTTGTAGCCGTGTGTTGTTCACTAGGCTTTGG
	155	CCCTATAGTGTGTTGCAAC
	156	ACAGAAATGCTAGTGTCTTAAGCAGCCAAATTGTGTTTGTGTAATCCATAG
	157	CCTGACACCTCATTTTATTAATCCAG
	158	CCACACCTAATGCTGACACACACAGCGGCTGTTTTG
	159	GCCACTAATGCCCCACACCTAATGACACAGCGGCTGTTTTG

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	160	AAGTTCCAATCCTTAATAACTGC
	161	ACCACTCGCAGTACCAATTTAAGTAAATATAGACATTAACATCTGCAG
	162	TGTATTCCTCCCTCCAGTG
	163	TAATTGATTATGCCAGCAACACCCTCTATTGTTACCTGACTCCC
	164	GCCAGCAACACCATGTGTACTCTATTGTACTGACTCCC
	165	GCCAGCAACACCATGTGTATGCTCTATTGTTAAGTCTGACTCCC
	166	GAATATAGGACATAACATCTGCAG
	167	ACCACTCGCAGTACCAATTTAACCTCAACATGTCTGCTACTGC
	168	CCACTGCGAGTACCAATTTAACCTCAACATGTCTGCTACTGC
	169	CCACTGCGAGTACCAATTTAACCTCAACATGTCTGCTACTGC
	170	ACCTGTGCTTATGTACC
	171	GATGACACTGAAGTCCCATGCGCCCAAAATACATAACTGTGTCTGC
	172	GATGACACTGAAGTCCCATGCGCCCAAAATACATAACTGTGTCTGC
	173	AGTGTCCCCAATAGCAGG
	174	CAGTGTCCCCAATAGCAGG
	175	GACACTGAAGTTCCTATGCCGCTGTGTCTTATAATCTACAGACAC
	176	TAAAATGATGCCCACTAAGGCTGTGTGAATGAAATGGCCG
	177	CCTGAACACACACGTTTAGTG
	178	CACACGTTTAGTGAGGCC
	179	ACCTGATACTAGTATTATTAATCCTGA
	180	GATGCCACTAAGGCCACACAGCGCTGTGTGAGTGA
	181	CACTAAGGCCAACCTAAGGCAACACGTTTAGTGTGGG

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	182	AGTGTCCCCAATAGCAGG
	183	GACACTGAAAGTTCCTCCATGCGCTGTGTCTGCTTATATCTACAGACAC
	184	CCTGAAACACAACGTTTAGTG
	185	ACCTGATACTAGTATTTATATATCCTGA
	186	GATGCCCACTAAGGCCAACACAGCCTGTGCTGAGTGA
	187	CACTAAGGCCAACCTAAGGCAACACAAGTTTAGTGGG
	188	CCAATCTTCCAAATAGCAGGATTTC
	189	ACCACACGTAATACCAATATGTCTCTGAAATATATGTCAATTATGTCTGCAG
	190	CATACTTCTCTACACTAGCG
	191	AACTGATTGCCCCACAAATACCCTCCATGCTTACTTCAGATGCAC
	192	CCATTATGTGTCCCTGAGCACCCTCCATGCTTACTTCAGATGCAC
	193	CTGATTGCCCCCAACAATACCTCCATGTGTTACTTCAGATGC
	194	CTGATTGCCCCCAACAATACCCATGTGTTACTTCAGATGCAC
	195	GTGAATATATGTCAATTATGTCTGCAG
	196	ACCACACGTAATACCAATATGTCTTCTCCATCCATGTCTTAATACTC
	197	ACGACACGTAATACCAATATGTCAATTCTCCATCCATGTCTTAATACTC
	198	CACACGTAATACCAATATGTCTGATTCCTCACCATGTCTTAATACTC
	199	CCACACGTAATACCAATATGTCCCTCACCATGTCTTAATACTC
	200	CCACACGTAATACCAATATGTCTCACCATGTCTTAATACTC
	201	CACGTTGCATCCAAATATGGT
	202	CACGTTGCATCCAAATATGG
	203	CACTGAAAACTCTAATAGATATGCGGTGCAACCAAGTAAACACAGTTGTG
		(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	204	CCAATAGGTGGTTGGCAAC
	205	CCTTTACCCCAATGCTCTCC
	206	CACGAAAACTCTAATAGATATGCCGAGTTGTGTGTTTATATATCCATTG
	207	CTGAAACTCTAATAGATATGCTGTGTGTGTTTATATCCATTG
	208	GGATGACCACTAATACCTACACCCCTGTGTGTGTTAGAGGTAGTTC
	209	TCCTGATACATCTTTTATATTCCTG
	210	AACTCAACGCTTAGTTGGGC
	211	CCACTAATACCTACACCTAATGGCTGCAAACTCAACGCTTAGTTGGGC
	212	CACTAATACCTACACCTAATGGCTCAACGCTTAGTTGGG
	213	GACCTAACCTTAACCAACACAG
	214	TAATGGCTGCCGCGA
	215	CCAATAGGTGTTGCAAC
	216	CACTGAAACTCTAATAGATATGCCGAGTTGTGTGTTTATATCCATTG
	217	TCCTGATACATCTTTTATATTCCTG
	218	CCACTAATACCTACACCTAATGGCTGCAAACTCAACGCTTAGTTGGGC
	219	GGAGGTGTAAACCAAAATTGCC
	220	ACCACTCGCAGTACTAATATGACTATGCTAATACCTTCGCAGTTAAGG
	221	ACCACTCGCAGTACTAATATGACTATGCTAATACCTTCGCAGTTAAGG
	222	GCTTTTTCCTCCTAGTG
	223	CCTGATGGCCCAACAATACGATCAATGTTACTTCGGAATCTC
	224	CCTGATGGCCCAACAATACGACCATATTGGCTACACGTCG
	225	ATGTCAATACTTCTGCAGTTAAGG

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	226	ACCACTCGCAGTACTAATATGACTTCTTCAACATGCTTATATATTTC
	227	ATACCACTCGCAGTACTAATATGATGTTCTTCAACATGCTTATATATTTC
	228	ACCACTCGCAGTACTAATATGACATTTCTTCAACATGCTTATATATTCT
	229	ATACCACTCGCAGTACTAATATGATTTCTTCAACATGCTTATATATTCT
	230	CCTGGACACACCGGCTGTTGGAGGCTTACATCCAAG
	231	TATCTGGACACACCGGCTCTCTGTTGGAGGCTTACATCCAAG
	232	GGAGGCTTACATCCAAGTAAAC
	233	GTACAAGCAACACCTTTACCCC
	234	GACACTGAACCGGTACACAGTATCCACTGTGTTGTTTATATCCATGG
	235	GGATGACCACTTATGCCAACGCCACACGATTAGTATGGCATGTG
	236	CCTGACACCTCCTTTATAACCTT
	237	CCTGACACCTCCTTTATAACCC
	238	CACTTATGCCAACCGCTTATGGATACACACGATTAGTATGGGC
	239	GGATGACCACTTATGCCAACGACACACGATTAGTATGGGCATG
	240	GCTGCCCTCTTACTTATTTCAAGG
	241	CACCTTTACCCCAATGTTCC
	242	GTCAATTAGTACTGCGAGTGG
	243	CCGGGTGCTGATAATAGGACCTGTGGAGGCTTACATCC
	244	CCATATTGGCTACACGCTGCTACCTGATTGCCCAACA
	245	CCATATTGGCTACACGCTGACCAACATACCTGATTGCCCC
	246	GTGCAACAAGTCAATATAATGG
	247	AGTATGGGCAATGTGTAAGC

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	248	AGGGCTGGTACATTAGGAGA
	249	TGTTCCCGATGACCTGTAC
	250	CTGTACCGGTTTCAGTGTCAGCAGACCATTAAGCGTTG
	251	GCACTGCTTTGAATAGAGGACTGTTCCGATGACCTG
	252	GTAAACCATGATCCACTAGGAGTGAAGGTTCAAGAACTACTGCC
	253	GTAGTTCCTGAACCTTTAATGTACAG
	254	GCACTGCTTTGAATAGAGGCA
	255	CAGTAGTTCCTGAACTTTAATGTACA
	256	GGAGGCTTACATCCAGTAAAC
	257	GACACTGAACCGGTAAACAGTATCCACTGTGTTTGTATATATCCATGG
	258	CCTGACACCTCCTTTATAACCCT
	259	CACTATGCCAACGCTAATGGGATACACAAGATTAGTATGGGC
	260	CAAAATCCTGTGTCTAACATG
	261	GGCACACCTTGTATATGCTAATCCCCGTCCTGTAGTACAGTG
	262	ATGTTGTACTCTGTGTAATCTC
	263	GGAGGCTTACAACCTATTAAACAGGTACAGATTAACAGGGAATGC
	264	AATGTGTTTGTATATATCCATAG
	265	TGCACCAATCCTGTGTC
	266	GCTAACCAAGTAAAGCAGATACCATGTCCCCGTCCTTG
	267	AACTCTGTACTCTGTGTACAG
	268	GGAGGCTTACACCTATTAAACAACAGGGAATGCATTCTATGG
	269	CAATTGTGTTTGTATATATCCATAG

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	270	GATATTTGCAATGGAAGTGG
	271	GACGGGACATGTTAGACACATATATCTAGGGGAACATCAC
	272	GTGTTAATAGTTGTAGGCC
	273	CTCCTGCTTTACCTGTTAGCTCCTATAGTGAACATTTGGG
	274	ATTACAAGGTGTGCCCTTTC
	275	GGATATTTGCAATGGAAGTGG
	276	GGGACATGTTAGACACAGGACATATATCTAGGGGAACATCAC
	277	CCTATAGGTGAACATTTGGG
	278	GTTTAGTAACTCCAAAGGAGGACAAAGGCACACCTTGTATATGC
	279	ATTCTCCTGCTTTTACCTGG
	280	CATTCTCCTGCTTTTACCTGGT
	281	ATCCTCTAATAATGACGGGTTG
	282	CAACCCGTAGTACAAATATATGTCTGATATGTCAATACATCTGCTGTAGTG
	283	CTAGTTATTTCTCTACTCCTAGTGG
	284	CAATTGGTTACTCCAAACAATACCTCTATGTGTAACTCCGATGCAC
	285	CCATTAATTATGGCCTTGTGCAAGCTCTATGTGAACCTCCGATGCAC
	286	ATGGCCTTGTGCAAGCTTGTGCAACCTCTATGTGAACCTCCGATGCAC
	287	GGCCTTGTGCAAGCTTGTGCAACCTCTATGTGAACCTCCGATGCAC
	288	GCCTTGTGCAAGCTTGTGCAACCTCTATGTGAACCTCCGATGCAC
	289	ATGTCAATACATCTGCTGTAGTG
	290	ATGTCAATACATCTGCTGTAGTG
	291	CAACCCGTAGTACAAATATATGTCTGTCTTCAACCATGCTTAATATTTCC

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	292	CCCGTAGTACAATATGTCTGCACCATGCGCTTAATATATTC
	293	CCCGTAGTACAATATGTCTGTTCACCATGCGCTTAATATATTC
	294	CCCGTAGTACAATATGTCTGTTCACCATGCGCTTAATATATTC
	295	CCAATATGGTTTATTAATATTTG
	296	CAATATGGTTTATTAATATTTGTG
	297	CAATATGGTTTATTAATATTTGTG
	298	GTTGGTAACTCTGTAACTCTGGGAGGCCCTACAACTATTTAAACAC
	299	GTTGGTAACTCTGTAACTCTGGGAGGCCCTACAACTATTTAAACAC
	300	CCCAATGTTCACTATAGGAGG
	301	GCCTTTCCCAATGTTCAAC
	302	TGGTAACTCTGGTAACTCTGTACAGCCTACAACTATTTAAACAATTTGTG
	303	GGATGACCACTAATACTACTCCGTTGGTTGGGCGGTACAGG
	304	GGATGACCACTAATACTACTCCGTTGGTTGGGCGGTACAG
	306	CCAGACATCATTTTATGATCC
	306	TTATGATCCCTGCGCTCCAGC
	307	GACCACTAATACTACTCTAAATGGCGTGCCTCCAGCGTTTGG
	308	AGCATTAACAAGGTGTGCC
	309	CAGATTAACAGGGAATGATTTCAATGTTCACTATAGGAGGCC
	310	AAGTAGGTCTGTGTACAGC
	311	CCAGAGTTACAGAGTTACCAACGAGTAGGTATTAAGTGTCAATCC
	312	GATTTAGTATCATCCATTTAT
	313	CCCAATGTTCACTATAGGAGG

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	314	TGGTAACTCTGTAACTCTGGTACAGCCTACAACTTAATTAACAAATTGTG
	315	CCAGACACATCATTTTATGATCC
	316	GACCACTAATACCTACTCTAATAGGCTGCCTCCAGCGTTTG
	317	CCAATTGTCCAATATAGAGAATTC
	318	ACTACCCGTAAGTACCACTTTACGACATAACATCAGTTGTTAATGTGAC
	319	GTTCTGTAACTGCCCCCTTC
	320	AACATATACCATTTGTTGGCCCTTCATGTGAACCTCTGATTTCCC
	321	GCCTTATGTAGCCCAATAAGGCCAGCGGTTCCATGTGTAACC
	322	GCCTTATGTAGCCCAATAAGGCGCGGTTCCATGTGTAACCTCTG
	323	GCCACATATACCAATTGTTGTCATGTGTAACCTCTGATTTCCC
	324	GACATAACATCAGTTGTTAATGTGAC
	325	ACTACCCGTAAGTACCACTTTACTCCACGTGCGCTGTATATTCC
	326	ACTACCCGTAAGTACCACTTTACTCCACGTGCGCTGTATATTCCCT
	327	CTACCCGTAAGTACCACTTTACCCACGTGCGCTGTATATTCC
	328	CCTTATGTAGCCCAATAAGGC
	329	GGCCTTATGTAGCCCAATAAGGC
	330	CAGTAGGGAATAATGTGTCGTGGATGCTTTCCTTACCCCAAGTG
	331	AATGGCGGGAACACAGC
	332	CCGTAGATACATTATTGGGCTTGC
	333	CTGAAGTCTACCACTTTTCATCAACCCACAACACTGTGTCTGTTTATAATCCAC
	334	GGTAGTTTTCAGTATCATCTGTGCCATTGGGTGTGGTATTAGTGG
	335	CCAGATGCATCCTTATATATAATCCA

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	336	GTTTAGTAGGGCTTGTAGG
	337	ATGGGTGCCACTAATAACCAACGTTTAGTAGGGCTTGTAGGG
	338	AATGGCGGAACACAGC
	339	CTGAAACTCACCATTTCATCAACCCACAACCTGTGTCTGTTTAATCCAC
	340	CCAGATGCATCCTTATATATCCA
	341	ATGGGTGCCACTAATAACCAACGTTTAGTAGGGCTTGTAGGG
	342	TGGTGAGGGACCCAAATTTC
	343	TTCCAATTTCTAATACTACTATTTC
	344	CACTACCCGCACTAATTTAACATATGACATTAACCTCTGCAGTTAAAG
	345	CACTACCCGCACTAATTTAACGATATATGACATTAACCTCTGCAG
	346	CACTACCCGCACTAATTTAACCTCTGCAGTTAAAGTAATAGTGC
	347	CACTACCCGCACTAATTTAACCTATGGATATATGACATAACCTCTGC
	348	TGTATTCCTCTCCAG
	349	GTGAACCCCTGGCAGTTG
	350	AAATACCATTTGTTATGGCCCTGGGGCTCTATTATTACTTCTGATTTCTC
	351	ATACCATTTGTTATGGCCCTGGGTGTATTTCCCTTCTCCAG
	352	ATACCATTTGTTATGGCCCTGGGTGTATTTCCCTTCTCCAGTG
	353	ATACCATTTGTTATGGCCCTGGGGCTCTATTATTACTTCTGATTTCTC
	354	CAACTGATTATGCCAACAAATACAGCCATATGTGTTACATAAGGCC
	355	TATGACATAACCTCTGCAGTTAAG
	356	CACTACCCGCACTAATTTAACCTCCACATGTCTACTATACTGC
	357	CACTACCCGCACTAATTTAACACTATACTGTCTTAACTTAGTAGGG

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	358	GGATGATTACAGAAAGTGTCTCATGCCCCCTAAATATACACAGCTGTGTTGC
	359	GGATGATTACAGAAAGTGTCTCAAATATACACAGCTGTGTTGC
	360	CACCAATAGCAGGTACACAACC
	361	GTGCTCACCAATAGCAGGTAC
	362	GGATGATTACAGAAAGTGTCTCATGCACTGTGTTGCTTATATCAACTGACACA
	363	TAAATGGATGGCCACTTAGCCGGTATGGAATTGTCGTGGGC
	364	CCACTTAGGCCAATACCTAAGTGTAGGTATGGAATTGTCG
	365	CCTGAACACACACGTTTGTT
	366	GAAACACACGTTTGTTGGC
	367	GCCACTTAGGCCAATACCTAAAGGCATGTGTAGGTATGGAATTGG
	368	GCCACTTAGGCCAATACCTAAAGTGGCATGTGTAGGTATGAA
	369	AGGCTGCCACGACC
	370	CAATACCTAAAGCTGCC
	371	CACCAATAGCAGGTACACAACC
	372	GGATGATTACAGAAAGTGTCTCATGCACTGTGTTGCTTATATCAACTGACACA
	373	CCTGAACACACGTTTGTT
	374	GCCACTTAGGCCAATACCTAAAGGCATGTGTAGGTATGGAATTGG
	375	GCCACTTAGGCCAATACCTAAAGTGGCATGTGTAGGTATGAA
	376	CTGTCAAGAAATGTAGGATCC
	377	TCCACTGTTCAAGAAATGTAGG
	378	TAACTATTAGCACTGCACATGCAATAGCCATTACCTCTGTAGTTAAAG
	379	TAACTATTAGCACTGCACATGCGTGTGTAAATTAAGCCATTACCTCTG

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	380	ATATACTCTGCTACTCCCAGTG
	381	GGCCGTGACCCCTATAGAAAG
	382	GCTGATTGTTCCAGCAATGCCGGTCTATGATAACATCTGATTCTC
	383	ATTATTGTGACCCCTGCCGCAOGGATACTCTGCTACTCCCAGTGGG
	384	TTAGCCATTACCTCTGTAGTTAAG
	385	TAACTATTAGCACTGCCACTGCCCTTCCCCATGCCCTAATATATTGC
	386	ATACTACCAGAAGTACAAATTTAACCTTCCCCATGCCCTAATATATTGC
	387	GCAACAACAAGATGTTAGAGATAACACCCAATAGGTGGAGCACAGCCT
	388	TTGCATGTAGTGCATAATACCC
	389	GCATGTAGTGCCAATACCCC
	390	TGCACAACAAGATGTTAGAGATAACACAATAGGTGGAGCACAGCCT
	391	GCAACAACAAGATGTTAGAGATAACAAATAGGTGGAGCACAGCC
	392	GCAACAACAAGATGTTAGAGATAAATAGGTGGAGCACAGCC
	393	GCAACAACAAGATGTTAGAGATCAATAGGTGGAGCACAGCC
	394	TGCTATGCCGTGAATTTCTGTGTCTTGTTGGTGGCCTTAGTGTCA
	395	GTTGAGGTGGCAGAGAGAC
	396	CCAGACACAGATAGTTGGTG
	397	CTATGCCGTGAATTTCTGTGTCAATCCCTTGTTGGTGGCCTTAGT
	398	CTATGCCGTGAATTTCTGTGTGCCCTTGTTGGTGGCCTTAG
	399	GCTATGCCGTGAATTTCTGTGTGCCCTTGTTGGTGGCCTTAG
	400	CATCATATTATTAAATAAGGATG
	401	TTTATTAAATAAGGATGACCA

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	402	CATATTATTAAATAAGGATGACCAC
	403	TTGCATGTAGTCCCAATACCC
	404	TGCACAACAAGATGTTAGAGATAACACAATAGTGGAGCACAGCCT
	405	GTTAGGTGGGCAAGAGAC
	406	CTATGCGTGAATTTCTGTGTCAATCCCTTGTTGGCCTTAGT
	407	CCTCAGCACATTAAGTCATG
	408	GTA CTG GTTACAACGTGCGCA GTGGTATCCACA CTGTGAC
	409	GGGCTTAAC TCTGGCAAT
	410	GGATTCTGAGGTTACCATAGAACC ACTGCCACTGTACAAAGC
	411	CCTCAGCACATTAAGTCATG
	412	CAGGCCACAATATGGCAAT ACGAGTGGTATCCACAAC
	413	GGGCTTAAC TCTGGCAAT
	414	GGATTCTGAGGTTACCATAGAACCCTGCCACTGTACAAAGC
	415	GTCCTCTAAATATAGTGGCATCC
	416	GGGGTAAGGCCAAATTGCC
	417	CCA CTG TAGCACTAACA TAGCGTATGTCA TTAACATCAGCTGTTAATG
	418	CCA CTG TAGCACTAACA TAGACCCTCTTAAATA TAGTGGCATCCATC
	419	GCTTTTFTCC TACTCC TAGTGG
	420	GCCACTGTACA AAGCAGTGC
	421	ACTGATGCCCCACA CATATGCCCTTCTATG GTAACTCAGAAATCCC
	422	ATTATGTGGCCCTGCGCAGCTTCTATGTAGTA CCTCAGAAATCCC
	423	CCCTGCCGACGTTGTACTATGTAGTA CCTCAGAAATCCC

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	424	CCAAATATGCCATTATTTGCTATGTTAACCTCAGAAATCCC
	425	ACCACTCGTAGCACTAATGACTCGCCATGACGAAAGGTATTCT
	426	CCACTCGTAGCACTAATCATGGCCATGACGAAAGGTATTCC
	427	CCACTCGTAGCACTAATCATGACGCCATGACGAAAGGTATTCC
	428	GTATGTCATAACATCAGCTGTTAATG
	429	TGAATGTATGTCATATACATCAGCTG
	430	CCACTCGTAGCACTAATGACTCGCCATGACGAAAGGTATTCC
	431	GCTGAGGTTAAAAAGGAAAGCACA
	432	GACTTTATGTGCTGAGGTTAAAAAGG
	433	CTTTATGTGCTGAGGTTAAAAAGGAAAG
	434	CCAGTACGTTTATTTAATAATT
	435	GCGCAGTTGTAACCAGTAC
	436	GTTGTAACCAGTACGTTTATTTAATA
	437	CGTTGTAACCAGTACGTTTATTTAAT
	438	CACCTATAGGAGGTTGCATCC
	439	TGATACTGAATCCAGTAACAATAATATGTAAGTCTGCTTATATCCATAG
	440	CCAGATACATCTTTTATTAAACCAG
	441	AAAGGATGCCACTAATCCCAAAAAACCAAGGTTGTTGTG
	442	CCTCAGCACATAAAGTCATG
	443	CAGGGCCACATAATGGCAT AGTGGTATCCCAACTGTGA
	444	GCCACTGTACAAGCAGT
	445	CACGTTGTAACCAGTACGTTTTCCTACTCCTAGTGGTTCT

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	446	CACCTATAGAGGTTTGATCC
	447	TGATACTGAAACGAGTACAAATATGCTAAGTGTGCTTATAATCCATAG
	448	CCAGATACATCTTTTATTAACCCAG
	449	AAAGATGCCCACTAATACCCACAACCAAGGTTGTGTG
	450	GTCTCCAGTAGGTTAGATTCTC
	451	AGTACTAACATGACTATTAGTACTGCTGCCATAACCTCTGCAGACAAAG
	452	ATACTACTAGAAGTACTTAACATGACTGCCATAACCTCTGCAGACAAAG
	453	GTATATGTTGCTACGCCCTAGTG
	454	AATGATTACCCCGCAAAATGCCGTATGATTACGCTGAGGCAC
	455	CCCCAGCAATGCCATTATTCTATGATTAGTCTGAGGCAC
	456	GCCATAACCTCTGCAGACAAAG
	457	ATACTACTAGAAGTACTTAACATGACCCCTCCACATGTCTAAGTACTG
	458	GCACGTTGCAACCAATAAG
	459	GGCTGGATGATACTGAAGTCCCACTGTTGTTGCTTGCCATC
	460	TCCAATGTTACCCCATAGC
	461	CCAATGTTCACCCATAGCGG
	462	GGATGATACCTGAAGTCCCAATTTAGCCACAACGTGTGTTGCTTGCC
	463	AAACAATGATGGCCACTTAGCCATGTAGGTTGGAGGTAGGC
	464	TTATAATCCGAGACCAAGAACG
	465	ATAATCCGAGACCAAGAACG
	466	ACAATGATGGCCACTTAGCC GCATGTGTAGGTTTGAGAGGTAGG
	467	GGATGATACCTGAAGTCCCAATTTAGCCACAACGTGTGTTGCTTGCC

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	468	TTATAATCCGGACCAAGAACG
	469	ACAATGATGGCCACTTAGCCGATGTGTAGGTTTGAGGTAGG
	470	TCCAATGTTCACCCATAGC
	471	CAAGTCCATGCATCCAAAC
	472	GCCTGTAACAATAATGCAGCTGCACCATGTCAACCATCCTCA
	473	AACGATATPCCCGCACAG
	474	GTGGAGGTTTACAGCCAATTAGTCTGATAACAGGGAATGC
	475	CCATTGTTATGACCTTGTGC
	476	TCCAACCTCTAGTGGCTCTATATAGCGCTGTAGCCAATAAGGC
	477	GACGTGAGCAGATGTTTGT
	478	GGATACTGCAGTATTAACCGACCTTAGGGCTGGAAAACTTGG
	479	GTACCTCAGATCACAATTATTTAATAAGCC
	480	CCTCAGATGCACAATTATTTAATAAGCC
	481	CAGTCCTCCAAATATGTGAATCC
	482	AACCAATTGGCAGTCCTCC
	483	TACCACTCGTAGCACTAATAATGACATAATGTCAATTATCTGCAGTTAGTG
	484	ACCACTCGTAGCACTAATAATGACTATGTCAATTATCTGCAGTTAGTG
	485	ACCACTCGTAGCACATAATATGACATAATGTCAATTATCTGCAGTTAGTG
	486	ACCACTCGTAGCACTAATAATATGACGAGTTAGTGTAAATTTGCAAGCTG
	487	TACCACTCGTAGCACTAATAATATGACGAGTTAGTGTAAATTTGCAAGCTG
	488	GTAGTGCAATTTTTCACACTCCTAG
	489	CTGCAGTTATCCAAAGTAGTGC

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	490	CTGATTGCCCCAGCAATGCGCTCTATAGTTACCTCAGAATCAC
	491	CTGATTGCCCCAGCAATGCTTGGCTACAGCGTGCAAGG
	492	CTGATTGCCCCAGCAATGCGGCTCTATAGTTACCTCAGAATCA
	493	ATGTCATTATCTCTGCAGTTAGTG
	494	ACCACTCGTAGCACTAATATGACTTCTTCAACATGACGTACATATTCC
	495	CTCACCAGTGGAGGTTTAC
	496	CTGAACCCAGTAACGATATCCGGCCCAATTAAACATATTTGTGTTTG
	497	TGAACCAAGTAACAGATATCCCGTCCATAGATAAGCATTTCCCTG
	498	TGAACCAAGTAACAGATATCCCGAATCCATAGATAAGCATTTCCC
	499	TAACCTTGATACACACGTTTG
	500	AGGATGACCACCTTACGCCAACACTCTGGGCA TGTTAGGCTT
	501	CAATGGCTGTCCCCCTACCTA
	502	ATGGCTGTCCCCCTACCTATTTC
	503	CCTTAACCCCAATGCTCAC
	504	AGCCAGGCTCTGATTAACAGGGGAGGTTTACAGCCCAATT
	505	AATAGGTAAGGGACAGCC
	506	GCGGATATCTGTTA CTGTTTACGCGTAA GTGTCA TCCCTT
	507	CTCACCA GTGGAGGTTTAC
	508	CTGA AACCAAGTAACAGATATCCGGCCCAATTAAACATATTTGTGTTTG
	509	TAACCTTGATACACACGTTTG
	510	AGGATGACCACCTTACGCCAACACTCTGGGCA TGTTAGGCTT
	511	CCAATCCTCCAA AATAGTGTATTTC

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	512	CTACTGCAGCACC AATCTTTCGTATGACATTACCTCTGTAGTTAATG
	513	CTACTGCAGCACC AATCTTTCGAATGATGACATTACCTCTGTAG
	514	CTACTGCAGCACC AATCTTTCGAATGATGACATTACCTCTGTAG
	515	ACAATTGATTGTGCC AATATACCGGCTGTGGTTACTTCTGATTAC
	516	TATATCCCCCTTCCC AAGTG
	517	CAATTGATTGTGCC AATATACCGGCTGTGGTTACTTCTGATTAC
	518	TTAACCCTGAGCCTT GTGAGGGTCTGTGTTACTTCTGATTAC
	519	GTATGACATTACCTC TGTAGTTAATG
	520	GAATGTATGACATTAC CTCTGTAG
	521	TGAATGTATGACATTAC CTCTGTAG
	522	CTACTGCAGCACC AATCTTTCCTCCACATGCTGGCATATTC
	523	GCAGGTACACAGCC AATATATAC
	524	GATGA CACTGAAACTCTCATGTAGCGCTGAGTTGTTATAATCCACAG
	525	GATGACACTGAAACTCTCATGTAGTTGTTATAATCCACAG
	526	CCAGATTAACACGATATGATCCTAAC
	527	CACTGAGTCCCTAACCCCTAAAGGTTGTTCAACGCTGTGCTGG
	528	CACTGAGTCCCTAACCCCTAAAGGTTCTCAACGCTGTGCTGG
	529	GCTGTTGATACCAAGATACACGTTG
	530	CTGTTGATACCAAGATACACGTTGATA
	531	GATACCAAGATACACGTTGATAATG
	532	GCATCTGCTGTTGATACCAAGATTAC
	533	GATTTCACACCTACACAGGC
		(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	534	GCAGGTACACAGCCCAATAATACAC
	535	GATGA CACTGAAAC TCTCATGTAG CGCTGAGTTTGTATATATCCACAG
	536	CCAGATAACACAGTATATGATCCTAAC
	537	CACTGAGTCCTAACCCCTAAAGGTGTCTCAACGCTTGCTGG
	538	GTGCTTGTGCAGCCAA
	539	GTAGTTATGTATATGCCCCCTGCGGCTTGTTAATAACTGGAGTCTGA
	540	ACGTAGGGAACAGTTATTGCTAG
	541	TGTCACGTATGTCAGTGCCCTTAATGAATAGAGGGGCATGT
	542	AATGGCAGAACACAGCC
	543	TGAATAATCCCCGTTTCTCCACACGCGTTTGTATATAGTCACCTGAAC
	544	TGATACGACAGCGATTGGTATG
	545	TGCCCACTAAGGCCAACACCGGCTGTGTGTTGAA
	546	GTTAAATTAAGTGGAGTCTGAGGAT
	547	TAAGGCACTGACATACGTGACAGCCATAGACCCACTAGGCGAG
	548	CTGACAGTGTATATGAGACAGTA
	549	AGTGTCCCTTACCATGCCCCACGTAGGGAACAGTTATTGCT
	550	TGTGTCCCTGTGCCTTGT
	551	GTAGTTATGTATATGCCCCCTGCGCGCAACCAATAGGCGTTT
	552	CGCAGTACCAATTTTACTTTGTCTACTACTACCTCAACATGCTAATATATTTCC
	553	ACTGACATACGTGACAGTCCTAG
	554	GATTATGCCCAACAATAACATGTGTGTTCACAGTTATTTAACAAAGCCC
	555	CAGTAAGAAATAATTGATTATGTCACCAACAAGCCCTATTGGCTGC

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	556	CCACTGCGAGTACCAATTTTACTTTGGCTCAACATGCGCTAATATATTCC
	557	ATACCACTGCGAGTACCAATTTTACCCTCAACATGCGCTAATATATTCC
	558	TCAGTGGACAATGTTATAGTACAC
	559	CCACTGCGAGTACCAATTTTACTTTGGCTCAACATGCGCTAATATATTCC
	560	ATACCACTGCGAGTACCAATTTTACCCTCAACATGCGCTAATATATTCC
	561	CATCAGTGGATAATGTTATAGTACAC
	562	GCGCAGTACTAATTTTACATTGTCCCCCTCAACATGCGCTAATATTCC
	563	ATACAAGCGCAGTACTAATTTTACCCTCAACATGCGCTAATATTCC
	564	GATTTACCTTTGGCCCACTG
	565	TGATGATACTGAAAAATTCGCCGTTGCTATATATACATAGTTGCGTTTG
	566	CCTGAGTCTACATTATATAACCTGA
	567	CCCACTAAGGCCAACACCTAATGTACGACGCGATTGGTATGG
	568	CAGTGATTTCAGTAGTAGTAGACAA
	569	GGCACAGGGACACACAACTGTAATTGTACTGCGAGTGGTA
	570	TGACATACGTGACAGTCTCTAGT
	571	TTGTGAGGCCAATAGGGCTTGTAAGTATATAGCCCCCTGCGCTTA
	572	CTCTAATCCAAAAATGCGCTAGCA
	573	CCTAGTAGTTATGTATATAGCCCCCTC
	574	TACAATTCAGTAGGTATAGTGTCCCCCT
	575	GTGGGTCTATGGTATCCTCAGACTC
	576	CCACTGCGAGTACCAATTTTACTTTGTGATCAGTGGACAAATGTTATAGTACAC
	577	TACCACTGCGAGTACCAATTTTACCATCAGTGGACAAATGTTATAGTACAC

(계속)

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 4 서열군	578	CCATTGTTGTGTCCCTGTGCTCTATAGTATTCCTCAGACTCCC
	579	CAACAAATACCATTTGTGTGTCCCTCTATGGTATCCTCAGACTCCC
	580	CCTCCACCAAAAATCCTAAGGACAGGCCAATGGCAGGACACAGCC
	581	CTCCACCAAAAATCCTAAGGACAGGCCAATGGCAGGACACAGCCT
	582	GATTACCTTTGGCCAGTGC
	583	TATATGATGCCCACTAAGCGCCCTGTGTGTGTGTTGAATAGG
	584	ACCCTGATACGACGAGTTG
	585	GTTATGTATATGCCCCCTCG
	586	CAACGCGCAGTACTAATTTTACATTCATGCATCAGTGGAATATGTATAGTACAC
	587	TACAACGCGCAGTACTAATTTTACCATCAGTGAGTATGTATAGTACAC
	588	GTTATGTATATGCCCCCTCG
	589	CAACAAATACCATTTGTGTGTCCCTCTATGGTGTCTCTGACTCCC
	590	CCAATCATCCAAAATAGCAGATTG
	591	TAGATGATACTGAAAATTTCCCGTTGCCCTATATATACATAGTTGCGTTTG
	592	CCTGAGTCTACATTATATTAACCTTGA
	593	CCCACTAAGGCCAACACCTTAATGTACGACGAGTTGTATGG
	594	GATTACCTTTGGCCAGTGC

[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	AACCAATAAGGTTTATTGAATATTTGGGCATC
	597	ACCAATAAGGTTTATTGAATATTTGGGCATCAGA
	598	CAATAAGGTTTATTGAATATTTGGGCATCAG
	599	ATAAGGTTTATTGAATATTTGGGCATCAGAG
	600	AAGGTTTATTGAATATTTGGGCATCAGAGG
	601	AAATGCAGGTGTGGATAATAGAGAATGTAT
	602	AAATGCAGGTGTGGATAATAGAGAATGTA
	603	ATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAAC
	604	GTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACAT
	605	TATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATA
	606	ACTTCAGAAACTACATATAAAAATACTAACTTTAA
	607	TTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACT
	608	CTACTTCAGAAACTACATATAAAAATACTAACTT
	609	TCAGAAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAG
	610	AACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTA

(계속)

[0078]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	611	ATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAA
	612	TGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAATACT
	613	TCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCAATATG
	614	AATATGTGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCT
	615	CTCCTGTACCTGGGCAATATGATGCTACCAA
	616	CACGTCTAATGTTTCTGAGGACGTTAGGGA
	617	GTCTAATGTTTCTGAGGACGTTAGGGA
	618	TAATGTTTCTGAGGACGTTAGGGA
	619	TAATGTTTCTGAGGACGTTAGGGACAATGTG
	620	TAATGTTTCTGAGGACGTTAGGGACAATG
	621	AATGTTTCTGAGGACGTTAGGGACAATGTG
	622	AATATGTGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCT
	623	TGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCA
	624	TGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCA
	625	ACCTGGGCAATATGATGCTACCAAATTTAA
	626	CCTGTACCTGGGCAATATGATGCTACCAAATTTAA
	627	TGGTCCTGGCACTGATAATAGGGAATGTATATCAATGG

(계속)

[0079]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	628	ATAATAGGGAATGTATATCAATGGATTATAAAACAAACAC
	629	GGCACTGATAATAGGGAATGTATATCAATGGATTATAAA
	630	TGGTCCTGGCACTGATAATAGGGAATGTAT
	631	ATAATAGGGAATGTATATCAATGGATTATAAA
	632	ATAATAGGGAATGTATATCAATGGATTATAAAC
	633	ATAATAGGGAATGTATATCAATGGATTATAAAACAAAC
	634	TGCTGCAATTGCAACAGTGATACTACATT
	635	AACAGTGATACTACATTTAAAAGTAGTAATTTTAA
	636	TTATCCATGGATTATAAACAAACACAGTTATGTTT
	637	TTATCCATGGATTATAAACAAACACAGTTATGTTTAC
	638	TTATCCATGGATTATAAACAAACACAGTTATGTTTACTTGA
	639	ACAAGGTCATAATAATGGTATTTGTTGGGG
	640	GTAGTTCCTGAACCTTTAATGTACAGGTCA
	641	CAAGGTCATAATAATGGTATTTGTTGGGGC
	642	ATGTTTATCCATGGATTATAAACAAACACAGTTAT
	643	TTATCCATGGATTATAAACAAACACAGTTA
	644	TTATCCATGGATTATAAACAAACACAGTTATGT

(계속)

[0080]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	645	TGGACAACCGGGTGCTGATAATAGGGAATG
	646	TGGACAACCGGGTGCTGATAATA
	647	GATAATAGGGAATGTTTATCCATGGATTATAAACAA
	648	AGGGAATGTTTATCCATGGATTATAAACAAACAC
	649	AGGGAATGTTTATCCATGGATTATAAACAA
	650	AATGTTTATCCATGGATTATAAACAAACACAGT
	651	ACTTTATGCACACAAGTAACTAGTGACAGT
	652	ACTAGTGACAGTACATATAAAAATGAAAATTTTAA
	653	ATGGATTTTACTACATTACAAGCTAATAAAA
	654	TTTGGTGCAATGGATTTTACTACATTACAAGCTA
	655	GTGCAATGGATTTTACTACATTACAAGCTAATA
	656	ATAACAGGGAATGCATTTCTATGGATTAT
	657	TTCTGCTGTGTCTTCTAGTGACAGTACATA
	658	TCTAGTGACAGTACATATAAAAATGACAATTTTAA
	659	TCTATAGAGTCTTCCATACCTTCTACATATGATCCT
	660	TGGGCCTTATGTAGCCAATAAGGCTTATTAAATAACTG
	661	GCCAATAAGGCTTATTAAATAACTGGGAATCAGAG

(계속)

[0081]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	662	CAATAAGGCTTATTAAATAACTGGGAATCA
	663	AATAAGGCTTATTAAATAACTGGGAATCAGA
	664	TCTTCCATACCTTCTACATATGATCCTTCTAA
	665	TCCATACCTTCTACATATGATCCTTCTAAGTTTAAGGAAT
	666	TTATCTACCTCTATAGAGTCTTCCATACCTTCTACA
	667	ATACCTTCTACATATGATCCTTCTAAGTTTAAG
	668	TTCTACATATGATCCTTCTAAGTTTAAGGAATATACC
	669	TATGTAGCCAATAAGGCTTATTAAATAACTGGGA
	670	ACCAATAAGGACAGTAGGGATAATGTGTCT
	671	ACCAATAAGGACAGTAGGGATAATGTGT
	672	ACCAATAAGGACAGTAGGGATAATGTG
	673	CCTCTATAGAGTCTTCCATACCTTCTACAT
	674	TCCATACCTTCTACATATGATCCTTCTAAGTTTAA
	675	GTTATTACGCAGGATGTTAGGGATAATGTG
	676	AGCTACAGCTGTTATTACGCAGGATGTTAGG
	677	ACGCAGGATGTTAGGGATAATGTGTCTAGTTGAT
	678	CTACAGCTGTTATTACGCAGGATGTTAGGGATAATGTGTC

(계속)

[0082]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	679	ACAGCTGTTATTACGCAGGATGTTAGGGAT
	680	TGTTATTACGCAGGATGTTAGGGATAATGT
	681	TTACGCAGGATGTTAGGGATAATGTGTCAG
	682	TACACAAAATCCTGTGCCAAGTACATATGA
	683	CCTGTGCCAAGTACATATGACCCTACTAAGTTAA
	684	GACAACAAACAGACTCAGTTATGTATAATAGGCTGTGC
	685	TCATCATATTTATTAAATAAGGGATGACCACT
	686	ACATCTGTTGACAACAAACAGACTCAGTTATGTA
	687	ATCATATTTATTAAATAAGGGATGACCCTAAGG
	688	TGTTGACAACAAACAGACTCAGTTATGTATAAT
	689	TATTTATTAAATAAGGGATGACCACTAAGGCCA
	690	TTGACAACAAACAGACTCAGTTATGTATAATAGGCT
	691	GCGGTTTCCCCAACATTTACTCCAAGTAACTTT
	692	TCCCCAACATTTACTCCAAGTAACTTTAAGC
	693	AAACAGACTCAGTTATGTATAATAGGCTGTG
	694	CAGACTCAGTTATGTATAATAGGCTGTGCT
	695	TCTGTTGACAACAAACAGACTCAGTTATGTATAATAGG

(계속)

[0083]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	696	TCTGTTGACAACAAACAGACTCAGTTATGTATAAT
	697	GTTGACAACAAACAGACTCAGTTATGTATAATAGG
	698	TGTTGACAACAAACAGACTCAGTTATGTATAATAGG
	699	TCTGTTGACAACAAACAGACTCAGTTATGTATAATAGGCT
	700	GCTGCGGTTTCCCCAACATTTACTCCAAGT
	701	GCGGTTTCCCCAACATTTACTCCAAGTAAC
	702	GCGGTTTCCCCAACATTTACTCCAAGTAACTTTAA
	703	TAATGGCATATGTTGGGGCAATCAGTTGTTTGTACAG
	704	ACTAGGAGTAGGAAAAAAGCACTGCTTTG
	705	GGGCCACAATAATGGCATATGTTGGGGCAATCAGTTGTT
	706	TATGTTGGGGCAATCAGTTGTTTGTACAGTT
	707	TAGGAGTAGGAAAAAAGCACTGCTTTGTA
	708	CACAATAATGGCATATGTTGGGGCAATCAGT
	709	ACAATAATGGCATATGTTGGGGCAATCAGTTGTTTGT
	710	TACGGTTTATTAAATAATTGGGATTCTGAG
	711	GAGGTTAAAAAGGAAAGCACATATAAAAATGAAAATTTTA
	712	TTTATGTGCTGAGGTTAAAAAGGAAAGCACA

(계속)

[0084]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	713	TTGTAACCAGTACGGTTTATTAAATAATTGGGA
	714	GTAAAAAGGAAAGCACATATAAAAAATGAAAT
	715	TAAAAAGGAAAGCACATATAAAAAATGAAATTTTAAGGAA
	716	GGAAAGCACATATAAAAAATGAAATTTTAAGGAATACCTT
	717	TGTAACCAGTACGGTTTATTAAATAATTGGGATTCTGA
	718	TGTGCTGAGGTTAAAAAGGAAAGCACATATAAAAAATGAAA
	719	CCAGTACGGTTTATTAAATAATTGGGATTC
	720	CTGAGGTTAAAAAGGAAAGCACATATAAAAA
	721	TTAAAAAGGAAAGCACATATAAAAAATGAAAAAT
	722	CTGAGGTTAAAAAGGAAAGCACATATAAAAAAT
	723	TGCTGAGGTTAAAAAGGAAAGCACATATAAA
	724	AAAAAGGAAAGCACATATAAAAAATGAAATTTTAAGGA
	725	TGCTGAGGTTAAAAAGGAAAGCACATATAAAAAATGAAAA
	726	TGCTGAGGTTAAAAAGGAAAGCACATATAAAAAAT
	727	TTTATGTGCTGAGGTTAAAAAGGAAAGCACATATAAAAAATGAAAA
	728	TTTATGTGCTGAGGTTAAAAAGGAAAGCACATATAAAAAAT
	729	TTTATGTGCTGAGGTTAAAAAGGAAAGCACATATA

(계속)

[0085]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	730	GGTAAACCTGGTATAGATAATAGGGAATGT
	731	TGGTAAACCTGGTATAGATAATAGGGAATGT
	732	TTTATGTGCTGAGGTTAAAAAGGAAAGCAC
	733	CCTTGGGCACGTTGCAACCAATAAGGTTTATTAAATAACT
	734	TTAGTACTGCTACAGAACAGTTAAGTAAATATGATGCACG
	735	GGCACGTTGCAACCAATAAGGTTTATTAAATAACTGTGCC
	736	CGTTGCAACCAATAAGGTTTATTAAATAACTGTGCCTC
	737	GCTACAGAACAGTTAAGTAAATATGATGCACGAAAAAT
	738	TTATTATGGCCTTGGGCACGTTGCAACCAATAAGGTTT
	739	ACAGAACAGTTAAGTAAATATGATGCACGAAAA
	740	ACCAATAAGGTTTATTAAATAACTGTGCCTCAGAC
	741	AGAACAGTTAAGTAAATATGATGCACGAAAAATTAATCAG
	742	TAACATGACTATTAGTACTGCTACAGAACAGTTAAGTAAA
	743	GTAAATATGATGCACGAAAAATTAATCAGTACCTTAG
	744	TGACTATTAGTACTGCTACAGAACAGTTAAGTAAATATGA
	745	GAACAGTTAAGTAAATATGATGCACGAAAA

(계속)

[0086]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	746	TACTGCTACAGAACAGTTAAGTAAATATGATGCACG
	747	AATAATAATGTTATAGAAGATAGTAGGGAC
	748	ATAGTAGGGACAATATATCAGTTGATGGCA
	749	TATTAGTACTGCTACAGAACAGTTAAGTAA
	750	ACAGAACAGTTAAGTAAATATGATGCACGA
	751	GAACAGTTAAGTAAATATGATGCACGAAAAATTAA
	752	AGGTCATCCGGACAGCCTCGCCAAGTTT
	753	TTACCTCAGAATCACAAATTATTAAATAAGCCT
	754	CTTTAATATAAAGGTCATCCGGACAGCCTCG
	755	CAGAATCACAATTATTAAATAAGCCTTATT
	756	CCAATGGCTGTCCCCTACCTATTCAAGGC
	757	CACAGCCAGGGTCTGATAACAGGGAATGCTT
	758	TGGCTGTCCCCTACCTATTCAAGGCCTAC
	759	GGGTCTGATAACAGGGAATGCTTATCTATG
	760	CACAGCCAGGGTCTGATAACAGGGAATGCT

(계속)

[0087]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	761	CAGGGAATGCTTATCTATGGATTATAAACA
	762	CACTGAAGTAAC TAAGGAAGGTACATATAA
	763	ATTATGCACTGAAGTAAC TAAGGAAGGTAC
	764	ACTAAGGAAGGTACATATAAAAATGATAATTTAA
	765	TGATACCAAAGATACACGTGATAATGTATCTG
	766	ATCTGCTGTTGATACCAAAGATACACGTGA
	767	GCCCCGACCGATTTC AACACCTACACAGGC
	768	GCCCCGACCGATTTC AACACCTACACAGGCCAGACCAA
	769	ACCAAAGATACACGTGATAATGTATCTGTGGATTATA
	770	CCCGACCGATTTC AACACCTACACAGGCCAGAC
	771	CTGTTGATACCAAAGATACACGTGATAATG
	772	GTTGATACCAAAGATACACGTGATAATGTATCTGTGGA
	773	CGATTTC AACACCTACACAGGCCAGACCA
	774	ATCTGCTGTTGATACCAAAGATACACGTGA
	775	CTGCTGTTGATACCAAAGATACACGTGA
	776	TCTGCTGTTGATACCAAAGATACACGTGAT

(계속)

[0088]

서열군	서열 번호	서열 (5' → 3')
제 5 서열군	777	ATCTGCTGTTGATACCAAAGATACACGTGATAATG
	778	GTTGATACCAAAGATACACGTGATAATGTATCTGTGG
	779	TCTGCTGTTGATACCAAAGATACACGTGATAATGTATCTG
	780	TCTATTCCCTAATGTATACACCTACCAGT
	781	TCTATTCCCTAATGTATACACCTACCAGTTTAA
	782	TCCTAGTAGTTATGTATATGCCCCCTCGCCT
	783	AGTAGTTATGTATATGCCCCCTCGCCTAGT
	784	AGTAGTTATGTGTATGCCCCCTCGCCTAGC
	785	TGAATCAGCTGTACCAAATATTTATGATCCT
	786	AGACTCTACTGTACCAGCTGTGTATGATTCT
	787	TTCTCCAACAAAAATCCTAAGGACAGTAG
	788	TTCTCCAACAAAAATCCTAAGGACAGTA
	789	TCCTAAGGACAGTAGGGAATATGTTTCAGT
	790	TCAGTGGACTATAAACAAACGCAACTATG
	791	TCCACTACTACAGACTCTACTGTACCAGCT
	792	GCTGTACCAAATATTTATGATCCTAATAAATTTAA
	793	TTTGTCTACTACTACTGAATCAGCTGTACCAA
	794	ACTGTACCAGCTGTGTATGATTCTAATAAATTTAA

[0089]

[0090]

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

[0091]

(1) 합성 올리고뉴클레오타이드

[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 상보체와 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 구성을 가진다. 사용된 주형으로는 HPV16이 클로닝된 플라스미드 DNA를 사용하였다.

표 6

시약	부피
멸균 초순수	1.5 μ L
Bst DNA 폴리머라제	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]

[0096]

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	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTCTTTGTTACTGTGGTAGATACTAC
F3 프라이머	13	GCACAGGGCCACAATAATGG
BIP 프라이머	14	TTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGACGTCCTAAAGGAACTGATC
B3 프라이머	15	CCTGCTTGTAGTAAAAATTT

[0097]

[0098]

(3) LAMP법에 의한 핵산 증폭

[0099]

온도는 58℃, 시간은 1시간으로 하여 핵산 증폭을 행한다. 주형 대신에 멸균수를 첨가한 것을 네거티브 컨트롤로 한다. 증폭된 LAMP 산물을 아가로스 겔 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	TGCCCAGGTACAGGAGACTGTGTAGAAGCA
HPV26	9	AGTGGATGCAGATGCTGCAGATAATGTACT
HPV31	10	GTATCACTGTTTGCAATTGCAGCACAAACA
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, 카르보다이미드 처리한 슬라이드 유리 기판에 프로브 용액을 스폿팅(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℃에서 60분간 정치함으로써 혼성화시켰다. 계속해서, Cy5 표지한 서열 번호 7의 핵산을 첨가하여 35℃, 15분 정치한 후, 초순수로 가볍게 세정하였다. 형광 강도는 아머삼(Amersham) 사 제조 타이훈(Typhoon)을 이용하여 검출하였다.

[0107]

(6) 결과

[0108]

형광 측정의 결과, HPV16의 프로브를 고정화한 스폿으로부터만 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	TGCCCAGGTACAGGAGACTGTGTAGAAGCA
HPV26	9	AGTGGATGCAGATGCTGCAGATAATGTACT
HPV31	10	GTATCACTGTTTGCAATTGCAGCACAAACA
rDNA	11	CTGGACGAAGACTGACGCTC

*말단은 티올기 수식.

[0112]

[0113]

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

[0114]

(8) 핵산 프로브에의 LAMP 산물의 혼성화

[0115]

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

[0116]

(9) 결과

[0117]

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

[0118]

(10) LAMP법에 의한 멀티 증폭 1

[0119] 표 9에 나타난 프라이머를 이용하여 1종의 주형에 대한 증폭을 행하였다. 그 결과, LAMP 증폭에 특징적인 래더형 밴드가 관찰되어, 유전자형 특이적인 증폭이 확인되었다 (도 7). 그 후, 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
		212
B	18	120
		121
		212
		213
		214
C	58	125
		128
		230
		231
		232
C	35	136
		137
		232
		233
		234
B	56	142
		143
		234
		235
		236
A	31	147
		148
		214
		217
		218
A	45	152
		158
		218
		220
		221
B	33	165
		167
		222
		225
		226
A	52	171
		174
		226
		228
		229
D	59	179
		180
		236
		237
		238
D	39	187
		188
		240
		242
		243
C	51	194
		196
		244
		245
		246
D	68	202
		203
		247
		248
		253

[0120]

[0121] (11) LAMP 멀티 증폭 산물의 검출 1

[0122] 도 8에 나타난 증폭 산물을, 서열 번호 605, 623, 635, 652, 683, 763 및 793로 나타난 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 나타난 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
		120
B	18	121
		212
		213
		125
		128
C	58	230
		231
		136
		139
		232
B	35	233
		142
		143
		234
		235
A	31	147
		148
		214
		217
		281
A	45	388
		284
		285
		379
		380
C	33	381
		382
		171
		174
		404
A	52	403
		302
		303
		304
		305
D	59	187
		188
		240
		242
		286
C	51	287
		288
		289
		202
		411
D	68	250
		253

[0125]

[0126]

(13) LAMP 멀티 증폭 산물의 검출 2

[0127]

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

[0129]

표 11에 나타낸 A 내지 D 그룹의 프라이머 세트를 혼합하여 복수의 프라이머 세트를 얻었다. 구체적으로, 튜브 A는 프라이머 16, 35 및 59의 프라이머 세트를 함유하고, 튜브 B는 프라이머 18, 39 및 56의 프라이머 세트를 함유하고, 튜브 C는 프라이머 45, 51, 58 및 68의 프라이머 세트를 함유하고, 튜브 D는 프라이머 31, 33 및 52의 프라이머 세트를 함유하였다. 또한, 튜브 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℃에서 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	TGATGTATGGGCCAAGAG
	796	GAGGTCTAGTGATGACAGCCGCTGAGGGTTTGAAGTCCAATCC
	797	AATCTACTCCCAAGAGCAGGGCTAGTGAACACAGTTGTGTCAAGAG
	798	GAGTCAGATGCACCATGTGTG
	799	TGAGGTCTAAGTGATGACAGCCGCTGAGGGTTTGAAGTCCAATCC
	800	AATCTACTCCCAAGAGCAGGGAAAGTGAACACAGTTGTGTCAAGAGC
	801	AGGGCTGAGGGTTTGAAGTC
	802	TGAGGTCTAAGTGATGACAGCCGCAACTCCTAAGCCAGTGCAGAG
	803	CTAGGGTTGGCCAACTACTCCCAATAGATGGCTGTGCCCTGAC
	804	TGAACACAGTTGTGTCAAGAGC

[0132]

[0133]

(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 나 타낸 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, 반응 의 포지티브 컨트롤로서, β-글로빈 유전자를 검출하기 위한 프로브로서 서열 번호 813을, 그리고 네거티브 콘 트롤로서 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

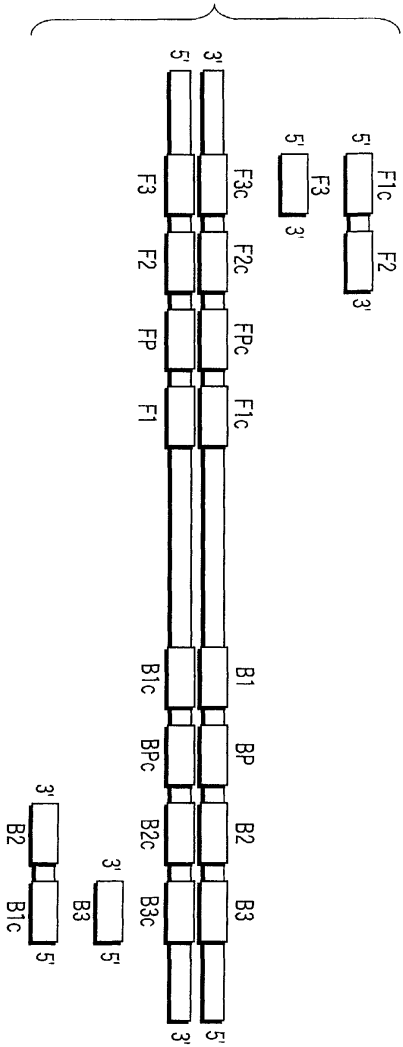
그룹	시열 번호	시열 (5' → 3')
포지티브 컨트롤	805	ATAAAGTCAGGCGAGGCCATCTATTGCTTAC
	806	TCAGGCGAGGCCATCTATTGCTTACATTT
	807	GTCAGGCGAGGCCATCTATTGCTTACATTTGCTT
	808	AGGCGAGGCCAGGCGCTGGGCATAAAGTCAGGG
	809	AAAGTCAGGCGAGGCCATCTATTGCTTACATTTG
	810	TGGCATTAAGTCAGGCGAGGCATC
	811	CAGGAGCGAGGAGGCGAGGCCAGGGCTGGGCAT
	812	CAGGAGGGCGAGGCCAGGGCTGGGCAT
	813	CAGGAGCGAGGAGGCGAGGCCAGGG
	814	GACTATAACATGCTTCCGTGGCA
네거티브 컨트롤		

[0135]

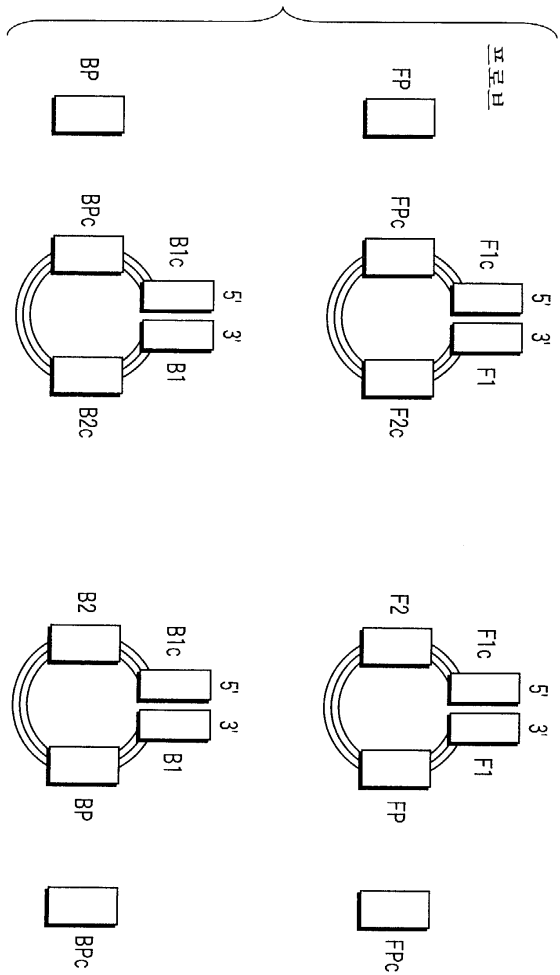
[0136]

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.

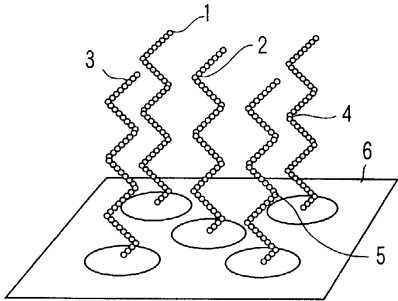
도면3



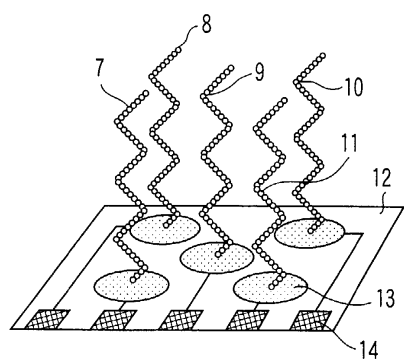
도면4



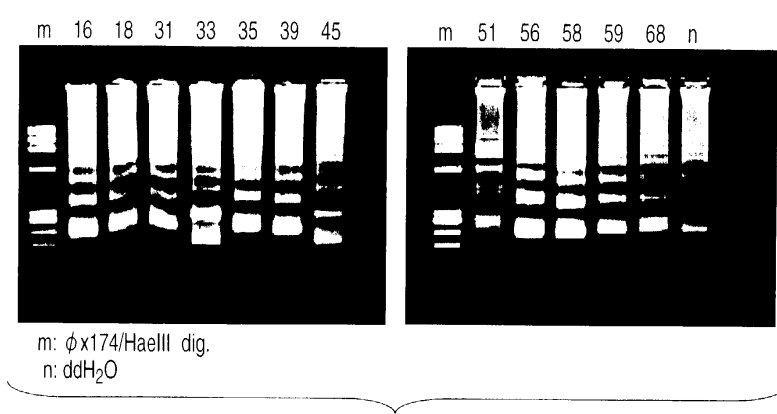
도면5



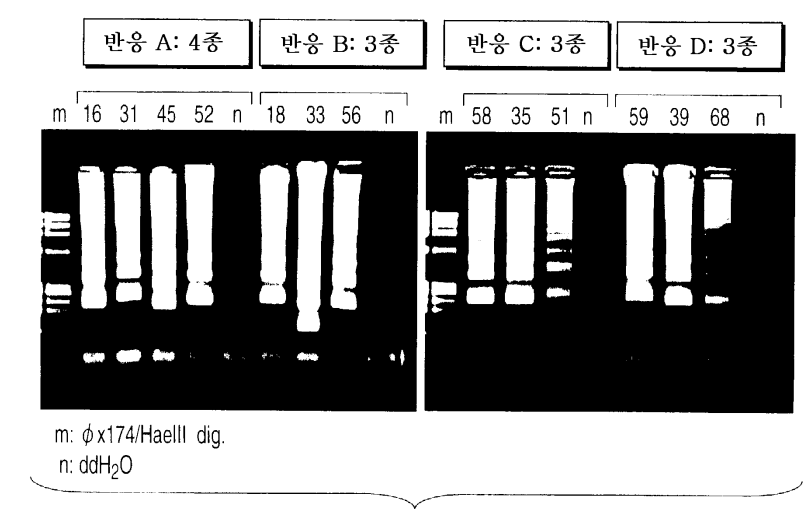
도면6



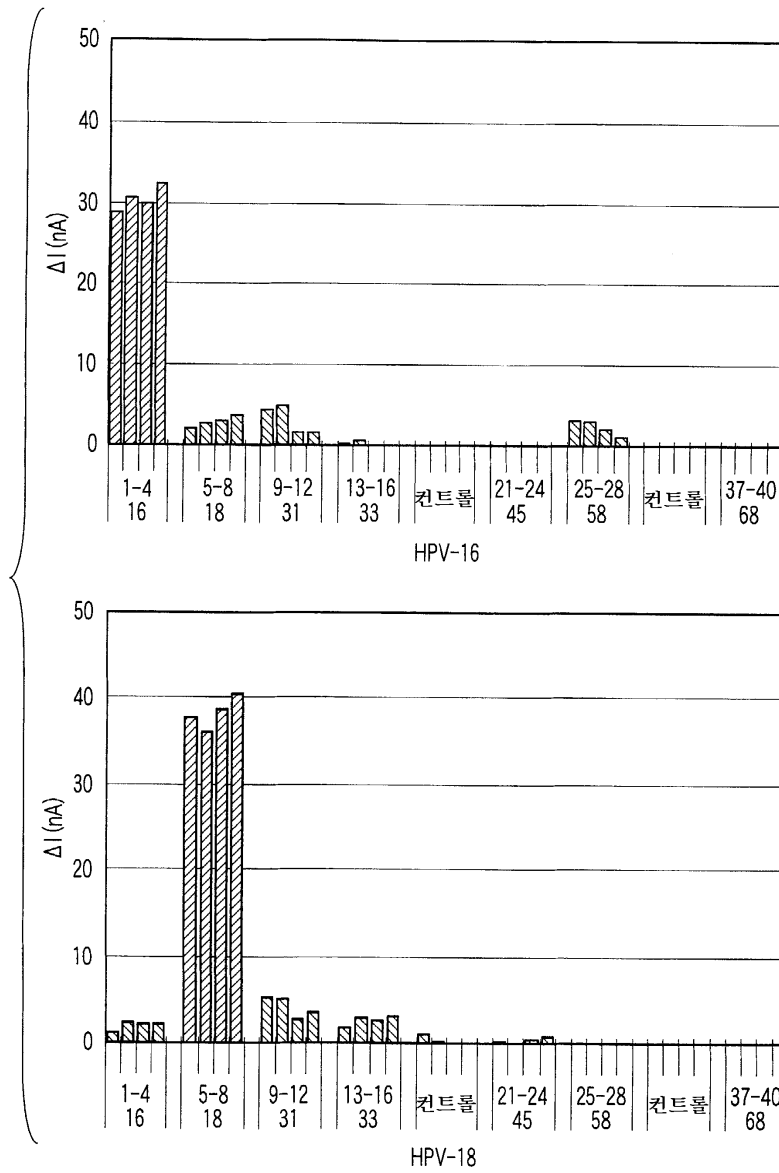
도면7



도면8

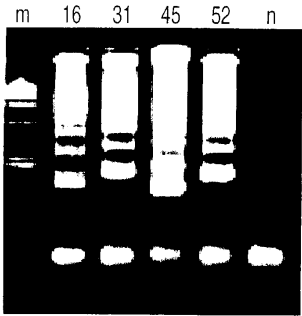


도면9



도면10

반응 A



반응 B



반응 C



반응 D



도면11

5821	ttcctaaagt atcaggatta caatacaggg tatttagaat acatttaoct gaccccaata	
5881	agtttgggtt toctgacaco tcatittata atccagatac acagcgctg gtttgggct	
5941	gtgtagggtg tgaggtaggt cgtggtcagc cattagggtt gggcattagt ggccatcctt	서열 4
6001	tattaataaa attggatgac acagaaaatg ctagtgccta tgcagcaaat gcagggtg	
6061	ataatagaga atgtatatct atggattaca aacaaacaca attgtgttta attgttgoa	
6121	aaccacctat aggggaacac tggggcaag gatcccatg taaccaatgt gcagtaaatc	서열 2
6181	caggtgattg tccaccatta gagttaataa acacagttat tcaggatgtt gatattgttc	
6241	atactggctt tgggtgatg gactttacta cattacagc taacaaaagt gaagtccac	
6301	tggatatttg tacatctatt tgcnaatato cagattatat taaaatggtg tcgaaccat	
6361	atggcgacag ctattttttt tattacgaa gggaaacaat gttgttaga catttttta	서열 3
6421	atagggtggt taotgttgt gaaaatgac cagacgattt atacattaaa ggcctgtggt	
6481	ctactgcaaa tttagccagt tcaattattt ttctacacc tagtggttct atggttaoct	
6541	ctgatgocaa aatattcaat aacacctatt gtttacaac agcacagggc cacaataatg	
6601	gcatttgttg gggtaaccaa ctatttttta ctgttttga tactacagc agtaacaata	
6661	tgtcattatg tgggtccata tctactcag aaactacata taaaatact aactttaagg	
6721	agtacctacg acatggggag gaattgatt tacttttat ttctaacctg tgcaaaataa	
6781	ccttaactgc agacgttatg acatacatc attctatgaa ttccactatt ttggaggact	
6841	ggaaatttgg tctacaacct cccccaggag gcacactaga agatacttat aggtttgta	서열 1
6901	cccaggcaat tgcitgcaa aaacatacac ctccagcacc taagaagat gatccoctta	
6961	aaaatacac tttttggaa gtaaattnaa aggaaaagt ttctgcagac ctatgcagt	
7021	ttccttttag acgcaattt ttactacaag caggattgaa ggccaaacca aaatttcat	서열 5
7081	taggaaaacg aaaagctaca cccaccaact catctaccto tacaactgt aaacgcaaaa	
7141	aacgtaagct gtaagtattg tatgtatgtt gaattaggtt tttttgtgt gtatatgtt	
7201	gtatgtgctt gtatgtgctt gtaaatatta agttgtatgt gtgtttgtat gtaaggata	서열 6
7261	ataaacagct gtgtatgtgt tttaaatgc ttgttaact attgtgtcat gcaacataaa	
7321	taaacttatt gtitcaacac ctactaattg tttgttgtt attcattgta tataaactat	
7381	atttgtaca toctgttttt gttttatata tactatatt ttagcgcca ggccatttt	
7441	gtagcttcaa cgaattogg ttgatgctt ttggcaca aatgtgtttt tttaaatagt	
7501	totatgtcag caactatgtt ttaaacctgt acgtttcctg cttgcocatg gtgocaaac	
7561	cctgttttcc tgacctgcac tggttgcaa ccattccatt gtttttaca ctgcaactg	
7621	tgcaactact gaatcaatat gtacattgtg tcatataaaa taaatcacta tgcgccaacg	
7681	ccttacatac cgcgttagg cacatatattt tggctgttt taactaacct aattgcata	
7741	ttggcataag gtttaacctt ctaaggccaa ctaaatgtca ccttagttca tacatgaact	
7801	gtgtaaggt tagtcataca ttgttcattt gtaaaactgc acatgggtgt gtgcaaacg	
7861	atttgggtt acacatttac aagcaactta tataataata ctaa	

서열 목록

[서열목록 전자과일 첨부](#)